

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FACULTADE DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**RECONOCIMIENTO DE SECUENCIAS DE ADN:
NUEVOS AGENTES ESPECÍFICOS Y SENSORES
FLUORESCENTES**

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

Olalla Vázquez Vázquez

Santiago de Compostela, Julio 2010

JOSÉ LUIS MASCAREÑAS CID, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y MARCO EUGENIO VÁZQUEZ SENTÍS, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICAN: que la memoria adjunta titulada *Reconocimiento de Secuencias de ADN: Nuevos Agentes Específicos y Sensores Fluorescentes*, que, para optar al grado de Doctor en Química presenta Olalla Vázquez Vázquez, ha sido realizada bajo su dirección en los laboratorios del departamento de Química Orgánica de esta universidad.

Considerando que constituye trabajo de tesis, se autoriza su presentación en la Universidade de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela a 18 de Mayo de 2010

Fdo: José Luis Mascareñas Cid

Fdo: M. Eugenio Vázquez Sentís

A mi familia

Agradecimientos

A vida non é máis que unha viaxe onde a sucesión de feitos e casualidades fan que marches por un camiño ou por outro. O máis importante e gratificante desa viaxe son as persoas que atopas na beira e coas que compartes momentos difíciles de esquecer. A viaxe vaite definindo apañando un pouco delas no largo percorrer...por iso, antes de nada, quixera agradecer a todas esas persoas que dun xeito ou doutro colaboraron nesta Tese.

Ós meus directores de Tese, Jose Luis e Eugenio, pola súa axuda e disposición constante, e sobre todo, pola confianza depositada en min para abordar este traballo. Deles lévome o seu entusiasmo pola investigación.

Ós profesores Javier Benavente e José Martínez Costas, sen a súa colaboración moitos deste proxectos non sairían á luz, pero especialmente quería agradecerlles a eles, e a toda a xente do seu grupo, (Rebe, Javi, Lisa, Marcelo, Alberto, Iria, Lorena...) terme acollido coma unha máis ó carón da centrífuga. Ó profesor Mosquera, ós investigadores Rivas e van Raaij e os doutores Guardado e Luque polo traballo conxunto realizado.

Ós profesores Gregory Verdine e Oliver Seitz por brindarme a posibilidade de facer unha estadía no seus respectivos laboratorios. O meu tempo en Harvard non sería o mesmo sen Lourdiñas e Charisse. Sen dúbida a miña estadía en Berlín non ten sentido sen Julia, Tom, Elke, Haase, Hendrik e sobre todo sen Anne... *ich bin halbe Deutsche!*

Ós profesores Luis Castedo, Concepción Bello, Gabriel Tojo e Juan Granja por esas discusións tan fructíferas dos seminarios.

Ós meus compañeiros de Orgánica, son moitas as horas que pasamos alí “pechados” e definitivamente, sen eles non sería doado de aturar. Quixera mostrar a miña gratitude a todos aqueles que pasaron e ós que aínda seguen no grupo JL...*concepto manada*. Ós de Síntesis, sempre cunha solución para as nosas reaccións: Fernando, Moi, Juan, Gaurav, Isaac, Lucía, Lara, Marisel, Paloma, Helio... e ós de Bio: Vero, Elena, Suso, Borja, Ceci, coa súa alegría contaxiosa, Adrián, o meu último compañeiro de mesa, para ti a canción número un. Ós inorgánicos: Gus, Jose Manual e Adrián. Ó resto da xente do Consello en xeral, e en especial: Eldara, cantas horiñas botamos xuntas estudiando, Cris, Rober, Vero, Chus, Iago, Antonio, Antía, César, Jorge, Alex, Sonia, gracias pola túa valiosa axuda nos RMNs iniciáis, Lorena, compi de liofilizador, María e Sergio, sen eles dous o laboratorio sería un auténtico caos, gracias pola vosa paciencia. Dentro dos meus compañeiros quero agradecer especialmente a Juan, Bea e Mateo. Juan por ser o meu mentor inicial, polas súas ensinanzas e sobre todo, por seguir estando presente a pesar da distancia, Hey Joe...temos que repetir ese Road Trip! Beiña, qué grande a nosa aventura americana, lévome un grato recordo. A Mateo, a súa autenticidade e vitalidade foron moi importantes na última etapa deste camiño.

Non quixera deixar atrás a toda esa xente que aínda que non están relacionadas coa química sen eles, todo isto non sería posible. A Soniña, todo se soluciona cun bo café. Ás rapazas de pandeireta: Noa, Carmen e Rosa, hai que ver que desestresante é o pum-tacatá. Ós meus amigos de Pontevedra: Ana, Inma, Telmo, Óscar, Touri, Juan, Marta, Pablo, Javi, Maribel, Julito, Irene e Lu gracias por manterme nesa burbulliña onde todo está e segue coma sempre....

Por último, agradecer a Camilo, ó meu irmán, á miña avoa, ó meu pai e á miña nai, todo, porque todo é TODO.

*Damit das Mögliche entsteht,
muss immer wieder das Unmögliche versucht werden*

HERMANN HESSE (Septiembre, 1960)

ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos v

INTRODUCCIÓN

Química Biológica: la frontera entre la Química y la Biología 3

Expresión genética: bases moleculares 5

Conceptos generales 6

Regulación de la expresión genética: factores de transcripción 8

Factores de transcripción como dianas terapéuticas: cáncer 12

Interacción intermolecular entre los factores de transcripción y el ADN 16

Estructura del ADN y sus implicaciones en el reconocimiento 16

Dominios de unión de los factores de transcripción 18

Consideraciones generales de las interacciones intermoleculares entre los factores de transcripción y el ADN 21

Versiones en miniatura de factores de transcripción 24

Modificaciones sintéticas de factores de transcripción: GCN4 24

Híbridos monoméricos de la región básica de GCN4 25

Interacción intermolecular entre moléculas pequeñas y el ADN 29

Consideraciones generales 29

Interacción en el surco menor: polipirroles y bis(benzamidinios) 32

Sensores fluorescentes de ADN de doble cadena 35

Fluorescencia 35

Métodos indirectos de detección de ADN de doble cadena 36

Métodos directos de detección de ADN de doble cadena 37

Bibliografía 41

OBJETIVOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reconocimiento de ADN mediante conjugados entre regiones básicas bZIP y tripirroles: influencia de la estructura del conector en la interacción 53

- Objetivo y diseño* 53
- Síntesis* 54
- Estudio de la interacción con el ADN* 61
- Comparación del híbrido A₄ con el híbrido A₃* 67
- Conclusiones* 69
- Bibliografía* 70

Estudios de internalización celular 71

- Objetivo y diseño* 71
- Síntesis* 73
- Estudios de internalización celular* 85
- Interacción con el ADN* 91
- Conclusiones* 95
- Estudios de citotoxicidad* 96
- Estudios biológicos adicionales: leishmaniasis* 97
- Bibliografía* 100

Conjugados entre dominios de unión de dedos de cinc y tripirroles 103

- Objetivo y diseño* 103
- Síntesis* 105
- Estudio del plegamiento y la geometría del dominio Cys₂His₂* 112
- Estudio general de la interacción de los híbridos con el ADN* 116
- El papel del cinc en el reconocimiento* 119
- Estudio de la afinidad y la selectividad en la interacción del híbrido C₂ con el ADN* 123
- Conclusiones* 127
- Estudios cristalográficos preliminares sobre el complejo del ADN con el híbrido C₂* 128
- Bibliografía* 131

Aza–bis(benzamidinios): nuevos agentes fluorogénicos para unir ADN 133

- Objetivo y diseño* 133
- Síntesis* 135
- Estudios de fluorescencia: dependencia del medio* 137
- Interacción de BAPPA con el ADN* 139
- Ensayos de competición con moléculas no fluorescentes* 145
- Conclusiones* 149
- Bibliografía* 150

Modificación funcional de BAPPA: sensibilización de lantánidos y FRET 151

- Objetivo y diseño 151*
- Síntesis 153*
- Interacción del derivado hidroxibAPPA **43** con el ADN 156*
- Estudios de los conjugados DOTA[Ln³⁺] 158*
- Proceso de transferencia de energía: conjugado BAPPA–cumarina 160*
- Conclusiones 165*
- Estudios iniciales de internalización celular y actividad 166*
- Bibliografía 169*

Anclajes alternativos en el surco menor: híbridos bis(benzamidinos) 171

- Objetivo y diseño 171*
- Síntesis 172*
- Interacción del derivado aminoBAPPA **56** con el ADN 178*
- Estudio de la interacción del híbrido **A₆** con el ADN 180*
- Estudios preliminares de la interacción del híbrido **C₆** con el ADN 183*
- Conclusiones 186*
- Bibliografía 187*

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos 191

Aparatos y procedimientos 193

- Procedimiento para los análisis de dicroísmo circular 193*
- Procedimiento para la espectroscopía de fluorescencia 193*
- Procedimiento para la espectroscopía de UV–visible 194*
- Procedimiento para las electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida 196*
- Procedimiento para los estudios de internalización celular 197*

Determinación de las constantes de afinidad 199

- Determinación de la constante de afinidad mediante los experimentos radiactivos de PAGE 199*
- Determinación de la constante de afinidad mediante fluorescencia 199*
- Determinación de la constante de afinidad mediante experimentos de competición 200*

Reacciones 202

- Síntesis del esqueleto tripirrólico 202*
- Síntesis de los conectores alquílicos 214*
- Síntesis de las unidades tripirrólicas modificadas 240*
- Síntesis de los compuestos tipo bis(benzamidinio) 254*

Síntesis de los compuestos tipo bis(benzoguanidinio) 276
Síntesis de los compuestos bis(benzamidinios) modificados 284
Síntesis de los péptidos 295
Síntesis de los híbridos peptídicos 304

Bibliografía 316

Abreviaturas y acrónimos

δ	Desplazamiento químico (ppm)
ϵ	Coefficiente de extinción
$\bar{\nu}$	Número de onda
μ	Momento dipolar
μL	Microlitro
μM	Micromolar
θ_{MRE}	Elipticidad molar por residuo
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
A	Adenina
aa	Aminoácido
Aba	<i>p</i> -Acetamidobenzoico
Ac	Acetilo
Ac_2O	Anhídrido acético
AcCl	Cloruro de acetilo
AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etilo
Ahex	Ácido 6-aminohexanoico
Alloc	Aliloxicarbonil
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNpol	ARN polimerasa
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosíntrifosfato
ba	Banda ancha
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
Boc_2O	di- <i>tert</i> -Butildicarbonato
BSA	Seroalbúmina bovina
Bn	Bencilo

^t Bu	<i>tert</i> -Butilo
c	Cuartete
C	Citosina
calcd.	Calculada
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CPP	Péptidos penetrantes de células
CTD	Dominio C-terminal
d	Doblete
Da	Dalton
DABCO	1, 4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	4', 6'-diamidino-2-fenilindol
DC	Dicroísmo circular
DECP	Cianofosfonato de dietilo
DEDTC	Dietilditiocarbamato
DIEA	<i>N, N'</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	<i>N, N'</i> -Dimetilaminopiridina
DMEM	Medio modificado de águila de Dulbecco
DMF	<i>N, N'</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMP	Peryodano de Dess Martin
DPE	Elemento después del promotor
dsADN	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
DSC	Carbonato de <i>N, N</i> -disuccinimidilo
DTNB	Ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DTT	1, 4-Diotreitól
EDT	1, 2-Etanoditiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectroscopía de masas

EM/HPLC–FR	Espectroscopía de masas y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
EMSA	Ensayos de desplazamiento en gel
equiv	Equivalente
ESI	Espectrometría de masas de electroespray
Et	Etilo
Et ₃ N	Trietilamina
Et ₂ O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
FAB	Ionización por bombardeo con átomos (o iones) rápidos
FBS	Suero de bovino fetal
FID	Método de desplazamiento de un intercalante fluorescente
FITC	Isocianato de fluoresceína
Flu	Fluoresceína
Fmoc	9–Fluorenilmetoxycarbonilo
FR	Fase reversa
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
FT	Factor de transcripción
FTG	Factor de transcripción general o basal
G	Guanina
h	Hora
HAT	Histona acetiltransferasa
HATU	Hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1, 2, 3-tiazolo[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metil metanaminio
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il) dimetilamino metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HEPES	Ácido <i>N</i> -2-Hidroxiethylpiperacín- <i>N</i> '-2-etanosulfónico
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HLH	Familia de factores de transcripción Hélice-lazo-hélice
HTH	Familia de factores de transcripción Hélice-giro-hélice
IE	Impacto electrónico

Im	Imidazol
Inr	Elemento iniciador
IQ	Ionización química
ISC	Cruce de sistemas
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K_a	Constante de asociación
K_D	Constante de disociación
M	Molar
m	Multiplete
MALDI	Ionización mediante desorción por láser asistida mediante matriz
Me	Metilo
CD ₃ OD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertzios
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MPD	2–metil–2, 4–pentanediol
MTT	Sal de Tetrazolio
m/z	Masa/carga
N/A	No aplicado
N/C	No calculado
NLS	Elemento de señalización nuclear
NLS m	Elemento de señalización nuclear mutado
nm	Nanómetro
NHR	Receptores hormonales nucleares
nM	Nanomolar
NP–40	Octiletoxipolietoxietanol

OMS	Organización mundial de la salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón de sales de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pd/C	Paladio sobre carbón activo
PEG	Polietilén glicol
pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo
Pi	Bases nitrogenadas pirimidínicas
PIC	Complejo de preiniciación
PNA	Ácido nucleico peptídico
ppm	Partes por millón
Pu	Bases nitrogenadas púricas
Py	Pirrol
PyAOP	Hexafluorofosfato de fosfonio de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris (pirrolidino)
quin	Quintuplete
RMN	Resonancia magnética nuclear
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RXR	Receptor retinoideo
s	Singlete
ssADN	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
SNP	Poliformismo de un único nucleótido
t	Triplete
T	Timina
t.a.	Temperatura ambiente
TBE	Disolución de tris-borato-EDTA
TBP	Proteína de unión a TATA
TCEP	Triscarboxietilfosfina
TE	Transferencia electrónica

TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
TMEDA	<i>N, N, N', N'</i> -Tetrametiletilendiamina
TMS	Tetrametilsilano
TNBS	Ácido 2, 4, 6-Trinitrobenceno sulfónico
TOF	Analizador de tiempo de vuelo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TRP	Fragmento tripirrólico
Trt	Trifenilmetilo (tritilo)
UV	Ultravioleta
VDR	Receptor nuclear de la vitamina D3
ZFP	Familia de factores de transcripción de los dedos de cinc

INTRODUCCIÓN

Química Biológica: la frontera entre la Química y la Biología

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

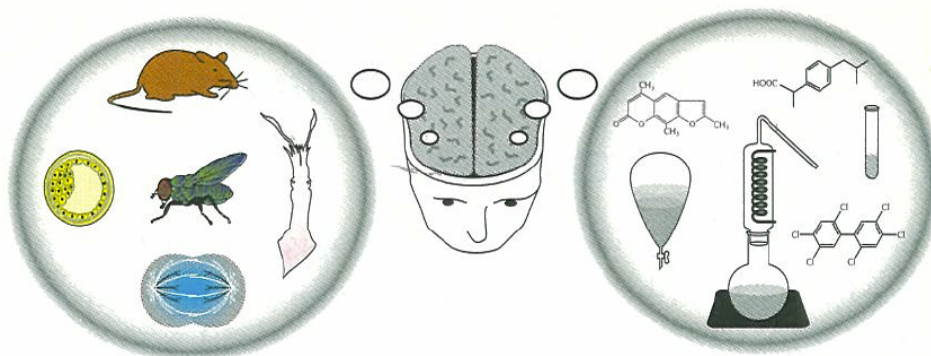


Figura 1. Representación clásica de la diferencia entre la biología y la química.

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

Las transformaciones ocurridas en la segunda mitad del siglo XX crearon un punto de inflexión en las ciencias de la vida. Los biólogos descifraron el código genético humano [1] y determinaron la estructura y la relación íntima entre numerosas biomacromoléculas importantes. Los químicos, por su parte, desarrollaron la metodología adecuada para sintetizar moléculas de relevancia biológica, tanto moléculas pequeñas, como macromoléculas o (bio)polímeros (proteínas [2] y ácidos nucleicos [3]). Esto, junto con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis, como la secuenciación de ADN, la tecnología de *arrays*, los ensayos masivos, PCR... y los avances en las técnicas de difracción de rayos X, RMN, análisis de masas, e imagen, permitieron estudiar con detalle los procesos biológicos y bioquímicos, *in vitro*, *in vivo* e, incluso, en organismos vivos. Todos estos acontecimientos impulsaron el desvanecimiento de las fronteras clásicas de la ciencia y ahora la química se presenta como el lenguaje esencial para entender de forma racional las transformaciones que ocurren en los seres vivos [4], ya que **los procesos biológicos no son más que procesos químicos** y por tanto, pueden y deben ser estudiados a nivel molecular.

La acción conjunta de la química y la biología en la elucidación de las bases moleculares de los procesos biológicos conlleva una serie de ventajas. Así, por ejemplo, a pesar del incuestionable valor del desciframiento del código genético, este hito no ha hecho más que poner sobre la mesa una serie de nuevos retos. El conocimiento de los genes es muy

relevante, pero no suficiente para interpretar toda esa información en un contexto celular y relacionarlo con las consecuencias bioquímicas últimas. De hecho, dicho conocimiento no determina qué proteínas serán expresadas, ni bajo qué condiciones, ni tampoco el destino final de la célula. En este contexto la **química** juega un papel fundamental al proporcionar las **herramientas para entender las interacciones entre biomoléculas y para intentar manipularlas de forma programada**.

Otra limitación de los métodos biológicos y bioquímicos clásicos reside en las graves dificultades para estudiar en tiempo real los cambios celulares, aunque no por ello estos métodos deben ser menospreciados, dado la utilidad que tuvieron en el descubrimiento de las rutas bioquímicas. Los sistemas vivos son dinámicos y las aproximaciones químicas mediante el uso de moléculas sintetizadas a medida como, por ejemplo, compuestos enmascarados o modulables mediante señales externas, permiten introducir **parámetros de control espacial y temporal** para estudiar los fenómenos biológicos [5].

En la actualidad se ha experimentado un gran interés por esta disciplina conjunta acuñada recientemente con el término *Química Biológica (Chemical Biology)* [6]. Se ha definido como la rama de **la ciencia enfocada al desarrollo y uso de técnicas químicas para estudiar los fenómenos biológicos** [7]. De todos modos, es importante resaltar que esta definición debe entenderse de forma sinérgica, como el uso de la química para avanzar en el entendimiento molecular de la biología y el aprovechamiento de los conocimientos biológicos adquiridos para avanzar en los estudios de tipo químico [8]. El carácter interdisciplinar de esta ciencia hace muy complicado establecer un campo exacto de acción [9]. Abarca materias tan diversas como el **reconocimiento biomolecular**, la **catálisis enzimática**, la **señalización celular**, los **procesos de internalización y transporte**, la **síntesis de biomoléculas** o la **regulación de la expresión genética**.

El concepto de química biológica parece algo totalmente novedoso y una prueba contundente del impacto y potencial de este área en la actualidad es la aparición, a partir de la década de los noventa, de varias revistas especializadas en esta temática tales como: *Chemistry & Biology*, *ChemBioChem*, *Current Opinion in Chemical Biology* y otras aun más recientes como *ACS Chemical Biology* y *Nature Chemical Biology*. Asimismo, se han incorporado programas específicos de formación en universidades [10] e, incluso, algunos departamentos de gran relevancia mundial, han cambiado su nombre para incluir en él, el nuevo término *Chemical Biology*. De todos modos, dicho concepto no es algo completamente original de nuestros tiempos, pues la misma idea básica ya se había puesto en práctica a finales del siglo XVIII [11]. El primer químico biológico, puede que haya sido el descubridor del óxido de nitroso, Joseph Priestley, (1733–1804) quien para aumentar los conocimientos de la química de dicho gas, incubaba ratones con él. Durante el siglo XIX hubo algunos investigadores más que siguieron esta filosofía interdisciplinar de la ciencia, pero también es cierto que no ha sido hasta nuestros días cuando la química biológica ha conocido todo su esplendor.

Expresión genética: bases moleculares

La naturaleza de los organismos vivos está determinada por sus genes, esto es, por secuencias concretas de ácidos nucleicos que son necesarias para la síntesis de un polipéptido funcional [12]. La transferencia de esta información genética de una generación a la siguiente es una cuestión fundamental para la vida. El flujo de la información genética fue postulado por Francis Crick en la reunión internacional de la *Society of Experimental Biology* en 1957 y se publicó un año después [13]. La idea básica de este postulado, denominado por él mismo como *Dogma Central*,ⁱ está esquematizada en la figura 2.

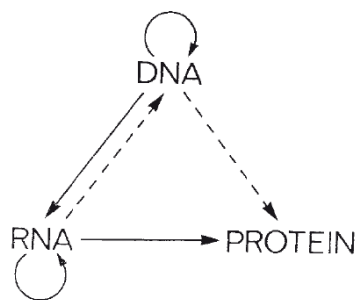


Figura 2. Esquema original publicado por Francis Crick: las líneas continuas representan transferencias permitidas, las punteadas posibles y la ausencia de líneas define las prohibidas según el dogma central.

Según el esquema de Francis Crick la información genética se transcribe de manera unidireccional desde el ADN hasta las proteínas a través del ARN. El dogma central otorgaba al ADN un papel clave en la biología y tuvo una gran repercusión ya que sirvió como un punto de referencia para los defensores de la nueva biología molecular a finales de la década de 1950. No obstante, también fue objeto de muchas críticas, puesto que, de acuerdo con su planteamiento, la información se traduce en proteínas y éstas no pueden ser modificadas, ni afectar a los genes. La unidireccionalidad del proceso fue y sigue siendo uno de los temas de mayor controversia provocando, incluso, que el propio Crick tuviera que volver a la idea original, en 1970, y explicar su interpretación en un artículo completo [14].

Si bien es cuanto menos curioso que Francis Crick usase el término *dogma* para designar una hipótesis científica, lo cierto es que durante algún tiempo su idea adquirió cierta dimensión de verdad absoluta [15]. Sin embargo, desde la formulación inicial del dogma central hasta nuestros días, se han efectuado algunas correcciones del esquema original [16]. Asimismo, se ha demostrado la acción reguladora de las proteínas sobre el ADN, la existencia de proteínas transmisibles (priones), el descubrimiento de que el 98% de la producción transcripcional está constituida por *intrones* y otros ARN sin función codificadora, ARN que desempeña funciones enzimáticas (*ribozimas*), ARN de interferencia, etc.

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

Conceptos generales

La entrada en la era postgenómica centra las investigaciones bioquímicas en la comprensión de las funciones de los productos de nuestros genes y en el modo en que éstos son regulados. En este capítulo se abordarán los aspectos generales de la expresión genética en las células eucariotas desde una perspectiva molecular [17].

El término *expresión genética* se refiere al proceso completo mediante el cual la información contenida en un gen es decodificada, dando lugar a una determinada proteína. De forma simplificada y partiendo de la replicación del ADN, el proceso consta de dos etapas básicas: transcripción y traducción [18]. Sin embargo, a nivel molecular ocurren muchos procesos dentro de cada etapa general.

El genoma celular está organizado en cromosomas y cada uno de ellos contiene una única molécula de ADN lineal (10^7 – 10^9 pb). A diferencia de lo que ocurre en los organismos procariontes, los cromosomas eucariotas normalmente no se encuentran libres en el citoplasma, sino que están separados mediante la membrana o envoltura nuclear formando una masa enmarañada de fibras de un complejo proteína–ADN denominado *cromatina*. El *nucleosoma* es la unidad estructural mínima de la cromatina y está constituido por una secuencia de ADN (146 pb) enrollado a un octámero de proteínas denominadas *histonas* (dos moléculas de cada histona: H2A, H2B, H3 y H4). Además del papel estructural de compactación del ADN, la cromatina también juega un papel fundamental en la regulación de la expresión [19] facilitando o restringiendo el acceso de la maquinaria transcripcional a las cadenas de ADN y consecuentemente desencadenando o inhibiendo el proceso de la transcripción.

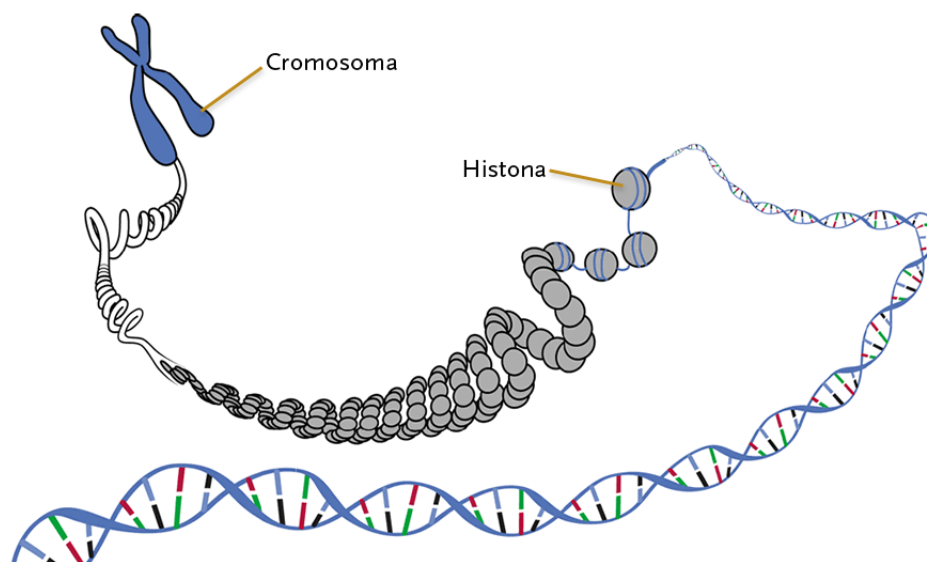


Figura 3. Proceso de desempaquetamiento del cromosoma.

Mediante el proceso de la **transcripción**, la información codificada en la *hebra molde* o *codificante* de ADN se transmite al ARN. La transcripción de los genes eucariotas requiere la presencia de tres enzimas especializadas de ARN polimerasa (ARNpol): La *ARNpol I* transcribe los genes ribosomales en ARN ribosomal (ARNr) mientras que la *ARNpol III* codifica un número pequeño de ARN entre los que se encuentran los ARN de transferencia

(ARNt). La transcripción de los genes que codifican las proteínas la lleva a cabo la *ARNpol II* [20], por lo que la discusión se centrará exclusivamente en ésta. Los últimos estudios han dividido el proceso de la transcripción en ocho etapas básicas, esquematizadas en la figura siguiente [21].

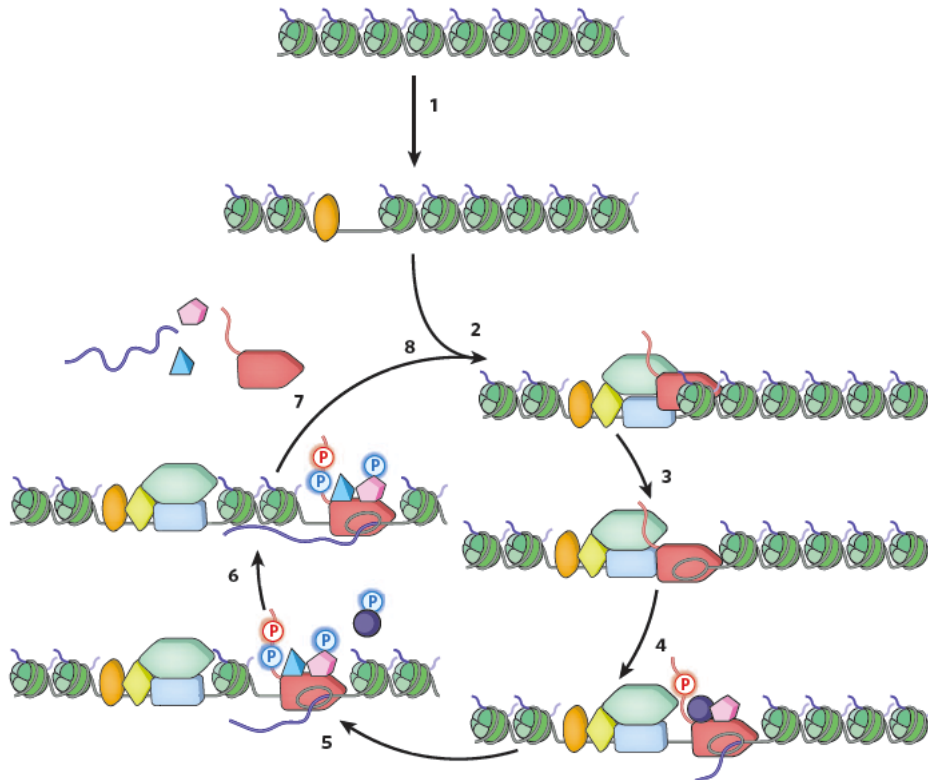


Figura 4. Etapas de la transcripción.

El proceso se inicia cuando la ARNpol II accede a la secuencia del *promotor*, una secuencia rica en pares de bases A/T conocida con el nombre de *caja TATA* (*TATA box*), puesto que presenta una secuencia consenso de 7 pares de bases (5'-TATAAAA-3', o una variante) flanqueada por regiones ricas en G/T. Dicha secuencia consenso es reconocida por la *proteína de unión TATA* (TBP: Tata Binding Protein). A continuación, en la segunda etapa, el *complejo de preiniciación* (PIC) constituido por más de 40 proteínas distintas se une al núcleo promotor (etapa 2) y es entonces cuando un fragmento de la secuencia del ADN es desenrollado (12–20 pb) para llevar a cabo la síntesis del ARN en la llamada burbuja de la transcripción [22] (etapa 3). Tan pronto como la ARNpol II inicia la transcripción, el recién sintetizado ARN es modificado en el extremo 5'. Esta modificación sirve inicialmente, para proteger el ARN contra el ataque de las nucleasas y después, para inducir la unión de las proteínas encargadas de exportar el ARN maduro al citoplasma. Posteriormente, la enzima se desplaza a lo largo de la hebra molde produciéndose la elongación de la cadena en la dirección 5' → 3' hasta que se alcanza una región de pausa proximal del promotor (etapa 4). Después el complejo es hiperfosforilado (etapa 5) y a través de un mecanismo desconocido o bien termina el proceso, o bien entra en una etapa de elongación productiva. Las secuencias codificadas del gen (*exones*) son acompañadas por largas secuencias no codificables (*intrones*) que son eliminadas mediante el corte y empalme (*splicing*) de ARNm. Si el proceso no ha terminado, la ARNpol II debe entonces seguir con la elongación

productiva a lo largo de todo el gen (etapa 6). Finalmente se produce la terminación, donde el ARNm es liberado y modificado en el extremo 3' con una secuencia de poliadenosinas (etapa 7) y podría, entonces, empezarse un nuevo ciclo (etapa 8).

Por último, una vez que el ARNm ha sido exportado al citoplasma a través de los poros de la membrana nuclear, se puede llevar a cabo la **traducción**, esto es, el ensamblaje de los distintos 20 aminoácidos en una determinada proteína siguiendo las reglas del código genético [18]. La síntesis de las proteínas tiene lugar en unos complejos de ARN y proteínas llamados *ribosomas* [23]. El principio básico de la traducción consiste en que una molécula de ARNm se une a un ribosoma mientras las moléculas de ARNt transportan los aminoácidos de uno en uno. Cada ARNt identifica el codón apropiado en el ARNm y añade el aminoácido correspondiente a la cadena proteica en crecimiento. El ribosoma se desplaza a lo largo de ARNm, con lo que el mensaje genético puede “leerse” y traducirse en una proteína. La cadena polipeptídica recién sintetizada sufre un proceso de plegamiento y, a menudo, modificaciones químicas postraducción para generar finalmente la proteína activa, alcanzándose así, el último estadio de la expresión genética.

Regulación de la expresión genética: factores de transcripción

La identidad de un organismo viene determinada por sus genes y más concretamente por la expresión de los mismos. Todas las células de un organismo presentan los mismos genes, pero no todos son expresados de la misma manera. Los genes que codifican los componentes metabólicos o estructurales esenciales de una célula pueden ser expresados de forma continuada en todos los tipos celulares; sin embargo, la mayoría del los genes son expresados bajo circunstancias particulares: en determinados tipos de células, en fases del ciclo celular concretas, o en fases de desarrollo, o como respuesta a señales externas. Esto implica que **la morfología y el correcto funcionamiento de una célula dependen en gran medida de que la expresión de su material genético se produzca de forma controlada.**

La expresión genética es un proceso muy sofisticado y elaborado que conlleva muchos niveles de regulación coordinados para su correcta ejecución. La interrelación de la expresión genética hace que no se puedan infravalorar ninguno de los procesos de **regulación**, pero se ha observado que la regulación se produce fundamentalmente en la **etapa de la transcripción** [24] y concretamente, en la iniciación del proceso [25], por lo que la discusión se centrará principalmente en esta etapa de la transcripción y se analizará con más detenimiento.

A nivel molecular, la regulación está dictada fundamentalmente por la combinación de las interacciones de unas proteínas denominadas **factores de transcripción (FT)**, entre sí y con secuencias específicas de ADN. En la estructura de un gen eucariota típico de clase II (codificador de una proteína) pueden diferenciarse los siguientes elementos:

- *Núcleo promotor* (core promotor): secuencia de ADN constituida generalmente por la caja TATA localizada en la posición ~ 25–35 pb antes del sitio de inicio de la transcripción (+1), un *elemento iniciador* (Inr) con una secuencia consenso PiPi AX(T/A)PiPi (donde X representa cualquier nucleótido) situado alrededor de la posición +1 y un *elemento después del promotor* (DPE) cuya secuencia consenso es PuG(A/T)CGTG y su situación es la posición +30. El núcleo es el lugar donde se unirá la ARNpol II.

- *Promotores proximales y distales*: elementos reguladores pequeños (6–10 pb) cuya secuencia consenso variará dependiendo del determinado gen.
- *Potenciadores (enhancers)* [26] y *silenciadores (silencers)* [27]: pueden estimular o reprimir la transcripción del mismo modo que los elementos proximales. A diferencia de éstos, están situados lejos del promotor y muchos de ellos dependen del tipo celular.

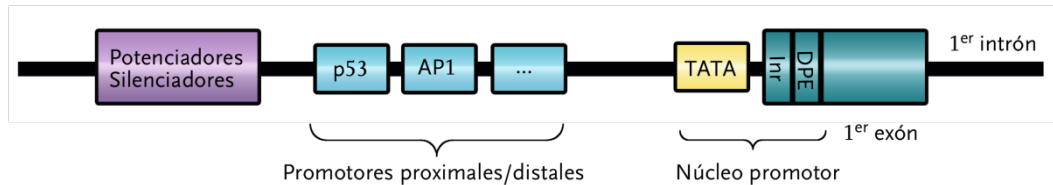


Figura 5. Estructura de un gen eucariota típico con sus elementos reguladores.

Los *factores de transcripción* son proteínas que influyen de forma determinante en la expresión de un gen mediante su interacción, selectiva y con elevada afinidad, con secuencias específicas de ADN (secuencias del promotor o las secuencias reguladoras distales). El hecho de que aproximadamente el 5–10% de los genes codifiquen factores de transcripción pone de manifiesto la importancia de esta familia de proteínas. Los factores de transcripción pueden clasificarse en tres grupos [28]:

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN GENERALES O BASALES (FTGs) [29]: están presentes en todas las células y son imprescindibles para la síntesis de cualquier ARNm, ya que a diferencia de lo que ocurre con la polimerasa procarionta, la ARNpol II por si sola es incapaz de reconocer el promotor.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN COFACTORES [30]: desempeñan un papel fundamental en el efecto de los factores de transcripción ya sea mediante una interacción física directa con ellos o con la ARNpol II o indirectamente mediante modificaciones en la estructura de la cromatina.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ANTES DEL SITIO DE INICIO: interactúan específicamente con las secuencias proximales y distales del gen y/o con las secuencias potenciadoras y silenciadoras modulando la velocidad del proceso de la transcripción. Dentro de este grupo también se puede hablar de *factores de transcripción inducibles*, aquellos que únicamente son sintetizados en las células de los tejidos o en las fases de desarrollo en respuesta a estímulos fisiológicos o ambientales.

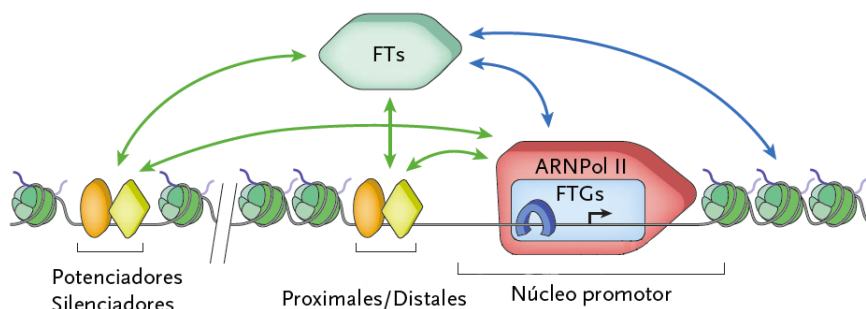


Figura 6. Factores de transcripción eucariota y su interacción.

La regulación en la transcripción se inicia con las histonas. Estas proteínas han pasado de ser consideradas un elemento meramente estructural a empezar a hablarse del *código de las histonas* el cual está íntimamente relacionado con la **epigenética** [31]. Todas las histonas presentan un extremo N-terminal susceptible de ser alterado y el modo en el que éste es modificado, afecta al empaquetamiento de la cromatina. Posiblemente la acetilación es una de las modificaciones más importantes de las histonas con respecto a la transcripción genética, pero éstas también pueden sufrir metilaciones, fosforilaciones, etc. Actualmente se han observado varias combinaciones de ellas, lo que ha conducido a proponer que la modificación del extremo N-terminal de las histonas genera un código entendido por las proteínas que modulan la transición entre los diferentes estados de la cromatina. La hipótesis predice que dicha modificación crea sitios de unión accesibles para proteínas auxiliares. El mecanismo de la acetilación es el mejor conocido: la histona acetiltransferasa (HAT) aumenta la accesibilidad de los factores de transcripción mediante la neutralización de la carga de los residuos de lisina debido a su acetilación, esto reduce la compactación y permite el acceso a los factores de transcripción generales junto con la enzima ARNpol II.

La maquinaria de **transcripción general o basal** [32] está compuesta por la enzima ARNpol II y al menos seis factores de transcripción generales (FTGs) nombrados como: TFIIA (*Transcription Factor Class II A*) TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. Únicamente el TFIIF es capaz de unirse específicamente a la secuencia de ADN del promotor y es esta unión la que induce la unión de los otros factores de transcripción basales. Estudios *in vitro* demostraron que, a pesar de la complejidad de la maquinaria de transcripción general descrita anteriormente, ésta es incapaz de producir la transcripción de manera eficiente por si sola y necesita la presencia de los **cofactores** y los otros factores de transcripción [33]. Los cofactores no se unen selectivamente a secuencias específicas de ADN, pero son reclutados de forma regulada mediante interacciones con coreguladores específicos de secuencia, o con la maquinaria de transcripción general. El reclutamiento del complejo de cofactores es una etapa crítica en la regulación de la transcripción [34]. Entre los distintos cofactores es de especial importancia la figura del *complejo mediador* [35], ya que este gran complejo proteico (1MDa, 22–28 subunidades) actúa como puente entre el complejo general de ARNpol II y los activadores o represores que transmiten las señales desde los elementos distales y proximales del ADN como las secuencias potenciadoras o represoras. De este modo, la naturaleza modular del complejo mediador permite la integración de las señales reguladoras positivas y negativas.

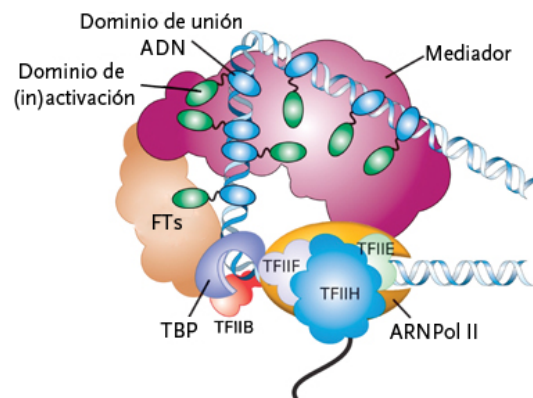


Figura 7. Maquinaria de transcripción regulada por los factores de transcripción.

La última etapa de la iniciación implica el ensamblaje cooperativo de un conjunto de más de 40 proteínas distintas, que se conoce con el nombre de *complejo de preiniciación* (PIC) [36], en el núcleo promotor. Recientemente se ha observado que esta unión está relacionada con la fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la unidad más grande de la ARNpol II [37]. Dicho dominio, en los mamíferos, está formado por 52 repeticiones de la secuencia: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, donde los residuos de serina son susceptibles de ser fosforilados. La fosforilación de este dominio provoca un cambio substancial en las propiedades iónicas del ARNpol II. Cuando esto ocurre, la enzima abandona el complejo de preiniciación y comienza a sintetizar el ARNm, empezando de esta forma las otras fases de la transcripción diferentes a la iniciación.

Una vez presentada la elaborada red de regulación existente en la expresión génica y conocida la importancia de los factores de transcripción en este proceso, la pregunta lógica que surge es **¿Quién regula a los reguladores?** [38]

Los factores de transcripción funcionan como centros de integración de diferentes rutas de señalización celular afectando la activación de un determinado gen. Es obvio, por tanto, que su regulación sea de crucial importancia. En general, existen dos mecanismos básicos por los que la acción de los factores de transcripción puede ser regulada: **control de la síntesis (concentración)** y **control de la actividad**.

La concentración de los factores de transcripción, puede regularse en cualquiera de las etapas del proceso de expresión del gen, del mismo modo que la concentración de cualquier otra proteína intracelular. Existen varios mecanismos para lograr este control como, el corte de ARN, la localización nuclear, la degradación del ARNm, etc. Todos ellos se caracterizan por ser procesos lentos. Uno de los mecanismos más estudiados es la autorregulación del factor de transcripción. La versión más simplificada de éste sería la unión de un único factor de transcripción al promotor de su propio gen, pero el proceso puede ser mucho más complejo. Así por ejemplo, varios factores de transcripción pueden unirse a los promotores de otros genes y de este modo indirecto afectar a la velocidad de la transcripción de su propio gen. La regulación por retroalimentación positiva proporciona un mecanismo de memoria esencial para mantener el fenotipo específico de una célula.

El **control por activación**, por el contrario, es un mecanismo muy rápido que se produce como respuesta ante una determinada necesidad celular. La actividad de los factores de transcripción está a menudo regulada por procesos de (de)fosforilación, que pueden bloquear o desencadenar la acción de proteasas, de proteínas transportadoras nucleares o la unión al ADN. La unión de un determinado ligando, como un compuesto orgánico o iones metálicos, también puede afectar a la interacción mediante cambios conformacionales en el factor de transcripción. Este tipo de control es muy común en la familia de receptores hormonales nucleares (NHR). Un ejemplo clásico es el receptor nuclear de la vitamina D3 (VDR), una fosfoproteína que se une a la hormona VDR con una gran afinidad, regulando la expresión de los genes a través de interacciones proteína-proteína. La vitamina D3 juega un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles adecuados de los iones calcio y fosfato en los huesos. Esta vitamina es transformada por la radiación ultravioleta en el compuesto $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con actividad hormonal que se une al VDR e induce cambios conformacionales que favorece la heterodimerización con el receptor retinoideo (RXR). Este complejo modula la transcripción génica de factores de transcripción como NFkB, o SMAD que se expresan únicamente en células de diferentes tejidos [39].

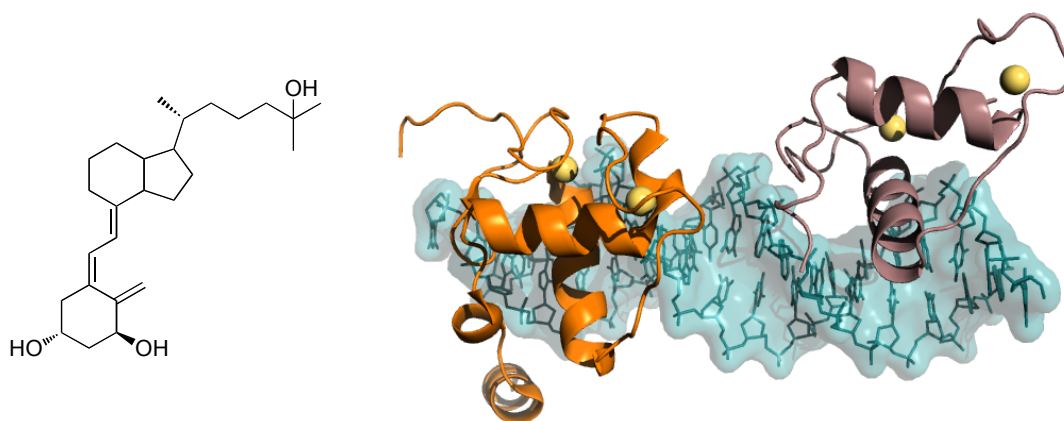


Figura 8. Izquierda: Estructura de la forma activa de la vitamina D3 con actividad hormonal (1,25(OH)₂D₃). Derecha: Estructura del complejo VDR-RXR (PDB: 1YNW).

Como en el caso del receptor RXR y la hormona VDR, muchos factores de transcripción reconocen sus secuencias consenso mediante la formación de **homo- o heterodímeros**, o incluso mediante la formación de estructuras proteicas más complejas. Por tanto, las interacciones proteína-proteína también constituyen un mecanismo fundamental de control de la actividad. A diferencia de lo que ocurre con los factores de transcripción procariontes, que se unen a secuencias palindrómicas de ADN formando homodímeros; las proteínas eucariotas pueden reconocer secuencias no simétricas de ADN mediante heterodímeros o incluso en algunas ocasiones, en forma de monómeros. Este tipo de control homo- o heterodimérico permite reconocer muchas más secuencias y asegurar buenas afinidades en la interacción ($K_a \sim 10^8\text{--}10^{11} \text{ M}^{-1}$). En este caso se habla del concepto de *economía genética*, esto es, varios genes son regulados por el mismo factor de transcripción [40].

Dada la gran importancia de los factores de transcripción, es fundamental comprender las bases moleculares que rigen sus interacciones con otras proteínas y con sus secuencias de unión al ADN. Esto podría permitir avanzar en el diseño de versiones sintéticas de factores de transcripción o de compuestos orgánicos con capacidad para alterar su actividad; lo cual sería importante no sólo desde una perspectiva terapéutica, sino también, para obtener más conocimiento básico en el campo de la química biológica.

Factores de transcripción como dianas terapéuticas: cáncer

Como se puede deducir de la discusión anterior, los factores de transcripción ejercen un papel biológico muy importante, y por lo tanto, podrían servir como dianas terapéuticas de alcance [41]. La gran mayoría de las rutas de señalización conocidas desencadenan en última instancia en la actividad de un factor de transcripción para regular algún gen específico [42].

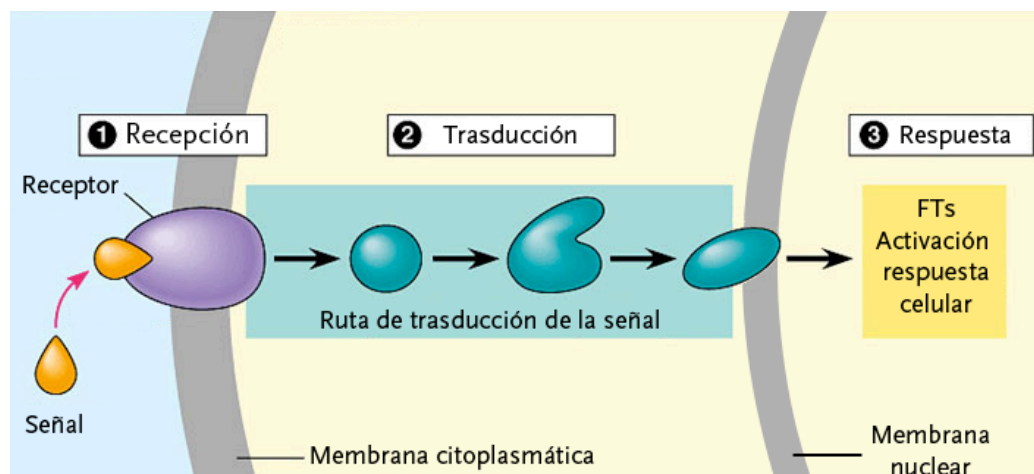


Figura 9. Relación entre las rutas de señalización y los factores de transcripción.

A pesar del gran número de genes que codifican factores de transcripción, se han desarrollado muy pocos compuestos y estrategias capaces de regular de forma terapéutica la actividad de determinados factores de transcripción [43]. Algunas de las razones de la dificultad de abordar los factores de transcripción como dianas terapéuticas son su localización nuclear y la necesidad de conseguir una elevada especificidad y selectividad. Aún así, se ha logrado modular el proceso de transcripción mediante el uso de dos estrategias básicas: a) *estrategias indirectas* como la inactivación de quinasas [44], y b) *estrategias directas* como: el uso de moléculas que interaccionan selectivamente con secuencias específicas de ADN [45], o que impiden la dimerización [46]. También se han usado péptidos helicoidales estabilizados conformacionalmente con propiedades de internalización mejoradas, y que inhiben la formación del complejo de transcripción mediante la interrupción de interacciones proteína-proteína cruciales en el proceso [47].

Los factores de transcripción están relacionados con muchas enfermedades humanas pero el cáncer ocupa un lugar especial dentro de estas enfermedades [48]. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los factores de transcripción que están siendo investigados como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.

Factor de transcripción	Motivos estructurales
AP1	Familia (FOS, JUN, MAF, etc) que regula el oncogén RAS y las citoquinas proinflamatorias.
C/EBP	Involucrado en el control del ciclo celular, podría ser una diana terapéutica para el cáncer de piel.
CREB	Interviene en la ruta de señalización celular del AMP cíclico, podría ser una diana terapéutica para la leucemia.
E2F	Regula genes esenciales del ciclo celular.
Ets	Regula la proliferación y la apoptosis celular. Se relaciona con el cáncer de tiroides, páncreas e hígado.
FoxO	Se encuentra en la ruta de señalización del crecimiento, proapoptótico.
FoxP3	Se define como la molécula reguladora de las células T. Importante en el descubrimiento de respuesta inmune frente tumores.

HIP	Se activa por la hipoxia para promover angiogénesis. Se relaciona con la mortandad en el cáncer de mama y otros cánceres.
Myc	Se sobreexpresa en el linfoma de Burkitt y en carcinomas de colón, pecho y próstata.
Myb	Su concentración se eleva en el cáncer de mama, hígado, próstata y testículos.
NF-kB	Relacionado con la supervivencia de determinados genes relacionados con cánceres
STAT	Su concentración se eleva en muchos tipos de cánceres y se relaciona con la proliferación celular.

Tabla 1. Posibles factores de transcripción como dianas terapéuticas [42b].

Myc (también llamado c-Myc) fue el primer factor de transcripción oncogénico descubierto (1979). Esta proteína desempeña un papel fundamental en la regulación de muchas actividades celulares (figura 10) y se ha observado que muchas enfermedades (~ 30%) como por ejemplo, el linfoma de Burkitt [49] son consecuencia de su descontrol y sobreexpresión. Su unión al ADN requiere la formación de un heterodímero con la proteína Max y los recientes resultados sugieren que la especificidad y afinidad de Myc están relacionados con el empaquetamiento de la cromatina y más concretamente, con la modificación de las histonas [50]. Estos descubrimientos sugieren que quizá, la manipulación de Myc podría abordarse también mediante la modificación de las histonas, además de intentar bloquear la formación del heterodímero.

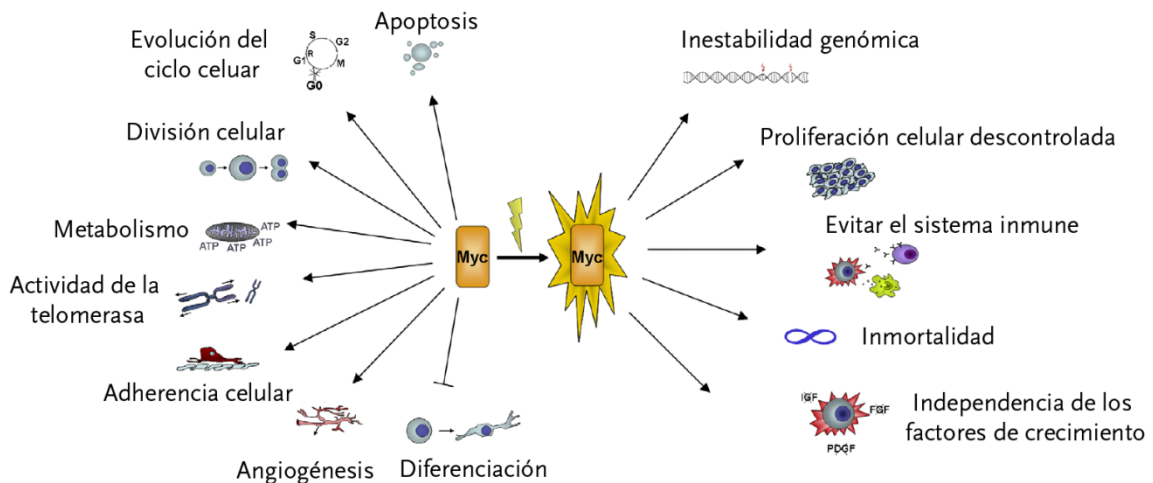


Figura 10. Procesos celulares relacionados con Myc en condiciones normales (izquierda) y durante su descontrol (derecha).

La familia AP-1 está constituida por ocho proteínas diferentes entre las que se encuentran la proteína GCN4 (de la que se hablará más adelante), Fos y Jun. Estas dos últimas proteínas reconocen la secuencia TRE: 5'-d(TGAC/GTCA)-3' localizada en los promotores de varios genes que controlan los procesos de división celular. La interacción se produce en forma de heterodímeros (Jun/Fos) u homodímeros (Jun/Jun) [51]. Se ha observado que mutaciones en Fos, que alteran su capacidad de heterodimerizar con Jun, inhiben también su habilidad de transformar las células en cancerosas [52]. Se ha demostrado también que los componentes

de la familia AP-1 se activan en respuesta a un gran número de estímulos, por lo que se trata de una familia de factores de transcripción altamente flexible e integrada en las cascadas de señalización celular.

Finalmente, el gen que codifica a la proteína p53 (TP53) es probablemente el supresor de tumores más común en los cánceres humanos (50%). Esta proteína de 393 aminoácidos se suele conocer con el nombre del *guardián del genoma*, ya que su nivel aumenta drásticamente en respuesta a los daños genómicos y al estrés celular, causando la apoptosis de las células dañadas como medida de prevención de la proliferación de cánceres.

Interacción intermolecular entre los factores de transcripción y el ADN

Los factores de transcripción reconocen una determinada secuencia de ADN debido a que su superficie es químicamente complementaria a la del ADN [53]. Esta compatibilidad estructural es algo general para cualquier proceso de reconocimiento biomolecular. Por tanto, el proceso de interacción entre los factores de transcripción y el ADN no se puede comprender totalmente sin analizar las propiedades estructurales básicas de ambos.

Estructura del ADN y sus implicaciones en el reconocimiento

El ADN es un biopolímero derivado de nucleótidos caracterizado por un esqueleto fosfatado altamente cargado negativamente. Se caracteriza por tener una estructura regular de doble hélice en la que las cadenas se mantienen unidas gracias a los enlaces de hidrógeno complementarios e interacciones hidrofóbicas entre las bases nitrogenadas. Se ha observado que la doble hélice adopta diferentes conformaciones dependiendo de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, disolvente, etc.). La conformación más relevante bajo condiciones fisiológicas es la llamada ADN-B. Ésta es la conformación reconocida por la mayoría de los factores de transcripción, por lo que es conveniente resaltar algunas de sus características estructurales [54]. El ADN-B tiene un diámetro aproximado de 20 Å con 10 pares de bases por vuelta. La distancia entre los pares de bases consecutivos es de 3.4 Å y la rotación por residuo de 36°. A pesar de que se trata de una estructura bastante regular y uniforme presenta una cierta variabilidad, existen desviaciones en los ángulos de torsión con respecto a la media. Estas variaciones son dependientes de la secuencia e importantes en las interacciones específicas con las proteínas [55].

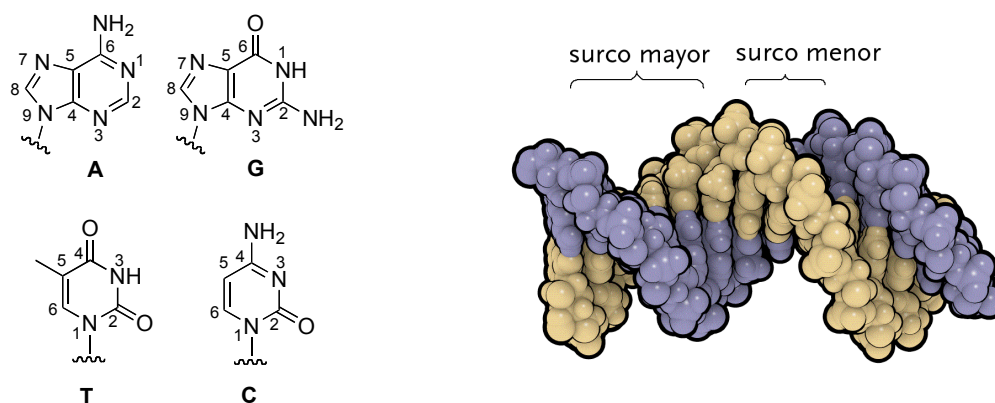


Figura 11. Izquierda: estructura de las cuatro bases nitrogenadas del ADN. Derecha: estructura de ADN donde se observan el surco mayor y el menor.

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

por la entalpía mientras que la unión en el surco menor se caracteriza por una desfavorable entalpía compensada por la contribución entrópica [56].

En la mayoría de los casos la unión de los factores de transcripción al ADN no afecta al empaquetamiento entre las bases nitrogenadas del ADN, porque el proceso de reconocimiento tiene lugar a través de los grupos expuestos de las bases del surco, aunque bien es cierto que pueden causar alteraciones conformacionales locales.

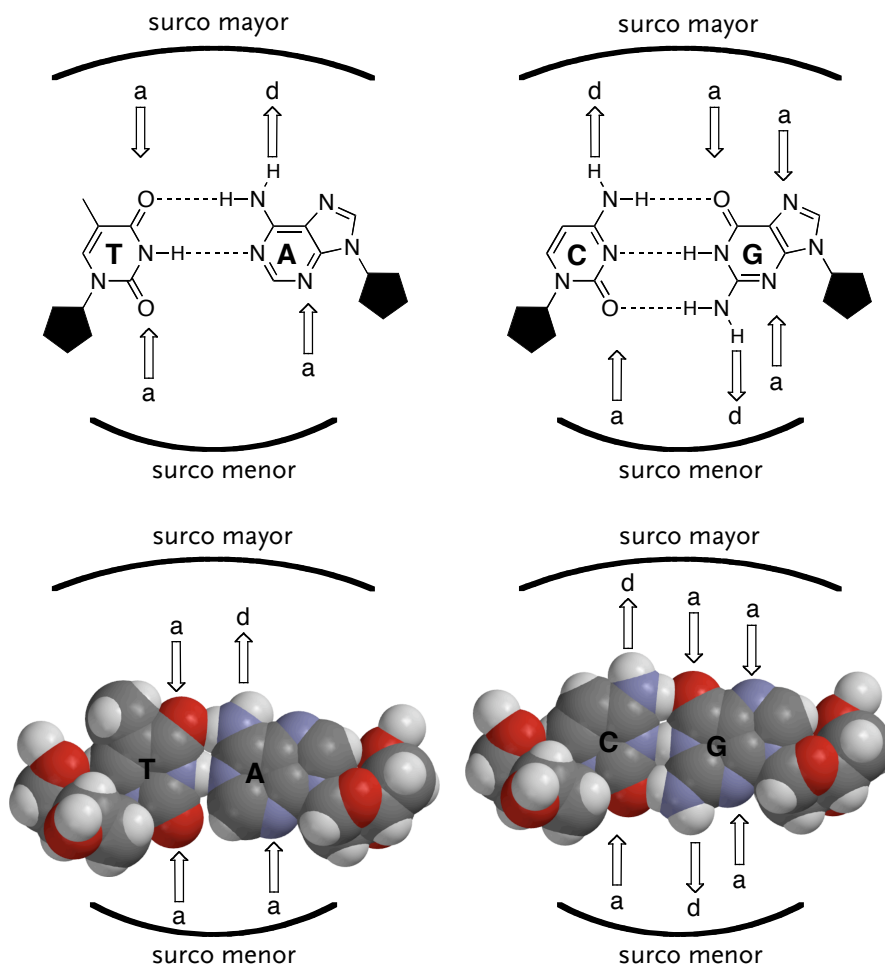


Figura 12. Representación del patrón de dadores (d) y aceptores (a) de puentes de hidrógeno en los pares de bases del ADN mostrando la diferencia entre surco mayor y menor.

Analizando la estructura idealizada del ADN-B se observa que la variabilidad funcional del surco mayor es más elevada que la del surco menor. De hecho, en el surco menor los pares de bases A/T son degenerados en relación a su habilidad para formar enlaces de hidrógeno, mientras que en el surco mayor las cuatro combinaciones de los pares de bases presentan un patrón de reconocimiento diferente [57]. Estos factores junto con el tamaño y la hidratación del surco menor justifican el que **las proteínas reconozcan el ADN preferentemente a través del surco mayor.**

Dominios de unión de los factores de transcripción

En los últimos años se han resuelto un gran número de estructuras de complejos ADN–proteína mediante técnicas de resonancia magnética molecular y cristalográficas. Así, a finales del 2002 había más de 280 estructuras de estos complejos depositados en la base de datos *Protein Data Bank* [58] y ocho años más tarde existen más del doble de estructuras.

A pesar de la gran variabilidad morfológica de los complejos ADN–proteína, el estudio de las estructuras de estos complejos a escala atómica ha permitido derivar unas reglas generales sobre el modo en el que se produce la interacción. En la mayoría de los casos las proteínas presentan una hélice α (*hélice de reconocimiento*), encargada directamente de la “lectura” de los pares de bases en el surco mayor del ADN. Esta hélice está implicada en las interacciones específicas del complejo y se ha demostrado que cuando se inserta en el surco mayor con su eje flanqueando el esqueleto del ADN logra el número máximo de contactos con las bases del ADN [59]. Sin embargo, la disposición de la hélice no es igual en todas las proteínas e incluso, hay hélices que se pueden insertar en el surco menor del ADN [60] y proteínas que utilizan otros motivos estructurales, como láminas β o giros para realizar el reconocimiento. Además, normalmente, estos elementos de reconocimiento se encuentran integrados en una estructura más compleja e imprescindible para la interacción que recibe el nombre de *dominio de unión*.

Se ha establecido varias clasificaciones estructurales en función de los motivos de reconocimiento utilizados por estas proteínas [61]:

HÉLICE–GIRO–HÉLICE (HTH: *Helix–Turn–Helix*) y HOMEODOMINIO: el HTH fue el primer motivo estructural de reconocimiento de ADN descubierto, es un elemento muy común en los factores de transcripción procariotas [62]. Tradicionalmente se definió como un segmento de 20 aminoácidos de dos hélices α casi perpendiculares ($\sim 120^\circ$) conectadas a través de un giro β de cuatro residuos, pero en la actualidad algunos autores han extendido esta definición e incluido también bajo esta categoría los motivos estructurales con conectores más largos siempre y cuando se mantenga la orientación relativa de sus hélices.

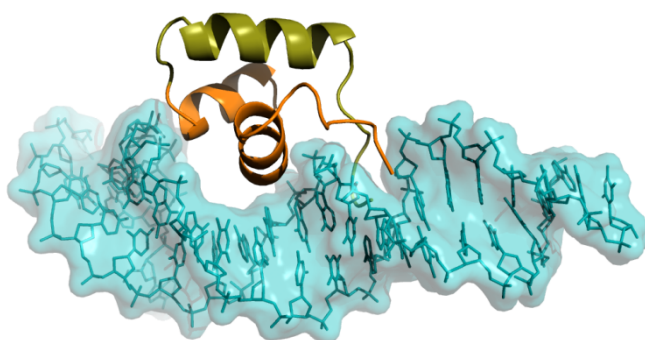


Figura 13. Estructura del dominio HLH de la proteína TC3, representado en naranja (PDB: 1TC3).

Además de los contactos específicos de las cadenas laterales de los residuos de la hélice de reconocimiento, en estas estructuras se observan otros contactos con el esqueleto del ADN fundamentales para el reconocimiento. El conector y la primera hélice de este motivo realizan interacciones inespecíficas sirviendo de puente entre el surco mayor y el extremo N–terminal de la hélice de reconocimiento. Cuando este motivo estructural se encuentra en factores de transcripción eucariotas suele recibir el nombre de *homeodominio*. Es interesante

resaltar que algunos autores han establecido diferencias estructurales que van más allá del tipo de organismo en el que se encuentran. El *homeodominio* se ha definido como un motivo estructural más grande, constituido por 60 aminoácidos y capaz de formar por sí solo un plegamiento estable de la proteína e interactuar con el ADN, a diferencia de lo que ocurre con el dominio HTH (~ 20 aminoácidos).

DEDOS DE CINCO (ZFP: **Z**inc **F**inger **P**rotein): constituyen la mayor familia de factores de transcripción. La estructura de un dedo de cinc se caracteriza por contener secuencias regulares de residuos de Cys y/o His. La coordinación tetrahédrica de estos residuos al Zn^{2+} induce el plegamiento de la proteína, generando la conformación responsable del reconocimiento. Ésta está constituida por dos láminas β antiparalelas y una hélice α que se inserta en el surco mayor de ADN. Existen distintas combinaciones de residuos Cys e His (Cys₂His₂, Cys₄, Cys₆, Cys₃His, etc) pero dentro de ellas la más común es la Cys₂His₂. El dominio de unión Cys₂His₂ se caracteriza por contener entre 22 y 30 aminoácidos con una secuencia de este tipo: X₂-C-X_{2,4}-C-X₁₂-H-X_{3,4,5}-H donde X representa residuos de naturaleza hidrofóbica [63].

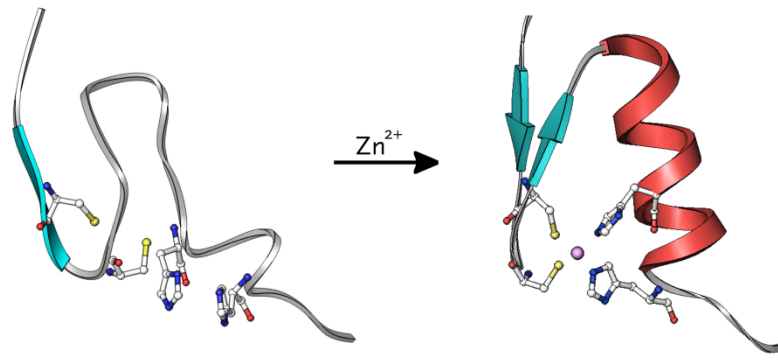


Figura 14. Cambio conformacional debido a la coordinación del Zn^{2+} .

La mayor parte de los dedos de cinc interactúan en forma de oligómeros con el ADN y se ha observado que esta oligomerización es fundamental para la interacción. Para explicar esto se toma como ejemplo la proteína ZIF268, el primer dedo de cinc descubierto (1982) [64].

La proteína ZIF268 está constituida por tres módulos de dedos de cinc, Cys₂His₂. En cada uno de ellos los contactos críticos con las bases del esqueleto del ADN se realizan a través de una Arg situada inmediatamente antes de la hélice α que interactúa con la tercera base de la estructura primaria del ADN (5'—G); el tercer residuo en la hélice contacta con la segunda base (5'—G—) y el sexto residuo de la hélice contacta con la primera base (5'G—). Esta disposición refleja la cooperación entre cada unidad. La interacción está muy conservada dentro de esta familia, las posiciones básicas del reconocimiento son -1, 2, 3 y 6 (siendo el primer aminoácido de la hélice el 1). La manipulación de estos residuos clave permite obtener variantes que reconocen secuencias de ADN alternativas [65].

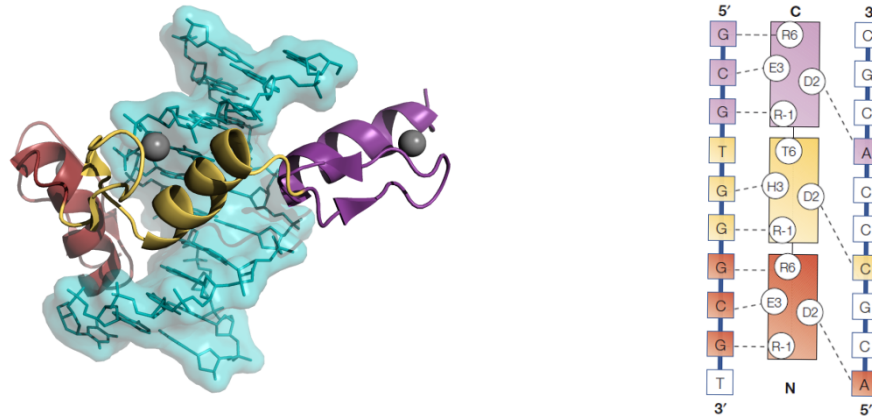


Figura 15. Izquierda: Estructura del ZFP ZIF268 (PDB: 1AAY). Derecha: Diagrama de las interacciones específicas entre el ADN y la proteína.

PROTEÍNAS DE CREMALLERA: bZIP y HÉLICE-LAZO-HÉLICE (HLH: *Helix Loop Helix*): Estas proteínas se han identificado exclusivamente en organismos eucariotas. Su nombre proviene de la forma del motivo estructural que emplean para formar dímeros funcionales. El motivo bZIP es uno de los más sencillos y eficaces. Consiste simplemente en homo- o heterodímeros helicoidales no covalentes cuyas unidades monoméricas están formadas aproximadamente por 60 aminoácidos. Dichas unidades presentan dos zonas bien diferenciadas. La *región básica* denominada así por la presencia de residuos cargados positivamente del tipo arginina. Está constituida aproximadamente por 20 aminoácidos y situada en el extremo N-terminal. Dicha región interacciona con el ADN insertándose en el surco mayor. La otra zona se conoce con el nombre de *cremallera de leucinas*. Está compuesta por aproximadamente 30 aminoácidos y situada en el extremo C-terminal. Tal como su nombre indica se caracteriza por poseer residuos de Leu, cada siete aminoácidos y son estos residuos los que proporcionan el ambiente hidrofóbico necesario para la dimerización.

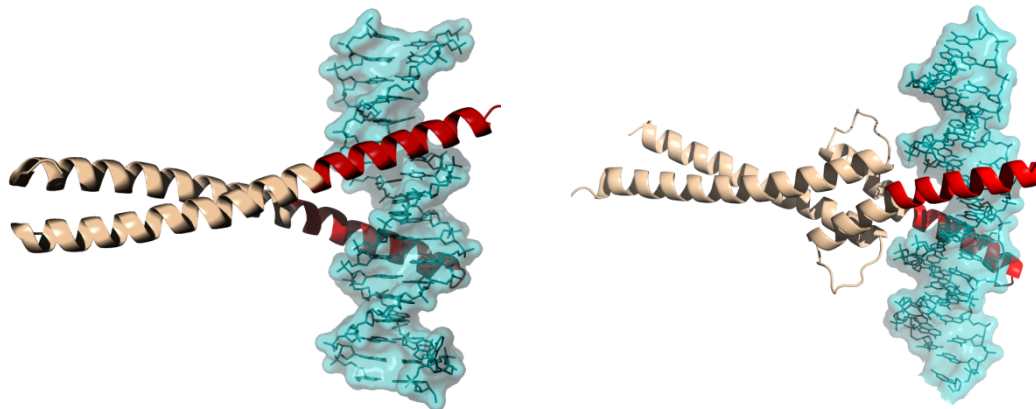


Figura 16. Izquierda: Estructura del dominio bZIP de la proteína GCN4 (PDB: 1YSA). Derecha: Estructura del dominio HLH de la proteína SREBP1a (PDB: 1AM9).

Se ha demostrado que cada uno de los monómeros por separado es incapaz de interactuar con el ADN con cierta afinidad y que, en ausencia de ADN, la región básica carece de estructura secundaria definida. Por tratarse de una proteína dimérica la interacción con el ADN podría llevarse mediante dos rutas diferentes: dimerizando primero

e insertándose después (ruta del dímero), o bien que los dos monómeros se unan secuencialmente al ADN y que la dimerización sea posterior (ruta del monómero). Los datos actuales sugieren que esta segunda ruta es la más probable [66]. El motivo HLH puede considerarse como una modificación de las hélices α del dominio bZIP en el que la región básica y la zona de dimerización están separados a través de un giro.

PROTEÍNAS DE LÁMINAS β : a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los factores de transcripción, estas proteínas utilizan láminas β para llevar a cabo el reconocimiento y la unión con el ADN. El ejemplo más característico es la proteína de unión a TATA (TBP), de la que se habló anteriormente. Dicha proteína está formada por diez láminas β antiparalelas que se insertan en el surco menor ocasionando la deformación del ADN [67].

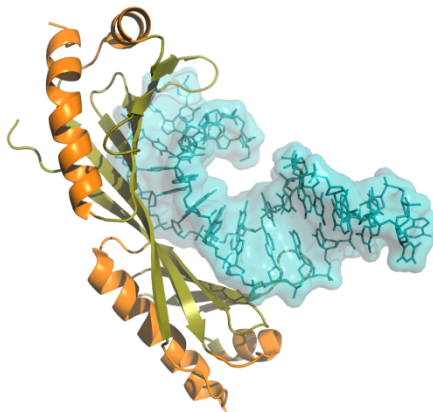


Figura 17. Estructura de la proteína TBP (PDB: 1YTB).

Consideraciones generales de las interacciones intermoleculares entre los factores de transcripción y el ADN

Dada la gran variedad de motivos estructurales empleados por los factores de transcripción para realizar el reconocimiento de ADN es extremadamente difícil establecer unas reglas generales que expliquen la selectividad en el proceso de reconocimiento de secuencias del ADN. De hecho, muchos autores han señalado que no existe un código sencillo que relacione la estructura secundaria de una proteína y sus aminoácidos con una secuencia específica de ADN [68]. Incluso en el caso de los dedos de cinc, donde todos sus miembros reconocen secuencias diferentes empleando siempre el mismo motivo estructural, ha sido muy difícil deducir un código de reconocimiento general. Sin embargo, a pesar de la ausencia de patrones de secuencia-reconocimiento existen una serie de consideraciones comunes que resultan de gran relevancia para entender la unión específica.

En general, una **unión específica** se define como una asociación molecular en la cual una determinada molécula se une fuerte y exclusivamente mediante la formación de un complejo estabilizado desde el punto de vista cinético y termodinámico [69]. La constante de afinidad de este proceso suele ser del orden de 10^8 – 10^{11} M^{-1} [70]. Por el contrario, una **interacción inespecífica** se define como una asociación molecular aleatoria ($K_a \sim 10^4$ – 10^6 M^{-1}). Con respecto a los factores de transcripción y el ADN, básicamente existen cinco tipos de interacciones directas que afectan a su selectividad y especificidad.

- Los puentes salinos y los enlaces de hidrógeno entre el esqueleto fosfatado del ADN y las cadenas laterales de los residuos básicos de la proteína (Lys, Arg, o His): este tipo de contactos normalmente no confiere especificidad a la interacción pero son fundamentales porque incrementan la estabilidad termodinámica del complejo y ayudan a anclar el dominio de reconocimiento en la orientación adecuada.
- Enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas del ADN y las cadenas laterales de los residuos polares de la proteína: estos son imprescindibles para la especificidad de la interacción. El análisis de las estructuras de los complejos existentes mostraron que Arg, Lys, Ser y Thr son los residuos que más frecuentemente participan en este tipo de enlaces. Curiosamente, los residuos ácidos como Asp y Glu apenas intervienen, probablemente debido a su desfavorable interacción electrostática con el esqueleto fosfatado del ADN. Dentro de este grupo de interacciones son especialmente importantes los enlaces de hidrógeno bidentados.

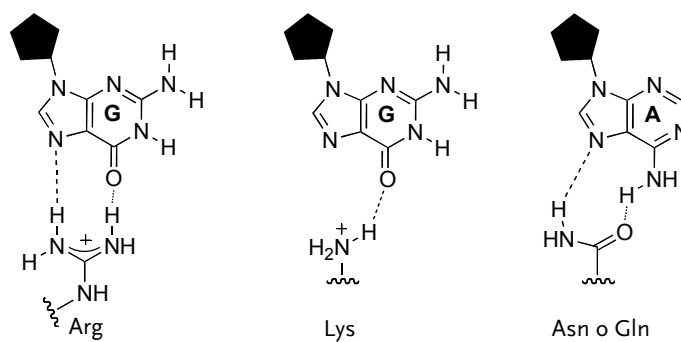


Figura 18. Ejemplos de enlaces de hidrógeno característicos.

- Contactos no polares entre el esqueleto del ADN y las cadenas laterales de los residuos no polares de la proteína: a pesar de su falta de direccionalidad se ha observado que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en el reconocimiento.
- Enlaces de hidrógeno mediados por moléculas de agua: son relativamente comunes; en la mayoría de los casos se establecen entre el esqueleto del ADN y aminoácidos polares o cargados positivamente (Arg, Lys, Asn, Gln), o incluso negativamente (Glu, Asp).
- Enlaces de van der Waals entre las bases nitrogenadas del ADN y las cadenas laterales de los residuos polares de la proteína: estos contactos junto con los enlaces de hidrógeno constituyen las interacciones más relevantes desde el punto de vista de la especificidad.

Los **factores termodinámicos** del proceso se pueden agrupar según su origen en: entálpicos y entrópicos. Dentro de los **entálpicos**, los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y las interacciones electrostáticas contribuyen favorablemente a la interacción, mientras que la desolvatación de los grupos polares y la desviación de los parámetros geométricos ideales del complejo afectan desfavorablemente. En cuanto a los **entrópicos**, las interacciones hidrofóbicas y la redistribución iónica en el complejo, contribuyen favorablemente, pero la pérdida de grados de libertad, vibracionales, rotacionales y traslacionales durante la formación del complejo perjudican la interacción [69].

Desde el punto de vista cinético, se postula un *mecanismo general de reconocimiento del ADN* realizado por los factores de transcripción que consta de dos etapas. Inicialmente el ADN y la proteína se acercan gracias al efecto de las interacciones electrostáticas inespecíficas

(etapa 1). La formación de este complejo inicial es seguida por un deslizamiento de la proteína a lo largo del ADN hasta que se alcanza la secuencia de reconocimiento, en este momento se establecen las interacciones específicas y se forma el complejo estable (etapa 2), en muchos casos esto conlleva un reajuste conformacional de la proteína y/o del ADN [70].

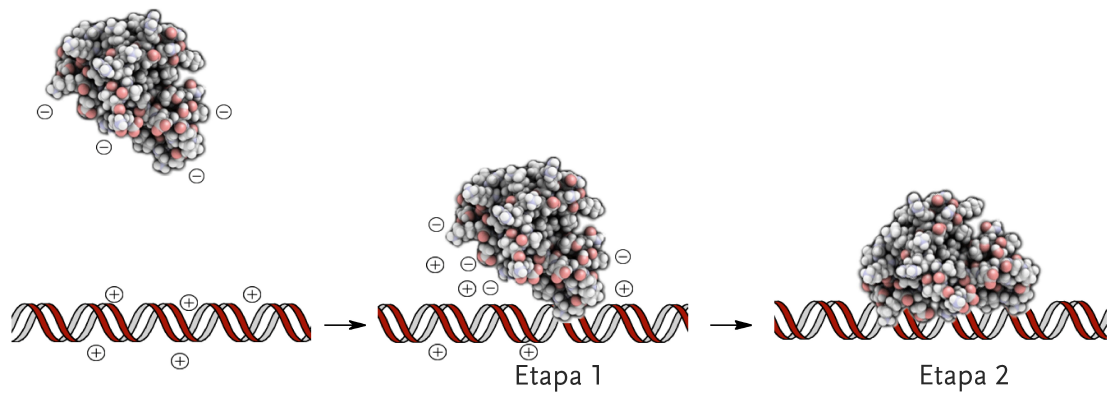


Figura 19. Hipótesis del mecanismo general de reconocimiento.

Versiones en miniatura de factores de transcripción

Disponer de versiones sintéticas de factores de transcripción capaces de mimetizar su comportamiento y su capacidad de reconocer ADN es muy relevante desde el punto de vista biológico y médico. Desafortunadamente, el hecho de que no existan reglas generales sobre el reconocimiento entre los factores de transcripción y el ADN hace extremadamente difícil diseñar alternativas sintéticas. De hecho, se ha observado que la eliminación de residuos de los factores de transcripción naturales alejados del dominio de unión tiene consecuencias drásticas en la capacidades de reconocimiento de ADN [63c]. Por lo tanto, para el diseño de este tipo de sistemas es inevitable recurrir, en parte, a aproximaciones del tipo ensayo y error.

A pesar de todas estas complicaciones, en los últimos años se han sintetizado algunas versiones en miniatura de factores de transcripción que reproducen la interacción específica con el ADN.

Modificaciones sintéticas de factores de transcripción: GCN4

Debido a su sencillez estructural, el motivo de unión al ADN de los factores de transcripción de la familia bZIP ha sido el más utilizado para la síntesis de versiones artificiales de FT en miniatura. En concreto, la proteína homodimérica GCN4, ha sido la más estudiada. Al igual que todas las proteínas de la familia bZIP, los monómeros de GCN4 no reconocen el ADN con gran afinidad y sólo se unen fuertemente a su secuencia palindrómica diana 5'-ATGACGTCAT-3' cuando se encuentran en forma de dímeros. Varios grupos han demostrado que es posible sustituir el elemento de dimerización natural, la cremallera de leucinas, por otros elementos artificiales sin que esto repercuta significativamente en las propiedades de reconocimiento a bajas temperaturas. El primero en publicar uno de estos factores de transcripción minimizados fue el grupo de Kim en 1990, que sustituyó la cremallera de leucinas del dominio de unión al ADN del GCN4 por un puente disulfuro, demostrando que el dímero resultante reconocía la secuencia consenso de ADN con la misma afinidad que la proteína natural a 4 °C [71].

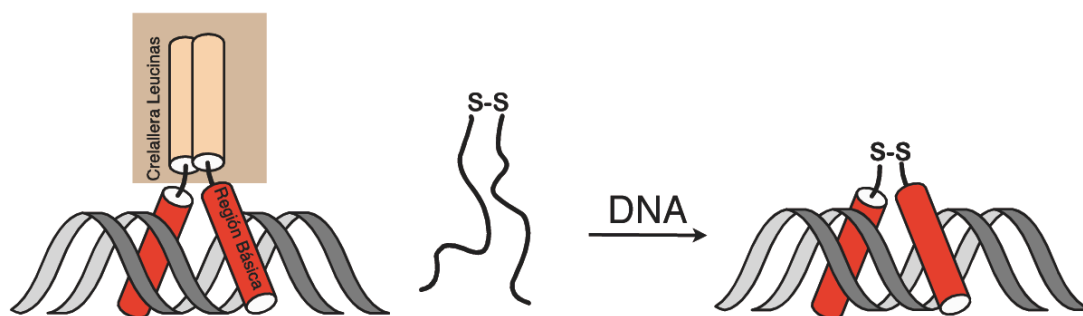


Figura 20. Izquierda: representación esquemática de GCN4. Derecha: modelo hipotético de la interacción del dímero disulfuro diseñado por el grupo de Kim.

Esta estrategia se usó también para otras proteínas bZIP heterodiméricas [72]. Después del descubrimiento de Kim varios grupos de investigación demostraron que las regiones básicas de GCN4 podían ser dimerizadas empleado diferentes tipos de conectores:

covalentes o no covalentes, como, por ejemplo, complejos metálicos de terpiridina [73], o complejos de inclusión entre ciclodextrinas y adamantanos [74].

Diez años más tarde, en nuestro grupo se llevó a cabo una dimerización covalente basada en azobenceno, permitiendo modular la interacción externamente usando la luz. Se observó que existía una diferencia de afinidad entre los dos isómeros, de manera que el híbrido con el azobenceno en conformación *cis* reconocía la secuencia consenso con mayor afinidad que el *trans* [75]. Este tipo de estrategia fue utilizada posteriormente por otros investigadores para modular la interacción de GCN4 y otras proteínas a través de cambios conformacionales en la cremallera de leucinas [76].

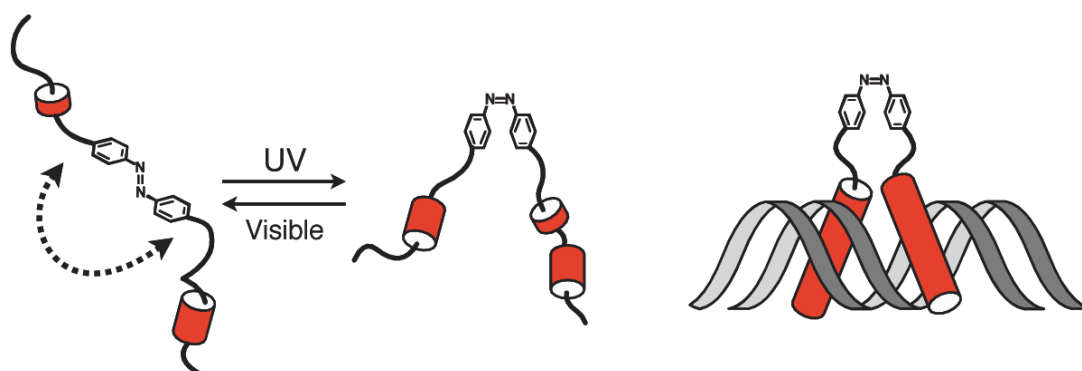


Figura 21. Izquierda: isomerización del azopéptido. Derecha: modelo de la interacción con el ADN.

Híbridos monoméricos de la región básica de GCN4

Tal y como se señaló previamente, los monómeros naturales del dominio de unión del GCN4 son incapaces de interactuar con gran afinidad con la secuencia diana de ADN 5'–ATGAC–3' ($K_D \sim 1\text{--}10 \mu\text{M}$ a 4 °C) [77]. Sin embargo, en estos últimos años se han desarrollado estrategias que han logrado la interacción selectiva y específica de regiones básicas monoméricas derivadas de ese dominio de unión. Así, en 1995 el grupo Verdine demostró que si la región básica de GCN4 se libera hacia el surco mayor del ADN de forma intramolecular, eliminado parcialmente el coste entrópico asociado a la formación del complejo, entonces es posible un reconocimiento específico [78].

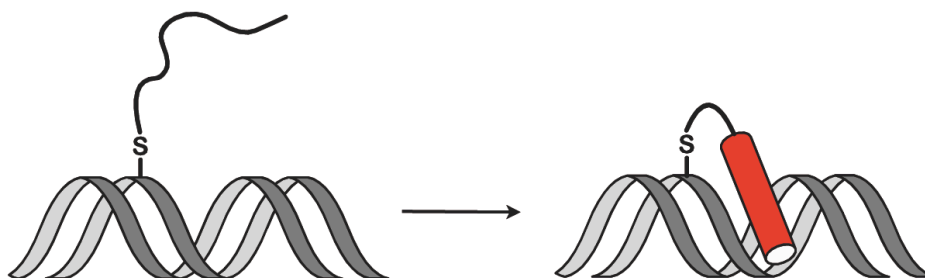


Figura 22. Modelo del proceso de reconocimiento del oligopéptido diseñado en el grupo de Verdine.

Posteriormente otros investigadores desarrollaron una estrategia relativamente general, donde el coste entrópico y entálpico de la formación del complejo se reducía mediante la preorganización de la hélice de reconocimiento.

El grupo de Schepartz insertó los residuos de la región básica de GCN4 claves para el reconocimiento del ADN en las posiciones expuestas de la miniproteína aPP obteniendo el péptido PPrb [79]. La estructura de la proteína aPP consiste en una hélice α unida mediante un giro a una hélice de poliprolinas que estabiliza la estructura secundaria. De esta forma sintetizaron péptidos de 42 aminoácidos capaces de interactuar con la secuencia consenso ATGAC con altas afinidades. Posteriormente se optimizaron las secuencias N-terminales logrando afinidades a temperatura ambiente en el mismo rango que el factor de transcripción natural sin la necesidad de la dimerización.

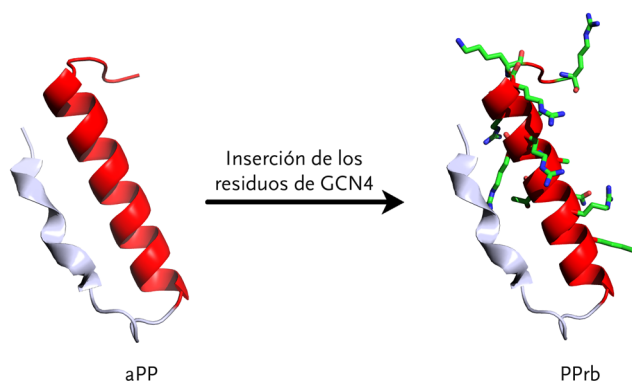


Figura 23. Modelo de la estrategia diseñada por Schepartz.

Inspirándose en el modo bivalente de interacción de los factores de transcripción de la familia de los homeodominios y considerando los estudios previos, particularmente, el trabajo del grupo de Verdine, en nuestro grupo se consideró que la unión covalente de la región básica de GCN4 a una molécula pequeña, capaz de insertarse en el surco menor de una secuencia adyacente al lugar de unión de la región básica, podría disminuir el coste entrópico y facilitar la interacción. En concreto, se conjugó la región básica de GCN4 con un polipirrol de tipo distamicina, capaz de unirse a través del surco menor del ADN a secuencias ricas A/Ts.

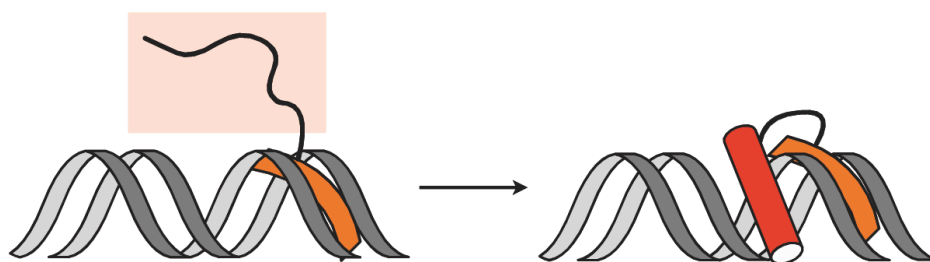


Figura 24. Modelo de la estrategia diseñada por nuestro grupo.

Para realizar el diseño, se utilizaron como base las estructuras cristalográficas de cada uno de los complejos por separado. La superposición de estas estructuras sugería que el residuo más adecuado por su posición y orientación para realizar la conjugación, era la Arg 245 (R_{245}). Para facilitar la síntesis covalente del híbrido con las dos unidades de reconocimiento, este residuo se mutó por Glu (E_{245}).

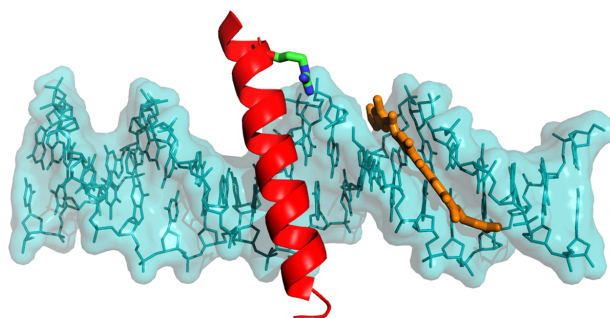


Figura 25. Estructuras cristalográficas superpuestas de las dos unidades de reconocimiento, donde puede verse que la R_{245} está preorientada al surco menor.

En los estudios iniciales del grupo se observó que la longitud del conector era un factor fundamental para la interacción. De hecho, el primer híbrido sintetizado en nuestro grupo (híbrido A_1) a través de esta estrategia bivalente no mostró una interacción específica. Los estudios de dicroísmo circular sugerían que mientras que la unidad de tripirrol era capaz de insertarse en el surco menor, la región básica establecía interacciones inespecíficas con los fosfatos del esqueleto [80].

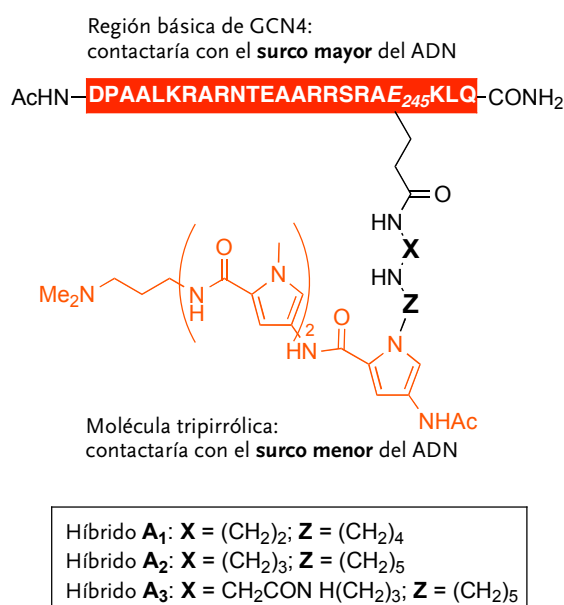


Figura 26. Híbridos sintetizados en el grupo siguiendo la estrategia bivalente: surco mayor/surco menor.

Una revisión cuidadosa del modelo parecía indicar que la cadena del conector era demasiado corta para permitir la inserción simultánea del tripirrol en el surco menor y de la región básica en el surco mayor. Considerando esto se pensó en alargar el conector (híbrido A_2). Obteniéndose así un híbrido que sí interaccionaba del modo deseado a través de los dos surcos con su secuencia consenso y con elevada afinidad a 4 °C. Sin embargo, los estudios de electroforesis combinados con los de dicroísmo mostraron que en realidad con el ADN consenso, donde están presentes simultáneamente la zona de reconocimiento del tripirrol y de la región básica, confluían dos tipos de interacción: una específica, en la que cada unidad de reconocimiento está insertada en su surco correspondiente y otra inespecífica en el que el péptido haciendo contactos electrostáticos con los fosfatos [81].

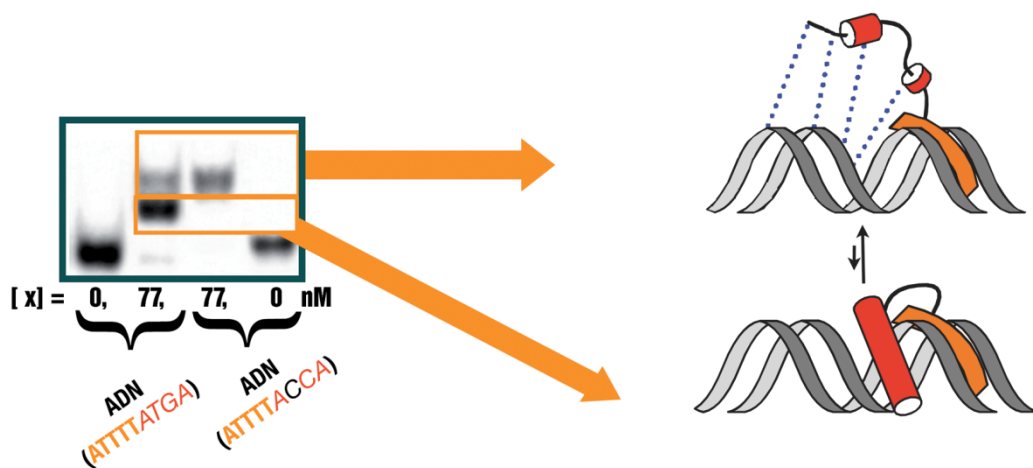


Figura 27. Izquierda: electroforesis del híbrido A_2 con el ADN diana (ATTTTATGA) y con el ADN mutado en la secuencia de reconocimiento del péptido (ATTTTAcCA). Derecha: Modelos hipotéticos de los complejos correspondientes a las bandas observadas en electroforesis.

La optimización del diseño se realizó añadiendo una unidad extra de glicina al conector. Se demostró entonces que el híbrido extendido resultante A_3 presenta un único modo de interacción con su secuencia consenso, el específico, ($K_D \sim 3 \pm 0.2$ nM a 4°C) [82].

Interacción intermolecular entre moléculas pequeñas y el ADN

Consideraciones generales

Uno de los campos más activos de la química biológica y de la química médica es la síntesis de moléculas con utilidad terapéutica, incluyendo las que actúan a nivel del ADN. Desafortunadamente, incluso con el desarrollo de nuevas tecnologías, la obtención de un fármaco es una tarea muy complicada, y en la mayoría de los casos los compuestos preparados fallan en las primeras fases del proceso. El futuro en este campo demanda una aproximación interdisciplinar donde el desarrollo de nuevos compuestos aproveche los últimos avances en las técnicas de la química biológica.

La reciente aprobación del uso del agente de reconocimiento del surco menor *trabectedina* (Yondelis®) para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos y del cáncer de ovario, ha hecho resurgir el interés por las moléculas pequeñas que interactúan con el ADN [83].

En general, estas moléculas pueden interactuar con los ácidos nucleicos de cuatro formas diferentes [84]:

INTERACCIÓN ELECTROSTÁTICA EXTERNA: la superficie polianiónica del ADN interactúa con cationes metálicos (alcalinos: grupo I y grupo II), interacción que confiere estabilidad a la conformación plegada del ADN. Del mismo modo, las moléculas orgánicas catiónicas (poliaminas [85], etc) estabilizan el ADN al evitar las fuerzas repulsivas entre los fosfatos y provocando además, la liberación de los contraiones, lo que proporciona una contribución entrópica a la energía del enlace. Estas uniones poseen cinéticas de complejación rápidas ($K_a \sim 10^8-10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) pero son no específicas en términos de secuencia.

Un ejemplo reciente de compuestos que interactúan de este modo son los oligómeros trinucleares de Pt (II), que interactúan con el ADN a través de contactos electrostáticos y enlaces de hidrógeno.

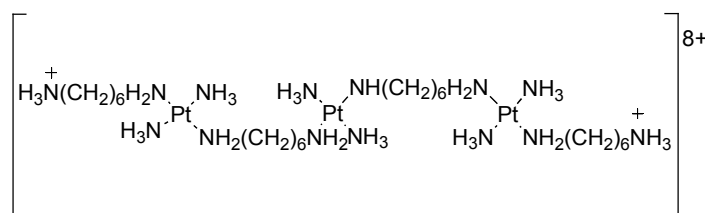


Figura 28. Estructura del complejo de Pt (II) que interactúa con el ADN a través de enlaces de hidrógeno y fuerzas electrostáticas.

INTERCALACIÓN: un intercalante es un compuesto aromático con una superficie óptima de 39 \AA^2 que se puede situar entre los pares de bases de un ácido nucleico. Una característica estructural común de todos los agentes intercalantes es que son sistemas aromáticos π deficientes, de dos o más anillos de seis eslabones (el naftaleno constituye la superficie mínima). La intercalación se puede producir a través de cualquiera de los dos surcos y las fuerzas que operan en este proceso son: apilamientos π , interacciones de transferencia de carga, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. La intercalación conlleva una deformación en la hélice del ADN y aunque éstos se unen con una cierta preferencia a pares G/C, no se suele hablar de selectividad de secuencia en esta interacción. Un ejemplo

típico de intercalante es el bromuro de etidio, que se utiliza de forma habitual en el marcaje fluorescente de ADNs e incluso se ha aprovechado para determinar constantes de afinidad por competición (FID: Fluorescent Intercalator Displacement).

Actualmente la estructura clásica de los intercalantes se ha combinado con diferentes grupos como, por ejemplo, con otra unidad intercalante, (*bisintercalantes*) [86] que mejoran la afinidad de la interacción; con sustituyentes [87] que mejoran sus propiedades de especificidad y estabilidad termodinámica, o con complejos metálicos de rutenio o rodio que le confieren al intercalante propiedades luminiscentes o causan rotura del ADN, respectivamente.

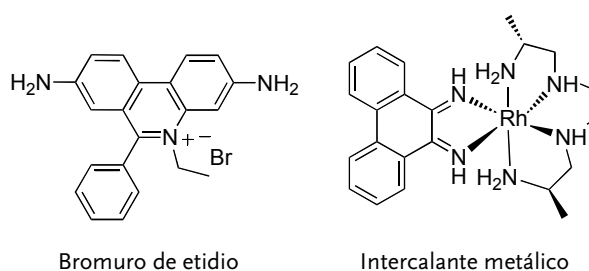


Figura 29. Estructura del compuestos intercalantes.

INTERACCIÓN COVALENTE (AGENTES ALQUILANTES): las moléculas que interaccionan de este modo se conocen con el nombre de agentes alquilantes. Las posiciones del ADN más favorables para sufrir modificaciones son: la posición N⁷ y el C²-NH₂ de la guanina y los átomos de nitrógeno N³ y N⁷ de la adenina. Dentro de este grupo se encuentran, por ejemplo, el agente antitumoral *cis*-platino, el antibiótico antramycin y el antitumoral mitomicina A.

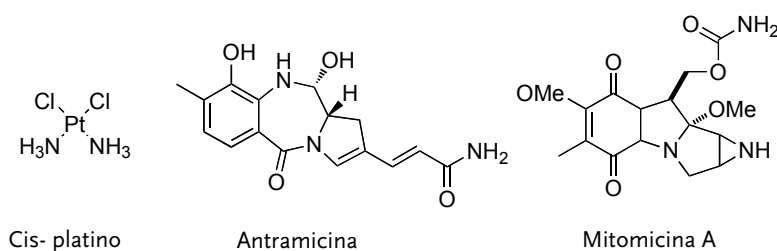


Figura 30. Estructura de compuestos alquilantes.

INSERCIÓN EN LOS SURCOS DEL ADN: Se ha observado que existen algunos oligonucleótidos pequeños (~ 10–20 pb), que son capaces de formar una triple hélice interaccionando a través del surco mayor del ADN. Dicho tipo de interacción se establece a través de la formación de enlaces de tipo Hoogsteen entre los pares de bases [88]. Esta interacción es específica de secuencia, únicamente se observa cuando el ADN presenta una región de purinas amplia e ininterrumpida. Estos agentes se han usado para regular la expresión genética [89].

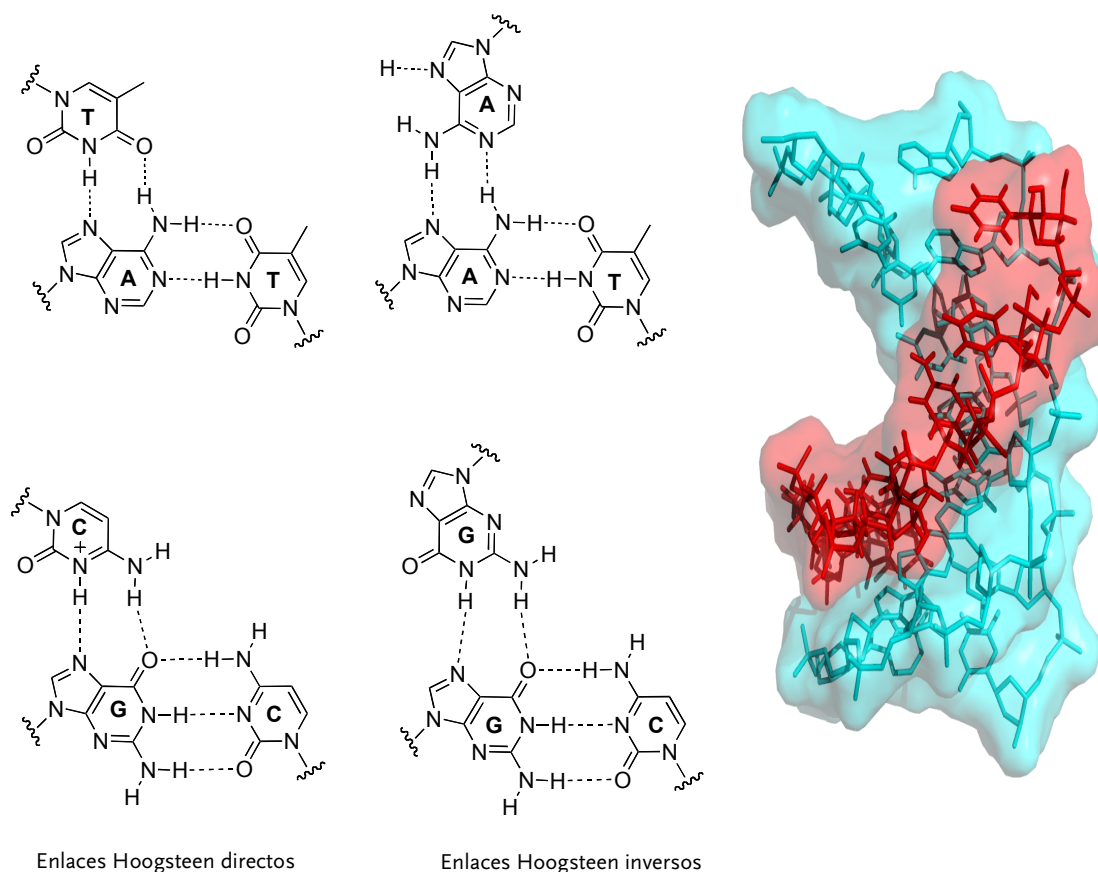


Figura 31. Izquierda: representación de los enlaces de Hoogsteen directos e inversos. Derecha: estructura cristalográfica de una triple hélice (PDB: 1PNN).

A diferencia de lo que ocurre con los factores de transcripción, las moléculas de tamaño relativamente pequeño presentan una predisposición para unirse con selectividad de secuencia al surco menor. Los primeros productos naturales donde se observó una interacción selectiva de este tipo eran compuestos de tipo dicatiónico [90]. La interacción en el surco menor viene determinada por la formación de enlaces de hidrógeno, enlaces de van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Otro hecho común, aunque no imprescindible para la interacción, es la complementariedad de la forma (*isohelicidad*) [91].

En la mayoría de los casos estas **moléculas son selectivas a las regiones A/T** debido a que los surcos menores en esas regiones son más estrechos y profundos que en regiones ricas en pares G/C, lo que favorece la inserción al maximizar las interacciones de van der Waals. Por el contrario, en las regiones ricas en pares G/C el grupo amino de las guaninas sobresale en el fondo del surco menor, interfiriendo con la inserción [92]. Dentro de este grupo se encuentran compuestos como DAPI, un agente antiparasitario cuyos efectos secundarios han impedido su uso clínico. Su uso más frecuente hoy en día es en el campo de la microscopía electrónica como marcador fluorescente de los núcleos celulares.

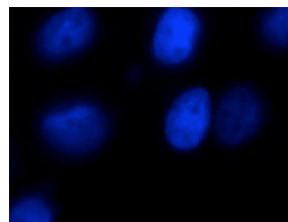
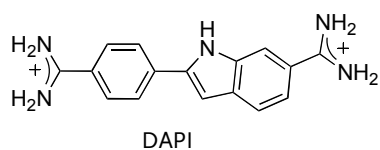


Figura 32. Izquierda: estructura de DAPI. Derecha: núcleos de células teñidos con DAPI.

En el contexto del trabajo realizado durante esta tesis doctoral, para facilitar la comprensión, se pasará a comentar en mayor profundidad dos agentes de reconocimiento del surco menor: los compuestos del tipo distamicina y los bis(benzamidinos).

Interacción en el surco menor: polipirroles y bis(benzamidinos)

La **distamicina A** es un ejemplo clásico de un ligando específico del surco menor que está constituido por unidades aromáticas unidas por enlaces peptídicos. La distamicina A se inserta en el surco menor abarcando de 4 a 6 pb [93].

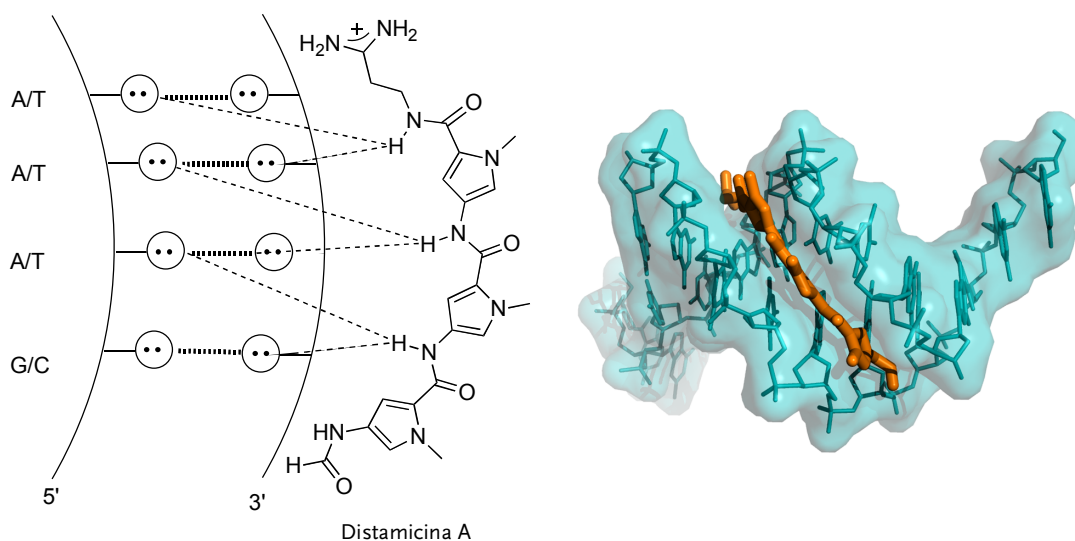


Figura 33. Izquierda: modelo de la interacción, los puntos representan los pares electrónicos libres de los átomos de N3 de las purinas y O2 de las pirimidinas. Derecha: estructura cristalográfica del complejo ADN y distamicina (PDB:1K2Z).

En 1989 el grupo de Wemmer observó que la distamicina A puede formar dímeros antiparalelos con el ADN [94]. La tendencia a dar complejos 1:1 o 2:1 es fuertemente dependiente de la secuencia de ADN.

Estudios llevados a cabo por dicroísmo circular muestran que la tendencia a la formación del complejo 2:1 decrece en el siguiente orden: AAGTT, ATATA \geq AAAC $>$ AATAA $>$ AAATA $>$ AAAGT $>$ AATAT $>$ TAAAA \geq AAATT \geq AAAAA \geq ATAAA, AAAAT [95].

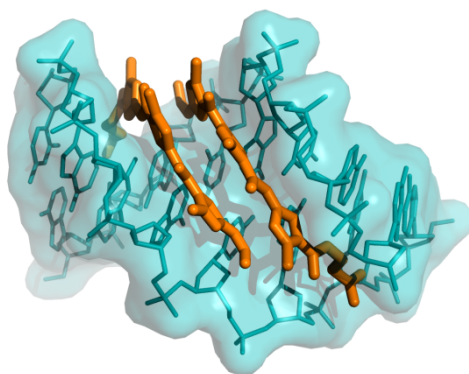


Figura 34. Estructura del dímero antiparalelo de Wemmer (PDB: 378D).

El descubrimiento de esta interacción dimérica, junto con los resultados de Lown y Dickerson que demostraron que si se sustituye alguno de los grupos pirrol (Py) de la distamicina por un imidazol (Im) se facilita la interacción con pares GC, aunque con baja selectividad [96], indujeron al grupo de Dervan a investigar sistemas de reconocimiento formados por las dos unidades unidas covalentemente. También se estudió el efecto de la sustitución de los pirroles por diferentes heterocícllos, demostrando que en estas poliamidas en forma de horquilla se puede inducir la interacción con una secuencia específica combinando los heterocícllos de forma apropiada [97].

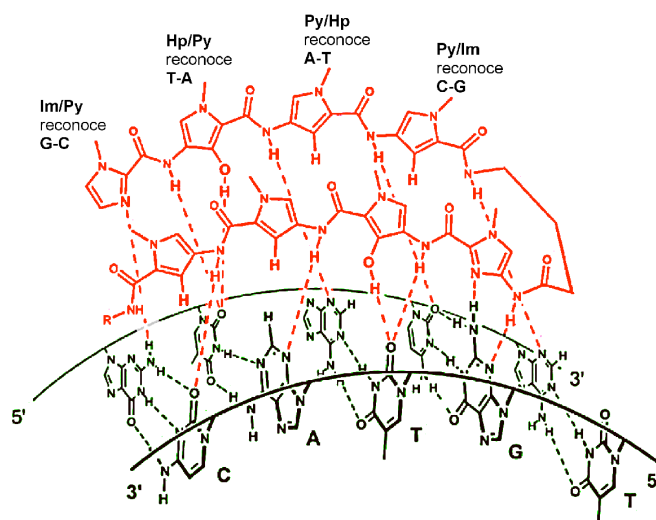


Figura 35. Estructura tridimensional de las interacciones que se establecen en el reconocimiento del surco menor del ADN por parte de poliamidas en horquilla.

El estudio sistemático desarrollado por Dervan ha logrado avances espectaculares, y sus poliamidas han despertado un gran interés en química biológica y biomedicina. Sin embargo, este tipo de agentes de reconocimiento presentan limitaciones relacionadas con las dificultades sintéticas de modificar estas estructuras y la cierta falta de especificidad de algunos derivados. Por otro lado, estas moléculas presentan problemas de transporte y penetración a través de las membranas celulares, sobre todo, de internalización en el núcleo celular, alcanzándolo sólo en determinadas ocasiones y con cinéticas muy lentas. Finalmente, otro problema importante deriva del hecho de que interactúan con el ADN únicamente a través del surco menor, con la limitación que esto supone en términos de

poder interferir con la acción de los FT que tienen lugar preferentemente a través del surco mayor [98].

Los compuestos de tipo **bis(benzamidinio)**, tales como la **pentamidina** o **propamidina**, son otro tipo de agentes que también reconocen secuencias ricas de A/T del surco menor del ADN. En la figura 36 puede verse la estructura cristalográfica de la propamidina [99].

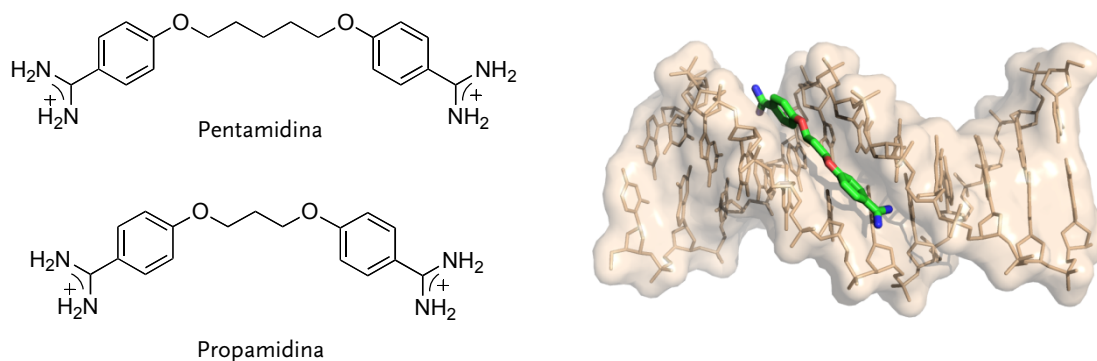


Figura 36. Izquierda: Estructura de compuestos bis(benzamidinios). Derecha: Estructura de complejo propamidina y ADN $d(\text{CGCAAATTTGCCG})_2$ (PDB: 102D).

Estas moléculas son especialmente atractivas desde el punto de vista farmacológico puesto que son estables y presentan buenas propiedades de transporte en numerosas líneas celulares [100]. Así por ejemplo, la pentamidina está siendo utilizada desde hace años contra la tripanosomiasis, la leishmaniasis, neumonía de *P. Carinii* que se encuentran frecuentemente en pacientes de SIDA, y también ha sido usada con éxito en el tratamiento de tumores que son resistentes a la quimioterapia con *cis*-platino [101]. De entre los derivados de bis(benzamidinios) son especialmente importantes aquéllos con conectores de tipo aromático; la DB289, una prodrogra de la furamidina, se encuentra en fase clínica III contra la enfermedad del sueño y es muy activa contra otros parásitos [102].

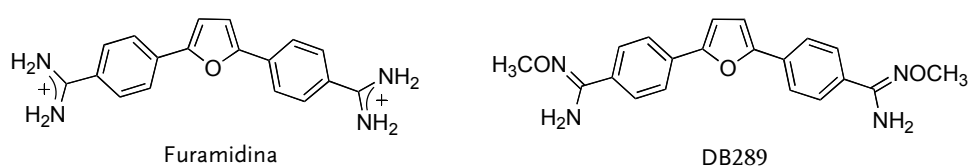


Figura 37. Estructura de compuestos bis(benzamidinios) con conectores aromáticos.

Estas buenas propiedades farmacológicas junto con su simplicidad estructural han animado la búsqueda de nuevos análogos con propiedades de reconocimiento mejoradas y toxicidades reducidas [103]. En estos momentos las mayores limitaciones para el desarrollo de este tipo de bis(benzamidinios) tienen que ver con la escasa versatilidad y practicidad de las rutas sintéticas existentes y con el hecho de que no exista un método simple, rápido y fiable que permita evaluar y cuantificar su afinidad y selectividad por secuencias específicas del ADN: el método habitual para estudiar la afinidad de este tipo de moléculas se basa en la desnaturalización térmica de sus complejos con el ADN. Sin embargo, este método sólo da información indirecta y bastante cualitativa de las características de reconocimiento de estos compuestos, y además es difícil de implementar en estrategias de ensayo masivo para búsquedas sistemáticas [104].

Sensores fluorescentes de ADN de doble cadena

El descubrimiento del origen genético de múltiples enfermedades, así como la influencia del genotipo en la respuesta a medicamentos hace que la detección de secuencias específicas de ADN tenga un enorme potencial diagnóstico y clínico.

Se cree que aproximadamente en el genoma humano cada 1000 pares de bases se produce un *polimorfismo de un único nucleótido* (SNP: Single Nucleotide Polymorphism), que contribuyen a las diferencias en el fenotipo e influyen las características propias que diferencian cada individuo. Los SNPs pueden permitir conocer qué genes contribuyen al desarrollo de enfermedades o pueden utilizarse para evaluar el riesgo de sufrir una determinada patología, por ejemplo el SNP T•G es uno de los más comunes y se ha asociado recientemente al cáncer de colon. En la actualidad ya existen empresas dedicadas al análisis genético individualizado, como por ejemplo la empresa *23andMe*ⁱⁱ que, a través del estudio de SNPs, proporciona un perfil genético detallado que cubre más de 100 enfermedades con componentes genéticos. La detección de SNPs incluso podría servir como herramienta de diagnóstico permitiendo predecir la respuesta individual a un tratamiento médico concreto, lo que se ha dado en llamar “medicina personalizada” [105].

Fluorescencia

Las técnicas de fluorescencia han revolucionado la investigación biomédica permitiendo el análisis de la función y organización celular con una precisión y claridad sin precedentes. En la actualidad existen sensores fluorescentes para detectar iones metálicos, cloruro, fosfatos, citrato, glucosa, etc. [106]. El enorme éxito de las técnicas fluorescentes es consecuencia de su extraordinaria sensibilidad y selectividad, además de rapidez, flexibilidad y simplicidad experimental. Hay que señalar además, que el estudio de los sistemas biológicos está cada vez más ligado a la probabilidad de visualizar y cuantificar los procesos con suficiente resolución espacial y temporal en su contexto celular. Las técnicas fluorescentes se han mostrado especialmente adecuadas para esta tarea.

Se denomina *fluorescencia* al proceso de emisión de un fotón por parte de moléculas en estados electrónicos excitados formados como consecuencia de la absorción de radiación (normalmente UV). Salvo en contadas ocasiones, la emisión de fluorescencia se produce entre los niveles $S_1 \rightarrow S_0$. En principio, las moléculas fluorescentes (*fluoróforos*) pueden completar el ciclo de absorción/excitación/emisión indefinidamente, dando lugar en cada ciclo a la emisión de fotones; esta capacidad de amplificar la señal es la base de la extrema sensibilidad que caracteriza a la técnica de fluorescencia [107].

El **diagrama de Jablonski** es la representación de las transiciones energéticas implicadas en los diversos procesos derivados de la absorción de un fotón y la formación de una especie en su estado electrónico excitado. Como se observa en el diagrama, la vuelta al estado fundamental con emisión de luz es sólo uno de los procesos que pueden sufrir las moléculas en estados excitados y son posibles muchas otras rutas: conversión interna, desactivación térmica o cruce de sistemas seguido de emisión de fosforescencia, además de interacciones con otras moléculas de su entorno dando lugar a procesos de transferencia

ⁱⁱ <https://www.23andme.com>

electrónica, formación de *excímeros*ⁱⁱⁱ o *exciplejos*,^{iv} etc. Las propiedades fotofísicas de los fluoróforos van a verse afectadas por estos procesos, y de esta forma es posible estudiar sus interacciones con el medio que les rodea, lo cual constituye la base para el desarrollo de sensores fluorescentes.

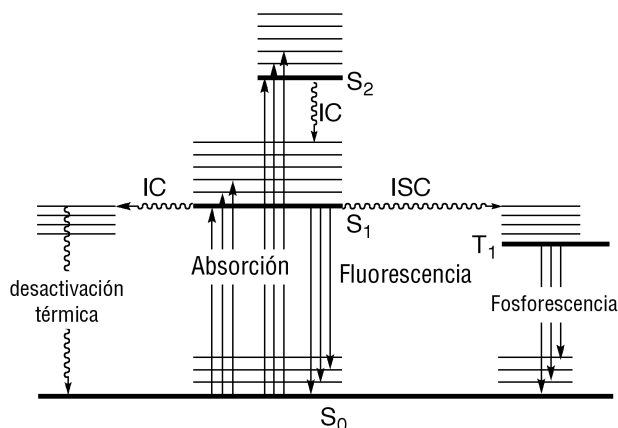


Figura 38. Diagrama de Jablonski.

Métodos indirectos de detección de ADN de doble cadena

En la actualidad la mayoría de las técnicas descritas de detección de ADN de doble cadena (dsADN) son indirectas y explotan la habilidad del ADN de cadena sencilla (ssADN) de unirse específicamente a otra cadena de: ssADN, ssRNA o ácido nucleico peptídico (PNA: Peptide Nucleic Acid) [108]. La aproximación más sencilla sería: hibridar la hebra que queremos detectar con otra previamente marcada.

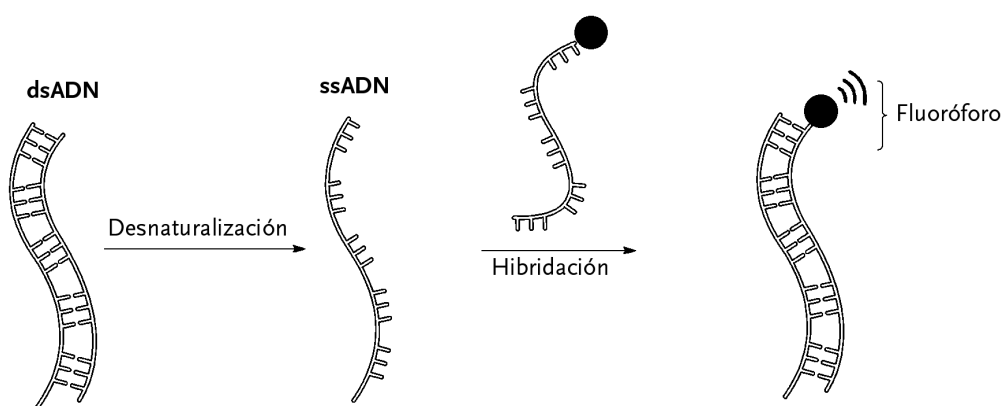


Figura 39. Esquema general del método indirecto de detección de dsADN.

Uno de los métodos más conocidos conlleva el uso de *molecular beacons*, en donde, el fluoróforo y una molécula desactivante de la fluorescencia (*quencher*) se conjugan a los extremos de una cadena de ADN en forma de horquilla; la unión de este ADN modificado a

ⁱⁱⁱ El término *excímero* viene de la abreviación de *excited dimer*, es un dímero o heterodímero formado por dos especies en las que al menos una de ellas se encuentra en un estado excitado.

^{iv} Un *exciplejo* es cualquier complejo que existe en el estado excitado pero que se disocia en el estado fundamental.

su secuencia complementaria provoca un cambio conformacional que aleja el fluoróforo del desactivante de fluorescencia, produciendo un aumento en la emisión de fluorescencia [109]. Otra estrategia similar son los llamados sensores *Light-up*.

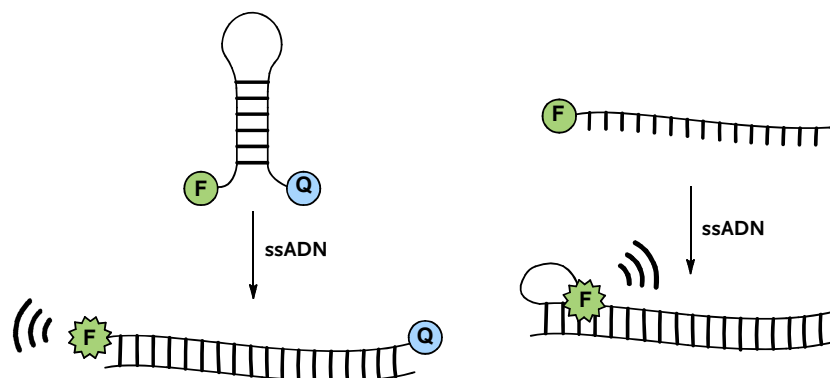


Figura 40. Izquierda: estrategia molecular beacons. Derecha: estrategia *Light-up*.

Este método *Light-up* consistente en conjugados de PNA, con un fluoróforo de tipo cianina, naranja de tiazol (TO: Thiazole Orange). El PNA dirige el conjugado a un sitio de hibridación específico, donde la emisión del fluoróforo, relativamente débil en medio acuoso, se ve amplificada por su intercalación entre pares de bases consecutivos [110]. En ambos casos el aumento de la señal fluorescente depende de la formación de los complejos complementarios con cadenas de ADN de cadena sencilla, lo cual requiere condiciones fuertes para la desnaturalización del ADN de doble cadena original. Con el fin de conseguir mayores sensibilidades en algunos casos se recurre a métodos de amplificación que han permitido llegar a límites de detección del orden de zeptomolar (1 a 500 moléculas de ADN por mL de muestra) [111].

Métodos directos de detección de ADN de doble cadena

Los métodos de detección directos de dsADN, a pesar de estar en sus primeras etapas de desarrollo, son especialmente prometedores y atractivos puesto que, a diferencia de los métodos basados en el reconocimiento de ssADN, no requieren las etapas de desnaturalización del dsADN natural.

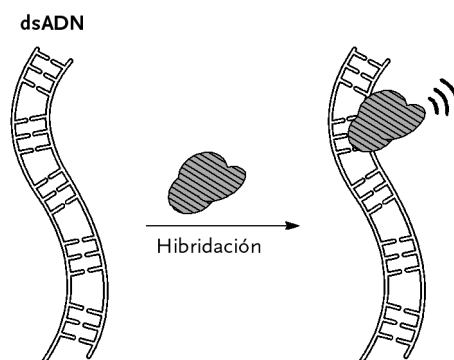


Figura 41. Esquema general del método directo de detección de dsADN.

Los sistemas poliheterocíclicos derivados de la distamicina presentan una emisión de fluorescencia intrínseca muy débil, por lo que su aplicación como sensores requiere la conjugación con grupos fluorogénicos.

En 2003 el grupo de Peter Dervan preparó un conjugado entre una poliamida en horquilla y un fluoróforo de tetrametil rodamina (TMR) [112]. El conector favorece que, en ausencia de ADN, se establezcan interacciones hidrofóbicas entre la TMR y la horquilla de poliamidas, dando lugar a un proceso eficiente de desactivación no radiactiva [113]. La unión específica de la horquilla a la secuencia objetivo en el surco menor del ADN provoca cambios conformacionales en el sensor dificultando esas interacciones y provocando la modulación de la emisión de fluorescencia. Se observa un aumento de unas diez veces en la intensidad de emisión de la TMR.

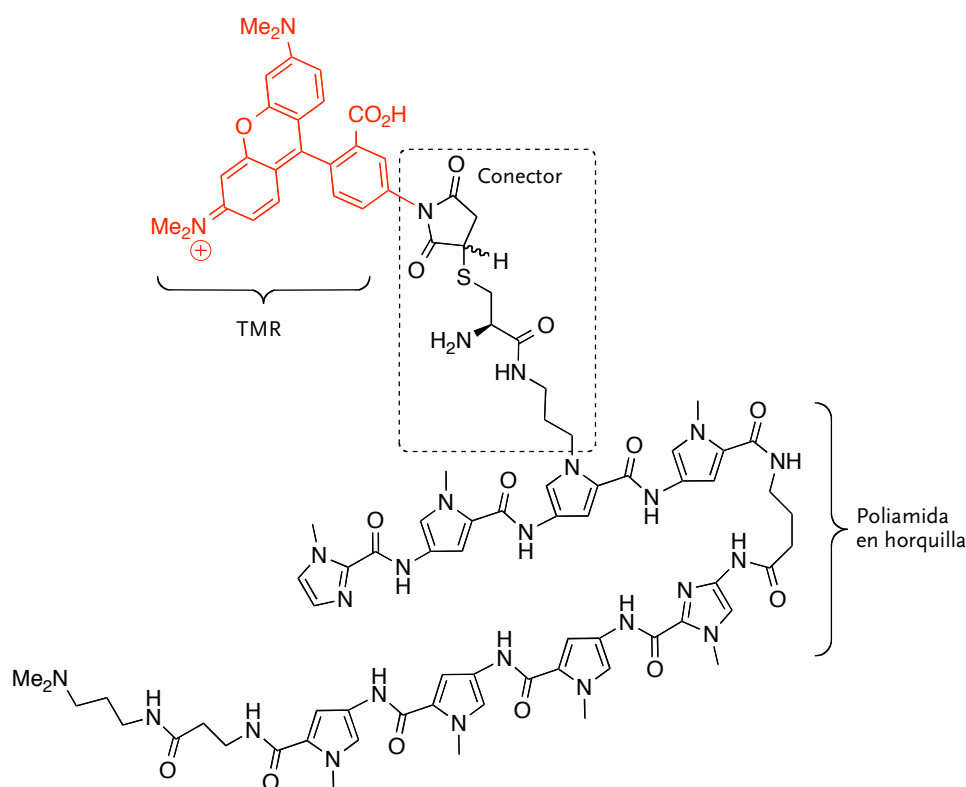


Figura 42. Estructura del primer sensor fluorescente basado en poliamidas en forma de horquillas.

Recientemente el mismo grupo de Dervan ha desarrollado un nuevo tipo de poliamidas en horquilla modificadas que integran los elementos fluorescentes en su propia estructura de reconocimiento [114]. Para el diseño de estas horquillas los autores recurrieron a varias combinaciones con bencimidazol, hidroxí-imidazol e imidazopiridina, debido a su similitud estructural con las combinaciones de heterociclos presentes en las poliamidas en horquilla estándar, al tiempo que contienen sistemas aromáticos más extendidos que aportan propiedades de emisión fluorescente. Las horquillas así sintetizadas muestran un aumento significativo de la fluorescencia en presencia de diferentes secuencias de dsADN (figura 43). Desafortunadamente, la modificación estructural en este tipo de horquillas con respecto a las estructuras estándar es muy grande y la cinética de la unión al dsADN se ve severamente comprometida, hasta el punto de que experimentalmente se vieron obligados a

alargar los tiempos de incubación con los ADN hasta 12 horas. De la misma forma, la modificación estructural perjudica la capacidad y selectividad del reconocimiento.

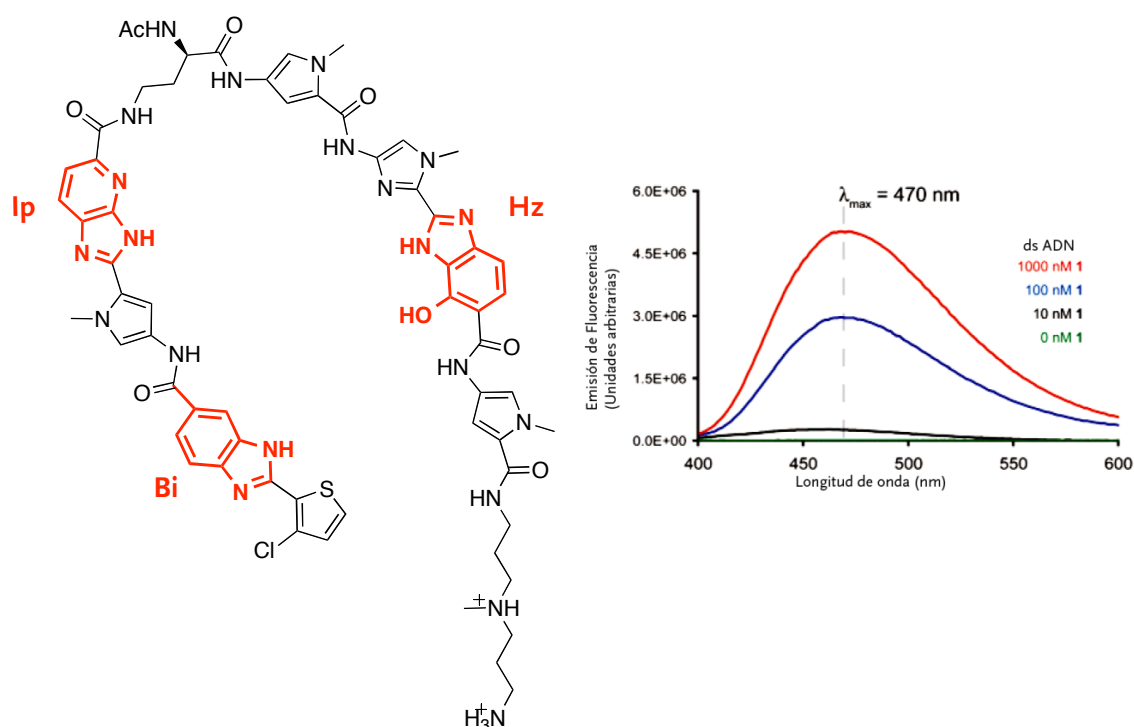


Figura 43. Izquierda: estructura de una poliamida en horquilla con fluorescencia intrínseca. Derecha: espectros de emisión de la horquilla con cantidades crecientes de dsADN.

Tal y como se indicó anteriormente, el surco mayor del dsADN es más rico en grupos funcionales y permite una mejor discriminación entre secuencias que el surco menor. Sin embargo, a pesar de esa ventaja, hasta ahora no se han desarrollado muchos sensores fluorescentes que actúen reconociendo ese surco debido a la dificultad para la obtención de moléculas de tamaño relativamente pequeño con ese modo de unión. El método más habitual seguido para obtener sensores que actúen a través del surco mayor se basa en el uso de dedos de cinc.

Uno de los ejemplos consiste en la aplicación del ensamblaje de fragmentos proteicos dependiente del reconocimiento del dsADN. En esta aproximación se utilizan dos péptidos, cada uno de los cuales contiene un oligómero de dedos de cinc para dirigir el reconocimiento, y un fragmento de una proteína GFP. Cuando los dos péptidos se unen a secuencias de dsADN consecutivas (determinadas por los dedos de cinc), los fragmentos complementarios de la GFP interaccionan, formando una estructura nativa fluorescente. Esta técnica es altamente selectiva, puesto que la GFP fluorescente sólo se ensambla como consecuencia del reconocimiento selectivo del dsADN [115].

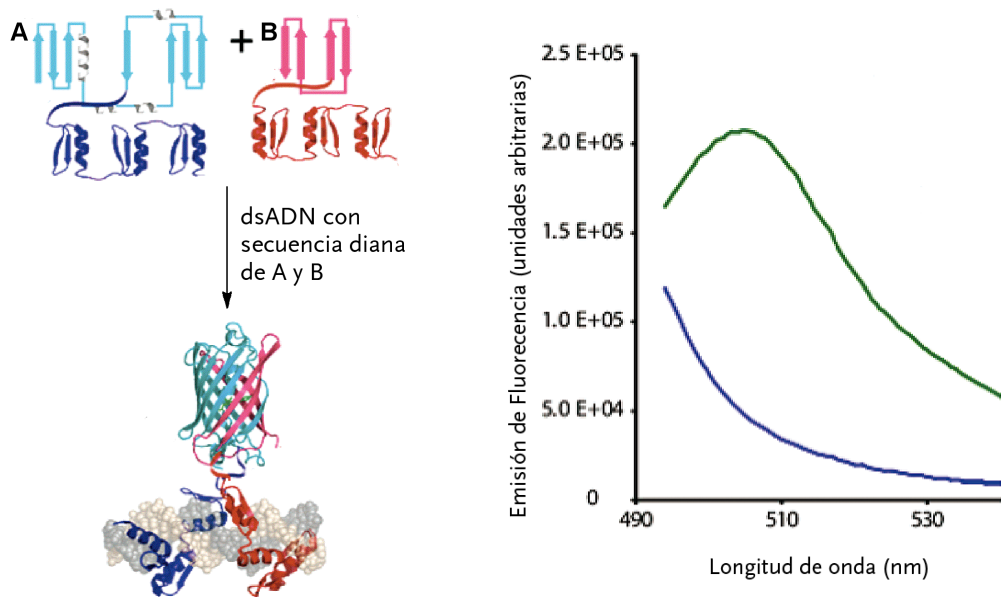


Figura 44. Izquierda: esquema de la estrategia de ensamblaje de los fragmentos GFP como consecuencia del reconocimiento de secuencias vecinas de dsADN. Derecha: espectro de fluorescencia de la mezcla en ausencia (azul) y presencia (verde) del dsADN diana.

Bibliografía

- [1] a) Venter, J.C. y colaboradores, *Science* **2001**, *291*, 1304–1351. b) Pennisi, E. *Science* **2003**, *300*, 409. c) International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*, **2004**, *431*, 931–945.
- [2] Pellois, J. P.; Muir, T. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *39*, 3–22.
- [3] a) Narang, S. A. *Tetrahedron* **1986**, *10*, 487–491.
- [4] a) Kornberg, A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6888–6891. b) Kornberg, A. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 3–5.
- [5] Imperiali, B. *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 9–10
- [6] a) Schreiber, S. L. *Chem. Eng. News* **1992**, *70*, 22–32. b) Famulok, M.; Waldmann, H. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 3–6.
- [7] Waldmann, H.; Janning, P. *Chemical Biology: a practical course*, ISBN: 3–527–30656–0, WILEY–VCH, Weinheim, **2004**; capítulo 1.
- [8] *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 3.
- [9] Altmann, K. H.; Buchner, J.; Kessler, H.; Diederich, F.; Kräutler, B.; Lippard, S.; Liskamp, R.; Klaus Müller, K.; Nolan, E. M.; Samorì, B.; Schneider, G.; Schreiber, S. L.; Schwalbe, H.; Toniolo, C.; van Boeckel, C. A. A.; Waldmann, H.; Walsh, C. T. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 16–29.
- [10] Godwin, H. A.; Davis, B. L. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 176–179.
- [11] a) Morrison, K. L.; Weiss, G. A. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 3–6. b) Quinkert, G.; Wallmeier, H.; Windhab, N.; Reichert, D. *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*, Schreiber, S. L.; Kapoor, T.; Wees G. ISBN 978–3–527–31150–7, WILEY–VCH, Weinheim, **2007**; pág 3–67.
- [12] Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology*, ISBN 0–7167–3136–3, W. H. Freeman, New York, **2000**; capítulo 9.
- [13] Crick, F. H. C. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138–163
- [14] Crick, F. H. C. *Nature*, **1970**, *227*, 561–563.
- [15] a) Baltimore, D. *Nature*, **1970**, *226*, 1209–1211. b) Commoner, B. *Nature*, **1964**, *203*, 486–491. c) Commoner, B. *Nature*, **1968**, *220*, 334–340.
- [16] a) Thieffry, D. C. *Trends in Biochemical Sciences*, **1998**, *23*, 312–316. b) Alonso L. *Investigación y Ciencia*, **2005**, *342*, 92–96.
- [17] a) Orphanides, G.; Reinberg D. *Cell*, **2002**, *108*, 439–451. b) Delgado, M. D.; León, J. *Clin Transl. Oncol.* **2006**, *8*, 780–787.
- [18] Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology*, ISBN 0–7167–3136–3, W. H. Freeman, New York, **2000**; capítulo 10.
- [19] a) Li, Y. J.; Fu, X. H.; Liu, D. P.; Liang, C. C. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2004**, *36*, 1411–1423. b) Khorasanizadeh, S. *Cell*, **2004**, *116*, 259–272.

- [20] Cramer, P.; Buschnell, D. A.; Fu, J.; Gnatt, A. L.; Maier–Davis, B.; Thompson, N. E.; Burgess, R. R.; Edwards, A. M.; David, P. R.; Kornberg, R. D. *Science*, **2000**, *288*, 640–649
- [21] Fuda, N. J.; Ardehali, M. B.; Lis, J. T. *Nature*, **2009**, *461*, 186–192.
- [22] White, R. J. *Gene Transcription: Mechanisms and Control*, ISBN 0–632–04888–3, Backwell Science Ltd, Hong Kong, **2001**; capítulo 1.
- [23] a) Harms, J.; Schluenzen, F.; Zarivach, R.; Bashan, A.; Gat, S.; Agmon, I.; Bartels, H.; Franceschi, F.; Yonath, A. *Cell*, **2001**, *107*, 679–688 b) Ramakrishnan, V. *Cell*, **2002**, *108*, 557–572
- [24] a) Wolberger, C. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 29–56. b) Kornberg, R. D. *Trends in Cell Biology*, **1999**, *9*, M46–M49. c) Patikoglou, G.; Burley, A.K. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *29*, 289–325.
- [25] Cramer, P. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 686–687.
- [26] Ptashne, M. *Nature*, **1988**, *335*, 683–689
- [27] Ogbourne, S.; Antalis, T. M. *Biochem. J.* **1998**, *331*, 1–14
- [28] Martínez, E. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *50*, 925–947.
- [29] a) Buratowski S. *Cell*. **1994**, *77*, 1–3. b) Juven–Gershon, T.; Hsu, J. Y.; Theisen, J. W.; Kadonaga, J. T. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 253–259.
- [30] Lemon, B.; Tjian, R. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2551–2569.
- [31] a) Kornberg, R. D.; Lorch, Y. *Cell*. **1999**, *98*, 285–294. b) Sims, R. J.; Reinberg, D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 815–820.
- [32] Roeder, R. G.; Lorch, Y. *Trends Biochem Sci.* **1996**, *21*, 327–335.
- [33] Flanagan, P. *Nature* **1991**, *350*, 436–438.
- [34] Patashne, M.; Gann A. *Nature* **1997**, *386*, 569–577
- [35] Kornberg, R. D. *Trends Biochem Sci.* **2005**, *30*, 235–239.
- [36] Asturias, F. J. *Curr Opin Struct. Biol.* **2004**, *14*, 121–129.
- [37] Meinhart, A.; Kamenski, T.; Hoepfner, S.; Baumli, S.; Cramer, P. A. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1401–1415
- [38] a) Falvey, E.; Schibler, U. *FASEB J.* **1991**, *5*, 309–314. b) Calkhoven, C. F.; Geert, A. B. *Biochem. J. Mol.* **1996**, *317*, 329–342.
- [39] a) Haussler, M. R; Haussler, C. A.; Jurutka, P. W.; Thompson, P. D.; Hsieh, J–C.; Remus, L. S.; Selznick, S. H.; Whitfield; G. K. *Journal of Endocrinology.* **1997**, *154*, 557–573. b) Schaffer, P. L.; Gewirth, D. T. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *89–90*, 215–219.
- [40] White, R. J. *Gene Transcription: Mechanisms and Control*, ISBN 0–632–04888–3, Backwell Science Ltd, Hong Kong, **2001**; capítulo 5.
- [41] Berg, T. *Curr Opin.Chem. Biol.* **2008**, *12*, 464–471.
- [42] a) Latchman, D. S. *Eukaryotic Transcription Factors*, ISBN 0–12–437178–7, Elsevier Ltd, Italy, **2004**; capítulo 9. b) Brennan P.; Donev, R.; Hewamana, S. *Mol. BioSyst.* **2008**, *4*, 909–919.

- [43] Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 993–996.
- [44] a) Neidle, S.; Thurston, D. E. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *5*, 285–296. b) Noble, M. E.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. *Science* **2004**, *303*, 1800–1805.
- [45] a) Arndt, H. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4552–4560. b) Stafford, R. L.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14026–14033.
- [46] Yin, X.; Giap, C.; Lazo, S. J.; Prochownik, E. V. *Oncogene*, **2003**, *22*, 6151–6159
- [47] Moellering, R. E.; Cornejo, M.; Davis, T. N.; Del Bianco, C.; Aster, J. C.; Blacklow, S. C.; Kung, A. L.; Gilliland, D. G.; Verdine, G. L.; Bradner, J. E. *Nature*, **2009**, *462*, 182–189.
- [48] Darnell, J. E. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 740–747.
- [49] a) Vita, M.; Henriksson, M. *Seminars in Cancer Biology*, **2006**, *16*, 318–330. b) Ruggero, D. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8839–8843. c) Eilers, M.; Eisenman, R. N. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2755–2766. d) Grandori, C.; Cowley, S. M.; James, L. P.; Eisenman, R. N. *Annu. Rev. Cell Dev.* **2000**, *16*, 653–699.
- [50] Guccione, E.; Martinato, F.; Finocchiaro, G.; Luzi, L. Tizzoni, L., Dall’Olio, V.; Zardo, G.; Nervi, C.; Loris, B.; Amati, B. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 764–770.
- [51] a) Curran, T.; Franza, R. *Cell*, **1988**, *55*, 395–397. b) Bergami, P. L.; Lau, E.; Ronai, Z. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 65–75.
- [52] Ángel, P.; Karin, M. *Biochemica and Biophysica Acta*, **1991**, *1072*, 129–157
- [53] a) Rohs, R.; West, S. M.; Sosinsky, A.; Liu, P.; Mann, R. S.; Honig, B. *Nature*, **2009**, *461*, 1248–1254. b) Garvie, C. W.; Wolberger, C. *Molecular Cell*, **2001**, *8*, 937–946.
- [54] Blackburn, G. M.; Gait, M. J.; Loakes, D.; Williams, D. M.; *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, ISBN-10: 0-85404-654-2, RSCPublishing, Cambridge, **2006**; capítulo 2.
- [55] a) Otwinowski, Z.; Schevitz, R. W.; Zhang, R-G.; Lawson, C. L.; Joachimiak, A.; Marmorstein, R. Q.; Luisi, B. F.; Sigler, P. B. *Nature*, **1988**, *335*, 321–329. b) Dickerson, R. E.; Drew, H. R. *J. Mol. Biol.* **1981**, *149*, 761–786.
- [56] Privalov, P. L.; Dragan, A. I.; Crane-Robinson, C.; Breslauer, K. J.; Remeta, D. P.; Minetti, C. A. S. A. *J. Mol. Biol.*, **2007**, *365*, 1–9.
- [57] Luscombe, N. M.; Laskowski, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [58] Berman, H. M.; Westbrook, R. A.; Thornton, J. M. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2860–2861.
- [59] Suzuki, M.; Gerstein, M. *Proteins* **1995**, *23*, 525–535.
- [60] Lewis, M.; Chang, G. Horton, N. C.; Kercher, M. A.; Pace, H. C.; Schumacher, M. A., Brennan, R. G.; Lu, P. *Science*, **1996**, *271*, 1247–1254.
- [61] a) Latchman, D. S. *Eukaryotic Transcription Factors*, ISBN 0-12-437178-7, Elsevier Ltd, Italy, **2004**; capítulo 4. b) Luscombe, N. M.; Austin, S. E.; Berman, H. M.; Thornton, J. M. *Genome Biology*, **2000**, *1*, 1–37. c) Pabo, C. O. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 1053–1094.
- [62] Harrison, S. C. *Nature*, **1991**, *353*, 715–719.

- [63] a) Dhanasekaran, D.; Negi, S.; Sugiura, Y. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 45–52. b) Krishna, S.; Majumdar, I.; Grishin, N. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 532–550. c) Pabo, C. O.; Peisach, E.; Grant, R. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 313–340.
- [64] Iuchi, S.; Kuldell, N. *Zinc Finger Proteins: From atomic contact to cellular function*, ISBN 0–306–48229–0, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2005**; capítulo 1.
- [65] Jamieson, A. C.; Miller, J. C.; Pabo, C. O. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2003**, *2*, 361–368.
- [66] Kohler, J. J.; Schepartz, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2435–2443.
- [67] Allemann, R. K.; Egli, M. *Chemistry & Biology*. **1997**, *4*, 643–650.
- [68] Pabo, C. O.; Nekludova, L. *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 597–624.
- [69] Masayuki, O.; Nakamura, H. *Genes to Cell*, **2000**, *5*, 319–326.
- [70] Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Mascareñas, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 338–349
- [71] Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Kim, P. S. *Science*, **1990**, *249*, 769–771
- [72] a) Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard III, W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 9094–9096. b) Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard III, W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 4892–4896.
- [73] Cuenoud, B.; Shepartz, A. *Science*, **1993**, *259*, 510–513.
- [74] a) Ueno, M.; Murakami, A.; Makino, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575–12576 b) Morii, T.; Yamane, J.; Aizawa, Y.; Makino, K.; Sigiura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10011–10017.
- [75] Caamaño, A. M.; Vázquez, M. E.; Martínez–Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3104–3107.
- [76] a) Woolley, G. A.; Jaikaran, A. S. I.; Berezovski, M.; Calarco, J. P.; Krylov, S. N.; Smart, O. S.; Kumita, J. R. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 6075–6084. b) Kneissl, S.; Loveridge, E. J.; Williams, C.; Crump M. P.; Allemann, R. K. *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 3046–3054.
- [77] Zhang, M.; Wu, B.; Zhao, H.; Taylor, J. W. *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 125–136
- [78] Stanojevic, D.; Verdine, G. L. *Nature. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 450–457.
- [79] a) Zondlo, N. J.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6938–6939. b) Chin, J.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2929–2930.
- [80] Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Castedo, L.; Gramberg, D.; Mascareñas, J. L. *Tetrahedron Letters*, **1999**, *40*, 3625–3628
- [81] Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez–Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723–4725
- [82] Blanco J. B.; Vázquez M. E.; Martinez–Costas J.; Castedo L.; Mascareñas J. L. *Chemistry & Biology*, **2003**, *10*, 713–722
- [83] Cai, X.; Gray Jr, P. J.; Von Hoff, D. *Cancer Treatment Reviews*, **2009**, *35*, 437–450
- [84] a) Wilhelmsson, L. M.; Lincoln, P.; Nordén, B. *Sequence–specific DNA Binding Agents*, Waring, M. ISBN–10: 0–85404–370–5, RSCPublishing, Cambridge, **2006**; capítulo 4. b) Lorente, A.; Fernández, M. J. *An. Quím.* **2008**, *104*, 280–289. c) Hannon, M. J.; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280–295

- [85] Thomas, T. J.; Bloomfield, V. A. J. *Biopolymers*, **1984**, *23*, 1295–1306.
- [86] Berthet, N.; Michon, J.; Lhomme, J.; Teulade-Fichou, M. P.; Vigneron, J-P.; Lehn, J-M. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 3625–3630.
- [87] Davies, J.; Dodson, E. J.; Moore, M. H. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 415–425
- [88] Praseuth, D.; Guieysse, A. L.; Hélène, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 181–206.
- [89] Da Ros, T.; Spalluto, G.; Prato, M. Saison-Behmoaras, T; Boutorine, A.; Cacciari, B. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 71–88.
- [90] a) Wemmer, D. E. *Proc. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439–461. b) Nelson, S. M.; Ferguson, L. R.; Denny, W. A. *Mutation Research*, **2007**, *623*, 24–40.
- [91] Nguyen, B.; Lee, M. P. H.; Hamelberg, D.; Joubert, A.; Bailly, C.; Brun, R.; Neidle, S.; Wilson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13680–13681.
- [92] Hamelberg, D.; Williams, L. D.; Wilson, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7745–7755.
- [93] Lacy, E. R.; Madsen, E. M.; Lee, M.; Wilson, W. D. *Small Molecule DNA and RNA Binders*, Demeunynck, M.; Bailly, C.; Wilson, D. E. ISBN: 3-527-30595-5, WILEY-VCH, Weinheim, **2003**; capítulo 15.
- [94] Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 5723–5727.
- [95] Chen, F.; Sha, F. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 11144–11151.
- [96] a) Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 1376–1380. b) Lown, J. W.; Krowicki, K.; Bhat, U. G.; Skorobogaty, A.; Ward, B.; Dabrowiak, J. C. *Biochemistry*, **1986**, *25*, 7408–7416.
- [97] a) Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215–2235. b) Dervan, P. B.; Edelson, B. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284–299. c) Dervan, P. B.; Poulin-Kerstien, A. T.; Fechter, E. J.; Edelson, B. S. *Top Curr. Chem.* **2005**, *253*, 1–31
- [98] a) Best, T. P.; Edelson, B. S.; Nickols, N. G.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12063–12068. b) Edelson, B. S.; Best, T. P.; Olenyuk, B.; Nickols, N. G.; Doss, R. M.; Foister, S.; Heckel, A.; Dervan, P. B. *Nuc. Acid Res.* **2004**, *32*, 2802–2818
- [99] Nunn, C. M.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2317–2325
- [100] a) Lansiaux, A.; Dassonneville, L.; Facompre, M.; Kumar, A.; Stephens, C.E.; Bajic, M.; Tanius, F.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W.; Bailly, C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1994–2002; b) Susbielle, G.; Blattes, R.; Brevet, V.; Monod, C.; Kas, E. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 409–420; c) Reddy, B. S. P.; Sondhi, S.M.; Lown, J. W. *Pharm. Ther.* **1999**, *84*, I–III. d) Neidle, S.; Kelland, L. R.; Trent, J. O.; Simpson, I. J.; Boykin, D.W.; Kumar, A.; Wilson, W. D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1403–1408
- [101] a) Bray, P. G.; Barrett, M. P.; Ward, S. A.; de Koning, H. P. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 232–239; b) Bouteille, B.; Oukem, O.; Bisser, S.; Dumas, M. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2003**, *17*, 171–181; c) Rosypal, A. C.; Werbovets, K. A.; Salem, M.; Stephens, C. E.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R. *J. Parasitol.* **2008**, *94*, 743–749.

- [102] a) Mathis, A. M.; Bridges, A. S.; Ismail, M. A.; Kumar, A.; Francesconi, I.; Anbazhagan, M.; Hu, Q.; Tanious, F. A.; Wenzler, T.; Saulter, J.; Wilson, W. D.; Brun, R.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Hall, J. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2801–2810; b) Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Mathis, A.; Tevis, D.; Hall, J. E.; Boykin, D. W. *Biochimie* **2008**, *90*, 999–1014; c) Thuita, J. K.; Karanja, S. M.; Wenzler, T.; Mdachi, R. E.; Ngotho, J. M.; Kagira, J. M.; Tidwell, R.; Brun, R. *Acta Trop.* **2008**, *108*, 6–10.
- [103] a) Tidwell, R. R.; Jones, S. K.; Geratz, J. D.; Ohemeng, K. A.; Cory, M.; Hall, J. E. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1252–1257; b) Mayence, A.; Eynde, J. J. V.; Krogstad, F. M.; Krogstad, D. J.; Cushion, M. T.; Huang, T. L. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2700–2705; c) Rodríguez, F.; Rozas, I.; Kaiser, M.; Brun, R.; Nguyen, B.; Wilson, W. D.; García, R. N.; Dardonville, C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 909–923.
- [104] a) Dardonville, C.; Barrett, M. P.; Brun, R.; Kaiser, M.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3748–3752; b) Corey, M.; Tidwell, R. R.; Fairley, T. A. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 431–438.
- [105] Sánchez, M. I.; Jiménez, A.; Mascareñas, J. L.; Vázquez, M. E. *An. Quím.* **2009**, *105*, 180–188.
- [106] a) Yan, Y.; Marriott, G.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 635–640. b) Jameson, D. M.; Croney, J. C.; Moens, P. D.; *Methods Enzymol.* **2003**, *360*, 1–43. c) Pinaud, F.; Michalet, X.; Bentolilla, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Iyer, G.; Weiss, S.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 1679–1687. d) Lippincott–Schwartz, J.; Patteron, G. H.; *Science* **2003**, *300*, 87–91.
- [107] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, ISBN: 3–527–29919–X, WILEY–VCH, Weinheim, **2002**; capítulo 3
- [108] a) Nielsen, P. E.; *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 545–550. b) Levsky, J. M.; Singer, R. H.; *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2833–2838. c) Bissonnette, L.; Bergeron, M. G. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2006**, *6*, 433–450.
- [109] a) Tyagi, S.; Bratu, D. P.; Kramer, F. R.; *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49–53. b) Tyagi, S.; Kramer, F. R.; *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [110] Svanvik, N.; Westman, G.; Wang, D.; Kubista, M. *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26–35.
- [111] Ghosh, I.; Stains, C. I.; Segal, D. J.; *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 551–560.
- [112] Rucker, V. C.; Foister, S.; Melander, C.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1195–1202.
- [113] Rucker, V. C.; Dunn, A. R.; Sharma, S.; Dervan, P. B.; Gray, H. B. *J. Phys. Chem.* **2004**, *108*, 7490–7494.
- [114] Chenoweth, D. M.; Viger, A.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2216–2217.
- [115] Stains, C. I.; Porter, J. R.; Ooi, A. T.; Seal, D. J.; Ghosh, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10782–10783.

OBJETIVOS

Recapitulando brevemente lo que se ha indicado en la introducción, la comprensión de las bases moleculares del proceso de unión específica de los factores de transcripción al ADN es uno de los grandes objetivos de la investigación en el área de la química biológica, puesto que abriría las puertas a la modificación programada de los patrones de expresión de proteínas. En este contexto es especialmente interesante el estudio de **versiones artificiales simplificadas de factores de transcripción**, que de alguna forma sean capaces de mimetizar sus características de interacción con ADN.

Por ello en esta tesis se planteó como objetivo general diseñar y sintetizar moléculas capaces de inducir nuevos procesos de reconocimiento biomolecular codificado por el ADN de doble cadena. En concreto se fijaron los siguientes objetivos:

- *Evaluación de la influencia del conector entre el tripirrol y la región básica de GCN4 en la interacción, de estos híbridos, con el ADN.* La información resultante puede ser de importancia para el diseño de nuevos agentes y para entender mejor las bases del reconocimiento molecular.
- *Evaluación y optimización de la internalización de los agentes de reconocimiento de ADN sintetizados.* El análisis de las propiedades de transporte es fundamental, ya que uno de los principales obstáculos de la aplicación práctica de los agentes que interaccionan con ADN reside en la dificultad intrínseca de cruzar las membranas celulares y alcanzar el núcleo en un tiempo relativamente pequeño.
- *Desarrollo de la estrategia de reconocimiento bivalente surco mayor/surco menor en otras familias de factores de transcripción.* Demostrar la aplicación general de dicha estrategia extrapolándola a otra familia de factores de transcripción, en concreto, a la familia de los *dedos de cinc*.
- *Desarrollar alternativas fluorogénicas para la interacción en el surco menor y estudiar su posible utilización como sensores fluorescentes de secuencias específicas de ADN.* Las dificultades para la síntesis de los compuestos análogos a la distamicina sugiere la búsqueda de agentes de reconocimiento del surco menor que sean sintéticamente más sencillos y con propiedades ópticas que faciliten su caracterización y utilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reconocimiento de ADN mediante conjugados entre regiones básicas bZIP y tripirroles: influencia de la estructura del conector en la interacción

Objetivo y diseño

Los estudios precedentes desarrollados en nuestro grupo con los híbridos A₁, A₂, A₃, habían puesto de manifiesto la importancia de la *longitud* del conector entre las dos unidades de reconocimiento, la región básica de GCN4 y la molécula de tipo distamicina, para conseguir una interacción de alta afinidad con el ADN. En concreto, la longitud del híbrido A₃, parece la más apropiada para la interacción simultánea surco mayor/surco menor, al observarse una afinidad por la secuencia consenso de ADN comparable a la de los factores de transcripción naturales [82].

El siguiente paso consistió en abordar la influencia de la *naturaleza química* del conector en el reconocimiento. En concreto se quería evaluar el papel de la amina secundaria presente en la cadena en dicha interacción, puesto que al encontrarse protonada a pH fisiológico podría formar enlaces de hidrógeno y/o interacciones electrostáticas con los grupos fosfato del esqueleto del ADN favoreciendo el reconocimiento. Para comprobar dicha posibilidad, se planteó la síntesis y evaluación de un híbrido análogo a A₃ donde el –NH– es sustituido por un –O–. Este cambio imposibilitaría la formación de enlaces de hidrógeno y/o contactos electrostáticos y serviría para confirmar el papel de los mismos en la interacción.

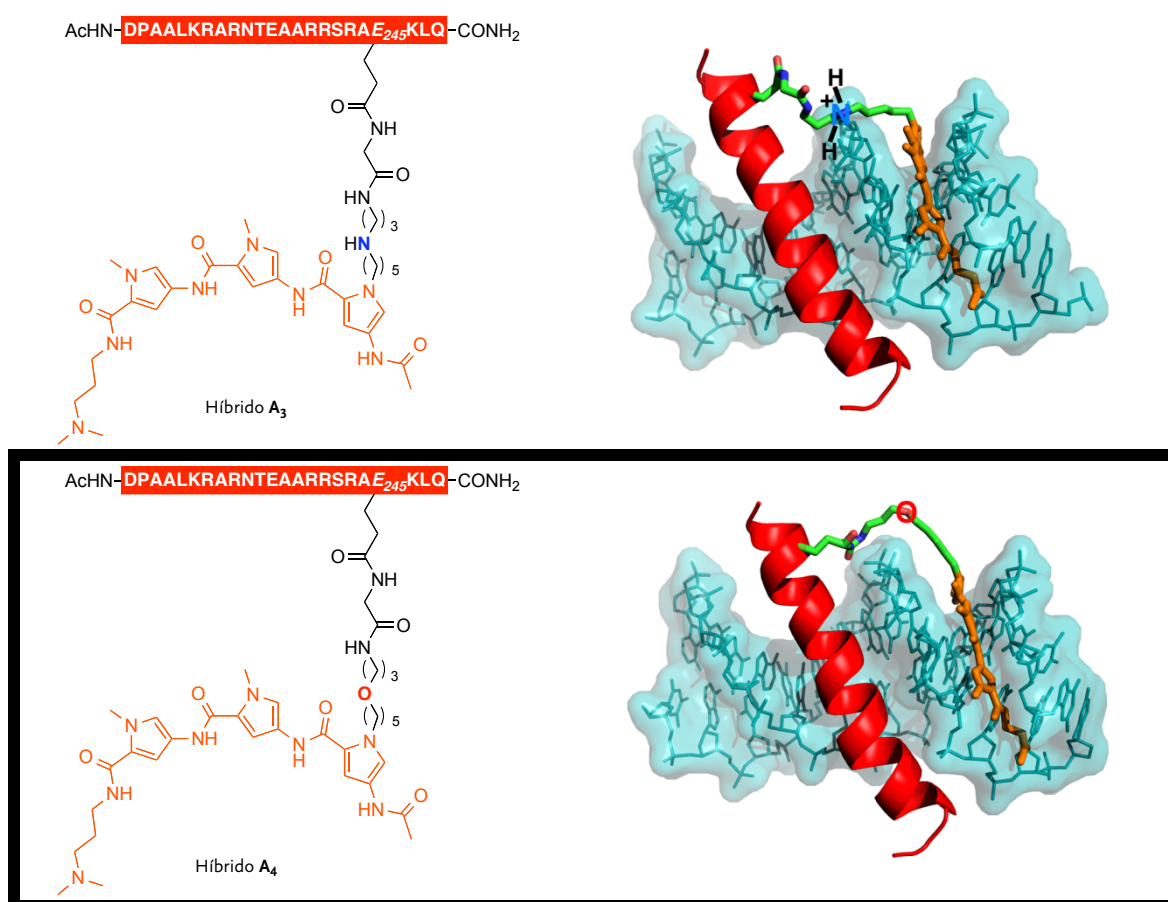
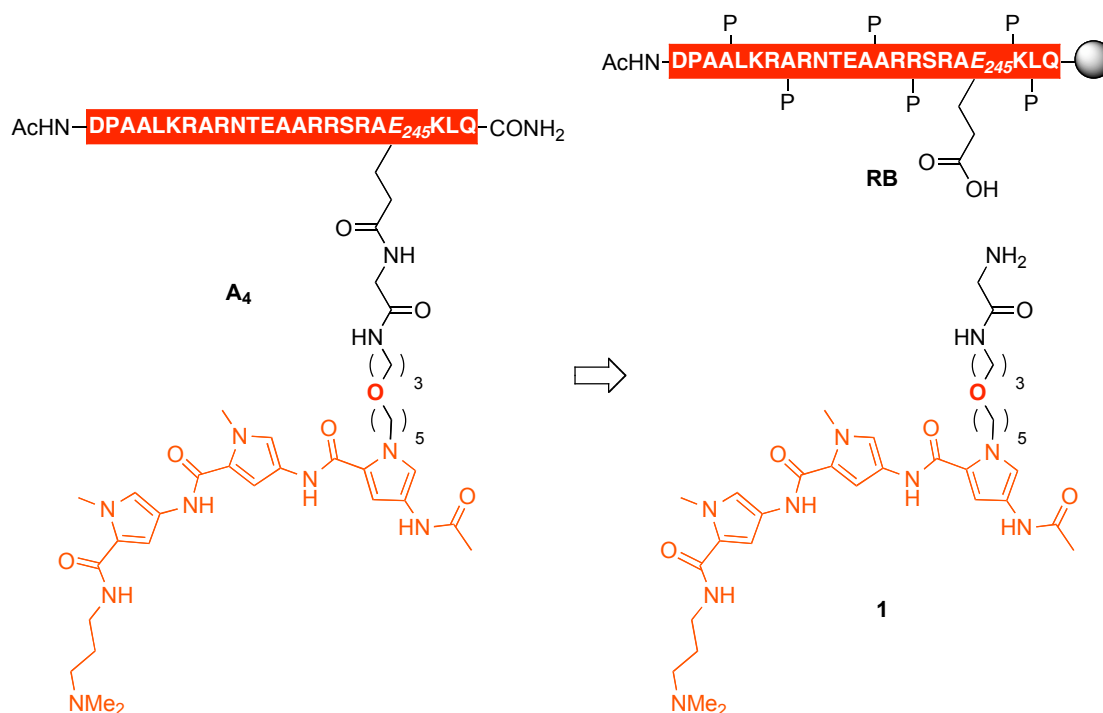


Figura 45. Figura comparativa entre el híbrido A₃ y el que se pretende sintetizar y evaluar, híbrido A₄.

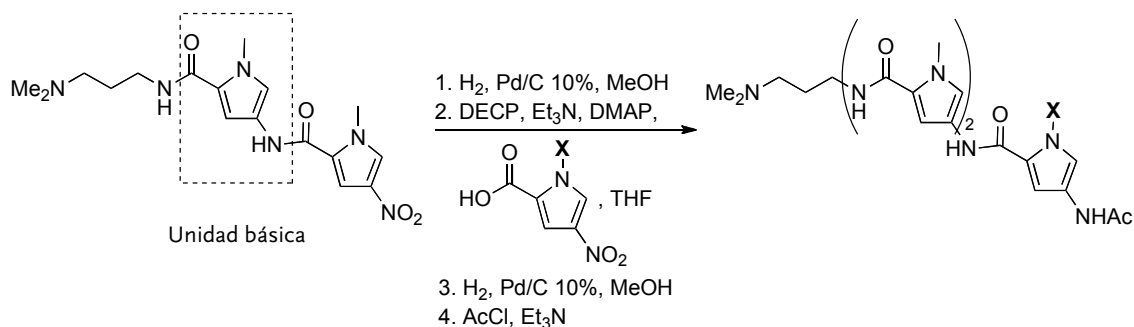
Síntesis

La síntesis del híbrido **A₄** se realizó siguiendo la estrategia general empleada en nuestro grupo para estos sistemas. Esto es, un acoplamiento en fase sólida entre el tripirrol equipado con una cadena lateral adecuada y el péptido unido a la resina, desprotegido ortogonalmente en un único residuo, el Glu de la posición 245 (*E₂₄₅*).



Esquema 1. Retrosíntesis del híbrido **A₄**.

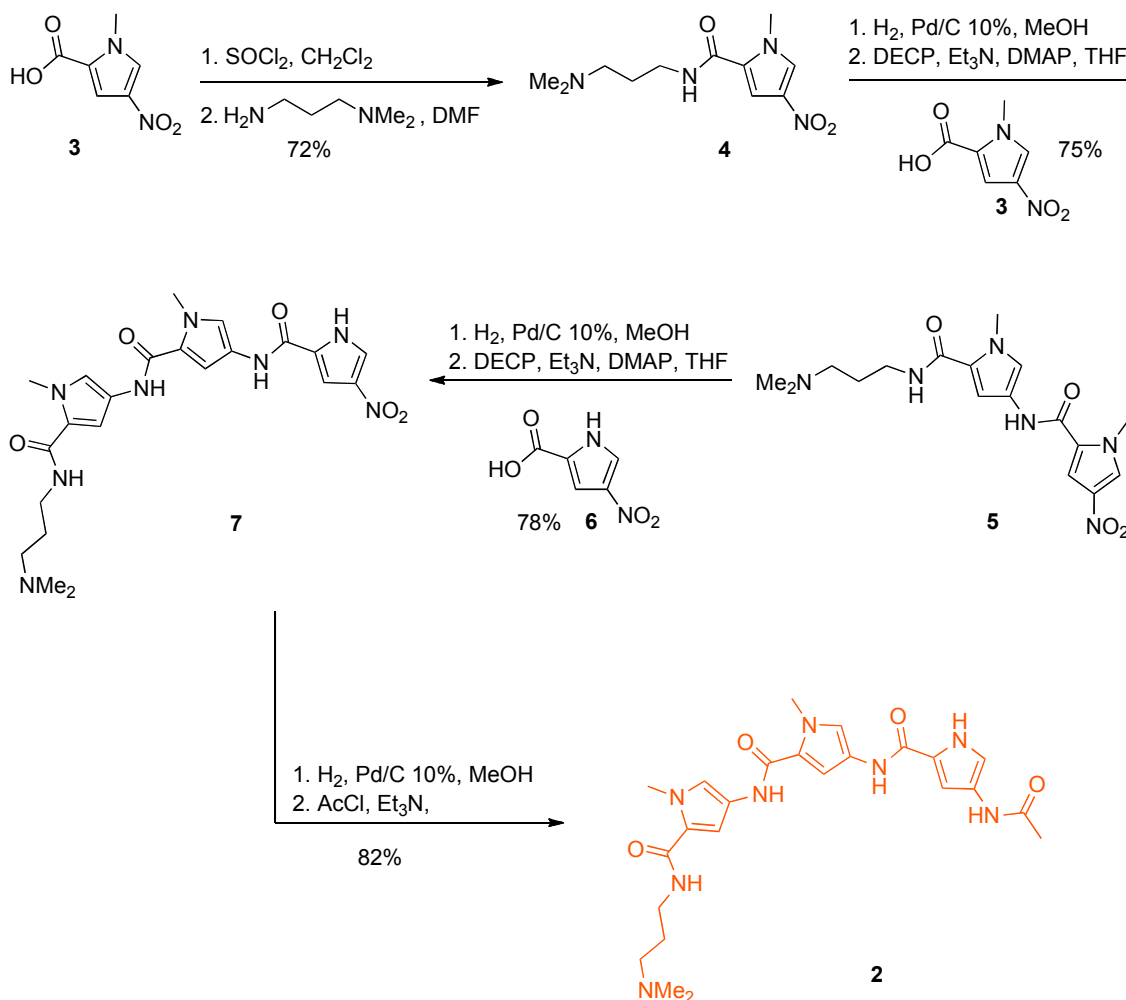
El tripirrol seleccionado incluye la sustitución de los grupos 3-amidiniopropil del extremo C-terminal y del formilo del extremo N-terminal presentes en la distamicina natural, por los grupos: *N*, *N*-dimetilaminopropil, y acetamida respectivamente. Estas modificaciones confieren una mayor estabilidad al compuesto sin perjudicar sus propiedades de unión [116]. La síntesis de estos compuestos, realizada previamente en nuestro grupo, se basaba en la unión a través de enlaces de amida de la unidad básica *N*-metil-4-nitropirrol-2-carboxílico y del monopirrol análogo correspondientemente alquilado.



Esquema 2. Últimas etapas de la síntesis de la unidad de reconocimiento del surco menor de nuestro grupo, donde **X** representa cualquier cadena alquímica.

Tomando como base los precedentes sintéticos de estos sistemas en nuestro laboratorio, se decidió desarrollar una nueva estrategia para acceder al derivado tripirrólico **1** sintetizando la unidad tripirrólica común **2**.

El tripirrol **2** se obtuvo a partir del ácido **3** que se hizo reaccionar con cloruro de tionilo para obtener el cloruro de ácido correspondiente. El uso de dicho cloruro de ácido como agente acilante difiere del planteamiento original de Bruice y sus colaboradores [116], donde el ácido se activa con cianofosfonato de dietilo (DECP) para sintetizar la amida correspondiente.^v A continuación, el cloruro de ácido se trató con la *N*¹, *N*¹-dimetilpropano-1, 3-diamina para dar el pirrol **4**. El grupo nitro de éste se redujo mediante hidrogenación catalítica y la amina resultante se condensó directamente con el ácido **3**, previamente activado con DECP. De este modo se obtuvo el dipirrol **5**, sobre el que se llevaron a cabo una serie de reacciones análogas a las anteriores para obtener el compuesto tripirrólico **7**. Finalmente, se redujo y acetiló el grupo nitro de este compuesto para dar lugar al intermedio clave de la síntesis **2**. Éste se purificó y se caracterizó mediante RMN y espectroscopía de masas.



Esquema 3. Síntesis de la unidad básica de reconocimiento del surco menor **2**.

^v La introducción de este agente activante en la síntesis de análogos sintéticos de la distamicina tuvo en su momento una gran relevancia, ya que condujo a un notable aumento en el rendimiento en las etapas de acoplamiento entre monopirroles, pero averiguamos que no es necesario su uso en esta primera etapa para obtener un buen rendimiento.

Espectroscópicamente la introducción de una nueva unidad pirrólica en el fragmento dipirrólico **5** y posterior acetilación conduce a un desplazamiento característico del máximo de absorción de 20 nm hacia al rojo.

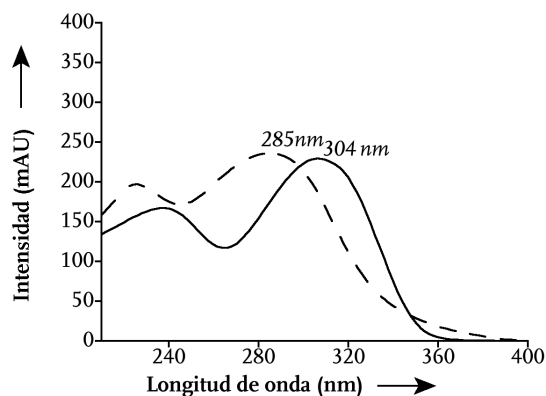
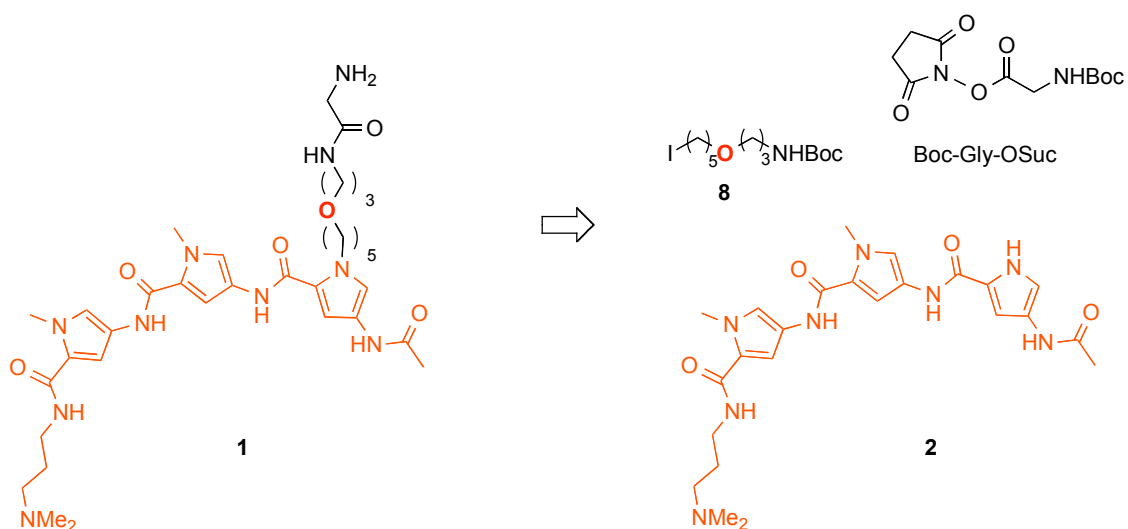


Figura 46. Espectros de absorción de los compuestos: dipirrol **5** (línea discontinua) y tripirrol **2** (línea continua).

Este nuevo procedimiento, más corto y versátil que el desarrollado anteriormente en el grupo, supone la síntesis del intermedio común **2** que puede ser finalmente modificado de forma divergente con diferentes cadenas alquílicas, de manera que se pueden obtener fácilmente un mayor número de derivados sin tener que efectuar cada síntesis desde el inicio.

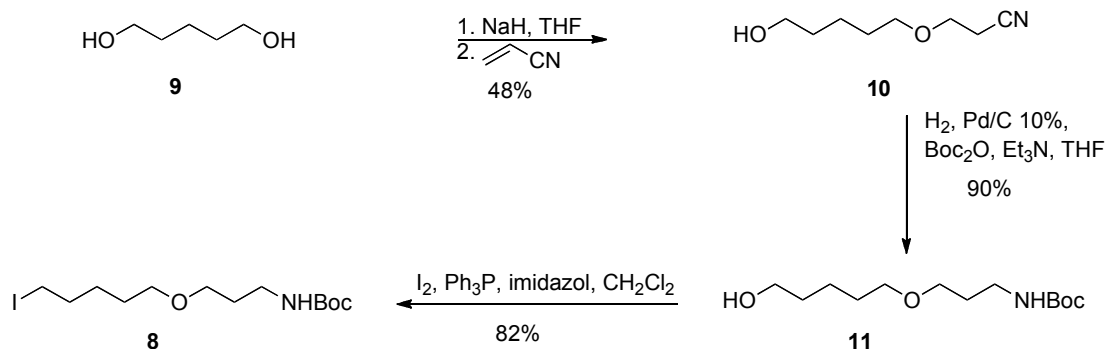
En el esquema inferior se muestra la retrosíntesis del compuesto alquilado **1**, al que se llegaría después de una reacción de alquilación seguida de una acilación con una glicina convenientemente protegida y activada:



Esquema 4. Retrosíntesis de la alquilación de la unidad de reconocimiento del surco menor.

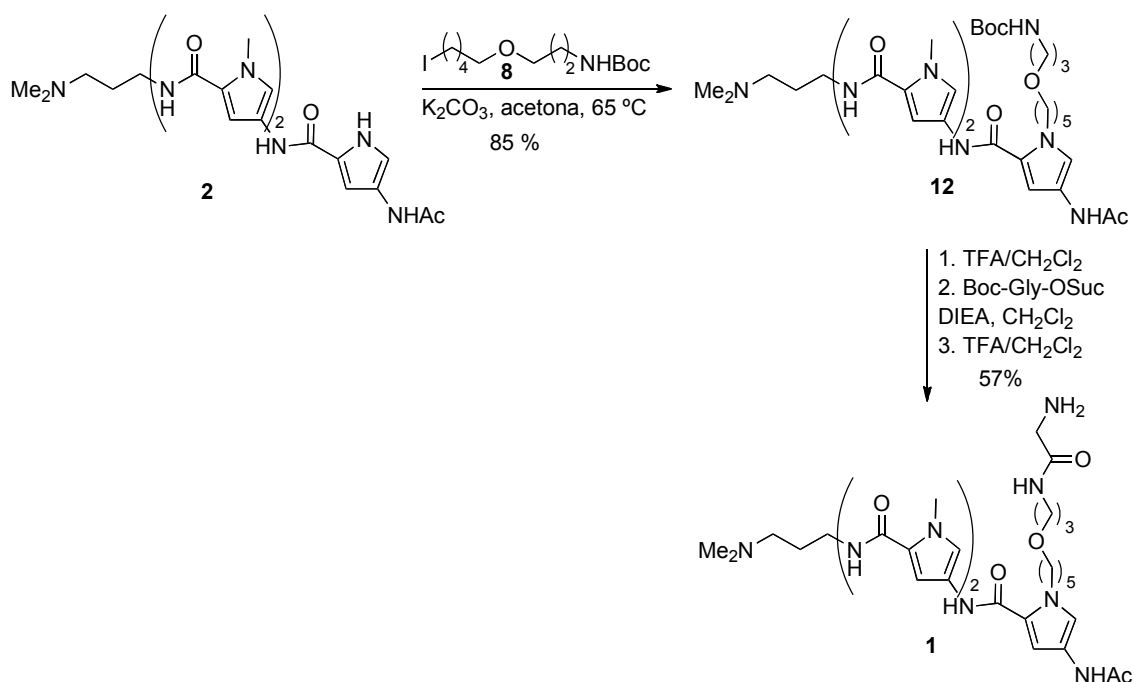
La incorporación de la cadena se llevó a cabo mediante una reacción de tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ entre el derivado tripirrólico **2** y el yoduro **8**. El agente alquilante se preparó en tres pasos a partir de

sustrato comercial 1, 5-pentanodiol. Inicialmente, éste se desprotonó en presencia de hidruro sódico y el alcóxido resultante se adicionó al acrilometilo, dando lugar al nitrilo **10**. El rendimiento de la adición fue moderado, probablemente debido a problemas de diadición. El siguiente paso consistió en la reducción del nitrilo a amina y su protección *in situ* en un único paso, para lo cual se trató el compuesto **10** en las condiciones clásicas de hidrogenación catalítica sobre Pd/C en presencia de dicarbonato de di-*tert*-butilo. Posteriormente se realizó la halogenación del alcohol **11** utilizando el reactivo de yodación de Garegg [117].



Esquema 5. Síntesis del agente alquilante **8**.

Posteriormente, el compuesto tripirrólico **2** se hizo reaccionar con el agente alquilante **8** en acetona a reflujo y empleando carbonato potásico como base. El producto resultante **12** se purificó por cromatografía en columna y se caracterizó mediante RMN y espectroscopía de masas. A continuación, se eliminó del grupo protector Boc, y la amina resultante se condensó con la glicina activada Boc-Gly-OSuc. Finalmente, la desprotección de las aminas dio lugar al aminotripirrol deseado **1** para acoplar al péptido.



Esquema 6. Alquilación del tripirrol **2**.

En la siguiente figura se muestra el cromatograma de HPLC del compuesto tripirrólico alquilado **1** y su correspondiente espectro de absorción. Una propiedad general de este tipo de compuestos y sus conjugados, es la presencia de dos bandas de absorción a 240 y 304 nm.

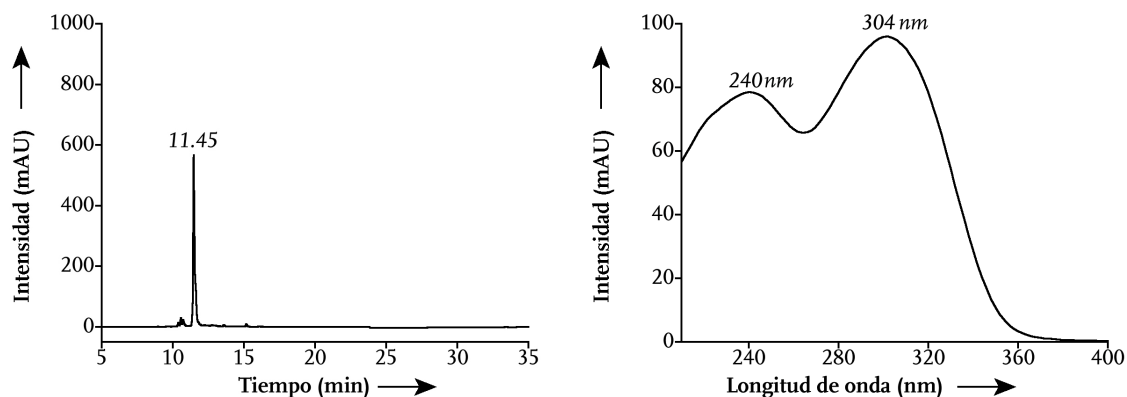
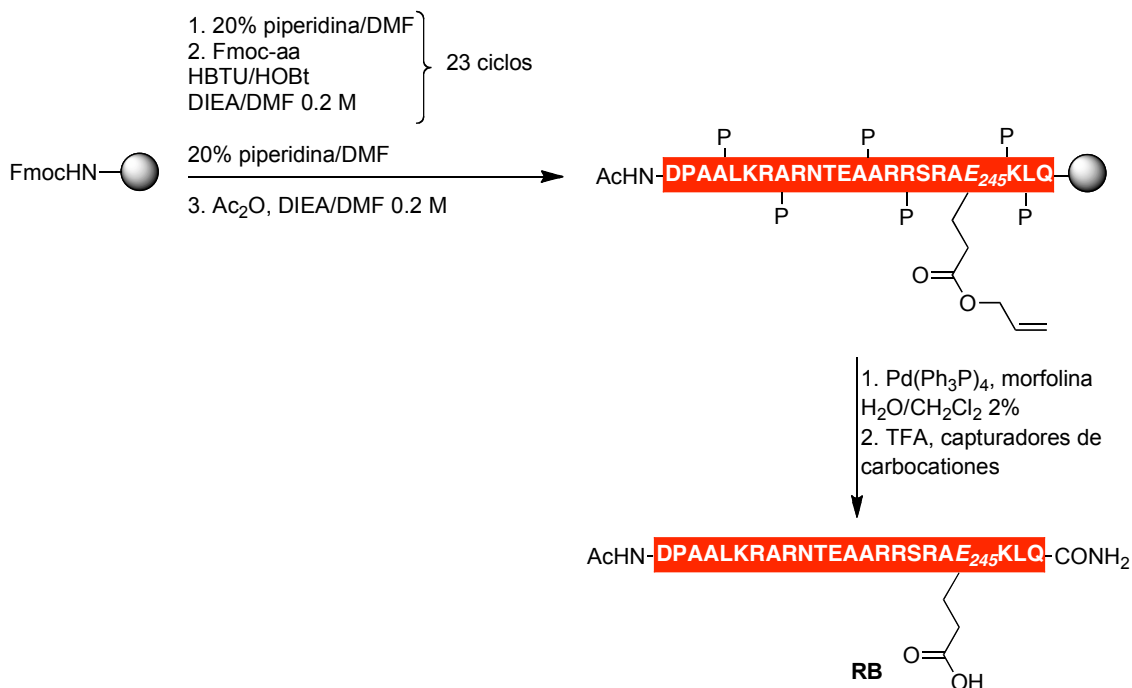


Figura 47. Izquierda: cromatograma de HPLC del tripirrol alquilado **1**, gradiente 1, $\lambda = 222 \text{ nm}$.^{vi} Derecha: espectro de absorción.

La síntesis del péptido se llevó a cabo siguiendo la metodología estándar Fmoc de síntesis de péptidos en fase sólida [118], utilizando una resina de tipo PAL-PEG-PS, que en medio ácido fuerte (TFA) libera el péptido en forma de amida. En el siguiente esquema se muestra el procedimiento seguido para preparar el péptido **RB**.



Esquema 7. Síntesis en fase sólida de la región básica de la proteína GCN4 (**RB**).

^{vi} En los cromatogramas de esta tesis se han utilizado tres gradientes diferentes (ver parte experimental).

El análisis de la estructura cristalográfica de la proteína GCN4 sugería que la Arg 245 era la posición más conveniente para realizar la unión bivalente puesto que su cadena lateral se encuentra preorientada hacia el surco menor. Con el fin de disponer de un grupo funcional para la conjugación con el tripirrol, se introdujo en esa posición un aminoácido de Glu (E_{245}), protegido en su cadena lateral con un grupo Alilo. La región básica de GCN4 se sintetizó a través de 23 ciclos de desprotección/acoplamiento y se acetiló en extremo N-terminal. A continuación, el residuo E_{245} se desprotegió selectivamente con $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (98:2) usando morfolina como base [119]. La desprotección y rotura del péptido contenido en una pequeña porción de resina, nos permitió confirmar mediante EM/HPLC-FR la identidad del péptido **RB**.

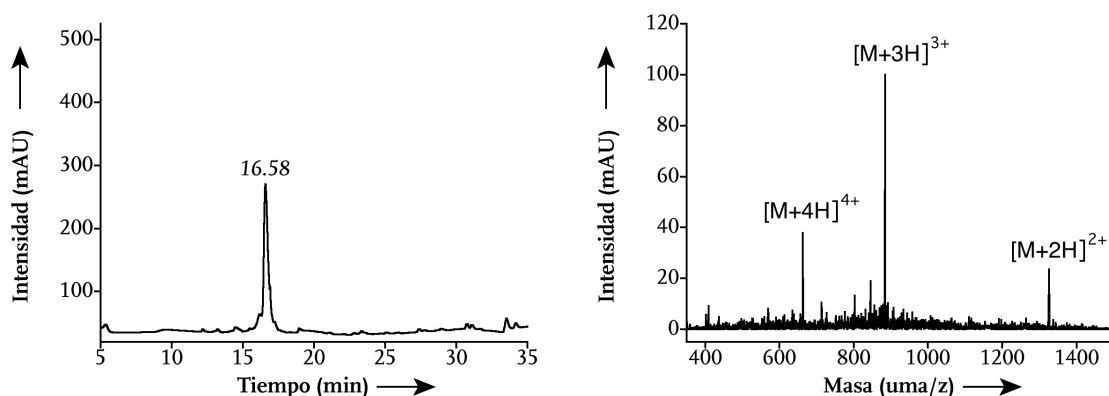
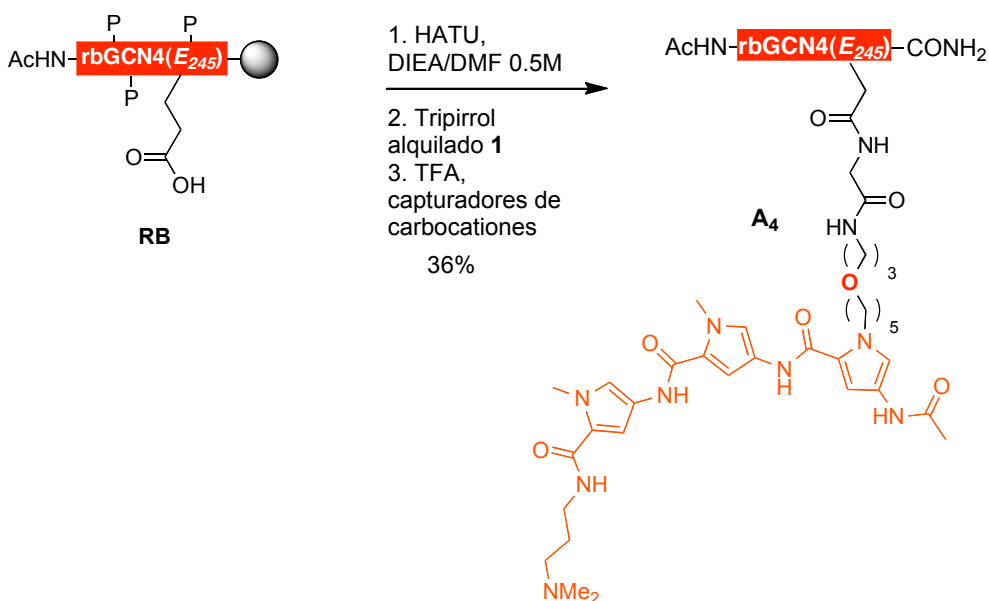


Figura 48. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de **RB**, gradiente 2, $\lambda = 222 \text{ nm}$. Derecha: espectro de masas; *calcd.* para $\text{C}_{109}\text{H}_{193}\text{N}_{43}\text{O}_{34}$: 2649.9. *Encontrada*: 1325.9 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; 884.2 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$; 663.4 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

El acoplamiento ortogonal entre la amina del tripirrol **1** y el residuo E_{245} , para dar el híbrido **A₄**, se realizó en fase sólida siguiendo procedimientos previamente descritos y desarrollados en nuestro grupo [81], [82] y utilizando HATU como activante [120].



Esquema 8. Síntesis en fase sólida del híbrido **A₄**.

El análisis del crudo de desprotección a través de EM/HPLC–FR mostró la aparición de un pico mayoritario cuyo espectro de absorción presenta las bandas características del tripirrol a 240 y 304 nm, así como un aumento de la intensidad de la banda en torno a 220 nm, correspondiente a la absorción de los enlaces amida del péptido. La identidad del producto aislado se corroboró mediante espectroscopía de masas.

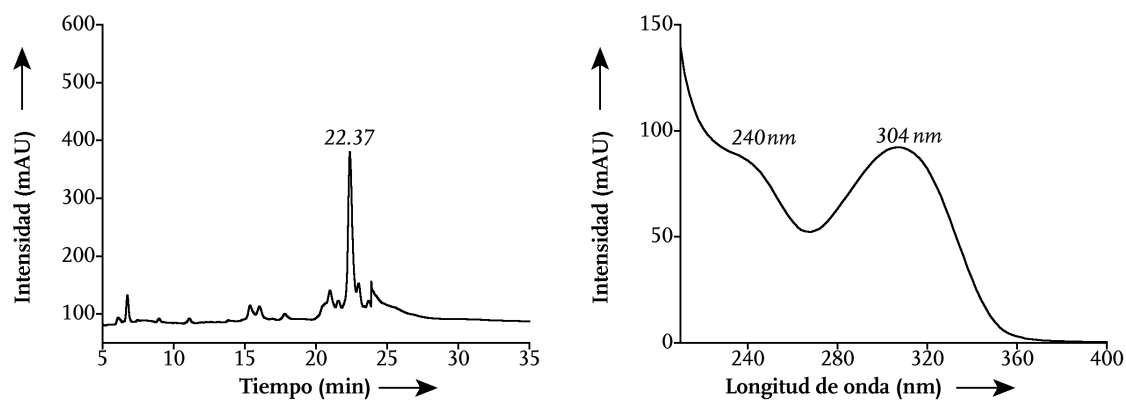


Figura 49. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción para obtener el híbrido A_4 , gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción del híbrido A_4 .

Estudio de la interacción con el ADN

Tal como se ha comentado en la introducción, la región básica de las proteínas bZIP no presenta estructura secundaria definida cuando no interacciona con el ADN, de tal forma que **la cadena polipeptídica está plegada en la conformación de hélice α sólo en presencia del ADN que contenga la secuencia correcta de reconocimiento** [121]. Este cambio conformacional permite utilizar la técnica del dicroísmo circular (DC) para estudiar el proceso de interacción con el ADN.

El DC mide la diferencia de absorción entre la luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha que se observa cuando el compuesto es quiral, o está situado en un ambiente asimétrico [122]. Las proteínas presentan estructuras secundarias quirales como consecuencia de estar formados por aminoácidos naturales que también son quirales (excepto Gly). Las proteínas tienen, por lo tanto, señales características de dicroísmo circular.

El ADN presenta un espectro de dicroísmo circular característico, que surge como consecuencia de la absorción de las bases nitrogenadas que, aunque son aquirales, se encuentran en un entorno quiral dentro de la hélice del ADN como consecuencia de la asimetría de la desoxirribosa [123]. Además también existen señales diferentes para cada conformación del ADN. La conformación B del ADN se caracteriza por una banda positiva a 275 nm, una banda negativa a 240 nm con el cero en torno a 258 nm y otras dos bandas positivas en torno a 220 y 195 nm. Los espectros de los péptidos en presencia ADN se representan una vez sustraída la contribución del ADN.

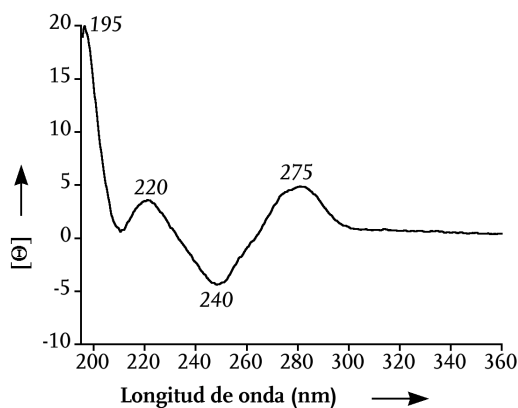


Figura 50. Espectro de DC típico de la conformación B del ADN.

La interpretación de los espectros de DC de péptidos y proteínas se basa en reglas empíricas con algunas suposiciones como, por ejemplo, que cada elemento de estructura secundaria puede ser descrito a través de un único espectro, que la contribución de la estructura terciaria es despreciable, o que el espectro de dicroísmo circular de un péptido o una proteína puede ser considerado como la suma de las contribuciones de los espectros correspondientes a los distintos motivos de estructura secundaria. Así, los distintos motivos de estructura secundaria tienen espectros característicos. La hélice α , por ejemplo, presenta una banda negativa intensa a 222 nm y otra a 208 nm. Además, esta técnica también permite cuantificar la proporción de hélice α en un péptido según la intensidad de la banda negativa a 222 nm [124], lo cual resulta útil para evaluar la interacción del híbrido y el ADN.

Los espectros se representan normalmente normalizados en θ_{MRE} (*elipticidad molar por residuo*) para compararse.

Los espectros característicos de una proteína bZIP en ausencia del ADN y en presencia del ADN se muestran en la figura 51. Es importante resaltar el aumento que se produce en la intensidad de la señal negativa a 222 nm en presencia del ADN diana. Dicho aumento se correlaciona con un aumento de *helicidad* (proporción de residuos en conformación de hélice α).

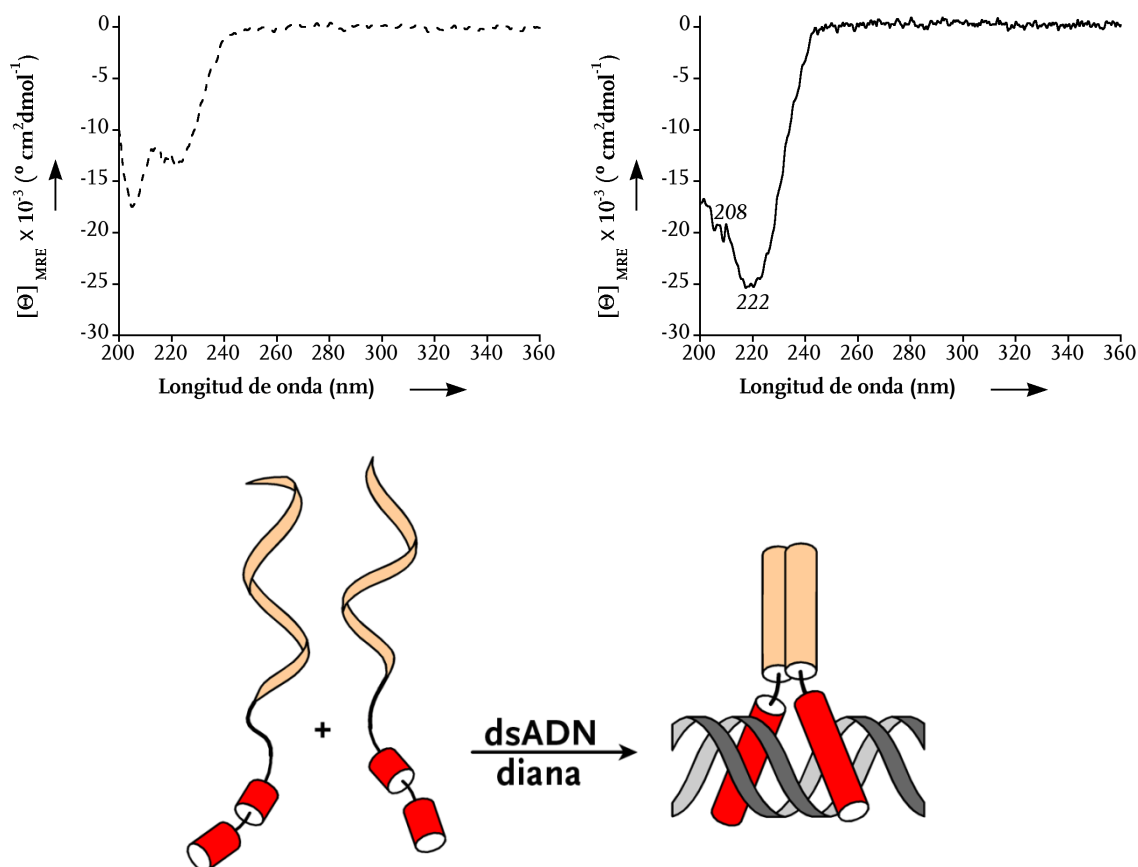


Figura 51. Izquierda: espectro de DC típico de una proteína bZIP en ausencia de ADN. Derecha: espectro de DC típico de una proteína bZIP en presencia del ADN diana, una vez sustraída la contribución del ADN.

Tanto la **distamicina** como sus **análogos** a pesar de ser aquirales, también **presentan** un espectro de dicroísmo circular característico cuando se insertan al surco menor del ADN, ya que se tuercen para acomodarse a la geometría del surco, generando **una señal de DC inducida característica a 330 nm** [125].

Basándonos en las propiedades de DC de los péptidos, ADN y los análogos de la distamicina, se puede utilizar esta técnica para estudiar las propiedades de reconocimiento específico de nuestros híbridos, puesto que la **unión bivalente al ADN** debería inducir un aumento de **helicidad** en el péptido, que se vería reflejado en un **aumento en la intensidad negativa en torno a 222 nm**, al tiempo que la unión del tripirrol en el surco menor debiera dar lugar a la **aparición de una banda inducida centrada a 330 nm**.

Para realizar los estudios de dicroísmo circular se utilizaron oligonucleótidos de doble cadena (dsADN) con secuencias cortas, pero suficientemente largas para asegurar la

conformación B del ADN. Los dsADN se prepararon mediante la hibridación de cantidades equimoleculares de cada una de las hebras (véase parte experimental). En la tabla 2 se muestra la secuencia de una de las hebras de los dsADN utilizados: en negrita se indica la secuencia de interacción del tripirrol y en cursiva subrayada la secuencia de reconocimiento de la región básica de GCN4; las mutaciones en esta zona de reconocimiento se representan en minúsculas (este formato se mantendrá a lo largo de toda la tesis).

dsADN ^{vii}	Secuencia (5' a 3')
AT/CRE^{hs}	GAGGATTTT ATGACG TTCGT
AT/CRE^{hs}m	GAGGATTTT AcGACG TTCGT
CRE^{hs}	AGGACCTTCG ATGACG TTCG

Tabla 2. Secuencias de los ADN usados en los estudios de DC.

Se registraron los espectros de DC a 4 y 20 °C del híbrido A₄ por separado y en presencia de los distintos ADNs en disoluciones de tampón fosfato 10 mM, 100 mM de NaCl, pH 7.5 y concentraciones 5 μM en péptido y en cada uno de los ADNs.

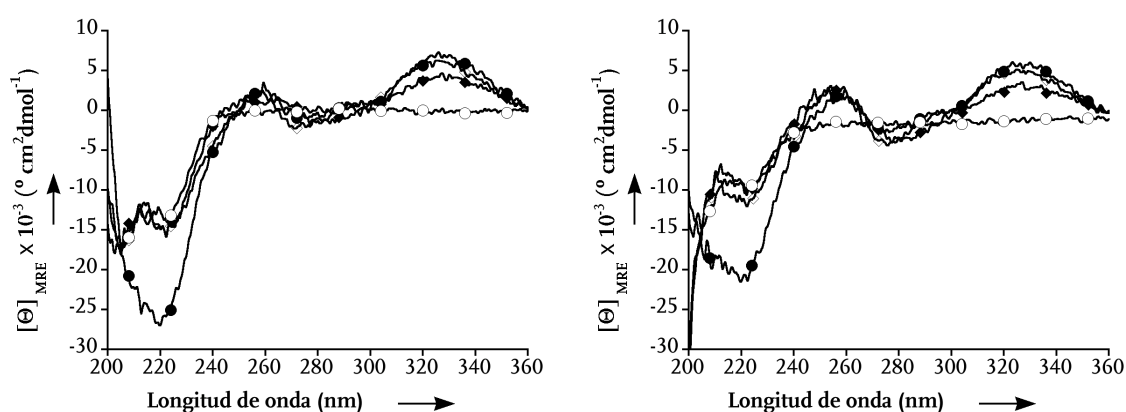


Figura 52. Izquierda: espectro de DC del híbrido A₄ solo y con los distintos ADNs a 4 °C. Derecha: Espectro de DC del híbrido A₄ solo y con los distintos ADNs a 20 °C. En ambos casos: ○ híbrido en ausencia de ADN; ● híbrido en presencia de **AT/CRE^{hs}**; ◇ híbrido en presencia de **AT/CRE^{hs}m**; ◆ híbrido en presencia de **CRE^{hs}**.

Como se observa en la figura 52, el comportamiento del híbrido A₄ con los distintos ADNs a diferentes temperaturas es análogo. La diferencia principal ocurre al incubar el híbrido A₄ con el ADN **AT/CRE^{hs}**, que contiene consecutivamente las secuencias de unión del tripirrol y de la región básica del péptido. En ambos casos, comparando estos espectros (●) con los correspondientes del híbrido en ausencia de ADN (○), se observa la aparición de una nueva banda a 330 nm como consecuencia de la inserción del compuesto tripirrólico en el surco menor del ADN. La incubación también induce un aumento significativo, en valor absoluto,

^{vii} La nomenclatura de los dsADN se refiere a: **AT**: es la secuencia de reconocimiento del compuesto tripirrólico; **CRE^{hs}** es la secuencia de reconocimiento de la región básica de un único monómero y **CRE^{hs}m** es la misma secuencia con una mutación. Sólo se representa la secuencia de una hebra.

de la elipticidad molar a 222 nm. Estos datos indican que la incubación del híbrido **A₄** con dicho ADN induce un aumento notable en la helicidad, consecuencia de un cambio en la estructura secundaria del péptido y un aumento en proporción de hélice α . Tal como se esperaba, los espectros a mayor temperatura mostraron un menor valor de elipticidad molar y consecuente un menor porcentaje de proporción hélice α ($\Theta_{4^{\circ}\text{C}} = 26,940 \text{ }^{\circ} \text{cm}^{-2} \text{dmol}^{-1}$ frente $\Theta_{20^{\circ}\text{C}} = 21,400 \text{ }^{\circ} \text{cm}^{-2} \text{dmol}^{-1}$).

El espectro de dicroísmo circular del híbrido **A₄** en presencia del ADN **AT/CRE^{hs}m** (\diamond) da lugar únicamente a la señal positiva a 330 nm, y no se observa ningún aumento de intensidad en la señal negativa a 222 nm respecto al híbrido en ausencia de ADN (\circ). Estos datos concuerdan con la ausencia, en este ADN, de la secuencia consenso de unión del péptido, confirmando la selectividad en el reconocimiento. De forma análoga, al incubar el híbrido **A₄** con el ADN **CRE^{hs}** (\blacklozenge), sólo se observa la banda positiva a 330 nm, aunque con una intensidad menor que cuando el ADN contiene también la secuencia de reconocimiento para el tripirrol. La presencia de cierta señal, aún en ausencia de la secuencia diana óptima es consecuencia de las condiciones de alta concentración a las que se realizan los ensayos de DC que favorecen la formación de complejos aún cuando sean poco estables.

Es importante destacar que, cuando no se sustrae el espectro de dicroísmo circular del ADN, el espectro del complejo híbrido **A₄** en presencia del oligonucleótido **AT/CRE^{hs}** presenta las bandas típicas de la conformación B del ADN, lo que sugiere que la interacción del híbrido no provoca cambios significativos en su conformación.

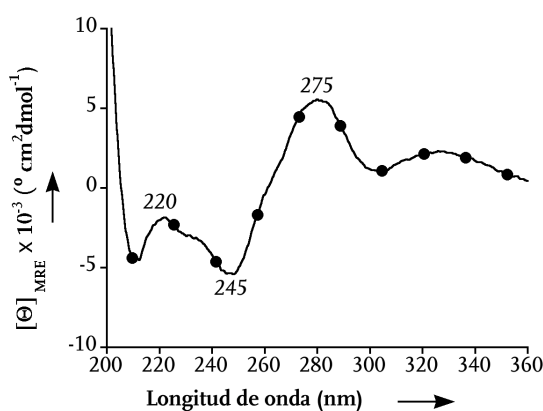


Figura 53. DC del híbrido **A₄** en presencia de **AT/CRE^{hs}** (\bullet) sin sustraer la contribución del ADN.

Los resultados de dicroísmo circular obtenidos son consistentes con un modelo en que el híbrido **A₄** interacciona específicamente con su secuencia diana **AT/CRE^{hs}** a través de una inserción simultánea en los surcos mayor y menor. Sin embargo, en el caso de los oligonucleótidos de doble cadena utilizados como control (**AT/CRE^{hs}m**, **CRE^{hs}**) la helicidad de la región peptídica en el complejo es relativamente baja, lo que sugiere que dicha región no está insertada en el surco y probablemente realice únicamente contactos electrostáticos inespecíficos con los fosfatos del ADN. La presencia de la banda de DC inducida a 330 nm sugiere que en estos complejos el tripirrol está insertado en el surco menor. Es importante recordar que en estudios anteriores se había demostrado que para que se produzca la interacción en este tipo de sistemas es condición necesaria la presencia del tripirrol, puesto

que la región básica por sí misma, sin el apoyo de unidad tripirrólica, no muestra ninguna variación en el valor de la elipticidad a 222 nm en presencia de la secuencia diana [81].

Los datos obtenidos mediante la espectroscopía de dicroísmo circular nos permiten evaluar de forma rápida y cualitativa si existe interacción entre los híbridos sintetizados y el ADN. Sin embargo, las elevadas concentraciones utilizadas en esta técnica imposibilitan la obtención de datos termodinámicos típicos de interacciones específicas ($K_a \sim 10^8 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$), [70] por lo que se hace necesario la utilización de otras técnicas diferentes. En concreto, la electroforesis de retardo en gel (EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay) [126] es una técnica particularmente adecuada para estudiar las interacciones entre proteínas o péptidos relativamente grandes con el ADN, debido a que la formación de los complejos induce un notable retardo en la migración del ADN. Además, en el caso del las electroforesis radiactivas las concentraciones empleadas son del orden de nanomolar.

Con el fin de obtener una estimación cuantitativa del proceso de reconocimiento del ADN por parte del híbrido A_4 se llevaron a cabo ensayos de electroforesis a 4 °C. En estos experimentos se prepararon disoluciones con concentraciones crecientes del híbrido A_4 y a una concentración constante de ADN AT/CRE^{hs} ($\sim 45 \text{ pM}$), previamente marcado con ^{32}P en el extremo 5',^{viii} en un tampón especial de incubación (38 mM Tris•HCl, pH 7.5, 90 mM KCl, 1.8 mM $MgCl_2$ y 1.8 mM AEDT). Las mezclas se incubaron durante 20 min y se cargaron en un gel de poliácridamida al 10% (PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). El desarrollo de la electroforesis y posterior revelado, dio lugar al autorradiograma de la figura 54, en el que se observa claramente un nuevo complejo (b) con movilidad diferente al ADN AT/CRE^{hs} (a)

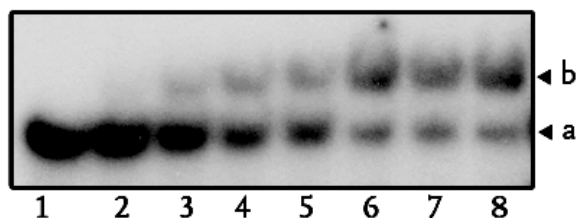


Figura 54. PAGE del híbrido A_4 en presencia del ADN AT/CRE^{hs} marcado radiactivamente. Calles 1–8 [$Híbrido A_4$]: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 nM.

La interpretación de este gel se basa en la observación experimental de que los complejos de ADN y proteínas migran más lentamente que el ADN solo; [127] la banda superior **b** se asigna entonces a un complejo entre el híbrido A_4 y el ADN. La otra señal producida, la inferior **a**, se debe al ADN libre. Se puede observar que la mitad de la fracción unida se alcanza en torno a concentraciones de 125 nM, lo que implica una constante de disociación de ese orden.^{ix}

^{viii} El marcaje se realizó únicamente en una de las hebras utilizando ^{32}P -ATP (5000 Ci/mmol) y la enzima T-4 polinucleótido quinasa, en la parte experimental de la tesis se detalla todo el protocolo de los ensayos de EMSA.

^{ix} Considerando el equilibrio $L + M = LM$ (donde M es el ADN y L el híbrido) por definición $K_D = [L][M]/[LM]$. Dado que se emplean concentraciones muy pequeñas de ADN $[M]_T \ll [L]_T$ podemos asumir que $[L] = [L]_T$ de manera que $K_D = [L]_T[M]/[LM]$ y entonces si $[M]/[LM] = 1$, entonces $K_D = [L]_T$. Es decir, que cuando en el autorradiograma las intensidades relativas de las señales correspondientes al ADN libre (M) y al complejo (LM) sean las mismas, el valor numérico de la constante de disociación K_D será igual a la concentración total de híbrido añadido en esa calle.

Para comprobar si esta nueva banda se corresponde efectivamente con la formación de un complejo específico se realizó un experimento similar con el ADN *AT/CRE^{hs}m*, aquél que presenta mutada la zona de reconocimiento de la región básica y únicamente contiene la secuencia de reconocimiento del compuesto tripirrólico.

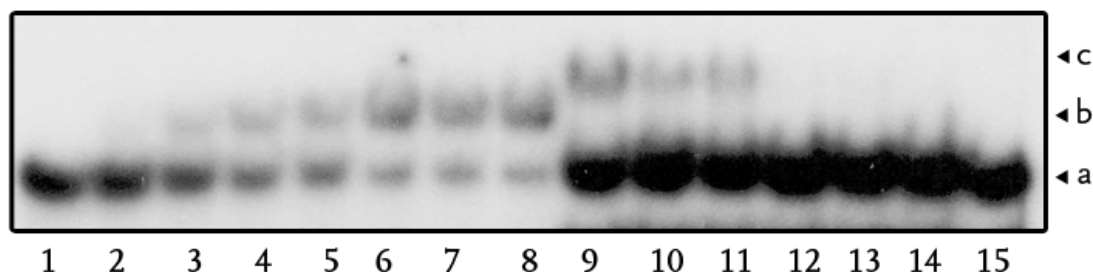


Figura 55. Izquierda: calles 1–8 estudio a través de PAGE del híbrido A_4 en presencia del ADN *AT/CRE^{hs}m* marcado radiactivamente. [Híbrido A_4]: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 nM.; Derecha: Calles 9–15 estudio a través de PAGE del híbrido A_4 en presencia del ADN *AT/CRE^{hs}m* marcado radiactivamente. [Híbrido A_4]: 200, 150, 100, 80, 60, 40, 0.

La electroforesis del híbrido A_4 con ambos ADNs se desarrolló conjuntamente en el mismo gel. Analizando ambos autorradiogramas se observa que al incubar el híbrido con el ADN *AT/CRE^{hs}m* se forma una nueva banda que migra algo más lentamente que la banda que aparece al incubarlo con el ADN diana *AT/CRE^{hs}*. Este hecho es consistente con la hipótesis de que la banda **b** se debe a una interacción específica de ambas partes del híbrido. La nueva banda **c**, teniendo en cuenta los estudios de dicroísmo circular previamente discutidos, se puede asignar a la formación de un complejo menos compacto, en el que el tripirrol se encontraría insertado en el surco menor del ADN, mientras que el fragmento peptídico se localizaría fuera del surco mayor, interaccionando de forma inespecífica con los grupos fosfato de la superficie del ADN.

Comparación del híbrido A_4 con el híbrido A_3

Una vez realizado el estudio de interacción del híbrido A_4 , para poder sacar conclusiones sobre la relación estructura/función es imprescindible comparar su comportamiento con el del análogo que presenta el nitrógeno en lugar del oxígeno en la cadena conectora (híbrido A_3 , figura 45). Tal como muestra la figura 56, los espectros de dicroísmo de ambos híbridos con los distintos ADNs son muy similares, aunque se detecta que en el caso del híbrido A_3 , la proporción de helicidad es ligeramente mayor ($\Theta_{\text{Híbrido } A_3} = 28,820 \text{ } ^\circ \text{ cm}^{-2} \text{ dmol}^{-1}$ frente $\Theta_{\text{Híbrido } A_4} = 26,940 \text{ } ^\circ \text{ cm}^{-2} \text{ dmol}^{-1}$). Esta diferencia no implica necesariamente una mayor afinidad, sino una mayor proporción de hélice α .

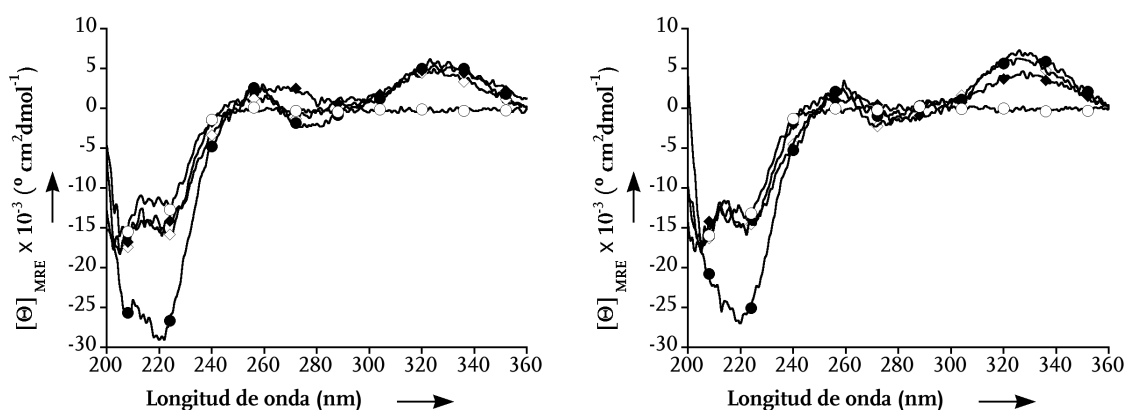


Figura 56. Izquierda: espectro de DC del híbrido A_3 solo y con los distintos ADNs a 4 °C. Derecha: espectro de DC del híbrido A_3 solo y con los distintos ADNs a 4 °C. En ambos casos: ○ híbrido en ausencia de ADN; ● híbrido en presencia de AT/CRE^{hs} ; ◇ híbrido en presencia de $AT/CRE^{hs}m$; ◆ híbrido en presencia de CRE^{hs} .

Para poder sacar conclusiones sobre afinidad deben compararse los autoradiogramas de los dos híbridos a 4 °C. En las electroforesis de la figura 57 se demuestra que la afinidad del híbrido que presenta el $-NH-$ (izquierda) es considerablemente mayor que la del análogo con $-O-$. De hecho, mientras que el híbrido A_3 a 20 nM se encuentra complejo casi en su totalidad, a esa misma concentración sólo se comienza a observar, muy tenuemente, la banda correspondiente al complejo entre el ADN y el híbrido A_4 .

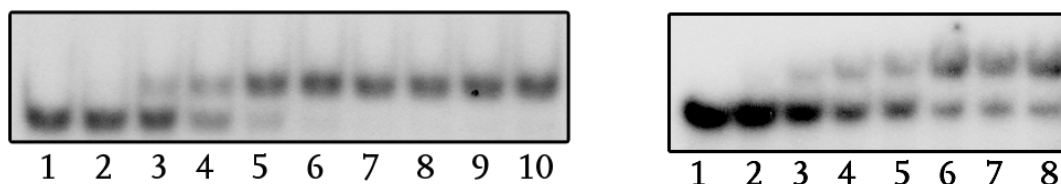


Figura 57. Izquierda: estudio a través de PAGE del híbrido A_3 en presencia del ADN AT/CRE^{hs} marcado radiactivamente. Calles 1–10, [híbrido A_3]: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM.; Derecha: estudio a través de PAGE del híbrido A_4 en presencia del ADN AT/CRE^{hs} marcado radiactivamente. Calles 1–8 [híbrido A_4]: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 nM.

Una valoración de la interacción de cada uno de los híbridos con el ADN *AT/CRE^{hs}* permite deducir la afinidad del proceso en cada caso. Tomando como base la intensidad relativa de las señales del ADN libre y del ADN complejado se observó que, en ambos casos, los datos experimentales se ajustan a la ecuación que describe un modo de interacción 1:1 [128] y que existe una diferencia de afinidad muy notable: [$K_D = (3 \pm 0.2)$ nM para el híbrido **A₃** frente $K_D = (133 \pm 4)$ nM para el híbrido **A₄**].

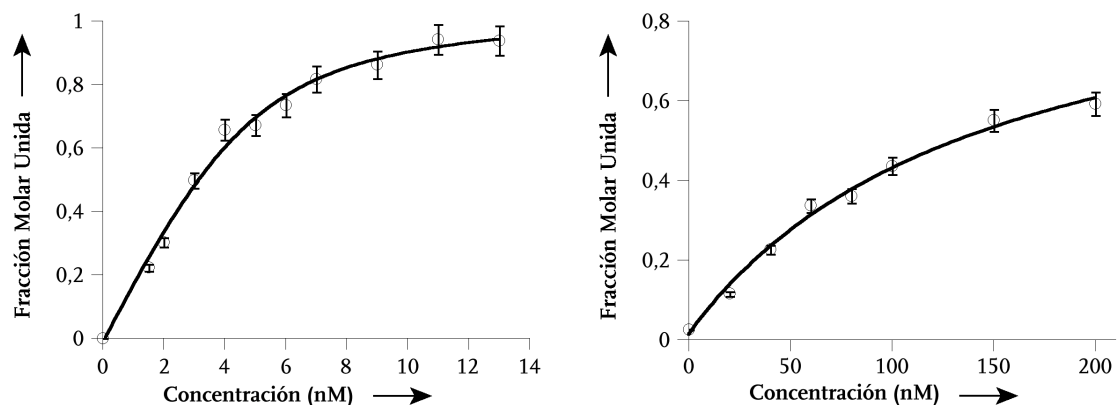


Figura 58. Izquierda: representación gráfica de los datos de la valoración del híbrido **A₃** con el ADN *AT/CRE^{hs}* ajustados al modelo de interacción 1:1. Derecha: representación gráfica de los datos de la valoración del híbrido **A₄** con el ADN *AT/CRE^{hs}* ajustados al modelo de interacción 1:1.

Conclusiones

A la vista de los resultados, se puede concluir que el híbrido **A₄** se comporta cualitativamente de manera similar al híbrido **A₃**. Sin embargo, los estudios de electroforesis ponen de manifiesto que un cambio mínimo en la estructura del conector, consistente en la sustitución del –NH– por un –O–, conduce a una disminución de la afinidad por la secuencia consenso muy notable. Esta diferencia de afinidad sugiere que la amina secundaria del conector en el híbrido **A₃** forma algún tipo de interacción estabilizante, puente salino y/o interacciones de enlace de hidrógeno con los fosfatos del esqueleto del ADN, que da lugar a un aumento de la afinidad con respecto al análogo que presenta un oxígeno (el híbrido **A₄**). Estos resultados demuestran que la naturaleza del conector entre el fragmento tripirrólico y el péptido, más allá de mantener las unidades de reconocimiento a una distancia adecuada para interactuar, juega también un papel activo en la interacción y debe de tenerse en cuenta a la hora de diseñar nuevos conjugados.

Esta comprobación de la importancia de las interacciones electrostáticas indujo a nuestro grupo a pensar que, introduciendo nuevas interacciones de este tipo se podría contribuir a aumentar la constante de asociación de los híbridos bivalentes con el ADN. Sobre esta base se sintetizaron, entonces, híbridos similares al híbrido **A₃** que interactúan con el ADN con afinidades del orden de nanomolar a temperatura ambiente [129].

El trabajo incluido en este capítulo se publicó en:

Blanco, J. B.; Vázquez, O.; Martínez–Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. High affinity, sequence specific DNA–binding by synthetic tripyrrole–peptide conjugates. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4171–4178.

Bibliografía

- [116] He, G.; Browne, K. A.; Groppe, J. C.; Blaskó, A.; Mei, H.; Bruce, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7061–7071.
- [117] Garegg, P. J.; Samuelsson, B. *Chem Comm.* **1979**, *8*, 978–980.
- [118] a) Sewald, N.; Jakubke, H–D. *Peptides: Chemistry and Biology*, ISBN: 3–527–30405–3, WILEY–VCH, Weinheim, **2002**; capítulo 4. b) Andreu, D.; Rivas, L. *Peptidos en Biología y Biomedicina*, ISBN: 84–00–07670–2, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, **1997**; capítulo 2. c) Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pep. Protein Res.* **1990**, *35*, 161–214. b) Chang, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* ISBN–10: 0199637245 Oxford University Press, New York, **2000**.
- [119] Lloyd–Williams, P.; Jou, G.; Albericio, F.; Giralt, E; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4207–4210.
- [120] So–Han, S.; Kim, Y. A. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2447–2467.
- [121] a) Weiss, M. A. *Biochemistry*, **1990**, *29*, 8020–8024. b) O’Neil, K. T.; Hoess, R. H.; Degrado, W. F. *Science*, **1990**, *249*, 774–778.
- [122] Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular Dichroism: Principles and Applications*, ISBN: 0–471–33003–5, WILEY–VCH, Weinheim, **2000**; capítulo 1.
- [123] Gray, D. M.; Ratliff, R. L.; Vaughan, M. R. *Methods Enzymol.* **1992**, *211*, 389–406.
- [124] Chen, Y–H.; Yang, J. T.; Chau, K. H. *Biochemistry*, **1974**, *13*, 3350–3359.
- [125] Eriksson, M.; Nordén, B. *Methods Enzymol.* **2001**, *340*, 68–98.
- [126] a) Varshavsky, A. *Methods Enzymol.* **1987**, *151*, 551–565. b) Carey, J. *Methods Enzymol.* **1991**, *208*, 103–117.
- [127] Xian, J.; Harrington, M. G.; *Nucleic Acid Electrophoresis*, Tietz, D. ISBN: 3–540–63959–4, Springer–Verlag, Berlín, Heidelberg, New York **1998**; capítulo 11.
- [128] Roehrl, M. H. A.; Wang, J. Y.; Wagner, G. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 16056–16066.
- [129] Blanco, J. B.; Vázquez, O.; Martínez–Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4171–4178.

Estudios de internalización celular

Objetivo y diseño

Las barreras biológicas han evolucionado para evitar la entrada de tóxicos en las células; no obstante, son las mismas barreras las que a menudo limitan los efectos de los fármacos y, por tanto, el beneficio terapéutico. La eficiencia del reconocimiento del ADN mediante moléculas sintéticas no sólo exige una puesta a punto de sus propiedades de interacción, sino también la modulación de sus características físicas para que dichas moléculas puedan llegar al núcleo de forma rápida. De hecho, uno de los principales obstáculos a la hora de poder utilizar compuestos como la distamicina, en biología molecular o terapias a nivel genómico deriva de sus dificultades intrínsecas para cruzar las membranas celulares y entrar en el núcleo.

En la figura 59 de la derecha se observa que después de un largo periodo de incubación (24 horas) la distamicina, aunque es capaz de atravesar la membrana citoplasmática, no alcanza el núcleo. Estudios recientes con las poliamidas en forma de horquilla desarrolladas en el grupo de Dervan, sugieren que la entrada celular de estos compuestos es un proceso lento [130] y bastante dependiente de la estructura concreta de la poliamida [131], así como, del tipo celular [132].

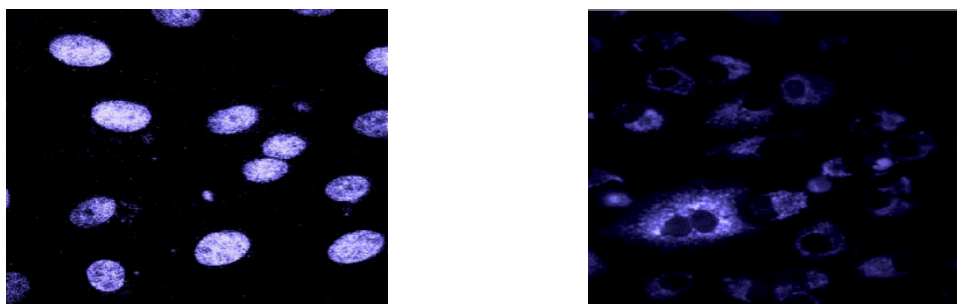


Figura 59. Izquierda: núcleos celulares teñidos con el compuesto comercial Hoechst 33258. Derecha: distribución celular de la distamicina marcada en células Vero [130 b].

Tal como se ha comentado anteriormente, en los estudios iniciales realizados en nuestro grupo con los sistemas bivalentes surco menor/surco mayor se observó una inesperada alta afinidad con los ADNs que no contienen la secuencia de reconocimiento de la región básica de la proteína GCN4 (ADN **AT/CRE^{hs}m**) [81], [82]. Estos resultados se justificaron por la existencia de interacciones electrostáticas entre péptido altamente básico con los fosfatos del esqueleto del ADN que complementan la interacción específica del compuesto tripirrólico con el surco menor. Considerando estas observaciones y teniendo en cuenta los precedentes existentes sobre el uso de *péptidos penetrantes de células* (CPP: Cell-Penetrating Peptide), particularmente, de secuencias de oligoargininas para favorecer procesos de internalización celular de diversas moléculas [133], se pensó que el compuesto resultante de conjugar el tripirrol con una octaarginina podría cruzar las membranas celulares de forma eficiente y, al mismo tiempo, contribuir a una mejora de la afinidad del tripirrol por el ADN por complementariedad de cargas, como consecuencia de su naturaleza catiónica [134].

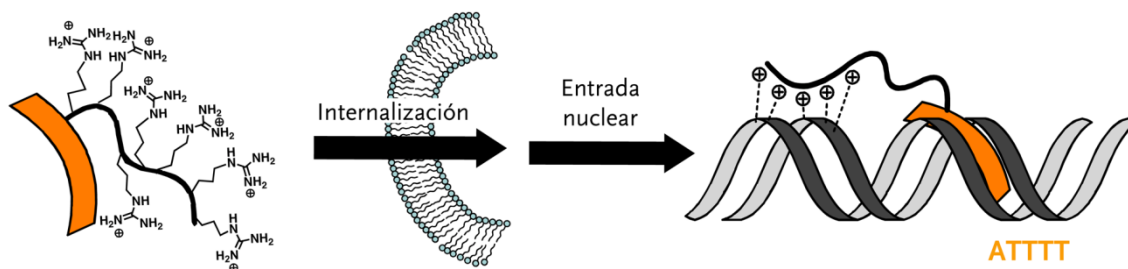


Figura 60. Representación esquemática de la hipótesis del proyecto. La cinta naranja representa el agente de reconocimiento del surco menor tripirrólico.

Los datos estructurales sobre la interacción de la distamicina con el ADN sugieren que los nitrógenos pirrólicos son la mejor posición para realizar la unión covalente de la octaarginina (R_8) sin alterar los contactos específicos con el ADN, ya que apuntan hacia el exterior del surco [135].

Debido al bajo rendimiento cuántico de fluorescencia de la distamicina y sus análogos [136], se decidió incorporar a los conjugados un fluoróforo extrínseco (fluoresceína), con el fin de poder visualizar el proceso de internalización en la células a través de microscopía de fluorescencia.

En el figura 61 se muestra la estructura del conjugado objetivo que hemos diseñado (B_{1A}) y de su correspondiente control negativo, el compuesto tripirrólico sin octaarginina (compuesto **13**).

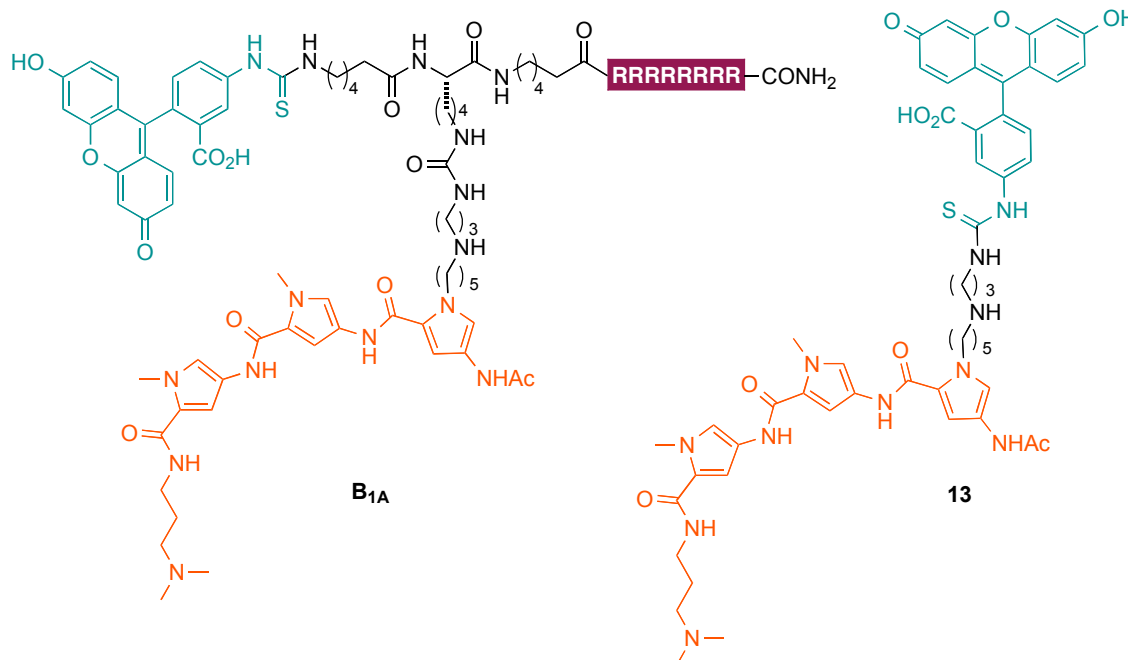
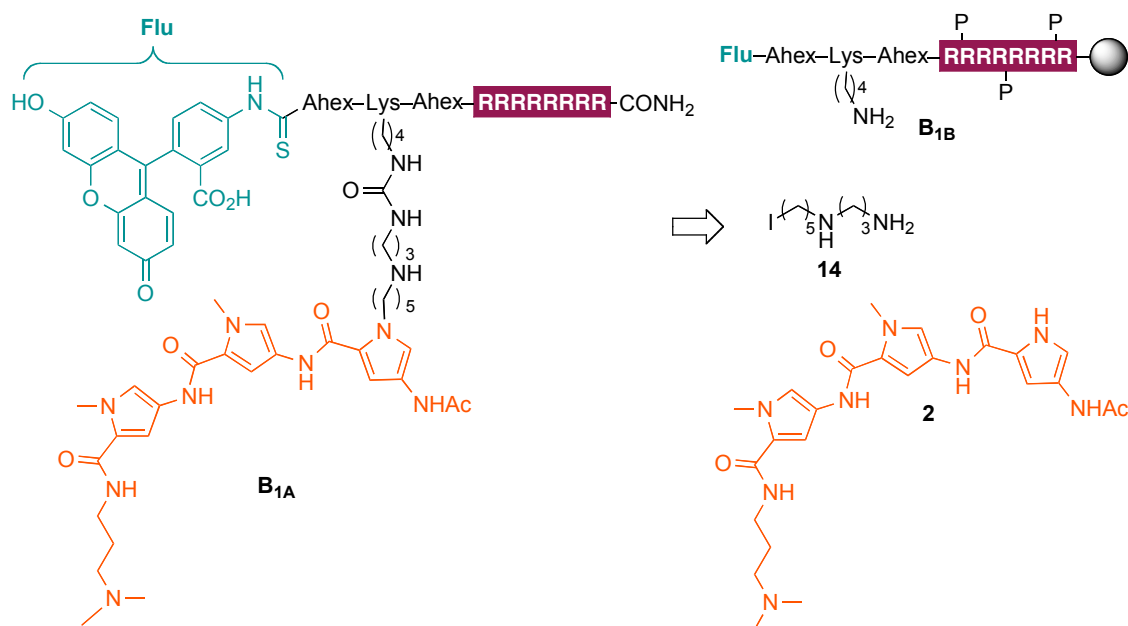


Figura 61. Estructura del conjugado tripirról-octaarginina B_{1A} y del control negativo sin parte peptídica **13**.

Síntesis

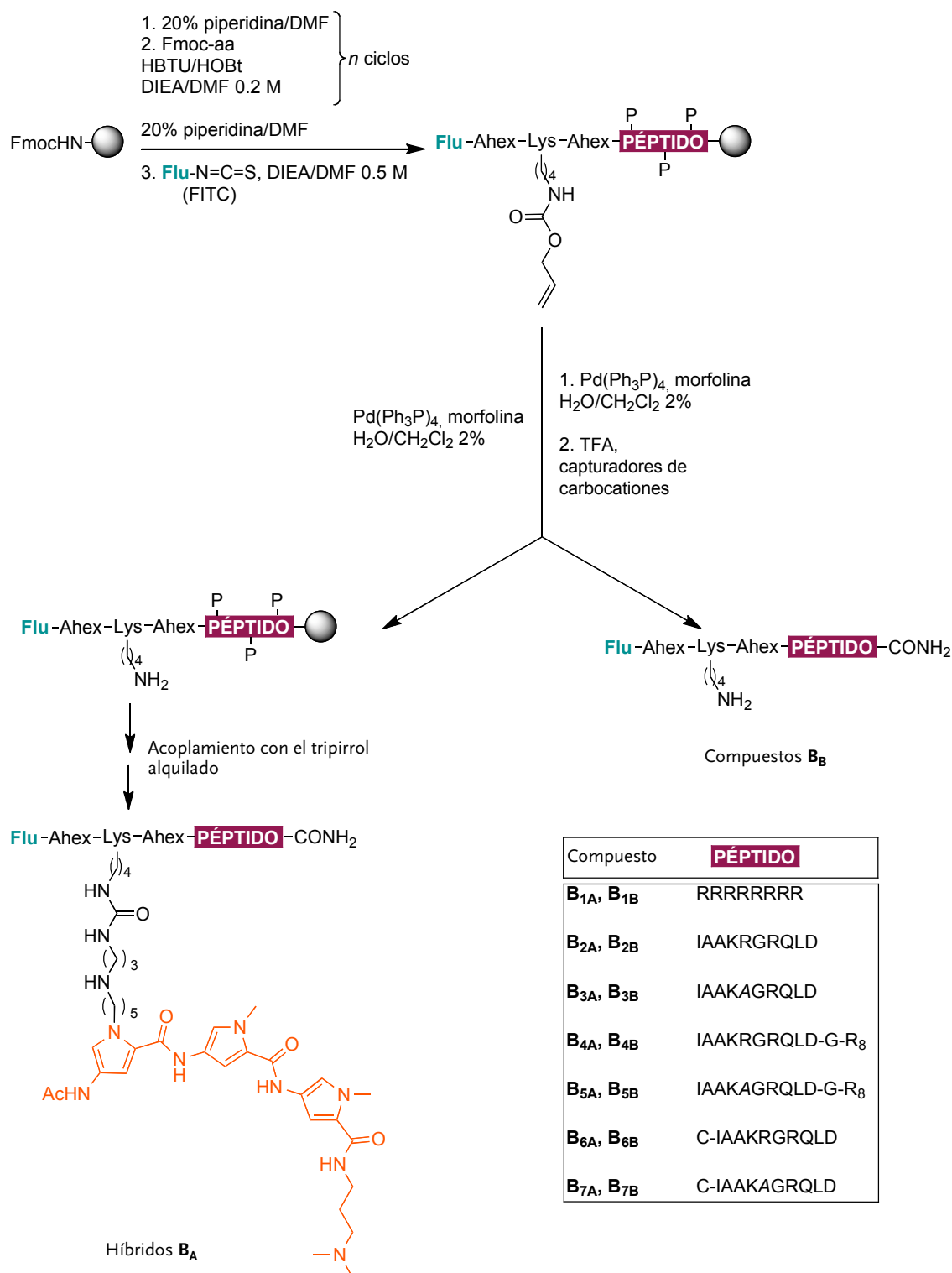
La síntesis del conjugado tripirrol–octaarginina (**B_{1A}**) se planteó a través de la formación selectiva de un enlace urea en fase sólida entre, una amina primaria, presente en la cadena del compuesto tripirrólico, y el péptido marcado con fluoresceína y desprotegido ortogonalmente en un único residuo de Lys introducido en el extremo N–terminal, después de un espaciador de tipo ácido aminohexanoico (Ahex).



Esquema 9. Análisis retrosintético del conjugado **B_{1A}**, donde **Flu** representa la unidad de fluoresceína.

La versatilidad de esta aproximación convergente permitió preparar de forma rápida y eficiente otros conjugados con distintas secuencias peptídicas. Tal y como se muestra en el esquema siguiente, se sintetizaron los compuestos provistos de la molécula tripirrólica (híbridos de la familia **B_A**) y los controles sin el elemento de unión al surco menor (compuestos de la familia **B_B**). La síntesis de la parte peptídica se realizó siguiendo la metodología estándar Fmoc de síntesis de péptidos en fase sólida. El espaciador de tipo aminohexanoico se introdujo del mismo modo que el resto de los aminoácidos y a continuación, se acopló la **Lys** protegida en su cadena lateral con el grupo **Alloc**, de tal modo que se permitiese su desprotección selectiva frente a los grupos protectores estándar presentes en las cadenas laterales de los otros residuos de la secuencia.

Durante el desarrollo de esta síntesis se observó que para que la introducción del fluoróforo transcurriera de manera eficiente es necesario colocar otro espaciador de tipo aminohexanoico. El marcaje se realizó acoplando el isocianato de fluoresceína (**FITC**) con la amina libre del extremo N–terminal. Al llegar a este punto, dependiendo del compuesto deseado, se realizó la rotura del péptido de la resina para obtener los compuestos desprovistos del tripirrol (compuestos **B_B**), o bien, se llevó a cabo el acoplamiento del fragmento tripirrólico sobre el único aminoácido desprotegido (**Lys**) para obtener los conjugados provistos del elemento de reconocimiento del surco menor (híbridos **B_A**), esta reacción se comentará posteriormente en mayor detalle.



Esquema 10. Procedimiento de síntesis de los péptidos con y sin el fragmento tripirrólico.

A modo de ejemplo se muestra en la figura 62 el cromatograma del compuesto de octaarginina sin el fragmento tripirrólico (B_{1B}). El espectro de absorción en estos compuestos presenta una banda en torno a 220 nm que se corresponde a los enlaces amida del péptido y otra nueva banda a 442 nm, característica de la fluoresceína. La identidad de los híbridos se corroboró mediante espectroscopía de masas. Es importante mencionar que

en las condiciones del HPLC está favorecida la forma lactona de la fluoresceína, caracterizada por una absorbancia y emisión de fluorescencia mucho menos intensas que la forma abierta, predominante en medio ligeramente básico [137].

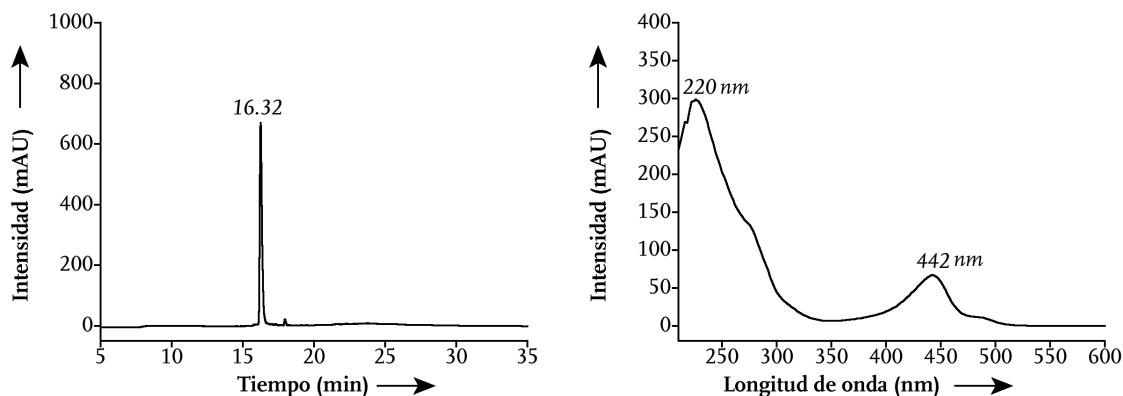


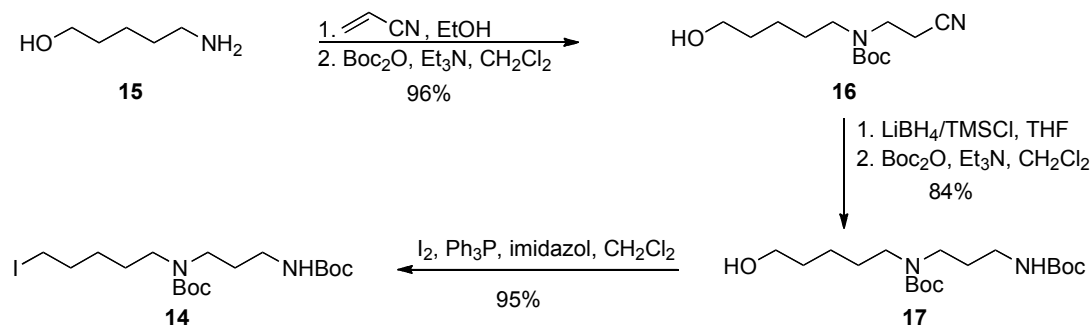
Figura 62. Izquierda: cromatograma de HPLC del híbrido B_{1B} gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Además de los compuestos con la secuencia peptídica de octaargininas, también se sintetizaron las otras secuencias mostradas en el esquema 10. Así, los compuestos B_{2A} y B_{2B} presentan una secuencia conocida como *elemento de señalización nuclear* o NLS (IAAKRGRQLD). Esta secuencia se ha utilizado en estudios previos para favorecer el paso a través de la membrana nuclear [138].

Asumiendo que la presencia de la octaarginina puede que no fuese suficiente para asegurar la correcta entrada al núcleo, se sintetizaron también compuestos que incorporan ambas secuencias (NLS y octaarginina) conjugadas de forma lineal (IAAKRGRQLD-G-R₈) o unidas a través de un enlace lábil de tipo disulfuro. Como controles adicionales se prepararon compuestos donde una de las argininas de la secuencia NLS ha sido mutada por una alanina (B_{3A} y B_{3B}), basándose en estudios previos donde se demuestra que dicha mutación en ese determinado residuo de la secuencia NLS suprime la habilidad transportadora de ésta [139].

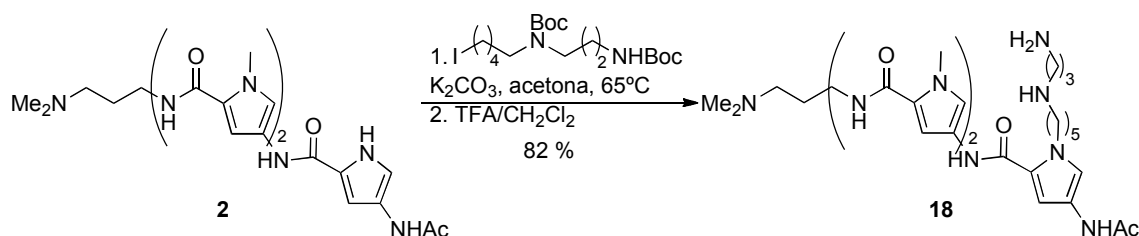
Por otro lado, la síntesis del fragmento tripirrólico se realizó siguiendo el procedimiento discutido previamente, esto es, usando la unidad tripirrólica común **2** (esquema 3).

La cadena para la alquilación del compuesto tripirrólico **2** se preparó siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo en nuestro grupo con anterioridad [82]. El yoduro **14** se sintetizó en cinco pasos a partir de sustrato comercial 5-aminopentanol (**15**). La adición del acrilonitrilo sobre este compuesto [140], y la posterior protección de la amina secundaria con dicarbonato de di-*tert*-butilo permitió obtener el compuesto **16** con un buen rendimiento. Este producto se utilizó en la siguiente etapa sin ninguna purificación. El nitrilo se redujo siguiendo las condiciones establecidas por Giannis y Sandhoff, [141] más rápidas que la hidrogenación catalítica, aunque no permite la protección simultánea de la amina obtenida. Tras llevar a cabo esa protección (compuesto **17**), se realizó la yodación siguiendo el mismo procedimiento que para el conector con el oxígeno, obteniéndose de este modo el agente alquilante **14**.



Esquema 11. Síntesis del agente alquilante **14**.

Una vez sintetizado el agente alquilante **14**, se acopló con el fragmento tripirrólico **2** tal como se indica en el esquema siguiente.



Esquema 12. Alquilación del compuesto tripirrólico **2** con el yoduro **14**.

En la figura 63 se muestra el cromatograma de HPLC final del compuesto tripirrólico alquilado **18** y su correspondiente espectro de absorción con las dos bandas a 240 y 304 nm, características de los derivados tripirrólicos.

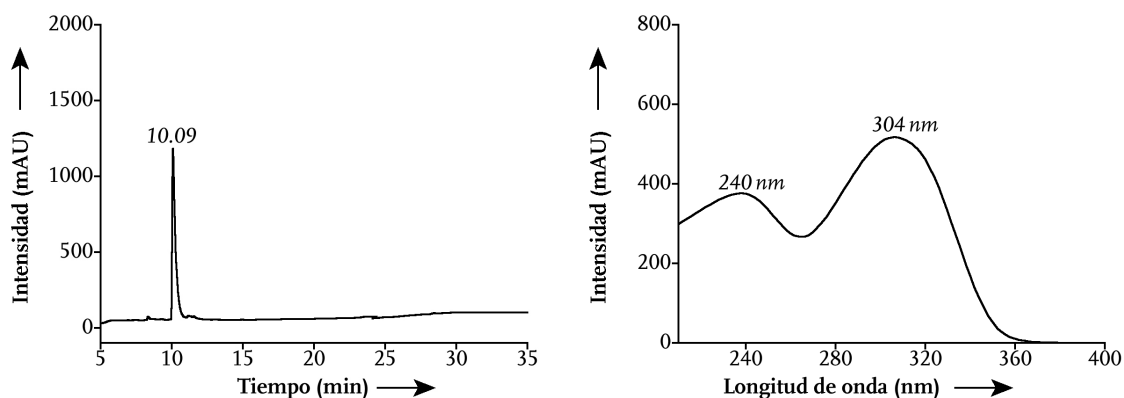
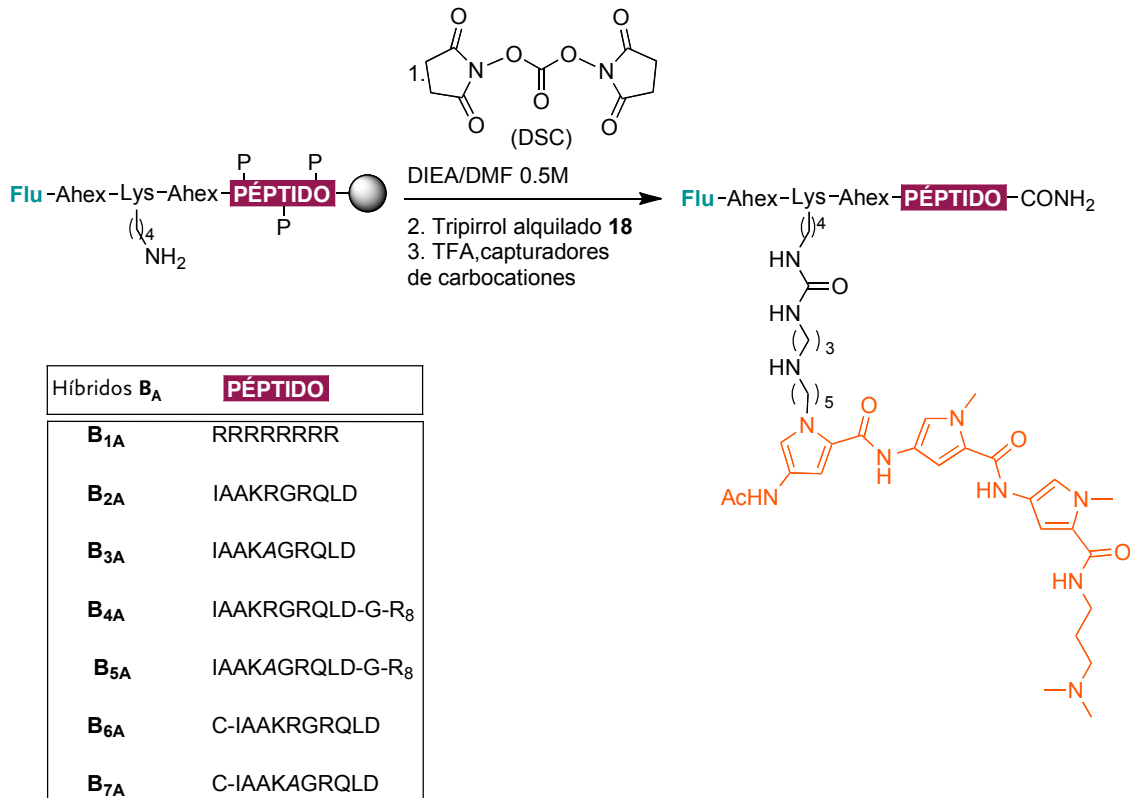


Figura 63. Izquierda: cromatograma de HPLC del tripirrol alquilado **18** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

La reacción de acoplamiento con los péptidos para dar lugar a los híbridos (híbridos **B_A**) se llevó a cabo en fase sólida mediante la formación de un enlace urea ortogonal, a través de la adición secuencial de carbonato de *N, N'*-disuccinimidilo (DSC) y el aminotripirrol **18** sobre la resina que contiene el residuo de Lys desprotegido selectivamente (esquema 13).



Esquema 13. Síntesis de los híbridos B_A.

El análisis a través de EM/HPLC-FR del crudo de desprotección de la resina mostró, en todas las reacciones, la aparición de un pico mayoritario en el cromatograma. El espectro de absorción de estos compuestos en las condiciones de pH de la cromatografía presenta una banda en torno a 220 nm, correspondiente a los enlaces amida del péptido; una banda a 442 nm, característica de la fluoresceína y otra a 304 nm, típica del tripirrol.

En figura 64 se muestra a modo ejemplo el crudo de la reacción de acoplamiento para el caso del híbrido B_{1A}. En la parte experimental de esta tesis pueden verse los datos experimentales de los otros compuestos. La identidad de los híbridos se corroboró mediante espectroscopía de masas.

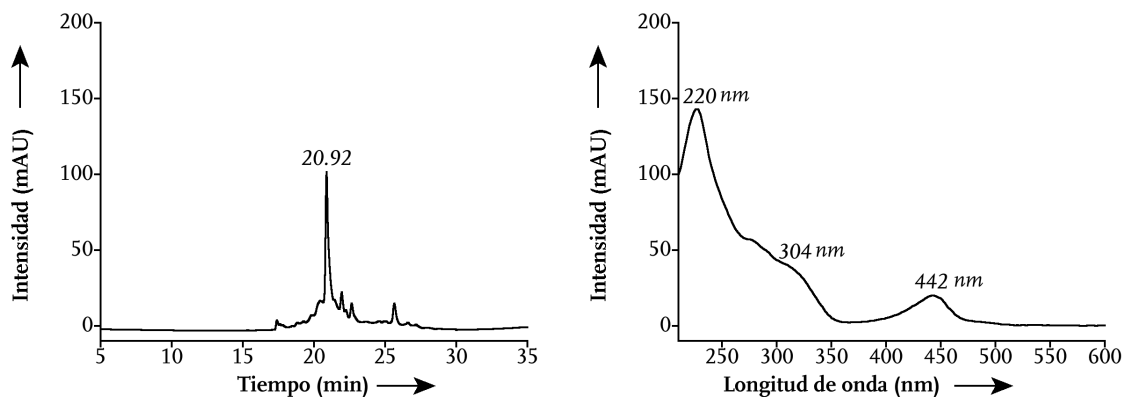
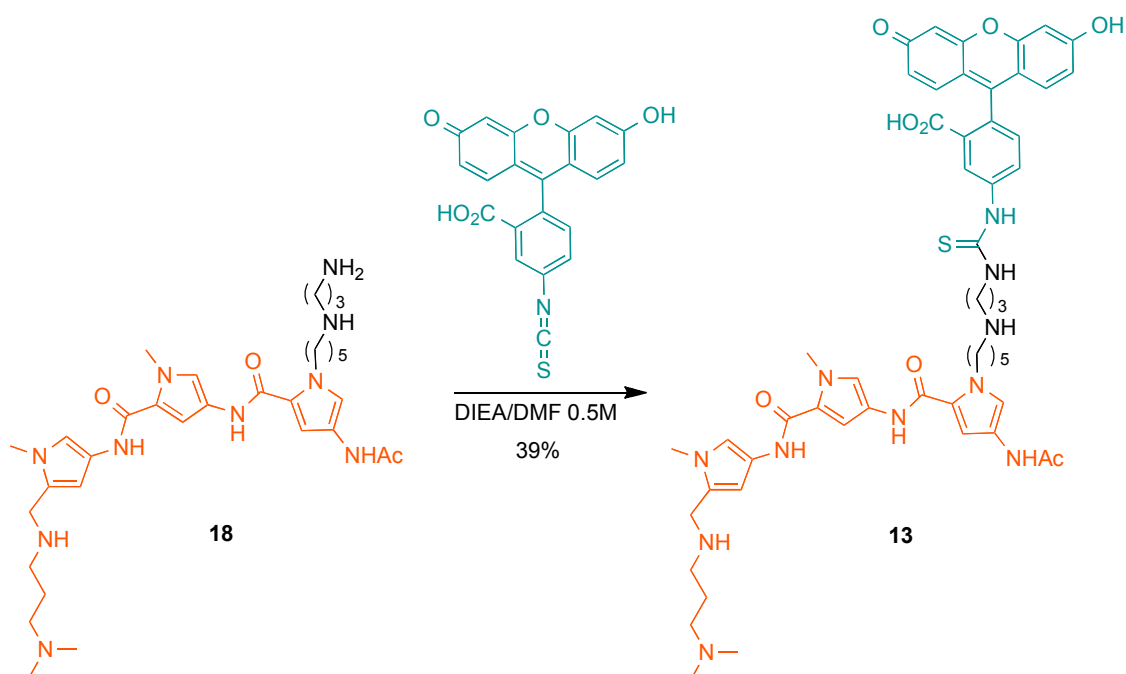


Figura 64. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción de acoplamiento del híbrido B_{1A} gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción del pico mayoritario.

El compuesto tripirrólico marcado con fluoresceína **13** se sintetizó fácilmente a partir del aminotripirrol **18**. Éste se adicionó sobre una disolución de FITC en DIEA/DMF 0.5 M para dar lugar al compuesto deseado en dos horas (esquema 14). La reacción se siguió mediante EM/HPLC–FR.



Esquema 14. Síntesis del control negativo **13**, desprovisto de secuencias peptídicas.

En la figura inferior se puede ver el cromatograma de HPLC final del compuesto tripirrólico marcado **13** y su espectro de absorción. En dicho espectro pueden verse claramente las bandas esperadas del fragmento tripirrólico (304 nm) y de la fluoresceína (442 nm).

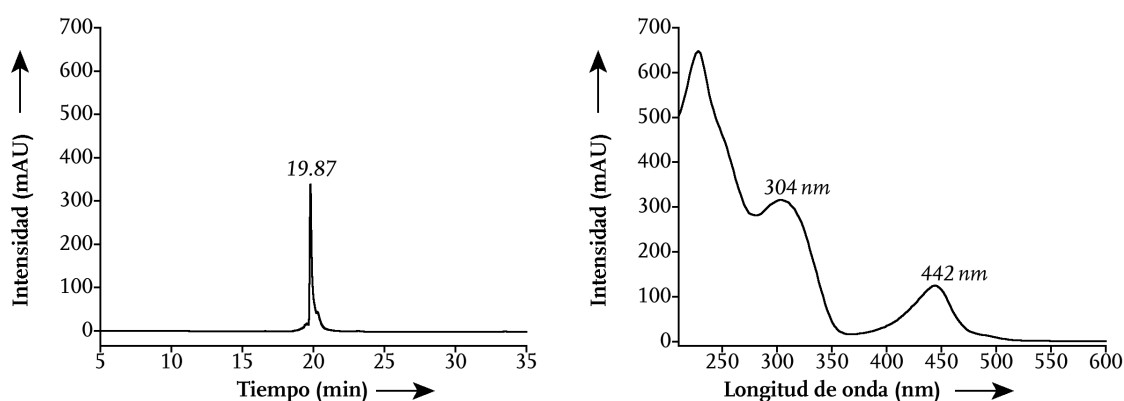
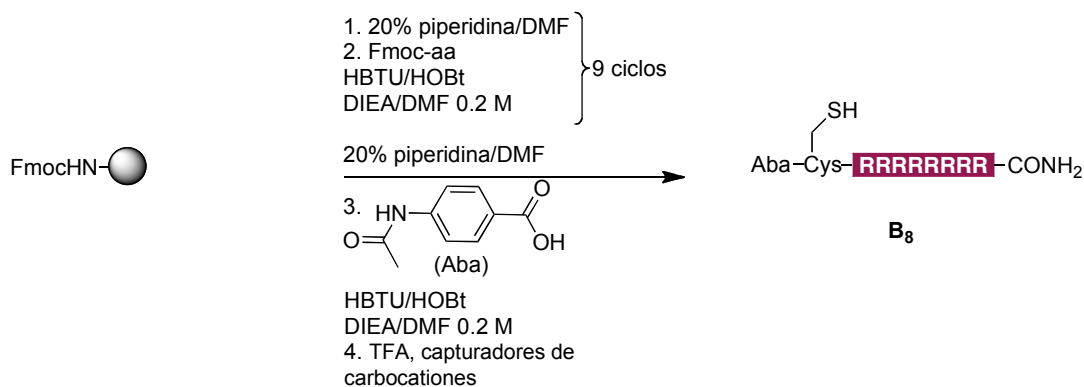


Figura 65. Izquierda: cromatograma de HPLC del tripirrol marcado con fluoresceína **13**, gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

También se prepararon híbridos disulfuro que incorporan simultáneamente la secuencia octaarginina y NLS, así como sus versiones mutadas en la parte NLS. Estos se sintetizaron a través de la dimerización de cisteínas en el extremo N-terminal de cada uno de los

péptidos. La preparación de los péptidos que contienen las secuencias CIAAKRGRQLD o CIAAKAGRQLD, con o sin el fragmento tripirrólico dependiendo del caso, se llevó tal como muestran los esquemas 10 y 13. La síntesis del péptido que contiene la octaarginina se realizó siguiendo la misma metodología e incorporando en el extremo N-terminal Cys y el ácido *p*-acetamidobenzoico (*Aba*), cuyo coeficiente de extinción es conocido ($\epsilon_{270\text{nm}} = 18,069 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) y facilita la medida de la concentración del péptido para la dimerización.



Esquema 15. Síntesis del péptido **B₈** necesario para los dímeros disulfuros.

En la figura 66 puede verse el cromatograma de HPLC para el compuesto **B₈**, así como su espectro de absorción mostrando el máximo de absorción a 270 nm, característico del cromóforo *Aba*. La identidad del compuesto se verificó mediante espectroscopía de masas.

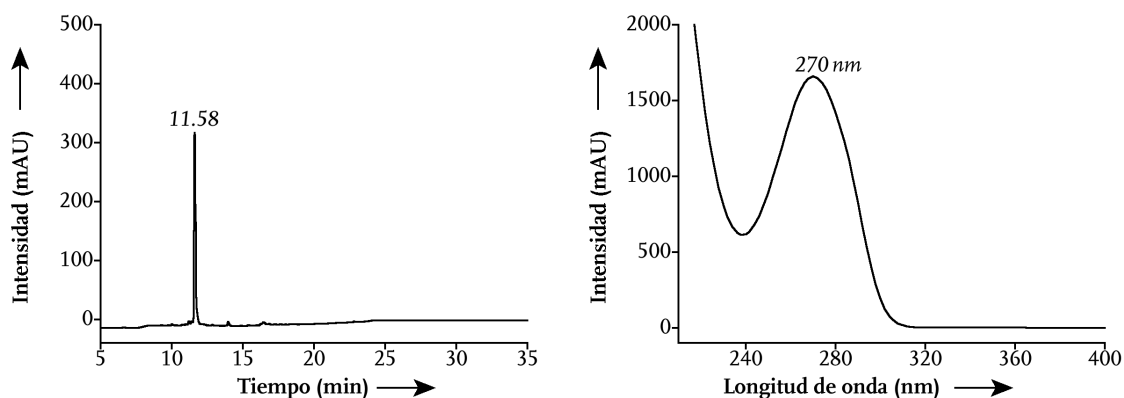
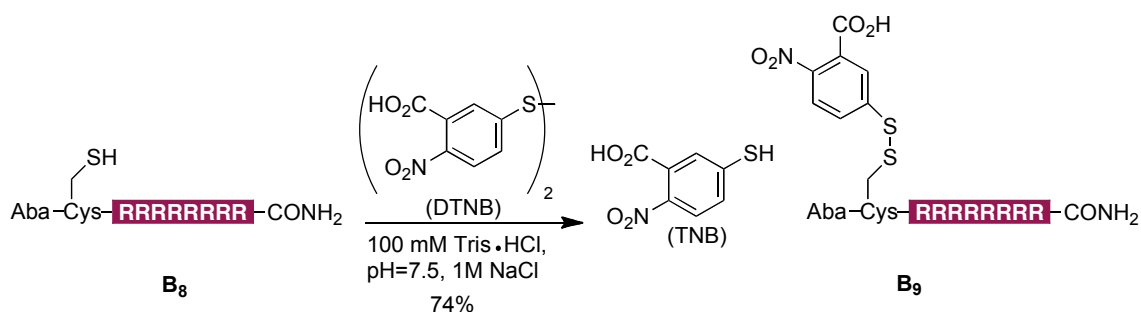


Figura 66. Izquierda: cromatograma de HPLC del péptido **B₈**, gradiente 1, $\lambda = 222 \text{ nm}$. Derecha: espectro de absorción.

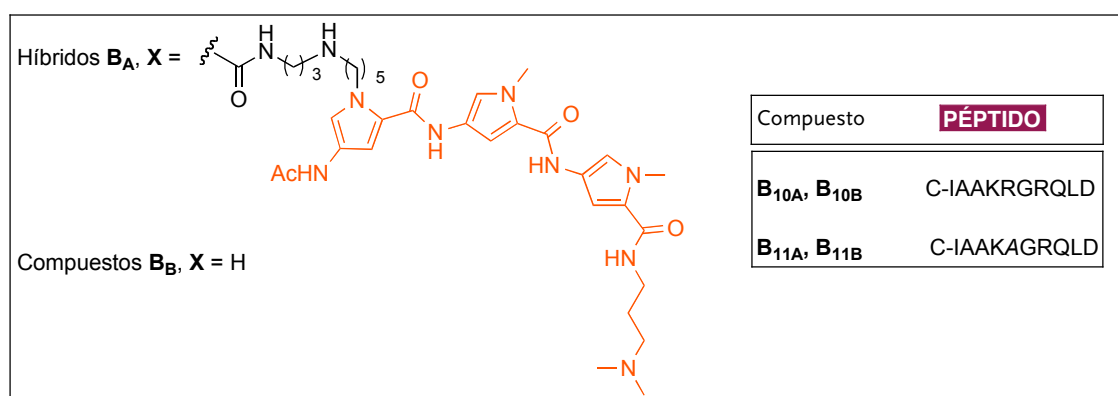
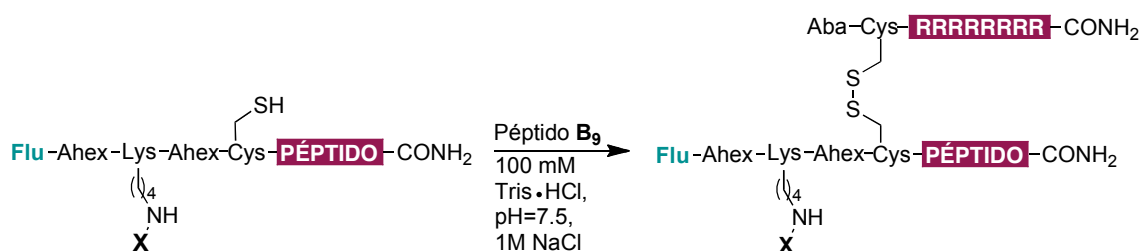
Para poder realizar la dimerización, el grupo tiol del péptido con la secuencia de las octaargininas, el péptido **B₈**, se activó con el reactivo de Ellman (DTNB) (esquema 16). Este reactivo se usa comúnmente para conjugar biomoléculas a través de enlaces disulfuro en disoluciones acuosas. Se ha observado que el enlace disulfuro del propio reactivo de Ellman reacciona fácilmente con los grupos tioles libres presentes en otras moléculas [142]. La reacción va acompañada de la liberación de una molécula del ácido cromogénico 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), lo que facilita el seguimiento de la reacción al dar un color amarillo intenso a la disolución. La reacción se monitorizó mediante EM/HPLC-FR, observándose

la conversión total del péptido **B₈** en 45 minutos. El péptido resultante **B₉**, se purificó y su identidad fue corroborada mediante espectroscopía de masas.



Esquema 16. Activación del péptido **B₈** con el reactivo de Ellman.

Este nuevo compuesto activado **B₉** puede volver a sufrir un intercambio con cualquier sustancia que contenga un grupo tiol. De manera que, a continuación, se llevaron a cabo reacciones de dimerización tanto para los híbridos que contienen el tripirrol, como los compuestos que no, tal y como se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 17. Síntesis de los dímeros disulfuro.

En las figuras siguientes se muestra el cromatograma y el espectro de absorción de uno de estos híbridos (híbrido **B_{10A}**) y el compuesto análogo desprovisto del fragmento tripirrolóico (compuesto **B_{10B}**). Todos estos compuestos se caracterizaron mediante espectroscopía de masas, los datos experimentales adicionales de todos ellos se encuentran en la parte experimental de esta tesis.

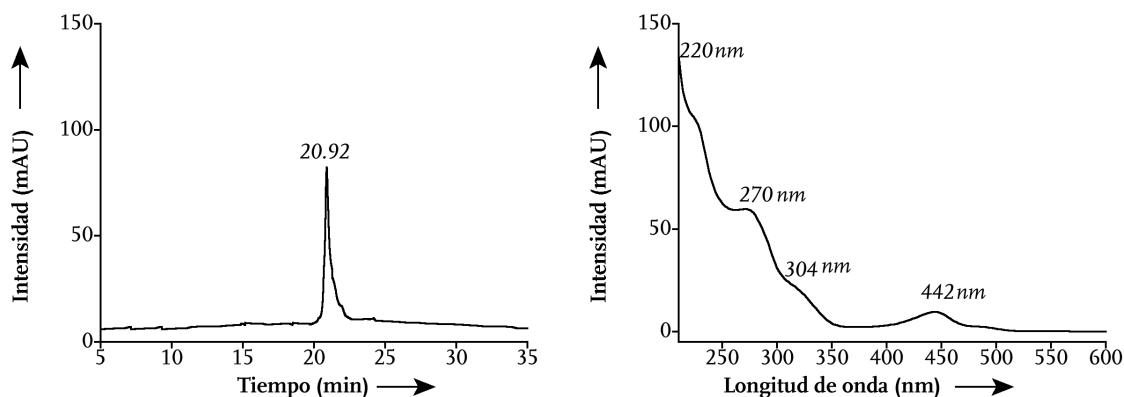


Figura 67. Izquierda: cromatograma de HPLC del híbrido ortogonal **B_{10A}**, gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

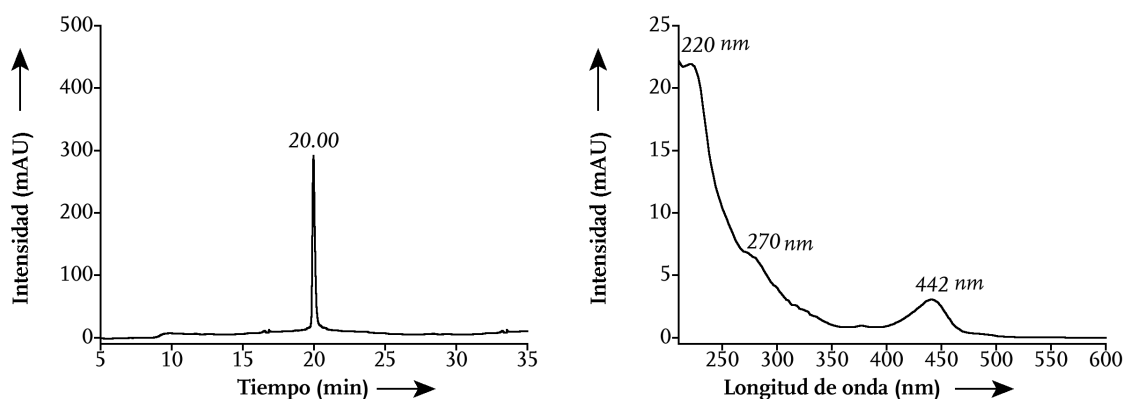
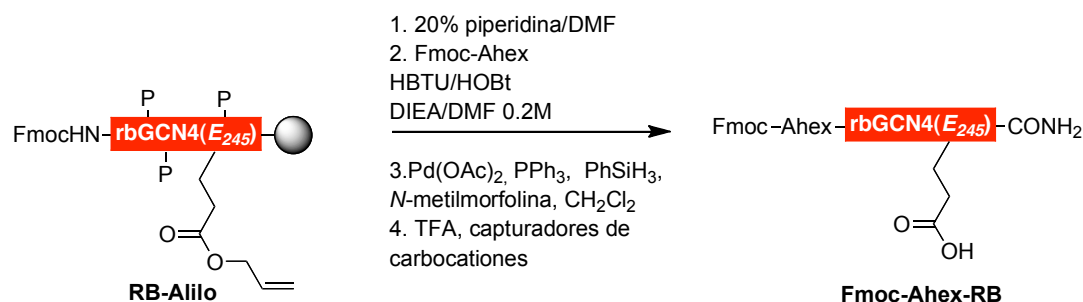


Figura 68. Izquierda: cromatograma de HPLC de compuesto análogo sin el tripirrol **B_{10B}**, gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Llegados a este punto se pensó en analizar también las propiedades de internalización del híbrido bivalente **A₃**, aquél constituido por la región básica de la proteína GCN4 y un fragmento tripirrólico unidos covalentemente por un conector con una amina central (figura 45).

Para poder visualizar dicho proceso fue necesario el marcaje del híbrido con fluoresceína. Desafortunadamente, los intentos de síntesis siguiendo el procedimiento similar al presentado en los esquemas 10 y 13, donde el compuesto tripirrólico se introduce en la última etapa después de haber marcado el péptido, fueron, en este caso, infructuosos dando lugar a un cromatograma muy sucio de difícil asignación. De todos modos esto se pudo resolver cambiando el orden de las reacciones. El procedimiento sintético definitivo consistió, inicialmente, en desproteger selectivamente el grupo protector Alilo de la cadena lateral del Glu en la posición 245 (E_{245}) en presencia del Fmoc en el extremo N-terminal de la región básica. Este hecho hizo necesario el uso de unas condiciones de desprotección con catálisis de paladio más suaves que las habituales [143]. La reacción se evaluó a través de EM/HPLC-FR mediante la rotura de una pequeña porción de péptido de la resina. La espectroscopía de masas verificó la identidad del péptido deseado (figura 69).



Esquema 18. Desprotección selectiva del grupo Alilo para obtener el péptido **Fmoc-Ahex-RB**.

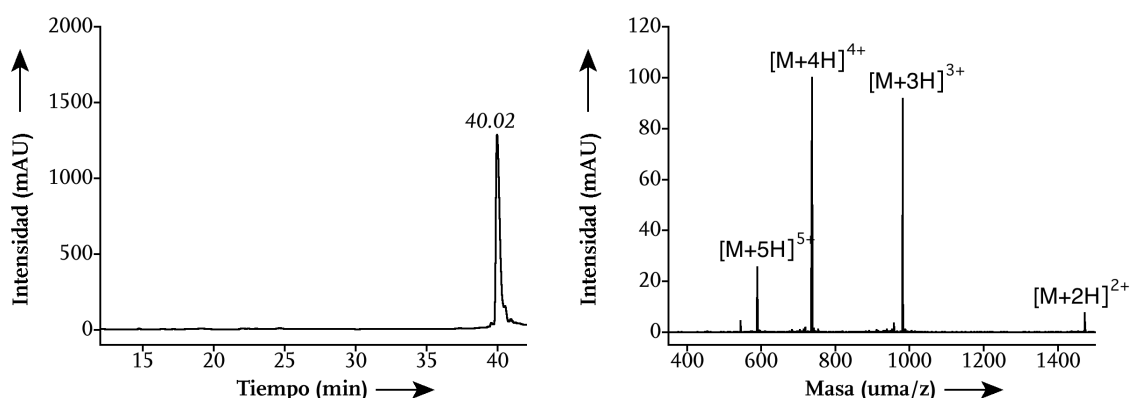
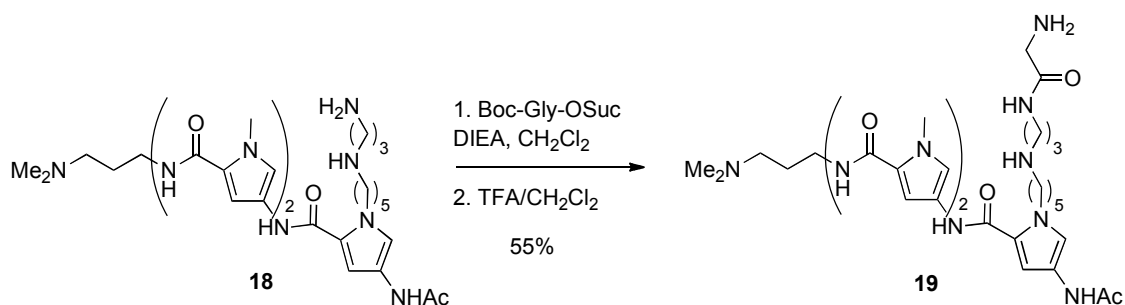


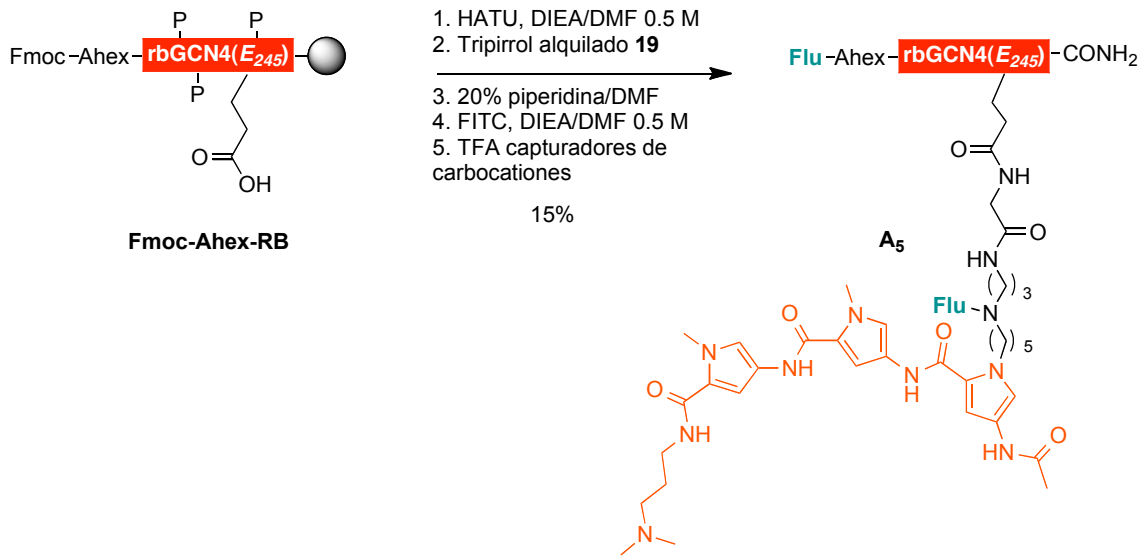
Figura 69. Izquierda: cromatograma de HPLC del péptido **Fmoc-Ahex-RB**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de masas de dicho compuesto. Calcd para $C_{128}H_{212}N_{44}O_{36}$: 2943.3. Encontrada: 1472.2 $[M+2H]^{2+}$; 981.8 $[M+3H]^{3+}$; 736.6 $[M+4H]^{4+}$; 589.5 $[M+5H]^{5+}$

A continuación se preparó el aminotripirrol **19**, necesario para el híbrido bivalente, a partir del compuesto **18**. Éste nuevo derivado tripirrólico **19** es idéntico al compuesto **1** (salvo por la presencia del grupo amino en su cadena alquílica en lugar de un oxígeno) por lo que la condensación con la glicina activada se llevó a cabo del mismo modo al explicado anteriormente.



Esquema 19. Síntesis del tripirrol alquilado **19**.

A continuación, se acopló de forma secuencial al péptido (en fase sólida) el aminotripirrol **19** y la fluoresceína. Desafortunadamente, fue difícil controlar la reacción de marcaje con la fluoresceína, comprobándose mediante EM/HPLC-FR que el compuesto mayoritario de la reacción contenía dos fluoresceínas. La segunda probablemente esté incorporada en el conector amino.



Esquema 20. Síntesis del híbrido **A₅** marcado con fluoresceína.

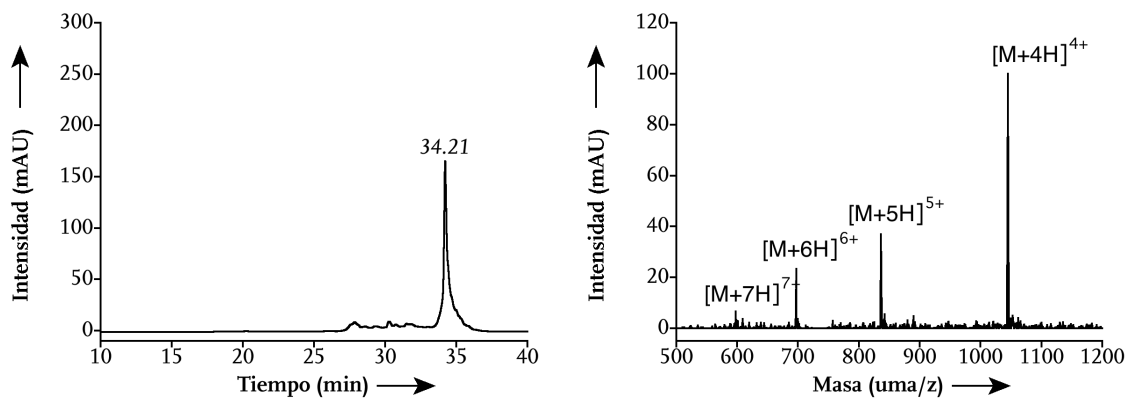
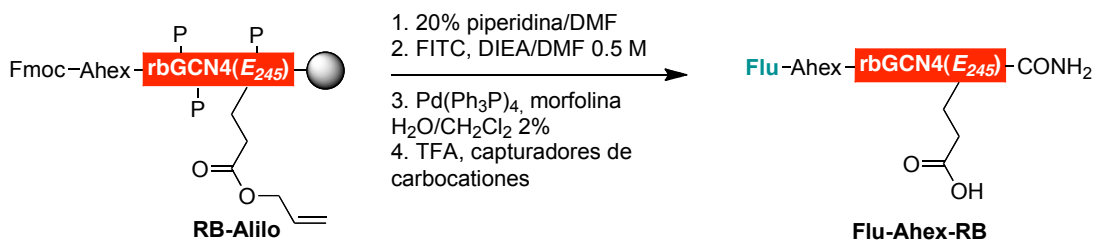


Figura 70. Izquierda: cromatograma de HPLC del híbrido **A₅**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de masas de dicho compuesto que corrobora la entrada de dos fluoresceínas. Calcd considerando dos fluoresceínas $C_{189}H_{273}N_{57}O_{48}S_2$ 4175.7 Encontrada: 1045.3 [M+4H]⁴⁺; 836.2 [M+5H]⁵⁺; 697.2 [M+6H]⁶⁺ 597.8 [M+7H]⁷⁺.

Además como control, también se preparó, a través de una aproximación sintética similar a la descrita en el esquema 10, la región básica marcada con fluoresceína y desprovista del tripirrol. En la figura 71 se puede ver el cromatograma para dicho compuesto.



Esquema 21. Síntesis de la región básica de GCN4 marcada con fluoresceína.

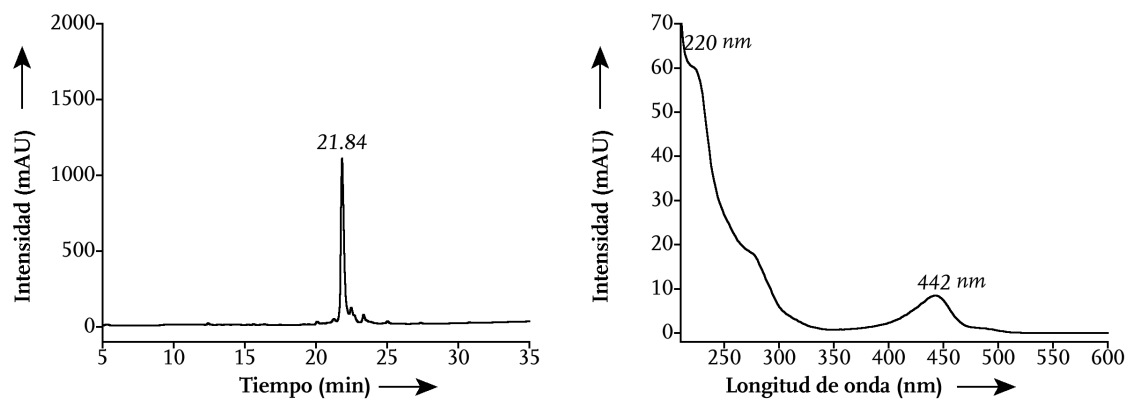


Figura 71. Izquierda: cromatograma de HPLC de la región básica marcada con fluoresceína, **Flu-Ahex-RB** gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

La presencia de dos fluoresceínas en el híbrido **A₅** no debería afectar en gran medida al análisis preliminar de las capacidades de internalización de nuestros sistemas bivalentes, por lo que se decidió hacer los ensayos iniciales con este conjugado **A₅** y con el control **Flu-Ahex-RB**

Estudios de internalización celular

La evaluación de las propiedades de transporte de los compuestos sintetizados se realizó contando con la colaboración del profesor José Martínez-Costas, del Dpto de Bioquímica y Biología Molecular de esta universidad.

Inicialmente se ensayaron dos compuestos: el tripirrol marcado con fluoresceína **13** y el híbrido disulfuro **B_{10A}**, que está equipado con las dos secuencias peptídicas de internalización (NLS y octaarginina) además de con el fragmento tripirrólico (TRP). Los ensayos se hicieron con cuatro líneas celulares (Vero, COS, HeLa, HEK). Los compuestos se incubaron a 37 °C en una concentración de 2 μM durante 45 min, 5 h y 24 h. Los resultados se analizaron sin fijar las células. En estos experimentos preliminares se observó únicamente fluorescencia en el interior de las células en el caso del híbrido **B_{10A}**. También se comprobó que la distribución del compuesto es dependiente del tiempo y del tipo celular. Las células HeLa fueron las que mostraron una mayor internalización, por lo que se decidió continuar los ensayos con estas células.

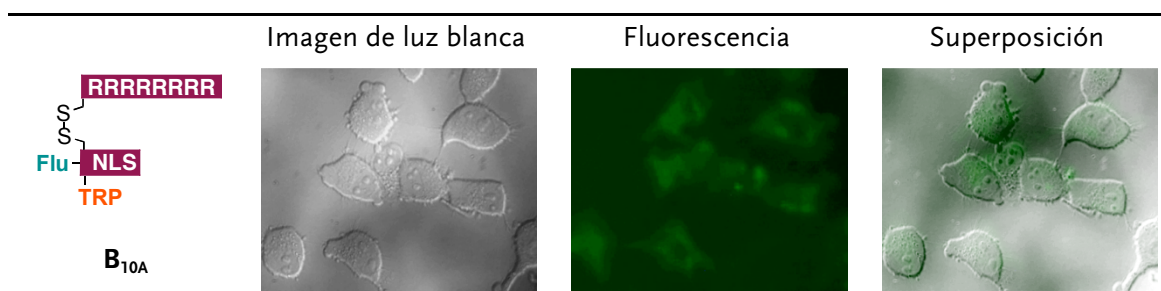
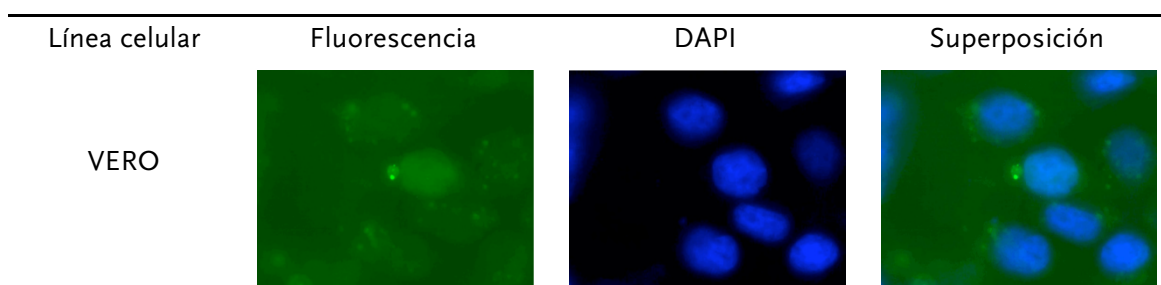


Figura 72. Distribución intracelular del híbrido disulfuro **B_{10A}** en células HeLa después de 45 min de incubación. Para facilitar la identificación del compuesto se usa un dibujo esquemático donde: **Flu** = fluoresceína; **TRP** = tripirrol; **NLS** = secuencia de señalización nuclear.

Otra observación de estos primeros ensayos fue que a las cinco horas existía una saturación de la fluorescencia, lo que complicaba el análisis de los resultados. Además, la distribución celular después 24 horas no era homogénea y se observaban deformaciones en la morfología de algunas células.

En estas muestras se ensayó también el efecto de la fijación con *p*-formaldehído, reactivo que se utiliza comúnmente para preservar el estado de las células. La coincidencia de los resultados, independientemente de la etapa de fijación, demostró que éste no genera una redistribución artificial de las moléculas y, además, facilita la interpretación de los resultados con el marcaje simultáneo de los núcleos con DAPI. Como ventaja añadida, la fijación permite el almacenamiento de los especímenes durante más tiempo.



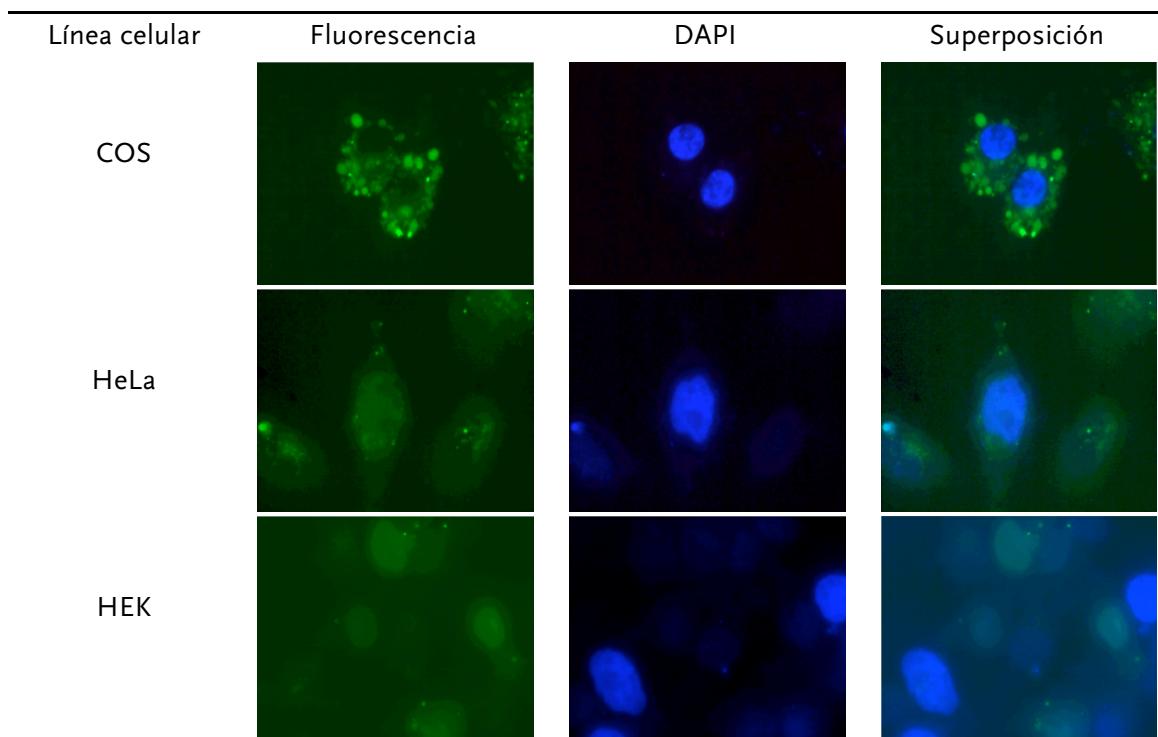
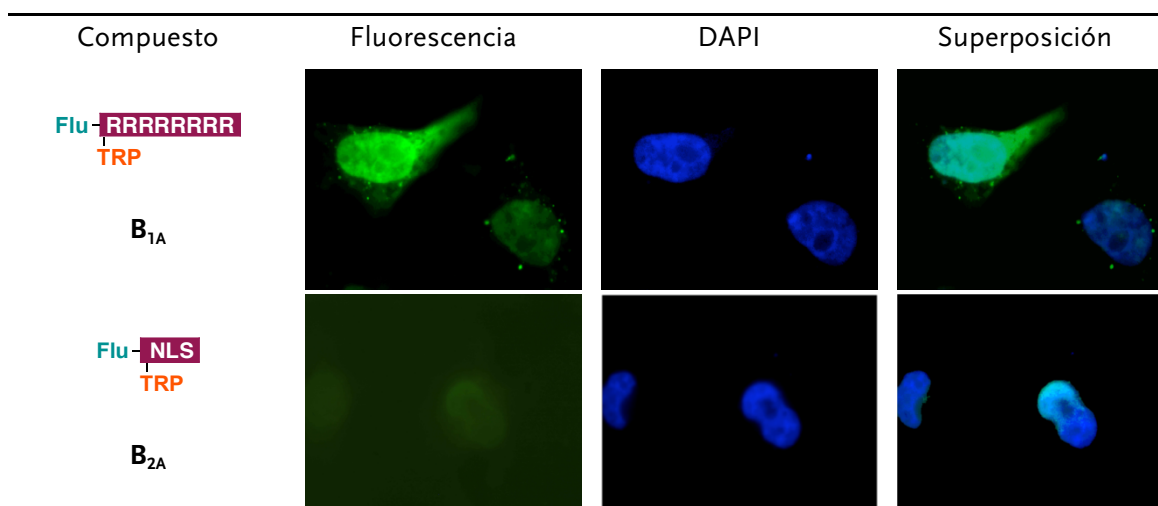


Figura 73. Distribución intracelular del híbrido disulfuro **B_{10A}** en las cuatro líneas celulares después de 24 h de incubación.

La superposición de las imágenes permite verificar la entrada en el núcleo del híbrido disulfuro **B_{10A}** en tres de las líneas celulares ensayadas (figura 73). Curiosamente, en la línea celular COS, el híbrido ortogonal se acumula en forma de vesículas en el citoplasma.

En base a estos estudios preliminares, se estudiaron todos los compuestos en células HeLa a una concentración de 2 μ M y los resultados se evaluaron después de la fijación con *p*-formaldehído. Las imágenes se obtuvieron a tres tiempos diferentes: 30 min, 90 min y 3 h. Los resultados obtenidos en cada franja de tiempo fueron cualitativamente similares, aunque el grupo de datos más representativo en todos los casos fue el obtenido después de la incubación durante 90 min. A los 30 minutos la distribución era, generalmente, incompleta y a las 3 h la intensidad de la fluorescencia estaba sobresaturada.



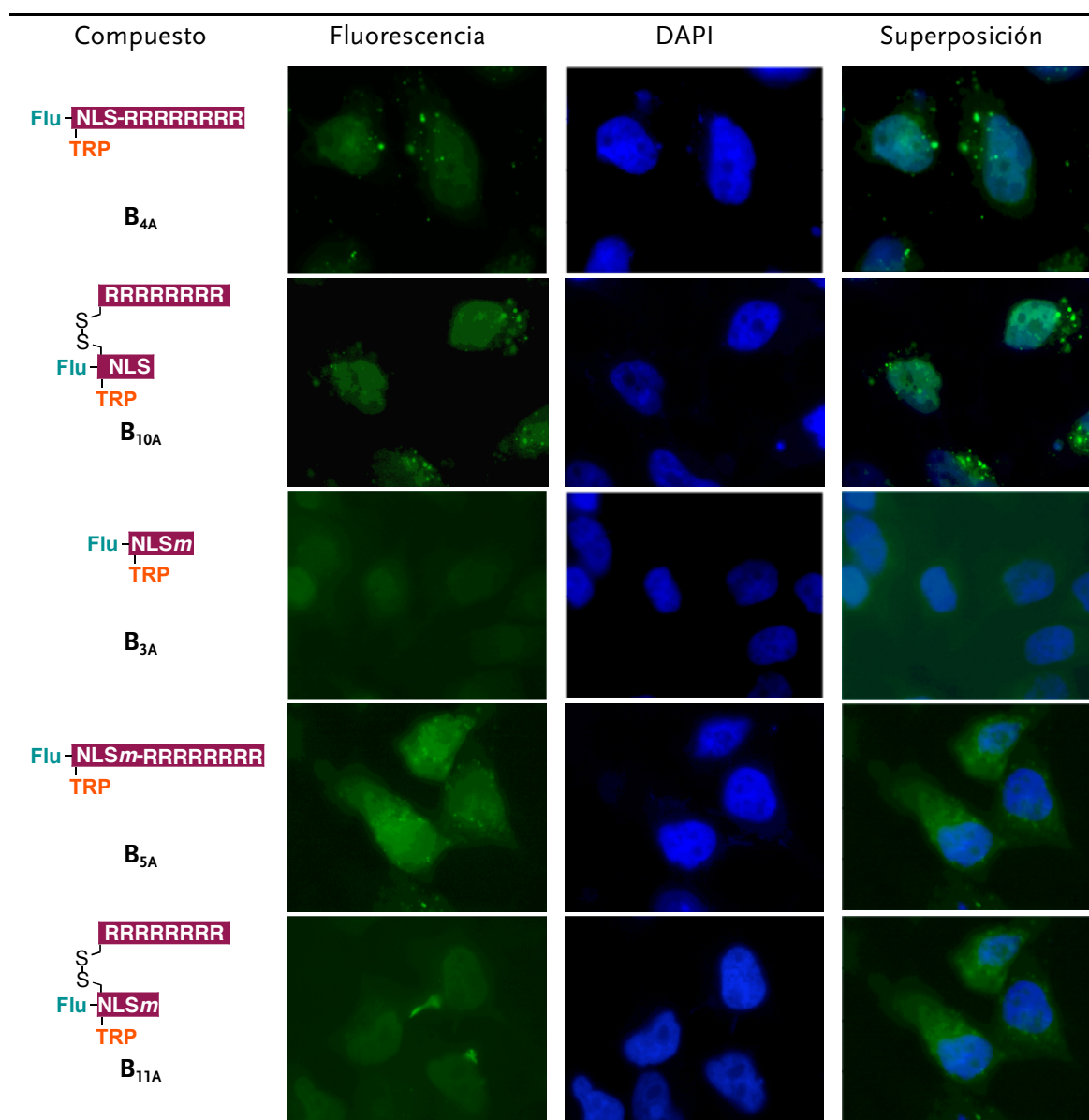


Figura 74. Distribución intracelular de los híbridos en células HeLa. Los tiempos de exposición son: **B_{1A}**, **B_{4A}** = 1/18 s; **B_{2A}** = 1/2 s; **B_{10A}**, **B_{5A}** = 1/6 s; **B_{3A}**, **B_{11A}** = 1s. Para facilitar la identificación de los compuestos se usan dibujos esquemáticos similares al de la figura 72 donde: **Flu** = fluoresceína; **TRP** = tripirrol; **NLS** = secuencia de señalización nuclear; **NLSm** = secuencia de señalización nuclear mutada. Los dibujos esquemáticos se mantendrán en todo este tipo de figuras.

Tal como se observa en la figura 74, la incubación con una concentración de 2 μM del conjugado octaarginina–tripirrol **B_{1A}** durante 90 minutos a 37 °C conduce a la aparición de una señal de fluorescencia muy intensa y homogénea en los núcleos celulares, demostrándose así que la octaarginina no sólo ayuda al compuesto tripirrólico a cruzar la membrana citoplasmática sino que, además, parece facilitar la internalización en el núcleo celular. Además, este compuesto presentó una distribución homogénea con una señal de fluorescencia intensa después de una incubación de tan sólo 30 min. Este hecho implica una rápida entrada nuclear, lo cual es particularmente relevante dado que las poliamidas en forma de horquilla necesitan periodos de incubación mucho mayores para poder llegar a los núcleos celulares [130], [131], [132].

En el caso del híbrido **B_{2A}**, que incorpora la secuencia de señalización nuclear (NLS: IAAKRGRQLD) en lugar de la octaarginina, se observó una señal de fluorescencia débil, localizada principalmente en los núcleos. La menor intensidad de fluorescencia observada con este compuesto en comparación con la del híbrido **B_{1A}** puede ser debida, simplemente, a la menor eficiencia de la secuencia NLS para atravesar la membrana citoplasmática. La incorporación de una secuencia de octaargininas al híbrido NLS, ya sea de forma lineal (**B_{4A}**), o por medio de un enlace lábil de tipo disulfuro (**B_{10A}**) reestablece la capacidad de internalización. Así, la incubación de las células con los híbridos **B_{4A}** y **B_{10A}** dio lugar a la aparición de una señal de fluorescencia en los núcleos más intensa que el caso del compuesto **B_{2A}**. De todos modos es importante destacar que la intensidad de fluorescencia observada para estos dos conjugados no llega a ser tan grande como en el caso del híbrido **B_{1A}**. La intensidad de fluorescencia registrada para el híbrido lineal **B_{4A}** fue mayor que la observada con el análogo ortogonal **B_{10A}**, quizás como consecuencia de la rotura parcial del enlace disulfuro en el citoplasma celular [144]. Los conjugados que contienen la secuencia NLS mutada (**B_{5A}**, **B_{3A}**, **B_{11A}**) presentan una fluorescencia más débil y difusa que sus análogos sin dicha mutación, lo que es consistente con lo esperado.

Tal como señalaban los estudios preliminares, el compuesto tripirrólico **13**, que carece de una secuencia peptídica que favorezca la entrada celular, no fue capaz de inducir fluorescencia intracelular, incluso, después de 3 h de incubación. Este resultado confirma el papel crucial de la unidad de octaarginina en el proceso de internalización celular.

Por otro lado, se ha podido confirmar que el fragmento tripirrólico tiene una influencia significativa en la localización intranuclear de estas moléculas. Así, el péptido de octaarginina **B_{1B}** mostró una señal de fluorescencia muy intensa pero, a diferencia del conjugado **B_{1A}** que contenía el tripirrol, se localiza predominantemente en el citoplasma. Los péptidos **B_{2B}**, **B_{3B}**, que no contienen la secuencia de octaarginina, y el péptido **B_{11B}** no son capaces de entrar en la célula, pues no se detectó fluorescencia. Los péptidos **B_{4B}**, **B_{10B}** y **B_{5B}** mostraron una localización intracelular en el citoplasma, aunque bien es cierto que la señal fue muy débil y difusa, sobre todo para el péptido **B_{5B}**.

Como se observó con los análogos que contienen el fragmento tripirrólico, la presencia de la secuencia NLS en los péptidos con octaarginina no proporcionó ningún efecto beneficioso en las propiedades de internalización celular.

Compuesto	Fluorescencia	DAPI	Superposición
<p>Flu-TRP</p> <p>13</p>			N/A
<p>Flu-RRRRRRR</p> <p>B_{1B}</p>			

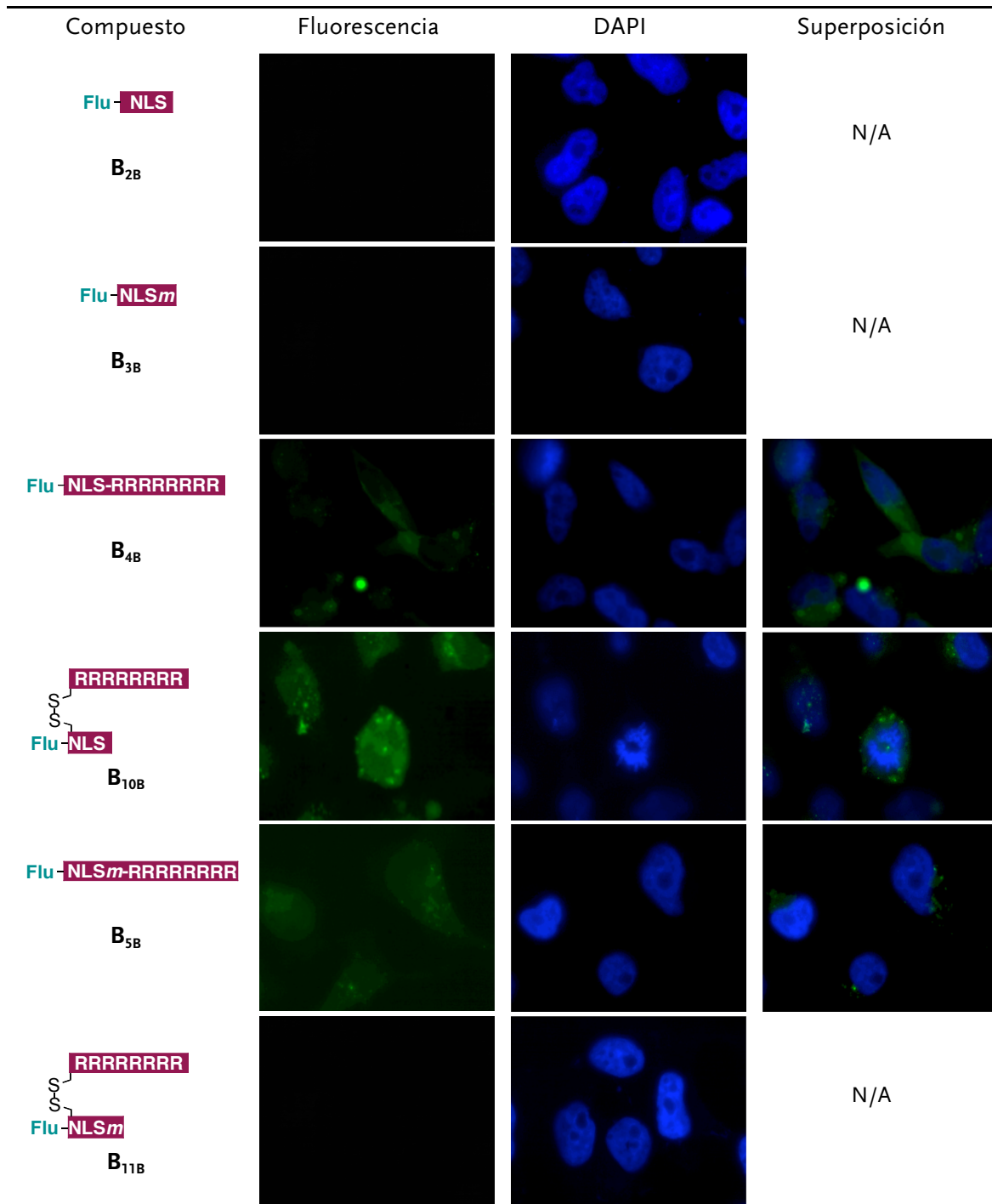


Figura 75. Distribución intracelular de los híbridos en células HeLa. Los tiempos de exposición son: C_{1B} = 1/18 s; 13, C_{2B}, C_{3B}, C_{10B}, C_{11B} = 1/6 s; C_{4B} = 1/2 s; C_{5B} = 1 s.

Todos estos resultados corroboran la importancia de la secuencia de octaarginina en la localización nuclear, y demuestran que el híbrido B_{1A} se acumula en los núcleos de forma rápida y eficiente. No obstante, en ausencia de la unidad de reconocimiento del surco menor (el fragmento tripirrólico) el péptido se localiza en el citoplasma. Por lo tanto, la entrada nuclear se ve favorecida por la sinergia de ambas unidades, del tripirrol (TRP) y la octaarginina (R₈).

Los estudios celulares con el híbrido bivalente con la región básica de GCN4 marcado con fluoresceína (A_5) pusieron de manifiesto nuevamente la importancia de las dos unidades de reconocimiento en el proceso de internalización. Así, mientras que la incubación de las células con **Flu-Ahex-RB**, que no contiene el tripirrol, no generó fluorescencia intracelular; el híbrido A_5 mostró una señal fluorescente homogénea en los núcleos celulares, aunque con una intensidad más baja que los análogos conjugados con octaarginina (a pesar de contener dos unidades de fluoresceína).

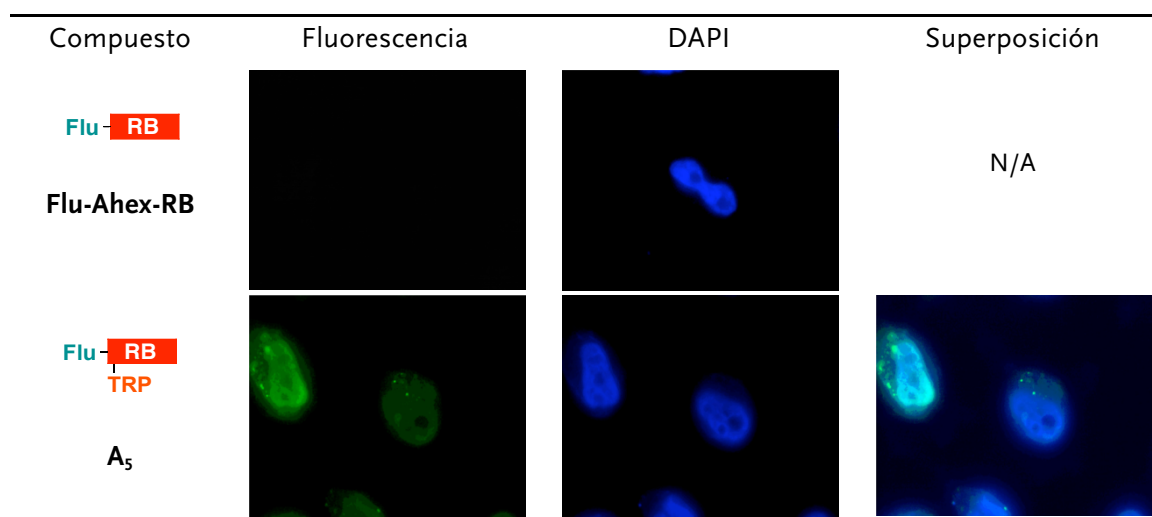


Figura 76. Distribución intracelular en células HeLa. Los tiempos de exposición son: A_5 = 1/18 s; **Flu-Ahex-RB** = 1 s; En estos dibujos esquemáticos se mantiene la misma nomenclatura y además se añade RB = región básica de GCN4.

No se conoce de forma precisa el mecanismo exacto a través del cual las poliargininas favorecen la entrada celular y existe una cierta controversia sobre el mismo. Sin embargo, si ha sido demostrada claramente la importancia del grupo guanidinio en la internalización celular [145]; probablemente éste podría formar enlaces de hidrógeno con los fosfolípidos presentes en la membrana celular y favorecer, de este modo, la entrada. Además, se ha demostrado que la linealidad en la secuencia de poliargininas no es indispensable para la localización celular pero si es fundamental el cluster de argininas, necesitándose al menos cinco grupos guanidinos para lograr una internalización efectiva con este motivo [146]. La secuencia de la región básica del híbrido bivalente presenta cinco argininas, por lo tanto, parece lógico que el híbrido bivalente logre alcanzar el núcleo celular. El hecho de que no se detecte fluorescencia intranuclear con la región peptídica aislada subraya el papel del fragmento tripirrólico, que probablemente beneficie termodinámicamente el proceso al favorecer el atrapado en el núcleo.

Interacción con el ADN

Una vez demostradas las ventajas en el transporte celular de la unión de una oligoarginina a un agente de reconocimiento del surco menor, se comprobó si la presencia de esta secuencia peptídica catiónica contribuye a aumentar la afinidad del compuesto por el ADN sin comprometer la selectividad. Estos estudios se realizaron a temperatura ambiente mediante PAGE, utilizando los siguientes oligonucleótidos de doble cadena.^x

dsADN ^{xi}	Secuencia (5' a 3')
ATTTT	GAGGATTTTCAGCTTACGCT
CGGCC	GAGGCGGCCATGACGTTTCGT
CTTTT	GAGGCTTTTGAGAGTACGCT
CTTCC	GAGGCTTCCATGACGTTTCGT

Tabla 3. Secuencias de ADN usados en los estudios de PAGE.

La adición de concentraciones crecientes del híbrido **B_{1A}** al ADN **ATTTT** marcado radiactivamente con P³² da lugar a la aparición de una banda que se desplaza más lentamente que la correspondiente al ADN solo (figura 77 izquierda). La incubación de este mismo conjugado con una secuencia que carece de dicha región (ADN **CGGCC**) no genera la aparición de ninguna banda detectable en el gel, incluso, a elevadas concentraciones (figura 77 derecha). Las bandas de estos autorradiogramas son bastante difusas y desaparecen a elevadas concentraciones del híbrido **B_{1A}**.



Figura 77. Estudio a través de PAGE del híbrido **B_{1A}**. Izquierda: en presencia del ADN **ATTTT** marcado radiactivamente. Calles 1–7, [híbrido **B_{1A}**]: 0, 5, 20, 50, 100, 150, 200, nM.; Derecha: en presencia del ADN **CGGCC** marcado radiactivamente. Calles 1–6 [híbrido **B_{1A}**]: 0, 50, 100, 200, 300, 500 nM.

En la figura siguiente se muestra el experimento de PAGE de la octaarginina **B_{1B}** y el ADN **ATTTT**, observándose que no hay nuevas bandas de desplazamiento de retardo en el gel, incluso a concentraciones de 500 nM, lo que confirma la necesidad del tripirrol para la interacción efectiva con el ADN.

^x En general, la interacción de los agentes de reconocimiento del surco menor con el ADN no se analiza mediante ensayos de electroforesis de retardo en gel (EMSA) debido a su pequeño tamaño y poca carga, pero se consideró que, en este caso, la presencia del conjugado de octaarginina debería permitir la realización de estos experimentos.

^{xi} La nomenclatura de los dsADN se refiere a: **ATTTT**: es la secuencia de reconocimiento del compuesto tripirrólico; **CGGCC** es la secuencia mutada que no contiene la zona de reconocimiento del compuesto tripirrólico. **CTTTT** y **CTTCC**, son secuencias que sirven para evaluar la mínima secuencia de reconocimiento. Sólo se representa la secuencia de una hebra.

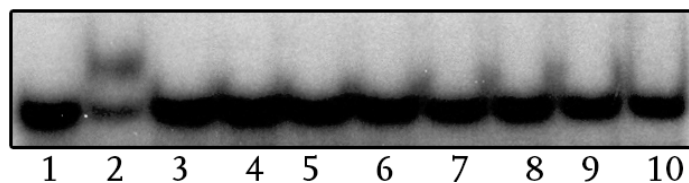
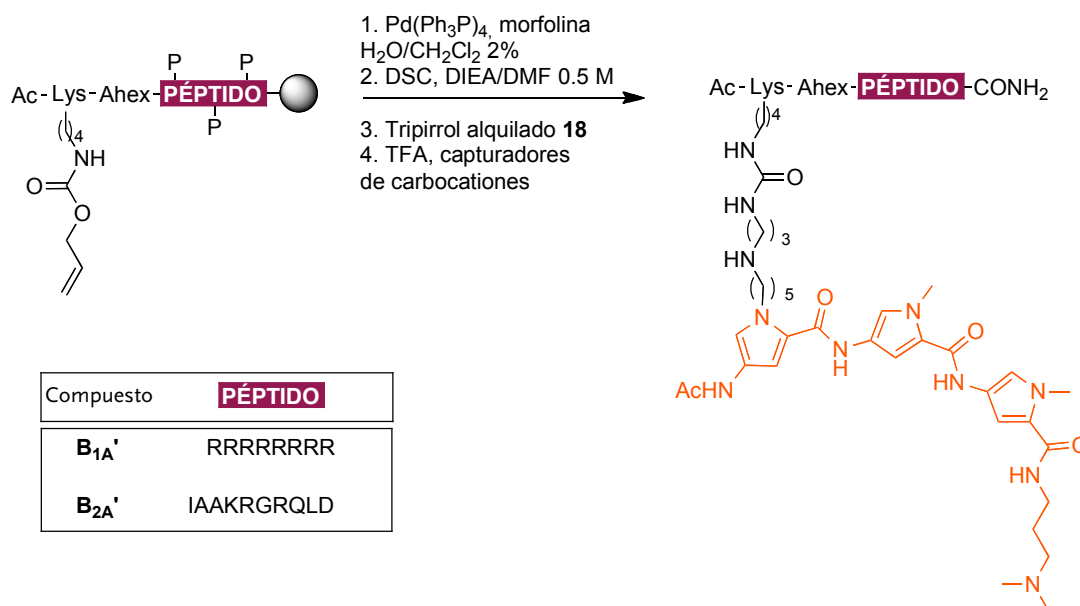


Figura 78. Estudio a través de PAGE del híbrido B_{1B} en presencia del ADN ATTTT marcado radiactivamente. Calle 1,3–10, [híbrido B_{1B}]: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 nM. Calle 2: control con el híbrido B_{1A} y el mismo ADN; [híbrido B_{1A}]: 150 nM.

Asumiendo que las bandas difusas de los autorradiogramas de la figura 77 podrían deberse a un efecto adverso en la solubilidad y propiedades migratorias de los complejos ADN–conjugado debido a la fluoresceína, se sintetizaron conjugados análogos de B_{1A} y B_{2A} sin la unidad de fluoresceína y acetilados en el extremo N–terminal (B_{1A}' y B_{2A}'). Los espectros de absorción de B_{1A}' y B_{2A}' carecen de la banda de la fluoresceína (442 nm).



Esquema 22. Síntesis de los conjugados sin fluoresceína B_{1A}' , B_{2A}' .

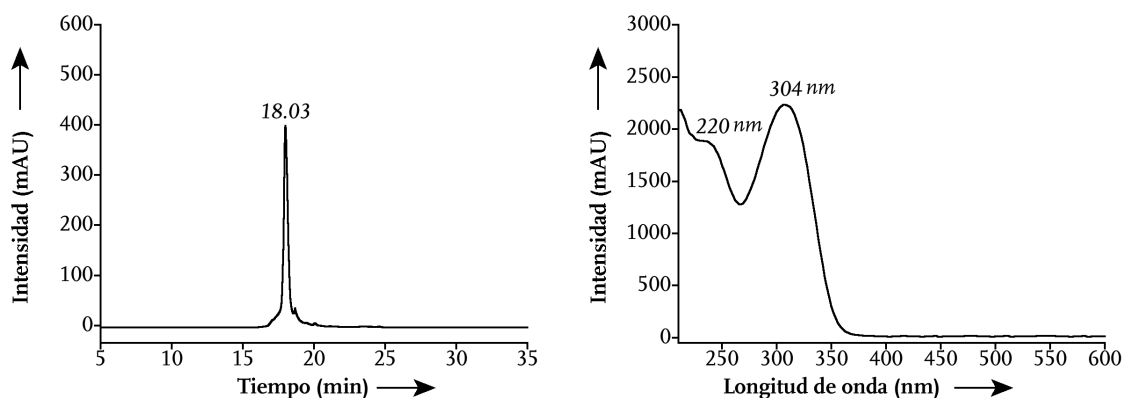


Figura 79. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción de acoplamiento del híbrido B_{1A}' , gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

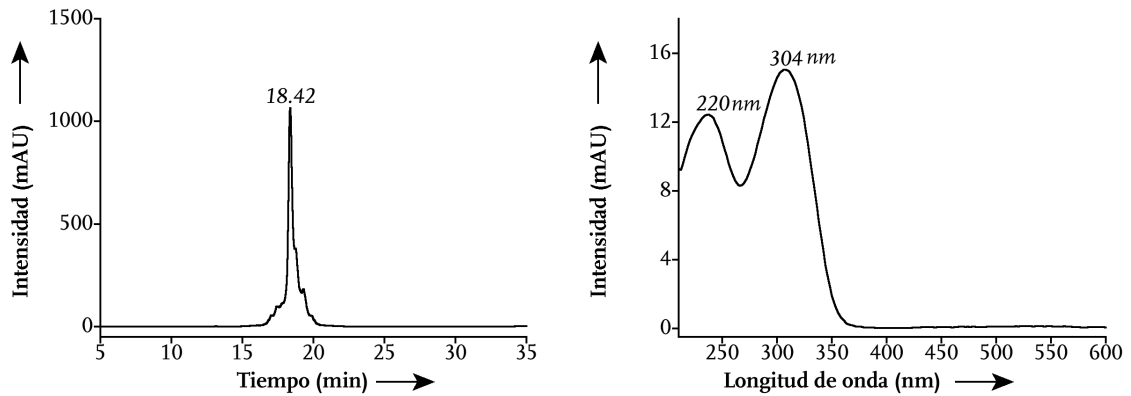


Figura 80. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción de acoplamiento del híbrido B_{2A}' , gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Afortunadamente este nuevo conjugado B_{1A}' carente de fluoresceína daba lugar a bandas bien definidas en el gel, consistentes con interacciones específicas y de alta afinidad con el ADN **ATTTT** [147].

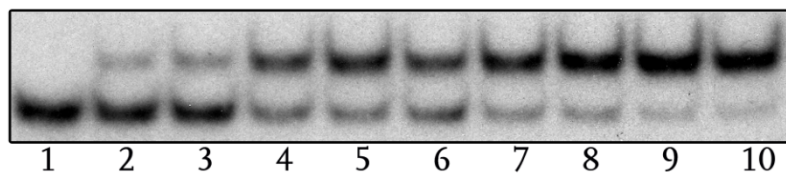


Figura 81. Valoración del conjugado B_{1A}' con el ADN **ATTTT**. Calle 1–10, [híbrido B_{1A}']: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25 nM.

El análisis cuantitativo de ese gel a temperatura ambiente permitió calcular la constante de disociación para el modo de unión 1:1, $K_D = (6 \pm 0.5)$ nM, que es aproximadamente dos órdenes de magnitud mejor que para la distamicina [134].

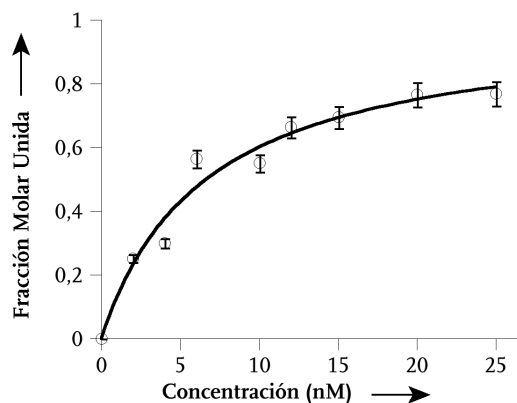


Figura 82. Isotherma de unión resultante del análisis de densidad del gel de la figura 81.

Estos resultados confirman que la unión de la octaarginina aumenta de forma eficiente la afinidad por el ADN del agente de reconocimiento del surco menor. La relevancia de la octaarginina en la unión del ADN se comprobó al evaluar la afinidad de un nuevo híbrido

B_{2A}' , análogo a B_{2A} y constituido por la región NLS pero sin la fluoresceína para evitar problemas de solubilidad en el gel. Como puede verse en la figura 83, el compuesto B_{2A}' interacciona con el ADN **ATTTT** con una afinidad mucho peor que su análogo con octaarginina (B_{1A}').

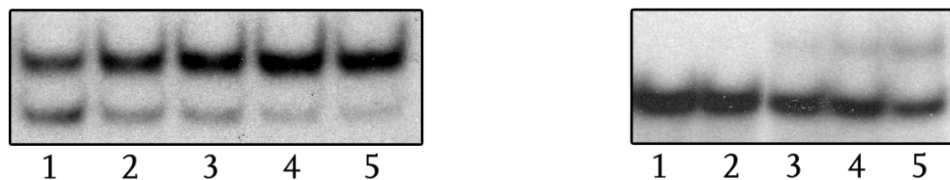


Figura 83. Izquierda: PAGE del híbrido B_{1A}' en presencia del ADN **ATTTT** marcado radiactivamente. Calle 1–5, [híbrido B_{1A}']: 10, 12, 15, 20, 25 nM, Derecha: PAGE del híbrido B_{2A}' en presencia del ADN **ATTTT** marcado radiactivamente. Calle 1–5, [híbrido B_{2A}']: 50, 100, 200, 300, 500 nM.

La unión de la oligoarginina no afecta a la selectividad de secuencia del compuesto tripirrólico, como se deduce de los autorradiogramas de la figura siguiente.

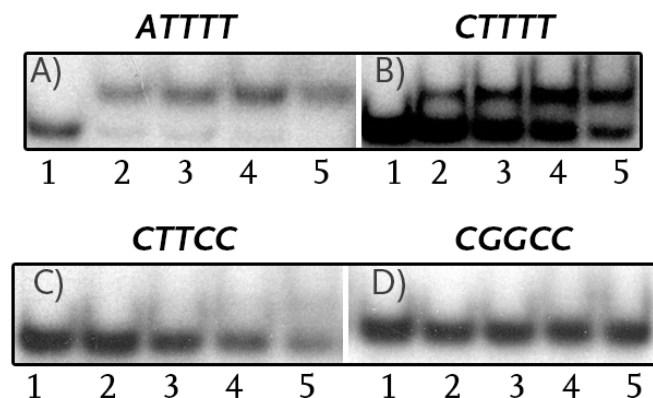


Figura 84. PAGE del híbrido B_{1A}' en presencia de distintos ADNs marcados radiactivamente. En todos los casos calles 1–5, [híbrido B_{1A}']: 0, 20, 50, 100, 150 nM. A) en presencia del ADN **ATTTT**. B) en presencia del ADN **CTTTT**. C) en presencia del ADN **CTTCC**. D) en presencia del ADN **CGGCC**.

Conclusiones

Los agentes de reconocimiento del surco menor del tipo distamicina presentan serias dificultades para alcanzar los núcleos celulares debido a su baja permeabilidad. Con estos estudios se ha demostrado que la unión covalente de dichas moléculas a una secuencia de octaarginina no sólo permite una rápida localización nuclear, sino que, también, induce a una gran aumento de afinidad por las secuencias de ADN ricas en A/Ts (~ 100 veces). También se ha observado una sinergia entre el agente de reconocimiento del surco menor y la secuencia de poliarginina en la traslocación celular y localización nuclear. Esta estrategia debería poder extenderse a otros agentes de reconocimiento del surco menor y por tanto, podría permitir la entrada eficiente de compuestos en el núcleo celular.

El trabajo incluido en este capítulo ha dado lugar a una solicitud de patente y a un artículo:

Vázquez, O.; Blanco, J. B.; Vázquez, M. E.; Martínez–Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. Compuestos híbridos tripirrol–octaarginina. N° Solicitud: P200802520, **2008**.

Vázquez, O.; Blanco, J. B.; Vázquez, M. E.; Martínez–Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. Efficient DNA binding and nuclear uptake by distamycin derivatives conjugated to octa-arginine sequences. *ChemBioChem*. **2008**, 9, 2822–2829.

Estudios de citotoxicidad

Pensando en una posible aplicación práctica de nuestros conjugados con octaarginina nos pareció interesante analizar de forma preliminar su posible actividad citotóxica. Estos experimentos fueron realizados por la Unidad de Evaluación de Actividades Farmacológicas de Compuestos Químicos (USEF) dirigida por las profesoras Mabel Loza y María Isabel Cadavid de esta universidad.

Los estudios de citotoxicidad se llevaron a cabo en la línea celular HeLa y la inhibición del crecimiento celular inducida por estos compuestos se evaluó usando un método colorimétrico basado en la tinción celular por cristal violeta y posterior acetilación. Este ensayo se realiza directamente sobre las células *in vivo* y es un método rápido de calcular viabilidad celular en cultivo cuando las células son sometidas a un tratamiento potencialmente tóxico.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguiente tabla:

Compuesto	Concentración (μM)	% Inhibición del crecimiento celular
13 (TRP-Flu)	4.5	1 \pm 1
B_{1B} (Flu-R ₈)	5.9	1 \pm 2
B_{1A} (Flu-R ₈ -TRP)	2.6	20 \pm 5

Tabla 4. Resultados del estudio de citotoxicidad.

De forma cualitativa, estos datos sugieren que existe un aumento de actividad citotóxica de los compuestos asociado a la mejor capacidad de acceso al núcleo celular. De hecho, es el conjugado octaarginina-tripirrol **B_{1A}** el que presenta un mayor efecto citotóxico a pesar de haber utilizado la mitad de concentración en los experimentos.

Estudios biológicos adicionales: leishmaniasis

Actualmente se está colaborando con el grupo del Dr. Luis Rivas López del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid) en el análisis de la actividad antimicrobiana y antiparasitaria de este tipo de compuestos; en concreto, se está evaluando el potencial leishmanicida, tema en el que el grupo de Rivas es experto.

La **leishmaniasis**, una de las enfermedades tropicales más desatendidas, según ha reconocido la OMS, es una infección protozoaria crónica causada por las diferentes especies del género *Leishmania* que abarca desde lesiones cutáneas más o menos benignas, hasta infecciones viscerales que resultan mortales en ausencia de tratamiento. El parásito es un protozoo digénico^{xii}, con una forma extracelular denominada *promastigote*, en la cual habita en el insecto vector, y una forma intracelular, llamada *amastigote*, responsable de la patología en vertebrados y que reside en el interior de la vacuola parasitófora de los macrófagos del hospedador. *Leishmania* se comporta frecuentemente como un patógeno oportunista, con especial relevancia en coinfecciones con el VIH [148]. Afecta a unos 12 millones de personas en el mundo, con una incidencia anual de dos millones de casos. Hasta el momento no existe una vacuna contra la enfermedad [149], y por consiguiente la quimioterapia continúa siendo la única opción en la lucha contra la enfermedad. Sin embargo, al margen de la toxicidad de algunos fármacos, del complicado seguimiento de los tratamientos y de su elevado precio, la eficacia de la quimioterapia se reduce cada vez más debido a los crecientes fenómenos de resistencia [150]. Por consiguiente, hay una **necesidad urgente de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas contra nuevas dianas aún sin explotar en *Leishmania***. En este sentido, muchos compuestos con potencial leishmanicida ven impedida su acción tóxica frente al parásito debido a la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, lo que en muchos casos determina un fenotipo resistente. Una **herramienta eficaz** para salvar este obstáculo es, nuevamente, **el uso de los péptidos penetrantes de células (CCP), capaces de acceder al espacio intracelular y una vez allí liberar las moléculas a las que se hubieran conjugado**.

Considerando todo esto pensamos en evaluar la actividad biológica de nuestros compuestos frente a este parásito dado que, al ser capaces de alcanzar el núcleo celular con gran rapidez y eficacia y al contener el fragmento tripirrólico, que reconoce secuencias ricas en A/Ts, pueden presentar un importante potencial en este campo.

Los ensayos preliminares realizados por el Dr. Luque Ortega del grupo de Dr. Rivas fueron muy prometedores. Los estudios fueron llevados a cabo mediante la incubación de los compuestos con células de promastigotes de *Leishmania donovani*, y como control de especificidad, la toxicidad se evaluó también en macrófagos de la línea tumoral RAW 264.7, y en tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma brucei brucei* (Tbb). La medida de la inhibición de la proliferación celular se realizó mediante la reducción celular de MTT o de resazurina. A mayor reducción, menor inhibición [151].

Resultados iniciales:

TOXICIDAD EN PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA DONOVANI: en la figura 85 puede verse los resultados comparados. El compuesto **13** resultó inactivo frente a *Leishmania*. Sin embargo, el híbrido con octaarginina (**B_{1A}**) muestra un potente efecto tóxico en el parásito con una LC₅₀ de (1.26 ± 0.14) μM, en contraposición a la leve toxicidad de la octaarginina por sí sola, **B_{1B}**.

^{xii} Organismo que necesita a más de un hospedador para completar su ciclo biológico.

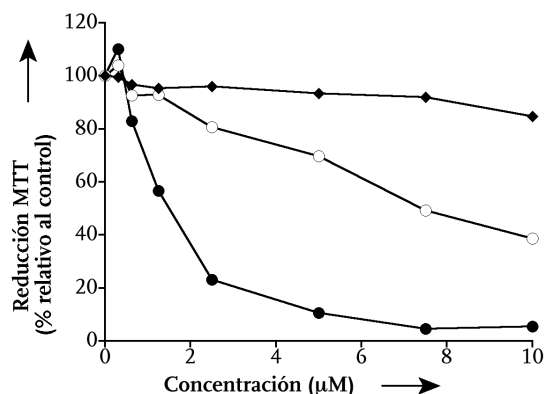


Figura 85. Representación de la toxicidad frente a promastigotes de *Leishmania donovani* de los compuestos: conjugado octaarginina–tripirrol **B_{1A}** (●), compuesto con la secuencia de octaarginina sola **B_{1B}** (○) y tripirrol marcado con fluoresceína **13** (◆).

TOXICIDAD FRENTE A MACRÓFAGOS: tras 24 horas de incubación, el compuesto tripirrólico **13** y la octaarginina por separado (**B_{1B}**) no mostraron actividad citotóxica en el rango de concentraciones ensayado (figura 86). Al igual que en el caso de la toxicidad frente a promastigotes, la conjugación del tripirrol a la octaarginina (**B_{1A}**) produjo un incremento de la toxicidad del compuesto. El compuesto conjugado mostró un buen índice terapéutico (LC_{50} macrófago/ LC_{50} *Leishmania*) ya que la toxicidad sobre macrófagos requirió de concentraciones 8 veces superiores a las letales en *Leishmania*, obteniéndose una LC_{50} en macrófagos de $(8.55 \pm 0.70) \mu\text{M}$.

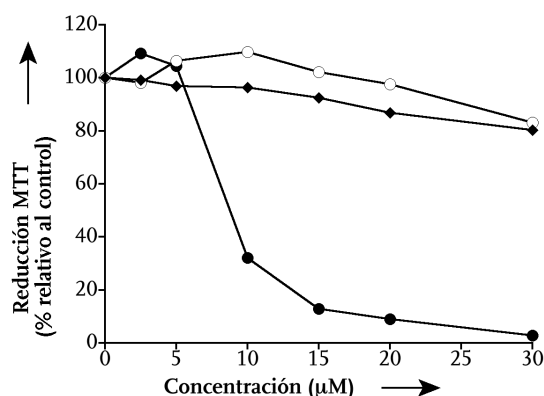


Figura 86. Toxicidad frente a macrófagos de los compuestos: conjugado octaarginina–tripirrol **B_{1A}** (●), compuesto con la secuencia de octaarginina sola **B_{1B}** (○) y tripirrol marcado con fluoresceína **13** (◆).

TOXICIDAD FRENTE A FORMAS SANGUÍNEAS DE TBB : evaluamos también la eficacia de nuestros compuestos frente a esta forma del Tbb. Al igual que en el caso de la toxicidad frente a promastigotes y macrófagos, la conjugación del compuesto tripirrólico a una octaarginina produjo un incremento de la toxicidad del compuesto sobre formas sanguíneas del parásito (figura 87). La octaarginina por sí sola resultó inocua, descartándose como responsable del efecto letal del conjugado **B_{1A}**.

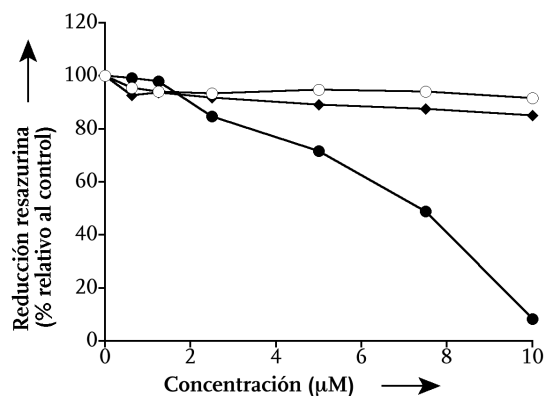


Figura 87. Toxicidad frente a Tbb de los compuestos: conjugado octaarginina-tripirrol **B_{1A}** (●), compuesto con la secuencia de octaarginina sola **B_{1B}** (○) y tripirrol marcado con fluoresceína **13** (◆).

CONCLUSIÓN: el compuesto tripirrólico únicamente presenta actividad cuando se conjuga a una octaarginina, probablemente debido a la mejora en sus propiedades de internalización celular. De hecho estudios preliminares de internalización celular en promastigotes de *Leishmania donovani* realizados sin fijar las células, demostraron que mientras que el compuesto **13** es incapaz de alcanzar el núcleo celular (figura 88A), el conjugado a octaarginina aparece localizado en los promastigotes de *Leishmania donovani* (figura 88B) después de 30 min de incubación.

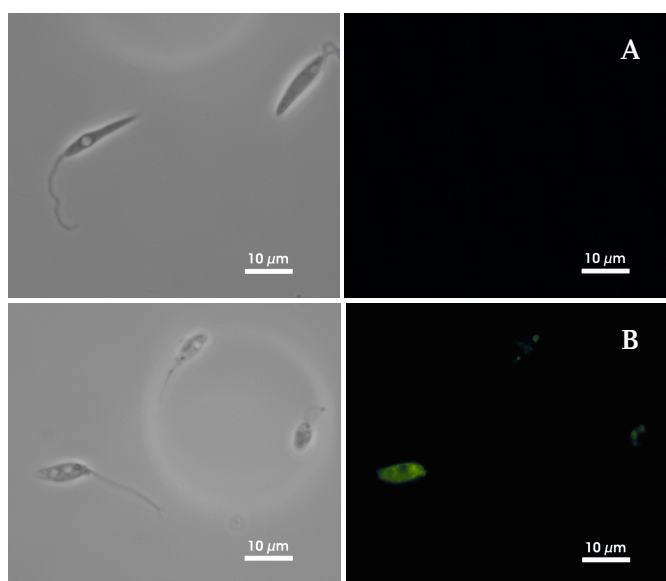


Figura 88. Distribución celular del compuesto **13** y **B_{1A}** en promastigotes de *Leishmania donovani*.

Bibliografía

- [130] a) Best, T. P.; Edelson, B. S.; Nickols, N. G.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12063–12068. b) Avecilla, S. *The UCI Undergraduate Research Journal* **2000**, *III*, 1–11.
- [131] Nickols, N. G.; Jacobs, C. S.; Farkas, M. E.; Dervan, P. B. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 363–370.
- [132] Hsu, C. F.; Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5851–5855.
- [133] a) Wender, P. A.; Rothbard, J. B.; Jones, L. R.; Pillow, T. H.; Goun, E. A. *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 1497–1515. b) Kirschberg, T. A.; VanDeusen, C. L.; Rothbard, J. B.; Yang, M.; Wender, P. A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3459–3462. c) Futaki, S. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2005**, *57*, 547–558.
- [134] a) Kahane, A. L.; Bruice, T. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6255–6261. b) Satz, A. L.; Bruice, T. C. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 86–95.
- [135] a) Rentzeperis, D.; Marky, L. A.; Dwyer, T. J.; Geierstanger, B. H.; Pelyon, J. G.; Wemmer, D. E. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 2937–2945. b) Bailly, C.; Chaires, J. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 513–538. c) Coll, M.; Frederik, C. A.; Wang, H-J.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 8385–8389. d) Uytterhoeven, K.; Sponer, J.; Meervelt, L. V.; *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2868–2877.
- [136] a) Baliga, R.; Crothers, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7814–7818. b) Baliga, R.; Baird, E. E.; Herman, D. M.; Melander, C.; Dervan, P. B.; Crothers, D. M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3–8.
- [137] Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. *Spectrochim. Acta A* **1995**, *51*, L7–L21
- [138] a) Escriou, V.; Carrière, M.; Scherman, D.; Wils, P. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2003**, *55*, 295–306. b) Costas, C.; Martínez-Costas, J.; Bodelón, G.; Benavente, J. *J. Virol.* **2005**, *79*, 2141–2150.
- [139] a) DiDonato, D.; Brasaemle, D. L. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 773–780. b) Hoetelmans, R. W.; Prins, F. A.; Corneleseten, V. I.; van der Meer, J.; van der Velde, C. J.; van Dierendonck, J. H. *Appl. Immunohistochem.* **2001**, *9*, 346–351.
- [140] Carretero, J. C.; Arrayás, R. G. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2993–3005.
- [141] Giannis, A.; Sandhoff, K.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 218–220.
- [142] a) Herma, G. T. *Bioconjugate Techniques*, ISBN 10: 0123423368, Academic Press, USA, **1996**; parte 2, capítulo 2. b) Ellman, G. L.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
- [143] a) Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*, 250–256. b) Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F. *Tetrahedron. Lett.* **1997**, *38*, 7275–7278.
- [144] Carrigan, C. N.; Imperiali, B. *Anal. Biochem.* **2005**, *341*, 290–298.
- [145] a) Luedtke, N. W.; Carmichael, P.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12374–12375. b) Rothbard, J. B.; Kreider, E.; VanDeusen, C. L.; Wright, L.; Wylie, B. L.; Wender, P. A. *J. Med Chem.* **2002**, *45*, 3612–3618.
- [146] Richard, J. P.; Vivès, M. E.; Verbeure, R. B.; Gait, M. J.; Lebleu, C. B.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590.

- [147] Liebler, E. K.; Diederichsen, U. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2893–3896.
- [148] Morales, M. A.; Cruz, I.; Rubio, J. M.; Chicharro, C.; Canavate, C.; Laguna, F.; Alvar, J. *J. Infect. Dis.* **2002**, *185*, 1533–1537.
- [149] Palatnik–de–Sousa, C. B. *Vaccine*, **2008**, *26*, 1709–1724
- [150] a) Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111–126. b) Mishra, J.; Saxena, A.; Singh, S. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1153–1169.
- [151] a) Luque–Ortega, J. R.; Saugar, J. M.; Chiva, C.; Andreu, D.; Rivas, L. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 221–230. b) Luque–Ortega, J. R.; van’t Hof, W.; Veerman, E. C.; Saugar, J. M.; Rivas, L. *FASEB J.* **2008**, *22*, 1817–1828.

Conjugados entre dominios de unión de dedos de cinc y tripirroles

Objetivo y diseño

El híbrido bivalente A_3 , constituido por la región básica de GCN4 y el compuesto tripirrólico, es capaz de interactuar con su secuencia consenso de ADN con alta afinidad ($K_D \sim 3$ nM a 4 °C) [82]. Animados por el éxito de este diseño, nos planteamos la extrapolación de la estrategia bivalente surco mayor/menor a otra familia de factores de transcripción, con el fin de comprobar su validez y su aplicabilidad general. Además, tal como se indicó en la introducción, la mayoría de los estudios para el desarrollo de nuevas versiones sintéticas de factores de transcripción se han restringido a la familia de los bZIP, por lo que sería muy interesante disponer de versiones en miniatura de otras familias menos estudiadas.

Una familia de factores de transcripción particularmente interesante son los **dedos de cinc**, ya que constituyen el grupo más abundante de proteínas eucariotas que interactúan con el ADN. Estas proteínas interactúan con secuencias específicas de ADN en forma multimérica, normalmente como trímeros covalentes (véase introducción, página 19). La interacción de estas proteínas con el ADN depende de la coordinación a iones metálicos, fundamentalmente iones Zn^{+2} . A pesar de que en las últimas décadas ha habido numerosos avances en la preparación de dedos de cinc recombinantes con selectividades definidas [152], todavía no se han desarrollado dedos de cinc monoméricos con buenas propiedades de reconocimiento.

La mayoría de los dedos de cinc interactúan en forma de oligómeros con el ADN, pero también existe algún ejemplo aislado de proteínas naturales que están formadas por una sola unidad de dedo de cinc. Tal es el caso de la proteína procariota GAGA que presenta un dominio de unión formado por 65 aminoácidos que se une específicamente a la secuencia consenso, que le da nombre, GAGAG. Su dominio Cys_2His_2 está flanqueado por tres regiones básicas que son cruciales para que se produzca la interacción con el ADN [153]. De hecho, el módulo Cys_2His_2 aislado del resto de la proteína, sin estas regiones básicas, no es capaz de realizar el reconocimiento.

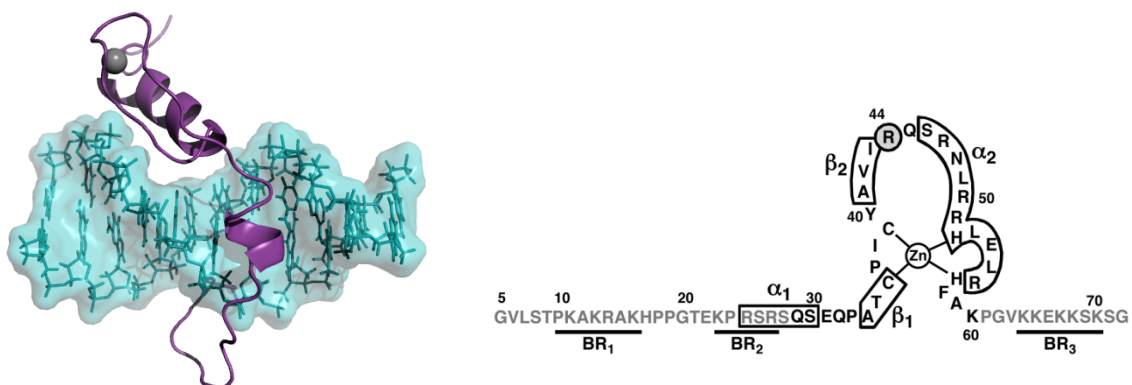


Figura 89. Izquierda: estructura del complejo entre el ADN y la proteína GAGA (PDB: 1YUI). Derecha: secuencia del dominio de unión de la misma proteína mostrando la localización de las regiones básicas.

Este parecía, pues, un buen sistema para comprobar si sería posible recuperar la capacidad de unión al ADN de dicho fragmento de dedo de cinc monomérico, al unirlo covalentemente a un derivado tripirrólico que se inserte en surco menor de una secuencia vecina. La posición elegida para realizar la conexión covalente con la molécula tripirrólica fue la 44, ocupada por un residuo de Arg. En la estructura cristalográfica del complejo GAGA-ADN [154] se observa que este aminoácido está expuesto a la cara del disolvente y orientado hacia el surco menor del ADN. Para simplificar la síntesis del conjugado se decidió mutar esa Arg por una Lys, lo cual facilita la conjugación al poder utilizar la Lys como nucleófilo.

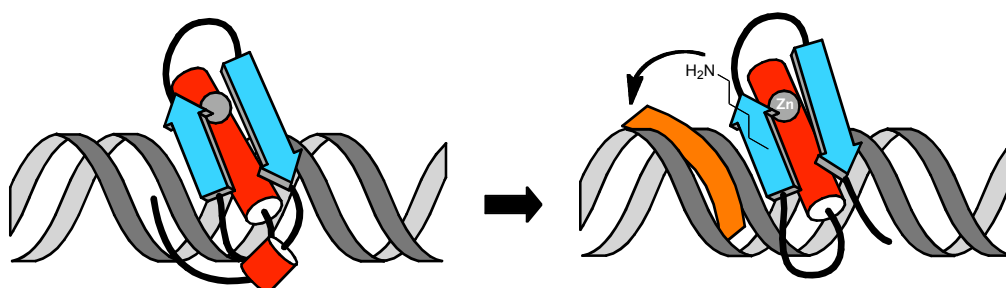
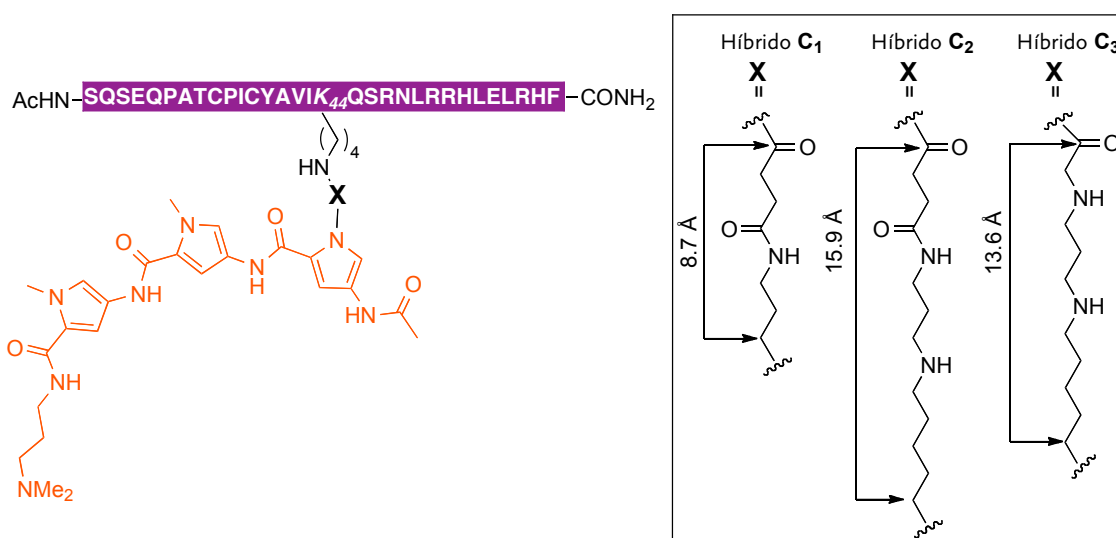


Figura 90. Representación esquemática del diseño.

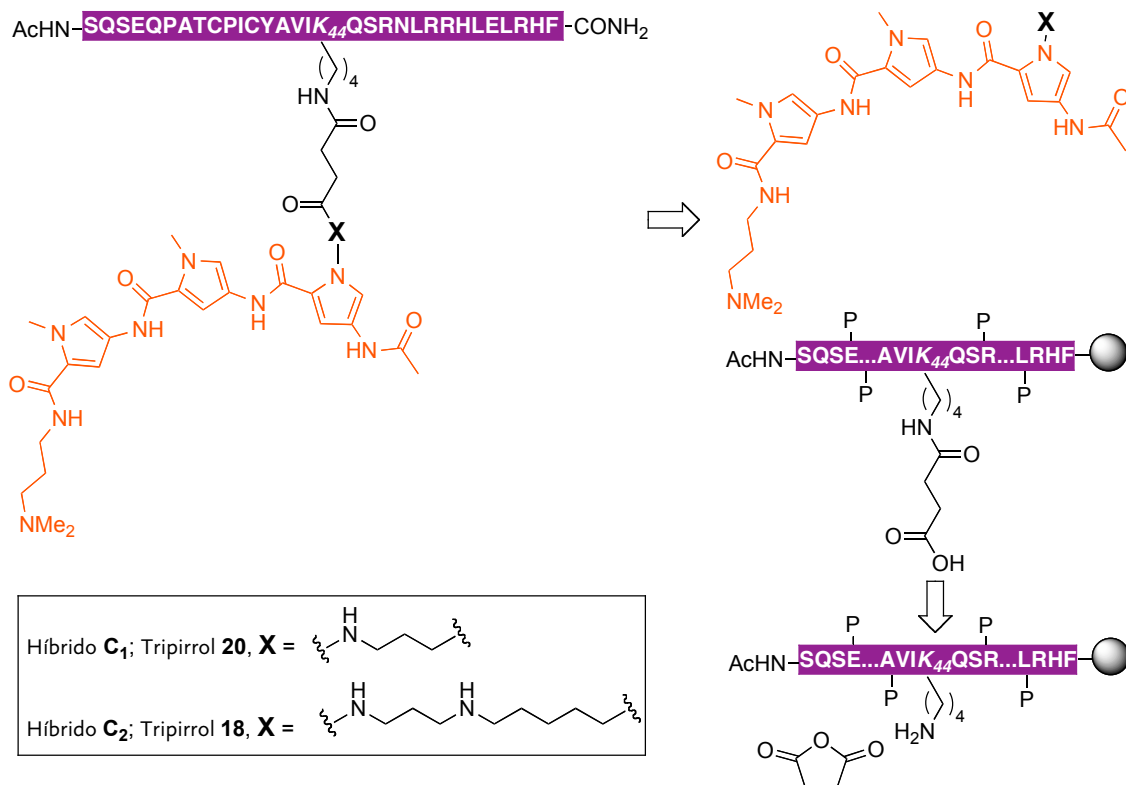
Siguiendo este diseño se planteó la síntesis y evaluación de tres híbridos que únicamente se diferencian en el conector entre el motivo Cys₂His₂ y el fragmento tripirrólico. La longitud y la naturaleza de los conectores son diferentes (esquema 23). Uno tiene un conector corto (~ 8.7 Å), otro un conector análogo pero más largo (~ 15.9 Å) conteniendo una amina, y un tercer híbrido posee un conector de longitud intermedia (~ 13.6 Å), y con dos aminas en la cadena de conexión entre las unidades de reconocimiento. Estas diferencias entre los compuestos deberían permitir sacar conclusiones sobre cómo afecta la longitud y la naturaleza del conector, en estos sistemas, al reconocimiento del ADN.



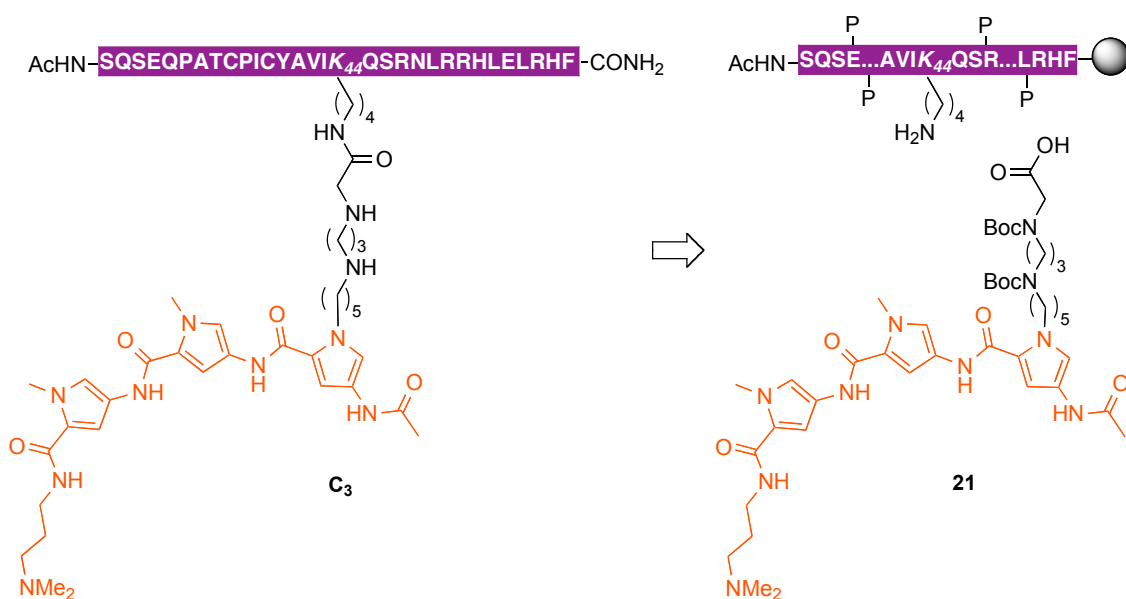
Esquema 23. Híbridos bivalentes entre el dominio de unión de GAGA y el agente de reconocimiento del surco menor de tipo tripirrol.

Síntesis

La síntesis de estos nuevos híbridos se planteó del mismo modo que en los otros casos, a través del acoplamiento del correspondiente tripirrol alquilado y el péptido unido a la resina y selectivamente desprotegido en la Lys (K_{44}). En los híbridos C_1 y C_2 se pensó en condensar el anhídrido succínico sobre ese residuo, antes de adicionar **20** o **18**.

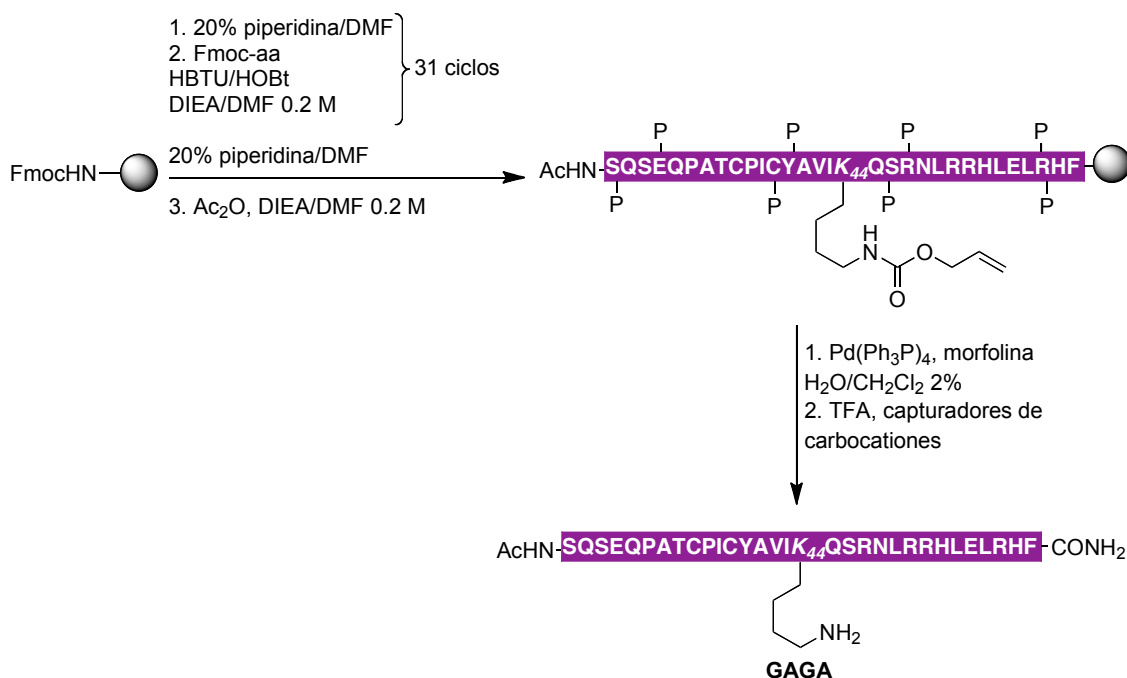


Esquema 24. Análisis retrosintético de los híbridos C_1 y C_2 .



Esquema 25. Análisis retrosintético del híbrido C_3 .

La síntesis del péptido común para los tres compuestos se llevó a cabo siguiendo la misma metodología estándar Fmoc de síntesis de péptidos en fase sólida. En el esquema 26 se muestra el procedimiento seguido para la síntesis y la desprotección selectiva del grupo Alloc de la Lys.



Esquema 26. Síntesis en fase sólida del dominio de unión Cys₂His₂ de la proteína **GAGA**.

La desprotección y rotura del péptido contenido en una pequeña porción de resina, nos permitió confirmar mediante EM/HPLC-FR la identidad del péptido que denominamos **GAGA**.

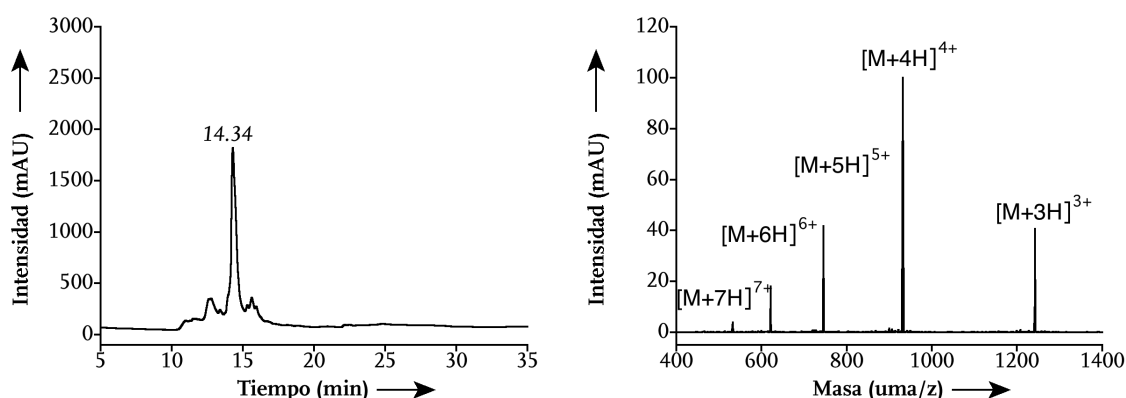
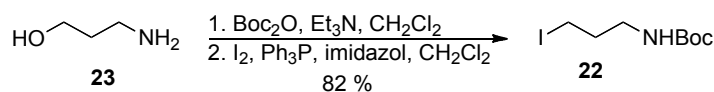


Figura 91. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **GAGA**, gradiente 1, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de masas del péptido. Calcd. para C₁₆₁H₂₆₂N₅₃O₄₅S₂: 3724.3. Encontrada: 1242.1 [M+3H]²⁺; 931.7 [M+4H]⁴⁺; 745.5 [M+5H]⁵⁺; 621.3 [M+6H]⁶⁺; 532.7 [M+7H]⁷⁺.

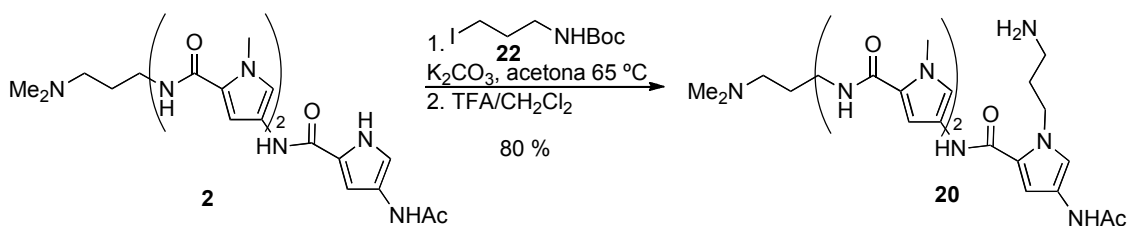
El tripirrol alquilado **18** se sintetizó tal como se ha descrito anteriormente (esquema 11 y esquema 12). El agente alquilante **22** se sintetizó a partir del compuesto comercial 3-

amino-1-propanol a través de la protección del grupo amino y consiguiente yodación, tal y como se muestra en el esquema siguiente [117].



Esquema 27. Síntesis del agente alquilante **22**.

Una vez sintetizado el agente alquilante **22**, el fragmento tripirrónico **2** se alquiló en las condiciones estándar.



Esquema 28. Alquilación del tripirrol **2**.

En la siguiente figura se muestra el cromatograma de HPLC final del compuesto tripirrónico alquilado **20** y su correspondiente espectro de absorción donde se observa las dos bandas características de estos compuestos a 240 y 304 nm.

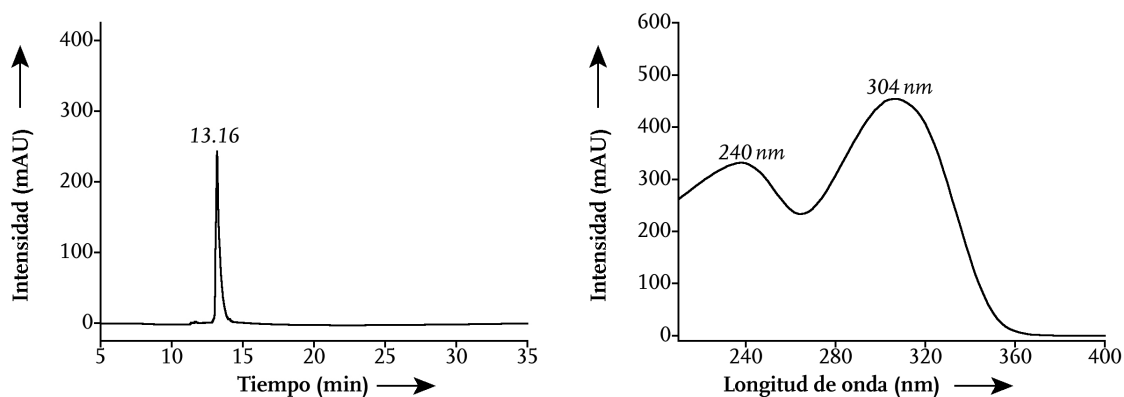
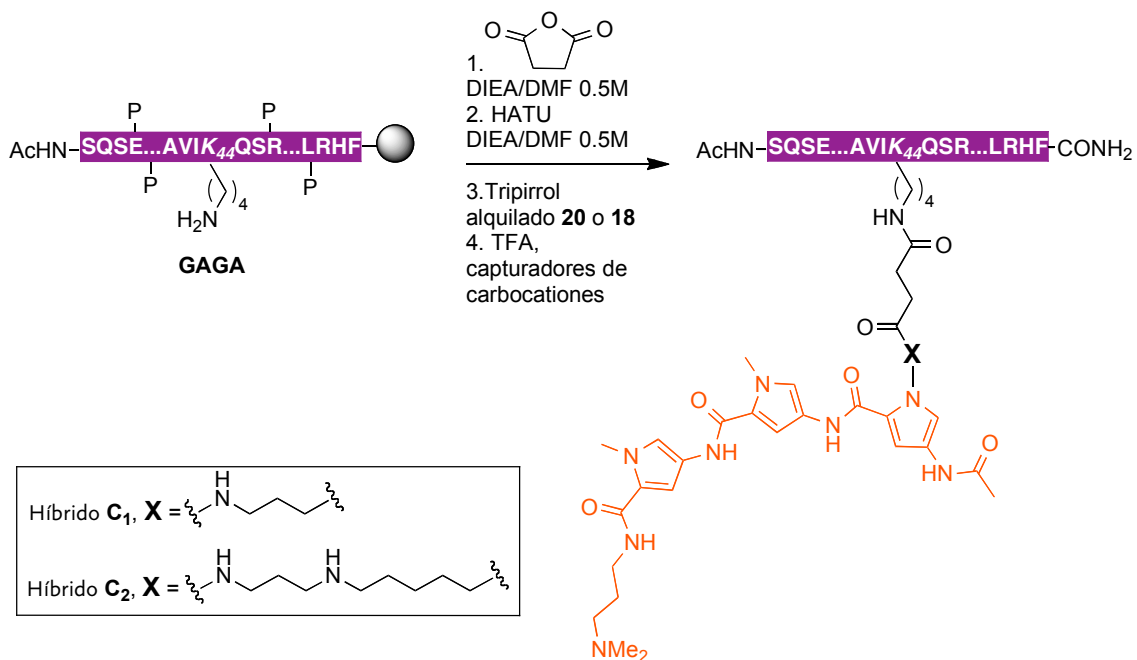


Figura 92. Izquierda: cromatograma de HPLC del tripirrol alquilado **20**, gradiente 1, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

La síntesis de los híbridos **C₁** y **C₂** se realizó mediante la adición del anhídrido succínico sobre el péptido unido a la resina, previamente desprotegido de forma selectiva en la *K₄₄*. Esta modificación en la cadena lateral del residuo de Lys permitió la posterior condensación con el compuesto tripirrónico correspondiente, **20** o **18** usando HATU como agente activante. La reacción se completó en 2 h.



Esquema 29. Síntesis en fase sólida de los híbridos **C₁** y **C₂**.

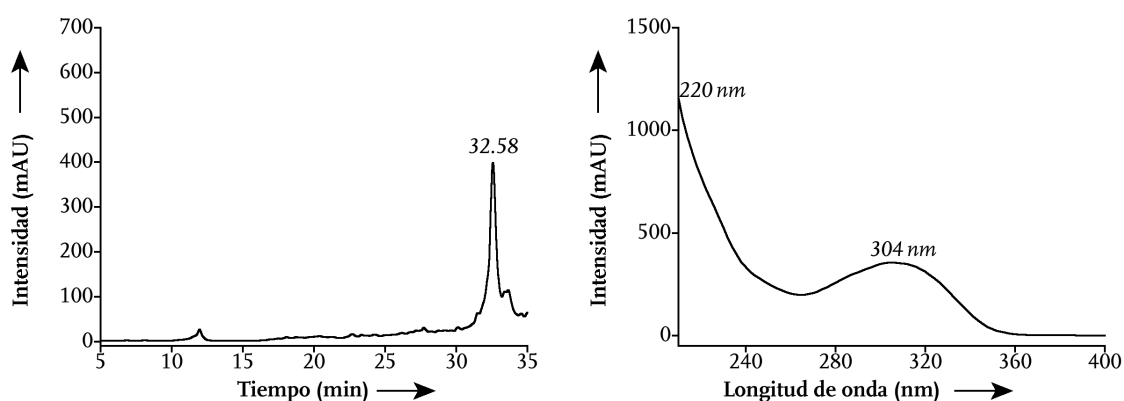


Figura 93. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción para obtener el híbrido **C₁**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción del pico mayoritario.

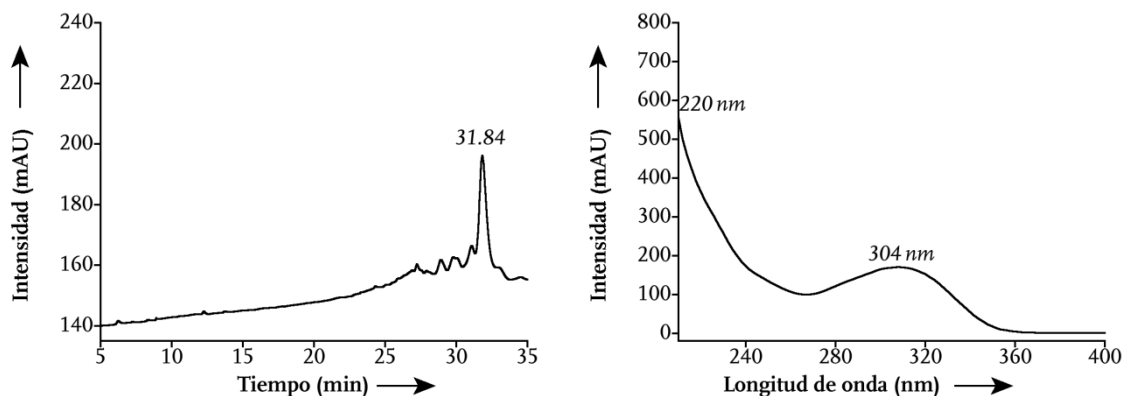
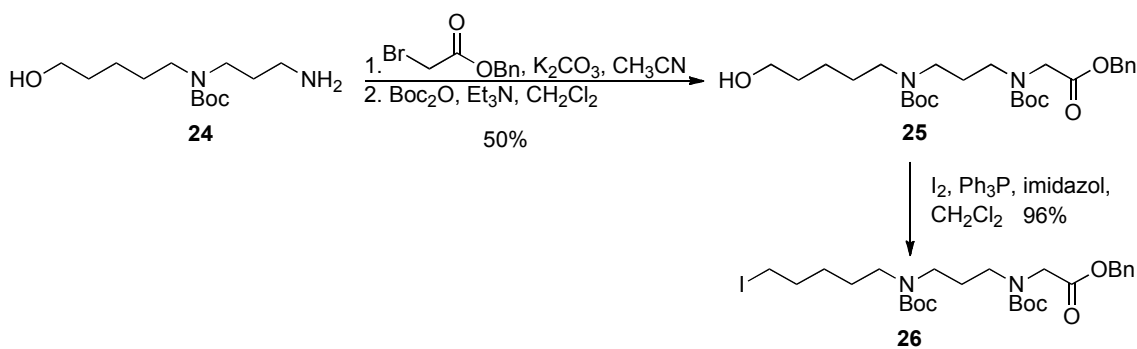


Figura 94. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción para obtener el híbrido **C₂**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción del pico mayoritario.

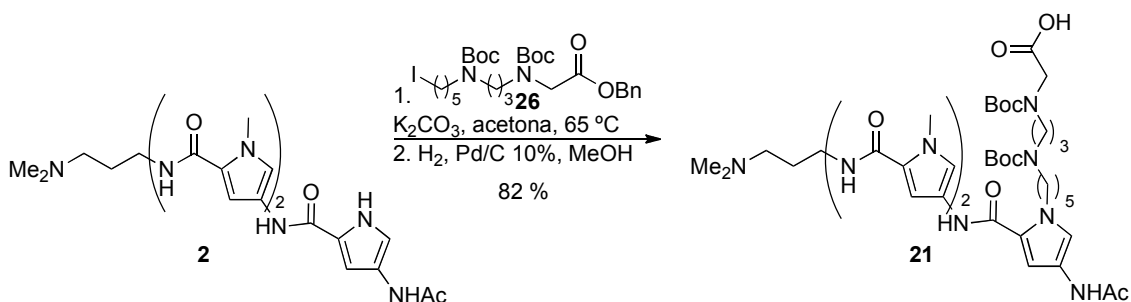
En las figuras 93 y 94 pueden verse los cromatogramas de HPLC de los crudos de la reacción de acoplamiento del aminotripirrol **20** para dar lugar al híbrido **C₁** (rendimiento global 20%) y del aminotripirrol **18** para obtener el híbrido **C₂** (rendimiento global 23%) respectivamente. En ambos casos los espectros de absorción muestran las bandas características de la parte peptídica y del compuesto tripirrólico. Las identidades de los conjugados se verificaron mediante espectroscopía de masas.

La obtención del el híbrido **C₃** requirió la síntesis de un nuevo agente alquilante. Éste se preparó a partir del compuesto comercial 5-amino-1-pentanol, llevando a cabo las mismas primeras etapas de reacción que en el esquema 11: adición de acrilometilo, protección de la amina secundaria y reducción del nitrilo para obtener el compuesto **24**. La posterior alquilación de la amina primaria con 2-bromoacetato de bencilo, protección con dicarbonato di-*tert*-butilo y halogenación dio lugar al yoduro deseado **26**. El compuesto final se caracterizó mediante RMN y espectroscopía de masas [155].



Esquema 30. Síntesis del agente alquilante **26**.

La unidad tripirrólica común **2** se alquiló con el yoduro **26** del modo habitual. Una vez alquilado, el compuesto resultante se desprotegió mediante hidrogenación catalítica, liberando el grupo ácido, reactivo necesario para realizar el acoplamiento en fase sólida con el péptido. La identidad del compuesto **21** se verificó mediante RMN y espectroscopía de masas.



Esquema 31. Alquilación con el yoduro **26**.

A continuación se muestra el cromatograma del compuesto tripirrólico alquilado **21** y su espectro de absorción con las bandas características de este tipo de compuestos.

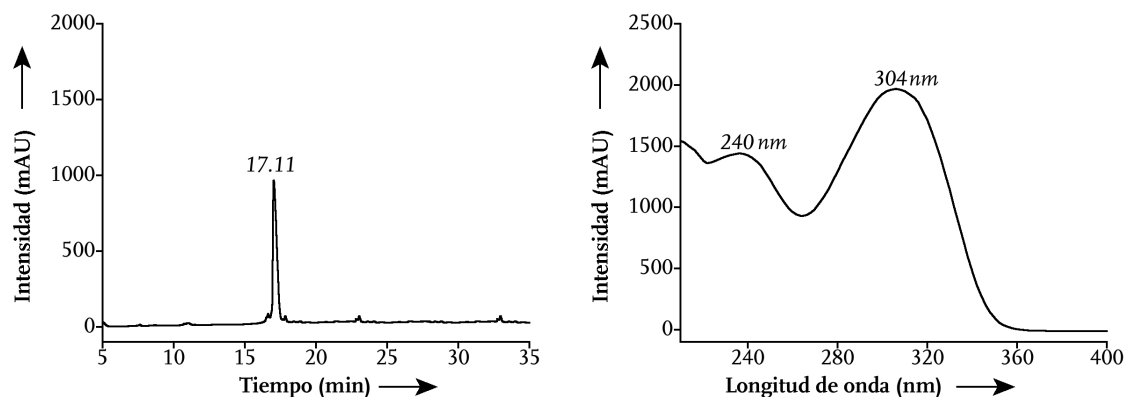
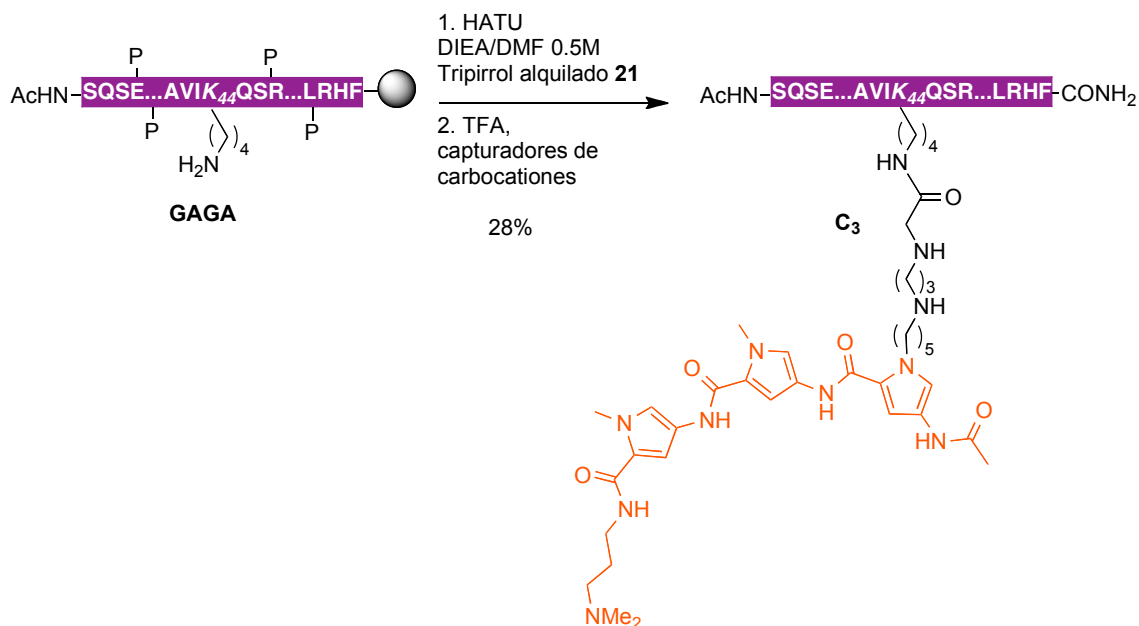


Figura 95. Izquierda: cromatograma de HPLC del tripirrol alquilado **21**, gradiente 1, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Tras la síntesis del compuesto **21**, se llevó a cabo su acoplamiento en fase sólida con la parte peptídica del dominio de unión Cys₂His₂ del factor de transcripción GAGA. Una vez activado el tripirrol **21** con HATU, éste se adicionó sobre el péptido **GAGA** unido a la resina. Después del tratamiento con TFA se obtuvo el híbrido **C₃** con un rendimiento global del 28%.



Esquema 32. Síntesis en fase sólida del híbrido **C₃**.

El análisis del crudo de reacción tras la rotura y desprotección de la resina mediante EM/HPLC–FR confirmó la presencia de un pico mayoritario atribuible al híbrido deseado (figura 96). Al igual que en el caso de los híbridos previos (**C₁** y **C₂**) el espectro de absorción de este compuesto muestran las bandas características de la parte peptídica (220 nm) y del compuesto tripirrólico (304 nm). La identidad de todos los conjugados se verificó mediante espectroscopía de masas.

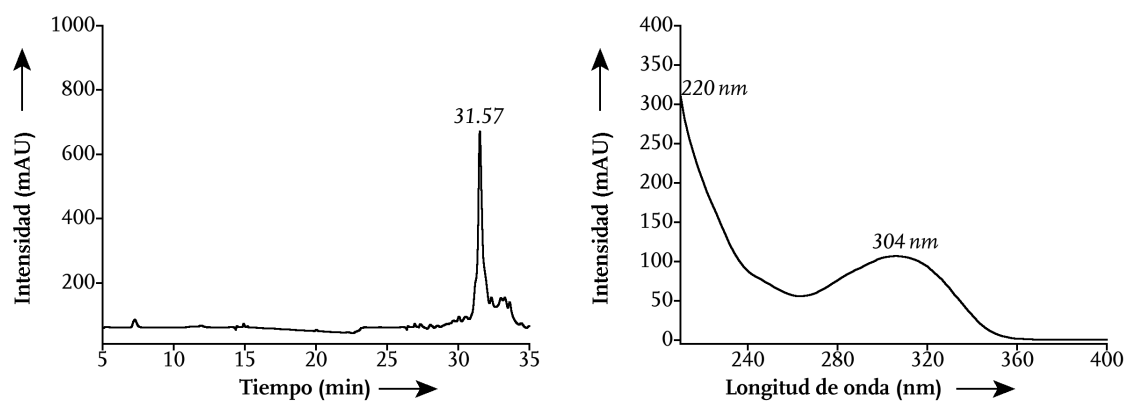
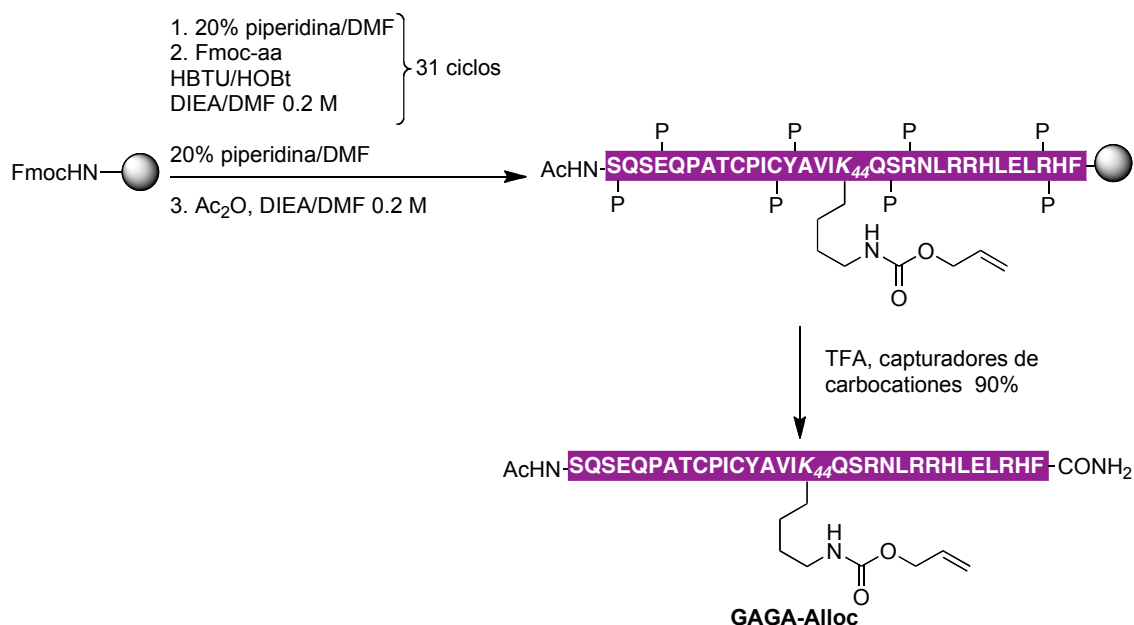


Figura 96. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción para obtener el híbrido C_3 , gradiente 3, $\lambda = 222 \text{ nm}$. Derecha: espectro de absorción del pico mayoritario.

Estudio del plegamiento y la geometría del dominio Cys₂His₂

Antes de estudiar los híbridos, se analizaron las propiedades espectroscópicas del dominio sintético Cys₂His₂ del factor de transcripción GAGA que posee la Lys de la posición 44 protegida con el grupo Alloc.



Esquema 33. Síntesis del péptido **GAGA-Alloc**.

En la figura 97 se muestra el cromatograma de HPLC del péptido **GAGA-Alloc** y su correspondiente espectro de absorción. Se puede ver que el péptido presenta la banda de absorción típica en torno a 220 nm, correspondiente a los enlaces amida, y otro máximo a 280 nm, característico del residuo de Tyr. El coeficiente de extinción de dicho aminoácido ($\epsilon_{280} = 1,490 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) se usó para determinar la concentración de péptido **GAGA-Alloc** en disolución [156].

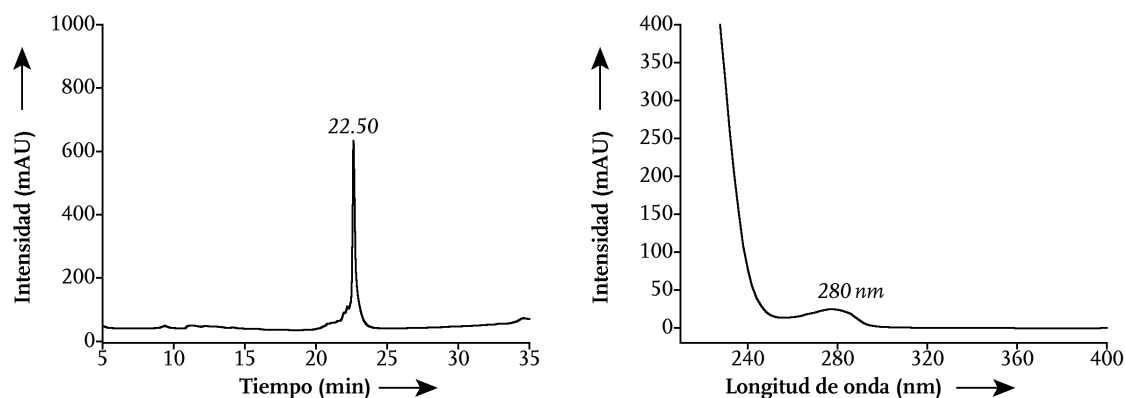


Figura 97. Izquierda: cromatograma de HPLC del péptido **GAGA-Alloc**, gradiente 2, $\lambda = 222 \text{ nm}$. Derecha: espectro de absorción.

Inicialmente, se estudió si el péptido **GAGA-Alloc** era capaz de plegarse en la conformación necesaria para el reconocimiento en presencia del catión Zn^{2+} . Para ello se monitorizó la formación de hélice α mediante estudios de dicroísmo circular. Los espectros de DC se registraron a 20 °C y una concentración de péptido de 5 μ M en una disolución de tampón:^{xiii} Tris•HCl 18 mM, pH 7, 50 mM KCl, 1.8 mM $MgCl_2$, 0.5 mM AEDT y 0.5 mM de DTT.

Los espectros de DC mostraron que la adición de 10 equivalentes^{xiv} de $ZnCl_2$ sobre el péptido provoca cambios espectrales en la región de 200–250 nm, lo que indica una diferente conformación del péptido en presencia o ausencia del metal (figura 98). Al adicionar el metal (\blacktriangledown) se observaron dos cambios significativos con respecto al espectro de dicroísmo circular del péptido **GAGA-Alloc** sin cinc (\circ). Por un lado, se produjo una disminución en valor absoluto de la elipticidad molar en torno a 200 nm y por otro, la presencia del cinc induce la aparición de los picos negativos a 208 y 222 nm característicos de la estructura de hélice α . Estos cambios son consistentes con los datos espectrales disponibles de la formación del motivo del dedo de cinc [157].

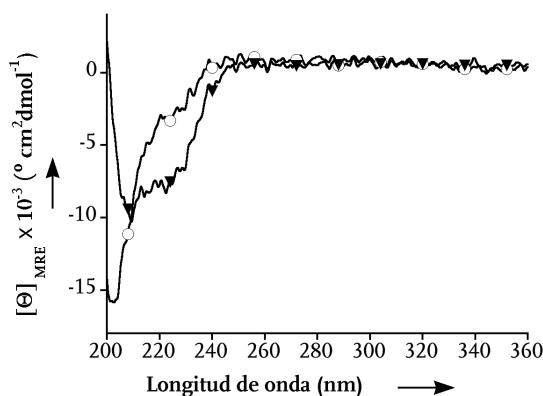


Figura 98. CD del péptido **GAGA-Alloc** en: \circ ausencia de $ZnCl_2$ y \blacktriangledown en presencia de 10 equiv de $ZnCl_2$.

Una vez confirmado el plegamiento del motivo Cys_2His_2 , el siguiente paso consistió en averiguar la geometría de coordinación del cinc en el complejo mediante estudios de espectroscopía de absorción del complejo entre el péptido **GAGA-Alloc** y el ión Co^{2+} [158]. Los distintos entornos geométricos de los complejos de cobalto muestran espectros de absorción característicos, lo que se ha aprovechado para estudiar el entorno de coordinación en metaloproteínas en general [159], y también, en el caso particular de los dedos de cinc [160].

Cuando sobre una disolución del péptido **GAGA-Alloc** de concentración 2 mM (línea negra) se adicionaron volúmenes crecientes de una disolución de $CoCl_2$ de concentración 300 μ M, se observó la aparición de nuevas bandas en el espectro (figura 99). La adición de un exceso molar de cobalto no condujo a cambios en el espectro (línea marrón). Estos experimentos permitieron confirmar la geometría tetraédrica del metal basándonos en la

^{xiii} Se observó que el péptido **GAGA-Alloc** es insoluble en el tampón fosfato 10 mM, 100 mM de NaCl, pH 7.5 usado anteriormente en los estudios de los híbridos bivalentes formados por la región básica de GCN4. La presencia del reductor DTT y el pH en torno a 7 en el nuevo tampón son fundamentales para evitar la oxidación de los tioles de las Cys.

^{xiv} Es necesario exceso de metal debido a elevada afinidad del DTT por el cinc ($\sim 10^{10}$).

teoría del campo ligando y analizando las bandas obtenidas. Las intensas bandas de absorción que aparecen en el ultravioleta cercano en torno a 310–340 nm son indicativas de la transferencia de carga del ligando tiolato al metal [$S^- \rightarrow Co(II)$]. [161] La absorción observada en la región del visible reveló una transición electrónica $d \rightarrow d$. Es conocido también, que en los complejos tetraédricos de cobalto dichas transiciones muestran bandas de absorción con un coeficiente de extinción $\epsilon > 300 M^{-1} cm^{-1}$ en la región de $650 \pm 50 nm$ (en nuestro caso: $\epsilon_{645} = 452 M^{-1} cm^{-1}$) con un hombro en torno a 575 nm [159a].

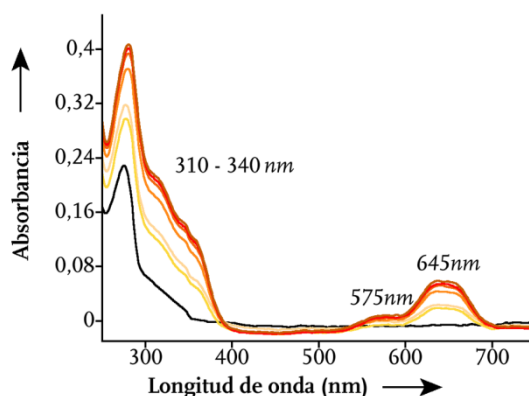


Figura 99. Espectro de absorción del péptido **GAGA-Alloc** en: ausencia de $CoCl_2$ (línea negra) y en presencia de cantidades crecientes de $CoCl_2$ (líneas de colores, color más oscuro a mayor concentración). La línea marrón se corresponde con la adición de un exceso molar de $CoCl_2$.

A diferencia de lo que le ocurre al Co^{2+} , el catión Zn^{2+} es inactivo espectroscópicamente debido a su configuración diamagnética d^{10} . Por lo tanto, a través de un experimento sencillo de competición se puede tener una idea aproximada de la afinidad relativa del péptido por esta especie. Sobre una disolución del péptido **GAGA-Alloc** saturada con exceso molar de $CoCl_2$ (línea marrón) se adicionó una cantidad estequiométrica de $ZnCl_2$ (línea negra discontinua). Este ensayo de competición puso de manifiesto que el cinc fácilmente desplaza al cobalto del complejo, reemplazando su entrono tetraédrico.

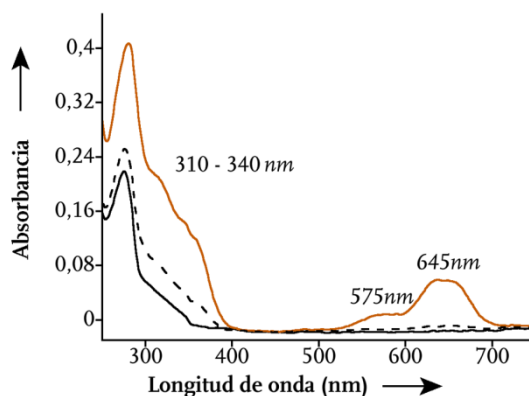


Figura 100. Espectro de absorción del péptido **GAGA-Alloc**: ausencia de metales (línea negra); en presencia de exceso molar $CoCl_2$ (línea marrón); en presencia de exceso molar de $CoCl_2$ y una cantidad estequiométrica de $ZnCl_2$ (línea negra discontinua).

Tal como se ve en la figura 100, la adición de una cantidad estequiométrica de cinc a la disolución saturada del péptido **GAGA-Alloc** con CoCl_2 elimina la absorción a 635 y 575 nm, a la vez que reduce la intensidad de las bandas en torno a 310–340 nm, comprobándose así la preferencia del péptido por el cinc y la formación del complejo tetraédrico esperado.

Estudio general de la interacción de los híbridos con el ADN

En primer lugar, los híbridos se evaluaron mediante dicroísmo circular para comprobar si, al igual que fragmento péptido **GAGA–Alloc**, son capaces de plegarse en la conformación estable, análoga a la natural, capaz de reconocer la secuencia consenso de ADN. Además, también se estudió el efecto en la conformación, de la adición de un oligonucleótido de doble cadena que contiene simultáneamente las secuencias de reconocimiento del factor de transcripción GAGA y del tripirrol en posiciones contiguas.

dsADN ^{xv}	Secuencia (5' a 3')
AT/GAGAG	GAGGATTTT <u>GAGAG</u> TACGCT

Tabla 5. Secuencia del ADN diana usado en este estudio.

Los espectros de DC de los híbridos y del ADN **AT/GAGAG** se registraron en primer lugar por separado, en la misma disolución tampón y concentración que en el caso del péptido **GAGA–Alloc**. Posteriormente, los híbridos **C₁**, **C₂** y **C₃** se incubaron, por separado, con una disolución de ZnCl₂, durante 5 min y se registró el espectro de DC. Sobre cada disolución se adicionó una cantidad estequiométrica del ADN **AT/GAGAG** y se registró el espectro de DC.

En los tres casos, los experimentos de DC pusieron de manifiesto que la adición de ZnCl₂ provoca cambios espectrales consistentes con un aumento de estructura secundaria en la región peptídica. Los resultados indican que la habilidad para formar el complejo **Cys₂His₂–Zn²⁺** se mantiene después de la conjugación del péptido con la molécula de tripirrol. Asimismo, la adición del ADN **AT/GAGAG** sobre este complejo no provoca cambios significativos en el espectro en la región del UV lejano, pero se observa que induce una banda de elipticidad positiva a 330 nm, sin duda, como consecuencia de la interacción del tripirrol con el surco menor del ADN.

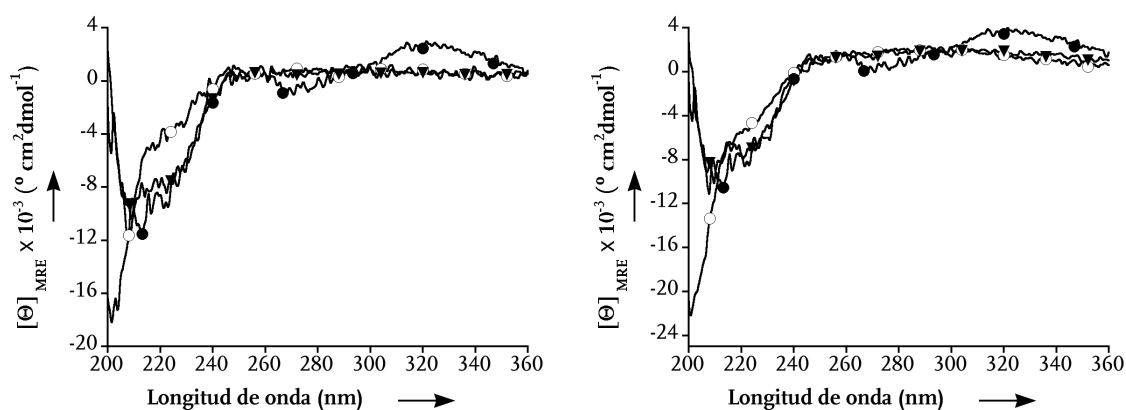


Figura 101. Izquierda: espectro de DC del híbrido **C₁**. Derecha: espectro de DC del híbrido **C₂**. En ambos casos: ○ híbrido en ausencia de ADN y de metal; ▼ híbrido en presencia de 10 equiv de ZnCl₂; ● híbrido en presencia de **AT/GAGAG**.

^{xv} La nomenclatura del dsADN se refiere a: **AT**: es la secuencia de reconocimiento del compuesto tripirrólico; **GAGAG** es la secuencia de reconocimiento del dominio de unión Cys₂His₂ del factor de transcripción GAGA. Sólo se representa una hebra.

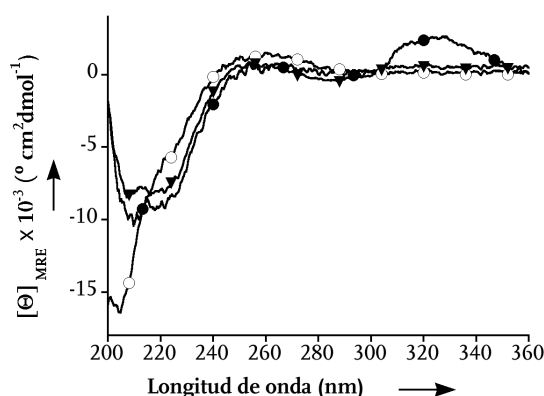


Figura 102. Espectro de DC del híbrido **C₃**: ○ en ausencia de ADN y de metal; ▼ en presencia de 10 equiv de ZnCl₂; ● en presencia de AT/GAGAG.

Los resultados obtenidos mostraron que el comportamiento espectral de los tres híbridos es similar. Estos datos son consistentes con que la parte peptídica de los híbridos está adecuadamente plegada en su conformación natural, imprescindible para la interacción en el surco mayor; además, considerando la elipticidad en torno a 330 nm, es muy probable que la unidad de tripirrol esté insertada en el surco menor del ADN AT/GAGAG.

La capacidad de interacción de los híbridos sintéticos con el ADN se evaluó también mediante electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida (PAGE) a 20 °C. Estos ensayos se realizaron preparando diferentes disoluciones de concentraciones crecientes del híbrido correspondiente, en presencia de 10 equivalentes de ZnCl₂ y con una concentración constante de ADN AT/GAGAG (~ 45 pM), previamente marcado con ³²P en el tampón de incubación optimizado para esta nueva familia de factores de transcripción. Esta incubación provoca, en los tres casos, la aparición en los geles de una nueva banda, cuya migración es más lenta que la banda asignada al ADN solo. Por tanto, esa nueva banda es atribuible a la formación de complejos entre el híbrido correspondiente y el ADN AT/GAGAG.

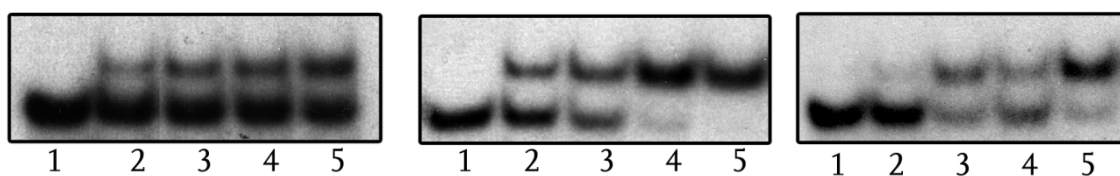


Figura 103. Estudios a través de PAGE en presencia del ADN AT/GAGAG y 10 equiv de ZnCl₂. Izquierda: híbrido **C₁**. Calles 1–5, [híbrido **C₁**]: 0, 20, 400, 600, 1000 nM. Centro: híbrido **C₂**. Calles 1–5, [híbrido **C₂**]: 0, 2, 5, 10, 15 nM. Derecha: híbrido **C₃**. Calles 1–5, [híbrido **C₃**]: 0, 3, 5, 7, 9 nM.

El híbrido **C₁** interactúa con el ADN AT/GAGAG con una afinidad modesta, mientras que los otros dos híbridos presentan una afinidad por el ADN muy buena, ya que la formación del complejo está casi completada a una concentración de 10 nM. Esta diferencia de afinidad debe ser consecuencia del conector entre las dos unidades de reconocimiento. En concreto, la diferencia tiene que estar relacionada con la presencia del grupo amino en la cadena de conexión y con la mayor longitud y flexibilidad de la cadena de conexión. Otro hecho interesante, es que a pesar de que el híbrido **C₃** presenta dos grupos amino en el conector e interactúa muy bien con el ADN, su afinidad es ligeramente peor que en el

caso del híbrido C_2 , donde sólo existe un grupo amino, pero la longitud de la cadena es mayor.

Además, tal y como se esperaba, el fragmento peptídico truncado (**GAGA-Alloc**), sin la molécula de reconocimiento del surco menor, fue incapaz de formar complejos estables y detectables en el gel incluso a la elevada concentración de 5 μ M.

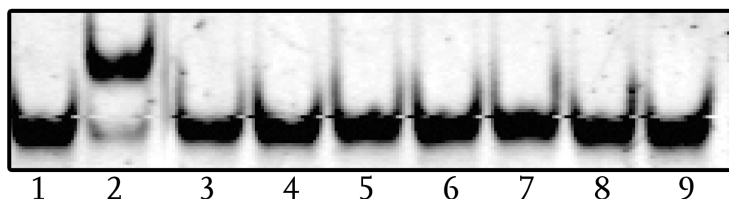


Figura 104. Estudios a través de PAGE del péptido **GAGA-Alloc** en presencia del ADN **AT/GAGAG** con 10 equiv de $ZnCl_2$. Calles 1, 3-9, [péptido **GAGA-Alloc**]: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 5 μ M. Calle 2: control con el híbrido C_2 y el mismo ADN; [híbrido C_2]: 7 nM.

En base a todas estas observaciones y considerando la mayor versatilidad sintética del híbrido C_2 se decidió centrar los esfuerzos en la caracterización detallada del reconocimiento por parte de este híbrido C_2 .

El papel del cinc en el reconocimiento

Desde el descubrimiento de la familia de los dedos de cinc mediante el estudio de la proteína TFIIIA se puso de manifiesto, a través de espectroscopía de absorción atómica, la presencia de una importante concentración de cinc en estas proteínas aisladas [162]. En los años posteriores los estudios de competición con cobalto y la espectroscopía de DC demostraron que la presencia de este metal era crítica para que el dominio de unión Cys₂His₂ pudiese adquirir el plegamiento adecuado para el reconocimiento [157], [163]. Considerando estos precedentes, decidimos confirmar que la unión del híbrido C₂ al ADN **AT/GAGAG** dependía de la presencia del cinc.

El estudio de la influencia del Zn²⁺ en la interacción se realizó a través de electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida (PAGE) a 20 °C. Dado que en este tipo de análisis la afinidad no es el objeto del estudio, se decidió realizar los experimentos a través de una técnica más rápida y cómoda que el marcaje radiactivo, pero que a su vez implica el uso de concentraciones más elevadas de ADN (~ 50 nM). De este modo, se utilizó el revelado fluorimétrico del agente SYBR[®] Gold cuyo modo de actuación es similar al agente intercalante bromuro de etidio, pero su sensibilidad es 100 veces mayor [164].

Un hecho sorprendente observado en este experimento fue la complejación del híbrido C₂ con el ADN **AT/GAGAG**, incluso cuando no se añadía ZnCl₂ al medio.

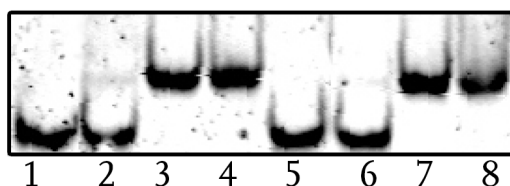


Figura 105. Estudios de PAGE del híbrido C₂ con el ADN **AT/GAGAG**. Izquierda: con 10 equiv de ZnCl₂; calles 1–4, [híbrido C₂]: 0, 50, 300, 500 nM. Derecha en ausencia de cinc; calles 5–8, [híbrido C₂]: 0, 50, 300, 500 nM. El gel se analizó mediante la emisión de SYBR[®] Gold.

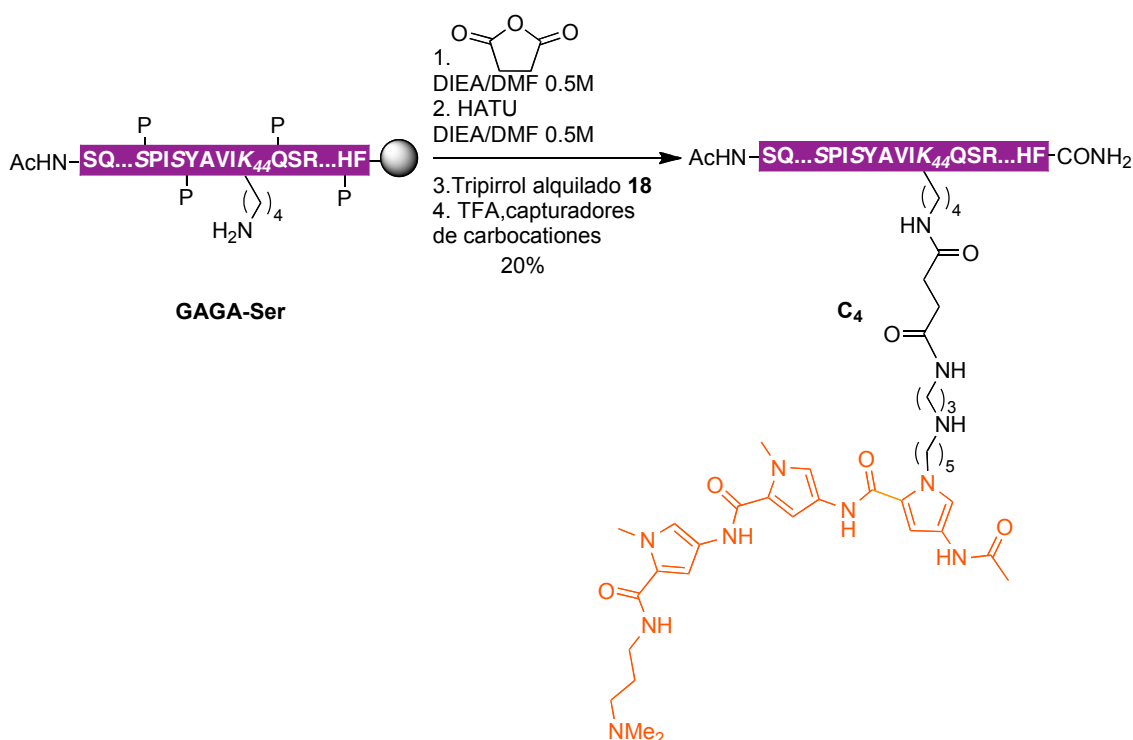
A la vista de este resultado se pensó que quizás hubiese, en las disoluciones utilizadas, trazas de metal con una concentración suficiente para inducir el plegamiento del híbrido y el consecuente reconocimiento del ADN **AT/GAGAG**. Para verificar esto, se decidió repetir los experimentos de electroforesis sustituyendo todos los reactivos por otros con un grado de pureza máximo [165]. El uso de estos reactivos ultrapuros (NaOH, ácido bórico, Trizma[®]base, AEDT, KCl y MgCl₂) confirmó la dependencia del cinc en el reconocimiento específico de ADN. En presencia del metal la mitad de la fracción unida se alcanzó en torno a concentraciones de 100 nM y en su ausencia, con reactivos ultrapuros, no se detectó ninguna banda en el gel a más del triple de concentración.



Figura 106. Estudio de PAGE del híbrido C₂ y del ADN **AT/GAGAG** usando reactivos ultrapuros. Izquierda: con 10 equiv de ZnCl₂. Derecha: en ausencia de metal. En ambos: calles 1–6, [híbrido C₂]: 0, 50, 100, 150, 250, 350 nM. Los gels se analizaron mediante la emisión de SYBR[®] Gold.

Con el fin de confirmar de forma adicional la necesidad de coordinación del metal, se programaron experimentos control con híbridos en los que los residuos coordinantes de Cys se bloquearon mediante la sustitución por residuos de serina (híbrido **C₄**), o por alquilación con bromoacetato de etilo (**C₅**).

En el esquema 34 se muestra la reacción final de acoplamiento entre la región peptídica mutada con serinas y el aminotripirrol **18**. La síntesis de este híbrido **C₄** se realizó de forma análoga a la del híbrido **C₂** (esquemas 26 y 29). La figura 107 muestra el cromatograma de esta reacción, tras la rotura del híbrido de la resina y su espectro de absorción. La identidad del híbrido **C₄** se confirmó por espectroscopía de masas.



Esquema 34. Síntesis del híbrido **C₄** donde las Cys de la región peptídica fueron mutadas por Ser.

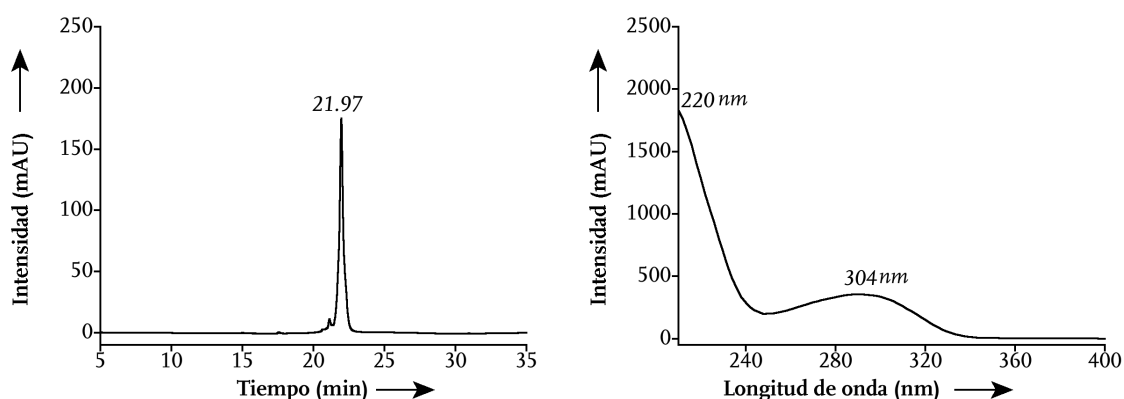
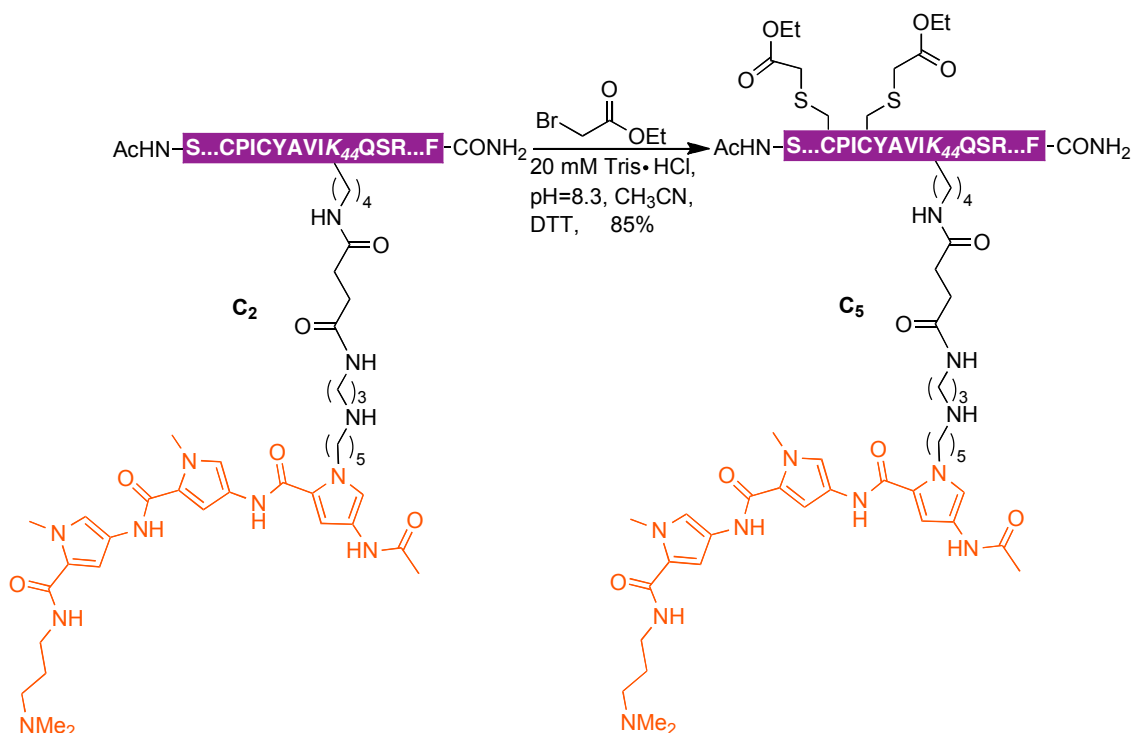


Figura 107. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción para obtener el híbrido **C₄**, gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

La síntesis del híbrido C_5 se realizó mediante alquilación directa del híbrido C_2 en disolución acuosa y siguiendo las condiciones expuestas en el esquema 35.



Esquema 35. Alquilación de las Cys del híbrido C_2 .

La reacción se siguió mediante EM/HPLC–FR observándose la conversión completa del híbrido C_2 en el conjugado alquilado C_5 después de cuatro horas de reacción. En la figura 108 puede verse la evolución de la reacción a tiempo cero y después de cuatro horas. La identidad del nuevo conjugado se verificó por espectrometría de masas.

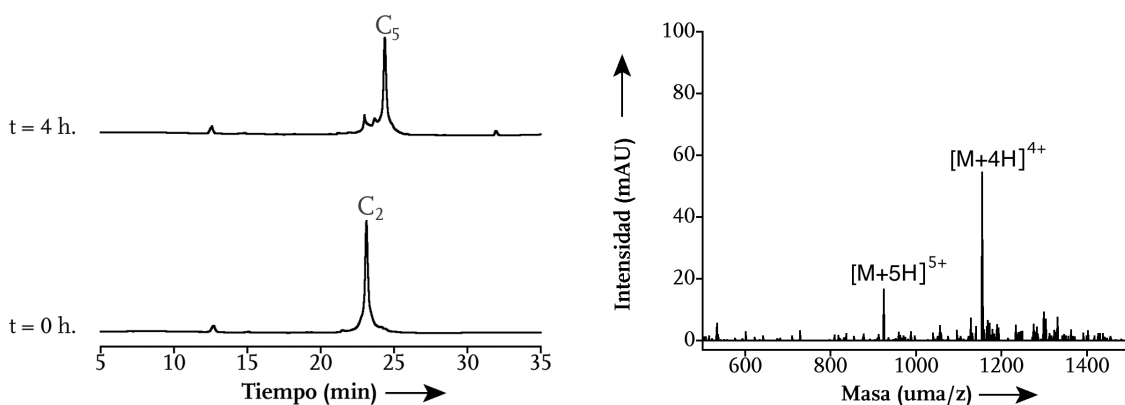


Figura 108. Izquierda: cromatograma de HPLC de la reacción para obtener el híbrido C_5 a diferentes tiempos, gradiente 2, $\lambda = 304$ nm. Derecha: espectro de masas del péptido: calcd para $C_{205}H_{326}N_{63}O_{55}S_2$: 4617.3. Encontrada: 1154.9 $[M+4H]^{4+}$; 924.0 $[M+5H]^{5+}$.

Los experimentos de PAGE a 20 °C con los híbridos C_4 y C_5 confirman que al bloquear las posiciones coordinantes del cinc se pierde la capacidad de formar complejos con el ADN

diana, ya que no se detectó ninguna banda superior en el gel. Estos resultados corroboran la necesidad del metal a la hora de formar complejos estables con el ADN.



Figura 109. Estudio a través de PAGE en presencia del ADN AT/GAGAG. Izquierda: híbrido C_4 . Calles 1,3–5, [híbrido C_4]: 0, 100, 300, 500 nM. Derecha: híbrido C_5 . Calles 1,3–5, [híbrido C_5]: 0, 200, 500, 1000 nM.; En ambos geles calle 2: control con el híbrido C_2 , 10 equiv de $ZnCl_2$ y ADN AT/GAGAG; [híbrido C_2]: 400 nM. Los geles se analizaron mediante la emisión de SYBR® Gold.

También se evaluó el efecto de otros metales en la interacción; para ello se realizaron estudios de PAGE a 20 °C incubando el híbrido C_2 con el ADN diana AT/GAGAG, en presencia de otros metales diferentes al cinc. Tal como podría esperarse, sólo con los cationes Zn^{2+} y Co^{2+} (homólogos desde el punto de vista de sus características de coordinación) se forman complejos detectables en el gel. La ausencia de bandas de complejación en los otros casos es consistente con una peor coordinación, o bien con una geometría diferente que imposibilita el plegamiento del péptido en su forma activa [166].

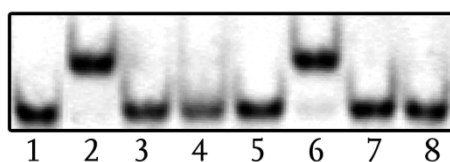


Figura 110. Estudio de la influencia de los distintos metales en la unión del híbrido C_2 con el ADN AT/GAGAG través de EMSA Calles 2–8, metales respectivamente: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} . Calle 1 [híbrido C_2]: 0 nM; calles 2–8 [híbrido C_2]: 500 nM. El gel se analizó por emisión de SYBR® Gold.

Mediante dicromismo circular se observó que, tal como cabría esperar, el complejo con cobalto presenta cambios conformacionales similares a los observados en el caso del complejo con cinc.

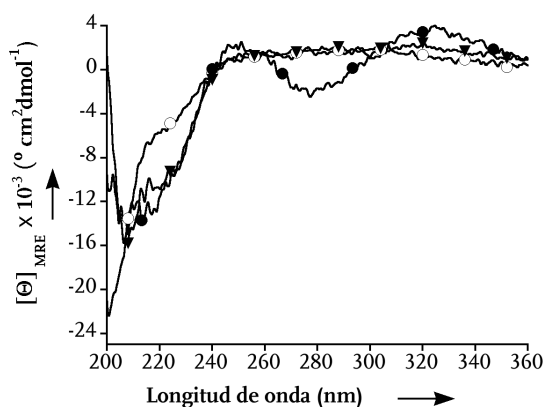


Figura 111. Espectro de DC del híbrido C_2 : ○ en ausencia de ADN y de metal; ▼ en presencia de 10 equiv de $CoCl_2$; ● en presencia de AT/GAGAG.

Estudio de la afinidad y la selectividad en la interacción del híbrido C₂ con el ADN

Para analizar la selectividad de la interacción con el ADN se realizaron experimentos de electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida (PAGE) con diferentes secuencias de ADN que contenían mutaciones específicas en las zonas de reconocimiento del surco mayor y/o menor.

Los estudios de PAGE se realizaron a 20 °C y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos de doble cadena:

dsADN ^{xvi}	Secuencia (5' a 3')
AT/GAGAG	GAGGATTTT <u>GAGAG</u> TACGCT
ATm/GAGAG	GAGGCTTCC <u>GAGAG</u> TACGCT
AT/GAGct	GAGGATTTT <u>GAGct</u> TACGCT
AT/cAGAG	GAGGATTTT <u>cAGAG</u> TACGCT
AT/cAGct	GAGGATTTT <u>cAGct</u> TACGCT
AT/cAtAG	GAGGATTTT <u>cAtAG</u> TACGCT
AT/cAGAt	GAGGATTTT <u>cAGAt</u> TACGCT
AT/GAagG	GAGGATTTT <u>GAagG</u> TACGCT

Tabla 6. Secuencias de los ADN usados en este estudio.

Tal y como se esperaba, si se elimina la secuencia de adeninas necesaria para la unión de la molécula tripirrólica, se inhibe completamente la interacción con el ADN. Este resultado resalta la importancia de las interacciones complementarias establecidas por el agente de reconocimiento del surco menor en la formación de complejos estables con el ADN y secunda el modelo de unión bivalente, propuesto para estos híbridos.



Figura 112. Estudio a través de PAGE del híbrido C₂ con 10 equiv de ZnCl₂. En ambos casos calles 1–5, [híbrido C₂]: 0, 100, 200, 400, 1000 nM. Izquierda: en presencia del ADN **AT/GAGAG**. Derecha: en presencia del ADN **ATm/GAGAG**. Los geles se analizaron mediante la emisión de SYBR® Gold.

Con respecto a la selectividad del reconocimiento de la parte peptídica del híbrido, las mutaciones cuidadosamente diseñadas en su zona de reconocimiento desvelaron información muy interesante.

^{xvi} En esta nomenclatura de los ADN únicamente se representa la secuencia de una de las hebras; las bases mutadas en la región de reconocimiento del factor de transcripción GAGA con respecto a la secuencia diana **AT/GAGAG** están representados en minúsculas. **ATm/GAGAG** hace referencia a la mutación en la región de reconocimiento del fragmento tripirrólico.

Como se muestra en la figura 113 (A y B), la incubación del híbrido C_2 con los ADNs **AT/GAGct** y **AT/cAGAG** condujo a la formación de bandas bien definidas en el gel, comparables a las observadas con el ADN diana (**AT/GAGAG**). Sin embargo, las subsiguientes mutaciones que eliminan una de las guaninas restantes provocan una disminución crítica en la afinidad (ADNs: **AT/cAGct**, **AT/cAtAG** y **AT/cAGAt**).

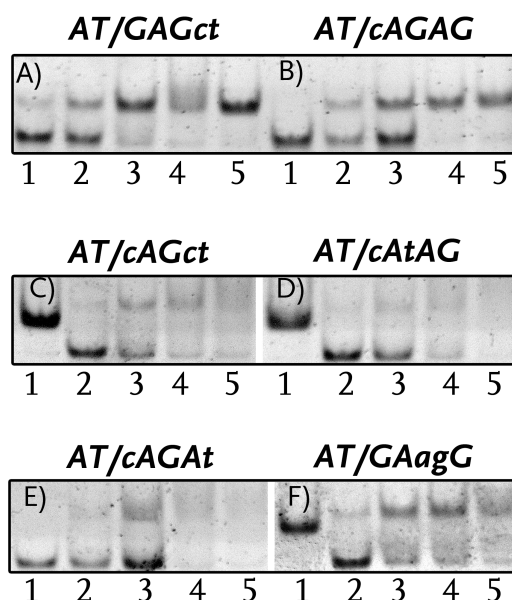


Figura 113. Estudios de PAGE del híbrido C_2 con los correspondientes ADNs y con 10 equiv de $ZnCl_2$. Calles 2–5 [híbrido C_2]: 100, 200, 400, 1000 nM (A–F). Calle 1 en los experimentos: C, D y F control con [híbrido C_2]: 400 nM y ADN **AT/GAGAG**. Calle 1 en los experimentos: A, B, E [híbrido D_2]: 0 nM. Los geles se analizaron mediante la emisión de SYBR® Gold.^{xvii}

En el caso del ADN **AT/GAagG** (figura 113 F), se detectó una nueva banda, de menor intensidad, que se desplaza más lentamente que la observada con los ADNs: **AT/GAGAG**, **AT/GAGct** y **AT/cAGAG**. Dicha banda es consistente con un modo de reconocimiento no específico en el cual el fragmento Cys_2His_2 del híbrido no esté interaccionado con las bases del surco mayor. Para comprobar las diferencias de afinidad y desplazamiento de los dos complejos se llevó a cabo una electroforesis conjunta con los dos ADNs: **AT/GAagG** y **AT/GAGAG** que confirmó la mayor afinidad por este último.

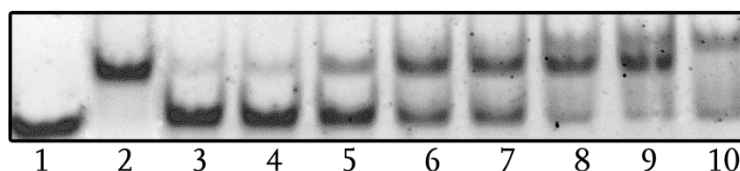


Figura 114. Experimento de competición con los ADNs **AT/GAGAG** y **AT/GAagG** en presencia del híbrido C_2 y con 10 equiv de $ZnCl_2$. Calle 1 [híbrido C_2]: 0 nM; Calle 2 control con el ADN **AT/GAGAG** exclusivamente y [híbrido C_2]: 400 nM. Calles 3–9 ambos ADNs con [híbrido C_2]: 50, 100, 200, 300, 400, 600, 1000 nM. Calle 10 control con el ADN **AT/GAagG** exclusivamente y [híbrido C_2]: 400 nM. El gel se analizó por emisión de SYBR® Gold.

^{xvii} La desaparición de las bandas a elevadas concentraciones es probablemente debida a la precipitación del ADN por la formación de múltiples especies [147].

Los resultados anteriores muestran que el sistema acepta mutaciones en la región de reconocimiento del péptido, pero, solamente, hasta cierto punto. Los datos disponibles de la estructura del complejo del factor de transcripción natural GAGA y el ADN indican que la unidad Cys₂His₂ interacciona de forma específica con la triada GAG mientras que las dos regiones básicas BR₁ y BR₂ se unen a las otras bases A y G de la secuencia GAGAG [167]. Esto sugiere que lo importante, para lograr la interacción de elevada afinidad del híbrido C₂ con el ADN, es preservar la presencia de la triada GAG a una distancia adecuada de la región de reconocimiento de la molécula tripirrólica (ATTTT).

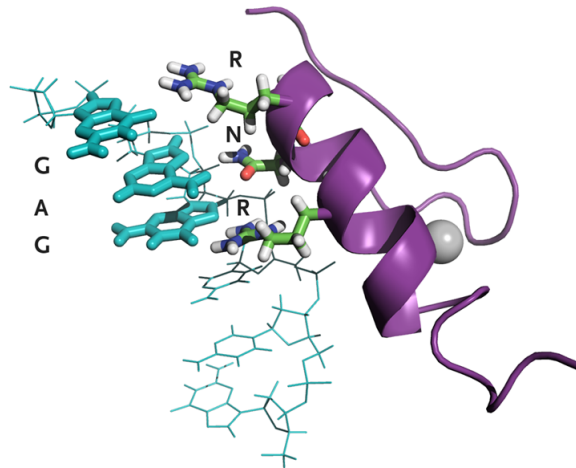


Figura 115. Interacción de la proteína natural GAGA y la triada GAG.

Para confirmar esta hipótesis se realizaron una serie de estudios de PAGE a 20 °C, con oligonucleótidos donde las secuencias de reconocimiento ATTTT y GAG se encontrasen a diferente distancia.

dsADN ^{xviii}	Secuencia (5' a 3')
AT/cGAG	GAGGATTTT <u>c</u> GAGTACGCTG
AT/caGAG^{xix}	GAGGATTTT <u>ca</u> GAGAGTACG
AT/cgcGAG	GAGGATTTT <u>cgc</u> GAGTAGCT
AT/caacGAG	GAGGATTTT <u>caac</u> GAGTACG

Tabla 7. Secuencias de los ADN usados en los estudios de PAGE.

En la figura siguiente se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de PAGE. Considerando de manera global estos últimos resultados y los observados en la figura 113 C, D y E, se verificó que hay interacción siempre y cuando la triada GAG esté presente y se sitúe en la cercanía de ATTTT.

^{xviii} Sólo se representa una de las hebras del ADN de doble cadena.

^{xix} Es conveniente recordar que en los estudios de selectividad de la parte peptídica (figura 113) ya se probó el ADN **AT/cAGAG** donde la triada de reconocimiento GAG está también separada por 2 pb.

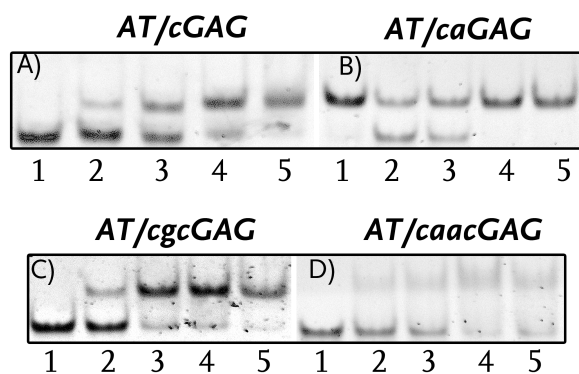


Figura 116. Estudios de PAGE del híbrido C_2 con ADN con distintos espaciadores entre sus secuencias consenso y con 10 equiv de $ZnCl_2$. Calles 2–5 [híbrido C_2]: 100, 200, 400, 1000 nM (A–D). Calle 1 en los experimentos: A, C y D [híbrido C_2]: 0 nM. Calle 1 en el experimento B, control con [híbrido C_2]: 400 nM y ADN AT/GAGAG. Los geles se analizaron mediante la emisión de SYBR® Gold.

Tras el estudio detallado de la selectividad en la interacción del híbrido C_2 , para completar la caracterización se determinó su afinidad a través de una valoración con el ADN AT/GAGAG marcado radiactivamente. Esta permitió calcular una constante de disociación aproximada para el modo de unión 1:1, $K_D = (2.5 \pm 0.3)$ nM a 20 °C, la cual representa una de las mejores afinidades logradas hasta la fecha por miméticos artificiales de factores de transcripción [168].

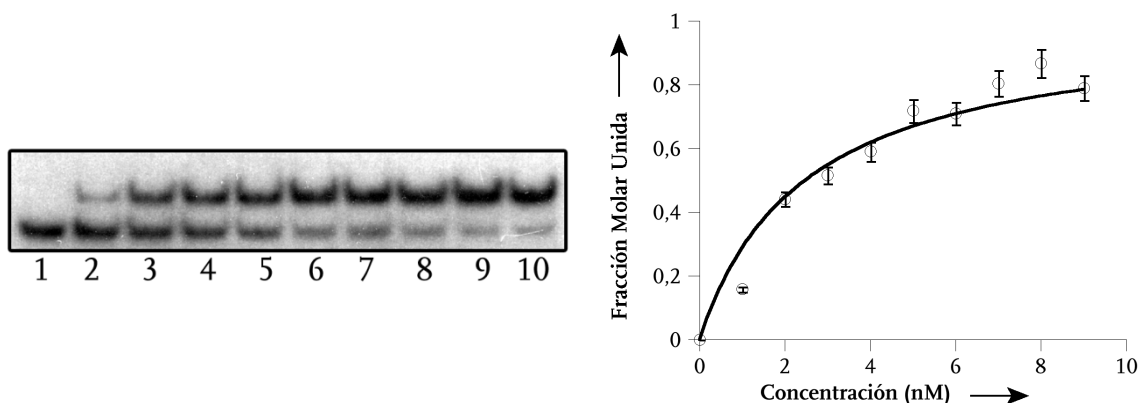


Figura 117. Izquierda: valoración radiactiva del híbrido C_2 con el ADN AT/GAGAG y 10 equiv de $ZnCl_2$. Calle 1–10, [híbrido C_2]: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 nM. Derecha: isoterma de unión resultante del análisis desiométrico del gel de la misma figura.

Conclusiones

Con este trabajo se ha demostrado que la estrategia de interacción surco mayor/surco menor es aplicable a la familia de factores de transcripción de los dedos de cinc, de manera que la unión de una molécula tripirrólica a un solo dominio Cys₂His₂ permite el reconocimiento específico y de alta afinidad de la triada GAG cuando ésta se sitúa a una distancia adecuada de una secuencia rica en A/Ts.

El híbrido C₂ constituye el primer ejemplo de un dedo de cinc monomérico y sintético que logra tal grado de afinidad y selectividad por su secuencia consenso [169], aportando nuevas posibilidades a la ingeniería de fragmentos de reconocimiento de ADN.

El trabajo incluido en este capítulo se publicó en:

Vázquez, O.; Vázquez, M. E.; Blanco, J. B.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. Specific DNA recognition by a synthetic, monomeric Cys₂His₂ zinc finger peptide conjugated to a minor groove binder. *Angew. Chem.* **2007**, *46*, 6886–6890.

Estudios cristalográficos preliminares sobre el complejo del ADN con el híbrido C₂

Con el fin de obtener información estructural, se iniciaron estudios encaminados a la cristalización de los complejos ADN-C₂ y a su resolución mediante difracción de rayos X. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Pablo Guardado perteneciente al grupo del investigador Mark J. van Raaij (CSIC).

Inicialmente, se probaron las condiciones del kit de cristalización *Natrix*, (Hampton Research) con el híbrido C₂ y el ADN **AT/GAGAG** en una relación (1: 1.5). En ese caso se observó que, aunque el híbrido y el ADN eran solubles a concentraciones en torno a 2 mM e, incluso superiores, la adición del ADN sobre el híbrido C₂ provocaba la precipitación instantánea de un sólido blanco. Estos cambios de solubilidad suelen ser indicativos de la formación de complejos específicos entre proteínas y ADN [170]. Normalmente la adición de un par de gotas de Tris•HCl 1M suele restablecer la disolución; sin embargo, en nuestro caso no fue así, por lo que nos vimos obligados a diluir la concentración del complejo a 500 μM, lo cual desafortunadamente, desfavorecía la formación de cristales de un tamaño adecuado.

Tras probar 96 condiciones, después de dos semanas se observó que se obtenían muchos cristales, aunque de tamaño muy reducido, con la condición de cristalización: KCl 0.1 M, CaCl₂•2H₂O 0.01 M, HEPES 0.05M pH 7, PEG 400 10%. Se intentó refinar pero en ningún caso se lograron cristales de tamaño suficiente para poder ser difractados.



Figura 118. Microcristales obtenidos en los primeros experimentos.

Posteriormente en el centro *Partnership for Structural Biology* se realizó un ensayo robótico masivo de condiciones. Con estos nuevos experimentos se obtuvieron dos condiciones prometedoras de las 1632 ensayadas por el robot.

- a) MPD 65%, Tris•HCl 0.1M pH 8, CaCl₂ 200 mM.

Estas condiciones dieron lugar a cristales pequeños, sin forma definida, que no difractaron.

- b) MPD 65%, MES monohidratado 0.1M pH 6, CaCl₂ 200 mM.

Con estas nuevas condiciones se obtuvieron cristales hexagonales de tamaño suficientemente grande para poder ser difractados; sin embargo, sólo se pudo llegar a una resolución de 12 Å, que permitió verificar la formación de un patrón de difracción típico de fibras de ADN, lo que demostró la presencia inequívoca del ADN en el cristal.

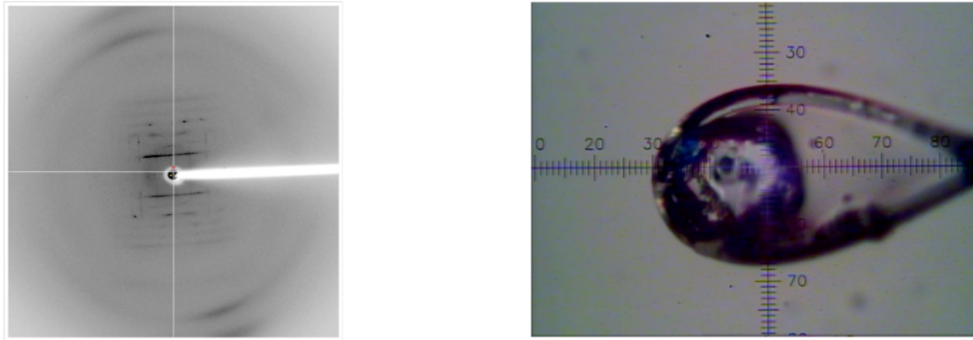


Figura 119. Izquierda: patrón de difracción presentado por el cristal hexagonal. Derecha: foto del cristal hexagonal.

Tomando como base la información obtenida en estos estudios preliminares, se pensó en modificar otra variable muy importante: la longitud del ADN. Éste es uno de los parámetros más complicados de optimizar en este tipo de cristalografía y ha demostrado ser un factor determinante a la hora de obtener buenos cristales de complejos ADN–proteína [171]. A pesar de que la determinación de la secuencia adecuada lleva implícita una serie de ensayos de tipo prueba y error, se suele tomar como principio general el uso de la mínima unidad funcional flanqueada con un número pequeño de pares bases adicionales (1 a 5). En la práctica un único giro helicoidal (10–12 pb) es, a menudo, el punto de partida, ya que por debajo de esta longitud es probable que la conformación de doble hélice del ADN no sea estable a temperatura ambiente. Por ello, pensamos en reducir la secuencia de 20 pares de bases del ADN **AT/GAGAG**.

Para reducir la longitud, la secuencia de los pares de bases adicionales que flanquean la región de interacción es otra variable a tener en cuenta en el diseño. La terminación más sencilla de un ADN de doble cadena es el llamado *extremo romo*, donde las hebras acaban en bases apareadas; sin embargo, a menudo se ha observado que el extremo del ADN de un cristal se empaqueta con otro extremo de ADN. Esta terminación se conoce con el nombre de *extremos complementarios (sticky ends)* y contienen normalmente una o dos bases desapareadas. En los nuevos experimentos se decidió probar dos secuencias reducidas del ADN **AT/GAGAG** cada una con un tipo de extremo.

dsADN ^{xx}	Secuencia (5' a 3')
AT/GAGAG	GAGGATTTT <u>GAGAG</u> TACGCT CTCCTAAAACTCTCATGCGT
(AT/GAGAG)_r	GATTTT <u>GAGAG</u> CTAAAACTCTC
(AT/GAGAG)_c	GATTTT <u>GAGAG</u> TAAAACTCTCC

Tabla 8. Secuencias de ADNs usados en los primeros ensayos de cristalización.

Con estas nuevas secuencias se obtuvieron cristales en condiciones similares a las estudiadas anteriormente. Esto es una fuerte indicación de que los cristales obtenidos

^{xx} En esta nomenclatura de los ADN r y c hacen referencia a los extremos romos y complementarios, respectivamente.

anteriormente eran de complejo y no de ADN. Lamentablemente, en todos los casos los cristales obtenidos fueron demasiado pequeños para hacer estudios de difracción. Finalmente, se hizo un nuevo intento de refinar la longitud del ADN probando con nuevas secuencias:

dsADN ^{xxi}	Secuencia
$(A/GAG)r_{13}$	CGCAAAAGAGGCG GCGTTTTCTCCG
$(A/GAG)c_{13}$	CGCAAAAGAGGCG GGCGTTTTCTCCG
$(A/GAGAG)r_{14}$	CGCAAAAGAGAGCG GCGTTTTCTCTCG
$(A/GAGAG)c_{14}$	CGCAAAAGAGAGCG GGCGTTTTCTCTCG
$(A/GAG)c_{14}$	CGCAAAAGAGGCGC GCGCGTTTTCTCCG
$(A/GAGAG)c_{15}$	CGCAAAAGAGAGCGC GCGCGTTTTCTCTCGCG

Tabla 9. Secuencias de ADNs usados en los segundos ensayos de cristalización.

Desafortunadamente los resultados obtenidos con estas secuencias fueron bastante parecidos a los anteriores, apareciendo cristales demasiado pequeños. Los mejores cristales se obtuvieron con el ADN $(A/GAGAG)c_{14}$ y la condición: MPD 22–25%, Tris•HCl pH 7.2, CaCl₂ 200 mM pero no difractaron.

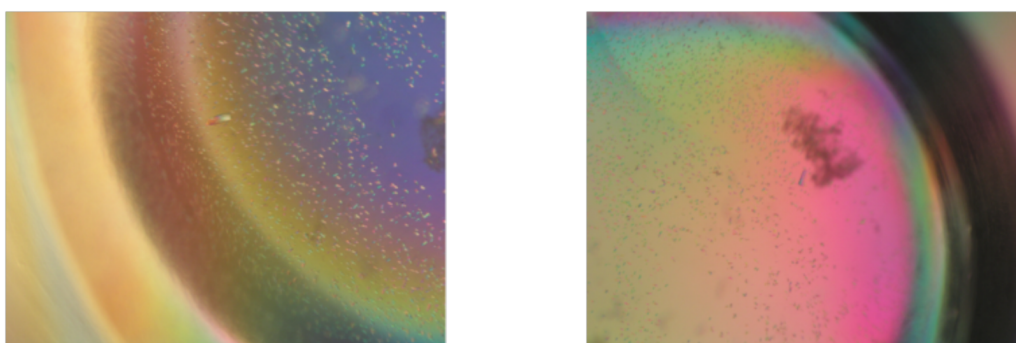


Figura 120. Fotografía de los cristales obtenidos en la mejor condición. En medio de los microcristales pueden verse cristales suficientemente grandes como para ser difractados.

El hecho de haber obtenido cristales nos anima a seguir intentando en el futuro la cristalización de este tipo de complejos probando nuevas secuencias, y/o intentando mejorar las condiciones de solubilidad del complejo para poder obtener una mayor concentración de complejo en disolución y, consecuentemente, cristales de mayor tamaño.

^{xxi} En esta nomenclatura los subíndices numéricos hacen referencia al número de bases en la secuencia.

Bibliografía

- [152] a) Corbi, N.; Libri, V.; Onori, A.; Passananti, C.; *Biochem. Cell Biol.* **2004**, *82*, 428–436; b) Blancafort, P.; Segal, D. J.; Barbas III, C. F. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1361–1371; c) Futaki, S.; Tatsuto, K.; Shiraishi, Y.; Sugiura, Y. *Biopolymers*, **2004**, *76*, 98–109. d) Onori, A.; Desantis, A.; Buontempo, S.; Di Certo, M. G.; Fanciulli, M.; Salvatori, L.; Passananti, C.; Corbi, N. *Biochem. Cell Biol.* **2007**, *85*, 358–365.
- [153] Pedone, P. V.; Ghirlando, R.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Felnenfeld, G.; Omichinski, J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2822–2826.
- [154] Omichinski, J. G.; Pedone, P. V.; Felsenfeld, G.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 122–132.
- [155] Blanco, J. B.; Vázquez, M. E.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 2173–2177.
- [156] Du, H.; Fuh, R. A.; Li, J.; Corkan, A.; Lindsey, J. S. *J. Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 141–142.
- [157] Frankel, A. D.; Berg, J. M.; Pabo C. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, *84*, 4841–4845.
- [158] Cotton, F. A.; Murillo, C. A.; Bochmann, M. *Advanced Inorganic Chemistry*, ISBN 0–471–19957–5, Wiley, USA, **1999**.
- [159] a) Bertini, I.; Luchinat, C. *Adv. Inorg. Biochem.* **1984**, *6*, 71–111. b) Maret, W.; Vallee, B. L. *Methods Enzymol.* **1993**, *226*, 52–71.
- [160] a) Berg, J. M.; Merkle, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3759–3761. b) Weiss, M. A.; Keutmann, H. T. *Biochemistry*, **1990**, *29*, 9808–9813. c) Nomura, A.; Sugiura, Y. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3693–3698.
- [161] a) Vasak, M.; Kägi, H. H. R.; Holmquist, B.; Vallee, B. L. *Biochemistry* **1981**, *20*, 6659–6664. b) May, S. W.; Kuo, J. Y. *Biochemistry* **1978**, *17*, 3333–3338.
- [162] Miller, J.; McLachland, A. D.; Klug, A. *EMBO J.* **1985**, *4*, 1609–1614.
- [163] Parraga, G.; Horvath, S. J.; Eisen, A.; Taylor, W. E.; Hood, L.; Young, E. T.; Klevit, R. E. *Science* **1988**, *241*, 1489–1492.
- [164] Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes Inc. Leiden; capítulo 8.
- [165] Shults, M. D.; Pearce, D. A.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10591–10597.
- [166] a) Rulisek, L.; Vondrasek, J. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *71*, 115–127. b) Krizek, B. A.; Amann, B. T.; Kilfoil, V. J.; Merkle, D. L.; Berg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518–4523. c) Krizek, B. A.; Berg, J. M. *J. Inorg. Biochem.* **1992**, *31*, 2984–2986.
- [167] Iuchi, S.; Kuldell, N. *Zinc Finger Proteins: From atomic contact to cellular function*, ISBN 0–306–48229–0, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2005**; capítulo 4.
- [168] a) Majmudar, C. Y.; Mapp, A. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 467–474. b) Mapp, A. K. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2217–2220.
- [169] Vázquez, O.; Vázquez, M. E.; Blanco, J. B.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6886–6890.

[170] Yang, W.; Steitz, T. A. *Cell*, **1995**, 82, 193– 207.

[171] Jordan, S. R.; Whitcombe, T. V.; Berg, J. M.; Pabo, C. O. *Science*, **1985**, 230, 1383–1385.

Aza-bis(benzamidinios): nuevos agentes fluorogénicos para unir ADN

Objetivo y diseño

Este proyecto surgió en el contexto de la búsqueda de sustitutos de los compuestos tripirrólicos utilizados como agentes de reconocimiento del surco menor. Estábamos interesados en encontrar alternativas que pudiesen ser más fáciles de sintetizar y modificar. Dentro de las diferentes posibilidades, los agentes dicatiónicos de tipo propamidina (**27**) nos parecieron los más atractivos. Estas moléculas, a pesar de su sencillez estructural, presentan selectividad por las regiones ricas en A/Ts del surco menor y muestran mejores propiedades de transporte a través de las membranas celulares que los agentes de reconocimiento del surco menor de tipo distamicina.

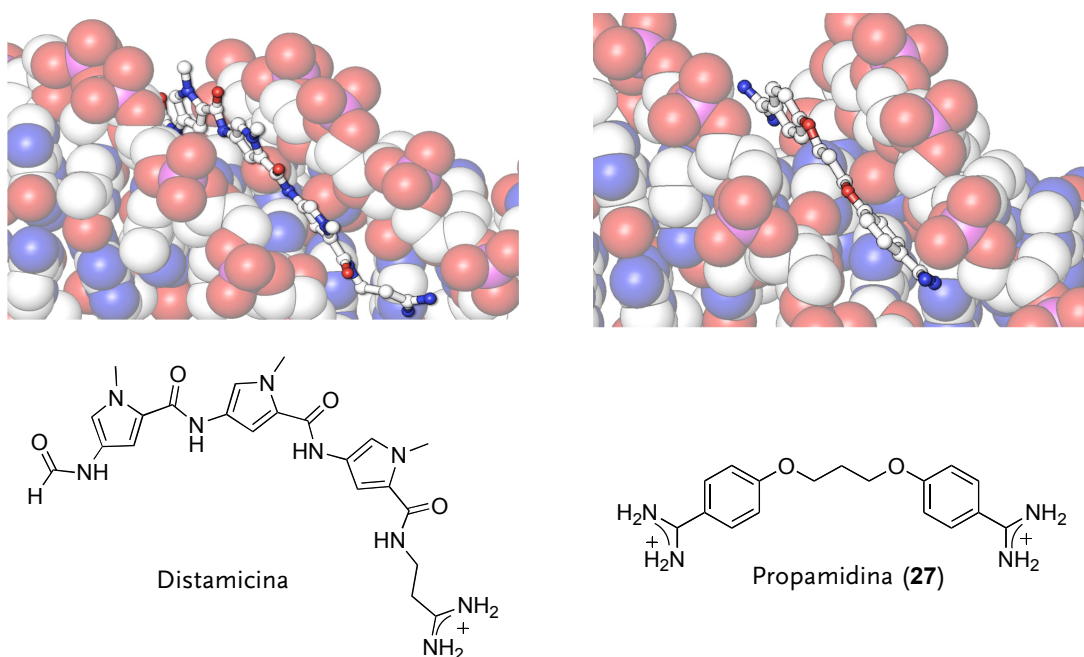


Figura 121. Interacción de los dos agentes de reconocimiento del surco menor. Izquierda: estructura del complejo entre el ADN y la distamicina. Derecha: estructura del complejo entre el ADN y la propamidina.

El análisis de la configuración electrónica de la propamidina hizo postular que esta molécula podría presentar propiedades fluorescentes interesantes, debido a la configuración dador/aceptor [172] de la unidad 4-carbamimidoilfenoxi. Merece la pena recordar en este punto que, en los sistemas de electrones deslocalizados la transición de menor energía es la $\pi \rightarrow \pi^*$ [173]. La fluorescencia de este tipo de moléculas está íntimamente relacionada con la polarización de los electrones π . En una estructura coplanar, el movimiento de los electrones π se ve favorecido por la presencia de un grupo dador ($-\text{OR}$, en el caso de la propamidina) en un extremo y uno aceptor en el otro (amidinio, en el caso de la propamidina) [174].

Las particularidades de esta configuración electrónica pueden determinar que las propiedades de emisión sean sensibles a la naturaleza del medio en el que se encuentre. Es conocido, por ejemplo, que las diferencias en la polaridad del disolvente provocan cambios espectroscópicos en su absorción y fluorescencia. Estos cambios se conocen con el nombre

de cambios solvatochrómicos y son la evidencia experimental de las variaciones en la energía de solvatación de las moléculas [175]. Los compuestos solvatochrómicos normalmente emiten débilmente en medios polares y, sobre todo, en disolvente próticos, pero suelen presentar un buen rendimiento cuántico de emisión cuando se encuentran en disolventes apolares o ambientes hidrofóbicos, características que han hecho que presenten un gran interés en el diseño de biosensores [176].

Considerando estos argumentos, parecía razonable pensar que el ambiente relativamente hidrofóbico del surco menor del ADN, donde se inserta la propamidina, podría provocar un aumento de la fluorescencia de esta molécula. Desafortunadamente, la longitud de onda de excitación de la propamidina (260 nm) coincide con la absorción del ADN, lo que imposibilita su excitación selectiva; esto nos llevó a considerar la síntesis de análogos de propamidina que presentasen mayores longitudes de onda de excitación. Considerando el mejor carácter dador del nitrógeno y los momentos dipolares calculados para las moléculas que se muestran en la figura 122, que confirman la mayor polarización como consecuencia de la sustitución del O por un N, se pensó en sintetizar el análogo nitrogenado de la propamidina: N^1, N^3 -bis(4-amidinofenil)propano-1, 3-diamina, a la que bautizamos con el nombre de BAPPA (28).

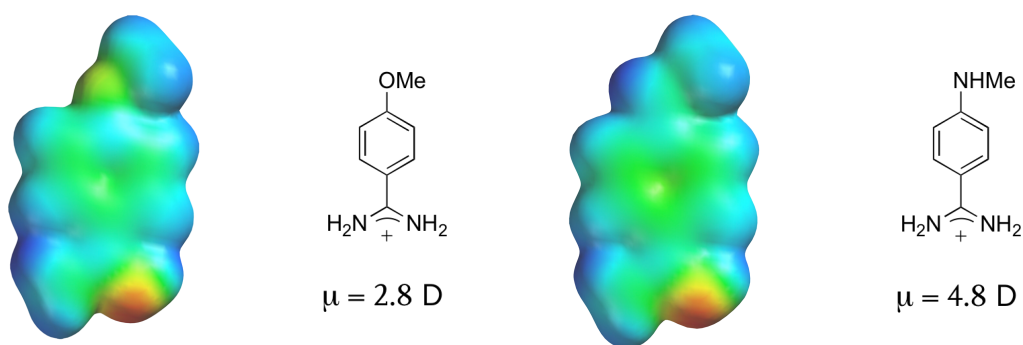


Figura 122. Representación de las densidades electrónicas y del momento dipolar de los dos sustituyentes de la unidad benzamidinio calculado con el programa Spartan'08 (Wavefunction, Inc.; Irvine, CA).

Este nuevo compuesto BAPPA (28) debería presentar propiedades de emisión fluorescentes dependientes de la polaridad, que podrían permitir el estudio del proceso de complejación con el surco menor del ADN mediante métodos fluorescentes. Se esperaría que la inserción en el surco menor del ADN generase un aumento de la señal de fluorescencia.

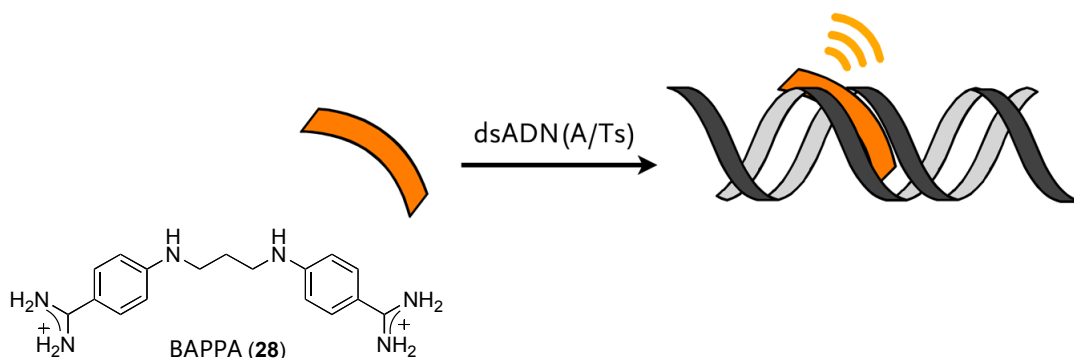
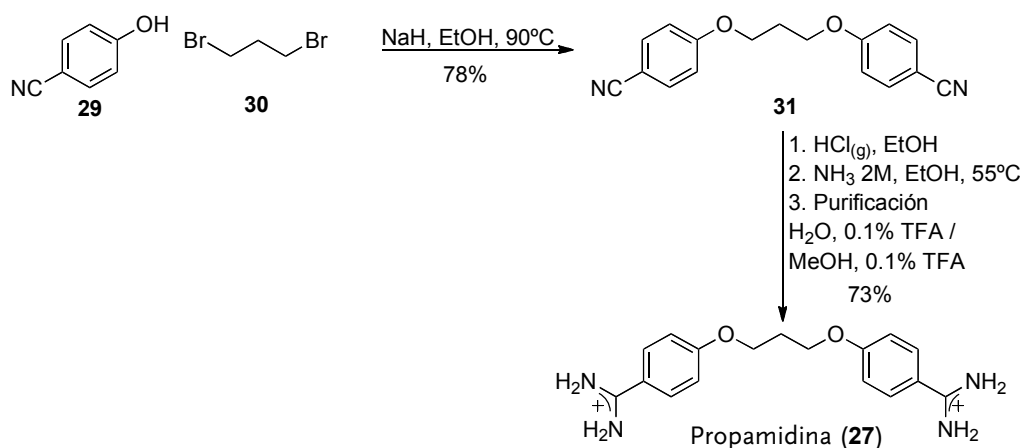


Figura 123. Representación esquemática de la interacción de BAPPA con el ADN que debiera conllevar un aumento de su fluorescencia. BAPPA se representa como una cinta naranja.

Síntesis

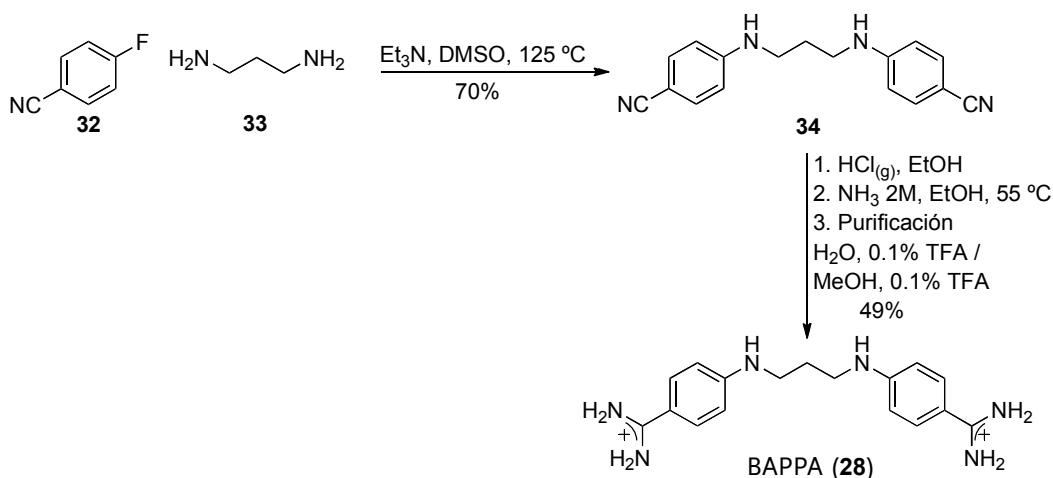
La síntesis de la propamidina (**27**) y de BAPPA (**28**) se realizó siguiendo procedimientos publicados previamente [177]. Tal como era de esperar, estos agentes de reconocimiento del surco menor son mucho más accesibles sintéticamente que los compuestos tripirrólicos (esquemas 36 y 37).

La propamidina se sintetizó siguiendo una secuencia de tres reacciones: una sustitución nucleófila, donde el compuesto comercial 4-hidroxibenzonitrilo (**29**), previamente desprotonado, se adicionó sobre el 1, 3-dibromopropano (**30**); una reacción Pinner [178], donde los grupos nitrilos del bis(benzonitrilo) resultante en la reacción anterior se transforman en imidatos gracias a la acción de una corriente de HCl gas; y finalmente, el intercambio de los grupos iminoéteres por amidinios mediante la adición de una disolución de amoníaco.



Esquema 36. Síntesis del agente de reconocimiento del surco menor propamidina (**27**).

La síntesis de BAPPA fue idéntica a la de la propamidina, salvo en el primer paso, que consistió en una sustitución nucleófila aromática sobre el 4-fluorobenzonitrilo comercial (**32**), que se encuentra activado por el carácter aceptor del grupo nitrilo [179].



Esquema 37. Síntesis del agente de reconocimiento del surco menor BAPPA (**28**).

En la siguiente figura se muestran los cromatogramas de HPLC finales de la propamidina y de BAPPA, respectivamente. La identidad de estos compuestos se verificó por RMN y espectroscopía de masas.

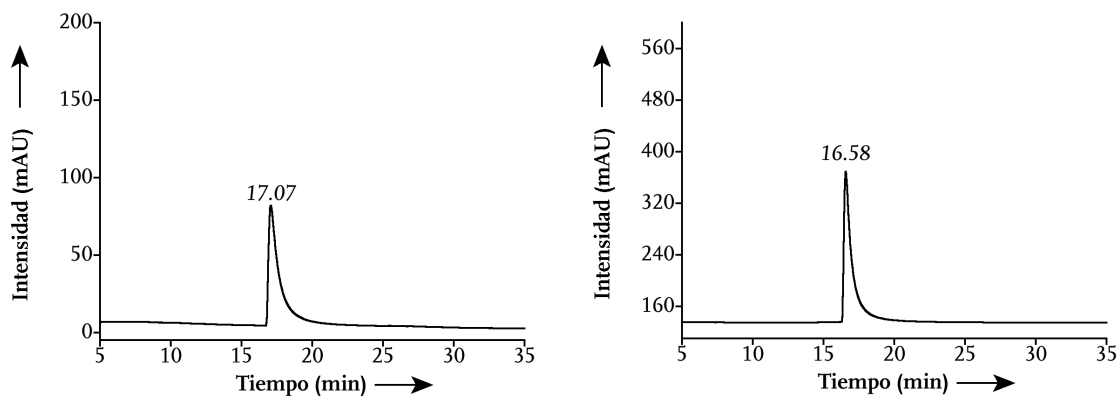


Figura 124. Izquierda: cromatograma de HPLC de la propamidina (**27**). Derecha: cromatograma de HPLC de BAPPA (**28**). En ambos cromatogramas: gradiente 3, $\lambda = 222 \text{ nm}$.

Tal como se esperaba, la sustitución de los oxígenos de la propamidina por los nitrógenos en la molécula BAPPA provoca un desplazamiento batocrómico de más de 50 nm en el máximo de absorción [180].

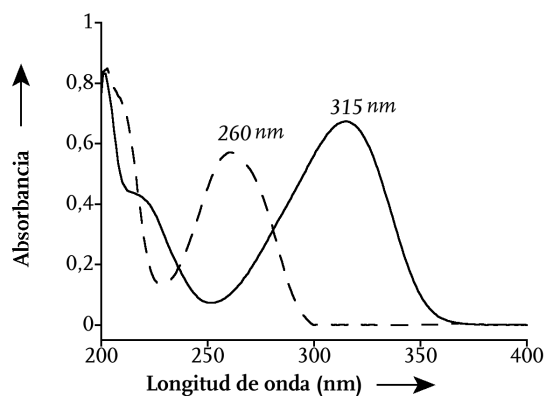


Figura 125. Espectros de absorción de los compuestos: propamidina (línea discontinua) y BAPPA (línea continua).

Estudios de fluorescencia: dependencia del medio

Una vez sintetizado el análogo de nitrógeno BAPPA, se procedió a la caracterización de sus propiedades de fluorescencia, encontrándose que la longitud máxima de emisión es de 391 nm, y el espectro de excitación muestra un máximo a 329 nm, lo que permite su excitación selectiva en presencia de oligonucleótidos.

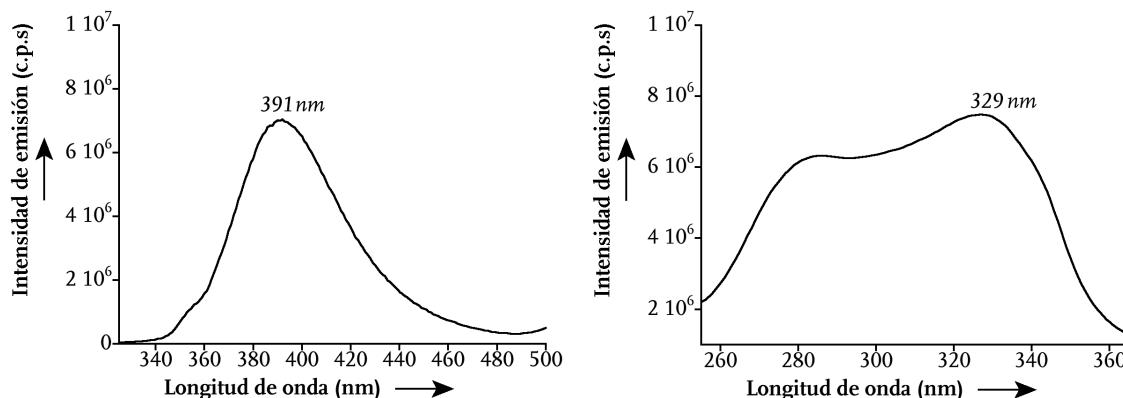


Figura 126. Izquierda: espectro de emisión de BAPPA a 315 nm. Derecha: espectro de excitación de BAPPA a 391 nm.

Con estos sencillos experimentos y con el espectro de absorción de BAPPA se pudo calcular el *desplazamiento de Stokes*. [173a] El desplazamiento de Stokes es la diferencia entre el máximo de la longitud de onda de absorción de una molécula y el máximo de la longitud de onda de emisión expresado en números de onda: $\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ (cm^{-1}).

Este parámetro es importante porque puede proporcionar información sobre los estados de excitación, por ejemplo, cuando el momento dipolar de una molécula es mayor en el estado excitado que en el fundamental, el desplazamiento de Stokes aumenta con la polaridad del disolvente.

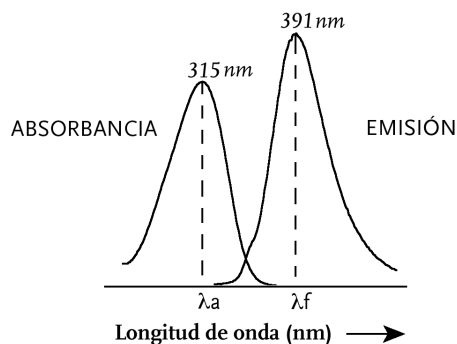


Figura 127. Desplazamiento de Stokes de BAPPA.

Desde un punto de vista práctico, la detección de una especie fluorescente será más fácil cuanto mayor sea su desplazamiento de Stokes. El desplazamiento de Stokes de BAPPA es de $6,170 \text{ cm}^{-1}$ mayor que el de fluoróforos como la benzoxazona BOZ 7 ($3,540 \text{ cm}^{-1}$) o la rodamina 6 G ($1,010 \text{ cm}^{-1}$).

La naturaleza dipolar de BAPPA trae como consecuencia una fuerte dependencia de la emisión de fluorescencia con el disolvente. Así, la intensidad de la emisión se incrementa al aumentar la hidrofobicidad del medio, de manera que BAPPA casi no es fluorescente en agua, mientras que en metanol presenta una importante emisión, y ésta todavía es mayor en el caso del isopropanol (figura 128). Curiosamente, y en contraste con otros cromóforos dador/aceptor [176a], la intensidad en disolventes polares no próticos, como la DMF, es más débil que la observada con los disolventes próticos metanol e isopropanol. En el caso del 1, 4-dioxano y tetrahidrofurano se observó además una emisión dual de fluorescencia. La banda a longitudes de onda mayores podría ser explicada por la formación de un excímero intramolecular [181].

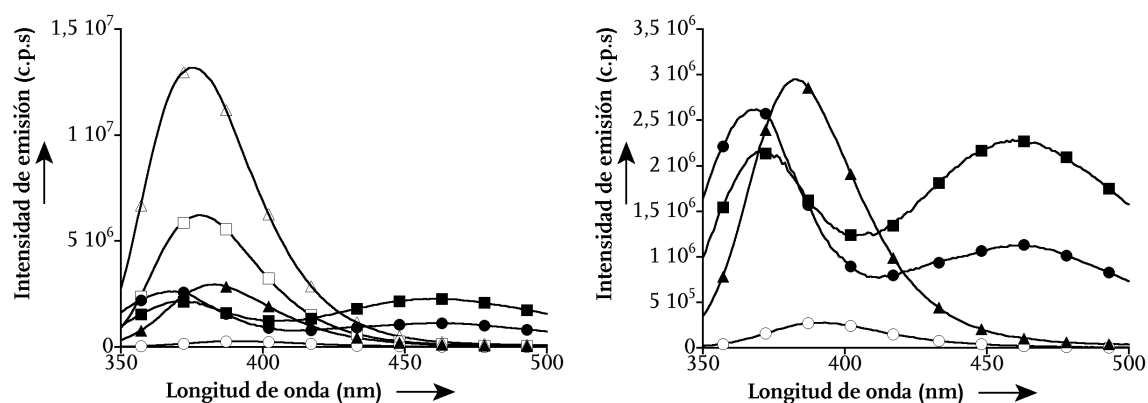


Figura 128. Fluorescencia de una disolución de BAPPA $0.5 \mu\text{M}$ en distintos disolventes. Izquierda: \circ agua; \square metanol; \triangle isopropanol; \bullet 1, 4-dioxano; \blacksquare THF y \blacktriangle DMF. Derecha: diferente escala para visualizar mejor las diferencias de los espectros donde la fluorescencia es menos intensa, se sigue el mismo código.

Interacción de BAPPA con el ADN

Una vez demostrada la dependencia de la fluorescencia de BAPPA de la polaridad del medio, se estudiaron los cambios en la emisión que ocurren al añadir, sobre una disolución de BAPPA sucesivas alícuotas de ADN con una secuencia rica en A/Ts. En la figura 129 puede verse que la adición de un ADN horquilla con la secuencia de unión AATTT (ADN **AATTT**, tabla 10) provocó un aumento de más de 10 veces en la intensidad de emisión de fluorescencia en comparación, con la detectada para la molécula sola en disolución. Este gran aumento de la intensidad de emisión podría ser debido al cambio del entorno experimentado por molécula como consecuencia de su inserción en el surco menor del ADN [182].

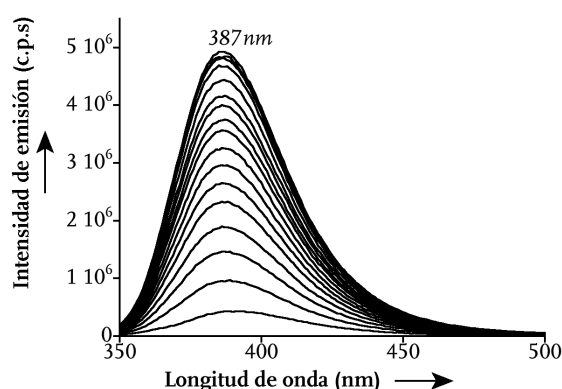


Figura 129. Espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA ($0.5 \mu\text{M}$ en Tris•HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM) con el ADN horquilla **AATTT**.

Para poder establecer la selectividad de secuencia de BAPPA se llevaron a cabo nuevas valoraciones con los siguientes ADN horquilla.^{xxii}

ADN ^{xxiii}	Secuencia (5' a 3')
AATTT	GGCG AATTT CAGC TTTT GCG AAATT CGCC
AATT	GGCG AATT CAGC TTTT GCTG AATT CGCC
AAAA	GGCG AAAA CAGC TTTT GCTG TTTT CGCC
AATG	GGCG AATG CAGC TTTT GCTG CATT CGCC
ATGG	GGCG ATGC CAGC TTTT GCTG GCAT CGCC
AAGG	GGCG AAGG CAGC TTTT GCTG CCTT CGCC
GGCC	GGCA GGCC CAGC TTTT GCTG GGCC TGCC

Tabla 10. Secuencias de los ADNs usados en las valoraciones.

^{xxii} Son ADNs que a pesar de estar formados por una única hebra, son capaces de plegarse de forma intramolecular para adquirir una conformación de doble hélice.

^{xxiii} En esta nomenclatura la h hace referencia a que son ADNs horquilla. Está representada la secuencia completa.

Las valoraciones de BAPPA ($0.5 \mu\text{M}$ en Tris•HCl 20 mM pH 7.5 , NaCl 100 mM) con los distintos ADN's condujo a un perfil de cambio de fluorescencia más o menos intenso dependiendo del ADN.

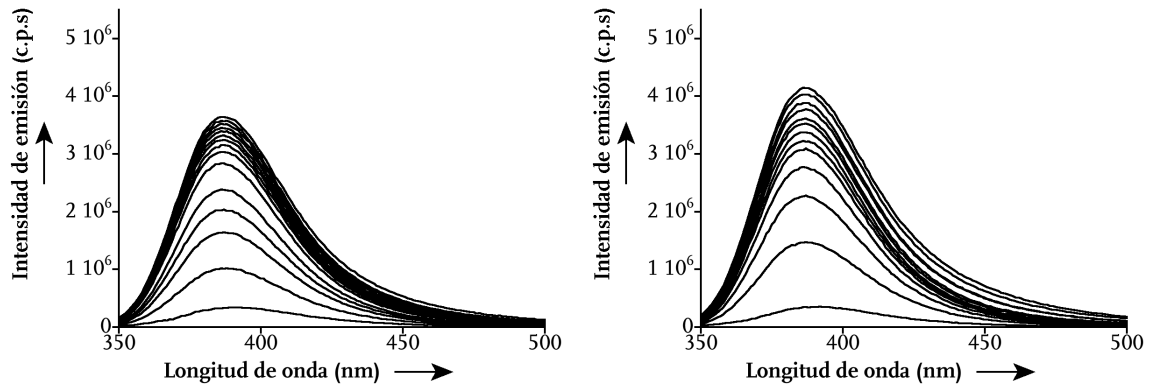


Figura 130. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con el ADN AATT. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con el ADN AAAA.

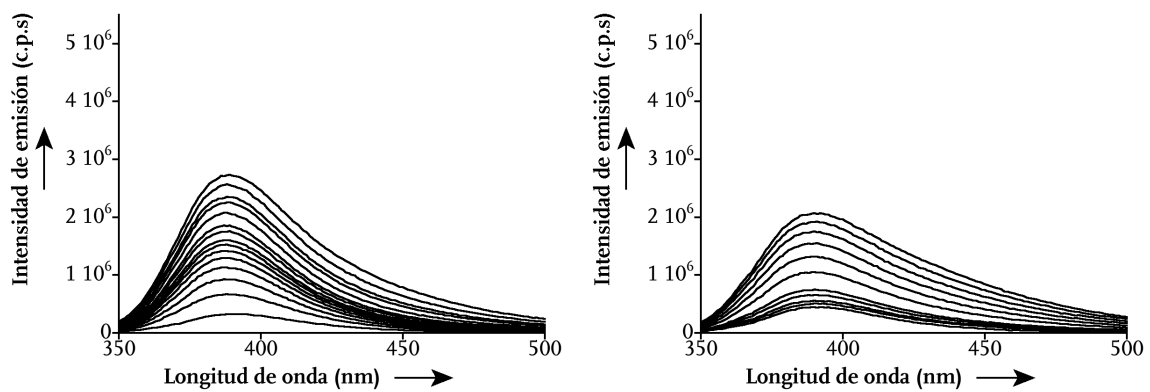


Figura 131. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con el ADN AATG. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con el ADN ATGG.

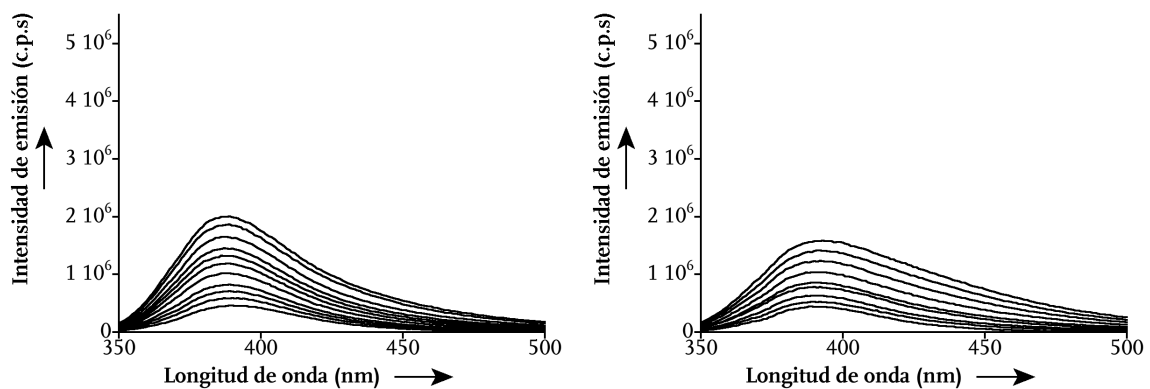


Figura 132. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con el ADN AAGG. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con el ADN GGCC.

El aumento de la intensidad de emisión a 387 nm pudo ajustarse en cada caso a la ecuación que describe un modo de interacción 1:1 y que considera la contribución de la fluorescencia residual del ADN (véase la parte experimental para la derivación de la ecuación) [183]. Dicho ajuste permitió la determinación de los valores de la constante de disociación para cada uno de los ADNs (figura 133).

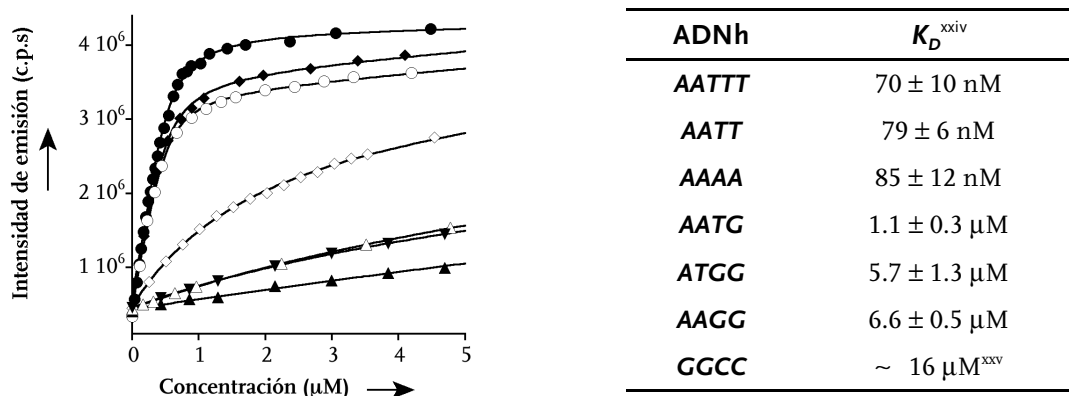


Figura 133. Izquierda: representación de ajuste al modelo de interacción 1:1 de las valoraciones con los ADNs: AATTT (●), AATT (○), AAAA (◆), AATG (◇), AAGG (▼), ATGG (△), GGCC (▲). Derecha: valores de las constantes de disociación calculadas en cada caso.

Estas valoraciones permitieron establecer el perfil de interacción de BAPPA, encontrándose que las secuencias que contienen al menos cuatro bases A/T son las que dan lugar a complejos más estables.

La interacción de mayor afinidad se observó para el ADN **AATTT** y la constante obtenida ($K_D \sim 70$ nM) es consistente con las calculadas previamente para la propamidina y otros agentes relacionados de unión al ADN a través del surco menor [184].

Con respecto a las secuencias de cuatro bases A/T, se observó una interacción ligeramente más fuerte para la secuencia del ADN **AATT** que para el ADN **AAAA**. La introducción de una única mutación G/C en esta secuencia condujo a una disminución de la afinidad en 15 veces ($K_D \sim 1.1$ μ M). Sucesivas mutaciones provocaron una drástica disminución de la afinidad hasta que sólo se observa una unión residual con la secuencia ricas en pares G/C.

Para verificar que el aumento de fluorescencia de emisión observado es realmente debido a la interacción selectiva de BAPPA y no a la fluorescencia residual del ADN, se realizaron dos sencillos experimentos control con los ADN **AATTT** y **GGCC** con y sin BAPPA. Los ensayos demostraron que efectivamente el cambio en la fluorescencia se debe a la interacción, ya que en ausencia de BAPPA la fluorescencia de los ADNs es insignificante.

^{xxiv} Los valores de las constantes de disociación calculados para cada ADN son la media de al menos tres valoraciones independientes.

^{xxv} No se observó la saturación para este ADN incluso a concentraciones elevadas.

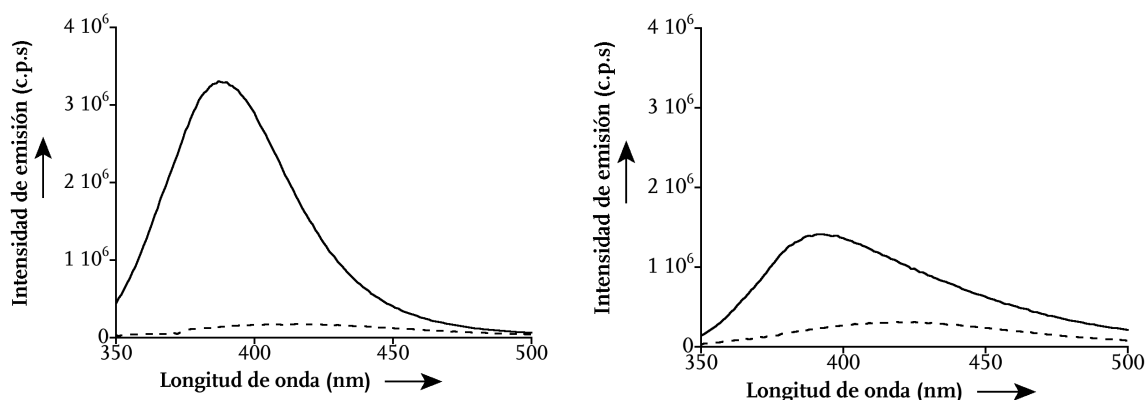


Figura 134. Izquierda: espectros de fluorescencia de 7 equiv de ADN **AATT** en Tris•HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM con: 0.5 μM de BAPPA (línea continua); solo (línea discontinua) Derecha: espectros de fluorescencia de 8 equiv de ADN **GGCC** en Tris•HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM con: 0.5 μM de BAPPA (línea continua); solo (línea discontinua).

Curiosamente, cuando se evaluó la selectividad de BAPPA frente a un ADN horquilla con una secuencia de reconocimiento más larga AAATTT, se observó la saturación mucho antes que en los otros casos. Este hecho obligó a reducir la concentración de la disolución madre de ADN **AAATTT** en más de 10 veces para poder obtener suficientes puntos para la determinación de la constante.

ADNh	Secuencia (5' a 3')
AAATTT	GGC AAATTT CGC TTTT GCG AAATTT GCC

Tabla 11. Secuencia del ADN usado en estas valoraciones.

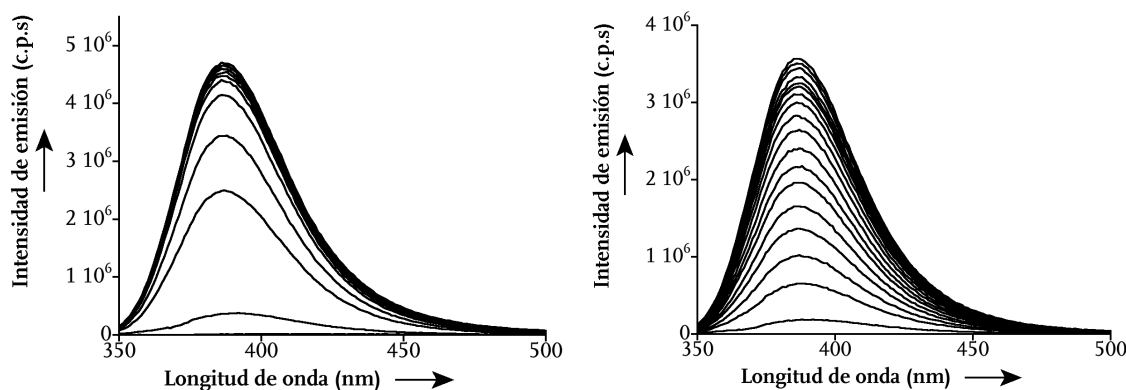


Figura 135. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con el ADN **AAATTT** realizados del modo habitual. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración de BAPPA con alícuotas de concentración 10 veces inferior del ADN **AAATTT**.

A la vista de este resultado, se decidió evaluar mediante el método de *variación continua* la estequiometría de la interacción de BAPPA con los ADNs: **AAATTT**, **AATTT**, **AATT** e, incluso, se usó como control otro ADN que contiene dos posibles sitios de interacción (ADN **AATTGCAATT**):

ADNh	Secuencia (5' a 3')
AATTGCGAATT	GGC AATT GCG AATT CAGC TTTT GCTG AATT CGC AATT GCC

Tabla 12. Secuencia del ADN con dos posibles sitios de interacción.

En el método de variación continua [185], la concentración molar total de BAPPA y de ADN se mantienen constante pero se va variando progresivamente las fracciones molares de cada componente en la mezcla. La representación gráfica de la intensidad de la emisión de fluorescencia medida en cada punto, frente a la fracción molar de una de las moléculas implicadas se conoce con el nombre de *gráficas de Job*. La estequiometría de la interacción se determina a través de la relación entre ambas fracciones molares en el máximo de la curva (n). Desde el punto de vista práctico, los tres primeros puntos de cada uno de los lados de la curva se ajustan a una recta y el punto de intersección de ambas rectas determina el valor de n y, por tanto, la estequiometría.

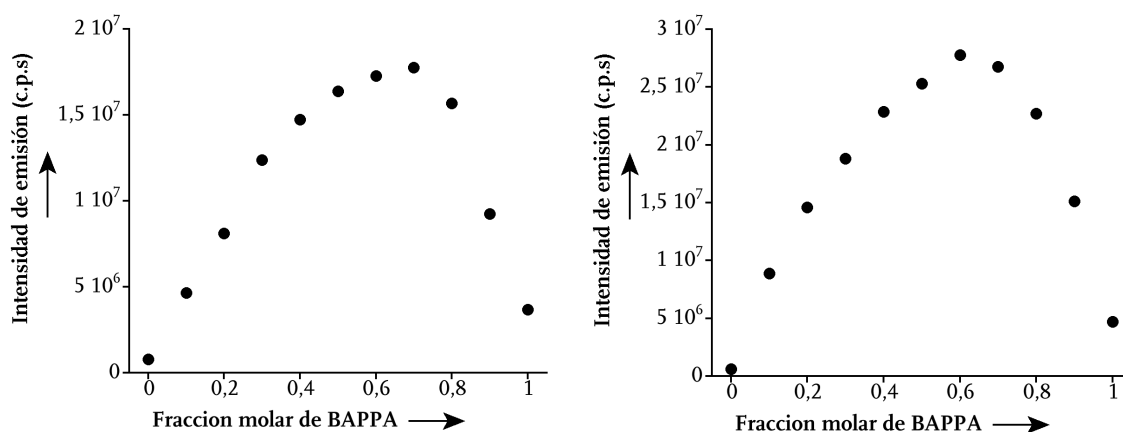


Figura 136. Izquierda: gráfica de Job de BAPPA y el ADN AATTGCGAATT a una concentración de 10 μ M; $n = 0.67/0.33 = 2.03$ Derecha: gráfica de Job de BAPPA y el ADN AAATTT a una concentración de 10 μ M; $n = 0.65/0.35 = 1.85$

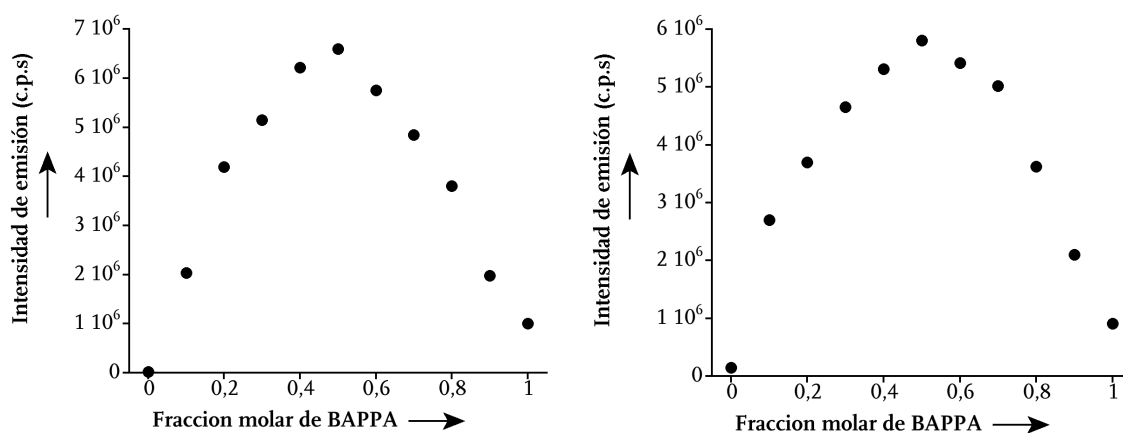


Figura 137. Izquierda: gráfica de Job de BAPPA y el ADN AATTT a una concentración de 20 μ M; $n = 0.48/0.52 = 0.92$ Derecha: gráfica de Job de BAPPA y el ADN AATT a una concentración de 25 μ M; $n = 0.49/0.51 = 0.96$

Considerando las gráficas de Job se verificó que dos moléculas de BAPPA interaccionan con una de ADN tanto con el ADN **AATTGCGAATT** como con el ADN **AAATTT** ($n = 2.03$ y $n = 1.85$, respectivamente). Sin embargo, con los ADNs **AATTT** y **AATT** el modo de unión fue 1:1 ($n = 0.92$ y $n = 0.96$, respectivamente). Estos resultados son consistentes con los ajustes de las valoraciones realizados previamente (figura 133).

Como era de esperar a la vista de las gráficas de Job, la isoterma de unión obtenida de las valoraciones de BAPPA con el ADN **AAATTT** se ajusta mejor a un modo de interacción 2:1.^{xxvi} Este resultado coincide, además, con observaciones recientes que sugieren la formación de complejos de este tipo en el surco menor del ADN con otros bis(benzamidinios) [186].

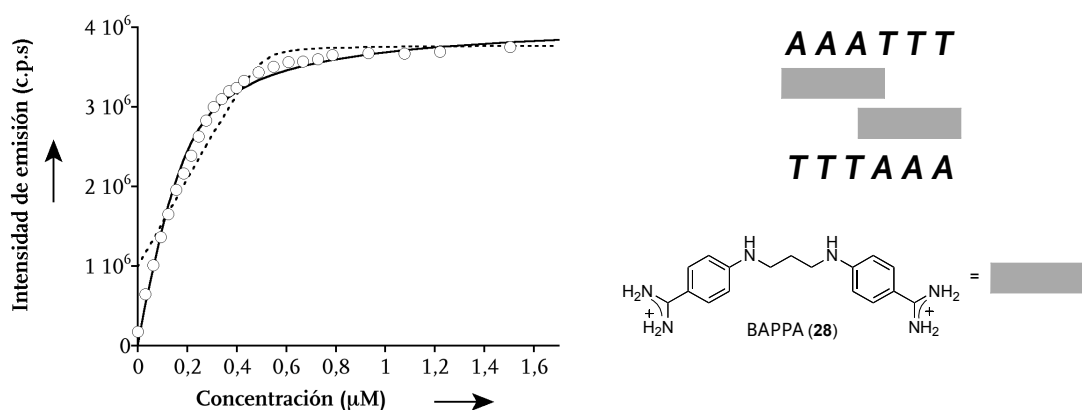


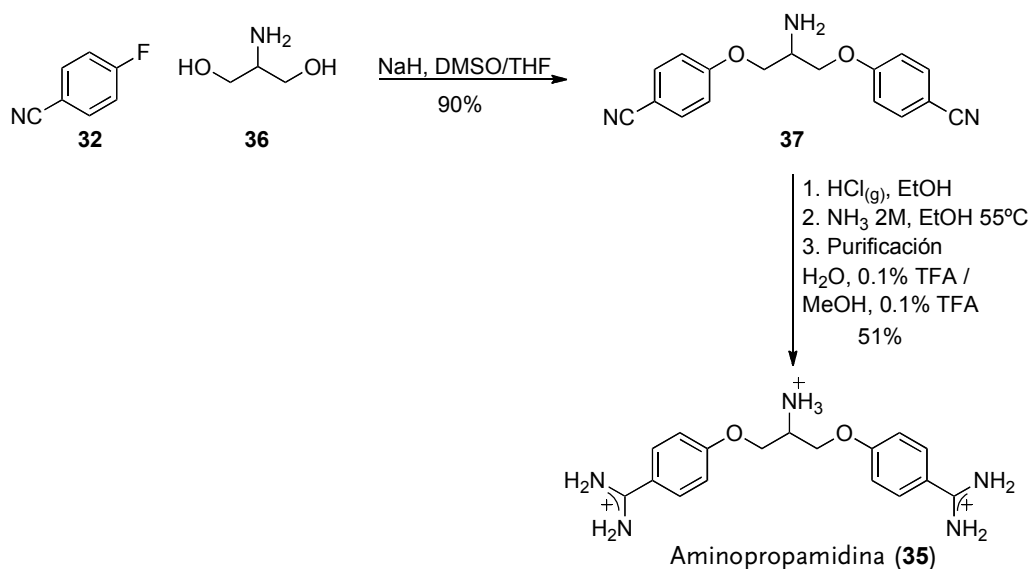
Figura 138. Izquierda: representación de la isoterma obtenida de las valoraciones fluorescentes de BAPPA y el ADN **AAATTT**, ajustándola a diferentes modos de unión: ○ datos experimentales; línea discontinua: ajuste al modo de unión 1:1; línea continua: ajuste al modo de unión 2:1. Derecha: representación esquemática de como podría ser la interacción de dos BAPPAs con el ADN **AAATTT** debido a su mayor longitud.

^{xxvi} El ajuste de la isoterma obtenida al modo de unión 2:1 fue llevado a cabo por el catedrático, Manuel Mosquera González del Dpto de Química Física de esta universidad.

Ensayos de competición con moléculas no fluorescentes

La fluorescencia de BAPPA inducida por los ADNs que presentan secuencias ricas en A/Ts también se utilizó para estudiar la interacción de otros agentes de reconocimiento del surco menor que no son fluorogénicos, mediante experimentos de competición.

La simplicidad estructural y accesibilidad sintética de los compuestos de tipo bis(benzamidinio) permitió preparar un derivado análogo a la propamidina con un grupo amino central (compuesto **35**), el cual puede ser utilizado como punto de anclaje para la conjugación a otras moléculas. Este compuesto se preparó siguiendo la misma secuencia de reacciones que la usada en la síntesis de BAPPA.



Esquema 38. Síntesis del bis(benzamidinio) **35** con una amina como punto de anclaje.

En la figura 139 se muestra el cromatograma final de la aminopropamidina **35** y su correspondiente espectro de absorción con sus máximos característicos.

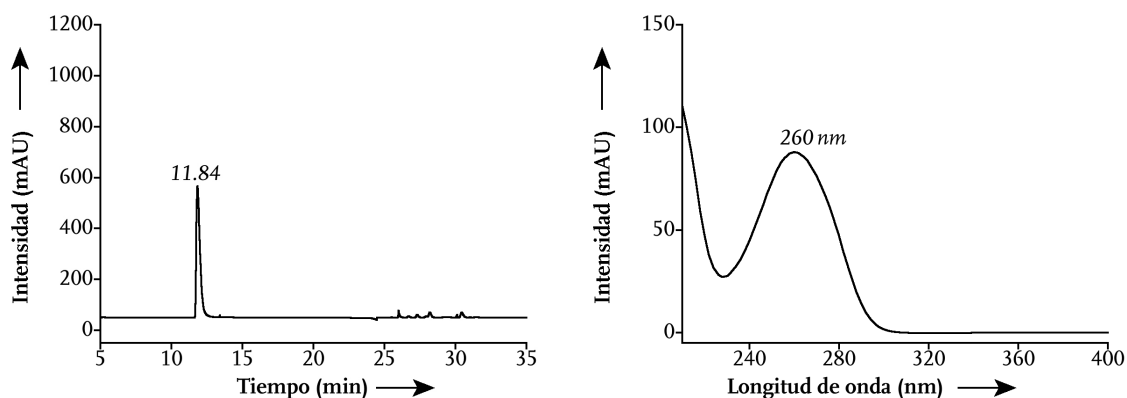
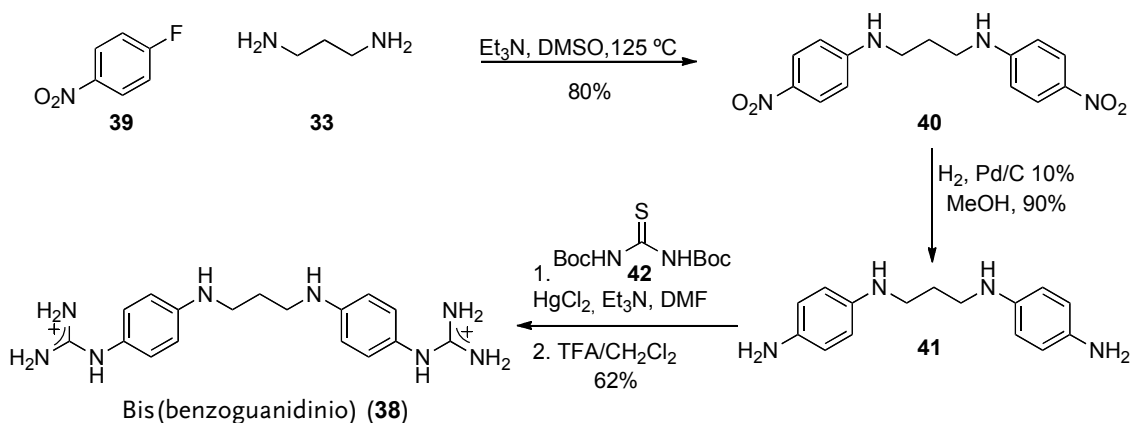


Figura 139. Izquierda: cromatograma de HPLC del compuesto **35**, gradiente 3, $\lambda = 222 \text{ nm}$. Derecha: espectro de absorción.

Para analizar el efecto del grupo amidinio en la interacción y en la fluorescencia se sintetizó el compuesto bis(benzoguanidinio) análogo a BAPPA (**38**). Inicialmente se llevó a cabo una sustitución nucleófila aromática sobre el 1-fluoro-4-nitrobenzenceno, seguida de una reducción de los grupos nitro mediante hidrogenación catalítica. A continuación, la diamina obtenida se hizo reaccionar con la tiourea protegida, siguiendo el procedimiento descrito para la misma transformación en otros sustratos [187]. Finalmente la desprotección de los grupos protectores dio lugar al bis(benzoguanidinio) deseado **38**.



Esquema 39. Síntesis del bis(benzoguanidinio) **38**.

A continuación puede verse el cromatograma del compuesto final **38** y su espectro de absorción. El menor carácter aceptor de los grupos guanidinos en comparación con el de los grupos amidinios tiene como consecuencia que el máximo de absorción se sitúe a longitudes de onda menores, de manera que, al igual que la propamidina, este compuesto no puede excitarse selectivamente en presencia de ADN.

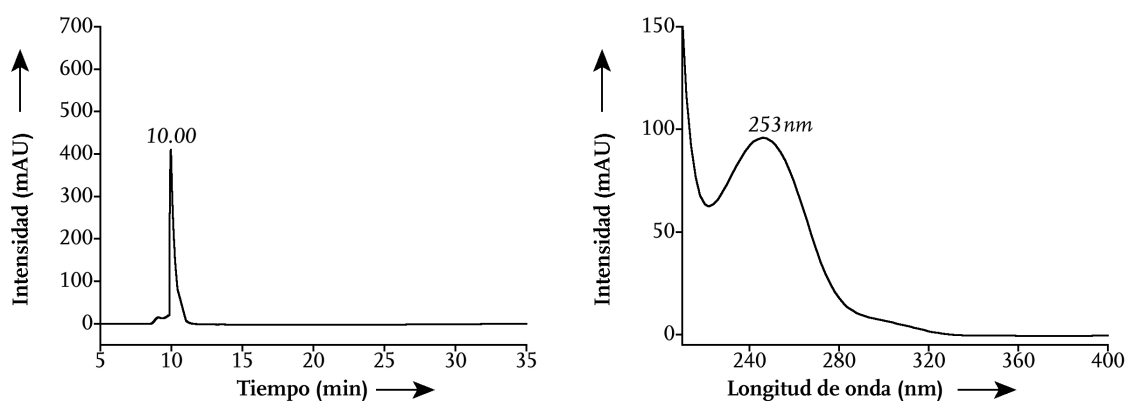


Figura 140. Izquierda: cromatograma de HPLC del compuesto **38**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Del mismo modo que en cualquier experimento típico de competición, para determinar la interacción de los agentes de reconocimiento no fluorescentes se llevaron a cabo valoraciones con cantidades crecientes de ellos sobre una disolución donde se ha preformado el complejo de BAPPA con un ADN rico en A/Ts. En particular, en estos experimentos se usó una concentración de BAPPA de 0.5 μ M y del ADN **AATTT** 1.4 μ M en

tampón. La concentración del agente de unión externo [propamidina (**27**), aminopropamidina (**35**) y bis(benzoguanidinio) (**38**)] varió entre 150–500 μM , dependiendo de su afinidad relativa por el ADN. En las siguientes figuras se muestran las valoraciones de los diferentes experimentos de competición.

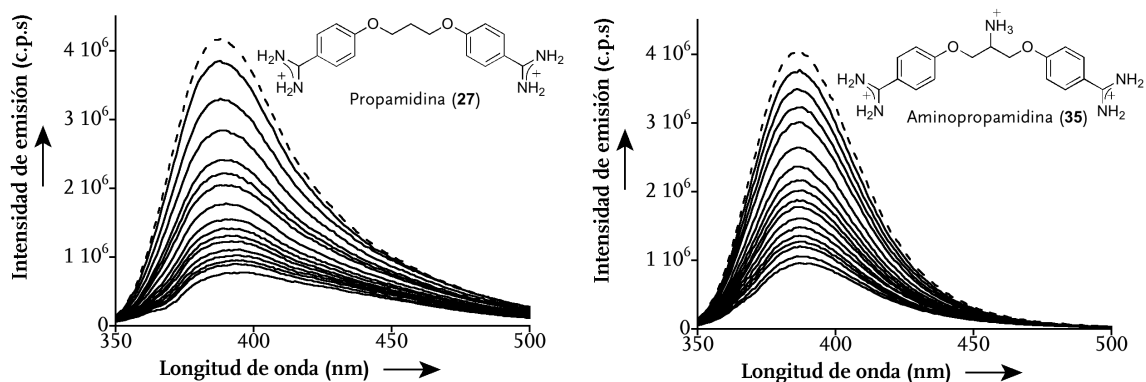


Figura 141. Ensayos de competición. Izquierda: línea discontinua: espectro de fluorescencia de BAPPA con el ADN AATTT. Líneas continuas: espectros de fluorescencia de BAPPA con el ADN AATTT y cantidades crecientes de propamidina **27**. Derecha: línea discontinua: espectro de fluorescencia de BAPPA con el ADN AATTT. Líneas continuas: espectros de fluorescencia de BAPPA con el ADN AATTT y cantidades crecientes de la aminopropamidina **35**.

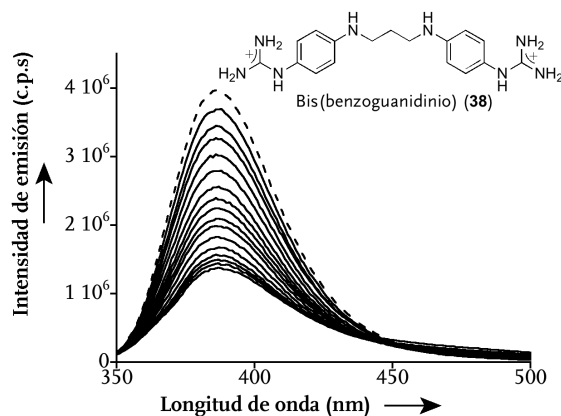


Figura 142. Ensayo de competición. Línea discontinua: espectro de fluorescencia de BAPPA con el ADN AATTT. Líneas continuas: espectros de fluorescencia de BAPPA con el ADN AATTT y cantidades crecientes del compuesto bis(benzoguanidinio) **38**.

La disminución de la fluorescencia observada después de cada adición, consecuencia del desplazamiento del compuesto fluorescente BAPPA del surco menor, se utilizó para determinar la constante de unión de estos compuestos [188]. Los valores de constante de disociación obtenidos para el ADN AATTT y los agentes de reconocimiento del surco menor: propamidina (**27**), aminopropamidina (**35**) y bis(benzoguanidinio) (**38**) fueron: (161 ± 22) nM, (452 ± 7) nM y (479 ± 22) nM, respectivamente. Por tanto, mientras la afinidad de la propamidina por el ADN AATTT es similar a la de BAPPA, la introducción del grupo amino en el medio de la cadena de conexión entre las dos unidades de benzamidinio provoca una disminución de la afinidad. Por otra parte, se observa que la sustitución de los grupos

amidinio de BAPPA por guanidinos induce a una disminución de casi diez veces la afinidad.

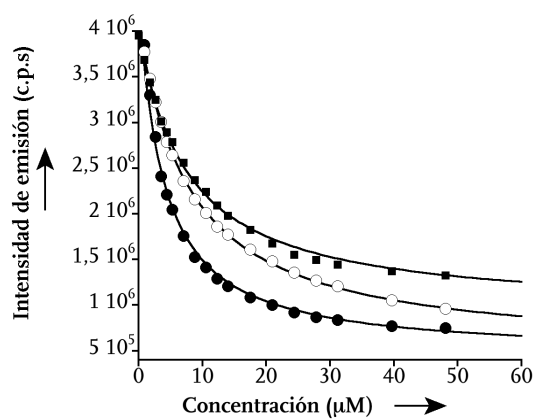


Figura 143. Curvas de desplazamiento de 0.5 μM de BAPPA y 1.4 μM ADN AATTT con: ● propamidina 27; ○ aminopropamidina 35; ■ bis(benzoguanidinio) 38.

Conclusiones

La *aza*-propamidina (BAPPA) es una molécula con una estructura sencilla capaz de insertarse en el surco menor del ADN cuando existen secuencias ricas en A/Ts. Además al producirse dicha interacción se observa un aumento significativo en la emisión de fluorescencia a 387 nm. Por ello BAPPA puede usarse como sonda fluorescente para la detección de ADNs de doble cadena ricos en pares A/T sin necesidad de desnaturalizar el ADN. Su aumento de fluorescencia dependiente del ADN, junto con las buenas propiedades de transporte celular que han sido descritas para este tipo de moléculas, sugiere que BAPPA y sus derivados, podrían ofrecer un gran potencial para el desarrollo de nuevos agentes que actuaran a nivel de ADN con posibles aplicaciones químicas, biológicas y ópticas. La fluorescencia de BAPPA permite también analizar fácilmente la unión al ADN de agentes de reconocimiento del surco menor no fluorescentes mediante experimentos de competición.

El trabajo incluido en este capítulo ha dado lugar a una solicitud de patente y a un artículo:

Vázquez, O.; Sánchez, M. I.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L. Uso de compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos para señalar secuencias específicas de ADN de doble cadena. N° Solicitud: P200930462, **2009**.

Vázquez, O.; Sánchez, M. I.; Martínez-Costas, J.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L. Bis-4-aminobenzamidines: versatile, fluorogenic A/T-selective dsDNA binders. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 216–219.

Bibliografía

- [172] a) Gompper, R.; Wagner, H. U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1437–1455. b) Kivala, M.; Diederich, F. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 235–248. c) Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899–4031.
- [173] a) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, ISBN: 3–527–29919–X, WILEY–VCH, Weinheim, **2002**; capítulo 2 y 3 b) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ISBN: 0–306–46093–9, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2002**; capítulo 1.
- [174] a) Weber, G.; Farris, F. J. *Biochemistry*, **1979**, *18*, 3075–3078. b) Painelli, A.; Terenziani, F. *J. Phys. Chem. A*, **2002**, *104*, 11041–11048.
- [175] a) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, ISBN: 3–527–29919–X, WILEY–VCH, Weinheim, **2002**; capítulo 7. b) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ISBN: 0–306–46093–9, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2002**; capítulo 3.
- [176] a) Vázquez, E. M.; Blanco, J. B.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1300–1306. b) Lord, S. J.; Conley, N. R.; Lee, H. D.; Samuel, R.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9204–9205. c) Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- [177] a) Geratz, J. D.; Whitmore, A. C.; Cheng, M. C. F.; Piantadosi, C. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 970–975. b) Geratz, J. D.; Cheng, M. C.; Tidwell, R. R. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 477–481. c) Tidwell, R. R.; Jones, S. K.; Geratz, J. D.; Ohemeng, K. A.; Cory, M.; Hall, J. E.; *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1252–1257.
- [178] Pinner, A.; Klein, A. *Chem Ber* **1877**, *10*, 1889–1897.
- [179] Berg, S. S. *J. Chem. Soc.* **1960**, *6*, 5172–5176.
- [180] Rogana, E. R.; Mares–Guia, M. *J. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6844–6848.
- [181] a) Zhang, S. L.; Lang, M. J.; Goodman, S.; Durnell, C.; Fidler, V.; Fleming, G. R.; Yang, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9042–9051. b) Dähne, S.; Freyer, W.; Teuchner, K.; Dobkowski, J.; Grabowski, Z. R. *J. Lumin.* **1980**, *22*, 37–49.
- [182] a) Nguyen, B.; Neidle, S.; Wilson, W. D., *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 11–21. b) Degtyareva, N. N.; Wallace, A. R.; Loo, K. M.; Petty, T. J., *Biophys. J.* **2007**, *92*, 959–965.
- [183] a) Roehrl, M. H.; Wang, J. Y.; Wagner, G. *Biochemistry* **2004**, *43*, 16056–16066. b) Stricher, F.; Martin, L.; Barthe, P.; Pogenberg, V.; Mechulam, A.; Menez, A.; Roumestand, C.; Veas, F.; Royer, C.; Vita, C. *Biochem J.* **2005**, *390*, 29–39.
- [184] Chaires, J. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *453*, 26–31.
- [185] Huang, C. Y. *Methods Enzymol.* **1982**, *87*, 509–525.
- [186] Munde, M.; Ismail, M. A.; Arafa, R.; Peixoto, P.; Collar, C. J.; Liu, Y.; Hu, L.; David–Cordonnier, M.–H.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13732–13743.
- [187] Dardonville, C.; Brun, R. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2296–2307.
- [188] Wang, Z.–X. *FEBS Lett.* **1995**, *360*, 111–114.

Modificación funcional de BAPPA: sensibilización de lantánidos y FRET

Objetivo y diseño

Aprovechando la sencillez estructural y accesibilidad sintética de BAPPA, se pensó en la preparación de derivados con un punto de anclaje en el conector entre las dos unidades de benzamidinio, como el compuesto **43**, con el fin de incorporar grupos que pudiesen dar lugar a algún tipo de respuesta funcional interesante ligada a la interacción con el ADN. Una de las posibilidades consiste en acoplar un fluoróforo aceptor y así investigar la posibilidad de desplazar la emisión de luz de BAPPA a longitudes de onda mayores mediante procesos de transferencia de energía intramolecular.

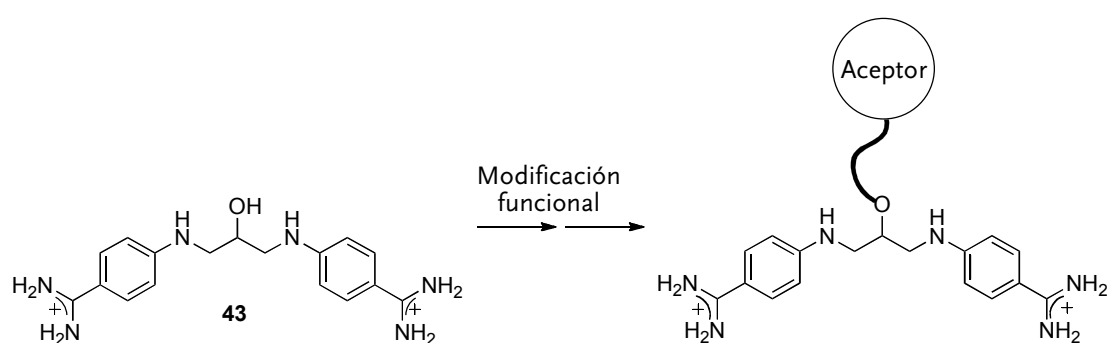


Figura 144. Estructura del derivado funcional de BAPPA hidroxibAPPA **43** e hipótesis de estudio.

En primer lugar se planteó la conjugación con un agente quelatante de lantánidos. La importancia de los lantánidos en la investigación de nuevos materiales y en la química biológica ha resurgido desde la pasada década, como lo prueba la existencia de un considerable número de revisiones recientes sobre esta temática [189]. Los lantánidos presentan unas características fisicoquímicas únicas, siendo especialmente interesantes sus propiedades espectroscópicas. Los cationes trivalentes de los iones lantánidos presentan bandas de absorción y de emisión que corresponden a transiciones $f \rightarrow f$, prohibidas por las reglas de Laporte^{xxvii} [190], con coeficientes de absorción muy bajos ($< 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lo que hace que la excitación directa sea ineficiente, a menos que se usen láseres muy potentes, o una elevadísima concentración de ión [191]. Esta dificultad puede solucionarse mediante el uso de un cromóforo que actúe como sensibilizador (*efecto antena*) [192]. El papel de la *antena* es absorber la energía procedente de la radiación UV-visible y transferirla al ión lantánido. El proceso de sensibilización consta de tres etapas (figura 145) que pueden visualizarse en la siguiente figura: excitación de la antena mediante la absorción de energía, que pasa entonces desde su estado fundamental hasta su estado excitado, seguido de un cruce de sistemas (ISC) hasta un estado triplete, desde él que tiene lugar una transferencia de energía intramolecular (TE) y finalmente, emisión de luz en la región del visible por parte del metal (Tb 545 nm y Eu 611 a 618 nm).

^{xxvii} Es una regla de selección relevante en la espectroscopía de los metales de transición, según la cual las transiciones que conserven su simetría o asimetría con respecto a un centro de inversión están teóricamente prohibidas.

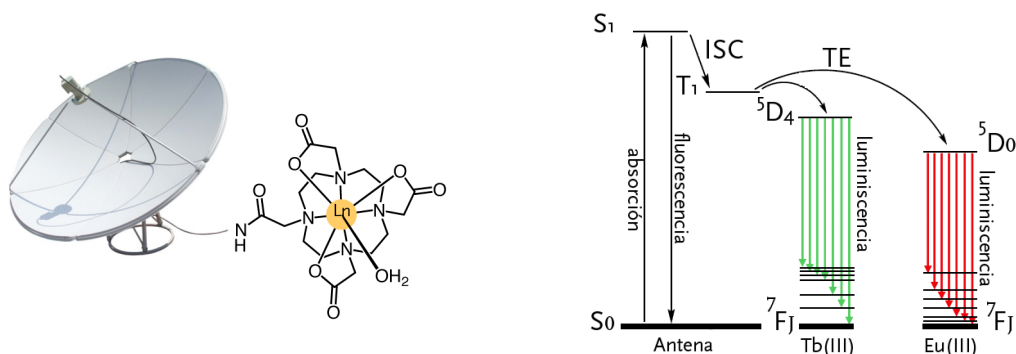


Figura 145. Izquierda: representación esquemática del efecto antena. Derecha: diagrama que muestra las principales rutas de transferencia de energía en el proceso de sensibilización para el terbio y el europio.

Los complejos luminiscentes de lantánidos ofrecen varias ventajas con respecto a las sondas tradicionales basadas en compuestos orgánicos [193]: a) gran desplazamiento de Stokes, lo que evita los problemas de autoabsorción dependientes de la concentración; b) el espectro de emisión de los lantánidos no se solapa, debido a las estrechas bandas de emisión de estos metales, lo que permite el uso simultáneo de sondas con diferentes lantánidos [194]; c) los tiempos de vida son largos, en el caso del Tb³⁺ y el Eu³⁺ son del orden milisegundos mientras que el habitual de los compuestos orgánicos suele ser de nanosegundos, esta característica es ideal para la detección en medios biológicos.

A pesar de sus ventajas, la luminiscencia de los lantánidos se desactiva de forma muy eficiente por el acoplamiento del estado excitado del ión con los niveles vibracionales del agua [195] pero este efecto no es igual en todos los elementos de la serie. Los complejos de Tb³⁺ y Eu³⁺ son los menos sensibles, por eso y por su emisión en la región del visible son los lantánidos más usados como sondas fluorescentes. De hecho, la complejación de ellos con calixirenos y 1, 4, 7, 10-tetraazadodecano (*cyclen*) [196] se ha usado satisfactoriamente en imagen médica, receptores para radiofármacos y sensores luminiscentes [197].

Por tanto, considerando todo lo expuesto, se pensó en un primer momento en modificar el derivado de BAPPA con un quelato DOTA[Ln] (Ln = Tb³⁺ y Eu³⁺) (**44**), de tal modo que se observase el proceso de transferencia únicamente en presencia de ADNs ricos A/Ts.

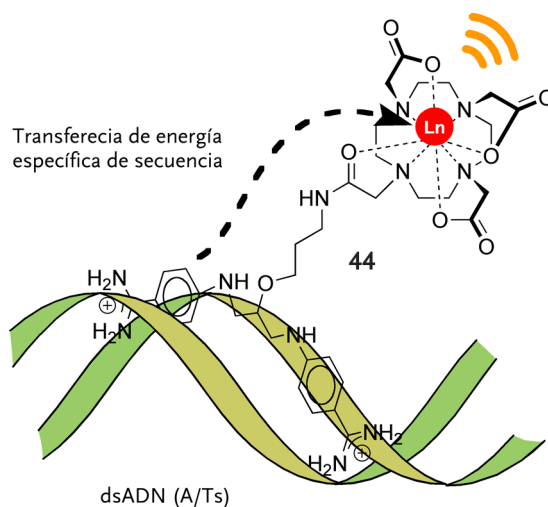
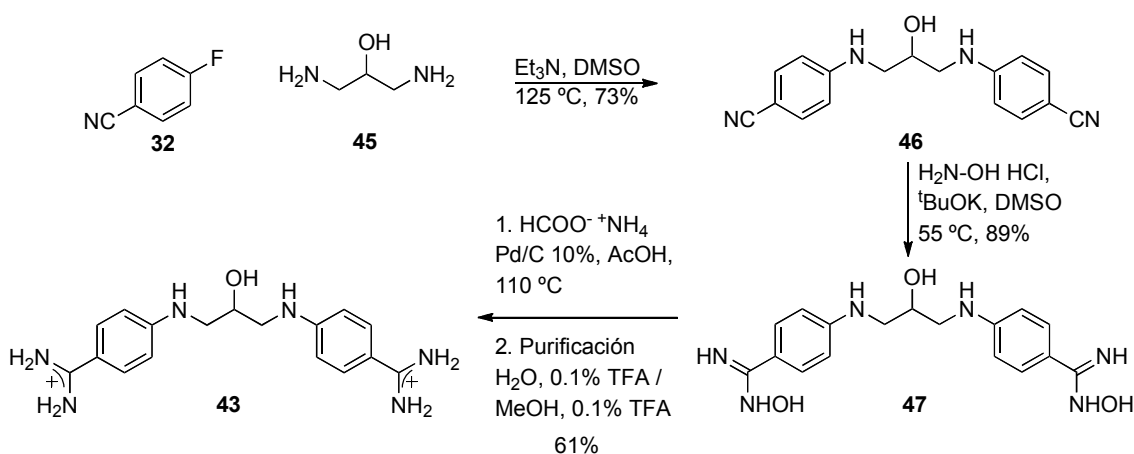


Figura 146. Proceso de sensibilización codificado por ADNs ricos en A/Ts.

Síntesis

Inicialmente el derivado **43** se intentó preparar de forma análoga a BAPPA (esquema 37); sin embargo, en este caso no se observó la conversión de la sustancia **46** en el diimidato correspondiente durante la reacción de apertura del nitrilo con HCl gas, incluso, dejando la reacción durante varios días. Por lo tanto, la síntesis se llevó a cabo mediante la formación de un intermedio hidroxilamino, siguiendo los procedimientos descritos para esta misma transformación en otros sustratos [198]. La bis(benzamidoxima) resultante se transformó directamente en el bis(benzoamidinio) deseado a través de una reducción usando formiato amónico [199].



Esquema 40. Síntesis del aza-bis(benzamidinio) con un hidroxilo como punto de anclaje **43**.

En la siguiente figura se puede ver el cromatograma del compuesto final después de la purificación y su espectro de absorción con un máximo similar a BAPPA, por lo que presumiblemente el nuevo compuesto compartirá las propiedades espectroscópicas con esta molécula. La identidad de los compuestos fue verificada por RMN y espectroscopía de masas.

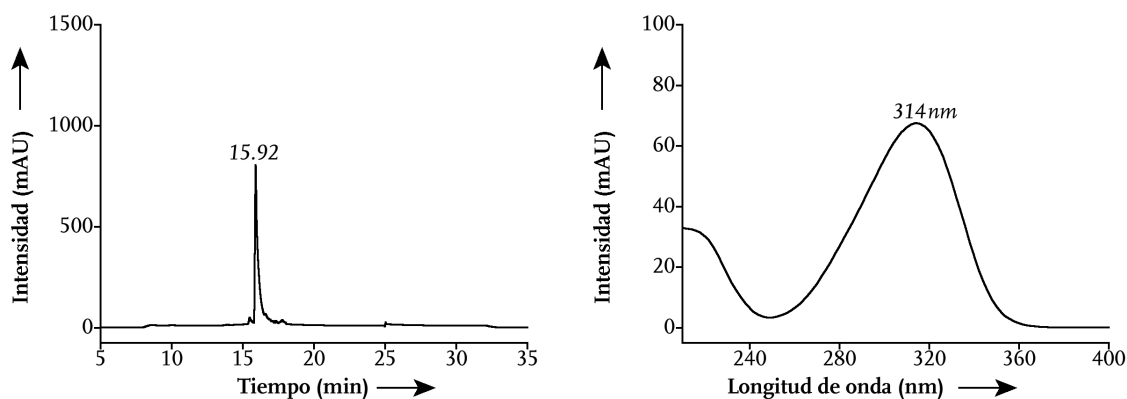
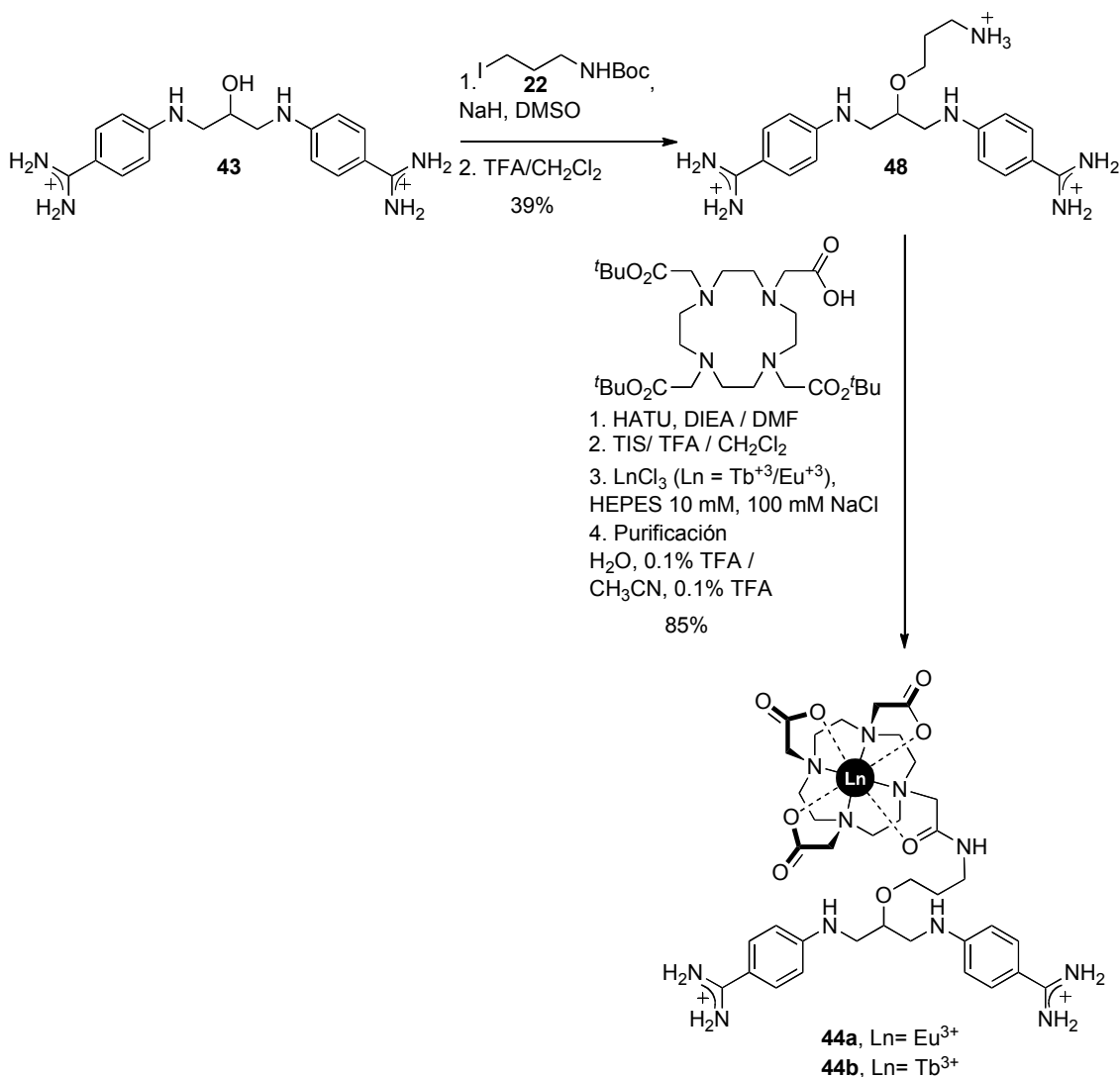


Figura 147. Izquierda: cromatograma de HPLC del compuesto **43**, gradiente 3, $\lambda = 222\text{ nm}$. Derecha: espectro de absorción.

Una vez sintetizado el compuesto **43**, el grupo hidroxilo se alquiló con el agente alquilante **22**, sintetizado previamente (esquema 27). La amina resultante de la desprotección del compuesto alquilado **48** se condensó con el macrociclo quelatante DOTA, protegido en todas sus posiciones salvo en una. La desprotección y complejación con el tricloruro de lantánido apropiado permitió obtener los conjugados macrocíclicos deseados (**44a/44b**).



Esquema 41. Síntesis de los conjugados con DOTA[Ln³⁺].

La complejación con el metal no provoca cambio en el tiempo de retención ni en el espectro de absorción, en comparación con la molécula conjugada con el quelato DOTA, desprovista del lantánido. Consecuentemente, sólo se muestra el cromatograma y el espectro de absorción para el caso del compuesto conjugado con DOTA [Eu³⁺] (**44a**) tras su purificación. Los compuestos **44a** y **44b** fueron caracterizados mediante RMN y espectroscopía de masas.

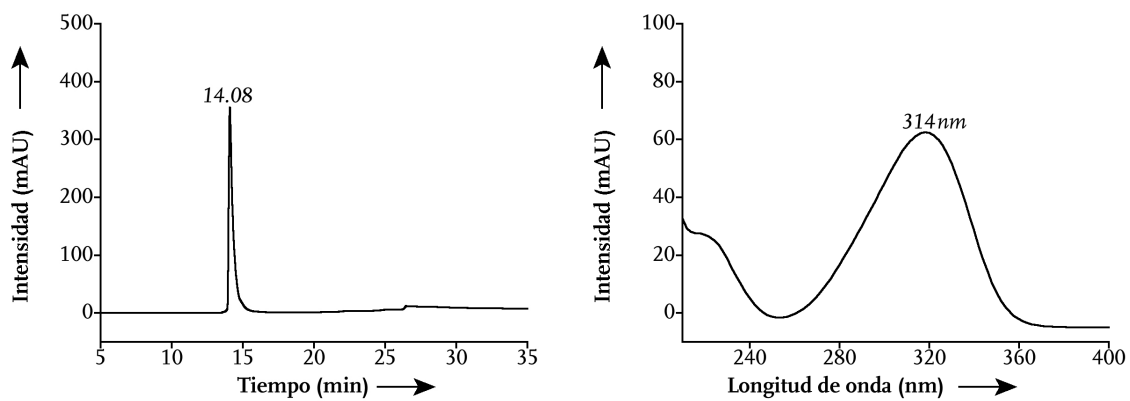


Figura 148. Izquierda: cromatograma de HPLC del compuesto **44a**, gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Interacción del derivado hidroxibAPPA 43 con el ADN

Antes de evaluar los derivados modificados, se estudió el perfil de unión al ADN del compuesto **43**. El análisis de la interacción se realizó de la misma forma que lo explicado en el caso de BAPPA, aprovechando el aumento de fluorescencia producido por su interacción con ADNs que contienen secuencias de reconocimiento ricas en A/Ts.

ADNh	Secuencia (5' a 3')
AAATTT	GGC AAATTT CGC TTTT GCG AAATTT GCC
AATTT	GGCG AATTT CGC TTTT GCG AATTT CGCC
AATT	GGCG AATT CAGC TTTT GCTG AATT CGCC
GGCC	GGCA GGCC CAGC TTTT GCTG GGCC TGCC

Tabla 13. Secuencias de los ADNs usados en las valoraciones.

Las valoraciones realizadas se muestran en las siguientes figuras.

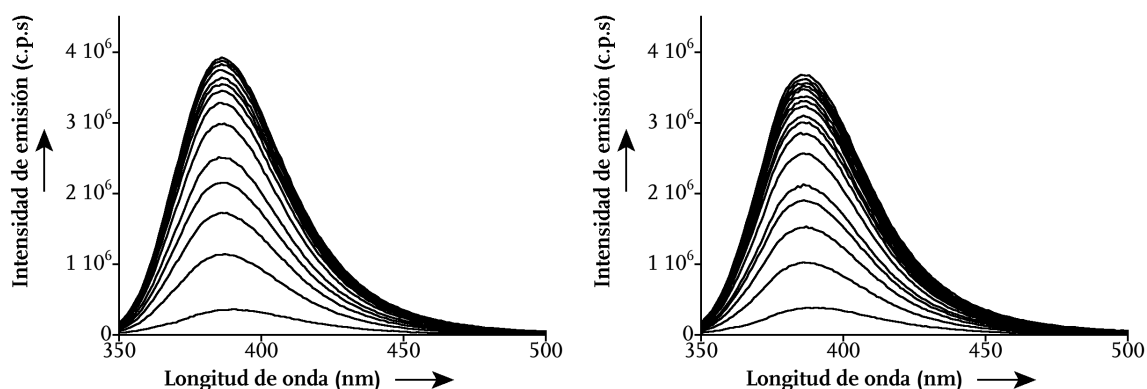


Figura 149. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración del hidroxibAPPA **43** con el ADN **AAATTT**. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración del hidroxibAPPA **43** con el ADN **AATTT**.

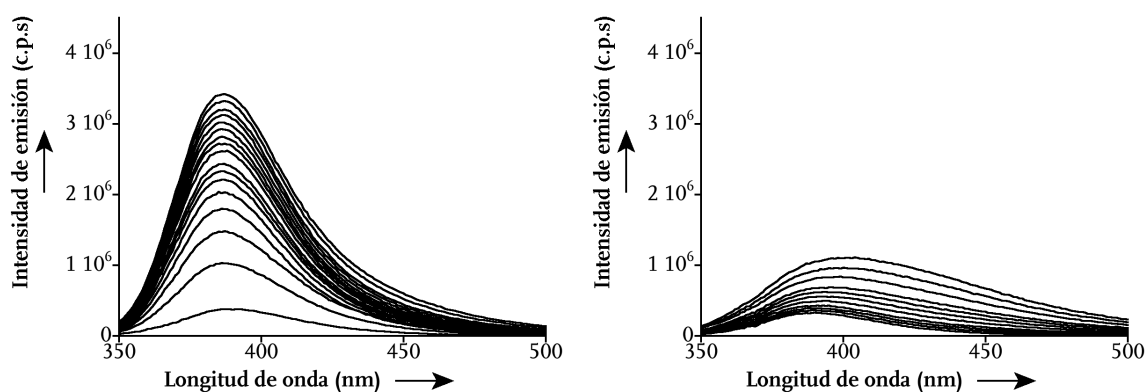
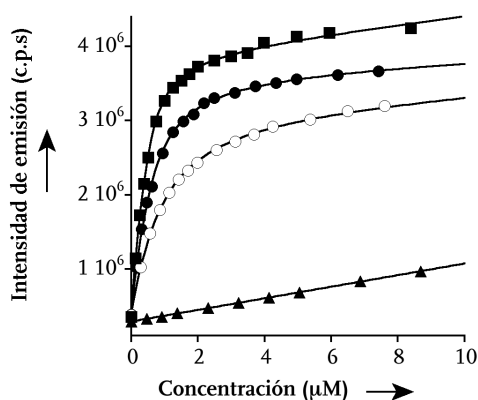


Figura 150. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración del hidroxibAPPA **43** con el ADN **AATT**. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración del hidroxibAPPA **43** con el ADN **GGCC**.

Al igual que lo observado con BAPPA, la adición de cantidades crecientes de ADN provoca un importante aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia a 387 nm. A diferencia de lo comentado para BAPPA, el aumento observado con el ADN **AAATTT** (y con los demás ADNs) pudo ajustarse a la ecuación que describe el modo de interacción 1:1 y que considera la contribución de la fluorescencia residual del ADN (véase la parte experimental para la derivación de la ecuación) [183]. El ajuste permitió la determinación de los valores de la constante de disociación para cada uno de los ADNs.



ADNh	K_D
AAATTT	101 ± 7 nM
AATTT	227 ± 33 nM
AATT	548 ± 35 nM
GGCC	N/C ^{xxviii}

Figura 151. Izquierda: representación de ajuste al modelo de interacción 1:1 de las valoraciones con los ADNs: **AAATTT** (■), **AATTT** (●), **AATT** (○), **GGCC** (▲). Derecha: valores de las constantes de disociación calculadas en cada caso.

Estos experimentos demostraron que la fluorescencia intrínseca del derivado **43** es dependiente de la secuencia así que, en líneas generales y su interacción con el ADN es similar a la de BAPPA.

^{xxviii} N/C: no calculada, ya que no se observó la saturación para este ADN incluso a concentraciones elevadas.

Estudio de los conjugados DOTA[Ln³⁺]

Las características espectroscópicas de los conjugados de lantánido **44a** y **44b** se estudiaron en ausencia y en presencia de los siguientes oligonucleótidos en horquilla:

ADNh	Secuencia (5' a 3')
AATTT	GGCG AATTT CGC TTTT GCG AAATT CGCC
AATT	GGCG AATTT CGC TTTT GCG AAATT CGCC
AATG	GGCG AATG CAGC TTTT GCTG CATT CGCC
GGCC	GGCA GGCC CAGC TTTT GCTG GGCC TGCC

Tabla 14. Secuencias de los ADNs usados en las valoraciones.

Como se esperaba, la irradiación a 329 nm de una disolución 0.5 μM en tampón Tris•HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM de los compuestos **44a** y **44b** no produce ningún cambio significativo en la emisión del metal. Asimismo, la adición de un ADN horquilla que no contiene la región de reconocimiento consenso de la unidad de bis(benzamidinio) (ADN **GGCC**), o bien, la de un ADN que posee una secuencia de pares de bases A/Ts menor de cuatro (ADN **AATG**), no afecta a la intensidad de la luminiscencia del complejo de lantánido. Sin embargo, la adición de un ADN horquilla **AATTT** induce, en ambos casos, a un importante aumento de las bandas de emisión de los metales (figura 152). A pesar de que la variación relativa en la intensidad de emisión en ambos conjugados es similar, la emisión del complejo de terbio se solapa con la cola de la banda de emisión del bis(benzamidinio), lo que provoca que el espectro sea menos claro. De la misma manera, la incubación de los conjugados con lantánido con el ADN **AATT** induce un incremento en la intensidad de emisión de los metales, aunque más débil que lo observado con el ADN **AATTT**.

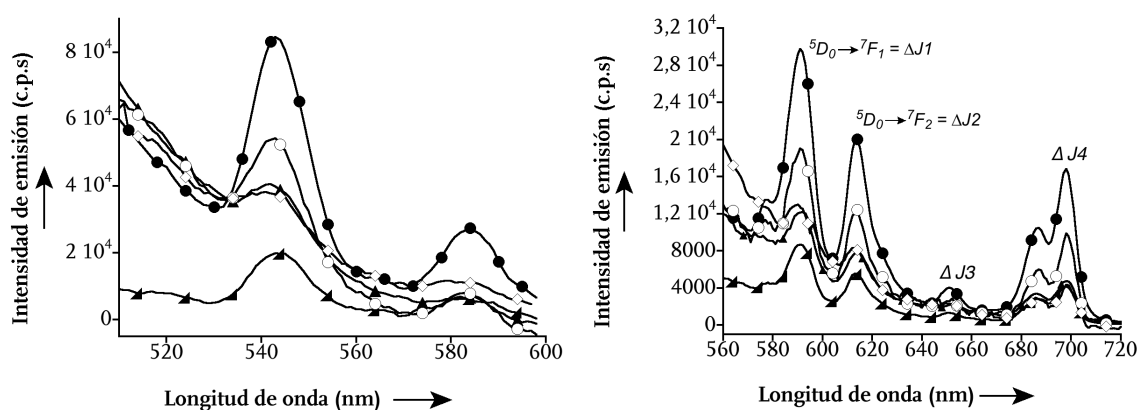


Figura 152. Izquierda: espectro de emisión del conjugado DOTA[Tb³⁺] (**44 b**) con sus bandas características. Derecha: espectro de emisión del conjugado DOTA[Eu³⁺] (**44 a**) con sus bandas características. En ambas figuras: espectro en ausencia de ADN (▲); con 9 equiv de ADN **GGCC** (▲); con 9 equiv de ADN **AATG** (◇); con 9 equiv de ADN **AATT** (○); con 9 equiv de ADN **AATTT** (●)

En el caso del complejo de Eu^{3+} , se observó un incremento de la intensidad de emisión de al menos cuatro veces en presencia del ADN **AATTT**. El perfil de emisión luminiscente observado es el típico de los complejos DOTA[Eu^{3+}] con geometrías de antiprisma cuadrado, caracterizado fundamentalmente por la presencia y la relación de intensidades de dos bandas: la *banda hipersensible* en torno a 618 nm debida a la transición ΔJ_2 ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) y otra más intensa situada más hacia el azul y correspondiente a la transición ΔJ_1 ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$) [200].

Resumiendo, estos experimentos muestran que se ha logrado, por primera vez, la sensibilización de los lantánidos usando un compuesto cuya fluorescencia está determinada por la secuencia de ADN empleada. Estos descubrimientos establecen las bases para desarrollar nuevas sondas de lantánidos dependientes de ADN.

Proceso de transferencia de energía: conjugado BAPPA–cumarina

Al demostrar la posibilidad de usar de los bis(benzamidinos) como antenas de lantánidos en donde la transferencia de energía está desencadenada por ADN's ricos en A/T's, se pensó que el uso de otros aceptores orgánicos podrían dar lugar a un proceso de transferencia de energía más eficiente y una emisión más intensa. En concreto, se pensó en conjugar al compuesto hidroxibAPPA **43** a una cumarina para dar el compuesto **49**.

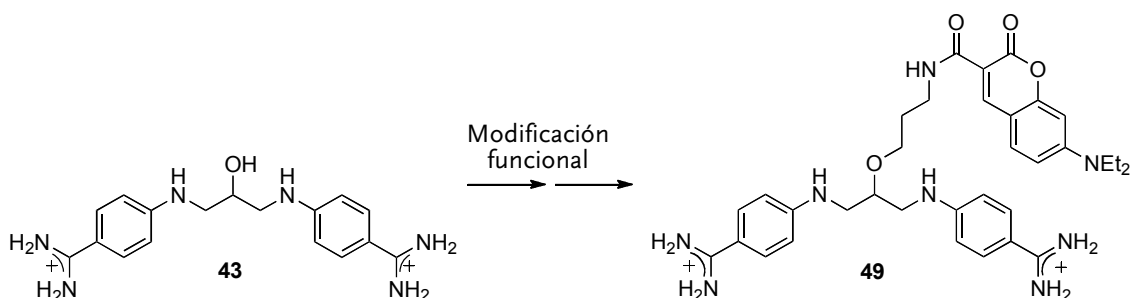
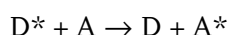


Figura 153. Modificación funcional del derivado de BAPPA **43** para dar el conjugado BAPPA–cumarina **49**.

En este caso la transferencia de energía se produciría mediante la interacción entre los estados electrónicos excitados de dos fluoróforos. La excitación se transfiere de un dador (D) a un aceptor (A) sin emisión de fotones en un proceso conocido con el acrónimo de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) [201].



Para que la transferencia de energía entre dos fluoróforos sea eficiente es fundamental la combinación de especies con niveles de energía adecuados. Este requerimiento energético puede visualizarse fácilmente analizando el solapamiento del espectro de emisión del dador y el de absorción del aceptor. Para nuestro caso particular, usando la unidad *aza*-bis(benzamidino) como dador, se pensó en utilizar como aceptor la 7-(dietilamino)cumarina debido al buen solapamiento entre el espectro de emisión de BAPPA y el de absorción de la cumarina.

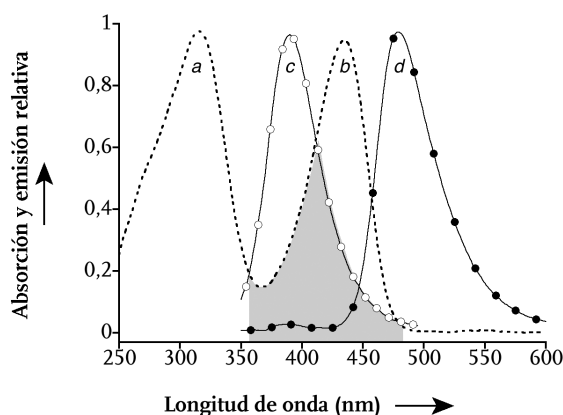
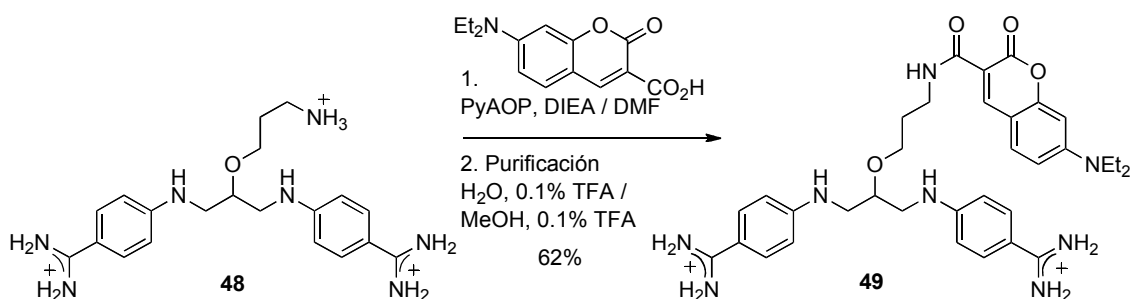


Figura 154. Línea discontinua espectro de absorción del conjugado cumarina **49**, compuesto por las dos bandas características de cada cromóforo: a) absorción de la unidad *aza*-bis(benzamidino), b) absorción de la cumarina. Línea continua: emisión de fluorescencia de BAPPA (○) y del conjugado cumarina **49** (●).

Para la síntesis del derivado **49** con cumarina, el amino-bis(benzamidinio) alquilado **48**, sintetizado anteriormente (esquema 41) se acopló directamente con el ácido comercial 7-(diethylamino)cumarina-3-carboxílico utilizando PyAOP como agente activante [202]. El compuesto resultante se purificó y se caracterizó mediante RMN y espectroscopía de masas.



Esquema 42. Síntesis del conjugado cumarina **49**.

El espectro de absorción del compuesto **49** es consistente con la presencia de los dos cromóforos, observándose, de este modo, en el espectro dos máximos de absorción correspondientes a cada uno de los cromóforos: 314 nm del derivado de BAPPA y 436 nm de la unidad de cumarina.

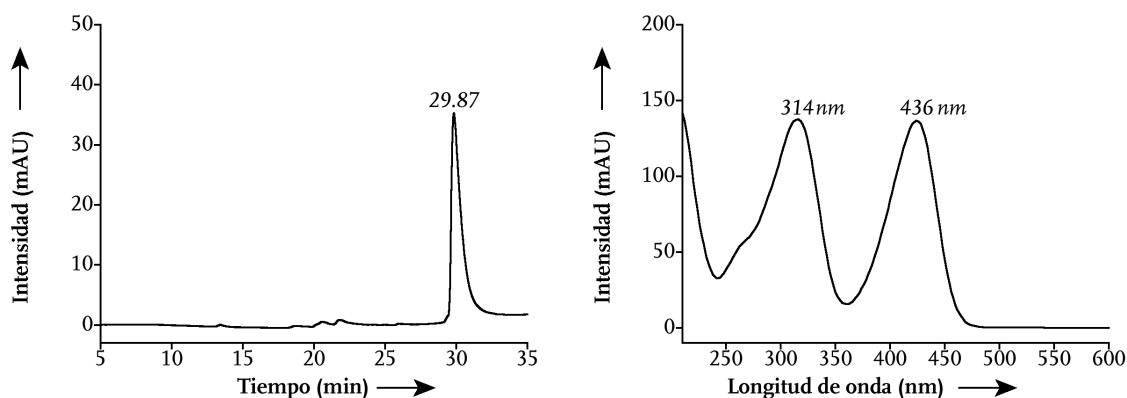


Figura 155. Izquierda: cromatograma de HPLC del compuesto **49**, gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

A continuación, se estudiaron las propiedades de fluorescencia del conjugado de cumarina **49**. Se observó que la emisión de fluorescencia después irradiar la molécula a 329 nm es muy débil y está totalmente dominado por la banda de emisión de la cumarina a 472 nm. Al adicionar el ADN horquilla **AATTT** se observó un aumento de aproximadamente 60 veces en la fluorescencia de la cumarina. Dicho aumento es tan grande que permitió la detección a simple vista de pequeñas cantidades de ADN (< de 3 ng), como puede verse en el recuadro de la figura 156. Por lo tanto, la conjugación del bis(benzamidinio) con la cumarina da lugar a una sonda cuya fluorescencia aumenta al unirse específicamente a su secuencia consenso AATTT y además presenta un incremento del desplazamiento de Stokes (10,559 cm⁻¹) en comparación con BAPPA.

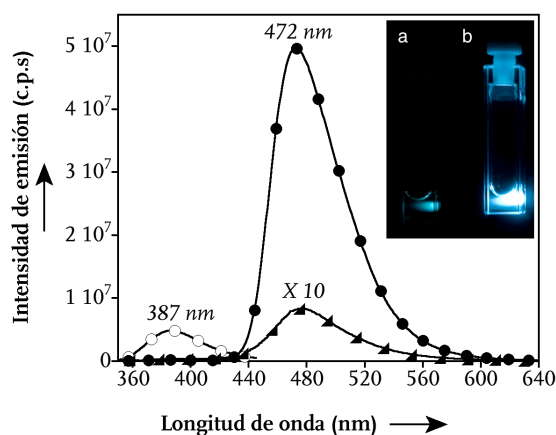


Figura 156. Emisión de fluorescencia de: BAPPA con 9 equiv de ADN AATTT (○); del conjugado cumarina 49 sólo (▲) aumentada en 10 veces su intensidad; de este conjugado 49 en presencia de 9 equiv de ADN AATTT (●). En el recuadro se muestran las cubetas con 500 nM del conjugado cumarina 49 y: a) sin ADN; b) con 2 equiv de ADN AATTT.

Posteriormente se evaluó la selectividad de la interacción a través de valoraciones fluorescentes y usando los siguientes oligonucleótidos horquilla:

ADNh	Secuencia (5' a 3')
AATTT	GGCG AATTT CGC TTTTT GCG AAATT CGCC
AATT	GGCG AATT CAGC TTTTT GCTG AATT CGCC
AATG	GGCG AATG CAGC TTTTT GCTG CATT CGCC
GGCC	GGCA GGCC CAGC TTTTT GCTG GGCC TGCC

Tabla 15. Secuencias de los ADNs usados en las valoraciones.

En las siguientes figuras se muestran las valoraciones realizadas.

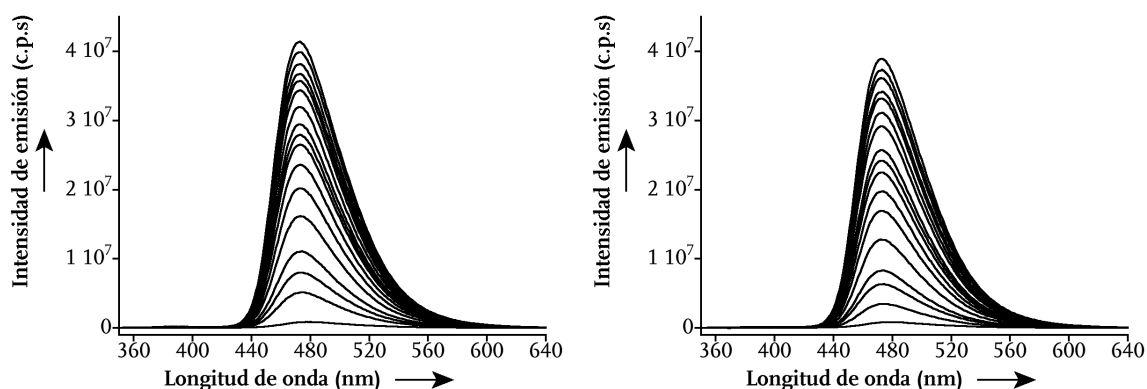


Figura 157. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración del conjugado cumarina 49 con el ADN AATTT. Derecha: espectros de fluorescencia del conjugado cumarina 49 con el ADN AATT.

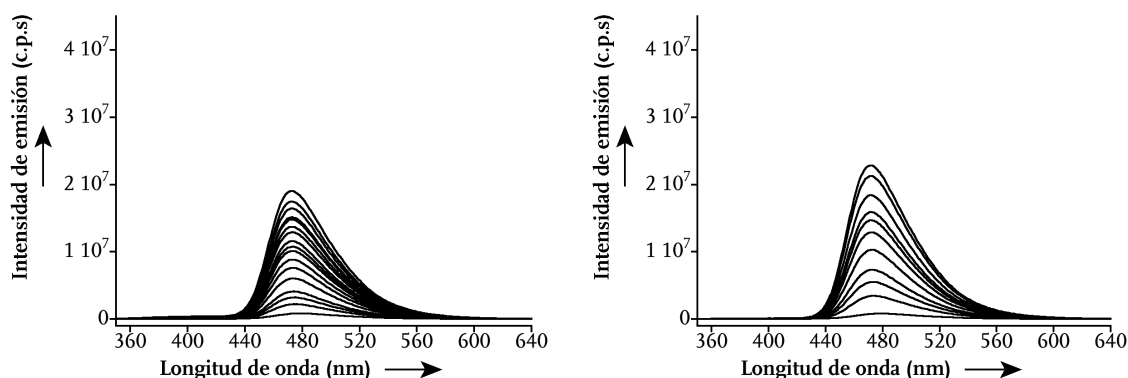
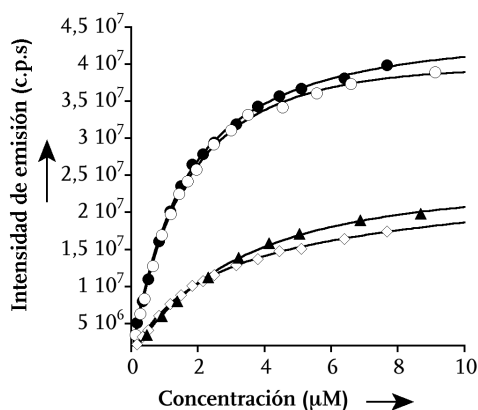


Figura 158. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración del conjugado cumarina **49** con el ADN **AATG**. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración del conjugado cumarina **49** con el ADN **GGCC**.

Al igual que lo observado con los otros derivados de BAPPA, la adición de cantidades crecientes de ADN provoca un aumento en la fluorescencia; este aumento de la intensidad de emisión a 472 nm pudo ajustarse en todos los casos a la ecuación que describe el modo de interacción 1:1 y que considera la contribución de la fluorescencia residual del ADN (véase la parte experimental para la derivación de la ecuación) [183]. El ajuste permitió la determinación de los valores de la constante de disociación para cada uno de los ADNs.



ADNh	K_D
AATTT	814 ± 9 nM
AATT	1.4 ± 0.2 μ M
AATG	2.38 ± 0.3 μ M
GGCC	3.81 ± 0.7 μ M

Figura 159. Izquierda: representación del ajuste al modelo de interacción 1:1 de las valoraciones con los ADNs: **AATTT** (●), **AATT** (○), **AATG** (◇), **GGCC** (▲). Derecha: valores de las constantes de disociación calculadas en cada caso.

El hecho de tener la cumarina en el conjugado parece tener consecuencias importantes en la selectividad y la afinidad, que resultaron ser ligeramente inferiores que en los otros derivados. Esta diferencia en la interacción podría atribuirse al efecto de la cumarina ya que se conocen casos en los que la fluorescencia de los derivados de cumarina es dependiente del ADN [203]. Para ver el efecto del ADN sobre la fluorescencia de la cumarina se analizó la fluorescencia del compuesto sólo y en presencia de los ADNs **AATTT** y **GGCC** excitando a la longitud de onda de la cumarina, (432 nm), los datos obtenidos se compararon con los espectros análogos excitando a la longitud de onda de BAPPA (329 nm).

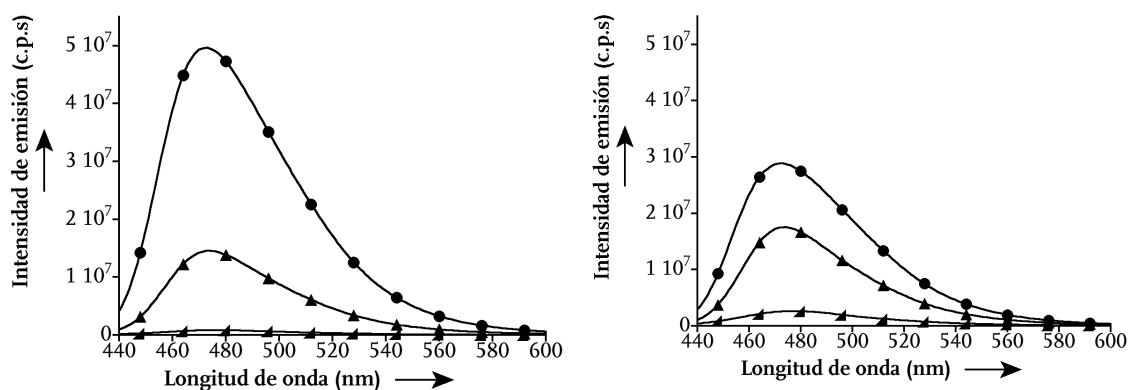


Figura 160. Izquierda: espectros de emisión a 329 nm. Derecha: espectros de emisión a 432 nm. En ambos casos: espectro del conjugado cumarina **49** solo (▲); de este conjugado **49** con 9 equiv de ADN GGCC (▲) y de este conjugado en presencia de 9 equiv de ADN AATTT (●)

Se observó que al excitar únicamente la cumarina (432 nm), la intensidad de emisión depende de la presencia del ADN en el medio, pero la secuencia de éste no tiene un efecto tan drástico como cuando se excita el derivado de BAPPA (329 nm); esto parece confirmar la existencia de una cierta interacción no específica entre la unidad de cumarina y los ADNs.

Conclusiones

Se ha descrito un nuevo proceso de sensibilización de lantánidos inducido por un determinado tipo de secuencias de ADN, logrando una emisión luminiscente a longitudes de onda en la región del visible a través de un proceso que implica, una transferencia de energía intramolecular. Además, se ha demostrado también la posibilidad de usar esta estrategia de una forma general usando, incluso, otros aceptores orgánicos, lo que permite lograr procesos de transferencia de energía más eficiente y más intensa sin perder su dependencia de la secuencia de ADN.

Estos descubrimientos abren la puerta a nuevos estudios y al desarrollo de nuevas versiones de compuestos similares para ser utilizados como sondas luminiscentes en la detección específica de secuencias de ADN de doble cadena, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

El trabajo incluido en este capítulo ha dado lugar a una solicitud de patente y a un artículo:

Vázquez, O.; Sánchez, M. I.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L. Compuestos derivados de bis-benzamidinos como agentes fluorogénicos para señalar secuencias específicas de ADN de doble cadena. N° Solicitud: P2010000561, **2010**.

Vázquez, O.; Sánchez, M. I.; Mascareñas, J. L.; Vázquez, M. E. dsDNA-triggered energy transfer and lanthanide sensitization processes. Luminescent probing of specific A/T sequences. *Chem. Com.* **2010**, *en prensa*, DOI: 10.1039/b927305k.

Estudios iniciales de internalización celular y actividad

En colaboración con el profesor José Martínez–Costas se realizaron estudios preliminares del proceso de internalización en células HeLa y de las propiedades de emisión fluorescentes del derivado de hidroxibAPPA **43** y del conjugado cumarina **49** *in vivo*.

En el caso del compuesto **43** fue posible observar fluorescencia concentrada en los núcleos celulares (claramente diferenciada de la autofluorescencia del fondo) usando un sistema de filtros que nos permite excitar a 360–370 nm y recoger a partir de 420 nm.

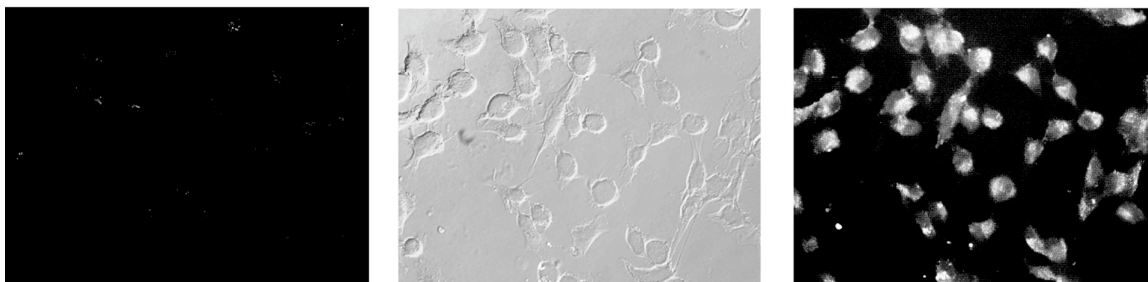


Figura 161. Izquierda: experimento control en el que no se añadió el derivado **43**. Centro: imagen de luz blanca de las células HeLa después de la incubación de **43** durante 30 min. Derecha: mismas células mostrando la fluorescencia localizada en el núcleo celular. Las imágenes originales fueron intensificadas simultáneamente mediante una manipulación global de los valores individuales de los canales RGB.

Para el conjugado cumarina también se utilizó el mismo sistema de filtros, observándose fluorescencia como resultado de la excitación de la unidad de cumarina. El conjugado es capaz de entrar en las células después de una incubación de 30 min, pero a diferencia de lo observado con los compuestos de tipo tripirrol–octaarginina, la distribución no es uniforme, y se observan también una elevada concentración de compuesto en la membrana nuclear formando vesículas.

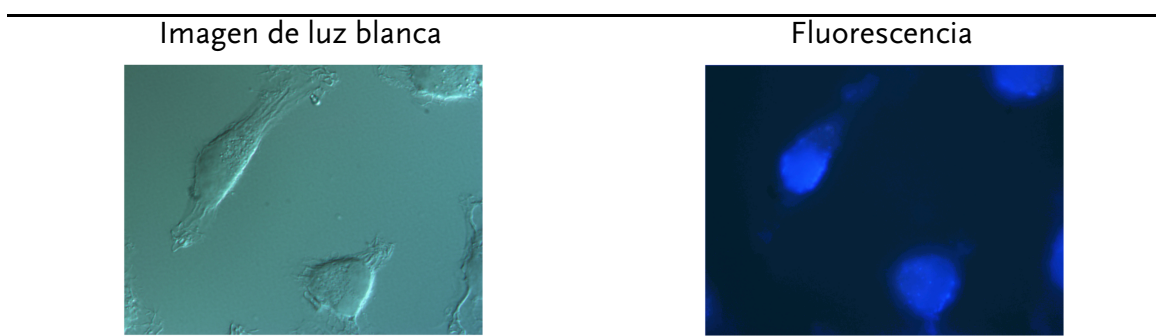


Figura 162. Estudios de internalización del conjugado **49**. Izquierda: imagen de luz blanca. Derecha: fluorescencia recogiendo a 420 nm.

Puesto que la baja longitud de onda de excitación de BAPPA limita la capacidad para excitarla selectivamente y observar el proceso de transferencia *in vivo* usando un microscopio convencional, se pensó que quizá, mediante el uso de técnicas de multifotón podría salvarse este inconveniente.

Las técnicas de excitación de multifotón se basan en la absorción simultánea de dos fotones en un único evento cuántico para conseguir la transición electrónica al estado excitado. Como la energía de un fotón es inversamente proporcional a su longitud de onda, los dos fotones absorbidos han de tener una longitud de onda el doble de la utilizada en una excitación tradicional con un único fotón. Por lo tanto, la excitación del *aza-bis(benzamidinio)* a, aproximadamente, 330 nm podría realizarse mediante dos fotones de luz visible a 660 nm, que alcanzarán el fluoróforo simultáneamente (dentro de un intervalo de 1×10^{-18} s). Para poder generar un número significativo de eventos de absorción simultánea de dos fotones la densidad del haz de luz ha de ser aproximadamente un millón de veces la requerida para la absorción normal de un fotón, por lo que es necesario el uso de fuentes de alta potencia como láseres. Una vez alcanzado el estado excitado, el proceso de emisión es el mismo que el producido por la excitación normal con un fotón.

Las pruebas se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) que dispone de un microscopio confocal multifotón adecuado para esta técnica. Lamentablemente, en un primer intento no se detectó la transferencia de energía *in vivo*.

Con respecto a la actividad de los compuestos de tipo bis(benzamidinio) el Dr. Luque Ortega del CIB realizó estudios similares a los explicados anteriormente para los compuestos de tipo octaarginina. En la siguiente figura se muestran los compuestos incubados con células de promastigotes de *Leishmania donovani*.

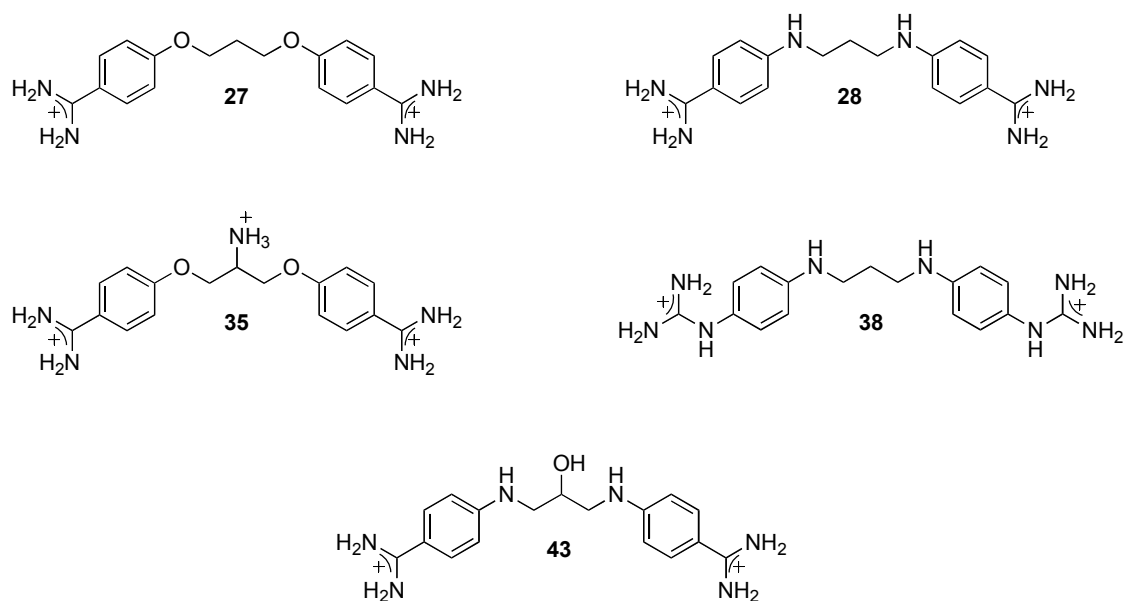


Figura 163. Estructura de los compuestos ensayados.

Tras una incubación inicial a 50 μ M, se estudió la dependencia de la concentración de los compuestos activos, aquellos que inhibían el crecimiento. Estos estudios le permitieron determinar la concentración letal media (LC_{50}) para la propamidina **27** (4.54 ± 2.16) μ M y BAPPA **28** (39.37 ± 7.6) μ M. La toxicidad de estos derivados, en ambos casos, es inferior a lo que se había observado para el conjugado octaarginina–tripirrol **B_{1A}** [$LC_{50} = (1.26 \pm 0.14)$ μ M], lo que pone de manifiesto que las mejores propiedades de transporte y/o de afinidad de este conjugado **B_{1A}** repercuten en su actividad.

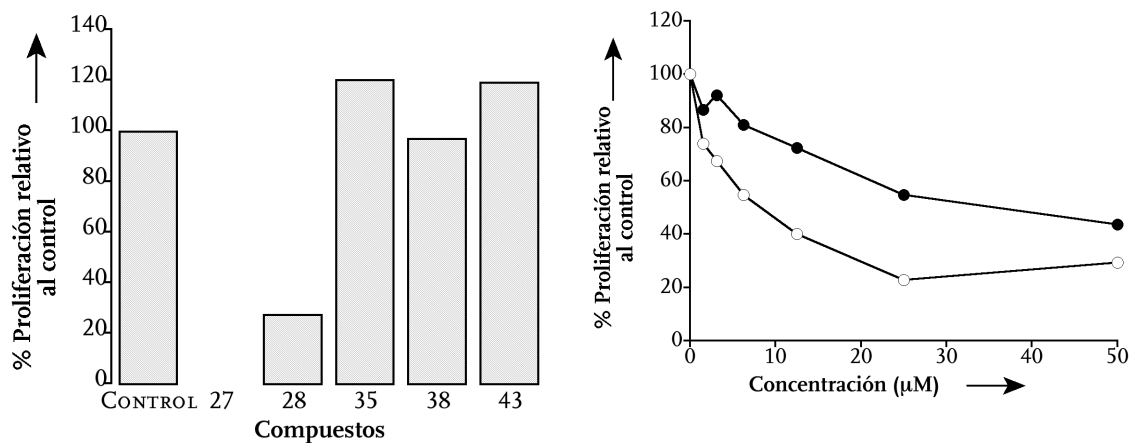


Figura 164. Izquierda: estudio inicial con los compuestos. Derecha: estudio de la dependencia de la concentración de la propamidina (27) ○ y BAPPA (28) ● en el porcentaje de proliferación celular.

Bibliografía

- [189] a) Bünzli, J.-C. G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729–2755. b) Binnemans, K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283–4374. c) Wang, F.; Xiaogang, L. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 976–989. d) Montgomery, C. P.; Murray, B. S.; New, E. J.; Pal, R.; Parker, D. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 925–937.
- [190] Laporte, O.; Meggers, W. F. *J. Opt. Soc. Am.* **1925**, *11*, 459–460.
- [191] Leonard, J. P.; Nolan, C. B.; Stomeo, F.; Gunnlaugsson, T. *Top Curr. Chem.* **2007**, *281*, 1–43.
- [192] Moore, E. G.; Samuel, A. P. S.; Raymond, K. N. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 542–552.
- [193] a) Thibon, A.; Pierre, V. C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 107–120. b) dos Santos, C. M. G.; Harte, A. J.; Quinn, S. J.; Gunnlaugsson, T. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 2512–2527.
- [194] Tremblay, M. S.; Sames, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7570–7577.
- [195] Dickins, R. S.; Bruce, J. I.; Parker, D.; Tozer, D. J. *Dalton Trans.* **2003**, *32*, 1264–1271.
- [196] Lukes, I.; Kotek, J.; Vojtisek, P.; Hermann, P. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216*, 287–311.
- [197] Parker, D. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 109–130.
- [198] a) Ismail, M. A.; Brun, R.; Wenzler, T.; Tanious, T. A.; Wilson, D.; Boykin, D. W.; *Bio. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5405–5413. b) Charton, J.; Cousaert, N.; Bochu, C.; Willand, N.; B. Déprez, B.; Deprez-Poulain, R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1479–1483.
- [199] a) Anbazhagan, M.; Boykin, D. W.; Stephens, C. E. *Synthesis* **2003**, *16*, 2467–2469. b) Johnstone, R. A. W.; Wilby, A. H.; Entwistle, I. D. *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 129–170. c) Ram, S.; Ehrenkauf, R. E. *Synthesis*. **1988**, *2*, 91–95.
- [200] Aime, S.; Botta, M.; Parker, D.; Howard, J. A. K. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 17–23.
- [201] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, ISBN: 3–527–29919–X, WILEY–VCH, Weinheim, **2002**; capítulo 4
- [202] Albericio, F.; Bofill, J. M.; Ayman, E.-F.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678–9683.
- [203] Seela, F.; Xiong, H.; Leonard, P.; Budow, S. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1374–1387.

Anclajes alternativos en el surco menor: híbridos bis(benzamidinio)

Objetivo y diseño

Uno de los motivos por los que comenzamos nuestro estudio sobre los compuestos de tipo bis(benzamidinio) estaba relacionado con la sustitución del tripirrol de los híbridos péptido–tripirrol por una unidad más sencilla. Por ello nos planteamos la síntesis y evaluación de nuevos híbridos bivalentes donde los compuestos de tipo bis(benzamidinio) constituyen la unidad de reconocimiento del surco menor.

En concreto, se diseñaron dos híbridos: uno análogo a los híbridos A₁₋₅ constituido por la región básica del factor de transcripción GCN4 y por un compuesto de tipo propamidina y otro, en donde la unidad de reconocimiento del surco mayor es el dominio Cys₂His₂ del factor de transcripción GAGA, análogo a los híbridos C₁₋₅, pero a diferencia de ellos la unidad de reconocimiento del surco menor es un compuesto de tipo aza–bis(benzamidinio).

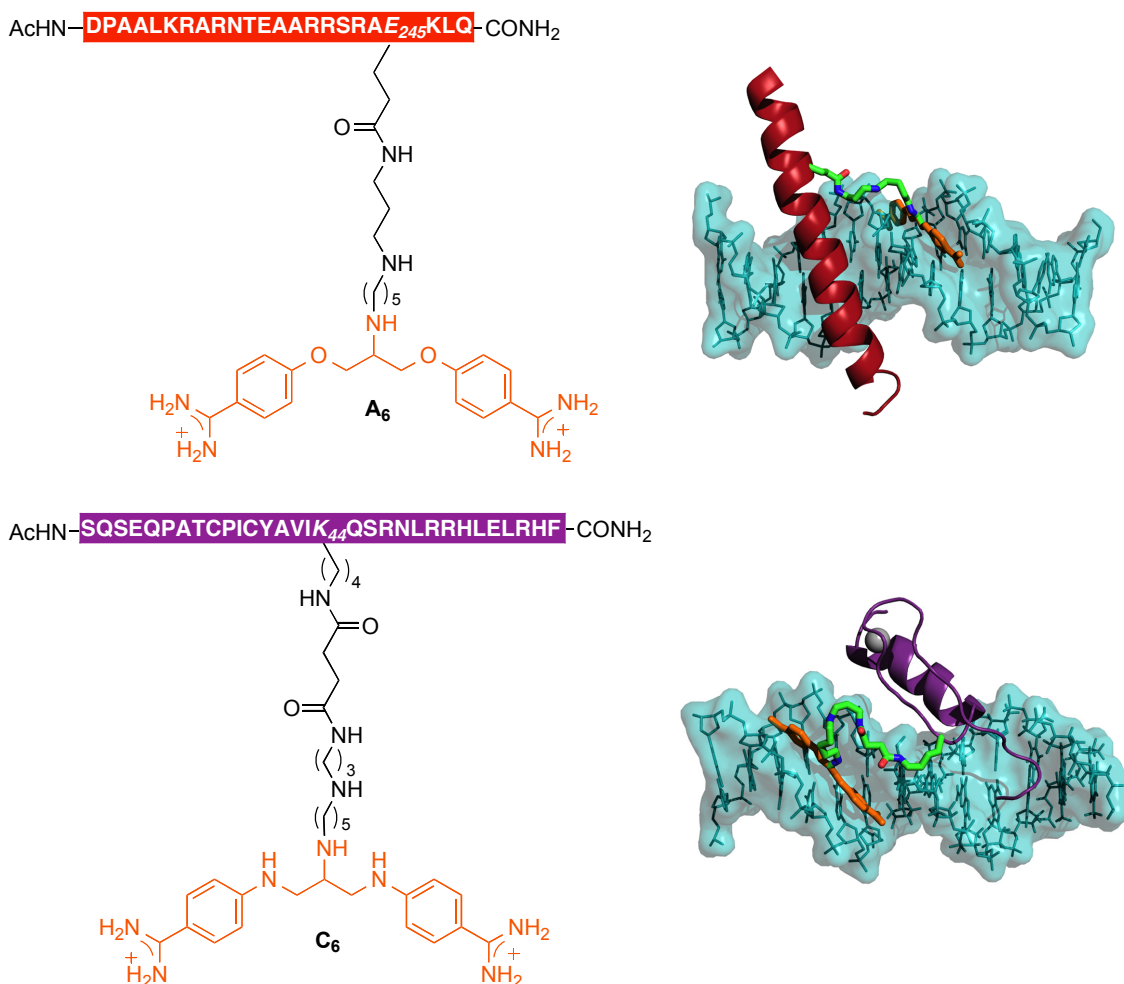
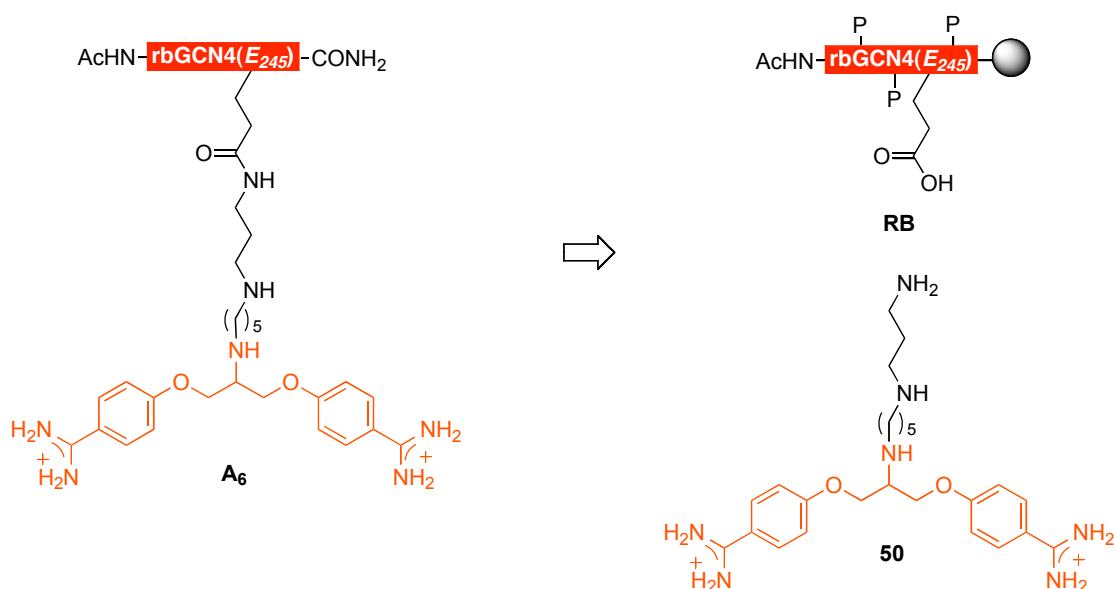


Figura 165. Izquierda: estructura de los híbridos bivalentes en donde la unidad de reconocimiento del surco menor es un compuesto de tipo bis(benzamidinio). Derecha: modo de interacción hipotético de los híbridos.

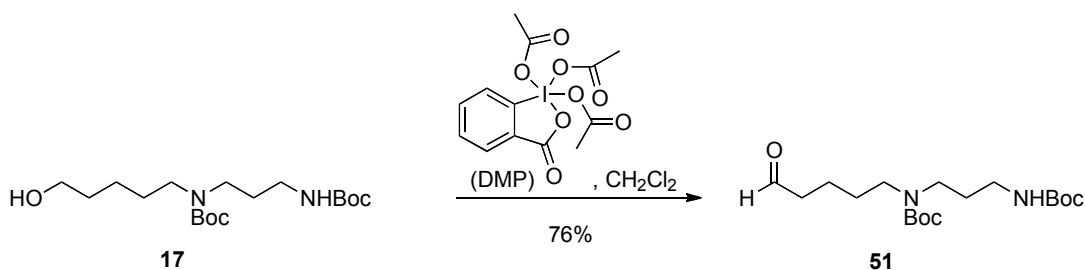
Síntesis

La síntesis del híbrido A_6 se realizó siguiendo la misma estrategia empleada anteriormente para los híbridos con tripirroles; esto es, llevando a cabo un acoplamiento entre un bis(benzamidinio) provisto de la cadena lateral adecuada y el péptido unido a la resina y desprotegido ortogonalmente en el residuo de Glu de la posición 245 (E_{245}). La síntesis de la parte peptídica y la desprotección selectiva del grupo Alilo del residuo E_{245} ya fue explicada anteriormente (esquema 7) por lo que la discusión de la preparación de este híbrido se centrará en la síntesis de la propamidina alquilada y el acoplamiento con la región básica.



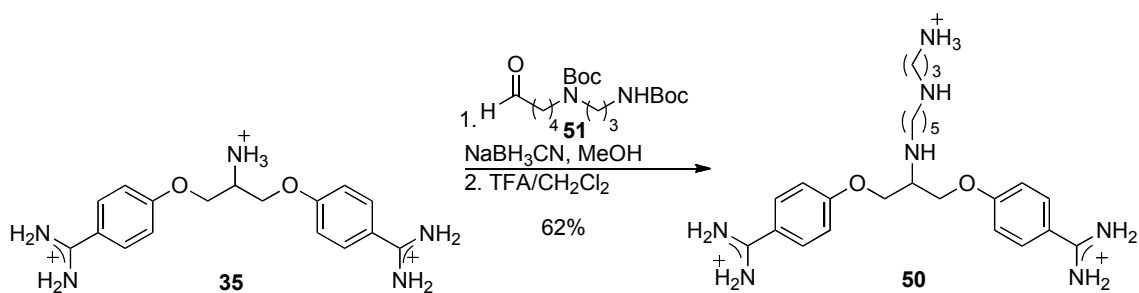
Esquema 43. Análisis retrosintético del híbrido A_6 .

La propamidina alquilada se preparó a través de una aminación reductora [204] para lo que fue necesario preparar inicialmente el aldehído **51**. Este se sintetizó mediante la oxidación del compuesto **17** previamente preparado (esquema 11) con peryodinano de Dess–Martin (DMP) [205].



Esquema 44. Oxidación con el reactivo de Dess–Martin para obtener el aldehído **51**.

A continuación, el compuesto **50** se sintetizó mediante una condensación entre el recién preparado aldehído **51** y el bis(benzamidinio) **35**; posteriormente los grupos protectores de las aminas se desprotegeron del modo habitual con una mezcla de TFA/ CH_2Cl_2 .



Esquema 45. Síntesis de la propamidina alquilada 50.

La reacción de alquilación se siguió y se purificó mediante cromatografía en fase reversa. La identidad del compuesto se corroboró por RMN y espectroscopía de masas. En la siguiente figura puede verse el cromatograma del producto puro y su espectro de absorción con el máximo a 260 nm, característico de los compuestos de tipo propamidina.

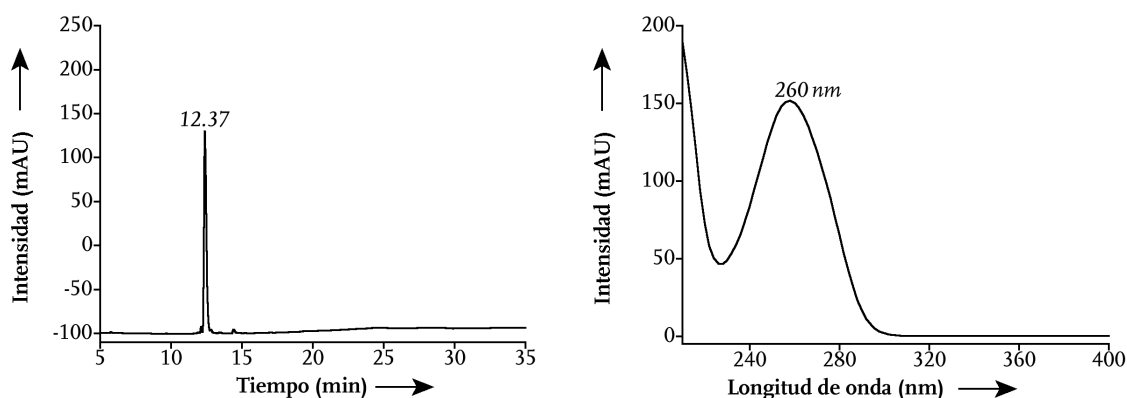
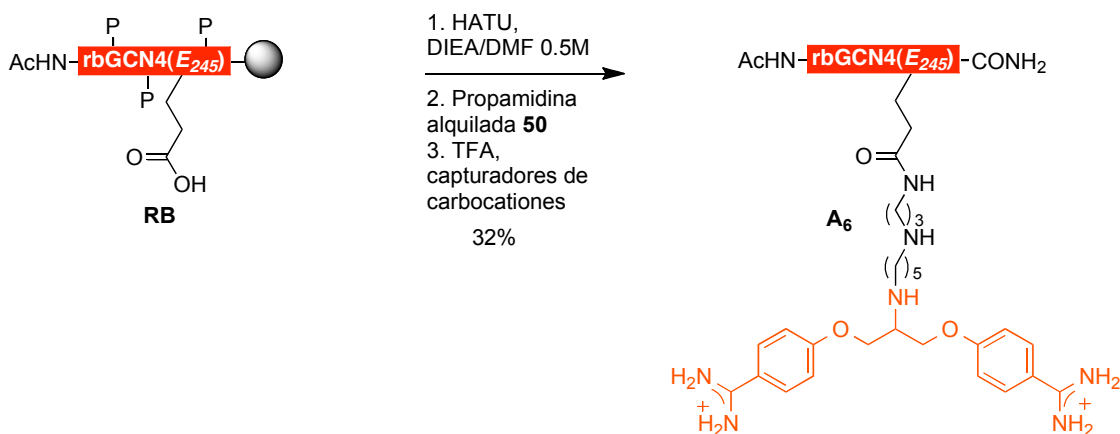


Figura 166. Izquierda: cromatograma de HPLC de la propamidina alquilada 50, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

El acoplamiento entre la propamidina alquilada y el residuo de Glu se realizó de la misma forma que en el caso de los híbridos con tripirrol (esquema 8). El cromatograma de HPLC del crudo de reacción y su espectro de absorción se muestran en la figura 167.

Esquema 46. Síntesis en fase sólida del híbrido A₆.

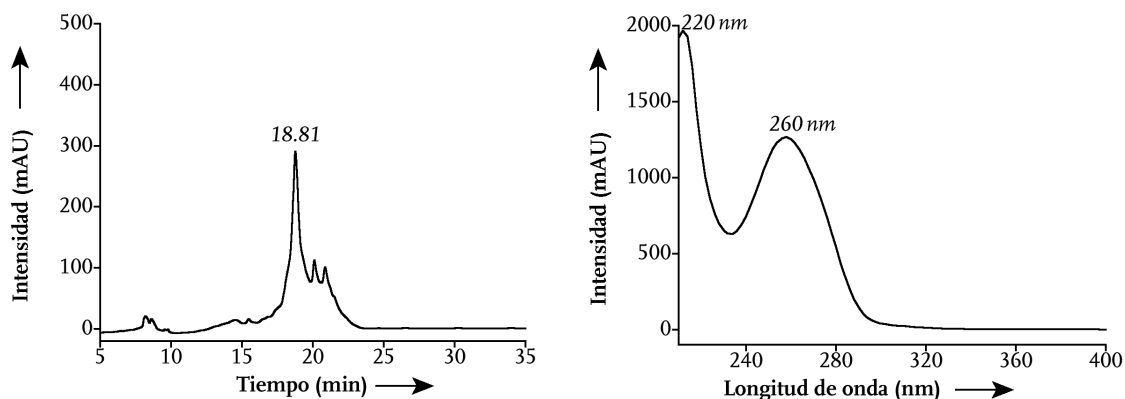
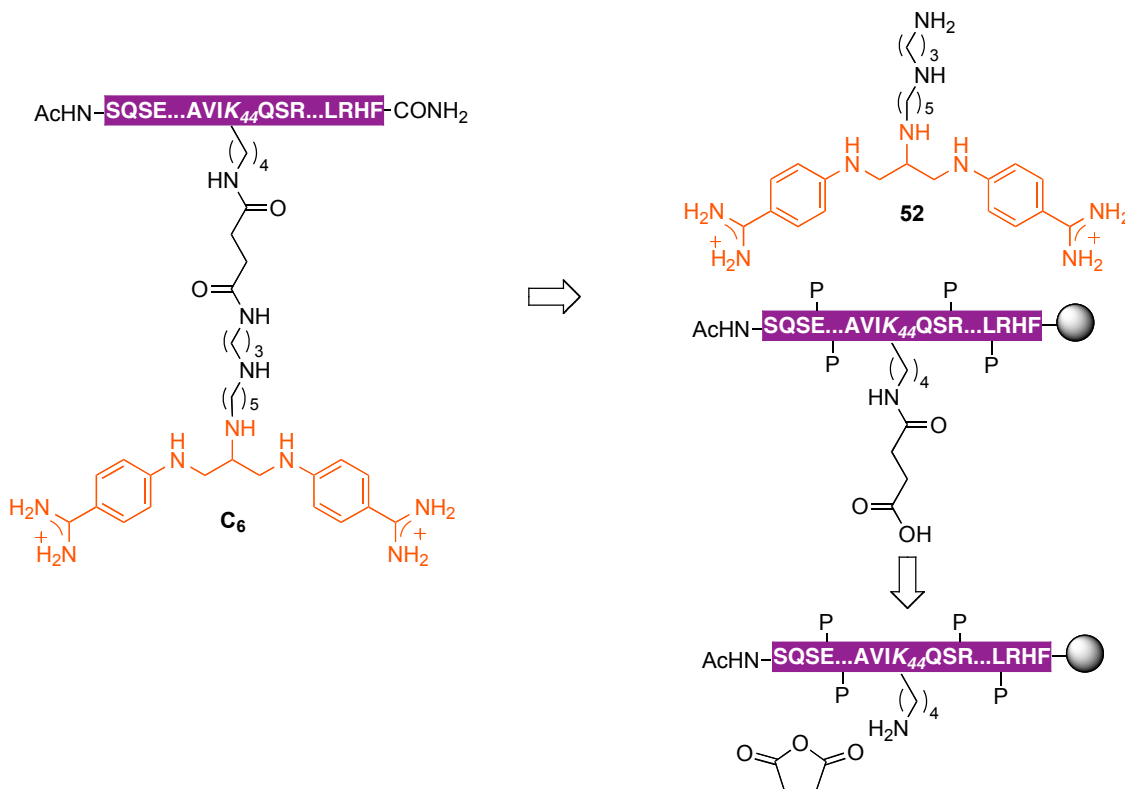


Figura 167. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción para obtener el híbrido **A₆**, gradiente 2, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

El espectro de absorción presenta las banda características de la unidad de la propamidina a 260 nm, así como otra banda en torno a 220 nm, resultante de la absorción de los enlaces amida en el péptido. Del mismo modo que en los otros híbridos bivalentes la identidad del producto aislado se corroboró mediante espectroscopía de masas.

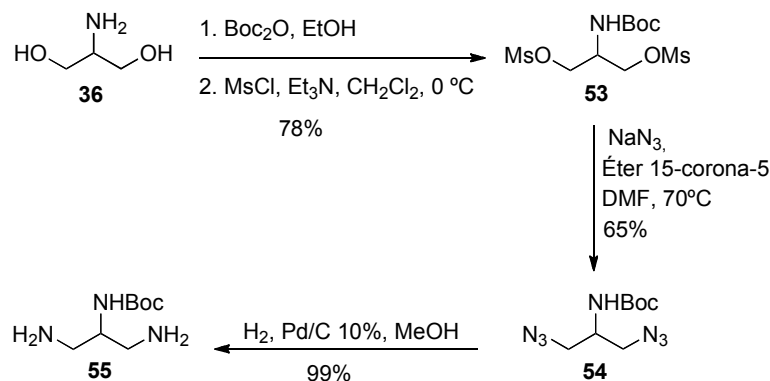
La síntesis del híbrido **C₆** se realizó del mismo modo que los otros híbridos constituidos por el dominio de unión Cys₂His₂ de GAGA, es decir, a través del acoplamiento en fase sólida del derivado de BAPPA alquilado **52** y el péptido selectivamente desprotegido en la Lys de la posición 44 (**K₄₄**) y modificado con anhídrido succínico.



Esquema 47. Análisis retrosintético del híbrido **C₆**.

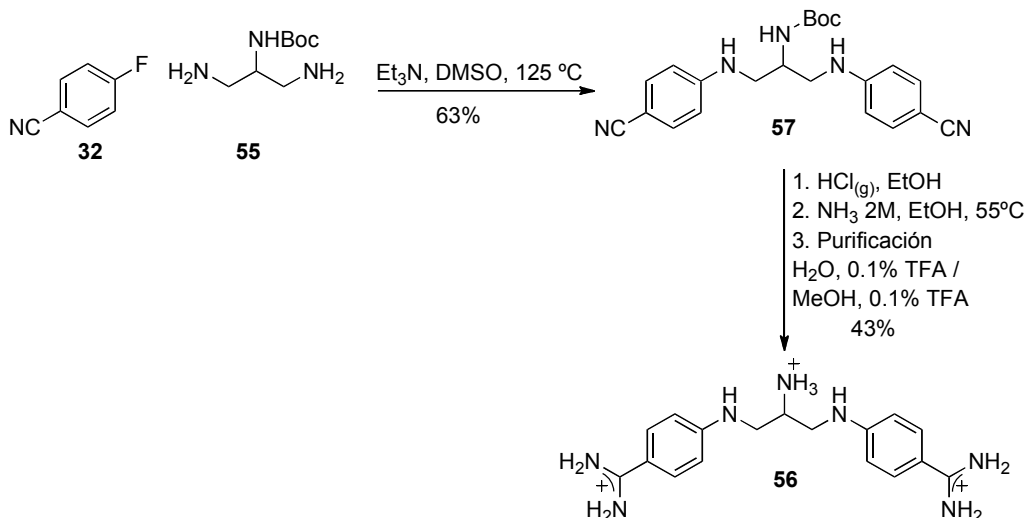
Tal como se muestra en el esquema retrosintético el punto de anclaje del derivado de BAPPA es en este caso una amina, lo que obligó a llevar a cabo una serie de reacciones previas antes de sintetizar el compuesto de tipo bis(benzamidinio).

El compuesto comercial 2-amino-1, 3-propanodiol se protegió con dicarbonato de di-*tert*-butilo y, a continuación, los grupos hidroxilo se activaron como intermedios metanosulfonilo (compuesto **53**), para, posteriormente, hacerse reaccionar con azida sódica en DMF, obteniéndose el compuesto **54** [206]. Las azidas resultantes se redujeron mediante hidrogenación catalítica para dar lugar a la triamina *N*-monoprotegida, **55**



Esquema 48. Síntesis de la triamina *N*-monoprotegida **55**.

El compuesto aminoBAPPA **56**^{xxix} se sintetizó del modo habitual: a través de una sustitución nucleófila aromática sobre el 4-fluorobenzonitrilo, seguida de la reacción de Pinner con intercambio de los grupos iminoéteres y purificación. Su espectro de absorbancia muestra el máximo característico de los compuestos tipo BAPPA (figura 168).



Esquema 49. Síntesis de la aminoBAPPA **56**.

^{xxix} La preparación de esta molécula aminoBAPPA se realizó en colaboración con el doctorando Mateo I. Sánchez López, dicha síntesis constituyó su Proyecto de Fin de Carrera de la Licenciatura de Química.

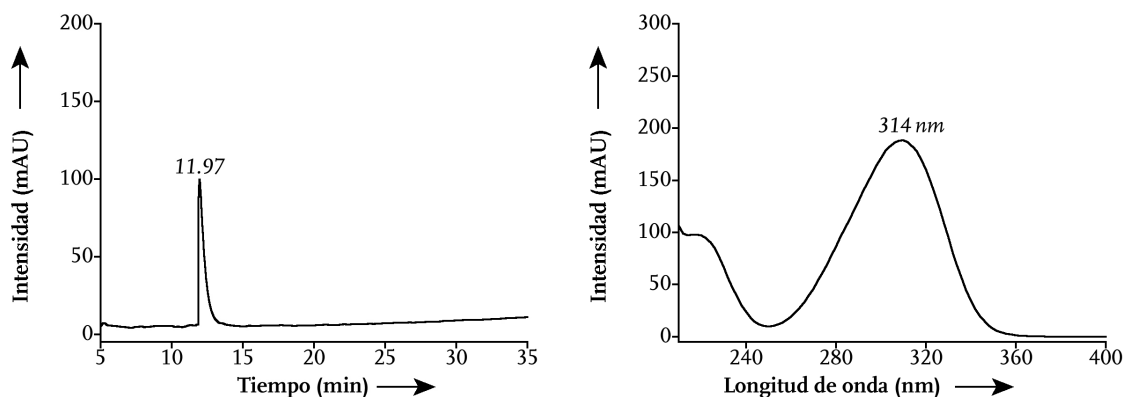
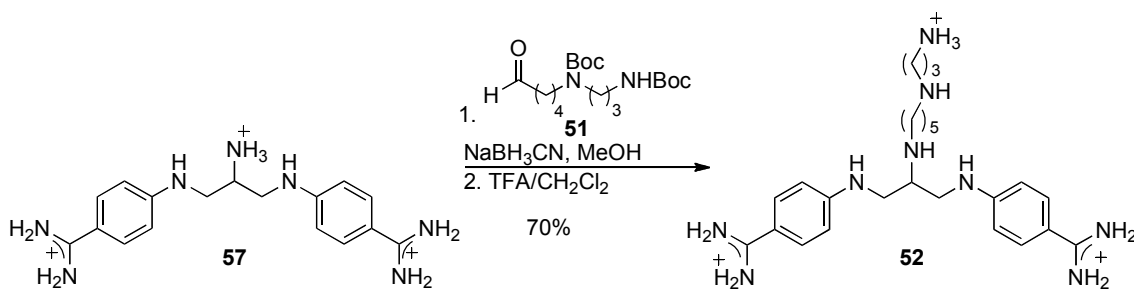


Figura 168. Izquierda: cromatograma de HPLC de la aminoBAPPA **56**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

El compuesto obtenido se alquiló mediante una aminación reductora análoga a la explicada anteriormente (esquema 45) y del mismo modo, posteriormente, las aminas del compuesto resultante se desprotegeron. La reacción se siguió y se purificó por cromatografía en fase reversa. La identidad del compuesto alquilado **52** se comprobó por RMN y espectroscopía de masas. En la siguiente figura puede verse el cromatograma del producto puro **52** y su espectro de absorción.



Esquema 50. Síntesis del derivado de BAPPA alquilado **52**.

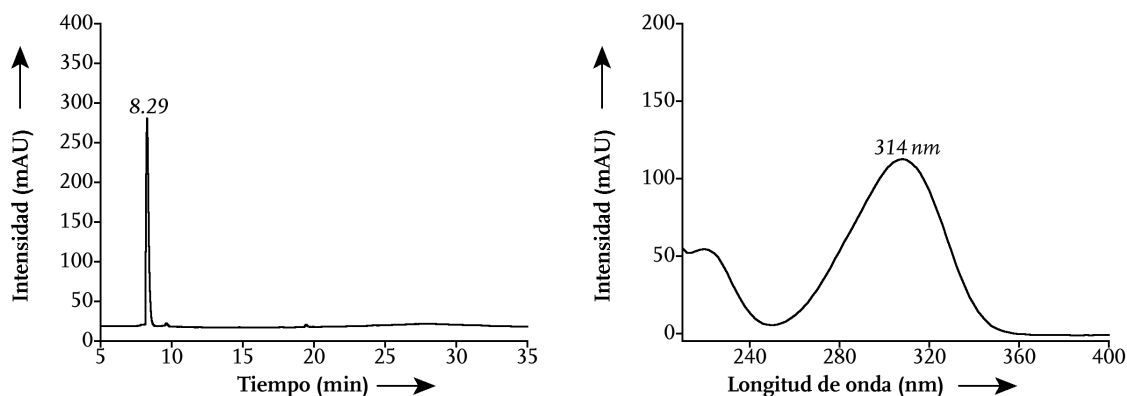
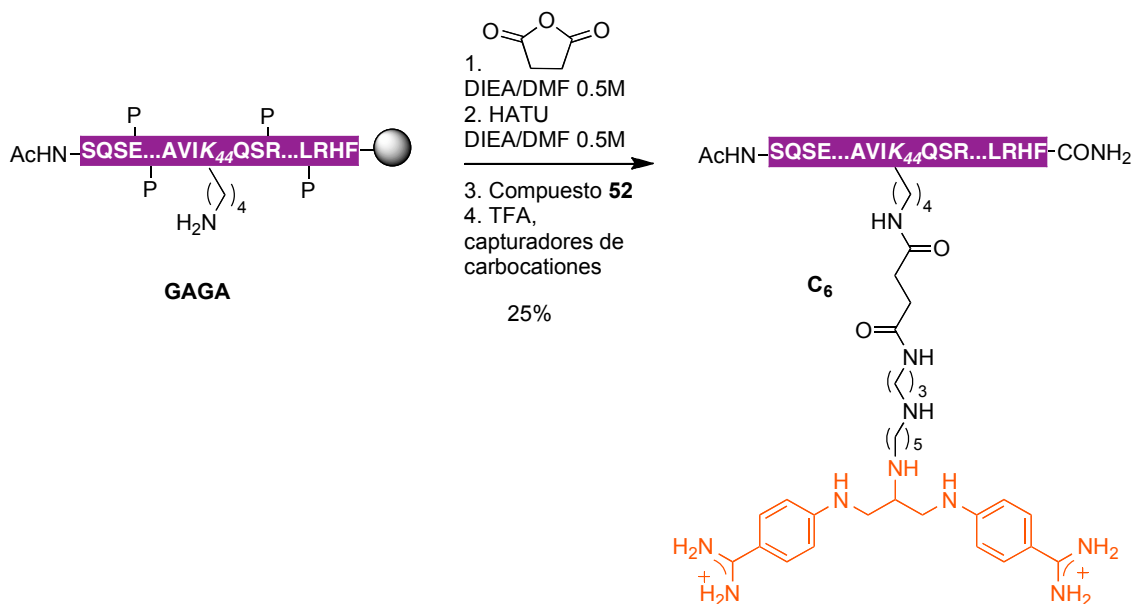


Figura 169. Izquierda: cromatograma de HPLC del derivado de BAPPA alquilado **52**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Una vez sintetizado el derivado de BAPPA alquilado, éste se acopló con la parte peptídica unida a la resina, después de haber adicionado el anhídrido succínico sobre el único

aminoácido desprotegido selectivamente, la Lys de la posición 44 (K_{44}). Esta modificación en la cadena lateral del residuo de Lys permitió la posterior condensación con el compuesto bis(benzamidínio) **52** usando HATU como agente activante del ácido. La reacción se completó en 2 h. La síntesis y desprotección del grupo Alloc del dominio Cys₂His₂ ya ha sido explicada previamente (esquema 26).



Esquema 51. Síntesis en fase sólida del híbrido **C₆**.

En la figura 170 puede verse el cromatograma de HPLC del crudo de la reacción de acoplamiento para dar lugar al híbrido **C₆** y el espectro de absorción del pico mayoritario. Éste presenta las bandas características de la parte peptídica y del compuesto *aza*-bis(benzamidínio). La identidad del híbrido se verificó mediante espectroscopía de masas.

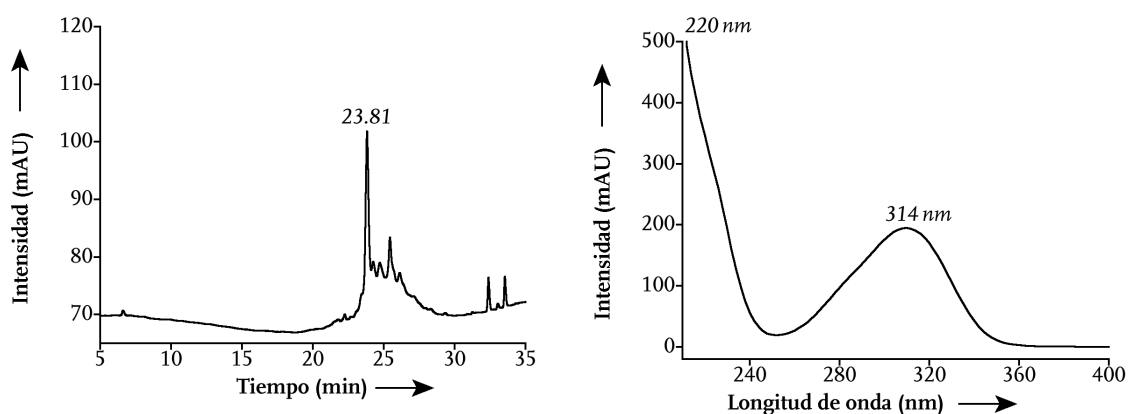


Figura 170. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la reacción de acoplamiento para obtener el híbrido **C₆**, gradiente 3, $\lambda = 222$ nm. Derecha: espectro de absorción.

Interacción del derivado aminoBAPPA 56 con el ADN

Con el fin de poder interpretar mejor el comportamiento de los híbridos, inicialmente se estudió el perfil de unión al ADN del compuesto aminoBAPPA 56. El análisis de la interacción se realizó de la forma descrita previamente. En la siguiente tabla se muestran los oligonucleótidos horquilla utilizados.

ADNh	Secuencia (5' a 3')
AAATTT	GGC AAATTT CGC TTTT GCG AAATTT GCC
AATTT	GGCG AATTT CGC TTTT GCG AAATT CGCC
AATT	GGCG AATT CAGC TTTT GCTG AATT CGCC
GGCC	GGCA GGCC CAGC TTTT GCTG GGCC TGCC

Tabla 16. Secuencias de los ADNs usados en las valoraciones.

Las valoraciones realizadas se muestran en las siguientes figuras.

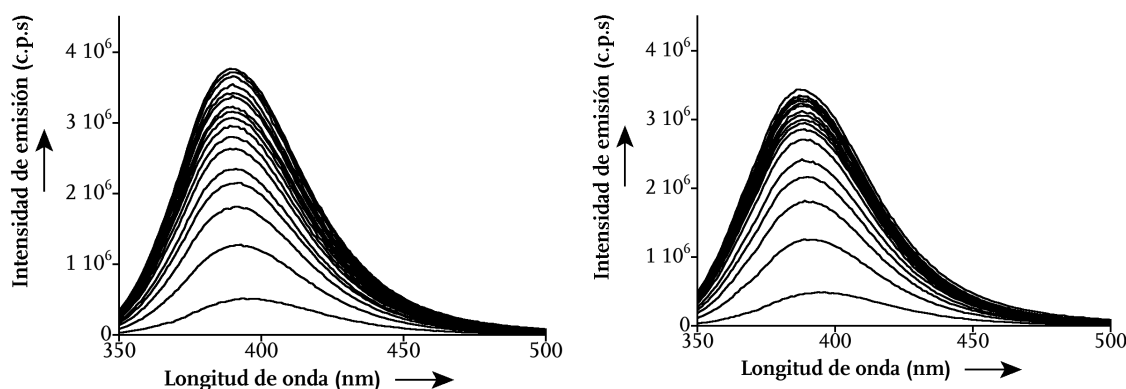


Figura 171. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración del aminoBAPPA 56 con el ADN AAATTT. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración del aminoBAPPA 56 con el ADN AATTT.

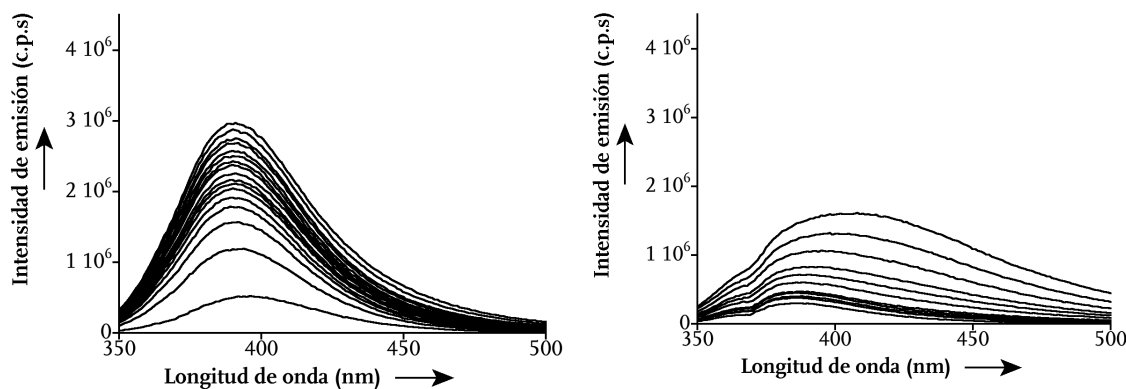
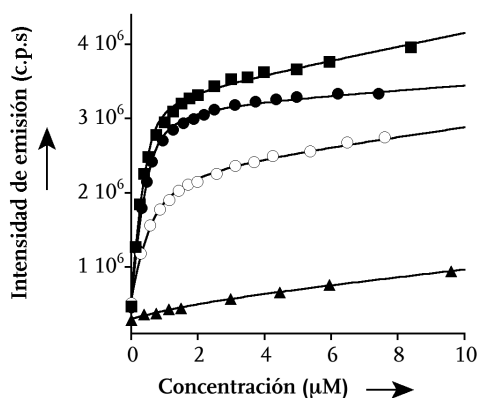


Figura 172. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración del aminoBAPPA 56 con el ADN AATT. Derecha: espectros de fluorescencia de la valoración del aminoBAPPA 56 con el ADN GGCC.

Al igual que lo observado con BAPPA y con su análogo hidroxilado **43**, la adición de cantidades crecientes de ADN ricos en A/Ts provoca un importante aumento en la fluorescencia. Dicho aumento de la intensidad de emisión a 387 nm pudo ajustarse en todos los casos a la ecuación que describe el modo de interacción 1:1 y tiene en cuenta la contribución residual del ADN a la emisión de fluorescencia. Se observó que los valores de la constante de disociación siguen la misma tendencia observada para el análogo con el hidroxilo en el conector entre las dos unidades de bis(benzamidinio).



ADNh	K_D
AAATTT	72 ± 10 nM
AATTT	114 ± 13 nM
AATT	225 ± 20 nM
GGCC	N/C ^{xxx}

Figura 173. Izquierda: representación de ajuste al modelo de interacción 1:1 de las valoraciones con los ADNs: AAATTT (■), AATTT (●), AATT (○), GGCC (▲). Derecha: valores de las constantes de disociación calculadas en cada caso.

Estos experimentos demostraron que la fluorescencia intrínseca del derivado aminoBAPPA **56** es dependiente de la secuencia y en líneas generales su interacción es análoga a los otros compuestos *aza*-bis(benzamidinios) evaluados.

^{xxx} N/C: no calculada, ya que no se observó la saturación para este ADN incluso a concentraciones elevadas.

Estudio de la interacción del híbrido A_6 con el ADN

Inicialmente se evaluó la conformación que este nuevo híbrido adquiriría en presencia de un ADN con la secuencia que contenía de forma contigua las zonas de reconocimiento de ambas unidades, es decir, con la secuencia de unión de la región básica de GCN4 y del fragmento propamidínico. Para ello se llevaron a cabo estudios de dicroísmo circular utilizando los siguientes oligonucleótidos de doble cadena. Estos únicamente se diferencian en la longitud de la secuencia consenso de la molécula propamidina:

dsADN ^{xxxi}	Secuencia (5' a 3')
AAATTT/CRE ^{hs}	GAGGAAATTTATGACGTTCCG
AATTT/CRE ^{hs}	GAGGAATTTATGACGTTCCGT

Tabla 17. Secuencias de los ADNs usados en los estudios de DC.

Los espectros de dicroísmo circular del híbrido A_6 por separado y en presencia de los distintos ADNs, se registraron a temperatura ambiente, en tampón fosfato 10 mM, 100 mM de NaCl, pH 7.5 y con concentraciones de 5 μ M de híbrido y de cada uno de los ADNs.

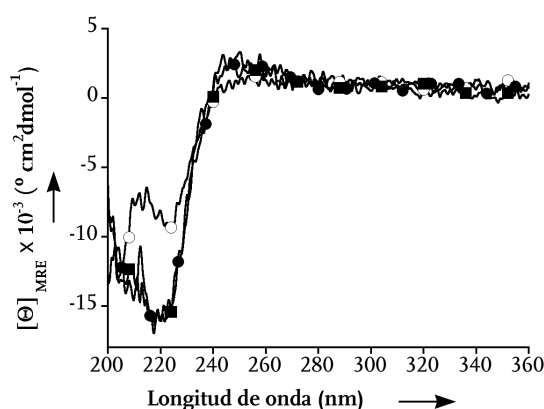


Figura 174. Izquierda: espectro de DC del híbrido A_6 sólo y con los distintos ADNs a t.a.: ○ híbrido en ausencia de ADN; ■ híbrido en presencia de ADN AAATTT/CRE^{hs}; ● híbrido en presencia de ADN AATTT/CRE^{hs}.

Al incubar el híbrido en presencia de cualquiera de los dos ADNs diana se observó el comportamiento típico de las proteínas bZIP cuando interactúan con el ADN: un aumento importante en la intensidad de la señal negativa a 222 nm que se correlaciona con un aumento de proporción de la conformación de hélice α . El espectro de dicroísmo circular es igual para ambos ADNs.

^{xxxi} La nomenclatura de los dsADN se refiere a: AAATTT y AAATTT: son las secuencias de reconocimiento de la propamidina; CRE^{hs} es la secuencia de reconocimiento de un único monómero de la región básica. Se representa sólo la secuencia de una hebra.

A diferencia de los tripirroles, en este caso no se observa ninguna banda debida a la inserción de la propamidina en el surco menor del ADN. Esto no significa que no haya inserción en el surco menor puesto que los bis(benzamidinios) son aquirales y la banda de interacción es una banda inducida por el entorno quiral del ADN [207].

Los datos obtenidos mediante la espectroscopía de dicroísmo circular apuntaban a la posibilidad de una interacción entre el híbrido sintetizado y el ADN. El siguiente paso consistió en estudiar en detalle esa interacción. Para ello se llevaron a cabo experimentos de electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida (PAGE) con diferentes secuencias de ADN que contenían mutaciones específicas en las zonas de reconocimiento del surco mayor y/o menor. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos de doble cadena:

dsADN ^{xxxii}	Secuencia (5' a 3')
AAATTT/CRE^{hs}	GAGGAAATTTATGACGTTTCG
AATTT/CRE^{hs}	GAGGAATTTATGACGTTTCGT
CGGCC/CRE^{hs}	GAGGCCGCCATGACGTTTCGT
AATTT/AcGAC	GAGGAATTTAcGACGTTTCGT
AATTT/AgcAC	GAGGAATTTAgcACGTTTCGT
AATTT/CRE^{hs}m	GAGGAATTTGCCGCCTTCGT

Tabla 18. Secuencias de los ADNs usados en los estudios de PAGE.

La figura 175 (izquierda) muestra que la incubación del híbrido **A₆** con un ADN que presenta las secuencias de reconocimiento de las dos unidades del híbrido bivalente (ADN **AAATTT/CRE^{hs}**) da lugar a la aparición de una nueva banda en el gel que se desplaza más lentamente que la correspondiente al ADN solo.

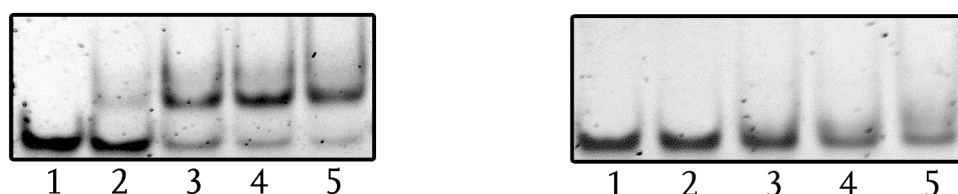


Figura 175. Estudio a través de PAGE del híbrido **A₆**. En ambos casos calles 1–5, [híbrido **A₆**]: 0, 100, 300, 500, 1000 nM Izquierda: en presencia del ADN **AAATTT/CRE^{hs}**. Derecha: en presencia del ADN **CGGCC/CRE^{hs}**. Los geles se analizaron mediante la emisión de SYBR[®] Gold.

La eliminación de la secuencia de A/Ts inhibe completamente la interacción con el ADN (figura 175 derecha). Este comportamiento es idéntico al de los híbridos bivalentes de tripirrol y vuelve a resaltar la importancia de las interacciones proporcionadas por el agente

^{xxxii} La nomenclatura de los dsADN se refiere a: **AAATTT** y **AAATTT**: son las secuencias de reconocimiento de la propamidina; **CRE^{hs}** es la secuencia de reconocimiento de un único monómero de la región básica de un único monómero; **CRE^{hs}m**, **AcGAC**, **AgcAC** son secuencias con mutaciones en la zona de reconocimiento del péptido. Sólo se representa una hebra del ADN de doble cadena.

de reconocimiento del surco menor para la formación de complejos estables con el ADN, lo cual confirma el modelo de unión bivalente.

Se analizó también el efecto de distintas mutaciones en la secuencia de reconocimiento de la región básica. En todos los casos las mutaciones en esta región dieron lugar a la aparición de una nueva banda en el gel que migra más lentamente que la banda observada con el ADN diana (**AATTT/CRE^{hs}**). Del mismo modo que en los híbridos bivalentes de tipo GCN4 con tripirrol, esta nueva banda puede atribuirse a una unión inespecífica en el que el péptido en lugar de estar insertado en el surco mayor interacciona de forma no específica con los fosfatos del esqueleto del ADN [81].

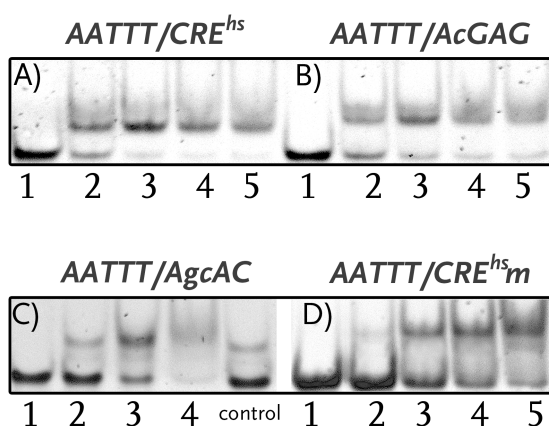


Figura 176. Estudio a través de PAGE del híbrido **A₆**. En todos los casos: calles 1–5, [híbrido **A₆**]: 0, 100, 300, 500, 1000 nM; control: [híbrido **A₆**]: 100 nM en presencia del ADN **AATTT/CRE^{hs}**. Los gels se analizaron mediante la emisión de SYBR® Gold.

Una vez evaluada la selectividad de la interacción, con el fin de obtener una estimación aproximada de la afinidad proceso de reconocimiento, se llevó a cabo una valoración radiactiva con el ADN **AAATTT/CRE^{hs}** a temperatura ambiente.

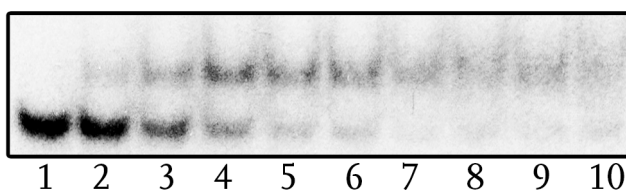


Figura 177. PAGE del híbrido **A₆** en presencia del ADN **AAATTT/CRE^{hs}** marcado radiactivamente. Calles 1–10 [Híbrido **A₆**]: 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 nM.

La mitad de la fracción unida se alcanza en torno a concentraciones de 150 nM, lo que implica una constante de disociación de ese orden a temperatura ambiente. Este dato es consistente con lo obtenido en nuestro grupo con el híbrido tripirrólico **A₂** [81].

Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de sustituir el fragmento tripirrólico por una propamidina sin alterar las capacidades de reconocimiento de los híbridos.

Estudios preliminares de la interacción del híbrido C_6 con el ADN

El modo de interacción de este híbrido se estudió a través de experimentos de electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida (PAGE) a temperatura ambiente y utilizando oligonucleótidos de doble cadena con diferentes secuencias.

dsADN ^{xxxiii}	Secuencia (5' a 3')
AAATTT/GAGAG	GACAAATTTGAGAGTACGCT
GCGGCC/GAGAG	GACGCGGCCGAGAGTACGCT
AAATTT/GAGAGm	GACAAATTTcAtAGTACGCT

Tabla 19. Secuencias de los ADNs usados en los estudios de PAGE.

Del mismo modo que ocurre con los híbridos que contienen el dominio de unión del factor de transcripción GAGA y el fragmento de reconocimiento del surco menor tripirrólico, la incubación del híbrido C_6 con el ADN diana **AAATTT/GAGAG** da lugar a una nueva banda detectable en el gel que se puede atribuir a la formación de un complejo estable entre este nuevo híbrido y el ADN.

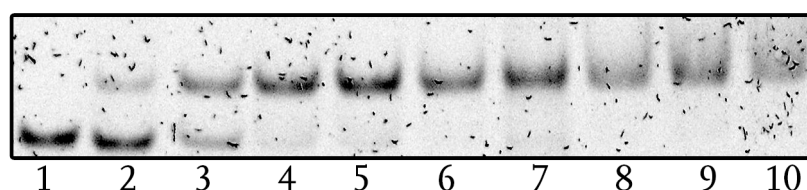


Figura 178. PAGE del híbrido C_6 en presencia del ADN **AAATTT/GAGAG**. Calles 1–10 [Híbrido C_6]: 0, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 nM. Los geles se analizaron mediante la emisión de SYBR[®] Gold.

La mutación en la triada de reconocimiento GAG de la parte peptídica tiene como consecuencia la eliminación total de la interacción. Sin embargo, cuando se altera la zona de reconocimiento de BAPPA y se mantiene la secuencia de interacción del péptido GAGAG, se pudo detectar, a concentraciones elevadas, una banda de intensidad muy tenue, que migra más lentamente que la observada con el ADN diana. Probablemente esta nueva banda aparezca como consecuencia de la interacción de baja afinidad de BAPPA por las secuencias mutadas, ya que únicamente se manifiesta en las calles del gel donde las concentraciones son las más elevadas.

^{xxxiii} La nomenclatura de los dsADN se refiere a: **AAATTT/GAGAG**: es la secuencia de reconocimiento con las dos zonas de interacción de las unidades del híbrido bivalente; **GCGGCC/GAGAG** es la secuencia mutada en la región de interacción de BAPPA; **AAATTT/GAGAGm** representa la secuencia mutada para el factor de transcripción GAGA. Sólo se representa una de las hebras del ADN de doble cadena.



Figura 179. Estudio a través de PAGE del híbrido C_6 . En ambos casos calles 1,3-5, [híbrido C_6]: 0, 300, 500, 1000 nM. Calle 2 control con [híbrido C_6]: 100 nM en presencia del ADN **AAATTT/GAGAG**. Izquierda: en presencia del ADN **AAATTT/GAGAGm**. Derecha: en presencia del ADN **CGGCC/GAGAG**. Los geles se analizaron mediante la emisión de SYBR® Gold.

La afinidad de la interacción se determinó a través de una valoración radiactiva con el ADN **AAATTT/GAGAG**. Los problemas de solubilidad encontrados hicieron necesarios realizar estas valoraciones a 37 °C. Estos experimentos permitieron calcular una constante de disociación aproximada para un modo de unión 1:1, $K_D \sim (20 \pm 3)$ nM a 37 °C.

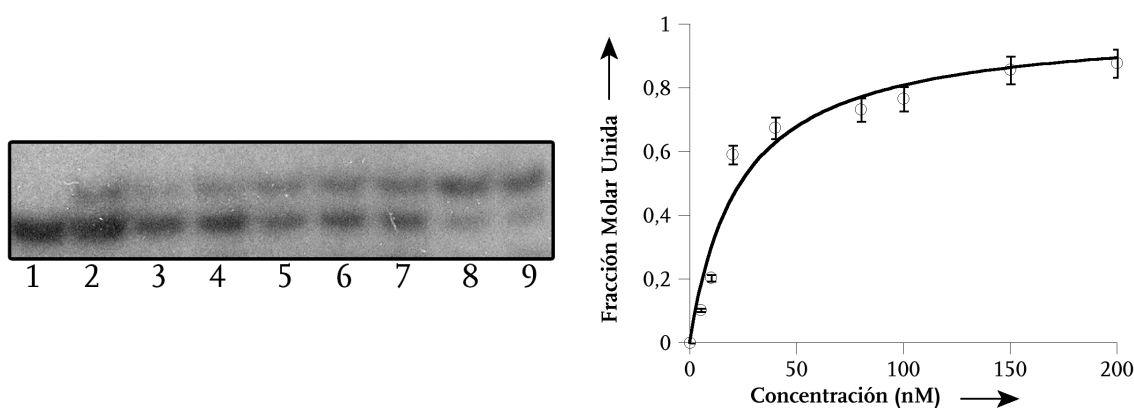


Figura 180. Izquierda: valoración radiactiva del híbrido con el ADN **AAATTT/GAGAG**. Calle 1-9, [híbrido C_6]: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 nM. Derecha: Isoterma de unión resultante del análisis densiométrico del gel de la misma figura izquierda.

Los experimentos de electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida demostraron la interacción selectiva y con alta afinidad del híbrido por la secuencia que presentan simultáneamente las zonas de reconocimiento de la unidad peptídica y BAPPA. Dado que los *aza*-bis(benzamidinos) son fluorogénicos se pensó en estudiar también el comportamiento de este híbrido mediante espectroscopía de fluorescencia.

La adición de cantidades crecientes de los ADNs **AAATTT/GAGAG** y **AAATTT/GAGAGm** sobre el híbrido C_6 provocó un aumento en la intensidad de fluorescencia a 387 nm, como consecuencia de la inserción del *aza*-bis(benzamidinio) en el surco menor del ADN; aunque dicho aumento es considerablemente inferior al observado cuando la molécula de *aza*-bis(benzamidinio) no está conjugada al péptido. Por otro lado, en presencia del ADN mutado en la secuencia rica en pares A/Ts no se observó ningún aumento en la emisión de fluorescencia.

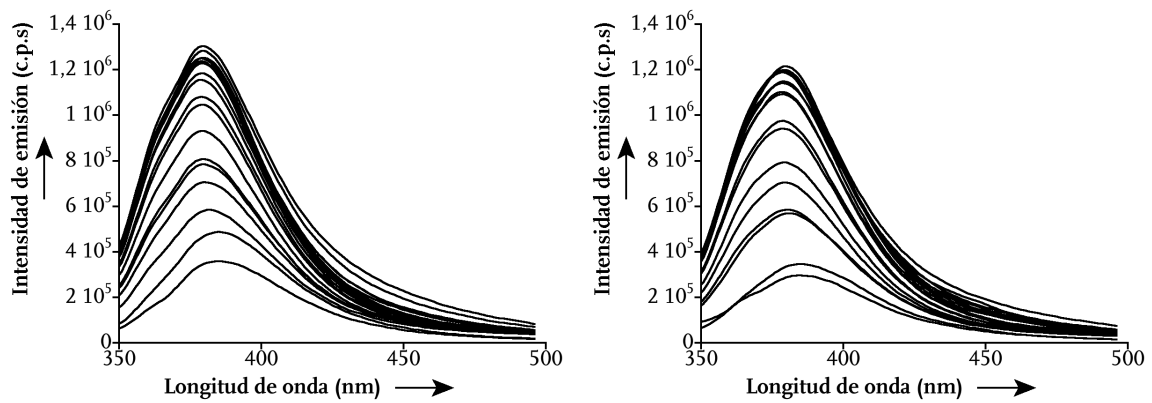


Figura 181. Izquierda: espectros de fluorescencia de la valoración del híbrido C₆ con el ADN AAATTT/GAGAG. Derecha: C₆ con el ADN AAATTT/GAGAGm.

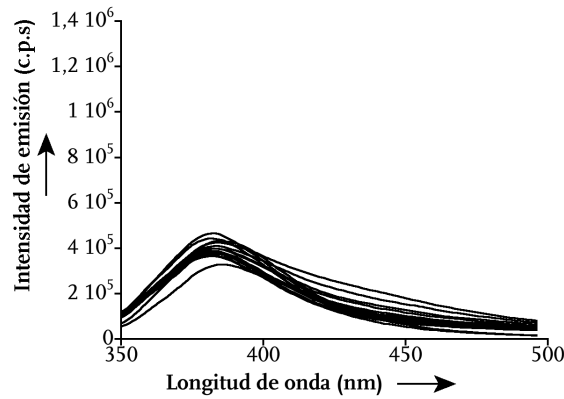


Figura 182. Espectros de fluorescencia de la valoración del híbrido C₆ con el ADN GCGGCC/GAGAG.

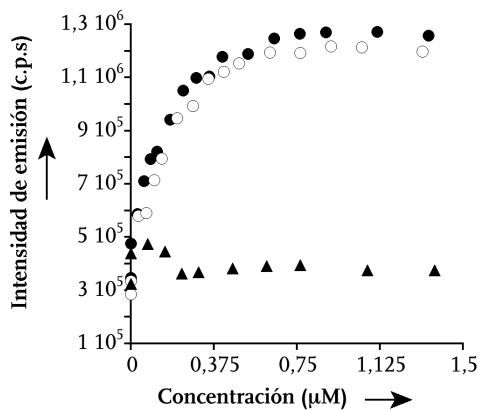


Figura 183. Representación de los puntos obtenidos de las valoraciones fluorescentes del híbrido C₆ los ADNs: AAATTT/GAGAG (●), AAATTT/GAGAGm (○), GCGGCC/GAGAG (▲).

Los intentos iniciales de ajustar los datos experimentales a los distintos modelos de interacción no resultaron satisfactorios. Es necesario repetir los experimentos y, si es posible, utilizar una menor concentración en las valoraciones fluorescentes para que ésta sea similar a la usada en las electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida (PAGE).

Conclusiones

En este apartado se ha demostrado la generalidad de la estrategia de conjugación de dominios de reconocimiento de factores de transcripción naturales a moléculas pequeñas que interaccionan a través de secuencias adyacentes en el surco menor. Los híbridos resultantes son capaces de reconocer de forma selectiva y con alta afinidad, secuencias de ADN que incluyen ambos elementos de reconocimiento.

El empleo de *aza*-bis(benzamidinios) permite la aplicación de espectroscopía de fluorescencia para el estudio de este tipo de interacciones, como una técnica complementaria a las aplicadas hasta ahora, dicroísmo circular y electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida.

Bibliografía

- [204] Gómez, S.; Peters, J. A.; Maschmeyer, T. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1037–1057.
- [205] Dess, D. B; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4156–4158.
- [206] Benoist, E.; Loussouarn, A.; Reumaud, P.; Chantal, J.-F.; Gestin, J.-F. *Synthesis*, **1998**, *8*, 1113–1118.
- [207] Luck, G.; Zimmer, C. H.; Schweizer, D. *Stud. Biophys.* **1988**, *125*, 107–119.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Las reacciones para la preparación de las moléculas pequeñas se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón, empleando disolventes secos y a temperatura ambiente, salvo que se especifique lo contrario. Los disolventes se secaron por destilación bajo atmósfera de argón sobre el agente de secado adecuado, siguiendo los procedimientos descritos en el manual de Perrin [208]. Las fases orgánicas de las operaciones de extracción se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor.

Para el seguimiento de las reacciones por cromatografía en capa fina se emplearon cromatofolios de gel de sílice de tipo 60 F_{254} (Merck) sobre soporte de aluminio y óxido de alúmina neutra 60 F_{254} (Merck) también sobre el mismo soporte. Los componentes de la capa fina se visualizaron mediante luz UV (254 nm) o por tratamiento de ésta con una de las siguientes disoluciones, seguido de calentamiento [209]:

- *p*-*anisaldehído*: constituye un método general de revelado; particularmente bueno con compuestos que presentan grupos con propiedades nucleofílicas. La disolución se prepara añadiendo 2.1 mL de *p*-*anisaldehído*, 1.8 mL de AcOH y 6.25 mL de H_2SO_4 en 169 mL EtOH.
- *ninhidrina*: es el método de revelado más común para amino compuestos. La disolución está formada por un 2% *ninhidrina* en EtOH.

La purificación de aquellos compuestos que se pudo hacer por cromatografía en columna a presión reducida se llevó a cabo utilizando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60, con un tamaño de partícula de 0.04–0.063 mm (230–400 *mesh* ASTM, Merck), o bien, óxido de alúmina activo neutro, del tipo 90, con un tamaño de partícula 0.063–0.200 mm (79–230 *mesh* ASTM, Merck), empleando el eluyente especificado en cada reacción. En los otros casos, las moléculas pequeñas se purificaron en un sistema preparativo Büchi Sepacore formado por: un controlador de bombas C-615, con dos bombas C-605, para lograr un gradiente binario de disolvente, un colector de fracciones C-660 y un espectrofotómetro de UV C-635. La purificación se llevó a cabo usando fase reversa con gradientes lineales de mezclas de H_2O (A) y MeOH (B) con 0.1% TFA en 30 min, con una velocidad de flujo de 30 mL/min, usando un cartucho preparativo (150 × 40 mm) preempaquetado con fase reversa de sílica gel RP18ec (Büchi 54863). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron en un liofilizador ThermoSavant Modulyo D acoplado a una bomba Edwards RV de alto vacío.

La cromatografía de HPLC analítica se llevó a cabo en un cromatógrafo Agilent 1100 provisto de un detector de diodos utilizando las columnas analíticas: Merck LiChrospher WP 300 RP-18 (5 μm), Júpiter WP 300 RP-18 (5 μm), Eclipse XDB-C18 (5 μm); Phenomenex Júpiter Proteo-C18 (4 μm), Phenomenex Luna-C18 (4 μm). La detección se llevó a cabo, en general, a 220, 304 y 330 nm simultáneamente. La cromatografía de HPLC preparativa usada para la purificación de los híbridos y los péptidos se realizó en un cromatógrafo Agilent 1100, consistente en un módulo de bombas binario y un detector de UV-visible con una única longitud de onda, y utilizando las columnas semipreparativas: Nucleosil 120-10 C18 (250 × 8 mm) y Phenomenex Júpiter Proteo-C18 (250 × 10 mm). En ambas cromatografías se utilizaron mezclas de H_2O (A) y CH_3CN (B) con 0.1% de TFA. Las condiciones estándares usadas consistieron en un régimen isocrático durante los cinco primeros minutos seguido por el gradiente lineal determinado:

- GRADIENTE 1: 5% → 95% disolvente B durante 30 min a una velocidad de flujo de 1 mL/min en el caso de la cromatografía analítica y 3 mL/min para la preparativa.
- GRADIENTE 2: 5% → 75% disolvente B durante 30 min a una velocidad de flujo de 1 mL/min en el caso de la cromatografía analítica y 3 mL/min para la preparativa.
- GRADIENTE 3: 0% → 35% disolvente B durante 30 min a una velocidad de flujo de 1 mL/min en el caso de la cromatografía analítica y 3 mL/min para la preparativa.

Los compuestos se caracterizaron mediante RMN y espectroscopía de masas. Los espectros de RMN se registraron a temperatura ambiente en diferentes equipos dependiendo de la muestra concreta. Los equipos usados fueron: *Bruker DPX-250*, *Varian Mercury 300*, *Varian Inova 400* y *Varian Inova 500*. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm respecto a la señal del TMS y las constantes de acoplamiento en Hz. Los espectros de RMN se procesaron con el programa *MestReNova* y se referenciaron usando los valores de los desplazamientos conocidos y tabulados de la bibliografía [210]. Los espectros de masas de IQ y FAB se realizaron en un *Micromass Autospec*, los ESI en un *PE Biosystems Voyager System 1089*, *Bruker Biotof II* o en un *LC/MSD VL* de *Agilent* y los MALDI en un *Bruker Autoflex*.

Las medidas de pH se realizaron en un pHmetro *InoLab pH Level 2*.

El H₂O se purificó mediante el sistema de *Millipore Milli-Q RG*.

Las estructuras de rayos X utilizadas para la construcción de modelos se obtuvieron del servidor del *RCSB Protein Data Bank*.^{xxxiv} Los modelos se construyeron con el módulo *Builder* del programa *InsightII* y las representaciones gráficas se hicieron con el programa *MacPyMol*.

Los compuestos se nombraron utilizando el programa *ACD Name*.

Con respecto al estilo, se siguió en términos generales la guía de la Sociedad Americana de Química (ACS) [211].

^{xxxiv} <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

Aparatos y procedimientos

Procedimiento para los análisis de dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular se llevó a cabo en un *Jasco J-715* termostatzado con un baño *Nestlab RTE-111*. Los experimentos de dicroísmo circular (CD) se registraron en una celda de paso óptico de 2 mm, con una disolución tamponada de pH 7.5 de composición 10 mM de fosfato potásico y 100 mM de NaCl, para los híbridos de la región básica y en una disolución tamponada de: 18 mM Tris•HCl, pH 7, 50 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.5 mM AEDT y 0.55 mM DTT, y con 10 equiv de ZnCl₂ para los híbridos constituidos por el dominio de unión del factor de transcripción GAGA y a la temperatura especificada en cada caso.

Para la medida de las interacciones entre los péptidos y los diferentes ADNs se registró primero el espectro del ADN solo (a una concentración 5 µM) y se adicionó después la disolución del péptido, de forma que la concentración final fuese de 5 µM; después de 2 min se registró el espectro de la mezcla. El espectro del péptido complejado se obtuvo restando al espectro de la mezcla el espectro del ADN solo.

Los parámetros utilizados en la medida de las muestras fueron los siguientes:

- Rango de adquisición: 380–200 nm.
- Ancho de banda: 2.0 nm.
- Resolución: 0.2 nm.
- Acumulación: 5–10 barridos.
- Sensibilidad: 10 miligrados.
- Tiempo de respuesta: 0.25 segundos.
- Velocidad: 100 nm/min.

Los espectros obtenidos se suavizaron ligeramente para su mejor visualización utilizando en el programa *Kaleidagraph*.

Procedimiento para la espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de espectroscopía de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro *Jobin-Yvon Fluoromax-3 (DataMax 2.20)* termostatzado con un control de temperatura Peltier de *Wavelength Electronics LFI-3751*.

Las valoraciones fluorescentes y las medidas de fluorescencia se realizaron sobre una disolución del analito de interés a una concentración de 0.5 µM en Tris•HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM. En el caso de las valoraciones, se fueron añadiendo alícuotas de la disolución madre del ADN correspondiente con concentración aproximada de 550 µM.

Los parámetros utilizados en la medida de las muestras de los compuestos fueron los siguientes:

- Compuestos de tipo *aza-bis(benzamidinio)*: incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de la rendija de excitación: 3.0 nm; ancho de la rendija de

emisión: 6.0 nm; longitud de onda de excitación: 329 nm; rango de adquisición: 345–500 nm.

- Conjugado *aza*-bis(benzamidinio) con DOTA[Tb³⁺]: incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de la rendija de excitación: 3.0 nm; ancho de la rendija de emisión: 6.0 nm; longitud de onda de excitación: 329 nm; rango de adquisición: 345–600 nm.
- Conjugado *aza*-bis(benzamidinio) con DOTA[Eu³⁺]: incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de la rendija de excitación: 6.0 nm; ancho de la rendija de emisión: 6.0 nm; longitud de onda de excitación: 329 nm; rango de adquisición: 500–750 nm. Se usó un filtro de paso largo de 500 nm para evitar la interferencia del armónico.
- Conjugado *aza*-bis(benzamidinio) con cumarina: incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de la rendija de excitación: 3.0 nm; ancho de la rendija de emisión: 4.0 nm; longitud de onda de excitación: 329 nm o 432 nm; rango de adquisición: 345–640 nm.

Procedimiento para la espectroscopía de UV–visible

Las medidas de UV–visible para determinar los coeficientes de extinción de las moléculas pequeñas y para la medida de la concentración de todas las disoluciones utilizadas en los distintos experimentos se realizaron a t.a. en un espectrofotómetro *Varian Cary 100 Bio* con celdas de cuarzo *Helma* de paso óptico de 10 mm.

El coeficiente de extinción molar de los compuestos de la tabla 20 se obtuvo fácilmente mediante medidas de absorbancia de muestras de concentración conocida y teniendo en cuenta la ley de Lambert–Beer, que relaciona la absorbancia con la concentración.

$$A = \epsilon l C$$

En esta ecuación *A* es la absorbancia de la disolución, *l* es la longitud de la cubeta, *C* es la concentración y ϵ es el coeficiente de extinción molar.

Las regresiones lineales de las representaciones de los valores de absorbancia frente a las concentraciones permitieron obtener el coeficiente de extinción molar de los compuestos, en el caso de los bis(benzamidinios) y bis(guanidinius) éstos se aislaron de la cromatografía en fase sólida como sales de ácido trifluoroacético.

Compuesto	Estructura	Coefficiente de extinción molar
2		$\epsilon_{304nm} = 32,274 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

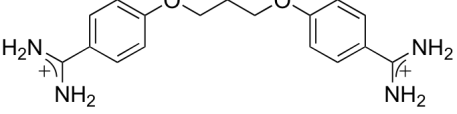
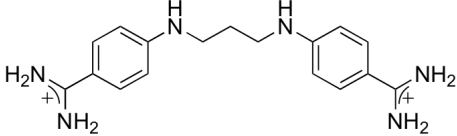
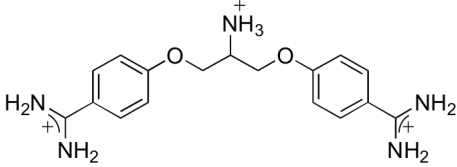
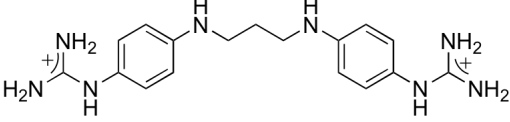
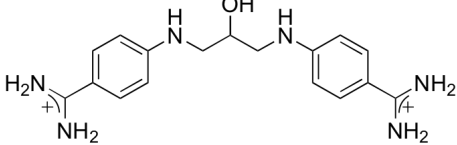
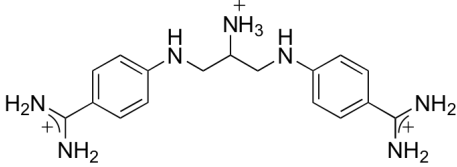
Compuesto	Estructura	Coefficiente de extinción molar
27		$\epsilon_{260\text{nm}} = 21,899 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
28		$\epsilon_{315\text{nm}} = 32,141 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
35		$\epsilon_{260\text{nm}} = 23,560 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
38		$\epsilon_{253\text{nm}} = 18,530 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
43		$\epsilon_{314\text{nm}} = 29,824 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
56		$\epsilon_{314\text{nm}} = 31,497 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

Tabla 20. Coeficientes de extinción calculados experimentalmente.

La determinación de los coeficientes de extinción de los oligonucleótidos es diferente dependiendo de si se trata (o no) de ADNs horquilla [212].

El coeficiente de extinción de los ADN de cadenas sencillas (no horquilla) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\epsilon_{260 \text{ nm}} = \{(8.8 \times \# \text{ T}) + (7.3 \times \# \text{ C}) + (11.7 \times \# \text{ G}) + (15.4 \times \# \text{ A})\} \times 0.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

La fórmula para los ADNs horquilla es similar pero tiene en cuenta la complementariedad:

$$\epsilon_{260 \text{ nm}} = \{(8.8 \times \# \text{ T}) + (7.3 \times \# \text{ C}) + (11.7 \times \# \text{ G}) + (15.4 \times \# \text{ A})\} \times 0.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

En ambas fórmulas # representa el número de la base nitrogenada determinada en toda la secuencia de ADN, T representa las timinas, C representa las citosinas, G las guanidas y A representa las adenidas

La hibridación del ADN de doble cadena utilizado en los experimentos no radiactivos se realizó, en el caso de los ADNs no horquilla, mezclando cantidades equimoleculares de cada una de las hebras, y directamente en los ADNs horquilla. La disolución de ADN se

calentó a 90 °C durante 10 minutos, y a continuación, se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente en ambos casos.

Procedimiento para las electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida

La electroforesis es una técnica bioquímica que se utiliza para separar sustancias con carga eléctrica que se encuentran en una mezcla, tras someterlas a la acción de un campo eléctrico. Inicialmente al activarse el campo eléctrico, las moléculas se aceleran rápidamente hasta alcanzar una velocidad constante. Dicha velocidad viene dada por el equilibrio entre la fuerza ejercida por el campo eléctrico y la fuerza que se opone al movimiento [213]:

$$f\dot{v} = q \xi$$

En esa ecuación q representa la carga de la molécula (en Culombios), ξ es la fuerza del campo eléctrico (en voltios por metro), v es la velocidad de la partícula y f su coeficiente de fricción.

El coeficiente de fricción depende del tamaño y de la forma de las moléculas, de tal modo que las moléculas grandes y asimétricas encuentran más resistencia de fricción que las pequeñas o compactas. Teniendo en cuenta esto y la ecuación anterior, se puede deducir fácilmente que las distintas velocidades a las que se desplacen las moléculas vendrán dadas por la relación entre su carga, tamaño y forma. Por ejemplo, en el caso de dos moléculas con la misma masa, la que tenga mayor carga neta se moverá más rápidamente a través del gel. De la misma forma, las proteínas pequeñas (o más compactas) migran más rápidamente a lo largo del gel. La velocidad también está determinada por el tamaño de poro y la diferencia de potencial aplicada.

La electroforesis puede llevarse a cabo de modo libre en una disolución; sin embargo, es más conveniente utilizar algún medio de soporte, los dos más usados son el papel y el gel. En nuestro caso particular las electroforesis (EMSA) se realizaron usando geles no desnaturizantes de poliacrilamida como soporte (PAGE). Los ensayos de PAGE siguen unos determinados protocolos:

PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA: la poliacrilamida es un polímero obtenido por copolimerización radicalaria de la acrilamida y la N, N' -metilenbisacrilamida. Esta última favorece el entrecruzamiento de la acrilamida, por ello las propiedades físicas del gel en cuanto a su rigidez y tamaño de poro vendrán determinadas por la proporción de N, N' -metilenbisacrilamida presente en él. En nuestros experimentos se utilizaron geles no desnaturizantes del 10% de poliacrilamida. La preparación de dos minigeles se llevó a cabo de la siguiente manera: en un matraz erlenmeyer se mezclaron 7.55 mL de H_2O , 1.2 mL de TBE^{xxxv} 5×, 3.5 mL de protogel (mezcla de acrilamida/ N, N' -metilenbisacrilamida 30/0.8), 7.5 μ L de TMEDA (N, N, N', N' -tetrametiletildiamina) para estabilizar los radicales y controlar la velocidad de polimerización y 75 μ L de persulfato amónico al 10% que actúa como agente iniciador de la reacción radicalaria. La mezcla se agita brevemente y se introduce entre las placas, colocándose en último lugar el molde para formar los pocillos, en los que se cargarán las muestras. La mezcla se dejó polimerizar durante media hora, después se retiró el molde y se lavaron los pocillos con H_2O Milli-Q.

^{xxxv} La composición del TBE 5× es: 0.445 M Trizma® base, 0.445 M ácido bórico, 10 mM AEDT (pH 8.0). Salvo para el caso de los dedos de cinc, donde se usó menos AEDT y un medio un poco más ácido: 5 mM, pH = 6.8.

MARCAJE DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS CON ^{32}P : en el caso de los experimentos de electroforesis que se realizaron con oligonucleótidos marcados radiactivamente con ^{32}P en el extremo 5' se siguió el siguiente protocolo de marcaje. Se prepararon disoluciones de las hebras de cadena sencilla de concentración 10 μM y con ellas se prepararon las siguientes disoluciones:

- *disolución de marcaje*: 1 μL de la disolución 10 μM del oligonucleótido de cadena sencilla que se desea marcar + 1 μL de tampón quinasa 10 \times (40 mM Tris•HCl pH 7.5, 10 mM de MgCl_2 y 5 mM de DTT) + 3.5 μL de H_2O Milli-Q + 4 μL de ^{32}P -ATP (5000 Ci/mmol) + 0.5 μL de T-4 polinucleótido quinasa de concentración 10 unidades/ μL . Esta enzima es la encargada de la transferencia del grupo fosfato del ^{32}P -ATP al extremo 5' del oligonucleótido)

La mezcla se incubó a 37 $^\circ\text{C}$ durante 1 h y después se calentó a 90 $^\circ\text{C}$ durante 10 min para inactivar el enzima.

- *disolución de la cadena complementaria*: 2 μL de la hebra complementaria 10 μM + 1 μL de tampón quinasa 10 \times (40 mM Tris•HCl pH 7.5, 10 mM de MgCl_2 y 5 mM de DTT) + 7 μL de H_2O .

Finalmente las dos disoluciones se mezclaron y se hibridaron de la misma forma explicada anteriormente.

INCUBACIÓN DE MUESTRAS, DESARROLLO DE LOS GELES Y DETECCIÓN: la incubación se llevó a cabo usando en el caso de las **electroforesis radiactivas 45 pM de dsADN** marcado y en las **fluorescentes 50 nM de dsADN** sin marcar, en una mezcla de 20 μL que contenía una composición diferente dependiendo del péptido. Salvo en los híbridos que presentan el dominio de unión de GAGA la composición fue: 18 mM de Tris, pH 7.5, 90 mM de KCl, 1.8 mM de MgCl_2 , 1.8 mM de AEDT y 9% de glicerol, 0.11 mg/mL de BSA y 2.2% de NP-40. En los dedos de cinc la composición fue: 18 mM de Tris, pH 7.0, 50 mM de KCl, 1.8 mM de MgCl_2 , 0.5 mM de AEDT, 9% de glicerol, 0.11 mg/mL de BSA y 4.4% de NP-40. Las mezclas se incubaron durante 30 min a la temperatura a la que se va a realizar el experimento. Posteriormente se cargaron las muestras en el gel y éste se desarrolló durante 45 min en una disolución de TBE 0.5 \times a 140 V a t.a. y durante 1h en las electroforesis a 4 $^\circ\text{C}$.

Finalmente, en el caso de las electroforesis fluorescente los geles se tiñeron con una disolución de 5 μL de SYBR[®] Gold en 50 mL de TBE 1 \times durante 10 min y se visualizaron con un transiluminador UVP ($\lambda = 302$ nm). Cuando los experimentos de PAGE se realizaron con oligonucleótidos marcados con ^{32}P , después de desarrollar los geles, estos se fijaron por tratamiento con una disolución al 33% de MeOH y 10% de AcOH, se secaron y se autorrevelaron en una placa fotográfica a -80 $^\circ\text{C}$.

Procedimiento para los estudios de internalización celular

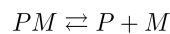
Las células crecieron en un medio de DMEM con un 10% de FBS. El día anterior a los ensayos de internalización las células se sembraron en cajas de 12 compartimentos provistos con un cubreobjetos de vidrio (15 mm). Antes de realizar los experimentos, las células se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se añadió 1 mL de DMEM fresco sin suero añadido. A continuación, se añadió sobre cada compartimento el volumen correspondiente de los diferentes compuestos a analizar para tener una concentración final

de compuesto de 2 μ M. Las muestras se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Tras la incubación las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar el exceso de los compuestos y se observaron en un microscopio de fluorescencia antes y después de fijar. La fijación se llevó a cabo por el tratamiento de una disolución al 4% de *p*-formaldehído en PBS con 300 nM de DAPI (para teñir los núcleos) durante 15 min a 4 °C. Después de la fijación, los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos usando como soporte Mowiol 4-88® (100 mg/mL en 100 mM Tris•HCl, pH 8.5, 25%) y DABCO 0.1% para evitar el desvanecimiento de la señal. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital *Olympus DP-50* colocada en un microscopio de fluorescencia *Olympus BX51*.

Determinación de las constantes de afinidad

Determinación de la constante de afinidad mediante los experimentos radiactivos de PAGE

La determinación de la constante de afinidad mediante los experimentos radiactivos de PAGE se basa en medir la intensidad relativa de cada una de las bandas de electroforesis a las distintas concentraciones. El desarrollo matemático en el que se basa se detalla a continuación, donde P representa al híbrido, M al ADN y PM al complejo.



El hecho de que se usen concentraciones de ADN muy inferiores a las del híbrido permite despreciar la fracción x del péptido total que reacciona para formar el complejo PM. Consecuentemente la constante de disociación viene dada por la siguiente expresión:

$$K_D = \frac{[M][P]}{[PM]} \Rightarrow K_D = \frac{[M][P] - [P]x}{x}$$

Por otro lado, teniendo en cuenta que la intensidad relativa medida se corresponde a la fracción unida y que ésta a su vez es igual al cociente de la fracción de ADN que reacciona con el híbrido y el ADN total, sustituyendo el valor de [M] por el valor despejado de la ecuación superior, llegamos a la siguiente igualdad:

$$\theta_{unida} = \frac{x}{[M]} = \frac{[P]}{K_D + [P]}$$

Por lo tanto si se representa la intensidad relativa de las bandas de electroforesis a cada concentración, los datos se ajustarán a una función asintótica creciente de la que se puede deducir la constante de disociación y, consecuentemente, la constante de afinidad.

Determinación de la constante de afinidad mediante fluorescencia

La típica ecuación para un modo de unión 1:1 en el cual un ligando no fluorescente (dsADN) se añade sobre un receptor fluorescente [compuesto *aza*-bis(benzamidinio)] se describe por las siguientes ecuaciones si no se tiene en cuenta la unión no específica:

$$K_D = \frac{R \cdot L}{C} \quad (1)$$

$$R_T = R + C \quad (2)$$

$$L_T = L + C \quad (3)$$

$$F_T = F_0 + F_C \times C \quad (4)$$

Donde R es la concentración del receptor libre en el equilibrio; R_T , la concentración total del receptor (se mantiene aproximadamente constante durante toda la valoración); L , es la concentración de ligando libre en el equilibrio; L_T , es la concentración total de ligando añadido; K_D , es la constante de disociación de la interacción entre el receptor y el ligando; C es la concentración del complejo ligando–receptor fluorescente; F_T , es la fluorescencia total observada; F_0 , es un parámetro ajustable que considera la fluorescencia del fondo; F_C es un parámetro ajustable para la fluorescencia del complejo ligando–receptor. Resolviendo el sistema de ecuaciones para F_T y eliminando R , L , y R_L , se obtuvo la conocida ecuación 5:

$$F_T = \frac{1}{2}[2F_0 + F_C \sqrt{K_D^2 + (L_T - R_T)^2 + 2K_D(L_T + R_T)}] \quad (5)$$

Esta ecuación es válida cuando la contribución de la fluorescencia del ADN a la fluorescencia total es muy pequeña, despreciable. Esto sólo ocurre cuando el receptor se une al ADN diana de forma muy eficiente y consecuentemente hay un gran aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia.

Si la unión es más débil el aumento de intensidad de fluorescencia es menor y entonces la ecuación 5 no es un modelo apropiado para lo observado experimentalmente. Se necesita otra ecuación en el cual la fluorescencia total F_T , considere la fluorescencia del ligando (ADN) (F_L L_T) [183].

$$F_T = F_0 + F_C \cdot C + F_L \cdot L_T \quad (6)$$

El conjunto resultante de ecuaciones se resolvió usando el programa *Mathematica 6.0.1.0* para *MacOS X (Wolfram Research)*, dando lugar a la ecuación 7, que fue usada para el ajuste no lineal de los datos experimentales. Esta ecuación considera las pequeñas variaciones de la emisión de fluorescencia como resultado de la fluorescencia residual del ADN a una determinada longitud de onda.

$$F_T = \frac{1}{2}[2F_0 + F_C \cdot K_D + F_C \cdot L_T + 2F_L \cdot L_T + F_C \cdot R_T - F_C \sqrt{K_D^2 + (L_T - R_T)^2 + 2K_D(L_T + R_T)}] \quad (7)$$

Determinación de la constante de afinidad mediante experimentos de competición

Los datos obtenidos de los experimentos de competición se ajustaron al modelo general de unión en el que un agente no fluorescente de reconocimiento del surco menor y BAPPA compiten por la unión a una misma y única región de un dsADN [188]. Este modelo considera una unión competitiva completa, lo que significa que la interacción del agente no fluorescente de reconocimiento y BAPPA son exclusivas mutuamente. También no se considera los efectos de interacción inespecífica.

Este comportamiento se describe por un grupo de ecuaciones similares a las de la unión directa, las cuales se pueden resolver dando lugar a la ecuación 8.

$$F_T = \frac{2\sqrt{d^2 - 3e} \cdot \cos \theta / 3 - d}{3K_D + 2\sqrt{d^2 - 3e} \cdot \cos \theta / 3 - d} \quad (8)$$

Donde:

$$d = K_D + K_{DC} + L_T + L_{CT} - R_T \quad (9)$$

$$e = (L_{CT} - R_T) \cdot K_D + (L_T - R_T) \cdot K_{DC} + K_D K_{DC} \quad (10)$$

$$f = -K_D K_{DC} R_T \quad (11)$$

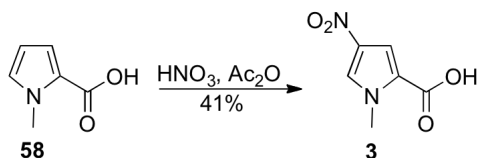
$$\theta = \arccos \frac{-2d^3 + 9de - 27f}{2\sqrt{(d^2 - 3e)^3}} \quad (12)$$

K_{DC} es la constante de disociación del agente de unión competitivo, L_{CT} es la concentración total de dicho compuesto.

Reacciones

Síntesis del esqueleto tripirrólico

ÁCIDO 1-METIL-4-NITRO-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (**3**)



El ácido 1-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (15.34 g, 122.59 mmol) se disolvió en Ac₂O (92 mL). La disolución se enfrió a -25 °C y sobre ésta se añadió gota a gota, mediante un embudo de presión compensada (45 min), una mezcla de Ac₂O (58 mL) y HNO₃ (70%, 12 mL) a -25 °C. La disolución resultante se agitó enérgicamente a -25 °C durante 30 min y se llevó a t.a. lentamente. La suspensión resultante se enfrió nuevamente a -25 °C para favorecer la formación de un precipitado que se filtró y se lavó con hielo y Ac₂O (8 mL) y posteriormente con agua fría. El sólido aislado se secó a vacío sobre P₂O₅, obteniéndose el producto **3** como un sólido de color amarillo claro (8.54 g, 41%, pf 200 °C) [214].

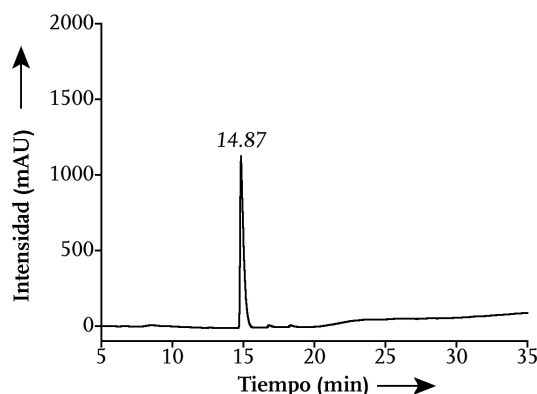


Figura 184. Cromatograma de HPLC del compuesto **3** gradiente 1, $\lambda = 222 \text{ nm}$.

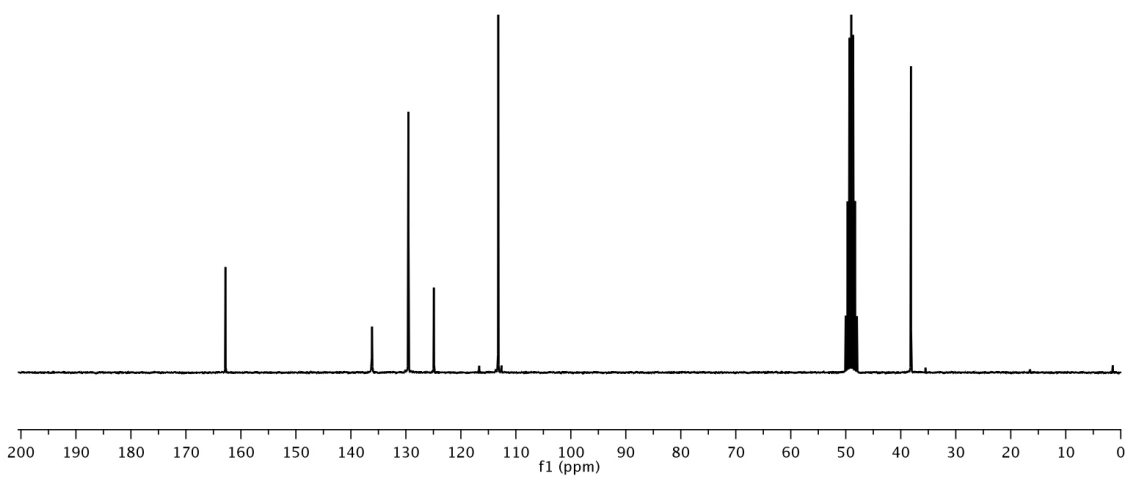
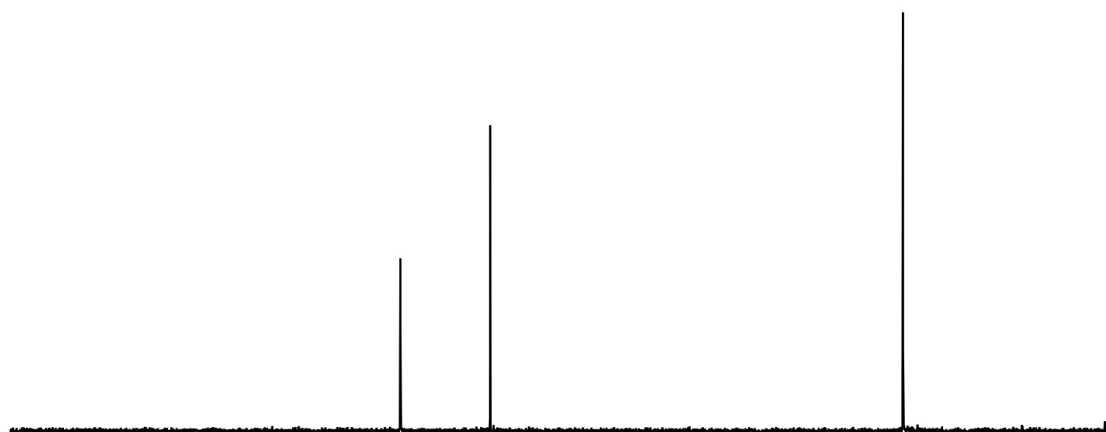
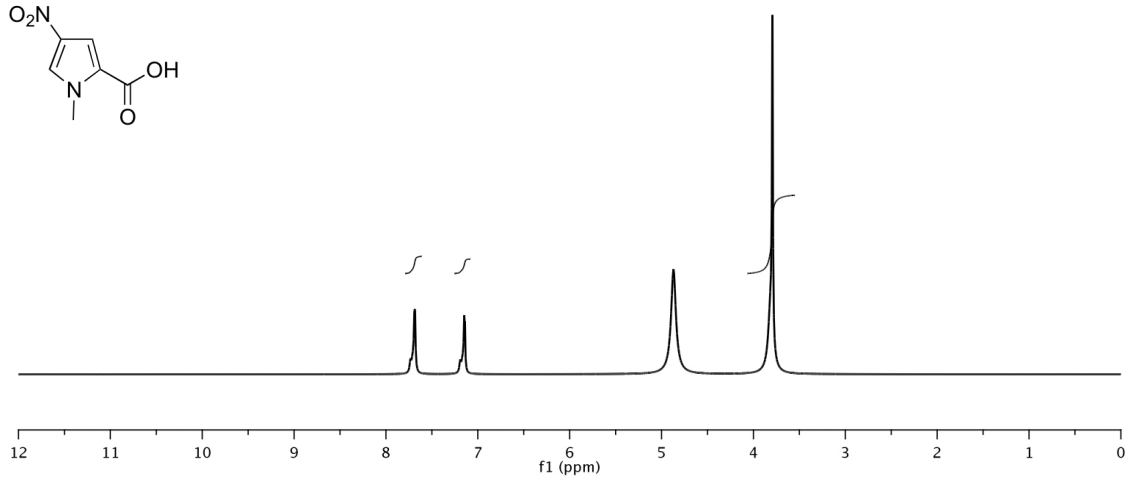
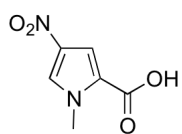
RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ): 3.79 (s, 3H), 7.14 (s, 1H), 7.69 (s, 1H).

RMN ¹³C (250 MHz, CD₃OD, δ): 38.16 (CH₃), 112.99 (CH), 124.92 (C), 129.55 (CH), 136.16 (C), 162.68 (C).

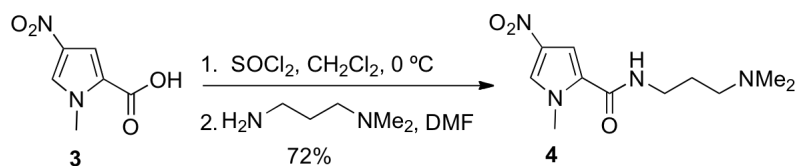
EM-IE (70 eV) *m/z*: M⁺ 170 (100), 79 (33), 58 (16).

EMAR: calcd para C₆H₆N₂O₄: 170.0328. Encontrada: 170.0394.

HPLC: *t_R* = 14.87 min.



N-[3-(DIMETILAMINO)PROPI]-1-METIL-4-1*H*-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (**4**)



Sobre una disolución del ácido **3** (3.00 g, 17.64 mmol) en 60 mL de CH₂Cl₂ y DMF (0.5 mL) enfriada a 0 °C se adicionó lentamente SOCl₂ (15.4 mL, 176.47 mol) y se agitó la mezcla durante 6 h. El exceso de SOCl₂ se eliminó a presión reducida y se dejó 15 min en la bomba a vacío. El residuo resultante se disolvió en DMF (12 mL) y sobre dicha disolución, enfriada a 0 °C, se añadió lentamente *N*¹, *N*¹-dimetilpropano-1, 3-diamina (5 mL, 38.72 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a t.a. durante 12 h, después de las cuales se añadió agua (150 mL) y se extrajo con AcOEt (5 × 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ acuoso (10%), se secaron con Na₂SO₄ y concentraron a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (5 → 10%, MeOH/CH₂Cl₂), para dar un sólido amarillo claro cuyos datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía para el producto **4** (3.22 g, 72% rendimiento global, pf 120 °C).

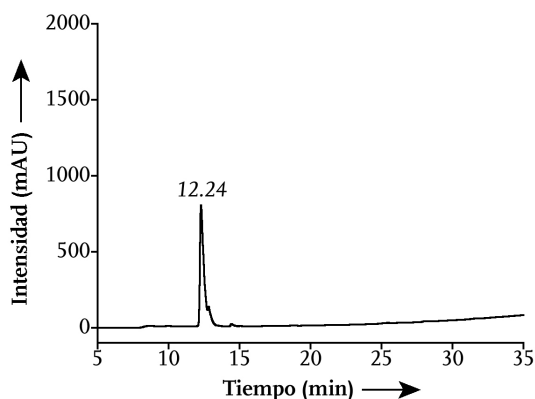


Figura 185. Cromatograma de HPLC del compuesto **4** gradiente 1, $\lambda = 222 \text{ nm}$.

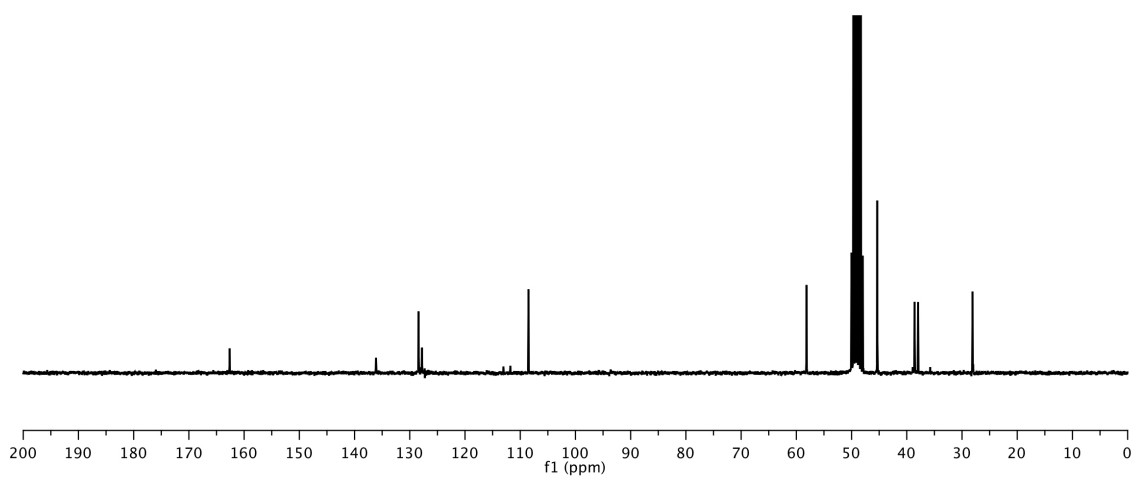
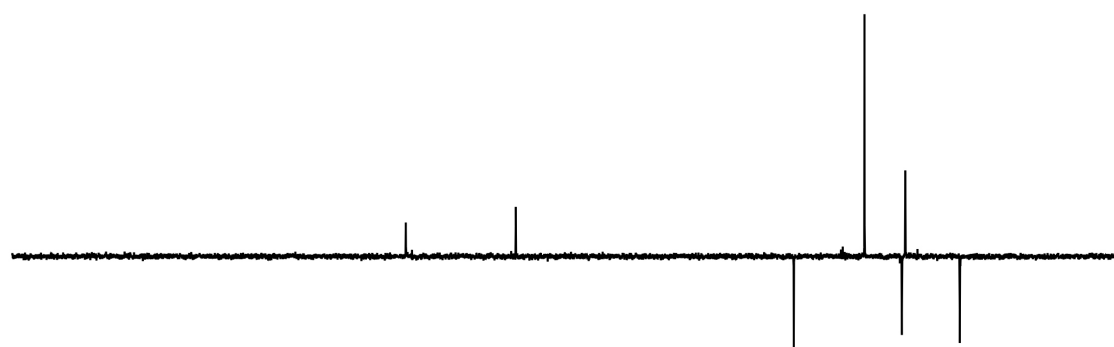
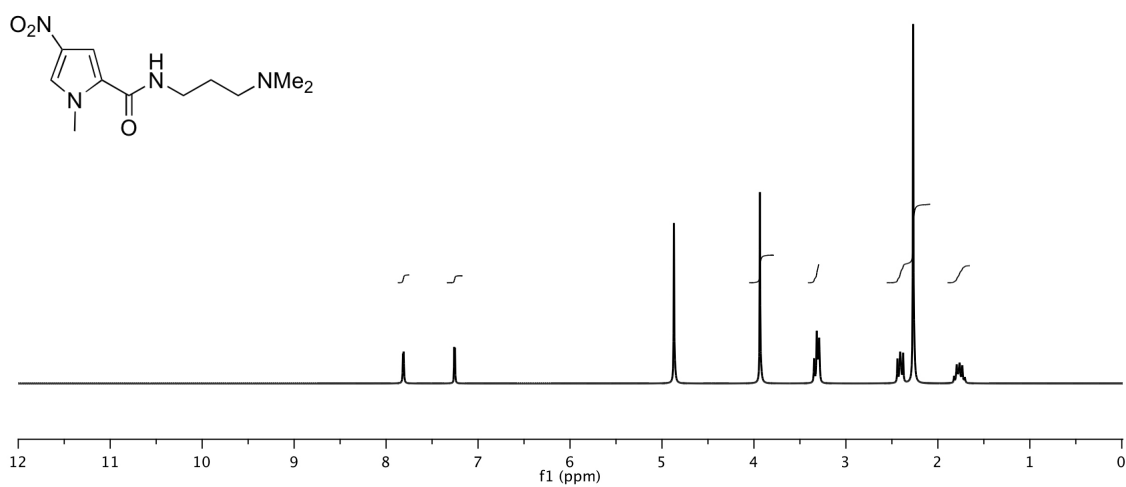
RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ): 1.76 (quin, $J = 7.16 \text{ Hz}$, 2H), 2.27 (s, 6H), 2.41 (t, $J = 6.90 \text{ Hz}$, 2H), 3.29–3.34 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 7.25 (s, 1H), 7.82 (s, 1H).

RMN ¹³C (250 MHz, CD₃OD, δ): 28.09 (CH₂), 37.96 (CH₃), 38.59 (CH₂), 45.35 (CH₃), 58.15 (CH₂), 108.50 (CH), 127.79 (C), 128.41 (CH), 136.12 (C), 162.54 (C).

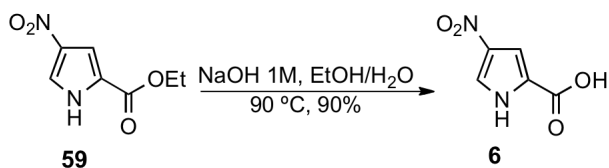
EM-IE (70 eV) m/z : M⁺ 254 (10), 181 (14), 153 (11), 153 (11), 131 (17), 58 (100).

EMAR: calcd para C₁₁H₁₈N₄O₃: 254.1379. Encontrada: 254.1399.

HPLC: $t_R = 12.24 \text{ min}$.



ÁCIDO 4-NITRO-1H-PIRROL-2-CARBOXÍLICO (**6**)



El compuesto **6** se sintetizó del mismo modo al descrito en bibliografía. [215] El éster **59** [216] (1.01 g, 5.43 mmol) se hizo reaccionar con una disolución (30 mL) de NaOH 1 M en EtOH acuoso (70%). La mezcla se agitó a 90 °C durante 4 h. A continuación, la disolución resultante se enfrió a -20 °C y se acidificó hasta pH 1 con HCl concentrado. El precipitado resultante, amarillo claro, se extrajo con éter (4 × 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron y concentraron a presión reducida para la obtención del producto deseado **6** como un sólido blanco. Dicho sólido no necesitó ninguna etapa de purificación y sus datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía [116] (0.76 g, 90%, pf 210 °C).

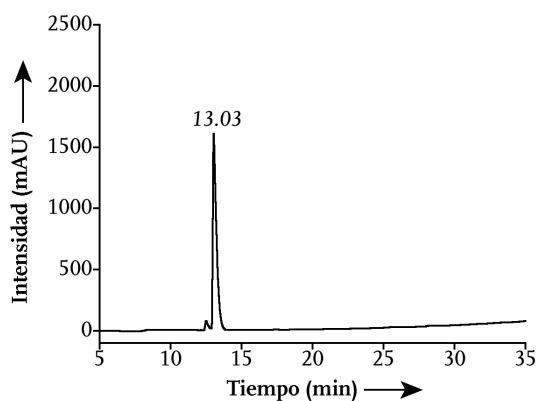


Figura 186. Cromatograma de HPLC del compuesto **6** gradiente 1, $\lambda = 222\text{ nm}$.

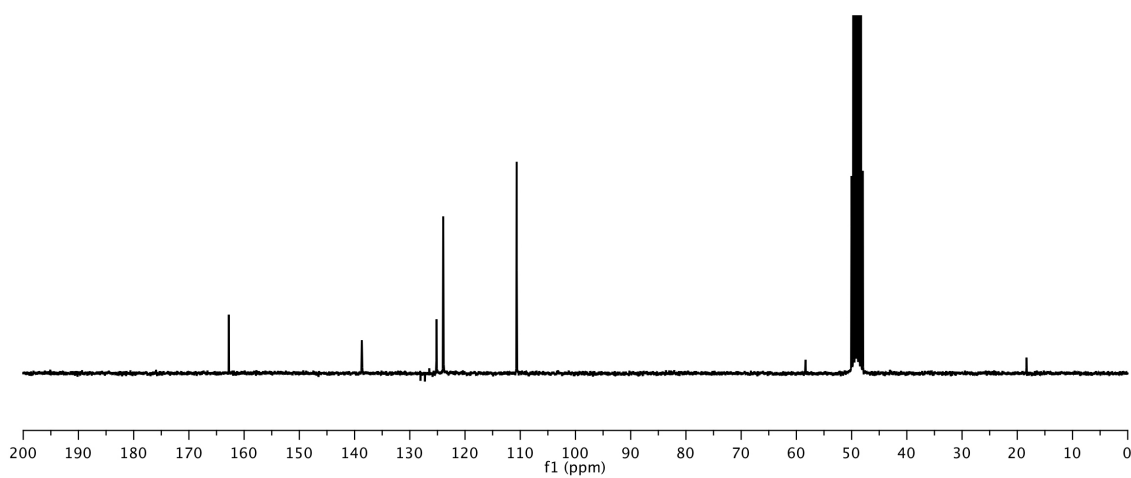
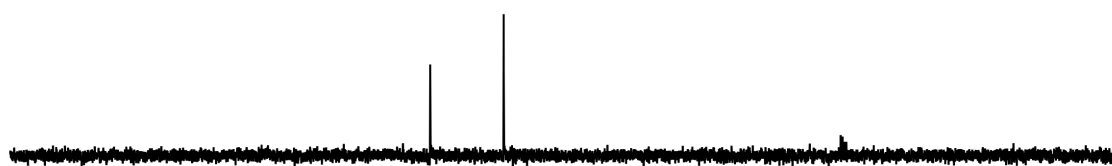
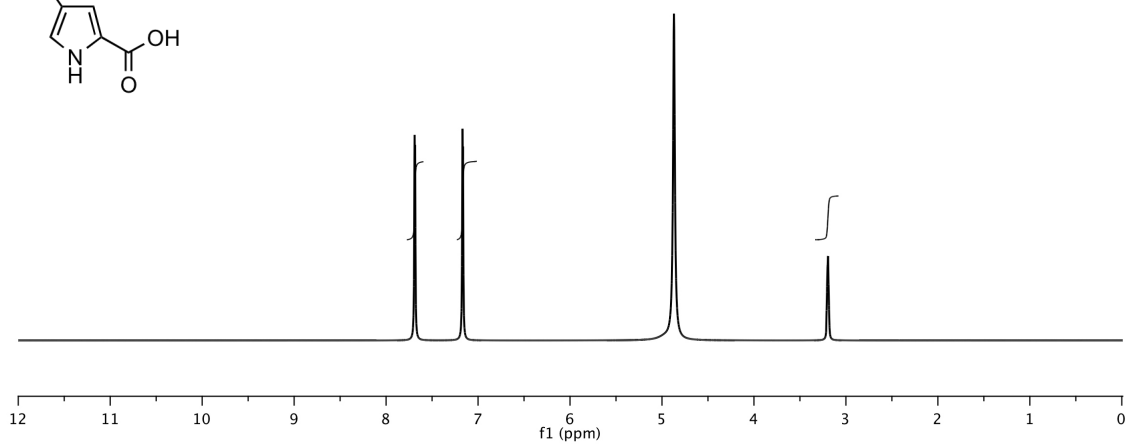
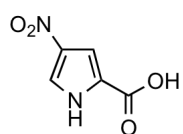
RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ): 3.18 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.68 (s, 1H).

RMN ^{13}C (250 MHz, CD_3OD , δ): 110.65 (CH), 123.82 (CH), 125.03 (C), 138.61 (C), 162.67 (C).

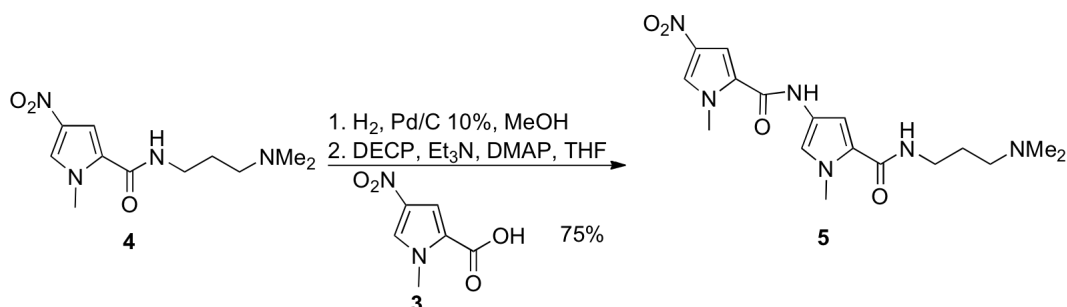
EM-IE (70 eV) m/z : M^+ 156 (63), 138 (13), 122 (12), 108 (9), 92 (6), 65 (100).

EMAR: calcd para $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$: 156.0171. Encontrada: 156.0172.

HPLC: $t_R = 13.03\text{ min}$.



N-[3-[(DIMETILAMINO)PROPI]L-1-METIL-4-[[[(1-METIL-4-NITRO-1*H*-PIRROL-2-IL) CARBONIL]AMINO]-1*H*-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (**5**) [217]



Una suspensión del pirrol **4** (1.20 g, 4.72 mmol) y Pd/C 10% (0.65 g) en MeOH (30 mL) se agitó durante 1 h a t.a. bajo atmósfera de H₂. El catalizador se separó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en DMF (2 mL) y se adicionó sobre una nueva disolución previamente preparada y enfriada a 0 °C, de **3** (0.57 g, 3.33 mmol), DECP [218] (0.63 mL 3.88 mmol), Et₃N (2.3 mL, 16.7 mmol) y DMAP catalítico, en THF (10 mL). La mezcla se agitó a t.a. durante 12 h, pasadas las cuales, se adicionó MeOH (5 ml) y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de alúmina (1% Et₃N en 10% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose un sólido amarillo (1.12 g, 75% rendimiento global, *mp* 190 °C).

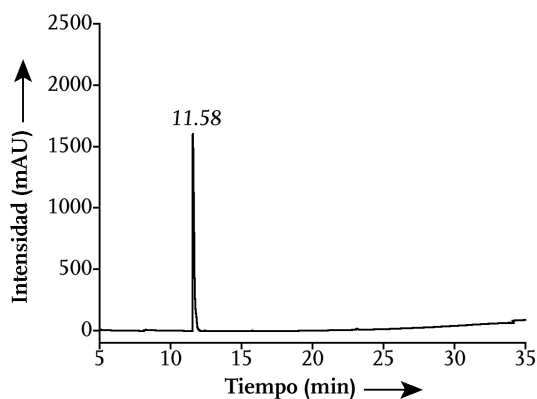


Figura 187. Cromatograma de HPLC del compuesto **5** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

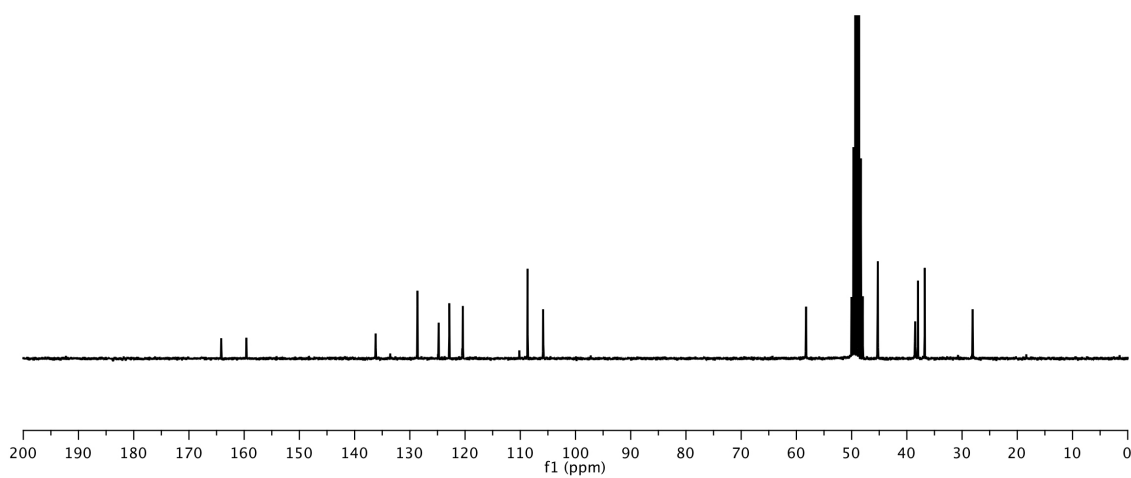
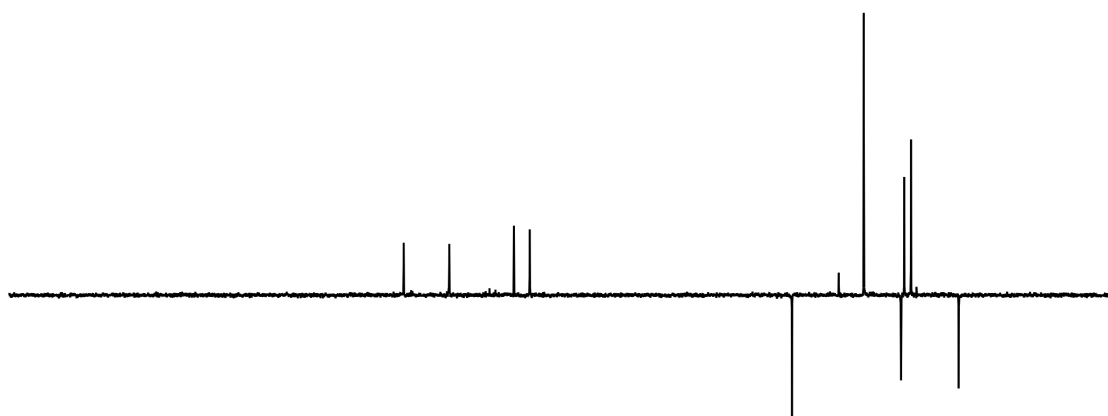
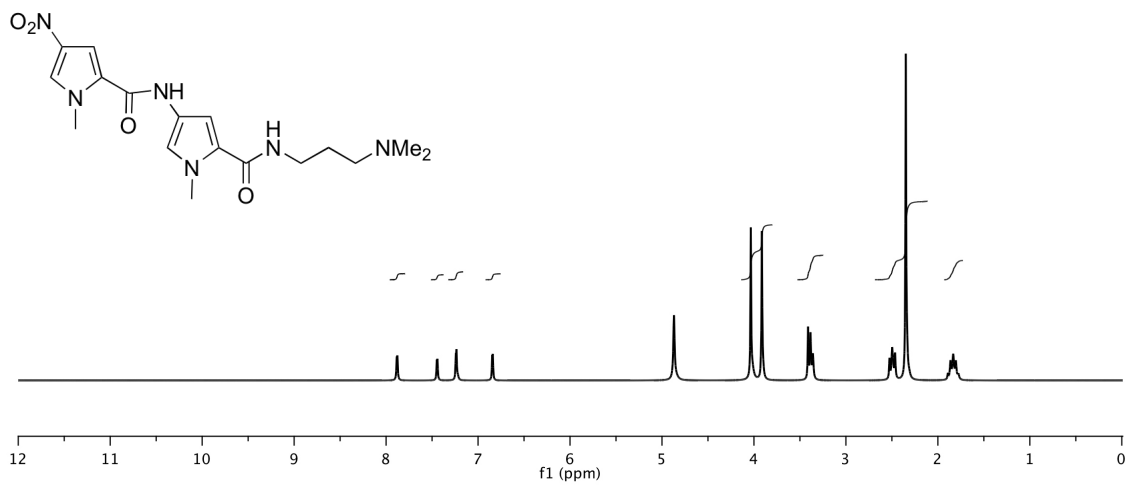
RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ): 1.83 (quin, *J* = 7.20 Hz, 2H), 2.35 (s, 6H), 2.50 (t, *J* = 7.61 Hz, 2H), 3.36–3.42 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.03 (s, 3H), 6.84 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.88 (s, 1H).

RMN ¹³C (250 MHz, CD₃OD, δ): 28.09 (CH₂), 36.64 (CH₃), 37.88 (CH₃), 38.41 (CH₂), 45.25 (CH₃), 58.12 (CH₂), 105.86 (CH), 108.68 (CH), 120.24 (CH), 122.72 (C), 124.66 (C), 128.63 (CH), 136.04 (C), 159.60 (C), 164.16 (C).

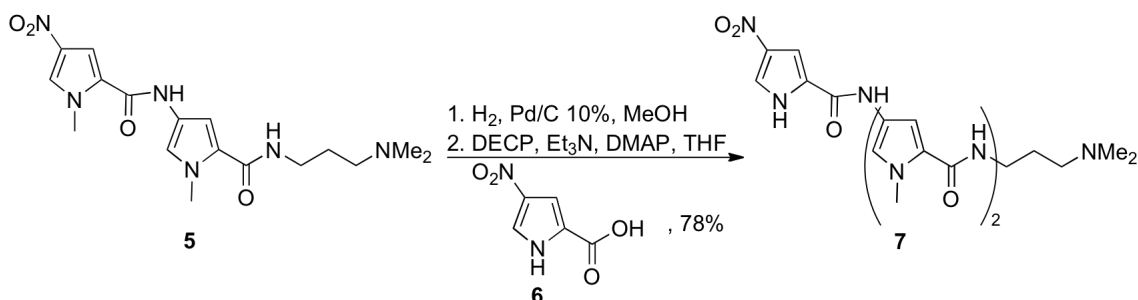
EM-FAB⁺ (*m/z*): [M + H]⁺ 377 (100), 361 (14), 217 (26), 157 (17).

EMAR: calcd para C₁₇H₂₅N₆O₄: 377.1859. Encontrada: 377.1945.

HPLC: *t*_R = 11.58 min.



N-[3-[(DIMETILAMINO)PROPI]-1-METIL-4-[[[(1-METIL-4-[(4-NITRO-1*H*-PIRROL-2-IL) CARBONIL]AMINO]-1*H*-PIRROL-2-IL) CARBONIL]AMINO]-1*H*-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (**7**)



Una suspensión del compuesto **5** (1.20 g, 2.90 mmol) y Pd/C 10% (0.65g) en MeOH (30 mL) se agitó durante 1 h bajo atmósfera de H₂. El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en DMF (8 mL) y se adicionó sobre una nueva disolución, previamente preparada y enfriada a 0 °C, de: **6** (0.56 g, 3.58 mmol), DECP (0.63 mL 3.88 mmol), Et₃N (2.10 mL, 14.90 mmol) y DMAP catalítico en THF (22 mL). La mezcla se agitó a t.a. durante 12 h. Posteriormente, se adicionó MeOH (5 ml) y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de alúmina (5%, MeOH/CH₂Cl₂) dando el producto deseado **7** como un sólido de color amarillo (1.09 g, 78% rendimiento global, pf 265 °C).

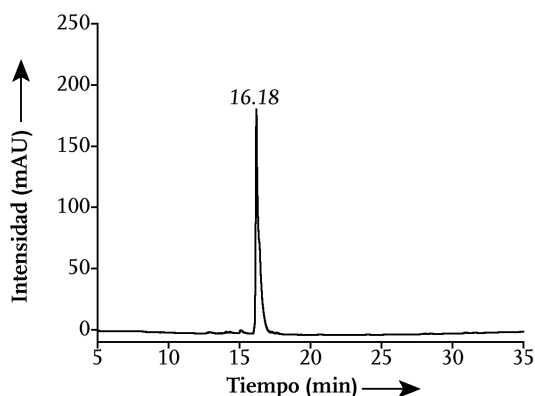


Figura 188. Cromatograma de HPLC del compuesto **7** gradiente 1, $\lambda = 222 \text{ nm}$.

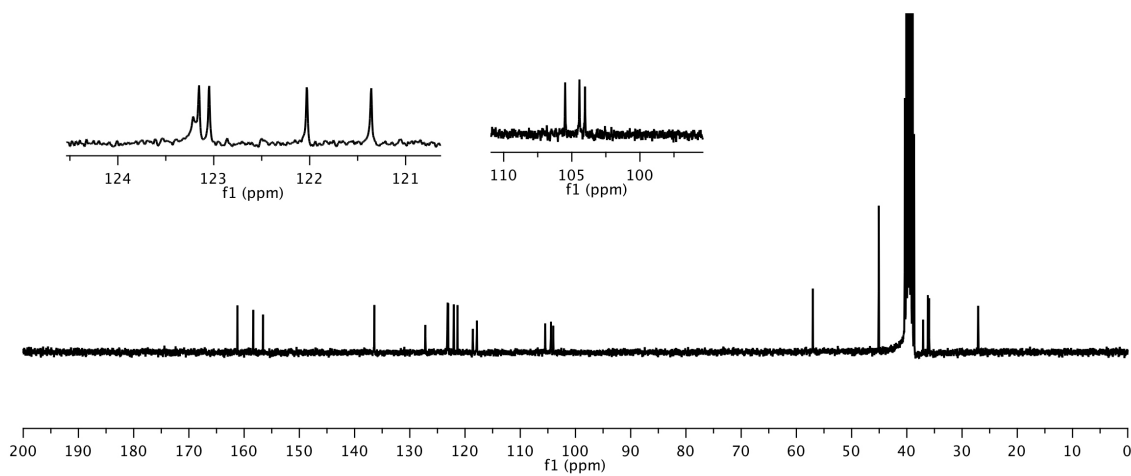
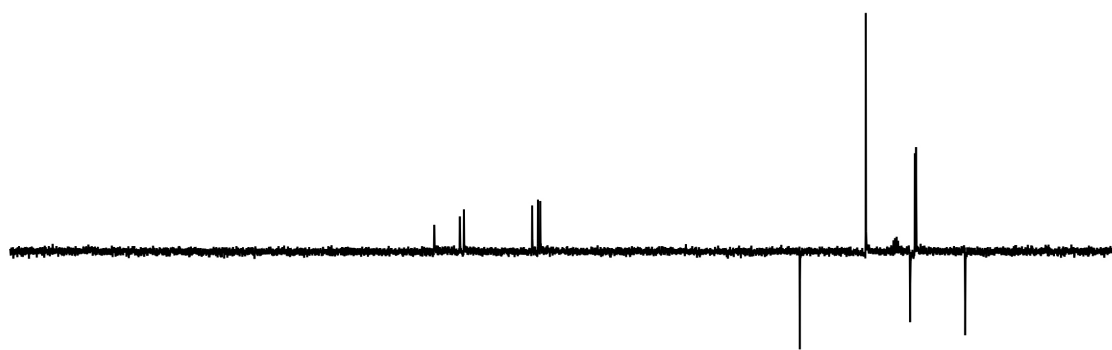
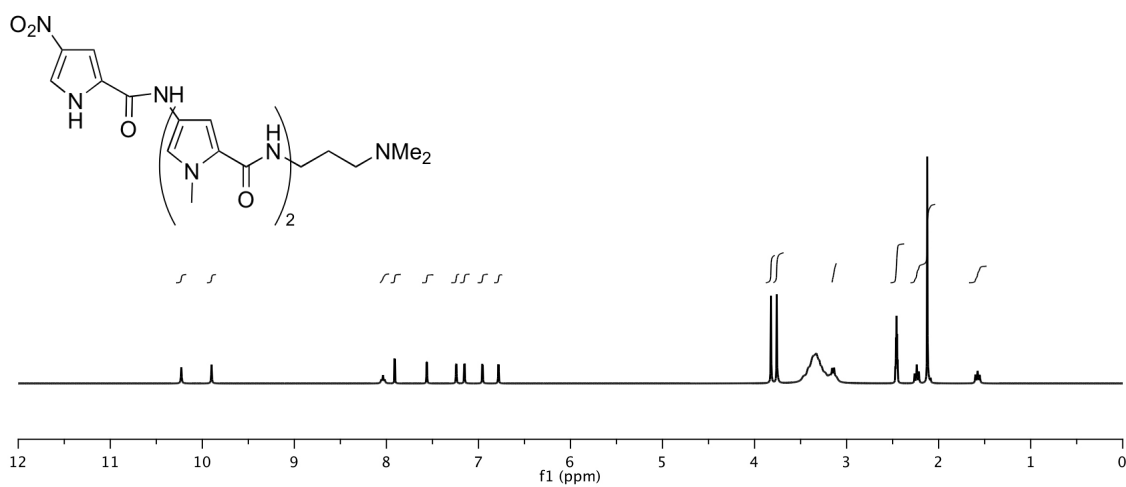
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.58 (t, *J* = 7.00 Hz, 2H), 2.12 (s, 6H), 2.24 (t, *J* = 7.01 Hz, 2H), 2.45–2.47 (m, 3H), 3.14–3.18 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.78 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.04 (t, *J* = 5.52 Hz, 1H), 9.90 (s, 1H), 10.23 (s, 1H).

RMN ¹³C (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 27.08 (CH₂), 35.97 (CH₃), 36.20 (CH₃), 37.05 (CH₂), 45.08 (CH₃), 57.02 (CH₂), 104.03 (CH), 104.37 (CH), 105.49 (CH), 117.85 (CH), 118.58 (CH), 121.36 (C), 122.03 (C), 123.05 (C), 123.15 (CH), 123.21 (C), 127.19 (C), 136.42 (C), 156.53 (C), 158.34 (C), 161.21 (C).

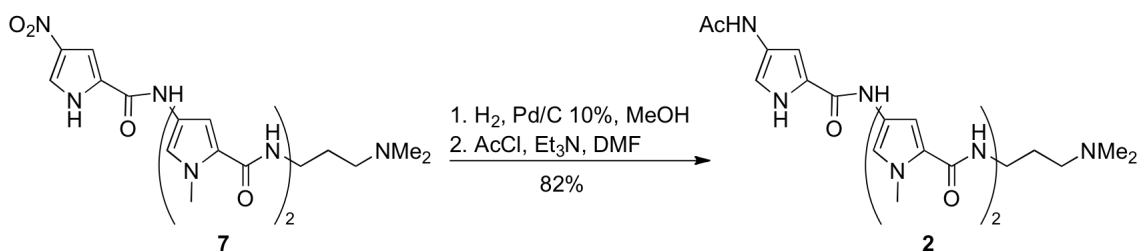
EM-FAB⁺ (*m/z*): [M + H]⁺ 485 (32), 460 (100), 307 (90), 289 (30).

EMAR: calcd para C₂₂H₂₉N₈O₅: 485.2183. Encontrada: 485.2276.

HPLC: *t*_R = 16.18 min.



4-([4-(ACETILAMINO)-1*H*-PIRROL-2-IL]CARBONIL)AMINO-*N*-[5-([3-(DIMETILAMINO)PROPI]AMINO)CARBONIL]-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL]-1-METIL-1*H*-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (**2**)[219]



Una suspensión del compuesto **7** (1.00 g, 2.18 mmol) y Pd/C 10% (0.60 g) en MeOH (40 mL) se agitó durante 45 min bajo una atmósfera de H₂. El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en DMF (15 mL) y se enfrió a 0 °C. Sobre esta disolución se añadió gota a gota, otra preparada previamente de Et₃N (1.20 mL, 8.51 mmol) y AcCl (0.30 mL, 4.16 mmol) en DMF (10 mL). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y a t.a. durante 2 h. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de alúmina (5%, MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose el producto deseado **2** como un sólido amarillo-anaranjado (0.89 g, 82% rendimiento global, pf 202 °C).

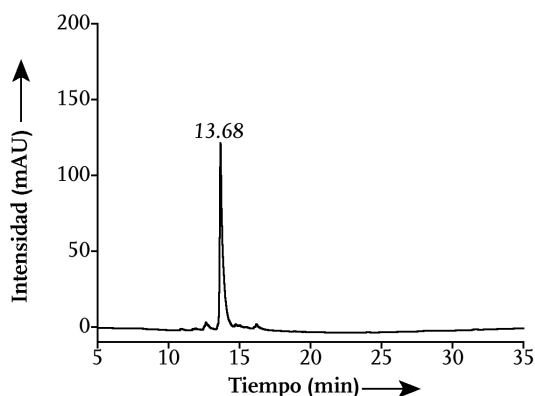


Figura 189. Cromatograma de HPLC del compuesto **2** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

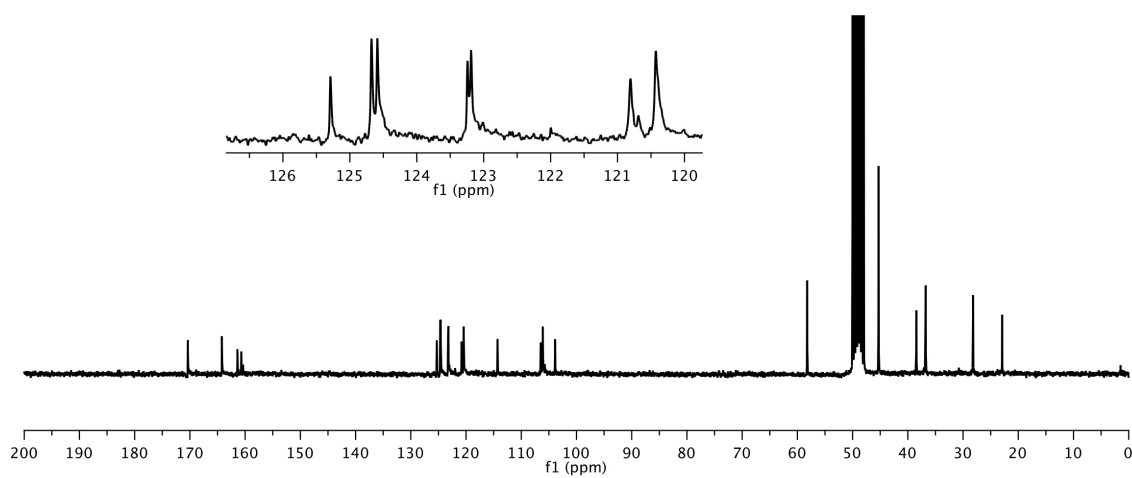
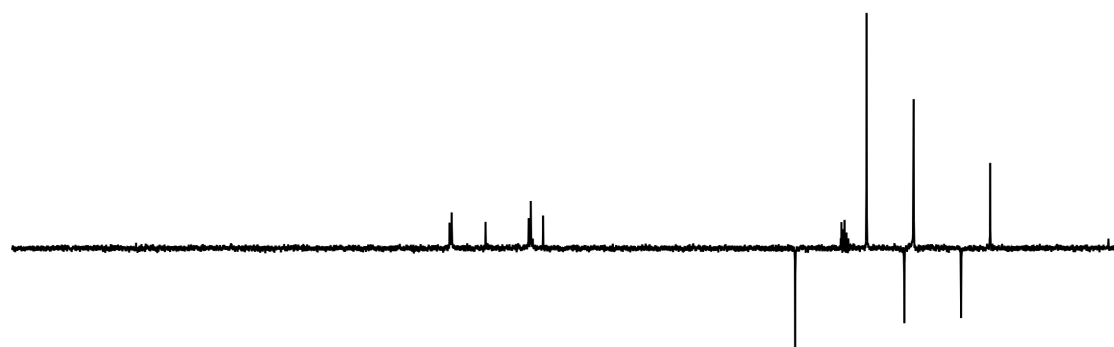
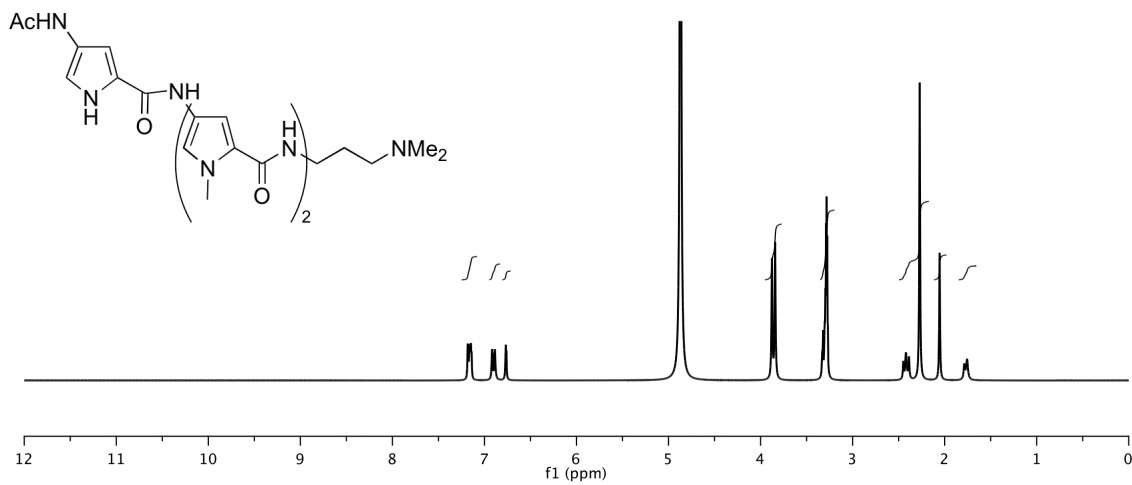
RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ): 1.76–1.79 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.27 (s, 6H), 2.42 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.27–3.30 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 6.76 (s, 1H), 6.89–6.92 (m, 2H), 7.14–7.18 (m, 3H).

RMN ¹³C (250 MHz, CD₃OD, δ): 22.91 (CH₃), 28.19 (CH₂), 36.76 (CH₃), 38.45 (CH₂), 45.30 (CH₃), 58.23 (CH₂), 103.88 (CH), 106.02 (CH), 106.48 (CH), 114.30 (CH), 120.43 (CH), 120.81 (CH), 123.19 (C), 123.24 (C), 124.59 (C), 124.68 (C), 125.29 (C), 160.67 (C), 161.39 (C), 164.22 (C), 170.37 (C).

EM-FAB⁺ (m/z): [M + H]⁺ 497 (7), 389 (100), 287 (42), 129 (26).

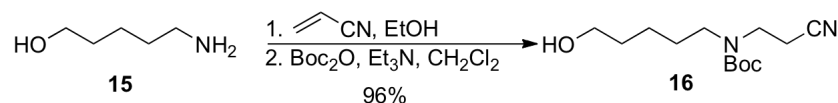
EMAR: calcd para C₂₄H₃₃N₈O₄: 497.2547. Encontrada: 497.2562.

HPLC: $t_R = 13.68$ min.



Síntesis de los conectores alquílicos

TERT-BUTIL(2-CIANOETIL)(5-HIDROXIPENTIL)CARBAMATO (**16**)



La síntesis del compuesto **16** se realizó siguiendo un procedimiento publicado previamente por nuestro grupo [81]. El compuesto comercial 5-aminopentanol **15** (11.99 g, 116.28 mmol) se disolvió en EtOH (120 mL) y sobre esta disolución, previamente enfriada a 0 °C, se adicionó lentamente (45 min) acrilonitrilo (7.66 mL, 116.28 mmol). La mezcla resultante se dejó que alcanzase t.a. y se agitó durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y sobre el residuo se añadió CH₂Cl₂ (120 mL). A continuación se añadió Et₃N (32.25 mL, 232.80 mmol) y Boc₂O (25.34 g, 116.28 mmol) y se agitó la mezcla durante 1 h a t.a. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadió HCl acuoso (75 mL, 3%) para facilitar la extracción de la mezcla con CH₂Cl₂ (2 × 75 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. El residuo aceitoso obtenido se identificó como el compuesto deseado **16** (28.69 g, 96% rendimiento global) que se utilizó en la reacción siguiente sin necesidad de purificación.

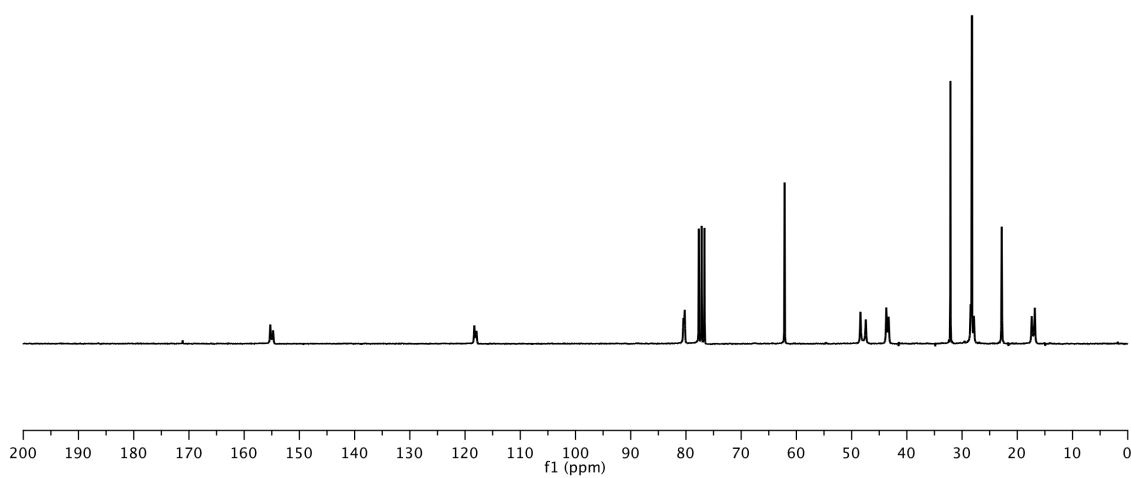
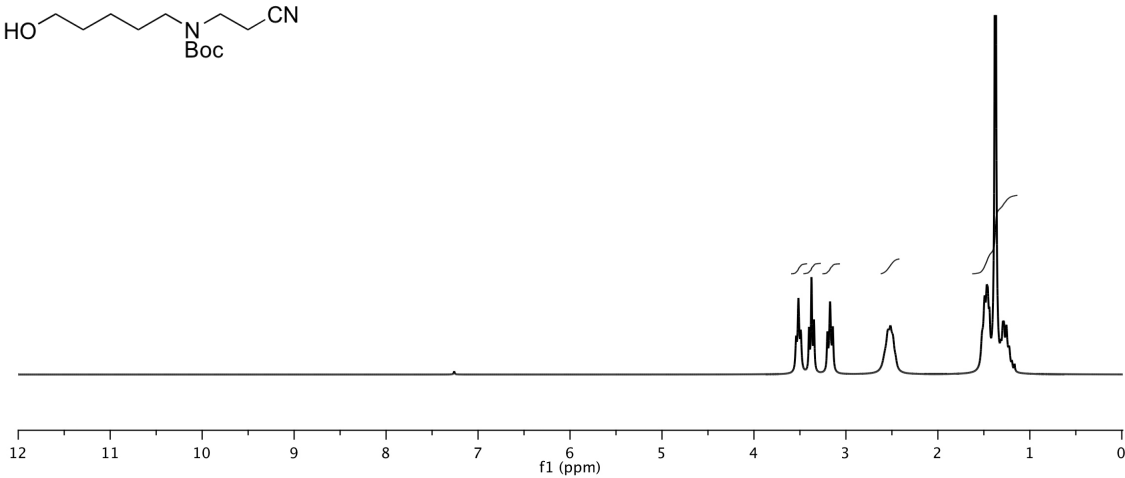
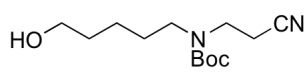
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.22–1.32 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.44–1.52 (m, 4H), 2.52 (ba, 2H), 3.17 (t, *J* = 7.32 Hz, 2H), 3.37 (t, *J* = 6.70 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 6.39 Hz, 2H).

RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ):^{xxxvi} 16.82 (CH₂), 17.38 (CH₂), 22.82 (CH₂), 27.69 (CH₂), 28.22 (CH₃), 28.22 (CH₂), 32.11 (CH₂), 43.29 (CH₂), 43.72 (CH₂), 47.42 (CH₂), 48.41 (CH₂), 62.13 (CH₂), 80.22 (C), 80.46 (C), 117.92 (C), 118.32 (C), 154.76 (C), 155.27 (C).

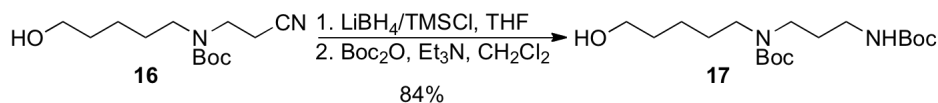
EM-IQ⁺ (70 eV) *m/z*: M⁺ 257 (1), 201 (26), 184 (53), 157 (100), 139 (36), 116 (72).

EMAR: calcd para C₁₃H₂₅N₂O₃: 257.1865. Encontrada: 257.1876.

^{xxxvi} Se observa una duplicación de las señales más cercanas al grupo Boc; este fenómeno no es extraño en los compuestos que presentan este grupo protector; es el resultado de la existencia de diferentes conformeros que intercambian lentamente en la escala del RMN.



TERT-BUTIL- $\{3-[(\textit{TERT}$ -BUTOXICARBONIL)AMINO]PROPIL $\}$ (5-HIDROXIPENTIL)CARBAMATO (17)



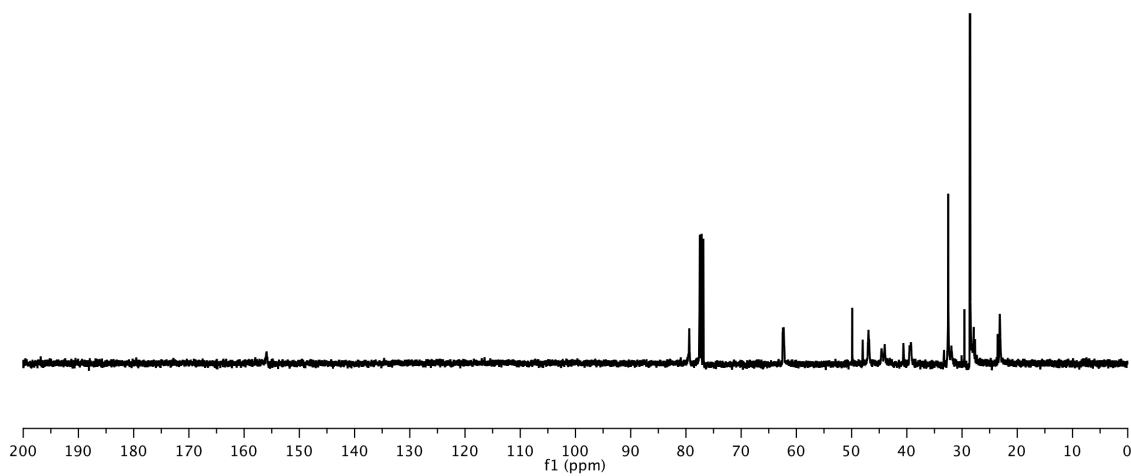
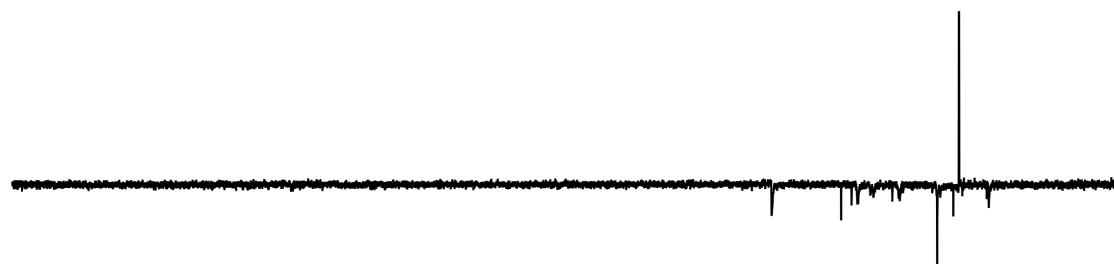
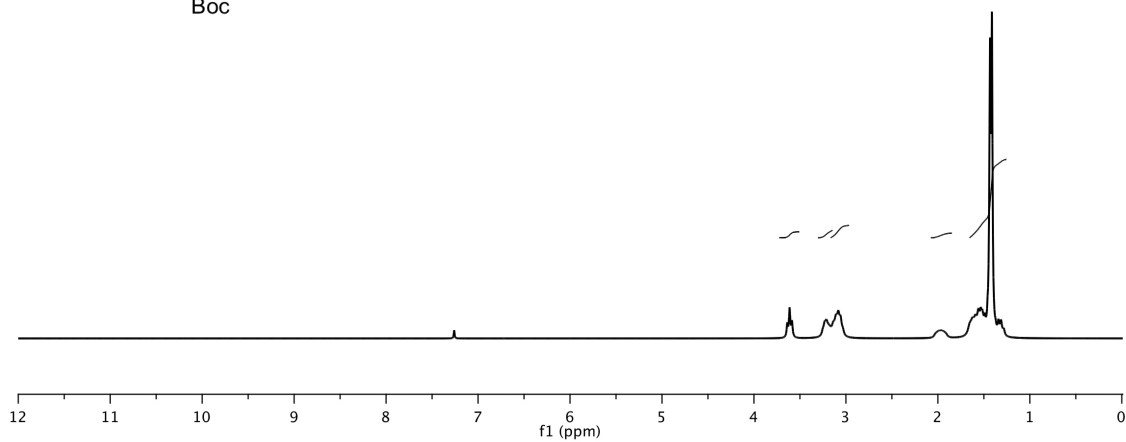
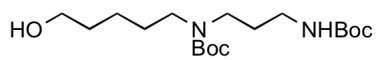
La síntesis del compuesto **17** se realizó siguiendo el procedimiento de reducción de nitrilos de Giannis y Sandhoff [141]. Sobre una suspensión de LiBH_4 (3.03 g, 137.70 mmol) en THF (41 mL) se adicionó lentamente (40 min) TMSCl (35.65 mL, 281.10 mmol). La suspensión resultante se agitó durante 45 min a t.a. para formar el complejo reductor $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$. A continuación, dicha suspensión se enfrió a 0°C y sobre ésta se añadió una disolución previamente preparada del nitrilo **16** (20.41 g, 79.75 mmol) en THF (41 mL). Después de 12 h la mezcla se enfrió de nuevo y la reacción se detuvo mediante la adición lenta y controlada de MeOH (10 mL). El disolvente se eliminó parcialmente, se añadió una disolución acuosa de KOH (25 mL, 10%) y se extrajo la mezcla con CH_2Cl_2 (3×40 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron y concentraron a presión reducida. El residuo aceitoso conteniendo la amina deseada (10.00 g, 38.46 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (50 mL) y sobre esta disolución se adicionaron: Et_3N (8.13 mL, 57.98 mmol) y Boc_2O (8.40 g, 38.46 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a t.a. y a continuación se añadió HCl acuoso (25 mL, 3%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2×25 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 y concentraron a presión reducida. El residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (5%, MeOH/ CH_2Cl_2) para dar el alcohol **17** como un aceite (13.32 g, 84% rendimiento global).

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ): 1.28–1.34 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.49–1.62 (m, 4H), 1.82–2.03 (m, 2H), 3.06–3.11 (m, 4H), 3.22 (ba, 2H), 3.61 (t, $J = 6.31$ Hz, 2H).

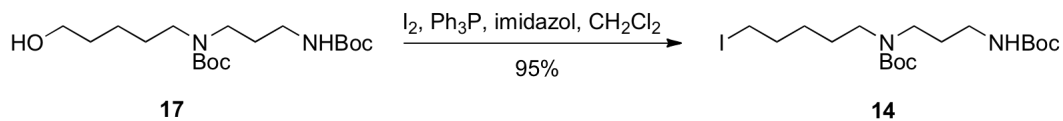
RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , δ):^{xxxv} 23.16 (CH_2), 28.56 (CH_3), 29.57 (CH_2), 32.51 (CH_2), 39.24 (CH_2), 40.63 (CH_2), 44.01 (CH_2), 44.58 (CH_2), 46.94 (CH_2), 47.99 (CH_2), 49.88 (CH_2), 62.30 (CH_2), 79.41 (C), 115.93 (C).

EM-IQ $^+$ (70 eV) m/z : M^+ 361 (100), 261 (47), 205 (44).

EMAR: calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$: 361.2703. Encontrada: 361.2702.



TERT-BUTIL- $\{3-[(\textit{TERT}$ -BUTOXICARBONIL)AMINO]PROPI $\}$ (5-YODOPENTIL)CARBAMATO (**14**)



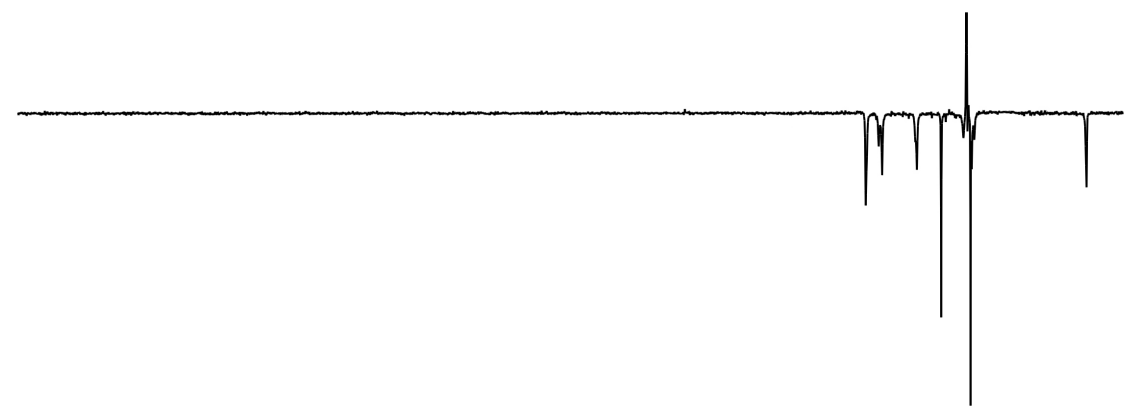
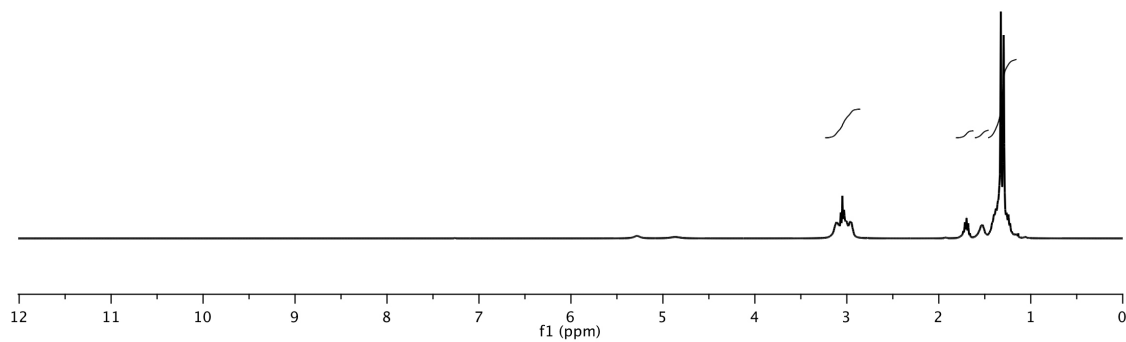
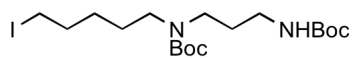
La yodación del compuesto **17** se realizó siguiendo el procedimiento clásico descrito por Garegg y Samuelsson [117]. Sobre una disolución de: Ph_3P (1.34 g, 5.11 mmol), imidazol (0.48 g, 6.99 mmol) y el alcohol **17** (1.68 g, 4.66 mmol) en CH_2Cl_2 (35 mL), se adicionó I_2 (1.16 g, 4.66 mmol). De forma instantánea se observó la formación de un precipitado blanco, correspondiente al óxido de fosfina. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min a t.a., posteriormente, se añadió sobre una disolución acuosa de NaHSO_3 (20 mL, 1M) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3×30 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 y concentraron a presión reducida. El residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (20 \rightarrow 60%, AcOEt/hexano) para dar un aceite (2.08 g, 95%) que se identificó como el yoduro **14**.

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ): 1.20–1.44 (m, 22H), 1.48–1.62 (m, 2H), 1.70 (quin, $J = 7.15$ Hz, 2H), 2.88–3.18 (m, 8H).

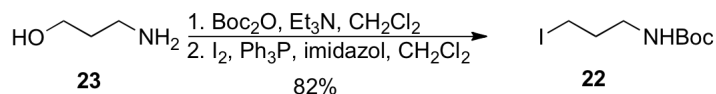
RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.55 (CH_2), 27.42 (CH_2), 27.56 (CH_2), 28.30 (CH_3), 32.88 (CH_2), 37.28 (CH_2), 43.58 (CH_2), 44.20 (CH_2), 46.40 (CH_2), 78.57 (C), 79.29 (C), 155.84 (C).

EM-FAB $^+$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 471 (45), 371 (24), 315 (100).

EMAR: calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{I}$: 471.1720. Encontrada: 471.1703.



TERT-BUTIL(3-YODOPROPIL)CARBAMATO (22)



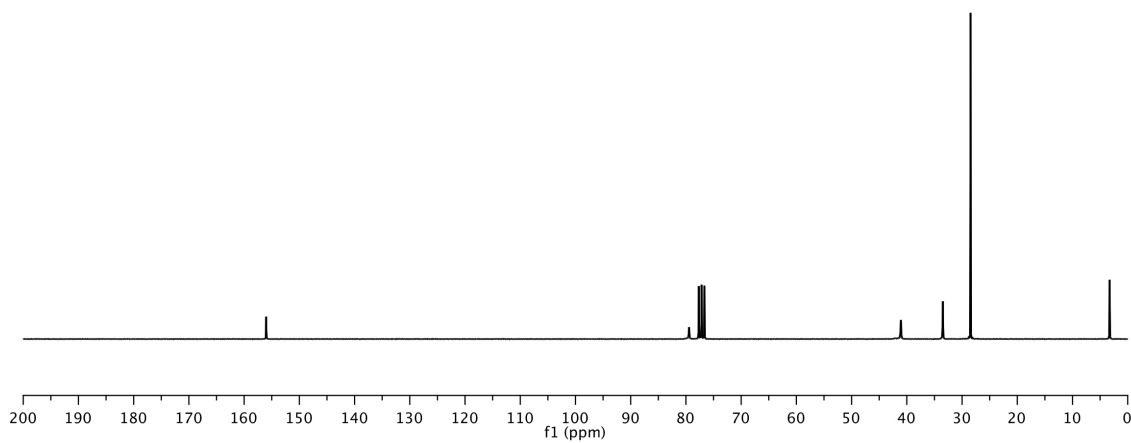
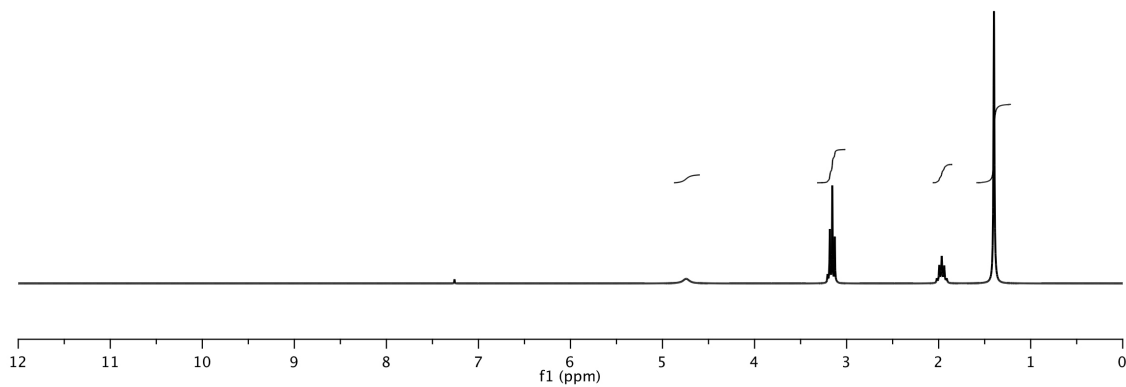
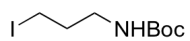
El compuesto comercial 3-amino-1-propanol (**23**) (5.10 mL, 66.70 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (150 mL). Sobre esta disolución se adicionaron Et₃N (13.86 mL, 100.05 mmol) y Boc₂O (16.00 g, 73.30 mmol); la mezcla resultante se agitó durante 2 h a t.a. después de las cuales se añadió HCl acuoso (200 ml, 3%) y se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂ (3 × 150 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido (2.40 g, 13.69 mmol) se redisolvió en CH₂Cl₂ (50 mL). Sobre esta disolución se añadió Ph₃P (3.95 g, 15.06 mmol), imidazol (1.40 g, 20.54 mmol) y I₂ (3.47 g, 13.69 mmol) [117]. Se observó inmediatamente la formación de un precipitado blanco correspondiente al óxido de fosfina. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min a t.a., posteriormente se añadió sobre una disolución acuosa de NaHSO₃ (40 mL, 1M) y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 × 50 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (20 → 60%, AcOEt/hexano) para dar el yoduro **22** como un aceite (3.44 g, 82% rendimiento global).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.40 (s, 9H), 1.99 (quin, *J* = 6.70 Hz, 2H), 3.16 (t, *J* = 6.83 Hz, 4H), 4.74 (ba, 1H).

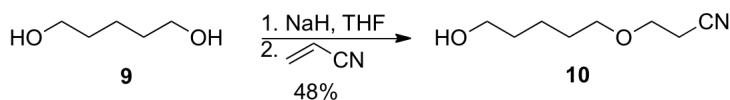
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 3.28 (CH₂), 28.46 (CH₃), 33.48 (CH₂), 41.07 (CH₂), 79.43 (C), 156.27 (C).

EM-IQ⁺ (70 eV) *m/z*: [M+H]⁺ 286 (23), 230 (86), 186 (28), 102 (88).

EMAR: calcd para C₈H₁₇NO₂I: 286.0304. Encontrada: 286.0291.



3-[(5-HIDROXIPENTIL)OXI]PROPANONITRILLO (**10**)



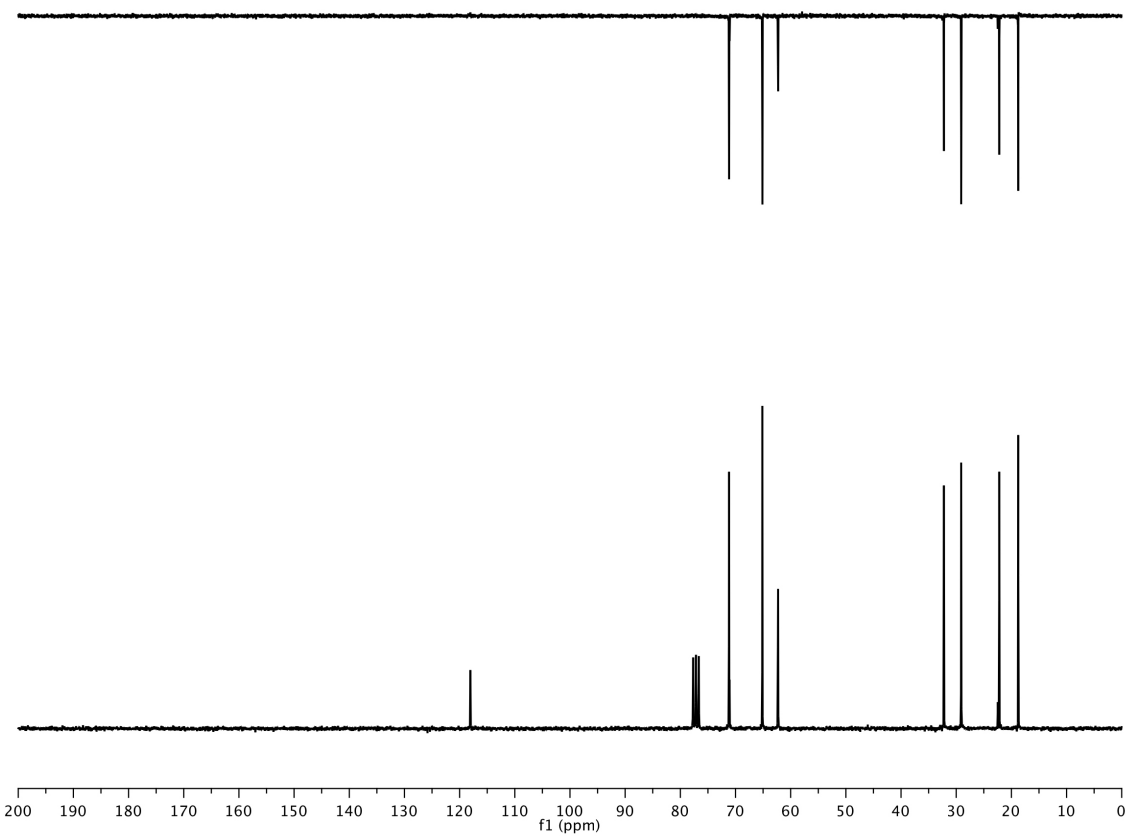
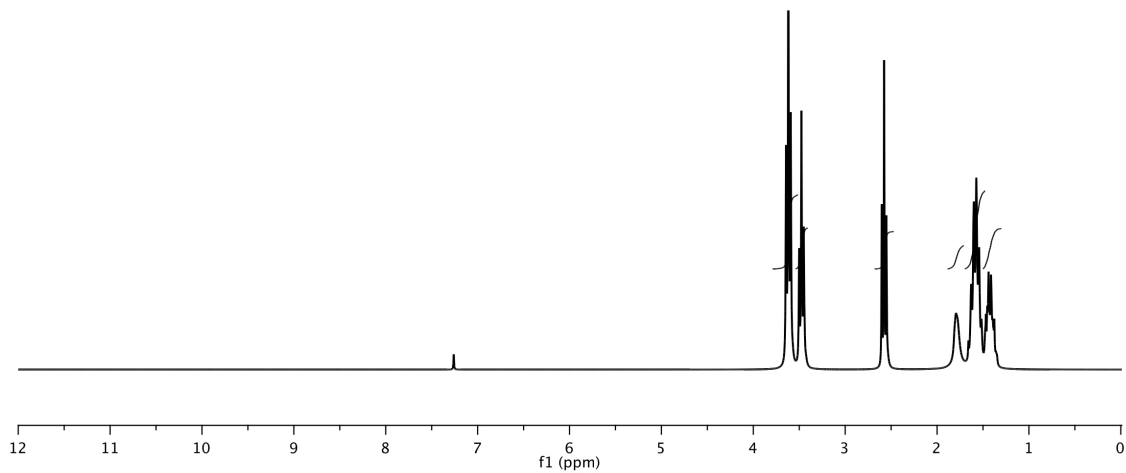
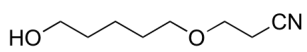
El 1,5-pentanodiol (3.00 mL, 28.62 mmol) se adicionó sobre una suspensión previamente preparada y enfriada a 0 °C de NaH (0.86 g, 28.62 mmol) en THF (50 mL). La mezcla se agitó 5 min a 0 °C y 20 min a t.a., enfrió a 0 °C y sobre ella se añadió acrilometilo (1.50 mL, 22.82 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 10 h a t.a., después de las cuales se añadió lentamente MeOH (5 mL). La mezcla se vertió a continuación sobre H₂O (20 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 25 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (3%, MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose el producto deseado **10** como un aceite (2.16 g, 48% rendimiento global).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.35–1.47 (m, 2H), 1.52–1.66 (m, 4H), 1.79 (ba, 1H), 2.58 (t, *J* = 6.32 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 6.36 Hz, 2H), 3.62 (t, *J* = 6.35 Hz, 4H).

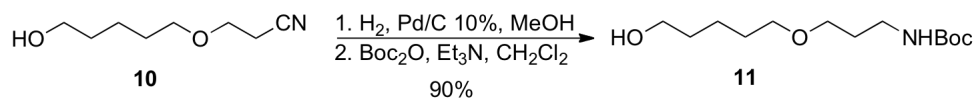
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 18.76 (CH₂), 22.20 (CH₂), 29.10 (CH₂), 32.24 (CH₂), 62.28 (CH₂), 65.13 (CH₂), 71.18 (CH₂), 118.05 (C).

EM-IQ⁺ (70 eV) *m/z*: [M+H]⁺ 158 (10), 140 (30), 69 (100).

EMAR: calcd para C₈H₁₆NO₂: 158.1181. Encontrada: 158.1183.



TERT-BUTIL{3-[(5-HIDROXIPENTIL)OXI]PROPIl}CARBAMATO (11)



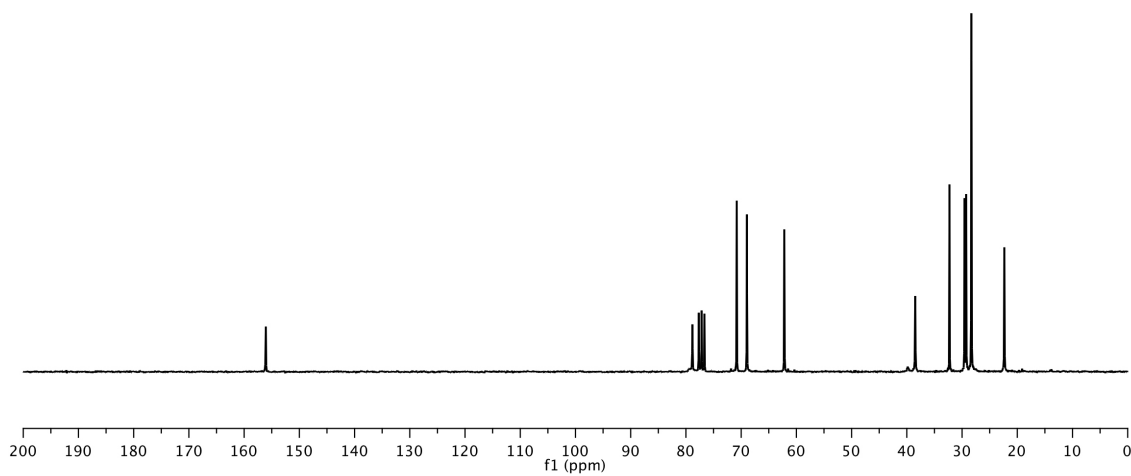
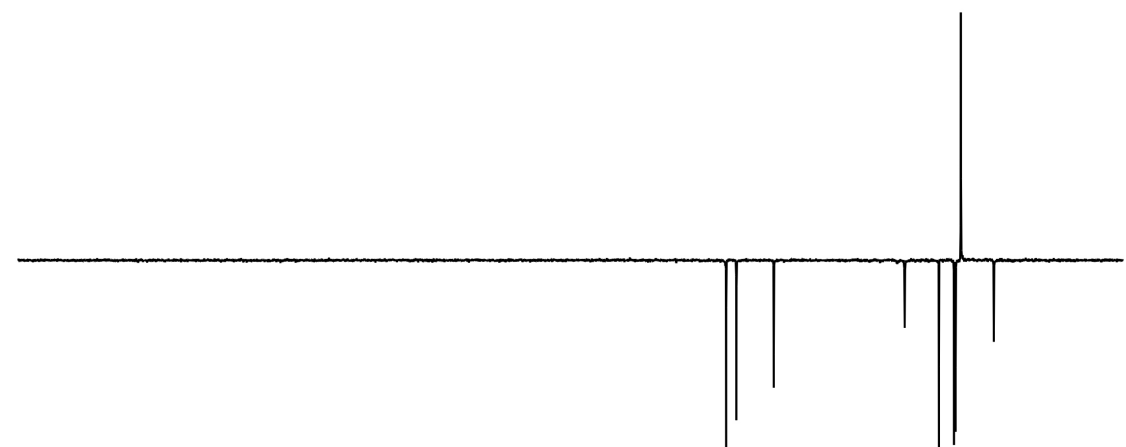
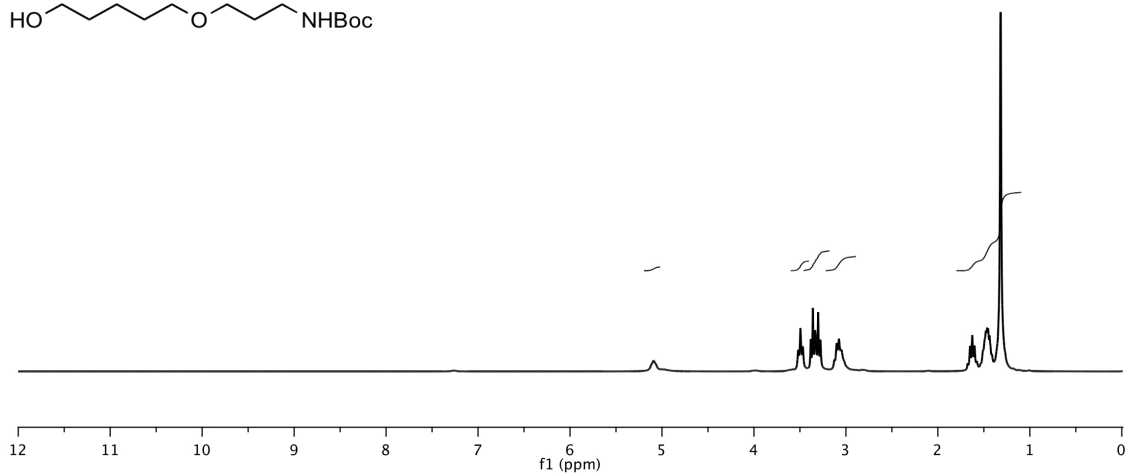
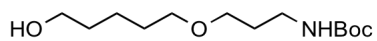
Una disolución del nitrilo **10** (340 mg, 2.15 mmol), Boc₂O (521 mg, 2.39 mmol), Et₃N (0.5 mL, 3.26 mmol) y DMAP en cantidad catalítica en THF (30 mL) se hidrogenó a presión atmosférica sobre Pd/C 10% (150 mg) durante 12 h. El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el disolvente se concentró a presión reducida. EL crudo de reacción se vertió sobre HCl acuoso (10 ml, 3%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y concentraron a presión reducida. El residuo aceitoso resultante se identificó como el compuesto deseado **11** (507 mg, 90% rendimiento global), que se usó en la siguiente reacción sin necesidad de purificación.

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.32 (ba, 11H), 1.41–1.54 (m, 4H), 1.62 (c, *J* = 6.21 Hz, 2H), 3.05–3.13 (m, 3H), 3.30 (t, *J* = 6.48 Hz, 2H), 3.36 (t, *J* = 6.00 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 6.29 Hz, 2H), 5.09 (ba, 1H).

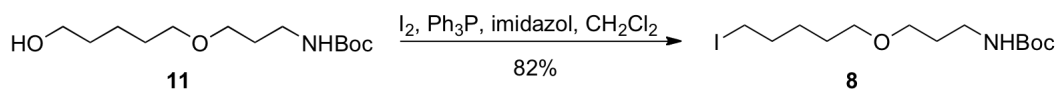
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 23.34 (CH₂), 28.31 (CH₃), 29.26 (CH₂), 29.56 (CH₂), 32.27 (CH₂), 38.48 (CH₂), 62.19 (CH₂), 68.96 (CH₂), 70.81 (CH₂), 78.82 (C), 156.07 (C).

EM-IQ⁺ (70 eV) *m/z*: [M+H]⁺ 262 (26), 206 (34), 162 (100), 102 (56).

EMAR: calcd para C₁₃H₂₈NO₄: 262.2018. Encontrada: 262.2014.



TERT-BUTIL{3-[(5-YODOPENTIL)OXI]PROPIL}CARBAMATO (**8**)



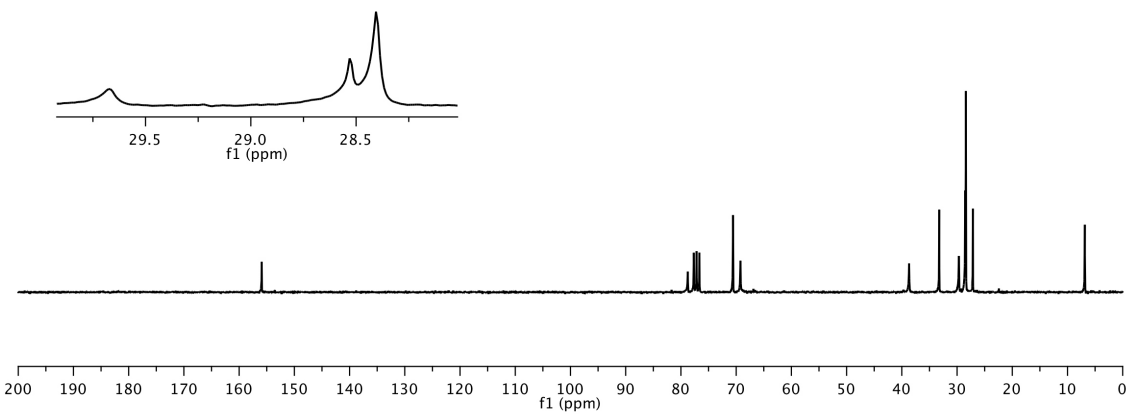
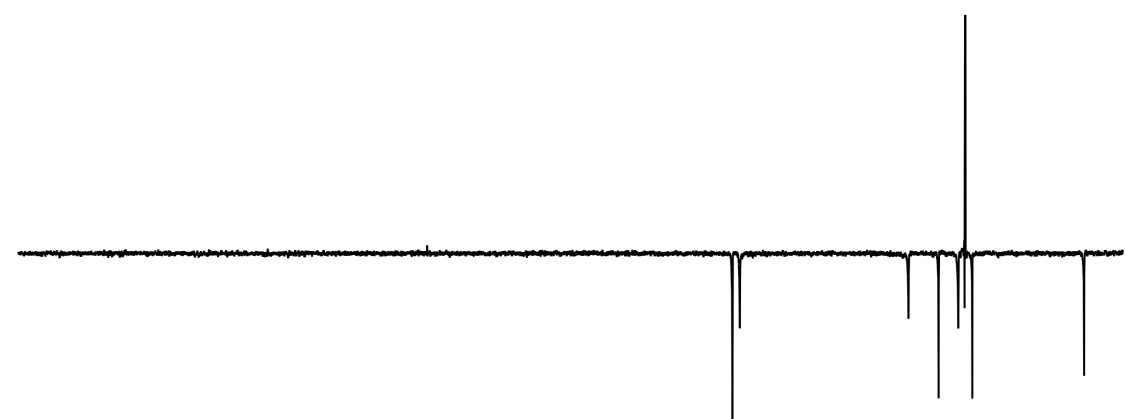
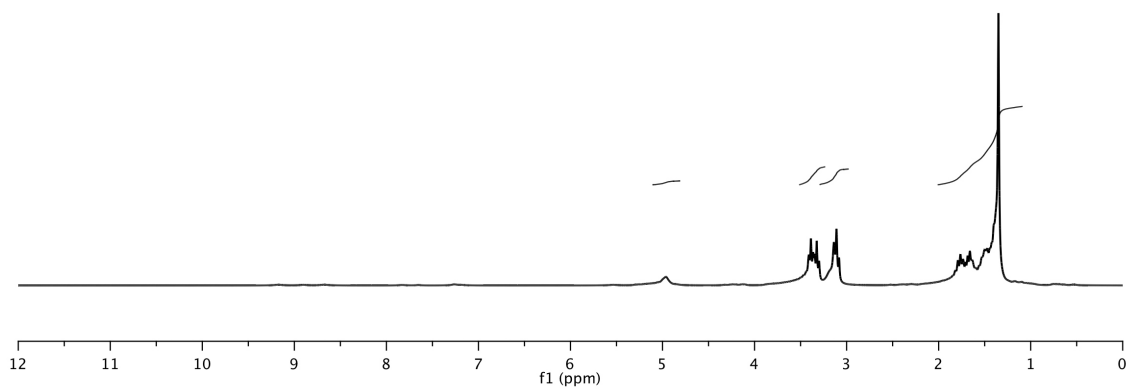
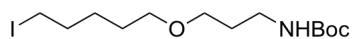
La halogenación del compuesto **11** se realizó utilizando el reactivo de yodación de Garegg [117]. Sobre una disolución de: Ph_3P (723 mg, 2.76 mmol), imidazol (256 mg, 3.76 mmol) y el alcohol **11** (655 mg, 2.51 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL), se adicionó I_2 (637 mg, 2.51 mmol). Inmediatamente se observó la formación de un precipitado blanco correspondiente al óxido de fosfina. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min a t.a., se añadió sobre una disolución acuosa de NaHSO_3 (10 mL, 1M) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2×20 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 y concentraron a presión reducida. El residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (20 \rightarrow 60%, AcOEt/hexano) para dar el yoduro **8** como un aceite (761 g, 82%).

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ): 1.35 (ba, 11H), 1.42–1.56 (m, 2H), 1.60–1.71 (m, 2H), 1.74–1.82 (m, 2H), 3.08–3.14 (m, 4H), 3.30–3.41 (m, 4H), 4.96 (ba, 1H).

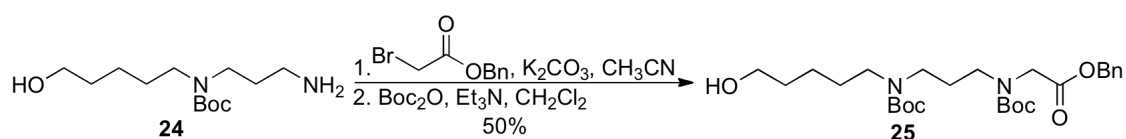
RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.87 (CH_2), 27.13 (CH_2), 28.40 (CH_3), 28.53 (CH_2), 29.67 (CH_2), 33.23 (CH_2), 38.68 (CH_2), 69.22 (CH_2), 70.57 (CH_2), 78.76 (C), 155.91 (C).

EM-IQ $^+$ (70 eV) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 372 (10), 316 (8), 272 (45), 57 (100).

EMAR: calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{I}$: 372.1036. Encontrada: 372.1034.



BENCIL *N*-(*TERT*-BUTOXICARBONIL)-*N*-{3-[(*TERT*-BUTOXICARBONIL)(5-HIDROXIPENTIL)AMINO]PROPIL}GLICINATO (**25**)



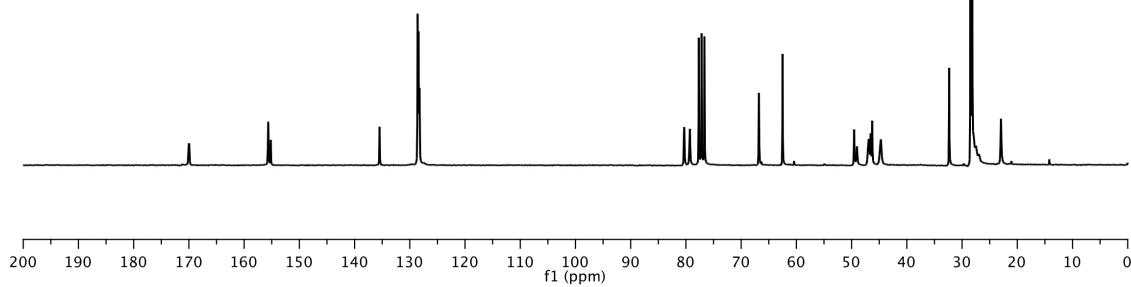
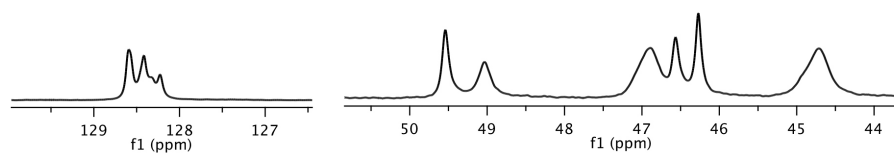
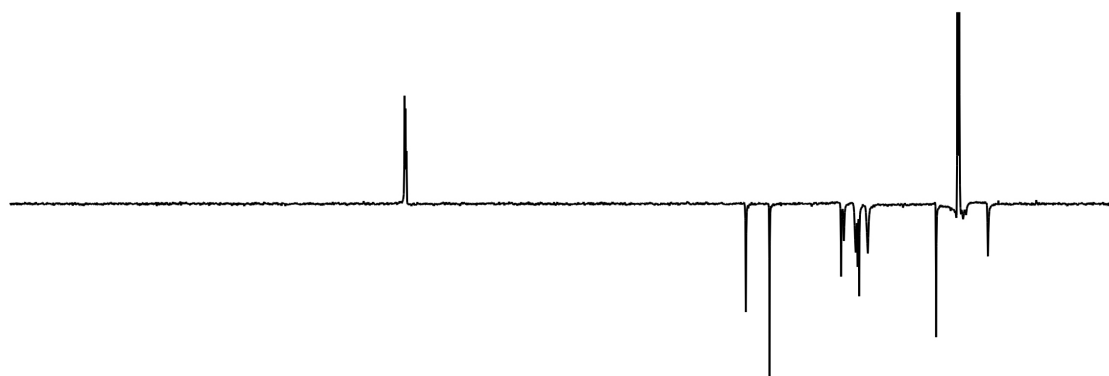
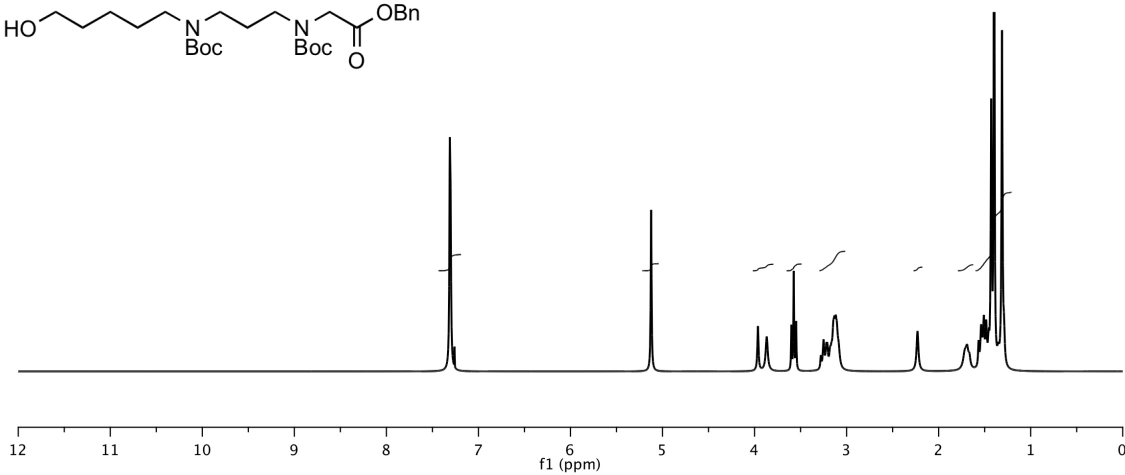
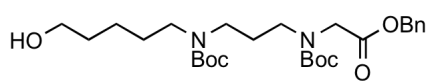
La síntesis del compuesto **25** se realizó siguiendo el procedimiento previamente publicado por nuestro grupo [155]. La amina **24** (2.45 g, 9.43 mmol) se disolvió en CH₃CN (75 mL). Sobre esta disolución se añadió K₂CO₃ seco (5.23 g, 37.90 mmol) y la suspensión resultante se agitó durante 10 min a 0 °C. A continuación, se adicionó 2-bromoacetato de bencilo (1.92 g, 8.42 mmol) y la mezcla se agitó a t.a. durante 12 h. A continuación se eliminó parcialmente el disolvente y el residuo se vertió sobre H₂O (20 mL) para llevar a cabo la extracción con CH₂Cl₂ (3 × 25 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (5 → 10%, MeOH/CH₂Cl₂). El producto obtenido se redisolvió en CH₂Cl₂ (30 mL) y sobre esta disolución se adicionaron Boc₂O (4.09 g, 18.75 mmol) y Et₃N (3.90 mL, 28.06 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 1 h, se añadió sobre HCl acuoso (30 mL, 3%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ y concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (5%, MeOH/CH₂Cl₂) para dar el alcohol **25** como un aceite (2.40 g, 50% rendimiento global).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.31 (ba, 4H), 1.40 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.45–1.57 (m, 2H), 1.70–1.75 (m, 2H), 2.23 (s, 1H), 3.05–3.30 (m, 6H), 3.54 (t, *J* = 6.20 Hz, 2H), 3.87 (s, 1H), 3.96 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 7.31 (s, 5H).

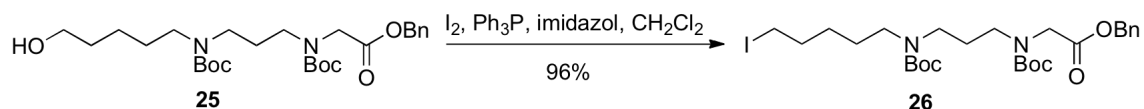
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 22.96 (CH₂), 28.15 (CH₃), 28.48 (CH₃), 32.34 (CH₂), 44.71 (CH₂), 46.27 (CH₂), 46.56 (CH₂), 46.89 (CH₂), 49.03 (CH₂), 49.54 (CH₂), 62.50 (CH₂), 66.79 (CH₂), 79.28 (C), 80.31 (C), 128.23 (CH), 128.42 (CH), 128.59 (CH), 135.48 (C), 155.17 (C), 155.63 (C), 169.94 (C).

EM-IQ⁺ (70 eV) *m/z*: [M+H]⁺ 509 (35), 409 (100), 353 (97), 309 (69).

EMAR: calcd para C₂₇H₄₅N₂O₇: 509.3149. Encontrada: 509.3134.



BENCIL N -(*TERT*-BUTOXICARBONIL)- N -{3-[(*TERT*-BUTOXICARBONIL)(5-YODOPENTIL)AMINO]PROPIL}GLICINATO (**26**)



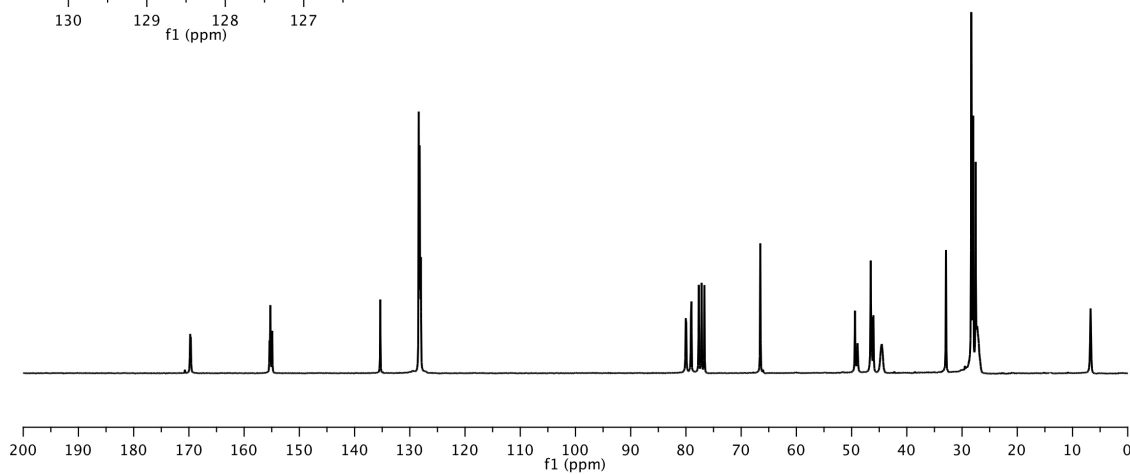
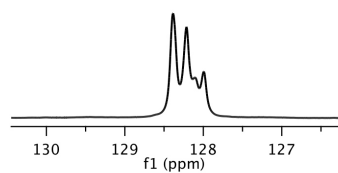
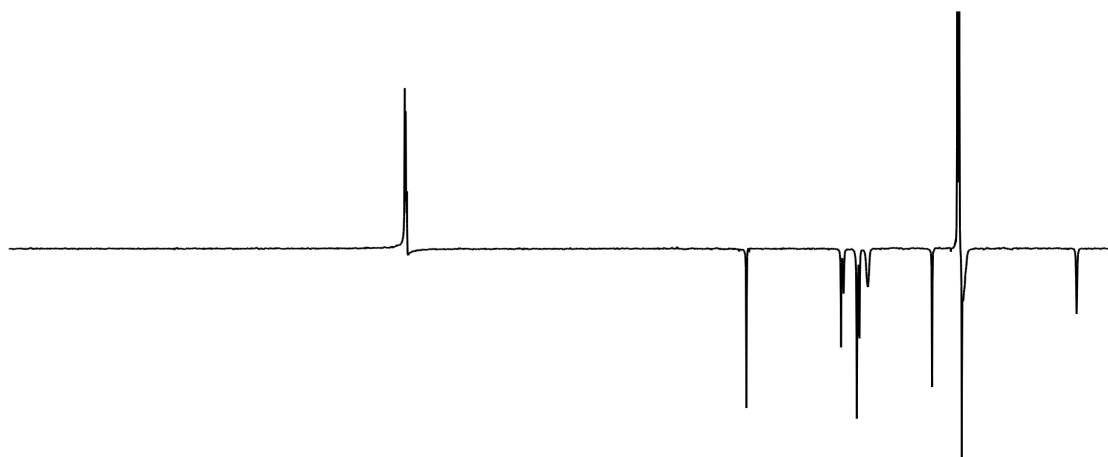
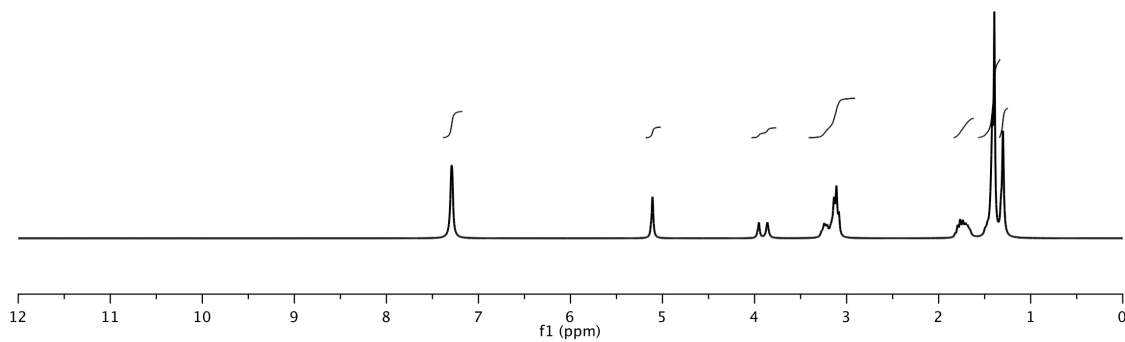
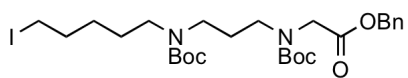
La síntesis del compuesto **26** se realizó usando el reactivo de Garegg [117]. Sobre una disolución de: Ph_3P (1.35 g, 5.14 mmol), imidazol (0.48 mg, 7.04 mmol) y el alcohol **25** (2.40 g, 4.72 mmol) en CH_2Cl_2 (30 mL) se adicionó I_2 (1.20 g, 4.72 mmol). Inmediatamente se observó la formación de un precipitado blanco correspondiente al óxido de fosfina. La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 10 min, se añadió sobre una disolución acuosa de NaHSO_3 (30 mL, 1M) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2×30 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 y concentraron a presión reducida. El residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (20 \rightarrow 60%, AcOEt/hexano) para dar el yoduro **26** como un aceite (2.80 g, 96%).

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ): 1.30 (ba, 4H), 1.39 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.63–1.83 (m, 4H), 3.05–3.30 (m, 6H), 3.86 (s, 1H), 3.96 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 7.29 (s, 5H).

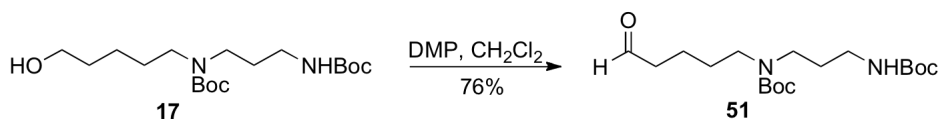
RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.72 (CH_2), 27.53 (CH_2), 27.98 (CH_3), 28.33 (CH_3), 32.91 (CH_2), 44.55 (CH_2), 46.04 (CH_2), 46.54 (CH_2), 48.93 (CH_2), 49.39 (CH_2), 66.53 (CH_2), 79.00 (C), 80.03 (C), 128.00 (CH), 128.21 (CH), 128.39 (CH), 135.35 (C), 154.91 (C), 155.25 (C), 169.67 (C).

EM-FAB $^+$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 619 (49), 519 (61), 419 (40).

EMAR: calcd para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6\text{I}$: 619.2166. Encontrada: 619.2135.



TERT-BUTIL{3-[(*TERT*-BUTOXICARBONIL)AMINO]PROPIL} (5-OXOPENTIL)CARBAMATO (**51**)



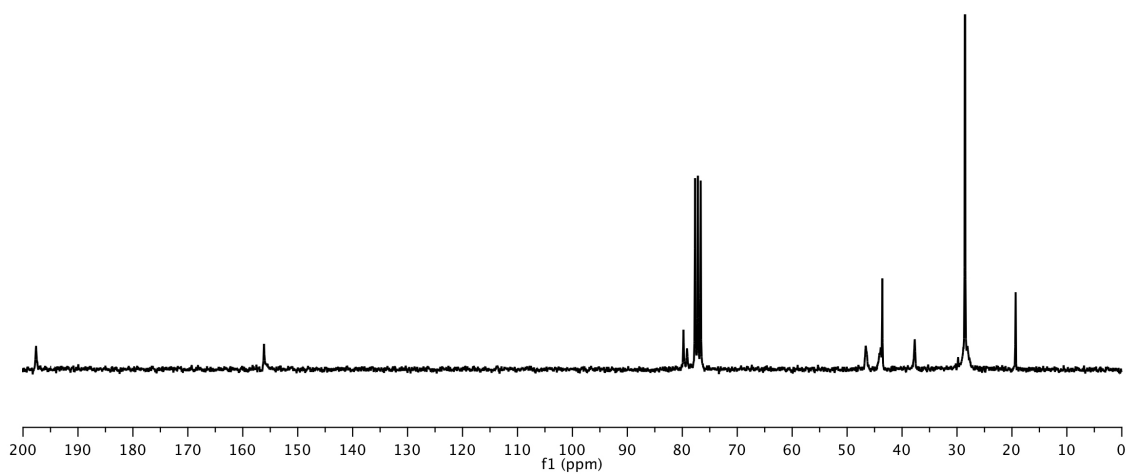
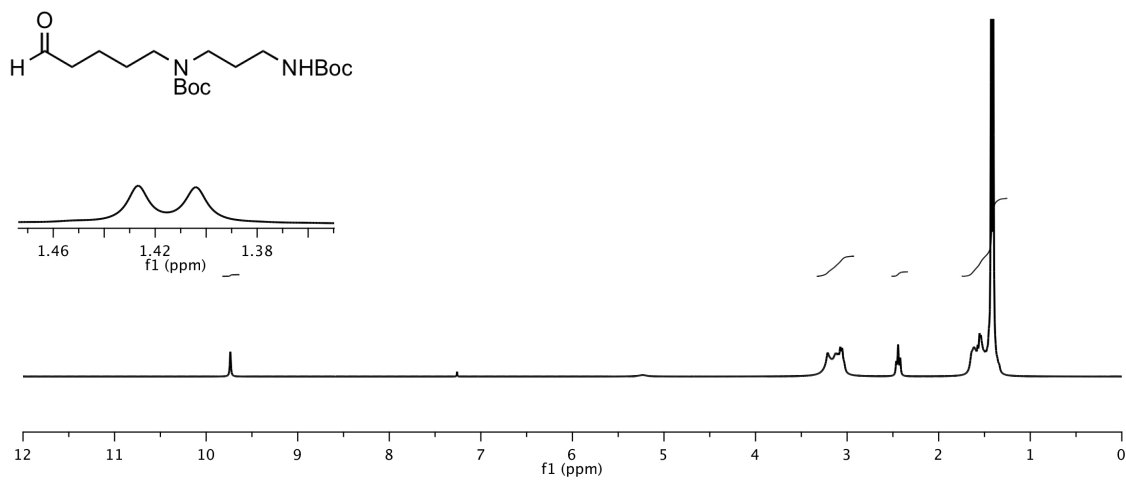
La oxidación del alcohol **17** se realizó con el reactivo de Dess–Martin [205]. Sobre una suspensión de DMP (353 mg, 0.83 mmol) en CH₂Cl₂ (2.5 mL) se añadió el alcohol **17** (250 mg, 0.69 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (3.5 mL). La suspensión resultante se agitó a t.a. durante 30 min. La reacción se detuvo con una disolución de Na₂S₂O₃ (5 mL, 1M) en NaHCO₃, observándose la formación de la sal del ácido 2–yodobenzoico. La mezcla se extrajo a continuación con Et₂O/salmuera (3 × 15 mL). Las fracciones orgánicas se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (5 mL), se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (20%, AcOEt/hexano) obteniéndose el aldehído **51** como un aceite (188 mg, 76%).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.40 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.48–1.68 (m, 6H), 2.44 (t, *J* = 6.40 Hz, 2H), 3.01–3.21 (m, 6H), 9.73 (s, 1H).

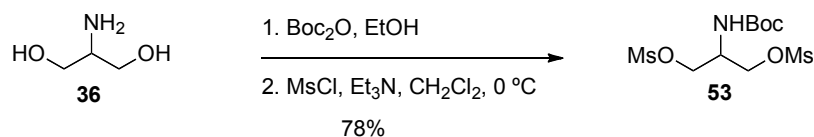
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 19.33 (CH₂), 28.53 (CH₃), 37.70 (CH₂), 43.59 (CH₂), 46.16 (CH₂), 78.14 (C), 79.78 (C), 156.15 (C), 197.99 (CH).

EM–ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 359 (15), 303 (100).

EMAR: calcd para C₁₈H₃₅N₂O₅: 359.2540. Encontrada: 359.2536.



*N*²-(DI-*TERT*-BUTOXICARBONIL)-2-AMINO-1, 3-DIMETILSULFONILPROPANO (**53**)



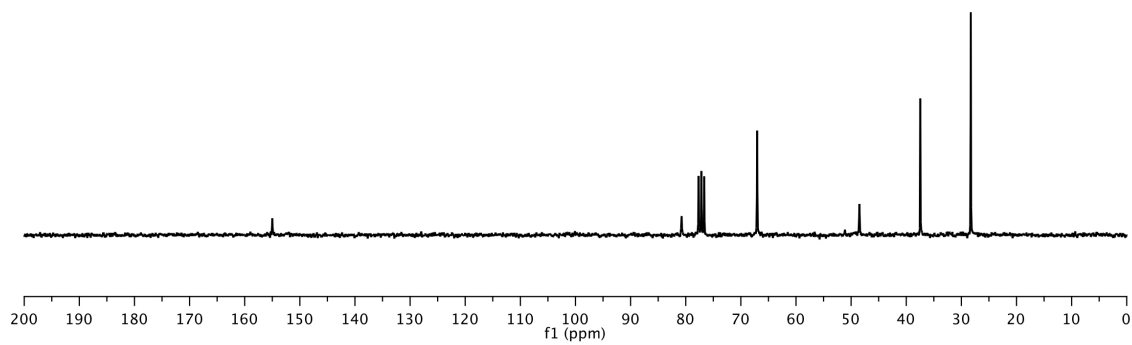
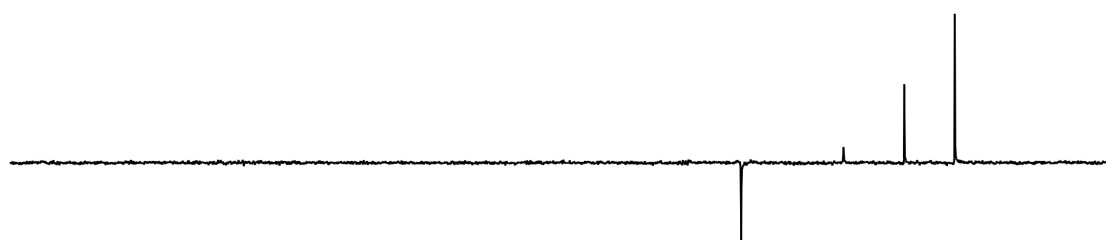
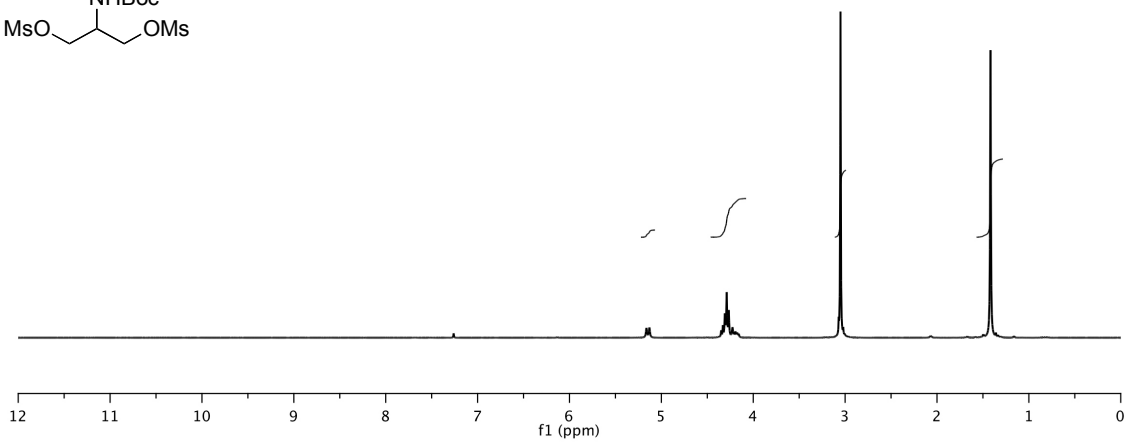
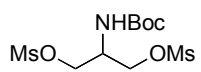
La síntesis del compuesto **53** se llevó a cabo siguiendo un procedimiento descrito [206]. El compuesto comercial 2-amino-1,3-propanodiol (**36**) (1.80 g, 19.76 mmol) se disolvió en EtOH (50 mL) y sobre esta disolución se adicionó Boc₂O (5.18 g, 23.71 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a t.a. después de la cual, el crudo se extrajo con AcOEt (3 × 50 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido (3.70 g, 19.36 mmol), se utilizó en la siguiente etapa sin necesidad de realizar ninguna purificación; para ello se redisolvió en CH₂Cl₂ (100 mL) y se agregó Et₃N (8 mL, 58.08 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C en un baño de agua/hielo y posteriormente se adicionó lentamente MsCl (3.6 mL, 46.46 mmol), la disolución se vuelve totalmente transparente al completar dicha adición. La reacción se agitó durante 1 h a 0 °C y 30 min a t.a. Transcurrido ese tiempo, la reacción se concentró parcialmente y se vertió sobre H₂O acidificada ligeramente con HCl 10% (50 mL) para realizar la elaboración mediante una extracción con CH₂Cl₂ (2 × 50 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel usando un gradiente isocrático (3%, MeOH/CH₂Cl₂) para dar el compuesto **53** como un sólido amarillo (5.91 g, 78% rendimiento global, pf 85 °C).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.42 (s, 9H), 3.05 (s, 6H), 4.16–4.35 (m, 5H), 5.15 (d, *J* = 7.90 Hz, 1H).

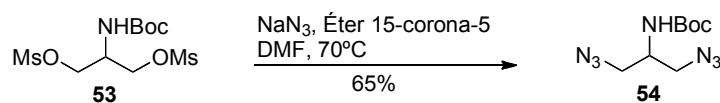
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 28.29 (CH₃), 37.45 (CH₃), 48.50 (CH), 67.05 (CH₂), 80.75 (C), 155.00 (C).

EM-IQ⁺ (70 eV) *m/z*: M⁺ 347 (42), 248 (60).

EMAR: calcd para C₁₀H₂₂NO₈S₂: 348.0787. Encontrada: 348.0791.



*N*²-(DI-*TERT*-BUTOXICARBONIL)-2-AMINO-1, 3-DIAZIDOPROPANO (**54**)



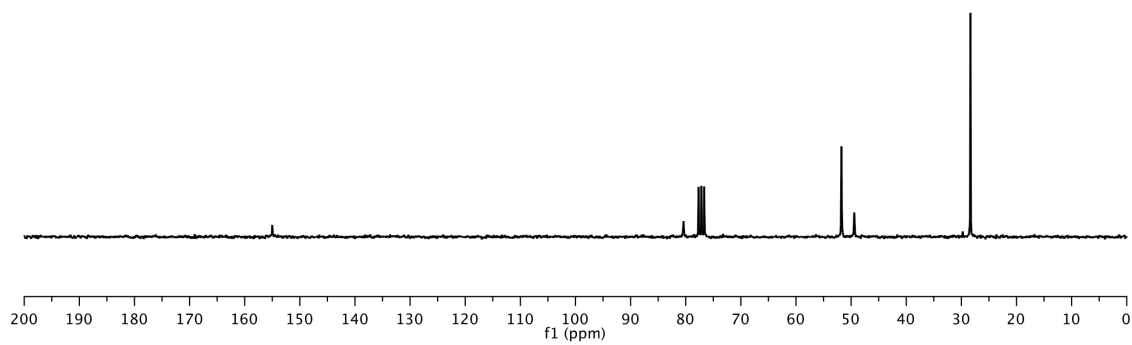
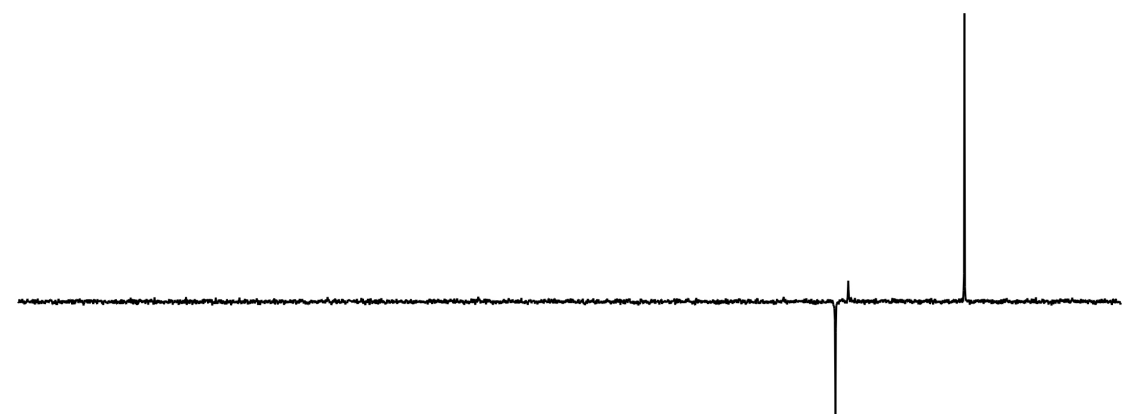
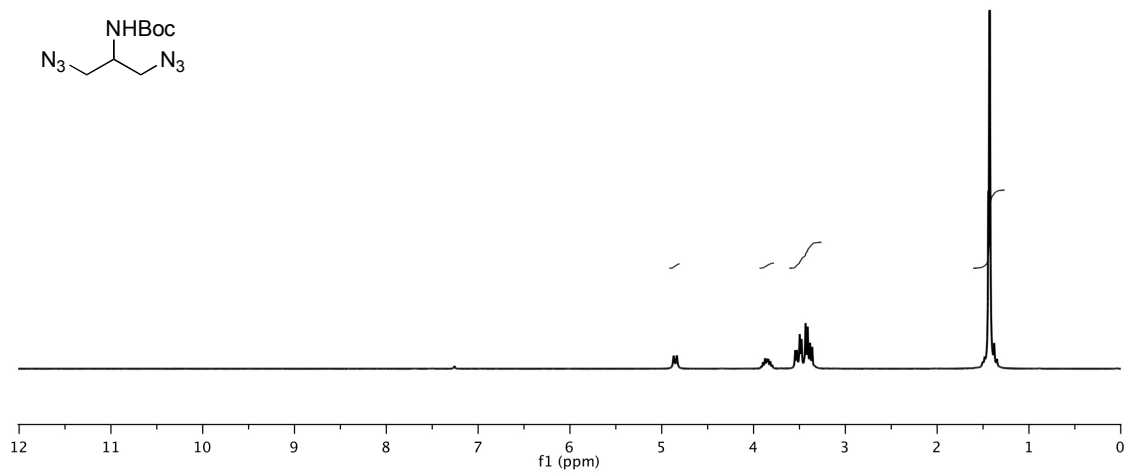
La síntesis del compuesto **54** se realizó a través de una sustitución nucleófila de tipo S_N2. El compuesto **53** (2.00 g, 5.76 mmol) se disolvió en DMF (15 mL) y se calentó a 70 °C. Sobre esta disolución se adicionó NaN₃ (2.25 g, 34.54 mmol) y el éter 15–corona–5 en cantidades catalíticas (0.1 equiv). La mezcla resultante se agitó durante 12 h, después de las cuales la reacción se enfrió, se vertió sobre H₂O (50 mL) y se extrajo con AcOEt (3 × 50 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (10%, AcOEt/hexano) para dar el compuesto **54** como un aceite amarillo (0.90 g, 65%).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.43 (s, 9H), 3.36–3.55 (m, 4H), 3.80–3.92 (m, 1H), 4.85 (d, *J* = 7.38 Hz, 1H).

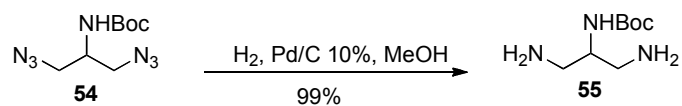
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 28.36 (CH₃), 49.42 (CH), 51.75 (CH₂), 80.40 (C), 155.00 (C).

EM–IQ⁺ (70 eV) *m/z*: M⁺ 241 (35), 142 (70).

EMAR: calcd para C₈H₁₆N₇O₂: 242.2610. Encontrada: 242.2708.



*N*²-(DI-*TERT*-BUTOXICARBONIL)-2-AMINO-1, 3-DIAMINOPROPANO (**55**)



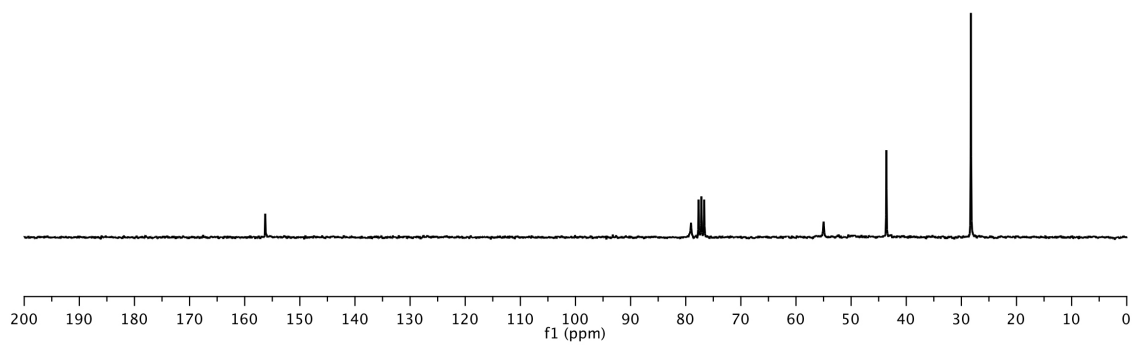
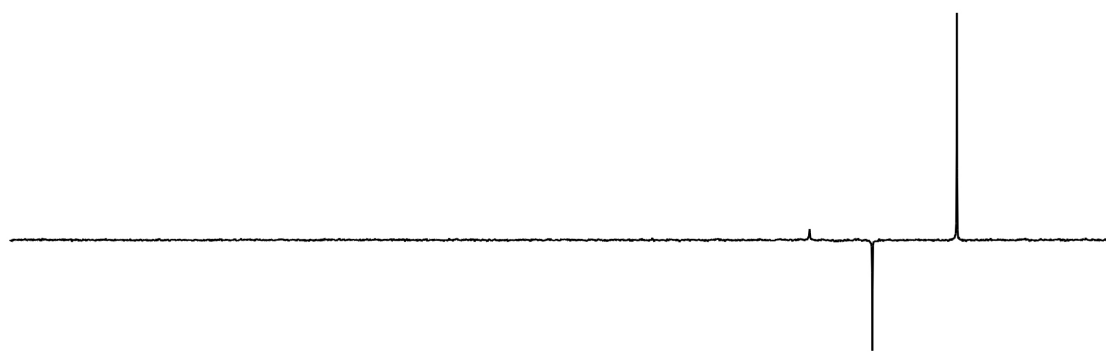
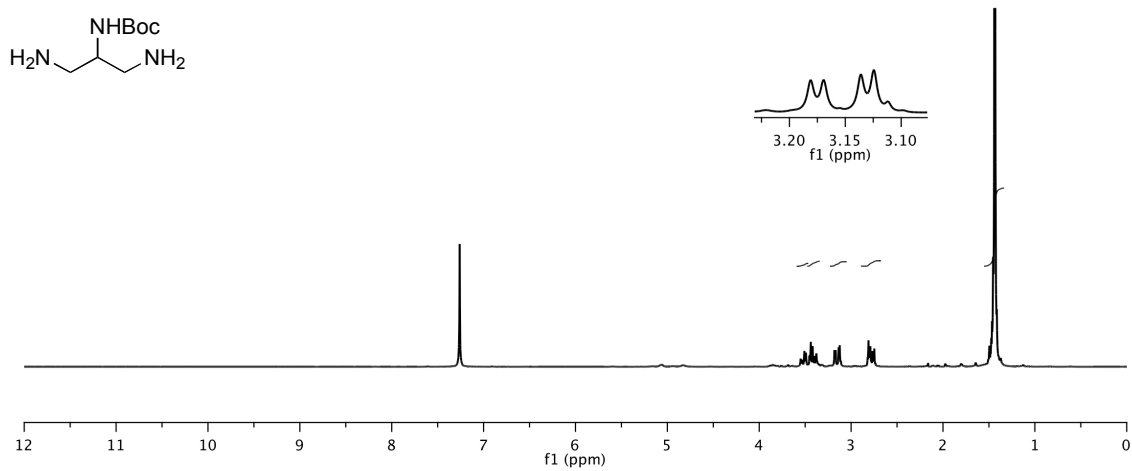
Una suspensión de la diazida **54** (600 mg, 2.49 mmol) y Pd/C 10% (300 mg) en MeOH (25 mL) se agitó durante toda la noche a t.a. bajo atmósfera de H₂. Posteriormente, el catalizador se separó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida obteniéndose el compuesto **55** como un aceite amarillo y sin necesidad de ninguna etapa de purificación (47 mg, 99%).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.44 (s, 9H), 2.74–2.82 (m, 2H), 3.15 (dd, *J* = 13.44, 3.35 Hz 2H), 3.38–3.45 (m, 1H), 3.49–3.55 (m, 1H).

RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 28.27 (CH₃), 43.61 (CH₂), 54.98 (CH), 79.04 (C), 156.28 (C).

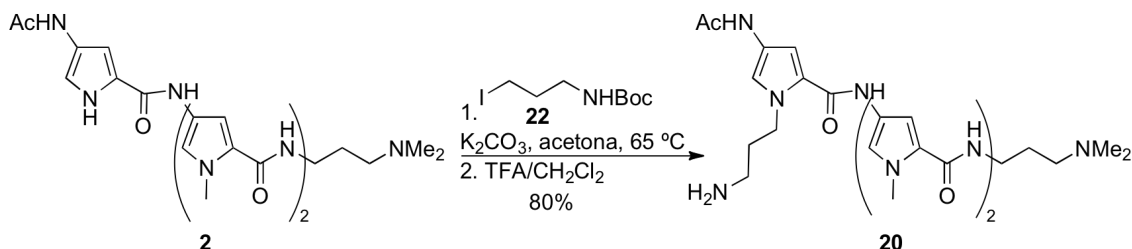
EM-IQ⁺ (70 eV) *m/z*: M⁺ 188 (15), 88 (98).

EMAR: calcd para C₈H₂₀N₃O₂: 190.1555. Encontrada: 190.1558



Síntesis de las unidades tripirrólicas modificadas

4-(ACETILAMINO)-1-(3-AMINOPROPIL)-N-[5-({[5-({[3-DIMETILAMINO]PROPILO]AMINO} CARBONIL)-1-METIL-1H-PIRROL-3-IL]AMINO} CARBONIL)-1-METIL-1H-PIRROL-3-IL]-1H-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (**20**)



El tripirrol **2** (100 mg, 0.20 mmol) se disolvió en acetona (3mL). Sobre esta disolución se añadió K_2CO_3 seco (300 mg, 2.19 mmol) y la suspensión resultante se agitó a t.a. durante 10 min. A continuación se adicionó el yoduro **22** (288 mg, 1.01 mmol) disuelto en acetona (5 mL). La mezcla se agitó a $65\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 h, se filtró por celita, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de alúmina (5%, MeOH/ CH_2Cl_2). El producto alquilado se disolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Se añadió TFA (3 mL) gota a gota (15 min) y la disolución resultante se agitó durante 1 h a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y a t.a. durante 2 h. El TFA residual se eliminó mediante codestilación con CH_2Cl_2 obteniéndose el producto deseado **20** (90 mg, 80 % rendimiento global, pf $155\text{ }^\circ\text{C}$).

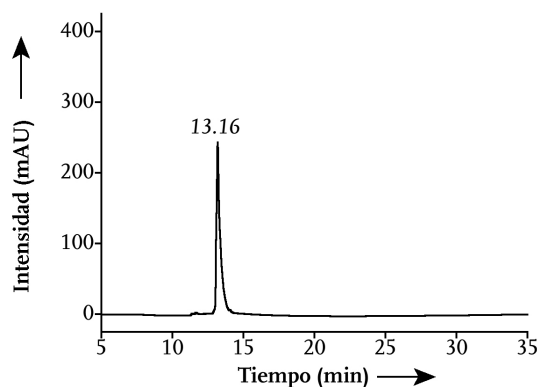


Figura 190. Cromatograma de HPLC del compuesto **20** gradiente 1, $\lambda = 222\text{ nm}$.

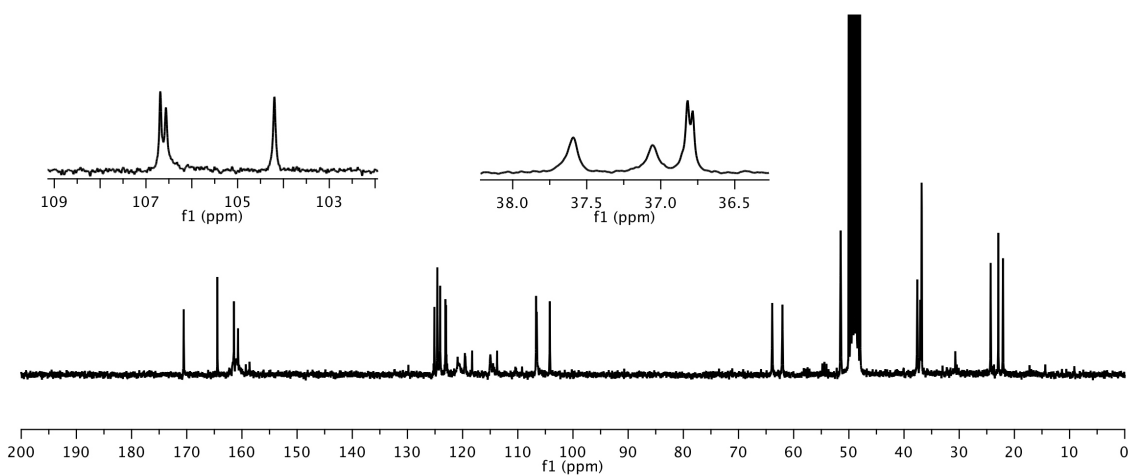
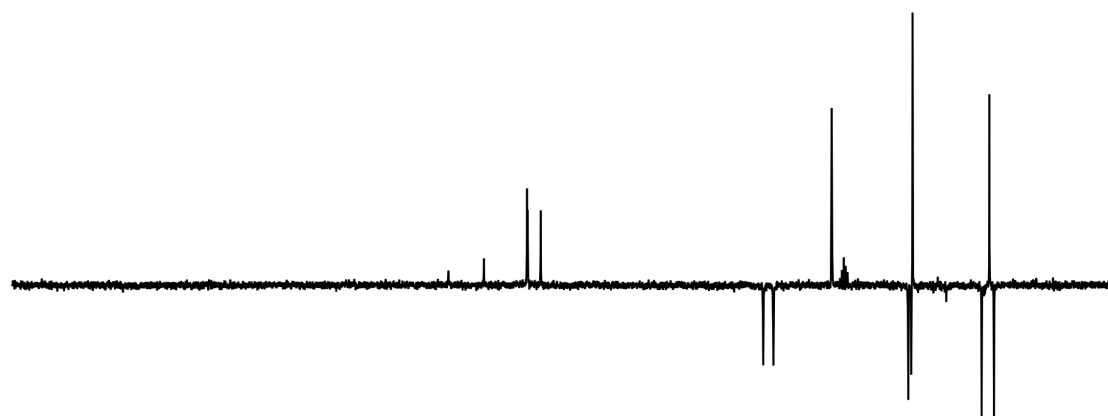
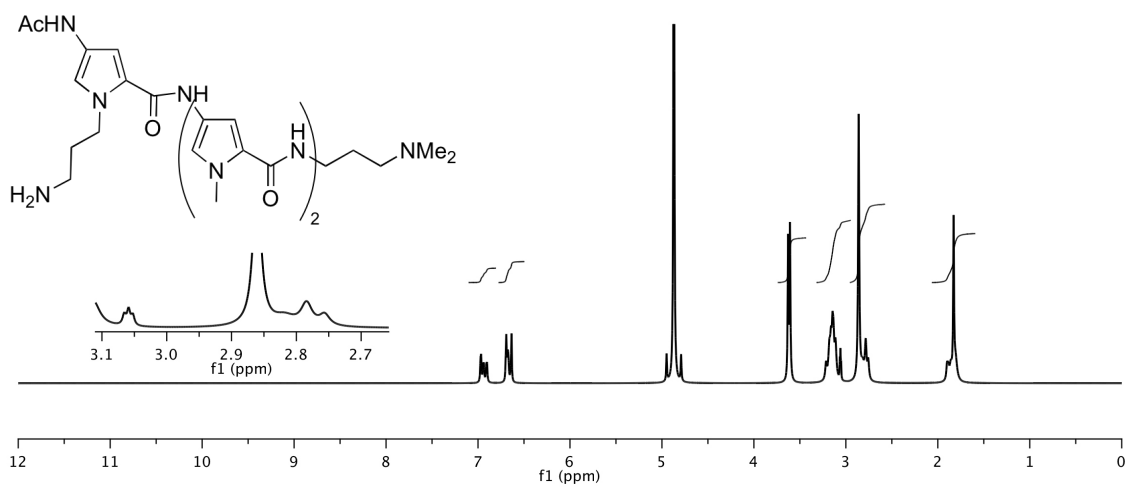
RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ): 1.83 (s, 3H), 1.86–1.90 (m, 2H), 2.78 (t, $J = 7.32\text{ Hz}$, 2H) 2.86 (s, 6H), 3.05 (t, $J = 6.81\text{ Hz}$, 2H), 3.11–3.22 (m, 6H), 3.61 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 6.64–6.69 (m, 3H), 6.90–6.97 (s, 3H).

RMN ^{13}C (250 MHz, CD_3OD , δ): 22.06 (CH_2), 22.91 (CH_3), 24.31 (CH_2), 36.78 (CH_3), 36.82 (CH_3), 37.06 (CH_2), 37.59 (CH_2), 51.49 (CH_3), 62.04 (CH_2), 63.89 (CH_2), 104.10 (CH), 106.56 (CH), 106.69 (CH), 114.82 (CH), 118.27 (C), 119.48 (C), 120.95 (CH), 123.01 (C), 123.12 (C), 124.07 (C), 124.58 (C), 125.11 (C), 160.70 (C), 161.45 (C), 164.46 (C), 170.55 (C).

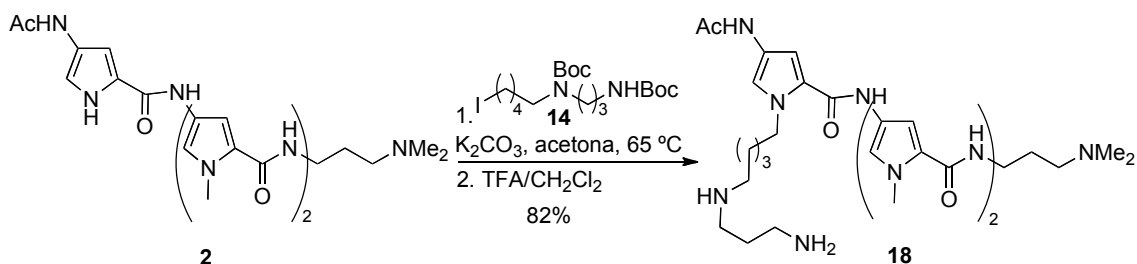
EM-FAB $^+$ (m/z): $[M+H]^+$ 554 (100), 287 (38), 151 (26), 122 (14).

EMAR: calcd para $C_{27}H_{40}N_9O_4$: 554.3125. Encontrada: 554.3116.

HPLC: $t_R = 13.16\text{ min}$.



4-(ACETILAMINO)-1-[5-[(3-AMINOPROPIL)AMINO]PENTIL]-N-[5-([5-([3-DIMETILAMINO]PROPI[L]AMINO)}CARBONIL)-1-METIL-1H-PIRROL-3-IL]AMINO}CARBONIL)-1-METIL-1H-PIRROL-3-IL]-1H-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (**18**)



Sobre el tripirrol **2** (151 mg, 0.31 mmol) disuelto en acetona (3 mL) y DMF (0.5 mL) se añadió K_2CO_3 seco (462 mg, 3.34 mmol) y la suspensión resultante se agitó a t.a. durante 10 min. A continuación se añadió el yoduro **14** (451 mg, 1.22 mmol) en acetona (5 mL) y la suspensión se agitó a 65 °C durante 5 h, se filtró a través de celita, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de alúmina (2 → 5%, MeOH/ CH_2Cl_2). El intermedio se disolvió en CH_2Cl_2 (5 mL) y se enfrió a 0 °C, se añadió TFA (5 mL) gota a gota (25 min) y la disolución resultante se agitó durante 1 h a 0 °C y a t.a. durante 2 h obteniéndose el producto deseado **18** (162 mg, 82 % rendimiento global, pf 104 °C).

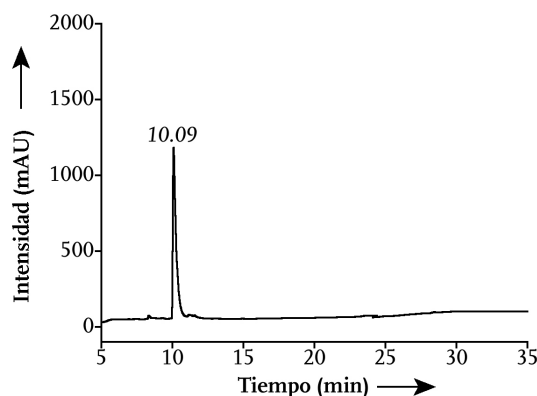


Figura 191. Cromatograma de HPLC del compuesto **18** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

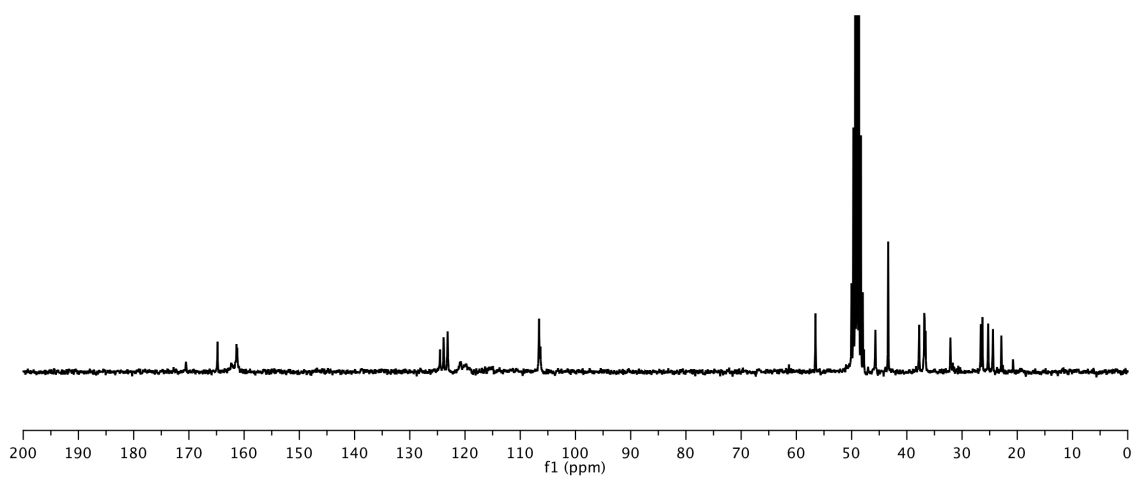
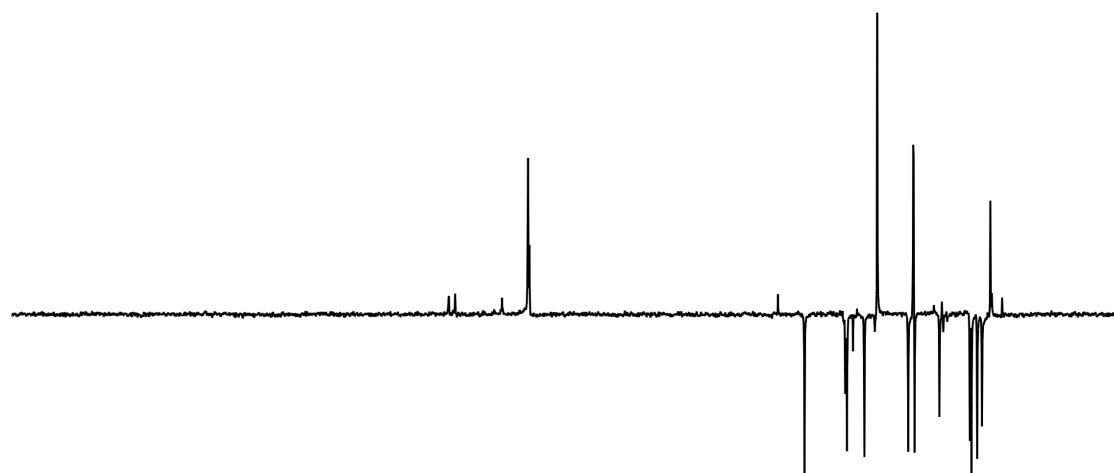
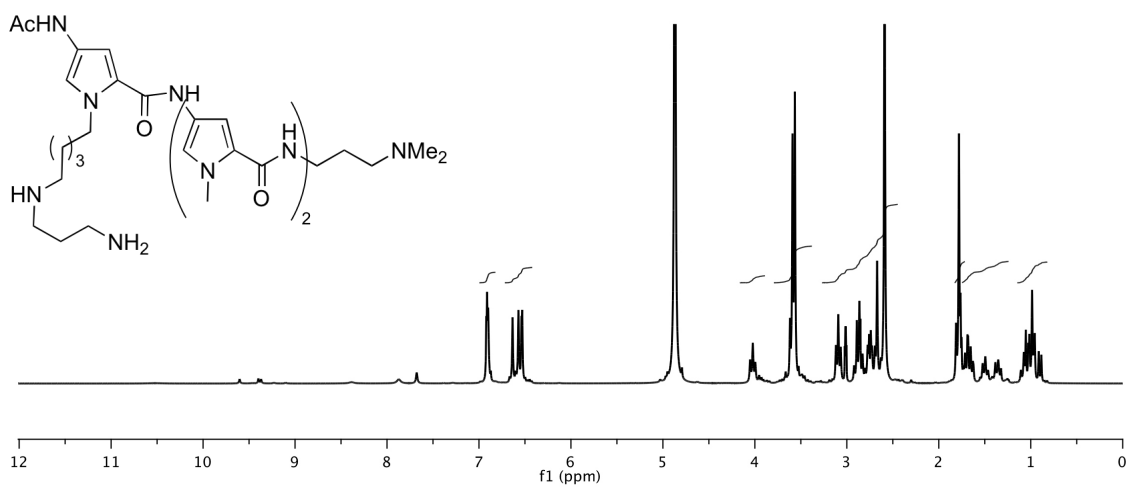
RMN 1H (250 MHz, CD_3OD , δ): 0.88–1.11 (m, 4H), 1.32–1.71 (m, 4H), 1.78 (s, 3H), 2.59 (s, 6H), 2.63–2.77 (m, 6H), 2.83–2.92 (m, 2H), 3.00–3.12 (m, 4H), 3.56 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.99–4.05 (m, 2H), 6.53 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.90 (s, 1H).

RMN ^{13}C (250 MHz, CD_3OD , δ): 22.88 (CH_3), 24.40 (CH_2), 25.27 (CH_2), 26.30 (CH_2), 26.61 (CH_2), 31.66 (CH_3), 32.11 (CH_2), 36.60 (CH_2), 36.85 (CH_3), 37.76 (CH_2), 43.37 (CH_3), 45.69 (CH_2), 47.76 (CH_2), 48.85 (CH_2), 56.54 (CH_2), 106.59 (CH), 111.90 (CH), 119.79 (CH), 120.92 (CH), 123.15 (C), 123.89 (C), 124.52 (C), 161.25 (C), 161.38 (C), 164.80 (C), 170.76 (C).

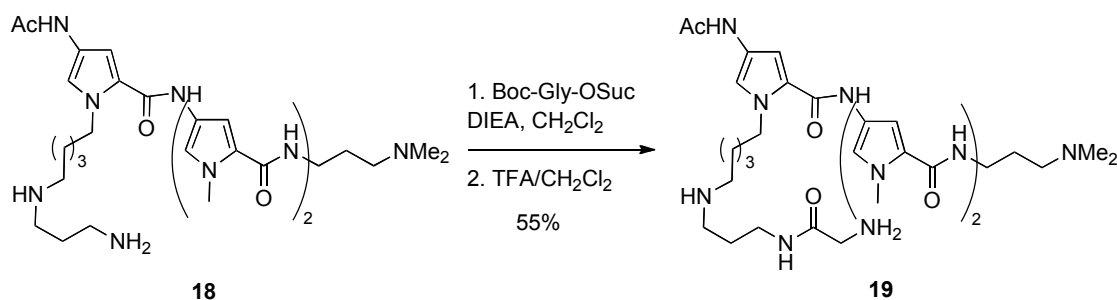
EM-FAB $^+$ (m/z): $[M+H]^+$ 639 (10), 422 (8), 391 (21), 309 (73), 278 (100).

EMAR: calcd para $C_{32}H_{51}N_{10}O_4$: 639.4089. Encontrada: 639.4088.

HPLC: $t_R = 10.09$ min.



4-(ACETILAMINO)-*N*-[5-({[5-({[3-DIMETILAMINO]PROPILO]AMINO}CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL]AMINO}CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL]-1-(5-([3-(GLICILAMINO)PROPILO]AMINO}PENTIL)-1*H*-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (**19**)



Sobre una disolución de **18** (80 mg, 0.12 mmol) en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMF}$ (50%, 5 mL) se adicionó DIEA (0.1 mL, 0.48 mmol) y *N*-*tert*-butiloxycarbonil-glicina succinimidil éster (33 mg, 0.12 mmol); la mezcla resultante se agitó durante 1 h. Se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna de alúmina (5%, $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). El sólido obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 (2 mL) y se enfrió a 0 °C, se añadió TFA (2 mL) gota a gota (15 min) y la disolución resultante se agitó durante 1 h a 0 °C y a t.a. durante 2 h, obteniéndose el producto deseado **19** (46 mg, 55% rendimiento global, pf 130 °C).

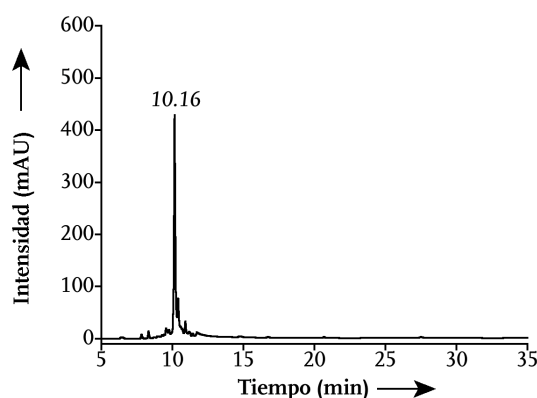


Figura 192. Cromatograma de HPLC del compuesto **19** gradiente 1, $\lambda = 222 \text{ nm}$.

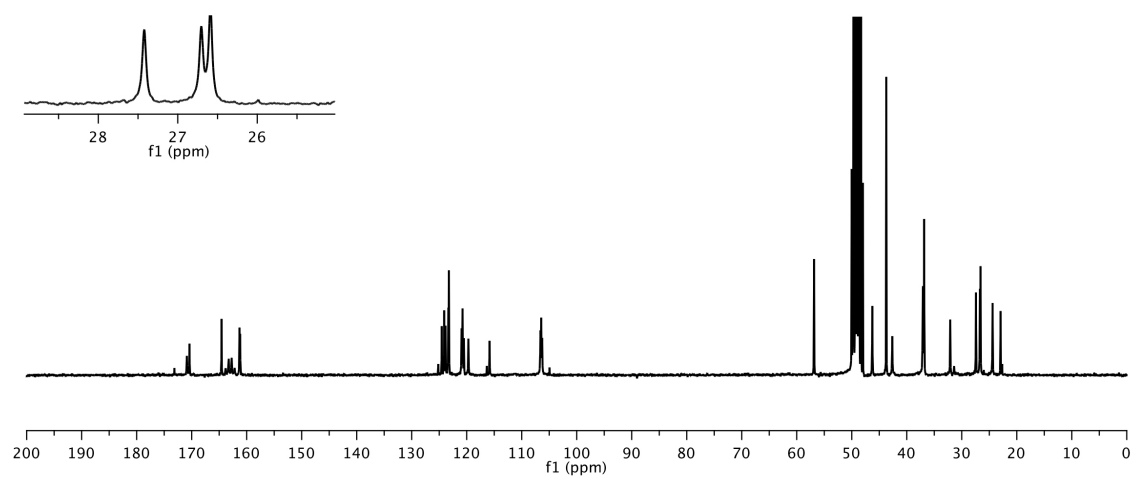
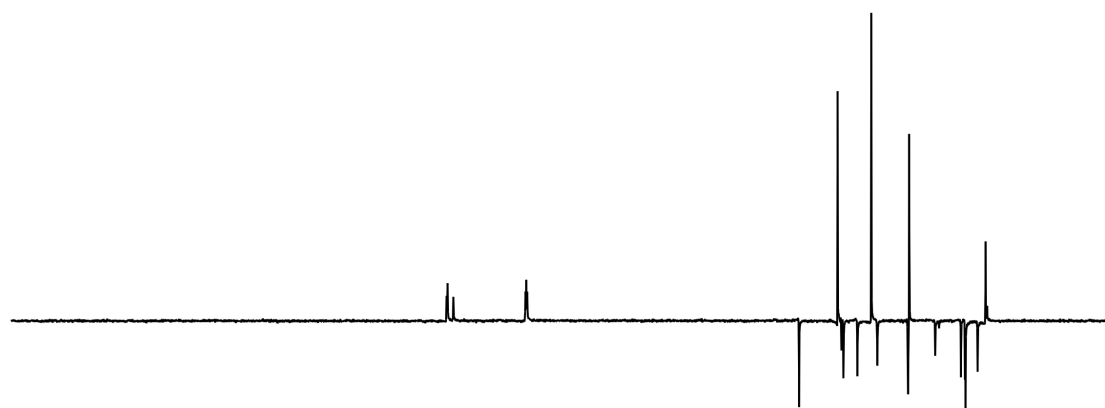
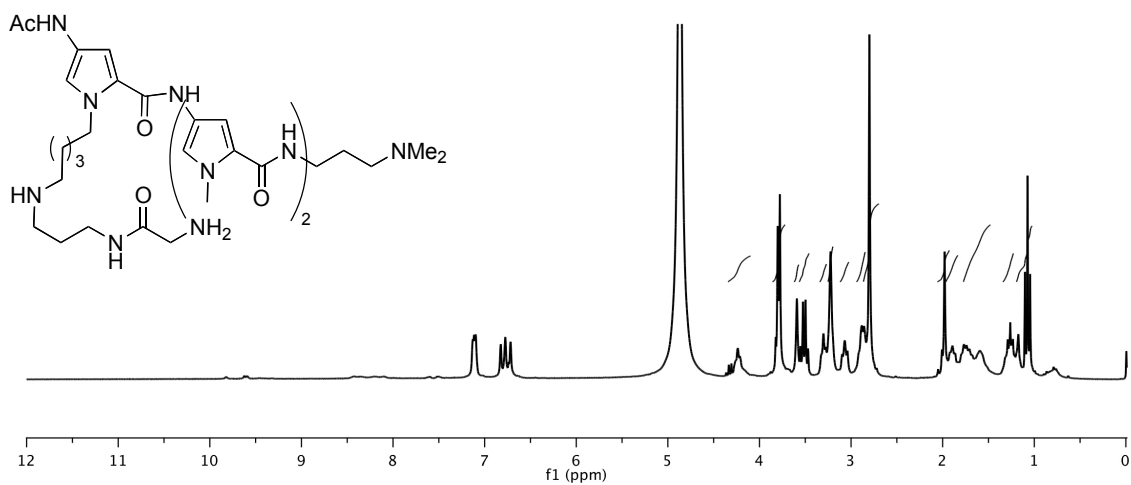
RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ): 1.04–1.17 (m, 4H), 1.23–1.31 (m, 2H), 1.51–1.77 (m, 4H), 1.86–1.93 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 2.80 (s, 6H), 2.86–2.92 (m, 2H), 3.06 (t, $J = 7.30 \text{ Hz}$, 2H), 3.22 (s, 2H), 3.28–3.33 (m, 2H), 3.51 (c, $J = 6.01 \text{ Hz}$, 2H), 3.60 (ba, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.21–4.28 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 7.10–7.13 (m, 3H).

RMN ^{13}C (250 MHz, CD_3OD , δ): 22.94 (CH_3), 24.40 (CH_2), 26.59 (CH_2), 26.70 (CH_2), 27.42 (CH_2), 32.10 (CH_2), 36.84 (CH_3), 37.03 (CH_2), 42.63 (CH_2), 43.72 (CH_3), 46.26 (CH_2), 48.79 (CH_2), 49.15 (CH_2), 49.85 (CH_3), 56.85 (CH_2), 106.28 (CH), 106.46 (CH), 106.60 (CH), 115.85 (C), 119.70 (CH), 120.51 (C), 120.75 (CH), 123.24 (C), 123.34 (C), 123.86 (C), 124.09 (C), 124.54 (C), 161.19 (C), 161.303 (C), 164.57 (C), 170.40 (C), 170.88 (C).

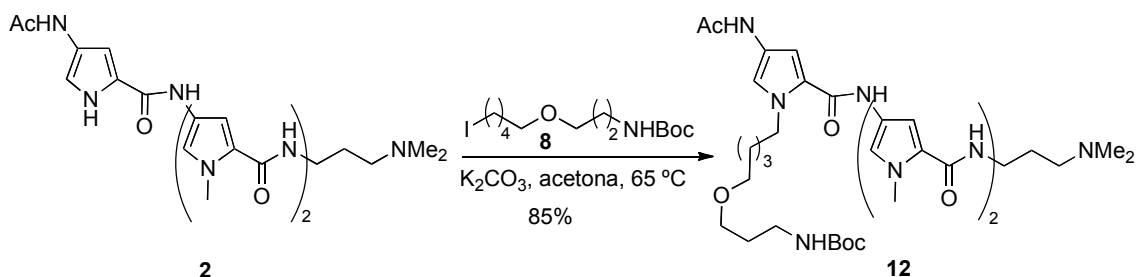
EM-FAB $^+$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 695 (80).

EMAR: calcd para $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{N}_{11}\text{O}_5$: 695.4231. Encontrada: 695.4226.

HPLC: $t_R = 10.16 \text{ min}$.



TERT-BUTIL[3-({5-[4-(ACETILAMINO)-2-({[5-({[5-({[3-(DIMETILAMINO)PROPI]AMINO} CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL]AMINO} CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL] AMINO} CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL]AMINO} CARBONIL)-1*H*-PIRROL-1-IL] PENTIL}OXI)PROPI] CARBAMATO (**12**)



Sobre una disolución de **2** (100 mg, 0.20 mmol) en acetona (3 mL) se añadió K_2CO_3 seco (300 mg, 2.19 mmol) y la suspensión resultante se agitó a t.a. durante 10 min. A continuación se añadió el yoduro **8** (299 mg, 0.90 mmol) disuelto en acetona (5 mL). La reacción se agitó a 65 °C durante 8 h. La suspensión se filtró a través de celita, y el filtrado obtenido se concentró a presión reducida. El aceite resultante se purificó por cromatografía en columna de alúmina (3 → 8% MeOH/ CH_2Cl_2) obteniéndose el producto deseado **12** (127 mg, 85%, pf 152°C).

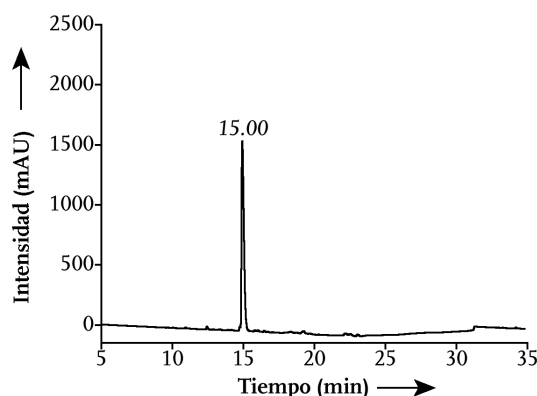


Figura 193. Cromatograma de HPLC del compuesto **12** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

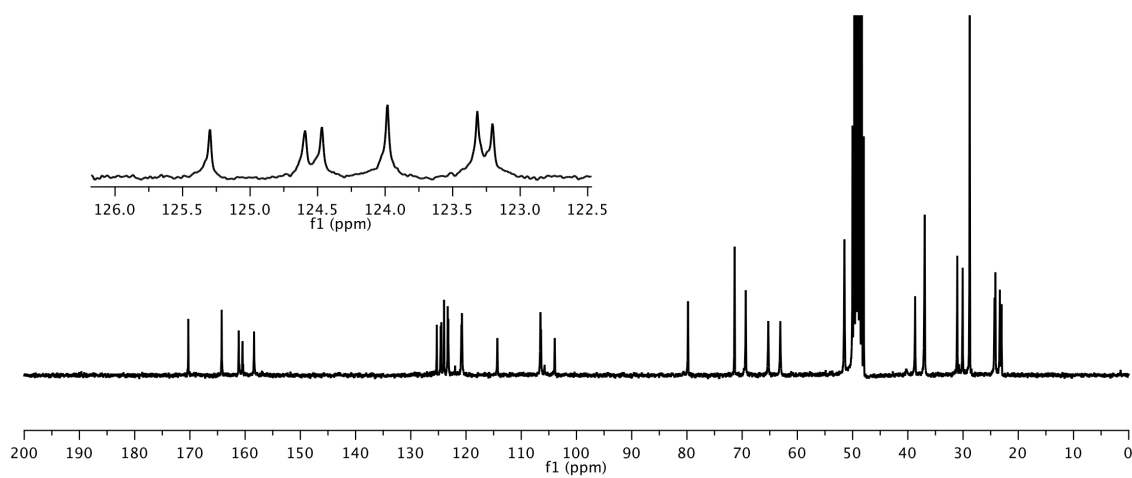
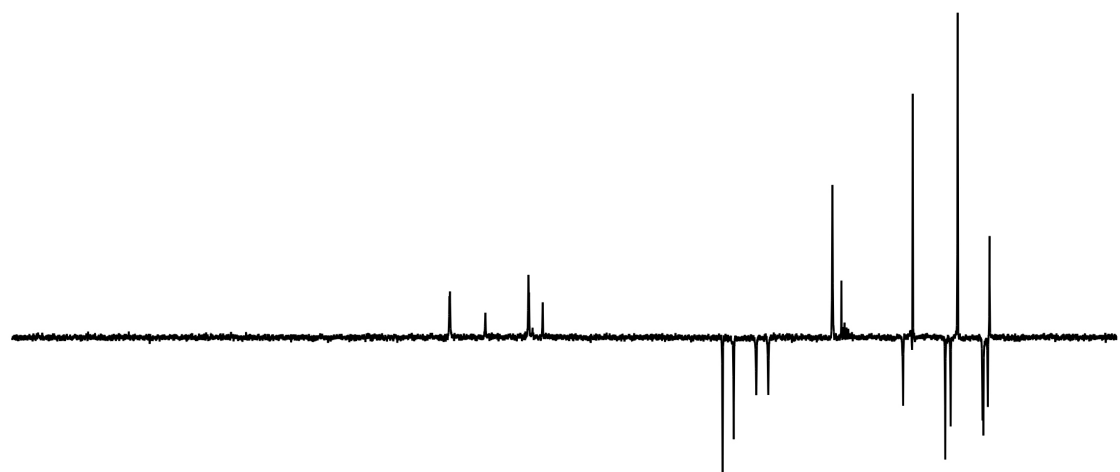
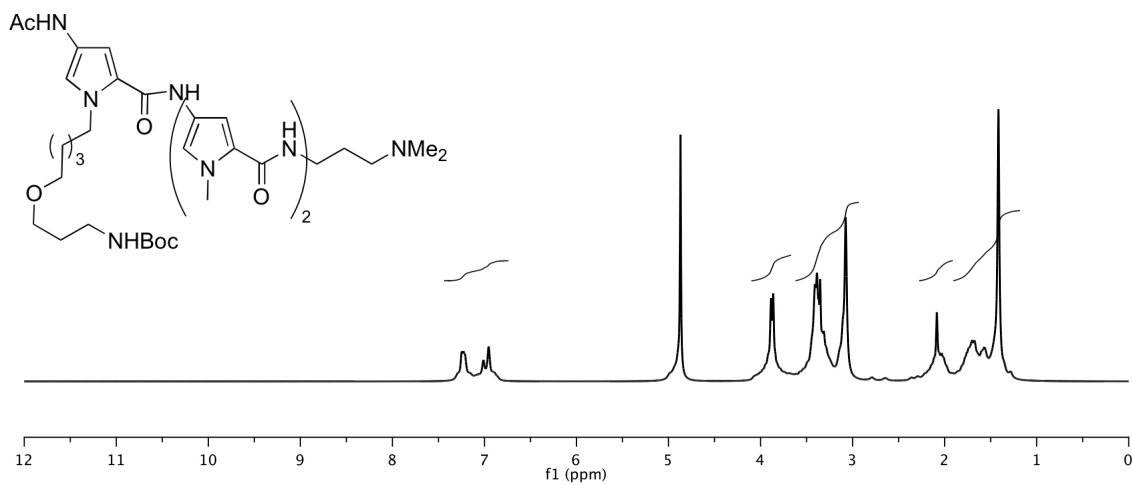
RMN 1H (300 MHz, CD_3OD , δ): 1.28–1.45 (ba, 13H), 1.51–1.57 (m, 2H), 1.62–1.74 (m, 4H), 1.99–2.08 (m, 5H) 3.08 (ba, 6H), 3.31–3.41 (m, 10H), 3.86 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 6.89–7.01 (m, 3H), 7.15–7.29 (m, 3H).

RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD , δ): 23.02 (CH_3), 23.34 (CH_2), 24.15 (CH_2), 24.31 (CH_2), 28.79 (CH_3), 30.07 (CH_2), 31.05 (CH_2), 36.94 (CH_3), 38.68 (CH_2), 49.85 (CH_3), 51.48 (CH_3), 63.09 (CH_2), 65.27 (CH_2), 69.35 (CH_2), 71.36 (CH_2), 79.80 (C), 103.93 (CH), 106.52 (CH), 114.33 (CH), 120.74 (CH), 123.20 (C), 123.32 (C), 123.98 (C), 124.47 (C), 124.59 (C), 125.30 (C), 158.38 (C), 160.47 (C), 161.16 (C), 164.25 (C), 170.29 (C).

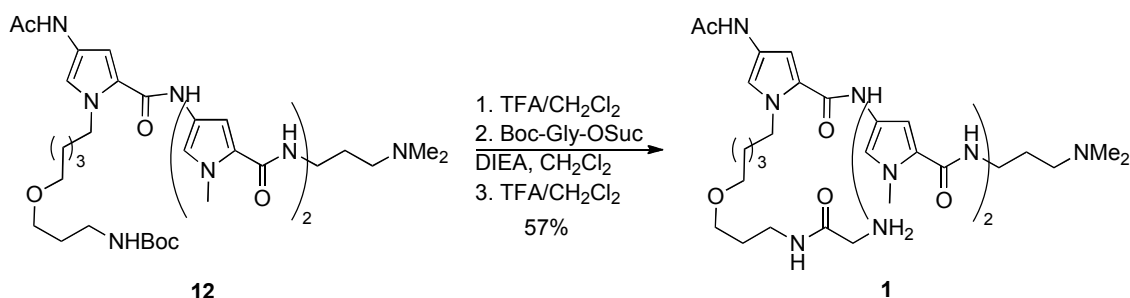
EM-FAB $^+$ (m/z): $[M+H]^+$ 740 (36), 618 (14), 302 (13), 132 (100).

EMAR: calcd para $C_{37}H_{58}N_9O_7$: 740.4459. Encontrada: 740.4459.

HPLC: $t_R = 15.00$ min.



4-(ACETILAMINO)-N-[5-({[5-({[3-(DIMETILAMINO)PROPI]AMINO}CARBONIL)-1-METIL-1H-PIRROL-3-IL]AMINO}CARBONIL)-1-METIL-1H-PIRROL-3-IL]-1-(5-[3-(GLICILAMINO)PROPOXI]PENTIL)-1H-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (1)



Sobre el compuesto 12 (150 mg, 0.21 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (3 mL) a 0 °C se añadió TFA (3 mL) y se agitó 1 h a 0 °C y 2 h a t.a.. El TFA residual se eliminó por codestilación con CH₂Cl₂ y el residuo se disolvió en CH₃CN/DMF (50%, 10 mL), adicionándose DIEA (0.2 mL, 0.98 mmol) y N-*tert*-butiloxicarbonil-glicina succinimidil éster (54 mg, 0.20 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h, después se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna de alúmina (5%, MeOH/CH₂Cl₂). El sólido obtenido se sometió de nuevo a la etapa de eliminación del grupo Boc, utilizando el procedimiento habitual, dando lugar así al producto deseado 1 (83 mg, 57% rendimiento global, pf 150 °C).

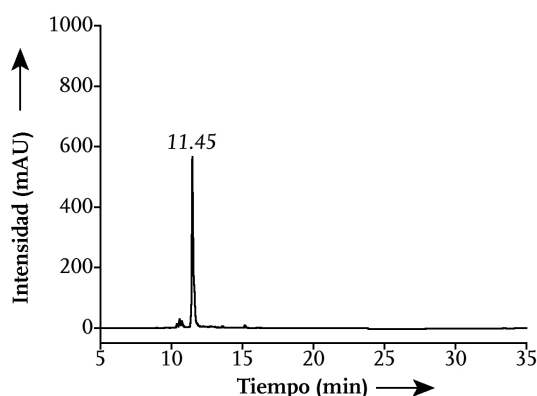


Figura 194. Cromatograma de HPLC del compuesto 1 gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

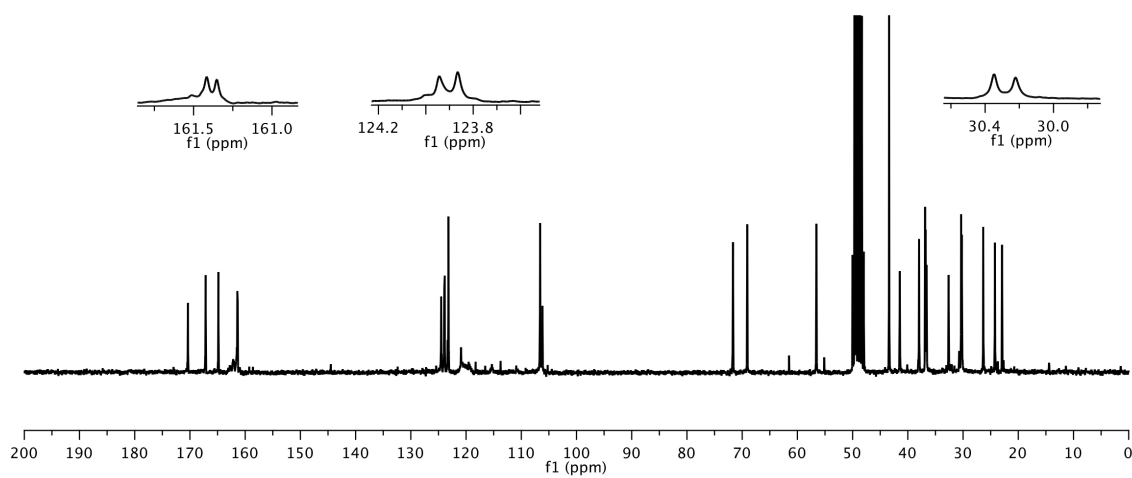
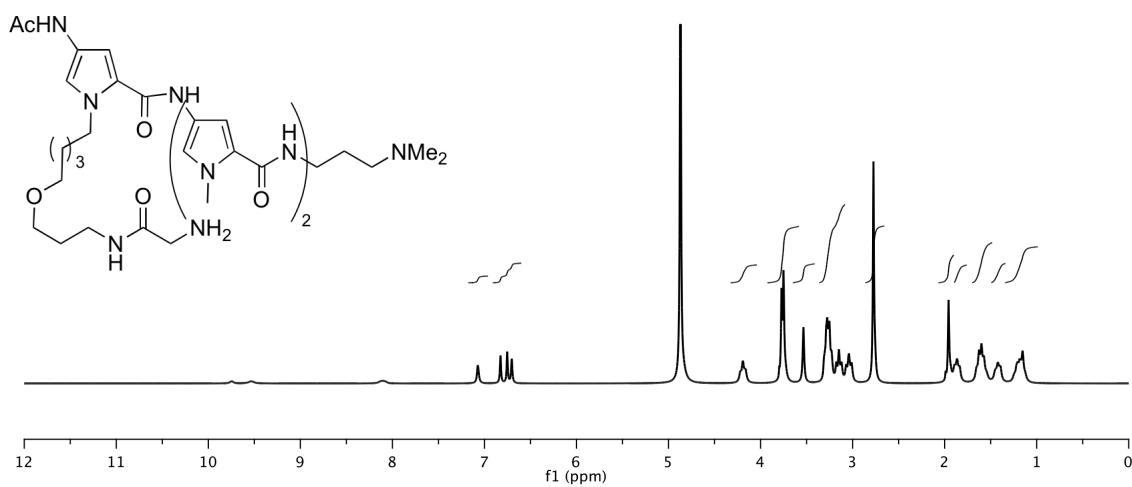
RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ): 1.15–1.21 (m, 4H), 1.39–1.48 (m, 2H), 1.57–1.68 (m, 4H), 1.83–1.98 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 2.77 (s, 6H), 3.04 (t, $J = 7.30$ Hz, 2H), 3.12 (t, $J = 6.81$ Hz, 2H), 3.23–3.30 (m, 4H), 3.53 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 4.19 (t, $J = 6.29$ Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.83 (s, 2H), 7.07 (s, 1H).

RMN ¹³C (250 MHz, CD₃OD, δ): 22.94 (CH₃), 24.23 (CH₂), 26.35 (CH₂), 30.22 (CH₂), 30.35 (CH₂), 32.62 (CH₂), 36.60 (CH₂), 36.78 (CH₃), 36.87 (CH₃), 37.97 (CH₂), 41.45 (CH₂), 43.40 (CH₃), 49.55 (CH₂), 56.56 (CH₂), 69.08 (CH₂), 71.66 (CH₂), 106.18 (CH), 106.58 (CH), 119.26 (CH), 120.91 (CH), 123.20 (C), 123.86 (C), 123.94 (C), 124.50 (C), 161.35 (C), 161.42 (C), 164.85 (C), 167.16 (C), 170.36 (C).

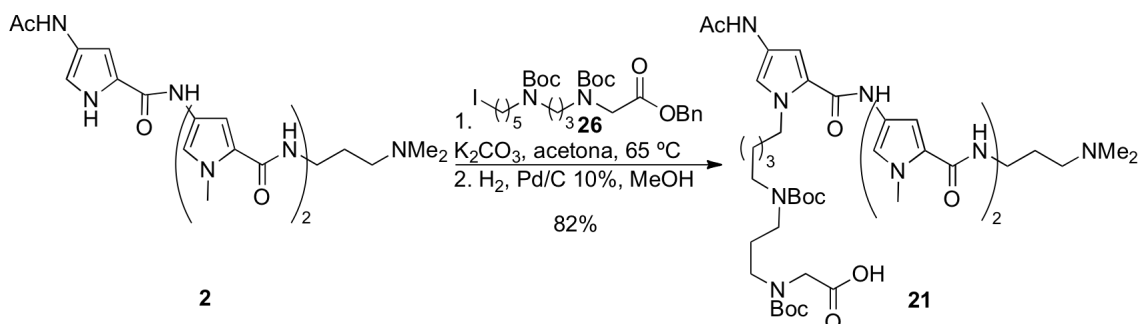
EM-FAB⁺ (m/z): [M+H]⁺ 697 (100).

EMAR: calcd para C₃₄H₅₃N₁₀O₆: 697.4150. Encontrada: 797.4151.

HPLC: $t_R = 11.45$ min.



N-{3-[[5-[4-(ACETILAMINO)-2-({[5-({[5-({[3-(DIMETILAMINO)PROPI]AMINO)CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL]AMINO}CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL]AMINO}CARBONIL)-1*H*-PIRROL-1-IL]PENTIL]}(TERT-BUTOXYCARBONIL)AMINO}PROPI]-*N*-(TERT-BUTOXYCARBONIL)GLICINA (**21**)



Sobre una disolución de **2** (79 mg, 0.16 mmol) en acetona (2.5 mL) se añadió K_2CO_3 (240 mg, 1.75 mmol) se agitó 10 min a t.a. Se adicionó el yoduro **26** (288 mg, 1.01 mmol) en acetona (4 mL), agitándose 6 h a 65 °C; se filtró (celita) y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en alúmina (5%, MeOH/ CH_2Cl_2). El producto (133 mg, 0.13 mmol) se disolvió en MeOH (8mL) y agitó junto con Pd/C 10% (100 mg) 3 h a t.a. bajo H_2 . El catalizador se eliminó por filtración (celita) y el filtrado se concentró a sequedad, aislándose el producto deseado **21** (116 mg, 82% rendimiento global, pf 205 °C).

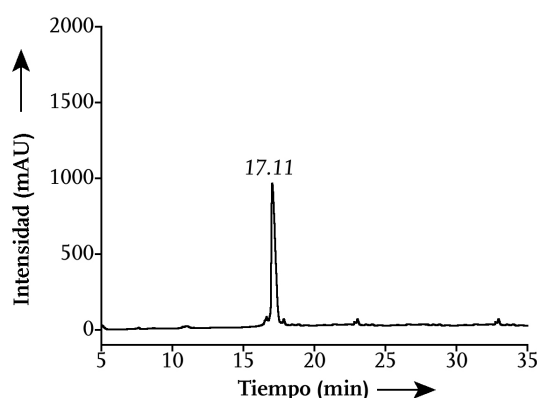


Figura 195. Cromatograma de HPLC del compuesto **21** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

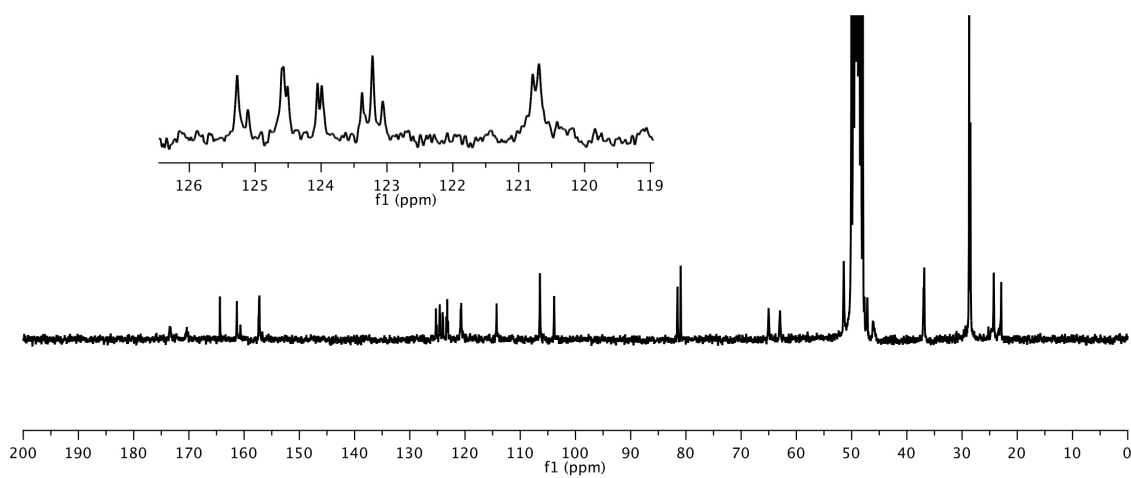
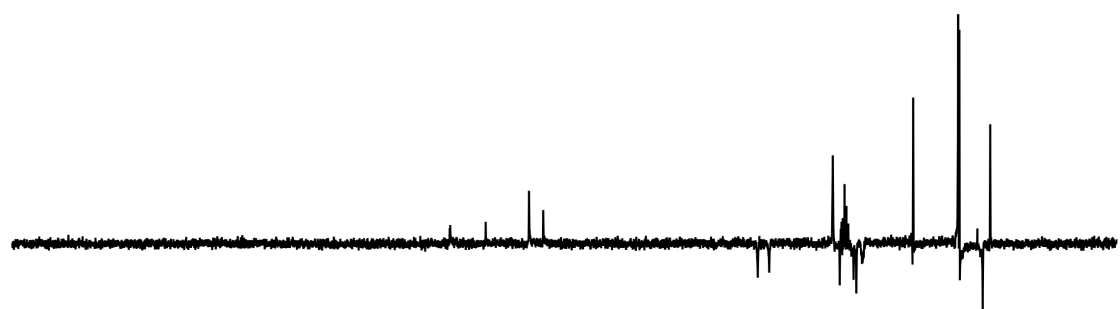
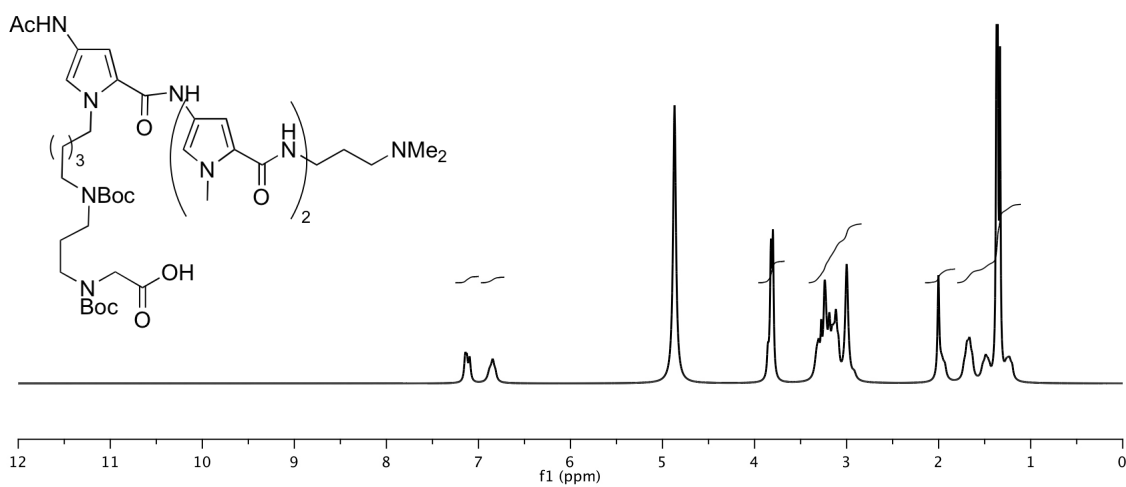
RMN 1H (250 MHz, CD_3OD , δ): 1.17–1.30 (m, 2H), 1.33 (m, 9H), 1.37 (s, 9H), 1.39–1.74 (m, 6H), 2.00 (s, 3H), 2.99 (s, 6H), 3.11–3.30 (m, 14H), 3.80–3.85 (m, 8H), 6.84 (ba, 3H), 7.10–7.14 (m, 3H).

RMN ^{13}C (250 MHz, CD_3OD , δ): 22.91 (CH_3), 24.26 (CH_2), 28.48 (CH_3), 28.72 (CH_3), 36.84 (CH_3), 37.97 (CH_2), 46.14 (CH_2), 47.15 (CH_2), 47.66 (CH_2), 51.41 (CH_3), 62.96 (CH_2), 65.03 (CH_2), 80.95 (C), 81.54 (C), 103.86 (CH), 106.45 (CH), 114.29 (CH), 120.69 (CH), 120.80 (CH), 123.06 (C), 123.22 (C), 123.30 (C), 123.99 (C), 124.05 (C), 124.59 (C), 125.11 (C), 125.27 (C), 157.21 (C), 160.70 (C), 161.33 (C), 164.38 (C), 170.38 (C), 173.3(C).

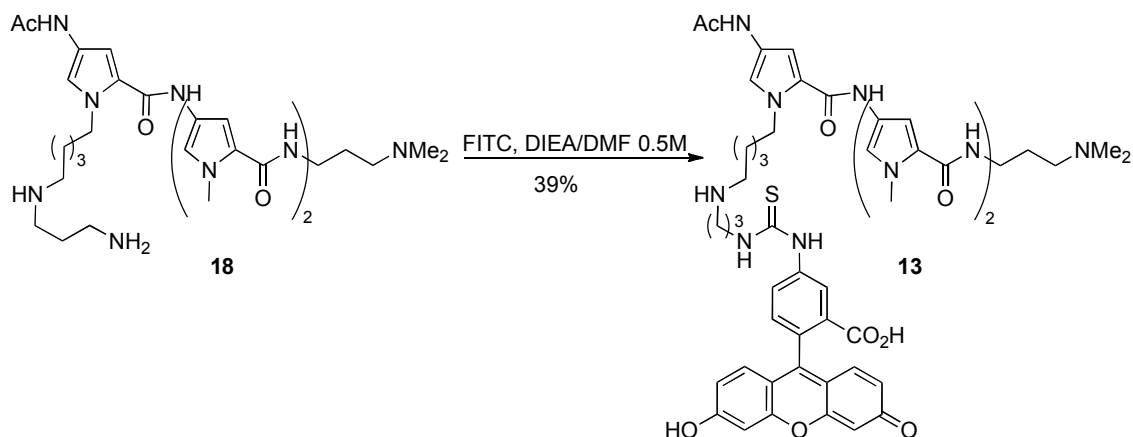
EM-FAB $^+$ (*m/z*): [M+H] $^+$ 897 (100), 695 (60), 412 (11),

EMAR: calcd para $C_{44}H_{69}N_{10}O_{10}$: 897.5198. Encontrada: 897.5182.

HPLC: $t_R = 17.11$ min.



ÁCIDO 5-[[[3-({5-[4-(ACETILAMINO)-2-({5-({5-({3-(DIMETILAMINO)PROPILO)AMINO} METIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL)AMINO} CARBONIL)-1-METIL-1*H*-PIRROL-3-IL)AMINO} CARBONIL)-1*H*-PIRROL-1-IL]PENTIL]AMINO) PROPILO]AMINO} CARBONOTIOIL)AMINO]-2-(6-HIDROXI-3-OXO-3*H*-XANTEN-9-IL)BENZOICO (**13**)



Sobre una disolución de **18** (6 mg, 9.39 mmol) con DIEA 0.5 M en DMF (200 μ L) se añadió FITC (2 mg, 4.70 mmol) en DMF (140 μ L). La mezcla se agitó durante 2 h a t.a. El producto mayoritario se purificó mediante HPLC (gradiente 2) obteniéndose el compuesto **13** (4 mg, 39%).

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , δ): 0.81–0.87 (m, 2H), 1.23–1.33 (m, 4H), 1.72 (ba, 4H), 1.98 (s, 3H), 2.52 (s, 6H), 2.90 (ba, 2H), 3.03 (s, 6H), 3.28 (ba, 6H), 3.83 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.59–6.62 (m, 3H), 6.70–6.72 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.75–7.77 (m, 1H), 7.94 (ba, 3H), 8.16 (ba, 1H), 9.38 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 9.92–9.94 (ba, 2H), 11.20 (s, 1H).

RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6 , δ): 22.83 (CH₃), 23.11 (CH₂), 25.34 (CH₂), 26.49 (CH₂), 35.68 (CH₂), 36.05 (CH₃), 36.23 (CH₂), 36.59 (CH₂), 41.83 (CH₂), 43.95 (CH₂), 46.48 (CH₂), 50.06 (CH₃), 53.57 (CH₃), 61.42 (CH₂), 62.99 (CH₂), 102.04 (CH), 102.33 (CH), 104.55 (CH), 109.56 (C), 111.67 (CH), 112.66 (CH), 118.11 (CH), 118.50 (CH), 120.77 (CH), 122.09 (C), 122.24 (C), 122.62 (C), 122.83 (C), 123.34 (CH), 124.20 (C), 125.89 (CH), 128.81 (CH), 133.52 (CH), 142.54 (C), 148.52 (C), 151.82 (C), 151.90 (C), 158.75 (C), 159.57 (C), 161.54 (C), 166.04 (C), 168.53 (C), 180.31 (C).

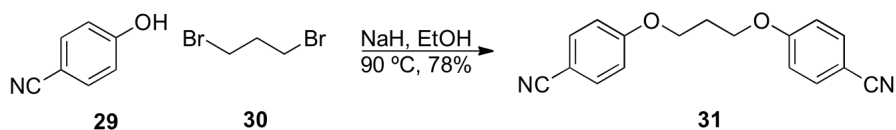
EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 1028 (7), 639 (30), 390 (100).

EMAR: calcd para C₅₃H₆₂N₁₁O₉S: 1028.4447. Encontrada: 1028.4470.

HPLC: t_R = 19.87 min (figura 65).

Síntesis de los compuestos tipo bis(benzamidinio)

4, 4'-[PROPANO-1, 3-DIILBIS(OXI)]DIBENZONITRILO (**31**)



El bis(benzonitrilo) **31** se sintetizó siguiendo procedimientos descritos en la bibliografía [177]. El 4-hidroxibenzonitrilo (1.05 g, 8.40 mmol) se disolvió en EtOH (5 mL) y sobre esta disolución se adicionó NaH (0.35 g, 8.74 mmol). La suspensión resultante se agitó durante 10 min y a continuación se añadió 1,3-dibromopropano (0.84 g, 4.19 mmol). La mezcla se agitó durante 48 h a 90 °C. A continuación se enfrió a t.a., se añadió MeOH (~ 1 mL) y se enfrió en un baño de agua/hielo observándose la formación de un precipitado. Éste se filtró, se lavó con agua abundante y se secó a vacío, obteniéndose, sin necesidad de mayor purificación, el producto deseado **31** como un sólido blanco (0.91 g, 78%, 154 °C).

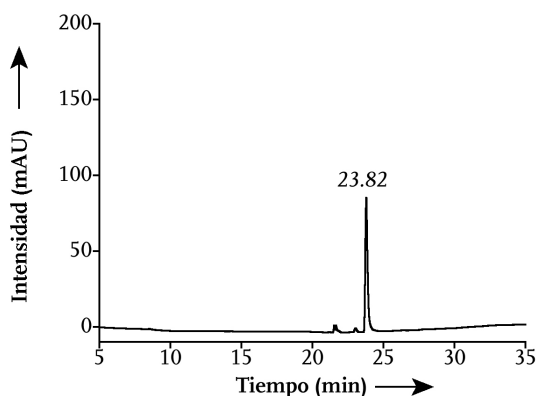


Figura 196. Cromatograma de HPLC del compuesto **31** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

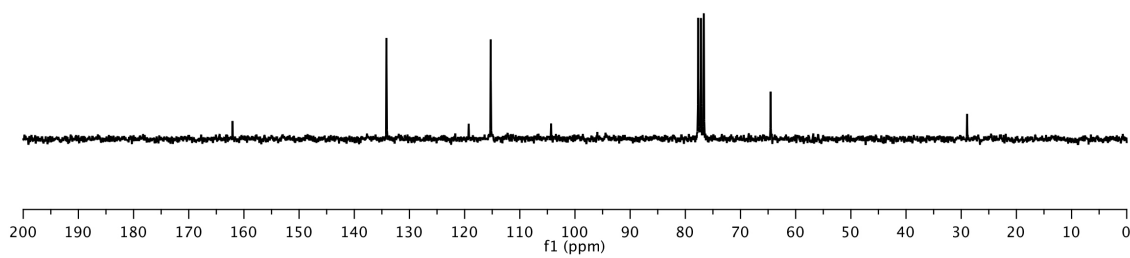
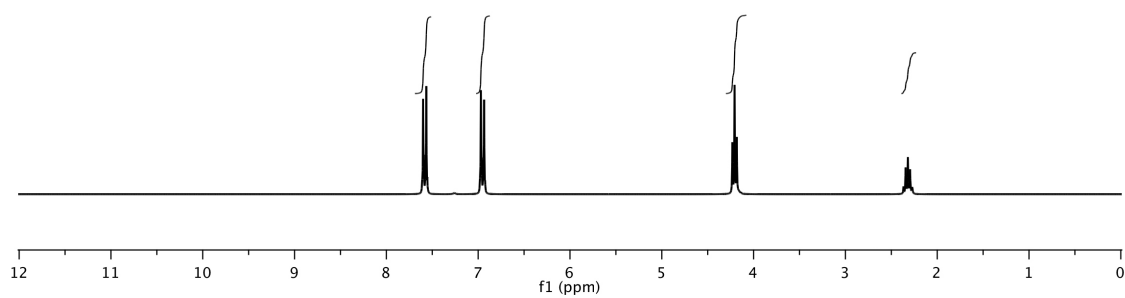
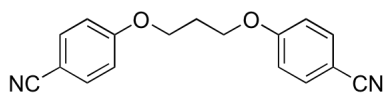
RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ): 2.32 (quin, $J = 5.97$ Hz, 2H), 4.21 (t, $J = 5.99$ Hz, 4H), 6.94 (d, $J = 8.96$ Hz, 4H), 7.57 (d, $J = 8.96$ Hz, 4H).

RMN ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , δ): 28.93 (CH_2), 64.54 (CH_2), 104.33 (C), 155.27 (CH), 119.26 (C), 134.14 (CH), 162.07 (C).

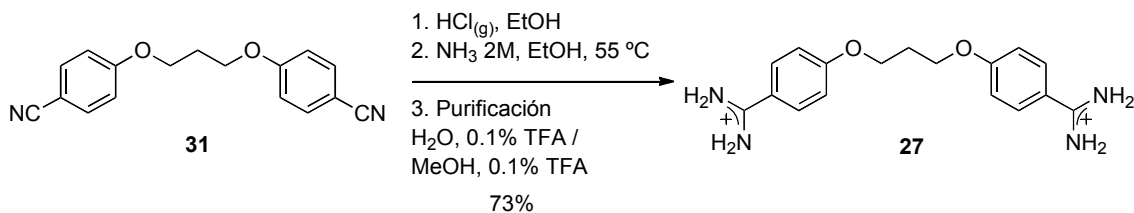
EM-ESI $^+$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 279 (35), 131 (5).

EMAR: calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$: 279.1128. Encontrada: 279.1119.

HPLC: $t_R = 23.82$ min.



[PROPANO-1, 3-DIILBIS(OXI-4, 1-FENILEN)]BIS(AMINOMETANOIMINIO) (27)



El bis(benzamidinio) **27** se sintetizó siguiendo procedimientos descritos anteriormente en la bibliografía [177]. El bis(benzonitrilo) **31** (700 mg, 2.52 mmol) se disolvió en EtOH (20 mL) y se enfrió a 0 °C. Sobre la suspensión resultante se burbujeó una corriente seca de HCl gas. La reacción se siguió mediante EM/HPLC-FR, observándose la transformación del bis(benzonitrilo) de partida en el diimidato intermedio después de 2 h de reacción. A continuación, se llevó la reacción a t.a. y se añadió Et₂O (150 mL), observándose la formación de un precipitado que se filtró, lavó con Et₂O y secó. El sólido obtenido (303 mg, 0.81 mmol) se disolvió en NH₃ en EtOH (2M, 20 mL). La disolución se agitó a 55 °C durante 3 h. El crudo de la reacción se concentró parcialmente y se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% → 75% B 30 min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, concentraron y liofilizaron, obteniéndose el producto deseado en forma de sal de ácido trifluoroacético **27** (359 mg, 73%, rendimiento global, pf 187 °C).

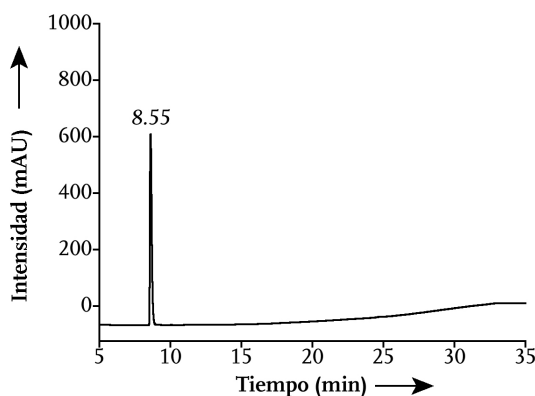


Figura 197. Cromatograma de HPLC del compuesto **27** gradiente, $\lambda = 222$ nm.

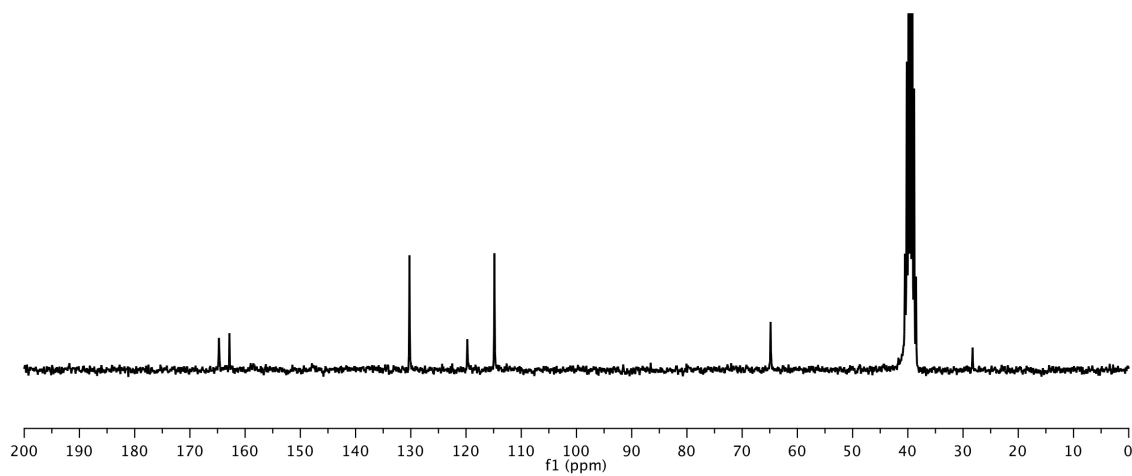
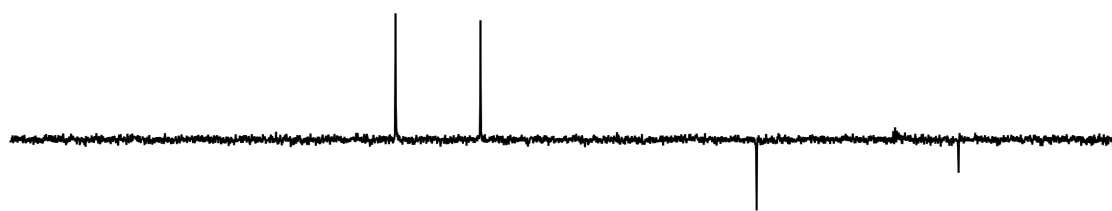
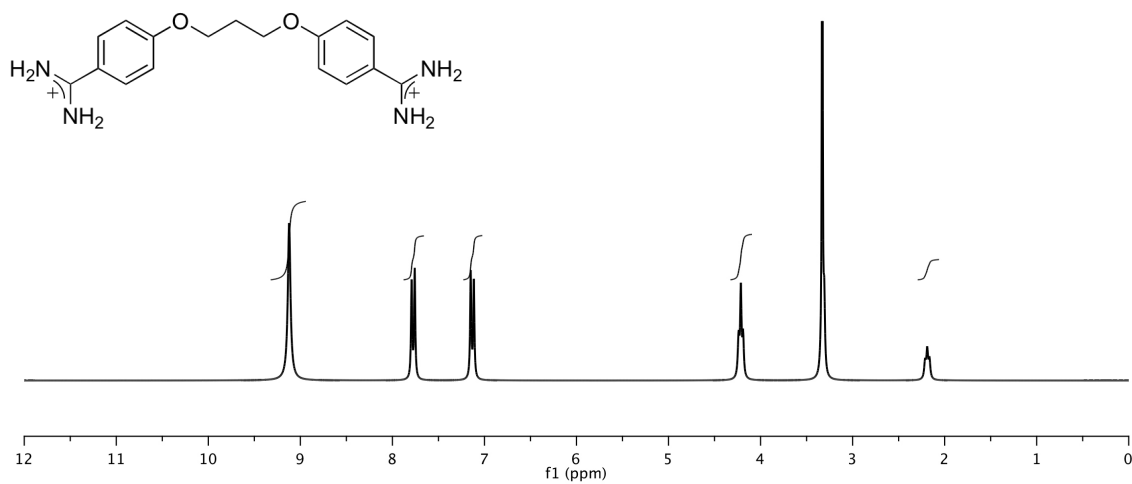
RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 2.15–2.25 (m, 2H), 4.21 (t, *J* = 5.94 Hz, 4H), 7.13 (d, *J* = 8.82 Hz, 4H), 7.77 (d, *J* = 8.80 Hz, 4H), 9.17 (br, 8H).

RMN ¹³C (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 28.27 (CH₂), 64.85 (CH₂), 114.86 (CH), 119.77 (C), 130.24 (CH), 162.84 (C), 164.74 (C).

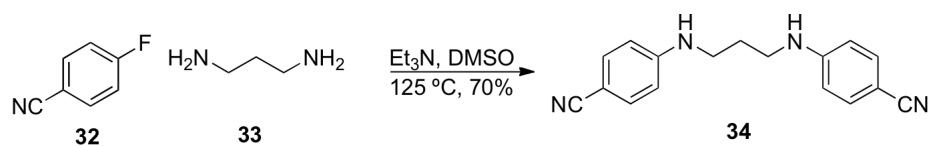
EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 313 (100), 314 (25).

EMAR: calcd para C₁₇H₂₁N₄O₂: 313.1659. Encontrada: 313.1654.

HPLC: *t*_R = 8.55 min.



4, 4'-[PROPANO-1, 3-DIILDI(IMINO)]DIBENZONITRILLO (34)



El bis(benzonitrilo) **34** se sintetizó siguiendo un procedimiento previo descrito en la bibliografía [177c]. El 1, 3-diaminopropano (2.25 mL, 27.0 mmol) se disolvió en DMSO (50 mL) y sobre esta mezcla se adicionó Et₃N (9.38 mL, 67.6 mmol). La disolución resultante se agitó durante 10 min y a continuación se añadió 4-fluorobenzonitrilo (9.82 g, 81.1 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 3 h a 125 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre una mezcla agua/hielo (1 L) observándose la aparición de un precipitado. El sólido se filtró y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (60%, AcOEt/hexano) obteniéndose el producto deseado **34** como un sólido blanco (5.2 g, 70%, pf 159 °C).

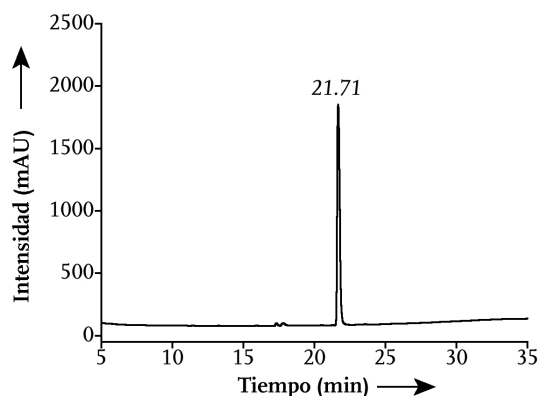


Figura 198. Cromatograma de HPLC del compuesto **34** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

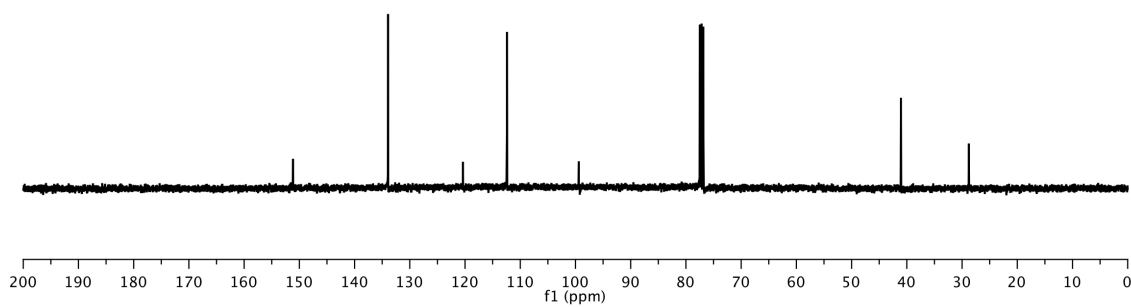
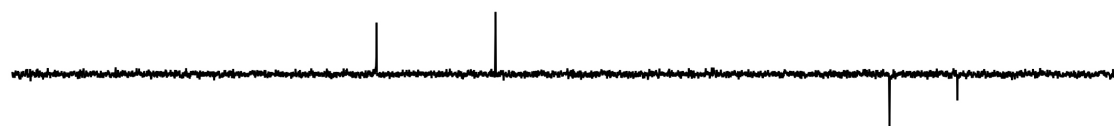
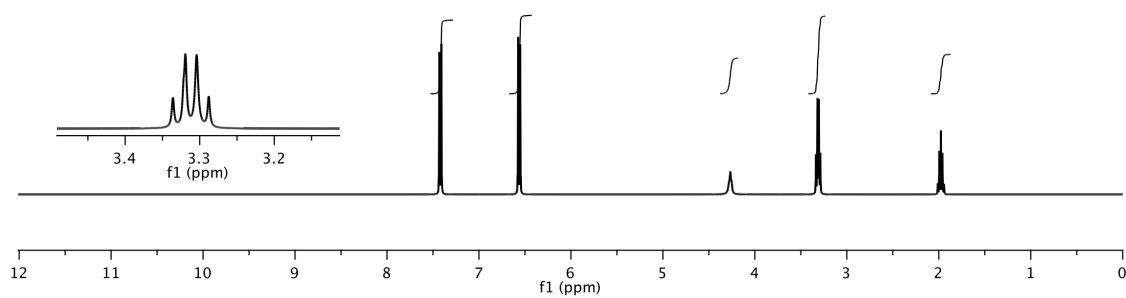
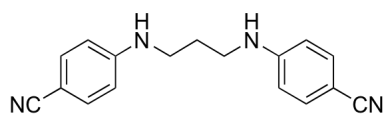
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.98 (quin, $J = 6.79$ Hz, 2H), 3.31 (dd, $J = 12.58, 6.63$ Hz, 4H), 4.27 (ba, 2H), 6.56 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H), 7.42 (d, $J = 8.70$ Hz, 4H).

RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 28.77 (CH₂), 41.06 (CH₂), 99.40 (C), 112.40 (CH), 120.38 (C), 133.94 (CH), 151.15 (C).

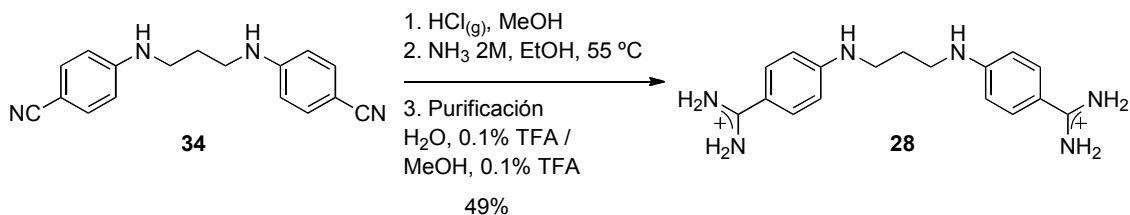
EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ 277 (100), 278 (21), 299 (80).

EMAR: calcd para C₁₇H₁₇N₄: 277.1448. Encontrada: 277.1446.

HPLC: $t_R = 21.71$ min.



[PROPANO-1, 3-DIILBIS(IMINO-4, 1-FENILEN)]BIS(AMINOMETANOIMINIO) (**28**)



El bis(benzonitrilo) **34** (1.02 g, 3.68 mmol) se disolvió en MeOH (30 mL) y se enfrió a 0 °C. Sobre la suspensión resultante se burbujeó una corriente seca de HCl gas durante 3 h. Se permitió, entonces, que la reacción alcanzase t.a. y se añadió Et₂O (220 mL) observándose la formación de un precipitado que se filtró, lavó con Et₂O y secó con Na₂SO₄. El sólido así obtenido (0.80 g, 2.35 mmol) se disolvió en 15 mL de NH₃ 2M en EtOH (2M, 20 mL). La disolución se agitó a 55 °C durante 4 h. Se concentró parcialmente el crudo y se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% → 75% B 30 min). Las fracciones combinadas conteniendo el producto, se concentraron y liofilizaron obteniéndose el compuesto deseado en forma de sal de ácido trifluoroacético **28** (0.65 g, 49%, rendimiento global, pf 295 °C).

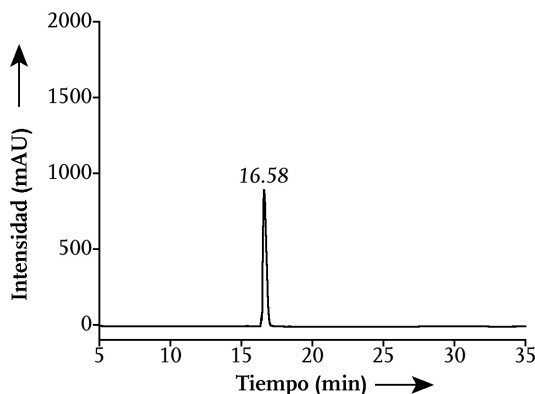


Figura 199. Cromatograma de HPLC del compuesto **28** gradiente 3, $\lambda = 222$ nm.

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxvii} 1.80–1.89 (m, 2H), 3.21 (t, $J = 6.90$ Hz, 4H), 6.68 (d, $J = 8.76$ Hz, 4H), 7.64 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H), 8.75 (ba, 4H), 8.79 (ba, 4H).

RMN ¹³C (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxviii} 27.75 (CH₂), 39.99 (CH₂), 111.15 (CH), 112.22 (C), 129.82 (CH), 153.63 (C), 164.30 (C).

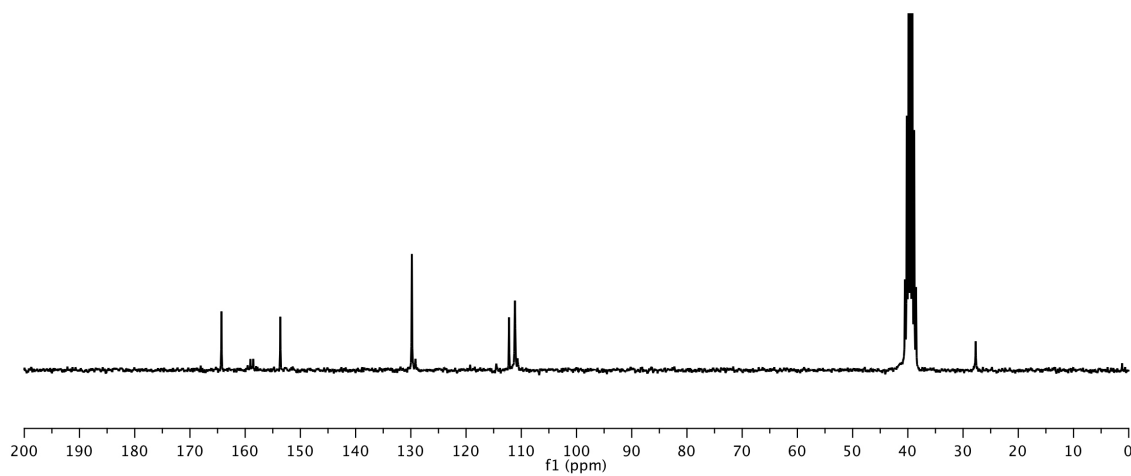
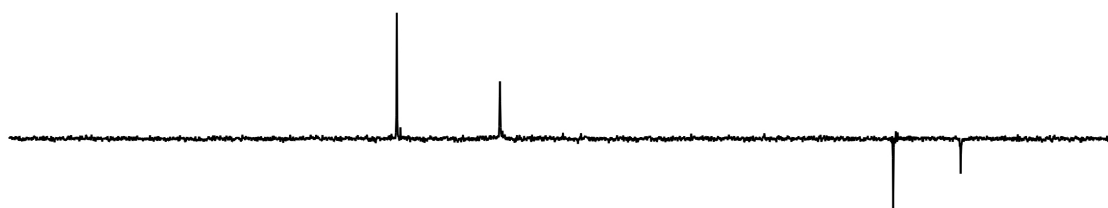
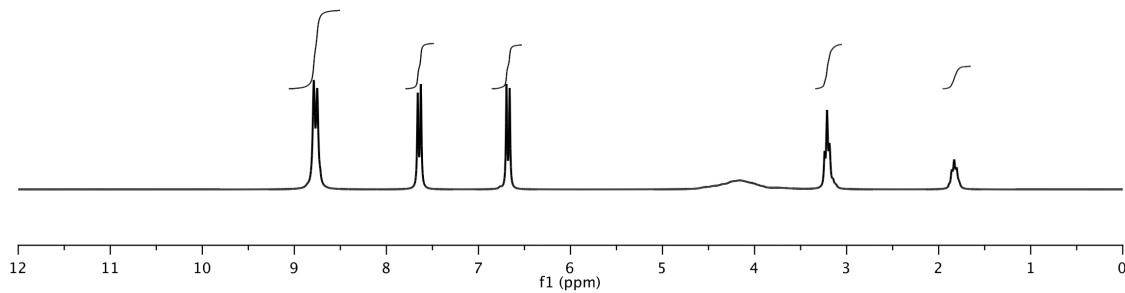
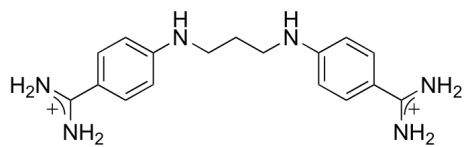
EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ 311 (100), 312 (80).

EMAR: calcd para C₁₇H₂₃N₆: 313.1979. Encontrada: 311.1972.

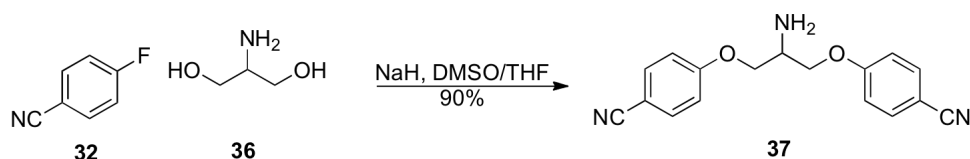
HPLC: $t_R = 16.58$ min

^{xxxvii} Cuando los protones amínicos se encuentran en un elemento estructural de tipo amidinio la velocidad de intercambio es menor y frecuentemente se observa el desdoblamiento.

^{xxxviii} En los compuestos obtenidos como sales de TFA, dependiendo de la concentración de la muestra y del aparato de resonancia empleado, se ha observado la aparición de múltiples señales con débil intensidad en entorno a 158 ppm, atribuibles a las señales de los carbonos de los aniones de TFA.



4, 4'-[(2-AMINOPROPANO-1, 3-DIIL)BIS(OXI)]DIBENZONITRILO (**37**)



El compuesto comercial 2-amino-1,3-propanodiol (2.00 g, 10.47 mmol) se disolvió en DMSO/THF (20 mL, 1/10), y sobre esta disolución se adicionó NaH (1.26 g, 31.41 mmol). La suspensión resultante se agitó durante 10 min, posteriormente se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota 4-fluorobenzonitrilo (3.84 g, 31.41 mmol) disuelto en THF (15 mL). La mezcla resultante se llevó a t.a. y se agitó durante 24 h, después de las cuales se añadió MeOH (10 mL). El crudo de reacción se concentró parcialmente, se vertió sobre Na₂CO₃ acuoso (25 ml, 10%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 25 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (60%, AcOEt/hexano) obteniéndose el producto deseado **37** como un sólido amarillo claro (2.76 g, 90%, pf 169 °C).

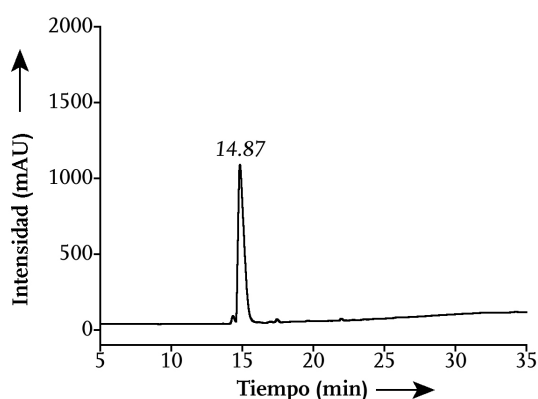


Figura 200. Cromatograma de HPLC del compuesto **37** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ):^{xxxix} 1.74 (ba, 2H), 3.62 (quin, $J = 5.42$, 1H), 4.05–4.16 (m, 4H), 6.96 (d, $J = 8.93$ Hz, 4H), 7.57 (d, $J = 8.92$ Hz, 4H).

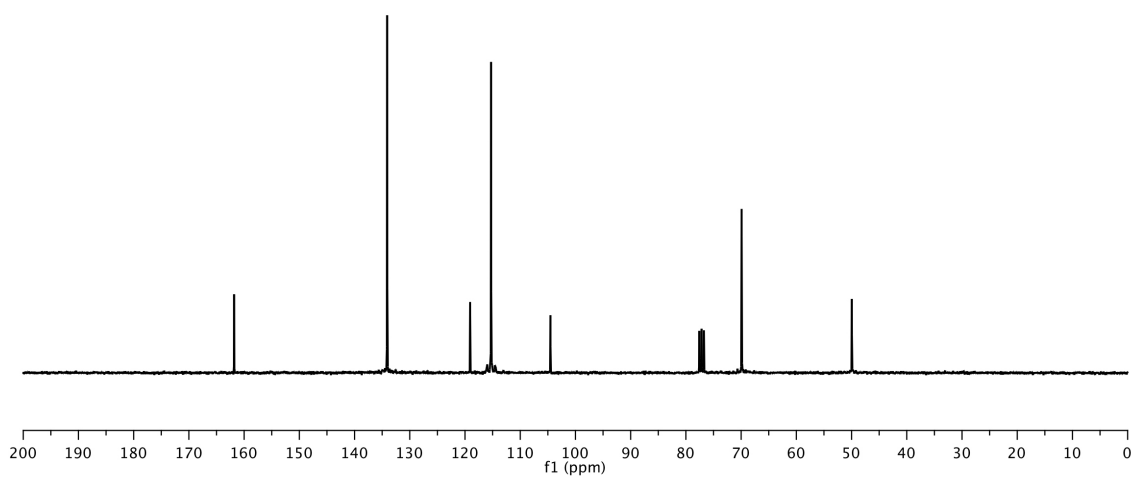
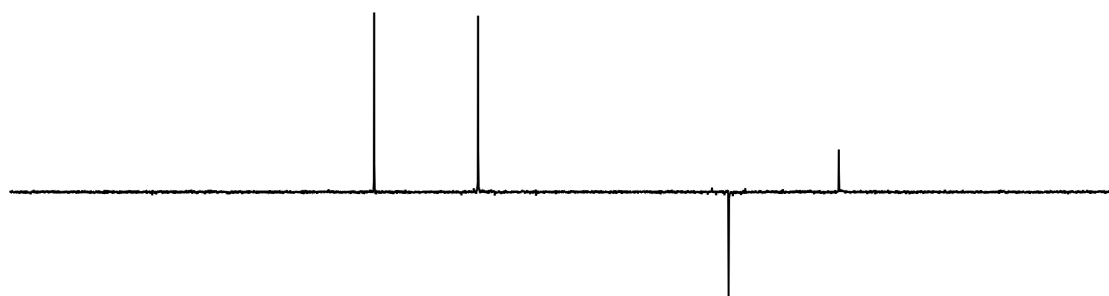
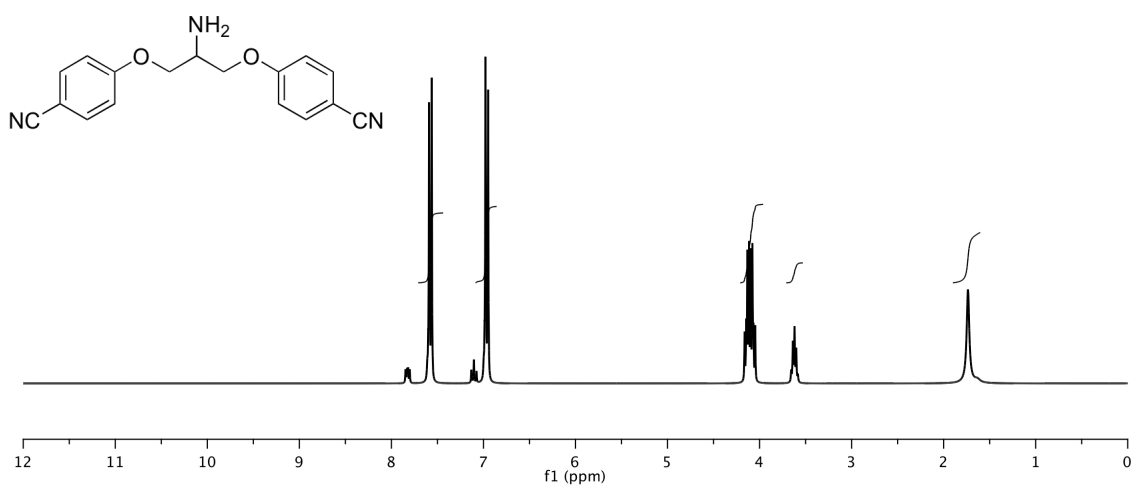
RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃, δ): 49.96 (CH), 69.91 (CH₂), 104.52 (C), 115.18 (CH), 119.07 (C), 134.09 (CH), 161.81 (C).

EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ 294 (100), 295 (25).

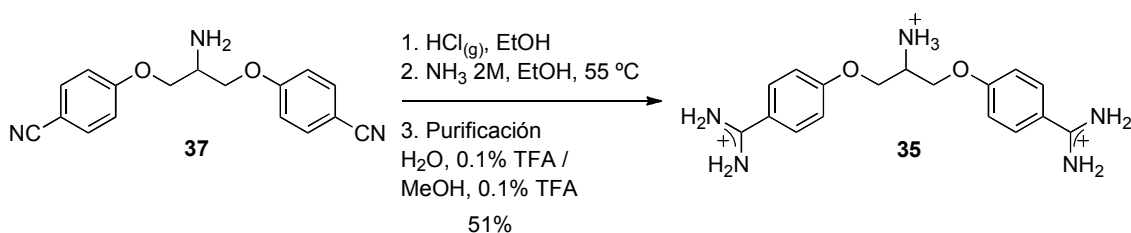
EMAR: calcd para C₁₇H₁₆N₃O₂: 294.1237. Encontrada: 294.1236.

HPLC: $t_R = 14.87$ min.

^{xxxix} En este tipo de compuestos se ha observado una duplicación, con distinta intensidad, de las señales en la región de los protones benzoílicos.



{(2-AMINOPROPANO-1, 3-DIIL)BIS[OXI-4, 1-FENILEN(AMINOMETILLIDENO)]}DIAMONIO (35)



El bis(benzonitrilo) **37** (1.00 g, 3.41 mmol) se disolvió en EtOH (30 mL) y se enfrió a 0 °C. Sobre la suspensión resultante se burbujó una corriente seca de HCl gas. Después de 2 h se llevó la reacción a t.a. se añadió Et₂O (200 mL) observándose la formación de un precipitado. Dicho precipitado se centrifugó, se decantó, se lavó con Et₂O y se secó. El sólido obtenido (2.00 g, 0.68 mmol) se disolvió en una disolución de NH₃ en EtOH (2M, 25 mL). La disolución se agitó durante 2 h a 55 °C. A continuación, el crudo de la reacción se concentró parcialmente y se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% → 75% B 30 min). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se concentraron y se liofilizaron, obteniéndose el bis(benzamidinio) **35** en forma de sal de ácido trifluoroacético (242 mg, 51%, rendimiento global).

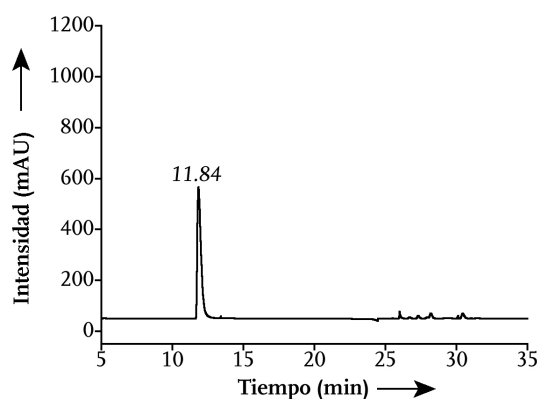


Figura 201. Cromatograma de HPLC del compuesto **35** gradiente 3, $\lambda = 222$ nm.

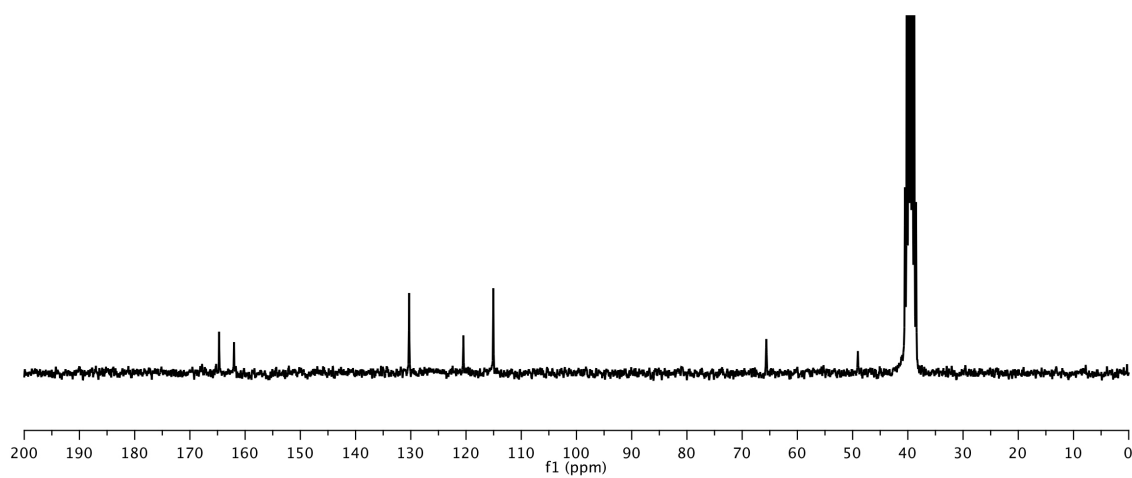
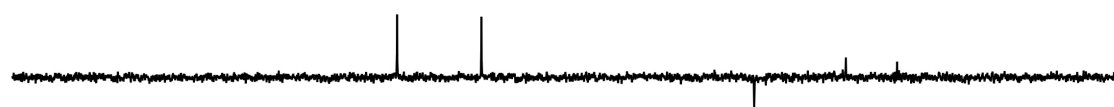
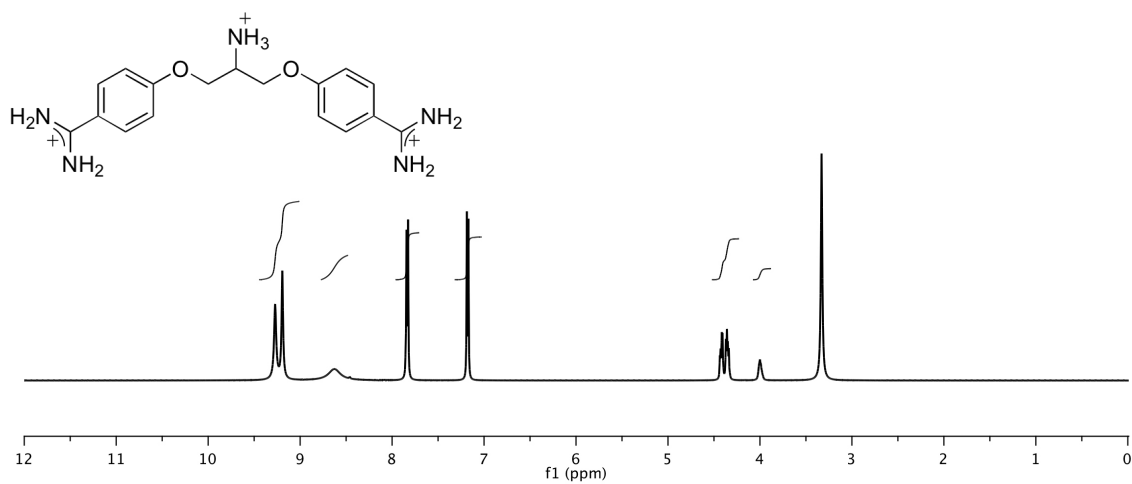
RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxvi} 3.99 (s, 1H), 4.34–4.44 (m, 4H), 7.18 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 7.83 (d, *J* = 8.72 Hz, 4H), 8.62 (ba, 2H), 9.19 (ba, 4H), 9.27 (ba, 4H).

RMN ¹³C (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 49.05 (CH), 65.62 (CH₂), 115.06 (CH), 120.48 (C), 130.30 (CH), 162.01 (C), 164.74 (C).

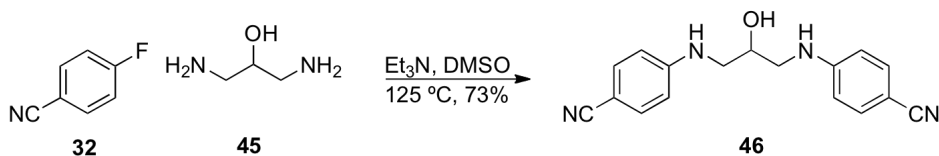
EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 328 (100), 239 (25).

EMAR: calcd para C₁₇H₂₂N₅O₂: 328.1768. Encontrada: 328.1766.

HPLC: *t*_R = 11.84 min.



4, 4'-[(2-HIDROXIPROPANO-1, 3-DIIL)DI(IMINO)]DIBENZONITRILLO (46)



El compuesto comercial 1, 3-diamino-2-propanol (2.00 g, 22.19 mmol) se disolvió en DMSO (75 mL) y sobre esta disolución se adicionó Et₃N (7.75 mL, 55.50 mmol). La disolución se agitó durante 10 min y, a continuación, se añadió 4-fluorobenzonitrilo (8.06 g, 66.55 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 6 h a 125 °C. A continuación, la mezcla se enfrió a t.a. y se vertió sobre una mezcla agua/hielo (200 mL) observándose la aparición de un precipitado. Éste se filtró y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (60%, AcOEt/hexano) obteniéndose el producto deseado 46 como un sólido blanco (4.75 g, 73%).

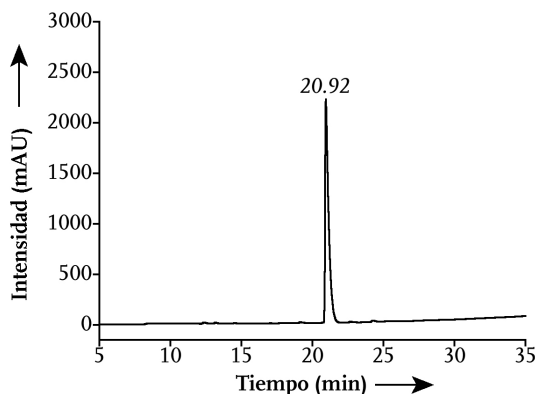


Figura 202. Cromatograma de HPLC del compuesto 46 gradiente 1, $\lambda = 222\text{ nm}$.

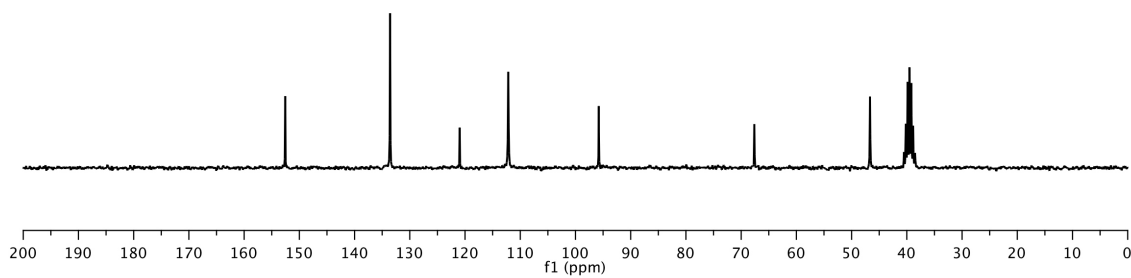
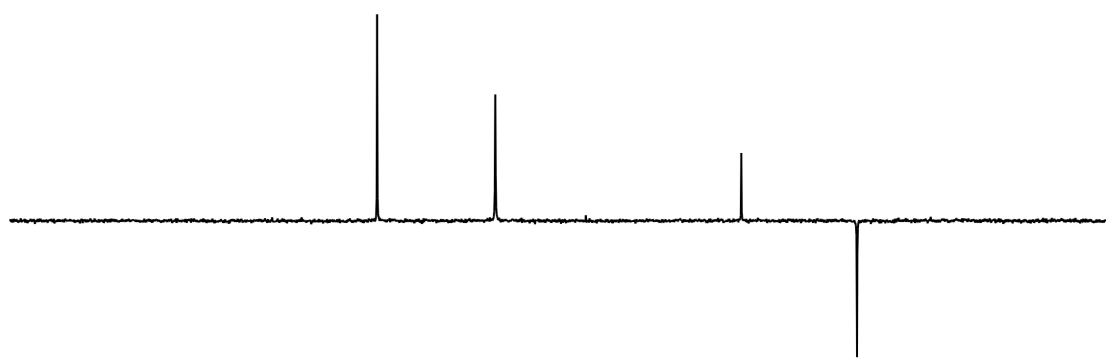
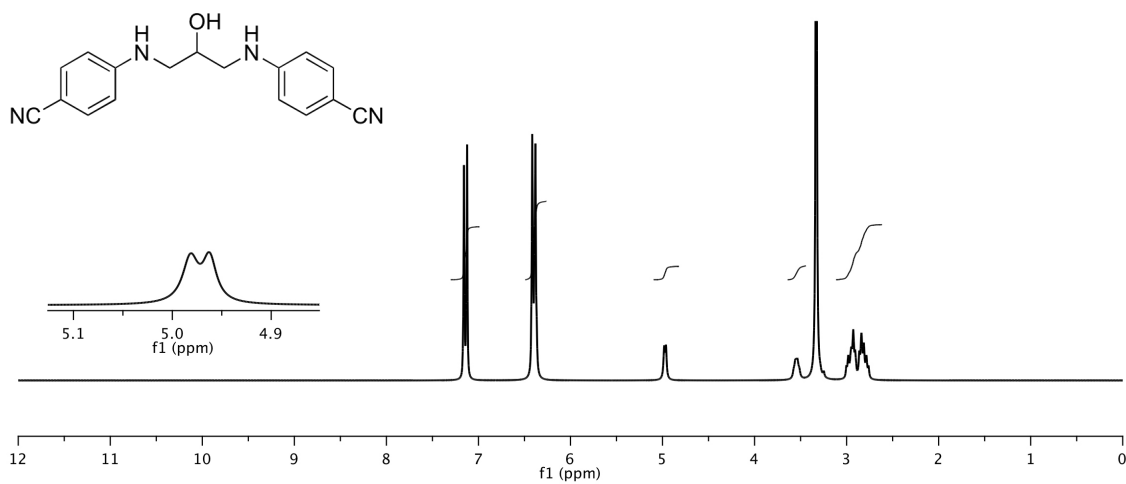
RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 2.76–3.00 (m, 4H), 3.55 (ba, 1H), 4.96 (d, *J* = 4.59 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 8.82 Hz, 6H), 7.41 (d, *J* = 8.77 Hz, 4H).

RMN ¹³C (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 46.67 (CH₂), 67.62 (CH), 95.78 (C), 112.16 (CH), 120.97 (C), 133.57 (CH), 152.55 (C).

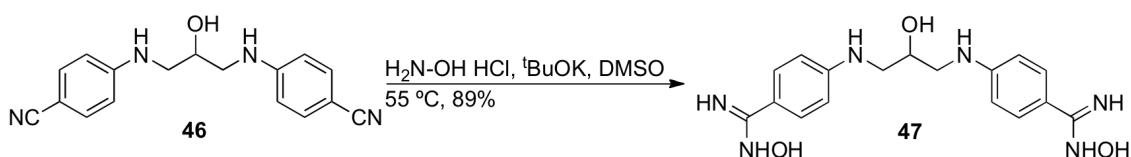
EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 293 (100), 118 (20).

EMAR: calcd para C₁₇H₁₇N₄O: 293.1397. Encontrada: 293.1397.

HPLC: *t*_R = 20.92 min.



4, 4'-[(2-HIDROXIPROPANO-1, 3-DIIL)DI(IMINO)]BIS(N-HIDROXIBENCENOCARBOXIMIDA AMIDA) (**47**)



La síntesis del derivado bis(benzamidinio) se llevó a cabo a través del intermedio hidroxilamino. Este intermedio se sintetizó tomando como base los procedimientos descritos en otros sustratos [198]. El hidrocloreto de hidroxilamina (0.95 g, 13.60 mmol) se disolvió en DMSO (8 mL) y sobre esta disolución se adicionó de forma fraccionada ^tBuOK (1.52 g, 13.60 mmol). La disolución resultante se agitó durante 30 min y a continuación se añadió **46** (0.40 g, 1.40 mmol). La mezcla se agitó durante 12 h a 55 °C y se siguió mediante EM/HPLC-FR. Al observarse la desaparición del pico correspondiente al producto de partida y la aparición de un nuevo producto se procedió a la purificación del crudo por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 5% B 5 min, 5% → 50% B 30 min). Las fracciones adecuadas se combinaron, concentraron y liofilizaron obteniéndose el producto deseado **47** (0.43 g, 89%).

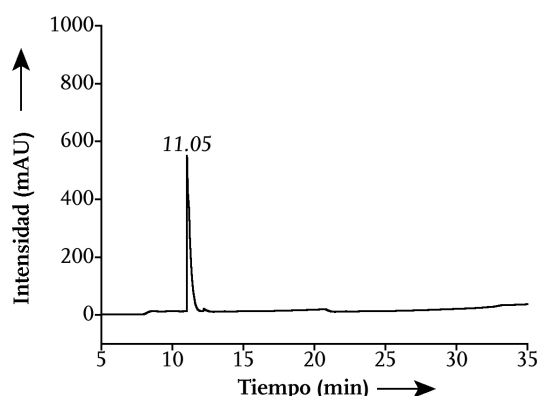


Figura 203. Cromatograma de HPLC del compuesto **47** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, δ):^{x1} 3.17–3.37 (m, 4H), 3.99 (t, $J = 5.03$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 8.87$ Hz, 4H), 7.47 (d, $J = 8.84$ Hz, 4H).

RMN ¹³C (300 MHz, CD₃OD, δ): 47.84 (CH₂), 69.58 (CH), 112.07 (C), 113.18 (CH), 130.06 (CH), 155.11 (C), 162.80 (C).

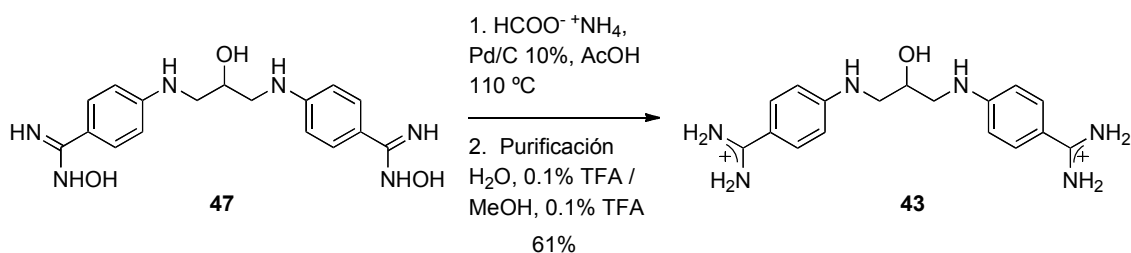
EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ 359 (15), 246 (15), 180 (100).

EMAR: calcd para C₁₇H₂₃N₆O₃: 359.1826. Encontrada: 359.1827.

HPLC: $t_R = 11.05$ min.

^{x1} Los protones hidroxilamino aparecen con baja intensidad entre 6.6–7.7 ppm.

[(2-HIDROXIPROPANO-1, 3-DIIL)BIS(IMINO-4, 1-FENILEN)]BIS(AMINOMETANOIMINIO)
(43)



La síntesis de **43** se llevó a cabo tomando como base procedimientos descritos en bibliografía para otros sustratos [199]. La bis(benzamidoxima) **47** (49 mg, 0.14 mmol) se disolvió en AcOH glacial (1.5 mL) y sobre esta disolución se adicionó formiato amónico (43 mg, 0.69 mmol) y Pd/C 10% (49 mg). La mezcla resultante se agitó durante 4 h a 110 °C y se analizó mediante EM/HPLC-FR. Una vez verificada la desaparición de la sustancia de partida, la reacción se enfrió a t.a. y se filtró a través de celita. El filtrado obtenido se diluyó con el doble de volumen de H₂O (2 mL) y se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 5% B 5 min, 5% → 65% B 30 min). Las fracciones adecuadas se combinaron, se concentraron y se liofilizaron obteniéndose el producto deseado en forma de sal de trifluoroacético **43** (46 mg, 61%).

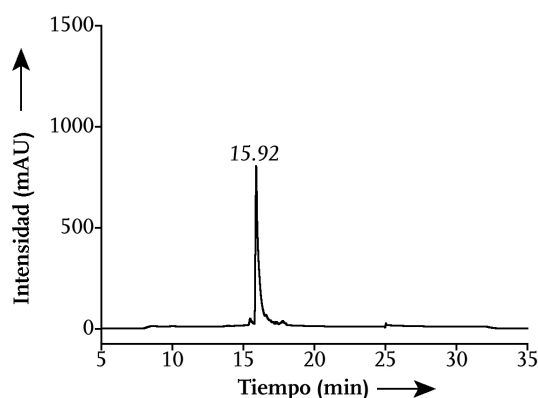


Figura 204. Cromatograma de HPLC del compuesto **43** gradiente 3, $\lambda = 222$ nm.

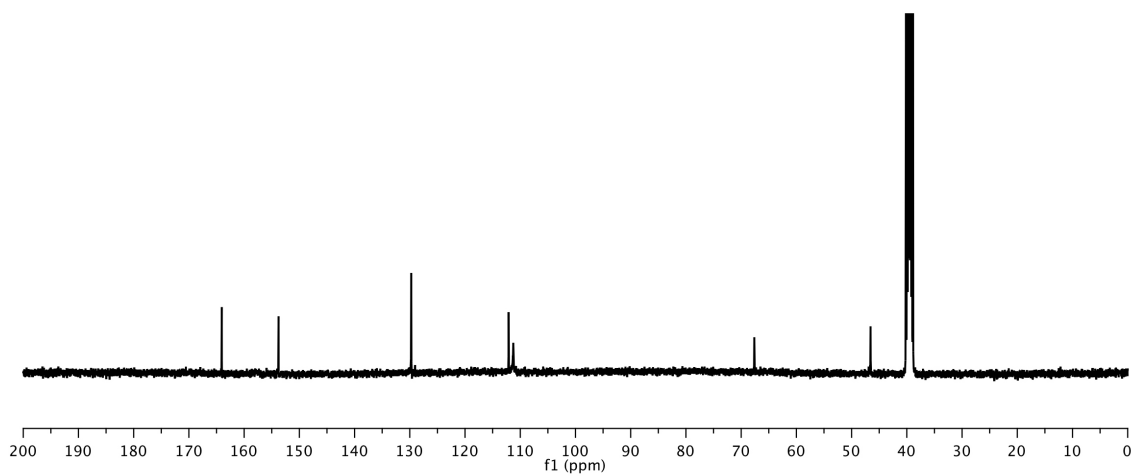
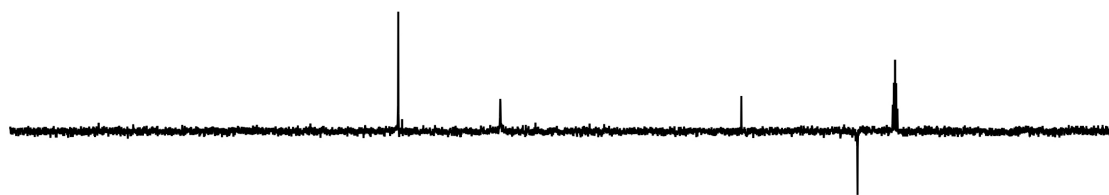
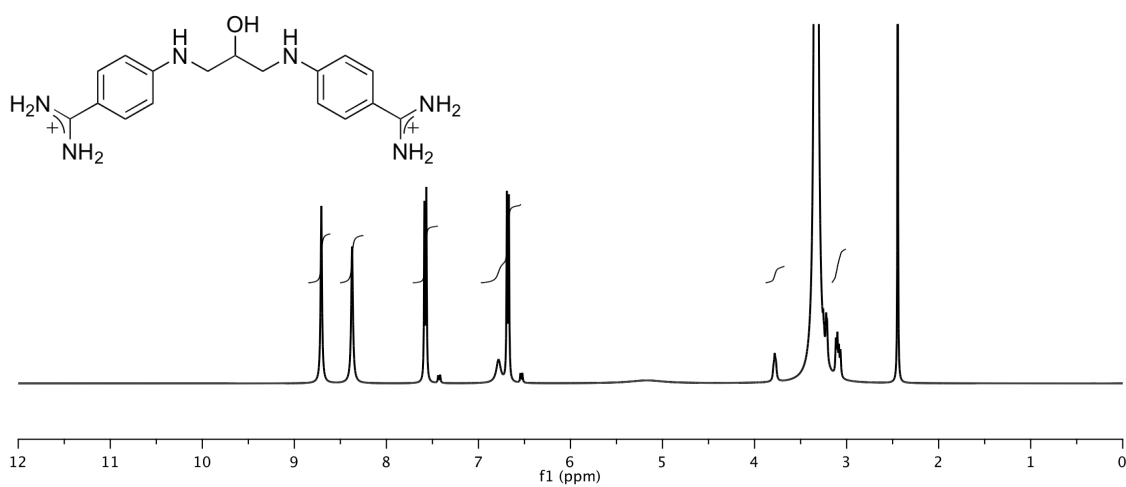
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxvi, xxxviii} 3.07–3.12 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 4.88 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.78 Hz, 4H), 6.78 (br, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.77 Hz, 4H), 8.37 (ba, 4H), 8.71 (ba, 4H).

RMN ¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 46.57 (CH₂), 67.61 (CH), 111.26 (C), 112.14 (CH), 129.73 (CH), 153.76 (C), 164.05 (C).

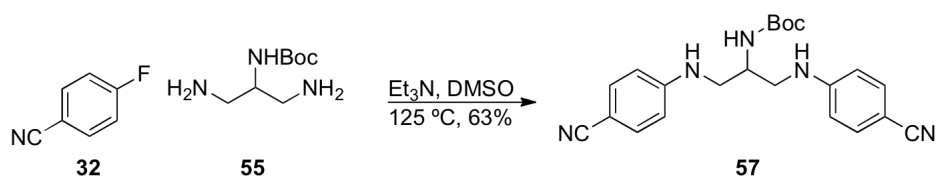
EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 327 (30), 245 (60), 164 (100).

EMAR: calcd para C₁₇H₂₃N₆O: 327.1928. Encontrada: 327.1926.

HPLC: *t*_R = 15.92 min.



TERT-BUTIL(2-[(4-CIANO FENIL)AMINO]-1-[[4-(4-CIANO FENIL)AMINO]METIL]ETIL)CARBAMATO (57)



El N^2 -(di-*tert*-butoxycarbonil)-1, 2, 3-triaminopropano **55** (240 mg, 1.27 mmol) se disolvió en DMSO (3.2 mL) y sobre esta disolución se adicionó Et_3N (0.44 mL, 3.18 mmol) y se agitó durante 10 min. A continuación, se añadió 1-fluorobenzonitrilo (461 mg, 3.81 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 6 h a 125 °C, se enfrió a t.a. y se vertió sobre una mezcla agua/hielo (100 mL) observándose la aparición de un precipitado que se centrifugó, decantó y se secó a vacío, obteniéndose, sin necesidad de mayor purificación, el producto deseado **57** como un sólido blanco higroscópico (313 mg, 63%).

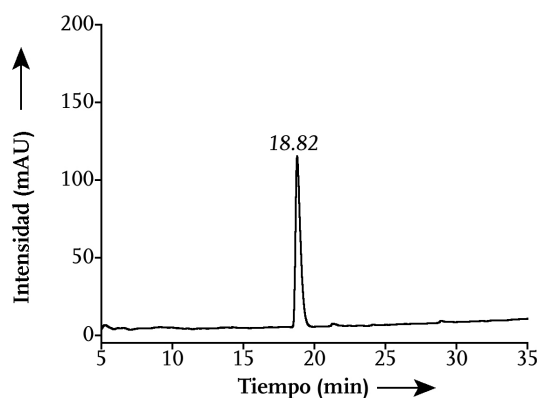


Figura 205. Cromatograma de HPLC del compuesto **57** gradiente 1, $\lambda = 222 \text{ nm}$.

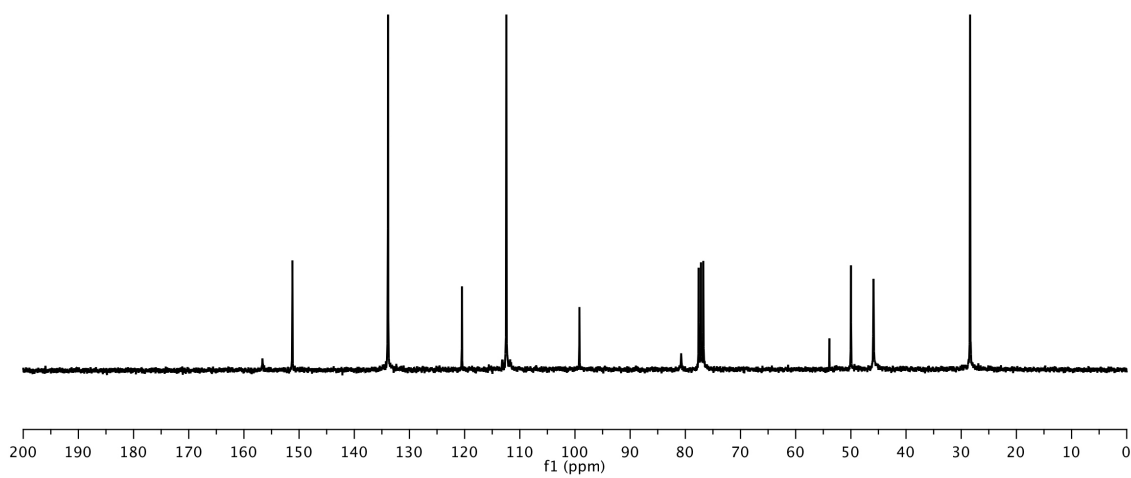
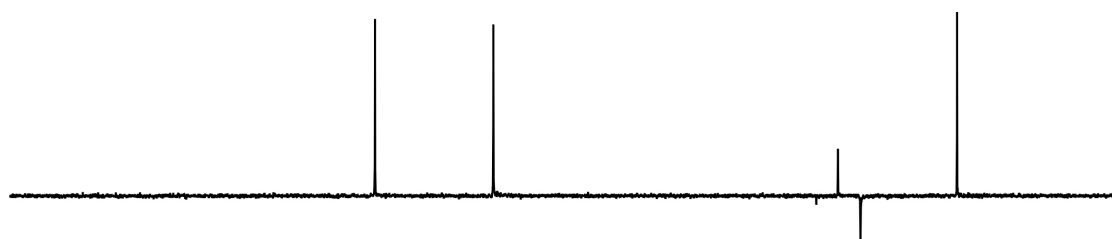
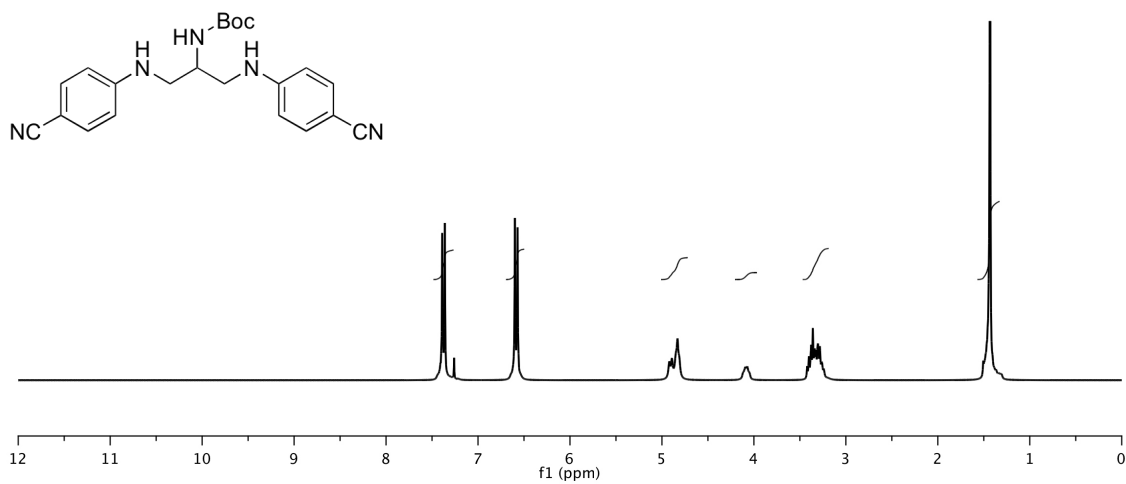
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.43 (s, 9H), 3.24–3.42 (m, 4H), 4.09 (ba, 1H), 4.83 (ba, 2H), 4.89–4.92 (m, 1H), 6.58 (d, $J = 8.61 \text{ Hz}$, 4H), 7.38 (d, $J = 8.59 \text{ Hz}$, 4H).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , δ):^{xxxv} 28.40 (CH_3), 45.90 (CH_2), 49.98 (CH), 53.89 (CH_2), 80.75 (C), 99.19 (C), 112.43 (CH), 120.48 (C), 133.87 (CH), 151.21 (C), 156.63 (C).

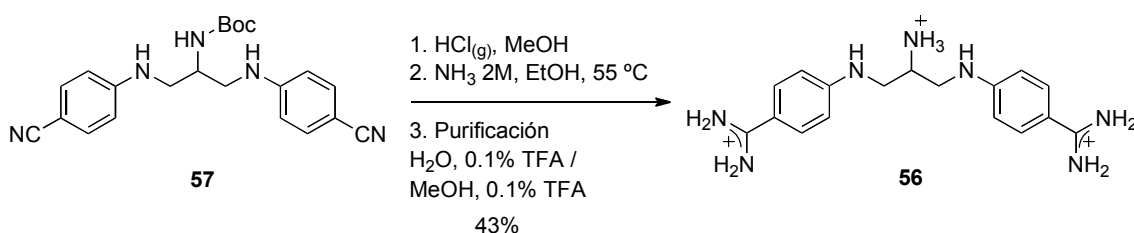
EM-IQ⁺ (70 eV) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 392 (90), 318 (45), 292 (100), 119 (75).

EMAR: calcd para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$: 392.2086. Encontrada: 392.2084.

HPLC: $t_R = 18.82 \text{ min}$.



{(2-AMONIOPROPANO-1, 3-DIIL)BIS[IMINO-4, 1-FENILEN(AMINOMETILIDENO)]}DIAMONIO (56)



El bis(benzonitrilo) **57** (120 mg, 0.31 mmol) se disolvió en MeOH (2 mL) y se enfrió a 0 °C. Sobre la suspensión se burbujeó una corriente seca de HCl gas. Después de 7 h la reacción se llevó a t.a. y sobre ella se añadió Et₂O (25 mL) observándose la formación de un precipitado. Dicho precipitado se filtró, se lavó con Et₂O y se secó. El sólido obtenido se disolvió en una disolución de NH₃ (2M, 5 mL) en EtOH. La mezcla se agitó a 55 °C durante 4 h. Se concentró parcialmente el crudo de reacción y se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 10% B 5 min, 10% → 60% B 30 min). Las fracciones adecuadas se combinaron, concentraron y liofilizaron, obteniéndose el producto deseado en forma de sal de ácido trifluoroacético **56** (74 mg, 43%, rendimiento global).

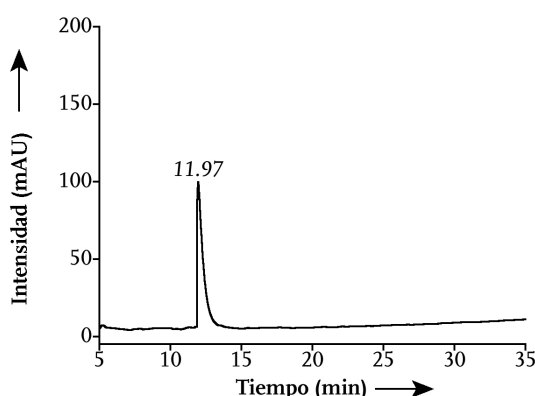


Figura 206. Cromatograma de HPLC del compuesto **56** gradiente 3, $\lambda = 222$ nm.

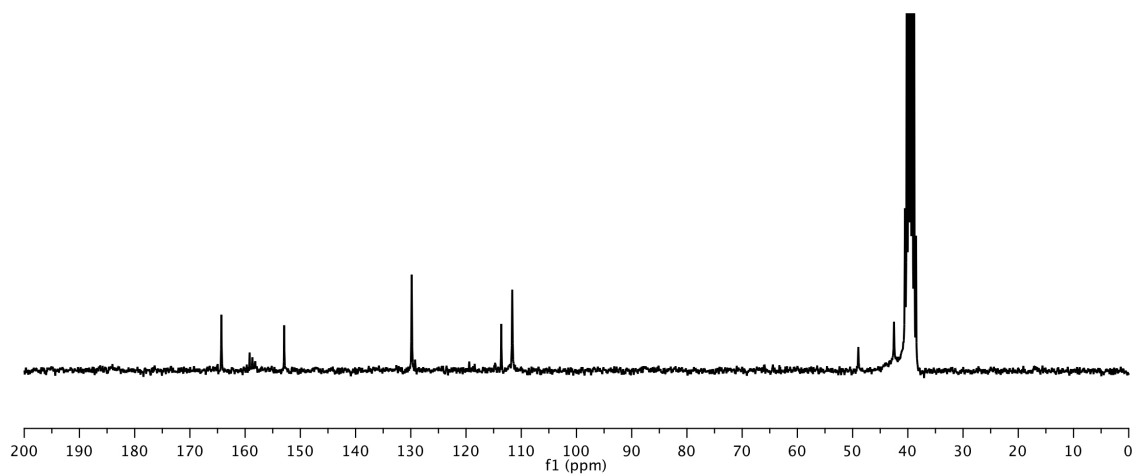
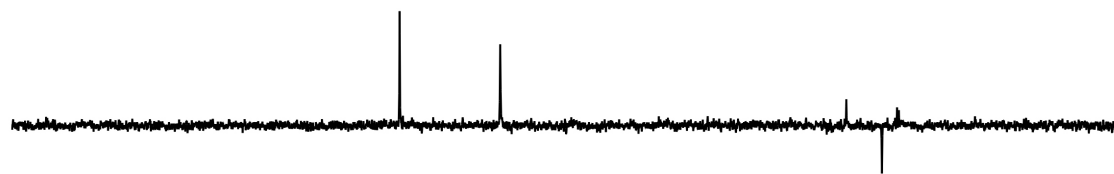
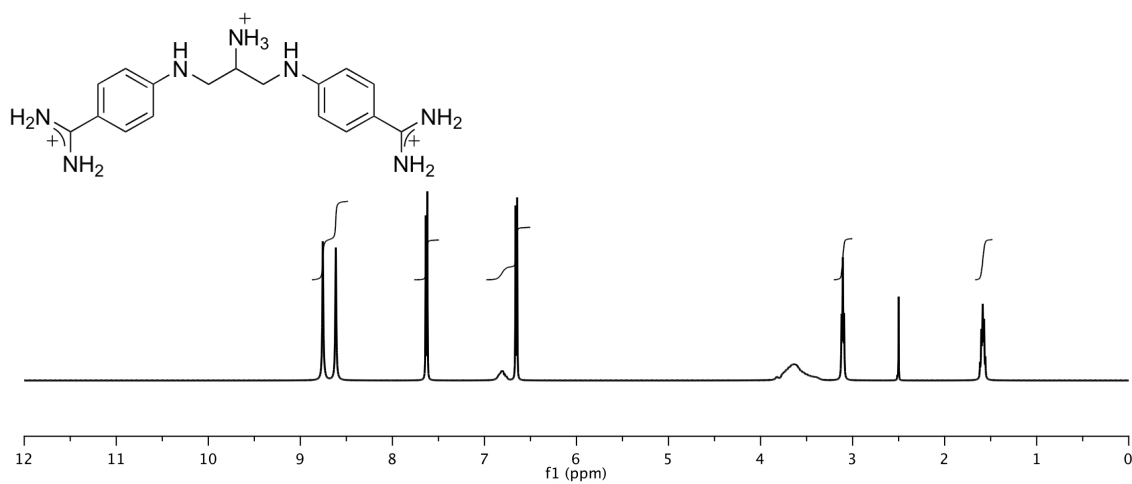
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxvi, xxxviii} 1.59 (m, 4H), 3.16 (t, *J* = 6.80 Hz, 4H), 6.65 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 6.82 (ba, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.78 Hz, 4H), 8.62 (s, 4H), 8.76 (s, 4H).

RMN ¹³C (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxvii} 42.51 (CH₂), 48.96 (CH), 111.62 (CH), 113.62 (C), 129.84 (CH), 153.93 (C), 164.30 (C).

EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 326 (40), 331 (100).

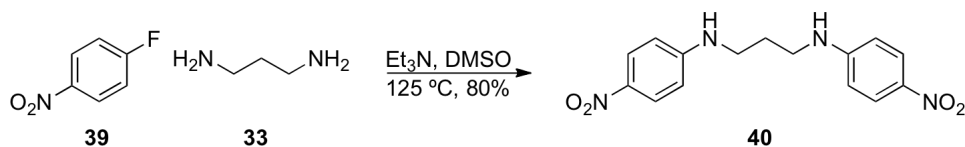
EMAR: calcd para C₁₇H₂₄N₇: 326.2088. Encontrada: 326.2087.

HPLC: *t*_R = 11.97 min.



Síntesis de los compuestos tipo bis(benzoguanidinio)

N, N'-BIS(4-NITROFENIL)PROPANO-1,3-DIAMINA (**40**)



El compuesto comercial 1, 3-diaminopropano (1.5 mL, 18.02 mmol) se disolvió en DMSO (35 mL) y sobre esta disolución se adicionó Et₃N (6.2 mL, 45.05 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 10 min y a continuación se añadió 1-fluoro-4-nitrobenzeno (7.62 g, 54.06 mmol). La disolución se agitó durante 12 h a 125 °C, se enfrió a t.a. y se vertió sobre una mezcla agua/hielo (700 mL) observándose la aparición de un precipitado amarillo. Éste se filtró y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (60%, AcOEt/hexano) obteniéndose el producto deseado **40** como un sólido amarillo (4.56 g, 80%, pf 260 °C).

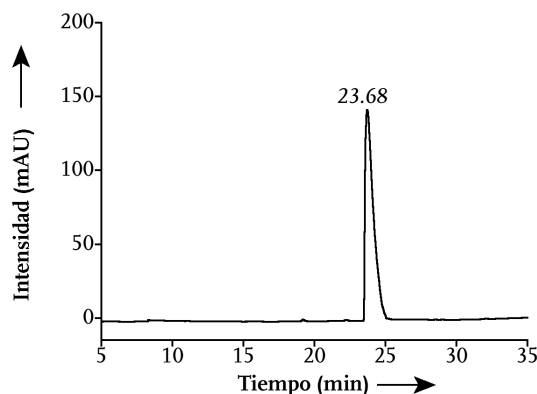


Figura 207. Cromatograma de HPLC del compuesto **40** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

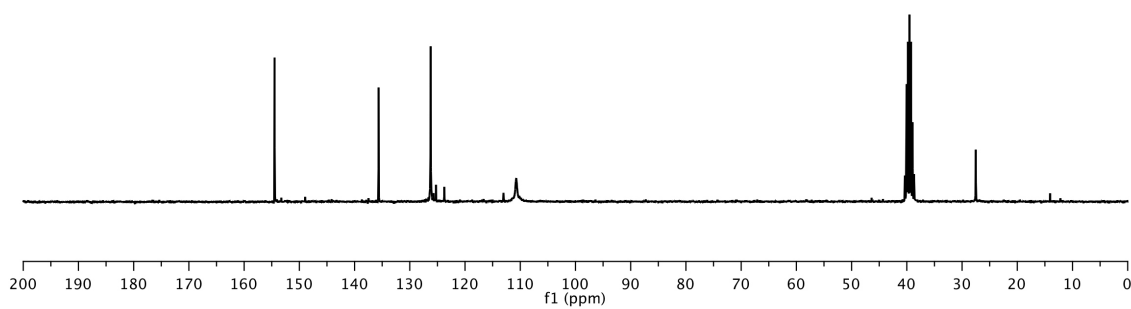
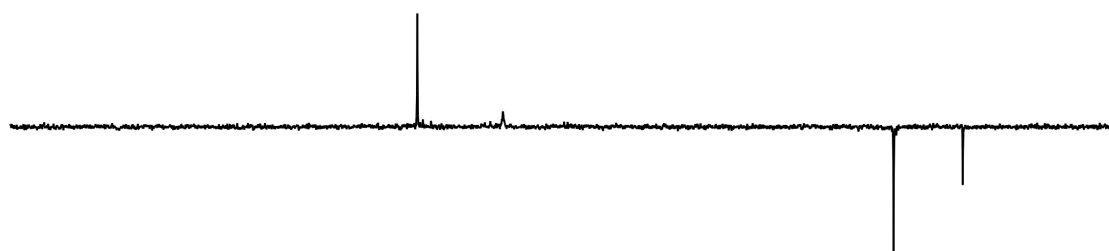
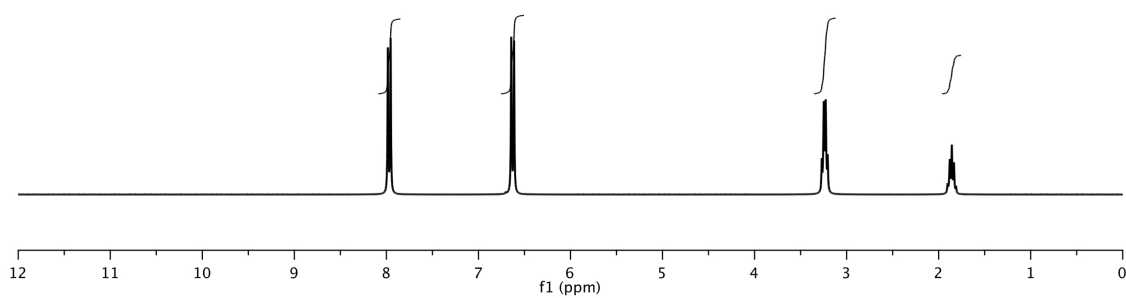
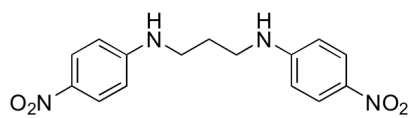
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.86 (quin, $J = 6.81$ Hz, 2H), 3.25 (dd, $J = 12.70, 6.50$ Hz, 4H), 6.63 (d, $J = 7.68$ Hz, 4H), 7.42 (d, $J = 7.97$ Hz, 4H).

RMN ¹³C (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 27.52 (CH₂), 40.05 (CH₂), 110.70 (CH), 126.22 (CH), 135.65 (C), 154.48 (C).

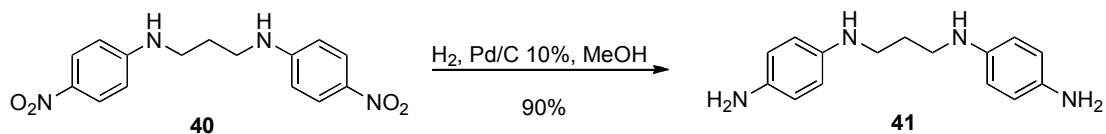
EM-ESI⁺ (m/z): [M+Na]⁺ 339 (100), 282 (25), 133 (25).

EMAR: calcd para C₁₅H₁₇N₄O₄: 317.1259. Encontrada: 317.1250.

HPLC: $t_R = 23.68$ min.



$N^1, N^{1'}$ -PROPANO-1, 3-DIIL DIBENCENO-1, 4- DIAMINA (**41**)



Una suspensión del compuesto **40** (500 mg, 1.58 mmol) y Pd/C 10% (250 mg) en MeOH (100 mL) se agitó durante 2 h bajo de H₂ a presión atmosférica. El catalizador se separó por filtración a través de celita, el filtrado se concentró a sequedad y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (5%, MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose la diamina deseada **41** como un sólido marrón (364 mg, 90%, pf 109 °C).

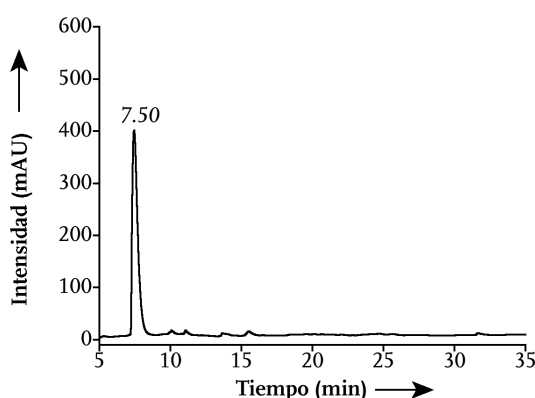


Figura 2o8. Cromatograma de HPLC del compuesto **41** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

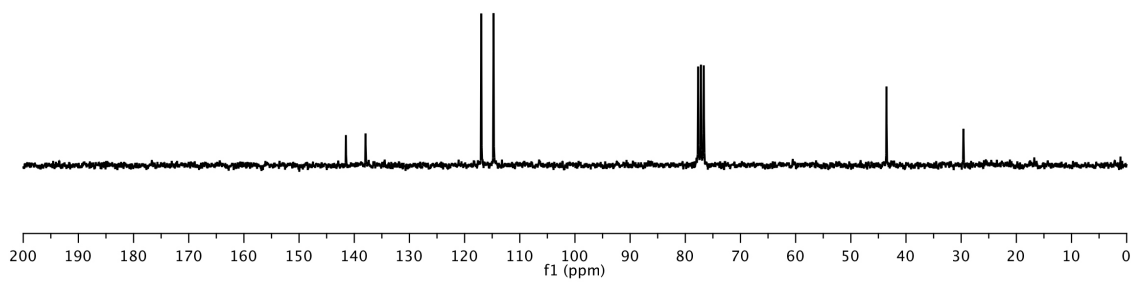
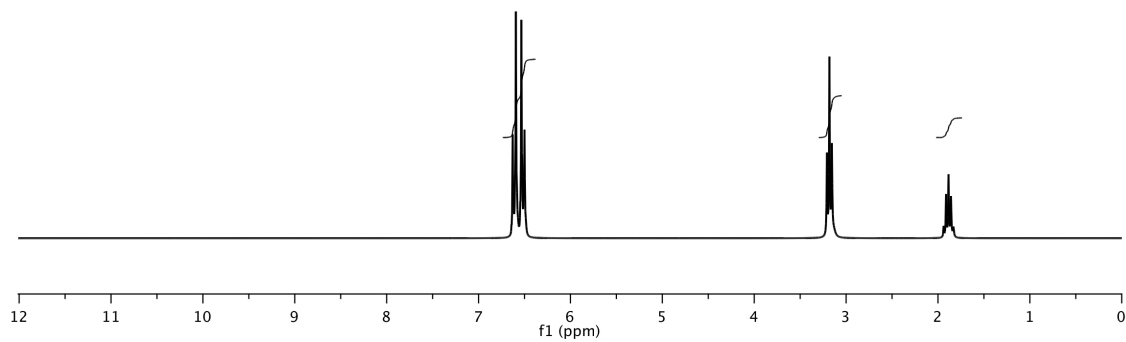
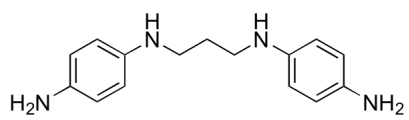
RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD, δ): 1.88 (quin, $J = 6.67$ Hz, 2H), 3.18 (t, $J = 6.70$ Hz, 4H), 6.56 (d, $J = 8.63$ Hz, 4H), 6.57 (d, $J = 8.68$ Hz, 4H).

RMN ¹³C (300 MHz, CD₃OD, δ): 29.59 (CH₂), 43.53 (CH₂), 114.75 (CH), 116.98 (CH), 137.95 (C), 141.52 (C).

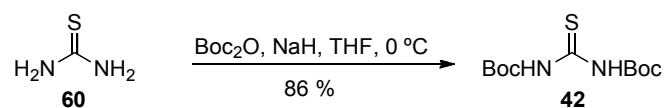
EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ 257 (10), 149 (10), 121 (100).

EMAR: calcd para C₁₅H₂₁N₄: 257.1761. Encontrada: 257.1766.

HPLC: $t_R = 7.50$ min.



O, O-DI-*TERT*-BUTIL DIIMIDOTIOTRICARBONATO (**42**)



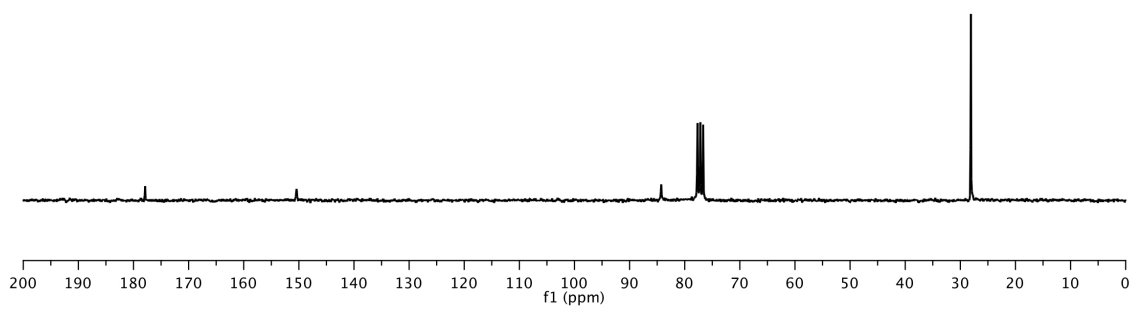
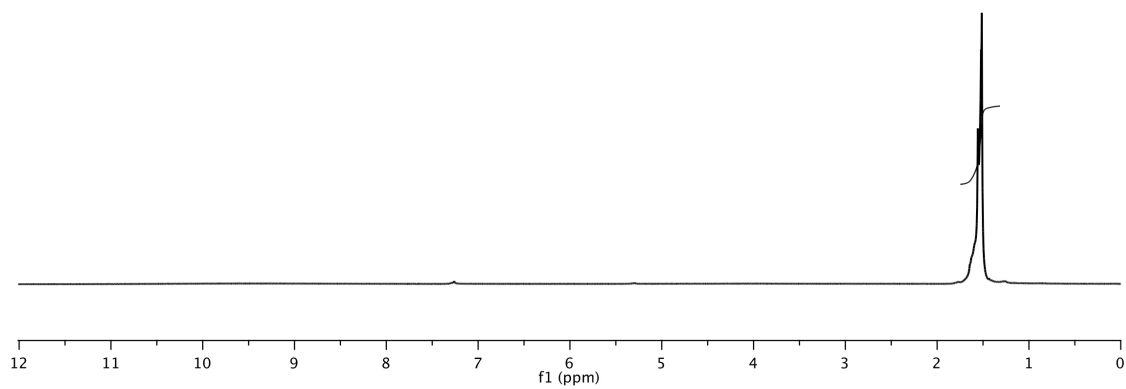
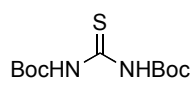
La protección de la urea **60** se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía [220]. Sobre una disolución del compuesto **60** (570 mg, 7.49 mmol) en THF (150 mL) enfriada a 0 °C se adicionó NaH (1.35 g, 33.80 mmol). Después de 5 min, se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó durante 15 min a t.a. Posteriormente la mezcla se volvió a enfriar a 0 °C para añadir Boc₂O (3.60 g, 16.50 mmol), después de 30 min se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó durante 2 h a t.a. Transcurrido ese tiempo, se añadió NaHCO₃ (10mL, 10%), se vertió sobre H₂O (10mL) y se extrajo con AcOEt (3 × 75 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel usando un gradiente isocrático (100%, CH₂Cl₂) para dar el compuesto **42** como un sólido amarillo (1.78 g, 86% pf 128 °C).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃, δ): 1.56 (s, 18H).

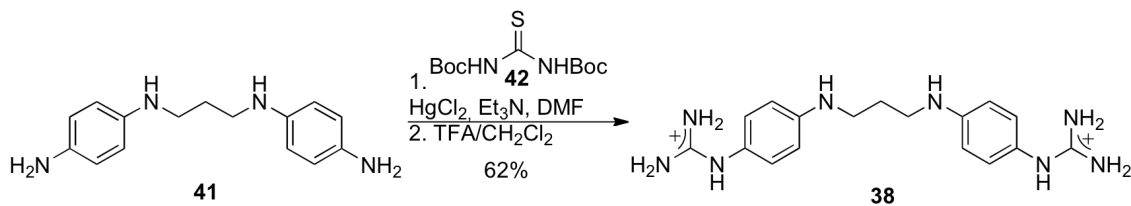
RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃, δ): 28.08 (CH₃), 84.26 (C), 150.42 (C), 177.89 (C).

EM-IE (70 eV) *m/z*: M⁺ 276 (5), 219 (18), 163 (60), 57 (100).

EMAR: calcd para C₁₁H₂₀N₂O₄S: 276.1144. Encontrada: 276.1142.



N, N'-[PROPANO-1, 3-DIIL BIS(IMINO-4, 1-FENILEN)] DIGUANIDINIO (**38**)



Sobre una disolución de **41** (365 mg, 1.42 mmol), *N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonil)tiourea (867 mg, 3.14 mmol) y Et₃N (1.02 mg, 7.10 mmol) en DMF (10 mL) enfriada a 0 °C, se adicionó HgCl₂ (854 mg, 3.14 mmol). La reacción se agitó durante 30 min a 0 °C y a t.a. durante 12 h. A continuación, se diluyó con CH₂Cl₂ (20 mL), se filtró a través de celita y se extrajo con CH₂Cl₂/salmuera (3 × 20 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido (450 mg, 0.61 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (15 mL) y se enfrió a 0 °C, se añadió TFA (15 mL) gota a gota a lo largo de 20 min y la disolución resultante se agitó durante una hora a 0 °C y a t.a. durante 2 h. El TFA residual se eliminó mediante codestilación con CH₂Cl₂ y el residuo resultante se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% → 95% B 30 min). Las fracciones combinadas se concentraron y liofilizaron obteniéndose el compuesto deseado en forma de sal de ácido trifluoroacético **38** como un compuesto blanquecino higroscópico (305 mg, 62%, rendimiento global).

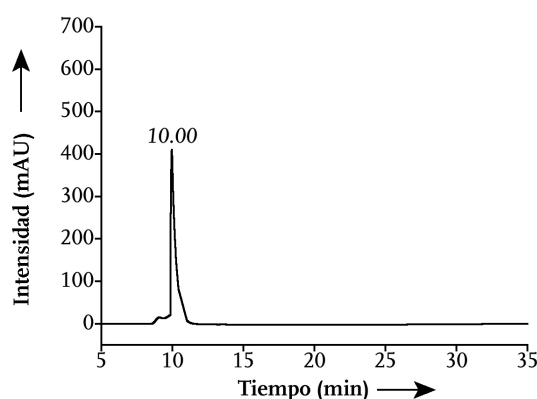


Figura 209. Cromatograma de HPLC del compuesto **38** gradiente 3, $\lambda = 222$ nm.

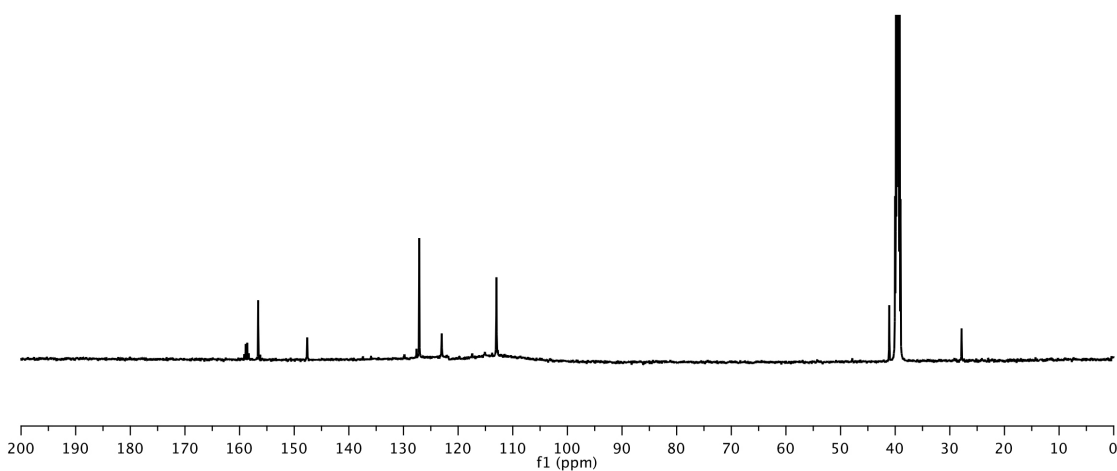
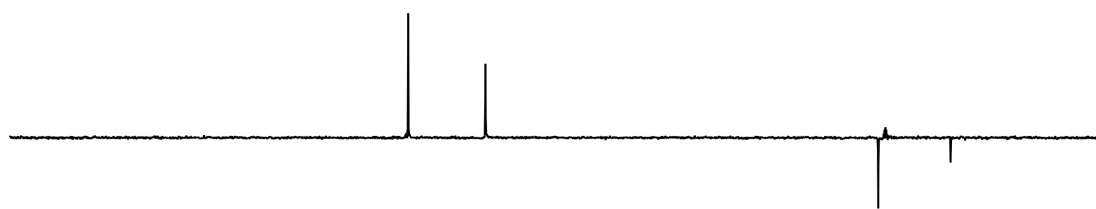
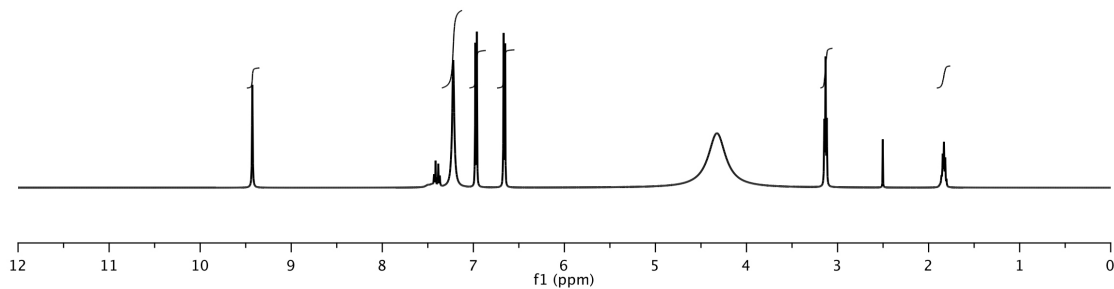
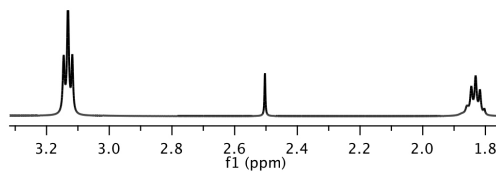
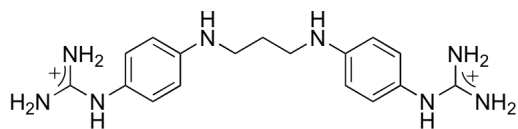
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.82 (quin, *J* = 6.70 Hz, 2H), 3.13 (t, *J* = 6.90 Hz, 4H), 6.66 (d, *J* = 8.76 Hz, 4H), 6.97 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 7.22 (ba, 8H), 9.43 (ba, 2H).

RMN ¹³C (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 27.85 (CH₂), 41.08 (CH₂), 112.99 (CH), 123.00 (C), 127.12 (CH), 147.62 (C), 156.60 (C).

EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 341 (20), 171 (100).

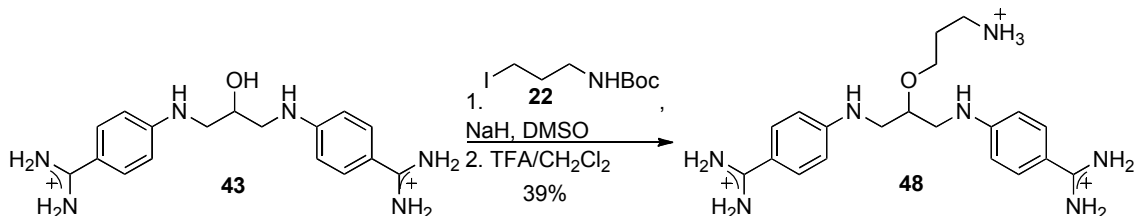
EMAR: calcd para C₁₇H₂₅N₈: 341.2197. Encontrada: 341.2193.

HPLC: *t*_R = 10.00 min.



Síntesis de los compuestos bis(benzamidinio) modificados

{(2-(3-AMONIOPROPOXI)PROPANO-1, 3-DIIL)BIS[IMINO-4,1-FENILEN(AMINOMETILIDENO)]} DIAMONIO (48)



Se disolvió el bis(benzamidinio) **43** (66 mg, 0.12 mmol) en DMSO (1.50 mL) y se adicionó NaH (68 mg, 0.48 mmol). La suspensión resultante se agitó durante 30 min. A continuación se añadió lentamente el yoduro **22** (19 mg, 0.24 mmol) y se agitó la mezcla durante 6 h. El crudo se purificó directamente por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% → 95% B 30 min). Las fracciones combinadas que contenían el producto se concentraron y liofilizaron. El intermedio se disolvió en CH₂Cl₂ (1 mL) y se enfrió a 0 °C, se añadió TFA (1 mL) gota a gota y la disolución se agitó durante 1 h a 0 °C y a t.a. durante 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 0% B 5 min, 0% → 50% B 30 min). Las fracciones combinadas, se concentraron y liofilizaron obteniéndose el producto deseado como sal de ácido trifluoroacético **48** en forma de sólido blanquecino (13 mg, 39%, rendimiento global).

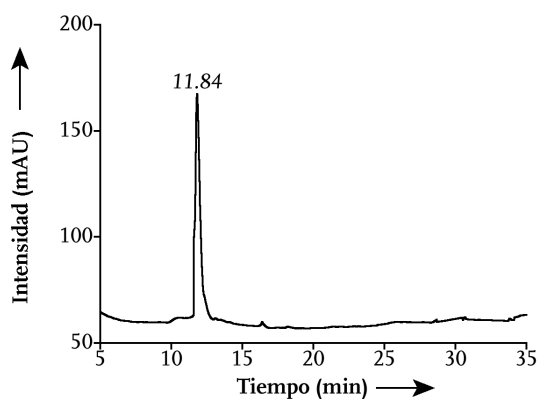


Figura 210. Cromatograma de HPLC del compuesto **48** gradiente 2, $\lambda = 222$ nm.

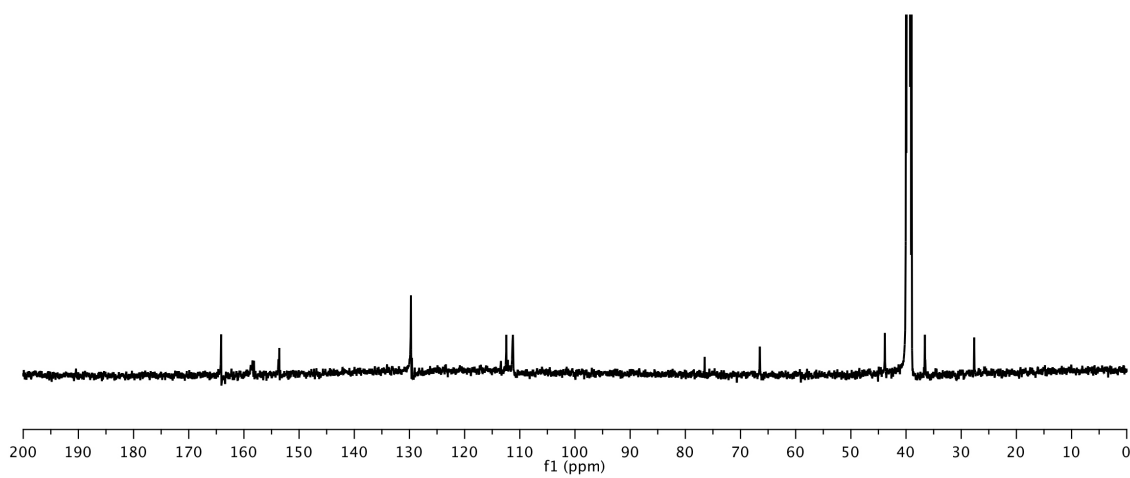
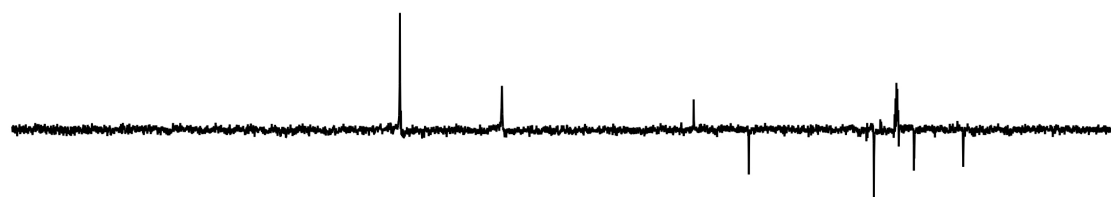
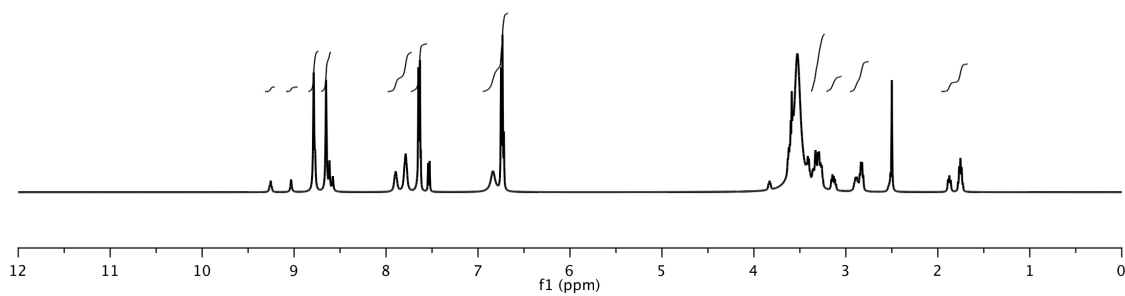
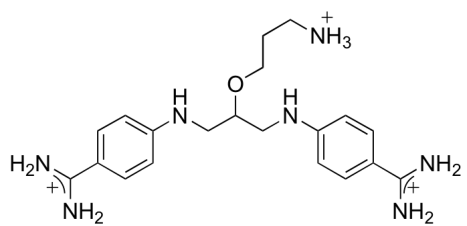
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxvi, xxxviii} 1.73–1.89 (m, 2H), 2.81–2.89 (m, 2H), 3.11–3.16 (m, 1H), 3.26–3.36 (m, 4H), 6.75 (d, *J* = 8.75 Hz, 4H), 6.84 (ba, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.86 Hz, 4H), 7.78 (ba, 2H), 7.89 (ba, 2H), 8.65 (ba, 4H), 8.79 (ba, 4H), 9.03 (ba, 1H), 9.25 (ba, 1H).

RMN ¹³C (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ):^{xxxvii} 27.65 (CH₂), 36.59 (CH₂), 43.84 (CH₂), 66.50 (CH₂), 76.50 (CH), 111.25 (CH), 112.45 (C), 129.73 (CH), 153.58 (C), 164.13 (C).

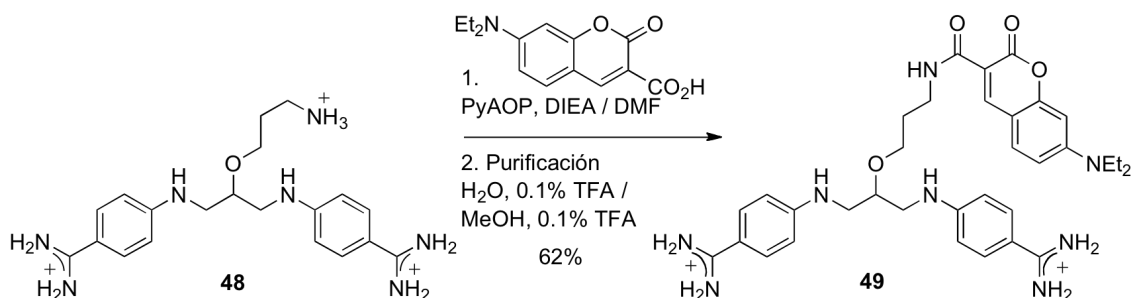
EM-ESI⁺ (*m/z*): [M+H]⁺ 384 (100), 385 (15), 406 (5).

EMAR: calcd para C₂₀H₃₀N₇O: 384.2506. Encontrada: 384.2506.

HPLC: *t*_R = 11.84 min.



[[2-[3-({[7-(DIETILAMINO)-2-OXO-2*H*-CROMEN-3-IL]CARBONIL}AMINO)PROPOXI]PROPANO-1, 3-DIIL]BIS(IMINO-4, 1-FENILEN)]BIS(AMINOMETANOIMINIO)DIAMONIO (**49**)



El ácido 7-diethylaminocumarin-3-carboxílico (24 mg, 0.1 mmol) se disolvió en DIEA 0.2 M en DMF (460 μ L); se le adicionó el agente activante PyAOP (48 mg, 1 mmol) y después de 5 min se añadió esta disolución sobre otra previamente preparada de **48** (9 mg, 0.02 mmol) en 230 μ L de DIEA 0.2 M en DMF. La mezcla resultante se agitó durante 2 h. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% \rightarrow 95% B 30 min). Las fracciones combinadas se concentraron y liofilizaron obteniéndose el producto deseado en forma de sal de ácido trifluoroacético (12 mg, 62%, rendimiento global).

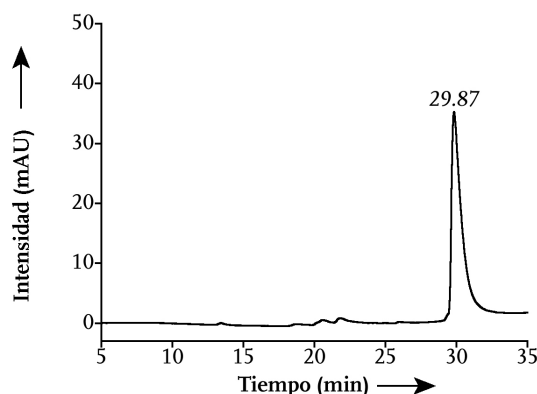


Figura 211. Cromatograma de HPLC del compuesto **49** gradiente 2, $\lambda = 222$ nm.

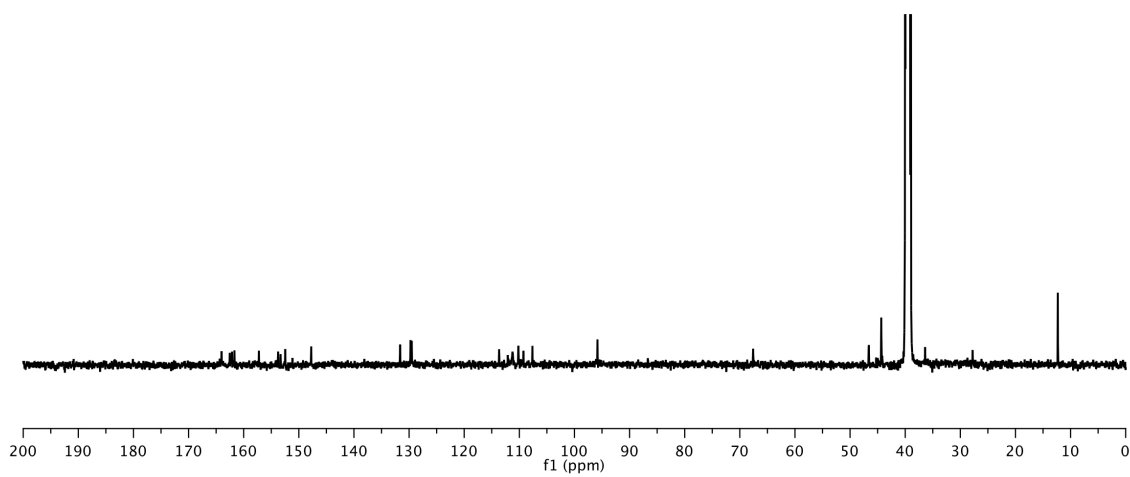
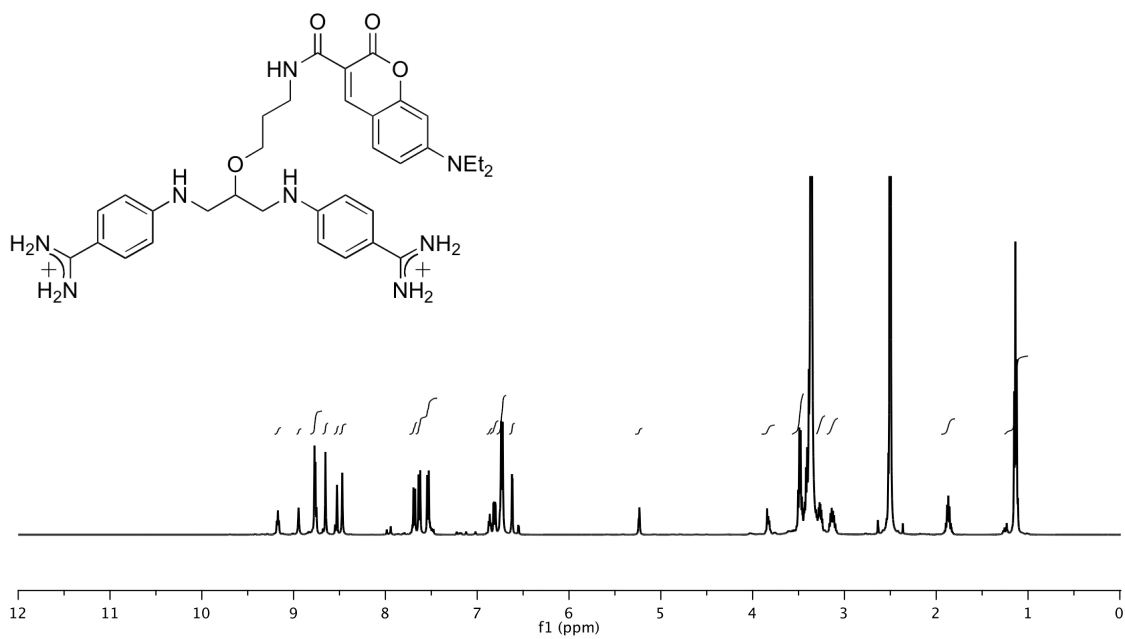
RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , δ):^{xxxvi, xxxviii} 1.14 (t, $J = 6.95$ Hz, 6H), 1.87 (quin, $J = 6.49$ Hz, 2H), 3.09–3.16 (m, 2H), 3.24–3.29 (m, 2H), 3.46–3.50 (m, 4H), 3.84 (ba, 1H), 5.23 (s, 1H), 6.62 (ba, 1H), 6.73 (d, $J = 7.44$ Hz, 4H), 6.82 (dd, $J = 9.06, 2.18$ Hz, 2H), 6.86 (ba, 1H), 7.58 (dd, $J = 46.43, 8.87$ Hz, 4H), 7.68 (d, $J = 9.04$ Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.77 (ba, 2H), 8.94 (s, 1H), 9.17 (ba, 1H).

RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6 , δ):^{xxxvii} 12.32 (CH_3), 27.77 (CH_2), 36.39 (CH_2), 44.15 (CH_2), 44.34 (CH_2), 46.59 (CH_2), 67.59 (CH), 95.82 (CH), 107.62 (C), 109.25 (C), 110.17 (CH), 111.20 (CH), 113.67 (C), 129.52 (CH), 129.74 (CH), 131.62 (CH), 147.74 (CH), 152.46 (C), 153.41 (C), 153.75 (C), 157.24 (C), 161.68 (C), 162.12 (C), 162.52 (C), 164.02 (C).

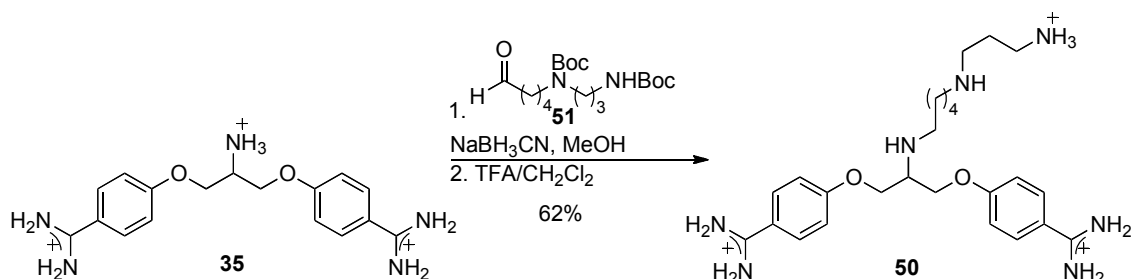
EM-ESI $^+$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 627 (5), 314 (100).

EMAR: calcd para $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_8\text{O}_4$: 627.3402. Encontrada: 627.3385.

HPLC: $t_R = 29.87$ min.



[[2-(5-[(3-AMINOPROPIL)AMINO]PENTIL)AMINO)PROPANO-1,3-DIIL]BIS(OXI-4,1-FENILEN)]BIS(AMINOMETANOIMINIO) (**50**)



El bis(benzamidinio) **35** (90 mg, 0.13 mmol) y el aldehído **51** (39 mg, 0.10 mmol) se disolvieron MeOH (1.25 mL). Sobre esta disolución se añadió NaBH_3CN (8 mg, 0.12 mmol) y la mezcla se agitó a t.a. durante 5 h. El crudo de reacción se concentró parcialmente y se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% → 95% B 30 min). Las fracciones combinadas con el producto se concentraron y liofilizaron. El intermedio protegido se disolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y se enfrió a 0 °C. Se añadió TFA lentamente (3 mL), se agitó durante 30 min a 0 °C y a t.a. durante 2 h. El TFA residual se eliminó mediante codestilación con CH_2Cl_2 . El residuo obtenido se identificó como el producto deseado **50** (65 mg, 62%, rendimiento global) [204].

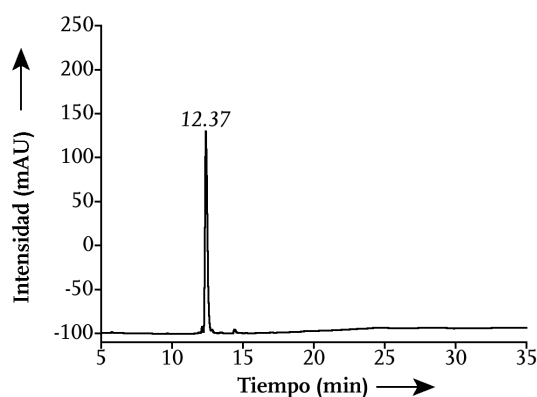


Figura 212. Cromatograma de HPLC del compuesto **50** gradiente 3, $\lambda = 222 \text{ nm}$.

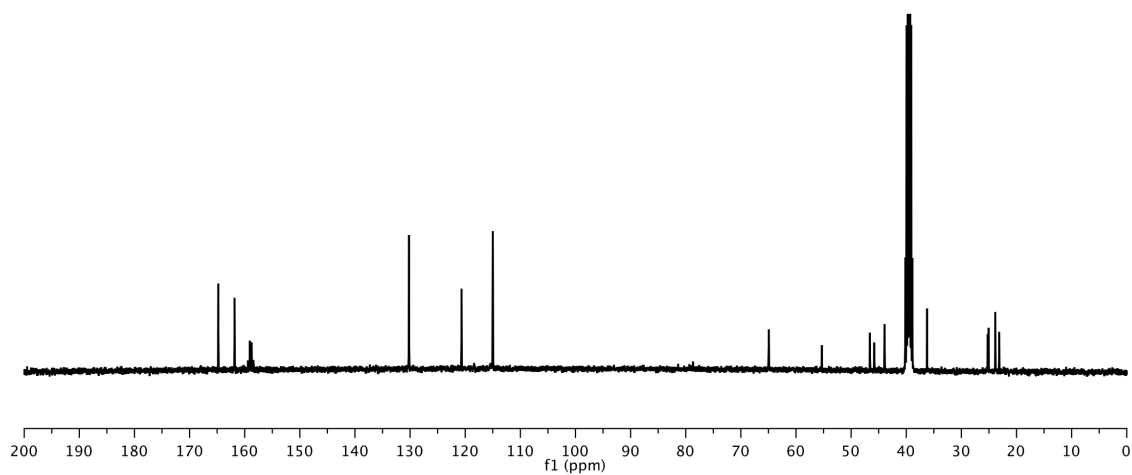
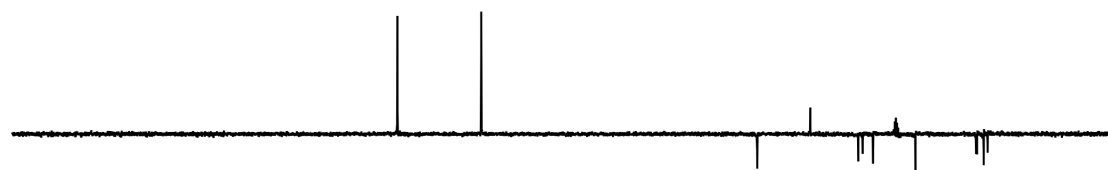
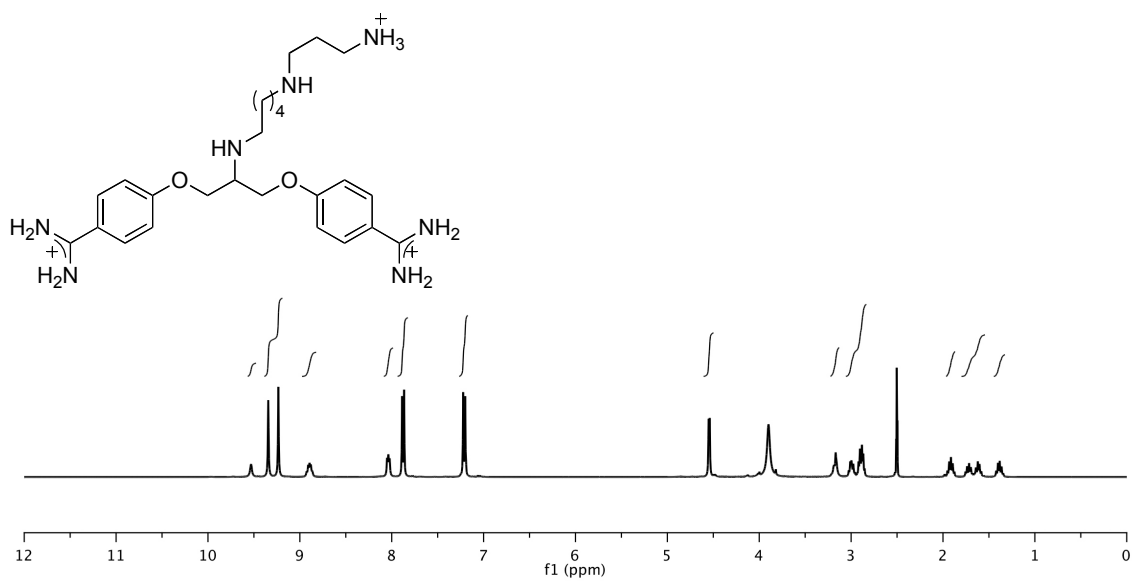
RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ):^{xxxvi, xxxviii} 1.34–1.42 (m, 2H), 1.58–1.66 (m, 2H), 1.67–1.76 (m, 2H), 1.88–1.95 (m, 2H), 2.85–2.93 (m, 2H), 2.98–3.02 (m, 2H), 3.17 (ba, 2H), 4.54 (s, 4H), 7.21 (d, $J = 8.87 \text{ Hz}$, 4H), 7.88 (d, $J = 8.83 \text{ Hz}$, 4H), 8.02–8.05 (m, 2H), 8.86–8.93 (m, 2H), 9.23 (s, 4H), 9.34 (s, 4H), 9.53 (s, 1H).

RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ):^{xxxvii} 23.14 (CH_2), 23.85 (CH_2), 25.06 (CH_2), 25.22 (CH_2), 36.23 (CH_2), 43.93 (CH_2), 45.81 (CH_2), 46.60 (CH_2), 55.31 (CH), 64.93 (CH_2), 115.00 (CH), 120.67 (C), 130.20 (CH), 161.84 (C), 164.80 (C).

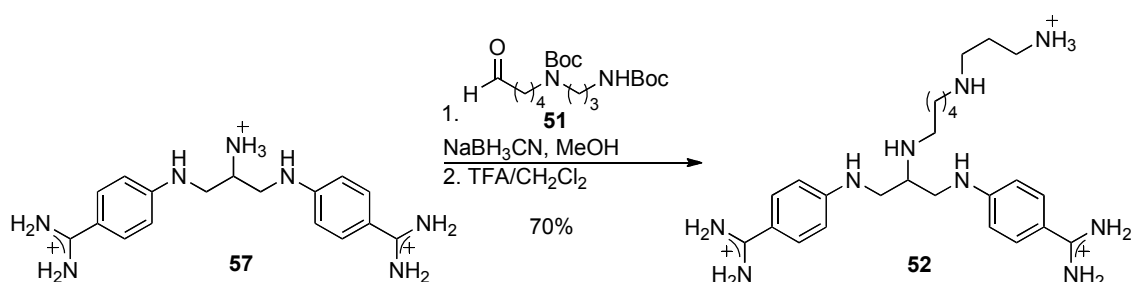
EM-ESI⁺ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 470 (95), 413 (25).

EMAR: calcd para $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_2$: 470.3238. Encontrada: 470.3236.

HPLC: $t_R = 12.37 \text{ min}$.



[[2-({5-[(3-AMINOPROPIL)AMINO]PENTIL}AMINO)PROPANO-1,3-DIIL]BIS(IMINO-4,1-FENILEN)]BIS(AMINOMETANOIMINIO) (**52**)



El bis(benzamidinio) **57** (100 mg, 0.15 mmol) y el aldehído **51** (45 mg, 0.12 mmol) se disolvieron MeOH (1.25 mL). Sobre esta disolución se añadió NaBH_3CN (9 mg, 0.14 mmol) y la mezcla se agitó a t.a. durante 5 h. El crudo de reacción se concentró parcialmente y se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 15% B 5 min, 15% \rightarrow 95% B 30 min). Las fracciones combinadas con el producto se concentraron y liofilizaron. El intermedio protegido se disolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y se enfrió a 0 °C. Se añadió TFA lentamente (3 mL), se agitó durante 30 min a 0 °C y a t.a. durante 2 h. El TFA residual se eliminó mediante codestilación con CH_2Cl_2 . El residuo obtenido se identificó como el producto deseado **52** (97 mg, 70%, rendimiento global) [204].

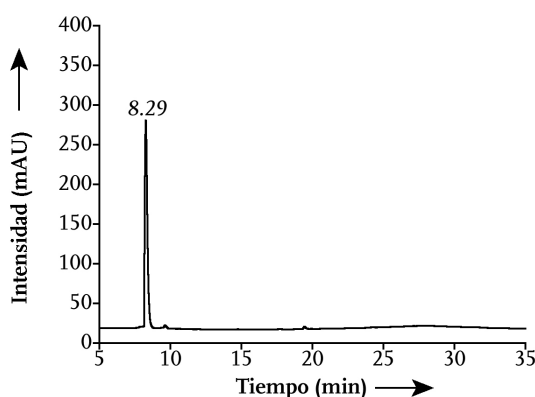


Figura 213. Cromatograma de HPLC del compuesto **52** gradiente 1, $\lambda = 222$ nm.

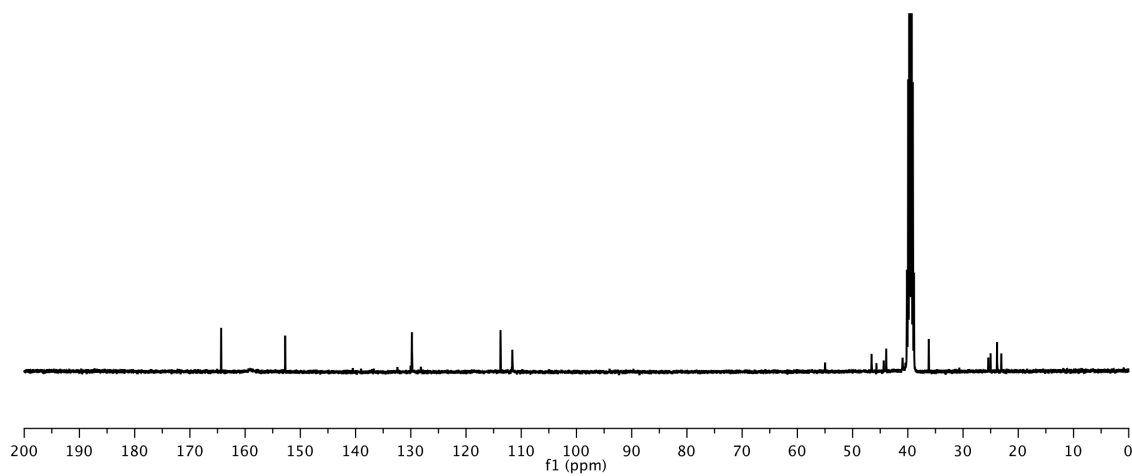
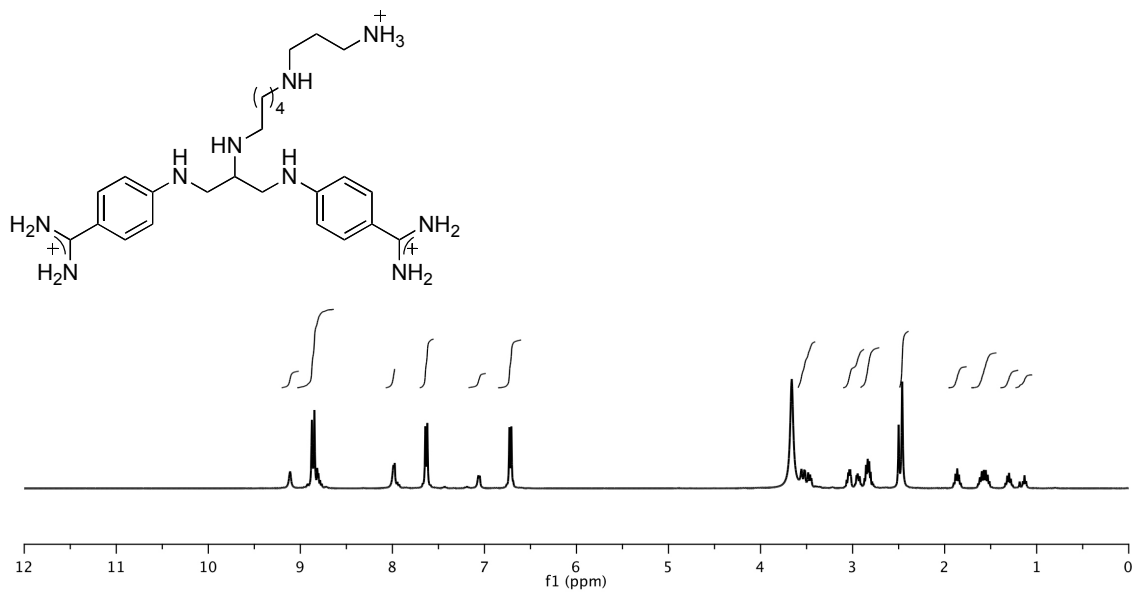
RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): ^{xxxvi}, ^{xxxviii} 1.12–1.18 (m, 2H), 1.26–1.34 (m, 2H), 1.51–1.64 (m, 4H), 1.86 (quin, $J = 7.60$ Hz, 4H), 2.46 (ba, 4H), 2.80–2.87 (m, 4H), 2.91–2.97 (m, 1H), 3.02–3.06 (m, 2H), 3.45–3.56 (m, 4H), 6.72 (d, $J = 8.61$ Hz, 4H), 7.06 (ba, 2H), 7.63 (d, $J = 8.58$ Hz, 4H), 7.98 (ba, 2H), 8.85 (s, 4H), 8.88 (s, 4H), 9.11 (ba, 2H).

RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 23.07 (CH_2), 23.84 (CH_2), 25.01 (CH_2), 25.42 (CH_2), 36.21 (CH_2), 40.95 (CH_2), 43.91 (CH_2), 44.37 (CH_2), 45.69 (CH_2), 46.56 (CH_2), 54.98 (CH), 111.61 (CH), 113.75 (C), 129.79 (CH), 152.81 (C), 164.34 (C).

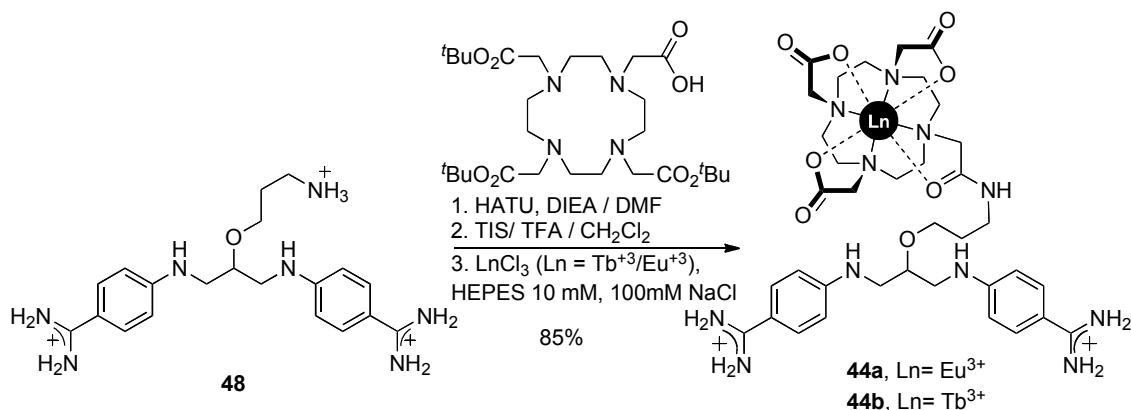
EM-ESI $^+$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 468 (70), 298 (100), 235 (20).

EMAR: calcd para $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_9$; 468.3558. Encontrada: 468.3558.

HPLC: $t_R = 8.29$ min.



N-(3-{2-({4-[AMINO(IMINO)METIL]PHENIL}AMINO)-1-[(4[AMINO(IMINO)METIL]FENIL}AMINO)METIL]ETOXI}PROPILO)-7-(DIETILAMINO)-2-OXO-2*H*-CROMENO-3-CARBOXAMIDA AMONIATO (44)



El ácido 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano-1, 4, 7-tris-*tert*-butilacetato-10-acético (53 mg, 0.09 mmol) se disolvió en DIEA 0.2 M en DMF (460 μ L) y, a continuación, se adicionó el agente activante HATU (35 mg, 0.09 mmol). Después de 5 min se añadió esa disolución sobre otra previamente preparada de 48 (9 mg, 0.02 mmol) en 230 μ L de DIEA 0.2 M en DMF y la mezcla resultante se agitó durante 2 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (500 μ L) y se enfrió a 0 $^\circ\text{C}$, se añadió TFA (500 μ L) gota a gota y la disolución resultante se agito durante 1 h a 0 $^\circ\text{C}$ y 2 h a t.a. A continuación, la mezcla se concentró y sobre el residuo resultante se adicionó TIS en TFA (1 mL, 5%), la disolución se agitó durante 48 h [221]. El crudo de reacción se concentró a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*, gradiente: 8% B 5 min, 8% \rightarrow 40% B 30 min). Las fracciones combinadas, se concentraron y se liofilizaron obteniéndose el producto deseado 44 en forma de sal de ácido trifluoroacético (19 mg, 85%, rendimiento global).

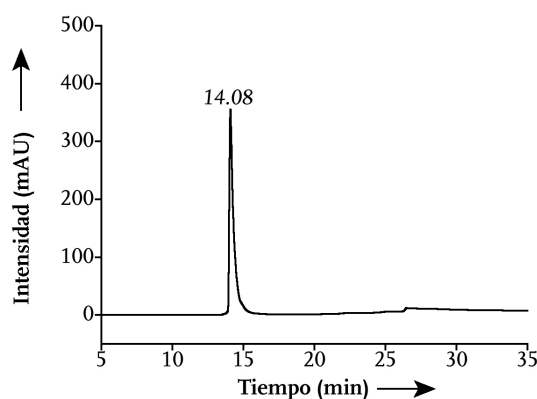


Figura 214. Cromatograma de HPLC del compuesto 44 gradiente 2, $\lambda = 222$ nm.

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 1.74–1.80 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.83–2.87 (m, 2H), 2.90 (s, 4H), 3.06 (s, 2H), 3.12–3.17 (m, 4H), 3.28–3.37 (m, 4H), 3.40 (s, 2H), 3.59–3.66 (m, 8H), 6.76 (d, $J = 8.91$ Hz, 4H), 6.87 (ba, 2H), 7.66 (d, $J = 8.91$ Hz, 4H), 8.74 (ba, 4H), 8.81 (ba, 4H).

RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6 , δ):^{xxxvii} 27.66 (CH_2), 29.02 (CH_2), 30.76 (CH_2), 35.78 (CH_2), 41.78 (CH_2), 43.84 (CH_2), 44.90 (CH_2), 45.03 (CH_2), 66.30 (CH_2), 76.50 (CH), 111.24 (CH), 112.47 (C), 115.57 (C), 117.92 (C), 129.72 (CH), 153.58 (C), 162.30 (C), 164.13 (C), 169.56 (C).

EM-ESI⁺ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 770 (100), 385 (80).

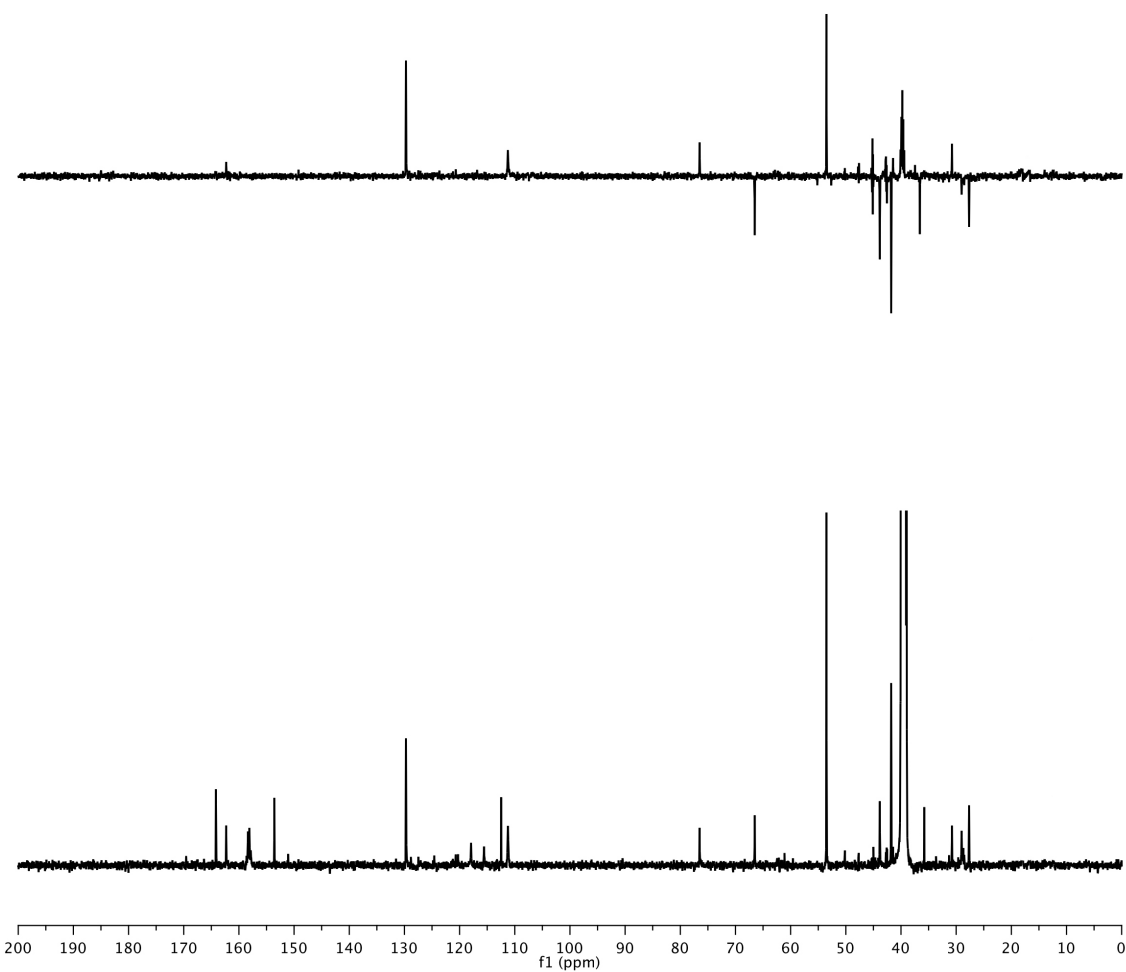
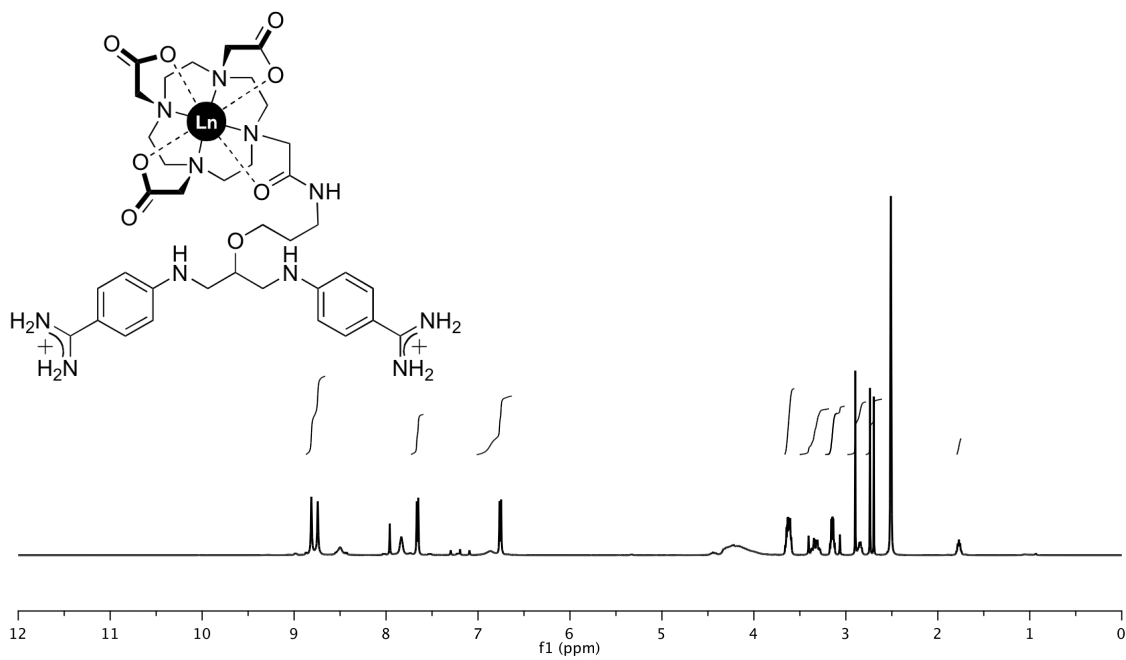
EMAR: calcd para $[\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_{11}\text{NaO}_8]^{2+}/2$: 396.7100. Encontrada: 396.7112.

HPLC: t_R = 14.08 min.

Los quelatos metálicos se obtuvieron de forma análoga: el conjugado bis(benzamidino) DOTA (~ 1 mg) se disolvió en una disolución tamponada de HEPES 10 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM (600 μL), sobre dicha disolución se adicionaron 400 μL de una disolución 50 mM del correspondiente tricloruro de lantánido en HCl 1 mM. La mezcla se agitó durante 1 h, observándose por EM/HPLC-FR la desaparición de la masa del producto de partida y la aparición de la masa del complejo metálico correspondiente. Los quelatos se purificaron por cromatografía analítica en fase reversa (gradiente 2: 5% B 5 min, 5% \rightarrow 75% B 30 min). Las fracciones combinadas con el producto deseado, se concentraron y liofilizaron, identificándose los complejos por espectrometría de masas MALDI:

44a: EM-MALDI/TOF: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{EuN}_{11}\text{O}_8$: 920.3. Encontrada: 920.1.

44b: EM-MALDI/TOF: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_{11}\text{O}_8\text{Tb}$: 926.3. Encontrada: 926.3.



Síntesis de los péptidos

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo empleando la estrategia estándar *Fmoc de síntesis en fase sólida* [118]. Los aminoácidos se encontraban protegidos en sus cadenas laterales con los siguientes grupos: Trt para Gln, Asn y Cys, ^tBu para Asp y Glu, Boc para Lys y Pbf para Arg.

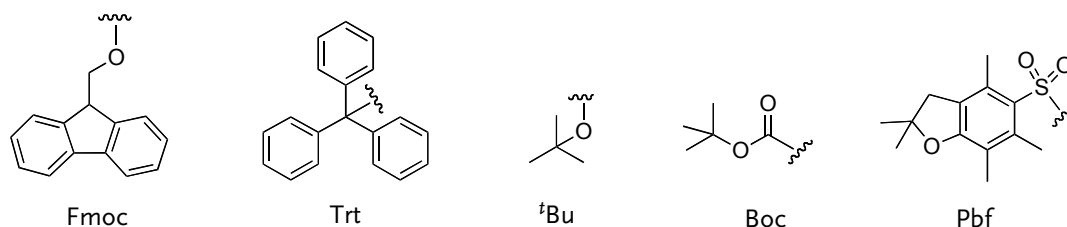


Figura 215. Grupos protectores usados en la síntesis de péptidos Fmoc.

Como agente de acoplamiento se usó HBTU, empleando también HOBT *in situ*. La síntesis se realizó manualmente sobre una resina amida Fmoc-PAL-PEG-PS (*Amersham Biosciences*) con una carga teórica de 0.19 mmol/g en una escala de 0.1 mmol en suspensión de DMF y bajo burbujeo continuo de N₂. Los reactivos se adquirieron a *GL Biochem*, *Novabiochem*, *IRIS Biotech*, o *Bachem*.

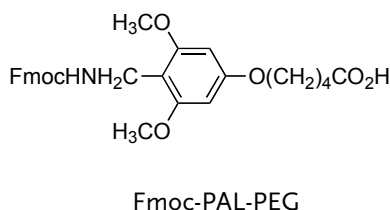


Figura 216. Espaciador de la resina Fmoc-PAL-PEG-PS.

Cada aminoácido se preactivó con la mezcla de HBTU/HOBT en medio básico (DIEA/DMF) durante 3 min antes de adicionarlo a la resina. Los acoplamientos para formar los enlaces peptídicos se realizaron durante 45 min, utilizándose el test TNBS para seguir su progreso [222]. Este test se utiliza para detectar aminas primarias libres en la resina, por ello sirve para determinar el grado de incorporación de los aminoácidos acoplados. El TNBS reacciona con aminas primarias formándose una sulfonamida de color rojo intenso.

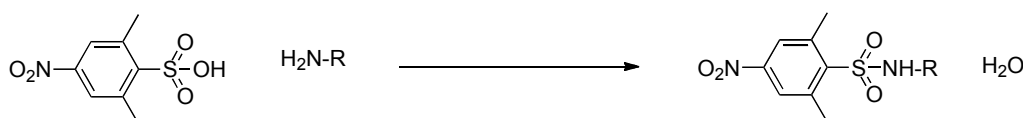


Figura 217. Reacción entre el TNBS y una amina primaria

El test TNBS se realiza sobre una pequeña alícuota de la resina (~ 0.5 mg) sobre la que se adicionan dos gotas de una disolución de DIEA (10% en DMF) y otra gota de una disolución de TNBS (1% en DMF). La presencia de aminas en la resina resulta en una coloración rojo intenso.

A continuación se detalla cada una de la etapas del protocolo sintético:

- **DESPROTECCIÓN TEMPORAL DEL FMOC:** la eliminación del grupo Fmoc del aminoácido acoplado a la resina se realizó mediante el tratamiento de la resina con piperidina (20% en DMF) durante 15 minutos. Finalizada la desprotección se filtra y se lava la resina con DMF ($3 \times 5 \text{ mL} \times 3 \text{ min}$). La verificación de la desprotección completa del grupo Fmoc se realiza con el test TNBS.
- **ACOPLAMIENTO:** en todas las reacciones de acoplamiento se empleó un exceso de 4 equiv de aminoácido (0.4 mmol) y de 6 equiv de base (0.6 mmol de DIEA en DMF 0.2 M). Para la activación y acoplamiento de los aminoácidos protegidos con Fmoc (Fmoc-aa), estos se disolvieron en 2 mL de una disolución 0.2 M de HBTU/HOBt en DMF y 3 mL de una disolución 0.2 M de DIEA en DMF. La mezcla resultante se agitó 3 minutos a t.a. y, luego, se adicionó sobre la resina. La reacción de acoplamiento se prolongó durante 45 min, tras la cual se filtró la resina y lavó con DMF ($3 \times 5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$). La síntesis se continuó con ciclos de desprotección/acoplamiento.
- **ACETILACIÓN DEL EXTREMO N-TERMINAL:** después de sintetizar completamente el péptido y desproteger el grupo Fmoc del extremo N-terminal del modo habitual, se llevó a cabo la acetilación de este extremo: 0.1 mmol del péptido unido a la resina se trataron con 5 mL de Ac_2O (20% en DMF) y 2.5 mL de DIEA (0.2 M en DMF); la mezcla resultante se agitó por burbujeo de N_2 durante 1 h y a continuación se filtró y lavó con DMF ($3 \times 5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$).
- **DESPROTECCIÓN SELECTIVA DE LA CADENA LATERAL LYS(ALLOC) Y GLU(ALILO):** la desprotección selectiva de estos grupos protectores se realizó siguiendo el siguiente protocolo: 0.1 mmol del péptido unido a la resina se trató con una mezcla de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1 equiv) y morfolina (190 equiv) en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 2% durante 5 h a t.a. Posteriormente, la resina se filtró y lavó con DMF ($3 \times 5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$), dietilditiocabamato (DEDTC) (25 mg en 5 mL, $2 \times 2 \text{ min}$), DMF ($3 \times 5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$) y CH_2Cl_2 ($2 \times 5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$) [119]. La desprotección selectiva en presencia del grupo Fmoc se realizó en condiciones más suaves: $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.3 equiv), PPh_3 (1.5 equiv) N-metil morfolina (10 equiv), fenilsilano (10 equiv) en CH_2Cl_2 durante 8 h a t.a. [143].
- **DESPROTECCIÓN DE TODAS CADENAS LATERALES DE LOS AMINOÁCIDOS Y SEPARACIÓN DEL PÉPTIDO DE LA RESINA:** ambas operaciones se realizan en una única etapa y se pueden ensayar en cualquier punto del proceso sintético del péptido, bien en medio de la síntesis para comprobar el estado de la misma (pureza del péptido sintetizado hasta el momento) o finalizada la síntesis. La resina unida al péptido se secó y se trató con una mezcla estándar de TFA con atrapadores de carbocationes: para 40 mg de resina se utilizaron 50 μL de CH_2Cl_2 , 25 μL de H_2O , 25 μL de TIS y TFA hasta 1 mL. Para aquellos péptidos que incorporan residuos de cisteínas se utilizó la siguiente mezcla: 25 μL de EDT, 25 μL de H_2O , 10 μL de TIS y TFA hasta 1 mL, para 40 mg de resina. La suspensión resultante fue agitada durante 2 h y posteriormente se separó de la resina por filtración. Los filtrados se añadieron sobre Et_2O (10 volúmenes de Et_2O por cada volumen de mezcla) a 0 °C para inducir la precipitación del péptido, que se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 5 min, separándose del sobrenadante por decantación. El residuo sólido se secó bajo una ligera corriente de Ar y se disolvió en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ al 50% para su análisis y purificación por HPLC-FR.

Los datos analíticos de los péptidos sintetizados se muestran a continuación:

- REGIÓN BÁSICA DE LA PROTEÍNA GCN4 (**RB**)

$t_R = 16.58$ min, gradiente 2; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{109}H_{194}N_{43}O_{34}$: 2650.9.
Encontrada: 2650.5.

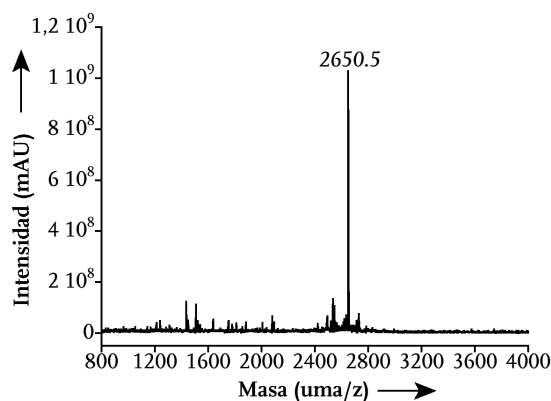


Figura 218. MALDI/TOF del péptido **RB**.

- DOMINIO CYS₂HIS₂ DE LA PROTEÍNA GAGA (**GAGA**)

$t_R = 14.34$ min, gradiente 1; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{161}H_{262}N_{53}O_{45}S_2$: 3724.3. Encontrada: 3724.4.

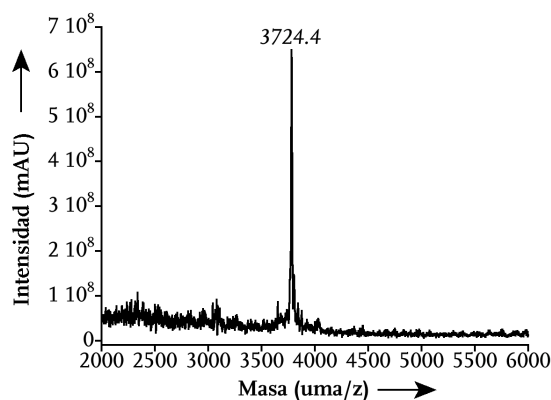


Figura 219. MALDI/TOF del péptido **GAGA**.

- DOMINIO CYS₂HIS₂ DE LA PROTEÍNA GAGA CON LYS-ALOC (**GAGA-ALLOC**)

$t_R = 22.50$ min, gradiente 2; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{165}H_{266}N_{53}O_{47}S_2$: 3808.3. Encontrada: 3809.7.

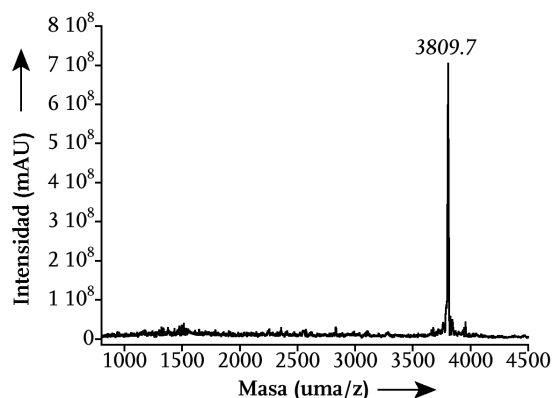


Figura 220. MALDI/TOF del péptido **GAGA-Alloc**.

- DOMINIO CYS₂HIS₂ DE LA PROTEÍNA GAGA DONDE SE MUTARON LAS CYS POR SER (**GAGA-SER**)

$t_R = 20.65$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₆₁H₂₆₂N₅₃O₄₇: 3692.1. Encontrada: 1231.3 [M+3H]³⁺; 923.7 [M+4H]⁴⁺.

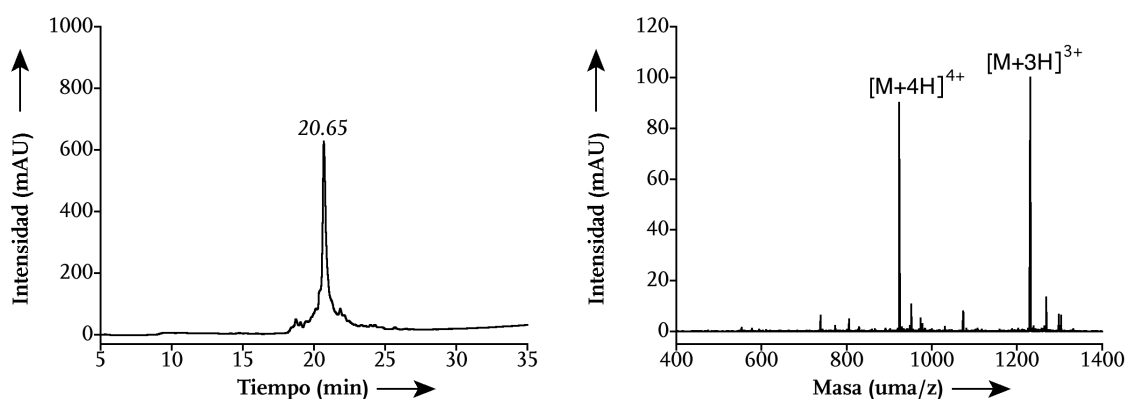


Figura 221. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **GAGA-Ser**. Derecha: espectro de masas.

- PÉPTIDOS USADOS EN LOS ESTUDIOS DE INTERNALIZACIÓN NUCLEAR: **B_{1B}-B_{7B}, B₈, B₉, B_{10B}, B_{11B}, FLU-AHEX-RB**

B_{1B}: $t_R = 16.32$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₈₇H₁₄₅N₃₈O₁₆S: 2011.4. Encontrada: 708.8 [M(CF₃CO₂)+4H]³⁺; 670.8 [M+3H]³⁺; 503.5 [M+4H]⁴⁺, 402.9 [M+5H]⁵⁺, 335.8 [M+6H]⁶⁺.

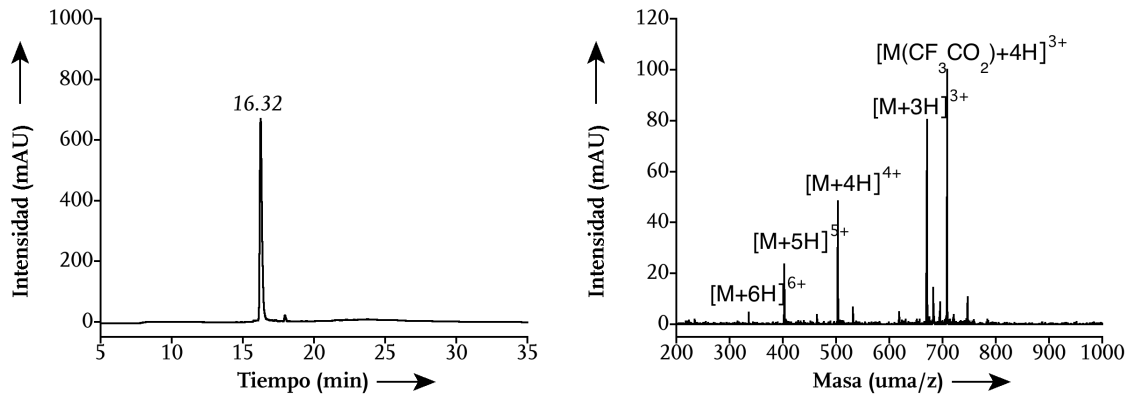


Figura 22. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B_{1B}**. Derecha: espectro de masas.

B_{2B}: $t_R = 21.16$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₈₆H₁₃₃N₂₄O₂₁S: 1871.2. Encontrada: 935.5 [M+2H]²⁺; 624.0 [M+3H]³⁺; 468.4 [M+4H]⁴⁺, 374.9 [M+5H]⁵⁺.

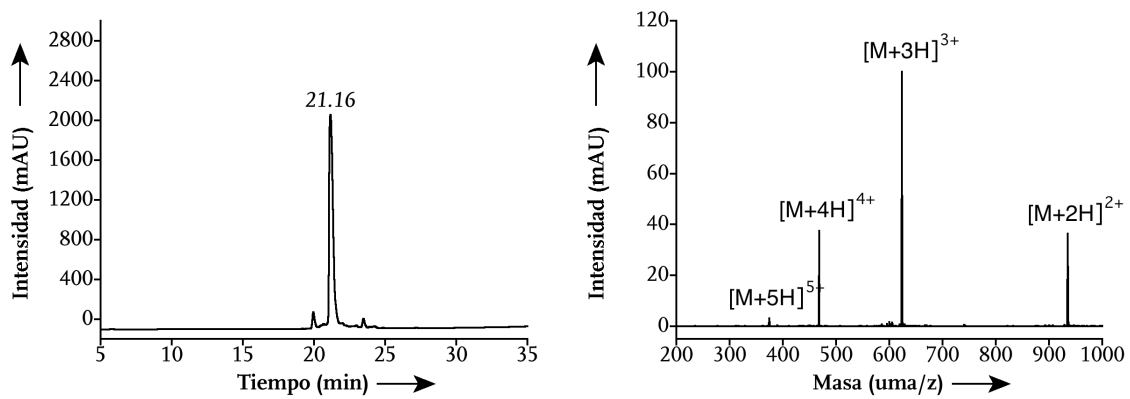


Figura 23. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B_{2B}**. Derecha: espectro de masas.

B_{3B}: $t_R = 21.77$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₈₃H₁₂₆N₂₁O₂₁S: 1786.1. Encontrada: 893.0 [M+2H]²⁺; 595.8 [M+3H]³⁺; 447.0 [M+4H]⁴⁺.

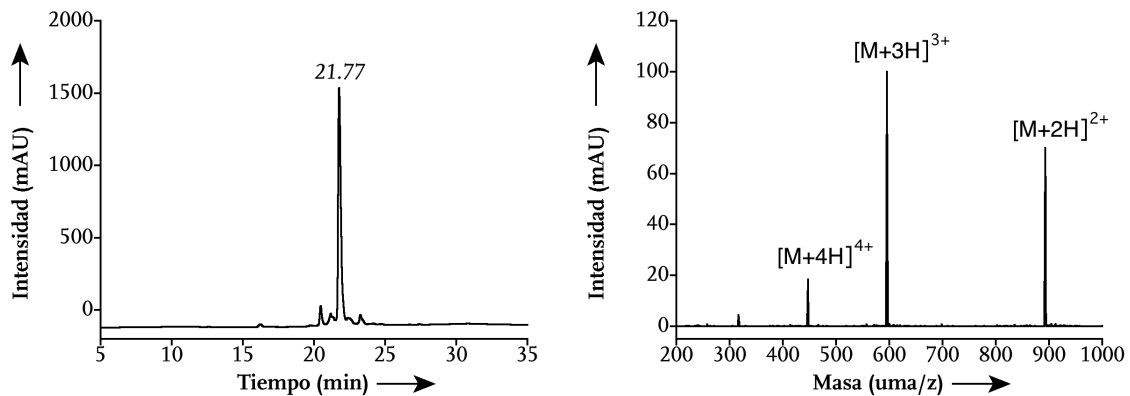


Figura 24. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B_{3B}**. Derecha: espectro de masas.

B_{4B}: $t_R = 20.67$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₃₆H₂₃₂N₅₇O₃₀S: 3177.7. Encontrada: 823.3 [M(CF₃CO₂)+5H]⁴⁺; 795.9 [M+4H]⁴⁺; 636.2 [M+5H]⁵⁺; 530.4 [M+6H]⁶⁺; 454.3 [M+7H]⁷⁺.

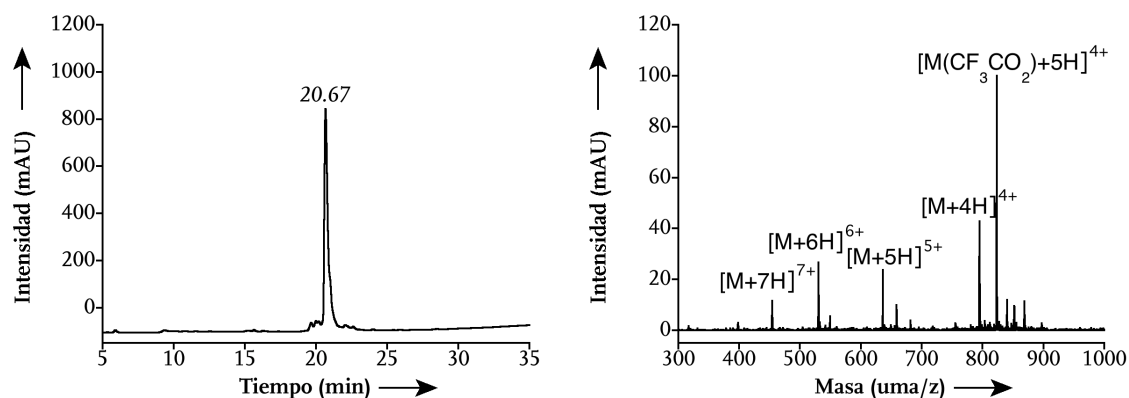


Figura 225. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B_{4B}**. Derecha: espectro de masas.

B_{5B}: $t_R = 21.08$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₃₃H₂₂₅N₅₄O₃₀S: 3092.6. Encontrada: 1031.4 [M+3H]³⁺; 773.8 [M+4H]⁴⁺; 619.2 [M+5H]⁵⁺; 516.2 [M+6H]⁶⁺.

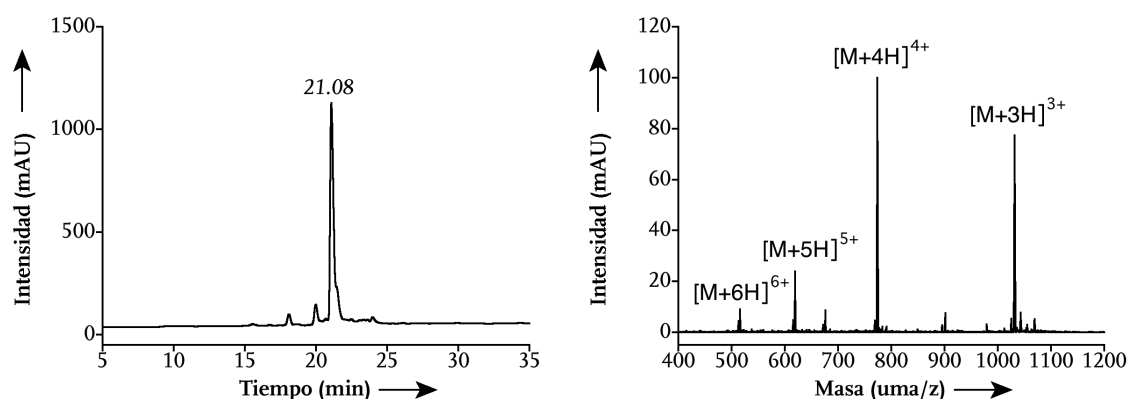


Figura 226. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B_{5B}**. Derecha: espectro de masas.

B_{6B}: $t_R = 21.48$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₈₉H₁₃₈N₂₅O₂₂S₂: 1974.3. Encontrada: 987.5 [M+2H]²⁺; 658.4 [M+3H]³⁺; 494.0 [M+4H]⁴⁺.

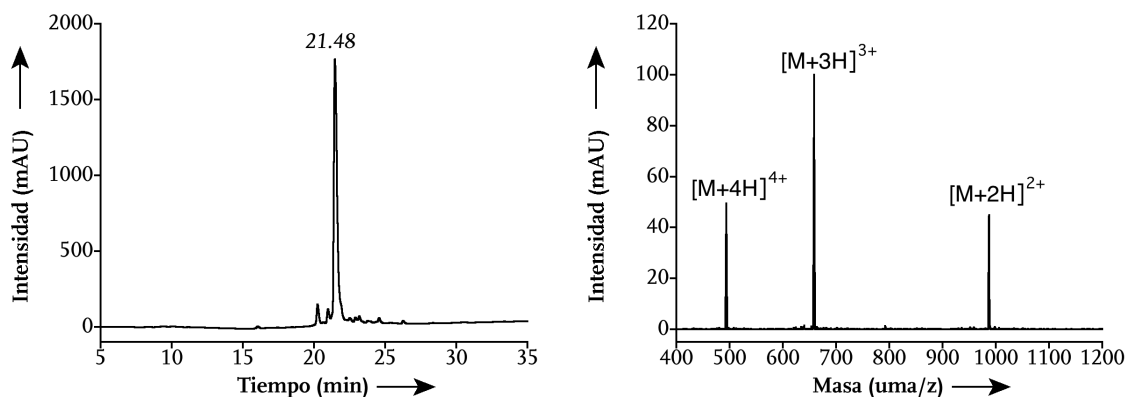


Figura 227. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido B_{6B} . Derecha: espectro de masas.

B_{7B} : $t_R = 21.87$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): $[M+H]^+$ calcd para $C_{86}H_{131}N_{22}O_{22}S_2$: 1889.2. Encontrada: 944.6 $[M+2H]^{2+}$; 630.2 $[M+3H]^{3+}$; 473.0 $[M+4H]^{4+}$.

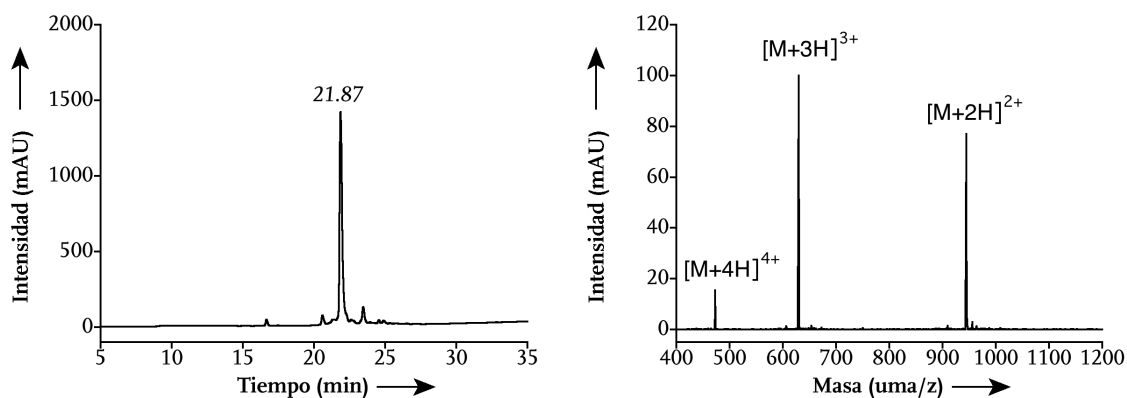


Figura 228. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido B_{7B} . Derecha: espectro de masas.

B_8 : $t_R = 15.39$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): $[M+H]^+$ calcd para $C_{60}H_{112}N_{35}O_{11}S$: 1531.9. Encontrada: 766.06 $[M+2H]^{2+}$; 511.1 $[M+3H]^{3+}$.

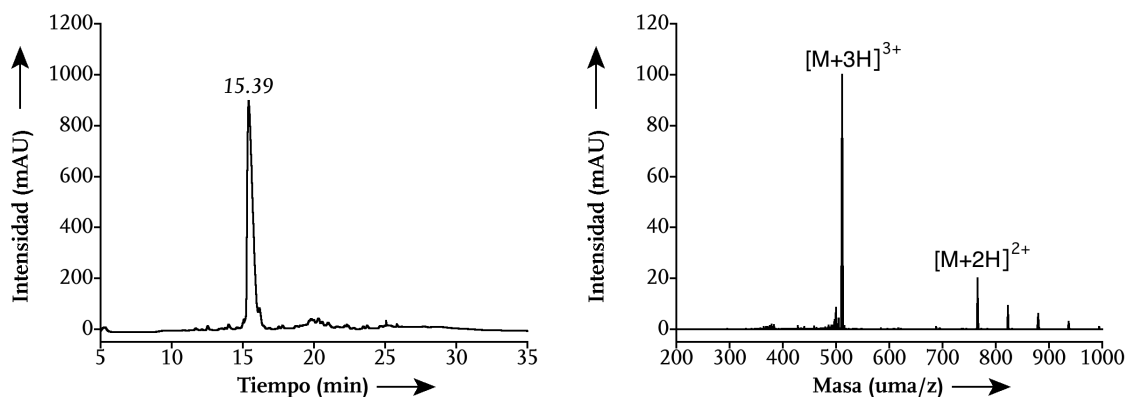
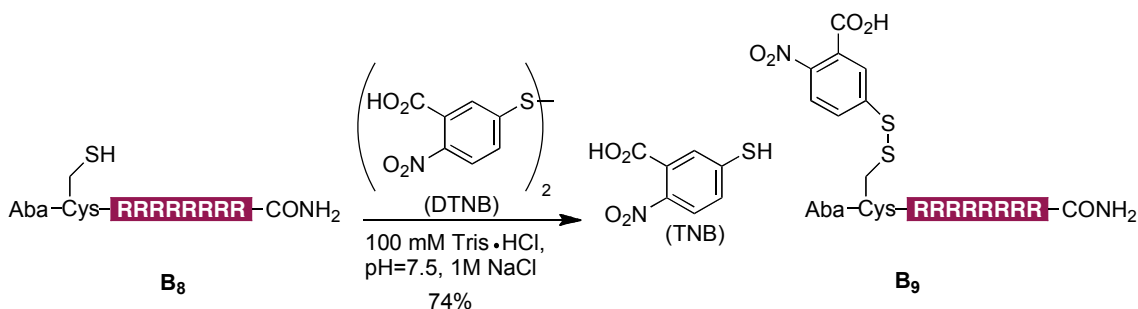


Figura 229. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido B_8 . Derecha: espectro de masas.

ACTIVACIÓN CON EL REACTIVO DE ELLMAN (**B₉**)



Sobre una disolución desoxigenada del péptido **B₈** (6 mg, 3.91 mmol) en tampón Tris·HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 1 M (200 μ L) se adicionó una disolución previamente preparada de DTNB (3 mg, 7.80 mmol) en una mezcla desoxigenada de tampón Tris·HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 1 M/CH₃CN (66%, 125 μ L). La reacción se agitó durante 45 min, observándose la formación del péptido activado **B₉** (5 mg, 74% rendimiento). Datos analíticos: $t_R = 16.58$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₆₇H₁₁₅N₃₆O₁₅S₂: 1729.0. Encontrada: 865.2 [M+2H]²⁺; 576.8 [M+3H]³⁺; 433.2 [M+3H]³⁺.

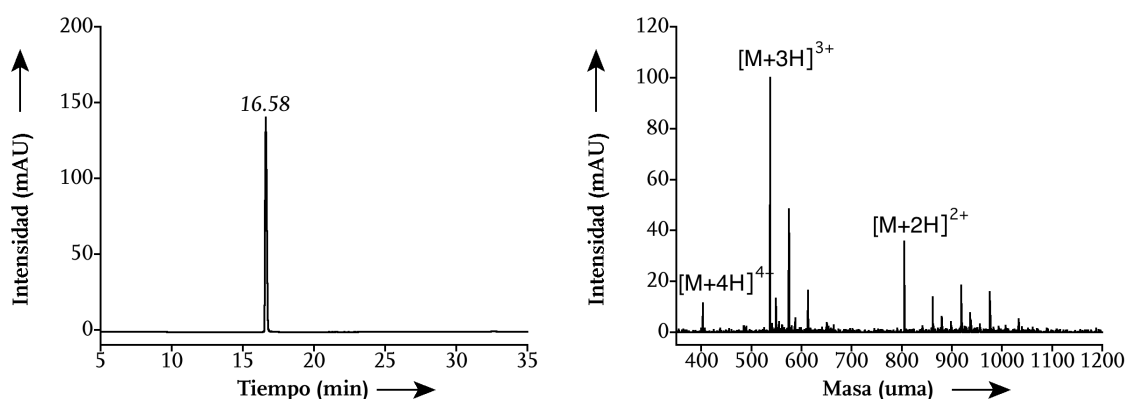
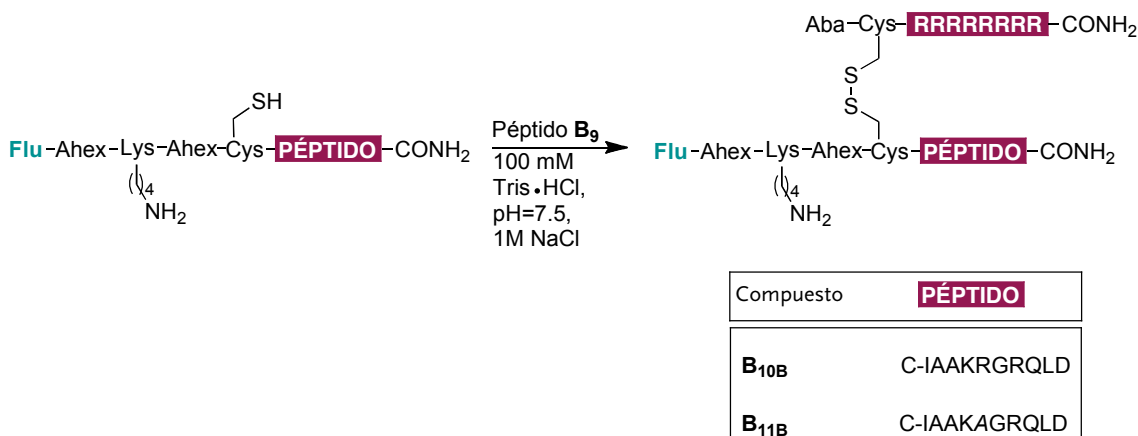


Figura 230. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B₉**. Derecha: espectro de masas.

DIMERIZACIÓN (**B_{10B}**, **B_{11B}**)



La dimerización se realizó de forma análoga para el caso de los dos péptidos, por lo que sólo se ejemplificará una de ellas. Sobre una disolución desoxigenada del péptido **B_{6B}** (~ 1.4 mg, 0.71 mmol) en una mezcla de tampón Tris·HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 1 M (200 µL) se adicionó una disolución previamente preparada del péptido activado **B₉** (~ 1.5 mg, 0.85 mmol) en el mismo tampón usado anteriormente (60 µL). La reacción se agitó durante 30 min, observándose la formación del dímero disulfuro **B_{10B}** (~ 2.5 mg, 48% rendimiento).

Datos analíticos:

B_{10B}: $t_R = 20.29$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₄₉H₂₄₈N₆₀O₃₃S₃: 3504.1. Encontrada: 1168.0 [M+3H]³⁺; 876.2 [M+4H]⁴⁺.

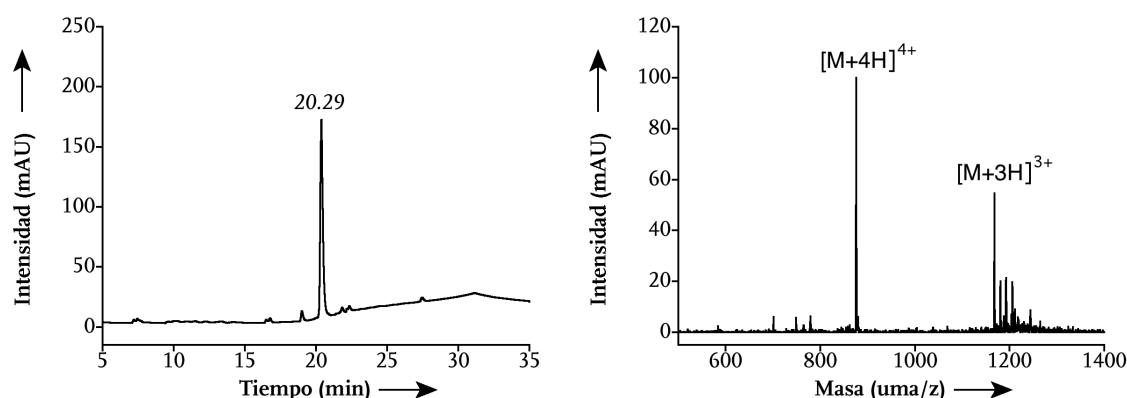


Figura 231. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B_{10B}**. Derecha: espectro de masas.

B_{11B}: $t_R = 20.39$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₄₆H₂₄₁N₅₇O₃₃S₃: 3419.0. Encontrada: 1140.0 [M+3H]³⁺; 855.0 [M+4H]⁴⁺.

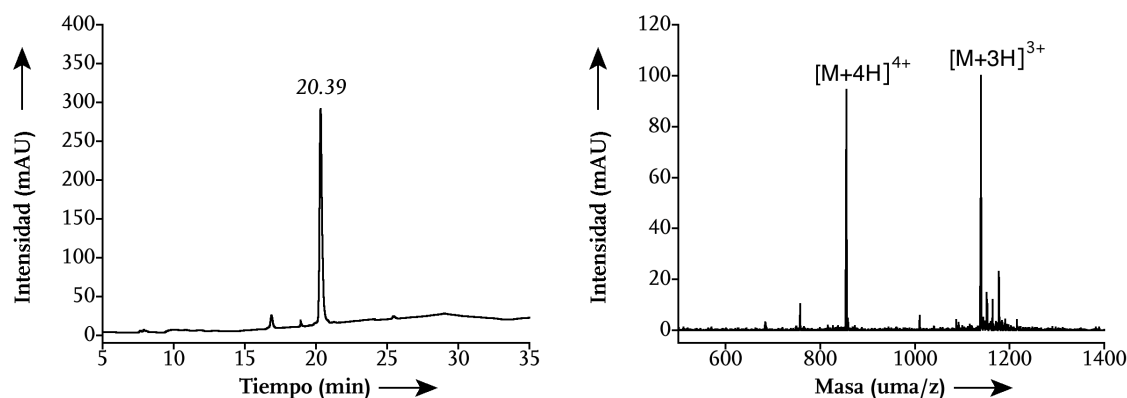


Figura 232. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **B_{11B}**. Derecha: espectro de masas.

FLU-AHEX-RB: $t_R = 21.84$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₃₄H₂₁₄N₄₅O₃₉S: 3111.5. Encontrada: 1037.7 [M+3H]³⁺; 778.5 [M+4H]⁴⁺; 623.0 [M+5H]⁵⁺.

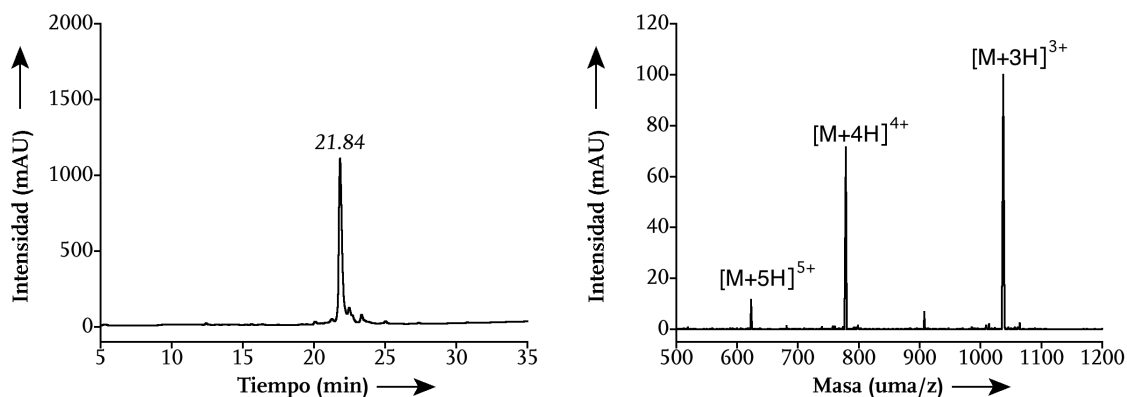


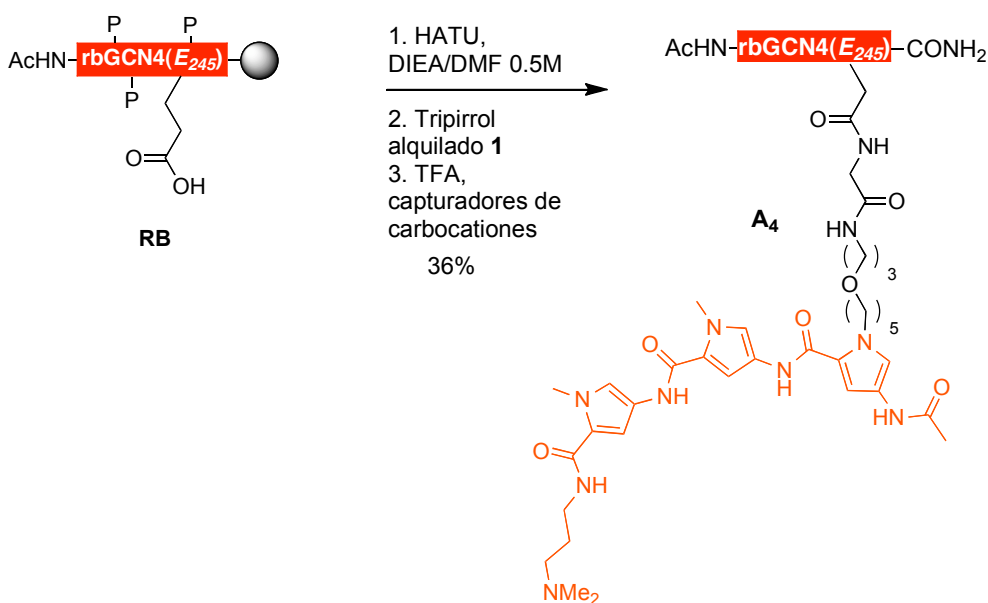
Figura 233. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del péptido **Flu-Ahex-RB**. Derecha: espectro de masas.

Síntesis de los híbridos peptídicos

El procedimiento llevado a cabo en las síntesis de los híbridos es general y en la mayoría de los casos se basa fundamentalmente en una condensación entre un grupo ácido y una amina primaria. Las modificaciones existentes en la síntesis se hicieron en función de la unidad que presente cada grupo y el agente de acoplamiento empleado.

- **HÍBRIDOS. A₄, A₅, A₆**

La parte peptídica de estos tres híbridos es la región básica de GCN4 desprotegida selectivamente en el E₂₄₅. La reacción de acoplamiento es análoga, por lo que se ejemplificará únicamente para el híbrido **A₄**.



El péptido unido a la resina **RB** (25 mg, $\sim 3.50 \times 10^{-3}$ mmol) se suspendió en DMF (1 mL) durante 1 h para asegurar la expansión de la resina. Posteriormente, la DMF se eliminó por decantación y se añadió sobre la **RB** una disolución de HATU (3 mg, ~ 7.90

$\times 10^{-3}$ mmol) en DMF (170 μ L) y DIEA (0.5 M, 28 μ L) en DMF. La mezcla se agitó durante 5 min. A continuación, el sobrenadante se eliminó y la resina se lavó con DMF (3×1 mL \times 2 min) para añadir sobre el ácido activado de la resina una disolución del tripirrol **1** (10 mg, $\sim 1.40 \times 10^{-2}$ mmol) y DIEA (0.5 M, 28 μ L) en DMF. La reacción se agitó durante 2 h a t.a. El sobrenadante se eliminó y la resina se lavó nuevamente con DMF (3×1 mL \times 3 min). La rotura, desprotección y precipitación del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar de síntesis de péptidos explicadas anteriormente. El sólido se purificó mediante HPLC–FR (gradiente 2) obteniéndose el híbrido **A₄**.

Datos analíticos:

A₄: $\sim 34\%$ rendimiento global^{xli}; $t_R = 22.37$ min, gradiente 2; EM–MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{143}H_{244}N_{53}O_{39}$: 3327.9. Encontrada: 3327.6.

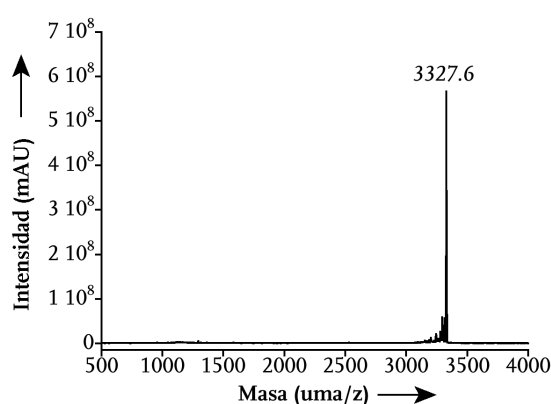


Figura 234. MALDI/TOF del híbrido **A₄**.

A₅: $\sim 15\%$ rendimiento global; $t_R = 22.37$ min, gradiente 2; EM–ESI⁺ (m/z): $[M+H]^+$ calcd para $C_{189}H_{273}N_{57}O_{48}S_2$: 4175.7. Encontrada: 1045.3 $[M+4H]^{4+}$; 836.2 $[M+5H]^{5+}$, 697.2 $[M+6H]^{6+}$ 597.8 $[M+7H]^{7+}$.

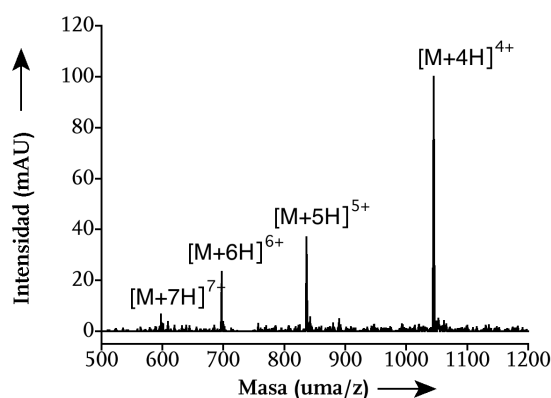


Figura 235. Espectro de masas del híbrido **A₅**.

^{xli} Todos los rendimientos de los híbridos son globales, considerando la síntesis del péptido, la desprotección selectiva, el acoplamiento, la desprotección/rotura y la purificación.

A₆: ~ 32% rendimiento global; $t_R = 18.81$ min, gradiente 2; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{134}H_{230}N_{50}O_{35}$: 3101.6. Encontrada: 3101.2.

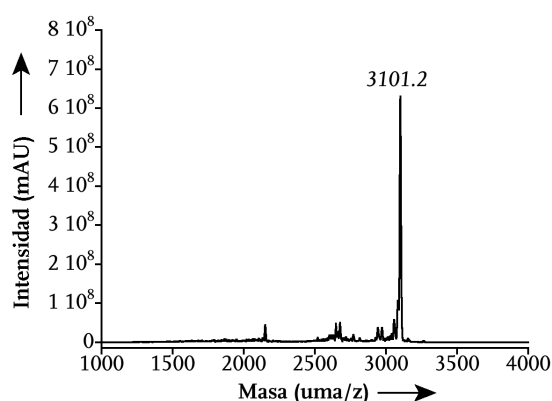


Figura 236. MALDI/TOF del híbrido **A₆**.

- HÍBRIDOS. **C₁**, **C₂**, **C₄**, **C₆**

Todos estos compuestos tienen en común la presencia de una Lys selectivamente desprotegida en el dominio Cys₂His₂ (o el análogo mutado con Ser). La síntesis hace necesario la condensación directa del anhídrido succínico sobre dicho residuo (4 equiv, DIEA en DMF 0.5 M), lo que permite tener un ácido libre en el péptido y por tanto realizar el acoplamiento del agente de reconocimiento del surco menor del mismo modo que en el caso anterior.

Datos analíticos:

C₁: ~ 20% rendimiento global; $t_R = 32.58$ min, gradiente 3; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{192}H_{303}N_{62}O_{51}S_2$: 4359.9. Encontrada: 4359.1.

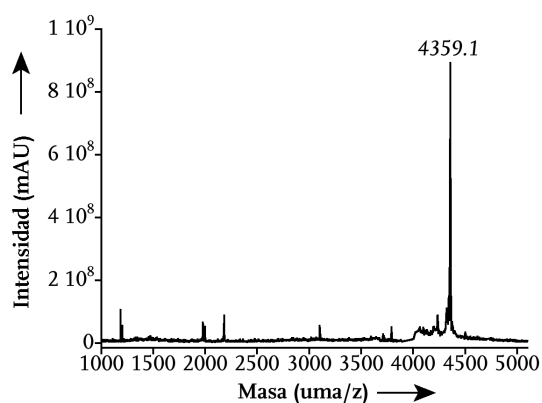


Figura 237. MALDI/TOF del híbrido **C₁**.

C₂: ~ 23% rendimiento global; $t_R = 31.84$ min, gradiente 3; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{197}H_{314}N_{63}O_{51}S_2$: 4445.1. Encontrada: 4444.3.

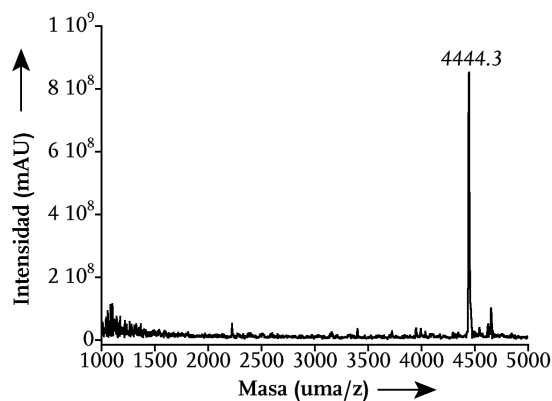


Figura 238. MALDI/TOF del híbrido C_2 .

C_4 : ~ 20% rendimiento global; $t_R = 21.97$ min, gradiente 2; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{197}H_{314}N_{62}O_{54}$: 4415.0. Encontrada: 4415.7.

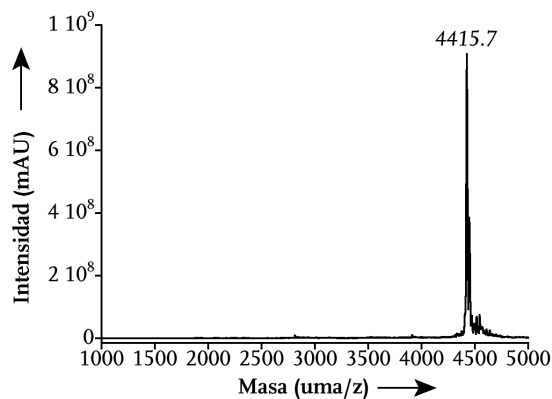


Figura 239. MALDI/TOF del híbrido C_4 .

C_6 : ~ 25% rendimiento global; $t_R = 23.81$ min, gradiente 2; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{190}H_{305}N_{62}O_{47}S_2$: 4273.9. Encontrada: 4472.6.

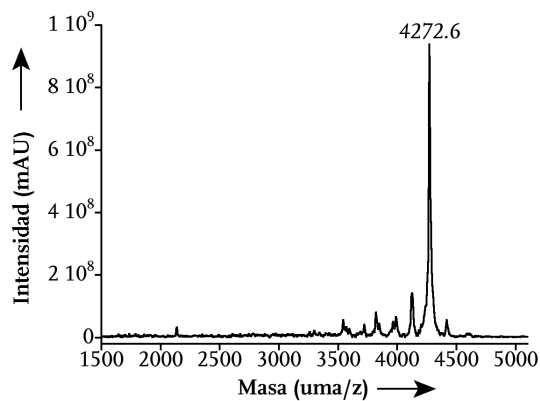
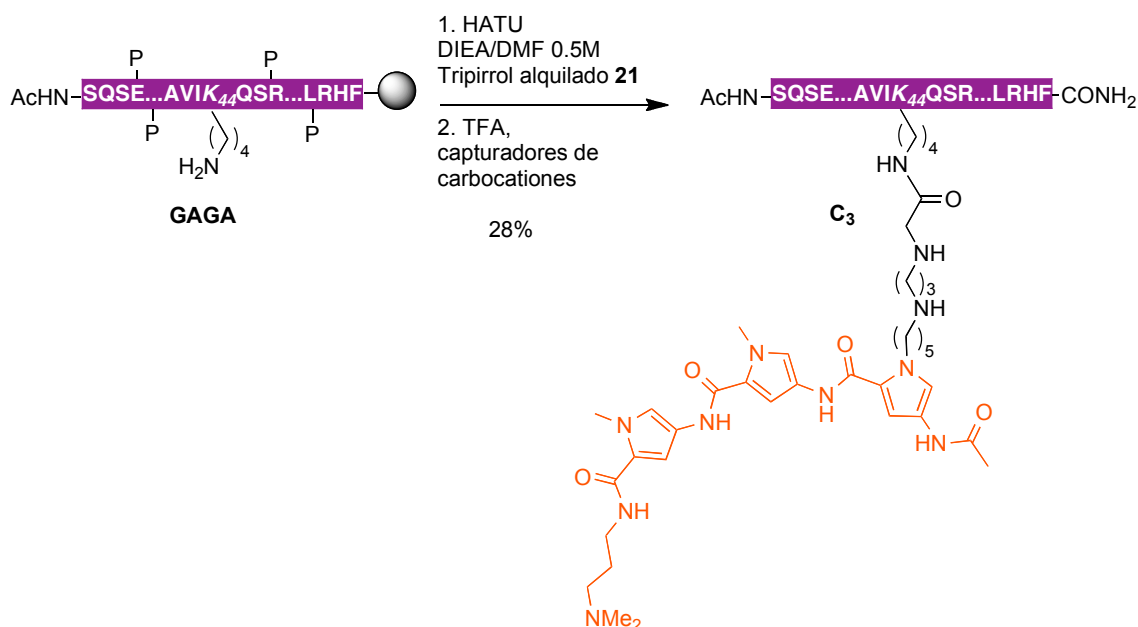


Figura 240. MALDI/TOF del híbrido C_6 .

• HÍBRIDO **C₃**

En el acoplamiento en fase sólida para la obtención del híbrido **C₃** el grupo ácido está presente en el agente de reconocimiento del surco menor, por lo que el procedimiento sintético difiere un poco del explicado anteriormente.



El péptido unido a la resina **GAGA** (29 mg, $\sim 2.37 \times 10^3$ mmol) se suspendió en DMF (1 mL) durante 1 h para asegurar la expansión de la resina. Posteriormente, la DMF se eliminó por decantación y se añadió sobre **GAGA** una disolución de DIEA (0.5 M, 57 μ L) en DMF, la mezcla se agitó durante 2 min. Mientras tanto se preparó una disolución del tripirrol **21** (7 mg, $\sim 7.11 \times 10^{-2}$ mmol), DIEA (0.5 M, 57 μ L) en DMF y HATU (0.05 M, 135 μ L) en DMF, la cual se agitó durante 3 min y se adicionó sobre la mezcla anterior que contiene el péptido unido a la resina **GAGA**. La reacción se agitó durante 2 h a t.a. El sobrenadante se eliminó y la resina se lavó con DMF (3×1 mL \times 3 min). La rotura, desprotección y precipitación del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar de síntesis de péptidos explicadas anteriormente. El sólido se purificó mediante HPLC-FR (gradiente 3) obteniéndose el híbrido **C₃**.

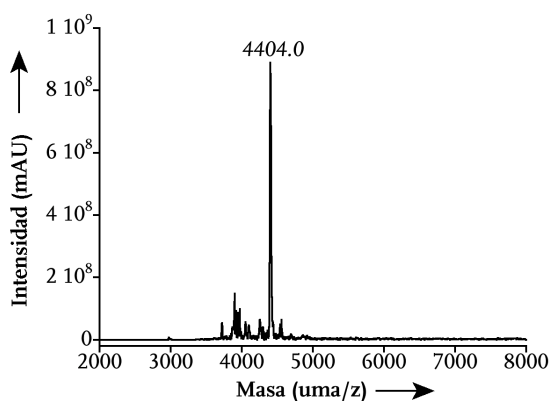
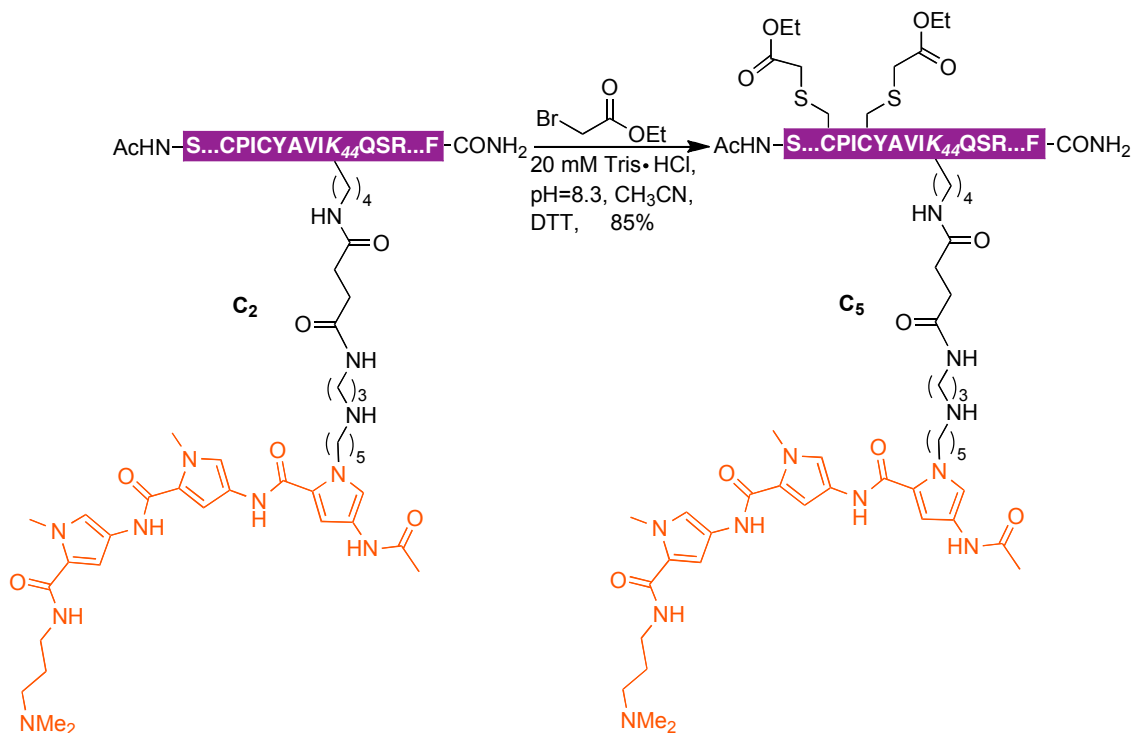


Figura 241. MALDI/TOF del híbrido **C₃**.

C_3 : ~ 28% rendimiento global; $t_R = 31.57$ min, gradiente 3; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{195}H_{312}N_{63}O_{50}S_2$: 4403.1. Encontrada: 4404.0.

- ALQUILACIÓN, HÍBRIDO C_5



Sobre una disolución desoxigenada del péptido C_2 (~ 1 mg, ~ 2.70 mmol) en una mezcla de tampón Tris·HCl 20 mM, pH= 8.3/ CH_3CN (50%, 400 μL) se adicionó una disolución de 2-bromoacetato de etilo (0.5 M, 5 μL) en CH_3CN . La reacción se agitó durante 4 h a t.a. El producto mayoritario se purificó mediante HPLC-FR (gradiente 2) y se identificó como el híbrido C_5 . Datos analíticos: 85%; $t_R = 24.59$ min, gradiente 2; EM-MALDI/TOF: $[M+H]^+$ calcd para $C_{205}H_{326}N_{63}O_{55}S_2$: 4617.3. Encontrada: 4620.7

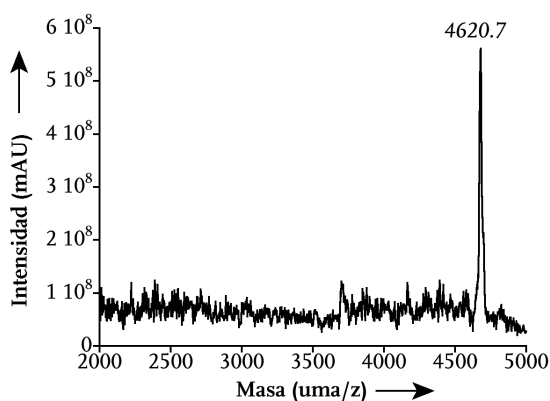
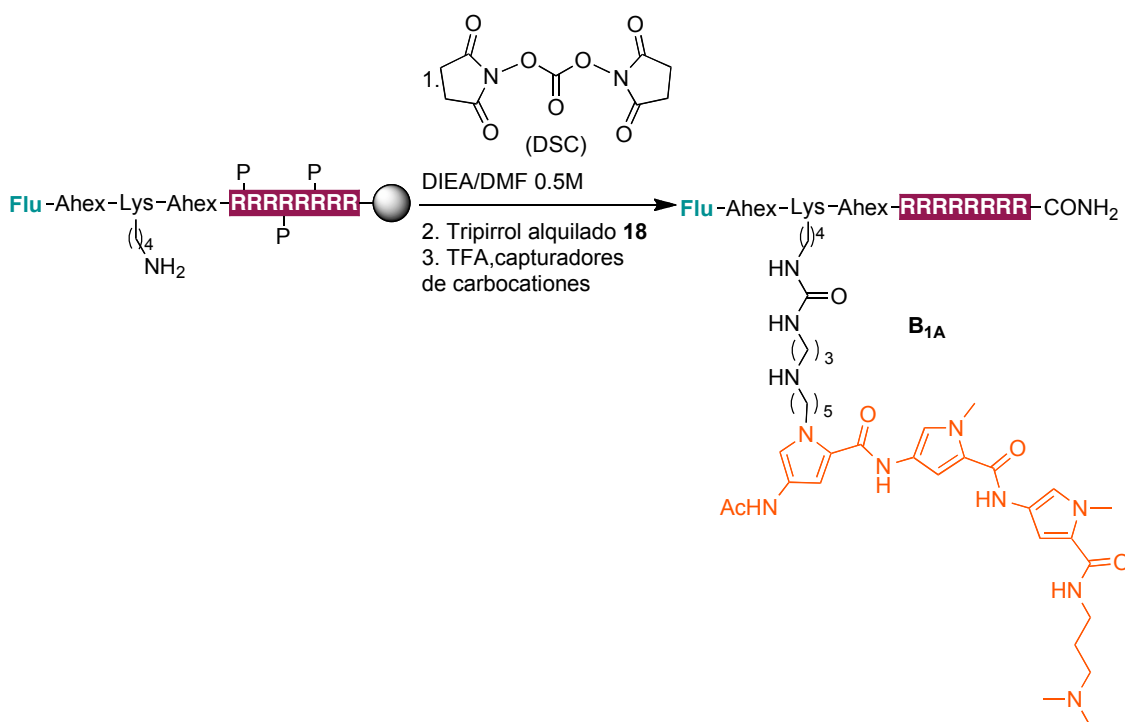


Figura 242. MALDI/TOF del híbrido C_5 .

- HÍBRIDOS USADOS EN LOS ESTUDIOS DE INTERNALIZACIÓN NUCLEAR: **B_{1A}**–**B_{7A}**, **B_{10A}**, **B_{11A}**, **B_{1A'}**, **B_{2A'}**

La unión del agente de reconocimiento del surco menor y del péptido correspondiente, se realizó, en todos estos compuestos, a través de un enlace urea, usando el DSC como agente activante. Dado que la reacción es análoga únicamente se ejemplificará para el compuesto **B_{1A}**.



El péptido unido a la resina (19 mg, $\sim 1.96 \times 10^{-3}$ mmol) se suspendió en DMF (1 mL) durante 1 h para asegurar la expansión de la resina. Posteriormente, la DMF se eliminó por decantación y se añadió sobre la resina las siguientes disoluciones: DIEA (0.5 M, 57 μ L) en DMF, DMAP (0.08 M, 48 μ L) en DMF y DSC (0.2 M, 140 μ L) en DMF. La mezcla se agitó durante 45 min a t.a. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el sobrenadante y la resina se lavó DMF (3×1 mL \times 3 min). Posteriormente se adicionó sobre la resina las siguientes disoluciones: DIEA (0.5 M, 57 μ L) en DMF, DMAP (0.08 M, 48 μ L) en DMF y el tripirrol alquilado **18** (0.05 M, 140 μ L) en DMF. La reacción se agitó durante 2 h a t.a. El sobrenadante se eliminó y la resina se lavó con DMF (3×1 mL \times 3 min). La rotura, desprotección y precipitación del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar de síntesis de péptidos explicadas anteriormente. El sólido se purificó mediante HPLC–FR (gradiente 2) obteniéndose el híbrido **B_{1A}**.

Datos analíticos:

B_{1A}: $\sim 26\%$ rendimiento global; $t_R = 20.92$ min, gradiente 2; EM–ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₂₀H₁₉₃N₄₈O₂₁S: 2676.2. Encontrada: 968.4 [M(CF₃CO₂)₂+5H]³⁺; 930.7 [M(CF₃CO₂)+4H]³⁺; 669.5 [M+4H]⁴⁺; 536.2 [M+5H]⁵⁺; 446.4 [M+6H]⁶⁺; 383.0 [M+7H]⁷⁺.

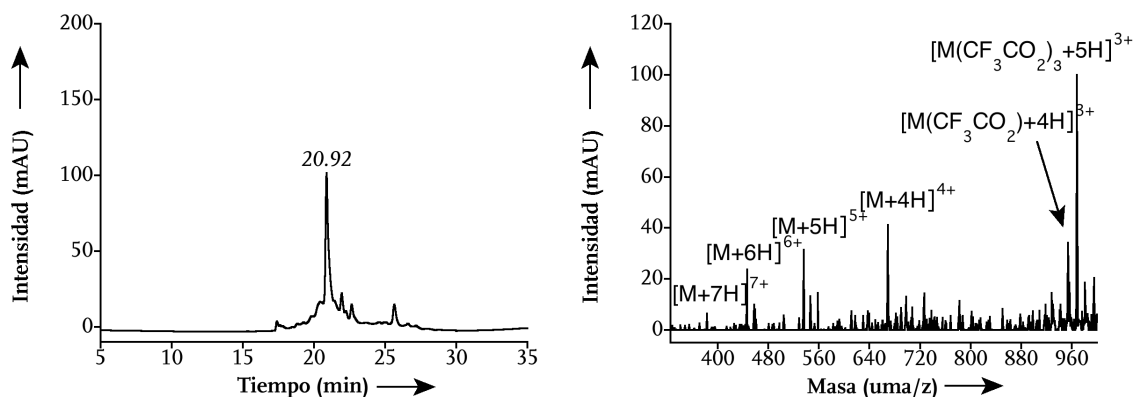


Figura 243. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido B_{1A} . Derecha: espectro de masas.

B_{2A} : ~ 20% rendimiento global; $t_R = 22.38$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para $C_{119}H_{181}N_{34}O_{26}S$: 2535.9. Encontrada: 845.1 [M+3H]³⁺; 633.9 [M+4H]⁴⁺; 507.2 [M+5H]⁵⁺; 422.6 [M+6H]⁶⁺; 317.7 [M+8H]⁸⁺.

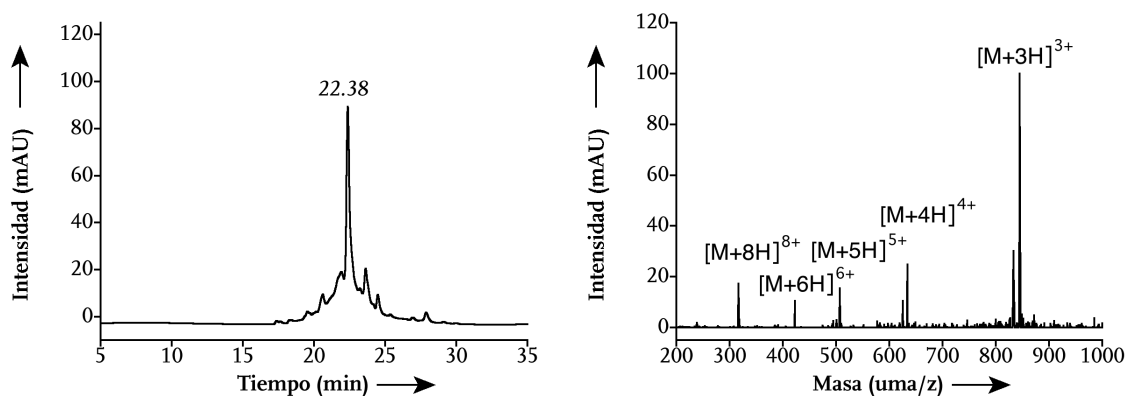


Figura 244. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido B_{2A} . Derecha: espectro de masas.

B_{3A} : ~ 17% rendimiento global; $t_R = 22.38$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para $C_{116}H_{174}N_{31}O_{26}S$: 2450.9. Encontrada: 1225.6 [M+2H]²⁺; 817.1 [M+3H]³⁺; 613.8 [M+4H]⁴⁺.

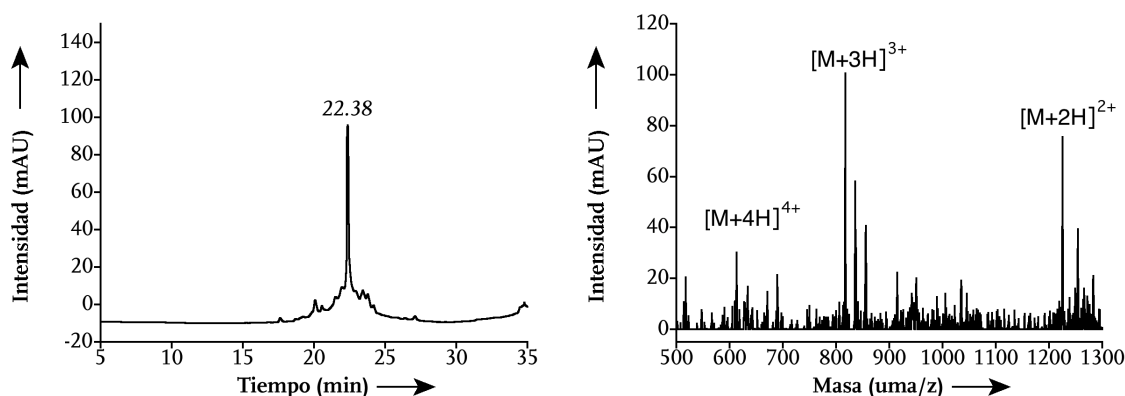


Figura 245. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido B_{3A} . Derecha: espectro de masas.

B_{4A}: ~ 20% rendimiento global; $t_R = 21.30$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₆₉H₂₈₀N₆₇O₃₅S: 3842.5. Encontrada: 961.3 [M+4H]⁴⁺; 769.2 [M+5H]⁵⁺; 641.2 [M+6H]⁶⁺; 549.8 [M+7H]⁷⁺.

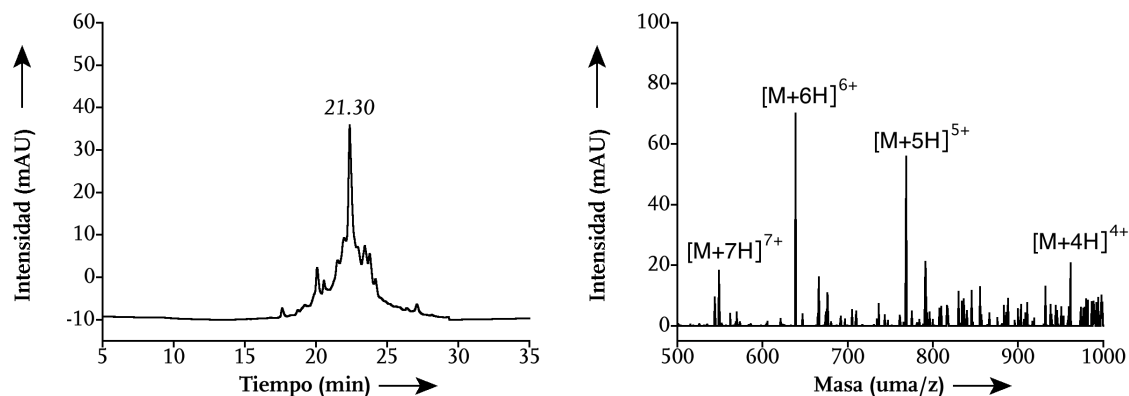


Figura 246. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido **B_{4A}**. Derecha: espectro de masas.

B_{5A}: ~ 22% rendimiento global; $t_R = 21.60$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₆₆H₂₇₃N₆₄O₃₅S: 3757.4. Encontrada: 968.8 [M(CF₃CO₂)+5H]⁴⁺; 940.0 [M+4H]⁴⁺; 627.1 [M+6H]⁶⁺.

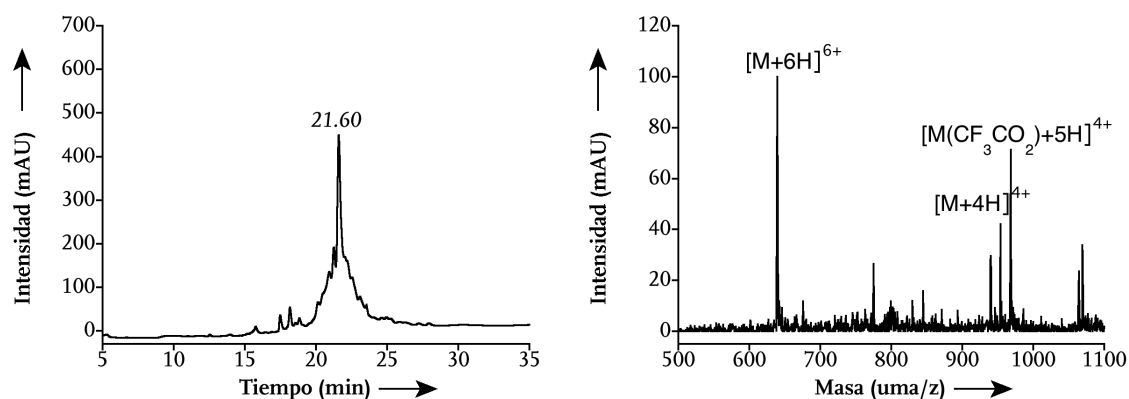


Figura 247. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido **B_{5A}**. Derecha: espectro de masas.

B_{6A}: ~ 25% rendimiento global; $t_R = 22.15$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₂₂H₁₈₆N₃₅O₂₇S₂: 2639.1. Encontrada: 918.6 [M(CF₃CO₂)+4H]³⁺; 880.0 [M+3H]³⁺; 660.5 [M+4H]⁴⁺.

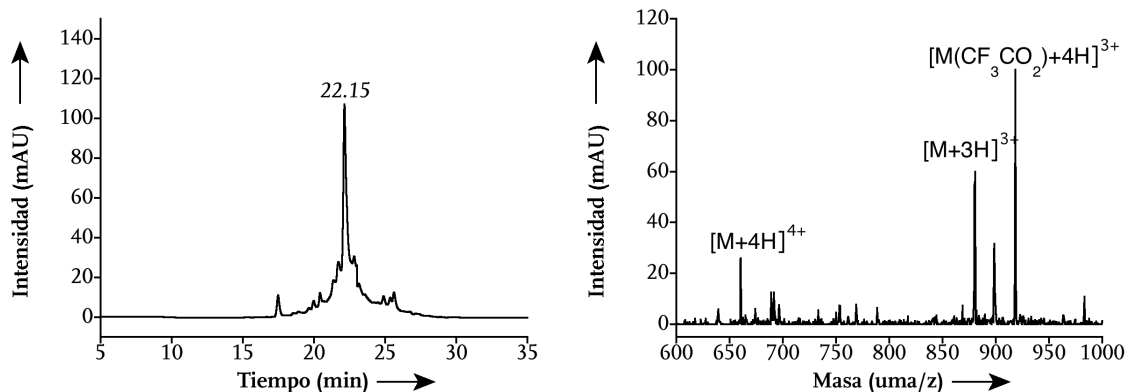


Figura 248. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido B_{6A} . Derecha: espectro de masas.

B_{7A} : ~ 21% rendimiento global; $t_R = 22.44$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para $C_{119}H_{179}N_{32}O_{27}S_2$: 2554.0. Encontrada: 1277.2 [M+2H]²⁺; 851.7 [M+3H]³⁺; 639.0 [M+4H]⁴⁺.

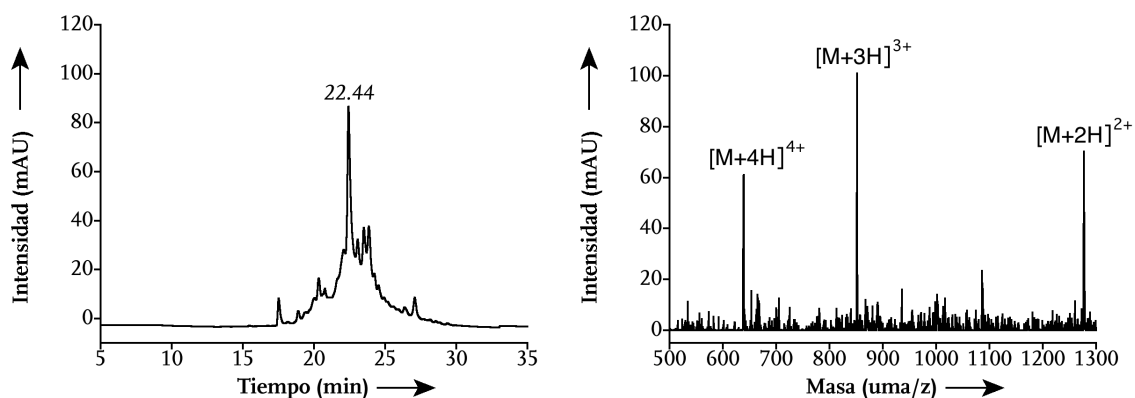


Figura 249. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido B_{7A} . Derecha: espectro de masas.

B_{1A}' : ~ 30% rendimiento global; $t_R = 18.03$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para $C_{95}H_{170}N_{46}O_{16}$: 2212.7. Encontrada: 739.5 [M+3H]³⁺; 554.6 [M+4H]⁴⁺; 443.9 [M+5H]⁵⁺.

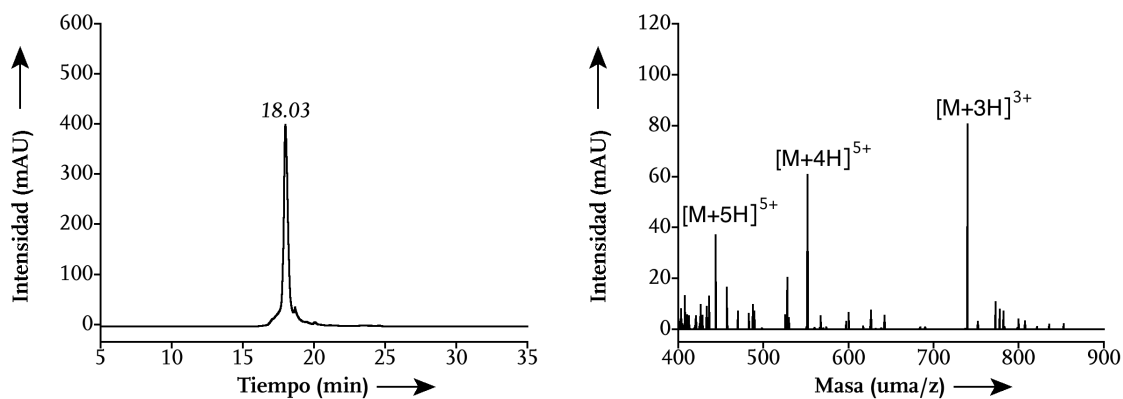


Figura 250. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido B_{1A}' . Derecha: espectro de masas.

B_{2A'}: ~ 25% rendimiento global; $t_R = 18.42$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₉₄H₁₆₁N₃₂O₂₁: 2075.5. Encontrada: 1038.3 [M+2H]²⁺; 692.3 [M+3H]³⁺; 519.5 [M+4H]⁴⁺; 416.0 [M+5H]⁵⁺.

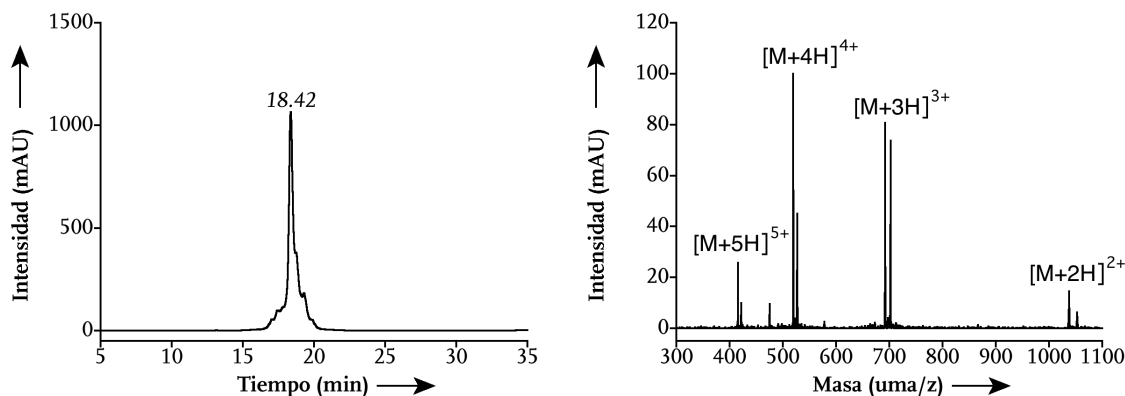


Figura 251. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido **B_{2A'}**. Derecha: espectro de masas.

DIMERIZACIÓN (**B_{10A}**, **B_{11A}**)

La dimerización se llevó a cabo del mismo modo que en el caso de los péptidos **B_{10B}**, **B_{11B}**.

Datos analíticos:

B_{10A}: $t_R = 20.92$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₈₂H₂₉₆N₇₀O₃₈S₃: 4168.9. Encontrada: 1466.1 [M(CF₃CO₂)₂+5H]³⁺; 1071.4 [M(CF₃CO₂)+5H]⁴⁺; 1042.5 [M+4H]⁴⁺; 900.7 [M(CF₃CO₂)₃+8H]⁵⁺; 629.4 [M(CF₃CO₂)₂+9H]⁷⁺.

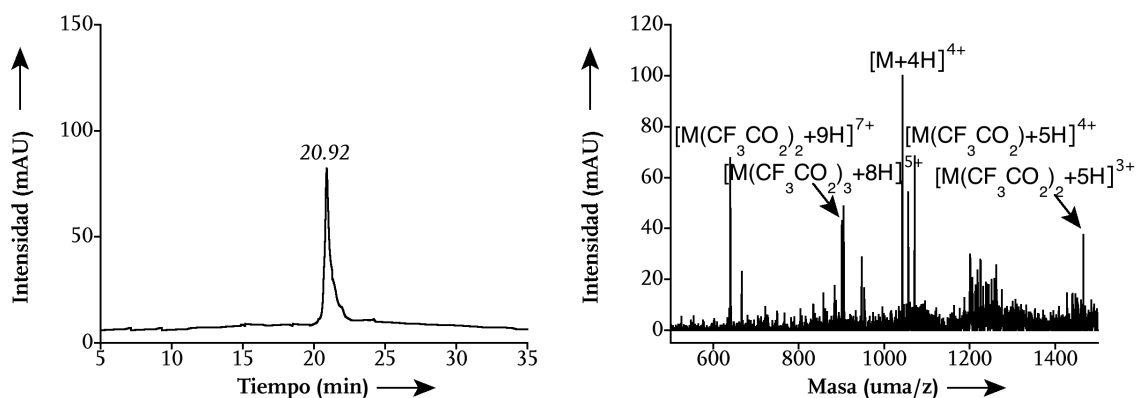


Figura 252. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido **B_{10A}**. Derecha: espectro de masas.

B_{11A}: $t_R = 20.00$ min, gradiente 2; EM-ESI⁺ (m/z): [M+H]⁺ calcd para C₁₇₉H₂₈₈N₆₇O₃₈S₃: 4083.8. Encontrada: 1021.7 [M+4H]⁴⁺; 840.4 [M(CF₃CO₂)+6H]⁵⁺; 681.5 [M+6H]⁶⁺.

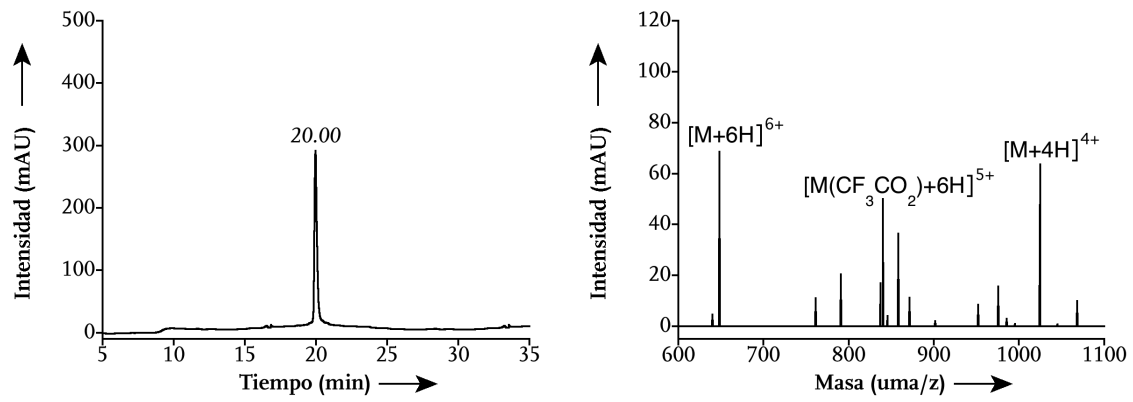


Figura 253. Izquierda: cromatograma de HPLC del crudo de la desprotección del híbrido B_{11A} . Derecha: espectro de masas.

Bibliografía

- [208] Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals* ISBN-10/ASIN: 1856175677 Butterworth-Heinemann, Woburn, MA (USA) **1996**.
- [209] Hahn-Deinstrop, E. *Applied Thin-Layer Chromatography* ISBN: 978-3-527-31553-6 WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- [210] a) Gottlieb, H. E.; Vadim, K.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515. b) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C.; Herrera, A.; Martínez, R. *Determinación estructural de compuestos orgánicos* ISBN: 84-07-00526-6 Springer, Barcelona, **2001**.
- [211] Dodd, J. S. *The ACS Style Guide: A manual for Authors and Editors* ISBN: 0-8412-3461-2 American Chemical Society, Washington, DC **1997**.
- [212] a) Engman, K. C.; Sandin, P.; Osborne, S.; Brown, T.; Billeter, M.; Lincoln, P.; Nordén, B.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. *Nucl. Acids Res.* **2004**, *32*, 5087-5095. b) Kallansrud, G.; Ward, B. *Anal Biochem.* **1996**, *236*, 134-138.
- [213] Van Holde, K. E.; Jonson, W. C.; Ho, P. S. *Principles of Physical Biochemistry*, ISBN-10: 0137204590 Prentice Hall, Upper Saffle River, N. J. **1998**; capítulo 5.
- [214] Thomas, M.; Varshney, U.; Bhattacharya, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *21*, 3604-3615.
- [215] Lee, M.; Coulter, D. M.; Lown, J. W. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1855-1859.
- [216] Bremer, R. E.; Szewczyk, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1947-1955.
- [217] Nishiwaki, E.; Shigeaki, T.; Hideaki, L.; Shibuya, M. *Heterocycles* **1988**, *27*, 1945-1952.
- [218] Yamada, S.; Kasai, Y.; Shioiri, T.; *Tetrahedron Letters* **1973**, *18*, 1595-1598.
- [219] Wade, S.W; Dervan, P.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1574-1575.
- [220] a) Iwanowicz, E. J.; Poss, M. A.; Lin, J. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1443-1445. b) Expósito, A.; Fernández-Suárez, M.; Iglesias, T.; Muñoz, L.; Riguera, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4206-4213.
- [221] Barge, A.; Upadhyaya, T. D.; Fedeli, F.; Beltrami, L.; Stefania, R.; Aime, S.; Cravotto, G. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1176-1184.
- [222] Hancock, W. S.; Battersby, J. E. *Anal. Biochem.* **1976**, *15*, 260-264.