



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Química

FUNCIONALIZACIÓN DE PÉPTIDOS SENSIBLES A ENZIMAS
CON ANÁLOGOS DE VIOLÓGENO

FUNCTIONALIZATION OF ENZYME-RESPONSIVE PEPTIDES
WITH VIOLOGEN ANALOGUES

FUNCIONALIZACIÓN DE PÉPTIDOS SENSIBLES A ENZIMAS
CON ANÁLOGOS DE VIOLÓXENO

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Directores: Marcos Daniel García Romero y Francisco
Fernández Trillo**

Iago Fadda Ferreiro

Curso:2022/2023 – Convocatoria: Julio

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

δ desplazamiento químico

C grado centígrado

[] concentración

¹H RMN resonancia magnética de protón

¹³C RMN resonancia magnética de carbono

1D unidimensional

2D bidimensional

Å ångström (10^{-10} m)

ADN ácido desoxirribonucleico

COSY *correlation spectroscopy*

Hz hercio

J constante de acoplamiento

kJ kilojulio

d doblete

dd doble doblete

mmol milimol

MS espectrometría de masas

m/z relación de masa carga

μL microlitro

ppm partes por millón

M molaridad

m multiplete

mL mililitro

HRMS *High Resolution Mass Spectrometry*

HSQC *heteronuclear single quantum correlation*

g gramo

HMBC *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

ESI *electrospray ionization*

T temperatura

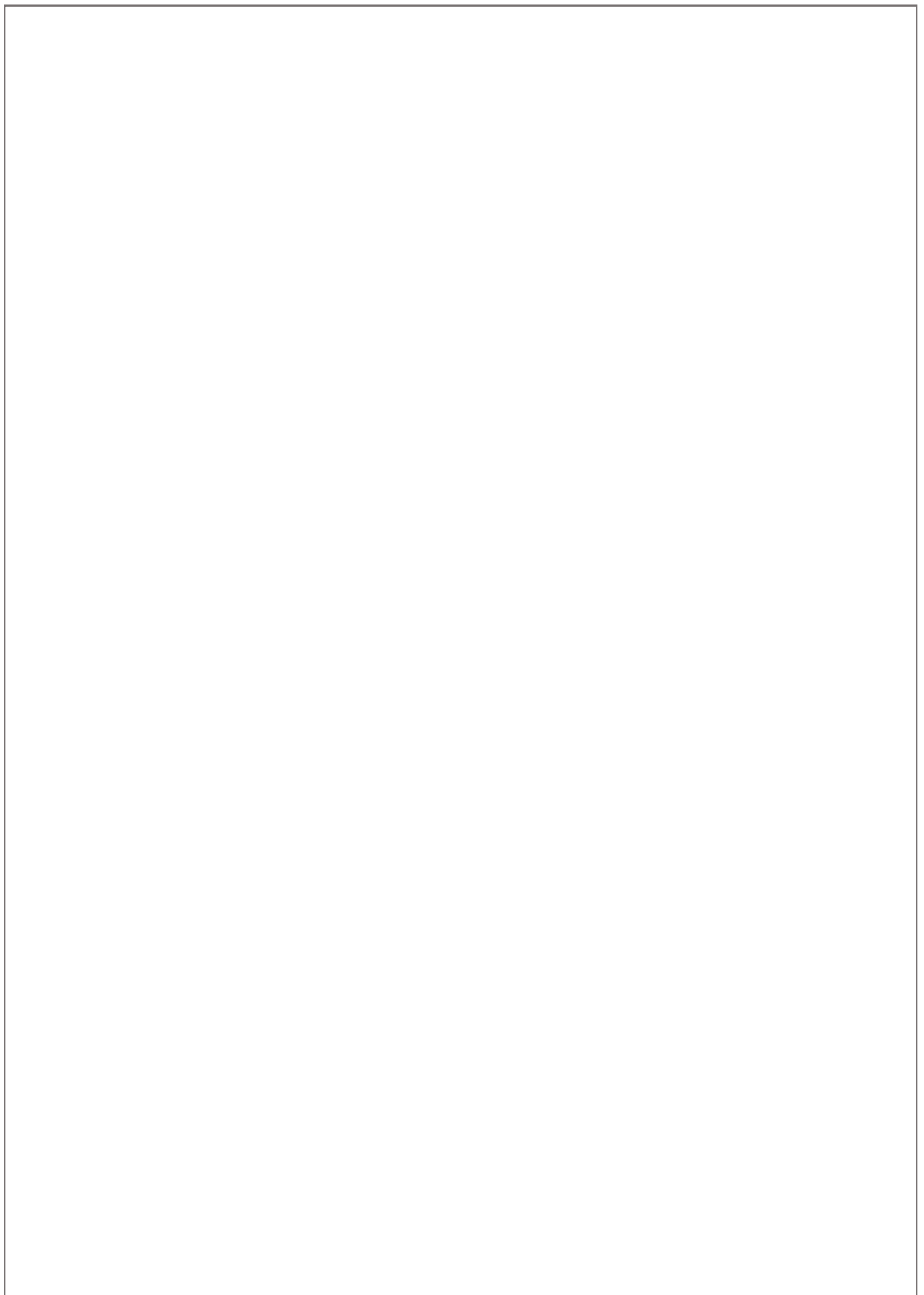
t triplete

s singulete

RMN resonancia magnética nuclear

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1.-Introducción.....	8
1.1.-Química supramolecular	9
1.2.-Química receptor-sustrato.....	11
1.2.1.-Complejos viológeno-CB[8] en la liberación de fármacos.	13
1.3.-Aspectos generales de la química de viológenos y análogos.	14
1.4.“Vermellógenos” como sustitutos de viológenos.....	16
1.6.-Preparación de híbridos péptido-viológeno. Antecedentes.....	17
1.7.-Degradación enzimática de estructuras peptídicas.	19
2.- Objetivos.	21
3.- Discusión de resultados.....	22
3.1.- Estrategia sintética.....	22
3.2.- Síntesis de 2^{2+}	23
3.3.- Síntesis de 1^{2+}	33
3.4.- Ensayo de degradación enzimática de 1^{2+} ·2TFA con una metaloproteasa de Zn.....	38
4.- Parte experimental.....	46
4.1.- Síntesis de bromuro de 1-(4-carboxibencil)-4-formilpiridinio.	47
4.2.- Síntesis de cloruro de 4-hidrazinilpiridinio.	48
4.3.- Neutralización de cloruro de 4-hidrazinilpiridinio.....	49
4.4.- Síntesis de yoduro de 1-metil-4-(2-(propan-2-ilideno)hidrazinil)piridinio.	50
4.5.- Síntesis de 1-(4-carboxibencil)-4-((2-(1-metilpiridin-4-il)hidrazinil)metil)piridinio.	51
4.6.- Síntesis de 1-(4-((2-(((R)-1-amino-1-oxopropan-2-il)amino)-4,4-dimetil-1-oxopentan-2-il)amino)-2-oxoetil)carbamoil)bencil)-4-((E)-((1-metil-piridin-4-ilideno)hidrazinilideno)metil)piridinio.	52
CONCLUSIONES	54



RESUMEN

El presente trabajo de fin de grado tiene como objetivo principal investigar la síntesis, purificación y elucidación estructural de compuestos tipo vermellógeno, análogos no tóxicos de los viológenos con respuesta ácido-base, así como su utilización como “esqueleto” en la síntesis de péptidos.

En primer lugar, se proporciona una revisión sobre los compuestos tipo viológeno, resaltando sus principales características químicas, su utilización en el campo de la química supramolecular y las limitaciones de dicho uso. Además, se describen los antecedentes en la incorporación de compuestos de este tipo como parte de compuestos peptídicos, y las potenciales ventajas de su degradación enzimática controlada.

Una vez establecidos los objetivos del trabajo se procede a describir la síntesis, purificación y elucidación estructural de un nuevo híbrido vermellógeno-péptido poseedor de un resto GLA en su extremo O-terminal, así como un ensayo de degradación con una enzima proteolítica de Zn^{2+} , encaminado a establecer la no interferencia del esqueleto bipyridínico en el proceso de degradación enzimática.

RESUMO

O presente traballo de fin de grao ten como obxectivo principal investigar a síntese, purificación e elucidación estrutural de compostos tipo vermellóxico, análogos non tóxicos dos violóxenos con resposta ácido-base, así como a súa utilización como "esqueleto" na síntese de péptidos.

En primeiro lugar, proporcionase unha revisión sobre os compostos tipo violóxico, resaltando as súas principais características químicas, a súa utilización no campo da química supramolecular e as limitacións desa utilización. Ademais, descríbense os antecedentes na incorporación de compostos deste tipo como parte de compostos peptídicos e as potenciais vantaxes da súa degradación enzimática controlada.

Unha vez establecidos os obxectivos do traballo, procedese á descrición da síntese, purificación e elucidación estrutural dun novo híbrido vermellóxico-péptido que posúe un resíduo GLA no seu extremo O-terminal, así como un ensaio de degradación cunha enzima proteolítica de Zn^{2+} , co obxectivo de establecer a non interferencia do esqueleto biperidínico no proceso de degradación enzimática.

ABSTRACT

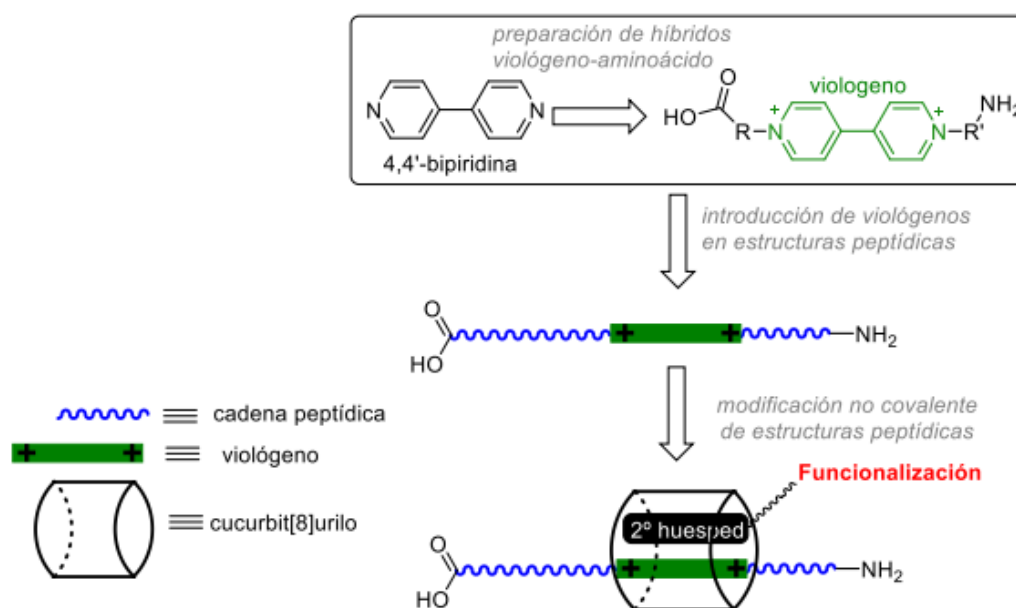
The main objective of this undergraduate thesis is to investigate the synthesis, purification, and structural elucidation of vermellogen-like compounds, non-toxic analogs of viologens with acid-base response, as well as their utilization as a scaffold in peptide synthesis.

Firstly, a review is provided on viologen-type compounds, highlighting their main chemical characteristics, their use in the field of supramolecular chemistry, and the limitations of such usage. Additionally, the incorporation of compounds of this type as part of peptide compounds is described, along with the potential advantages of controlled enzymatic degradation.

Once the objectives of the study are established, the synthesis, purification, and structural elucidation of a new vermellogen-peptide hybrid with a GLA residue at its C-terminal end are described, as well as a degradation assay with a Zn^{2+} -proteolytic enzyme, aimed at establishing the non-interference of the bipyridine skeleton in the enzymatic degradation process.

1.-Introducción

El presente trabajo de fin de grado se enmarca en el área de la química supramolecular, específicamente en la síntesis de nuevos híbridos de viológeno-aminoácido como huéspedes moleculares. Así, el trabajo forma parte de una línea de investigación del grupo Quimolmat-SUPREN, cuyo objetivo es la incorporación de aminoácidos en estructuras peptídicas, y la modulación de las propiedades de los péptidos resultantes mediante química receptor-sustrato utilizando el receptor molecular cucurbit[8]urilo (**Esquema 1**).



Esquema 1

En la introducción de este trabajo se abordarán varios aspectos relacionados con la química supramolecular, centrándose específicamente en la química de sales con estructura de *N,N'*-dialquil-4,4'-bipiridinio (viológeno), y análogos dependientes del pH (vermellógenos). También se incluirá una breve revisión de los antecedentes en la síntesis de híbridos péptido-viológeno.

1.1.-Química supramolecular

La química supramolecular es un campo multidisciplinario con raíces que se remontan a más de 100 años atrás, cuando Emil Fischer propuso el concepto de "llave-cerradura" para explicar la interacción entre enzimas y sustratos. Sin embargo, el nacimiento formal de esta rama de la química se sitúa en la década de los 60 y principios de los 70, con los trabajos pioneros sobre receptores moleculares realizados por J. Pedersen, J.-M. Lehn y D. Cram, quienes recibieron el Premio Nobel de Química en 1987.¹

Fue Jean-Marie Lehn quien definió la química supramolecular como "la química más allá de la molécula", haciendo referencia a las entidades complejas resultantes de la asociación de especies químicas mediante diversas fuerzas intermoleculares.² Estas fuerzas intermoleculares, como las fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces de coordinación a centros metálicos, interacciones π - π , interacciones electrostáticas y fuerzas hidrofóbicas, desempeñan un papel crucial en los procesos de reconocimiento molecular. El autoensamblaje molecular, que es el proceso en el cual dos o más moléculas interactúan mediante fuerzas intermoleculares débiles para formar una entidad más grande, es un concepto central en la química supramolecular.

Es importante mencionar que los procesos de reconocimiento molecular están asociados a complejos supramoleculares de tipo "anfitrión-huésped", donde una molécula más grande (el receptor o anfitrión) interactúa con una molécula más pequeña (el sustrato o huésped), formando un agregado receptor-sustrato. Por otro lado, los procesos de autoensamblaje molecular se refieren a la asociación de una o más especies bajo control termodinámico, dando lugar a agregados supramoleculares jerárquicamente organizados con diferentes topologías, composiciones y propiedades.³

¹ Ariga, K.; Kunitake, T.; *Supramolecular Chemistry- Fundamentals and Application*, s.l.: Springer, **2006**.

² Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, **1995**.

³ Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; Eds. Wiley: Chichester; UK, **2009**.

En la naturaleza, es común observar procesos de autoensamblaje, y uno de los ejemplos más destacados es la formación de la doble hélice del ADN. En este caso, las hebras complementarias del ADN se unen mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre sus bases complementarias (**Figura 1**).⁴

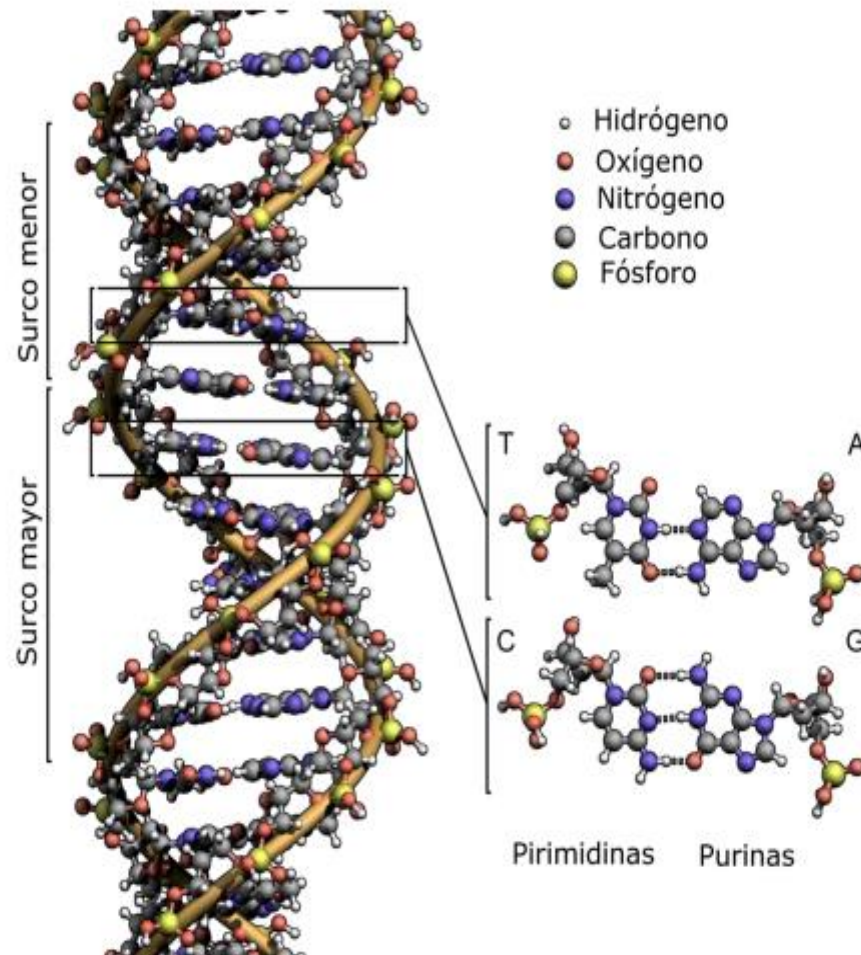


Figura 1. Estructura de la doble hélice del ADN, autoensamblada a partir de dos hebras complementarias para formar una estructura binaria de alta especificidad.

⁴ Creighton, T. E. *Proteins: Structures and Molecular Properties*; Freeman: New York, **1984**, 4.

1.2.-Química receptor-sustrato

Como se mencionó previamente, uno de los ejemplos más simples de formaciones supramoleculares es el autoensamblaje entre dos moléculas. Este proceso se produce debido a una interacción débil no covalente, entre las moléculas. En este escenario, una molécula funciona como receptor y se une a otra molécula, conocida como sustrato, para formar un complejo receptor-sustrato.

Dentro de la amplia variedad de compuestos, hay numerosos ejemplos de moléculas diseñadas específicamente para actuar como receptores de sustratos. Entre estos compuestos, se destacan las ciclodextrinas, los calixarenos, los cucurbiturilos y los pilarenos, que son moléculas orgánicas altamente reconocidas por su capacidad de formar complejos con diferentes sustratos. (Figura 2).

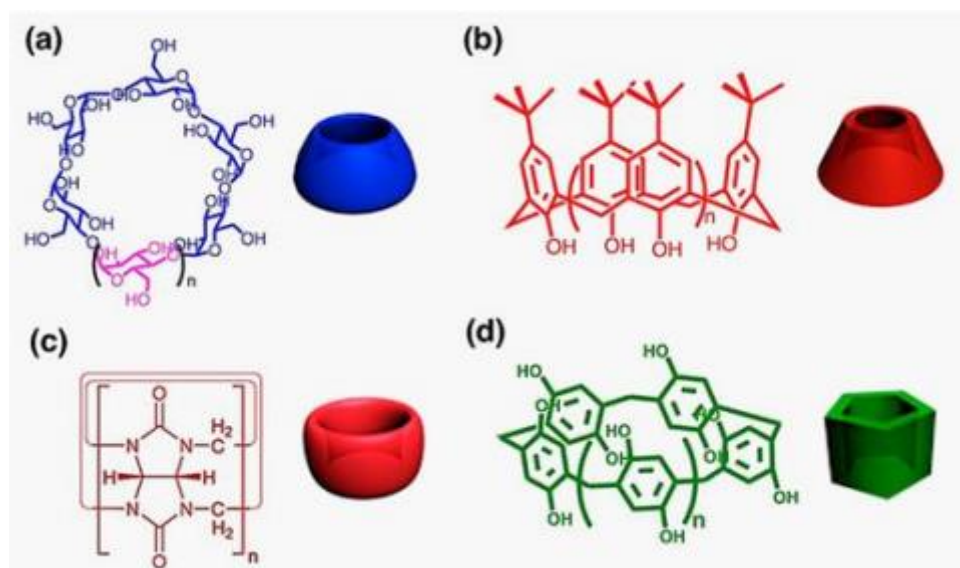


Figura 2. Representación esquemática de algunos receptores moleculares orgánicos (a) ciclodextrina; (b) calix[n]areno, b) cucurbit[n]urilo; c) pilarenos.⁵

Brevemente, se puede comentar que las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de glucosa con unión $\alpha(1,4)$ con una superficie exterior hidrofílica y una cavidad interior hidrofóbica, lo que les permite que se puedan incluir en su interior sustratos apolares.⁶

⁵ Imagen: Lou, X.-Y.; Song, N.; Yang, Y.-W.; *Molecules*, **2017**, 22, 1640.

⁶ Del Valle, E.M.M. *Process Biochem.* **2004**, 39, 1033.

Los calixarenos son macrociclos con grupos fenólicos unidos por puentes metileno, formando una cavidad hidrofóbica con un “borde inferior” polar y un borde superior no polar. Son capaces de formar complejos con una gran variedad de sustratos (cationes metálicos, aniones o moléculas neutras).⁷ Otro grupo importante de receptores orgánicos son los pilarenos,⁸ formados por unidades de hidroquinona conectadas por puentes metileno entre las posiciones 2 y 5, y que están siendo fruto de una gran actividad investigadora al poseer una química receptor-sustrato muy controlable y alta flexibilidad en su funcionalización.

Por último, los cucurbit[n]urilos (CB[n]s) son receptores en forma de calabaza, y que químicamente se pueden considerar como oligómeros cíclicos de n unidades de glicolurilo.⁹ Los cucurbit[n]urilos se caracterizan por presentar una cavidad interna hidrofóbica y un exterior más hidrofílico, con varios portales que contienen grupos carbonilo ricos en electrones. Debido a estas características, los CB[n]s son excelentes receptores de una gran cantidad de sustratos orgánicos e inorgánicos.¹⁰ En el contexto del uso prospectivo de los compuestos orgánicos preparados en este trabajo, son especialmente relevantes los complejos formados entre el cucurbit[8]urilo (CB[8]) y las sales derivadas de 4,4'-bipiridinio (viológenos),¹¹ por lo que las principales características de estas sales se abordarán en el siguiente apartado de esta introducción.

⁷ Sansone, F.; Baldini, L.; Casnati, A.; Ungaro, R. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2715.

⁸ Sathiyajith, C.; Shaikh, R.R.; Han, Q.; Zhang, Y.; Meguellati, K.; Yang, Y.W. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 677.

⁹ Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844.

¹⁰ Barrow, S. J.; Kasera, S.; Rowland, M. J.; del Barrio, J.; Scherman, O. A. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320

¹¹ Pazos, E.; Novo, P.; Peinador, C.; Kaifer, A. E.; García, M. D.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**

1.2.1.-Complejos viológeno-CB[8] en la liberación de fármacos.

El uso de cucurbit[8]urilo como anfitrión molecular se ha establecido como una estrategia confiable para crear sistemas químicos dinámicos. Su capacidad para formar complejos homo y heteroternarios en medios acuosos con interruptores moleculares adecuados como invitados es la clave de este enfoque (**Figura 3**).

De esta manera, los interruptores supramoleculares basados en CB[8] se pueden diseñar de manera predecible y modular, mediante la selección de substratos adecuados que condicionen el comportamiento redox, fotoquímico o ácido-base en estos sistemas multicomponente. Esta versatilidad en el diseño confiere a dichos interruptores un gran potencial para el desarrollo racional de nuevos materiales, donde su función no solo depende de la capacidad de respuesta a estímulos, sino también de la agregación/desagregación transitoria de bloques de construcción homo o heteroméricos.

Por ejemplo, se puede lograr un interruptor redox reversible utilizando derivados de bipyridinio como aceptores de electrones y CB[8] como molécula anfitrión (**Figura 3**). En general, la elección de los estímulos externos depende de la aplicación específica y la funcionalidad deseada del interruptor supramolecular.¹²

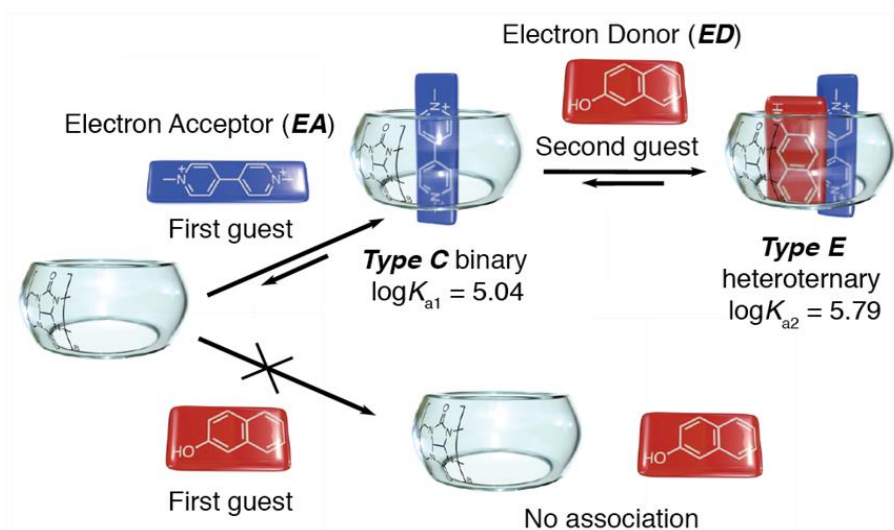


Figura 3. Representación esquemática de los distintos tipos de complejos supramoleculares entre CB[8] y viológenos.¹²

¹² Elena Pazos; Paula Novo; Carlos Peinador; Angel E.Kaifer; Marcos D. Garcia: *Cucurbit[8]uril (CB[8])-Based Supramolecular Switches*, **2019**, 58, 403.

1.3.-Aspectos generales de la química de viológenos y análogos.

Los viológenos son materiales orgánicos funcionales compuestos por grupos conjugados de bi-/polipiridinio. Poseen propiedades excepcionales, que incluyen tres estados redox estables, una excelente capacidad para aceptar electrones y sustituyentes de nitrógeno ajustables. Los viológenos pueden experimentar dos pasos de reducción para formar, respectivamente, cationes radicales estables y especies neutras con diferentes colores, lo que implica aplicaciones potenciales en electrocromismo (cambio reversible del color de un material debido a la aplicación de un potencial eléctrico). (Figura 4)

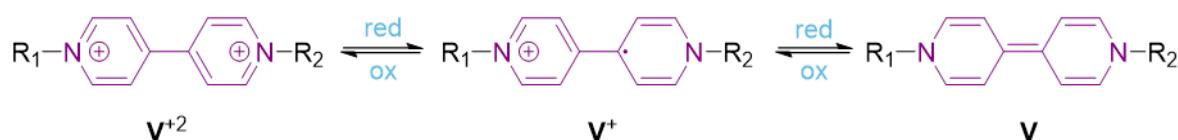
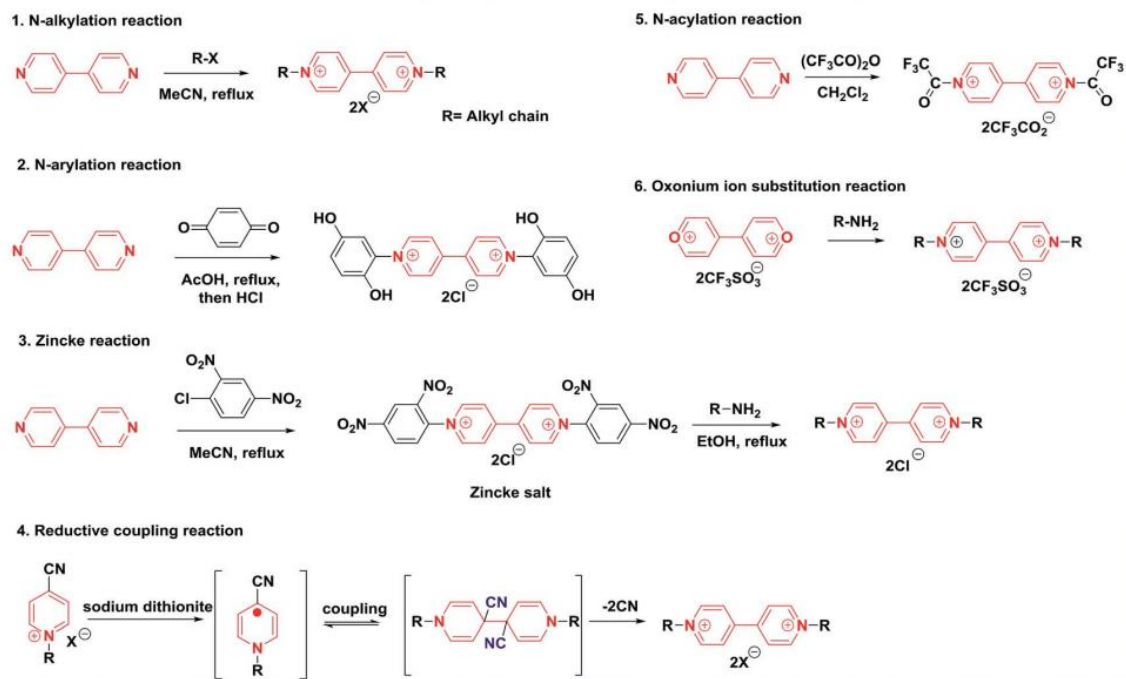


Figura 4

Con una buena capacidad redox reversible, los viológenos pueden utilizarse como analitos potenciales en baterías de flujo redox orgánicas (OFRBs, por sus siglas en inglés). Además, como aceptores de electrones deseados, los viológenos pueden combinarse con un donante de electrones para formar complejos de transferencia de carga, que se pueden utilizar como capa activa en transistores de efecto de campo o dispositivos de memoria.¹³

Se han realizado grandes progresos en la síntesis de viológenos y sus derivados. Como se muestra en el **Esquema 2**, han conseguido desarrollarse seis métodos típicos, a saber: la reacción de *N*-alquilación, la reacción de *N*-arilación, la reacción de Zincke, la reacción de acoplamiento reductivo, la reacción de *N*-acilación y la reacción de sustitución del ion oxonio. Estos métodos sintéticos permiten una alta versatilidad sintética en la preparación de análogos de viológenos, lo que se traduce en una alta capacidad de ajuste de sus propiedades fisicoquímicas.

¹³ Junjie Ding; Caini Zheng; Luxin Wang; Chenbao Lu; Bin Zhang; Yu Cheng; Mingqiang Li; Guangqun Zhai; Xiaodong Zhuang: *Viologen-inspired functional materials: synthesis strategies and applications*, **2019**, 7, 23337.



Esquema 2: Estrategias sintéticas para la preparación de viológenos.¹⁴

¹⁴ Junjie Ding; Caini Zheng; Luxin Wang; Chenbao Lu; Bin Zhang; Yu Cheng; Mingqiang Li; Guangqun Zhai; Xiaodong Zhuang: *Viologen-inspired functional materials: synthesis strategies and applications*, **2019**, 7, 23337.

1.4. “Vermellógenos” como sustitutos de viológenos.

A pesar de la gran accesibilidad sintética de los viológenos, la ajustabilidad de sus propiedades, y su capacidad como aceptores de electrones y sustratos en química receptor-sustrato, un factor clave limita considerablemente la aplicabilidad de estos sistemas en el contexto de medios biológicamente relevantes: la alta citotoxicidad de los viológenos como productores de especies reactivas oxigenadas.¹⁵

Es por ello por lo que el grupo de investigación SUPREN ha centrado parte de sus intereses en los últimos tiempos en el desarrollo de los denominados “vermellogenos”, una nueva clase de análogos de viológeno sensibles al pH, que reemplazan la unión directa entre los grupos para-piridinio sustituidos en esos compuestos por un grupo funcional hidrazona. Se han sintetizado eficientemente una serie de estos compuestos en medios acuosos mediante reacciones de intercambio de hidrazona, mostrando una notable sensibilidad al pH.¹⁶

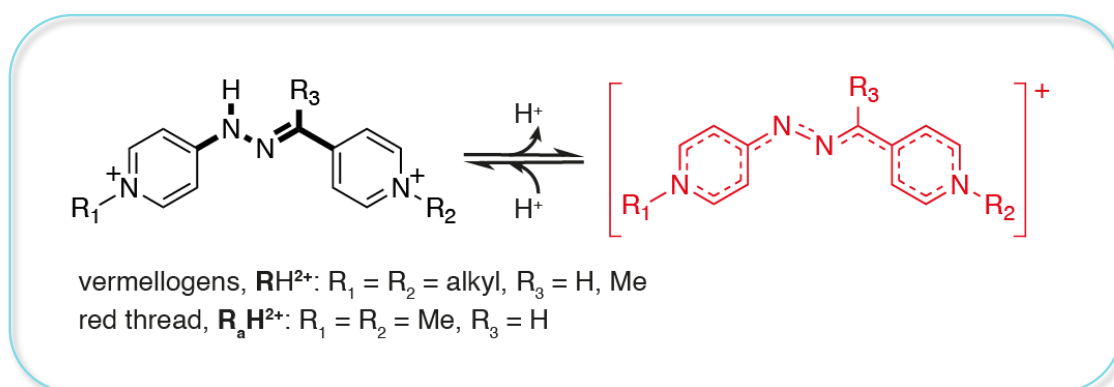


Figura 5. Estructura de algunos “vermellogenos desarrollados por el grupo de investigación SUPREN

En lugar del equilibrio redox que justifica la gran utilidad de los viológenos, los vermillionenos presentan un equilibrio ácido-base debido a la inusual acidez del grupo amino en estos compuestos ($\text{p}K_a \sim 8.5$), consiguiendo una nueva clase de sales orgánicas con capacidad de conmutación molecular. Estos pueden ser sintetizados eficientemente en medio acuoso ácido mediante reacciones de intercambio de hidrazona y muestran una marcada capacidad de respuesta ácido-base en valores de pH relevantes desde el punto de vista biológico. **(Figura 5)**

¹⁵ Alejandro Vila García; Ana Rey Rico; Andrés Martínez Lage: “Análisis biológico de sondas mitocondriales de especies oxigenadas reactivas basadas en viológenos”, **2021**, 2183, 29247.

¹⁶ Liliana Barravecchia; Arturo Blanco-Gómez; Iago Neira; Raminta Skackauskaite; Alejandro Vila; Ana Rey-Rico; Carlos Peinador; Marcos D. García: “Vermellogens” and the Development of CB[8]-Based Supramolecular Switches Using pH-Responsive and Non-Toxic Viologen Analogues, **2022**, 144, 19127.

Aunque los "vermelógenos" puedan considerarse como análogos estructurales de los viológenos, la introducción del grupo hidrazona interrumpiría la capacidad de los anillos de piridinio conjugados para ser reducidos de forma reversible, lo que a su vez disminuiría la citotoxicidad de estos en comparación con los viológenos.

1.6.-Preparación de híbridos péptido-viológeno. Antecedentes.

Se ha denotado un creciente interés en el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas para la funcionalización de péptidos. Los péptidos tienen una amplia variedad de aplicaciones, siendo plataformas ideales para el desarrollo de medicamentos, biosensores, etc.¹⁷ Esto se debe a su accesibilidad sintética y a su gran versatilidad funcional y estructural. A pesar de los avances importantes en la modificación de péptidos, como la introducción de aminoácidos no naturales adecuadamente funcionalizados y sus posteriores reacciones de acoplamiento cruzado o activación de C-H, las metodologías simples para la modificación no covalente, en particular mediante química receptor-substrato, apenas han comenzado a recibir atención en los últimos años.¹⁸

En 2009, Reczek et al. desarrollaron una estrategia para la conjugación de un derivado de viológeno mediante una síntesis en fase sólida. Esta metodología se enfoca únicamente en la introducción de la sal orgánica en la cadena lateral de un residuo de ácido glutámico (**Esquema 3**).¹⁹

Así, como se muestra en el esquema, podemos distinguir cinco pasos para la síntesis de este tipo de conjugados péptido-viológeno: 1) síntesis de la secuencia de péptido deseada e introducción de un residuo de ácido glutámico protegido como éster, en cada sitio deseado para el grupo viológeno, y acetilación de la amina *N*-terminal; 2) desprotección selectiva del éster en solución ácida mientras aún está en la resina; 3) activación del ácido carboxílico al éster de pentafluorofenilo; 4) acoplamiento de un

¹⁷ Liu Q; Wang J; Boyd B. J: *Talanta*, **2015**, 136, 114.

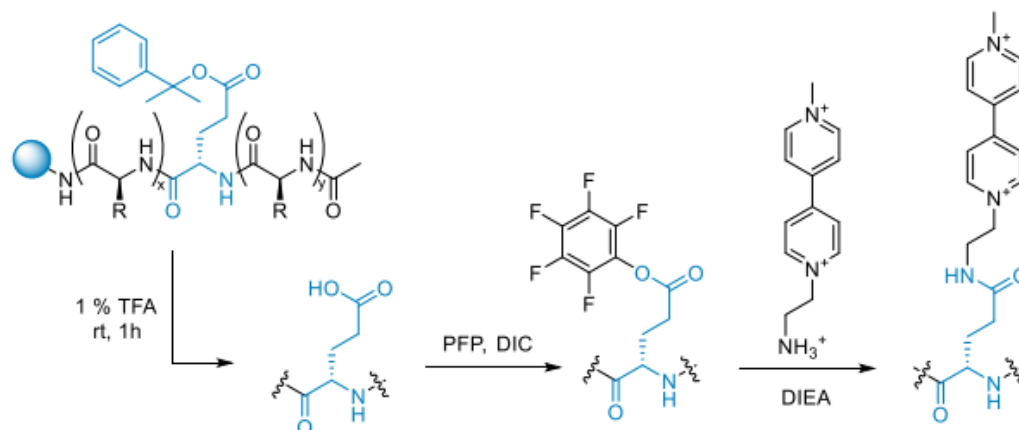
¹⁸a) Willemsse T; Schepens W; Vlijmen H. W. T; Maes B. U. W; Ballet S: *Catalysts*, **2017**, 7, 74.

b) Lee T; Manandhar B; Kassees K; Ahn J. J: *Org. Chem*, **2020**, 85, 1376.

¹⁹ a) Reczek J. J; Kennedy A. A; Halbert B. T; Urbach A. R: *Multivalent Recognition of Peptides by Modular Self-Assembled Receptors*, **2009**, 131, 2408.

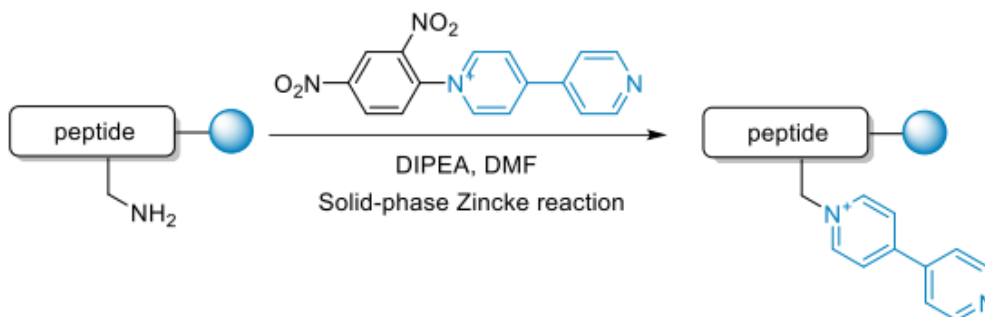
b) Reczek J. J; Rebolini E; Urbach A. R: *Solid-Phase Synthesis of Peptide-Viologen Conjugates*, **2010**, 75, 2111.

aminoalquil-viológeno a los residuos de ácido glutámico activados y 5) liberación del conjugado del soporte sólido y purificación por HPLC.



Esquema 3: Estrategia sintética para la introducción de viológenos en estructuras peptídicas a través de la modificación de una cadena lateral de ácido glutámico.

Recientemente se ha desarrollado una estrategia de conjugación de los derivados de 4,4'-bipiridina a las estructuras de péptidos mediante el uso de una reacción de Zincke en fase sólida (**Esquema 4**). De esta manera los conjugados deseados se pueden producir de manera sencilla, con las unidades de bipyridinio unidas al extremo N-terminal de los péptidos o a las cadenas laterales de los residuos de Lys.²⁰



Esquema 4: Estrategia sintética de la preparación de conjugados péptido-4,4'-bipiridinio.

²⁰ Cortón P; Novo P; López-Sobrado V; García M. D; Peinador C; Pazos E: *Synthesis*, **2020**.

1.7.-Degradación enzimática de estructuras peptídicas.

La degradación enzimática de compuestos orgánicos ha despertado un gran interés en los últimos años debido a su relevancia en diversas aplicaciones científicas. Un campo particularmente prometedor es el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos,²¹ donde la capacidad de descomponer selectivamente los péptidos unidos a viológenos mediante enzimas específicas ofrece un enfoque novedoso.

Al incorporar grupos funcionales sensibles a enzimas en los viológenos, es posible lograr una respuesta específica ante la presencia de enzimas en el entorno biológico. Esto permitiría una liberación controlada y precisa de sustancias bioactivas, lo que tiene un gran potencial en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Muchas especies de bacterias pueden producir proteasas neutras que son más activas a un pH neutro y son inhibidas por varios quelatantes de metales como el EDTA. Se ha observado que estas enzimas tienen especificidad por residuos de aminoácidos hidrofóbicos como la L-leucina, L-isoleucina, L-fenilalanina, etc., cuyos grupos amino donan sus enlaces para ser divididos, en las proteasas neutras, entre otros, de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoproteolyticus* ("termolisina"), *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium histolyticum*, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae*. Estas enzimas pueden ser llamadas amino endopeptidasas, como propusieron Millet y Acher.²²

Por otro lado, la enzima LasB es una metaloproteasa neutra dependiente de Zn^{2+} . Posee varios sitios de unión para zinc y calcio, que son iones necesarios para su estabilidad y actividad. Su estructura terciaria es similar a la termolisina, pero tiene una hendidura de sitio activo más abierta y muestra preferencia por aminoácidos hidrofóbicos en la posición P10 del sustrato. El procesamiento adecuado y la actividad completa de LasB dependen tanto de Ca^{2+} como de Zn^{2+} , ya que estos iones estabilizan la enzima en la estructura conformacional correcta. Además, el Zn^{2+} es esencial para la catálisis. LasB es capaz de hidrolizar una variedad de sustratos proteicos, habiéndose documentado numerosos ejemplos de hidrólisis mediada por LasB en proteínas tanto de origen humano como bacteriano en la literatura científica.²³

²¹ Quanyin Hu; Prateek S. Katti; Zhen Gu: *Enzyme-Responsive Nanomaterials for Controlled Drug Delivery*. **2014**, 6, 12273.

²² Kazuyuki Morihara; Hiroshige Tsuzuki: *Comparative Study of Various Neutral Proteinases from Microorganisms: Specificity with Oligopeptides*, **1971**, 146, 291.

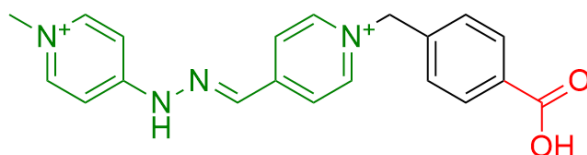
²³ Martin J. Everett; David T. Davies: *Pseudomonas aeruginosa elastase (LasB) as a therapeutic target*, **2021**, 26, 2108.

En resumen, la degradación enzimática de compuestos orgánicos, especialmente mediante proteasas neutras como LasB, ofrece un enfoque prometedor para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. Estas enzimas, con su capacidad de reconocer y descomponer selectivamente péptidos específicos, pueden desempeñar un papel crucial en el desarrollo de tecnologías avanzadas de administración de medicamentos.

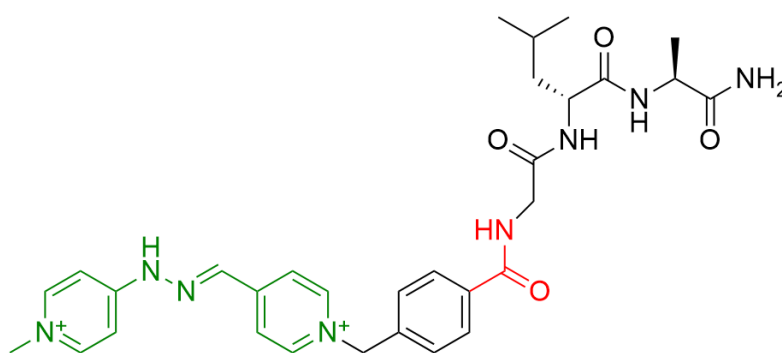
2.- Objetivos.

De acuerdo con lo mencionado en la introducción, la combinación de derivados de viológeno con cucurbit[8]urilo como receptores moleculares es una estrategia sumamente interesante para la creación de interruptores supramoleculares. Estos sistemas químicos dependen de estímulos, y aprovechan las propiedades redox del viológeno para controlar de manera reversible la agregación de múltiples bloques de construcción. Por lo tanto, se plantean los siguientes objetivos para este trabajo de fin de grado:

1. Síntesis en disolución y caracterización estructural de un nuevo vermellógeno, **2²⁺**, portador de un grupo ácido carboxílico para su ulterior funcionalización con aminoácidos.



2. Síntesis en fase sólida del híbrido vermellógeno-péptido **1²⁺**, purificación y elucidación estructural.

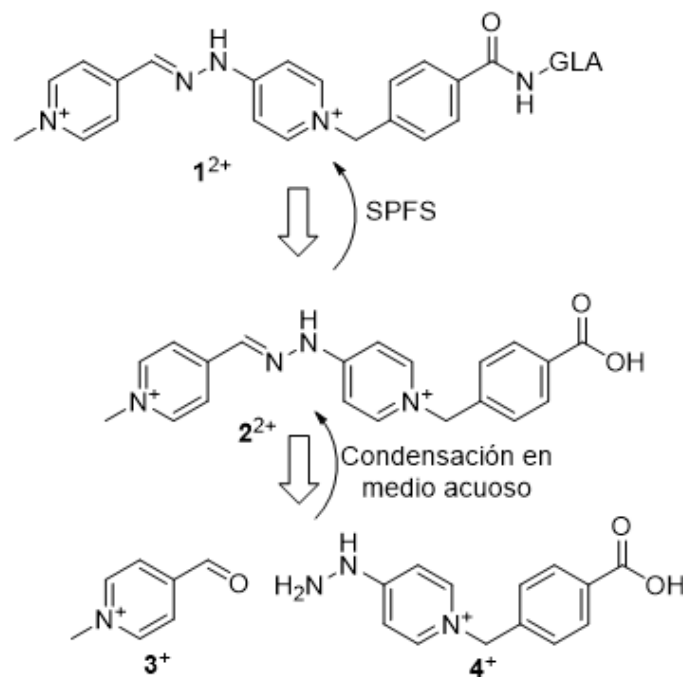


3. Incubación del **híbrido 1²⁺** con una metaloproteasa de Zn utilizando Ca²⁺ como cofactor (CaCl₂), y posterior adición de fluorescamina para la comprobación de la escisión del péptido portador del grupo vermellógeno.

3.- Discusión de resultados

3.1.- Estrategia sintética

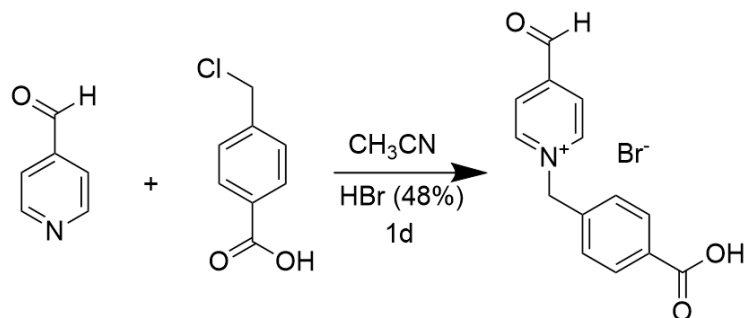
A continuación, se especifica la retrosíntesis para el híbrido vermellógeno-peptido objetivo 1^{2+} . (Esquema 5).



Esquema 5: Retrosíntesis para la preparación del compuesto objetivo 1^{2+} .

Para obtener el híbrido 1^{2+} , se realiza una síntesis en fase sólida mediante sus precursores, el compuesto 2^{2+} y una secuencia de aminoácidos GLA (Alanina, Leucina y Glicina en este orden). El compuesto 2^{2+} se prepara a través de una condensación de 4-formil-1-metilpiridinio (3^+) y 1-(4-carboxibencil)-4-hidrazinilpiridinio (4^+), preparados mediante métodos sintéticos bien establecidos. A continuación, se procede a discutir aquellos aspectos más relevantes referidos a la síntesis, purificación y caracterización estructural del compuesto objetivo y los intermedios sintéticos.

3.2.- Síntesis de 2²⁺



Esquema 6: Síntesis del compuesto 5⁺.

Según lo mostrado en el **Esquema 6**, la primera reacción llevada a cabo para la preparación de la molécula objetivo 1²⁺ es una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2), entre el átomo de nitrógeno del isonicotinaldehído y el átomo de carbono unido al cloro en el ácido 4-(clorometil)benzoico. El átomo de nitrógeno actúa como nucleófilo, atacando al carbono bencílico portador del cloro, desplazándolo y formando un nuevo enlace C-N.

Así, calentando a reflujo con agitación una mezcla de los reactivos durante 1 día, se obtiene como producto de la reacción un sólido en forma de polvo amarillo, que fue confirmado como el compuesto 5⁺·Br por sus datos espectroscópicos con un rendimiento del 54%. A continuación, se muestra el espectro de ¹H RMN para el catión 5⁺:

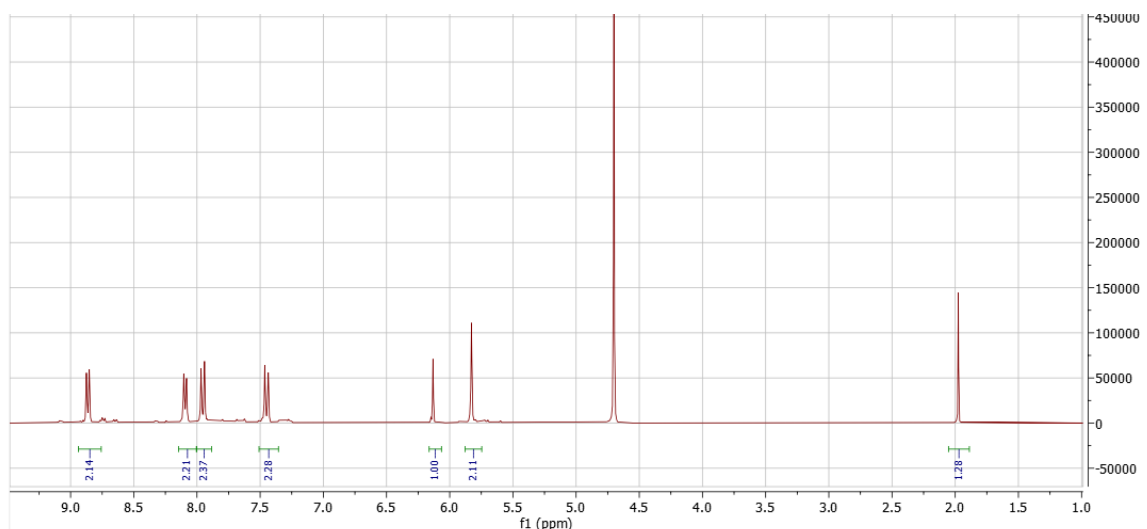
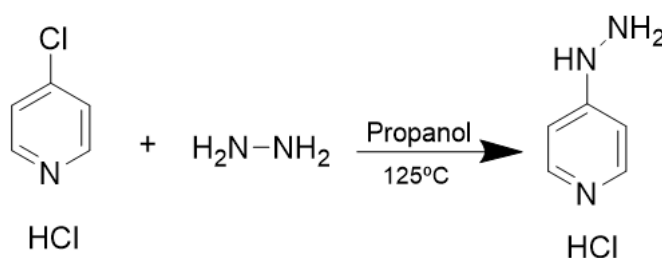


Figura 6: Espectro parcial de ¹H RMN (D₂O, 500MHz, 25°C) del compuesto 5⁺.

La señal que se ve en torno a 2 ppm correspondería a los hidrógenos del metileno bencílico. Alrededor de 6 ppm se distinguen 2 señales, propias de los aldehídos en forma hidrato (y que no aparecen como una misma señal porque tienen un entorno químico distinto, provocando esta diferencia la presencia de un átomo de nitrógeno protonado) mientras que a partir de 7 ppm se ven 4 dobletes que corresponden a los hidrógenos aromáticos, siendo los más desapantallados aquellos de la piridina.

Del mismo modo, se procedió a la preparación del compuesto **6**, mediante la reacción de sustitución nucleófila aromática (S_NAr) mostrada en el **Esquema 7**.



Esquema 7: Síntesis del compuesto **6**.

En este caso, la reacción tiene lugar entre la 4-cloropiridina y la hidrazina en un medio de propanol y a 125°C. La hidrazina actúa como un nucleófilo, atacando al carbono de la piridina y desplazando al cloro. Como resultado se obtiene un producto esperado que se presenta como un sólido ligeramente amarillo en un rendimiento del 62%, y que fue identificado como el clorhidrato **6**·HCl por sus datos experimentales.

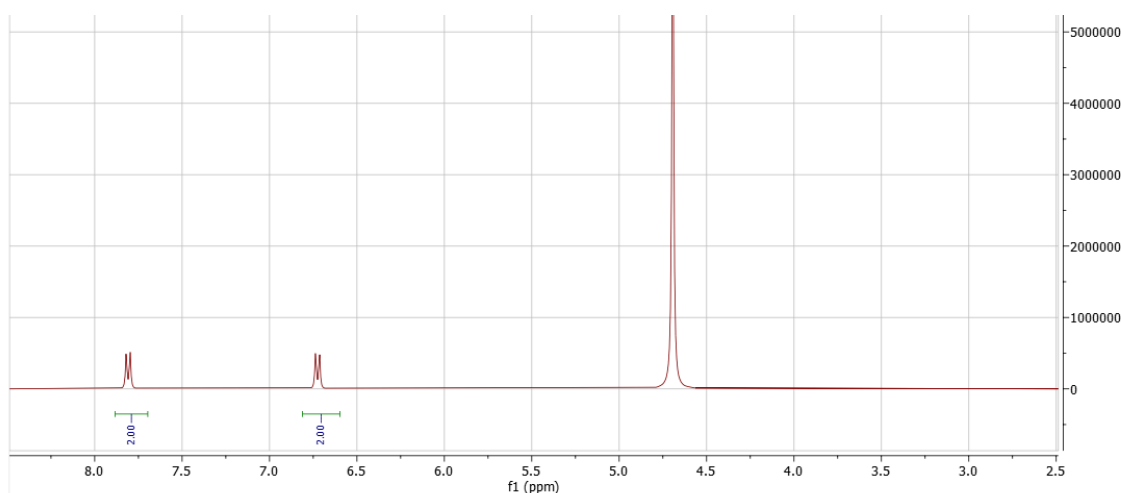
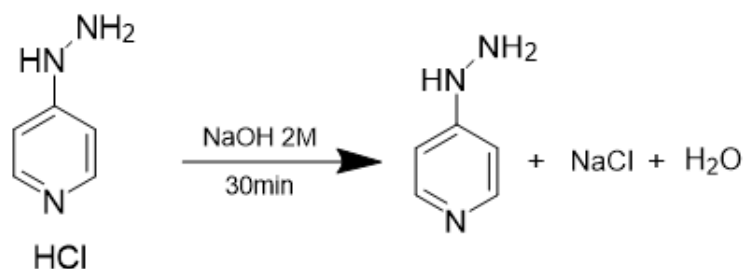


Figura 7: Espectro parcial de ¹H RMN (D₂O, 500MHz, 25°C) del compuesto **6**.

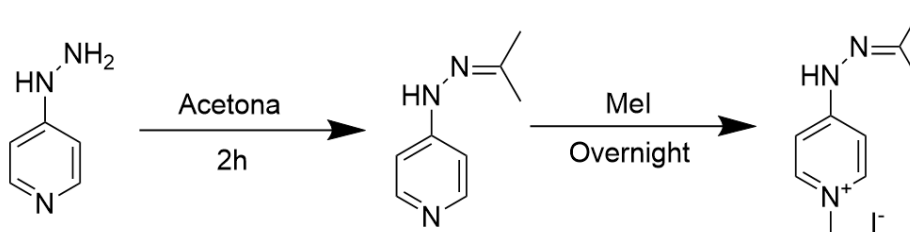
Mediante el espectro de ^1H RMN se comprueba la presencia de los hidrógenos de los anillos aromáticos, como dos dobletes que integran por 2H, mientras que los correspondientes al grupo hidrazina no aparecerían al intercambiar con los deuterios del disolvente utilizado (D_2O).

Con el fin de permitir la alquilación quimioselectiva del anillo piridínico en el derivado de hidrazina obtenido, se procede en primer lugar a liberar la base mediante tratamiento con medio básico (NaOH 2M), para asegurar su forma desprotonada, según lo mostrado en el **Esquema 8**. Tras extracción con disolvente orgánico de la fase acuosa ácida, y eliminación de los disolventes obtenidos a presión reducida, el producto así obtenido es usado en la siguiente reacción sin mayor purificación.



Esquema 8: Neutralización de **6** para dar lugar a **7**.

Así, el producto **7** se disuelve en acetona y se calienta a reflujo durante una hora, protegiendo de esta forma el grupo hidrazina como hidrazona *in situ*, y permitiendo la alquilación quimioselectiva del nitrógeno piridínico por adición de Mel. De esta manera, y según el **Esquema 9** se obtiene un aceite granate correspondiente a **8**:



Esquema 9: Protección de **7** y síntesis de **8**.

El producto 8 se caracteriza mediante un espectro de ^1H RMN:

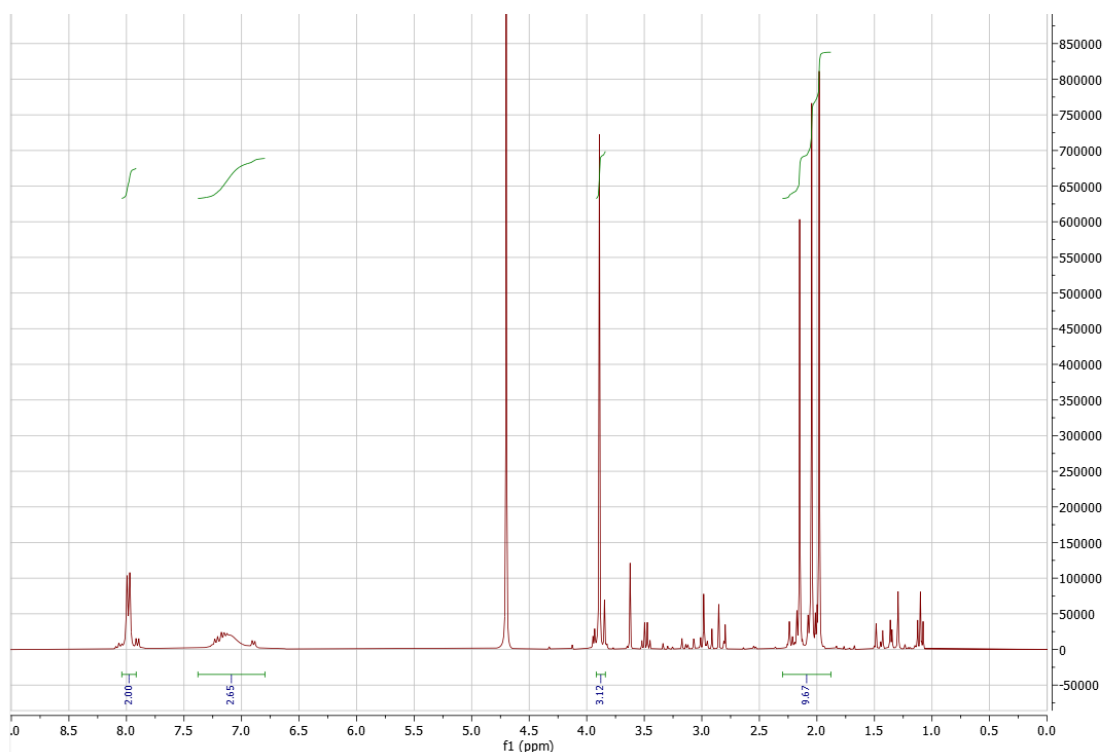
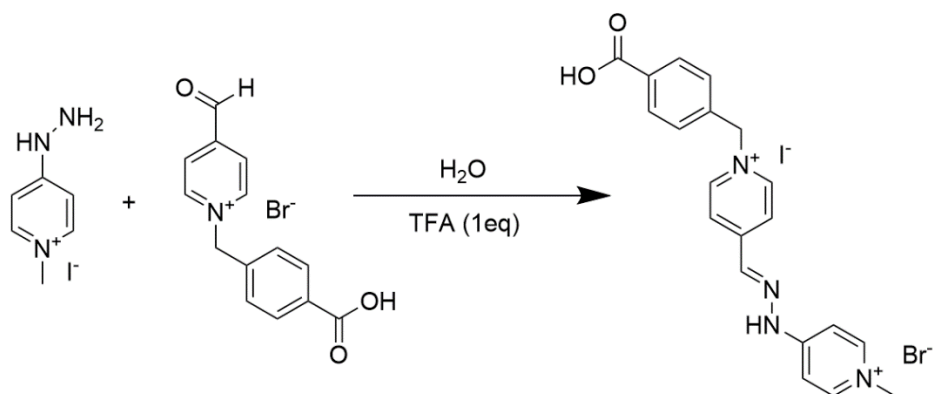


Figura 8: Espectro de ^1H RMN (D_2O , 500MHz, 25°C) del compuesto **8**.

Con la información obtenida en el espectro de RMN se pueden observar un doblete a 8 ppm correspondientes a los 2H en posición α al N alquilado. Del mismo modo, los 2H en posición β a dicho átomo aparecen como un singlete ancho, debido a un efecto de coalescencia cercano a equilibrio rápido en la escala de tiempos de RMN, y producido por la rotación restringida del enlace $\text{C}_{\text{pyr}}\text{-NH-}$ en el compuesto. Por otra parte, a 3.9 ppm se puede observar el singlete por 3H correspondiente al grupo metilo que cuaterniza el nitrógeno piridínico, y en torno a 2 ppm varios grupos metilo asociados a los distintos isómeros del grupo hidrazona en la molécula.

Una vez preparados los compuestos **5-Br** y **8-I**, se procede a la preparación del correspondiente vermellógeno, mediante condensación en medio acuoso con ácido trifluoroacético catalítico. Tras calentar a 60 °C hasta la completa disolución del precipitado formado por la mezcla, se enfría la disolución amarilla resultante de la que precipita un sólido blanco tras añadir exceso de hexafluorofosfato de potasio (**Esquema 10**).



Esquema 10: Síntesis de 2^{2+} .

La reacción que tiene lugar para producir el vermellógeno es una reacción de condensación entre el 4-hidrazinil-1-metilpiridinio y el 1-(4-carboxibencil)-4-(dihroximetil)piridinio. En esta, el grupo hidroximetil del compuesto 5^{+} reacciona con el grupo hidrazina del compuesto 8^{+} , eliminándose una molécula de agua y formándose un enlace entre el carbono del grupo metileno y el nitrógeno del grupo hidrazina. A diferencia de otros procesos de formación de enlaces imina, en este caso la reacción puede llevarse a cabo en medio acuoso, ya que los anillo piridinio conjugados con el grupo hidrazona formado producen una enorme estabilización del grupo funcional frente a la hidrólisis.

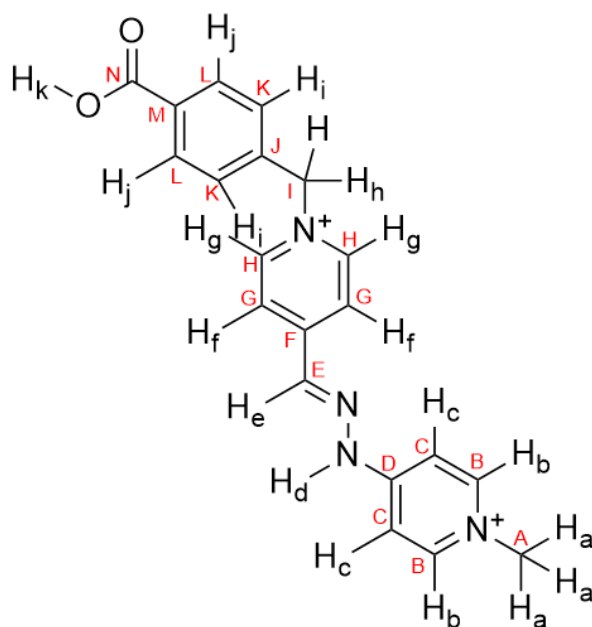


Figura 9: Estructura de 2^{2+} mostrando las etiquetas arbitrarias utilizadas para la asignación mediante RMN de los átomos de C (A, B, C...) e H (H_A , H_B , H_C ...)

El producto obtenido se caracteriza por RMN de ^1H , ^{13}C mono y bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC). Así, según la estructura de la **Figura 7** se obtendría el siguiente espectro de ^1H RMN (**Figura 10**):

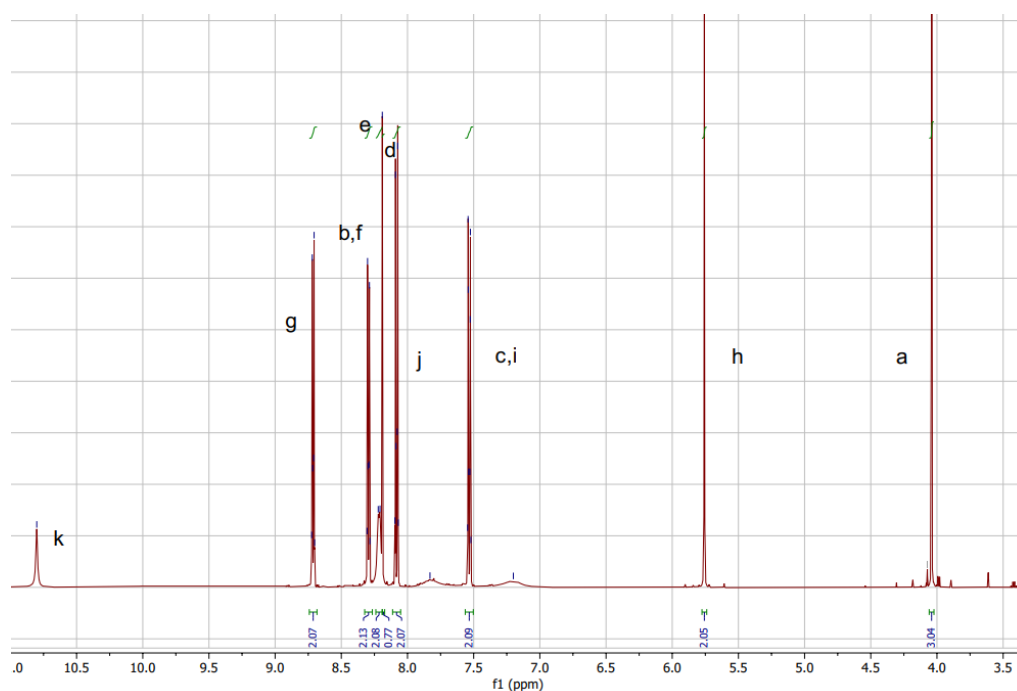


Figura 10: Espectro parcial de RMN ^1H (D_2O , 500MHz, 25°C) del compuesto 2^{2+} .

Así se observan 11 señales, de las cuales destaca un singlete en torno a 10,5 ppm que corresponde al hidrógeno del ácido carboxílico, mientras que los hidrógenos de los anillos aromáticos se ven en el rango de 7-9 ppm, siendo los más desapantallados aquellos próximos al átomo de nitrógeno protonado. La señal que aparece como un singlete en 5,75 ppm sería la correspondiente a los hidrógenos del metileno bencílico, integrando por 2H, mientras que la señal que integra por 3H y está localizada en 4 ppm sería la del grupo metilo terminal de la molécula.

A continuación, y según la **Figura 11**:

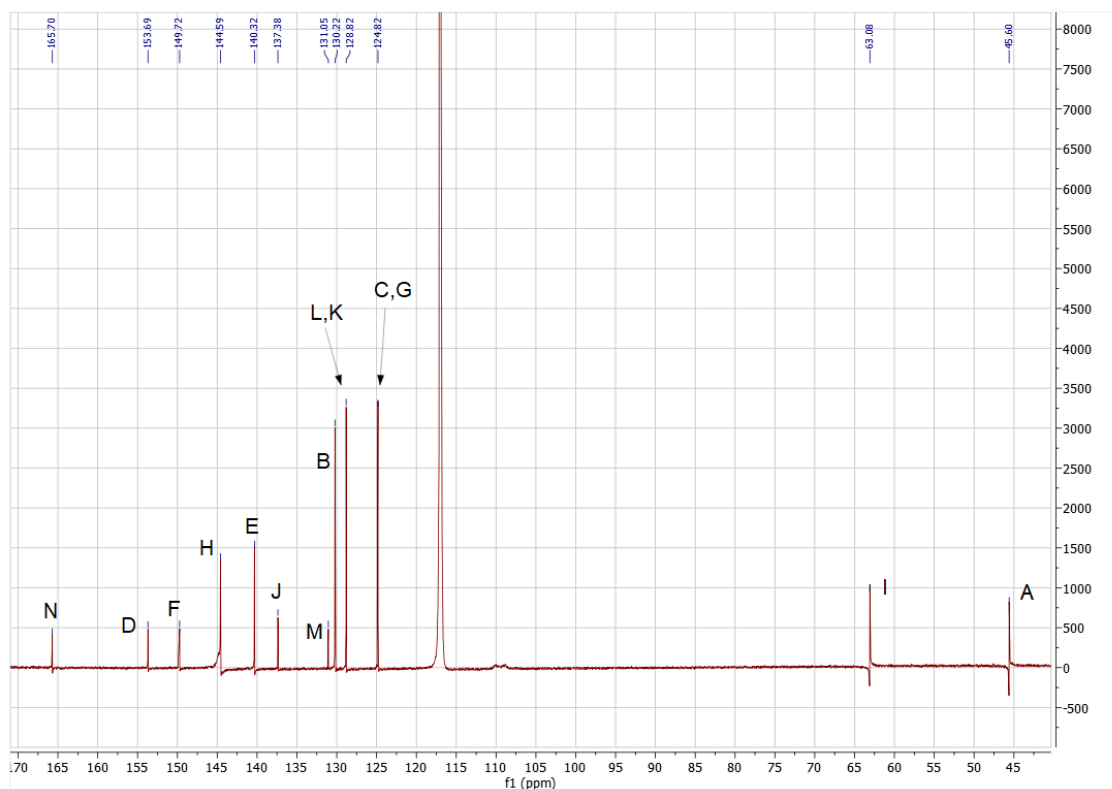


Figura 11: Espectro de RMN ¹³C del compuesto **22⁺**.

En el espectro de ¹³C RMN (Figura 9) se presentan 13 señales de las cuales 5 corresponden a carbonos cuaternarios. El carbono N que aparece en torno a 165 ppm es el más desapantallado de la molécula, y se espera por tanto que sea el del ácido carboxílico. Junto a este carbono se observan señales de similar intensidad, que aparecerían en menor grado que otras más intensas debido a que pertenecen a carbonos cuaternarios (estos serían J, M, D y F) correspondientes a aquellos de los anillos bencílicos y piridínicos. El grupo de carbonos (C, G) y (L, K) son señales que aparecen muy próximas en el espectro y que se relacionan con carbonos con entornos químicos muy similares (es por ello que estas señales en concreto son más intensas que cualquier otra del espectro, sin tener en cuenta la correspondiente al CD₃CN, impureza al purificar). El grupo metileno bencílico se relaciona con el carbono I, mientras que A sería el del grupo metilo terminal.

La estructura completa se verifica utilizando información de espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC.

El espectro COSY muestra correlaciones entre protones que están separados por un enlace, donde los cruces en la diagonal representan al mismo hidrógeno y aquellas fuera de la diagonal representan correlaciones entre hidrógenos diferentes. El espectro HSQC muestra las correlaciones entre protones y los carbonos que están a un enlace de distancia, mientras que el espectro HMBC muestra las correlaciones entre protones y los carbonos que están a dos o tres enlaces de distancia.

Según el experimento COSY (**Figura 12**), y observando las intersecciones que se alejan de la diagonal que describen las señales entre sí (la señal H_A con la señal H_A , la señal H_B con la señal H_B , etc.) se observan 2 cortes que se relacionan con el acoplamiento de los protones: H_D con H_C y H_J con H_I (en la primera intersección empezando por arriba) y H_F con H_G). De esta forma se va construyendo la estructura **2²⁺** (**Figura 7**) y poniendo nombre a cada una de las señales de los espectros de 1H RMN y ^{13}C RMN.

Observando el experimento HSQC (**Figura 13**) y atendiendo a las intersecciones entre las señales del espectro de carbono 13 y el espectro de hidrógeno, se infiere la relación entre los siguientes átomos a través de un enlace simple: H_A con C_A (formando de esta manera el grupo metilo en uno de los extremos de **2²⁺**) H_H con C_I (correspondiente al grupo metileno localizado entre 2 anillos aromáticos) H_I con C_K , H_F con C_G y H_G con C_H , entre muchos otros (protones y carbonos que pertenecen a los anillos aromáticos).

De igual manera se observa el experimento HMBC (**Figura 14**), con el que mediante las intersecciones se deduce el resto de la estructura, relacionando el C_K con el H_H a una distancia de 3 enlaces, o el C_J con el H_H a una distancia de 2 enlaces, entre otros.

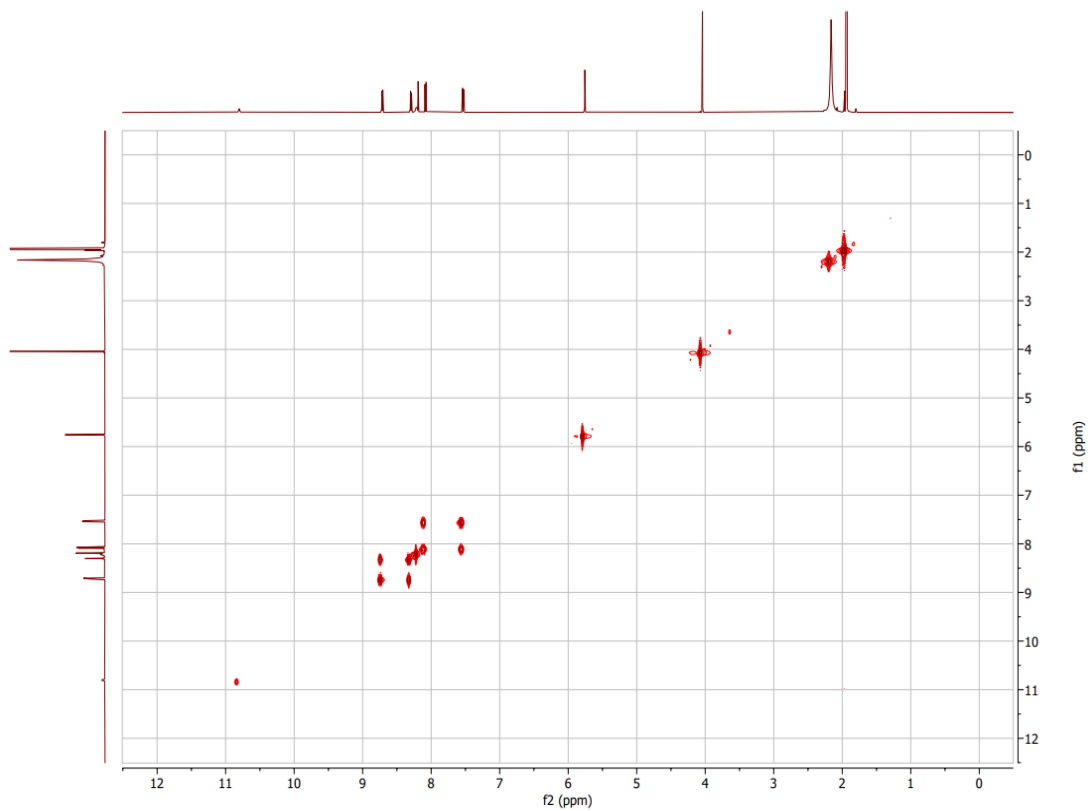


Figura 12: Experimento COSY realizado para el compuesto **2²⁺**.

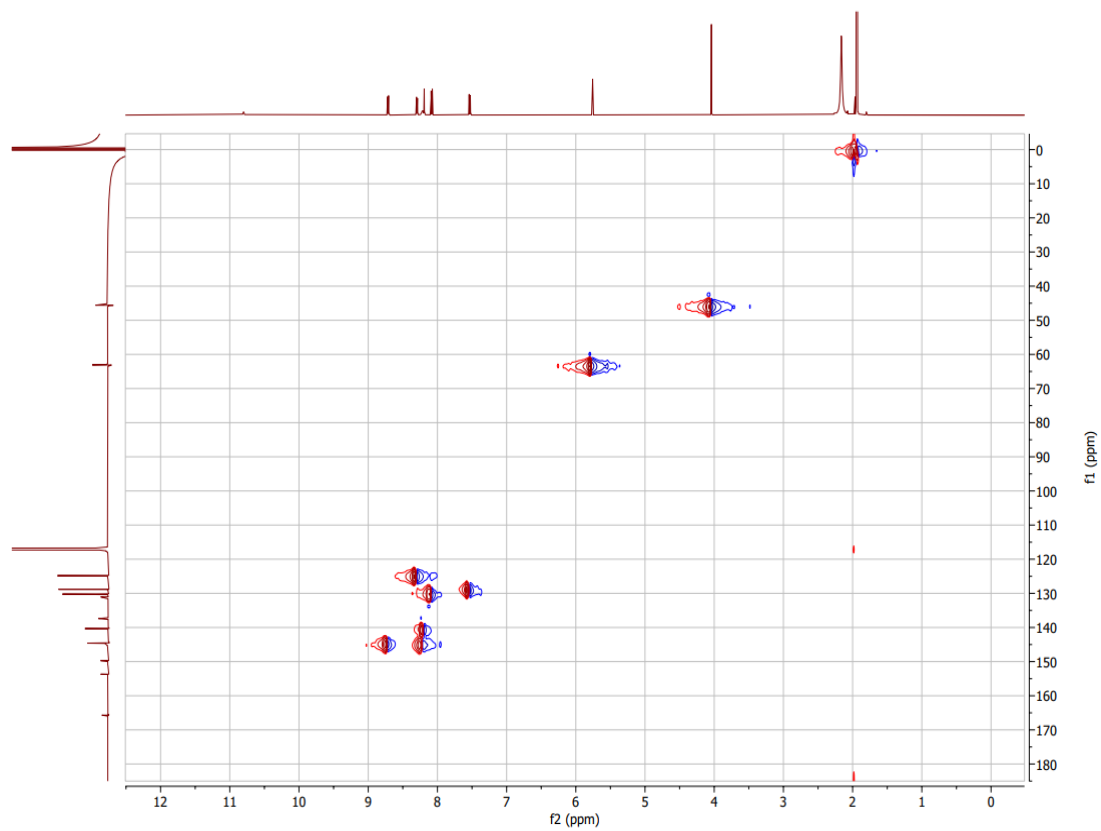


Figura 13: Experimento HSQC realizado para el compuesto **2²⁺**.

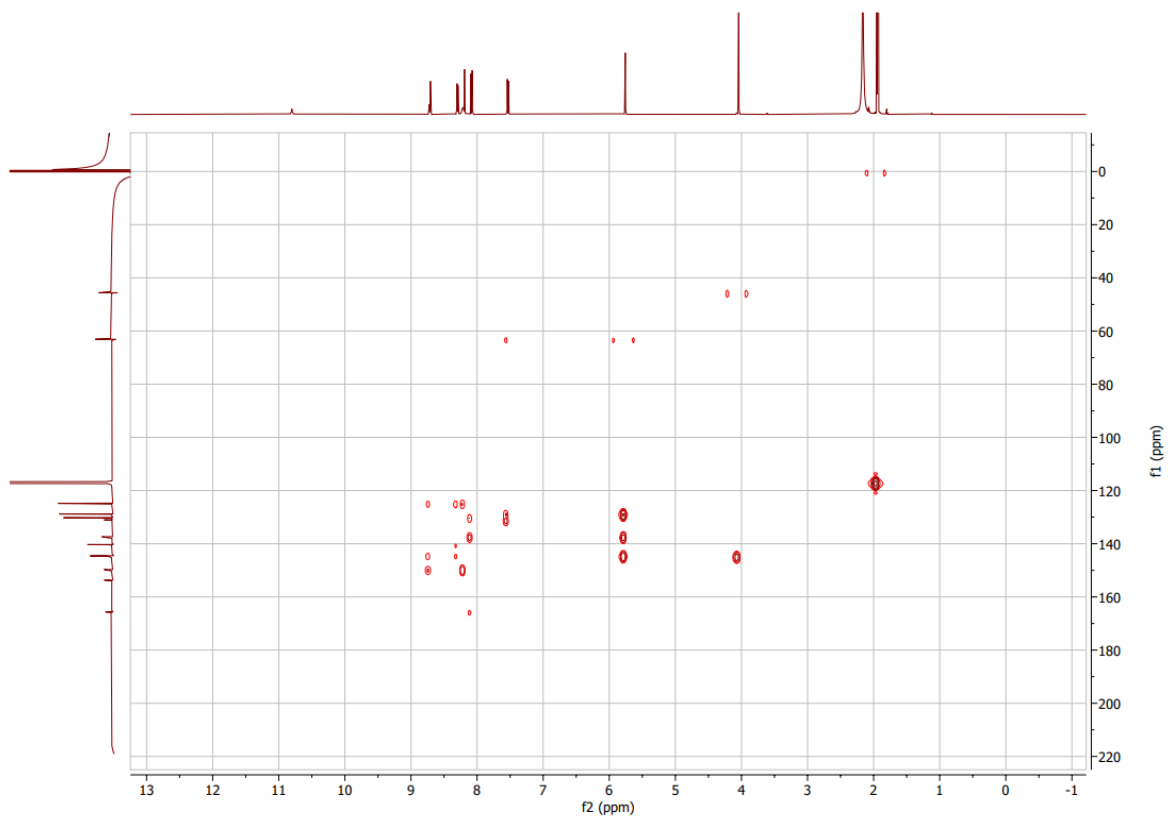


Figura 14: Experimento HMBC para el compuesto **2²⁺**.

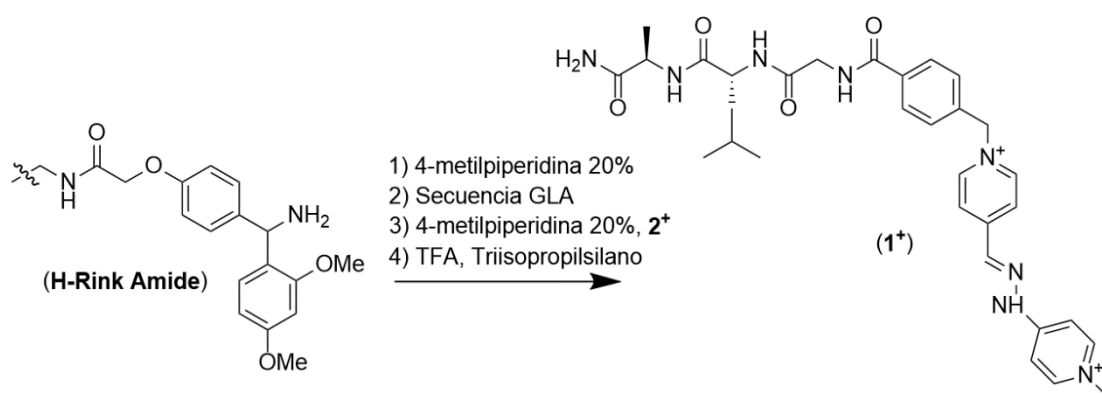
3.3.- Síntesis de 1^{2+}

Una vez se ha conseguido el compuesto 2^{2+} y se ha caracterizado para comprobar su estructura, se procede con la obtención de 1^{2+} . Para ello, se realizará una síntesis en fase sólida de un péptido de Alanina, Leucina y Glicina (**secuencia GLA**).

La síntesis en fase sólida de péptidos (SPFS) es un método comúnmente utilizado para la construcción de cadenas de aminoácidos que forman péptidos y proteínas. Esta técnica se basa en la adición secuencial de aminoácidos protegidos a un soporte sólido, como una resina, a través de enlaces covalentes. Generalmente comienza con la fijación de un aminoácido protegido al soporte sólido, que contiene un grupo protector en su extremo amino y evita la reacción no deseada durante la etapa de acoplamiento.

En este caso se ha utilizado una resina "H-Rink amide" como esqueleto para ir añadiendo secuencialmente, y en este orden, los aminoácidos Alanina, Leucina y Glicina mediante desprotecciones con 4-metilpiperidina y lavados con CH_2Cl_2 y DMF. Además, y mediante una prueba de TNBS se ha ido comprobando el estado de la resina/péptido (extremo protegido-desprotegido) en las distintas fases de la síntesis. El TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico) es un reactivo que se utiliza para detectar la presencia de grupos amino libres en una molécula. En el laboratorio se pone en contacto con la resina después del anclaje de cada aminoácido para comprobar la eficacia del acoplamiento o desacoplamiento del extremo terminal.

Una vez se ha añadido la secuencia GLA a la resina, se introduce el compuesto 2^{2+} en condiciones de acoplamiento similares a las indicadas para la introducción de los otros aminoácidos para dar lugar a 1^{2+} , con su posterior desanclaje de la resina utilizando TFA y triisopropilsilano, como se describe en el **Esquema 11**:



Esquema 11: SPFS de 1^{2+} a partir de 2^{2+} .

El producto de la escisión de la resina con TFA y el silano se agita durante 90 minutos y se gotea sobre una disolución de Et₂O fría (separando la resina sólida), obteniéndose un sólido de color amarillo, que es secado con una corriente de nitrógeno (N₂(g)). Este se purifica con un método de elución con 2 fases en un HPLC (una fase A de H₂O milliQ y una fase B de CH₃CN) en la que se empieza con un 95% de fase A y un 5% de fase B, para ir cambiando la composición del eluyente con una rampa hasta un 95% de fase B y un 5% de fase A. Como se puede ver en la Figura 16, el espectro de masas ESI-MS para el pico mayoritario en la purificación de 1²⁺ presenta una m/z de 587,383 g/mol (m/z calculado para C₃₁H₄₀N₈O₄²⁺: 588.316) (Figura 15).

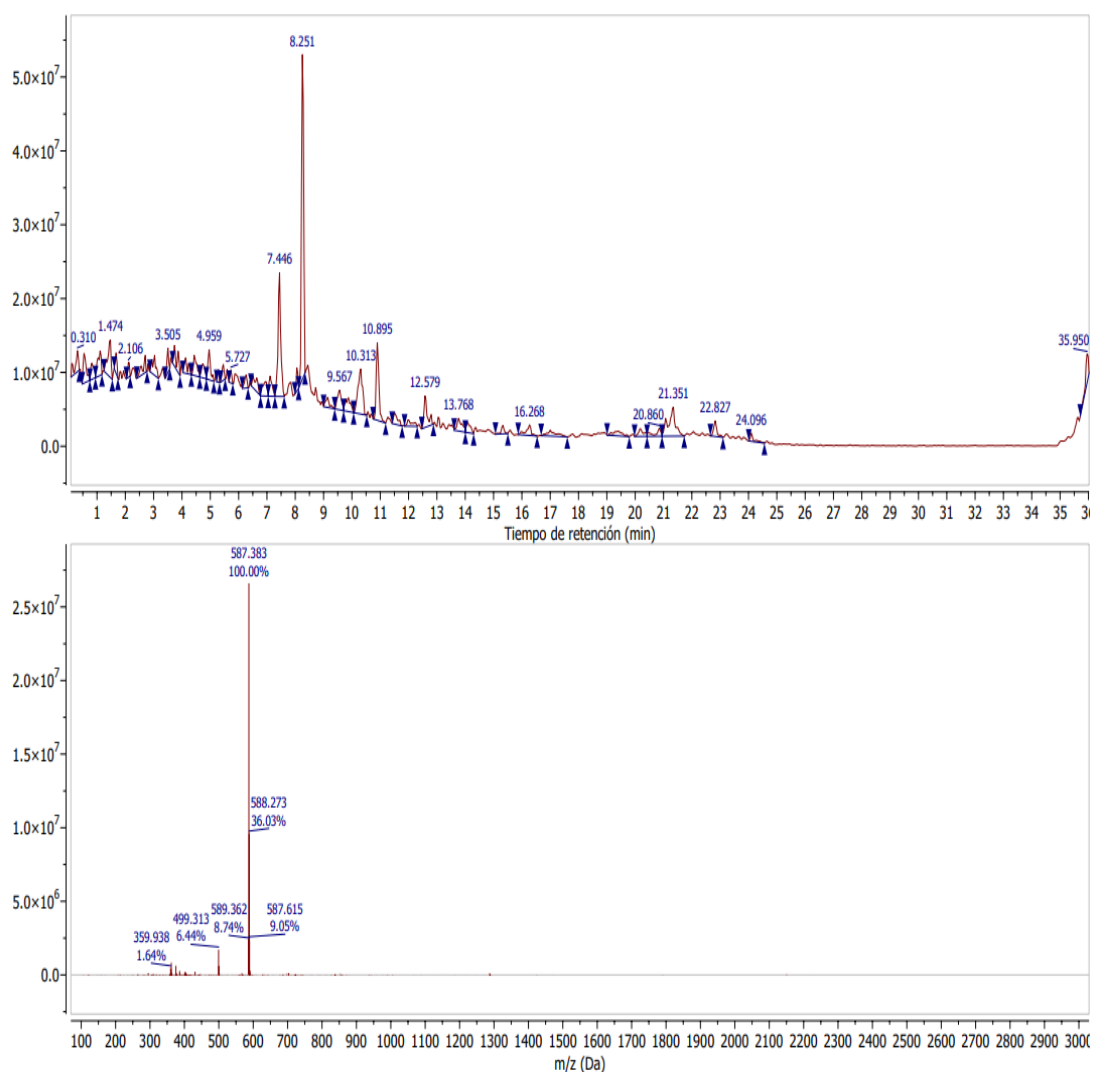


Figura 15: Cromatograma correspondiente a la purificación del péptido 1²⁺ mediante HPLC, y espectro de masas correspondiente al pico mayoritario.

A continuación, el producto purificado se caracteriza mediante ^1H RMN, ^{13}C RMN mono y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC), siguiendo un razonamiento análogo al discutido para el compuesto 2^{2+} . La **Figura 16** muestra las etiquetas arbitrarias adjudicadas a los distintos núcleos para su asignación estructural.

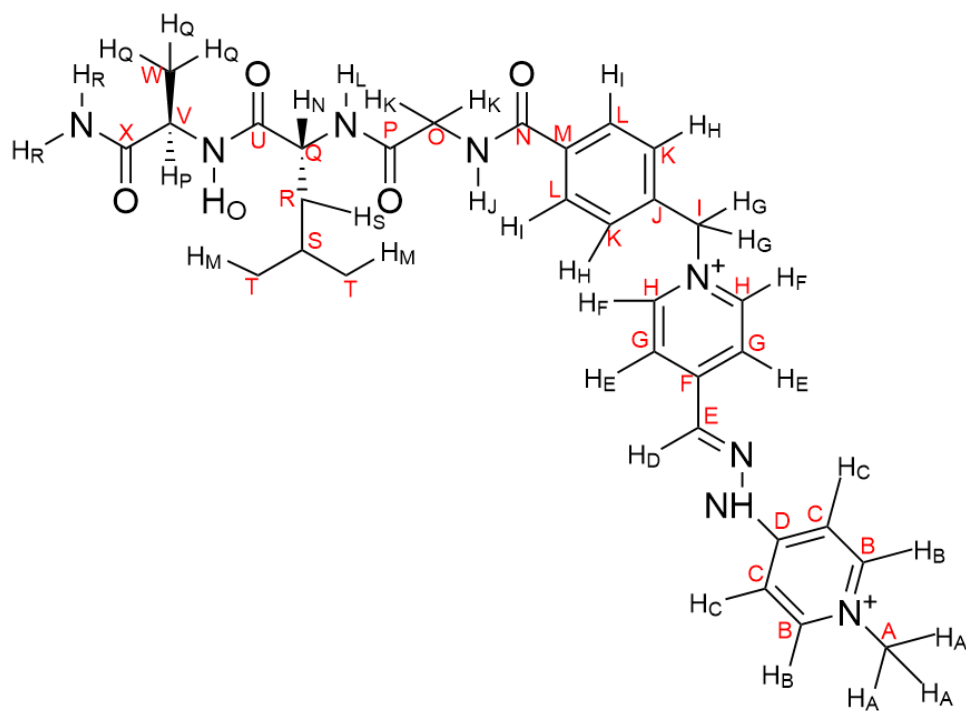


Figura 16: Estructura de 1^{2+} mostrando las etiquetas arbitrarias utilizadas para la asignación mediante RMN de los átomos de C (A, B, C...) e H (H_A, H_B, H_C...)

En el espectro de ^1H RMN (**Figura 17**) se observan 14 señales correspondientes a los protones del compuesto 1^{2+} , de las cuales se espera que la más desapantallada corresponda al hidrógeno piridínico más próximo al metileno bencílico. En el rango de 6,5-8,5 ppm aparecen los demás hidrógenos bencílicos y/o piridínicos por su característico desplazamiento en estos valores, además de aquellos hidrógenos pertenecientes a las amidas propias de los aminoácidos que forman el péptido unido al vermellógeno. El hidrógeno del grupo hidrazona se observa como un singulete que integra por 1H, y aparece en el espectro en el rango de los hidrógenos de carbonos sp^3 . Se destaca también la presencia de los hidrógenos A a un desplazamiento lejano para lo que cabría esperar en un fragmento CH_3 , pero se tiene en cuenta la proximidad a un átomo de nitrógeno protonado para justificar ese desapantallamiento. Se espera que la señal asignada para los hidrógenos P, N y D integre por 3H y sea tan intensa debido al entorno químico al que están sometidos, siendo muy parecido en estos 3 casos. El resto de los hidrógenos bencílicos y piridínicos integran por 2H y aparecen en su mayoría como dobletes.

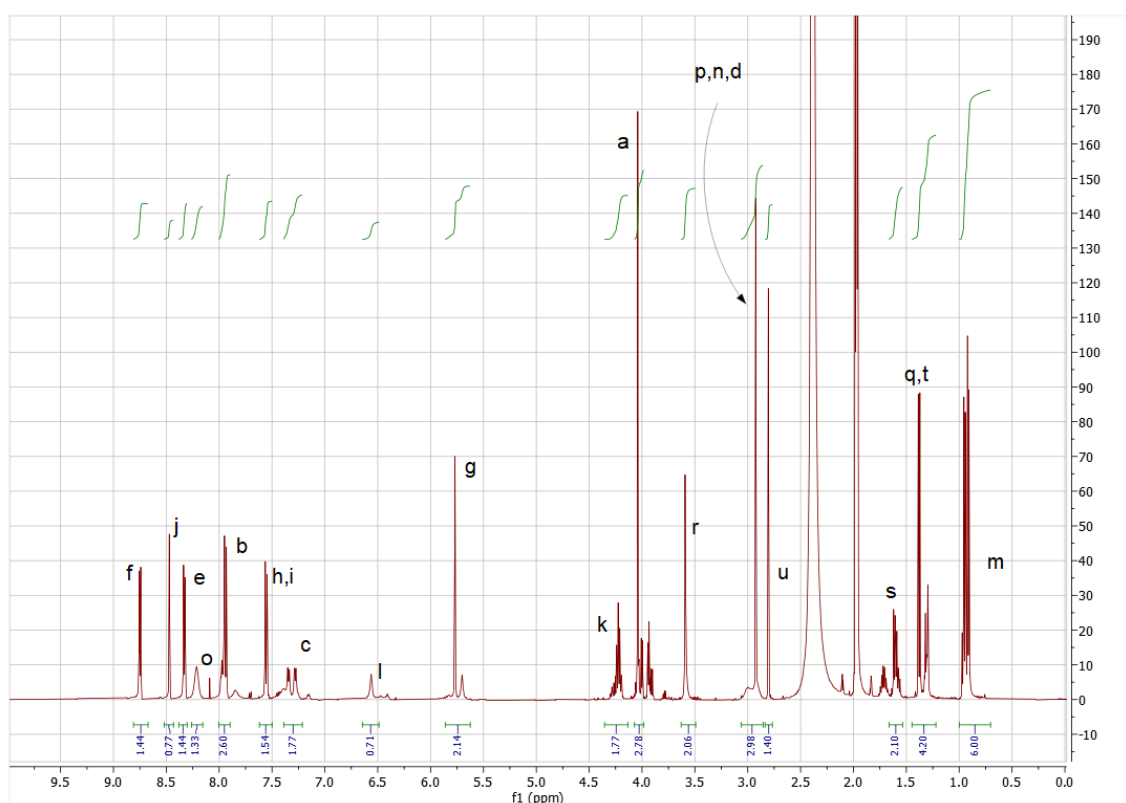


Figura 17: Espectro parcial de ^1H RMN (D_2O , 500 MHz, 25°C) de 1^{2+} .

A continuación, se muestra el espectro de ^{13}C RMN para 1^{2+} (**Figura 18**), en el que se observan 24 señales, de las cuales 5 pertenecerían a carbonos cuaternarios. Se espera que el carbono más desapantallado sea el carbono de la amida terminal del péptido, el carbono X. Las señales de menor intensidad en el rango de 125ppm-175ppm se relacionan con los carbonos cuaternarios de la molécula restantes, siendo estos los fragmentos correspondientes a los carbonos D, F, J, M, N, P y U. Las señales H, K y L son más intensas que el resto por pertenecer a carbonos aromáticos que tienen por ende un entorno químico similar, integrando por 2 carbonos cada una y apareciendo en torno a 130ppm. A la derecha en el espectro se muestran las señales que corresponden a carbonos sp^3 , siendo estos aquellos fragmentos de la molécula como el metilo terminal de la piridina o las ramificaciones de los aminoácidos pertenecientes al péptido. El metileno bencílico se relaciona con la señal que aparece en 145ppm, aproximadamente.

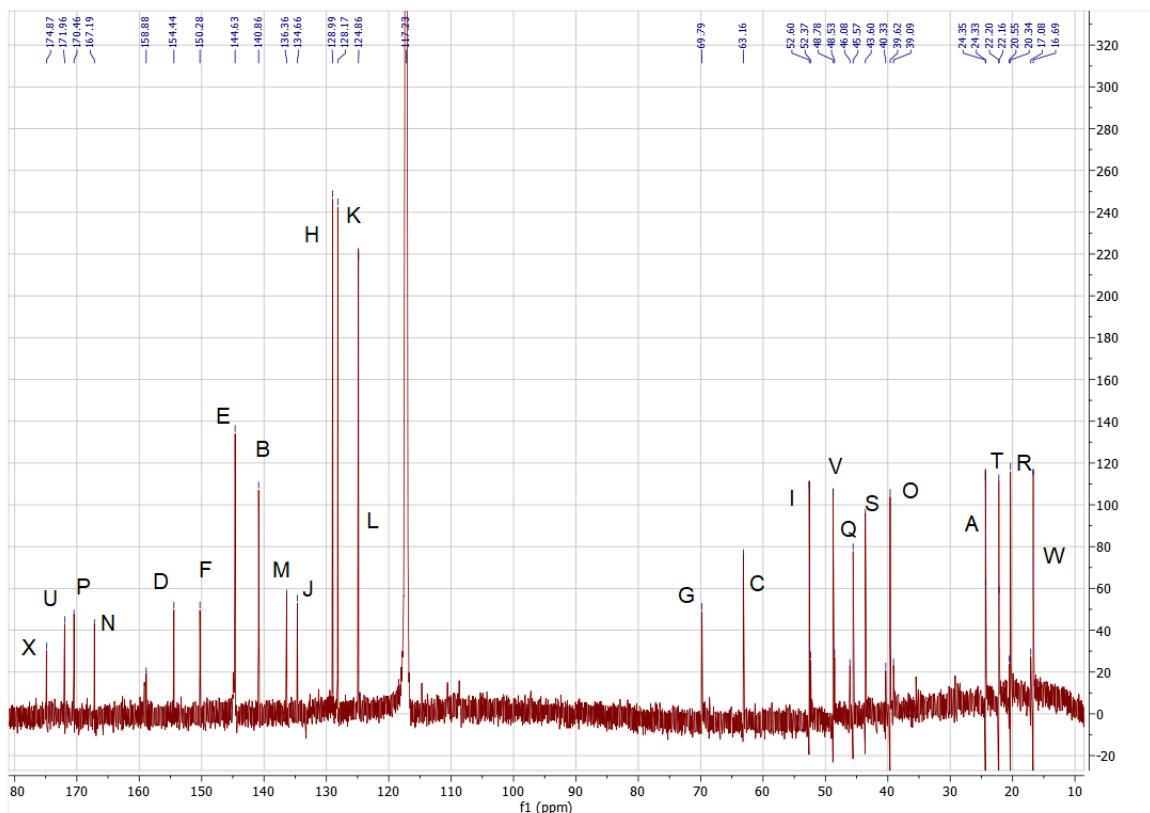


Figura 18: Espectro parcial de ^{13}C RMN para 1^{2+} .

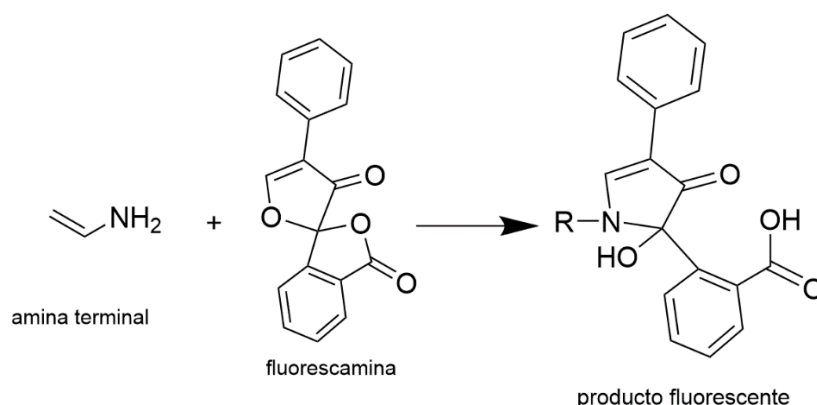
3.4.- Ensayo de degradación enzimática de 1^{2+} -2TFA con una metaloproteasa de Zn.

A continuación, se discutirá el ensayo de degradación del péptido GLA incluido en la estructura 1^{2+} mediante una enzima proteolítica conocida como **termolisina**, comprobando si la inclusión del resto de vermellógeno en este péptido no interfiere con su actividad química habitual.

Las metaloproteasas son aquellas enzimas que necesitan de la presencia de iones metálicos para desarrollar su actividad catalítica, y en concreto la termolisina depende de la presencia de iones Zn^{2+} . Estos iones están implicados en la coordinación y estabilización de los residuos aminoácidos en el sitio activo de la enzima, permitiendo así su capacidad para hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas objetivo.

El proceso para comprobar el efecto de la estructura del vermellógeno en la escisión del péptido empezará con la incubación del compuesto 1^{2+} con la termolisina, utilizando $CaCl_2$ como cofactor necesario para su actividad proteolítica. Posteriormente se añade ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que “captura” los iones Ca^{2+} , evitando que siga actuando como cofactor después de un tiempo controlado. Una vez ha tenido lugar la escisión del péptido se añade fluorescamina, que se utiliza para dar productos fluorescentes en presencia de aminas terminales y por ello primarias (que estarán disponibles después de la escisión de 1^{2+} , como resultado de la división del péptido).

(Esquema 12)



Esquema 12: Reacción de fluorescamina con aminas primarias para dar lugar a fluorescencia.

Todo ello se realizará con un control positivo de succinilcaseína en paralelo, para comprobar la efectividad basal de la enzima para degradar péptidos, además de previas medidas de fluorescencia de 1^{2+} creando un “blanco de fluorescencia” que permita ver un cambio notorio en esta después de la adición de la fluorescamina.

Además, se ha de tener en cuenta la posibilidad de “quencheo” en la señal de fluorescencia obtenida después de la adición de fluorescamina. Independientemente de que el producto de la reacción amina (procedente del péptido incluido en la estructura 1^{2+}) + fluorescamina sea fluorescente, la estructura tipo “varilla” correspondiente a 2^{2+} podría impedir la correcta fluorescencia de la mezcla.

El “quencheo” de la fluorescencia se refiere a la disminución o extinción de la emisión de luz fluorescente de una muestra debido a la interacción con ciertos compuestos o condiciones experimentales. Este puede tener lugar por diferentes mecanismos (transferencia de energía por resonancia (RET), colisión de moléculas entre sí, etc.) todos ellos provocando una disipación de la energía excitada de la molécula fluorescente sin que esta emita luz. Cualquiera de ellos puede influir en la medida de fluorescencia final, y se tienen en cuenta realizando controles con otros aminoácidos que se someterán al mismo procedimiento que el péptido objetivo.

Otro factor a tener en cuenta es el pH del medio en el que se hacen las medidas de fluorescencia ($\text{pH}=\pm 8$) en el que se espera que parte del vermellógeno esté protonado y desprotonado a la vez, teniendo en cuenta un pK_a para su protón del grupo amina próximo a 8,5 (**Figura 19**).

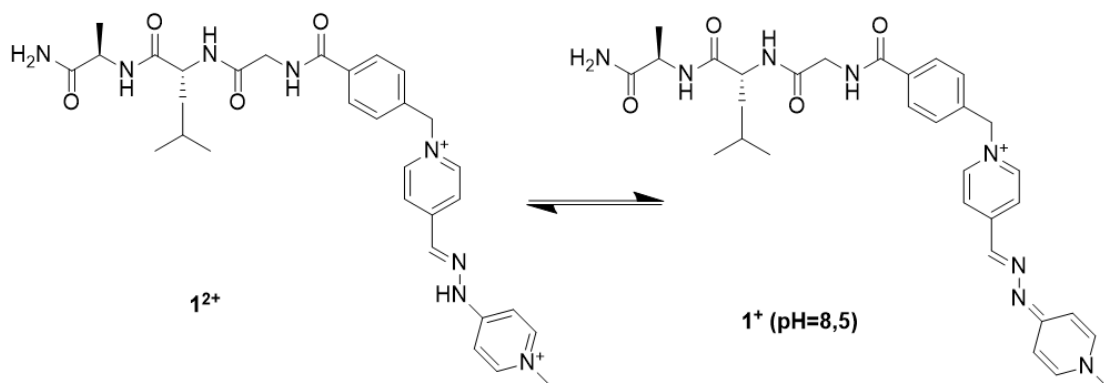


Figura 19: Equilibrio acido-base del compuesto 1^{2+} .

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado se prepararon 2 disoluciones tampón para las medidas de fluorescencia:²⁴

Disolución Buffer A ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 2,5mM a pH=8, CaCl_2 10mM)

Disolución Buffer B ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 2,5mM a pH=8, CaCl_2 10mM y un 10% DMSO)

Una se utilizará para disolver el compuesto 1^{2+} , la succinilcaseína y otros aminoácidos de referencia con ayuda de un 10% de DMSO (como la Leucina o la Valina, disueltos en el Buffer B) mientras que en la otra (Buffer A) se disolverá la enzima.

Las medidas de fluorescencia se realizan en una microplaca de 96 pocillos de Corning, y las disoluciones se preparan directamente ahí (exceptuando las disoluciones tampón). De esta manera se inyectan 25 μL de la disolución de IFF8 (1mM en el Buffer B) en la microplaca por triplicado junto con 25 μL de la disolución de enzima (0,6 μg de ThL en buffer A) también por triplicado. Además, se preparan disoluciones de la enzima y los sustratos (1^{2+} , succinil caseína, y demás aminoácidos) como blancos por triplicado.

La microplaca se incuba a 37 °C durante 4h con agitación orbital (provocando la escisión del péptido unido al vermellógeno), y después se añaden 10 μL de EDTA 0,1M (en H_2O destilada y a pH= 8) a cada cubeta, con el fin de inhibir la actividad enzimática. Posteriormente cada muestra se mezclará con un volumen 1:1 (60 μL) de una disolución 1mM de fluorescamina en MeOH, que dará lugar a un complejo fluorescente similar al del **esquema 12**. Se repite la incubación de la microplaca a 37 °C con agitación orbital durante 30 minutos, y se mide la fluorescencia excitando a 355 nm, leyendo la emisión a (460 \pm 10) nm.

²⁴ Ignacio Insua; Evangelos Liamas; Zhenyu Zhang; Anna F. A. Peacock; Anne Marie Krachler; Francisco Fernandez Trillo. *Enzyme-responsive polyon complex (PIC) nanoparticles for the targeted delivery of antimicrobial polymers*. **2016**, 7, 2684.

Para la identificación de la longitud de onda de excitación se realizó un experimento previo con 1^{2+} , en el que se preparó una disolución 1mM de $1^{2+}\cdot 2\text{TFA}$ en el Buffer B a pH=8. Se midió la absorbancia UV-Vis para distintas concentraciones del péptido (1^{2+}) en la disolución buffer, teniendo como resultado una serie de espectros que seguían este patrón:

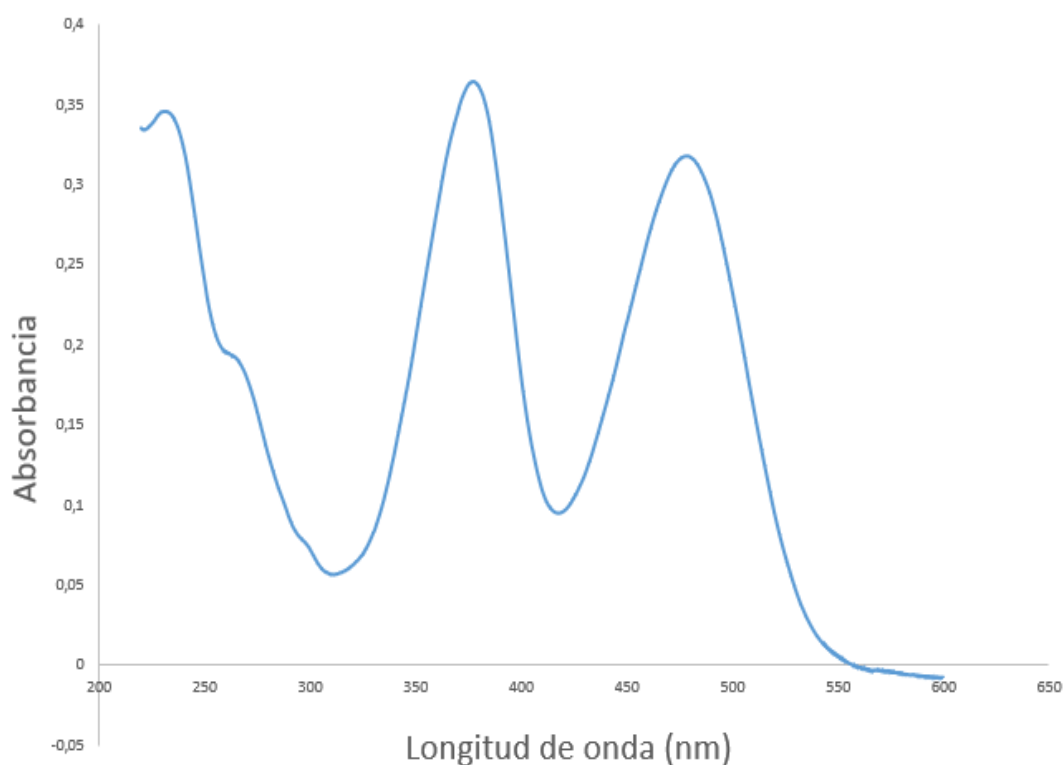


Figura 20: Espectro UV-Vis para 1^{2+} a pH=8.

Según lo indicado en la **figura 20**, el espectro de absorbancia a pH=8 muestra el comportamiento típico del vermellógeno ($pK_a \sim 8.5$), donde se pueden observar las bandas asociadas a la forma ácida del compuesto ($\lambda_{max} = 377\text{nm}$), y básica ($\lambda_{max} = 480\text{nm}$), longitudes de excitación objetivo para el ensayo de fluorescencia.

A continuación, se indican las distintas disoluciones utilizadas en el experimento de degradación en la microplaca, todas ellas por triplicado y preparando blancos para cada uno de los reactivos susceptibles de emitir fluorescencia, atendiendo al comportamiento de 1^{2+} :

- **25 μ L Buffer A + 25 μ L Buffer B (Blanco)**
- **25 μ L ThL + 25 μ L Buffer B (Blanco de la enzima)**
 - **25 μ L 1^{2+} + 25 μ L Buffer A**
- **25 μ L 1^{2+} + 25 μ L ThL (Escisión del péptido 1^{2+})**
- **25 μ L Succinilcaseína 1mM + 25 μ L Buffer A**
- **25 μ L Succinilcaseína 1mM + 25 μ L ThL (control para comprobar el funcionamiento de la enzima proteolítica, ThL)**
 - **25 μ L Valina 1mM + 25 μ L Buffer B**
 - **25 μ L Valina 1mM + 25 μ L ThL**
 - **25 μ L Valina 1mM + 25 μ L 1^{2+} 1mM**
 - **25 μ L Leucina 1mM + 25 μ L Buffer B**
 - **25 μ L Leucina 1mM + 25 μ L ThL**
 - **25 μ L Leucina 1mM + 25 μ L 1^{2+} 1mM**
- **25 μ L 2-bromoetanoamina 1mM + 25 μ L Buffer B**
- **25 μ L 2-bromoetanoamina 1mM + 25 μ L ThL**
- **25 μ L 2-bromoetanoamina 1mM + 25 μ L 1^{2+} 1mM**

La mezcla de disoluciones tampón se utiliza como blanco de fluorescencia para el resto de muestras, y se añade un volumen de Buffer A equivalente al volumen de cada una de las disoluciones de Buffer B y viceversa [como en el caso de la disolución del compuesto 1^{2+} en 25 μL de Buffer B (que contiene DMSO), a los que se añaden 25 μL de Buffer A]. Se realizan controles con otros aminoácidos como la Leucina y la Valina para asegurar el correcto funcionamiento del fluorímetro, además de la efectividad basal de la enzima en la escisión del péptido dando lugar a fluorescencia. La utilización de 2-bromoetanoamina es adecuada puesto que se busca un compuesto que produzca una respuesta similar a 1^{2+} , ya que según su estructura se prevé un comportamiento químico similar (su estructura es similar a la estructura del vermellógeno, una cadena carbonada que puede influir en la medida de fluorescencia del compuesto 1^{2+}).

En primer lugar, se realizan las medidas de fluorescencia con una inyección de cada muestra por triplicado. Los resultados obtenidos no son fiables debido al incorrecto funcionamiento del fluorímetro y/o la calidad del aminoácido Valina (la señal del producto de la escisión de este aminoácido en contacto con la fluorescamina era muy poco intensa, casi no producía fluorescencia), y es por ello que se repite el experimento una segunda vez, repitiendo la preparación de los controles del aminoácido Valina y juntando los triplicados de cada una de las muestras para medirlas una sola vez, asegurando una cuantificación más correcta de la señal teniendo como resultado el siguiente gráfico (**Figura 21**):

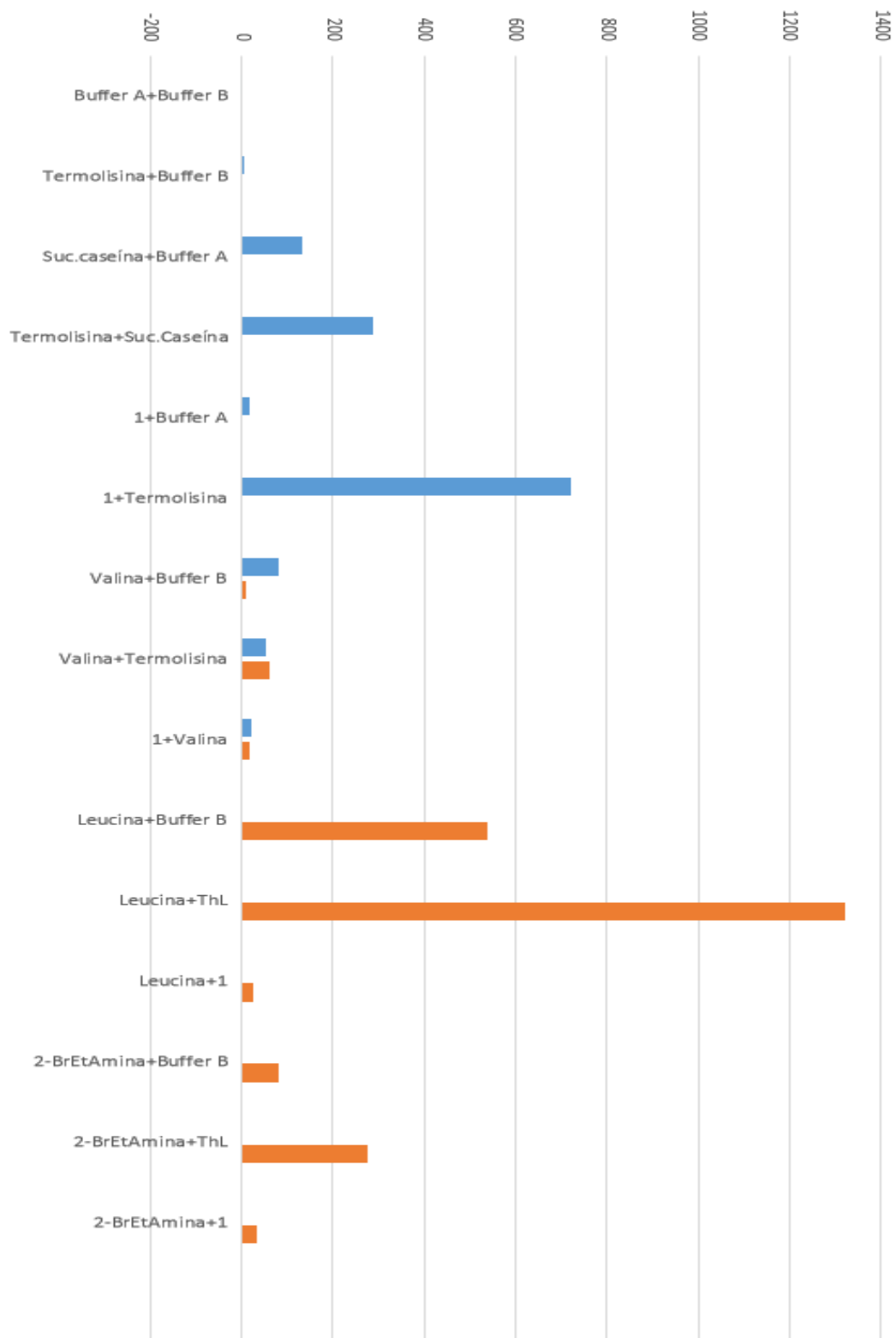


Figura 21: Fluorescencia emitida por las distintas mezclas ubicadas en la microplaca para el ensayo de 1^{2+} con la metaloproteasa de Zn^{2+} (ThL).

Atendiendo a las medidas de fluorescencia se observa un aumento de la señal al poner en contacto el compuesto 1^{2+} con la termolisina (ThL), comparando dicha señal con la obtenida para la mezcla del compuesto 1^{2+} con el Buffer A. Este aumento en la señal se justifica con la correcta escisión del péptido por la enzima. Aun así, la señal no es todo lo intensa de lo que cabría esperar si atendemos a la señal obtenida para la mezcla del aminoácido Leucina con la termolisina, que funciona como control para comprobar el correcto funcionamiento de la enzima y da una señal mucho más intensa. Esta diferencia en la intensidad de estas 2 señales se debería al “quencheo” de la señal fluorescente emitida por el péptido de 1^{2+} , influenciado por la estructura del vermellógeno y mediante mecanismos de “quencheo” explicados anteriormente. A través de esta información se deduce que la enzima degrada correctamente al péptido incluido en la estructura del compuesto 1^{2+} , puesto que tras su adición al péptido unido al vermellógeno la mezcla emite fluorescencia, aunque no es posible determinar cuánto influye el posible “quencheo” a la intensidad de esta señal. Es posible que la medida de la fluorescencia a un pH= 8,5 no sea lo más correcto pues coexisten ambas formas del vermellógeno (protonado y desprotonado), lo que también influiría en la fluorescencia emitida.

4.- Parte experimental

Se emplearon reactivos comerciales sin purificación adicional, además de agua de calidad mili-Q que se obtuvo mediante un aparato Millipore Gradient A1. Para el seguimiento de las reacciones de síntesis se utilizó cromatografía en capa fina, con cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254 y radiación ultravioleta (254 y 360 nm) como revelador.

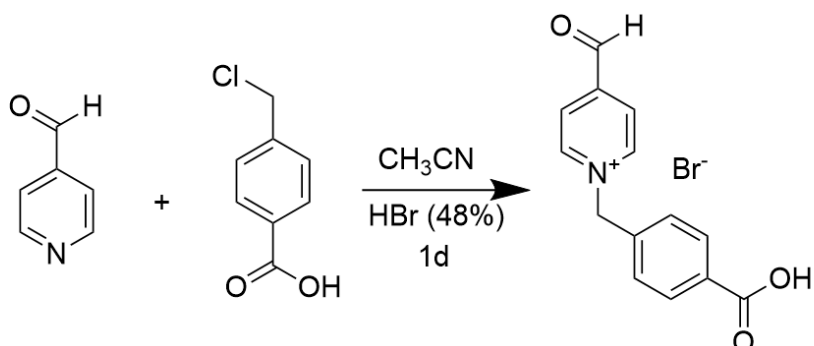
La caracterización por RMN se llevó a cabo con los espectrómetros Bruker Avance 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C , con criosonda dual para ^1H y ^{13}C en experimentos de alta sensibilidad y sonda inversa BBI en experimentos a baja temperatura), y Bruker Avance 300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C). Para preparar las muestras a analizar, se utilizó agua deuterada (D_2O) y cloroformo deuterado (CDCl_3), y se utilizó la señal del disolvente protonado residual como referencia.

Los análisis por EM se realizaron en el SAI (Servizos de Apoio á Investigación) de la Universidade da Coruña, utilizando el espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite para ES de alta y baja resolución. Los espectros de UV-Vis se registraron con un espectrómetro monohaz Perkin Elmer Lambda 900.

Se realizó una purificación mediante un HPLC-MS con un equipo Brüker Elute SP con detector cuadrupolo amaZon speed Toxyper, utilizando una columna Aeris C18.

Las medidas de luminiscencia se hicieron con un espectrofluorímetro Horiba Fluoromax, empleando una cubeta de cuarzo de 1mL.

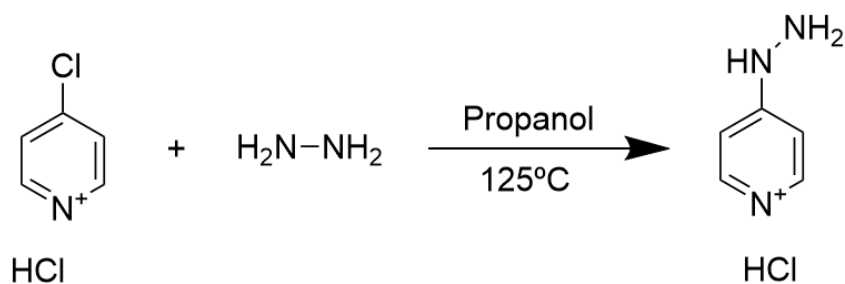
4.1.- Síntesis de bromuro de 1-(4-carboxibencil)-4-formilpiridinio.



Sobre una disolución de aldehído (425 mg; 3,73 mmol) en CH₃CN (30 mL) se añade benzoico (578 mg; 3,40 mmol). A la mezcla se le añade una disolución de HBr al 48% (400 μ L; 3,40 mmol) calentando a reflujo. Tras 12 horas de reacción, se observa un precipitado amarillo claro en una disolución transparente levemente amarilla. El producto se filtra a vacío y se lava con CH₃CN y Et₂O. El compuesto 5⁺ se obtiene como un sólido en forma de polvo amarillo (625 mg; Rendimiento= 54%) que se empleó en la siguiente reacción sin mayor purificación.

¹H RMN (D₂O, 500 Hz, 25°C), δ (ppm): 8.86 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 8.09 (d, J = 6.5 Hz, 4H), 7.95 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 2H), 5.83 (s, 1H), 1.98 (s, 1H).

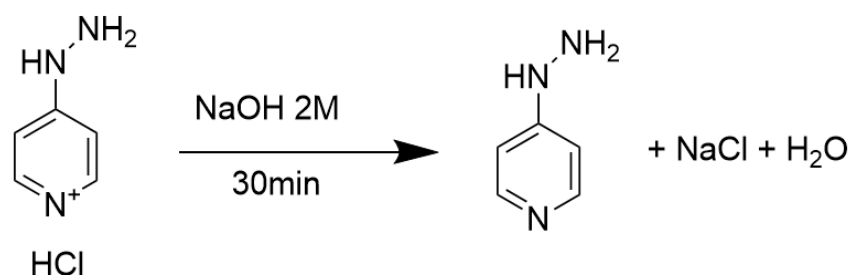
4.2.- Síntesis de cloruro de 4-hidrazinilpiridinio.



Se añade a una disolución de 4-cloropiridina (4,12 g; 27,5 mmoles) en propanol (75 mL) una disolución al 55% de hidrazina (24 mL; 412 mmoles). La mezcla se calienta a reflujo (125 °C) y el seguimiento de la reacción se realiza mediante una cromatografía en capa fina. El producto de la reacción se seca en un rotavapor para filtrarlo posteriormente a vacío, obteniendo un sólido blanco-amarillo (3,12 g; rendimiento= 62%) que se utilizó para la siguiente reacción sin mayor purificación.

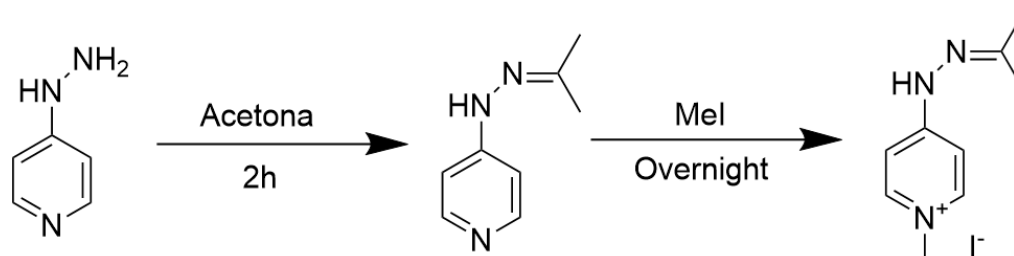
$^1\text{H RMN}$ (D_2O , 500 Hz, 25°C), δ (ppm): 7.82 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 6.72 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H).

4.3.- Neutralización de cloruro de 4-hidrazinilpiridinio.



Se añade una disolución NaOH 2M (30 mL) al sólido blanco-amarillo correspondiente al 4-hidrazinilpiridinio, que después de 30 minutos de agitación se extrae 8 veces con acetato de etilo (8X30 mL). Se concentra la fase orgánica obtenida en un rotavapor y después en una bomba de vacío, obteniendo de esta manera un aceite granate al que se le añade acetona (30 mL) y se lleva a reflujo durante 2 horas.

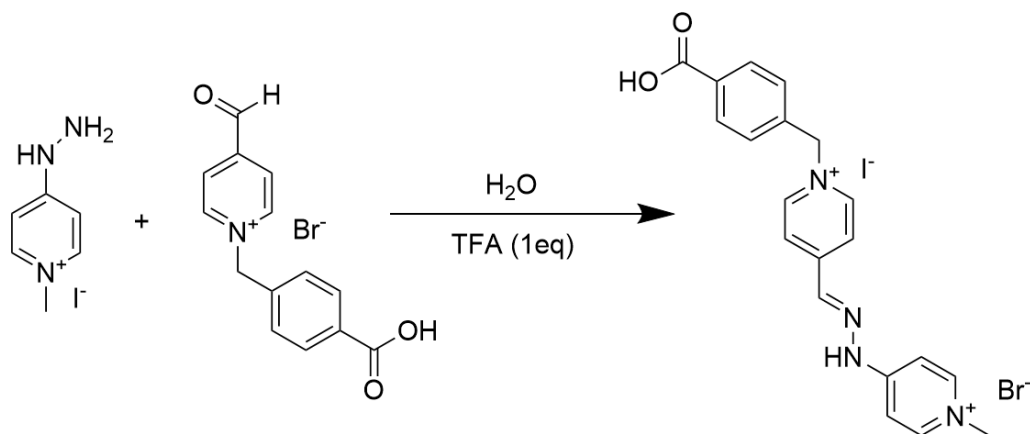
4.4.- Síntesis de yoduro de 1-metil-4-(2-(propan-2-ilideno)hidrazinil)piridinio.



Sobre la disolución del aceite granate en acetona (4-hidrazinilpiridinio) se añade yoduro de metilo (10 mL) con agitación constante y a temperatura ambiente durante 1 día. Se comprueba el progreso de la reacción mediante una cromatografía de capa fina, y se elabora el producto de reacción concentrando en un rotavapor, consiguiendo un aceite granate.

$^1\text{H RMN}$ (D_2O , 500 Hz, 25°C), δ (ppm): 7.98 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.26 – 7.08 (m, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.62 (s, 1H), 2.98 (s, 1H), 2.15 (s, 1H), 2.05 (s, 2H), 1.98 (s, 1H), 1.29 (s, 1H), 1.10 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H).

4.5.- Síntesis de 1-(4-carboxibencil)-4-((2-(1-metilpiridin-4-il)hidrazinil)metil)piridinio.

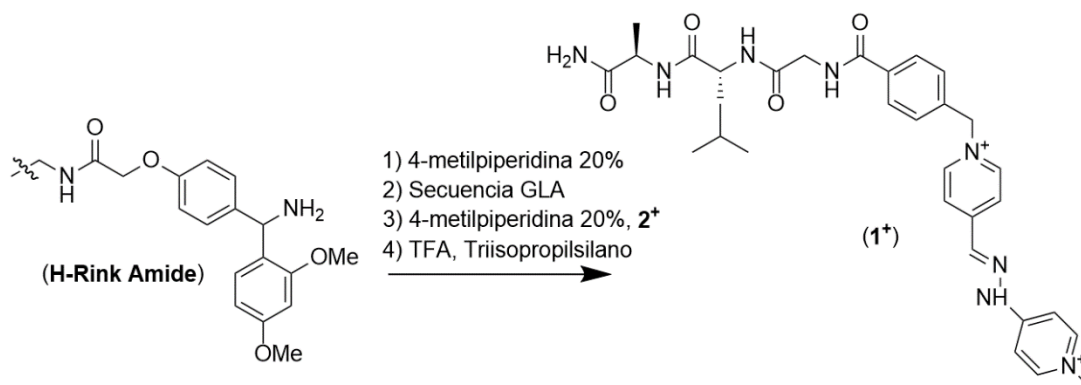


Se añade 1-(4-carboxibencil)-4-formilpiridinio (894 mg; 2,63 mmoles) al yoduro de 4-hidrazinilpiridinio (747 mg; 2,63 mmoles) tras su disolución con H₂O destilada (20 mL). A continuación, se vuelve a añadir H₂O destilada (30 mL) con agitación, resultando una disolución amarilla con un precipitado en forma de sólido negro. Al día siguiente se vuelve a añadir H₂O destilada (30 mL) para promover la disolución del sólido, calentando a 60 °C en un montaje de reflujo. Se obtiene una disolución amarilla a la que se le añade ácido trifluoroacético (TFA) (201 µL; 2,63 mmoles) y se calienta a 60 °C en un montaje de reflujo con agitación constante durante 1 día. Pasado este tiempo, se añade un exceso de KPF₆ hasta observar el cese de la precipitación de un sólido blanco del medio de reacción. Se agita la disolución hasta el día siguiente. Esta se filtra a gravedad y se lava con H₂O destilada y Et₂O después de filtrar a vacío, obteniendo así un sólido en forma de polvo amarillo. (1,26 g; rendimiento=81%)

¹H RMN (D₂O, 500Hz, 25°C), δ (ppm): 10.80 (s, 1H), 8.77 – 8.64 (m, 2H), 8.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.19 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H), 4.04 (s, 3H).

¹³C RMN ((D₂O, 125MHz, 25°C), δ (ppm): 165,70 (C), 153,69 (C), 149,72 (C), 144,59 (CH), 140,32 (CH), 137,38 (C), 131,05 (C), 130,22 (CH), 128,82 (CH), 124,82 (CH), 117,00 (CH), 63,08 (CH₂), 45,60 (CH₃).

4.6.- Síntesis de 1-(4-((2-(((R)-1-amino-1-oxopropan-2-il)amino)-4,4-dimetil-1-oxopentan-2-il)amino)-2-oxoetil)carbamoil)bencil)-4-((E)-((1-metil-piridin-4-ilideno)hidrazinilideno)metil)piridinio.



Se prepara una resina "H-Rink Amide" 0,1 mmolar pesando 245 mg de otra de concentración 0,41 mmol/g. Se prepara una disolución de DIEA (45 mL; 0,195 M) y otra de 4-metilpiperidina (45 mL; 20%). Además, se pesan 4 equivalentes de cada aminoácido por cada equivalente de resina, resultando: Alanina (150,8 mg), Leucina (140,8 mg) y Glicina (125,7 mg). A cada uno de los aminoácidos se les añade HBTU (152 mg).

Con la resina introducida en una columna de síntesis en fase sólida, se añade DMF y se burbujea una corriente de N₂ durante 15 minutos, tras los cuales se seca haciendo vacío y se añade DMF (2 mL) y DIEA (3 mL; 0,195 M) agitando durante 2 minutos. Se burbujea de nuevo una corriente de N₂ durante 30 minutos, secando después de este tiempo haciendo vacío. A continuación, se realizan 3 lavados de la columna [CHCl₂ (2 min)-DMF (2 min)-CHCl₂ (2 min)] y se realiza una prueba con TNBS, comprobando la correcta protección de la resina.

Al día siguiente, se añade DMF y se burbujea con una corriente de nitrógeno durante 15 minutos, para después añadir 4-metilpiperidina con dicha corriente durante otros 15 minutos. Después de un lavado de DMF-CHCl₂-DMF se comprueba que la resina está desprotegida mediante una prueba con TNBS, y se añade la alanina previamente disuelta en DMF (2 mL) y DIEA (3 mL; 0,195 M), para después aplicar una corriente de N₂ durante 30 minutos.

Se realizan de nuevo los lavados CH_2Cl_2 -DMF- CH_2Cl_2 en intervalos de 2 minutos, añadiendo 4-metilpiperidina y burbujeando N_2 durante 15 minutos de nuevo. Después de aplicar otro proceso de lavado DMF- CH_2Cl_2 -DMF se realiza una prueba TNBS para comprobar la unión de la alanina a la resina. Este proceso se repite de la misma manera tanto para la leucina como para la glicina y en este orden, con una prueba TNBS que marca el final del procedimiento.

2 días después, se añade DMF a la columna burbujeando una corriente de N_2 durante 15 minutos, se seca la columna a vacío y se añade 4-metilpiperidina, de nuevo burbujeando durante otros 15 minutos. Se lava con DMF- CH_2Cl_2 -DMF y se seca a vacío, realizando una prueba TNBS que verifica la desprotección de la columna. Hecho esto, se añade el compuesto 2^+ (131,6 mg) junto con HBTU (77,2 mg) a una disolución de DMF (2 mL) y DIEA (3 mL; 0,195 M) agitando durante 2 minutos. Esta mezcla se añade a la columna recién desprotegida, burbujeando una corriente de nitrógeno durante 4 horas, después de las cuales se seca a vacío y se lava con DMF- CH_2Cl_2 -DMF. Una prueba TNBS confirma la “protección” de la columna, lo que implica la correcta unión del compuesto 2^+ a la resina.

Al día siguiente se recoge la resina (5,6 mg) y se le añade TFA (4,75 mL), junto con H_2O destilada (125 μL) triisopropilsilano (125 μL) y agitación durante 3 horas, después de los cuales se gotea la disolución resultante en otra disolución de Et_2O fría. La disolución se decanta separando el sólido amarillo resultante, que se seca con una corriente de nitrógeno. Como resultado se obtiene un aceite amarillo que se liofiliza para conseguir un sólido en forma de polvo amarillo, correspondiente a 1^+ .

^1H RMN (D_2O , 500Hz, 25°C), δ (ppm): 8.76 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.56 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.56 (s, 2H), 5.77 (s, 3H), 3.59 (d, $J = 2.3$ Hz, 4H), 2.92 (s, 3H), 1.77 – 1.65 (m, 2H), 1.64 – 1.53 (m, 4H), 1.32 (s, 1H), 1.30 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 0.93 (dd, $J = 17.2, 6.5$ Hz, 9H).

^{13}C RMN (D_2O , 125MHz, 25°C), δ (ppm): 174,87 (C), 171,96 (C), 170,46 (C), 167,19 (C), 158,88 (C), 154,44 (C), 150,28 (C), 144,63 (CH), 140,86 (CH), 136,36 (C), 134,66 (C), 128,99 (CH), 128,17 (CH), 124,86 (CH), 69,79 (CH₂), 63,16 (CH₂), 52,77 (CH), 48,64 (CH), 45,54 (CH), 43,48 (CH₂), 39,57 (CH₂), 23,98 (CH₃), 21,27 (CH₃), 20,39 (CH₃), 16,48 (CH₃).

HR-ESI-MS (m/z) calculado para $[\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}_4]^+$ 588,273; encontrado 587,383.

CONCLUSIONES

Se ha realizado la síntesis en disolución de un nuevo vermellógeno: **2·Brl**, que puede considerarse como un análogo estructural de un viológeno en el que la conexión directa entre las unidades de piridinio es sustituida por un grupo hidrazona. Dicho vermellógeno presenta en uno de sus nitrógenos cuaternizados un metilo y en el otro un grupo ácido, que se utilizará posteriormente para la incorporación del tripéptido glicina-alanina-leucina (GLA) mediante síntesis peptídica en fase sólida (SPFS). La caracterización estructural del compuesto se realiza mediante RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ y masas, y permite confirmar la identidad estructural del compuesto preparado.

Se ha realizado la SPFS de un nuevo híbrido vermellógeno-tripéptido (**1·2TFA**), mediante la preparación del péptido GLA sobre una resina Rink amida, y posterior acoplamiento de **2·Brl** en el extremo *N*-terminal del péptido en crecimiento. Tras su desanclaje de la resina, el crudo de reacción fue purificado mediante HPLC y la identidad del compuesto obtenido como **1·2TFA**, se comprobó mediante espectrometría de masas y espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C .

Por último, se ha realizado un ensayo de degradación enzimática **1·2TFA** con termolisina, comprobando que la reacción de la enzima con el péptido no es impedida por la estructura correspondiente al vermellógeno. Esto último se ha comprobado con un aumento de la señal fluorescente emitida al poner en contacto la estructura con fluorescamina.

CONCLUSIÓNS

Realizouse a síntese en disolución dun novo vermellóxeno: 2·Brl, que pode considerarse como un análogo estrutural dun violóxeno no que a conexión directa entre as unidades de piridinio é substituída por un grupo hidrazona. Dito vermellóxeno presenta nun dos seus nitróxenos cuaternizados un metilo e no outro un grupo ácido, que utilizarase posteriormente para a incorporación do tripéptido glicina-alanina-leucina (GLA) mediante síntese peptídica en fase sólida (SPFS). A caracterización estrutural do composto realízase mediante RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ e masas, e permite confirmar a identidade estrutural do composto preparado.

Realizouse a SPFS dun novo híbrido vermellóxeno-tripéptido (1·2TFA), mediante a preparación do péptido GLA sobre unha resina Rink amida, e posterior acoplamento de 2·Brl no extremo N-terminal do péptido en crecemento. Tras o seu descancelado da resina, o crude da reacción foi purificado mediante HPLC e a identidade do composto obtido como 1·2TFA, comprobouse mediante espectrometría de masas e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

Por último, realizouse un ensaio de degradación enzimática 1·2TFA con termolisina, comprobando que a reacción da enzima co péptido non é impedida pola estrutura correspondente ao vermellóxeno. Isto último comprobouse cun aumento da sinal fluorescente emitida ao poñer en contacto a estrutura coa fluorescamina.

CONCLUSIONS

The synthesis in solution of a new vermellogen, 2·Brl, has been performed. It can be considered a structural analog of a viologen in which the direct connection between the pyridinium units is replaced by a hydrazone group. This vermellogen has a methyl group on one of its quaternized nitrogens and an acidic group on the other, which will be subsequently used for the incorporation of the glycine-alanine-leucine (GLA) tripeptide through solid-phase peptide synthesis (SPPS). The structural characterization of the compound is carried out using $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR and mass spectrometry, which confirms the structural identity of the prepared compound.

The SPPS of a new vermellogen-tripeptide hybrid (1·2TFA) has been performed by preparing the GLA peptide on a Rink amide resin, followed by coupling of 2·Brl at the N-terminal end of the growing peptide. After cleavage from the resin, the reaction crude was purified using HPLC, and the identity of the obtained compound as 1·2TFA was confirmed by mass spectrometry, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy.

Finally, an enzymatic degradation assay of 1·2TFA with thermolysin was performed, confirming that the enzyme reaction with the peptide is not hindered by the corresponding vermellogen structure. This was verified by an increase in the fluorescent signal emitted upon contacting the structure with fluorescamine.