



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## Grado en Química

### Memoria del trabajo de Fin de Grado

**NUEVAS SONDAS LUMINISCENTES PARA LA DETECCIÓN  
DE PATÓGENOS**

**NOVAS SONDAS LUMINISCENTES PARA A DETECCIÓN DE  
PATÓXENOS**

**NEW LUMINESCENT PROBES FOR THE DETECTION OF  
PATHOGENS**

**Martín Sandá Ares**

**Curso: 2021 - 2022.**

**Convocatoria: Julio**

*Elena Pazos Chantrero  
Francisco Fernández Trillo*



# Abreviaturas, símbolos y acrónimos

<b>Ar</b>	Argon
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
<b>Bzl</b>	benzoilo
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloruro cálcico
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	diclorometano
<b>DCC</b>	N,N' - dicitclohexilcarbodiimida
<b>DIEA</b>	N,N - diisopropiletilamina
<b>DMF</b>	dimetilformamida
<b>DOTA</b>	ácido 1,4,7,10 – tetraazaciclododecano – 1,4,7,10 – tetraacético
<b>Fmoc</b>	9-fluoronilmetiloxicarbonilo
<b>HATU</b>	Hexafluorofosfato de 3 – óxido de 1- [bis (dimetilamino)metileno] – 1H -1,2,3 – triazolo [4,5.-b]piridinio
<b>HBTU</b>	hexafluorofosfato de 2 - (1h – benzotriazole – 1 – il ) – 1,1,3,3, - tetrametiluronio
<b>HEPES</b>	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
<b>HOAt</b>	1-hidoxi-7-azabenzotriazol
<b>HOBt</b>	hidoxibenzotriazol
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>LasB</b>	Elastasa B
<b>MeCN</b>	Acetonitrilo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	espectrometría de masas
<b>PyAOP</b>	Hexafluorofosfato de (7 – azabenzotriazol – 1 – iloxi)tripirrolidinosfosfonio
<b>PyBOP</b>	hexafluorofosfato de benzotriazole – 1 -iloxitripirrolidinosfosfonio
<b>TbCl<sub>3</sub></b>	cloruro de Tb(III)
<b><i>t</i>-Bu</b>	<i>tert</i> -butilo
<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>TIS</b>	triisopropilsilano
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>ε</b>	coeficiente de absortividad molar
<b>l</b>	camino óptico



# RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* constituye un factor de riesgo para los seres humanos, al considerarse una de las bacterias responsables de gran parte de las infecciones que los enfermos adquieren en los hospitales, provocando en algunos casos efectos muy perjudiciales en la salud del paciente.

En este trabajo se ha desarrollado un sensor para detectar y monitorizar el enzima Elastasa B, un enzima que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* segrega al medio celular, y que por tanto permitiría detectar la bacteria.

El sensor está formado por un complejo macrocíclico de Tb(III) luminiscente unido a un péptido que contiene la secuencia consenso que corta el enzima. La síntesis del péptido se ha llevado a cabo mediante síntesis manual en fase sólida, mientras que el macrociclo es un derivado del DO3A.

El funcionamiento de la sonda se basa en que la antena necesaria para transferir la energía al Tb(III), y que se produzca la emisión de luminiscencia por parte del metal, se encuentra separada del complejo metálico por la secuencia de reconocimiento del enzima, de tal modo que la ruptura de la secuencia peptídica por parte del enzima conlleva a una disminución de la luminiscencia.

**Palabras clave:** Elastasa b, péptidos, complejos de lantánidos, luminiscencia, actividad enzimática.

# ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* constitutes a risk for humans, as it is considered one of the bacteria responsible for a large part of the hospital infections, in some cases causing very harmful effects on the patient's health.

In this work, a sensor has been developed to detect and monitor the enzyme Elastase B, an enzyme secreted by *Pseudomonas aeruginosa* into the cellular environment, that would therefore allow the detection of the bacterium.

The sensor consists of a luminescent Tb(III) macrocyclic complex linked to a peptide containing the consensus sequence that cleaves the enzyme. The synthesis of the peptide has been carried out by manual solid-phase synthesis, while the macrocycle is a derivative of DO3A.

The sensing mechanism of the probe relies on the fact that the antenna necessary to transfer the energy to the Tb (III) ion, and for the luminescence emission of the metal, is separated from the metal complex by the enzyme binding sequence, so that the cleavage of the peptide sequence by the enzyme leads to a decrease in luminescence.

**Keywords:** Elastase b, peptides, lanthanide complexes, luminescence, enzyme activity.

# Resumo

*Pseudomonas aeruginosa* constitúe un risco para os seres humanos, ó considerarse unha das bacterias responsables de gran parte das infeccións que os enfermos adquiren nos hospitais, provocando nalgúns casos efectos moi perxudiciais para a saúde do paciente.

Neste traballo desenvóllese un sensor para detectar e monitorizar o encima Elastasa B, un encima que a bacteria *Pseudomonas aeruginosa* segrega ao medio celular, e que polo tanto permitiría detectar a bacteria.

O sensor está formado por un complexo macrocíclico de Tb(III) luminiscente unido a un péptido que contén a secuencia consenso que corta o encima. A síntese do péptido levóuse a cabo mediante síntese manual en fase sólida, mentres que o macrociclo é un derivado do DO3A.

O funcionamento da sonda baséase en que a antena necesaria para transferir a enerxía ao Tb(III) e que se produza a emisión de luminiscencia por parte do metal, encóntrase separada do complexo metálico pola secuencia de recoñecemento do encima, de tal modo que a ruptura da secuencia peptídica por parte do encima provoca unha diminución da luminiscencia.

**Palabras clave:** Elastasa b, péptidos, complexos de lantánidos, luminiscencia, actividade enzimática.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Los patógenos en la vida cotidiana. El caso de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>9</b>
1.1. Elastasa B de <i>P. aeruginosa</i> .....	10
<b>2. Proteínas y péptidos</b> .....	<b>10</b>
2.1. Enlace peptídico y estructura de las proteínas .....	10
2.2. Síntesis de péptidos en fase sólida.....	11
<b>3. Sensores luminiscentes</b> .....	<b>15</b>
3.1 Luminiscencia .....	15
3.2 Complejos de lantánidos luminiscentes.....	15
3.3 Sensores basados en complejos de lantánidos .....	16
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Diseño y síntesis del péptido <math>S_1</math>[Tb]</b> .....	<b>20</b>
1.1. Síntesis del péptido $P_1$ .....	21
<b>2. Síntesis del ligando <math>L_2</math></b> .....	<b>25</b>
2.1. Síntesis del precursor $L_1$ .....	25
2.2. Síntesis del ligando $L_2$ .....	27
<b>3. Acoplamiento entre el péptido y el ligando</b> .....	<b>28</b>
<b>4. Estudios de la emisión de fosforescencia de la sonda <math>S_1</math>[Tb]</b> .....	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>1. Cronograma</b> .....	<b>35</b>
<b>2. Parte general</b> .....	<b>35</b>
<b>3. Desarrollo sintético</b> .....	<b>36</b>
3.1. Síntesis del péptido Fmoc- $P_1$ .....	36
3.2. Acoplamiento entre el péptido $P_1$ y el espaciador .....	38
3.3. Síntesis del derivado $L_1$ .....	39
3.4. Síntesis del ligando $L_2$ .....	39
3.5. Síntesis del producto $S_1$ .....	40
<b>4. Cálculo de la concentración del péptido</b> .....	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>47</b>



# INTRODUCCIÓN

## 1. Los patógenos en la vida cotidiana. El caso de *Pseudomonas aeruginosa*

Las bacterias constituyen el grupo más grande de patógenos que se relacionan con los seres humanos. Algunos ejemplos de enfermedades producidas por bacterias son el tétanos, la tuberculosis o el cólera. Las herramientas actuales para diagnóstico médico no suelen determinar de forma rápida cuál de las numerosas bacterias provoca la enfermedad al paciente. En la mayoría de los casos, se requieren métodos de cultivo que necesitan días para poder identificar las cepas bacterianas causantes de la enfermedad, lo que en ocasiones supone un retraso en el inicio del tratamiento que puede resultar mortal, de modo que los médicos intentan cubrir todas las posibilidades recetando antibióticos de amplio espectro.

La falta de diagnóstico de la enfermedad y la receta de antibióticos de amplio espectro genera resistencias de las bacterias a los mismos, lo cual supone un riesgo creciente para la salud pública. Resulta alarmante la rápida propagación a nivel mundial de bacterias multirresistentes que son causa de infecciones comunes, pero a su vez son resistentes al tratamiento de fármacos antimicrobianos. Este fenómeno se ha originado principalmente por mutaciones en los genes bacterianos, bien por herencia o incluso a través de elementos genéticos móviles, como los plásmidos.

Diversos estudios han evidenciado una relación directa entre el consumo de antibióticos y la aparición y diseminación de cepas de bacterias resistentes.

Este hecho provoca numerosos problemas, como la necesidad de tomar antibióticos más severos y las repercusiones que puedan originar en el cuerpo, tratamientos más caros o un aumento en el número de hospitalizaciones [1].

Por este motivo, existe un **gran interés en el desarrollo de nuevos sensores que permitan realizar una detección rápida del patógeno causante de la enfermedad.**

De entre las distintas bacterias patógenas, *Pseudomonas aeruginosa* es considerada la quinta causa más frecuente de infecciones a nivel mundial, la segunda de neumonía nosocomial, la tercera de infecciones urinarias, la cuarta de infecciones quirúrgicas, la séptima responsable de sepsis. Además, destaca por estar relacionada con un 10-15 % de las infecciones nosocomiales que se adquieren en los hospitales del mundo, debido a las capacidades para persistir en condiciones ambientales adversas, así como a los mecanismos de patogenicidad que posee [2].

La patogenicidad de las bacterias tiene lugar por la producción y excreción al medio extracelular de factores de virulencia. Dentro de estos factores se encuentran diversas enzimas, como proteasas y elastasas.

*P. aeruginosa* es capaz de formar biofilms, es decir, de crecer embebida en una matriz de exopolisacáridos y adherida a una superficie inerte o un tejido vivo, lo que aporta una mayor resistencia a las sustancias químicas agresivas, a los antibióticos y a los componentes del sistema inmunitario cuando están provocando la infección. Además, puede desarrollar rápidamente

resistencia a los fármacos antimicrobianos mediante la adquisición de genes de resistencia en elementos genéticos móviles [3]. Por tanto, el tratamiento de las enfermedades provocadas por *P. aeruginosa* supone una dificultad clínica.

### 1.1. Elastasa B de *P. aeruginosa*

La elastasa B (LasB), también conocida como pseudolisina, es una metaloenzima multifuncional secretada por la bacteria que se encarga de dirigir bastantes eventos fisiopatológicos durante el hospedaje de la bacteria en el cuerpo humano. En la fase aguda de las infecciones por *P. aeruginosa*, LasB degrada los constituyentes proteicos de la matriz extracelular de las células del huésped, induciendo lesiones tisulares y hemorragias. Además, LasB muestra acciones relevantes durante las infecciones crónicas a través de su capacidad para manipular las respuestas del huésped mediante la degradación de varios componentes de las defensas inmunitarias. LasB ejerce su actividad cortando la secuencia peptídica -GLA- (-glicina-leucina-alanina-) entre los residuos de glicina y leucina, aunque se ha demostrado que LasB también escinde la secuencia -AAAA-.

Teniendo en cuenta el modo de acción de LasB, el grupo de investigación del Dr. Fernández Trillo, ha desarrollado nanopartículas de complejos poli-iónicos que se degradan en presencia de LasB, y no de otras elastasas endógenas, liberando polímeros antimicrobianos. Esa liberación del polímero se produce cuando la enzima corta el péptido con secuencia Ac-C-E-GLA-E-C-OH.

Sin embargo, a pesar de haber sido utilizada como diana para inducir la liberación controlada de sustancias antimicrobianas, **apenas se ha utilizado como diana para desarrollar sensores luminiscentes basados en péptidos que permitan monitorizar su actividad y por tanto detectar la presencia de *P.aeruginosa*.**

## 2. Proteínas y péptidos

### 2.1. Enlace peptídico y estructura de las proteínas

Los péptidos y las proteínas son polímeros naturales formados por  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces amida, también conocidos como enlaces peptídicos. Estos enlaces se forman por la condensación de un grupo carboxilato de un aminoácido con un grupo amino del siguiente aminoácido, eliminándose una molécula de agua [4].

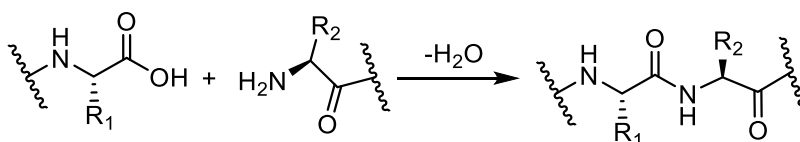


Figura 1. Formación de un enlace peptídico por condensación de un ácido y una amina

Todos los aminoácidos son  $\alpha$ , es decir, el grupo amino se encuentra unido con respecto al grupo ácido en la posición  $\alpha$ , y pertenecen a la serie L, lo que significa que todos tienen la misma estereoquímica. Sin embargo, los aminoácidos se diferencian entre sí por sus cadenas laterales que son diferentes. Si atendemos a la naturaleza de las cadenas laterales, los aminoácidos se pueden clasificar en aminoácidos *no polares* (G, A, V, L, I, M, F, P, W), *polares* (S, T, N, Q, Y, C), *ácidos* (D, E) y *básicos* (K, R, H).

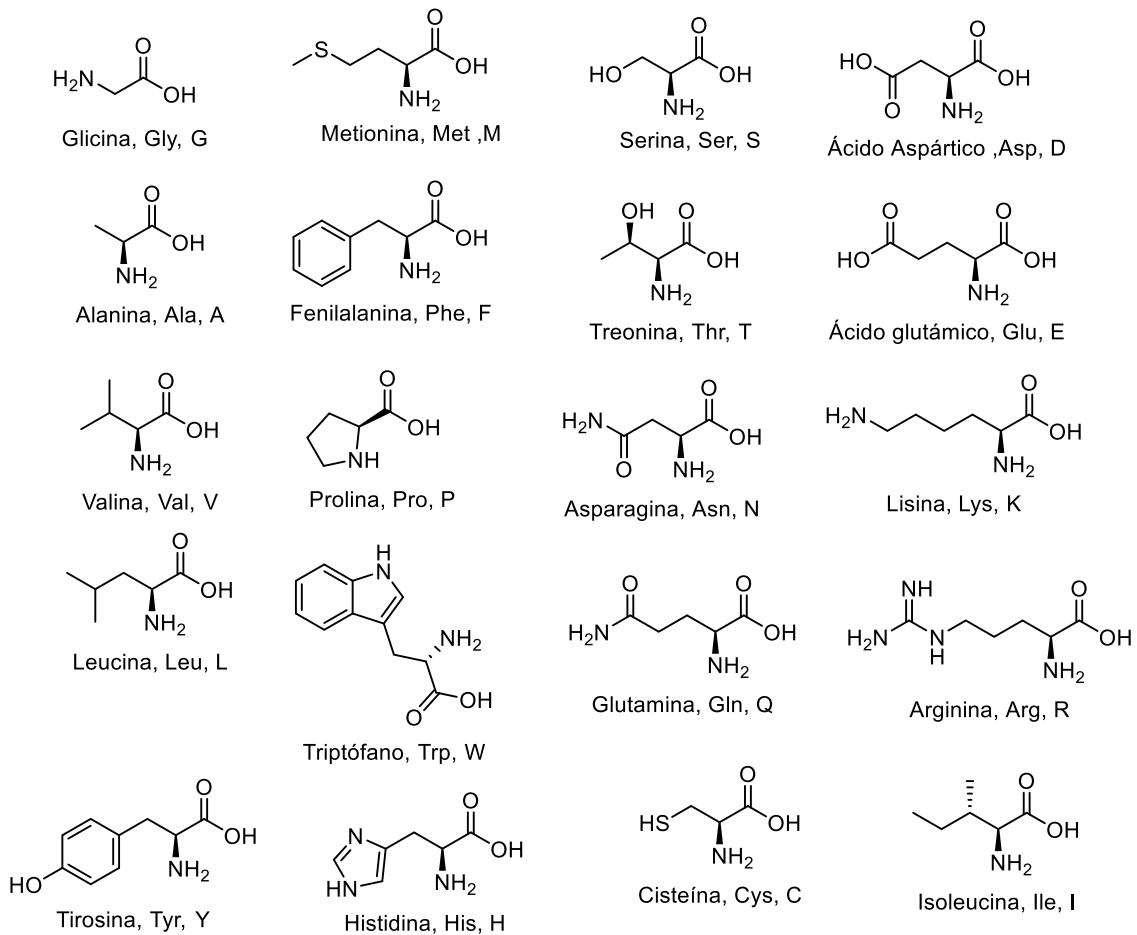


Figura 2. Estructura y códigos de una y tres letras para los aminoácidos más comunes.

Las proteínas no se encuentran formando una larga cadena lineal polipeptídica, sino que se pliegan para formar una única estructura tridimensional que determina muchas de sus funciones biológicas. Por tanto, no solamente es necesario conocer la estructura primaria de una proteína, que consiste en la secuencia de sus aminoácidos a lo largo de la cadena peptídica, sino que hay que considerar también su estructura *secundaria*, *terciaria* e incluso, si la proteína está formada por varias subunidades, su *estructura cuaternaria* [5].

## 2.2. Síntesis de péptidos en fase sólida

El método de síntesis de péptidos en fase sólida fue desarrollado por Merrifield en 1963 y se ha convertido en la metodología por excelencia para preparar péptidos de una forma rápida. La técnica se basa en adición secuencial de aminoácidos a un soporte polimérico. Para ello, los aminoácidos se introducen con sus cadenas laterales protegidas, de forma que en cada acoplamiento se forma un nuevo enlace amida entre el extremo *N*-terminal de la cadena peptídica unida a la resina y el nuevo aminoácido.

La característica fundamental de esta técnica es que se lleva a cabo en un soporte polimérico que influye en la síntesis, principalmente en función de su capacidad para solvarse y permitir de esa forma un acceso eficiente de los reactivos a los sustratos inmovilizados en la resina.

Por otra parte, también tiene gran importancia el conector que proporciona una unión reversible entre el péptido y la resina y, simultáneamente, protege el extremo *C*-terminal

durante el proceso de la elongación de la cadena. El conector determina también la funcionalidad que resulta al final de dicho extremo.

Para que los acoplamiento se produzcan de forma efectiva, las cadenas laterales de los aminoácidos se protegen durante toda la síntesis, empleando grupos protectores que no se vean afectados por las condiciones de los acoplamiento. Los aminoácidos se van añadiendo con el grupo amino protegido de forma temporal y una vez acoplado el aminoácido éste se desprotege para continuar con el siguiente acoplamiento [6].

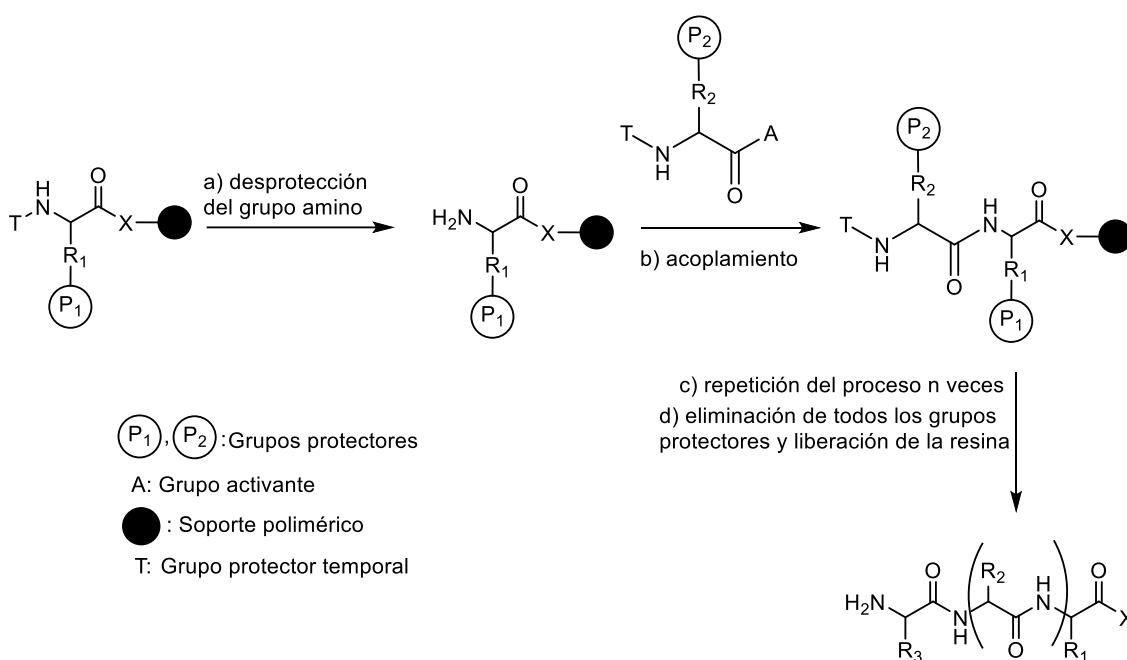


Figura 3. Representación del proceso de síntesis de péptidos en fase sólida

Hay dos metodologías principales que se diferencian en los grupos protectores que se emplean: Boc/Bzl o Fmoc/t-Bu.

El grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc) se desprotege en medio ácido por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA). Por el contrario, el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) se desprotege en medio básico empleando piperidina. Generalmente los grupos protectores de las cadenas laterales, tipo bencil (Bzl) o *t*-butil (*t*-Bu), se escogen de forma que se rompan en condiciones análogas que las que se emplean para la liberación del péptido de la resina.

En la metodología Boc/Bzl la rotura final utiliza ácidos fuertes, como el HF o el ácido trifluorometanosulfónico, mientras que en caso de la estrategia de Fmoc/*t*-Bu es suficiente con tratamiento con TFA [6].

Este último procedimiento soluciona los posibles problemas que puede traer el uso de ácidos fuertes a las cadenas laterales de los aminoácidos. Las desprotecciones del extremo *N*-terminal se realizan con una base suave (piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF) como disolvente) y el TFA solamente se emplea para la desprotección final.

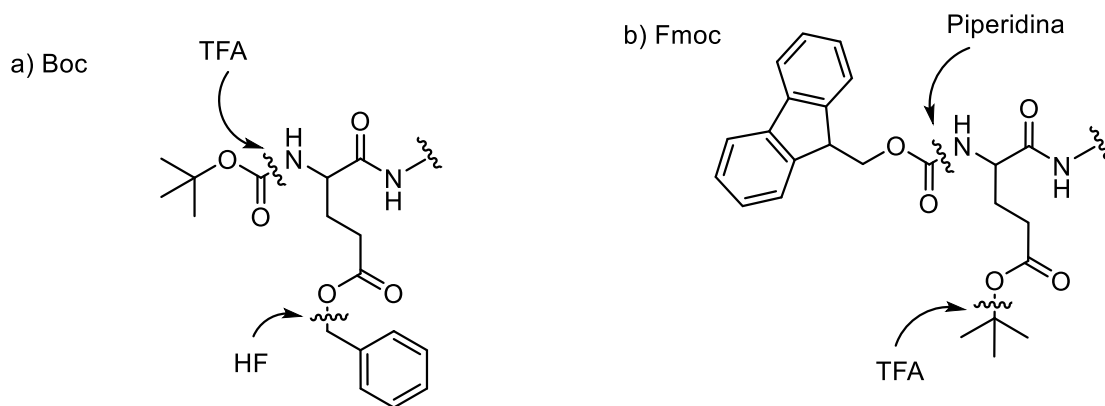


Figura 4. Forma de ruptura para el Boc y para el Fmoc, cada uno con su respectivo reactivo.

La etapa clave de la síntesis de péptidos en fase sólida es la formación de los enlaces amida entre los aminoácidos, que requiere la activación del grupo carboxilo. Existen cuatro formas principales de llevar a cabo la activación [6]:

- a) **Carbodiimidas:** Constituyen uno de los agentes activantes más extendidos. Su principal limitación es que pueden producir deshidratación de residuos de Asn y Gln. Uno de estos agentes es la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC):

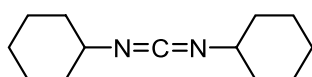


Figura 5. Molécula de DCC.

- b) **Anhídridos de ácido:** Se utilizan fundamentalmente en la metodología Boc/Bzl y se suelen generar *in situ* utilizando dos equivalentes del aminoácido protegido y un equivalente de DCC. Se trata de un método poco eficiente ya que se han de utilizar dos equivalentes del aminoácido protegido para formar la especie activada, de la cual habrá que añadir exceso.
- c) **Esteres activos:** Utilización de aminoácidos modificados en forma de ésteres altamente reactivos, por ejemplo el del HOBt:

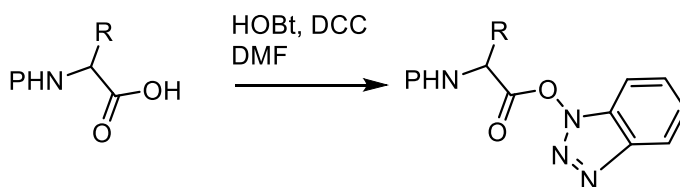


Figura 6. Preparación de un éster activo de HOBt de un aminoácido

- d) **Formación *in situ* de ésteres activos:** Es el método más utilizado y consiste en la activación del ácido *in situ*. Se trata de una metodología muy fácil de usar que permite llevar a cabo reacciones limpias y rápidas, incluso entre aminoácidos con impedimentos estéricos.

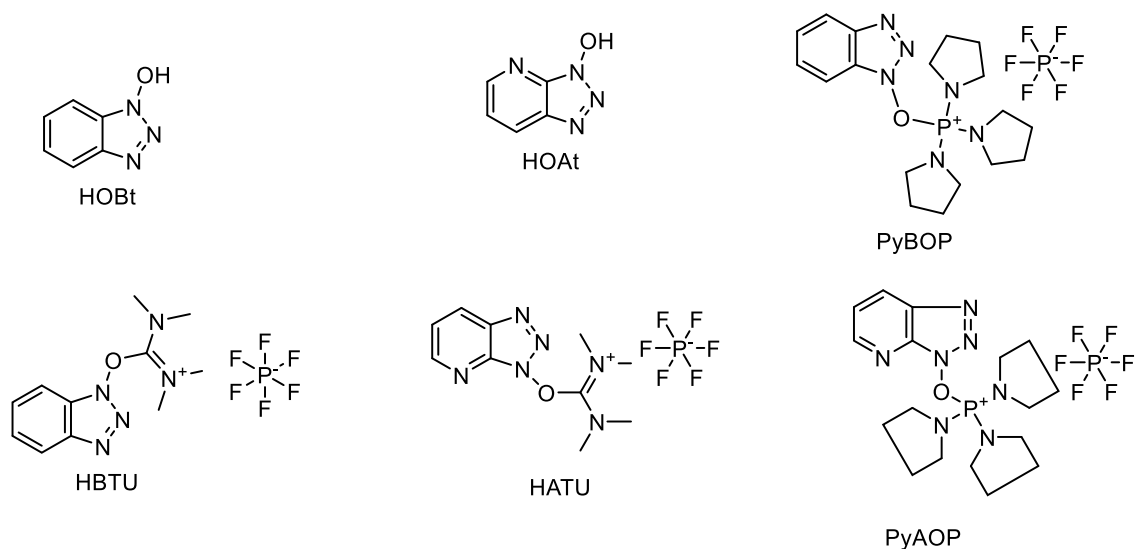


Figura 7. Agentes activantes comúnmente utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida.

A continuación, se ejemplifica el mecanismo de la reacción de activación para el caso del HBTU:

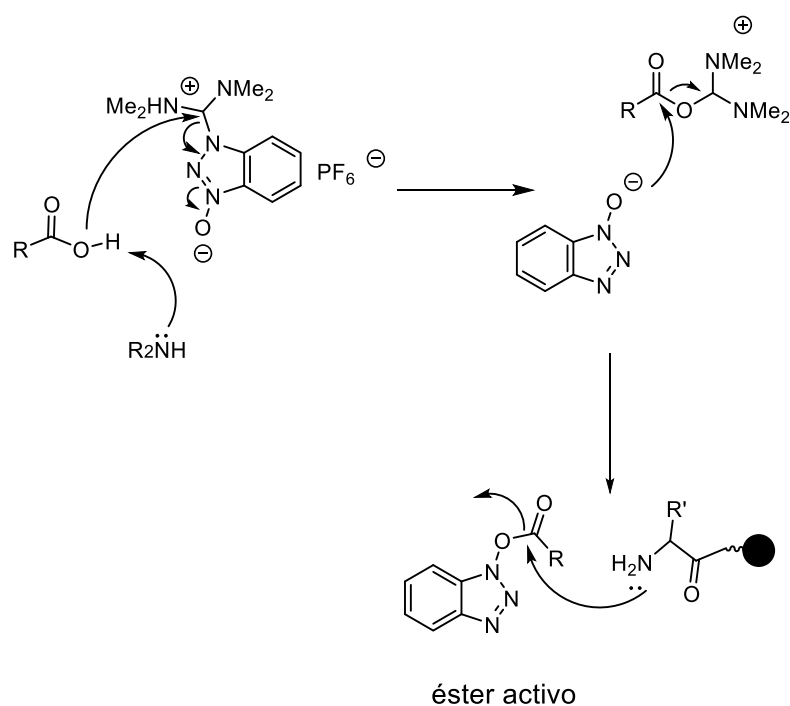


Figura 8. Activación de un ácido, formación *in situ* del éster activo y acoplamiento.

La mayor ventaja de la síntesis de péptidos en fase sólida sobre la química clásica en disolución es la posibilidad de utilizar exceso de reactivos, garantizando un alto rendimiento de cada uno de los pasos de la síntesis.

Otra ventaja es que los productos laterales que se generan en disolución se filtran al finalizar el acoplamiento y desprotección, no siendo necesarios procesos de purificación intermedios.

Sin embargo, la mayor limitación es que los subproductos de las reacciones que se generan en la resina se irán acumulando a lo largo de toda la síntesis y la separación final del producto puede

ser un proceso complicado, pues en algunas ocasiones los productos secundarios suelen tener características físicas y químicas similares, lo que repercute en técnicas como la purificación en HPLC ya que los productos laterales presentan propiedades cromatográficas similares [6].

### 3. Sensores luminiscentes

Debido a la importancia de desarrollar nuevas herramientas que permitan realizar un diagnóstico preciso y que permitan comprender los mecanismos por los que se desencadenan las distintas patologías, en los últimos años ha habido un gran interés en el desarrollo de biosensores. De entre todas las técnicas de diagnóstico, las técnicas luminiscentes son muy interesantes gracias a su simplicidad, a la alta sensibilidad y especificidad y a la posibilidad de obtener información espacial y temporal con gran resolución [7].

#### 3.1 Luminiscencia

Se denomina luminiscencia al proceso de emisión de un fotón desde un estado excitado de una molécula a su estado fundamental. La mayoría de las veces, la emisión se produce entre los niveles  $S_1 \rightarrow S_0$  y se conoce como fluorescencia. Se define el rendimiento cuántico como el número de fotones emitidos por cada 100 fotones incidentes.

En un proceso de emisión de luminiscencia, el espectro, el rendimiento cuántico y el tiempo de vida, se ven afectados por las interacciones que se producen entre la molécula excitada y su entorno, lo que permite obtener información sobre el microentorno de la molécula luminiscente. El estado excitado puede evolucionar a través de multitud de procesos que se representan normalmente en un Diagrama de Jablonski.

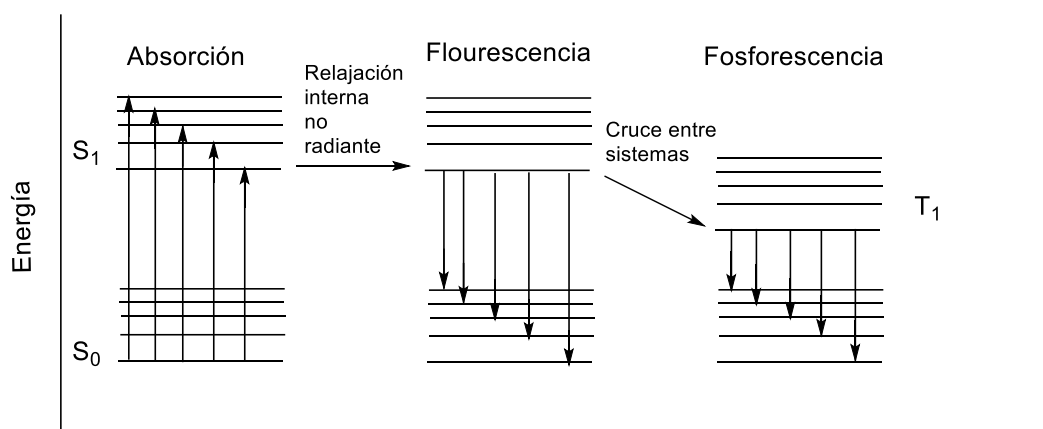


Figura 9. Diagrama de Jablonski.

#### 3.2 Complejos de lantánidos luminiscentes

Muchos de los complejos de lantánidos trivalentes son luminiscentes en las regiones del visible e infrarrojo cercano, pero algunos emiten más que otros. Normalmente, los complejos de lantánidos luminiscentes se caracterizan por presentar un tiempo de vida medio (tiempo que tarda en regresar a la configuración de mínima energía del estado fundamental pasado un lapso de tiempo un estado excitado) excepcionalmente largo, del orden de milisegundos, y bandas de absorción muy estrechas, lo que permite que su emisión se pueda medir fácilmente sin interferencias de la señal de autofluorescencia de los medios biológicos y, por tanto, son muy

interesantes para desarrollar biosensores. De la serie de los lantánidos los que presentan mejores propiedades de emisión son Tb(III) y Eu(III) [7].

Los lantánidos trivalentes emiten luminiscencia por transiciones que involucran a orbitales  $4f$ , prohibidas por las reglas de selección, y como resultado presentan un coeficiente de absorción muy bajo (menor de  $10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [7]. Este coeficiente de absorción bajo provoca que no se pueda excitar directamente a los lantánidos. Para solucionar este problema se recurre a un método de excitación indirecta, conocido como sensibilización o efecto antena, en el que la excitación se produce a través de un ligando orgánico próximo al lantánido, cuya excitación se transfiere a continuación al ion metálico.

La sensibilización produce la emisión de luminiscencia por parte del ion metálico mediante un proceso que consta de tres etapas, esquematizadas en la figura siguiente:

1. La luz se absorbe en el entorno del Ln(III) por un cromóforo orgánico.
2. La excitación se transfiere a uno o varios estados excitados del ion metálico.
3. Se produce emisión de luminiscencia por parte del metal.

Cabe destacar que en el proceso de sensibilización no es necesaria la unión directa entre el cromóforo y el centro metálico, si no que su proximidad en el espacio a menos de  $20 \text{ \AA}$  es suficiente para tener un proceso de transferencia de energía eficiente entre ambas especies [8].

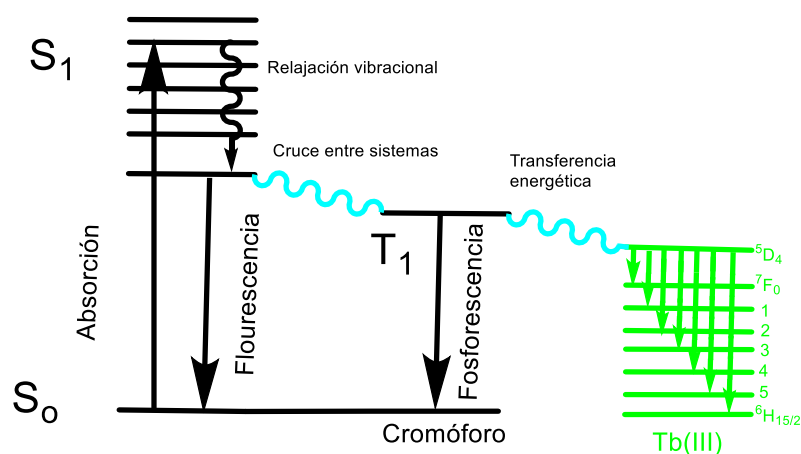


Figura 10. Representación de la transferencia de energía durante la sensibilización de los lantánidos.

### 3.3 Sensores basados en complejos de lantánidos

Para llevar a cabo un diseño de un sensor basado en complejos de lantánidos luminiscentes, habitualmente se trata de modular la luminiscencia mediante mecanismos que dependen de la concentración de un analito [9]:

- a. Interacción directa entre el analito y el catión lantánido, es decir, en ausencia de analito el complejo de Ln(III) no emite luminiscencia y cuando el analito se une a él sí emite luminiscencia.



- b. El analito interfiere en las propiedades fotofísicas del complejo, es decir, el complejo de Ln(III) pasa de emitir luminiscencia en ausencia de analito a no ser luminiscente cuando el analito está presente.
- c. El analito actúa como antena del complejo no luminiscente y una vez que el analito se encuentra a una distancia adecuada para que el proceso de sensibilización sea efectivo, se producirá la emisión de fluorescencia.
- d. El analito cambia la estructura del sensor provocando un cambio en la intensidad de emisión del complejo metálico.

Existen precedentes de sensores de enzimas basados en complejos peptídicos de lantánidos.

De los distintos ejemplos que se pueden encontrar en la bibliografía se describen los siguientes por su similitud con el sensor que se desarrollará en este trabajo fin de grado. El elemento común de ambos sensores es que se basan en secuencias peptídicas que contienen un complejo macrocíclico de un ion lantánido para monitorizar la actividad de quinasas o fosfatasas. En el año 2012 E. Pazos *et al.* describieron un sensor que contiene la secuencia de reconocimiento de la proteína quinasa C (PKC) y un ligando derivado de DO3A que no satisface el número de coordinación del lantánido el cual permite la coordinación de una antena externa resultando en un complejo luminiscente. La fosforilación del residuo de serina por PKC supone la coordinación del fosfato introducido y el desplazamiento de la antena externa disminuyendo la luminiscencia del sensor. Sin embargo, cuando se trata la versión fosforilada de la sonda con fosfatasa alcalina se elimina el grupo fosfato y se recupera la luminiscencia por parte del sensor [9].

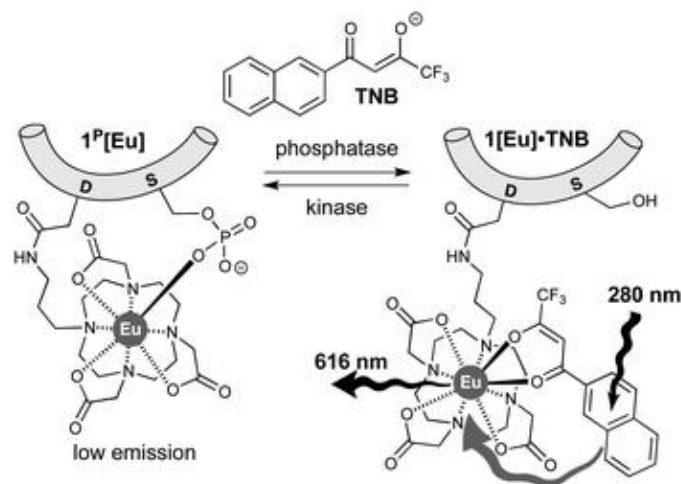


Figura 11. Equilibrio de la sonda luminiscente con una antena externa para la monitorización de la actividad enzimática de PKC y la fosfatasa alcalina [9].

En el año 2017 González-Vera *et al.* describieron un sensor que permite monitorizar la actividad del complejo CDK4/ciclina D en extractos celulares de melanoma. En este caso el sensor contiene la secuencia específica del sustrato de la quinasa CDK4 y un dominio de unión de fofoaminoácidos (PAABD)[8]. En este caso, al producirse la fosforilación del sensor en presencia de CDK4, el complejo peptídico fosforilado es reconocido por PAABD lo que conduce a un cambio conformacional que aproxima la antena [10], en este caso un triptófano, al complejo de Tb(III) aumentando así la emisión de luminiscencia (Figura 12).

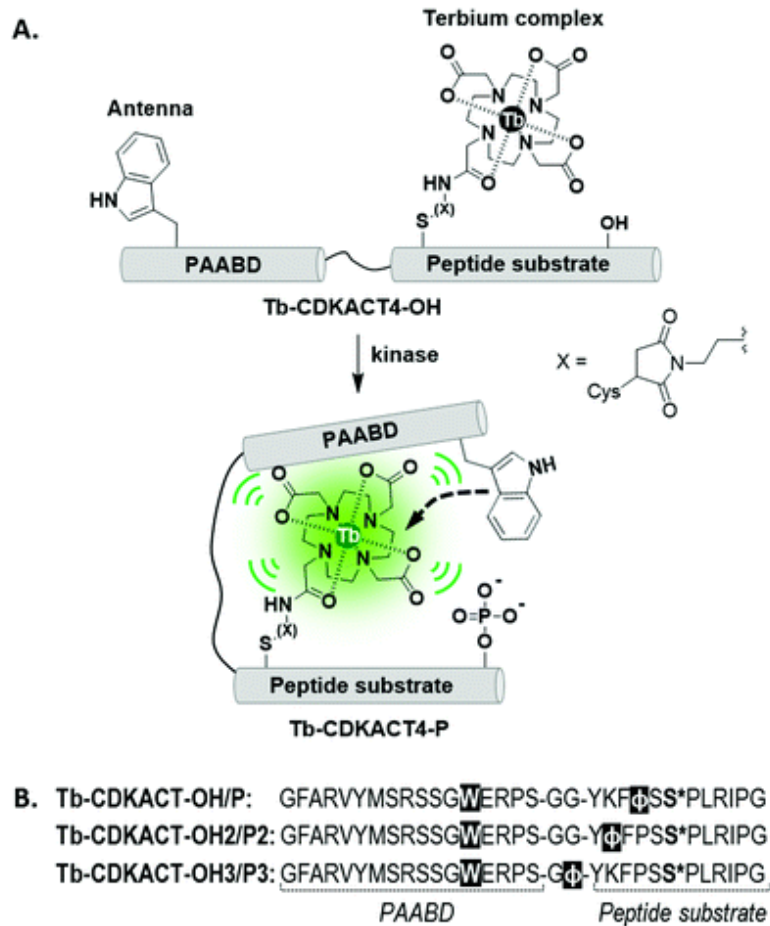


Figura 12. Representación de la sonda luminiscente que permite monitorizar la actividad de CDK4 [10].

# OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es la preparación de un complejo peptídico de terbio como sensor que permita monitorizar la actividad del enzima LasB de la bacteria *P. aeruginosa*.

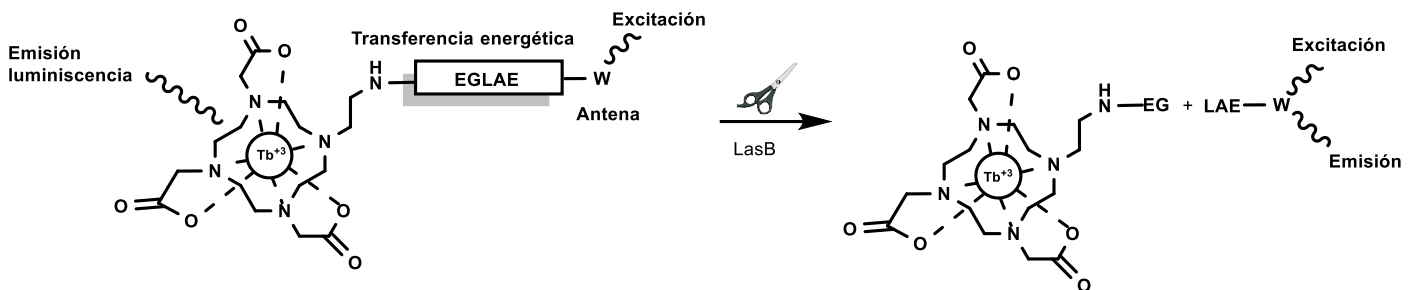


Figura 13. Esquema para la detección del enzima.

Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis de una secuencia peptídica que contenga la secuencia de reconocimiento de LasB (-GLA-), un residuo de triptófano (W), que actuará como antena del complejo metálico, y un residuo que permita acoplar el complejo metálico.
2. Preparación de un derivado macrocíclico de DO3A que permita su acoplamiento a la secuencia peptídica.
3. Acoplamiento del ligando macrocíclico al péptido, purificación y caracterización del conjugado peptídico.

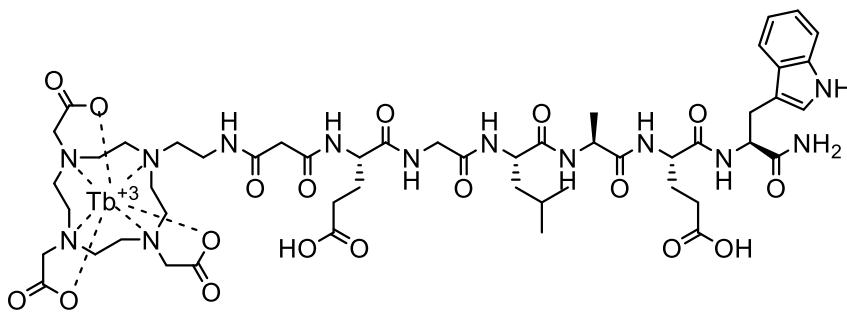


Figura 14. Estructura de la sonda.

4. Estudio de las propiedades fotofísicas del complejo peptídico de Tb(III).
5. Estudios de detección del enzima LasB.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Diseño y síntesis del péptido S<sub>1</sub>[Tb]

Como previamente se ha comentado, la finalidad de este trabajo es la síntesis de una sonda luminiscente, la cual será empleada para la detección de la bacteria *P. aeruginosa* a través de su enzima Elastasa B.

Para esta tarea, el péptido EGLAEW (Glutámico – Glicina – Leucina – Alanina – Glutámico – Triptófano) fue escogido para incorporarse a la sonda por incluir la secuencia de corte del enzima (-GLA-) (La elastasa B hidrolizará el enlace amida entre los residuos)[11]. También es necesario para el funcionamiento del sensor incorporar una antena, en este caso el triptófano terminal (W).

Por último, se requiere la presencia de un grupo quelatante de metales: ácido 1,4,7,10 – tetraazaciclododecano – 1,4,7,10 – tetraacético (DOTA). La elección de este macrociclo se basa en la posibilidad que ofrece para ser modificado con diversos grupos para desarrollar estructuras múltiples, así como la elevada constante de formación para los complejos que forma con lantánidos. Para el anclaje al péptido, el complejo ofrece la posibilidad de poder reaccionar con un espaciador, en este caso anhídrido succínico [12].

Lo esperado es que cuando se irradie con luz, la antena (triptófano) absorba esa energía y ocurra una transferencia energética hasta el lantánido, el cual debe emitir fosforescencia [13].

En presencia de la enzima el péptido será segmentado, de modo que la actividad enzimática será determinada en función de la variación de la emisión de fosforescencia a lo largo del tiempo.

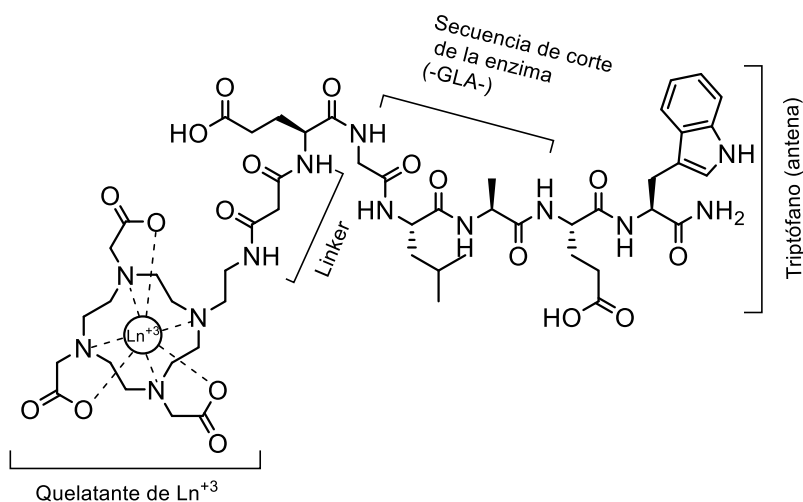


Figura 15. Esquema de las diferentes partes de la sonda.

El trabajo realizado se esquematiza en la Figura 16:

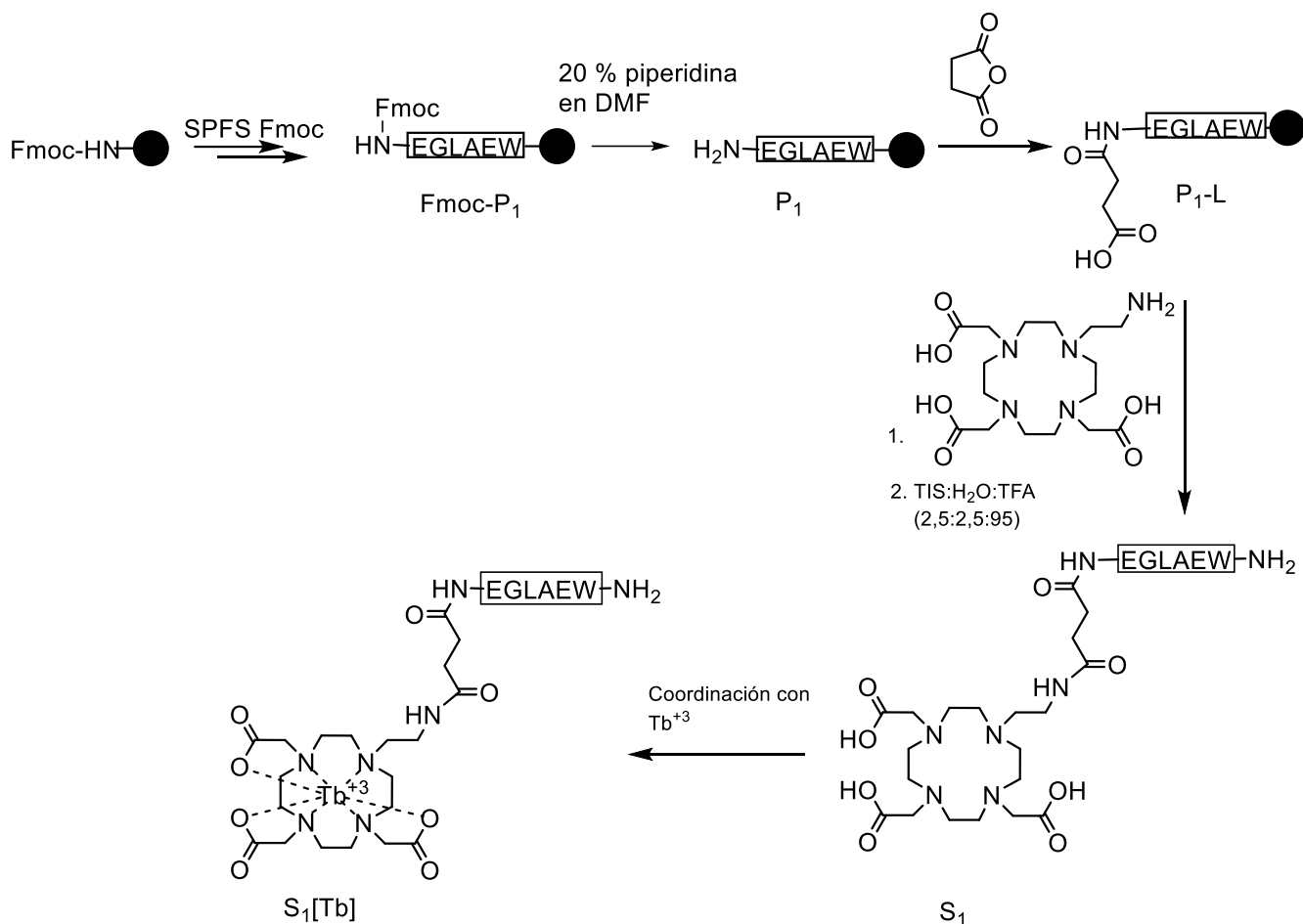


Figura 16. Esquema de trabajo para la síntesis de la sonda.

### 1.1. Síntesis del péptido $P_1$

El péptido fue sintetizado siguiendo los protocolos habituales de síntesis de péptidos en fase sólida, utilizando HBTU/HOBt como agente de acoplamiento. Una vez sintetizado el derivado peptídico Fmoc- $P_1$ , se desprotegió una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con la mezcla de desprotección (triisopropilsilano (TIS):H<sub>2</sub>O:TFA, 2.5:2.5:95) y el crudo de la desprotección se analizó mediante HPLC-UV y HPLC-MS.

Como se observa en la Figura 17, el cromatograma a 280 nm muestra un pico mayoritario con un tiempo de retención de 17.5 min que se identificó mediante espectrometría de masas como el péptido deseado.

En la Figura 18 se representa el cromatograma para el análisis HPLC-MS. El pico mayoritario, el cual sale a un tiempo de retención de 17, 7 min se corresponde al  $P_1$ . Se encontró un valor para un pico  $[M+H]^+$  de 925,7 que se asocia al producto deseado.

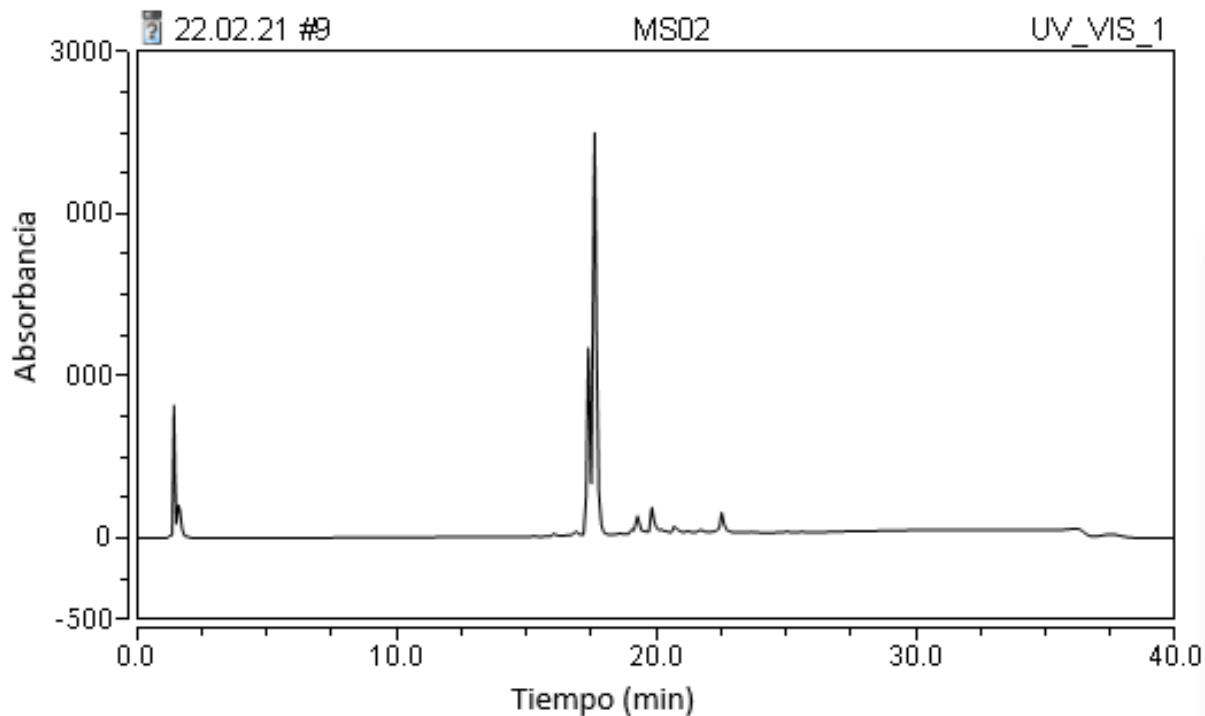


Figura 17. Cromatograma de HPLC-UV a 280 nm en el que el pico de 17,7 min corresponde al péptido EGLAEW.

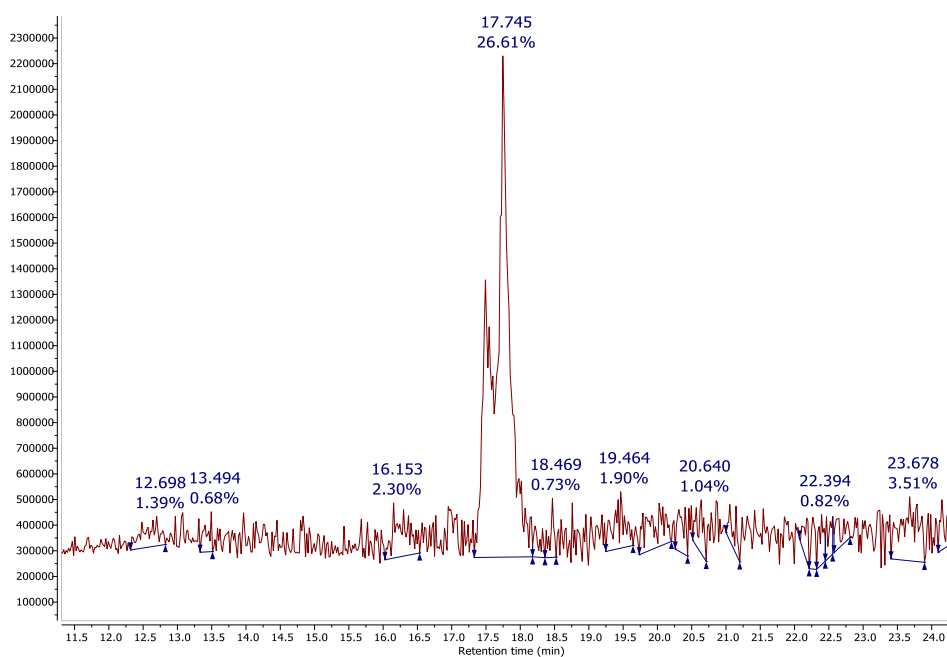


Figura 18. TIC (Total Ion Chromatogram) en el que se aprecia un pico a 17,7 min que se corresponde al péptido.

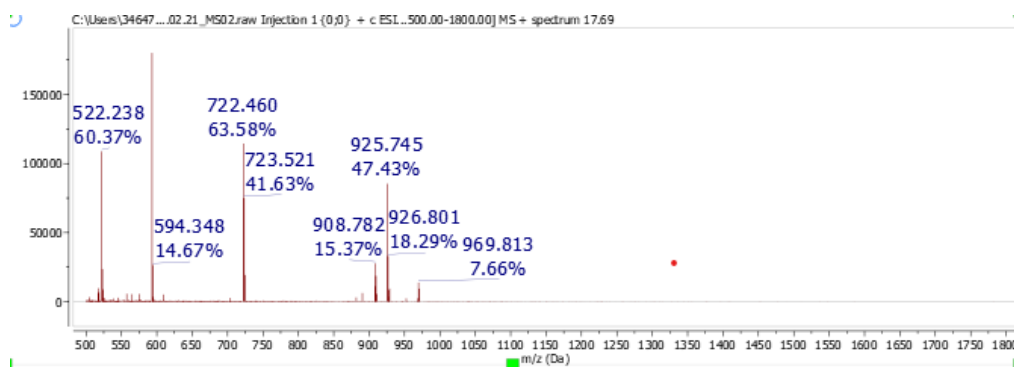


Figura 19. Valores los picos masa/carga para la señal del péptido EGLAEW.

Tras la confirmación de que el péptido se había obtenido de forma satisfactoria se continuó el experimento que se muestra en la Figura 20:

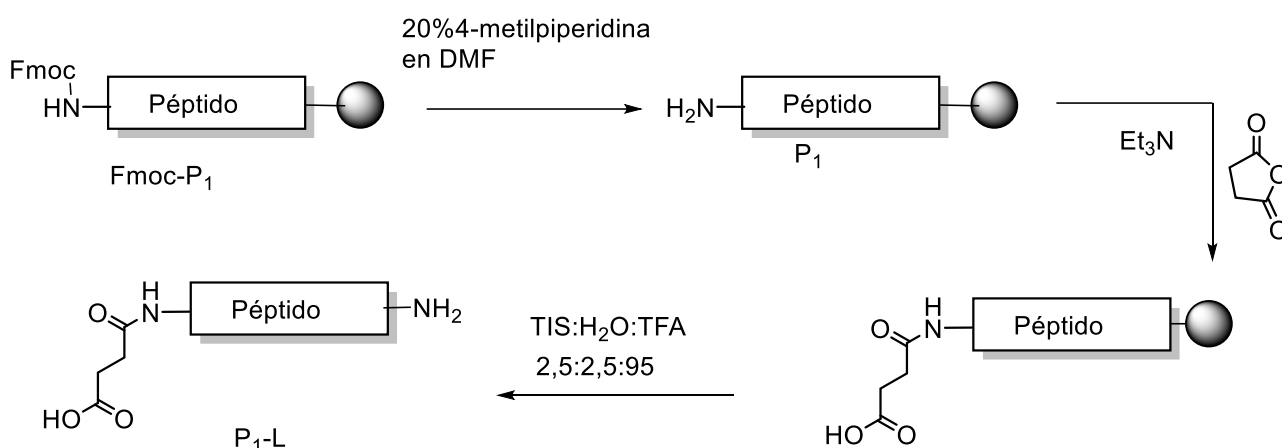


Figura 20. Esquema de trabajo para la síntesis de  $P_1$ -L.

Se llevó a cabo la reacción de desprotección del grupo Fmoc del extremo *N*-terminal por tratamiento con una disolución 20% 4-metilpiperidina en DMF y, a continuación, el acoplamiento con el anhídrido succínico en presencia de trietilamina en DMF como disolvente. Una vez realizado el acoplamiento, se desprotegió una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con la mezcla de desprotección TIS:H<sub>2</sub>O:TFA (2.5:2.5:95) y el crudo de la desprotección se analizó mediante HPLC-MS y HPLC-UV.

En el cromatograma de HPLC-UV a 280 nm se aprecia un pico de mayor intensidad en comparación a los restantes, el cual tiene un tiempo de retención de 13 minutos y que se asocia al producto  $P_1$ -L. Mediante HPLC-MS se identificó el producto deseado de la reacción, el cual presenta un pico con un tiempo de retención de 9,6 min.

Se encontró un valor para un pico  $[M+H]^+$  de 803,4; que confirmó que la reacción habría ocurrido de forma satisfactoria.

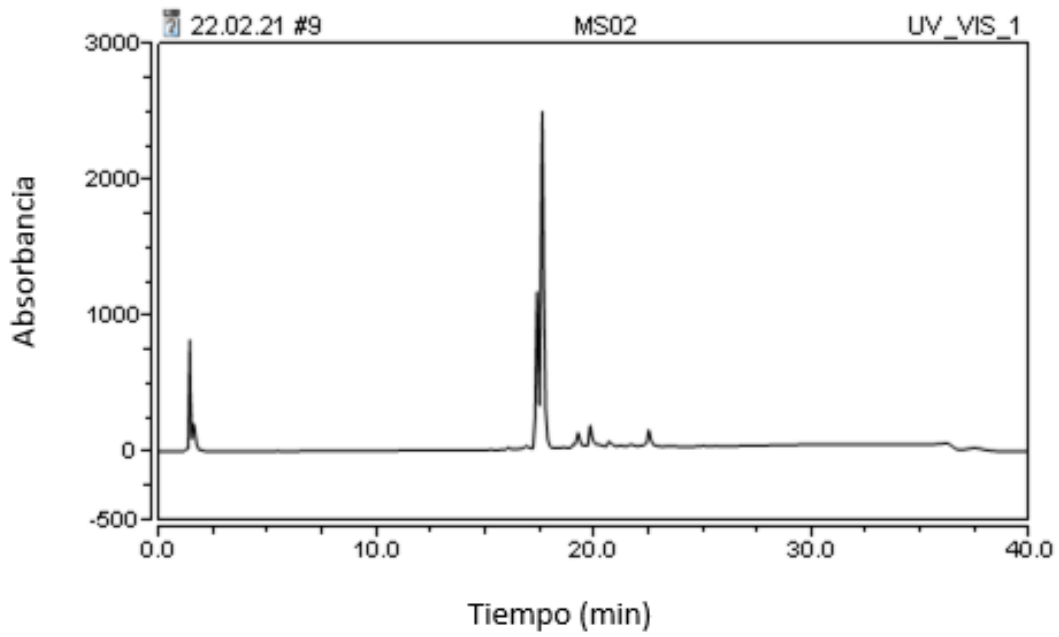


Figura 21. Cromatograma HPLC 280 en la que se aprecia un pico a 13 min correspondiente a el producto  $P_1$ -L.

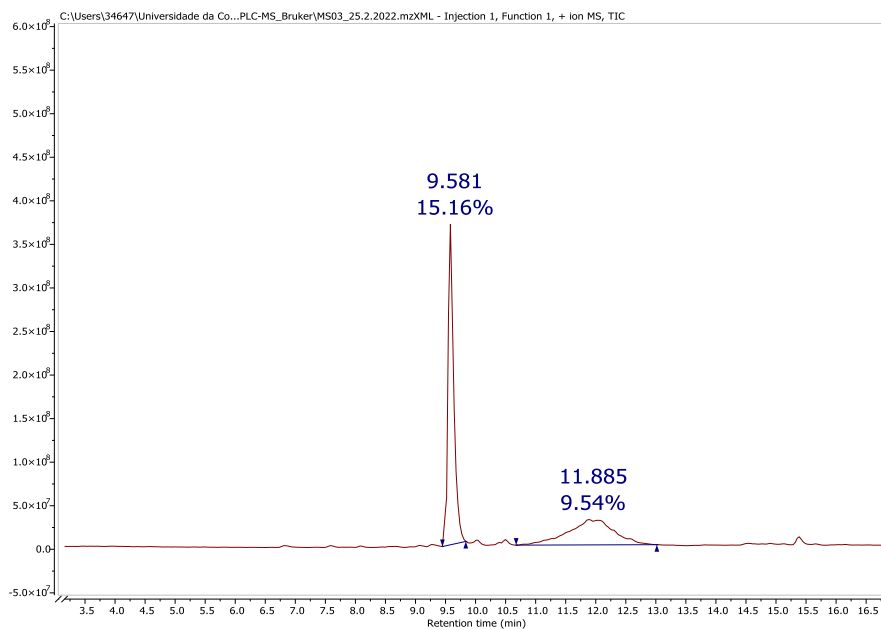


Figura 22. TIC (Total Ion Chromatogram) en el que se aprecia un pico con un tiempo de retención de 9,6 min que se corresponde al producto  $P_1$ -L-



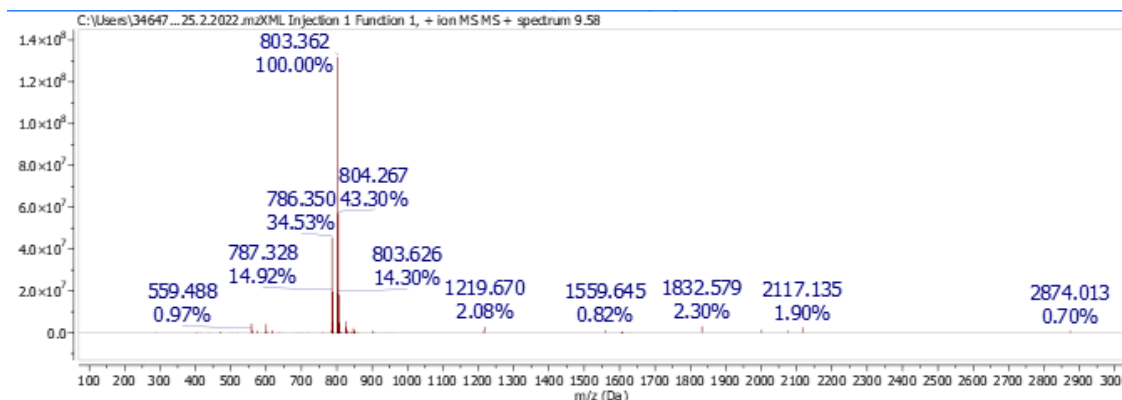


Figura 22. Picos de cromatograma HPLC-MS correspondiente al pico del producto P<sub>1</sub>-L.

## 2. Síntesis del ligando L<sub>2</sub>

Para llevar a cabo la síntesis del ligando L<sub>2</sub> se planteo la siguiente ruta sintética siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía [12]:

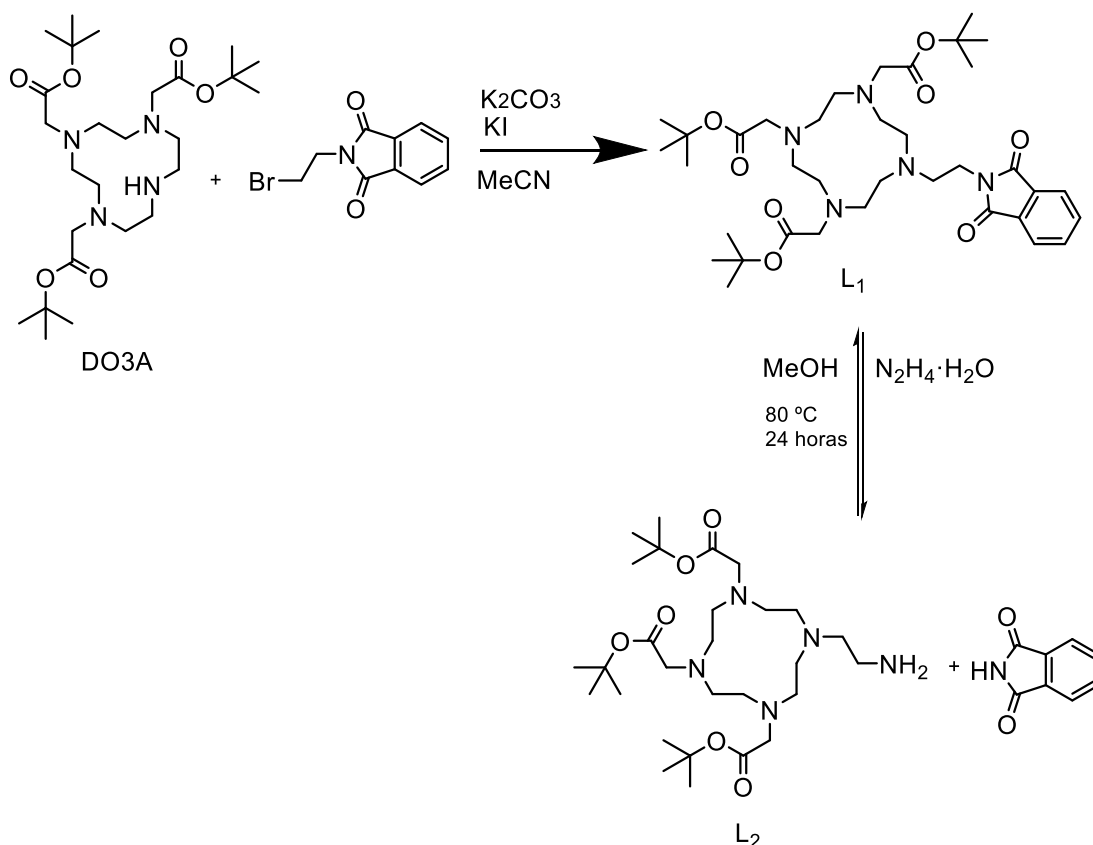


Figura 24. Esquema de trabajo para la síntesis del ligando L<sub>2</sub>.

### 2.1. Síntesis del precursor L<sub>1</sub>

Como se puede apreciar en la Figura 24, este apartado experimental consta de dos reacciones. La primera se muestra en la Figura 25:

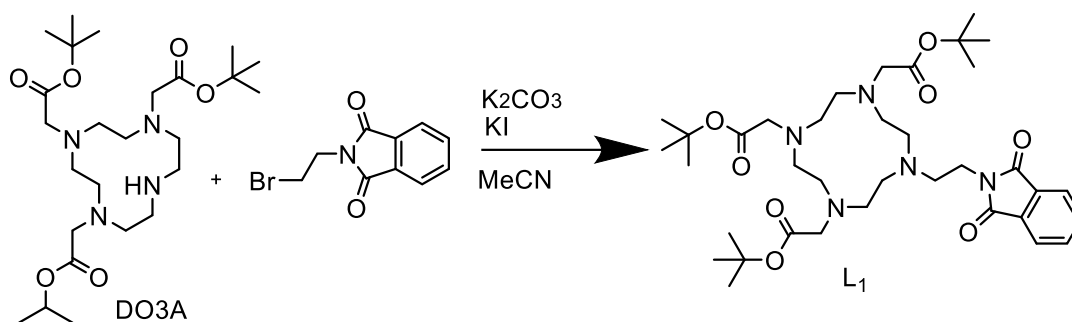


Figura 25. Síntesis del ligando  $L_1$ .

Se hizo reaccionar un equivalente de DO3A con un equivalente de N-(2-bromoetil)-ftalamida con acetonitrilo como disolvente.

Fue necesaria la adición de dos equivalentes más de N-(2-bromoetil)-ftalamida para considerar que la reacción de ataque  $S_N2$  (sustitución nucleófila bimolecular) por parte de la amina secundaria del DO3A al carbono electrófilo enlazado al Br del N-(2-bromoetil)-ftalamida se diese por concluida.

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente empleando condiciones de atmósfera inerte de Ar.

El seguimiento de esta reacción se llevó a cabo empleando la técnica de HPLC-MS, para lo cual a una alícuota del producto se le añadió una disolución  $H_2O:MeCN$  1:1 para ser inyectada en el equipo.

En la Figura 23 se muestra un pico de mayor intensidad, el cual se corresponde con un pico de relación  $m/z = 688,43$  que presenta un tiempo de retención de 21,5 minutos, que se relaciona con el producto deseado  $L_1$ .

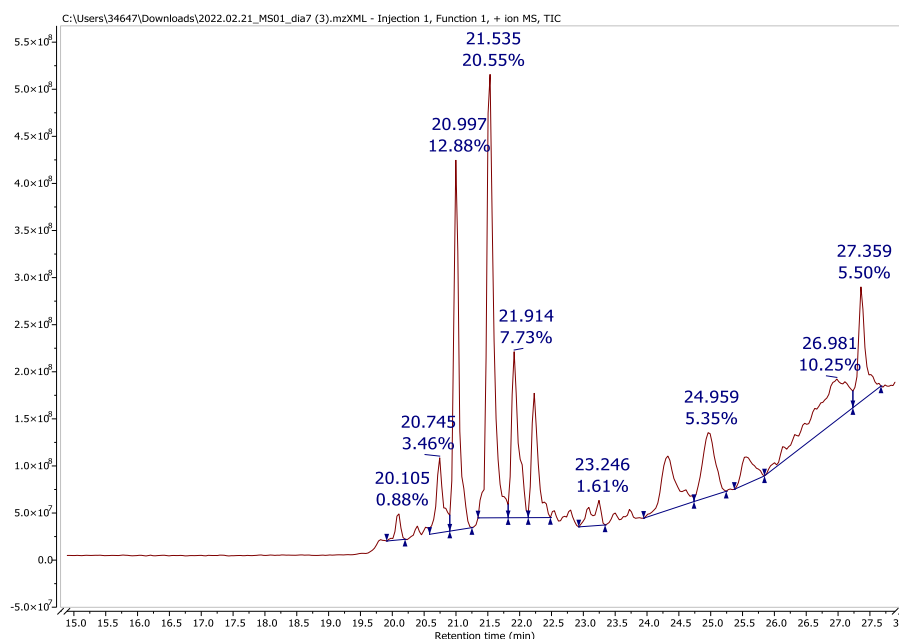


Figura 26. TIC (Total Ion Chromatogram) en el que el pico de 21,5 min se corresponde con el producto deseado  $L_1$ .

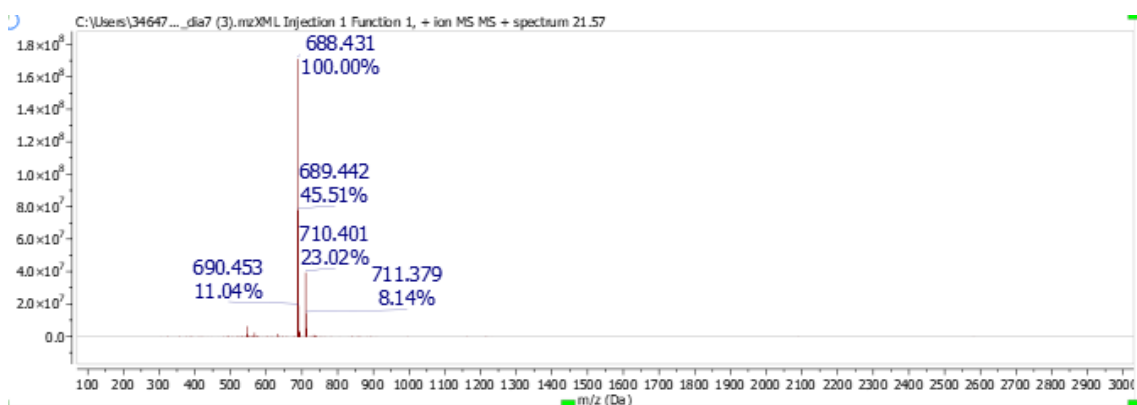


Figura 27. Picos de cromatograma HPLC-MS correspondientes al pico del producto L<sub>1</sub>.

Como se puede apreciar en la Figura 26 aparecen numerosos picos en el cromatograma aparte del producto deseado. El pico que muestra un tiempo de retención de 30,0 minutos y el de 21,9 minutos fueron asignados a los reactivos DO3A y N-(2-bromoetil)-ftalamida respectivamente.

## 2.2. Síntesis del ligando L<sub>2</sub>

En este apartado tiene lugar la segunda reacción descrita en la Figura 24:

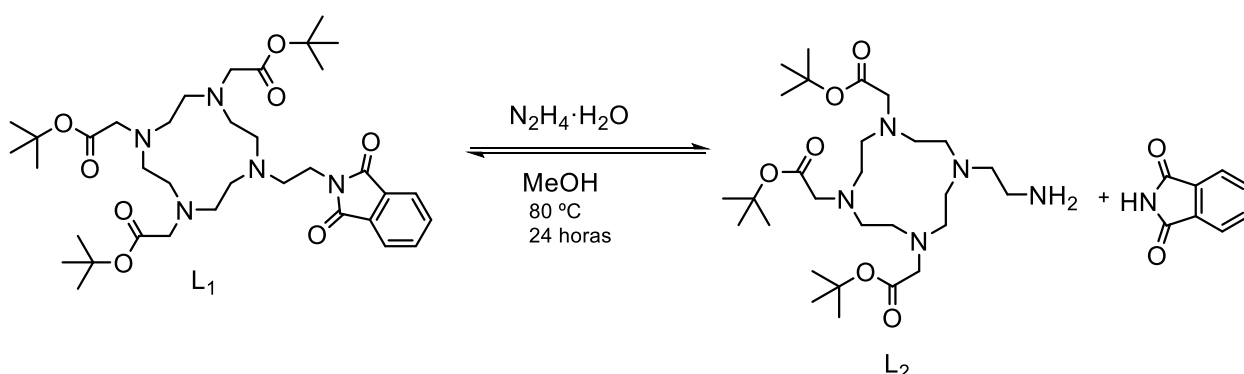


Figura 28. Síntesis del ligando L<sub>2</sub>.

Para este procedimiento, el producto L<sub>1</sub> obtenido fue disuelto en metanol y posteriormente se hizo reaccionar con 5 equivalentes de hidrazina a reflujo durante 24 horas a una temperatura de 80 °C. Fue necesario realizar dos adiciones a mayores de 5 equivalentes cada una de hidracina. El crudo de la reacción se analizó mediante HPLC-MS, observándose en el cromatograma un pico mayoritario en la Figura 29 con un tiempo de retención de 10,6 min que se corresponde con el ligando L<sub>2</sub>.

En la figura 29 se aprecia un pico [M+H]<sup>+</sup> con valor 558,4; el cual se corresponde con el producto deseado.

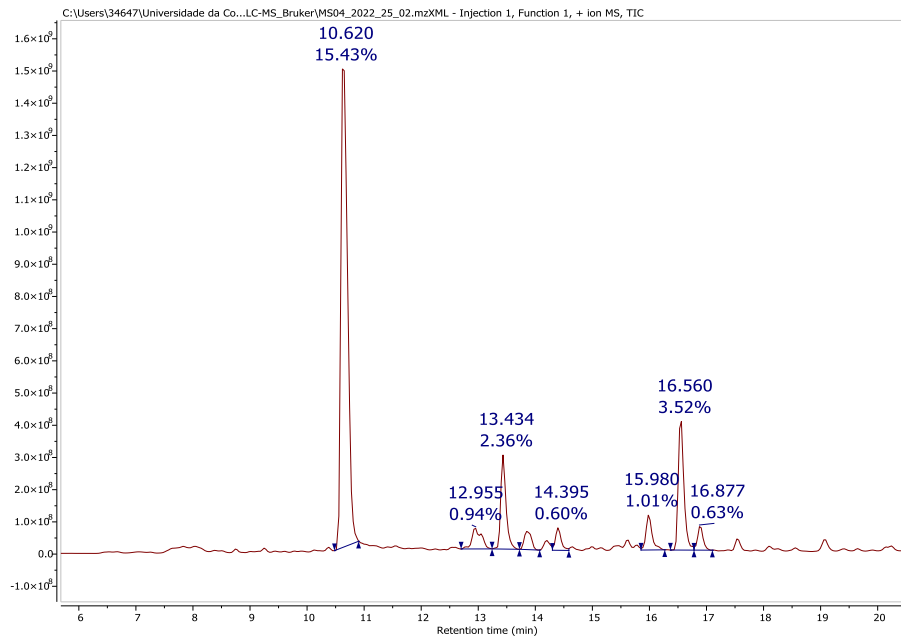


Figura 29. TIC (total ion chromatogram) en el que el pico a 10,6 min se identificó como el producto deseado  $L_2$ .

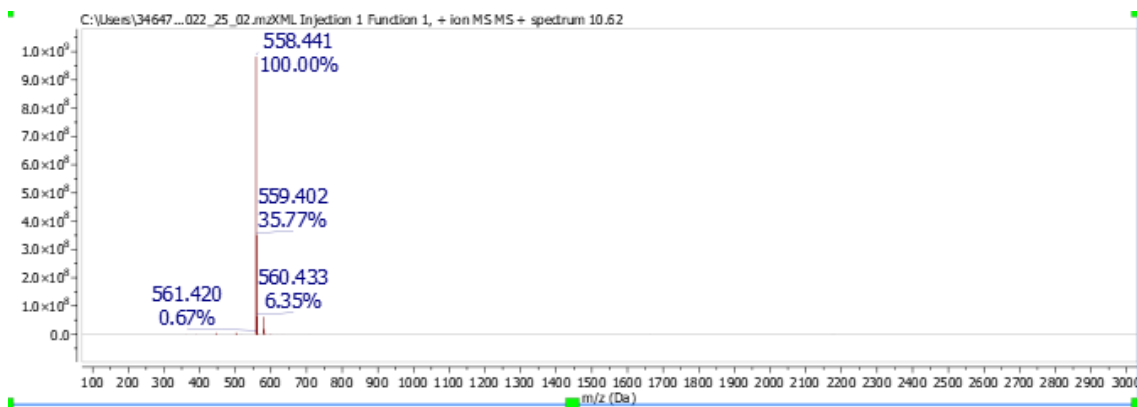


Figura 30. Espectro de masas del pico con tiempo de retención 10,6 min, correspondiente del producto  $L_2$ .

### 3. Acoplamiento entre el péptido y el ligando

El procedimiento que tiene lugar en este apartado es el siguiente:

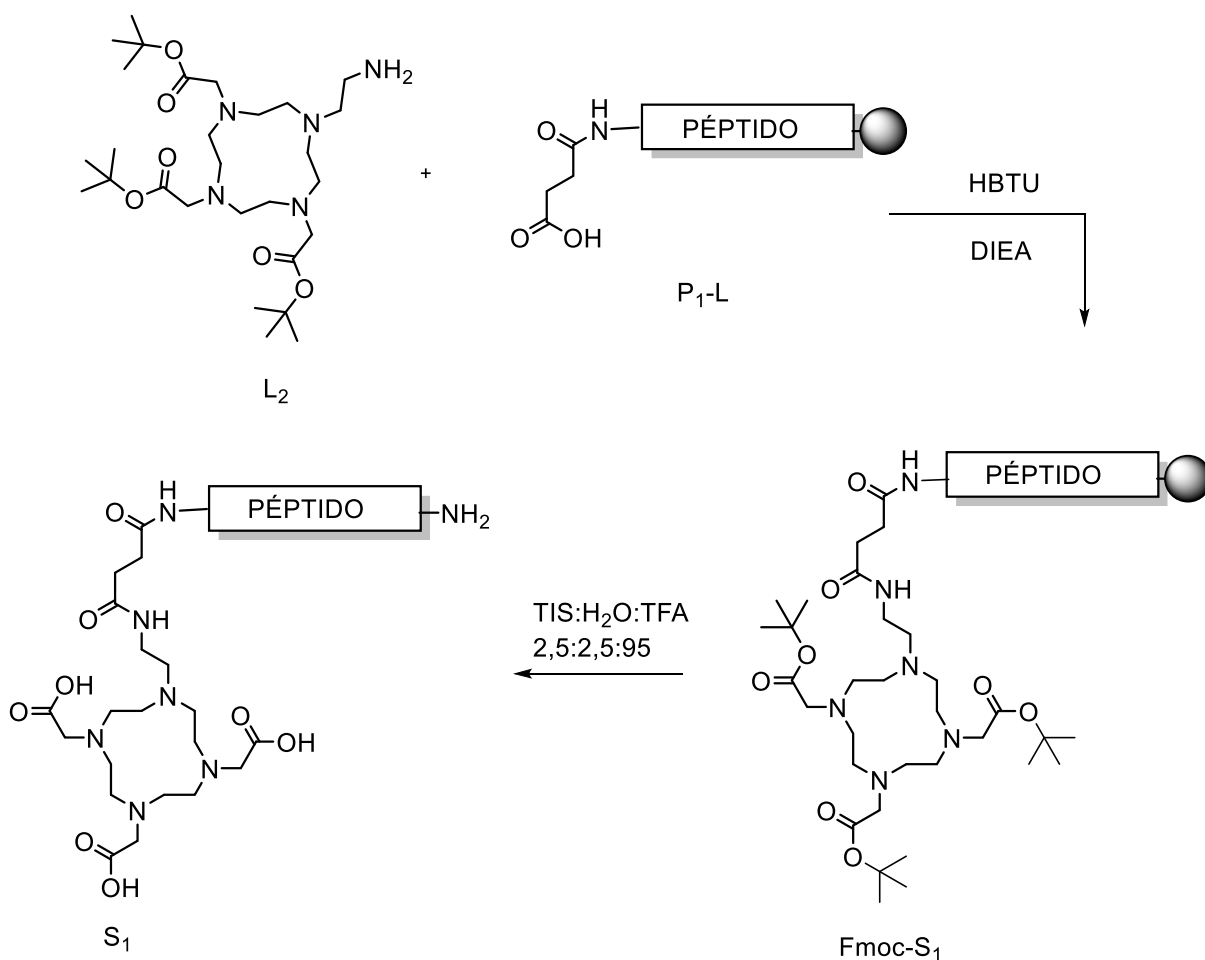


Figura 31. Esquema de procedimiento para la síntesis del producto S<sub>1</sub>.

Se probaron dos procedimientos de forma simultánea en vista a experiencias anteriores del grupo para saber qué proporción entre los reactivos otorgaba mejores resultados.

En el primero se utilizó 1 equivalente de péptido, 1 equivalente de HBTU; 1,5 equivalentes de DIEA y 4 equivalentes del derivado del DOTA.

En el segundo se empleó 1 equivalente de péptido, 1 equivalente de HBTU, 4 equivalentes de DIEA y 2 equivalentes del derivado del DOTA.

Se pesó la cantidad correspondiente de péptido en una columna y se hinchó en el montaje de síntesis en fase sólida. Se preparó una disolución con un equivalente de HBTU en 2 mL de DMS.

Se disolvieron los equivalentes correspondientes de DO3A de cada método en 1 mL de DMS.

Se preparó una nueva disolución mezclando la de HBTU con la DIEA y se añadió a la columna que contiene el péptido. Tras dos minutos de reacción, se añadió la disolución de DO3A.

La reacción duró una hora.

El seguimiento de la reacción se hizo a través de una cromatografía HPLC-MS.

Para ello fue necesario aplicarle un cóctel de desprotección a compuesto unido a la resina.

En el primero de los dos métodos, se observa un pico que tiene un tiempo de retención de 10,6 minutos (Figura 32) que se corresponde con el producto  $S_1$  ya que se encontró un pico  $[M+2H]^{2+}$  que tiene un valor de 615,86 y que corresponde con el valor esperado.

No se pudieron asignar los demás picos que aparecen en la Figura 32.

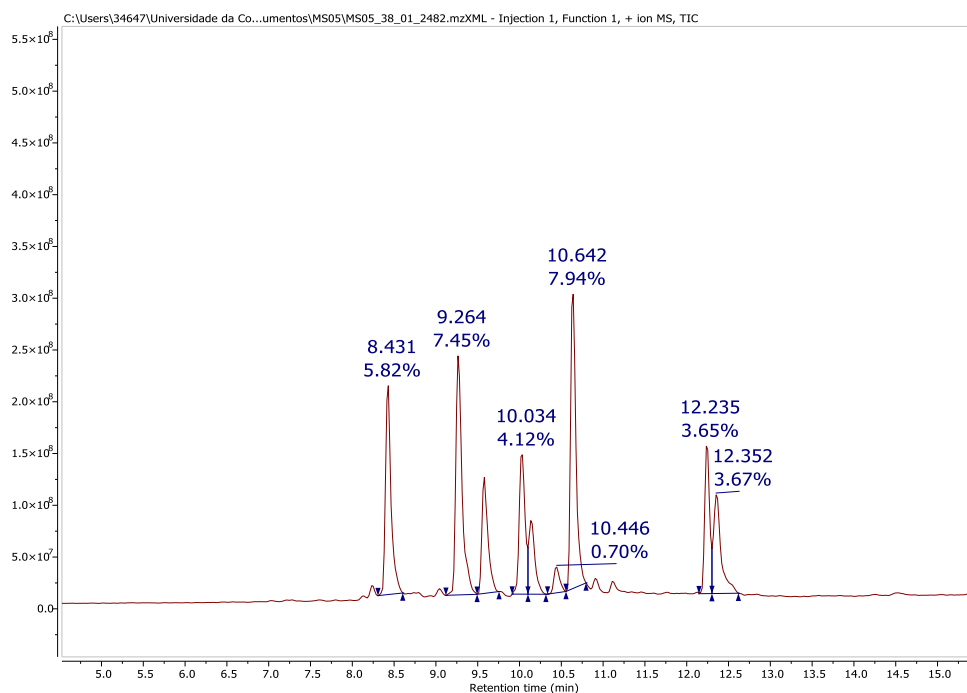


Figura 32. TIC (Total Ion Chromatogram) para el producto  $S_1$ . El pico correspondiente se encuentra en 10,6 min.

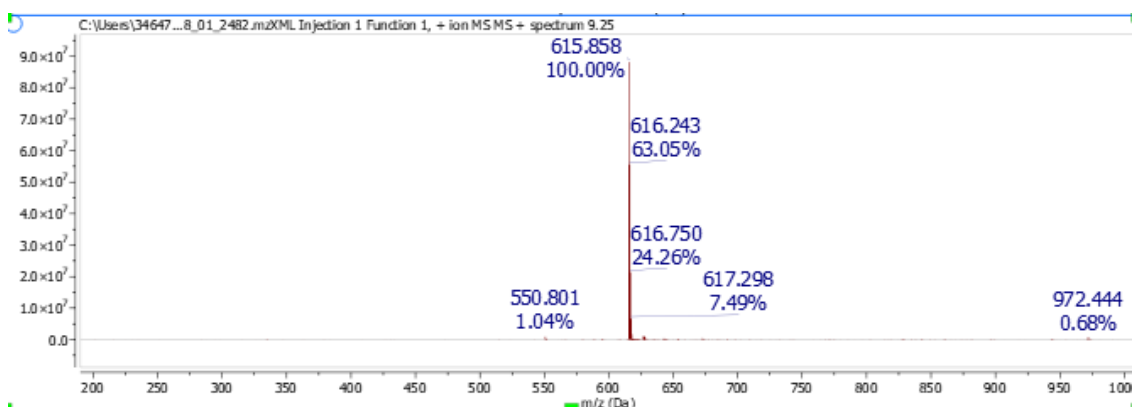


Figura 33. Picos de relación masa/carga del cromatograma MS correspondiente al producto  $S_1$ .

El cromatograma correspondiente al método 2 no muestra ningún pico (Figura 34), ni de reactivos ni de productos. Por esta razón, se escogió el método 1 para continuar con el experimento.

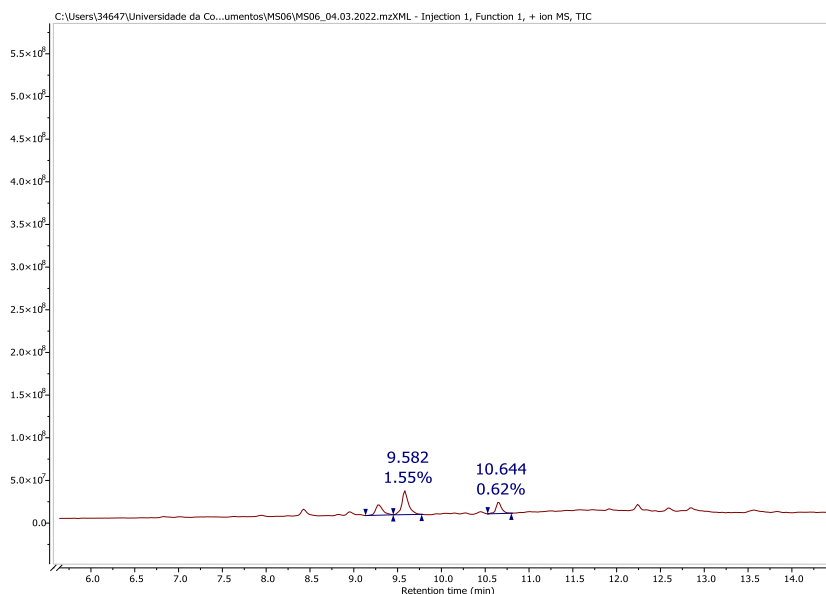


Figura 34. TIC (Total Ion Chromatogram) para el método 2.

La purificación del péptido obtenido por el primero de los dos métodos se llevó a cabo empleando una cromatografía HPLC-UV en fase reversa. El producto de la purificación fue recolectado en fracciones y fue liofilizado.

#### 4. Estudios de la emisión de fosforescencia de la sonda $S_1$ [Tb]

Una vez sintetizado y caracterizado el derivado peptídico  $S_1$  se procedió a estudiar sus propiedades luminiscentes. Para ello, se preparó una disolución 10  $\mu$ M del péptido  $S_1$  en una disolución tampón 10 mM HEPES, pH 8,02 y se registró el espectro de emisión del péptido  $S_1$  en ausencia y en presencia de 1 equivalente de  $Tb^{+3}$ .

Se observó la aparición de las bandas características de los complejos de Tb(III) (Figura 35). Esto indica la formación del complejo metálico y que la distancia entre la antena y el metal es suficiente para permitir un proceso eficiente de transferencia de energía.

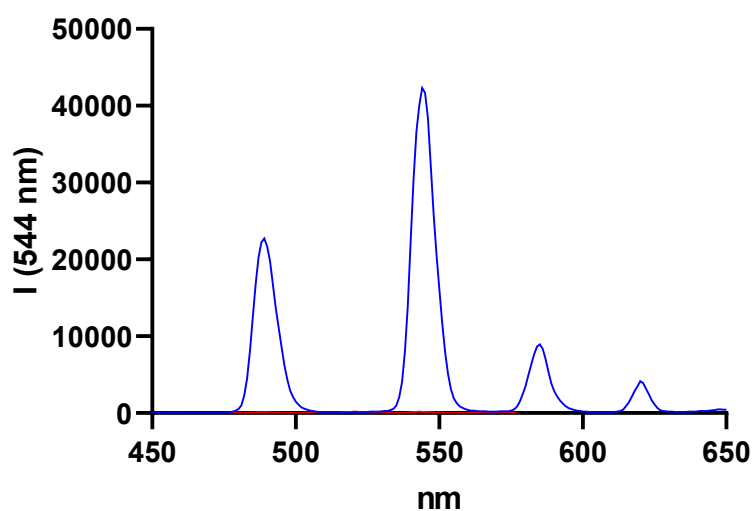


Figura 35. Espectros de emisión superpuestos del péptido con Tb(III) y sin él.

A continuación se llevó a cabo una valoración de luminiscencia en la que se añadieron cantidades crecientes de Tb(III) para confirmar la formación de un complejo 1:1. Para ello, se preparó una disolución 10  $\mu\text{M}$  de péptido S<sub>1</sub> en 10 mM HEPES, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, pH de 8,02; y sobre esta se añadieron cantidades crecientes de TbCl<sub>3</sub>.

En la figura 36 se representa el aumento de la luminiscencia a medida que se aumenta la cantidad de metal añadida, mientras que en la Figura 37 se representa la intensidad a 544 nm frente a los equivalentes de Tb(III) añadidos. Para determinar la estequiometría del complejo se hace una regresión con los datos experimentales. La intersección entre las dos rectas que se muestran en la Figura 33 indica que la emisión de fosforescencia alcanza un máximo para una relación péptido:metal 1:0,84. En vista al resultado y atendiendo a estudios previos [14] se asume la formación de un complejo 1:1 entre S1 y Tb(III).

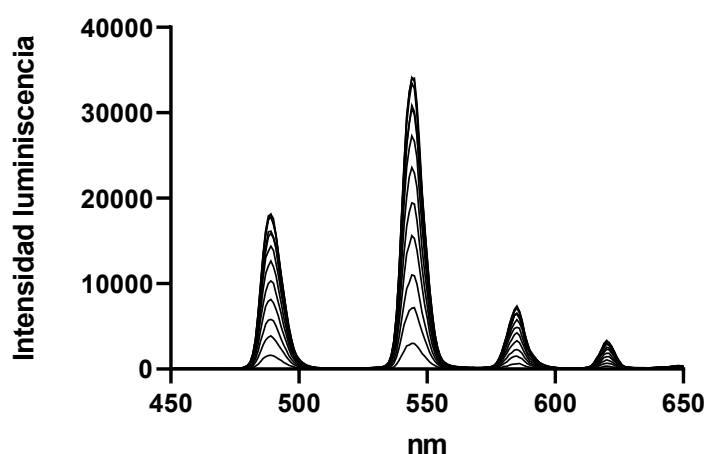


Figura 36. Representación de la luminiscencia de una disolución 10  $\mu\text{M}$  de S1 en 10 mM HEPES, pH de 8,02 con cantidades crecientes de TbCl<sub>3</sub>.

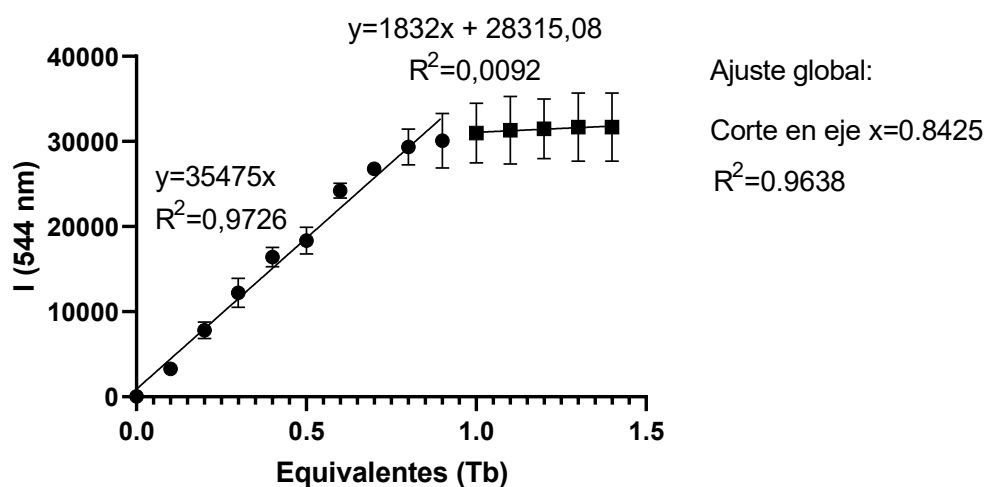


Figura 37. Representación de la intensidad de emisión a 544 nm de una disolución 10  $\mu\text{M}$  de S1 en 10 mM HEPES, pH de 8,02 con cantidades crecientes de TbCl<sub>3</sub>



Por esto, de aquí en adelante, todos los experimentos realizados se llevaron a cabo con una disolución 10  $\mu\text{M}$  de **S1[Tb]**.

Una vez que se corroboró la formación del complejo peptídico de Tb(III) se estudió la estabilidad de este complejo con el tiempo y en presencia de Ca(II) (cofactor del enzima), ya que es un metal que podría competir con el Tb (III) por la unión al macrociclo [15].

Para ello, se comenzó estudiando el tiempo que tarda el complejo péptido – metal en formarse y como varía su estabilidad en el tiempo. Para eso se preparó una disolución 10  $\mu\text{M}$  de ambos componentes y de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  en uno de los dos en el buffer previamente mencionado e inmediatamente después se midió la fosforescencia a 544 nm con intervalos de tiempo de 1 hora.

Como se puede ver en la Figura 38 la máxima emisión del complejo, indicativo de la formación completa del mismo, tiene lugar 2 horas después de la preparación de la disolución y además se mantiene con el tiempo, es decir, es estable.

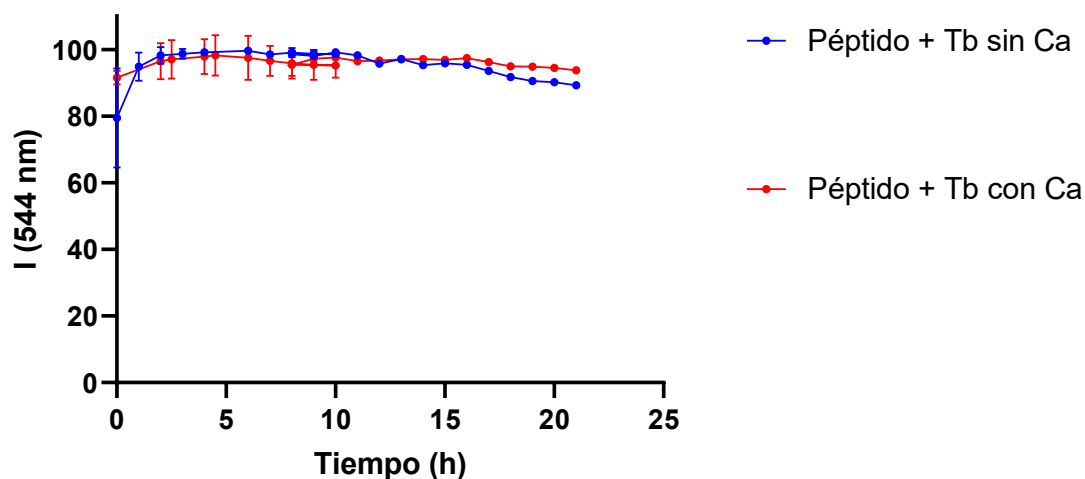


Figura 38. Duplicado de las cinéticas para la disolución de  $S_1[\text{Tb}]$  con y sin  $\text{Ca(II)}$ .

Una vez que se corroboró que el Ca(II) no compite con el Tb(III), se registraron los espectros de luminiscencia de **S1[Tb]** en presencia del enzima. Debido a que el enzima LasB ya no es comercial, estos experimentos se realizaron con Termolisina. Este enzima es producido por *Bacillus thermoproteolyticus*, se trata de una proteasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos entre aminoácidos hidrofóbicos, aunque con menos especificidad de secuencia que LasB, por lo tanto puede servir de modelo para comprobar si la estrategia de detección funciona. [15].

Tras haber caracterizado la emisión del complejo con el tiempo y estudiada su estabilidad en presencia del cofactor de la enzima, se añadió la enzima. El corte de la misma en la secuencia GLA provocaría la separación de dos fragmentos: por una parte DO3A-EG y por otro LAEW-NH<sub>2</sub>, lo cual provocaría la separación de la antena (triptófano) y del complejo de Tb(III) disminuyendo así la luminiscencia.

A una disolución 10  $\mu\text{M}$  de  $S_1[\text{Tb}]$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , en 10 mM HEPES pH 8,02 de 1 mM se añadió una alícuota del enzima para obtener una concentración final 0,1  $\mu\text{M}$  y se registró el espectro de

emisión de la mezcla a temperatura ambiente cada hora. Como se observa en la Figura 39, la intensidad de luminiscencia disminuyó con el tiempo lo que indica que el complejo peptídico está siendo reconocido por el enzima y que esta es capaz de degradarlo. Sin embargo, la degradación del péptido es lenta.

Dado que la temperatura óptima de la termolisina es 70 °C [16] se decidió estudiar la interacción entre la sonda y la enzima a 40 °C. A esta temperatura se observó que reacción es más rápida y que con el tiempo la intensidad de luminiscencia se estabiliza.

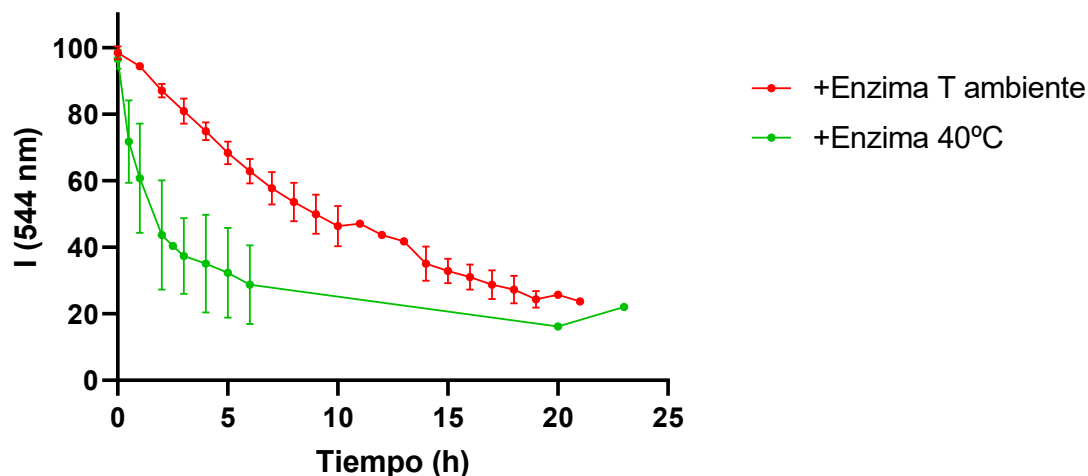


Figura 39. Representación conjunta de los ensayos enzimáticos por duplicado..

Tras observar la disminución de emisión de fosforescencia se quiso confirmar la ruptura del péptido por la acción de la enzima a través de HPLC. Para ello se liofilizó la muestra al terminar la cinética y se inyectó en el HPLC-MS. Al inyectar en condiciones similares a las utilizadas para caracterizar el péptido S1 se obtuvo un cromatograma muy complejo en el que no se pudo identificar ninguno de los picos del cromatograma.

Con interés de mejorar el resultado, se probaron diferentes columnas cromatográficas especializadas en compuestos polares con eluciones isocráticas en lugar de en gradiente.

Sin embargo, a pesar de los intentos no se consiguió identificar ningún producto en los distintos picos del cromatograma.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Cronograma

	Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio				Julio							
	Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Búsqueda bibliográfica																												
Síntesis del péptido																												
Síntesis L1																												
Síntesis L2																												
Síntesis S1																												
Ensayos luminiscencia																												
Redacción																												

## 2. Parte general

Los reactivos utilizados a lo largo de todo este experimento fueron reactivos comerciales que no se purificaron de forma adicional. El agua fue purificada empleando un sistema Mili-Q.

La resina empleada para la síntesis en fase sólida fue una resina H-Rink amide Chem Matrix, que tiene un grupo  $\text{NH}_2$  libre.

Las reacciones fueron seguidas a través de cromatografía HPLC-MS con un equipo Brüker Elute SP con detector cuadrupolo amaZon speed Toxyper.

Como los compuestos son polares se realizaron cromatografías en fase inversa, en las cuales se utilizaron los siguientes disolventes: a) 0,1 % TFA en  $\text{H}_2\text{O}$  y b), 1 % TFA en MeCN.

La columna utilizada fue Phenomenex Aeris 3,6  $\mu\text{m}$  peptide XB-C18 100 Å; 150 x 2,1 mm.

El gradiente utilizado para los experimentos HPLC-MS fue el siguiente:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%B
0	0,3	5
2	0,3	5
23	0,3	95
24	0,3	100
30	0,3	100
31	0,3	5
38	0,3	5

Tabla 1

Excepcionalmente, en los intentos de realizar un análisis cromatográfico a la disolución de los ensayos enzimáticos se emplearon las columnas Atlantis 13, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  en la cual se inyectó un flujo continuo de 1,0 mL/min y Hypersil Gold aQ C18, 3  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 250 mm en la cual se inyectó un flujo de 1,2 mL/min.

En estas dos últimas experiencias se llevó a cabo una elución isocrática 99% en a) y 1% en b).

Se realizaron también cromatografías HPLC-UV para las cuales se utilizó el equipo Thermo Scientific UltiMate 3000 conectado a un detector de una matriz de fotodiodos (PDA). Se utilizó la misma columna Aeris C18 de las cromatografías HPLC-MS, los mismos eluyentes y las mismas condiciones cromatográficas contenidas en la Tabla 1.

Para la purificación se usó un JASCO LC-4000 con detector de UV (PDA). Se trabajó con una longitud de onda de 280 nm. La columna utilizada para esta labor fue una Luna C18 Phenomenex 100 Å, 3 µm, 4,6 x 150 mm. Como eluyentes se emplearon una disolución de 20 mM NH<sub>4</sub>Ac en H<sub>2</sub>O y de 20 mM NH<sub>4</sub>Ac en MeCN.

La elución fue en gradiente de 2% a 60% de 20 mM NH<sub>4</sub>Ac en MeCN en 28 minutos

La cuantificación de la concentración del péptido se llevó a cabo en un espectrofotómetro Jasco V-750 de doble haz, utilizando siempre una cubeta de cuarzo de 1 mL.

Las medidas de luminiscencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Horiba Fluoromax, empleando también una cubeta de cuarzo de 1 mL para las valoraciones y las cinéticas y una cubeta de 0,8 mL con agitador magnético para los ensayos enzimáticos.

El tratamiento de datos se realizó con la ayuda de los programas Origin 2022 y GraphPad 8.1, mientras que las reacciones se diseñaron y se comprobaron relaciones masa/carga para el HPLC-MS en el ChemDraw 20.1.1.

### 3. Desarrollo sintético

#### 3.1. Síntesis del péptido Fmoc-P<sub>1</sub>

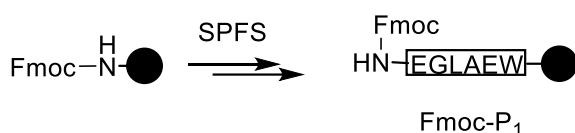


Figura 40. Esquema para la síntesis del péptido Fmoc-P<sub>1</sub>.

La síntesis de péptidos y sus modificaciones se realizan en fase sólida, a través de su anclaje a una resina. La resina se dispone en una columna plástica que se coloca en un matraz de dos bocas, a través del cual se hace pasar una corriente de N<sub>2</sub> para mezclar los reactivos.

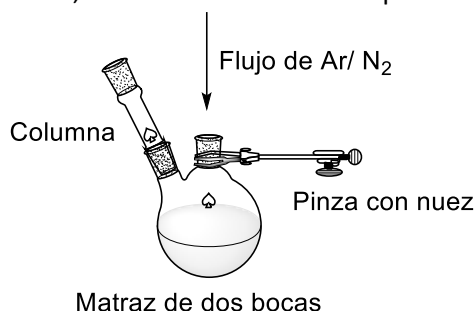


Figura 41. Montaje para la síntesis en fase sólida.

El desarrollo sintético del producto Fmoc-P<sub>1</sub> comenzó preparando una disolución de cada aminoácido (4 equivalentes) en HBTU (4 equivalentes) disuelto en DMF (2 mL).

Se añadió una disolución de DIEA (0,195 M, 2 mL) y se dejó reaccionando durante 2 minutos, cronometrados lo más exacto posible.

Esta disolución AA/HBTU/DIEA se llevó a la columna que contiene la resina y se dejó la reacción durante 45 minutos bajo corriente de N<sub>2</sub>.

Se llevaron a cabo dos lavados de la resina con DMF: se filtró la suspensión conectando el matraz a una bomba de vacío, se añadió DMF (4 mL), se burbujó N<sub>2</sub> durante 3 minutos y se repitió el proceso dos veces más.

A continuación se desprotegió la resina añadiendo una disolución de 20% piperidina en DMF (4 mL) durante 20 minutos.

Se hicieron tres lavados de la resina con DMF de forma idéntica a la explicada anteriormente y se comprobó si había grupos aminos libres aplicando el test TNBS (ácido 2,4,6 – trinitrobenzenosulfónico):

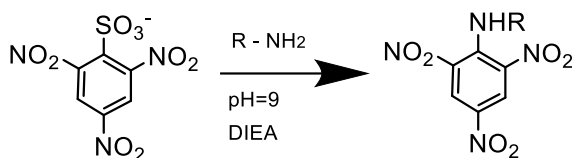


Figura 42. Reacción del test TNBS.

Si la reacción de desprotección tiene lugar, es decir, hay grupos aminos libres, aparece un color rojizo en las bolas de resina sobre las que se aplica el test. En cambio si es negativo las bolas mantienen su incoloridad.

Se repitió el proceso de forma idéntica para cada uno de los aminoácidos siguientes. Tras haber añadido los aminoácidos correspondientes se tomó una porción de la resina (aproximadamente 5 mg), a la cual se le aplicó un cóctel de desprotección (1 mL, TIS:H<sub>2</sub>O:TFA, 2,5:2,5:95).

La disolución se dejó en agitación durante una hora y media y se retiró el sobrenadante.

Sobre la disolución sobrenadante se virtió éter dietílico (aproximadamente 1,2 mL) a -20 °C.

Se apreció el precipitado de pellets blancos, los cuales fueron disueltos posteriormente en H<sub>2</sub>O:MeCN en proporción 1:1 (200 µL). Se tomó la mitad de este volumen y se llevó a un vial de inyección para HPLC.

Phenomenex Aeris peptide XB-C18, gradiente 5% a 95% de b) en 21 minutos.

[M+H]<sup>+</sup> encontrado: 925,7, t<sub>R</sub>=17,7 min

[M+H]<sup>+</sup> calculado: 925,6

### 3.2. Acoplamiento entre el péptido P<sub>1</sub> y el espaciador

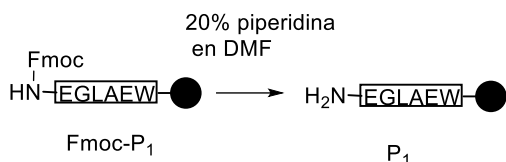


Figura 43. Desprotección para Fmoc-P<sub>1</sub>.

En una nueva columna se introdujo la resina (0,1 mmoles) y se reacondicionó añadiendo de DMF (3 mL) a la resina durante 15 minutos bajo corriente de N<sub>2</sub>. El disolvente se eliminó aplicando vacío.

Se eliminó el grupo protector Fmoc de la resina añadiendo una disolución de 20% piperidina en DMF (4 mL) durante 20 minutos bajo burbujeo de N<sub>2</sub>. Posteriormente se llevaron a cabo tres lavados con DMF (3 mL) de 5 minutos cada uno. El disolvente fue eliminado a través de vacío.

Para la siguiente etapa:

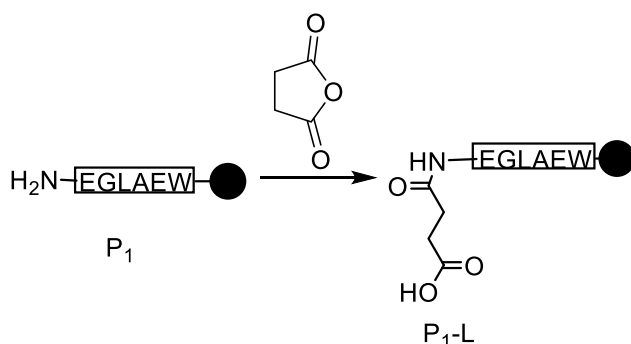


Figura 44. Síntesis del producto P<sub>1</sub>-L.

Se pesó el anhídrido succínico (100,9 mg, 1 mmol) y fue disuelto en de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) y sobre esta disolución se adicionó el Et<sub>3</sub>N (15 μL, 1,1 mmol).

Esta disolución se añadió a la columna, la cual tras un minuto bajo corriente de N<sub>2</sub> se retiró del montaje y se dejó en agitación mecánica durante 24 horas.

Tras el tiempo estipulado se eliminó la disolución de la columna a través de vacío, se hicieron 3 lavados con DMF (3 mL) de 4 minutos cada uno y tras eliminar el disolvente mediante vacío se secó la resina añadiendo CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) durante 15 minutos.

Se eliminó la disolución de forma análoga a los lavados y se tomó una porción de la resina (aproximadamente 5 mg), los cuales siguieron un proceso de desprotección de la resina y de redisolución en H<sub>2</sub>O:MeCN 1:1 de forma idéntica al anterior a la explicada en el anterior apartado, para así ser inyectados de la misma forma en el HPLC-MS.

Phenomenex Aeris peptide XB-C18, gradiente 5% a 95% de b) en 21 minutos.

[M+H]<sup>+</sup> encontrado: 803,4; t<sub>R</sub>=9,6 min

[M+H]<sup>+</sup> calculado: 803,4

### 3.3. Síntesis del derivado L<sub>1</sub>

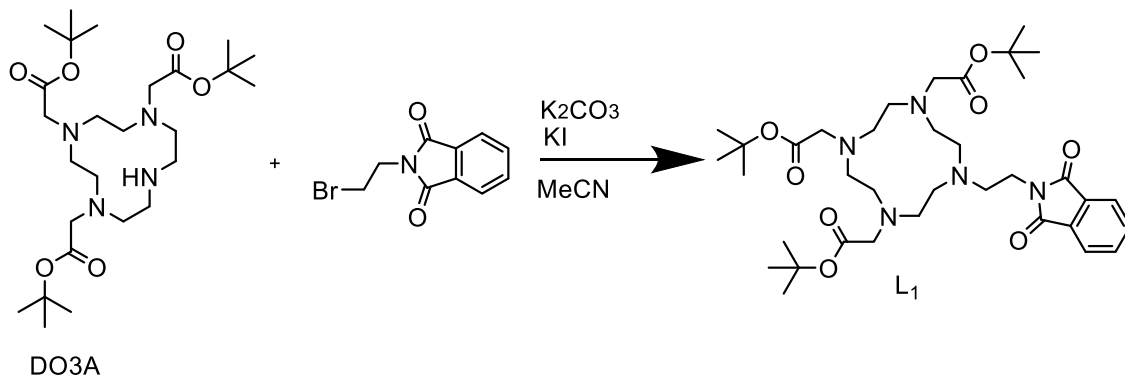


Figura 45. Síntesis del producto L<sub>1</sub>.

Se preparó una disolución de N-(2-bromoetil)-ftalamida (146,9 mg, 0,58 mmol) en MeCN (10 mL).

Se pesó el DOTA (296,3 mg, 0,58 mmol) y sobre este reactivo se añadió el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (397,3 mg, 2,32 mmol) y una punta de espátula de KI.

El montaje fue purgado con Ar durante 10 minutos y se llevó la disolución de N-(2-bromoetil)-ftalamida al embudo de presión compensada, donde se dejó caer a razón de una gota por segundo aproximadamente.

La reacción duró 24 horas y fueron necesarios 3 equivalentes de N-(2-bromoetil)-ftalamida en total para dar por concluida la reacción. Se obtuvo una disolución de color amarilla. Se tomaron 5 µL del producto y se disolvieron en 195 µL de una disolución de H<sub>2</sub>O:MeCN en un vial para inyección en HPLC.

Tras observar que el cromatograma mostraba que la reacción había tenido resultados satisfactorios, se eliminó el disolvente mediante un rotavapor y se obtuvieron 0,3962 g de un sólido amarillo.

Phenomenex Aeris peptide XB-C18, gradiente 5% a 95% de b) en 21 minutos

[M+H]<sup>+</sup> encontrado: 688,4; t<sub>R</sub>=21,5 min

[M+H]<sup>+</sup> calculado: 688,5

### 3.4. Síntesis del ligando L<sub>2</sub>

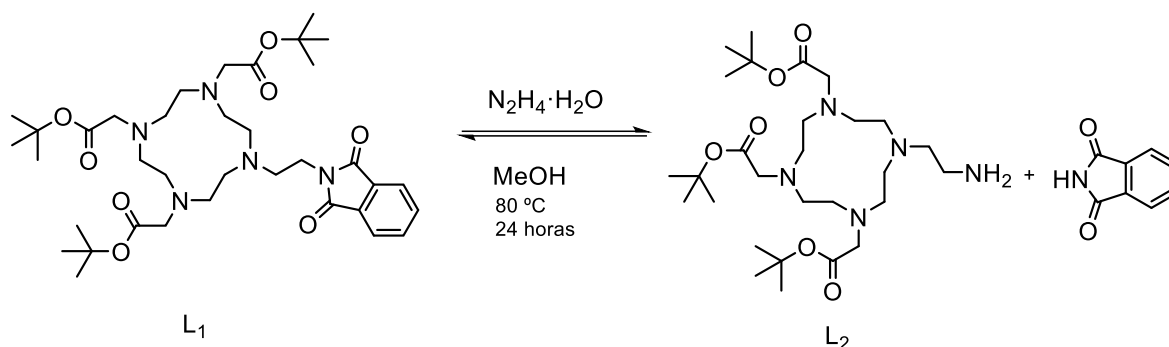


Figura 46. Síntesis del producto L<sub>2</sub>.

El producto L<sub>1</sub> obtenido (0,3962 g, 0,58 mmol) se redisolvió en MeOH (10 mL). Sobre esta disolución se añadió la hidrazina (140 µL, 2,9 mmol) y la reacción se deja a reflujo a una temperatura de 80 °C durante 24 horas.

En total fue necesario repetir 3 veces la adición de hidrazina, obteniéndose un sólido de color amarillo. Se toman 5 µL del crudo de reacción, a los cuales se les añaden 195 µL de una disolución H<sub>2</sub>O:MeCN en proporción 1:1 y llevan a un vial para inyección en HPLC.

El producto obtenido fue redisoluelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) y tras una filtración por gravedad para eliminar compuestos no disueltos, se procedió a realizar una extracción (3 repeticiones) con de H<sub>2</sub>O (30 mL) como fase acuosa.

La fase orgánica fue secada añadiéndole MgSO<sub>4</sub> consiguiendo una disolución incolora, mientras que la fase acuosa fue desechada.

Se elimina el MgSO<sub>4</sub> a través de una filtración por gravedad.

Se elimina en disolvente en el rotavapor, obteniéndose así un sólido de color amarillo de masa 135,4 mg.

Phenomenex Aeris peptide XB-C18, gradiente 5% a 95% de b) en 21 minutos

[M+H]<sup>+</sup> encontrado: 558,4; t<sub>R</sub>=10,6 min

[M+H]<sup>+</sup> calculado: 558,2

### 3.5. Síntesis del producto S<sub>1</sub>



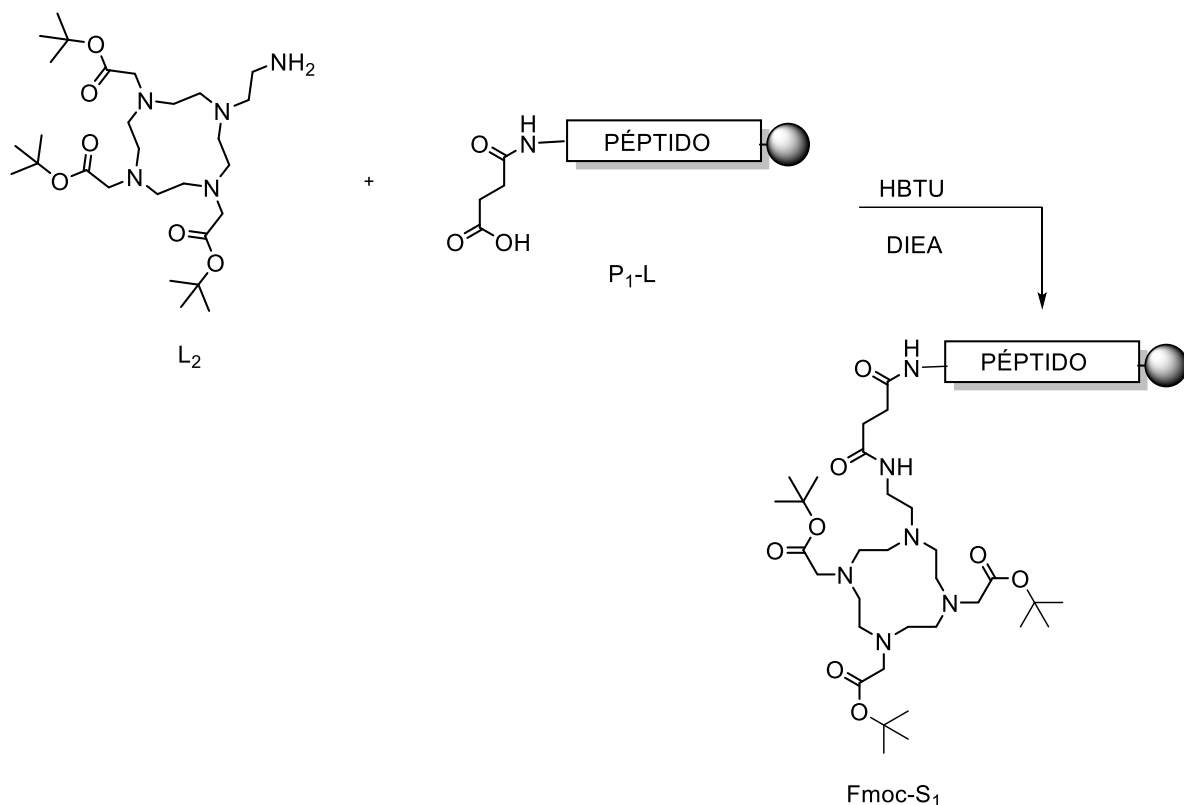


Figura 47. Síntesis del producto *Fmoc-S<sub>1</sub>*.

Una vez que se demostró que el método 1 era más efectivo que el método 2, se tomó la masa del péptido  $P_1-L$  (227, 46 mg, 0,061 mmol) y se reacondicionó empleando DMF (3 mL, durante 5 minutos, 3 veces). El disolvente se elimina a través de vacío.

Se disolvió el HBTU (24,3 mg, 0,066 mmol) en MeCN (1,5 mL) y sobre esta disolución se añadió más tarde la DIEA (470  $\mu$ L, 0,091 mmol).

El producto  $L_2$  (135,4 mg, 0,24 mmol) fue disuelto en MeCN (1,5 mL).

Se añadió a la columna la disolución de HBTU/DIEA donde se encontraba el péptido  $P_1-L$  enlazado a la resina. Se cronometraron dos minutos y se adicionó la disolución del ligando  $L_2$  en la columna.

La reacción se dejó durante dos horas, se lavó con DMF (3 mL, durante 5 minutos, 3 veces) y tras la eliminación del disolvente mediante vacío se añadió  $CH_2Cl_2$  (3 mL, durante 15 minutos en burbujeo de  $N_2$ ) para secarla.

Para completar satisfactoriamente el proceso de secado se deja la resina bajo vacío durante 15 minutos.

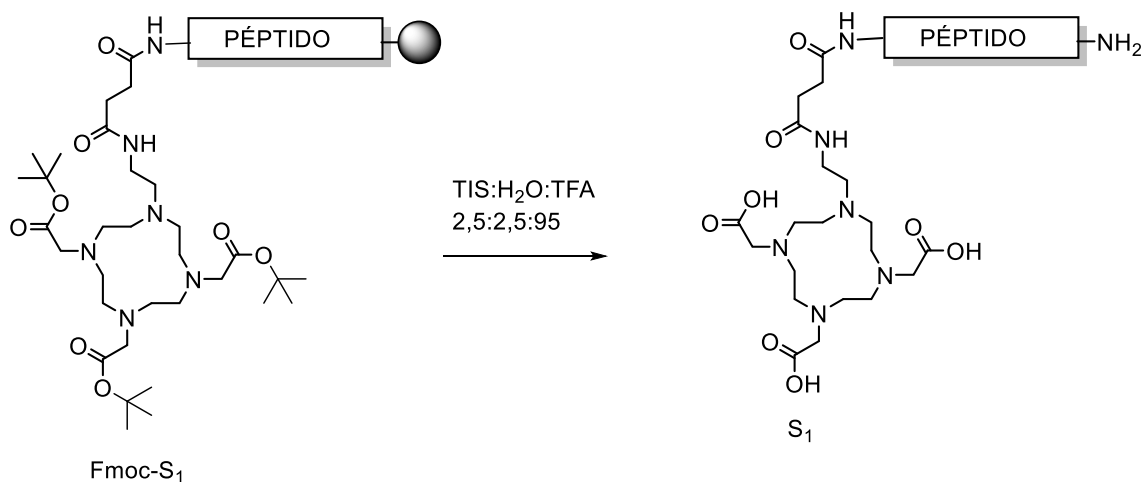


Figura 48. Síntesis del producto S<sub>1</sub>.

Para el estudio de la reacción se empleó la técnica de HPLC-MS. Se tomó una porción del producto (aproximadamente 5 mg) y se sometió a un cóctel de desprotección y a un proceso de redisolución análogo a los anteriores.

Como los resultados obtenidos fueron satisfactorios se procedió a desacoplar todo el compuesto de la resina. Para ello se hizo un procedimiento análogo del cóctel de desprotección, pero con diferentes volúmenes de los reactivos (226  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O y de TIS y 9 mL de TFA).

La disolución se mantuvo en agitación durante 4 horas y media y se emplearon 45 mL de éter dietílico a -20 °C. El éter se elimina en el rotavapor posteriormente, obteniendo los pellets.

Phenomenex Aeris peptide XB-C18, gradiente 5% a 95% de b) en 21 minutos

[M+H]<sup>2+</sup> encontrado: 615,9; t<sub>R</sub>=10,6 min

[M+H]<sup>+</sup> calculado: 1231,6

#### 4. Cálculo de la concentración del péptido

El proceso de determinación de la concentración del péptido se llevó a cabo a través de espectroscopía de UV. Se toman 5,8 mg del péptido en un Eppendorf y se disuelven en 200  $\mu\text{L}$  de agua. Sobre 800  $\mu\text{L}$  de una disolución de tampón fosfato 10 mM, pH 7,5, se añadieron alícuotas del péptido S<sub>1</sub> y tras cada adición se registró el espectro de UV-Vis de la disolución resultante.

Con los datos de absorbancia obtenidos se calculó la concentración del péptido utilizando la ley de Lambert-Beer y  $\epsilon=5579 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el triptófano [17]. Se determinó una concentración 2,96 mM para S<sub>1</sub>.

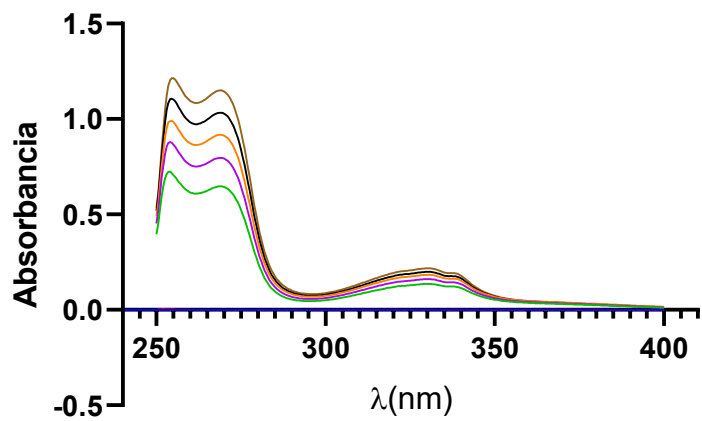


Figura 44. Espectro de absorción de las diferentes disoluciones de concentración creciente de péptido S1.

# CONCLUSIONES

En este trabajo se ha sintetizado y caracterizado un derivado peptídico una sonda con aplicaciones como detector para la bacteria *P. Aeruginosa*.

Se ha sintetizado un péptido que contenía una secuencia de corte de una enzima proveniente de *P. aeruginosa* mediante síntesis en fase sólida manual.

El ligando DO3A ha demostrado que compleja con el lantánido y que sigue siendo una molécula con potencial para el desarrollo de sondas luminiscentes.

Se han estudiado las propiedades fotofísicas del complejo que actúa como una sonda y se comprobó a través de las medidas experimentales que el complejo presentaba fosforescencia a través la energía que el cromóforo capta y transmite al ion lantánido, el cual emite.

Por último se han llevado a cabo estudios de detección de la enzima LasB.

Se han hecho medidas de luminiscencia para la sonda en presencia del enzima, en los cuales se ha podido comprobar que en efecto había una interacción que provocaba un decrecimiento de la intensidad de luminiscencia, como se esperaba.

Aún así, no se han podido identificar en los espectros de HPLC con detector masas ninguno de los productos ni reactivos esperados. Para poder caracterizar la disolución de los ensayos enzimáticos a través de esta técnica, sería necesario emplear un filtro de exclusión de tamaños moleculares, el cual en teoría debería eliminar la enzima o los fragmentos de la misma.

Hasta que se pueda caracterizar con fiabilidad, no se puede asegurar con franqueza que el complejo funciona de forma esperable y predecible, aunque los ensayos de luminiscencia han dado resultados prometedores.

Para obtención de mejores resultados, hubiese sido interesante el poder contar con un espectrofluorímetro Peltier, el cual puede programarse para mantenerse a una temperatura constante y hacer medidas a cualquier tiempo.

# CONCLUSIONS

In this work we have synthesised and characterised a peptide derivative of a probe with applications as a detector for *P. aeruginosa* bacteria.

A peptide who contains a cleavage sequence of a enzyme from *P. aeruginosa* has been synthesised by manual solid-phase synthesis.

The DO3A ligand has been shown to complex with lanthanide and remains a molecule with potential for the development of luminiscent probes.

The photophysical properties of the complex acting as a probe have been studied and it was found through experimental measurements that the complex exhibited phosphorescence through the energy that the chromophore captures and transmits to the lanthanide ion, which it emits.

Finally, studies have been carried out to detect the LasB enzyme.

Luminiscence measurements were made for the probe in the presence of the enzyme, and in that situations it was found that there was indeed an interaction that caused a decrease in luminiscence intensity, as expected.

However, none of the expected products or reagents could be identified in the HPLC spectra with mass detector. In order to characterise the dissolution of the enzyme assays by this technique, it would be necessary to use a molecular size exclusion filtermem which in theory should remove the enzyme or enzyme fragments.

Until it can be reliably characterised, it is not posible to say with confidence that the complex Works in an expected and predictable way, although luminscence assays have given promising results.

To obtain better results, it would be interesting to have a Peltier spectrofluorimeter, which can be programmed to stay at a constant temperatura and make measurements at any time.

# CONCLUSIONES

Neste traballo sintetizouse e caracterizouse un derivado peptídico dunha sonda con aplicación como detector para a bacteria *P. Aeruginosa*.

Sintetizouse un péptido que contiña unha secuencia de corte dun encima que provén de *P. aeruginosa* mediante síntese de péptidos en fase sólida manual.

O ligando DO3A demostrou que complexa co lantánido e que segue sendo unha molécula con potencial para o desenvolvemente de sondas luminiscentes.

Estudiáronse as propiedades fotofísicas do complexo que actúa como unha sonda. Comprobouse a través de medidas experimentais que o complexo presentaba fosforescencia a través da enerxía que o cromóforo capta e transmite ao ion lantánido, o cal emite.

Por último leváronse a cabo estudos de detección do encima Lasb.

Fixéronse medidas de luminiscencia para a sonda en presenza do encima, nos cales comprobouse que en efecto había unha interacción que provocaba un decrecemento da intensidade de luminiscencia, como se esperaba.

Ainda así, non se puideron identificar nos espectros de HPLC con detector masas ningún dos produtos nin dos reactivos esperados. Para poder caracterizar a disolución dos ensaios enzimáticos a través desta técnica, sería necesario emplear un filtro de exclusión de tamaños moleculares, o cal en teoría debería eliminar o encima e os fragmentos do mesmo.

Ata que se poida caracterizar con fiabilidade, non se pode asegurar con franqueza que o complexo funciona de forma esperable e predecible, aínda que os ensaios de luminiscencia diron resultados prometedores.

Para a obtención de mellores resultados, puidese ser interesante o poder contar con un espectrofluorímetro Peltier, o cal pode programarse para manterse a unha temperatura constante e facer medidas a calquera tempo.

# Referencias

- [1] Rizo, N. (2018). Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, Boletín Conamed:1-2
- [2] P.D. Lister, D. J. Wolter, and N.D. Hanson, (2009) Antibacterial resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally, encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 4.: 581-610
- [3] Enriquez Estrada, J.S., Rivera Muñoz, O. & Camilo Castro, C. (2020). Estado actual de *Pseudomonas aeruginosa* con multirresistencia a los antibióticos en muestras clínicas, ambientes naturales y en animales. Repositorio Institucional Universidad de Santiago de Cali
- [4] Sewald, N. & Jakubke, H-D. (2020). *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH. Weinheim
- [5] *Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins*. (2018). Ed: Hecht, S.M. Oxford University Press. Oxford.
- [6] Dick, F. (1994). Acid cleavage/deprotection in Fmoc/tBiu solid phase peptide synthesis. Ed: Pennington, M.W. & Dunn, B.M. *Peptide Synthesis Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol 35.
- [7] Pazos Chantretero, E. (2012). Sensores luminiscentes de proteínas implicadas en cáncer. [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. Repositorio Institucional USC
- [8] Pazos Chantretero, E, Golicnik, M & Mascareñas J.L . (2012). Detection of phosphorylation states by intermolecular sensitization of lanthanide-peptide conjugates. Royal Society of Chemistry.
- [9] Pazos, E., Torrecilla, D., Vazquez-López, M., Castedo, L., Mascareñas, J.L., Vidal, A. & Vázquez, M.E. (2008). Cyclin a probes by means of intermolecular sensitization of terbium-chelating peptides. *American Chemical Society*. 130, 30: 9652-9653.

- [10] González-Vera, J.A, Bouzada, D, Bouclier, C. Vázquez M.E. & Morris C. M. (2017). Lanthanide-based peptide biosensor to monitor CDK4/cyclin D kinase activity. *Chemical Communications*.
- [11] Rodríguez-Ríos M., Megia-Fernández, A., J. Norman D. & Bradley M. (2021). Peptide probes for proteases – innovations and applications for monitoring proteolytic activity.
- [12] De la Reberdière A., Lachaud F., Chuburu F., Cadiou C. & Lemercier G. (2012). Synthesis of a new family of protected 1,4,7,10 – tetraazacyclododecane – 1,4,7 – triacetic acid derivatives with thiotic acid pending arms. *Tetrahedron Letters*.
- [13] Galán Fernández, L. (2015). Síntesis de sistemas poliheterocíclicos basados en anillos de piridina, pirazol e indazol. Luminiscencia de sus complejos con lantánidos y su aplicación en el marcaje de oligonucleótidos para la detección de bacterias responsables de sepsis. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid].
- [14] Pazos Chantrero, E. (2006). Síntesis de péptidos fluorescentes para el estudio de interacciones proteína-proteína. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Química Orgánica.
- [15] Eijsink V. & van den Burg B. (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Chapter 111: Thermolysin and Related Bacillus Metallopeptidases.
- [16] Laurence A. Cole, (2010). Dissociation, Desialylation, and Cleavage of hCG, *Science Direct*
- [17] Dixon, J. M., M. Taniguchi and J. S. Lindsey (2005), "PhotochemCAD 2. A Refined Program with Accompanying Spectral Databases for Photochemical Calculations, *Photochem. Photobiol.*, 81, 212-213.



