



TESE DE DOUTORAMENTO

# **PÉPTIDOS ARTIFICIALES PARA EL RECONOCIMIENTO DEL ADN Y FORMACIÓN CONTROLADA DE CLÚSTERS DE ORO**

David Bouzada Reboredo

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E TECNOLOXÍA QUÍMICA



SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

ANO 2021



D./Dna. **David Bouzada Reboredo**

Título da tese: **Péptidos artificiales para el reconocimiento del ADN y formación de clústers de oro**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela, 24 de Agosto de 2021.**

**Sinatura electrónica**





## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

### Péptidos artificiales para el reconocimiento del ADN y formación controlada de clústeres de oro

D. M. Eugenio Vázquez Sentís

D. Miguel Vázquez López

INFORMA/N:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. David Bouzada Reboredo, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reprodución de publicacións, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 26 de Agosto de 2021





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mis directores de tesis Eugenio y Miguel por darme la oportunidad de realizar la tesis con ellos. Muchas gracias por haberme acogido en vuestro grupo de investigación desde el año 2015 y enseñarme lo que es ser un científico.

Quiero agradecer a mis padres y a mi hermano por todo el apoyo recibo desde que empecé a estudiar Química. Vuestro apoyo ha sido fundamental durante esta etapa de mi vida. De manera muy especial, quiero agradecer a Mirian por su infinita paciencia y su apoyo incondicional: esta tesis hubiera sido imposible sin ti.

Quiero darle las gracias enormemente a mis compañero de laboratorio: Jacobo, te quiero y odio a partes iguales y, aun así, has sido como un hermano para mí. Me alegra haber compartido todas las vivencias de la tesis de los 4 últimos años contigo; Sonia, gracias por hacer la vida más fácil en el laboratorio, por todas esas conversaciones y cotilleos durante los cafés y las meriendas para desconectar. Ha sido todo un placer tenerte como compañera de labo; Soraya, gracias por todo tu buenrollismo dentro del labo y sobre todo gracias por sufrir conmigo todas las penurias derivadas del sinte. Con vosotros tres he pasado unos últimos 5 años que no olvidaré nunca. ¡Se os quiere!

Diego, muchas gracias por haber tenido la paciencia suficiente para enseñarme todo al inicio de la tesis. Recordaré por siempre tus charlas de padre; Gus, gracias por tu apoyo en estos últimos años con los proyectos de Rutenio y por los largos cafés de Agosto; Ana, gracias por esos momentos de risas que le alegran a uno el día; Axel, gracias por estar ahí en los últimos meses de esta etapa; Laura, gracias por aguantarme a pesar del poco tiempo que hemos compartido de laboratorio, espero haberte sido de ayuda durante tu TFG y tus primeros meses de tesis; Andrés, gracias por todas tus interesantes charlas sobre casi cualquier tema, incluso de química.

Quería agradecer también a Jose Costas, Rebe y Natalia por su ayuda con la parte bio de alguno de mis proyectos.

Me gustaría agradecer también de manera muy especial al Team Ourense: Ángela, gracias por hacer que los trayectos en tren sean más amenos. Nuestras conversaciones dan para libro; Alfonso, hemos compartido unos siete meses de tren en los que hemos hablado de química, de libros y de la vida. Gracias a ambos por hacer que mi paso por tierras ourensanas sea más llevadero. Os lo agradezco un montonazo.

Me gustaría agradecer a mis compañeros del Máster de Química Orgánica Marta, Jesús, Álvaro, Lamas y Eva, los momentos vividos cuando nos estábamos encaminado hacia la tesis .

Quería agradecer a Arcadio toda la paciencia que tuvo (y tiene) conmigo cada vez que un equipo no funcionaba. Tu ayuda con todo el Instrumental 3 ha hecho posible esta tesis. Espero haberte incordiado lo menos posible.

Quería agradecer también a mis amigos de toda la vida su apoyo. David, Rubi, Berto, Gon, Jose, Cou, Pit y a todos los demás: a pesar de que ya no nos vemos tan a menudo, los reencuentros son como si no hubiera pasado el tiempo.

También quería agradecer a todas aquellas personas que en los últimos años han compartido parte de su tiempo conmigo: Jaime, Marc, Felipe, Joan, Cristian, Jose C., María T., María R., Xuli, Richi, Sara, Alberto, Marisa, demás gente de la planta 3...y a todos aquellos que probablemente me olvide de mencionar.

Finally, I would like to thank Professor Roman Jerala for hosting me in his laboratory for 3 months and teaching me how beautiful biology is. Mostly, I wanted to thank Fabio, Jana and the rest of the group for making my life much easier during those months.

*A mis padres*



## Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	i
ABREVIATURAS.....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
Química biológica.....	1
Péptidos y proteínas.....	2
Introducción.....	2
El enlace peptídico.....	4
Estructura de las proteínas.....	5
Síntesis de péptidos.....	8
Introducción.....	8
Síntesis en disolución.....	8
Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) .....	9
Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida.....	10
Síntesis de péptidos en fase sólida asistida por microondas (SPPS-MW) .....	14
Reacciones secundarias en la SPPS.....	19
OBJETIVOS GENERALES.....	27
CAPÍTULO 1 .....	29
Metalopéptidos oligocatiónicos de Ru(II) derivados del ligando dipiridofenazina (dppz) como agentes de unión selectivos a G-cuadruplejos. .29	
Resumen.....	29
Introducción.....	30
Estructura y función biológica de los G-cuadruplejos.....	32
Agentes de unión a G-cuadruplejos basados en complejos metálicos en terapia anticáncer .....	36
Modos de unión de los agentes de reconocimiento de G4s.....	41
Ventajas de los complejos metálicos sobre las moléculas orgánicas como agentes de unión a G4s.....	44
Complejos metálicos octaédricos equipados con ligandos planos como agentes de unión a G4s.....	45
Objetivos.....	67

Resultados y discusión.....	68
Conclusiones.....	80
CAPÍTULO 2.....	81
Síntesis, caracterización y estudio de las propiedades de unión al ADN de metalopéptidos semi-sandwich de Ru(II).....	81
Resumen .....	81
INTRODUCCIÓN.....	82
El descubrimiento de la estructura del ADN-B.....	82
Estructura del ADN-B.....	85
Función del ADN-B.....	86
Agentes de reconocimiento del ADN-B.....	87
Complejos de Ru(II) derivados del ligando areno.....	92
Estructura y mecanismo de acción.....	93
Complejos de Ru(II)-areno como agentes de unión al ADN.....	95
Complejos de Ru(II) con actividad catalítica.....	98
Objetivos .....	101
Resultados y discusión.....	101
Conclusiones.....	111
CAPÍTULO 3.....	113
Estudio de la proteína autoensamblante gp23.1 como plataforma para la síntesis de nanoclústers de oro.....	113
Resumen .....	113
Introducción.....	114
Nanoclusters de Oro (AuNCs).....	116
Los AuNCs como sensores.....	118
Los AuNCs en catálisis.....	120
Proteínas anulares como plataforma en nanociencia.....	121
La proteína gp23.1.....	127
Objetivos .....	130
Resultados y discusión.....	130
Conclusiones.....	145

CONCLUSIONES GENERALES.....	147
GENERAL CONCLUSIONS.....	149
RESUMEN.....	151
Capítulo 1: Metalopéptidos oligocatiónicos de Ru(II) derivados del ligando dipiridofenazina (dppz) como agentes de unión selectivos a G-cuadruplejos. ....	151
Capítulo 2: Síntesis, caracterización y estudio de las propiedades de unión al ADN de metalopéptidos semi-sandwich. ....	155
Capítulo 3: Estudio de la proteína autoensamblante gp23.1 como plataforma para la síntesis de nanoclústers de oro. ....	157
SUMMARY.....	163
Chapter 1: Ru (II) oligocationic metalloptides derived from dipyridophenazine ligand (dppz) as selective G-quadruplex binding agents. ....	163
Chapter 2: Synthesis, characterization, and study of the DNA-binding properties of semi-sandwich metalloptides. ....	167
Chapter 3: Study of the self-assembling protein gp23.1 as a platform for the synthesis of gold nanoclusters. ....	169
PARTE EXPERIMENTAL.....	173
Reactivos.....	173
Procedimientos y técnicas experimentales.....	173
Espectrometría de masas .....	173
Espectroscopía de UV-Vis.....	174
Espectroscopía de fluorescencia .....	174
Dicroísmo Circular.....	174
HPLC y UHPLC.....	174
Estudios de internalización celular:.....	175
Microscopio electrónico de transmisión (TEM) .....	175
Síntesis del aminoácido Fmoc-βAla5Bpy-OH.....	175
Síntesis del ligando dppz (dipirido[3,2-a:2,3-c]fenacina).....	180
Síntesis del precursor [Ru(DMSO) <sub>4</sub> Cl] <sub>2</sub> .....	181
Síntesis de péptidos en fase sólida.....	181

Capítulo 1.....	185
Síntesis del complejo [Ru(dppz)].....	185
Síntesis del complejo [Ru(dppz)]-R <sub>8</sub> .....	185
Síntesis del complejo [Ru(dppz) <sub>2</sub> ].....	186
Síntesis del complejo [Ru(dppz) <sub>2</sub> ]-R <sub>8</sub> .....	187
Capítulo 2.....	188
Síntesis del complejo [Ru(m-terp)].....	188
Síntesis del complejo [Ru(biph)].....	188
Síntesis del complejo [Ru(p-cym)].....	189
Capítulo 3.....	189
Síntesis de gp23.1-AAC.....	189
Síntesis de (gp23.1-AAC) <sub>2</sub> .....	191
Síntesis de AuNC mediada por proteína.....	192
Imágenes (TEM).....	193
Valoraciones de Fluorescencia de gp23.1-AAC.....	195
Espectroscopía de UV-Vis de AuNCs.....	196
Electroforesis de Agarosa.....	196
Síntesis in-situ de nanoclústeres de oro fotoluminiscentes.....	197
Síntesis e inserción de los soluble naked nanocustlers (AuNKNCs).....	197
Caracterización óptica de los AuNKNCs.....	198
PFGSE-NMR.....	198
Anexos.....	201

## ABREVIATURAS

5Bpy	ácido 5'-amino-2,2'-bipiridil-5-carboxílico
$\beta$ Ala	$\beta$ -alanina
$\delta$	desplazamiento químico (ppm)
$\Theta$	elipticidad molar
$^{\circ}\text{C}$	grados Celsius
aa	aminoácido
Ac	acetilo
Ac <sub>2</sub> O	anhídrido acético
ADN	ácido desoxirribonucleico
All	alilo
Alloc	aliloxicarbonilo
ARN	ácido ribonucleico
Boc	tert-butiloxicarbonilo
Bpy	2,2'-bipiridina
CD	dicroísmo circular
c.p.s	cuentas por segundo
d	doblete (en espectro RMN)
dd	doble doblete (en espectro RMN)

DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
dppz	dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenacina
MS	espectrometría de masas
eq	equivalentes
ESI	ionización por electrospray
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
HATU	1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo [4,5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato
HBTU	(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfate
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
J	constante de acoplamiento (Hz)
K <sub>D</sub>	constante de disociación
μM	micromolar
m	multiplete (en espectro RMN)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mdeg	miligrados
MeOH	metanol
min	minuto
mM	milimolar
MQ	agua mili-Q
MW	peso molecular
PBS	tampón fosfato salino
Phen	1,10-fenantrolina

ppm	partes por millón
q	cuartete (en espectro RMN)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP	fase reversa (en cromatografía de HPLC)
s	singlete (en espectro RMN)
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
t	triplete (en espectro RMN)
ta	temperatura ambiente
TCLM	Transferencia de Carga del Ligando al Metal
TCLMM	Transferencia de Carga del Ligando al Metal-Metal
$t_R$	tiempo de retención
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	triisopropilsilano
TOF	tiempo de vuelo
Uma	unidades de masa atómica
UV-Vis	UltraVioleta-Visible



# INTRODUCCIÓN

## Química biológica

La *Química Biológica* es la disciplina que comprende la aplicación de los conceptos y herramientas químicas para la comprensión, a nivel molecular, de los sistemas biológicos y el aprovechamiento de la biología como inspiración para el avance en la química. En realidad, la *Química Biológica* no es una disciplina claramente delimitada, sino que abarca a un amplio abanico especialidades, tales como la enzimología, la química supramolecular y el reconocimiento molecular, la catálisis y la química sintética, los fenómenos de transporte e internalización celular o la espectroscopía, entre otras. La *Química Biológica* es, por lo tanto, una rama de la ciencia que requiere un trabajo sinérgico.<sup>1</sup>

Podemos encontrar referencias a los orígenes de la *Química Biológica*<sup>2</sup> en el año 1775, cuando Joseph Priestley realizó experimentos con gases en ratones.<sup>3</sup> Sin embargo, el precedente más claro de la *Química Biológica* lo podemos encontrar en el año 1828, cuando Friedrich Wöhler descubrió de manera fortuita la síntesis de la urea, demostrando así que se pueden sintetizar sustancias asociadas a los organismos vivos partiendo de materiales inorgánicos.<sup>4</sup> Posteriormente, en 1856, William H. Perkin sintetizó el primer colorante químico, abriendo así paso no sólo a su aplicación en la industria textil, si no también al desarrollo de agentes de

---

<sup>1</sup> E. L. Ostler, *Chem Cent J.* **2007**, 1, 5

<sup>2</sup> K. L. Morrison, and G. A. Weiss, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 3.

<sup>3</sup> J. Priestley, and J. Pringle, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **1775**, 65, 384-94.

<sup>4</sup> F. Wöhler, *Ann. Phys.* **1828**, 88, 253-256.

## Introducción

tinción celular específicos.<sup>5</sup> Estos agentes influirían en el trabajo del premio Nobel Paul Ehrlich, quien sintetizó la droga *Salvarsán* para el tratamiento de la sífilis.<sup>6</sup> Este trabajo también supuso el inicio de la Química Médica como la búsqueda metódica de fármacos específicos para enfermedades concretas y dirigidos a dianas moleculares. Ya en el siglo XX, Sidney Farber descubrió que el ácido fólico tiene un papel fundamental en la proliferación de células cancerosas en leucemias. En base a esto, hizo uso de la *aminopterin* (antagonista del ácido fólico) con la que logró la remisión de la leucemia aguda en niños.<sup>7</sup> Gracias a este trabajo, Farber es considerado como el padre de la quimioterapia moderna. Fueron, sin embargo, Linus Pauling y George W. Beadle quienes utilizaron por primera vez el término *Química Biológica* en una solicitud de un proyecto dirigido a la *Rockefeller Foundation*.<sup>8</sup> Posteriormente, este término reapareció en 1954 en una editorial de la revista *Engineering and Science* de la institución americana Caltech, en la que se definió por primera vez, el alcance y objetivos de esta nueva rama de la Química.<sup>9</sup>

La Química Biológica se ha convertido en una área científica rica y multidisciplinar, que desafía los límites establecidos y que además está en constante crecimiento, generando nuevas herramientas y abriendo nuevas vías de investigación. Por estos motivos, la Química Biológica no es solo un término que puede sonar bien, si no que se ha convertido, por derecho propio, en un campo de investigación plenamente establecido en la frontera entre la Química y la Biología, que busca el riguroso entendimiento de los procesos biológicos a través de medios químicos, al mismo tiempo que apunta a la aplicación de ese conocimiento biológico para el avance de las ciencias químicas.<sup>10</sup>

## Péptidos y proteínas

### Introducción

El científico y filósofo italiano Beccari de Bologna, en el siglo XVIII, descubrió que una proteína, el gluten en la harina de trigo, era uno de los componentes

---

<sup>5</sup> W. H. Perkin, *J. Chem. Soc. Trans.* **1896**, 69, 596.

<sup>6</sup> J. Drews, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 797-801

<sup>7</sup> S. Farber, L. K. Diamond, *N. Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787-793.

<sup>8</sup> Lily E. Kay, *The molecular Vision of Life*. Caltech, *The Rockefeller Foundation*, and the *Rise of the New Biology*, Oxford Univ. Press **1997**, ISBN: 9780195111439 (pp. 225-242) and @CaltechArchives

<sup>9</sup> *Eng. & Sci.* **1954**, 17, 9-13

<sup>10</sup> G. von Kiedrowski, *ChemBioChem* **2001**, 2, 597-598.

fundamentales de las sustancias vegetales.<sup>11</sup> Sin embargo, no fue hasta el año 1839 cuando el científico holandés Gerardus J. Mulder usó por primera vez el término *proteína*,<sup>12,13</sup> aunque posteriormente se demostró que la verdadera autoría del término le corresponde a su colega Jöns J. Berzelius, quien le habría sugerido el uso de este nuevo término para sus estudios.<sup>14</sup>

Durante el siglo XIX, los químicos comenzaron el estudio sistemático de las proteínas como una familia diferenciada de biomoléculas, de tal forma que incluso con sus métodos rudimentarios, fueron capaces de aislar y estudiar los componentes básicos de las proteínas, llamados *aminoácidos*. A principios del siglo XX serían identificados 18 de estos aminoácidos.<sup>15</sup>

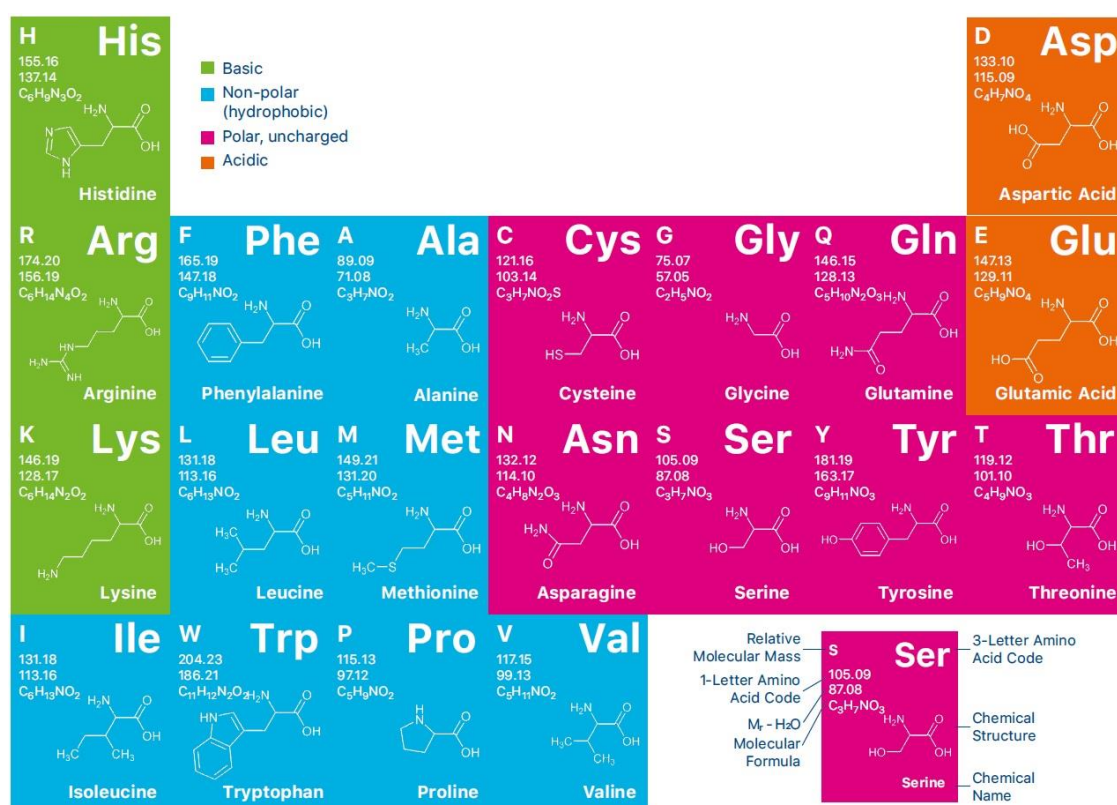


Figura I: tabla periódica de los 20 aminoácidos naturales. Adaptada de [www.bachem.com](http://www.bachem.com)

Los péptidos y las proteínas son, por tanto, biopolímeros compuestos por aminoácidos unidos entre sí por un enlace amida, también llamado *enlace peptídico*. La estructura, función y reactividad de las proteínas viene definida por su



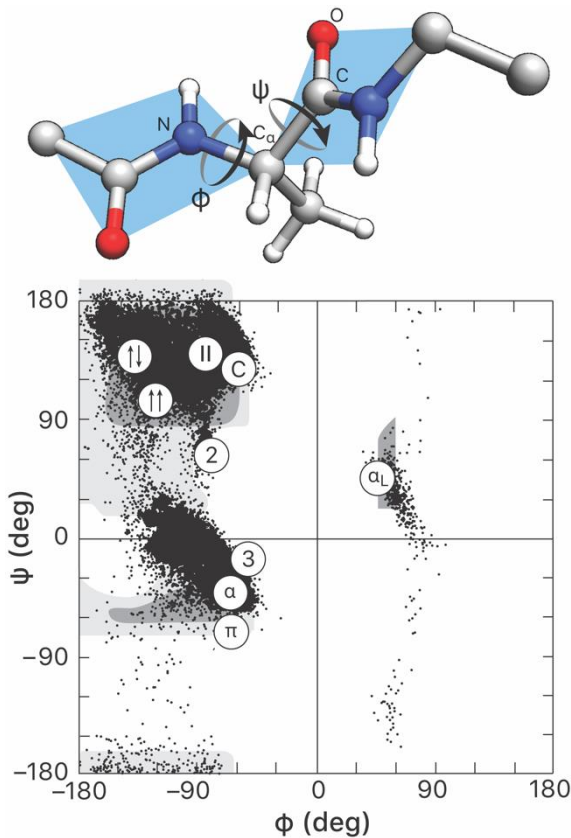
- 11 E. F. Beach, *J. Hist. Med. Allied Sci.* **1931**, 16, 354-373.
- 12 G.J. Mulder, *J Prakt Chem.* **1839**, 16, 129-152.
- 13 G. A. Bray, *Obesity Research* **1997**.
- 14 H. Hartley, *Nature* **1951**, 168, 244.
- 15 H. B. Vickery, C. L. A. Schmidt, *Chem. Rev.* **1931**, 9, 169-318.

## Introducción

secuencia de aminoácidos. Dicha secuencia, es conocida como la **estructura primaria** de una proteína. Los aminoácidos se caracterizan por tener un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ), un grupo ácido ( $-\text{COOH}$ ), un átomo de hidrógeno y una cadena lateral que los identifica ( $-\text{R}$ ), unidos a un átomo de carbono llamado *carbono alfa* ( $\text{C}\alpha$ ). Las diferentes cadenas laterales definen las propiedades de cada aminoácido permitiéndonos así diferentes clasificaciones, tales como *no polares* (hidrofóbicos), *polares* (no cargados), *ácidos* y *básicos* (Figura 1).<sup>16</sup> Para poder representarlos de una manera sencilla, cada aminoácido tiene un código de tres letras. Sin embargo, este tipo de nomenclatura resultaba bastante tediosa y el químico checo Šorm estableció en 1961 el código de una letra.<sup>17,18</sup>

### El enlace peptídico

Los estudios de difracción de rayos X de aminoácidos y péptidos pequeños llevados a cabo por L. Pauling y R. Corey muestran que el enlace C–N que forma parte del enlace peptídico es más pequeño en comparación con el típico enlace C–N de las aminas. Esto indica que el enlace entre el carbono y el nitrógeno que forman parte del enlace peptídico tiene cierto carácter de doble enlace y, en consecuencia, los átomos involucrados en dicho enlace son coplanares, impidiendo así su libre rotación. Por eso el esqueleto de un péptido se puede describir como una serie de planos rígidos con un punto de rotación común, el  $\text{C}\alpha$ . La orientación espacial de los planos de



<sup>16</sup> M. Saffran, *Biochem. Ed.* **1998**, 26, 116-118.

<sup>17</sup> F. Šorm, B. Keil, J. Vaněček, V. Tomášek, O. Mikeš, B. Meloun, V. Kostka, V. Holeyšovský, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1961**, 26, 531-578.

<sup>18</sup> a) D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry*, John & Sons, New York, **2007**, 76-81; b) B. ALberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell* **2008**, Garland Publishing, New York, Capítulo 3.

dos residuos adyacentes se caracteriza por dos ángulos diédricos,  $\Phi$  (N–Ca) y  $\psi$  (Ca–C).<sup>19</sup> Debido a la propia naturaleza de los ángulos  $\Phi$  y  $\psi$  el número de conformaciones permitidas es limitado.

Figura 2. Arriba: representación de la libertad de torsión en una cadena peptídica. El doble enlace parcial del enlace peptídico restringe los grados de libertad de un péptido; abajo, diagrama de Ramachandran que muestra la distribución de los ángulos conformacionales permitidos  $\phi$  (N–C $\alpha$ ) y  $\psi$  (C $\alpha$ –C) en las proteínas. Las regiones de los ángulos permitidos están sombreadas en gris oscuro, mientras que las regiones de gris claro corresponden a conformaciones que tienen distancias límite de van der Waals. El diagrama también muestra la distribución de ángulos para 25,327 residuos (excluyendo Gly) en 207 estructuras de rayos X de alta resolución (<1,2 Å).<sup>20</sup>

### Estructura de las proteínas

La mayor parte de las proteínas se pliegan espontáneamente en su forma correcta, pero si las tratamos con ciertos disolventes o aditivos, podemos conseguir que la proteína se *desnaturalice* dando lugar a una cadena peptídica flexible (forma no nativa). En ausencia de estos disolventes y aditivos, la proteína recuperará su conformación nativa. Esto sugiere que toda la información necesaria para el correcto plegamiento de las proteínas se halla en la secuencia de aminoácidos. En este proceso de plegamiento, las cadenas laterales de los aminoácidos juegan un papel fundamental, ya que las cadenas laterales hidrofóbicas tienden a agruparse en el interior de la molécula evitando así el contacto con el medio acuoso. Por otro lado, los aminoácidos con cadenas laterales polares tienden a disponerse hacia el exterior de la entidad proteica, de tal forma que pueden interactuar con el agua u otros aminoácidos polares. Además, los enlaces peptídicos—que también son polares—tienden a interactuar entre sí y con los residuos polares, sobre todo aquellos enterrados en el interior de la proteína, mediante enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, los enlaces de hidrógeno juegan un papel fundamental en el plegamiento de las proteínas.<sup>21</sup>

Como ya hemos mencionado, la secuencia lineal de aminoácidos en una proteína es la *estructura primaria*. Dicha secuencia se puede plegar, adquiriendo una disposición tridimensional en dos formas distintas (hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ ) dando lugar a la *estructura secundaria*. En la forma globular de la proteína, las hélices y las



<sup>19</sup> D. L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* **2017**, W.H. Freeman Company, NY; Capítulo 4.

<sup>20</sup> Adaptada de D. Voet, J.G. Voet, *Biochemistry* **2011**, 4th Ed. John Wiley & Sons, New York.

<sup>21</sup> A. Ben-Naim, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 1437–1444.

## Introducción

láminas, junto con los bucles se pueden plegar obteniéndose así la *estructura terciaria*. Dichas proteínas, pueden asociarse con otras cadenas polipeptídicas estructuradas constituyendo así la *estructura cuaternaria*.<sup>22</sup>

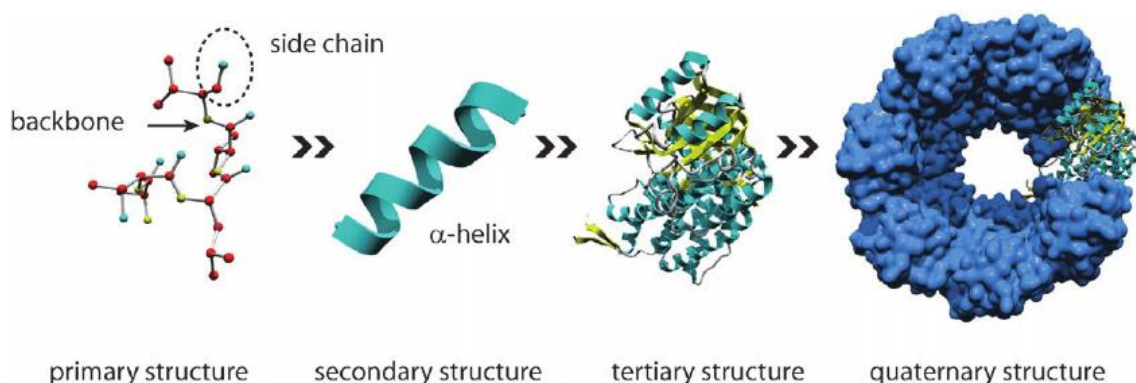


Figura 3: esquema de la jerarquía de la estructura de las proteínas. Adaptada con permiso de M. Heim, L. Römer, T. Scheibel, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 156–164. ©2010 . *The Royal Society of Chemistry*.

La **estructura secundaria** es la conformación predominante de las cadenas peptídica en condiciones fisiológicas debido a que está favorecida energéticamente por los ángulos de torsión  $\Phi$  y  $\psi$ , además de por otros factores, como enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas.<sup>23</sup> Existen dos unidades fundamentales de estructura secundaria: hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ . Estos elementos fueron propuestos por Pauling y Corey en 1951 en base a sus estudios teóricos sobre los patrones de difracción de rayos X de  $\alpha$ -queratinas<sup>24</sup> y otras proteínas fibrosas como la mioglobina, cuya estructura sería confirmada en 1958 por Kendrew *et al.*<sup>25</sup> confirmando así la hipótesis de Pauling.<sup>26</sup>

La **estructura terciaria** surge cuando los elementos de la estructura secundaria interaccionan entre sí, formando unidades globulares de forma compacta estabilizada por interacciones débiles,<sup>27</sup> cada una de las cuales recibe el nombre de dominio. Estos dominios suelen estar constituidos por una cadena peptídica de entre 50–350 residuos. Según el tamaño de las proteínas pueden presentar uno o

<sup>22</sup> a) W. Wang, S. Nema, D. Teagarden, *Int. J. Pharm.* **2010**, 390, 89–99; b) R. Jaenicke, H. Lilie, in *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, **2000**, pp. 329–401.

<sup>23</sup> N. Sewald, and HD. Jakubke. *Peptides: Chemistry and Biology*. **2015**, John Wiley & Sons.

<sup>24</sup> L. Pauling, R. B. Corey, and H. R. Branson. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, 37, 205–211.

<sup>25</sup> J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips, *Nature* **1958**, 181, 662–666.

<sup>26</sup> D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100, 11207–11210.

<sup>27</sup> a) G. D. Rose, S. Roy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77, 4643–4647; b) D. Walther, F. Eisenhaber, P. Argos, *J. Mol. Biol.* **1996**, 255, 536–553.

varios dominios. Una de las características de la estructura terciaria es la superficie externa compleja que le permite interactuar de manera específica con moléculas pequeñas u otras macromoléculas que puedan tener una región complementaria en forma y carga.<sup>28</sup> Aunque las hélices y las láminas suelen estar conectadas por bucles perfectamente ajustados, es muy habitual encontrar fragmentos de la secuencia peptídica no organizados y que conectan los elementos de la estructura secundaria. Estos fragmentos o *loops* se suelen encontrar en la superficie de las proteínas convirtiéndose en sitios de reconocimiento de proteínas,<sup>29</sup> sitios de unión a ligandos<sup>30</sup> y a sitios de interacción de membrana.<sup>31</sup>

Por último, estas proteínas globulares se pueden asociar a través de un elevado número de interacciones débiles dando lugar a entidades supramoleculares de mayor orden que constituyen la **estructura cuaternaria** de las proteínas.

- 
- <sup>28</sup> a) A. M. Lesk, C. Chothia, *Biophys. J.* **1980**, 32, 35–47; b) F. M. Richards, T. Richmond, *Ciba Found. Symp.* **1977**, 23–45.
- <sup>29</sup> P. Chakrabarti, J. Janin, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2002**, 47, 334–343.
- <sup>30</sup> a) G. Ausiello, P. F. Gherardini, E. Gatti, O. Incani, M. Helmer-Citterich, *BMC Bioinformatics* **2009**, 10, 182; b) S. N. Gradl, J. P. Felix, E. Y. Isacoff, M. L. Garcia, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12668–12669.
- <sup>31</sup> M. Eilers, S. C. Shekar, T. Shieh, S. O. Smith, P. J. Fleming, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 5796–5801.

## Síntesis de péptidos

### Introducción

Los orígenes de la síntesis de péptidos se remontan al descubrimiento por parte de F. Hofmeister<sup>32</sup> y E. Fischer<sup>33</sup> de que las proteínas estaban formadas por cadenas de aminoácidos unidos a través de enlaces amida. Este descubrimiento fue precedido por la síntesis de los primeros péptidos simples por parte de Curtius<sup>34</sup> y posteriormente por Fischer<sup>35</sup> considerado como el padre de la química de péptidos. Sin embargo, las dificultades que presenta la síntesis de incluso los péptidos más sencillos sirven de estímulo para mejorar los métodos de síntesis de péptidos. La obtención de la oxitocina, su determinación estructural y su síntesis total por parte de V. du Vigneaud<sup>36</sup> o la elucidación de la estructura de la insulina por parte de Sanger y colaboradores,<sup>37</sup> proporcionaron el impulso necesario para el desarrollo de nuevos procedimientos sintéticos. Hoy en día podemos crear proteínas sintéticas (naturales o no naturales)<sup>38</sup> que nos ayudan a comprender los procesos biológicos.<sup>39</sup>

### Síntesis en disolución

La síntesis de péptidos se basa en la activación del grupo de ácido carboxílico de los aminoácidos para generar intermedios reactivos, tales como cloruros de ácido o anhídridos ácidos, que ya eran comúnmente usados en la preparación de amidas

---

<sup>32</sup> F. Hofmeister, *Ergeb. Physiol.* **1902**, 1, 759–802.

<sup>33</sup> E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, 39, 530–610.

<sup>34</sup> T. Curtius, *J. Prakt. Chem.* **1881**, 24, 239–240.

<sup>35</sup> E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, 35, 1095–1106.

<sup>36</sup> a) E. A. Popenoe, J. G. Pierce, V. d. Vigneaud, H. B. Van Dyke, *Exp. Biol. Med.* **1952**, 81, 506–508; b) V. Du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3115–3121; c) H. Tuppy, *Biochim. Biophys. Acta* **1953**, 11, 449–450; d) V. du Vigneaud, C. Ressler, Swan, College John M., C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, S. Gordon, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 4879–4880.

<sup>37</sup> F. Sanger, *Nature* **1953**, 171, 1025–1026.

<sup>38</sup> a) S. B. H. Kent, *Angew Chem Int Ed* **2013**, 52, 11988–11996; b) P. Siman, A. Brik, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 5684–5697; c) O. Romero, M. Filice, B. de las Rivas, C. Carrasco-Lopez, J. Klett, A. Morreale, J. A. Hermoso, J. M. Guisan, O. Abian, J. M. Palomo, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 9053.

<sup>39</sup> a) H. J. Rideout, L. Stefanis, *Neurochem. Res.* **2014**, 39, 576–592; b) R. Schulz, U. M. Moll, *Curr. Opin. Oncol.* **2014**, 26, 108–113; c) C. Nguyen, R. W. Haushalter, D. J. Lee, P. R. L. Markwick, J. Bruegger, G. Caldara-Festin, K. Finzel, D. R. Jackson, F. Ishikawa, B. O'Dowd, J. A. McCammon, S. J. Opella, S.-C. Tsai, M. D. Burkart, *Nature* **2014**, 505, 427–431.

mucho antes del desarrollo de la metodología de síntesis de péptidos. Sin embargo, la protección de la amina terminal o cualquier otro grupo funcional que no forma parte del enlace amida resultó muy problemático durante mucho tiempo. Un gran avance de cara a la solución de este problema fue el descubrimiento por parte de Bergmann y Zervas<sup>40</sup> en 1932 del grupo protector benciloxicarbonilo (Z) el cual se podía eliminar mediante hidrogenación catalítica manteniendo el enlace peptídico intacto y las cadenas laterales del péptido inalteradas. Posteriormente se desarrollaron otros grupos protectores que podían ser eliminados en condiciones ácidas suaves como, por ejemplo, el *tert*-butoxicarbonilo (Boc), el *o*-nitrofenilsulfonilo (Nps) o el bifenililisopropiloxicarbonilo (Bpoc). Como alternativa a la acidólisis, se introdujo el grupo Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo), que podía eliminarse en presencia de aminas secundarias.<sup>41</sup> En paralelo también se desarrollaron nuevos métodos para la activación del grupo carbonilo que dieron lugar al inicio del uso de los agentes de acoplamiento que conocemos hoy en día.<sup>42</sup>

Uno de los grandes inconvenientes de la síntesis en disolución es la purificación de los productos tras cada reacción de acoplamiento. Además, todos estos procesos pueden ir acompañados de reacciones secundarias que complicaban la obtención del producto final (alquilación del tioéter de la metionina o del indol del triptófano, sustitución electrófila aromática en las tirosinas o acetilación de los hidroxilos de las serinas y treoninas, entre otras). Las dificultades de la síntesis de péptidos en disolución, así como la gran cantidad de tiempo necesario para la obtención de péptidos complejos dio lugar al desarrollo de las técnicas de síntesis en fase sólida, que facilitaron la síntesis de péptidos mediante el uso de operaciones simples y repetitivas e incluso automatizadas.

### **Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)**

Bruce Merrifield fue pionero en la síntesis de péptidos sobre un soporte sólido (un polímero insoluble), en donde con una sola etapa que combina la desprotección de grupos funcionales de las cadenas laterales y la liberación del soporte sólido se puede obtener el péptido deseado totalmente desprotegido. El desarrollo de esta metodología fue reconocido con el Premio Nobel en Química en el año 1984.<sup>43</sup> La SPPS tiene dos claras ventajas: *simplicidad* (todas las reacciones tienen lugar en un mismo reactor) y *eficiencia* (evitando las pérdidas de producto durante su

<sup>40</sup> M. Bergmann, L. Zervas, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1932**, 65, 1192–1201.

<sup>41</sup> L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404–3409.

<sup>42</sup> J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067–1068.

<sup>43</sup> R. B. Merrifield, *Angew Chem Int Ed.* **1985**, 24, 799–810.

purificación y aumentando los rendimientos usando reactivos en exceso). La metodología utilizada en la síntesis de péptidos en disolución sirve como punto de partida y se adapta a la fase sólida. Sin embargo, hay que tener en cuenta los factores propios de la SPPS, como son la composición de la resina (el polímero que la compone y el conector que se usa como punto de anclaje de la cadena peptídica), los grupos protectores de los aminoácidos, el uso de disolventes compatibles con el soporte sólido, etc. La metodología de síntesis en fase sólida sigue en constante desarrollo. Por ejemplo, se han implementado sistemas de microondas durante la síntesis—que mejora los rendimientos de los péptidos complejos y minimiza ciertas reacciones secundarias no deseadas—y se han desarrollado nuevos soportes sólidos e incluso nuevos agentes de acoplamiento.<sup>44</sup>

### **Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida**

El procedimiento general para la SPPS se realiza a través de una serie de etapas que se repiten recursivamente y a través de las cuales se ensambla la cadena peptídica progresivamente partiendo de su extremo C-terminal. La primera etapa del ciclo puede variar en función de la resina que utilizemos, pero, en general, consiste en el acoplamiento del aminoácido—activado previamente—seguida de una serie de lavados para eliminar el exceso de reactivos y los posibles subproductos derivados de la reacción. A continuación, se desprotege el grupo protector temporal del grupo  $\alpha$ -amino, seguido de otra serie de lavados. De esta forma se vuelve al estado inicial, con una amina anclada al soporte sólido y lista para incorporar el siguiente aminoácido. Estas operaciones se repetirán hasta que la secuencia peptídica esté completa. Por último, el péptido es desanclado de la resina y desprotegido simultáneamente en la última etapa de la síntesis (Figura 4).



---

<sup>44</sup> a) S. L. Pedersen, A. Pernille Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1826–1844; A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6557; c) R. Subiros-Funosas, S. N. Khattab, L. Nieto-Rodriguez, A. El-Faham, F. Albericio, *ChemInform* **2014**, 45.

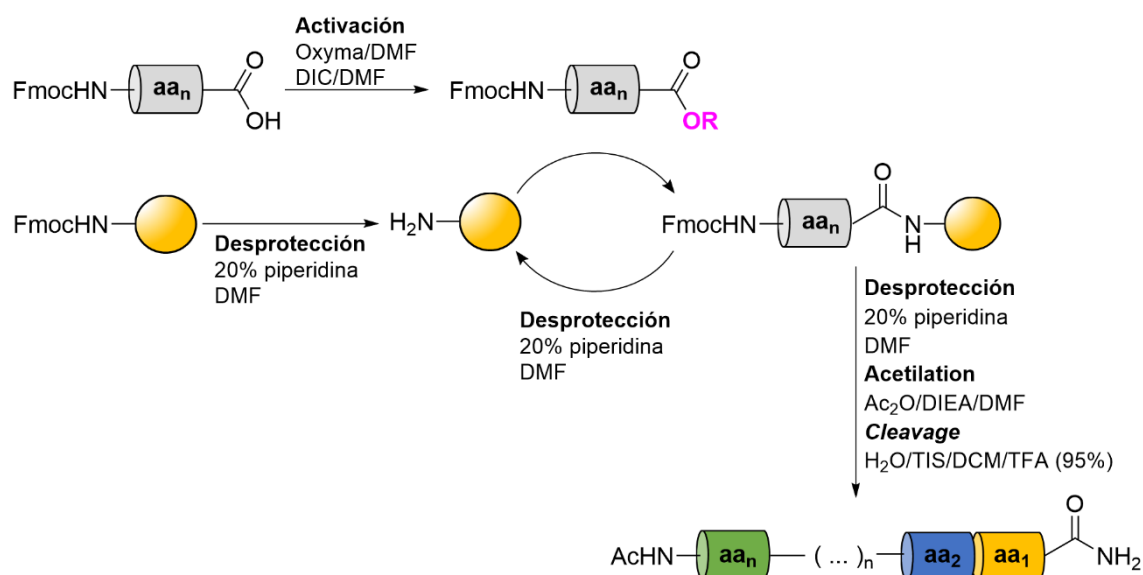


Figura 4: esquema general de la SPPS.

Una de las características que define la química en la SPPS es el grupo protector temporal—también llamado *semipermanente*—del extremo N-terminal en los aminoácidos durante la síntesis. Los dos grupos protectores usados son el *tert*-butoxicarbonil (Boc)—sensible a ácidos como el ácido trifluoroacético (TFA),<sup>45</sup> y el grupo 9-Fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc)—sensible a bases como la piperidina.<sup>46</sup> La naturaleza del grupo protector temporal N-terminal determina la naturaleza de los grupos protectores permanentes en las cadenas laterales de los aminoácidos, que permanecen durante toda la síntesis hasta la desprotección final de la secuencia totalmente ensamblada.

En el procedimiento optimizado publicado en 1964, Merrifield estableció la aplicación del Boc como grupo protector N-terminal semipermanente. Ese procedimiento básico fue mejorado en 1967 por Sakakibara, quien introdujo los grupos protectores Bzl para las cadenas laterales de los aminoácidos y su desprotección final simultánea con HF.<sup>47</sup> Aunque la estrategia Fmoc/Bzl aún tiene aplicaciones especializadas, ésta ha sido casi totalmente desplazada por la estrategia Fmoc/*t*Bu, introducida en 1970 por Han y Carpino, que combina el

<sup>45</sup> a) M. Schnolzer, P. Alewood, A. Jones, D. Alewood, S. B. H. Kent, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 22, 57; b) R. B. Merrifield, *Science* **1986**, 232, 341.

<sup>46</sup> L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748.

<sup>47</sup> S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, H. Sugihara *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40, 2164.

## Introducción

grupo semipermanente Fmoc con derivados del *tert*-butoxicarbonil para la protección de las cadenas laterales.<sup>48</sup>

Existen una serie de consideraciones que debemos tener en cuenta antes de empezar la síntesis del péptido. Esto nos permitirá mejorar el rendimiento y la pureza de nuestro péptido:

- *Selección de la resina*: hay dos factores a tener en cuenta, la composición y la forma del extremo C-terminal. En cuanto a la composición, el poliestireno (PS) es uno de los componentes más usados como núcleo de las resinas. Otras resinas están compuestas de poliaminas o polietilenglicoles (PEG)-PS que mejoran la porosidad de la resina y facilitan la obtención de compuestos polares.<sup>49</sup> En los últimos años el desarrollo de resinas como la ChemMatrix® ha mejorado la síntesis de péptidos largos y/o complejos.<sup>50</sup> Por otro lado, hay resinas que después del desanclaje final, dejan el extremo C-terminal en forma de ácido (Wang, HMPB ó 2CTC) o en forma de amida (Rink Amida ó HMBA).
- *Hinchado de la resina (swelling)*: aunque no lo parezca, el hinchado de la resina también es muy importante<sup>43,45</sup> debido fundamentalmente a la difusión y accesibilidad de los reactivos al núcleo del polímero. Es decir, el hinchado afecta directamente a la eficiencia de la síntesis de péptidos. Por tanto, para cada resina (en función de su composición) existe un disolvente más adecuado.<sup>51</sup> Sin embargo, Merrifield observó que la eficacia del disolvente para este proceso varía en función de si la resina está cargada (contiene un péptido) o no. Por ejemplo, una resina que no está cargada se hincha mejor en DCM que en DMF. Pero a medida que va creciendo el péptido en la resina, el proceso de hinchado es más eficiente en DMF.<sup>52</sup>
- *Acoplamiento del primer aminoácido*: este primer acoplamiento es fundamental y va a marcar cómo de eficiente será la síntesis del péptido. Para ello

---

<sup>48</sup> W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, Oxford University Press, **2000**.

<sup>49</sup> a) R. De Marco, A. Tolomelli, A. Greco, L. Gentilucci, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2013**, *1*, 566; b) M. Kim, Y.-S. Park, D.-S. Shin, S. Lee, Y.-S. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4576–4579.

<sup>50</sup> Y. García-Ramos, M. Paridis-Bas, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *J. Pept. Sci.*, **2010**, *16*, 675.

<sup>51</sup> a) R. Santini, M. C. Griffith and M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951; b) M. Baumann, I. R. Baxendale, S. V. Ley, N. Nikbin and C. D. Smith, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1587.

<sup>52</sup> B. Merrifield, *Brit. Poly. J.* **1984**, *16*, 173.

necesitamos que su acoplamiento sea casi cuantitativo. En las resinas comerciales la carga nominal suele ser de entre 0.3 a 2.5 mmol de grupo reactivo (amina) por gramo de resina, pero resulta conveniente recalcular la carga. Una de las ventajas de usar el grupo Fmoc es que podemos cuantificar el primer acoplamiento por espectroscopia UV, de tal forma que podremos calcular la carga real de la resina.<sup>53</sup>

- **Monitorización de acoplamientos, desprotecciones:** durante la síntesis del péptido, en ocasiones es conveniente analizar de manera cualitativa la eficiencia de las reacciones sin tener que hacer una desprotección parcial. Para ello existen una serie de test que se basan en la detección de aminas primarias libres.<sup>54</sup> Estos test son muy recomendables sobre todo cuando se realiza la síntesis del péptido manualmente. Por ejemplo, el **test de Kaiser** (uno de los más usados) que se basa en la reacción de la ninhidrina con las aminas primarias o el test **TNBS**<sup>55</sup> donde el ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico reacciona con las aminas primarias libres de tal forma que la resina obtiene un color rojo-anaranjado.
- **Grupos protectores ortogonales:** existe un buen número de grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos que son sensible a medio ácido (Pbf, O<sup>t</sup>Bu, Trt, Boc) de tal forma que solo se desprotegerán en el desanclaje final. Sin embargo, si queremos introducir nuevas funciones a través de alguna cadena lateral de los residuos es indispensable que el residuo a funcionalizar contenga un grupo protector ortogonal a los ya presentes en la secuencia peptídica. Algunos de estos grupos son el Alloc o el All que son sensibles al Pd.<sup>56</sup>
- **Agentes de acoplamiento:** el uso de agentes de acoplamiento es necesario para una reacción rápida y cuantitativa.<sup>44b</sup> Uno de los primeros de estos agentes usados por Merrifield fue el DCC (diciclohexilcarbodiimida). Sin embargo, uno de sus grandes inconvenientes es la formación de subproductos insolubles en los disolventes de trabajo.<sup>43</sup> Debido a esto, se opta por el uso de la diisopropilcarbodiimida (DIC) ya que los subproductos permanecen en disolución durante la SPPS. Su único inconveniente es un proceso de

---

<sup>53</sup> S. Eissler, M. Kley, D. Bächle, G. Loidl, T. Meier, D. Samson, *J. Pept. Sci.* **2017**, 23, 757–762.

<sup>54</sup> a) E. Kaiser, R. L. Colescot, C. D. Bossinge, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595;  
b) V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *Anal. Biochem.* **1981**, 117, 147;  
c) T. Vojtkovsky, *J. Pept. Res.* **1995**, 8, 236

<sup>55</sup> W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, 71, 260–264.

<sup>56</sup> A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455–2504.

racemización que puede minimizarse mediante la adición de HOBt (menos reactivo, más estable y menos propenso a la racemización).<sup>57</sup> Una alternativa a las carbodiimidias es la familia conocida como onium salts (sales de uronio/fosfonio que contienen un triazol)<sup>44a</sup> donde las más usadas son el HATU, HBTU o PyBOP. En ocasiones se utilizan mezclas de estos agentes de acoplamiento (como HOBt/HBTU) pero, en cualquier caso, los agentes de acoplamiento se deben combinar siempre con una base, como es la diisopropiletilamina (DIEA). En los últimos años se han desarrollado nuevos agentes de acoplamiento que toman como base la estructura de la Oxyma,<sup>56</sup> logrando ciertas ventajas sobre los reactivos basados en los benzotriazoles.

- **Desprotección del grupo Fmoc:** la desprotección del grupo protector temporal Fmoc es muy importante ya que una desprotección parcial puede dar lugar a péptidos truncados, complicando seriamente la purificación del producto final.<sup>58</sup> Además, durante esta etapa tienen lugar dos de las reacciones secundarias más problemáticas durante la SPPS como son la **formación de aspartimidias**<sup>59</sup> y **dicetopiperazinas**.<sup>60</sup> Por tanto, la selección de la disolución básica adecuada resulta esencial.

### **Síntesis de péptidos en fase sólida asistida por microondas (SPPS-MW)**

A pesar de los grandes avances de la SPPS de las últimas décadas asociados a la implementación de nuevos grupos protectores de aminoácidos, agentes de acoplamiento o resinas, y de la robustez general de la metodología, aún hoy en día es posible fracasar en la síntesis del péptido deseado o obtener péptidos con una baja pureza, especialmente a medida que el péptido objetivo se hace más largo. Los principales motivos en ambos casos son el impedimento estérico y la formación de agregados inter e intramoleculares. Por ejemplo, los péptidos que son susceptibles de formar láminas  $\beta$  tienden a sufrir procesos de agregación durante la elongación del péptido debido a la formación de enlaces de hidrógeno (Asn y Gln) e interacciones hidrofóbicas al contener una alta proporción de Ala, Val, Ile

---

<sup>57</sup> L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397–4398.

<sup>58</sup> W. Li, N. M. O'Brien-Simpson, M. A. Hossain, J. D. Wade, *Aust. J. Chem.* **2020**, 73, 271–276.

<sup>59</sup> T. Michels, R. Dölling, U. Haberkorn, W. Mier, *Org. Lett.* **2012**, 14, 5218–5221.

<sup>60</sup> E. Pedroso, A. Grandas, X. de las Heras, R. Eritja, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 743–746.

y Phe.<sup>61</sup> Además, el proceso de agregación intermolecular conduce a una mala solvatación del péptido anclado a la resina, complicando el acceso de los reactivos. Estos problemas a menudo dan lugar a péptidos truncados que son difíciles de purificar. Algunas de las estrategias que ayudan a prevenir, o incluso suprimir la agregación, se basan en la introducción de pseudoprolinas,<sup>62</sup> agentes caotrópicos<sup>63</sup> o cambios en la composición de los disolventes usados durante la síntesis.<sup>64</sup>

Tradicionalmente todos los pasos en el ciclo SPPS se llevan a cabo a temperatura ambiente. Sin embargo, al aumentar la temperatura (30-80 °C) durante los acoplamientos de los aminoácidos y en algunos casos incluso en las etapas de desprotección y lavado, se obtuvieron mejoras significativas en cuanto a rendimiento y pureza, sobre todo, en las secuencias difíciles.<sup>65</sup> Como consecuencia, el aumento de la temperatura también puede dar lugar a procesos ya mencionados como la racemización<sup>66</sup> o a reacciones secundarias como la formación de las aspartimidias.<sup>67</sup>

En el calentamiento por microondas, la energía se aplica directamente al disolvente y los reactivos, de tal forma que los distintos materiales interactúan de forma diferente con el campo magnético, almacenando y convirtiendo la energía en calor en diferentes extensiones. Por ejemplo, la *N,N*-dimetilformamida (DMF), y la *N*-metil-2-pirrolidona (NMP),<sup>68</sup> los dos disolventes más usados en la SPPS tienen una muy buena capacidad de almacenar la energía y transformarla rápidamente en calor. En el caso de la NMP, se descubrió que la adición de aminoácidos y agentes de acoplamiento tenía un efecto positivo en la absorción de

---

<sup>61</sup> a) J. F. McNamara, H. Lombardo, S. K. Pillai, I. Jensen, F. Albericio, S. A. Kates, *J. Pept. Sci.* **2000**, 6, 512–518; b) L. A. Carpino, E. Krause, C. D. Sferdean, M. Schümann, H. Fabian, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7519–7523; c) C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Pep. Prot. Res.*, **2009**, 43, 431–440.

<sup>62</sup> T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9218–9227.

<sup>63</sup> D. Seebach, A. Thaler, A. K. Beck, *Helv. Chim. Acta* **1989**.

<sup>64</sup> D. Yamashiro, J. Blake, C. Hao Li, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 1469–1472.

<sup>65</sup> a) S. Wang, G. L. Foutch, *Chem. Eng. Sci.* **1991**, 46, 2373–2376; b) A. K. Rabinovich, J. E. Rivier, *Am. Biotechnol. Lab.* **1994**, 12, 48, 51.; c) L. M. Varanda, M. T. M. Miranda, *J. Pept. Res.* **1997**, 50, 102–108.

<sup>66</sup> M. P. Souza, M. F. M. Tavares, M. T. M. Miranda, *Tetrahedron* **2004**, 60, 4671–4681.

<sup>67</sup> R. Subirós-Funosas, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron* **2011**, 67, 8595–8606.

<sup>68</sup> C. Gabriel, S. Gabriel, E. H. Grant, E. H. Grant, B. S. J. Halstead, D. M. P. Mingos, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 213.

## Introducción

microondas.<sup>69,70</sup> El disolvente no es el único factor que influye en la SPPS-MW: el volumen de reacción, el material del que está compuesto el reactor o el modo de agitación (agitación mecánica o burbujeo de nitrógeno), son parámetros que también afectan enormemente a la síntesis.

Durante la década de los años 90 el uso de microondas adquiere gran relevancia como método de calentamiento en síntesis orgánica debido a las mejoras tanto en los tiempos de reacción como en los rendimientos obtenidos. En el año 1992 K.-T. Wang publicó un estudio en el que se sintetizó por primera vez un péptido en fase sólida mediante la aplicación de radiación de microondas (incrementando la eficiencia de los acoplamientos) usando un horno microondas convencional (Figura 5).<sup>71</sup>

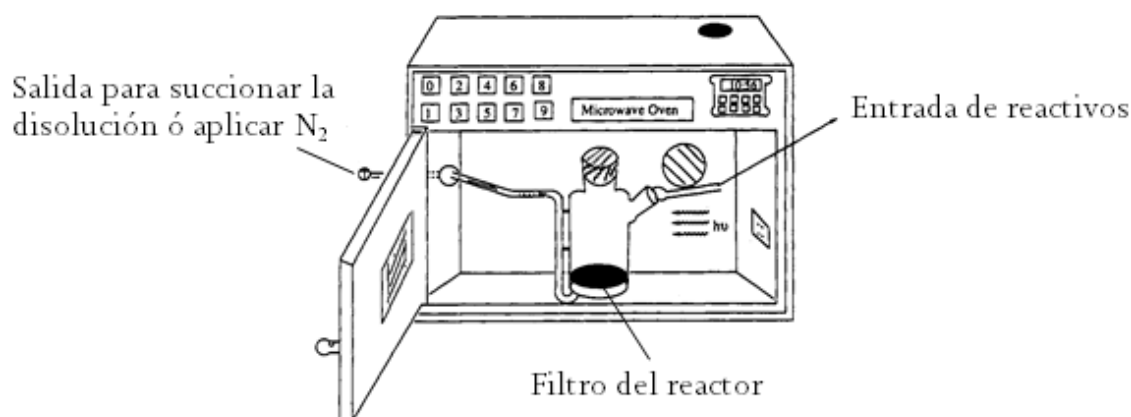


Figura 5: Horno microondas con un reactor de fabricación casera adaptado para la SPPS. El reactor se posiciona en el centro del horno microondas conectando el brazo lateral del reactor a una fuente de N<sub>2</sub> mediante un tubo de teflón. Durante la irradiación con microondas, se introduce una corriente de N<sub>2</sub> como método de agitación (burbujeo). Después de detener la irradiación, la disolución se filtra a través del brazo lateral por succión. Adaptada con permiso de la referencia 71

Sin embargo, el procedimiento descrito por Wang no era fácilmente reproducible ni podía tener un control de la temperatura de reacción al tratarse de un horno microondas comercial. En el año 2002 el grupo de A. Gogoll publicó un procedimiento de acoplamiento de aminoácidos rápido (1.5-20 min) en fase sólida asistido por microondas. En este estudio observaron que el soporte sólido no se degradaba a altas temperaturas. Además, emplearon reactores especiales capaces de

<sup>69</sup> C. O. Kappe, C. Oliver Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6250–6284.

<sup>70</sup> B. Bacsa, K. Horváti, S. Bősze, F. Andreae, C. Oliver Kappe, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7532–7542.

<sup>71</sup> H. M. Yu, S. T. Chen, K. T. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4781–4784.

soportar las altas presiones generadas por los compuestos volátiles. Sin embargo, dichos reactores no eran aptos para la filtración, por tanto, debían trasvasar la mezcla de reacción a columnas de polipropileno equipadas con una frita para poder realizar los lavados y las desprotecciones.

En el año 2006 el grupo de C. O. Kappe publicó un estudio en el que evaluaron distintos procedimientos de SPPS asistidos por microondas, para la obtención de un péptido de nueve aminoácidos utilizando una fibra óptica como sensor interno para el control continuo de la temperatura. La clave de estos protocolos era alternar las etapas de calentamiento (acoplamiento y desprotección) en los que la radiación se aplica mediante pulsos cortos con una potencia constante (30 s a 30 W), con etapas de enfriamiento (a temperatura ambiente o 0 °C según el método). La combinación de estos protocolos con una cápsula porosa (los reactivos podían penetrar la cápsula mientras la resina permanecía en el interior) permitió la síntesis del péptido en menos tiempo y con una mayor pureza y rendimiento.<sup>72</sup> El mismo grupo publicó un nuevo estudio en el año 2008 describiendo la síntesis de una serie de péptidos de diferente longitud (desde 9 a 24 aminoácidos) evaluando el efecto del campo magnético en la SPPS asistida por microondas. Hasta ese momento, se especulaba que la radiación de microondas interactuaba directamente con los momentos dipolares del enlace amida en los péptidos y que dicha interacción era la que causaba el calentamiento explicando así la rapidez y los altos rendimientos de la SPPS-MW.<sup>73,74,75</sup> Kappe y colaboradores obtuvieron resultados casi idénticos en términos de pureza y niveles de racemización de las tres secuencias peptídicas, independientemente del método de calentamiento utilizado (convencional o microondas). Por lo tanto, el efecto de las microondas aplicadas en la SPPS es puramente térmico y no está relacionado con el campo magnético. Además, estudiaron la influencia de la temperatura en la racemización de los aminoácidos. Mientras que para la mayoría no se observó una racemización significativa, las altas temperaturas durante las etapas de acoplamiento condujeron a niveles considerables de racemización para la His y la Cys.<sup>70</sup>

En el año 2011 el grupo de A.-M. Papini sintetizó el fragmento N-terminal de 34 residuos de PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea) a través del método estándar de la SPPS y del método de SPPS-M, y utilizando en ambos casos el mismo sintetizador automático de péptidos para una mejor comparación de

---

<sup>72</sup> B. Bacsa, B. Desai, G. Dibo, C. O. Kappe, *J. Pept. Sci.* **2006**, 12, 633–638.

<sup>73</sup> S. A. Palasek, Z. J. Cox, J. M. Collins, *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 143–148.

<sup>74</sup> J. M. Collins, N. E. Leadbeater, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1141–1150.

<sup>75</sup> H. Rodríguez, M. Suarez, F. Albericio, *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 136–140.

## Introducción

ambas metodologías. Debido a que en el momento del estudio los protocolos de SPPS automatizados no permitían el seguimiento de la síntesis en tiempo real, los investigadores realizaron desprotecciones de pequeñas porciones de la resina que posteriormente analizaron mediante UPLC-MS(ESI). De esta manera les fue posible detectar la presencia de acoplamiento difícil que resultaban en una síntesis incompleta, como péptidos truncados que carecían de Leu, His o Arg. Para solventar estos problemas, decidieron disminuir la potencia de las microondas y bajar la temperatura para evitar la racemización de la His y la posible formación de  $\gamma$ -lactamas de la Arg.<sup>76</sup>

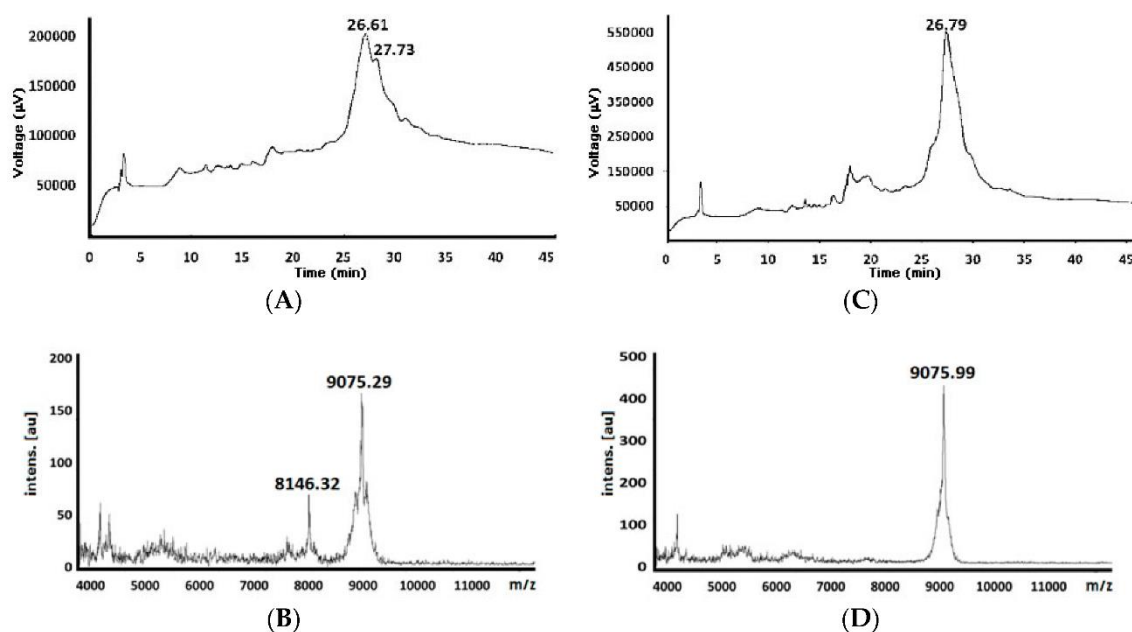


Figura 6: Perfiles cromatográficos y espectros de masas del crudo del péptido de 82 residuos (PM teórico: 9051.42 Da) obtenidos por métodos estándar de SPPS (**A**, **B**) y SPPS-MW (**C**, **D**). Adaptada de la referencia 77.

Más recientemente el grupo de M. Vanegas publicó un estudio en el que comparaban la síntesis de un péptido largo de 82 residuos mediante protocolos estándar de SPPS y SPPS-MW. Para evitar los problemas de agregación debido a la longitud del péptido, decidieron utilizar una resina de polietilenglicol (Rink Amide ChemMatrix) y reducir su carga. Además, para evaluar el progreso de la síntesis, realizaron controles cada 11 residuos. Así pues, el acoplamiento de los 22 primeros residuos resultó en una única señal en el cromatograma del HPLC en ambos métodos (convencional y microondas). Sin embargo, a partir de los 33 residuos, el análisis del crudo se complicó debido a la aparición de varias señales correspondientes a péptidos truncados. Además, análisis posteriores a los 57 y 66

<sup>76</sup> M. H. Cezari, L. Juliano, *Pept. Res.* **1996**, 9, 88–91.

residuos mostraron una disminución del pico correspondiente al péptido de interés debido a la acumulación de especies truncadas.

Finalmente, lograron la síntesis del péptido de 82 residuos tanto por el método convencional (162 h de tiempo total) como por el asistido por microondas (37.8 h de tiempo total) demostrando que las dificultades durante la síntesis son inherentes de la secuencia peptídica y no se pueden resolver con la aplicación de microondas. Sin embargo, la SPPS-MW mejora extremadamente los tiempos de la síntesis obteniendo además rendimientos y purezas ligeramente mejores que con los métodos estándar.<sup>77</sup>

### **Reacciones secundarias en la SPPS**

Una de las condiciones para que los acoplamientos durante la SPPS ocurran de manera satisfactoria es la difusión de los reactivos a través de la matriz del soporte sólido, que tiene lugar si la resina está correctamente solvatada. En caso contrario, puede ocurrir que tanto las reacciones de acoplamientos como las desprotecciones del N<sup>o</sup> no se completen dando lugar a péptidos truncados a los que les falta uno o más aminoácidos. Además, como se ha mencionado en apartados anteriores, la interacción tanto inter como intramolecular de las cadenas peptídicas puede provocar procesos de agregación impidiendo el acceso de los reactivos. Junto con estos problemas, existen una serie de reacciones secundarias que pueden ocurrir durante la síntesis de un péptido, que pueden complicar (o imposibilitar en algunos casos) su obtención. Estas posibles reacciones secundarias, están bien estudiadas y en la mayoría de los casos existen protocolos que ayudan a minimizar o prevenir los problemas derivados de cada tipo de estas reacciones.<sup>78</sup>

### **Racemización**

Las propiedades de los péptidos y las proteínas y el plegamiento adecuado dependen de la configuración uniforme de los centros quirales. Por tanto, la alteración de uno solo de estos centros puede originar un cambio drástico en la actividad biológica. Los aminoácidos estándar, a excepción de la Gly, contienen un centro quiral en el C<sup>o</sup>. Además, la Ile y la Thr contienen un centro quiral extra en sus cadenas laterales. La racemización ha sido ampliamente estudiada durante las etapas de acoplamiento en la síntesis en fase sólida, pero este proceso indeseado también puede ocurrir durante las desprotecciones del N<sup>o</sup> (catalizadas por una base). Durante los acoplamientos, la epimerización puede ocurrir a través de la formación de un intermedio de oxazolona o mediante enolización directa. En este

---

<sup>77</sup> Y. F. Varela, M. Vanegas Murcia, M. E. Patarroyo, *Molecules* **2018**, 23.

<sup>78</sup> Y. Yang, *Side Reactions in Peptide Synthesis*, Elsevier Science, **2015**.

último caso, la conversión del aminoácido que se va a acoplar en un éster activo incrementa la acidez del hidrógeno  $\alpha$ , favoreciendo la enolización dando lugar a un reordenamiento. Además, tanto la His como la Cys son los aminoácidos más susceptibles a la epimerización en la SPPS.<sup>79,80,81</sup> Para evitar estos problemas se puede sustituir la DIEA por una base más impedida estéricamente como la 2,4,6-trimetilpiridina (TMP), cuyo uso ha demostrado reducir la epimerización durante los acoplamientos. En la SPPS-MW, el uso de protocolos modificados de SPPS-MW en los que la temperatura durante el acoplamiento no supera los 50 °C también logra reducir los niveles de racemización de la Cys.<sup>73</sup> En el caso de la His, el nitrógeno  $\pi$  desprotegido de la cadena lateral se encuentra cerca del protón del Ca y cuando el aminoácido se encuentra en su forma activada, el N puede abstraer dicho protón dando lugar a la racemización a través de la enolización del mismo modo que la Cys. Por tanto, una forma de prevenir este tipo de reacciones secundarias es utilizar temperaturas menores o incluso realizar los acoplamientos a temperatura ambiente; al ser un proceso intramolecular, el uso de una base más impedida no logra reducir en este caso los niveles de epimerización.

### Formación de aspartimidas

La formación de aspartimidas se detectó originalmente en la síntesis de péptidos siguiendo la estrategia Boc/Bzl, teniendo lugar durante la etapa de desprotección total del péptido mediada por HF, en las etapas de desprotección del grupo protector Boc en el Na llevadas a cabo con TFA e incluso durante el acoplamiento de aminoácidos en presencia de una amina terciaria.<sup>82</sup> Posteriormente el uso de la estrategia Fmoc/tBu ha contribuido todavía más al impacto de estas reacciones secundarias en la síntesis de péptidos ya que también puede ocurrir durante las etapas de desprotección del grupo Fmoc. En cualquier caso, el efecto de la formación de aspartimidas es acumulativo ya que cada tratamiento de la resina con piperidina (la base más usada en la desprotección del grupo Fmoc) puede inducir su formación. De hecho, se ha encontrado que este tipo de reacciones secundarias

---

<sup>79</sup> T. Kaiser, G. J. Nicholson, H. J. Kohlbau, W. Voelter, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1187-1190.

<sup>80</sup> Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4307-4312.

<sup>81</sup> R. H. Angeletti, L. Bibbs, L. F. Bonewald, G. B. Fields, J. W. Kelly, J. S. McMurray, W. T. Moore, S. T. Weintraub, in *Techniques in Protein Chemistry* (Ed.: D.R. Marshak), Academic Press, **1997**, pp. 875-890.

<sup>82</sup> J. Martinez, M. Bodanszky, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, 12, 277-283.

son más susceptibles de ocurrir en medio básico que en medio ácido, convirtiéndose así en uno de los mayores desafíos en la SPPS.<sup>83</sup>

Los residuos de ácido aspártico incorporados a un péptido tienen el grupo carboxilo en su cadena lateral protegido en forma de éster. Sin embargo, esta cadena lateral puede interactuar con varios nucleófilos durante la SPPS (Figura 7).

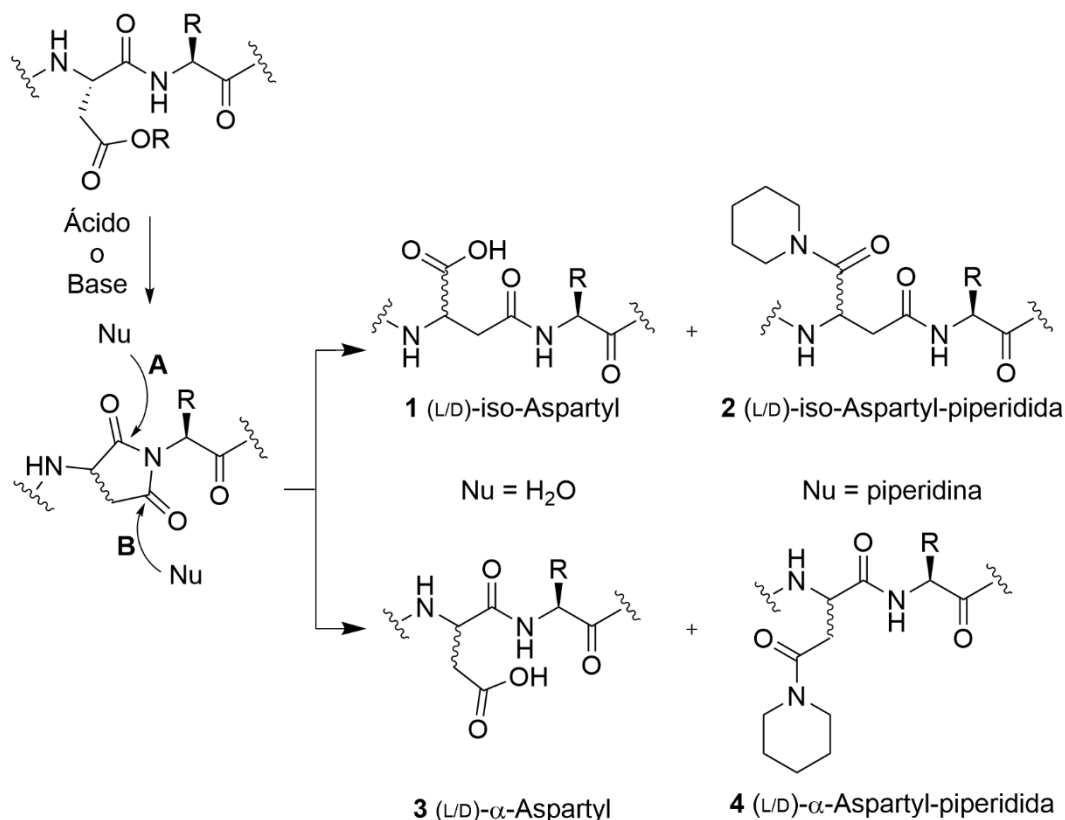


Figura 7: Mecanismo de formación de aspartimidas.

Así pues, el carboxilo de la cadena lateral del aspártico puede sufrir un ataque nucleofílico por parte del Na perteneciente al residuo anterior, de modo que se convierte en la aspartimida (especie con un anillo de cinco miembros). Por otro lado, el intercambio de protones en una aspartimida se ve acelerado debido al incremento de su acidez en comparación en el Ha de su precursor, agravando todavía más la racemización.<sup>84</sup> La aspartimida puede llegar a permanecer inalterada durante toda la síntesis de tal forma que se podrá identificar como una impureza

<sup>83</sup> F. Rabanal, J. J. Pastor, E. Nicolás, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 8093–8096.

<sup>84</sup> J. L. Radkiewicz, H. Zipse, S. Clarke, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9148–9155.

con una diferencia de  $-18$  unidades de masa respecto al péptido deseado. Además, la aspartimida podría experimentar una apertura del anillo debido a una adición nucleofílica tanto por una molécula de agua como por piperidina. Si la aspartimida experimenta la hidrólisis del anillo puede dar lugar a las especies **1** (ruta A) y **3** (ruta B) que difícilmente pueden ser detectadas mediante espectrometría de masas y normalmente resulta casi imposible separar estos isómeros del péptido de interés mediante RP-HPLC.<sup>85</sup> Por otro lado, si el nucleófilo que media la apertura de la aspartimida es la piperidina, se obtendrán los subproductos **2** (ruta A) y **4** (ruta B). En este caso, los subproductos se pueden detectar por espectrometría de masas debido al incremento del peso molecular (+68) respecto al péptido objetivo.

Debido al mecanismo a través del cual tiene lugar la formación de aspartimidas, se pueden deducir algunos factores que pueden potenciar esta reacción secundaria. Algunos de los factores más importantes son:

- **Bases:** el uso de aminas auxiliares terciarias es imperativo durante los acoplamientos, pero puede desencadenar la formación de aspartimidas. Sin embargo, la DIEA (una de las aminas auxiliares más usadas en SPPS para la activación de los aminoácidos) es menos propensa a inducir esa reacción secundaria debido a su impedimento estérico.<sup>86</sup> Por otro lado, es necesario usar una amina secundaria para desproteger el grupo Fmoc del N<sup>α</sup> y, por tanto, es probable que se pueda inducir la formación de aspartimidas. De hecho, es en esta etapa donde la formación de aspartimidas es mucho más significativa que la generada durante los acoplamientos (usando aminas terciarias).<sup>87</sup>
- **Grupos protectores de la cadena lateral del Asp:** el tipo de grupo protector en la cadena lateral del Asp es uno de los factores más decisivo a la hora de prevenir la formación de aspartimidas durante la síntesis de péptidos. De hecho, los efectos estéricos y la capacidad de retirar carga del grupo protector del Asp destacan como los factores predominantes. Por tanto, grupos protectores voluminosos o con poca capacidad de retirada de carga pueden reducir la formación de aspartimidas. Ciertos derivados del Asp



<sup>85</sup> C. M. Kaneshiro, K. Michael, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1077–1081.

<sup>86</sup> E. Nicolás, E. Pedroso, E. Giraldo, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 497–500.

<sup>87</sup> R. Dölling, M. Beyermann, J. Haenel, F. Kernchen, E. Krause, P. Franke, M. Brudel, M. Bienert, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 853–854.

como el Asp(OBzl)<sup>88</sup> o el Asp(OAll)<sup>89</sup> favorecen la formación de aspartimidas, mientras que, derivados como Asp(OtBu),<sup>90</sup> Asp(OChx),<sup>91</sup> Asp(OBno),<sup>92</sup> Asp(OEpe),<sup>93</sup> Asp(OMpe)<sup>93</sup> previenen la aparición de esta reacción secundaria.

- *Secuencia peptídica*: el microambiente tanto químico como físico que rodea al aspártico tiene un papel muy importante respecto a la formación de aspartimidas. Debido a que el proceso comienza por el ataque nucleofílico del N de la amida que precede al Asp en el esqueleto peptídico, es razonable pensar que en la secuencia -Asp(X)-Yaa- el aminoácido Yaa puede afectar a la formación de aspartimidas en función de sus propiedades.<sup>87</sup> Este efecto de la secuencia ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que cuando una Gly acompaña al Asp en una secuencia peptídica (-Asp(X)-Gly-), la formación de aspartimidas será extremadamente susceptible a tener lugar tanto en medio básico como ácido, debido al pobre impedimento estérico de la Gly (dos H en su C $\alpha$ ) que favorece el ataque nucleofílico del N del esqueleto peptídico sobre la cadena lateral del Asp.<sup>94</sup>

Existen otros factores que pueden influenciar la formación de aspartimidas como la composición del soporte sólido (resinas menos hidrofóbicas reducen las aspartimidas),<sup>95</sup> la temperatura (reduciéndola temperatura se disminuye la aparición de aspartimidas),<sup>96</sup> el disolvente utilizado, la conformación del péptido o la aplicación de microondas (que favorece la reacción secundaria. Sin embargo, se puede disminuir su aparición añadiendo HOBT a la disolución de piperidina).<sup>97</sup>

---

<sup>88</sup> P. Stathopoulos, S. Papas, S. Kostidis, V. Tsikaris, *J. Pept. Sci.* **2005**, 11, 658–664.

<sup>89</sup> D. Flora, H. Mo, J. P. Mayer, M. A. Khan, L. Z. Yan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1065–1068.

<sup>90</sup> M. J. Dixon, A. Nathubhai, O. A. Andersen, D. M. F. van Aalten, I. M. Eggleston, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 259–268.

<sup>91</sup> H. Süli-Vargha, G. Schlosser, J. Ilas, *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 742–748.

<sup>92</sup> R. Behrendt, S. Huber, P. White, *J. Pept. Sci.* **2016**.

<sup>93</sup> R. Behrendt, S. Huber, R. Martí, P. White, *J. Pept. Sci.* **2015**, 21, 680–687.

<sup>94</sup> R. Röder, P. Henklein, H. Weisshoff, C. Mügge, M. Pätzelt, U. Schubert, L. A. Carpino, P. Henklein, *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 65–70.

<sup>95</sup> J. Cebrian, V. Domingo, F. Reig, *J. Pept. Res.* **2003**, 62, 238–244.

<sup>96</sup> M. Michael, *Frontiers in Modern Carbohydrate Chemistry*, ACS, Symposium Serie 960. Washintong D.C., **2007**, 328–353.

<sup>97</sup> S. L. Pedersen, K. K. Sørensen, K. J. Jensen, *Biopolymers* **2010**, 94, 206–212.

## Introducción

### Reacciones secundarias del triptófano (Trp)

El indol de la cadena lateral del Trp puede experimentar una serie de reacciones secundarias durante la desprotección total del péptido como *tert*-butilación,<sup>98</sup> alquilación,<sup>99</sup> o sulfonación,<sup>100</sup> entre otras. De manera general, tras el tratamiento con TFA para desanclar el péptido de la resina y eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales, el indol del Trp se expone a un ambiente con numerosas especies electrófilas (*tert*-butilos, sulfonilos, acilos, bencilos, etc.) que pueden dar lugar a las reacciones secundarias mencionadas, de manera irreversible, teniendo lugar en medio ácido. Por tanto, la selección de un grupo protector del indol resulta fundamental, siendo el *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) uno de los grupos protectores más usados, ya que previene la mayor parte de esas reacciones secundarias mencionadas. Sin embargo, el propio Boc puede ser el causante de otra reacción secundaria debido a una desprotección incompleta. En la Figura 8 se describe el mecanismo por el cual se desprotege el grupo Boc y también tiene lugar la reacción secundaria.<sup>101</sup>

---

<sup>98</sup> E. Wünsch, E. Jaeger, L. Kisfaludy, M. Löw, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **1977**, 16, 317–318.

<sup>99</sup> F. Albericio, N. Kneib-Cordonier, S. Biancalana, L. Gera, R. I. Masada, D. Hudson, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3730–3743.

<sup>100</sup> P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1637–1640.

<sup>101</sup> W. Chan, P. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, **1999**.

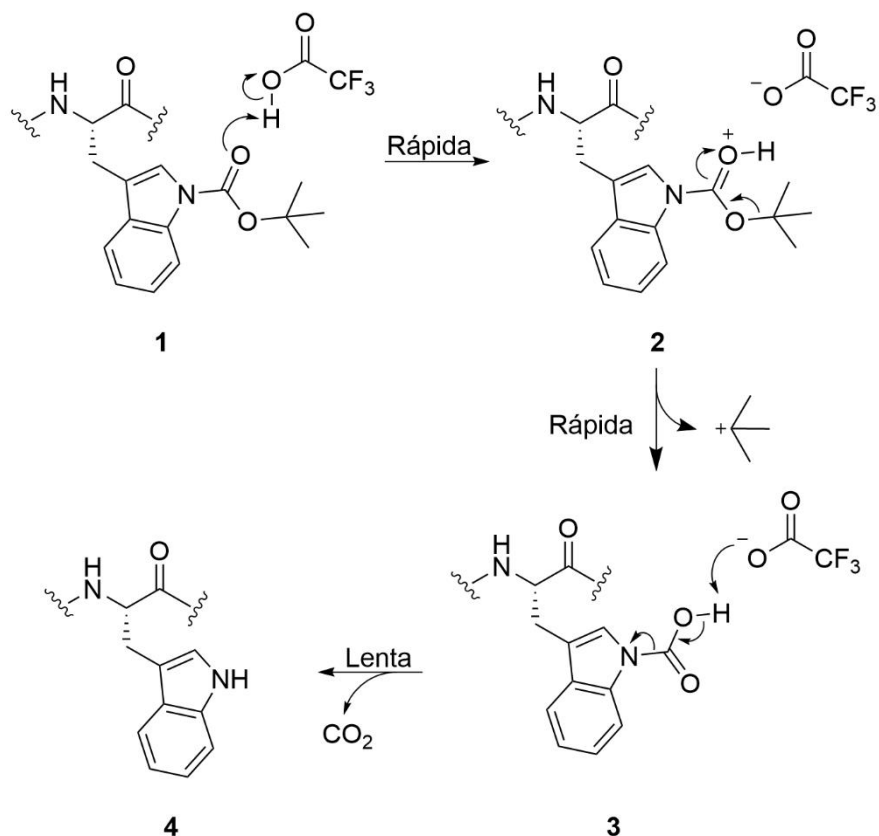


Figura 8: mecanismo de desprotección de la cadena lateral del Trp.

En primer lugar, el Trp(Boc) (**1**) se convierte en el derivado de carbamato **3** tras el tratamiento con TFA. Esta transformación ocurre de manera muy rápida. A continuación, tiene lugar la liberación de  $\text{CO}_2$  del carbamato **3** (todavía en presencia de TFA), siendo esta una etapa muy lenta, para dar finalmente el Trp correctamente desprotegido. El hecho de que esta segunda etapa del mecanismo sea muy lenta, hace posible que se pueda asilar el intermedio **3**, es decir, en ocasiones se pueden detectar desprotecciones incompletas del Trp en un péptido con un incremento de +44, que complican además la purificación del compuesto. Afortunadamente, este problema se puede solventar ampliando el tiempo de desprotección total del péptido, aumentando el volumen de la mezcla de TFA o liofilizando el crudo obtenido después de la desprotección.

Además de las reacciones secundarias mencionadas en esta introducción, hay un número considerable de reacciones secundarias que han sido muy estudiadas a lo largo de los últimos años y que tienen lugar a pesar de los grandes avances en la SPSS.<sup>78</sup>



## OBJETIVOS GENERALES

El uso de complejos de Ru(II) como agentes anticancerígenos ha sido un campo de investigación de gran interés en los últimos años debido a que en algunos casos estos complejos presentan actividades similares a las del cisplatino con una mayor biocompatibilidad y propiedades fotofísicas interesantes para su uso como en aplicaciones teranósticas. Los dos primeros capítulos de esta tesis exploran nuevos complejos de Ru(II) con potenciales aplicaciones como antitumorales.

**El primer capítulo de esta tesis se centra en el diseño y síntesis de metalopéptidos de Ru(II) derivados del ligando dppz capaces de estabilizar G-cuadrupejos (G4s)**, que son secuencias del ADN presentes en los telómeros y en regiones promotoras de genes humanos con un rol muy importante en muchos procesos biológicos fundamentales como la transcripción, el procesamiento del ARNm, la replicación del ADN, la estabilidad del genoma o la función de los telómeros.

**En el segundo capítulo estudiamos complejos de Ru(II) de tipo semi-sandwich** (ó Ru(II)-areno) que han adquirido una gran relevancia en los últimos años debido a su versatilidad estructural. Más concretamente, describimos el estudio de las propiedades de unión al ADN de tres nuevos complejos de Ru(II)-areno adaptados a la síntesis de péptidos en fase sólida.

Las proteínas poseen propiedades de gran interés para los materiales nanoestructurados: su función está relacionada con la estructura, pueden tener interacciones específicas con diferentes substratos y macromoléculas y pueden autoensamblarse en grandes complejos supramoleculares. Sin embargo, el gran tamaño de estas proteínas requiere métodos de expresión *in vitro* para su

producción de modo que introducir nuevas funcionalidades requiere métodos engorrosos. Por otro lado, los péptidos pueden ser sintetizados fácilmente mediante métodos químicos, se pueden obtener a gran escala y la introducción de nuevas funcionalidades resulta mucho más sencilla. **En el tercer capítulo de esta tesis se propone el uso de proteínas pequeñas sintéticamente accesibles mediante métodos químicos como plataformas.**

## CAPÍTULO I

### **Metalopéptidos oligocatiónicos de Ru(II) derivados del ligando dipiridofenazina (dppz) como agentes de unión selectivos a G-cuadruplejos.**

#### **Resumen**

Se ha sintetizado una serie de metalopéptidos polipiridínicos de Ru(II) derivados del ligando dppz a través de la metodología SPPS. Los datos de las valoraciones de fluorescencia indican que los metalopéptidos funcionalizados con una secuencia de octaarginina C-terminal muestran una mayor afinidad por secuencias de G-cuadruplejos que los que carecen de ella. Además, la relación existente entre la secuencia de octaarginina y el ligando auxiliar dppz parece tener un papel fundamental en el proceso de reconocimiento selectivo entre diferentes conformaciones de G-cuadruplejos. Finalmente, los estudios de microscopía de fluorescencia llevados a cabo indican que los metalopéptidos equipados con octaarginina son capaces de internalizarse eficientemente en células Vero, causando la muerte celular con signos de apoptosis.

Este capítulo ha sido publicado en la revista *Chemical Communications* como:

D. Bouzada, I. Salvadó, G. Barka, G. Rama, J. Martínez-Costas, R. Lorca, Á. Somoza, M. Melle-Franco, M. E. Vázquez, M. V. López, Selective G-quadruplex binding by oligoarginine-Ru (dppz) metallopeptides. *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 658–661. DOI: 10.1039/C7CC08286J

<https://pubs.rsc.org/fi/content/articlehtml/2018/cc/c7cc08286>

## Introducción

El ADN es un biopolímero derivado de nucleótidos caracterizado por tener un esqueleto fosfatado negativo altamente cargado. El ADN puede adoptar diferentes conformaciones dependiendo de las condiciones del medio. La más común y reconocida por la mayoría de los factores de transcripción es la denominada ADN-B. Existen conformaciones del ADN con estructura de doble hélice distintas al ADN-B y que también son biológicamente activas, como el ADN-A<sup>102</sup> y el ADN-Z (Figura 9).<sup>103</sup>

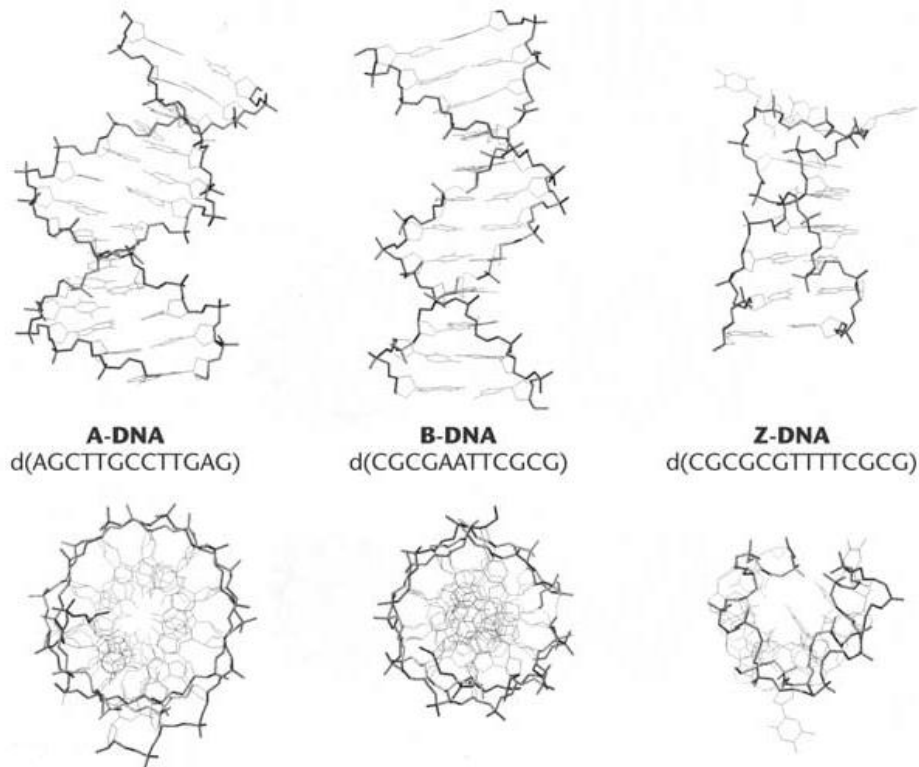


Figura 9: Representación de las diferentes conformaciones de las hélices del ADN-A, -B y -Z vistas desde el lateral (arriba) y de la parte superior (abajo). Las estructuras fueron dibujadas a partir de las estructuras cristalinas, utilizando el programa Cn3D disponible en la página web de NCBI. Adaptada con permisos de D. W. Ussery, *Elsevier Oceanogr. Ser.* ©2002 . John Wiley & Sons, Ltd.

En todas ellas, las interacciones de enlace de hidrógeno que se establecen entre los pares de bases—A-T y G-C—se conocen como emparejamiento canónico de bases Watson-Crick. Pero las nucleobases poseen otros sitios disponibles para la formación de enlaces de hidrógeno e incluso otras combinaciones de enlaces de

<sup>102</sup> a) R. I. Gumport, F. H. Deis, N. C. Gerber. *Biochemistry* 5th Edition. **2006**, W. H. Freeman, New York; b) R. E. Dickerson, *Methods in Enzymol* **1992**, 211, 67–111.

<sup>103</sup> A. Rich, A. Nordheim, A. H. Wang, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, 53, 791–846.

hidrógeno posibles y, cuando éstas entran en juego se pueden generar otras estructuras secundarias diferentes a las de doble hélice.<sup>104,105</sup> Algunos de estos emparejamientos de bases no canónicos son Watson-Crick reversos o de Hoogsteen.<sup>106</sup>

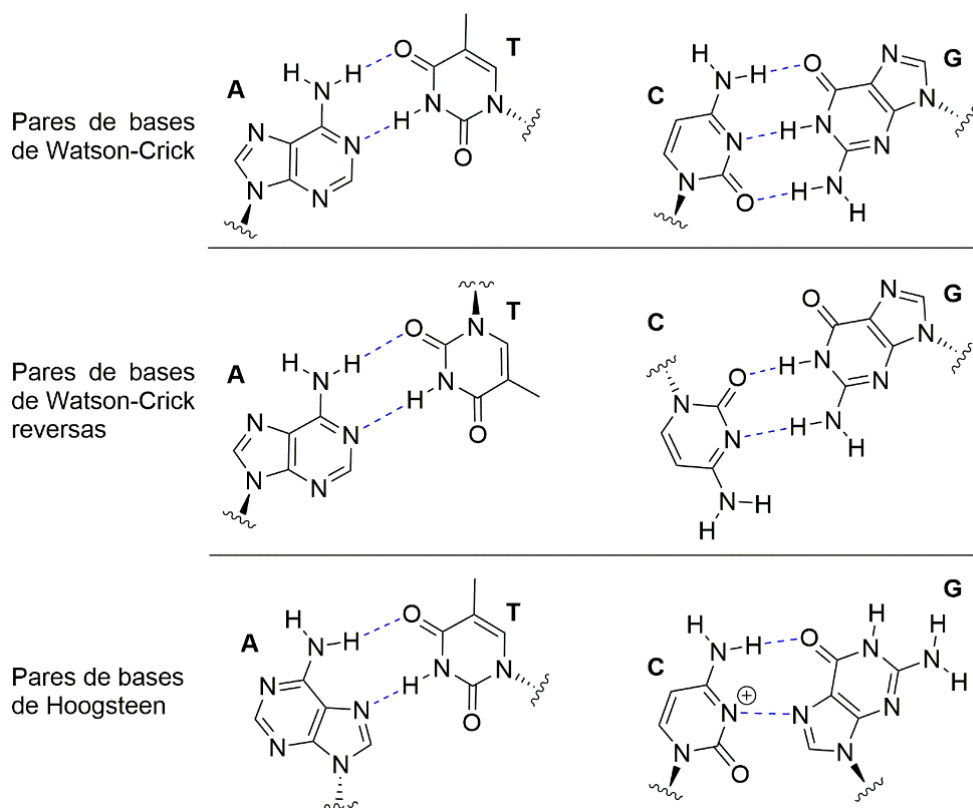


Figura 10: Estructuras químicas de los emparejamientos de bases Watson-Crick canónico, Watson-Crick reverso y Hoogsteen.

<sup>104</sup> G. Govil, R.V. Hosur, *Conformation of Biological Molecules*, NMR **1982**, Vol 20, Springer-Verlag, New York.

<sup>105</sup> a) W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, **1984**, p. 556, Springer-Verlag, New York; b) V. N. Soyfer, V.N. Potaman, *Triple-helical Nucleic Acids* **1996**, Springer-Verlag, New York.

<sup>106</sup> G. Raghunathan, H. T. Miles, V. Sasisekharan, *Biopolymers* **1994**, 34, 1573-81.

Algunas de estas estructuras secundarias alternativas y minoritarias son el ADN de triple hebra o ADN H,<sup>107</sup> los G-cuadruplejos<sup>108</sup> o los i-motivos.<sup>109</sup> Todas ellas desempeñan funciones biológicas muy importantes como, por ejemplo, la regulación y transcripción de los genes, la recombinación genética o el ensamblaje de los cromosomas. Las diferentes cadenas de ADN que las conforman pueden interactuar entre ellas de forma antiparalela, pero también de forma paralela.<sup>110</sup>

### **Estructura y función biológica de los G-cuadruplejos**

Desde finales de los años 80, se sabe que los extremos teloméricos de los cromosomas eucariotas, cuya parte final es monocatenaria, contienen repeticiones de secuencias cortas ricas en guaninas (TTAGGG),<sup>111</sup> y que este tipo de secuencias pueden ensamblarse de forma espontánea *in vitro* en unas estructuras supramoleculares complejas denominadas cuadruplejos, G-cuadruplejos o G4s.<sup>112</sup> En el año 2003 se publicaron las primeras estructuras de rayos X de alta resolución de G-cuadruplejos cocrystalizados con daunorrubicina<sup>113</sup> y con derivados de la acridina,<sup>114</sup> Posteriormente, fueron

---

<sup>107</sup> a) G. Felsenfield, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 2023-24; b) J. S. Lee, D. A. Johnson, A. R. Morgan, *Nucleic Acids Res.* **1979**, 6, 6659; S. R. Bhaumik, K. V. R. Chary, G. Govil, K. Liu, H. T. Miles, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 4116-21.

<sup>108</sup> a) F. Aboul-Ela, A. I. H. Murchie, D. G. Norman, D. M. Lilley, *J. Mol. Biol.* **1997**, 243, 458-71; b) K. Phillips, Z. Dauter, A. I. H. Murchie, D. M. Lilley, B. Luisi, *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 171-82.

<sup>109</sup> M. Zeraati, D. B. Langley, P. Schofield, A. L. Moye, R. Rouet, W. E. Hughes, T. M. Bryan, M. E. Dinger, D. Christ, *Nat. Chem.* **2018**, 10, 631-637.

<sup>110</sup> a) N. B. Ramsing, K. Rippe, T. M. Jovin, *Biochemistry* **1989**, 28, 9528-35; b) V. R. Parvathy, S. R. Bhaumik, K. V. R. Chary, G. Govil, K. Liu, F. B. Howard, H. T. Miles, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 1500-1511.

<sup>111</sup> a) R. K. Moyzis, J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff, J. R. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1988**, 85, 6622-26.

<sup>112</sup> a) D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1988**; b) W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature* **1989**, 342, 825-829; c) J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, T. R. Cech, *Cell* **1989**, 59, 871-880.

<sup>113</sup> G. R. Clark, P. D. Pytel, C. J. Squire, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4066-67.

<sup>114</sup> S. M. Haider, G. N. Parkinson S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, 2003, 326, 117-25.

publicadas otras estructuras cristalinas con otros agentes de unión, como BRACO-19,<sup>115</sup> TMPyP4<sup>116</sup> o una naftalenodiimida tetrasustituída.<sup>117</sup>

Los primeros análisis genómicos que se realizaron demostraron que la presencia de secuencias precursoras de G-cuadruplejos (**G4s**) es recurrente en los telómeros y también en las regiones promotoras de muchos genes humanos y de otras especies superiores, especialmente en aquellos que están involucrados en procesos de replicación, como los protooncogenes.<sup>118</sup> Estos datos relanzaron el interés por los G4s, ya que daban a entender que se trataban de un mecanismo basado en ácidos nucleicos cuya función era regular el mantenimiento del tamaño de los telómeros,<sup>119</sup> así como los procesos de transcripción, replicación y traslación genéticas.<sup>118c</sup>

Recientemente, se ha detectado la existencia de estructuras de G4s endógenas en células humanas sanas<sup>120</sup> y también cancerígenas.<sup>121</sup> Además, se ha identificado su

---

<sup>115</sup> N. H. Campbell, G. N. Parkinson, A. P. Reszka and S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6722–24.

<sup>116</sup> G. N. Parkinson, R. Ghosh S. Neidle, *Biochemistry* **2007**, 46, 2390–97.

<sup>117</sup> G. N. Parkinson, F. Cuenca S. Neidle, *J. Mol. Biol.* **2008**, 381, 1145–56.

<sup>118</sup> a) A. K. Todd, M. Johnston, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 2901–2907; b) J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 2908–2916; c) J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 406; d) H. J. Lipps, D. Rhodes, *Trends Cell Biol.* **2009**, 19, 414–422.

<sup>119</sup> K. Paeschke, S. Juranek, T. Simonsson, A. Hempel, D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15, 598–604.

<sup>120</sup> a) G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 182–186; b) A. Henderson, Y. Wu, Y. C. Huang, E. A. Chavez, J. Platt, F. B. Johnson, R. M. Brosh, D. Sen, P. M. Lansdorp, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 42, 860–869; c) A. L. Moye, K. C. Porter, S. B. Cohen, T. Phan, K. G. Zyner, N. Sasaki, G. O. Lovrecz, J. L. Beck, T. M. Bryan, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 7643; d) S. Zhang, H. Sun, L. Wang, Y. Liu, H. Chen, Q. Li, A. Guan, M. Liu, Y. Tang, *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46, 7522–7532.

<sup>121</sup> G. Biffi, D. Tannahill, J. Miller, W. J. Howat, S. Balasubramanian, *PLoS One* **2014**, 9, e102711.

presencia en ADN genómico<sup>122</sup> y también en un contexto de cromatina.<sup>123</sup> Todos estos estudios han aportado mucha información acerca del paisaje biológico de los G4s en relación con el tipo y con el estado concreto de la célula, revelando la estrecha relación existente entre los G4s y episodios en los que la transcripción es elevada. Las moléculas pequeñas<sup>124</sup> y los anticuerpos modificados<sup>125</sup> han sido las herramientas clave que han permitido estudiar la formación y las funciones biológicas de los G4s dentro de las células. Fruto de estas investigaciones, se ha descubierto que varias proteínas endógenas interaccionan con los G4s tales como las helicasas,<sup>126</sup> los factores de transcripción<sup>127</sup> o los remodeladores de cromatina.<sup>128</sup> Los diferentes estudios estructurales y funcionales llevados a cabo

- 
- <sup>122</sup> a) V. S. Chambers, G. Marsico, J. M. Boutell, M. Di Antonio, G. P. Smith, S. Balasubramanian, *Nat. Biotechnol.* **2015**, 33, 877–881; b) G. Marsico, V. S. Chambers, A. B. Sahakyan, P. McCauley, J. M. Boutell, M. D. Antonio, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, 3862–3874; c) J. Spiegel, S. Adhikari, S. Balasubramanian, *Trends Chem* **2020**, 2, 123–136.
- <sup>123</sup> a) R. Hänsel-Hertsch, D. Beraldi, S. V. Lensing, G. Marsico, K. Zyner, A. Parry, M. Di Antonio, J. Pike, H. Kimura, M. Narita, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Genet.* **2016**, 48, 1267–1272; b) R. Hänsel-Hertsch, J. Spiegel, G. Marsico, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Protoc.* **2018**, 13, 551–564.
- <sup>124</sup> a) A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 11593–11598; b) L. Anders, M. G. Guenther, J. Qi, Z. P. Fan, J. J. Marineau, P. B. Rahl, J. Lovén, A. A. Sigova, W. B. Smith, T. I. Lee, J. E. Bradner, R. A. Young, *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 92–96; c) Q. Li, J.-F. Xiang, Q.-F. Yang, H.-X. Sun, A.-J. Guan, Y.-L. Tang, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 41, D1115–D1123; d) D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 627–636; e) K. D. Warner, C. E. Hajdin, K. M. Weeks, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, 17, 547–558.
- <sup>125</sup> a) H.-Y. Liu, Q. Zhao, T.-P. Zhang, Y. Wu, Y.-X. Xiong, S.-K. Wang, Y.-L. Ge, J.-H. He, P. Lv, T.-M. Ou, J.-H. Tan, D. Li, L.-Q. Gu, J. Ren, Y. Zhao, Z.-S. Huang, *Cell Chem Biol* **2016**, 23, 1261–1270; b) C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 8572–8577.
- <sup>126</sup> a) L. T. Gray, A. C. Vallur, J. Eddy, N. Maizels, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 313; b) K. Paeschke, J. A. Capra, V. A. Zakian, *Cell* **2011**, 145, 678–691; c) M. Sauer, K. Paeschke, *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, 45, 1173–1182; d) R. Tippana, H. Hwang, P. L. Opreko, V. A. Bohr, S. Myong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113, 8448–8453.
- <sup>127</sup> a) S. Cogoi, M. Paramasivam, B. Spolaore, L. E. Xodo, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 3765–3780; b) V. González, K. Guo, L. Hurley, D. Sun, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 23622–23635; c) E.-A. Raiber, R. Kranaster, E. Lam, M. Nikan, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 1499–1508.
- <sup>128</sup> Y. Kanoh, S. Matsumoto, R. Fukatsu, N. Kakusho, N. Kono, C. Renard-Guillet, K. Masuda, K. Iida, K. Nagasawa, K. Shirahige, H. Masai, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22, 889–897.

han proporcionado una visión amplia de las interacciones G4-proteína y han puesto de manifiesto la potencial participación de los G4s en una gran variedad de procesos biológicos.<sup>129</sup>

### Estructura de los G-cuadruplejos

Las unidades fundamentales de los G-cuadruplejos son las tétradas coplanares de guaninas, que surgen de la asociación de cuatro guaninas en una disposición cíclica que se mantienen unidas a través de enlaces de hidrógeno de tipo Hoogsteen. En las tétradas, cada guanina establece dos enlaces de hidrógeno con sus bases vecinas ( $N^1-O^6$  y  $N^2-N^7$ ) y, además, las tétradas se apilan unas sobre otras, dando lugar a estructuras tridimensionales en donde el número de tétradas es el que define la altura de los cuadruplejos. Los apilamientos de G-tétradas se estabilizan a través de la coordinación de cationes metálicos a los  $O^6$  de las guaninas, que se disponen en el canal central, con preferencia estabilizadora por cationes monovalentes en el orden  $K^+ > Na^+ > Li^+$ . Los G-cuadruplejos, presentan una estructura helicoidal dextrógira, con un ángulo de giro de  $30^\circ$  y un diámetro de 25 Å. Los esqueletos de polifosfatos de las cadenas de ADN (o el esqueleto, en el caso de G4s monocatenarios) generan cuatro surcos en los que se pueden acomodar moléculas de agua.

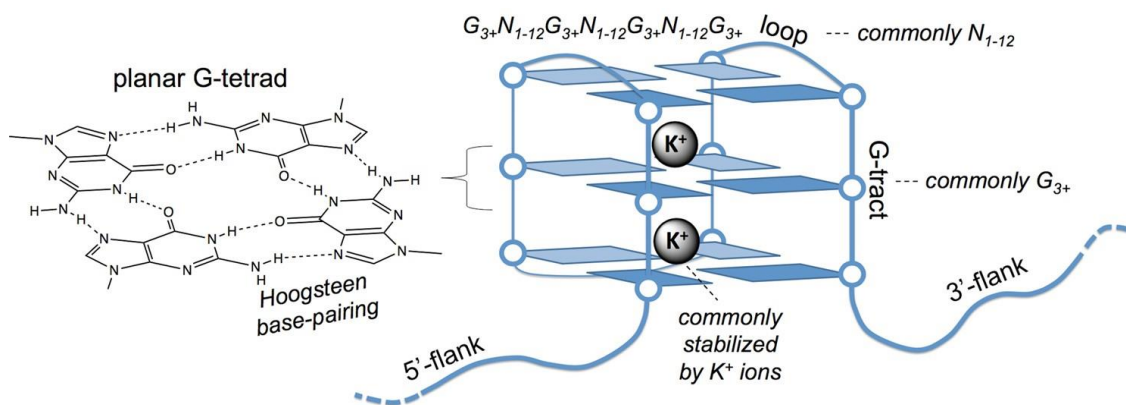


Figura 11: Representación esquemática de un G-cuadruplejo (G4) en el ADN, junto con una secuencia común utilizada para identificar tales estructuras. Adaptada de A. B. Sahakyan, V. S. Chambers, G. Marsico, T. Santner, M. Di Antonio, S. Balasubramanian, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 14535.

Los G4s pueden clasificarse en función del número de cadenas de ADN que los constituyen. Así, si están formados por el plegamiento de una única cadena de ADN se denominarán G4s intramoleculares, mientras que si se generan por el ensamblaje de dos o más cadenas se denominarán G4s intermoleculares. Además,

<sup>129</sup> S. K. Mishra, A. Tawani, A. Mishra, A. Kumar, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 38144.

dependiendo de la orientación relativa de las cadenas de ADN, así como de la naturaleza de los conectores existentes entre secuencias de cuatro guaninas consecutivas en una misma cadena de ADN (G-tracks), los G4s pueden adoptar una amplia diversidad de topologías (paralelos, antiparalelos, híbridos de paralelo y antiparalelo, etc.)<sup>130,131</sup> La longitud y la naturaleza de los conectores entre G-tracks tiene un papel fundamental en la estabilidad y en la topología de los G4s.

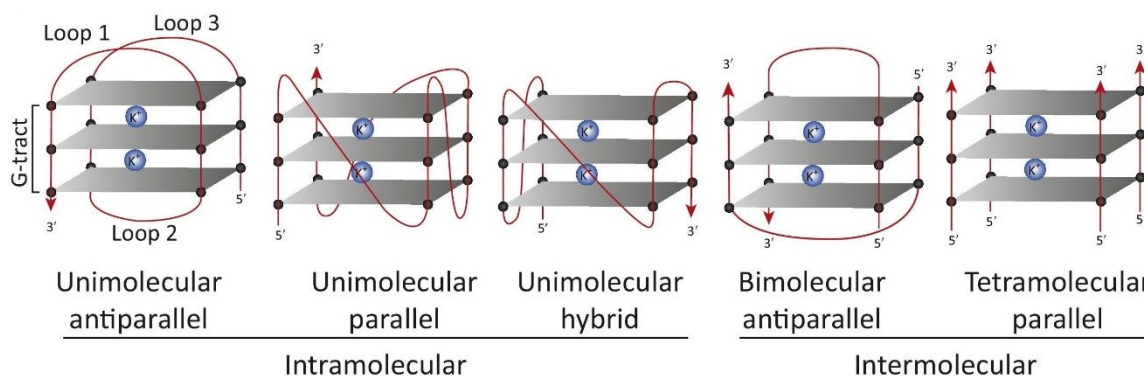


Figura 12: Topologías representativas de los G-cuadruplejes. Adaptada con permisos de la referencia 220.

### Agentes de unión a G-cuadruplejes basados en complejos metálicos en terapia anticáncer

Los G4s como diana biológica en terapia anticáncer

Existen numerosas evidencias que sugieren que los G4s juegan un papel crucial en la extensión de los telómeros mediada por la telomerasa (provocando el crecimiento de las células cancerígenas),<sup>118</sup> la replicación<sup>132</sup> e inestabilidad genómica.<sup>133</sup> Además, se sabe que existe un mayor número de G4s en células cancerígenas que en sanas,<sup>121,123</sup> lo que convierte a estas estructuras secundarias

<sup>130</sup> a) D. J. Patel, A. T. Phan, V. Kuryavyi, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 7429–7455; b) S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5402–5415; c) A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray, J. O. Trent, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 5482–5515.

<sup>131</sup> M. Webba da Silva, M. Trajkovski, Y. Sannohe, N. Ma'ani Hessari, H. Sugiyama, J. Plavec, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 9167–70.

<sup>132</sup> J. Lopes, A. Piazza, R. Bermejo, B. Kriegsman, A. Colosio, M.-P. Teulade-Fichou, M. Foiani, A. Nicolas, *EMBO J.* **2011**, 30, 4033–4046.

<sup>133</sup> C. Ribeyre, J. Lopes, J.-B. Boulé, A. Piazza, A. Guédin, V. A. Zakian, J.-L. Mergny, A. Nicolas, *PLoS Genet.* **2009**, 5, e1000475.

del ADN en una diana terapéutica muy interesante para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos.<sup>134</sup>

Los telómeros son secuencias de ADN no codificante que se localizan en los extremos de los cromosomas y cuya función es proteger su integridad estructural, asegurando la correcta división celular.<sup>135</sup> Se sabe que las células nuevas tienen los telómeros más largos y que estos se van acortando a medida que las células se dividen. Este hecho tiene lugar debido a que las polimerasas no pueden copiar el extremo 5' de las cadenas de ADN durante el proceso de replicación, ya que necesitan la presencia de un primer de ARN en esa misma posición. En consecuencia, la longitud de los telómeros se va acortando tras cada división celular y, cuando alcanza un cierto límite, el proceso de división se ve interrumpido, lo que marca el inicio de la muerte celular programada.

Sin embargo, las células poseen una enzima denominada *telomerasa*,<sup>136</sup> cuya función es la de alargar los telómeros utilizando un ARN interno como plantilla. Esta enzima es funcional en células germinales, en tejidos fetales y en ciertas células madre, pero está reprimida en las células maduras tras el nacimiento. En las células cancerígenas la telomerasa se encuentra activada y por encima está sobreexpresada, ya que es uno de los mecanismos que utilizan para superar el límite de la división celular y, por lo tanto, para evitar la muerte programada. Desde hace algunos años esta enzima se ha convertido en una nueva diana terapéutica contra el cáncer, ya que aquellos fármacos capaces de reducir la actividad de la telomerasa poseen potencial capacidad para detener el crecimiento de las células malignas.<sup>130a, 137</sup> Como hemos indicado anteriormente, los telómeros contienen repeticiones de la secuencia TTAGGG, que se ensambla espontáneamente en estructuras de G4s. De hecho, la generación de estas estructuras de G4s teloméricas forman parte del mecanismo celular que inhibe la acción de la telomerasa. Por ello, los agentes de unión a G4s, o ligandos-G4, que son moléculas pequeñas capaces de estabilizar este tipo de estructuras secundarias del ADN, son candidatos ideales para su desarrollo como fármacos

---

<sup>134</sup> J. Spiegel, S. Adhikari, S. Balasubramanian, *Trends Chem* **2020**, 2, 123–136.

<sup>135</sup> E. H. Blackburn, *Nature* **1991**, 350, 569.

<sup>136</sup> M. O'Reilly, S. A. Teichmann, D. Rhodes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 56.

<sup>137</sup> a) J.-L. Mergny, J.-F. Riou, P. Mailliet, M.-P. Teulade-Fichou, E. Gilson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 839; b) S. Neidle, G. H. Parkinson, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, 1, 383; c) L. Oganessian and T. M. Bryan, *Bioessays* **2007**, 29, 155.

anticancerígenos. En los últimos años se han publicado muchos ejemplos relacionados con esta estrategia.<sup>138</sup>

Otra de las estrategias estudiadas y que ha obtenido resultados muy prometedores es la estabilización con moléculas pequeñas de estructuras de G4s localizadas en los promotores de genes individuales implicados en la progresión del cáncer (protooncogenes como KRAS,<sup>139</sup> c-myc<sup>124, 140</sup> o c-kit<sup>141</sup>) con el objetivo de regular su actividad transcripcional.<sup>142</sup> Además, muy recientemente se han diseñado agentes de unión capaces de unirse a varias secuencias promotoras de G4s a la vez y, por lo tanto, de regular la transcripción de diversos protooncogenes al mismo tiempo.<sup>143</sup> Esta estrategia polifarmacológica es muy interesante, ya que implica el diseño de fármacos capaces de alterar simultáneamente diversas rutas implicadas en la progresión del cáncer. En principio, este tipo de fármacos poseen potenciales de eficacia más altos en comparación con aquellos que son selectivos de una única diana biológica.

### Complejos metálicos como agentes de unión a G-cuadruplejos

El **cisplatino** y sus derivados son unos de los agentes anticancerígenos más efectivos para el tratamiento de cáncer testicular y de ovario desde su aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso clínico en 1978.<sup>144</sup> Sin embargo, este tipo de complejos metálicos poseen efectos secundarios importantes como nefrotoxicidad y ototoxicidad. Además, se sabe que las células

---

<sup>138</sup> a) S. Asamitsu, S. Obata, Z. Yu, T. Bando, H. Sugiyama, *Molecules* **2019**, 24; b) S. Neidle, *Nature Reviews Chemistry* **2017**, 1, 0041; c) S. Shi, S. Gao, T. Cao, J. Liu, X. Gao, J. Hao, C. Lv, H. Huang, J. Xu, T. Yao, *PLoS One* **2013**, 8, e84419.

<sup>139</sup> S. Cogoi, L. E. Xodo, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 2536–2549.

<sup>140</sup> T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1167–72.

<sup>141</sup> a) S. Rankin, A. P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G. N. Parkinson, A. K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10584–89; b) H. Fernando, A. P. Reszka, J. Huppert, S. Ladame, S. Rankin, A. R. Venkitaraman, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Biochemistry* **2006**, 45, 7854–60.

<sup>142</sup> J. Seenisamy, E. M. Rezler, T. J. Powell, D. Tye, V. Gokhale, C. S. Joshi, A. Siddiqui-Jain and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8702–09.

<sup>143</sup> C. Marchetti, K. G. Zyner, S. A. Ohnmacht, M. Robson, S. M. Haider, J. P. Morton, G. Marsico, T. Vo, S. Laughlin-Toth, A. A. Ahmed, G. Di Vita, I. Pazitna, M. Gunaratnam, R. J. Besser, A. C. G. Andrade, S. Diocou, J. A. Pike, D. Tannahill, R. B. Pedley, T. R. J. Evans, W. D. Wilson, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 2500–2517.

<sup>144</sup> B. Lippert, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, John Wiley & Sons, **1999**.

tumorales desarrollan resistencia contra este tipo de fármacos. El cisplatino y derivados interactúan con el ADN de tal modo que procesos como la transcripción o traducción se vuelven disfuncionales, causando en última instancia la muerte celular, y la razón principal de sus efectos secundarios es que no distinguen entre células tumorales o sanas.<sup>145</sup> Desde el éxito clínico del cisplatino, el desarrollo de fármacos anticancerígenos basados en complejos metálicos ha experimentado un enorme auge, en particular en la búsqueda de nuevas dianas biológicas.<sup>146</sup>

Como hemos dicho anteriormente, el desarrollo de moléculas pequeñas capaces de estabilizar G4s como nuevos agentes anticancerígenos es actualmente un área de gran interés científico. En particular, la búsqueda de complejos metálicos como nuevos ligandos-G4 es especialmente interesante, debido a la combinación única de propiedades electrónicas y estructurales propias de este tipo de compuestos. Los agentes de unión a G4s deben poseer unas determinadas características para estabilizar estas estructuras secundarias de forma efectiva:

- Tener un sistema  $\pi$  deslocalizado que permita apilarse con las G-tétradas.
- Poseer una carga parcial positiva, de tal modo que esta pueda disponerse en el centro de las tétradas sustituyendo los iones de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ .
- Estar equipados con sustituyentes cargados positivamente capaces de interactuar con los surcos y los bucles de los G4s.

Algunas de las familias de complejos metálicos más importantes que actúan como agentes de unión a G-cuadruplejos son las metaloporfirinas,<sup>147</sup> metalocorroles,<sup>148</sup>

---

<sup>145</sup> Y.-P. Ho, S. C. F. Au-Yeung, K. K. W. To, *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 633–655.

<sup>146</sup> P. C. A. Bruijninx, P. J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 197–206.

<sup>147</sup> a) E. Izbicka, R. T. Wheelhouse, E. Raymond, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, D. Sun, B. E. Windle, L. H. Hurley, D. D. Von Hoff, *Cancer Res.* **1999**, 59, 639–644.; b) D.-F. Shi, R. T. Wheelhouse, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4509–4523.

<sup>148</sup> a) I. H. Wasbotten, T. Wondimagegn, A. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8104–8116; b) Z. Gershman, I. Goldberg, Z. Gross, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4320–4324; c) B. Fu, D. Zhang, X. Weng, M. Zhang, H. Ma, Y. Ma, X. Zhou, *Chemistry - A European Journal* **2008**, 14, 9431–9441.

metalophtalatocianinas,<sup>149</sup> metalosalfenos y metalosalenos,<sup>150</sup> complejos derivados de bipyridinas y fenantrolinas<sup>151,153a, c, d</sup> y de terpiridinas.<sup>152</sup>

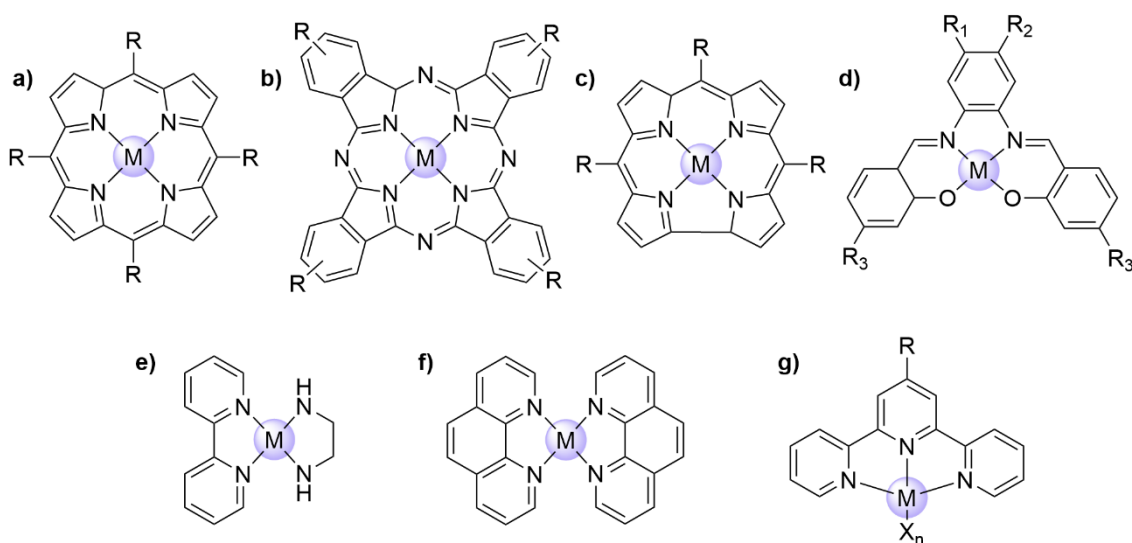


Figura 13: Familias de agentes de unión a G-cuadruplejos más relevantes, a) metaloporfirina, b) metalophtalatocianinas, c) metalocorroles, d) metalosalfenos, e) derivados de 2,2'-bipiridina, f) derivados de fenantrolina y g) derivados de terpiridina.

<sup>149</sup> a) D. P. N. Gonçalves, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **2006**, 4685–4687; b) L. Zhang, J. Huang, L. Ren, M. Bai, L. Wu, B. Zhai, X. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 303–312; c) J. Alzeer, B. R. Vummidi, P. J. C. Roth, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, 48, 9362–9365.; d) A. Membrino, M. Paramasivam, S. Cogoi, J. Alzeer, N. W. Luedtke, L. E. Xodo, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 625–627.

<sup>150</sup> a) S. S. Mandal, U. Varshney, S. Bhattacharya, *Bioconjug. Chem.* **1997**, 8, 798–812; b) J. G. Muller, L. A. Kayser, S. J. Paikoff, V. Duarte, N. Tang, R. J. Perez, S. E. Rokita, C. J. Burrows, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 185-186, 761–774; c) J. E. Reed, A. A. Arnal, S. Neidle, R. Vilar, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5992–5993.

<sup>151</sup> a) R. Kieltyka, J. Fakhoury, N. Moitessier, H. F. Sleiman, *Chem. Eur J.* **2008**, 14, 1145–1154; b) S. E. Pierce, R. Kieltyka, H. F. Sleiman, J. S. Brodbelt, *Biopolymers* **2009**, 91, 233–243; c) J.-T. Wang, X.-H. Zheng, Q. Xia, Z.-W. Mao, L.-N. Ji, K. Wang, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 7214–7216; d) K. Suntharalingam, D. Gupta, P. J. Sanz Miguel, B. Lippert, R. Vilar, *Chemistry* **2010**, 16, 3613–3616.

<sup>152</sup> a) H. Bertrand, D. Monchaud, A. De Cian, R. Guillot, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2555; b) P. Wang, C.-H. Leung, D.-L. Ma, S.-C. Yan, C.-M. Che, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 6900–6911; c) E. Largy, F. Hamon, F. Rosu, V. Gabelica, E. De Pauw, A. Guédin, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 13274–13283; d) C. Wei, L. Ren, N. Gao, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 57, 1–8.

Por otro lado, en los complejos metálicos equipados con ligandos  $\pi$ -deslocalizados que contienen átomos dadores de nitrógeno (como, por ejemplo, fenantrolinas, bipyridinas, terpidiridinas, salfenos o derivados de éstos), los heteroátomos actúan como grupos que retiran carga, de tal modo que el sistema  $\pi$  de los ligandos es deficiente en electrones, incrementando así las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  con las tétradas de guanina de los G4s. Se han realizado estudios comparativos que demuestran que los complejos metálicos equipados con ligandos con una superficie  $\pi$  extendida interaccionan más fuertemente con los G4s.<sup>151c, 153</sup>

### Modos de unión de los agentes de reconocimiento de G4s

Los complejos metálicos pueden unirse a los G-cuadruplejos de distintas formas en función de su estructura y de las propiedades químicas de los ligandos y del centro metálico. Los posibles modos de unión que pueden presentar son los siguientes:

- **Apilamiento  $\pi$ :** este modo de unión es uno de los mejor estudiados.<sup>130, 154</sup> Se basa en la interacción  $\pi$  que tiene lugar entre ligandos planares que forman parte del complejo y las nucleobases de la tétrada. El apilamiento puede producirse tanto en la parte superior como en la inferior del cuadruplejo. En dominios que contienen más de una unidad de cuadruplejo se pueden formar superestructuras de tipo “sándwich” entre dos unidades de G4s y un ligando planar del complejo metálico.<sup>155</sup> Los primeros agentes de reconocimiento de G4 con este modo de unión fueron una familia de metaloporfirinas capaces de apilarse terminalmente a G4s de manera similar a como lo hacen las porfirinas.<sup>156</sup>
- **Reconocimiento del surco:** ciertas moléculas flexibles no planares pueden insertarse en los surcos laterales de los G4s.

<sup>153</sup> a) R. Kieltyka, J. Fakhoury, N. Moitessier, H. F. Sleiman, *Chemistry* **2008**, 14, 1145–1154; b) J. Talib, C. Green, K. J. Davis, T. Urathamakul, J. L. Beck, J. R. Aldrich-Wright, S. F. Ralph, *Dalton Trans.* **2008**, 1018–1026; c) S. E. Pierce, R. Kieltyka, H. F. Sleiman, J. S. Brodbelt, *Biopolymers* **2009**, 91, 233–243; d) K. J. Castor, J. Mancini, J. Fakhoury, N. Weill, R. Kieltyka, P. Englebienne, N. Avakyan, A. Mittermaier, C. Autexier, N. Moitessier, H. F. Sleiman, *ChemMedChem* **2012**, 7, 85–94.

<sup>154</sup> S. Neidle, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 239–250.

<sup>155</sup> a) G. W. Collie, S. Sparapani, G. N. Parkinson, S. Neidle, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 2721–2728; b) N. H. Campbell, G. N. Parkinson, A. P. Reszka, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6722–6724; c) Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, 48, 7833–7836.

<sup>156</sup> G. N. Parkinson, R. Ghosh, S. Neidle, *Biochemistry* **2007**, 46, 2390–2397.

- **Metalación:** este modo de unión es característico de complejos metálicos equipados con uno o varios ligandos lábiles (Cl, H<sub>2</sub>O, etc.) que favorece la coordinación directa del ion metálico a los heteroátomos de las nucleobases, en mayor medida el N7 de las guaninas, por ser el más nucleófilo. Puede tener lugar en una única posición del ADN o en varias dando lugar a entrecruzamiento de nucleobases.<sup>157</sup>
- **Interacción electrostática:** se puede producir interacción electrostática entre el complejo metálico cargado positivamente y el esqueleto de polifosfatos polianiónico de los G4s. Este tipo de interacción es de tipo no específico.<sup>158</sup>
- **Intercalación:** este es uno de los modos de unión más difíciles de obtener no solo porque la estructura del cuadruplejo sea extremadamente estable y rígida si no que, además, la distorsión de la estructura del cuadruplejo requiere un alto coste energético en comparación con los otros modos de unión.<sup>159</sup>

---

<sup>157</sup> S. Redon, S. Bombard, M.-A. Elizondo-Riojas, J.-C. Chottard, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 1605–1613.

<sup>158</sup> S. Lusvarghi, C. T. Murphy, S. Roy, F. A. Tanius, I. Sacui, W. David Wilson, D. H. Ly, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18415–18424.

<sup>159</sup> T.-M. Ou, Y.-J. Lu, J.-H. Tan, Z.-S. Huang, K.-Y. Wong, L.-Q. Gu, *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* **2008**, 3, 690–713.

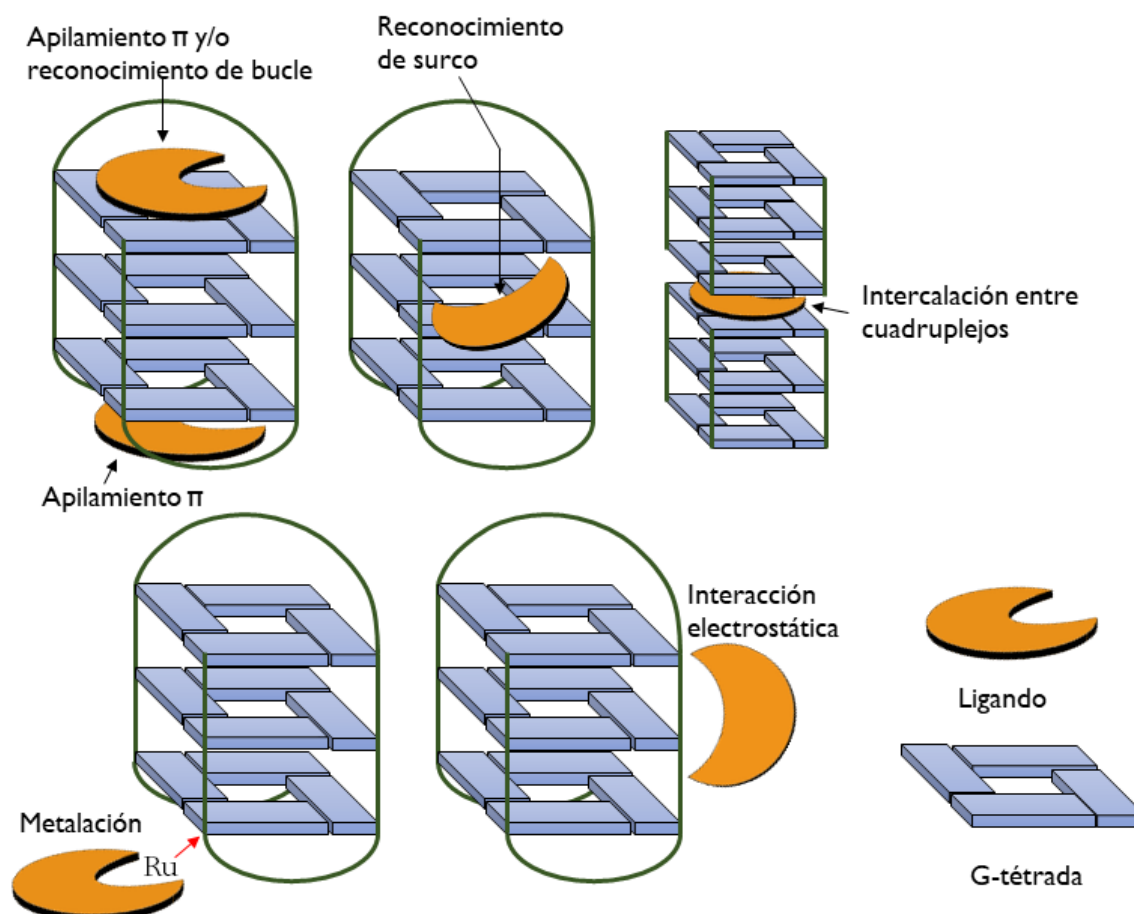


Figura 14: Modos de unión de los ligandos al ADN G-cuadruplejo. Adaptado con permiso de E. Largy, A. Granzhan, F. Hamon, D. Verga, M.-P. Teulade-Fichou, in *Quadruplex Nucleic Acids* (Eds.: J.B. Chaires, D. Graves), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**, pp. 111–177.

Existe además un modo de unión dual el cual combina las características de la unión covalente (a través del centro metálico) y el apilamiento  $\pi$  (mediante una cadena lateral flexible unida al complejo metálico capaz de interactuar con las nucleobases del ADN).<sup>147d</sup> El grupo de M.-P. Teulade-Fichou sintetizó un complejo de Pt equipado con una cadena lateral flexible que contenía una quinacridina (mono-*para*-quinacridina o MPQ). Este complejo es capaz de apilarse sobre un extremo del G4, permitiendo así la interacción del centro de Pt con la guanina (2 o 22, dependiendo de la topología del G4) del extremo opuesto (Figura 15).

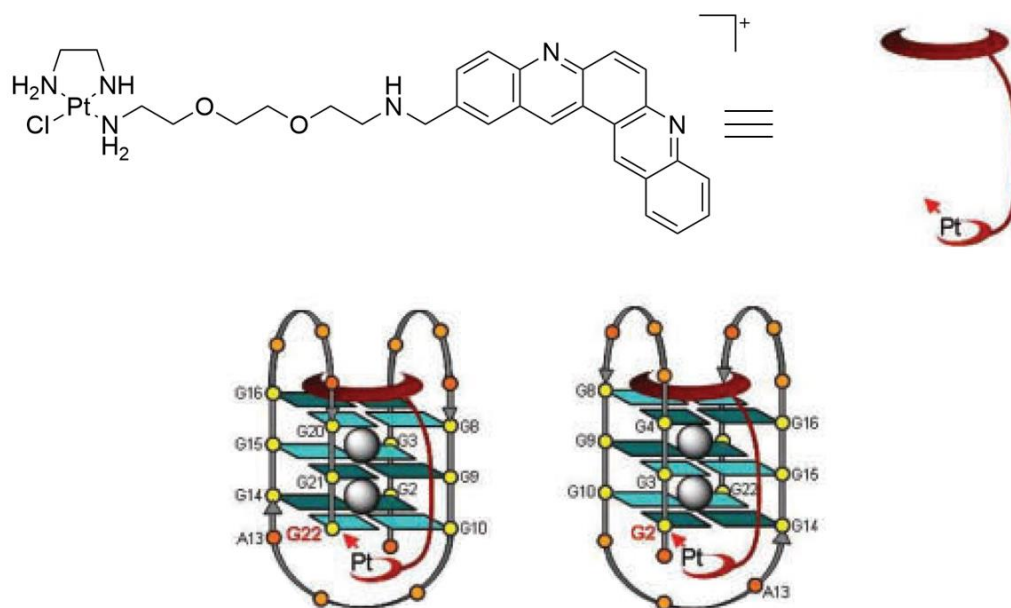


Figura 15: Ejemplo me modo de unión dual. Adaptada con permisos de la referencia 147d

### Ventajas de los complejos metálicos sobre las moléculas orgánicas como agentes de unión a G4s

El uso de complejos metálicos como agentes de unión a G-cuadruplejos es un campo de investigación que ha adquirido un gran interés en los últimos años debido a que se ha demostrado que este tipo de compuestos interactúan de manera fuerte y selectiva con los G4s.<sup>160</sup> Las principales ventajas de los complejos metálicos frente a las moléculas orgánicas pequeñas es que su síntesis es más sencilla y que se puede controlar la geometría de coordinación de los complejos (plana, octaédrica, piramidal tetragonal, etc) a través de la selección cuidadosa de los centros metálicos y de los ligandos. Esta versatilidad geométrica es muy importante debido a que con ella se puede acceder a una gran variedad de modos de unión. Las moléculas planares favorecen la interacción por apilamiento  $\pi$  con los G-cuartetos o por intercalación entre las tétradas, mientras que otras geometrías y estructuras favorecen otros modos de unión, como el reconocimiento de los surcos o a de los bucles, la interacción electrostática o la coordinación directa (metalación).

<sup>160</sup> a) S. N. Georgiades, N. H. Abd Karim, K. Suntharalingam, R. Vilar, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, 49, 4020–4034; b) J. Zhang, F. Zhang, H. Li, C. Liu, J. Xia, L. Ma, W. Chu, Z. Zhang, C. Chen, S. Li, S. Wang, *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 2957–2975.

Por otro lado, los iones metálicos y los ligandos pueden proporcionar propiedades catiónicas a los complejos, una característica que favorece una interacción electrostática más fuerte con el ADN y una mayor permeabilidad celular. Además, dependiendo del ión metálico seleccionado, los complejos pueden sumar a sus habilidades anticancerígenas otro tipo de características útiles desde un punto de vista biológico, como determinadas propiedades ópticas, magnéticas o catalíticas. Por ejemplo, los complejos polipiridínicos de Ru(II) o de Ir(III) presentan grandes desplazamientos de Stokes,<sup>161</sup> altos rendimientos cuánticos,<sup>162</sup> luminiscencia de larga duración<sup>161</sup> y buena fotoestabilidad que permiten estudiar su comportamiento en células vivas a tiempo real, lo que los convierte en candidatos ideales para el diseño de agentes teranósticos.<sup>163</sup> Todas estas propiedades únicas convierten a los complejos metálicos en candidatos ideales para el desarrollo de nuevos agentes de reconocimiento de G4s.<sup>160a</sup>

### **Complejos metálicos octaédricos equipados con ligandos planos como agentes de unión a G4s**

Los complejos de rutenio se han estudiado de manera exhaustiva como alternativa a los agentes anticancerígenos de platino debido a sus propiedades de unión al ADN y a su actividad biológica.<sup>164</sup>

En concreto, los complejos polipiridínicos de Ru(II)<sup>165</sup> poseen geometría de coordinación octaédrica y, debido a su inercia cinética, ofrecen la posibilidad de combinar diferentes ligandos en torno a centro metálico, por lo que son sistemas ideales para, a través de su cuidadosa selección y combinación, modular su afinidad, selectividad y modo de unión al ADN.<sup>166</sup> Los complejos polipiridínicos de Ru(II) también son muy interesantes debido a sus propiedades fotoluminiscentes, fotoeléctricas, electroluminiscentes y como generadores de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas propiedades habilitan

---

<sup>161</sup> a) S. Ji, H. Guo, X. Yuan, X. Li, H. Ding, P. Gao, C. Zhao, W. Wu, W. Wu, J. Zhao, *Org. Lett.* **2010**, 12, 2876–2879; b) N. P. Cook, V. Torres, D. Jain, A. A. Martí, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11121–11123.

<sup>162</sup> J. R. Lakowicz, G. Piszczek, J. S. Kang, *Anal. Biochem.* **2001**, 288, 62–75.

<sup>163</sup> G. Li, L. Sun, L. Ji, H. Chao, *Dalton Trans.* **2016**, 45, 13261–13276.

<sup>164</sup> A. Levina, A. Mitra, P. A. Lay, *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 1085–1107.

<sup>165</sup> a) B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. K. Barton, *Chem. Commun.* **2007**, 4565–4579; b) H.-K. Liu, P. J. Sadler, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 349–359; c) B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright, J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.* **2015**, 44, 3505–3526.

<sup>166</sup> a) F. R. Keene, J. A. Smith, J. G. Collins, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2021–2035; b) M. R. Gill, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3179–3192.

## Capítulo 1

el uso de estos complejos en numerosas aplicaciones que abarcan desde el marcado biomolecular luminiscente hasta su uso en terapias.<sup>167</sup>

El ejemplo paradigmático de esta familia de complejos es  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ , sintetizado por el grupo de J. K. Barton en el año 1990.<sup>168</sup> En disoluciones acuosas y a temperatura ambiente este complejo no muestra emisión de fluorescencia, debido a que las moléculas de agua la extinguen al establecer enlaces de hidrógeno con los átomos de nitrógeno no coordinados del ligando dppz. Sin embargo, en presencia de ADN-B la fluorescencia del sistema revive, al acomodarse el ligando dppz dentro del ambiente hidrofóbico del ADN. En otras palabras, este complejo se comporta como un interruptor de luz de ADN (DNA light-switch).



<sup>167</sup> a) B. Elias, A. Kirsch-De Mesmaeker, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 1627–1641; b) A. D. Richards, A. Rodger, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 471–483.

<sup>168</sup> A. E. Friedman, J. C. Chambron, J. P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4960–4962.

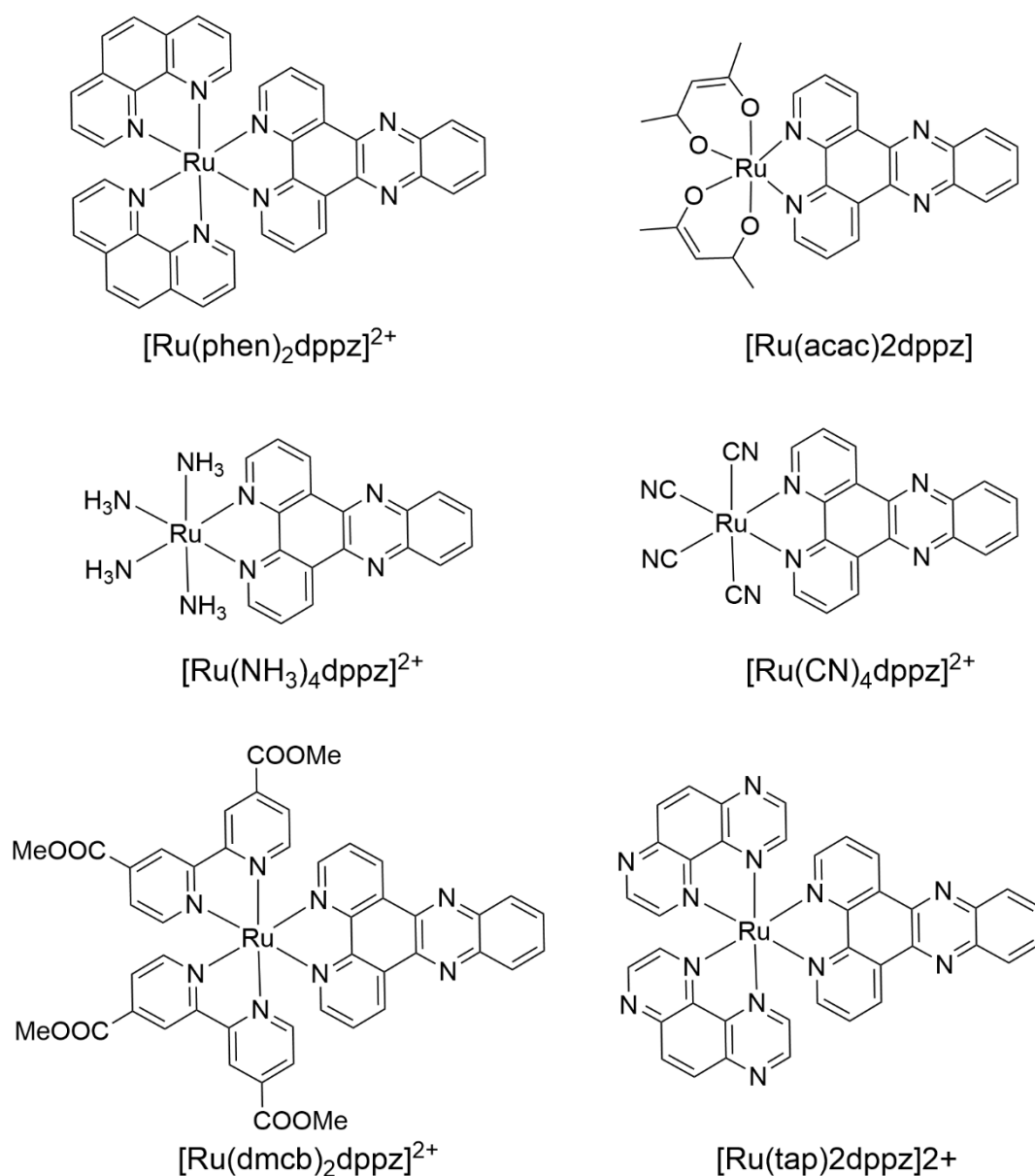


Figura 16: a) Estructura de complejos de Ru(II) equipados con el ligando dppz y diversos ligandos auxiliares. Adaptada con permisos de la referencia 163.

También se ha estudiado la capacidad de los complejos polipiridínicos de Ru(II) derivados del ligando dppz como agentes de unión a G4s, debido a la forma plana  $\pi$ -extendida del ligando dppz. Sin embargo, la afinidad y la selectividad de estos complejos por estas estructuras secundarias es bastante débil y la estabilización de los G4s no es la esperada. Una posible vía para mejorar estas propiedades es la funcionalización de los ligandos polipiridínicos. Por ejemplo, el complejo sintetizado por J.-L. Yao et al,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz-izdo}]^{2+}$ , presenta un sustituyente de imidazolona en el ligando dppz que le confiere al complejo de rutenio un efecto notable de light switch de G4 en disolución tamponada conteniendo  $\text{K}^+$  y, además,

una potente capacidad para inducir y estabilizar la formación de G4 antiparalelos en presencia de iones metálicos alcalinos.<sup>169</sup>

Chao et al.<sup>170</sup> sintetizaron dos complejos polipiridilo de Ru(II) en los cuales el ligando dppz estaba modificado con una amina cíclica flexible. Estos complejos demostraron ser capaces de unirse a los G4 y estabilizarlos, exhibiendo un efecto inhibitor dependiente de la concentración ( $IC_{50}$ ) en la actividad telomerasa de entre 100-500 nM. De manera similar, el grupo de L.-N. Ji sintetizó dos complejos de Ru(II) equipados con dos ligandos dppz y una bipyridina modificada con dos aminas cuaternarias, que exhibían una fuerte capacidad de estabilización de G4 en comparación con el complejo clásico  $[Ru(dppz)(bpy)_2]^{2+}$ , incrementando la temperatura de fusión del G4 entre 7-9.4 °C.<sup>171</sup>

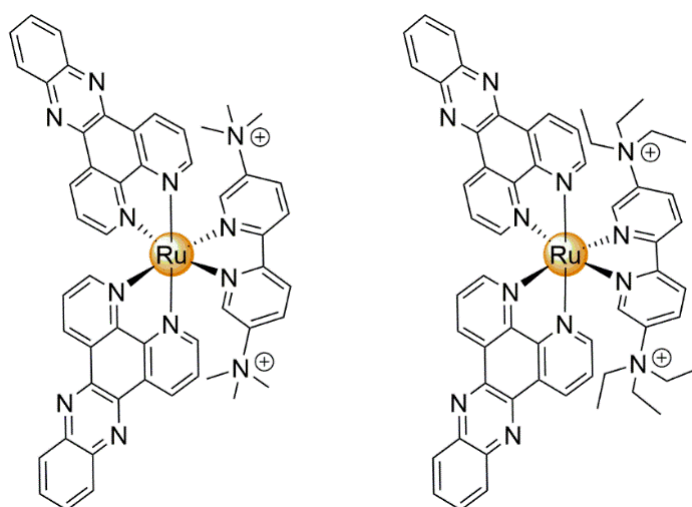


Figura 17: Complejos de Ru(II) sintetizados en el grupo de L.-N. Ji equipados con una bipyridina con dos amonios cuaternarios.<sup>171</sup>

### Ligandos peptídicos como precursores de complejos metálicos bioactivos

La descripción del ADN-B (su estructura y función) así como los modos de unión de los agentes de reconocimiento del ADN-B basados en complejos metálicos se hará en el capítulo 2.

<sup>169</sup> J.-L. Yao, X. Gao, W. Sun, S. Shi, T.-M. Yao, Dalton Trans. **2013**, 42, 5661.

<sup>170</sup> G. Liao, X. Chen, J. Wu, C. Qian, H. Wang, L. Ji, H. Chao, Dalton Trans. **2014**, 43, 7811.

<sup>171</sup> J. Sun, Y. An, L. Zhang, H.-Y. Chen, Y. Han, Y.-J. Wang, Z.-W. Mao, L.-N. Ji, J. Inorg. Biochem. **2011**, 105, 149–154.

Existen numerosos artículos de revisión que abordan el tema de los complejos metálicos como agentes de unión al ADN desde diferentes puntos de vista.<sup>172, 173</sup> Sin embargo, el uso de **metalopéptidos** en esta área es mucho menos frecuente.<sup>174</sup> Una de las particularidades de los metalopéptidos es que, en principio, tanto los complejos metálicos como los dominios peptídicos pueden actuar simultáneamente como elementos de unión al ADN.

Existen en la literatura numerosos ejemplos basados en agentes clásicos de unión al ADN derivados de complejos metálicos, como  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ,<sup>168</sup> y funcionalizados con diferentes motivos peptídicos, combinando así las propiedades de ambos elementos estructurales.

Por otro lado, existen numerosos estudios basados en secuencias peptídicas naturales con propiedades de unión al ADN funcionalizados con ligandos quelatantes o complejos metálicos que complementan las propiedades inherentes de la secuencia peptídica. Un ejemplo de secuencias peptídicas naturales con propiedades de unión al ADN es la cremallera de leucinas básicas (bZIP), que son factores de transcripción específicos que se encargan de guiar a las ARN polimerasas hacia promotores determinados.<sup>175</sup>

---

<sup>172</sup> a) J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2009, 1303–1312; b) L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7, 573–584; c) R. W.-Y. Sun, D.-L. Ma, E. L.-M. Wong, C.-M. Che, *Dalton Trans.* **2007**, 4884–4892.

<sup>173</sup> a) J. A. Smith, F. R. Keene, F. Li and J. G. Collins, in *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition)*, eds. J. Reedijk and K. Poeppelmeier, Elsevier, Amsterdam, **2013**, pp. 709–750; b) M. R. Gill, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3179–3192; c) I. Romero-Canelón, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 12276–12291.

<sup>174</sup> A. Myari and N. Hadjiliadis, in *Metal Complex–DNA Interactions*, eds. N. Hadjiliadis, E. Sletten, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2009**, pp. 347–367.

<sup>175</sup> P. Cramer, *Cell* **2019**, 179, 808–812.

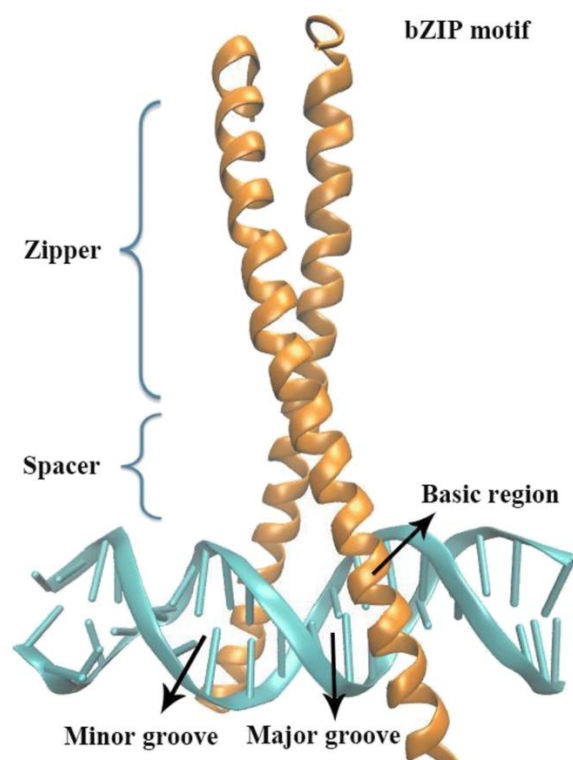


Figura 18: Representación de la estructura de una bZIP en su unión al ADN. Adaptada con permiso de Q. Li, L. Xiong, J. Gao, H.-Y. Zhang, *J. Mol. Model.* **2019**, 25, 246.

Dentro de las bZIP, el GCN4 es el factor de transcripción más estudiado. El grupo de P. S. Kim demostró en 1990 que parte de la secuencia peptídica del GCN4 se podía sustituir por un puente disulfuro manteniendo sus propiedades de unión al ADN.<sup>176</sup> Posteriormente el grupo de A. Schepartz publicó la dimerización de péptidos derivados de GCN4 por medio de complejos metálicos, demostrando que las diferentes geometrías de coordinación de los metales utilizados jugaban un papel clave en la orientación relativa de los fragmentos peptídicos y, por lo tanto, en sus propiedades de reconocimiento del ADN.<sup>177</sup> Posteriormente, el grupo de A. Peacock publicó el desarrollo de un dímero conectado a través de un complejo terpiridínico que contenía la secuencia mínima de GCN4 necesaria para permitir el reconocimiento del ADN.<sup>178</sup>

En el año 2000 el grupo de J. Reedijk describió por primera vez la aplicación de la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida para el ensamblaje de un

<sup>176</sup> R. V. Talanian, C. J. McKnight, P. S. Kim, *Science* **1990**, 249, 769–771

<sup>177</sup> a) B. Cuenoud, A. Schepartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1154–1159; b) C. R. Palmer, L. S. Sloan, J. C. Adrian, B. Cuenoud, D. N. Paolella, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8899–8907.

<sup>178</sup> E. Oheix, A. F. A. Peacock, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 2829–2839.

metalopéptido de Pt(II).<sup>179</sup> Esta metodología resulta muy interesante debido a que los metalopéptidos son completamente ensamblados en la resina y no necesitan de etapas previas de purificación, de tal forma que se obtienen mejores rendimientos. En 2015 el grupo de V. Marchán publicó la síntesis de un derivado del cisplatino anclado a un ciclo-octapéptido que presentaba una alta afinidad por el receptor GPCR sst<sub>2</sub> de la somatostatina, comúnmente sobreexpresado en células tumorales.<sup>180</sup> También publicaron la síntesis de un derivado de platino unido al motivo peptídico ciclo-(RGDFK),<sup>181</sup> el cual se dirige a los receptores de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , que aparecen sobreexpresados en tumores pulmonares de pecho, próstata, ovarios o cerebro.<sup>182</sup> Posteriormente, este mismo grupo publicó la síntesis de una serie de conjugados metalopéptidicos derivados de complejos arénicos de Ru(II) y Os(II), como  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{RuCl}(\text{imidazol-CO}_2\text{H})(\text{PPh}_3)]^+$ , algunos de los cuales mostraron una intensa actividad antiproliferativa frente a líneas celulares tumorales.<sup>183</sup>

### **Metalopéptidos artificiales derivados de 2,2'-bipiridina**

La 2,2'-bipiridina es uno de los ligandos más clásicos de la química de coordinación.<sup>184</sup> Sus complejos derivados suelen presentar altas constantes de asociación debido al efecto quelatante de los dos nitrógenos dadores y a la capacidad de la bipiridina de actuar como aceptor- $\pi$ .<sup>185</sup> La 2,2'-bipiridina (bpy) es una base de Lewis frontera, lo que implica que puede formar complejos estables con prácticamente todos los metales de transición, siendo algunos de ellos cinéticamente inertes y/o con propiedades fotofísicas interesantes. Por estas

<sup>179</sup> M. S. Robillard, A. R. Valentijn, N. J. Meeuwenoord, G. A. van Der Marel, J. H. van Boom, J. Reedijk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3096–3099.

<sup>180</sup> a) J. P. Hannon, C. Nunn, B. Stolz, C. Bruns, G. Weckbecker, I. Lewis, T. Troxler, K. Hurth, D. Hoyer, *J. Mol. Neurosci.* **2002**, 18, 15–27; b) A. Di Cianni, A. Carotenuto, D. Brancaccio, E. Novellino, J. C. Reubi, K. Beetschen, A. M. Papini and M. Ginanneschi, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 6188–6197.

<sup>181</sup> A. Massaguer, A. González-Cantó, E. Escribano, S. Barrabés, G. Artigas, V. Moreno, V. Marchán, *Dalton Trans.* **2015**, 44, 202–212.

<sup>182</sup> a) D. Arosio, C. Casagrande, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, **97**, 111–143; b) T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Zarka, U. Reuning, J. Notni, H.-J. Wester, C. Mas-Moruno, J. Spatz, B. Geiger, H. Kessler, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 39805.

<sup>183</sup> F. Barragán, D. Carrion-Salip, I. Gómez-Pinto, A. González-Cantó, P. J. Sadler, R. de Llorens, V. Moreno, C. González, A. Massaguer, V. Marchán, *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23, 1838–1855.

<sup>184</sup> W. W. Brandt, *Chem. Rev.* **1954**, 54, 959–1011.

<sup>185</sup> F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry* **1988**, John Wiley & Sons.

razones, la bpy es uno de los aminoácidos no naturales más utilizados en la construcción de metalopéptidos artificiales.

La bpy se puede funcionalizar con ácidos carboxílicos en distintas posiciones del anillo aromático de tal manera que se pueden obtener los correspondientes derivados mono- o disustituídos para hacerlos reaccionar con el extremo N-terminal de una secuencia peptídica cualquiera, aunque esta es también su mayor limitación. Para que la bpy pueda estar presente en cualquier posición de la secuencia peptídica es necesario echar mano del correspondiente derivado asimétrico en forma de aminoácido. Este tipo de residuos artificiales presentan importantes ventajas, como por ejemplo una mejor integración en la metodología SPPS o una mayor flexibilidad en el diseño de nuevos metalopéptidos.

- **Bipiridinas monosustituídas N-terminales:** la bpy se puede monofuncionalizar en cuatro posiciones distintas de sus anillos aromáticos con un ácido carboxílico de tal forma que la molécula se puede integrar fácilmente en el extremo N-terminal de cualquier secuencia peptídica a través de la metodología SPPS.<sup>186,187</sup> El grupo de Ghadiri publicó en el año 1992 uno de los primeros metalopéptidos derivados de este tipo de bipiridinas. En concreto sintetizaron un péptido de 15 residuos equipado con el derivado denominado 5Bpac (Figura 19) en el extremo N-terminal. Dicho péptido se encuentra desestructurado en disolución. Sin embargo, en presencia de iones metálicos divalentes como Fe(II), Ni(II) o Ru(II), el péptido adopta una estructura de hélice  $\alpha$  de triple hebra.<sup>188</sup>

---

<sup>186</sup> 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.

<sup>187</sup> 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.

<sup>188</sup> M. R. Ghadiri, C. Soares, C. Choi, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 825-831.

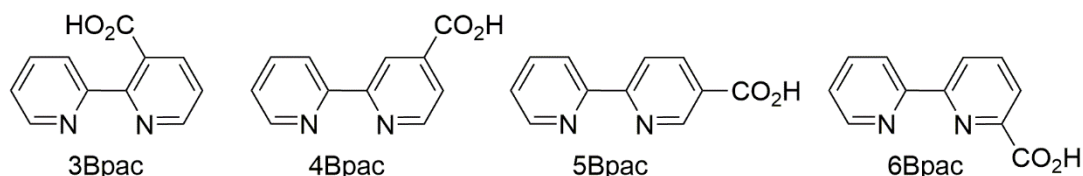


Figura 19: Derivados de la 2,2'-bipiridina monosustituída con un ácido carboxílico.

- Bipiridinas disustituídas N-terminales: las bipiridinas disustituídas con ácidos carboxílicos (Bpda) también han sido ampliamente usadas en química de coordinación y en la construcción de metalopéptidos artificiales. Existen numerosos ejemplos en bibliografía en los cuales los ligandos de tipo Bpda han sido usados como conectores o puentes entre dos cadenas peptídicas (a excepción de la 3,3'-bipiridina).<sup>189,190</sup> En 2010, nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo de J.-C. G. Bünzli, publicó la aplicación del ligando 5,5'-Bpda en la construcción de complejos heterometálicos de iones lantánidos y Ru(II).<sup>191</sup>

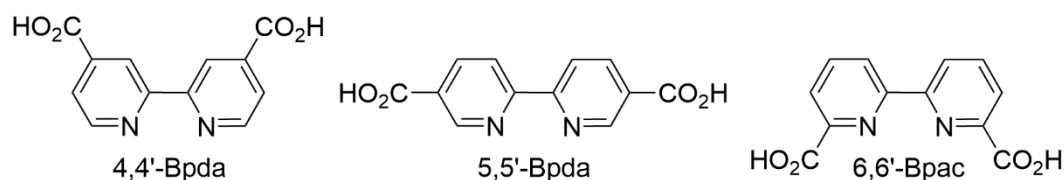


Figura 20: Derivados de la 2,2'-bipiridina disustituídos con ácidos carboxílicos.

- Bipiridinas como cadenas laterales de aminoácidos: la bpy se puede funcionalizar en las posiciones 4, 5 y 6 del anillo aromático de tal modo que se pueden

<sup>189</sup> 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. Heseck, 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.

<sup>190</sup> 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.

<sup>191</sup> 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.

obtener aminoácidos con una bpy en la cadena lateral.<sup>192</sup> Sin embargo, la síntesis estereoselectiva de este tipo de aminoácidos no es trivial, lo cual ha obstaculizado su aplicación en el diseño de nuevos metalopéptidos artificiales.<sup>193</sup> El grupo de B. Imperiali publicó en 1996 uno de los primeros ejemplos en donde se describe la síntesis y aplicación del 6Bpa para estabilizar estructuras de horquilla- $\beta$  a través de coordinación con metales.<sup>194</sup>

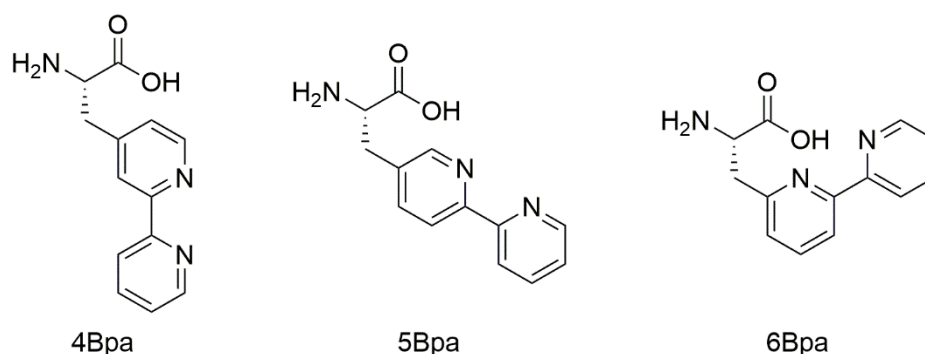


Figura 21: Aminoácidos equipados con la 2,2'-bipiridina en la cadena lateral.

- **Bipiridinas asimétricas:** La introducción del ligando Bpy en la cadena central de un péptido es la mejor manera de adaptar las preferencias conformacionales de la cadena peptídica a la coordinación del ion metálico y se ha logrado con los aminoácidos 5Bpy y 4Bpy (Figura 22A).<sup>195</sup> La síntesis del aminoácido 5Bpy fue publicado por primera vez en 1996 por el grupo de B. Imperiali. En este trabajo, mostraron que el paso clave de su ruta sintética era la reacción de acoplamiento cruzado (reacción de

<sup>192</sup> a) B. Imperiali, R. A. Moats, S. L. Fisher, T. J. Prins, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3182–3188; b) B. Imperiali, S. L. Fisher, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 757-759; c) B. Imperiali, T. J. Prins, S. L. Fisher, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 1613-1616.

<sup>193</sup> 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.

<sup>194</sup> R. P. Cheng, S. L. Fisher, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11349-11356.

<sup>195</sup> 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; c) G. R. Newkome, J. Gross, A. K. Patri, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3013-3014.

Stille) entre dos derivados de piridina, una funcionalizada con un grupo nitro y la otra con un éster metílico. Una hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C generó la correspondiente amina, la cual se puede transformar en el Fmoc-aminoácido adecuado para la SPPS.<sup>196</sup> Además, demostraron su aplicabilidad sintetizando una serie de péptidos equipados con este aminoácido y derivatizados en sus extremos (N- y C-terminal) con un fluoróforo y un quencher (supresor de la fluorescencia). Dichos péptidos sufren un cambio conformacional tras la coordinación con un ion metálico que puede ser monitorizada debido a la variación de la intensidad de la fluorescencia tras la interacción del fluoróforo con el quencher.

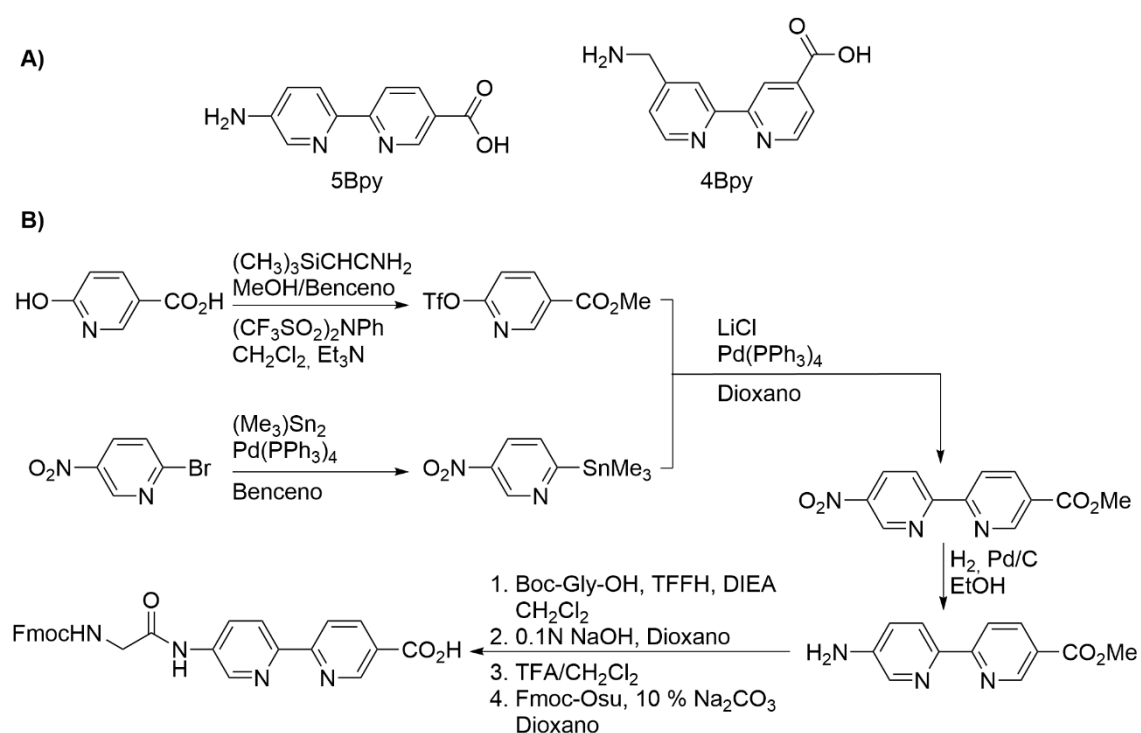


Figura 22: A) Bipiridinas asimétricas sustituidas en posiciones diferentes con un ácido carboxílico y una amina; B) ruta sintética propuesta por el grupo de B. Imperiali para la obtención del aminoácido derivado de la Bpy protegido con el grupo protector Fmoc, siendo así adecuado para la SPPS.<sup>196</sup>

En el año 1997 G. R. Newkome desarrolló una nueva ruta sintética para la obtención de 5Bpy (Figura 23). La reacción clave de la ruta sintética es la asimetrización del dietil [1, 1'-bipiridil]-4,4'-dicarboxilato mediante el tratamiento con hidrazina monohidratada, de tal modo que bajo ciertas condiciones se puede obtener el producto monosustituido por

<sup>196</sup> A. Torrado, B. Imperiali, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8940-8948.

precipitación selectiva. Este compuesto es oxidado a la correspondiente acil azida que posteriormente se transforma en un carbamato a través del reordenamiento de Curtius. Finalmente, mediante una hidrólisis simultánea del carbamato y del éster se puede obtener el aminoácido derivado de la biperidina con un rendimiento global del 21%.<sup>197</sup>

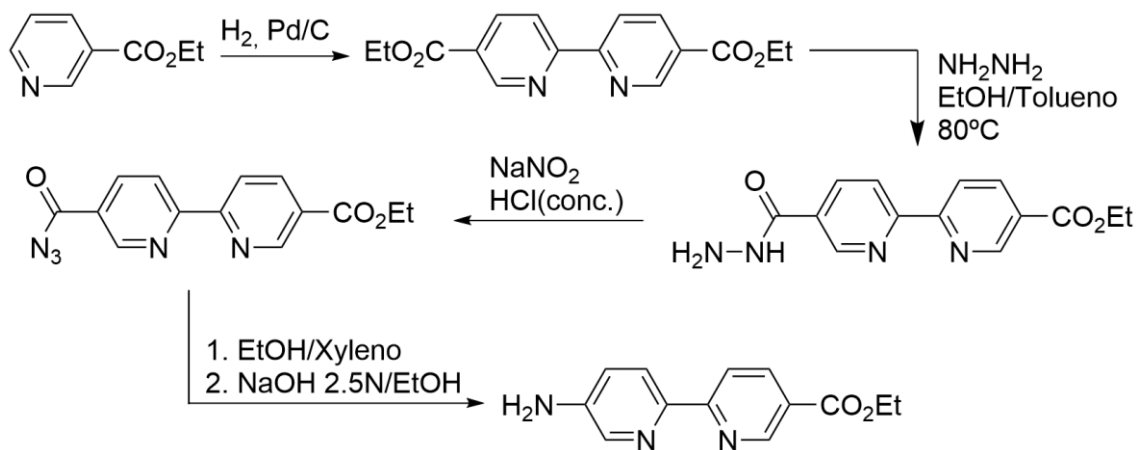


Figura 23: Ruta sintética propuesta por el grupo de G.R. Newkome para la obtención del aminoácido 5Bpy.<sup>197</sup>

Posteriormente, el grupo de T. Darbre diseñó una nueva ruta sintética para la obtención del aminoácido 5Bpy protegido convenientemente para uso en SPPS. En esta ruta, se parte de la 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina, la cual se oxida en primer lugar para posteriormente realizar una esterificación en medio ácido. En este caso, la asimetrización de la molécula se produce a través de la desprotección selectiva de uno de los ésteres etílicos. El monocarboxilato resultante se hace reaccionar con azida. A partir de este punto esta ruta sintética sigue el procedimiento desarrollado por Newkome.<sup>198</sup>

<sup>197</sup> G. R. Newkome, J. Gross, A. K. Patri, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3013–3014.

<sup>198</sup> N. A. Uhlich, P. Sommer, C. Bühr, S. Schürch, J.-L. Reymond, T. Darbre, *Chem. Commun.* **2009**, 6237–6239.

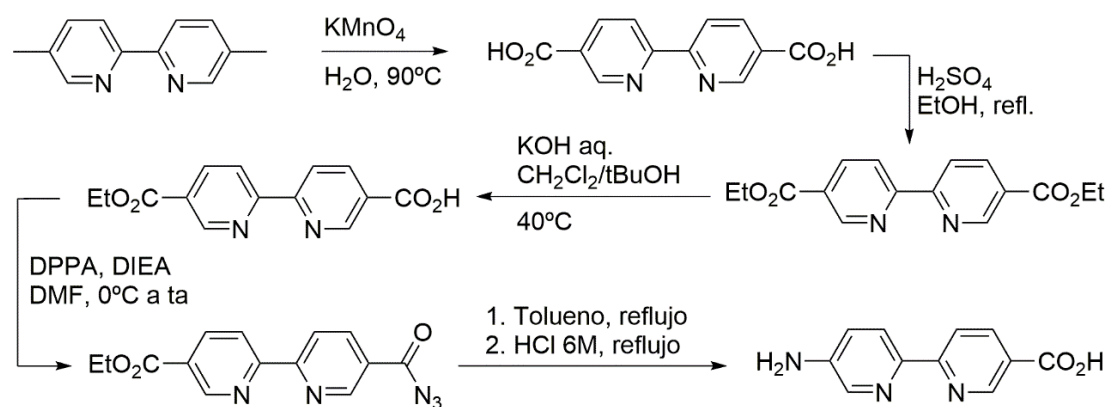


Figura 24: Ruta sintética propuesta por Darbre *et al.* de la 5Bpy para su uso en SPPS.<sup>198</sup>

En nuestro grupo de investigación, siguiendo un procedimiento modificado de las rutas sintéticas previamente mencionadas,<sup>196,197,199</sup> logramos diseñar una nueva ruta sintética para la obtención de aminoácidos derivados de la 5Bpy compatibles con la SPPS en escala de multigramos con un rendimiento global del 46% (Figura 25).<sup>200</sup>

<sup>199</sup> C. P. Whittle, *J. Heterocycl. Chem.* **1977**, 14, 191–194.

<sup>200</sup> G. Rama, A. Ardá, J.-D. Maréchal, I. Gamba, H. Ishida, J. Jiménez-Barbero, M. Eugenio Vázquez, M. V. López, *Chemistry - A European Journal* **2012**, 18, 7030–7035.

## Capítulo 1

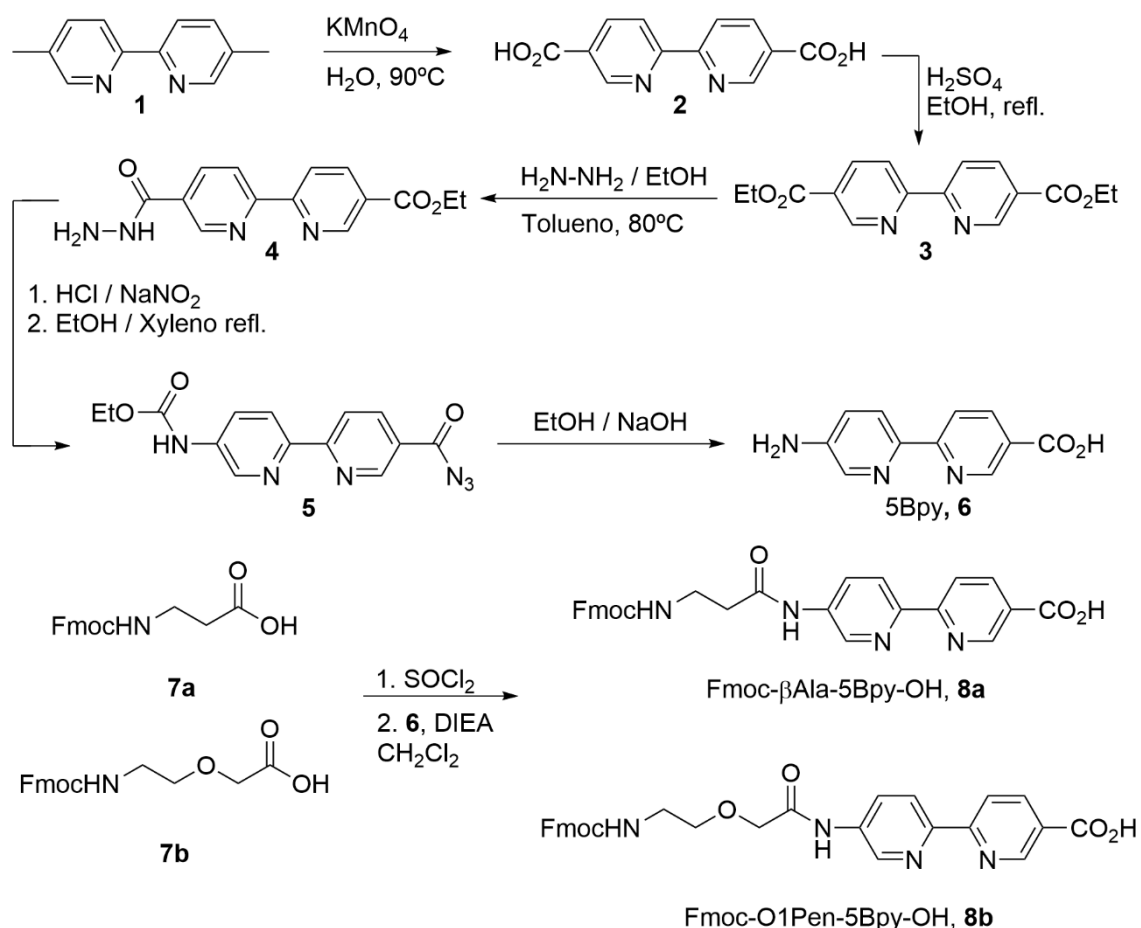


Figura 25: ruta sintética propuesta por nuestro grupo de investigación para la obtención de aminoácidos derivados de la 2,2'-bipiridina.<sup>200</sup>

Esta ruta consistió en la oxidación (2) y posterior esterificación (3) de la 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina comercial. A continuación, se procedió a la asimetrización de la Bpy de manera sencilla gracias a la baja solubilidad del derivado monocarbohidrazida (4). Posteriormente, se realizó una transposición de Curtius sobre la carbazida correspondiente (5), seguida de la desprotección del intermedio, obteniéndose así el aminoácido de la Bpy (6). Debido a la baja reactividad de las aminas aromáticas durante los acoplamientos de aminoácidos en la síntesis de péptidos, se funcionalizó el aminoácido de la Bpy con la Fmoc-βAla-OH o con el ácido 5-amino-3-oxapentanoico (O1Pen) de tal forma que se obtuvieron los dipéptidos finales Fmoc-βAla5Bpy-OH (8a) o Fmoc-O1pen5Bpy-OH (8b, O1pen5Bpy), ambos aptos para su uso en la SPPS.

### Metalopéptidos de Ru(II) derivados de 2,2'-bipiridina como agentes de unión al ADN

Los complejos polipiridínicos de Ru(II) son una familia de compuestos muy atractiva para su aplicación en química biológica. En concreto, estos compuestos

tienen aplicación en técnicas de imagen molecular,<sup>201</sup> en concreto como sondas y sensores del ADN, debido a que sus bandas de emisión son sensibles a la interacción con el ADN<sup>202</sup> y a que presentan longitudes de onda de excitación y emisión elevadas, lo que hace que puedan ser usados en tejidos biológicos.<sup>203,204</sup> Además, presentan una gran estabilidad cinética y muy buena solubilidad en medio acuoso. Debido a esto, en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de complejos metálicos de Ru(II) mono<sup>205</sup> y dinucleares,<sup>206</sup> así como de secuencias peptídicas funcionalizadas con complejos de Ru(II), que presentan propiedades de unión al ADN.<sup>207</sup>

El grupo de investigación de A. Gaoufis publicó en 2004 la síntesis de dos metalopéptidos bisbipiridílicos de Ru(II),  $\Lambda$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(m-GHK)]Cl<sub>2</sub> y  $\Delta$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(m-GHK)]Cl<sub>2</sub>, así como el estudio de sus propiedades de unión al ADN.

---

<sup>201</sup> W. Semmler, M. Schwaiger, Eds., *Molecular Imaging I*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2008**.

<sup>202</sup> A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. von Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.* **1988**, 84, 85–277.

<sup>203</sup> a) J. A. Smith, J. G. Collins, F. R. Keene, in *Metal Complex–DNA Interactions* (Eds.: N. Hadjilias, E. Sletten), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2009**, pp. 317–346; b) U. McDonnell, M. R. Hicks, M. J. Hannon, A. Rodger, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 2052–2059; c) G. I. Pascu, A. C. G. Hotze, C. Sanchez-Cano, B. M. Kariuki, M. J. Hannon, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2007**, 46, 4374–4378; d) C.-C. Ju, A.-G. Zhang, C.-L. Yuan, X.-L. Zhao, K.-Z. Wang, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, 105, 435–443; e) P. Lincoln, B. Nordén, *Chem. Commun.* **1996**, 2145–2146.

<sup>204</sup> a) C. Piguet, J.-C. G. Bünzli, in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, **2010**, pp. 301–553; b) S. I. Klink, H. Keizer, F. C. J. M. van Veggel, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2000**, 39, 4319–4321.

<sup>205</sup> a) E. Alessio, G. Mestroni, G. Nardin, W. M. Attia, M. Calligaris, G. Sava, S. Zorzet, *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 4099–4106; b) C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, S. Choua, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 584–592.; c) X. H. Zou, B. H. Ye, H. Li, Q. L. Zhang, H. Chao, J. G. Liu, L. N. Ji, X. Y. Li, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, 143–150; d) L.-N. Ji, X.-H. Zou, J.-G. Liu, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 216–217, 513–536.

<sup>206</sup> a) S. Sun, F. Li, F. Liu, X. Yang, J. Fan, F. Song, L. Sun, X. Peng, *Dalton Trans.* **2012**, 41, 12434–12438; b) V. Gonzalez, T. Wilson, I. Kurihara, A. Imai, J. A. Thomas, J. Otsuki, *Chem. Commun.* **2008**, 1868–1870; c) C. B. Spillane, J. A. Smith, J. L. Morgan, F. R. Keene, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12, 819–824; F. Pierard, A. Kirsch-De Mesmaeker, *Inorg. Chem. Commun.* **2006**, 9, 111–126.

<sup>207</sup> A) M. Lieberman, T. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1470–1471; b) N. Y. Sardesai, J. K. Barton, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, 2, 762–771; c) M. P. Fitzsimons, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3379–3380; d) K. D. Copeland, M. P. Fitzsimons, R. P. Houser, J. K. Barton, *Biochemistry* **2002**, 41, 343–356.

## Capítulo 1

Ambos isómeros interactúan de manera distinta con el ADN dúplex: el isómero  $\Delta$  se une a través del surco mayor mientras que el isómero  $\Lambda$  lo hace a través del surco menor. Además, determinaron que la unión de la secuencia peptídica GHK favorece la interacción del isómero  $\Delta$  con el oligonucleótido.<sup>208</sup>

En 2005, el mismo grupo publicó la síntesis de dos isómeros trisbipiridínicos de Ru(II) con una bpy modificada con la secuencia peptídica RGNAHER, que pertenece al bucle de reconocimiento de la endonucleasa de restricción MunI, con el objeto de aumentar la selectividad del reconocimiento.<sup>209</sup> Se estudió la interacción de los metalopéptidos con el ADN mediante  $^1\text{H}$ -RMN. El isómero  $\Delta$  se une de manera débil al surco mayor terminal CG/GC, mientras que el isómero  $\Lambda$  dispone los ligandos bpy en el surco mayor central de la secuencia TT/AA.

Ese mismo año, el grupo de J. Reedijk publicó un procedimiento para la síntesis de metalopéptidos de Ru(II), equipados con un ligando terpiridina y un cloruro, mediante la metodología SPPS. Los autores obtuvieron la mezcla racémica de estos metalopéptidos, que no pudieron purificar completamente por cromatografía líquida. Dichos complejos de rutenio interactúan con el ADN coordinándose preferentemente con guaninas y citosinas. Además, observaron una interacción de tipo electrostática entre el catión metálico y el esqueleto polianiónico del ADN. Solo uno de los isómeros era capaz de interactuar con el ADN, lo que demuestra la importancia de la quiralidad del complejo en las propiedades de reconocimiento.<sup>210</sup>



---

<sup>208</sup> A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 2004, 1427–1439.

<sup>209</sup> A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 616–626.

<sup>210</sup> K. Karidi, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, J. Reedijk, *Dalton Trans.* **2005**, 728–734.

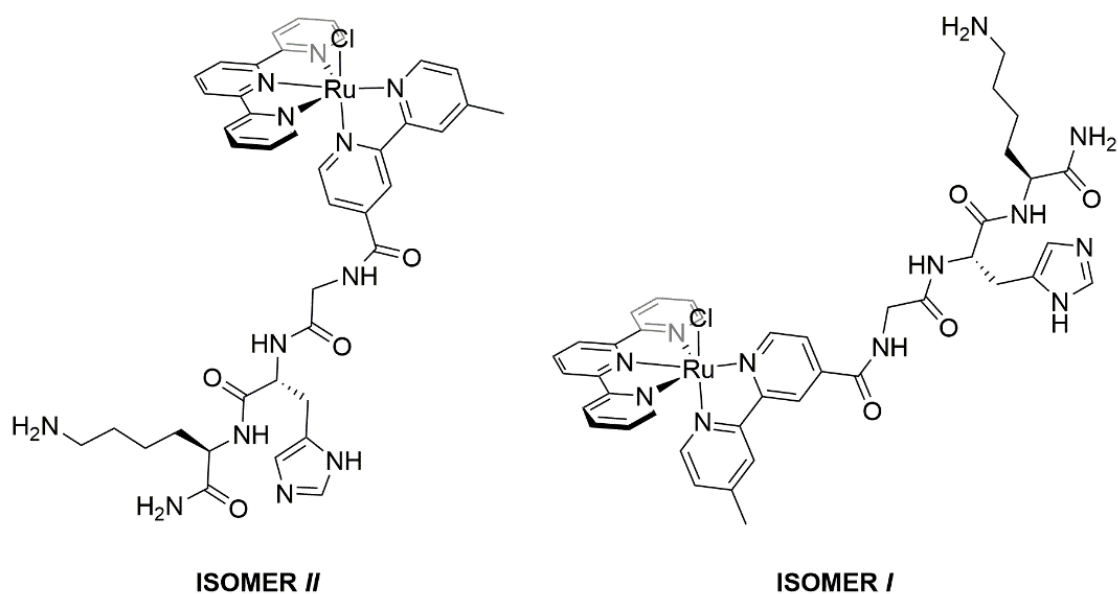


Figura 26: Isómeros de los metalopéptidos de Ru(II) sintetizados por el grupo de J. Reedijk.<sup>210</sup>

En el año 2009, el grupo de J.K. Barton publicó un estudio en el que comparó la captación y la localización celular de un conjugado de Ru-octaarginana con y sin fluoresceína. Para este estudio utilizaron el complejo de Ru(II)-dppz debido a sus propiedades inherentes de luminiscencia que les permitió observar la internalización del complejo “no marcado” con fluoresceína.

En este trabajo, el grupo de Barton logró teñir el citosol, núcleo y nucleolo de células HeLa con el conjugado Ru-octaarginina-fluoresceína. En este caso, las propiedades lipofílicas de la fluoresceína permitieron la internalización de los conjugados a través de un mecanismo no endocítico. Por otro lado, el complejo no marcado con fluoresceína internalizó a través de un mecanismo de endocitosis de tal modo que los conjugados quedaron atrapados en endosomas y dieron lugar a la tinción punteada característica. De este modo demostraron que la naturaleza del fluoróforo, además de proporcionar propiedades luminiscentes, afecta al modo de internalización de los conjugados en los procesos de internalización.<sup>211</sup>

El mismo grupo de investigación publicó al año siguiente (2010) un trabajo en el que evaluaron la capacidad de internalización celular de un complejo de Ru(II) derivado de la 2,2'-bipiridina, funcionalizado con la secuencia peptídica RrRK (siendo r = D-Arg). En este caso, el tetrapéptido RrRK facilitó la internalización y localización nuclear del complejo de rutenio (al igual que para el conjugado Ru-

<sup>211</sup> C. A. Puckett, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 8738–8739.

D-R<sub>8</sub>), aunque la concentración mínima necesaria para la internalización es más alta para este conjugado (Ru-RrRK) que para el de Ru-D-R<sub>8</sub>. Por otro lado, funcionalizaron el conjugado con una fluoresceína, que generalmente facilita la internalización celular. Sin embargo, no lograron mejorar la entrada en el núcleo del conjugado Ru-RrRK, lo que demuestra que la conjugación de fluoresceína no es una estrategia general para modular la distribución de péptidos de penetración celular (CPP). Finalmente, el grupo de Barton demostró que la conjugación con la secuencia peptídica RrRK incrementó la internalización celular en comparación con los complejos de rutenio no conjugados (sin la secuencia peptídica), dirigiendo el complejo de rutenio hacia el núcleo.<sup>212</sup>

#### Agentes de unión al ADN basados en metalopéptidos derivados de 5Bpy

El aminoácido 5Bpy se ha usado en la síntesis de algunos metalopéptidos artificiales.<sup>213</sup> Por ejemplo, Ishida *et al.* publicaron la síntesis de metalopéptidos luminiscentes de Ru(II) equipados con tres ligandos de bipyridina. Dichos metalopéptidos presentaban una estructura característica inducida por las secuencias de giros  $\beta$ .<sup>214</sup>

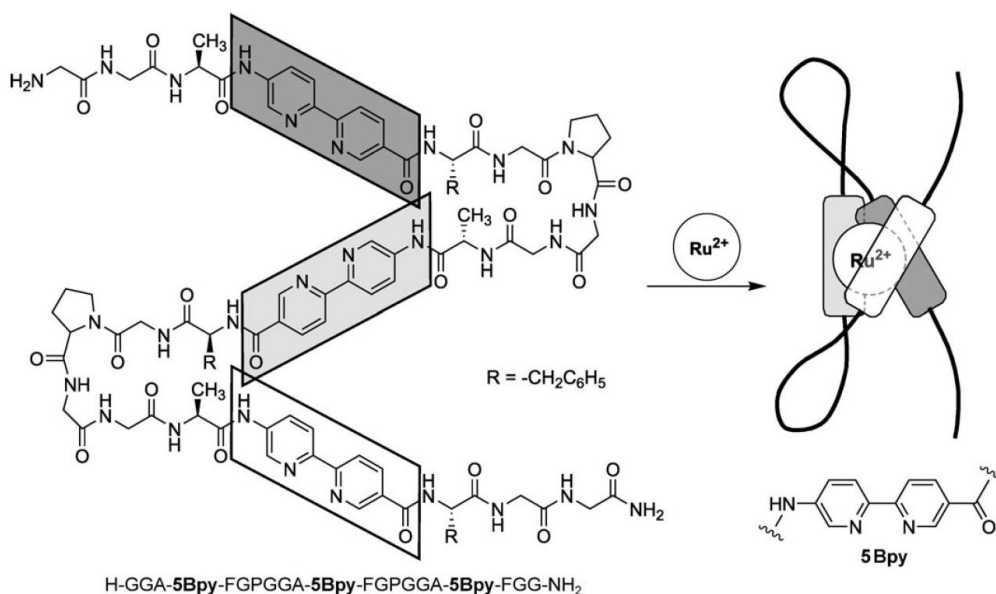


Figura 27: Diseño propuesto por Ishida *et al.* de la metaloproteína artificial con un complejo de Ru(II) tris(bipiridilo) como núcleo.<sup>214</sup>

<sup>212</sup> C. A. Puckett, J. K. Barton, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 3564–3569.

<sup>213</sup> a) M. Albrecht, P. Stortz, R. Nolting, *Synthesis* **2003**, 2003, 1307–1320; b) M. Kyakuno, S. Oishi, H. Ishida, *Chem. Lett.* **2005**, 34, 1554–1555; c) M. Albrecht, P. Stortz, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 496–506.

<sup>214</sup> a) H. Ishida, Y. Inoue, *Biopolymers* **2000**, 55, 469–478; b) H. Ishida, Y. Maruyama, M. Kyakuno, Y. Kodera, T. Maeda, S. Oishi, *Chembiochem* **2006**, 7, 1567–1570.

En nuestro grupo hemos usado extensivamente 5Bpy en la construcción de metalopéptidos bioactivos. En el año 2013 reportamos la de complejos dinucleares de Ru(II) homoquirales (Figura 28) derivados de  $\beta$ ala5Bpy a través de la metodología SPPS. La versatilidad de la SPPS nos permitió modificar estos metalopéptidos, funcionalizándolos con una cadena de poliargininas, con la finalidad de mejorar sus propiedades de unión al ADN y su internalización celular.<sup>215</sup> También hemos publicado la síntesis de metalopéptidos mononucleares de Fe(II), Co(II), Ni(II) y Zn(II) derivados de péptidos bisbipiridínicos y trisbipiridínicos que se construyeron haciendo uso del aminoácido O1pen5Bpy.<sup>216</sup>

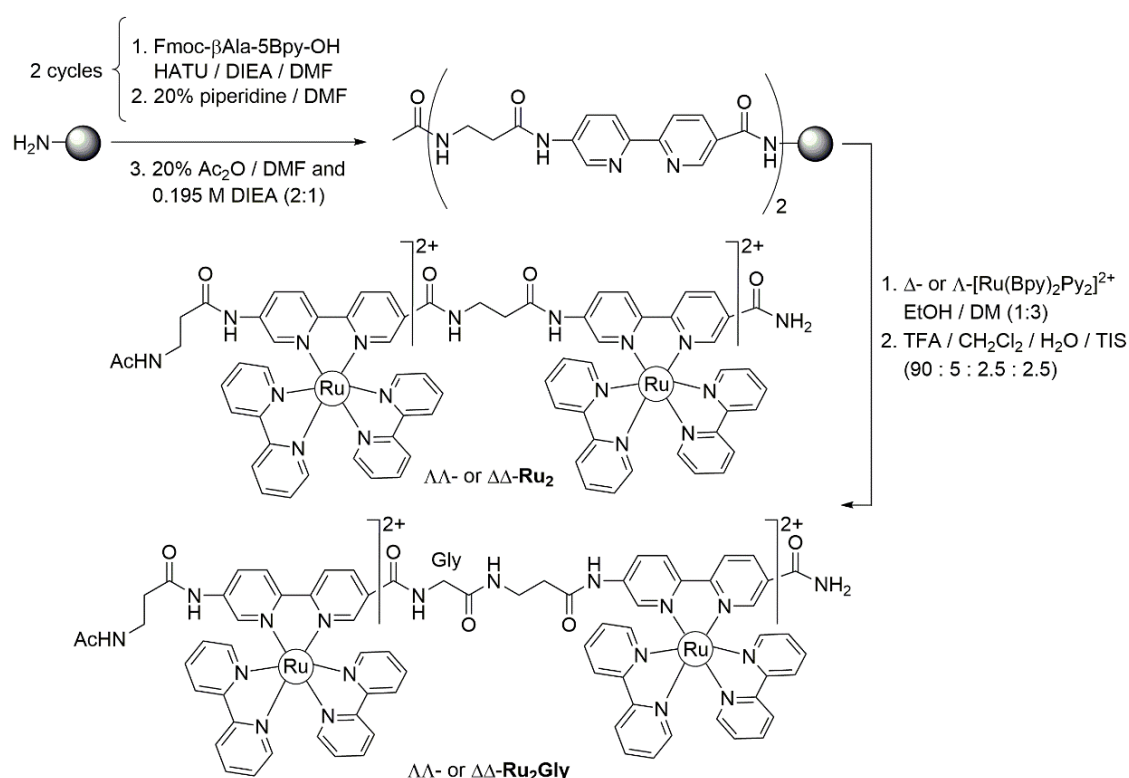


Figura 28: Síntesis de péptidos en fase sólida de los complejos modelo dinucleares  $\Lambda\Lambda$ - y  $\Delta\Delta$ -Ru<sub>2</sub>. Los complejos  $\Lambda\Lambda$ - y  $\Delta\Delta$ -Ru<sub>2</sub>Gly fueron sintetizados siguiendo el mismo procedimiento.<sup>215</sup>

<sup>215</sup> a) I. Gamba, I. Salvadó, R. F. Brissos, P. Gamez, J. Brea, M. I. Loza, M. E. Vázquez, M. Vázquez López, Chem. Commun. **2016**, 52, 1234–1237; b) I. Salvadó, I. Gamba, J. Montenegro, J. Martínez-Costas, J. M. Brea, M. I. Loza, M. Vázquez López, M. E. Vázquez, Chem. Commun. **2016**, 52, 11008-11011.

<sup>216</sup> a) G. Rama, A. Ardá, J. -D. Maréchal, I. Gamba, H. Ishida, J. Jiménez-Barbero, M. E. Vázquez, M. Vázquez López, Chem. Eur. J. **2012**, 18, 7030-7035; b) I. Gamba, G. Rama, E. Ortega- Carrasco, R. Berardozi, V. M. Sánchez-Pedregal, L. Di Bari, J. -D. Maréchal, M. E. Vázquez, M. Vázquez López, Dalton Trans. **2016**, 45, 881-885.

Aplicando esta misma metodología también nuestro grupo sintetizó una serie de complejos mono-, di- y trinucleares de Ir(III) derivados de  $\beta$ ala5Bpy y sus correspondientes análogos de octaarginina, los cuales presentaron una alta afinidad y selectividad de secuencia por regiones ricas en A/T. De entre todos estos derivados, el complejo trinuclear equipado con la cadena de poliarginina presenta una afinidad similar a la de mejores agentes de unión al surco menor del ADN.<sup>215a</sup>

En el año 2014, nuestro grupo de investigación publicó la síntesis a través de la metodología de SPPS de un helicato peptídico quiral derivado de O1pen5Bpy con propiedades de unión al ADN.<sup>216a</sup> En concreto, se sintetizaron dos ligandos peptídicos conteniendo seis unidades de O1penBpy capaz de ensamblarse en un helicato dinuclear de una sola hebra con los dos centros metálicos octaédricos. Para que este ensamblaje fuera adecuado, se incorporó a la secuencia peptídica el motivo  $-\text{[(D/L)-Pro]-Gly}$  que favorece la formación de giros  $\beta$  dando lugar así a dos ligandos peptídicos enantioméricos: LL-H (con L-Pro en los giros) y DD-H (con D-Pro en los giros). La formación de los helicos se estudió mediante espectroscopía de UV en donde se observó la aparición de una banda de absorción centrada a 545 nm característica de los complejos trisbipiridínicos de Fe(II) con unas constantes de formación globales de 18.9  $\mu\text{M}$  para ambos helicos. Posteriormente se comprobó mediante dicroísmo circular que los helicos eran enantiómeros (Figura 29).

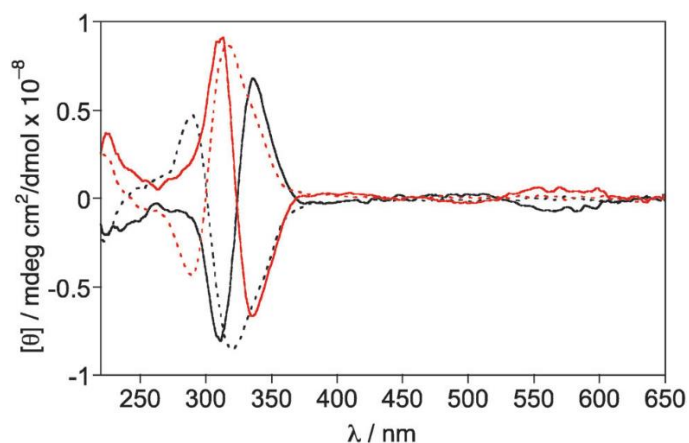


Figura 29: Espectro de CD de los ligandos peptídicos LL-H y DD-H y sus helicos. LL-H antes (línea negra punteada) y después (línea negra sólida,  $\Lambda\Lambda\text{-}[\text{Fe}_2(\text{LL-H})]^{4+}$ ) de la adición de 2 eq. De Fe(II) y DD-H antes (rojo punteado) y después (línea roja sólida,  $\Delta\Delta\text{-}[\text{Fe}_2(\text{LL-H})]^{4+}$ ) de la adición de 2 eq. de Fe(II). Adaptada con permisos de la referencia 216a.

Finalmente se estudiaron las propiedades de unión de los helicos peptídicos frente al ADN de tres vías (three-way junction). Para ello, se funcionalizaron los

helicatos en el extremo N-terminal con rodamina siguiendo la metodología sintética previamente usada con los ligandos peptídicos. Una vez formados los helicatos a partir de los correspondientes ligandos peptídicos marcados, éstos se incubaron con el ADN de tres vías (twDNA) y se observó un incremento en la anisotropía de fluorescencia dependiente de la concentración debido al cual se propuso un modelo de unión 1:1 modificado, en el que se incluyeron agregados de orden superior debido a interacciones no específicas. Así pues, el helicato peptídico  $\Lambda\Lambda$  presenta una mayor afinidad que su enantiómero  $\Delta\Delta$  obteniéndose unas constantes aparentes de disociación de  $0.25 \mu\text{M}$  y  $37.6 \mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 30).

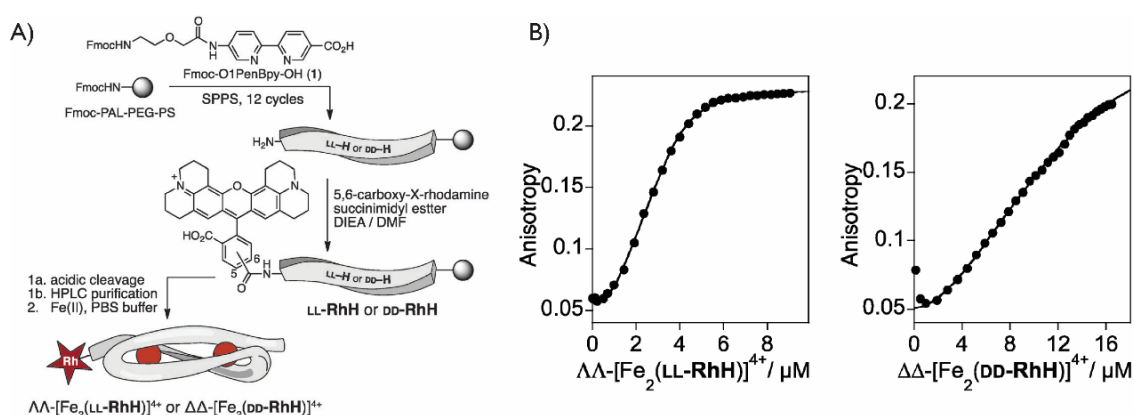


Figura 30: A) Esquema sintético de los helicatos peptídicos marcados con rodamina obtenidos mediante SPPS; B) Ensayos de unión al ADN de tres vías (twDNA) de los helicatos peptídicos marcados, realizados mediante anisotropía de fluorescencia. Adaptada con permisos de la referencia 216a

Recientemente, nuestro grupo publicó un nuevo estudio en el que se describe el uso de un dominio peptídico trimérico para el autoensamblaje controlado de helicatos y el estudio de sus propiedades de unión frente al twDNA.<sup>217</sup> En concreto se usó el dominio del extremo C-terminal del bacteriófago T4 Fibrin (T4Ff), un trímero que se forma a través de un proceso de autoensamblaje de un péptido de 27 aminoácidos. El extremo N-terminal de este trímero se modificó de tal modo que se pudieron introducir unidades de 2,2'-bipiridina, lo que permitió la formación de los helicatos. Además, el giro natural del extremo N-terminal de poliprolinas en el T4Ff indujo una configuración  $\Lambda\Lambda$  (helicidad M) en el helicato correspondiente.

<sup>217</sup> J. Gómez-González, D. G. Peña, G. Barka, G. Sciortino, J.-D. Maréchal, M. Vázquez López, M. E. Vázquez, *Frontiers in Chemistry* **2018**, 6, 520.

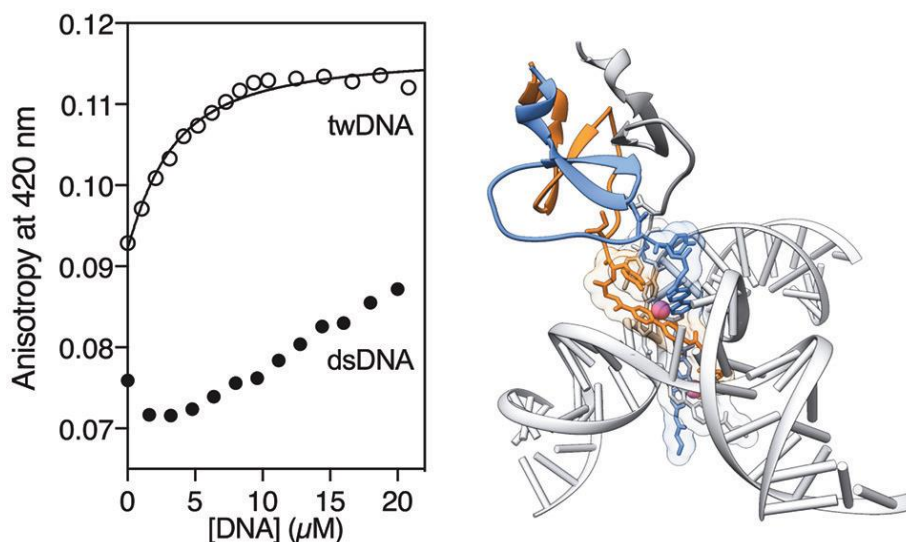


Figura 31: izquierda, perfil de la anisotropía de fluorescencia del helicato  $\Lambda\text{-}[\text{Fe}_2[(\beta\text{AlaBpy})_2\text{-T4Ff}]_3]^{+4}$  con el ADN de tres vías (twDNA) y ADN de doble hebra (dsDNA); derecha, representación de la unión entre el helicato y el twDNA. Adaptada de la referencia 217.

En este trabajo se monitorizó la formación del helicato  $[(\beta\text{AlaBpy})_2\text{-T4Ff}]_3$  mediante espectroscopía de fluorescencia obteniéndose un perfil de la valoración que se pudo ajustar a un modelo de unión 1:2 con unas constantes de disociación de  $5.5 \mu\text{M}$  para la coordinación del primer ion de Fe(II) y  $6.6 \mu\text{M}$  para el segundo confirmándose además la formación del helicato por espectrometría de masas. La quiralidad del helicato se confirmó mediante CD y, finalmente, se analizaron las propiedades de unión al ADN mediante anisotropía de fluorescencia, en las cuales se determinó una constante de unión de  $2.17 \mu\text{M}$  del complejo  $\Lambda\text{-}[\text{Fe}_2[(\beta\text{AlaBpy})_2\text{-T4Ff}]_3]^{+4}$  con el ADN de tres vías mientras que para la interacción del helicato con un ADN de doble hebra se obtuvo una interacción no específica débil (Figura 31).

En el año 2021, nuestro grupo publicó un nuevo trabajo relacionado con helicos peptídicos.<sup>218</sup> En este nuevo estudio se modificaron las secuencias peptídicas previamente usadas por el grupo.<sup>216a</sup> Por una parte se usó la  $\beta\text{Ala5Bpy}$  como unidad coordinante en lugar de la  $\text{O1pen5Bpy}$ ; y por otro lado, se modificaron los giros de Pro-Gly (que generaban problemas de solubilidad) por una secuencia promotora de giros  $\beta$  de tipo II o III que consiste en la combinación de aminoácidos D/L. Así pues, las secuencias seleccionadas fueron L-Arg– L-Pro– D-

<sup>218</sup> J. Gómez-González, Y. Pérez, G. Sciortino, L. Roldan-Martín, J. Martínez-Costas, J.-D. Maréchal, I. Alfonso, M. Vázquez López, M. E. Vázquez, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2021**, 60, 8859–8866.

Arg y D-Arg– D-Pro– L-Arg. A continuación, se analizó el ensamblaje de los heli-catos con Fe(II) y Co(II) y se encontró que las valoraciones de los péptidos con las correspondientes sales metálicas se ajustaban a un modelo de unión 1:2 con constantes de disociación dos órdenes de magnitud más pequeñas que para los heli-catos basados en la O1PenBpy. Debido al autoensamblaje dinámico de los heli-catos (que limita sus potenciales aplicaciones), se decidió testear la formación in situ de heli-catos cinéticamente inertes de Co(III) a través de la oxidación del correspondiente heli-cato de Co(II). Esto se logró mediante la oxidación con nitrato amónico de cerio,  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ . Además, se pudo determinar su estructura mediante 1D  $^1\text{H}$ -RMN.

Posteriormente se estudiaron las propiedades de unión de estos heli-catos frente al ADN de tres vías marcado con fluoresceína. En estos ensayos se pudo obtener una constante de disociación para  $\text{Fe}(\text{II})_2\text{LLD}$  de  $0.45 \mu\text{M}$ , mientras que para el heli-cato  $\text{Co}(\text{III})_2\text{LLD}$  se obtuvo una constante de  $7.9 \mu\text{M}$ , correspondiente a la inserción del heli-cato en el hueco hidrofóbico, y otra de  $4.9 \mu\text{M}$  correspondiente a la interacción del heli-cato con el ADN en tres sitios equivalentes (interacciones no específicas). Finalmente se sintetizó el heli-cato  $\text{Fe}(\text{II})_2\text{TAMRA-LLD}$  y se estudió su interacción con el ADN de tres vías en células funcionales, de tal modo que se logró marcar por primera vez (y de manera selectiva) los puntos de replicación del ADN en el núcleo (Figura 32).

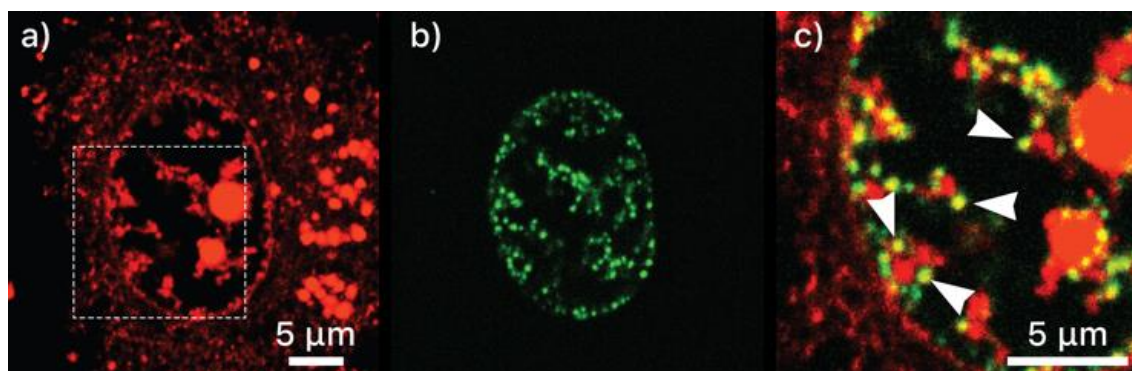


Figura 32: Marcaje selectiva de los sitios de replicación del ADN por el heli-cato  $\text{Fe}(\text{II})_2\text{TAMRA-LLD}$ . a) Canal rojo de emisión que muestra la distribución del heli-cato marcado; b) canal verde correspondiente a la emisión de la sonda GFP-PCNAL2 marcando los sitios de replicación del ADN; c) superposición de los canales rojo y verde con flechas señalando los sitios de replicación del ADN donde coinciden los marcajes del heli-cato y de la sonda GFP-PCNAL2. Adaptada con permisos de la referencia 218.

## Objetivos

El objetivo de este capítulo es la síntesis de una serie de metalopéptidos de Ru(II) derivados del ligando dppz a través de la metodología SPPS y estudiar sus

propiedades de unión a G-cuadruplejos mediante espectroscopía de UV-Vis y Dicroísmo Circular (CD)

## Resultados y discusión

Se sabe que los G-cuadruplejos desempeñan funciones críticas en una variedad de procesos biológicos<sup>219, 220</sup> tales como la regulación transcripcional la replicación del ADN o la estabilidad del genoma. Por lo tanto, el reconocimiento de tales estructuras de ADN no canónicas por moléculas pequeñas es un tema de gran interés en el campo de la química biológica.<sup>221</sup> Sin embargo, la diversidad de estructuras de los G4s añade todavía más complejidad en el diseño de agentes de unión selectivos,<sup>120a, 222</sup> razón por la cual la mayoría de los estudios se centran en la búsqueda de agentes capaces de discriminar entre G4s y otras estructuras secundarias de ADN,<sup>120a,221,222</sup> especialmente del ADN-B, más que en la selectividad entre las diferentes conformaciones de los G4s.<sup>223</sup>

Las rutas típicas para obtener agentes de unión a G4s requiere procedimientos sintéticos exigentes que dificultan el acceso eficiente a las múltiples variantes estructurales necesarias para su optimización funcional.<sup>120a,221-223</sup> Una posible alternativa es la funcionalización de dichos agentes de reconocimiento con secuencias peptídicas que modifiquen sus propiedades fisicoquímicas de una manera más predecible y sintéticamente accesibles.<sup>224</sup> Sin embargo, a pesar del gran potencial de esta estrategia, la aplicación de los metalopéptidos como agentes de unión al ADN no ha sido estudiada en profundidad.<sup>225</sup> Por otro lado,

---

<sup>219</sup> S. Balasubramanian, S. Neidle, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 345–353.

<sup>220</sup> G. W. Collie, G. N. Parkinson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5867–5892.

<sup>221</sup> a) S. N. Georgiades, N. H. Abd Karim, K. Suntharalingam, R. Vilar, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, 49, 4020–4034; b) Q. Cao, Y. Li, E. Freisinger, P. Z. Qin, R. K. O. Sigel, Z.-W. Mao, *Inorg. Chem. Front.* **2017**, 4, 10–32.

<sup>222</sup> A. Shivalingam, M. A. Izquierdo, A. L. Marois, A. Vyšniauskas, K. Suhling, M. K. Kuimova, R. Vilar, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8178.

<sup>223</sup> L. He, X. Chen, Z. Meng, J. Wang, K. Tian, T. Li, F. Shao, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 8095–8098.

<sup>224</sup> a) M. Nitz, K. J. Franz, R. L. Maglathlin, B. Imperiali, *Chembiochem* **2003**, 4, 272–276; b) G. Dirscherl, B. König, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 597–634.

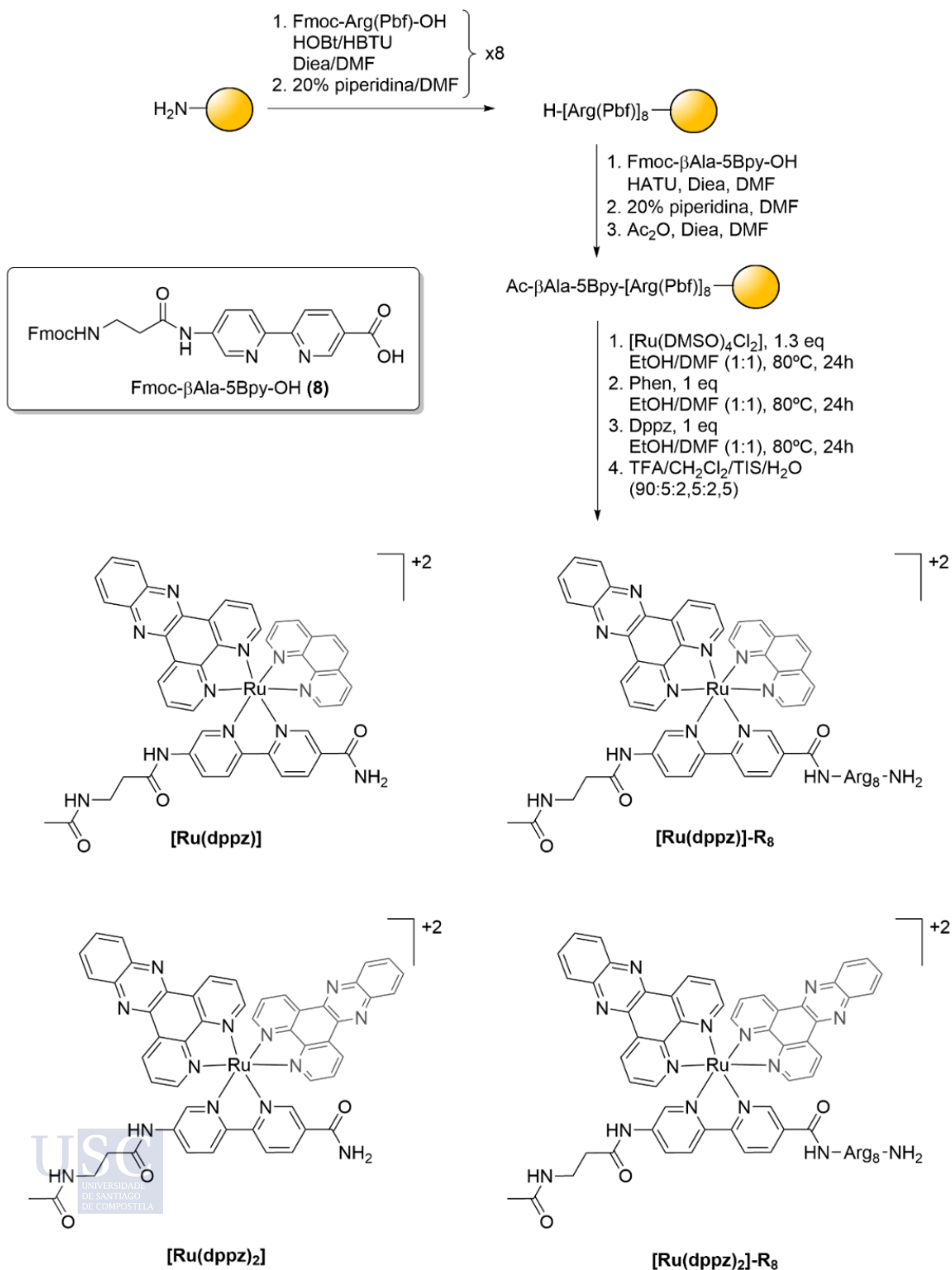
<sup>225</sup> a) K. Usui, A. Okada, in *Chemical Biology of Nucleic Acids: Fundamentals and Clinical Applications* (Eds.: V.A. Erdmann, W.T. Markiewicz, J. Barciszewski), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 459–475; b) K. Jantos, R. Rodriguez, S. Ladame, P. S. Shirude, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 13662–13663.

se sabe que péptidos básicos, como la secuencia de la Antennapedia,<sup>226</sup> pueden internalizarse eficientemente en células. De hecho, estos péptidos oligocatiónicos se convierten en herramientas muy útiles para el transporte de una variedad de cargas al interior celular. En concreto, la funcionalización con dominios de octaarginina se ha aplicado con éxito para la internalización celular y nuclear de agentes de unión de ADN.<sup>211,212,227</sup> Estos sistemas presentan una mayor afinidad hacia el ADN debido a la interacción electrostática atractiva entre la secuencia catiónica de octaarginina y el esqueleto de fosfatos cargado negativamente del ADN.<sup>215a</sup> Sin embargo, no hay estudios sobre el efecto de estos motivos oligocatiónicos podrían tener respecto a las propiedades de unión a G4s. Así pues, decidimos centrar nuestra atención sobre los complejos de Ru(II) derivados del ligando dipiridofenazina (dppz),<sup>165, 228</sup> los cuales han sido ampliamente estudiados como sensores fluorescentes de ADN.<sup>165b,229,230</sup> Estos sistemas interaccionan con el ADN-B mediante un proceso de intercalación entre el ligando aromático extendido (dppz) y pares bases consecutivas del ADN.<sup>231</sup> Además, hay evidencias de que estos complejos de Ru(II)-dppz se unen a G4s.<sup>171,232,233</sup> Siguiendo nuestros estudios sobre metalopéptidos oligocatiónicos con propiedades de unión al ADN,<sup>234</sup> decidimos explorar el efecto de una secuencia de octaarginina en las propiedades de unión a los G4s de complejos de

- 
- <sup>226</sup> D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 18188–18193.
- <sup>227</sup> 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, *Chemistry* **2013**, 19, 13369–13375.
- <sup>228</sup> a) K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2777–2796.
- <sup>229</sup> a) E. Amouyal, A. Homsí, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, 1841–1845; b) R. B. Nair, B. M. Cullum, C. J. Murphy, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 962–965; c) C. Hiort, P. Lincoln, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3448–3454.
- <sup>230</sup> A. C. Komor, J. K. Barton, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 3617–3630.
- <sup>231</sup> H. Song, J. T. Kaiser, J. K. Barton, *Nat. Chem.* **2012**, 4, 615–620.
- <sup>232</sup> S. Shi, J. Zhao, X. Geng, T. Yao, H. Huang, T. Liu, L. Zheng, Z. Li, D. Yang, L. Ji, *Dalton Trans. J. Inorg. Chem.* **2010**, 39, 2490.
- <sup>233</sup> a) G.-L. Liao, X. Chen, L.-N. Ji, H. Chao, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 10781; b) S. Shi, J.-H. Xu, X. Gao, H.-L. Huang, T.-M. Yao, *Chemistry - A European Journal* **2015**, 21, 11435–11445; c) D. Saadallah, M. Bellakhal, S. Amor, J.-F. Lefebvre, M. Chavarot-Kerlidou, I. Baussanne, C. Moucheron, M. Demeunynck, D. Monchaud, *Chemistry* **2017**, 23, 4967–4972.
- <sup>234</sup> I. Gamba, G. Rama, E. Ortega-Carrasco, J.-D. Maréchal, J. Martínez-Costas, M. E. Vázquez, M. Vázquez López, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 11097–11100.

## Capítulo 1

Ru(II) derivados del ligando dppz. Con este objetivo en mente, diseñamos el complejo modelo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** (Esquema 1) que está equipado, junto con el ligando intercalante dppz y el coligando fenantrolina, con una unidad de βAla5Bpy enlazada a una secuencia de (L)-octaarginina.



Esquema I: Síntesis en fase sólida del complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** y estructuras de los complejos análogos estudiados **[Ru(dppz)]**, **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>8</sub>** y **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]**

El ligando peptídico precursor fue ensamblado siguiendo protocolos estándar Fmoc/tBu de síntesis de péptidos en fase sólida incorporando el núcleo de bipyridina (Fmoc-βAla5Bpy-OH **8**) al dominio de octaarginina previamente anclado a la resina.<sup>215a,235</sup> Posteriormente se procedió a la desprotección del grupo protector temporal Fmoc, seguido de la acetilación del extremo N-terminal usando anhídrido acético en medio básico. A continuación, se incorporó el centro metálico de Ru(II) haciendo reaccionar el precursor  $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$ <sup>236</sup> con el péptido todavía anclado a la resina. El ligando intercalante dppz y el ligando auxiliar 1,10-fenantrolina (phen)<sup>237</sup> se introdujeron del mismo modo que el precursor de Ru (DMF, 80°C, 24 h) con el péptido anclado a la resina. (Esquema 1). Por último, se procedió al desanclaje del péptido del soporte sólido y a la desprotección total del mismo en medio ácido. Dicha mezcla ácida se concentró a un volumen aproximado de 1 mL para posteriormente precipitar el metalopéptido (como un sólido amarillo brillante) con una disolución saturada de hexafluorofosfato amónico. Finalmente, el sólido obtenido se redisolvió en H<sub>2</sub>O MilliQ y se purificó mediante HPLC de fase reversa, obteniéndose el metalopéptido de Ru(II) deseado como una mezcla de diastereoisómeros.

Además del complejo modelo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>**, también sintetizamos un complejo control que carecía del dominio de octaargininas (**[Ru(dppz)]**, Esquema 1). Posteriormente, procedimos a estudiar las propiedades de unión a G4s de estos complejos, aprovechando las propiedades de fluorescencia intrínsecas de los complejos de Ru(II)-dppz.<sup>238</sup> Para ello, se seleccionó como G4s de referencia el ADN G4 TEL (ADN cuádruplex telomérico) el cual es el modelo arquetípico de la topología de G4 mixta paralela/antiparalela, así como las secuencias promotoras oncogénicas c-MYC<sup>239</sup> y c-KIT,<sup>240</sup> ambas con una topología paralela.

Aunque existen estudios sobre la interacción de complejos de Ru(II)-dppz enantiopuros con G4, decidimos trabajar con la mezcla racémica puesto que se ha demostrado que la selectividad quiral en G4 paralelos y paralelos/antiparalelos es baja.<sup>233b</sup> Con el propósito de comprobar su selectividad respecto de otras

<sup>235</sup> I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 3247–3256.

<sup>236</sup> I. P. Evans, A. Spencer, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1973**, 204–209.

<sup>237</sup> J. E. Dickeson, L. A. Summers, *Aust. J. Chem.* **1970**, 23, 1023–1027.

<sup>238</sup> A. W. McKinley, P. Lincoln, E. M. Tuite, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, 2676–2692.

<sup>239</sup> C. Y. Lin, J. Lovén, P. B. Rahl, R. M. Paranal, C. B. Burge, J. E. Bradner, T. I. Lee, R. A. Young, *Cell* **2012**, 151, 56–67.

<sup>240</sup> H. Fernando, A. P. Reszka, J. Huppert, S. Ladame, S. Rankin, A. R. Venkitaraman, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Biochemistry* **2006**, 45, 7854–7860.

conformaciones del ADN, también estudiamos las propiedades de unión de los metalopéptidos con un oligonucleótido de ADN-B.

La adición sucesiva de alícuotas de una disolución stock del G4 TEL a una disolución de 2  $\mu\text{M}$  del complejo **[Ru(dppz)]** en tampón fosfato (pH = 7.5) resultó en un incremento progresivo en la intensidad de emisión del complejo de Ru(II), el cual se pudo ajustar a un modelo de unión 1:1 consistente con la formación del complejo **[Ru(dppz)]/TEL**. La afinidad de los diferentes complejos para el resto de los oligonucleótidos fue determinada siguiendo el mismo procedimiento experimental.

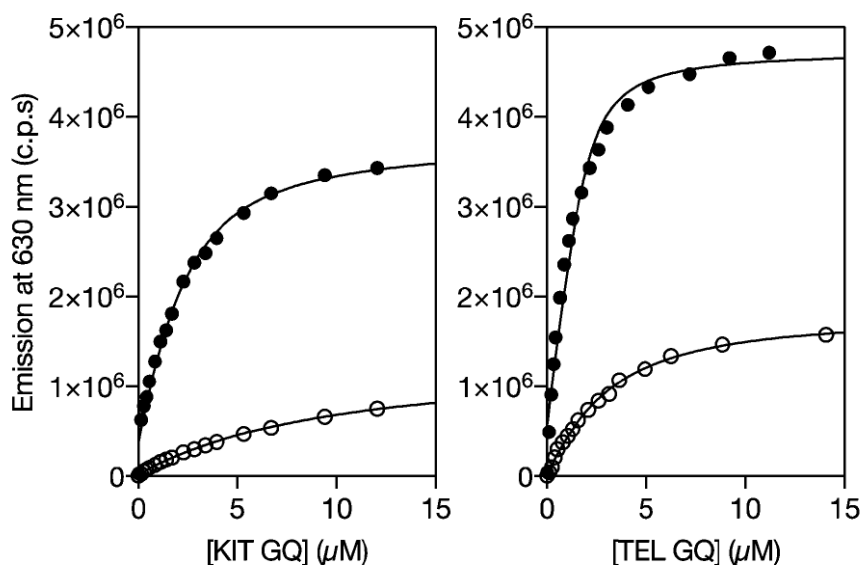


Figura 33: Perfiles de la emisión a 630 nm del complejo **[Ru(dppz)]** (○) y **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** (●) con los G4 KIT (derecha) y TEL (izquierda). Se usó la misma escala en ambas gráficas para poder comparar los datos. Las líneas se corresponden con el mejor ajuste para un modo de unión 1:1 que resultaron con unas constantes de disociación mostradas en la tabla (el ajuste de la curva se realizó con el programa Dynafit). Valoraciones similares fueron realizadas con los complejos **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** y **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>8</sub>**.

El análisis de las constantes de disociación aparentes indica una clara preferencia del complejo **[Ru(dppz)]** por el G4 TEL sobre los dos promotores del ADN G4s (Tabla 1). Por otro lado, el complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** presenta una mayor afinidad por todos los ADN y de nuevo, una clara preferencia por el cuadruplejo TEL respecto a las otras dos secuencias de G4s. Así pues, ambos complejos **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** y **[Ru(dppz)]** reconocen secuencias de G4s con mayor afinidad y, además, la presencia de la secuencia terminal de octaargininas induce a un incremento significativo en la unión. Finalmente, los estudios también sugieren que ambos complejos pueden discriminar entre las distintas topologías de los cuadruplejos mostrando, además, una considerable selectividad sobre la

secuencia TEL frente a c-MYC y c-KIT. Cabe destacar que, en algunos casos, el complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** aparentemente presenta una emisión intrínseca ligeramente superior al complejo **[Ru(dppz)]** la cual se podría deber a la protección del ligando dppz de un proceso de desactivación (mediado por la protonación del disolvente) por parte de la secuencia de oligoargininas.<sup>241</sup>

El diferente comportamiento respecto a la unión con los G4 mostrado por el complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** resulta evidente también en el espectro de UV-Visible, el cual se caracteriza por una banda MLCT (transferencia de carga metal-ligando) centrada a 443 nm que se ve afectada cuando el complejo se une a los G4s o al ADN-B.<sup>223,242</sup> Más concretamente, ambos complejos **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** y **[Ru(dppz)]** experimentan un evidente hipocromismo en sus respectivas bandas MLCT después de la adición de TEL (Figura 34), lo cual sugiere una fuerte interacción entre los metalopéptidos y el oligonucleótido.<sup>233</sup>

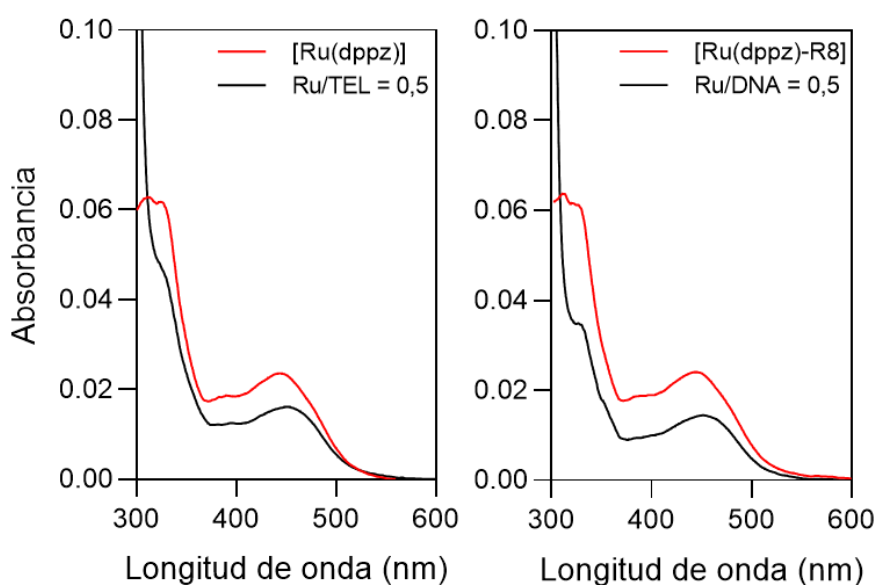


Figura 34: Espectros de UV-Vis de los complejos **[Ru(dppz)]** (4.0  $\mu$ M) y **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** (4.1  $\mu$ M) con el G4 TEL.

Sin embargo, este fenómeno de hipocromismo se aprecia más pronunciado en el complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** que en **[Ru(dppz)]**. Respecto a la interacción de **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** con c-MYC y c-KIT, el fenómeno de hipocromismo es

<sup>241</sup> a) C. J. Cardin, J. M. Kelly, S. J. Quinn, *Chem. Sci.* **2017**, 8, 4705–4723; b) P. L. Higgs, A. W. McKinley, E. M. Tuite, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 1883–1886.

<sup>242</sup> a) Q. Yu, Y. Liu, C. Wang, D. Sun, X. Yang, Y. Liu, J. Liu, *PLoS One* **2012**, 7, e50902; b) A. K. F. Mårtensson, P. Lincoln, *Dalton Trans. J. Inorg. Chem.* **2015**, 44, 3604–3613.

ligeramente menos pronunciado (Figura 35), corroborando las diferentes preferencias de unión de este metalopéptido por el ADN telomérico respecto a las dos secuencias promotoras de oncogenes.

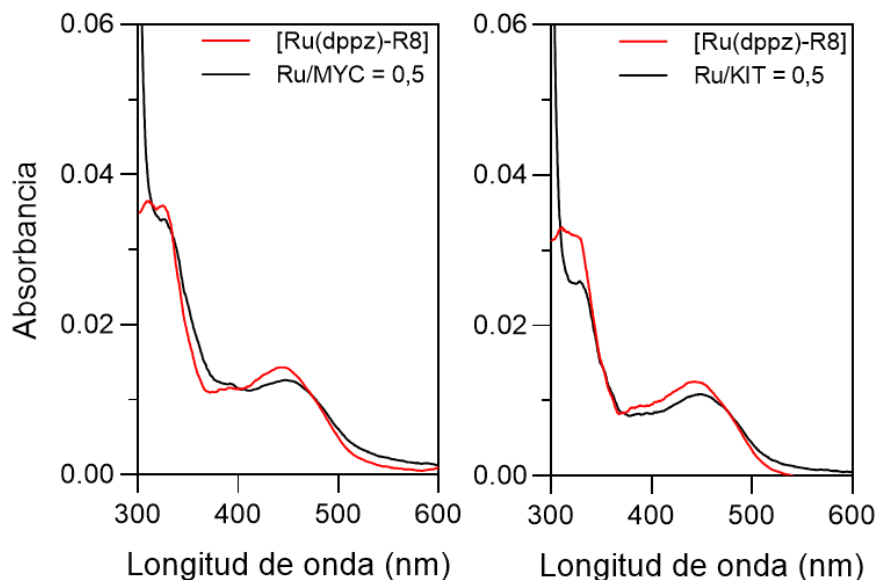


Figura 35: Espectros de UV-Vis del complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** (2.2 y 2.3  $\mu$ M respectivamente) con los G4s MYC y KIT.

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) puede ser utilizada para estudiar la conformación de los ácidos nucleicos permitiéndonos así obtener información muy valiosa, particularmente en el caso de los G4s polimórficos.<sup>233,243</sup> Curiosamente, los espectros de CD de todos los G4 estudiados permanecen inalterados en presencia tanto del complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** como de **[Ru(dppz)]**, lo que indica que las estructuras de los G4 no se ven significativamente afectadas por la presencia de los metalopéptidos de Ru(II) (Figura 36).

<sup>243</sup> A. Randazzo, G. P. Spada, M. W. da Silva, *Top. Curr. Chem.* **2013**, 330, 67–86.

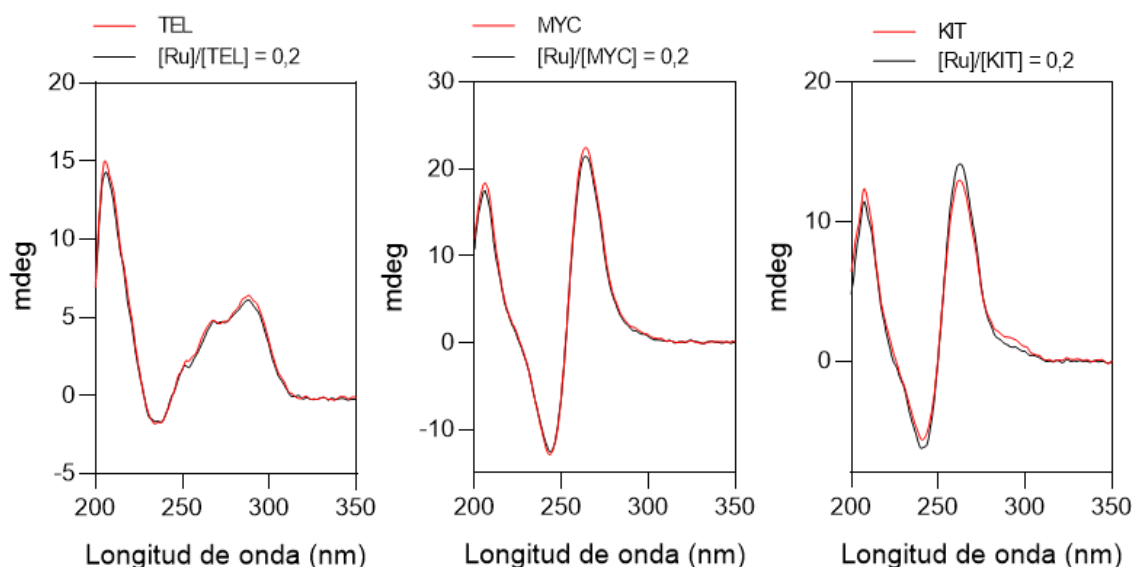


Figura 36: Espectros de dicroísmo circular del complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})]\text{-R}_8$  ( $2 \mu\text{M}$ ) con los ADN G4s ( $10 \mu\text{M}$ ) TEL, MYC y KIT.

No se observaron señales de CD en la región visible del espectro. Habiendo demostrado el efecto beneficioso del dominio de oligoarginina en el proceso de reconocimiento de los G4s, decidimos investigar el rol del ligando auxiliar en su interacción con estos ADNs. De este modo, sintetizamos dos nuevos complejos de Ru(II),  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$  y  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_8$  (Esquema 1), en los cuales el coligando fenantrolina fue reemplazado por una segunda unidad de dppz.<sup>233d</sup> Las valoraciones de fluorescencia mostraron que el complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$  se une con una mayor afinidad a los diferentes G4s que su análogo equipado con una sola unidad de dppz. Además, la preferencia de unión por la secuencia TEL respecto a las secuencias promotoras c-MYC y c-KIT, se mantuvo, aunque la selectividad en ese caso fue menos pronunciada respecto al complejo con un ligando de fenantrolina. Por el contrario, la sustitución del ligando auxiliar de fenantrolina (phen) en el complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_8$  resultó en un incremento significativo (unas 20 veces más) de la afinidad sobre las secuencias promotoras de oncogenes c-MYC y c-KIT de modo que el perfil de selectividad general se invierte con respecto a  $[\text{Ru}(\text{dppz})]\text{-R}_8$  (Tabla 1).

Tabla I: Constantes de disociación ( $K_D/ \mu\text{M}$ ) de los metalopéptidos de Ru(II) con los distintos oligonucleótidos.

	TEL	c-MYC	c-KIT
<b>[Ru(dppz)]</b>	2.72 ± 0.21	11.23 ± 1.03	19.27 ± 1.69
<b>[Ru(dppz)]R<sub>8</sub></b>	0.93 ± 0.06	4.01 ± 0.33	2.05 ± 0.10
<b>[Ru(dppz)<sub>2</sub>]</b>	0.85 ± 0.05	3.65 ± 0.19	3.06 ± 0.15
<b>[Ru(dppz)<sub>2</sub>]R<sub>8</sub></b>	1.30 ± 0.07	0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.04

Este es el primer ejemplo de esta clase de inversión de selectividad entre diferentes conformaciones G4s. Nuestros estudios sugieren que tanto el ligando auxiliar como el dominio de oligoargininas son elementos estructurales claves que influyen en el proceso de reconocimiento de G4s.

Para obtener más información sobre el proceso de reconocimiento de los G4, realizamos estudios computacionales con los complejos **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** y **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>4</sub>** (el dominio R<sub>8</sub> se redujo a cuatro residuos para hacer viables los cálculos computacionales). Estos complejos se acoplaron a la estructura cristalina del ADN telomérico TEL.<sup>244</sup> Se hicieron cálculos con los cuatro estereoisómeros (dos L y dos D) de **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** y **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>4</sub>**. En concordancia con los resultados experimentales obtenidos, los perfiles de unión de ambos metalopéptidos parecen ser completamente diferentes. En el caso del complejo **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]**, nuestro modelo indica que un ligando dppz encaja perfectamente en el bolsillo creado por la secuencia GTTAG cerca del extremo del cuadruplejo, para todos los estereoisómeros (Figura 37).



<sup>244</sup> Secuencia del AND: GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG; PDB ID: 1kf1

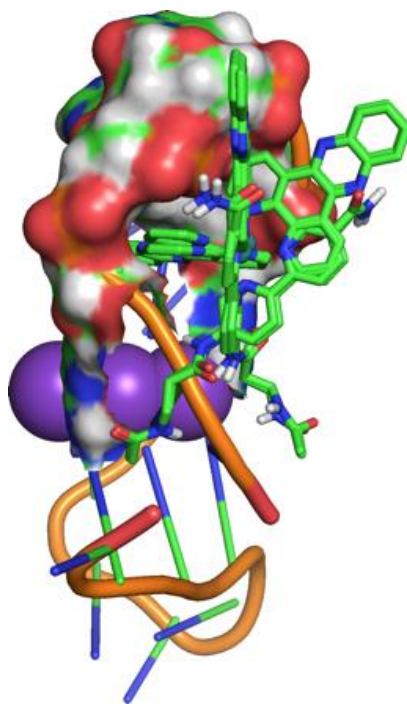


Figura 37: Conformación más estable del complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$  con el G4 TEL (1kfl). Las esferas de color violeta y verde oscuro representan los átomos de potasio y rutenio respectivamente. La superficie de Van der Waals resalta el bolsillo formado por la secuencia GTTAG en el cuadruplejo.

El valor de la energía de unión intermolecular proporciona una estimación de la fuerza de dicha unión, siendo de unas  $11\text{-}12 \text{ kcal mol}^{-1}$  para el complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$ . La energía libre de unión también fue estimada con AutoDock obteniendo valores similares:  $9\text{-}10 \text{ kcal mol}^{-1}$ . El modo de unión de  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_4$  parece ser diferente al de  $[\text{Ru}(\text{dppz})]$ , ya que en ninguna de las poses de energía más baja hay un ligando auxiliar dppz en un CTTAG, o bolsillos similares. De hecho, el modo de unión del complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_4$  parece estar claramente dominado por las interacciones entre los grupos guanidinio cargados positivamente de las cadenas laterales de las argininas y los grupos fosfato aniónico del esqueleto del ADN G4. El valor de la energía de unión intermolecular de  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_4$  es de  $19\text{-}20 \text{ kcal mol}^{-1}$ , y la energía de unión libre es de  $10\text{-}11 \text{ kcal mol}^{-1}$ , lo que indica una mejora en la interacción del complejo con la secuencia TEL en comparación con el complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$ . Por lo tanto, los resultados computacionales apoyan nuestra suposición inicial de que el dominio oligocatiónico establece interacciones electrostáticas constructivas con esqueleto del ADN, lo que resulta en una mayor afinidad de unión. En un intento por descifrar el origen de la inversión en la selectividad resultante de la introducción de una segunda unidad de dppz, también

realizamos el acoplamiento del estereoisómero  $\Lambda$ -[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>4</sub> a c-KIT.<sup>245</sup> Los estudios computacionales del complejo  $\Lambda$ -[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>4</sub> a TEL y c-KIT producen prácticamente la misma energía de unión independientemente de las diferentes geometrías: en la parte superior para el G4 TEL y parcialmente intercalado para c-KIT (Figura 38). De acuerdo con los resultados experimentales, esto sugiere un mecanismo de unión similar a pesar de las diferencias de sustrato.<sup>246</sup>

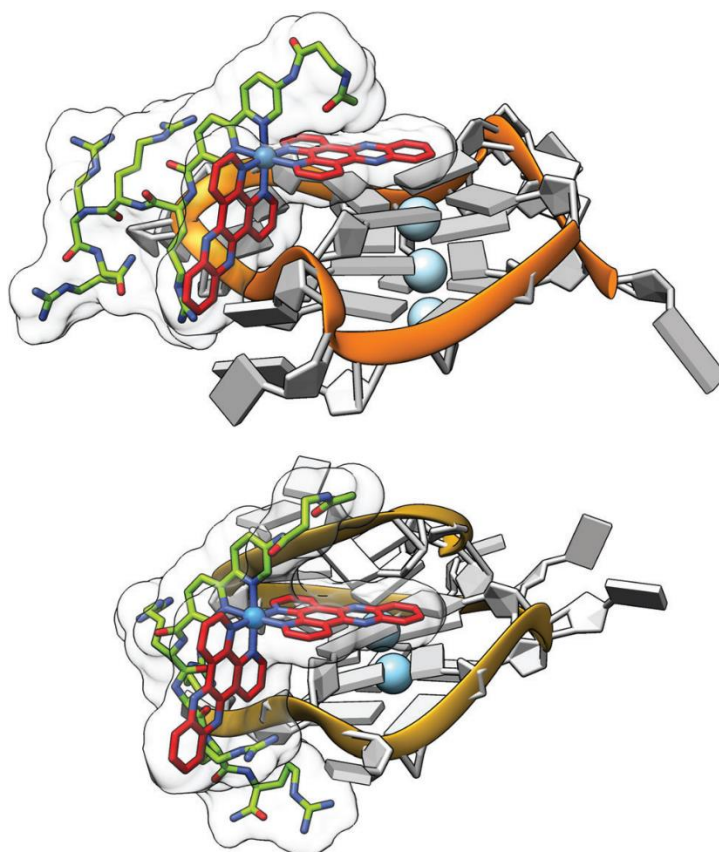


Figura 38: Arriba, conformación más estable de  $\Lambda$ -[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>4</sub> con el G4 TEL. Los ligandos dppz se muestran en rojo con uno de ellos encajando en la parte superior del G4. Abajo, mejor pose  $\Lambda$ -[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>4</sub> con el G4 c-KIT. En este caso, uno de los ligandos dppz se encuentra parcialmente intercalado con el G4. Las esferas azul claro representan los iones de potasio en el centro de los G-cuartetos, las bases se muestran de color gris y el esqueleto del ADN como cintas de color naranja o amarillo. El dominio R<sub>4</sub> interactúa en ambos casos estabilizando los complejos mediante una interacción de tipo electrostática.

<sup>245</sup> Secuencia del AND: AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG; PDB ID 4wo3

<sup>246</sup> Debido a las relaciones exponenciales entre  $K_D$  y  $\Delta G$ , la diferencia 20 veces superior en la  $K_D$  puede surgir de diferencias relativamente pequeñas en la energía libre de enlace.

Debido a las interesantes propiedades de unión al ADN de estos complejos de rutenio, nos propusimos estudiar también sus efectos en células vivas. Para ello incubamos células Vero con 25  $\mu\text{M}$  del complejo  $[\text{Ru}(\text{Dppz})_2]$ , durante 30 min. Tras la incubación lavamos las células con medio de cultivo y las observamos con el microscopio de fluorescencia.

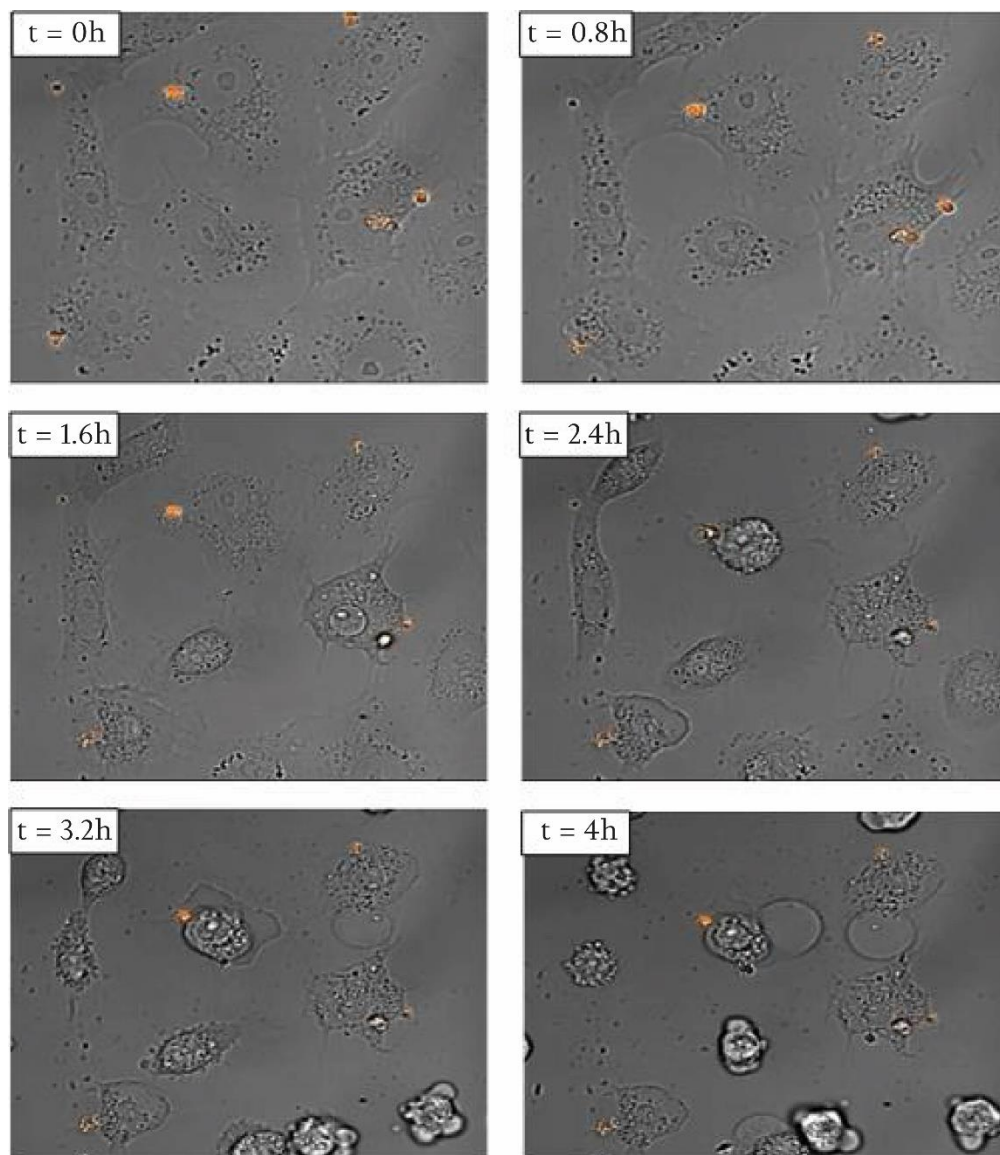


Figura 39: Estudios realizados en células Vero en DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) sin FBS (fetal bovine serum) o antibióticos, del compuesto  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$  (25  $\mu\text{M}$ ) con un tiempo de incubación de 30 min a 37°C en atmósfera húmeda con 5%  $\text{CO}_2$ . Las células fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia.

Así comprobamos como el compuesto se deposita en forma de agregados que se asocian específicamente con las células y no se observan en ningún caso en la superficie de las placas de cultivo en aquellos espacios libres de células. Al prolongar en el tiempo la incubación, se observa que los agregados acaban perforando la membrana plasmática, lo que provoca la pérdida de la homeostasis

celular y su muerte. Por otra parte, las células en las que no es aparente la presencia en su membrana de ningún agregado del compuesto, mueren por apoptosis. Esto sugiere que, o bien una pequeña parte del complejo ha internalizado, aunque no seamos capaces de detectarlo, o bien existe algún tipo de interacción con la membrana plasmática o alguno de sus componentes. En cualquiera de los dos casos, el contacto con estas sustancias es capaz de desencadenar el proceso de apoptosis en aquellas células que conservan la membrana intacta.

### **Conclusiones**

En este primer capítulo de la tesis hemos estudiado el efecto de una secuencia C-terminal de oligoargininas en las propiedades de reconocimiento de un agente de unión a G4s. Hemos encontrado que la incorporación de esta secuencia de octaargininas ( $R_8$ ) a un complejo Ru(II)-dppz tiene como consecuencia un aumento de su afinidad por secuencias de G4s y que la relación entre el ligando auxiliar y la secuencia de  $R_8$  es clave para controlar la selectividad entre las diferentes estructuras de los G4s. Además, la funcionalización con  $R_8$  dotó a los agentes de reconocimiento G4s de propiedades de internalización celular y de capacidades citotóxicas apreciables.

## CAPÍTULO 2

### **Síntesis, caracterización y estudio de las propiedades de unión al ADN de metalopéptidos *semi-sandwich* de Ru(II)**

#### **Resumen**

Se han sintetizado una serie de metalopéptidos arénicos de Ru(II) de tipo *semi-sandwich*. Este tipo de complejos están equipados con un ligando areno, un ligando bidentado quelato y un ligando monodentado lábil. Haciendo uso de la metodología SPPS hemos podido incorporar a la esfera de coordinación del Ru(II) un ligando bpy como ligando bidentado quelato. A través de este procedimiento se han sintetizado tres metalopéptidos diferenciados únicamente en la naturaleza del ligando arénico. Se ha determinado la estructura en estado sólido de uno de ellos a través de difracción de rayos X. Se han estudiado sus propiedades de unión al ADN mediante HPLC-MS(ESI) y electroforesis.

## INTRODUCCIÓN

### **El descubrimiento de la estructura del ADN-B**

El ADN es un biopolímero formado por nucleótidos y estructurado en torno a un esqueleto de polifosfatos cargado negativamente. El ADN puede adoptar diferentes estructuras secundarias, pero la más relevante en condiciones fisiológicas es el ADN-B. El relato de su descubrimiento es uno de los capítulos más apasionantes de la Historia de la Ciencia.

Uno de los primeros científicos en percatarse de que había cierto tipo de información que se transmitía de una generación a otra fue el naturalista inglés Charles Darwin. En 1859 publicó su libro *El origen de las especies*,<sup>247</sup> en el cual expuso su famosa *Teoría de la Evolución*. Según Darwin, los seres vivos que mejor se adaptan a su entorno tienen más probabilidades de sobrevivir, reproducirse y transmitir sus características a las generaciones futuras, lo que provoca que las especies cambien gradualmente con el tiempo.

En 1866, Gregor Mendel—considerado como el padre de la genética— sugirió que existían ciertas características propias de las especies que se transmitían de una generación a otra. Mendel realizó una serie de experimentos con plantas de guisantes intentando cruzar sus características con combinaciones específicas. A través de estos estudios logró identificar siete características hereditarias diferentes y acuñó los términos *recesivo* y *dominante*.<sup>248</sup>

Tres años más tarde, el químico suizo Friedrich Miescher descubrió accidentalmente el ADN mientras trataba de aislar y caracterizar los componentes proteicos de los leucocitos. Comprobó que esta nueva sustancia— a la que llamó *nucleína*—tenía unas propiedades químicas inusuales, además de un alto contenido en fósforo, ausencia de azufre y una gran resistencia a la digestión proteica.<sup>249</sup>

Posteriormente, en 1881, el bioquímico alemán Albrecht Kossel demostró que la nucleína era en realidad una mezcla de ácidos nucleicos, logrando aislar las cinco bases nitrogenadas que la componen: adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U).

Un año más tarde, Walter Flemming descubrió la mitosis. Sus estudios sobre la división de los cromosomas fueron de gran importancia para el desarrollo de la

---

<sup>247</sup> C. Darwin, W. F. Bynum, *The Origin of Species by Means of Natural Selection: Or, the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life* **2009**. Penguin Harmondsworth.

<sup>248</sup> C. T. Druery, W. Bateson J. R. Horti. *Soc.* **1901**, 26, 1-32.

<sup>249</sup> R. Dahm, *Human Genetics* **2008**, 122, 565–81.

Teoría cromosómica de la herencia, formulada a principios siglo XX por Theodor Boveri y Walter Sutton, en la que postularon el papel clave que desempeñan los cromosomas en la transmisión de la información genética de generación en generación.<sup>250</sup>

El siguiente capítulo de esta historia lo escribió Sir Archibald Edwar Garrod, quien en 1902 relacionó por primera vez las leyes de Mendel con el desarrollo de una enfermedad y propuso la idea de que las enfermedades se debían a errores innatos del metabolismo.<sup>251</sup>

Algunos años más tarde, en 1944, el médico canadiense Oswald Avery descubrió que al mezclar una variante viva e inofensiva de la bacteria responsable de la neumonía (neumococo) con una variante inerte pero letal, la bacteria inicialmente inofensiva se volvía dañina. Avery publicó estos estudios en un artículo en donde describió al ADN como el Principio Transformador, y en donde propuso que es el ADN, y no las proteínas, como se creía hasta entonces, las portadoras de los genes.<sup>252</sup> Basándose en los estudios de Avery, Erwin Chargaff hizo en 1950 dos descubrimientos que resultaron fundamentales para la posterior elucidación de la estructura de doble hélice del ADN canónico. El primero de ellos fue que, en el ADN, el número de guaninas es igual al de citosinas y el número de adeninas es igual al de timinas. El segundo fue que la cantidad relativa de adeninas, timinas, citosinas y guaninas varía entre especies, lo que aumentó el número de evidencias a favor de que era el ADN, y no las proteínas, el encargado de almacenar y transportar la información genética. A estos dos descubrimientos se los conoce hoy en día como las reglas de Chargaff.<sup>253</sup>

Hasta el inicio de la década de los 50 del siglo XX, varios investigadores habían hecho importantes pero inconexos descubrimientos sobre la composición y la estructura del ADN. Además de las reglas de Chargaff, el químico orgánico Alexander Todd descubrió en 1952 que el ADN era un polímero cuyo esqueleto contenía unidades repetidas de grupos fosfato y desoxirribosa. También en 1952, el matemático John Griffith propuso, basándose para ello en una serie cálculos de mecánica cuántica, que las bases nucleicas del ADN se emparejaban complementariamente a través de enlaces de hidrógeno: adenina con timina y

---

<sup>250</sup> a) W. S. Sutton, Biol. Bull. **1902**, 4, 24–39; b) T. H. Boveri, “Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns”, (Archive.org)

<sup>251</sup> A. E. Garrod, Yale J. Biol. Med. **2002**, 75, 221–31.

<sup>252</sup> O.T. Avery, C. M. Macleod, M. McCarty, J. Exp. Med. **1944**, 79, 137-58.

<sup>253</sup> a) E. Vischer, E. Chargaff, J. Biol. Chem. **1948**, 176, 703–14; b) E. Chargaff, Experientia, **1950**, 6, 201–209.

## Capítulo 2

citocina con guanina. Por otro lado, Maurice Wilkins y Rosalind Franklin, del King's College de Londres, habían estado obteniendo durante los últimos años imágenes de rayos X de alta resolución de fibras de ADN, que sugerían que su estructura era helicoidal. En mayo de 1952 Franklin obtuvo la famosa "Photograph 51" del ADN (Figura 40). Meses más tarde, Maurice Wilkins mostraría esta imagen a Watson y Crick sin el permiso de su autora, algo que resultó clave en toda esta historia. Por otra parte, Linus Pauling, había descubierto poco tiempo antes una de las estructuras secundarias de las proteínas más recurrentes, la hélice alfa, lo que hizo que los científicos del momento tuviesen presente en su mente esta forma geométrica y la considerasen biológicamente viable. Además, el considerado padre de la biología molecular había desarrollado recientemente el sistema de diseño de moléculas a través de modelos moleculares, metodología que Watson y Crick utilizaron en sus investigaciones desde finales de 1952. Estos dos científicos temían que Pauling descubriese la estructura del ADN antes que ellos y, de hecho, éste llegó a proponer un modelo helicoidal de triple hebra en febrero de 1953, que resultó ser erróneo.<sup>254</sup>

A principios de 1953, todo estaba listo para que la estructura del ADN fuese descubierta en cuestión de meses. Después de algunos intentos infructuosos que incluyeron un modelo de triple hélice en el que las bases estaban enfrentadas con ellas mismas (citocina con citocina, etc.), Watson y Crick dieron con la estructura correcta. Para ello necesitaron la ayuda inestimable de Jerry Donohue, un químico procedente del laboratorio de Pauling que se encontraba de sabático en Cambridge por aquel entonces y con quien compartían despacho. En la construcción de sus modelos, Watson estaba utilizando la forma enólica de la guanina y de la timina, información que había sacado de un libro de texto muy usado en aquella época. Fue Donohue el que le hizo ver que ese libro estaba desfasado, que en aquel momento los químicos habían aceptado que la forma correcta de esas dos bases era la cetónica y que, en consecuencia, los modelos en los que estaban trabajando hasta ese momento era incorrectos. En la mañana del 28 de febrero de 1953, mientras jugaba con sus modelos moleculares, Watson consiguió encajar todas estas piezas y obtener por fin un modelo de estructura plausible para el ADN-B. Watson y Crick llegaron a un acuerdo con el laboratorio rival del King's College para comunicar este descubrimiento de manera coordinada en una serie de tres artículos que fueron publicados en la revista

---

<sup>254</sup> L. Pauling, R. B. Corey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1953**, 39, 84–97.

Nature.<sup>255</sup> En 1962, Watson, Crick y Wilkins fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por estos estudios.



Figura 40: Imagen de rayos X del ADN en su forma B, denominada “Photograph 51”, tomada por R. G. Gosling y R. E. Franklin en 1952.<sup>255c</sup>

### Estructura del ADN-B

El ADN-B es una doble hélice dextrógira compuesta por dos hebras antiparalelas que se mantienen unidas a través de interacciones de enlace de hidrógeno entre pares de nucleobases (adenina con timina y citosina con guanina), que se conocen como *emparejamiento canónico de bases Watson-Crick*.

El ADN-B se caracteriza por tener un diámetro de aproximadamente 20 Å, con 10 pares de bases por giro de la hélice. La distancia entre pares de bases consecutivas es de 3,4 Å, con una rotación por residuo de 36°. A pesar de ser una estructura muy estable, regular y bien conservada, hay ciertas desviaciones en el ángulo de torsión que son características de la secuencia de nucleótidos y que tienen mucha importancia en lo que se refiere a su interacción con las proteínas.<sup>256</sup> En el ADN-B se pueden distinguir dos surcos de diferente tamaño. El surco mayor es más ancho y no demasiado profundo, mientras que el surco menor es más angosto y profundo. La anchura del surco menor viene determinada por la secuencia de nucleótidos, de tal forma que las regiones ricas en AT son más estrechas mientras que las regiones ricas en GC son más anchas.

<sup>255</sup> a) J. D. Watson, F. H. Crick *Nature* **1953**, 171, 737–38; b) M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature*, **1953**, 171, 738–740; c) R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature*, **1953**, 171, 740–741.

<sup>256</sup> a) G. Michael Blackburn, M. J. Gait, D. M. Williams, D. Loakes, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Royal Society of Chemistry, **2006**; b) R. G. Zhang, A. Joachimiak, C. L. Lawson, R. W. Schevitz, Z. Otwinowski, P. B. Sigler, *Nature* **1987**, 327, 591–597; c) R. E. Dickerson, H. R. Drew, *J. Mol. Biol.* **1981**, 149, 761–786.

Sin embargo, la variabilidad del surco mayor es mucho mayor que la del surco menor. Además, diferentes estudios sobre la hidratación de los dos surcos muestran diferencias relevantes desde un punto de vista termodinámico. Si se tienen en cuenta de forma conjunta todos estos factores—tamaño, hidratación y variabilidad—es fácil entender por qué las proteínas reconocen el ADN preferentemente a través de la interacción con el surco mayor.<sup>257</sup>

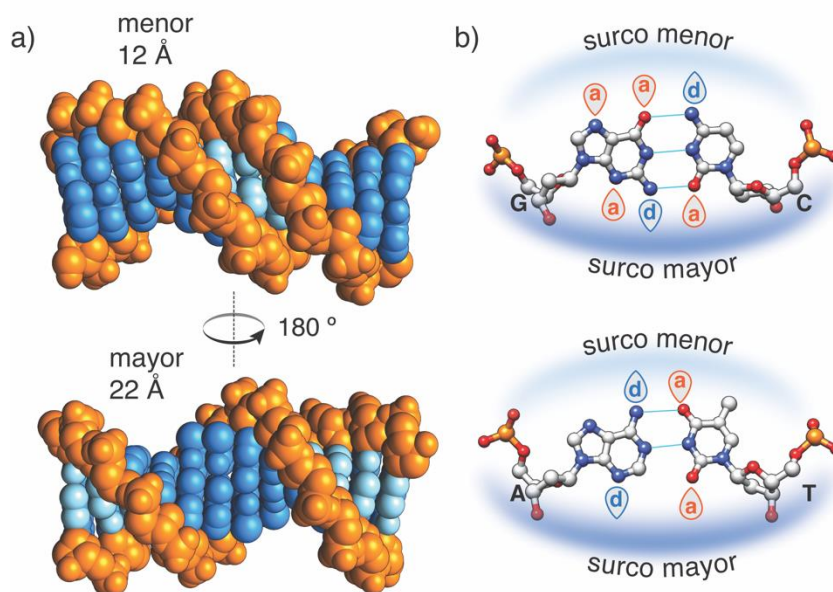


Figura 41: a) Estructura del ADN-B representada por el dodecámero de Dickerson-Drew (PDB: 4C64), en la que se destacan los principales elementos estructurales: el esqueleto de ribosa-fosfato en naranja, los bordes expuestos de los pares de bases en el surco mayor en azul oscuro, y en el surco menor en azul claro; b) la estructura de los diferentes pares de bases G•C y A•T mostrando el patrón de los dadores (d) y los aceptores (a) de enlaces de hidrógeno.

### **Función del ADN-B**

La naturaleza de los seres vivos está determinada por sus genes, que son secuencias concretas de ADN —ácido desoxirribonucleico— en las que se encuentran codificadas todas las proteínas necesarias para su desarrollo, crecimiento, supervivencia y reproducción. El mecanismo a través del cual se expresa y se transmite la información genética contenida en los genes fue

<sup>257</sup> a) 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; b) N. M. Luscombe, J. Laskowski, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235-242.

postulado por Francis Crick en 1957 (y actualizado en 1970) y quedó ilustrado en lo que se conoce como el Dogma Central de la Biología.

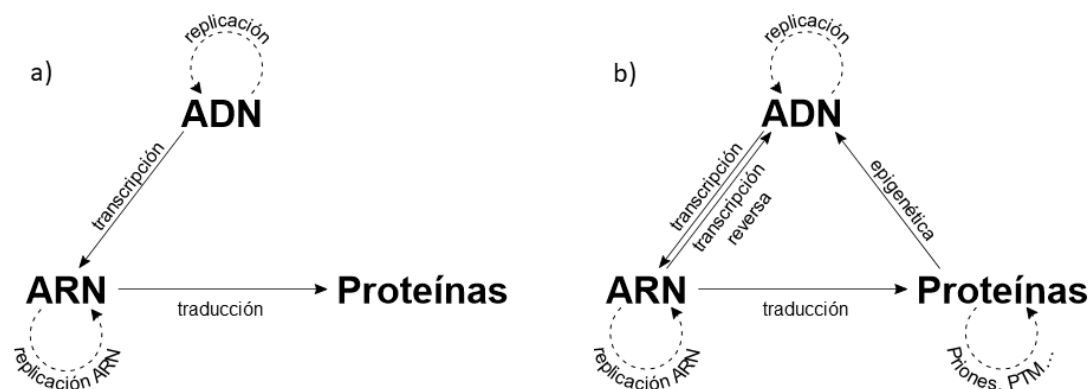


Figura 42: a) Dogma central de la Biología Molecular propuesto originalmente por F. Crick en 1957;<sup>258</sup> b) versión actualizada del Dogma que incluye otros procesos que influyen en la forma en que la información es transmitida/almacenada en las células.

Según el esquema original del Dogma, la información genética es transcrita de forma unidireccional desde el ADN en el ARN —ácido ribonucleico— y que este traduce en proteínas, que son las herramientas que realizan la acción celular. Asimismo, también postula que el ADN puede duplicarse y, por lo tanto, transmitir información genética a la descendencia. Esta primera propuesta fue muy criticada en su momento por su unidireccionalidad, es decir, porque parte de la base de que la información genética es transferida desde el ADN a las proteínas, pero la transferencia de proteína a proteína o de proteína a ADN no es posible. El dogma ha ido evolucionando con el paso de los años al irse introduciendo nuevas rutas para el flujo de la información (Figura 42).

### Agentes de reconocimiento del ADN-B

El desarrollo de moléculas pequeñas con actividad terapéutica que tienen al ADN como diana biológica es uno de los campos más activos en Química Biológica y Médica, sobre todo desde el descubrimiento del origen genético de múltiples enfermedades y de la influencia del genotipo en la respuesta a medicamentos. En este sentido, se ha demostrado que la detección y señalización de secuencias específicas del ADN tiene un enorme potencial diagnóstico y clínico.<sup>259</sup> A pesar

<sup>258</sup> a) F. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, 12, 138-163; b) F. Crick, *Nature* **1970**, 227, 561-563; c) M. Cobb, *PLoS Biol.* **2017**, 15, e2003243.

<sup>259</sup> a) B. Valeur, *Molecular Fluorescence* **2002**, Wiley-VCH, Weinheim; b) W. T. Manson, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity – A practical guide to technology for quantitative real-time analysis* **1999**, Academic Press; c) E. Pazos, O. Vázquez, J. L.

de los avances logrados en este campo, el reconocimiento selectivo de secuencias específicas del ADN o de conformaciones concretas del mismo sigue siendo un reto colosal.

Los **agentes de reconocimiento del ADN** basados en moléculas pequeñas se pueden clasificar en dos grandes grupos, las moléculas orgánicas y los complejos metálicos. En el anterior capítulo hemos explicado las ventajas que poseen los complejos metálicos sobre las moléculas orgánicas como agentes de unión a G-cuadruplejos, ventajas que se pueden extrapolar a los agentes de reconocimiento de otras estructuras secundarias del ADN, como, por ejemplo, el ADN-B. En cualquier caso, ambas clases de compuestos pueden interactuar con el ADN-B a través de diferentes modos de unión:<sup>260</sup>

- *Interacciones electrostáticas.* En el ADN-B, los grupos fosfato cargados negativamente interactúan electrostáticamente con iones metálicos de los grupos I y II de la tabla periódica, lo que provoca una estabilización de la estructura. Esta estabilización también puede conseguirse a través de la interacción con moléculas orgánicas policatiónicas a pH fisiológico, como la espermina o espermidina.<sup>261</sup> Unos complejos metálicos de Pt(II) con carga formal positiva, denominados *abrazaderas fosfato* (phosphate clamps), son capaces de interactuar con el ADN de una manera muy similar a esas poliaminas.<sup>262</sup>

---

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. Van Engelenburg, A. E. Palmer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 60-82.

<sup>260</sup> a) L. M. Wilhelmsson, P. Lincoln, B. Nordén, *Sequence-specific DNA Binding Agents*, RSC Publishing, **2006**. b) A. Lorente, M. J. Fernández, *An. Quím.* **2008**, 104, 280-289. c) M. J. Hannon, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 280-295.

<sup>261</sup> H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas Jr, *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28, 3379- 3385.

<sup>262</sup> S. Komeda, T. Moulaei, K. K. Woods, M. Chikuma, N. P. Farrell, L. D. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16092-16103.

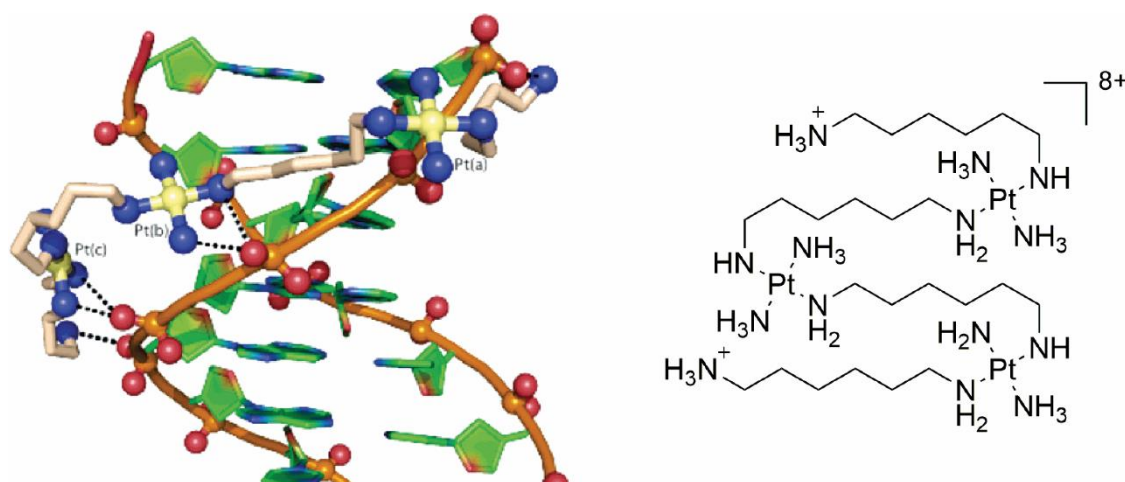


Figura 43: representación de un *phosphate clamp* (TriplatinNC) con un ADN (PDB 2DYW) Adaptada de la referencia 262 con permisos de *The Royal Society of Chemistry*.

- **Intercalación/inserción.** Este tipo de interacción es típica de compuestos que contienen sistemas aromáticos extendidos que son  $\pi$ -deficientes. La interacción se puede producir a través de cualquiera de los dos surcos del ADN-B.<sup>263</sup> Aunque por lo general este tipo de interacción muestra una pobre selectividad de secuencia, existe una ligera preferencia por regiones ricas en pares de bases G-C.<sup>264</sup> Un ejemplo típico de este modo de unión es el complejo  $\Delta$ -[Rh(Me<sub>2</sub>Trien)Phi]<sup>3+</sup>, que intercala el ligando fenantroquinona (Phi) entre dos pares de bases.<sup>265</sup> Si el ligando aromático es demasiado extenso no podrá intercalarse, aunque sí insertarse entre pares de bases no complementarias, colocándose en el espacio que dejan libre en el interior de la doble hélice del ADN-B.<sup>266</sup>

<sup>263</sup> a) K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Intercalating Drugs, in Drug-DNA interactions: Structures and Spectra* **2008**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA; b) A. Rescifina, Z. Zagni, M.G. Varrica, V. Pistarà, A. Corsaro, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 74, 95-115.

<sup>264</sup> a) B. A. D. Neto, A. A. M. Lapis, *Molecules* **2009**, 14, 1725-1746; b) H. M. Bernan, P. R. Young, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, 10, 87-114.

<sup>265</sup> A. H. Krotz, B. P. Hudson, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12577.

<sup>266</sup> A. C. Komor, J. K. Barton, *Chem. Commun.*, **2013**, 3617-3630.

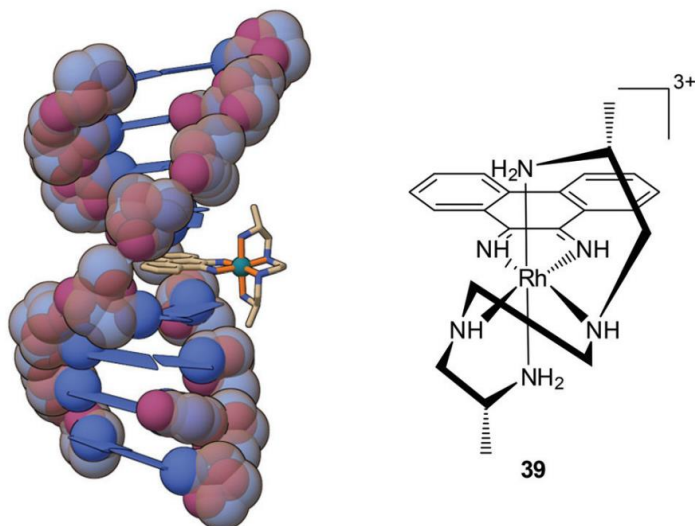


Figura 44: imagen generada a partir de los datos de rayos X del complejo intercalante selectivo  $[\text{Rh}(\text{Me}_2\text{trien})(\text{phi})]^{3+}$  interaccionando con la secuencia 5'-TGCA-3' (PDB 454D). Adaptada con permisos de B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright, J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.* **2015**, 44, 3505–3526.

- **Inserción en el surco menor.** Este es un modo de unión típico de moléculas orgánicas pequeñas que poseen forma cóncava, ya que se adaptan de forma idónea al hueco existente en este surco. Las fuerzas intermoleculares que estabilizan el reconocimiento son los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas.<sup>267</sup> La inserción está favorecida entrópicamente debido al desplazamiento de iones y de moléculas de agua. Este modo de unión suele tener lugar en regiones ricas en pares de bases A-T debido a que su surco menor es más profundo y estrecho. Algunos ejemplos de moléculas que se insertan en el surco menor son DAPI<sup>268</sup> o Hoechst 33342.<sup>269</sup> Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado el primer ejemplo de un complejo metálico capaz de interactuar con el ADN-B a través de una inserción canónica en el surco menor.<sup>270</sup>

<sup>267</sup> P. G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, D. Preti, M. A. Tabrizi, M. G. Pavani, R. Romagnoli, *Med. Res. Rev.* **2004**, 24, 475-528.

<sup>268</sup> a) B. Nguyen, M. P. H. Lee, D. Hamelberg, A. Joubert, C. Bailly, R. Brun, S. Neidle, D. W. J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13680-13681; b) D. Hamelberg, L. D. Williams, W.D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7745-7755.

<sup>269</sup> J. Bucevičius, G. Lukinavičius, R. Gerasimaitė, *Chemosensors* **2018**, 6, 18.

<sup>270</sup> M. I. Sánchez, G. Rama, R. Calo-Lapido, K. Ucar, P. Lincoln, M. Vázquez López, M. Melle-Franco, J. L. Mascareñas, M. E. Vázquez, *Chem. Sci.* **2019**, 10, 8668–8674.

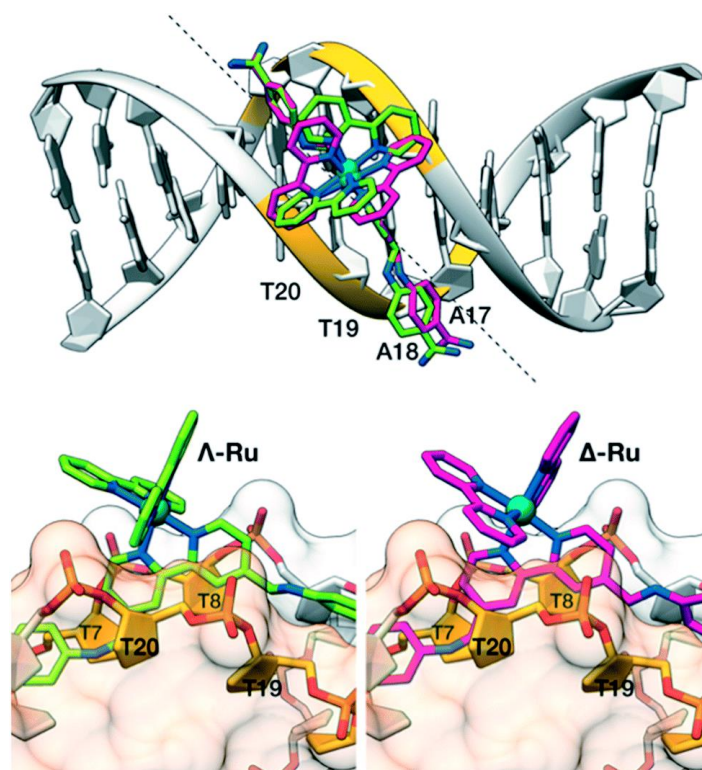


Figura 45: Estructuras de *docking* del compuesto  $\Lambda$ -Ru (verde) y  $\Delta$ -4Ru (magenta). Arriba: alineamiento de los ligandos b4bpy con el surco menor del dodecámero de Dickerson-Drew (**xA2T2**). Las líneas punteadas forman un ángulo de  $45^\circ$  con el eje del ADN y coincide con la orientación aproximada del ligando b4bpy de los complejos. Abajo izquierda: vista lateral del complejo  $\Lambda$ -Ru mostrando el ligando de bipyridina entre los grupos fosfato flanqueando la T20 (frontal, superficie naranja) y T8 (posterior, superficie gris oscura). Abajo derecha: idéntica vista para el complejo  $\Delta$ -4Ru. Adaptado con permisos de *The Royal Society of Chemistry*.

- *Interacción covalente/coordinada covalente*. Algunos complejos metálicos con posiciones de coordinación vacantes o lábiles son capaces de establecer enlaces covalentes coordinados con las nucleobases del ADN, fundamentalmente con el N<sup>7</sup> de la guanina, aunque también pueden participar en el proceso el N<sup>2</sup> de la guanina o en el caso de la adenina, el N<sup>3</sup> y el N<sup>7</sup>.<sup>271</sup> Este tipo de complejos suelen tener unas propiedades citotóxicas muy importantes y algunos de ellos se usan desde hace tiempo en terapia anticáncer,<sup>272</sup> como, por ejemplo, el cisplatino y derivados.<sup>273</sup> A este grupo de agentes de unión pertenece los complejos arénicos de Ru(II), de los que hablaremos en detalle más adelante.

<sup>271</sup> S. R. Rajski, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2723.

<sup>272</sup> D. Fu, J. A. Calvo, L. D. Samson, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12, 104-120.

<sup>273</sup> T. Boulikas, M. Vougiouka, *Oncol. Rep.* **2004**, 11, 559-595; b) R. A. Alderden, M. D. Hall, T. W. Hambley, *J. Chem. Ed.* **2006**, 83, 728-734.

### Complejos de Ru(II) derivados del ligando areno

Existe un buen número de complejos de rutenio con prometedora actividad anticancerígena e, incluso, algunos complejos de Ru(III), como por ejemplo NAMI-A<sup>274</sup> o KP1019,<sup>275</sup> han llegado a ensayos clínicos. Sin embargo, se cree que su actividad *in vivo* pasa por la reducción de su estado de oxidación a Ru(II). Debido a esto, ha aumentado el interés científico por los complejos de Ru(II) equipados con un ligando areno,<sup>276</sup> los cuales, además, contienen un ligando bidentado quelato y un ligando monodentado lábil. Estas estructuras de semi-sandwich o taburete de piano (piano-stool) presentan múltiples opciones de diseño debido a las potenciales posibles modificaciones tanto en el ligando areno, como en el ligando bidentado quelato, en el ligando lábil o en la carga neta del complejo, lo que permite controlar su termodinámica y su cinética y, por lo tanto, sus propiedades farmacológicas (captación y distribución celular, efectos secundarios tóxicos y desintoxicación o interacciones con otras biomoléculas).<sup>277</sup> Por ejemplo, complejos de Ru(II) del tipo  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{en})\text{X}]^+$  (en donde X es un ligando lábil) presentan altos niveles de citotoxicidad *in vitro* en diversas líneas celulares, comparables a la del cisplatino y, además, dicha citotoxicidad es dependiente del ligando areno.<sup>278</sup> Otros ejemplos con un modo de acción similar al cisplatino son el  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-biphenyl})(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$  y  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})(\text{pta})\text{Cl}_2]$ .<sup>279</sup> Por

---

<sup>274</sup> J. M. Rademaker-Lakhai, D. Van Den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 3717–3727

<sup>275</sup> M. A. Jakupec, V. B. Arion, S. Kapitza, E. Reisner, A. Eichinger, M. Pongratz, B. Marian, N. Grafvon Keyserlingk, B. K. Keppler, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2005**, 43, 595 – 596

<sup>276</sup> a) M. J. Clarke, F. Zhu, D. R. Frasca, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2511–2533; b) M. J. Clarke, S. Bitler, D. Rennert, M. Buchbinder, A. D. Kelman, *J. Inorg. Biochem.* **1980**, 12, 79–87; c) L. A. Huxham, E. L. S. Cheu, B. O. Patrick, B. R. James, *Inorg. Chim. Acta* **2003**, 352, 238–246; d) C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4161–4171.

<sup>277</sup> a) Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.* **2005**, 38, 4764–4776; b) M. Melchart, P. J. Sadler in *Bioorganometallics*, Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, pp. 39–64

<sup>278</sup> a) Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.* **2005**, 4764–4776; b) A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, R. Fernández, V. Walland, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons, R. E. Aird, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1739–1748.

estos motivos los complejos de Ru(II) equipados con ligandos areno son de gran interés debido a sus prometedoras propiedades anticancerígenas.<sup>279</sup>

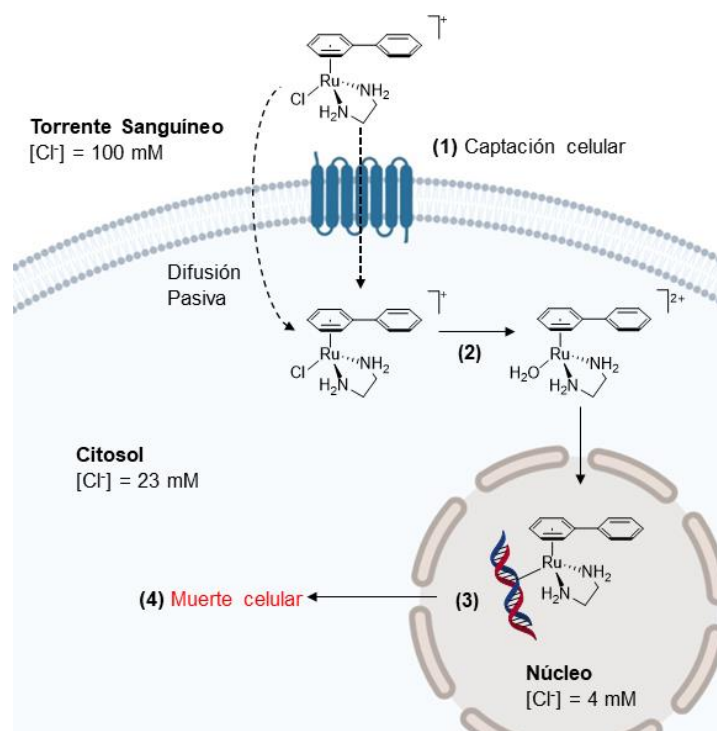


Figura 46: Mecanismo general de acción de complejos de Rutenio-areno propuesto, similar al de cisplatino: 1) captación celular; 2) acuación/activación; 3) unión al ADN; 4) procesamiento celular del ADN dañado conduciendo a la muerte de la célula.<sup>280</sup>

### Estructura y mecanismo de acción

Los complejos de semi-sandwich de Ru(II)-areno presentan una serie de elementos con un papel fundamental tanto en su estructura como en su función y de manera general, estos complejos siguen la fórmula  $[Ru(areno)(XY)Z]$  (Figura 47):

- **ligando areno:** es un derivado de un fenilo que puede, o no, estar sustituido en cualquiera de sus carbonos y que ocupa tres posiciones del entorno coordinativo pseudo-octaédrico del Ru(II). Estos ligandos aportan estabilidad al estado de oxidación +2 del metal enlazándose como dador de electrones  $\eta^6$  y  $\pi$ -aceptor.

<sup>279</sup> a) R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer* **2002**, 86, 1652, b) C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4161-71.

<sup>280</sup> H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 173–186.

- **ligando XY:** es un ligando bidentado quelato que ocupa dos posiciones del entorno coordinativo pseudo-octaédrico del Ru(II). Este ligando aporta estabilidad al sistema y permite modular las propiedades electrónicas del ión metálico.
- **ligando Z:** es un ligando lábil monodentado que ocupa la última posición disponible de la esfera de coordinación octaédrica del Ru(II). En general es un halógeno<sup>281</sup> y ofrece una posición activa a través del cual el ion metálico puede interactuar con los heteroátomos de las biomoléculas.

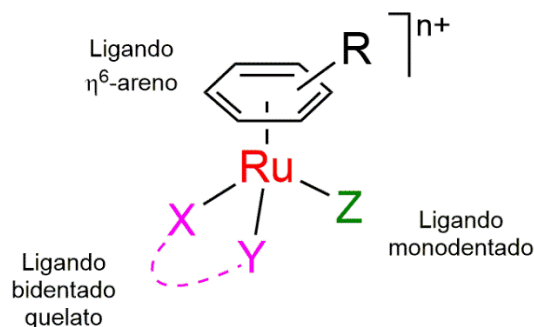


Figura 47: Estructura general de los complejos *semi-sandwich* de Ru(II).

Como ya hemos mencionado el modo de acción de estos complejos es análogo al *cisplatino*, siendo el ADN-B el objetivo principal. Generalmente, estos complejos de rutenio forman aductos monofuncionales a través del N<sup>7</sup> de las guaninas del ADN.<sup>282</sup> Por ejemplo, en el caso del complejo  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{en})\text{X}]^+$ , estudios de RMN sugieren que la interacción entre el ligando etilendiamina (*en*) y el átomo de oxígeno exocíclico del nucleótido de guanina (C<sup>6</sup>-O), mejora la unión con dichas bases.<sup>280</sup> Por otro lado, la interacción con las adeninas es más débil debido al impedimento estérico entre el ligando *en* y los grupos amino exocíclicos. Sin embargo, si sustituimos este ligando por el ligando *acac* (acetilacetato), el complejo  $\text{Ru}(\eta^6\text{-cymene})(\text{acac})\text{Cl}$  puede unirse a ambos nucleótidos.<sup>283</sup>

La activación de los complejos *semi-sandwich* de Ru(II)-areno depende de la labilidad del ligando Z. Esta activación puede surgir a través de dos mecanismos distintos:

<sup>281</sup> M. Melchart, P. J. Sadler, in *Bioorganometallics*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**, pp. 39–64.

<sup>282</sup> O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P. J. Sadler, V. Brabec, *Biochemistry* **2003**, 42, 11544–11554.

<sup>283</sup> R. Fernández, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5173–5179.

- La rotura del enlace Ru-Z por **hidrólisis**: este mecanismo se basa en que los enlaces metal-ligando son más débiles en comparación con los enlaces covalentes. La hidrólisis del enlace Ru-Z genera un intermedio activo, el Ru-OH<sub>2</sub> (acu-complejo). A concentraciones superiores a 100 mM de cloruro en el medio, este acu-complejo se encuentra prácticamente suprimido y revierte a su forma original Ru-Z (siendo Z el Cl). Sin embargo, en el interior celular se puede formar el acu-complejo Ru-OH<sub>2</sub> ya que la concentración de [Cl<sup>-</sup>] es mucho más baja, entre 4-20 mM. De este modo, obtenemos un mecanismo selectivo de activación de los complejos, debido a la supresión de la forma acu (Ru-OH<sub>2</sub>) en el medio extracelular y su posterior activación al entrar en la célula.
- La rotura del enlace Ru-Z por **irradiación** (activación fotoquímica): nos ofrece la posibilidad de controlar la localización y el momento de activación del complejo metálico de manera selectiva. Para llevar a cabo esta rotura de enlace es necesario utilizar luz UV-vis de alta energía. El tratamiento de ciertos tipos de cáncer con esta técnica se denomina *photodynamic therapy* (PTD).<sup>284</sup>

### Complejos de Ru(II)-areno como agentes de unión al ADN

En el año 2008, el grupo de V. Brabec publicó un estudio en el cual comparaban la citotoxicidad, internalización celular y las propiedades de unión al ADN de una serie de complejos de isoméricos Ru(II) derivados del ligando terfenilo, [(η<sup>6</sup>-areno)Ru(en)Cl]<sup>+</sup>, donde el areno es orto (o-terp), meta (m-terp), o para-terfenilo (p-terp).<sup>285</sup> El complejo **[Ru(p-terp)]** (Figura 48), cuya estructura cristalina de rayos X confirmó la geometría clásica de *taburete de piano*, mostró una potencia similar a la del cisplatino, pero sin tener resistencia cruzada. Además, la actividad de este complejo era mucho mayor que para los complejos **[Ru(o-terp)]** o **[Ru(m-terp)]**. Realizaron también ensayos de unión al ADN donde encontraron que el complejo **[Ru(p-terp)]** se unía al ADN de forma rápida y cuantitativa, preferentemente a los residuos de guanina provocando, además, un desenrollamiento significativo del ADN. Posteriormente realizaron experimentos de dicroísmo circular y lineal, de competición con bromuro de etidio, de desnaturalización térmica del ADN, además de espectroscopía Raman

<sup>284</sup> D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 380–387.

<sup>285</sup> T. Bugarcic, O. Nováková, A. Halámiková, L. Zerzánková, O. Vrána, J. Kaspárková, A. Habtemariam, S. Parsons, P. J. Sadler, V. Brabec, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5310–5319.

de superficie mejorada (SERS), que confirmaron un modo de unión dual, intercalativo y coordinativo (metalación), del complejo **[Ru(p-terp)]**, mejorando así la citotoxicidad en líneas celulares tumorales. Por otro lado, el complejo **[Ru(m-terp)]**, presentó una menor citotoxicidad además de un modo de unión al ADN monofuncional vía metalación con las bases del ADN.

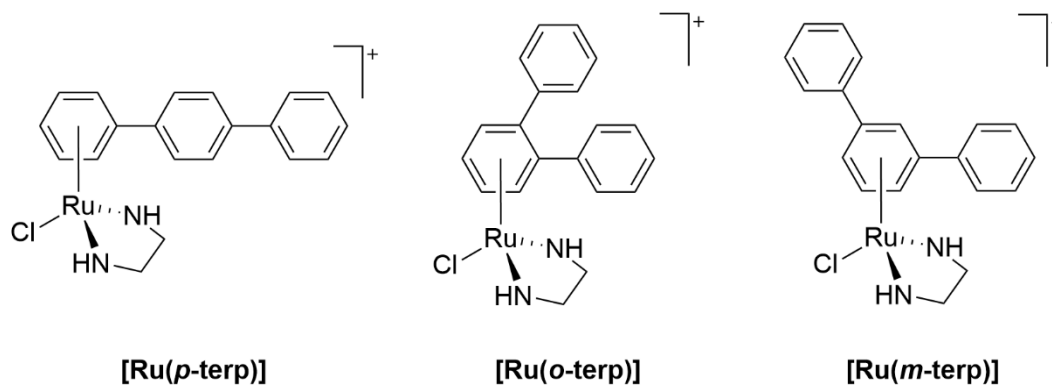


Figura 48: Estructuras de los complejos de Ru(II)-areno. **[Ru(p-terp)]**,  $[(\eta^6\text{-p-terp})\text{Ru}(\text{en}) \text{Cl}]^+$ ; **[Ru(o-terp)]**,  $[(\eta^6\text{-o-terp})\text{Ru}(\text{en}) \text{Cl}]^+$ ; **[Ru(m-terp)]**,  $[(\eta^6\text{-m-terp})\text{Ru}(\text{en}) \text{Cl}]^+$ . El ligando en es la etilendiamina.<sup>285</sup>

El grupo de J.P. Sadler publicó en el año 2012, un trabajo en el que sintetizaron una serie de complejos de Ru(II)-areno(Figura 49).<sup>286</sup>

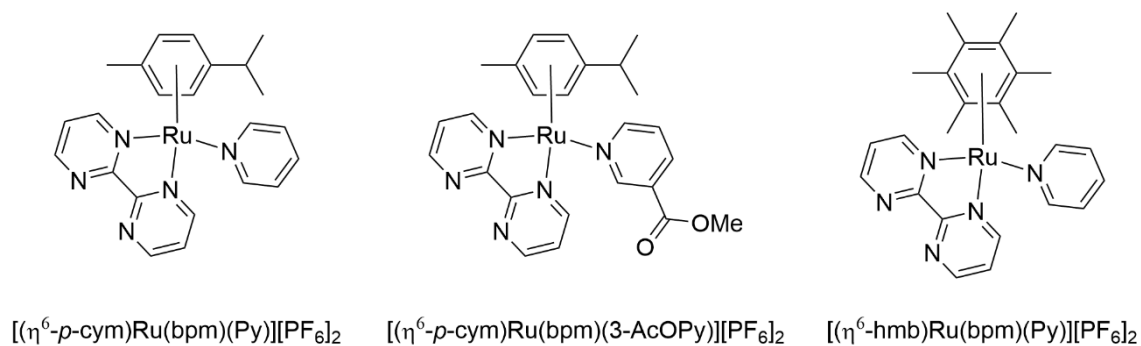


Figura 49: Tres ejemplos de los complejos de Ru(II)-areno sintetizados por el grupo de J. P. Sadler.

En estos complejos, el ligando monodentado lábil (L) se fotodisocia selectivamente cuando se excitaba con luz UVA o luz blanca, lo que les permitía un control estricto de la formación de las especies acuó reactivas  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{N}, \text{N}')(\text{OH}_2)]^{2+}$ . Mediante cálculos de DFT y TD-DFT caracterizaron los estados excitados para obtener información sobre la fotoquímica de los complejos. Todos los complejos de Ru(II) derivados de la piridina, presentaron

<sup>286</sup> S. Betanzos-Lara, L. Salassa, A. Habtemariam, O. Novakova, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, B. Liskova, V. Brabec, P. J. Sadler, *Organometallics* **2012**, 31, 3466–3479.

un mecanismo fotoquímico de disociación del ligando L relativamente similar, que probablemente se producía a partir de una serie de estados triplete  $^3MC$  con carácter disociativo. El proceso fotoquímico demostró ser mucho más eficiente cuando se utilizó radiación UVA. Sorprendentemente, la activación por luz se usó para activar el proceso de unión de estos potenciales agentes anticancerígenos con preferencia hacia la 9-etilguanina (9-EtG) sobre la 9-etiladenina (9-EtA). Posteriormente, hicieron estudios de unión al CT-ADN (*calf-thymus* ADN) en los que descubrieron que los complejos irradiados se unen al CT-ADN mientras que las formas no irradiadas apenas presentan unión con dicho ADN. Los estudios de unión al CT-ADN en células sugirieron un modo de unión combinado débil, coordinativo (metalación) e intercalativo. Finalmente, algunos de los complejos de Ru(II)-areno fueron citotóxicos para las líneas celulares de cáncer de ovario humano A2780 en ausencia de fotoirradiación con valores de  $IC_{50}$  en el rango de 9.0 a 60  $\mu M$ .

En el año 2017, el grupo de A. M. Pizarro publicó un estudio en el que describían la síntesis de una familia de complejos de rutenio(II)-areno que presentan dos conformaciones distintas (abierta o cerrada) cuya fórmula general era  $[Ru\{\eta^6: \kappa^1-C_6H_5(C_6H_4)NH_2\}(XY)]^{n+}$  (conformación cerrada), funcionalizados con diferentes ligandos XY quelantes (XY = diamina alifática, fenilén diamina, oxalato, bisfosfino etano). En estos complejos el ligando arénico seleccionado fue el 2-aminobifenilo debido a que puede actuar como ligando hemi-lábil, quelatando el centro metálico de Ru(II) con el  $\eta^6$  areno y un enlace de coordinación  $\kappa^1-NH_2$  (Figura 50).<sup>287</sup>

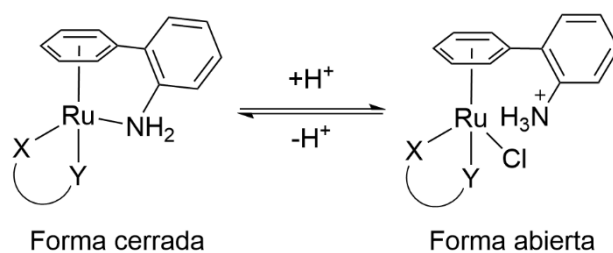


Figura 50: Mecanismo de activación de los complejos de Ru(II)-areno dependiente del pH propuesto por el grupo de A. M. Pizarro.<sup>287</sup>

En primer lugar, llevaron a cabo la activación de estos complejos (conversión de la forma cerrada a abierta) en metanol y DMSO obteniendo distintas extensiones de reacción para los diferentes complejos, así como diferentes velocidades de reacción. Lo más importante de este trabajo es que lograron la activación del

<sup>287</sup> F. Martínez-Peña, A. M. Pizarro, *Chemistry* **2017**, 23, 16231–16241.

complejo Ru(II) (rotura del enlace Ru-N que forma el anillo o la forma cerrada) en medio acuoso con una concentración elevada de protones (tras la protonación del N que forma el anillo con el Ru). Además, lograron modular la dinámica de activación de estos complejos variando el ligando quelante XY. Las propiedades electrónicas y estéricas de dichos ligandos XY tuvieron un impacto directo en la reactividad del enlace Ru-N, de tal modo que ligandos XY = N,N'-dimetil-, N,N'-diethyl-, y N,N,N'-tetrametiletilen diamina, proporcionaron los complejos más propensos a la activación. Dicha activación en medio ácido fue completamente reversible siendo la concentración de protones el parámetro que domina en el proceso de activación-desactivación de los complejos. Es decir, el cierre del anillo se ralentizó al disminuir el pH. Estudiaron también la interacción del complejo  $[\text{Ru}\{\eta^6\text{-}\kappa^1\text{-C}_6\text{H}_5(\text{C}_6\text{H}_4)\text{NH}_2\}(\text{dmen})\text{Cl}]^+$  tanto en su forma cerrada como abierta, con la monofosfato 5'-guanosina (GMP). En este caso, la forma abierta (activa) del complejo de rutenio interaccionó con la GMP mientras que su forma cerrada (inactiva) no mostró ningún tipo de interacción debido a que dicha conformación no posee una posición libre en la primera esfera de coordinación del Ru.

### **Complejos de Ru(II) con actividad catalítica**

En el año 2006, el grupo de J. P. Sadler publicó un interesante estudio en el cual complejos anticancerígenos de Ru(II)-areno,  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$  (donde areno es hexametilbenceno, p-cym o indan; en es etilendiamina) pueden catalizar la reducción regioselectiva del  $\text{NAD}^+$  por formiato en agua para formar el 1,4-NADH, en condiciones fisiológicas (pH 7.2, 37 °C, en presencia de aire). La actividad catalítica de dichos complejos dependió de forma muy marcada del ligando areno, siendo el complejo funcionalizado con hexametilbenceno (hmb) el que mostró la mayor actividad. Para el complejo  $[(\eta^6\text{-hmb})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , la velocidad de reacción resultó independiente de la concentración de  $\text{NAD}^+$ . Además, se observó un valor de  $K_m$  de 58 mM (siendo  $K_m$  la constante de Michaelis-Menten, que es la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima) y una tasa de conversión (TON en sus siglas en inglés; tiempo que tarda en convertirse el  $\text{NAD}^+$  en NADH) de  $1,46 \text{ h}^{-1}$ . Posteriormente comprobaron que al eliminar el cloruro del medio y al realizar de la reacción bajo argón, las velocidades de reacción fueron más altas.<sup>288</sup> Así pues, en este trabajo mostraron como un complejo de Ru(II)-areno pueden convertir  $\text{NAD}^+$  en NADH utilizando formiato como fuente de hidruros y que

---

<sup>288</sup> Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 483–488.

tales reacciones pueden tener lugar en las células ya que éstas toleran niveles de concentración milimolar de formiato.

El grupo de Sadler publicó en el año 2012 un nuevo trabajo en el que estudiaron, por primera vez, la transferencia de un hidruro desde el 1,4-NADH a complejos organometálicos. En este artículo mostraron como complejos de Ru(II)-areno pueden usar el NADH como fuente de hidruros para, por ejemplo, la reducción de cetonas. En primer lugar, mejoraron la eficiencia de los complejos  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{N},\text{N}')\text{Cl}]^+$  como catalizadores para la transferencia del hidruros desde el formiato hacia el  $\text{NAD}^+$  reemplazando el ligando bidentado quelato en por ligandos  $\pi$ -aceptores como la 2,2'-bipirimidina (bpm) o la 1,10-fenantrolina (phen). A continuación, realizaron los estudios de transferencia de hidruros mediante RMN. Encontraron que los aductos de formiato eran estables y no producían especies hidruro. Sin embargo, al alcanzar una concentración crítica de NADH observaron un cambio de color (de amarillo pálido a rojo oscuro) al mismo que apareció la señal Ru-H en el espectro de RMN. Por lo tanto, lograron demostrar que el proceso de donación de hidruros desde el 1,4-NADH hasta el centro de Ru(II) es favorable. El complejo  $[(\eta^6\text{-hmb})\text{Ru}(\text{bpm})\text{Cl}]^+$  logró conversión más rápida de NADH a  $\text{NAD}^+$  debido a que el ligando hmb tiene sustituyentes con un fuerte efecto dador de electrones en comparación con los otros ligandos arénicos. Finalmente estudiaron la conversión del piruvato en lactato, reacción que tiene lugar *in vivo* mediante el NADH como cofactor para la enzima lactato deshidrogenasa. Para el complejo  $[(\eta^6\text{-hmb})\text{Ru}(\text{bpm})\text{Cl}]^+$ , en las primeras 24 h aparecieron las señales en el espectro de RMN correspondientes al lactato, así como las correspondientes señales de los aductos de piruvato y lactato con  $[(\eta^6\text{-hmb})\text{Ru}(\text{bpm})\text{Cl}]^+$ . La aparición de estos aductos inhibió la conversión total del piruvato a lactato.<sup>289</sup>

En el año 2018, el grupo de A. M. Pizarro publicó un trabajo en el que se describe la síntesis y caracterización de una nueva familia de complejos de Ru(II)-areno que se caracterizan por tener el ácido fenilacético como ligando arénico. (Figura 51).<sup>290</sup>



<sup>289</sup> S. Betanzos-Lara, Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, B. Qamar, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Weinheim Bergstr. Ger.* **2012**, 124, 3963–3966.

<sup>290</sup> F. Martínez-Peña, S. Infante-Tadeo, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 5657–5668.

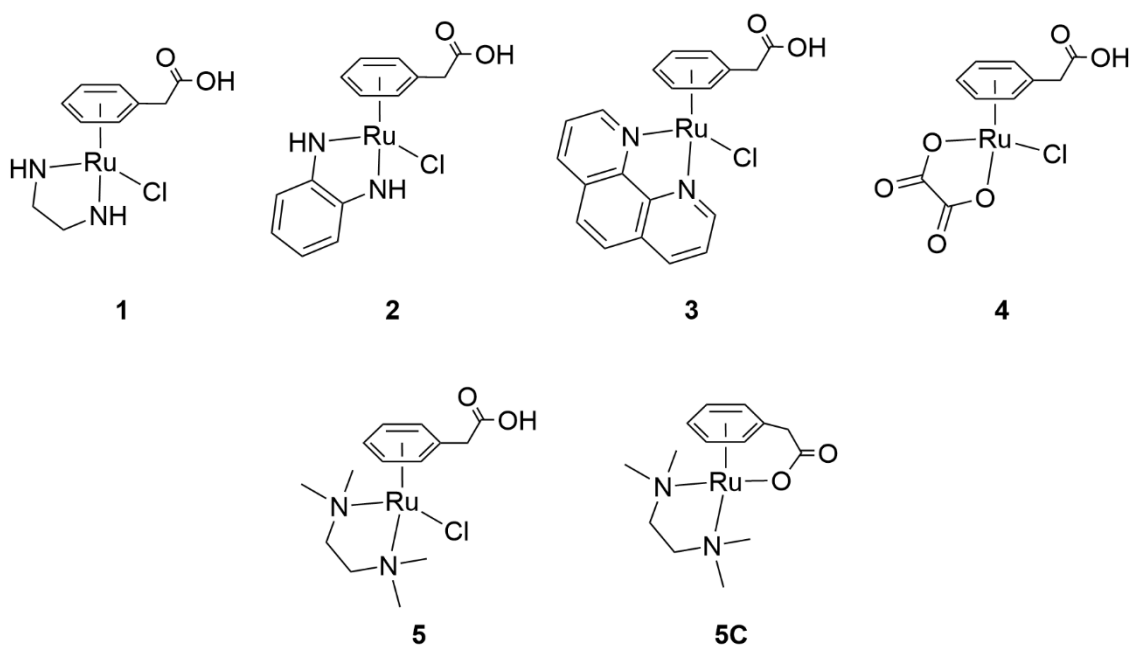


Figura 51: Familia de complejos de Ru(II)-areno derivados del ácido fenilacético reportados por el grupo de A. M. Pizarro.<sup>290</sup>

El complejo **5C** fue uno de los primeros complejos en el cual la forma cerrada se compone de un anillo de 5 miembros, con un enlace Ru ( $\eta^6$ :  $\kappa^1$ -areno: O). Esta conformación cerrada (inactiva) de los complejos de Ru(II) se abre (forma activa) a un pH ácido (<5) siendo dicho proceso reversible en disolución acuosa. Además, observaron que la forma abierta (activa) de este complejo (el cloro-complejo) se transformó en el acuo-complejo antes de que tuviera lugar la formación de la especie inactiva. Encontraron, además, que existía un equilibrio entre tres especies diferentes (cloro-, acuo- y complejo cerrado) en un amplio rango de pH (0-12) dependiente de la concentración de protones y de la naturaleza del ligando quelatante. Por ejemplo, el complejo **3C** con un ligando de fenantrolina ( $\sigma$ -dador,  $\pi$ -aceptor) se transforma en su forma activa rápidamente a pH 4 mientras que el complejo **5C** difícilmente se abre incluso a pH 1. Estudiaron también las propiedades citotóxicas de los complejos **1** y **2** (los cuales permanecen predominantemente en su forma inactiva en medio intracelular) obteniendo un  $IC_{50}$  de 130 y 117  $\mu$ M, respectivamente, en células de cáncer de ovario humano (A2780). Por otro lado, también estudiaron las propiedades catalíticas de los complejos de Ru(II). Así pues, el complejo **1** fue capaz de catalizar la reducción no regioselectiva del  $NAD^+$  en 1,4-NADH y 1,6-NADH.

## Objetivos

El objetivo de este capítulo es la síntesis y caracterización de una serie de complejos de Ru(II)-areno derivados del ligando quelatante 2,2'-Bpy. Se han estudiado, además, las propiedades de acución de los complejos, así como su interacción con 5'-guanosin monofosfato (GMP).

## Resultados y discusión

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) nos permite la obtención de péptidos equipados con aminoácidos no naturales con características concretas. Así, con esta metodología se pueden preparar metalopéptidos artificiales que presenten aminoácidos artificiales con propiedades coordinantes.<sup>216,217,218</sup> En el anterior capítulo hemos descrito como se puede acoplar el centro metálico directamente al péptido coordinante todavía anclado a la resina.<sup>291</sup>

Así pues, hemos sintetizado una familia de metalopéptidos de Ru(II)-areno cuya fórmula es  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\beta\text{Ala5bpy})\text{Cl}]^+$ , en donde el ligando areno puede ser *p*-cymeno (*p*-cym), bifenilo (biph) o *m*-terfenilo (*m*-terp). En estos complejos, la unidad quelatante es la  $\beta\text{Ala-5Bpy}$  (5Bpy, utilizada ampliamente en nuestro grupo de investigación) y el ligando lábil es un cloro (Cl).

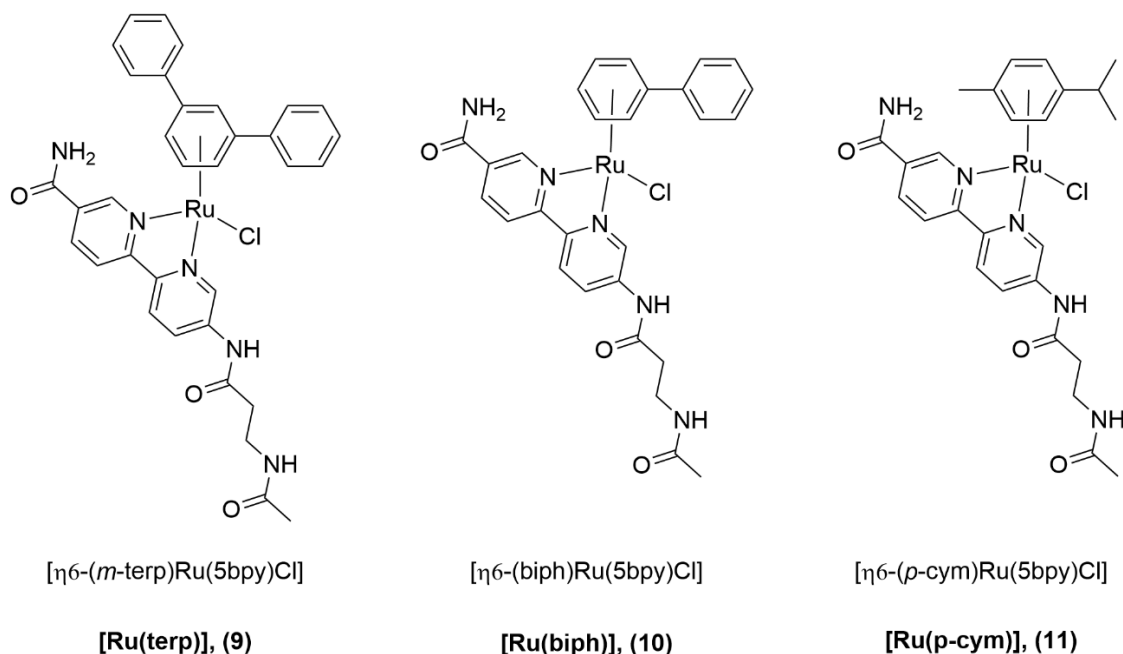


Figura 52: Estructuras de los metalopéptidos de Ru(II)-areno sintetizados en este capítulo.

<sup>291</sup> D. Bouzada, I. Salvadó, G. Barka, G. Rama, J. Martínez-Costas, R. Lorca, Á. Somoza, M. Melle-Franco, M. E. Vázquez, M. V. López, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 658–661.

La síntesis de estos metalopéptidos de rutenio se ha realizado en colaboración con el grupo de A. M. Pizarro, quienes han sintetizado los precursores de Ru(II) siguiendo los protocolos reportados previamente (Figura 53).<sup>292</sup>

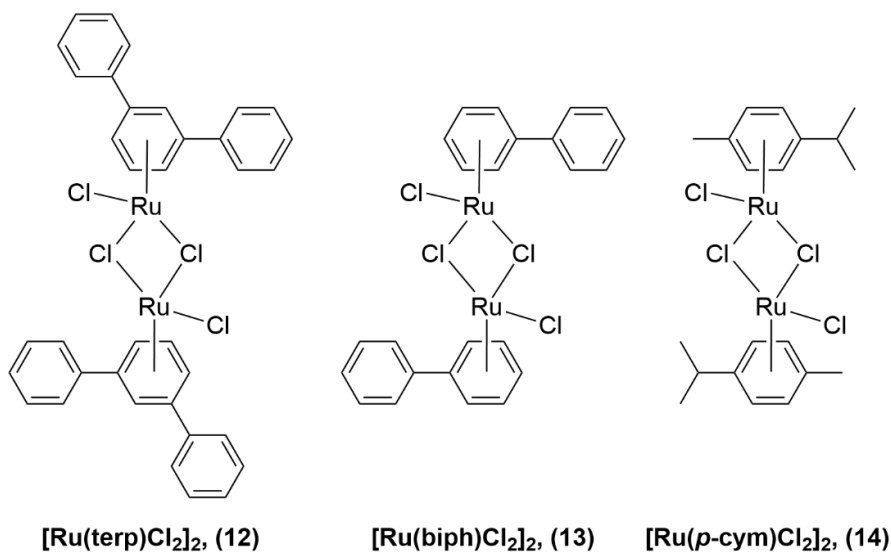


Figura 53: Precursores de Ru(II) utilizados en la síntesis de los nuevos metalopéptidos de Ru(II)-areno proporcionados por el grupo de A. M. Pizarro.

En primer lugar, se sintetizó la  $\beta\text{Ala5Bpy}$  siguiendo el protocolo mencionado en el capítulo 1 de esta tesis (Figura 25). Mediante protocolos SPPS, la  $\beta\text{Ala5Bpy}$  se acopló a la resina (ChemMatrix), para seguidamente desproteger el grupo protector temporal Fmoc y proceder a la acetilación del extremo N-terminal para impedir reacciones no deseadas.

Debido que no existen precedentes de síntesis de complejos de Ru(II)-areno en fase sólida, procedimos a analizar el tiempo que tardan en reaccionar los distintos precursores arénicos de Ru(II) con la  $\beta\text{Ala5Bpy}$  todavía anclada en la resina.

Así pues, se procedió a la síntesis, en primer lugar, del complejo **[Ru(terp)]**. Para ello, se resuspendió la resina con la  $\beta\text{Ala5Bpy}$  en DMF en un balón para, posteriormente añadirle 0.5 eq. del precursor **[Ru(terp)Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub>**. Esta mezcla se agitó muy suavemente a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. Se tomaron muestras de la resina al cabo de 1, 2, 3, 4 y 24h. Cada muestra individual se trató con el cóctel de desprotección total usado habitualmente en SPPS (TFA:DCM:TIS:H<sub>2</sub>O) durante 2h. La disolución ácida se diluyó con una mezcla de H<sub>2</sub>O/AcN y se filtró previamente a su análisis mediante HPLC-MS(ESI). Los

<sup>292</sup> A. M. Pizarro, M. Melchart, A. Habtemariam, L. Salassa, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 3310–3319.

resultados obtenidos sugirieron que la reacción se completa al cabo de 1h. (Figura 54).

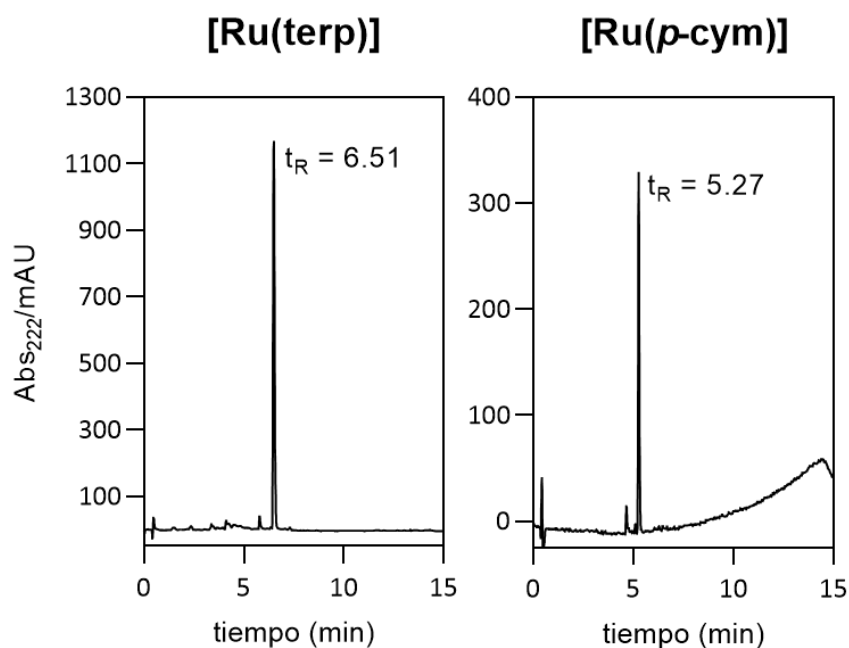


Figura 54: Cromatogramas de HPLC de los complejos **9** (izquierda) y **11** (derecha) tras 1 h de reacción.

Repetimos el mismo procedimiento para los complejos [Ru(p-cym)] y [Ru(biph)]. En el caso del complejo [Ru(p-cym)] la reacción también se completa al cabo de una hora (Figura 54). Sin embargo, para el complejo [Ru(biph)] son necesarias 3 h (Figura 55).

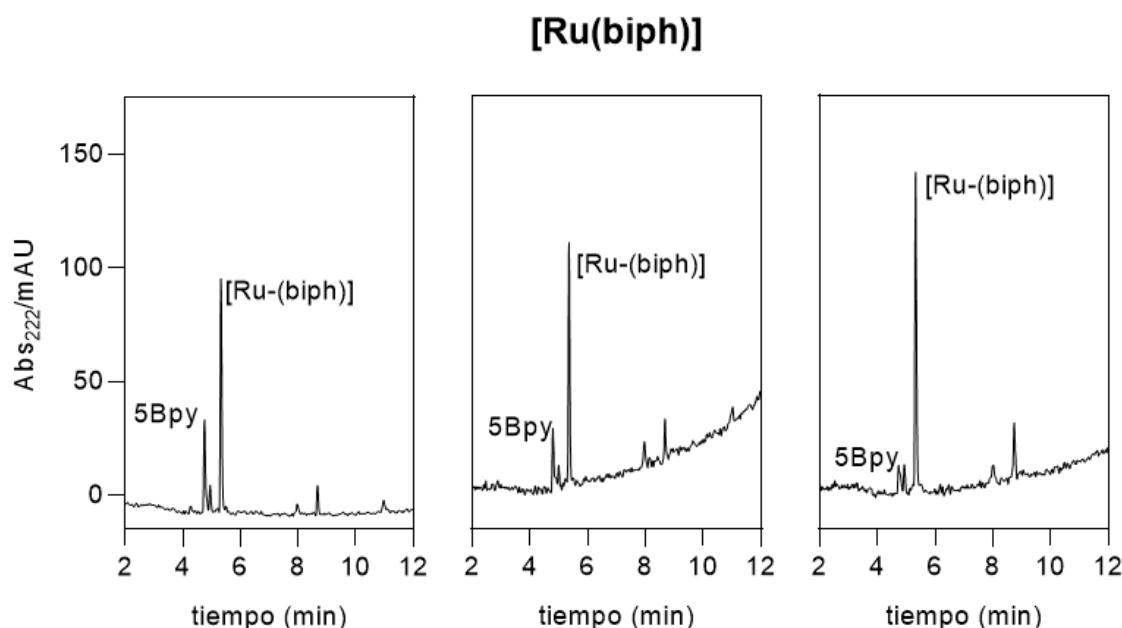


Figura 55: Cromatogramas de HPLC correspondientes al complejo **10** al cabo de 1h (izquierda), 2 h (centro) y 3 h (derecha). El seguimiento de la reacción se analizó en base a la relación entre las intensidades de los picos correspondientes al complejo ( $t_R = 5.32$  min) y a la 5Bpy ( $t_R = 4.74$  min) siendo de 2.9, 3.8 y 12.7 veces más de Ru/  $\beta$ Ala5Bpy.

Una vez optimizamos las condiciones de reacción, se procedió a la desprotección total de los péptidos con la mezcla ácida previamente mencionada. Transcurridas las 2h necesarias para la desprotección, se filtró la mezcla resultante y se concentró con una corriente de  $N_2$ . A continuación se intentó precipitar los metalopéptidos de Ru(II) añadiendo una disolución saturada de hexafluorofosfato amónico ( $NH_4PF_6$ ). Sin embargo, solo el complejo **[Ru(terp)]** precipitó tras la adición de dicha sal de amonio. En el caso de los otros dos complejos fue necesaria su purificación mediante HPLC de fase reversa.

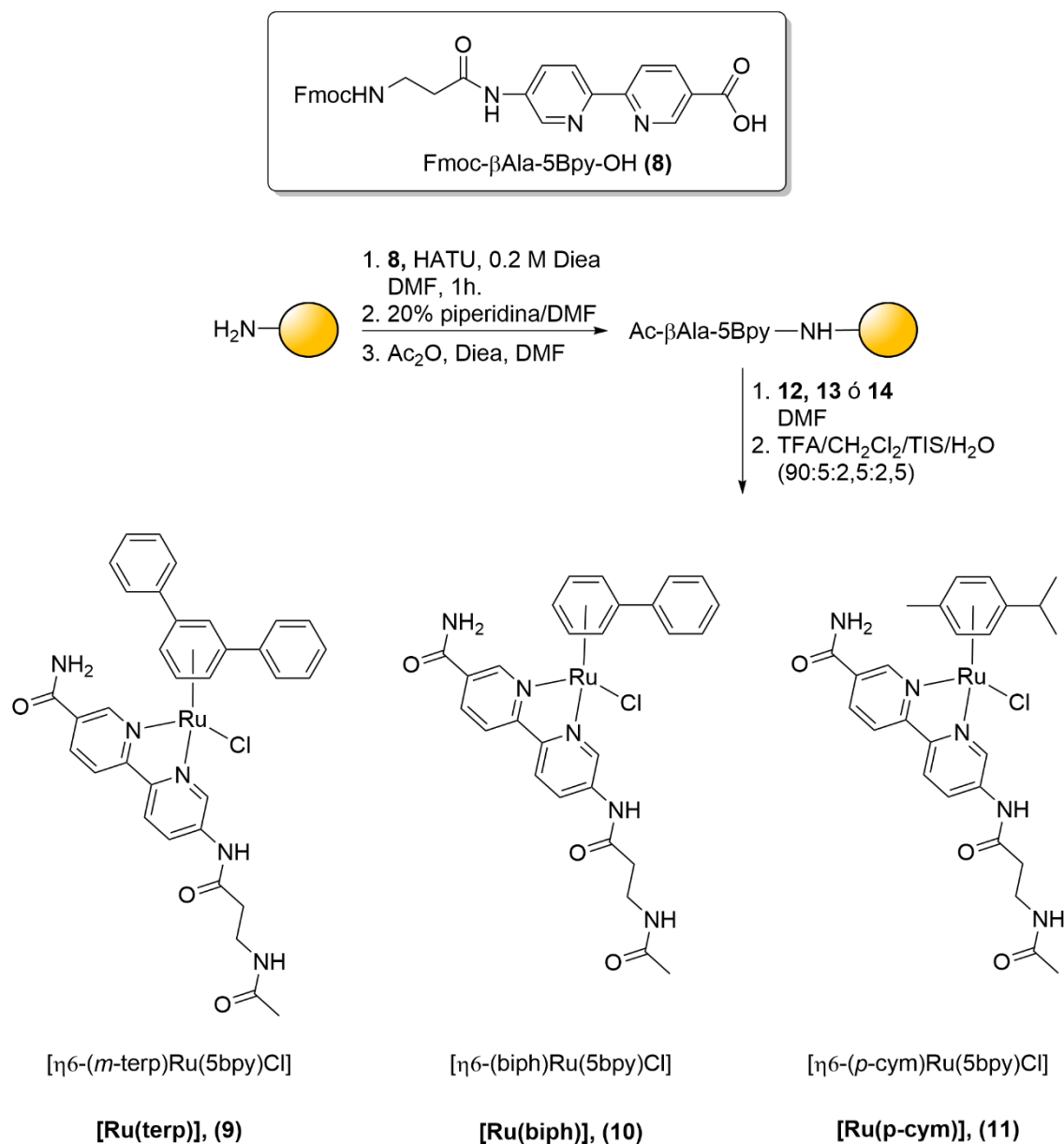


Figura 56: Ruta sintética para la obtención de los complejos de Ru(II)-areno derivados de βAla5Bpy.

Posteriormente, procedimos con la determinación de la estructura de los cristales de los respectivos complejos mediante difracción de rayos X. Para poder obtener los respectivos cristales, probamos distintos métodos de cristalización, como evaporación lenta o difusión (en frío y a temperatura ambiente). Para el complejo **[Ru(*p*-cym)]**, pudimos obtener cristales naranjas con forma de agujas mediante un proceso de difusión lenta utilizando MeOH (para preparar la disolución muy saturada del complejo; 1.2 mg en 20 μL) y pentano como codisolvente (Figura 57).

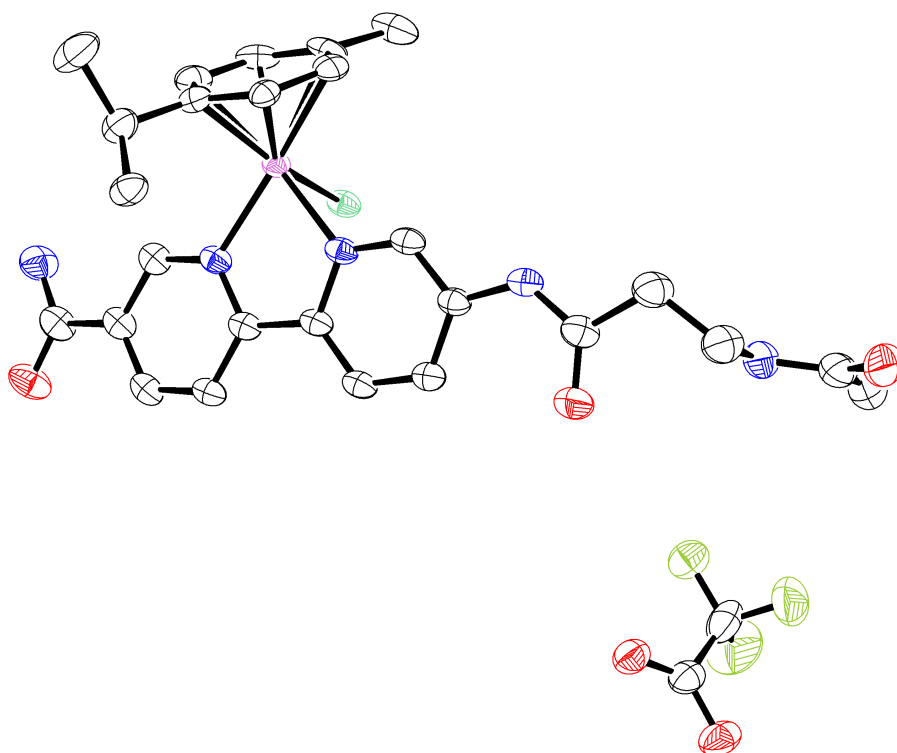


Figura 57: Estructura cristalográfica del complejo **[Ru(p-cym)]**. La molécula pequeña en la parte inferior de la imagen se corresponde con el TFA (contraíón). Color de los átomos representados: blanco, C; rojo, O; azul, N, lila, Ru; verde, Cl; verde claro, F.

Se puede observar que el complejo **[Ru(p-cym)]** adopta la típica geometría de pseudo-octaedro de los complejos de tipo semi-sandwich con el centro metálico formando un enlace  $\pi$  con el ligando p-cym, un enlace  $\sigma$  con el cloro y los átomos dadores del ligando quelatante, de manera similar a otros complejos de Ru(II)- $\eta^6$ -areno.<sup>293,294</sup>

Tabla 2: Datos cristalográficos del complejo [Ru(p-cym)]

Complejo [Ru(p-cym)]	
Chemical Formula	C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Ru·C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ·1.407(H <sub>2</sub> O)
M <sub>r</sub>	736.41
Crystal system, space group	Monoclinic, C2/c

<sup>293</sup> S. Betanzos-Lara, O. Novakova, R. J. Deeth, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, B. Liskova, V. Brabec, P. J. Sadler, A. Habtemariam, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, 17, 1033–1051.

<sup>294</sup> R. E. Morris, R. E. Aird, P. del Socorro Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3616–3621.

Temperature (K)	100
a, b, c (Å)	33.4616 (8), 12.8017 (3), 32.4419 (8)
$\beta$ (°)	113.6383 (15)
V (Å <sup>3</sup> )	12731.0 (5)
Z	16
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	5.35
Crystal size (nm)	0.34 x 0.03 x 0.02

Empleando condiciones similares a las usadas para obtener el cristal del complejo **[Ru(p-cym)]**, se intentó cristalizar los otros dos complejos. Para el caso del complejo **[Ru(biph)]** fue posible obtener un sólido cristalino anaranjado con forma de varilla (rod), sin embargo, no difractó lo suficiente para poder resolver su estructura, mientras que para el complejo **[Ru(terp)]** no se pudo conseguir sólido cristalino alguno.

A continuación, caracterizamos la formación de los respectivos acuo-complejos mediante espectroscopía de UV-Vis. Para ello hemos analizado una disolución 25  $\mu$ M de los respectivos complejos en tampón fosfato (10 mM, NaCl 4 mM, pH 7.44) a 37°C y hemos registrado espectros de absorción cada 5 min. Esto nos ha permitido obtener la velocidad a la que se forman los distintos acuo-complejos. En primer lugar, estudiamos el proceso de acuación del complejo **[Ru(terp)]**. Como se puede observar, con el paso del tiempo aparece una banda centrada a 317 nm correspondiente con la formación del acuo-complejo. Esto nos permite calcular la constante de acuación ( $K_{aq}$ ) con un valor de  $0,88 \cdot 10^{-2} \pm 0,59 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

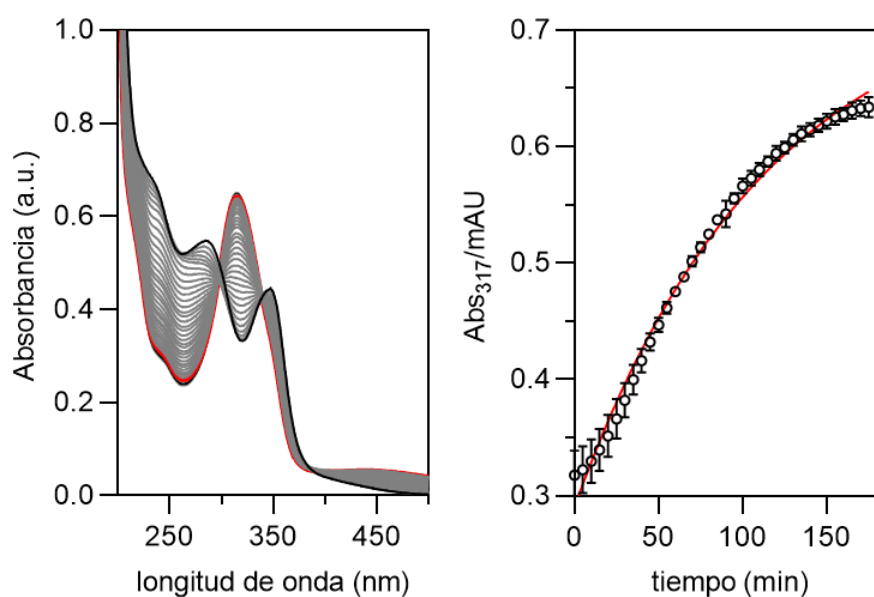


Figura 58: Izquierda, espectro de Uv-Vis del complejo **[Ru(terp)]** correspondiente al proceso de aciación del complejo (línea negra,  $t=0$ ; línea roja,  $t=175$  min); perfil de UV-Vis del complejo **[Ru(terp)]** en tampón fosfato (10 mM, NaCl 4 mM, pH 7.44) a  $37^\circ\text{C}$ .

Posteriormente, analizamos el proceso de aciación del complejo **[Ru(biph)]**. En este caso, la variación de la banda centrada a 317 nm fue acentuada de modo que el desplazamiento del Cl es más rápido que para el anterior complejo, obteniéndose una  $K_{aq} = 1,67 \cdot 10^{-2} \pm 4,64 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

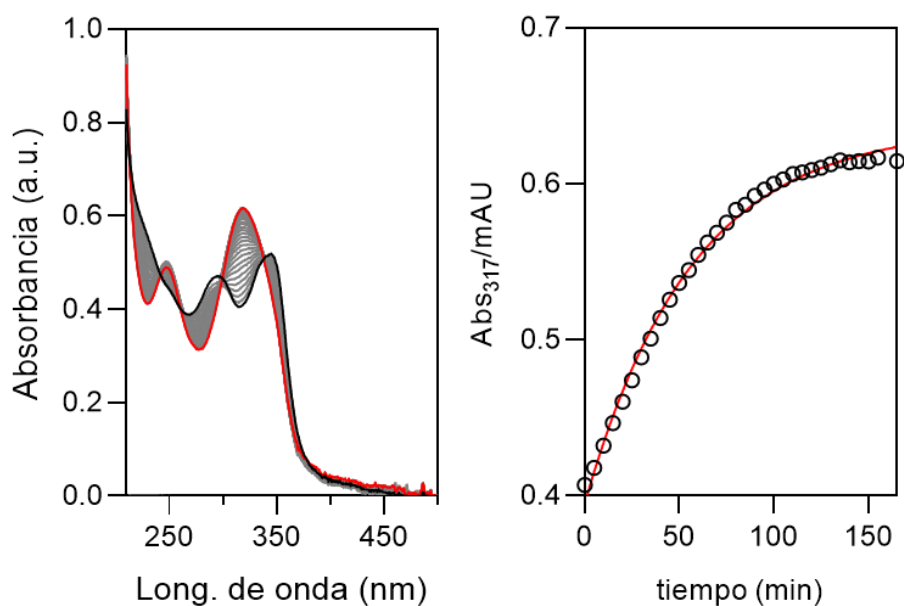


Figura 59: Izquierda: espectro de UV-Vis del complejo **[Ru(biph)]** correspondiente al proceso de acuación del complejo (línea negra,  $t=0$ ; línea roja,  $t=165$  min); derecha: perfil de la acuación correspondiente a la banda centrada a 317 nm.

Finalmente, el proceso de acuación del complejo **[Ru(p-cym)]** es más lento en comparación con el complejo **[Ru(biph)]**, obteniendo una  $K_{aq} = 7,70 \cdot 10^{-2} \pm 0,70 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

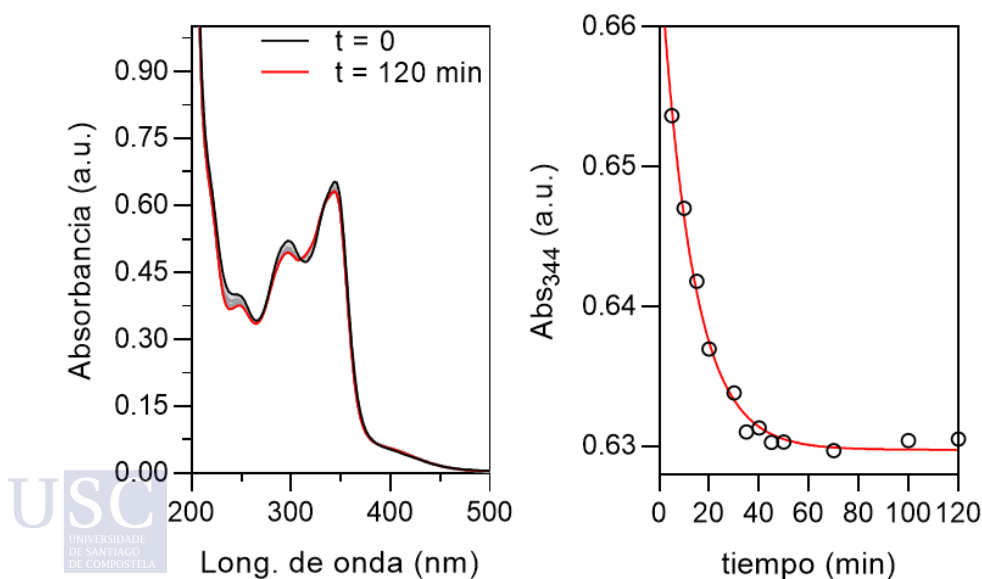


Figura 60: Izquierda: espectro de UV-Vis del complejo **[Ru(p-cym)]** correspondiente al proceso de acuación del complejo (línea negra,  $t=0$ ; línea roja,  $t=175$  min); derecha: perfil de la acuación correspondiente a la banda centrada a 344 nm.

Se sabe que el daño irreversible del ADN es el mecanismo de acción de los complejos anticancerígenos basados en metales, con el N7 de la guanina como el sitio preferido de unión al interactuar con el ADN.<sup>295</sup> Por este motivo, estudiamos la interacción de los distintos complejos de Ru(II) con el modelo de ADN GMP (5'-guanosín monofosfato) mediante su análisis por HPLC-MS. Así pues, se incubaron disoluciones 0.1-0.5 mM de cada complejo, con 1 eq de GMP en tampón fosfato (10 mM, NaCl 4 mM, pH 7.44) a 37°C durante 24 h y posteriormente se analizaron por HPLC-MS(ESI). Para el complejo **[Ru(terp)]** ha sido imposible identificar los productos de la unión. Sin embargo, para el caso de los complejos **[Ru(p-cym)]** y **[Ru(biph)]** sí que hemos podido identificar la interacción entre los complejos y el GMP. En el caso del complejo **[Ru(p-cym)]** se observó que la unión fue casi cuantitativa (Figura 61).

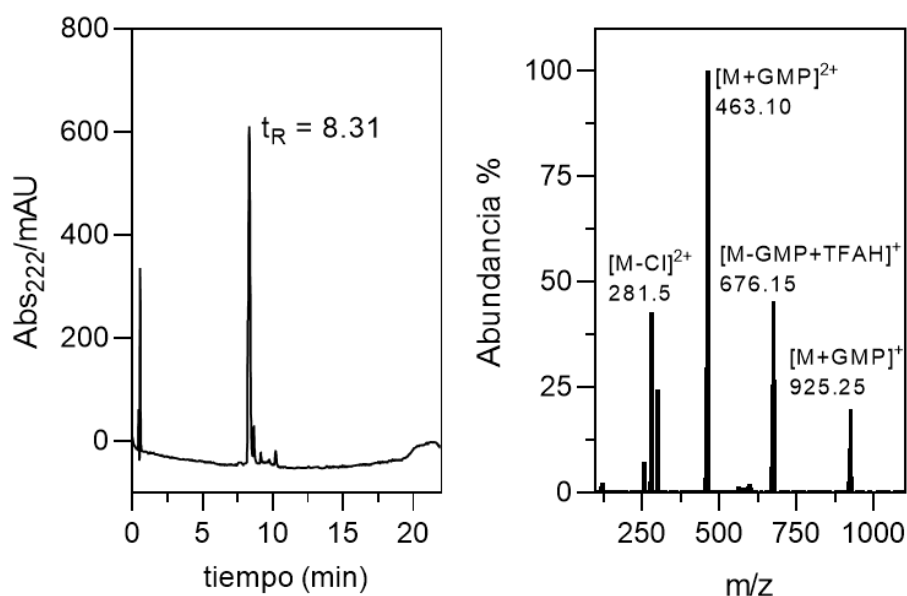


Figura 61: Análisis de la unión del complejo **[Ru(p-cym)]** con el GMP, mediante HPLC-MS. Izquierda, cromatograma del HPLC donde se observa un pico mayoritario correspondiente al producto de la interacción del complejo con el GMP; derecha, espectro de masas perteneciente al pico con tiempo de retención 8.31 min.

En el caso del complejo **[Ru(biph)]** sin embargo, la interacción del complejo con el GMP no es tan eficiente y se puede observar que todavía complejo de partida sin reaccionar.

<sup>295</sup> a) A. M. Pizarro, P. J. Sadler, *Biochimie* **2009**, 91, 1198–1211; b) R. C. Todd, S. J. Lippard, *Metallomics* **2009**, 1, 280–291; c) S. J. Dougan, P. J. Sadler, *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2007**, 61, 704–715; d) A. M. Pizarro, N. P. E. Barry, P. J. Sadler, in *Comprehensive Inorganic Chemistry II* (Ed.: K. Poepelmeier), Elsevier, **2013**, pp. 751–784.

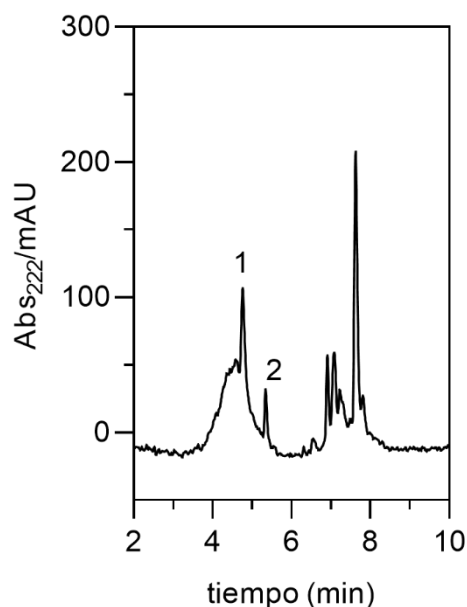


Figura 62: Cromatograma de HPLC resultado de la unión del complejo **[Ru(biph)]** con el GMP. El pico 1, se corresponde con **[Ru(biph)]+GMP**; el pico 2 se corresponde con el complejo de partida **[Ru(biph)]**.

Todo ello parece indicar que la naturaleza del ligando areno afecta notablemente en la interacción con el GMP de tal forma que el complejo **[Ru(p-cym)]** interactúa más eficientemente con el GMP debido probablemente, a que el ligando p-cym ofrece menos impedimento estérico. Si embargo, para los complejos **[Ru(biph)]** y **[Ru(terp)]**, cuyos ligandos son más voluminosos, la interacción con el GMP es menos efectiva o indetectable. Actualmente, estamos realizando los estudios biológicos de los tres complejos de Ru en colaboración con el profesor Viktor Brabec.

### Conclusiones

En este capítulo hemos logrado implementar la SPPS en la síntesis de nuevos complejos de Ru(II)-areno en condiciones muy suaves. Los tres complejos se han caracterizado mediante HPLC-MS y se ha podido obtener la estructura de rayos X de uno de los complejos. Se ha analizado la acuación de los complejos mediante espectroscopía de UV-Vis de tal modo que hemos podido calcular las constantes de dicho proceso. Además, hemos podido analizar las propiedades de unión al ADN, con el modelo GMP, mediante HPLC obteniendo resultados positivos para los complejos **[Ru(p-cym)]** y **[Ru(biph)]** con distinta eficiencia.



## CAPÍTULO 3

### **Estudio de la proteína autoensamblante gp23.1 como plataforma para la síntesis de nanoclústers de oro.**

#### **Resumen**

La síntesis de nanoclústers de oro (AuNCs) es un tema de gran interés en el campo de los nanomateriales debido a sus propiedades catalíticas y espectroscópicas. Nos hemos fijado en la pequeña proteína viral gp23.1 para la formación controlada de AuNCs. La gp23.1 es una pequeña proteína globular, compuesta por 50 residuos, que oligomeriza en disolución formando toroides hexaméricos. Demostramos que la modificación de la superficie interna de ese toroide introduciendo un residuo de Cys permite la síntesis controlada en medio acuoso de AuNCs con propiedades catalíticas y de fluorescencia.

## Introducción

Las proteínas poseen propiedades de gran valor en el campo de materiales nanoestructurados: su función está codificada en su secuencia de aminoácidos, pueden mediar interacciones específicas con diversos sustratos y con otras macromoléculas, y pueden autoensamblarse en complejos supramoleculares.<sup>296</sup> Sin embargo, su gran tamaño hace que sólo se puedan obtener por expresión *in vitro*, por lo que la introducción de funcionalidades extrínsecas generalmente requiere protocolos engorrosos,<sup>297</sup> o modificaciones post-sintéticas que típicamente presentan baja selectividad.<sup>298</sup> En cambio, los péptidos comparten muchas de las propiedades que hacen de las proteínas unas plataformas privilegiadas,<sup>299</sup> y además pueden sintetizarse fácilmente y obtenerse en grandes cantidades a través de métodos químicos.<sup>300</sup> La síntesis química permite además, la introducción directa de funcionalidades extrínsecas (por ejemplo, introducción de grupos reactivos ortogonales, de unidades quelatantes o fluoróforos, o el ensamblaje de estructuras enantioméricas o heteroquirales con D-aminoácidos, etc.) con una simplicidad y flexibilidad que no pueden igualar la expresión de proteínas.<sup>301</sup> Además, el desarrollo de métodos de acoplamiento químico nativa (Native Chemical Ligation, o NCL, en inglés) ha abierto la puerta a la síntesis de proteínas que hasta hace poco no eran accesibles por medios químicos.<sup>302</sup> Recientemente, la química Click ha permitido modificaciones post-sintéticas con una selectividad y simplicidad sin precedentes.<sup>303</sup> Por todo ello los investigadores han explorado el autoensamblaje de diversos motivos peptídicos, incluyendo *coiled coils*, horquillas- $\beta$ , péptidos anfipáticos, foldámeros, etc., como

---

<sup>296</sup> a) A. Schreiber, M.C. Huber, H. Cölfen, S.M. Schiller, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 6705; b) S. Sim, D. Miyajima, T. Niwa, H. Taguchi, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 465.

<sup>297</sup> a) L. Wang and P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 34; b) H. Murakami, A. Ohta, H. Ashigai and H. Suga, *Nat. Methods* **2006**, 3, 35; c) I.S. Carrico, B.L. Carlson, C.R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 32.

<sup>298</sup> E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 697.

<sup>299</sup> a) G. Licini, P. Scrimin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4572; b) C.M. Rufo, Y.S. Moroz, O.V. Moroz, J. Stöhr, T.A. Smith, X. Hu, W.F. Degrado, I.V. Korendovych *Nat. Chem.* **2014**, 6, 303.

<sup>300</sup> a) M.P. Lutolf, J.A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 47; b) D.N. Woolfson, M.G. Ryadnov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 559.

<sup>301</sup> B. Jung, A.G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, 31, 367.

<sup>302</sup> V. Muralidharan, T.W. Muir, *Nat. Methods.* **2006**, 3, 429.

<sup>303</sup> J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1249.

base de dispositivos y materiales biofuncionales,<sup>304</sup> aunque la mayor parte de estos estudios se han centrado en la formación de fibras, pasando por alto estructuras autoensambladas discretas.<sup>305</sup>

En este capítulo nos proponemos explotar la simplicidad estructural inherente de las oligoproteínas simétricas como una estrategia potente para unir la complejidad estructural y funcional de las proteínas, con la simplicidad y versatilidad de la síntesis de péptidos en fase sólida. Estas oligoproteínas se obtendrán fácilmente a través del autoensamblaje programado de dominios peptídicos cortos, que a su vez son fácilmente accesibles a través de métodos químicos. Dichas oligoproteínas pueden mostrar las propiedades multifuncionales de las proteínas grandes, los dendrímeros o las nanopartículas, manteniendo un control espacial preciso en la disposición de los grupos funcionales de su superficie.

La capacidad de comprender y controlar la posición, la orientación y la geometría de los objetos a escala nanométrica, es crucial para la modulación de propiedades únicas, como por ejemplo catálisis.<sup>306</sup> Además, las propiedades combinadas de las nanopartículas con las propiedades de especies bioactivas de interés, pueden dar lugar a nuevas propiedades emergentes.<sup>307</sup> Debido a ello, el uso de mini proteínas sintéticas autoensambladas ofrece una gran versatilidad y simplicidad para obtener plataformas estructuradas con una disposición geométrica precisa adecuada para ligandos multivalentes, ofreciendo así ventajas de diseño significativas sobre sistemas conformacionalmente mal definidos.<sup>308</sup> Por ejemplo, una de las aplicaciones más interesantes de las proteínas

---

<sup>304</sup> a) R.V. Ulijn, A.M. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 664; b) E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1263; c) H. Robson Marsden, A. Kros, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 2988.

<sup>305</sup> C.A.E. Hauser, S. Maurer-Stroh, I.C. Martins, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 5326.

<sup>306</sup> W. L. Barnes, A. Dereux, T. W. Ebbesen, *Nature* **2003**, 424, 824.

<sup>307</sup> a) A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E.-M. Roller, A. Hoge, F. C. Simmel, A. O. Govorov, T. Liedl, *Nature* **2012**, 483, 311; b) G. Tikhomirov, S. Hoogland, P. E. Lee, A. Fischer, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 485; c) H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 4146.

<sup>308</sup> a) J. E. Dueber, G. C. Wu, G. R. Malmirchegini, T. S. Moon, C. J. Petzold, A. V. Ullal, K. L. J. Prather, J. D. Keasling, *Nat. Biotechnol.* **2009**, 27, 753–759; b) S. Schmidt-Dannert, G. Zhang, T. Johnston, M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 102, 8373–8388; c) S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1171–1178.

autoensamblantes ha sido la encapsulación de nanopartículas de materiales conductores o semiconductores.<sup>309</sup>

### **Nanoclusters de Oro (AuNCs)**

Los AuNCs están compuestos de unos pocos hasta cientos de átomo de Au.<sup>310</sup> Esto implica que los AuNCs exhiben propiedades similares a las moléculas, tales como luminiscencia,<sup>311</sup> y estados electrónicos discretos dependientes del tamaño.<sup>312</sup> Así pues, los AuNCs presentan propiedades ópticas y químicas muy diferentes en comparación con las de las nanopartículas de oro (AuNP), de tamaños superiores a 3 nm. Uno de los mayores retos de la síntesis de los AuNCs es poder controlar con precisión atómica el tamaño de los clúster, ya que las variaciones de tamaño pueden modificar sus propiedades. A pesar de que los métodos de síntesis de los nanoclúster todavía son bastante limitados, en los últimos años se han logrado grandes progresos en la síntesis de estas especies con precisión atómica.

En los años 1990, Brust *et al.*, inspirados en los estudios realizados en la década anterior sobre monocapas autoensambladas de tioles (SAMs),<sup>313</sup> sintetizan de manera análoga, nanopartículas de oro (AuNP) recubiertas por tioles.<sup>314</sup> Dichas nanopartículas se caracterizan por ser extraordinariamente estables debido al fuerte enlace covalente S-Au<sup>315</sup> (pueden ser almacenadas durante un largo período en forma de polvo) y por la posibilidad de realizar modificaciones postsintéticas, tales como la funcionalización de su superficie. Sin embargo, uno de los grandes

---

<sup>309</sup> a) F. C. Meldrum, V. J. Wade, D. L. Nimmo, B. R. Heywood, S. Mann, *Nature* **1991**, 349, 684–687; b) P. Wang, X. Wang, L. Wang, X. Hou, W. Liu, C. Chen, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, 16, 034610; c) S. H. D. P. Lacerda, J. J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M. L. Becker, A. Karim, J. F. Douglas, *ACS Nano* **2010**, 4, 365–379.

<sup>310</sup> J. Zheng, P. R. Nicovich, R. M. Dickson, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 409–431.

<sup>311</sup> N. Schaeffer, B. Tan, C. Dickinson, M. J. Rosseinsky, A. Laromaine, D. W. McComb, M. M. Stevens, Y. Wang, L. Petit, C. Barentin, D. G. Spiller, A. I. Cooper, R. Lévy, *Chem. Commun.* **2008**, 3986–3988.

<sup>312</sup> S. Chen, R. S. Ingram, M. J. Hostetler, J. J. Pietron, R. W. Murray, T. G. Schaaff, J. T. Khoury, M. M. Alvarez, R. L. Whetten, *Science* **1998**, 280, 2098–2101.

<sup>313</sup> a) C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 506–512; b) L. H. Dubois, R. G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1992**, 43, 437–463; c) A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic, New York, **1991**.

<sup>314</sup> a) M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin and R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801–802; b) M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1655–1656; c) M. Brust, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. J. Kiely, *Adv. Mater.*, **1995**, 7, 795–797.

<sup>315</sup> S.-H. Cha, J.-U. Kim, K.-H. Kim, J.-C. Lee, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 6297–6303.

inconvenientes es la polidispersidad de las partículas, al obtenerse con tamaños variados entre 2-5 nm, puesto que es de suma importancia lograr monodispersidad de los clústeres para poder observar distintos efectos cuánticos. Para ello es necesario controlar el número de átomos de oro en los complejos  $Au_n(SR)_m$  (siendo  $n$  el número de átomos de Au y  $m$  el número de ligandos derivados de tiol). Algunos de los primeros AuNCs eran hidrofóbicos (funcionalizados con alcanotiolatos o ariltiolatos) y era realmente complicado determinar el número de átomos de Au mediante técnicas como MALDI (desorción/ionización laser asistida por matriz) debido a la tendencia a fragmentar los nanoclúster.<sup>316</sup> Por eso es muy recomendable utilizar sistemas que puedan ser analizados por ESI-MS (espectrometría de masas de ionización por electroespray), una técnica de ionización más suave, que permite determinar la masa exacta del clúster. En este sentido, Schaaff *et al.* sintetizaron AuNCs funcionalizados con glutatión (GSH) solubles en medio acuoso. El ligando GSH ejerce un efecto estérico en el control del tamaño del clúster de tal forma que permite su caracterización mediante ESI-MS.<sup>317</sup>

Uno de los métodos de obtención de AuNCs estables es a través de la reducción química de Au(III) a Au(I) y posteriormente a oro metálico en presencia de agentes reductores. Los tioles, como ya hemos mencionado previamente, son usados en presencia de reductores debido fuerte enlace entre los átomos S–Au que hace posible la nucleación de los nanoclúster de oro. Alguno de los reductores más usados son el borohidruro sódico ( $NaBH_4$ ) o el cloruro de tetrakis (hidroximetil)fosfonio (THPC). Negishi *et al.* publican en el año 2007 la síntesis de un nanoclúster de oro funcionalizado con glutatión (GSH–AuNC) preparado a partir de Au(III) en presencia de GSH utilizando  $NaBH_4$  como reductor.<sup>318</sup> Existen otros métodos alternativos para obtener AuNC como la reducción fotoquímica (evitando así el uso de sustancias peligrosas). Así, el grupo de B. Tan publicó la síntesis de AuNCs fluorescentes solubles en agua utilizando polímeros con ligandos tridentados tioéter, obteniendo AuNCs con un rendimiento cuántico (QY) de 5,3%. En un estudio posterior, logró obtener AuNCs con QY de hasta un 20% variando la composición del polímero, demostrando que el tamaño



<sup>316</sup> R. J. Arnold, J. P. Reilly, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1528–1532.

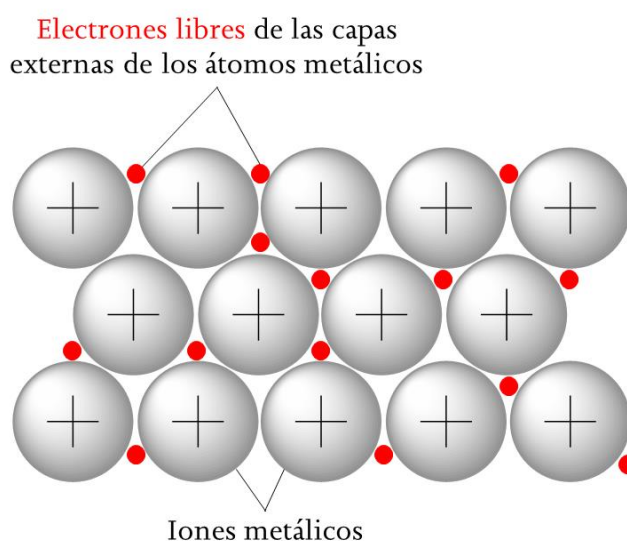
<sup>317</sup> T. G. Schaaff, G. Knight, M. N. Shafiqullin, R. F. Borkman, R. L. Whetten, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 10643–10646.

<sup>318</sup> Y. Negishi, N. K. Chaki, Y. Shichibu, R. L. Whetten, T. Tsukuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11322–11323.

y los QY de los AuNCs dependen de la naturaleza de los ligandos y se pueden controlar variando, además, la relación molar entre el polímero y el Au.<sup>319</sup>

### Los AuNCs como sensores

Los AuNCs no presentan la resonancia de plasmón superficial (RPS) pero sí exhiben fluorescencia a longitudes de onda que van desde el visible hasta regiones del infrarrojo cercano (NIR).<sup>320</sup> Los mecanismos de fluorescencia de los AuNC todavía no se comprenden del todo, pero existen modelos sencillos que pueden explicar este fenómeno y se basan, en la teoría clásica del electrón libre.<sup>321</sup>



Esquema 2: Representación de la teoría del electrón libre. En el enlace metálico, el enlace se forma entre todos los átomos que conforman la red y los electrones libres que comparten cada uno de los átomos de la red. Sin tener en cuenta las interacciones electrón-electrón y electrón-ion, parece que los electrones se mueven en una caja confinada, con colisiones periódicas con otros iones en la red. Esta idea fue dada por Paul Drude y la utilizó para explicar muchas propiedades de los metales, como la conductividad eléctrica, la conductividad térmica, etc.

Se cree además, que en la fluorescencia están involucradas las bandas TCLM (transferencia de carga desde un átomo de S, por ejemplo, hacia el centro metálico de Au) y TCLMM (considerando la interacción Au-Au aurofílica). Por ejemplo, el grupo de G. Ramakrishna estudiaron el complejo  $\text{Au}_{25}(\text{SC}_6\text{H}_{13})_{18}$  que está compuesto por un núcleo icosaédrico de 13 átomos de oro ( $\text{Au}_{13}$ ) y una



<sup>319</sup> a) H. Zhang, X. Huang, L. Li, G. Zhang, I. Hussain, Z. Li, B. Tan, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 567–569; b) L. Li, Z. Li, H. Zhang, S. Zhang, I. Majeed, B. Tan, *Nanoscale* **2013**, 5, 1986–1992.

<sup>320</sup> J. Zheng, C. Zhou, M. Yu, J. Liu, *Nanoscale* **2012**, 4, 4073–4083.

<sup>321</sup> a) P. Drude, *Ann. Phys.* **1900**, 306, 566–613; b) R. Jin, *Nanoscale* **2010**, 2, 343–362

cubierta compuesta por seis “grapas” S–Au–S–Au–S, de tal forma que exhibe fluorescencia en el NIR excitando a 514 nm (LMCT/LMMCT) y fluorescencia verde excitando a 400 nm (transición del electrón libre centrado en el metal).<sup>322</sup>

Los AuNCs tienen aplicaciones analíticas prometedoras debido a sus grandes ventajas como son: tiempos de vida largos, desplazamiento de Stokes grande, fácil conjugación y biocompatibilidad. Por estos motivos, los AuNCs son adecuados para el desarrollo de sistemas de detección sensibles y selectivos para diversos analitos. Se han desarrollado sistemas de detección de metales pesados como Hg(II), Cd(II), Pb(II) y Cu(II), muy difíciles de detectar en muestras biológicas o ambientales. El mecanismo de acción de los AuNCs como sensores de metales pesados se basa en el descenso de la fluorescencia de los clústers a medida que aumenta la concentración de esos iones. Precisamente, en el año 2012 el grupo de G.U. Nienhaus publicó un estudio donde funcionalizan AuNCs con ácido dihidrolipoico (la forma reducida del ácido lipoico) de tal forma que pudieron detectar iones Hg(II) con un límite de detección (LOD) de 0.5 nM.<sup>323</sup> Existen estudios en los cuales los AuNCs son capaces de detectar aniones inorgánicos como por ejemplo cianuro (extremadamente tóxico ya que detiene la respiración celular inhibiendo la actividad de la citocromo *c* oxidasa en las mitocondrias). En concreto, el grupo de C. Dong sintetizaron nanoclúster de oro conjugados con lisozima (Lys-AuNC) de modo que estos conjugados reconocen de manera muy selectiva los iones cianuro con un límite de detección de 190 nM. En este caso el mecanismo de detección se basa en la oxidación de los AuNCs por CN<sup>-</sup> en presencia de O<sub>2</sub> generando los complejos estables [Au(CN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>.<sup>324</sup> Existen otros ejemplo de AuNCs modificados que pueden ser sensibles a pequeñas biomoléculas, como es el caso del conjugado glucosa oxidasa-AuNC (GOD-AuNC) publicado por el grupo de J. Wang en el año 2013, capaz de detectar glucosa con un límite de detección de 0.7 μM. En este caso el bioconjugado GOD-AuNC combina las propiedades catalíticas de la enzima GOD con las propiedades fluorescentes del clúster metálico. El mecanismo de detección se basa en la oxidación de la glucosa (catalizada por la GOD) que produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la cual disminuye de manera cuantitativa la fluorescencia del AuNC.<sup>325</sup> En ese mismo

---

<sup>322</sup> M. S. Devadas, J. Kim, E. Sinn, D. Lee, T. Goodson, G. Ramakrishna, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 22417–22423.

<sup>323</sup> L. Shang, L. Yang, F. Stockmar, R. Popescu, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, G. U. Nienhaus, *Nanoscale* **2012**, 4, 4155–4160.

<sup>324</sup> D. Lu, L. Liu, F. Li, S. Shuang, Y. Li, M. M. F. Choi, C. Dong, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, 121, 77–80.

<sup>325</sup> X. Xia, Y. Long, J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2013**, 772, 81–86.

año, el grupo de Y. C. Chen publicó un estudio en el que utilizaban un conjugado glutatión-AuNC (GSH-AuNC) para detectar biomoléculas que contienen fosfatos, pudiendo utilizar este sensor tanto en lisados celulares como en muestras de plasma humano. En este estudio, la fluorescencia del conjugado GSH-AuNC disminuye en presencia de iones Fe(III), debido a la transferencia de electrones entre el ión metálico y el conjugado GSH-AuNC. Sin embargo, en presencia de metabolitos que contienen fosfatos como el ATP o el pirofosfato, los iones de Fe(III) son secuestrados como resultado de las altas constantes de afinidad entre iones de Fe(III) y biomoléculas que contienen fosfatos,<sup>326</sup> resultando así en un aumento de la fluorescencia.

#### Los AuNCs en catálisis

Los nanoclúster han adquirido gran relevancia en el campo de la catálisis debido a que, al igual que las propiedades espectroscópicas, su actividad catalítica depende del tamaño de los clúster.<sup>327</sup> Uno de los nanoclúster ampliamente estudiados por sus potenciales propiedades catalíticas es Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub>. Este tipo de AuNC exhibe una estructura compuesta por un núcleo de Au<sub>13</sub> icosaédrico, encapsulado por una cubierta porosa con los 12 átomos de oro restantes. Las cavidades que presenta la cubierta pueden actuar como centros activos catalíticos. Además, Au<sub>23</sub>(SR)<sub>18</sub> exhibe niveles de energía discretos causados por el efecto de tamaño cuántico.<sup>328</sup> La estabilidad térmica de los clúster del tipo Au<sub>n</sub>(SR)<sub>m</sub> también es de gran importancia de cara a potenciales aplicaciones catalíticas ya que la mayor parte de las reacciones tienen lugar en condiciones térmicas superiores a la temperatura ambiente, pudiendo soportar temperaturas de hasta 300°C (a partir de esta temperatura tiene lugar la desorción de los ligandos). Los NC de Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub> pueden ser usados en procesos de oxidación o reducción catalíticos debido a sus especies reversibles [Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub>]<sup>-</sup> y [Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub>]<sup>0</sup> aplicándolos con éxito en procesos como la oxidación catalítica de monóxido de carbono (CO) a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).<sup>329</sup> El grupo de R. Jin publicó un estudio en el que un conjugado Au<sub>23</sub>(SR)<sub>18</sub>/CeO<sub>2</sub> (siendo CeO<sub>2</sub> el soporte sólido sobre el que está depositado el NC) presentaba una actividad moderada a una temperatura

---

<sup>326</sup> P.-H. Li, J.-Y. Lin, C.-T. Chen, W.-R. Ciou, P.-H. Chan, L. Luo, H.-Y. Hsu, E. W.-G. Diau, Y.-C. Chen, *Analytical Chemistry* **2012**, 84, 5484–5488.

<sup>327</sup> T. Tsukuda, *BCSJ* **2012**, 85, 151–168.

<sup>328</sup> H. Qian, M. Zhu, Z. Wu, R. Jin, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1470–1479.

<sup>329</sup> a) G. C. Bond, C. Louis, D. T. Thompson, *Catalysis by Gold*, Imperial College Press, London, **2006**; b) M. Haruta, S. Tsubota, T. Kobayashi, H. Kageyama, M. J. Genet, B. Delmon, *J. Catal.* **1993**, 144, 175–192.

próxima a los 60°C. Sin embargo, descubrieron que el tratamiento previo del conjugado Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub>/CeO<sub>2</sub> con O<sub>2</sub> a 150°C conducía a un drástico incremento en la actividad catalítica, consiguiendo de esta forma una conversión completa del CO a una temperatura 100°C.

El grupo de T. Tsukuda, estudió la oxidación catalítica aeróbica de alcoholes utilizando como catalizador AuNC dopados con Pd, adheridos a nanotubos de carbono (CNT). En la oxidación aeróbica del alcohol bencílico, el conjugado Pd<sub>1</sub>Au<sub>24</sub>/CNT presentaba un aumento en la actividad catalítica (74% de conversión) respecto al nanoclúster no dopado Au<sub>25</sub>/CNT (22% de conversión) debido a la modulación de la estructura electrónica del clúster por transferencia de electrones dentro del clúster desde el Pd al Au.<sup>330</sup>

Los nanoclúster Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub> también se han usado en otras reacciones como la hidrogenación catalítica (hidrogenación quimioselectiva de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas a alcoholes  $\alpha,\beta$ -insaturadas),<sup>331</sup> o la oxidación selectiva del estireno que se puede lograr en presencia de O<sub>2</sub> catalizado por el nanoclúster en disolución,<sup>331</sup> utilizando un sistema Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub>/HAP (HAP = hidroxiapatita),<sup>332</sup> entre otras.<sup>333</sup>

### **Proteínas anulares como plataforma en nanociencia**

Las proteínas anulares (ring proteins) o toroidales, tienen una función muy ligada al ADN dúplex, estando implicadas en procesos bioquímicos fundamentales como, por ejemplo, el aumento de la procesividad de las ADN polimerasas, la generación de ADN monocatenario a partir del ADN hibridado, recombinación homóloga del ADN, desenrollado del ADN superenrollado y transporte de ADN.<sup>334</sup> Dentro de la familia de las proteínas anulares existen diversas clases como las pinzas de ADN (DNA clamps) las cuales se encargan de mantener en contacto a la ADN polimerasa con la hebra de ADN durante la replicación<sup>335</sup> o proteínas tubulares, utilizadas por organismos como los virus con diferentes propósitos como la infección del huésped o el almacenamiento de su material genético. Otras clases de proteínas anulares interesantes son las proteínas jaula

---

<sup>330</sup> S. Xie, H. Tsunoyama, W. Kurashige, Y. Negishi, T. Tsukuda, *ACS Catal.* **2012**, 2, 1519–1523.

<sup>331</sup> Y. Zhu, H. Qian, M. Zhu, R. Jin, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 1915–1920.

<sup>332</sup> Y. Liu, H. Tsunoyama, T. Akita, T. Tsukuda, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 550–552.

<sup>333</sup> G. Li, R. Jin, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 1749–1758.

<sup>334</sup> M. M. Hingorani, M. O'Donnell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, 1, 22–30.

<sup>335</sup> X.-P. Kong, R. Onrust, M. O'Donnell, J. Kuriyan, *Cell*, **1992**, 69, 425–37.

(protein cages) de gran interés debido a aplicación potencial como vehículos de transporte, las chaperoninas,<sup>336</sup> ferritinas<sup>337</sup> o los propios virus.<sup>338</sup>

Las proteínas toroidales son de gran interés para la organización de la materia a escala nanométrica, ya que poseen tres tipos de superficies externas (parte superior del toroide, parte inferior y el borde exterior) las cuales se pueden modificar para modular sus propiedades, además de una superficie interna que se puede modificar para albergar nanopartículas y **controlar su tamaño y forma**.

Estudios iniciales en los años 90 describieron la aplicación de las capas-S, formaciones regulares formadas por la asociación de proteínas que se encuentran en muchas bacterias arqueas,<sup>339</sup> como soporte para la síntesis de partículas inorgánicas.<sup>340</sup> Estos estudios sentaron las bases para la aplicación de sistemas biomoleculares autoorganizados para la organización de la materia a escala nanométrica y pueden presentar propiedades ópticas únicas, muy útiles en campos como de la biomedicina,<sup>341</sup> biocatálisis<sup>342</sup> o en técnicas de imagen.<sup>343</sup>

En 2006 J. G. Heddle publicó un primer estudio en el que fusionaban monómeros de la proteína TRAP (Trp RNA-binding Attenuation Protein) para obtener análogos que se autoensamblaban formando dodecámeros toroidales (frente a la oligomerización de 11 unidades monoméricas en la proteína natural).<sup>344</sup> Al año siguiente publicarían el primer ejemplo de la colocación de

---

<sup>336</sup> H. Saibil, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, 14, 630–42.

<sup>337</sup> X. Liu, E. C. Theil, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 167–75.

<sup>338</sup> A. Zlotnick, S. Francis, L. S. Lee, J. C.-Y. Wang, *Viral Nanotechnology* **2015**, CRC Press, cap 2, pp. 13–26.

<sup>339</sup> R. P. Fagan, N. F. Fairweather, *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, 12, 211–222.

<sup>340</sup> a) K. Douglas, N. A. Clark, K. J. Rothschild, *Appl. Phys. Lett.* **1986**, 48, 676–678; b) K. Douglas, N. A. Clark and K. J. Rothschild, *Appl. Phys. Lett.* 1986, **48**, 676–678; c) R. A. McMillan, C. D. Paavola, J. Howard, S. L. Chan, N. J. Zaluzec, J. D. Trent, *Nat. Mater.*, 2002, **1**, 247–252.

<sup>341</sup> a) S. Shen, H. Y. Tang, X. T. Zhang, J. F. Ren, Z. Q. Pang, D. G. Wang, H. L. Gao, Y. Qian, X. G. Jiang, W. L. Yang, *Biomaterials*, **2013**, 34, 3150; b) F. Ren, S. Bhana, D. D. Norman, J. Johnson, L. Xu, D. L. Baker, A. L. Parrill, X. Huang *Bioconjugate Chem.*, **2013**, 24, 376.

<sup>342</sup> a) S. Komathi, A. I. Gopalan, S. K. Kim, G. S. Anand, K. P. Lee, *Electrochim. Acta* **2013**, 92 71; P. Zijlstra, P. M. Paulo and M. Orrit, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7, 379.

<sup>343</sup> a) J. Van Noort, B. Van Den Broek, B. A. Ashcroft, T. H. Oosterkamp, *Nano Lett.* **2013**, 13, 980; b) C. Gui and D. X. Cui, *Cancer Biol. Med.* **2012**, 9, 221.

<sup>344</sup> J. G. Heddle, T. Yokoyama, I. Yamashita, S.-Y. Park and J. R. H. Tame, *Structure* **2006**, 14, 925.

nanopartículas de oro (AuNPs) en la cavidad central del anillo de una proteína toroidal reemplazando el residuo de Arg en la posición 66 en la proteína TRAP natural de *B. stearothermophilus* por un residuo de Cys que queda situado en el interior de la cavidad central y, como TRAP no contiene otras Cys de forma natural, las once copias del residuo mutado proporcionan los únicos átomos de azufre disponibles para la colocación AuNP previamente sintetizadas en su interior.<sup>345</sup>

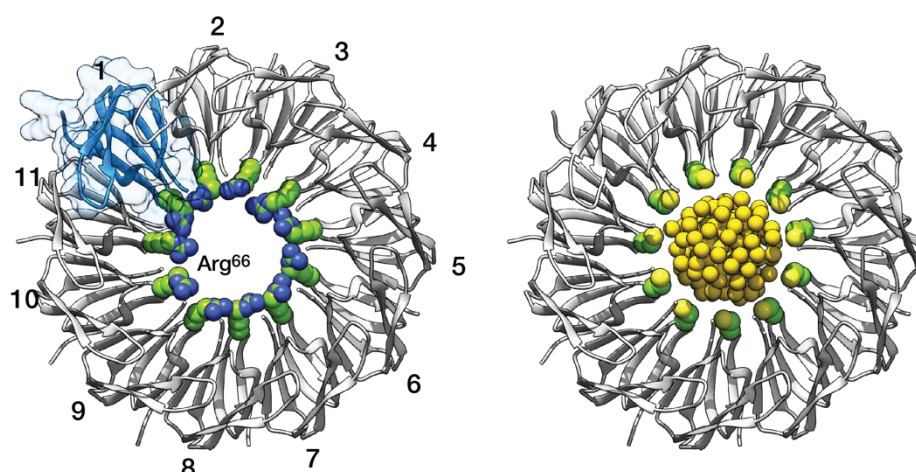


Figura 63: Estructura del complejo oligomérico (11 monómeros) de la proteína toroidal TRAP de *B. stearothermophilus* (PDB: 1QAW) mostrando los residuos de Arg<sup>66</sup> en la cavidad central. A la derecha el mutante con Cys<sup>66</sup> atrapando una AuNP en el centro de la cavidad

El grupo de O. Shoseyov publicó en el año 2006 la caracterización biofísica detallada de la Proteína Estable 1 (SP1) de la planta *Populus tremula*, demostrando que SP1 se ensamble formando un dodecámero con forma de anillo de 11 nm de diámetro y un poro interno central de 2–3 nm. SP1 muestra, además, una estabilidad térmica ( $T_m \approx 107^\circ\text{C}$ ) y química extremadamente alta, siendo capaz de resistir la acción de detergentes, como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y a las proteasas, lo cual la convierte en una plataforma interesante con posibles usos en (bio)nanotecnología.<sup>346</sup> De esta forma, en el año 2009 describieron la aplicación de esta proteína hiperestable para la síntesis de AuNPs en el interior de su cavidad. Para ello expresaron un mutante con una cola de seis residuos de His en su extremo N-terminal para obtener una variante con 72 residuos de His en la cavidad interna del toroide. La histidina es capaz de coordinar iones metálicos a

<sup>345</sup> J. G. Heddle, I. Fujiwara, H. Yamadaki, S. Yoshii, K. Nishio, C. Addy, I. Yamashita, J. R. H. Tame, *Small* **2007**, 3, 1950–1956.

<sup>346</sup> W.-X. Wang, O. Dgany, S. G. Wolf, I. Levy, R. Algom, Y. Pouny, A. Wolf, I. Marton, A. Altman, O. Shoseyov, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 95, 161.

través del átomo N3 desprotonado en el anillo de imidazol. Cuando el mutante fue tratado con  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  y un agente reductor se obtuvo una disolución coloidal que demostró contener nanopartículas metálicas en el interior de SPI.<sup>347</sup>

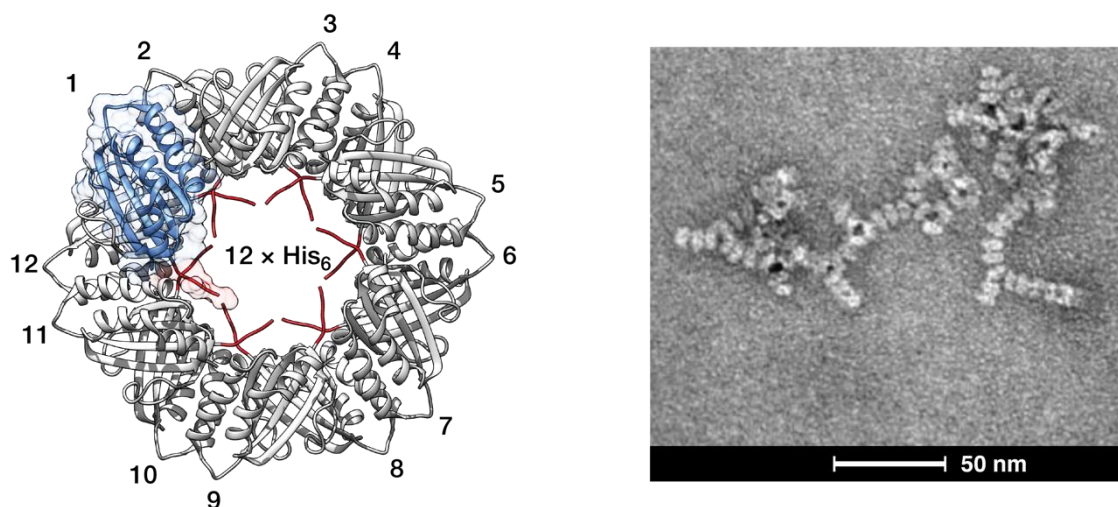


Figura 64: Izquierda: estructura del dodecámero de SPI destacando uno de los monómeros (azul) y el extremo N-terminal del péptido orientado hacia el interior del poro en donde se introducen las colas de His6 (en rojo). Derecha, Imagen de TEM del híbrido de Pd-His6-SPI marcado con acetato de uranilo, en la que se observan las nanopartículas en negro. Adaptado de la ref. 347 con autorización de la editorial *John Wiley & Sons* (Lic. núm. 4835210213017).

En el año 2012 el grupo de A. S. Blum publica un estudio en el que utilizan la proteína de la cubierta del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV-cp), una proteína que en su forma natural presenta una estructura cilíndrica con un poro interno de 4 nm de diámetro, que se puede asociar en forma de discos o en cilindros helicoidales de longitud variable dependiendo de las condiciones del medio. Utilizando esta proteína como plantilla, sintetizan un anillo de nanopartículas de oro de 23 nm de diámetro estable en disolución, debido a la interacción electrostática entre los discos de la TMV-cp con las nanopartículas de oro pasivadas con ligandos derivados de fosfinas. Por otro lado, la unión de una nanopartícula en la cavidad central se debe a la interacción con los residuos de Arg presentes en el poro sólo cuando el pH del medio permite la protonación de los carbonilos también presentes en el poro interno.<sup>348</sup> En este mismo año, J. G. Hedde y S. Tomita publican un nuevo estudio sobre la proteína TRAP en el cual observan una reorganización de la proteína inducida por las nanopartículas de oro, obteniéndose una estructura hueca similar a la cápside de un virus. Para ello

<sup>347</sup> S. Behrens, A. Heyman, R. Maul, S. Essig, S. Steigerwald, A. Quintilla, W. Wenzel, J. Bürck, O. Dgany, O. Shoseyov, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3515.

<sup>348</sup> O. K. Zahr, A. S. Blum, *Nano Lett.* **2012**, 12, 629–633.

mutan la Lys<sup>35</sup> por una Cys de tal forma que cada unidad de TRAP tiene 11 Cys en su superficie exterior.<sup>349</sup>

El grupo de R. Ippoliti publicó en el año 2014 una nueva estrategia para la creación de superestructuras que combinan nanopartículas con proteínas. Para ello se basaron en las propiedades de la proteína 2-Cys peroxiredoxina I (SmPrxI), que en condiciones normales se encuentra formando dímeros, pero que se en condiciones oxidantes suaves se autoensambla formando toroides decaméricos y filamentos tubulares en condiciones más drásticas. Así pues, al igual que hizo previamente O. Shoseyov con la proteína SP1, funcionalizaron el extremo N-terminal de SmPrxI, que se sitúa en el interior del poro del anillo, con un motivo de His, de tal forma que puede nuclear la formación de nanopartículas metálicas o encapsular AuNPs con iones de Ni<sup>2+</sup> en su superficie. Una vez ensambladas las nanopartículas, los investigadores pudieron modificar las condiciones para obtener filamentos tubulares con nanopartículas de oro en su interior.<sup>350</sup>

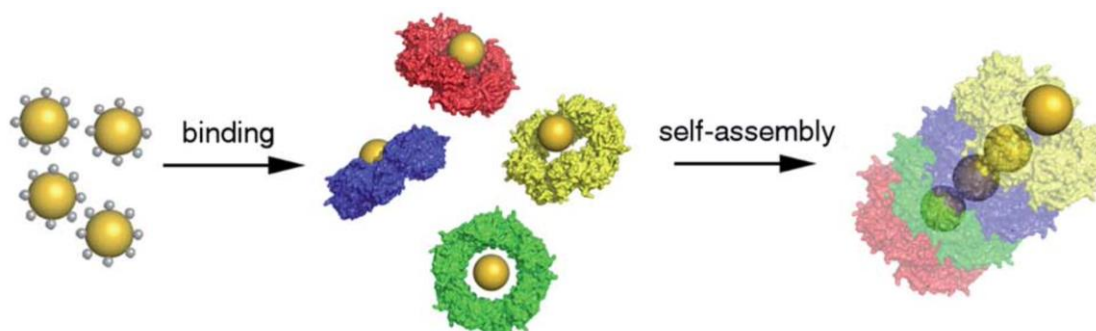


Figura 65: Estrategia para el autoensamblaje inducido por metales de nanotubos SmPrxI. Reproducido de la ref. 350 con permiso de *The Royal Society of Chemistry*.

En el año 2015 el grupo de S. M. Schiller publica una interesante aproximación utilizando la proteína toroidal Hcp1 (Heme Carrier protein 1) como adaptadores/conectores y no solo como plantilla para encapsular nanopartículas de oro (AuNP). En este caso, reemplazaron determinados residuos de la proteína Hcp1 por residuos de Cys, generando así una serie de sitios activos capaces de unir a AuNP. De este modo se pueden asociar formando distintas arquitecturas (cadenas en 1D, redes complejas o estructuras en forma de estrella).<sup>351</sup> De la misma forma, el grupo de H. Cölfen publicó en el año 2017 un trabajo en el que,

<sup>349</sup> A. D. Malay, J. G. Heddle, S. Tomita, K. Iwasaki, N. Miyazaki, K. Sumitomo, H. Yanagi, I. Yamashita, Y. Uraoka, *Nano Lett.* **2012**, 12, 2056–2059.

<sup>350</sup> M. Ardini, F. Giansanti, L. Di Leandro, G. Pitari, A. Cimini, L. Ottaviano, M. Donarelli, S. Santucci, F. Angelucci, R. Ippoliti, *Nanoscale* **2014**, 6, 8052–8061.

<sup>351</sup> A. Schreiber, M. C. Huber, H. Cölfen, S. M. Schiller, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 6705.

siguiendo la misma estrategia con la proteína Hcp1, eran capaces de preparar nanocables de ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) consiguiendo unas propiedades magnéticas análogas a las de los imanes de neodimio.<sup>352</sup>

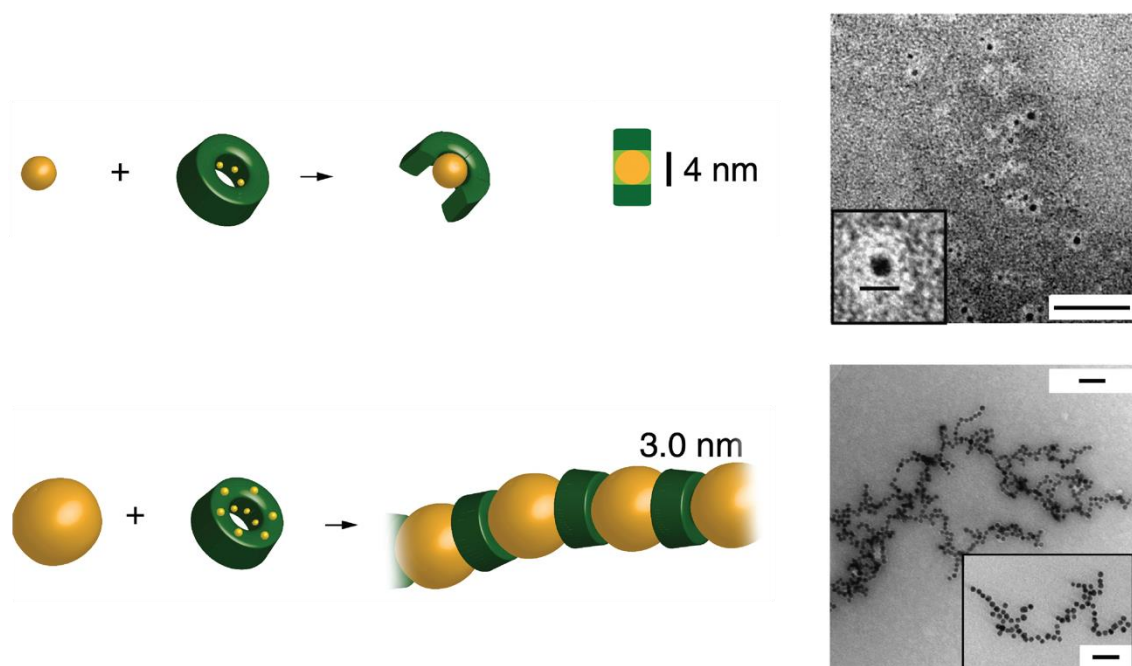


Figura 66: Formación de diferentes nanoarquitecturas autoensambladas a través de mutantes de Hcp1 y AuNPs de diferente tamaño. Arriba: AuNPs de 4 nm son incorporadas y estabilizadas por el mutante Q54C; abajo, el triple mutante Q54C, G91C y N159C se añade sobre una disolución de AuNPs de 10 nm para dar lugar a un ensamblaje monodimensional. Modificado a partir de una figura en la ref. 351 con autorización de Springer Nature (Lic. núm. 4835280814870).

Más recientemente, un estudio del grupo de J Malmström describió la encapsulación de nanopartículas de oxihidróxido de hierro en el interior de la peroxiredoxina (Prx). Para ello, de manera similar a la del grupo de R. Ippoliti, funcionalizaron la parte interior de los toroides de la proteína con residuos de histidina. En este caso, para evitar la oxidación del Fe(II) a Fe(III) en medio acuoso a  $\text{pH} > 6$ , introdujeron el ligando citrato en el tampón en el que esta disuelto la proteína, de tal forma que se promueve la precipitación de las nanopartículas de Fe en el interior de los toroides. Finalmente, mediante la

<sup>352</sup> T. A. Pham, A. Schreiber, S. M. Schiller, H. Cölfen, *Adv. Funct. Mater.* **2017**, 27, 1604532.

modulación del pH, los toroides mineralizados se asocian en estructuras unidimensionales albergando las nanopartículas en su interior.<sup>353</sup>

Recientemente, las proteínas toroidales también se han usado como bloques de construcción de arquitecturas más complejas como los nanotubos.<sup>354</sup> En cualquier caso, para la funcionalización de dichas estructuras con nanopartículas, es necesaria la mutación de al menos, uno de los aminoácidos de la secuencia peptídica por una cisteína, ya que el tiol de su cadena lateral es un punto de anclaje ideal para la unión y el crecimiento de las NPs.<sup>355</sup> Como consecuencia del crecimiento de las AuNPs, las proteínas toroidales pueden sufrir ciertas transformaciones, adquiriendo una estructura poliédrica hueca (similar a la cápside de los virus) de tal forma que pueden actuar como transportadores o nanoreactores.<sup>356</sup> En estos casos, el oro actúa como catalizador del reordenamiento de la estructura de la proteína. Una aplicación directa de este tipo de nanoestructuras artificiales es su uso como transportadores de *nanodots* de oro a un dispositivo semiconductor.<sup>357</sup>

### La proteína gp23.1

La proteína viral gp23.1 es una pequeña proteína globular compuesta por 50 residuos que se pliega en un dominio de tres hélices antiparalelas (S<sup>2</sup> E<sup>10</sup> S<sup>15</sup> L<sup>18</sup> L<sup>21</sup> Y<sup>24</sup> G<sup>27</sup> Y<sup>30</sup> F<sup>33</sup> L<sup>36</sup> D<sup>39</sup> S<sup>42</sup> W<sup>45</sup> L<sup>48</sup> D<sup>50</sup> G<sup>15</sup> T<sup>20</sup> A<sup>25</sup> S<sup>30</sup> E<sup>35</sup> K<sup>40</sup> L<sup>45</sup> L<sup>50</sup> R<sup>55</sup> V<sup>60</sup> A<sup>65</sup> V<sup>70</sup> N<sup>75</sup> A<sup>80</sup> G<sup>85</sup> D<sup>90</sup> L<sup>95</sup> T<sup>100</sup> Q<sup>105</sup> E<sup>110</sup> E<sup>115</sup> A<sup>120</sup> D<sup>125</sup> K<sup>130</sup> I<sup>135</sup> M<sup>140</sup> S<sup>145</sup> Y<sup>150</sup> P<sup>155</sup> W<sup>160</sup> G<sup>165</sup> A<sup>170</sup> W<sup>175</sup> N<sup>180</sup> S<sup>185</sup> D<sup>190</sup>).<sup>358</sup> Una de las particularidades de esta proteína, es que forma un hexámero en disolución, tal y como lo revelan las medidas *light scattering*. Además, su estructura se ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X.<sup>359</sup> Cabe destacar que la proteína gp23.1 exhibe una estructura toroidal—o con forma de donut—con unos 58 Å de diámetro, un canal central de ~18 Å de ancho delimitado por las seis

<sup>353</sup> S. Manuguri, K. Webster, N. A. Yewdall, Y. An, H. Venugopal, V. Bhugra, A. Turner, L. J. Domigan, J. A. Gerrard, D. E. Williams, J. Malmström, *Nano Lett.* **2018**, 18, 5138–5145.

<sup>354</sup> X. Gao, H. Matsui, *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2037.

<sup>355</sup> R. G. Acres, V. Feyer, N. Tsud, E. Carlino, K. C. Prince, *J. Phys. Chem. C* **2014**, 118, 10481.

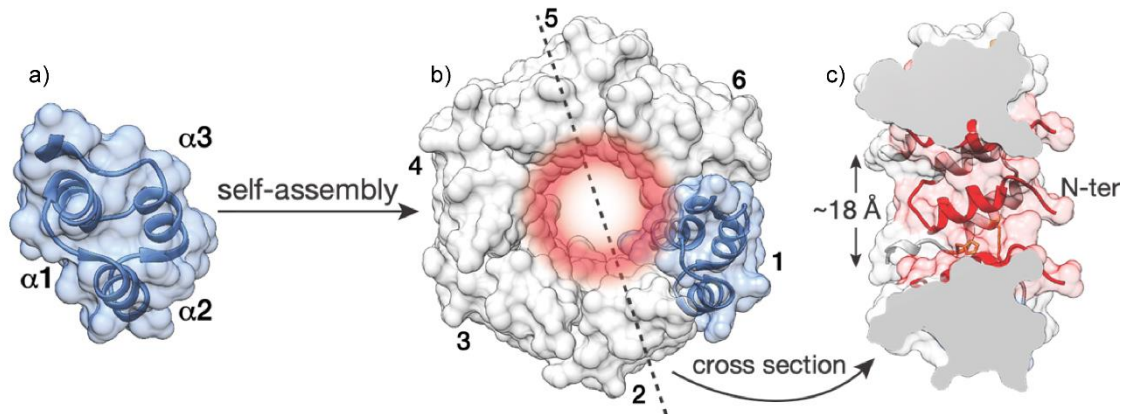
<sup>356</sup> a) K. McCoy, M. Uchida, B. Lee and T. Douglas, *ACS Nano*, **2018**, 12, 3541; b) J. Lee and H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2015**, 112, 13768.

<sup>357</sup> F. F. Miranda, K. Iwasaki, S. Akashi, K. Sumitomo, M. Kobayashi, I. Yamashita, J. R. H. Tame, *Small* **2009**, 5, 2077–84

<sup>358</sup> Numeración según la estructura de rayos X (PDB ID#: 2XF6)

<sup>359</sup> D. Veessler, S. Blangy, J. Lichière, M. Ortiz-Lombardía, P. Tavares, V. Campanacci, C. Cambillau, *Protein Sci.* **2010**, 19, 181.

hélices  $\alpha 1$ , mientras que las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  forman la superficie exterior. Las interacciones que tienen lugar entre dos monómeros, para asegurar la cohesión del hexámero, incluyen un puente salino (Lys<sup>40</sup>-Asp<sup>32</sup>), enlaces de hidrógeno y contactos de van der Waals.<sup>360</sup>



**Figura 67:** Estructura de la proteína gp23.1; a) monómero; b) vista superior de la proteína toroidal; c) corte transversal de la proteína donde se aprecian las dimensiones del canal interno.

El tamaño relativamente pequeño de la proteína gp23.1 y la accesibilidad sintética de los monómeros hacen de esta proteína una plataforma excelente para el control geométrico y preciso de funcionalidades a escala nanométrica, incluyendo grupos funcionales extrínsecos que aporten nuevas funcionalidades inaccesibles a proteínas naturales.

La proteína gp23.1 está presente en el fago SPP1 del *Bacillus subtilis*. Dicho fago, tiene encapsulado su genoma en la cápside isométrica de 60 nm de ancho, la cual está conectada con una larga cola de 160 nm de largo.<sup>361</sup> La infección del anfitrión tiene lugar cuando el extremo de la cola se une a la proteína de membrana YueB (interacción específica e irreversible) iniciando la cascada de eventos que resulta en la eyección del ADN en el citoplasma del *B. subtilis*. Una característica particular de la proteína gp23.1 es que su secuencia peptídica no tiene similitud alguna con la secuencia de cualquier otra proteína, hecho que dificulta postular su posible función. La presencia del canal central puede sugerir que es una proteína estructural permitiendo el tránsito del ADN. Sin embargo, el potencial

<sup>360</sup> a) M.P. Lutolf, J.A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 47; b) D.N. Woolfson, M.G. Ryadnov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 559.

<sup>361</sup> a) H. Brüßow, R. W. Hendrix, *Cell* **2002**, 108, 13–16; b) C. Plisson, H. E. White, I. Auzat, A. Zafarani, C. São-José, S. Lhuillier, P. Tavares, E. V. Orlova, *EMBO J.* **2007**, 26, 3720–3728.

electrostático negativo, así como el diámetro del canal, más pequeño que el ADN, hacen imposible el movimiento del ADN a través de dicho canal.

Los fagos pueden expresar enzimas o proteínas involucradas en un número limitado de funciones como: anclaje a la pared celular vía proteínas de unión al receptor; digestión de la pared celular para permitir la entrada del ADN o la salida del fago (Lisozima y lisina); maduración de los viriones (proteasas); perforación de la membrana; replicación de los fagos basada en enzimas y proteínas de unión al ADN; o chaperonas involucradas en el ensamblaje de proteínas estructurales. En el caso de la proteína gp23.1, el grupo de C. Cambillau postula que la proteína podría actuar como chaperona, interaccionando con otras proteínas durante el ensamblaje del fago. Para ello se basan en que el dominio de unión del SSP1 se localiza en el extremo de la cola, por tanto, la gp23.1 no podría actuar en las etapas de adsorción de los fagos.<sup>362</sup> Por otro lado, en la secuencia peptídica de gp23.1 no hay ninguna similitud con las secuencias de las proteasas, descartando así su actividad catalítica. Finalmente, la proteína gp23.1 ni es una proteína de membrana ni está cargada positivamente de tal forma que pueda interaccionar con el ADN o el ARN.



---

<sup>362</sup> C. São-José, S. Lhuillier, R. Lurz, R. Melki, J. Lepault, M. A. Santos, P. Tavares, J. Biol. Chem. **2006**, 281, 11464–11470.

## Objetivos

El objetivo de este capítulo es la síntesis del monómero de una proteína viral que oligomeriza en disolución formando una mini proteína con una estructura toroidal que servirá como plataforma para la síntesis controlada de nanoclúster de oro (AuNC).

## Resultados y discusión

La proteína gp23.1 nos ofrece grandes oportunidades para modular sus propiedades ya sea a través de la superficie externa (en ambas caras del toroide) o la superficie interna del canal. Por ejemplo, podemos introducir un grupo azida para la modificación de forma ortogonal mediante química click. Además, el poro interno del hexámero nos ofrece la oportunidad para diseñar metaloenzimas artificiales de interés en catálisis bioortogonal con compuestos organometálicos.<sup>363</sup> La mutación Asp<sup>12</sup>→Cys genera un punto de unión para nanoclústers de oro (AuNC) que se ajustan a la cavidad interior de la proteína (~1.8 nm de diámetro).<sup>364</sup> Como reacciones modelo para estudiar nuestro sistema, hemos seleccionado la hidroarilación de alquinos catalizada por oro en condiciones aeróbicas.

---

<sup>363</sup> T. Völker, F. Dempwolff, P.L. Graumann, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10536.

<sup>364</sup> a) J. G. Heddle, I. Fujiwara, H. Yamadaki, S. Yoshii, K. Nishio, C. Addy, I. Yamashita, J. R. H. Tame, *Small* **2007**, 3, 1950–1956; b) R. A. McMillan, C. D. Paavola, J. Howard, S. L. Chan, N. J. Zaluzec, J. D. Trent, *Nat. Mater.* **2002**, 1, 247; c) A. Schreiber, M. C. Huber, H. Cölfen, S. M. Schiller, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 6705.

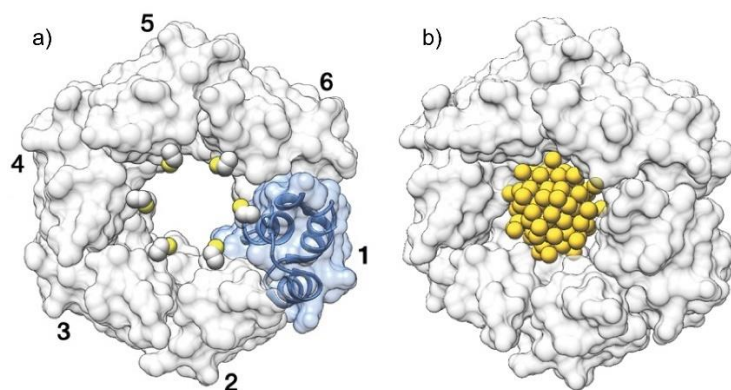


Figura 68: a) vista superior del hexámero con el monómero representado en azul. Las esferas amarillas representan la Cys<sup>12</sup> que servirán como punto de anclaje de los nanoclúster; b) representación del hexámero con los nanoclúster de Au.

En primer lugar, decidimos mutar la Met<sup>42</sup> por el aminoácido Nle (norleucina) para evitar los problemas de oxidación de la metionina.<sup>365</sup> Por otro lado, empleamos la resina PAL-PEG-PS (Life Technologies) con una carga nominal baja (0.18 mmol/g) que puede facilitar la síntesis de secuencias peptídicas largas. En primer lugar, la síntesis del péptido se llevó a cabo en un sintetizador automático de péptidos (PS3™ Protein Technologies, inc) haciendo acoplamiento simple, utilizando la mezcla HOBT/HBTU (0.2 M en DMF) como agentes de acoplamiento, DIEA como base (0.195 M en DMF) y una disolución de piperidina al 20 % en DMF como disolución para la desprotección del grupo protector temporal Fmoc. Debido a que la secuencia peptídica es bastante larga, se realizaron análisis mediante HPLC-MS(ESI) desprotegiendo una pequeña porción de la resina, de tal forma que hemos podido monitorizar la evolución de la síntesis de la secuencia peptídica.

Así pues, sintetizamos el péptido **1** (H<sub>2</sub>N-I(Nle)SYPWGAWND-CONH<sub>2</sub>). El análisis mediante HPLC reveló la presencia de dos compuestos mayoritarios con igual masa. Esto significa que probablemente el péptido sufrió un proceso de racemización durante la síntesis. Decidimos continuar con la elongación del péptido acoplando los siguientes 12 aminoácidos, de tal forma que la secuencia peptídica sintetizada (**2**) sería la siguiente: H<sub>2</sub>N-NAGDLTQEEADKI-I(Nle)YSPWGAWND-CONH<sub>2</sub>. En este caso, tras el análisis correspondiente por HPLC-MS se observó un pico mayoritario que se correspondía con una deleción de la secuencia debido a que uno de los Glu (E) no había acoplado.

<sup>365</sup> a) J. I. Harris, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1967**, pp. 390–398; b) K. Norris, J. Halstrøm, K. Brunfeldt, K. Pihlaja, K. Schaumburg, L. Ehrenberg, *Acta Chem. Scand.* **1971**, 25, 945–954.

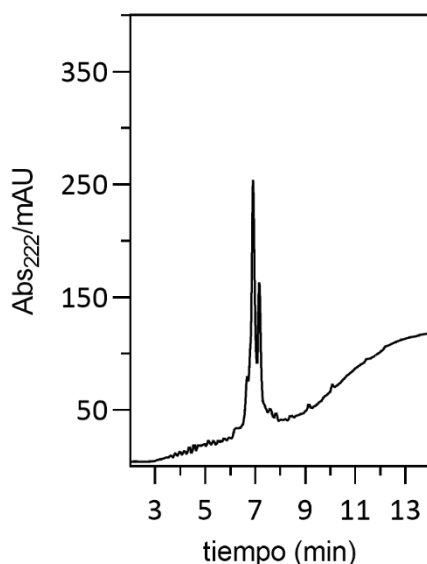


Figura 69: cromatograma correspondiente a la secuencia peptídica **2**.

En base a los problemas que estábamos teniendo, decidimos cambiar el soporte sólido sustituyendo la resina PAL-PEG-PS por la resina Rink Amide ChemMatrix<sup>®</sup>. Esta resina está compuesta por polietilenglicol (PEG) 100% y se caracteriza por combinar la estabilidad química de las resinas basadas en poliestireno (PS) y el rendimiento de las resinas basadas en (PEG). Además, es apta para la SPPS-MW y posee una gran capacidad de hinchado permitiendo el acceso de los reactivos para que reaccionen correctamente.<sup>50</sup> A diferencia de la resina PAL-PEG-PS (ampliamente utilizada en la síntesis de péptidos pequeños), la resina ChemMatrix<sup>®</sup> es muy recomendable para la síntesis de péptidos largos o que tienden a agregar. El único inconveniente, es una mayor carga nominal de la resina (0.4-0.6 mmol/g) que puede perjudicar en la obtención de secuencias peptídicas largas.

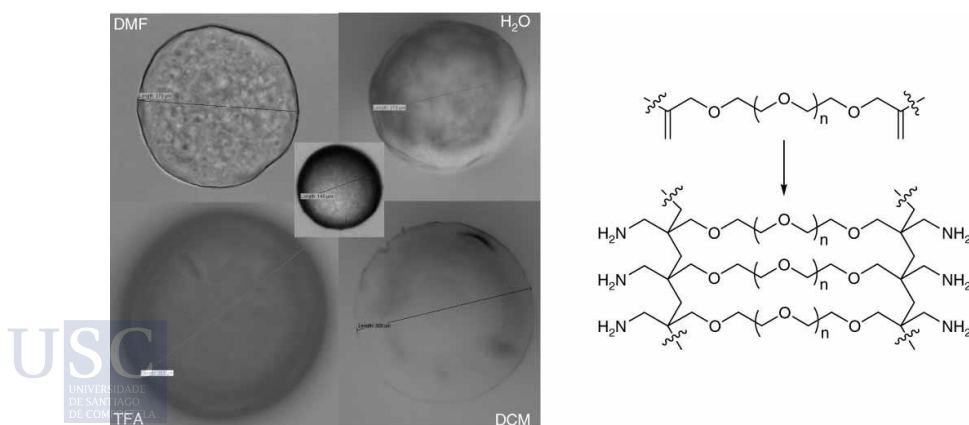


Figura 70: Izquierda, comparación del hinchado de las perlas de la resina ChemMatrix<sup>®</sup> en diferentes disolventes utilizados en la SPPS; Derecha, representación del monómero y del polímero de la resina ChemMatrix<sup>®</sup>. Adaptada de la referencia 50 con permiso de *European Peptide Society and John Wiley & Sons*. Copyright © 2010.

Comenzamos nuevamente la síntesis del péptido empleando la resina ChemMatrix<sup>®</sup> y las mismas condiciones que en los casos anteriores (aminoácidos 5 eq., HOBT/HBTU 5 eq., DIEA 0.195M/DMF, 20% piperidina/DMF). En esta ocasión se programó el sintetizador de péptidos de tal forma que el objetivo fue la secuencia de 34 aa (**3**) (H<sub>2</sub>N-TASE-ELLRVAVNAG-DLTQEEADKI-(Nle)SYPWGAWND-CONH<sub>2</sub>). El análisis del péptido nos reveló de nuevo la existencia de 2 especies mayoritarias debido a la epimerización (Figura 71).

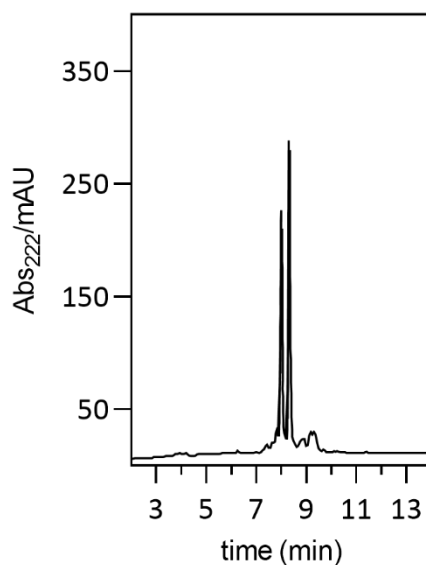


Figura 71: cromatograma de HPLC-MS(ESI) correspondiente al péptido **3**.

A pesar de este inconveniente decidimos continuar y se sintetizó el péptido **4** hasta completar la secuencia peptídica de 50 aa. (**4**). Desafortunadamente, el análisis del péptido final nos muestra una mezcla compleja en la que, además, no hemos podido identificar el péptido de interés.

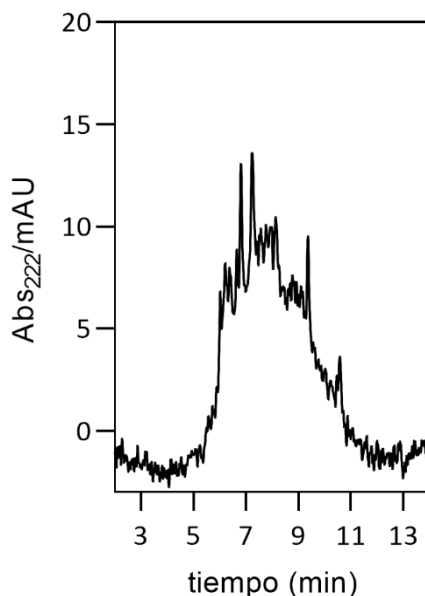


Figura 72: Cromatograma de HPLC del péptido final de 50 aa (4).

En este momento se adquirió un nuevo sintetizador de péptidos con un módulo de microondas (Liberty Light, CEM Corporation). Estos nuevos sintetizadores permiten realizar las etapas de acoplamiento y desprotección a temperaturas elevadas controladas que permiten no solo mejorar el rendimiento si no que, además, reducen enormemente el tiempo empleado en la síntesis de péptidos. Por otro lado, el uso de microondas también puede favorecer la agregación y formación de aspartimidas, aunque se puede disminuir la aparición de estas reacciones secundarias con los protocolos adecuados. Además, optamos por la estrategia DIC/Oxyrna (N,N'-diisopropilcarbodiimida y etil 2-ciano-2(hidroxiimino)acetato, respectivamente) como agentes de acoplamiento. Esta estrategia es muy usada en síntesis de péptidos debido fundamentalmente a que el subproducto derivado del acoplamiento de un aminoácido utilizando DIC es una urea, muy soluble en DMF o DCM. Por otro lado, si se usa solo DIC como agente de acoplamiento se obtienen altos niveles de enantiomerización a través de un intermedio de oxazolona estabilizado por resonancia.<sup>366,367</sup> Para prevenir la enantiomerización se añade una hidroxilamina que convierte la O-acilo isourea en un intermedio menos reactivo.



<sup>366</sup> N. L. Benoiton, *Pept. Sci.* **1996**, 40, 245–254.

<sup>367</sup> C. A. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827–10852.

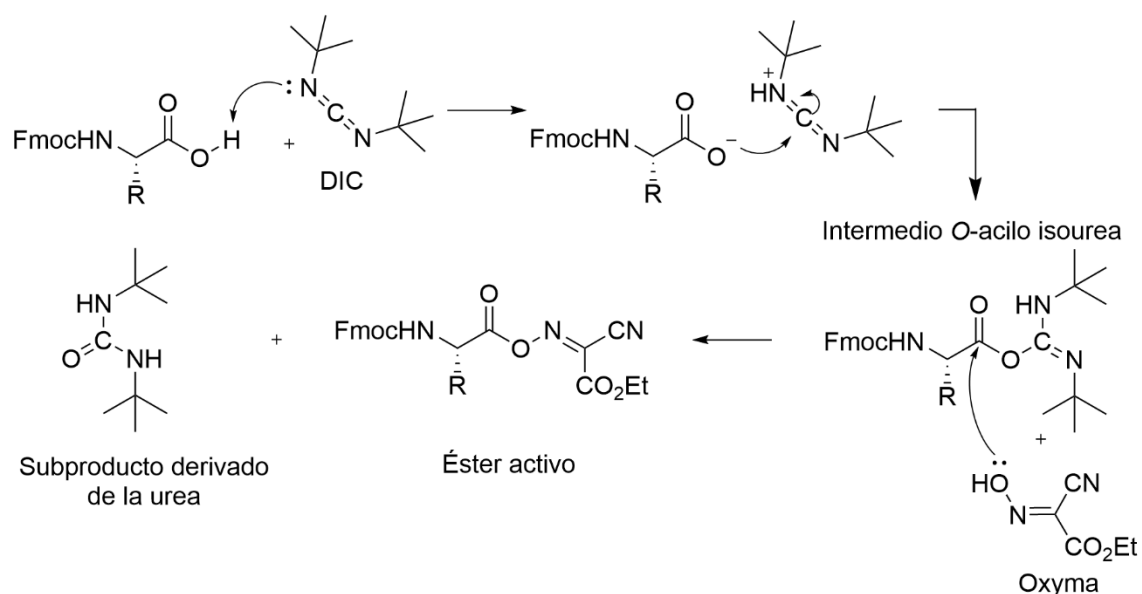


Figura 73: mecanismo de activación de los aminoácidos según la estrategia DIC/Oxyma.

Empezamos de nuevo la síntesis del péptido utilizando esta vez el sintetizador asistido por microondas y el nuevo protocolo (aminoácidos 5 eq., DIC 0.5M, Oxyma 1M, 20% piperidina/DMF). En primer lugar, sintetizamos el péptido **5** correspondiente al fragmento de 34 aminoácidos (H<sub>2</sub>N-TASE-ELLRVAVNAG-DLTQEEADKI-(Nle)SYPWGAWND-CONH<sub>2</sub>), el cual se comprobó por HPLC-MS, obteniendo como resultado un pico cromatográfico mayoritario correspondiente al péptido de interés. Por este motivo, continuamos hasta terminar la secuencia de 50 aminoácidos. En este caso, tampoco hemos podido obtener el péptido final (**6**) incluso habiendo utilizado un sintetizador asistido por microondas.

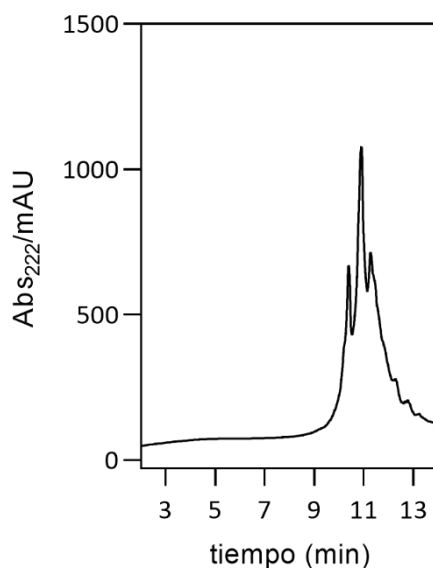


Figura 74: cromatograma de la síntesis fallida del péptido **6** utilizando un sintetizador de péptidos asistido por microondas.

Al realizar una búsqueda bibliográfica de posibles reacciones secundarias que se pueden producir durante la SPPS, encontramos que el fragmento Asp-Gly y el fragmento Asp-Ser son susceptibles de formar aspartimidas en medio básico. De hecho, el fragmento Asp-Gly es considerado el motivo peptídico con mayor tendencia a la formación de aspartimidas.

Tabla 3: Tendencia de los aminoácidos a formar aspartimidas en una secuencia Asp-Aaa.<sup>82,87,368</sup>

Aminoácido	Tendencia aspartimidas
<b>Ala</b>	+
<b>Arg(Pbf)</b>	++
<b>Asp(OtBu)</b>	+++
<b>Asn(Trt)</b>	+++
<b>Cys(Acm)</b>	++
<b>Cys(Trt)</b>	+
<b>Gly</b>	++++

<sup>368</sup> J. L. Lauer, C. G. Fields, G. B. Fields, *Lett. Pept. Sci.* **1995**, 1, 197–205.

En la gran mayoría de los protocolos publicados se recomienda el uso del dipéptido Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH (**DG**), que tiene el N<sup>o</sup> de la Gly protegida con el grupo Dmb (dimetoxibencilo) que impide así el ataque nucleofílico sobre la cadena lateral del Asp. Además, recomiendan la adición de HOBt (0.1M) en la disolución de piperidina para prevenir la racemización.<sup>57</sup> o en su defecto, sustituirlos por hidroxilaminas como la Oxyma ya que los derivados de triazol como el HOBt<sup>48,57</sup> a pesar de ser muy eficientes a la hora de prevenir la racemización, pueden ser explosivos bajo ciertas condiciones y por ello, su uso no es aconsejable.

Con toda esta información empezamos nuevamente la síntesis del péptido utilizando esta vez el sintetizador asistido por microondas y el nuevo protocolo (aminoácidos 5 eq., DIC 0.5M, Oxyma 1M, 20% piperidina + 0.1M HOBt). En primer lugar, sintetizamos el péptido **6** correspondiente al fragmento de 34 aa (H<sub>2</sub>N-TASE-ELLRVAVNAG-DLTQEEADKI-(Nle)SYPWGAWND-CONH<sub>2</sub>). Se comprobó el progreso de la síntesis por HPLC-MS obteniendo como resultado un pico cromatográfico mayoritario correspondiente al péptido de interés, de tal forma que continuamos hasta terminar la secuencia de 50 aa. De nuevo nos es imposible obtener el péptido final (**7**) incluso habiendo utilizado un sintetizador asistido por microondas, el dipéptido para prevenir la formación de aspartimidas y HOBt como aditivo durante las desprotecciones del grupo Fmoc para prevenir la racemización y las aspartimidas.

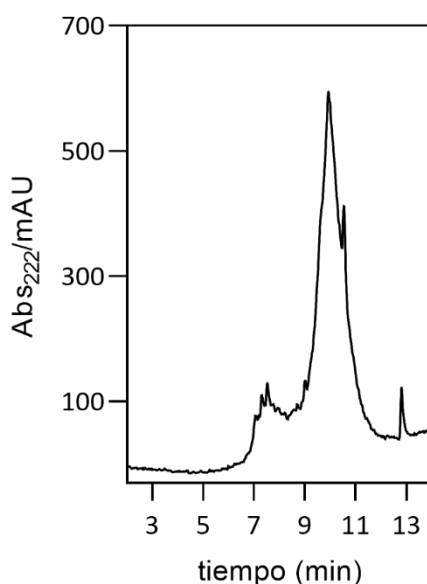


Figura 75: cromatograma del péptido **7** utilizando el sintetizador de péptidos asistido por microondas + el dipéptido Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH y la disolución de desprotección de 20% piperidina/DMF + 0.1M HOBt para prevenir la formación de las aspartimidas.

Debido a todos los problemas que estábamos teniendo, finalmente decidimos mutar la secuencia peptídica. En concreto, se mutaron la Gly<sup>8</sup>→Ala, la Gly<sup>17</sup>→Ala y por último el Asp<sup>12</sup>→Cys. Se introdujo la Cys en la posición 12 debido a que esta posición es la idónea para la formación de los nanoclústers de Au a través del tiol de la cadena lateral que está perfectamente dirigida hacia el canal interno de la proteína. La Gly<sup>17</sup> se introdujo para prevenir la formación de la aspartimida. Por último, la Gly<sup>8</sup> se introdujo para ayudar a la formación de la hélice  $\alpha$ .

De nuevo, sintetizamos el péptido (mismo protocolo que en el caso anterior para equivalentes, agentes de acoplamiento y desprotección) comprobando el progreso de la síntesis analizando el fragmento de 34 aa. Finalmente, hemos podido obtener el péptido final (**gp23.1AAC**). En este caso, como la secuencia peptídica contiene una Cys, es necesario utilizar un cóctel de desprotección con EDT para prevenir la oxidación del tiol de la cadena lateral de la Cys.

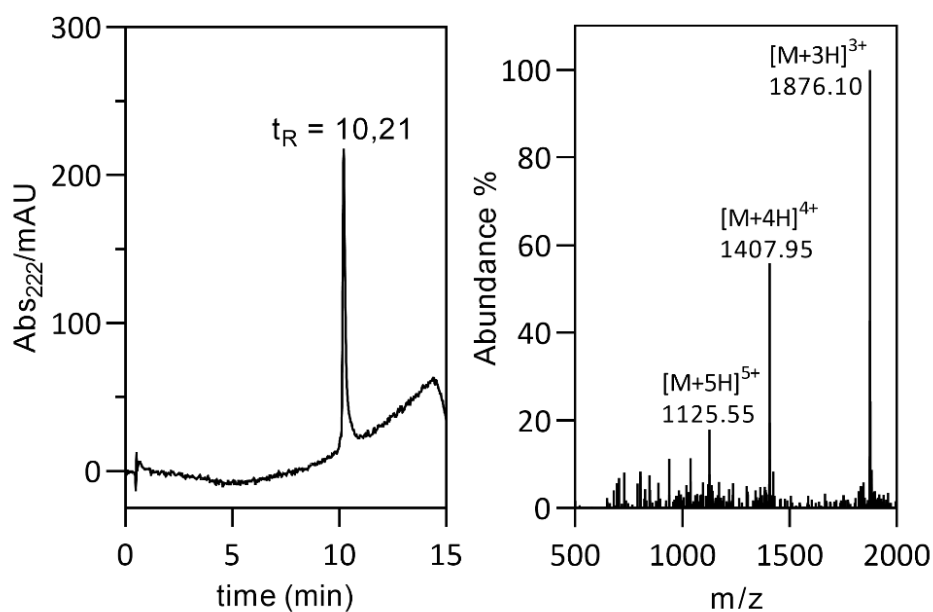


Figura 76: izquierda, cromatograma del péptido final **gp23.1AAC** puro con las mutaciones mencionadas; derecha, espectro de masas del péptido puro.

Una vez que hemos obtenido el monómero sintético **gp23.1AAC**, estudiamos y confirmamos su correcto plegamiento y sus propiedades básicas de autoensamblaje. De este modo, el espectro de dicroísmo circular (CD) de una disolución 32  $\mu$ M del péptido **gp23.1AAC** (Figura 77) presenta una banda negativa de CD centrada a 222 nm debido a las hélices  $\alpha$  que la conforman, con una elipticidad molar por residuo (MRE) de  $\approx -15900$  deg  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ , indicando que

el monómero es aproximadamente un 48% helicoidal en disolución<sup>369</sup> Estos datos coinciden con el PDB del hexámero y con los datos obtenidos según el algoritmo STRIDE para la asignación de la estructura secundaria de proteínas.<sup>370</sup>

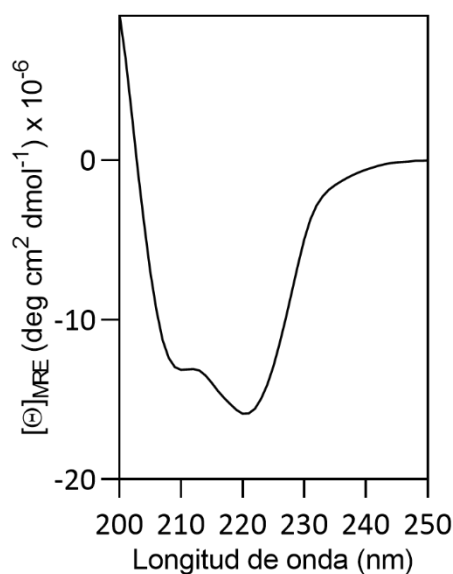


Figura 77: espectro de dicroísmo circular de una disolución 32  $\mu\text{M}$  del monómero **gp23.1AAC** en 10 mM TrisHCl, 100mM NaCl, pH 8.1, 20 °C.

Además, hemos realizado experimentos desnaturalización térmica del monómero globular **gp21.1AAC** que nos indican que la proteína es muy estable.

<sup>369</sup> Y.-H. Chen and J. T. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, 44, 1285–1291; b) Y. H. Chen, J. T. Yang and H. M. Martinez, *Biochemistry*, **1972**, 11, 4120–4131.

<sup>370</sup> D. Frishman and P. Argos, *Proteins*, **1995**, 23, 566–579.

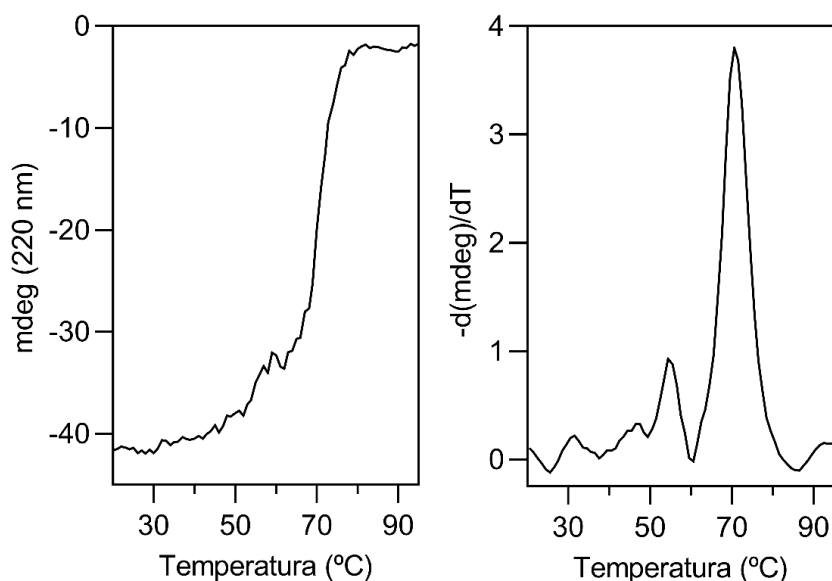


Figura 78: representación de la desnaturalización térmica del monómero **gp23.1AAC** (izquierda) y la derivada de primer orden de la función de CD (derecha) mostrando una  $T_m \approx 71$  °C.

Más importante aún, la emisión intrínseca de los residuos de triptófano en la secuencia (Trp<sup>14</sup>, Trp<sup>46</sup> and Trp<sup>49</sup>) nos permiten monitorizar el proceso de autoensamblaje de los monómeros en disolución, midiendo los cambios en la anisotropía de fluorescencia a diferentes concentraciones de péptido. De este modo, el péptido **gp23.1AAC** presenta una anisotropía con forma sigmoideal con un punto de transición en torno a 0.7 mM consistente con la formación esperada del hexámero. Además, también presenta signos de agregación de los hexámeros a concentraciones elevadas—en concordancia con la estructura de rayos X, en la cual los hexámeros de la proteína natural gp23.1 se apilan formando estructuras tubulares. La oligomerización de **gp23.1AAC** también se confirmó midiendo los cambios en la velocidad de difusión traslacional ( $D$ ) mediante la técnica PFGSE NMR. El radio hidrodinámico ( $r_H$ ), estimado a partir de los valores de  $D$  a partir de la ecuación de Stokes-Einstein, fueron 1.51-1.56 nm en muestras diluidas y 2.37-2.44 nm en disoluciones concentradas.<sup>371</sup> Estos valores se ajustan perfectamente a los valores calculados por el programa HYDRONMR utilizando las estructuras de la proteína gp23.1, los cuales son 1.51 y 2.74 nm para el monómero y el hexámero respectivamente. Además, los valores del perfil de difusión traslacional se superponen con los valores obtenidos en las valoraciones

<sup>371</sup> A. Macchioni, G. Ciancaleoni, C. Zuccaccia, D. Zuccaccia, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 479–489; b) W. S. Price, M. Nara, Y. Arata, *Biophys. Chem.* **1997**, 65, 179–187.

de anisotropía confirmando que la proteína se encuentra en forma de hexámero a partir de concentraciones superiores a 0.9 mM (Figura 79)

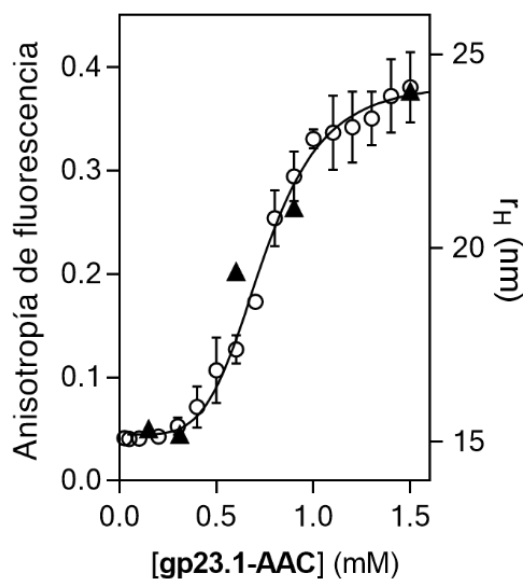
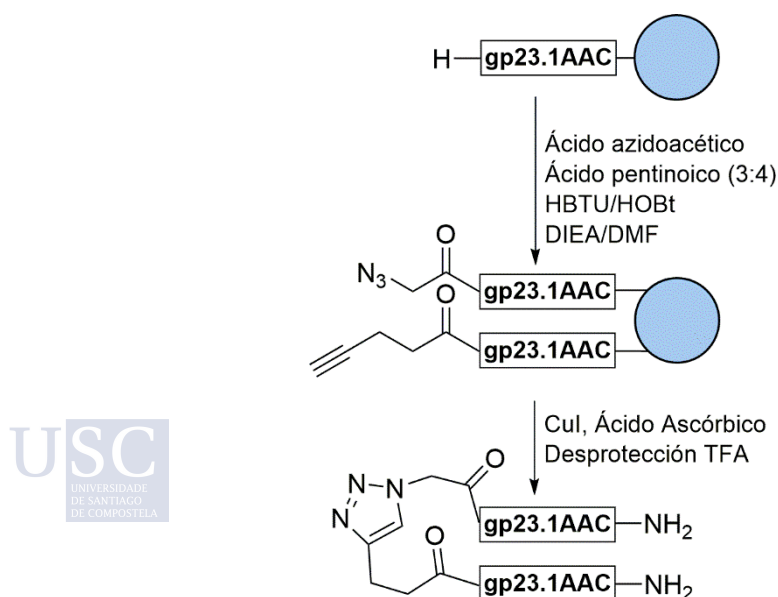


Figura 79: anisotropía de fluorescencia a 350 nm (○) y radios hidrodinámicos medidos por PFGSTE NMR (▲) a diferentes concentraciones del monómero gp23.1AAC. La línea continua se corresponde con el mejor ajuste para una oligomerización secuencial para formar el hexámero.

Como prueba de concepto de la versatilidad que proporciona la síntesis química en fase sólida de los monómeros **gp23.1AAC** como bloques de construcción, hemos realizado la dimerización de dichos monómeros *cabeza-cabeza*, catalizada por Cu(I) en resina.



Esquema 3: procedimiento para la obtención del dímero  $(\text{gp23.1AAC})_2$  en fase sólida.

Esta estrategia se basa en el capado del extremo N-terminal de la cadena peptídica con una mezcla isocinética de ácido pentinoico y ácido azidoacético (3:4) que genera una mezcla equimolar de péptidos, todavía anclados a la resina, capados con la azida y el alquino.<sup>372</sup> La ciclación click en resina con CuI y ácido ascórbico en 4-metilpiperidina/DMF nos permite obtener, después del desanclado de la resina y la purificación por HPLC, el dímero de la proteína deseado (**gp23.1AAC**)<sub>2</sub> de una manera sencilla, tal como se puede observar por HPLC-MS(ESI).

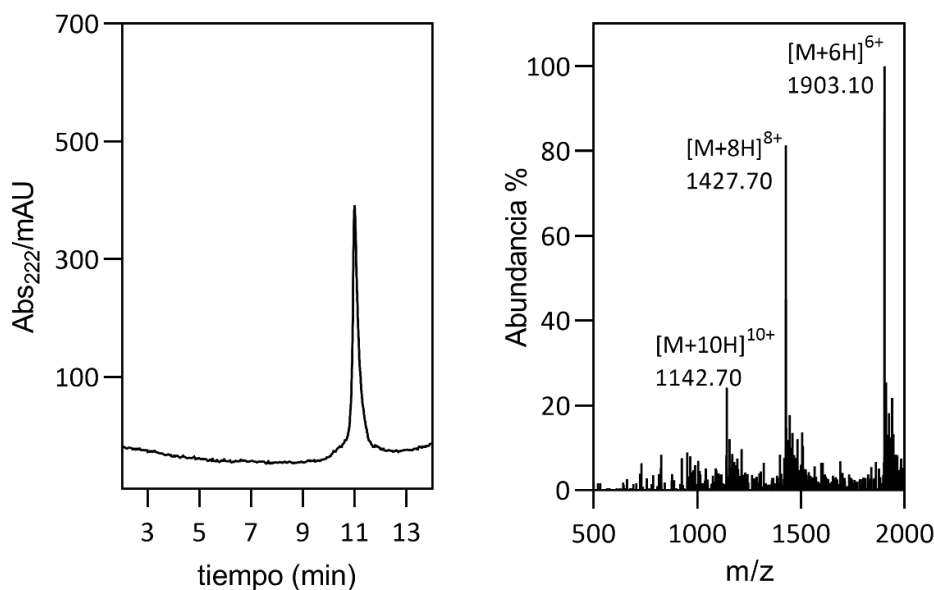


Figura 80: izquierda, cromatograma del péptido final (**gp23.1AAC**)<sub>2</sub> puro; derecha, espectro de masas del péptido puro.

Los dímeros obtenidos presentan una mayor tendencia a oligomerizar, tal y como se muestra en los ensayos de fluorescencia polarizada, que exhiben un claro perfil sigmoideal con una transición a una concentración de 0.1 mM. Este hecho, está en concordancia con el ensamblaje cooperativo esperado de especies formadas por dos anillos.

<sup>372</sup> a) M. Sainlos, C. Tigaret, C. Poujol, N. B. Olivier, L. Bard, C. Breillat, K. Thiolon, D. Choquet, B. Imperiali, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 81–91; b) J. M. Ostresh, J. H. Winkle, V. T. Hamashin, R. A. Houghten, *Biopolymers* **1994**, 34, 1681–1689.

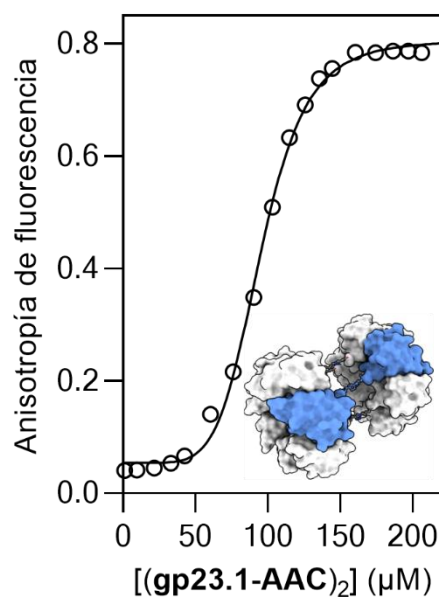


Figura 81: caracterización del dodecámero **gp23.1AAC**: anisotropía de fluorescencia a 380 nm (○) a diferentes concentraciones de **(gp23.1AAC)<sub>2</sub>** (se muestra un dímero en color azul).

Una vez que hemos confirmado que **gp23.1AAC** se comporta bien y forma hexámeros estables en solución, estudiamos su potencial para moldear la formación de nanoclusters de oro monodispersos (AuNC). Para ello, preparamos una solución 0.9 mM de gp23.1AAC y la mezclamos con una sal precursora de oro (HAuCl<sub>4</sub>), para que los iones Au (III) pudieran ser secuestrados por los residuos Cys<sup>12</sup> en la cavidad central del hexámero. La reducción suave mediante el uso de tiosulfato de sodio a temperatura ambiente durante 12 h resultó en la formación del híbrido biomoldeado deseado AuNC@gp23.1AAC (Tabla 4),<sup>373</sup> tal y como se muestra por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM). El diámetro medio del núcleo de las AuNC de  $\approx 1,26 \pm 0,3$  nm es coherente con el efecto de plantilla del toroide **gp23.1AAC** (Figura 82). Se observaron efectos de plantilla similares en la formación de AuNC con los nanocilindros autoensamblados derivados de los dímeros **(gp23.1-AAC)<sub>2</sub>** (ver parte experimental). Aunque las AuNC obtenidas mediante este método no eran luminiscentes, una ligera modificación en el protocolo de reducción de Au (III), mediante el uso de ascorbato de sodio a 50 °C durante 72 h, resultó en AuNC luminiscentes que mostraban emisión dual a 450 nm y 684 nm cuando se

<sup>373</sup> A. C. Templeton, S. Chen, S. M. Gross, R. W. Murray, *Langmuir* **1999**, 15, 66–76

excitaba a 380 nm (Figura 82 c/d), lo que permite su uso potencial en técnicas de imagen.<sup>374</sup>

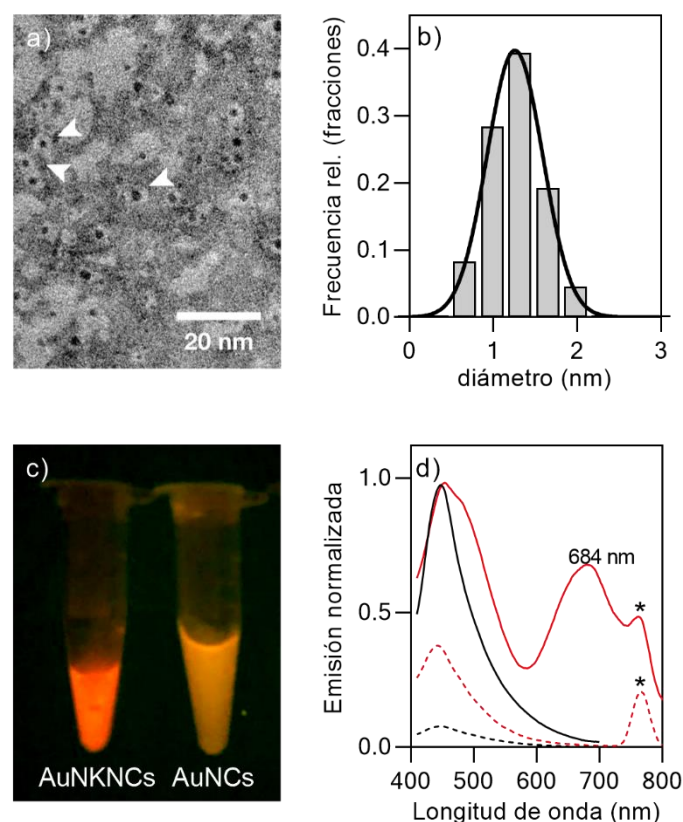


Figura 82: Caracterización de los nanoclusters de oro usando como plantilla **gp23.1AAC**. a) Micrografía TEM (ZEISS Libra 200 TEM) de AuNCs@gp23.1-AAC después de una tinción negativa con acetato de uranilo. Las partículas híbridas aparecen como una "yema" negra de AuNC, rodeada por la "clara de huevo" gris gp23.1-AAC; b) Histograma de la distribución del diámetro del núcleo (dc) de los nanoclusters en los ensamblajes AuNC@gp23.1-AAC según se determina a partir de las imágenes TEM, dc promedio =  $1,26 \pm 0,3$  nm; c) Disoluciones de AuNKNC@gp23.1AAC y AuNC@gp23.1AAC bajo luz ultravioleta (360 nm); d) Espectros de emisión normalizados de AuNKNC (rojo) y AuNC (negro) con gp23.1AAC en estado monomérico (discontinuo) o hexamérico (línea continua) tras la excitación a 380 nm. La banda estrecha a 760 nm marcada con un asterisco corresponde al armónico de la longitud de onda de excitación.

Además, exploramos si era posible insertar nanoclusters de oro pre-sintetizados (AuNKNC) en el toroide gp23.1AAC que actúa como un nanorreceptor. Por tanto, la simple reducción de  $\text{HAuCl}_4$  en NaOH proporcionó AuNKNC dispersas en

<sup>374</sup> A. Aires, I. Llarena, M. Moller, J. Castro-Smirnov, J. Cabanillas-González, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 6214–6219; b) A. Cantelli, G. Battistelli, G. Guidetti, J. Manzi, M. Di Giosia, M. Montalti, *Dyes Pigm.* **2016**, 135, 64–79.

agua.<sup>375</sup> La incubación de estos nanoclusters no pasivados con el hexámero gp23.1AAC dio como resultado una solución luminiscente con dos picos de emisión amplios en aproximadamente 450 y 700 nm, que son indicativos de que las cadenas laterales de Cys actúan como residuos de coordinación para AuNKNC (Fig. 4c y 4d). Sorprendentemente, no se observa ninguna emisión significativa cuando se utilizó el péptido gp23.1AAC monomérico para la estabilización de las AuNC, lo que demuestra claramente el papel esencial de la forma hexamérica de gp23.1AAC en la estabilización y las propiedades de las AuNC.<sup>375</sup>

## Conclusiones

Hemos diseñado la mini proteína gp23.1 como una plataforma nanotecnológica viable. La modificación racional de la secuencia natural de la proteína proporcionó el mutante gp23.1-AAC sintéticamente accesible, que se ensambló en disolución como un hexámero estable. Hemos usado el hexámero gp23.1-AAC como plantilla para la síntesis de AuNC luminiscentes y también mostramos su aplicación como nanoreceptores para encapsular nanoclústers de oro preformados, los cuales se vuelven altamente luminiscentes tras la formación del híbrido AuNKNCs@gp23.1AAC. El trabajo actual para optimizar la estabilidad del hexámero y ajustar la secuencia para lograr la formación controlada de otros tipos de NC ampliará las aplicaciones de variantes de gp23.1 sintéticamente accesibles en nanociencia y catálisis.



---

<sup>375</sup> P. Londoño-Larrea, J. P. Vanegas, D. Cuaran-Acosta, E. Zaballos-García, J. Pérez-Prieto, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 8137–8141.



## CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Hemos implementado la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida para obtener metalopéptidos de Ru(II) con diversas funcionalidades.
- 2) Hemos demostrado que la funcionalización del complejo Ru-dppz con una cola de oligoargininas (R8) incrementa su afinidad por secuencias de G-cuadruplejos (G4). La interacción entre el ligando auxiliar y la cola de R8 es clave para controlar la selectividad entre diferentes estructuras de G4. Además, la secuencia de oligoargininas dotó de propiedades de internalización celular y capacidades citotóxicas a los complejos de rutenio.
- 3) Hemos obtenido complejos de Ru(II)-areno de manera sencilla y en condiciones muy suaves. El análisis del proceso de acuación de dichos complejos resultó en unas constantes para el proceso del mismo orden de magnitud que complejos de rutenio similares publicados.
- 4) Hemos analizado la interacción de los complejos de Ru-areno con el ADN, usando la GMP (5'-guanósín monofosfato) como modelo, identificando la interacción mediante HPLC-MS para dos de los complejos.
- 5) Hemos podido obtener mediante la SPPS la miniproteína gp23.1AAC, una variante de la proteína natural gp23.1. La variante gp23.1AAC se ensambló en disolución obteniendo un hexámero estable que usamos como plantilla para la síntesis de AuNC luminiscentes. Demostramos también la

capacidad del hexámero gp23.1AAC para actuar como nanoreceptores capaces de encapsular nanoclústers de oro preformados que se vuelven altamente luminiscentes al formarse el híbrido nanoclúster-proteína.

## GENERAL CONCLUSIONS

- 1) We have implemented the solid phase peptide synthesis methodology to obtain Ru (II) metallopeptides with various functionalities.
- 2) We have shown that the functionalization of the **[Ru(dppz)]** complex with an oligoarginine tail ( $R_8$ ) increases its affinity for G-quadruplex (G4) sequences. The interaction between the ancillary ligand and the  $R_8$  tail is the key to controlling the selectivity between different G4 structures. Furthermore, the oligoarginine sequence endowed the ruthenium complexes with cellular internalization properties and cytotoxic capabilities.
- 3) We have obtained Ru (II)-arene complexes in a easy manner and under very mild conditions. Analysis of the aquation process of these complexes resulted in constants of the same order of magnitude as previously published for similar ruthenium complexes.
- 4) We have analyzed the interaction of the Ru-arene complexes with DNA, using GMP (5'-guanosine monophosphate) as a model, identifying the Ru-arene/DNA complex by HPLC-MS for two of the complexes.
- 5) We have been able to obtain the miniprotein gp23.1AAC, a variant of the natural protein gp23.1, using the SPPS methodology. The gp23.1AAC variant was assembled in solution obtaining an hexamer that we use as a template for the synthesis of luminescent AuNC. We also demonstrate the

ability of the gp23.1AAC hexamer to act as nanoreceptor, capable of encapsulating preformed gold nanoclusters that become highly luminescent when the nanocluster-protein hybrid is formed.

## RESUMEN

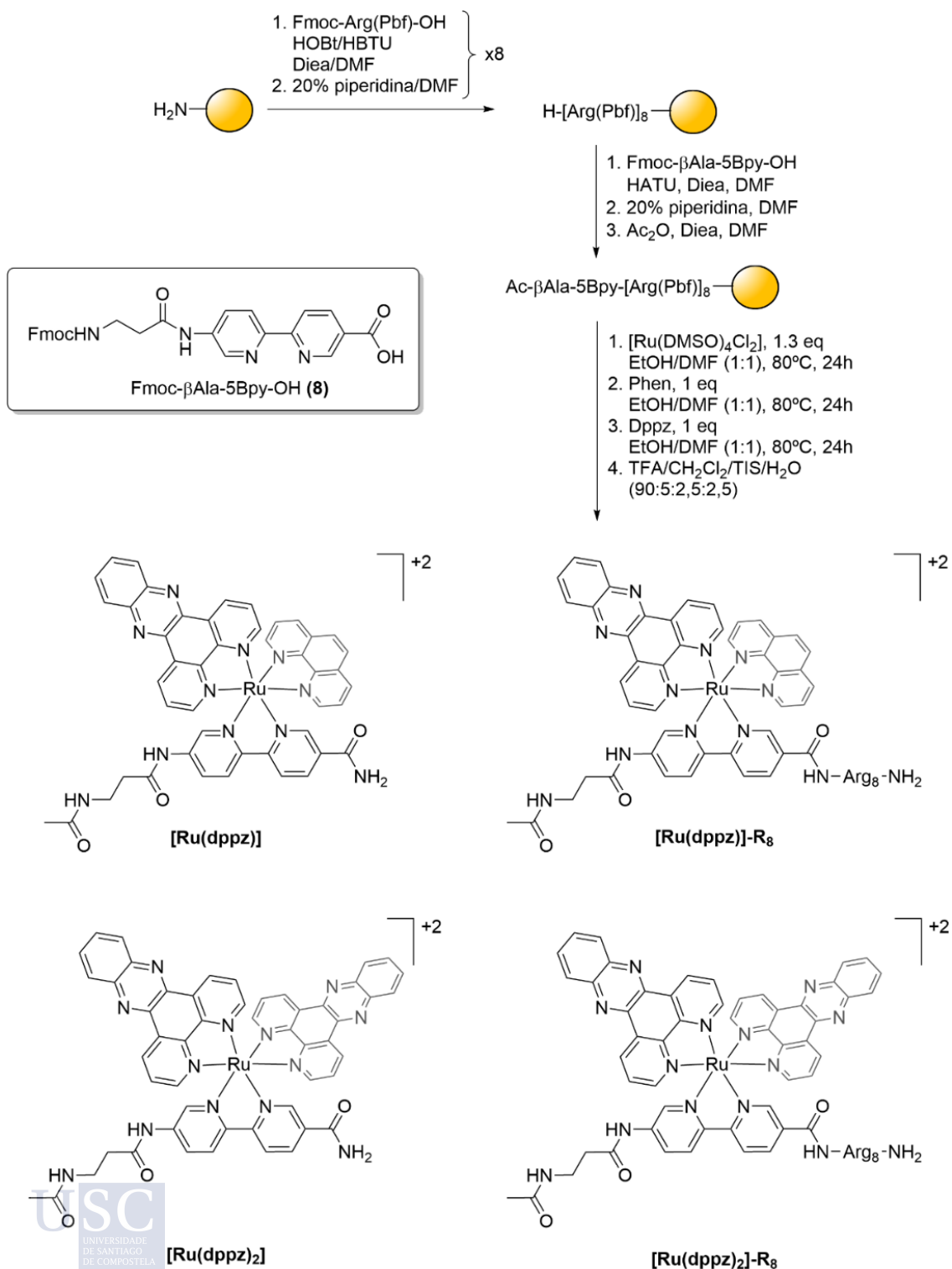
### **Capítulo 1: Metalopéptidos oligocatiónicos de Ru(II) derivados del ligando dipiridofenazina (dppz) como agentes de unión selectivos a G-cuadruplejos.**

En este capítulo se demuestra que una serie de metalopéptidos de Ru(II) derivados del ligando dppz y funcionalizados con una cola de octaarginina, poseen propiedades de unión a G-cuadruplejos (G4), una forma no canónica del ADN, e incluso propiedades de internalización celular.

En primer lugar, se sintetizó el complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** equipado, junto con el ligando intercalante dppz y el coligando fenantrolina, con una unidad de  $\beta$ Ala5Bpy que nos permitió, mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), funcionalizar el extremo C-terminal con una secuencia de (L)-octaarginina. El núcleo de bipyridina se ensambló siguiendo protocolos estándar Fmoc/tBu de SPPS al dominio de octaargininas previamente anclado a la resina. Posteriormente se acetiló el extremo N-terminal del precursor peptídico usando anhídrido acético en medio básico. A continuación, se incorporó el centro metálico de Ru(II) haciendo reaccionar el precursor  $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$  con el péptido en resina. Finalmente se introdujo en primer lugar el ligando dppz y a continuación el ligando auxiliar phen empleando las mismas condiciones que las utilizadas con el precursor  $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$  (DMF, 80°C, 24 h). El desanclaje del péptido del soporte sólido y la desprotección total se llevó a cabo mediante el tratamiento ácido de la resina para posteriormente precipitar el metalopéptido con una disolución saturada de hexafluorofosfato amónico. Además del complejo modelo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>**, también se sintetizó el complejo control que carecía del dominio de octaargininas **[Ru(dppz)]**. Adicionalmente, se sintetizaron otros

## Resumen

dos complejos análogos ( $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_8$  y  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$ , respectivamente) en los que se sustituye el ligando auxiliar de fenantrolina por una segunda unidad de dppz.



Esquema I: Síntesis en fase sólida del complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})]\text{-R}_8$  y estructuras de los complejos análogos estudiados  $[\text{Ru}(\text{dppz})]$ ,  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_8$  y  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]$ .

De manera general, los distintos complejos de Ru(II) reconocen las secuencias de G4s. Más concretamente, las valoraciones de fluorescencia nos mostraron que el complejo **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** presenta una mayor afinidad respecto a las distintas secuencias de G4 que su análogo equipado con una sola unidad de dppz, manteniendo la preferencia por la secuencia TEL, aunque con una selectividad menos pronunciada.

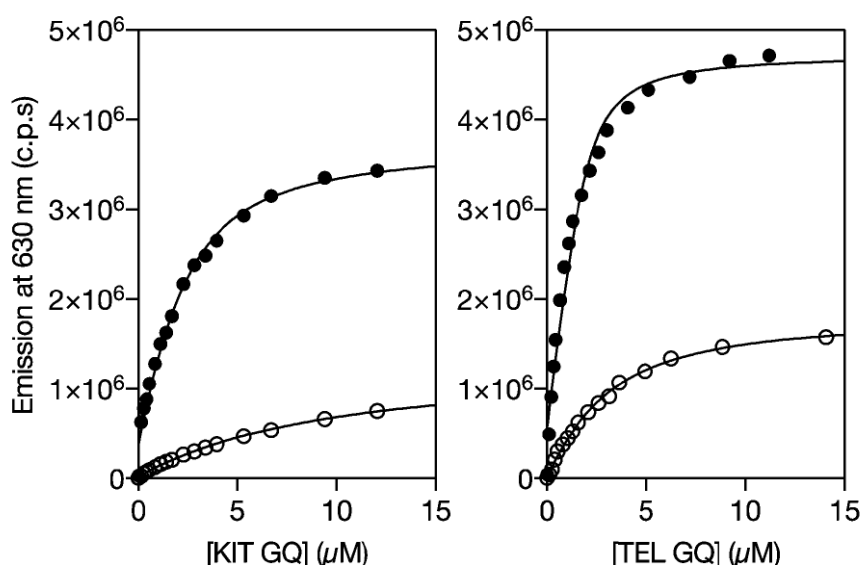


Figura 1: Perfiles de la emisión a 630 nm del complejo **[Ru(dppz)]** (○) y **[Ru(dppz)]-R8** (●) con los G4 KIT (derecha) y TEL (izquierda). Se usó la misma escala en ambas gráficas para poder comparar los datos. Las líneas se corresponden con el mejor ajuste para un modo de unión 1:1 que resultaron con unas constantes de disociación mostradas en la tabla (el ajuste de la curva se realizó con el programa Dynafit). Valoraciones similares fueron realizadas con los complejos **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** y **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R8**.

Por otro lado, la sustitución del ligando auxiliar de fenantrolina en el complejo **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>8</sub>**, resultó en una inversión en la selectividad general respecto al complejo **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** obteniendo una mayor afinidad por las secuencias c-MYC y c-KIT. (Tabla 1).

Tabla 1: Constantes de disociación ( $KD/\mu M$ ) de los metalopéptidos de Ru(II) con los distintos oligonucleótidos.

	TEL	c-MYC	c-KIT
<b>[Ru(dppz)]</b>	$2.72 \pm 0.21$	$11.23 \pm 1.03$	$19.27 \pm 1.69$
<b>[Ru(dppz)]R<sub>8</sub></b>	$0.93 \pm 0.06$	$4.01 \pm 0.33$	$2.05 \pm 0.10$
<b>[Ru(dppz)<sub>2</sub>]</b>	$0.85 \pm 0.05$	$3.65 \pm 0.19$	$3.06 \pm 0.15$
<b>[Ru(dppz)<sub>2</sub>]R<sub>8</sub></b>	$1.30 \pm 0.07$	$0.15 \pm 0.05$	$0.14 \pm 0.04$

## Resumen

El comportamiento de los distintos complejos se confirmó mediante espectroscopía de UV-Vis observándose desplazamientos en las bandas MLTC centradas a 443 nm, las cuales que se ven afectadas cuando los complejos se unen a los G4. Además, mediante Dicroísmo Circular, demostramos que la estructura de los GQ no se vió afectada por la presencia de los distintos metalopéptidos.

Finalmente, estudiamos las propiedades de internalización celular del complejo **[Ru(Dppz)<sub>2</sub>]**. Así comprobamos como el compuesto se depositó en forma de agregados que se asocian específicamente con las células llegando a provocar su muerte tras un tiempo prolongando de incubación.

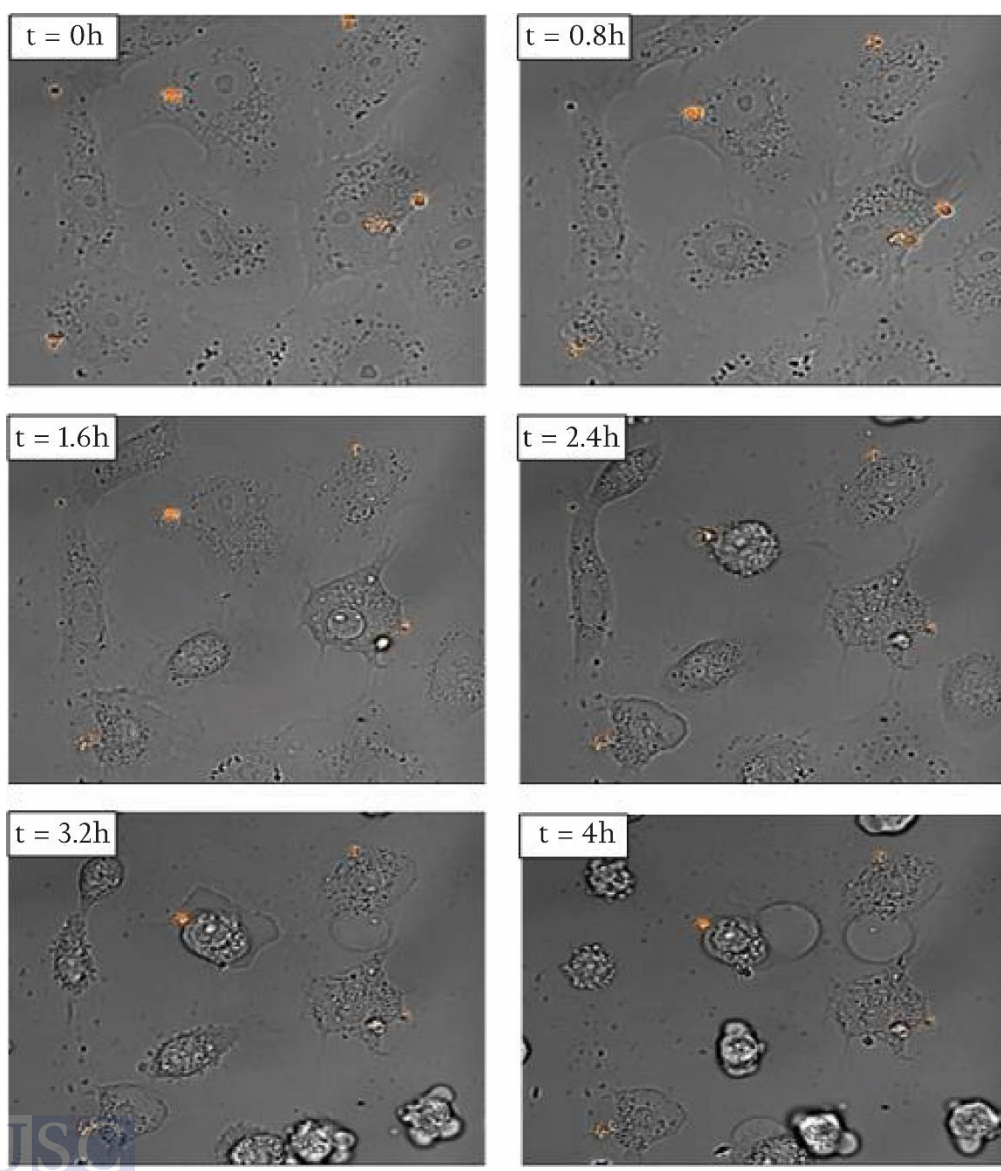


Figura 2: Estudios realizados en células Vero en DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) sin FBS (fetal bovine serum) o antibióticos, del compuesto **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** (25  $\mu$ M) con un tiempo de incubación de 30 min a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia.

## Capítulo 2: Síntesis, caracterización y estudio de las propiedades de unión al ADN de metalopéptidos semi-sandwich.

En este capítulo se demostró la versatilidad sintética de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) para la obtención de una nueva familia de metalopéptidos. Los nuevos metalopéptidos de Ru(II)-areno se caracterizan por poseer un ligando areno que puede ser *p*-cymeno (*p*-cym), bifenilo (biph) o *m*-terfenilo (*m*-terp), la unidad quelatante es la  $\beta$ Ala5Bpy (5Bpy) y el ligando lábil es un cloro (Cl).

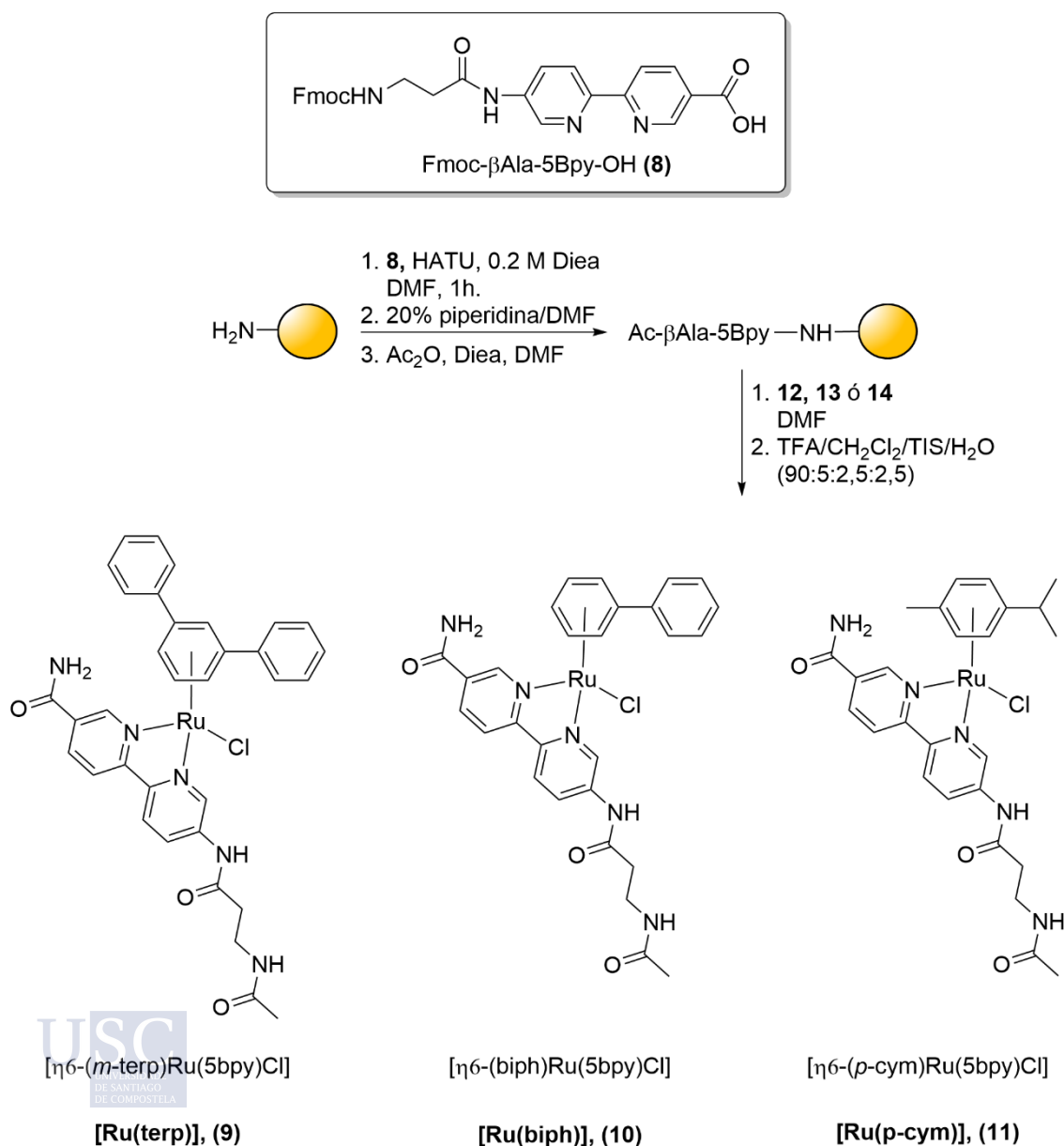


Figura 3: Ruta sintética para la obtención de los complejos de Ru(II)-areno derivados de  $\beta$ Ala5Bpy.

## Resumen

En primer lugar, se acopló la 5Bpy (sintetizada del mismo modo que en capítulo anterior) a la resina utilizando los protocolos estándar de SPPS. Posteriormente, dado que no existían protocolos de síntesis de complejos de Ru(II)-areno en fase sólida, se evaluaron las condiciones necesarias para obtener los complejos deseados haciendo reaccionar los precursores de Ru con la 5Bpy anclada a la resina. Una vez se obtuvieron las condiciones óptimas de síntesis de los complejos de Ru(II)-areno y tras su purificación mediante HPLC se procedió con la determinación de la estructura de rayos X de los complejos. El complejo **[Ru(p-cym)]** cristalizó en forma de agujas naranjas mediante un proceso de difusión lenta. Los datos cristalográficos nos mostraron que el complejo adopta la típica geometría de pseudo-octaedro de los complejos de tipo semi-sandwich. Sin embargo, para los complejos **[Ru(biph)]** y **[Ru(m-terp)]** todavía no hemos podido conseguir que cristalicen.

A continuación, se analizó el proceso de acución de los distintos complejos mediante espectroscopía de UV-Vis.

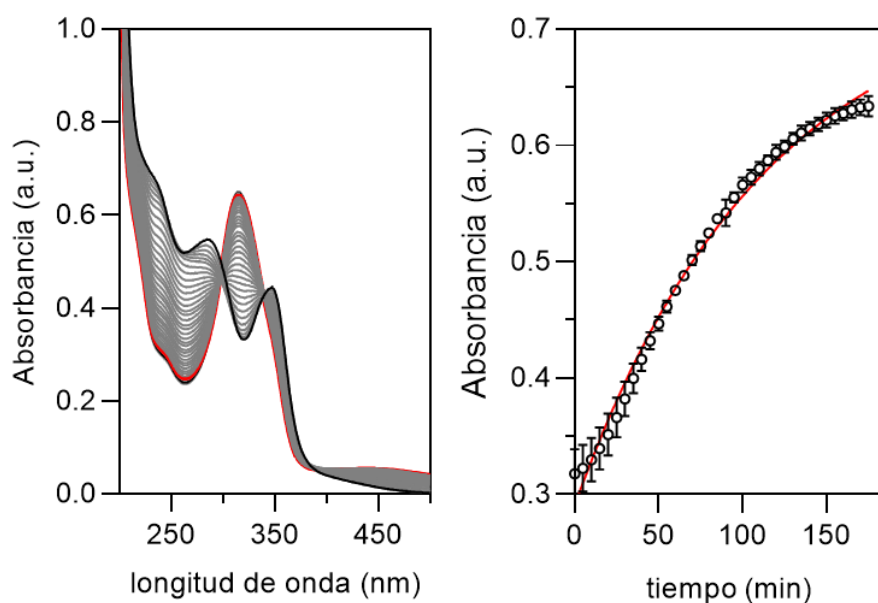


Figura 4: Izquierda: espectro de UV-Vis del complejo **[Ru(biph)]** correspondiente al proceso de acución del complejo (línea negra,  $t=0$ ; línea roja,  $t=165$  min); derecha: perfil de la acución correspondiente a la banda centrada a 317 nm.

Los resultados nos mostraron que la constante de acución ( $K_{aq}$ ) para el complejo **[Ru(m-terp)]** es más baja que para los complejos **[Ru(biph)]** y **[Ru(p-cym)]** siendo  $0,88 \cdot 10^{-2} \pm 0,59 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $1,67 \cdot 10^{-2} \pm 4,64 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  y  $7,70 \cdot 10^{-2} \pm 0,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  respectivamente.

Por último, se estudió las propiedades de unión de los distintos complejos con el ADN, utilizando como modelo la GMP (5'-guanosín monofosfato) obteniendo resultados positivos de la unión (metalación) para los complejos **[Ru(p-cym)]** y **[Ru(biph)]**.

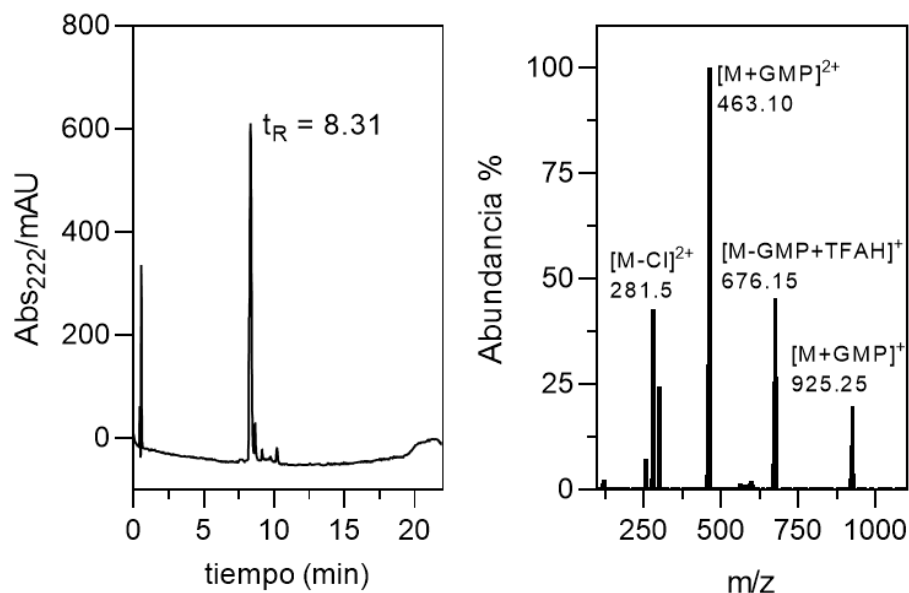


Figura 5: Análisis de la unión del complejo **[Ru(p-cym)]** con el GMP, mediante HPLC-MS. Izquierda, cromatograma del HPLC donde se observa un pico mayoritario correspondiente al producto de la interacción del complejo con el GMP; derecha, espectro de masas perteneciente al pico con tiempo de retención 8.31 min.

### Capítulo 3: Estudio de la proteína autoensamblante gp23.1 como plataforma para la síntesis de nanoclústers de oro.

En este capítulo se demuestra el uso de la proteína toroidal autoensamblante en disolución gp23.1 como plataforma para la obtención controlada de nanoclústers de oro luminiscentes.

La proteína gp23.1 es una pequeña proteína globular compuesta por 50 residuos que se pliega en tres dominios de tres hélices antiparalelas (S<sup>2</sup> ESLLYGYF<sup>10</sup> LDSWLDGTAS<sup>20</sup> EELLRVAVNA<sup>30</sup> GDLTQEEADK<sup>40</sup> IMSYPWGAWN<sup>50</sup> D). De manera particular, la proteína forma un hexámero en disolución y se caracteriza por tener una estructura toroidal (o con forma de donut) con unos 58Å de diámetro, un canal central de ~18Å de ancho delimitado por las seis hélices α1, mientras que las hélices α2 y α3 forma la superficie exterior.

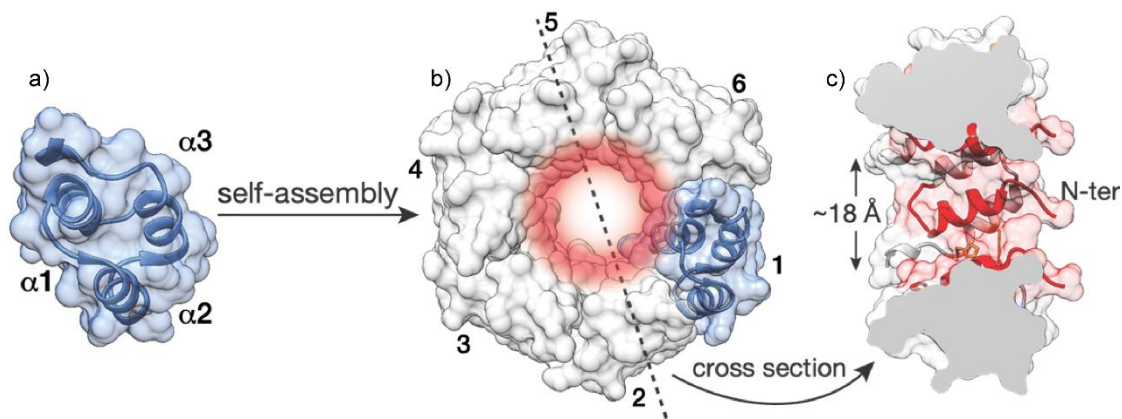


Figura 6: Estructura de la proteína gp23.1; a) monómero; b) vista superior de la proteína toroidal; c) corte transversal de la proteína donde se aprecian las dimensiones del canal interno.

Mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) pudimos sintetizar la variante gp23.1-AAC y solventar los problemas de la propia metodología tales como la formación de aspartimidias, desprotecciones incompletas de las cadenas laterales, etc. Una vez se identificó el péptido deseado se purificó mediante HPLC.

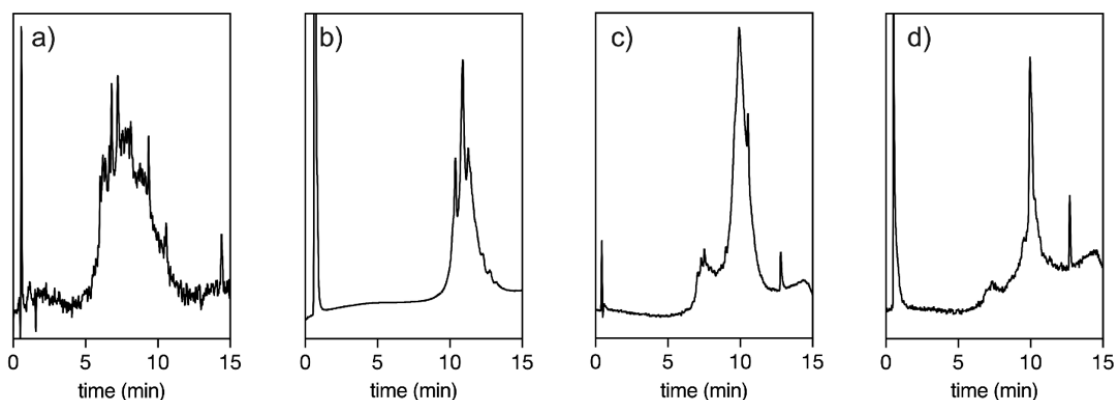


Figura 7: Cromatogramas de HPLC de la evolución de la síntesis del péptido gp23.1-AAC usando diferentes sistemas: a) cromatograma del crudo del péptido usando un sintetizador de péptidos automático; b) usando un sintetizador automático asistido por microondas; c) usando un sintetizador automático asistido por microondas + Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH (y la disolución de desprotección de 20% piperidina + 0.1M HOBt) para prevenir la formación de aspartimidias; d) usando el sintetizador asistido por microondas con la secuencia peptídica mutada gp23.1-AAC que nos permitió obtener el péptido final.

Posteriormente se caracterizó el péptido. En primer lugar, se analizó su espectro de dicroísmo circular (CD) que nos mostró una banda negativa centrada a 222 nm típica de hélices  $\alpha$  que la conforman con una elipticidad molar por residuo (MRE) de  $\approx -15900 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  lo cual nos indicó que el monómero en un

48% helicoidal en disolución. Además, experimentos de desnaturalización térmica del monómero nos indicaron que la proteína es muy estable.

Más importante aún, la emisión intrínseca de los triptófanos presentes en la secuencia nos permitió monitorizar el proceso de autoensamblaje en disolución, midiendo los cambios en la anisotropía de fluorescencia a diferentes concentraciones. Del mismo modo, se analizó la oligomerización de **gp23.1-AAC** midiendo los cambios en la velocidad de difusión traslacional ( $D$ ) mediante la técnica PFGSE-NMR de tal modo que los valores del perfil obtenidos mediante esta técnica se superponen con los obtenidos en las valoraciones de anisotropía, confirmando que la forma hexamérica de la proteína a partir de concentraciones superiores a 0.9 mM.

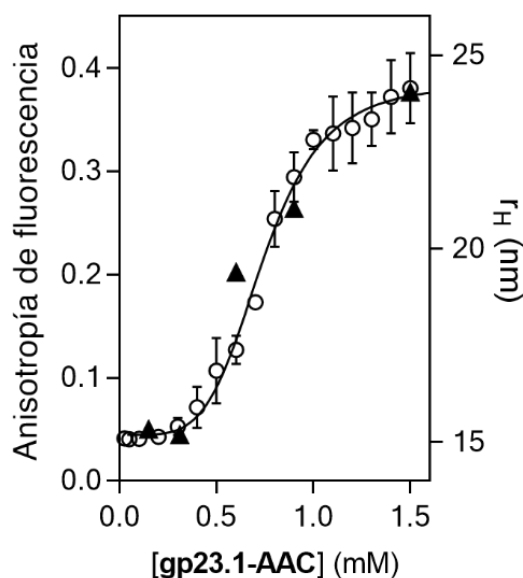


Figura 8: anisotropía de fluorescencia a 350 nm (○) y radios hidrodinámicos medidos por PFGSTE NMR (▲) a diferentes concentraciones del monómero gp23.1AAC. La línea continua se corresponde con el mejor ajuste para una oligomerización secuencial para formar el hexámero.

Como prueba de la versatilidad sintética de la SPPS, realizamos la dimerización de monómeros de **gp23.1AAC** cabeza-cabeza, catalizada por Cu(I) en resina. Los monómeros de **gp23.1AAC** se caparon con una mezcla de ácido azidoacético y ácido pentinoico. Posteriormente se realizó la ciclación click en resina tras la adición de CuI y ácido ascórbico, tal forma que se obtuvo el dímero (**gp23.1AAC**)<sub>2</sub> siguiendo los protocolos estándar de desprotección y purificación. El posterior análisis de la oligomerización de los dímeros (**gp23.1AAC**)<sub>2</sub> mediante anisotropía de fluorescencia reveló una mayor tendencia a auto ensamblarse en comparación con el monómero **gp23.1AAC**.

## Resumen

Finalmente, una vez que se confirmó la estabilidad en disolución de **gp23.1AAC** se estudió su potencial para moldear la formación de nanoclusters de oro (AuNC). Para ello se emplearon dos técnicas distintas. Por una parte, se realizó la síntesis in situ de los AuNC mezclando una disolución de **gp23.1AAC** con una sal precursora de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ). La reducción de la sal de oro en condiciones muy suaves resultó en la formación del híbrido biomoldeado. El análisis de las imágenes de HR-TEM nos mostró un diámetro medio de los AuNC de 1,26 nm, coherente con el efecto plantilla de la proteína. Se observaron efectos de plantilla similares en la formación de AuNC con los nanocilindros derivados de los dímeros (**gp23.1AAC**)<sub>2</sub>.

Por otro lado, una ligera modificación en el protocolo de reducción del Au(III) resultó en AuNC luminiscentes que mostraban emisión dual cuando se excitaba a 380 nm permitiendo su potencial uso en técnicas de imagen.

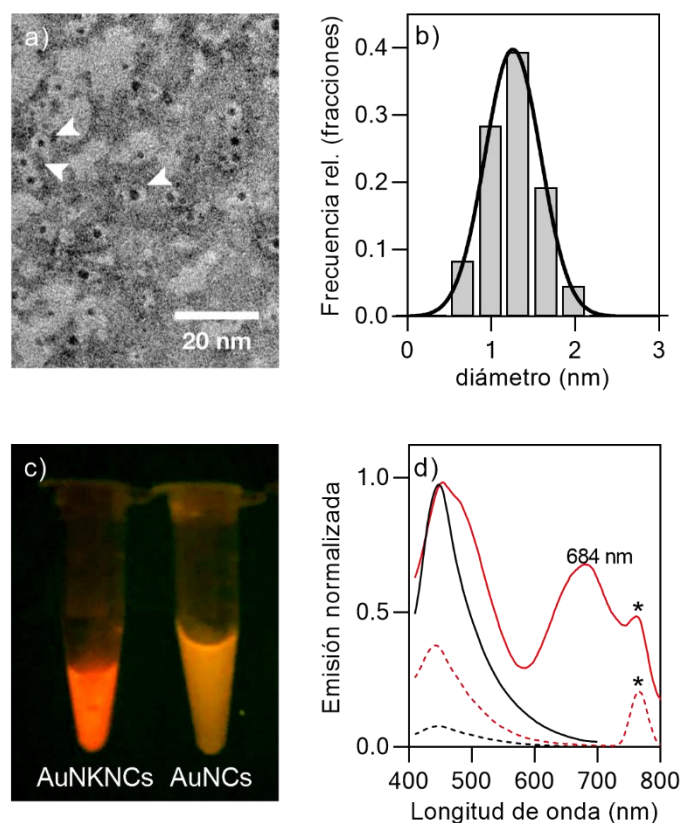


Figura 9: Caracterización de los nanoclusters de oro usando como plantilla **gp23.1AAC**. a) Micrografía TEM (ZEISS Libra 200 TEM) de AuNCs@gp23.1-AAC después de una tinción negativa con acetato de uranilo. Las partículas híbridas aparecen como una "yema" negra de AuNC, rodeada por la "clara de huevo" gris gp23.1-AAC; b) Histograma de la distribución del diámetro del núcleo (dc) de los nanoclusters en los ensamblajes AuNC@gp23.1-AAC según se determina a partir de las imágenes TEM, dc promedio =  $1,26 \pm 0,3$  nm; c) Disoluciones de AuNKNC@gp23.1AAC y

AuNC@gp23.IAAC bajo luz ultravioleta (360 nm); d) Espectros de emisión normalizados de AuNKNC (rojo) y AuNC (negro) con gp23.IAAC en estado monomérico (discontinuo) o hexamérico (línea continua) tras la excitación a 380 nm. La banda estrecha a 760 nm marcada con un asterisco corresponde al armónico de la longitud de onda de excitación.



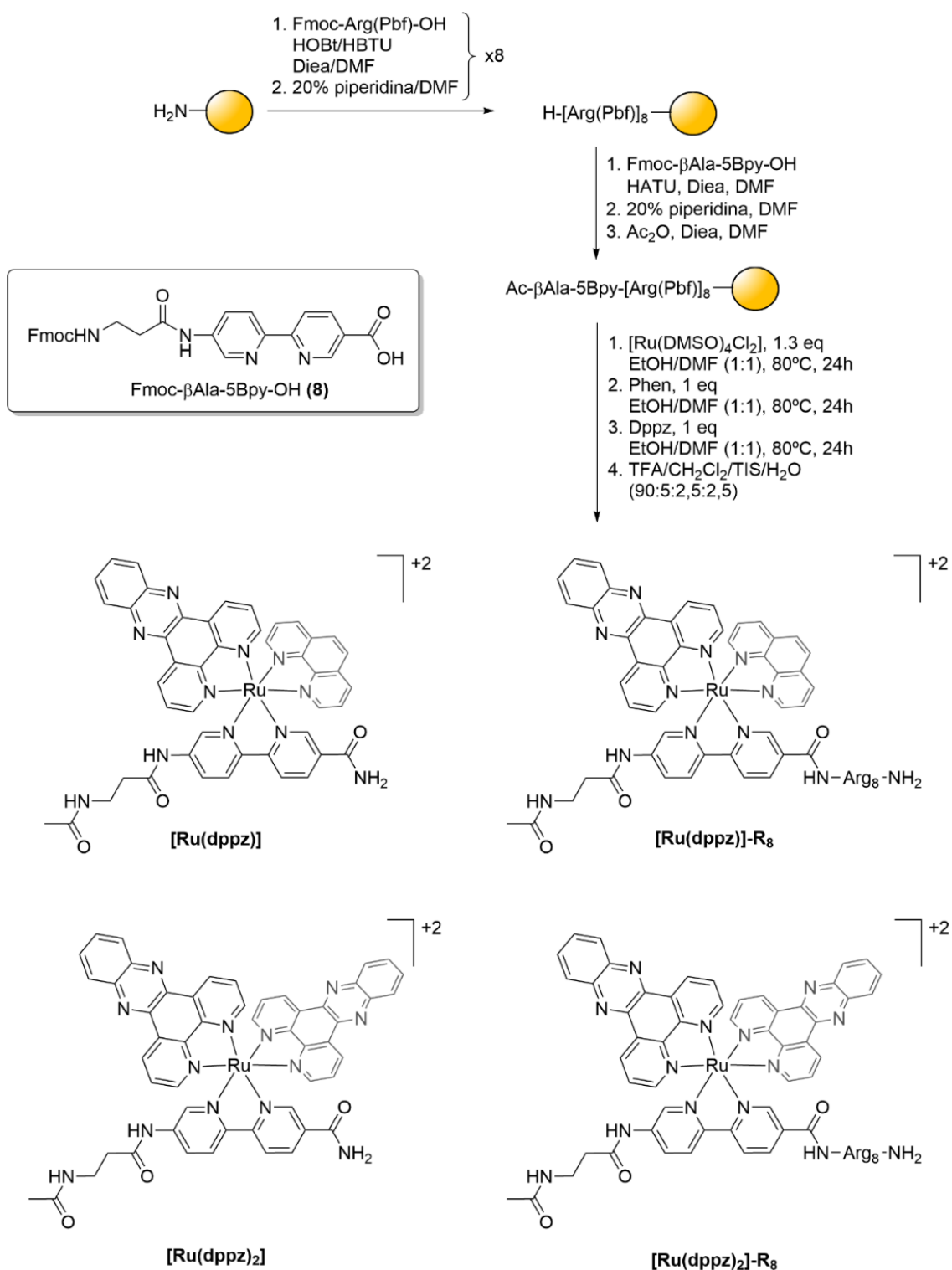
## SUMMARY

### **Chapter 1: Ru (II) oligocationic metallopeptides derived from dipyridophenazine ligand (dppz) as selective G-quadruplex binding agents.**

This chapter demonstrates that a series of Ru (II) metallopeptides derived from the dppz ligand and functionalized with an octaarginine tail, possess G-quadruplex (G4) binding properties, a non-canonical form of DNA, and even properties of cell internalization.

First, the [Ru(dppz)]-R<sub>8</sub> complex was synthesized with the intercalating ligand dppz, the ancillary ligand phenanthroline and a βAla5Bpy unit that allowed us, using the solid phase peptide synthesis methodology (SPPS), functionalize the C-terminus of the metallopeptide with a sequence of (L)-octaarginine. The bipyridine core was assembled following standard SPPS Fmoc/tBu protocols to the octaarginine domain previously anchored to the resin. Subsequently, the N-terminal end of the peptide precursor was acetylated using acetic anhydride in basic medium. Next, the Ru (II) metal center was incorporated by reacting the precursor [Ru(DMSO)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] with the peptide attached to the resin. Finally, the dppz ligand was introduced first, followed by the addition of the ligand phen using the same conditions (DMF, 80 ° C, 24 h). The cleavage of the peptide from the solid support and the total deprotection was carried out by acid treatment of the resin followed by the precipitation of the metallopeptide with a saturated solution of ammonium hexafluorophosphate. In addition to the model complex [Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>, the control complex lacking the octaarginine domain [Ru (dppz)] was also synthesized. Additionally, two other analogous complexes were synthesized ([Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>8</sub> and [Ru(dppz)<sub>2</sub>], respectively) in which the phenanthroline ligand is replaced by a second dppz unit.

## Summary



Scheme 1: Solid phase synthesis of complex **Síntesis en fase sólida del complejo [Ru(dppz)]-R<sub>8</sub> y estructuras de los complejos análogos estudiados [Ru(dppz)], [Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>8</sub> y [Ru(dppz)<sub>2</sub>].**

In general, the different Ru(II) complexes recognize the G4s sequences. More specifically, the fluorescence titrations showed us that the [Ru(dppz)<sub>2</sub>] complex has a higher affinity for the different G4 sequences than its analog equipped with

a single dppz unit, maintaining the preference for the TEL sequence, although with less pronounced selectivity.

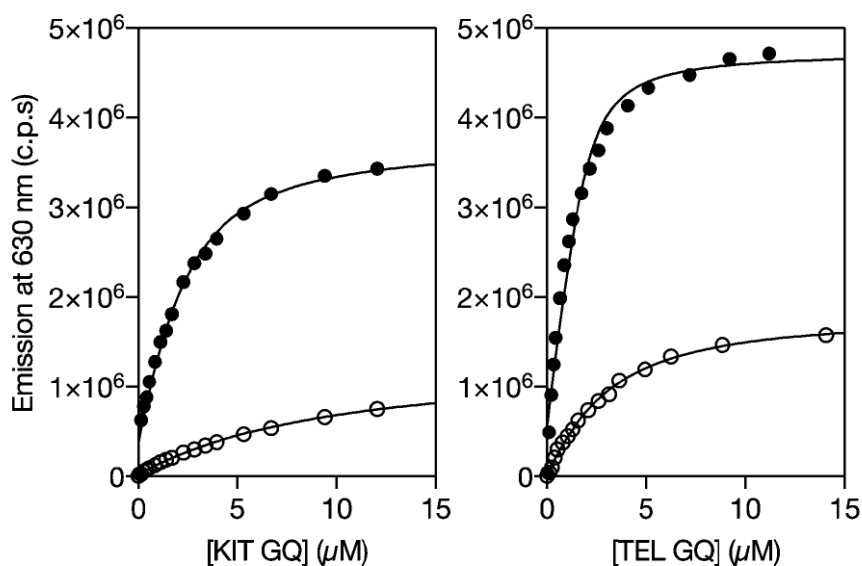


Figure 1: Emission profiles at 630 nm of representative titrations of **[Ru(dppz)]** (○) and **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** (●) with KIT GQ (left) and TEL GQ (right). The same scale was used in both graphs for comparison. The lines correspond to the best fits to a simple 1 : 1 binding mode that results in the dissociation constants shown in Table 1 (see ESI† for curve fitting procedures using the DynaFit program).<sup>27</sup> Similar titrations were performed with **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** and **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>8</sub>**.

On the other hand, the substitution of the phenanthroline ligand in the **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]-R<sub>8</sub>** complex resulted in an inversion in the general selectivity with respect to the **[Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>** complex, obtaining a higher affinity for the sequences. c-MYC and c-KIT. (Table 1).

Table 1: Dissociation constants ( $K_D/\mu\text{M}$ ) of the Ru (II) metallopeptides with the different oligonucleotides.

	TEL	c-MYC	c-KIT
<b>[Ru(dppz)]</b>	$2.72 \pm 0.21$	$11.23 \pm 1.03$	$19.27 \pm 1.69$
<b>[Ru(dppz)]R<sub>8</sub></b>	$0.93 \pm 0.06$	$4.01 \pm 0.33$	$2.05 \pm 0.10$
<b>[Ru(dppz)<sub>2</sub>]</b>	$0.85 \pm 0.05$	$3.65 \pm 0.19$	$3.06 \pm 0.15$
<b>[Ru(dppz)<sub>2</sub>]R<sub>8</sub></b>	$1.30 \pm 0.07$	$0.15 \pm 0.05$	$0.14 \pm 0.04$

The behavior of the different complexes was confirmed by UV-Vis spectroscopy observing shifts in the MLTC bands centered at 443 nm, which are affected when the complexes bind to the GQ. Furthermore, by Circular Dichroism, we

## Summary

demonstrated that the structure of the GQs was not affected by the presence of the different metallopeptides.

Finally, we study the cellular internalization properties of the complex **[Ru(Dppz)<sub>2</sub>]**. Thus, we verify how the compound was deposited in the form of aggregates that are specifically associated with the cells, causing their death after a prolonged time of incubation.

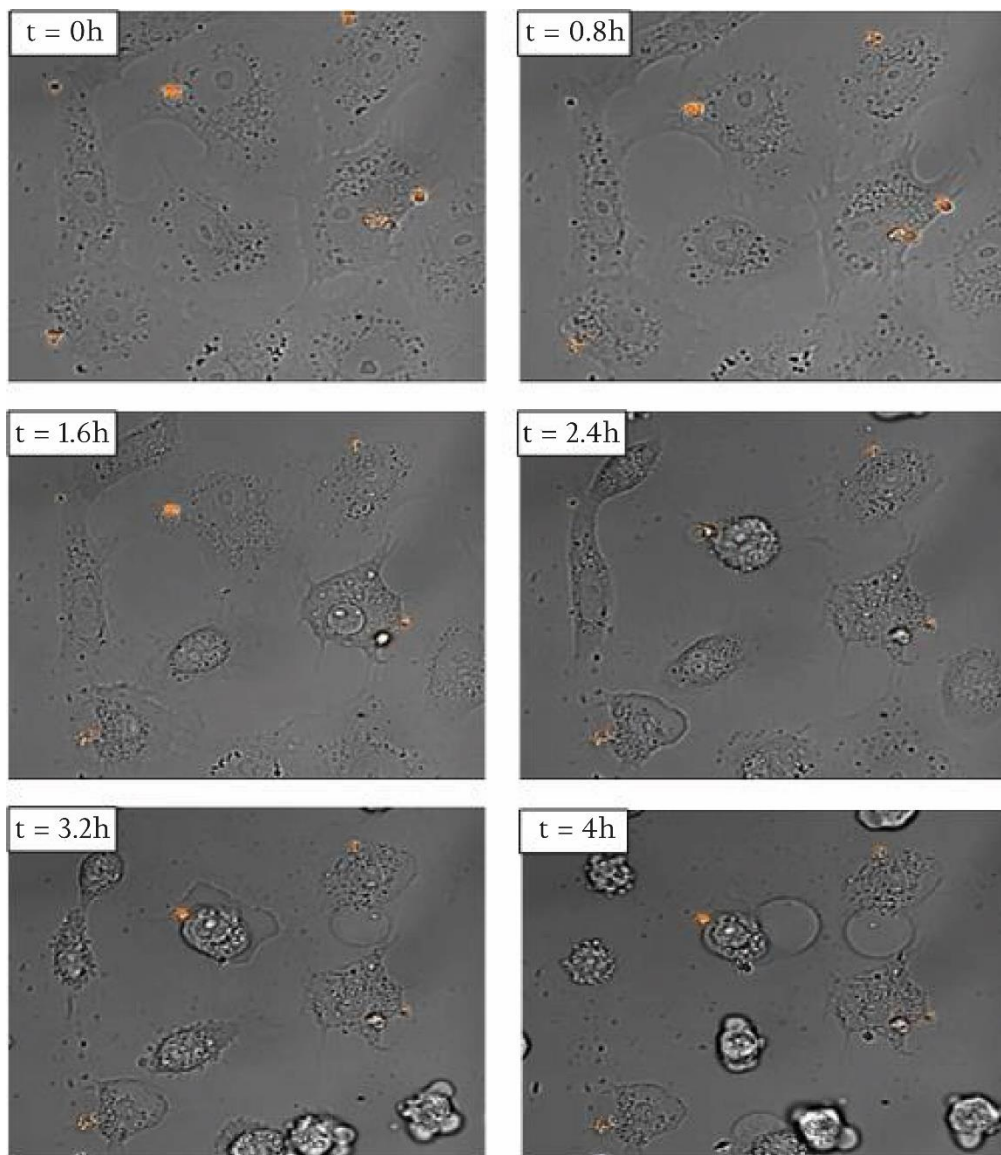


Figure 2: Studies performed on Vero cells in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) without FBS (fetal bovine serum) or antibiotics, of the compound **[Ru(dppz)<sub>2</sub>]** (25  $\mu$ M) with an incubation time of 30 min at 37 ° C in atmosphere wet with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were observed under a fluorescence microscope.

## Chapter 2: Synthesis, characterization, and study of the DNA-binding properties of semi-sandwich metallopeptides.

This chapter demonstrated the synthetic versatility of solid phase peptide synthesis (SPPS) to obtain a new family of metallopeptides. The general structure of half-sandwich Ru(II)-arene metallopeptides is shown on Figure 2. The complexes contain  $\eta^6$  arene ligand that can be *p*-cymeno (*p*-cym), biphenyl (*biph*) or *m*-terphenyl (*m*-terp), the chelating unit  $\beta$ Ala5Bpy (5Bpy) and the labile ligand is a chlorine (Cl).

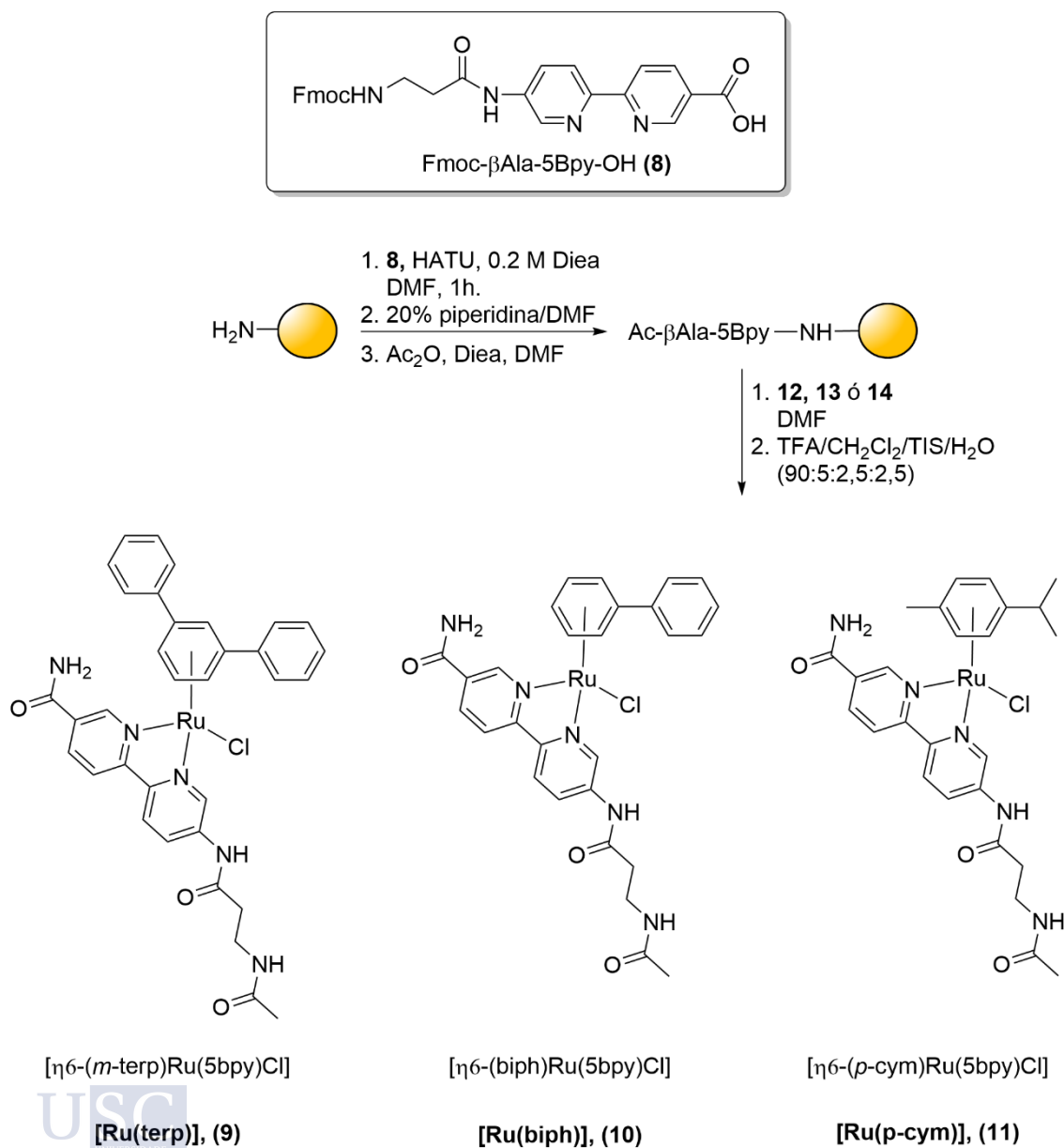


Figure 2: Synthetic route of Ru(II)-arene metallopeptides

First, 5Bpy was coupled to the resin using standard SPPS protocols. Then, we introduced the Ru(II)-arene core. Since there were no synthetic protocols for solid phase of Ru(II)-arene complexes, we evaluated the conditions necessary to

## Summary

obtain the desired complexes by reacting the Ru precursors with the 5Bpy anchored to the resin. Once the optimal conditions for the synthesis of the Ru (II)-arene complexes were established and after their purification by HPLC, the X-ray structure of the complexes was determined. The **[Ru(p-cym)]** complex crystallized into orange needles through a slow diffusion process. The crystallographic data showed us that the complex adopts the typical pseudo-octahedron geometry of semi-sandwich complexes. However, for the **[Ru(biph)]** and **[Ru(m-terp)]** complexes we have not yet been able to get them to crystallize.

Then, we analyzed the process of aquation of the different complexes by UV-Vis spectroscopy.

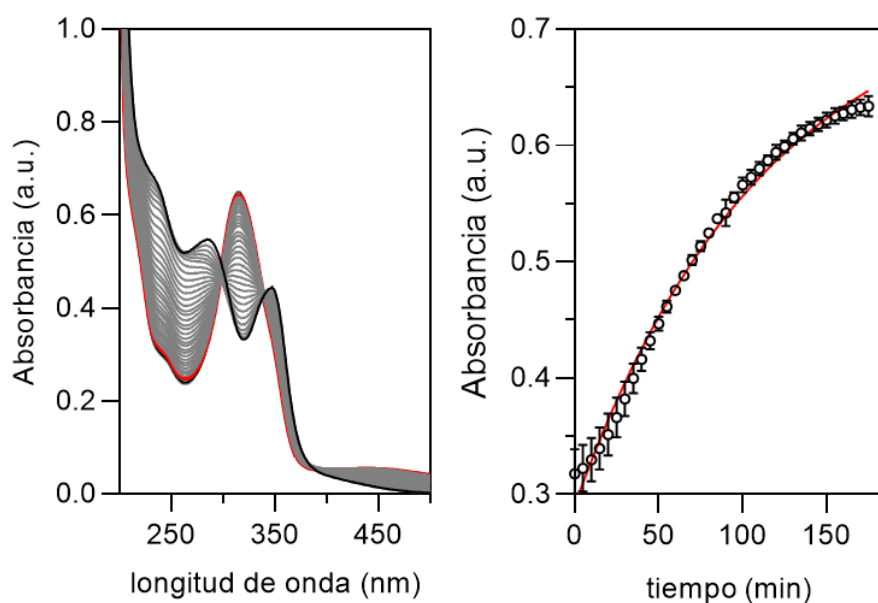


Figure 3: left, UV-Vis spectrum of complex; izquierda: **espectro de UV-Vis** del complejo **[Ru(biph)]** correspondiente al proceso de acuación del complejo (línea negra,  $t=0$ ; línea roja,  $t=165$  min); derecha: perfil de la acuación correspondiente a la banda centrada a 317 nm.

The results showed us that the aquation constant ( $K_{aq}$ ) for the complex **[Ru(m-terp)]** is lower than for the complexes **[Ru(biph)]** and **[Ru(p-cym)]** being  $0,88 \cdot 10^{-2} \pm 0,59 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $1,67 \cdot 10^{-2} \pm 4,64 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  and  $7,70 \cdot 10^{-2} \pm 0,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  respectively.

Finally, the binding properties of the different complexes with DNA were studied using the GMP (5'-guanosine monophosphate) as a model, obtaining positive binding results (metalation) for **[Ru(p-cym)]** and **[Ru (biph)]** complexes.

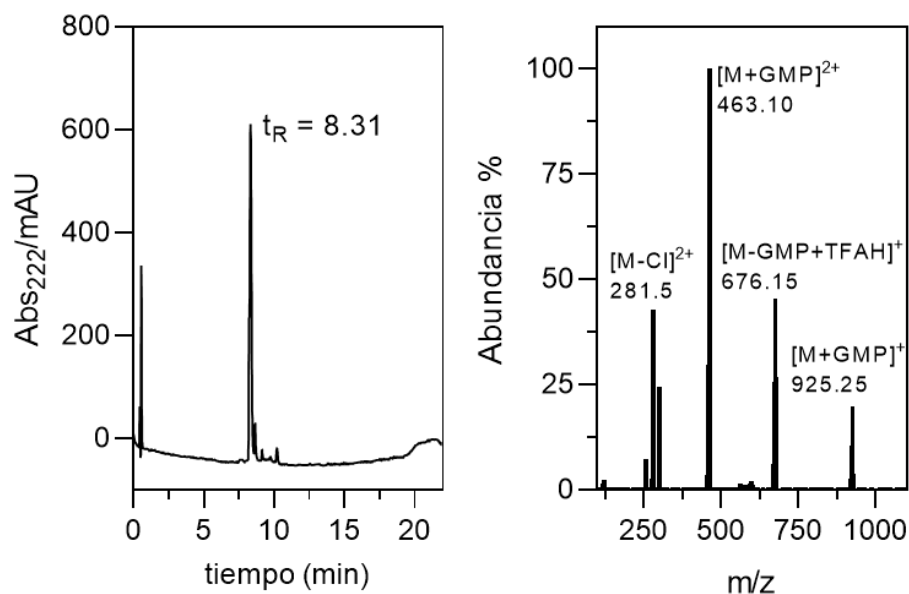


Figure 4: Analysis of the binding between Análisis **de la unión** del complejo [Ru(p-cym)] con el GMP, mediante HPLC-MS. Izquierda, cromatograma del HPLC donde **se observa un pico** mayoritario correspondiente al producto de la interacción del complejo con el GMP; derecha, espectro de masas perteneciente al pico con tiempo de retención 8.31 min.

### Chapter 3: Study of the self-assembling protein gp23.1 as a platform for the synthesis of gold nanoclusters.

This chapter demonstrates the use of the self-assembling toroidal protein gp23.1 in solution as a platform for the controlled growth of luminescent gold nanoclusters.

The gp23.1 protein is a small globular protein composed of 50 residues that folds into three domains of three antiparallel helices (S<sup>2</sup> E<sup>10</sup> S<sup>20</sup> L<sup>10</sup> D<sup>10</sup> S<sup>10</sup> W<sup>10</sup> L<sup>10</sup> D<sup>10</sup> G<sup>10</sup> T<sup>10</sup> A<sup>10</sup> S<sup>10</sup> E<sup>10</sup> E<sup>10</sup> L<sup>10</sup> L<sup>10</sup> R<sup>10</sup> V<sup>10</sup> A<sup>10</sup> V<sup>10</sup> N<sup>10</sup> A<sup>10</sup> G<sup>10</sup> D<sup>10</sup> L<sup>10</sup> T<sup>10</sup> Q<sup>10</sup> E<sup>10</sup> E<sup>10</sup> A<sup>10</sup> D<sup>10</sup> K<sup>10</sup> I<sup>10</sup> M<sup>10</sup> S<sup>10</sup> Y<sup>10</sup> P<sup>10</sup> W<sup>10</sup> G<sup>10</sup> A<sup>10</sup> W<sup>10</sup> N<sup>10</sup> D<sup>10</sup>). In particular, the protein forms a hexamer in solution having a doughnut-like structure with about 58Å in diameter, a central channel ~18Å wide delimited by the six α1 helices, while helices α2 and α3 form the outer surface.

## Summary

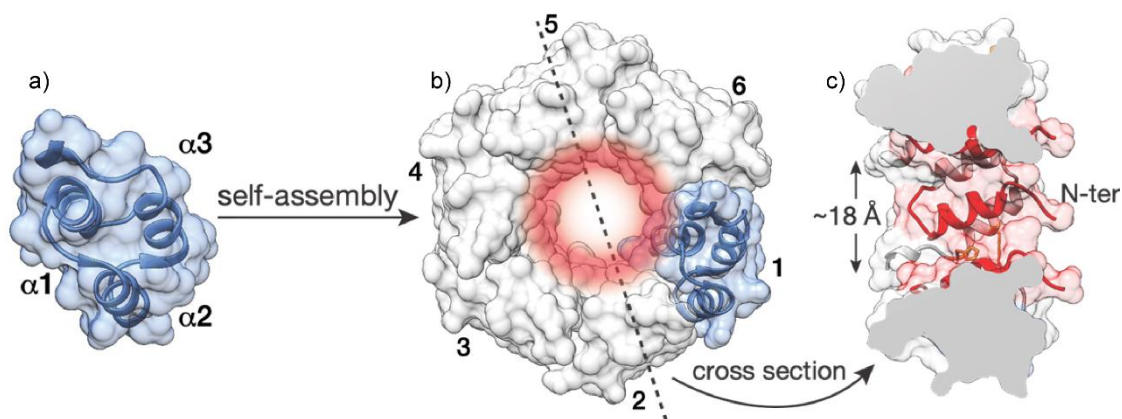


Figure 5: Estructura de la proteína gp23.1; a) *monómero*; b) vista superior de la proteína toroidal; c) corte transversal de la proteína donde se aprecian las dimensiones del canal interno.; c) cross section of the protein through the dashed line in b, showing the potential for functional modification of the interior cavity by mutations of the N-terminal  $\alpha 1$  helix.

Through the solid phase peptide synthesis methodology (SPPS) we were able to synthesize the gp23.1-AAC variant and solve the problems of the methodology itself such as the formation of aspartimides, incomplete deprotections of the side chains, etc. Once the desired peptide was identified it was purified by RP-HPLC.

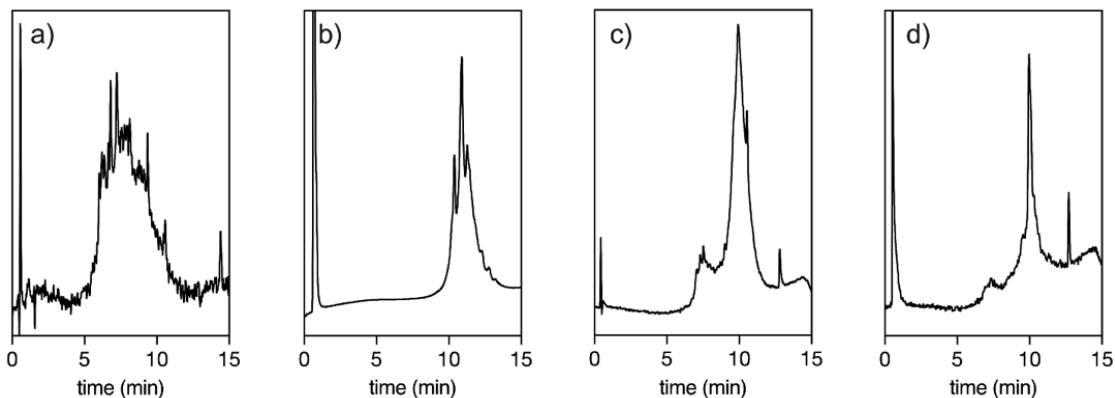


Figura 6 HPLC chromatograms of the evolution of the synthesis of the gp23.1-AAC peptide using different systems: a) chromatogram of the crude peptide using an automatic peptide synthesizer; b) using an automatic microwave-assisted synthesizer; c) using an automatic microwave-assisted synthesizer + Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH (and the deprotection solution of 20% piperidine + 0.1M HOBt) to prevent the formation of aspartimides; d) using the microwave-assisted synthesizer with the mutated peptide sequence gp23.1-AAC that allowed us to obtain the final peptide.

The peptide was then characterized. First, its circular dichroism (CD) spectrum was analyzed, which showed us a negative band centered at 222 nm typical of a helices with a molar ellipticity per residue (MRE) of  $\approx -15900 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  which indicated that the monomer was 48% helical in solution. Furthermore,

thermal denaturation experiments of the monomer indicated that the protein is very stable.

More importantly, the intrinsic emission of the tryptophan present in the sequence allowed us to monitor the self-assembly process in solution, measuring the changes in fluorescence anisotropy at different concentrations. The oligomerization of gp23.1-AAC was also analyzed by measuring the changes in the translational diffusion rate ( $D$ ) using the PFGSE-NMR technique in such a way that the profile values obtained by this technique nicely overlap with those obtained in the anisotropy titrations, confirming that at concentrations above 0.9 mM the protein is in its hexamer form.

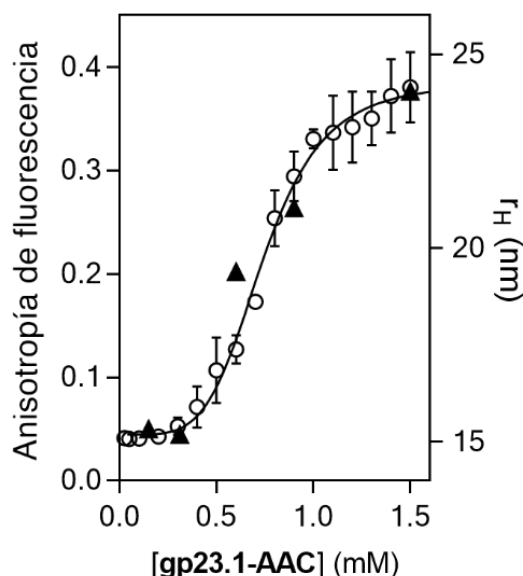


Figure 7: Fluorescence anisotropy at 350 nm (○) and PFGSTE NMR measured hydrodynamic radius (▲) at different concentrations of the gp23.1AAC monomer. Line corresponds to the best fit to a sequential oligomerization to form the hexamer.

As proof of the synthetic versatility of SPPS, we performed head-to-head dimerization of gp23.1AAC monomers, catalyzed by Cu (I) in resin. The gp23.1AAC monomers were capped with a mixture of azidoacetic acid and pentynoic acid. Subsequently, the click cyclization was carried out on the resin after the addition of CuI and ascorbic acid, in such a way that the dimer  $(\text{gp23.1AAC})_2$  was obtained following the standard deprotection and purification protocols. Analysis of the oligomerization of the  **$(\text{gp23.1AAC})_2$  dimers** by fluorescence anisotropy revealed a greater tendency to self-assemble compared to the gp23.1AAC monomer. Finally, once the stability of gp23.1AAC in solution was confirmed, its potential to template the formation of gold nanoclusters (AuNC) was studied. For this purpose, two different techniques were used. On one hand, the in situ synthesis of AuNC was carried out by mixing a solution of

## Summary

gp23.1AAC with a gold precursor salt ( $\text{HAuCl}_4$ ). The reduction of the gold salt under very mild conditions resulted in the formation of the *biotemplated* hybrid. The analysis of the HR-TEM images showed us a mean diameter of the AuNC of 1.26 nm, consistent with the template effect of the protein. Similar templating effects in the formation of AuNCs were observed with the self-assembled nanocylinders derived from the (gp23.1-AAC)<sub>2</sub> dimers

On the other hand, a slight modification in the Au(III) reduction protocol, by using sodium ascorbate at 50 °C for 72 h, resulted in luminescent AuNCs that displayed dual emission at 450 nm and 684 nm when excited at 380 nm (Figure 8), allowing their potential use in imaging.

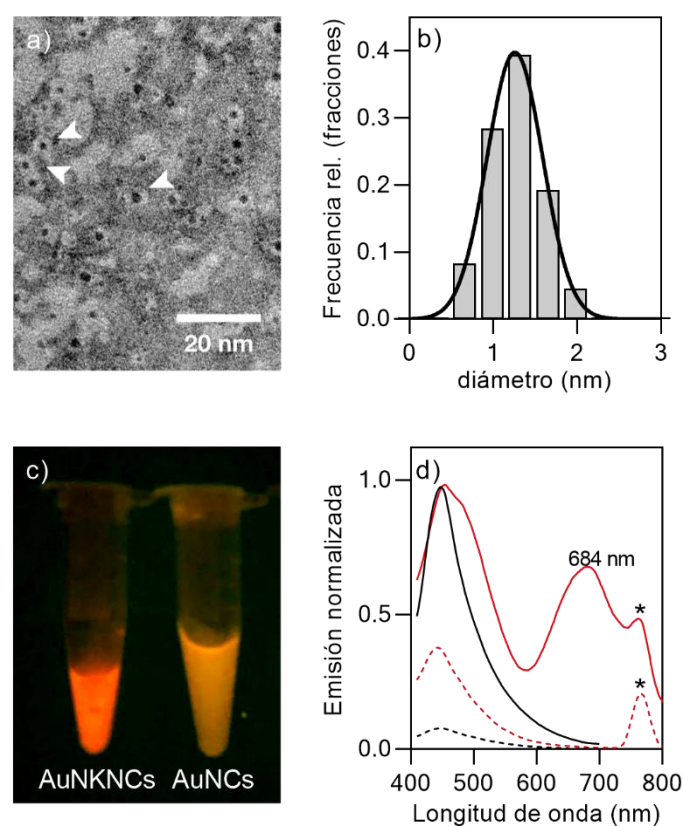


Figure 8: Characterization of the gp23.1AAC templated gold nanoclusters. a) TEM micrograph (ZEISS Libra 200 TEM) of the AuNCs@gp23.1-AAC after negative staining with uranyl acetate. The hybrid particles appear as a black AuNC “yolk” surrounded by the gray gp23.1-AAC “egg white”; b) Histogram of the distribution of the core diameter (dc) of the nanoclusters in the AuNC@gp23.1-AAC assemblies as determined from TEM images, average dc =  $1.26 \pm 0.3$  nm; c) AuNKNCS@gp23.1AAC and AuNC@gp23.1AAC solutions under UV-light (360 nm); d) Normalized emission spectra of AuNKNCS (red) and AuNCs (black) with gp23.1AAC in monomeric (dashed) or hexameric state (solid line) upon excitation at 380 nm. The narrow band at 760 nm marked with an asterisk corresponds to the harmonic of the excitation wavelength.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reactivos

Todos los disolventes empleados en la síntesis del aminoácido Fmoc- $\beta$ Ala5Bpy-OH fueron obtenidos de diferentes fuentes comerciales: Fisher Chemical (acetonitrilo grado HPLC, cloroformo, tolueno, DMF, metanol), Sharlau (etanol absoluto, celita), Sigma Aldrich (5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{SOCl}_2$ , hidrazina monohidrato, xileno, DIEA) Panreac ( $\text{NaNO}_2$ )

Para la síntesis de los péptidos todos los aminoácidos proceden de Sigma Aldrich excepto el Fmoc-NLe-OH (Nova Biochem). Todos los aminoácidos fueron usados protegidos con el grupo protector temporal Fmoc en el N $\alpha$ . La resina empleada para la SPPS fue RinkAmide ProTide (LL) con una carga de 0.18 mmol/g de CEM Corporation.

Los reactivos empleados para la síntesis de los dímeros fueron adquiridos en Sigma Aldrich (ácido 2-acidoacético, ioduro de cobre, 4-metilpiperidina), Alfa Aesar (ácido 4-pentinoico, ácido ascórbico).

Los reactivos empleados para la síntesis del precursor de Ru (Capítulo 1), fueron adquiridos en STREM Chemicals ( $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) Los precursores de Ru-areno (Capítulo 2) fueron sintetizados por Sonia Infante (Grupo A. M. Pizarro, IMDEA Madrid).



### Procedimientos y técnicas experimentales

#### Espectrometría de masas

La desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS) fue realizada en un Bruker Autoflex MALDI-TOF en modo de escaneado positivo por irradiación

## Parte Experimental

directa del péptido adsorbido sobre la matriz de ácido sinapínico (para péptidos de más de 3 kDa)

### **Espectroscopía de UV-Vis**

Las medidas de UV fueron realizadas en un espectrofotómetro Jasco V-630 acoplado a un control de temperatura Jasco ETC-717, utilizando una cubeta Hellma semi-micro (108.002-QS) con un camino óptico de 10 mm. Las medidas se realizaron a 20°C. Los parámetros de adquisición fueron: rango de 220-400 nm, velocidad de escaneo 200 nm/min, resolución de 0.2 nm. Para los complejos de rutenio del capítulo 2, la cubeta usada fue Hellma - Cell for magnetic stirrers (119-004-10-40, QS) con un camino óptico de 10 mm. Las medidas se realizaron a 37°C siendo los parámetros de adquisición los siguientes: rango de 200-700 nm, velocidad de escaneo 200 nm/min, resolución de 0.2 nm

### **Espectroscopía de fluorescencia**

Las valoraciones de anisotropía se han llevado a cabo en un espectrofluorímetro Jobin-Yvon FluoroMax-3 (DataMax 2.20) acoplado a un controlador de temperatura Wavelenhtg electronics LFI-3751. Todas las medidas se realizaron en una cubeta Hellma ultra-micro (105.250-QS) a 20°C. Los valores de anisotropía se corresponden a la acumulación de tres medidas. Los parámetros de las medidas son:  $\lambda_{exc}=280$  nm,  $\lambda_{em} = 350$  nm.

### **Dicroísmo Circular**

Las medidas de Dicroísmo Circular fueron realizadas en un Jasco J-715 acoplado a un baño de agua termostatzado Neslab RTE-111 utilizando una cubeta Hellma 100-QS (2 mm paso óptico). La velocidad de escaneo fue 200 nm/min y el espectro obtenido es la media de tres acumulaciones.

### **HPLC y UHPLC**

#### **UHPL-MS**

El análisis de los péptidos fue realizado mediante UHPLC-MS en un Agilent 1200 series LC/MS utilizando una columna analítica Zorbax SB-C18 (1.8  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm) de Phenomenex. Las condiciones para el UHPLC analítico consisten en un gradiente lineal del 5% al 95% del disolvente B en 12 min a un flujo de 0.350 mL/min (A: H<sub>2</sub>O + 0.1%TFA, B: acetonitrilo +0.1% TFA). Los compuestos son detectados por UV a 222, 270, y 330 nm. La espectrometría de masas por ionización de electrospray (ESI-MS) es llevada a cabo en un Agilent 6120 Quadrupole LC/MS en modo positivo de escaneo utilizando una inyección directa de la disolución del péptido puro en el detector de masas.

### HPLC Preparativo

La purificación del péptido es llevada a cabo mediante RP-HPLC preparativo en un Waters 1500series Liquid Chromatograph utilizando una columna de fase reversa Sunfire Prep C18 OBD (5  $\mu\text{m}$ , 19 x 150 mm) de Waters. Las condiciones estándar para el RP-HPLC preparativo consisten en un régimen isocrático durante 5 min, seguido de un gradiente lineal del disolvente B durante 30 ó 35 min dependiendo del péptido (A:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1%TFA, B: acetonitrilo +0.1% TFA). Los gradientes también se ajustados en función del péptido.

### Estudios de internalización celular:

Los experimentos de internalización celular se realizaron en colaboración con el Prof. José Martínez Costas, (CIQUS). Las células Vero se cultivaron en un medio de DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) con un 10 % de FBS (Fetal Bovine Serum) en cajas de 12 compartimentos provistos de 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. Se trataron las células de la siguiente forma: se añadió sobre cada compartimento el volumen correspondiente de los diferentes compuestos a analizar para tener una concentración final de compuesto determinada. Las muestras se incubaron en una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  a 37 °C durante 30 min. ó 24 h.

### Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

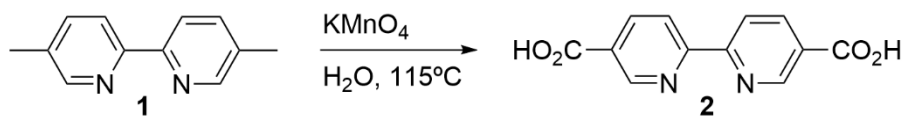
Todas las micrografías de TEM fueron obtenidas utilizando un microscopio de electrones ZEISS Libra 200 y un JEOL JEM-1011. Una muestra de 2  $\mu\text{L}$  se depositó en sobre una película de carbono soportado en una malla de Cu 400 y se secó con una corriente de aire (Electric Microscopy Sciences, CF400-CU). Las muestras se tiñieron usando una disolución al 2% de acetato de Uranilo en agua destilada, para poder observar la AuNC de oro. Se han podido extraer 300 AuNCs de las imágenes de TEM con el programa (ImageJ) y se han usado para hacer los histogramas tamaño-frecuencia.

### Síntesis del aminoácido Fmoc- $\beta$ Ala5Bpy-OH

La síntesis del residuo quelatante fue llevada a cabo siguiendo los protocolos recientemente publicados por nuestro grupo de investigación.<sup>215,216</sup> Todos los productos fueron analizados por HPLC-MS para comprobar su pureza.

### Síntesis del ácido 2,2'-bipiridil-5,5'-dicarboxílico (2)

## Parte Experimental



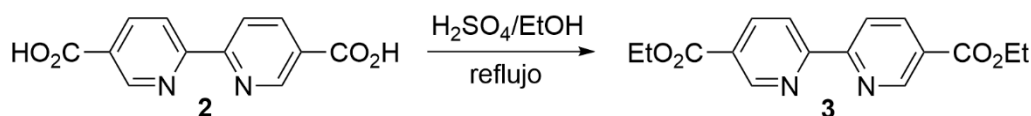
Una mezcla de 39 g de permanganato potásico y 7 g de la 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina en 250 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  se calentó durante 2 h (a  $115^\circ\text{C}$ ). Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se filtró sobre celita. El filtrado se enfrió a  $4^\circ\text{C}$  y se acidificó con  $\text{HCl}$  hasta la precipitación de un sólido blanco, el cual se filtró y se lavó con agua. El sólido se liofilizó obteniéndose el producto deseado en un 93% (8.7 g).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 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,  $^3J = 8.3$ ;  $^4J = 2.15$  Hz, 2H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 165.49, 156.84, 149.82, 137.97, 126.65, 120.62.

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z, 5-95 %B,  $t_R = 17.9$  min).  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4]^+ = 245.0$ ; encontrado = 245.1.

### Síntesis de 2,2'-bipiridil-5,5'-diel éster (3)



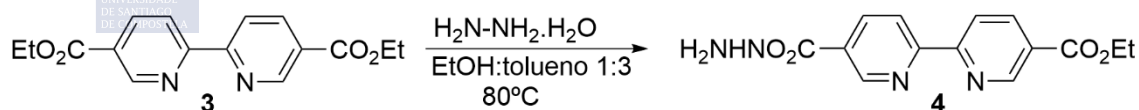
El ácido 2,2'-bipiridil-5,5'-dicarboxílico (10.0 g, 41 mmol) fue resuspendido en 150 mL de etanol absoluto. A continuación, se añadió lentamente ácido sulfúrico concentrado (20.0 mL) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 18 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 400 mL de agua a  $4^\circ\text{C}$ , causando la precipitación de un sólido blanco que fue filtrado, lavado (con agua) y liofilizado. 11.5g (93.0%).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 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,  $^3J = 8.3$ ;  $^4J = 2.15$  Hz, 2H); 4.0 (q,  $^3J = 7.1$  Hz, 4H); 1.37 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 6H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 164.2, 157.2, 149.8, 138.0, 126.2, 121.0, 61.1, 13.9.

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z, 5-95 %B,  $t_R = 21.0$  min).  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4]^+ = 301.1$ ; encontrado = 301.2.

### Síntesis de 5'-(carbohidracina)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (4)



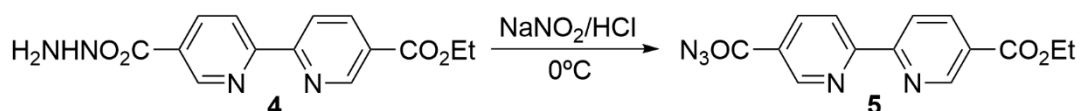
Una mezcla de 2,2'-bipiridil-5,5'-dietil éster (15.00 g, 50 mmol) e hidracina monohidratada (3.75 mL, 55 mmol) en una disolución de EtOH (42 mL) y tolueno (128 mL) se calentó a 80 °C durante 48 h. El precipitado se filtró y se lavó con CHCl<sub>3</sub> y posteriormente se secó a vacío. 11.4 g (80%). El dietil éster que no reaccionó se concentró y se mezcló nuevamente con hidracina (en las mismas condiciones) para obtener un rendimiento global del 90%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 1.35 (t, 3H), 4.37 (q, 2H), 8.35 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H), 8.45 (dd, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 4J = 2 Hz, 1H), 8.52 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H), 8.57 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H), 9.1 (d, <sup>4</sup>J = 2 Hz, 1H), 9.2 (d, <sup>4</sup>J = 2 Hz, 1H), 10.1 (br, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 14.1, 61.3, 120.9, 120.9, 126.1, 129.6, 136.2, 138.2, 148.1, 150.0, 155.8, 157.8, 163.8, 164.5.

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z, 5-95 %B, t<sub>R</sub> = 23.9 min). [M+H]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> = 287.1, encontrado 287.1; [M+Na]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> = 309.0; encontrado = 309.0.

#### Síntesis de 5'-(azidocarbonil)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (5)



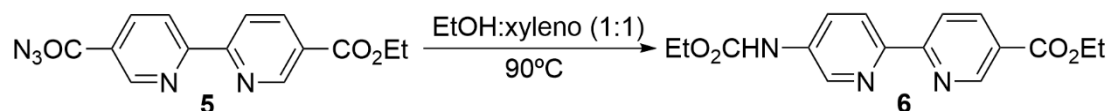
Una disolución de 5'-(carbohidracina)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (5.7g, 20 mmol) en HCl concentrado (100 mL) se enfrió a 0 °C y a continuación se añadió una disolución acuosa de NaNO<sub>2</sub> (1.73 g, 25 mmol; 15 mL) gota a gota, manteniendo la temperatura a 0 °C. Después de 60 min, la disolución amarilla se diluyó con agua (300 mL) para precipitar el monoéster **5** como un sólido blanco, el cual se filtró, lavó con agua y liofilizó para obtener 5.5 g (92%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>, δ): 9.13 (d, <sup>4</sup>J = 1.91 Hz, 1H), 9.10 (d, <sup>4</sup>J = 1.91 Hz, 1H), 8.71 (d, <sup>3</sup>J = 12.5 Hz, 1H), 8.69 (d, <sup>3</sup>J = 12.5 Hz, 1H), 8.517 (m, 2H; 4.31 (q, <sup>3</sup>J = 7.15 Hz, 2H); 1.29 (t, <sup>3</sup>J = 7.15, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>, δ): 170.8, 164.5, 159.2, 157.7, 150.3, 150.0, 138.0, 137.9, 127.0, 121.3, 61.2, 13.6.

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z, 5-95 %B, t<sub>R</sub> = 33.5 min). [M+H]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> = 298.1; encontrado = 298.1; [M+Na]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> = 320.1; encontrado = 320.2.

#### Síntesis de 5'-(etoxicarbonilamino)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (6)



## Parte Experimental

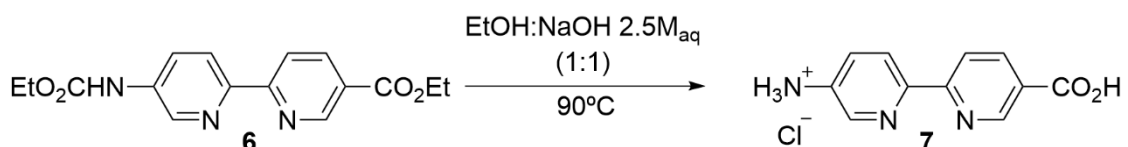
Una disolución de 5'-(azidocarbonil)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (8.6 g, 29 mmol) en una mezcla de EtOH (100 mL) y xileno (100 mL) se calentó a 90 °C durante 4 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo amarillo resultante se lavó con EtOH y se secó a vacío obteniéndose 8.21 g (90%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.35 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 4.17 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.36 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 8.08 (dd, <sup>3</sup>J = 8 Hz, <sup>4</sup>J = 2 Hz, 1H), 8.35 (dd, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J = 2 Hz, 1H), 8.40 (dd, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, <sup>5</sup>J = 1 Hz, 1H), 8.45 (d, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 1H), 8.70 (d, <sup>4</sup>J = 2 Hz, 1H), 9.12 (d, <sup>4</sup>J = 2 Hz, <sup>5</sup>J = 1 Hz, 1H), 10.13 (s, 1H).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 13.6, 13.9, 60.3, 60.6, 119.1, 121.2, 124.46, 124.9, 136.7, 137.4, 139.0, 147.4, 149.4, 153.1, 158.1, 164.2.

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z, 5-95 %B, t<sub>R</sub> = 23.2 min). [M+H]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 316.1; encontrado = 316.2; [M+Na]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 337.1; encontrado = 337.4.

### Síntesis del ácido 5'-amino-2,2'-bipiridil-5-carboxílico hidrocioruro(7)



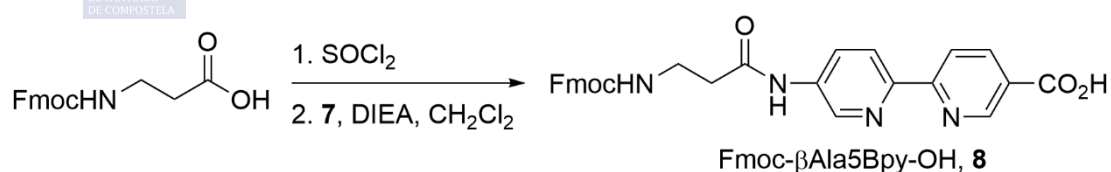
Una disolución de 5'-(etoxicarbonilamino)-2,2'-bipiridil-5-etil éster (14.55 g, 45.9 mmol) en una mezcla de EtOH (50 mL) y NaOH 2.5M<sub>aq</sub> (50 mL) se calentó a 75 °C durante 14 h. El EtOH se concentró a vacío y la disolución acuosa restante se acidificó con HCl para obtener un precipitado amarillo brillante, el cual se filtró, lavó con agua fría y liofilizó para obtener 9.80 g (85 %).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 7.00 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 2.8 Hz, 1H), 7.55, 7.61 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 2H), 7.81 (d, <sup>4</sup>J = 2.9 Hz, 1H), 7.98 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 2.9 Hz, 1H), 8.65 (d, <sup>4</sup>J = 2.8 Hz, 1H)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 123.3d, 126.2, 126.7, 133.8, 139.8, 141.34, 147.5, 147.4, 152.4, 159.6, 176.04

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z, 5-95 %B, t<sub>R</sub> = 13.5 min). [M+H]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = 216.1; encontrado = 216.0; [M+Na]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = 238.1; encontrado = 238.2.

### Síntesis de Fmoc-βAla5Bpy-OH (8)



Sobre 4.58 g (14.7 mmol) de Fmoc- $\beta$ Ala-OH se añadieron 10 mL de  $\text{SOCl}_2$  lentamente y a temperatura ambiente. La disolución se agitó durante 30 min y, posteriormente, se concentró el cloruro de tionilo a vacío, apareciendo un sólido amarillento que se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x10 mL) y se secó a presión reducida. El compuesto **7** (3.7 g, 14.8 mmol) se añadió junto con 20 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 5 mL de DIEA sobre el sólido amarillento anterior. Esta mezcla se dejó con agitación a temperatura ambiente 18h. A continuación, se evaporó el disolvente y el sólido resultante se resuspendió en una mezcla acetonitrilo (+ 0.1% TFA)/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1), se centrifugó y se lavó con acetonitrilo y  $\text{H}_2\text{O}$  para finalmente liofilizarlo, obteniéndose 6.70 g (89 %).

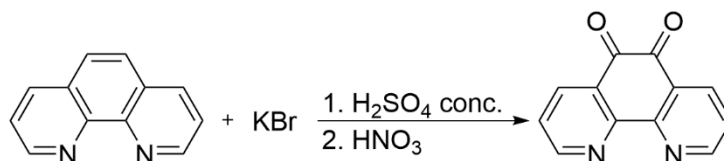
**$^1\text{H}$ -RMN** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 10.44 (s, 1H); 9.13 (d,  $^4\text{J} = 1.36$  Hz, 1H); 8.89 (d,  $^4\text{J} = 2.12$  Hz, 1H); 8.42 (m, 3H); 8.25 (dd,  $^3\text{J} = 8.48$  Hz,  $^4\text{J} = 2.12$  Hz, 1H); 7.88 (d,  $^3\text{J} = 7.46$  Hz, 2H); 7.67 (d,  $^3\text{J} = 7.38$  Hz, 2H); 7.49 (t,  $^3\text{J} = 5.34$  Hz, NH); 7.40 (t,  $^3\text{J} = 7.21$  Hz, 2H); 7.30 (t,  $^3\text{J} = 7.38$  Hz, 2H); 4.30 (d,  $^3\text{J} = 6.95$  Hz, 2H); 4.21 (t,  $^3\text{J} = 6.95$  Hz, 1H) 3.32 (t,  $^3\text{J} = 6.70$  Hz, 2H); 2.60 (t,  $^3\text{J} = 6.70$  Hz, 2H).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 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<sub>2</sub>), 63.77 (CH<sub>2</sub>), 47.62 (CH), 41.71 (CH<sub>2</sub>).

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z, 5-95 %B,  $t_R = 26.9$  min).  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $[\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_5]^+ = 509.2$ , encontrado = 509.1

### Síntesis del ligando dppz (dipirido[3,2-a:2,3-c]fenacina)

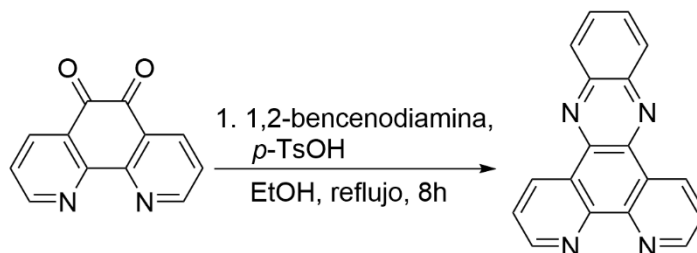
#### Síntesis de la fendiona



Un matraz conteniendo 1,10'-fenantrolina (1 g, 5.04 mmol) y bromuro potásico (5.95 g, 50.0 mmol) se enfrió en un baño de hielo. A continuación, se añadió ácido sulfúrico concentrado (20 mL), seguido de una adición gota a gota lentamente de HNO<sub>3</sub> concentrado. La mezcla resultante se calentó a 85 °C durante 2 h y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 400 mL de H<sub>2</sub>O y la mezcla resultante se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para posteriormente extraer la fendiona con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El compuesto se recrystalizó en MeOH:H<sub>2</sub>O (0.78 g, 78%).<sup>376</sup>

**MALDI-TOF** (m/z). [M+H]<sup>+</sup> calculado para, [C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = 210.0; encontrado = 210.1.

#### Síntesis del ligando dppz

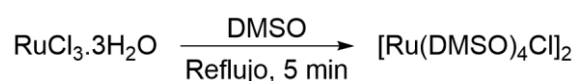


En un matraz se disolvió la fendiona (0.78 g, 3.71 mmol) en 30 mL de EtOH junto con 1,2-benzenodiamina (0.44 g, 4.08 mmol) y p-TsOH (19 mg, 0.1 mmol) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 8 h. Posteriormente, se dejó enfriar la disolución, se filtró el sólido y se lavó con etanol. El producto se purificó por recrystalización a partir de la mezcla EtOH:H<sub>2</sub>O obteniéndose un sólido en forma de polvo amarillo pálido. (0.75 g, 72 %).<sup>377</sup>

**MALDI-TOF** (m/z). [M+H]<sup>+</sup> calculado para [C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 283.0, encontrado = 283.3.

<sup>376</sup> U. Udeochu, T. Jimerson, A. Vivoni, O. Bakare, C. M. Hosten, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 3409–3415.

<sup>377</sup> W. Yang, W. Yang, W. Liu, W. Qin, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, 104, 56–63.

**Síntesis del precursor  $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}]_2$** 

Se disolvió 1 g (3.83 mmol) de  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en 5 mL de DMSO y se calentó a reflujo durante 5 min bajo atmósfera de Ar. Posteriormente se añadieron 20 mL de acetona y precipitó un sólido amarillo. Se concentró parcialmente el disolvente para a continuación filtrar el sólido y lavarlo con acetona y éter. Se secó el sólido a vacío obteniéndose 1.33 g (72 %).<sup>236</sup>

**MALDI-TOF** (m/z).  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_4\text{RuS}_4]^+ = 419.7$ , encontrado = 420.3.

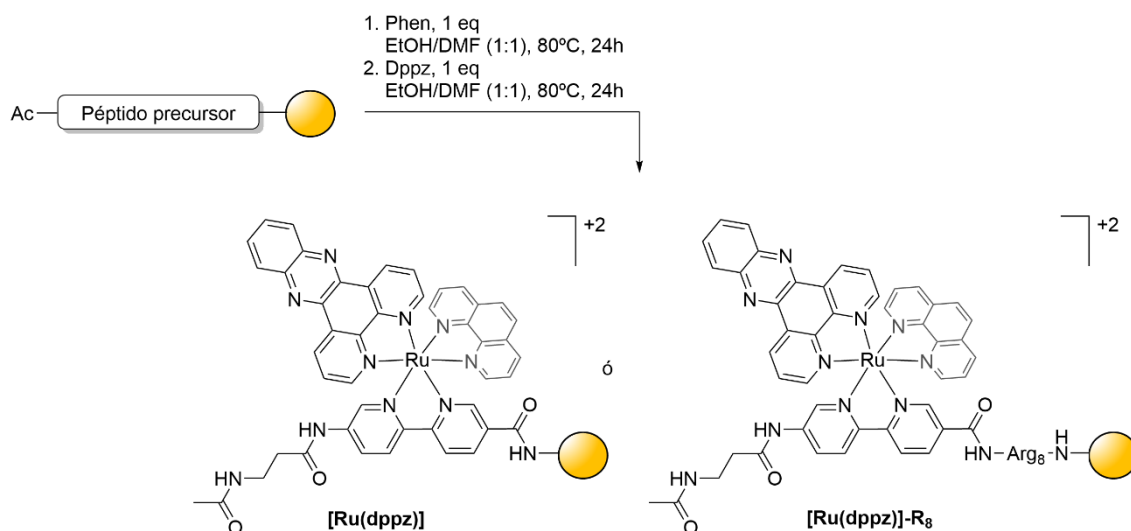
**Síntesis de péptidos en fase sólida****Metalopéptidos de Ru(II) derivados del ligando dppz**

Los precursores peptídicos de los metalopéptidos de Ru(II) derivados del ligando dppz se han sintetizado siguiendo los protocolos estándar de la SPPS usando la estrategia Fmoc/tBu en una escala de 0.05 mmol utilizando la resina *H*-Rink amide ChemMatrix (0.05mmol/g, 35-100 tamaño partícula). Los fragmentos de octaarginina se ensamblaron en un sintetizador automático de péptidos asistido por microondas (Liberty Lite) de CEM Corporation. Los aminoácidos se acoplaron con un exceso de 5 equivalentes en dos etapas (acoplamiento doble) usando la combinación DIC/Oxyma como agentes de acoplamiento. Los acoplamientos se realizaron durante 4 min a 90 °C. Los acoplamientos del aminoácido quelatante Fmoc- $\beta$ Ala5Bpy-OH (**8**) se realizan a mano utilizando un exceso de 3 equivalentes. usando como agente de acoplamiento HATU (3 equivalentes en 5mL de DIEA/DMF (0.2M)). La desprotección del grupo protector temporal Fmoc se llevó a cabo mediante el tratamiento de la resina con una disolución al 20% de piperidina en DMF durante 1 min a 75 °C. Una vez que la síntesis ha finalizado, se acetila el extremo N-terminal de los péptidos con una disolución de 0.8 mL  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 2 mL DIEA/DMF (0.2M) y 3.2 mL DMF.

La síntesis de los metalopéptidos de Ru(II) derivados del ligando tiene como etapa común la siguiente reacción:

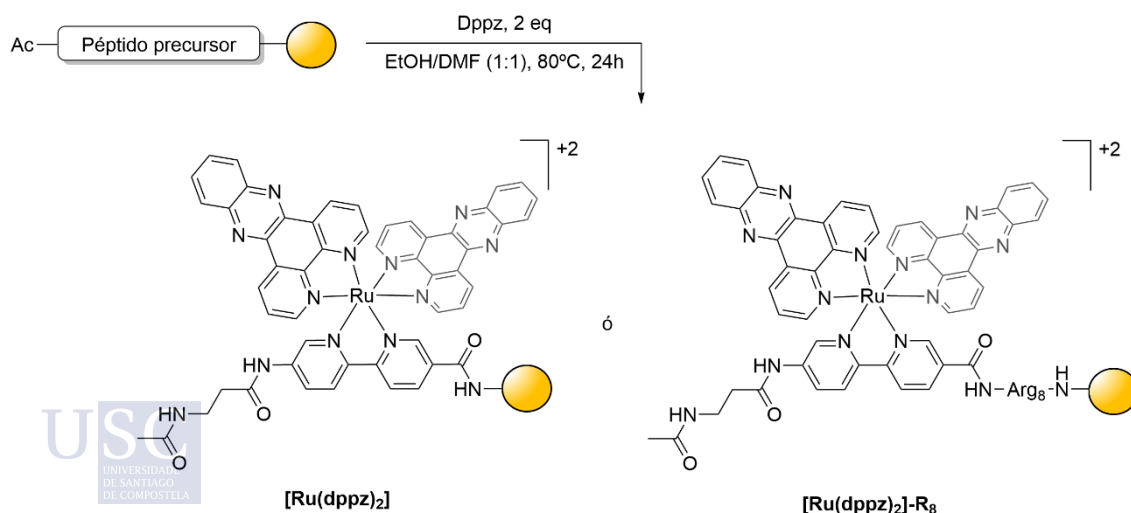
En un balón ámbar se resuspendió 100 mg (0.05 mmol) de resina del precursor peptídico en una mezcla 1:1 de EtOH/DMF. A continuación, se añadió  $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}]_2$  (31.9 mg, 0.065 mmol) y se calentó a 80 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo se hicieron lavados con DMF (3x5 mL) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x5 mL) y se secó la resina a vacío.

### Síntesis de los complejos $[Ru(dppz)]$ y $[Ru(dppz)]-R_8$



En un balón ámbar se resuspendió 100 mg (0.05 mmol) de resina del péptido precursor complejoado con rutenio, en 3 mL de la mezcla EtOH/DMF (1:1) y se añadió 9 mg (0.05 mmol) de 1,10-fenantrolina. A continuación, se calentó la mezcla a 80 °C durante 24 h bajo atmósfera inerte. Transcurrido el tiempo la resina se filtró y se lavó con DMF (3x5 mL) y  $CH_2Cl_2$  (3x5 mL) y se secó a vacío. Posteriormente, en un balón ámbar se volvió a resuspender la resina (100 mg, 0.05 mmol) en una mezcla EtOH/DMF (1:1). A continuación, se añadió 14.1 mg (0.05 mmol) del ligando dppz y se calentó la mezcla a 80 °C durante 24 h bajo atmósfera inerte. Transcurrido el tiempo la resina se filtró y se lavó con DMF (3x5 mL) y  $CH_2Cl_2$  (3x5 mL) y se secó a vacío.

### Síntesis de los complejos $[Ru(dppz)_2]$ y $[Ru(dppz)_2]-R_8$



En un balón ámbar se resuspendió 100 mg (0.05 mmol) de resina del péptido precursor complejoado con rutenio, en 3 mL de la mezcla EtOH/DMF (1:1) y se añadió 28.2 mg (0.2 mmol) de dppz. A continuación, se calentó la mezcla a 80 °C

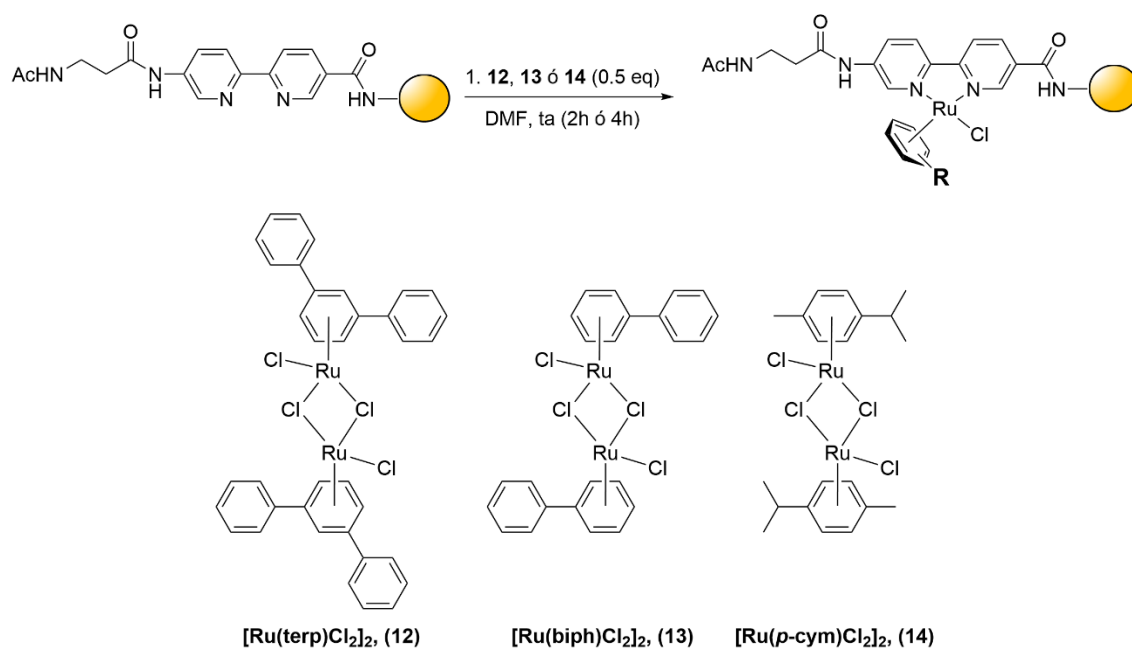
durante 24 h bajo atmósfera inerte. Transcurrido el tiempo la resina se filtró y se lavó con DMF (3x5 mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x5 mL) y se secó a vacío

### Metalopéptidos de Ru(II)-areno

El acoplamiento del Fmoc-βAla5Bpy-OH (**8**) se realizó siguiendo los protocolos mencionados anteriormente, incluidas las etapas de desprotección del grupo protector temporal Fmoc y la acetilación del extremo N-terminal.

El procedimiento a seguir para sintetizar los complejos de Ru(II) derivados de esta tesis es el siguiente:

En un balón ámbar conteniendo 100 mg (0.05 mmol) del precursor peptídico Ac-βAla5Bpy-NH<sub>2</sub> se añadió 2 mL de DMF y 0.5 eq. (0.025 mmol) del dímero precursor de Ru correspondiente. A continuación, se agitó (80 r.p.m.) a temperatura ambiente durante 2h (para los precursores **12** y **14**) ó 4h (para el precursor **13**). Transcurrido ese tiempo, la resina se filtró y se lavó con DMF (3x5 mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x5 mL).



### Péptidos derivados de gp23.1

Los péptidos gp23.1-AAC y (gp23.1AAC)<sub>2</sub> se han sintetizado siguiendo los procedimientos estándar de SPPS mediante la estrategia Fmoc/tBu. En una escala de 0.1 mmol utilizando la resina RinkAmide ProTide (LL) con una carga de 0.18 mmol/g en un sintetizador de péptidos automático asistido por microondas (Liberty Lite) de CEM Corporation. Los aminoácidos fueron acoplados en un exceso de 5 eq utilizando Oxima y DIC como agentes de acoplamiento. Los

## Parte Experimental

acoplamiento se llevaron a cabo durante 4 min a 90°C. La desprotección del grupo protector Fmoc se realizó tratando la resina con una disolución de 20% piperidina en DMF durante 12 min a 75°C.

### **Desanclaje de la resina y desprotección total**

El desanclaje y la desprotección total del péptido se realizó simultáneamente utilizando condiciones estándar incubando la resina durante 2.5 h en una mezcla ácida conteniendo 50  $\mu\text{L}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 25  $\mu\text{L}$  de TIS y 900  $\mu\text{L}$  de TFA por cada 40 mg de resina. Se filtra la resina y se concentra el filtrado con una corriente de nitrógeno hasta un volumen aproximado de 1 mL, añadiéndolo a continuación sobre una disolución de dietiléter (30 mL) enfriado previamente. Después de 15 min, el precipitado se centrifuga y se vuelve a lavar con 10 mL de dietiléter frío. El residuo obtenido se redisolvió en una mezcla 1:1 de acetonitrilo-agua y se liofilizó. El sólido resultante se disolvió en una mezcla 20% acetonitrilo- $\text{H}_2\text{O}$  y posteriormente se basificó con una disolución tampón (PBS o TBS) hasta pH 7.5-8.

En el caso de que el péptido contenga Cys, la mezcla ácida para el desanclaje de los péptidos de la resina se modificará introduciendo EDT (1,2-etanoditiol) para evitar la oxidación de los tioles. La mezcla ácida usada fue la siguiente: 10  $\mu\text{L}$  TIS, 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 25  $\mu\text{L}$  de EDT y 940  $\mu\text{L}$  de TFA por cada 40 mg de resina.

## Capítulo I

### Síntesis del complejo [Ru(dppz)]

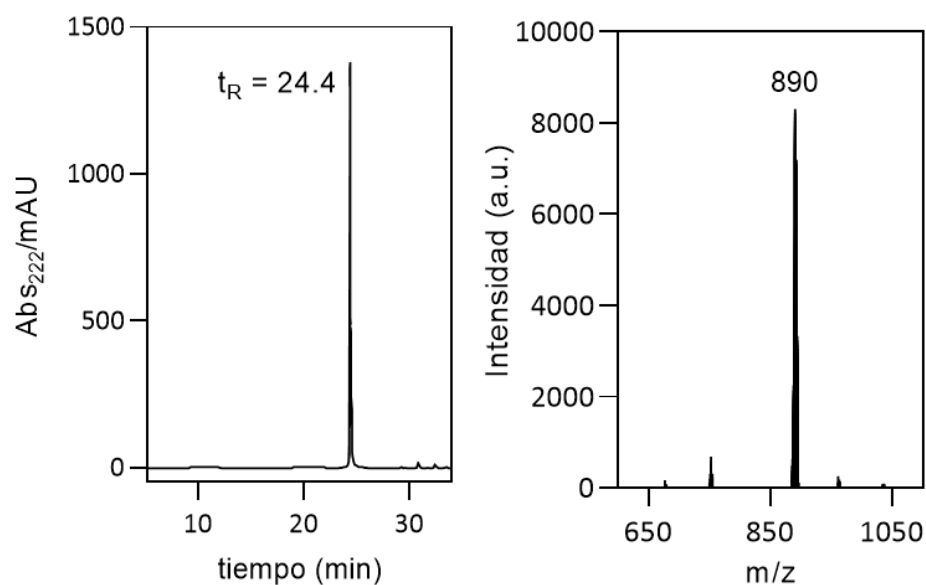


Figura 83: Izquierda, cromatograma del complejo [Ru(dppz)] puro ( $t_R = 24.4$  min, cromatograma realizado con el método I-75% B en 35 min, siendo A: H<sub>2</sub>O +0.1% TFA y B: AcN +0.1% TFA); derecha, espectro de masas de MALDI del complejo [Ru(dppz)].

### Síntesis del complejo [Ru(dppz)]-R<sub>8</sub>

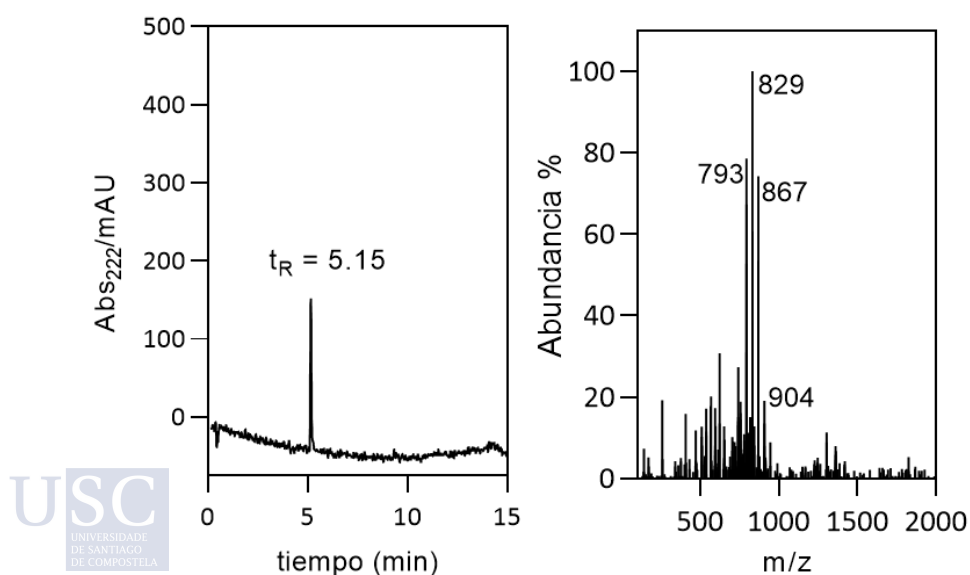


Figura 84: Izquierda, cromatograma del complejo [Ru(dppz)]-R<sub>8</sub> puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 5.15$  min.

## Parte Experimental

**UHPLC-MS (ESI):** (5-95% B,  $t_R = 5.15$  min) Calculado para  $C_{94}H_{131}N_{43}O_{11}Ru = 2140.0$ ; encontrado  $[M+3H+5TFAH]^{+3} = 904.33$ ;  $[M+3H+4TFAH]^{+3} = 866.33$ ;  $[M+3H+3TFAH]^{+3} = 829.0$ ;  $[M+3H+2TFAH]^{+3} = 793.33$ .

### Síntesis del complejo $[Ru(dppz)_2]$

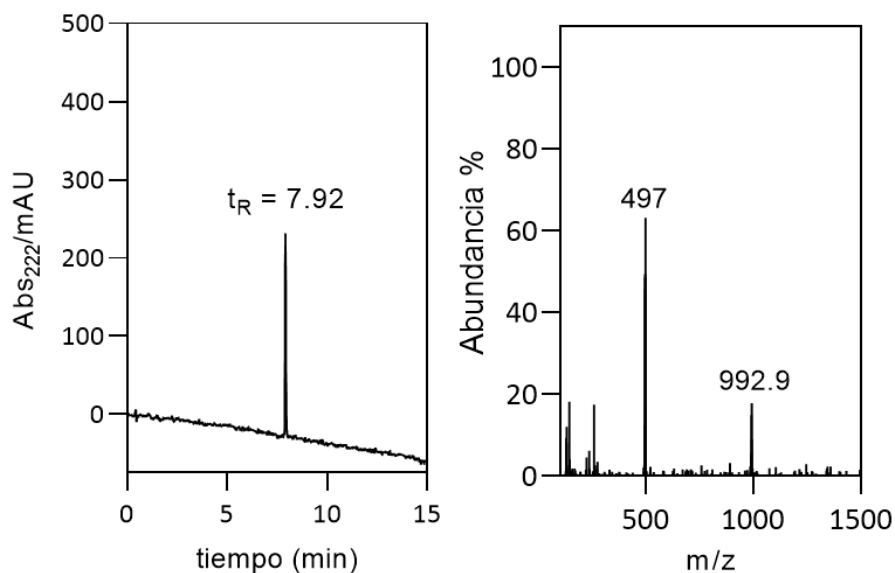


Figura 85: Izquierda, cromatograma del complejo  $[Ru(dppz)_2]$  puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 7.92$  min.

**UHPLC-MS (ESI):** (5-95% B,  $t_R = 7.92$  min) Calculado para  $C_{52}H_{37}N_{13}ORu = 991$ ; encontrado  $[M+H]^+ = 991.33$ ;  $[M+2H]^{+2} = 497.66$ .

### Síntesis del complejo $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_8$

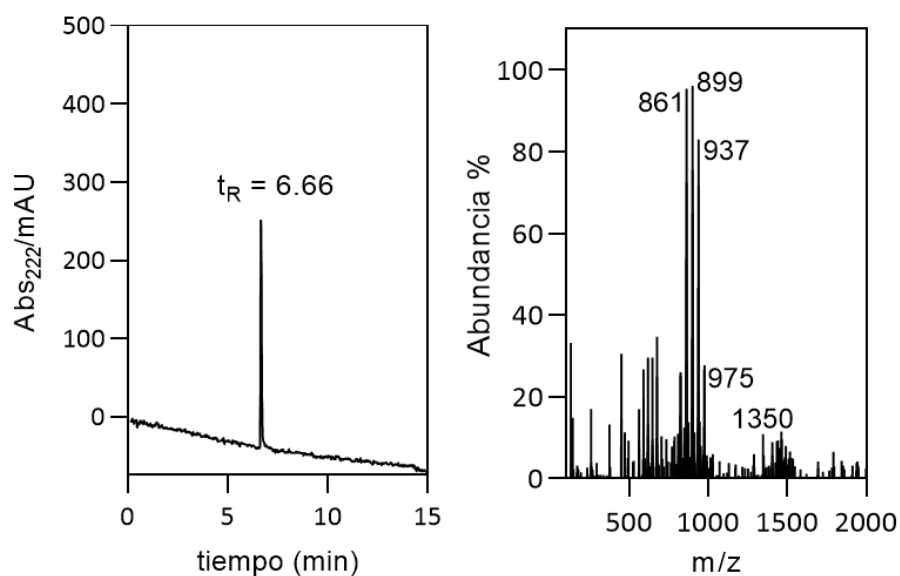


Figura 86: Izquierda, cromatograma del complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2]\text{-R}_8$  puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 6.66$  min.

**UHPLC-MS (ESI):** (5-95% B,  $t_R = 5.15$  min) Calculado para  $\text{C}_{100}\text{H}_{133}\text{N}_{45}\text{O}_{11}\text{Ru} = 2242.0$ ; encontrado  $[\text{M}+2\text{H}+4\text{TFAH}]^{+2} = 1350.00$ ;  $[\text{M}+3\text{H}+6\text{TFAH}]^{+3} = 975.33$ ;  $[\text{M}+3\text{H}+5\text{TFAH}]^{+3} = 937.0$ ;  $[\text{M}+3\text{H}+4\text{TFAH}]^{+3} = 899.00$ ;  $[\text{M}+3\text{H}+3\text{TFAH}]^{+3} = 861.66$ .

## Capítulo 2

### Síntesis del complejo [Ru(m-terp)]

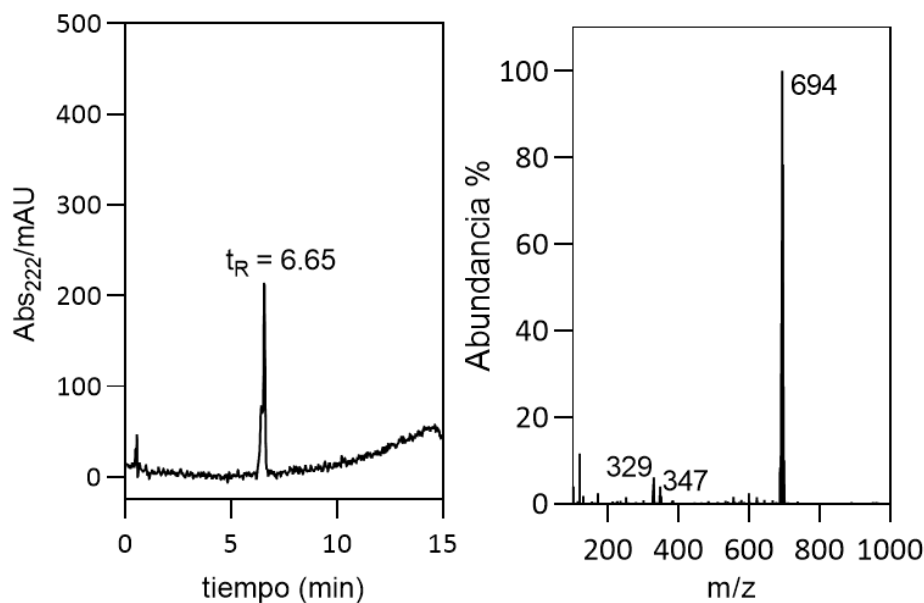


Figura 87: Izquierda, cromatograma del complejo [Ru(m-terp)] puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 6.66$  min.

**UHPLC-MS (ESI):** (5-95% B,  $t_R = 5.27$  min) Calculado para  $C_{34}H_{31}ClN_5O_3Ru = 694.12$ , encontrado  $[M+H]^+ = 694.9$ ;  $[M+2H]^{+2} = 347.1$ ;  $[M+2H-Cl]^{+2} = 329.0$ .

### Síntesis del complejo [Ru(biph)]

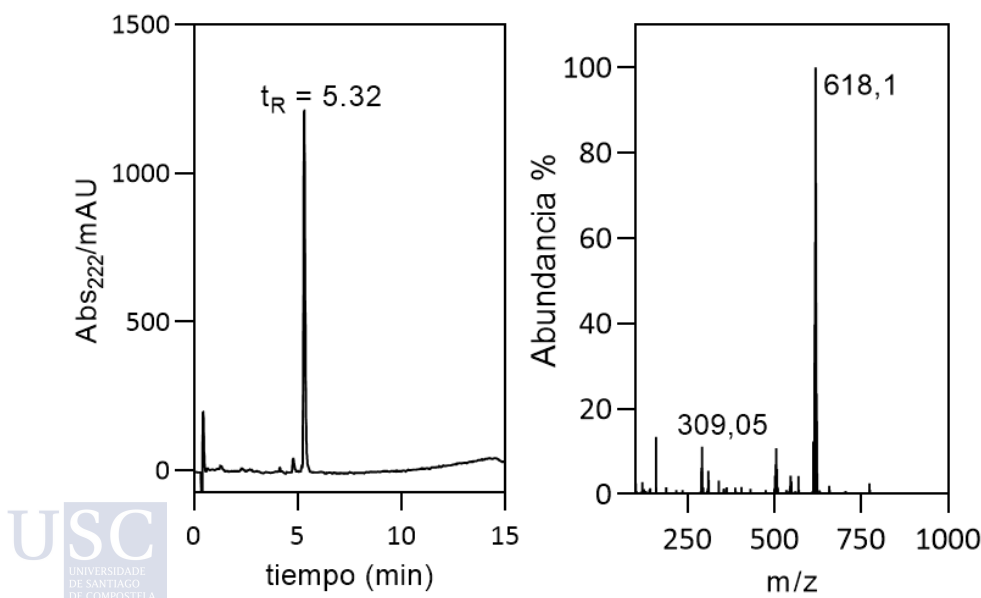


Figura 88: Izquierda, cromatograma del complejo [Ru(biph)] puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 6.66$  min. El pico cromatográfico correspondiente a  $t_R = 4.81$  min se corresponde con el acuo-complejo que se forma al momento de preparar la muestra.

**UHPLC-MS (ESI):** (5-95% B,  $t_R = 5.32$  min) Calculado para  $C_{28}H_{27}ClN_5O_3Ru = 618$ ; encontrado  $[M+H]^+ = 618.10$ ;  $[M+2H]^{+2} = 309.05$ .

### Síntesis del complejo [Ru(p-cym)]

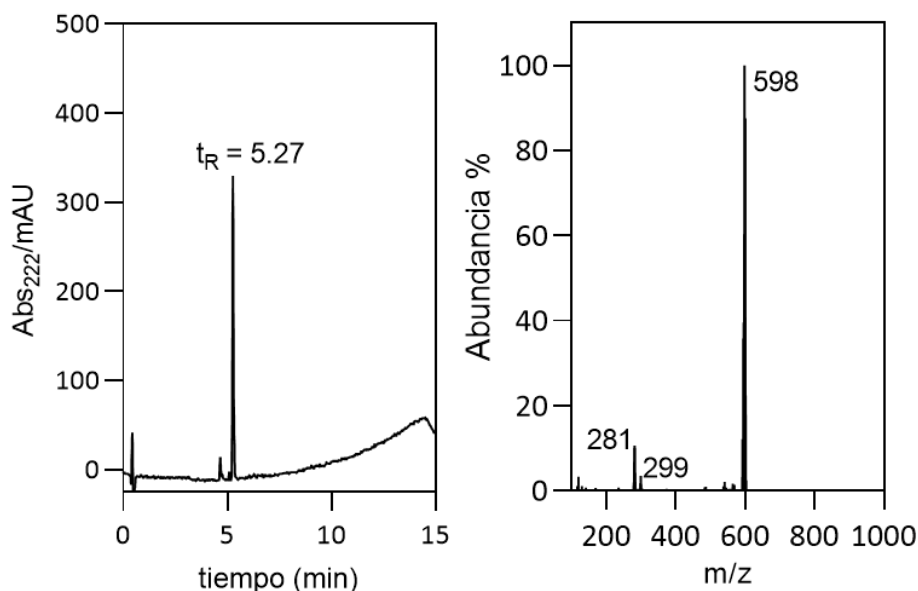


Figura 89: Izquierda, cromatograma del complejo [Ru(p-cym)] puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 5.27$  min. El pico cromatográfico correspondiente a  $t_R = 4.6$  min se corresponde con el acuo-complejo que se forma al momento de preparar la muestra.

**UHPLC-MS (ESI):** (5-95% B,  $t_R = 5.27$  min) Calculado para  $C_{26}H_{31}ClN_5O_3Ru = 598.12$ , encontrado  $[M+H]^+ = 598.9$ ;  $[M+2H]^{+2} = 299.1$ ;  $[M+2H-Cl]^{+2} = 281$ .

## Capítulo 3

### Síntesis de gp23.1-AAC

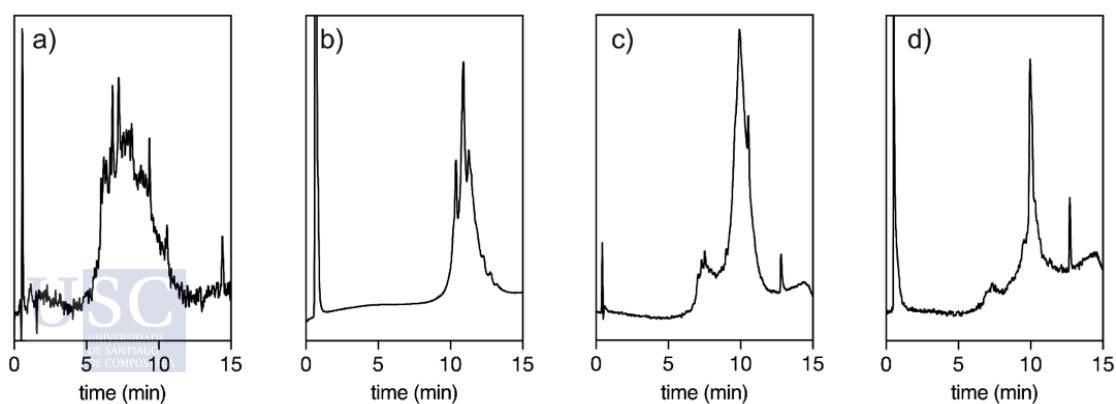


Figura 90: Cromatogramas de HPLC de la evolución de la síntesis del péptido gp23.1-AAC usando diferentes sistemas: a) cromatograma del crudo del péptido usando un sintetizador de péptidos automático; b) usando un sintetizador automático asistido por

## Parte Experimental

microondas; c) usando un sintetizador automático asistido por microondas + Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH (y la disolución de desprotección de 20% piperidina + 0.1M HOBt) para prevenir la formación de aspartimidas; d) usando el sintetizador asistido por microondas con la secuencia peptídica mutada gp23.I-AAC que nos permitió obtener el péptido final.

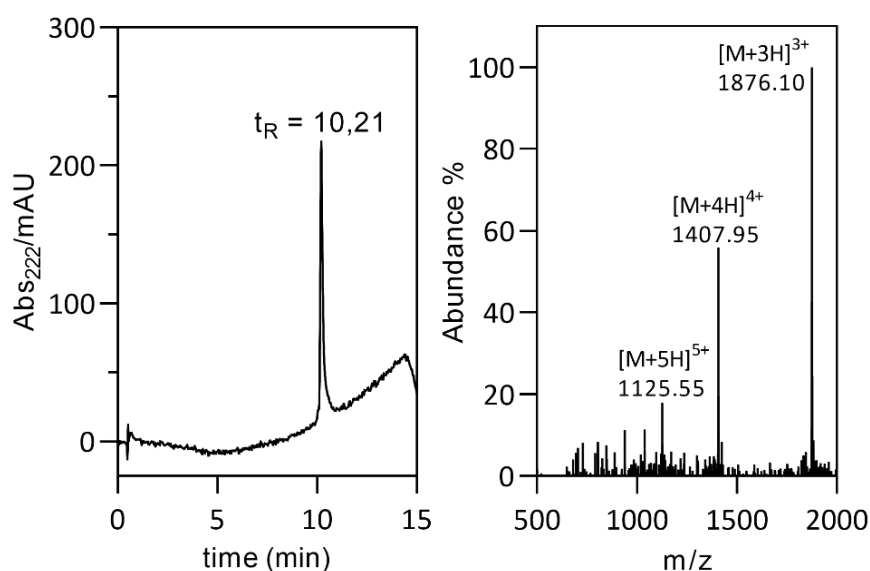


Figura 91: Izquierda, cromatograma péptido puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 10.21$ .

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z)  $[M+H]^+$  calculado. para  $C_{255}H_{378}N_{61}O_{81}S = 5626.23$ ; calculado para  $[M+3H]^{3+} = 1876.07$ ; encontrado = 1876.10; calculado para  $[M+4H]^{4+} = 1407.30$ ; encontrado = 1407.95; calculado para  $[M+5H]^{5+} = 1126.04$ ; encontrado = 1125.55.

**MALDI-TOF** (m/z)  $[M]^+$  calculado para  $C_{255}H_{377}N_{61}O_{81}S = 5625.23$ ; encontrado = 5625.0;  $[2M]^+$  calculado para  $C_{510}H_{752}N_{122}O_{162}S_2 = 11248.44$ ; encontrado 11249.4.

Rendimiento = 10 %

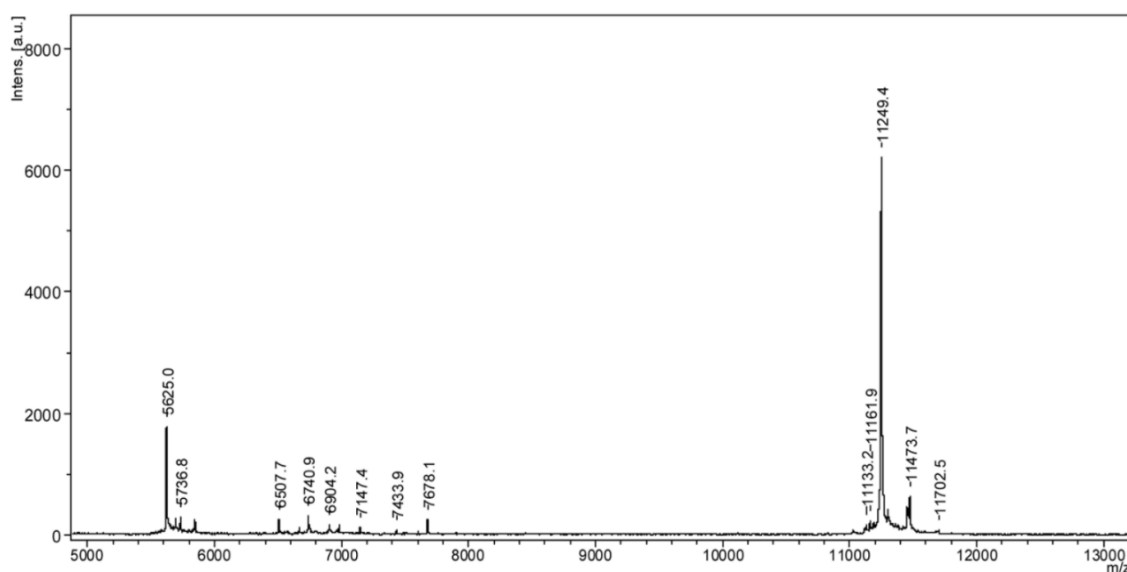


Figura 92: Espectro de MALDI-TOF del péptido gp23.1-AAC.

### Síntesis de (gp23.1-AAC)<sub>2</sub>

El péptido gp23.1-AAC anclado a la resina fue funcionalizado en el extremo N-terminal con una mezcla (3:4) de ácido 4-pentinoico y ácido azidoacético mediante condiciones estándar de acoplamiento. Después del acoplamiento la resina se secó a vacío. En un balón ámbar equipado con un agitador magnético se resuspendió la resina con la mezcla equimolar de péptidos en 20% de 4-metilpiperidina (seca) en DMF. Seguidamente se añadió CuI (55 mM, 5 eq) y ácido ascórbico (5 eq). La mezcla resultante se agitó muy lentamente (80 r.p.m.) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N<sub>2</sub> 18 h. Transcurrido el tiempo, la resina se lavó con DMF hasta que los filtrados fueron incoloros, posteriormente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x5 mL) y se secó a vacío. El desanclaje de la resina y la desprotección total se realizó siguiendo los protocolos estándar tratando de la resina con la disolución de TFA estándar. El crudo del péptido se obtuvo mediante precipitación con éter frío. El sólido resultante se liofilizó y se redisolvió en 10% de acetonitrilo/agua (15 mL). La disolución se basificó hasta un pH 7.5-8 con una disolución tampón de fosfato y el péptido se purificó a escala preparativa mediante HPLC de fase reversa. Las fracciones recogidas se liofilizaron y se almacenaron a -20°C. El péptido se identificó por HPLC-MS(ESI).

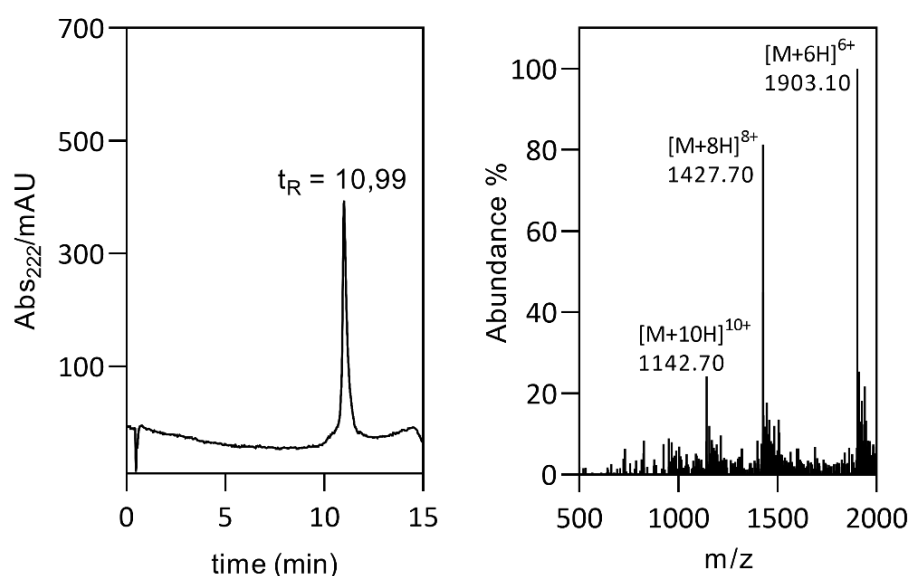


Figura 93: Izquierda, cromatograma del péptido puro. Derecha, espectro de masas del pico con  $t_R = 10.99$ .

**UHPLC-MS(ESI)** (m/z)  $[M+H]^+$  calculado. para  $C_{517}H_{759}N_{125}O_{164}S_2 = 11413.59$ ; calculado para  $[M+6H]^{6+} = 1903.27$ ; encontrado = 1903.10; calculado para  $[M+8H]^{8+} = 1477.69$ ; encontrado = 1427.70; calculado  $[M+10H]^{10+} = 1142.35$ ; encontrado = 1142.70.

### Síntesis de AuNC mediada por proteína

Los nanoclústeres de oro monodispersos (AuNCs) fueron sintetizados mediante un proceso de *protein templated synthesis* utilizando tiosulfato sódico como agente reductor suave.

Se pudieron obtener complejos proteína-AuNC satisfactoriamente usando un ratio estequiométrico de 0.5 mol de AuNC (1 nm de diámetro) por 1 mol de gp23.1 (hexámero). La masa de un nanoclúster ( $m_{AuNPs}$ ) se determinó como el producto de la densidad del núcleo ( $\rho_{Au} = 19.3 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) y el volumen del núcleo ( $V_{AuNC}$ ,  $5.24\cdot 10^{-22} \text{ cm}^3$  obtenido para una esfera de oro de 1 nm de diámetro). Así pues, la masa molar de un AuNP  $M_{AuNC}$  ( $6258 \text{ g mol}^{-1}$ ) puede ser calculada multiplicando la masa de un nanoclúster ( $m_{AuNC} 1\cdot 10^{-20} \text{ g}\cdot\text{NC}^{-1}$ ) por el número de Avogadro. Para la etapa de reducción del oro se utilizó un ratio de 1 mol de  $HAuCl_4$  por mol de  $Na_2S_2O_3$  (Tabla 4).

Un cierto volumen ( $V_2$ ) de una disolución 25 mM de tetracloroaurato (III) hidratado disuelta en  $H_2O$  miliQ ( $C_2$ ) fue añadido a la disolución de **gp23.1-AAC** ( $V_1$ ,  $C_1$ ) y agitado a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, el

volume correspondiente ( $V_3$ ) de una disolución 25 g/L de tiosulfato sódico disuelto en  $H_2O$  miliQ ( $C_3$ ) se añadió al complejo protein- $Au^{3+}$  y se agitó a  $1000\text{ rpm}$  hasta que se logró la formación de las nanopartículas. La reacción se completó en  $\sim 12\text{ h}$ . El color de la disolución cambia de amarillo pálido a marrón oscuro cuando el proceso de formación de las nanopartículas concluye. La reacción se puede monitorizar por UV-Vis. Debido al pequeño tamaño de los AuNCs ( $< 4\text{ nm}$ ) la banda de plasmón de superficie no aparece.

Tabla 4: Condiciones optimizadas para la obtención de los nanoclústeres de oro (AuNC) de tamaño uniforme.

gp23.1-AAC			AuNCs					HAuCl <sub>4</sub> (C <sub>2</sub> = 25 mM)		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (C <sub>3</sub> = 25 g/L)		
C <sub>1</sub> / $\mu$ M	V <sub>1</sub> / $\mu$ L	mol	r Au /nm	V AuNP/cc	m AuNP/g	NP/mol	NPs/g	Au/mol	V <sub>2</sub> / $\mu$ L	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /mol	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /g	V <sub>3</sub> $\mu$ L
100	100	$1 \cdot 10^{-8}$	0.5	$5.24 \cdot 10^{-22}$	$1 \cdot 10^{-20}$	$5 \cdot 10^{-9}$	$3.04 \cdot 10^{-5}$	$1.54 \cdot 10^{-7}$	6.2	$1.54 \cdot 10^{-7}$	$3.83 \cdot 10^{-5}$	1.53
485	100	$4.85 \cdot 10^{-8}$	0.5	$5.24 \cdot 10^{-22}$	$1 \cdot 10^{-20}$	$2.43 \cdot 10^{-8}$	$1.48 \cdot 10^{-4}$	$7.49 \cdot 10^{-7}$	30.0	$7.49 \cdot 10^{-7}$	$1.86 \cdot 10^{-4}$	7.44

### Imágenes (TEM)

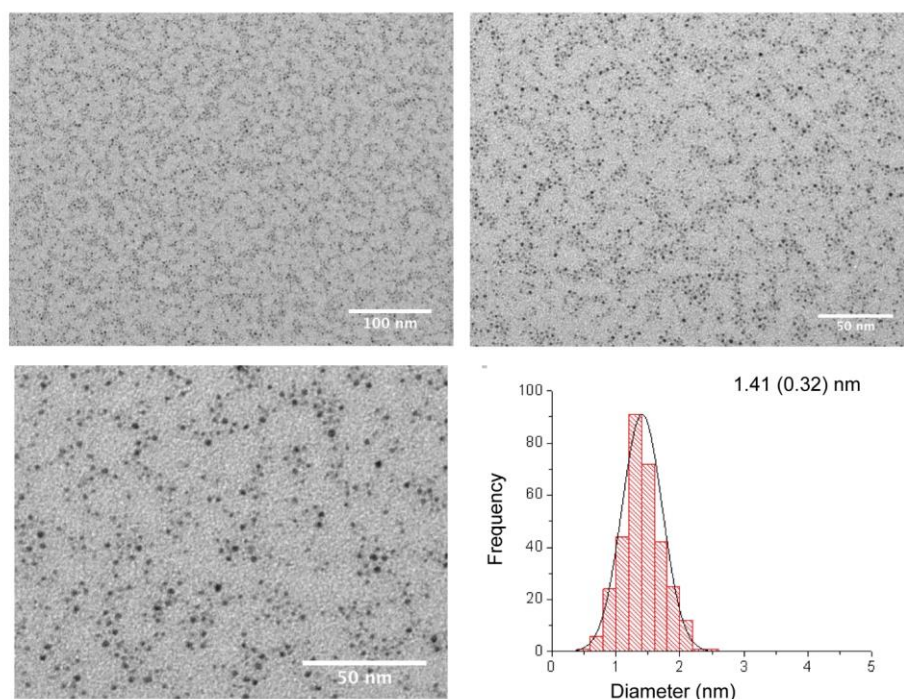


Figura 94: Micrografías representativas de TEM (JEOL JEM-1011 TEM) y el correspondiente histograma de la distribución numérica  $N$  ( $N= 300$ ) del diámetro del núcleo (dC) de AuNC@gp23.1-AAC determinado a partir de las imágenes de TEM,  $dC = (1.4 \pm 0.32)\text{ nm}$ .

## Parte Experimental

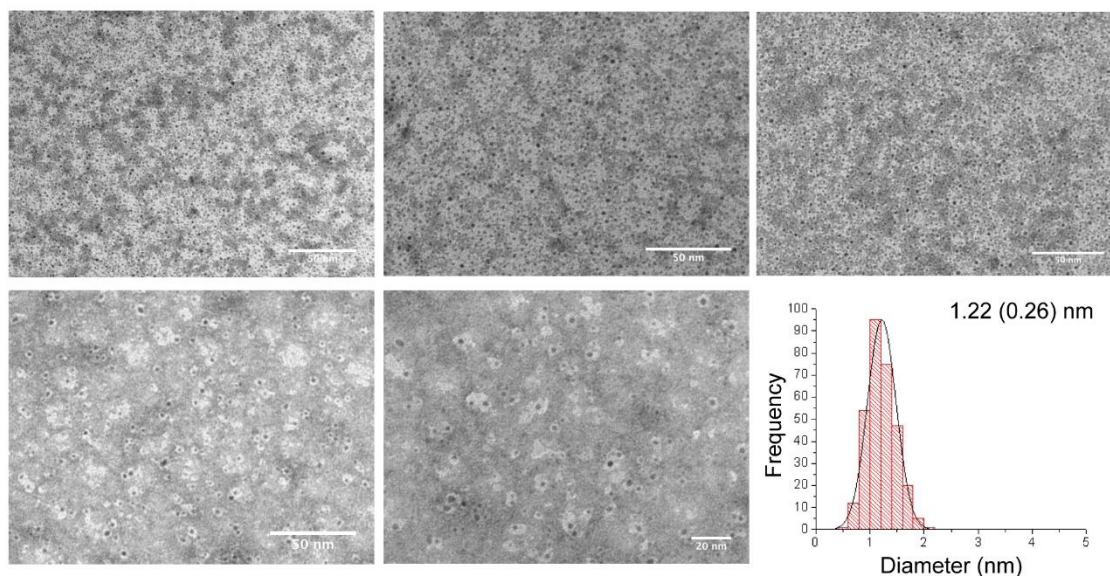


Figura 95: Micrografías representativas de TEM (JEOL JEM-1011 TEM) de AuNC@gp23.I-AAC después de la tinción negativa con acetato de uranilo y el correspondiente histograma de la distribución numérica N (N= 300) del diámetro del núcleo (dC) de AuNC determinado a partir de la imágenes de TEM,  $dC = (1.22 \pm 0.26)$  nm.

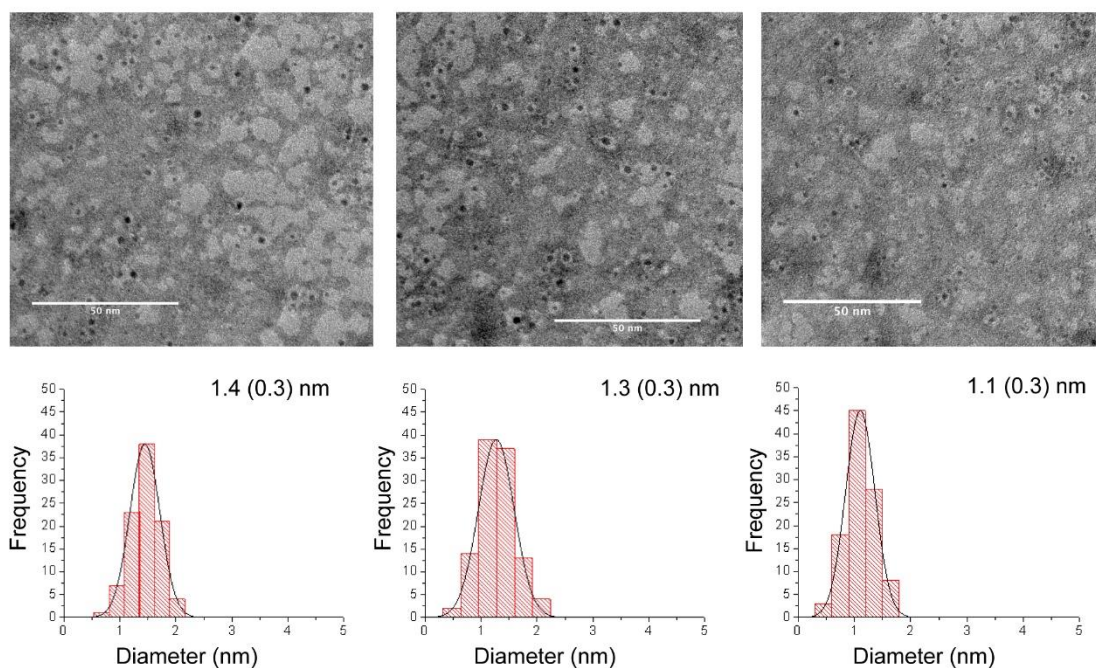


Figura 96: Micrografías representativas de TEM (ZEISS Libra 200 TEM) de AuNC@gp23.I-AAC después de la tinción negativa con acetato de uranilo y el correspondiente histograma de la distribución numérica N (N= 100) del diámetro del núcleo (dC) de AuNC determinado a partir de la imágenes de TEM,  $dC = (1.2 \pm 0.3)$  nm.

### Valoraciones de Fluorescencia de gp23.1-AAC

El espectro de fluorescencia de **gp23.1-AAC** (32  $\mu\text{M}$ ) en tampón fosfato (10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.5, 293 K) fue registrado para comprobar el máximo de la emisión del triptófano ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ). Los experimentos de anisotropía de fluorescencia se realizaron por dilución, partiendo de una disolución madre 1.5 mM del péptido de **gp23.1-AAC** en tampón fosfato (100 mM NaCl, pH 7.5, 293 K).

Los datos experimentales fueron ajustados con el programa DynaFit 4.0. El programa es totalmente gratuito para su uso académico en <http://www.biokin.com/dynafit/>. El programa requiere archivos de texto sin formato que contengan información sobre el modelo químico subyacente a los datos experimentales, los valores de los parámetros del modelo, así como las concentraciones iniciales de reactivos e información sobre la ubicación de los archivos. A continuación, se incluye un guión típico utilizado en el análisis, considerando la formación escalonada del dímero, luego el tetrámero y finalmente el toroide gp23.1 ACC hexamérico, junto con los datos en bruto del ajuste y los residuos correspondientes. Se obtuvieron resultados similares con rutas de ensamblaje alternativas (por ejemplo, monómero-dímero-trímero-hexamero).

```
[task]
task = fit
data = equilibria
```

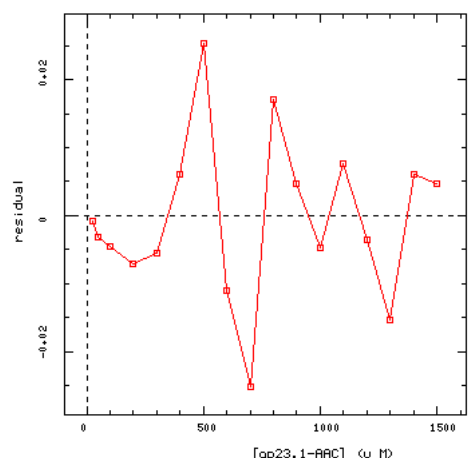
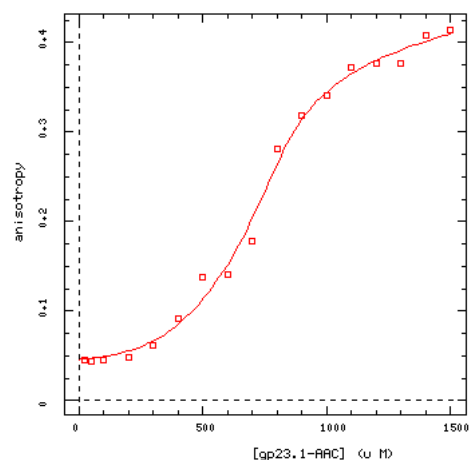
```
[mechanism]
gp + gp <=> gp2 : Kd1 dissociation
gp2 + gp2 <=> gp4 : Kd1 dissociation
gp4 + gp2 <=> gp6 : Kdc dissociation
gp6 + gp6 + gp6 + gp6 + gp6 <=> oligo : Kdo dissociation
```

```
[constants]
Kd1 = 10.0 ?
Kdc = 0.01 ?
Kdo = 10.0 ?
```

```
[responses]
intensive
gp = 1.0 ?
gp2 = 10.0 ?
gp4 = 100.0 ?
gp6 = 1000.0 ?
oligo = 100 * gp6
```

```
[data]
variable gp
offset auto
directory ./lab/david/gp231/data
sheet hexa.csv
columns 3
```

```
[output]
```



## Parte Experimental

directory ./lab/david/gp231/out

[settings]

{Output}

XAxisLabel = [gp23.1-AAC] (u M)

YAxisLabel = anisotropy

BlackBackground = n

### Espectroscopía de UV-Vis de AuNCs

Todos los espectros de UV-Vis correspondientes a la formación de AuNCs se realizaron en un espectrofotómetro de UV-Vis Biochrom Libra S60 usando una cubeta Hellma de cuarzo y 1 cm de paso óptico. Todos los espectros de absorción de los AuNCs fueron registrados en disolución acuosa.

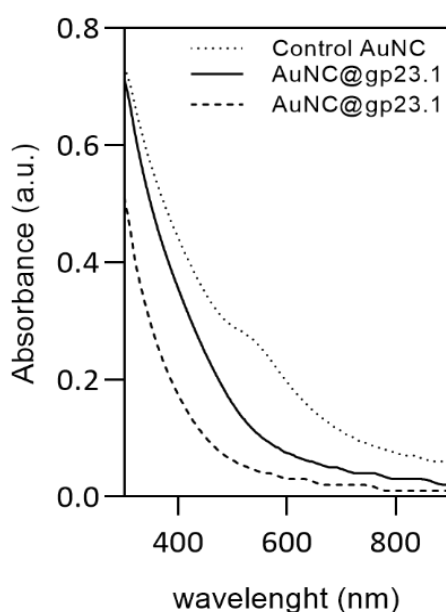


Figura 97: caracterización óptica de los AuNCs: espectro de absorción de UV-Vis de AuNC@gp23.1-AAC (línea sólida AuNC@gp23.1-AAC después de la síntesis; línea punteada AuNC@gp23.1-AAC después de un mes).

### Electroforesis de Agarosa

El gel de Agarosa se preparó disolviendo 1 % de agarosa (p/v) en tampón 0.5X TBE. Las muestras se diluyeron mezclándolas con el tampón de carga conteniendo 30 % (v/v) de glicerol, y posteriormente fueron cargadas en el gel y se corrieron usando un diferencial de potencia de 100 V (ENDUROTM 7.10 Horizontal Gel System).

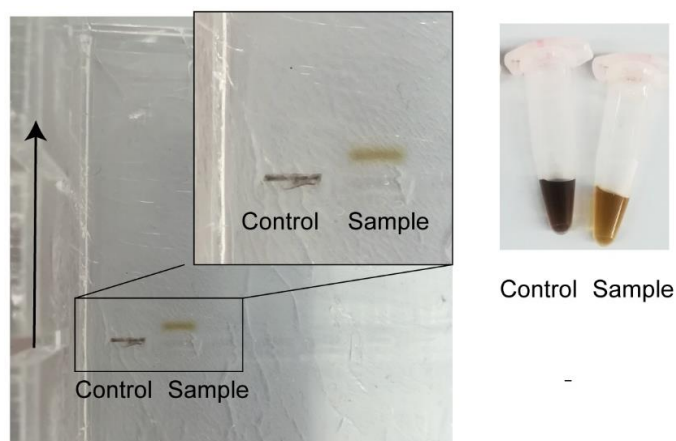


Figura 98: ensayo de gel de electroforesis de agarosa (1 %) donde se muestra: control (AuNCs sintetizadas sin proteína) y la muestra AuNC@gp23.1-AAC. En ausencia de la proteína, las partículas dejan de ser estables con el tiempo dando lugar a la agregación de estas.

### Síntesis in-situ de nanoclústeres de oro fotoluminiscentes

Los AuNCs estabilizados mediante proteína fueron sintetizadas siguiendo un protocolo modificado basado en un protocolo previamente publicado.<sup>378</sup> 1000  $\mu\text{L}$  de una disolución 50  $\mu\text{M}$  de gp23.1-AAC (forma monomérica) previamente reducidos con DTT fue incubada con  $\text{HAuCl}_4$  (2 eq de Au(III) por péptido) durante 30 min a 50  $^{\circ}\text{C}$ , para permitir la unión de los cationes metálicos a las cisteínas. Posteriormente la muestra se concentró usando un Amicon de ultracentrifugación (3k) llegando a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  para asegurarse la formación de los hexámeros. Posteriormente, la reducción se realizó usando un exceso de 100 eq de ascorbato sódico por equivalente de oro usado. La reacción se incubó a 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 72 h. La muestra se purificó usando una columna desaladora PD-10 en tampón fosfato. El siguió el mismo procedimiento para la muestra de monómero, pero saltándose la etapa de la concentración para evitar la formación de los hexámeros.

### Síntesis e inserción de los soluble naked nanoclusters (AuNKNCs)

Los AuNKNCs fueron sintetizados siguiendo un protocolo previamente descrito.<sup>379</sup> Brevemente, 440  $\mu\text{L}$  de NaOH 2M fueron mezclados con 860  $\mu\text{L}$  of agua nanopura y 25  $\mu\text{L}$  de una disolución 50 mM  $\text{HAuCl}_4$ . La disolución se dejó reaccionar durante 1 h a tasin agitación. Posteriormente, los AuNKNCs se

<sup>378</sup> A. Aires, I. Llarena, M. Moller, J. Castro-Smirnov, J. Cabanillas-Gonzalez, A. L. Cortajarena, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2019**, 58, 6214–6219.

<sup>379</sup> P. Londoño-Larrea, J. P. Vanegas, D. Cuaran-Acosta, E. Zaballos-García, J. Pérez-Prieto, *Chemistry* **2017**, 23, 8137–8141.

## Parte Experimental

concentraron usando un Amicon de ultrafiltración (3k) El pH se ajustó a 7.0. A continuación se añadieron 70  $\mu$ L de una disolución del hexámero **gp23.1-AAC** reducido previamente con DTT a una concentración de 600  $\mu$ M, sobre las AuNKNCS y se incubó la mezcla durante 16 h con agitación continua a ta. Finalmente, las muestras se filtraron nuevamente con el Amicon (3k).

### Caracterización óptica de los AuNKNCS

Los espectros de UV-Vis y fotoluminiscencia de los nanoclústeres luminiscentes coordinados a **gp23.1-AAC** fueron registrados usando un lector de placas SynergyH1 (Biotek) a una longitud de onda de excitación de 380 nm.

### PFGSE-NMR

Tabla 5: Datos PFGSE a) usando el software *Dynamicscenter* de Bruker; b) D. Veessler, S. Blangy, J. Lichière, M. Ortiz-Lombardía, P. Tavares, V. Campanacci and C. Cambillau, *Protein Sci.*, 2010, **19**, 1812–1816; c) W. S. Price, M. Nara and Y. Arata, *Biophys. Chem.*, 1997, **65**, 179–187; d) 20 mM Tris-d11/50 mM NaCl, pH 8.2 in D<sub>2</sub>O; e) 20 mM Tris-d11, pH 7.5 in D<sub>2</sub>O; f) usando la aproximación de intercambio-rápido y  $X_h = (D_{obs} - D_m)/(D_h - D_m)$ , donde  $D_m$  (coeficiente de difusión de monómero) es el coeficiente de difusión de una muestra 0.15 mM y  $D_h$  (coeficiente de difusión del hexámero) es el coeficiente de difusión de una muestra 0.9 mM.

	D (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	error <sup>a</sup>	r <sub>H</sub> (nm)	% hexamer <sup>f</sup>
1.50 mM <sup>d</sup>				100
Aromatic	8.355 10 <sup>-11</sup>	1.578 10 <sup>-14</sup>	2.37	100
Aliphatic	8.128 10 <sup>-11</sup>	6.465 10 <sup>-15</sup>	2.44	100
0.90 mM <sup>d</sup>				93
Aromatic	8.928 10 <sup>-11</sup>	2.575 10 <sup>-14</sup>	2.22	87
Aliphatic	8.142 10 <sup>-11</sup>	1.079 10 <sup>-14</sup>	2.43	99
0.30 mM <sup>d</sup>				73
Aromatic	9.669 10 <sup>-11</sup>	7.732 10 <sup>-14</sup>	2.05	70
Aliphatic	9.289 10 <sup>-11</sup>	3.261 10 <sup>-14</sup>	2.14	76
0.90 mM <sup>e</sup>				75
Aromatic	9.228 10 <sup>-11</sup>	1.249 10 <sup>-13</sup>	2.15	80
Aliphatic	9.646 10 <sup>-11</sup>	6.434 10 <sup>-14</sup>	2.06	69
0.60 mM <sup>e</sup>				57
Aromatic	1.015 10 <sup>-10</sup>	3.693 10 <sup>-14</sup>	1.95	59
Aliphatic	1.029 10 <sup>-10</sup>	1.614 10 <sup>-14</sup>	1.93	56
0.31 mM <sup>e</sup>				0
Aromatic	1.297 10 <sup>-10</sup>	1.748 10 <sup>-13</sup>	1.53	0
Aliphatic	1.317 10 <sup>-10</sup>	7.301 10 <sup>-14</sup>	1.51	0
0.15 mM <sup>e</sup>				0
Aromatic	1.273 10 <sup>-10</sup>	1.901 10 <sup>-13</sup>	1.56	0
Aliphatic	1.306 10 <sup>-10</sup>	7.926 10 <sup>-14</sup>	1.51	0
Hydrodynamic radius				
Hexamer (DLS, from crystal structure) <sup>b</sup>			2.77	
Hexamer (calcd. from R = (3Mw/4N)*protein) <sup>1/3</sup> ) <sup>c</sup>			2.18	
HydroNMR prediction				
Monomer (2xf6.pdb)	1.318 10 <sup>-10</sup>		1.51	
Hexamer (2xf5.pdb)	7.238 10 <sup>-10</sup>		2.74	

Todos los datos fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avanc 10-III 500 MHz equipado con una criosonda TCI de triple resonancia ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) de gradiente de campo pulsado en el eje z. Las muestras de RMN conteniendo el péptido **gp23.1-AAC** fueron preparadas usando Tris-d11 en  $\text{D}_2\text{O}$ . Las muestras más diluídas (0.35 y 0.15 mM) se obtuvieron por dilución de las muestras concentradas.

Para los experimentos de difusión de PFG-NMR, la fuerza del gradiente de campo (Gz) fue calibrado midiendo el coeficiente de difusión del  $\text{H}_2\text{O}$  residual en una muestra 100% de  $\text{H}_2\text{O}$  a 298.0 K. Se usó un coeficiente de difusión de  $.91 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para el cálculo de la fuerza del gradiente de campo. Se usó la secuencia de pulso `stebpgp1s19` junto con WATERGATE 3919 para la supresión de agua. El coeficiente de difusión, D, fue determinado ajustando las intensidades de los pico seleccionados o las integrales sobre un rango, a la siguiente ecuación  $I = I_0 \exp\{-\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D\}$  (Eq. 1), donde  $\gamma$  es el ratio giromagnético del protón y  $g$ ,  $\delta$  y  $\Delta$  son la amplitud, duración y separación del par único de pulsos de gradiente, respectivamente. Debido al uso de elementos de gradiente bipolar  $\Delta$  se reemplazó por  $\Delta - \tau_1/2$  en la Eq. 1, siendo  $\tau_1$  el intervalo de tiempo entre los pulsos de gradiente bipolar codificando o decodificando segmentos. Los ajustes a la Eq. 1 se realizaron usando Dynamics Center 2.5.7 de Bruker BioSpin.



## Anexos

### Publicaciones

#### Capítulo 1:

D. Bouzada, I. Salvadó, G. Barka, G. Rama, J. Martínez-Costas, R. Lorca, Á. Somoza, M. Melle-Franco, M. E. Vázquez, M. V. López, Selective G-quadruplex binding by oligoarginine-Ru (dppz) metallopeptides. *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 658–661. DOI: 10.1039/C7CC08286J.

<https://pubs.rsc.org/fi/content/articlehtml/2018/cc/c7cc08286j>

Contribución: Síntesis de los compuestos estudiados; estudios de espectroscopía (UV-Vis, CD)

Índice de impacto: 5.996 (2019)

Categoría: Chemistry (miscellaneous), Q1

Índice-H: 333

Ranking: 1570

SCImago Journal Rank (SJR): 1.837

Editorial: Royal Society of Chemistry

ISSN: 1364-548X

**Autorización de la revista:** La revista *Chem. Commun.* considera que no es necesario pedir autorización para el uso del artículo en una tesis si se es autor, tal y como indican en el apartado Request Permissions

(<https://pubs.rsc.org/fi/content/articlelanding/2018/cc/c7cc08286j/unauth>):

“If you are the author of this article, you do not need to request permission to reproduce figures and diagrams provided correct acknowledgement is given. If you want to reproduce the whole article in a third-party publication (**excluding**

Anexos

**your thesis/dissertation for which permission is not required)** please go to the [Copyright Clearance Center request page](#).”

