



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ORGÁNICA

The cover art features a central image of two hands, one red and one green, holding a DNA double helix. The background is a blue sky with white clouds. Overlaid on the image are several chemical structures, including a pyridine ring with an NMe2 group, a pyrazole ring with an NH group, and a pyrazole ring with an NHAc group. The title 'MIMÉTICOS SINTÉTICOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NATURALES' is written in a bold, black, serif font across the center. At the bottom, the author's name 'Juan Bautista Blanco Canosa' and the date 'Santiago de Compostela, Febrero 2006' are written in a smaller, black, serif font.

**MIMÉTICOS SINTÉTICOS DE
FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN NATURALES**

Juan Bautista Blanco Canosa
Santiago de Compostela, Febrero 2006

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**MIMÉTICOS SINTÉTICOS DE
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
NATURALES**

Memoria que, para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Santiago de Compostela, presenta

Juan Bautista Blanco Canosa

Santiago de Compostela, Febrero 2006

D. JOSÉ LUIS MASCAREÑAS CID, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICA: que la memoria adjunta titulada "*Miméticos sintéticos de factores de transcripción naturales*" que, para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, presenta D. Juan Bautista Blanco Canosa, ha sido realizada bajo mi dirección, en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizo su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, Febrero de 2006.

Fdo.: Juan Bautista Blanco Canosa

Fdo.: José Luis Mascareñas Cid

Agradecimientos

Llegado este momento, y después de cinco años de duro trabajo, es tiempo de recordar y agradecer a todos aquell@s que han conseguido hacer más llevadero este trabajo. Quisiera agradecer, de todo corazón, a todas aquellas personas que me han enseñado, entregado su amistad y alegría porque han hecho que todos los momentos sean únicos e irrepetibles y siempre han contribuido a mi formación como persona y científico. A todos, MUCHAS GRACIAS!

En primer lugar, al Profesor José Luis Mascareñas, director de esta tesis, por brindarme la oportunidad de realizar una tesis en un campo tan apasionante como es el de la química-biológica, por las enseñanzas recibidas, por su apoyo constante y por haberme inculcado el gusanillo por la investigación.

En el campo más personal quisiera agradecer a toda la gente del laboratorio de orgánica del CSIC, desde aquellos con los cuales comencé hasta la última gente que ha entrado a formar parte del "grupo". Quiero agradecer a Eva, Patricia, Ana Villar y Montse, gente que ya estaba cuando yo emprendí el viaje. Más cercanos están Roberto, Manuel, Eduardo, Emilio, Cristina y María.

Dentro del grupo "JL" propiamente dicho empezaré por mencionar a Álex, Soco y Fernando, por su excelente compañerismo y los buenos ratos pasados. Doy las gracias a Eugenio por ser mi mentor en los inicios de este trabajo, enseñarme las vicisitudes de la química y por abrirme las puertas para realizar una estancia en Boston. Deseo agradecer especialmente a Ramón y a Ana por las enseñanzas recibidas, su apoyo constante y sus ánimos y la amistad brindada durante todo este tiempo. Como ley implacable de vida muchos de ellos ya no están, pero en su lugar vino gente también enriquecedora y maravillosa. Deseo agradecer a Verónica, Cecilia y Juan, a Moisés por compartir 4 años de química, con sus sabores y sinsabores, y por su amistad, y a Bea, por transmitir siempre ese optimismo tan necesario en el trabajo de laboratorio. Quiero agradecer especialmente a Olalla su simpatía, su amistad, los buenos momentos pasados fuera del laboratorio (que también son importantes) y por haber colaborado en la realización de esta tesis.

Gran parte de esta tesis se ha realizado en el laboratorio de Bioquímica del Profesor Javier Benavente de la Facultad de Farmacia. Con esa ayuda y colaboración ha sido posible obtener muchos de los resultados que se exponen en esta tesis. Por ello, quiero agradecer a Javier Benavente y a

todo su grupo por haberme acogido como a uno de ellos durante estos años: los que están (Marcelo, Lois, Lisa, Lorena, Mark...) y los que estuvieron (Gus, Celina y Fernando) y, muy especialmente, a Jose (un magnífico codirector de esta tesis) por tener siempre un momento para aportar soluciones a mis problemas y enseñarme un poco del apasionante mundo de la Biología, y por tantos ratos de charla distendida y amable. No quiero olvidarme, por supuesto, de esas "excursiones" de grupo.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Profesora Barbara Imperiali del Dep. de Química del MIT por brindarme la posibilidad de realizar una estancia en su laboratorio y al Profesor Mark Nitz, con el que tuve la oportunidad de aprender muchas cosas durante la estancia, así como toda la gente que tuve la oportunidad de conocer en Boston. Y aquí en Santiago al Profesor Manuel Mosquera por la ayuda desinteresada aportada en el análisis de los datos.

Gracias a Eldara (tan sorprendente como siempre), a David Garrido... y a todas aquellas personas que he conocido y que también han aportado su grano de arena.

Por último, un abrazo muy grande a toda mi familia, por quererme siempre.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS _____	V
A. PARTE INTRODUCTORIA _____	1
1. Introducción _____	3
2. La expresión genética _____	4
3. Bases generales del proceso de transcripción genética _____	5
3.1 La iniciación de la transcripción en organismos procariotas _____	6
3.2 La iniciación de la transcripción en organismos eucariotas _____	6
4. Factores de Transcripción (FTs) _____	7
4.1 Regulación de la actividad de los Factores de Transcripción en organismos eucariotas _____	7
4.2 Factores de Transcripción y cáncer: oncogenes y genes supresores de tumores _____	10
5. Interacciones de los Factores de Transcripción con el ADN _____	13
5.1 Características estructurales del ADN _____	13
5.2 Motivos estructurales utilizados por los FTs para interactuar con el ADN _____	14
5.3 Conclusiones generales sobre las bases estructurales de la interacción entre FTs y ADN _____	20
6. Moléculas pequeñas que interactúan con el ADN _____	22
6.1 Consideraciones generales _____	22
6.2 Poliamidas sintéticas desarrolladas por Dervan _____	25
7. Diseño de miniproteínas para el reconocimiento de secuencias específicas de ADN _____	28
7.1 Consideraciones generales _____	28
7.2 Diseño de dímeros no naturales de la región básica de proteínas bZIP _____	29
7.3 Proteínas monoméricas de la región básica de GCN4 _____	32
7.4 Diseño de un híbrido de la región básica de GCN4 conjugado a un tripirrol _____	35
B. OBJETIVOS GENERALES _____	39
C. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	43
1. Estudio de híbridos en los que el tripirrol se reemplaza por un motivo AThook _____	45
1.1 Objetivo _____	45
1.2 Motivos AThook _____	46
1.3 Diseño y planteamiento sintético _____	47
1.4 Síntesis _____	49
1.5 Evaluación de las interacciones de A3 y A4 con el ADN _____	53
1.6 Conclusiones _____	55
2. Alargamiento de la cadena de conexión en híbridos péptido-tripirrol. Desarrollo de conjugados más eficientes _____	57
2.1 Objetivo _____	57
2.2 Diseño y planteamiento _____	57
2.3 Síntesis del híbrido A5 _____	58
2.4 Evaluación de la interacción de A5 con distintos ADNs. Comparación con el híbrido A2 _____	62
2.5 Comparación del híbrido A5 con el A2 . Conclusiones _____	72

3. Influencia de la estructura de la cadena de conexión en la interacción del híbrido péptido-tripirrol A5 con el ADN	75
3.1 Objetivos y diseño	75
3.2 Planteamiento sintético	76
3.3 Síntesis del híbrido A6	76
3.4 Evaluación de la interacción de A6 con distintos ADNs	78
3.5 Conclusiones	79
3.6 Planteamiento sintético para obtener el híbrido A7	80
3.7 Síntesis del híbrido A7	81
3.8 Evaluación de la interacción de A7 con CRE ^{hs} -A. Conclusiones	85
4. Diseño y síntesis de híbridos que interaccionan con ADN con afinidades de orden nanomolar a temperatura ambiente	88
4.1 Objetivo y diseño	88
4.2 Planteamiento sintético	89
4.3 Síntesis del híbrido A8	90
4.4 Evaluación de la interacción de A8 con distintos ADNs.	
Comparación con A5	93
4.5 Conclusiones	95
5. Estudios iniciales sobre la preparación de híbridos con regiones básicas helicoidales preorganizadas	97
5.1 Objetivo y diseño	97
6. Extensión de la estrategia para reconocer otras secuencias de ADN. Conexión del tripirrol a través del extremo N-terminal del péptido	100
6.1 Objetivo y diseño	100
6.2 Planteamiento sintético	101
6.3 Síntesis de los híbridos B1 y B2	102
6.4 Evaluación de las interacciones de B1, B2, y RB5 con distintos ADNs	106
6.5 Conclusiones	113
7. Desarrollo de versiones del sistema en las que los módulos de reconocimiento están conectados a través de uniones no covalentes	115
7.1 Objetivo y diseño	115
7.2 Estructuras supramoleculares en H ₂ O formadas por complejos de β-ciclodextrina (βCD) con adamantano (Ad)	116
7.3 Diseño	118
7.4 Planteamiento sintético	119
7.5 Síntesis	120
7.6 Evaluación de la interacción de los sistemas D1:38-CD y C1:38-CD con distintos ADNs	124
7.7 Conclusiones	136
D. PARTE EXPERIMENTAL	139
1. Procedimientos generales y protocolos	141
1.1 Síntesis en fase sólida de péptidos	142
1.2 Determinación de la concentración de las disoluciones mediante espectroscopía de UV	144
1.3 Análisis mediante Dicroísmo Circular	145
2. Materiales y métodos	147
3. Reacciones	148
Ácido 1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -pirrol-2-carboxílico (3)	148
N-(3-(dimetilamino)propil)-1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -pirrol-2-carboxamida (2)	149

N2-[(dimetilamino)propil]-1-metil-4-[[(1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -2-pirrolil) carboxamido]-1 <i>H</i> -2-pirrolcarboxamida (4)	150
Ácido 4-nitro-1 <i>H</i> -pirrol-2-carboxílico (14)	151
Acoplamiento del dipirrol 4 con el ácido 14	152
Reducción y acetilación del nitrotripirrol 15	153
Síntesis del éster <i>tert</i> -Butílico del ácido (3- <i>tert</i> -Butoxicarbonilaminopropil)-(5-yodopentil)-carbámico (7)	154
Carbamato de <i>tert</i> -Butil-3-yodopropilo	156
Síntesis del carbamato de <i>tert</i> -Butil-3-(5-yodopentiloxi)propilo (20)	157
Preparación del yoduro 36	159
Protocolo general para las alquilaciones de los pirroles, ejemplificado en la alquilación del 4-nitro-1 <i>H</i> -pirrol-2-carboxilato de etilo (5) con el yoduro 7	161
Ácido 1-{5-[<i>tert</i> -Butoxicarbonil-(3- <i>tert</i> -Butoxicarbonilaminopropil)-amino]-pentil}-4-nitro-1 <i>H</i> -pirrol-2-carboxílico (6)	164
Ácido 1-(3- <i>tert</i> -Butoxicarbonilaminopropil)-4-nitro-1 <i>H</i> -pirrol-2-carboxílico (28)	165
Ácido 1-{3-[2-(<i>tert</i> -Butoxicarbonilaminoacetilamino)-propoxi]-pentil}-4-nitro-1 <i>H</i> -pirrol-2-carboxílico (21)	166
Acoplamiento del dipirrol 4 con el ácido 6 para dar el tripirrol 10	167
Reducción y acetilación del nitroderivado 10 para formar el tripirrol acetilado 11	168
Eliminación del grupo Boc de 11 para formar el derivado tripirrónico 12	169
Acoplamiento de glicina al derivado aminotripirrónico 12 para formar el tripirrol 1	170
Eliminación del grupo Boc de 12 para dar el aminotripirrol 17	171
Acoplamiento de bencil-triglicina con el aminotripirrol 17	172
Acoplamiento de glicina con el compuesto 45	173
Acoplamiento del ácido 21 con el dipirrol 4 y posterior reducción del nitroderivado y acetilación de la amina para dar el tripirrol 45	174
Acoplamiento de glicina con el ácido 6 para formar el ácido 29	175
Acoplamiento del pirrol 2 con el ácido 28 para obtener el dipirrol 30	176
Acoplamiento del dipirrol 30 con el ácido 29 para dar el tripirrol 31	177
Reducción y acetilación del nitroderivado 31	178
Eliminación del grupo Fmoc de 32	179
Eliminación del grupo bencilo del éster 37	180
Monotosilación de la β CD	181
Síntesis de la amino- β CD	182
Síntesis de β CD-NHCOCH ₂ Br (43)	183
Acoplamiento entre la amino- β CD y el ácido tripirrónico 33	184
2-Bromoacetato de adamantanilo	185
Preparación de la diamina 39	186
Síntesis en fase sólida de los péptidos A Thook, RB1-Alloc , RB2-Alloc , RB4-Alloc y RB5-Alloc , RB6 , RB7 . Eliminación del grupo alilo en RB1-Alloc y RB2-Alloc y del Alloc en RB4-Alloc y RB5-Alloc	188
GS-Alloc y R-Alloc	191
Síntesis de RB3	192
RB4-Alloc , RB5-Alloc , RB4 y RB5	193
Síntesis de RB6 y RB7	195
Acoplamiento de los péptidos R-Alloc y GS-Alloc al fragmento peptídico RB1r y eliminación de los grupos Alloc	197
Acoplamiento de los tripirroles 1 , 13 , 19 y 27 al fragmento peptídico RB2r . Síntesis de los híbridos A5 , A6 , A7 y A8	199
Acoplamiento del tripirrol 12 al fragmento peptídico RB4r . Síntesis de B1	202
Acoplamiento del tripirrol 33 al fragmento peptídico RB4r . Síntesis de B2	204

Acoplamiento del adamantano 39 al fragmento peptídico RB1r . Síntesis de D1	205
Síntesis de C1 y C2	206
Síntesis de C3	207
Síntesis de (RB6)₂	208
E. ANEXOS	209
1. Síntesis de péptidos en fase sólida.	211
2. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)	216
2.1 DC de péptidos y proteínas	217
2.3 Uso del DC para monitorizar la interacción de ligandos con el ADN	220
3. Experimentos de retardo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida	221
3.1 Preparación de los geles	221
3.2 Marcaje de los ADNs e incubación de las muestras	221
4. Determinación de la constante de afinidad mediante experimentos de EMSA. Dedución de la ecuación de equilibrio para un modelo de complejación 1:1	223
F. ESPECTROS	225
CD-ROM	
Tesis.pdf	
Espectros.pdf	

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	desplazamiento químico (ppm)
μL	microlitro
μM	micromolar
θ	elipticidad
$^{\circ}\text{C}$	grado centígrado
Aba	<i>p</i> -acetamidobenzoico
Ac	acetilo
Ac_2O	anhídrido acético
AcCl	cloruro de acetilo
ac	disolución acuosa
AcOH	ácido acético
AcOEt	acetato de etilo
Ad	adamantano
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNpol	ARN polimerasa
ATP	adenosíntrifosfato
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
Boc_2O	di- <i>tert</i> -Butildicarbonato
BSA	seroalbúmina bovina
Bn	bencilo
^tBu	<i>tert</i> -Butilo
Bzl	benciloxicarbonilo
calcd.	calculada
cap.	capítulo
CD	ciclodextrina
CDCl_3	cloroformo deuterado
CH_3CN	acetonitrilo
d	doblete
dADN	ácido desoxirribonucleico de doble cadena
DC	dicroísmo circular o elipticidad (en miligrados)
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DECP	cianofosfonato de dietilo
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMAP	<i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido

DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
ds	doble cadena
DTT	1,4-ditiotreitol
ε	coeficiente de extinción
EDT	1,2-etanoditiol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EM	espectroscopía de masas
EMSA	ensayos de desplazamiento en gel de poliacrilamida
equiv	equivalente
ESI	espectrometría de masas de electroespray
Et	etilo
Et ₃ N	triethylamina
Et ₂ O	éter dietílico
EtOH	etanol
FAB	ionización por bombardeo con átomos (o iones) rápidos
FT	factor de transcripción
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
h	hora
HATU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-tiazolo[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HBTU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)dimetilamino metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IE	impacto electrónico
Im	imidazol
IQ	ionización química
ⁱ Pr	isopropilo
ⁱ PrOH	isopropanol
<i>J</i>	constante de acoplamiento
<i>K</i> _a	constante de asociación
<i>K</i> _d	constante de disociación
<i>M</i>	molar
<i>m</i>	multiplete
MALDI	(ionización mediante) desorción por láser asistida mediante matriz
Me	metilo
CD ₃ OD	metanol deuterado
MeOH	metanol
mg	miligramo
MHz	megahertzios
VI	

min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
mre	elipticidad media por residuo
nm	nanómetro
nM	nanomolar
NP-40	octiletoxipolietoxietanol
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
Pd/C	paladio sobre carbón activo
pf	punto de fusión
Ph	fenilo
PhOH	fenol
ppm	partes por millón
PyAOP	hexafluorofosfato de fosfonio de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris (pirrolidino)
PyBOP	hexafluorofosfato de fosfonio de benzotriazol-1-iloxitris (pirrolidino)
q	cuartete
qui	quintuplete
RMN	resonancia magnética nuclear
RP	fase reversa
rpm	revoluciones por minuto
s	singlete
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
TBE	disolución de tris-borato-EDTA
TCEP	triscarboxietilfosfina
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
TMUCl Cl	cloruro de <i>N</i> -[cloro(dimetilamino)metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
TOF	analizador de tiempo de vuelo
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trt	trifenilmetilo (tritilo)
UV	ultravioleta

A. PARTE INTRODUCTORIA

1. Introducción

En los últimos años la química y la biología han experimentado profundos cambios que han repercutido en la forma de analizar y abordar los temas a los que se enfrentan. El desciframiento del código genético y la manipulación de nuevos materiales a escala nanométrica ha impulsado la aparición de nuevas disciplinas dentro de estas ciencias clásicas, muchas de las cuales abordan problemas que están en la frontera de sus campos de actuación actuales.

El desarrollo y la aplicación de nuevos métodos y técnicas en biología ha permitido seguir con mayor detalle los procesos bioquímicos *in vitro*, *in vivo* e, incluso, en organismos vivos. Las investigaciones realizadas en el campo de la biología molecular y estructural han puesto al descubierto que los procesos biológicos no son más que procesos químicos y, por lo tanto, pueden ser estudiados y analizados a nivel molecular. Este hecho ha atraído la atención de los químicos que, como expertos en el campo de la síntesis orgánica y en las interacciones intra- e intermoleculares, han enfocado parte de sus esfuerzos en tratar de desenmarañar las bases moleculares de los procesos celulares. La conjunción de químicos y biólogos es fundamental para entender las interacciones entre proteínas, entre proteínas y estructuras supramoleculares (como las membranas celulares) y entre proteínas y otras biomoléculas (como los ácidos nucleicos, azúcares u otros ligandos) y, a partir de ahí, explicar y tratar de modificar de forma programada y selectiva los procesos biológicos.

Como consecuencia de esto se puede decir que en los últimos años ha surgido una nueva rama de la ciencia que podríamos englobar dentro del nombre de **Química Biológica**.¹ Dentro de esta parte de la ciencia podríamos incluir todos los estudios dirigidos al desarrollo de técnicas y métodos químicos para el estudio y modificación programada de los procesos y fenómenos biológicos.

De la pujanza y futuro potencial de este nuevo campo de la ciencia dan fe el nacimiento reciente de varias revistas, algunas ya de impacto muy establecido como "Chemistry & Biology", "Current Opinion in Chemical Biology", "ChemBiochem", y otras que acaban de nacer y que presentan buenas perspectivas de futuro: "ACS Chemical Biology" y "Nature Chemical Biology". También es destacable que alguno de los Departamentos de

¹ Godwin, H. A.; Davis, B. L. *Nature Chem. Biol.* **2005**, *1*, 176.

Química más potentes del mundo (como el de la Universidad de Harvard) hayan pasado a llamarse "Department of Chemistry and Chemical Biology". Alguno de los estudios más relevantes de la química biológica actual se centran en el análisis y modificación de los procesos relacionados con la señalización y transporte celular, y con la expresión genética.

2. La expresión genética

La *expresión genética* es el proceso celular que permite la transferencia de información desde el nivel de la secuencia de nucleótidos del ADN al nivel de la secuencia de aminoácidos de una proteína.² En organismos eucariotas consta de las siguientes etapas básicas:

- transcripción: en este paso se forma el transcrito primario, el pre-ARN mensajero (ARNm). El proceso se inicia como consecuencia de la unión de la ARN polimerasa (ARNpol) con la zona promotora del gen.
- conversión del pre-ARNm en el ARNm maduro: esta etapa incluye el procesado (modificación, corte y empalme) y el transporte del ARN del núcleo al citosol.
- traducción o translación: síntesis de la proteína a partir de dicho ARN en el ribosoma.

La expresión genética es un proceso perfectamente controlado en términos espaciales y temporales y sigue un patrón específico en cada célula que determina su morfología y función.³ Esta regulación se produce, fundamentalmente, a nivel de la transcripción, gracias a la acción de unas proteínas reguladoras llamadas **Factores de Transcripción** (FTs),⁴ que interaccionan con zonas específicas de la región promotora de los genes y así inducen la acción de la ARN polimerasa para que esta pueda iniciar el proceso de transcripción. Dicha regulación también depende de que dichas secuencias genéticas estén accesibles espacialmente con el fin de interaccionar de manera efectiva con los FTs.⁵

² Mathews, C. K.; Van Holde, K. E.; Ahern, K. G. *Bioquímica* **2003**, cap. 4, Addison Wesley, Madrid.

³ Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell* **1994**, cap. 7, Garland Publishing, New York (USA).

⁴ a) Latchman, D. S. *Eukaryotic Transcription Factors* **2004**, Elsevier Academic Press, San Diego (USA). b) Krauss, G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation* **2001**, Wiley-VCH, Bayreuth (Germany).

⁵ Turner, B. M.; Birley, A. J.; Lavender, J. *Cell* **1992**, *69*, 375.

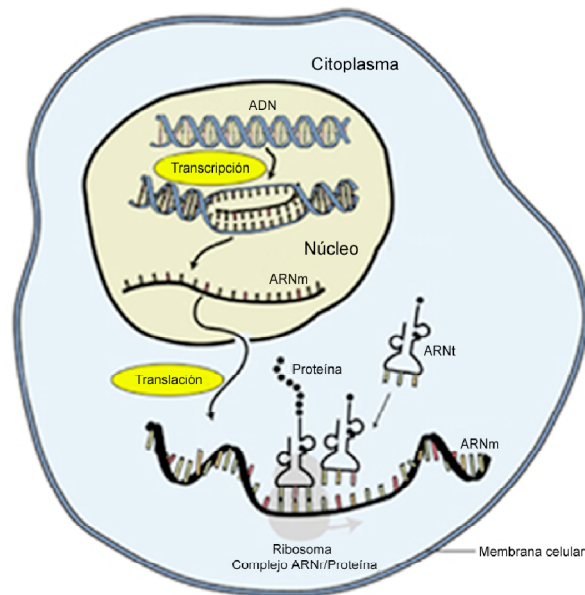


Figura 2.1 Resumen esquemático del proceso de expresión genética.

3. Bases generales del proceso de transcripción genética

La *transcripción* es el proceso por el que se transmite la información contenida en el ADN al ARN. Este proceso está catalizado por la ARN polimerasa (ARNpol), la cual utiliza como molde una de las dos hebras del ADN, la denominada *hebra codificante*. Para que se inicie el proceso de transcripción la ARNpol debe unirse a zonas específicas del ADN denominadas promotores, normalmente situadas hacia el extremo 5' de la secuencia reguladora. La transcripción consta de las siguientes etapas:²

- iniciación: la ARNpol se une al promotor y se incorpora el primer nucleótido.
- elongación: fase durante la cual se produce la síntesis de la cadena de ARN por la ARNpol. La elongación de la cadena de ARN se produce en la dirección 5'→3'.
- terminación: fin de la síntesis del ARNm y separación del complejo transcripcional.

² Mathews, C. K.; Van Holde, K. E.; Ahern, K. G. *Bioquímica* 2003, cap. 4, Addison Wesley, Madrid.

3.1 La iniciación de la transcripción en organismos procariotas

En células procarióticas existen una serie de proteínas que regulan la unión de la ARN polimerasa a los promotores y son, por lo tanto, las responsables de controlar la iniciación del proceso.³ Normalmente, la ARNpol se une a lo que denomina caja TATA que se sitúa en la posición -10 del inicio de la transcripción, o a la secuencia TTGACA, situada en la posición -35.

3.2 La iniciación de la transcripción en organismos eucariotas

El aparato transcripcional en eucariotas es más complejo que el de procariotas. En eucariotas existen 3 tipos distintos de ARN polimerasas, cada uno de los cuales se encarga de transcribir distintos tipos de genes, aunque la más relevante es la ARNpol II.⁶ Para que pueda llevarse a cabo la transcripción de un gen eucariota primero tiene que producirse una descompactación de la cromatina con el fin de que la maquinaria transcripcional pueda acceder al ADN. Parece ser que este desenrollamiento es un proceso que está muy regulado mediante procesos de acetilación y/o metilación de histonas, las proteínas responsables de compactar el ADN.⁷

En organismos eucariotas la ARNpol II ejerce su actividad formando un complejo transcripcional en el promotor con otras proteínas transcripcionales basales. Se ha demostrado que para que se forme este complejo transcripcional activo es necesario que otras proteínas, conocidas como factores de transcripción específicos (FTs) se unan de forma muy selectiva a "secuencias reguladoras" del gen que, en muchos casos, están situadas en regiones lejanas a la zona codificadora.⁸

³ Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell* **1994**, cap. 6, Garland Publishing, New York (USA).

⁶ La estructura de la ARNpol II ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X: Cramer, P.; Bushnell, D. A.; Fu, J.; Gnatt, A. L.; Maier-Davis, B.; Thompson, N. E.; Burgess, R. R.; Edwards, A. M.; David, P. R.; Kornberg, R. D. *Science* **2000**, *288*, 640.

⁷ Revisiones sobre modificaciones post-translacionales de la cromatina: a) Strahl, B. D.; Allis, C. D. *Nature* **2000**, *403*, 41. b) Wu, J.; Grunstein, M. *Trends in Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 619. c) Jenuwein, T.; Allis, C. D. *Science* **2001**, *293*, 1074. d) Felesenfeld, G.; Groudine, M. *Nature* **2003**, *421*, 448.

⁸ a) Conaway, R. C.; Conaway, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 161. b) Kadonaga, J. T.; *Cell* **2004**, *116*, 247. c) White, R. J. *Gene Transcription, Mechanism and Control* **2001**, Blackwell Science, Oxford. d) Garvie, C. W.; Wolberger, C. *Molecular Cell* **2001**, *8*, 936.

Aunque no se sabe con certeza el mecanismo por el cual la unión de los FTs a las secuencias reguladoras aumenta la velocidad de iniciación de la transcripción por parte del complejo transcripcional, parece ser que en muchos casos lo que se produce es una interacción directa entre una región activadora del FT y alguna de las proteínas del complejo transcripcional.⁴ Sin duda, uno de los aspectos más destacables de los FTs es su enorme especificidad, ya que en muchos casos son capaces de reconocer de forma muy específica secuencias de 8-20 pares de bases entre una multitud de secuencias alternativas.

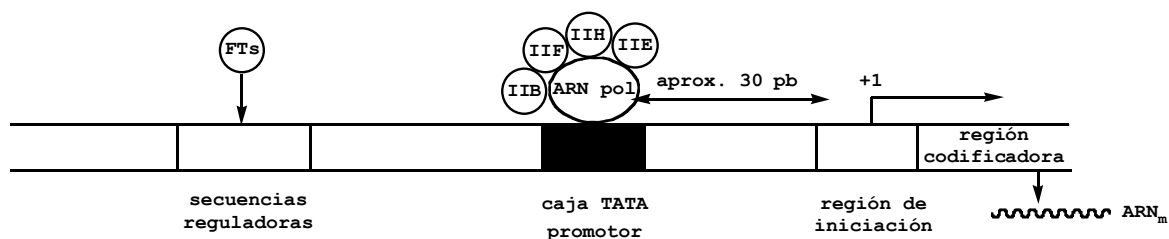


Figura 3.1 Estructura de un sitio de inicio de transcripción eucariota. IIB, IIF, IIH y IIE son factores de transcripción generales que se unen a la ARNpol para formar el complejo transcripcional.

4. Factores de Transcripción (FTs)

4.1 Regulación de la actividad de los factores de transcripción en organismos eucariotas

Como se ha comentado anteriormente, los factores de transcripción son proteínas que se unen con gran selectividad y afinidad a secuencias específicas del ADN localizadas en las zonas reguladoras de los genes, y de esta forma dirigen y controlan el inicio de la transcripción. La actividad de los factores de transcripción está regulada de manera muy precisa, puesto que de ellos depende en gran medida el correcto funcionamiento celular.⁹ En muchos casos, dicha regulación consiste en su activación mediante la acción de un estímulo externo, por ejemplo, un ligando extracelular que se une a *receptores* específicos situados en la superficie celular y, con ello, promueve su dimerización u

⁴ a) Latchman, D. S. *Eukaryotic Transcription Factors* **2004**, Elsevier Academic Press, San Diego (USA). b) Krauss, G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation* **2001**, Wiley-VCH, Bayreuth (Germany).

⁹ Revisión sobre los mecanismos de control de la actividad de los factores de transcripción: a) Calkhoven, C. F.; Geert, A. B. *Biochem. J.* **1996**, *317*, 329. b) Kornberg, R. D. *Trends in Cell Biol.* **1999**, *9*, M46.

oligomerización (figura 4.1). Como consecuencia de esto en muchos casos se induce la acción de quinasas que activan factores de transcripción que están presentes en el citoplasma en un estado latente.

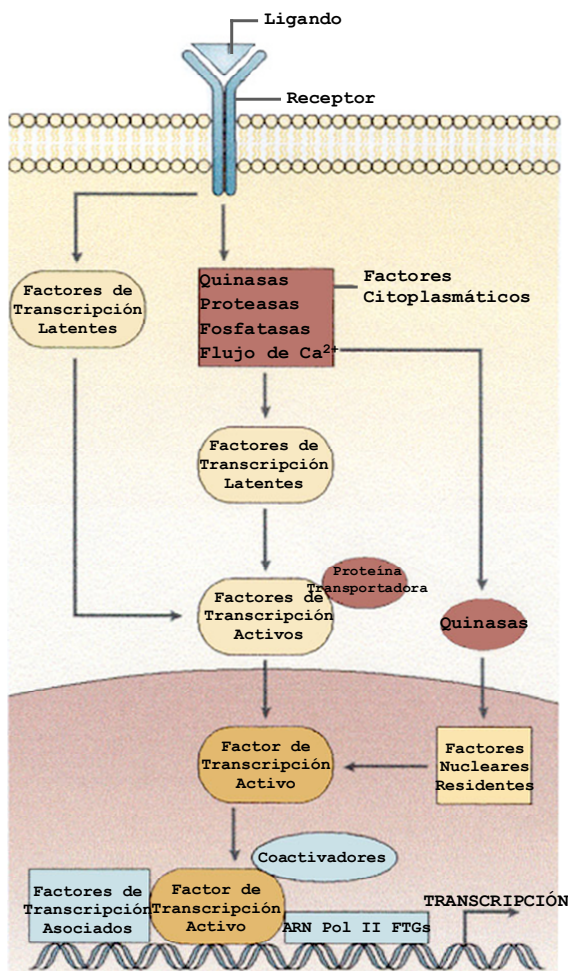


Figura 4.1 Algunos mecanismos de activación de factores de transcripción.

Por ejemplo, en el caso del factor de transcripción c-Jun, su activación se inicia con fosforilación en las serinas situadas en las posiciones 63 y 73.¹⁰ Una vez activados los FTs se unen a proteínas de transporte denominadas *transportadoras*, y penetran en el núcleo celular para participar en la regulación de la transcripción genética.

Otros modos de activación de los factores de transcripción citoplasmáticos latentes son menos directos, e implican la fosforilación que bloquea o desencadena la acción de proteasas, o la acción de proteínas transportadoras que facilitan la entrada de los FTs en el

¹⁰ a) Baker, S. J.; Kerppola, T. K.; Luk, D.; Vadenberg, M. T.; Marshak, D. R.; Curran, T.; Abate, C. *Molecular and Cell Biology* **1992**, *12*, 4649. b) Catling, A. D.; Wyke, J. A.; Frame, M. C. *Oncogene* **1993**, *8*, 1875. c) Deng, T.; Karin, M. *Nature* **1994**, *371*, 171.

núcleo celular. En algunos casos, las quinasas penetran en el núcleo y realizan la activación de los factores de transcripción que residen en él.

También existen factores de transcripción cuya actividad está regulada por la interacción directa con ligandos: metales (Cu^+ , Zn^{2+}),¹¹ aminoácidos... Un ejemplo clásico es el *repressor del triptófano*, un FT que controla la expresión de los enzimas responsables de la biosíntesis del triptófano y cuya regulación depende de la concentración de Trp en la célula:¹² si el nivel de Trp es bajo, el repressor se une al promotor del gen con baja afinidad lo que permite el libre acceso a la ARN polimerasa para que se ensamble en la posición adecuada del ADN y pueda iniciarse la transcripción de los genes que codifican los enzimas para la biosíntesis del Trp. Por el contrario, si la concentración de Trp en la célula es alta, el Trp se une al repressor induciendo un cambio conformacional en su estructura que conlleva un aumento de la afinidad del repressor por la secuencia promotora de ADN inhibiendo la unión de la ARN polimerasa y, por consiguiente, la transcripción de los genes.

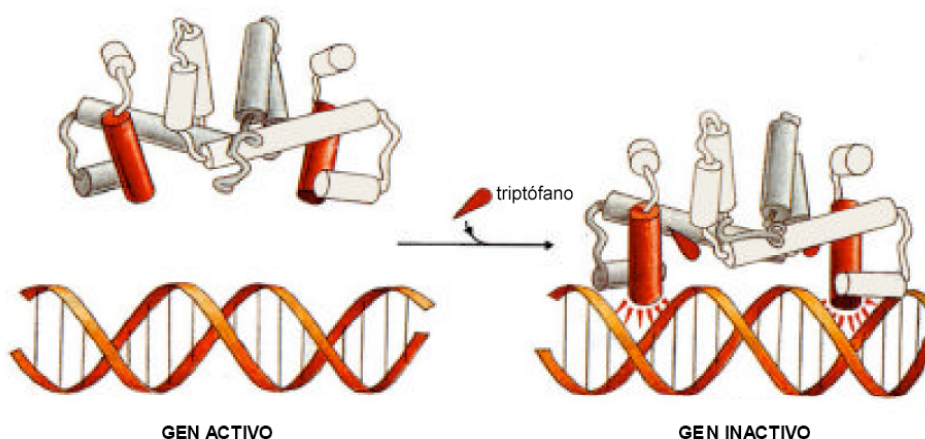


Figura 4.2 La unión de Trp al repressor de Trp modifica la conformación de la proteína: la unión de dos moléculas de Trp incrementa la distancia entre las dos hélices de reconocimiento del homodímero, permitiendo a la proteína insertarse adecuadamente en el surco mayor del ADN y reconocer su secuencia diana.

Es muy importante destacar que en muchos casos los factores de transcripción se unen a las secuencias específicas del ADN cooperando con otras proteínas reguladoras y/o coactivadores. Esta complejación es determinante en la inducción de la transcripción bien porque aumenta la especificidad de secuencia o porque permite la interacción con el complejo transcripcional de la ARNpol II.

¹¹ Thiele, D. J. *Nuc. Acid Res.* **1992**, *20*, 1183.

¹² Sigler, P. B.; Haran, T. E.; Joachimiak, A. *Embo J.* **1992**, *11*, 3021.

En la mayoría de los casos los **FTs reconocen secuencias específicas de ADN formando homo o heterodímeros con otras proteínas**. Esta cooperación asegura buenas afinidades ($K_a \sim 10^8 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$) y selectividades por los sitios de unión diana. Además, con este modo de actuación se consigue que utilizando un número relativamente pequeño de proteínas se puedan reconocer una gran variedad de secuencias genéticas. Esto es lo que se conoce como *regulación combinatoria* de la transcripción,¹³ que implica que el control de la expresión de un gen requiere de la acción combinada de varias proteínas. Esta estrategia también permite que cada una de estas proteínas pueda participar en la regulación de varios genes.¹⁴

Dada la enorme importancia de los FTs, es fundamental comprender las bases moleculares que rigen sus interacciones con otras proteínas y con sus secuencias de unión al ADN. Conociendo en profundidad estas interacciones tendríamos una mejor comprensión del proceso de transcripción y estaríamos en condiciones de diseñar estrategias para alterar de forma programable y selectiva la expresión de determinados genes. Dado que como consecuencia de la secuenciación del genoma crece de forma exponencial la información sobre las alteraciones genéticas responsables de diferentes enfermedades, sobre todo cánceres, parece obvio que dicha posibilidad de incidir de forma racional sobre la expresión genética tendría un gran potencial terapéutico.¹⁵

4.2 Factores de Transcripción y cáncer: oncogenes y genes supresores de tumores

El cáncer, una enfermedad causada por la proliferación celular excesiva y descontrolada, tiene su origen en muchos casos en la aparición de mutaciones en genes responsables de regular la división celular. Muchas de estas mutaciones se producen en *oncogenes*, genes implicados en procesos de crecimiento y diferenciación celular. Se denominan *proto-oncogenes* a aquellos genes que se pueden transformar en oncogenes.¹⁶

Existen diferentes grupos de proto-oncogenes, y muchos de ellos codifican FTs. Los más conocidos y estudiados son los genes que codifican *Fos*, *Jun*

¹³ Lamb, P.; Mcknight, S. L. *Trens Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 417.

¹⁴ Tijan, R.; Maniatis, T. *Science* **2001**, *77*, 5.

¹⁵ a) Dervan, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215. b) Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Mascareñas, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 338. c) Ghosh, I.; Yao, S.; Chmielewski, J. *Comprehensive Natural Products Chemistry* **1999**, Elsevier, New York.

¹⁶ a) Hartwell, L. H.; Kastan, M. B. *Science* **1994**, *266*, 1821-1828. b) Baserga, R. *Cell* **1994**, *79*, 927.

y *Myc*.¹⁷ Así, por ejemplo, el desarreglo en la actividad del factor de transcripción *Myc* es la causa del Linfoma de Burkitt.¹⁸ Un ejemplo característico de factores de transcripción implicados en procesos cancerosos lo constituye el complejo proteico AP-1, un complejo heterodimérico formado por dímeros de proteínas de la familia *Jun* o heterodímeros de proteínas *Jun* con proteínas *Fos*,¹⁹ que ejerce un papel crucial en la inducción de la expresión de una amplia variedad de genes en respuesta a señales mitogénicas.²⁰ El complejo AP-1 se une a la secuencia de ADN denominada TRE (5'-d(TGAc/gTCA)-3'), que se encuentra en los promotores de varios genes que controlan la división celular. La capacidad de *Fos* y *Jun* de producir cáncer está relacionada con su capacidad de inducir la expresión de estos genes específicos. Mutaciones en *Fos* que impiden su dimerización con *Jun*, y de ahí su unión al ADN, también inhiben su capacidad de transformar las células en cancerosas.²¹ Además, dependiendo de la composición de los heterodímeros, el complejo AP-1 puede regular positiva o negativamente la expresión de genes específicos.²² Se ha demostrado que los componentes de AP-1 se activan en respuesta a una gran cantidad de estímulos: estrés celular, estrés oxidativo, radiación ultravioleta e ionizante... También se sabe que agentes promotores de tumores, como el TPA (tetradecanoil forbolacetato), actúan a través de la activación del complejo AP-1.²³ Normalmente, los niveles de *Fos* y *Jun* se incrementan temporalmente como respuesta al tratamiento de las células con factores de crecimiento, provocando un período de crecimiento celular. Un continuo incremento en los niveles de estas proteínas deriva en un crecimiento incontrolado y persistente, que a la larga puede derivar en cáncer.

Claramente pues, sería de gran interés investigar la posibilidad de incidir y controlar los procesos de transcripción genética mediados por el complejo AP-1. Los genes supresores de tumores o antioncogenes son

¹⁷ Bravo, R.; Burckhardt, J.; Curran, T.; Muller, R. *Embo J.* **1985**, *4*, 1193.

¹⁸ Spencer, C. A.; Groudine, M. *Adv. Cancer Res.* **1991**, *56*, 1.

¹⁹ a) Curran, T.; Franza, B. R. Jr. *Cell* **1988**, *55*, 395. b) Kataoka, K.; Noda, M.; Nishizawa, M. *Molecular and Cellular Biology* **1994**, *14*, 700. c) Kerppola, T.; Curran, T. *Nature* **1995**, *373*, 199. d) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Kim, P. *Cell* **1992**, *68*, 699. e) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Stafford, W. F.; Kim, P. *Science* **1989**, *245*, 646.

²⁰ a) Bravo, R.; Burckhardt, J.; Curran, T.; Muller, R. *Embo J.* **1985**, *4*, 1193. b) Wisdom, R. *Exp. Cell. Research* **1999**, *253*, 180.

²¹ Angel, P.; Karin, M. *Biochemica and Biophysica Acta* **1991**, *1072*, 129.

²² a) Chiu, R, Angel, P.; Karin, M. *Cell* **1989**, *59*, 979. b) Ryseck, R. P.; Bravo, R. *Oncogene* **1991**, *6*, 533. c) Nakabeppu, Y.; Nathans, D. *Cell* **1991**, *64*, 751.

²³ Szabo, E.; Brown, P. H.; Birrer, M. J. *Cell. Growth Diff.* **1991**, *2*, 475.

genes que codifican proteínas cuya función es inhibir el crecimiento celular y así ayudan a prevenir la formación de tumores.²⁴ La eliminación o mutación de estos genes puede derivar en cáncer. El antioncogén más importante de los conocidos es el *p53*, que también codifica un factor de transcripción. En células normales su expresión se produce como consecuencia de daños en el ADN y su función consiste en detener el crecimiento celular de las células dañadas, o incluso inducir la muerte de dichas células por apoptosis. De ahí que al *p53* se le haya llamado el "guardián del genoma" ya que permite que proliferen sólo las células cuyo ADN no ha sido dañado.²⁵

²⁴ Futreal, P.A.; Kasprzyk, A.; Bimey, E.; Mullikin, J. C.; Wooster, R.; Stratton, M. R. *Nature* **2001**, *409*, 850.

²⁵ a) Levine, A. J.; Momaid, J.; Finlay, C. A. *Nature* **1991**, *351*, 453. b) Berns, A. *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 137. c) Asschert, J. G.; Vellenga, E.; De Jong, S.; De Vries, E. G. E. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 1713.

5. Interacciones de los Factores de Transcripción con el ADN

5.1 Características estructurales del ADN

Para entender mejor los aspectos estructurales de las interacciones que se producen entre proteínas (FTs) y el ADN se esbozan brevemente unas cuantas consideraciones acerca de la estructura del ADN en su forma B, que es la conformación mayoritaria del ADN de doble cadena en condiciones fisiológicas.²⁶

El ADN B tiene un diámetro aproximado de 20 Å. Hay unos 10 pares de bases por vuelta de hélice, siendo la distancia entre los pares de bases consecutivos de 3.4 Å y la rotación por residuo de 36°. Como se puede observar en la figura, este ADN presenta dos tipos de surcos, denominados *surco mayor* (con una anchura de 12 Å) y *surco menor* (de unos 5 Å de anchura).

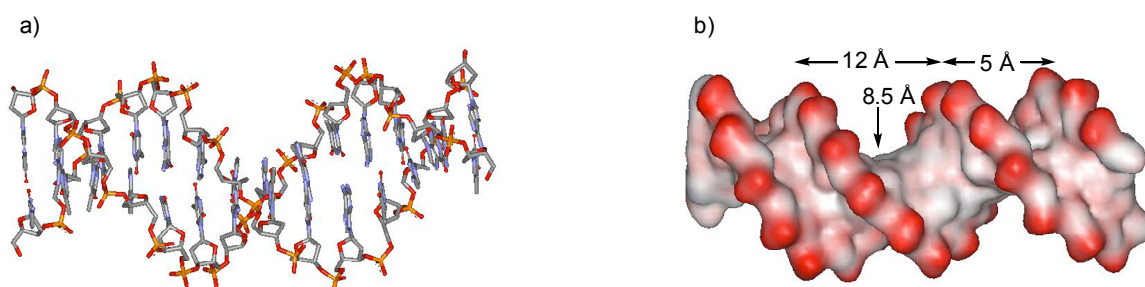


Figura 5.1 a) Estructura del ADN B. b) Modelo de superficies en donde se observan claramente los surcos mayor y menor.

El surco mayor es ligeramente más profundo que el menor (8.5 Å frente a 7.5 Å). Claramente, la interacción selectiva de las proteínas con secuencias específicas de este ADN de doble cadena debe conllevar el reconocimiento de las zonas externas expuestas por los pares de bases. El surco mayor presenta más posibilidades para participar en procesos de reconocimiento intermolecular, pues ofrece un mayor número de opciones combinatorias para formar distintos tipos de enlaces de hidrógeno. Además, el mayor tamaño del surco mayor lo hace más accesible a las interacciones con proteínas.

²⁶ Lavery, R.; Zardecki, C.; Westbrook, J. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure* 1999, Oxford Science Pub., Oxford.

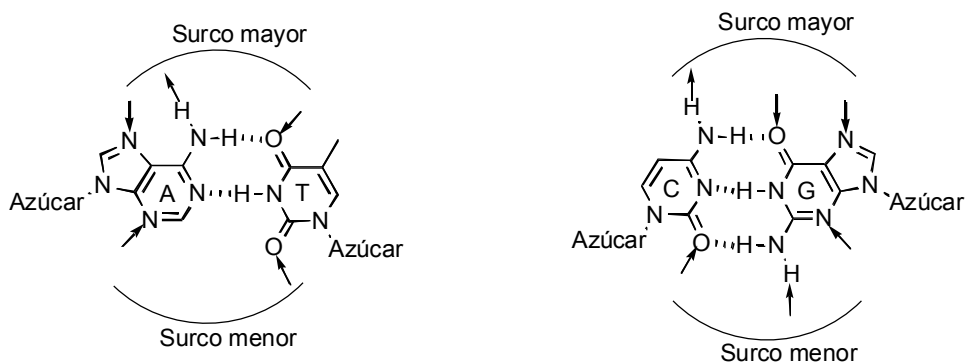


Figura 5.2 Representación de pares de bases AT y GC. Se indican con flechas las posibilidades de interacción como aceptores o dadores de puentes de hidrógeno de los átomos situados en las zonas externas de los surcos mayor y menor.

5.2 Motivos estructurales utilizados por los FTs para interactuar con el ADN

La unión de los FTs a secuencias específicas de ADN es un proceso de importancia crítica para que se produzca la iniciación de la transcripción, sobre todo en eucariotas. Para que esta unión sea específica es necesario que la proteína distinga su secuencia objetivo de entre todas las posibles secuencias alternativas que componen el genoma humano. El creciente número de estructuras de complejos proteína-ADN resuelto mediante cristalografía de rayos X y RMN ha permitido comprender mejor las bases estructurales que rigen las interacciones entre los FTs y el ADN.

Así, hoy se sabe que para llevar a cabo el reconocimiento, los FTs utilizan distintos motivos estructurales, lo que permite agruparlos en familias:²⁷

5.2.1 Hélice-giro-hélice (HGH)

La mayoría de las proteínas pertenecientes a esta familia se encuentran en organismos procariotas.²⁸ Suelen interactuar con el ADN en forma de dímeros, en los que cada uno de los monómeros utiliza el motivo hélice-giro-hélice de unos 22 aminoácidos para contactar con el ADN. Este motivo

²⁷ a) Pabo, C. O.; Sauer, R. T.; *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 1053. b) Burley, S. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 3. c) Luscombe, N. M.; Austin, S. E.; Berman, H. M.; Thornton, J. M. *Genome Biol.* **2000**, *1*, 1. d) Garvie, C. W.; Wolberger, C. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 937.

²⁸ a) Harrison, S. C.; Aggarwal, A. K. *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 933. b) Wintjens, R.; Rooman, M. J. *Mol. Biol.* **1996**, *262*, 294.

consiste en una hélice α , un giro y una segunda hélice α que se inserta en el surco mayor, y que se denomina *hélice de reconocimiento*. Es desde esta hélice desde donde se establecen la mayor parte de los contactos entre aminoácidos y bases que son responsables de la especificidad. Las dos hélices forman entre sí un ángulo de 120° , y aunque la primera de ellas no se inserta en el surco, puede establecer contactos con los grupos fosfato que permiten aumentar la afinidad del reconocimiento. Es importante señalar que un motivo HGH aislado del resto de la proteína es incapaz de unirse al ADN, por lo que necesita ser estabilizado por hélices adicionales para que pueda plegarse adecuadamente y ser activa.

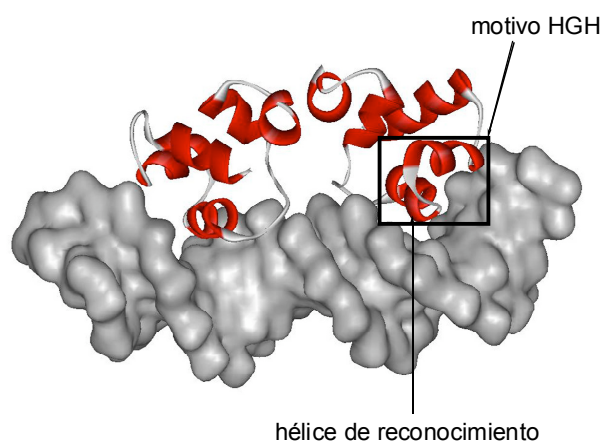


Figura 5.3. Estructura de rayos X del complejo entre el dominio de unión al ADN del fago represor 434 y el sitio operador OR3. En la figura se representa el dominio N-terminal de la proteína (residuos del 1 al 69).²⁹

5.2.2 Homeodominio

El *homeodominio* es el motivo estructural de eucariotas equivalente al hélice-giro-hélice procarionta.³⁰ Una diferencia importante con respecto al HGH es que la hélice de reconocimiento es más larga y, por lo tanto, desde ella se pueden establecer más contactos con el ADN que en el caso de la hélice del HGH. Además, muchas de estas proteínas establecen contactos adicionales a través de los extremos N o C-terminales con los surcos menores adyacentes del ADN, lo que permite un aumento de afinidad. Por estas razones se ha observado que en numerosos casos, como el de la

²⁹ Rodgers, D. W.; Harrison, S. C. *Structure* **1993**, *1*, 227.

³⁰ a) Affolter, M.; Percival-Smith, A.; Muller, M.; Leupin, W.; Gehring, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4093. b) Gehring, W. J.; Mueller, M.; Affolter, M.; Percival-Smith, A.; Billeter, M.; Qian, Y. Q.; Otting, G.; Wuethrich, K. *Trends Genet.* **1990**, *6*, 323. c) Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, R456.

proteína *MAT α 2*,³¹ estos factores de transcripción son capaces de interactuar de forma específica con el ADN incluso como monómeros.

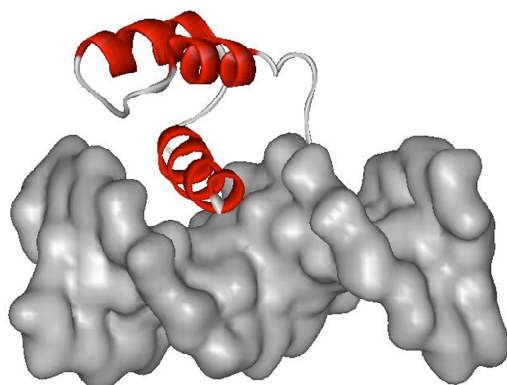


Figura 5.4. Estructura del homeodominio de la proteína *MAT α 2* complejo al ADN.³¹

5.2.3 Dedos de cinc

Es uno de los motivos estructurales más utilizados por las proteínas para interactuar con el ADN.³² Este motivo se caracteriza por contener un catión Zn^{2+} complejo con 4 residuos de Cys y/o His. Dependiendo de la estequiometría del complejo de coordinación se pueden distinguir dedos de zinc del tipo $Zn-Cys_2His_2$,³³ $Zn-Cys_4$ ³⁴ y Zn_2-Cys_6 . El átomo de Zn ejerce una función estructural que permite mantener empaquetadas una hélice α que reconoce el surco mayor (hélice de reconocimiento) y la lámina β . De este modo se consigue la correcta orientación y estabilización de la hélice. La mayor parte de estas proteínas contienen en su secuencia varios dedos de zinc unidos de forma covalente, pues los motivos monoméricos por si mismos presentan una afinidad muy baja.

³¹ Wolberger, C.; Vershon, A. K.; Liu, B.; Johnson, A. D.; Pabo, C. O. *Cell* **1991**, 67, 517.

³² Klug, A.; Schwabe, J. W. R. *Faseb J.* **1995**, 9, 597.

³³ Wolfe, S. A.; Nekludova, L.; Pabo, C. O. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 183.

³⁴ Rastinejad, F.; Perlmann, T.; Evans, R. M.; Sigler, P.B. *Nature* **1995**, 375, 203.

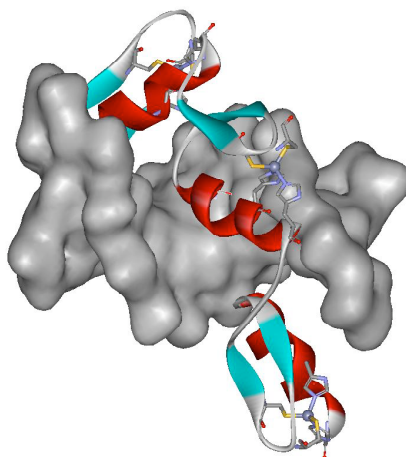


Figura 5.5 Estructura de rayos X del complejo entre el factor Zif268 y el ADN.³⁵

5.2.4 Motivos bZIP

Es uno de los motivos de reconocimiento de ADN más sencillo y eficaz. El motivo consiste en homo- o heterodímeros helicoidales no covalentes, cuyas unidades monoméricas constan de dos regiones bien diferenciadas. La región encargada de la dimerización, también denominada **cremallera de leucinas**, está compuesta por unos 30 aminoácidos y se sitúa en el extremo C-terminal. Esta región se caracteriza por poseer residuos de leucina cada 7 aminoácidos, proporcionando un ambiente hidrofóbico en una cara de la hélice que posibilita la interacción entre las dos cremalleras de cada monómero. La región encargada de interaccionar con el ADN, que se denomina **región básica** debido a la presencia de aminoácidos cargados positivamente, se encuentra en el extremo N-terminal y contiene unos 20 aminoácidos. La región básica se inserta en el surco mayor del ADN estableciendo contactos electrostáticos, hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno con las bases del ADN.³⁶

³⁵ Elrod-Erickson, M.; Benson, T. E.; Pabo, C. O. *Structure* **1998**, *6*, 451.

³⁶ a) Hu, J. C.; Sauer, R. T. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1992**, *6*, 82. b) Hurst, H. C. *Protein Profile* **1995**, *2*, 101. c) Ellemberger, T. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 12. d) Luscombe, N. M.; Austin, S. E.; Berman, H. M.; Thornton, J. M. *Genome Biol.* **2000**, *1*, 1.

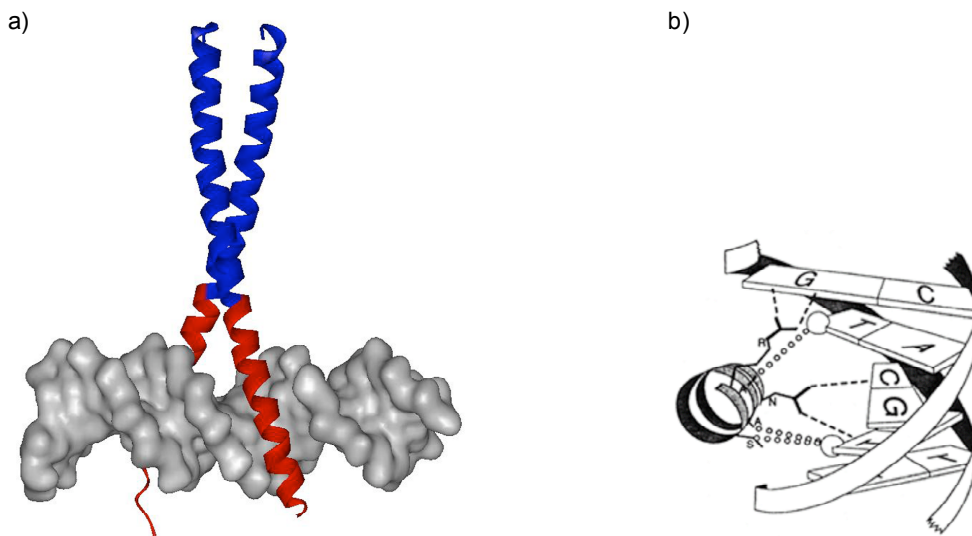


Figura 5.6 a) Estructura cristalina del complejo entre el FT *GCN4* y el sitio de unión API [5'-d(ATGAcTCAT)-3']. En azul se representa la cremallera de leucinas y en rojo la región básica. b) Contactos llevados a cabo por la región básica de reconocimiento a través del eje longitudinal de la hélice α . Se representan las cadenas laterales de los residuos más importantes que contactan directamente con las bases del ADN [Asparagina 235 (N235), Alanina 238 (A238), Alanina 239 (A239), Serina 242 (S242), Arginina 243 (R243)]; (°°°°) contactos hidrofóbicos, (---) contactos por enlace de hidrógeno.³⁷

Un aspecto relevante de este tipo de proteínas es que en ausencia del ADN diana la región básica carece de estructura secundaria, y sólo se pliega para formar la hélice α en presencia del ADN que contiene la secuencia correcta de reconocimiento.³⁸

Aunque la dimerización de estas proteínas es un proceso que puede ocurrir en ausencia de ADN, se ha comprobado que es probable que la unión al ADN se produzca de forma secuencial de tal forma que primero se ensambla un monómero en el ADN y, luego, se produce la dimerización.³⁹ Esta cinética de interacción es una estrategia natural muy interesante en tanto en cuanto evita que los dímeros queden atrapados un tiempo relativamente largo en secuencias no consenso, ya que como dímeros la interacción con dichas secuencias puede ser relativamente fuerte.

³⁷ a) Ellenberger, T. E.; Brandl, C. J.; Struhl, K.; Harrison, S. C. *Cell* **1992**, *71*, 1223. b) Köning, P.; Richmond, T. J. *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 139.

³⁸ a) Weiss, M. A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8020. b) O'Neil, K. T.; Hoess, R. H.; Degradó, W. F. *Science* **1990**, *249*, 774.

³⁹ Kholer, J. J.; Schepartz, A. *Biorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2435.

5.2.5 Hélice-lazo-hélice

Este motivo es estructuralmente muy similar al bZIP. La interacción con el ADN se produce a través de la inserción de dos regiones básicas helicoidales en el surco mayor, conectadas a través de un lazo a otras dos hélices que se encargan de la dimerización de modo análogo a las cremalleras de leucina.

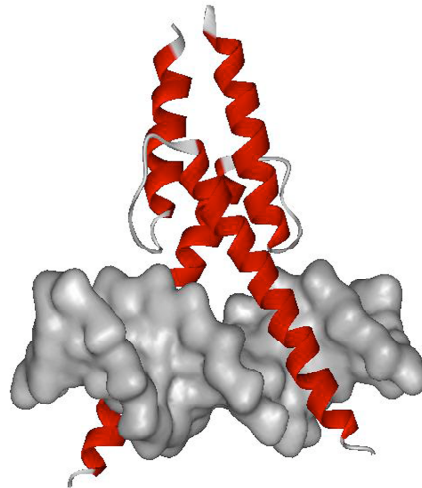


Figura 5.7 Estructura de rayos X del complejo entre MyoD y el ADN. En la figura están representados los residuos 102-162.⁴⁰

Al igual que ocurre con el motivo bZIP, la región básica carece de estructura en ausencia de un ADN que contenga la secuencia correcta de unión.

Hay FTs que combinan varios motivos estructurales distintos para interactuar con el ADN. Tal es el caso de *Skn-1*,^{41,42} que posee una región básica helicoidal en el extremo C-terminal que reconoce la misma secuencia que GCN4, pero no posee una cremallera de leucinas. El extremo N-terminal interactúa con el surco menor de manera análoga a los homeodominios. A diferencia de las proteínas del motivo bZIP, este factor reconoce el ADN como monómero.

⁴⁰ Ma, P. C.; Rould, M. A.; Weintraub, H.; Pabo, C. O. *Cell* **1994**, *77*, 451.

⁴¹ a) Blackwell, T. K.; Bowerman, B.; Priess, J. R.; Weintraub, H. *Science* **1994**, *266*, 621; b) Pal, S.; Lo, M-C.; Schmidt, D.; Pelczer, I.; Thurber, S.; Walker, S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5556. c) Lo, M-C.; Ha, S.; Pelczer, I.; Pal, S.; Walter, S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8455.

⁴² Rupert, P. B.; Daughdrill, G. W.; Bowerman, B.; Matthews, B. *Nature Struct. Biol.* **1998**, *5*, 484.

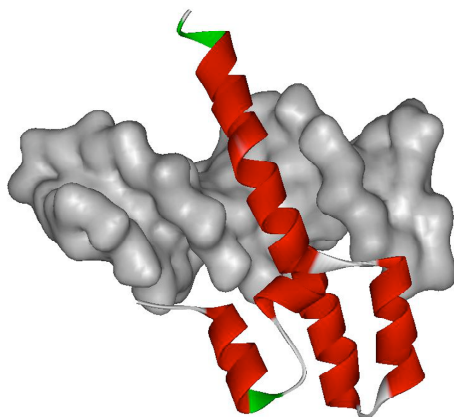


Figura 5.8 Estructura de rayos X del FT Skn-1 complejado con el ADN.⁴²

5.3 Conclusiones generales sobre las bases estructurales de la interacción entre FTs y ADN

De lo expuesto hasta ahora se puede deducir que la mayoría de los FTs se unen a secuencias específicas de ADN formando **homo-** o **heterodímeros**. El reconocimiento se produce como consecuencia de la interacción de determinadas zonas de la proteína (enlace peptídico o cadenas laterales) con los fosfatos o con los grupos funcionales expuestos por las bases, fundamentalmente en el **surco mayor**.⁴³ En muchos casos los elementos más relevantes del reconocimiento se sitúan en una **hélice α** que se inserta en el surco mayor del ADN y desde la que se establecen contactos específicos aminoácido-base. En algunos casos las proteínas establecen contactos adicionales con el surco menor de zonas contiguas del ADN. Cualquier interacción proteína-ADN que tenga una afinidad dentro del rango $K_a \sim 10^8 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$ se considera específica. Por el contrario, las interacciones inespecíficas suelen tener afinidades del orden $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$.^{15b}

Como en cualquier proceso de reconocimiento intermolecular, los factores responsables de la interacción se pueden agrupar según su origen entálpico o entrópico. Dentro de los entálpicos los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas contribuyen favorablemente a la formación del complejo proteína-ADN, mientras que la desolvatación de los grupos polares y la desviación de los parámetros geométricos ideales en el complejo contribuyen desfavorablemente. En cuanto a los entrópicos, la deshidratación de

⁴³ a) Seeman, N. C.; Rosenberg, J. M.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 804. b) Luscombe, N. M.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2860.

^{15b} Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Mascareñas, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 338.

regiones no polares (efecto hidrofóbico) y la redistribución iónica en el complejo contribuyen favorablemente, mientras que la pérdida de grados de libertad rotacionales, vibracionales y traslacionales durante la formación del complejo desfavorecen la interacción.⁴⁴

Los contactos directos proteína-ADN se establecen fundamentalmente en base a las siguientes interacciones intermoleculares:

- Enlaces de hidrógeno: son muy importantes desde el punto de vista de la especificidad y energéticamente son más favorables cuanto mayor sea la linealidad entre el H-donante y el H-aceptor. En las proteínas existe una gran variedad de aminoácidos cuyas cadenas laterales pueden actuar como dadoras oceptoras de enlaces de H: Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, Glu, Asp, Arg, Lys, His y Cys. Asimismo, los heteroátomos y grupos funcionales de la desoxirribosa y de las bases que no están implicados en los enlaces de hidrógeno de la doble hélice pueden actuar como dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno. En muchas ocasiones, estos enlaces de hidrógeno son transmitidos a través de moléculas de H₂O. Sin duda alguna los enlaces más relevantes desde el punto de vista energético son las uniones bidentadas entre Arg y guanina y Gln y adenina.

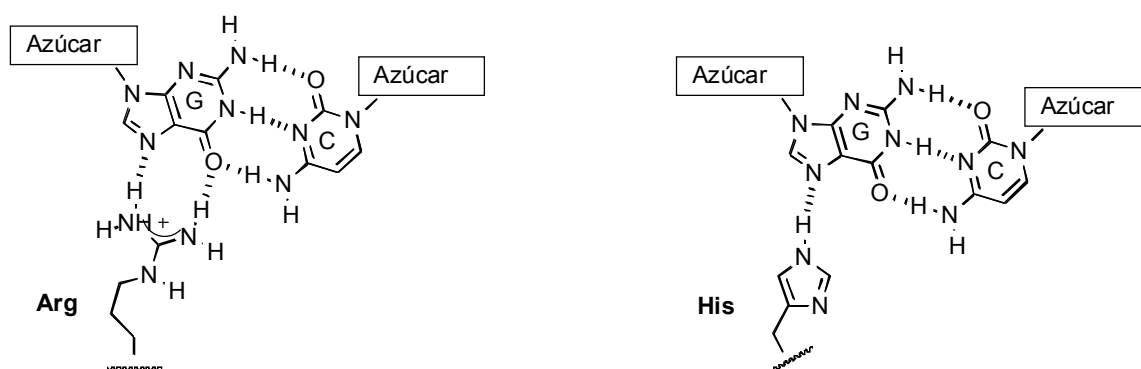


Figura 5.9 Ejemplos de enlaces de hidrógeno característicos entre algunos aminoácidos y zonas expuestas de GC.

- Puentes salinos: son interacciones electrostáticas que se producen entre la cadena fosfatídica cargada negativamente y las cadenas laterales de aquellos aminoácidos que pueden protonarse (Lys, Arg, His). A diferencia de los enlaces de hidrógeno, no son direccionales y son efectivos a larga distancia. Son, por lo tanto, menos adecuados en relación con la especificidad de la interacción, aunque contribuyen a la estabilidad termodinámica del complejo proteína-ADN.

⁴⁴ a) Jen-J. L.; Engler, L. E.; Jacobson, L. A. *Structure* **2000**, *8*, 1015. b) Oda, M.; Nakamura, H. *Genes Cells* **2000**, *5*, 319.

- Interacciones no polares: son interacciones de corto alcance, como las fuerzas de Van der Waals, pero que también juegan un papel importante en el reconocimiento específico. Se producen entre residuos con cadenas laterales no polares (Ala, Leu, Ile) y grupos no polares de las bases. Son particularmente reseñables las interacciones que se establecen con el grupo metilo de la timina.

Aparte de todo lo comentado anteriormente, existen otros factores indirectos que también influyen en las interacciones proteína-ADN, como pueden ser los cambios conformacionales locales en el ADN, en particular en determinadas secuencias como (dA)₅₋₆, que causan curvaturas en la estructura de la macromolécula y de esta forma pueden facilitar la unión del FT.⁴⁵

6. Moléculas pequeñas que interaccionan con el ADN

6.1 Consideraciones generales

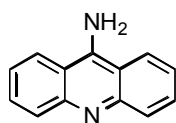
Existen una serie de moléculas de pequeño tamaño capaces de interaccionar con el ADN, pero la mayoría de ellas presentan una afinidad y una especificidad de secuencia relativamente baja. Por ello, aunque algunas son de gran interés desde el punto de vista biológico e incluso farmacológico, su eficiencia está, en general, limitada debido a la toxicidad que deriva de su falta de especificidad.

Estas moléculas se pueden clasificar en función de la estrategia de unión al ADN en cuatro grupos:⁴⁶

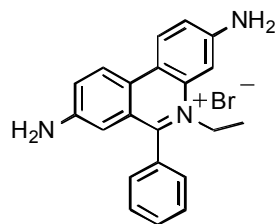
a) Agentes intercalantes: son una familia de compuestos consistentes en sistemas aromáticos heterocíclicos, tales como la 9-aminoacridina, el bromuro de etidio o los antibióticos intercaladores de la familia de la antraciclina. Estos compuestos se intercalan entre los pares de bases del ADN y muestran una baja selectividad de secuencia.

⁴⁵ Alleman, R. K.; Egli, M. *Chem. & Biol.* **1997**, *4*, 643.

⁴⁶ a) Wemmer, D. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439. b) Chaires, J. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 314.

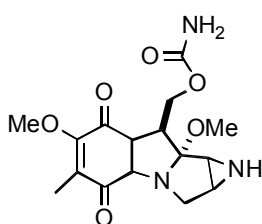


9-aminoacridina

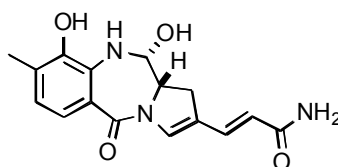


Bromuro de etidio

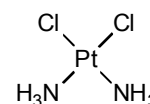
b) Agentes alquilantes: son moléculas que se unen al ADN formando enlaces covalentes con las bases, como la Mitomicina A, la antramycin o el conocido agente antitumoral cis-platino.



Mitomicina A

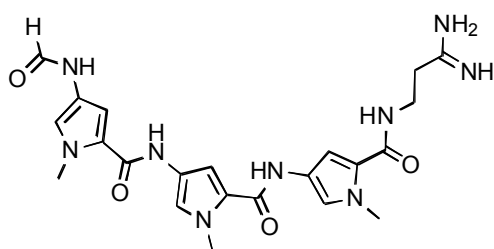


Antramycin

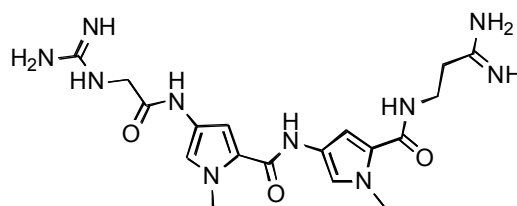


cis-platino

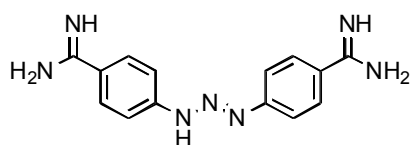
c) Moléculas que se insertan en el surco menor del ADN: en este grupo se incluyen tanto productos naturales como la Distamicina A y la Netropsina, así como moléculas diseñadas en el laboratorio (Berenil, Pentamidina, Hoechst 33258). También podemos incluir en este grupo péptidos de pequeño tamaño, como la secuencia GRKPRGRPCK del motivo "A,T-hook" presente en la proteína HMG-I/Y, una proteína cromosómica no histónica que funciona como factor de transcripción.



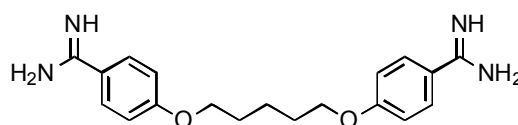
Distamicina A



Netropsina



Berenil



Pentamidina

Estos compuestos se caracterizan por presentar una forma cóncava que favorece su inserción en el estrecho surco menor del ADN rico en secuencias de pares de bases AT y TA.^{46,47}

La unidad estructural básica de la distamicina y la neptrosina es una N-metilpirrolcarboxamida: la neptrosina contiene dos y la distamicina A tres. Tanto la neptrosina como la distamicina A se unen de manera específica a secuencias ricas en A y T del ADN en forma B. La estructura obtenida por RMN del complejo entre la distamicina con d(CGCAAATTTGCG)₂ muestra que el sitio de unión mínimo para la distamicina consiste en cuatro pares de bases AT consecutivos, de forma que el tripirrol se inserta en el surco menor permitiendo la formación de contactos de tipo de Van-der-Waals, así como enlaces de hidrógeno de tres centros entre las amidas de la distamicina y N₃ de adeninas y O₂ de las timinas. Los dos primeros pirroles se disponen, aproximadamente, de manera coplanar, mientras que el tercer anillo está ligeramente girado para ajustarse a la geometría del surco.⁴⁸

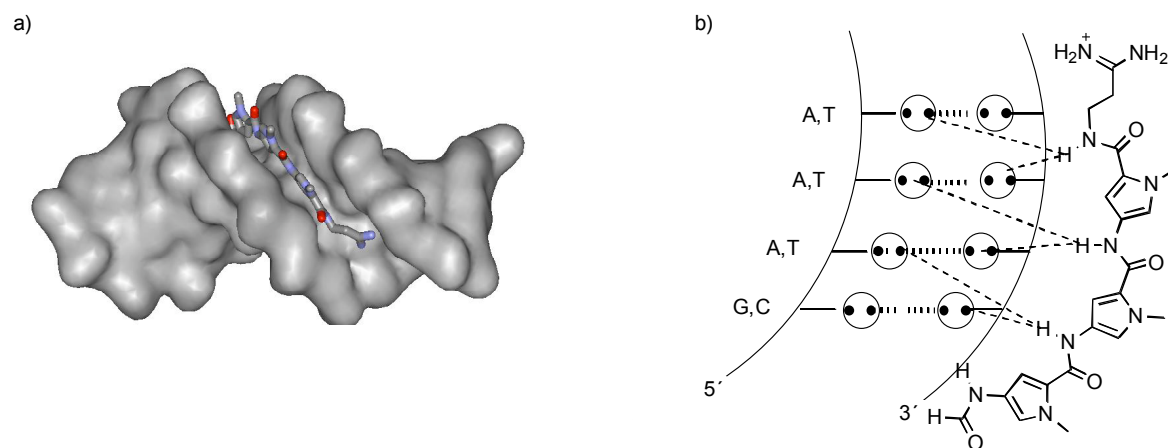


Figura 6.1. a) Estructura de rayos X del complejo distamicina A-ADN.⁴⁹ b) Modelo de unión de la distamicina al ADN: los círculos con puntos representan pares solitarios de átomos N₃ de purinas y O₂ de pirimidinas. Los enlaces de hidrógeno se muestran con líneas discontinuas.

La especificidad por secuencias ricas en A y T es, fundamentalmente, consecuencia de que el grupo 2-amino de las guaninas sobresale en el surco menor del ADN e impide el acceso de moléculas al fondo del mismo. Precisamente, la capacidad de este grupo amino para participar como dador

⁴⁶ a) Wemmer, D. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439. b) Chaires, J. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 314.

⁴⁷ a) Hurley, L. H. *Nature Rev. Cancer* **2002**, *2*, 188. b) Opalinska, J. B.; Gewirtz, A. M. *Nature Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 503. c) Neidle, S. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 291.

⁴⁸ Coll, M.; Frederick, C. A.; Wang, A. H. J.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 8385.

⁴⁹ Uytterhoeven, K.; Sponer, J.; Van Meervelt, L. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2868.

de enlaces de H ha permitido comprobar que sustituyendo los pirroles por imidazol, tiazol, furano, triazol o pirazol, entre otros heterociclos, es posible diseñar sustancias, llamadas *lexitropsinas*, que se unen a secuencias que contienen uno o dos pares de bases GC dentro de una región rica en A y T.^{50,51}

d) Moléculas que forman una triple hélice: oligonucleótidos de entre 10 a 20 pares de bases que se unen al surco mayor de secuencias oligopirimidina-oligopurina formando una triple hélice por medio de interacciones tipo Hoogsteen.^{47b,52}

6.2 Poliamidas sintéticas desarrolladas por Dervan

Se ha observado también que, en determinadas secuencias de al menos cinco pares de bases de longitud, es posible que se acomoden dos distamicinas simultáneamente de manera antiparalela en el surco menor.⁵³ En estos complejos de tipo 2:1 cada ligando mantiene todos los elementos de reconocimiento comentados anteriormente, de tal forma que cada una de las moléculas interacciona con una de las hebras del ADN (enlaces de hidrógeno, interacciones de Van-der-Waals).

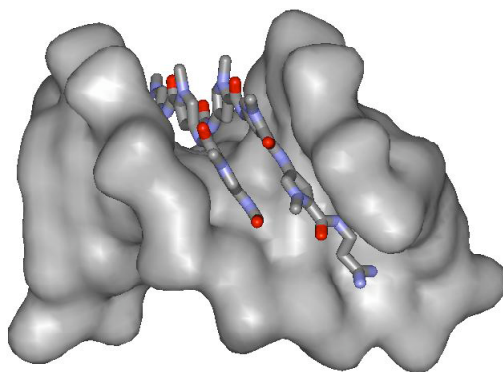


Figura 6.2 Estructura de rayos X de la unión de dos moléculas de distamicina A al surco menor del ADN.⁵⁴ En la figura se puede observar claramente como adoptan una disposición antiparalela al insertarse en el surco menor.

La tendencia a dar complejos de tipo 1:1 o 2:1 es fuertemente dependiente de la secuencia del ADN. Estudios llevados a cabo mediante dicroísmo

⁵⁰ Goodsell, D.; Dickerson, R. E. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 727.

⁵¹ Dervan, P. B. *Science* **1986**, *232*, 464.

^{47b} Opalinska, J. B.; Gewirtz, A. M. *Nature Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 503

⁵² Faria, M.; Giovannangeli, C. J. *Gene Med.* **2001**, *3*, 299.

⁵³ Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5723.

⁵⁴ Chen, X.; Ramakrishnam, B.; Rao, S. T.; Sundaralingam, M. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 169.

circular demuestran que la preferencia por la formación de complejos 2:1 decrece en el siguiente orden: AAGTT, ATATA \geq AAAC T > AATAA > AAATA, AAAGT > AATAT > TAAAA \geq AAATT \geq AAAAA \geq ATAAA, AAAAT.⁵⁵

El descubrimiento de esta interacción dimérica indujo hace algunos años al grupo de Dervan a investigar si uniendo ambas unidades de forma covalente podrían obtenerse sistemas de reconocimiento de secuencias específicas de ADN de gran afinidad. A lo largo de estos últimos años el grupo ha demostrado la viabilidad de la estrategia preparando una gran cantidad de poliamidas conteniendo unidades de pirrol (Py), Imidazol (Im) o hidroxipirrol (Hp) conectadas en horquilla mediante ácido γ -aminobutírico.⁵⁶ De hecho, el grupo ha establecido una especie de código de reconocimiento que empareja pares de bases con pares de heterociclos: pares A·T (Py/Hp), T·A (Hp/Py), G·C (Im/Py) y C·G (Py/Im).^{15a} Gracias al estudio sistemático desarrollado, el grupo ha logrado avances espectaculares y algunas de estas moléculas que presentan afinidades muy grandes ($K_d < 10$ nM) han sido ensayadas con éxito in vitro como agentes moduladores de la expresión de determinados genes.^{57,15a} Sin embargo, parece que en algunos casos las especificidades no son muy altas y, por ello, los ensayos "in vivo" no están dando los frutos deseados. Además, estas moléculas parece que presentan problemas de transporte y penetración en la membrana y, sobre todo, el núcleo celular.⁵⁸ Otro problema importante de estas poliamidas sintéticas deriva del hecho de que interaccionan con el ADN a través del surco menor, mientras que los FTs lo hacen, principalmente, a través del surco mayor, con lo que las posibilidades de interferencia con los FTs están bastante limitadas.

⁵⁵ Chen, F.; Sha, F. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11144.

⁵⁶ Dervan, P. B.; Bürli, R. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 688.

^{15a} Dervan, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215.

⁵⁷ a) Fechter, E. J.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8476. b) Dickinson, L. A.; Burnett, R.; Melander, C.; Edelson, B. S.; Arora, P. S.; Dervan, P. B.; Gottesfeld, J. M. *Chem. & Biol.* **2004**, *11*, 1. c) Olenyuk, B., Zhang, G. -J.; Klco, J. M.; Nickols, N.; Kaelin Jr., W. G.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16768. d) Wemmer, D. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439.

⁵⁸ a) Best, T. P.; Edelson, B. S.; Nickols, N. G.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12063. b) Edelson, B. S.; Best, T. P.; Olenyuk, B.; Nickols, N. G.; Doss, R. M.; Foister, S.; Heckel, A.; Dervan, P. B. *Nuc. Acid Res.* **2004**, *32*, 2802.

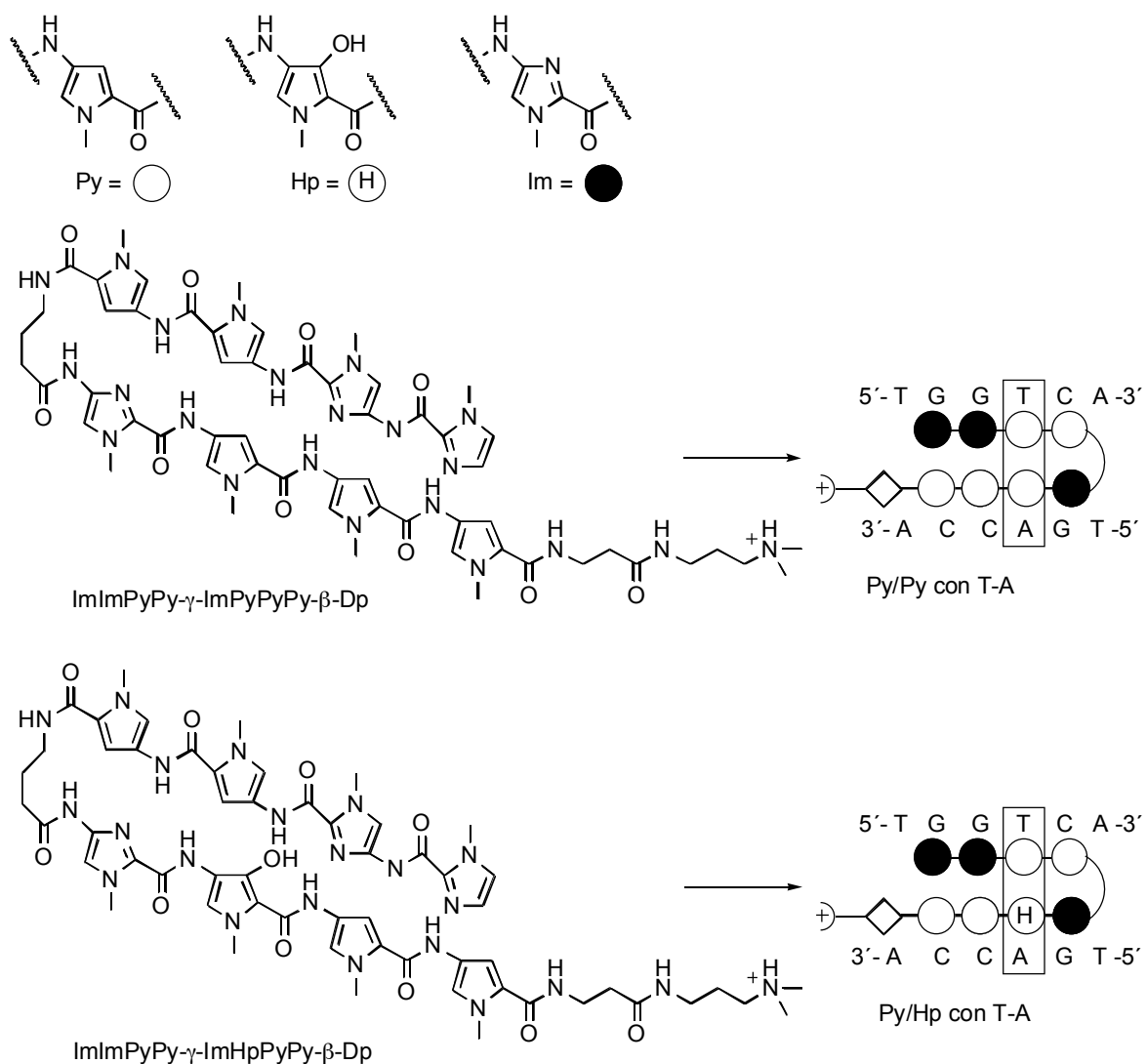


Figura 6.3 Estructura de poliamidas sintéticas: Hp, 3-hidroxipirrol; Im, imidazol; Py, pirrol; β , β -alanina; γ , ácido γ -aminobutírico; Dp, dimetilaminopropilamida y modelos de unión para las poliamidas representadas complejadas con 5'-TGGTCA-3'. Las líneas curvas representan al ácido γ -aminobutírico; \diamond representa a la β -alanina; + representa el grupo dimetilaminopropilamida cargado positivamente.

7. Diseño de miniproteínas para el reconocimiento de secuencias específicas de ADN

7.1 Consideraciones generales

La investigación en el área de los péptidos ha experimentado un enorme auge en las últimas décadas como consecuencia de la gran influencia que tienen en distintos tipos de funciones fisiológicas y bioquímicas muy importantes para la vida, tales como procesos de neurotransmisión (β -endorfina), respuestas hormonales (la insulina, el glucagón), etc. A pesar de que hasta el momento el perfil farmacológico de los péptidos es más bien bajo debido a su rápida degradación por la acción de las proteasas y baja permeabilidad para atravesar las membranas,⁵⁹ su potencialidad biológica, unida a la facilidad para preparar una gran variedad de péptidos mediante síntesis automática, les convierte en un tipo de moléculas de gran interés y enorme futuro en el campo de la química biológica. Una posible solución a las limitaciones terapéuticas de los péptidos está relacionada con la preparación de péptidos modificados conteniendo aminoácidos no naturales, peptidomiméticos (compuestos no peptídicos que imitan la estructura de un péptido cuando está enlazado a su receptor),⁶⁰ β -péptidos,⁶¹ PNAs (ácidos nucleicos que tienen un esqueleto peptídico),⁶² oligocarbamatos,⁶³ peptoides (oligómeros de Gly N-sustituidos)...

El diseño *de novo* de péptidos, con tamaños relativamente pequeños, que pudieran ser capaces de mimetizar el comportamiento de los factores de transcripción naturales,^{15b} es un reto particularmente interesante y atractivo por varias razones:

⁵⁹ a) Morgan, B. A.; Gainor, J. A. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1989**, *24*, 243. b) Hruby, V. J. *Biopolymers* **1993**, *33*, 1073. c) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1244. d) Wiley, R. A.; Rich, D. H. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327. e) Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 169.

⁶⁰ a) Kieber-Emmons, T.; Murali, R.; Gree, M. I. *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, *8*, 435.

⁶¹ a) Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173. b) Apella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi, J. J.; Gellman, Jr. S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381. c) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043.

⁶² a) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, *25*, 1497. b) Meier, C.; Engels, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1008.

⁶³ Cho, C. Y.; Moran, E. J.; Cherry, S. R.; Stephans, J. C.; Fodor, S. P. A.; Adams, C. L.; Sundaram, A.; Jacobs, J. W.; Schultz, P. G. *Science* **1993**, *261*, 1303.

^{15b} Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Mascareñas, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 338.

- Razones de tipo básico, en tanto en cuanto pueden servir como modelos para obtener nueva información estructural y energética sobre los aspectos fundamentales que rigen procesos como el plegamiento en proteínas, o el reconocimiento biomolecular entre proteínas y ADN.
- Razones de tipo biomédico, pues pudieran servir como herramientas terapéuticas en enfermedades relacionadas con disfunciones genéticas como el cáncer, debido a que podrían interferir de forma programada con la acción de factores de transcripción naturales. Sin embargo, obtener estos mimicos mínimos no es una tarea fácil puesto que en la gran mayoría de los casos el truncamiento de secuencias de la proteína (o el FT) conlleva una reducción importante o incluso total en la afinidad por secuencias específicas de ADN.⁶⁴

Debido a su sencillez estructural, los FTs de la familia bZIP han sido los más estudiados en cuanto al diseño de versiones minimizadas que mantengan sus propiedades de interacción con el ADN.

7.2 Diseño de dímeros no naturales de la región básica de proteínas bZIP

Varios grupos han demostrado que es posible reemplazar la cremallera de leucinas en los FTs de tipo bZIP por unidades de dimerización artificiales covalentes o no covalentes sin que se vean afectadas sensiblemente las propiedades de reconocimiento a 4°C. El mayor problema deriva en que casi todos estos miméticos ven disminuida en gran medida su afinidad a temperatura ambiente.

En 1990, el grupo de Peter Kim sustituyó la cremallera de leucinas por un puente disulfuro, y comprobó que el dímero resultante, que conserva 31 residuos de la proteína natural y contiene tres aminoácidos adicionales (GGC) en el extremo C-terminal, reconoce las secuencias API (5'-ATGACTCAT-3') y CRE (5'-ATGACGTCAT-3').⁶⁵

⁶⁴ a) Ghosh, I.; Yao, S.; Chmielewski, J. *Comprehensive Natural Products Chemistry* **1999**, Elsevier, New York (USA). b) Pabo, C. O.; Peisach, E.; Grant, A. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 313. c) Pedone, P. V.; Ghirlando, R.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Felsenfeld, G.; Omichinski, J. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2822.

⁶⁵ Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Kim, P. S. *Science* **1990**, *249*, 769.

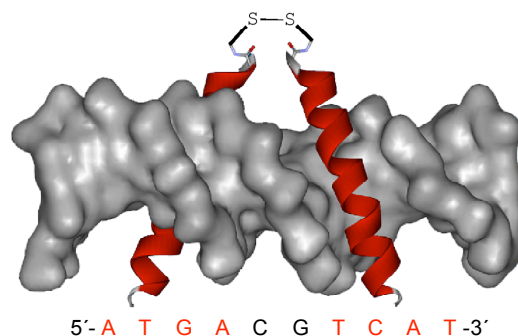


Figura 7.1 Modelo hipotético de interacción con el ADN del dímero disulfuro diseñado por el grupo de Peter Kim.

Estudios posteriores permitieron comprobar que era posible acortar la región básica hasta 23 aminoácidos, y que el dímero resultante aún era capaz de realizar el reconocimiento específico de las secuencias consenso con afinidades en torno a 10 nM a 4°C.⁶⁶ Además, estos autores pudieron comprobar que las eliminaciones de parte de la secuencia en el extremo C-terminal (RMKQ) afectan más a la estabilidad del complejo que en el extremo N-terminal.

Más adelante, el grupo de Goddard III demostró que dicha dimerización también se puede realizar por el extremo N-terminal, incluso extendiendo la estrategia a la formación de heterodímeros.⁶⁷

El primer ejemplo de dimerización no covalente basada en la utilización de metales como elementos de dimerización lo publicaron Alanna Schepartz y sus colaboradores en el año 1993. En este caso, acoplaron una unidad de terpiridina en el extremo C-terminal del péptido, de tal forma que en presencia de Fe(II) se forma un complejo octaédrico dimérico (figura 7.2 a).⁶⁸

⁶⁶ Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6871.

⁶⁷ a) Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard III, W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9094. b) Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard III, W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4892.

⁶⁸ Cuenoud, B.; Schepartz, A. *Science* **1993**, *259*, 510.

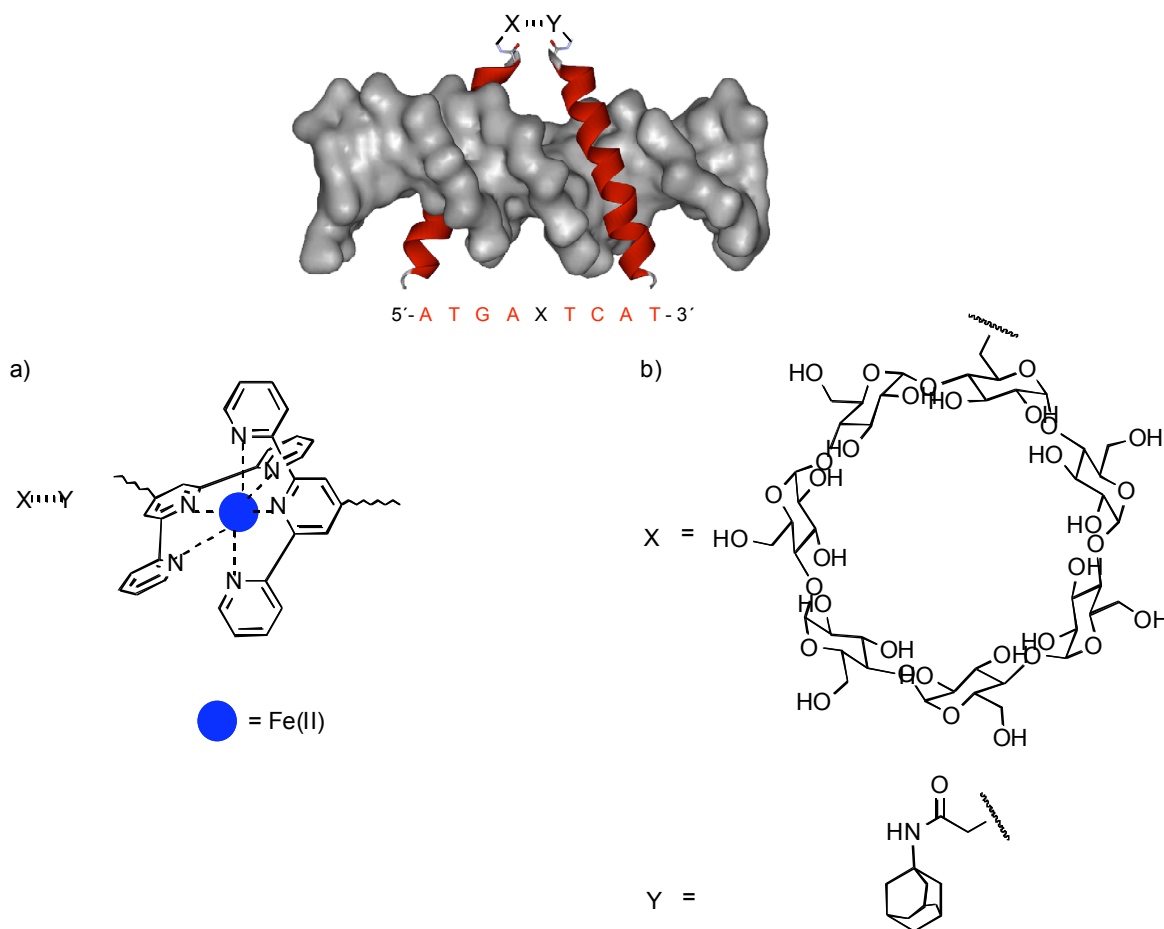


Figura 7.2 Modelo cualitativo de unión al ADN: a) dimerización mediante un complejo de coordinación, b) dimerización mediante un complejo de inclusión ciclodextrina-adamantano.

Otro ejemplo de dimerización no covalente lo presentó el grupo de Morii ese mismo año. La estrategia se basó en una realizar una dimerización a través del extremo C-terminal mediante la formación de un complejo de inclusión ciclodextrina-adamantano (figura 7.2 b).⁶⁹

En el año 2000, nuestro grupo diseño y preparó un híbrido covalente a través del extremo C-terminal en el que la dimerización se realiza a través de una unidad de azobenceno. El isómero *cis* del péptido resultante reconoce la secuencia CRE con mayor afinidad que el *trans*. Lo reseñable es que la modulación de la afinidad se puede conseguir a través de la interconversión de los dos isómeros mediante simple irradiación fotoquímica.⁷⁰

⁶⁹ a) Ueno, M.; Murakami, A.; Makino, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575. b) Morii, T.; Yamane, J.; Aizawa, Y.; Makino, K.; Sugiura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10011.

⁷⁰ Caamaño, A. M.; Vázquez, M. E.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3104.

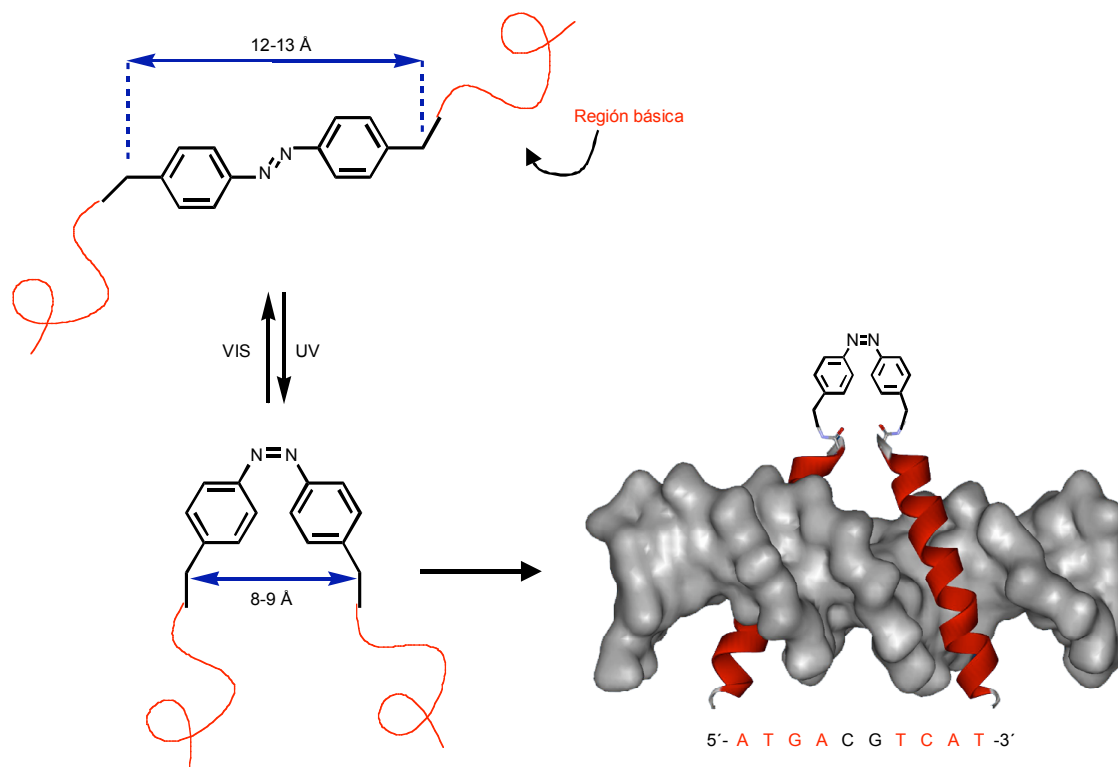


Figura 7.3 La menor distancia entre las regiones básicas en el conformero cis favorece una mayor afinidad por el ADN que en el caso del trans.

7.3 Proteínas monoméricas de la región básica de GCN4

Como se comentó previamente (sección 5.2), cada uno de los monómeros de la región básica de GCN4 es incapaz por si solo de reconocer la secuencia consenso 5'-ATGA-3' (su afinidad a 4 °C se ha calculado en torno a 1-10 μM).⁷¹ En el año 1995, el grupo de Verdine demostró que si la región básica se libera de manera intramolecular a través de la unión covalente a la cadena de ADN puede plegarse y reconocer específicamente su secuencia consenso, ya que en este caso el coste entrópico ligado a la formación del complejo es mucho menor.⁷²

⁷¹ Zhang, M.; Wu, B.; Zhao, H.; Taylor, J. W. *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 125.

⁷² Stanojevic, D.; Verdine, G. L. *Nature Struct. Biol.* **1995**, *2*, 450.

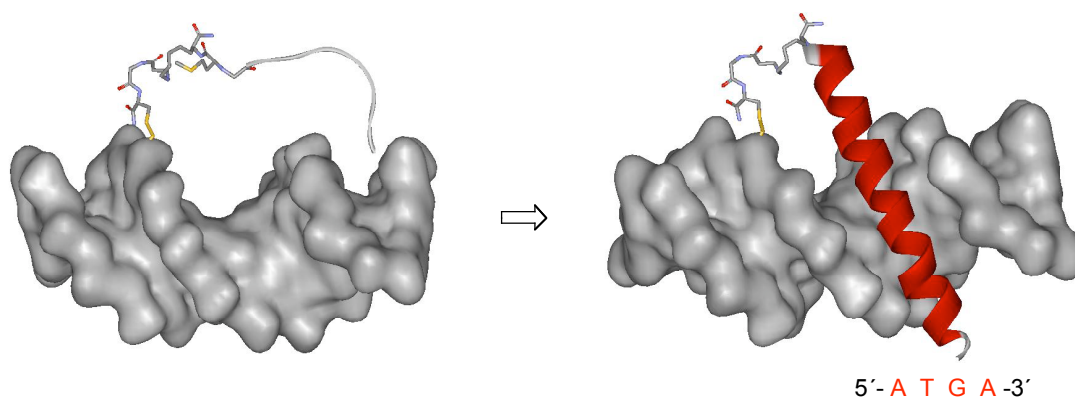


Figura 7.4 Modelo que esquematiza el proceso de reconocimiento del oligopéptido de Verdine.

Dado que la pérdida de entropía asociada a la interacción de la región básica monomérica con el ADN y a la formación de la hélice α no puede ser compensada por la ganancia entálpica de la unión, varios grupos han pensado en la posibilidad de aumentar la afinidad del reconocimiento monomérico estabilizando la estructura secundaria de hélice α .

Alanna Schepartz y su grupo insertaron los residuos de la región básica GCN4 claves para el reconocimiento del ADN en una estructura helicoidal molde como es la de la proteína **aPP**, una hélice α estabilizada mediante interacciones hidrofóbicas con una hélice de poliprolinas. Dichos aminoácidos fueron colocados en la cara de la hélice expuesta al disolvente, de manera que los residuos encargados de mantener la estructura helicoidal quedaran empaquetados con la hélice de proliprolina. De esta forma consiguieron péptidos de 42 aa capaces de interactuar con la secuencia consenso **ATGA** con afinidades altas.⁷³ Posteriormente, mediante técnicas de evolución refinaron el sistema hasta conseguir afinidades y especificidades comparables a la de la proteína natural GCN4, incluso a temperatura ambiente.⁷⁴

⁷³ Zondlo, N. J.; Schepartz, A. J. *Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6938.

⁷⁴ Chin, J. W.; Schepartz, A. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2929.

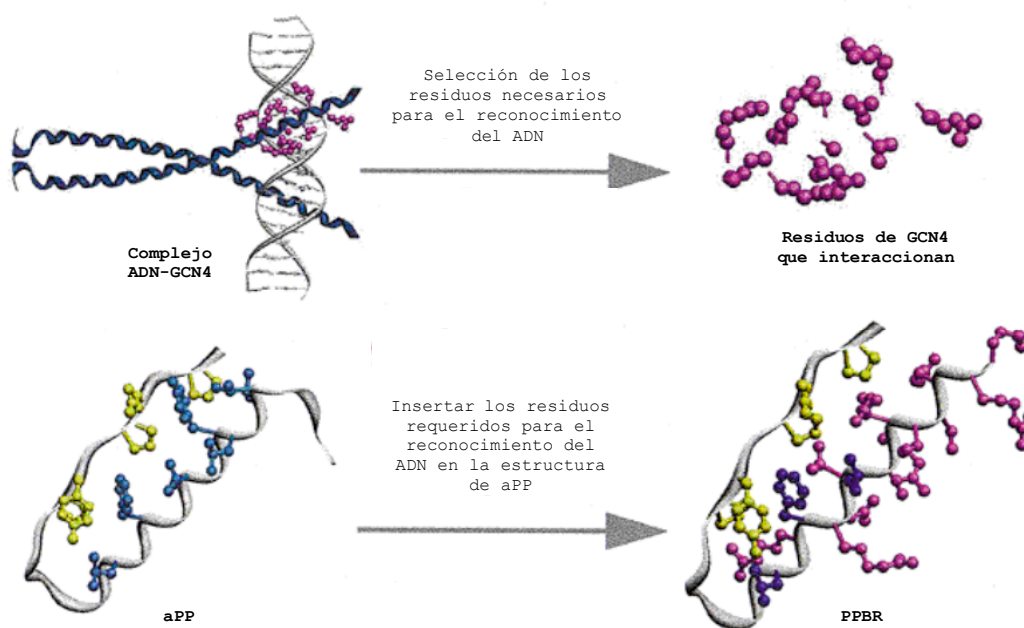


Figura 7.5 Esquema del diseño de Schepartz. El péptido (**PPBR**) de 46 aa se une a la secuencia CRE^{hs} con una constante de disociación de 1.6 nM.

Teniendo en cuenta que la Ala es el aminoácido con mayor propensidad para formar y estabilizar hélices α , Shin y sus colaboradores comprobaron que reemplazando residuos de la región básica no esenciales para el reconocimiento del ADN por alaninas se incrementaba la helicidad del péptido sin perder afinidad ni especificidad,⁷⁵ aunque en todo caso sigue siendo necesaria la dimerización.

Por otra parte el grupo de Taylor sintetizó un análogo de la región básica de GCN4 con un puente lactama en el extremo C-terminal entre las cadenas laterales de la Lys25 y el Asp29. El péptido sintetizado posee un contenido helicoidal mayor que la región básica natural $[\theta]_{222}(\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}) = -9600$ para **GCN4rb** y -17200 para el péptido **rb-C**, aunque la afinidad es solo ligeramente mayor ($K_d = 3.9 \mu\text{M}$ para **GCN4rb** y $0.65 \mu\text{M}$ para el péptido **rb-C**).⁷¹

GCN4rb: Ac-DPAALKRARNTTEAARRSRARKLQRMKQLE-NH₂

Péptido rb-C: Ac-DPAALKRARNTTEAARRSRARKLQRKAAAD-NH₂

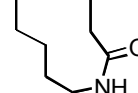


Figura 7.6 Secuencias de la **GCN4rb** y del péptido **rb-C** sintetizado por Taylor.

⁷⁵ Lajmi, A. R.; Lovrencic, M. E.; Wallace, T. R.; Thomlinson, R. R.; Shin, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5638.

⁷¹ Zhang, M.; Wu, B.; Zhao, H.; Taylor, J. W. *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 125.

7.4 Diseño de un híbrido de la región básica de GCN4 conjugado a un tripirrol

Inspirándose en el modo de interacción con el ADN de las proteínas homeodominio y teniendo en cuenta los precedentes de Verdine comentados en las páginas 32 y 33, en nuestro grupo se razonó que, aunque la región básica es incapaz de reconocer su secuencia consenso de forma aislada, si esta se une covalentemente a una molécula que se inserte en el surco menor de una secuencia vecina se podría disminuir el coste entrópico asociado a la inserción de la región básica en el surco mayor del ADN. Con el fin de comprobar la viabilidad de la estrategia se decidió conjugar la región básica del FT GCN4^{37a} (fragmento desde Asp 226 hasta Gln 248) con un tripirrol relacionado con la distamicina y comprobar si el híbrido resultante sería capaz de interactuar con el ADN con alta afinidad y especificidad.

Para realizar el diseño se utilizaron como base las estructuras de rayos X de los complejos con el ADN del GCN4 y de la distamicina (figura 7.7).

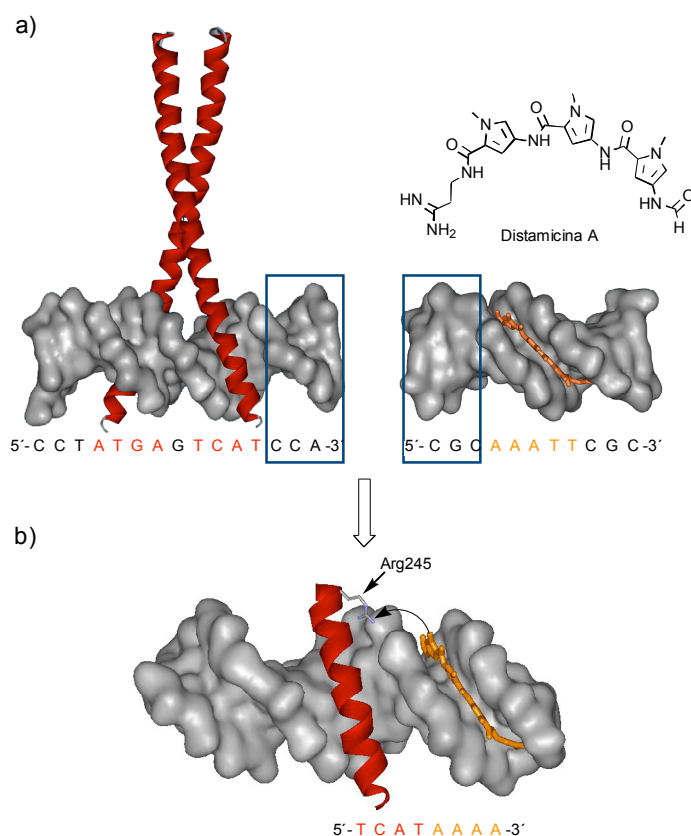


Figura 7.7 a) Estructura de los complejos del FT GCN4 (RX) y de la distamicina (RX). b) Modelo cualitativo de interacción simultánea en surcos vecinos. Con la flecha se señala el lugar de conexión: Arg245 y N del pirrol N-terminal.

^{37a} Ellenberger, T. E.; Brandl, C. J.; Struhl, K.; Harrison, S. C. *Cell* **1992**, *71*, 1223.

La inspección del modelo mostró que un aminoácido apropiado para efectuar la unión era la **Arg245**, puesto que su cadena lateral se orientaba hacia el surco menor en el cual se encuentra la distamicina. Para poder acoplar el péptido al análogo tripirrólico de la distamicina era necesario mutar esta Arg por un aminoácido con una cadena lateral más apropiada para realizar una unión covalente, como **Glu**. Como conector se eligió una cadena metilénica de suficiente longitud para acomodar simultáneamente el péptido y el tripirrol, con una amina secundaria en una posición adecuada para que pudiese establecer interacciones con los fosfatos y así contribuir a la estabilidad del complejo. De esta forma se diseñó el híbrido **A1**, que podría interactuar con el ADN según el modelo hipotético que se muestra en la siguiente figura:

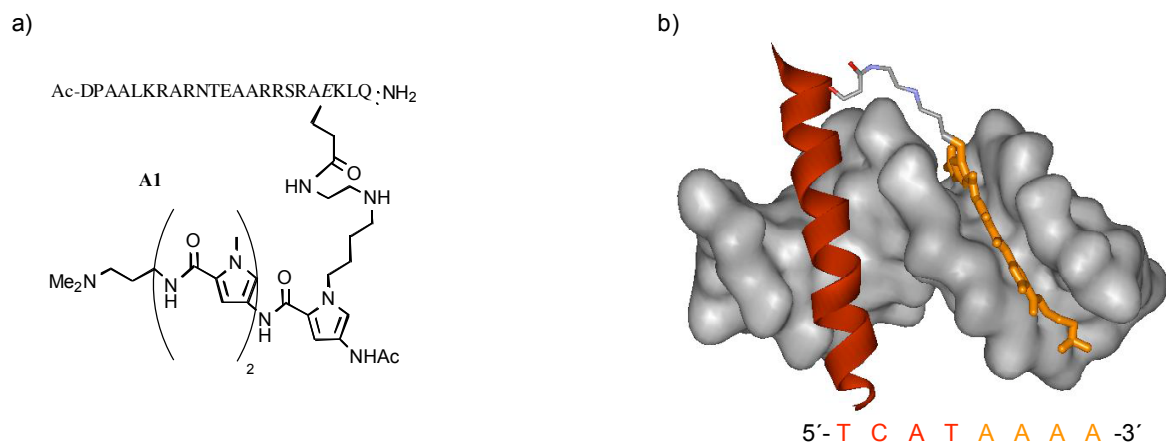


Figura 7.8 Estructura del híbrido péptido-tripirrol **A1** y modelo hipotético de interacción con el ADN.

Desafortunadamente, los resultados experimentales obtenidos utilizando técnicas de dicroísmo circular (DC) y electroforesis parecían indicar que el tripirrol era capaz de insertarse en el surco menor del ADN, pero el péptido no se plegaba en hélice α , por lo que en lugar de insertarse en el surco probablemente establecía interacciones de tipo electrostático con los fosfatos del ADN.^{76,77}

Una revisión detallada del modelo sugirió que la cadena de conexión podría ser demasiado corta impidiendo que el péptido tuviera suficiente flexibilidad para insertarse en el surco sin generar mucha tensión. Por eso se decidió alargar el conector para dejar mayor libertad

⁷⁶ Vázquez, E.; Caamano, A. M.; Castedo, L.; Gramberg, D.; Mascareñas, J. L. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 3625.

⁷⁷ Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723.

conformacional a las dos unidades de reconocimiento. Los estudios sobre el nuevo híbrido **A2** demostraron que era capaz de interactuar simultáneamente a través de los surcos mayor y menor reconociendo la secuencia 5'-**TCATAAAA**-3' de forma específica y con alta afinidad a 4°C.⁷⁷ Sin embargo, los resultados de electroforesis señalaban que aparte del complejo de unión específico (en el que el péptido está plegado como hélice α) existía una pequeña proporción de otro complejo (figura 7.9 b). Dado que los datos de DC indicaban que en este complejo secundario el péptido no estaba plegado en forma de hélice se concluyó que su estructura sería del tipo indicado en la figura 7.9 c, en la que el péptido está haciendo contactos no específicos con el ADN. La K_d calculada para el complejo específico mediante valoraciones con electroforesis de retardo en gel era del orden de 6-8 nM a 4°C.⁷⁷

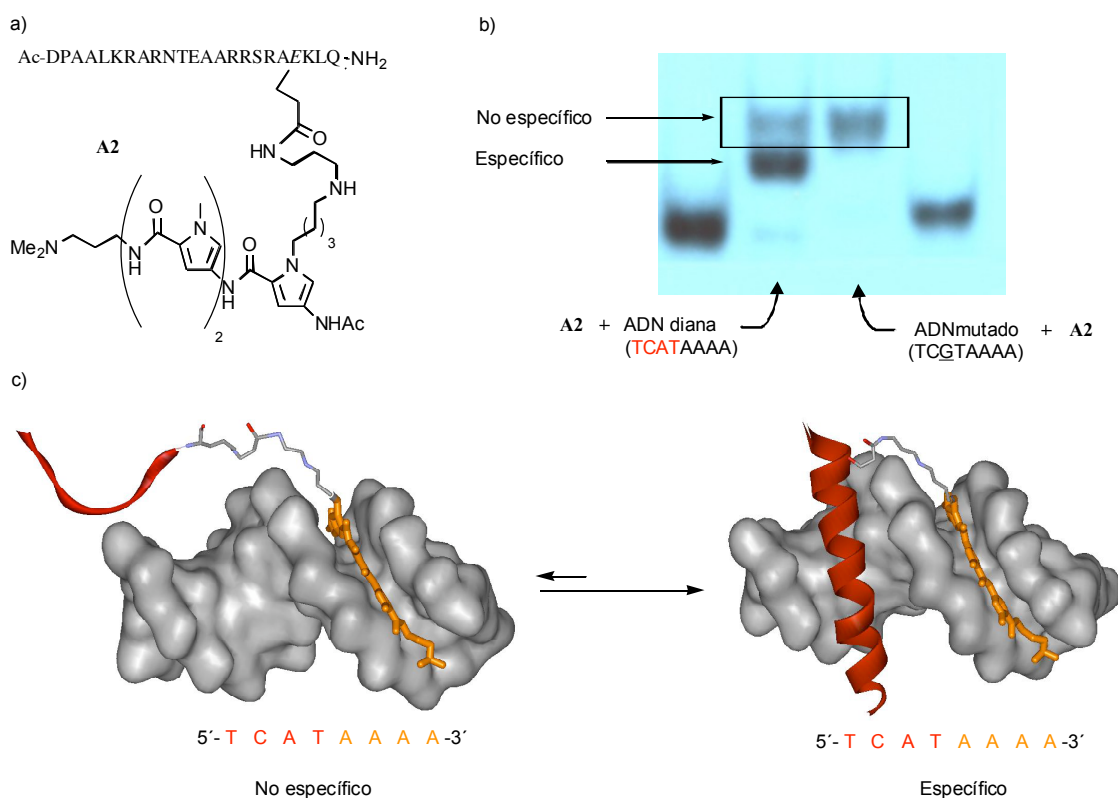


Figura 7.9 a) Estructura del híbrido **A2** y b) resultados de los experimentos de electroforesis de retardo en gel a 4°C con el ADN diana y el ADN mutado en la zona de reconocimiento del péptido. c) Modelos hipotéticos de los complejos correspondientes a las dos bandas observadas en la electroforesis.

⁷⁷ Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723.

B. OBJETIVOS GENERALES

Tal como se ha indicado en la sección anterior (página 37), los resultados obtenidos en nuestro grupo con el híbrido **A2** indican que es posible un reconocimiento simultáneo de los surcos mayor y menor a través de un péptido y un tripirrol unidos covalentemente. El éxito del diseño nos animó a indagar más en profundidad sobre las bases moleculares que rigen las interacciones entre este tipo de híbridos y el ADN, y extraer las conclusiones necesarias para diseñar nuevos híbridos con mejores afinidades y especificidades.

Por eso en esta tesis fijamos los siguientes objetivos generales:

- **Diseñar y desarrollar híbridos con mayores especificidades y afinidades.** Sobre todo, sería muy interesante encontrar un sistema que funcione bien a temperatura ambiente, puesto que esto nos daría la oportunidad de poder realizar ensayos de interferencia con los factores de transcripción naturales.
- **Elucidar la importancia de la cadena de conexión entre los módulos de reconocimiento,** para poder extraer conclusiones sobre las relaciones estructura-interacción.
- **Extender la estrategia para reconocer otras secuencias.** Incluso extendiendo el tipo de diseño a otros motivos estructurales de factores de transcripción.
- **Desarrollar versiones basadas en la unión no covalente de los módulos de reconocimiento.** Un sistema de este tipo imitaría, de manera simplificada, una de las estrategias de reconocimiento usadas por la naturaleza en la que la capacidad de una proteína para unirse al ADN depende de su interacción con otras proteínas o ligandos. La ventajas de un sistema de este tipo serían evidentes, en tanto en cuanto no solo permitiría controlar temporalmente la actuación sobre una determinada secuencia, sino que abriría las puertas para poder controlar el reconocimiento de varias secuencias genéticas mediante la combinación de un número pequeño de elementos.

C. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de híbridos en los que el tripirrol se reemplaza por un motivo AThook

1.1 Objetivo

Los experimentos de desplazamiento en gel de poliacrilamida (EMSA) del híbrido **A2** (página 37) revelaron que, además de la banda correspondiente a la interacción específica surco mayor-menor, hay una proporción menor de una banda que migra más lentamente. Los datos obtenidos utilizando secuencias mutadas de ADN y realizando estudios de dicroísmo circular sugieren que dicha banda minoritaria se debe a un modo de interacción competitivo en el cual el oligopirrol se inserta en el surco menor, pero la región básica está desordenada y establece contactos no específicos con el ADN, muy probablemente con los grupos fosfatos.⁷⁷ Se ha calculado que la interacción específica **A2** con el sitio 5'-TCAT**AAAAT**-3' se realiza con una $K_d \sim 6-8$ nM a 4°C, mientras que la afinidad por una secuencia que tiene una mutación en el sitio de unión de la región básica (5'-TCGT**AAAAT**-3') es unas 3 veces peor (~15-20 nM).⁷⁸ La alta afinidad de este último modo de interacción inespecífico no es sorprendente teniendo en cuenta los estudios realizados por Bruice y sus colaboradores concernientes a los *microgonotropenos*: derivados tripirrólicos con cadenas de N-alquil amina positivamente cargadas que muestran afinidades relativamente altas por el ADN.⁷⁹ Así pues, la especificidad del híbrido **A2** no es todo lo buena que sería deseable puesto que el sistema podrá unirse con afinidades altas a zonas del genoma que contengan secuencias ricas en AT en las que puede insertarse el tripirrol. Esto es también problemático desde el punto de vista cinético, pues en presencia de ADNs grandes la molécula podría quedar atrapada tiempos largos en regiones ricas en AT.

Una posible estrategia para tratar de aumentar la especificidad del sistema podría basarse en utilizar como elemento de reconocimiento del surco menor una molécula que tuviera menos afinidad por su secuencia diana que el sistema tripirrólico. Aunque obviamente este diseño podría conducir a conjugados con menor afinidad global, su especificidad por la

⁷⁷ Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723.

⁷⁸ Blanco, J. B.; Vázquez, M. E.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 713.

⁷⁹ Satz, A. L.; Bruice, T. C. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 86.

secuencia híbrida diana pudiera ser mayor debido a que en este caso sólo la interacción bivalente conduciría a afinidades razonables. En todo caso también sería interesante comenzar a comprobar la posibilidad de utilizar otros elementos distintos a los tripirroles análogos de la distamicina como unidades de reconocimiento del surco menor, y por eso se pensó en utilizar una secuencia "AThook" en lugar de un tripirrol.

1.2 Motivos AThook

HMG-I/Y es una proteína cromosómica no histónica que funciona como factor de transcripción y que es capaz de unirse al surco menor de secuencias ricas en A y T, aunque con afinidades no muy altas.⁸⁰ El elemento clave para el reconocimiento del surco menor es la secuencia peptídica **TPKRPRGRP**, que interacciona con el ADN con constantes de asociación entre mili y micromolar.⁸¹ HMG-I/Y tiene 3 copias de este fragmento, el cual también se encontró en otras proteínas donde el número de copias varía de 1 a 15,⁸² por ello esta secuencia se clasificó como un nuevo motivo de reconocimiento del ADN que se denominó "AThook".

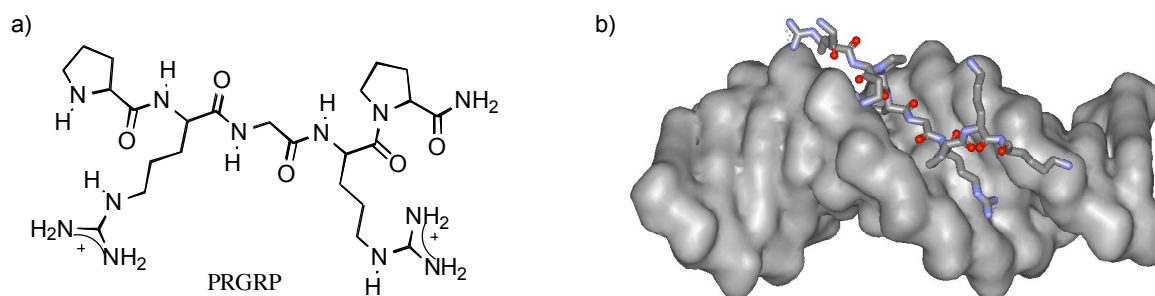


Figura 1.1 a) Estructuras del pentapéptido PRGRP. b) Estructura de RMN del complejo entre el ADN y GRKPRGRP. ⁸³

Los residuos de Pro son los responsables de mantener la estructura rígida de este dominio, mientras que el núcleo RGR (Arg-Gly-Arg) adopta una estructura extendida penetrando en el fondo del surco. Los contactos

⁸⁰ a) Baxevanis, A. D.; Landsman, D. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1604. b) Bustin, M.; Trieschmann, L.; Postnikov, Y. V. *Semin. Cell Biol.* **1995**, *6*, 247. c) Reeves, N.; Nissen, M. S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8573. d) Thanos, D.; Maniatis, T. *Cell* **1992**, *71*, 777. e) Strick, R.; Laemmli, U. K. *Cell* **1995**, *83*, 1137.

⁸¹ Geierstanger, B. H.; Volkman, B. F.; Kremer, W.; Wemmer, D. E. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5347.

⁸² Aranvid, L.; Landsman, D. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4413.

⁸³ Huth, J. R., Bewley, C. A., Nissen, M. S., Evans, J. N., Reeves, R., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 657.

⁸⁴ Rastinejad, F.; Perlmann, T.; Evans, R. M.; Sigler, P.B. *Nature* **1995**, *375*, 203.

establecidos por los grupos guanidinio de las Arg determinan la especificidad por secuencias ricas en A y T, habiéndose observado que la mutación de las Arg por Lys conlleva la pérdida de afinidad y especificidad.

Este modo de unión de alguna forma mimetiza la interacción de la netropsina, con las cadenas laterales de las argininas actuando de modo similar a los grupos guanidinio y amidinio de dicho dipirrol.⁸¹

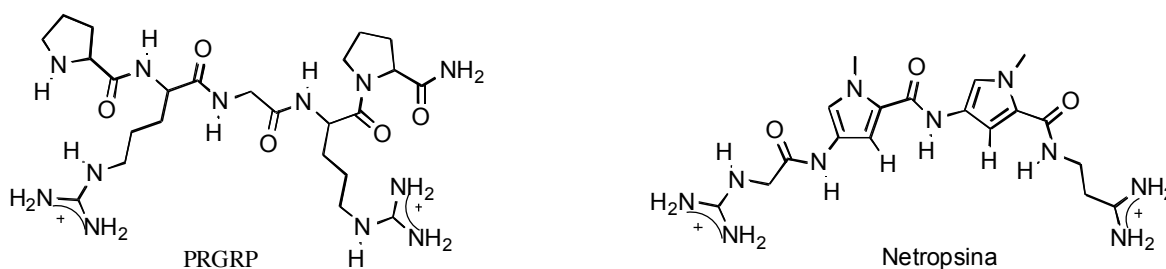


Figura 1.2 Comparación de las estructuras de la Netropsina y PRGRP.

1.3 Diseño y planteamiento sintético

Nuestro objetivo se centró en un híbrido entre la región básica del GCN4 y la secuencia "ATHook". Para ello, tomamos como referencia las estructuras de rayos X de los complejos GCN4-ADN³⁷ y de RMN de la secuencia de GRKPRGRPCK unida a ADN,⁸³ y construimos un modelo de interacción simultáneo con la región básica de GCN4 y el motivo ATHook situados en secuencias contiguas. La inspección de este modelo cualitativo sugería que, como en el caso del híbrido **A2**, la Arg245⁸⁴ podría ser adecuada para realizar la conexión. Igualmente, para poder efectuar la conexión covalente decidimos mutar esta Arg por un residuo de Glu.

³⁷ a) Ellenberger, T. E.; Brandl, C. J.; Struhl, K.; Harrison, S. C. *Cell* **1992**, *71*, 1223. b) Köning, P.; Richmond, T. J. *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 139.

⁸³ Huth, J. R., Bewley, C. A., Nissen, M. S., Evans, J. N., Reeves, R., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 657.

⁸⁴ En los péptidos sintetizados a lo largo de la tesis se conservará esta numeración de la proteína natural (GCN4) para sus fragmentos peptídicos.

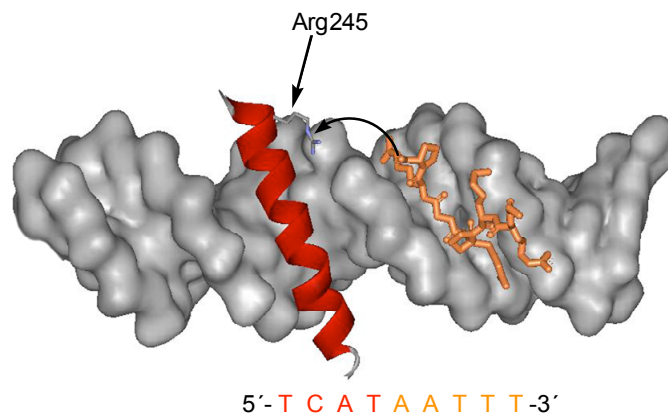


Figura 1.3 Modelo cualitativo de interacción surco mayor-surco menor de la región básica del GCN4 y el motivo AThook.

Se escogió la misma secuencia de la región básica de GCN4 que la que se utilizó en el híbrido **A2**. Como secuencia "Ahook" elegimos PRGRPCK, que es la secuencia mínima del motivo que interacciona específicamente con d(5'-AATT-3').⁸¹ Para conectar ambas unidades pensamos en utilizar varias glicinas, e introducir algún tipo de contacto adicional con los fosfatos, bien por enlace de hidrógeno o por puente salino. Por eso, diseñamos dos secuencias: GGSPRGRPCK (**GS**) y GGRPRGRPCK (**R**), en las que los grupos GG del extremo N-terminal de la secuencia debieran servir como cadena de conexión. La Ser y Arg subrayadas podrían permitir el establecimiento de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas con los fosfatos y, de esta forma, facilitar la interacción. Los dos péptidos se diferencian, además, en la longitud del conector (**GS** es más largo que **R** pues posee una G adicional). En principio, los dos diseños se ajustan bien al modelo, pero un conector ligeramente más largo permitiría una mayor relajación de las dos unidades peptídicas (región básica del GCN4 y Ahook) en sus respectivas secuencias de unión. Los híbridos concretos que se fijaron como objetivo sintético son, por lo tanto, **A3** y **A4**:

⁸¹ Geierstanger, B. H.; Volkman, B. F.; Kremer, W.; Wemmer, D. E. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5347.

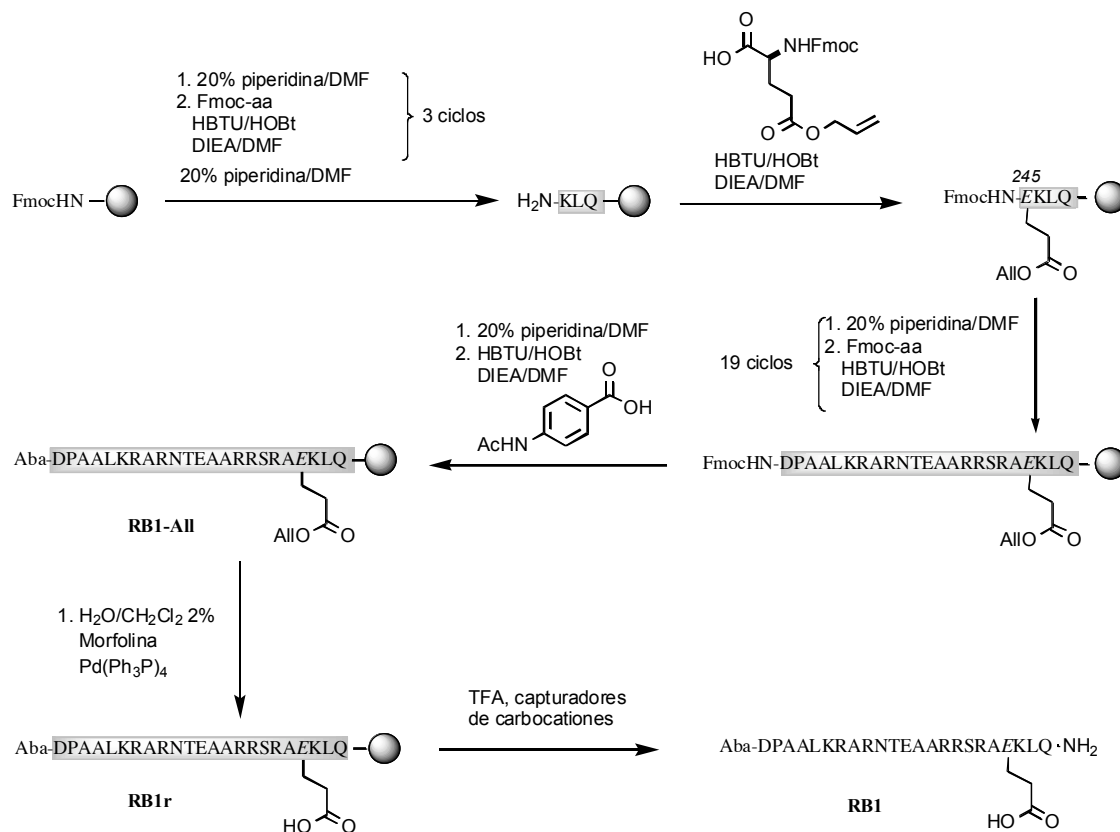


Figura 1.4 Detalle del proceso seguido para la síntesis de **RB1**.⁸⁵

En el extremo N-terminal se acopló el grupo Aba, un cromóforo de coeficiente de extinción conocido ($\epsilon_{270\text{ nm}} = 18069\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El ácido del Glu245 se desprotegió con Pd(Ph₃P)₄ en CH₂Cl₂ conteniendo un 2% de H₂O y utilizando morfolina como base.⁸⁶ La desprotección y rotura de una alícuota de resina permitió confirmar la identidad del péptido **RB1** (masas, MALDI-TOF: calcd. 2768.5, encontrada 2768.5).

Los péptidos AThook **GS-Alloc** y **R-Alloc** se sintetizaron de manera análoga al fragmento **RB1** (figura 1.5). La desprotección de las cadenas laterales (excepto las de las Lys), rotura del soporte sólido y purificación por HPLC de los compuestos correspondientes a los picos mayoritarios permitió obtener los péptidos deseados, confirmándose su identidad por espectrometría de masas (ESI-TOF, **GS-Alloc**: calcd. 1262.7, encontrada 1263, **R-Alloc**: calcd. 1274.7, encontrada 1275) con rendimientos del 80 y 70%, respectivamente.

⁸⁵ El sombreado sobre la secuencia del péptido indica que las cadenas laterales de los aa están protegidas. Este tipo de marca se utilizará a lo largo de la tesis.

⁸⁶ Lloyd-Williams, P.; Jou, G.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4207.

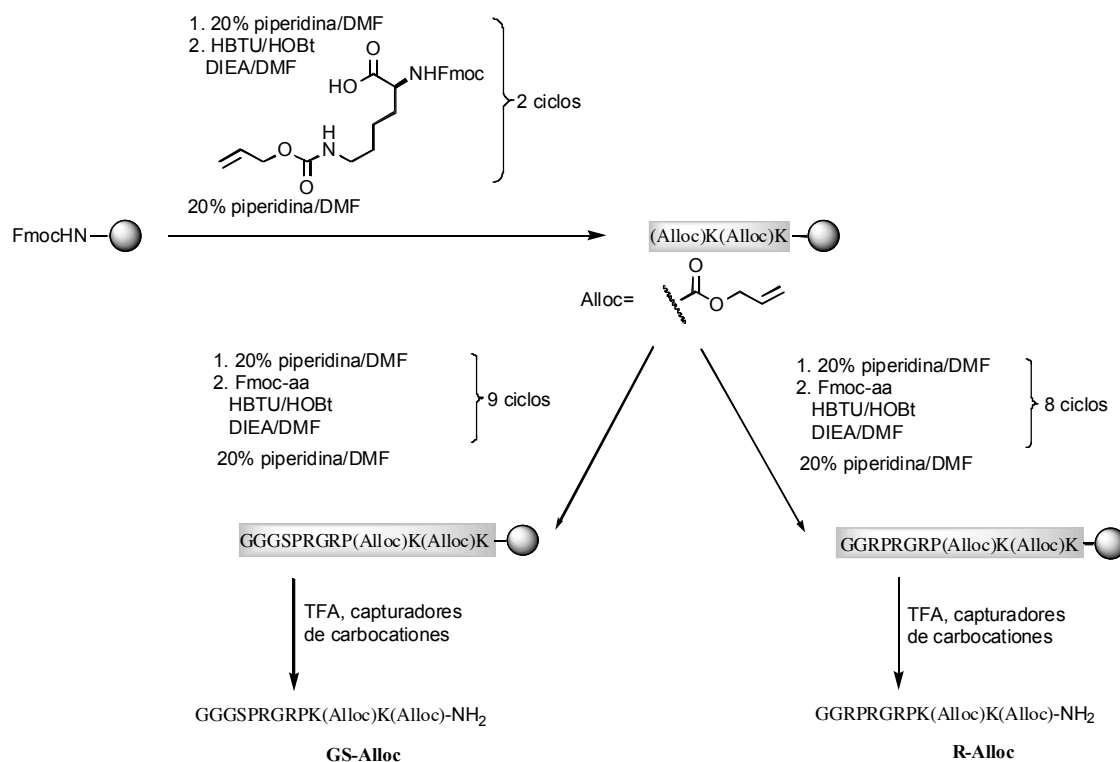
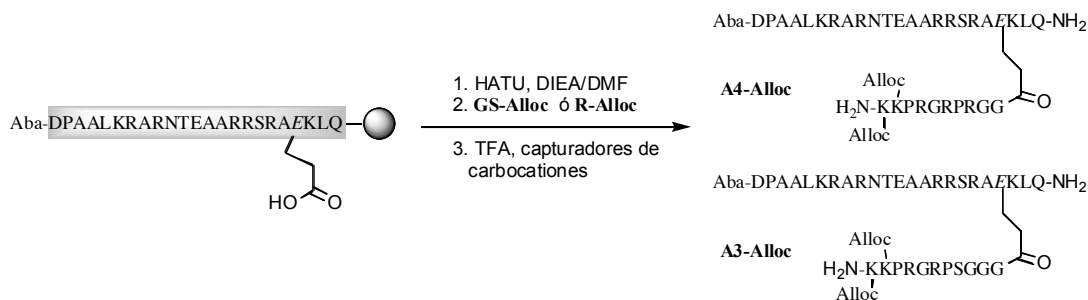


Figura 1.5 Esquema de la síntesis de **GS-Alloc** y **R-Alloc**. Es conveniente destacar que el grupo NH₂ indicado en el extremo C-terminal es de una amida $-(CO)NH_2$.

Para realizar el acoplamiento entre **RB1** y los fragmentos semiprottegidos de los péptidos AThook se activó el ácido de Glu245 del péptido unido a la resina **RB1r** durante 5 min con HATU, utilizando DIEA como base (ensayos hechos en la síntesis de **A2** con otros agentes de acoplamiento condujeron a peores rendimientos) y DMF como disolvente y, a continuación, se adicionó bien **GS-Alloc** o **R-Alloc** (4 equiv, esquema 1.2).

Una vez desprotegidas las cadenas laterales se realizó la separación del soporte sólido en condiciones estándar (TFA, PhOH, tioanisol, etanoditiol, H₂O). La identidad de los compuestos obtenidos una vez purificados por HPLC se confirmó por espectrometría de masas (ESI-TOF), correspondiendo a los productos de acoplamiento **A3-Alloc** y **A4-Alloc**, que se aislaron con rendimientos aproximados del 36 y 31%, respectivamente (en estos rendimientos se incluye el proceso de síntesis peptídica de **RB1**, el acoplamiento y la rotura de la resina).



Esquema 1.2

La desprotección de las aminas de las Lys se realizó con Pd(Ph₃P)₄ y morfolina, empleando DMSO y THF como disolventes. Ambas reacciones son limpias y transcurren con buenos rendimientos (88% para **A3** y 76% para **A4**), identificándose ambos péptidos por espectrometría de masas (**A3**, ESI-TOF, calcd. 3846.2, encontrada 3845; **A4**, MALDI-TOF: calcd. 3858.2, encontrada 3857.1).

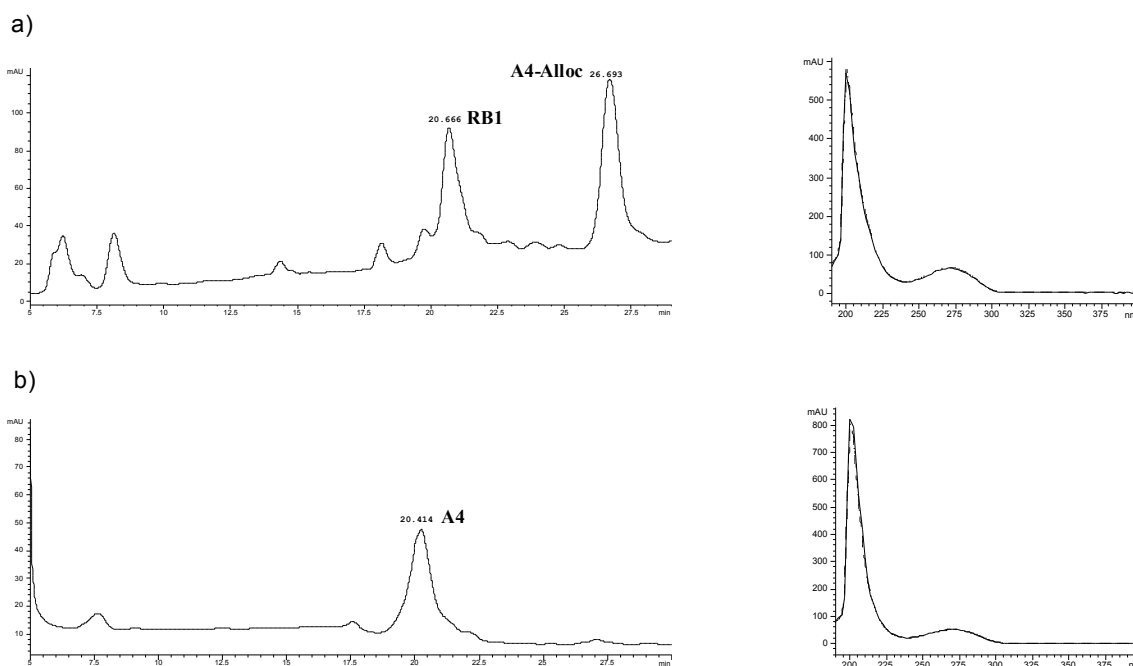


Figura 1.6 Cromatogramas de HPLC de los crudos de reacción obtenidos en la síntesis de **A4-Alloc** (a) y **A4** (b). A la derecha se representan los espectros de UV de los compuestos correspondientes a los picos mayoritarios. Las condiciones de inyección de HPLC son: gradiente lineal 10->35% B en 1/2 h (A: TFA/H₂O 0.1%, B: TFA/CH₃CN 0.1%).⁸⁷

La estrategia seguida: acoplamiento, rotura y eliminación de los alloc resultó ser la más conveniente, entre otras cosas porque, como puede apreciarse en los cromatogramas, los híbridos poseen un t_R muy similar al

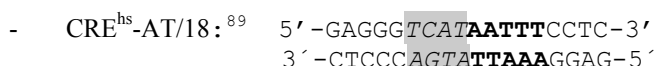
⁸⁷ Los eluyentes A y B son siempre los mismos a lo largo de la tesis.

de **RB1**, con lo cual hubiese sido muy difícil separarlos si la desprotección de las aminas de las Lys se hubiera hecho en fase sólida.

1.5 Evaluación de las interacciones de A3 y A4 con ADN

Como se ha comentado en la sección 5.2 de la introducción, la región básica de los motivos bZIP carece de estructura secundaria helicoidal en ausencia de su secuencia diana.³⁸ Por lo tanto, el dicroísmo circular (DC) es una técnica útil para seguir los cambios conformacionales que se producen en estas proteínas ya que nos da idea del aumento de helicidad, detectable en el incremento de la intensidad de la señal a 222 nm y que se produce debido al plegamiento asociado a la interacción específica con el ADN. Aunque un aumento de la helicidad no se correlaciona necesariamente con una mayor afinidad, sin embargo, una interacción específica requiere la inducción de una considerable proporción de una estructura en forma de hélice α . No obstante, para cualquier interacción que pueda considerarse específica y que ocurra con afinidades superiores a 10^7 M^{-1} se necesitará el empleo de otras técnicas más sensibles para poder determinar datos termodinámicos, como la fluorescencia o la electroforesis.

Para el estudio de las interacciones entre **A3** y **A4** y su secuencia consenso se emplearon oligonucleótidos de doble cadena de 18 pares de bases.⁸⁸ La secuencia escogida tiene los sitios de unión de la región básica y AThook contiguos. El lugar de unión de **RB1** aparece en cursiva y el del "AThook" en negrita:



En primer lugar, se registraron los espectros DC de los péptidos y del ADN por separado en una disolución de pH= 7.5 (10 mM tampón fosfato, 100 mM de NaCl) a 4°C y a una concentración 5 μM de cada molécula. Posteriormente, se mezcló cada péptido con el ADN durante 5 min en las mismas condiciones y se registró el espectro. Los espectros obtenidos

³⁸ a) Weiss, M. A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8020. b) O'Neil, K. T.; Hoess, R. H.; Degrado, W. F. *Science* **1990**, *249*, 774.

⁸⁸ Los oligonucleótidos de doble cadena se prepararon calentando a 90°C cantidades equimoleculares de cada una de las hebras y dejando enfriar lentamente la mezcla hasta alcanzar temperatura ambiente.

⁸⁹ La nomenclatura de los ADNs se refiere a: CRE^{hs} es la media secuencia de reconocimiento de la región básica de GCN4 y AT hace referencia a la secuencia de reconocimiento del motivo AThook. El número indica la longitud de cada hebra.

están representados en unidades de *mre* (elipticidad molar por residuo), es decir, están normalizados (se dividió entre la concentración final de péptido y entre el número total de residuos de la región básica: 23, que son los que contribuyen a la hélice α).

En los espectros de mezclas péptido+ADN que se representan en las figuras, a lo largo de toda la tesis, se ha sustraído la contribución del ADN, o sea, son el resultado de restar los espectros péptido+ADN menos el espectro del ADN (salvo que se indique lo contrario).

En la figura 1.7 b se representan los espectros de DC de **A4**:

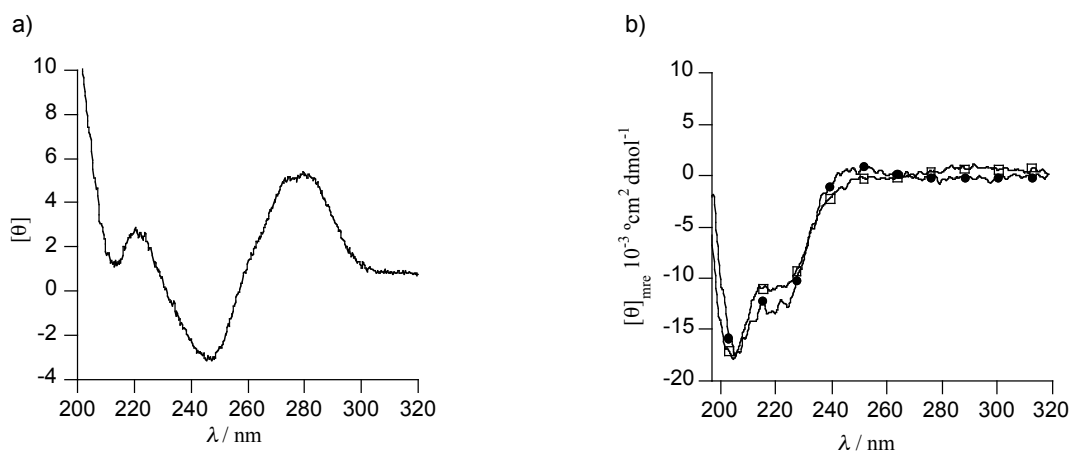


Figura 1.7 a) Espectro de DC del oligonucleótido de doble cadena CRE^{hs}-AT/18. Se observan claramente los máximos a 222 y 275 nm y el mínimo a 247 nm típicos de un ADN en forma B. Espectros de DC del **A4** en presencia o ausencia de ADN de doble cadena: en ausencia de ADN (\square), en presencia de CRE^{hs}-AT/18 (\bullet).

El espectro de DC de **A4** es el típico de una estructura poco ordenada: mínimos en torno a 208 y 222 nm y una $\theta_{mre} \sim -10000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ a 222 nm lo que nos indica una proporción baja de hélice.⁹⁰ El espectro de la mezcla **A4**+CRE^{hs}-AT/18 presenta la misma forma, no existiendo una variación significativa de la intensidad de la señal a 222 nm, lo que indica claramente que no existe una interacción específica entre nuestro péptido con el ADN. Hay que reseñar que la adición del péptido control en el cual tenemos el grupo Aba en lugar de la secuencia AThook en el Glu245, a una secuencia CRE^{hs} no genera ninguna variación en la zona del espectro a 222

⁹⁰ La proporción de hélice α es, aproximadamente, del 40% según la ecuación deducida por Chau et al. que permite calcular el contenido de hélice α según los valores de *mre* a 222 nm: Chen, Y. -H.; Yang, J. T.; Chau, K. H.; *Biochemistry* **1974**, *13*, 3350.

nm, lo que confirma que no existe una interacción específica, como es de esperar.⁷⁷

El estudio de la interacción de **A3** con el CRE^{hs}-AT/18 arrojó el mismo resultado que con **A4**, tal como se puede apreciar en los espectros de DC de la figura 1.8. Simplemente, podemos señalar que **A3** solo y cuando está en presencia del CRE^{hs}-AT/18 es ligeramente más helicoidal que **A4** pero, sin embargo, la variación de la señal a 222 nm cuando se registra el espectro en presencia de ADN es insignificante, similar al caso de **A3**.

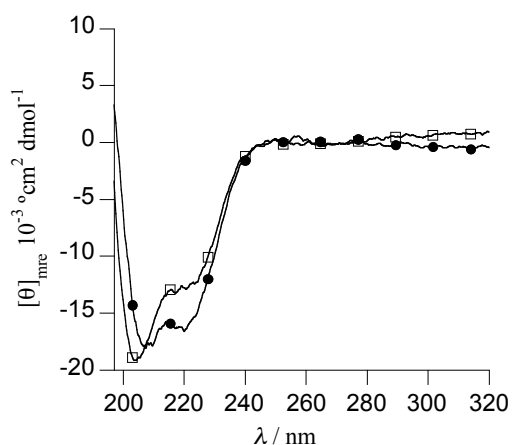


Figura 1.8 Espectros de DC de **A3** en ausencia de ADN (□) y en presencia de CRE^{hs}-AT/18 (●).

1.6 Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en los experimentos de DC se puede decir que ninguno de los dos híbridos interacciona de forma específica con la secuencia consenso de ADN 5'-**TCATAATTT**-3'. Quizás la raíz del problema resida en que la cadena de conexión entre los dos módulos de unión al ADN no sea la más adecuada. En base a la estructura del conector del híbrido **A2** podría pensarse que la presencia de un grupo amino en dicho conector sería importante, pues facilitaría el cruce del surco. De todas formas tampoco se puede descartar que la razón por la que no se observa la interacción esté relacionada con la baja la afinidad del motivo AThook por su secuencia (K_a entre micro y milimolar) que no permite compensar la pérdida de entropía que se produce cuando la región básica se pliega e interacciona con su secuencia diana.

⁷⁷ Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723.

Con el fin de confirmar o descartar la primera posibilidad, nuestros esfuerzos presentes en este tema se centran en preparar este tipo de híbridos region básica-AThook utilizando un conector exactamente igual al usado en el híbrido con el tripirrol, de tal forma que la única diferencia entre los conjugados resida en la unidad responsable de la interacción en el surco menor.

2. Alargamiento de la cadena de conexión en híbridos péptido-tripirrol. Desarrollo de conjugados más eficientes

2.1 Objetivo

Los resultados obtenidos con los híbridos **A3** y **A4** no fueron los esperados, y aunque habría posibilidades de seguir investigando alternativas relacionadas, preferimos centrar nuestros esfuerzos en la investigación de nuevos conjugados péptido-oligopirrol, tratando de mejorar el diseño para conseguir mejores afinidades y especificidades, y reducir la proporción del modo de complejación inespecífico que se observaba en el caso del híbrido **A2**.

2.2 Diseño y planteamiento

El cambio observado en los modos de interacción con el ADN del híbrido **A2** en relación con su predecesor **A1**, causado por un ligero alargamiento de la cadena de conexión (véanse páginas 36 y 37), es un indicación de la importancia de tener conectores suficientemente largos para evitar la introducción de tensiones desestabilizantes cuando ambos módulos se unen a sus respectivos sitios en la secuencia híbrida. Sin embargo, los conectores demasiado largos y flexibles pueden también contribuir desfavorablemente debido al aumento consiguiente del coste entrópico del proceso. Por lo tanto, tratando de optimizar nuestro diseño, decidimos alargar ligeramente el conector presente en **A2** añadiendo una glicina, que representa un incremento en la longitud de $\sim 2.5-3$ Å. Por ello, nuestro objetivo sería el híbrido **A5**, cuyo modelo hipotético de interacción con el ADN se indica en la figura 2.1 b:

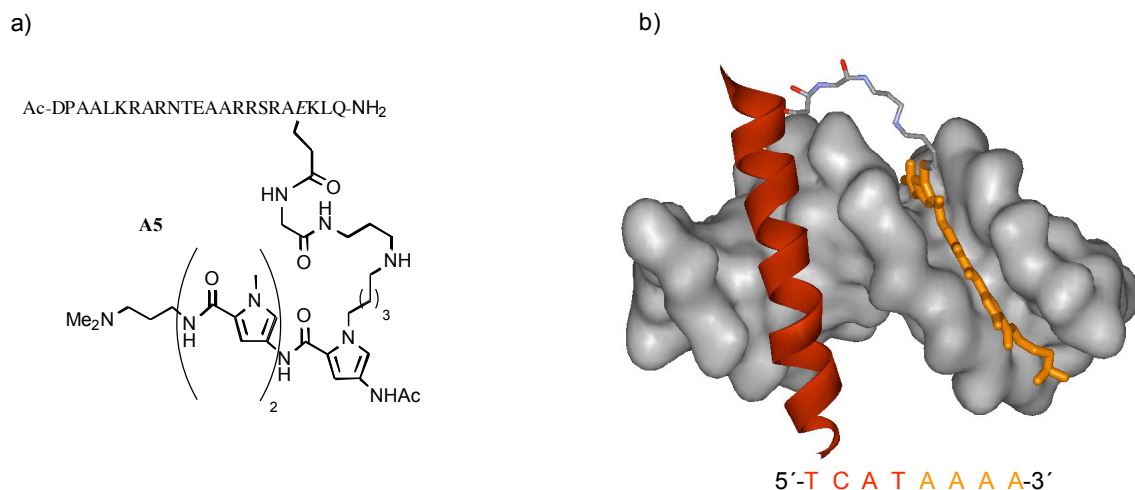
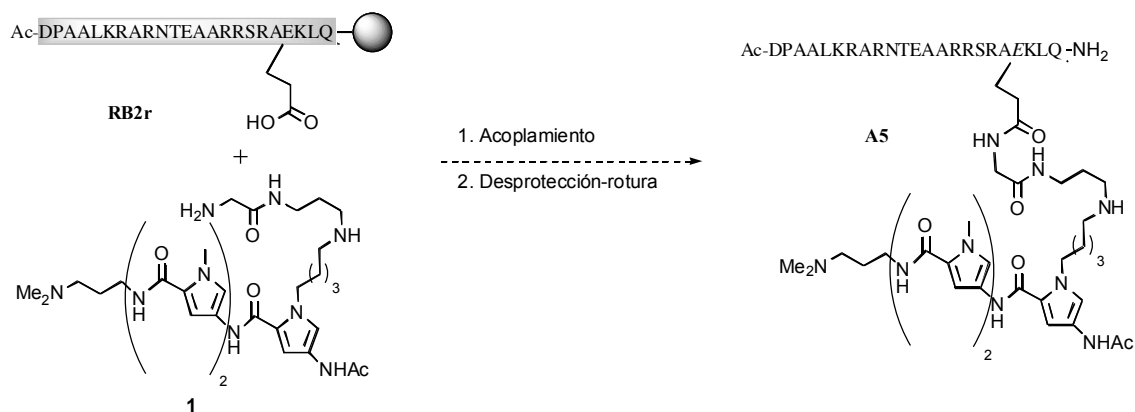


Figura 2.1 a) Estructura molecular de **A5**. b) Modelo cualitativo e hipotético de interacción entre **A5** y su secuencia de reconocimiento.

La síntesis de **A5** se llevaría a cabo de manera análoga a la utilizada para preparar el híbrido **A2**: acoplamiento del fragmento tripirrólico requerido (**1**) con el fragmento peptídico de la región básica anclado a la resina y desprotegido selectivamente en el Glu245 (**RB2r**).^{76,77} La posterior separación del producto de acoplamiento del soporte sólido nos permitiría obtener el híbrido deseado (esquema 2.1).



Esquema 2.1

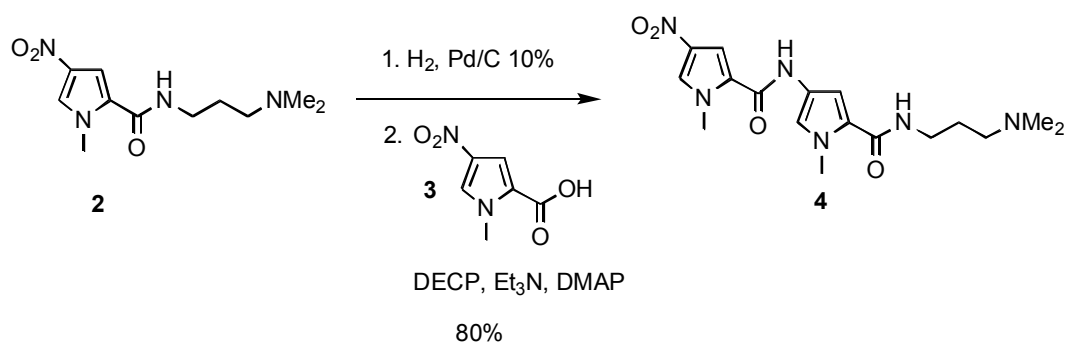
2.3 Síntesis del híbrido **A5**

La síntesis del aminotripirrol **1** se realizó empleando la metodología descrita previamente en el grupo y que consiste en el acoplamiento

⁷⁶ Vázquez, E.; Caamano, A. M.; Castedo, L.; Gramberg, D.; Mascareñas, J. L. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 3625.

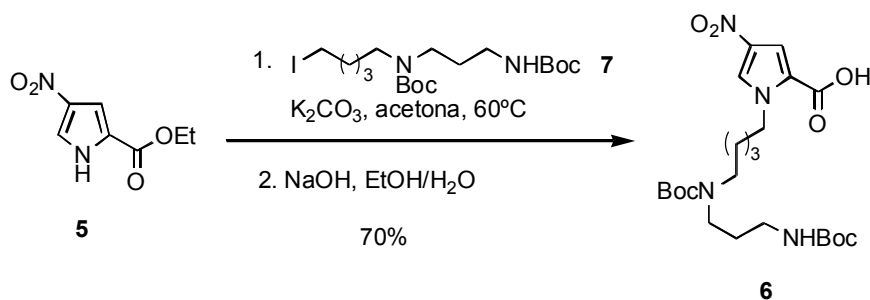
⁷⁷ Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723.

secuencial de cada uno de los pirroles que componen el fragmento tripirrólico. La reducción mediante hidrogenación catalítica del grupo nitro del pirrol en el compuesto **2** dio lugar a la correspondiente amina,⁹¹ que es inestable al aire, por lo que se utilizó directamente (sin purificar) en la etapa de acoplamiento con el ácido **3** previamente activado con DECP, obteniéndose de esta manera el dipirrol **4** con un rendimiento del 80%.⁹²



Esquema 2.2

El dipirrol **4** debe acoplarse con el pirrol ácido **6**, cuya síntesis detallamos a continuación. El éster pirrólico **5**⁹³ se alquiló con el yoduro **7** en acetona a reflujo utilizando K₂CO₃ como base. La reacción transcurre con un rendimiento del 75%. Este derivado alquilado se hidrolizó con NaOH en medio etanólico-acuoso para dar el ácido deseado **6** con un rendimiento del 94%.



Esquema 2.3

El yoduro **7** se sintetizó en 5 pasos a partir del 5-aminopentanol. La adición de acrilonitrilo sobre 5-aminopentanol⁹⁴ y posterior protección de la amina secundaria con Boc₂O permitió obtener con elevado rendimiento el compuesto **8** que se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación.

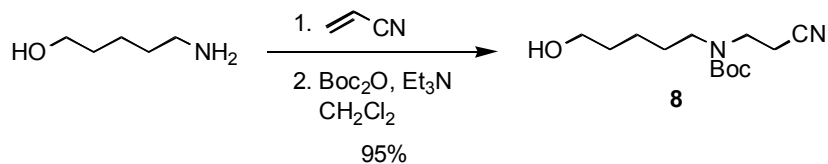
⁹¹ a) Bruice, T. C.; Mei, H.; He, G.; Lopez, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *82*, 1700.

b) Xue, T.; Browne, K. A.; Bruice, T. C. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 82.

⁹² Nishiwaki, E.; Shigeaki, T.; Hideaki, L.; Shibuya, M. *Heterocycles* **1988**, *27*, 1945.

⁹³ Huang, L.; Quada, J. C.; Lown, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9892.

⁹⁴ Carretero, J. C.; Arrayás, R. G. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2993.



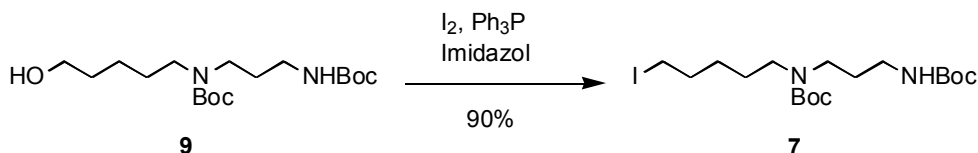
Esquema 2.4

La reducción de nitrilos a aminas es bien conocida y se pueden emplear diferentes métodos. En este caso, elegimos la reducción en presencia de LiBH_4 y TMSCl en THF,⁹⁵ más rápida que la hidrogenación catalítica, aunque con este último método quizás se podría reducir y proteger la amina en una única etapa. El residuo obtenido de la elaboración en medio básico (KOH) se redisolvió en CH_2Cl_2 y trató con Boc_2O utilizando Et_3N como base. El producto resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose el alcohol deseado **9** con un rendimiento del 76% para las 2 etapas.



Esquema 2.5

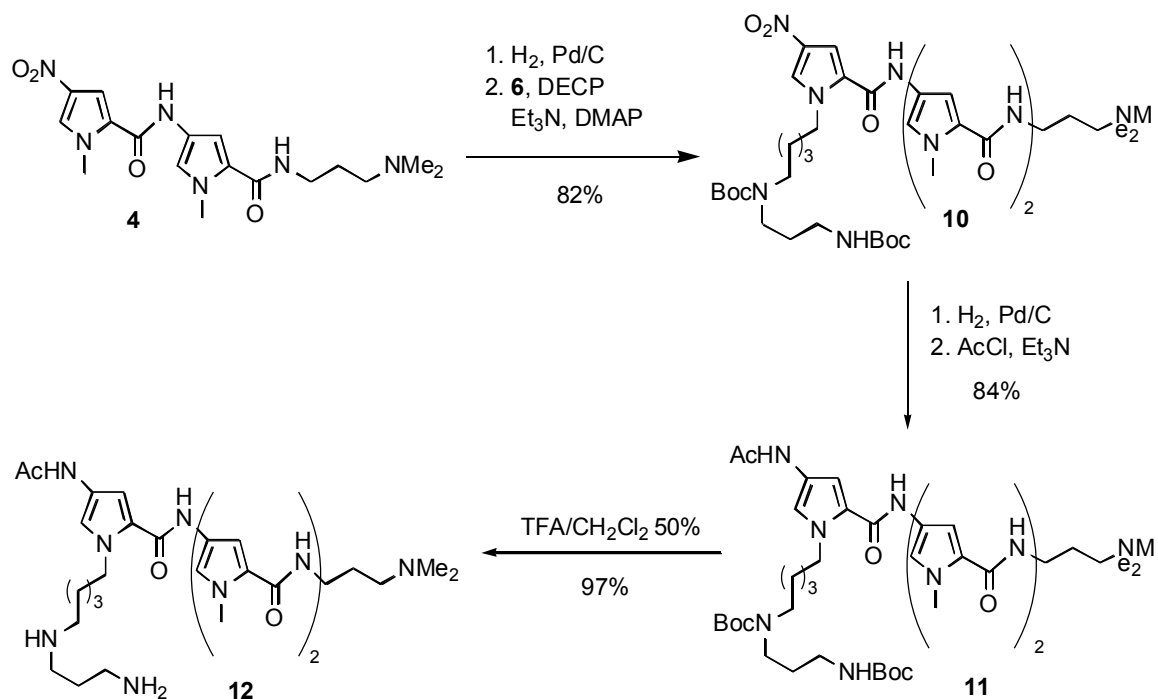
Finalmente, el alcohol **9** se transformó en el yoduro **7** deseado por tratamiento con I_2 en condiciones de Mitsunobu.



Esquema 2.6

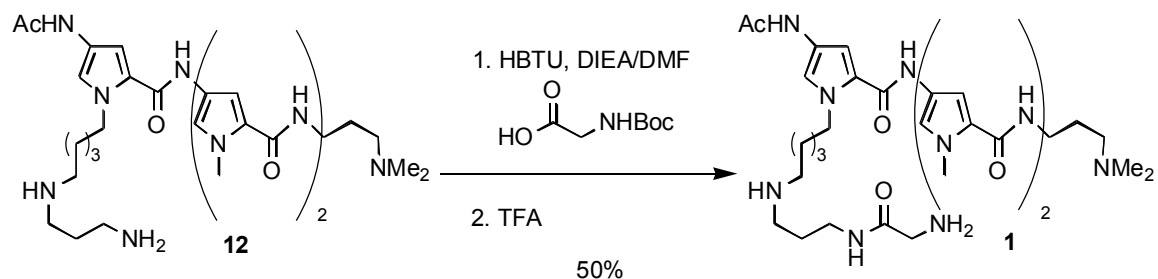
Para la construcción del sistema tripirrólico el dipirrol **4** se hidrogenó catalíticamente y la amina resultante se condensó con el ácido **6** en las mismas condiciones que las empleadas para la obtención del dipirrol, obteniéndose el nitrotripirrol **10** con un rendimiento del 82%. El nitrotripirrol **10** se hidrogenó y, finalmente, se acetiló con AcCl para dar el tripirrol acetilado **11**, que por tratamiento con $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ al 50% condujo al aminotripirrol esperado **12** con un rendimiento del 81% para las 2 etapas, confirmándose su identidad por RMN y masas (FAB+: calcd. 638.40, encontrada 638.4).

⁹⁵ Giannis, A.; Sandhoff, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 218.



Esquema 2.7

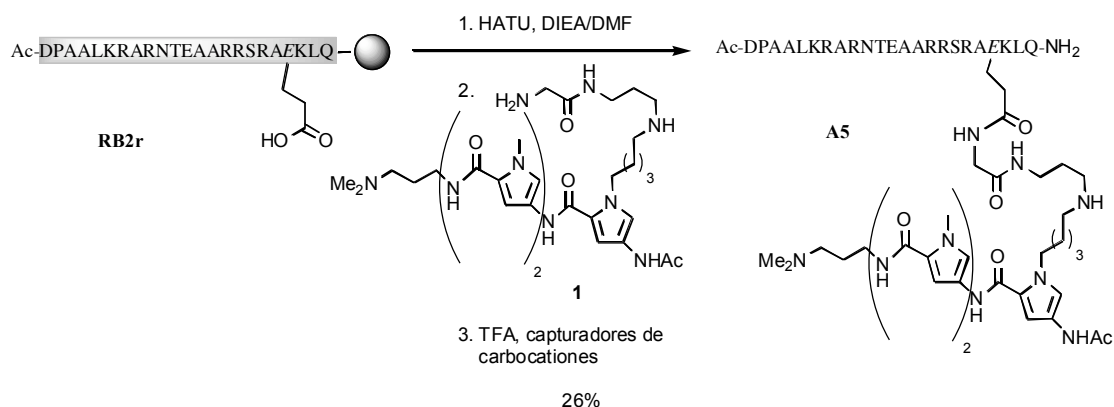
Finalmente, el tratamiento en una disolución en DMF de la amina tripirrólica **12** con una disolución de Boc-Gly, previamente activada con HBTU, y posterior eliminación del grupo Boc con TFA condujo a la amina deseada **1** con un rendimiento del 50%.



Esquema 2.8

La condensación entre **RB2r**⁹⁶ y el tripirrol **1** (4 equiv) se efectuó empleando HATU como agente activante (4 equiv), ya que el uso de otros agentes conduce a peores rendimientos del producto de acoplamiento. La reacción se siguió mediante la inyección de alícuotas en HPLC, observándose que se completaba después de agitar la suspensión, en atmósfera de Ar, durante 2 horas.

⁹⁶ **RB2r** es igual **RB1r** pero con acetilo en vez de Aba en el extremo N-terminal.



El análisis por HPLC del crudo de desprotección mostró la aparición de un pico mayoritario cuyo espectro de UV presenta las bandas características del tripirrol a 235 y 304 nm. La purificación del compuesto correspondiente a este pico y su análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF: calcd. 3326.9, encontrada 3326.6) confirmó su identidad como el híbrido deseado **A5**. El rendimiento global, considerando también la síntesis del péptido, fue de un 26%, lo cual es aceptable teniendo en cuenta que estamos acoplado una molécula relativamente grande a un ácido en fase sólida.

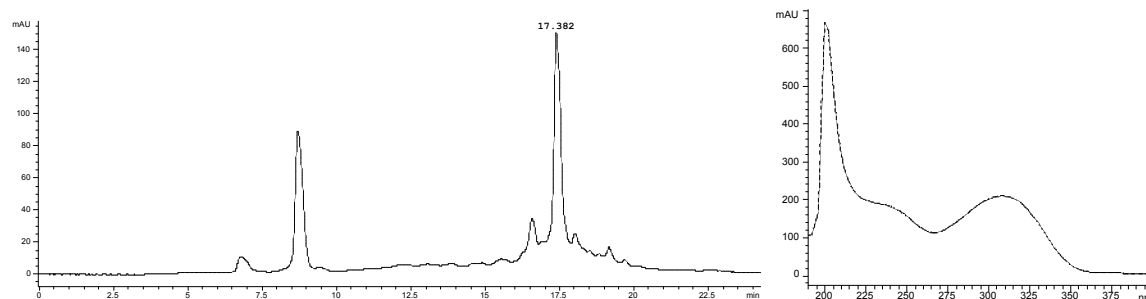
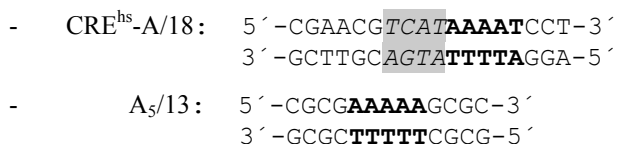


Figura 2.2 Cromatograma de HPLC del crudo de la reacción de acoplamiento y después de la desprotección; espectro de UV correspondiente al pico del producto **A5** a 17.4 min. Destaca la banda a 304 nm debido a la absorción del tripirrol. HPLC: gradiente lineal 10→35% B en 1/2 h.

2.4 Evaluación de la interacción de **A5** con distintos ADNs. Comparación con el híbrido **A2**

Una vez sintetizado el híbrido **A5** se procedió a estudiar su comportamiento frente a diferentes ADNs. Sin embargo, antes también se realizó un breve estudio mediante dicroísmo circular de las propiedades de reconocimiento del tripirrol **1**. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos de doble cadena CRE^{hs}-A/18 y A₅/13. CRE^{hs}-A/18 es la

secuencia diana que contiene los sitios de unión para el péptido y el tripirrol en posiciones adyacentes. Contiene 7 pares de bases consecutivos de A o T, lo que podría favorecer la formación de complejos tripirrol:ADN de estequiometría mayor que 1 en presencia de concentraciones relativamente altas de la molécula. A₅/13 es un ADN de doble cadena que posee 5 A consecutivas, lo que en teoría favorece la formación de complejos 1:1 tripirrol:ADN.



Cuando se registraron los espectros del ADN CRE^{hs}-A/18 con cantidades crecientes del tripirrol **1** a 20°C se obtuvieron los resultados que aparecen reflejados en la figura 2.3. Lo más destacable, es la aparición de una banda a 330 nm debido a la inserción del tripirrol en el ADN.⁵⁵ Los datos son consistentes con que cuando la relación [1]/[CRE^{hs}-A/18] es menor que 1, la estequiometría sea 1:1 y pase a ser 2:1 cuando la relación [1]/[CRE^{hs}-A/18] es mayor que 1, e incluso se puedan formar complejos de mayor estequiometría, ya que esta secuencia posee varios sitios de unión para el tripirrol. Prueba de ello es que no existe un punto isobéptico por el cual pasen todos los espectros, y que incluso a concentraciones de tripirrol de 32 µM no se alcanza la saturación.

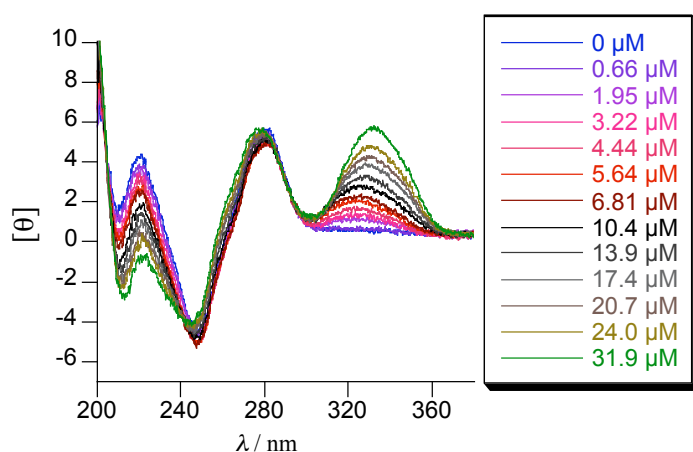


Figura 2.3 Espectros de la mezcla **1**+CRE^{hs}-A/18 obtenidos añadiendo cantidades sucesivas de **1**. La concentración inicial de ADN es 5 µM y la final 4.26 µM.

⁵⁵ Aunque el sistema tripirrólico es aquiral, cuando se inserta en el ADN el cromóforo adopta una conformación asimétrica que se detecta en el dicroísmo: Chen, F-M.; Sha, F. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11144.

Es importante reseñar que los estudios de dicroísmo circular se realizan con concentraciones relativamente altas de los sustratos (5 μM), con lo que la técnica permite detectar interacciones no demasiado fuertes.

La incubación de **1** con el ADN A₅/13 a 20°C condujo, sin embargo, a resultados ligeramente diferentes (figura 2.4). Todos los espectros pasan por el mismo punto isobéstico, lo que indica que el modo de interacción entre **1** y el ADN A₅/13 no varía.

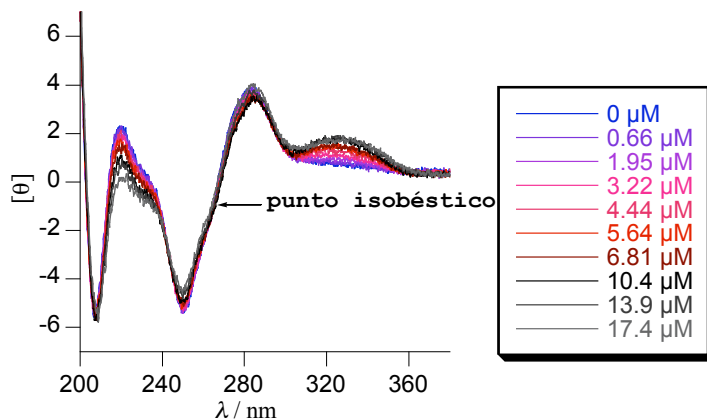


Figura 2.4 Espectros obtenidos para la mezcla **1** y A₅/13 en presencia de cantidades crecientes de **1**. La concentración inicial de ADN es 5 μM y la final 4.41 μM .

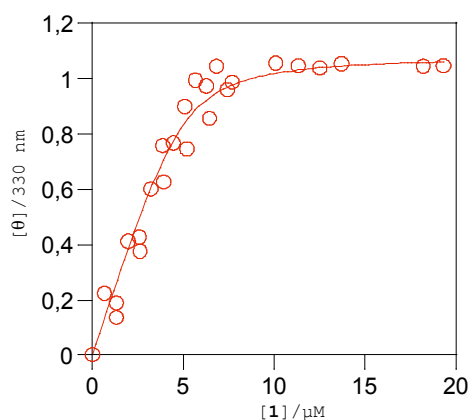
Tomando como referencia los valores de elipticidad obtenidos a 330 nm se pudo obtener una curva y de ahí deducir una constante de disociación aproximada de $0.49 \pm 0.2 \mu\text{M}$ cuando dicha curva se ajusta a un modelo 1:1, según la ecuación siguiente:

$$\theta_{330 \text{ nm}} = (0.5\theta_{\infty}/D) \{P+D+K_d - [(P+D+K_d)^2 - 4PD]^{0.5}\}$$

en donde:

- P representa la concentración total de tripirrol.
- D es la concentración total de ADN.
- θ_{∞} representa el valor de elipticidad cuando se ha alcanzado la saturación.

En la siguiente gráfica se representan los valores ajustados:



Esquema 2.10

A continuación, se procedió al análisis del comportamiento del híbrido péptido-tripirrol **A5** con los oligonucleótidos de doble cadena indicados en la esquema 2.11, que se han diseñado con el objetivo de obtener información precisa sobre la relación secuencia-reconocimiento.

CRE ^{hs} -A/18	5´-CGAACGTCAT AAAAT CCT-3´ 3´-GCTTGCAGT TTTT AGGA-5´
CRE ^{hs} cgA/20	5´-CGAACGTCATCG AAAT CCT-3´ 3´-GCTTGCAGTAGCT TTTA AGGA-5´
CRE ^{hs} /20	5´-CGAACGTCATCGAAGGTCCT-3´ 3´-GCTTGCAGTAGCTTCCAGGA-5´
CRE ^{hs} m-A/20	5´-ACGAACGTC G TAAAATCCTC-3´ 3´-TGCTTGCAGC A TTTTAGGAG-5´
NON/20	5´-GCAGCTGCAGCTGCAGCTGC-3´ 3´-CGTCGACGTCGACGTCGACG-5´

Esquema 2.11

CRE^{hs}cgA/20 es un ADN que contiene dos pares de bases (GC) entre los sitios de interacción del péptido y el tripirrol. Sirve para comprobar la especificidad del híbrido en cuanto a la separación de las regiones consenso de cada uno de los fragmentos. CRE^{hs}/20 contiene sólo la secuencia de unión para el péptido y, por lo tanto, será muy útil para comprobar la especificidad del sistema con respecto a secuencias que no poseen la zona de interacción del tripirrol. CRE^{hs}m-A/20 es un ADN que posee la secuencia compuesta para el péptido-tripirrol, pero el lugar de unión del péptido está mutado en una base (subrayada), con lo que sirve para comprobar la especificidad del híbrido en relación a secuencias no consenso para el péptido. NON/20 es un ADN aleatorio que sirve para obtener información sobre las interacciones inespecíficas del híbrido.

La adición a 4°C de A5 al dúplex CRE^{hs}-A/18 en una disolución tamponada a pH= 7.5 con 10 mM de fosfato y 100 mM de NaCl produce la aparición de la banda positiva a 330 nm en el espectro de dicroísmo circular (curva ●, figuras 2.5 a y b), sin duda como consecuencia de la inserción del tripirrol en el surco menor. También se observa un incremento significativo de la señal negativa a 222 nm respecto al híbrido en ausencia de ADN (○). La intensidad de esta banda indica la formación de una proporción considerable de hélice α ($\theta_{222} \sim -26000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), lo que debe ser consecuencia del plegamiento de la región peptídica y su inserción en el surco mayor.

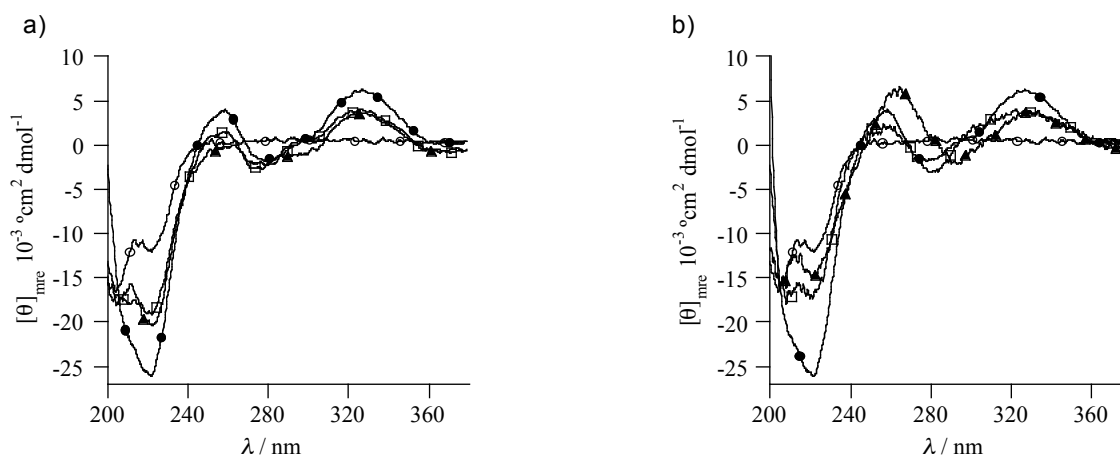


Figura 2.5 Espectros de DC de diferencia de A5 en ausencia y en presencia de diferentes ADNs obtenidos a 4°C en una disolución 10 mM de tampón fosfato y 100 mM de NaCl a pH= 7.5. a) en ausencia de ADN (○), en presencia de CRE^{hs}-A/18 (●), en presencia de CRE^{hscgA}/20 (▲), en presencia de CRE^{hsm}-A/20 (□). b) en ausencia de ADN (○), en presencia de CRE^{hs}-A/18 (●), en presencia de NON/20 (▲), en presencia de CRE^{hs}/20 (□). **Hay que hacer notar que en estos espectros, y en los que se pongan a lo largo de la tesis- salvo que se indique lo contrario-, la contribución del ADN ha sido sustraída.**⁶⁶

El espectro de DC adquirido en presencia de CRE^{hscgA}/20 o CRE^{hsm}-A/20 muestra variaciones menos relevantes en la helicidad del péptido (figura 2.5 a, curvas ▲ y □, respectivamente). Lo mismo que sucede cuando el híbrido se incubaba con un ADN aleatorio (NON/20, curva ▲, figura 2.5 b) o que sólo contiene la media secuencia de unión de la región básica (CRE^{hs}/20, curva □, figura 2.5 b). El hecho de que con estos dos dúplex (NON/20 y CRE^{hs}/20) se aprecie una señal positiva a 330 nm aún cuando no poseen secuencias consenso para el tripirrol sugiere que a las concentraciones a las que se realiza el experimento se forma una cierta proporción de un complejo en el cual el fragmento tripirrólico se enlaza

⁶⁶ Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6871.

débilmente al ADN adquiriendo una conformación asimétrica, que es la que origina la elipticidad.

Es importante destacar que el espectro de DC del ADN en el complejo **A5**- CRE^{hs} -A/18 muestra las típicas bandas de la estructura B del ADN (mínimos a 247 y 210 nm y máximo a 275 nm), lo que sugiere que la unión del híbrido no promueve cambios significativos en la conformación del ADN (figura 2.6).

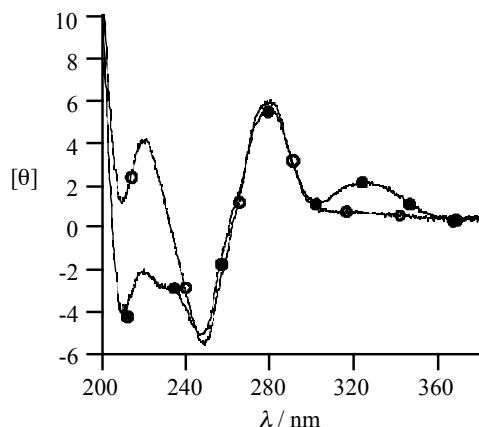


Figura 2.6 CRE^{hs} -A/18 solo (○), CRE^{hs} -A/18 en presencia de **A5** (●). Aquí no se ha sustraído la contribución del ADN.

Los resultados de DC obtenidos son consistentes con que **A5 interaccione específicamente con su secuencia diana CRE^{hs} -A/18 produciéndose la inserción simultánea surco mayor-menor.** Sin embargo, con los oligos de doble cadena utilizados como control (CRE^{hs} m-A/20, CRE^{hs} cgA/20, CRE^{hs} /20 y NON/20) la helicidad de la región peptídica en el complejo es mas bien baja, lo que sugiere que dicha región no está insertada en el surco. Es muy probable que en estos complejos el tripirrol esté insertado en el surco menor y el péptido esté realizando contactos electrostáticos inespecíficos con los fosfatos del ADN.

Por otra parte, también se ha comprobado que para que se produzca la interacción es necesaria la presencia del tripirrol, puesto que el péptido en el cual falta la unidad tripirrólica no induce ninguna variación en el valor de la elipticidad a 222 nm en presencia de la secuencia diana.⁷⁷

Experimentos de valoración en presencia de CRE^{hs} -A/18 utilizando cantidades crecientes de **A5**, indican que se mantiene un punto isobéptico (265 nm,

⁷⁷ Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723.

señalado con una flecha en la figura 2.7) hasta que la concentración de híbrido es doble que la de ADN, y luego parece haber un cambio. Lo más probable es que en primer lugar la estequiometría sea 1:1 y luego empiecen a formarse complejos en los que hay más de una molécula de híbrido por ADN. Podríamos en este caso estar ante un sistema 2:1, con dos moléculas de **A5** interaccionando simultáneamente: una de ellas específicamente y la otra con el tripirrol insertado en el surco menor y el péptido estableciendo contactos electrostáticos con el ADN o con los dos fragmentos realizando contactos inespecíficos con el ADN. En esta segunda posibilidad, la interacción tendría una afinidad baja, con lo que si usásemos concentraciones de orden nM probablemente no se observara, que es lo que ocurre cuando se hacen los experimentos de electroforesis que se describen más adelante.

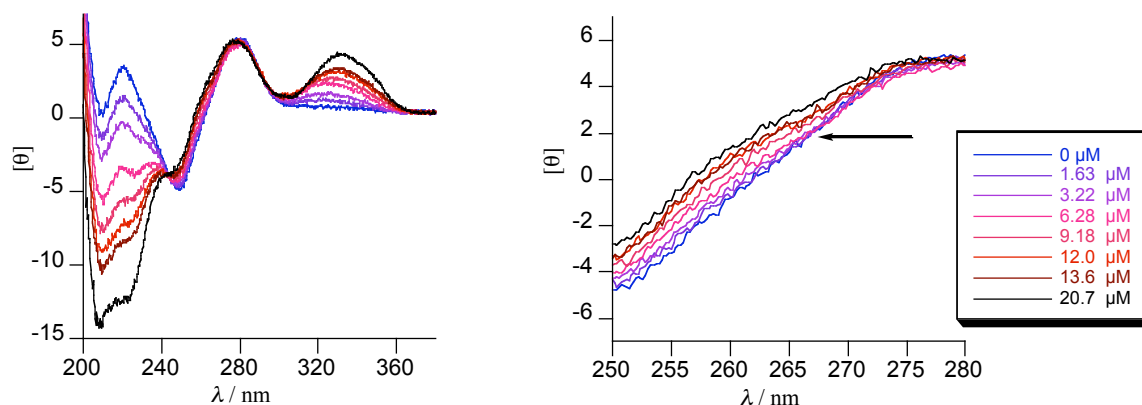


Figura 2.7 Valoración de **A5** en presencia de CRE^{hs}-A/18. La concentración inicial de ADN es 5 μM y la final 4.16 μM . A la derecha se indica el punto isobéptico.

El análisis de los resultados obtenidos con los ADNs control indicados anteriormente, sugieren que las elevadas concentraciones usadas en los experimentos de DC facilitan la interacción del tripirrol con otros sitios de unión diferentes a su secuencia consenso. En todo caso mediante DC no podemos determinar fácilmente la estequiometría y la afinidad del complejo, para lo que será preciso recurrir a otras técnicas en las que se utilicen cantidades más pequeñas de los agentes interaccionantes.

En concreto, está bien establecido que una de las técnicas más útiles para obtener información sobre la interacción entre proteínas o péptidos de tamaño considerable y el ADN se basa en observar los retardos que se producen en electroforesis de gel de poliacrilamida (EMSA: Ensayos de Desplazamiento en Gel de Poliacrilamida). Estos estudios se llevaron a cabo a 4°C utilizando como tampón de incubación 38 mM Tris.HCl (pH= 7.5), 90 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂ y 1.8 mM AEDT. Tal como se puede deducir de la

figura 2.8, la incubación de cantidades crecientes de **A5** con CRE^{hs}-A/18 marcado con ³²P radiactivo en el extremo 5' de una de las hebras, produce una banda de retardo que debe corresponderse con la formación de un solo tipo complejo entre el híbrido y el ADN. Se puede observar que la mitad de la fracción unida se alcanza a concentraciones menores de 5 nM (figura 2.8 a), lo cual representa una afinidad muy considerable.

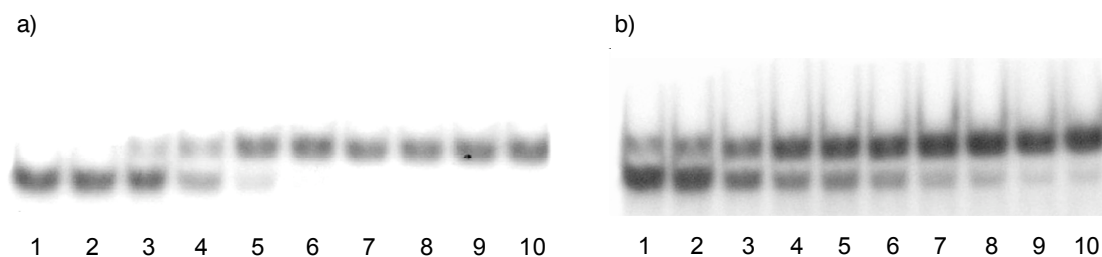


Figura 2.8 a) calles 1-10: ³²P-CRE^{hs}-A/18+A5, [A5]= 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM; [³²P-CRE^{hs}-A/18]~ 45 pM. b) calles 1-10: ³²P-CRE^{hs}-A/18+A5, [A5]= 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13 nM; [³²P-CRE^{hs}-A/18]~ 45 pM.

Una valoración detallada de la interacción (figura 2.8 b) cuantificando la intensidad de las bandas, permitió realizar un ajuste a un modelo 1:1, calculándose una $K_d = 3 \pm 0.2$ nM.

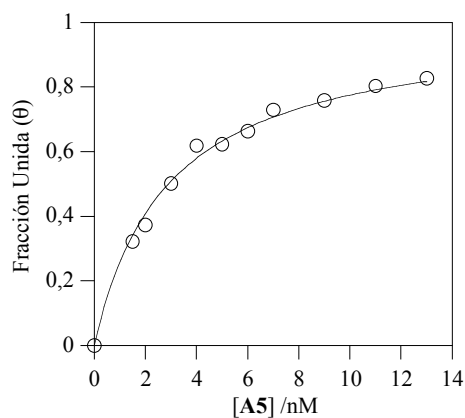


Figura 2.9 Valoración por EMSA de **A5**. Representación gráfica de los datos ajustados a la ecuación $\theta = P / (P + K_d)$, donde P es la concentración de **A5** y K_d es la constante de disociación.

Utilizando cantidades mayores de ADN marcado (aprox. 4.5 nM) se observó la misma banda de complejo, tanto a concentraciones iguales de ADN y péptido como a concentraciones mayores de **A5**, dato consistente con que en todos los casos se mantiene la estequiometría 1:1 deducida de la valoración anterior.

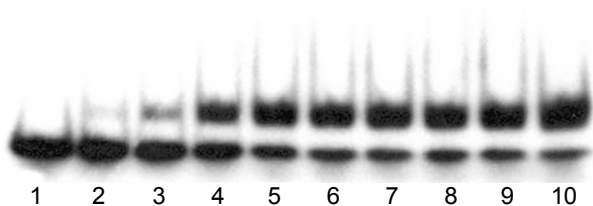


Figura 2.10 Calles 1-10: ^{32}P -CRE^{hs}-A/18+A5, [^{32}P -CRE^{hs}-A/18]~ 4.5 nM, [A5]= 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM.

Con el fin de observar mejor las diferencias entre bandas que se pueden producir utilizando ADN con distintas secuencias se utilizaron oligos de doble cadena de 20 pares de bases (esquema 2.12), en lugar de 18.

CRE ^{hs} -A/20	5'-ACGAACGTCAT AAAAT CCTC-3' 3'-TGCTTGCAGT TTTTA GGAG-5'
CRE ^{hs} m-A/20	5'-ACGAACGTC CGTAAAAT CCTC-3' 3'-TGCTTGCAG CATTTT TAAGGAG-5'

Esquema 2.12

El uso de ADNs mutados en la zona de unión de la región peptídica (CRE^{hs}m-A/20) o con las secuencias de unión del tripirrol y del péptido espaciadas 2 pares de bases (CRE^{hs}cgA/20) condujo a una banda de migración más lenta (figura 2.11, calles 4-6 y 7-8). Este dato, unido al resultado de DC, es consistente con la formación de un complejo inespecífico- menos compacto- en el cual la complejación probablemente se produce porque el tripirrol está insertado en el surco y el péptido está contactando electrostáticamente con los fosfatos. Utilizando un ADN (CRE^{hs}-20) que tiene sólo sitio de reconocimiento para el péptido (no para el tripirrol) la interacción es muy débil, ya que a concentraciones de híbrido de 200 nM no se detectan trazas de la formación de algún complejo. También podemos decir que la afinidad por NON/20 es menor de 1 μM, ya que no se observa banda de complejo a esta concentración.

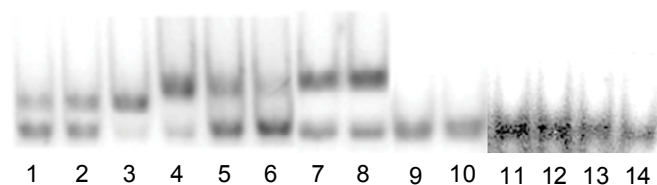


Figura 2.11 Comparación de la migración relativa de A5 con distintos ADNs marcados radioactivamente: calles 1-3, ^{32}P -CRE^{hs}-A/20+A5, [A5]= 2, 5, 10 nM; calles 4-6, ^{32}P -CRE^{hs}m-A/20+A5, [A5]= 100, 10, 5 nM; calles 7 y 8, ^{32}P -CRE^{hs}cgA/20+A5, [A5]= 40, 80 nM; calles 9 y 10, ^{32}P -CRE^{hs}-20+A5, [A5]= 80, 160 nM; calles 11-14, ^{32}P -NON/20+A5, [A5]= 700, 800, 900, 1000 nM.

Los datos obtenidos de la valoración de **A5** en presencia de CRE^{hs}m-A/20 a 4°C pueden ser bien ajustados a la ecuación para un sistema 1:1, obteniéndose una $K_d = 15 \pm 1$ nM.

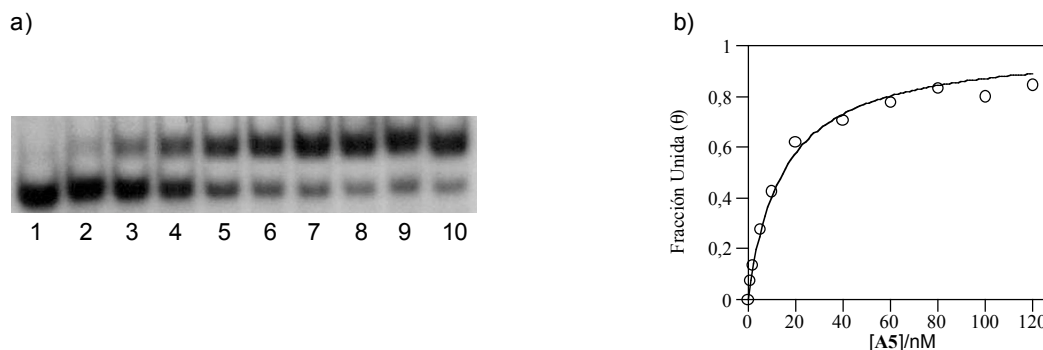


Figura 2.12 a) Valoración por EMSA de **A5**, calles 1-10: [A5]= 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 nM. b) Representación gráfica de los datos ajustados a la ecuación $\theta = P / (P + K_d)$, donde P es la concentración de **A5** y K_d es la constante de disociación.

Aunque pudiera resultar sorprendente la alta afinidad del modo de unión inespecífico observado con el ADN CRE^{hs}m-A/20, no lo es tanto si uno tiene en cuenta los precedentes de los estudios de Bruice donde demuestra que la incorporación de varios grupos básicos (amino) a derivados de distamicina aumenta en medida notable su afinidad por el ADN debido a la formación de puentes salinos con los fosfatos de la cadena de ADN.⁷⁹

En un experimento de competición hemos comprobado que la adición del ADN diana ³²P-CRE^{hs}-A/18 a disoluciones preformadas de 10 equivalentes de NON/20+A5 provoca sólo un ligero descenso en la afinidad, lo que es consistente con la formación de un complejo específico fuerte híbrido-CRE^{hs}-A/18 (figura 2.13).

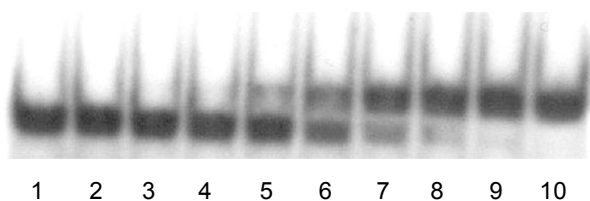


Figura 2.13 Valoración de EMSA de **A5** en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/18 y 10 equiv de NON/20. Calles 1-10, [A5]= 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM.

En términos de especificidad está claro que **A5** se une a su secuencia diana más de 1000 veces mejor que a otras secuencias que no tienen sitio de unión para el tripirrol (CRE^{hs}/20 y NON) y unas 5 veces mejor que a las

⁷⁹ Satz, A. L.; Bruice, T. C. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 86.

secuencias que tienen sitio de unión para el tripirrol pero están mutadas en el lugar de unión del péptido ($\text{CRE}^{\text{hs}}\text{m-A}/20$).

2.5 Comparación del híbrido **A5** con el **A2**. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos parece claro que el nuevo híbrido **A5** posee **mayor especificidad** y **afinidad** que **A2** por su secuencia diana.

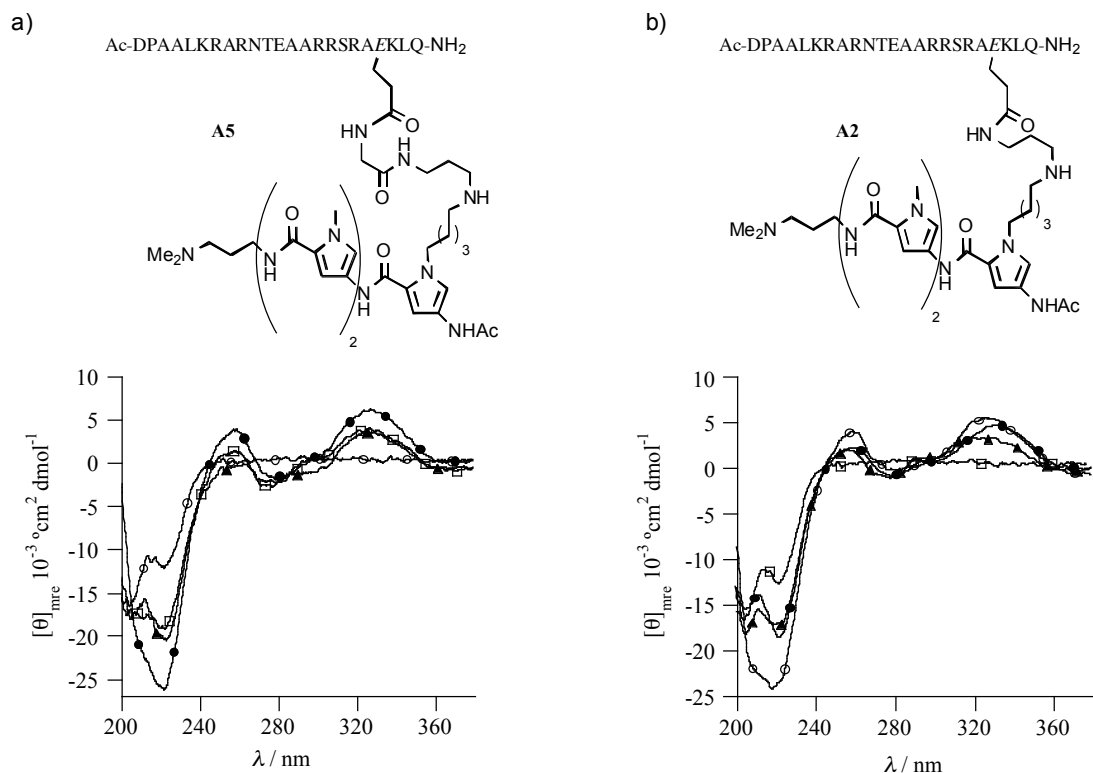


Figura 2.14 Comparación de los espectros de DC de **A5** y **A2** obtenidos en presencia de distintos ADN. a) **A5**: en ausencia de ADN (○), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A}/18$ (●), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{cgA}/20$ (▲), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{m-A}/20$ (□). b) **A2**: en ausencia de ADN (□), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A}/18$ (○), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{cgA}/20$ (●), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{m-A}/20$ (▲).

Aunque los espectros de DC de los dos híbridos en presencia de los ADNs son similares y por lo tanto no dan una idea cuantitativa clara de las posibles diferencias de afinidad, sin embargo, podemos destacar que la helicidad ($\theta_{222} \sim -24000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) de la región básica de **A2** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A}/18$ es ligeramente menor que la obtenida con **A5** ($\theta_{222} \sim -26000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$).

Los experimentos de electroforesis de retardo en gel revelan que en el caso de **A5**, en las condiciones del experimento se observa **sólo el modo de unión específico**, mientras que con **A2** también se observaban modos de unión inespecíficos competitivos. Este buen resultado obtenido con el

híbrido **A5** es, probablemente, consecuencia del aumento de estabilidad del complejo específico, mas que de la disminución de estabilidad del inespecífico.

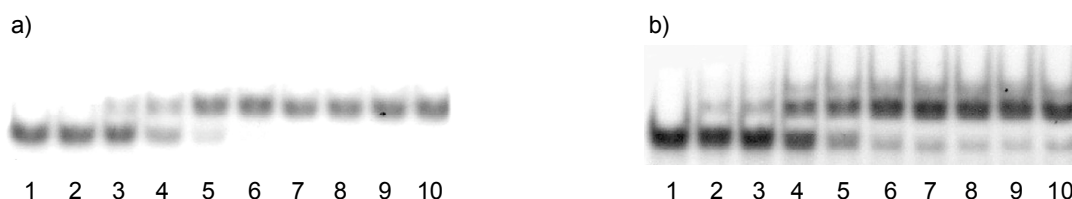
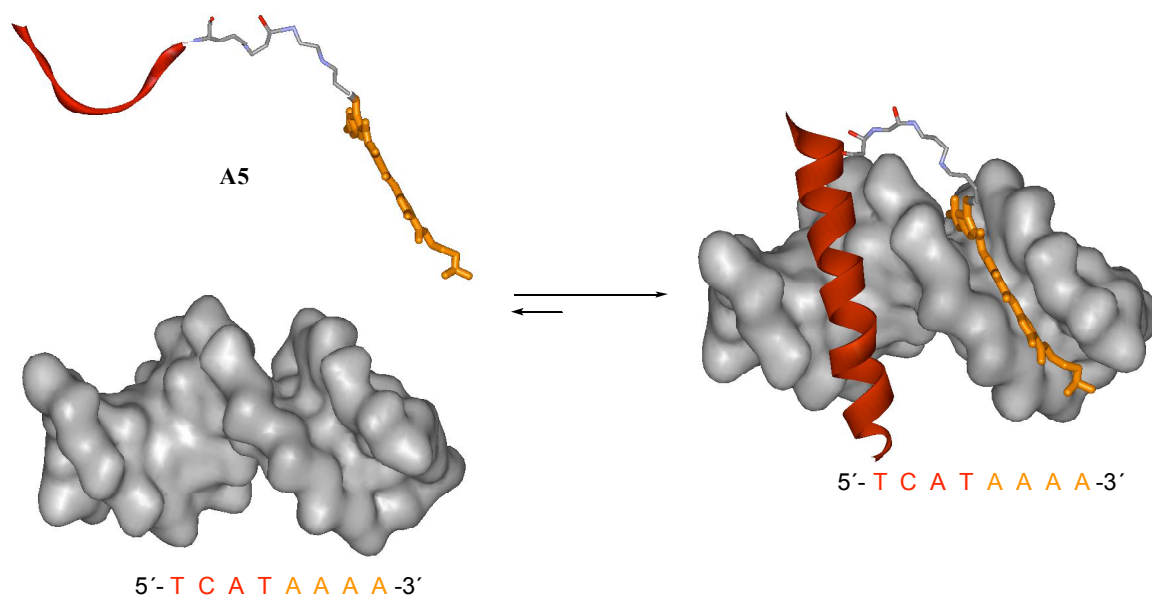


Figura 2.15 Comparación de las valoraciones de **A5** (a) y **A2** (b) con CRE^{hs}-A/18. Calles 1-10, [A5, A2]= 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM.

Así pues el alargamiento de la cadena de conexión entre el fragmento tripirrólico y el péptido ha posibilitado la obtención de un conjugado capaz de unirse, a 4°C, **con notable especificidad y gran afinidad a secuencias específicas de ADN de doble cadena que contienen los sitios de unión consenso del péptido y del tripirrol en posiciones contiguas**. Aunque en estos momentos no disponemos todavía de información estructural concreta sobre el complejo, los datos anteriormente discutidos sugieren que el complejo que se forma es acorde con el modelo planteado:



Esquema 2.13

El sistema posee una afinidad a 4°C comparable al complejo formado por el homodímero de la región básica más la cremallera de leucinas con la

secuencia AP-1.^{97,98} Sin embargo, hay que hacer notar que parte de esta afinidad se pierde cuando los experimentos se realizan a temperatura ambiente. En la figura 2.16 se puede comprobar como la afinidad descende aproximadamente un orden de magnitud a ~23°C.

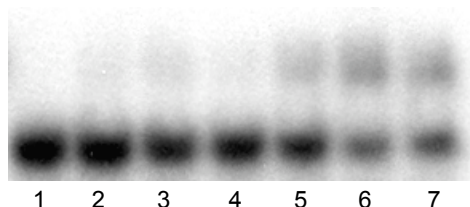


Figura 2.16 Autorradiograma mostrando la unión de **A5** a ³²P-CRE^{hs}-A/20 a 23°C: calle 1-7, [A5]= 5, 10, 15, 20, 30, 40 , 50 nM.

Parte del trabajo posterior de esta tesis va encaminado a solventar este problema, con el fin de lograr afinidades y especificidades similares a GCN4 en condiciones fisiológicas y poder desarrollar un sistema verdaderamente competitivo con los FTs naturales.

⁹⁷ a) Weiss, M. A.; Ellenberger, T.; Wobbe, C. R.; Lee, J. P.; Harrison, S. C.; Struhl, K. *Nature* **1990**, *347*, 575. b) Metallo, S. J.; Schepartz, A. *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 143. c) Cranz, S.; Berger, C.; Baici, A.; Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. *Biochemistry* **2004**, *43*, 718.

⁹⁸ Hollenbeck, J. J.; Oakley, M. G. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6380.

3. Influencia de la estructura de la cadena de conexión en la interacción del híbrido péptido-tripirrol **A5** con el ADN

3.1 Objetivos y diseño

Los resultados obtenidos anteriormente sugieren que el conector en el híbrido **A5** tiene la longitud apropiada para permitir la interacción bivalente requerida. No obstante, es muy probable que se puedan diseñar otras cadenas de conexión que conduzcan a mejores resultados. Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la influencia de la estructura de la cadena de conexión en la interacción con el ADN, decidimos averiguar si otros conectores de igual longitud, pero diferente estructura, conducirían a resultados similares. Particularmente, estábamos muy interesados en comprobar la influencia que podría ejercer en el reconocimiento la amina secundaria presente en la cadena de conexión de **A5**, pues al pH en el que se realizan los ensayos (7.5), dicha amina debiera estar protonada y, por lo tanto, podría participar en contactos electrostáticos con los grupos fosfato del ADN. Por otro lado, también sería interesante comprobar la influencia de la flexibilidad de la cadena de conexión.⁹⁹ Por ello, nos propusimos como primer objetivo de esta parte la preparación del híbrido **A6**, representado en la figura 3.1:

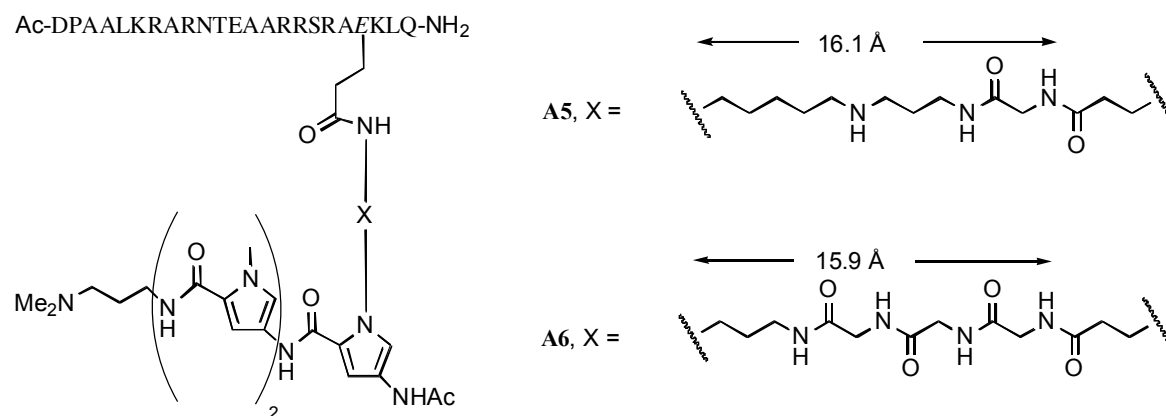


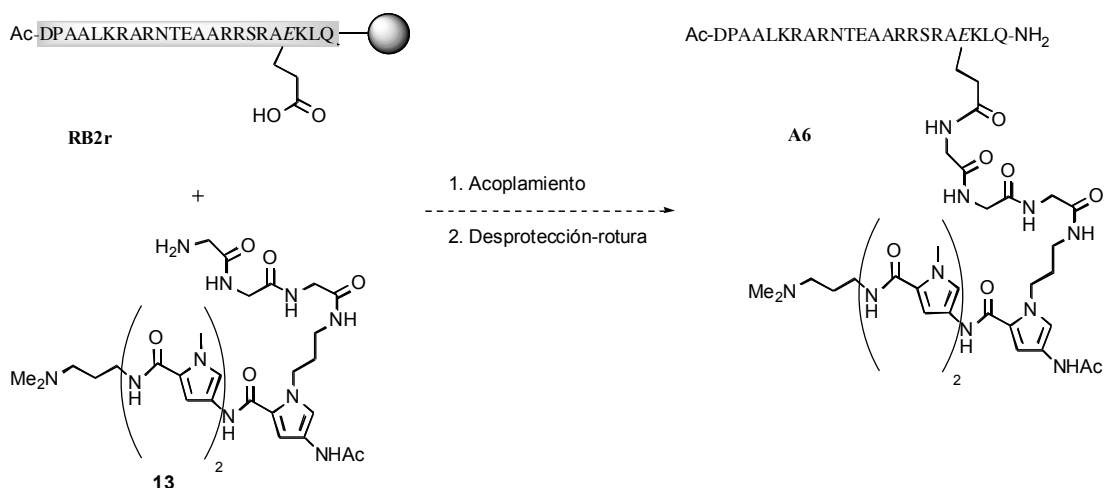
Figura 3.1 Estructuras de los híbridos **A5** y **A6**. En la derecha se representan los dos conectores con sus respectivas longitudes aproximadas, asumiendo una conformación extendida.

⁹⁹ Whitesides ha propuesto que conectores de tipo peptídico pueden ser útiles para unir sistemas bivalentes a sus respectivos receptores como consecuencia del menor coste entrópico conformacional asociado a la interacción: a) Mammen, M.; Choi, S-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755. b) Mammen, M.; Shakhnovich, E. I.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3168.

Este nuevo híbrido **A6** tiene un conector que abarca la misma longitud que el presente en **A5**, pero en lugar de la cadena bastante flexible de pentilpropilamina incorpora una unidad de triglicina que debe conferirle bastante rigidez. Por otra parte aunque puede establecer enlaces de hidrógeno con los fosfatos a través de los grupos amida, esta nueva cadena no posee el grupo amino secundario que podría ser relevante en la interacción.

3.2 Planteamiento sintético

Al igual que con los híbridos anteriores, la síntesis de **A6** se planteó en base a un acoplamiento del correspondiente derivado tripirrólico equipado con la cadena lateral (**13**) sobre el péptido anclado a la resina **RB2r**:

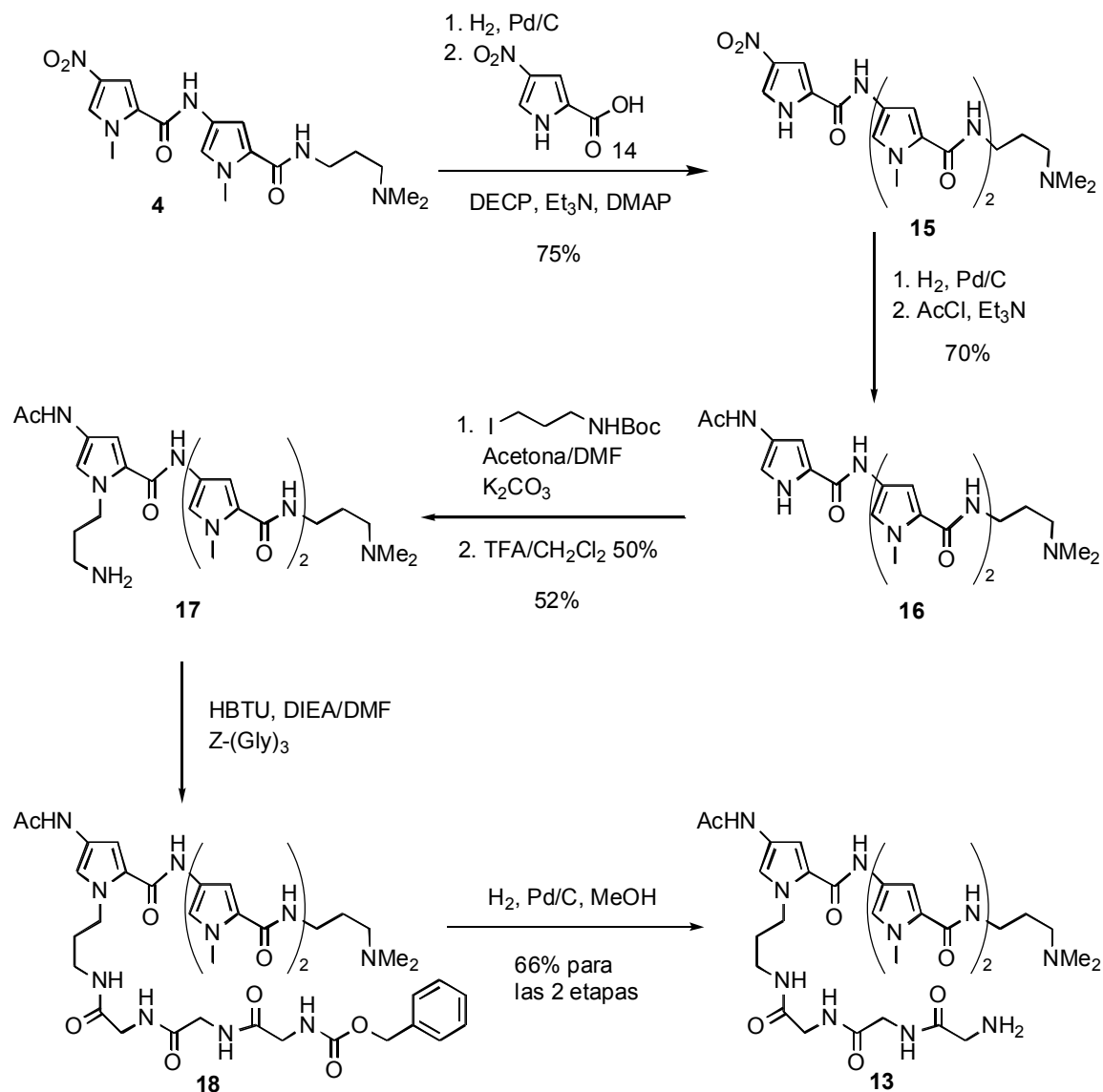


Esquema 3.1

3.3 Síntesis del híbrido **A6**

Para la síntesis del derivado tripirrólico requerido **13** se siguió una ruta diferente a la utilizada anteriormente para preparar **1** (sección 2.3). Esta nueva ruta es más versátil y permite la introducción de diferentes cadenas de conexión a partir del mismo tripirrol de partida (esquema 3.2). La reducción del nitrotripirrol **4** y acoplamiento de la amina resultante con el ácido **14** permitió obtener el nitrotripirrol **15** con un rendimiento del 75%. Este nitrotripirrol se acetiló, previa reducción del grupo nitro, para dar el compuesto **16** (70%), ligeramente más polar que el nitrotripirrol de partida, y que se purificó mediante cromatografía en columna de alúmina.

La alquilación del tripirrol **16** con Boc-3-yodopropilamina y posterior eliminación del Boc condujo al aminotripirrol **17** con un rendimiento del 52%. Esta amina se condensó con la bencil-triglicina y el producto de acoplamiento se sometió a hidrogenación catalítica para dar el derivado tripirrólico esperado **13** (FAB+: calcd. 724.4, encontrada 724.4).



Esquema 3.2

La amina **13** se conjugó con la región básica **RB2r** usando las condiciones descritas de acoplamiento para **A5** para dar el híbrido esperado **A6** con un rendimiento aproximado del 34% (considerando la síntesis de **RB2r**, acoplamiento y desprotección-rotura de la resina). La identidad del híbrido se confirmó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF: calcd. 3355.84 , encontrada 3355.94).

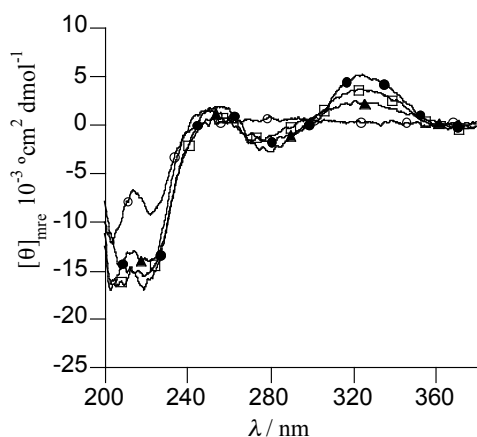


Figura 3.3. Espectros de DC de **A6** en ausencia y en presencia de diferentes ADN: en ausencia de ADN (○), en presencia de CRE^{hs}-A/18 (●), en presencia de CRE^{hs}-cgA/20 (▲), en presencia de CRE^{hs}-m-A/20 (□).

Los experimentos de EMSA confirmaron que la interacción de este híbrido con el ADN diana es muchísimo más débil que la del conjugado **A6**. Como se puede deducir de la figura 3.4, la formación de complejos ADN-péptido sólo se comienzan a observar cuando se alcanzan concentraciones de péptido de 60 nM, mientras que con dichas concentraciones **A6** ya estaba completamente complejado al mismo ADN. El retardo observado es similar al que se obtiene utilizando el ADN CRE^{hs}-m-A/20 mutado en la zona de reconocimiento del péptido.

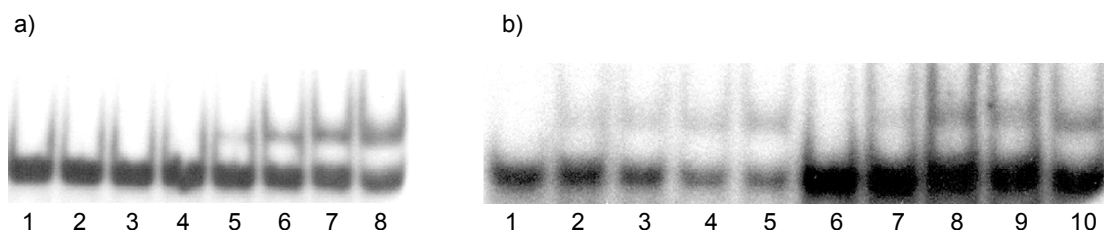


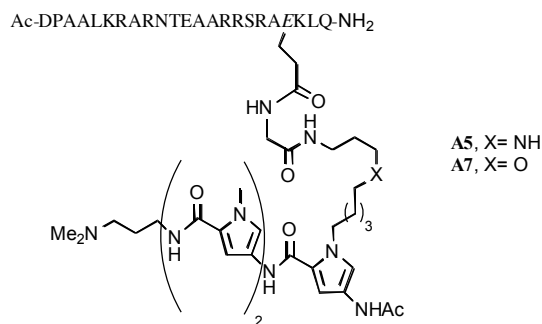
Figura 3.4 a) Autorradiograma de **A6** en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/18. Calles 1-8: [**A6**]= 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM. b) EMSA comparando la migración relativa de **A6** en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/20 y ³²P-CRE^{hs}-m-A/20: calles 1-5, ³²P-CRE^{hs}-A/20+**A6**, [**A6**]= 0, 80, 100, 150, 200 nM; calles 6-10, ³²P-CRE^{hs}-m-A/20+**A6**, [**A6**]= 0, 80, 100, 150, 200 nM.

3.5 Conclusiones

El híbrido **A6** interacciona mucho más débilmente con CRE^{hs}-A que **A5** y, además, la interacción se produce de modo inespecífico, o sea, la región básica no se pliega en hélice α para insertarse en el surco mayor de la secuencia diana de ADN.

Este resultado indica que no sólo la longitud, sino también la estructura de la cadena de conexión en los híbridos péptido-tripirrol influye de forma decisiva en el proceso de reconocimiento. En este caso la rigidez del conector de tipo peptídico parece ser perjudicial en la interacción, quizás porque impone restricciones geométricas que impiden que el péptido se acomode adecuadamente en el surco mayor del ADN. Sin embargo, no es descartable que la disminución en afinidad de **A6** con respecto a **A5** pudiera estar, al menos en parte, ligada a la ausencia de la amina secundaria que si está presente en la cadena de conexión de **A5**.

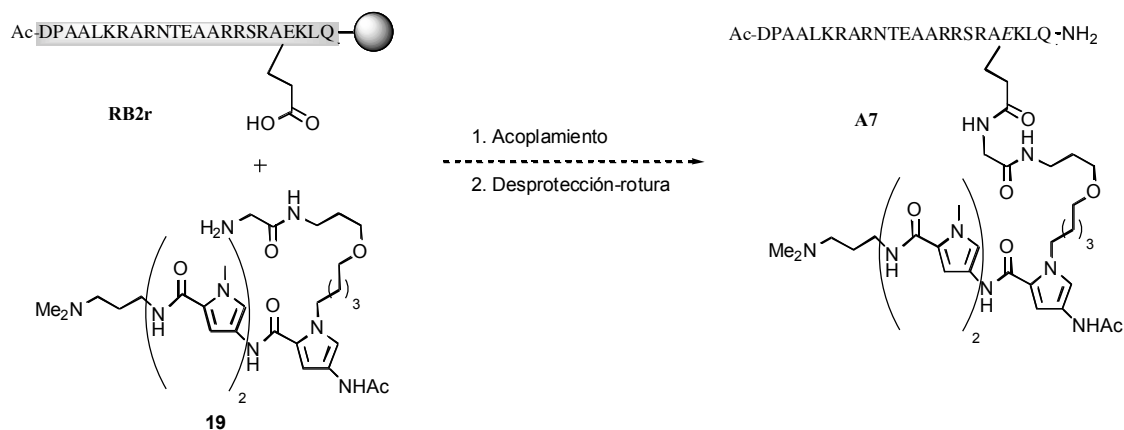
Con el fin de comprobar esto decidimos sintetizar un híbrido equipado con un átomo de oxígeno en lugar del NH presente en **A5**, y por ello nos planteamos la preparación del híbrido **A7**.



Esquema 3.4

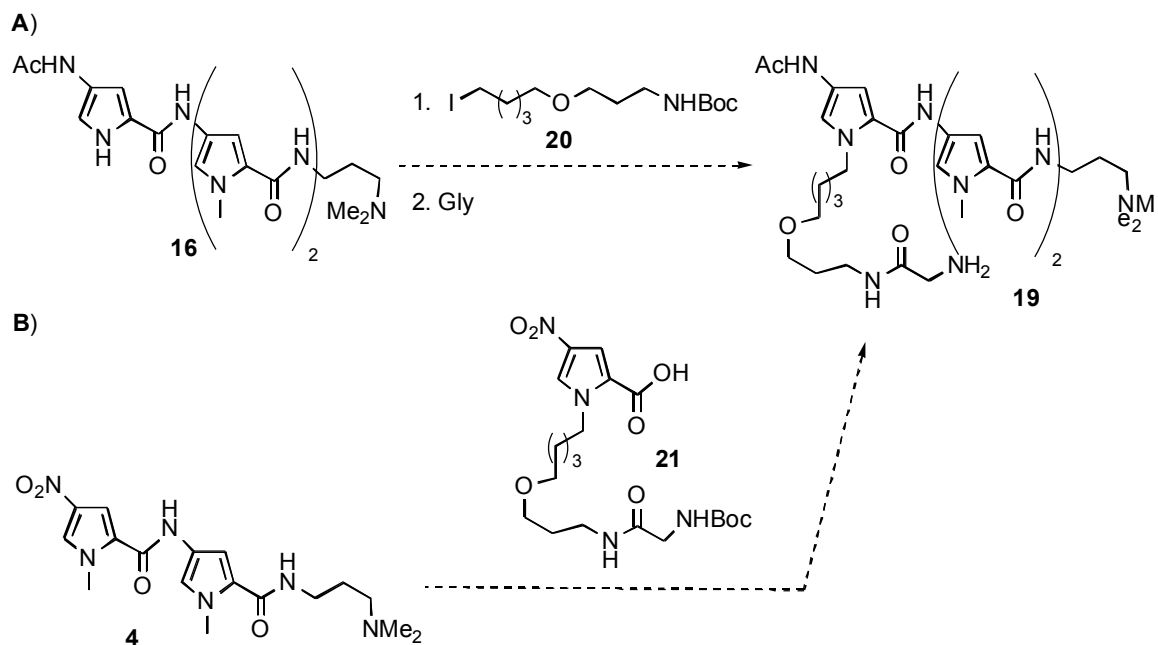
3.6 Planteamiento sintético para obtener el híbrido **A7**

En línea con los métodos de síntesis de híbridos desarrollados hasta el momento, la etapa clave de la síntesis de **A7** consistiría en el acoplamiento en fase sólida entre el fragmento tripirrólico **19** y el péptido unido a la resina **RB2r**:



Esquema 3.5

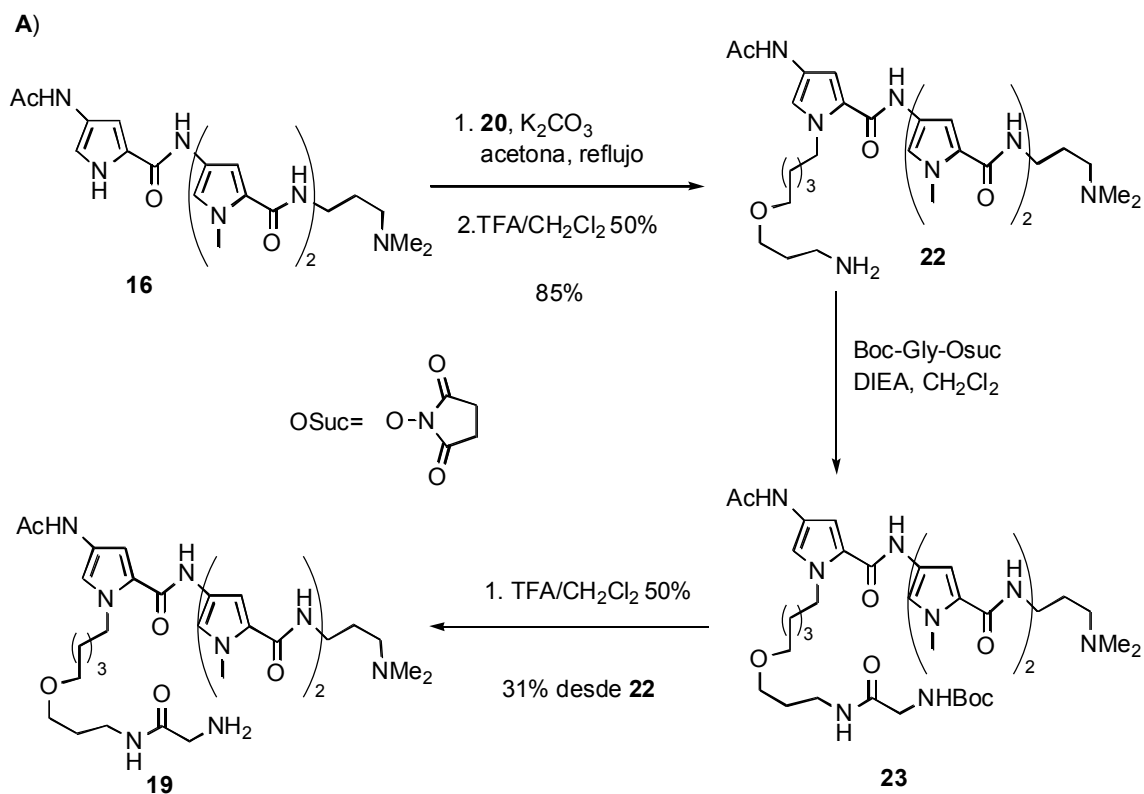
Para la obtención del tripirrol **19** se podrían seguir dos rutas: alquilar el tripirrol **16** con el conector (ruta **A**) o unir primero el conector al monopirrol y condensar luego el producto (**21**) con el dipirrol **4** (ruta **B**, esquema 3.6):



Esquema 3.6

3.7 Síntesis del híbrido A7

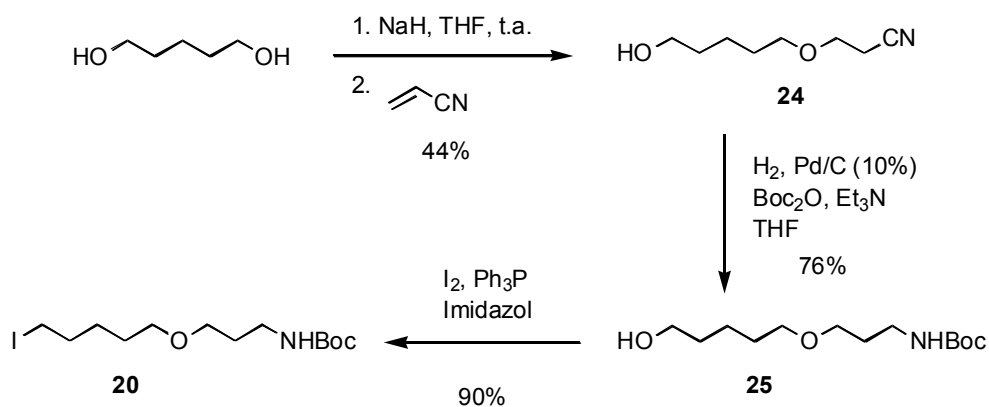
La síntesis de **19** se realizó siguiendo las dos rutas señaladas anteriormente, lo que demuestra que ambas son válidas. Aunque la ruta **B** es ligeramente más convergente, la ruta **A** es más corta y versátil, pues permite introducir diferentes conectores en la etapa final cambiando la especie alquilante (esquema 3.7).



Esquema 3.7

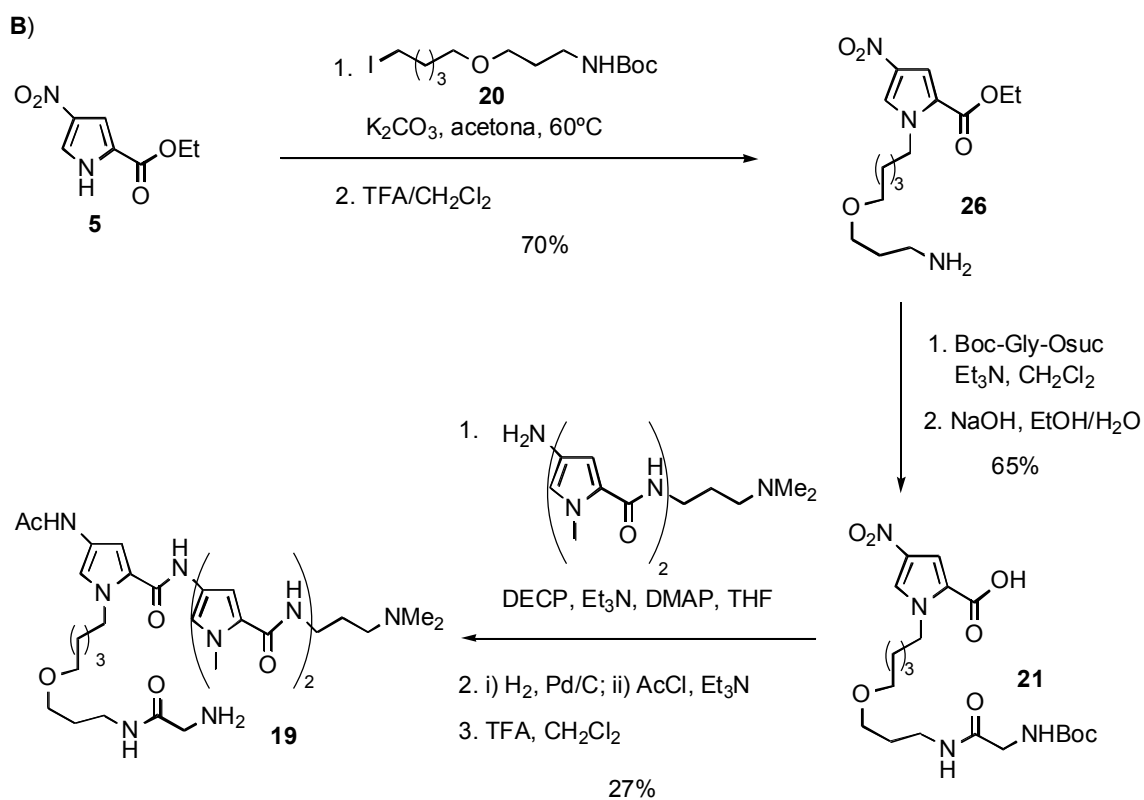
En la ruta **A**, la incorporación de la cadena se realizó alquilando el tripirrol **16** con el yoduro **20**, reacción que se llevó a cabo en acetona/DMF utilizando K_2CO_3 como base. El residuo se purificó en columna de alúmina y se sometió a la eliminación del grupo Boc en medio ácido, obteniéndose el aminotripirrol **22** con un rendimiento del 85%. Después de acoplar Boc-Gly y eliminar el Boc se obtuvo el tripirrol deseado **19** que se identificó por RMN y masas (FAB+: calcd. 697.4, encontrada 697.4).

La síntesis del yoduro **20** se realizó de manera análoga a la del yoduro **7** (página 60). La adición de acrilonitrilo a 1,5-pentanodiol condujo al nitrilo **24** con rendimiento moderado (44%), posiblemente debido a problemas de diadición. La reducción del nitrilo mediante hidrogenación catalítica con Pd/C (10%) en THF y protección in situ de la amina con Boc permitió obtener el alcohol **25** con un rendimiento del 76%. El tratamiento del alcohol con yodo y trifenilfosfina permitió obtener el yododerivado **20**.



Esquema 3.8

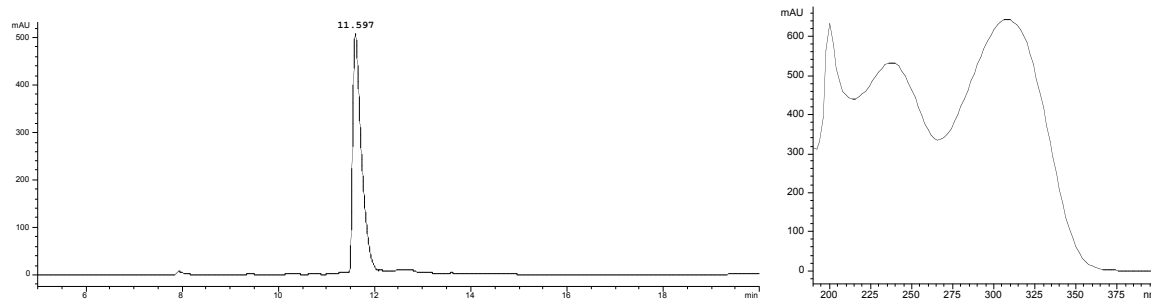
En la ruta **B**, el pirrol **5** se alquiló con el yoduro **20** en acetona a reflujo y empleando K₂CO₃ como base. El producto se sometió a la eliminación del grupo Boc y se acopló la Boc-Gly.



Esquema 3.9

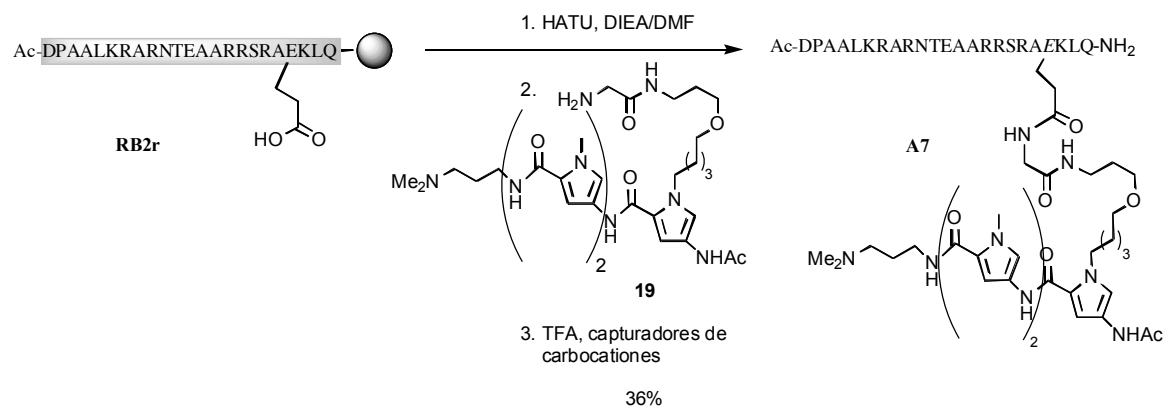
La hidrólisis del éster resultante condujo al ácido **21**, que se acopló con la amina resultante de reducir el nitrodipirrol **4**. La posterior acetilación y eliminación del grupo Boc condujo al aminotripirrol deseado **19**.

En el siguiente esquema se muestra el cromatograma de HPLC del compuesto y su espectro de UV. Como en todos los tripirroles e híbridos son características las bandas de absorción a 235 y 304 nm.



Esquema 3.10

Finalmente, se acopló la amina **19** al fragmento peptídico de la región básica en condiciones estándar, aislándose el conjugado **A7** con un rendimiento global del 36% (considerando la síntesis de **RB2r** y el acoplamiento) después de la rotura y desprotección de la resina. La identidad del híbrido se confirmó por espectrometría de masas (MALDI-TOF: calcd. 3327.9, encontrada 3327.6).¹⁰⁰



Esquema 3.11

¹⁰⁰ Este trabajo de síntesis de se hizo en colaboración con la tesinanda Olalla Vázquez Vázquez.

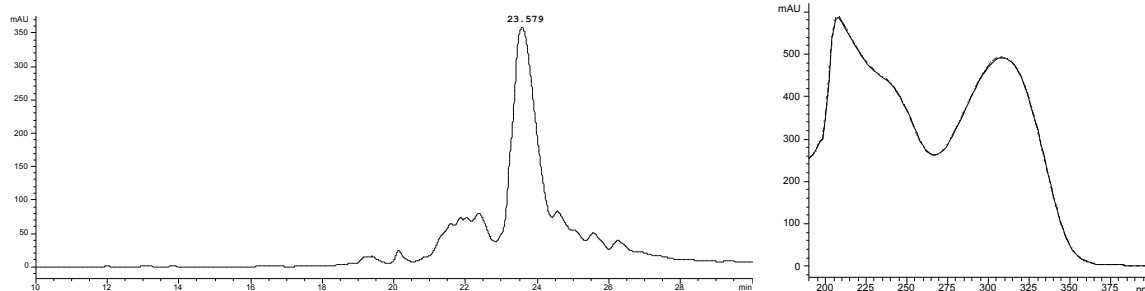


Figura 3.5 Cromatograma de HPLC del crudo de reacción de acoplamiento para dar **A7** y espectro de UV del híbrido. HPLC: gradiente lineal 10->35% B en 1/2 h.

3.8 Evaluación de la interacción de **A7** con CRE^{hs}-A. Conclusiones

Tal como se había comentado anteriormente (página 66), la adición de un oligonucleótido de doble cadena de 18 pares de bases (CRE^{hs}-A/18) a **A5** a 4°C produce una variación significativa de la señal a 222 nm, acompañada por la aparición de una banda con elipticidad positiva a 330 nm, lo cual es consistente con una unión bivalente específica surco mayor-menor (figura 3.6, curva O).¹⁰¹

La adición de **A7** al mismo oligonucleótido causó cambios espectrales paralelos a los inducidos por **A5**, pero con una intensidad de la banda a 222 nm ligeramente más baja (figura 3.6, curva ■), hecho que no necesariamente se tiene que correlacionar con una afinidad menor, aunque obviamente tampoco mayor. La observación de una variación mucho menos significativa de la intensidad de la señal a 222 nm cuando el ADN usado era CRE^{hs}m-A/20 (curva Δ), que tiene una mutación en el sitio de unión del péptido, o CRE^{hs}/20 (curva ▲), que no contiene la secuencia rica en adeninas responsable para la unión al surco menor del derivado tripirrólico, sugiere que la interacción de **A7** con el ADN diana conlleva la inserción de la región básica en el correspondiente surco mayor.

¹⁰¹ En esta figura en lugar de CRE^{hs}-A/18 se usa CRE^{hs}-A/20. Los resultados son similares.

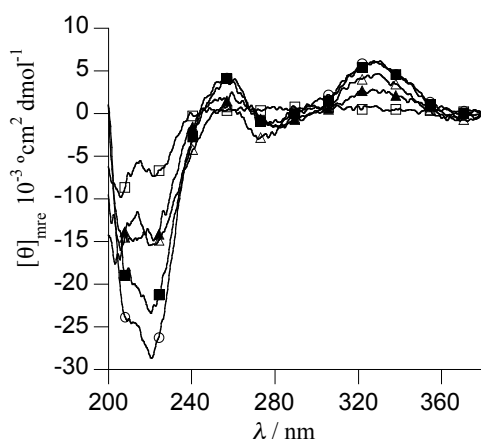


Figura 3.6 Espectros de DC de **A7** en ausencia y presencia de distintos ADN: en ausencia de ADN (\square), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A/20}$ (\blacksquare), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}/20$ (\blacktriangle), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-m-A/20}$ (\triangle). **A5** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A/20}$ (\circ).

Los experimentos de electroforesis de retardo en gel de poliacrilamida (EMSA) usando $^{32}\text{P-CRE}^{\text{hs}}\text{-A/20}$ mostraron que **A7** se enlaza de forma considerablemente más débil que **A5**: incluso a concentraciones de 200 nM no se observa una saturación completa (figura 3.7, calles 1-8), mientras que para **A5** dicha saturación se alcanzaba a concentraciones de 15 nM. Utilizando $^{32}\text{P-CRE}^{\text{hs}}\text{-m-A/20}$ se observó la formación de una banda de migración ligeramente más lenta que, probablemente, resulte de un complejo en el cual la región peptídica no está plegada en el interior del surco, sino electrostáticamente enlazada a la superficie fosfatídica de forma inespecífica (calles 9-14).

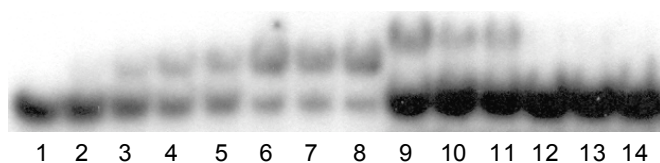


Figura 3.7 EMSA de **A7** en presencia de $^{32}\text{P-CRE}^{\text{hs}}\text{-A/20}$: calles 1-8, $[\text{A7}] = 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200$ nM, y $^{32}\text{P-CRE}^{\text{hs}}\text{-m-A/20}$: calles 9-14, $[\text{A7}] = 200, 150, 100, 80, 40, 0$ nM.

De estos datos se deduce que la constante de disociación de **A7** por la secuencia diana $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A}$ es superior a 100 nM, y por ello, al menos unas 40 veces mayor que la de **A5** por la misma secuencia ($K_d = 3$ nM), lo que parece evidenciar que el grupo NH- presuntamente protonado a $\text{pH} = 7.5-$, es muy importante en la interacción. Probablemente, este grupo está formando un puente salino con los oxígenos del fosfodiéster que se encuentran en la zona del oligonucleótido, lo que facilita el cruce entre surcos necesario

para la interacción bivalente.¹⁰² En el caso de nuestro sistema esta interacción de tipo electrostático es especialmente relevante para la estabilidad del complejo debido a la localización del grupo amino en la cadena de conexión.

¹⁰² Este tipo de interacciones se han descrito en otras proteínas: a) Larson, C.; Verdine, G. L. *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids* **1996**, Oxford University Press, New York. b) Gurlie, R.; Duong, T. H.; Zakrzewska, K. *Biopolymers* **1999**, *49*, 313. c) Gohlke, H.; Klebe, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2644.

4. Diseño y síntesis de híbridos que interactúan con ADN con afinidades de orden nanomolar a temperatura ambiente

4.1 Objetivo y diseño

Como se ha comentado en la página 74, la afinidad de **A5** por su secuencia diana de ADN decrece sobre un orden de magnitud cuando la incubación se realiza a temperatura ambiente en lugar de a 4°C. Esto constituye un obstáculo a la hora de utilizar esta aproximación para el reconocimiento del ADN como una estrategia viable para competir con los factores de transcripción naturales. Sería, por lo tanto, muy deseable y conveniente obtener conjugados que puedan interactuar con el ADN con constantes de disociación de orden nanomolar a temperaturas mayores que 4°C.

Los resultados descritos en los dos capítulos anteriores sugieren que el grupo amino secundario presente en el conector es importante desde el punto de vista de la afinidad, probablemente porque proporciona un contacto electrostático (puente salino) relevante con el esqueleto oligonucleotídico (fosfatos). Este dato nos indujo a pensar que quizás generando nuevas interacciones de este tipo podríamos contribuir a aumentar la constante de asociación de los híbridos con el ADN. Utilizando como base el modelo hipotético cualitativo de interacción bivalente de nuestros conjugados con el ADN, decidimos investigar las propiedades del híbrido **A8**, en el cual se ha instalado una cadena aminopropílica en el pirrol del medio con respecto a **A5** (figura 4.1). La idea es que ese grupo amonio terminal de la cadena propílica participe en una interacción atractiva de carácter electrostático con los fosfatos, y así el híbrido resultante presente una afinidad mayor.

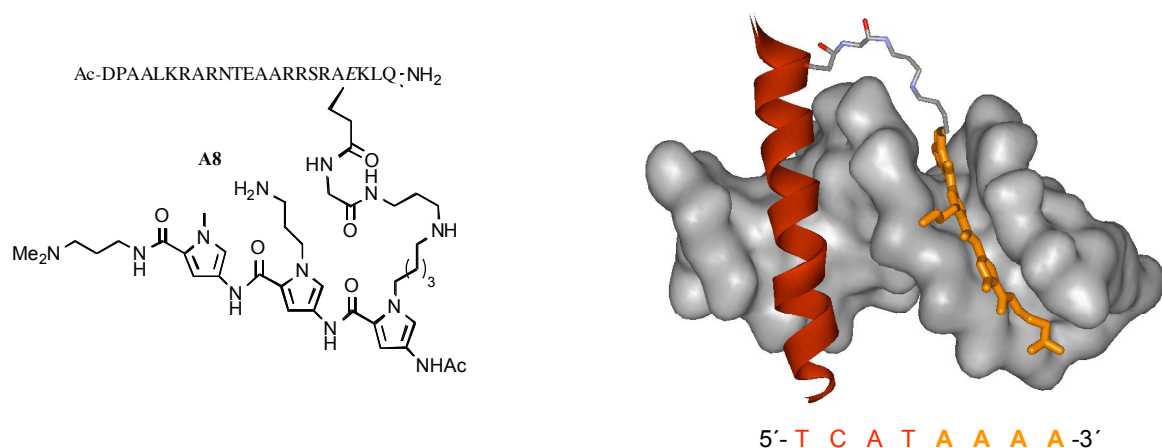
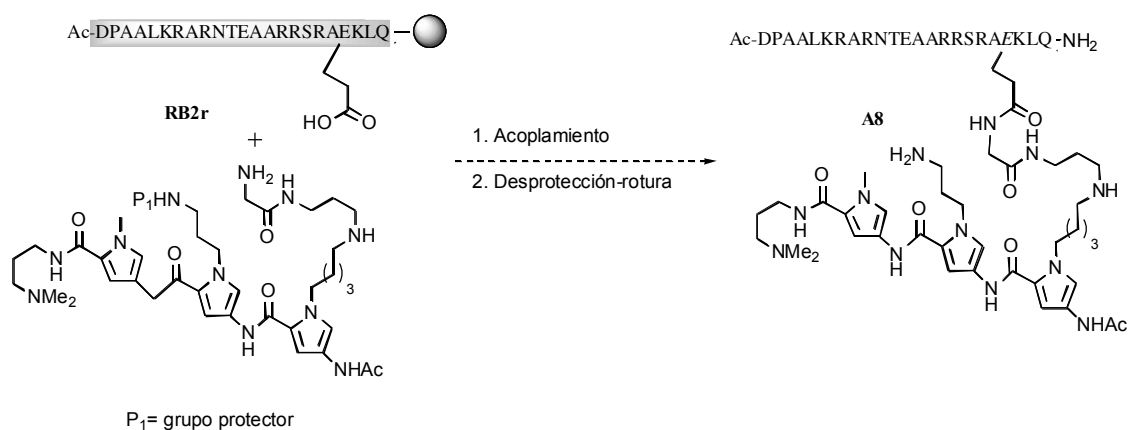


Figura 4.1 Estructura molecular del híbrido **A8** y modelo cualitativo de interacción.

4.2 Planteamiento sintético

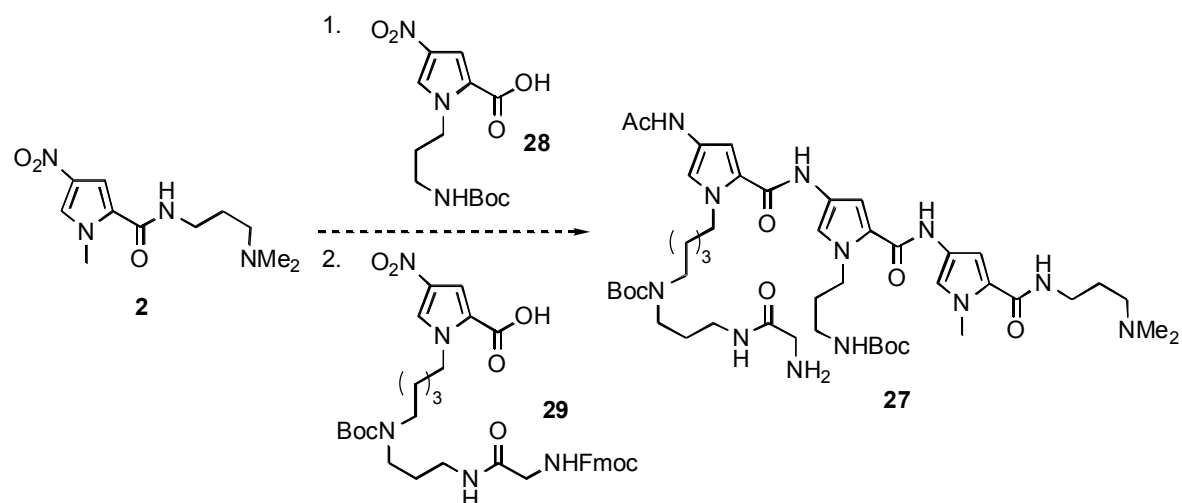
La síntesis de **A8** requeriría el acoplamiento selectivo de la amina primaria presente en la cadena del pirrol N-terminal sobre el péptido **RB2r**, siendo imprescindible la protección ortogonal de la amina primaria del pirrol central (esquema 4.1).



Esquema 4.1

Como grupo protector ortogonal para la amina de la cadena aminopropílica escogeríamos uno que fuese lábil a las condiciones de desprotección del péptido, para que pueda desprotegerse simultáneamente con las cadenas laterales en la etapa final de rotura de la resina. En este sentido, el grupo Boc (grupo protector de las cadenas laterales de las Lys) cumple a la perfección este cometido. Para la síntesis del sistema tripirrólico se pensó que una estrategia convergente, en la cual se ensamblen cada uno de los monómeros ya equipados con sus respectivas cadenas sería mejor que una lineal, ya que es más convergente y, además, simplificaría la purificación de los compuestos intermedios, menos polares que los pirroles sin alquilar. En el diseño de las unidades pirrólicas es necesario tener en cuenta que el grupo amino del pirrol N-terminal no puede protegerse con grupos como el alloc, que son incompatibles con la etapa de reducción mediante hidrogenación catalítica del grupo nitro de los nitropirroles intermedios. Consecuentemente, la mejor elección puede ser el grupo Fmoc, que se puede eliminar fácilmente en medio básico y es compatible con el grupo Boc.

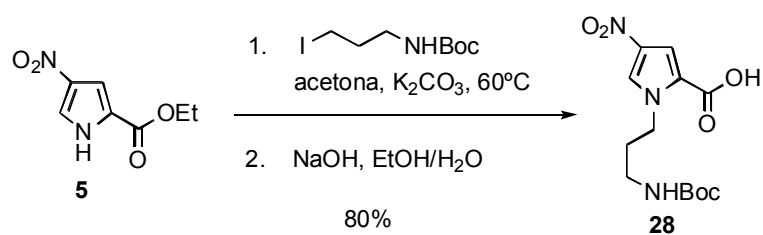
En base a estas consideraciones la síntesis del oligopirrol **27** se podría llevar a cabo ensamblando secuencialmente los pirroles monoalquilados que se indican en el esquema:



Esquema 4.2

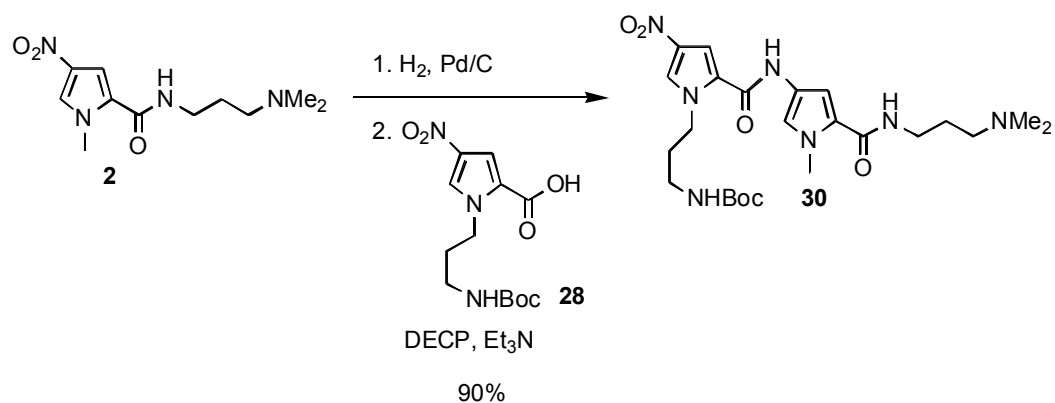
4.3 Síntesis del híbrido **A8**

La síntesis del pirrol **28** se llevó a cabo alquilando el éster pirrólico **5** con Boc-3-yodopropilamina seguido de hidrólisis en medio básico del éster.



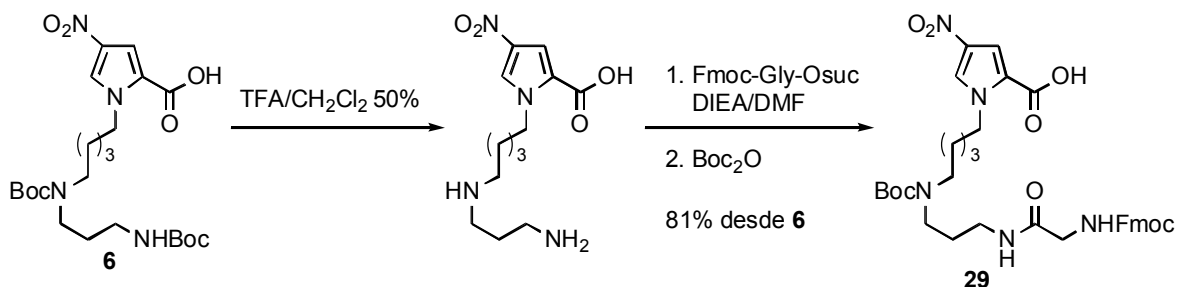
Esquema 4.3

Este ácido se acopló al pirrol **2** para dar el dipirrol **30** con un rendimiento del 90%.

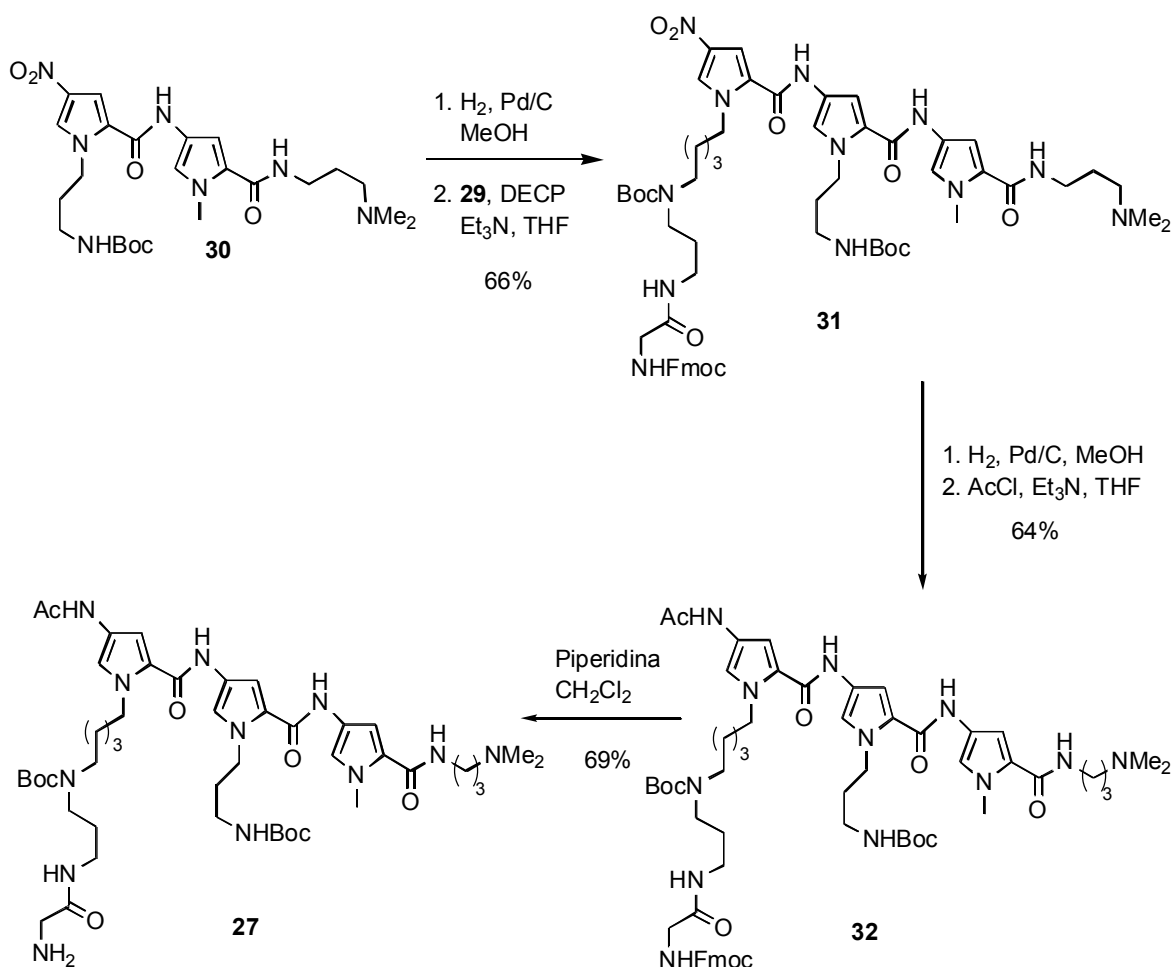


Esquema 4.4

La síntesis del pirrol terminal **29** se realizó a partir del pirrol **6**, cuya síntesis ya hemos descrito anteriormente para la obtención del tripirrol **1**. La eliminación de los grupos Boc, acoplamiento con 1 equiv de Fmoc-Gly y protección de la amina secundaria con Boc condujo al ácido deseado **27** (81%), que se purificó en columna de gel de sílice.



Una vez obtenidos los pirroles **29** y **30** se acoplaron siguiendo el procedimiento estándar para el acoplamiento de pirroles (esquema 4.6).



El grupo nitro del tripirrol **31** se redujo y la amina resultante se acetiló para dar el compuesto **32**. La eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo con piperidina y la purificación del aminotripirrol final **27** se realizó por cromatografía de HPLC en fase reversa debido a la alta polaridad de la amina y la dificultad para separarlo del aducto del Fmoc con la piperidina. El producto se identificó mediante RMN y masas (FAB+: calcd. 939.6, encontrada 939.6). Hay que destacar que presenta el mismo espectro de UV que los anteriores tripirroles acetilados.

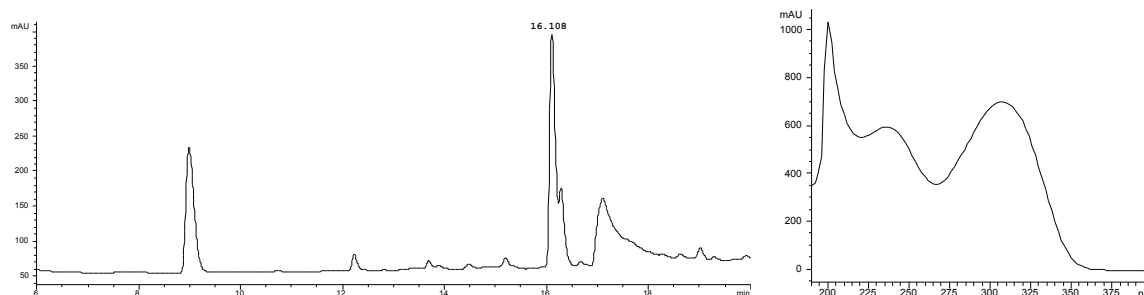
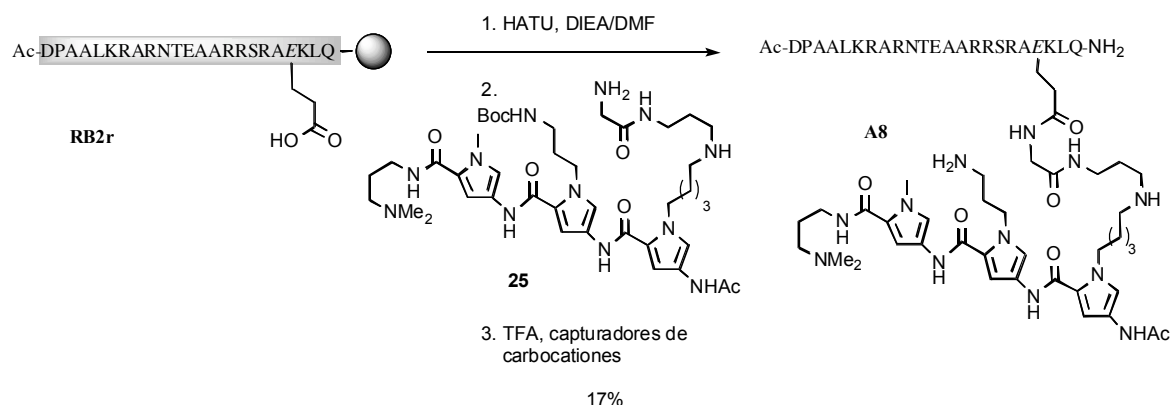


Figura 4.2 Cromatograma del crudo obtenido en la reacción eliminación del grupo Fmoc de **32**. A la derecha se muestra el espectro de UV del compuesto **27**. HPLC: gradiente lineal 5->95% B en 1/2 h.

El acoplamiento final del aminotripirrol **27** con el fragmento peptídico de la región básica **RB2r** se realizó en las condiciones habituales, activando con HATU y acoplado durante 2 horas. Finalmente, se obtuvo el híbrido **A8** con un rendimiento final global del 17% (considerando la síntesis de **RB2r**, acoplamiento y desprotección-rotura) una vez purificado por HPLC. El espectro de MALDI-TOF confirmó la identidad del compuesto (calcd. 3369.9, encontrada 3370.0).



La presencia del grupo amino en **A8** confiere mayor polaridad a este híbrido respecto a los anteriormente sintetizados, por eso el tiempo de retención observado en HPLC es menor que el de **A5**.

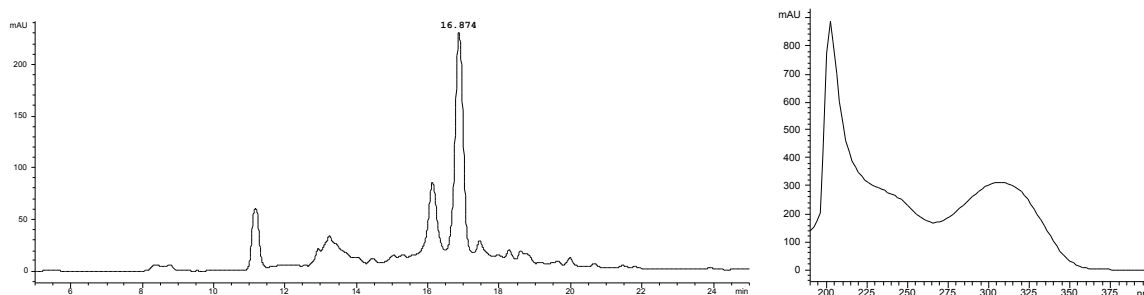


Figura 4.3 Cromatograma de HPLC del crudo obtenido en la reacción de acoplamiento para dar **A8** y espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 10->35% B en 1/2 h.

4.4 Evaluación de la interacción de **A8** con distintos ADN. Comparación con **A5**

Los datos experimentales de DC de **A8** en presencia de distintas secuencias de ADN se realizaron, en primer lugar, a 4°C para poder compararlos con los del híbrido de referencia **A5** (figura 4.4 a). La adición de CRE^{hs}-A/20 a **A8** induce un aumento muy grande de la elipticidad a 222 nm ($\theta \sim -32000$ °cm²dmol⁻¹, figura 4.4 a, curva ●) respecto al péptido solo ($\theta \sim -10000$ °cm²dmol⁻¹, figura 4.4 a, curva ○), mayor incluso que el obtenido para **A5** ($\theta \sim -27000$ °cm²dmol⁻¹ figura 4.4 a, curva ■).

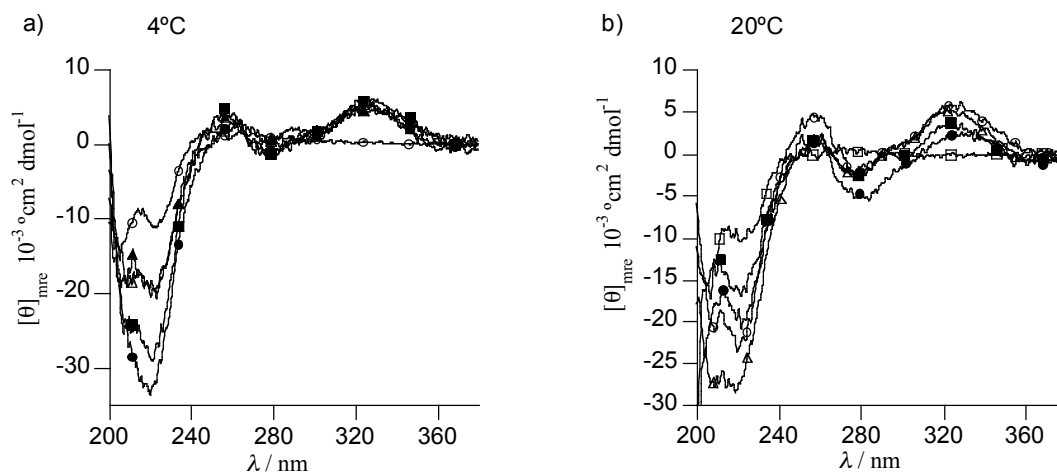


Figura 4.4 Espectros de DC de **A8** en ausencia y en presencia de diferentes ADN; a) a 4°C: en ausencia de ADN (○), en presencia de CRE^{hs}-A/20 (●), en presencia de CRE^{hs}m-A/20 (△), en presencia de CRE^{hs}/20 (▲). **A5** en presencia de CRE^{hs}-A/20 (■). b) a 20°C: en ausencia de ADN (□), en presencia de CRE^{hs}-A/20 (△), en presencia de CRE^{hs}m-A/20 (■), en presencia de CRE^{hs}/20 (●) y **A5** en presencia de CRE^{hs}-A/20 (○).

En presencia de las secuencias mutadas CRE^{hs}m-A/20 y CRE^{hs}/20 el incremento es significativamente menor ($\theta \sim -20000^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, figura 4.4 a, curvas Δ y \blacktriangle , respectivamente), lo que sugiere que la interacción de **A8** con su secuencia consenso CRE^{hs}-A/20 (figura 4.4 a, curva \bullet) conlleva, como sería de esperar, la inserción de la región peptídica en el surco mayor. Obviamente, también se observa claramente la banda correspondiente a la interacción del cromóforo tripirrólico con el ADN a 330 nm.

Lo más interesante, sin embargo, fue observar que a 20°C el descenso en el valor de la helicidad con el ADN diana CRE^{hs}-A/20 ($\theta \sim -26500^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, figura 4.4 b, curva Δ) era más importante que el que se producía para **A5** ($\theta \sim -22000^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, figura 4.4 b, curva \circ). Como era de esperar, el espectro de DC adquirido en presencia de CRE^{hs}m-A/20 o CRE^{hs}/20 a esa temperatura muestra una transición helicoidal más débil (figura 4.4 b, curvas \blacksquare y \bullet , respectivamente), consistente con el valor esperado para una interacción de tipo inespecífico.

Los ensayos de retardo en gel de poliacrilamida en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/20, a 23°C, revelaron que la mitad de la saturación con **A8** ocurría en torno a 5 nM, una concentración considerablemente menor que la de 50 nM requerida para que **A5** produzca la misma cantidad de complejo a esta misma temperatura (figura 4.5).

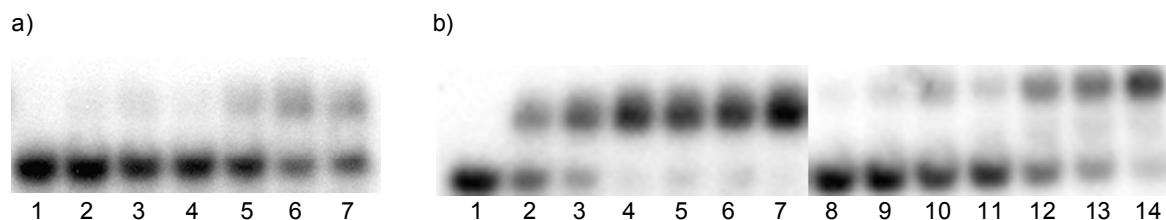


Figura 4.5 a) Autorradiograma mostrando la unión de **A5** a ³²P-CRE^{hs}-A/20 a 23°C: calles 1-7, [A5]= 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 nM. b) **A8**+³²P-CRE^{hs}-A/20, calles 1-7: [A8]= 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 nM. **A8**+³²P-CRE^{hs}m-A/20, calles 8-14: [A8]= 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 nM.

Al igual que **A5**, **A8** también forma un complejo de menor movilidad electroforética con el ADN mutado CRE^{hs}m-A/20, lo que puede ser atribuido como en otros casos a una interacción no específica sin inserción de la región básica en el surco mayor. En este caso, la mitad de la saturación se alcanza a concentraciones en torno a 40 nM, cerca de un orden de magnitud más que la necesaria en el caso de la secuencia diana.

Es interesante destacar que, a 4°C, **A8** interacciona con su secuencia consenso (CRE^{hs}-A/20) con constantes de disociación de orden subnanomolar (figura 4.6).

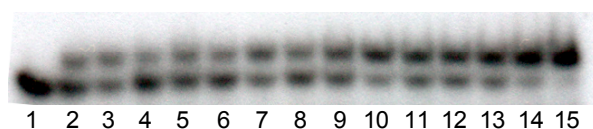


Figura 4.6 Valoración de ^{32}P -CRE^{hs}-A/20 con **A8** a 4°C. Calles 1-15, [A8]= 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 nM.

La constante de disociación de **A8** por CRE^{hs}/20 (que no posee la secuencia diana del tripirrol) a 23°C, se encuentra dentro del rango micromolar, ya que a concentraciones de 0.7 μM no se observa la formación de ningún complejo.

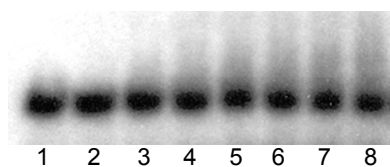


Figura 4.7 EMSA de **A8** en presencia de CRE^{hs}/20 a 23°C: calles 1-8, [A8]= 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 nM.

4.5 Conclusiones

Los resultados de electroforesis combinados con los datos de DC confirman que el nuevo conjugado péptido-tripirrol **A8** es capaz de unir a temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) a su secuencia consenso (5'-TCATAAAA-3') con constantes de disociación de orden nanomolar ($\sim 3\text{-}7$ nM), siendo enormemente selectivo respecto a secuencias en las que falta la región rica en adeninas y del orden de 10 veces más selectivo respecto a secuencias similares a la diana, pero con una única mutación en la zona de reconocimiento de la región básica de GCN4. Este aumento de afinidad con respecto al híbrido **A5**, es sin duda consecuencia de haber introducido el grupo aminopropilo sobre uno de los tripirroles, y confirma que las interacciones atractivas de carácter electrostático (puentes salinos) son de gran relevancia en este tipo de diseños y, probablemente, también más de lo pensado hasta el momento en el caso de los factores de transcripción naturales.

Con el híbrido **A8** estaríamos ya en condiciones de tratar de competir, al menos in vitro, con factores de transcripción cuya función pudiera verse afectada por la interacción de nuestro ligando con la secuencia TCATAAAA, pues la afinidad de nuestro sistema es similar o incluso mayor a la de muchas proteínas naturales que interaccionan con ADN. Es importante

destacar que a veces dicha interferencia no requiere una competición directa con el mismo sitio de unión, sino que podría producirse mediante efectos alostéricos o conformacionales indirectos propagados a través de la doble hélice ADN. **El híbrido A8 es el derivado peptídico sintético más pequeño preparado hasta el momento que muestra una afinidad tan alta por secuencias específicas de ADN de 8-9 pares de bases.**

5. Estudios iniciales sobre la preparación de híbridos con regiones básicas helicoidales preorganizadas

5.1 Objetivo y diseño

A pesar de que disponer del conjugado **A8** nos puede permitir pensar en realizar ensayos de actividad en el entorno celular, sería interesante tratar de mejorar todavía más los diseños de tal forma que la afinidad y, sobre todo, la especificidad de secuencia sean todavía mayores. Una posibilidad para aumentar más la estabilidad de los complejos de ADN con nuestros híbridos consistiría en incrementar la afinidad de la región básica peptídica. En concreto, pensamos que esto podría realizarse introduciendo algún elemento estructural en la región básica que preorganice el péptido en la conformación helicoidal necesaria para el reconocimiento, de tal forma que el coste entrópico del proceso de reconocimiento sea menor.

En principio esto podría ser también positivo desde el punto de vista de la especificidad ya que a través de esta estrategia se aumentaría la afinidad del modo de unión específico, pero no tendría porque aumentar la afinidad del modo inespecífico derivada de los contactos entre aminoácidos básicos y fosfatos; incluso esta interacción podría ser más débil cuando el péptido está preorganizado, ya que no estarían tan disponibles desde el punto de vista de flexibilidad conformacional las cadenas laterales básicas de la región peptídica.

Con esta idea nos propusimos como objetivo la síntesis del híbrido **A9** en el que hemos introducido modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la región básica. Estas modificaciones consisten fundamentalmente en introducir alaninas adicionales en el extremo C-terminal del péptido, así como en determinadas posiciones internas no implicadas en los contactos con el ADN. Es muy conocido que la presencia de este aminoácido favorece que los péptidos adopten estructuras secundarias de hélice α y, además, existe algún precedente de estabilización de este tipo de regiones básicas de proteínas bZIP.⁷⁵ También se introdujo una D-Arg en el extremo C-terminal, ya que existen estudios que demuestran que este aminoácido en dicha posición también favorece el aumento de helicidad.¹⁰³

⁷⁵ Lajmi, A. R.; Lovrencic, M. E.; Wallace, T. R.; Thomlinson, R. R.; Shin, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5638.

¹⁰³ Schneider, J. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2764.

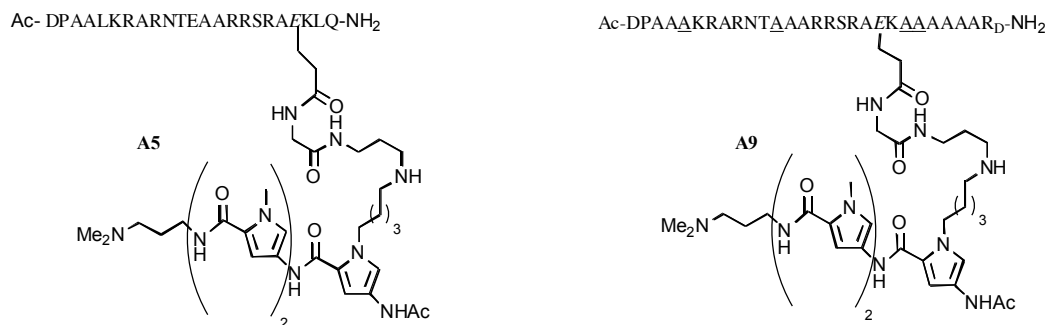
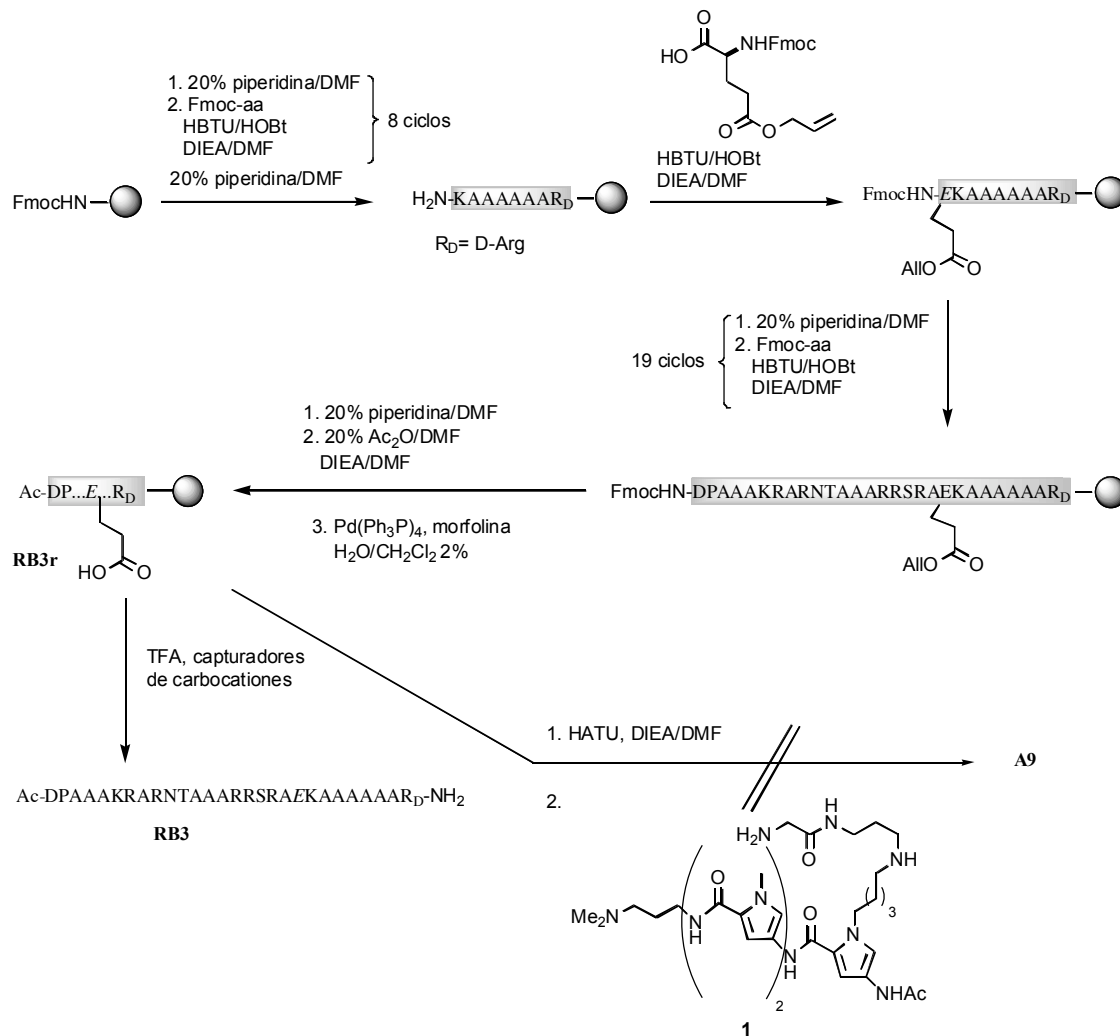


Figura 5.1 Estructura molecular de los híbridos **A5** y **A9**. Los aminoácidos cambiados en **A9** aparecen subrayados.

El péptido requerido para acoplar el sistema tripirrólico (**RB3**) se sintetizó en fase sólida siguiendo la metodología habitual, aunque los análisis por HPLC indicaron que la síntesis no es tan limpia como la del péptido **RB2**.



Esquema 5.1

En todo caso obtuvimos el péptido deseado unido a la resina, cuya

identidad se demostró desprotegiendo una alícuota y realizando un espectro de masas. La desprotección ortogonal del grupo alilo también transcurrió sin problemas.

Desafortunadamente, todos los intentos para acoplar el tripirrol **1** o cualquier otra amina en las más diversas condiciones- usando sales caotrópicas, N-metilpirrolidona (NMP) o mezclas NMP/trifluoretanol que poseen una gran capacidad de hinchamiento de resinas, calentando o probando otros agentes de acoplamiento- han resultado infructuosos recuperándose, en la mayoría de los casos, el péptido sin acoplar.

Recientemente, hemos observado que la utilización de TMUCl (agente activante especialmente indicado para acoplamiento difíciles)¹⁰⁴ conduce a la obtención de trazas del producto. Cabe esperar que utilizando resinas con mayor capacidad de hinchamiento- como la Tentagel- se pueda obtener el híbrido en mejores rendimientos y podamos disponer de suficiente cantidad para poder hacer los ensayos.

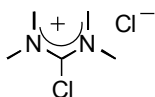


Figura 5.2 Estructura del TMUCl Cl.

¹⁰⁴ Vendrell, M.; Ventura, R.; Ewenson, A.; Royo, M.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5383.

6. Extensión de la estrategia para reconocer otras secuencias de ADN. Conexión del tripirrol a través del extremo N-terminal del péptido

6.1 Objetivo y diseño

Otro de los objetivos de nuestro trabajo consiste en demostrar que la estrategia de unión bivalente surco mayor-surco menor puede aplicarse para el reconocimiento de diferentes secuencias de ADN. Hasta el momento hemos conseguido demostrar que es posible reconocer secuencias 5'-TCATAAAA-3' (CRE^{hs}-A) cuando el tripirrol se une a una posición próxima al extremo C-terminal del péptido (híbridos de tipo **A**). La inspección de la estructura de rayos X de GCN4 nos muestra que la cadena lateral de la Arg232, un aminoácido situado en la zona N-terminal del péptido, está preorientada hacia al surco menor del lado opuesto hacia donde está la cadena lateral de la Arg245, donde habíamos hecho la conexión en los híbridos **A**. Esta orientación nos indujo a pensar que la conexión del tripirrol en la cadena lateral de dicha posición conduciría a un híbrido que hipotéticamente podría reconocer secuencias del tipo 5'-AAAA^XTCAT-3' (A-CRE^{hs}) (X= base/s espaciadora/s) (figura 6.1). Este diseño tendría un interés adicional debido a su paralelismo con el comportamiento de Skn-1, un factor de transcripción en el cual el reconocimiento se realiza a través de una hélice α que se inserta en el surco mayor del ADN, y que presenta contactos adicionales entre una región del extremo N-terminal y el surco menor de una secuencia contigua del ADN (sección 5.2).^{41,42}

⁴¹ a) Blackwell, T. K.; Bowerman, B.; Priess, J. R.; Weintraub, H. *Science* **1994**, *266*, 621. b) Pal, S.; Lo, M-C.; Schmidt, D.; Pelczer, I.; Thurber, S.; Walker, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5556. c) Lo, M-C.; Ha, S.; Pelczer, I.; Pal, S.; Walter, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8455.

⁴² Rupert, P. B.; Daughdrill, G. W.; Bowerman, B.; Matthews, B. *Nature Struct. Biol.* **1998**, *5*, 484.

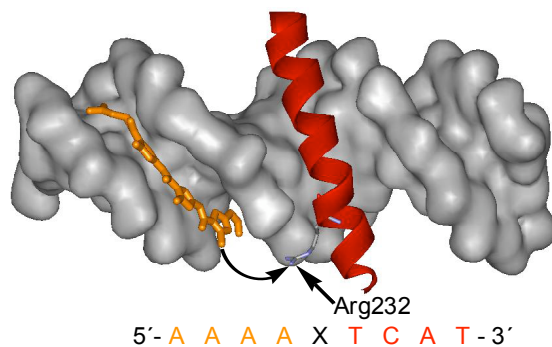
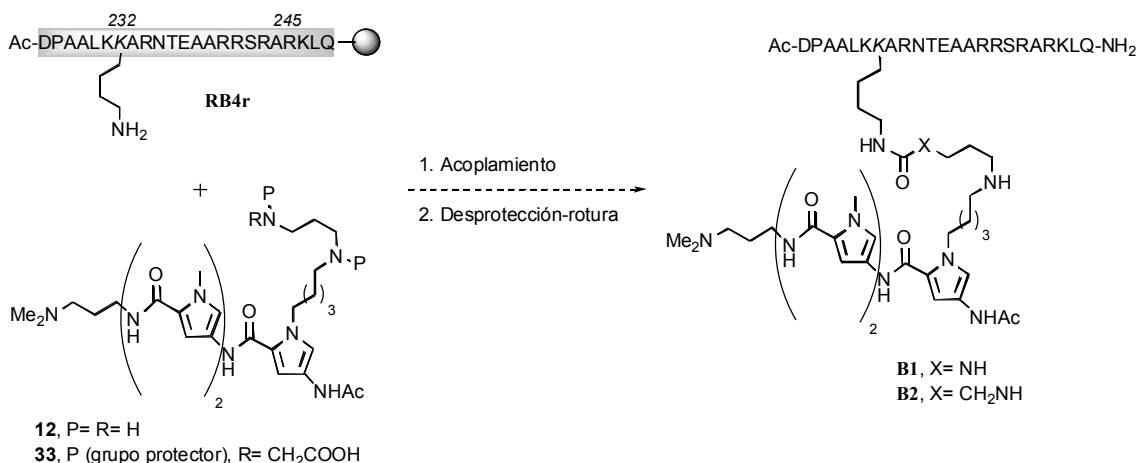


Figura 6.1 Modelo cualitativo para la interacción simultánea del tripirrol y la región básica de GCN4 en sitios adyacentes del ADN.

6.2 Planteamiento sintético

Al igual que sucedía con los híbridos conectados a través de la posición 245, por razones sintéticas decidimos reemplazar la Arg232 por otro aminoácido más adecuado para el acoplamiento con el tripirrol; en particular pensamos en una Lys. Ya que disponíamos del tripirrol **12** de la síntesis de los híbridos anteriores, podría llevarse a cabo el acoplamiento entre **12** y el fragmento **RB4r** anclado a la resina y desprotegido selectivamente en la Lys232 usando un agente de acoplamiento de tipo biselectrofílico como, por ejemplo, carbonato de disuccinimida, lo que daría lugar al híbrido **B1**.

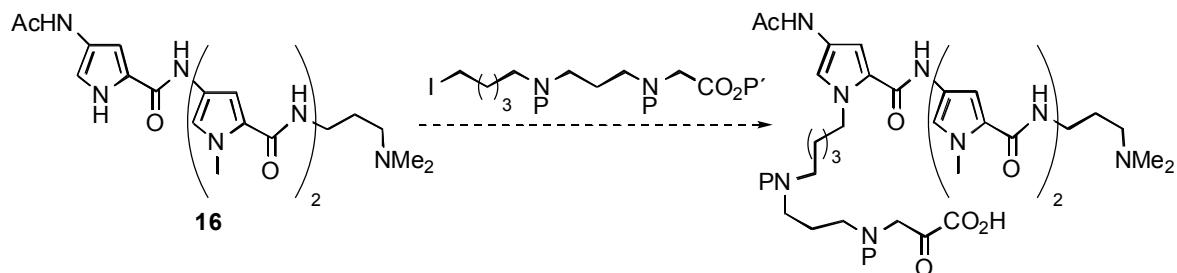


Esquema 6.1

Dado que es difícil predecir si la longitud de la cadena de conexión en el híbrido **B1** es adecuada y, sobre todo, cual puede ser el efecto de introducir un grupo funcional tipo urea en el medio del conector, también decidimos sintetizar un híbrido (**B2**) con una cadena de conexión

ligeramente más larga (~2.5-3 Å) y que conecta el péptido al tripirrol mediante un grupo amida.

La obtención del derivado ácidotripirrólico necesario para la síntesis de **B2** se podría realizar mediante una alquilación del tripirrol **16** con un yoduro adecuado.

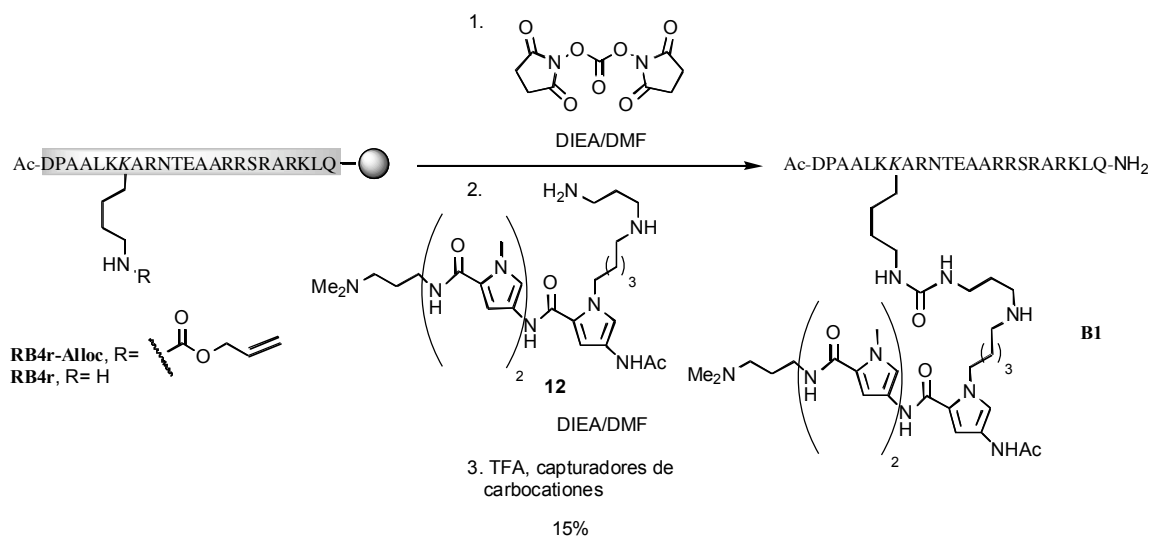


Esquema 6.2

6.3 Síntesis de los híbridos **B1** y **B2**

La síntesis en fase sólida del péptido **RB4r-Alloc** (sección D, pág. 163) se llevó a cabo utilizando las condiciones estándar, e introduciendo en la posición 232 una Lys(alloc), con el fin de que pueda ser desprotegida selectivamente con $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ para dar **RB4** (ESI-TOF: calcd. 2648.5, encontrada 2648.8).

Para la síntesis del híbrido **B1** (esquema 6.3) se hizo reaccionar primero el péptido unido a la resina **RB4r** con carbonato de disuccinimida (15 equiv) y, después, se acopló el aminotripirrol **12** (4 equiv). El híbrido resultante se purificó por HPLC obteniéndose con un rendimiento aproximado del 15% (MALDI-TOF: calcd. 3312.9, encontrada 3312.6).



Esquema 6.3

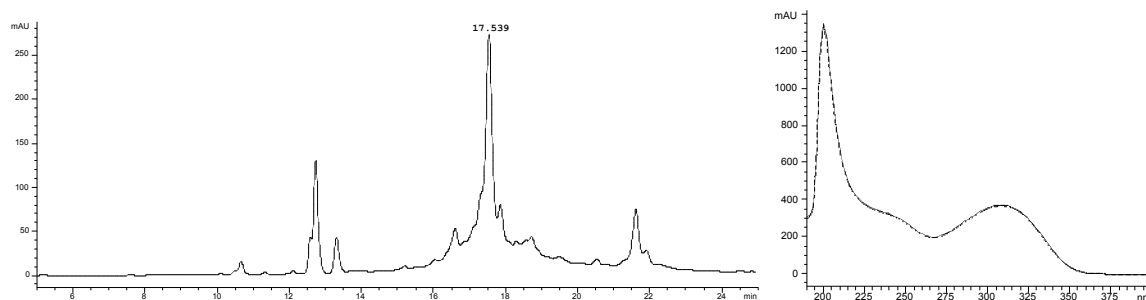
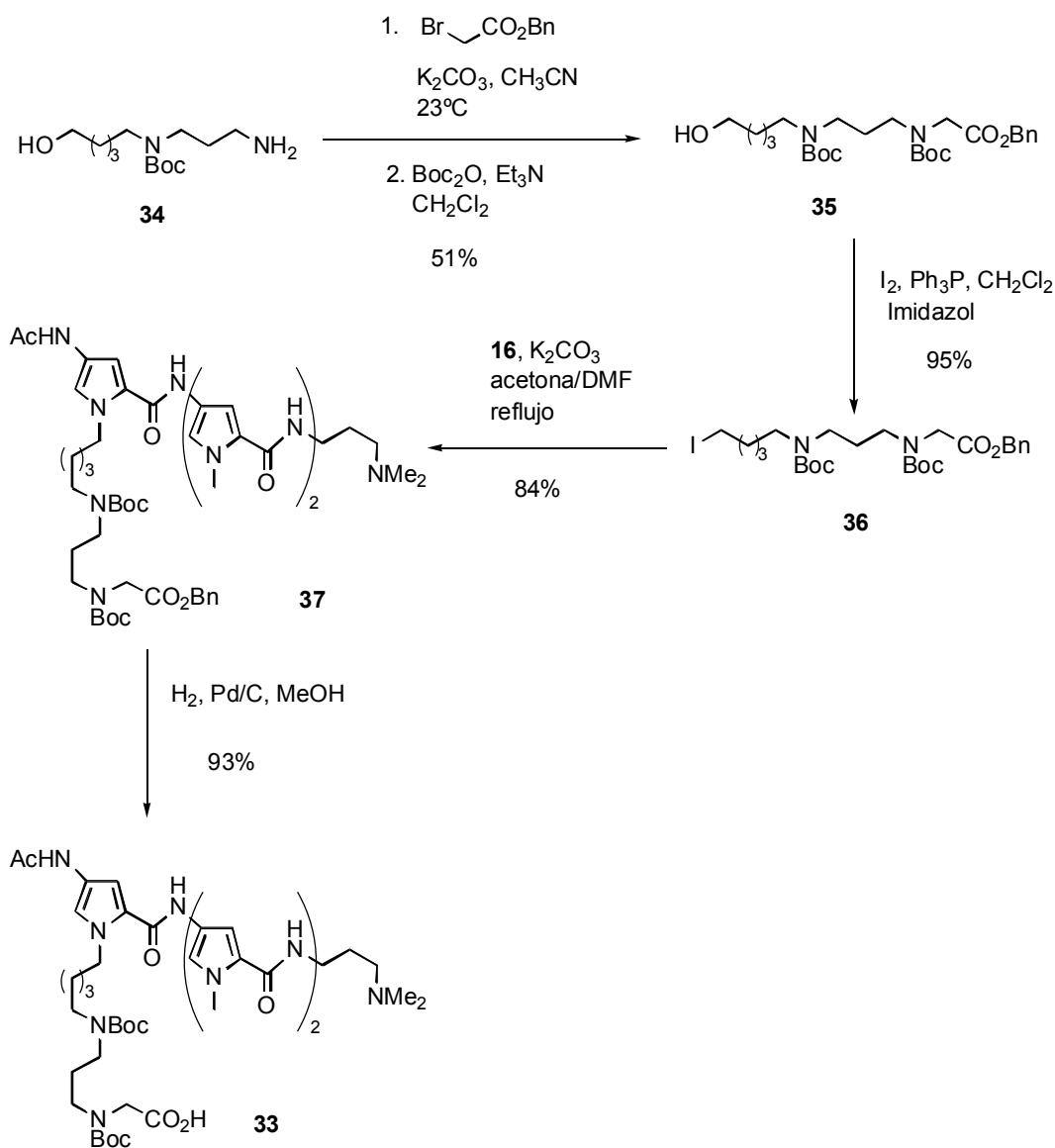


Figura 6.2 Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de la reacción de acoplamiento para dar **BI** y espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 10→35% B en 1/2 h.

El ácido **33**, necesario para preparar el híbrido **B2**, se obtuvo alquilando el tripirrol **16** (página 77) con el yoduro **36** y eliminando luego el bencilo mediante hidrogenación catalítica (78%, esquema 6.4).



Esquema 6.4

El yododerivado **36** se preparó alquilando la amina **34** (intermedio en la síntesis de **7**, pág. 60) con bromoacetato de bencilo, seguido de protección de la amina secundaria y yodación del alcohol. El oligopirrol resultante se identificó como el compuesto deseado **33** por RMN y masas (FAB+: calcd. 897.5, encontrada 897.5).

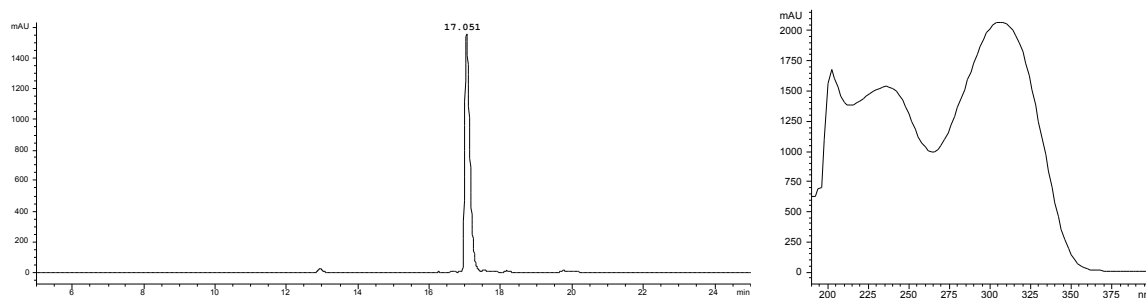
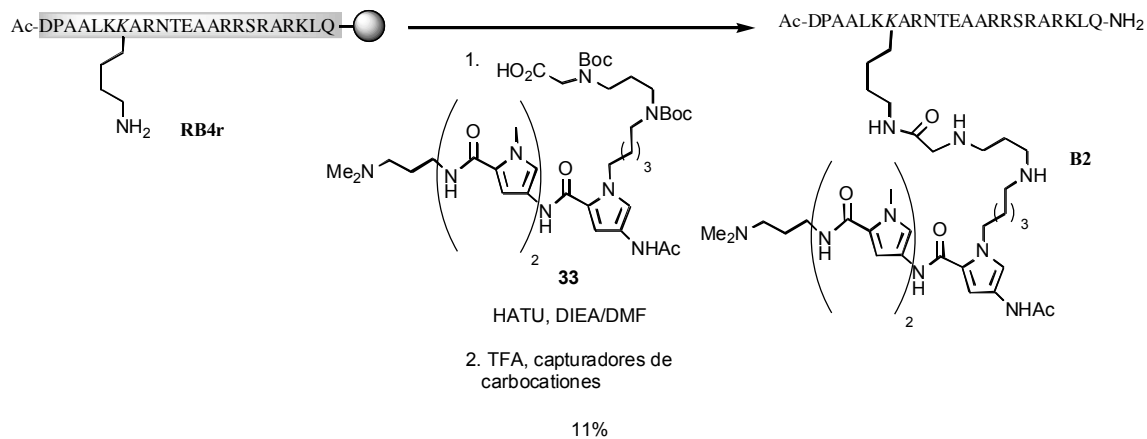


Figura 6.3 Cromatograma de **33** una vez purificado y espectro de UV. HPLC: gradiente lineal 5->95% B en 1/2 h.

La síntesis del híbrido **B2** se llevó a cabo mediante el acoplamiento del ácido **33** (4 equiv) activado con HATU con el fragmento **RB4r** (2 horas). Tras la rotura y desprotección de la resina se aisló el híbrido **B2** con un rendimiento aproximado del 11%, identificándose mediante MALDI (calcd. 3326.9, encontrada 3326.9)



Esquema 6.5

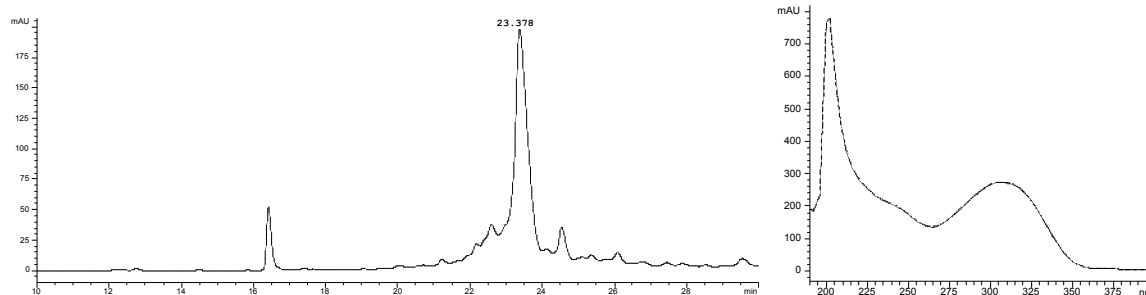
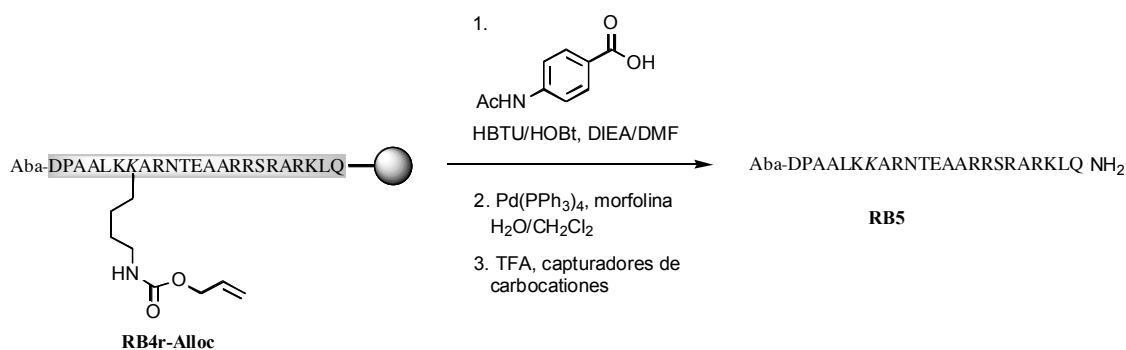


Figura 6.4 Cromatograma del crudo de desprotección de la reacción de acoplamiento para dar **B2** y espectro de UV del híbrido. HPLC: gradiente lineal 10→35% B en 1/2 h.

Con el fin de disponer de un péptido control para los estudios de interacción, también se preparó el péptido **RB5**, que está equipado con un cromóforo (Aba) en el extremo N-terminal, lo que facilita su cuantificación y seguimiento.



Esquema 6.6

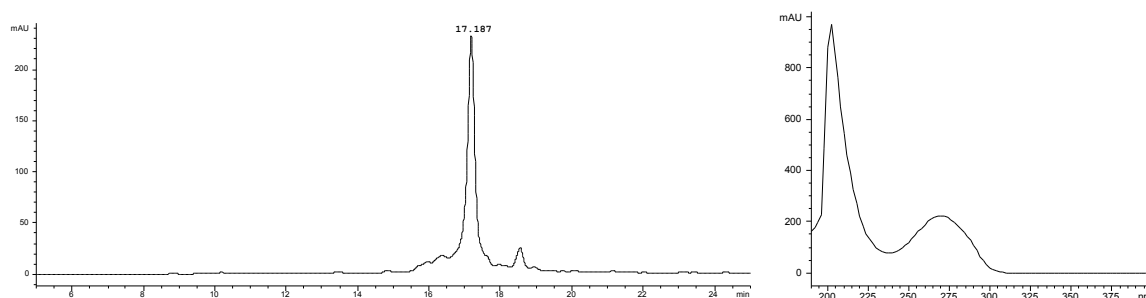


Figura 6.5 Cromatograma del crudo de desprotección para dar **RB5** y espectro de UV del péptido. HPLC: gradiente lineal 10→35% B en 1/2 h.

6.4 Evaluación de las interacciones de B1, B2, y RB5 con distintos ADNs

Para evaluar las propiedades de los híbridos **B** se utilizaron los siguientes oligonucleótidos de doble cadena:

A-CRE ^{hs} /18	5'-CTGCG AAAA TCATAGCAG-3' 3'-GACGC TTTT AGTATCGTC-5'
AcCRE ^{hs} /18	5'-CTGC AAAAG TCATAGCAG-3' 3'-GACG TTTT CAGTATCGTC-5'
A-CRE ^{hs} /20	5'-GCTGCG AAAA TCATAGCAGC-3' 3'-CGACGC TTTT AGTATCGTCG-5'
T-CRE ^{hs} /20	5'-CTGCG ATTTT TCATAGCAGC-3' 3'-GACGC TAAAA AGTATCGTCG-5'
A-CRE ^{hs} m/18	5'-CTGCG AAAA TCGTAGCAG-3' 3'-GACGC TTTT AGCATCGTC-5'
A-CRE ^{hs} m/20	5'-GCTGCG AAAA TCGTAGCAGC-3' 3'-CGACGC TTTT AGCATCGTCG-5'
A-CRE ^{hs} 2m/20	5'-GCTGCG AAAA TGCTAGCAGC-3' 3'-CGACGC TTTT ACGATCGTCG-3'
CRE ^{hs} /20	5'-GCTGCGACGATCATAGCAGC-3' 3'-CGACGCTGCTAGTATCGTCG-3'
NON/20	5'-GCAGCTGCAGCTGCAGCTGC-3' 3'-CGTCGACGTCGACGTCGACG-3'

Esquema 6.7

A-CRE^{hs}/18 y A-CRE^{hs}/20 se diferencian únicamente en el número de bases y contienen las secuencias híbridas teóricamente apropiadas para el reconocimiento por parte de los híbridos, con los sitios de unión del tripirrol y de la región básica en posiciones contiguas. T-CRE^{hs}/20 posee una secuencia alternativa para el tripirrol. AcCRE^{hs}/18 posee una base espaciadora entre las dos secuencias de unión. A-CRE^{hs}m/18 y A-CRE^{hs}m/20 son oligos que presentan una mutación en la zona de reconocimiento de la región básica y A-CRE^{hs}2m/20 posee dos mutaciones. CRE^{hs}/20 carece del lugar consenso de unión del tripirrol y NON/20 es una secuencia aleatoria.

La adición de **B1** a la secuencia diana A-CRE^{hs}/20 causó un incremento elevado en la intensidad de la señal de dicroísmo circular a 222 nm ($\theta_{222} \sim -31000$, figura 6.6 a, curva \square). Tal variación es consistente con la formación de un porcentaje significativo de hélice α . Se observa, además, la aparición de la banda a 330 nm, que corresponde a la interacción del cromóforo tripirrólico con el surco menor de su secuencia consenso. En

presencia de A-CRE^{hs}/18- más corto que A-CRE^{hs}/20- el espectro de DC es prácticamente idéntico (figura 6.6 b, curva ▲).

Igualmente, la adición de **B1** a AcCRE^{hs}/18- que contiene una base separando las secuencias consenso de reconocimiento del péptido y el tripirrol induce los mismos cambios espectrales (figura 6.6 b, curva ●), dato que parece indicar que la cadena de conexión es lo suficientemente larga como para permitir la inserción simultánea en los surcos mayor y menor incluso en secuencias separadas por un par de bases. La adición de A-CRE^{hs}m/20 a **B1** produce una variación menor de la helicidad del péptido, pero bastante significativa (figura 6.6 a, curva ○), como también ocurre con el ADN en el que la región CRE^{hs} se muta en dos bases (A-CRE^{hs}2m/20, figura 6.6 a, curva ●).

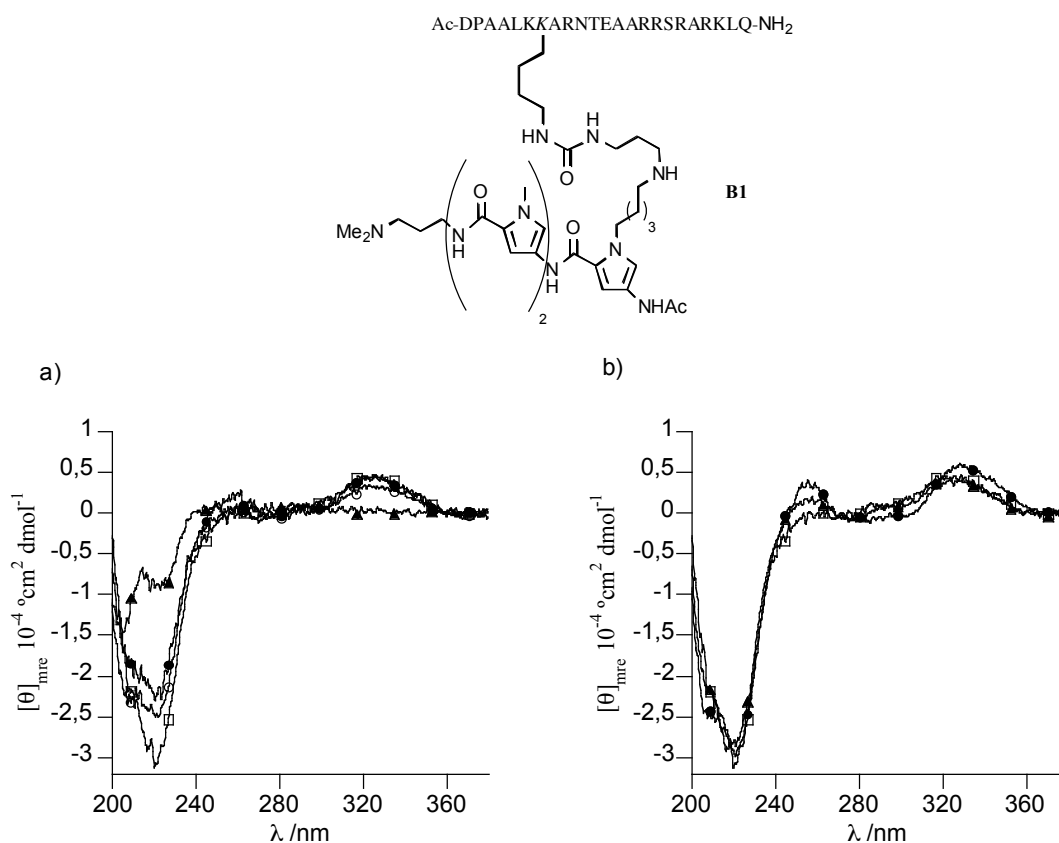


Figura 6.6 Espectros de DC de **B1** en ausencia y en presencia de distintos ADNs. a) en ausencia de ADN (▲), en presencia de A-CRE^{hs}/20 (□), en presencia de A-CRE^{hs}m/20 (○), en presencia de A-CRE^{hs}2m/20 (●). b) **B1** en presencia de A-CRE^{hs}/20 (□), en presencia de A-CRE^{hs}/18 (▲), en presencia de AcCRE^{hs}/18 (●).

Este aumento bastante significativo de la intensidad negativa de la banda a 220 nm, contrasta con lo que ocurría en el caso de los híbridos en los que el tripirrol estaba unido al aminoácido 245 de la región básica, y

sugiere que la región peptídica del híbrido **B1** exhibe una mayor tendencia intrínseca a plegarse en una hélice α cuando contacta con diferentes ADN. De hecho también hemos comprobado que en presencia de un oligonucleótido de doble cadena que no contiene la zona de unión del tripirrol ($\text{CRE}^{\text{hs}}/20$, figura 6.7, curva \square) sigue habiendo una proporción considerable de helicidad ($\theta_{222} \sim -25000$). Cuando el ADN tiene una secuencia aleatoria como la presente en $\text{NON}/20$ (figura 6.7, curva \bullet), el aumento de elipticidad es más pequeño.

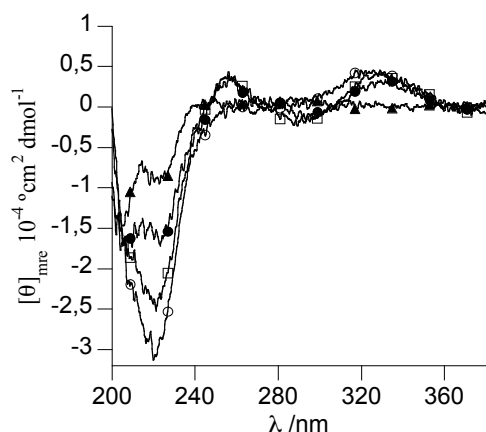


Figura 6.7 Espectros de DC de **B1** en ausencia y en presencia de distintos ADNs: en ausencia de ADN (\blacktriangle), en presencia de $\text{A-CRE}^{\text{hs}}/20$ (\circ), en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}/20$ (\square), en presencia de $\text{NON}/20$ (\bullet).

Por otra parte, hemos comprobado que la adición de cualquiera de los ADNs, incluyendo los que contienen la secuencia consenso de reconocimiento de la región básica, al péptido control **RB5**- que no posee el tripirrol- no genera cambios en la elipticidad a 222 nm ($\theta_{222} \sim -12000$, figura 6.8 a, curva \blacksquare). Por lo tanto, es necesario el derivado tripirrólico y la cadena de conexión para que se produzca una interacción con el ADN que provoque cambios conformacionales en la región básica del péptido.

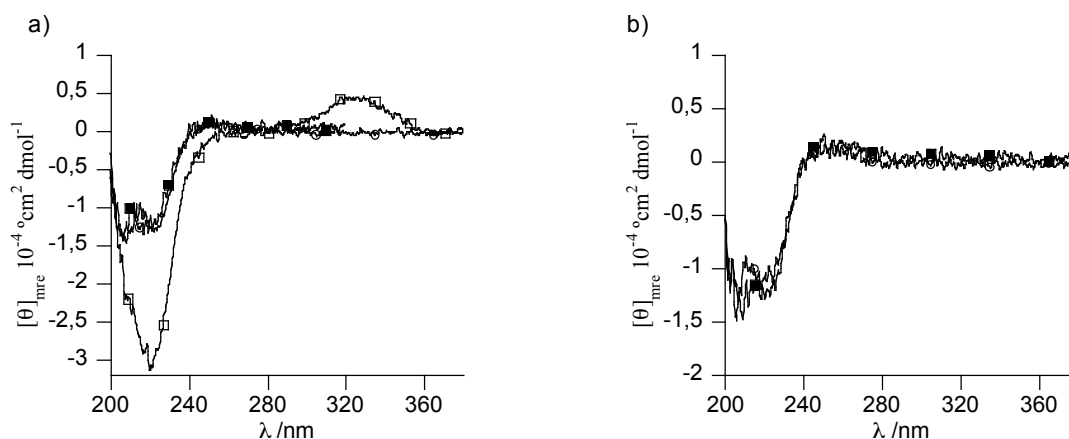


Figura 6.8 Espectros de DC de **RB5** en ausencia y en presencia de distintos ADN: a) en ausencia de ADN (O), en presencia de A-CRE^{hs}/20 (■); **B1** en presencia de A-CRE^{hs}/20 (□). b) **RB5** en presencia de A-CRE^{hsm}/20 (O), en presencia de CRE^{hs}/20 (■).

Los datos de dicroísmo indican claramente que una gran proporción de la región básica del híbrido **B1** se pliega en una hélice α cuando se adiciona el ADN que contiene la secuencia diana híbrida correcta, lo cual es consistente con el modo bivalente de interacción específica esperado. Aunque el hecho de que la adición de ADNs con mutaciones en la región básica también genere un plegamiento helicoidal considerable pudiera llevar a pensar en una inserción similar de la región básica en el surco mayor, esta posibilidad no parece demasiado verosímil debido precisamente a que están mutadas bases claves para la interacción específica. Existen precedentes que indican que, en algunos casos, ADNs con secuencias no específicas pueden ser también capaces de inducir una cierta proporción de plegamiento en la región básica de proteínas bZIP como consecuencia de contactos con los fosfatos.⁹⁸

El análisis por EMSA de las interacciones entre **B1** y ³²P-A-CRE^{hs}/20 confirmó que se formaba un complejo que debe ser debido a la interacción esperada, observándose que la mitad de saturación se obtiene a concentraciones de híbrido en torno a 30 nM. En presencia de las secuencias mutadas en la región de unión específica del péptido (A-CRE^{hsm}/20 y A-CRE^{hsm}/20) también se forma un complejo que migra más lentamente que el obtenido con el ADN específico A-CRE^{hs}/20 (figura 6.9 a, calles 6-10 y 11-15, respectivamente). Tal como se esperaba, la incubación de **B1** con CRE^{hs}/20 no produjo bandas detectables en el gel (figura 6.9 b, calles 10-15), ni tampoco se observaron cuando se incubó el péptido control **RB5** en presencia de A-CRE^{hs}/20 (figura 6.9 b, calles 3-9).

⁹⁸ Hollenbeck, J. J.; Oakley, M. G. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6380.

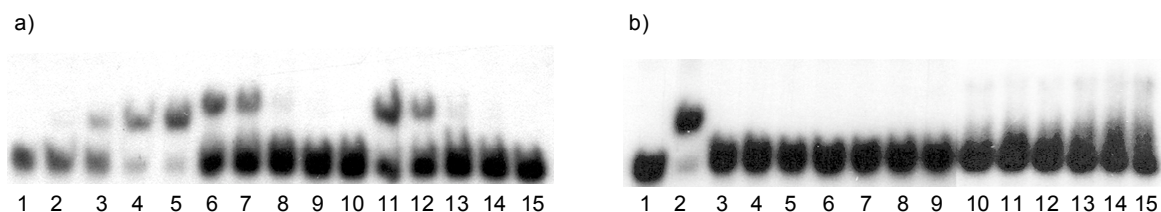


Figura 6.9 Autorradiogramas mostrando la unión de **B1** y **RB5** a distintos ADNs. a) calles 1-5, $B1+^{32}P-A-CRE^{hs}/20$, $[B1]= 0, 10, 20, 60, 100$ nM; calles 6-10, $B1+^{32}P-A-CRE^{hs}2m/20$, $[B1]= 100, 60, 20, 10, 0$ nM; calles 11-15, $B1+^{32}P-A-CRE^{hs}m/20$, $[B1]= 100, 60, 20, 10, 0$ nM. b) calles 1-2, $B1+^{32}P-A-CRE^{hs}/20$, $[B1]= 0, 100$ nM; calles 3-9, $RB5+^{32}P-A-CRE^{hs}/20$, $[RB5]= 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 5$ μ M; calles 10-15, $B1+^{32}P-A-CRE^{hs}/20$, $[B1]= 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 5$ μ M.

Estos datos de electroforesis indican que con el ADN híbrido que tiene las secuencias consenso se forma un complejo de alta estabilidad y, junto con los datos de dicroísmo circular, se puede afirmar que en dicho complejo ambos módulos de reconocimiento deben estar insertados en sus respectivos surcos. En presencia de los ADNs mutados en la zona de reconocimiento del péptido también se genera un complejo de alta afinidad, aunque al menos 3 veces menos estable que el formado con el ADN diana. A pesar de que los datos de DC indicaban que en estos complejos la región básica presenta un grado notable de helicidad, el retardo observado en el gel unido a la naturaleza de las secuencias de ADN sugiere que el complejo implica, además de la interacción del tripirrol en el surco menor, una interacción inespecífica de la región básica con la superficie fosfatídica del ADN, interacción que en todo caso genera una cierta organización helicoidal.

Realizando una valoración con $^{32}P-A-CRE^{hs}/18$ se ha deducido una constante de disociación para el complejo **B1-A-CRE^{hs}/18** de aproximadamente 35 ± 2 nM a $4^\circ C$.

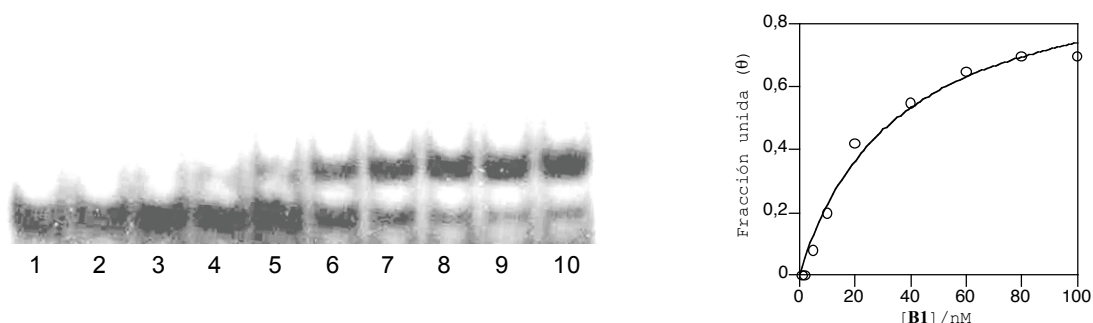


Figura 6.10 Valoración de **B1** con $^{32}P-A-CRE^{hs}/18$. Calles 1-10, $[B1]= 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100$ nM. A la derecha se muestra la representación gráfica de los valores ajustados a la ecuación $\theta = P / (P + K_d)$.

Aunque los experimentos de DC de **B1** en presencia A-CRE^{hs}/18 y AcCRE^{hs}/18 mostraban valores de helicidad prácticamente idénticos para el péptido, los ensayos de EMSA revelan que la afinidad de **B1** por la secuencia AcCRE^{hs}/18- que contiene un espaciador- es algo menor que por la secuencia A-CRE^{hs}/18.

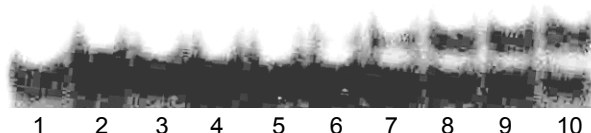


Figura 6.11 Valoración de **B1** con ³²P-AcCRE^{hs}/18. Calles 1-10, [**B1**]= 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM.

Aunque la afinidad es menor, los datos de desplazamiento, y de DC, son consistentes con que el modo de unión bivalente siga siendo específico (pirrol-surco menor, péptido plegado en hélice α -surco mayor).

Con una secuencia alternativa para la unión del tripirrol (T-CRE^{hs}/20) vemos que la afinidad es exactamente igual que para la secuencia A-CRE^{hs}/20.

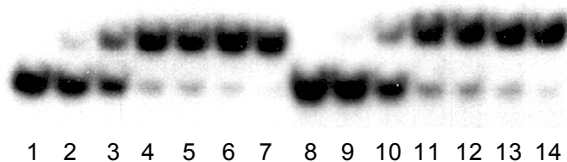


Figura 6.12 EMSA de **B1** con ³²P-A-CRE^{hs}/20 y ³²P-T-CRE^{hs}/20. Calles 1-7: ³²P-A-CRE^{hs}/20+**B1**, [**B1**]= 0, 10, 20, 40, 60, 80, 120 nM. Calles 8-14: ³²P-T-CRE^{hs}/20+**B1**, [**B1**]= 0, 10, 20, 40, 60, 80, 120 nM.

En la figura 6.13 se representan datos de electroforesis comparando la retención observada en los complejos de **B1** con diferentes ADNs. En este caso hemos usado como revelado una tinción con una sustancia que es fluorescente en presencia de ADN, lo cual es ventajoso pues no requiere marcar radioactivamente los oligonucleótidos, aunque para poder observar las bandas es necesario utilizar cantidades mayores de ADN. Este ensayo también demuestra que en presencia de CRE^{hs}-A- secuencia consenso para **A5**- el complejo con **B1** induce una banda que migra a la misma velocidad que las de los complejos de **B1** en presencia de los ADNs mutados A-CRE^{hs}m/20 y A-CRE^{hs}2m/20, lo que está en consonancia con un modo similar de complejación, menos compacto que con el ADN diana.

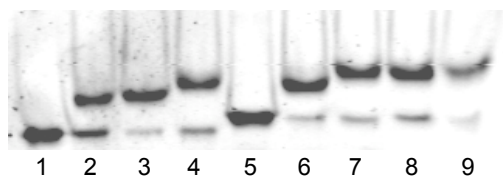


Figura 6.13 Comparación de la migración relativa de **B1** en presencia de diferentes ADN. El gel fue revelado mediante la fluorescencia emitida por SyBr Gold. En todas las calles la concentración de ADN es 50 nM y la de **B1**- cuando está presente- es 200 nM. Calle 1: AcCRE^{hs}/18, calle 2: AcCRE^{hs}/18+**B1**, calle 3: A-CRE^{hs}/18+**B1**, calle 4: A-CRE^{hs}m/18+**B1**, calle 5: CRE^{hs}-A/20, calle 6: A-CRE^{hs}/20+**B1**, calle 7: CRE^{hs}m-A/20+**B1**, calle 8: A-CRE^{hs}m/20+**B1**, calle 9: CRE^{hs}-A/20+**B1**.

La adición de los diferentes ADN de doble cadena al conjugado péptido-tripirrol **B2** induce cambios espectrales de DC similares a los observados con **B1**, comprobándose también un plegamiento helicoidal considerable en presencia de la secuencia A-CRE^{hs}m/18 que contiene una mutación en la secuencia de reconocimiento del péptido (figura 6.14, curva ■). La helicidad de **B2** con A-CRE^{hs}/18 ($\theta_{222} \sim -25500$, figura 6.14, curva □) es ligeramente menor que la observada en el complejo **B1**-A-CRE^{hs}/18 (figura 6.14, curva ○).

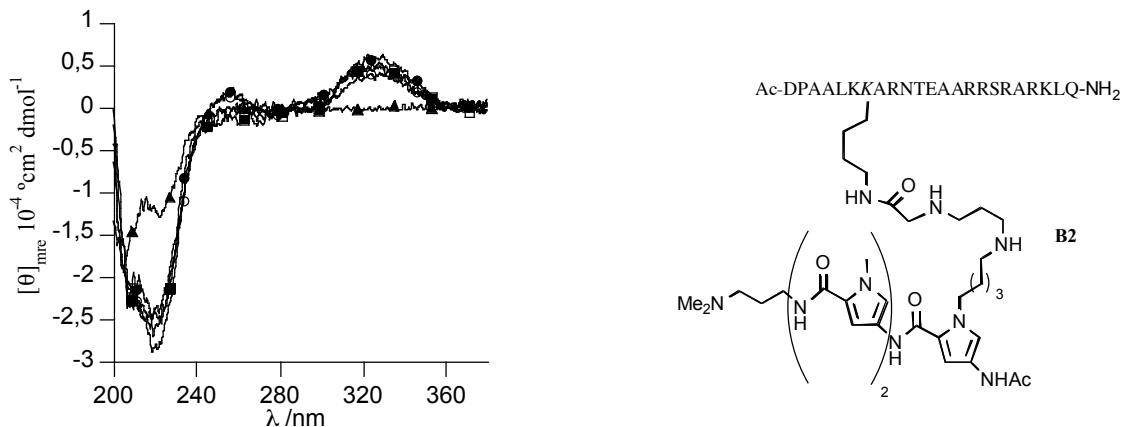


Figura 6.14 Espectros de DC de **B2** en ausencia y en presencia de distintos ADN: en ausencia de ADN (▲), en presencia de A-CRE^{hs}/18 (□); en presencia de AcCRE^{hs}/18 (●), en presencia de A-CRE^{hs}m/18 (■). **B1** en presencia de A-CRE^{hs}/18 (○).

Los experimentos de retardo en gel de electroforesis muestran que la afinidad de **B2** por A-CRE^{hs}/20 es, como mínimo, 2 veces menor que la de **B1** por la misma secuencia, pues a concentraciones de 60 nM de **B1** la unión al ADN se encuentra prácticamente saturada, mientras que en el complejo **B2**-A-CRE^{hs}/20 sólo se observa la mitad de la fracción unida (figura 6.15).

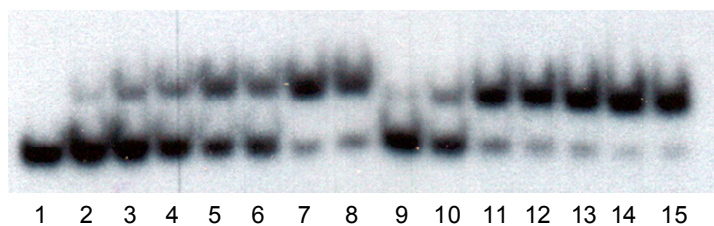


Figura 6.15 Valoración de **B2** y **B1** con $^{32}\text{P-A-CRE}^{\text{hs}}/20$. Calles 1-8: $^{32}\text{P-A-CRE}^{\text{hs}}/20+\text{B2}$, $[\text{B2}] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 \text{ nM}$. Calles 9-15: $^{32}\text{P-A-CRE}^{\text{hs}}/20+\text{B1}$, $[\text{B1}] = 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 \text{ nM}$.

Así pues, aunque **B2** tiene una cadena de conexión más larga que **B1**, su afinidad por $\text{A-CRE}^{\text{hs}}/20$ es algo menor. Se pueden dar dos posibles explicaciones a este resultado: una es que la presencia de las dos aminas secundarias en el conector de **B2** puede provocar una interacción con los fosfatos y ejercer un efecto de pinza sobre el ADN deformando la geometría ideal del conector y, por ende, la del complejo, y otra es que la cadena es demasiado larga y entrópicamente es más costoso el plegamiento del péptido en el surco. También podría pensarse que el caso de **B1** la interacción es mejor debido a la presencia del grupo uretano en la cadena de conexión, que podría inducir alguna interacción estabilizante basada en un enlace de hidrógeno bidentado con los fosfatos.

6.5 Conclusiones

Hemos demostrado que la estrategia de unión bivalente región básica-surco mayor/tripirrol-surco menor, que habíamos desarrollado para el reconocimiento de la secuencia $5'-\text{TCATAAAA}-3'$ ($\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A}$) puede ser aplicable al reconocimiento de secuencias inversas $5'-\text{AAAAATCAT}-3'$ (A-CRE^{hs}). Esto se consiguió diseñando un nuevo tipo de conjugados basados en conectar el tripirrol cerca del extremo N-terminal del péptido y por la cara opuesta de los híbridos **A**. El mejor de los dos híbridos sintetizados hasta el momento (**B1**) interacciona específicamente a 4°C con una constante de disociación en torno a 35 nM .

El modo de interacción de los híbridos **B** de alguna forma es similar al del factor de transcripción monomérico natural Skn-1, que es capaz de reconocer con alta afinidad la secuencia $5'-\text{ATTGTCAT}-3'$. Parece claro que si diseñamos una molécula alternativa al tripirrol que pudiera interactuar selectivamente con la secuencia **AAAA** podríamos estar en condiciones de mimetizar este factor de transcripción con un péptido

sintético relativamente sencillo y pequeño, y en su caso interferir de forma programada con su actividad.

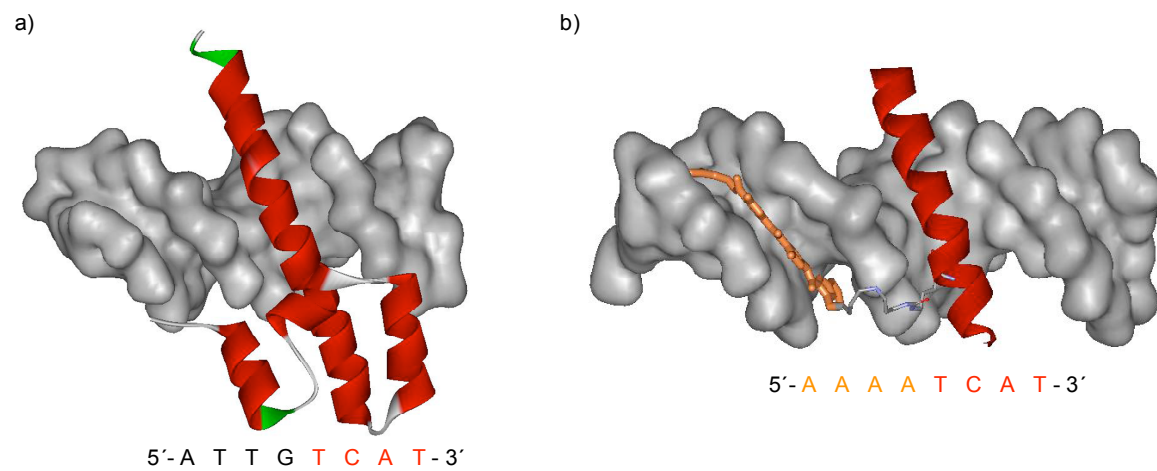


Figura 6.16 a) Estructura del complejo Skn-1:ADN. b) Modelo hipotético de interacción del híbrido **B1** con su secuencia diana.

7. Desarrollo de versiones del sistema en las que los módulos de reconocimiento están conectados a través de uniones no covalentes

7.1 Objetivo y diseño

Todos los híbridos diseñados hasta el momento tienen unidos covalentemente la región peptídica y el fragmento tripirrólico. Como hemos visto, uno de los problemas que presentan estos compuestos derivan de la relativamente elevada afinidad que presentan por todos los sitios que contienen una zona de interacción del tripirrol (secuencia rica en A), que es entre 5 y 10 veces menor que la afinidad del modo de unión específico con las secuencias híbridas diana. Esto representa un problema de especificidad sobre todo si se piensa en ADN's grandes, como el del genoma, en los que existirían múltiples secuencias a las que se podría unir el derivado tripirrólico de forma competitiva con la secuencia consenso. El problema sería fundamentalmente cinético, ya que los híbridos podrían quedar atrapados un tiempo relativamente largo en dichas secuencias y, por lo tanto, les costaría más alcanzar la secuencia diana.

Pensamos que una posibilidad atractiva para abordar este tipo de problemas podría basarse en diseñar un sistema en el que **el péptido y el tripirrol estén unidos de forma no covalente**. La idea consiste en que ambos módulos presenten afinidades bajas o moderadas por sus secuencias consenso, pero al encontrarse en secuencias vecinas se forme un complejo ternario cooperativo de alta afinidad y especificidad. Este tipo de diseños es también de gran interés desde un punto más básico y fundamental, pues de alguna forma estaríamos imitando a muchas proteínas y/o factores de transcripción naturales que presentan baja afinidad por el ADN por si solos pero son capaces de anclarse en secuencias específicas cuando interaccionan con otras proteínas o ligandos (véase apartado 4.1 de la introducción).^{13,14}

Desafortunadamente, no existe demasiadas vías para formar heterodímeros no covalentes de cierta estabilidad en agua. Una de las posibilidades podría basarse en la formación de complejos de inclusión ciclodextrina-adamantano, en base a una interacción de tipo hidrofóbico.

¹³ Lamb, P.; Mcknight, S. L. *Trens Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 417.

¹⁴ Tijan, R.; Maniatis, T. *Science* **2001**, *77*, 5.

Sobre esta base, y antes de concretar los diseños, creémos conveniente revisar brevemente las propiedades de las ciclodextrinas (CDs) en química supramolecular.

7.2 Estructuras supramoleculares en H₂O formadas por complejos de β -ciclodextrina (β CD) con adamantano (Ad)

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos homoquirales, la mayoría de los cuales están compuestos de 6, 7 u 8 unidades de D-glucopiranosas enlazadas por enlaces α -1,4 glicosídicos. Las CDs compuestas por 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas se denominan, respectivamente, α CD, β CD y γ CD.¹⁰⁵

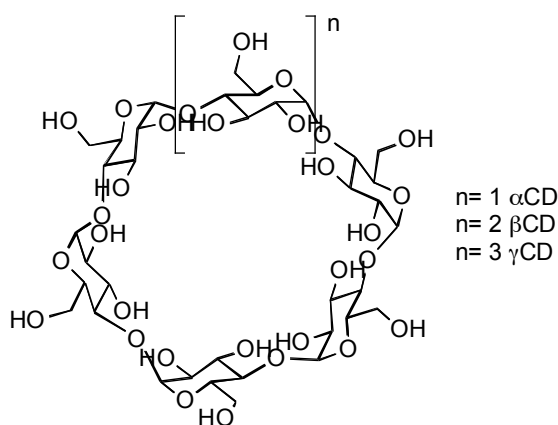


Figura 7.1 Estructura de las α , β y γ CDs.

Las CDs tienen un comportamiento anfipático en H₂O: los grupos hidroxilo se disponen hacia el exterior del anillo confiriendo solubilidad a la molécula, mientras que el interior del anillo está delimitado por los hidrógenos de los carbonos C₃, C₅ y C₆ y el oxígeno del enlace glicosídico. Debido a que el interior del anillo es bastante hidrofóbico, las CDs poseen la capacidad de incluir en su interior moléculas de carácter apolar, formando complejos de inclusión. La estequiometría de estos complejos es muy variada, pudiendo una molécula de CD complejar a más de un ligando o un ligando ocupar el interior de dos CDs, por ejemplo. La variedad de moléculas que pueden unirse a CDs abarca desde compuestos alifáticos, aromáticos, aminoácidos, colorantes,¹⁰⁶ etc. Uno de

¹⁰⁵ a) Duchene, D. *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives 1991*, Editions Santé, París. b) Saenger, W. *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1980**, *19*, 344. c) Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *35*, 163. d) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325.

¹⁰⁶ a) Fenyvesi, E.; Szenté, L.; Russell, N. R.; McNamara, M. *Specific Guest Types 1996*, Pergamon, Oxford. b) Inoue, Y.; Yamamoto, K.; Wada, T.; Everitt, S.; Gao, X.-M.; Hou, Z.-

los sistemas más estudiados es el formado por el complejo β CD:Adamantano (Ad), pues este hidrocarburo posee un tamaño muy apropiado para encajar en el hueco apolar del interior de la ciclodextrina.¹⁰⁷

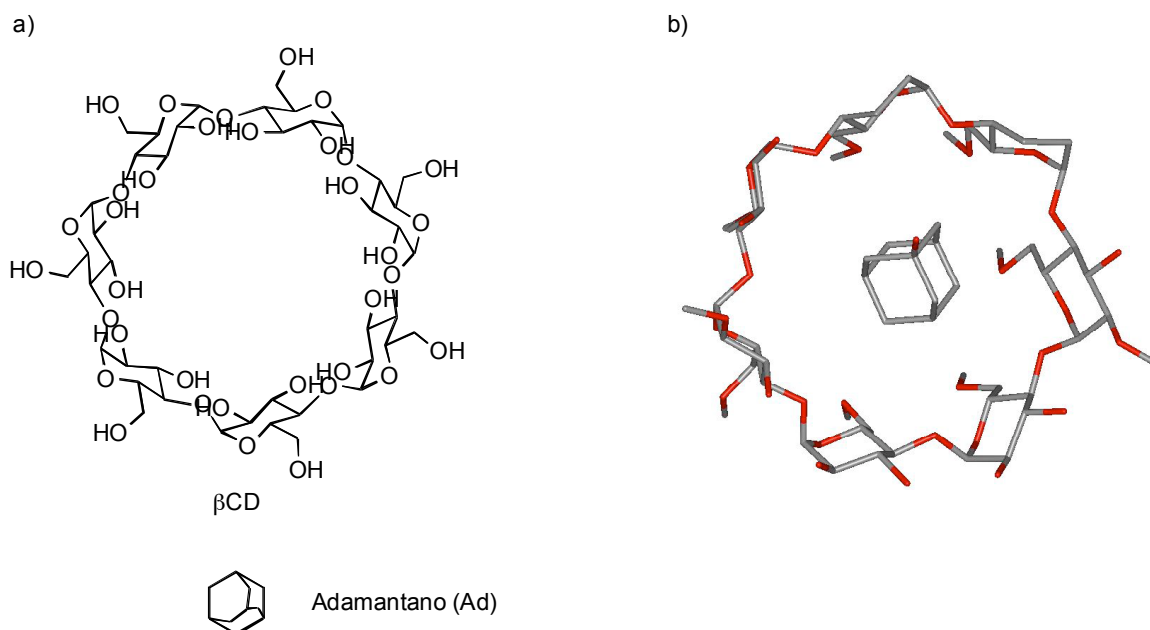


Figura 7.2 a) Estructura de la β CD y el Adamantano. b) Vista frontal del complejo β CD:Adamantano.

En la estabilización del complejo CD-ligando hay que considerar distintos factores responsables de la estabilidad de los complejos.¹⁰⁸ Por una parte están aquellos más obvios, como son las interacciones de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno entre la CD y el ligando, así como los cambios conformacionales en la CD y/o ligando. Pero, por otra parte, la liberación de moléculas de H_2O del entorno del ligando y la salida de H_2O del interior de la CD también contribuyen a la estabilización del complejo (efecto hidrofóbico). La salida de moléculas de H_2O del interior de la cavidad libera energía, puesto que estas moléculas en la cavidad interna no pueden formar los mismos enlaces de hidrógeno que en medio de toda la masa de H_2O .

J.; Tong, L.-H.; Jiang, S.-K.; Wu, H.-M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2, 1807. c) Smith, N. J.; Spotswood, T. M.; Lincoln, S. F. *Carbohydr. Res.* **1989**, 192, 9. d) Schaschke, N.; Fiori, S.; Weyher, E.; Escrieut, C.; Fourmy, D.; Müller, G.; Moroder, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7030.

¹⁰⁷ a) Eiftink, M. R.; Andy, M. L.; Bystrom, K.; Perlmutter, H. D.; Kristol, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6765. b) Palepu, R.; Reinsborough, V. C. *Aust. J. Chem.* **1990**, 43, 2119.

¹⁰⁸ a) Connors, K. A. *Measurement of Cyclodextrin Complex Stability Constants* **1996**, Pergamon, Oxford. b) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1325. c) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875.

7.3 Diseño

Una de las razones que nos indujo a elegir el sistema β CD:Ad para realizar la heterodimerización no covalente deriva de los de precedentes de Morii en los que utiliza este tipo de interacción para heterodimerizar regiones básicas de proteínas bZIP (página 31, introducción).⁶⁹

En términos de diseño se plantearon dos posibles alternativas, una basada en unir la CD al péptido y el Ad al tripirrol, y otra inversa basada en unir el Ad al péptido y la CD al tripirrol. Nos decantamos por esta segunda estrategia, fundamentalmente por la presumible mayor facilidad sintética para acoplar la CD al tripirrol, y la supuesta mejor solubilidad en agua del tripirrol resultante.

La unión del Ad al péptido podría realizarse en el extremo C-terminal (**a**) o quizás en la cadena lateral de la posición 245 del péptido (**b**), en base a como habíamos construido los híbridos covalentes (figura 7.3).

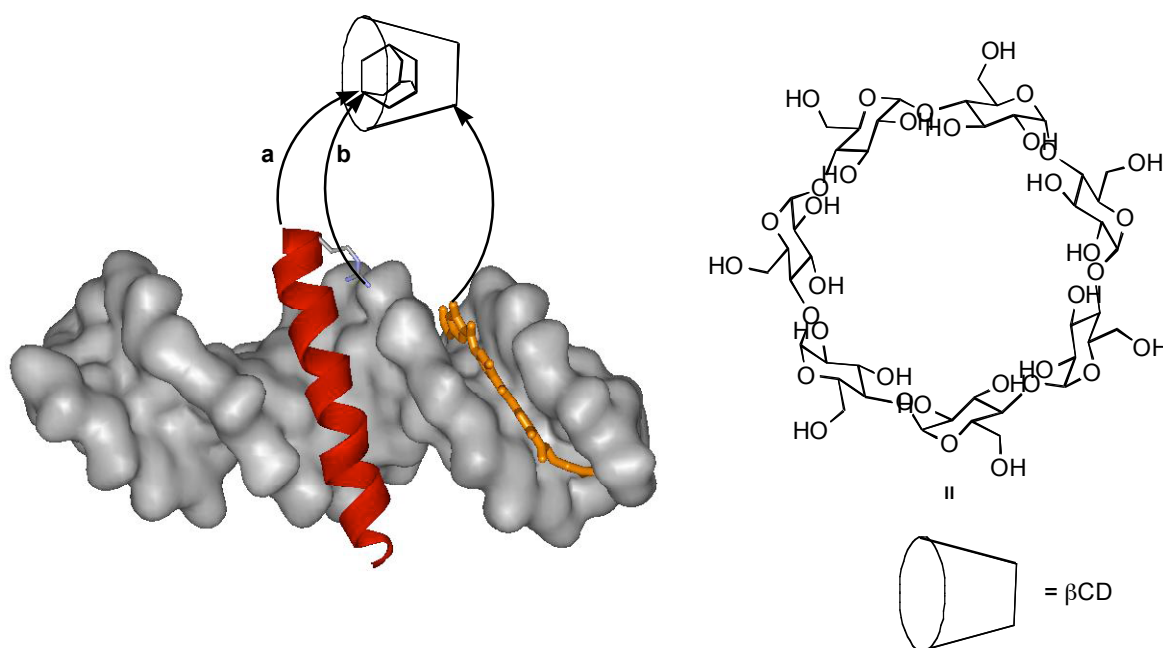


Figura 7.3 Modelo cualitativo para realizar el diseño. Se muestran dos posibles posiciones en la región básica (C-terminal y Arg245) para conectar al adamantano.

La ciclodextrina la incorporaríamos en el tripirrol a través de una cadena de conexión larga para asegurar flexibilidad y provista de algún átomo de N que facilitara su anclaje a los fosfatos del ADN, tratando de

⁶⁹ a) Ueno, M.; Murakami, A.; Makino, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575. b) Morii, T.; Yamane, J.; Aizawa, Y.; Makino, K.; Sugiura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10011.

aprovechar los tripirroles disponibles de las síntesis de híbridos covalentes. El adamantano en el extremo C-terminal se puede introducir vía alquilación de una Cys con un bromoderivado, mientras que para unirlo a la posición 245 se puede acoplar a través de una cadena de conexión similar a la de los híbridos covalentes tipo **A**.

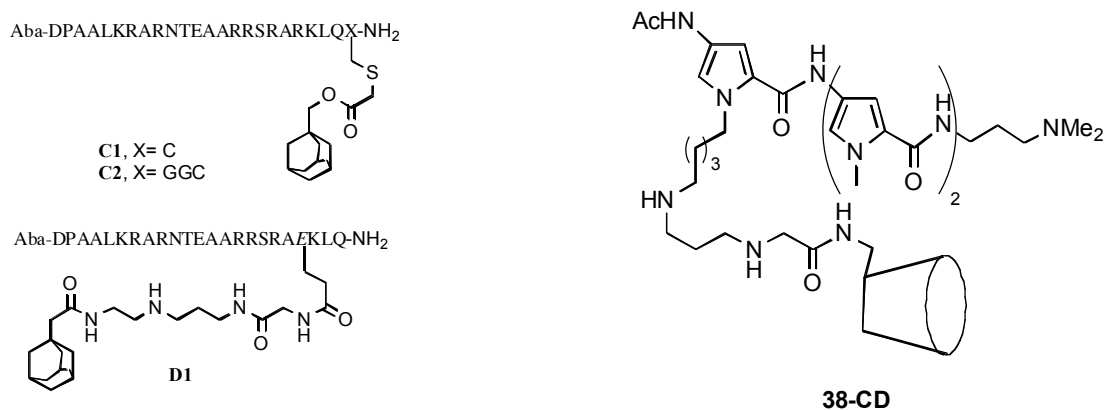
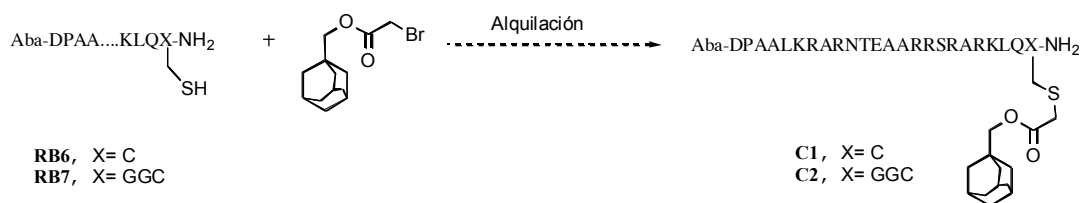


Figura 7.4 Estructura molecular de las moléculas **C1**, **C2**, **D1** y **38-CD**.

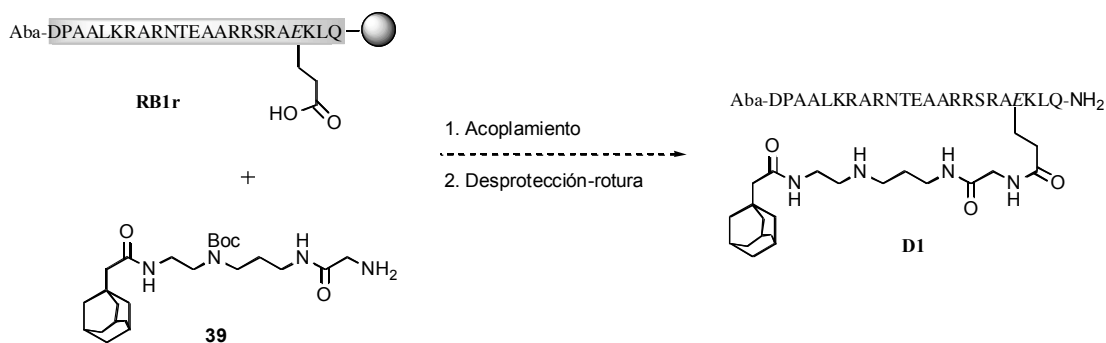
7.4 Planteamiento sintético

La síntesis de **C1** y **C2** se planteó en base a aprovechar la ventana de reactividad nucleofílica que ofrece el grupo tiol de la cisteína para acoplarlo con un bromoacetato de adamantano en condiciones acuosas, utilizando el péptido completamente desprotegido. Para medir la concentración del péptido en disolución y facilitar su seguimiento se introduciría el grupo Aba en el extremo N-terminal, tal como hemos hecho en casos anteriores.

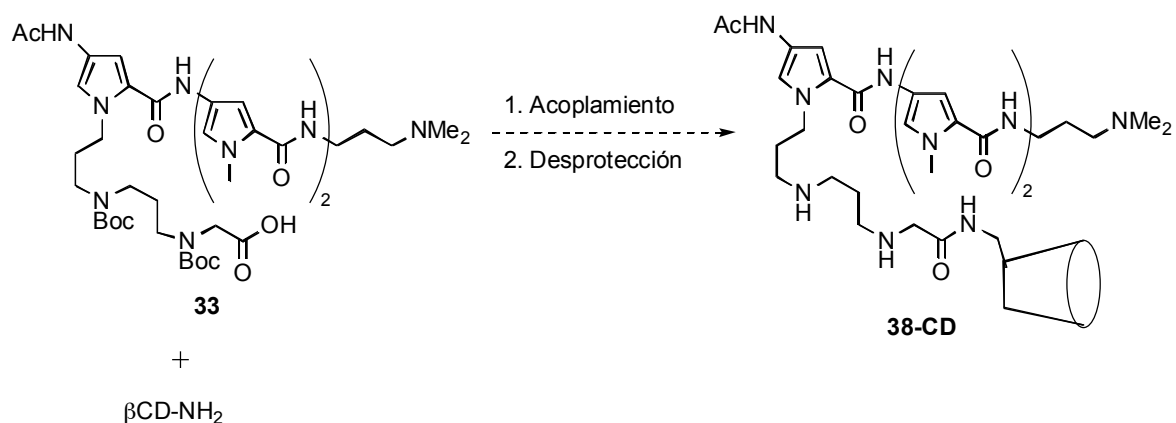


Esquema 7.1

La síntesis de **D1** se puede realizar acoplando el fragmento **39** al péptido **RB1r** unido a la resina.



Para la síntesis del compuesto **38-CD** se pensó en acoplar amino β -ciclodextrina con el tripirrol **33** (pág. 103), que ya habíamos preparado previamente, y eliminar posteriormente los grupos Boc en medio ácido.

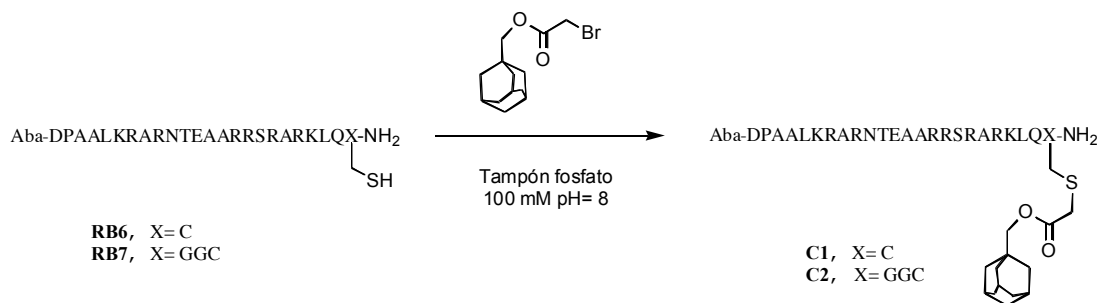


7.5 Síntesis

La síntesis de **C1** y **C2** se llevó a cabo agitando una mezcla de los péptidos **RB6** y **RB7**¹⁰⁹ con 4 equiv de bromoacetiladamantano en disolución acuosa desoxigenada mediante burbujeo de Ar y tamponada con fosfato 100 mM a pH= 8.0. La ausencia de O₂ es necesaria para evitar la dimerización del péptido. Después de 1 h de reacción, la inyección de una alícuota en HPLC de fase reversa indicó que se había consumido todo el péptido, apareciendo la señal de un nuevo compuesto que debiera ser el producto de acoplamiento deseado, lo que se confirmó mediante masas (MALDI-TOF, **C1**: calcd. 3104.7, encontrada 3104.5). La reacción fue muy limpia, calculándose un rendimiento aproximado de un 76%.

¹⁰⁹ La síntesis de **RB6** y **RB7** se realizó en fase sólida siguiendo el mismo protocolo que para la síntesis de **RB1**.

También se sintetizó el péptido **C2** (53% de rendimiento), que contiene dos glicinas adicionales en el extremo C-terminal (MALDI-TOF, **C2**: calcd. 3218.8, encontrada 3218.6).



Esquema 7.4

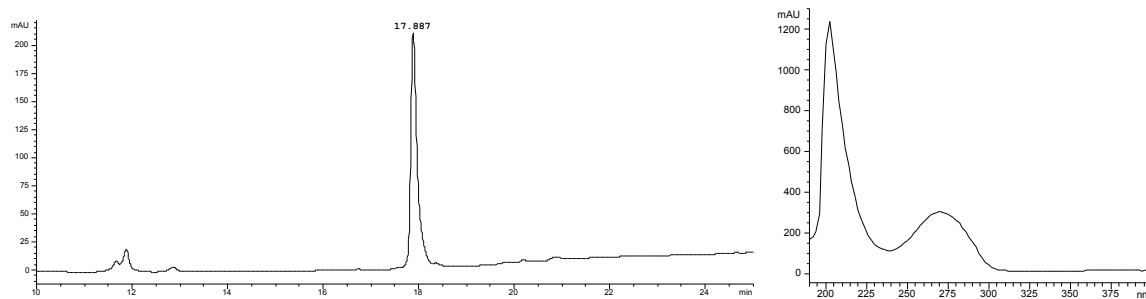
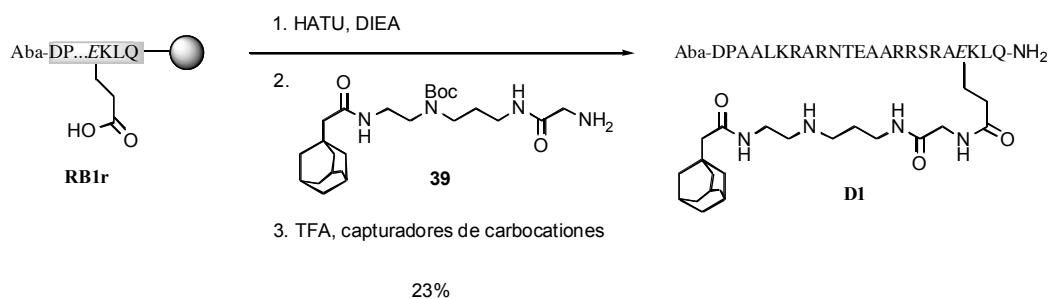


Figura 7.5 Cromatograma de la reacción de alquilación de **RB6** con bromoacetato de adamantanilo. A la derecha se representa el espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 5->75% B en 1/2 h.

La síntesis de **D1** se efectuó acoplando **39** a **RB1r** empleando HATU como agente de acoplamiento.



Esquema 7.5

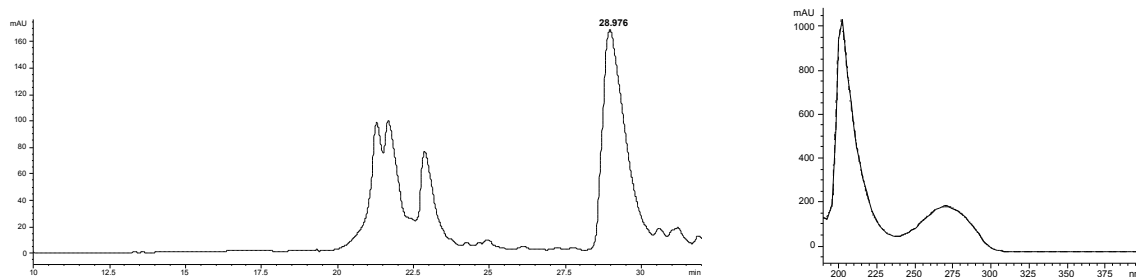
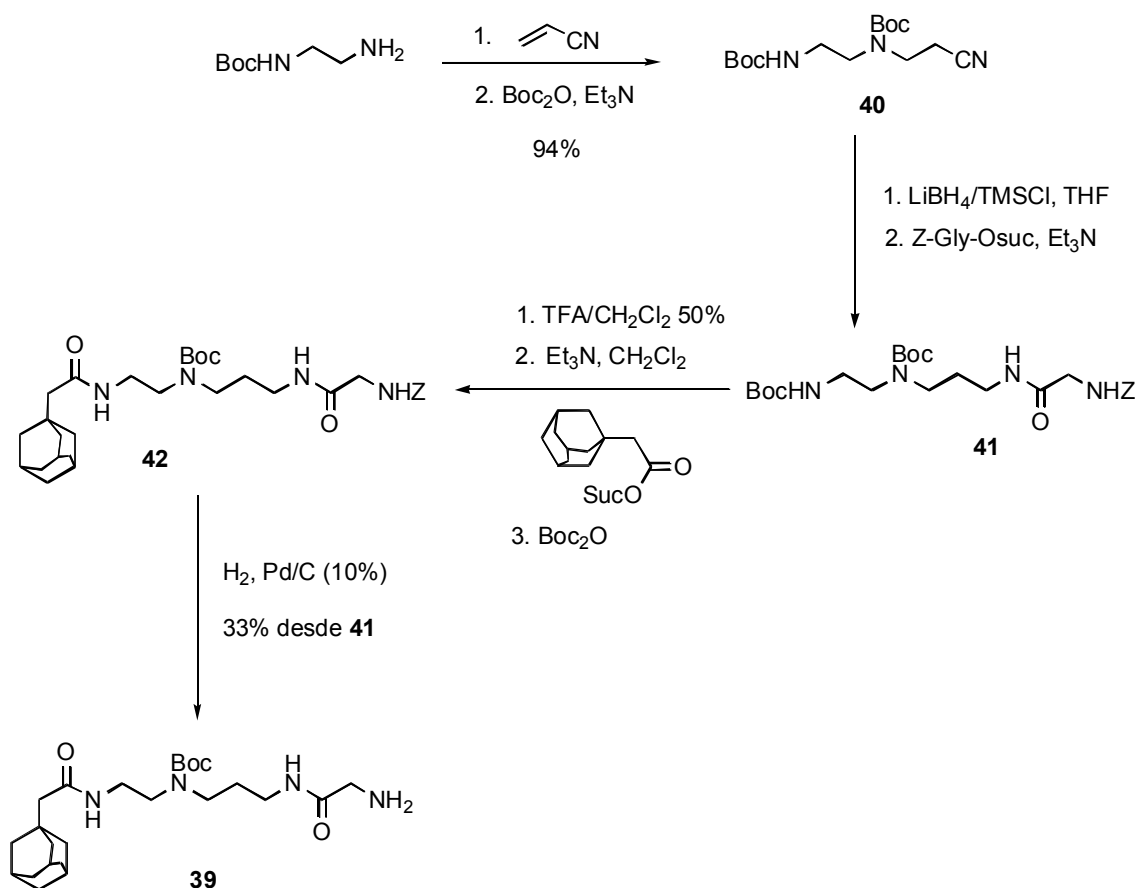


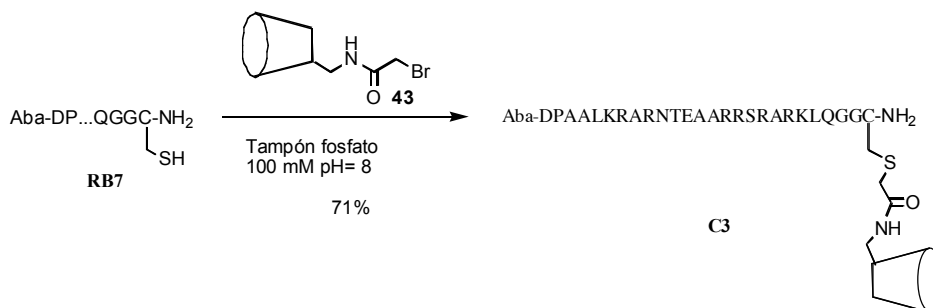
Figura 7.6 Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección obtenido en la síntesis de **D1**. A la derecha se representa el espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 10→35% B en 1/2 h.

La preparación del fragmento **39** que contiene el adamantano se muestra en el esquema 7.6. La adición de acrilonitrilo al Boc-diaminoetano condujo al compuesto **40** con un rendimiento del 94%. El nitrilo se redujo con borano generado *in situ* a partir de LiBH_4 y TMSCl y la amina resultante se acopló con Z-Gly. El producto **41** se sometió a la eliminación de los grupos Boc y se acopló el ácido adamantanoacético seguido de nueva protección de la amina secundaria. Finalmente, se eliminó el benciloxicarbonilo de la glicina mediante hidrogenación catalítica para dar el compuesto deseado **39**, que se identificó por RMN y masas.



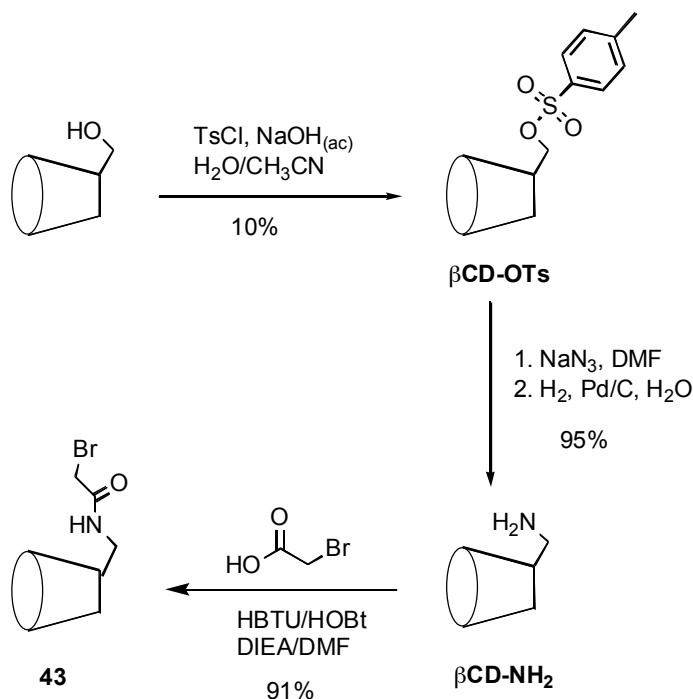
Esquema 7.6

También se sintetizó el péptido **C3**, en el que la CD está sobre el péptido, para poder utilizarlo como control en experimentos posteriores. La síntesis de se llevó a cabo mediante la alquilación de **RB7** con el bromoacetato de la aminociclodextrina, en las condiciones indicadas anteriormente para el acoplamiento de bromoacetiladamantano, obteniéndose el producto con buen rendimiento (71%, MALDI-TOF: calcd. 4186.0, encontrada 4187.0).



Esquema 7.7

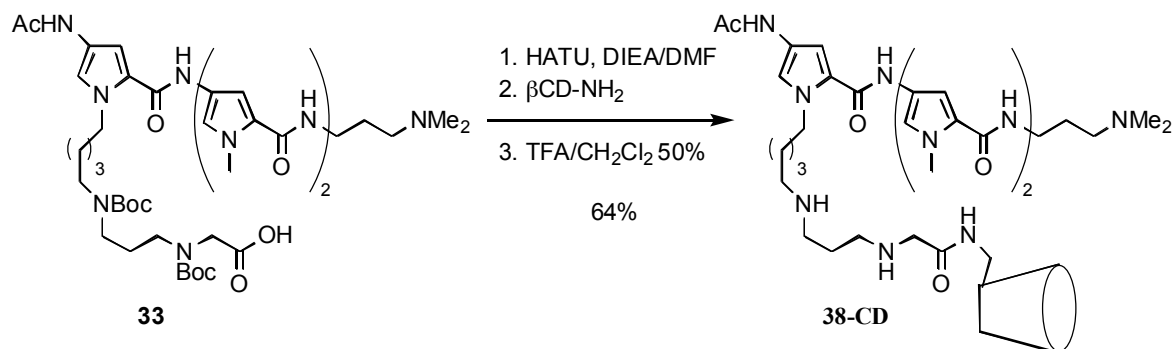
La preparación del bromoacetato de la aminociclodextrina **43** se realizó a partir de la β CD,¹¹⁰ mediante una reacción de monotosilación, posterior desplazamiento con azida seguida de reducción para formar la amina y acoplamiento de esta al ácido bromoacético.



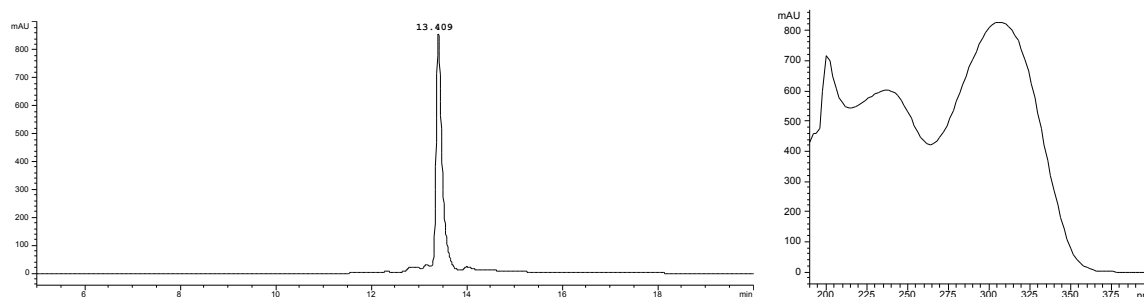
Esquema 7.8

¹¹⁰ Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, T. C.; Kumaravel, G.; Lin, F-T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.

La preparación de **38-CD** se llevó a cabo acoplando la β CD-NH₂ al ácido **33**, utilizando HATU como agente de acoplamiento, y eliminado posteriormente los grupos Boc en medio ácido. La reacción condujo al producto deseado, que se purificó mediante HPLC e identificó mediante masas (MALDI-TOF: calcd. 1812.8, encontrada 1812.8), con un rendimiento del 61%:



Esquema 7.9

Figura 7.7 Espectros de HPLC y UV de **38-CD**. Gradiente 5->50% B 1/2 h.

7.6 Evaluación de la interacción de los sistemas **D1:38-CD** y **C1:38-CD** con distintos ADNs

Como hemos procedido en los estudios con péptidos anteriores comenzaremos discutiendo los resultados obtenidos mediante espectroscopía de DC cuando se mezclan a 4°C **D1** y/o **38-CD** con los oligonucleótidos CRE^{hs}-A/18, CRE^{hs}-A/20, CRE^{hs}cgA/20, CRE^{hs}m-A/20 y CRE^{hs}/20. Tal como puede verse en la figura 7.8, la incubación de **D1** en presencia de la secuencia diana CRE^{hs}-A/18 no induce ningún cambio en la intensidad de la banda a 222 nm (curva O, $\theta_{222} \sim -10000$).

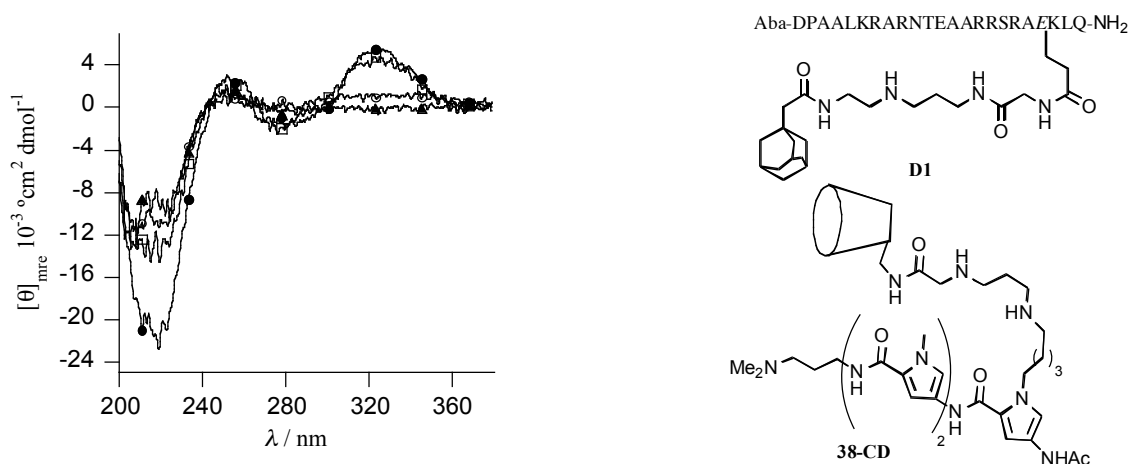


Figura 7.8 Espectros de DC de **D1** y **38-CD**: **D1** en presencia de CRE^{hs}-A/18 (○), **D1+38-CD** en presencia de CRE^{hs}-A/18 (●), **D1** en presencia de CRE^{hs}cgA/20 (▲), **D1+38-CD** en presencia de CRE^{hs}cgA/20 (□).

La adición de 1 equiv de **38-CD** induce un aumento en la helicidad de la región peptídica (curva ●), aunque no muy elevada. Cuando se incubó la mezcla **D1** y **38-CD** con un oligonucleótido de doble cadena con un par de bases entre las secuencias consenso del tripirrol y del péptido (CRE^{hs}cgA/20) la intensidad de la banda es, de nuevo, débil (curvas ▲ y □). Estos resultados son consistentes con la formación, al menos parcial, de un complejo ternario específico en presencia del ADN diana.

En cuanto a los estudios con el péptido **C1** lo primero que observamos es que, como era de esperar, la presencia de **38-CD** prácticamente no afecta el espectro de DC del péptido **C1** en ausencia de ADN (figura 7.9 a). Curiosamente, al añadir, a 4°C, el ADN diana (CRE^{hs}-A/20) al péptido **C1** se produce un aumento significativo en el grado de helicidad del péptido ($\theta_{222} \sim -22000^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, figura 7.9 b, curva ●). Aunque este dato pudiera llevar a pensar que este péptido monomérico presenta una afinidad considerable por su secuencia consenso de reconocimiento, el valor de elipticidad molar que resulta es similar al obtenido con el péptido **RB6**, que no tiene el Ad, y del que se sabe que su constante de disociación por dicha secuencia consenso es relativamente baja (1–5 μM).^{71,73} La observación de helicidad es sin duda consecuencia del plegamiento que deriva de su inserción en la secuencia específica del ADN, lo que ocurre en parte ya que en los experimentos de DC utilizamos concentraciones de

⁷¹ a) Zhang, M.; Wu, B.; Zhao, H.; Taylor, J. W. *J. of Pept. Sci.* **2002**, *8*, 125.

⁷³ Zondlo, N. J.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6938.

péptido y ADN elevadas (5 μM), por lo que se detectan complejos de poca afinidad.

Resulta, en cierta manera sorprendente, observar la diferencia de elipticidad obtenida para los péptidos **D1** ($\theta \sim -11500^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$) y **C1** ($\theta \sim -21000^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$) en presencia de su secuencia diana ($\text{CRE}^{\text{hs}}/20$). Esta diferencia puede atribuirse a que la mutación de la Arg232 por un Glu en **D1** dificulta la formación de la hélice.

Lo más importante, sin embargo, fue observar que cuando a la mezcla de ADN con **C1** se añade **38-CD** se observa una variación en la intensidad negativa de la señal a 222 nm muy notable, alcanzándose valores comparables e incluso mayores que los obtenidos con los híbridos covalentes **A** cuando interaccionan específicamente ($\theta_{222} \sim -31000^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, figura 7.9 b, curva \square).

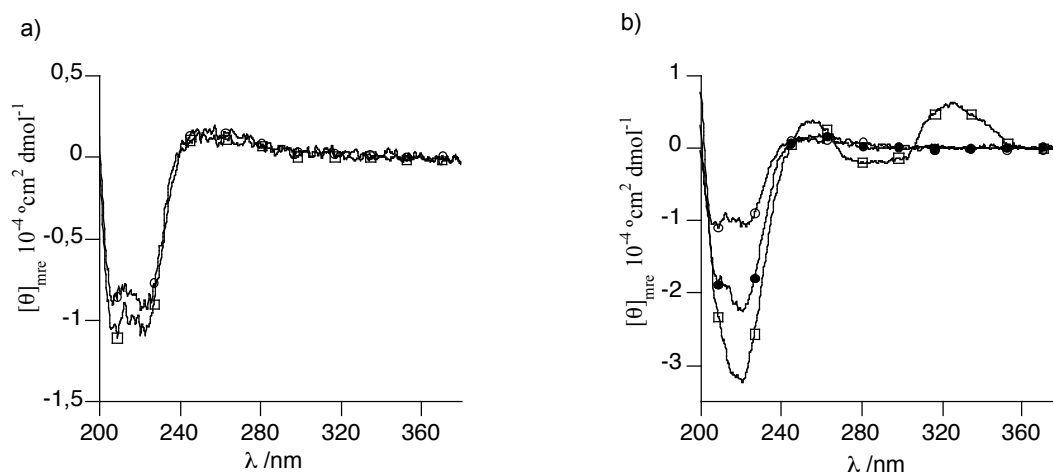


Figura 7.9 a) Espectros de DC de **C1** (\square) y de la mezcla **C1:38-CD** (\circ). b) **C1** en ausencia de ADN (\circ), **C1** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A}/20$ (\bullet), **C1+38-CD** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A}/20$ (\square).

Este cambio parece un dato claramente indicativo de que el tripirrol-CD está induciendo una mejor interacción específica del péptido, probablemente debido a la formación de un complejo ADN-péptido-tripirrol.

Para confirmar que el aumento de helicidad, y en principio mejor interacción del péptido con el ADN, está mediada por la formación de un complejo de inclusión CD:Ad, se realizó el espectro de una mezcla que contiene el ADN, **C1** y el tripirrol **1**, similar a **38-CD** pero sin la CD. Como vemos en la figura 7.10 (a) (curva Δ), la adición de **1** a **C1+CRE^{hs}-A/20** no induce ningún cambio en la señal a 222 nm.

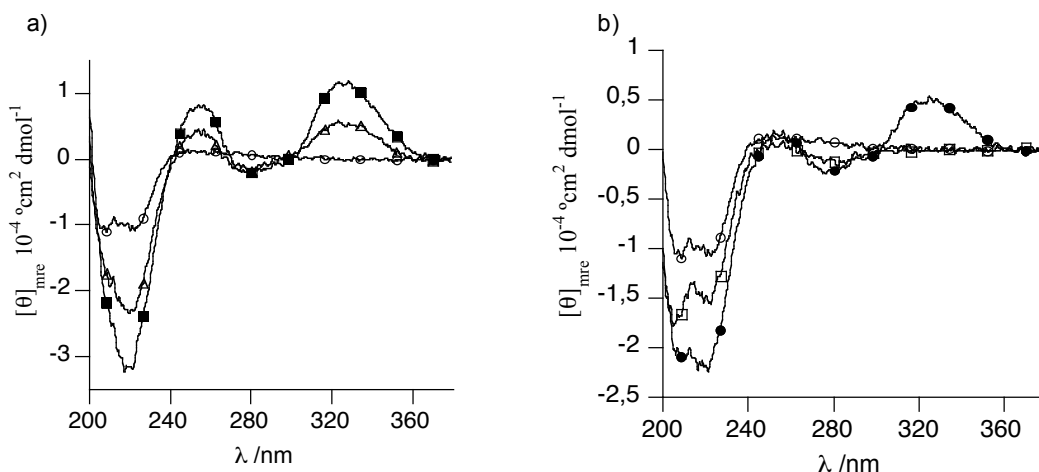


Figura 7.10 a) **C1** en ausencia de ADN (O), **C1+1** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A/20}$ (Δ), **C1+1+38-CD** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A/20}$ (\blacksquare). b) **C1** en ausencia de ADN (O), **C1** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-m-A/20}$ (\square), **C1+38-CD** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-m-A/20}$ (\bullet).

Si se observa la banda a 330 nm correspondiente a la inserción del tripirrol. Como era de esperar, la adición de **38-CD** a la mezcla anterior si provoca el aumento en la intensidad negativa a 222 nm (curva \blacksquare), similar al registrado para **C1:38-CD** en presencia de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-A/20}$. Además, también se observa un incremento de la señal a 330 nm, lo cual nos indica que, probablemente, en las condiciones del experimento de DC, se estén insertando más de una molécula de tripirrol en el surco menor del oligonucleótido de doble secuencia utilizado.

La adición de $\text{CRE}^{\text{hs}}\text{-m-A/20}$, ADN mutado en la secuencia de unión del péptido, a **C1** provoca un ligero aumento en la intensidad de la banda a 222 nm (curva \square), menor que en el caso de la secuencia consenso, y que debe corresponderse con la formación de un grado pequeño de hélice α . Cuando se añade a la mezcla **38-CD** se observa un aumento de helicidad (curva \bullet), aunque menor que con el ADN diana. Es probable que la formación del complejo CD:Ad fije la proporción de péptido (región básica) unido al ADN, probablemente de forma inespecífica contactando con los fosfatos, lo que también conlleva un pequeño aumento de helicidad.

Al añadir el derivado tripirrólico **38-CD** a la mezcla del péptido **C1** con el ADN $\text{CRE}^{\text{hs}}/20$, que no contiene la secuencia consenso de unión del tripirrol, (figura 7.11, curva \bullet), no se observan cambios en la señal a 222 nm respecto a la señal de **C1** solo (figura 7.11, curva \square). Se puede notar que, a pesar de la ausencia de una secuencia consenso para **38-CD**, se induce la banda a 330 nm que sugiere una interacción, probablemente

débil, del tripirrol **38-CD** con el ADN, interacción débil que influye en que el cromóforo de distamicina adquiriera una conformación quiral.

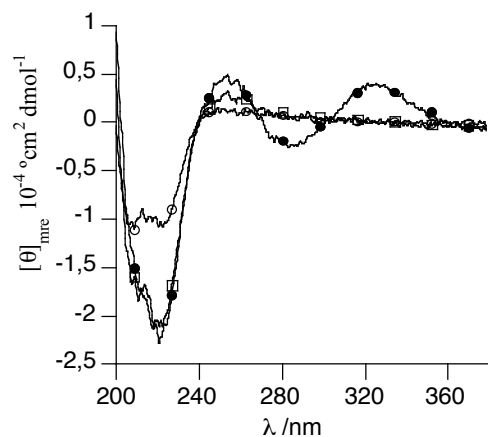


Figura 7.11 C1 en ausencia de ADN (○), C1 en presencia de CRE^{hs}/20 (□), C1+38-CD en presencia de CRE^{hs}/20 (●).

Para ver si la formación del complejo era dependiente de la concentración de cada una de las especies realizamos valoraciones manteniendo constante la concentración de CRE^{hs}-A/20 (~5 μM) y uno de los ligandos bien **C1** o **38-CD** (~5 μM), y variando la concentración del otro (**38-CD** o **C1**, respectivamente) y, también, preformando previamente el complejo **C1:38-CD**. Cuando la valoración se hace incrementando la concentración del péptido **C1** (figura 7.12), se observa que la señal a 222 nm va aumentando conforme aumenta la concentración de **C1** y no termina de saturar, lo cual es lógico, puesto que la intensidad de la señal es debida a las contribuciones del complejo y a la de **C1** libre- que de por si muestra ya algo de helicidad-. La banda a 330 nm permanece constante en toda la valoración pues la cantidad de **38-CD** también lo es.

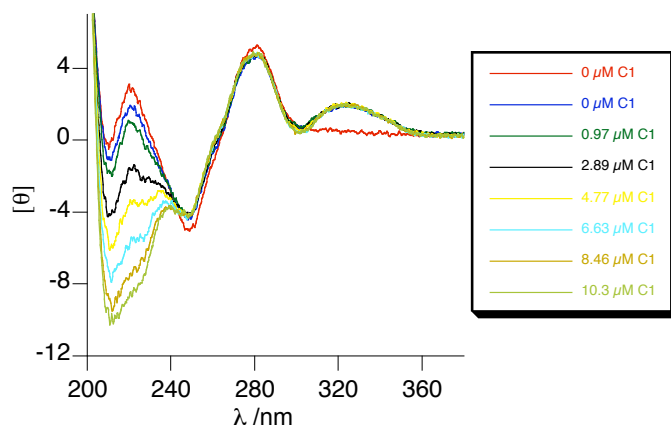


Figura 7.12 Valoración de CRE^{hs}-A/20+38-CD con C1.

Si la valoración se realiza manteniendo constante la concentración de **C1** y del ADN CRE^{hs}-A/20, se incrementa la de **38-CD** se observa que aumenta paulatinamente la intensidad negativa de la banda a 222 nm, que debe correlacionar con la inserción del péptido en el surco (figura 7.13). La saturación se llega a alcanzar en esta región dado que se mantiene constante la concentración de péptido, pero no en la región del tripirrol, probablemente debido a que en presencia de exceso del derivado tripirrólico se puede insertar más de una molécula en el surco menor a las concentraciones ensayadas.

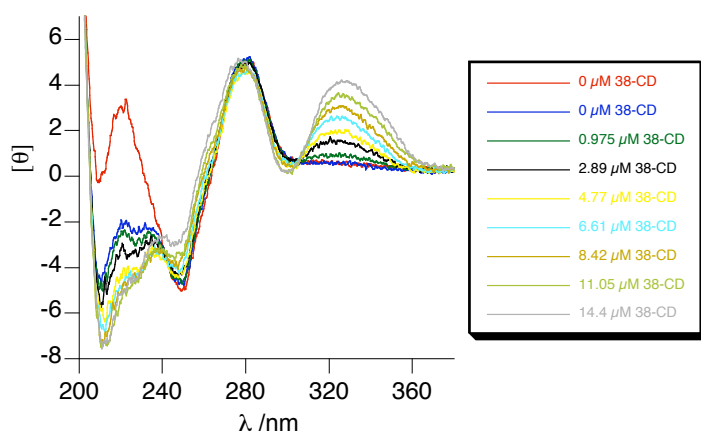


Figura 7.13 Valoración de CRE^{hs}-A/20+C1 con **38-CD**.

También se ha realizado una curva de valoración adicionando mezclas equimoleculares (1:1) de **C1:38-CD** sobre CRE^{hs}-A/20 (figura 7.14), observándose un aumento tanto de la señal a 222 como a 330 nm, no alcanzándose la saturación.

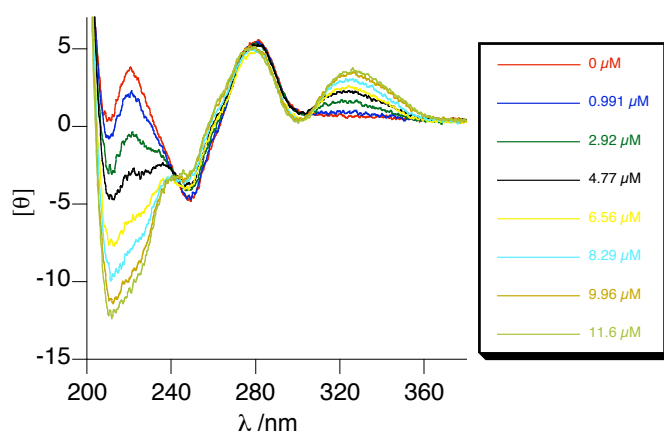


Figura 7.14 Valoración de CRE^{hs}-A/20 con **C1:38-CD** (1:1).

Los resultados de DC indicados anteriormente son consistentes con la formación de un complejo ternario entre **C1**, **38-CD** y $CRE^{hs}\text{-A/20}$, en el que el péptido está plegado como hélice α , como corresponde a su inserción en el surco mayor de la secuencia de reconocimiento y el tripirrol debiera estar unido a su secuencia consenso situada en la zona contigua. Sin embargo, habrá que hacer un análisis matemático más exacto de los datos para tratar de sacar conclusiones definitivas. Los experimentos control con el tripirrol desprovisto de la unidad de ciclodextrina confirman que la interacción es debida a la formación del complejo de inclusión ciclodextrina-adamantano entre las dos unidades.

Como en casos anteriores para confirmar la formación de complejos recurrimos, una vez más, a los experimentos de EMSA. Dado que el aumento de helicidad observado en DC con el péptido **C1** es considerablemente mayor que con el péptido **D1**, decidimos centrar los esfuerzos en el primero. Por motivos de facilidad operacional los experimentos iniciales de electroforesis se realizaron, a 4°C, utilizando una concentración elevada de ADN (500 nM), con el fin de poder detectar las especies que se forman en el gel mediante revelado con bromuro de etidio (así se evita el uso de radioactividad). Como se observa en la figura 7.15, efectivamente el péptido **C1** por si solo no es capaz de complejarse con el oligonucleótido. Sin embargo la adición de cantidades crecientes de **38-CD** permite detectar claramente la formación de una banda que migra más lentamente y que podría asignarse al complejo ternario. Cuando el experimento se realiza utilizando como ADN $CRE^{hs}\text{m-A/20}$, que presenta mutada la zona de reconocimiento del péptido, se puede observar la formación de una banda ligeramente más retenida y de menor afinidad, que en consonancia con lo que observábamos en el caso de los híbridos covalentes, podría corresponder a un complejo en el cual el tripirrol esté en el surco menor y el péptido unido inespecíficamente a los fosfatos. En este caso parece que este modo de unión es considerablemente más débil que el que se obtiene con el ADN diana.

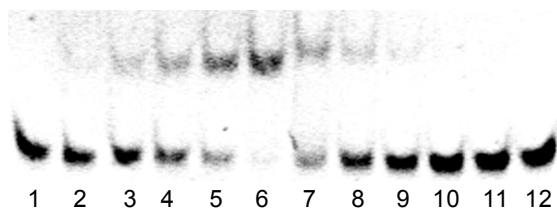


Figura 7.15 EMSA comparando la migración relativa de **C1** en presencia de CRE^{hs}-A/20 y CRE^{hs}m-A/20 y cantidades crecientes de **38-CD**. Calles 1-6: [CRE^{hs}-A/20]= [C1]= 0.5 μM; [38-CD]= 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 1.0 μM. Calles 7-12: [CRE^{hs}m-A/20]= [C1]= 0.5 μM; [38-CD]= 1.0, 0.6, 0.3, 0.2, 0.1, 0 μM.

Sorprendentemente, cuando se mezcló a 4°C el ADN diana marcado radiactivamente (³²P-CRE^{hs}-A/20) en concentraciones picomolar (~45 pM) con **C1** y se adicionaron concentraciones crecientes de **38-CD**, no se observaba la aparición de ninguna banda nueva en el autorradiograma (figura 7.16). Ni la incubación de ³²P-CRE^{hs}-A/20 con **38-CD** y posterior adición de **C1** o la formación previa del complejo **C1:38-CD** conducía a la formación de algún complejo.

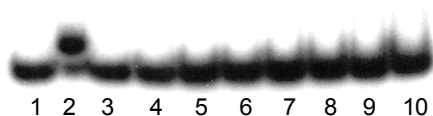


Figura 7.16 Autorradiograma de **C1+38-CD** en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/20 (~45 pM). Calles 1-2: híbrido covalente **A5** en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/20, [³²P-T/CRE^{hs}-20]= 45 pM, [**A5**]= 0, 100 nM. Calles 3-10: **38-CD** en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/20+C1, [³²P-CRE^{hs}-A/20]= 45 pM, [C1]= 500 nM, [**38-CD**]= 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 1000 nM.

Para descartar que el problema pudiera provenir de cualquier posible contaminación que pudiese tener la T4-Quinasa o la fuente de ³²P (³²P-ATP), el oligo marcado se purificó mediante cromatografía de exclusión en columnas G-25, precipitación en EtOH y en gel. Tampoco en estas condiciones, ni utilizando otros tampones de incubación o de carga para eliminar posibles interferencias, ni oligos de diferente tamaño (18 y 25 pares de bases) se observaron bandas de complejación.

Sin embargo, cuando al ADN radioactivo (en concentraciones pM) se añadía una cantidad sustancial de ADN similar pero sin marcar, de tal forma que la concentración del ADN era mayor- superior a 10 nM-, si se comenzaba a ver la formación de bandas retenidas del complejo. Este dato sugería que el problema en los experimentos con ADN marcado podría estar en que se utiliza muy poca cantidad de este, y si la interacción no es suficientemente fuerte, puede que no llegue a detectarse la banda del complejo.

Por ello, decidimos realizar los experimentos de incubación para la electroforesis empleando concentraciones mayores de ADN, que pudiesen incluso ser detectables por métodos de revelado fluorimétrico, tales como la tinción "SyBr Gold", un reactivo cuyo modo de actuación es similar al del bromuro de etidio- agente intercalante- pero que es unas 100 veces más sensible.¹¹¹ Esto nos ayudaría a rebajar la concentración de ADN de 10 a 20 veces con respecto a la necesaria en el caso del bromuro de etidio, y tener en todo caso suficiente ADN debiera como para poder detectar complejos en el equilibrio.

Cuando se mezclaron CRE^{hs}-A/20 (50 nM) y **C1** y, se añadieron concentraciones crecientes de **38-CD**, si se observaron las bandas correspondientes a la formación del complejo. En la figura 7.17 a podemos ver que cuando la concentración del péptido **C1** es 50 nM no se alcanza la saturación incluso a concentraciones de 400 nM de **38-CD**. Es necesario aumentar la concentración de **C1** a 200 nM para observar saturación en la unión, que se alcanza cuando tenemos 200 nM de **38-CD** (figura 7.17 b). En la figura 7.17 c se representa una valoración mezclando primero CRE^{hs}-A/20 con **38-CD** y aumentando la concentración de **C1**. En ambos casos se obtienen resultados muy similares.

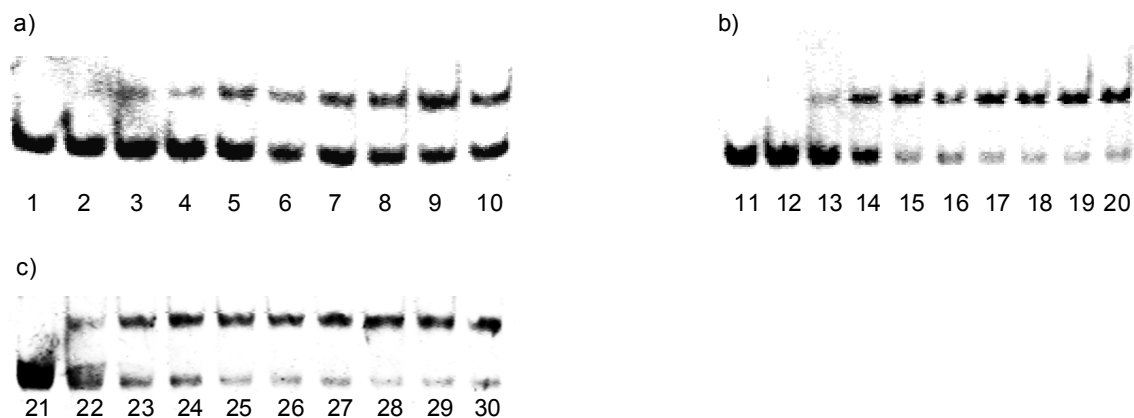


Figura 7.17 a) Adición de **38-CD** a una mezcla de **C1**+CRE^{hs}-A/20, [**C1**] = [CRE^{hs}-A/20] = 50 nM. Calles 1-10: [**38-CD**] = 0, 10, 20, 50, 80, 100, 150, 200, 300, 400 nM. b) Adición de **38-CD** a una mezcla de **C1**+CRE^{hs}-A/20, [**C1**] = 200 nM, [CRE^{hs}-A/20] = 50 nM. Calles 11-20: [**38-CD**] = 0, 20, 50, 80, 100, 150, 200, 300, 400, 600 nM. c) Adición de **C1** a una mezcla de **38-CD**+CRE^{hs}-A/20, [**38-CD**] = 500 nM, [CRE^{hs}-A/20] = 50 nM. Calles 21-30: [**38-CD**] = 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 nM.

Fue interesante observar que cuando se realizó el experimento en presencia del ADN mutado CRE^{hs}m-A/20 ([ADN] = 30 nM, [**C1**] = 200 nM) no se

¹¹¹ Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products 2002*, Molecular Probes Inc (9ª edición), cap. 8, Leiden (Holanda).

detectó la formación de ningún complejo (figura 7.18 a). Es necesario al menos utilizar una $[ADN] = 200$ nM para observar la presencia del complejo, probablemente inespecífico (banda más retenida, figura 7.18 b, calles 3-6).



Figura 7.18 a) Calles 1-5, **38-CD** en presencia de una mezcla de **C1+CRE^{hs}-A/20**, $[C1] = 200$ nM, $[CRE^{hs}-A/20] = 30$ nM, $[38-CD] = 0, 50, 100, 200, 400$ nM. Calles 6-10, **38-CD** en presencia de una mezcla **C1+CRE^{hs}m-A/20**, $[C1] = 200$ nM, $[CRE^{hs}m-A/20] = 30$ nM, $[38-CD] = 400, 200, 100, 50, 0$ nM. b) Calles 1-2: **38-CD+C1** en presencia de **CRE^{hs}-A/25**, $[CRE^{hs}-A/25] = 100$ nM, $[38-CD]+[C1] = 0, 1$ μ M. Calles 3-6: **38-CD+C1** en presencia de **CRE^{hs}m-A/25**, $[38-CD]+[C1] = 1$ μ M, $[CRE^{hs}m-A/25] = 500, 400, 200, 100$ nM. Calle 7: **CRE^{hs}/25+C1**, $[CRE^{hs}/25] = [C1] = 1$ μ M. Calle 8: **CRE^{hs}/25+38-CD+C1**, $[CRE^{hs}/25] = [38-CD]+[C1] = 1$ μ M. Calle 9: $[CRE^{hs}/25] = 100$ nM. El gel es del 15% en poliacrilamida.

Incluso con concentraciones de ADN de 500 nM la fracción unida es, aproximadamente, la mitad, lo cual nos está indicando que **la afinidad de este modo de unión no específico es, como mínimo, 1 orden de magnitud más bajo con respecto al modo específico**, que es uno de los resultados que precisamente estábamos buscando con este diseño no covalente. Como era de esperar, la afinidad de la región básica monomérica por su secuencia diana (**CRE^{hs}**) es muy baja, ya que incluso a concentraciones de **CRE^{hs}** de 1 μ M no se observan claramente bandas de complejación con **C1** (figura 7.18 b, calles 7-8).

Hay que señalar que en los experimentos de la figura 7.18 b se utilizaron ADNs de 25 pares de bases de longitud con el fin de detectar mejor diferencias de retención entre bandas, y hemos comprobado que la diferencia de tamaño no afecta a la afinidad. Las secuencias de ADN utilizadas para los experimentos indicados en dicha figura son las siguientes:

CRE ^{hs} -A/25	5'-CTGACGAACGTCAT AAAAT CCTCGC-3' 3'-GACTGCTTGCAGT TTTTA GGAGCG-5'
CRE ^{hs} /25	5'-CTGCGAACGTCATCGAAGGTCCTGC-3' 3'-GACGCTTGCAGTAGCTTCCAGGACG-5'
CRE ^{hs} m-A/25	5'-CTGACGAACGTCG TAAAAT CCTCGC-3' 3'-GACTGCTTGCAGC ATTTT AGGAGCG-5'

Esquema 7.10

Como era de esperar, en presencia de CRE^{hs}/20 (50 nM), ADN que no posee la secuencia de reconocimiento del tripirrol, no se detectó ninguna especie complejante en el equilibrio, incluso utilizando [C1]= 5 μM y [38-CD]= 20 μM. La desaparición de la banda del ADN libre a concentraciones elevadas se debe, probablemente, a su precipitación en dichas condiciones (figura 7.19).

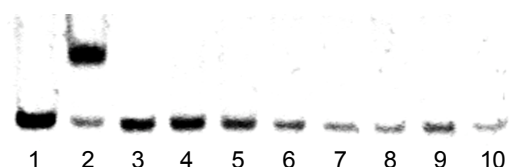


Figura 7.19 Calles 1-2: 38-CD en presencia de C1+CRE^{hs}-A/20, [CRE^{hs}-A/20]= 50 nM, [C1]= 2 μM, [38-CD]= 0, 400 nM. Calles 3-10: 38-CD en presencia de C1+CRE^{hs}/20, [CRE^{hs}/20]= 50 nM, [C1]= 5 μM, [38-CD]= 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 20 μM.

Con el fin de confirmar la existencia y necesidad de la interacción CD:Ad se realizaron experimentos control con tripirroles sin la βCD (**1**) y/o regiones básicas sin Ad (**RB6**). En la figura 7.20 se indica como cuando se mezcla C1 con **1** (tripirrol que no posee la CD) o 38-CD con **RB6** (péptido que no posee el Ad) en presencia de CRE^{hs}-A/20 (calles 4 y 5, respectivamente) no se observan bandas del complejo, lo cual confirma que para la interacción con el ADN es necesaria la formación del complejo βCD:Ad.

También se realizó un experimento de electroforesis comparando las retenciones relativas del complejo C1-38-CD-ADN con respecto a los complejos del híbrido covalente A5 y dímeros de regiones básicas con sus respectivas secuencias consenso. Los resultados que se muestran en la figura 7.20 indican que la migración del sistema C1-38-CD-CRE^{hs}-A/20 está de acuerdo con su tamaño, pues migra más lentamente que A5-CRE^{hs}-A/20 (calle 6, el complejo es más pequeño y de menor carga), pero más rápido que el dímero disulfuro de las dos regiones básicas⁶⁶ (RB6)₂-CRE (calle 5) y el dímero no covalente de dichas regiones C2-C3-CRE (calle 7),^{69,112} ambos de mayor peso molecular que nuestro complejo. Estos datos son

⁶⁶ (RB6)₂ es el dímero resultado de oxidar RB6: Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6871.

⁶⁹ a) Ueno, M.; Murakami, A.; Makino, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575. b) Morii, T.; Yamane, J.; Aizawa, Y.; Makino, K.; Sugiura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10011.

¹¹² a) Aizawa, Y.; Sugiura, Y.; Ueno, M.; Mori, Y.; Imoto, K.; Makino, K.; Morii, T. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4008. b) Sato, S-i.; Hagihara, M.; Sugimoto, K.; Morii, T. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5067.

consistentes con el modelo y consistentes con que sólo haya una molécula de péptido implicada en el complejo.¹¹³

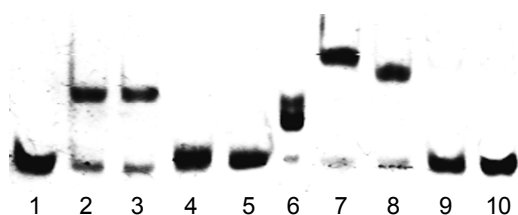


Figura 7.20 Comparación de la migración relativa de diferentes péptidos. En todas las calles la concentración de ADN es 50 nM. Calle 1: CRE^{hs}-A/20, calle 2: CRE^{hs}-A/20+C1+38-CD, [C1]= 2 μM, [38-CD]= 500 nM. Calle 3: CRE^{hs}-A/20+C2+38-CD, [C2]= 2 μM, [38-CD]= 500 nM. Calle 4: CRE^{hs}-A/20+C1+1, [C1]= 2 μM, [1]= 500 nM. Calle 5: CRE^{hs}-A/20+RB6+38-CD, [RB6]= 2 μM, [38-CD]= 500 nM. Calle 6: CRE^{hs}-A/20+A5, [A5]= 100 nM. Calle 7: CRE/20+C2+C3, [C2]= [C3]= 500 nM. Calle 8: CRE/20+(RB6)₂, [(RB6)₂]= 500 nM. Calle 9: CRE/20+RB6, [RB6]= 2 μM. Calle 10: CRE/20.¹¹⁴

Como ya se ha comentado, para poder detectar el complejo utilizando oligos marcados con ³²P en 5' fue necesario añadir el oligonucleótido de doble cadena sin marcar con el fin de alcanzar las concentraciones utilizadas en el revelado fluorescente. Los resultados obtenidos (figuras 7.21, 7.22 y 7.23) son totalmente concordantes con los que habíamos obtenido anteriormente utilizando revelado con indicador fluorescente.

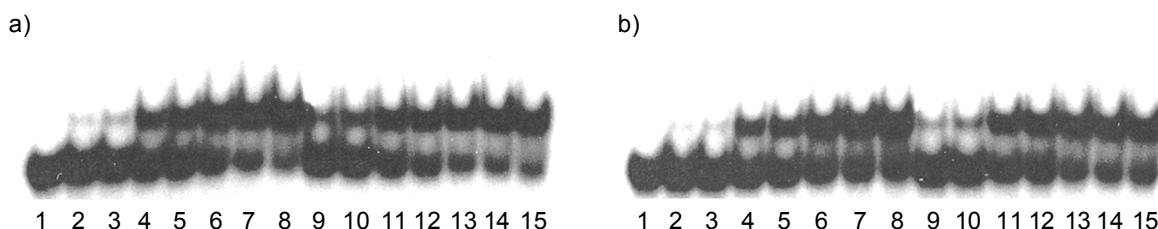


Figura 7.21 a) Calles 1-8: ³²P-CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+C1-38-CD, [³²P-CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [C1-38-CD]= 0, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 nM. Calles 9-15: C1 en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+38-CD, [³²P-CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [38-CD]= 200 nM, [38-CD]= 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 nM. b) Calles 1-8: ³²P-CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+C1-38-CD, [³²P-CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [C1-38-CD]= 0, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 nM. Calles 9-15: 38-CD en presencia de ³²P-CRE^{hs}-A/25+³²P-CRE^{hs}-A/25+C1, [³²P-CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [C1]= 200 nM, [38-CD]= 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 nM.

¹¹³ No es descartable que en presencia de exceso de 38-CD pueda insertarse más de una molécula en el surco menor.

¹¹⁴ La secuencia CRE/20 es: 5'-TGGAGATGACGTCATCTCGT-3'
3'-ACCTCTACTGCAGATGAGCA-5'

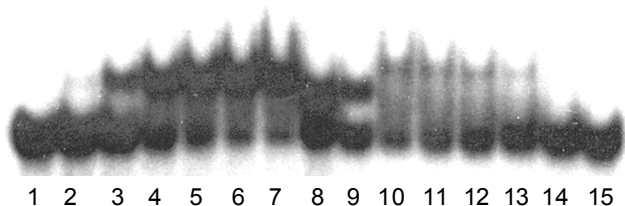


Figura 7.22 Calles 1-7: ^{32}P -CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+C1-38-CD, [^{32}P -CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [C1-38-CD]= 0, 50, 100, 200, 300, 600, 1000 nM. Calle 8: ^{32}P -CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+A5, [^{32}P -CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [A5]= 100 nM. Calle 9: ^{32}P -CRE^{hs}m-A/25+CRE^{hs}m-A/25+A5, [^{32}P -CRE^{hs}m-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}m-A/25]= 100 nM, [A5]= 100 nM. Calles 10-15: ^{32}P -CRE^{hs}m-A/25+CRE^{hs}m-A/25+C1-38-CD, [^{32}P -CRE^{hs}m-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}m-A/25]= 100 nM, [C1-38-CD]= 1000, 600, 300, 200, 100, 0 nM.

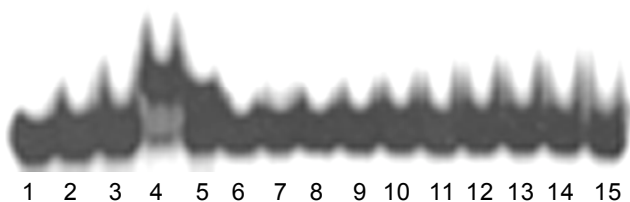


Figura 7.23 Calle 1: ^{32}P -CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25, [^{32}P -CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM. Calle 2: ^{32}P -CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+C1, [^{32}P -CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [C1]= 1 μ M. Calle 3: ^{32}P -CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+38-CD, [^{32}P -CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [38-CD]= 1 μ M. Calle 4: ^{32}P -CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+C1-38-CD, [^{32}P -CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [C1-38-CD]= 1 μ M. Calle 5: ^{32}P -CRE^{hs}-A/25+CRE^{hs}-A/25+A5, [^{32}P -CRE^{hs}-A/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}-A/25]= 100 nM, [A5]= 100 nM. Calle 6: ^{32}P -CRE^{hs}/25+CRE^{hs}/25, [^{32}P -CRE^{hs}/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}/25]= 100 nM. Calle 7: ^{32}P -CRE^{hs}/25+CRE^{hs}/25+A5, [^{32}P -CRE^{hs}/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}/25]= 100 nM, [A5]= 100 nM. Calles 8-15: ^{32}P -CRE^{hs}/25+CRE^{hs}/25+C1-38-CD, [^{32}P -CRE^{hs}/25]~ 45 pM, [CRE^{hs}/25]= 100 nM, [C1-38-CD]= 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 nM.

7.7 Conclusiones

Un aspecto fundamental que determina la elevada afinidad y especificidad de proteínas y FTs por sus lugares de reconocimiento en el ADN es su facilidad para cooperar con otras proteínas o ligandos. Esta cooperatividad posibilita que puedan reconocer secuencias de 8 a 16 pares de bases de longitud entre todas las que componen el genoma humano. Algunos FTs reconocen el ADN en forma de homo o heterodímeros no covalentes, como es el caso de los FTs de la familia bZIP, lo que implica que el reconocimiento de su secuencia diana se lleva a cabo formando un complejo ternario. Sorprendentemente, cada uno de los monómeros muestra una afinidad y especificidad relativamente baja por su secuencia y es la interacción simultánea entre ellos y con la secuencia de reconocimiento

del ADN la que permite la formación de un complejo altamente estructurado y específico.

La mayor parte de los estudios realizados por químicos y biólogos hasta el momento sobre el diseño y preparación de agentes capaces de interaccionar con ADN de doble cadena se han basado en modelos de interacción 1:1, siendo escasos los ejemplos de reconocimiento ternario entre dos ligandos y el ADN.^{68,69,115}

Teniendo presente lo comentado anteriormente sobre el reconocimiento cooperativo existente en el ámbito natural y tomando como base nuestros estudios de reconocimiento de ADN mediante los híbridos covalente tripirrol-péptido, hemos estudiado y demostrado la viabilidad de una alternativa de reconocimiento en el que ambos módulos están unidos de forma no covalente. En concreto hemos demostrado que introduciendo un grupo adamantano en el extremo C-terminal del péptido y una β CD unida al tripirrol, es posible formar complejos en los que ambos módulos se unan selectivamente en secuencias diana del tipo 5'-TCATAAAA-3'. La afinidad del heterodímero es considerablemente superior a la del péptido monomérico, y su especificidad por dicha secuencia con respecto a otras que tienen una sola mutación en la zona de unión del péptido parece muy considerable, aunque no la hemos cuantificado todavía.

Aparentemente, la necesidad de usar concentraciones relativamente elevadas de ADN para detectar complejos estaría en consonancia con que nuestro sistema no covalente posee una afinidad más bien moderada,¹¹⁶ lo que puede ser en parte debido a que la cadena de conexión entre el tripirrol y la β CD no es adecuada. Parece que no es un problema de la longitud, pues el híbrido **C2**, que posee dos glicinas más con respecto a **C1**, también puede reconocer la misma secuencia con similar afinidad. Habrá que estudiar si en este caso la presencia de aminas en el conector

⁶⁸ Cuenoud, B.; Schepartz, A. *Science* **1993**, *259*, 510.

⁶⁹ a) Ueno, M.; Murakami, A.; Makino, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575. b) Morii, T.; Yamane, J.; Aizawa, Y.; Makino, K.; Sugiura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10011.

¹¹⁵ Algunos ejemplos de sistemas que interactúan con el ADN en forma de dímeros: a) Aizawa, Y.; Sugiura, Y.; Ueno, M.; Mori, Y.; Imoto, K.; Makino, K.; Morii, T. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4008. b) Sato, S-i.; Hagihara, M.; Sugimoto, K.; Morii, T. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5067. c) Arndt, H-D.; Hauschild, K. E.; Sullivan, D. P.; Lake, K.; Dervan, P. B.; Ansari, A. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13322. d) Hauschild, K. E.; Metzler, R. E.; Arndt, H-D.; Moretti, R.; Raffaella, M.; Dervan, P. B.; Ansari, A. Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5008.

¹¹⁶ El cálculo requiere un estudio cuantitativo más detallado.

favorece al sistema, tal como ocurre con los híbridos covalentes o, si por el contrario, una cadena de conexión que no esté anclada a los fosfatos y tenga mayor libertad conformacional pudiera permitir un mejor plegamiento del péptido. También es importante tener en cuenta que la constante de dimerización entre la CD y el AD en las condiciones del ensayo es baja ($K_d > 10^{-5}$ M). Sin duda, aumentando ligeramente dicha asociación podríamos conseguir mejores afinidades.

En todo caso lo más relevante del estudio, en este momento, es la demostración de la viabilidad del concepto: **un péptido (C1= región básica-Ad) que por si solo presenta una afinidad baja por su secuencia consenso de reconocimiento, es capaz de dirigirse específicamente a una zona del ADN de 8-9 pares de bases cuando detecta cantidades suficientes de un ligando externo (38-CD= tripirrol-CD) con el que coopera para realizar el reconocimiento** (probablemente de forma bivalente).

Aunque en estos momentos el estudio está obviamente situado en el ámbito de la investigación básica, no cabe duda que el desarrollo de moléculas que por si mismo son inactivas en cuanto a su capacidad de interaccionar con el ADN, pero que pueden activarse en respuesta a la adición de ligandos, para dirigirlas a distintos tipos de secuencias, podría tener importantes implicaciones en los campos de la biología y la medicina.

D. PARTE EXPERIMENTAL

1. Procedimientos generales y protocolos

Las reacciones para la preparación de moléculas no peptídicas se llevaron a cabo bajo atmósfera de Ar (Ar C-50, pureza mínima 99.999%) y se emplearon disolventes secos, salvo que se especifique lo contrario. Los disolventes se secaron por destilación bajo atmósfera de Ar sobre el agente de secado adecuado, siguiendo los procedimientos descritos en el manual de Perrin.¹¹⁷ Los agentes de secado utilizados fueron: Na/benzofenona para el THF y el Et₂O, Mg para el MeOH, CaH₂ para el EtOH, Et₃N, DIEA, CH₂Cl₂, CHCl₃ y CH₃CN, K₂CO₃ para la acetona y P₂O₅ para el AcCl.

Para el seguimiento de las reacciones por cromatografía en capa fina se emplearon cromatofolios de gel de sílice de tipo 60 F₂₅₄ (Merck) sobre soporte de aluminio y óxido de alúmina neutra 60 F₂₅₄ (Merck), también sobre soporte de aluminio. Los componentes de la capa fina se visualizaron mediante luz UV (254 nm) o por tratamiento de la capa con una de las siguientes disoluciones seguido de calentamiento:

- *Ce/Mo*: 200 mg de nitrato cérico amónico + 9.6 g de molibdato amónico + 11.2 mL H₂SO₄ + 200 mL H₂O.
- *P-anisaldehido*: 2.1 mL *p*-anisaldehido + 1.8 mL AcOH + 6.25 mL H₂SO₄ + 169 mL EtOH.
- *Ninhidrina*: 2% ninhidrina en EtOH.
- *Ácido fosmolíbico*: 3 g de ácido fosfomolíbico en EtOH.

Las fases orgánicas de las operaciones de extracción se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor.

La purificación de aquellos compuestos que se pudo hacer por cromatografía en columna a presión reducida se llevó a cabo utilizando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60, con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm (230-400 mesh ASTM, Merck), o bien, óxido de alúmina activo neutro, del tipo 90, con un tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (79-230 mesh ASTM, Merck), empleando como eluyentes mezclas de EtOAc/Hexano o MeOH/CH₂Cl₂.

¹¹⁷ Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals* 1996, Butterworth-Heinemann, Woburn, MA (USA).

1.1 Síntesis en fase sólida de péptidos

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo empleando química "Fmoc" estándar de síntesis en fase sólida.¹¹⁸ Los aminoácidos se encontraban protegidos en sus cadenas laterales con los siguientes grupos: Trt para Gln, Asn y Cys, ^tBu para Asp y Glu, Boc para Lys y Pbf para Arg. Como agente de acoplamiento se usó HBTU, empleando también HOBT *in situ* para favorecer la formación del éster activo. La síntesis se realizó sobre una resina amida Rink MBHA acetamidofenoxi-norleucil-4-(2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil) con una carga teórica de 0.46 mmol.g⁻¹ en una escala de 0.1 mmol en suspensión de DMF y bajo burbujeo continuo de N₂. Todos los reactivos, así como la resina, se adquirieron a Novabiochem o Neosystems.

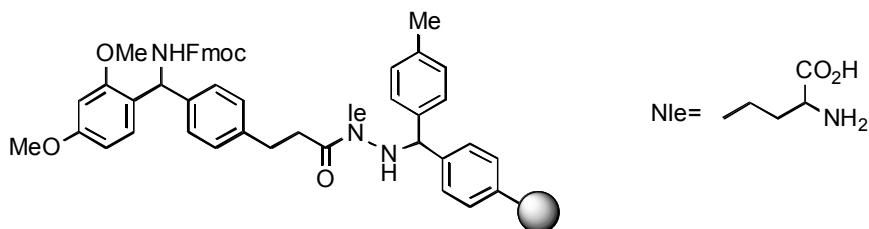


Figura 1.1 Estructura de la resina amida Rink MBHA.

Protocolo sintético.

- *Acoplamiento.* En todas las reacciones de acoplamiento se empleó un exceso de 4 equivalentes de aminoácido (0.4 mmol) y de 6 equivalentes de base (0.6 mmol de DIEA). Para la activación y acoplamiento de los Fmoc-aa, estos se disolvieron en 2 mL de una disolución 0.2 M de HBTU/HOBT en DMF más 3 mL de una disolución 0.2 M de DIEA en DMF. La mezcla resultante se agitó 3 minutos a temperatura ambiente y, luego, se adicionó sobre la resina. La reacción de acoplamiento se prolongó durante 1 hora, tras la cual se filtró la resina y lavó con DMF. Para comprobar si el acoplamiento había sido completo se analizó la resina con los Test TNBS¹¹⁹ y de cloranil.¹²⁰ En caso de que el test resultase positivo (indicación de que fue incompleto), se repite el acoplamiento.

- *Desprotección del Fmoc.* La eliminación del grupo Fmoc del aminoácido acoplado a la resina se realizó utilizando una mezcla de piperidina en

¹¹⁸ a) Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pep. Protein Res.* **1990**, *35*, 161. b) Chang, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* **2000**, Oxford University Press, New York.

¹¹⁹ Mergler, M.; Gosteli, J.; Nyfeler, R.; Tanner, R.; Grogg, P. *Peptides: Proceedings of the 20th European Peptide Symposium* **1988**, Walter de Gruyter, New York.

¹²⁰ Christensen, T. *Acta Chem. Scand. B* **1979**, *B33*, 763.

DMF al 20% durante 20 minutos. Finalizada la desprotección se lava la resina con DMF y se acopla el siguiente aminoácido de la secuencia.

- *Desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y separación del péptido de la resina.* Estas dos operaciones se realizan en una única etapa y se pueden ensayar en cualquier punto del proceso sintético del péptido, bien en medio de la síntesis para comprobar el estado de la misma (pureza del péptido sintetizado hasta el momento) o, lo que es más común, finalizada la síntesis, bien la del péptido o después de realizar los acoplamientos ortogonales de las moléculas sobre los aminoácidos desprotegidos selectivamente.

La resina se secó con Et₂O y una alícuota de la misma se trató a temperatura ambiente durante 2 horas con un cóctel formado por TFA y una serie de reactivos que actúan como capturadores de carbocationes. El cóctel para cada 35 mg de resina está compuesto por: 830 µL TFA, 25 µL de EDT, 50 mg de PhOH, 50 µL de tioanisol y 50 µL de H₂O.¹²¹ La suspensión se separó de la resina por filtración y se adicionó sobre Et₂O (10 volúmenes de Et₂O por cada volumen de mezcla) y se enfrió a -78 °C. El péptido se precipitó por centrifugación a 14000 r.p.m. durante 5 minutos, separándose del sobrenadante por decantación. El residuo sólido se secó bajo una ligera corriente de Ar y se disolvió en una mezcla H₂O/CH₃CN al 50% para su análisis y purificación por HPLC en fase reversa.

Test TNBS

El test TNBS se utiliza para detectar aminas primarias libres en la resina, sirviendo para determinar el grado de incorporación de los aminoácidos acoplados. TNBS es el acrónimo de "2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid".

El TNBS reacciona con aminas primarias formándose una sulfonamida de color rojo intenso.

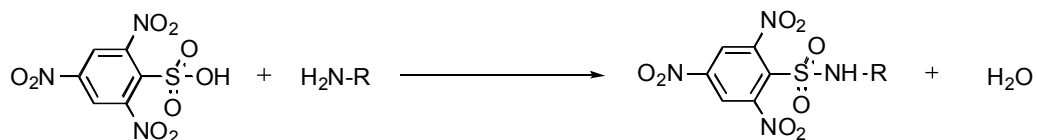


Figura 1.2 Condensación entre el TNBS y una amina primaria para formar una sulfonamida.

Para ensayar el test se coge una alícuota de la resina (≈ 2 mg) y se

¹²¹ King, D. S.; Fields, C. G.; Fields, G. B. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *36*, 255.

adiciona una gota de una disolución de DIEA (10% en DMF) y otra gota de una disolución de TNBS (1% en DMF). La suspensión se deja reposar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se observa el color que adquiere la resina:

- si el ensayo resulta positivo la resina toma un color rojo intenso, lo que significa que hay aminas libres en la resina.
- si el test es negativo la resina no colorea, señal de que no hay aminas libres en la resina.

Test de cloranil

El test de cloranil detecta la presencia de aminas secundarias libres, sirviendo, por lo tanto, como control para los acoplamiento efectuados sobre la prolina. El p-cloranil es la 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona y reacciona con las aminas para dar un color azul-verdoso.

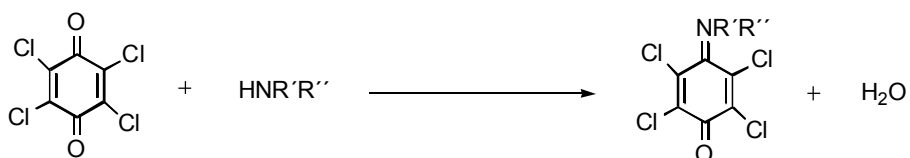


Figura 1.3 Condensación entre el cloranil y una amina secundaria.

Para ensayar el test se coge una alícuota de la resina (\approx 2 mg) y se adiciona una gota de una disolución de acetaldehído (2% en DMF) y otra gota de una disolución de p-cloranil (2% en DMF). La suspensión se deja reposar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se observa el color que adquiere la resina:

- si el ensayo resulta positivo la resina toma un color azul-verdoso, lo que significa que hay aminas libres en la resina.
- si el test es negativo la resina no colorea, señal de que no hay aminas libres en la resina.

1.2 Determinación de la concentración de las disoluciones mediante espectroscopía de UV

La medida de la concentración de las disoluciones de péptidos, oligopirroles y oligonucleótidos de cadena sencilla se realizó mediante espectroscopía de UV a temperatura ambiente en H₂O milli Q. Para ello se disolvieron las muestras en H₂O milli Q y se adicionaron volúmenes crecientes de la disolución madre a un volumen inicial conocido. El

cálculo de la concentración se efectuó mediante la resolución de la ecuación de Lambert-Beer:

$$[] = 10^6 \mathbf{A}(\mathbf{V}_0 + \mathbf{V}) / (\boldsymbol{\epsilon} \mathbf{l} \mathbf{V}) \mu\text{molL}^{-1}$$

donde **A** es la absorbancia de la disolución, **V₀** es el volumen inicial, **V** (en μL) es el volumen de la disolución madre que se va adicionando (en μL) y cuya concentración quiere determinarse, **ϵ** es el coeficiente de extinción y **l** es la longitud de la cubeta (1 cm). Los coeficientes de extinción utilizados para los péptidos dependieron del cromóforo presente, siendo $\epsilon_{270 \text{ nm}} = 18069 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el "Aba" (ácido 4-acetamido benzoico) y $\epsilon_{304 \text{ nm}} = 32274 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ¹²² para los híbridos péptido-tripirrol.

La determinación de los coeficientes de extinción de los oligonucleótidos de cadena sencilla se realizó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\epsilon_{260 \text{ nm}} = \{(8.8 \times n^\circ \text{ T}) + (7.3 \times n^\circ \text{ C}) + (11.7 \times n^\circ \text{ G}) + (15.4 \times n^\circ \text{ A})\} \times 0.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

La formación del ADN de doble cadena utilizado en los experimentos de DC se realizó mezclando cantidades equimoleculares de cada una de las cadenas y calentando la mezcla a 90°C durante 10 minutos, dejando enfriar luego durante 2 horas la disolución hasta alcanzar temperatura ambiente.

1.3 Procedimiento para los análisis mediante Dicroísmo Circular

Los experimentos de DC se registraron en una celda de paso óptico de 2 mm a 4 o 20°C, según se indique, en una disolución tamponada de pH= 7.5 de composición 10 mM de fosfato potásico y 100 mM de NaCl. Para la medida de las interacciones entre los péptidos y los diferentes ADNs se registró, primero, el espectro del ADN solo (a una concentración 5 μM) y se adicionó, después, la disolución del péptido de forma que la concentración final estuviese en torno a 5 μM , registrándose después de 2 minutos, el espectro de la mezcla. El espectro del péptido complejado se obtuvo restando al espectro de la mezcla el espectro del ADN libre. En los casos en los que se realizaron valoraciones, se adicionaron volúmenes crecientes de la disolución de péptido (salvo que se especificase lo

¹²² Vázquez, M. E. *Diseño y síntesis de péptidos para el reconocimiento de secuencias específicas del ADN* 2001, Tesis doctoral. El coeficiente de extinción utilizado para los tripirroles fue el mismo en todos los casos, puesto que todos tienen básicamente el mismo esqueleto. Su valor es similar al valor dado en la bibliografía para la Distamicina ($\epsilon_{304 \text{ nm}} = 34000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

contrario) sobre la disolución de ADN de concentración inicial 5 μM , de tal forma que el volumen final no excediese el 10% del volumen inicial de la disolución de ADN.

Los parámetros utilizados en la medida de las muestras fueron los siguientes:

- Rango de adquisición: 380-200 nm.
- Ancho de banda: 2.0 nm.
- Resolución: 0.2 nm.
- Acumulación: 5-10 barridos.
- Sensibilidad: 10 miligrados.
- Tiempo de respuesta: 0.25 segundos.
- Velocidad: 100 nm/min.

Los espectros se suavizaron ligeramente para su mejor visualización utilizando la macro "smooth" implementada en el programa *Kaleidagraph* (versión 3.6 de *Synergy Software*).

2. Materiales y métodos

Las medidas de UV se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro *Varian Cary 100 Bio* con celdas de cuarzo de paso óptico de 10 mm. La espectroscopía de DC se llevó a cabo en un espectrofotómetro *Jasco J-715* en celdas de cuarzo de paso óptico 2 mm termostatzado con un baño *Nestlab RTE-111*. Los espectros de RMN se registraron a 25 °C en un *Bruker DPX-250* (250.13 MHz para ^1H y 62.89 MHz para ^{13}C) o en un *Varian AMX-300* (300.13 MHz para ^1H y 75.47 para ^{13}C). Los desplazamientos químicos están expresados en ppm respecto a la señal del TMS y las constantes de acoplamiento en Hz.

Los espectros de masas de IQ y FAB se realizaron en un *Micromass Autospec*, los ESI en un *PE Biosystems Voyager System 1089*, *Bruker Biotof II* o en un *LC/MSD VL* de *Agilent* y los MALDI en un *Bruker Autoflex*.

La cromatografía de HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo *Hewlett-Packard Serial 1100* provisto de un detector de diodos utilizando las columnas analíticas *Merck LiChrospher WP 300 RP-18 (5 μm)* y *Júpiter WP-300 RP-18 (5 μm)* y la semipreparativa *Nucleosil 120-10 C-18 250x8* para las purificaciones. Se utilizaron mezclas de CH_3CN (B) y H_2O (A) con 0.1% de TFA con gradientes lineales como fase móvil y la detección se llevó a cabo a 220, 304 y 330 nm simultáneamente.

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

El H_2O utilizada en los experimentos se purificó mediante el sistema de *Millipore Milli-Q RG*.

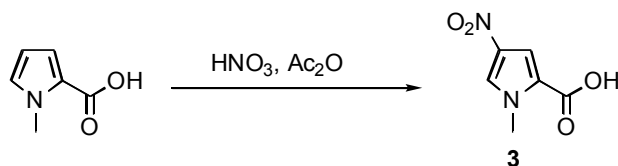
Las estructuras de rayos X utilizadas para la construcción de modelos se obtuvieron del servidor del *Protein Data Bank*.¹²³ Los modelos se construyeron con el módulo *Builder* del programa *InsightII* y las representaciones gráficas se hicieron con el programa *WebLab Viewer Pro*.¹²⁴

¹²³ La dirección del *Protein Data Bank* es: www.rcsb.pdb.org.

¹²⁴ El programa puede descargarse de: <http://molsim.vei.co.uk/weblab/index.html>

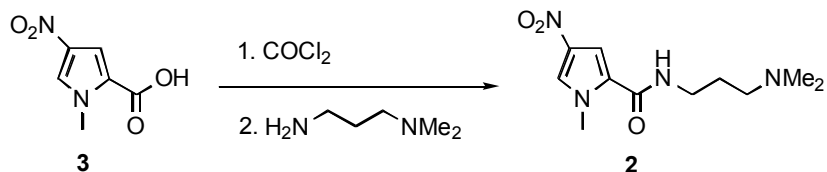
3. Reacciones

Ácido 1-metil-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxílico (**3**)¹²⁵



Sobre una disolución de ácido 1-metil-1H-pirrol-2-carboxílico (18.3 g, 0.146 mmol) en Ac₂O (100 mL) enfriada a -78 °C se adicionó lentamente una mezcla enfriada a -20 °C de HNO₃ en Ac₂O al 22% (120 mL). La suspensión se agitó a -78 °C durante 8 horas y se vertió sobre 200 mL de agua-hielo, agitándose a 5 °C durante 2 horas. Se refrigeró a -20 °C y el precipitado se filtró, secándose el sólido obtenido a vacío sobre P₂O₅ para dar el compuesto deseado **3** (9.1 g, 36%, pf= 182 °C). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 3.79 (s, 3H), 7.14 (s, 1H), 7.68 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 38.2 (CH₃), 113.2 (CH), 125.0 (C), 130.0 (CH), 136.3 (C), 162.3 (C). **EM (IE)**: m/z 170 (M⁺, 100), 79 (33), 58 (16). **EMAR**: calcd. para C₆H₆N₂O₄ 170.0328, encontrado 170.0394.

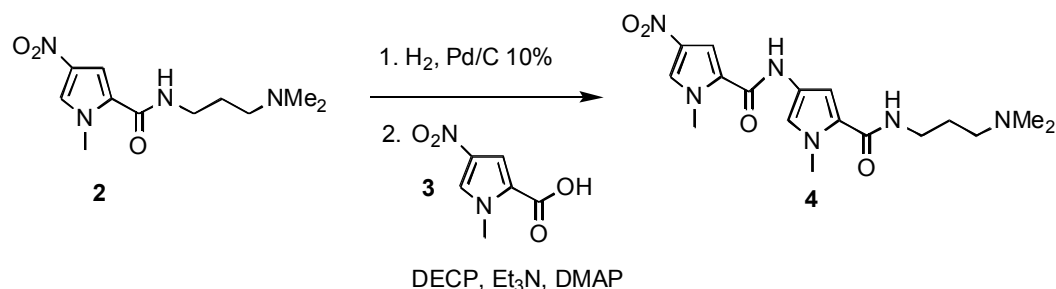
¹²⁵ Lown, J. W.; Krowicki, K.; Balzarini, J.; Newman, A.; De Clerq, E. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2368.

N-(3-(dimetilamino)propil)-1-metil-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxamida (2)^{91a}

Sobre una disolución del ácido **3** (5 g, 29.4 mmol) en 100 mL de CH_2Cl_2 y 0.1 mL DMF enfriada a 0 °C se adicionó lentamente cloruro de oxalilo (25.6 mL, 0.294 mol, 10 equiv). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se redisolvió en CH_2Cl_2 (60 mL). La disolución se enfrió en un baño de agua-hielo y sobre ella se añadió 3-dimetilaminopropilamina (7.4 mL, 58.8 mmol, 2 equiv.). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se eliminó el disolvente, se añadió H_2O (20 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (5x30 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron, cromatografiándose el producto obtenido en sílica gel (5->10% MeOH/ CH_2Cl_2) para dar el compuesto deseado **2** en forma de sólido amarillo (5.4 g, 72%, pf= 112 °C). **RMN ^1H δ (CD_3OD):** 1.73 (qui, $J= 7.1$ Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 2.38 (t, $J= 6.9$, 2H), 3.26-3.31 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 7.23 (s, 1H), 7.79 (s, 1H). **RMN ^{13}C δ (CD_3OD):** 28.2 (CH_2), 38.0 (CH_3), 38.6 (CH_2), 45.4 (CH_3), 58.2 (CH_2), 108.5 (CH), 127.8 (C), 128.4 (CH), 136.3 (C), 162.6 (C). **EM (IE):** m/z 254 (M^+ , 10), 181 (14), 153 (11), 131 (17), 58 (100). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$ 254.13789, encontrado 254.13997.

^{91a} Bruice, T. C.; Mei, H.; He, G.; López, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1700.

N2-[(dimetilamino)propil]-1-metil-4-[[(1-metil-4-nitro-1H-2-pirrolil)carboxamido]-1H-2-pirrolcarboxamida (4)⁹²



Una disolución del pirrol **2** (2.24 g, 8.84 mmol) en MeOH (100 mL) se hidrogenó sobre 10% de Pd/C (1.5 g) a temperatura ambiente durante 1 hora (presión de un globo de hidrógeno). El catalizador se separó mediante filtración a través de celita y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en DMF (8 mL) y se adicionó sobre otra disolución previamente preparada de **3** (1.66 g, 9.72 mmol), DECP (2 mL, 13.2 mmol), Et₃N (6.16 mL, 44.2 mmol) y DMAP (10 mg) en THF (12 mL), enfriada a 0 °C. La mezcla resultante se dejó agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de adicionar MeOH (5 mL), los disolventes se eliminaron a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de sílica (1% Et₃N en 10% MeOH/CH₂Cl₂) para dar **4** como un sólido amarillo (1.4 g, 80%, pf= 155 °C). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.80 (qui, *J*= 7.2 Hz, 2H), 2.32 (s, 6H), 2.47 (t, *J*= 7.6 Hz, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.85 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 28.1 (CH₂), 36.8 (CH₃), 38.0 (CH₃), 38.5 (CH₂), 45.3 (CH₃), 58.3 (CH₂), 105.9 (CH), 108.7 (CH), 120.5 (CH), 122.9 (C), 124.8 (C), 128.7 (CH), 136.2 (C), 159.6 (C), 164.2 (C). **EM (IQ+)**: *m/z* 376 (M⁺, 4), 307 (6), 155 (7), 154 (100). **EMAR**: calcd. para C₁₇H₂₄N₆O₄ 376.1859, encontrado 376.1947. UV(H₂O/CH₃CN) λ_{máx}= 285 nm.

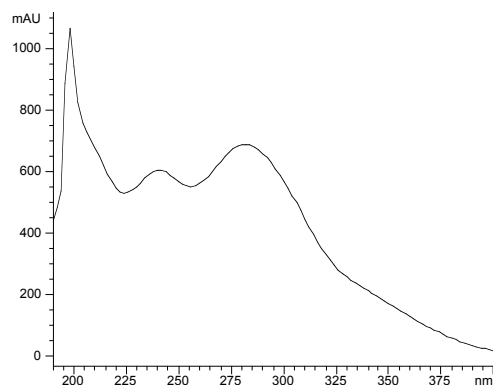
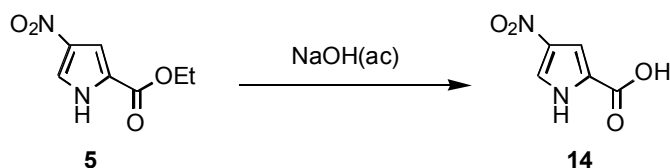


Figura 3.1 Espectro de UV del dipirrol **4**.

⁹² Nishiwaki, E.; Shigeaki, T.; Hideaki, L.; Shibuya, M. *Heterocycles* **1988**, *27*, 1945.

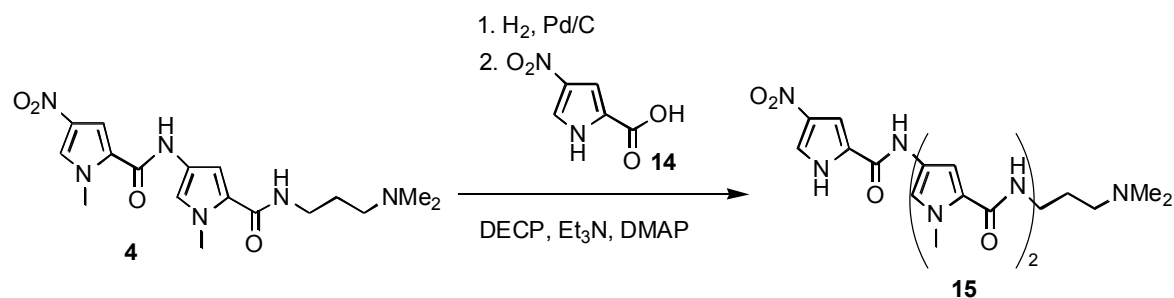
Ácido 4-nitro-1H-pirrol-2-carboxílico (14)¹²⁶

El pirrol **5**⁹³ (500 mg, 2.72 mmol) se trató con una disolución 1 M de NaOH en 70% de EtOH acuoso (30 mL) a temperatura ambiente durante 6 horas. La disolución resultante se acidificó cuidadosamente con HCl acuoso (10%) hasta pH= 2 y se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se secaron y el disolvente se eliminó a presión reducida obteniéndose el producto deseado **14** como un sólido blanco (360 mg, 85%, pf= 179 °C). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 3.2 (s 1H), 7.2 (s, 1H), 7.7 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 110.7 (CH), 123.9 (CH), 125.2 (C), 138.7 (C), 162.8 (C). **EM (IE)**: m/z 156 (M⁺, 63), 138 (13), 122 (12), 108 (9), 92 (6), 65, (100). **EMAR**: calcd. para C₅H₄N₂O₄ 156.0171, encontrado 156.0172.

¹²⁶ Lee, M.; Coulter, D. M.; Lown, J. W. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1855.

⁹³ Huang, L.; Quada, J. C.; Lown, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9892.

Acoplamiento del dipirrol **4 con el ácido **14****



Una disolución del dipirrol **4** (743 mg, 1.97 mmol) en MeOH (40 mL) se hidrogenó sobre 10% de Pd/C (350 mg) a temperatura ambiente durante 1 h y 50 min (presión de un globo). El catalizador se separó por filtración a través de celita y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se redisolvió en DMF (5 mL) y se adicionó sobre otra disolución previamente preparada de ácido **14** (368 mg, 2.36 mmol), DECP (0.388 mL, 2.56 mmol), Et₃N (1.37 mL, 9.85 mmol) y DMAP (5 mg) en THF (20 mL), previamente enfriada a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Se adicionó MeOH (5 mL) y los disolventes se eliminaron a presión reducida, purificándose el residuo obtenido por cromatografía en columna de alúmina (5% MeOH/CH₂Cl₂) para finalmente aislar el producto deseado **15** como un sólido amarillo (715 mg, 75%, pf= 265 °C). **RMN ¹H δ (DMSO-d₆):** 1.60 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.27 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.49 (m, 3H), 3.34 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.81 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 8.07 (t, J= 5.5 Hz, 1H), 9.93 (s, 1H), 10.26 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (DMSO-d₆):** 27.0 (CH₂), 35.9 (CH₃), 36.1 (CH₃), 37.0 (CH₂), 45.0 (CH₃), 56.9 (CH₂), 103.9 (CH), 104.4 (CH), 105.4 (CH), 117.8 (CH), 118.5 (CH), 121.3 (C), 121.9 (C), 123.0 (C), 123.1 (CH), 127.1 (C), 136.3 (C), 156.5 (C), 158.2 (C), 161.1 (C). **EM (FAB+):** m/z 485 (MH⁺, 32), 460 (100), 307 (90). **EMAR:** calcd. para C₂₂H₂₈N₈O₅ 484.2183, encontrado 484.2276. UV(H₂O/CH₃CN) λ_{máx}= 300 nm.

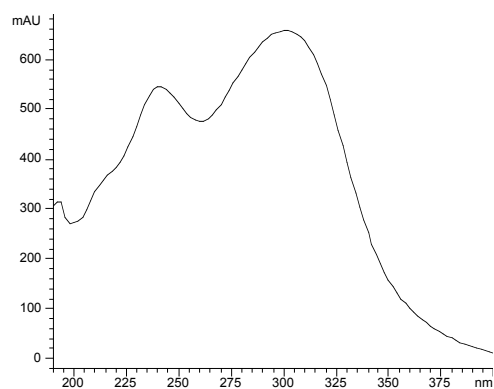
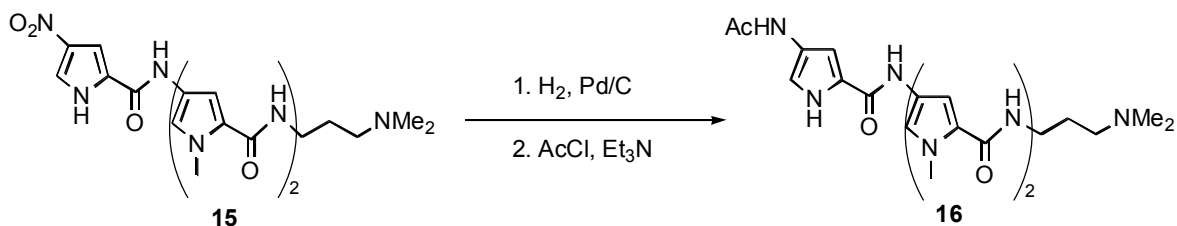


Figura 3.2 Espectro de UV del nitrotripirrol **15**.

Reducción y acetilación del nitrotripirrol **15**

Una disolución del nitrotripirrol **15** (370 mg, 0.763 mmol) en MeOH (40 mL) se hidrogenó sobre 10% de Pd/C (200 mg) a temperatura ambiente durante 1.5 horas (presión de un globo). El catalizador se separó por filtración a través de celita y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se redisolvió en DMF (10 mL) y Et₃N (0.529 mL, 3.82 mmol) y se enfrió a 0 °C. Sobre la mezcla se adicionó AcCl (0.272 mL, 0.133 mmol) y la disolución se agitó a 0 °C durante 30 minutos y otras 5 horas más a temperatura ambiente. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (alúmina, 5% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose el compuesto deseado **16** en forma de sólido marrón (265 mg, 70%, pf= 202 °C). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.73 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 2.24 (s, 6H), 2.39 (t, J= 7.6 Hz, 2H), 3.25 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.73 (s, 1H), 6.85-6.89 (m, 2H), 7.11-7.15 (m, 3H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 23.0 (CH₃), 28.2 (CH₂), 36.8 (CH₃), 38.5 (CH₂), 45.3 (CH₃), 58.3 (CH₂), 103.9 (CH), 106.1 (CH), 114.3 (CH), 120.5 (CH), 120.8 (CH), 123.2 (C), 123.3 (C), 124.6 (C), 124.7 (C), 125.3 (C), 160.7 (C), 161.4 (C), 164.3 (C), 170.4 (C). **EM (FAB+)**: m/z 497 (MH⁺, 6.68), 389 (100), 287 (42), 129 (26). **EMAR**: calcd. para C₂₄H₃₂N₈O₄ 496.2547, encontrado 496.2562. UV(H₂O) λ_{máx} (ε) 304 nm= 32274 M⁻¹cm⁻¹.

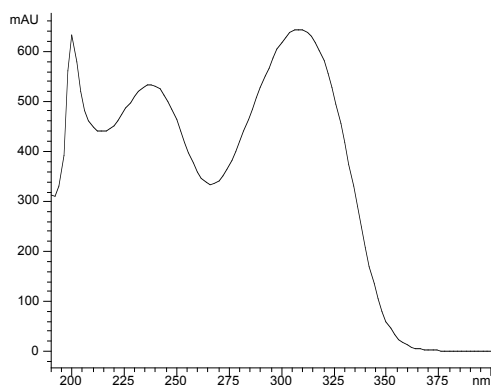
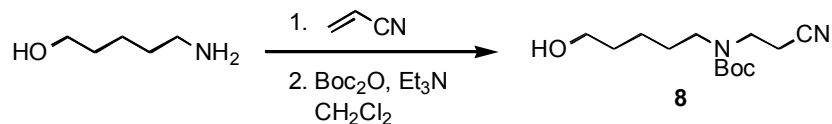
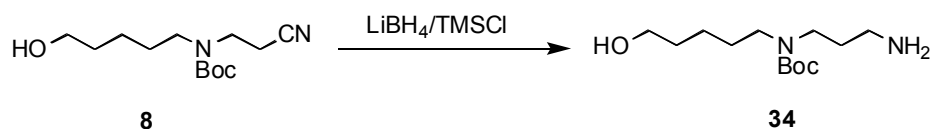


Figura 3.3 Espectro de UV del tripirrol **16**.

Síntesis del éster *tert*-Butílico del ácido (3-*tert*-Butoxicarbonilaminopropil)-(5-yodopentil)-carbámico (7)

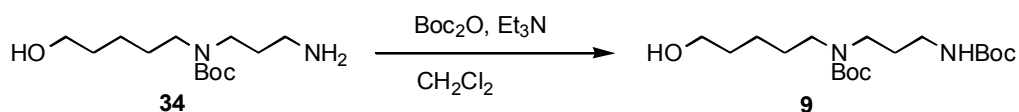


Sobre una disolución de 5-aminopentanol (10 g, 96.9 mmol) en EtOH (100 mL) enfriada a 0 °C se adicionó lentamente acrilonitrilo (6.38 mL, 96.9 mmol). La mezcla resultante se dejó que alcanzase temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (100 mL). Sobre la disolución se adicionaron Et_3N (27 mL, 0.194 mol) y Boc_2O (21.1 g, 96.9 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió HCl acuoso (60 mL, 3%) y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (2x60 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron y concentraron. El residuo aceitoso resultante consistía mayoritariamente en el éster *tert*-Butílico del ácido (2-cianoetil)-(5-hidroxipentil)-carbámico (**8**), que se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación (95%). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.23-1.32 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.44-1.52 (m, 4H), 2.52 (s ancho, 2H), 3.17 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 3.37 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 3.52 (t, $J=6.4$ Hz, 2H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 16.7 (CH_2), 17.2 (CH_2), 22.7 (CH_2), 27.7 (CH_2), 28.1 (CH_3), 28.3 (CH_2), 31.9 (CH_2), 43.1 (CH_2), 43.6 (CH_2), 47.3 (CH_2), 48.2 (CH_2), 62.0 (CH_2), 80.0 (C), 80.3 (C), 117.8 (C), 118.2 (C), 154.6 (C), 155.1 (C). **EM (IQ+):** m/z 257 (1), 201 (26), 184 (53), 157 (100), 139 (36), 116 (72). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$ 257.1865, encontrado 257.1876.

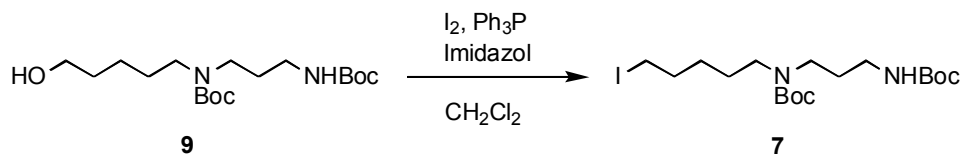


Sobre una suspensión de LiBH_4 (3.66 g, 0.168 mol) en THF (50 mL) se adicionó lentamente TMSCl (43.5 mL, 0.343 mol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos, se enfrió en un baño de agua-hielo y se añadió una disolución del nitrilo **8** (24.8 g, 96.9 mmol) en THF (50 mL). Después de 12 horas, la mezcla se enfrió de nuevo y la reacción se detuvo mediante la adición lenta de MeOH. Los disolventes se eliminaron parcialmente y sobre el residuo se añadió una disolución acuosa de KOH (30 mL, 10%). La suspensión resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (4x40 mL) y los extractos orgánicos se secaron y concentraron para

dar un residuo (20.3 g, 81%) que se utilizó en el siguiente paso de protección sin mayor purificación.

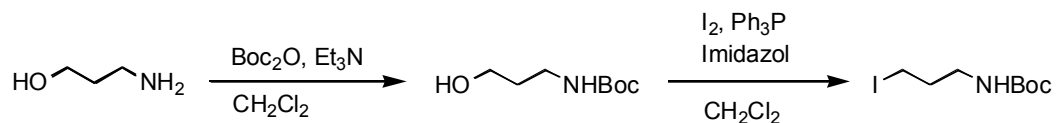


La amina **34** obtenida en el paso anterior (7.5 g, 29 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (40 mL) y sobre la disolución se adicionaron Et_3N (6.1 mL, 43.5 mmol) y Boc_2O (6.3 g, 29 mmol) en pequeñas porciones. La disolución se agitó durante 1 hora y se puso en HCl acuoso (20 mL, 3%). La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (2x20 mL) y las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron. El residuo se purificó en cromatografía en gel de sílice (5% MeOH/ CH_2Cl_2) para dar el alcohol deseado **9** (9.8 g, 94%, aceite viscoso). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.28-1.34 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.49-1.62 (m, 4H), 1.83-2.02 (m, 2H), 3.06-3.10 (m, 4H), 3.22 (s ancho, 2H), 3.61 (t, $J=6.4$ Hz, 2H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 22.8 (CH_2), 28.2 (CH_3), 29.2 (CH_2), 32.1 (CH_2), 38.9 (CH_2), 40.2 (CH_2), 46.4 (CH_2), 46.5 (CH_2), 47.6 (CH_2), 49.5 29.2 (CH_2), 62.1 (CH_2), 78.7 (C), 79.3 (C), 156.0 (C). **EM (IQ+):** m/z 361 (100), 261 (47), 205 (44). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$ 361.2703, encontrado 361.2702.

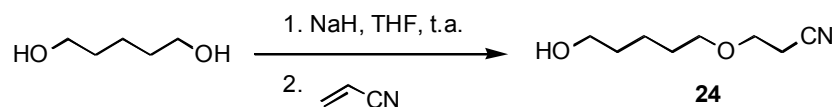


Sobre una disolución de Ph_3P (770 mg, 2.94 mmol), imidazol (273 mg, 4.01 mmol) y el alcohol **9** en CH_2Cl_2 (20 mL) se adicionó I_2 (667 mg, 2.63 mmol). Después de 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se añadió sobre una disolución acuosa de bisulfito sódico (10 mL, 5%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2x20 mL). Las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron y el residuo se cromatografió en EtOAc/hexano para dar el yoduro **7** como un aceite (1.1 g, 90%). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.22-1.44 (m, 22H), 1.48-1.62 (m, 2H), 1.70 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.88-3.18 (m, 8H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 6.4 (CH_2), 27.2 (CH_2), 27.4 (CH_2), 28.1 (CH_3), 32.7 (CH_2), 37.1 (CH_2), 43.4 (CH_2), 44.0 (CH_2), 46.4 (CH_2), 78.4 (C), 79.1 (C), 155.7 (C). **EM (FAB+):** m/z 471 (MH^+ , 45), 371 (24), 315 (100). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{I}$ 471.1720, encontrado 471.1703.

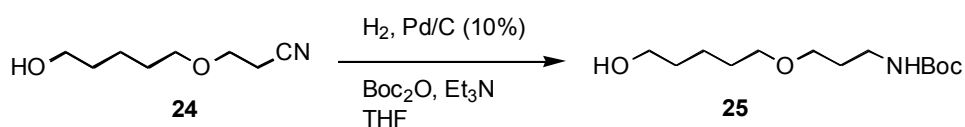
Carbamato de *tert*-Butil-3-yodopropilo



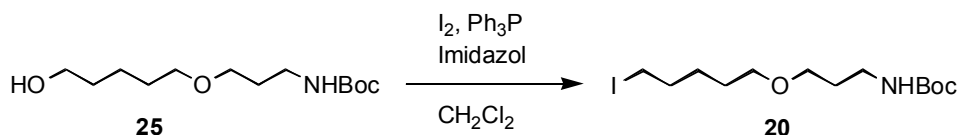
Sobre una disolución de 3-amino-1-propanol (1.02 mL, 13.3 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL) se adicionaron Et₃N (2.77 mL, 20.0 mmol) y Boc₂O (3.19 g, 14.6 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se añadió sobre una disolución acuosa de HCl (40 mL, 3%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x30 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron y concentraron. El residuo se redisolvió en CH₂Cl₂ (60 mL) y se añadieron Ph₃P (4.45 g, 17.0 mmol), imidazol (1.73 g, 25.5 mmol) y I₂ (1.73 g, 25.5 mmol). La suspensión se agitó 10 minutos a temperatura ambiente y se vertió sobre una disolución acuosa de bisulfito sódico (40 mL, 5%). La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (2x50 mL). Las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron, purificándose el crudo mediante cromatografía en gel de sílice (20% EtOAc/hexano) para dar el compuesto deseado como un aceite (3.2 g, 85%). **RMN ¹H δ (CDCl₃):** 1.40 (s, 9H), 1.96 (qui, *J*= 6.7 Hz, 2H), 3.16 (t, *J*= 6.8 Hz, 4H), 4.75 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CDCl₃):** 3.11 (CH₂), 28.3 (CH₃), 33.3 (CH₂), 40.9 (CH₂), 79.3 (C), 155.8 (C). **EM (IQ+):** m/z 285.9 (MH⁺, 23), 229.8 (86), 185.9 (28), 101.8 (88). **EMAR:** calcd. para C₈H₁₇INO₂ 286.03040, encontrado 286.02907.

Síntesis del carbamato de *tert*-Butil-3-(5-yodopentiloxi)propilo (20)

1,5-pentanodiol (3 mL, 28.6 mmol) se adicionó a una suspensión de NaH (860 mg, 35.7 mmol) en THF (50 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La suspensión resultante se enfrió en un baño de agua-hielo y sobre ella se añadió acrilonitrilo (1.5 mL, 22.8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 horas, se vertió sobre H₂O (20 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x20 mL). Los extractos orgánicos se recogieron, secaron, concentraron y el aceite resultante se purificó en columna de gel de sílice (3% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el producto deseado **24** como líquido aceitoso (1.6 g, 44%). **RMN ¹H δ (CDCl₃):** 1.38-1.47 (m, 2H), 1.57 (q, *J*= 6.9 Hz, 4H), 1.79 (s ancho, 1H), 2.58 (t, *J*= 6.3 Hz, 2H), 3.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.62 (t, *J*= 6.3 Hz, 4H). **RMN ¹³C δ (CDCl₃):** 18.6 (CH₂), 22.0 (CH₂), 29.0 (CH₂), 32.1 (CH₂), 62.7 (CH₂), 65.0 (CH₂), 71.0 (CH₂), 117.8 (C). **EM (IQ+):** *m/z* 158 (MH⁺, 10), 140 (30), 69 (100). **EMAR:** calcd. para C₈H₁₆NO₂ 158.1181, encontrado 158.1183.

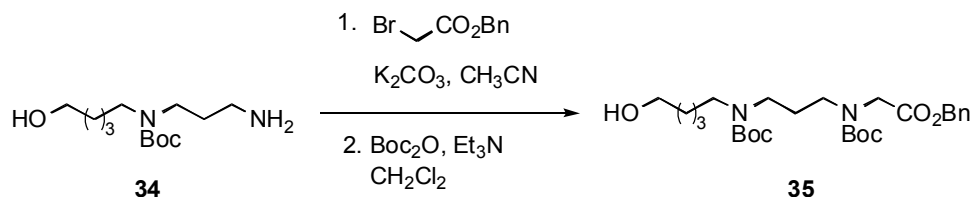


Una disolución del nitrilo **24** (340 mg, 2.15 mmol), Boc₂O (521 mg, 2.39 mmol), Et₃N (0.5 mL, 3.26 mmol) y DMAP (trazas) en THF (30 mL) se hidrogenó sobre Pd/C (10%, 150 mg) a temperatura ambiente (presión de un globo) durante 12 horas. La suspensión se filtró a través de celita y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo se vertió sobre una disolución acuosa de HCl (10 mL, 3%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x10 mL). Las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron, obteniéndose el alcohol deseado **25** como un aceite (507 mg, 90%). **RMN ¹H δ (CDCl₃):** 1.32 (s ancho, 11H), 1.41-1.53 (m, 4H), 1.62 (q, *J*= 6.2 Hz, 2H), 3.07 (m, 3H), 3.30 (t, *J*= 6.4 Hz, 2H), 3.36 (t, *J*= 6.0 Hz, 2H), 3.49 (t, *J*= 6.2 Hz, 2H), 5.09 (s ancho, 1H). **RMN ¹³C δ (CDCl₃):** 22.2 (CH₂), 28.2 (CH₃), 29.1 (CH₂), 29.4 (CH₂), 32.1 (CH₂), 38.3 (CH₂), 62.0 (CH₂), 68.8 (CH₂), 70.6 (CH₂), 78.7 (C), 155.9 (C). **EM (IQ+):** *m/z* 262 (MH⁺, 26), 206 (34), 162 (100), 102 (56). **EMAR:** calcd. para C₁₃H₂₈NO₄ 262.2018, encontrado 262.2014.



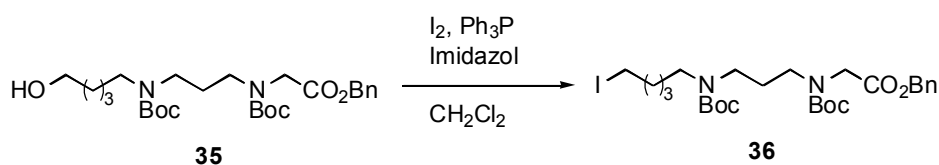
Sobre una disolución de Ph_3P (723 mg, 2.8 mmol), imidazol (256 mg, 3.8 mmol) y el alcohol **25** (655 mg, 2.5 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL) se adicionó I_2 (637 mg, 2.51 mmol). Después de 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa de bisulfito sódico (10 mL, 5%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2x20 mL). Las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron y el residuo se cromatografió en EtOAc/hexano para dar el yoduro **20** como un aceite (761 mg, 82%). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.35 (s ancho, 11H), 1.40-1.56 (m, 2H), 1.61-1.71 (m, 2H), 1.74-1.82 (m, 2H), 3.11 (t, $J=7.0$ Hz, 4H), 3.30-3.41 (m, 4H), 5.96 (s ancho, 1H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 6.7 (CH_2), 27.0, (CH_2), 28.2 (CH_3), 28.4 (CH_2), 29.5 (CH_2), 33.1 (CH_2), 38.5 (CH_2), 69.1 (CH_2), 70.4 (CH_2), 78.6 (C), 155.8 (C). **EM (IQ+):** m/z 372 (MH^+ , 10), 316 (8), 272 (45), 57 (100). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{I}$ 372.1036, encontrado 372.1034.

Preparación del yoduro 36



Sobre una disolución de la amina **34** (1.7 g, 6.5 mmol) en CH₃CN (50 mL) se añadió K₂CO₃ (3.5 g) y la suspensión resultante se enfrió en un baño de agua-hielo. Se adicionó 2-bromoacetato de bencilo (1.3 g, 5.77 mmol) y la mezcla se agitó en el baño durante 12 horas dejando alcanzar lentamente temperatura ambiente. Se eliminó parcialmente el disolvente y el residuo se vertió sobre H₂O (20 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x20 mL). Las fases orgánicas se secaron, concentraron y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice (10% MeOH/CH₂Cl₂).

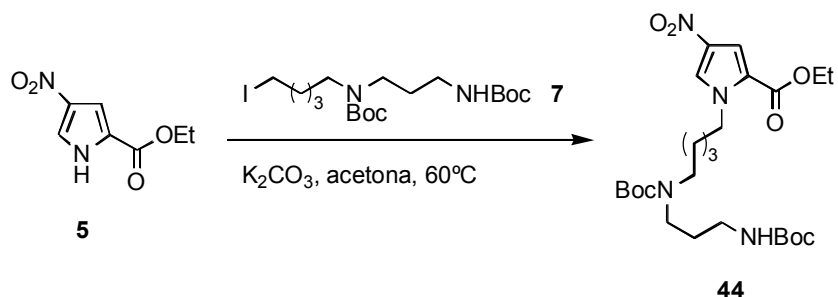
El producto obtenido se redisolvió en CH₂Cl₂ (20 mL) y sobre la disolución resultante se adicionaron Et₃N (2.71 mL, 19.5 mmol) y Boc₂O (2.84 g, 13 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora y se añadió sobre HCl acuoso (20 mL, 3%). La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (2x20 mL) y las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron. El residuo se purificó en cromatografía en gel de sílice (5% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el alcohol **35** (1.68 g, 51%, aceite viscoso). **RMN** ¹H δ (CDCl₃): 1.19 (m, 4H), 1.28-1.31 (2s, 18H), 1.36-1.60 (m, 4H), 2.11 (s, 1H), 2.87-3.16 (m, 6H), 3.45 (t, *J*= 6.45 Hz, 2H), 3.75-3.84 (2s, 2H), 5.0 (s, 2H), 7.19 (s, 5H). **RMN** ¹³C δ (CDCl₃): 22.8 (CH₂), 28.0 (CH₃), 28.3 (CH₃), 32.2 (CH₂), 44.6 (CH₂), 46.1 (CH₂), 46.4 (CH₂), 46.7 (CH₂), 48.9 (CH₂), 49.4 (CH₂), 62.3 (CH₂), 66.6 (CH₂), 79.1 (C), 80.2 (C), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (CH), 135.3 (C), 155.0 (C), 155.5 (C), 169.8 (C). **EM (FAB+)**: *m/z* 509 (MH⁺, 35), 409 (100), 353 (97), 309 (69). **EMAR**: calcd. para C₂₇H₄₄N₂O₇ 508.3149, encontrado 3134.



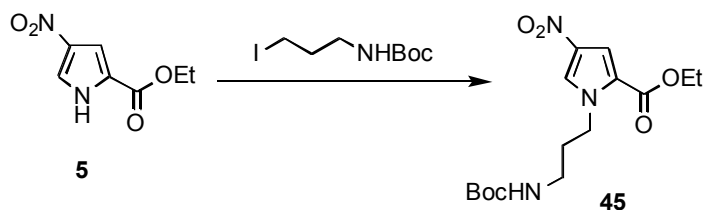
Sobre una disolución de Ph₃P (955 mg, 3.64 mmol), imidazol (337 mg, 4.96 mmol) y el alcohol **35** (1.68 g, 3.31 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) se adicionó I₂ (840 mg, 3.31 mmol). Después de 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se añadió sobre una disolución acuosa de bisulfito sódico (20 mL, 5%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (2x20 mL). Las fases orgánicas se recogieron,

secaron y concentraron y el residuo se cromatografió en EtOAc/hexano para dar el yoduro **36** como un aceite (1.94 g, 95%). **RMN ¹H δ (CDCl₃):** 1.20 (m, 4H), 1.29-1.32 (2s, 18H), 1.50-1.72 (m, 4H), 2.98-3.14 (m, 6H), 3.76-3.85 (2s, 2H), 5.01 (s, 2H), 7.19 (s, 5H). **RMN ¹³C δ (CDCl₃):** 6.57 (CH₂), 27.4 (CH₂), 27.8 (CH₃), 28.2 (CH₃), 32.8 (CH₂), 44.4 (CH₂), 45.9 (CH₂), 46.4 (CH₂), 48.8 (CH₂), 49.2 (CH₂), 66.4 (CH₂), 78.8 (C), 79.9 (C), 127.8 (CH), 128.0 (CH), 128.2 (CH), 135.2 (C), 154.7 (C), 155.1 (C), 169.6 (C). **EM (FAB+):** m/z 619 (MH⁺, 49), 519 (61), 419 (40). **EMAR:** calcd. para C₂₇H₄₃IN₂O₆ 618.2166, encontrado 618.2135.

Protocolo general para las alquilaciones de los pirroles, ejemplificado en la alquilación del 4-nitro-1*H*-pirrol-2-carboxilato de etilo (**5**) con el yoduro **7**

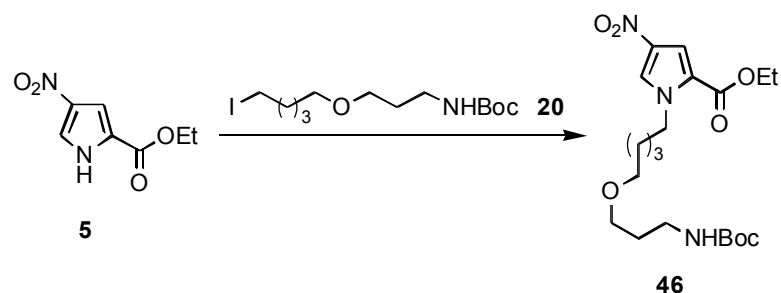


Sobre una disolución del pirrol **5** (570 mg, 3.1 mmol) en acetona (25 mL) se añadió K_2CO_3 (1.5 g) y el yoduro **7** (1.7 g, 3.77 mmol). La mezcla se agitó a reflujo durante 10 horas, se concentró, se añadió sobre una disolución acuosa de HCl (20 mL, 3%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3x20 mL). Las fases orgánicas se secaron y concentraron y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (30% EtOAc/hexano) para dar el producto esperado **44** como un sólido amarillo-pálido (1.22 g, 75%). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.26 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.39-1.40 (2 s, 18H), 1.51 (qui, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.56-1.68 (m, 2H), 1.78 (q, $J=7.5$ Hz, 2H), 3.04-3.26 (m, 6H), 4.27 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.31 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.59 (s, 1H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 14.1 (CH_3), 23.6 (CH_2), 28.3 (CH_3), 30.8 (CH_2), 37.3 (CH_2), 43.6 (CH_2), 44.1 (CH_2), 46.3 (CH_2), 46.6 (CH_2), 50.2 (CH_2), 60.8 (CH_2), 78.8 (C), 79.5 (C), 112.9 (CH), 122.3 (C), 126.6 (CH), 135.2 (C), 155.9 (C), 159.8 (C). **EM (FAB+):** m/z 527 (MH^+ , 1), 427 (7), 371 (100), 327 (21). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_8$ 527.3081, encontrado 527.3077.

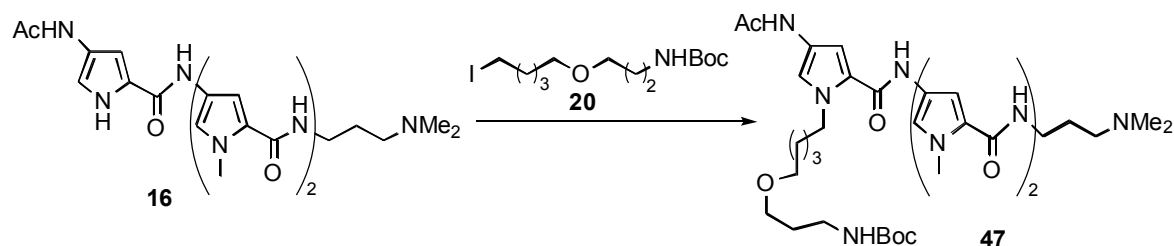


45 (sólido amarillo-pálido, 82%). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.96 (q, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.12 (m, 2H), 4.28 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.38 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 4.91 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.71 (s, 1H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 14.1 (CH_3), 28.2 (CH_3), 31.6 (CH_2), 37.3 (CH_2), 47.6 (CH_2), 60.9 (CH_2), 79.4 (C), 113.0 (CH), 122.3 (C), 127.0 (CH), 135.3 (C), 156.0 (C), 159.9 (C). **EM (IQ+):** m/z 342 (MH^+ , 2), 286 (32),

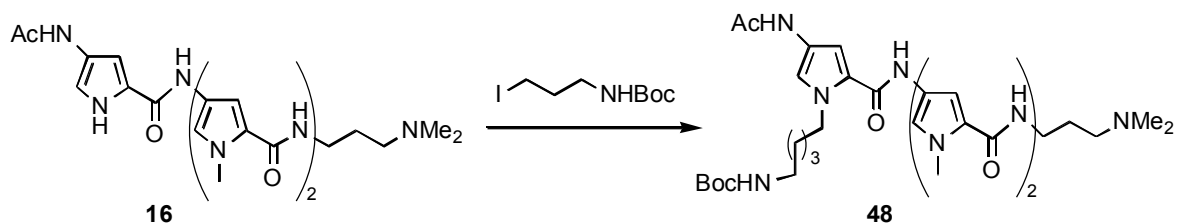
242 (100). **EMAR:** calcd. para $C_{15}H_{24}N_3O_6$ 342.1665, encontrado 342.1668.



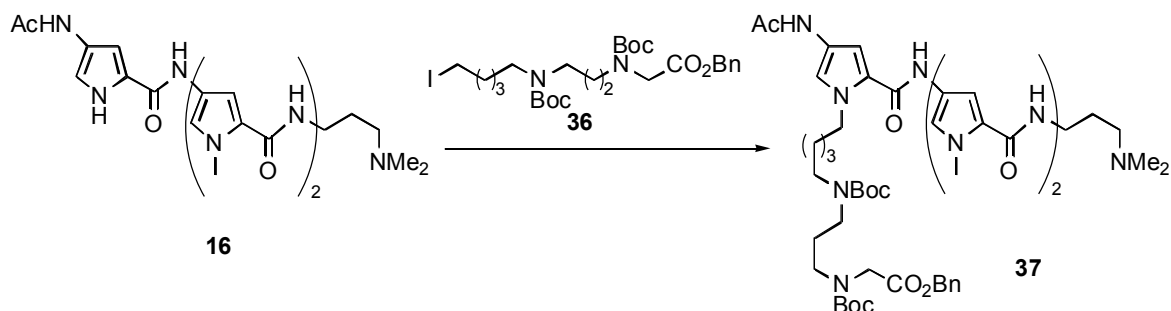
46 (sólido amarillo-pálido, 70%). **RMN 1H δ ($CDCl_3$):** 1.29-1.34 (m, 5H), 1.38 (s, 9H), 1.50-1.58 (m, 2H), 1.64-1.71 (m, 2H), 1.75-1.84 (m, 2H), 3.15-3.19 (q, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.32-3.44 (m, 4H), 4.22-4.34 (m, 4H), 4.86 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.61 (s, 1H). **RMN ^{13}C δ ($CDCl_3$):** 14.1 (CH_3), 23.0 (CH_2), 28.3 (CH_3), 29.0 (CH_2), 29.7 (CH_2), 30.8 (CH_2), 38.5 (CH_2), 50.2 (CH_2), 60.7 (CH_2), 69.0 (CH_2), 70.3 (CH_2), 78.8 (C), 112.8 (CH), 122.3 (C), 126.6 (CH), 135.2 (C), 155.8 (C), 159.8 (C). **EM (FAB+):** m/z 428 (MH^+ , 5), 372 (16), 328 (100). **EMAR:** calcd. para $C_{20}H_{34}N_3O_7$ 428.2397, encontrado 428.2385.



47 (sólido, 85%), **RMN 1H δ (CD_3OD):** 1.25-1.45 (s ancho, 13H), 1.52-1.58 (m, 2H), 1.62-1.70 (m, 4H), 2.00-2.05 (m, 5H), 3.04 (s ancho, 6H), 3.22-3.38 (m, 10H), 3.83-3.86 (2 s, 6H), 6.92-6.98 (m, 3H), 7.19-7.22 (m, 3H). **RMN ^{13}C δ (CD_3OD):** 23.1 (CH_3), 23.4 (CH_2), 24.2 (CH_2), 24.4 (CH_2), 28.8 (CH_3), 30.1 (CH_2), 31.1 (CH_2), 36.9 (CH_3), 38.9 (CH_2), 49.9 (CH_3), 51.5 (CH_3), 63.1 (CH_2), 65.3 (CH_2), 69.4 (CH_2), 71.4 (CH_2), 79.8 (C), 104.0 (CH), 106.6 (CH), 114.4 (CH), 120.8 (CH), 123.2 (C), 123.4 (C), 124.0 (C), 124.5 (C), 124.6 (C), 125.3 (C), 158.4 (C), 160.5 (C), 161.2 (C), 164.3 (C), 170.3 (C). **EM (FAB+):** m/z 740 (MH^+ , 36), 618 (14). **EMAR:** calcd. para $C_{37}H_{58}N_9O_7$ 740.4459, encontrado 740.4459. UV(H_2O/CH_3CN) $\lambda_{m\acute{a}x}$ (ϵ) 304 nm = 32274 $M^{-1}cm^{-1}$.

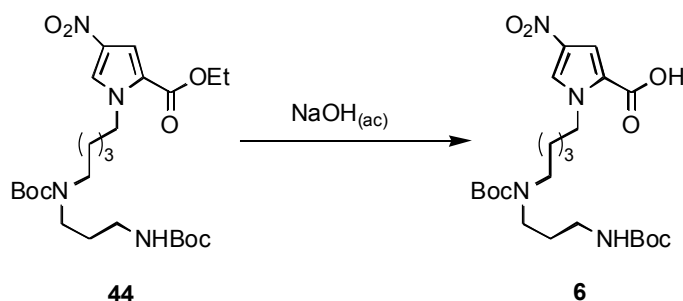


48 (sólido, 65%), **RMN ^1H δ (CD_3OD):** 1.23-1.32 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.82-2.02 (m, 4H), 2.07 (s, 3H), 3.07 (s, 6H), 3.28-3.41 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.76-4.92 (m, 2H), 6.93-6.97 (m, 3H), 7.18-7.22 (m, 3H). **RMN ^{13}C δ (CD_3OD):** 23.0 (CH_3), 24.4 (CH_2), 28.8 (CH_3), 36.9 (CH_3), 37.1 (CH_2), 38.3 (CH_2), 49.9 (CH_3), 51.6 (CH_3), 63.4 (CH_2), 80.4 (C), 104.1 (CH), 106.6 (CH), 106.7 (CH), 114.4 (CH), 120.8 (CH), 120.9 (CH), 123.2 (C), 123.3 (C), 124.1 (C), 124.6 (C), 124.7 (C), 125.3 (C), 158.4 (C), 160.6 (C), 161.3 (C), 164.4 (C), 170.4 (C). **EMAR (FAB+):** calcd. para $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{N}_9\text{O}_6$ 653.3649, encontrado 653.3652. UV($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm = 32274 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



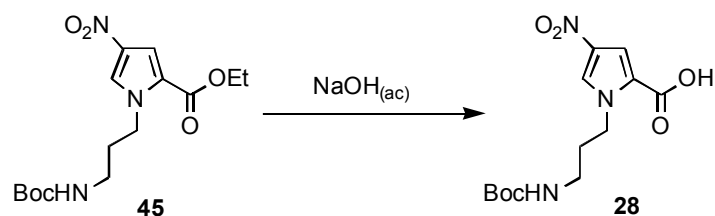
37 (sólido, 84%), **RMN ^1H δ (CD_3OD):** 1.05-1.43 (m, 22H), 1.55-1.70 (m, 4H), 1.98 (s, 3H), 2.98 (s, 6H), 3.08-3.29 (m, 14H), 3.78-3.91 (m, 8H), 5.06 (s, 2H), 6.81-6.87 (m, 3H), 7.07-7.12 (m, 3H), 7.25 (s ancho, 5H). **RMN ^{13}C δ (CD_3OD):** 23.0 (CH_3), 24.4 (CH_2), 28.5 (CH_3), 28.8 (CH_3), 36.9 (CH_3), 37.1 (CH_2), 47.3 (CH_2), 47.9 (CH_2), 50.6 (CH_2), 51.5 (CH_3), 63.0 (CH_2), 65.0 (CH_2), 67.8 (CH_2), 81.0 (C), 81.7 (C), 104.0 (CH), 106.6 (CH), 114.3 (CH), 120.8 (CH), 123.2 (C), 123.3 (C), 124.1 (C), 124.6 (C), 125.2 (C), 125.4 (C), 129.2 (CH), 129.6 (CH), 137.3 (C), 157.1 (C), 157.4 (C), 160.7 (C), 161.4 (C), 164.5 (C), 170.5 (C), 171.6 (C). **EMAR (FAB+):** calcd. para $\text{C}_{51}\text{H}_{75}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$ 987.5668, encontrado 987.5624.

Ácido 1 - { 5 - [*tert*-Butoxicarbonil-(3-*tert*-Butoxicarbonilaminopropil)-amino]-pentil}-4-nitro-1*H*-pirrol-2-carboxílico (6)



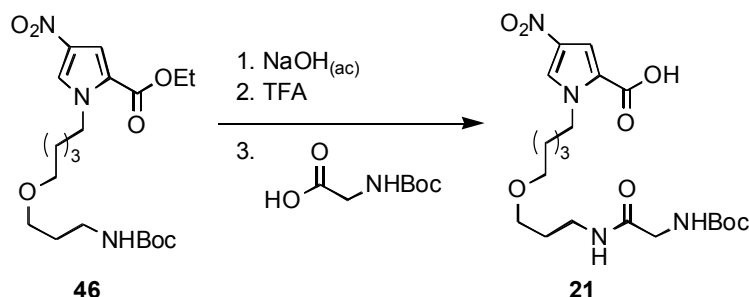
El pirrol **44** (1.0 g, 1.9 mmol) se trató con una disolución de NaOH (30 mL, 1 M) en 70% EtOH/H₂O a reflujo durante 30 minutos. Se eliminó el EtOH parcialmente a presión reducida y la disolución resultante se acidificó con HCl acuoso (5%). La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ y los extractos orgánicos combinados se secaron y concentraron para dar el producto **6** como un polvo blanco (888 mg, 94%). **RMN ¹H δ (CDCl₃):** 1.20-1.55 (m, 20H), 1.61-1.89 (m, 6H) 3.1-3.4 (m, 6H), 4.20-4.35 (m, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.62 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CDCl₃):** 23.1 (CH₂), 24.2 (CH₂), 28.7 (CH₃), 30.2 (CH₂), 38.1 (CH₂), 39.0 (CH₂), 46.9 (CH₂), 47.5 (CH₂), 51.2 (CH₂), 79.5 (C), 81.8 (C), 114.1 (CH), 123.1 (C), 126.9 (CH), 135.8 (C), 156.2 (C), 164.1 (C). **EM (FAB+):** m/z 499 (MH⁺, 61), 343 (12), 154 (100). **EMAR:** calcd. para C₂₃H₃₈N₄O₈ 498.2690, encontrada 498.2792.

Ácido 1-(3-*tert*-Butoxicarbonilaminopropil)-4-nitro-1*H*-pirrol-2-carboxílico (28)



Se siguió el mismo procedimiento sintético que se usó para obtener el ácido **6**. (Sólido blanco, 97%). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.31 (s, 9H), 1.84 (q, *J*= 6.7 Hz, 2H), 2.94 (t, *J*= 6.5 Hz, 2H), 4.31 (t, *J*= 6.9, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.84 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 28.8 (CH₃), 32.4 (CH₂), 38.2 (CH₂), 48.7 (CH₂), 80.1 (C), 113.8 (CH), 124.2 (C), 128.9 (CH), 136.4 (C), 158.4 (C), 162.7 (C). **EM (IQ⁺)**: *m/z* 314 (MH⁺, 2), 258 (38), 214 (100), 196 (55). **EMAR**: calcd. para C₁₃H₂₀N₃O₆ 314.1352, encontrado 314.1353.

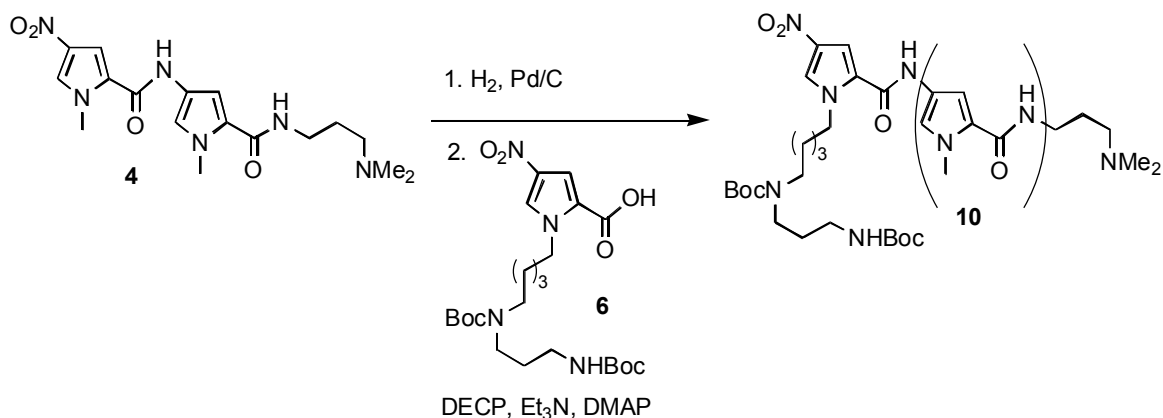
Ácido 1-{5-[3-(2-*tert*-Butoxicarbonilaminoacetilamino)-propoxi]-pentil}-4-nitro-1*H*-pirrol-2-carboxílico (21)



El pirrol **46** (524 mg, 1.23 mmol) se mezcló con una disolución de NaOH en 70% EtOH/H₂O (30 mL, 1 M). Después de refluir la mezcla durante 30 minutos, parte del disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se acidificó con HCl acuoso (5%) y se extrajo con CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos se secaron y concentraron para dar un sólido blanco que se sometió directamente a la etapa de desprotección del grupo Boc. Para ello, dicho sólido se disolvió en CH₂Cl₂ (3 mL) y sobre la disolución enfriada a 0 °C se adicionó TFA (3 mL). La mezcla de reacción se agitó 1 hora a 0 °C y otras 2 horas más a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron en el rotavapor y el TFA residual se eliminó por codestilación con CH₂Cl₂.

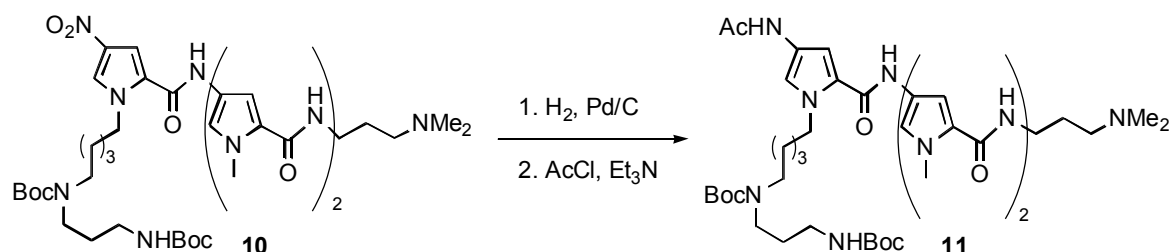
Sobre una disolución del ácido aminopirrol resultante (1.1 mmol) en CH₂Cl₂ (25 mL) se adicionaron DIEA (1.05 mL, 6.15 mmol) y Boc-Gly-Osuc (329 mg, 1.2 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas, se añadió sobre una disolución acuosa de HCl (10 mL, 3%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (2x20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron y concentraron. Después de la purificación mediante columna en gel de sílice se aisló un sólido blanco que se identificó como el compuesto deseado **21** (326 mg, 65%). **RMN** ¹H δ (CDCl₃): 1.22 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.55-1.60 (m, 2H), 1.71-1.82 (m, 4H), 3.35-3.39 (m, 4H), 3.45 (t, *J*= 5.4 Hz, 2H), 3.80 (m, 2H), 4.34 (t, *J*= 6.9 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 9.78 (s, 1H). **RMN** ¹³C δ (CDCl₃): 22.8 (CH₂), 28.2 (CH₃), 28.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 29.5 (CH₂), 30.9 (CH₂), 33.4 (CH₂), 37.9 (CH₂), 50.0 (CH₂), 69.1 (CH₂), 70.3 (CH₂), 80.0 (C), 80.4 (C), 113.5 (CH), 122.6 (C), 126.9 (CH), 135.2 (C), 156.5 (C), 162.1 (C), 170.3 (C). **EM (FAB+)**: *m/z* 457 (MH⁺, 27), 401 (18), 357 (30). **EMAR**: calcd. para C₂₀H₃₃N₄O₈ 457.2298, encontrado 457.2284.

Acoplamiento del dipirrol 4 con el ácido 6 para dar el tripirrol 10

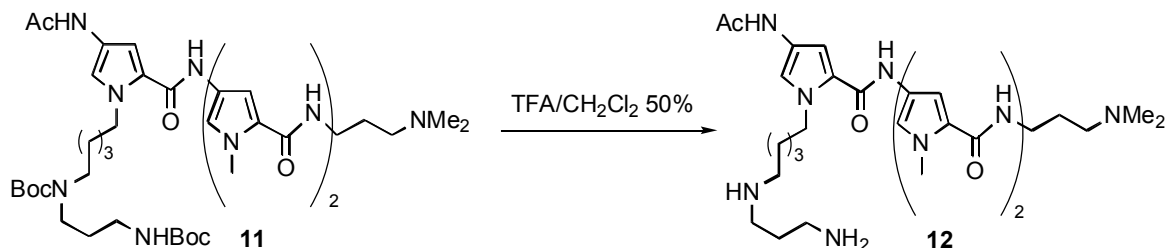


Una disolución del dipirrol **4** (430 mg, 1.13 mmol) en MeOH (50 mL) se hidrogenó sobre Pd/C (200 mg, 10%) a temperatura ambiente (presión de un globo). El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en DMF (10 mL) y se adicionó sobre otra disolución previamente preparada del ácido **6** (470 mg, 0.943 mmol), DECP (0.172 mL, 1.13 mmol), Et₃N (0.65 mL, 4.71 mmol) y DMAP (10 mg) en THF (12 mL) enfriada a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 horas. Se adicionó MeOH (5 mL) y los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en alúmina neutra (5% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el compuesto deseado **10** en forma de sólido amarillo (766 mg, 82%). **RMN ¹H δ (CD₃OD):** 1.21-1.41 (m, 4H), 1.51 (s, 18H), 1.62-1.69 (m, 4H), 1.8-2.0 (m, 3H), 2.42 (s, 6H), 2.60-2.70 (m, 2H), 3.05-3.15 (m, 4H), 3.21-3.30 (m, 4H), 3.40-3.45 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.49 (m, 2H), 6.81 (s, 1H), 7.0 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.91 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD):** 25.0 (CH₂), 28.1 (CH₂), 29.0 (CH₃), 30.0 (CH₂), 32.6 (CH₂), 37.5 (CH₃), 38.0 (CH₂), 39.1 (CH₂), 45.2 (CH₃), 46.1 (CH₂), 50.0 (CH₂), 50.1 (CH₂), 51.1 (CH₂), 58.3 (CH₂), 80.0 (C), 81.1 (C), 106.4 (CH), 106.6 (CH), 109.7 (CH), 120.8 (CH), 121.1 (CH), 123.0 (C), 123.2 (C), 124.9 (C), 125.1 (C), 127.0 (CH), 128.1 (C), 136.4 (C), 158.0 (C), 158.9 (C), 160.0 (C), 161.8 (C), 165.9 (C). **EM (FAB+):** m/z 827 (100), 627 (35). **EMAR:** calcd. para C₄₀H₆₂N₁₀O₉ 826.46535, encontrado 826.46597. UV(H₂O/CH₃CN) λ_{máx} = 300 nm.

Reducción y acetilación del nitroderivado 10 para formar el tripirrol acetilado 11

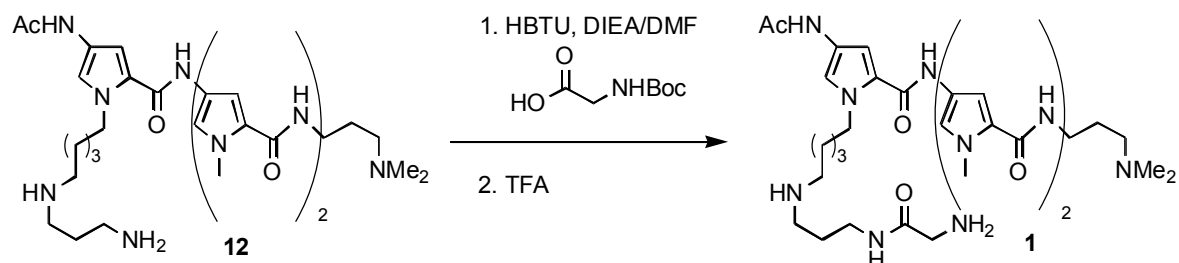


Una disolución del tripirrol **10** (100 mg, 0.121 mmol) en MeOH (40 mL) se hidrogenó sobre Pd/C (50 mg, 10%) durante 45 minutos a temperatura ambiente (presión de un globo). El catalizador se eliminó mediante filtración a través de celita y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se redisolvió en una mezcla de DMF (10 mL) y Et₃N (0.17 mL, 1.21 mmol) y la disolución se enfrió a 0 °C. Sobre ella se adicionó una disolución de AcCl en DMF (9.5 µL, 0.133 mmol en 0.2 ml) y la mezcla se agitó media hora a 0 °C y otras 3 horas a temperatura ambiente. Los disolventes se evaporaron a vacío y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en alúmina (5% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose el compuesto **11** en forma de sólido amarillo (85 mg, 84%, pf= 155 °C). **RMN ¹H δ (CD₃OD):** 1.20-1.40 (m, 2H), 1.40-1.60 (m, 20H), 1.61-1.92 (m, 4H), 1.96-2.02 (m, 5H), 2.97 (s, 6H), 3.05-3.10 (m, 2H), 3.15-3.25 (m, 4H), 3.37 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.38 (m, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.25 (m, 3H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD):** 23.8 (CH₃), 25.1 (CH₂), 28.8 (CH₂), 29.2 (CH₃), 32.1 (CH₂), 37.5 (CH₃), 38.9 (CH₂), 39.2 (CH₂), 45.1 (CH₃), 45.2 (CH₂), 47.3 (CH₂), 50.0 (CH₂), 58.0 (CH₂), 80.3 (C), 81.2 (C), 106.5 (CH), 106.9 (CH), 108.2 (CH), 119.9 (CH), 120.8 (CH), 121.2 (CH), 123.8, (C) 124.4 (C), 124.9 (C), 158.7 (C), 159.0 (C), 161.7 (C), 164.5 (C), 170.6 (C). **EM (FAB+):** m/z 839.5 (100), 639 (19), 309 (12), 231 (48). **EMAR:** calcd. para C₄₂H₆₆N₁₀O₈ 838.50651, encontrado 838.46535. UV(H₂O/CH₃CN) λ_{máx} (ε) 304 nm= 32274 M⁻¹cm⁻¹.

Eliminación del grupo Boc de **11** para formar el derivado tripirrólico **12**

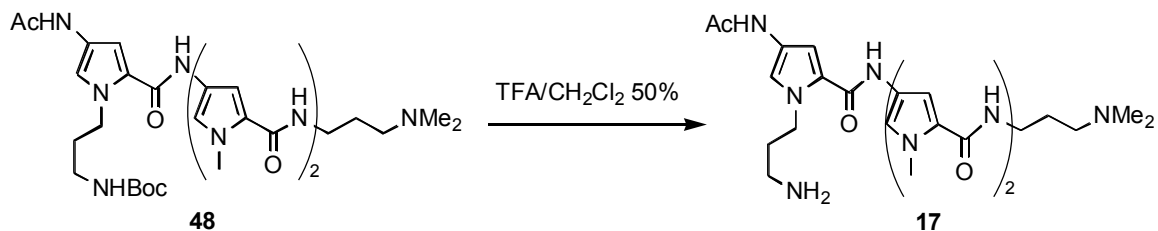
Sobre una disolución del tripirrol **11** (84 mg, 0.1 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL) enfriada a 0 °C se adicionó TFA (3 mL). La disolución resultante se agitó a 0 °C durante 1 hora y otras 2 horas más a temperatura ambiente. Los disolventes se concentraron a vacío y el TFA residual se eliminó por codestilación con CH₂Cl₂. El residuo se identificó como el producto deseado **12** (sólido amarillo, 97%, pf= 102 °C). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.14-1.35 (m, 4H), 1.50- 1.90 (m, 4H), 2.0 (s, 3H), 2.79 (s, 6H), 2.80-3.00 (m, 6H), 3.00-3.10 (m, 2H), 3.20-3.35 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.25 (m, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.50 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 22.1 (CH₃), 24.0 (CH₂), 24.9 (CH₂), 25.2 (CH₂), 29.8 (CH₃), 30.0 (CH₂), 35.0 (CH₂), 35.1 (CH₃), 35.2 (CH₂), 44.3 (CH₃), 46.3 (CH₂), 47.5 (CH₂), 48.1 (CH₂), 55.0 (CH₂), 107.3 (CH), 111.9 (C), 116.0 (C), 121.5 (CH), 122.7 (CH), 124.1 (C), 124.2 (C), 124.4 (C), 160.0 (C), 165.3 (C), 171.2 (C). **EM (FAB+)**: m/z 639 (MH⁺, 10), 422 (8), 391 (21), 309 (73). **EMAR**: calcd. para C₃₂H₅₀N₁₀O₄ 638.4017, encontrado 638.3956. UV(H₂O) λ_{máx} (ε) 304 nm= 32274 M⁻¹cm⁻¹.

Acoplamiento de glicina al derivado aminotripirrólico **12 para formar el tripirrol **1****



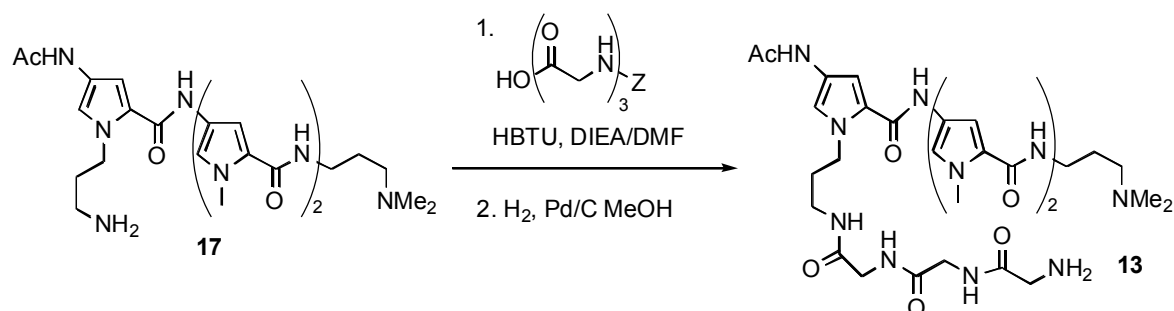
Sobre una disolución del tripirrol **12** (80 mg, 0.125 mmol) y DIEA (36.8 μ L, 0.215 mmol) en DMF (1 mL) se adicionó una mezcla recién preparada de Boc-Gly-OH (22 mg, 0.125 mmol) y HBTU (47 mg, 0.125 mmol) en DMF (2 mL). La disolución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y los disolventes se evaporaron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía semipreparativa de RP-HPLC (gradiente 5->95% B 1/2 hora; A: TFA/H₂O 0.1%, B: TFA/CH₃CN 0.1%, t_R = 12.8 min). El producto de acoplamiento se disolvió en CH₂Cl₂ (1 mL) y se enfrió a 0 °C. Se adicionó TFA (1 mL) y la disolución resultante se agitó a 0 °C durante 1 hora y otras 2 horas más a temperatura ambiente. Los disolventes se concentraron a vacío y el TFA residual se eliminó por codestilación con CH₂Cl₂. El residuo se identificó como el producto deseado **1** (sólido amarillo, 44 mg, 50%, pf = 130 °C). **RMN** ¹H δ (CD₃OD): 1.26-1.29 (m, 2H), 1.35-1.42 (m, 2H), 1.64-1.73 (m, 2H), 1.80-2.02 (m, 4H), 2.08 (s, 3H), 2.91 (s, 6H), 2.94-3.03 (m, 4H), 3.17 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.33-3.43 (m, 4H), 3.68 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.34 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 7.05-7.11 (m, 3H). **RMN** ¹³C δ (CD₃OD): 22.9 (CH₃), 24.4 (CH₂), 26.6 (CH₂), 26.7 (CH₂), 27.4 (CH₂), 32.1 (CH₂), 36.8 (CH₃), 37.0 (CH₂), 37.1 (CH₂), 42.6 (CH₂), 43.7(CH₃), 46.2 (CH₂), 48.8 (CH₂), 49.1 (CH₂), 49.8 (CH₃), 56.8 (CH₂), 106.3 (CH), 106.4 (CH), 106.6 (CH), 115.8 (C), 119.7 (CH), 120.7 (CH), 120.9 (CH), 123.2 (C), 123.3 (C), 123.8 (C), 124.1 (C), 124.5 (C), 161.2 (C), 161.3 (C), 164.6 (C), 170.4 (C), 170.9 (C). **EMAR**: calcd. para C₃₄H₅₃N₁₁O₅ 695.42311, encontrado 695.42262. UV(H₂O) $\lambda_{m\acute{a}x}$ (ϵ) 304 nm= 32274 M⁻¹cm⁻¹.

Eliminación del grupo Boc de 48 para dar el aminotripirrol 17



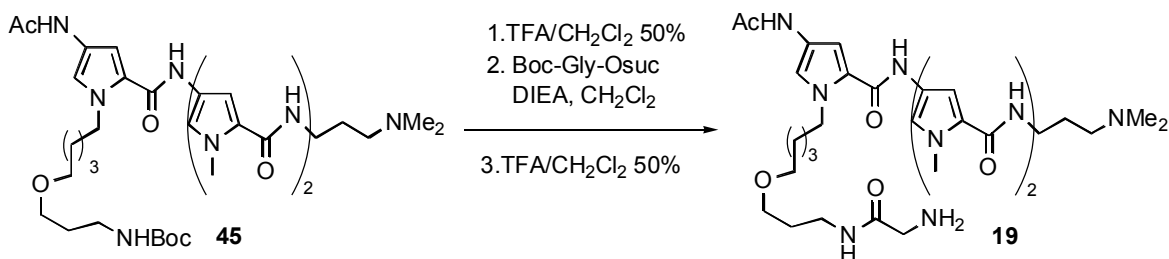
El compuesto tripirrólico **48** se disolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y la disolución se enfrió a 0°C . Sobre ella se adicionó TFA (3 mL) gota a gota y la mezcla resultante se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante otras 2 h. El disolvente se eliminó a vacío y el TFA residual se eliminó por codestilación con CH_2Cl_2 . El residuo resultante se identificó como la amina deseada (sólido amarillo, 80%). **RMN ^1H δ (CD_3OD):** 1.80 (s, 3H), 1.83–1.93 (m, 2H), 2.75 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 2.83 (s, 6H), 3.03–3.19 (m, 8H), 3.58 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 4.76–4.92 (m, 2H), 6.60–6.66 (m, 3H), 6.87–6.94 (m, 3H). **RMN ^{13}C δ (CD_3OD):** 21.1 (CH_2), 22.0 (CH_3), 23.4 (CH_2), 35.8 (CH_3), 35.9 (CH_2), 36.6 (CH_2), 50.5 (CH_3), 61.1 (CH_2), 62.9 (CH_2), 103.2 (CH), 105.6 (CH), 105.7 (CH), 114.0 (CH), 117.3 (C), 118.6 (C), 119.9 (CH), 122.0 (C), 122.2 (C), 123.1 (C), 123.6 (C), 124.2 (C), 159.7 (C), 160.5 (C), 163.5 (C), 169.6 (C). **EMAR (FAB+):** calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_9\text{O}_4$ 553.3125, encontrado 553.3116. UV(H_2O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm = 32274 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Acoplamiento de bencil-triglicina con el aminotripirrol 17



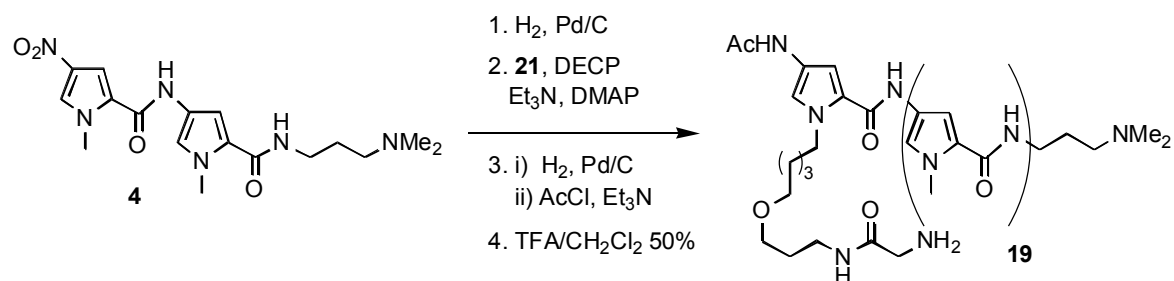
Sobre una disolución de la amina **17** (90 mg, 0.163 mmol) y DIEA (36.8 μL , 0.215 mmol) en DMF (2 mL) se adicionó una mezcla recién preparada de Z-(Gly)₃-OH (103 mg, 0.320 mmol) y HBTU (121 mg, 0.320 mmol) en DMF (2 mL). La disolución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y los disolventes se eliminaron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía semipreparativa de RP-HPLC (gradiente 5->95% B 1/2 hora; A:TFA/H₂O 0.1%, B: TFA/CH₃CN 0.1%, t_R = 16.9 min). El producto de acoplamiento obtenido se disolvió en MeOH (20 mL) y se hidrogenó durante 2 horas sobre Pd/C (60 mg, 10%) a temperatura ambiente (presión de un globo). El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró para dar el producto deseado **13** en forma de sólido amarillo (78 mg, 66%, pf= 198 °C). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.91-2.04 (m, 4H), 2.08 (s, 3H), 3.05 (s, 6H), 3.20-3.31 (m, 8H), 3.54 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.93 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.22 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 22.9 (CH₃), 23.8 (CH₂), 24.2 (CH₂), 36.8 (CH₃), 36.9 (CH₂), 43.3 (CH₂), 43.8 (CH₂), 43.9 (CH₂), 49.8 (CH₃), 51.5 (CH₃), 62.9 (CH₂), 63.3 (CH₂), 104.0 (CH), 106.5 (CH), 114.4 (CH), 115.9 (C), 120.6 (CH), 120.7 (CH), 120.8, (CH) 123.2 (C), 123.3 (C), 124.2 (C), 124.6 (C), 125.3 (C), 160.6 (C), 161.3 (C), 162.7 (C), 164.3 (C), 170.4 (C), 172.2 (C), 172.6 (C). **EM (FAB+)**: 725.2 (MH⁺, 33), 452.1 (20). **EMAR**: calcd. para C₃₃H₄₈N₁₂O₇ 724.37689, encontrado 724.37642. UV(H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm= 32274 M⁻¹cm⁻¹.

Acoplamiento de glicina con el compuesto 45



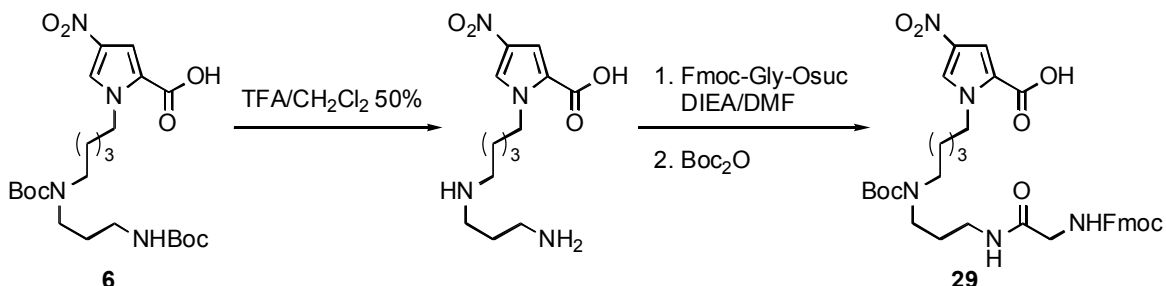
El tripirrol **45** se sometió a la etapa de eliminación del grupo Boc siguiendo el procedimiento estándar (véase, por ejemplo, página 169). El residuo resultante se disolvió en DMF (5 mL) y sobre la disolución se adicionaron DIEA (0.2 mL, 0.98 mmol) y Boc-Gly-OSuc (54 mg, 0.2 mmol). La mezcla resultante se agitó 1 hora a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó en el rotavapor y el residuo se purificó mediante cromatografía en alúmina (5% MeOH/CH₂Cl₂). El producto resultante se sometió de nuevo a una etapa de eliminación del grupo Boc (TFA/CH₂Cl₂) para dar directamente el compuesto deseado **19** (sólido amarillo, 43 mg, 31%). **RMN ¹H δ (CD₃OD):** 1.15 (m, 4H), 1.39 (m, 2H), 1.57 (m, 4H), 1.83 (m, 2H), 1.93 (s, 3H), 2.74 (s, 6H), 3.01 (t, *J*= 7.3 Hz, 2H), 3.12 (t, *J*= 6.9 Hz, 2H), 3.20–3.30 (m, 4H), 3.50 (s, 2H), 3.72–3.74 (2 s, 6H), 4.16 (t, *J*= 6.3 Hz, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.79 (s, 2H), 7.01 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD):** 22.9 (CH₃), 24.3 (CH₂), 26.4 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.4 (CH₂), 32.7 (CH₂), 36.7 (CH₂), 36.8 (CH₃), 36.9 (CH₃), 38.0 (CH₂), 41.5 (CH₂), 43.4 (CH₃), 49.6 (CH₂), 56.6 (CH₂), 69.1 (CH₂), 71.7 (CH₂), 106.2 (CH), 106.6 (CH), 119.6 (CH), 120.9 (CH), 123.2 (C), 123.9 (C), 124.0 (C), 124.5 (C), 161.5 (C), 164.9 (C), 167.2 (C), 170.4 (C). **EM (FAB+):** *m/z* 697 (MH⁺, 100). **EMAR:** calcd. para C₃₄H₅₃N₁₀O₆ 697.4150, encontrado 697.4151. UV(H₂O) λ_{máx} (ε) 304 nm= 32274 M⁻¹cm⁻¹.

Acoplamiento del ácido 21 con el dipirrol 4 y posterior reducción del nitroderivado y acetilación de la amina para dar el tripirrol 45



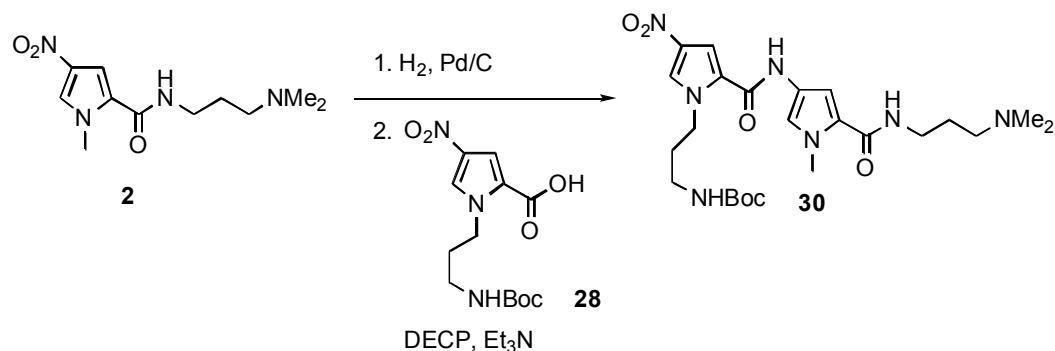
El acoplamiento entre el dipirrol **4** y el ácido **21** se llevó a cabo con DECP siguiendo el procedimiento habitual. La reducción posterior del nitrotripirrol derivado, acetilación de la amina resultante y eliminación del grupo Boc condujo al compuesto deseado **19** con un rendimiento global del 27%.

Acoplamiento de glicina con el ácido 6 para formar el ácido 29

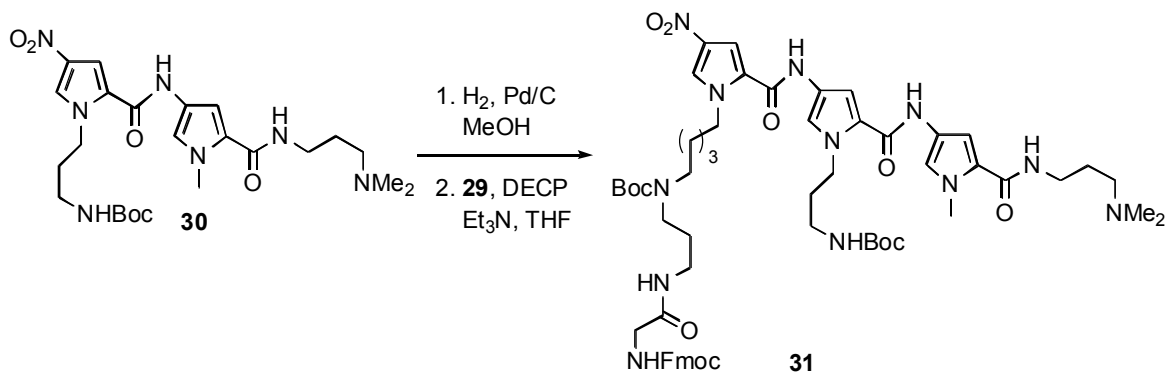


El pirrol **6** (498 mg, 1 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y la disolución se enfrió a 0 °C. Sobre ella se adicionó TFA (3 mL) y la mezcla se agitó 1 hora a 0 °C y otras 2 horas más a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron en el rotavapor y el TFA residual se eliminó por codestilación con CH_2Cl_2 . A una disolución del ácido diaminopirrol resultante (298 mg, 1 mmol) en DMF/dioxano (26 mL, 25%) se adicionaron DIEA (1.4 mL, 8 mmol) y una disolución de Fmoc-Gly-Osuc (394 mg, 1 mmol) en DMF/dioxano. Después de 30 minutos a temperatura ambiente se añadió Boc_2O (218 mg, 1 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas, se eliminó el dioxano, se añadió sobre HCl acuoso (10 mL, 3%) y se extrajo con Et_2O (3x20 mL). Las fases orgánicas se secaron, concentraron y el residuo se purificó en columna de gel de sílice para dar un sólido blanco que se identificó como el compuesto deseado **29** (548 mg, 81%). **RMN** ^1H δ (CDCl_3): 1.18-1.24 (m, 2H), 1.34 (s, 9H), 1.38-1.47 (m, 2H), 1.63-1.74 (m, 4H), 3.05-3.23 (m, 6H), 3.85 (s ancho, 2H), 4.14 (t, $J=6.6$ Hz, 1H), 4.24-4.34 (m, 4H), 7.19-7.24 (m, 2H), 7.32 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.51-7.57 (m, 3H), 7.66 (s, 1H), 7.69 (s, 1H). **RMN** ^{13}C δ (CDCl_3): 23.2 (CH_2), 25.4 (CH_2), 27.6 (CH_2), 28.4 (CH_3), 29.7 (CH_2), 30.7 (CH_2), 44.5 (CH_2), 46.9 (CH_2), 47.0 (CH_2), 49.7 (CH_2), 67.4 (CH_2), 80.1 (C), 113.9 (CH), 120.0 (CH), 122.2 (C), 125.0 (CH), 127.0 (CH), 127.7 (CH), 135.4 (C), 141.2 (C), 143.6 (C), 156.4 (C), 156.9 (C), 161.9 (C), 172.2 (C). **EM (FAB+)**: m/z 678 (MH^+ , 1), 578 (53). **EMAR**: calcd. para $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_9$ 678.3139, encontrado 678.3138.

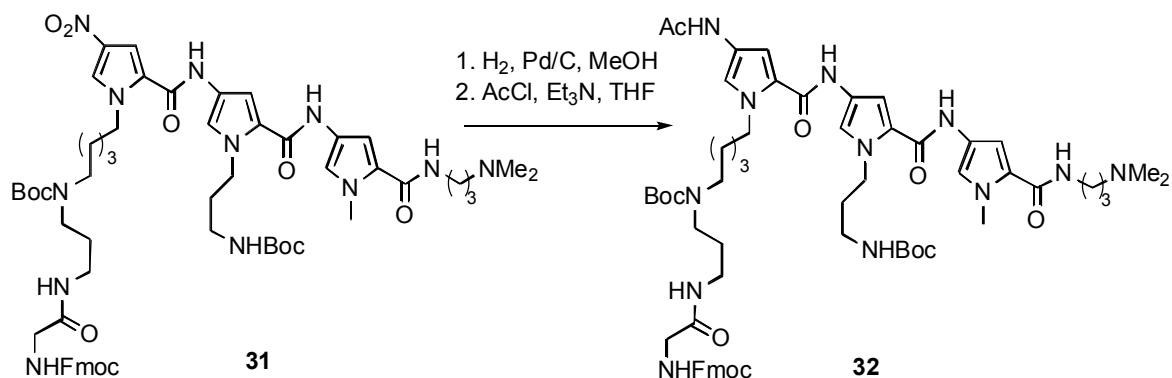
Acoplamiento del pirrol 2 con el ácido 28 para obtener el dipirrol 30



Una disolución del nitropirrol **2** (615 mg, 2.42 mmol) en MeOH (30 mL) se hidrogenó sobre Pd/C (400 mg, 10%) a temperatura ambiente durante 1.5 horas (presión de un globo). El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se redisolvió en DMF (8 mL) y se adicionó sobre otra disolución del nitroácido **28** (584 mg, 1.86 mmol), DECP (0.366 mL, 2.42 mmol), Et₃N (1.23 mL, 9.3 mmol) y DMAP (10 mg) en THF (25 mL), enfriada a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas y se concentró. El producto se purificó en columna cromatográfica en alúmina neutra (5% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el dipirrol **30** en forma de sólido amarillo (870 mg, 90%). **RMN ¹H δ (CDCl₃):** 1.41 (s, 9H), 1.75 (q, *J*= 7.2 Hz, 2H), 1.96 (q, *J*= 6.7 Hz, 2H), 2.25 (s, 6H), 2.39 (m, 2H), 3.04 (t, *J*= 6.6 Hz, 2H), 3.30 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 4.44 (t, *J*= 6.8 Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.90 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CDCl₃):** 28.2 (CH₂), 28.8 (CH₃), 32.6 (CH₂), 36.8 (CH₃), 38.4 (CH₂), 38.7 (CH₂), 45.6 (CH₃), 48.6 (CH₂), 58.4 (CH₂), 80.1 (C), 105.8 (CH), 109.1 (CH), 120.4 (CH), 122.9 (C), 124.7 (C), 127.2 (CH), 128.0 (C), 136.4 (C), 158.4 (C), 159.4 (C), 164.0 (C). **EM (FAB+):** *m/z* 520 (MH⁺, 100), 420 (5). **EMAR:** calcd. para C₂₄H₃₈N₇O₆ 520.2884, encontrado 520.2904. UV(H₂O/CH₃CN) λ_{máx}= 285 nm.

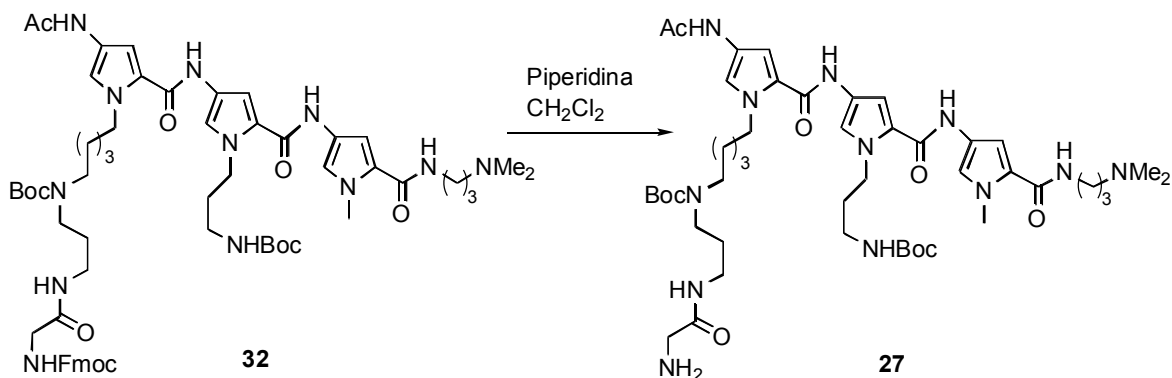
Acoplamiento del dipirrol **30** con el ácido **29** para dar el tripirrol **31**

Una disolución del dipirrol **30** (300 mg, 0.58 mmol) en MeOH (30 mL) se hidrogenó sobre Pd/C (200 mg, 10%) a temperatura ambiente durante 1.5 horas (presión de un globo). El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se redisolvió en DMF (8 mL) y se adicionó sobre otra disolución previamente preparada de **29** (510 mg, 0.75 mmol), DECP (0.123 mL, 0.81 mmol), Et₃N (0.402 mL, 2.9 mmol) y DMAP (10 mg) en THF (20 mL), enfriada a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía para dar el esperado nitrotripirrol **31** (sólido amarillo, 439 mg, 66%). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.17-1.22 (m, 2H), 1.33-1.36 (2s, 18H), 1.36-1.40 (m, 2H), 1.48-1.63 (m, 2H), 1.70-1.75 (m, 2H), 1.83-1.94 (m, 4H), 2.84 (s, 6H), 2.96 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.06-3.12 (m, 8H), 3.33 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.12 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.26-4.38 (m, 6H), 6.83 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.21-7.34 (m, 6H), 7.54 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.84 (s, 1H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 24.6 (CH₂), 26.6 (CH₂), 28.8 (CH₃), 32.2 (CH₂), 33.0 (CH₂), 36.5 (CH₂), 37.0 (CH₃), 38.7 (CH₂), 43.5 (CH₃), 45.1 (CH₂), 47.2 (CH₂), 48.2 (CH₂), 50.8 (CH₂), 56.6 (CH₂), 68.2 (CH₂), 80.0 (C), 81.0 (C), 106.7 (CH), 109.2 (CH), 119.8 (CH), 121.0 (CH), 123.3 (C), 123.8 (C), 124.3 (C), 126.2 (CH), 127.3 (C), 128.0 (CH), 128.2 (CH), 128.9 (CH), 136.4 (C), 142.6 (C), 145.3 (C), 158.5 (C), 159.1 (C), 159.6 (C), 161.2 (C), 165.0 (C), 172.3 (C). **EMAR (ESI-TOF)**: calcd. para C₅₉H₈₁N₁₂O₁₂ 1149.6097, encontrado 1149.609.

Reducción y acetilación del nitroderivado **31**

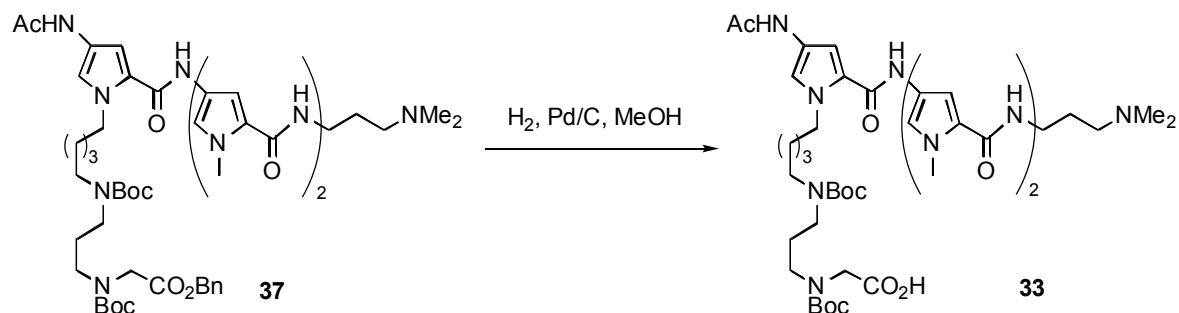
Una disolución del nitrotripirrol **31** (490 mg, 0.427 mmol) en MeOH (40 mL) se hidrogenó durante 1 hora sobre Pd/C (250 mg, 10%) a temperatura ambiente (presión de un globo). El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró. El residuo se redisolvió en THF (10 mL) conteniendo DIEA (0.367 mL, 2.14 mmol) y se enfrió a 0 °C. Sobre dicha disolución se adicionó AcCl (0.152 mL, 2.14 mmol) y la mezcla que resulta se agitó a 0 °C durante 30 minutos y a temperatura ambiente durante 3 horas. Los disolventes se evaporaron a vacío y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en alúmina neutra (5% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el derivado acetilado **32** como un sólido marrón (317 mg, 64%). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.06-1.25 (m, 4H), 1.35-1.37 (2 s, 18H), 1.52-1.74 (m, 4H), 1.82- 1.95 (m, 4H), 2.02 (s, 3H), 2.85 (s, 6H), 2.97 (t, *J*= 6.3 Hz, 2H), 3.01- 3.17 (m, 8H), 3.25-3.28 (m, 2H), 3.35 (t, *J*= 5.7 Hz, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 4.13 (t, *J*= 6.9 Hz, 1H), 4.28-4.30 (m, 4H), 6.78-6.92 (m, 3H), 7.14-7.25 (m, 5H), 7.32 (t, *J*= 7.3 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.74 (s, 1H). **EMAR (ESI-TOF)**: calcd. para C₆₁H₈₅N₁₂O₁₁ 1161.6461, encontrado 1161.642.

Eliminación del grupo Fmoc de 32

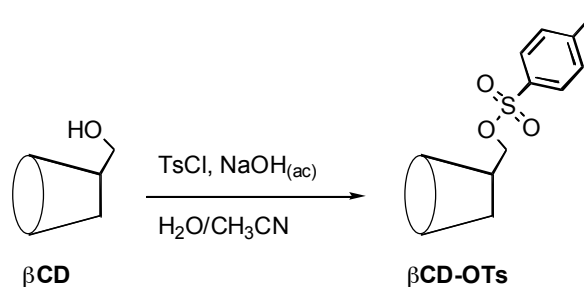


A una disolución del Fmoc-tripirrol **32** (295 mg, 0.254 mmol) en CH_2Cl_2 (8 mL) se adicionó piperidina (2 mL) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo se purificó por HPLC (gradiente 5- \rightarrow 95% B 1/2 hora; A:TFA/ H_2O 0.1%, B: TFA/ CH_3CN 0.1%, $t_R = 16.1$ min) obteniéndose el producto deseado **27** en forma de sólido amarillo (165 mg, 69%). **RMN ^1H δ (CD_3OD):** 1.22-1.35 (m, 4H), 1.43-1.44 (2s, 18H), 1.55-1.60 (m, 2H), 1.70-1.89 (m, 4H), 1.94 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 3.09 (s, 6H), 3.15-3.41 (m, 14H), 3.66 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 4.38 (t, $J = 6.41$ Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.26 (s, 1H). **EM (FAB+):** m/z 939 (MH^+ , 9), 839 (3), 739 (10). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{46}\text{H}_{75}\text{N}_{12}\text{O}_9$ 939.5780, encontrado 939.5771. UV(H_2O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm = 32274 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Eliminación del grupo bencilo del éster 37



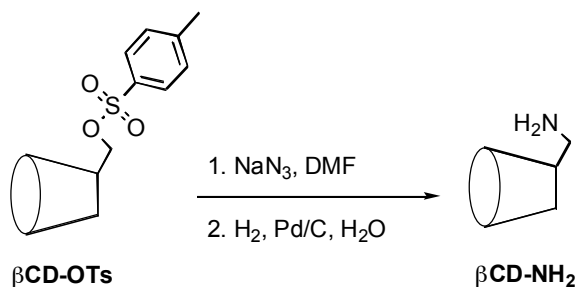
Una disolución del éster bencílico **37** (160 mg, 0.16 mmol) en MeOH (10 mL) se hidrogenó durante 3 horas sobre Pd/C (100 mg, 10%) a temperatura ambiente (presión de un globo). El catalizador se eliminó por filtración a través de celita y el filtrado se concentró, aislándose un sólido que se identificó como el compuesto deseado **33** (sólido amarillo, 133 mg, 93%). **RMN ¹H δ (CD₃OD)**: 1.13-1.25 (m, 2H), 1.30-1.33 (2s, 18H), 1.39-1.74 (m, 6H), 1.97 (s, 3H), 2.97 (s, 6H), 3.09-3.28 (m, 14H), 3.77-3.82 (m, 8H), 6.73-6.92 (m, 3H), 7.07-7.11 (m, 3H). **RMN ¹³C δ (CD₃OD)**: 23.0 (CH₃), 24.3 (CH₂), 28.5 (CH₃), 28.8 (CH₃), 36.9 (CH₃), 37.0 (CH₂), 46.2 (CH₂), 47.2 (CH₂), 47.7 (CH₂), 51.5 (CH₃), 63.0 (CH₂), 65.1 (CH₂), 81.0 (C), 81.6 (C), 103.9 (CH), 106.5 (CH), 114.3 (CH), 120.7 (CH), 120.8 (C), 123.3 (C), 123.4 (C), 124.1 (C), 124.6 (C), 125.3 (C), 157.3 (C), 160.7 (C), 161.4 (C), 164.4 (C), 170.4 (C), 173.4 (C). **EMAR (FAB+)**: calcd. para C₄₄H₆₉N₁₀O₁₀ 897.5198, encontrado 897.5182. UV(H₂O) λ_{máx} (ε) 304 nm= 32274 M⁻¹cm⁻¹.

Monotosilación de la β CD¹¹⁰

Sobre una suspensión de β CD (5 g, 4.4 mmol) en H_2O (42 mL) se adicionaron, siguiendo este orden, una disolución acuosa de NaOH (1.84 mL, 15.1 mmol, 8.2 M) y una disolución de TsCl en CH_3CN (809 mg, 2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se refrigeró a 4 °C, formándose un precipitado que se filtró y secó a vacío sobre P_2O_5 . El sólido resultante se identificó como la β CD monotosilada β CD-OTs (567 mg, 10%). **EM (MALDI-TOF)**, (M+H+Na): calcd. para $\text{C}_{49}\text{H}_{77}\text{O}_{37}\text{SNa}$ 1312.4, encontrada 1312.2, (M+H+Na-Ts) calcd. 1158.4, encontrada 1158.1.

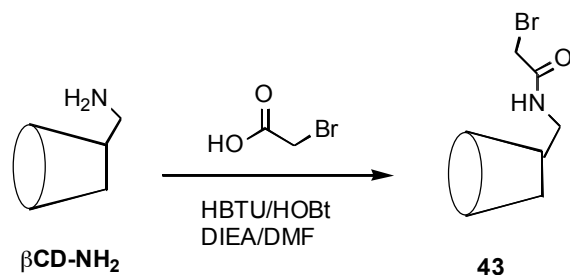
¹¹⁰ Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, T. C.; Kumaravel, G.; Lin, F-T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.

Síntesis de la amino-βCD¹¹⁰



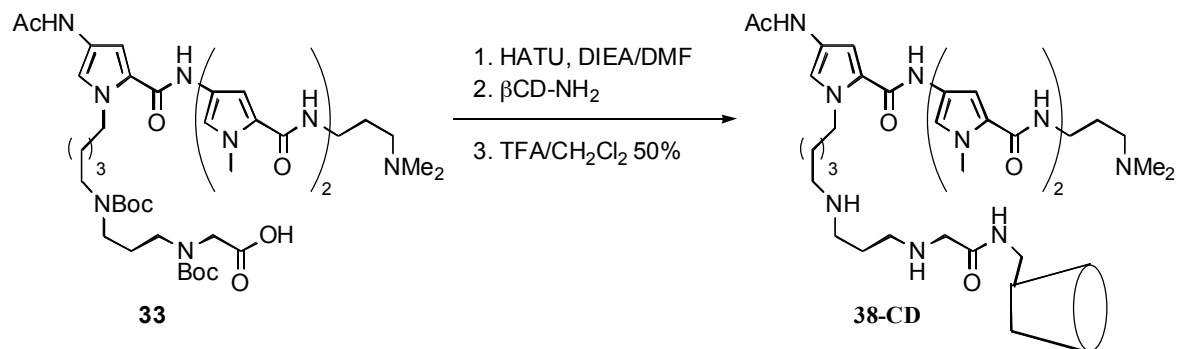
Sobre una disolución de $\beta\text{CD-OTs}$ (250 mg, 0.194 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron KI (16 mg, 0.097 mmol) y NaN_3 (124 mg, 1.90 mmol). La mezcla se calentó a 60 °C durante 20 horas y, sobre ella, se añadió amberlita IR-40 (200 mg). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1/2 hora. La resina se eliminó por filtración y el filtrado se vertió sobre acetona (20 mL), formándose un precipitado que se filtró a gravedad. El sólido aislado se secó a vacío y se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación. Una disolución de la azida formada anteriormente, $\beta\text{CD-N}_3$ (150 mg, 0.129 mmol) en H_2O (45 mL) se hidrogenó sobre Pd/C (50 mg, 10%) durante 12 horas a temperatura ambiente (presión de un globo). El catalizador se filtró a través de celita y el filtrado se liofilizó, obteniéndose un sólido blanco que se identificó como la $\beta\text{CD-NH}_2$ (139 mg, 95%). **EM (MALDI-TOF)**, (M+H): calcd. para $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{NO}_{34}$ 1134.4, encontrada 1135.3, (M+H+Na): calcd. 1156.4, encontrada 1157.4, (M+H+ CH_3CN): calcd. 1174.4, encontrada 1177.4, (M+H+Na+ CH_3CN): calcd. 1196.4, encontrada 1199.5.

¹¹⁰ Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, T. C.; Kumaravel, G.; Lin, F-T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.

Síntesis de β CD-NHCOCH₂Br (43)

Sobre una disolución de ácido bromoacético (14.7 mg, 0.106 mmol), HBTU (40.2 mg, 0.106 mmol), HOBt (14.3 mg, 0.106 mmol) y DIEA (37 μ L, 0.212 mmol, 0.195 M en DMF) en DMF (0.53 mL) se adicionó, al cabo de 3 min, una disolución de β CD-NH₂ (30 mg, 0.0265 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y se vertió sobre acetona (30 mL) formándose un precipitado blanco. El precipitado se filtró y se secó, confirmándose por el EM que se trataba de forma muy mayoritaria de la β CD-NHCOCH₂Br (**43**) (30 mg, 91%). **EM (MALDI-TOF)**, (M+H): calcd. para C₄₄H₇₃BrNO₃₅ 1238.3, encontrada 1238.9, (M+H+Na): calcd. 1277.3, encontrada 1276.3, (M+H+Na-Br): calcd. 1199.4, encontrada 1198.4, (M+2H+Na-COCH₂Br): calcd. 1156.4, encontrada 1157.3.

Acoplamiento entre la amino-βCD y el ácido tripirrólico 33



Sobre una disolución del tripirrol **33** (10 mg, 0.011 mmol) en DMF (100 mL) se adicionaron DIEA (90 μL, 0.5 M en DMF) y HATU (4.18 mg, 0.011 mmol en 139 μL de DMF). La mezcla se agitó durante 4 minutos a temperatura ambiente y sobre ella se adicionó una disolución de βCD-NH₂ (33 mg, 0.029 mmol) en DMF (400 μL) y DIEA (90 μL, 0.5 M en DMF). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y, después de eliminar los disolventes, el residuo se purificó mediante cromatografía semipreparativa de RP-HPLC (4 mL/min, 5-→95% B 1/2 h, t_R = 11.8 min), para dar el producto de acoplamiento deseado **38-CD** (14 mg, 64%).

El producto se sometió a la etapa de desprotección de los grupos Boc siguiendo el protocolo estándar. La identidad del tripirrol-βCD **38-CD** resultante se confirmó por espectrometría de masas (95%). **EM (MALDI-TOF)**: cald. para C₇₆H₁₂₂N₁₁O₃₉ 1812.8, encontrada 1812.8. UV(H₂O) λ_{máx} (ε) 304 nm = 32274 M⁻¹cm⁻¹.

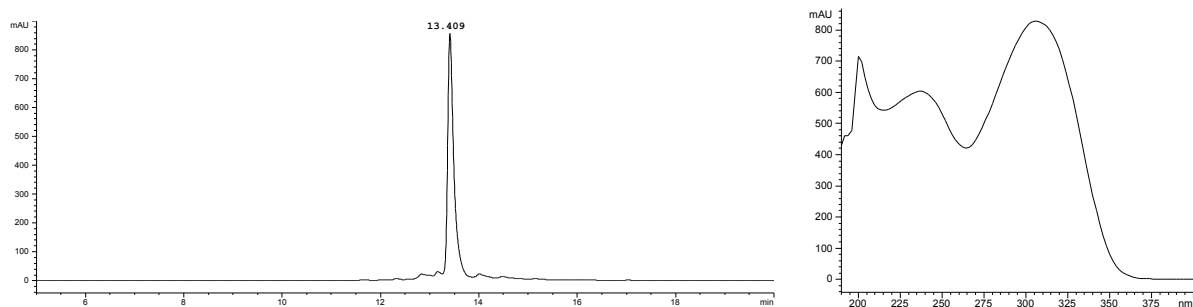
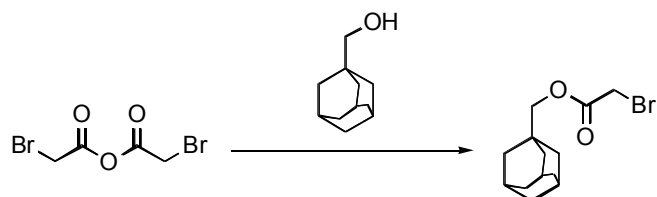
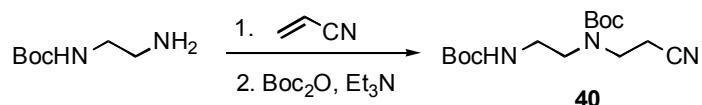


Figura 3.3 Espectros de HPLC y UV de **38-CD**. Gradiente 5-→50% B 1/2 h.

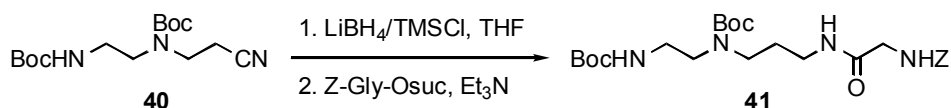
2-Bromoacetato de adamantanilo

Sobre una disolución de anhídrido bromoacético (598 mg, 2.3 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL) se añadió 1-admantanometanol (382 mg, 2.3 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió sobre una disolución acuosa de NaHCO_3 (20 mL, 5%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2x20 mL). Los extractos orgánicos se secaron y concentraron, y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (40% EtOAc/hexano) obteniéndose el compuesto deseado en forma de aceite (597 mg, 90%). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.51 (s ancho, 6H), 1.59-1.72 (m, 6H), 1.95 (s ancho, 3H), 3.73 (s, 2H), 3.82 (s, 2H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 25.8 (CH_2), 27.8 (CH), 33.2 (C), 36.7 (CH_2), 38.9 (CH_2), 75.4 (CH_2), 167.2 (C). **EM (IQ+):** m/z 287 (3), 149 (100). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{BrO}_2$ 287.0647, encontrada 287.0471.

Preparación de la diamina 39



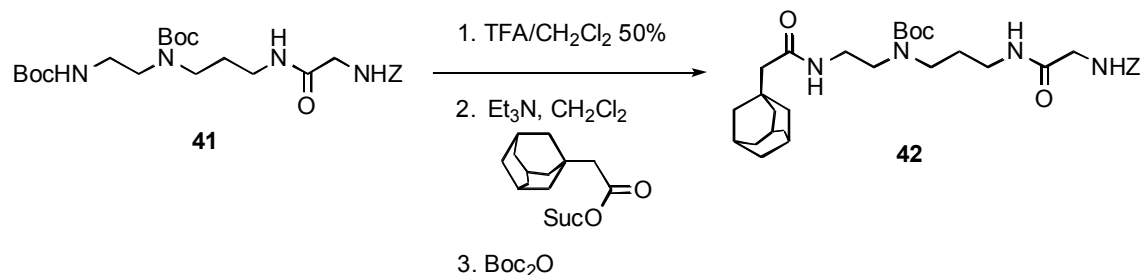
Sobre una disolución del carbamato de *tert*-Butil-2-aminoetilo (1.9 g, 12.3 mmol) en EtOH (30 mL), enfriada a 0°C en un baño de agua-hielo, se adicionó acrilonitrilo (0.891 mL, 13.5 mmol). La mezcla se agitó en el baño durante 12 horas, se concentró y sobre el residuo disuelto en CH₂Cl₂ (30 mL) se adicionaron Et₃N (2.55 mL, 18.4 mmol) y Boc₂O (3.23 g, 14.8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1/2 h, se vertió en HCl_(ac) (20 mL, 3%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (2X30 mL). Las fases orgánicas se secaron y concentraron obteniéndose un sólido blanco que se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación (3.6 g, 94%). **RMN ¹H δ (CDCl₃):** 1.40 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 2.56-2.63 (m, 2H), 3.20-3.27 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.47 (t, *J*= 6.7 Hz, 2H), 4.76-4.94 (2 s, 1H). **RMN ¹³C δ (CDCl₃):** 16.8 (CH₂), 17.4 (CH₂), 28.2 (CH₃), 28.3 (CH₃), 39.2 (CH₂), 44.2 (CH₂), 47.0 (CH₂), 48.0 (CH₂), 79.4 (C), 80.9 (C), 117.7 (C), 118.2 (C), 155.1 (C), 155.8 (C). **EM (IQ+):** *m/z* 314 (27), 258 (48), 202 (84), 158 (100), 114 (74). **EMAR:** calcd. para C₁₅H₂₈N₃O₄ 314.2080, encontrada 314.2078.



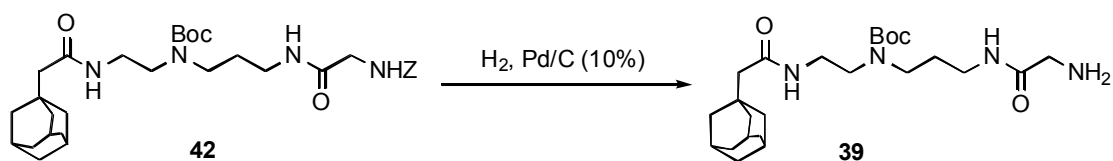
TMSCl (2.11 mL, 16.6 mmol) se adicionó lentamente a una suspensión de LiBH₄ (0.181 g, 8.3 mmol) en THF (15 mL). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y, luego, se enfrió en un baño de agua-hielo. Una disolución del nitrilo **40** (1.3 g, 4.15 mmol) en THF (5 mL) se adicionó a esta mezcla. Después de 12 horas, la reacción se enfrió de nuevo y se detuvo mediante la adición lenta de MeOH. Los disolventes se eliminaron parcialmente y sobre el residuo se añadió una disolución acuosa de KOH (10 mL, 10%). La suspensión resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (4x40 mL) y los extractos orgánicos se secaron y concentraron para dar un residuo (676 mg, 51%) que se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación.

La amina obtenida en el paso anterior (676 mg, 2.13 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (20 mL) y sobre la disolución se adicionaron Et₃N (0.591 mL, 4.26 mmol) y el éster succínico de la benciloxicarbonil-glicina (782 mg, 2.56 mmol). La disolución se agitó durante 1 hora, se vertió sobre HCl acuoso

(20 mL, 3%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2x20 mL). Las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron. El residuo se purificó en cromatografía en gel de sílice (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) obteniéndose 960 mg (89%) de la amina deseada **41**, que se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación.



El compuesto **41** se disolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y se enfrió a 0°C en un baño de agua-hielo. Sobre la disolución se adicionó TFA (3 mL) y la mezcla se agitó 15 min a 0°C y 2 h a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron en el rotavapor y sobre el residuo disuelto en CH_2Cl_2 (20 mL) se adicionaron Et_3N (0.626 mL, 4.51 mmol) y el éster succínico del acetato de adamantano (393 mg, 1.35 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó Boc_2O (394 mg, 1.8 mmol) y la mezcla se agitó 1 h a temperatura ambiente. Se puso en HCl acuoso (20 mL, 3%), se extrajo con CH_2Cl_2 (2x20 mL) y las fases orgánicas se recogieron, secaron y concentraron. El residuo se purificó en cromatografía en gel de sílice (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) y se sometió directamente a la siguiente etapa.



El compuesto **42** purificado anteriormente se disolvió en MeOH (30 mL) y se hidrogenó sobre Pd/C (10%, 150 mg) a temperatura ambiente (presión de un globo) durante 2 h. La mezcla se filtró sobre celita y el filtrado se concentró sequedad obteniéndose un sólido blanco que se identificó como la amina deseada **39** (135 mg, 33% desde **41**). **RMN ^1H δ (CDCl_3):** 1.23 (m, 3H), 1.41-1.44 (m, 11H), 1.57-1.70 (m, 10H), 1.88-1.93 (m, 4H), 3.24-3.45 (m, 10H). **RMN ^{13}C δ (CDCl_3):** 25.2 (CH_2), 28.2 (CH_3), 28.4 (CH_3), 29.5 (CH_2), 32.5 (C), 36.5 (CH_2), 39.2 (CH_2), 42.4 (CH_2), 43.1 (CH_2), 45.4 (CH_2), 51.4 (CH_2), 80.0 (C), 155.8 (C), 171.5 (C), 175.8 (C). **EM (FAB+):** m/z 451 (44), 351 (100). **EMAR:** calcd. para $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$ 450.3206, encontrado 450.2242.

Síntesis en fase sólida de los péptidos AThook, RB1-All, RB2-All, RB4-Alloc y RB5-Alloc, RB6, RB7. Eliminación del grupo alilo en RB1-All y RB2-All y del Alloc en RB4-Alloc y RB5-Alloc

La síntesis de los fragmentos peptídicos se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el anexo E de la memoria (apartado 1, Síntesis en fase sólida de péptidos). Se partieron de 217 mg de resina Rink amida (0.46 mmol/g, 0.1 mmol). Una vez finalizada la síntesis se desprotegió una alícuota de la resina (5 mg) para comprobar la pureza e identidad de los péptidos sintetizados.

El procedimiento para la eliminación selectiva del grupo alilo y alloc es idéntico para todos los péptidos. Detallamos el protocolo para la desprotección selectiva de **RB1-All**:⁸⁶

A una suspensión de la resina (160 mg, $\sim 2.2 \times 10^{-2}$ mmol) en H₂O/CH₂Cl₂ (6 mL, 2%) se añadió morfolina (0.42 mL, 4.84 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (29 mg, 0.025 mmol). La mezcla se agitó con un ligero burbujeo de N₂ durante 10 horas. La resina se filtró y lavó con DMF (3x5 mL x 5 minutos) y CH₂Cl₂ (3x5 mL x 5 min). Una alícuota de la misma (5 mg) se sometió a la etapa de desprotección y rotura con el fin de confirmar la identidad del péptido resultante.

⁸⁶ Lloyd-Williams, P.; Jou, G.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 4207.

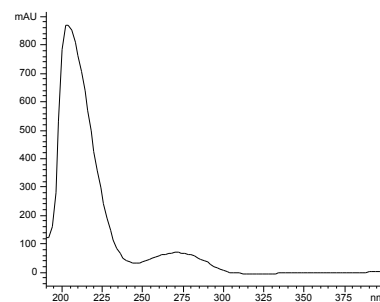
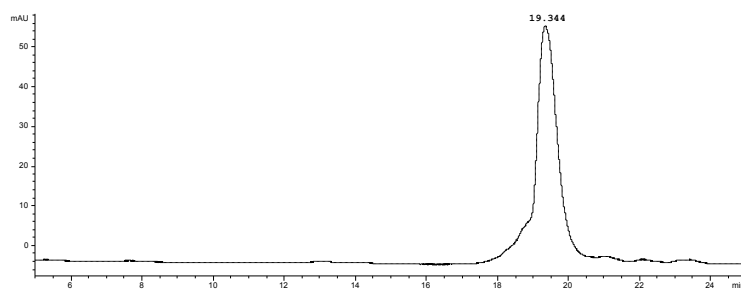
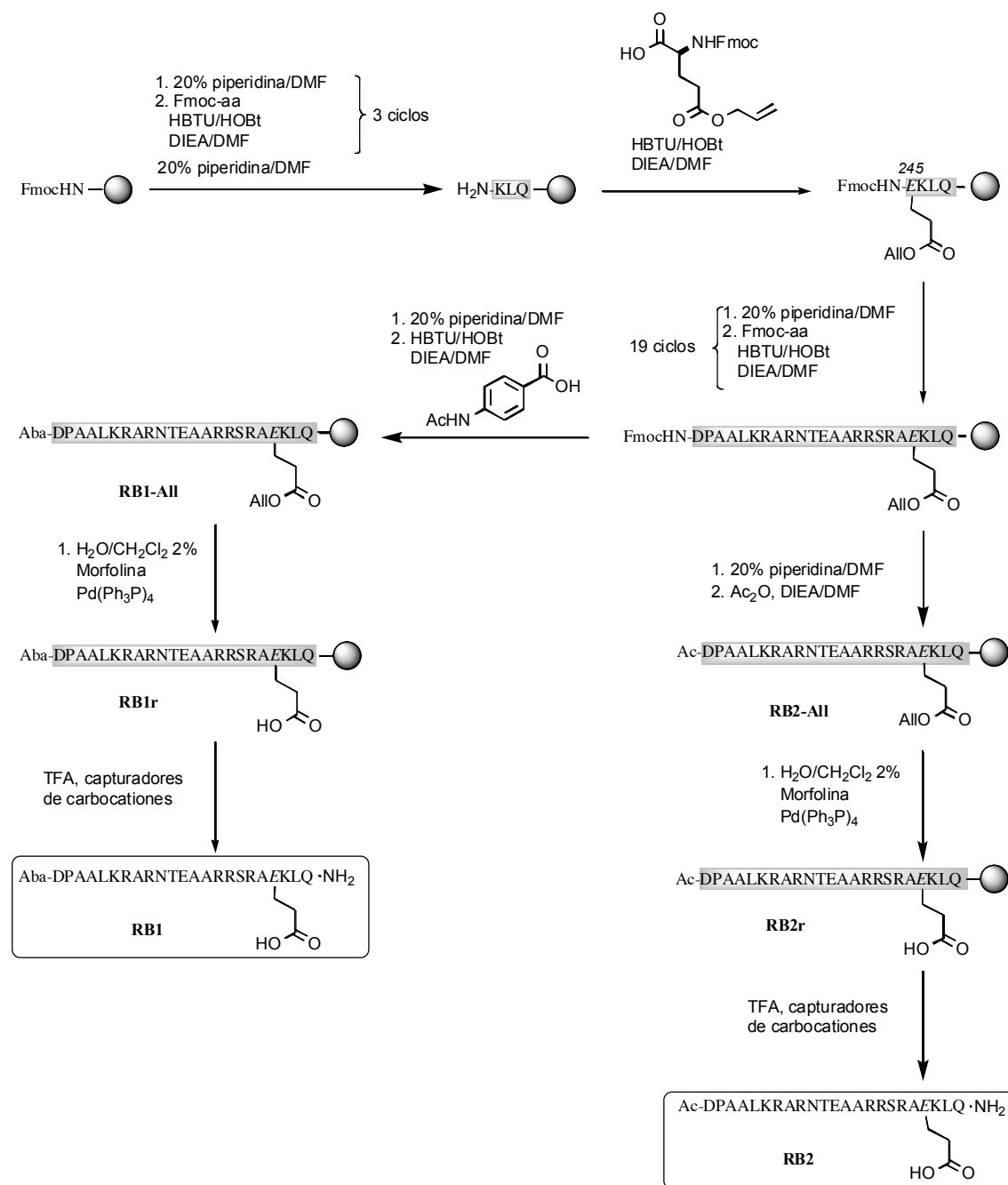


Figura 3.4 Cromatograma del crudo de desprotección de **RB1** y espectro de UV del compuesto. HPLC: 10- \rightarrow 35% B 1/2 h.

RB1 (MALDI-TOF): calcd. para $C_{116}H_{199}N_{44}O_{35}$ 2768.5, encontrada 2768.5.

UV(H_2O) $\lambda_{m\acute{a}x}$ (ϵ) 270 nm= 18069 $M^{-1}cm^{-1}$.

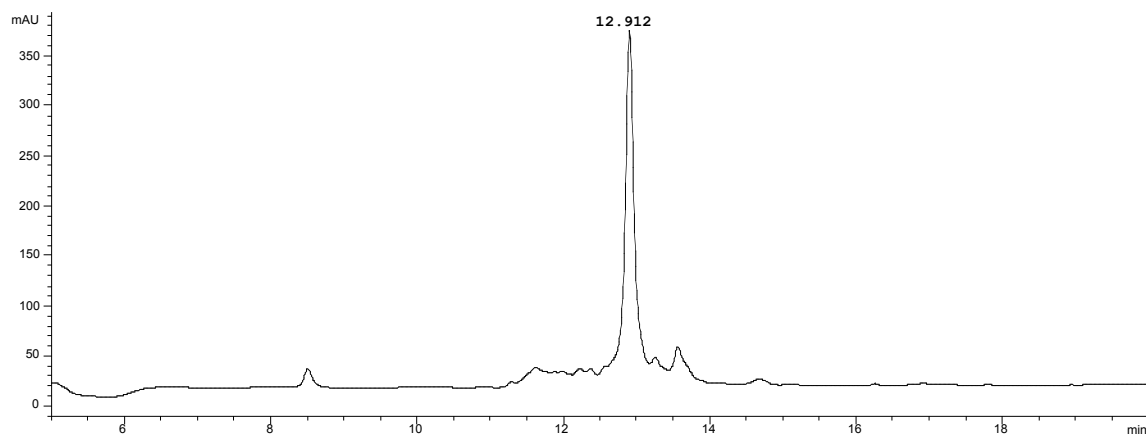


Figura 3.5 Cromatograma del crudo de desprotección de **RB2**. HPLC: 5->75% B 1/2 h.

RB2 (ESI-TOF): calcd. para $C_{109}H_{194}N_{43}O_{34}$ 2649.5, encontrada 2649.3.

GS-Alloc y R-Alloc

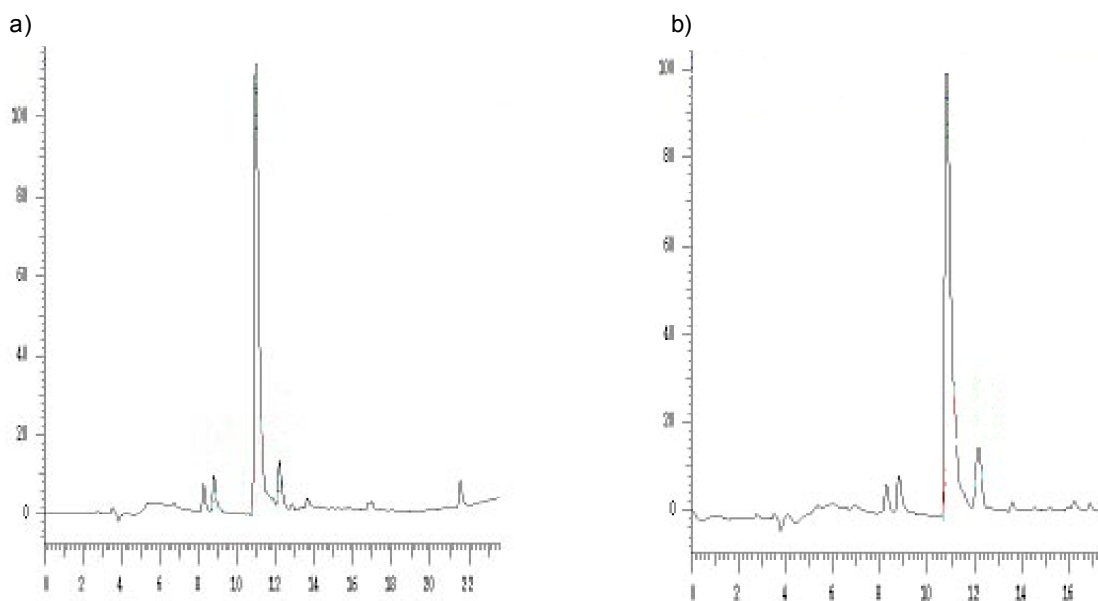
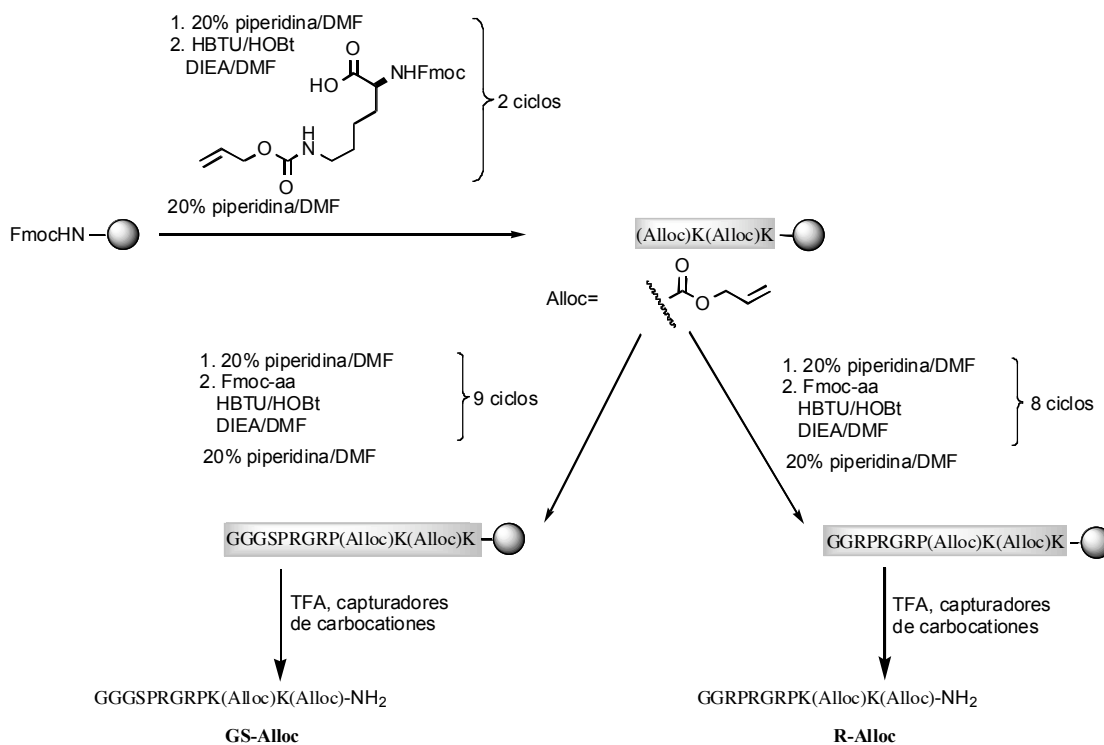


Figura 3.6 Cromatogramas de HPLC de los crudos de desprotección de **GS-Alloc** (a) y **R-Alloc** (b).

GS-Alloc (~80%): (ESI-TOF): calcd. para C₅₃H₉₀N₂₀O₁₆ 1262.7, encontrada 1263.

R-Alloc (~70%): (ESI-TOF): calcd. para C₅₉H₉₄N₂₂O₁₄ 1274.7, encontrada 1275.

Síntesis de RB3

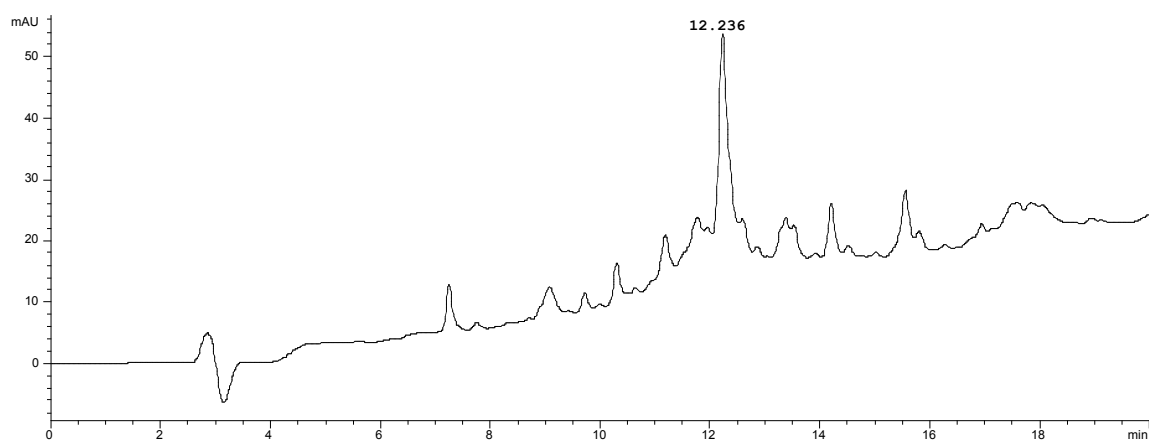
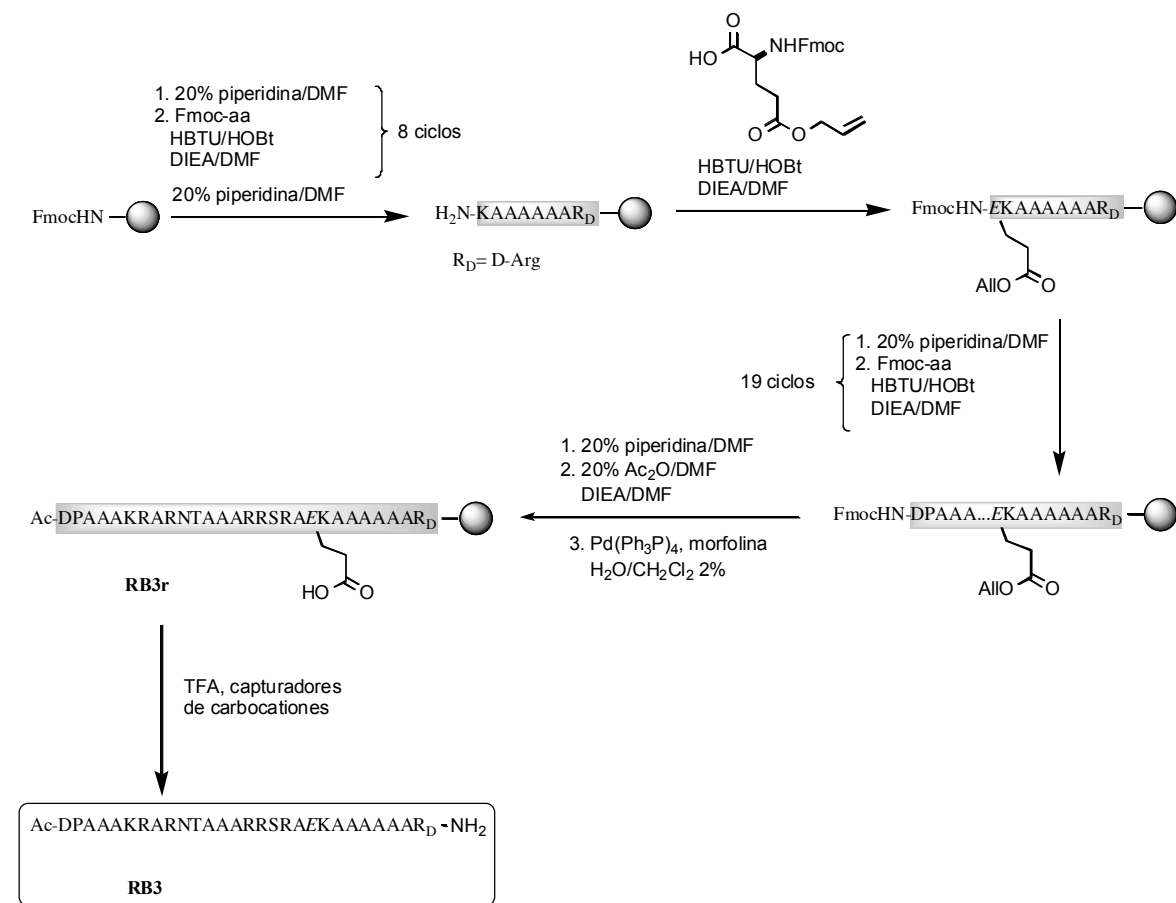
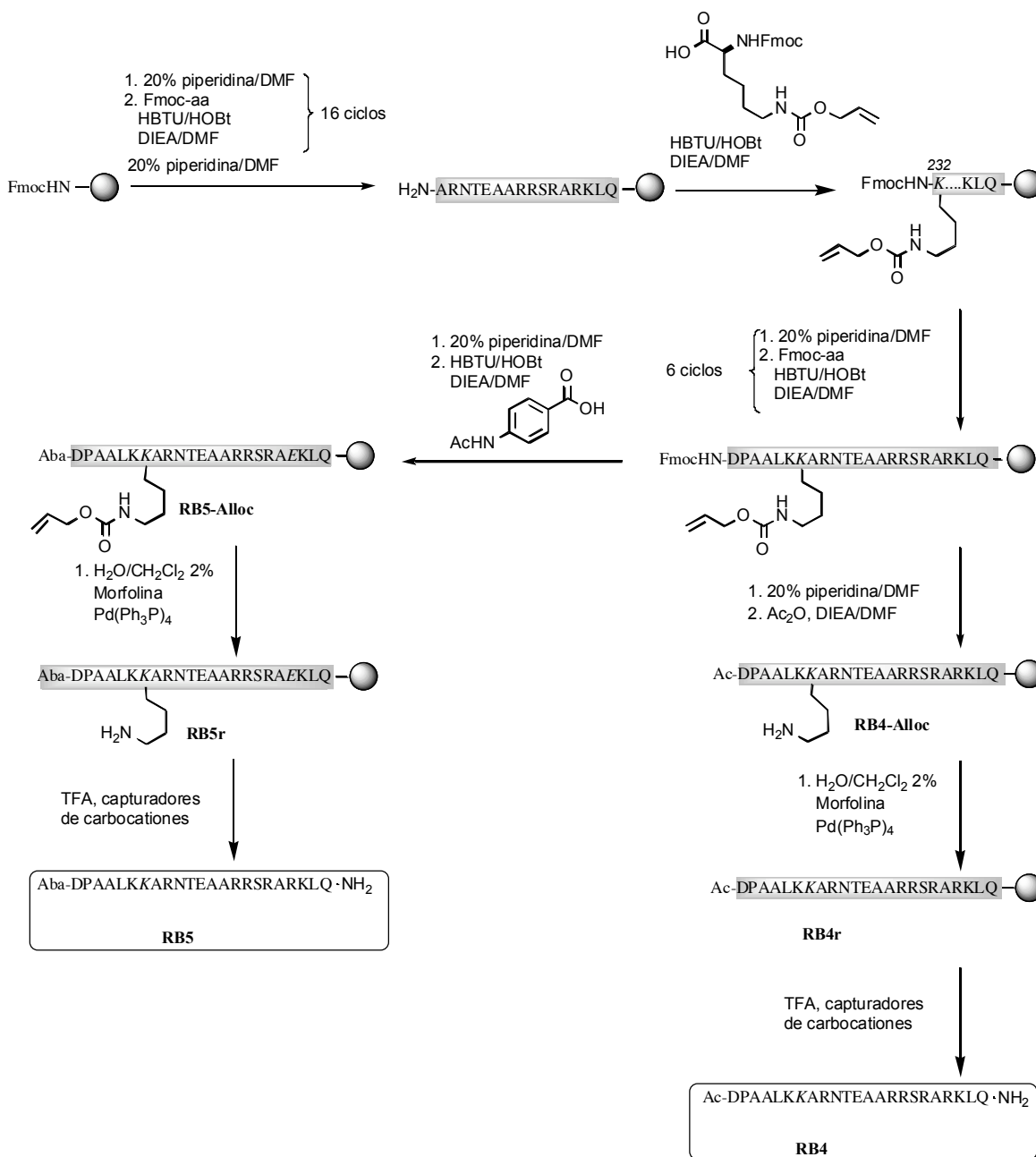


Figura 3.7 Cromatograma del crudo de desprotección de RB3. HPLC: 5->75% B 1/2 h.

RB3 (MALDI-TOF): calcd. para C₁₁₇H₂₀₉N₅₀O₃₆ 2890.6, encontrada 2891.7.

RB4-Alloc, RB5-Alloc, RB4 y RB5



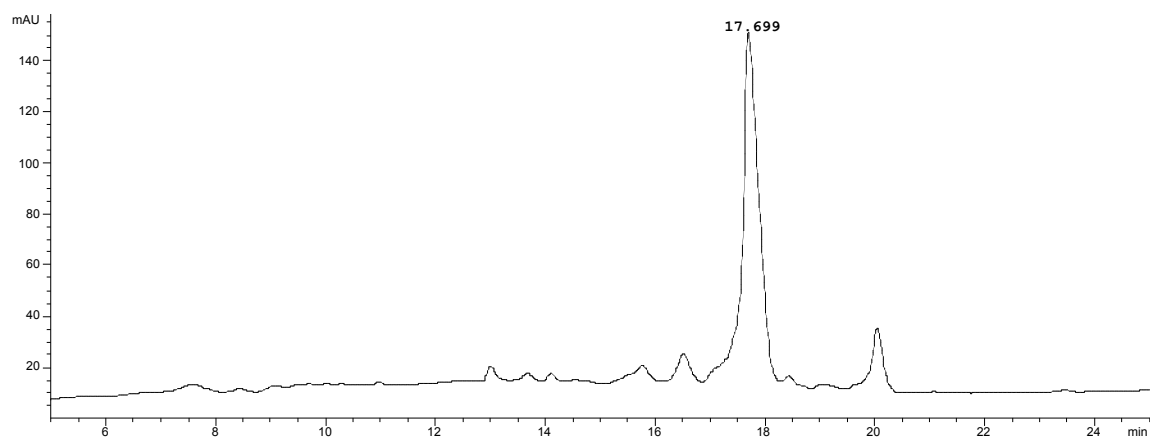


Figura 3.8 Cromatograma del crudo de desprotección de **RB4**. HPLC: 10->35% B 1/2 h.

RB4 (ESI-TOF): calcd. para $C_{110}H_{199}N_{44}O_{32}$ 2648.5, encontrada 2648.8.

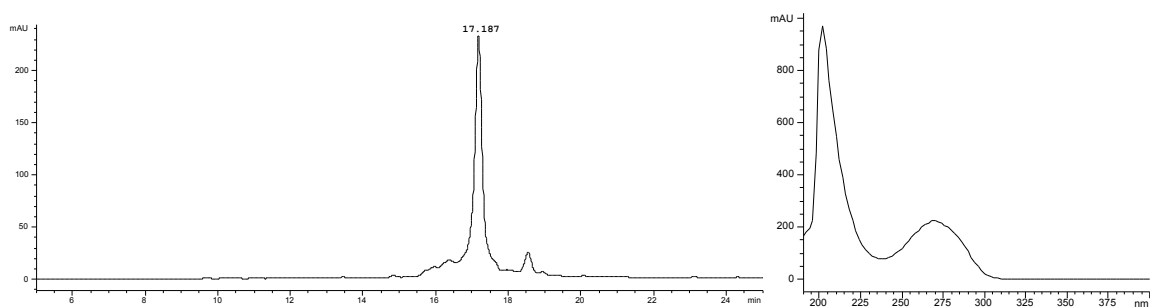


Figura 3.9 Cromatograma del crudo de desprotección de **RB5** y espectro de UV del compuesto. HPLC: 10->35% B 1/2 h.

RB5 (MALDI-TOF): calcd. para $C_{117}H_{204}N_{45}O_{33}$ 2767.6, encontrada 2767.8.
UV(H_2O) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (ϵ) 270 nm = $18069 M^{-1}cm^{-1}$.

Síntesis de RB6 y RB7

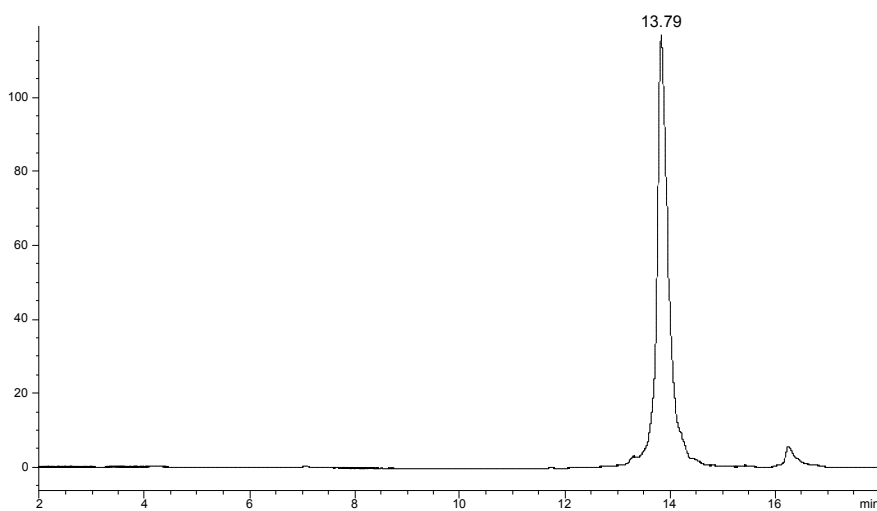
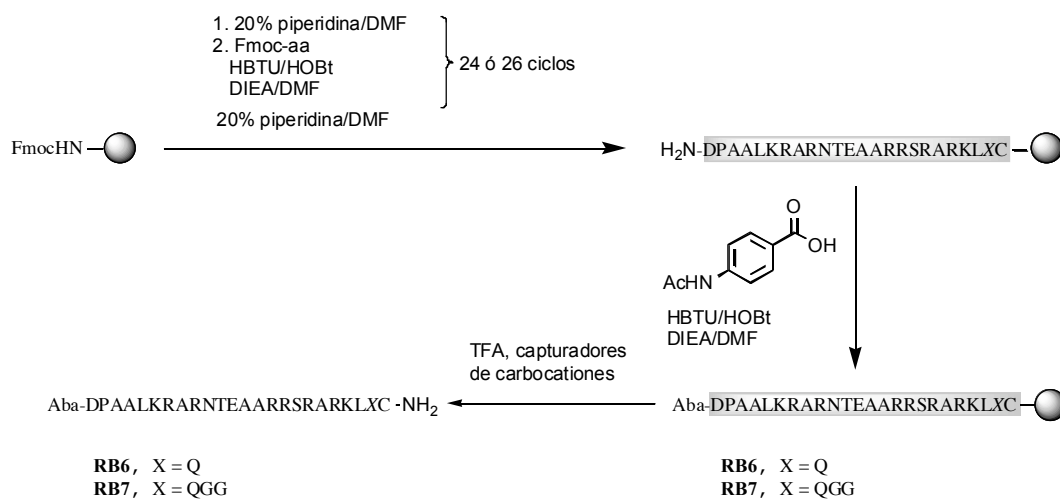


Figura 3.10 Cromatograma del crudo de desprotección de **RB6**. HPLC: 5-→75% B 1/2 h.

RB6 (MALDI-TOF): calcd. para C₁₂₀H₂₀₉N₄₈O₃₄S 2898.6, encontrada 2898.6.
 UV(H₂O) λ_{máx} (ε) 270 nm= 18069 M⁻¹cm⁻¹.

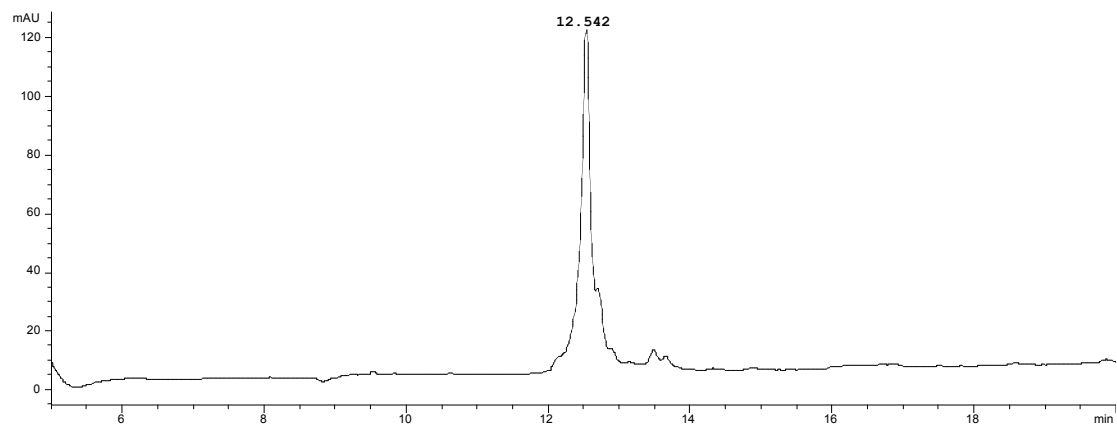
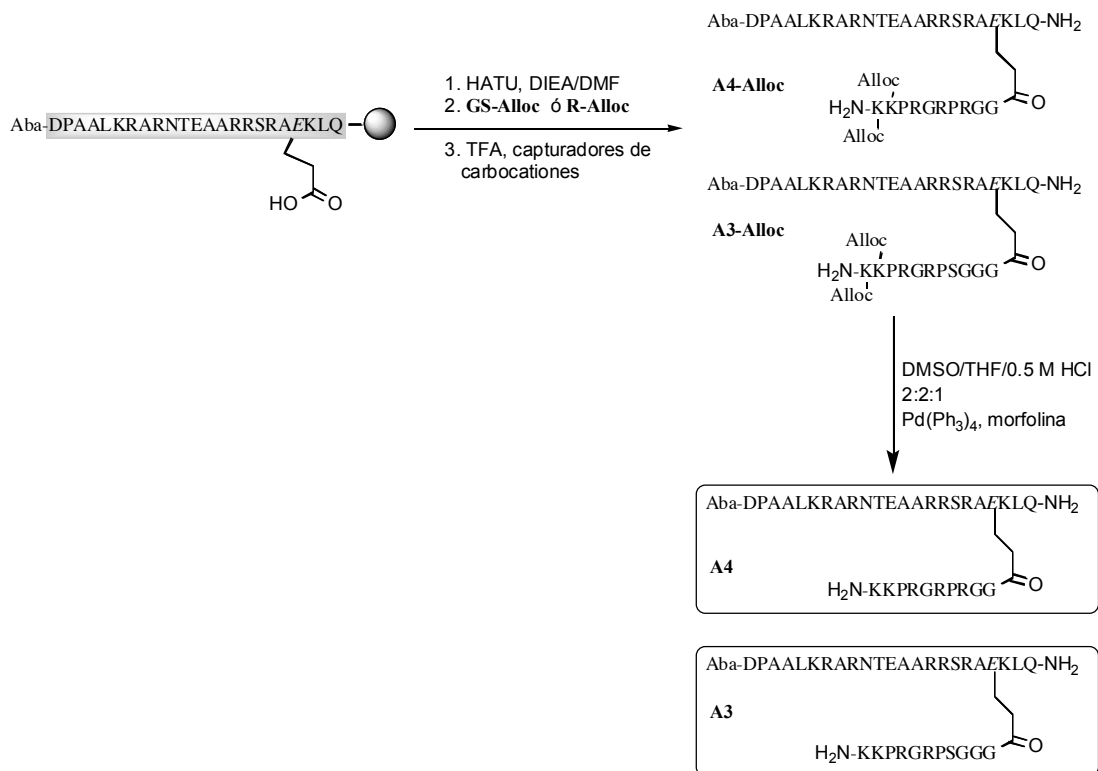


Figura 3.11 Cromatograma del crudo de desprotección de **RB7**. HPLC: 5->75% B 1/2 h.

RB7 (MALDI-TOF): calcd. para $C_{124}H_{215}N_{50}O_{36}S$ 3012.6, encontrada 3013.9.
UV(H_2O) $\lambda_{m\acute{a}x}$ (ϵ) 270 nm= 18069 $M^{-1}cm^{-1}$.

Acoplamiento de los péptidos R-Alloc y GS-Alloc al fragmento peptídico RB1r y eliminación de los grupos Alloc



Una suspensión del péptido anclado a la resina **RB1r** (10 mg, $\sim 1.4 \times 10^{-3}$ mmol) en 1 mL de DMF (tubo Eppendorf) se agitó mecánicamente durante 1 hora para asegurar el buen hinchamiento de la resina. Se filtró la resina y sobre esta se adicionó una disolución de HATU en DMF (0.8 mg en 80 μ L), DIEA (11.2 μ L, 0.5 M en DMF) y DMF (109 μ L). La suspensión se agitó durante 5 minutos y, a continuación, se añadió una disolución de DIEA (39 μ L, 0.5 M en DMF, ~ 14 equiv) y **R-Alloc** o **GS-Alloc** (7 mg en 70 μ L de DMF, ~ 4 equiv). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y la resina se lavó con DMF (3x0.6 mL x5 minutos) y Et₂O (3x0.6 mL x5 minutos). La rotura y desprotección del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar durante 2 horas. El sólido obtenido al precipitar sobre Et₂O se analizó por HPLC, purificándose el compuesto correspondiente al pico mayoritario que se corresponde con los péptidos deseados **A3-Alloc** (36%) y **A4-Alloc** (31%).¹²⁷

¹²⁷ Los rendimientos se han calculado teniendo en cuenta la cantidad teórica de péptido que debería haber según la carga de la resina.

A3-Alloc y **A4-Alloc** se disolvieron en una mezcla de DMSO/THF/0.5 M HCl (2:2:1, 300 μ L) y sobre la disolución se adicionó morfolina (160 μ L, 1.8×10^{-3} mmol, ~4 equiv) y Pd(Ph₃P)₄ (0.58 mg, 5×10^{-4} mmol, ~1 equiv). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h y el producto resultante se purificó por HPLC, para dar los péptidos deseados **A3** y **A4**.

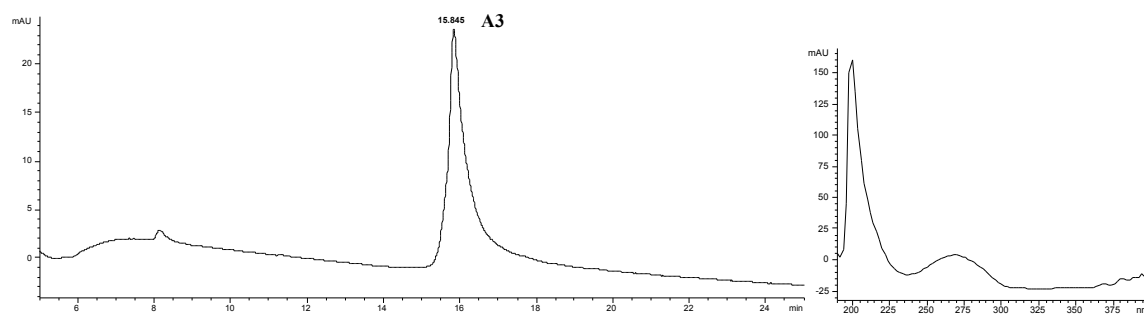


Figura 3.12 HPLC del crudo de reacción de **A3** y espectro de UV del compuesto.

A3 (76%, MALDI-TOF): calcd. para C₁₆₂H₂₈₄N₆₆O₄₄ 3846.2, encontrada 3845.
 UV(H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 270 nm= 18069 M⁻¹cm⁻¹.

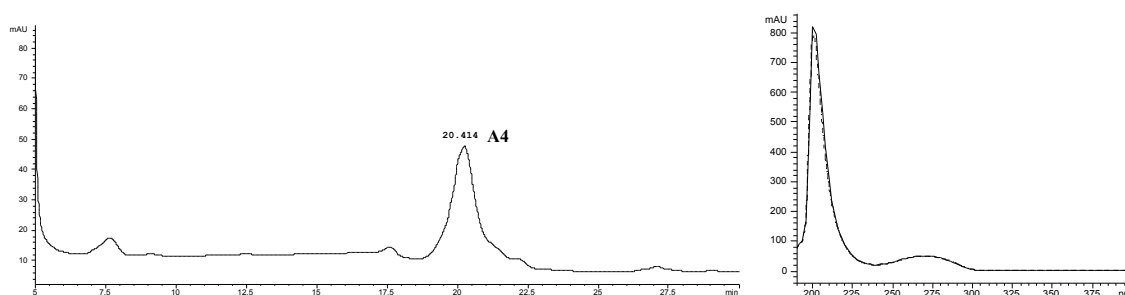
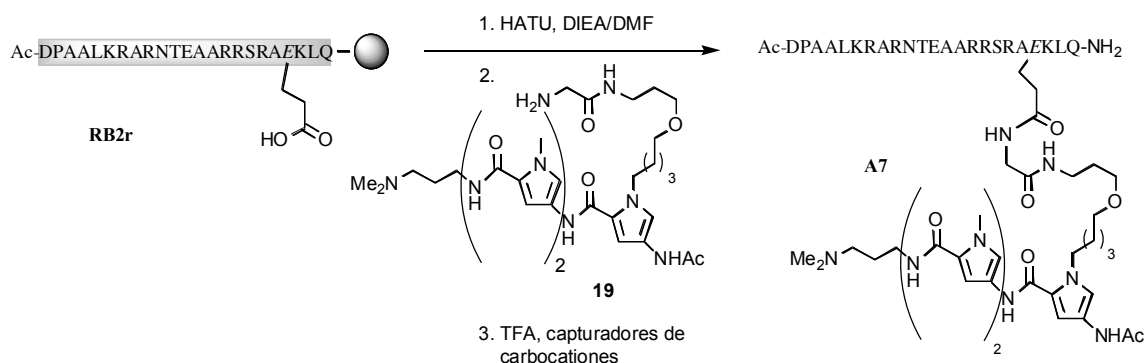


Figura 3.13 HPLC del crudo de reacción de **A4** y espectro de UV del compuesto.

A4 (88%, ESI-TOF): calcd. para C₁₆₁H₂₈₀N₆₄O₄₆ 3858.2, encontrada 3857.1.
 UV(H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 270 nm= 18069 M⁻¹cm⁻¹.

Acoplamiento de los tripirroles 1, 13, 19 y 27 al fragmento peptídico RB2r. Síntesis de los híbridos A5, A6, A7 y A8

El procedimiento siguiente es el general para el acoplamiento entre los derivados amino-tripirrólicos y el péptido **RB2r** enlazado a la resina, ejemplificado en el acoplamiento del tripirrol **19** para dar el híbrido **A7**:



El péptido unido a la resina **RB2r** (25 mg, $\sim 3.5 \times 10^{-3}$ mmol) se suspendió en 1 mL de DMF (tubo Eppendorf) y la mezcla se agitó durante 1 hora para asegurar el buen hinchamiento de la resina. La DMF se eliminó por decantación y sobre la resina se adicionó una disolución de HATU en DMF (2.6 mg en 170 μ L, 2×10^{-3} mmol, 2 equiv) y DIEA (28 μ L, 0.5 M en DMF, 1.4×10^{-2} mmol, 4 equiv). La mezcla se agitó durante 5 minutos y sobre ella se adicionaron una disolución del tripirrol **19** (10 mg en 70 μ L de DMF, 1.4×10^{-2} mmol, 4 equiv) y DIEA (28 μ L, 0.5 M en DMF). Después de 2 horas a temperatura ambiente, los líquidos se eliminaron por decantación y la resina se lavó con DMF (3×0.6 mL x 5 minutos) y Et₂O (3×0.6 mL x 5 minutos). La rotura y desprotección del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar durante 2 horas. El filtrado se precipitó sobre Et₂O y el sólido se analizó por HPLC, purificándose el compuesto correspondiente al pico mayoritario y confirmándose su identidad por espectrometría de masas. En este caso se obtuvo el híbrido deseado **A7** ($\sim 36\%$, considerando la síntesis de **RB2r**, el acoplamiento, la desprotección-rotura y la purificación).

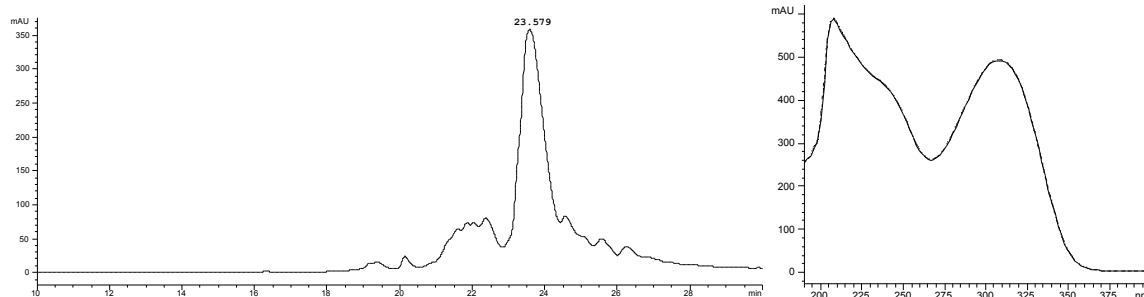


Figura 3.14 HPLC del crudo de desprotección y espectro de UV correspondiente a **A7** a 23.6 min. HPLC: gradiente lineal 10->35% B en 1/2 h.

A7 (~36%), (MALDI-TOF): calcd. para $C_{143}H_{244}N_{53}O_{39}$ 3327.9, encontrada 3327.6. UV(H_2O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm= 32274 $M^{-1}cm^{-1}$.

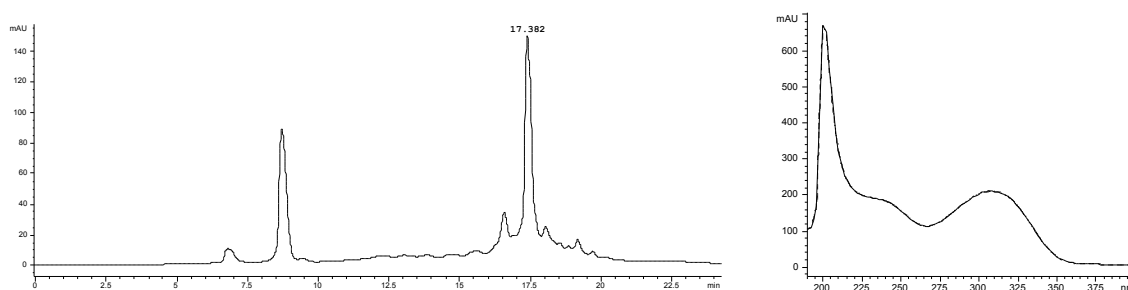


Figura 3.15 Cromatograma de HPLC del crudo de reacción de la desprotección de **A5** y espectro de UV del híbrido. HPLC: gradiente lineal 10->35% B en 1/2 h.

A5 (~26%), (MALDI-TOF): calcd. para $C_{143}H_{245}N_{54}O_{38}$ 3326.9, encontrada 3326.6. UV(H_2O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm= 32274 $M^{-1}cm^{-1}$.

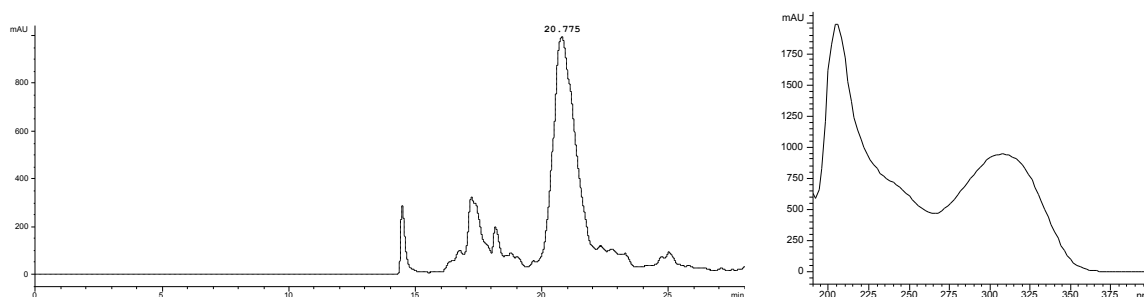


Figura 3.16 Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de **A6** (pico a 20.8 min). A la derecha se representa el espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 10->35% B en 1/2 h.

A6 (~34%), (MALDI-TOF): calcd. para $C_{142}H_{240}N_{55}O_{40}$ 3355.8, encontrada 3355.9. UV(H_2O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm= 32274 $M^{-1}cm^{-1}$.

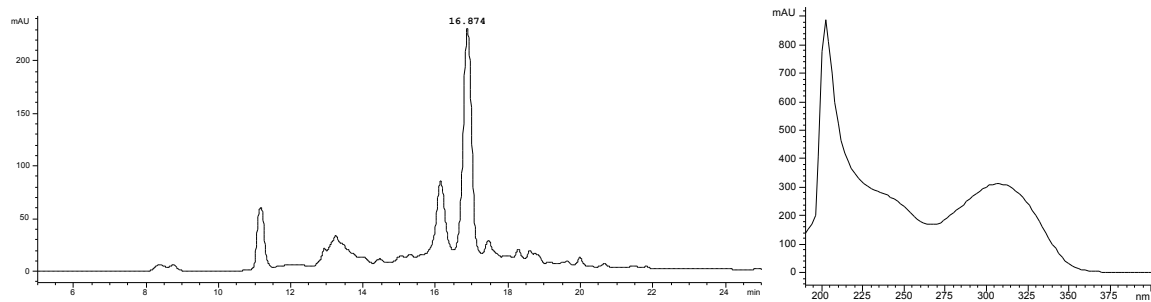
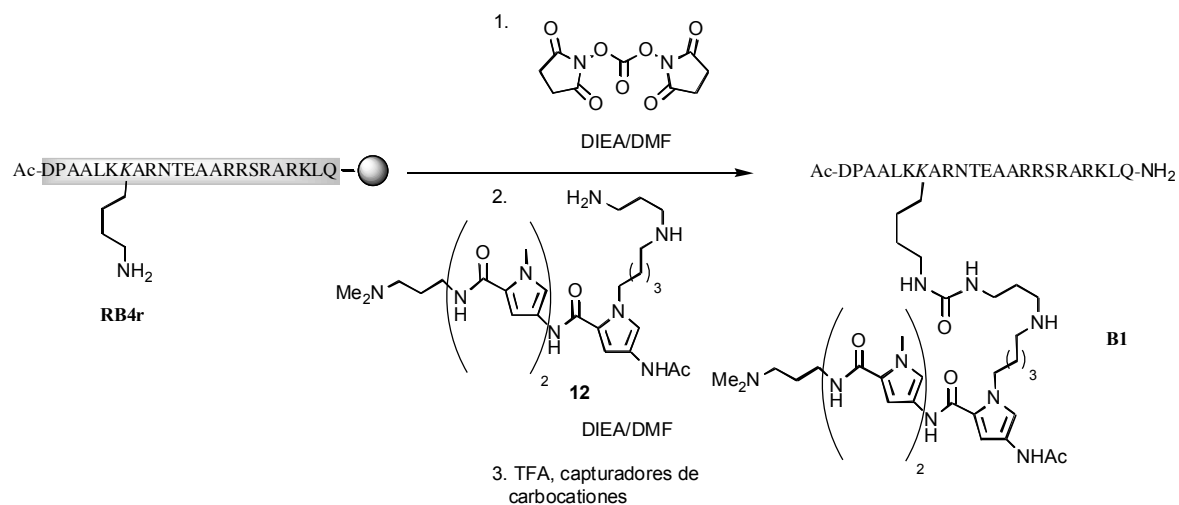


Figura 3.17 Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de **A8** y espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 10→35% B en 1/2 h.

A8 (~17%), (MALDI-TOF): calcd. para $C_{145}H_{250}N_{55}O_{38}$ 3369.9, encontrada 3370.0. UV(H_2O) $\lambda_{m\acute{a}x}$ (ϵ) 304 nm= 32274 $M^{-1}cm^{-1}$.

Acoplamiento del tripirrol 12 al fragmento peptídico RB4r. Síntesis de B1



El péptido unido a la resina **RB4r** (25 mg, $\sim 3.5 \times 10^{-3}$ mmol) se suspendió en 1 mL de DMF (tubo Eppendorf) y la mezcla se agitó durante 1 hora para asegurar el buen hinchamiento de la resina. Después de eliminar la DMF por decantación se adicionó una disolución de carbonato de disuccinimida en DMF (17 mg en 170 μ L, 6.6×10^{-2} mmol, ~ 15 equiv), DIEA (30 μ L, 0.5 M en DMF, 4 equiv) y DMAP (4.4 mg en 20 μ L de DMF, 3.6×10^{-2} mmol, 10 equiv). La mezcla se agitó durante 2 horas, se decantó y la resina se lavó con DMF (2×0.6 mL x 5 minutos). Sobre la resina se adicionó una disolución del tripirrol **12** (10 mg en 300 μ L de DMF, 1.5×10^{-2} mmol, 4 equiv), DIEA (30 μ L, 0.5 M en DMF) y DMAP (4.4 mg en 20 μ L de DMF). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y la resina se lavó con DMF (3×0.6 mL x 5 minutos) y Et₂O (3×0.6 mL x 5 minutos). La rotura y desprotección del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar durante 2 horas. El precipitado obtenido sobre Et₂O se analizó por HPLC, purificándose el compuesto correspondiente al pico mayoritario y confirmándose por espectrometría de masas como el híbrido deseado **B1** ($\sim 15\%$, considerando la síntesis de **RB4r**, el acoplamiento, la desprotección-rotura y la purificación).

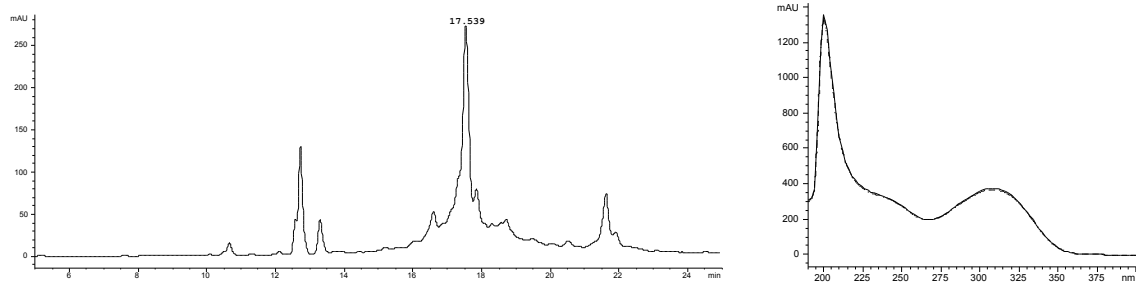
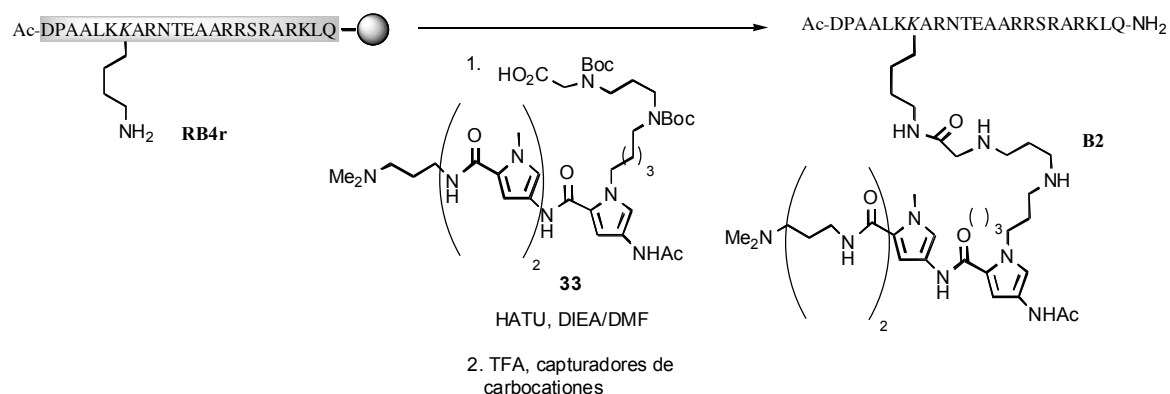


Figura 3.18 Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de **B1** y espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 10→35% B en 1/2 h.

B1 (MALDI-TOF): calcd. para $C_{143}H_{248}N_{54}O_{37}$ 3312.9, encontrada 3312.6. UV(H_2O)
 $\lambda_{m\acute{a}x}$ (ϵ) 304 nm = 32274 $M^{-1}cm^{-1}$.

Acoplamiento del tripirrol **33** al fragmento peptídico **RB4r**. Síntesis de **B2**



El péptido **RB4r** unido a la resina (25 mg, $\sim 3.5 \times 10^{-3}$ mmol) se suspendió en 1 mL de DMF y la mezcla se agitó durante 1 hora para asegurar el buen hinchamiento de la resina. La DMF se eliminó por decantación y sobre la resina se adicionó una mezcla de HATU en DMF (2.9 mg en 200 μL , 7.6×10^{-3} mmol, 2 equiv), DIEA (61 μL , 0.5 M en DMF, 3×10^{-2} mmol, 9 equiv) y el ácido **33** (6.8 mg en 20 μL de DMF, 7.6×10^{-3} mmol, 2 equiv), previamente agitada durante 5 min. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavó la resina con DMF (3×0.6 mL x 5 minutos) y Et_2O (3×0.6 mL x 5 minutos). La rotura y desprotección del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar durante 2 horas. El precipitado obtenido al añadir Et_2O se analizó por HPLC, purificándose el compuesto correspondiente al pico mayoritario y confirmándose por espectrometría de masas la identidad del híbrido deseado **B2** ($\sim 11\%$, considerando la síntesis de **RB4r**, el acoplamiento, la desprotección-rotura y la purificación).

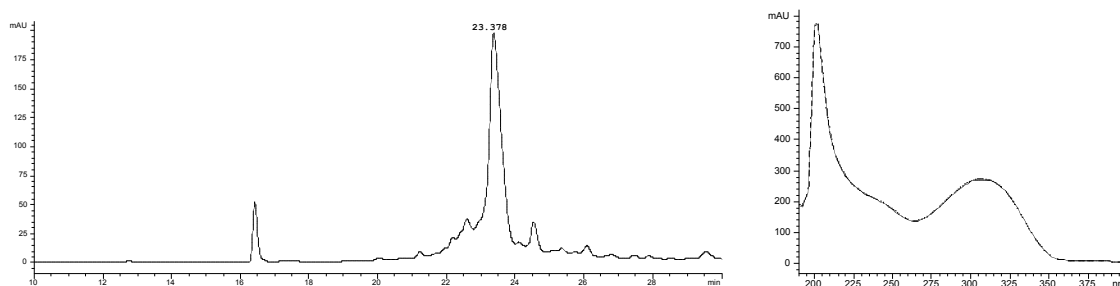
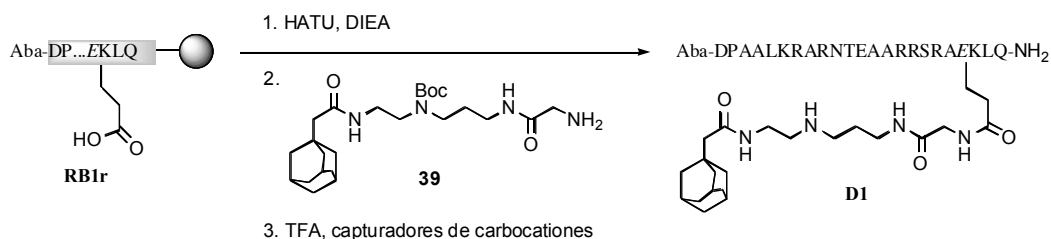


Figura 3.19 Cromatograma del crudo de desprotección de **B2** y espectro de UV del híbrido. HPLC: gradiente lineal 10->35% B en 1/2 h.

B2 (MALDI-TOF): calcd. para $\text{C}_{144}\text{H}_{250}\text{N}_{54}\text{O}_{37}$ 3326.9, encontrada 3326.9. UV(H_2O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 304 nm = $32274 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Acoplamiento del adamantano **39** al fragmento peptídico **RB1r**. Síntesis de **D1**



El péptido unido a la resina **RB1r** (25 mg, $\sim 3.5 \times 10^{-3}$ mmol) se suspendió en 1 mL de DMF y la mezcla se agitó durante 1 hora para asegurar el buen hinchamiento de la resina. La DMF se eliminó por decantación y sobre la resina se adicionó una disolución de HATU en DMF (1.5 mg en 170 μ L, 4.0×10^{-3} mmol, 2 equiv) y DIEA (20 μ L, 0.5 M en DMF, 1.0×10^{-2} mmol, 5 equiv). La mezcla se agitó durante 5 minutos y sobre ella se adicionaron una disolución del adamantano **39** (5 mg en 70 μ L de DMF, 1.1×10^{-2} mmol, 5 equiv) y DIEA (20 μ L, 0.5 M en DMF). Después de 2 horas a temperatura ambiente, los líquidos se eliminaron por decantación y la resina se lavó con DMF (3x0.6 mL x 5 minutos) y Et₂O (3x0.6 mL x 5 minutos). La rotura y desprotección del híbrido se realizó empleando las condiciones estándar durante 2 horas. El filtrado se precipitó sobre Et₂O y el sólido se analizó por HPLC, purificándose el compuesto correspondiente al pico mayoritario y confirmándose la identidad del péptido deseado **D1** por espectrometría de masas ($\sim 23\%$, considerando la síntesis de **RB1r**, el acoplamiento, la desprotección-rotura y la purificación).

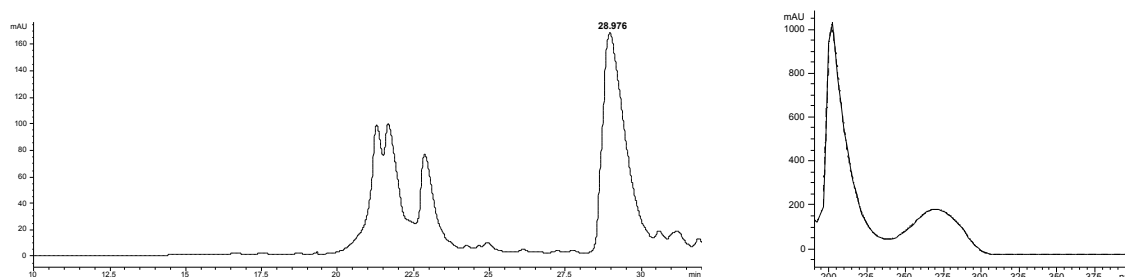
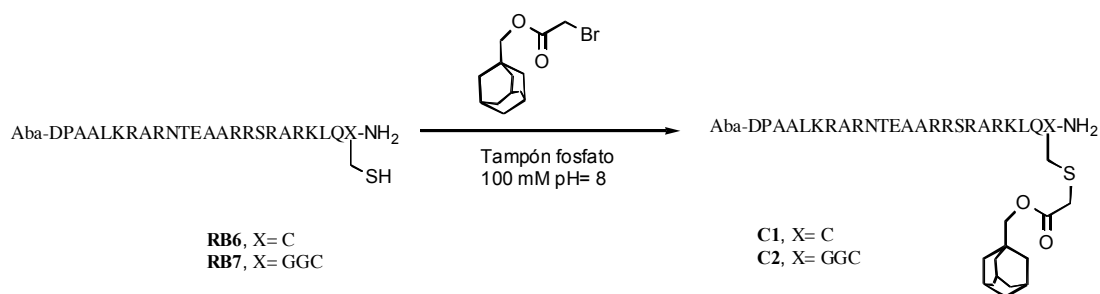


Figura 3.20 Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de **D1**. A la derecha se representa el espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 10 \rightarrow 35% B en 1/2 h.

D1 (MALDI-TOF): calcd. para C₁₃₅H₂₃₁N₄₈O₃₆ 3100.8, encontrada 3101.0.
UV(H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 270 nm = 18069 M⁻¹cm⁻¹.

Síntesis de C1 y C2



Sobre sendas disoluciones desoxigenadas de **RB6** y **RB7** (2 mg, 6.9×10^{-4} mmol) en tampón fosfato potásico (150 μ L, 100 mM, pH = 8.0) y CH₃CN (50 μ L) se adicionaron disoluciones de 2-bromoacetato de adamantanilo (0.79 mg, 9 μ L de una disolución 0.09 mg/ μ L). Las mezclas se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora bajo atmósfera de Ar y se comprobó por RP-HPLC la aparición de nuevos compuestos, que se purificaron y liofilizaron, certificándose por espectrometría de masas como los péptidos alquilados **C1** y **C2**.

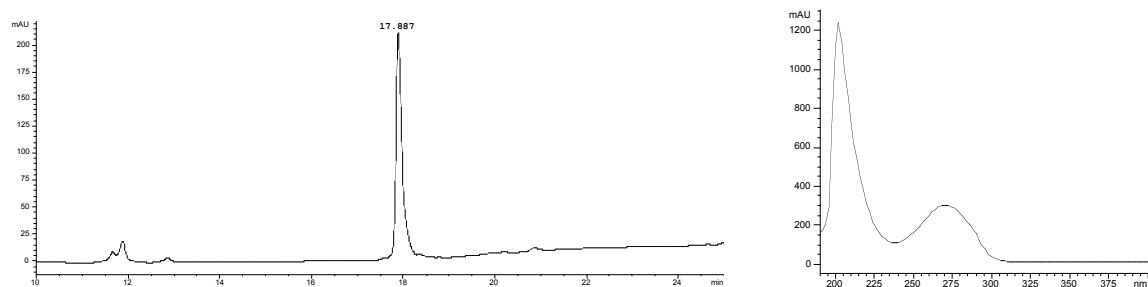


Figura 3.21 Cromatograma de la reacción de formación de **C1**. A la derecha se representa el espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 5- \rightarrow 75% B en 1/2 h.

C1 (1.6 mg, 76%, EM (MALDI-TOF): calcd. para C₁₃₃H₂₂₇N₄₈O₃₆S 3104.7, encontrado 3104.5. UV(H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 270 nm= 18069 M⁻¹cm⁻¹.

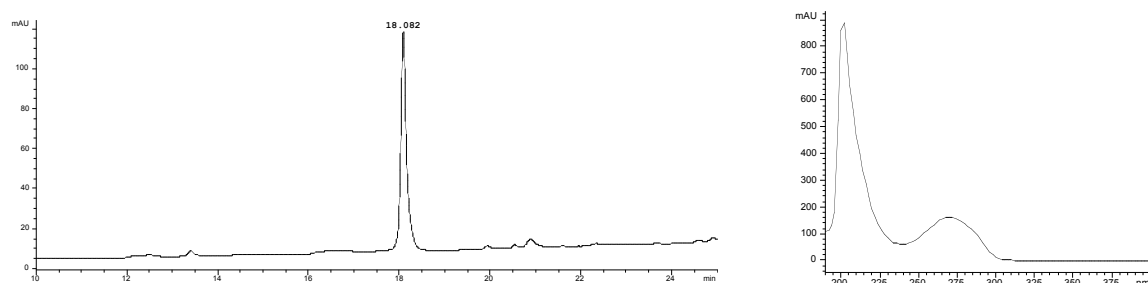
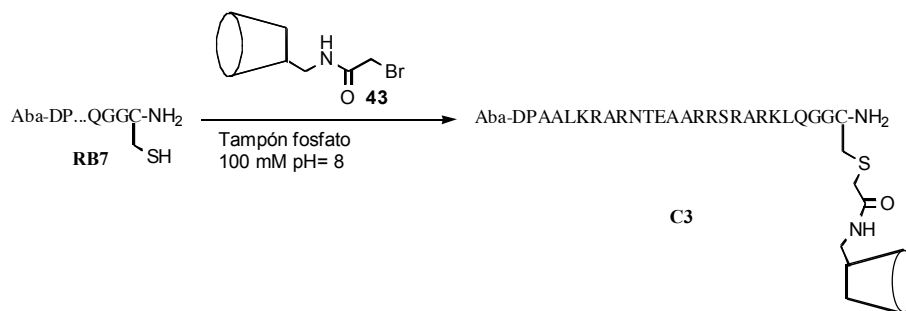


Figura 3.22 Cromatograma de la reacción de formación de **C2**. A la derecha se representa el espectro de UV del compuesto. HPLC: gradiente lineal 5- \rightarrow 75% B en 1/2 h.

C2 (0.9 mg, 53%, EM (MALDI-TOF): calcd. para C₁₃₇H₂₃₃N₅₀O₃₈S 3218.8, encontrado 3218.6. UV(H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 270 nm= 18069 M⁻¹cm⁻¹.

Síntesis de C3



Se agitó una disolución desoxigenada de **RB7** (1 mg, 3.3×10^{-4}) y **43** (1.6 mg, 1.28×10^{-3} mmol, ~4 equiv) en tampón fosfato potásico (100 μ L, 100 mM, pH= 8.0) a temperatura ambiente durante 4 horas bajo atmósfera de Ar y se comprobó por RP-HPLC la aparición de un nuevo compuesto, que se purificó y liofilizó, comprobándose por espectrometría de masas que se trataba del péptido alquilado **C3** (1.0 mg, 71%).

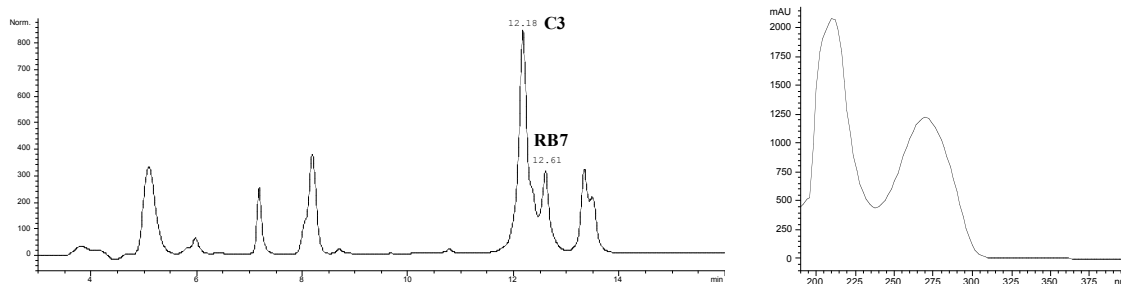
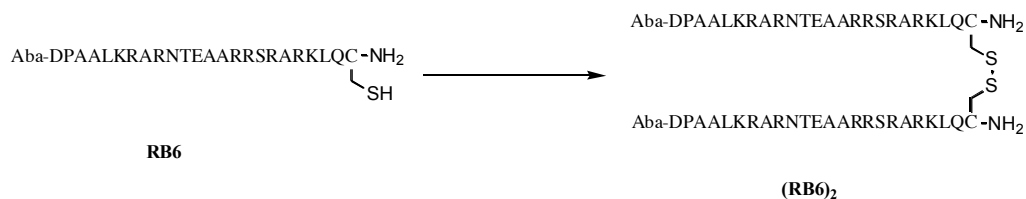


Figura 3.23 Cromatograma del crudo de la reacción de alquilación de **RB7** con el bromuro **43**. HPLC son: 5->75% B 1/2 h.

EM (MALDI-TOF): calcd. para $C_{168}H_{286}N_{51}O_{71}S$ 4186.0, encontrado 4186.0.
 UV(H_2O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 270 nm = $18069 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Síntesis de **(RB6)₂**



Una disolución de **RB6** (3 mg, 1.0×10^{-3} mmol) en tampón fosfato potásico (200 μ L, 100 mM, pH= 8.0) se agitó al aire durante 5 horas. La mezcla se inyectó en RP-HPLC y se purificó el compuesto correspondiente al pico mayoritario, aislándose un sólido blanco después de liofilizar que resultó ser el dímero **(RB6)₂** (4.1 mg, 71%).

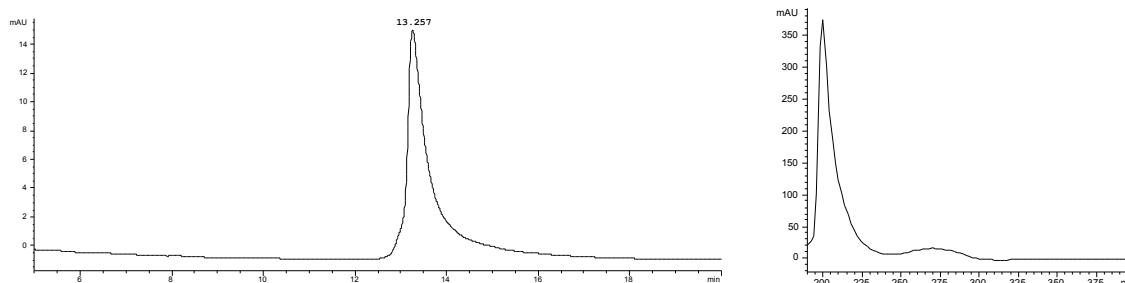


Figura 3.24 Cromatograma de la reacción de oxidación de **RB6** para formar el dímero **(RB6)₂**. HPLC: 5- \rightarrow 75% B 1/2 h.

EM (MALDI-TOF): calcd. para $C_{237}H_{411}N_{95}O_{67}S_2$ 5794.1, encontrado 5794.0.
 UV(H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ) 270 nm= 36138 M⁻¹cm⁻¹.

E. ANEXOS

1. Síntesis de péptidos en fase sólida.

La síntesis peptídica consiste en la formación química repetida de enlaces amida con el fin de conectar las funciones amina y carboxilo de α -aminoácidos adyacentes. Clásicamente, la síntesis de péptidos se llevaba a cabo en disolución. La introducción de la metodología de fase sólida por Merrifield en 1963 mejoró la síntesis, haciéndola más rápida y eficiente.¹²⁸

La construcción de una cadena peptídica sobre un soporte sólido tiene lugar por la adición sucesiva de α -aminoácidos, de manera que se forma un nuevo enlace amida entre el grupo carboxilo activado del aminoácido y el grupo amino terminal del aminoácido unido a la resina.¹²⁹ Para que se puedan llevar a cabo los acoplamientos de manera efectiva las cadenas laterales de los aminoácidos se protegen permanentemente durante toda la síntesis, utilizando grupos protectores que no se vean afectados por las condiciones de los acoplamientos. Los aminoácidos se van añadiendo con el grupo amino protegido de forma temporal que, una vez acoplado, se desprotege para realizar la siguiente etapa. Al final de la síntesis se obtiene un péptido unido a la resina a través de un espaciador por su extremo C-terminal, y puede liberarse en forma de amida o de carboxilo, dependiendo del espaciador elegido. Los grupos protectores de las cadenas laterales suelen elegirse de forma que se rompan al mismo tiempo que se libera el péptido del soporte sólido.

La metodología de síntesis en fase sólida posee varias ventajas:

- facilidad para separar los reactivos y disolventes de la cadena peptídica en crecimiento simplemente por filtración y lavado.
- posibilidad de usar exceso de reactivos, que permite que las reacciones de acoplamiento se completen en poco tiempo y en alto rendimiento.
- fácil automatización de todo el proceso, que permite el uso de sintetizadores automáticos de péptidos.

¹²⁸ a) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149. b) Merrifield, R. B. *Science* **1965**, *150*, 178.

¹²⁹ a) Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* **1989**, IRL Press, Oxford. b) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. A. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins* **1997**, CRC Press, Inc., Boca Raton. c) *Péptidos en Biología y Biomedicina* **1997**, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

La mayor limitación es el hecho de que las reacciones laterales o incompletas se acumulan en la resina durante el crecimiento de la cadena, contaminando el producto final.

Existen, básicamente, dos metodologías para la síntesis de péptidos en fase sólida que se diferencian entre sí en la combinación de grupos protectores que utilizan. Se conocen por el nombre del grupo utilizado en la protección transitoria de los grupos amino: **Boc/Bzl** y **Fmoc/^tBu**.

La metodología **Boc/Bzl** utiliza el grupo *tert*-Butoxicarbonil (Boc), que se desprotege con ácido trifluoroacético, para la protección temporal de la función α -amino de los aminoácidos, y grupos del tipo bencilo (Bzl) para proteger las cadenas laterales. La estrategia **Fmoc/^tBu** se basa en la utilización del grupo 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), lábil en medio básico (se desprotege con piperidina), para la protección del grupo α -amino, y la utilización de grupos protectores sensibles al medio ácido del tipo *tert*-Butilo (^tBu) para las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales.¹³⁰

La separación final del soporte sólido y desprotección simultánea de las cadenas laterales de los aminoácidos requiere condiciones ácidas fuertes: tratamiento con HF o TFA en el caso de la estrategia Boc/Bzl, y TFA en la metodología Fmoc/^tBu.

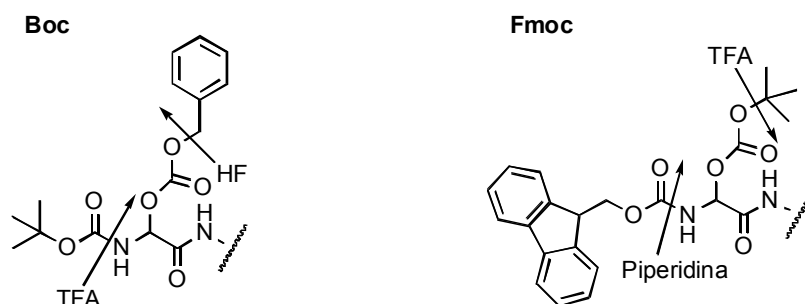


Figura 1.1 Roturas de los grupos protectores en las diferentes estrategias de síntesis en fase sólida.

Como fase sólida se suelen utilizar resinas con pequeño tamaño de partícula y con poco entrecruzamiento entre las cadenas del polímero,¹³¹ para favorecer la difusión rápida de los reactivos y el acceso eficiente a los sustratos inmovilizados en la resina. La mayoría de los polímeros utilizados son de poliestireno o de poliamida, aunque en los últimos años

¹³⁰ a) Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161. b) Chang, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* **2000**, Oxford University Press, New York.

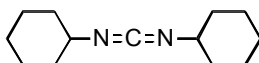
¹³¹ Sherrington, D. C. *Chem. Comm.* **1998**, *21*, 2275.

se están utilizando más frecuentemente materiales basados en polietilenglicol insertado sobre poliestireno, donde se combina el carácter hidrofóbico del poliestireno con la hidrofilia del polietilenglicol.¹³²

Otro elemento importante es el conector o espaciador, cuya función es la de proporcionar una unión reversible entre el soporte sólido y la cadena peptídica, además de proteger el grupo C-terminal durante el proceso de elongación de la cadena.¹³³ La elección del espaciador va a determinar la funcionalización del residuo C-terminal en el producto final. La mayoría de los espaciadores están diseñados para liberar los péptidos en forma de ácido o amida en su extremo C-terminal.

Una de las etapas claves en la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida es la formación eficiente del enlace amida entre los aminoácidos. La elección del grupo activante debe hacerse de forma cuidadosa, con el fin de conseguir un acoplamiento eficiente y al mismo tiempo minimizar las posibles reacciones laterales. Existen fundamentalmente cuatro formas distintas de activar el grupo carboxilo:

- *Carbodiimidias*. Son uno de los agentes activantes más populares para la síntesis de péptidos. Su principal limitación es que pueden producir deshidratación de residuos de Asn y Gln. Uno de los agentes más usados es la DCC:

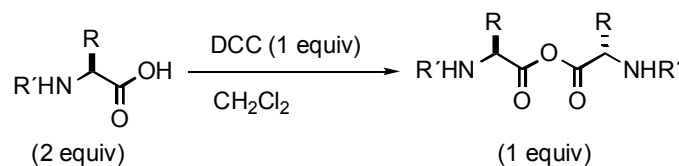


DCC

- *Anhídridos simétricos*. El uso de anhídridos simétricos preformados es un método de activación muy efectivo, sobre todo en la estrategia Boc/Bzl, debido a su elevada reactividad. Suelen generarse *in situ* utilizando dos equivalentes del aminoácido protegido y un equivalente de DCC. Este sistema es 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 (esquema 1.1).

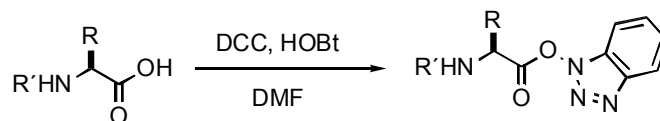
¹³² Saplisky, S.; Chang, J. L.; Albericio, F.; Barany, G. *Reactive Polymers* **1994**, *22*, 243.

¹³³ James, I. W. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855.



Esquema 1.1

- *Ésteres activos.* Consiste en el uso de aminoácidos derivatizados en forma de ésteres altamente reactivos, siendo uno de los más utilizados el HOBt:



Esquema 1.2

- *Formación in situ de ésteres activos.* Este es uno de los métodos más utilizados, debido a su facilidad de uso y a la capacidad de llevar a cabo reacciones limpias y rápidas, incluso entre aminoácidos con impedimentos estéricos. La mayoría de estos métodos se basan en el uso de sales de fosfonio o uronio en presencia de una base terciaria. Los agentes más comunes se muestran en la figura 1.2.¹³⁴ Se ha observado que el HATU y el PyAOP son los que muestran mejores resultados en términos de eficiencia del acoplamiento y ausencia de racemización.

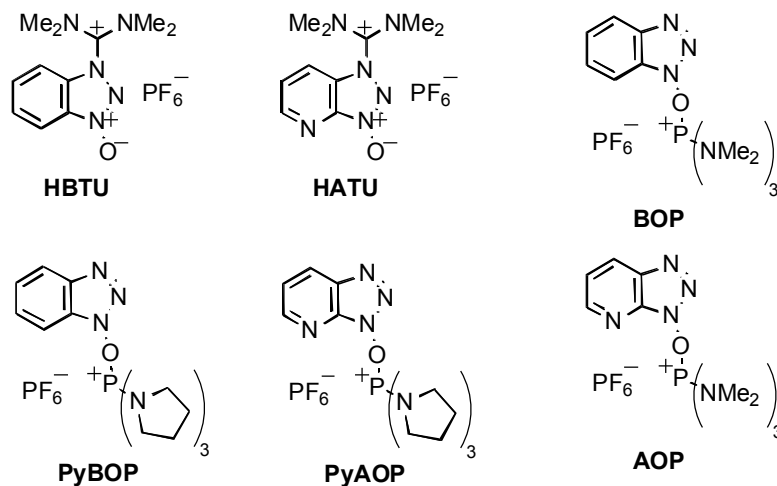


Figura 1.2 Agentes activantes utilizados comúnmente en la síntesis de péptidos en fase sólida.

¹³⁴ Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678.

La síntesis de proteínas por métodos químicos proporciona una ruta rápida y versátil, ofreciendo un método flexible que permite la incorporación de aminoácidos no naturales u otras modificaciones.

2. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular (DC) se define como la medida de la diferencia de absorción (ΔA) entre la luz polarizada circularmente a la izquierda (A_L) y a la derecha (A_R).^{135,136} La adaptación de la ley de Lambert-Beer para el DC sustituye el coeficiente de extinción (ϵ), por la diferencia entre los coeficientes de extinción para la absorción de la luz polarizada a la izquierda y a la derecha ($\Delta\epsilon$).

$$CD = \Delta A = A_L - A_R = \Delta\epsilon l C = (\epsilon_L - \epsilon_R) l C$$

En la mayor parte de los casos los espectros de DC no se expresan en unidades de absorbancia, sino que normalmente se transforman a *elipticidad*, en miligrados. La conversión entre las dos es directa:

$$\theta \text{ (miligrados)} = 32980 C l \Delta\epsilon = 32980 \Delta A$$

donde C es la concentración de la muestra en mol dm^{-3} y l es el paso óptico de la celda medido en cm.

Aunque, generalmente, la unidad más común para los espectros de DC es la *elipticidad molar*:

$$M_\theta = [\theta]_m = \theta / (10 C l) = 3298 \Delta\epsilon$$

En el caso de péptidos y proteínas se suele utilizar la *elipticidad molar por residuo* (mre , $^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$), que se calcula directamente a partir de la elipticidad molar simplemente dividiendo su valor entre el número de residuos del péptido o la proteína.

El DC es especialmente útil para el estudio de moléculas quirales, entre las cuales se encuentran prácticamente todas las moléculas de interés biológico. De hecho, la utilización del DC como técnica de análisis estructural está ampliamente extendida para el estudio de sistemas biológicos, a pesar de que las moléculas implicadas normalmente son muy grandes y no es posible un análisis estructural detallado de los espectros de DC obtenidos.

Las moléculas aquirales no dan señal en el DC. Sin embargo, en muchos casos su complejación con macromoléculas quirales provoca cambios conformacionales que inducen quiralidad en los ligandos, generando por lo tanto una señal inducida en DC. Dicha señal de DC puede ser utilizada para caracterizar la interacción responsable de esa asociación. El DC

¹³⁵ Fasman, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* 1990, Plenum Press, New York.

¹³⁶ Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular Dichroism* 2000, Wiley-VCH, New York.

normalmente se utiliza con dos fines: para detectar cambios en la conformación de macromoléculas, y para detectar la interacción entre macromoléculas y moléculas pequeñas, especialmente moléculas aquirales, cuya señal de DC inducida se deberá exclusivamente a su interacción con la macromolécula.¹³⁷

2.1 DC de péptidos y proteínas

Todos los aminoácidos naturales tienen quiralidad (excepto la Gly, que es aquiral). Como resultado de esta quiralidad, las estructuras secundarias formadas también son quirales y, por lo tanto, tienen señales características de DC. De los espectros de DC de péptidos y proteínas se puede deducir información tanto de la conformación de las cadenas laterales como del esqueleto.

Para su análisis, los espectros de DC normalmente se dividen en dos regiones diferentes: el UV cercano y el UV lejano. El UV cercano comprende aproximadamente entre 250 y 350 nm y, muchas veces, también se le conoce como la región aromática del espectro. La región del UV lejano es aquella de longitud de onda inferior a 250 nm y las señales en esta zona están dominadas por las transiciones electrónicas del enlace peptídico, aunque también puede haber contribuciones de otras transiciones. La región del UV cercano aporta información sobre todo de la estructura terciaria del péptido o proteína, en tanto que la región del UV lejano proporciona información a cerca de las estructuras secundarias presentes. El enlace peptídico contribuye en la zona del UV lejano, mientras que los residuos aromáticos y los enlaces disulfuro son los que absorben en el UV cercano.

Se considera que en ausencia de contribuciones por parte de cromóforos aromáticos, el espectro de DC de un péptido o una proteína puede ser considerado como la suma de las contribuciones de los espectros de DC correspondientes a los distintos motivos de estructura secundaria. Así, las hélices α tienen un espectro característico, lo mismo que las láminas β y las regiones sin estructura.

La hélice α es el motivo de estructura secundaria dominante en gran número de proteínas. Es un elemento estructural bien definido, que también es adoptado por gran número de homopolipéptidos en determinadas

¹³⁷ a) Zimmer, C.; Luck, G. *Advances in DNA Sequence Specific Agents* **1992**, *1*, 51. b) Brittain, H. G. en *Analytical Applications of Circular Dichroism* **1994**, *14*, 307. c) Hatano, M. *Adv. Polym. Sci.* **1986**, *77*, 1.

condiciones (por ejemplo, alto contenido en TFE), por lo que su espectro de DC es bien conocido. El espectro de DC está caracterizado por una banda negativa a 222 nm y otra a 208 nm.

Las láminas β son estructuras secundarias mucho peor definidas que las hélices α : pueden ser paralelas o antiparalelas, y con longitudes y anchuras variables y además, las láminas β suelen mostrar una torsión que depende de su longitud y que influirá en el espectro de DC. Todos estos factores hacen que la caracterización espectroscópica de las láminas β sea menos exacta. Los elementos fundamentales en el espectro de DC son la existencia de una banda negativa a 216 nm y otra banda positiva de magnitud similar en torno a 195 nm. La intensidad del espectro de láminas β es mucho menor que el de las hélices α .

Los péptidos desordenados poseen como principal característica una banda negativa intensa justo por debajo de 200 nm y una banda positiva en torno a 218 nm que no es totalmente general.

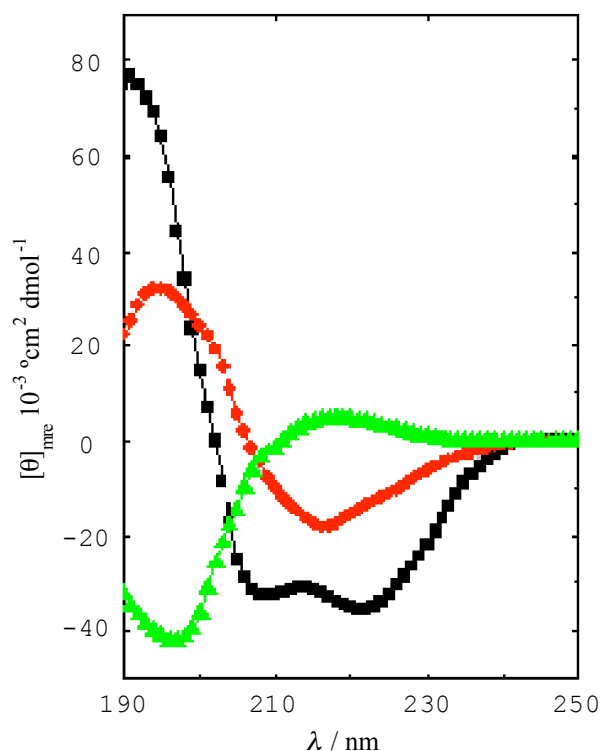


Figura 2.1 UV lejano del espectro de DC asociado a diferentes tipos de estructura secundaria en proteínas: hélice α (■), lámina β (●), estructura desordenada (▲).

El DC permite cuantificar la proporción de hélice α en un péptido según la intensidad de la banda negativa a 222 nm. Los péptidos relativamente cortos, como es el caso de los descritos en esta tesis y todos sus

derivados, en disolución se encontrarán fundamentalmente desordenados y sólo en presencia de ADN, en el caso de que exista unión, serán capaces de formar una hélice α .

DC de polinucleótidos¹³⁸

El espectro de los nucleótidos es debido a las transiciones electrónicas en las bases que, a pesar de ser aquirales se encuentran unidas a la desoxirribosa que sí es quiral. Además de eso, al estar las bases apiladas unas sobre otras dentro de la doble hélice del ADN se originan señales inducidas distintivas de las distintas conformaciones. En general, puede decirse que los espectros de DC de ADN son más sensibles a los cambios en la conformación que a la secuencia de bases que lo componen.

La conformación B del ADN se caracteriza por una banda positiva a 275 nm, una banda negativa a 247 nm con el cero en torno a 258 nm, a 220 nm la señal puede volverse positiva o menos negativa y, finalmente, una banda negativa pequeña es seguida por un pico positivo en torno a 190 nm.

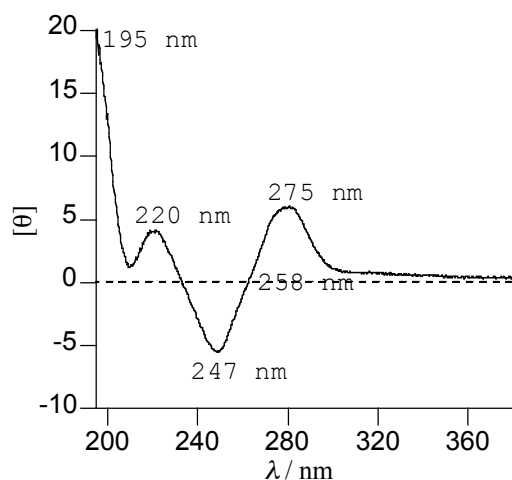


Figura 2.2 Espectro característico de un ADN en forma B. Se representan las longitudes de onda típicas para las bandas.

Los espectros de DC de cadenas sencillas de ADN son en gran medida similares a los que se obtienen para dobles hélices pero de menor intensidad. Las únicas diferencias se encuentran en la zona inferior a

¹³⁸ a) Gray, D. M.; Ratliff, R. L.; Vaughan, M. R. *Methods in Enzymology*, **1992**, 211, 389. b) Towell III, J, F.; Manning, M. C. *Analytical Applications of Circular Dichroism*, **1994**, 14, 175.

230 nm: un aumento de la señal de la banda a 220 nm y un desplazamiento del punto de corte de 258 nm a 261 nm.

2.3 Uso del DC para monitorizar la interacción de ligandos con el ADN¹³⁹

La distamicina y todos nuestros análogos son aquirales, por lo que no exhiben señal de DC, sin embargo, al insertarse en el surco menor del ADN han de torcerse para acomodarse a la geometría del surco menor, generando entonces una señal de DC inducida que puede verse claramente en torno a 330 nm.

Basándonos en las distintas propiedades espectroscópicas de los péptidos y los derivados de la distamicina, podemos monitorizar el modo de unión de nuestros híbridos utilizando el DC: la unión de la zona peptídica de las moléculas provocará un aumento en la intensidad negativa en torno a 222 nm; la unión del tripirrol, la aparición de una banda a 330 nm.

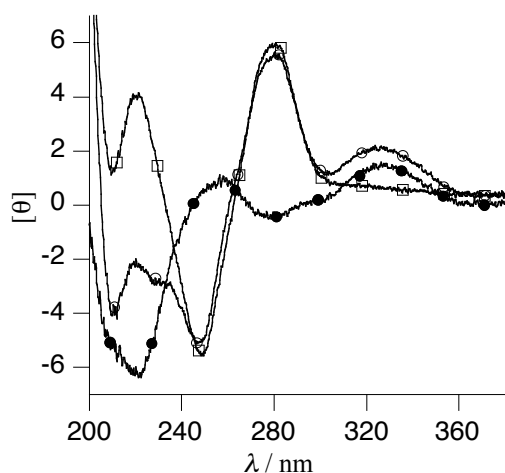


Figura 2.3 Espectro de DC de un ADN (□). Superpuesto está el espectro de DC de un complejo ADN-péptido (○) en donde se observa la banda inducida a 330 nm correspondiente a la inserción del pirrol en el surco menor y la bajada en la zona del UV lejano correspondiente a la hélice α . Espectro diferencia: ADN+péptido - ADN (●).

¹³⁹ a) Chaires, J. B. *Advances in DNA Sequence Specific Agents* **1992**, 1, 3. b) Zimmer, C.; Luck, G. *Advances in DNA Sequence Specific Agents* **1992**, 1, 3.

3. Experimentos de retardo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis es una técnica que permite la separación de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico. La diferencia de tamaño y de carga existente entre el ADN libre y el ADN complejado con el péptido induce un retardo en la migración del complejo respecto al ADN libre, de tal forma que se pueden visualizar y analizar por separado en el gel ambas moléculas.

Los experimentos se realizaron en cubetas de electroforesis de la casa *Bio-Rad* en minigeles de poliacrilamida (10x8 cm) a 4 o ~25 °C, según se indicase.

3.1 Preparación de los geles

La poliacrilamida es un polímero obtenido por copolimerización radicalaria de la acrilamida y la *N,N'*-metilenbisacrilamida. La *N,N'*-metilenbisacrilamida favorece el entrecruzamiento de la acrilamida y las propiedades físicas del gel en cuanto a su rigidez y tamaño de poro vendrán determinadas por la proporción de *N,N'*-metilenbisacrilamida presente en él. En nuestros experimentos se utilizaron geles no desnaturizantes del 10% de poliacrilamida. La preparación de los geles se llevó a cabo de la siguiente manera: en un matraz erlenmeyer se mezclaron 11.9 mL de H₂O, 2.1 mL de TBE 5X, 7 mL de protogel (mezcla 30:0.8 de acrilamida: *N,N'*-metilenbisacrilamida), 150 µL de persulfato amónico al 10% como agente iniciador de la reacción radicalaria y 15 µL de TMEDA (*N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina) para estabilizar los radicales y controlar la velocidad de polimerización. La mezcla se agita brevemente y se introduce entre las placas, colocándose en último lugar el molde para formar los pocillos en los cuales se cargarán las muestras. La mezcla se dejó polimerizar durante media hora, después se retiró el molde y se lavaron los pocillos con H₂O.

La composición del TBE 5X es la siguiente: 0.445 M base Tris, 0.445 M ác. bórico, 10 mM AEDT (pH= 8.0).

3.2 Marcaje de los ADNs e incubación de las muestras

Los experimentos de electroforesis (salvo que se indicase lo contrario) se realizaron con ADNs marcados en el extremo 5' con ³²P en una de sus cadenas. A continuación se detalla el protocolo seguido para el marcaje

en 5':¹⁴⁰

1. Se prepararon disoluciones madre de cada una de las hebras de concentración 10 μM . A partir de estas, se prepararon las disoluciones de marcaje.

2. Disoluciones de marcaje: se tomó 1 μL de una de las disoluciones de ADN de cadena sencilla de concentración 10 μM y se diluyó con 1 μL de tampón kinasa + 3.5 μL de H_2O milli Q + 4 μL de ^{32}P -ATP (5000 Ci/mmol) + 0.5 μL de T-4 polinucleótido Kinasa. La mezcla se incubó a 37 °C durante media hora y, luego, se calentó a 90 °C durante 10 minutos para inactivar el enzima.

La T-4 polinucleótido Kinasa es la enzima encargada de la transferencia del grupo fosfato del ^{32}P -ATP al extremo 5' del oligonucleótido. Tanto la enzima como el tampón fueron suministrados por *Promega*. La concentración de la Kinasa es de 5-10 unidades/ μL y la composición del tampón 1X es: 40 mM Tris·HCl (pH = 7.5), 10 mM de MgCl_2 y 5 mM de DTT.

Disolución complementaria: 2 μL de la hebra complementaria (concentración 10 μM) + 1 μL de tampón kinasa + 7 μL de H_2O .

Se mezclaron las dos disoluciones y se calentó a 90 °C durante 10 minutos, dejándose enfriar lentamente la mezcla (2 horas) hasta alcanzar temperatura ambiente. Una vez marcado e hibridado el ADN, se procedió a su incubación con el péptido. Las reacciones de incubación se llevaron a cabo usando 45 pM de dADN* en una mezcla (13 μL) que contenía 38 mM de Tris (pH = 7.5), 90 mM de KCl, 1.8 mM de MgCl_2 , 1.8 mM de AEDT, 9% de glicerol, 0.11 mg/mL de BSA (seroalbúmina bovina) y 2.2% de NP-40 (octiletóxipolietoxietanol). Las reacciones se incubaron durante 30 minutos (a 4 °C o temperatura ambiente, según se indicase), se adicionaron 7 μL de tampón de carga (0.25% de azul de bomofenol, 0.25% de xilenocianol, 15% ficol tipo 400 en H_2O ; salvo en el caso de los híbridos no covalentes) y se cargaron las muestras en el gel. El gel se desarrolló a 140 V durante 1 hora en una disolución de TBE 0.5X, después se fijó por tratamiento con una disolución de del 33% de MeOH y 10% AcOH, se secó y se autorreveló en una placa fotográfica a -80 °C.

¹⁴⁰ Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. *Molecular cloning, a laboratory manual* 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, USA

4. Determinación de la constante de afinidad mediante experimentos de EMSA. Deducción de la ecuación de equilibrio para un modelo de complejación 1:1

La determinación de la constante de disociación entre una macromolécula y un ligando en un sistema equilibrio en el cual la estequiometría del complejo es 1:1 se puede deducir fácilmente a partir de la ecuación que rige el equilibrio:



$$K_d = \frac{[P][D]}{[C]}$$

en donde [P] es la concentración del ligando (en nuestro caso, el híbrido), [D] es la concentración de ADN y [C] representa la concentración del complejo.

En las condiciones en las que realizan los experimentos de electroforesis se puede considerar prácticamente constante la concentración de P, ya que está en un exceso muy superior a la de D. Por lo tanto, tenemos que:

$$\text{si } [P] \gg [C], [P_T] = [P] + [C] \approx [P]$$

$$K_d = \frac{[P][D]}{[C]} = \frac{[P_T][D]}{[C]}$$

en donde $[P_T]$ representa la concentración total de P.

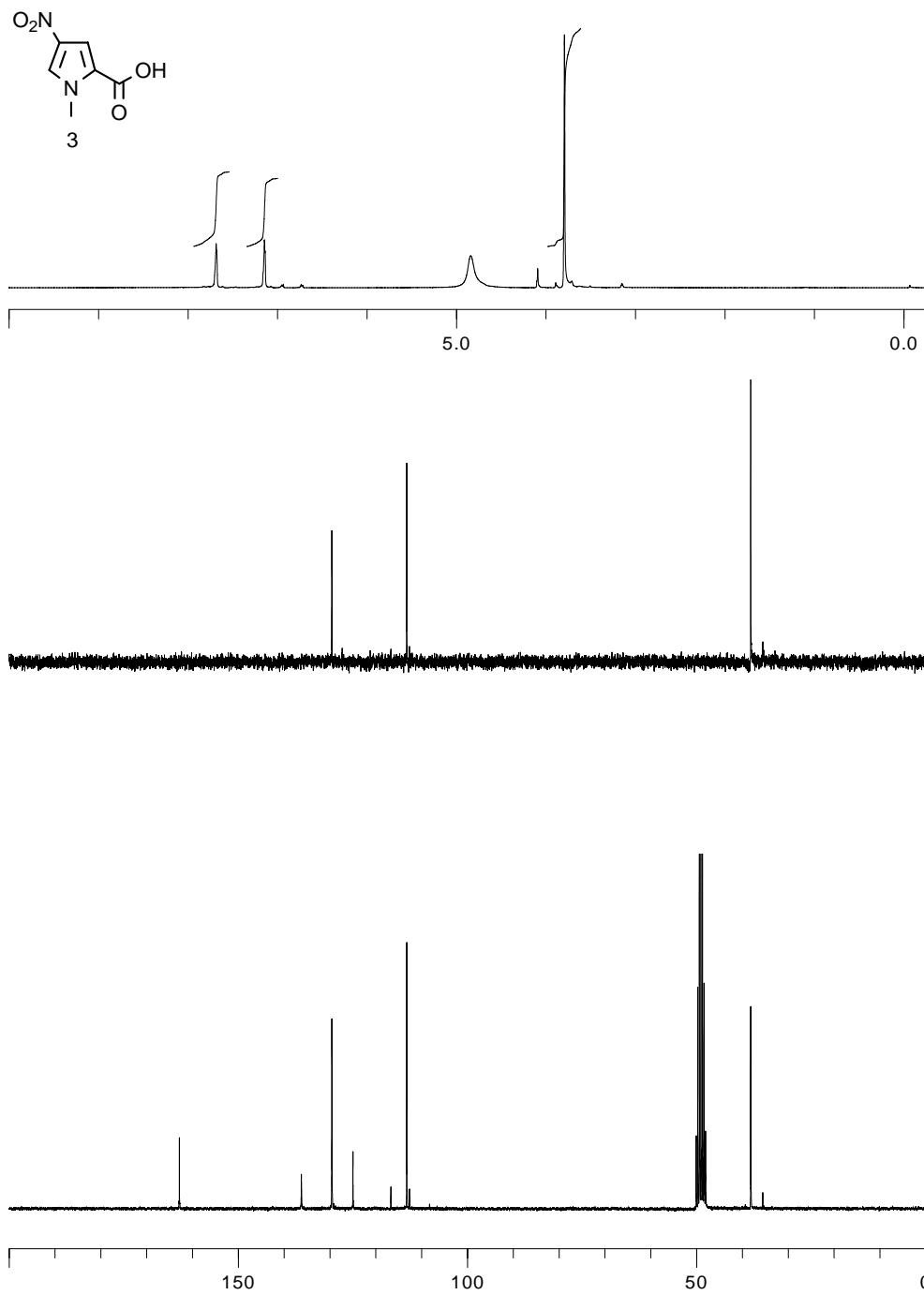
Teniendo en cuenta la concentración total de D y la fracción molar de complejo podemos llegar a la ecuación utilizada en el cálculo de la constante de afinidad:

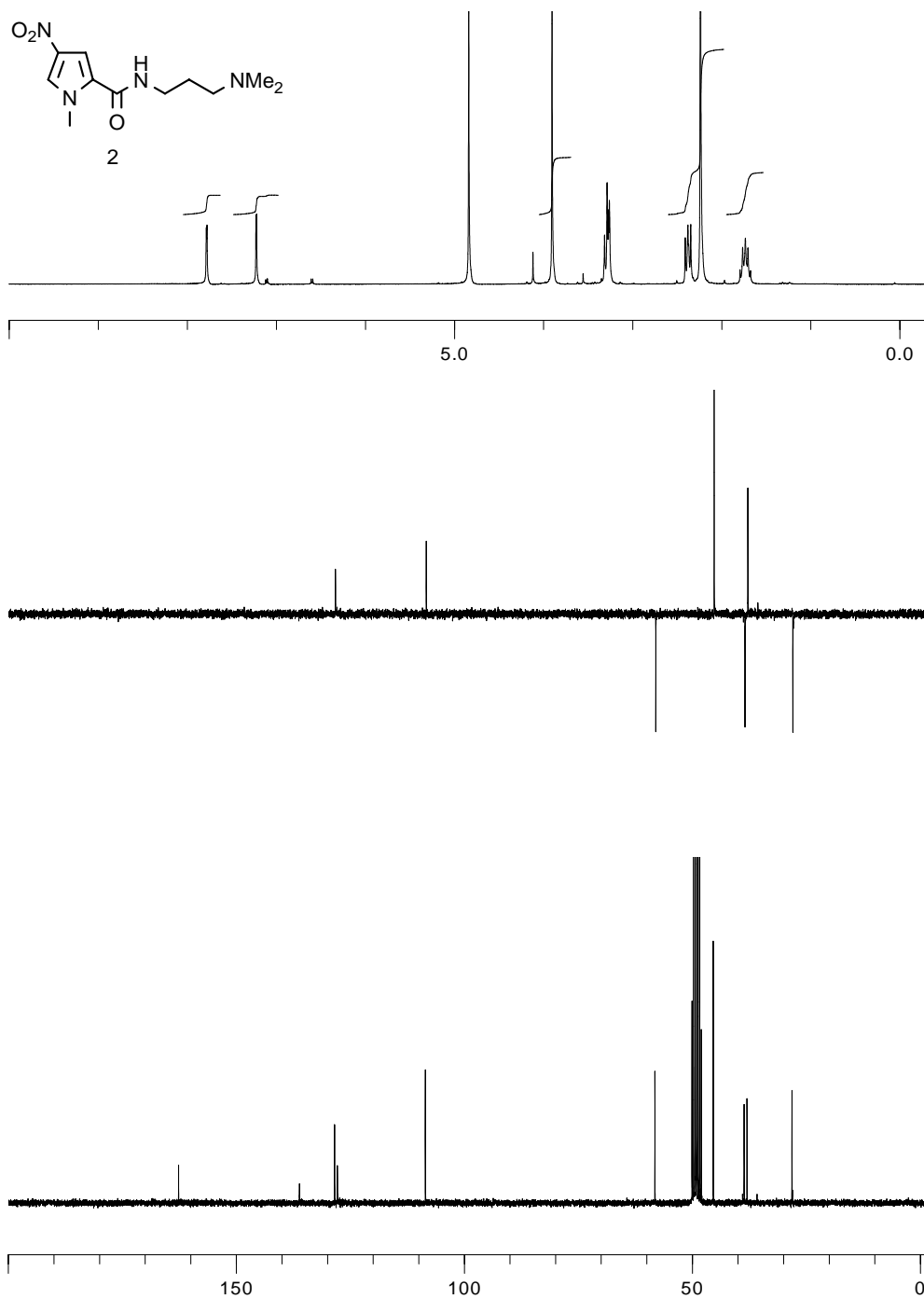
$$[D_T] = [D] + [C]$$

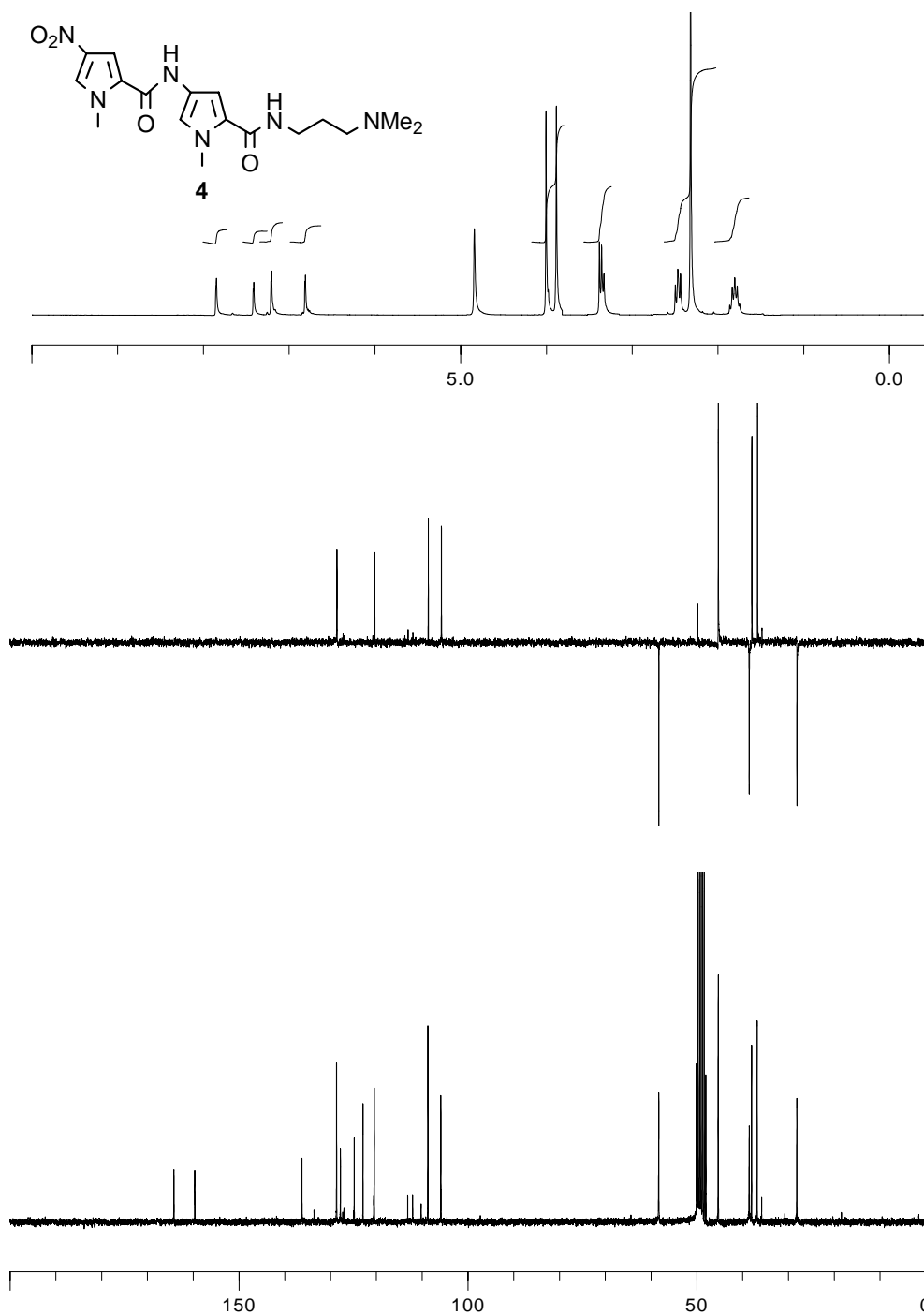
$$\theta = \frac{[C]}{[C] + [D]} = \frac{[D_T] - [D]}{[D_T]}$$

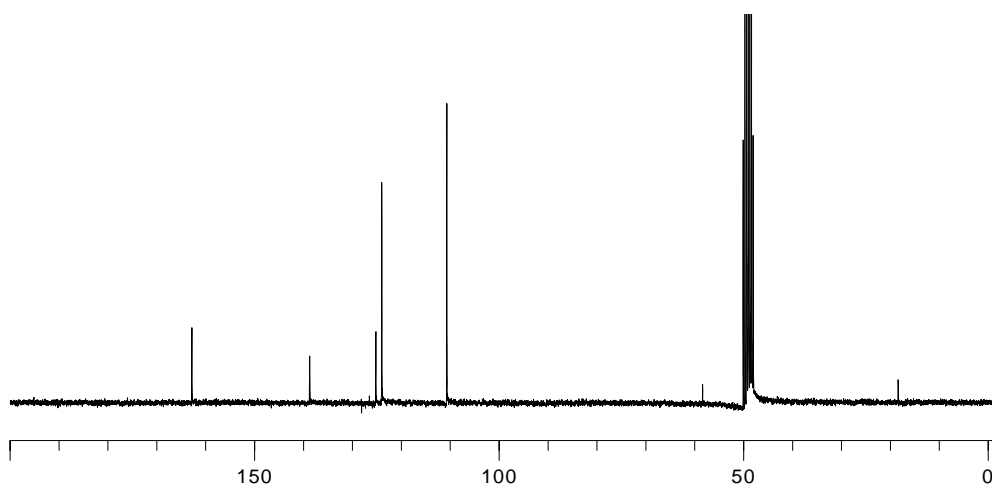
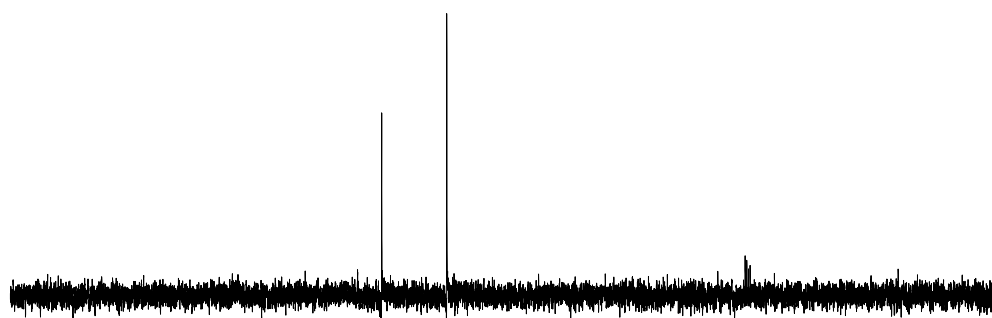
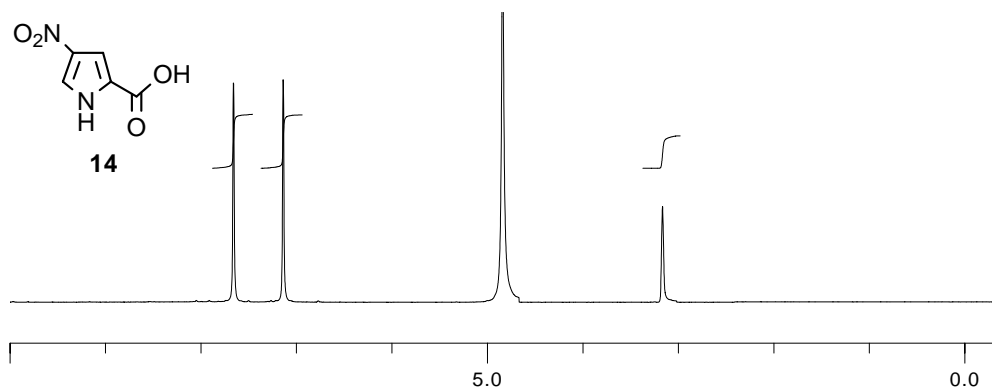
$$K_d = [P_T] \frac{[D]}{[D_T] - [D]} = [P_T] \frac{[D_T](1 - \theta)}{[D_T]\theta} \implies \theta = \frac{[P_T]}{K_d + [P_T]}$$

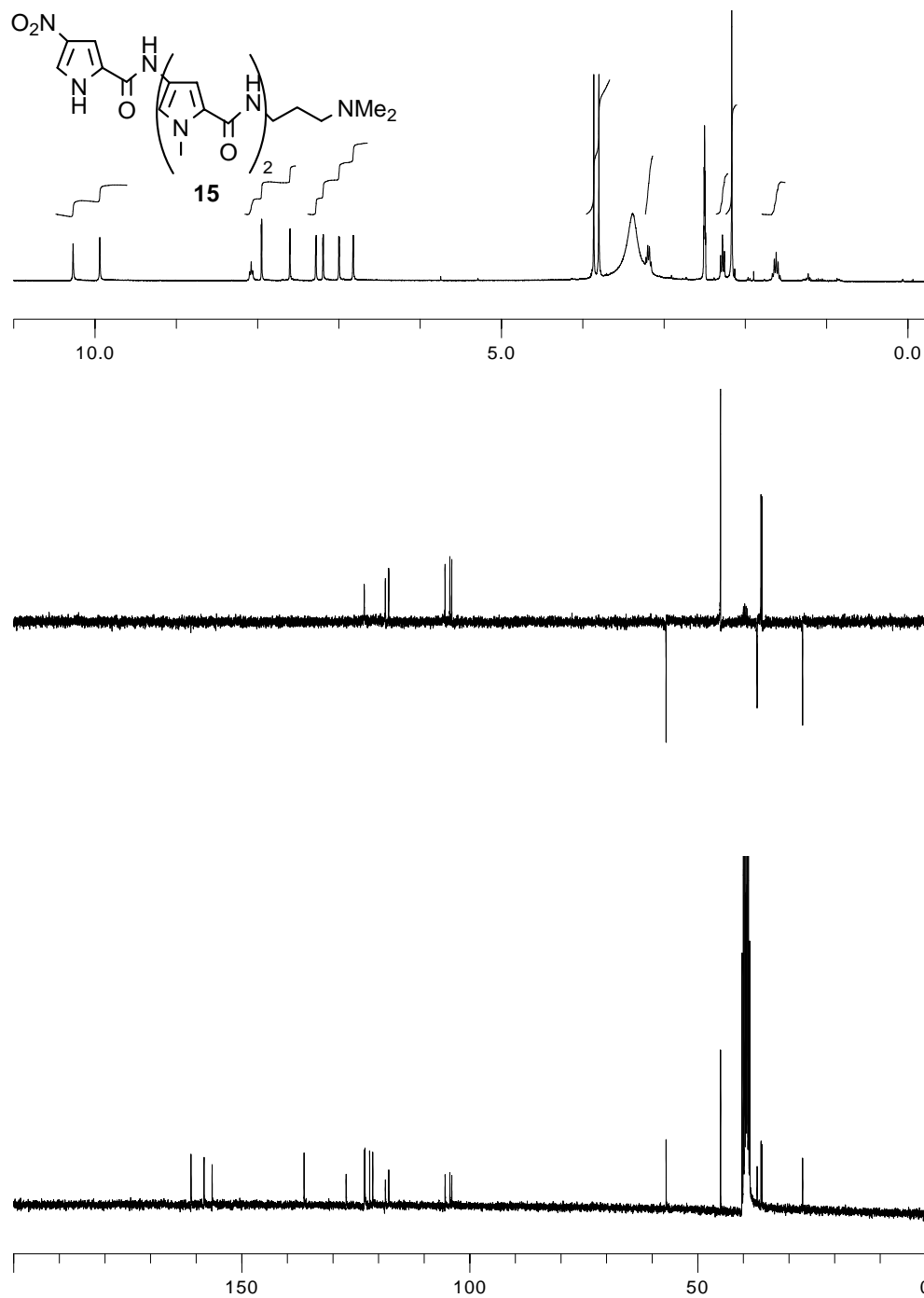
F. ESPECTROS

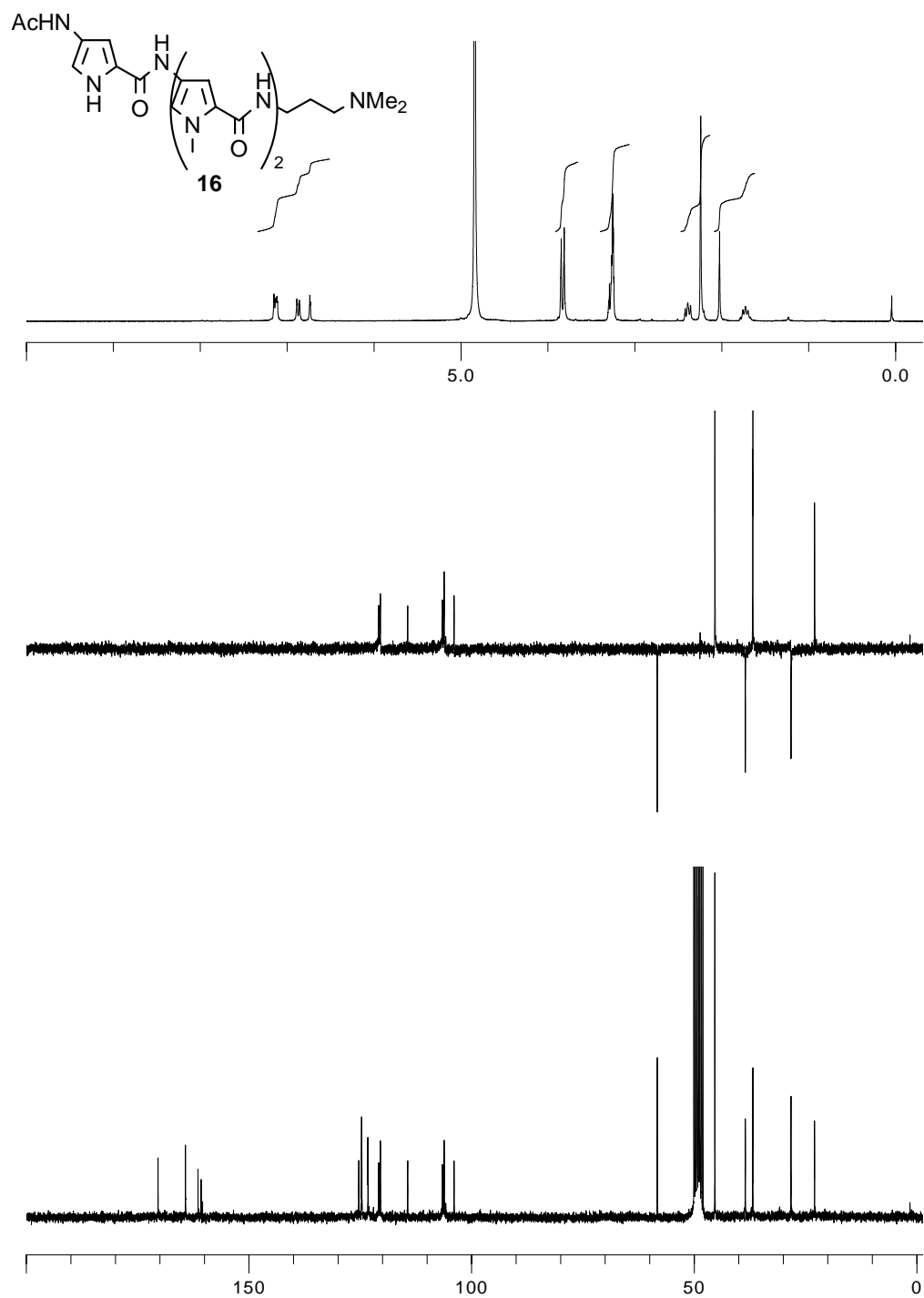


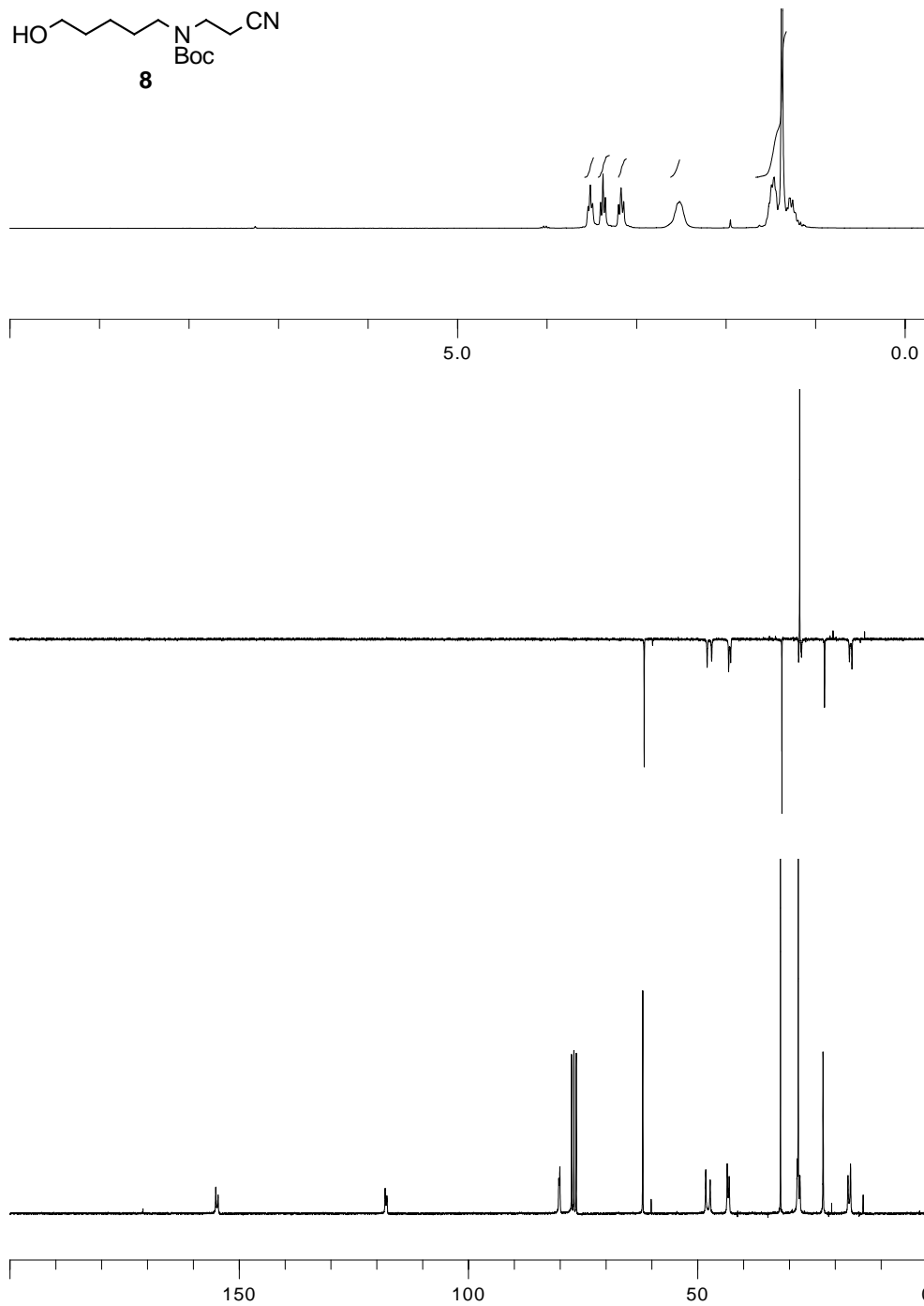


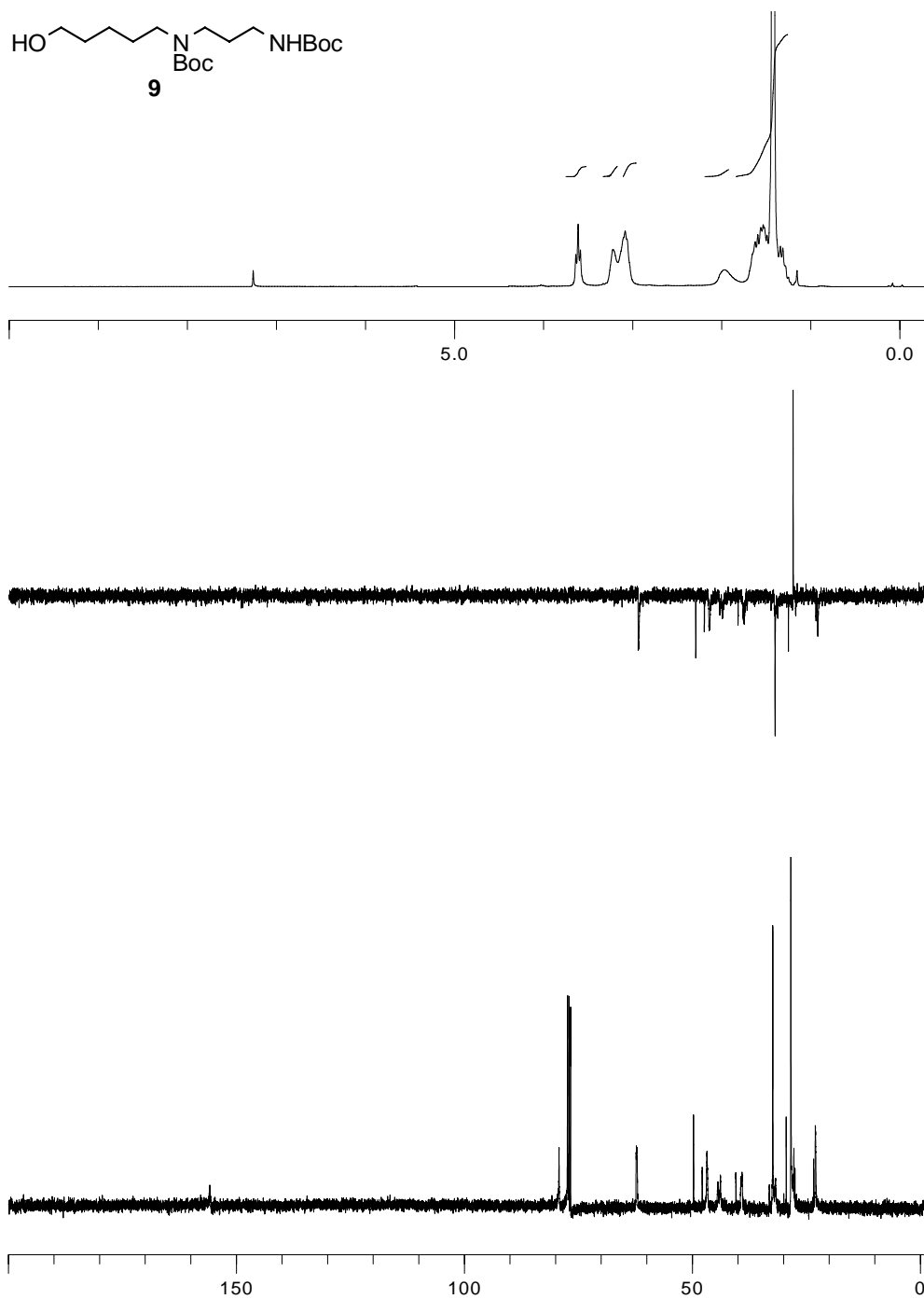


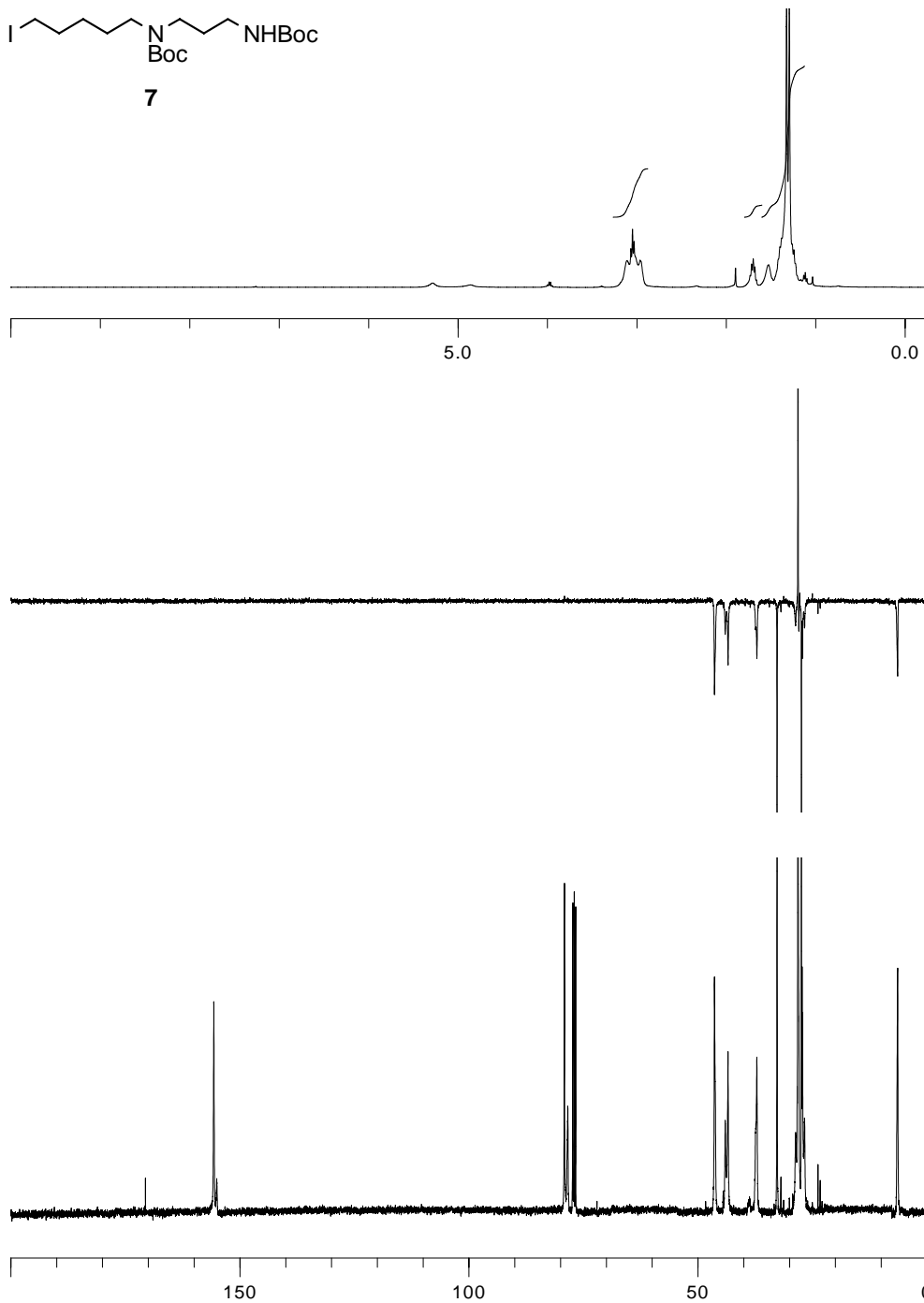


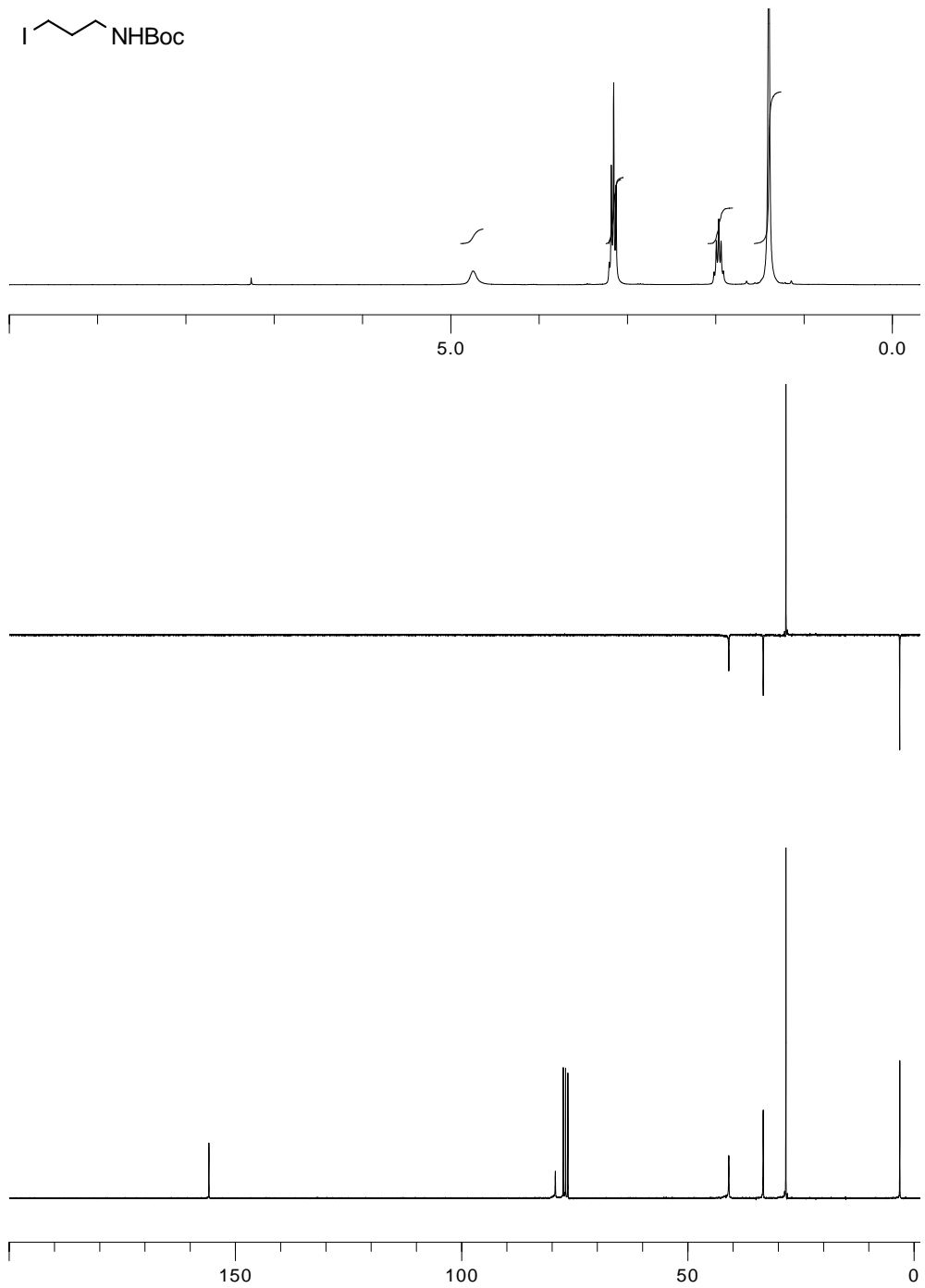


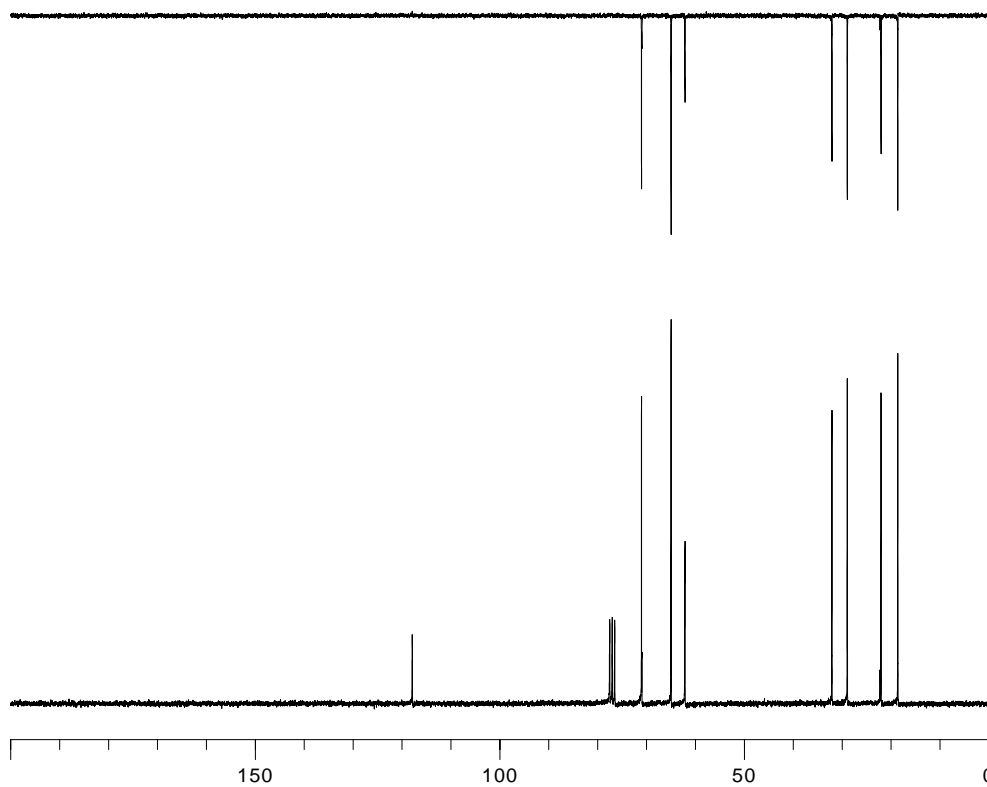
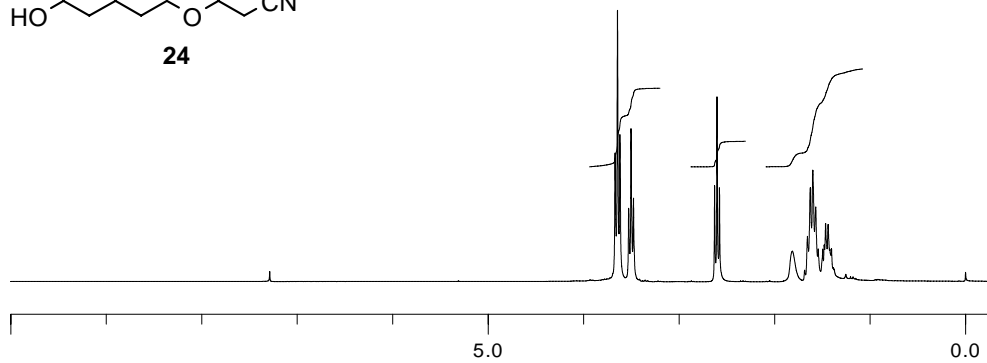
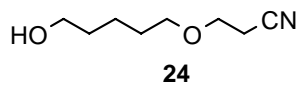


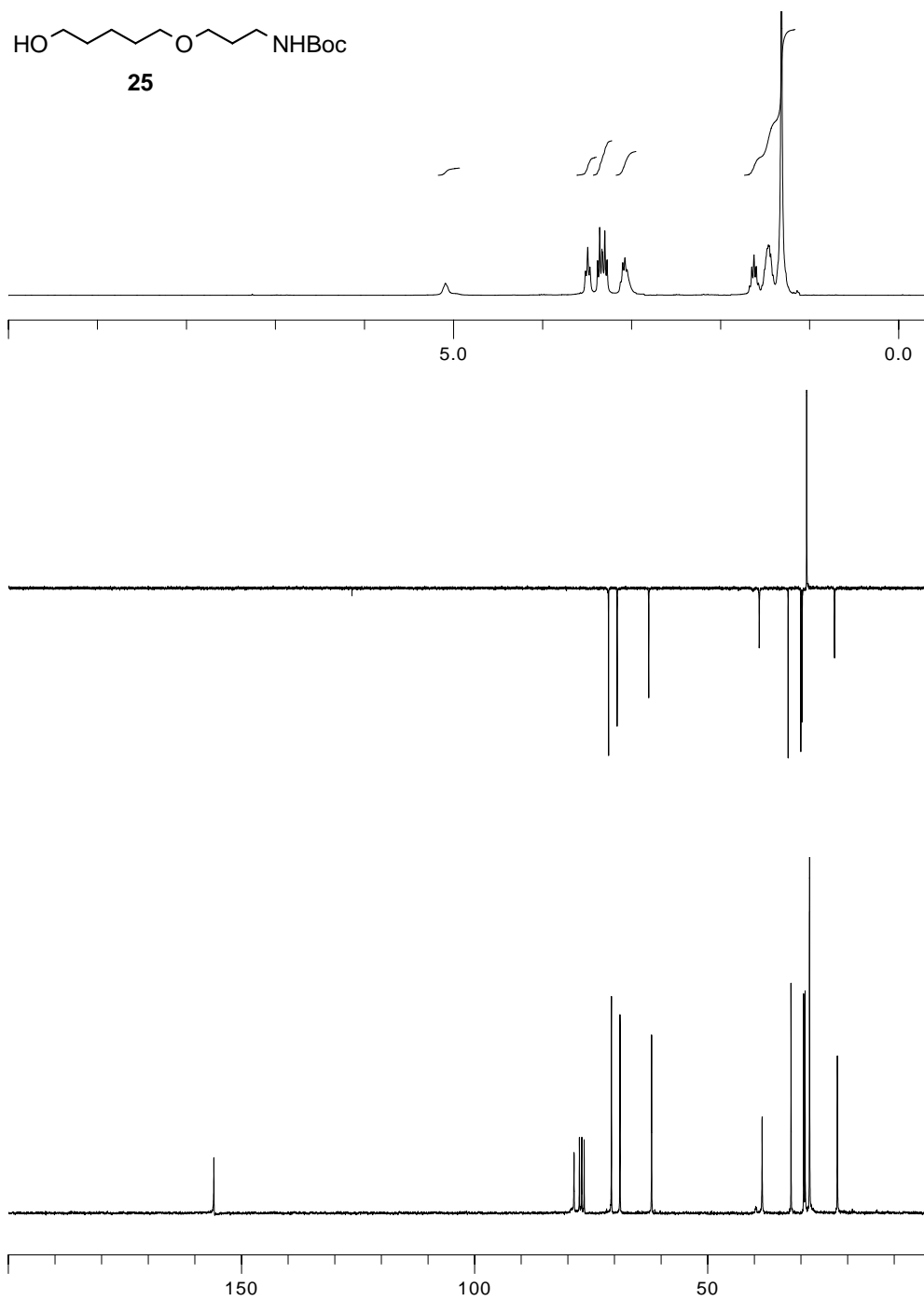


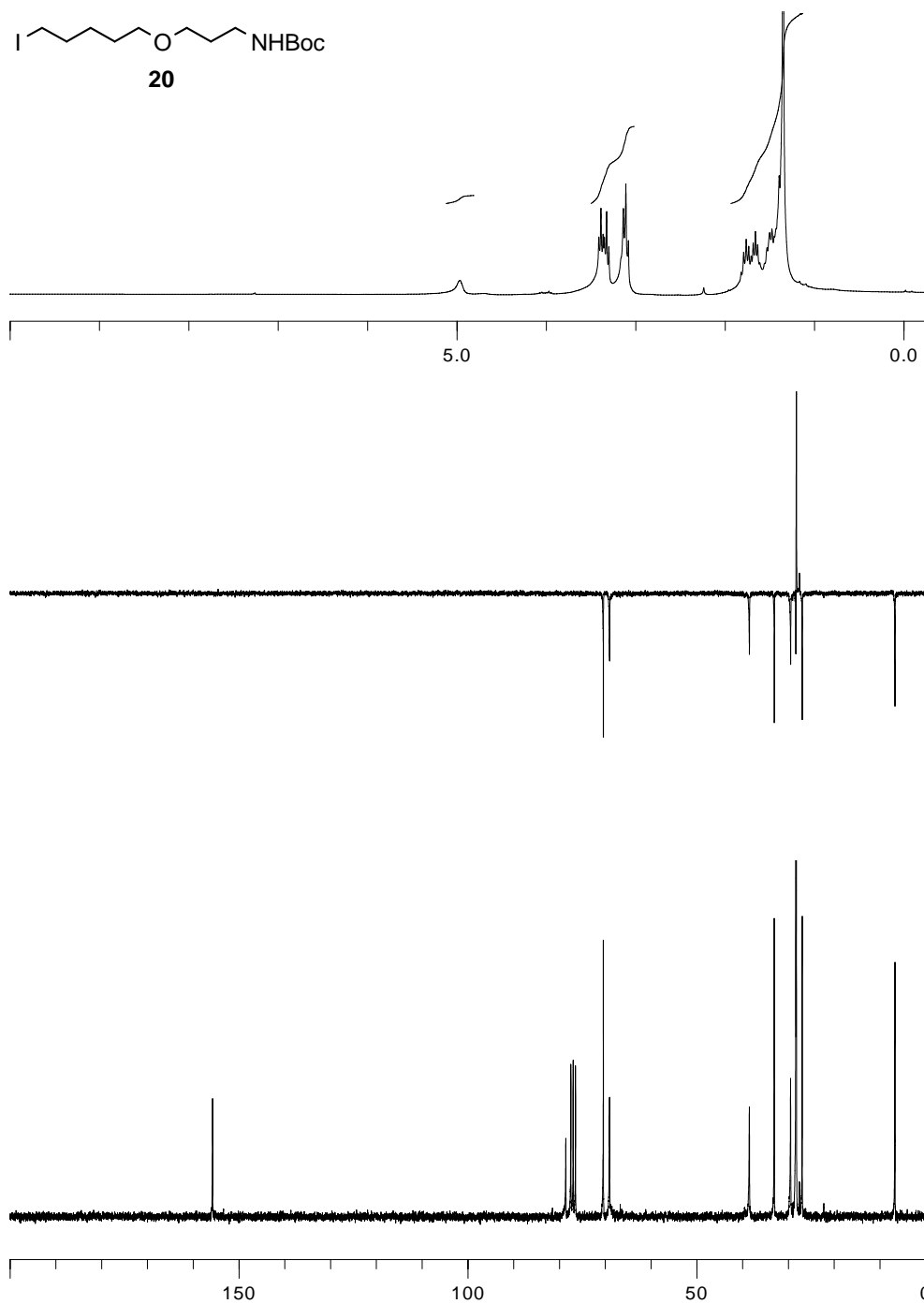


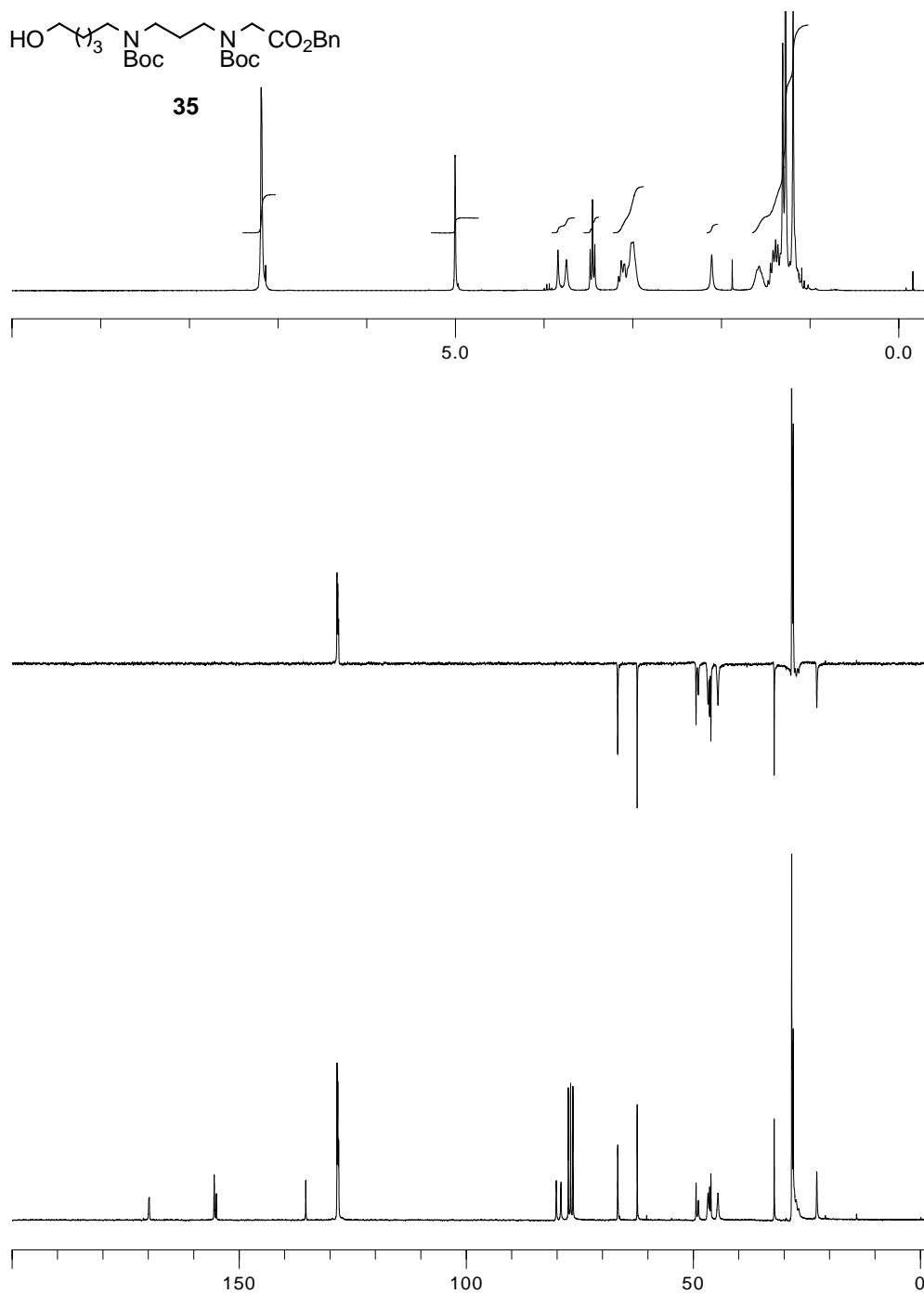


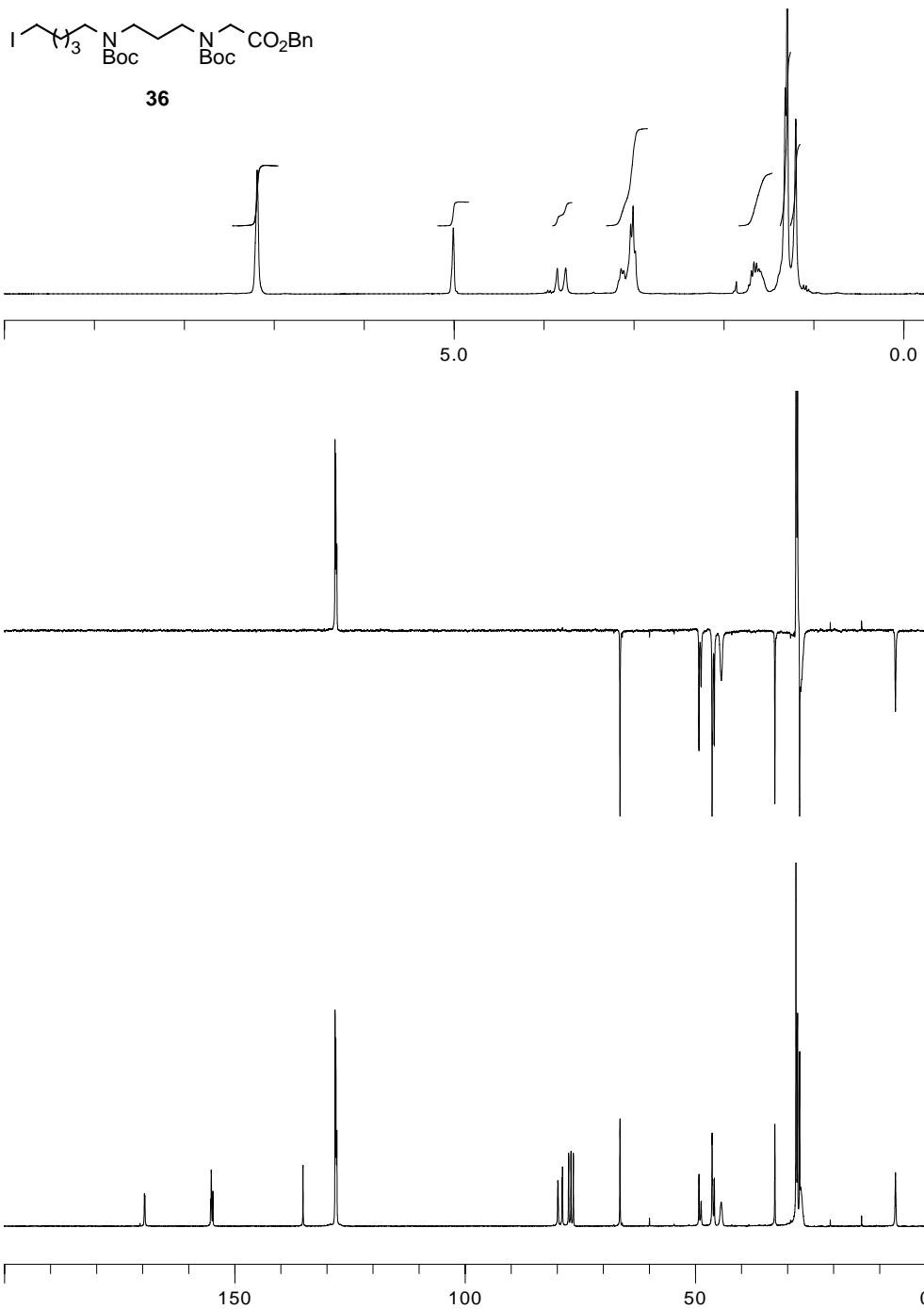


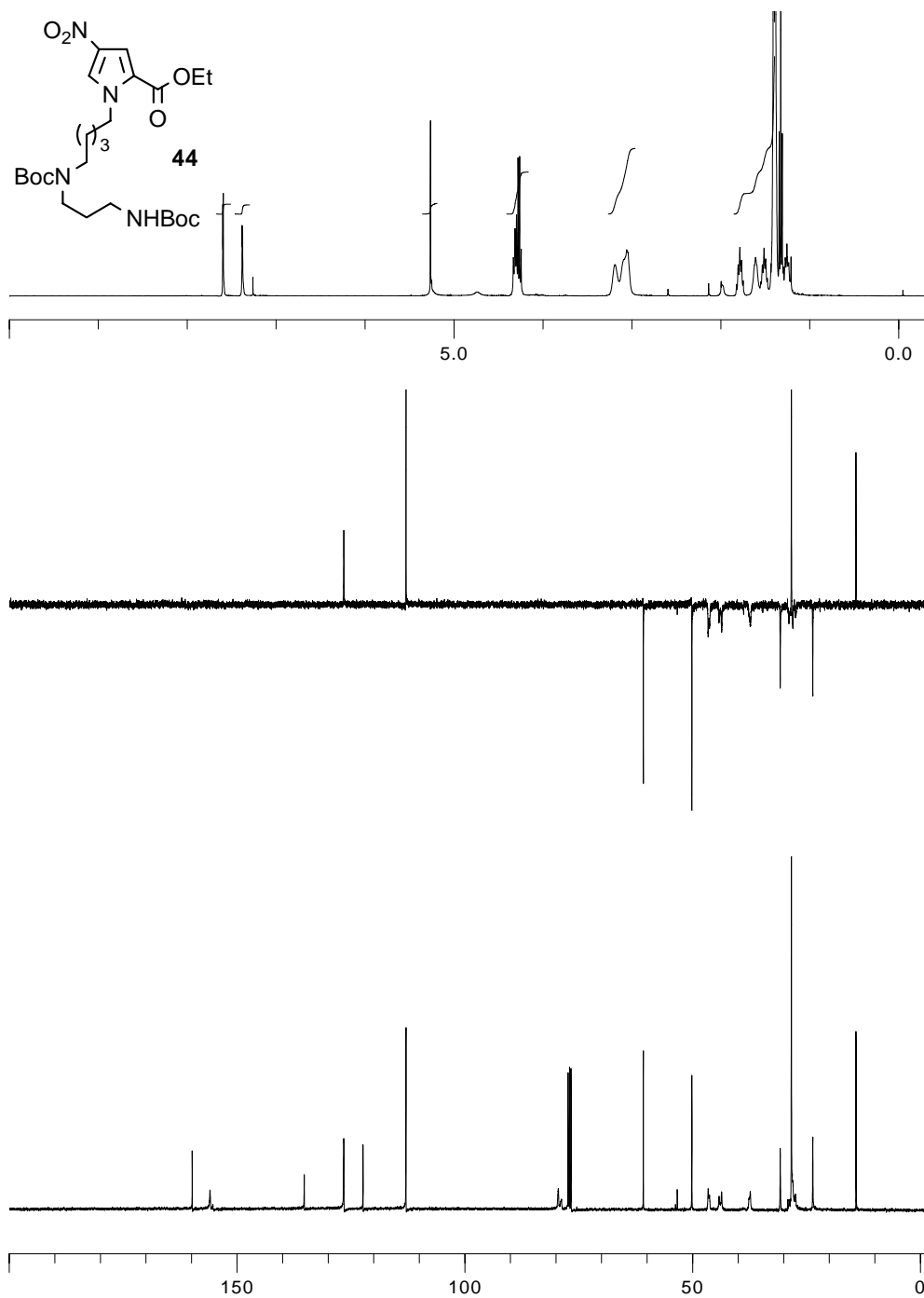


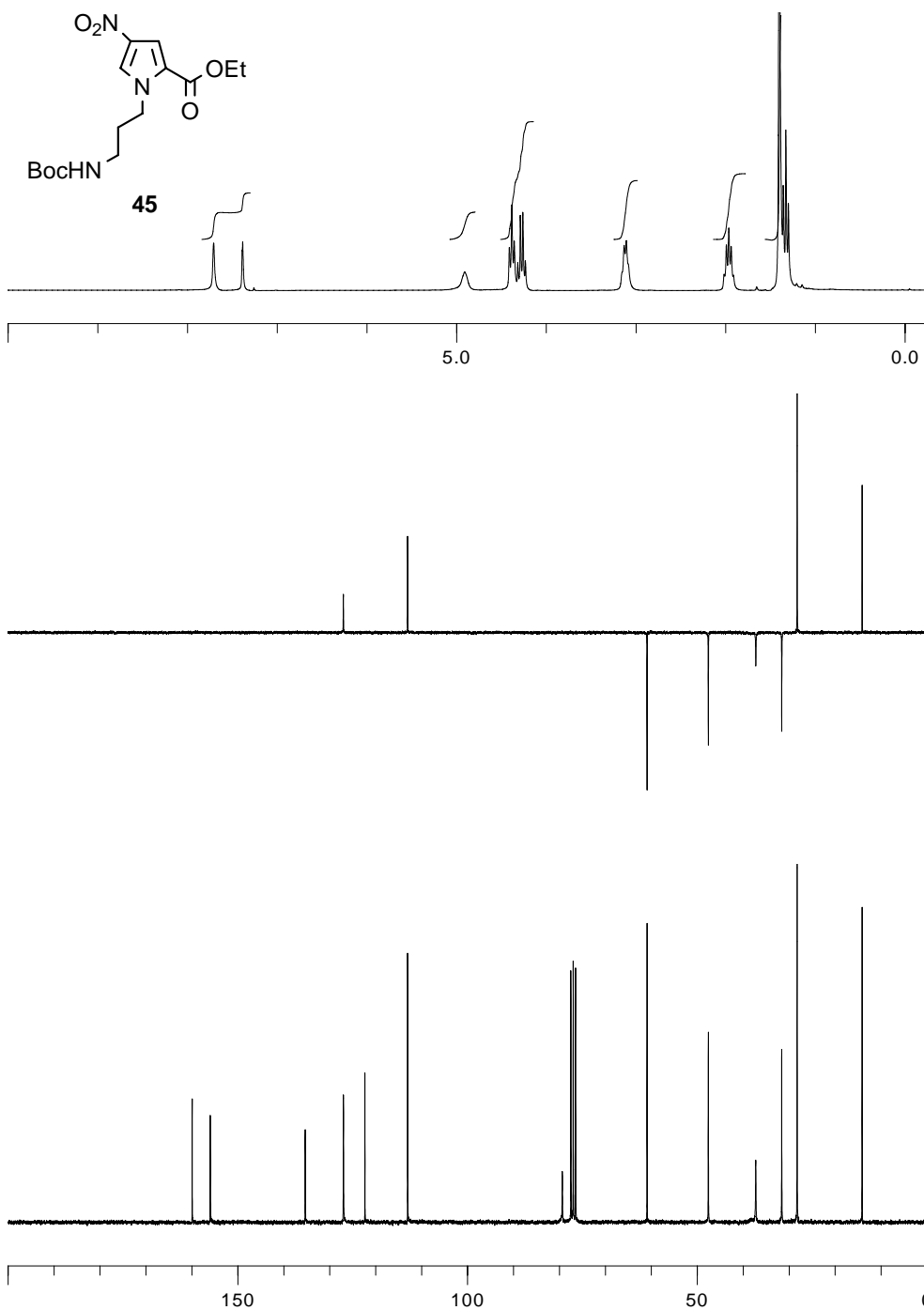


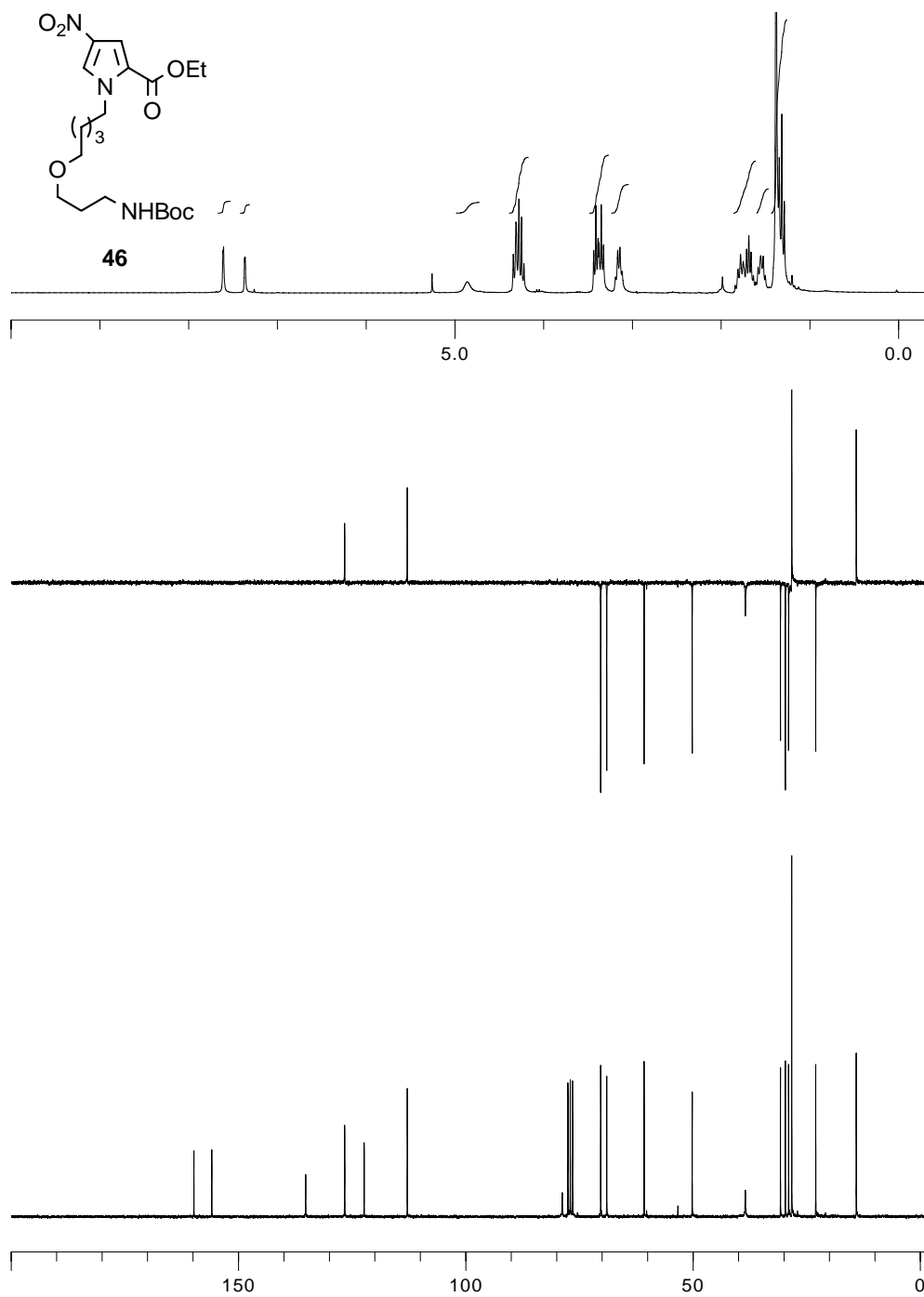


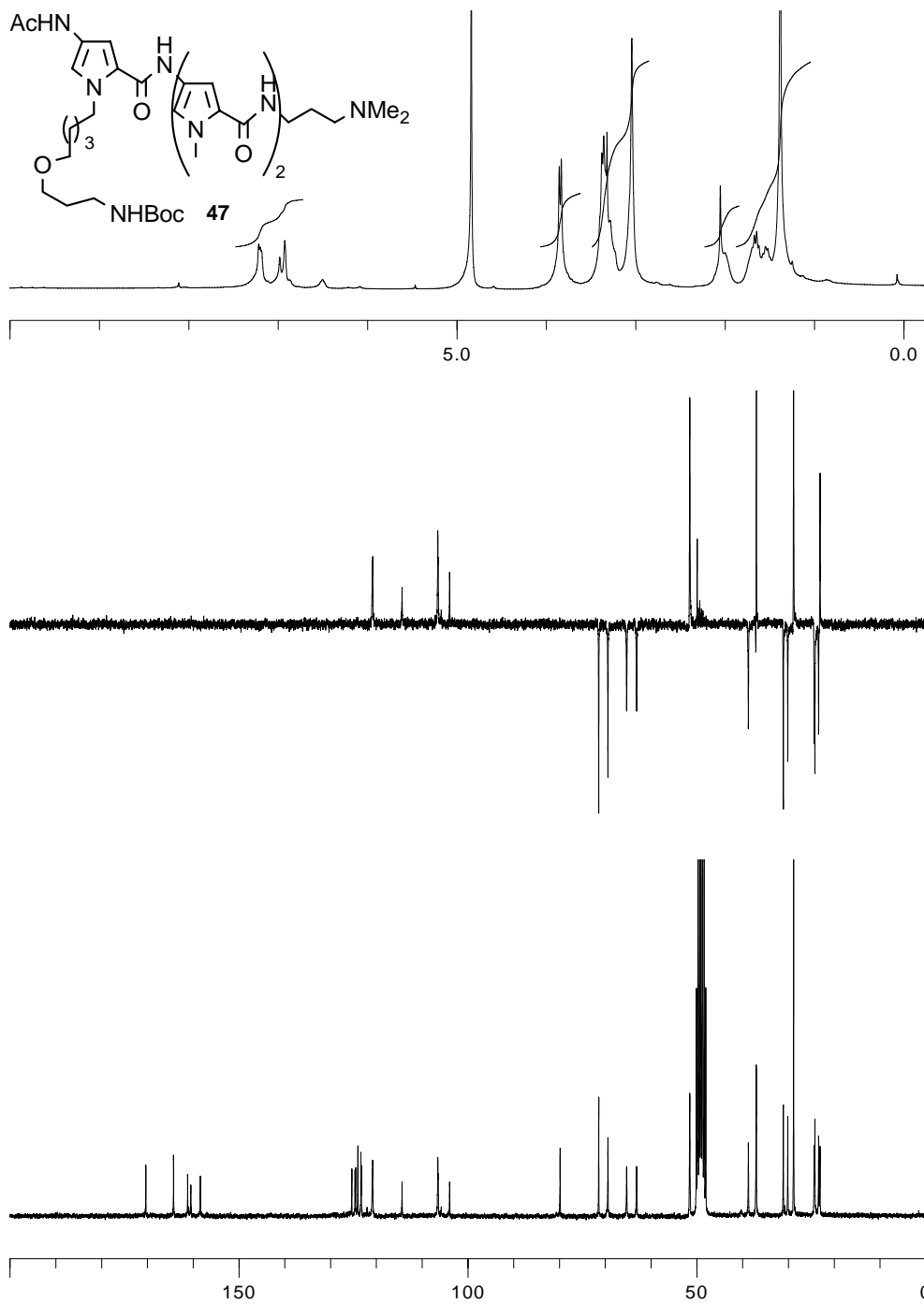


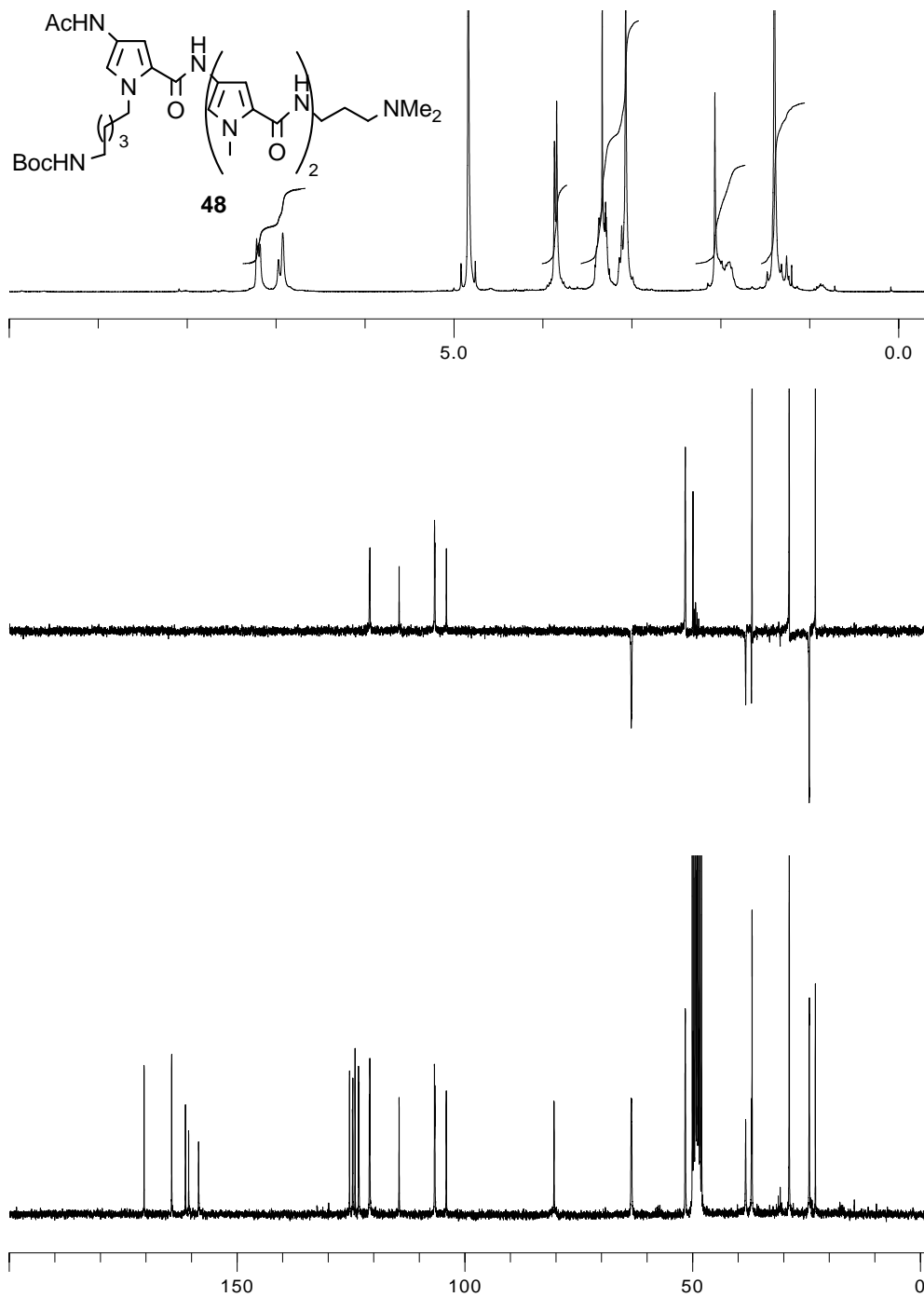


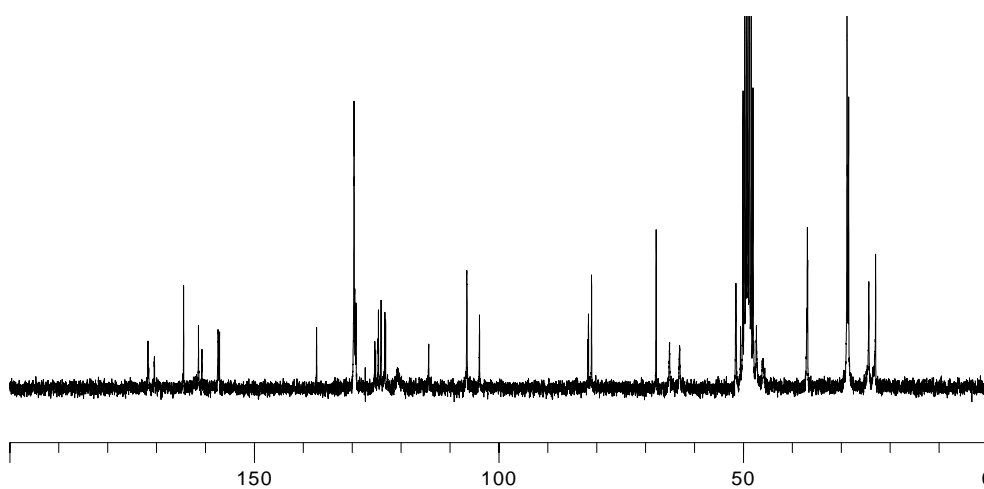
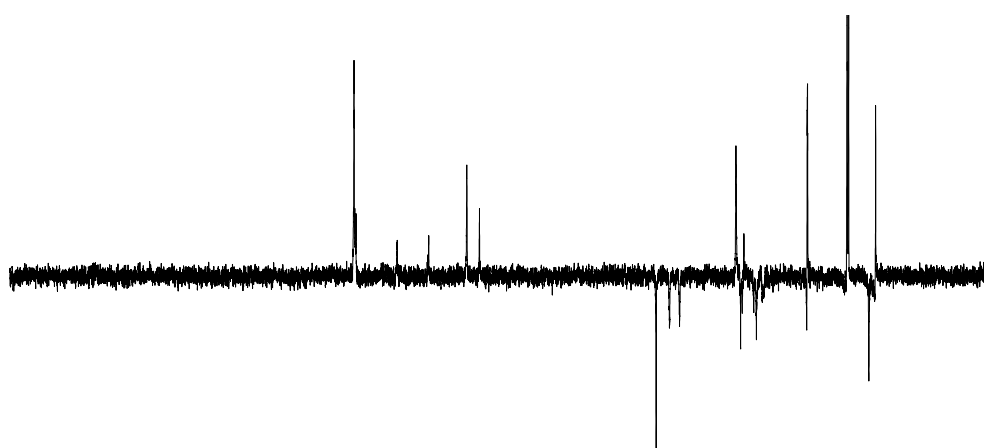
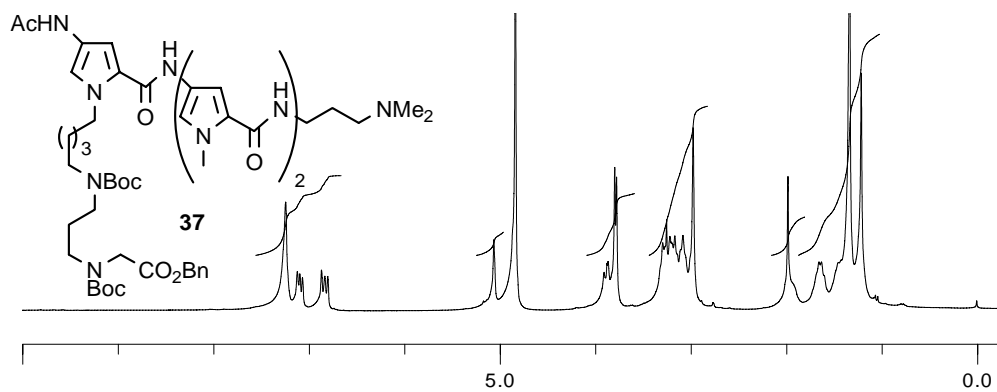


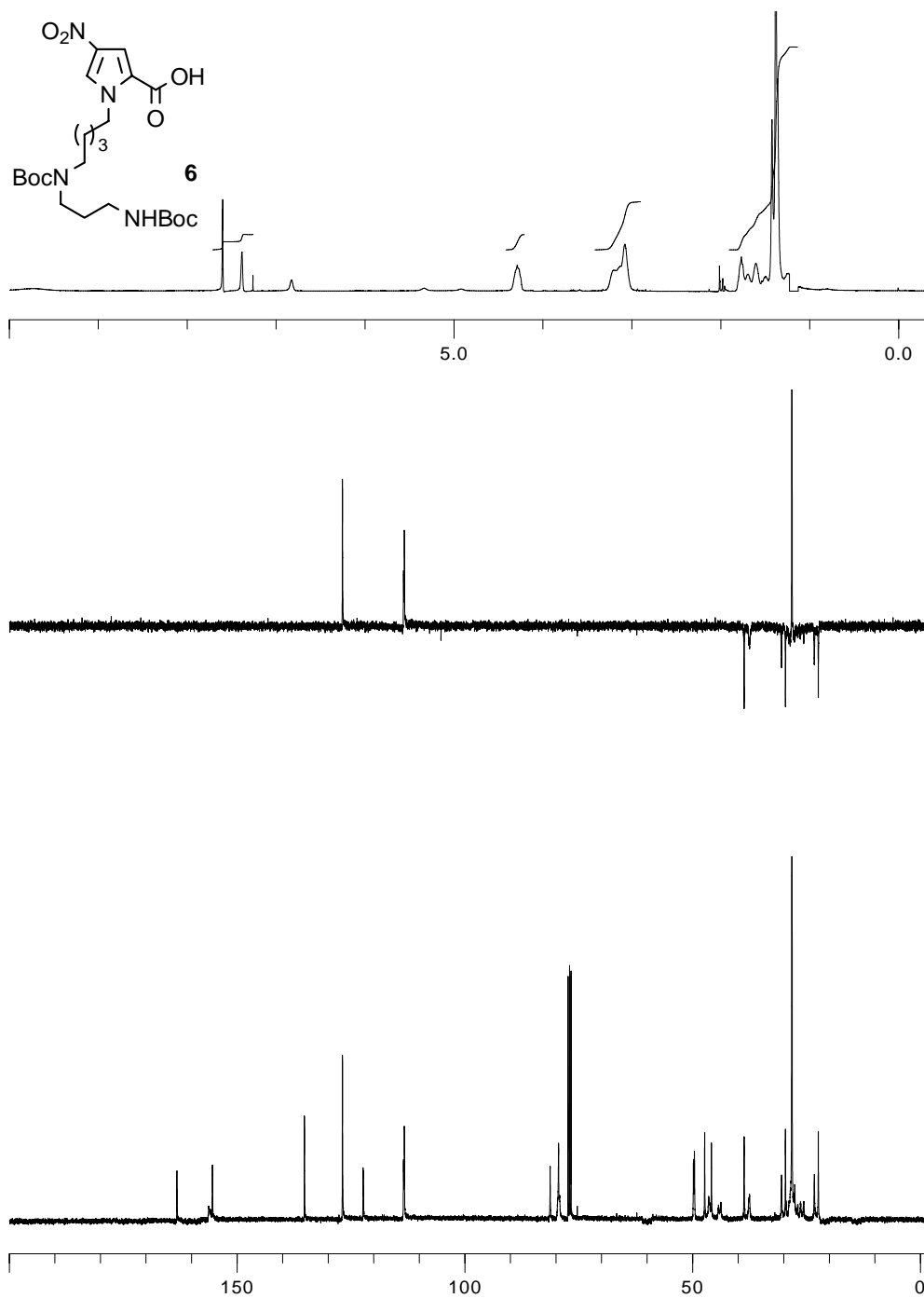


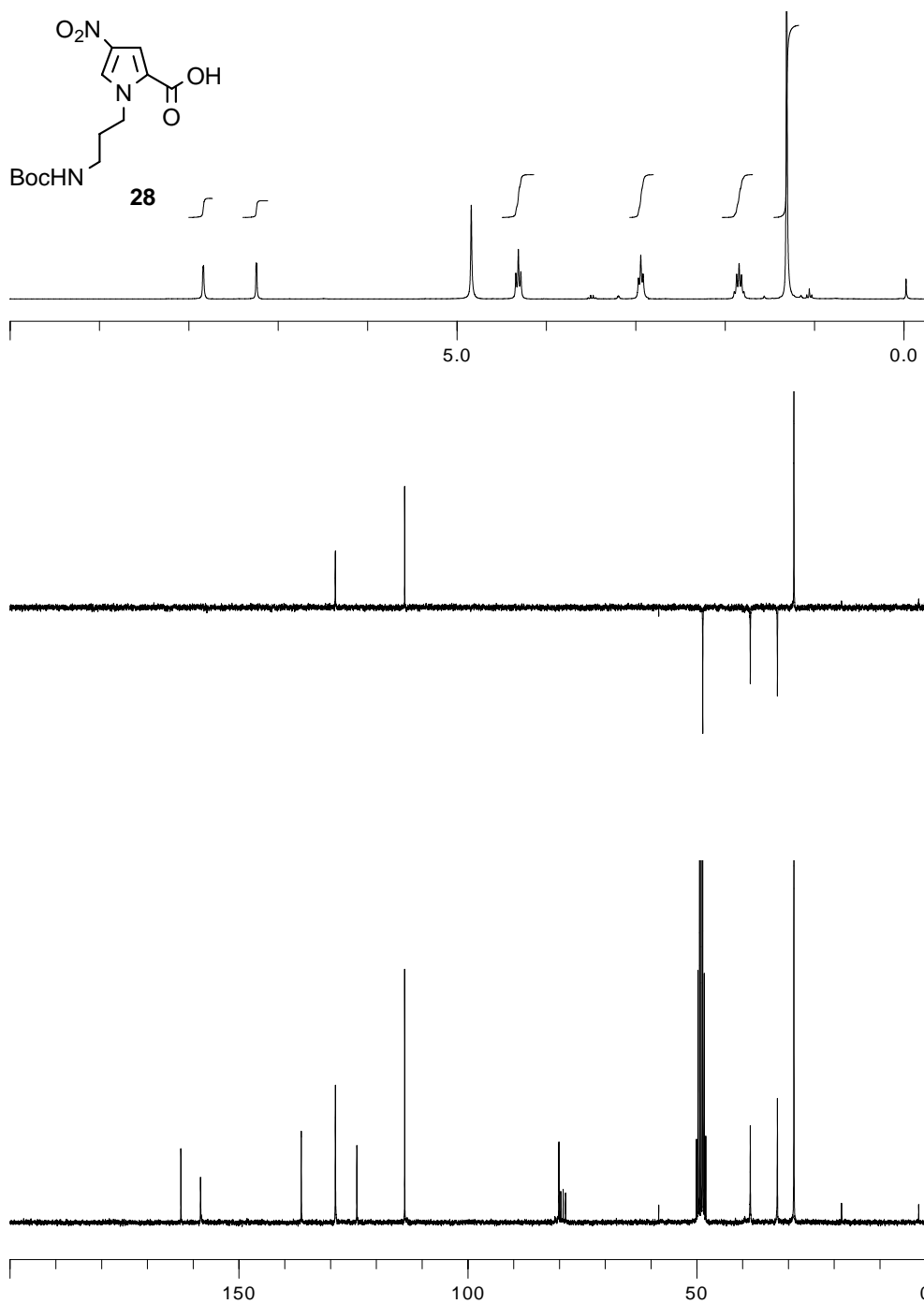


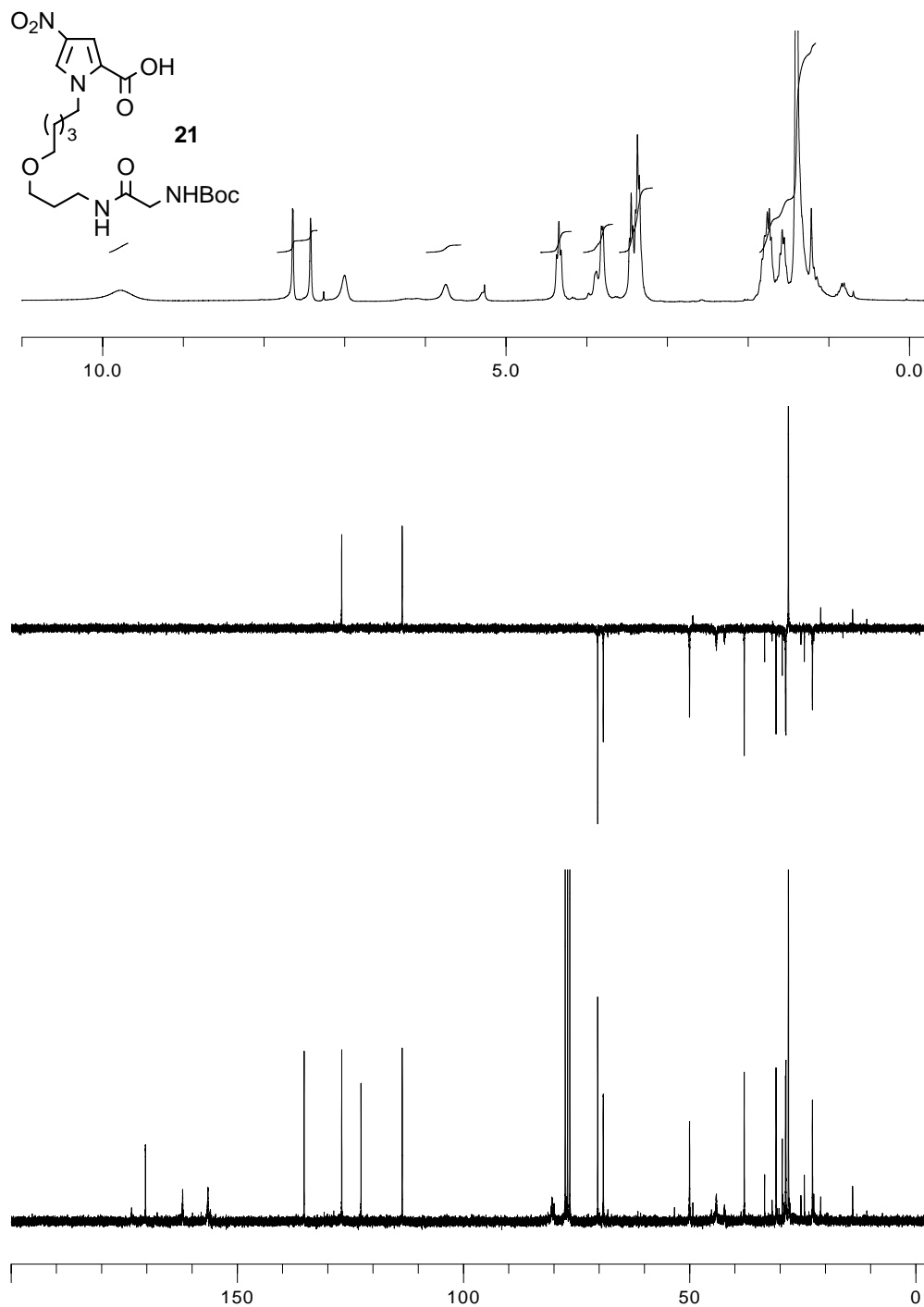


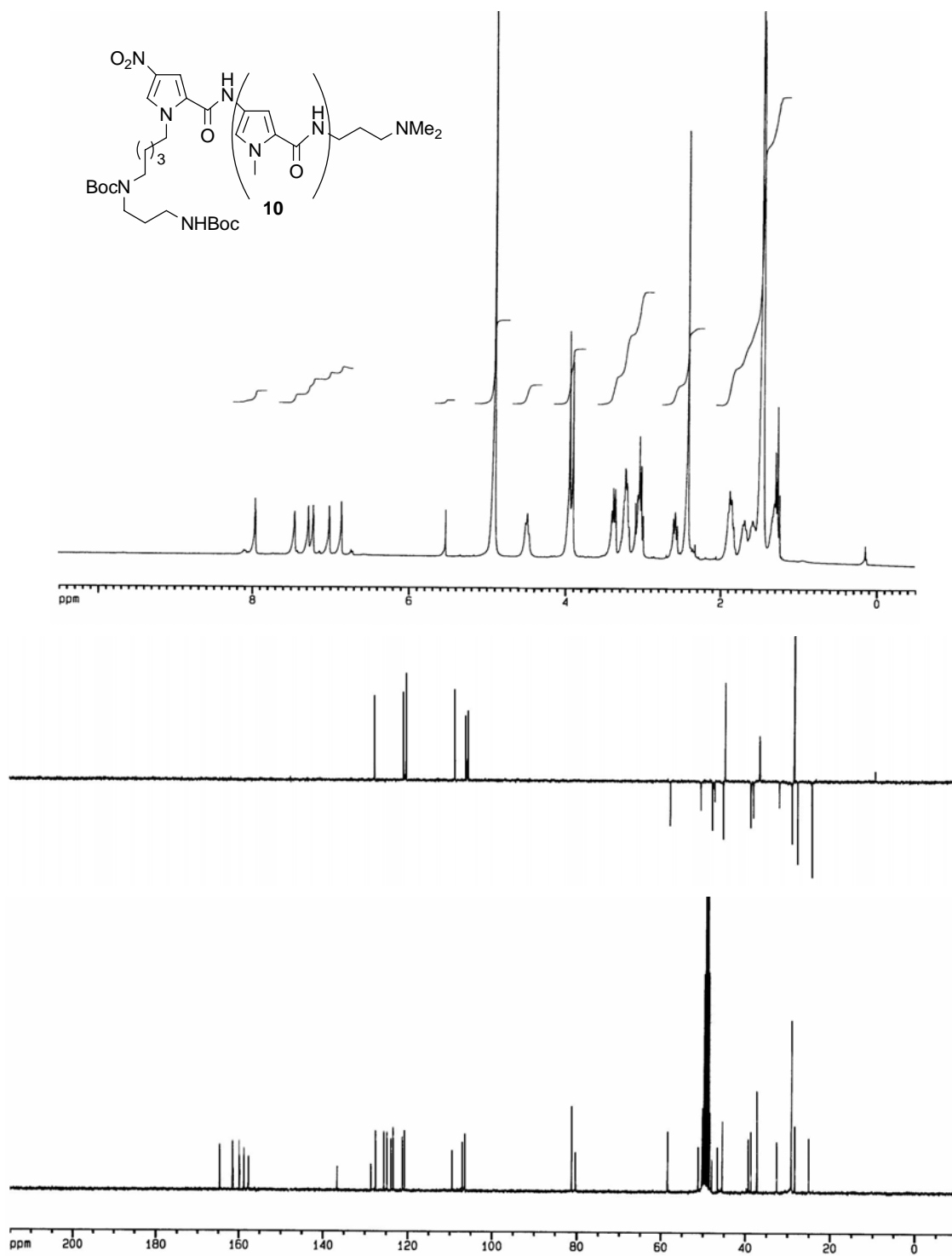


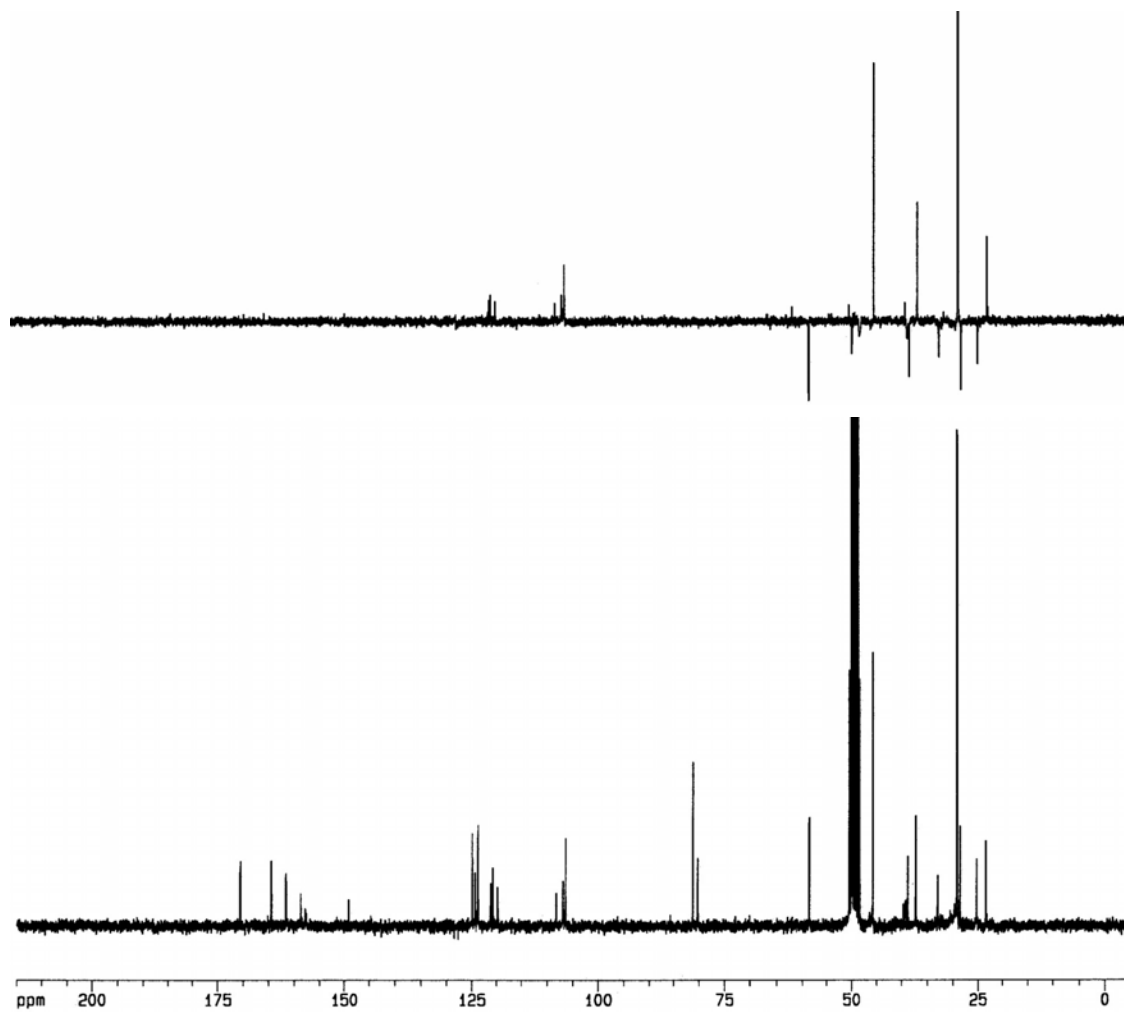
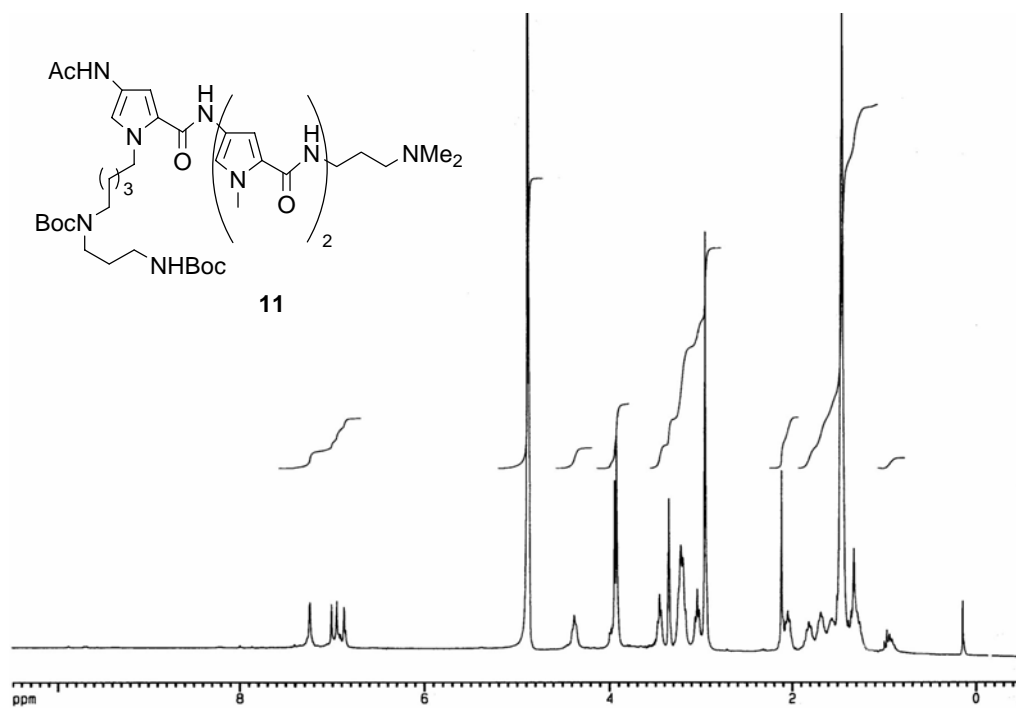


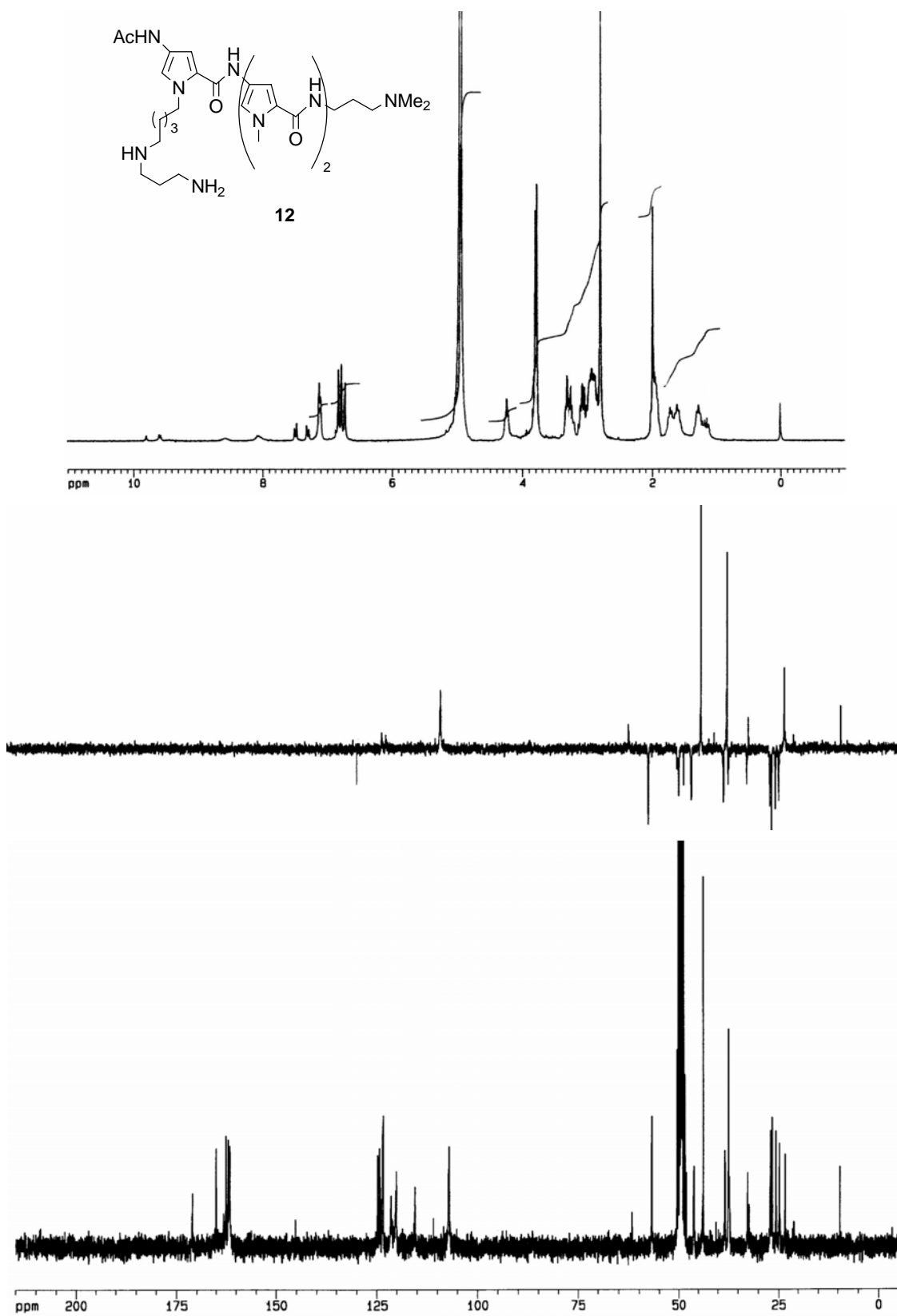


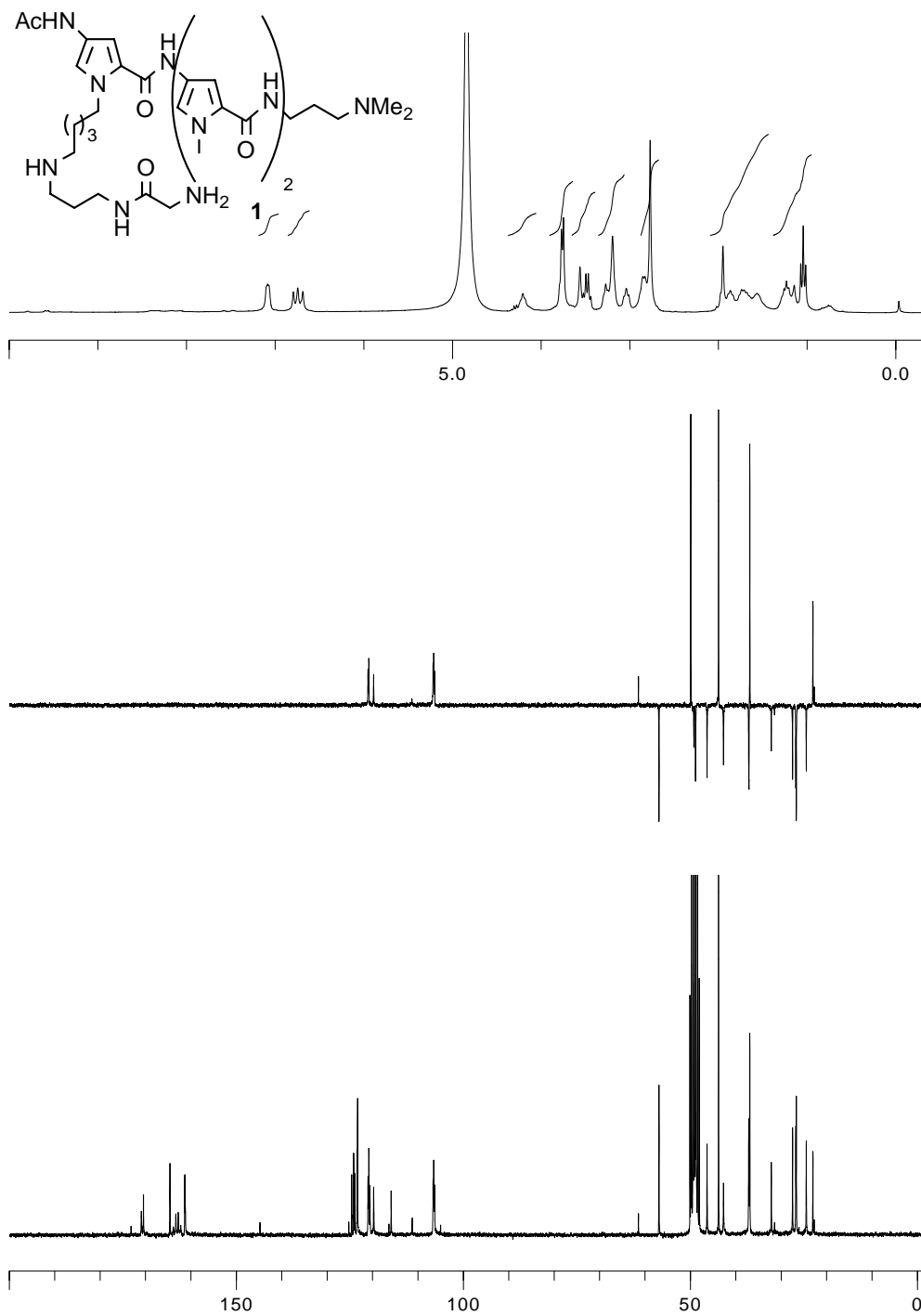


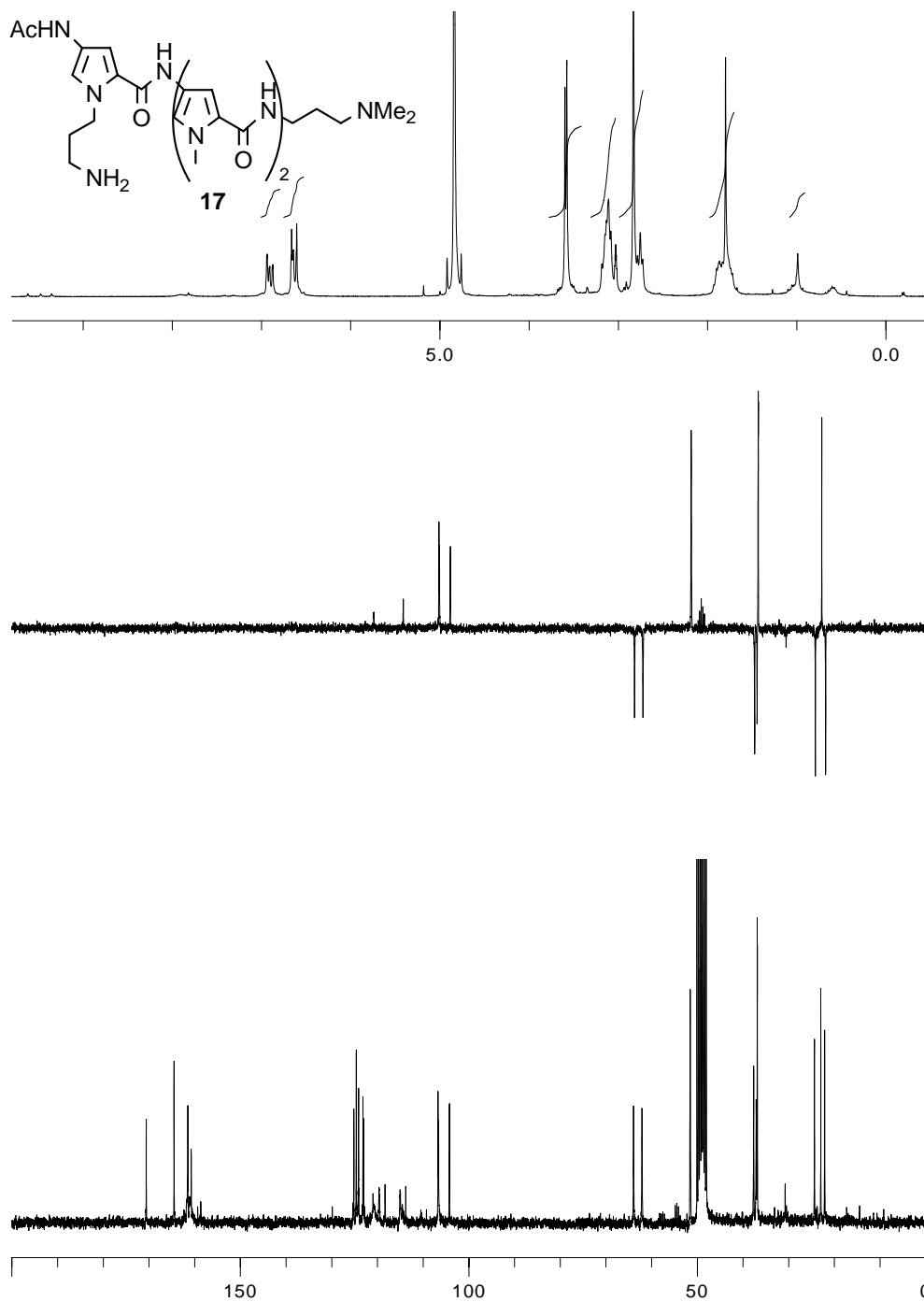


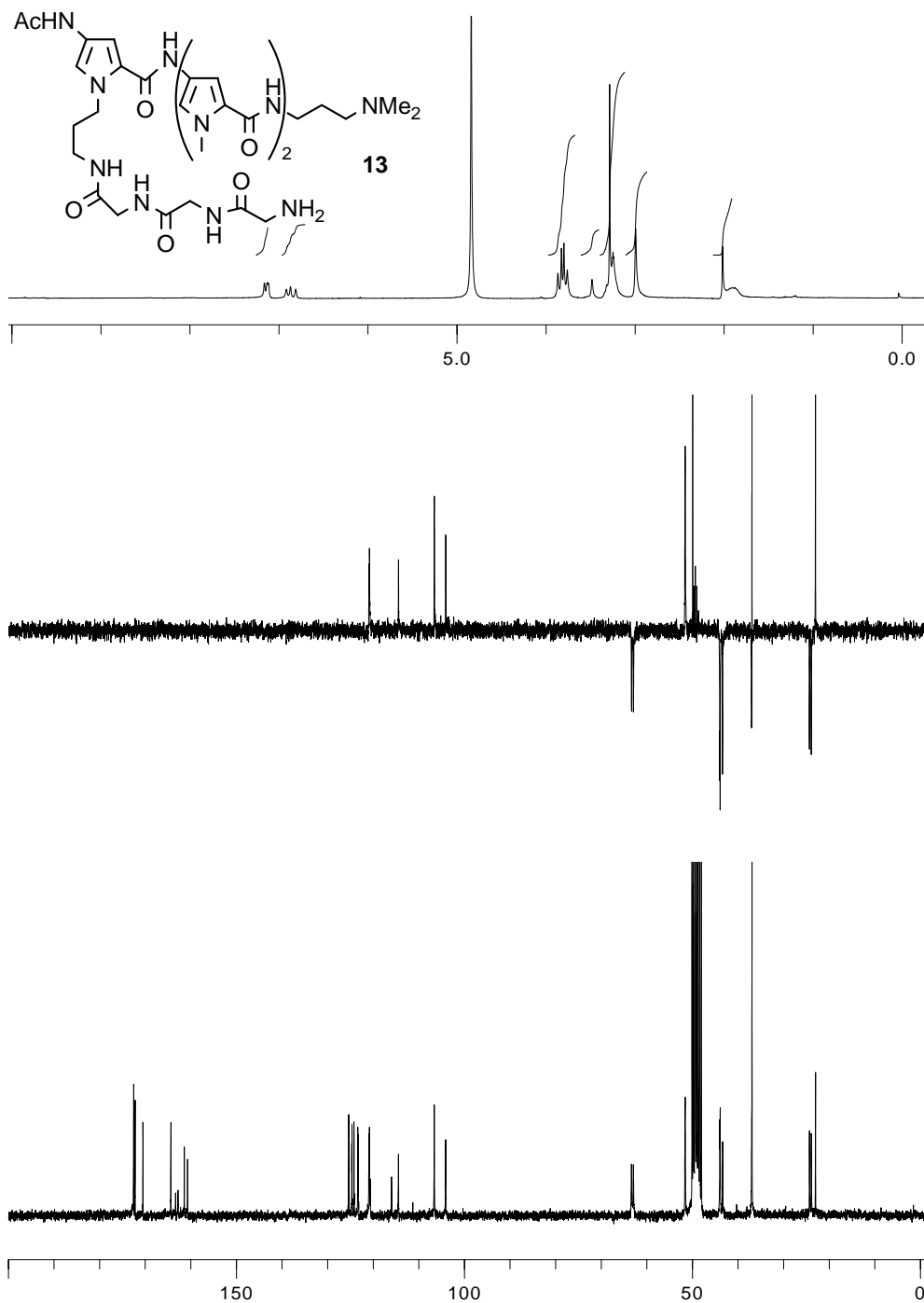


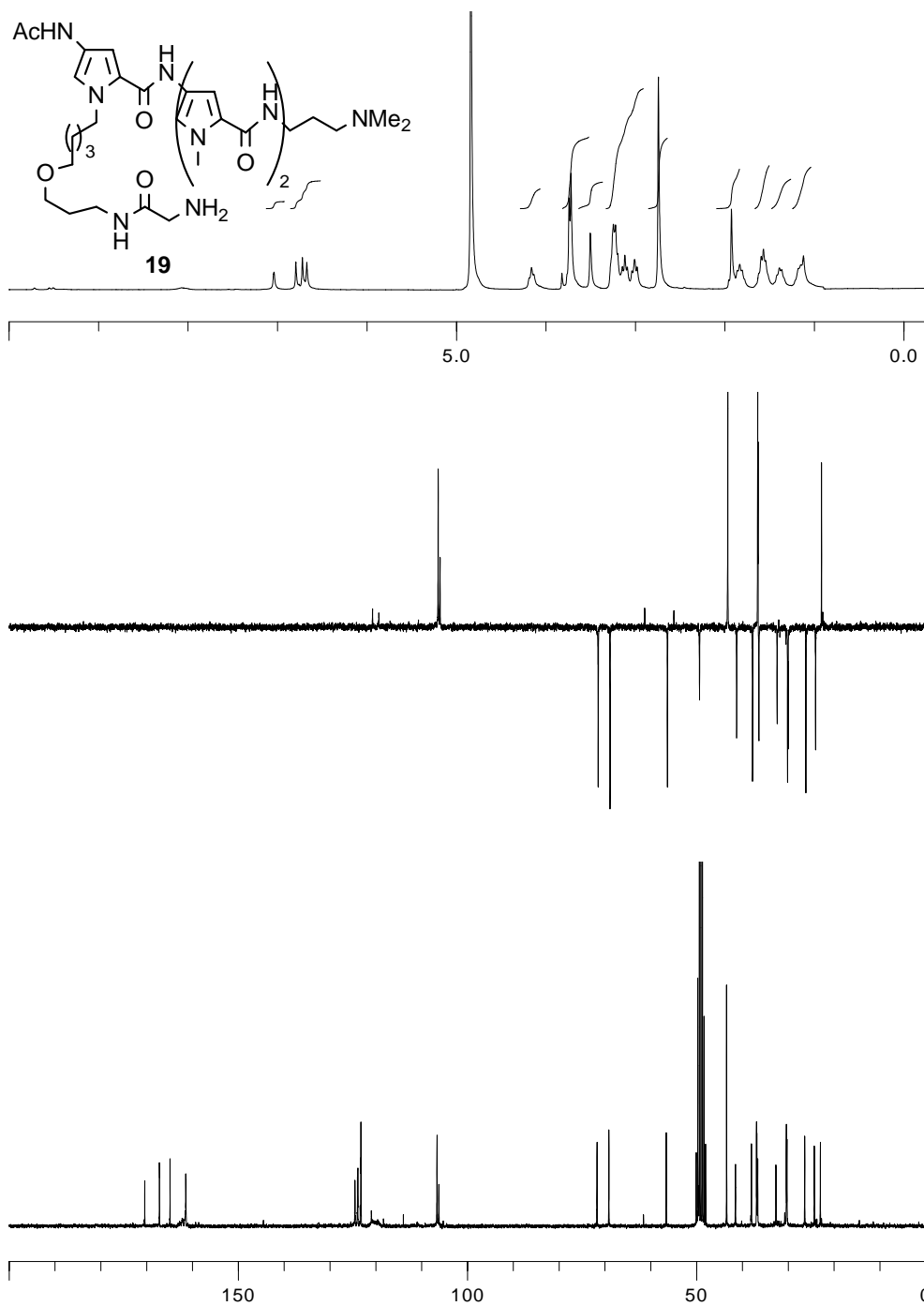


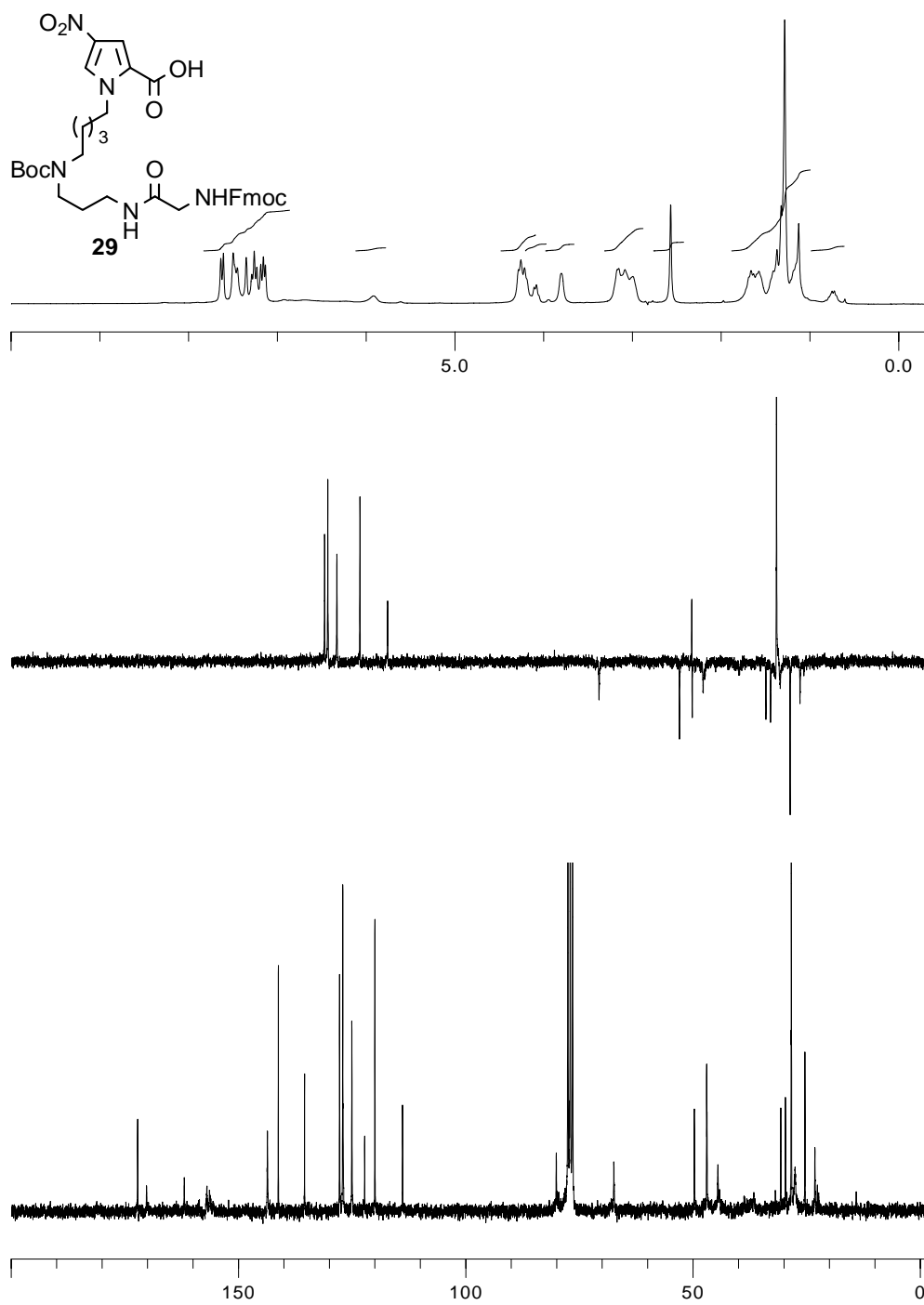


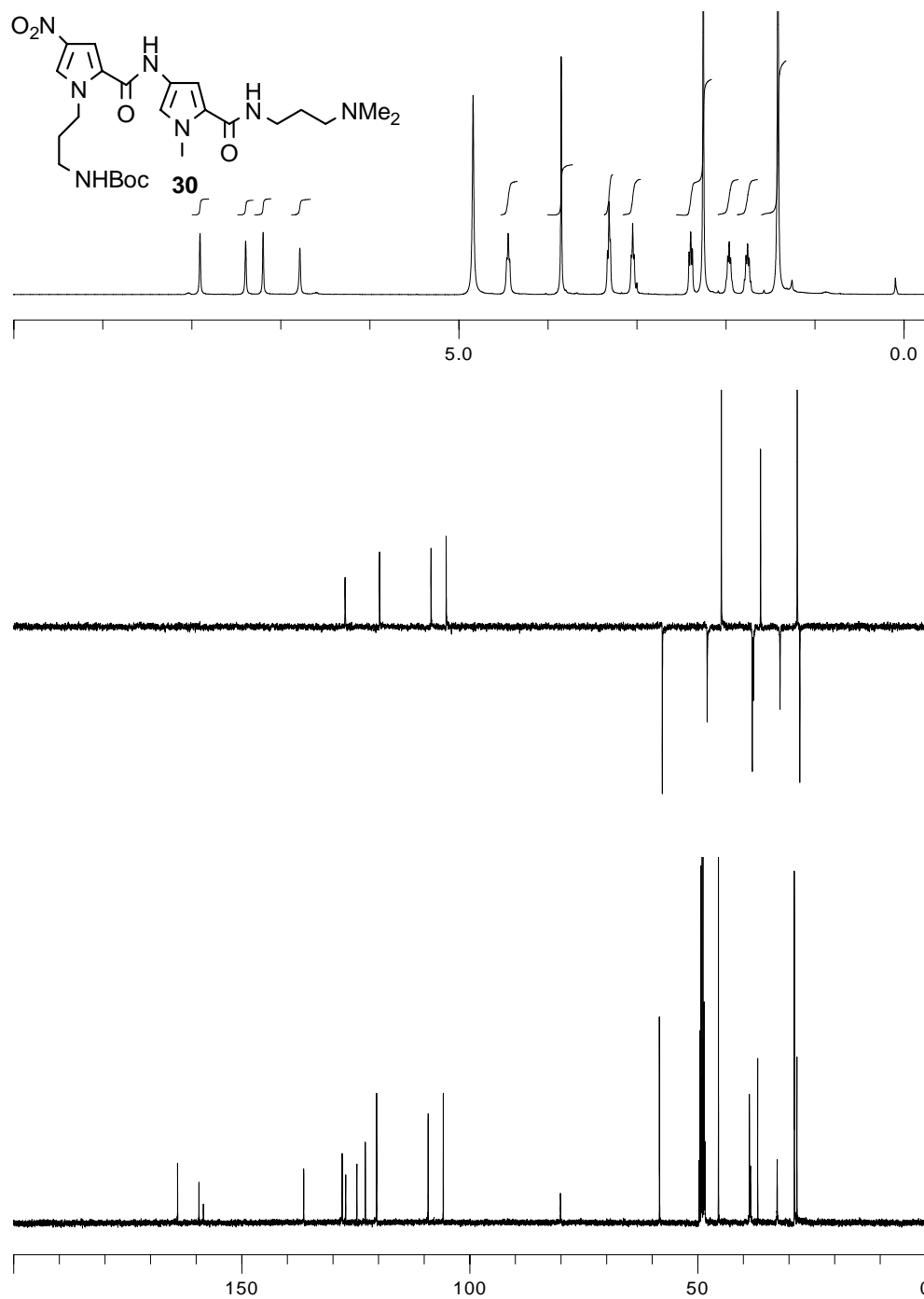


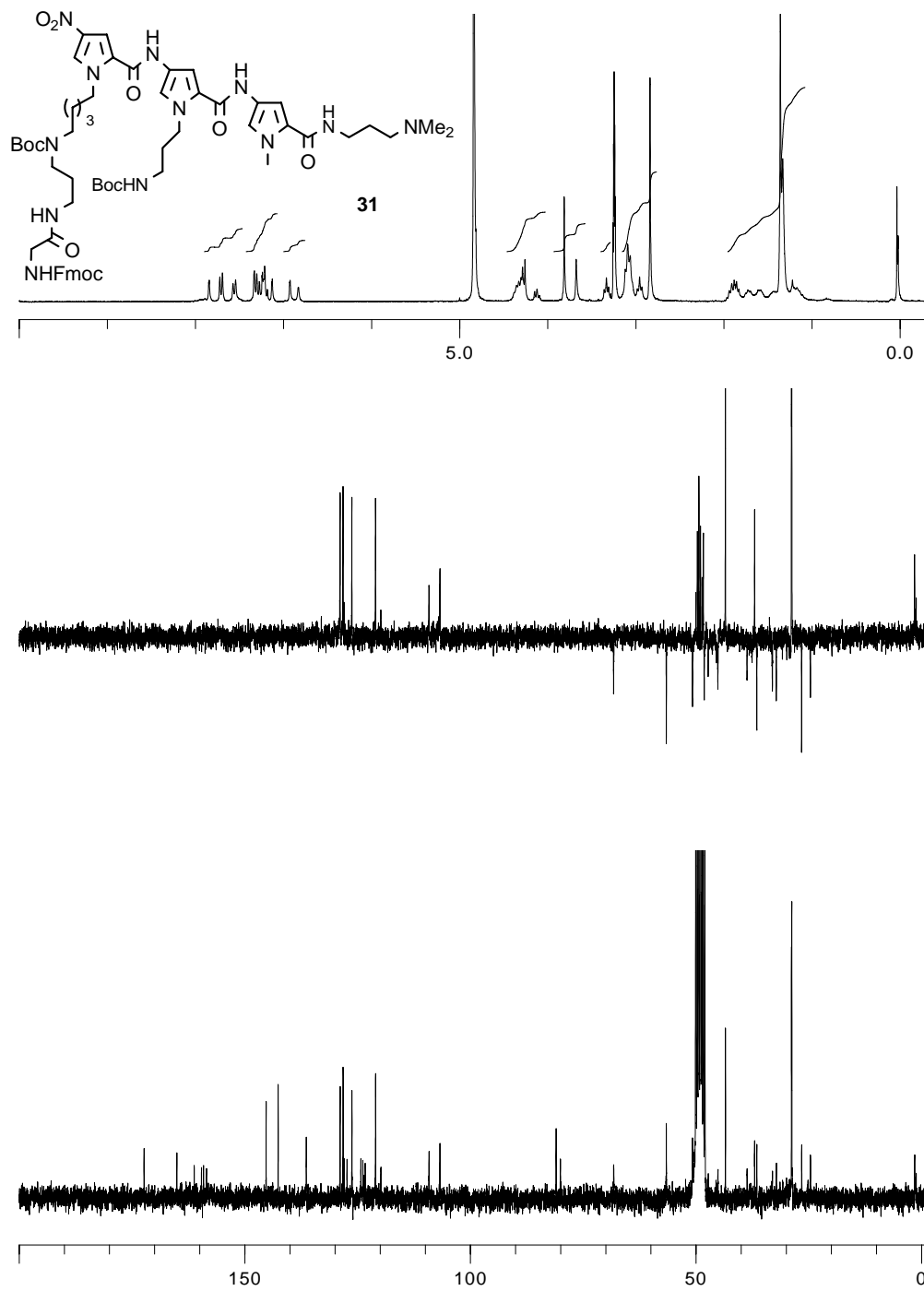


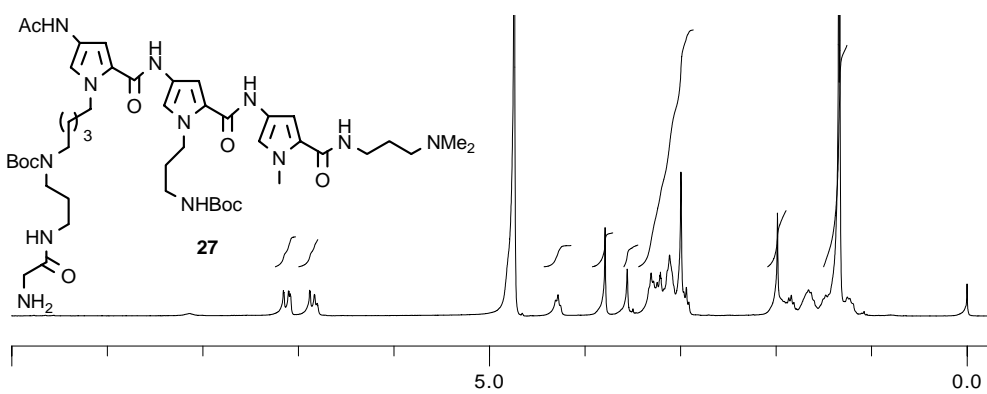
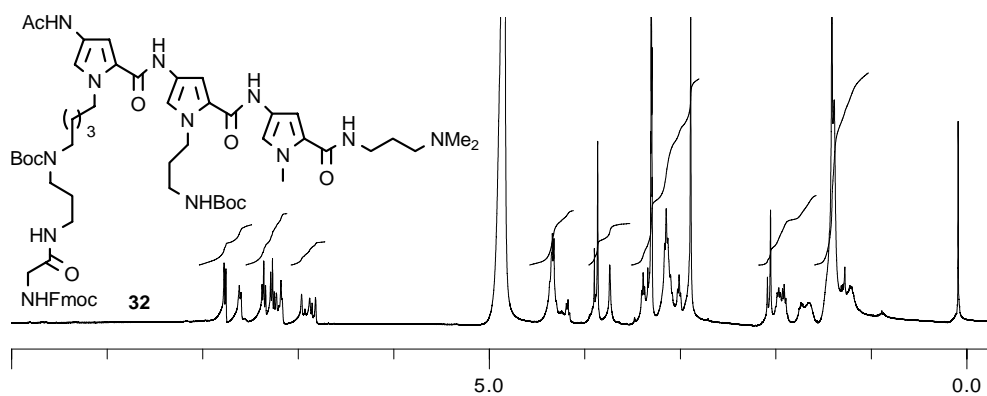


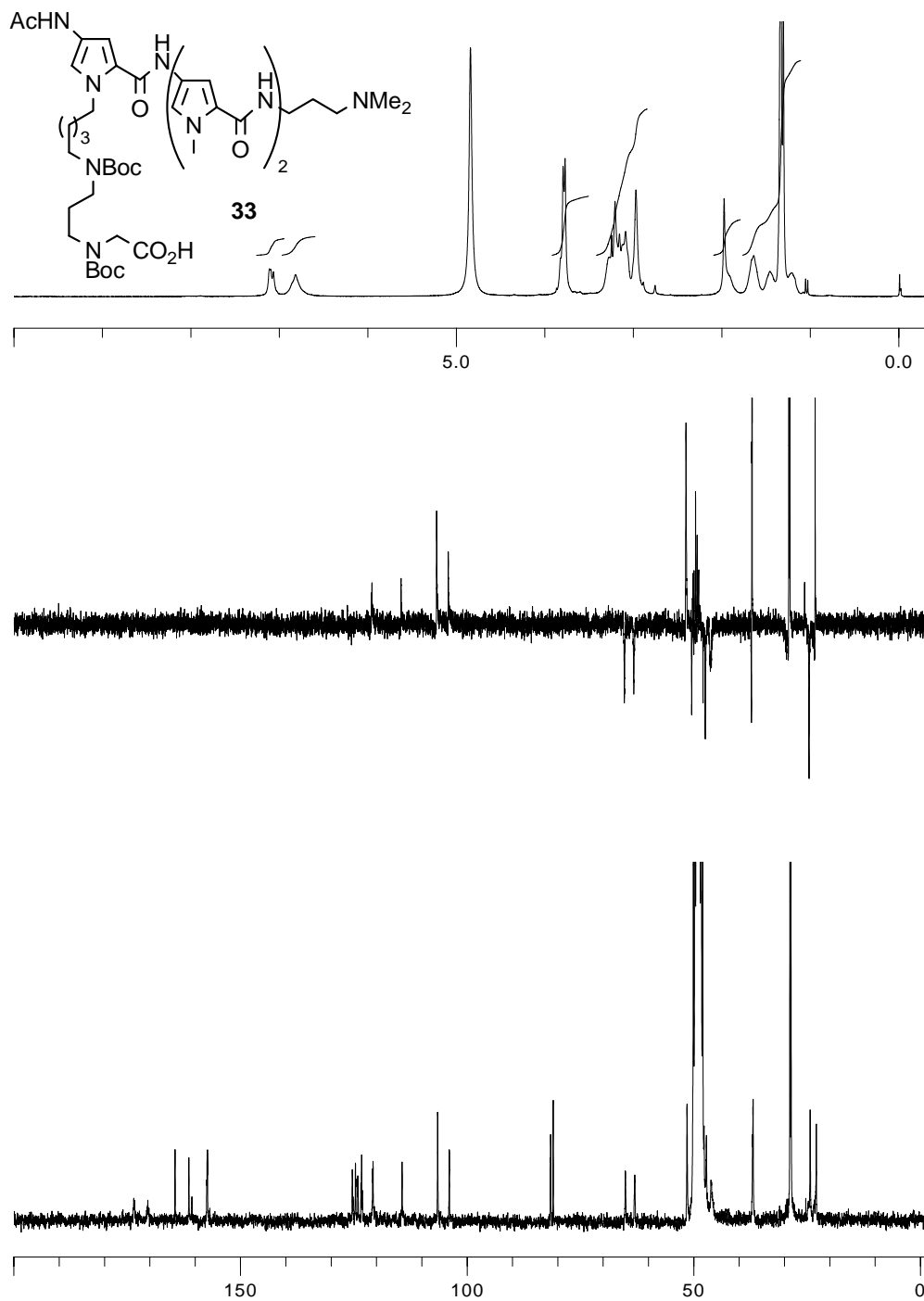


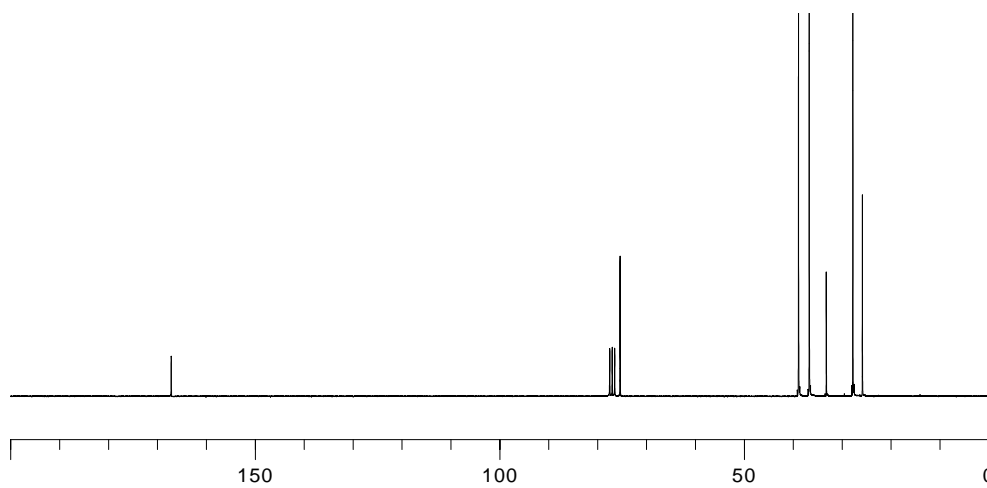
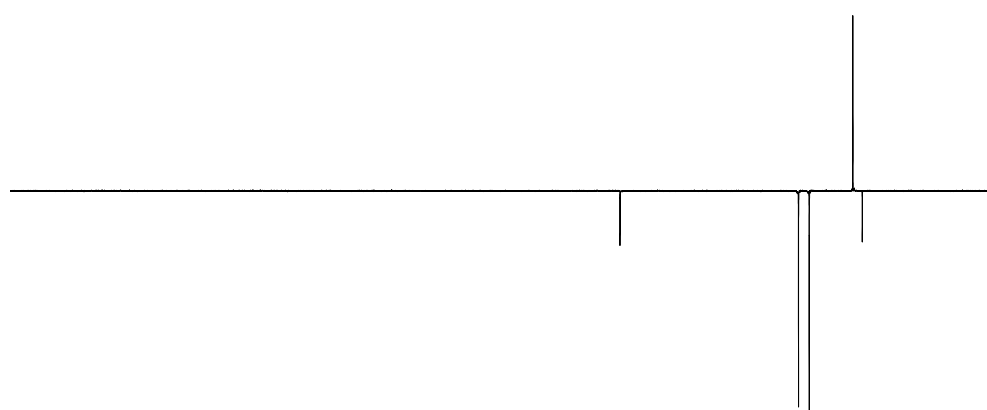
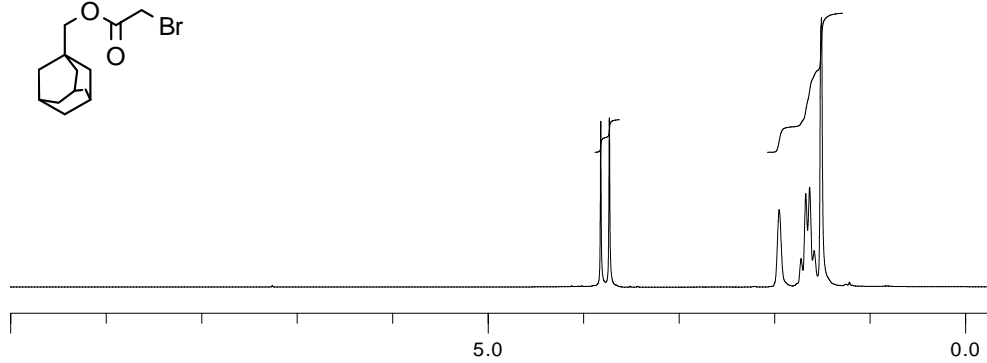
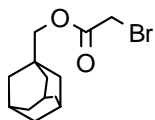


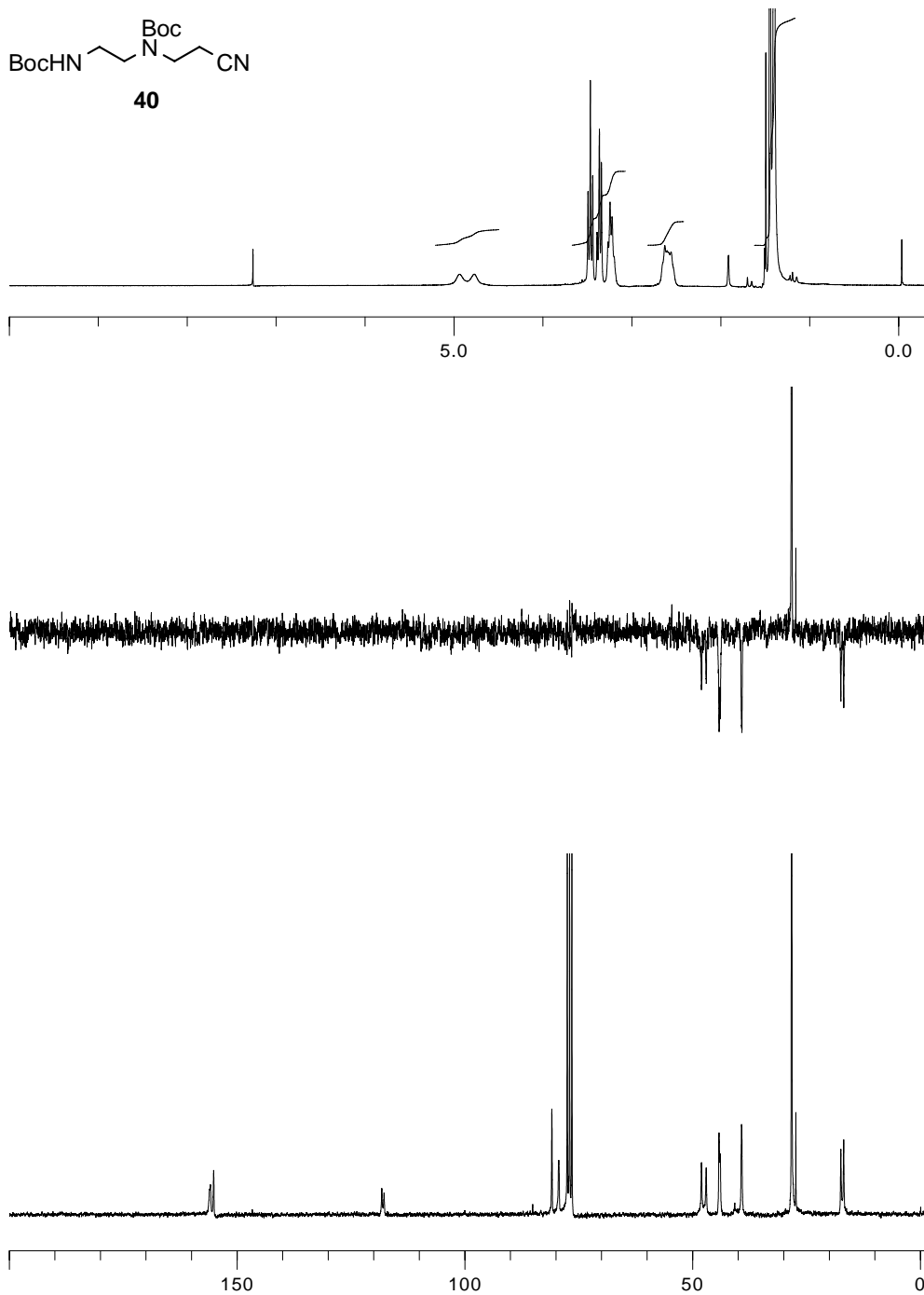


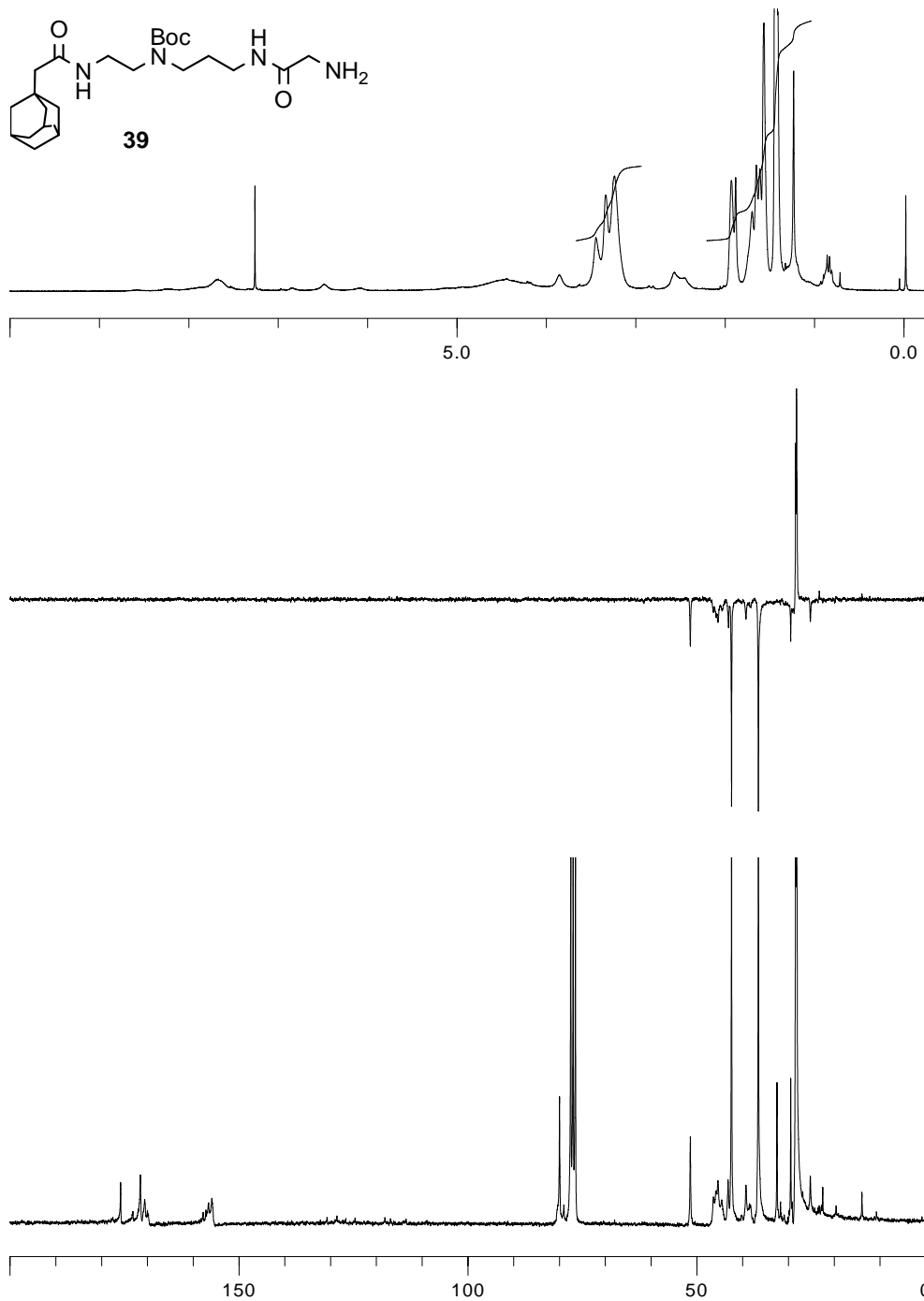




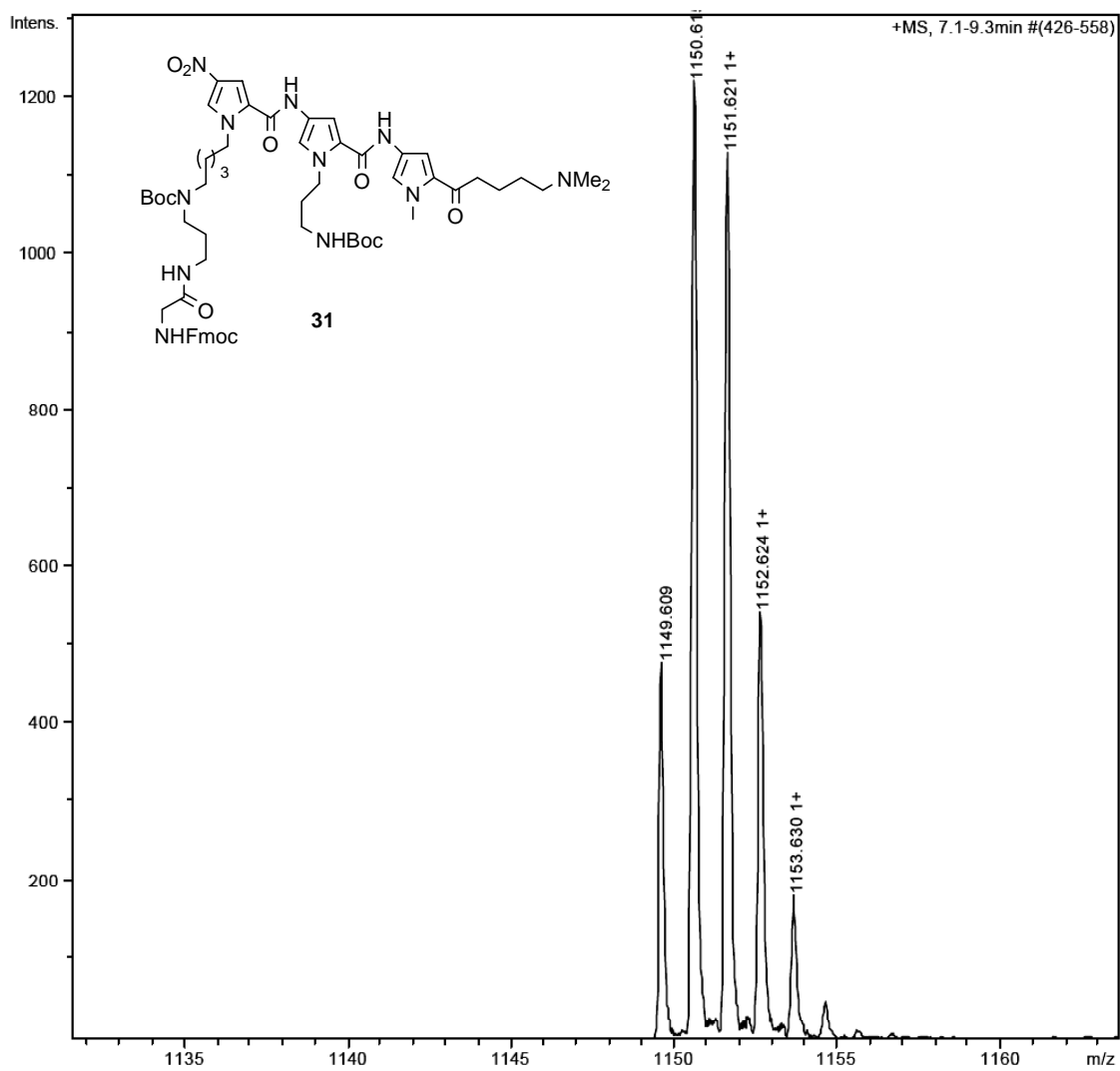




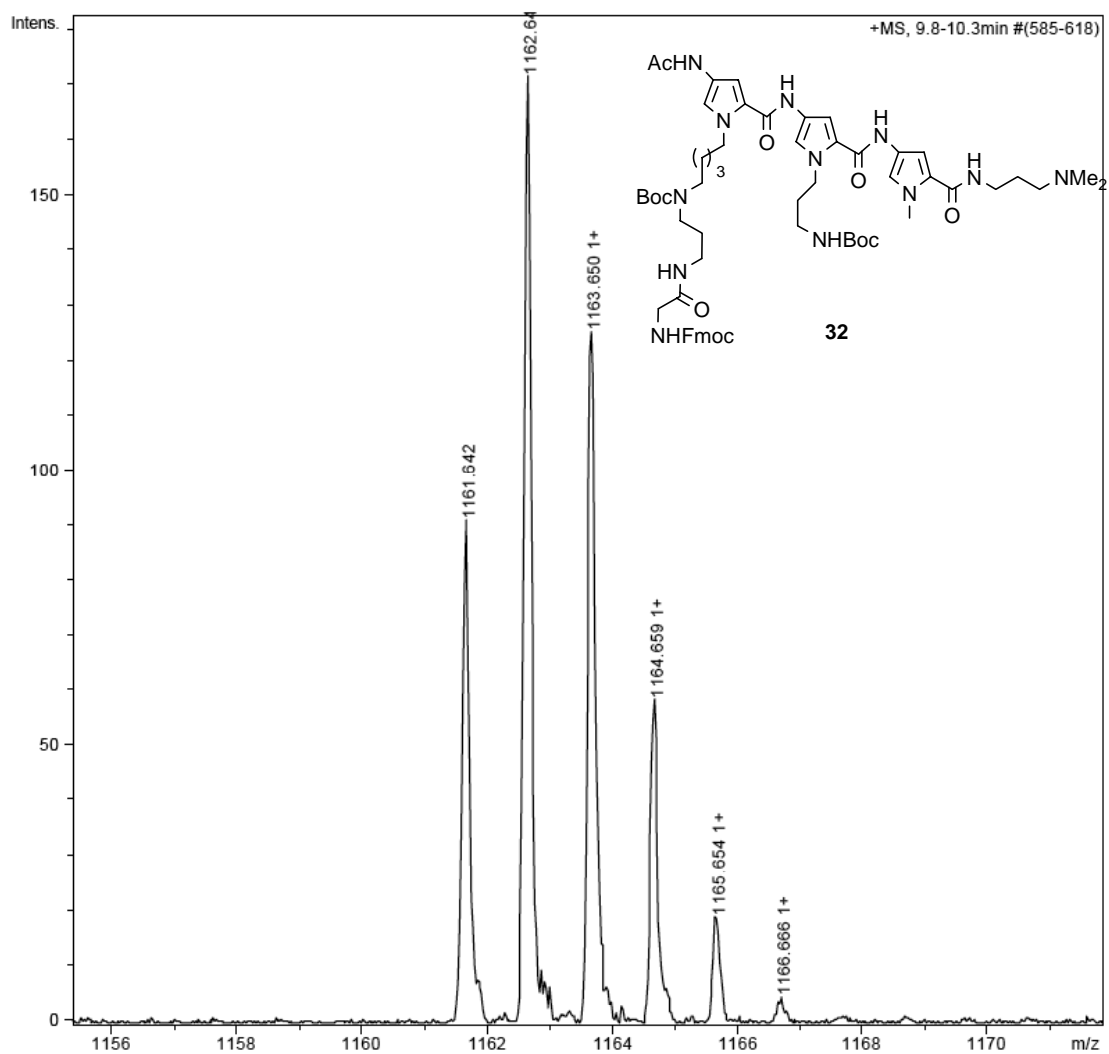




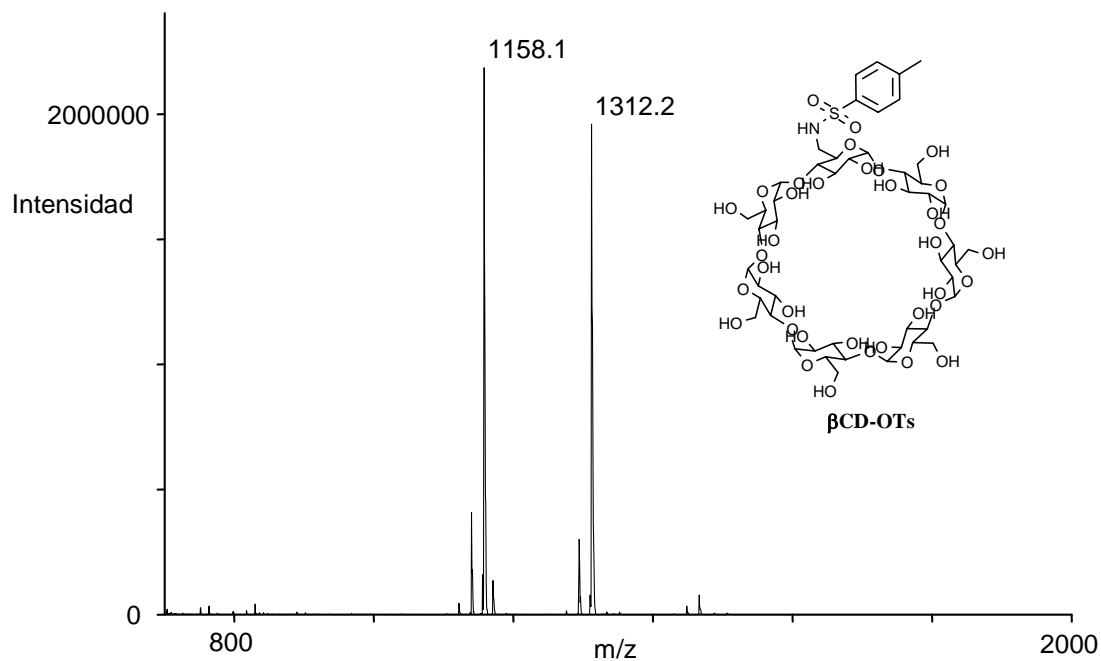
ESI-TOF:



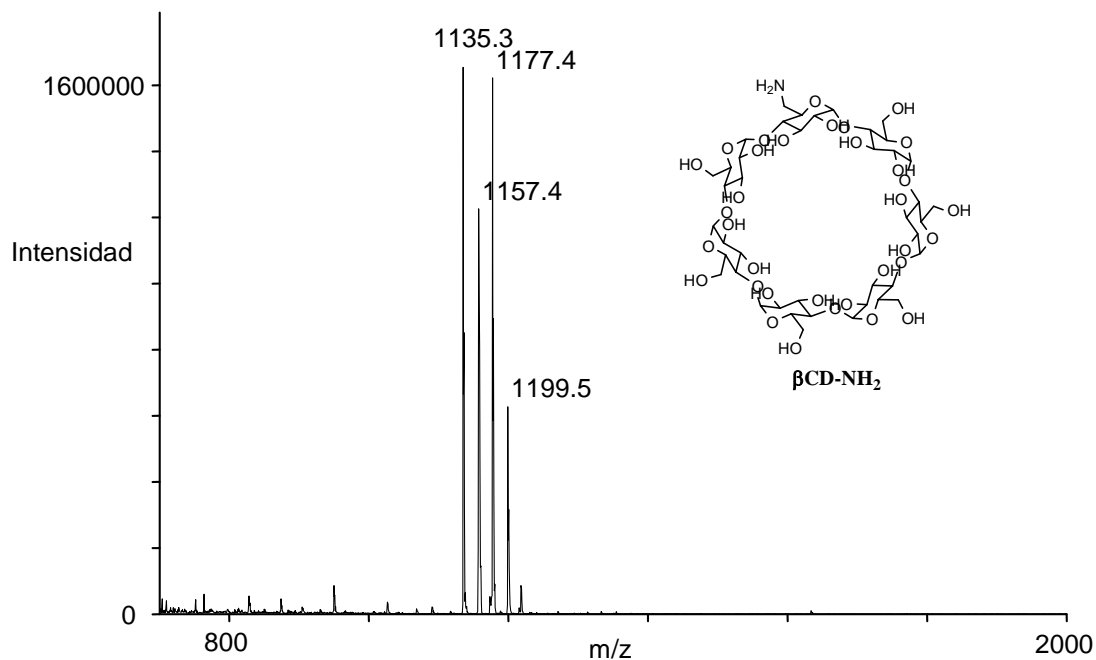
ESI-TOF:



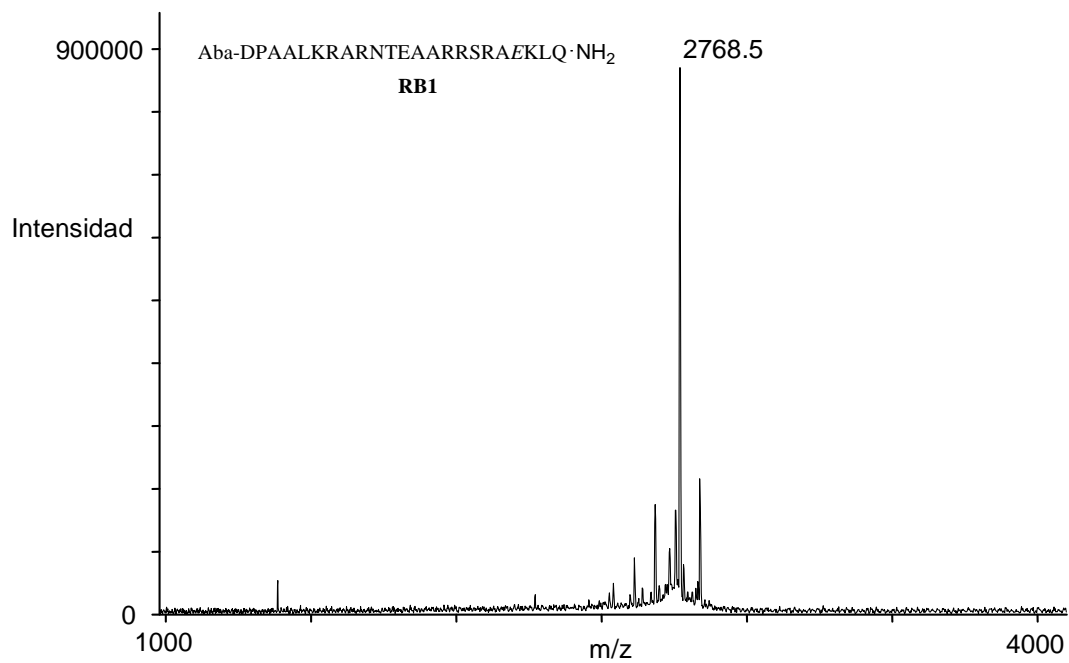
MALDI-TOF:



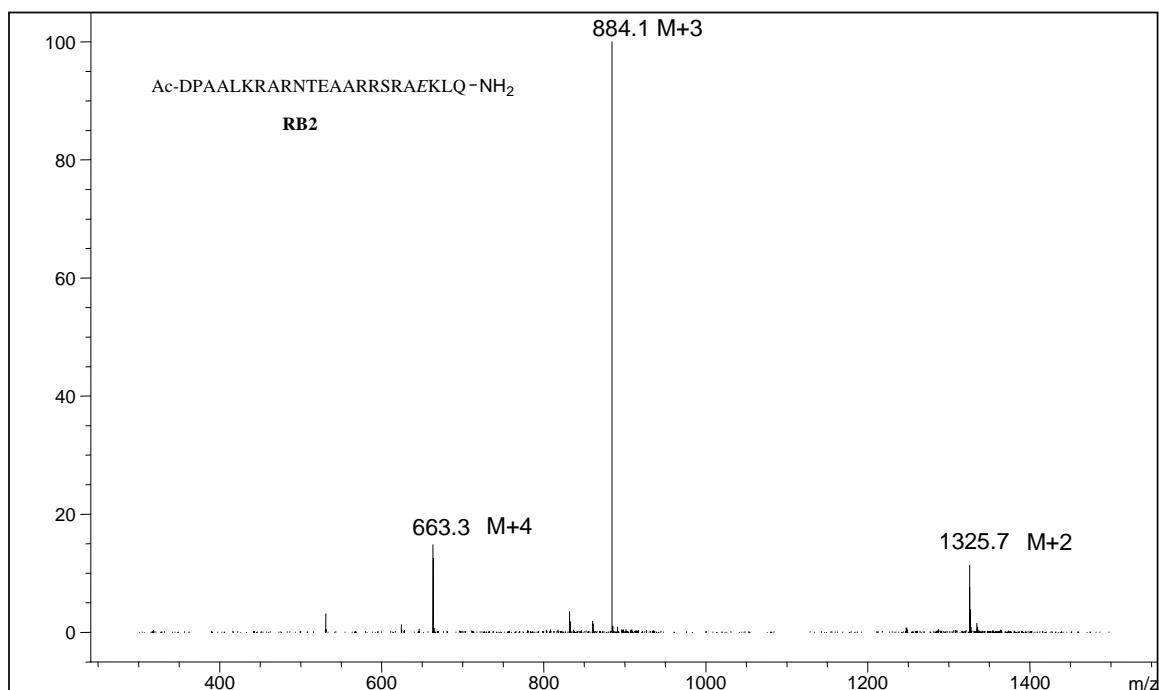
MALDI-TOF:



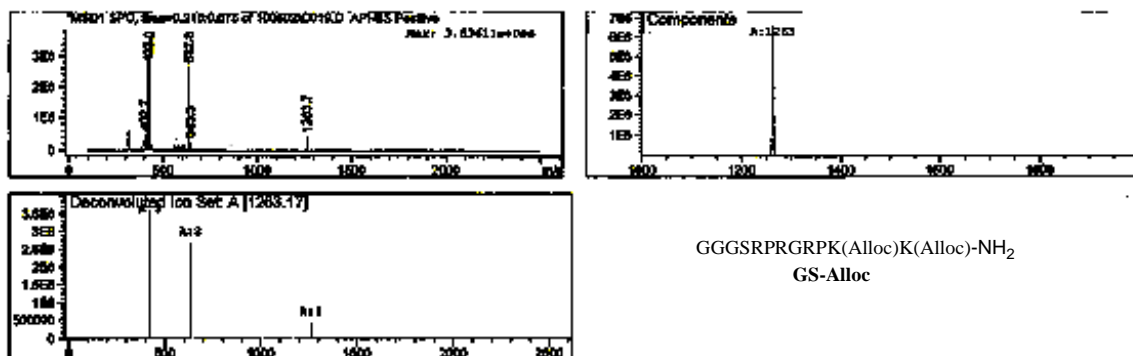
MALDI-TOF :



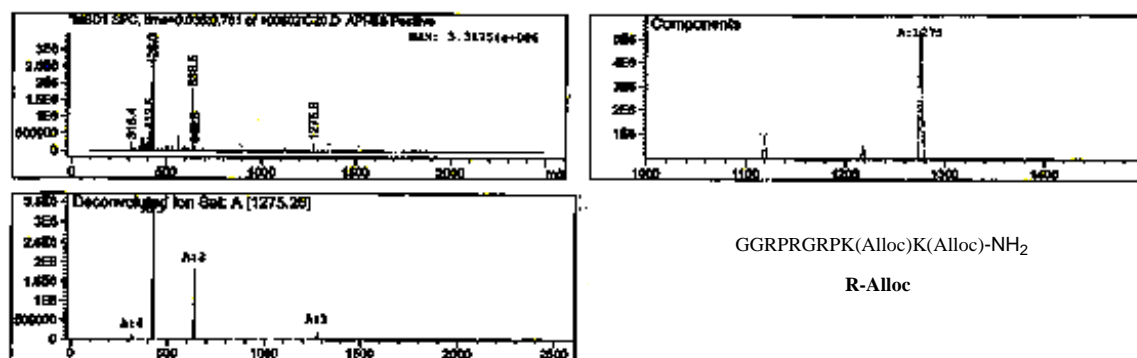
MALDI-TOF :



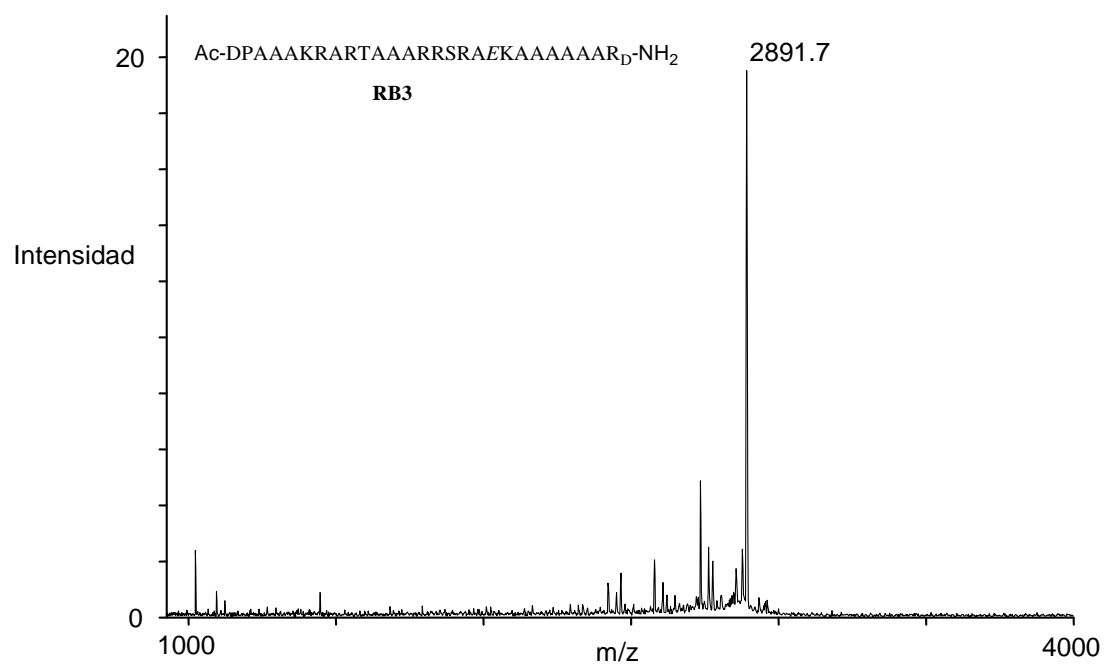
ESI-TOF:



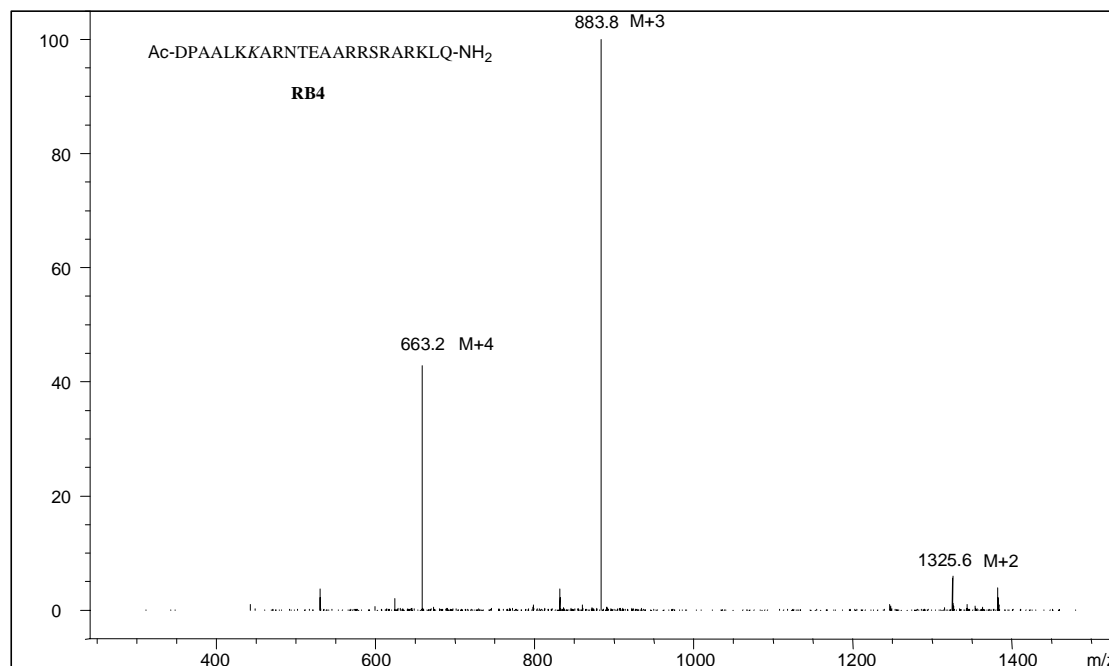
ESI-TOF:



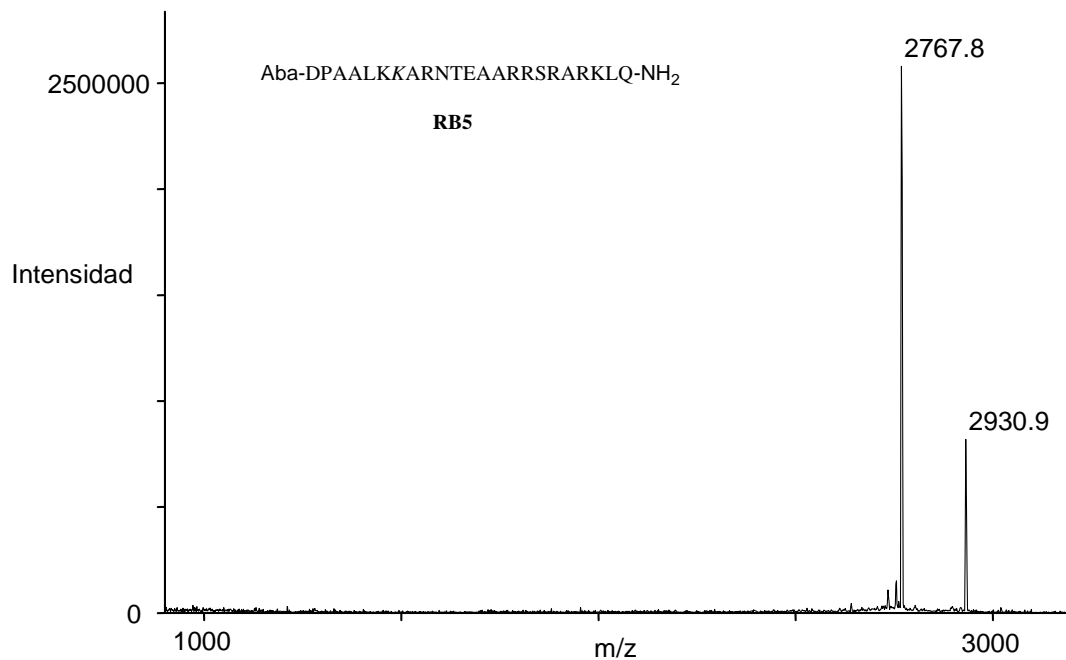
MALDI-TOF:



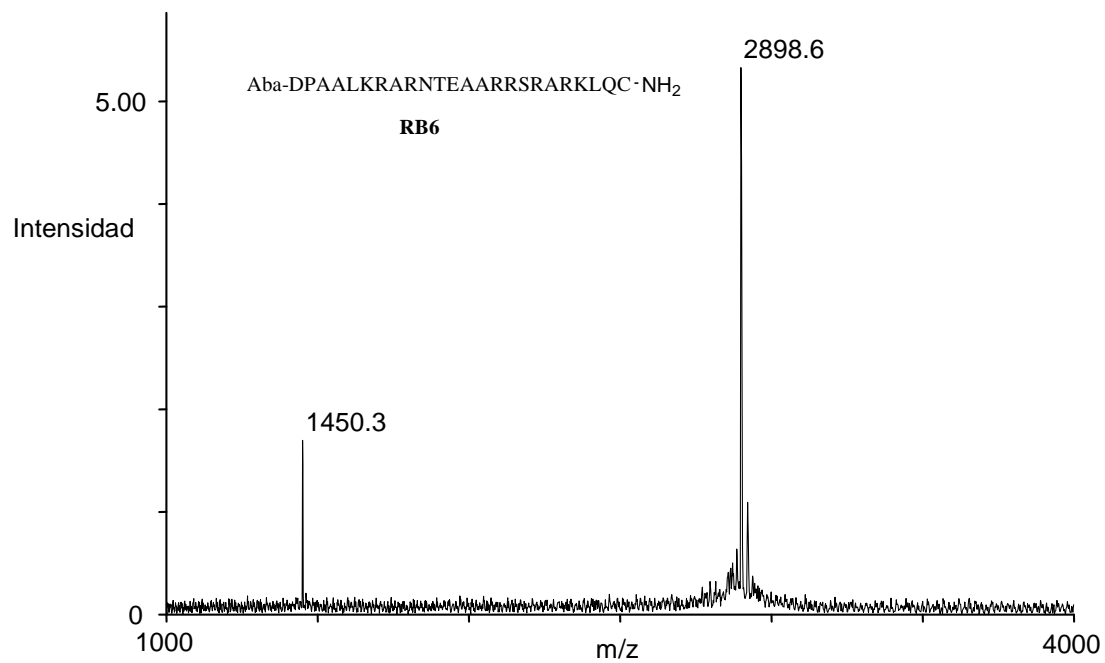
ESI-TOF:



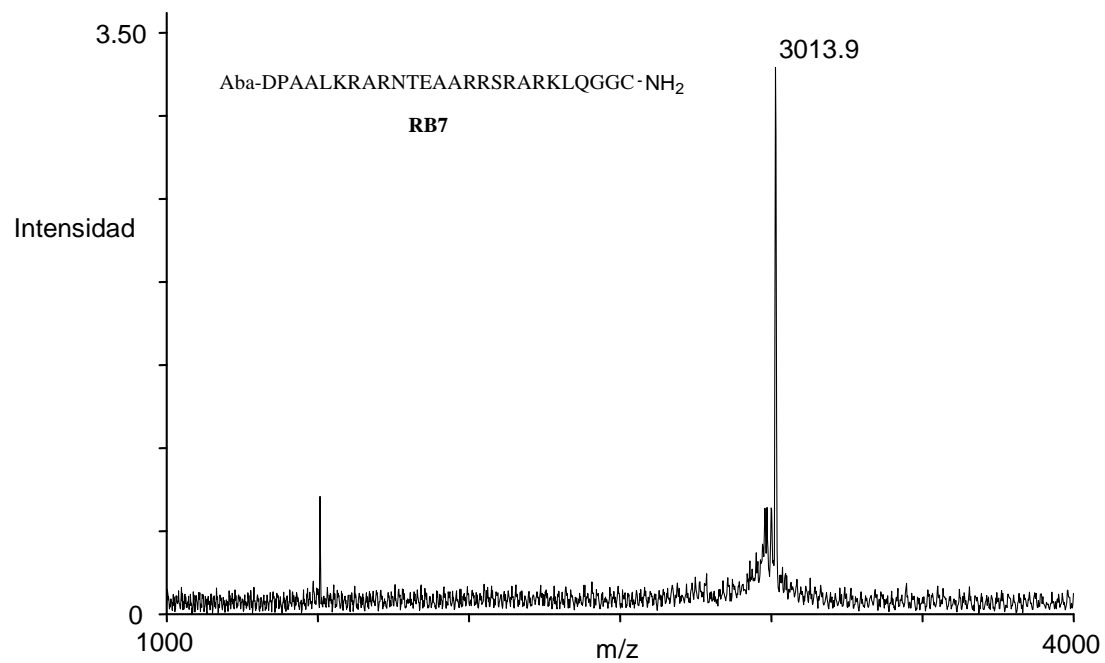
MALDI-TOF:



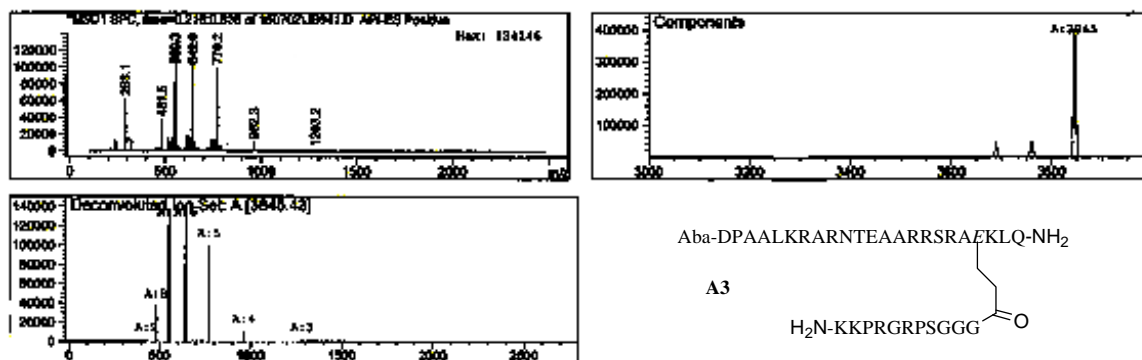
MALDI-TOF:



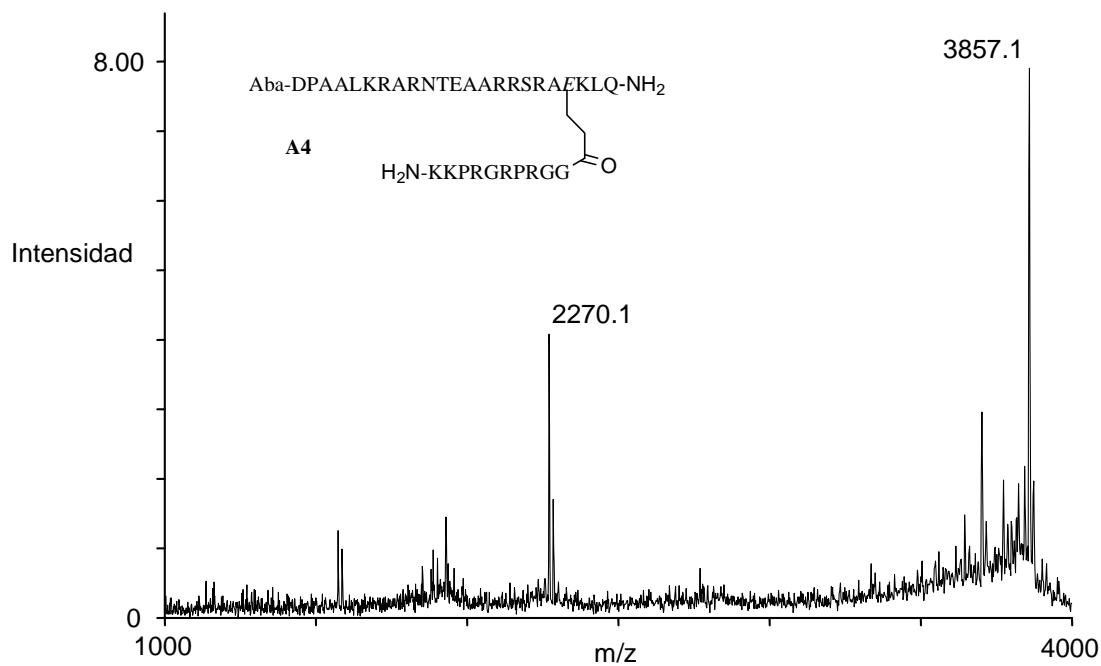
MALDI-TOF:



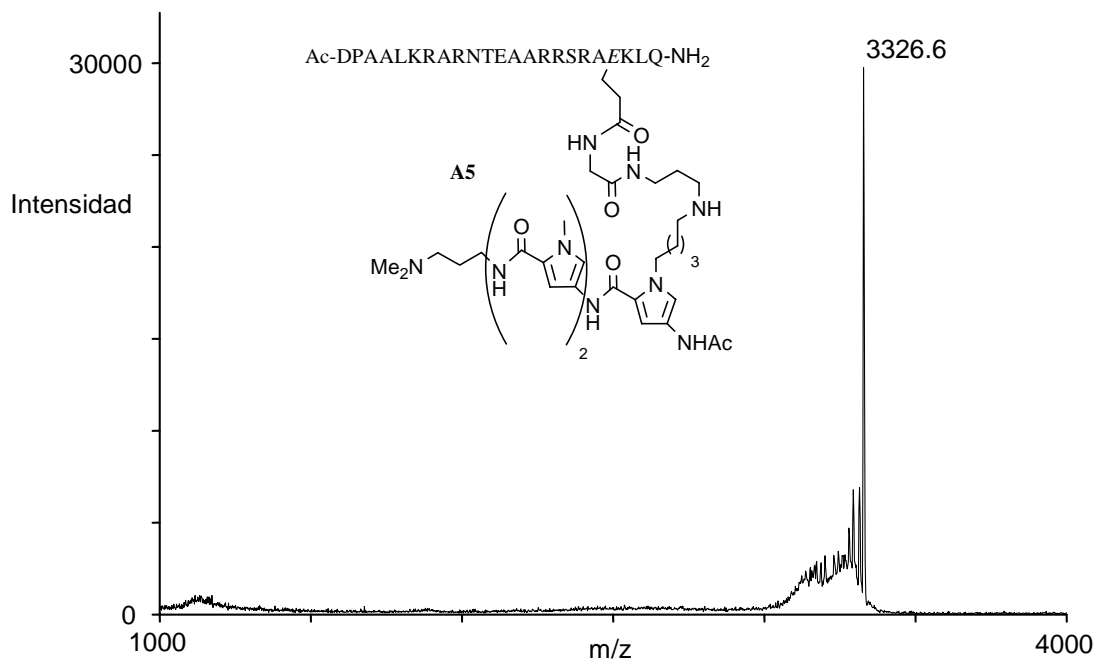
ESI-TOF:



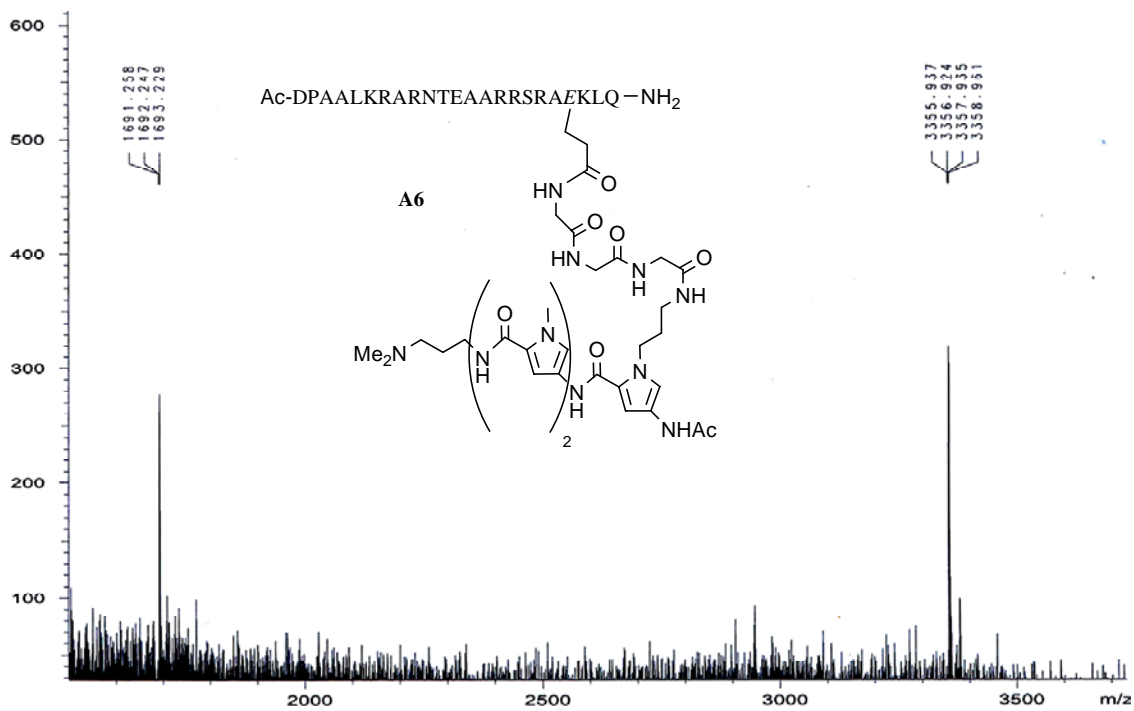
MALDI-TOF:



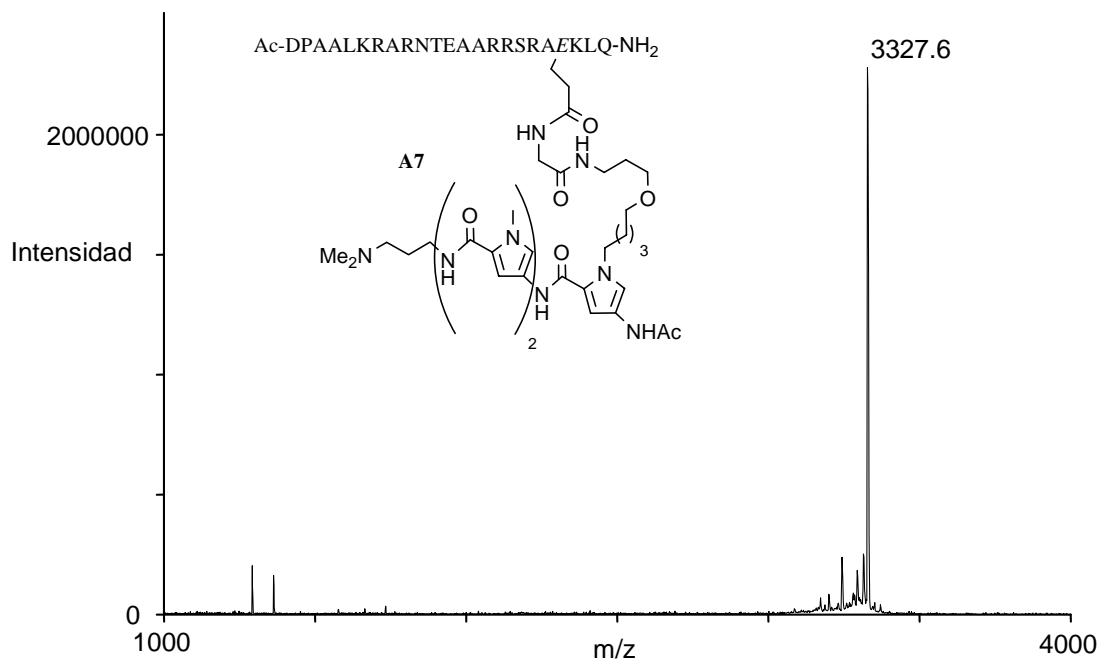
MALDI-TOF:



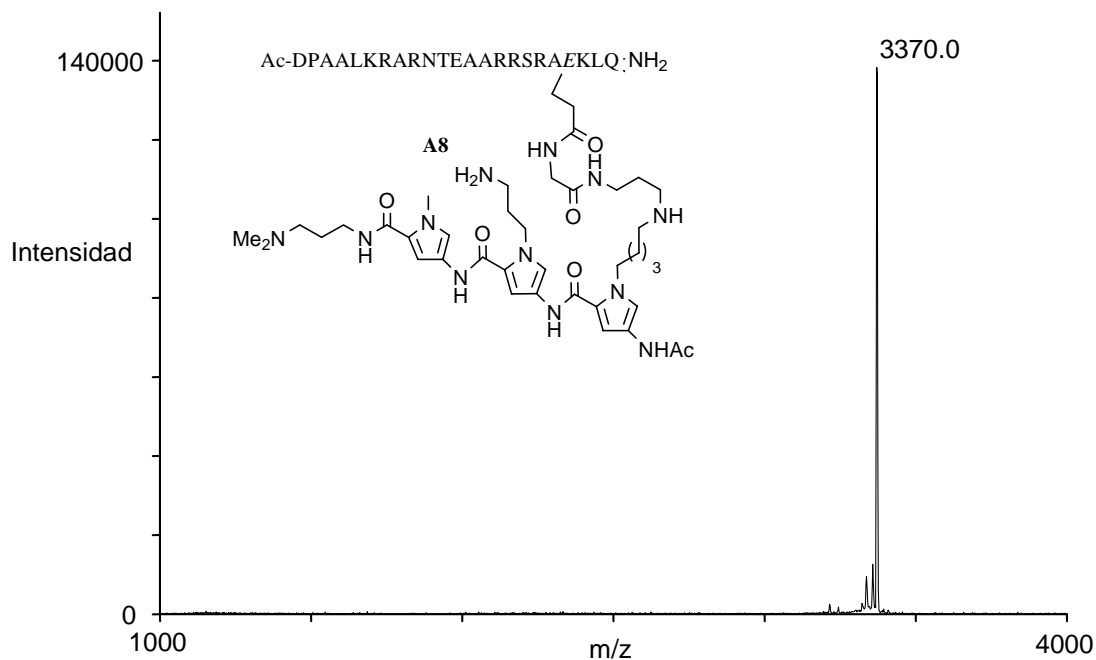
MALDI-TOF:



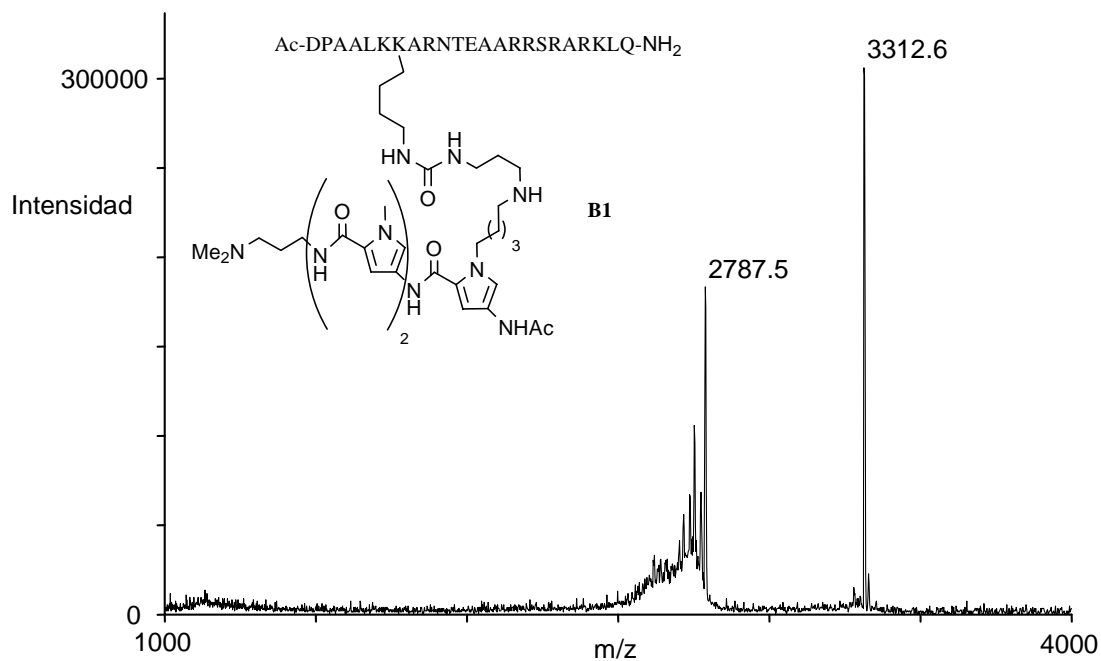
MALDI-TOF:



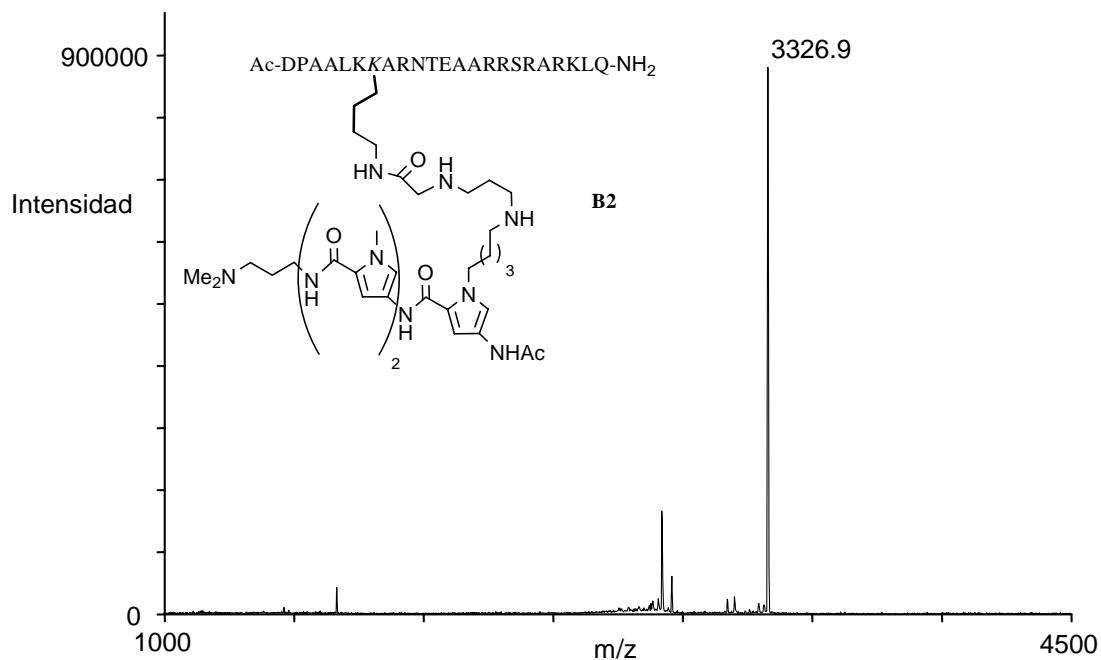
MALDI-TOF:



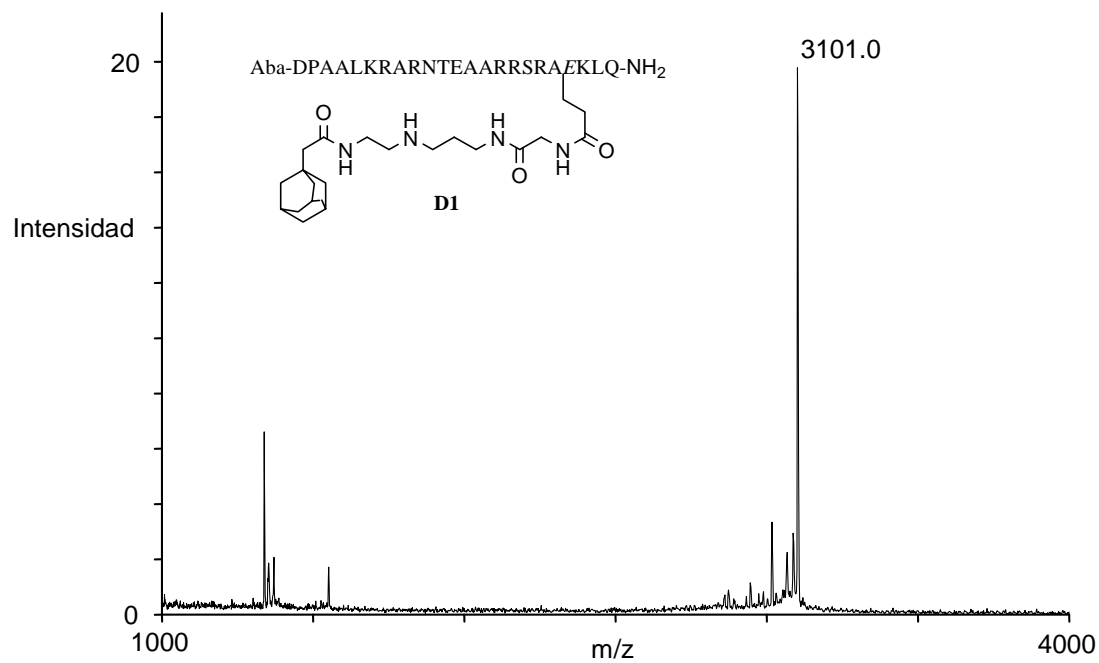
MALDI-TOF :



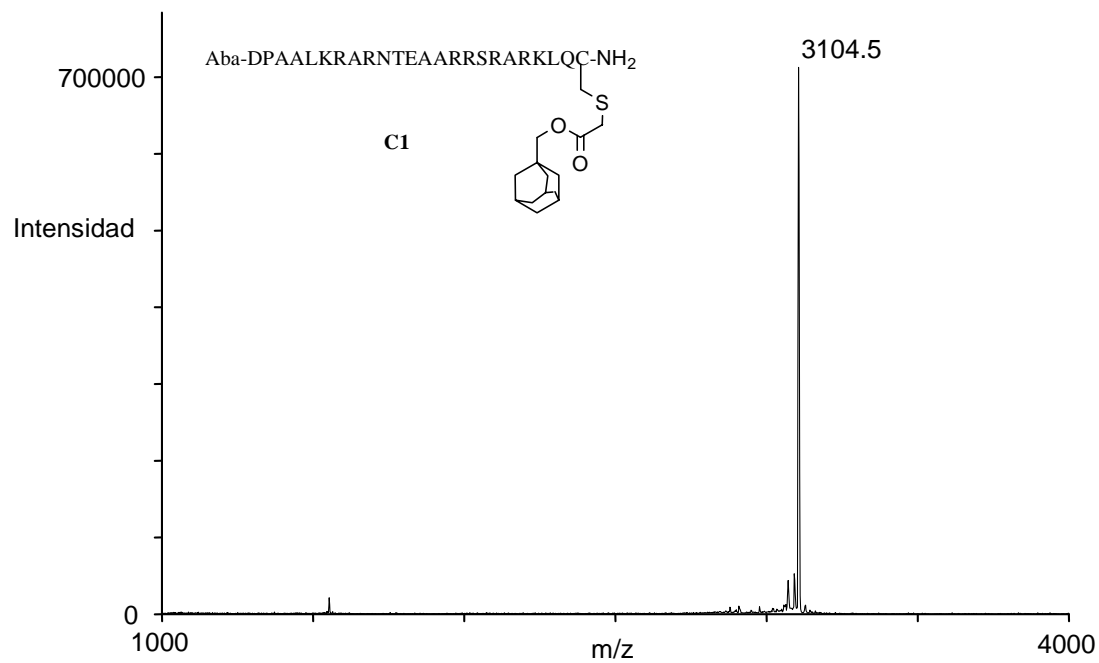
MALDI-TOF :



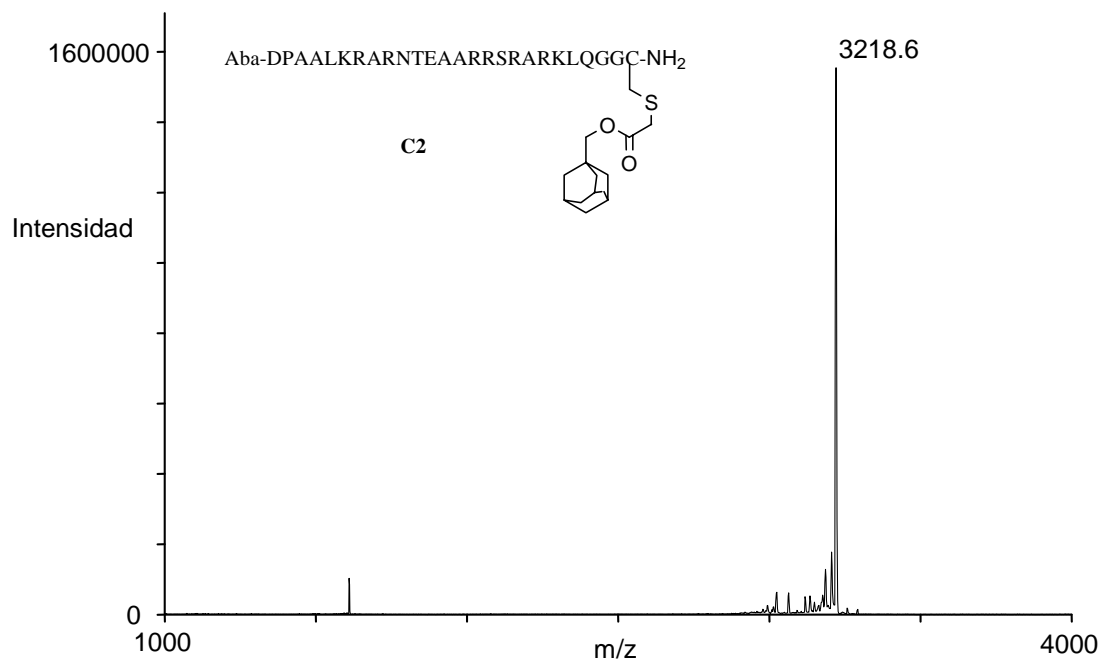
MALDI-TOF:



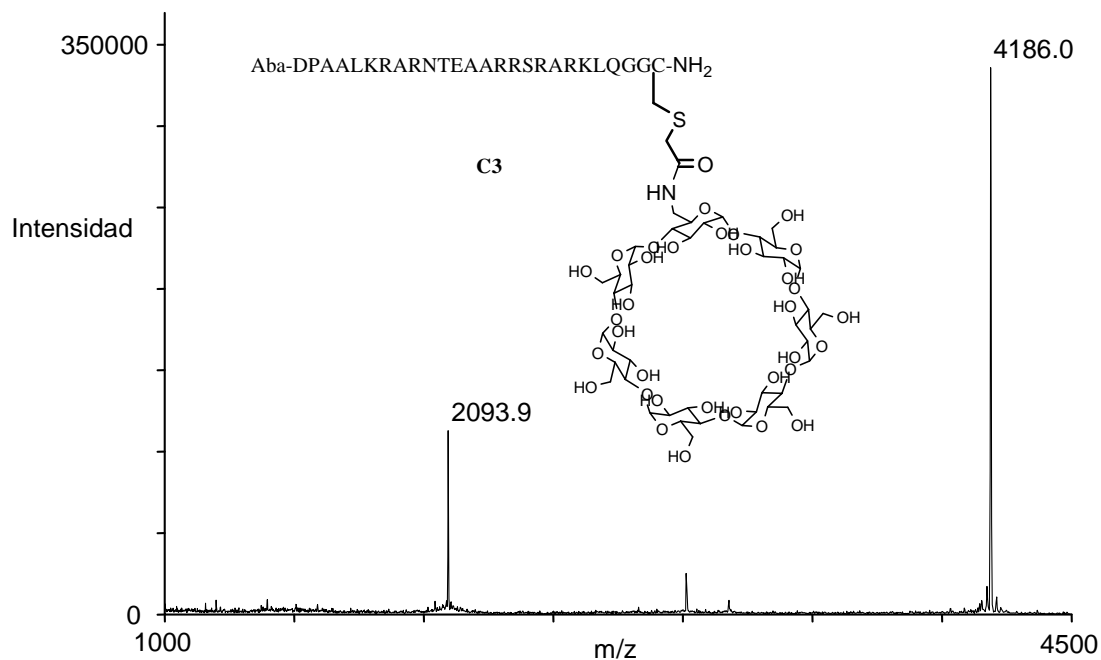
MALDI-TOF:



MALDI-TOF :



MALDI-TOF :



MALDI-TOF:

