



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## Grao en Química

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Título 1** Preparación y estudio de complejos peptídicos supramoleculares.

**Título 2** Preparation and study of supramolecular peptide complexes.

**Título 3** Preparación e estudo de complexos peptídicos supramoleculares.

**Sonia Lamas Guerrero**

**Curso: 2021 - 2022.Convocatoria: Julio.**

*Director 1: Elena Pazos Chantrero*

*Director 2: Carlos Peinador Veira*



Facultade de Ciencias

Dra. Elena Pazos Chantrero Profesora/Contratada y el Dr. Carlos Peinador Veira Catedrático de Universidad, pertenecientes al Departamento de Química (Área de Química Orgánica) de la Facultad de ciencias de la universidade da Coruña.

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Preparación y estudio de complejos peptídicos supramoleculares”, fue realizado bajo su dirección por Dña. Sonia Lamas Guerrero en los laboratorios del Centro de Investigación Científicas Avanzadas (CICA) y, una vez finalizado, autorizan su presentación como Trabajo de Fin de Grado para optar al Título de Graduado en Química por la Universidade da coruña.

Y para que así conste firman el presente certificado en A Coruña 22 de Julio de 2022.

Dra. Elena Pazos Chantrero

Dr. Carlos Peinador Veira.

## AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer a mis tutores, Dra. Elena Pazos, D. Carlos Peinador Veira por darme la oportunidad de realizar este trabajo y de guiarme en todo momento, así como a Paula Novo y a Esteban Suárez por ayudarme en la parte experimental de este proyecto.

A parte, también, quiero dedicar este Proyecto Fin de Grado a mi familia y a Minia Rodríguez por el apoyo dado en toda esta etapa universitaria.

## ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y ACRÓNIMOS

**ADN:** ácido desoxiribonucleico

**(bZip):** región básica de cremalleras de leucinas (Basic zipper)

**(Co<sup>+</sup>):** Cobaltoceno

**CB[n]s:** Cucurbit[n]urilo

**CB[8]:** Cucurbit[8]urilo

**Cp:** Ciclopentadienil

**°C:** Grados Celsius

**DC:** Dicroísmo circular

**DMF:** Dimetilformamida

**DIEA:** Diisopropiletilamina

**Fmoc:** 9-fluorenilmetoxicarbonil

**FT:** factor de transcripción

**HBTU:** Hexafluorofosfato de (2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

**HPLC-MS:** Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas

**K<sub>dim</sub>:** Constante de dimerización

**MV<sup>2+</sup>:** dimetilviológeno

**MV:** Metilviológeno

**min:** minutos

**mL:** mililitro **mmol:** milimol

**m/z:** relación masa- carga

**μL:** microlitro

**μM:** micromolar

**nm:** nanómetros

**PBS:** Buffer fosfato Salino

**Phe:** Fenilalanina

**PDA:** Photo-Diode Array

**pV<sup>+</sup>:** *N*-monoalquil-4,4'-bipiridinio

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**Trp:** Triptófano

**TFA:** ácido trifluoroacético

**TNBS:** Ácido 2,4, 6-trinitrobenceno-sulfónico

**UV-VIS:** ultravioleta-visible

## RESUMEN.

Este trabajo se centra en la capacidad del **CB[8]** de formar complejos homo- y heteroternarios con distintos ligandos. Cuando se combina el **MV** (metilviológeno) con otros ligandos pueden obtenerse complejos sensibles a estímulos externos debido al potencial de reducción del **MV**. Teniendo esto en cuenta, se planteó la posibilidad de modificar un péptido con **MV** y un derivado de triptófano para comprobar si es posible formar el dímero supramolecular con **CB[8]** y poder controlar su agregación con estímulos externos.

De este modo, en este proyecto de fin de grado se realizó la síntesis de la región básica del factor de transcripción GCN4, **P1**, al que se le añadió un triptófano en el extremo *C-terminal*. Este derivado se caracterizó mediante HPLC, espectrometría de masas y UV-Vis.

A continuación, se estudió la formación de complejos supramoleculares con un conjugado viológeno-péptido, **P2**, y el receptor macrocíclico cucurbit[8]urilo mediante técnicas espectroscópicas como UV-Vis, fluorescencia y dicroísmo circular. Los datos obtenidos parecen indicar la formación de un complejo supramolecular **CB[8]- P2** 1:1, en lugar del complejo heteroternario 1:1:1 entre **CB[8]-P1-P2**.

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

## ABSTRACT:

This work focuses on the ability of **CB[8]** to form homo- and heteroternary complexes with different ligands. When **MV** (methylviologen) is combined with other ligands, complexes sensitive to external stimuli can be obtained due to the potential for reduction of MV. Bearing this in mind, the possibility of modifying a peptide with **MV** and a tryptophan derivative was considered to check if it is possible to form the supramolecular dimer with **CB[8]** and be able to control its aggregation with external stimuli.

Thus, in this end-of-grade project, the synthesis of the basic region of the transcription factor GCN4, **P1**, was carried out, to which a tryptophan was added at the C-terminal end. This derivative was characterized by HPLC, mass spectrometry and UV-Vis.

Next, the formation of supramolecular complexes with a viologen-peptide conjugate, **P2**, and the macrocyclic cucurbit[8]uril receptor was studied using spectroscopic techniques such as UV-Vis, fluorescence, and circular dichroism. The data obtained seem to indicate the formation of a 1:1 **CB[8]-P2** supramolecular complex, instead of the 1:1:1 heteroternary complex between **CB[8]-P1-P2**.

**Keywords:** supramolecular chemistry, peptides, cucurbituriles, solid-phase peptide synthesis, peptide-viologen conjugates.

## RESUMO:

Este traballo céntrase na capacidade do **CB[8]** para formar complexos homo- e heteroternarios con diferentes ligandos. Cando se combina **MV** (metilviolóxeno) con outros ligandos, pódense obter complexos sensibles a estímulos externos debido ao potencial de redución da **MV**. Tendo isto en conta, considerouse a posibilidade de modificar un péptido con **MV** e un derivado de triptófano para comprobar se é posible formar o dímero supramolecular con **CB[8]** e poder controlar a súa agregación con estímulos externos.

Así, neste proxecto de fin de grao levouse a cabo a síntese da rexión básica do factor de transcrición GCN4, **P1**, á que se lle engadiu un triptófano no extremo C-terminal. Este derivado caracterizouse por HPLC, espectrometría de masas e UV-Vis.

A continuación, estudouse a formación de complexos supramoleculares cun conxugado violóxeno-péptido, **P2**, e o receptor macrocíclico cucurbit[8]uril mediante técnicas espectroscópicas como UV-Vis, fluorescencia e dicroísmo circular. Os datos obtidos parecen indicar a formación dun complexo supramolecular **CB[8]-P2** 1:1, en lugar do complexo heteroternario 1:1:1 entre **CB[8]-P1-P2**.

**Palabras chave:** química supramolecular, péptidos, cucurbituriles, síntese de péptidos en fase sólida, conxugados péptido-violóxeno.

## ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.....	11
1.2. CUCURBITURILOS.....	13
1.3. PAR <b>CB[8]</b> - BIPYRIDINIO PARA CONTROLAR LA AGREGACIÓN PEPTÍDICA.....	16
1.4. COMPLEJO HETEROTERNARIO TRIPTOFANO- DIMETILVIOLÓGENO - <b>CB[8]</b> .....	18
2. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
3.1. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO <b>P1</b> .....	21
3.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE <b>P1</b> CON <b>CB[8]</b> MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS. ....	27
3.3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE <b>P1</b> CON <b>CB[8]</b> MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	28
3.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL <b>P2</b> CON EL <b>CB[8]</b> MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS. ....	29
3.5. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE <b>P1: P2</b> CON <b>CB[8]</b> MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE UV_VIS. ....	31
3.6. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA MEZCLA <b>P1, P2</b> Y <b>CB[8]</b> EN PRESENCIA DE ADN MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR. ....	34
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
4.1. GENERAL.....	37

4.2.	SÍNTESIS DE <b>P1</b> MEDIANTE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.	38
4.3.	VALORACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL <b>CB[8]</b> .....	42
4.4.	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO <b>P1</b> CON EL <b>CB[8]</b> MEDIANTE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS. ....	42
4.5.	ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL PÉPTIDO <b>P1</b> CON EL <b>CB[8]</b> CON LA TÉCNICA FLUORESCENCIA.....	43
4.6.	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO <b>P2</b> CON EL <b>CB[8]</b> MEDIANTE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS. ....	44
4.7.	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE <b>P1: P2</b> CON <b>CB[8]</b> CON UV-VIS.	44
4.8.	ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL PÉPTIDO <b>P1: P2</b> CON EL <b>CB[8]</b> CON LA TÉCNICA DC.....	45
5.	CONCLUSIONES .....	47
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	50

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.

La química supramolecular ha sido definida como la “*química de los ensamblajes moleculares y del enlace intermolecular*” (1) por Jean-Marie Lehn. Comprende el estudio de las interacciones no covalentes entre moléculas y dentro de complejos multimoleculares. En un principio, la Química Supramolecular se refería a la interacción no covalente entre un “receptor” y un “ligando”. Posteriormente, se incluyó también el proceso de auto-ensamblaje, en el cual varias moléculas se asocian de forma espontánea para generar estructuras más complejas por medio de la acción cooperativa de interacciones no covalentes. (2)

En un inicio, los sistemas supramoleculares sintéticos fueron estructuralmente simples. Después, nuevos conocimientos sobre las interacciones intermoleculares, los mecanismos de reconocimiento molecular y así como el conjunto de formas de moléculas que pueden autoensamblarse para formar un bloque supramolecular, hicieron posible la síntesis de arquitecturas multimoleculares que pueden diferir en forma, composición y funcionalidad en una amplia gama de condiciones en solución y estado sólido. (3)

Las especies supramoleculares presentan características bien definidas en términos de estructura, la forma en que sus componentes se distribuyen en el espacio, así como de la naturaleza de los enlaces intermoleculares. Estas características son las que permiten la unión de los componentes de estos complejos. (2)

Para que se establezca un complejo supramolecular es necesario un proceso de reconocimiento entre las moléculas, de tal manera, que ocurra selectivamente la unión de sus componentes.

El reconocimiento molecular y el autoensamblaje son procesos que suceden en la naturaleza de forma muy eficiente, por eso el gran desafío de esta área de investigación es lograr en el laboratorio la imitación del comportamiento de estas biomoléculas. (3) El autoensamblaje es generado espontáneamente entre las moléculas implicadas en las interacciones no covalentes, dando lugar a un agregado que se encuentra en equilibrio con sus componentes. (3) Un caso particular y más sencillo, es la unión receptor-ligando donde una molécula actúa como receptor, con un tamaño significativamente mayor que

tiene la capacidad de alojar en su interior a otra más pequeña (ligando). El receptor suele ser una macromolécula cíclica sintética que presenta una cavidad central de tamaño considerable. (3) El ligando por su parte es una molécula pequeña en donde se incluyen desde un catión metálico hasta hormonas o neurotransmisores. (3) Los sitios de unión no covalente entre la molécula receptora y su ligando dependen del tamaño, las geometrías y la presencia de grupos funcionales en las moléculas involucradas.

Para obtener el control deseado sobre estos complejos, se necesitan los llamados interruptores moleculares. Según Grzybowski et al. (4) estos dispositivos se pueden definir y clasificar como entidades capaces de cambiar reversiblemente su forma o propiedades en respuesta a un estímulo. Específicamente, el interruptor supramolecular se define como un dispositivo molecular compuesto por dos o más unidades autoensambladas, cuya asociación puede ser transitoriamente promovida o interrumpida por la aplicación de un estímulo externo, como la luz, el potencial eléctrico o efectores químicos. (5)

Los interruptores supramoleculares son intrínsecamente adecuados para realizar no solo aquellas tareas de control, sino también para otras funciones como las requeridas en procesos químicos, (6) receptores moleculares inteligentes y sensores (7) así como sistemas supramoleculares de administración de fármaco (8) catálisis controlable (9) y otros materiales complejos que responden a estímulos. Hoy en día, hay disponibles una variedad de macrociclos (macromoléculas cíclicas) sintéticos que pueden ser utilizados como receptores. Entre los más importantes se pueden citar los éteres corona, las ciclodextrinas, calixarenos, pilararenos y cucurbit[n]urilos (CB[n]). (10) Estos últimos, los CBs han sido considerados como muy atractivos debido a las múltiples posibilidades que ofrecen para trabajar en los sistemas receptor-ligando, así como por su nula toxicidad.

Los CBs son una de las familias de receptores supramoleculares más utilizadas y estudiadas para el reconocimiento de secuencias peptídicas, ya que tienen la capacidad de complejarse con los péptidos y poder modular la función de las proteínas, como se puede observar en la siguiente Figura 1.

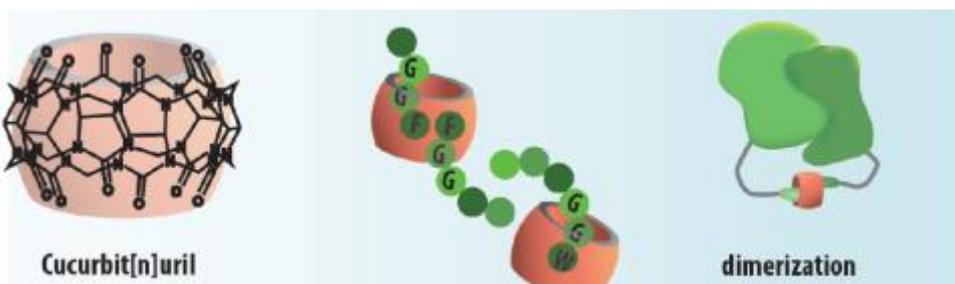


Figura 1: Estructura de CBs, con su estructura peptídica de reconocimiento y su dimerización.

## 1.2. CUCURBITURILOS

Cabe destacar, que en 1905 Behrend y sus colaboradores descubrieron que la condensación ácida entre el glicolurilo y el formaldehído daba como resultado un material cristalino blanco, soluble en agua capaz de formar complejos con sales metálicas y colorantes (Figura 2).

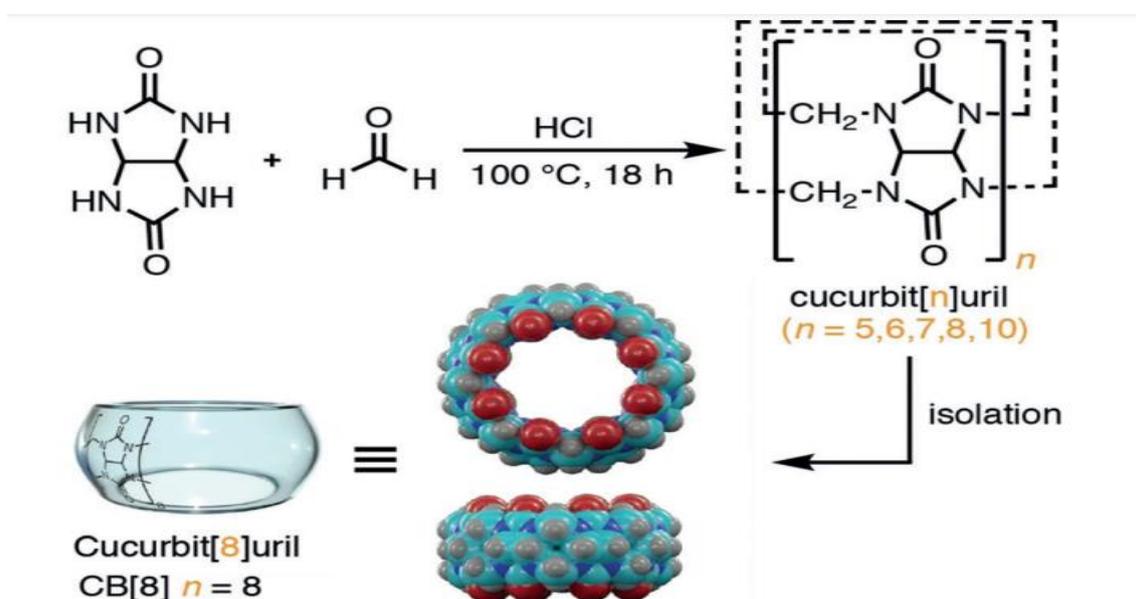


Figura 2: Síntesis del CB[8] mediante la condensación ácida entre el glicolurilo y el formaldehído.

Posteriormente en 1981, Mock describió la estructura de la familia de los cucurbiturilos como macrociclos formados por  $n$  unidades de glicolurilo unidas por  $2n$  puentes metileno. (11) Estos macrociclos presentan una cavidad hidrofóbica y 2 portales flanqueados por grupos carbonilo según se observa en la Figura 3.

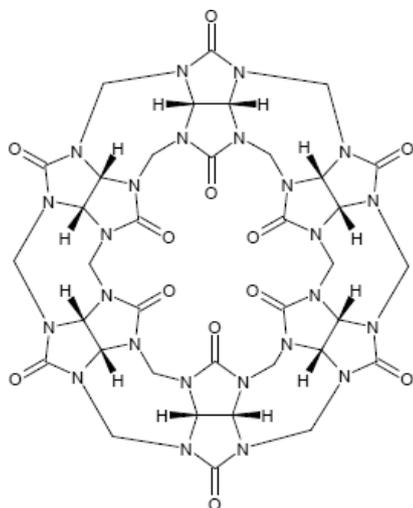


Figura 3: Representación de la molécula de **CB[6]**.

Como ya se nombró con anterioridad, los cucurbiturilos pueden ser utilizados como interruptores supramoleculares. Además, los **CB[n]** presentan algunas características óptimas para el desarrollo de potenciales aplicaciones, son muy poco reactivos, no son tóxicos y son adecuadamente solubles en medios acuosos. (5)

Los **CB[n]** actúan como receptores moleculares y son capaces de formar complejos de inclusión con ligandos orgánicos neutros o catiónicos mediante interacciones catión-dipolo, fuerzas hidrofóbicas y de optimizar los coeficientes de empaquetamiento del sustrato dentro del receptor.

En concreto, el cucurbit[8]urilo, **CB[8]**, debido al gran tamaño de su cavidad interna, tiene la capacidad de encapsular dos moléculas ligando que pueden ser iguales o diferentes y así, formar complejos homoternarios 1:2 o heteroternarios 1:1:1.

Por otra parte, las sales de *N*-monoalquil y *N,N'*-dialquil-4,4'-bipiridinio (pseudoviológenos y viológenos, se muestran sus estructuras en la Figura 4.

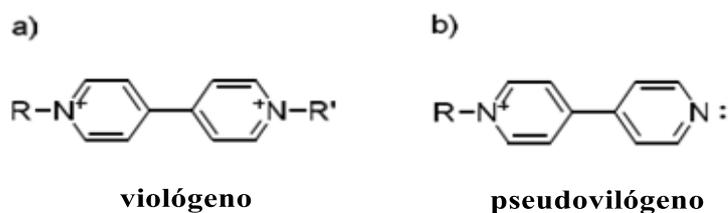


Figura 4: Estructuras del viológeno y pseudoviológeno.

Han demostrado ser magníficos interruptores supramoleculares en combinación con cucurbiturilos. Los derivados de viológeno presentan unas características óptimas como ligandos de **CB[8]**, debido a que los cationes del piridinio establecen interacciones ion-dipolo favorables con los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo mientras que su superficie aromática se “esconde” del medio acuoso en el interior del receptor(12)

Así por ejemplo, la fuerte unión de  $MV^{2+}$  con **CB[8]** es debida a la favorable interacción ion-dipolo. El receptor **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 homoternario 2:1  $(MV^+)_2 \subset CB[8]$  mediante la reducción monoeléctrica de la molécula de dimetilviológeno al catión radical correspondiente. Esto da lugar a un dímero estable del catión radical de metilviológeno  $(MV^+ \cdot)_2$  en la cavidad de **CB[8]** (12). De hecho, se ha demostrado que un complejo binario 1:1 entre el **CB[8]** y el dimetilviológeno ( $MV^{2+}$ ) ( $K_a = 1.1 \times 10^5 M^{-1}$ ) admite un segundo sustrato (hidroxinaftaleno) dando lugar a un agregado heteroternario 1:2 (**CB[8]**:( $MV^+ \cdot$ )<sub>2</sub>), como se muestra en la Figura 5.

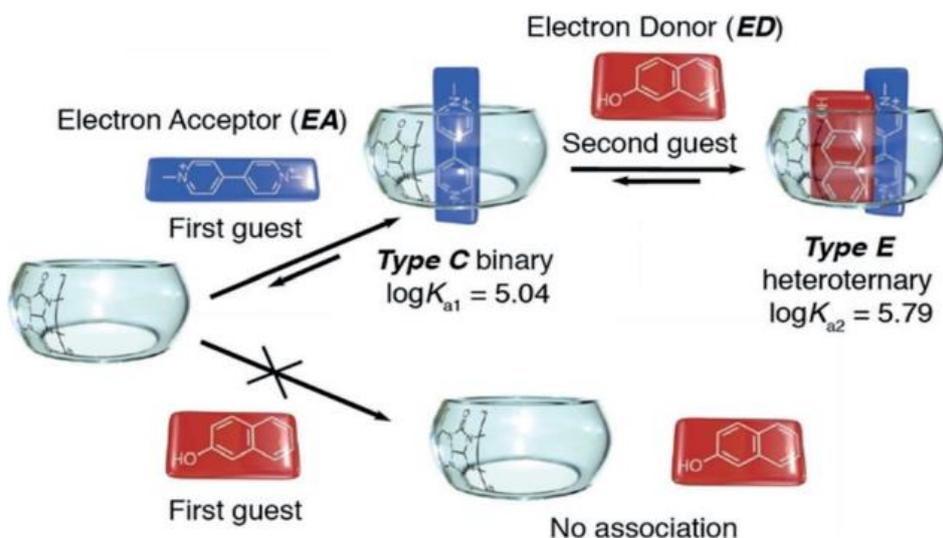


Figura 5: Esquema de autoensamblaje secuencial de un complejo heteroternario, mediante la formación inicial de un intermedio con un catión aromático basado en bipyridina como primer ligando.

También, se estimó que la constante de asociación aparente entre ligandos en presencia del **CB[8]** llegó a alcanzar un valor de  $K_{dim} = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , cinco veces mayor que sin el receptor, lo que explica la capacidad de **CB[8]** para proporcionar al dímero un ambiente hidrofóbico pero polarizado de forma apropiada. (13) De esta manera, la estequiometría de unión de este particular complejo receptor-ligando puede ser efectivamente controlado por la química redox del ligando. (13) La utilización de derivados de viológeno en combinación con **CB[8]** como receptores moleculares, constituye una estrategia útil para la preparación de interruptores supramoleculares, sistemas químicos dependientes de estímulos externos donde las propiedades redox del viológeno permiten el control reversible de la agregación de múltiples bloques de construcción. (14)

### 1.3. PAR **CB[8]**- BIPRIDINIO PARA CONTROLAR LA AGREGACIÓN PEPTÍDICA.

La conocida química receptor-sustrato del par **CB[8]**-viológeno permite la implementación del comportamiento dinámico en distintos sistemas químicos. El grupo QUIMOLMAT desarrolló recientemente un sistema que permite controlar la formación de un dímero supramolecular y su actividad biológica mediante estímulos externos. Para

ello, tuvieron en cuenta que el **CB[8]** puede formar complejos de inclusión 1:2 con una variedad de ligandos que pueden dar lugar a la oligomerización de péptidos en el extremo *C-terminal* (15). Esto es posible a través de la introducción de una unidad de *N*-monoalquil-4,4'-bipiridinio ( $pV^+$ ), que interactúa con el receptor macrocíclico produciendo agregados homodiméricos antiparalelos de **CB[8]**:( $pV^+$ )<sub>2</sub>. (15)

Se comprobó que la introducción de un derivado de 4,4'-bipiridinio en el extremo *C-terminal* de la región básica del factor de transcripción GCN4 (GCN4-rb-4,4'-bipiridinio) permite controlar la dimerización del conjugado, a través de la formación de un complejo supramolecular con **CB[8]**, como se puede observar en la ilustración 2.



*Figura 6: Representación del proceso de reconocimiento de ADN provocado por la formación del complejo de inclusión entre **CB[8]** y el conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio. (los cambios de color de naranja a verde representan la protonación del 4,4'-bipiridinio).*

Este dímero supramolecular preserva las propiedades de unión al ADN del factor de transcripción natural GCN4. Asimismo, la dimerización está inducida por **CB[8]** y, por tanto, la unión al ADN se puede interrumpir convenientemente de forma reversible mediante el desmontaje del complejo sustrato-sustrato del receptor, tras la adición de un ligando competidor específico. Por este motivo, la estrategia ofrece la posibilidad de diseñar nuevos complejos peptídicos para la formación de homodímeros que puedan implementarse en redes complejas basadas en proteínas. Además, podrían controlarse de manera reversible de una forma más sencilla mediante el uso de la química establecida receptor-ligando de **CB[8]**. Sin embargo, este sistema solo permite controlar la formación de homodímeros supramoleculares pero no de heterodímeros.

#### 1.4. COMPLEJO HETEROTERNARIO TRIPTOFANO- DIMETILVIOLÓGENO - CB[8].

Según se ha citado con anterioridad, el **CB[8]** es lo suficientemente grande como para promover la unión de dos ligandos formando un complejo heteroternario. Por ejemplo, un complejo heteroternario se forma a través de la unión secuencial de dos ligandos diferentes dentro de la cavidad del **CB[8]** y esto puede impulsar el autoensamblaje de copolímeros, hidrogeles, partículas y monocapas. (16)

El complejo **MV-CB[8]** puede complejar un segundo ligando rico en electrones como es el caso del triptófano (Trp). Además, esta unión de **CB[8]-MV<sup>+</sup>** a Trp se puede observar por ultravioleta visible, debido a la aparición de una banda de transferencia de carga.

Bush y Col estudiando los efectos de la carga electrostática en la unión de **CB[8]-MV** a un tripéptido que contiene un residuo de triptófano descubrieron que la carga positiva del grupo amonio es importante para la unión. Esto condujo al descubrimiento de que el complejo **CB[8]-MV** puede discriminar residuos *N*-terminal de *C*-terminal y residuos de Triptófano internos sobre la base de la carga electrostática (17) (Ilustración 3).

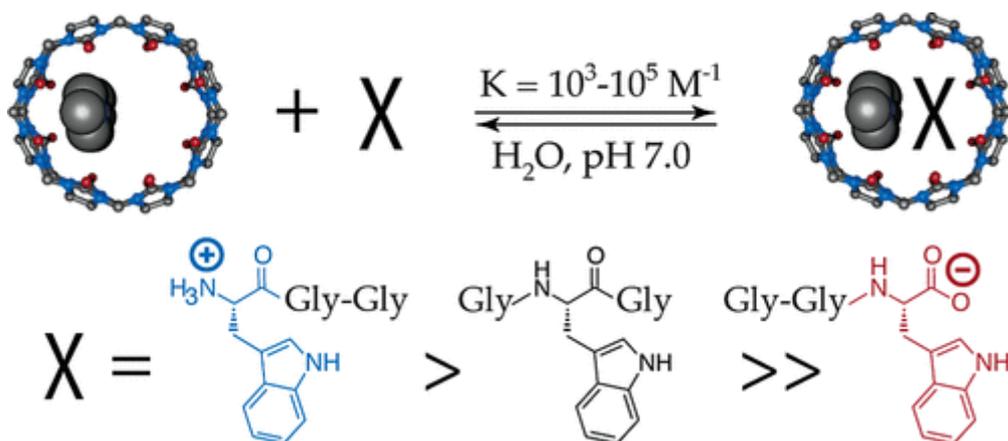


Figura 7: Reconocimiento del triptófano *N*-terminal en solución acuosa por parte del receptor sintético cucurbit[8]uril (**CB[8]**). (41)

De esta forma, Scherman *et al.* han publicado una estrategia de inmovilización selectiva para péptidos que tienen un triptófano en el extremo *N-terminal*, que actúa como dador de electrones y forma complejos con **CB[8]:MV<sup>2+</sup>**. Este enfoque se ha implementado con éxito para la separación de mezclas de péptidos mediante la inmovilización de péptidos diana sobre superficies, seguida de su liberación tras un estímulo electroquímico.

Sin embargo, no hay ejemplos en los que se utilice un Trp situado en el extremo de un péptido amida-*C-terminal* para formar heterodímeros supramoleculares en presencia de **CB[8]** y un conjugado viológeno-péptido.

## 2. OBJETIVO DEL TRABAJO.

El objetivo de este trabajo es controlar la agregación peptídica mediante la formación de complejos supramoleculares heteroternarios con el conjugado viológeno y el derivado de triptófano con el cucurbit[8]urilo.

Para ello, se estableció los siguientes objetivos específicos:

- Síntesis y caracterización de un derivado de la región básica del factor de transcripción GCN4, que incluya un residuo de triptófano en el extremo *C-terminal* (**P1**).

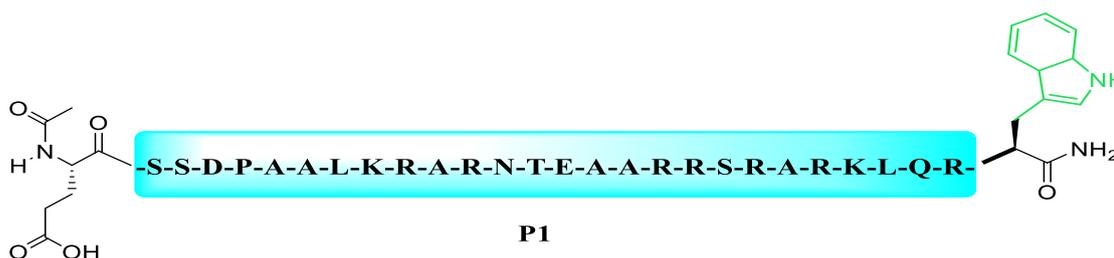


Figura 8: Estructura del derivado GCN4-rb (**P1**).

- Estudios de interacción entre el **P1** y **P2** (conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio previamente sintetizado en el grupo de investigación) con el **CB[8]** mediante distintas técnicas espectroscópicas. **P2** presenta una lisina en el extremo *C-terminal* conectada a una unidad de metilviológeno.

La secuencia peptídica del **P2** es la siguiente:

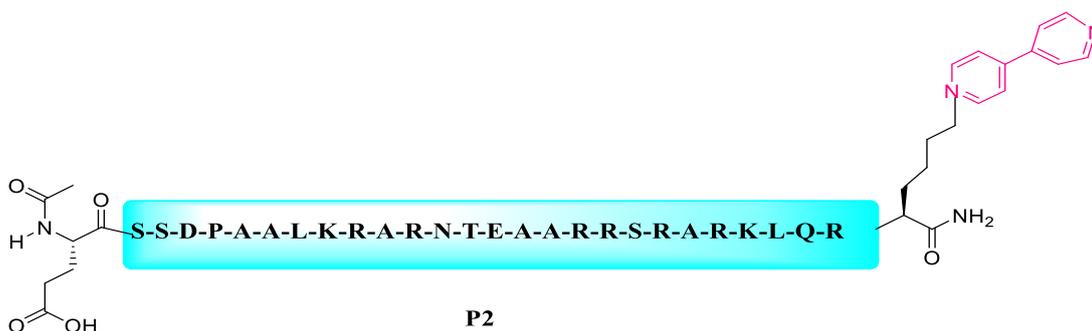


Figura 9: Estructura del conjugado GCN4-rb-4,4'-bipiridinio (**P2**).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 3.1. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO P1.



Figura 10: Esquema de la síntesis del **Fmoc-P1-R1**.

Para la síntesis del derivado **Fmoc-P1-R1**, se usó la técnica SPPS (síntesis de péptidos en fase sólida) siguiendo el esquema de Fmoc/t-Bu.

A través de esta técnica, el extremo del *C-terminal* de un péptido está anclado a un soporte polimérico sobre el que se adicionan consecutivamente los aminoácidos protegidos que constituyen su secuencia. De este modo, se forma un nuevo enlace peptídico en cada acoplamiento, este enlace tiene lugar entre el *N-terminal* del aminoácido que está unido a la resina y el *C-terminal* del nuevo aminoácido. Este proceso se divide en 4 etapas:

1. Desprotección del grupo amino terminal.
2. Lavado.
3. Acoplamiento del aminoácido debidamente protegido.
4. Lavado.

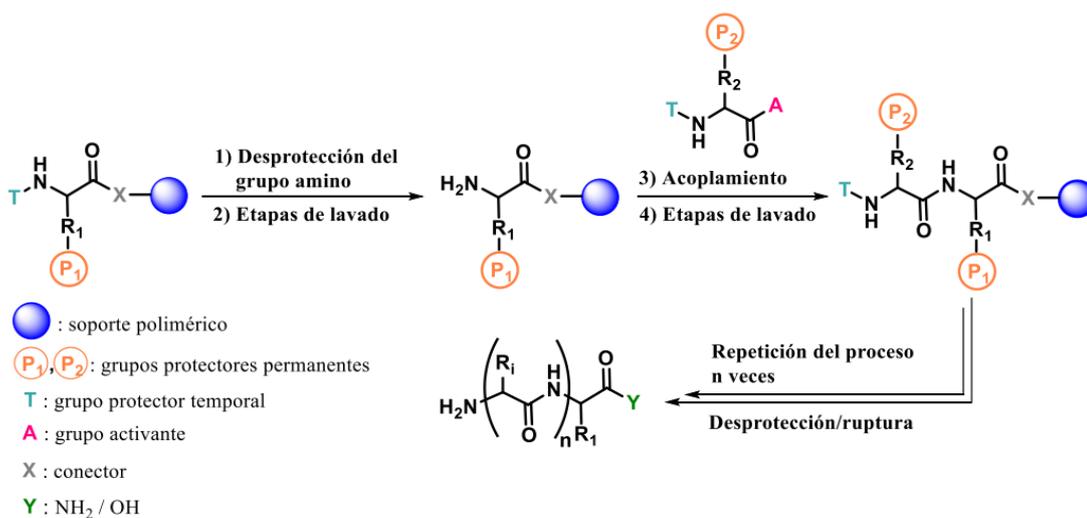


Figura 11: Esquema general de la metodología SPPS.

Se empleó como soporte sólido la resina H-Rink Amide ChemMatrix que contiene un grupo amina que al añadirle TFA produce la ruptura del enlace peptídico con la resina, formándose así un grupo amida en el extremo *C-terminal*.

Para realizar la síntesis del péptido, primero se deben preparar las disoluciones que dan lugar al acoplamiento de los aminoácidos (0.2 M HBTU/HOBt/DMF y 0.195 M DIEA/DMF) y para realizar el test TNBS (10% DIEA/DMF y 1% TNBS/DMF). Esta prueba es importante, ya que nos permite observar si hay aminas primarias en la resina y comprobar si se han realizado satisfactoriamente las etapas de acoplamiento y de desprotección. Al emplear estas disoluciones sobre la resina se puede observar que se pone de color rojo (Test positivo en nuestro caso). Esto, nos indica la formación de una sulfonamida por las aminas libres que están presentes en la resina como se observa en el Figura 12.

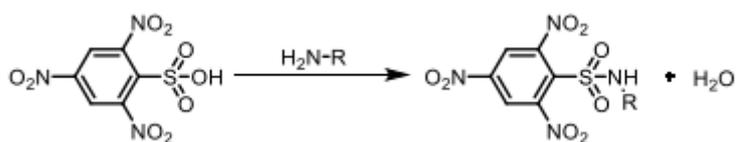


Figura 12: Formación de la sulfonamida en el test TNBS.

Por último, se acondicionó la resina para el proceso sintético (como se nombra en la parte experimental). Una vez acoplados los XX aminoácidos de la secuencia peptídica, se comprobó mediante HPLC que la síntesis del **Fmoc-P1-R1** se llevará a cabo satisfactoriamente. En el cromatograma de HPLC que se muestra en la Figura 13, hay un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 12.9 min, este pico fue identificado con el MS como el péptido **Fmoc-P1-R1** (Figura 14).

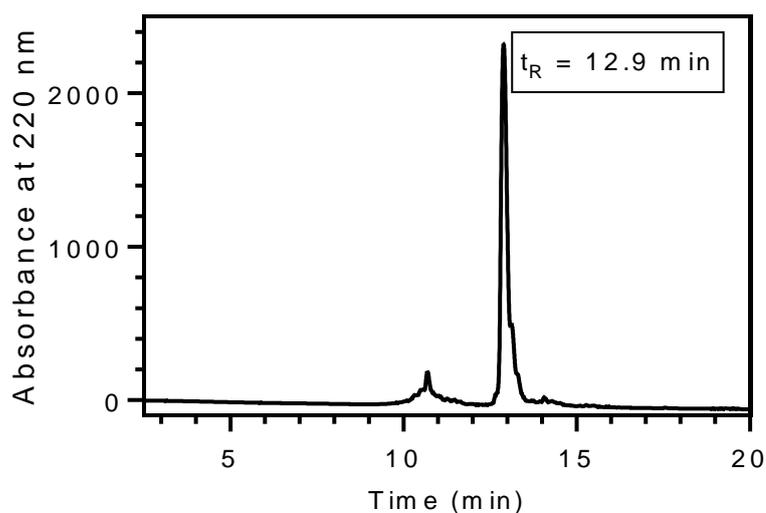


Figura 13 Cromatograma de HPLC correspondiente al crudo de desprotección y ruptura de la resina observado para el **Fmoc-PI-R1** como producto único a un tiempo de retención de 12.9 min

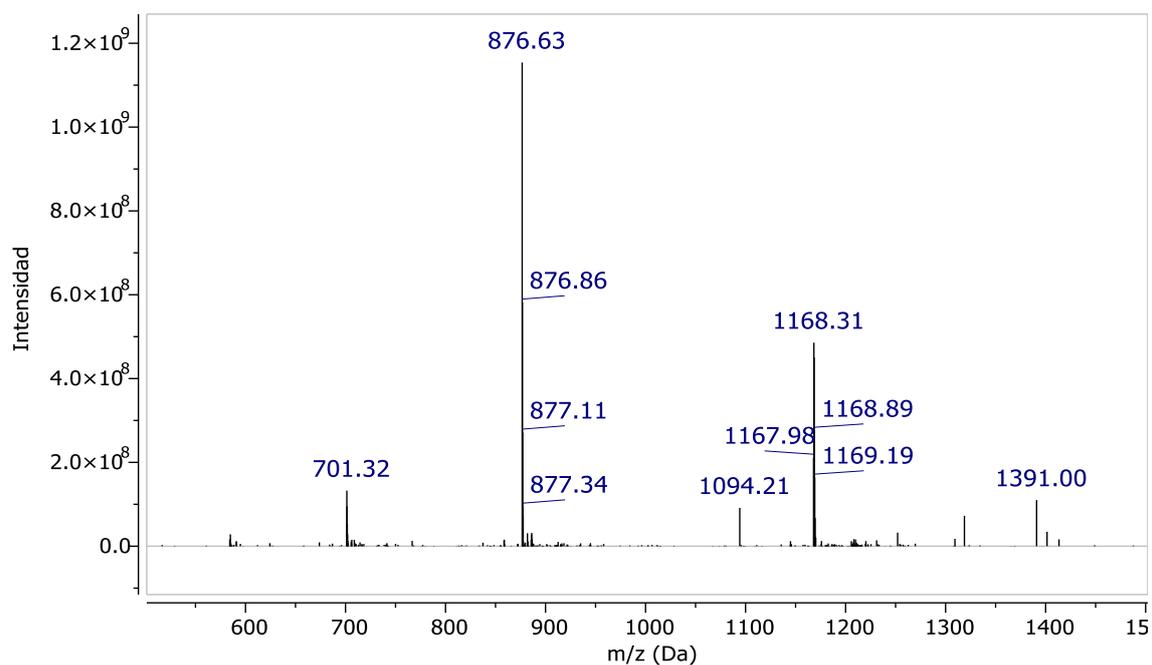


Figura 14: Espectro ESI-MS del pico del cromatograma de HPLC al tiempo de retención 12,9 min correspondiente a **Fmoc-PI-R1**.

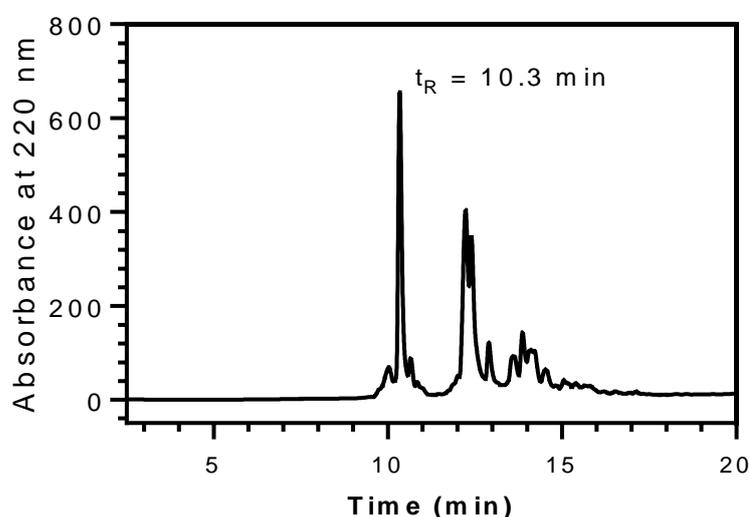
## DESPROTECCIÓN DEL GRUPO FMOC Y ACETILACIÓN DEL EXREMO *N*- TERMINAL



*Figura 15: Desprotección del grupo Fmoc y acetilación*

Para desproteger el grupo Fmoc del *extremo N-terminal* se trató el **Fmoc-P1-R1** con 4-metilpiperidina al 20% en DMF durante 15 minutos, el producto formado en esta reacción se acetiló con una mezcla de DIEA/DMF 0,195M para así obtener el **Ac-P1-R1**.

Una vez finalizado la acetilación del péptido se cogió una alícuota del **Ac-P1-R1** y se analizó el crudo por HPLC-MS. Como se puede ver en el cromatograma de HPLC (Figura 16) se observó que hay varios picos cromatográficos, pero hay un pico que aparece con mayor intensidad de absorbancia que los demás a un tiempo de retención de 10.3 minutos. Con ayuda del espectro de masas (Figura 17) se pudo confirmar que ese pico cromatográfico corresponde al péptido crudo de **Ac-P1-R1**.



*Figura 16: Cromatograma de HPLC observado para el Ac-P1-R1 como producto único a un tiempo de retención de 10.3 min.*

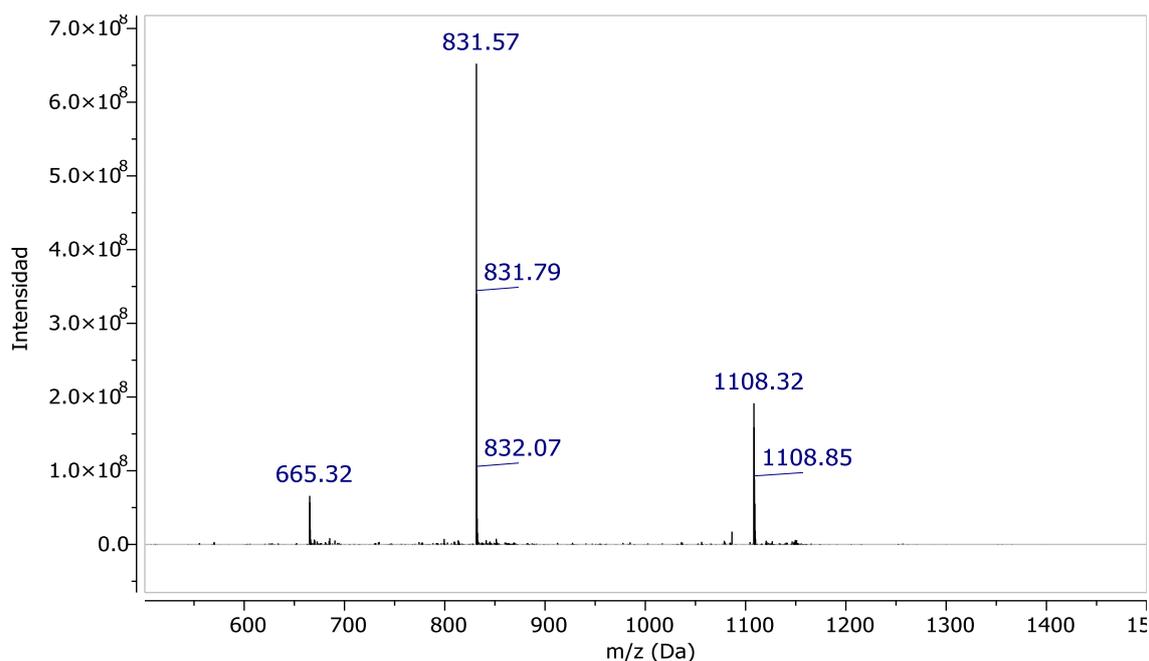


Figura 17: Espectro ESI-MS del pico del cromatograma de HPLC al tiempo de retención 10.3 min correspondiente a **Ac-P1-R1**.

### PURIFICACIÓN DEL P1

A continuación, se realizó la ruptura y desprotección de la resina de **P1** con una mezcla de (2,5:2,5:95) TIS:H<sub>2</sub>O: TFA. Se procedió a la purificación, a través del HPLC semipreparativo en fase reversa obteniéndose el siguiente cromatograma según se puede ver en la Figura 18, se obtiene un pico cromatográfico con un tiempo de retención de 10.4 min. Este pico se confirmó con el espectro de ESI-MS (Figura 19). Las fracciones del péptido **P1** puro se liofilizaron, obteniéndose (12,2 mg, 18%) un sólido blanco.

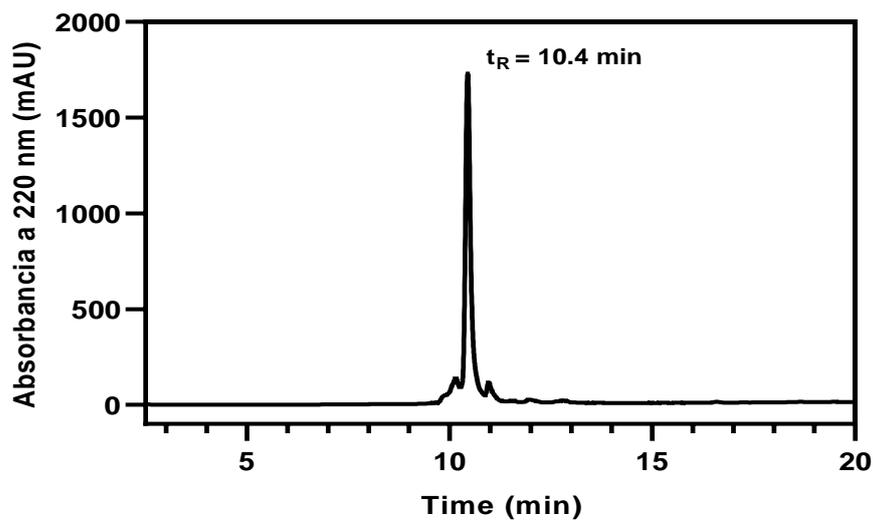


Figura 18: Cromatograma de HPLC correspondiente a la etapa de purificación, observándose un único pico a un  $t_R$  de 10.4 min correspondiente al péptido **P1**. Con gradiente lineal 5→95% MeCN, 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA).

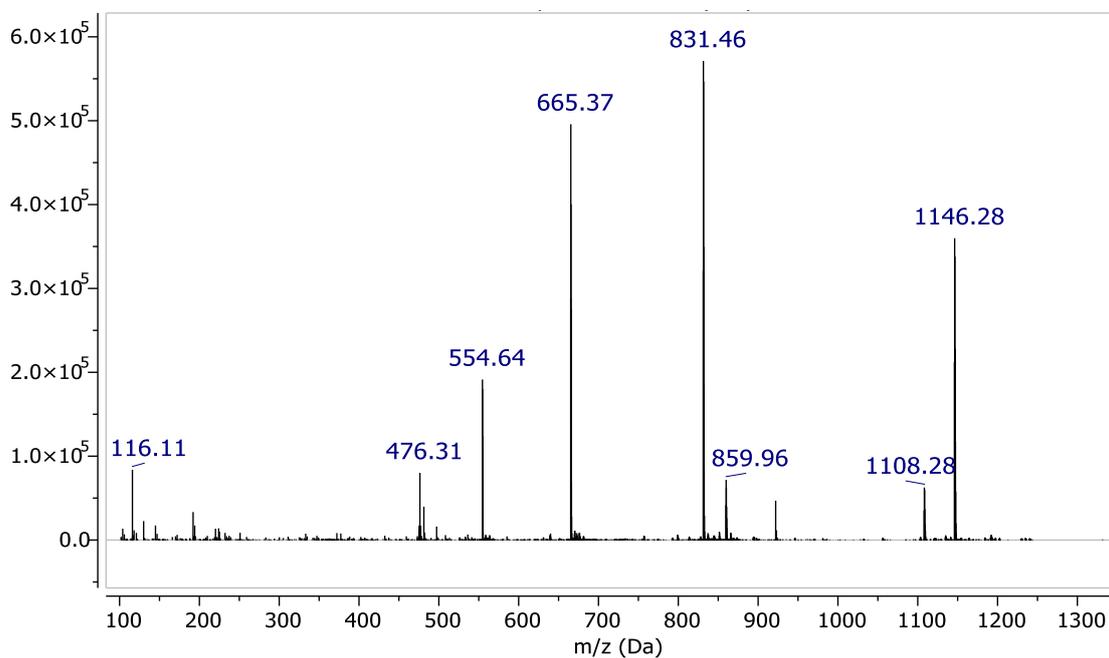


Figura 19: Espectro ESI-MS del pico del cromatograma de HPLC a los 10.4 min correspondiente al péptido puro **P1**.

### 3.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE **P1** CON **CB[8]** MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS.

Después de haber sintetizado y purificado el péptido **P1**, se estudió su interacción con el receptor **CB[8]** realizando una valoración de UV.

Para ello se registró el espectro de una disolución 35 $\mu$ M de **P1** en 10mM PBS, pH 7. A continuación, sobre esta, se añadieron alícuotas de una disolución 200  $\mu$ M de **CB[8]** en 35 $\mu$ M de **P1** y 10 mM PBS. En la figura 20, se observa que a medida que se va añadiendo la disolución de **CB[8]** disminuye la banda característica de absorción del Trp a 278 nm, lo que parece indicar que el **P1** y **CB[8]** están interaccionando.

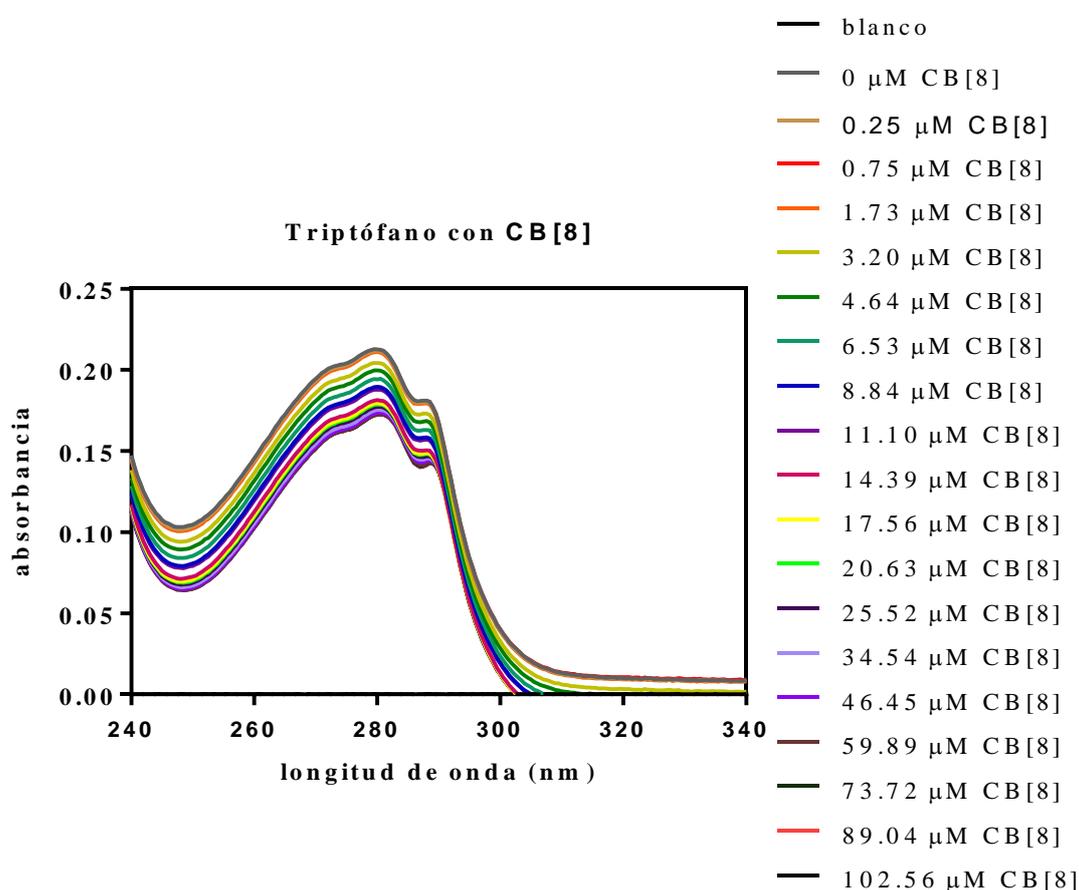


Figura 20: Valoración de UV de una disolución 35 $\mu$ M de **P1** en 10 mM PBS, pH 7 con concentraciones crecientes de **CB[8]**.

Los datos de la valoración se intentaron ajustar a un modelo de unión 1:1 (**P1:CB[8]**), pero no se ajustaron bien a este modelo. Sin embargo, sí que se ajustaron

cuando se probó un modelo 2:1 (**P1**<sub>2</sub>:**CB**[8]), como se observa en la Figura 21, pudiéndose estimar una constante de disociación para el complejo de  $36 \pm 49 \mu\text{M}$ .

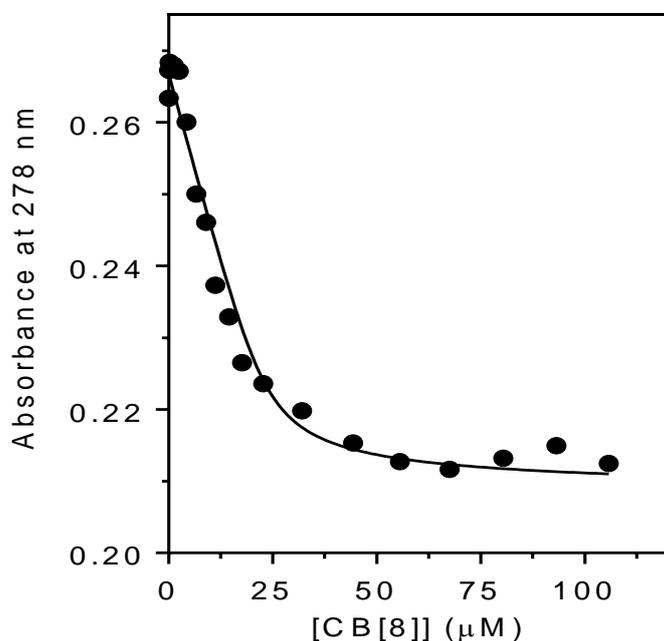


Figura 21: Representación de la absorbancia a 278nm de una disolución  $35\mu\text{M}$  de **P1** en  $10\text{ mM}$  PBS, pH 7 frente a la concentración de **CB**[8].



### 3.3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE **P1** CON **CB**[8] MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

A continuación, se realizó el estudio de fluorescencia del **P1** con el **CB**[8] utilizando el equipo de fluorescencia *FLUROMAX*.

Se realizó este estudio porque el triptófano es fluorescente, es decir, emite fluorescencia y este fenómeno tiene lugar cuando el triptófano está expuesto a los rayos de ultravioleta, ya que los electrones son excitados a estados de energía superiores por absorción y al descender a sus estados fundamentales emiten fluorescencia. Cuando el triptófano interacciona con el **CB**[8] cambia las propiedades del fluoróforo como los espectros de emisión. Por ello, se decidió estudiar la interacción mediante fluorescencia.

Para llevar a cabo esta valoración se registró primero el espectro de una disolución de 44  $\mu\text{M}$  de P1 en 10 mM PBS y después, se fue añadiendo alícuotas de una disolución de 200  $\mu\text{M}$  de CB[8] en 35  $\mu\text{M}$  de P1 y 10 mM PBS.

En la Figura 22, se observa que a medida que se va adicionando CB[8] va aumentando la banda específica de emisión del Trp a 361,4 nm, esto podría deberse al exceso de CB[8] y la formación del complejo homoternario 2:1

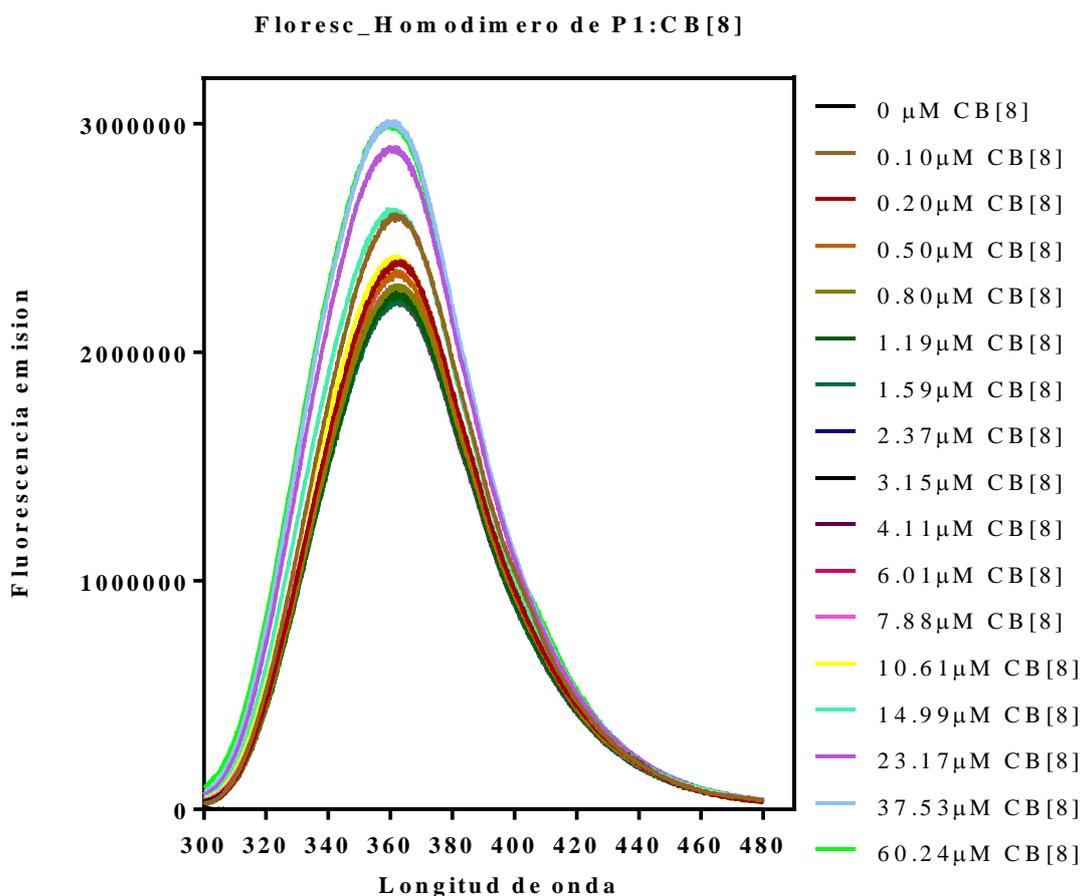


Figura 22: Valoración por fluorescencia del triptófano con el CB[8].

### 3.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL P2 CON EL CB[8] MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS.

Para el estudio de la interacción del CB[8] con el P2, se empezó con el registro del punto 0 de la valoración con una disolución base que contiene 15  $\mu\text{M}$  de P2 en 10 mM PBS a pH 7, después, se fueron añadiendo sobre ella alícuotas de una disolución de 200  $\mu\text{M}$  de CB[8] en la disolución base.

En los espectros obtenidos (Figura 23) se observó que según se van adicionando las alícuotas del **CB[8]** van disminuyendo las bandas características de absorbancia del dimetilviológeno a 262 nm, hasta la concentración de 52.26  $\mu\text{M}$  de **CB[8]**, donde deja de disminuir las bandas. Esto nos indica que el **P2** ya no está interaccionando con el **CB[8]**.

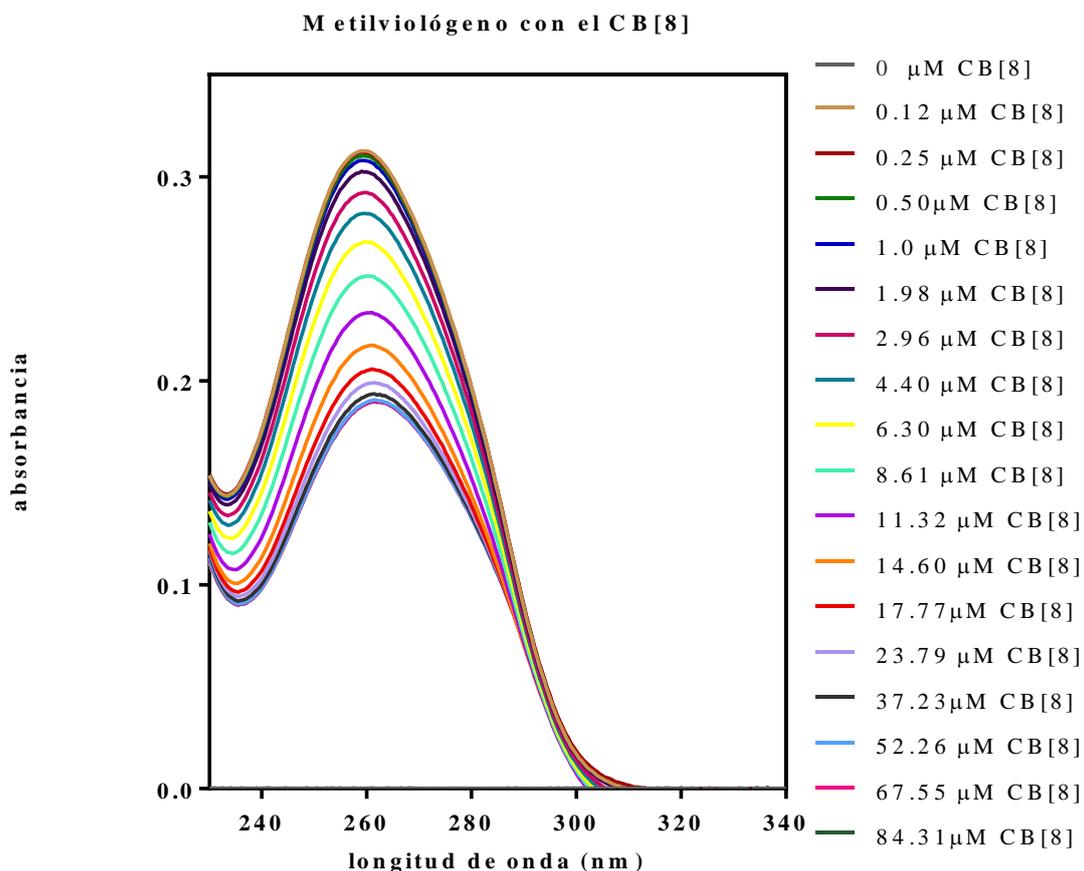
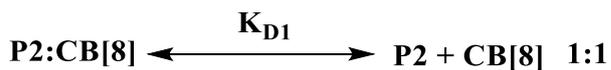


Figura 23: Espectros de UV-Vis de la valoración del complejo **P2-CB[8]**.

El resultado del ajuste se observa en la siguiente Figura 24, en la cual se representa la absorbancia frente a la concentración de **CB[8]**. Se observó que la valoración del **P2** con el **CB[8]** se ajusta a un modelo 1:1 con una constante  $Kd \approx 740 \pm 160$  nM.



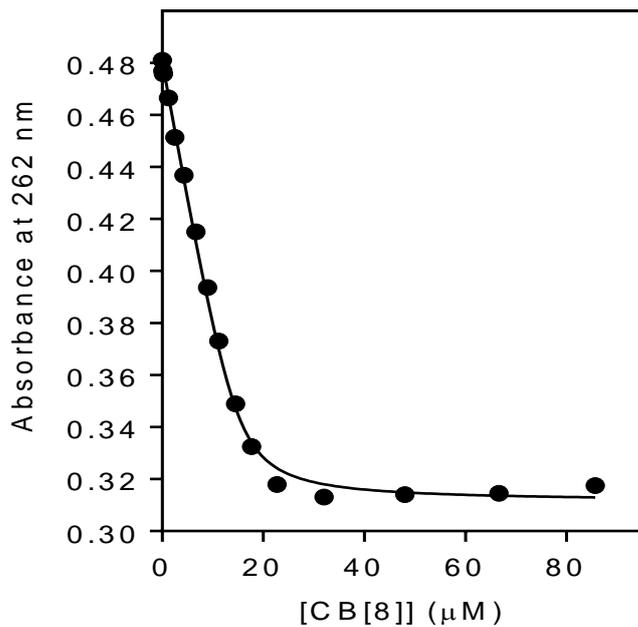
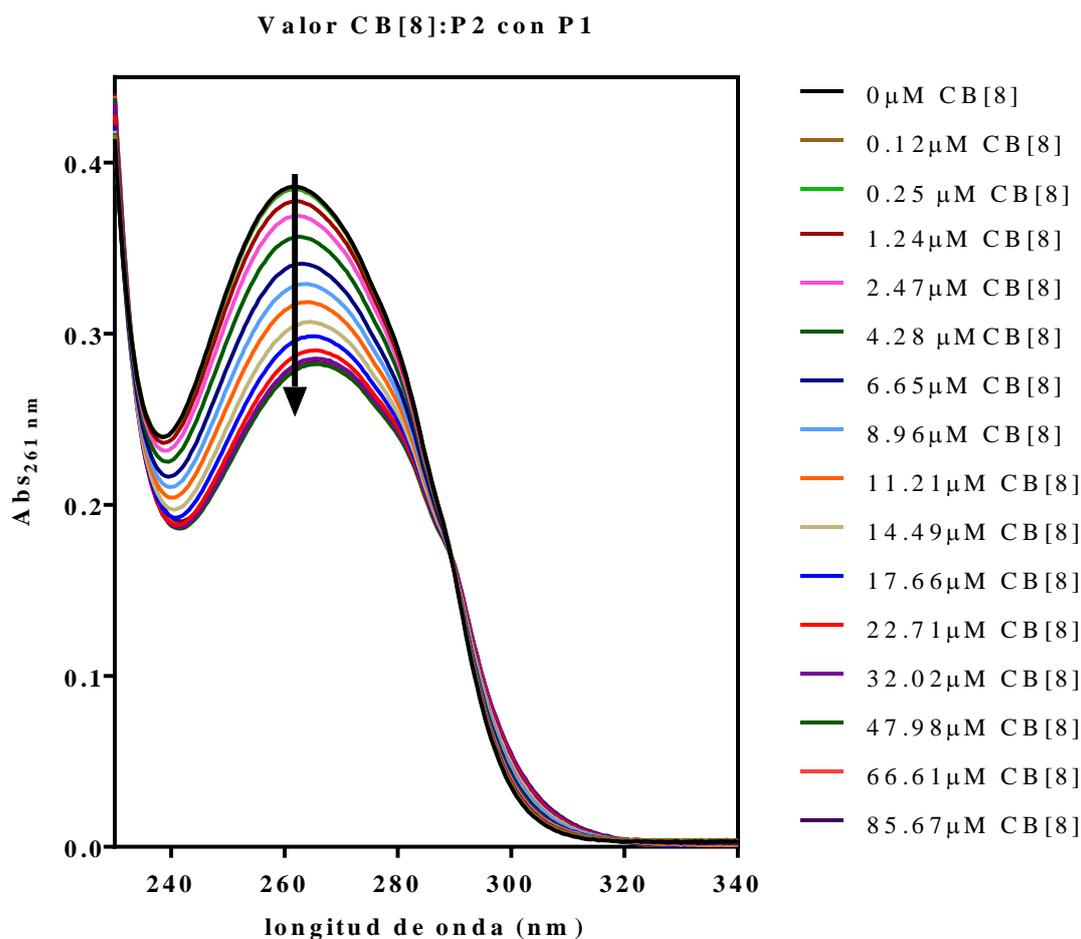


Figura 24: Representación de la absorbancia a 278nm frente a la concentración de CB[8].

### 3.5. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE P1: P2 CON CB[8] MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE UV\_VIS.

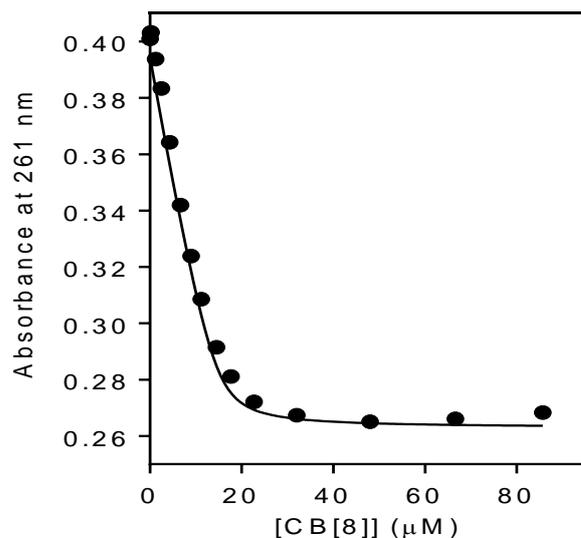
Para estudiar el comportamiento de P1 y P2 con el CB[8] se utilizó la espectroscopía de UV-Vis, para ello se comenzó la valoración con una disolución base que contiene 15 uM del P2 más 15 uM de P1 en 10 mM PBS a pH 7. A continuación, se fueron añadiendo alícuotas de una disolución de 200 μM CB[8] en disolución base.

Como se puede observar en el espectro de la Figura 25, a medida que se va adicionando el CB[8] van disminuyendo las bandas a 261 nm, esto nos indica que esta interaccionando P1 y P2 con el CB[8] o solo uno de ellos.



*Figura 25: Espectro de UV del heterodímero con el CB[8]*

Los datos obtenidos en la Figura 26 se intentaron ajustar a un modelo 1:1:1 de formación del complejo heteroternario, pero desafortunadamente los datos no se ajustaron al modelo propuesto. Sin embargo, se ajustaron a un modelo 1:1 (**P2:CB[8]**), con una constante de disociación del orden de la calculada anteriormente, lo que indicaría que en las concentraciones ensayadas **P1** no se introduce en la cavidad para dar lugar al complejo heteroternario.



*Figura 26: Representación de la absorbancia a 261 nm frente a la concentración de CB[8].*

Por último, se realizó una valoración en la que se tiene una disolución del complejo **P2:CB[8]** que contiene 30 μM de **P2**, 15 μM de **CB[8]** en 10 mM PBS a pH 7. Sobre esta, se fueron añadiendo cantidades crecientes de **P1** con una concentración mayor a las ensayadas anteriormente, los datos de absorbancia se registraron a 261 nm.

Según se observa en la figura 27, la banda de absorbancia aumenta hasta llegar a una concentración de 100 μM de **P1**, esto podría deberse a la absorbancia de **P1** en disolución. A mayores se puede observar, que a medida que aumenta la concentración del **P1** disminuye la absorbancia como consecuencia de su introducción en la cavidad de **CB[8]**, lo que indica una  $K_d$  es muy superior a la anterior.

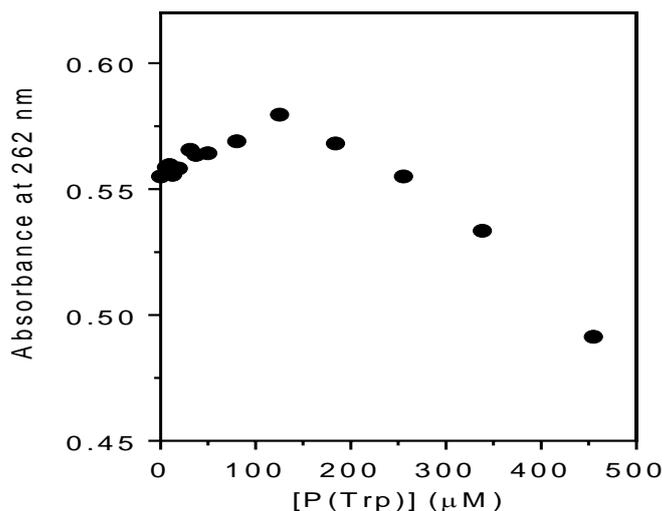


Figura 27: Representación de la absorbancia a 261 nm frente a la concentración de **P1**.

### 3.6. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA MEZCLA **P1**, **P2** Y **CB[8]** EN PRESENCIA DE ADN MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR.

Aunque los resultados anteriores parecen indicar que a concentraciones de **P1** y **P2** en el rango 10-50  $\mu\text{M}$  no forman un heterodímero supramolecular en presencia de **CB[8]**, se planteó la posibilidad de que al añadir el ADN diana del factor de transcripción GCN4 este favoreciera la formación del dímero al desplazar el equilibrio. Dado que es conocido que GCN4 solo adopta una conformación helicoidal cuando se une como dímero a su ADN diana, se decidió llevar a cabo estos estudios de interacción mediante dicroísmo circular (DC).

Para este experimento, se recogieron datos en el rango espectral 195-320 nm. Se tiene en cuenta que la región de UV lejano corresponde 250 nm, este abarca las transiciones electrónicas del enlace peptídico, es la que suministra conocimiento de las estructuras secundarias como son las de hélice  $\alpha$  o láminas  $\beta$ , cada uno con su espectro específico.

En especial, la presencia de hélices  $\alpha$  presenta en DC dos bandas negativas a 208 nm y a 220 nm. Lo más importante de este estudio es que el FT GCN4 tiene una estructura de hélice  $\alpha$  cuando está en contacto con el ADN diana en forma de dímero, y cuando no está en presencia de ADN presenta una estructura desordenada. Esto se observa porque aparece una banda positiva a 218 e incluso una banda negativa por debajo de los 200 nm.

Así mismo, lo que se intenta observar es la presencia de alguna banda que nos de información cualitativa de la formación del dímero supramolecular y, además, que nos indique la interacción con el ADN. Para finalizar y tener la máxima información posible sobre el espectro, se tendría que ver un cambio en la señal 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.

***DICROISMO CIRCULAR: Hibridación del péptido P1 más P2 con el ADN:***

Para ello, se prepararon 6 disoluciones a 4°C, en una disolución tampón (10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.5, 100 mM NaCl):

- Disolución de 5  $\mu\text{M}$  de ADN.
- Disolución de 5  $\mu\text{M}$  de **P1**
- Disolución de 5  $\mu\text{M}$  de **P1** y 5  $\mu\text{M}$  de ADN.
- Disolución de 5  $\mu\text{M}$  de **P1**, 18  $\mu\text{M}$  de **CB[8]**.
- Disolución de 5  $\mu\text{M}$  de **P1**, 18  $\mu\text{M}$  de **CB[8]** y 5  $\mu\text{M}$  de **P2**.
- Disolución de 5  $\mu\text{M}$  de **P1**, 5  $\mu\text{M}$  de **P2**, 18  $\mu\text{M}$  de **CB[8]** y 5  $\mu\text{M}$  de ADN.

La Figura 28, muestra los espectros de las 5 disoluciones empleadas. Como se puede observar, en ningún caso se observa la aparición de la banda característica de la formación de una hélice alfa, con mínimo a 208 y 222nm, lo que indica que el heterodímero supramolecular tampoco se forma en presencia del ADN diana.

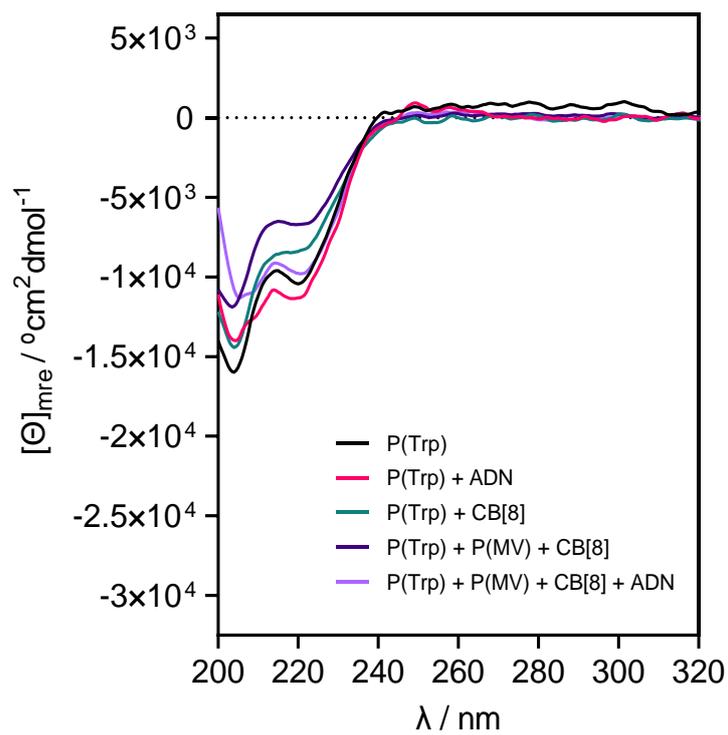


Figura 28: Espectro de DC para la variación de la estructura de hélice  $\alpha$ .

## 4. PARTE EXPERIMENTAL.

### 4.1. GENERAL.

Para este trabajo se utilizaron reactivos comerciales sin purificación adicional. Se trabajó con agua de calidad Milli-Q, obtenida mediante un aparato Millipore Gradient A1.

La síntesis del péptido se realizó en el sintetizador automático de péptidos PS3 de Protein Technologies Inc. Los reactivos de acoplamiento, como los aminoácidos y la resina empleada proceden 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 empleó una centrífuga no refrigerada Mini Sprout y la centrífuga refrigerada de alta velocidad de sobremesa Thermo Heraeus Biofuge.

Para purificación mediante HPLC se usó un equipo HPLC-Agilent. – Series. 1260 infinite II, una columna: LUNA Polar semipreparativa + precolumna. El gradiente general empleado en ambas inyecciones fue de 10→95% CH<sub>3</sub>CN, 0.1% TFA / H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA en 35 min.

Para el análisis 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. Para las inyecciones analíticas se utilizó una columna analítica Aeris 3.6 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (150 × 2.1 mm) de Phenomenex.

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 y para los espectros de fluorescencia se usó el equipo de fluromax.

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 GraphPad Prism 6 y el ajuste con el programa Dynafit.

Los aminoácidos se compraron como aminoácidos Fmoc protegidos con el esquema de protección de cadena lateral estándar:

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(t-Bu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(t-Bu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(t-Bu)-OH, Fmoc-Thr(t-Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

#### 4.2. SÍNTESIS DE P1 MEDIANTE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.

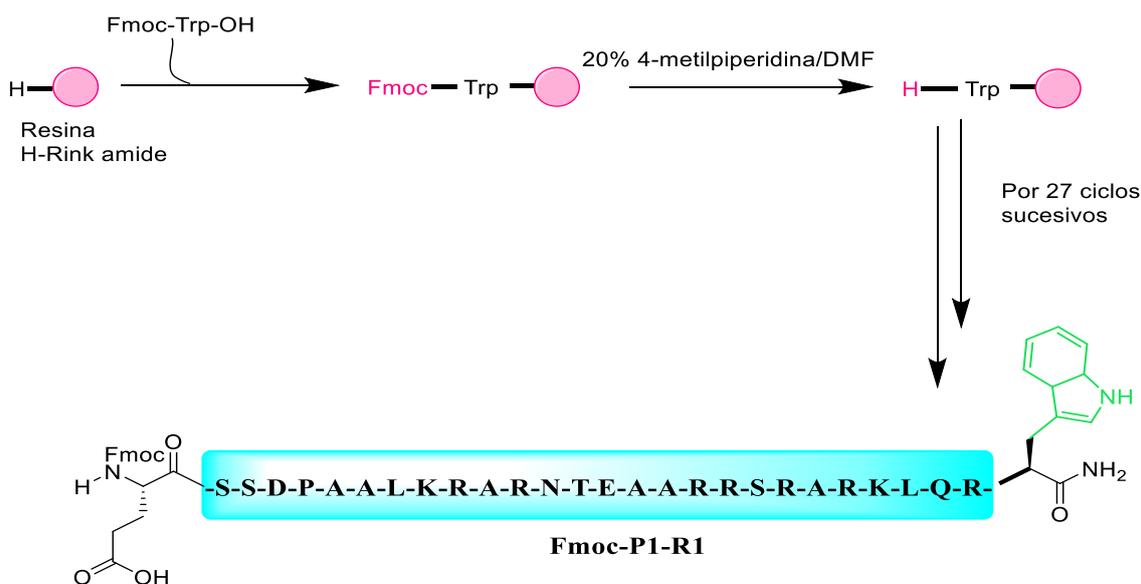


Figura 29: Esquema sintético para el péptido P1 y su secuencia mostrando en el externo C-terminal un triptófano.

Para el diseño del FT sintético se modificó la estructura de los FTs bZip sustituyendo la región de cremallera de leucinas C-terminal (responsable de la dimerización) manteniendo inalterada la región básica N-terminal (encargada de la unión al ADN). Concretamente se sintetizó un péptido derivado de la región básica del FT GCN4 que posee un residuo de triptófano en su extremo C-terminal.

(Ac--ESSDPAALKRARNTAAARRSRARKLQRW-NH<sub>2</sub>).

### Esquema de la síntesis:

Se realizó la secuencia de un péptido que contiene 28 aminoácidos. La síntesis se llevará a cabo desde el extremo *C-terminal* (**W**) al extremo *N-terminal* (**E**) del péptido.

(*N-terminal*) ----**E**SSDPAALKRARNTAAARRSRARKLQR**W**----(*C-terminal*.)

Para la síntesis se utilizaron las siguientes disoluciones que ya habían sido preparados anteriormente:

- DIEA/DMF: Con una concentración de (0,195M ).
- HBTU/HOBt/DMF: Esta disolución tenía una concentración de 0,2M HBTU y 0,2M HOBt.

### PREPARACIÓN DE LA RESINA.

Para proceder a la síntesis de fase sólida se emplea como soporte sólido la resina H-Rink amide ChemMatrix (121,6 mg) con una carga de 0.47 mmol/g. El proceso utilizado para la preparación de la resina antes del proceso sintético es el siguiente:

- I. Se agregó la resina en un matraz de reacción (0.05 mmol) y se realizaron lavados (2 × 5 ml × 5 min) con DCM (diclorometano) para hinchar la resina.
- II. Se comprobó que la resina estaba desprotegida con el test de TNBS (positivo). Por último, se realizaron lavados con DMF (2 × 5 ml × 5 min).

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

### PROCESO SINTÉTICO.

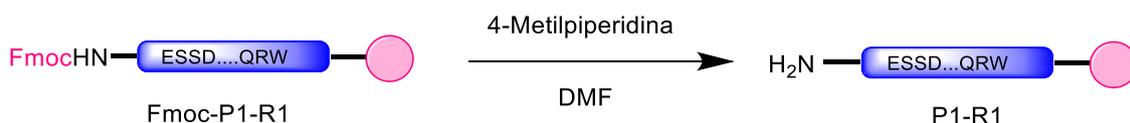
Para realizar la secuencia peptídica **Fmoc-P1-R1** se utilizó a una escala de 0,05 mmol empleado un *sintetizador* automático. Los acoplamientos formadores de enlaces peptídicos se llevaron a cabo usando un exceso de 4 veces (4 equiv) de los aminoácidos y (HBTU) (4 equiv.) como agente activador. Cada aminoácido se disolvió en DIEA/DMF (6 equiv) y se activó con el agente de acoplamiento durante 2 min antes de añadirlo. Estos acoplamientos peptídicos se realizaron en un periodo de 30 minutos.

Después, de sintetizar la secuencia peptídica, 4 mg de **Fmoc-P1-R1** se añadieron en un tubo de Eppendorf y se resuspendió en 200  $\mu$ L de un cóctel (2.5:2.5:95) TIS/H<sub>2</sub>O/TFA. Esta etapa provoca la rotura del péptido con la resina y la desprotección total. Esta mezcla se agitó durante una hora y media.

Posteriormente, se filtró la resina y al sobrenadante de TFA se le añadió 1 ml de éter en frío y el precipitado formado se centrifugó. Después, se secó con N<sub>2</sub> y se redisolvió en una mezcla (1:1) de MeCN:H<sub>2</sub>O y se analizó el crudo mediante HPLC semipreparativo de fase reversa.

En el espectro de ESI-MS calculado para C<sub>151</sub>H<sub>247</sub>N<sub>55</sub>O<sub>42</sub> 3222.79, se encontró los siguientes picos correspondientes: [MH]<sup>3+</sup> = 1168.56 m/z, [MH]<sup>4+</sup> = 876.62 m/z.

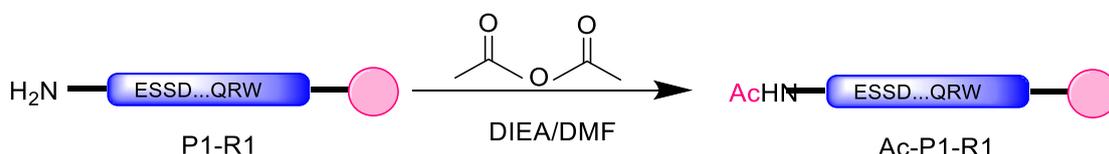
#### **DESPROTECCIÓN DEL GRUPO FMOC DEL EXTREMO N-TERMINAL.**



*Ilustración 13: Desprotección del grupo Fmoc del extremo N-terminal*

Tras confirmar que la síntesis peptídica era correcta, se procedió a la desprotección de grupo Fmoc de extremo *N-terminal*. Para este fin, los 0,05 mmol **Fmoc-P1-R1** se trataron con una disolución de 20% de 4-Metilpiperidina en DMF (10 ml) y se dejó agitando 15 minutos. Después, se realizaron lavados con DMF (3 $\times$ 5 ml $\times$ 2 min), con DCM (3 $\times$ 5 ml $\times$ 2 min) y bajo la corriente de N<sub>2</sub> se secó.

#### **ACETILACIÓN DE GRUPO N-TERMINAL.**



*Ilustración 14: Acetilación del grupo N-terminal.*

Una vez comprobada la desprotección de grupo *N-terminal* se lleva a cabo la acetilación del péptido. Los 0,05 mmol **P1-R1** se trataron con una mezcla de DIEA/DMF 0,195 M (3 ml) y Ac<sub>2</sub>O (48,2  $\mu$ L) durante 45 minutos a reflujo con N<sub>2</sub>.

A continuación, la resina se filtró y se realizaron lavados con DMF (3×5 ml×3 min), con DCM (3×5 ml×3 min) y se dejó secar a vacío.

Se cogen 4 mg de **Ac-P1-R1** se introdujeron en un tubo de Eppendorf y se disolvieron en 200 µL de un coctel (2.5:2.5:95) TIS/H<sub>2</sub>O/TFA. Esta etapa es para la rotura del péptido con la resina y la desprotección total. Esta mezcla se agitó durante una hora y media. Posteriormente, se filtró la resina y al sobrenadante de TFA se le añadió 1 ml de éter en frío y se centrifugó. Este precipitado formado se secó con N<sub>2</sub> y se redisolvió en una mezcla (1:1) de MeCN:H<sub>2</sub>O y se analizó el crudo mediante HPLC de fase reversa.

En este espectro de ESI-MS calculado para **C<sub>137</sub>H<sub>238</sub>N<sub>55</sub>O<sub>41</sub>** 3309,69, se encontró los siguientes picos correspondientes: [MH]<sup>3+</sup> = 1108.32 m/z, [MH]<sup>4+</sup> = 831.57 m/z.

#### **PURIFICACIÓN DEL P1.**

Para esta última etapa, la resina (113,2 mg, 0,02 mmol) se trasvasó a una nueva columna y se resuspendieron en 5 ml de un coctel de 95% TFA, 2,5% TIS y 2,5% H<sub>2</sub>O, la mezcla se dejó agitando durante 3h y 30 minutos (para que se separe el **P1** y se desproteja el grupo amino del extremo *C-terminal*). La resina se filtró y el filtrado de TFA se añadió sobre Et<sub>2</sub>O (40 ml) frío, se centrifugó a -4°C para así facilitar la precipitación y, por último, se secó el precipitado con N<sub>2</sub> gas.

A continuación, las fracciones del **P1** puro se liofilizaron durante 24 horas, obteniéndose (12,2 mg, 18%) de un sólido blanco y con aspecto esponjoso.

#### **VALORACIÓN DE LA DISOLUCIÓN STOCK DE P1**

La cantidad de **P1** se distribuyó en 3 Eppendorf y a continuación, se procedió a preparar una disolución de concentración conocida de este péptido de concentración conocida, mediante la técnica de UV-Vis.

Para las medidas UV, se utilizaron los siguientes parámetros y condiciones del espectrofotómetro:

- Disolución de 0.1 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 7 como blanco. (Disolución suministrada por el grupo de investigación).
- $\epsilon=5579 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \rightarrow$  longitud de onda = 278nm.

- Temperatura 20°C
- Rango de 200-400nm a 200nm/min.

Seguidamente, se cogieron 800  $\mu\text{L}$  de la disolución tampón, se agregaron alícuotas sucesivas de la disolución stock de **P1** y se fueron registrando los espectros de absorción. Por medio de la expresión derivada de la ecuación de Lambert-Beer, se obtuvo un valor de 1.809 mM de **P1**.

#### 4.3. VALORACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL **CB[8]**.

Se preparó una disolución stock de cobaltoceno de concentración inicial 2.5mM. Esta disolución es de color amarillo, se valoró mediante la técnica UV para determinar su concentración exacta. Para ello, se realizó la valoración utilizando como blanco 800  $\mu\text{L}$  de agua MQ y sobre el blanco se fueron añadiendo volúmenes crecientes de la disolución Stock. La concentración exacta de esta disolución de  $\text{Co}^+$  obtenida fue: **2370  $\mu\text{M}$** .

A partir de esta disolución Stock de  $\text{Co}^+$  2370  $\mu\text{M}$ , se preparó (10 ml) una disolución de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{Co}^+$  en agua MQ.

Se preparó otra disolución de **CB[8]** 150  $\mu\text{M}$ , para ello se pesaron 1.6 mg de **CB[8]** y se disolvieron con (8 ml) la disolución 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{Co}^+$ , se homogeniza esta disolución en el ultrasonidos a 80°C durante 20 minutos.

Se comienza la valoración con la disolución de  $\text{Co}^+$  y sobre esta disolución se van añadiendo volúmenes crecientes de la disolución de 150  $\mu\text{M}$  de **CB[8]**, se recogen los valores de absorbancia a 261 nm.

Se realizaron tres repeticiones de esta valoración y el peso molecular final del **CB[8]** fue **1835.74 mg/mmol**.

#### 4.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO **P1** CON EL **CB[8]** MEDIANTE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS.

Para estudiar la interacción del **P1** con el **CB[8]** se prepararon dos disoluciones:

- Disolución base (8000  $\mu\text{L}$ ): 35 $\mu\text{M}$  de **P1** en 0.1M PBS a pH 7.

Para ello, en un facon se añaden 6072.4  $\mu\text{L}$  de agua miliQ , 680  $\mu\text{L}$  de PBS 10 mM pH 7 y 47.6  $\mu\text{L}$  de **P1**. A continuación, se agita el en vortex 2 minutos para una buena homogenización.

- Disolución valorante: (5000  $\mu\text{L}$ ): 200  $\mu\text{M}$  de **CB[8]** a partir de la disolución base.

Se añadió en un vial 1.8 mg de **CB[8]** que fueron disueltos con 5 ml de la disolución base. Se llevo al ultrasonidos a 80°C unos 20 minutos, para que se disolviera todo el **CB[8]**.

- Disolución blanco (2000  $\mu\text{L}$ ): Se cogen 1800  $\mu\text{L}$  de agua miliQ y 200  $\mu\text{L}$  de 10 mM PB a pH 7.

Posteriormente, se empieza la valoración midiendo el blanco, luego (800  $\mu\text{L}$ ) de la disolución base y después añadiendo volúmenes crecientes de la disolución valorante. Se recogen los datos de absorción en el punto máximo del triptófano que es a 278 nm.

#### 4.5. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL PÉPTIDO **P1** CON EL **CB[8]** CON LA TÉCNICA FLUORESCENCIA.

Posteriormente, se realizó además un análisis de fluorescencia utilizando un equipo de *FLUROMAX*. Para llevar a cabo este estudio se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disolución base (4600  $\mu\text{L}$ ): 44  $\mu\text{M}$  del **P1** en 10 mM PBS pH 7.

Para preparar esta disolución se cogieron 140.75  $\mu\text{L}$ , 460  $\mu\text{L}$  de 10 mM PBS pH 7 y se enrasó a 3999.25  $\mu\text{L}$ .

- Disolución valorante (3500  $\mu\text{L}$ ) de 200  $\mu\text{M}$  **CB[8]** en disolución base.

Se pesaron 1.5 mg de **CB[8]** se añadió en un vial y se disolvieron en 3.5 ml de la disolución base. Se tapo el vial y se llevó al ultrasonido a 80°C hasta que el **CB[8]** se disolvió bien.

Para realizar la valoración de **P1** en fluorescencia, se comenzó registrando (800  $\mu\text{L}$ ) de la disolución base y se continuaron añadiendo alícuotas de la disolución valorante.

Las mediciones de los datos de emisión se cogen a 361.4 nm es el máximo.

#### 4.6. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO **P2** CON EL **CB[8]** MEDIANTE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS.

Para comprobar el comportamiento del **CB[8]** con el **P2**, se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disolución base (8000  $\mu\text{L}$ ): 15  $\mu\text{M}$  del **P2** en 10 mM PBS pH 7.

Para este fin, se cogieron 7194  $\mu\text{L}$  de agua miliQ, 800  $\mu\text{L}$  de PBS 10 mM pH 7 y 26  $\mu\text{L}$  de **P2**.

- Disolución valorante: de 200  $\mu\text{M}$  **CB[8]** en disolución base (6000  $\mu\text{L}$ ).

Se pesaron 2.2 mg de **CB[8]** se añaden en un vial y se disuelven en 6 ml de la disolución base. Se tapo el vial y se llevó al ultrasonido hasta que se disolvió bien.

A continuación, se empieza la valoración con la disolución base (800  $\mu\text{L}$ ) y se van añadiendo alícuotas de la disolución valorante y se fueron registrando los valores de absorbancia a 262 nm que es el máximo del dimetilviológeno

#### 4.7. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE **P1: P2** CON **CB[8]** CON UV-VIS.

Para estudiar el comportamiento de **P1** y **P2** con el **CB[8]** utilizan UV-Vis. Se realizaron las siguientes disoluciones:

- Disolución base (4600  $\mu\text{L}$ ): de una disolución de 15  $\mu\text{M}$  de **P2**, 15  $\mu\text{M}$  de **P1** en 10 mM PBS a pH 7.

Para ello, se añadieron 3843.43  $\mu\text{L}$  de agua miliQ, 435  $\mu\text{L}$  de PBS 10 mM pH 7, 35.08  $\mu\text{L}$  de **P2** y 36.07  $\mu\text{L}$  **P1** en un falcón y se homogenizo esta disolución en el vortex.

- Disolución valorante: 200  $\mu\text{M}$  **CB[8]** en disolución base (3500  $\mu\text{L}$ ).

Se pesó 1,5 mg de **CB[8]** y se disolvió en 3.5 ml de la disolución base.

Para realizar la valoración se empieza añaden 800  $\mu\text{L}$  de la disolución base y sobre ella se van añadiendo volúmenes crecientes de la disolución valorante. Se registraron las medidas de absorbancia a una longitud de onda de 262 nm.

Como con esta valoración no se obtuvo el heteroternario hicimos otra valoración por ultravioleta para confirmar si se formaba o no.

Para estudiar este comportamiento, se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disolución (5 ml) de 175 $\mu$ M de **CB[8]** en 10 mM PBS a pH 7.
- Disolución base (900  $\mu$ L) de una disolución 35 $\mu$ M de **P2** con 15  $\mu$ M de **CB[8]**.
- Disolución del blanco: (900  $\mu$ L): de agua miliQ en 10 mM PBS a pH 7.

Se comienza la valoración añadiendo la disolución base a la cubeta ``vieja`` y se miden volúmenes crecientes de la disolución Stock del **P1** de 5,003  $\mu$ M que se van añadiendo sobre la disolución base. Se recogen los valores de absorbancia a 278 nm que es el máximo de absorción del triptófano.

#### 4.8. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL PÉPTIDO **P1: P2** CON EL **CB[8]** CON LA TÉCNICA DC.

Por último, se estudió la interacción del dímero supramolecular con el oligonucleótido del ADN. Para ello, se prepararon 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 cogieron 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, se mezclaron bien y se enrasó con H<sub>2</sub>O hasta 30 mL.

Para llevar a cabo la hibridación de los oligonucleótidos, se mezclaron las secuencias complementarias en concentraciones equimolares (200  $\mu$ M para la hebra 1 ADN y 50  $\mu$ M para la hebra complementaria), se llevaron a 90 °C durante 10 min y luego se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente 2 horas.

El análisis de dicroísmo se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: 200-400 nm, flujo 100 nm/min y temperatura 23.2°C.

Se prepararon 6 disoluciones de 400  $\mu$ l para las medidas de DC en disolución tampón:

- Disolución de 5  $\mu$ M de ADN.
- Disolución de 5  $\mu$ M de **P1**
- Disolución de 5  $\mu$ M de **P1** y 5  $\mu$ M de ADN.
- Disolución de 5  $\mu$ M de **P1**, 18  $\mu$ M de **CB[8]**.
- Disolución de 5  $\mu$ M de **P1**, 18  $\mu$ M de **CB[8]** y 5  $\mu$ M de **P2**.

- Disolución de 5  $\mu\text{M}$  de **P1**, 5  $\mu\text{M}$  de **P2**, 18  $\mu\text{M}$  de **CB[8]** y 5  $\mu\text{M}$  de ADN.

## 5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo de fin de grado, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- I. Se sintetizó con éxito el derivado **P1** a través de la síntesis de péptidos en fase sólida, llegando a obtener un sólido blanco el cual fue purificado por HPLC, con un rendimiento del 18%.
- II. Se logro estudiar la interacción del **P1** con el **CB[8]** mediante la técnica de ultravioleta. Los datos obtenidos parecen indicar la formación de un complejo 2:1 (**P1<sub>2</sub>:CB[8]**).
- III. También se estudió la interacción de **P2** con el **CB[8]**, los datos obtenidos parecen indicar la formación de un complejo 1:1.
- IV. Los datos obtenidos de los ensayos de interacción de **P1**, **P2** y **CB[8]** parecen indicar que no se forma el complejo heteroternario entre las tres especies, ni en presencia del ADN diana de GCN4.

## CONCLUSIONS:

To finish this project, it concludes by saying that some of the objectives that we named at the beginning of this end-of-degree project have been met:

- I. The GCN4-Rb conjugate with tryptophan was successfully elaborated through solid phase peptide synthesis, obtaining a white solid which was purified by HPLC. With a yield of 18%.
- II. It was possible to study the interaction of **P1** with **CB[8]** using the ultraviolet technique, giving rise to a 2:1 model, as well as the interaction of **P2** with **CB[8]**, obtaining a 1:1 homoternary model.
- III. It was not possible to form the heteroternary complex of **P1**, **P2** with the cucurbit[8]uril, only the methylviologen enters the cavity of the **CB[8]**, thus forming the homoternary 1:1 model.
- IV. Finally, with the CD technique it can be confirmed that the supramolecular heterodimer with the target DNA sequence is not formed in the presence of **CB[8]**.

## CONCLUSIÓNS:

Para rematar este proxecto, conclúe dicindo que se cumpriron algúns dos obxectivos que nomeamos ao comezo deste traballo de fin de grao:

- I. Conxugado GCN4-Rb con triptófano elaborouse con éxito mediante síntese de péptidos en fase sólida, obtendo un sólido branco que se purificou por HPLC. Cun rendemento do 18%.
- II. Foi posible estudar a interacción de **P1** con **CB[8]** mediante a técnica ultravioleta, dando lugar a un modelo 2:1, así como a interacción de **P2** con **CB[8]**, obtendo un modelo homoternario 1:1.
- III. Non foi posible formar o complexo heteroternario de **P1**, **P2** co cucurbit[8]uril, só o metilvióxeno entra na cavidade do **CB[8]**, formando así o modelo homoternario 1:1.
- IV. Finalmente, coa técnica CD pódese confirmar que o heterodímero supramolecular coa secuencia de ADN diana non se forma en presenza de **CB[8]**.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Lehn JM. Cryptates: Inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules. *Pure and Applied Chemistry*. 1978 Jan 1;50(9–10):871–92.
2. Romero Carrasco M. Diseño de moléculas con actividad biológica: síntesis e Implicaciones en química supramolecular. 2019.
3. Van Dun S, Ottmann C, Milroy LG, Brunsveld L. Supramolecular Chemistry Targeting Proteins. *J Am Chem Soc*. 2017 Oct 11;139(40):13960–8.
4. Klajn R, Stoddart JF, Grzybowski BA. Nanoparticles functionalised with reversible molecular and supramolecular switches. *Chemical Society Reviews*. 2010;39(6):2203–37.
5. Pazos E, Novo P, Peinador C, Kaifer AE, García MD. Cucurbit[8]uril (CB[8])-Based Supramolecular Switches. Vol. 58, *Angewandte Chemie - International Edition*. Wiley-VCH Verlag; 2019. p. 403–16.
6. Groppi J, Baroncini M, Venturi M, Silvi S, Credi A. Design of photo-activated molecular machines: Highlights from the past ten years. *Chemical Communications*. 2019;55(84):12595–602.
7. Natali M, Giordani S. Molecular switches as photocontrollable “smart” receptors. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(10):4010–29.
8. Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. Vol. 13, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014. p. 813–27.
9. Choudhury J. Recent developments on artificial switchable catalysis. Vol. 59, *Tetrahedron Letters*. 2018. p. 487–95.
10. Liu Y, Yang H, Wang Z, Zhang X. Cucurbit[8]uril-based supramolecular polymers. *Chemistry - An Asian Journal*. 2013 Aug;8(8):1626–32.
11. Freeman WA, Mock WL, Shih NY. Cucurbituril. *J Am Chem Soc*. 1981;103(24):7367–8.

12. Barravecchia Prado L. Híbridos viológeno-aminoácido: síntesis y química receptor-sustrato. 2018;
13. Jeon WS, Kim HJ, Lee C, Kim K. Control of the stoichiometry in host–guest complexation by redox chemistry of guests: Inclusion of methylviologen in cucurbit[8]uril. *Chemical Communications*. 2002 Aug 21;(17):1828–9.
14. El-Barghouthi MI, Assaf KI, Rawashdeh AMM. Molecular dynamics of methyl viologen-cucurbit[ n ]uril complexes in aqueous solution. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2010;6(4):984–92.
15. Vincil GA, Urbach AR. Effects of the number and placement of positive charges on viologen-cucurbit[n]uril interactions. *Supramolecular Chemistry*. 2008 Dec;20(8):681–7.
16. Cavatorta E, Jonkheijm P, Huskens J, Cavatorta E, Jonkheijm P, Huskens J. Assessment of Cooperativity in Ternary Peptide-Cucurbit uril Complexes. *Wiley Online Library*. 2017 Mar 23;23(17):4046–50.
17. Bush ME, Bouley ND, Urbach AR. Charge-mediated recognition of *N-terminal* tryptophan in aqueous solution by a synthetic host. *J Am Chem Soc*. 2005 Oct 19;127(41):14511–7.
18. Heitmann LM, Taylor AB, Hart PJ, Urbach AR. Sequence-specific recognition and cooperative dimerization of *N-terminal* aromatic peptides in aqueous solution by a synthetic host. *J Am Chem Soc*. 2006 Sep 27;128(38):12574–81.