



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Máster Universitario en Investigación Química y  
Química Industrial**

**PAULA NOVO VALENCIA**

*Ensamblajes supramoleculares de conjugados péptido-  
viológeno como herramientas para aplicaciones en  
química biológica*

*Supramolecular assemblies of peptide-viologen  
conjugates as tools for chemical biology applications*

**Directores:** Carlos Peinador Veira y Elena Pazos Chantrero

**Centro de realización del trabajo:** Centro de Investigaciones  
Científicas Avanzadas (CICA)

**Período de evaluación:** julio, 2018



## *Agradecimientos*

Me gustaría dar las gracias a mis tutores, Dra. Elena Pazos Chantretero y Prof. Carlos Peinador Veira, y también al Prof. Marcos D. García Romero, por haberme dado la oportunidad de realizar un proyecto tan interesante y, sin duda, por toda la ayuda, orientación y enseñanzas que me han brindado durante este año.

También quiero dar las gracias a Iago, por haberme ayudado siempre que lo he necesitado.

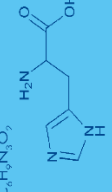
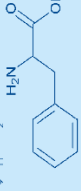
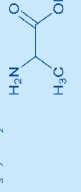
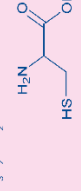
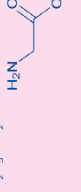
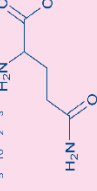
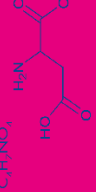
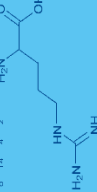
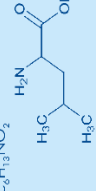
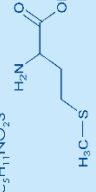
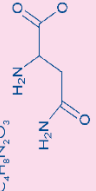
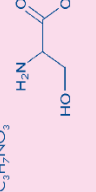
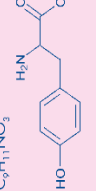
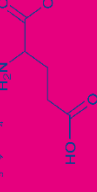
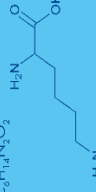
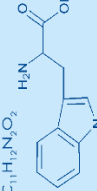
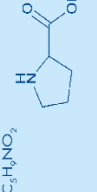
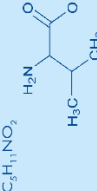

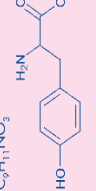
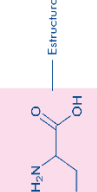


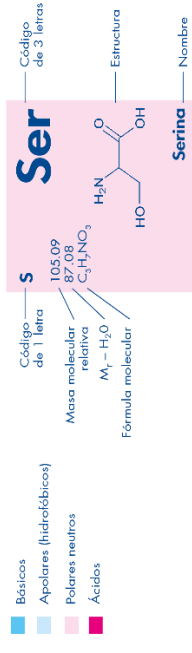
## Abreviaturas, símbolos y acrónimos

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butoxicarbonil
<b>Bzl</b>	benciloxicarbonil
<b>CB[8]</b>	cucurbit[8]urilo
$\delta$	desplazamiento químico
<b>d</b>	doblete
<b>dd</b>	doble doblete
<b>DC</b>	dicroísmo circular
<b>DCM</b>	diclorometano
<b>DIEA</b>	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamida
<b>eq</b>	equivalentes
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	dietil éter
<b>EtOH</b>	etanol
<b>Fmoc</b>	9-fluorenilmetoxicarbonil
<b>FT</b>	factor de transcripción
<b>h</b>	hora
<b>g</b>	gramo
<b>HBTU</b>	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)- 1,1,3,3- tetrametiluronio
<b>HOBt</b>	1-hidroxibenzotriazol
<b>HPLC-MS</b>	cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón

<b>Hz</b>	herzio
<b>J</b>	constante de acoplamiento
<b>M</b>	molaridad
<b>MeOH</b>	metanol
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitro
<b>mmol</b>	milimol
<b>Mtt</b>	4-metiltrilito
<b>N<sub>2</sub></b>	nitrógeno
<b>m/z</b>	relación masa- carga
<b>μL</b>	microlitro
<b>Pbf</b>	2,2,4,6,7-pentametildihidro-benzofuran-5-sulfonilo
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>s</b>	singulete
<b>SPPS</b>	síntesis de péptidos en fase sólida
<b>ta</b>	temperatura ambiente
<b><i>t</i>-Bu</b>	<i>tert</i> -butil
<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>TIS</b>	triisopropilsilano
<b>TNBS</b>	ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico
<b>tr</b>	tiempo de retención
<b>UV-Vis</b>	ultravioleta-visible

# Tabla periódica de los aminoácidos

<b>H</b> 155.16 137.14 $C_9H_9NO_2$  <b>His</b> Histidina	<b>F</b> 165.19 147.18 $C_9H_9NO_2$  <b>Phe</b> Fenilalanina	<b>A</b> 89.09 71.08 $C_3H_7NO_2$  <b>Ala</b> Alanina	<b>C</b> 121.16 103.14 $C_3H_7NO_2S$  <b>Cys</b> Cisteína	<b>G</b> 75.07 57.05 $C_2H_5NO_2$  <b>Gly</b> Glicina	<b>G</b> 146.15 128.13 $C_5H_9NO_3$  <b>Gln</b> Glutamina	<b>D</b> 133.10 115.09 $C_4H_7NO_4$  <b>Asp</b> Ácido Aspártico
<b>R</b> 174.20 156.19 $C_9H_{17}N_3O_2$  <b>Arg</b> Arginina	<b>L</b> 131.18 113.16 $C_6H_{13}NO_2$  <b>Leu</b> Leucina	<b>M</b> 149.21 131.20 $C_5H_9NO_2S$  <b>Met</b> Metionina	<b>N</b> 132.12 114.10 $C_4H_8N_2O_3$  <b>Asn</b> Asparagina	<b>S</b> 105.09 87.08 $C_3H_7NO_3$  <b>Ser</b> Serina	<b>Y</b> 181.19 163.17 $C_9H_9NO_3$  <b>Tyr</b> Tirosina	<b>E</b> 147.13 129.11 $C_5H_9NO_4$  <b>Glu</b> Ácido Glutámico
<b>K</b> 146.19 128.17 $C_6H_{14}N_2O_2$  <b>Lys</b> Lisina	<b>W</b> 204.23 186.21 $C_{11}H_{17}N_3O_2$  <b>Trp</b> Triptófano	<b>P</b> 115.13 97.12 $C_5H_9NO_2$  <b>Pro</b> Prolina	<b>V</b> 117.15 92.13 $C_6H_{11}NO_2$  <b>Val</b> Valina	<b>S</b> 105.09 87.08 $C_3H_7NO_3$  <b>Ser</b> Serina	<b>T</b> 119.12 101.10 $C_4H_9NO_3$  <b>Thr</b> Treonina	<b>I</b> 131.18 113.16 $C_6H_{13}NO_2$  <b>Ile</b> Isoleucina



## Grupos protectores comunes en síntesis Fmoc de péptidos

<b>Fmoc</b> 9-Fluorenilmetoxi-carbonil $M_r = 223.25$ 	<b>Mtt</b> 4-Metilritil $M_r = 257.36$ 	<b>Pmc</b> 2,2,5,7,8-Pentametil-croman-6-sulfonil $M_r = 267.37$ 	<b>t-Bu</b> t-Butil $M_r = 57.12$ 
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------





# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Química biológica .....	1
1.2. Factores de transcripción: regulación de la expresión génica .....	2
1.3. Péptidos de unión al ADN. Dímeros artificiales peptídicos de GCN4 .....	3
1.4. Péptidos de unión al ADN sensibles a estímulos .....	4
1.5. CB[8] como herramienta supramolecular para la síntesis de FTs artificiales.....	6
<b>2. Objetivo</b> .....	9
<b>3. Discusión de resultados</b> .....	11
3.1. Estructuración de la discusión.....	11
3.2. Diseño del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio y estrategia sintética.....	11
3.3. Síntesis y caracterización estructural del pseudoviológeno 1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-io y del péptido GCN4-rb. ....	13
3.3.1. Síntesis y caracterización estructural del pseudoviológeno 1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-io (3). ....	13
3.3.2. Síntesis del péptido GCN4-rb.....	13
3.4. Preparación y caracterización del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio mediante la reacción de Zincke en fase sólida. ....	16
3.5. Estudio de la interacción entre el dímero supramolecular del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio, inducido por la formación del complejo de inclusión entre 4,4'-bipiridinio y CB[8], con su ADN diana. ....	20
<b>4. Parte experimental</b> .....	25
4.1. General .....	25
4.2. Síntesis del cloruro de <i>N</i> -(2,4-dinitrofenil)-4,4'-bipiridina (3).....	26
4.3. Síntesis del péptido derivado de la región básica de GCN4 (4) y modificación con el derivado de 4,4'-bipiridinio (3) mediante la reacción de Zincke en fase sólida .....	27

4.3.1.	Síntesis del derivado de GCN4-rb (4) .....	27
4.3.2.	Acoplamiento del derivado de 4,4'-bipiridinio (3) en la cadena lateral de la Lys del derivado de GCN4.-rb (4).....	30
4.4.	Estudio de la interacción entre el dímero supramolecular del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio (9), inducido por la formación del complejo de inclusión entre la unidad de 4,4'-bipiridinio y CB[8], con su ADN diana. ....	32
<b>5.</b>	<b>Anexo</b> .....	<b>i</b>

# Resumen

En este proyecto se busca combinar la química biológica y la química supramolecular para la preparación de un agente de unión al ADN basado en péptidos como una nueva herramienta para aplicaciones en química biológica.

De esta forma, en este trabajo de fin de máster se llevó a cabo la síntesis de un precursor peptídico mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida, que posteriormente se modificó con un derivado de 4,4'-bipiridinio mediante una nueva metodología sintética basada en la reacción de Zincke en fase sólida. Posteriormente, se realizaron estudios de interacción entre el dímero supramolecular del conjugado péptido-4,4'-bipiridinio, formado en presencia de cucurbit[8]urilo (CB[8]), y el ADN mediante dicroísmo circular. Para caracterizar los compuestos se emplearon  $^1\text{H}$ -RMN y HPLC-MS.

**Palabras clave:** química supramolecular, química biológica, péptidos, cucurbiturilos, síntesis de péptidos en fase sólida, conjugados péptido-viológeno.



# Abstract

This project pretends to combine the chemical biology and supramolecular chemistry fields for the preparation of a peptide-based DNA binding agent as a new tool for applications in chemical biology.

Herein, in this master's final project a peptide precursor was synthesized by means of the solid phase peptide synthesis methodology, and this peptide was later modified with a 4,4'-bipyridinium derivative through a new synthetic route based in the solid phase Zincke reaction. Then, the interaction between the supramolecular dimer of the peptide-4,4'-bipyridine conjugate, assembled in the presence of cucurbit[8]uril (CB[8]), and DNA was studied via circular dichroism. All the compounds were characterized using <sup>1</sup>H-RMN and HPLC-MS.

**Keywords:** supramolecular chemistry, chemical biology, peptides, cucurbiturils, solid phase synthesis, peptide-viologen conjugates.



# 1. Introducción

## 1.1. Química biológica

La química biológica es una disciplina relativamente nueva que navega en la interfaz de los campos de la química y la biología, que surgió por el interés de aplicar las técnicas y herramientas químicas al estudio de sistemas biológicos, ya sea para investigar un proceso biológico o para crear una nueva función en dicho sistema.<sup>1</sup> Varios autores coinciden en que la química biológica “*surgió durante décadas como una compleja hibridación de la química bioorgánica, la bioquímica, la biología celular y la farmacología*”, y que la contribución de cada una de estas áreas dio lugar a una disciplina “*definida por un deseo práctico para comprender y manipular los sistemas biológicos de nuevas maneras*”.<sup>2</sup>

En los últimos 30 años, la gran evolución experimentada por la química biológica le ha permitido convertirse en una rama de la química de carácter transversal e interdisciplinar con un extenso abanico de áreas de aplicación (Figura 1), trabajando en los campos de la síntesis y reconocimiento biomolecular, la señalización celular, etc. Cabe destacar que esta disciplina ha contribuido a un gran número avances científicos, como el descubrimiento de ARN de interferencia en mamíferos,<sup>3</sup> la revelación de la estructura tridimensional del ribosoma,<sup>4</sup> la síntesis automatizada de carbohidratos,<sup>5</sup> etc.



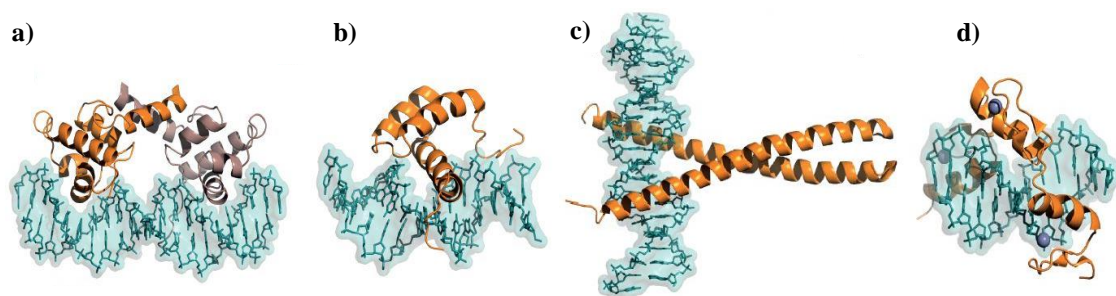
**Figura 1.** Diagrama de cruce que refleja el carácter transversal y multidisciplinar de la química biológica. (Imagen tomada de GQB-RSEQ ([www.rseq.org](http://www.rseq.org))).

- 1 Martín Santamaría, S. Química biológica: una disciplina emergente. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, **2011**, *169*, 21-25.
- 2 Bucci, M., Goodman, C., Sheppard, T. L., *Nature chemical biology* **2010**, *6*, 847–854.
- 3 Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- 4 Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A. *Science* **2000**, *289*, 905–920.
- 5 Plante, O.J., Palmacci, E.R., Seeberger, P.H. *Science* **2001**, *291*, 1523–1527.

## 1.2. Factores de transcripción: regulación de la expresión génica

Un campo de investigación de gran interés dentro de la química biológica es el estudio de la regulación de la expresión génica. En particular, existe un gran interés en explorar los mecanismos moleculares que gobiernan la interacción de unas proteínas denominadas factores de transcripción (FTs) con secuencias específicas de ADN,<sup>6</sup> lo cual constituye el principal mecanismo de control de la transcripción génica en células eucariotas, activando o reprimiendo la expresión de genes.<sup>7</sup>

De acuerdo con el plegamiento de sus dominios de unión al ADN, los FTs se clasifican en las siguientes familias: la familia de la región básica de cremalleras de leucinas (bZip), la familia de la región básica de hélice-lazo-hélice (bHLH), la familia de los dedos de zinc y las familias Hélice-giro-hélice (HTH) y Homeodominio, representadas en la Figura 2.<sup>8</sup>



**Figura 2.** Estructuras de rayos X de los motivos de unión al ADN de los FTs: a) El dominio HTH del represor lambda (PDB 1LMB); b) El homeodominio Antennapedia de *Drosophila melanogaster* (PDB 1AHD); c) El dominio de unión bZip del factor de transcripción GCN4 (PDB 1YSA); d) Triada Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> del factor de transcripción Zif268 (PDB 1AAY).

De todas ellas, la familia bZip destaca por su simplicidad estructural, siendo dímeros de hélices  $\alpha$  continuas. En cada hélice se distinguen dos partes: la *cremallera de leucinas*, zona rica en leucinas situada en el extremo *C*-terminal, que se encarga de la dimerización, y la *región básica*, secuencia de unos 20 aminoácidos situada en el extremo *N*-terminal, responsable de establecer los contactos con el ADN mediante interacciones de tipo enlace de hidrógeno y electrostáticas, con las bases nitrogenadas y el esqueleto azúcar-fosfato del surco mayor.

Es importante resaltar que la *región básica* de la familia de bZip adopta la conformación característica de hélice  $\alpha$  únicamente cuando se une al ADN; en disolución y en ausencia de su secuencia diana se comportan como proteínas intrínsecamente

6 A. H. Brivanlou, J. E. Darnell, Jr., *Science* **2002**, 295, 813–818.

7 A.-L. Todeschini, A. Georges, R. A. Veitia, *Trends Genet.* **2014**, 30, 211–219.

8 C. W. Garvie, C. Wolberger, *Mol. Cell* **2001**, 8, 937–946.



desordenadas y con poca estructura, debido al elevado gasto entrópico implicado en el plegamiento de la región básica para adoptar dicha conformación helicoidal.<sup>9</sup> En este sentido, la ausencia de rigidez estructural es la responsable de la gran selectividad con la que los FT bZip reconocen determinadas secuencias de ADN.

### ***1.3. Péptidos de unión al ADN. Dímeros artificiales peptídicos de GCN4***

Desde hace tiempo, se conoce que existe una fuerte relación entre el mal funcionamiento de estos FTs y la aparición de un número importante de enfermedades, entre ellas el cáncer,<sup>10</sup> por lo que existe un gran interés en entender los mecanismos moleculares que gobiernan el reconocimiento específico de determinadas secuencias de ADN, así como en desarrollar nuevos agentes de unión al ADN. En particular, con la intención de emular los FTs naturales, numerosos investigadores han explorado el desarrollo de agentes de unión al ADN artificiales basados en péptidos capaces de reconocer de manera específica determinadas secuencias de ADN.

La cantidad de información estructural y funcional del FT GCN4, perteneciente a la familia bZip, lo ha convertido en la plataforma preferida para el desarrollo de dichos factores de transcripción artificiales basados en péptidos (Figura 3a). Al igual que el resto de miembros de su familia, el FT GCN4 presenta afinidad por las secuencias ATF/CREB (5'-ATGAcgTCAT-3') o AP1/GCRE [5'-ATGA(c/g)TCAT-3']; a través de su región básica *N*-terminal, GCN4 establece contactos específicos mediante la interacción entre dicha región, que adquiere conformación de hélice  $\alpha$  continua, y las bases nitrogenadas del surco mayor del ADN.<sup>11</sup> Conviene mencionar que estas proteínas como monómeros presentan una baja afinidad por el ADN, por lo que su dimerización es fundamental para su unión al polinucleótido.<sup>12</sup>

Muchos de los dímeros artificiales derivados de GCN4 basan su diseño en la sustitución de la región de *cremallera de leucinas* por *linkers* específicos, tales como: enlaces disulfuro<sup>13</sup>, complejos de coordinación de metales de transición,<sup>14</sup> complejos

9 M. Zhang, B. Wu, H. Zhao, J. W. Taylor, J. *Pept. Sci.* **2002**, 8, 125–136.

10 Van Dam, H.; Castellazzi, M. *Oncogene* **2001**, 20, 2453–2464.

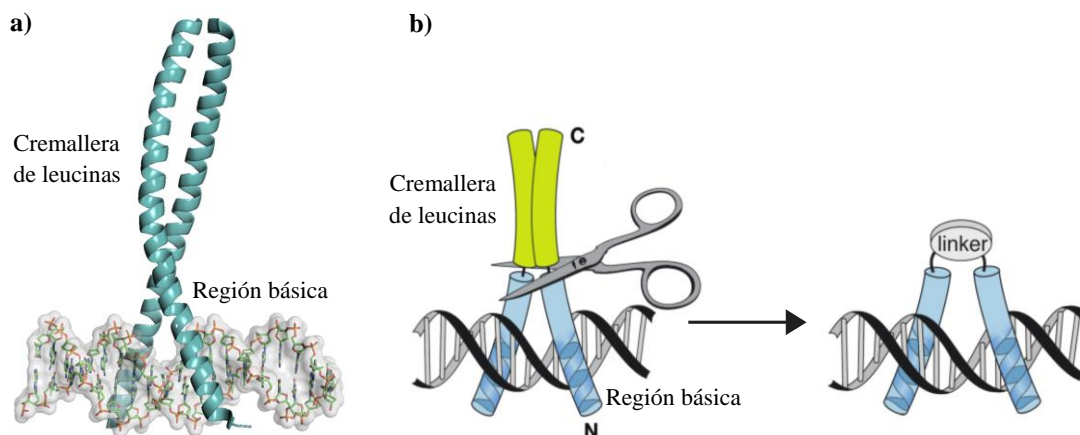
11 (a) T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, S. C. Harrison, *Cell* **1992**, 71, 1223–1237; (b) W. Keller, P. König, T. J. Richmond, *J. Mol. Biol.* **1995**, 254, 657–667.

12 (a) Vázquez, M.; Caamaño, A.; Mascareñas, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 338–349. (b) Pazos, E.; Mosquera, J.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L. *ChemBioChem* **2011**, 12, 1958–1973.

13 R. V. Talanian, C. J. McKnight, P. S. Kim, *Science* **1990**, 249, 769–771.

14 B. Cuenoud, A. Schepartz, *Science* **1993**, 259, 510–513

supramoleculares (ciclodextrina-adamantano)<sup>15</sup> o interruptores moleculares como el azobenceno<sup>16</sup>, entre otros (Figura 3b).<sup>17</sup>



**Figura 3.** a) Estructura de rayos X del complejo GCN4–ADN. b) Representación esquemática de la estrategia de generación de dímeros artificiales de GCN4, en la que se muestran las hélices como cilindros y se reemplaza la región de cremallera de leucinas por *linkers* específicos.<sup>17</sup>

#### 1.4. Péptidos de unión al ADN sensibles a estímulos

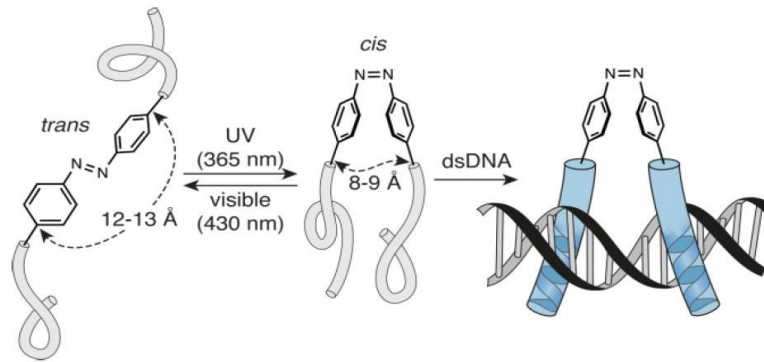
Algunos de los sistemas diseñados en base a la estrategia anterior, además de caracterizarse por su capacidad para unirse de forma muy específica al ADN, también presentan la capacidad de responder a ciertos estímulos.

En este contexto, cabe destacar el desarrollo de dímeros artificiales basados en GCN4 con azobenceno como *linker*, como el diseñado por el grupo de investigación de J. L. Mascareñas (Figura 4).<sup>16</sup> El potencial de este diseño reside en el cambio de geometría resultado del proceso de interconversión  $E \rightarrow Z$  del azobenceno, provocado por un estímulo lumínico. Así, es posible pasar del isómero *E*, que no presenta interacción con el ADN debido a la orientación opuesta de sus cadenas peptídicas, al isómero *Z*, en el que las cadenas peptídicas se orientan en la disposición adecuada, lo que le permite interactuar con gran afinidad con el ADN.

15 Y. Aizawa, Y. Sugiura, M. Ueno, Y. Mori, K. Imoto, K. Makino, T. Morii, *Biochemistry* **1999**, 38, 4008–4017.

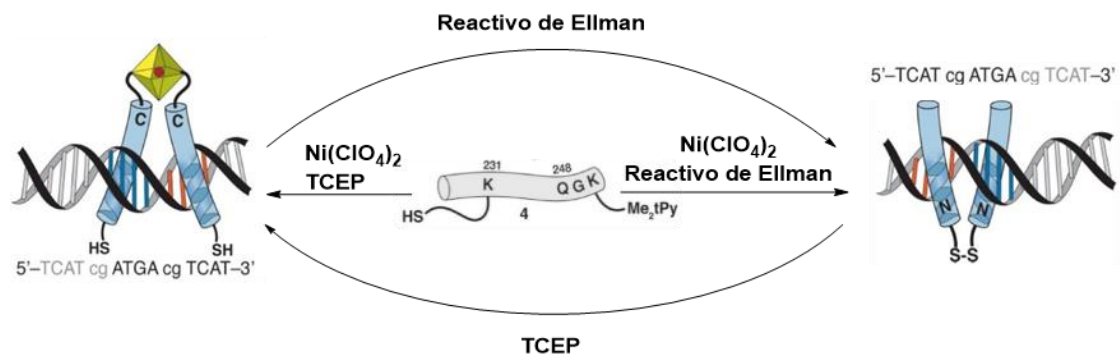
16 A. M. Caamaño, M. E. Vázquez, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *Angew. Chem.* **2000**, 3234–3237.

17 Boga, S.; Bouzada, D.; García Peña, D.; Vázquez López, M.; Vázquez, M. E. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 249–261.



**Figura 4.** Modulación de la capacidad de unión al ADN del dímero formado por dos péptidos derivados de la región básica del GCN4 unidos mediante la unidad azobenceno. La irradiación con luz UV permite controlar la isomerización  $E \rightarrow Z$  del azobenceno. (Imagen adaptada de la referencia 14).

Existen otros ejemplos de sistemas dinámicos basados en aunar el efecto de coordinación de iones metálicos y la sensibilidad a estímulos redox, como el sistema formado por un fragmento de la región básica del GCN4 con un residuo de cisteína  $N$ -terminal sensible a procesos redox, y un ligando derivado de la terpiridina unido a un residuo de lisina  $C$ -terminal (Figura 5).<sup>18</sup>



**Figura 5.** Por tratamiento con el  $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2$ , el monómero peptídico con los residuos de Cys reducidos se convierte en un complejo metálico que reconoce específicamente la secuencia 5'-ATGAcgTCAT-3'; mientras que la oxidación de dichos residuos da lugar al dímero a través de un enlace disulfuro, capaz de unirse a la secuencia 5'-TCATcgATGA-3'. (Imagen adaptada de la referencia 14).

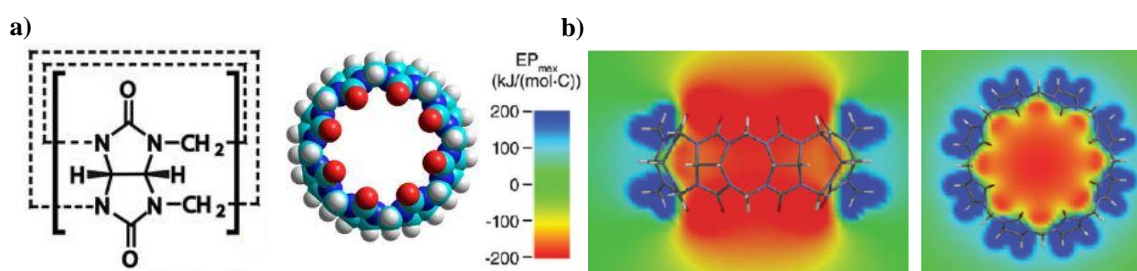
18 J. Mosquera, A. Jiménez-Balsa, V. I. Dodero, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1874.

### 1.5. CB[8] como herramienta supramolecular para la síntesis de FTs artificiales

Una alternativa interesante a estos diseños de FTs dinámicos, consiste en la introducción de interruptores supramoleculares basados en la formación de agregados no covalentes cuya unión sea controlable a través de estímulos externos como la luz, el cambio de pH o el potencial redox, etc.<sup>19</sup>

En este sentido, conviene destacar la familia de macrociclos cucurbiturilo<sup>20</sup>, constituida por oligómeros macrocíclicos formados por  $n$  unidades de glicolurilo unidas por  $2n$  puentes metilénicos (Figura 6a). Su estructura presenta una cavidad hidrofóbica y dos portales carbonílicos polares, tal y como se muestra en la Figura 6b, que impulsan la inclusión de moléculas huésped (típicamente, cationes orgánicos), con los que forman complejos de inclusión mediante una combinación de interacciones catión-dipolo, interacciones hidrofóbicas y maximización de los coeficientes de empaquetamiento del sustrato/sustratos dentro del receptor.

La utilidad de estos compuestos reside no solo en el contexto de reconocimiento molecular, sino también como base en el desarrollo de interruptores supramoleculares.<sup>21</sup> En especial, cucurbit[8]urilo, CB[8], gracias a las dimensiones de su cavidad interna, es capaz de encapsular dos moléculas huésped idénticas o diferentes formando complejos homoternarios 1:2 o heteroternarios 1:1:1, respectivamente.



**Figura 6.** a) Estructura y representación de modelo de bolas del CB[8]. b) Estructuras de potencial electrostático para el CB[8].<sup>20</sup>

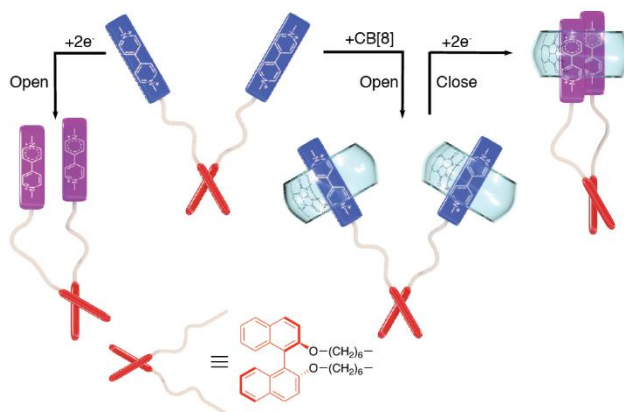
Las sales de  $N$ -monoalquil y  $N,N'$ -dialquil-4,4'-bipiridinio (pseudoviólógenos y viólógenos) han demostrado ser magníficos sustratos para la formación de interruptores

19 (a) Badjić, J. D.; Balzani, V.; Credi, A.; Silvi, S.; Stoddart, J. F. *Science* **2004**, *303*, 1845. (b) Muraoka, T.; Kinbara, K.; Aida, T. *Nature* **2006**, *440*, 512–515. (c) Zhao, Y.-L.; Dichtel, W. R.; Trabolsi, A.; Saha, S.; Aprahamian, I.; Stoddart, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11294–11296.

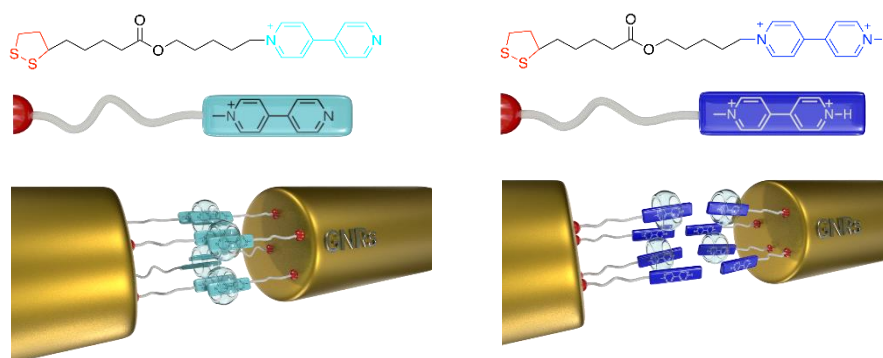
20 S. J. Barrow, S. Kaser, M. J. Rowland, J. del Barrio, and O. A. Scherman, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 12320–1240.

21 (a) Jeon, W. S.; Ziganshina, A. Y.; Lee, J. W.; Ko, Y. H.; Kang, J.-K.; Lee, C.; Kim, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4231–4234. (b) Sindelar, V.; Silvi, S.; Parker, S. E.; Sobransingh, D.; Kaifer, A. E. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 694–701. (c) Trabolsi, A.; Hmadeh, M.; Khashab, N. M.; Friedman, D. C.; Belowich, M. E.; Humbert, N.; Elhabiri, M.; Khatib, H. A.; Albrecht-Gary, A.-M.; Stoddart, J. F. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 254–263.

supramoleculares con cucurbiturilos (Figura 8). Por ejemplo, CB[8] y dimetilviológeno ( $MV^{2+}$ ) forman un complejo de inclusión 1:1 que se puede convertir completa y reversiblemente en el complejo de inclusión 2:1  $(MV^{+})_2 \subset CB[8]$  mediante la reducción monolectrónica de cada molécula de dimetilviológeno al catión radical correspondiente. Esto da lugar a un dímero estable del catión radical de metilviológeno  $(MV^{+})_2$  en la cavidad de CB[8] (Figura 7).<sup>22</sup> También existen ejemplos donde se ejerce control sobre el proceso de complejación mediante cambio del pH del medio (Figura 8).<sup>23</sup>



**Figura 7.** Interruptor supramolecular CB[8]-4,4'-bipiridinio sensible a estímulos redox.



**Figura 8.** Proceso de oligomerización reversible sensible al pH de barras de oro funcionalizadas con  $MV_2^+$ .

En el contexto del presente TFM, ha de comentarse que existe algún ejemplo del uso de CB[8] para el ensamblaje<sup>24,25,26</sup> de péptidos o proteínas (Figura 9). Sin embargo, todavía

22 a) C. Gao, S. Silvi, X. Ma, H. Tian, M. Venturi A. Credi, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 7577-75; b) C. Gao, S. Silvi, X. Ma, H. Tian, A. Credi, M. Venturi, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 16911-16921.

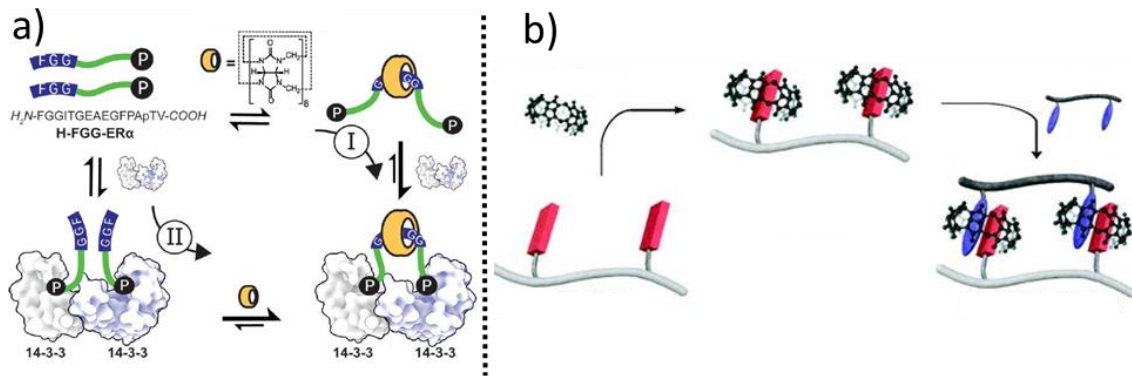
23 Y. Xu, X. Wang X. Ma, *Dyes and Pigments* **2017**, 145, 385-390.

24 de Vink, P. J., Briels, J. M., Schrader, T., Milroy, L. G., Brunsveld, L., Ottmann, C. *Angew.Chem.Int. Ed.* **2017**, 56,8998-9002.

25 Reczek, J.J.; Kennedy, A.A.; Halbert, B.T.; Urbach, A.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2408-2415.

26 Sonzini, S., Marcozzi, A., Gubeli, R. J., van der Walle, C. F., Ravn, P., Herrmann, A., and Scherman, O. A. *Angew. Chem.* **2016**, 128, 1-6.

no se ha explorado el uso de interruptores supramoleculares del tipo CB[8]/4,4'-bipiridinio para controlar reversiblemente el proceso de dimerización de proteínas.



**Figura 9.** a) Ensamblaje supramolecular de la proteína 14-3-3 a través de las secuencias fenilalanina-glicina-glicina (FGG) situadas en el extremo *N*-terminal, con el CB[8]. b) Representación esquemática del ensamblaje entre la entidad con grupos viológeno (rojo) y el péptido con dos residuos de triptófano (azul).

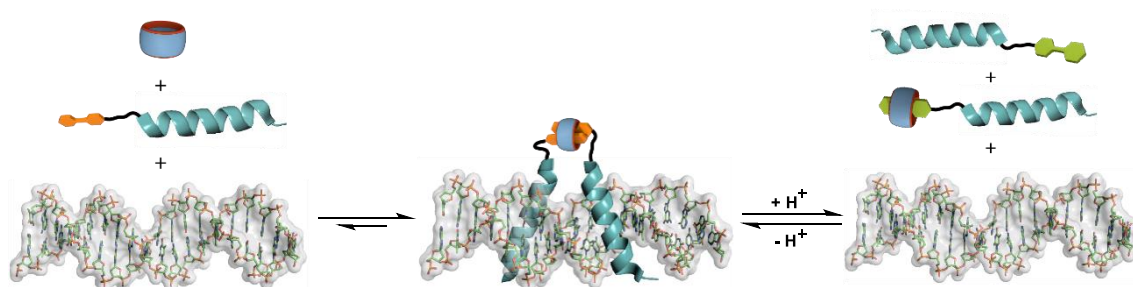


## 2. Objetivo

Según lo expuesto en la introducción, en este trabajo se plantea el diseño y la síntesis de un conjugado peptídico derivado del FT GCN4, modificado con un derivado de *N*-monoalquil-4,4'-bipiridinio en un extremo que permitirá reconocer reversiblemente secuencias específicas de ADN sólo cuando dimerice en presencia de CB[8]. Se espera así que un cambio de pH como estímulo externo, permita controlar reversiblemente el reconocimiento molecular del ADN.

De esta forma, se establecen los siguientes objetivos concretos:

1. Síntesis y caracterización del péptido **GCN4-rb** y del derivado de 4,4'-bipiridinio **1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-io**.
2. Preparación del conjugado **GCN4-rb-4,4'-bipiridinio** mediante una nueva metodología sintética basada en la reacción de Zincke en fase sólida.
3. Estudio de la interacción entre el dímero supramolecular del conjugado **GCN4-rb-4,4'-bipiridinio**, inducido por la formación del complejo de inclusión entre **4,4'-bipiridinio** y **CB[8]**, con su **ADN diana** mediante dicroísmo circular (DC).



**Figura 10.** Representación esquemática del proceso de reconocimiento del ADN promovido por la formación del complejo de inclusión entre CB[8] y el conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio (el cambio de color de la unidad 4,4'-bipiridinio de naranja a verde representa la protonación de esta unidad).





### 3. Discusión de resultados

#### 3.1. Estructuración de la discusión

Según lo establecido en los objetivos, la discusión de resultados se organiza de la siguiente forma:

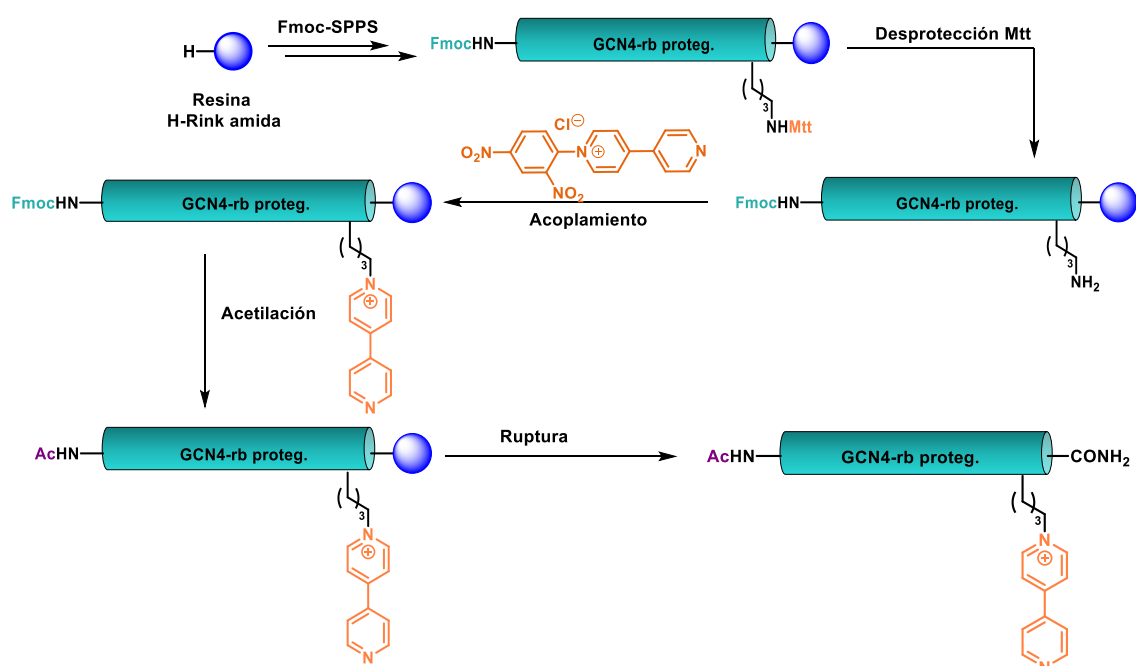
- I. Diseño del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio y estrategia sintética.
- II. Síntesis y caracterización estructural del pseudoviológeno 1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-ilo y del péptido GCN4-rb.
- III. Preparación y caracterización del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio mediante la reacción de Zincke en fase sólida.
- IV. Estudio de la interacción entre el dímero supramolecular del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio, inducido por la formación del complejo de inclusión entre 4,4'-bipiridinio y CB[8], con su ADN diana.

#### 3.2. Diseño del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio y estrategia sintética

Para el diseño del FT sintético se recurrió a la estrategia mencionada en la sección anterior, basada en modificar la estructura de los FTs bZip sustituyendo la región de cremallera de leucinas C-terminal (responsable de la dimerización), y manteniendo inalterada la región básica N-terminal (encargada de la unión al ADN). Concretamente, el sistema diseñado para este proyecto se trata de un péptido derivado de la región básica del FT GCN4 al que se añadió un residuo de Lys en su extremo C-terminal. La cadena lateral de este residuo presenta dos características relevantes: un grupo amino, en el que se acoplará un derivado de 4,4'-bipiridinio para formar el conjugado péptido-4,4'-bipiridinio, y una cadena de 4 átomos de carbono, que aporta la flexibilidad suficiente para que, en presencia de CB[8], se forme el dímero del conjugado, y para que este pueda adoptar la conformación adecuada para reconocer a su ADN diana.

Teniendo en cuenta este diseño, la estrategia sintética se ha planeado para permitir el acoplamiento selectivo del derivado de 4,4'-bipiridinio en la cadena lateral del residuo de Lys del extremo C-terminal (Esquema 1). A continuación, se mencionan las etapas planteadas:

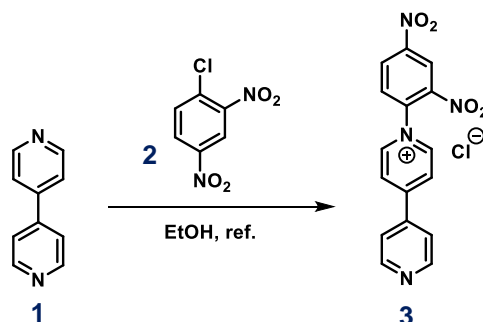
- 1) Síntesis del péptido derivado de la región básica del FT GCN4, de secuencia peptídica Fmoc-ESSDPAALKRARNTTEAARRSRARKLQRK-NH<sub>2</sub> mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), empleando el esquema de protección Fmoc/*t*-Bu. El primer aminoácido incorporado (en extremo *C*-terminal) será una Lys con un grupo Mtt, que se podrá desproteger ortogonalmente con respecto a los grupos protectores del resto de aminoácidos de la secuencia.
- 2) Desprotección del grupo Mtt.
- 3) Acoplamiento del derivado de 4,4'-bipiridinio al grupo amino desprotegido de la cadena lateral de la Lys mediante la reacción de Zincke en fase sólida.
- 4) Acetilación del grupo amino *N*-terminal.
- 5) Ruptura/desprotección del conjugado péptido-pseudovirológico para su purificación posterior mediante HPLC en fase reversa.



**Esquema 1.** Ruta sintética planteada para la obtención del conjugado péptido-4,4'-bipiridinio (el círculo representa la resina o soporte sólido y el cilindro la secuencia peptídica).

### 3.3. Síntesis y caracterización estructural del pseudovirológeno 1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-io y del péptido GCN4-rb.

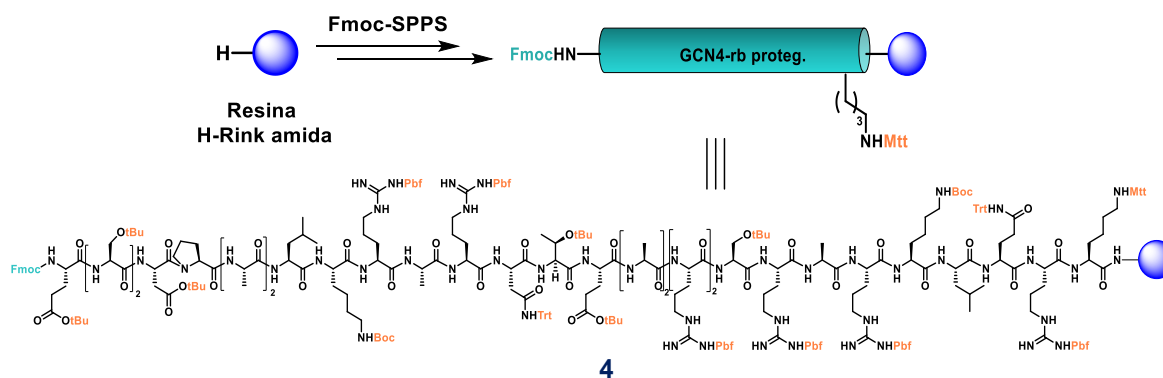
#### 3.3.1. Síntesis y caracterización estructural del pseudovirológeno 1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-io (3).



Esquema 2. Esquema sintético seguido para la preparación de 3.

Siguiendo una metodología sintética estándar, el precursor 1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-io (3) fue eficientemente preparado mediante sustitución nucleófila aromática (*S<sub>N</sub>Ar*) entre 4,4'-bipiridina (1) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (2) en EtOH a reflujo, obteniéndose el compuesto objetivo con un rendimiento del 74% y datos espectroscópicos coincidentes con los previamente descritos.<sup>27</sup>

#### 3.3.2. Síntesis del péptido GCN4-rb



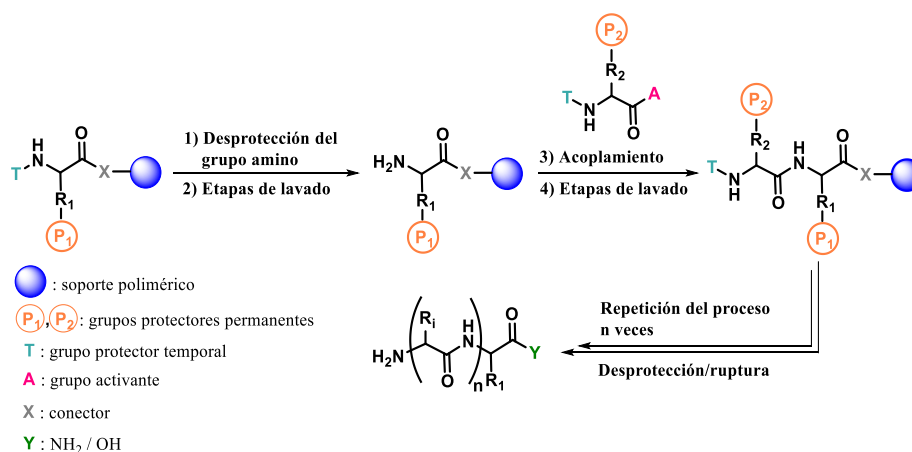
Esquema 3. Esquema sintético seguido para la preparación del derivado peptídico de GCN4-rb (4).

Para la síntesis del derivado peptídico (4), se siguió el procedimiento de síntesis manual de péptidos en fase sólida<sup>28</sup> (SPPS) utilizando el esquema de protección Fmoc/*t*-Bu.

27 Alvariño Bouza, C. Autoensamblaje de nuevos metalociclos, complejos de inclusión y moléculas mecánicamente entrelazadas. Tesis Doctoral, Universidad da Coruña, 2015.

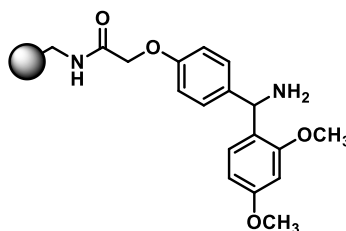
28 Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

Mediante esta técnica, un péptido anclado por su extremo *C*-terminal a un soporte polimérico se ensambla mediante la adición sucesiva de los aminoácidos protegidos que constituyen su secuencia; de esta manera, en cada acoplamiento se forma un nuevo enlace peptídico entre el extremo *C*-terminal del nuevo aminoácido añadido y el extremo *N*-terminal de la cadena peptídica unida a la resina. Se trata de un proceso iterativo, en el que cada adición de aminoácido se considera un ciclo formado por 4 etapas (Esquema 4): 1) desprotección del grupo amino terminal, 2) etapas de lavado, 3) acoplamiento del derivado de aminoácido adecuadamente protegido y 4) etapas de lavado.<sup>29</sup>



**Esquema 4.** Esquema general de la metodología SPPS.

Como soporte sólido se utilizó la resina H-Rink Amide ChemMatrix, que presenta un grupo amina que, por ruptura con TFA del enlace péptido-resina, dará lugar al péptido de interés con un grupo amida en su extremo *C*-terminal.



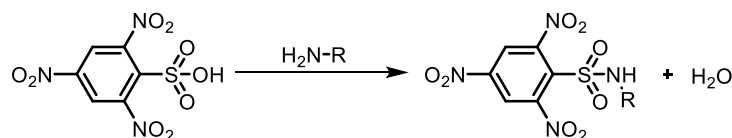
**Figura 11.** Estructura de la resina H-Rink amide.

Cabe mencionar que antes de comenzar la síntesis del péptido es necesario:

- Preparar las dos disoluciones necesarias para las etapas de acoplamiento (0.2 M HBTU/HOBt/DMF y 0.195 M DIEA/DMF), y las dos para realizar el test TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico) (10% DIEA/DMF y 1% TNBS/DMF). Este test permite detectar aminas primarias libres en la resina, y así saber si las

<sup>29</sup> Bachem Group. (2016). Solid Phase Peptide Synthesis – Bachem [archivo PDF]. Recuperado de [http://documents.bachem.com/solid\\_phase\\_peptide\\_synthesis.pdf](http://documents.bachem.com/solid_phase_peptide_synthesis.pdf)

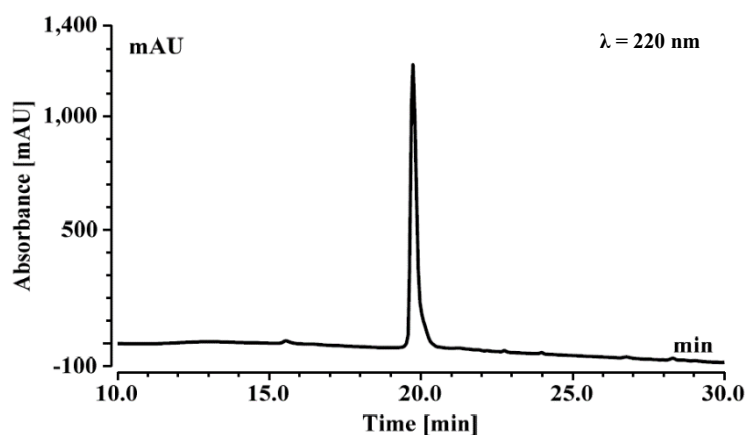
etapas de acoplamiento y desprotección transcurrieron con éxito; añadiendo una gota de cada disolución a una pequeña porción de resina, se puede observar que esta adquiere un color rojo intenso (debido a la formación de una sulfonamida de dicho color por reacción del TNBS con las aminas libres en la resina; test positivo, Esquema 5) o que permanece inalterada (no hay aminas libres; test negativo).



**Esquema 5.** Reacción del TNBS con una amina primaria para formar una sulfonamida.

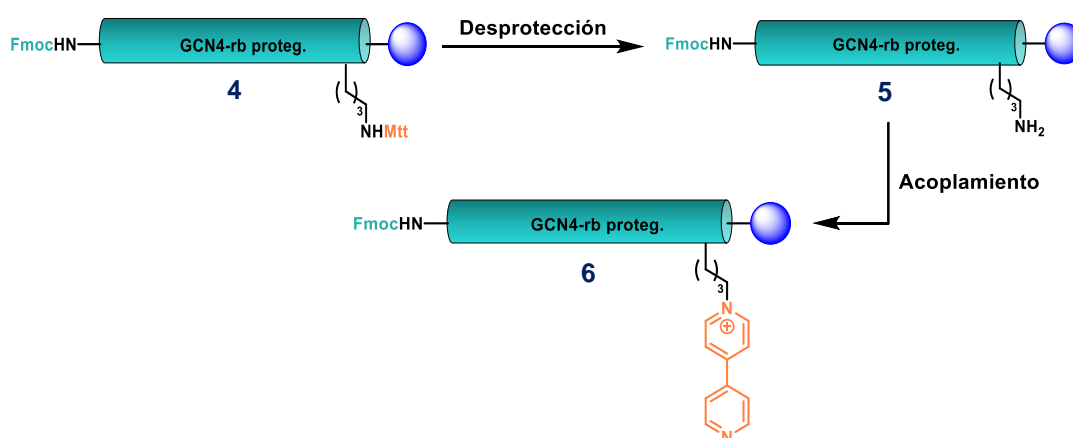
- b) Acondicionar la resina para el proceso de síntesis (descrito en la parte experimental).

La identidad y pureza de **4** se confirmaron mediante HPLC-MS, registrándose un único pico cromatográfico cuyo espectro de masas se corresponde con el esperado para el derivado peptídico de interés (Figura 12).



**Figura 12.** Cromatograma de HPLC correspondiente al crudo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose **4** como único producto a un tiempo de retención de 19,7 min.

### 3.4. Preparación y caracterización del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio mediante la reacción de Zincke en fase sólida.

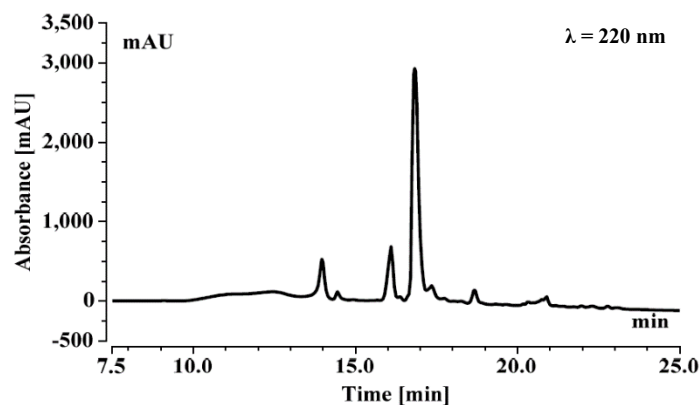


**Esquema 6.** Esquema sintético seguido para la preparación del conjugado péptido-4,4'-bipiridinio (**6**).

- **Pruebas en medio prótico**

Como primera aproximación, en base a las condiciones habituales empleadas para la reacción de Zincke en disolución, se decidió llevar a cabo la reacción en medio prótico.

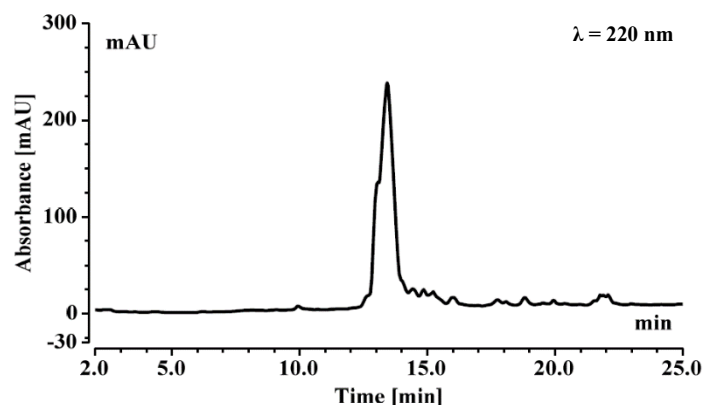
Previamente, se desprotegió de forma selectiva el grupo amino de la Lys del extremo C-terminal por tratamiento de una alícuota del péptido anclado a la resina con la mezcla TFA/TIS/DCM (4:4:92), mediante adiciones sucesivas durante 10 min. Tras filtrar y lavar la resina, se añadió la sal activada, **3**, (5 eq) sobre una suspensión de la resina en EtOH, y se dejó reaccionando a temperatura ambiente (ta) durante 1 hora. Una vez que se lavó la resina varias veces, se tomó una pequeña porción para tratarla con la mezcla de desanclaje, TIS/H<sub>2</sub>O/TFA (2.5:2.5:95), durante 2 horas, para después analizar el producto obtenido por HPLC-MS. En el cromatograma de HPLC registrado se observa un único pico que, tras su identificación mediante espectrometría de masas, corresponde al producto de partida (**4**) (Figura 13).



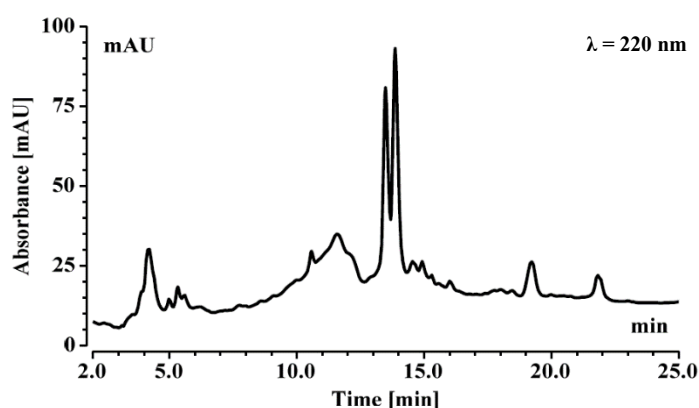
**Figura 13.** Cromatograma de HPLC correspondiente al crudo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_R$  de 16.9 min, correspondiente a **4**.

En vista de los resultados, se llevaron a cabo una serie de pruebas en las que se modificaron las siguientes variables de reacción: el número de equivalentes de **3** (5-3 eq), el tiempo de reacción (6 h – 30 min), la base empleada como tratamiento básico pre-acoplamiento (1 M – 0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o 0.195 M – 0.02 M DIEA/DMF) o la base usada en el acoplamiento (7 – 3.5 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Desafortunadamente, en ninguno de los casos se observó el producto deseado.

En una prueba posterior, se pesó nuevamente resina sin modificar, se trató con la mezcla original de desprotección del Mtt, TFA/TIS/DCM (4:4:92), se realizaron los lavados pertinentes con DCM, DMF y 0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y se llevó a cabo el acoplamiento de **3** (3 eq) en una disolución de 3.5 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . En el cromatograma de HPLC registrado, se observó un pico a 13.5 min que, tras su identificación mediante espectrometría de masas, corresponde al producto de partida (**4**), al conjugado de interés (**6**) y al producto con dos unidades de 4,4'-bipiridinio (Figura 14). Para incrementar la proporción del derivado **6**, se trató lo que quedó sin reaccionar de resina **4** con 2.5 eq del derivado **3** en las mismas condiciones. El cromatograma de HPLC registrado muestra dos picos que, tras su identificación mediante espectrometría de masas, se comprobó que corresponde a los conjugados con dos y tres derivados de 4,4'-bipiridinio acoplados ( $t_R$  de 13.5 min) y otro donde mayoritariamente se observa el conjugado con dos derivados y minoritariamente el compuesto deseado **6** ( $t_R$  de 13.9 min) (Figura 15).



**Figura 14.** Cromatograma de HPLC correspondiente al crudo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_R$  de 13.5 min, correspondiente a una mezcla de **4**, **6** y conjugado con dos unidades de 4,4'-bipiridinio.



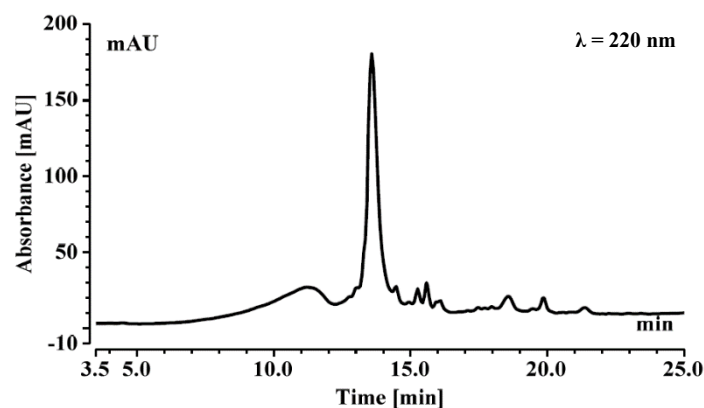
**Figura 15.** Cromatograma de HPLC correspondiente al crudo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_R$  de 13.5 min, correspondiente a una mezcla del conjugado con dos y tres unidades de 4,4'-bipiridinio, y otro pico a un  $t_R$  de 13.9 min, correspondiente a una mezcla del conjugado con dos unidades de 4,4'-bipiridinio y a **6**.

- **Pruebas en medio aprótico**

En vista de los resultados negativos obtenidos en medio prótico, se procedió a modificar la metodología utilizando DMF como disolvente aprótico polar más compatible con la metodología SPPS.

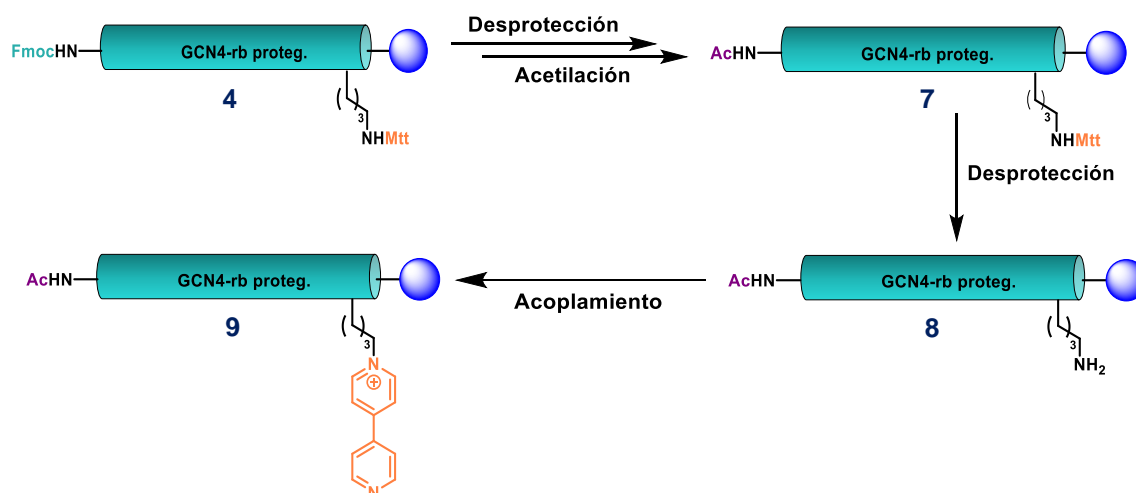
Se tomó una porción de **4** en un nuevo intento de acoplar **3** (3 eq) en una suspensión de la resina en DMF, con lavados pre-acoplamiento con 0.195 M DIEA/DMF, dejándose la reacción durante 90 min. El cromatograma de HPLC registrado muestra un único pico a un tiempo de retención de 13.7 min que, tras su identificación mediante espectrometría de masas, se corresponde a **6** (Figura 16).





**Figura 16.** Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_R$  de 13.7 min correspondiente a **6**.

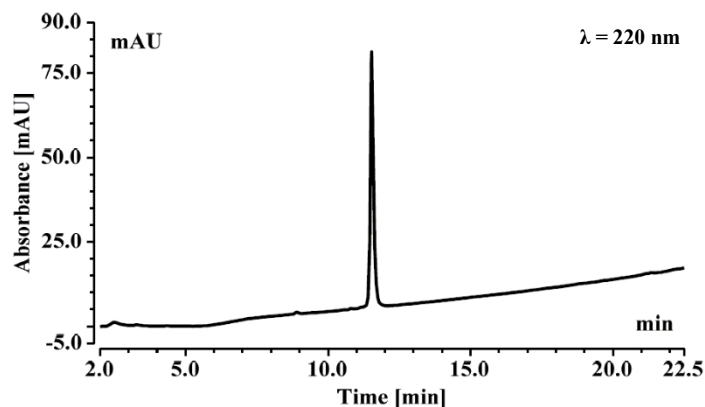
Para obtener suficiente cantidad de conjugado para los estudios posteriores, se tomó una mayor cantidad de **4** y se repitió el procedimiento optimizado. Sin embargo, tanto en este intento como en otros posteriores, se observó la formación de distintos conjugados, como aquel con tres derivados de 4,4'-bipiridinio acoplados, o mezclas de **6** y los conjugados con dos o tres derivados de 4,4'-bipiridinio acoplados.



**Esquema 7.** Esquema sintético modificado para la preparación del conjugado péptido-4,4'-bipiridinio (**6**).

En vista de los resultados, se decidió modificar la estrategia sintética (Esquema 7). Se tomó la cantidad restante de **4**, se eliminó el grupo temporal Fmoc del extremo *N*-terminal y se acetiló el grupo amino desprotegido. A continuación, se desprotegió el grupo Mtt, se realizaron lavados pre-acoplamiento con 0.04 M DIEA/DMF y llevó a cabo el acoplamiento con **3** (2.5 eq) en DMF anhidra, durante 90 min. El cromatograma de HPLC muestra un único pico a un  $t_R$  10.2 min que, tras su identificación por espectrometría de masas, se corresponde con con una proporción mayoritaria de **4** y minoritaria de **9**. A continuación, se repitió el procedimiento otras dos veces y se consiguió obtener **9** como

producto mayoritario. Posteriormente, se procedió a la desprotección y ruptura de la resina del conjugado, y purificación mediante HPLC semipreparativo en fase reversa (Figura 17). Las fracciones con el conjugado puro se liofilizaron, obteniéndose un sólido de color blanco (7.5 mg, 12%).



**Figura 17.** Cromatograma de HPLC correspondiente a la etapa de purificación, observándose un único pico a un  $t_R$  de 11.5 min correspondiente a **9**.

### ***3.5. Estudio de la interacción entre el dímero supramolecular del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio, inducido por la formación del complejo de inclusión entre 4,4'-bipiridinio y CB[8], con su ADN diana.***

Una vez sintetizado y purificado el conjugado **9**, se espera que, gracias a la capacidad de CB[8] para formar complejos de inclusión homodiméricos con el derivado de 4,4'-bipiridinio (tal y como se expuso en la Introducción), se pueda estudiar la interacción del dímero supramolecular resultante con el oligonucleótido de ADN diana. Para ello, se ha empleado el dicroísmo circular (DC), técnica espectroscópica basada en la medida de la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha por compuestos ópticamente activos, como lo es el ADN.<sup>30</sup>

Para este estudio, aunque se registró un amplio rango espectral (195-320 nm), la región correspondiente al UV lejano (por debajo de 250 nm), que engloba las transiciones electrónicas del enlace peptídico, es la que proporciona información sobre posibles estructuras secundarias (tales como hélices  $\alpha$  o láminas  $\beta$ ), cada una con su espectro de DC característico. En particular, el espectro de DC de las hélices  $\alpha$  se caracteriza por la presencia de dos bandas negativas: una a 208 nm y otra a 220 nm.

En este contexto, la clave de este estudio reside en el hecho de que el FT GCN4 solo presenta estructura de hélice  $\alpha$  en presencia del ADN diana cuando se encuentra como

30 Hammes, G. G.; Spectroscopy for the biological sciences. John Wiley & Sons: New Jersey, 2005.

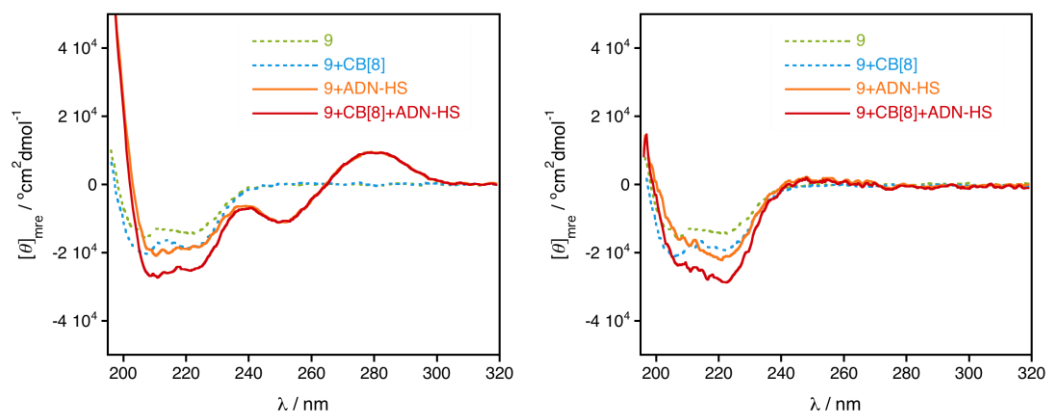
dímero, mientras que en su ausencia presenta una estructura desordenada, caracterizada por la presencia de una banda negativa intensa por debajo de 200 nm y, a veces, una banda positiva a 218 nm. Así, lo que se pretende observar es la aparición de alguna banda inducida que confirme, de forma cualitativa, la formación del dímero supramolecular en cuestión y también su interacción con el ADN. A mayores, también podría observarse algún cambio en la señal característica de DC de la doble hélice de ADN, debida a la distorsión de dicha hélice producida por la introducción del péptido en el surco mayor de la biomolécula.

Para ello, se realizaron dos experimentos de DC, en los cuales se registraron los espectros de DC de 6 disoluciones diferentes a 4 °C en disolución tampón (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.5, 100 mM NaCl): 3 de los precursores (7.5 μM **9**, 3.75 μM ADN y 3.75 μM CB[8]), 2 resultado de la combinación de **9** con CB[8] y con ADN (7.5 μM **9** + 3.75 μM CB[8], 7.5 μM **9** + 3.75 μM ADN) y una última resultado de la combinación de los tres (7.5 μM **9** + 3.75 μM CB[8] + 3.75 μM ADN). La diferencia entre estos dos experimentos es el empleo de dos oligonucleótidos distintos: el ADN-HS (“*Half-Site*”; 5’-CGCGTCATAATTGAGAGCGC-3’), que cuenta con un único sitio de interacción con el péptido (resaltado en negrita), y que servirá como control negativo, y el ATF/CREB (5’-ACGAGATGACGTCATCTCCA-3’), que presenta las dos regiones de unión específicas del dímero al ADN. Sabiendo que solo el conjugado (**9**) y el ADN son moléculas quirales, en los espectros registrados deberían aparecer las dos bandas características del ADN: una negativa a 258 nm y una positiva a 275 nm, y alguna asociada a algo de estructura de hélice  $\alpha$  que pueda tener **9**.

- **Experimento A** (con ADN-HS)

La Figura 18 muestra los espectros registrados de cuatro de las disoluciones empleadas, para observar que, aunque existen ligeras variaciones en la intensidad de las bandas de **9** en presencia de CB[8] y de **9** en presencia de ADN-HS, el espectro de la mezcla de los tres componentes no refleja ninguno de los cambios esperados en el caso de que se formase el dímero supramolecular y este interaccionase con el oligonucleótido. Un aspecto importante para sacar esta conclusión está relacionado con la intensidad de la banda asociada a la estructura de hélice  $\alpha$  de **9**; y es que se sabe que el valor de elipticidad

molar por residuo correspondiente para una estructura con el 100% de hélice  $\alpha$  varía entre  $-33000$  y  $-40000$   $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$ .<sup>31</sup> Aquí, el valor alcanza solo los  $-20000$   $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$ .

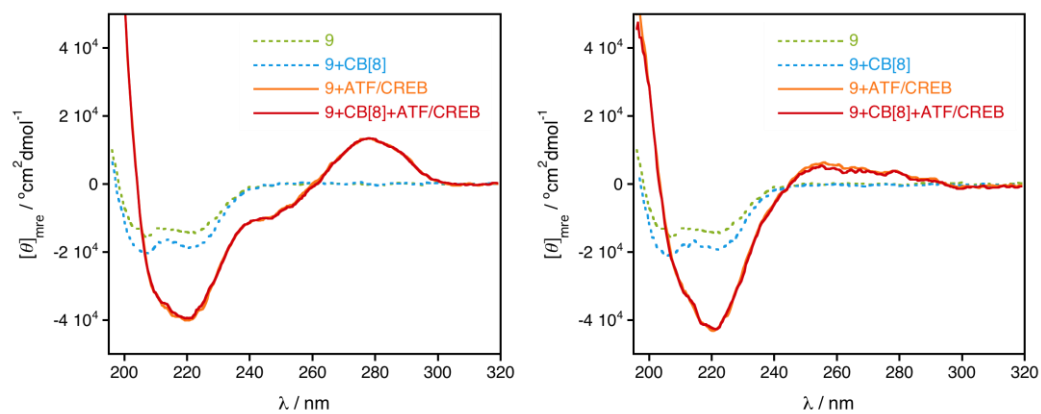


**Figura 18.** Espectros de DC empleando ADN-HS (izquierda). Espectros de DC empleando ADN-HS, pero restando la contribución del CB[8] y de ADN-HS, para observar únicamente la variación en la estructura de hélice  $\alpha$  de **9** (derecha).

- **Experimento B** (con ATF/CREB)

La Figura 19, al igual que en el experimento control, muestra los espectros de cuatro de las disoluciones empleadas. Sin embargo, en este caso se observa un comportamiento para nada esperado, y es que en presencia tanto de ATF/CREB solo como en presencia de CB[8] y ATF/CREB, se observa un valor de elipticidad molar por residuo de entorno a  $-40000$   $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$ , lo cual, de acuerdo con lo discutido anteriormente, implica un 100% de estructura de hélice  $\alpha$  del péptido. En vista de los resultados, parece que la presencia de CB[8] no es necesaria para la formación del dímero del conjugado **9** y su posterior interacción con el ADN, si no que la propia interacción con la biomolécula podría estar forzando la dimerización del sistema. Para obtener más información que corrobore estos resultados, se llevarán a cabo estudios complementarios de la interacción del sistema empleando otras técnicas como RMN, espectrometría de masas o electroforesis, entre otras.

31 (a) Chen, Y.-H.; Yang, J. T.; Chau, K. H. *Biochemistry* **1974**, *13*, 3350–3359. (b) Padmanabhan, S.; Marqusee, S.; Ridgeway, T.; Laue, T. M.; Baldwin, R. L. *Nature* **1990**, *344*, 268–270. (c) Luo, P.; Baldwin, R. L. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413–8421.



**Figura 19.** Espectros de DC empleando ATF/CREB (izquierda). Espectros de DC empleando ATF/CREB, pero restando la contribución del CB[8] y de ATF/CREB, para observar únicamente la variación en la estructura de hélice  $\alpha$  de **9** (derecha).



## 4. Parte experimental

### 4.1. General

Se emplearon reactivos comerciales sin purificación adicional. El agua empleada, de calidad Milli-Q, fue obtenida mediante un aparato Millipore Gradient A1.

Las reacciones en disolución se siguieron por cromatografía en capa fina, empleando cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254 y radiación ultravioleta (254 y 360 nm) como revelador.

La caracterización mediante RMN se realizó con un espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz para  $^1\text{H}$ ), y las muestras analizadas se prepararon en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), tomando como referencia la señal del disolvente protonado residual.

La síntesis de péptidos se realizó de forma manual, y los aminoácidos, los reactivos de acoplamiento y la resina provienen de las casas comerciales Iris Biotech GmbH y Sigma Aldrich. Los oligonucleótidos empleados provienen de la casa comercial Biomers.

Para la centrifugación de las muestras se utilizó una centrífuga no refrigerada Mini Sprout y la centrífuga refrigerada de alta velocidad de sobremesa Thermo Heraeus Biofuge.

Para los análisis y la purificación mediante HPLC-MS en fase reversa se empleó el espectrómetro Thermo Scientific UltiMate 3000 acoplado a un espectrómetro de cuadrupolo simple Thermo Scientific MSQ Plus con detector PDA (Photo-Diode Array). La detección se llevó a cabo a 220 y 280 nm, simultáneamente. Los espectros de masas del producto final fueron realizados en el equipo Thermo Scientific Accela acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Scientific LTQ-Orbitrap Discovery, proporcionado por el SAI (Servicios de Apoyo á Investigación). Para las inyecciones analíticas se utilizó una columna analítica Aeris 3.6  $\mu\text{m}$  PEPTIDE XB-C18 100 Å (150  $\times$  2.1 mm) de Phenomenex y para la purificación una semipreparativa Aeris 5  $\mu\text{m}$  PEPTIDE XB-C18 100 Å; 250  $\times$  10.0 mm de Phenomenex. El gradiente general empleado en ambas inyecciones fue de 10 $\rightarrow$ 95%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0.1% TFA /  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% TFA en 35 min.

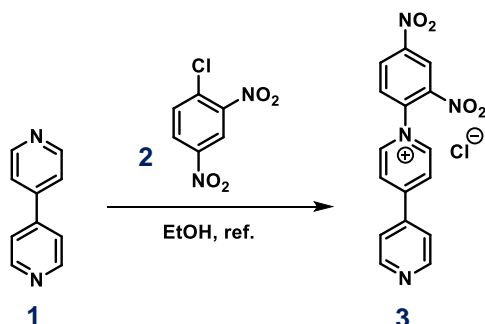
Para las liofilizaciones se empleó un liofilizador Telstar, Cryodos -80.

Los espectros de UV-Vis se registraron mediante un espectrómetro Jasco V-650 de doble haz, empleando una cubeta de cuarzo Hellma de 10 mm de paso óptico. Los espectros de DC se registraron en un espectrómetro Jasco J-185, empleando una cubeta Hellma (100-QS de 2 mm de paso óptico) a 4 °C y los siguientes parámetros de medida: rango de adquisición: 320-195 nm, ancho de banda: 1.0 nm, tiempo de respuesta: 0.25 s, acumulaciones: 4, velocidad: 100 nm/min y sensibilidad: 100 mdeg.

El tratamiento de datos se llevó a cabo mediante el programa KaleidaGraph (versión 4.1 de Synergy Software), mediante el cual también se suavizaron ligeramente los espectros para una mejor visualización.

Para las medidas de pH se empleó un pHmetro Hach Sension+ pH3.

#### 4.2. Síntesis del cloruro de *N*-(2,4-dinitrofenil)-4,4'-bipiridina (**3**)

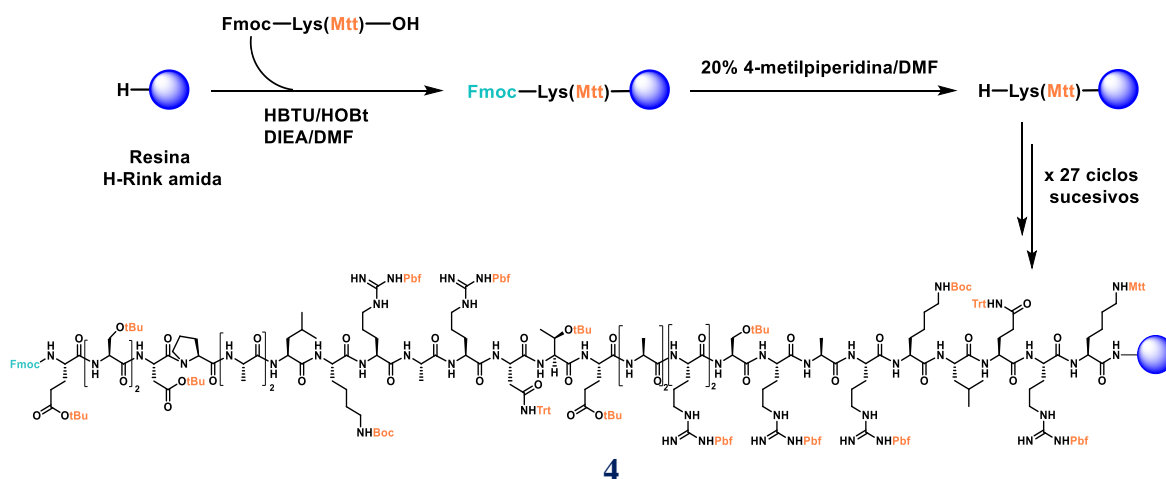


Una suspensión de 4,4'-bipiridina (**1**) (2.0104 g, 0.01287 mmol) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (**2**) (2.6076 g, 0.01287 mmol) en EtOH (20 mL) se calentó con agitación a 105 °C durante 20 h. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se precipitó en Et<sub>2</sub>O, obteniéndose un precipitado amarillo, que posteriormente se filtró a vacío y se lavó con 80 mL de AcOEt. El sólido resultante se redisolvió en la mínima cantidad de MeOH y se concentró a sequedad bajo presión reducida para obtener la sal deseada (**3**) como un sólido ocre (3.39 g, 74%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.44 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 9.28 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.98 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 8.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 8.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H).



### 4.3. Síntesis del péptido derivado de la región básica de GCN4 (4) y modificación con el derivado de 4,4'-bipiridinio (3) mediante la reacción de Zincke en fase sólida

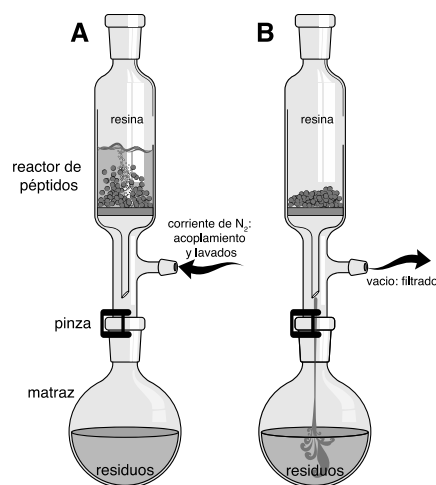
#### 4.3.1. Síntesis del derivado de GCN4-rb (4)



La secuencia peptídica Fmoc-ESSDPAALKRARNTAARRSRARKLQQRK-NH<sub>2</sub> se sintetizó manualmente en fase sólida, cuyos procedimientos generales se explican a continuación.

- **Montaje**

La síntesis se llevó a cabo utilizando un reactor como el que se muestra en la Figura 20, los disolventes se añaden por la parte superior del reactor. La resina se agita haciendo pasar una corriente de N<sub>2</sub> por el sistema y los disolventes y reactivos se eliminan por filtración a vacío.



**Figura 20.** Montaje para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

- **Reactivos y disolventes utilizados**

Las disoluciones utilizadas se prepararon al inicio de la síntesis.

**HBTU/HOBt/DMF:** Se mezclan 3.8 g de HBTU y 1.35 g de HOBt en 50 mL de DMF (concentraciones finales de la disolución 0.2 M HBTU, 0.2 M HOBt).

**DIEA/DMF:** 3 mL de DIEA en 90 mL de DMF (0.195 M DIEA).

- **Preparación de la resina**

Para la síntesis en fase sólida se utilizó como soporte sólido la resina H-Rink amide ChemMatrix con una carga de 0.47 mmol/g. El procedimiento seguido para preparar la resina antes de iniciar el proceso sintético es el siguiente:

- a) Añadir la resina al matraz de reacción (0.1 mmol) y lavarla con DCM ( $2 \times 5$  mL  $\times 5$  min).
- b) Comprobar que el test de TNBS es positivo.
- c) Lavar con DMF ( $2 \times 5$  mL  $\times 5$  min).

Completada la secuencia, la resina está lista para acoplar el primer aminoácido.

- **Proceso sintético**

*Acoplamiento:* Se disuelve el aminoácido correspondiente (0.4 mmol) en HBTU/HOBt/DMF (2 mL) y DIEA/DMF (3 mL) y, después de 2 min de activación, se añade la mezcla sobre la resina. La suspensión resultante se agita vigorosamente durante 30 min.

*Lavados:* Después de cada acoplamiento con DMF ( $2 \times 5$  mL  $\times 2$  min).

Una vez lavada la resina, se lleva a cabo el test TNBS para comprobar cómo ha ido el acoplamiento. Si es negativo, se puede proceder al siguiente aminoácido, en caso de dar positivo, se repite el acoplamiento.

*Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc):* Se lleva a cabo por tratamiento básico con 20% 4-metilpiperidina/DMF durante 15 min. A continuación, se lava la resina desprotegida con DMF ( $3 \times 5$  mL  $\times 2$  min).

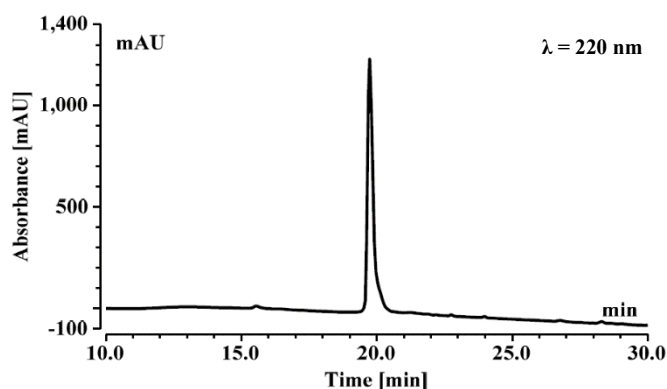
*Rotura de la unión del péptido con la resina y desprotección total:* Se lleva a cabo utilizando la siguiente mezcla: 950  $\mu$ L TFA, 25  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 25  $\mu$ L TIS / 30 mg resina.

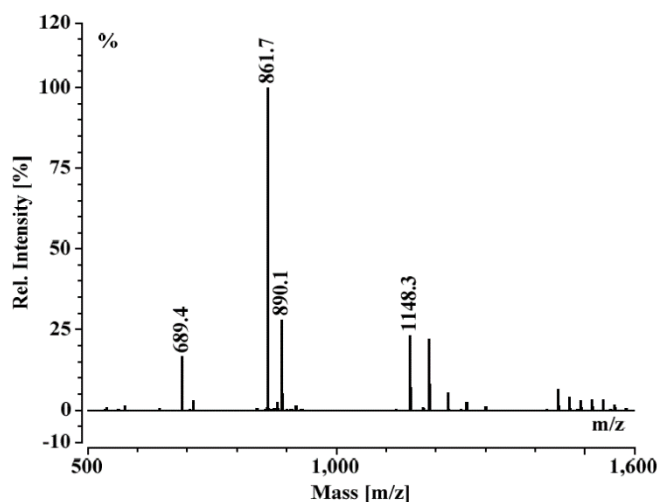
Las roturas se realizaron en atmósfera inerte de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 1) La resina (30 mg, peso seco) se sitúa en un vial Eppendorff. Se añade la mezcla de desprotección (1 mL) y la mezcla resultante se agita durante 2 h a ta.
- 2) La suspensión se filtra para separar la resina de la mezcla de desprotección y la resina separada se lava con 100  $\mu$ L de TFA.
- 3) Los filtrados combinados se añaden sobre Et<sub>2</sub>O (10 mL) a 0 °C.
- 4) La suspensión del péptido en Et<sub>2</sub>O se centrifuga a 6000 r.p.m. durante 5 min y se separa a continuación el líquido sobrenadante del sólido centrifugado.
- 5) El sólido obtenido se seca bajo una corriente de argon. El producto ya está listo para su análisis y purificación por HPLC.

Una vez sintetizada la secuencia peptídica completa, se llevó a cabo la desprotección y rotura del péptido de la resina, y el crudo resultante se analizó por HPLC-MS. El cromatograma de HPLC y el espectro de masas registrados confirman la obtención de **4** como único producto.

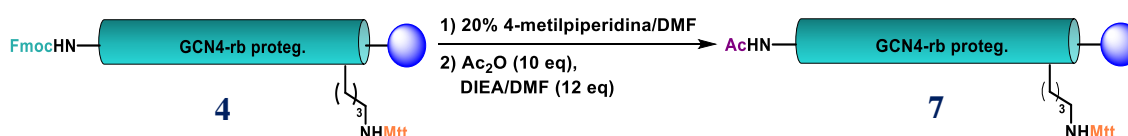
- $t_R=19.7$  min (columna Aeris 3.6  $\mu$ m PEPTIDE XB-C18; empleando un gradiente lineal 10 $\rightarrow$ 95% CH<sub>3</sub>CN, 0.1% TFA / H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA en 35 min).
- ESI-MS (m/z): [MH]<sup>+</sup> calculado para C<sub>146</sub>H<sub>247</sub>N<sub>55</sub>O<sub>42</sub>: 3443,9, encontrado: 1148.3 [MH<sub>3</sub>]<sup>3+</sup>, 1186.2 [MH<sub>2</sub>TFA]<sup>2+</sup>, 861.7 [MH<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>, 890.1 [MH<sub>3</sub>TFA]<sup>3+</sup>, 689.4 [MH<sub>5</sub>]<sup>5+</sup>.





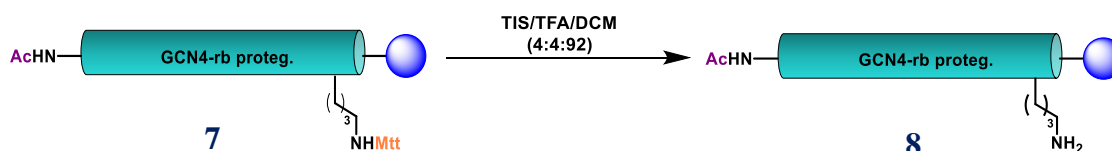
### 4.3.2. Acoplamiento del derivado de 4,4'-bipiridinio (3) en la cadena lateral de la Lys del derivado de GCN4.-rb (4)

#### 4.3.2.1. Desprotección del grupo temporal Fmoc (extremo N-terminal) y acetilación



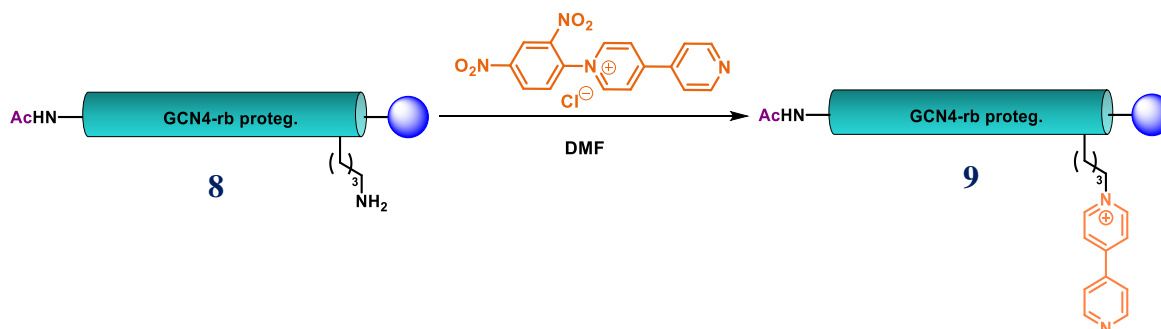
La resina **4** (161.2 mg, 0.02 mmol) se resuspendió con 20% 4-metilpiperidina en DMF y la mezcla se agitó durante 20 min. A continuación, se eliminó el disolvente por filtración y la resina se lavó con DMF ( $4 \times 5 \text{ mL} \times 3 \text{ min}$ ). A continuación, se preparó una disolución de  $\text{Ac}_2\text{O}$  (17,6  $\mu\text{L}$ , 10 eq) y 0.195 M DIEA/DMF (1.2 mL, 12 eq) y esta se añadió sobre la resina. La suspensión resultante se dejó reaccionar durante 30 min y a continuación se filtró, se lavó con DMF ( $3 \times 5 \text{ mL} \times 3 \text{ min}$ ) y DCM ( $2 \times 5 \text{ mL} \times 3 \text{ min}$ ) y se secó bajo corriente de  $\text{N}_2$ .

#### 4.3.2.2. Desprotección del grupo Mtt de la cadena lateral de la Lys



Una mezcla de TFA (200  $\mu\text{L}$ ), TIS (200  $\mu\text{L}$ ) y DCM (4600  $\mu\text{L}$ ) se añadió sobre la resina **7** ( $4 \times 1.5 \text{ mL} \times 10 \text{ min}$ ) y la mezcla se agitó mediante burbujeo con  $\text{N}_2$ . A continuación la resina se filtró y lavó con DCM ( $2 \times 5 \text{ mL} \times 5 \text{ min}$ ) y DMF ( $2 \times 5 \text{ mL} \times 5 \text{ min}$ ).

### 4.3.2.3. Acoplamiento del derivado de 4,4'-bipiridinio a la cadena lateral de la Lys

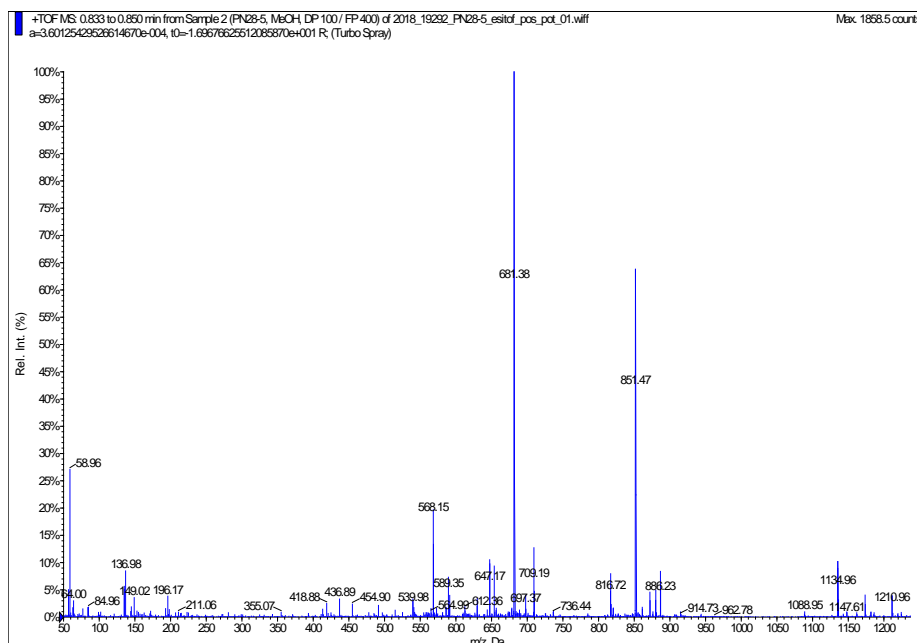
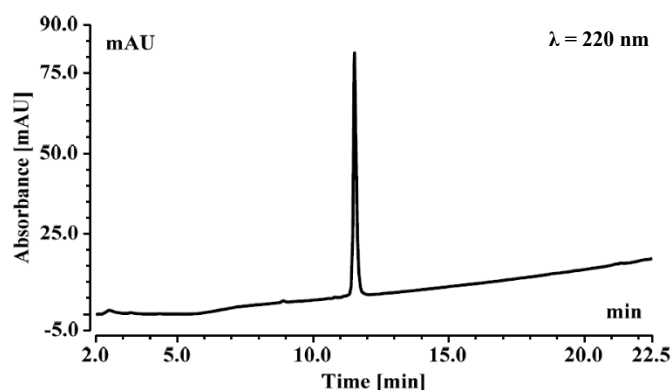


La resina **8** se lavó con 0.04 M DIEA/DMF ( $3 \times 2.5 \text{ mL} \times 3 \text{ min}$ ). A continuación, la resina se filtró, se resuspendió en DMF anhidra (5 mL) y se añadió el derivado **3** (16.7 mg, 0.047 mmol). La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación mecánica durante 1 hora y media, y luego se filtró y lavó con DMF ( $3 \times 5 \text{ mL} \times 4 \text{ min}$ ) y DCM ( $3 \times 5 \text{ mL} \times 4 \text{ min}$ ).

3-4 mg de la resina se trataron con 150  $\mu\text{L}$  de la mezcla de desprotección y rotura (2.5%, TIS, 2.5% H<sub>2</sub>O y 95% TFA) durante 90 min. La resina se filtró, el filtrado se añadió sobre Et<sub>2</sub>O a 0 °C (1.2 mL) y el precipitado obtenido se centrifugó durante 10 min. El residuo sólido obtenido se disolvió en 400  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O y se analizó por HPLC-MS. El cromatograma y el espectro de masas registrados para el crudo de desprotección/ruptura de la resina confirman la obtención de **9**, pero se observó también producto de partida (**4**), por lo que este procedimiento se repitió dos veces más, con 3 eq de **3** (19.4 mg, 0.054 mmol) de cada vez, hasta obtener mayoritariamente el producto deseado.

Tras confirmar que el derivado está acoplado al péptido, se procedió a la desprotección y ruptura de la resina del conjugado por tratamiento la mezcla de desprotección y rotura siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El sólido obtenido se redisolvió en 1 mL de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1 se purificó mediante HPLC semipreparativo en fase reversa. A continuación, las fracciones con el conjugado puro se liofilizaron, obteniéndose un sólido de color blanco (7.5 mg, 12%).

- $t_R = 11.5 \text{ min}$  (columna Aeris 5  $\mu\text{m}$  PEPTIDE XB-C18; gradiente lineal 10 $\rightarrow$ 45% CH<sub>3</sub>CN, 0.1% TFA / H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA en 35 min).
- ESI-MS (m/z): [MH]<sup>+</sup> calculado para C<sub>143</sub>H<sub>245</sub>N<sub>56</sub>O<sub>41</sub><sup>+</sup>: 3402,9, encontrado: 1148.3 [MH<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>, 1186.2 [MH+TFA]<sup>2+</sup>, 861.7 [MH<sub>3</sub>]<sup>4+</sup>, 890.1 [MH<sub>2</sub>TFA]<sup>3+</sup>, 689.4 [MH<sub>4</sub>]<sup>5+</sup>.



#### 4.4. Estudio de la interacción entre el dímero supramolecular del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio (9), inducido por la formación del complejo de inclusión entre la unidad de 4,4'-bipiridinio y CB[8], con su ADN diana.

Para las medidas de DC, se necesitaron las siguientes disoluciones:

- Disolución tampón 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5, 100 mM NaCl.

Se mezclaron 3 mL de una disolución 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5, y 3 mL de una disolución 1 M NaCl completando con H<sub>2</sub>O hasta 30 mL.

- Disoluciones stock de 9, CB[8], ADN-HS y ATF/CREB.

- Disolución stock 2.15 mM de 9.

Para preparar una disolución stock de 9 de concentración conocida, primero se determinó el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) de un análogo del derivado de 4,4'-bipiridinio, el hexafluorofosfato de *N*-metilbipiridinio, *N*-MB, mediante

espectroscopia UV-Vis, obteniéndose un valor de  $25225 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Posteriormente, se tomó 1 mL de la disolución tampón preparada, se añadieron alícuotas sucesivas de una disolución *stock* de **9** y se registraron los espectros de absorción correspondientes. Mediante la siguiente expresión, derivada de la ecuación de Lambert-Beer, se obtuvo un valor de 2.15 mM de **9**:

$$C = A \cdot \frac{V_{\text{disol.tampón}} + V_9}{\varepsilon \cdot \ell \cdot V_9} \quad (1)$$

Siendo:  $A$  la absorbancia de cada disolución,  $\varepsilon$  el coeficiente de extinción molar de **N-MB**,  $\ell$  el paso óptico de la cubeta (10 mm),  $V$  el volumen añadido de disolución tampón o de **9**, según corresponda, y  $C$  la concentración de la disolución *stock*.

- Disoluciones *stock* 50  $\mu\text{M}$  de CB[8] y 20  $\mu\text{M}$  **9** con exceso de CB[8]
- Disoluciones *stock* 200  $\mu\text{M}$  ADN-HS y 50  $\mu\text{M}$  ATF/CREB

Los oligonucleótidos (comprados como sólidos liofilizados) se disolvieron en agua Milli-Q y se midió su concentración mediante espectroscopia UV-Vis a 260 nm. Se midió dos veces la absorbancia y se calcularon las concentraciones de ambos oligonucleótidos empleando la ecuación de Lambert-Beer. Los coeficientes de extinción molar de cada cadena simple se calcularon mediante la ecuación **2**:

$$\varepsilon (260 \text{ nm}) = \{(8.8 \cdot \#T) + (7.3 \cdot \#C) + (11.7 \cdot \#G) + (15.4 \cdot \#A)\} \cdot 0.9 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (2)$$

Siendo #A, #T, #C, #G el número de cada tipo de base nitrogenada de la cadena de ADN considerada. Para hibridar los oligonucleótidos, se mezclaron las secuencias complementarias en concentraciones equimolares (200  $\mu\text{M}$  para ADN-HS y 50  $\mu\text{M}$  para ATF/CREB), se calentó a 90 °C durante 10 min y luego se dejó enfriar lentamente a  $t_a$  durante 2 h.

- Disoluciones de medida de los experimentos de DC

A partir de las disoluciones *stock*, se prepararon 400  $\mu\text{L}$  de cada disolución de medida de DC en disolución tampón:

- Disolución 7.5  $\mu\text{M}$  de **9**
- Disolución 3.75  $\mu\text{M}$  de CB[8]
- Disolución 3.75  $\mu\text{M}$  de ADN-HS
- Disolución 3.75  $\mu\text{M}$  de ATF/CREB:
- Disolución 7.5  $\mu\text{M}$  de **9** + 3.75  $\mu\text{M}$  de CB[8]
- Disolución 7.5  $\mu\text{M}$  de **9** + 3.75  $\mu\text{M}$  de ADN-HS
- Disolución 7.5  $\mu\text{M}$  de **9** + 3.75  $\mu\text{M}$  de ATF/CREB
- Disolución 7.5  $\mu\text{M}$  de **9** + 3.75  $\mu\text{M}$  de CB[8] + 3.75  $\mu\text{M}$  de ADN-HS
- Disolución 7.5  $\mu\text{M}$  de **9** + 3.75  $\mu\text{M}$  de CB[8] + 3.75  $\mu\text{M}$  de ATF/CREB





## Conclusiones

Según los resultados obtenidos, se han cumplido los siguientes objetivos establecidos para este trabajo de fin de máster:

1. Se sintetizaron y caracterizaron con éxito los dos precursores de la reacción de Zincke en fase sólida: el péptido GCN4-rb y el derivado de 4,4'-bipiridinio, este último con un rendimiento del 74%,
2. Se preparó satisfactoriamente el conjugado GCN4-br – 4,4'-bipiridinio mediante una nueva ruta sintética basada en la reacción de Zincke en fase sólida, obteniéndose como un sólido puro mediante purificación por HPLC en fase reversa.
3. Mediante la técnica de DC se ha podido confirmar, de forma cualitativa, la formación del dímero supramolecular y la interacción con su secuencia de ADN diana aunque, parece no ser necesaria la presencia del CB[8] para que esto se produzca.

Como trabajo futuro, se plantea la realización de estudios que complementen y corroboren esta información mediante técnicas como RMN, espectrometría de masas o electroforesis, entre otras.



## Conclusions

According to the reported results, the following objectives of this master's final project have been achieved:

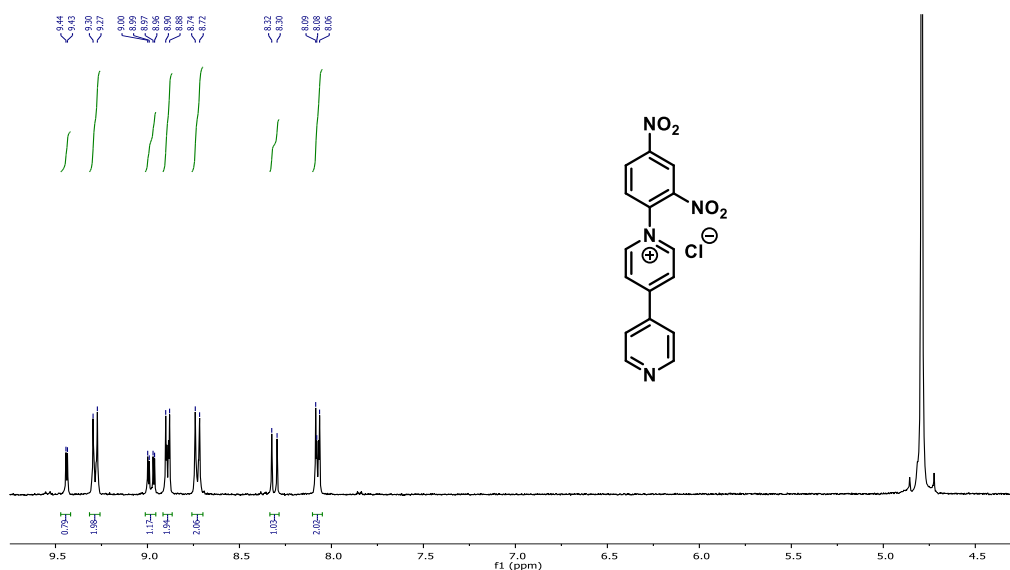
1. Both precursors of solid phase Zincke reaction were successfully synthesized and characterized: GCN4-br peptide derivative (**4**) and 4,4'-bipyridinium derivative, last one with 74% yield.
2. The GCN4-br – 4,4'-bipyridinium conjugate was satisfactorily prepared through a new synthetic route based in the solid phase Zincke reaction, leading a pure solid obtained by purification through reverse phase HPLC.
3. By means of circular dichroism technique, it was possible to confirm, in a qualitative way, the formation of a supramolecular dimer and the interaction with its target DNA sequence, even though it seems not to be necessary the presence of CB[8] for this process.

As future work, it is planned the accomplishment of new experiments for supporting and confirming this information by means of techniques such as NMR, mass spectrometry or electrophoresis, among others.



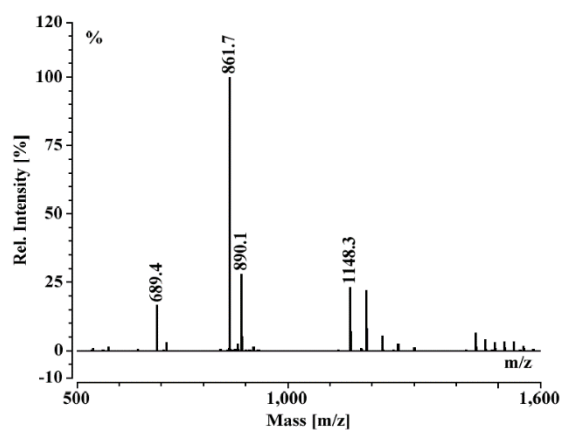
## 5. Anexo

### Pseudoviólógeno 1-(2,4-dinitrofenil)-[4,4'-bipiridin]-1-io (3)

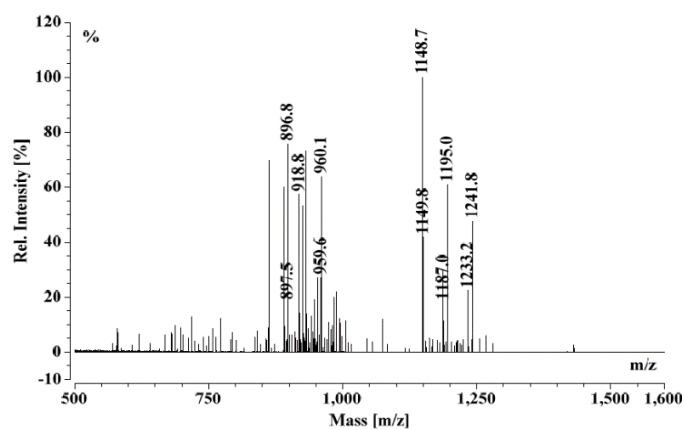


Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de 3.

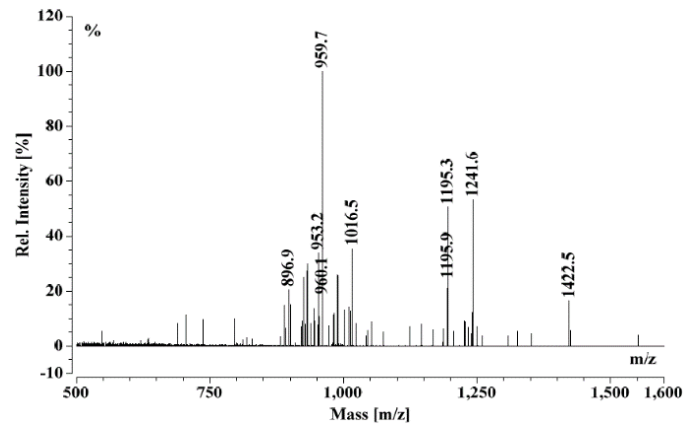
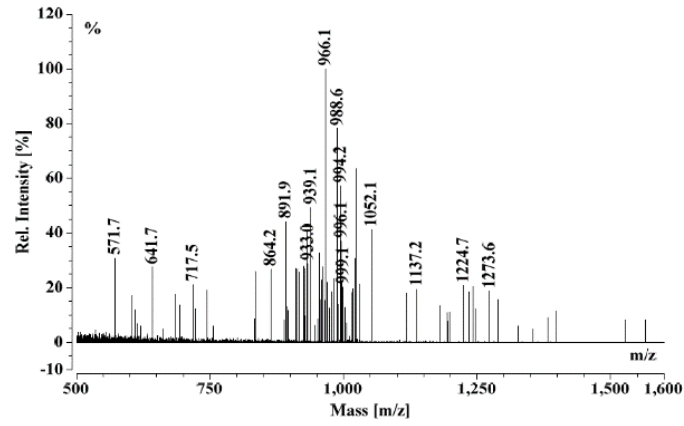
### Pruebas en medio prótico



Espectro de masas correspondiente al cromatograma de HPLC de la Figura 13.



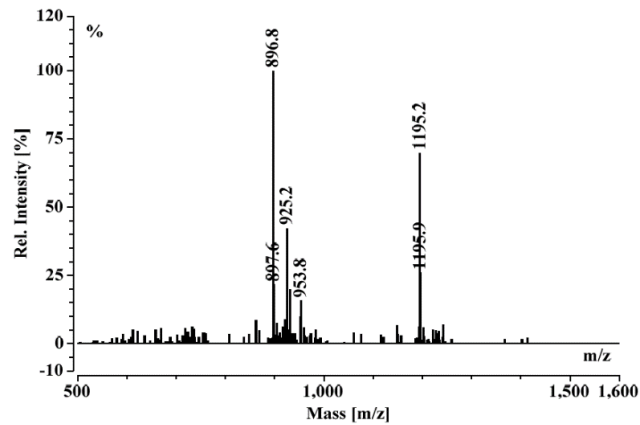
Espectro de masas correspondiente al cromatograma de HPLC de la Figura 14.



Espectros de masas correspondientes al cromatograma de HPLC de la Figura 15. (Arriba: correspondiente al pico cromatográfico a  $t_R$  de 13.5 min. Abajo: correspondiente al pico cromatográfico a  $t_R$  de 13.9 min).

## Pruebas en medio polar aprótico

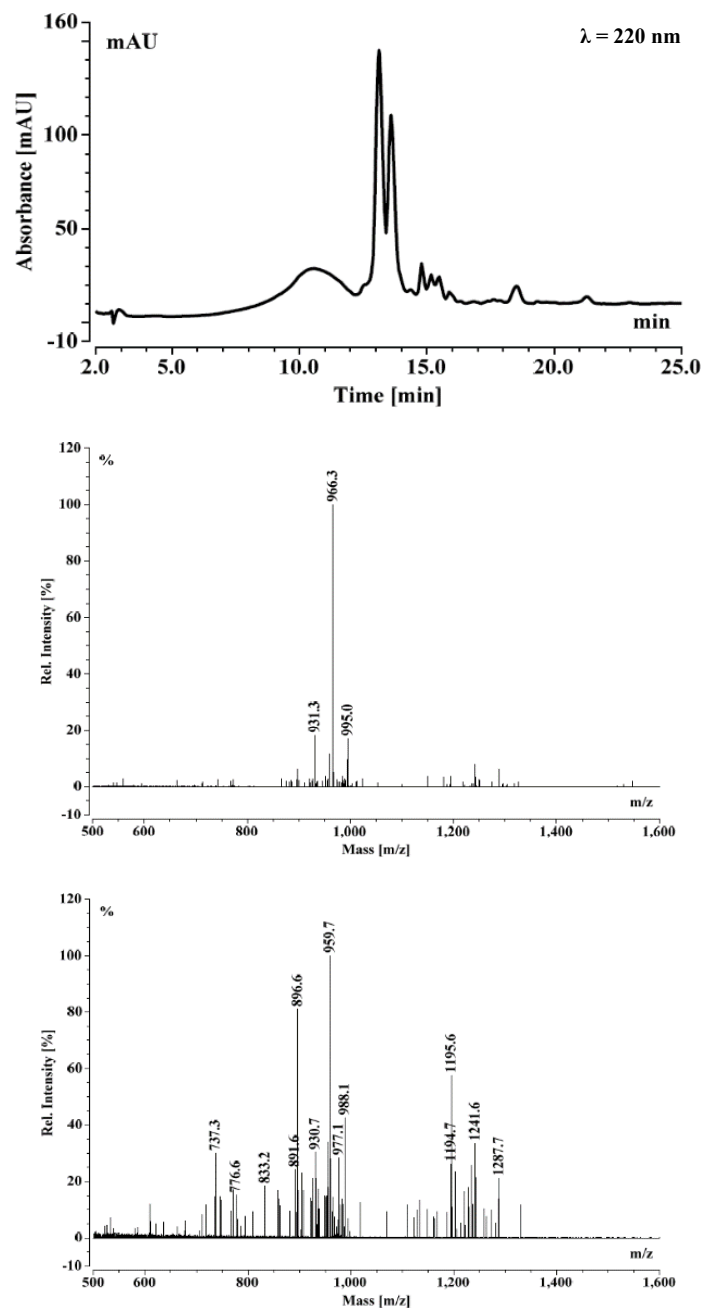
### Condiciones iniciales



Espectro de masas correspondiente al cromatograma de HPLC de la Figura 16.

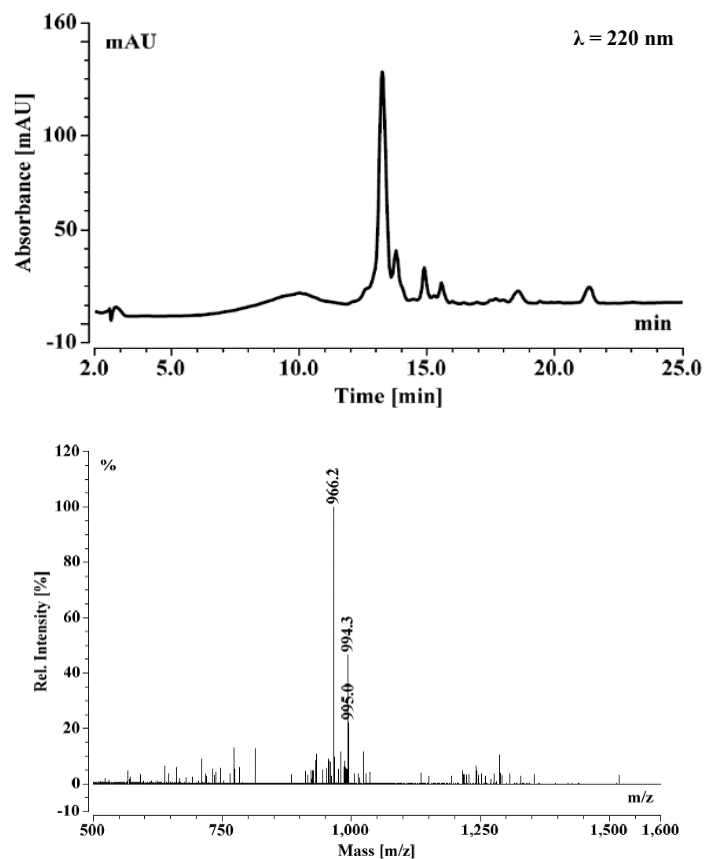
## Escalado de la reacción

- Primer intento



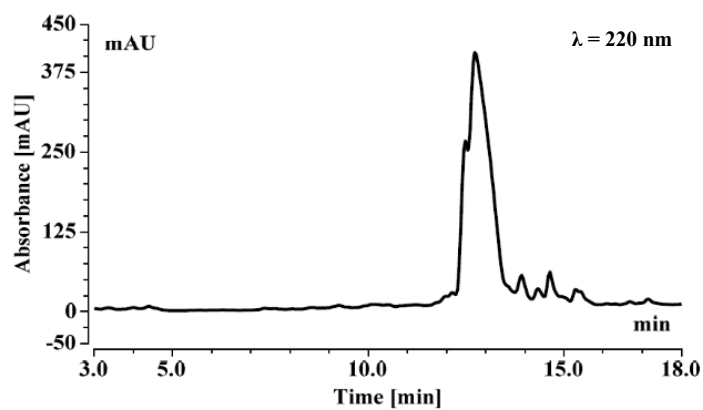
Cromatograma de HPLC (arriba) correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose dos picos, uno a un  $t_R$  de 13.3 min, correspondiente al conjugado con tres derivados acoplados y otro a 13.7 min, correspondiente a **9** y al conjugado con dos derivados acoplados, en vista de los espectros de masas registrados (abajo).

- Segundo intento

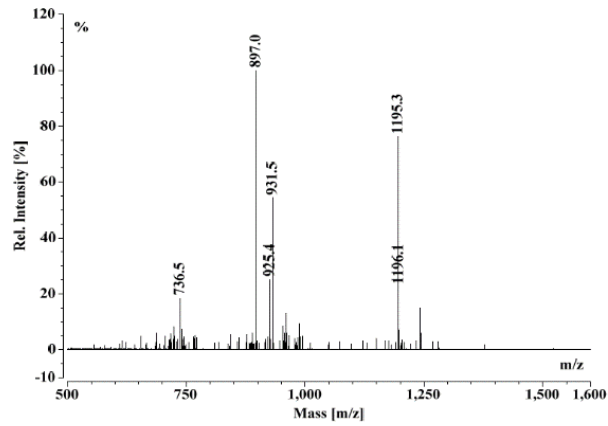


Cromatograma de HPLC (arriba) correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_r$  de 13.5 min correspondiente al conjugado con tres derivados acoplados, en vista del espectro de masas registrado (abajo).

- Tercer intento

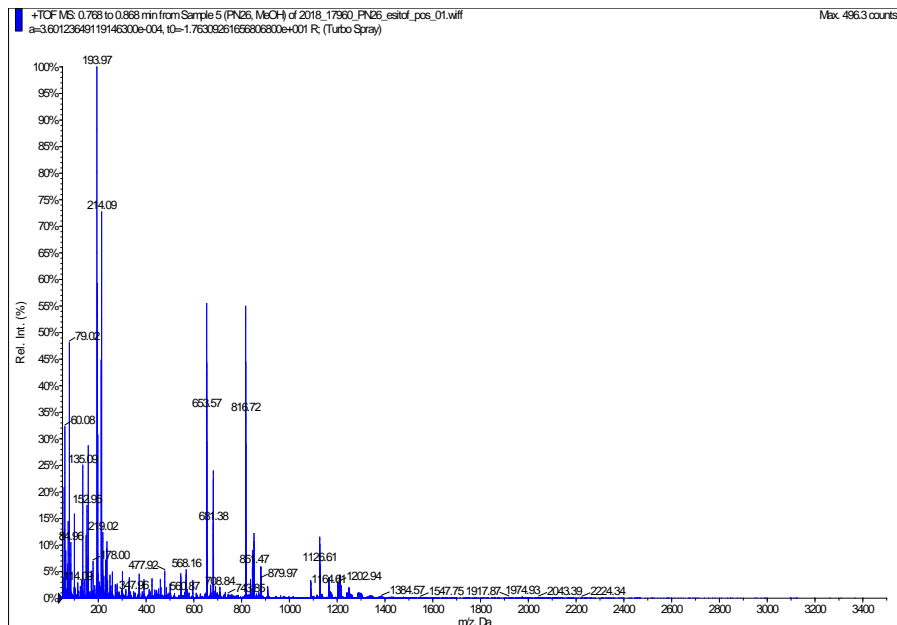
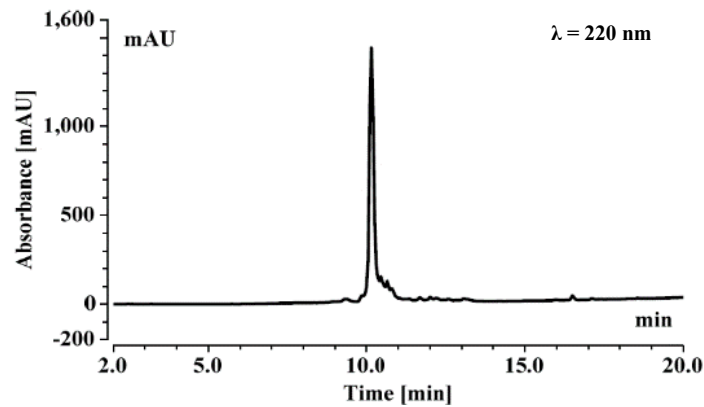




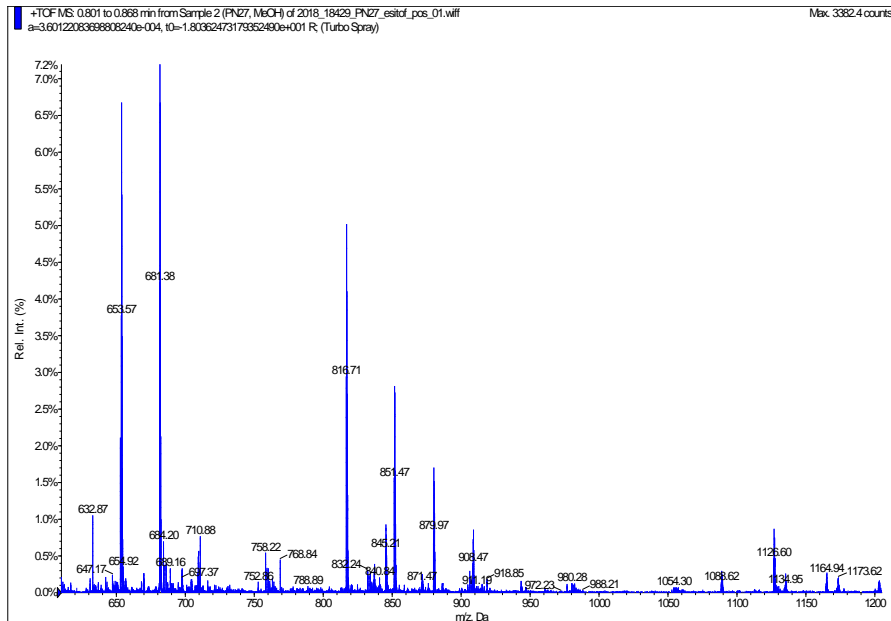
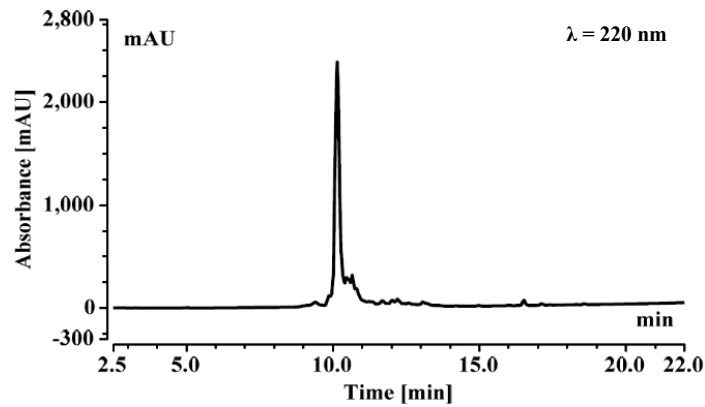


Cromatograma de HPLC (arriba) correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_R$  de 12.9 min correspondiente a una mezcla de **9** con el conjugado con dos derivados acoplados, en vista del espectro de masas registrado (abajo).

- **Cuarto intento**

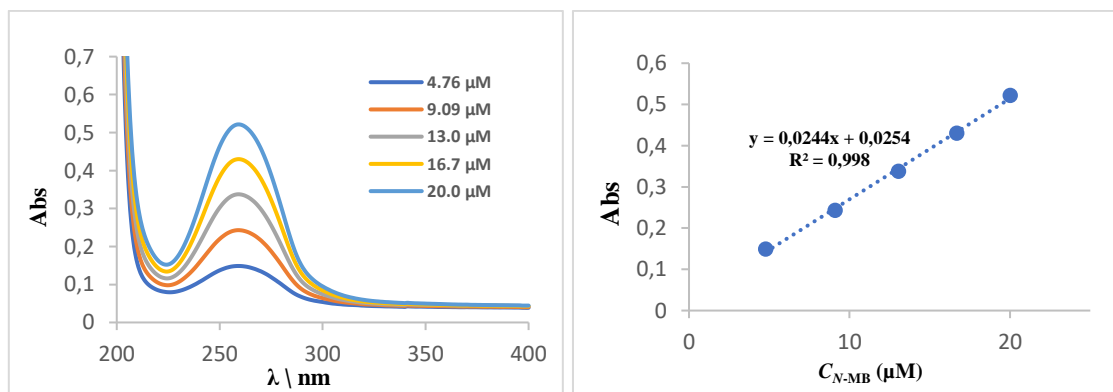


Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_R$  de 10.2 min, que se corresponde mayoritariamente al **4** y minoritariamente al **9**, en vista del espectro de masas registrado (derecha).



Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina, observándose un pico a un  $t_R$  de 10.2 min correspondiente a una mezcla casi equimolar de **9** y **4** (izquierda), en vista del espectro de masas registrado (derecha).

### Determinación del coeficiente de extinción molar del *N*-metilpiridinio (*N*-MB) (gráficas correspondientes a las medidas realizadas para una de las disoluciones).



**Figura 21.** Gráfica con los espectros UV-Vis solapados correspondientes a una de las disoluciones de concentración conocida de *N*-MB (izquierda). Gráfica de Lambert-Beer para el cálculo de  $\epsilon$ , empleando los valores de concentración en el máximo ( $\lambda=259$  nm) (derecha).