



TESIS DE DOCTORADO

**DESARROLLO DE NUEVOS
AGENTES MODULADORES
DEL ESTRÉS OXIDATIVO
CELULAR COMO
ANTITUMORALES**

Sonia Boga Matos

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

AÑO 2020





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Desarrollo de nuevos agentes moduladores del estrés oxidativo celular como antitumorales

Dña. Sonia Boga Matos

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 29 de Julio de 2020.

Fdo.: Sonia Boga Matos





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Desarrollo de nuevos agentes moduladores del estrés oxidativo celular como antitumorales

D. M. Eugenio Vázquez Sentís

D. Miguel Vázquez López

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. **Sonia Boga Matos**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 29 de Julio de 2020.

Fdo.: M. Eugenio Vázquez Sentís

Fdo.: Miguel Vázquez López



Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, Eugenio y Miguel, por acogerme y darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en su grupo de investigación.

En segundo lugar agradecer a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermana, que son quienes me han sufrido estos años, me han ayudado y me han apoyado de manera incondicional. Sin ellos esto sería imposible.

Agradecer sin duda a las personas que han estado conmigo día a día. Darle las gracias a Diego por hacerme tan fácil los primeros días en el laboratorio, por acogerme y ayudarme en todo desde el principio; a David por tu paciencia y por escucharme tantas veces cuando lo necesitaba; a Jacobo por todas las risas y buen rollo que transmites; sin vosotros tres nada sería lo mismo. A Soraya, porque para mí, eres una más en nuestro grupo químico y porque gracias a ti he estado con “celulillas” por unos minutos; a Ana porque a pesar de no haber coincidido mucho en el laboratorio, nos hemos conocido y es imposible aburrirse a tu lado; a Andrés, por estos pocos meses y por todas tus reflexiones.

También darle las gracias a mis compañeros del P3L6, Rebeca, Natalia y Tomás, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Agradecer a Jaime por todas las meriendas compartidas, a Felipe, Marc, Cristian... por ayudarme en mis problemas de síntesis, a Arcadio por resolverme siempre al momento los problemas con los equipos y a muchas otras personas que seguro me han ayudado durante esta etapa.

Darle las gracias a mis compañeros MOVIP, con los que empecé toda esta aventura dentro de la investigación: Ángela, Roi, Borja, Nuria, Leti, Elena... y por supuesto, a Sandra, porque nos entendimos desde el primer día y ahora tengo una casa en Tacoronte, gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado y por todos los que nos quedan.

Quiero dar las gracias también a todos los que estuvieron conmigo en mis primeros años universitarios: Noelia, Sara, Ana, Patri, Acuña, Álvaro, Noemí, Sainza, Pili... por todos esos cafés, crucigramas y horas de Século.

Gracias a Riscadela, por todas esas horas de ensayo, cotilleos y desconexión, ya que después de casi 22 años no entendería otra forma de vida. Porque más que un grupo somos una familia.

Por último quiero darle las gracias a Uxia, mi AMIGA, por entenderme como nadie, por aguantarme y por estar siempre.





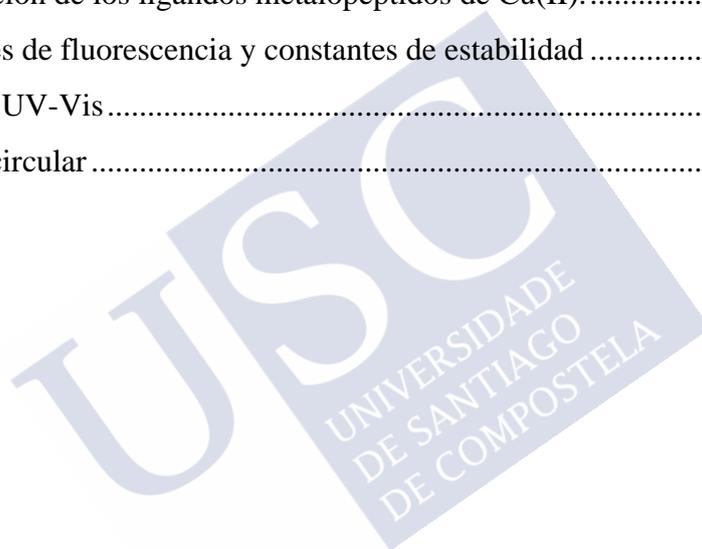
A mi madre y a mi padre



Índice

Abreviaturas	iii
Introducción.....	1
El metabolismo celular y las mitocondrias.....	1
Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo.....	3
Estrés oxidativo y cáncer.....	6
Cationes lipofílicas (DLCs) y localización mitocondrial.....	8
Modulación del estrés oxidativo como terapia. Mitocans.....	13
Objetivos.....	17
Derivados de antibióticos dirigidos a las mitocondrias para la modulación del estrés oxidativo	19
Antibióticos y estrés oxidativo. Inhibición de síntesis de proteínas mitocondriales..	19
Prodrogas sensibles al estrés oxidativo: boronatos.....	21
Discusión de resultados.....	27
Diseño y síntesis de una prodroga de Levofloxacin-TPP.....	27
Liberación de levofloxacin.....	34
Fosfonios fluorescentes	36
Metalopéptidos para modulación del estrés oxidativo	39
Los iones metálicos y el estrés oxidativo. Reacción de Fenton. Metalociclos biológicamente activos.....	39
Péptidos oligocatiónicos y transporte celular.....	42
Discusión de resultados	45
Diseño y síntesis de los ciclopéptidos.....	45
Estudio de las propiedades coordinativas de los ligandos peptídicos en agua en presencia de iones Cu(II) por técnicas espectroscópicas.....	46
Estudios de citotoxicidad.....	51
Conclusiones.....	53
Parte Experimental	55
Reactivos y Disolventes	57
Procedimientos y Técnicas Experimentales	57
Resonancia magnética nuclear (RMN).....	57
Espectrometría de masas (MS).....	57
Espectroscopía de fluorescencia.....	57
Ultravioleta visible.....	58

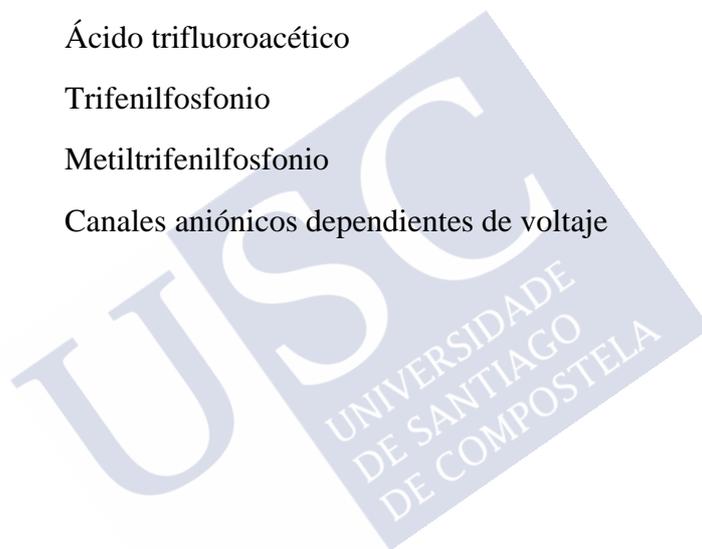
Dicroísmo Circular	58
HPLC	58
Síntesis de péptidos en fase sólida.....	58
Estudios de citotoxicidad.....	61
Estudios de internalización celular.....	62
Síntesis.....	63
Síntesis del derivado de la levofloxacin	63
Síntesis del derivado del pireno.....	87
Síntesis de los ligandos peptídicos.	90
Caracterización de los ligandos peptídicos.....	91
Caracterización de los ligandos metalopéptidos de Cu(II).....	95
Valoraciones de fluorescencia y constantes de estabilidad	99
Estudios de UV-Vis	103
Dicroísmo circular	105



Abreviaturas

$\Delta\psi$	Potencial de membrana
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ADP	Adenosín difosfato
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADNm	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
Bpy	2,2'-bipiridina
CoA	Coenzima A
CoQ	Coenzima Q
DCA	Ácido dicloroacético
DIEA	N,N'-diisopropiletilamina
DLC	Catión lipofílico deslocalizado
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMPA	Ácido N-2,3-dimercaptopropil ftalimidico
DMPS	Ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplasmático
ETC	Cadena de transporte electrónico
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MIDA	Ácido MetilImidoDiacético
mtROS	Especie reactiva de oxígeno mitocondrial
MTS	Secuencias de transporte mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OXPHOS	Fosforilación Oxidativa

PQ	Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
THF	Tetrahidrofurano
TMRE	Tetrametilrodamina
tBu	terc-butilo
tetraPP	Tetrafenilfosfonio
TFA	Ácido trifluoroacético
TPP	Trifenilfosfonio
TPMP	Metiltrifenilfosfonio
VDAC	Canales aniónicos dependientes de voltaje



Introducción

El metabolismo celular y las mitocondrias.

Las mitocondrias son orgánulos fundamentales en la célula, en los cuales se centralizan la mayoría de los procesos metabólicos. Fueron descubiertas en el siglo XIX por Albert von Kolliker, pero fue Leonor Michaelis quien apuntó en 1898 a su función en procesos redox intracelulares, por su capacidad de teñirse con el colorante de oxidación-reducción verde Jans. En 1913, Otto Warburg encontró el consumo de oxígeno en las células, lo que ayudó a clarificar muchos procesos metabólicos.¹

En la década de 1930, Hans Krebs demostró que el ciclo del ácido tricarbóxico se localizaba en las mitocondrias y éstas fueron reconocidas como importantes fábricas de biomoléculas. En los años siguientes se descubrió la fosforilación oxidativa y las mitocondrias fueron entonces identificadas como la principal fuente de energía en la célula. Sin embargo, el concepto que tenemos sobre el metabolismo en la actualidad, por ejemplo su implicación en la apoptosis celular surgió más adelante.

Las mitocondrias forman estructuras alargadas similares a hilos descritas por algunos autores como *red mitocondrial*. Además, en las células vivas, estas estructuras no solo están en constante movimiento sino que también se dividen y fusionan constantemente, de manera que la dinámica mitocondrial se relaciona íntimamente con la función y el estado metabólico de estos organelos.

Las mitocondrias presentan dos membranas: la membrana externa, que delimita el organelo y separa la mitocondria del citosol y la membrana interna que divide el interior de la mitocondria en dos compartimentos, la *zona intermembrana* y el compartimento interno o *matriz mitocondrial*. La membrana interna forma múltiples invaginaciones, las *crestas*, que aumentan su superficie interna. Ambas membranas están formadas por bicapas de fosfolípidos con múltiples proteínas integrales y periféricas, muchas de ellas con funciones transportadoras.

La membrana externa contiene un gran número de *porinas* mitocondriales, que son proteínas transmembranales de paso múltiple, que forman conductos a través de los cuales pueden pasar moléculas hidrosolubles de hasta 5 KDa, también llamados canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), que funcionan como tamiz molecular e impiden el paso de moléculas más grandes. Los VDAC son sólo en parte selectivos a los aniones, por lo que permite la difusión más o menos libre de cationes y moléculas sin carga. Entre sus compuestos lipídicos, la membrana externa contiene colesterol, en contraste con la membrana interna que es esencialmente libre de colesterol.

1 Koppenol, W.H., Bounds, P.L., and Dang, C.V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 325–337.

La membrana interna contiene toda la cadena respiratoria y el complejo ATP sintasa. Debido al funcionamiento de la cadena respiratoria junto con el bombeo de H^+ , esta membrana experimenta una gran diferencia de voltaje a ambos lados, con un rango de 180 mV sobre la membrana de aproximadamente 100 nm, lo cual refleja las propiedades aislantes extremadamente altas de la bicapa lipídica. Por otro lado, la membrana interna contiene varios transportadores específicos para metabolitos aniónicos, fosfatos inorgánicos, ADP y ATP. Un rasgo característico de la mayoría de los transportadores es que operan como portadores de intercambio (por ejemplo, ATP por ADP). Además, la membrana interna contiene una proporción mucho mayor de proteínas (80%) y solo un 20% de fosfolípidos, de los cuales un 10% es la cardiolipina, un fosfolípido único de esta membrana mitocondrial.

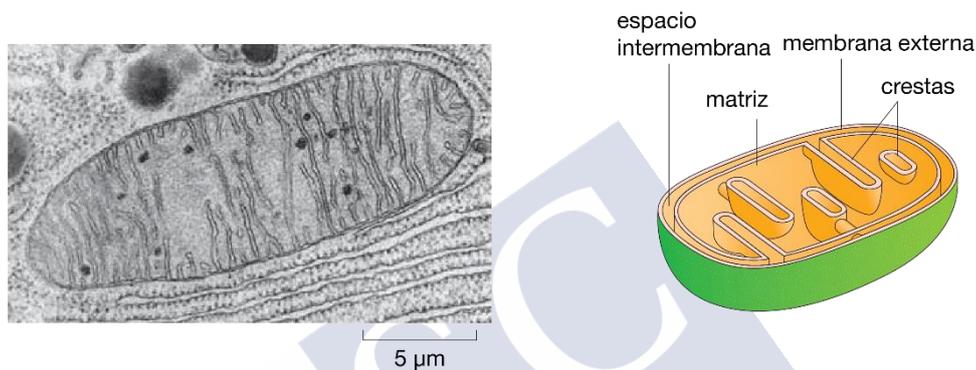


Figura 1. La estructura de una mitocondria. Izquierda: Imagen de microscopía electrónica de una mitocondria del páncreas de un murciélago; derecha: esquema que ilustra los tres espacios de membrana relevantes para las mitocondrias, así como la conectividad. (Adaptado de D. W. Fawcett, *The Cell, Its Organelles and Inclusions: An Atlas of Fine Structure*, W. B. Saunders, 1966.)

Los compartimentos internos delimitan la *matriz mitocondrial*, una solución densa de enzimas, coenzimas, metabolitos e iones inorgánicos donde tiene lugar el ciclo de Krebs, que proporciona reductores a la cadena respiratoria. La matriz también contiene el genoma mitocondrial, el ADN mitocondrial (ADNm) que, al igual que el ADN bacteriano, tiene forma circular y contiene 37 genes que codifican el ARN de los ribosomas mitocondriales, 22 ARNt específicos y las proteínas que conforman los complejos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico.

En la célula se producen dos corrientes opuestas de reacciones químicas: las vías *catabólicas* que descomponen los alimentos en moléculas más pequeñas, generando así una forma útil de energía para la célula, y las vías *anabólicas* o *biosintéticas*, que utilizan la energía generada en el catabolismo para impulsar la síntesis de biomoléculas. Juntos, estos dos conjuntos de reacciones constituyen el *metabolismo celular*.

Las células requieren un suministro constante de energía para generar y mantener el orden biológico que las mantiene vivas. Esta energía se deriva de la energía del enlace químico en las moléculas de los alimentos, que sirven como combustible para las células.

Las grandes moléculas poliméricas en los alimentos se descomponen durante la digestión en sus subunidades monoméricas: proteínas en aminoácidos, polisacáridos en azúcares y grasas en ácidos grasos y glicerol, a través de la acción de enzimas. Esas pequeñas moléculas orgánicas derivadas de los alimentos ingresan al citosol de la célula, donde comienza su oxidación gradual. En la primera etapa los azúcares se convierten en piruvato y dos tipos de moléculas transportadoras activadas: ATP y NADH. El piruvato luego pasa del citosol a las mitocondrias donde se convierte en CO₂ más un grupo acetilo de dos carbonos, que se une a la coenzima A (CoA), formando acetil CoA, otra molécula transportadora activada. La etapa final de la descomposición oxidativa de las moléculas de los alimentos tiene lugar en las mitocondrias. El grupo acetilo, unido a la coenzima A a través de un enlace de alta energía, entra en una serie de reacciones llamadas *ciclo del ácido cítrico* o *ciclo de Krebs* para generar grandes cantidades del transportador de electrones NADH. Finalmente, los electrones de alta energía del NADH pasan a lo largo de una cadena de transporte de electrones dentro de la membrana interna mitocondrial, donde la energía liberada por su transferencia se utiliza para impulsar un proceso que produce ATP y consume oxígeno molecular (O₂). Es en estos pasos finales donde la mayor parte de la energía liberada por la oxidación se aprovecha para producir la mayor parte del ATP de la célula.

La *cadena de transporte electrónico* o *cadena respiratoria mitocondrial* está compuesta por más de 85 proteínas ensambladas en cuatro complejos: el complejo I (NADH-ubiquinona oxido-reductasa), el complejo III (ubiquinol citocromo c oxido-reductasa) y el complejo IV (citocromo c oxidasa) se encuentran en la membrana interna mitocondrial como proteínas integrales, mientras el complejo II, que contiene succinato deshidrogenasa se une a la superficie interna de la membrana mitocondrial interna.

Debido a que la energía para impulsar la síntesis de ATP en las mitocondrias deriva en última instancia de la descomposición oxidativa de las moléculas de los alimentos, la fosforilación de ADP para formar ATP es impulsada por el transporte de electrones en la mitocondria que se conoce como fosforilación oxidativa.

En total, casi la mitad de la energía que, en teoría, podría derivarse de la oxidación de glucosa o ácidos grasos a H₂O y CO₂ se captura y se usa para impulsar la reacción desfavorable energéticamente $\text{Pi} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP}$. El resto de la energía es liberada por la célula en forma de calor.

Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo.

Las **especies reactivas de oxígeno** (ROS, ¹O₂, [•]O₂⁻, HO[•], H₂O₂) son radicales producidos como subproductos naturales de los procesos metabólicos, particularmente en la cadena de transporte electrónico durante la respiración celular. La “fuga de electrones” de algunos procesos redox de la cadena de transporte electrónico (ETC) produce una pequeña pero significativa reducción de oxígeno molecular ³O₂, que da lugar al radical superóxido ([•]O₂⁻). Según una estimación, el 1% de la captación de oxígeno total en tejidos se transforma en este radical libre. Una vez formado, el radical superóxido es

transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa (SOD) o por dismutación en disolución acuosa. En presencia de metales de transición que se liberan de grupos de hierro-azufre, grupos hemo, o proteínas de almacenamiento de metales, el peróxido de hidrógeno se puede convertir a su vez en el radical hidroxilo (HO^\bullet), que es altamente reactivo. A través de diversos procesos estos radicales iniciales pueden producir una variedad de productos reactivos secundarios a través de diferentes procesos, incluidas las especies reactivas de nitrógeno (RNS) derivadas del óxido nítrico.

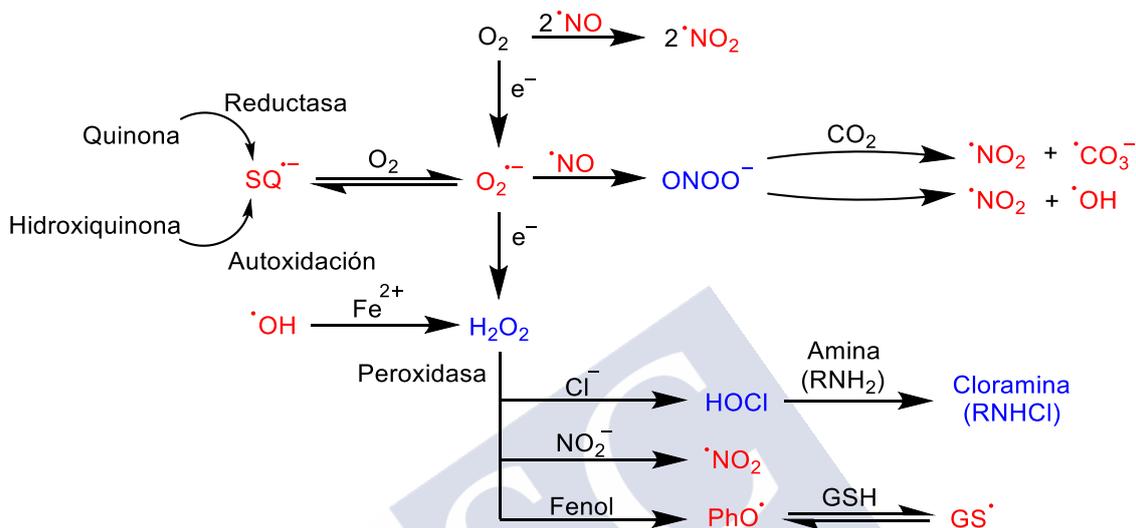


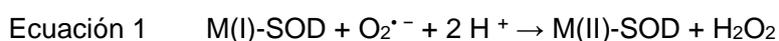
Figura 2 Descripción de los diferentes tipos de especies reactivas fisiológicamente relevantes y sus rutas de interconversión.²

Los ROS juegan un papel fundamental en todos los organismos vivos, actúan como segundos mensajeros mediando en la señalización del crecimiento, la diferenciación celular y en las respuestas inflamatorias,^{3,4} así como en la regulación de la actividad enzimática.^{5,6,7} Sin embargo, además de su papel biológico, su alta reactividad hace que estas especies pueden ser dañinas para la célula dando lugar a lo que se conoce como el estrés oxidativo.

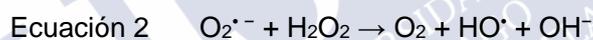
- 2 Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4, 278–286
- 3 Kasper. D, Longo D, Jameson J, Loscalzo J, Hauser S, Fauci A. (2015) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. McGraw-Hill.
- 4 Rhee S. (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Molec. Med.* 31, 53-59.
- 5 Balaban RS, Nemoto S, and Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- 6 Miller EW, Tulyathan O, Isacoff EY, and Chang CJ. (2007) Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling. *Nat. Chem. Biol.* 3, 263–267.
- 7 Murphy MP. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.

La relación entre las diferentes especies ROS es muy compleja, en muchos casos pudiendo reaccionar reversiblemente entre sí. Los ROS pueden subdividirse entre especies oxidantes *radicalarias* y *no radicalarias*. Dentro de cada clase, algunos son mucho más reactivos o fuertemente oxidantes que otros. La resistencia oxidante de los radicales puede clasificarse según sus potenciales de reducción, aunque en el caso de los ROS no radicalarios las consideraciones cinéticas son también importantes.²

El **superóxido** puede actuar como oxidante y reductor. Como oxidante es anómalo, porque a pesar de su potencial de reducción de 0.9 V tiene poca actividad debido por una parte a su carga aniónica, que limita la reactividad con los centros ricos en electrones, así como también por la facilidad de dismutación, que puede ser catalizada por el enzima superóxido dismutasa (SOD), tal y como se representa en la Ecuación 1.



El **peróxido de hidrógeno** es también poco reactivo y no afecta a la mayoría de las biomoléculas. Sus efectos perjudiciales se deben principalmente a radicales hidroxilo formados en diversas reacciones. Así pues, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con el radical superóxido a través de la reacción de Haber-Weiss (Ecuación 2) para dar lugar a radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Estos radicales son altamente reactivos e inducen daño en biomoléculas próximas, tanto lípidos, como ADN y proteínas, produciendo su degradación y dando lugar a efectos citotóxicos.⁸



Estas especies formadas a partir de reacciones de transferencia de electrones son responsables de mediar las modificaciones redox de diversas biomoléculas y prevalecen en enfermedades que van desde el cáncer hasta las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes. Por tanto, la sobreproducción de ROS conduce a niveles altos de estrés oxidativo que está implicado en el envejecimiento y la muerte.

Otra consideración importante para la química y la biología de los ROS es la ubicación subcelular donde se generan, ya que estos microambientes pueden dictar qué dianas potenciales encontrarán estas moléculas. Los ejemplos clásicos de orgánulos con generación localizada de ROS para fisiología incluyen fagosomas dentro de células especializadas del sistema inmune utilizado para matar patógenos y peroxisomas, que median las reacciones de oxidación catabólica para el metabolismo energético. Además de estas fuentes de ROS, destacamos otras tres localizaciones principales para la producción de ROS en células en condiciones fisiológicas como son las mitocondrias, el retículo endoplásmico (ER) y las membranas celulares.

8 Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuča, K., and Musílek, K. (2016). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* 90, 1–37.

Es en las mitocondrias los glúcidos, los lípidos y los aminoácidos se oxidan a CO₂ y H₂O empleando el oxígeno molecular, dando lugar a la producción de energía, fundamentalmente en forma de ATP. Este proceso metabólico lleva asociado la formación de estas especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo que, **aproximadamente el 90% del ROS intracelular se produce en la mitocondria**. La disfunción mitocondrial puede conducir a muchos trastornos mitocondriales secundarios y puede surgir por un daño en las proteínas, en el ADN o en los lípidos. Este daño oxidativo se considera propio de unos niveles de producción de ROS elevados en la cadena de transporte electrónica.⁹

A pesar de que el funcionamiento de las mitocondrias sea esencial para las células cancerígenas, la fisiología mitocondrial es diferente de las células sanas, no tumorales, lo que inicialmente llevó a la hipótesis de Otto Warburg de que una modificación en el metabolismo mitocondrial podría conducir al desarrollo de cáncer.

Una evidencia creciente indica que las células tumorales poseen niveles de ROS más altos que las células sanas, lo que promueve la proliferación celular anormal, entre otros procesos necesarios para la progresión del tumor.¹⁰ Sin embargo, **un estrés oxidativo excesivo puede ser tóxico para las células** puesto que la reacción de estos radicales libres puede causar la modificación oxidativa de diversas biomoléculas y alterar sus funciones. Un leve aumento en el nivel de los ROS puede provocar una alteración celular transitoria, mientras que un aumento severo de ROS en las células podría causar un daño oxidativo irreversible, lo que llevaría a la muerte celular.¹¹

Las células presentan mecanismos de defensa frente a estas especies, pero cuando estos oxidantes no se contrarrestan pueden generar reacciones en cadena causando fenómenos como oxidación de proteínas, peroxidación lipídica o daños en el ADN, lo que se traduce en la alteración de los procesos celulares normales. **El estrés oxidativo excesivo hace a las células más vulnerables a fármacos que promuevan la producción de ROS o debiliten la defensa antioxidante celular; en ambos casos generando niveles tan altos de ROS que son incompatibles con la supervivencia celular.**¹¹

Estrés oxidativo y cáncer.

La secuenciación del ADN ha demostrado que el cáncer puede estar producido por cientos de mutaciones diferentes y que el perfil mutacional del cáncer es dinámico, pudiendo

9 Michael P. Murphy and Richard C. Hartley. (2018) Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 865-886.

10 Schumacker, P. T. (2006) Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 10, 175–176.

11 Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 579–591.

variar incluso en tumores histológicamente idénticos.^{12,13} Por lo tanto, una sola mutación no es suficiente para causar un cáncer. Se estima que, en el transcurso de la vida, un cuerpo humano normal experimenta 10^6 divisiones celulares. Incluso en un entorno libre de mutágenos, las mutaciones ocurrirían espontáneamente. Claramente, si una sola mutación fuera capaz de convertir una célula sana en una célula cancerígena, no seríamos organismos viables. Esto sugiere que los tratamientos que poseen como diana un único gen posiblemente sean ineficaces y necesiten el uso de terapia combinada.¹⁴ Desafortunadamente, la mayoría de los fármacos antitumorales clásicos convergen en un número limitado de vías, por lo que existe la necesidad de diseñar nuevas moléculas susceptibles a ser utilizadas en terapia combinada. El aprovechamiento del metabolismo alterado en las células tumorales como diana terapéutica evita la complejidad genómica y se centra en procesos metabólicos necesarios para la supervivencia celular.¹⁵

Las células cancerígenas rompen las reglas más básicas del comportamiento celular mediante las cuales se construyen y mantienen los organismos multicelulares. En un cuerpo humano con más de $3.7 \cdot 10^{14}$ células,¹⁶ miles de millones de ellas experimentan mutaciones todos los días. Lo más peligroso de una mutación es que puede dar a la célula una ventaja selectiva, permitiéndole dividirse más rápidamente que sus células vecinas y convertirse en un clon mutante en crecimiento. El problema es que esos ciclos continuos de mutaciones, competencia y selección natural, lo único que hacen es que las cosas vayan cada vez peor. Estos son los “ingredientes” básicos del cáncer: una enfermedad en la que las células cancerígenas comienzan prosperando a expensas de sus células vecinas sanas y que al final destruyen todo el conjunto celular. El cáncer fue reconocido como una enfermedad de metabolismo alterado hace casi 100 años. Sin embargo, la reprogramación metabólica se ha reconocido mucho más recientemente como un sello distintivo esencial de esta patología.

Las células cancerígenas se definen por dos propiedades. Por un lado, se reproducen desafiando las restricciones normales en la división celular y, por otro, invaden y colonizan territorios que normalmente se reservan para otras células. Es la combinación de estas dos acciones las que hacen que el cáncer sea peligroso. Una célula anormal aislada, que no prolifera más allá de sus células vecinas, no produce daños significativos,

-
- 12 Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* 12, 323–334.
 - 13 Stratton, M. R., Campbell, P. J., and Futreal, P. A. (2009) The cancer genome. *Nature* 458, 719–724.
 - 14 Bock, C., and Lengauer, T. (2012) Managing drug resistance in cancer: lessons from HIV therapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 494–501.
 - 15 Biasutto, L., Dong, L.-F., Zoratti, M., and Neuzil, J. (2010) Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion* 10, 670–681.
 - 16 Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., et al. (2013) An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.* 40, 463–471.

pero si su proliferación está fuera de control, dará lugar a un tumor o neoplasia, una masa de células anormales que crece sin descanso. Mientras las células neoplásicas permanezcan agrupadas en una sola masa, se dice que el tumor es benigno. Un tumor se considera cáncer solo si es maligno, es decir, solo si sus células han adquirido la capacidad de invadir el tejido circundante. La invasión, generalmente, implica la capacidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o los vasos linfáticos, y de tumores secundarios, llamados metástasis, en otros sitios del cuerpo. Cuanto más se propaga el cáncer, más difícil es de erradicarlo.

Las alteraciones genéticas autónomas de las células se perciben como la única fuerza impulsora de la transformación neoplásica y las alteraciones oncogénicas del metabolismo celular se consideran derivadas de esas mutaciones. Sin embargo, con los descubrimientos de mutaciones oncogénicas en enzimas metabólicas mitocondriales apuntan a un papel de las alteraciones metabólicas en la generación de tumores.¹⁷

Los tumores requieren catabolitos para producir ATP, mantener un equilibrio de reducción-oxidación (redox) y generar biomasa. De hecho, se conoce la alta demanda de catabolitos que tienen las células tumorales. Dependiendo de la disponibilidad de estos nutrientes, algunas células dentro de un tumor son predominantemente glucolíticas, mientras que otras tienen principalmente un fenotipo metabólico OXPHOS. Esta heterogeneidad metabólica permite que diferentes células se acoplen metabólicamente promoviendo la proliferación celular y el crecimiento tumoral. El estrés oxidativo, que induce la autofagia, disfunción mitocondrial, altas tasas de glucólisis y liberación de catabolitos de un subconjunto de células tumorales, es uno de los mecanismos por los cuales se establece el acoplamiento metabólico en los tumores; los catabolitos generados por este subconjunto de células tumorales pueden ser utilizados por células en las que predomina OXPHOS. Por ejemplo, lactato y piruvato, los monocarboxilatos generados por la glucólisis citoplasmática, pueden ser transferidos y metabolizados por células adyacentes.

La glucosa es el nutriente más abundante en la sangre y es un sustrato metabólico comúnmente utilizado por las células tumorales. Como tal, se están investigando varios medicamentos que interfieren con la glucólisis y la fosforilación oxidativa como agentes anticancerígenos. Fármacos dirigidos a enzimas glucolíticas y transportadores de productos glucolíticos se han estudiado en numerosos estudios preclínicos.

Cationes lipofílicos (DLCs) y localización mitocondrial.

Las mitocondrias han emergido como un objetivo farmacológico principal y se están realizando esfuerzos cada vez mayores para diseñar moléculas de bajo peso molecular capaces de atacar a estos orgánulos o para desarrollar sistemas portadores de fármacos para el suministro selectivo de fármacos en su interior. Para describir y clasificar las

17 Willem H. Koppenol, Patricia L. Bounds, Chi V. Dang. (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* 11, 325-337.

moléculas que muestran un alto grado de afinidad mitocondrial, se propuso el término *mitocondriotrópicos*.

Se conoce que el efecto terapéutico de fármacos que tienen como diana procesos mitocondriales puede verse mejorado mediante la conjugación del fármaco con un catión lipofílico deslocalizado (DLC) ya que permite una liberación selectiva.

Los cationes lipofílicos deslocalizados (DLCs) pueden penetrar fácilmente las membranas debido a su baja entalpía de solvatación resultado de la repartición de la carga positiva sobre su amplia superficie. La captación inicial de los DLCs se ve favorecida por la carga negativa existente en la cara interna de la membrana celular ($\Delta\psi_c = -30$ a -60 mV), y una vez en el interior del citosol se acumula entre 10 y 100 veces más cantidad en el interior de la mitocondria que en el citosol como consecuencia de su alto potencial de membrana, resultado de la cadena de transporte electrónico ($\Delta\psi_m = -150$ a -180 mV). Esto explica como grandes concentraciones de estos compuestos producirían un daño en la membrana.

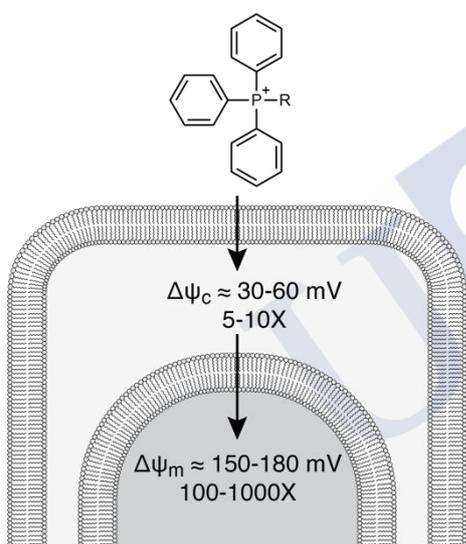


Figura 3. Esquema de internalización de un catión lipofílico a través de las membranas citosólica y mitocondrial inducido por la diferencia de potencial entre los diferentes compartimentos celulares. Los cationes TPP se adsorben en la membrana y luego, saltan rápidamente a través del núcleo hidrofóbico de la membrana hacia el pozo de energía potencial en la otra superficie de la membrana antes de desorberse de la membrana. Este mecanismo permite que los cationes lipofílicos pasen fácilmente a través de las bicapas de fosfolípidos y, por lo tanto, estos cationes pueden atravesar la membrana interna mitocondrial y acceder a la matriz.

Además, las células tumorales poseen un potencial de membrana mitocondrial más elevado que las células sanas,¹⁸ lo que facilita la acumulación de los DLCs en el tumor evitando toxicidades indeseadas.¹⁹ Por tanto, estos efectos deben tenerse en cuenta cuando consideramos usar este tipo de cationes lipofílicos como vehículo para dirigir antioxidantes u otros compuestos a las mitocondrias.

Se sugirió como estos cationes se pueden utilizar como "locomotoras eléctricas" para acumular residuos neutros dentro de la mitocondria. Este principio ha sido empleado con éxito por el grupo de M. Murphy para dirigir antioxidantes como CoQ o vitamina E a las

18 Bouchier-Hayes, L., Muñoz-Pinedo, C., Connell, S., and Green, D. R. (2008) Measuring apoptosis at the single cell level. *Methods* 44, 222–228.

19 Heerdt, B. G., Houston, M. A., and Augenlicht, L. H. (2005) The intrinsic mitochondrial membrane potential of colonic carcinoma cells is linked to the probability of tumor progression. *Cancer Res.* 65, 9861–9867.

mitocondrias. De acuerdo con la ecuación de Nernst, el coeficiente de acumulación en las mitocondrias ($\Delta\psi_m$ aproximadamente 180 mV) debería ser de alrededor de 10^3 .

Los cationes lipofílicos como el catión de tetrafenilfosfonio (tetraPP) y el catión metiltrifenilfosfonio (TPMP) tienen la propiedad inusual de ser relativamente solubles en lípidos, a pesar de su carga positiva neta. En consecuencia, pueden pasar fácilmente a través de las bicapas de fosfolípidos hacia el interior de las mitocondrias. La impermeabilidad de las membranas biológicas a los cationes hidrófilos se debe en gran medida al coste energético asociado al movimiento de un ion desde un ambiente acuoso al interior lipídico no polar de la membrana. Por lo tanto, la energía de activación para el movimiento a través del núcleo hidrofóbico de la membrana es muy alta, mientras que para los cationes lipofílicos esta energía de activación es mucho más baja, lo que permite su paso.

La energía de activación para el movimiento del medio acuoso al núcleo hidrofóbico de la membrana tiene contribuciones de interacciones electrostáticas y de fuerzas hidrofóbicas. El principal componente de energía electrostática, la *energía de Born*, es el coste entálpico asociado a la desolvatación de las moléculas de agua del catión tras la transferencia del ambiente acuoso al núcleo lipídico de la membrana; dicha entalpía es inversamente proporcional al radio iónico, de manera que un catión cuya carga se dispersa sobre un área de superficie grande tendrá una menor energía de solvatación. Además de la energía de Born, otras dos fuerzas electrostáticas afectan también al movimiento de un catión a través de una bicapa lipídica. Una es la energía electrostática con la superficie aniónica de la membrana y la otra es la *energía de dipolo*, que es el potencial eléctrico local dentro del núcleo de la bicapa de fosfolípidos, causado por la orientación de los dipolos de los grupos carbonilo de los ácidos grasos en los fosfolípidos. Finalmente, también hay un componente hidrofóbico importante asociado a la transferencia del catión lipofílico al entorno hidrofóbico del interior de la membrana.

Hay una amplia gama de cationes de fosfonio lipofílicos que se acumulan en las mitocondrias dentro de las células. Este enfoque se puede utilizar para dirigir una amplia gama de posibles sondas o moléculas terapéuticas a las mitocondrias. Algunas de estas son antioxidantes dirigidos a mitocondrias. Si se une un antioxidante al TPP, debería acumularse en las mitocondrias de las células y bloquear selectivamente el daño oxidativo mitocondrial y manipular la señalización redox mitocondrial. Estos antioxidantes dirigidos incluyen derivados de los antioxidantes endógenos ubiquinol (*MitoQ*) y atocoférol (*MitoVit E*). Se ha demostrado que estas moléculas bloquean el daño oxidativo y previenen la muerte celular en un modelo de ataxia de Friedreich, una enfermedad que se cree que surge debido al aumento del daño oxidativo mitocondrial. La utilidad de estos compuestos como terapias está respaldada por el hallazgo de que la administración oral de cationes de fosfonio lipofílico conduce a su acumulación en el cerebro, el corazón y los músculos, que son todos los tejidos afectados por el daño oxidativo mitocondrial. Mediante la administración de tetraPP a niveles donde su acumulación mitocondrial es lo suficientemente grande como para provocar la muerte celular en las células cancerosas

debido a la interrupción inespecífica de la función mitocondrial, pero es lo suficientemente baja como para evitar matar las células de control.²⁰

Los cationes lipofílicos son tóxicos en altas concentraciones porque su absorción excesiva por las mitocondrias interrumpe la síntesis de ATP. Aun así, las dosis sustanciales de TPMP y MitoVit E fueron bien toleradas. Curiosamente, las dosis agudas máximas toleradas fueron ampliamente similares, a pesar de las cadenas laterales e hidrofobicidades bastante diferentes de los tres compuestos. Este resultado implica que la toxicidad de estos compuestos está determinada por el catión lipofílico, no por la cadena lateral. La absorción fue reversible, como lo demuestra la rápida eliminación de TPMP de todos los órganos cuando se detuvo la administración oral. Se demostró que estos compuestos pueden ingresar al torrente sanguíneo y distribuirse a los tejidos.²¹

La ecuación de Nernst describió la absorción de MitoQ en las mitocondrias. Es muy probable que esta unión sea a la superficie de la membrana interna que mira hacia la matriz, con los compuestos de TPP adsorbidos como una monocapa en la membrana con el catión TPP en un pozo de energía potencial cerca de la superficie con la cadena lateral hidrofóbica insertada en la membrana. Sin embargo, la ubicación para los derivados hidrofóbicos de TPP es fortuita, ya que muchas actividades mitocondriales están asociadas con la membrana interna.

Por tanto, la absorción de los cationes TPP lipofílicos en las mitocondrias se describe mediante la ecuación de Nernst, es rápida en comparación con su metabolismo y se equilibra rápidamente con el conjunto de CoQ.²²

Además de los DLCs se han ensayado otros transportadores para la localización selectiva de moléculas bioactivas en las mitocondrias. Además de sistemas nanotecnológicos, como podrían ser sistemas basados en vesículas o nanopartículas, tal vez los más exitosos sean los **péptidos dirigidos a mitocondria**, que pueden dividirse en dos tipos: péptidos que contienen secuencias de señalización para transporte a mitocondrias y péptidos cuyas propiedades físico-químicas similares a las de los DLCs inducen la localización mitocondrial aprovechando el gradiente de potencial.²³

20 Ross, M.F., Kelso, G.F., Blaikie, F.H., James, A.M., Cochemé, H.M., Filipovska, A., Da Ros, T., Hurd, T.R., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P. (2005). Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry* 70, 222–230.

21 Smith, R.A.J., Porteous, C.M., Gane, A.M., and Murphy, M.P. (2003). Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5407–5412.

22 Ross, M.F., Prime, T.A., Abakumova, I., James, A.M., Porteous, C.M., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P. (2008). Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *Biochem. J* 411, 633–645.

23 Jean, S.R., Ahmed, M., Lei, E.K., Wisnovsky, S.P., and Kelley, S.O. (2016). Peptide-Mediated Delivery of Chemical Probes and Therapeutics to Mitochondria. *Acc. Chem. Res.* 49, 1893–1902.

Secuencias de transporte mitocondrial (MTS). Ciertas proteínas mitocondriales son codificadas en el núcleo de la célula y expresadas en el citoplasma y contienen secuencias de transporte mitocondrial de 20 a 40 aminoácidos que son reconocidas por translocasas en la membrana externa mitocondrial (e.g., TOM20, TOM22, TOM70 en la membrana externa y TIM23, TIM44 en la interna) para su importación.²⁴ Las principales dificultades asociadas a este enfoque están relacionadas con el considerable tamaño molecular de los MTS, así como su pobre solubilidad y permeabilidad, asociadas a estructura típica anfifílica (e.g., presecuencia pCOX IV (1-25): MLSLRQSIRF FKPATRTLCS SRYLL; pOTC(1-38): MLSNLRILLN KAALRKAHTS MVRNFRYGGP VQSQVQLK; PALDH(1-22); MLRAALSTAR KGPRLSRLLS YA). Estudios por RMN demuestran que estas secuencias adoptan una estructura helicoidal en donde la cara hidrofóbica se inserta en un surco de TOM20.²⁵

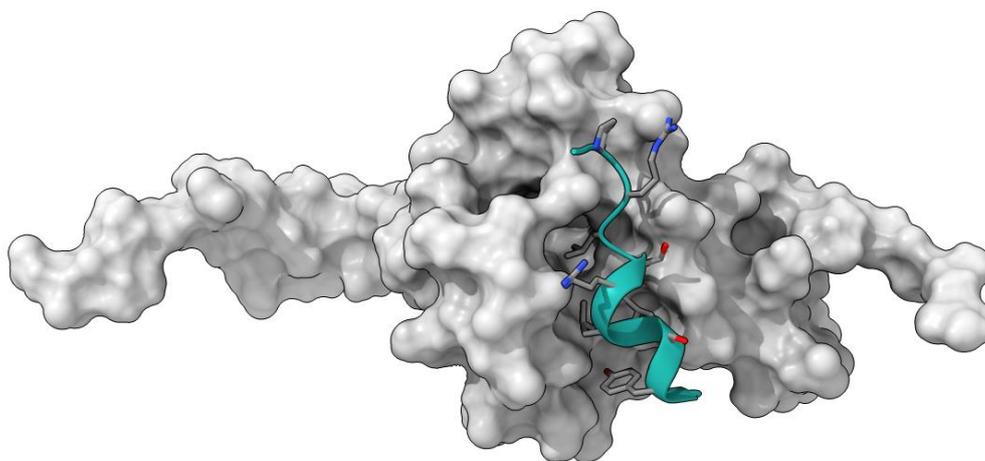


Figura 4 Estructura del fragmento correspondiente a la hélice N-terminal de pALDH (12-22 , GPRLSRLLSYA) unida al receptor mitocondrial TOM20 (PDB ID, 1OM2).

Péptidos sintéticos. Trabajos recientes han demostrado que la localización mitocondrial de los transportadores sintéticos se puede controlar alterando la lipofilia y la carga de las cadenas peptídicas, de manera que sus propiedades sean similares a las de los DLCs, lo que permite el diseño racional de transportadores eficientes para el suministro de fármacos a las mitocondrias. Destaca el trabajo del grupo de la Prof. S. O’Kelley, quien ha descrito secuencias sencillas donde se alternan residuos de ciclohexilalanina y argina que favorecen el transporte mitocondrial.²⁶

-
- 24 Pfanner, N., and Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 339–349.
 - 25 Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551–560.
 - 26 Horton, K.L., Stewart, K.M., Fonseca, S.B., Guo, Q., and Kelley, S.O. (2008). Mitochondria-penetrating peptides. *Chem. Biol.* 15, 375–382.

Modulación del estrés oxidativo como terapia. Mitocans.

Por otra parte, los ribosomas mitocondriales están especializados para la síntesis de las subunidades clave del sistema mitocondrial de transporte de electrones en la fosforilación oxidativa y se ha observado que la inhibición de la traducción de proteínas mitocondriales tiene actividad anticancerígena en estudios preclínicos. En este contexto es importante destacar que diversos antibióticos también presentan actividad cruzada al unirse a los ribosomas mitocondriales (mitorribosomas), e inhiben la síntesis de proteínas mitocondriales. Así pues, los antibacterianos de tipo aminoglucósidos, que actúan uniéndose a la subunidad 30S, también pueden unirse a la subunidad pequeña del mitorribosoma humano e inhibir la síntesis de proteínas mitocondriales; las oxazolidinonas, tales como el *linezolid*, se unen a las subunidades (mito) ribosómicas grandes y tetraciclinas, como la *doxiciclina* o la *tigeciclina*, que también se unen al ribosoma bacteriano 30S, inhiben la función del mitorribosoma y en todos los casos se ha observado una importante actividad antitumoral que han llevado a la realización de ensayos clínicos para evaluar su reposicionamiento como agentes anticancerígenos.^{27,28,29}

El estrés oxidativo y el metabolismo mitocondrial están muy vinculados. Cuando la producción de ROS en el proceso de fosforilación oxidativa es mayor que la capacidad de defensa antioxidante de la célula, se produce estrés oxidativo, que puede conducir a la muerte celular. Por lo tanto, para neutralizar el ROS y el estrés oxidativo, las células cancerosas tienen potenciadas sus defensas antioxidantes, que contribuyen a la oncogénesis. Por lo tanto, los medicamentos dirigidos al estrés oxidativo mitocondrial pueden reducir el potencial metastásico.³⁰

La producción de superóxido a partir de complejos respiratorios es una fuente importante de especies de oxígeno reactivo mitocondrial. Dentro de la matriz, el superóxido se convierte rápidamente por la Mn superoxidismutasa (MnSOD) en peróxido de hidrógeno, lo que contribuye al daño oxidativo en una variedad de patologías, incluidas las lesiones por isquemia/reperfusión, diabetes y neurodegeneración. En base a este hecho, el profesor Michael P. Murphy eligió para generar superóxidos, derivados del *Paraquat* (PQ, dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina) un herbicida ampliamente utilizado para

-
- 27 Xu, Z., Yan, Y., Li, Z., Qian, L., and Gong, Z. (2016). The Antibiotic Drug Tigecycline: A Focus on its Promising Anticancer Properties. *Front. Pharmacol.* 7, 473.
 - 28 Marchetti, P., Guerreschi, P., Mortier, L., and Kluza, J. (2015). Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics. *Int. J. Cell Biol.* 2015, 283145.
 - 29 Lamb, R., Ozsvari, B., Lisanti, C.L., Tanowitz, H.B., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2015). Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget* 6, 4569–4584.
 - 30 Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Maria Peiris-Pagès, Richard G. Pestell, Federica Sotgia, Michael P. Lisanti. (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clinical Oncol.* 14, 11-32.

aumentar la producción de superóxido en mitocondrias aisladas, células y organismos modelo.

El PQ puede aumentar la formación de superóxido mitocondrial *in vivo*, pero se requieren concentraciones de PQ muy altas para obtener los efectos mitocondriales deseados, lo que lleva a un aumento de superóxido en sitios no mitocondriales. Por lo tanto, se han desarrollado derivados del PQ que se acumulan selectiva y rápidamente en las mitocondrias, generando superóxidos solo dentro de estas. Aunque el PQ es un catión, su alta carga superficial e interfaz polar con agua hacen que el coste energético para su transporte a través del núcleo hidrofóbico de las membranas lipídicas sea muy elevado; con el fin de facilitar su transporte se probaron dos estrategias. La primera fue aumentar la hidrofobicidad de la molécula para hacer que su entrada en la membrana sea menos desfavorable y el segundo método fue conjugarla con un catión de trifenilfosfonio (TPP) lipofílico, que se acumula en mitocondrias en respuesta al potencial de membrana mitocondrial.³¹

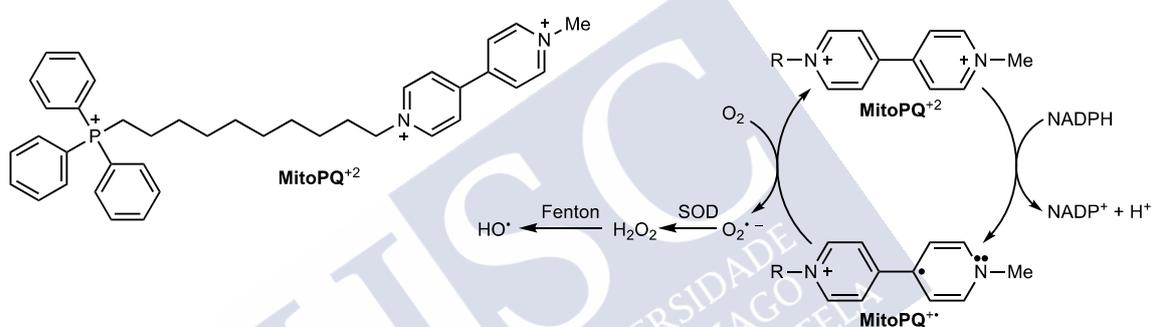


Figura 5 Estructura del **MitoPQ⁺²** y esquema del ciclo redox que da lugar a la generación de ROS y citotoxicidad.

Un efecto opuesto (disminución de ROS) se puede observar con la *Mitoquinona*, un análogo de la ubiquinona, que ha alcanzado la fase II del desarrollo clínico para el tratamiento de enfermedades como el Parkinson, hepatitis C y la enfermedad del hígado graso. La mejora de la eficacia terapéutica obtenida con la mitoquinona modificada se debe a la conjugación de esta con un catión TPP, el cual dota al fármaco de una acumulación específica en la mitocondria, lugar donde ejercerá su acción. La mitoquinona o MitoQ es un ejemplo de los múltiples antioxidantes que han sido modificados con el catión TPP, resultando en todos los casos en un aumento de la cantidad y velocidad con la que el fármaco se acumula en el interior celular y favoreciendo la localización mitocondrial una vez dentro de la célula. A mayores, el uso de TPP se ha

31 Ellen L. Robb, Justyna M. Gawel, Dunja Aksentijević, Helena M. Cochemé, Tessa S. Stewart, Maria M. Shchepinova, He Qiang, Tracy A. Prime, Thomas P. Bright, Andrew M. James, Michael J. Shattock, Hans M. Senn, Richard C. Hartley, Michael P. Murphy. (2015) Selective superoxide generation within mitochondria by the targeted redox cyler Mito Paraquat. *Free Radical Biol. Med.* 89, 883–894.

extendido al desarrollo de pruebas específicas mitocondriales, y representa una herramienta fundamental en la farmacología mitocondrial.

La administración sistemática de fármacos dirigida selectivamente a funciones mitocondriales presenta numerosos problemas. Por lo tanto, se ha prestado mucha atención a los medicamentos dirigidos a mitocondria, que pueden llegar a estos orgánulos sin afectar otras estructuras intracelulares y procesos extramitocondriales. Dicha administración selectiva de medicamentos se puede lograr mediante el uso de **transportadores específicos** que pueden unirse y entrar en las mitocondrias.





Objetivos

En este proyecto de tesis nos planteamos el estudio de diversas plataformas para la modulación del estrés oxidativo en células con posibles aplicaciones en quimioterapia.

- Síntesis de prodrogas de antibióticos dirigidas a la mitocondria por conjugación a cationes derivados del trifenilfosfonio. Se propone el uso de prodrogas sensibles al medio oxidante en el interior de la mitocondria, de manera que una vez en el interior de la matriz, el estrés oxidativo libere el antibiótico.
- Síntesis de ligandos peptídicos lineales y cíclicos capaces de coordinar iones Cu(II) y que puedan participar en reacciones de Fenton para generar ROS en el medio celular.





Derivados de antibióticos dirigidos a las mitocondrias para la modulación del estrés oxidativo

Antibióticos y estrés oxidativo. Inhibición de síntesis de proteínas mitocondriales.

Muchas familias de antibióticos inhiben la síntesis bacteriana de proteínas al unirse a los ribosomas, lo que acaba impidiendo el crecimiento de los microorganismos.³² Desafortunadamente, la similitud existente entre las mitocondrias y las bacterias hacen a estos orgánulos susceptibles a la inhibición de la síntesis proteica por algunos antibióticos, lo que se apoya en la teoría de la endosimbiosis mitocondrial.³³ De esta manera, un alto número de efectos adversos resultado de la inhibición de la síntesis proteica han sido observados en antibióticos como el cloranfenicol, tetraciclinas y oxazolidinonas.³⁴ Sin embargo, estos efectos indeseados abren nuevas oportunidades para aplicaciones como agentes anticancerígenos y de hecho, se han descrito efectos citotóxicos sobre distintas líneas celulares tumorales. En particular, es relevante un estudio realizado por el grupo de M. P. Lisanti, el cual demuestra que cinco clases de antibióticos actúan como agentes citotóxicos efectivos contra células madre de varios tipos tumorales (páncreas, melanoma, mama, carcinoma ductal in situ, próstata, pulmón y glioblastoma).³⁵ Otro estudio reciente demuestra que la *tigeciclina*, un derivado de la *minociclina* aprobado por la FDA, posee actividad sobre células madre y progenitoras de leucemia *in vitro* e *in vivo*.³⁶ Además, este mismo antibiótico es capaz de inhibir la proliferación celular e inducir la muerte celular programada en líneas celulares de cáncer

-
- 32 Bulkley, D., Innis, C. A., Blaha, G., and Steitz, T. A. (2010) Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 17158–17163.
- 33 Barnhill, A. E., Brewer, M. T., and Carlson, S. A. (2012) Adverse Effects of Antimicrobials via Predictable or Idiosyncratic Inhibition of Host Mitochondrial Components. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4046–4051.
- 34 McKee, E. E., Ferguson, M., Bentley, A. T., and Marks, T. A. (2006) Inhibition of Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis by Oxazolidinones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2042–2049.
- 35 Lamb, R., Ozsvari, B., Lisanti, C. L., Tanowitz, H. B., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. (2015) Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget* 6, 4569–4584.
- 36 Skrtić, M., Srisanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., Hurren, R., Jitkova, Y., Gronda, M., Maclean, N., Lai, C. K., Eberhard, Y., Bartoszko, J., Spagnuolo, P., Rutledge, A. C., Datti, A., Ketela, T., Moffat, J., Robinson, B. H., Cameron, J. H., Wrana, J., Eaves, C. J., Minden, M. D., Wang, J. C. Y., Dick, J. E., Humphries, K., Nislow, C., Giaever, G., and Schimmer, A. D. (2011) Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 20, 674–688.

de pulmón no microcítico,³⁷ inhibir la progresión del melanoma³⁸ y la proliferación del cáncer gástrico.³⁹ En todos estos casos el mecanismo de acción se asocia a la inhibición de la función mitocondrial.⁴⁰ Tomando como referencia los estudios publicados, nos centraremos en la *Levofloxacin*, un antibiótico de amplio espectro que pertenece a la familia de las fluoroquinolonas de segunda generación. Este antibiótico inhibe las topoisomerasas (enzimas responsables de modular el grado de enrollamiento del ADN). y su efecto antitumoral se asocia a la inhibición de la biogénesis mitocondrial. La levofloxacin presenta fluorescencia intrínseca, lo cual resulta atractivo para estudiar su transporte y localización intracelular.

Se ha demostrado que la *Levofloxacin* y otros antibióticos (quinolonas, aminoglucósidos y β -lactámicos) causan disfunción mitocondrial y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en células de mamíferos lo que produce en último término un daño celular por estrés oxidativo.⁴¹ Por otro lado, las células tumorales poseen una cantidad de ROS superior a las células sanas lo que las hace más sensibles a la muerte celular por agentes que incrementan la generación de ROS.⁴² En este contexto, antibióticos específicos contra la mitocondria poseen potencial como fármacos antitumorales que afectan a mecanismos fundamentales en la transformación celular.

-
- 37 Jia, X., Gu, Z., Chen, W., and Jiao, J. (2016) Tigecycline targets nonsmall cell lung cancer through inhibition of mitochondrial function. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 30, 297–306.
- 38 Hu, H., Dong, Z., Tan, P., Zhang, Y., Liu, L., Yang, L., Liu, Y., and Cui, H. (2016) Antibiotic drug tigecycline inhibits melanoma progression and metastasis in a p21CIP1/Waf1-dependent manner. *Oncotarget* 7, 3171–3185.
- 39 Tang, C., Yang, L., Jiang, X., Xu, C., Wang, M., Wang, Q., Zhou, Z., Xiang, Z., and Cui, H. (2014) Antibiotic drug tigecycline inhibited cell proliferation and induced autophagy in gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 105–112.
- 40 Moullan, N., Mouchiroud, L., Wang, X., Ryu, D., Williams, E. G., Mottis, A., Jovaisaite, V., Frochoux, M. V., Quiros, P. M., Deplancke, B., Houtkooper, R. H., and Auwerx, J. (2015) Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep.* 10, 1681–1691.
- 41 Kalghatgi, S., Spina, C. S., Costello, J. C., Liesa, M., Morones-Ramirez, J. R., Slomovic, S., Molina, A., Shirihai, O. S., and Collins, J. J. (2013) Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 192ra85.
- 42 Gorrini, C., Harris, I. S., and Mak, T. W. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947; b) Yang, Y., Karakhanova, S., Hartwig, W., D’Haese, J. G., Philippov, P. P., Werner, J., and Bazhin, A. V. (2016) Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J. Cell. Physiol.* 231, 2570–2581.

Prodrogas sensibles al estrés oxidativo: boronatos.

Las prodrogas son derivados de fármacos que experimentan una transformación química o enzimática *in vivo* para liberar el fármaco original activo que luego puede ejercer el efecto terapéutico deseado. Las prodrogas se han convertido en una herramienta ampliamente usada para mejorar las propiedades fisicoquímicas, farmacológicas o farmacocinéticas, de manera que alrededor del 5-7% de los medicamentos aprobados en todo el mundo pueden clasificarse como profármacos.⁴³

Las prodrogas brindan la posibilidad de superar diversas barreras para la formulación y administración de fármacos, como la escasa solubilidad acuosa, la inestabilidad química, la absorción oral insuficiente, el rápido metabolismo pre-sistémico, o la penetración cerebral inadecuada, la toxicidad y la irritación local. Además, también pueden mejorar la localización de los fármacos.

Existen una serie de grupos funcionales susceptibles de diseño de prodrogas. Idealmente, el diseño de una estructura apropiada debe considerarse en las primeras etapas del desarrollo preclínico, teniendo en cuenta que estos pueden alterar la distribución en los tejidos, la eficacia y la toxicidad del fármaco original. Se deben examinar cuidadosamente varios factores importantes al diseñar su estructura, que incluyen: Los grupos funcionales del medicamento original que se puedan modificar; la forma en que se eliminan del cuerpo, ya que la excreción debe ser segura y rápida; la absorción, distribución, metabolismo, excreción (ADME) y propiedades farmacocinéticas de la familia del profármaco; los posibles subproductos de degradación que pueden afectar la estabilidad química y física y conducir a la formación de nuevos productos de degradación.

Algunos de los grupos funcionales más comunes que se utilizan en el diseño de estas prodrogas aprovechan los grupos carboxílico, hidroxilo, amina, fosfato y carbonilo en los fármacos mediante su modificación en forma de ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas, fosfatos y oximas. Sin embargo, otros grupos funcionales poco comunes también se han investigado como estructuras potencialmente útiles en el diseño de prodrogas. Por ejemplo, los tioles reaccionan de manera similar a los alcoholes y pueden derivatizarse a tioéteres y tioésteres.

Los ésteres son las prodrogas más comúnmente utilizadas, y se estima que aproximadamente el 49% de todos ellos se activan por hidrólisis enzimática. Los profármacos de éster se usan con mayor frecuencia para mejorar la lipofilia y, por lo tanto, la permeabilidad pasiva de la membrana de los medicamentos solubles en agua enmascarando grupos cargados como los ácidos carboxílicos y los fosfatos. La síntesis de una prodroga de éster es a menudo sencilla. Una vez en el cuerpo, el enlace éster se hidroliza fácilmente por esterasas ubicuas que se encuentran en la sangre, el hígado y otros órganos y tejidos, incluidas las carboxilesterasas, las acetilcolinesterasas, las

⁴³ Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., and Savolainen, J. (2008). Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 255–270.

butirilcolinesterasas, las paraoxonasas y las arilesterasas. Sin embargo, un desafío significativo con los profármacos de ésteres es la predicción precisa de la disposición farmacocinética en humanos.

Varias prodrogas de ésteres de alquilo y arilo están en uso clínico, de los cuales los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) son algunos de los más exitosos. Sin embargo, la bioconversión relativamente lenta e incompleta de algunos ésteres de alquilo simples en sangre humana a veces puede dar lugar a una biodisponibilidad inferior a la prevista. Las prodrogas de éster de fosfato están normalmente funcionalizadas con grupos amino e hidroxilo con el objetivo de mejorar su solubilidad acuosa para permitir una administración más favorable.

Los carbonatos y los carbamatos difieren de los ésteres por la presencia de oxígeno o nitrógeno en ambos lados del carbono carbonílico. A menudo son enzimáticamente más estables que los ésteres correspondientes, pero son más susceptibles a la hidrólisis que las amidas. La bioconversión de muchos profármacos de carbonato y carbamato requiere esterasas para la formación del fármaco original.

En el diseño de prodrogas, las amidas se han usado solo en un grado limitado debido a su alta estabilidad enzimática in vivo. Un enlace amida generalmente se hidroliza por carboxilesterasas ubicuas, peptidasas o proteasas. Normalmente están diseñadas para una absorción oral mejorada mediante la síntesis de sustratos de transportadores de captación intestinal específicos.

Así, usando los grupos funcionales descritos anteriormente, la estrategia de profármacos se ha aplicado con éxito a una amplia gama de moléculas de fármacos.

La selectividad en la localización de los medicamentos puede ser determinante para su actividad y se puede lograr de cuatro maneras diferentes: mediante el enriquecimiento pasivo de drogas en el órgano; a través de la entrega mediada por transportador; por activación metabólica selectiva a través de enzimas; y por direccionamiento antigénico.

Una vez que la prodroga alcanza su sitio de unión, existe otro punto importante, que es la duración de acción del fármaco. Aunque varias formulaciones farmacéuticas se usan con frecuencia para prolongar la duración de la acción del fármaco, también existen algunos ejemplos que usan prodrogas. Generalmente se bioconvierten rápidamente, sin atenuar su acción terapéutica en la mayoría de los casos.⁴³

Como hemos comentado anteriormente, los ésteres son moléculas que se han utilizado en muchas ocasiones como prodrogas. Debido a su reactividad, los **ésteres borónicos** son elementos clave necesarios en el desarrollo de antioxidantes dirigidos a las mitocondrias ya que permiten una hidrólisis selectiva en medios oxidantes. Los boronatos se han

utilizado para el desarrollo de sensores fluorescentes específicos de ROS,^{44,45,46} pero no para la liberación de moléculas bioactivas dirigidas a procesos mitocondriales específicos. Existen una serie de estrategias de activación de ROS para un mayor desarrollo de nuevos profármacos, que finalmente conducen a enfoques novedosos y/o tecnología combinada para un tratamiento más eficaz y selectivo.

La selectividad se logra combinando una reacción específica entre boronatos y H₂O₂ (Figura 6) con el enmascaramiento eficaz de la toxicidad del fármaco en el profármaco a través del boronato. Los profármacos activados por ROS deben estar formados por dos dominios funcionales separados: un aceptor de ROS "desencadenante" y un "efector". La unidad de activación se debe unir con el efector mediante un "sistema de enlace" para que la reacción provoque un gran aumento en la potencia citotóxica del efector. Los boronatos reaccionan selectivamente con H₂O₂ formando un intermedio que se hidroliza rápidamente y libera los grupos salientes. Los ácidos y ésteres borónicos no parecen tener problemas de toxicidad intrínseca y, por tanto, el producto final de ácido bórico se considera no tóxico para los humanos.⁴⁷

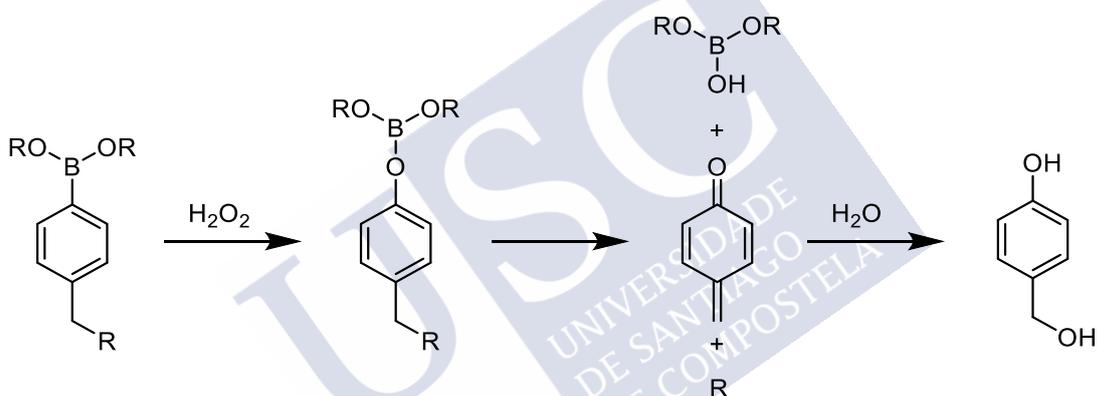


Figura 6 Activación de boronatos mediante peróxido de hidrógeno.

Existen sistemas muy relevantes de prodrogas sensibles a ROS. Se han desarrollado reactores sensibles a ROS basados en la camptotecina.⁴⁸ La camptotecina se ha seleccionado como un fármaco mitocondrial modelo, que puede actuar como un inhibidor

-
- 44 Dickinson, B. C., Huynh, C., Chang, C. J. (2010) A palette of fluorescent probes with varying emission colors for imaging hydrogen peroxide signaling in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5906–5915.
- 45 Dickinson, B. C. & Chang, C. J. (2008) A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9638–9639.
- 46 Chang, M. C. Y., Pralle, A., Isacoff, E. Y., Chang, C. J. (2004) A selective, cell-permeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15392–15393.
- 47 Peng, X., and Gandhi, V. (2012). ROS-activated anticancer prodrugs: a new strategy for tumor-specific damage. *Ther. Deliv.* 3, 823–833.
- 48 Zhang, W., Hu, X., Shen, Q., and Xing, D. (2019). Mitochondria-specific drug release and reactive oxygen species burst induced by polyprodrug nanoreactors can enhance chemotherapy. *Nat. Commun.* 10, 1704.

de la respiración celular para estimular la producción endógena de mtROS y la hiperpolarización de las mitocondrias, además de la inhibición general de la ADN topoisomerasa I para la terapia contra el cáncer. La camptotecina es un alcaloide de quinolina citotóxico y muy hidrofóbico que se modificó mediante la introducción de un conector sensible a ROS para modificar covalentemente su grupo hidroxilo, poder introducir una cadena lateral anfifílica y posteriormente liberar el fármaco, como se puede ver en la Figura 7.⁴⁹

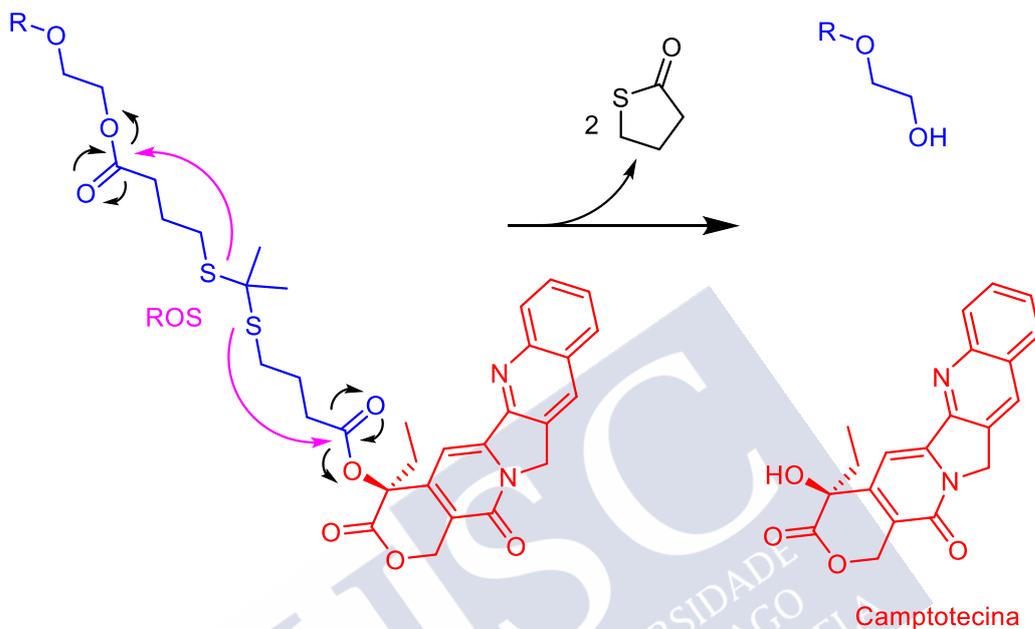


Figura 7 Mecanismo de liberación selectiva de la prodroga derivada de la camptotecina a través del grupo tiol sensible a las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Otro de los sistemas que se han utilizado como prodrogas sensibles a ROS ha sido los derivados de la doxorrubicina, un antibiótico de la familia de las antraciclinas. La doxorrubicina se conecta reversiblemente a una subunidad de ácido dicloroacético (DCA), así como al grupo de direccionamiento mitocondrial trifenilfosfonio (TPP).⁵⁰ Dentro de la estructura de esta prodroga, la unidad de DCA se une en forma de una anilina amida que se esperaba que fuera susceptible a la liberación inducida por enzimas. Se esperaba que la rotura del enlace cumpliera un doble papel. Primero, proporcionaría un modulador metabólico que debilitaría los mecanismos de resistencia a los medicamentos.

49 Zhang, W., Hu, X., Shen, Q., and Xing, D. (2019). Mitochondria-specific drug release and reactive oxygen species burst induced by polyprodrug nanoreactors can enhance chemotherapy. *Nat. Commun.* 10, 1704.

50 Sharma, A., Lee, M.-G., Shi, H., Won, M., Arambula, J.F., Sessler, J.L., Lee, J.Y., Chi, S.-G., and Kim, J.S. (2018). Overcoming Drug Resistance by Targeting Cancer Bioenergetics with an Activatable Prodrug. *Chem* 4, 2370–2383.

En segundo lugar, induciría una cascada de reacciones para liberar la doxorrubicina libre que finalmente se traslocaría al núcleo de las mitocondrias (Figura 8).⁵¹

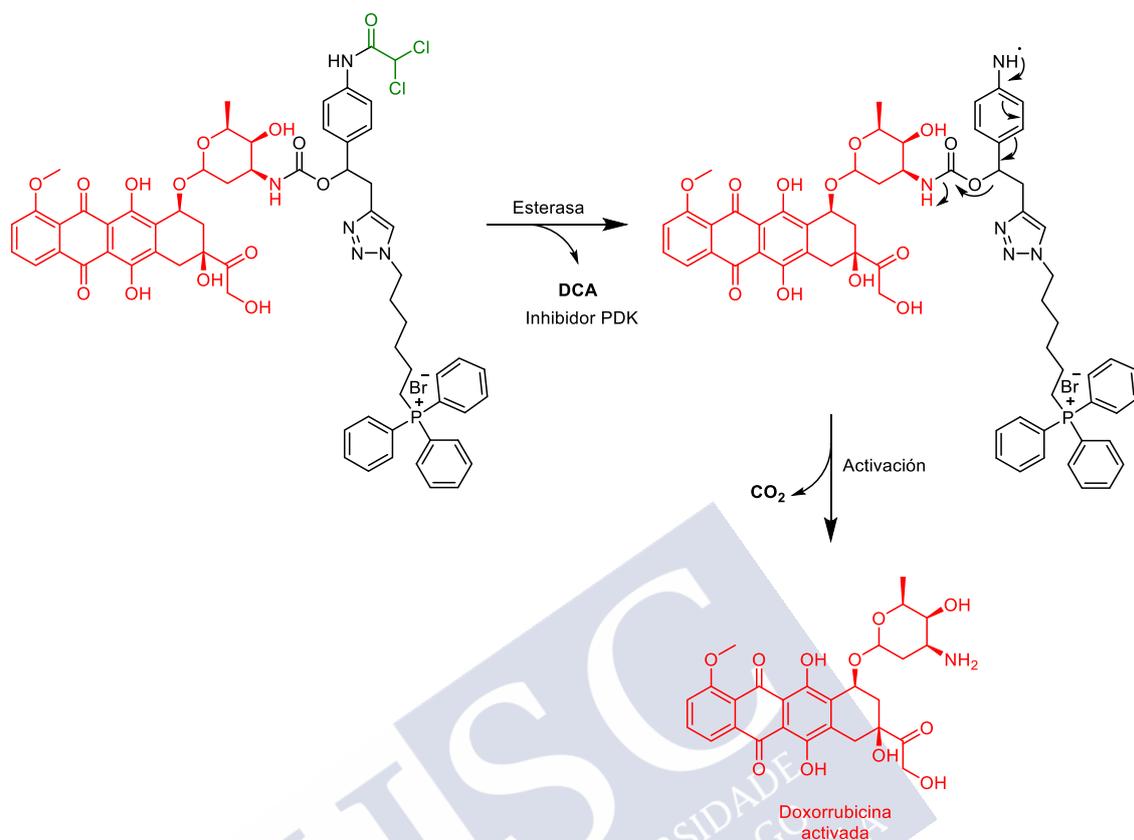


Figura 8 Mecanismo de liberación selectiva del profármaco derivado de la doxorrubicina activada por la enzima carboxilesterasa.

51 Sharma, A., Lee, M.-G., Shi, H., Won, M., Arambula, J.F., Sessler, J.L., Lee, J.Y., Chi, S.-G., and Kim, J.S. (2018). Overcoming Drug Resistance by Targeting Cancer Bioenergetics with an Activatable Prodrug. *Chem* 4, 2370–2383.



Discusión de resultados.

Diseño y síntesis de una prodroga de Levofloxacin-TPP.

Como sistema modelo para evaluar la viabilidad de la estrategia en este proyecto nos proponemos la síntesis de conjugados entre el antibiótico *levofloxacin* con el catión lipofílico deslocalizado trifenilfosfonio (TPP) que promueva la internalización y la localización mitocondrial. Para el diseño de estos conjugados hemos de tener en cuenta que los TPP son fragmentos muy voluminosos y podrían bloquear la unión del fármaco a su diana biológica. Por lo tanto, para mantener su actividad es esencial que se libere el antibiótico una vez se encuentre en la matriz mitocondrial. Con este objetivo nos proponemos el diseño de profármacos en los que el TPP esté unido al antibiótico a través de un conector hidrolizable, sensible al medio oxidante de la matriz mitocondrial.

Basándonos en los precedentes bibliográficos decidimos usar como conector un éster borónico que es susceptible a romperse por efecto de las especies reactivas de oxígeno (especialmente H_2O_2) presentes en la matriz mitocondrial.⁵² Por lo tanto, en esta síntesis nos enfrentamos a dos desafíos principales. En primer lugar, diseñar una ruta compatible simultáneamente con la química de los derivados de boro y con las sales de fosfonio y, en segundo lugar, que el boronato sea estable en medio acuoso pero a la vez lo suficientemente lábil como hidrolizarse de forma eficiente en condiciones oxidantes una vez el conjugado haya alcanzado la mitocondria.

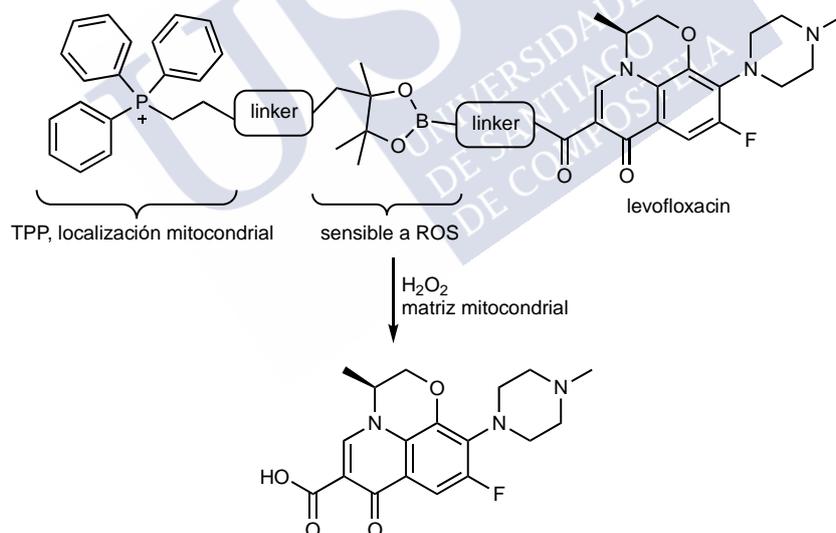
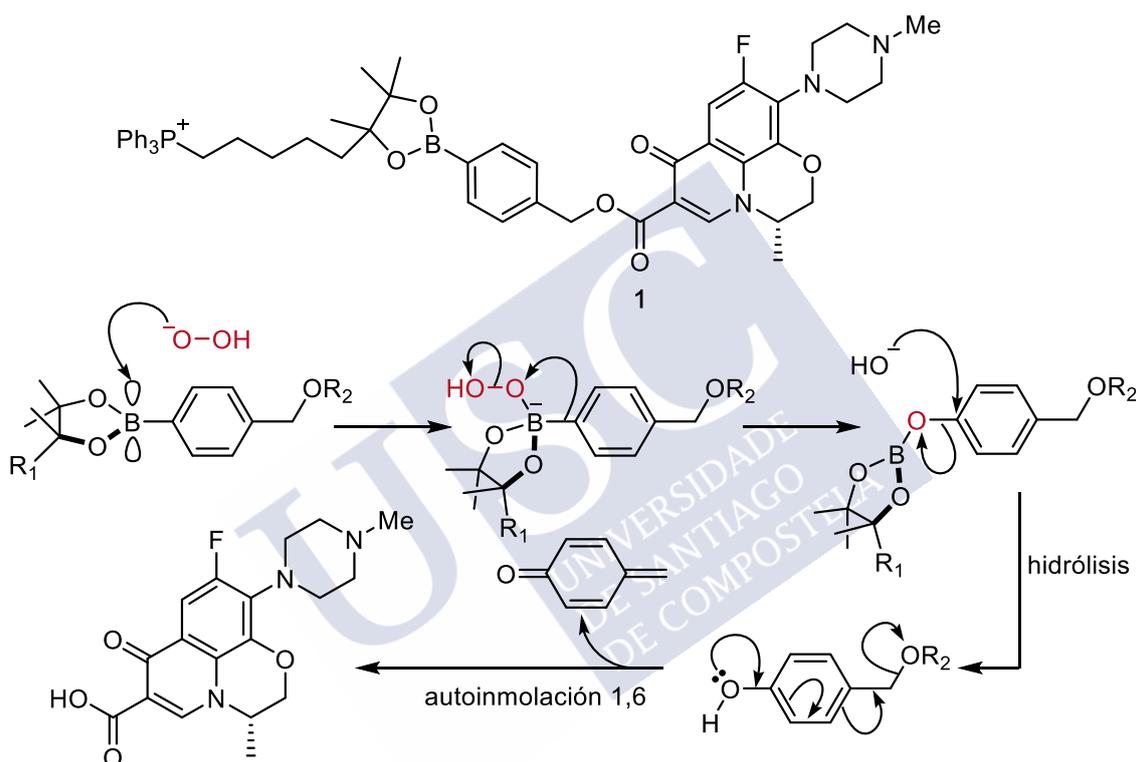


Figura 9. Esquema de la estrategia de liberación del profármaco de la levofloxacin. El derivado del trifenilfosfonio es el encargado de dirigir al profármaco a la matriz mitocondrial, donde el conector derivado de pinacol se hidroliza y libera la levofloxacin.

Previamente en el grupo, se había diseñado y sintetizado un derivado de la levofloxacin con un conector autoinmolable consistente en un éster borónico derivado del

52 Jourden, J. L. M., Daniel, K. B., and Cohen, S. M. (2011) Investigation of self-immolative linkers in the design of hydrogen peroxide activated metalloprotein inhibitors. *Chem. Commun.* **47**, 7968–7970.

2-metilbutano-2,3-diol unido a la levofloxacina a través de un éster bencílico. La hidrólisis de este tipo de boronatos aromáticos electrofílicos es conocida desde mediados del siglo XX,⁵³ y han sido descritos previamente en sensores fluorescentes que liberan fluoróforos por la hidrólisis oxidativa del éster borónico.^{54,55} La hidrólisis se inicia por la adición del peróxido al orbital *p* vacío del átomo de boro, generando un boronato que a continuación sufre un reagrupamiento por migración 1,2- del enlace C-B hasta el átomo de oxígeno adyacente, con pérdida de hidróxido. Finalmente, se hidroliza el enlace O–B generando el alcohol.⁵⁶ Este mecanismo de hidrólisis se combina con la autoinmolación de un derivado bencílico con un buen grupo saliente, que se fragmenta generando una ciclohexenona y liberando el fármaco como grupo saliente.



Esquema 1 Mecanismo de hidrólisis de ésteres borónicos de pinacol y fragmentación 1,6 con liberación de la levofloxacina.

-
- 53 Kuivila, H.G., and Armour, A.G. (1957). Electrophilic Displacement Reactions. IX. Effects of Substituents on Rates of Reactions between Hydrogen Peroxide and Benzenboronic Acid 1-3. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5659–5662.
- 54 Van de Bittner, G.C., Dubikovskaya, E.A., Bertozzi, C.R., and Chang, C.J. (2010). In vivo imaging of hydrogen peroxide production in a murine tumor model with a chemoselective bioluminescent reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21316–21321.
- 55 Lin, V.S., Dickinson, B.C., and Chang, C.J. (2013). Boronate-based fluorescent probes: imaging hydrogen peroxide in living systems. *Methods Enzymol.* 526, 19–43.
- 56 Sandford, C., and Aggarwal, V.K. (2017). Stereospecific functionalizations and transformations of secondary and tertiary boronic esters. *Chem. Commun.* 53, 5481–5494.

Desafortunadamente, ensayos preliminares demostraron que este derivado era excesivamente lábil, y se observó la descomposición de este éster borónico en disolución acuosa incluso a pH ácido, por lo que no se pudo utilizar para nuestros propósitos.⁵⁷

Con el fin de disponer de un sistema derivado de un ácido borónico sensible al medio oxidante pero más robusto que los boronatos de pinacol, decidimos reemplazar este grupo por un boronato MIDA que se sabe que es mucho más robusto y con el que podríamos conseguir como resultado un derivado mucho más estable.⁵⁸ Esta mayor estabilidad se debe a la presencia del átomo dador de nitrógeno, que forma un enlace con el orbital p vacío, estabilizando los boronatos resultantes frente al ataque por parte de nucleófilos y, por lo tanto, frente a la hidrólisis. De esta forma esperamos que el análogo MIDA sea estable hasta alcanzar la matriz mitocondrial, donde se libere de forma selectiva—y controlada—en el medio básico y oxidante.

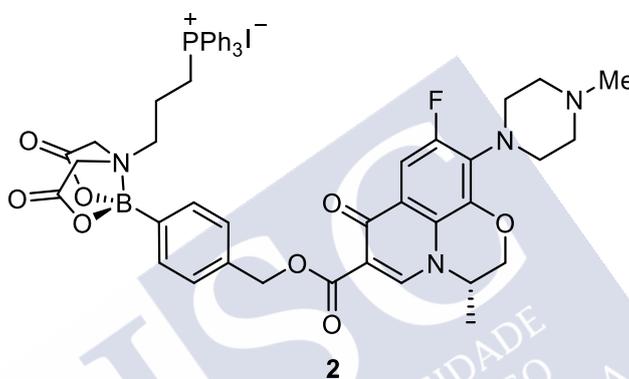
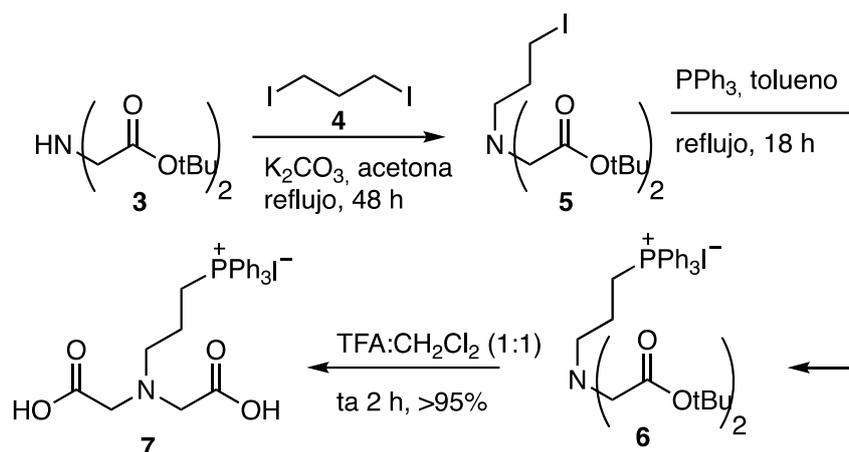


Figura 10 Estructura de la prodroga de levofloxacina **2** con un conector de ácido MetilimidoDiacético (MIDA).

La síntesis de nuestro derivado de interés requiere en primer lugar el acceso al diácido **7** que se obtuvo a través de la secuencia de reacciones del Esquema 2.

57 Achilli, C., Ciana, A., Fagnoni, M., Balduini, C., and Minetti, G. (2013). Susceptibility to hydrolysis of phenylboronic pinacol esters at physiological pH. *Cent. Eur. J. Chem.* 11, 137–139.

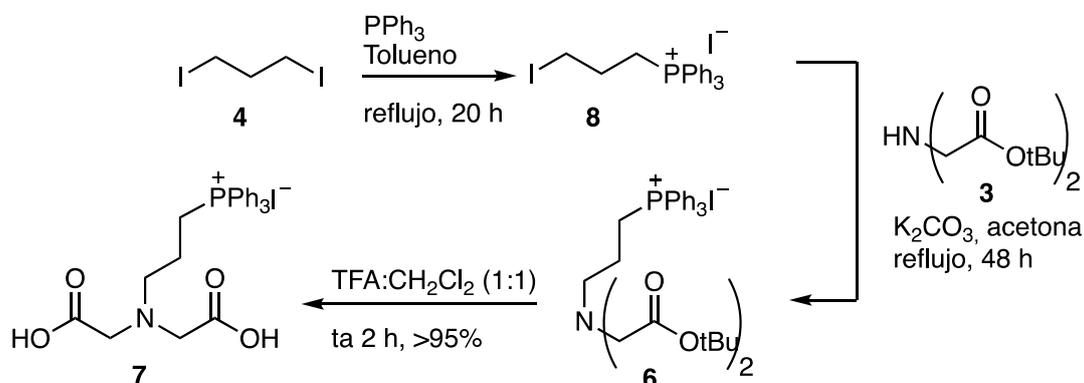
58 J. A. Gonzalez *et al.* (2016) MIDA boronates are hydrolysed fast and slow by two different mechanisms. *Nat. Chem.* 8, 1067–1075.



Esquema 2. Síntesis del ácido (3-(bis(carboximetil)amino)propil)trifenilfosfonio (7).

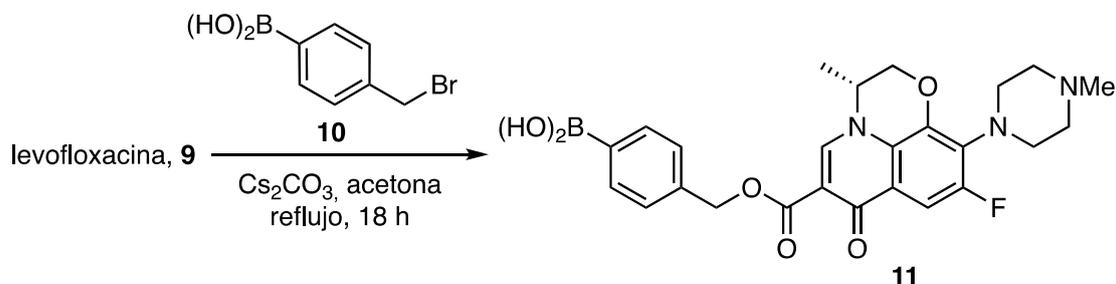
En una primera etapa se procedió a la alquilación de la amina **3** con el 1,4-diyodobutano (**4**) por reacción en acetona seca en presencia de carbonato potásico para controlar la acidificación del medio como consecuencia del desprendimiento de HI durante el transcurso de la reacción. A pesar de numerosos intentos de optimización, el yoduro deseado (**5**) sólo se pudo obtener en bajo rendimiento (15 %). A continuación, se hizo reaccionar el yoduro **5** con trifenilfosfina siguiendo las condiciones habituales para la formación de sales de fosfonio para obtener la sal de TPP deseada (**6**) y la hidrólisis de los ésteres terbutílicos en medio ácido por tratamiento con TFA en diclorometano condujeron a la sal de fosfonio del MIDA, **7**, en un buen rendimiento.

Ante la imposibilidad de mejorar el rendimiento de la primera reacción de esta ruta sintética y con el fin de optimizar el rendimiento global del procedimiento de síntesis del TPP-MIDA **7** se probó una ruta alternativa haciendo reaccionar el reactivo **4** con trifenilfosfina en tolueno para obtener el monoyoduro **8** en un excelente rendimiento del 94 %. A continuación, el fosfonio electrofílico (con el yoduro como grupo saliente) se hizo reaccionar con el MIDA protegido, para finalmente someterlo directamente a las condiciones de ácido fuerte para la desprotección de los grupos tBu y obtener así el producto deseado **7** en una secuencia sintética corta y con rendimiento del 91 % (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis alternativa del ácido (3-bis(carboximetil)amino)propil) trifenilfosfonio (7).

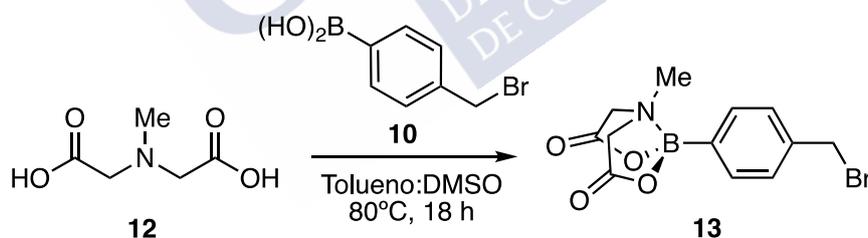
Paralelamente a la síntesis del TPP-MIDA **7**, se procedió a la síntesis del éster de levofloxacin **11**, para el cual se hizo reaccionar directamente el antibiótico levofloxacin con el bromuro bencílico **10** a reflujo durante 18 h en presencia de Cs₂CO₃, aislando el fragmento deseado mediante HPLC en fase reversa con un rendimiento del 35.5% (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis del éster de levofloxacin con el ácido 4-(hidroximetil)fenil borónico(**11**).

A continuación, procedimos a la condensación del TPP-MIDA **7** con el ácido borónico **11** para dar lugar al boronato MIDA objetivo. Desafortunadamente, en ningún caso obtuvimos el producto deseado, recuperándose los productos de partida de la reacción en todas las condiciones probadas: CH₂Cl₂/DMSO y CHCl₃/DMSO a 50 °C y a 60 °C incluso con tiempos de reacción largos de hasta 18 h.

Curiosamente, el estudio de una reacción modelo usando el derivado **12** y el ácido borónico (**10**) dio lugar al producto modelo **13** en buen rendimiento sin ningún tipo de complicación (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis del éster borónico modelo con el derivado de MIDA, **13**.

Estos datos indicaban que el grupo voluminoso de TPP afectaba negativamente a la reacción, posiblemente por aumentar significativamente la congestión estérica. Estudios de modelización suplementarios también mostraban claramente que el grupo TPP es muy voluminoso y la cadena alquílica corta no separaba suficientemente el TPP del grupo MIDA, reforzando nuestra hipótesis de podía estar impidiendo el acoplamiento por impedimento estérico; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Por tanto, nos planteamos un alargamiento del conector que alejase ambos grupos y facilitara, por lo tanto, la reacción de formación del boronato MIDA.

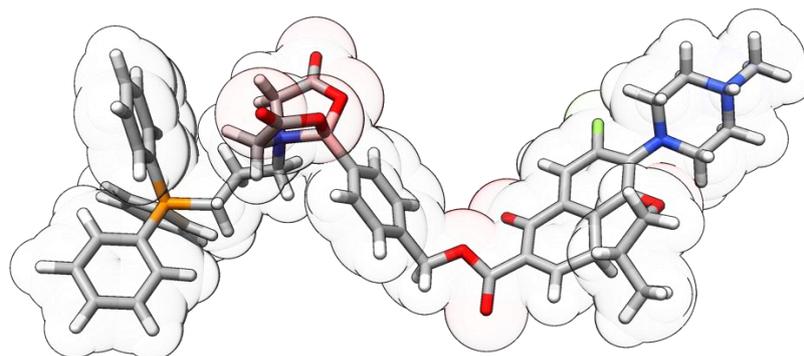
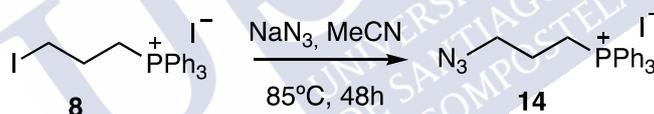


Figura 11 Estructura del trifenil fosfonio derivado de la levofloxacin indicando los átomos CPK en formato semitransparente para mostrar el impedimento estérico que podría ejercer el grupo TPP sobre el boronato.

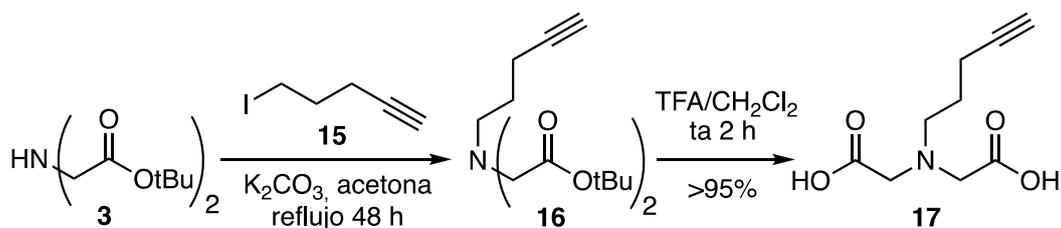
Con el fin de alejar el TPP del MIDA y favorecer así que pudiera tener lugar la formación del boronato deseado decidimos introducir una cadena alquílica de mayor longitud. Por otra parte, con el fin de aportar una mayor flexibilidad a la síntesis y permitir la introducción del TPP en el último paso de la síntesis en condiciones muy suaves y selectivas que no afectasen a la estructura del éster de la levofloxacin previamente ensamblada, nos planteamos la conexión a través de una reacción click.⁵⁹ Para ello, sintetizamos en primer lugar la azida derivada del TPP (**14**) mediante desplazamiento S_N2 del yoduro **8** previamente sintetizado, obteniéndose el producto deseado con un rendimiento excelente del 96% (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis del (3-azidopropil)-trifenilfosfonio (**14**) para acoplamiento “click”.

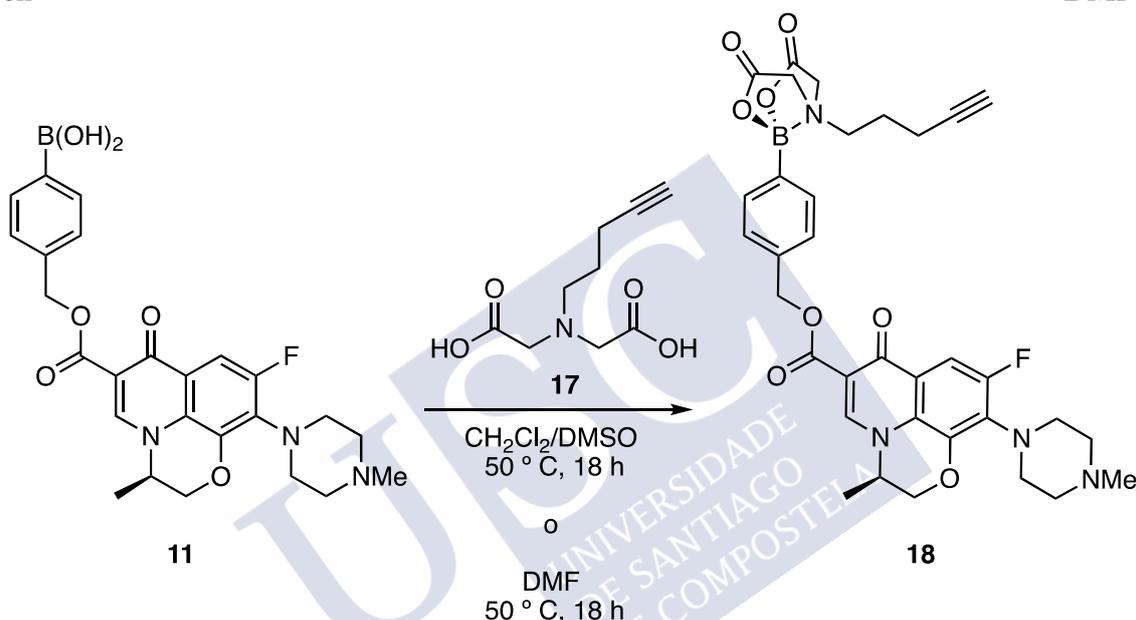
Por otro lado, se procedió a la alquilación de MIDA con el yoduro **15** para obtener el alquino intermedio **16** que permitiese la condensación con la azida del TPP (rendimiento del 54%). Seguidamente, como en situaciones anteriores, se realizó la desprotección de los ácidos carboxílicos por tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano (Esquema 7).

59 Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen (2002) Cycloaddition Process: copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 41, 2596–2599.



Esquema 7. Síntesis del derivado MIDA-alcino (**17**) para el acoplamiento “click”.

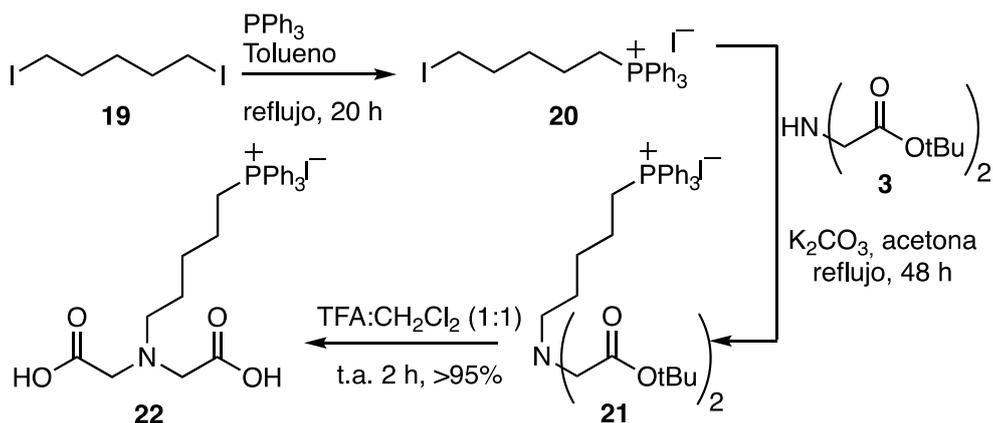
El alcino derivado del MIDA **17** se hizo reaccionar con el ácido borónico **11** para dar lugar al alcino-MIDA que se obtuvo en buen rendimiento tanto en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMSO}$ como en DMF .



Esquema 8. Formación del éster del ácido borónico de la levofloxacina con el MIDA-alcino (**18**) precursor para la reacción de acoplamiento “click”.

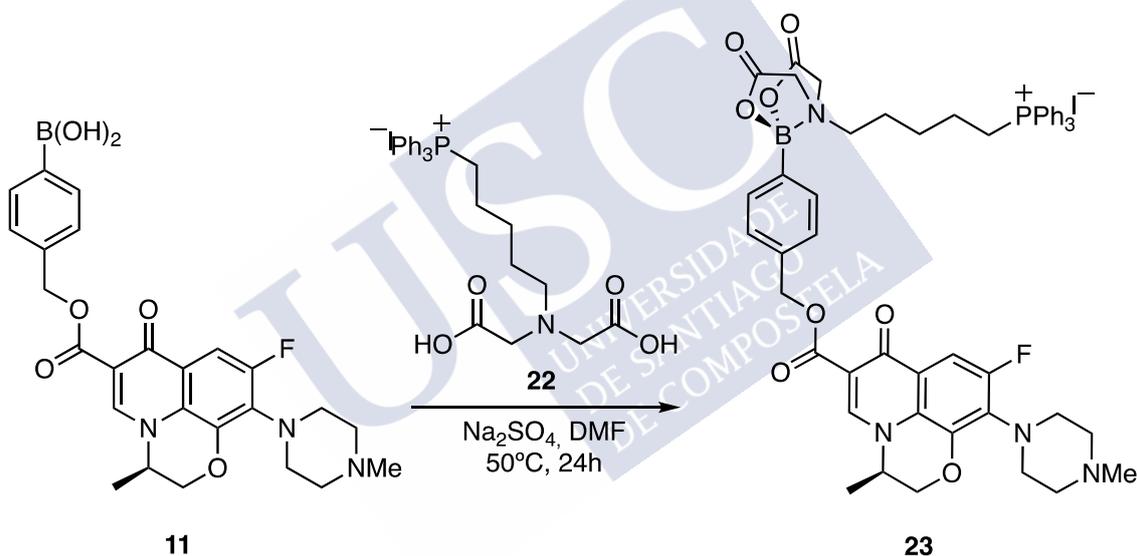
Desafortunadamente, la reacción “click” para conjugar la azida del TPP **14** con el alcino **18** no tuvo lugar siguiendo las condiciones habituales para estas reacciones: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMSO}$ en presencia de CuI y ácido ascórbico para mantener el Cu en estado de oxidación (I); DMF en presencia de 4-metilpiperidina, CuI y ácido ascórbico; DMF en presencia de 4-metilpiperidina y el complejo de cobre, bromotris(trifenilfosfina) cobre (I). En todos los casos observamos la descomposición del ácido borónico, posiblemente catalizada por el propio cobre. Estos resultados nos llevaron a rechazar también esta ruta sintética (Esquema 8).

Decidimos volver al planteamiento original usando una cadena alquílica sencilla en el conector, pero extendiéndola para separar el TPP y favorecer la reacción de formación del boronato. Así pues, sintetizamos un derivado de MIDA con la cadena alquílica de cinco carbonos como se muestra en el Esquema 9, siguiendo los mismos procedimientos descritos anteriormente.



Esquema 9. Síntesis del (5-(bis(carboximetil)amino)pentil)trifenilfosfonio (**22**).

Finalmente, procedimos a la síntesis de nuestra molécula objetivo con el conector extendido a partir del derivado **22** y el ácido borónico derivado de la levofloxacina (**11**), obteniéndose, finalmente, el boronato deseado **23** (Esquema 10).



Esquema 10. Síntesis del boronato **23**.

Liberación de levofloxacina.

Una vez obtenido el compuesto deseado, estábamos en disposición de estudiar la liberación de la levofloxacina por efecto del medio oxidante, para ello aprovechamos que a levofloxacina es fluorescente, con espectros de emisión diferenciados en función del pH del medio.⁶⁰ Los diferentes espectros de emisión nos permitirán estudiar la hidrólisis del éster derivado de la levofloxacina que daría lugar al carboxilato bajo rendimiento cuántico y emisión a una longitud de onda en torno a 460 nm, mientras que el ácido

⁶⁰ Polishchuk, A.V., Karaseva, E.T., Proskurina, N.A., and Karasev, V.E. (2008). Photochemical behavior of levofloxacin. *High Energy Chem.* 42, 459–463.

protonado (y el éster) tendrían un mayor rendimiento cuántico y una emisión a mayor longitud de onda, 520 nm (Figura 12).⁶⁰

El estudio de la hidrólisis de este profármaco se llevó a cabo incubando una disolución de 23 a 2 μM , con una disolución de H_2O_2 200 μM a diferentes pH. Como se muestra a continuación, la prodroga 23 es estable en medio neutro o ligeramente básico (pH = 8), pero se hidroliza a una velocidad lenta a pH básico (pH = 9, $t_{1/2} \approx 2$ h), observándose un aumento grande de la velocidad de hidrólisis a pH básico (pH = 10, $t_{1/2} \approx 0.5$ h), proporcionando así una demostración sólida del potencial de esta estrategia en profármacos para obtener la liberación selectiva dentro de las mitocondrias.

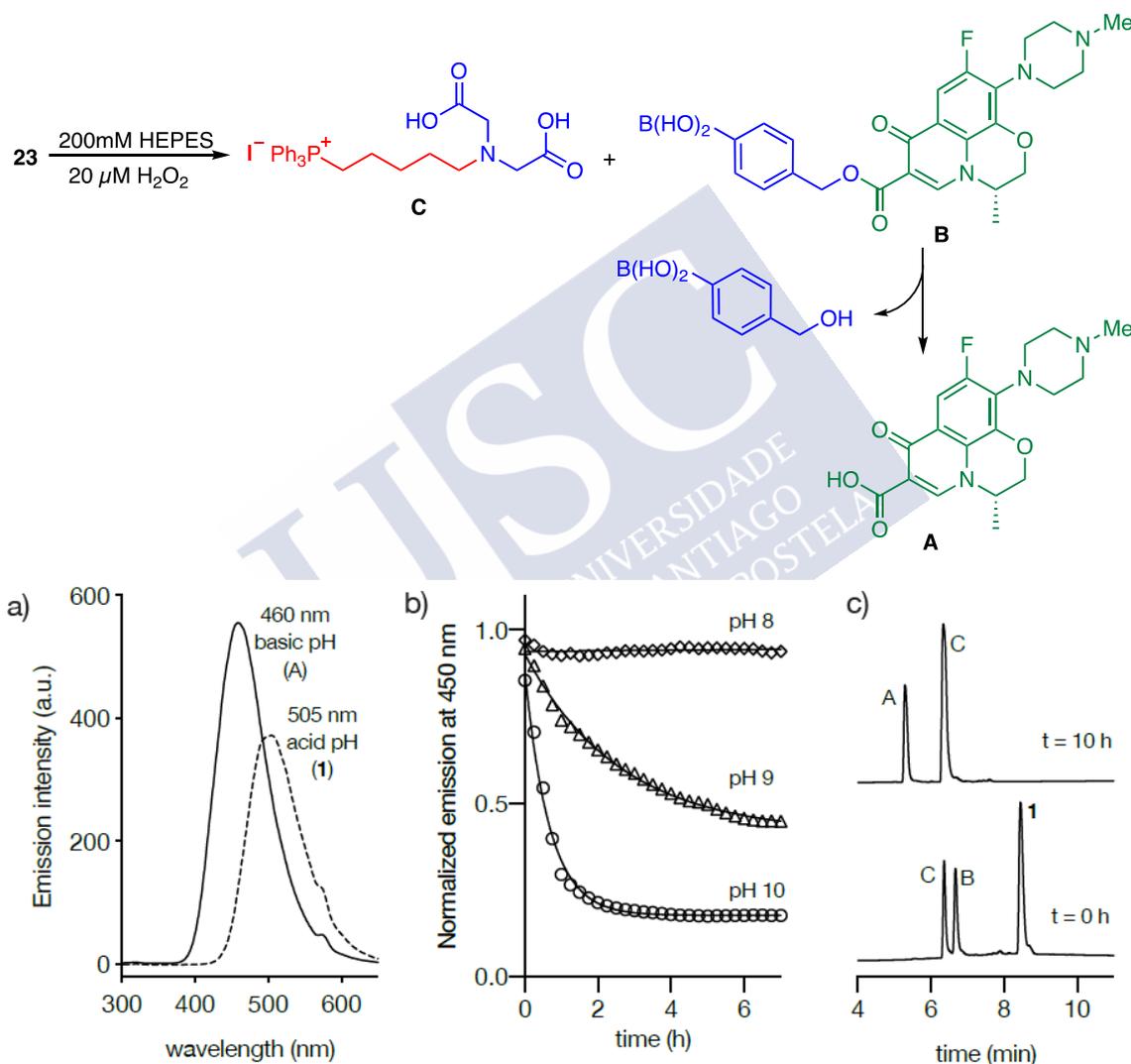


Figura 12 Arriba: Reacción de hidrólisis del profármaco **23**. Abajo: a) Espectros de emisión de una disolución 2.0 μM de la levofloxacina en tampón HEPES a pH = 2 (línea punteada) y a pH = 7.8 (línea continua). $\lambda_{\text{exc}} = 287$ nm, 25 °C. A 450 nm la diferencia entre la emisión a pH básico y pH ácido. b) cinética de hidrólisis del profármaco **23** a diferente pH en presencia de H_2O_2 200 mM. La vida media de **23** a pH 10 fue de aproximadamente 30 min, y a pH 8-9 en aproximadamente 2 h, no hubo hidrólisis significativa; c) Análisis por HPLC de la hidrólisis del profármaco **23**. Huella de HPLC inferior de una solución de profármaco **23** al comienzo del experimento de hidrólisis (t = 0 h), y después de 10 h a pH = 10 (t = 10 h) indicando las diferentes especies en la mezcla de reacción identificadas por ESI-MS.

Fosfonios fluorescentes

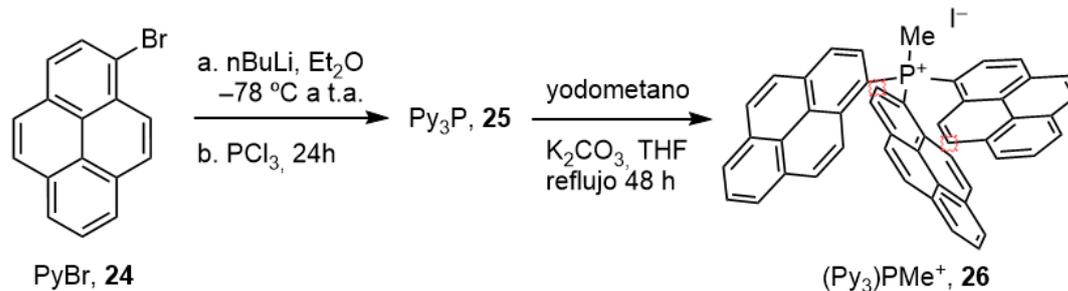
Aunque nuestra propuesta se centró en la aplicación de trifenilfosfonio (TPP) como modelo de DLC para inducir la localización mitocondrial, nos planteamos reemplazar los sustituyentes fenilo con unidades policíclicas más grandes que pudieran aportar nuevas propiedades, que incluyen modulación redox y fluorescencia para aplicaciones teranósticas.

El pireno se destaca entre los compuestos poliaromáticos por sus propiedades fotoquímicas únicas, que muestra una emisión intensa y su espectro de fluorescencia es sensible a la polaridad de su entorno y, dependiendo de las condiciones, el pireno puede formar excímeros, debido a la interacción de un pireno excitado con uno de estado fundamental, lo que resulta en una emisión distinta a larga longitud de onda. Teniendo en cuenta estas propiedades de y los precedentes de fosfinas y óxidos de fosfina derivadas de pireno,^{61,62} nos propusimos sintetizar un compuesto capaz de combinar las propiedades emisivas de las unidades de pireno con sus propiedades como cationes lipofílicos deslocalizados para la focalización mitocondrial.⁶³

Estos derivados de pireno fosfonio $\text{Py}_3\text{P}^+-\text{R}$ no solo representaría una nueva familia de cationes lipofílicos deslocalizados, que podrían impregnar las bicapas e internalizarse en las mitocondrias, sino también, sus unidades de pireno les otorgarían una intensa emisión de fluorescencia. Que podría usarse para cualquier tipo de rastreador mitocondrial.

En un primer momento se probó la síntesis del la fosfina **25** a partir del tratamiento del bromopireno (**24**) con $\text{P}(\text{OMe})_3$ en THF, pero no obtuvimos el producto deseado, por lo que decidimos utilizar un mejor electrófilo, reemplazando el $\text{P}(\text{OMe})_3$ por PCl_3 , en THF. Aunque en esas condiciones tampoco obtuvimos nuestro producto de interés, reemplazando THF por dietiléter permitió obtener la fosfina intermedia **25**, que se sometió directamente a la etapa de alquilación con yodometano en THF obteniendo nuestro producto deseado $(\text{Py})_3\text{PMe}^+$ (**26**) (Esquema 11).

-
- 61 Fang, Q., Li, J., Li, S., Duan, R., Wang, S., Yi, Y., Guo, X., Qian, Y., Huang, W., and Yang, G. (2017). Thermally populated “bright” states for wide-range and high temperature sensing in air. *Chem. Commun.* 53, 5702–5705.
- 62 Li, G., Xu, Y., Zhuang, W., and Wang, Y. (2016). Preparation of organic mechanochromic fluorophores with simple structures and promising mechanochromic luminescence properties. *RSC Adv.* 6, 84787–84793.
- 63 M. Tomás-Gamasa, M. Martínez-Calvo, J. R. Couceiro, J. L. Mascareñas. (2016) Transition metal catalysis in the mitochondria of living cells. *Nat. Commun.* 7, 12538.



Esquema 11. Síntesis del tripireno fosfonio **26**.

Finalmente, después de haber sintetizado el derivado de pireno deseado **25**, nos propusimos estudiar su localización mitocondrial. Para ello incubamos las células Hela en un cubreobjetos de vidrio a 150,000 células/ml un día antes del tratamiento. Luego, se incubaron con el compuesto **26** (5 μ M) durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron dos veces con DMEM y se incubaron con TMRE (tetrametilrodamina, éster etílico) 500 nM durante 10 minutos. Antes de la observación por microscopía de fluorescencia, las muestras se lavaron dos veces con DMEM reciente. Los cubreobjetos se observaron in vivo en un microscopio de fluorescencia equipado con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. Como se puede ver en la Figura 13, mostró una excelente localización mitocondrial mediante microscopía de fluorescencia.

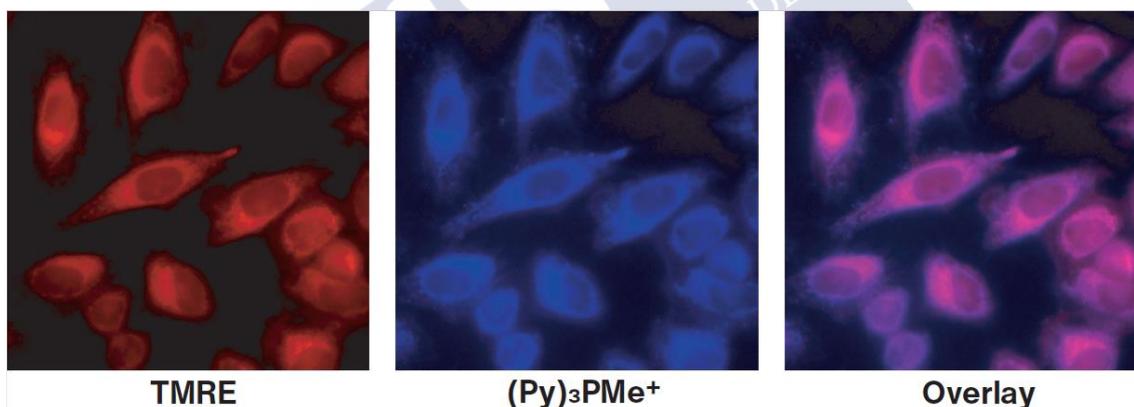


Figura 13 Células Hella observadas mediante microscopio tras el tratamiento con (Py)₃PMe⁺ (**26**), las imágenes se superponen al canal de emisión rojo y azul después de la incubación.



Metalo péptidos para modulación del estrés oxidativo

Los iones metálicos y el estrés oxidativo. Reacción de Fenton. Metalociclos biológicamente activos.

Los iones metálicos juegan un papel fundamental en la biología de la célula. Así, por ejemplo, el Zn(II) participa en procesos de señalización celular, en la regulación de expresión génica, en la síntesis de ADN, mediando en las interacciones proteína-proteína y es esencial para el funcionamiento de múltiples enzimas, en donde puede tener tanto un rol estructural como catalítico.^{64,65} De la misma forma, muchos otros iones metálicos están implicados en procesos claves para el normal funcionamiento de las células, siendo también cruciales en el desarrollo de ciertos estados patológicos,^{66,67} por lo que se tratan de una diana terapéutica de enorme relevancia en química médica y biológica.⁶⁸

Desde la primera mitad del siglo XX se han desarrollado una gran cantidad de ligandos orgánicos capaces de coordinar iones⁶⁹ metálicos y metaloides en un ambiente celular con el objetivo de reducir su biodisponibilidad. Durante la segunda guerra mundial se desarrolló un compuesto ditiólico denominado dimercaptol (o BAL, British Anti-Lewisite) como antídoto frente al gas venenoso Lewisita (beta-cloroetildicloroarsina), que contenía arsénico.⁷⁰ Después de la segunda guerra mundial, se observó que una gran cantidad del personal que había prestado servicios en los navíos de guerra, sobre todo aquellos que trabajaban en la reparación de los cascos de los barcos, presentaban altos niveles de plomo en la sangre. Esto hizo que se introdujese el uso médico del ligando EDTA como agente quelante de plomo.⁷¹ Desde los años 1960 se empezaron a introducir

-
- 64 Beyersmann, D., Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* 14, 331–341.
- 65 Berg, J.M., Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271, 1081–1085.
- 66 Kim, B.-E., Nevitt, T., Thiele, D. J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* 4(3), 176–185.
- 67 Roth, J. A. (2006). Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biol. Res.* 39(1), 45–57.
- 68 Chen, A. Y., Adamek, R. N., Dick, B. L., Credille, C. V., Morrison, C. N., Cohen, S. M. (2019). Targeting Metalloenzymes for Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* 119(2), 1323–1455.
- 69 Sears, M. E. (2013). Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification-a review. *Sci. World J.* 219840.
- 70 Peters, R., L. Stocken, R. Thompson. (1945) British anti-Lewisite (BAL). *Nature*, 156, 616–619.
- 71 Porru, S., Alessio, L. (1996). The use of chelating agents in occupational lead poisoning. *Occupational Medicine*, 46(1), 41–48.

modificaciones en el agente quelante BAL con el objetivo de reducir sus nocivos efectos secundarios, y comenzaron a surgir análogos como DMSA, DMPA o DMPS.⁷²

Tradicionalmente se ha considerado que la actividad biológica de los ligandos quelantes se reducía a su capacidad de secuestrar los iones metálicos, disminuyendo su biodisponibilidad.⁷³ Sin embargo, en los últimos años se han intentado dar explicación a las propiedades citotóxicas que presentan algunos de estos sistemas. De entre todas las justificaciones encontradas, tal vez la más relevante sea que muchos de estos ligandos quelantes tienen la capacidad de formar complejos metálicos que afectan a la homeostasis redox de la célula.⁷⁴ Así, por ejemplo, se ha demostrado que el compuesto *elesclomol*, una droga que ha sido ensayada clínicamente para el tratamiento del melanoma, es capaz de complejar iones Cu(II) extracelulares con alta afinidad y transportarlos hasta la matriz mitocondrial. Una vez en el interior de la mitocondria, el *elesclomol* facilita la reducción del Cu(II) a Cu(I), que a su vez cataliza la formación de especies oxidantes reactivas (ROS) que son tóxicas para la célula.^{75,76}

En este sentido, es necesario indicar que los iones metálicos pueden participar en los procesos de generación de ROS dentro de las células. En concreto, los iones metálicos en estados de oxidación reducidos, como Cu(I) o Fe(II), pueden participar en la descomposición del peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton, para dar lugar de nuevo a radicales peróxido.⁷⁷ Los radicales peróxido así generados son muy reactivos y pueden reaccionar con biomoléculas próximas, produciendo así su degradación y dando lugar a efectos citotóxicos.⁷⁸ En este proceso el potencial de

-
- 72 Aposhian, H., Carter, D. E., Hoover T.D., Hsu C., Maiorino, R. M., Stine, E. (1984) DMSA, DMPS, and DMPA-as Arsenic Antidotes. *Appl. Toxicol. J.* 4, 58–70.
- 73 Nelson, N. (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J.* 18, 4361–4371.
- 74 Ding, W.-Q., and Lind, S.E. (2009). Metal ionophores - an emerging class of anticancer drugs. *IUBMB Life* 61, 1013–1018.
- 75 Nagai, M., Vo, N.H., Shin Ogawa, L., Chimmanamada, D., Inoue, T., Chu, J., Beaudette-Zlatanova, B.C., Lu, R., Blackman, R.K., Barsoum, J. (2012). The oncology drug *elesclomol* selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 2142–2150.
- 76 Kirshner, J.R., He, S., Balasubramanyam, V., Kepros, J., Yang, C.-Y., Zhang, M., Du, Z., Barsoum, J., Bertin, J. (2008). *Elesclomol* induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2319–2327.
- 77 Hasinoff, B.B., Wu, X., Yadav, A.A., Patel, D., Zhang, H., Wang, D.-S., Chen, Z.-S., Yalowich, J.C. (2015). Cellular mechanisms of the cytotoxicity of the anticancer drug *elesclomol* and its complex with Cu(II). *Biochem. Pharmacol.* 93, 266–276.
- 78 Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuča K., K. Musílek, K. (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* 90, 1–37.

reducción $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}^\bullet$ es de + 0.46 V, por lo que cualquier complejo metálico con un potencial de reducción menor que ese valor puede catalizar dicha reacción.



Existen otros tipos de terapias relacionadas con la generación de ROS y que utilizan iones metálicos, como la terapia fotodinámica, una terapia no invasiva en la que la luz se usa para dañar selectivamente a tejidos que tengan algún tipo de lesión, generalmente a través de la creación in situ de ROS.^{79,80} Normalmente, esto se logra a través de un profármaco que genera oxígeno singlete citotóxico a través de la transferencia de energía en el estado excitado. La terapia fotodinámica se ha empleado con éxito para tratar una variedad de cánceres y otras enfermedades.^{81,82} Una ventaja de esta terapia es que la muerte celular puede estar dirigida a lugares concretos a través de una selección cuidadosa, minimizando muchos de los efectos secundarios no deseados que aparecen en otros tratamientos convencionales. La mayoría de los fotosensibilizadores en uso clínico son estructuras tetrapirrólicas.⁸³ Sin embargo, estas estructuras tienen una serie de desventajas, pues son sistemas con una solubilidad en agua relativamente baja y cuya síntesis y purificación no son triviales. En este sentido, los complejos de Ru(II)^{84,85} y de otros iones metálicos, como Ir(III),⁸⁶ han sido objeto de un creciente número de estudios en los últimos años por su alta solubilidad y estabilidad en agua, gran versatilidad química, atractivas propiedades ópticas y alta fotoestabilidad.

-
- 79 Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzińska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* 106, 1098–1107.
- 80 Chilakamarthi, U., Giribabu, L. (2017). Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* 17(8), 775–802.
- 81 Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: Cancer J. Clin.* 61(4), 250–281.
- 82 Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5), 380–387.
- 83 Lan, M., Zhao, S., Liu, W., Lee, C.-S., Zhang, W., Wang, P. (2019). Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Mater.* 8(13).
- 84 Lilge, L. (2017). Use of Ruthenium Complexes as Photosensitizers in Photodynamic Therapy. *Ruthenium Complexes*. 117–137.
- 85 Monro, S., Colón, K. L., Yin, H., Roque, J., Konda, P., Gujar, S., Thummel, R. P., Lilge, L., Cameron, C. G., McFarland, S. A. (2019). Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* 119(2), 797–828.
- 86 Huang, H., Banerjee, S., Sadler, P. J. (2018). Recent Advances in the Design of Targeted Iridium(III) Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *ChemBioChem.* 19(15), 1574–1589.

Por último, indicar que el estudio de la actividad biológica de los metalociclos y de las metalocajas es relativamente reciente.⁸⁷ Estas estructuras autoensambladas se han empleado con éxito en diversas áreas de la química biológica y de la química médica, como la terapia fotodinámica⁸⁸ o como agentes de unión al ADN.^{89,90} Estos sistemas, que pueden actuar en sí mismos como metalodrogas o como nanocontenedores de otras drogas y que están basados en la mayoría de los casos en iones metálicos cinéticamente inertes, son altamente estables en disolución acuosa y poseen lugares de unión altamente estructurados que contienen residuos aromáticos hidrófobos que se unen con alta afinidad a biomoléculas en condiciones biológicas.

Péptidos oligocatiónicos y transporte celular

En 1988 A.D. Frankel y M. Green demostraron que la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana era capaz de internalizarse eficientemente en las células, y que poseía tal capacidad gracias al fragmento 48-60 del dominio básico de la proteína, el llamado péptido TAT.⁹¹ Posteriormente, D. Derossi descubrió que una secuencia de 16 aminoácidos, denominado pAntp o penetratina, localizada en la tercera hélice α del homeodominio *Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK) era capaz de atravesar la membrana celular y alcanzar el núcleo.^{92,93} A lo largo de los años se han descrito muchos otros péptidos que presentan la capacidad de atravesar la membrana citoplasmática y alcanzar el interior de la célula eficientemente. Estos péptidos presentan una gran diversidad de secuencias y estructuras, pero, en general, se caracterizan por secuencias

-
- 87 Sepehrpour, H., Fu, W., Sun, Y., Stang, P. J. (2019). Biomedically Relevant Self-Assembled Metallacycles and Metallacages. *J. Am. Chem. Soc.* 141(36), 14005–14020.
- 88 Michael G. Walker, Paul J. Jarman, Martin R. Gill, Xiaohe Tian, Haslina Ahmad, Pattubala A. N. Reddy, Luke McKenzie, Julia A. Weinstein, Anthony J. H. M. Meijer, Giuseppe Battaglia, Carl G. W. Smythe, Jim A. Thomas (2016) A Self-Assembled Metallomacrocyclic Singlet Oxygen Sensitizer for Photodynamic Therapy. *Chem. Eur. J.* 22, 5996 – 6000.
- 89 Duskova, K., Lamarche, J., Amor, S., Caron, C., Queyriaux, N., Gaschard, M., Penouilh, M.-J., de Robillard, G., Delmas, D., Devillers, C.H. (2019). Identification of Three-Way DNA Junction Ligands through Screening of Chemical Libraries and Validation by Complementary in Vitro Assays. *J. Med. Chem.* 62, 4456–4466.
- 90 Zhu, J., Haynes, C. J. E., Kieffer, M., Greenfield, J. L., Greenhalgh, R. D., Nitschke, J. R., Keyser, U. F. (2019). FeII4L4 Tetrahedron Binds to Nonpaired DNA Bases. *J. Am. Chem. Soc.* 141(29), 11358–11362.
- 91 Frankel, A.D., Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189–1193.
- 92 De Rossi D., Joliot A. H., Chassaing G., Prochiantz A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450.
- 93 De Rossi D., Chassaing G., Prochiantz A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery *Trends Cell Biol.* 8, 84–87.

cortas de menos de 30 aminoácidos con muchos residuos básicos (Lys o Arg), que les confieren un marcado carácter catiónicos.^{94,95,96}

Los estudios de estructura-actividad de los péptidos penetrantes (**CPPs**) demuestran que los residuos catiónicos juegan un papel fundamental en la internalización de estos compuestos y que las argininas son más efectivas que las lisinas en dicho proceso.⁹⁷ Se cree que esto es debido a que los grupos guanidínios de las argininas pueden unirse de forma bidentada a través de enlaces por puente de hidrógeno con los grupos fosfato, sulfato y carboxilato cargados negativamente presentes en la superficie celular, mientras que el grupo amonio de la lisina, sólo puede unirse a estos mismos grupos de forma monodentada.^{94,96} A pesar de la gran cantidad de estudios realizados, no se conoce con exactitud el mecanismo exacto de penetración celular de los CPPs a través de las barreras biológicas.⁹⁸ Esto puede deberse a que se ha demostrado que los CPPs pueden interactuar con diferentes biomoléculas de la superficie celular, como lípidos y proteoglicanos, lo que favorece que coexistan distintas vías de entrada. En cualquier caso, los resultados experimentales evidencian que los CPPs pueden internalizar a través de dos vías principales: la translocación directa a través de la bicapa celular de la membrana y la vía endocítica, aunque existen evidencias de que también pueden emplear mecanismos de entrada alternativos.⁹⁹

Los CPPs son una de las herramientas más utilizadas en el transporte intracelular no invasivo de fármacos, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, liposomas, nanopartículas, o agentes de contraste de resonancia magnética, entre otros.^{100, 101} Sin embargo, no se han explorado en el contexto de transporte de iones metálicos. Los CPPs ofrecen ciertas ventajas respecto a otros transportadores, como son su baja citotoxicidad, su elevada

-
- 94 Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585–590.
- 95 Kauffman, W.B., Fuselier, T., He, J., Wimley, W.C. (2015). Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends Biochem. Sci.* 40, 749–764.
- 96 Zorko, M., Langel, U. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 529–545.
- 97 Su, Y., Doherty, T., Waring, A. J., Ruchala, P., Hong, M. (2009). Roles of arginine and lysine residues in the translocation of a cell-penetrating peptide from (13)C, (31)P, and (19)F solid-state NMR. *Biochem.* 48(21), 4587–4595.
- 98 Ruseska, I., Zimmer, A. (2020). Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein J. Nanotechnol.* 11, 101–123.
- 99 Rioboo, A., Gallego, I., Montenegro, J. (2019). Péptidos penetrantes celulares: descripción, mecanismo y aplicaciones. *An. Quím.* 115, 9–20.
- 100 Stanzl, E.G., Trantow, B.M., Vargas, J.R., Wender, P.A. (2013). Fifteen years of cell-penetrating, guanidinium-rich molecular transporters: basic science, research tools, and clinical applications. *Acc. Chem. Res.* 46, 2944–2954.
- 101 Tung, C.H., Weissleder, R. (2003). Arginine containing peptides as delivery vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 281–294.

eficiencia frente a distintas líneas celulares y una fácil adaptación a distintos sistemas de administración en pacientes.¹⁰² Los CPPs también se han demostrado útiles en el desarrollo de nuevas terapias anticáncer¹⁰³ y otras aplicaciones biomédicas.¹⁰⁴

Por otro lado, los péptidos son plataformas muy versátiles que ofrecen muchas ventajas sobre los ligandos orgánicos utilizados tradicionalmente en la química de coordinación para la construcción de complejos metálicos bioactivos.^{105, 106}



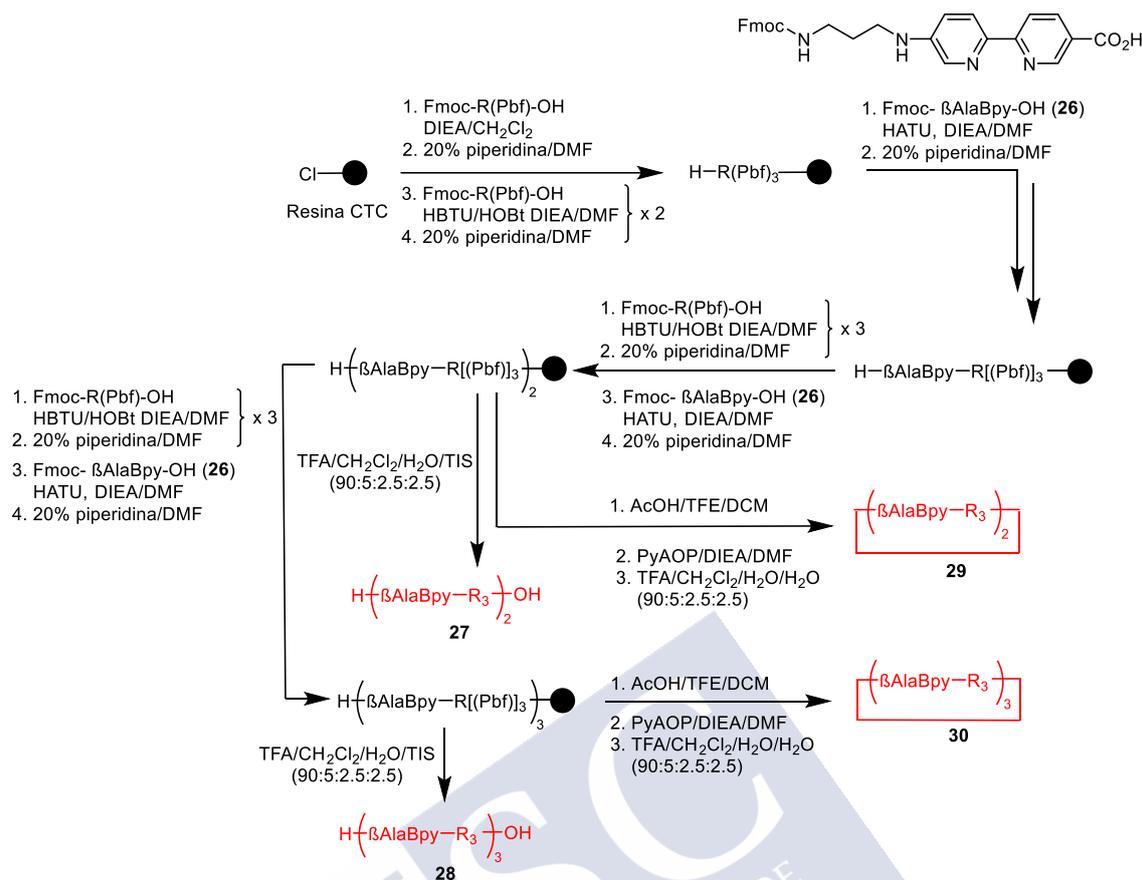
-
- 102 Guidotti, G., Brambilla, L., Rossi, D. (2017). Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* 38(4), 406–424.
- 103 Habault, J., Poyet, J. L. (2019). Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies. *Molecules*, 24(5).
- 104 Derakhshankhah, H., Jafari, S. (2018). Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. *Biomed. Pharmacother.* 108, 1090–1096.
- 105 Albrecth, M.; Storz, P.; Nolting, R. (2003). Peptide/Metal-Ligand Hybrids for the Metal-Assisted Stabilization of Peptide-Microstructures. *Synthesis*. 1307–1320.
- 106 Sculimbrene, B. R.; Imperiali, B. (2006) Lanthanide-Binding Tags as Luminescent Probes for Studying Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 7346–7352.

Discusión de resultados

Diseño y síntesis de los ciclopéptidos.

La síntesis del residuo coordinante Fmoc- β AlaBpy-OH **26**, derivado del ligando 2,2'-bipiridina (Bpy), convenientemente modificado para su uso en la metodología SPPS, se obtuvo siguiendo la metodología publicada con anterioridad por nuestro grupo de investigación,^{107,108,109,110,111} la cual está a su vez basada en trabajos previos llevados a cabo por los grupos Newkome e Imperiali.¹¹² Una vez obtenido el residuo coordinante **26**, sintetizamos los ligandos peptídicos lineales oligocatiónicos previamente diseñados, (β AlaBpy-R₃)₂ **27** y (β AlaBpy-R₃)₃ **28**, y sus correspondientes derivados cíclicos, ciclo-(β AlaBpy-R₃)₂ **29** y ciclo-(β AlaBpy-R₃)₃ **30**, siguiendo los protocolos estándar de fase sólida Fmoc/tBu (Esquema 12).

-
- 107 a) Albretch, M.; Stortz, P.; Nolting, R. (2003) Peptide/Metal-Ligand Hybrids for the Metal-Assisted Stabilization of Peptide-Microstructures. *Synthesis*. 1307–1320; b) Sculimbrene, B. R.; Imperiali, B. (2006) Double-Lanthanide-Binding Tags: Design, Photophysical Properties, and NMR Applications *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 7346–7352.
- 108 Kaes, C.; Katz, A.; Hosseini, M. W. (2000) Bipyridine: The Most Widely Used Ligand. A Review of Molecules Comprising at Least Two 2,2'-Bipyridine Units. *Chem. Rev.* *100*, 3553–3590.
- 109 a) Bouzada, D.; Salvadó, I.; Barka, G.; Rama, G.; Martínez-Costas, J.; Lorca, R.; Somoza, A.; Melle-Franco, M.; Vázquez, M. E.; Vázquez López, M. (2018) Selective G-quadruplex binding by oligoarginine-Ru(dppz) metallopeptides. *Chem. Commun.* *54*, 658–661; b) Gamba, I.; Rama, G.; Ortega-Carrasco, E.; Martínez-Costas, J.; Vázquez, M. E.; Vázquez López, M. (2014) Programmed stereoselective assembly of DNA-binding helical metallopeptides. *Chem. Commun.* *50*, 11097–11100.
- 110 a) Salvadó, I.; Gamba, I.; Montenegro, J.; Martínez-Costas, J.; Brea, J. M.; Loza, M. I.; Vázquez López, M.; Vázquez, M. E. (2016) Membrane-disrupting iridium(iii) oligocationic organometallopeptides. *Chem. Commun.* *52*, 11008–11011; b) Gamba, I.; Salvadó, I.; Brissos, R. F.; Gamez, P.; Brea, J.; Loza, M. I.; Vázquez, M. E.; Vázquez López, M. (2016) High-affinity sequence-selective DNA binding by iridium(iii) polypyridyl organometallopeptides. *Chem. Commun.* *52*, 1234–1237.
- 111 Gamba, I.; Salvadó, I.; Rama, G.; Bertazzon, M.; Sánchez, M. I.; Sánchez-Pedregal, V. M.; Martínez-Costas, J.; Brissos, R. F.; Gamez, P.; Mascareñas, J. L.; Vázquez López, M.; Vázquez, M. E. (2013) Custom-Fit Ruthenium(II) Metallopeptides: A New Twist to DNA Binding With Coordination Compounds. *Chem. Eur. J.* *19*, 13369–13375.
- 112 a) Torrado, A.; Walkup, G. K.; Imperiali, B. (1998) Thermodynamics and Biochemical Equilibria. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 609–610; b) Newkome, G. R.; Gross, J.; Patri, A. K. (1997) Synthesis of Unsymmetrical 5,5'-Disubstituted 2,2'-Bipyridines. *J. Org. Chem.*, *62*, 3013–3014.



Esquema 12. Ruta sintética SPPS para los ligandos peptídicos lineales **27**, **28**, y cíclicos **29** y **30**.

Estudio de las propiedades coordinativas de los ligandos peptídicos en agua en presencia de iones Cu(II) por técnicas espectroscópicas.

Una vez sintetizado el conjunto de ligandos peptídicos oligocationicos, procedimos a estudiar su comportamiento en presencia de iones Cu(II) en agua a través de diferentes técnicas. Como hemos demostrado en un trabajo reciente,¹¹³ mientras que el ligando 2,2'-bipiridina tiene una propiedades emisivas muy débiles e incluso es considerada como una molécula no fluorescente,¹¹⁴ la unidad asimétrica 5'-amida-[2,2'-bipiridina]-5-carboxamida, que se encuentra incluida dentro del residuo βAlaBpy, posee una intensa emisión fluorescente con una banda centrada a 420 nm y con un rendimiento cuántico de

113 Gómez-González, J.; Peña, D. G.; Barka, G.; Sciortino, G.; Maréchal, J.-D.; Vázquez López, M.; Vázquez, M. E. (2018) Directed Self-Assembly of Trimeric DNA-Bindingchiral Miniprotein Helicates. *Front. Chem.* 6.

114 a) Dhanya, S.; Bhattacharyya, P. K. (1992) Fluorescence behaviour of 2,2'-bipyridine in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 63, 179–185; b) Yagi, M.; Kaneshima, T.; Wada, Y.; Takemura, K.; Yokoyama, Y. (1994) The effects of conformation and coordination to zinc(II) ions on the luminescence properties of 2,2'-bipyridine, methyl-substituted 2,2'-bipyridines and 2,2'-biquinoline. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 84, 27–32.

0,37.¹¹⁵ La emisión fluorescente de este sistema se extingue parcialmente por la coordinación de iones Cu(II), por lo que puede emplearse para monitorizar la formación de los correspondientes complejos de Cu(II). Por lo tanto, procedimos a registrar los espectros de emisión de disoluciones 2 μ M de los ligandos peptídicos en tampón fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6.5) en presencia de concentraciones crecientes iones Cu(II) ($\lambda_{exc} = 308$ nm; $\lambda_{em} = 410$ nm). Durante la valoraciones fluorimétricas, se observó la extinción progresiva de la emisión fluorescente de las unidades bipyridínicas de los ligandos peptídicos en función de la concentración de iones Cu(II) en el medio (Figura 20). El perfil de intensidad de emisión de las valoraciones pudo ajustarse a diferentes modelos de unión para cada sistema peptídico sometido a estudio.¹¹⁶ El ajuste de los datos de emisión se llevó a cabo utilizando el software DynaFit.¹¹⁷ El número y la estequiometría de las especies introducidas en los ajustes se decidió después de analizar los espectros de masas MALDI de las mezclas finales de valoración. Las constantes de unión calculadas para cada sistema se resumen en la Tabla 1. Debemos señalar que todos los ligandos peptídicos estudiados son potencialmente capaces de ensamblarse en una gran variedad de complejos metálicos de diferentes estequiometrías que estarían en equilibrio termodinámico en disolución. Echando un vistazo a sus estructuras, esto es obvio para los péptidos lineales **27** y **28**, pero también para los cíclicos **29** y **30**. En este sentido, la conexión de las unidades de coordinación de 2,2'-bipyridina dentro de la estructura del ciclopéptido se hace a través de sus posiciones 5,5' y este tipo de conexión permite que las unidades de bipyridina de los ciclopéptidos puedan disponerse tanto en posición *exo* (exterior) como en *endo* (interior), dando lugar a una coordinación intermacrocíclica o intra-macrocíclica, respectivamente (Figura 14).¹¹⁸

115 Dong, Y.; Liu, T.; Wan, X.; Pei, H.; Wu, L.; Yao, Y. (2017) Facile one-pot synthesis of bipyridine-based dual-channel chemosensor for the highly selective and sensitive detection of aluminum ion. *Sens. Actuators B Chem.* 241, 1139–1144.

116 McBryde W. A. E. (1978) *A Critical Review of Equilibrium Data for Proton- and Metal Complexes of 1,10-Phenanthroline, 2,2'-Bipyridyl and Related Compounds*. Pergamon.

117 El software *DynaFit* ajusta los datos experimentales numéricamente, utilizando el algoritmo multidimensional de Newton-Raphson para resolver las ecuaciones no lineales que describen el equilibrio. Dynafit requiere archivos de texto sin formato llamados scripts que contienen información sobre el modelo químico subyacente a los datos experimentales, valores experimentales, como las concentraciones iniciales de reactivos, así como información sobre la ubicación de los archivos.

118 Tian, L.-l.; Wang, C.; Dawn, S.; Smith, M. D.; Krause, J. A.; Shimizu, L. (2009) Macrocycles with Switchable *exo/endo* Metal Binding Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 17620–17629.

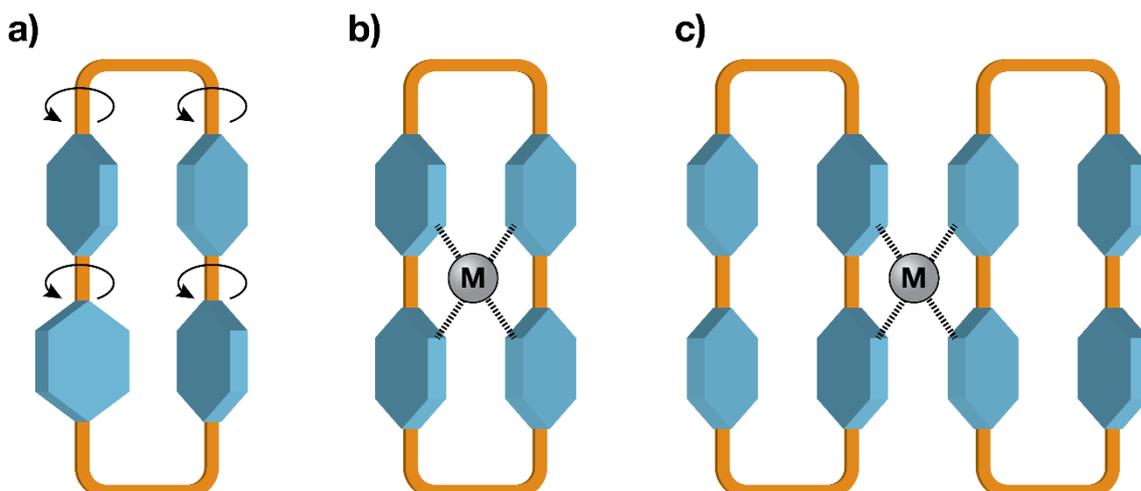


Figura 14 Representación esquemática de los modos de coordinación de los macrociclos. a) Estructura rígida donde se muestra el sentido de giro; b) Coordinación Intra-macroclíca; c) Coordinación Inter-macroclíca.

El espectro MALDI de la mezcla resultante de la valoración fluorimétrica del ligando $(\beta\text{AlaBpy-R}_3)_2$ **27** con iones Cu(II) muestra picos compatibles con la presencia de los aductos metálicos de estequiometría 1:1 y 1:2 (ligando:metal). A continuación utilizamos un modelo secuencial hacia el aducto 1:2 que contiene como intermedio un complejo de estequiometría 1:1 ($\text{Cu} + \text{P} \rightleftharpoons \text{C1}, K_D^1$; $\text{C1} + \text{Cu} \rightleftharpoons \text{C2}, K_D^{12}$), y un equilibrio combinado ($\text{Cu} + \text{Cu} + \text{P} \rightleftharpoons \text{C2}, K_D^{12}$). Aunque ambos modelos se ajustan bastante bien a los datos experimentales, los valores numéricos de las constantes secuenciales tenían poco sentido químico, por lo que decidimos considerar solo el equilibrio global o combinado, que presenta una constante de disociación aparente $K_D^{12} = 0.5(0.13) \mu\text{M}$ (**equilibrio 1:2**). Con respecto al comportamiento del ligando cíclico bispiridínico ciclo- $(\beta\text{AlaBpy-R}_3)_2$ **29** en presencia de iones Cu(II), el espectro MALDI de la mezcla de valoración resultante muestra picos que se atribuyen a aductos de estequiometría 1:1 y 1:2. Los datos de las valoraciones de fluorescencia pudieron ser ajustados a un modelo 1:2. Tanto el mecanismo secuencial por etapas como el combinado o global se ajustaron bien a los datos experimentales, pero la separación del proceso coordinativo en dos etapas elementales dio como resultado un aumento enorme de los errores del ajuste ($K_D^1 = 13(27) \mu\text{M}$; $K_D^2 = 0.024(0.042) \mu\text{M}$). Por ello seleccionamos para este sistema el equilibrio global, que presenta una constante de disociación aparente $K_D^{12} = 0.445(0.017) \mu\text{M}$ (**equilibrio 1:2**), muy similar a la de su análogo lineal **27**.

En lo que respecta a los ligandos peptídicos trispiridínicos, el análisis MALDI de la mezcla final resultante de la valoración de fluorescencia del ligando lineal $(\beta\text{AlaBpy-R}_3)_3$ **28** en presencia de iones Cu(II), muestra picos correspondientes a la formación de los aductos 1:1, 1:2, 1:3 y 2:3 (ligando:metal). El mejor ajuste se obtuvo con un modelo complejo que involucra a todas estas especies, pero esta estrategia nos llevó a una alta incertidumbre en los valores de las K_D resultantes, particularmente en las correspondientes a las especies de orden superior $K_D^{11} = 0.24(0.71) \mu\text{M}$ y $K_D^{12} = 0.3(0.55)$

μM (modelo mixto 1:1, 1:2 y 2:3). Finalmente, el espectro MALDI de la mezcla resultante de la valoración de fluorescencia del ligando cíclico trisbipiridínico ciclo-($\beta\text{AlaBpy-R}_3$)₃ **30** en presencia de iones Cu(II), muestra picos compatibles con la formación de aductos de estequiometría 1:1, 1:2 y 1:3. Además, aparecen picos con masas grandes que implican dos, e incluso tres ligandos peptídicos. Los datos de las valoraciones de fluorescencia se ajustaron mejor utilizando un modelo mixto que incluye especies 1:1 y 2:1 (ligando:metal). Sin embargo, los valores numéricos de las constantes de unión tuvieron errores extremadamente grandes debido a la introducción de demasiadas variables en el ajuste. La constante de disociación aparente para el modelo combinado o global fue $K_D^{21} = 0.168(0.056) \mu\text{M}$ (modelo mixto 1:1, 2:1 y especies de orden superior).

Sistemas metalopeptídicos	Modelos de enlace utilizados en los ajustes	Constantes de enlace calculadas*
27/Cu(II)	equilibrio 1:2	$K_D^{22} = 0.5(0.13) \mu\text{M}$.
28/Cu(II)	modelo mixto: 1:1, 1:2 y 2:3	$K_D^{11} = 0.24(0.71) \mu\text{M}$ $K_D^{12} = 0.3(0.55) \mu\text{M}$
29/Cu(II)	equilibrio 1:2	$K_D^{22} = 0.445(0.017) \mu\text{M}$
30/Cu(II)	modelo mixto 1:1, 2:1, y especies de orden superior	$K_D^{21} = 0.168(0.056) \mu\text{M}$

* Las constantes de enlace se han calculado utilizando el software DynaFit.

Tabla 1. Constantes de unión calculadas para los sistemas metalopeptídicos de Cu(II).

A continuación se procedió a estudiar la serie completa de ligandos peptídicos y metalopéptidos de Cu(II) a través de espectrofotometría UV-Vis. La incubación de las disoluciones 5-6 μM de los ligandos peptídicos en buffer fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6.5) con Cu(II) dio como resultado claros cambios hipo y batocrómicos de la banda de absorción de la Bpy de 312-315 nm en los ligandos libres a 334-336 nm en sus complejos metálicos, lo que confirma la exitosa coordinación de los iones Cu(II) a las unidades de Bpy. Además, se observó la aparición de una única banda ancha muy poco intensa centrada a 733-735 nm con coeficientes de extinción entre 57-114 $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$,

que puede asignarse a transiciones d-d.^{119,120,121,122} La forma, el coeficiente de extinción y la posición de esta banda única de campo ligando (LF) es consecuente con la presencia mayoritaria de subunidades metálicas de estequiometría $[\text{CuL}_2]^{2+}$ (L=fragmento βAlaBpy) dentro de las mezclas de las disoluciones de los metalopéptidos,^{123,124} lo que está de acuerdo con los datos de MALDI y de las valoraciones de emisión obtenidos.

También se realizaron estudios de CD a todos los ligandos peptídicos y metalopéptidos. Los ligandos peptídicos oligocationicos dan lugar a espectros de CD caracterizados por dos bandas de signos opuestos a 301-307 nm y 333-339 nm con un cruce a 318 nm, y con efecto Cotton positivo, que pueden atribuirse a los cromóforos de Bpy. La adición de iones Cu(II) induce un desplazamiento batocrómico de estas bandas a 321-325 nm y 353-355 nm, respectivamente, con un punto de cruce a 332-335 nm y una inversión en su signo. Además, la coordinación de Cu(II) induce la aparición de una nueva banda con signo positivo centrado a 292-295 nm. La inversión del signo después de la unión de Cu(II) sugiere, como se esperaba, que las bipyridinas no están preorganizados en absoluto en los péptidos lineales **27** y **28**, pero tampoco en los derivados cíclicos **29** y **30**. Los espectros de CD de los sistemas **27/Cu(II)**, **28/Cu(II)** y **29/Cu(II)** muestran perfiles e intensidades de banda muy similares, indicando una disposición similar de las subunidades metálicas $[\text{CuL}_n]^{2+}$ (L= fragmento βAlaBpy y n=1-3) dentro de las mezclas

-
- 119 Hathaway, B.J.; Billing, D.E. (1970) The electronic properties and stereochemistry of mononuclear complexes of the copper(II) ion. *Coord. Chem. Rev.* 5, 143–207.
- 120 Sacconi, L.; Ciampolini, M. (1964) Magnetic Investigation of Some Tetracoordinated Nickel(II) and Copper(II) Complexes between 80 and 300°K. *J. Chem. Soc.* 276–280.
- 121 a) Arena, G.; Bonomo, R. P.; Contino, A.; Sgarlata, C.; Spoto, G.; Tabbi, G. (2004) Influence of the coordination geometry on the physicochemical properties of a copper(ii) complex with a tailor-made calixarene-based ligand bearing dipyrindyl pendants. An ESR, UV-Vis and CV study. *Dalton Trans.* 3205–3211; b) Garribba, E.; Micera, G.; Sanna, D.; Strinna-Erre, L. (2000) The Cu(II)-2,2'-bipyridine system revisited. *Inorg. Chim. Acta.* 299, 253–261; c) Boiocchi, M.; Bonizzoni, M.; Fabbri, L.; Piovani, G.; Taglietti, A. (2004) A Dimetallic Cage with a Long Ellipsoidal Cavity for the Fluorescent Detection of Dicarboxylate Anions in Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 3847–3852; d) Amendola, V.; Miljkovic, A.; Legnani, L.; Toma, L.; Dondi, D.; Lazzaroni, S. (2018) Self-Assembly of Pseudorotaxane Structures from a Dicopper(II) Molecular Cage and Dicarboxylate Axles. *Inorg. Chem.* 57, 3540–3547.
- 122 Cárdenas, D.; Livoreil, A.; Sauvage, J.-P. (1996) Redox Control of the Ring-Gliding Motion in a Cu-Complexed Catenane: A Process Involving Three Distinct Geometries. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 11980–11981.
- 123 Ozutsumi, K., Kawashima, T. (1991) Structure of copper(II)-bpy and -phen complexes: EXAFS and spectrophotometric studies on the structure of copper(II) complexes with 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline in aqueous solution. *Inorg. Chim. Acta.* 180, 231–238.
- 124 Garribba, E.; Micera, G.; Sanna, D.; Strinna-Erre, L. (2000) The Cu(II)-2,2'-bipyridine system revisited. *Inorg. Chim. Acta.* 299, 253–161.

de las disoluciones de los metalopéptidos.¹²⁵ Sin embargo, la intensidad de la banda centrada a 292 nm es considerablemente mayor en **30/Cu(II)**.

Estudios de citotoxicidad

	HCT-116	SF-268	NCI/ADR-RES	NCI-H460	MRC-5
<i>Ligandos Peptídicos</i>					
27	>100.0, 31±2	>100.0, 52±3	>100.0, 22±2	>100.0, 53±2	>100.0, 46±3
28	>100.0, 67±2	26.0±2, 92±1	30.0±1, 88±2	22.0±1, 91±1	44.4±0.84, 90±1
29	>100.0, 27±1	>100.0, 45±2	>100.0, 10±2	>100.0, 32±2	>100.0, 24±2
30	>100.0, 80±1	16.0±1, 92±1	28.0±1, 86±1	21.0±1, 92±1	18.0±1, 92±1
<i>Metalopéptidos</i>					
27/Cu(II)	2.58±0.06, 94±1	2.27±0.04, 92±1	2.21±0.06, 88±1	3.48±0.05, 96±1	1.73±0.03, 92±1
28/Cu(II)	2.72±0.05, 95±1	2.10±0.07, 92±1	2.41±0.04, 88±1	3.41±0.03, 96±1	1.80±0.02, 92±1
29/Cu(II)	2.81±0.04, 94±1	2.49±0.03, 93±1	2.42±0.04, 88±1	3.64±0.07, 96±1	1.73±0.03, 92±1
30/Cu(II)	2.82±0.06, 95±1	2.27±0.07, 94±2	2.83±0.07, 88±1	3.48±0.02, 96±1	1.48±0.03, 92±1
<i>Controles</i>					
Cisplatino	13.0±1, 94±1	3.89±0.08, 92±1	13.0±1, 86±1	5.29±0.46, 62±4	5.70±0.22, 92±1
CuCl₂	>100.0, 94±1	>100.0, 87±1	99.0±1, 91±1	>100.0, 97±1	79.0±3, 91±1

Tabla 2. Valores de IC₅₀ (µM) y E_{max} (%) de los ligandos peptídicos y metalopéptidos de Cu(II) para las líneas celulares tumorales HCT-116, SF-268, NCI/ADR-RES y NCI-H460 y también para la líneas celular de fibroblastos de pulmón no transformados (MRC-5). Los estudios se han llevado a cabo usando el método MTT.

Se evaluó la citotoxicidad de los ligandos peptídicos y sus correspondientes metalopéptidos de Cu(II) frente a un conjunto de líneas celulares tumorales que incluyen

125 Gamba, I.; Rama, G.; Ortega-Carrasco, E.; Berardozi, R.; Sánchez-Pedregal, V.; Di Bari, L.; Maréchal, J.-M.; Vázquez, M.; Vázquez López, M. (2016) The folding of a metallopeptide *Dalton Trans.* 45, 881–885.

HCT-116 (carcinoma de colon), SF-268 (glioma humano), NCI / ADR-RES (carcinoma de ovario resistente a doxorubicina), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), así como en fibroblastos de pulmón no transformados (MRC-5). Se analizaron las curvas de respuesta y los resultados se resumen en la Tabla 2. El comportamiento citotóxico de los péptidos de ligando libre es variable y parece depender del número de fragmentos de Bpy incluidos dentro de las estructuras de ligando peptídico. Por un lado, los péptidos libres bisbipiridínicos (**27** y **29**) pueden considerarse no activos en todas las líneas celulares en estudio, ya que la curva de inhibición del crecimiento celular no puede completarse incluso alcanzando una concentración de 100 μM de compuesto. Esta situación se repite para los ligandos peptídicos trisbipiridínicos (**28** y **30**) y la línea celular HCT-116. Sin embargo, para todas las otras líneas celulares, tanto **28** como **30** parecen ser altamente citotóxicas, aunque mucho menos (un orden de magnitud más alto) que sus correspondientes complejos de Cu(II). Todos los metalopéptidos muestran una citotoxicidad muy alta frente a todas las líneas celulares de cáncer bajo estudio y también para la no tumoral (MRC-5) con diferencias muy pequeñas entre las líneas celulares y también entre sí, teniendo en cuenta los valores de IC_{50} alcanzados en cada caso. Estos valores de IC_{50} están en el orden de cisplatino para las líneas celulares SF-268 y NCI-H460 pero, sin embargo, son un orden de magnitud menor para las líneas celulares HCT-116 y NCI/ADR-RES. Además, aunque los valores de E_{max} de la serie completa de metalopéptidos de Cu(II) son bastante similares a los del cisplatino para las líneas celulares HCT-116, SF-268, NCI/ADR-RES e incluso MRC-5, estos son significativamente más altos que los de cisplatino para las células tumorales NCI-H460. Por ejemplo, el E_{max} medido para cisplatino en este caso fue de 62 μM , mientras que todas las series de metalopéptidos de Cu (II) mostraron valores de 96 (92 μM para los ligandos trisbipiridínicos libres **28** y **30**) en las mismas condiciones experimentales.¹²⁶

En la actualidad estamos estudiando el posible origen de la alta citotoxicidad de estos metalopéptidos. Datos preliminares obtenidos muy recientemente y que no se incluyen en esta memoria apuntan a que el origen de la misma es la capacidad de estos sistemas para generar especies ROS en el medio celular.

126 Fallahi-Sichani, M.; Honarnejad, S.; Heiser, L. M.; Gray, J. W.; Sorger, P. K. (2013) Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. *Nat. Chem. Biol.* 9, 708–714.

Conclusiones

- Hemos sintetizado la prodroga de levofloxacin con trifenilfosfonio con un conector de éster borónico MIDA. Estudios in vitro demuestran la hidrólisis selectiva en medio oxidante y pH básico, aunque esos estudios sugieren que la prodroga es excesivamente estable, los resultados preliminares validan la estrategia.
- Se ha sintetizado un derivado de fosfonio derivado de pireno que es fluorescente y se localiza selectivamente en la mitocondria, pudiendo tener aplicaciones terapéuticas.
- Se han sintetizado una serie de ligandos peptídicos oligocationicos lineales y cíclicos equipados con dos y tres unidades del ligando 2,2'-bipiridina (Bpy) y derivados del residuo coordinante Fmoc-βAlaBpy-OH **26** haciendo uso de la metodología sintética de péptidos en fase sólida (SPPS).
- Hemos estudiado el comportamiento coordinativo de estos ligandos peptídicos en disolución acuosa en presencia de iones Cu(II) mediante diferentes técnicas espectroscópicas, como espectroscopia de fluorescencia, espectrofotometría UV-vis y dicroísmo circular, así como por espectrometría de masas MALDI.
- Hemos estudiado las propiedades citotóxicas de todos los ligandos peptídicos y sus correspondientes metalopéptidos de Cu(II) frente a diversas líneas celulares cancerígenas. Todos los metalopéptidos muestran una citotoxicidad muy alta frente a todas las líneas celulares cancerígenas, en algunos casos un orden de magnitud mejor que el mostrado por el cisplatino. En estos momentos estamos estudiando el origen de la citotoxicidad de estos complejos, que sospechamos que reside en su capacidad para generar especies ROS en el entorno celular.



Parte Experimental





Reactivos y Disolventes

Los reactivos comerciales se adquirieron de *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Panreac* o *Fluka* y se emplearon sin purificación adicional. Los disolventes utilizados fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich*, *Scharlau* o *Fisher Chemical* y todos fueron de calidad de síntesis o de HPLC y se utilizaron sin purificación adicional.

Para cromatografía en capa fina analítica se emplearon placas de aluminio con gel de sílice 60 F₂₅₄ *Merck*. Las manchas se visualizaron con luz UV (254 y 365 nm). En aquellos casos en que fue necesario se emplearon los reveladores de Hannessian (disolución acuosa de molibdato amónico, sulfato de cerio y H₂SO₄) y ninhidrina (trioxihidroindeno monohidrato y etanol).

Para la cromatografía en columna a presión se empleó gel de sílice 60 (230-400 mesh ASTM) de *Merck*.

Por lo que respecta a la síntesis de los metalopéptidos y de los ligandos peptídicos; los aminoácidos, los reactivos de acoplamiento y la resina fueron suministrados por *Iris Biotech*, *Sigma-Aldrich*, *Fluorochem* y *NovaBiochem*. Se empleó la resina cloruro de 2-clorotritilo y la arginina se usó en forma de Fmoc-Arg(Pbf)-OH.

Procedimientos y Técnicas Experimentales

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los diferentes compuestos fueron caracterizados por RMN en instrumentos *Bruker* AMX500 de 11.74 T y *Varian Mercury* 300 de 7.04 T. Los datos de RMN se han escrito usando el formato recomendado por la American Chemical Society: ¹H-NMR (ν [¹H] MHz, disolvente-dⁿ, δ) y ¹³C-NMR (ν [¹³C] MHz, disolvente-dⁿ, δ).

Espectrometría de masas (MS)

Para la caracterización mediante espectrometría de masas de los diferentes compuestos se emplearon las técnicas ESI (*Bruker Microtof* ESI-TOF) y MALDI (*Bruker Autoflex* MALDI-TOF). La matriz se seleccionó en función del peso molecular de los péptidos, se utilizó 4-HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) para péptidos pequeños y ácido sinapínico para péptidos mayores de 3 KDa.

Los datos de espectrometría de masas de los diferentes compuestos sintetizados se han escrito usando el siguiente formato: MS (m/z). Calculado ($[M+H]^+$, C_xH_yN_zO_k) = , encontrado = ; calculado ($[M+2H]^{2+}$, C_xH_yN_zO_k) = , encontrado = .

Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de espectroscopia de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro *Varian Cary Eclipse*. Para las medidas se utilizó una cubeta *Hellma* 100-QS de 1.5 mL. Se llevaron a cabo estudios termodinámicos de la formación de los metalopéptidos, utilizando como parámetros: longitud de excitación 305 nm, rango de adquisición 310-600 nm, resolución 0.2 nm, acumulación 1 barrido, velocidad de barrido 200 nm/min.

Ultravioleta visible

Las medidas de absorbancia UV/Visible se realizaron en un espectrofotómetro *Jasco* V-630 termostatzado con un peltier *Jasco* ETC-717 a 20 °C. Para las medidas se empleó una cubeta *Hellma* 100-QS de 1 cm de paso óptico. Los parámetros de adquisición empleados en las medidas muestras fueron los siguientes: velocidad de barrido 200 nm/min, resolución 0.2 nm

Dicroísmo Circular

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un espectrómetro *Jasco* J-815 CD termostatzado a 20 °C y empleando una cubeta (100-QS, de 2 mm de paso óptico). La velocidad de escaneado se ajustó a 200 nm/min y los espectros se obtuvieron por acumulación de tres barridos. Se utilizaron para los espectros concentraciones de 10 µM de péptido y la concentración de ión metálico necesaria para su coordinación según los datos de valoración.

HPLC

HPLC-MS

Se empleó un cromatógrafo *Agilent* 1200 series LC/MS empleando una columna analítica *Phenomenex Luna* C₁₈ (1.8 µm, 2.1 × 50mm), en condiciones estándar de fase reversa. Como fase móvil se emplearon mezclas H₂O 0.1 % TFA (disolvente A) y CH₃CN 0.1 % TFA (disolvente B) en gradiente lineal en 12 min con un flujo de 0.350 mL/min. Los compuestos se detectaron por absorción UV a 222, 270 y 330 nm.

HPLC-Preparativa

Se empleó un cromatógrafo *Alliance HPLC* Waters 1500 series con detector UV 2489, utilizando una columna *Sunfire Prep* C₁₈ OBD (5 µm, 19 × 150 mm) en fase reversa de *Waters*. Las condiciones estándar para HPLC preparativa consistieron en un régimen isocrático durante los primeros 5 min, seguido de gradientes lineales durante 30 min (A: H₂O 0.1% TFA, B: CH₃OH 0.1% TFA). Los gradientes se ajustaron para cada péptido.

Síntesis de péptidos en fase sólida

El acoplamiento de los aminoácidos se realizó en un reactor como el de la Figura 15 de forma manual. Los disolventes se añaden por la parte superior del reactor. La resina se agita con la llave en la posición 1, haciendo pasar una corriente de N₂ por el sistema. Los disolventes y reactivos se filtran de A a B con la llave de tres bocas en la posición 2 y aplicando presión con N₂ desde la parte superior del reactor.

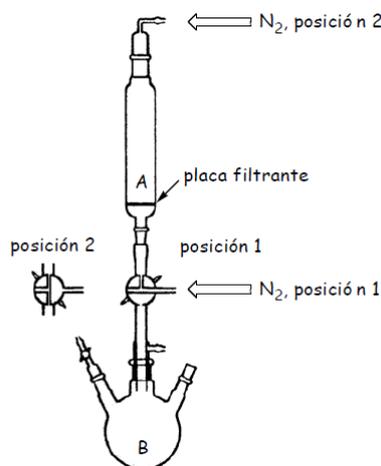


Figura 15 Montaje para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

Reactivos y disolventes utilizados en los acoplamientos

Se utilizó N,N'-Dimetilformamida (DMF) de grado adecuado para la síntesis de péptidos. Las disoluciones empleadas se prepararon al inicio de cada síntesis.

- **Piperidina/DMF**: 20 mL de piperidina en 80 mL de DMF.
- **DIEA/DMF**: 3 mL de DIEA en 90 mL de DMF (0.195 M DIEA).

Preparación de la resina

Para todos los péptidos, tanto lineales como cíclicos, se empleó la resina 2- Clorotritilo de Iris Biotech con carga 0.8 mmol/g.

El procedimiento de preparación de la resina para iniciar la SPPS es el siguiente:

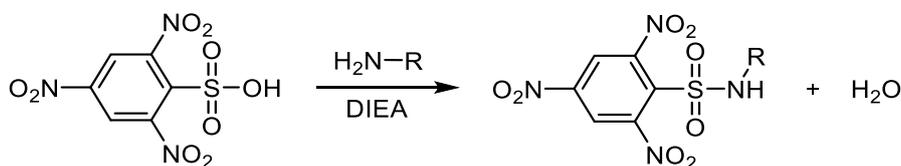
- a) Añadir la resina (0.05 mmol) al matraz de reacción y lavarla con DCM (5 mL, 10 min).
- b) Pesar 1.0 equiv. del primer aminoácido. Si se necesita una resina con carga más baja, se reduce la cantidad de aminoácido. Disolver el Fmoc-amino en DCM (aproximadamente 1 mL por mg de resina) y añadir 5 equiv. de DIEA. Añadirlo a la resina (60 min)
- c) Lavar con DCM (3 × 5 mL, 5 min)
- d) Comprobar que el test de TNBS es negativo.
- e) Desproteger el grupo amino de la resina: 20 % piperidina en DMF (5 mL durante 30 min).
- f) Lavar con DMF (3 × 5 mL, 5 min).
- g) Comprobar que el test de TNBS es positivo.

Completada esta secuencia, dicha resina está lista para continuar acoplando los siguientes aminoácidos. El proceso de la síntesis se detalla a continuación.

Proceso sintético de los acoplamientos

Los péptidos se sintetizaron manualmente siguiendo el protocolo estándar para síntesis de péptidos según metodología Fmoc, empleando una escala de 0.1 mmol:

- a) *Acoplamiento de la Fmoc-Arg(Pbf)*: Se disuelve el aminoácido (0.5 mmol, 5 equivalentes) junto con una cantidad estequiométrica de HBTU como agente activante y DIEA/DMF (3.75 mL, 6 equivalentes). Tras 2 min se añade la mezcla sobre la resina. La suspensión resultante se agita durante 30 min con corriente de N₂.
- b) *Acoplamiento de la Fmoc-βAlaBpy-OH*: En este caso se emplea un exceso de 3 equivalentes por mol de resina y se emplea el HATU como agente activante. Se pesa el residuo coordinante en un vial de vidrio junto con una cantidad estequiométrica de HATU. Sobre este sólido se adiciona 1 mL de DMF y 2.25 mL de DIEA/DMF; la mezcla se disuelve asistida por ultrasonidos durante 5 minutos. El tiempo de acoplamiento para estos residuos coordinantes fue de 1 hora.
- c) *Lavados*: Se realizan lavados después de cada acoplamiento con DMF (2 × 5 mL, 3 min). Una vez lavada la resina se lleva a cabo el test de TNBS para comprobar si se produjo el acoplamiento. Si es negativo se puede proceder al siguiente aminoácido. En caso de dar positivo se repite el acoplamiento.
- d) *Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc)*: Se lleva a cabo por tratamiento básico con 20 % piperidina en DMF durante 20 min. A continuación se lava la resina desprotegida con DMF (4 × 5 mL, 2 min).
- e) *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 ácido 2,4,6- trinitrobenzenosulfónico y reacciona con aminas primarias formándose una sulfonamida de color rojo intenso (Esquema 13). Para realizar el test se coge una pequeña fracción de la resina y se adiciona dos gotas de DIEA (10 % en DMF) y otra gota de una disolución de TNBS (1 % en DMF). La suspensión se deja reposar durante unos 2 min y se observa el color que adquiere la resina. Si la resina adquiere un color rojo intenso el test es positivo, lo que significa que hay aminas primarias libres en la resina. Si por el contrario la resina no se colorea, el test es negativo, y es indicativo de que el acoplamiento ha sido cuantitativo.
- f)



Esquema 13. Condensación entre el TNBS y una amina primaria para formar una sulfonamina.

Rotura de la unión del péptido con la resina y desprotección total

La rotura de la unión del péptido con la resina se llevó a cabo utilizando una mezcla de TFA con reactivos secuestradores de carbocationes:

Cóctel: 25 μL TIS, 25 μL H₂O, 50 μL CH₂Cl₂, 900 μL TFA.

Para una escala de 0.1 mmol se añaden 12.5 mL (1 mL de disolución por cada 40 mg de resina) de cóctel. La mezcla resultante se agita durante 2 h y la suspensión se filtra para separar la resina de la mezcla de desprotección y se lava la resina con TFA (1 mL aproximadamente) para a continuación concentrar la disolución ácida resultante hasta un volumen máximo de 2 mL empleando corriente de N₂. Esta disolución se añade lentamente sobre Et₂O (10 mL éter por cada mL de disolución de rotura empleada) previamente enfriado con CO₂ sólido y la suspensión de péptido en Et₂O se centrifuga a 7830 r.p.m. durante 15 min. A continuación se separa el líquido sobrenadante del sólido centrifugado suspendiéndose nuevamente dicho sólido en Et₂O (10 mL) para arrastrar restos de cóctel y se centrifuga de nuevo. El sólido obtenido se seca a vacío y se procede a su análisis mediante HPLC-MS y purificación por HPLC.

Para la desprotección de péptidos que van a ser ciclados se usa el cóctel AcOH/TFE/DCM (1:1:8) durante 1 h. El proceso de ciclación se realiza en disolución, con 2 equiv. del agente acoplante PyAOP y 6 equiv. DIEA en DMF durante toda la noche. Una vez ciclado, se vuelve a desproteger de los grupos protectores de las cadenas laterales utilizando el cóctel con TFA descrito previamente. A partir de aquí, es el mismo procedimiento que para un péptido lineal.

Para el cálculo de los rendimientos de la SPPS no hay más que pesar el péptido desprotegido y purificado y dividir esta cantidad por la que deberíamos obtener, teniendo presente la escala a la que hemos trabajado y multiplicando los milimoles esperados de péptido por su peso molecular, incluyendo los contraniones trifluoroacetato que llevarían consigo los residuos básicos.

Estudios de citotoxicidad

Los estudios de citotoxicidad de los compuestos se llevaron a cabo en las líneas celulares HCT-116, SF-268, NCI/ADR-RES, NCI-H460 y MRC-5. Estas células se cultivaron con medio de crecimiento McCoy's 5a Medium Modified suplementado con un 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, a una temperatura de 37 °C. La inhibición del crecimiento celular inducida por los compuestos se evaluó usando un sistema basado en las sales de tetrazolio del MTT, por su capacidad de ser transformado en formazán cuando las células son metabólicamente activas. Las células se sembraron en una placa estéril de 96 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo y se incubaron durante 24 h en medio de crecimiento. Posteriormente se añadieron los compuestos disueltos en H₂O, manteniendo la misma proporción de H₂O en cada pocillo. Al cabo de 48 horas (a 37 °C y en una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire) se añadió 10 µL de MTT a cada pocillo y se incubó durante 4 horas. El MTT se preparó a una concentración de 5 mg/mL en PBS (NaCl 0.136 M, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaH₂PO₄ 8 mM y KCl 2.68 mM). Posteriormente se añadieron 100 µL de SDS al 10% en HCl al 0.01M y se incubó durante 12-14 h bajo las mismas condiciones experimentales. Finalmente se realizó una lectura de absorbancia de las placas a una longitud de onda de 595 nm (*Tecan M1000 Pro*). Todos los experimentos se realizaron con puntos por triplicado.

Los datos se expresaron como % de inhibición del crecimiento. Este % de inhibición se calculó en base a la fórmula:

$$\% \text{ inhibicion} = 100 - \frac{AO \times 100}{AT}$$

en donde *AO* es la absorbancia observada en los pocillos con el compuesto objeto de estudio y *AT* es la absorbancia observada en los pocillos con H₂O.

El potencial de inhibición de los compuestos fue calculado mediante la construcción de curvas mediante el % de concentración de inhibición y extrapolando los valores de IC₅₀ (concentración de compuesto que inhibe el 50 % de crecimiento) a partir de los valores de las curvas. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Dr. José Manuel Brea Floriani, del Grupo de Investigación *BioFarma* (CIMUS, USC).

Estudios de internalización celular

Estos experimentos se realizaron en una vitrina limpia estéril Teslar AV-100 a temperatura ambiente. Las muestras utilizadas se mantienen almacenadas en nevera por lo que se calentaron previamente en un baño de agua (37°C).

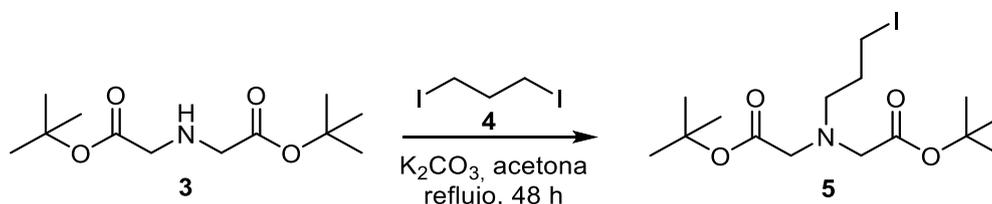
Las células Hela se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), 5 mM de glutamina, penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (100 unidades/mL) (todas de *Invitrogen*). Las muestras se incubaron en de 5% de CO₂ a 37 °C.

Las imágenes de microscopía se obtuvieron con una cámara digital Andor Zyla montada en una *Nikon TiE*. Posteriormente, las imágenes se procesaron con el software Image J o NIS. Los parámetros de los canales fluorescentes fueron para *Nikon* (Semrock): DAPI-1160B-000: BP 387/11 nm, LP 447/60 nm y DM 409 nm; TRITCB- 000: BP 543/22 nm, LP 593/40 nm y DM 562 nm.

Síntesis

Síntesis del derivado de la levofloxacin

Síntesis del di-tert-butil 2,2'-((3-iodopropil)azanodiil)diacetato (5).



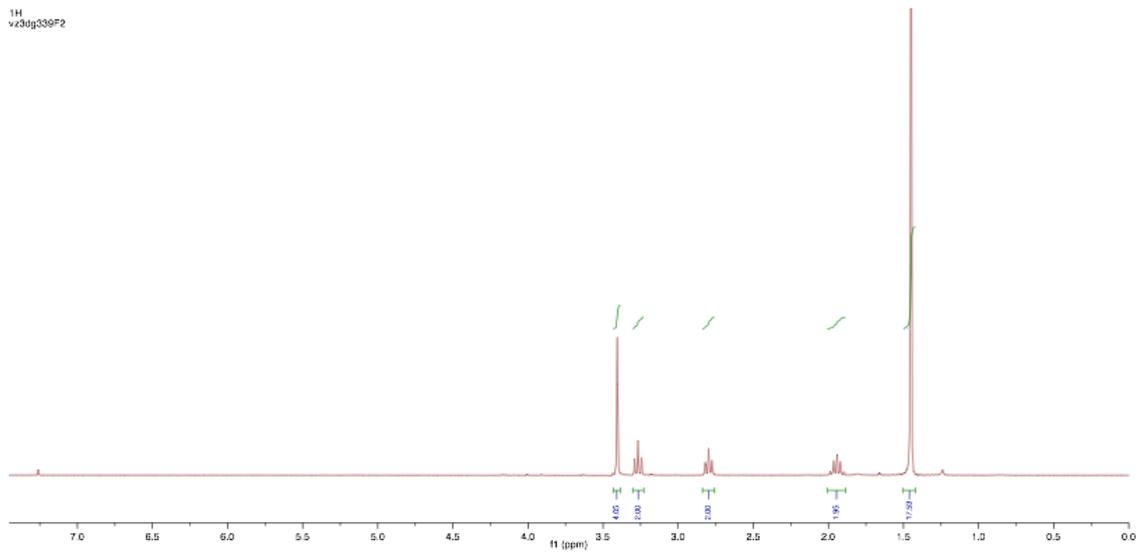
En un matraz seco, bajo N_2 , se introduce secuencialmente **3** (250 mg, 1.0 mmol), **4** (329 mg, 1.1 mmol) y K_2CO_3 (280 mg, 2.0 mmol). A continuación se añade acetona seca (10 mL). La mezcla resultante, provista de un tubo refrigerante, se introduce en un baño a 50 °C durante 48 h. Al cabo de las 2 h iniciales se observa la formación de una pasta blanquecina que evoluciona a grisácea hacia el final de la reacción.

Se deja que la mezcla alcance a sequedad y se concentra a sequedad. El residuo resultante se redissuelve en $CHCl_3$ (15 mL) y sobre la suspensión resultante se añade H_2O (15 mL). La mezcla se deja con agitación durante 1h hasta observar la desaparición de sólido en suspensión. La mezcla se pasa a un embudo de extracción y se separan las fases. La FA se extrae con más $CHCl_3$ (2×15 mL). El conjunto de FO se lava con una disolución saturada de NaCl (15 mL), se seca con Na_2SO_4 y se concentra a sequedad. El residuo resultante se purifica por columna (SiO_2 , corta, primero DCM; luego $CH_2Cl_2/AcOEt$ (9:1) para obtener **5** (102 mg, 24 %) como un sólido blanco.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.41 (s, 4H), 3.27 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.94 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.45 (s, 18H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.8 (2CO), 81.2 (2C), 56.4 (2 CH_2), 54.8 (CH_2), 32.2 (CH_2), 28.3 (6 CH_3), 4.6 (CH_2) ppm.

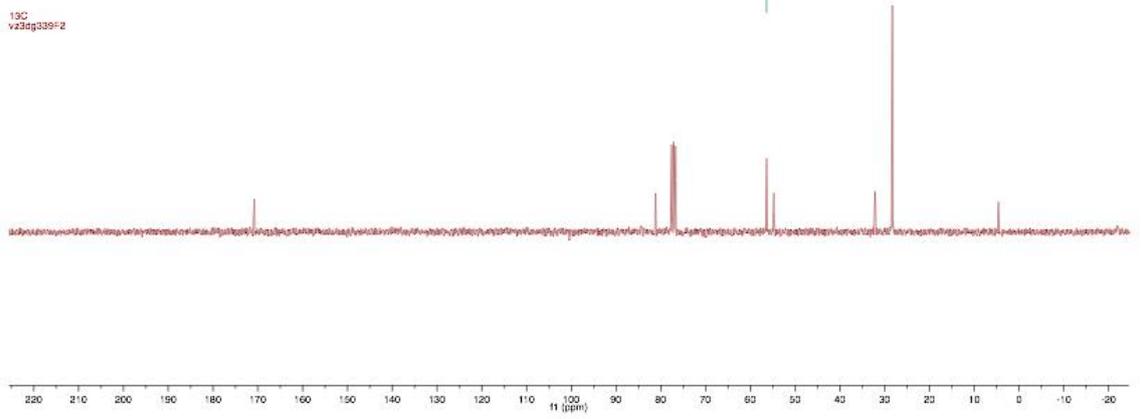
¹H
v23hg339F2



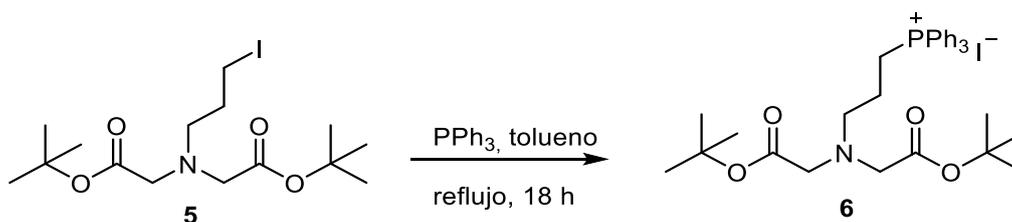
DEPT
v23hg339F2



¹³C
v23hg339F2



Síntesis del (3-(bis(2-(tert-butoxi)-2-oxoetil)amino)propil) trifenil- fosfonio (6).



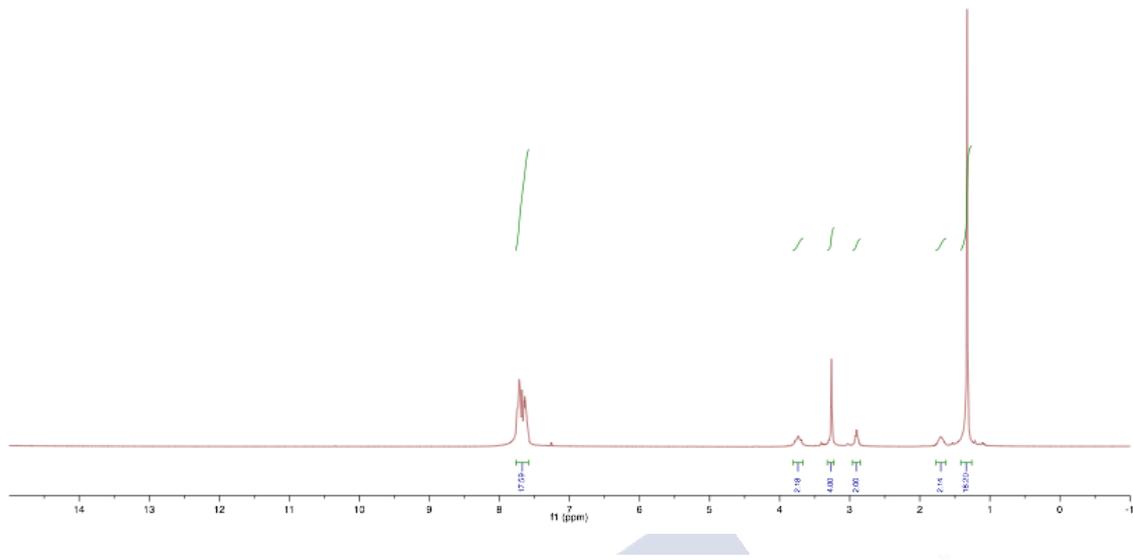
En un matraz seco se prepara una disolución de **5** (102 mg, 0.246 mmol) y PPh₃ (78 mg, 0.29 mmol) en tolueno (2.5 mL). La mezcla resultante se desoxigena mediante burbujeo de N₂ (globo) durante 5 min y se introduce en un baño a 110 °C (utilizar tubo refrigerante) durante 18h.

Se deja que la mezcla alcance temperatura ambiente y se pasa a un tubo *Falcon* con la ayuda de CH₂Cl₂ (menor volumen posible). Se concentra hasta obtener un volumen igual/o menor de 0.5 mL (aprox) y se añade éter (40 mL) observándose la formación de un sólido que se aísla por centrifugación. El lavado con éter se hace por triplicado. Se obtiene **6** (86 mg, 53%) como un sólido blanco.

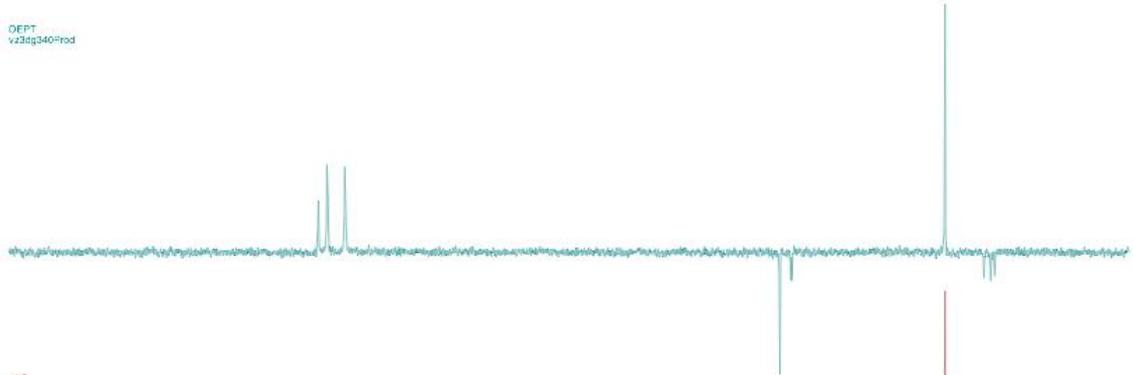
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.79-7.56 (m, 15H), 3.74 (dd, *J* = 15.3, 12.6 Hz, 2H), 3.26 (s, 4H), 2.90 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.32 (s, 18H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 170.5 (2CO), 135.0 (3CH), 133.5 (d, *J* = 10.0 Hz, 6CH), 130.4 (d, *J* = 12.5 Hz, 6CH), 118.05 (d, *J* = 86.2 Hz, 3C), 81.1 (2C), 56.2 (CH₂), 54.3 (d, *J* = 16.2 Hz, CH₂), 28.0 (6CH₃), 21.3 (CH₂), 19.9 (d, *J* = 52.7 Hz, CH₂) ppm.

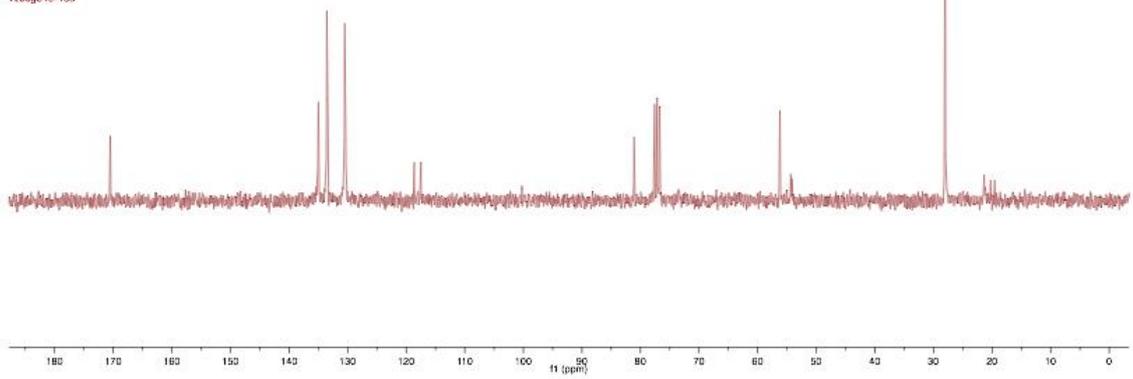
¹H
v23tg340Prod



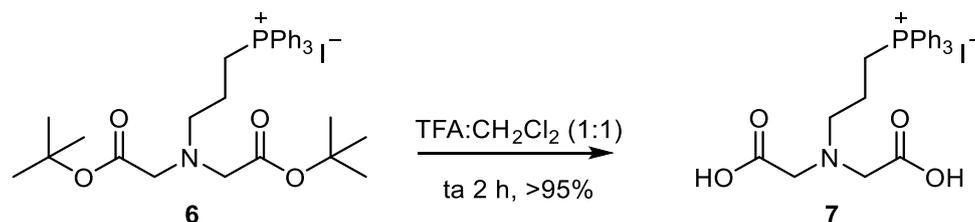
OEPT
v23tg340Prod



¹³C
v23tg340Prod



Síntesis del ácido (3-(bis(carboximetil)amino)propil)trifenilfosfonio (7).



En un matraz aforado se prepara una disolución de **6** (86 mg, 0.127 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL). Sobre esta disolución se añade TFA (4 mL) lentamente y la mezcla resultante se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 2 h.

La mezcla se concentra a sequedad, se redisuelve en CH₂Cl₂ (0.5 mL) y se añade éter (40 mL) observándose la formación de un sólido en suspensión que se aísla por centrifugación para obtener **7** como un sólido blanco (57 mg, 91 %). La obtención y pureza de este derivado se comprueba mediante HPLC.

HPLC-MS (ESI) (m/z, 5-95%B, t_R = 7.9 min). Calculado ([M+H]⁺, [C₂₅H₂₇NO₄P]⁺)⁺ = 436.17; encontrado = 436.32)

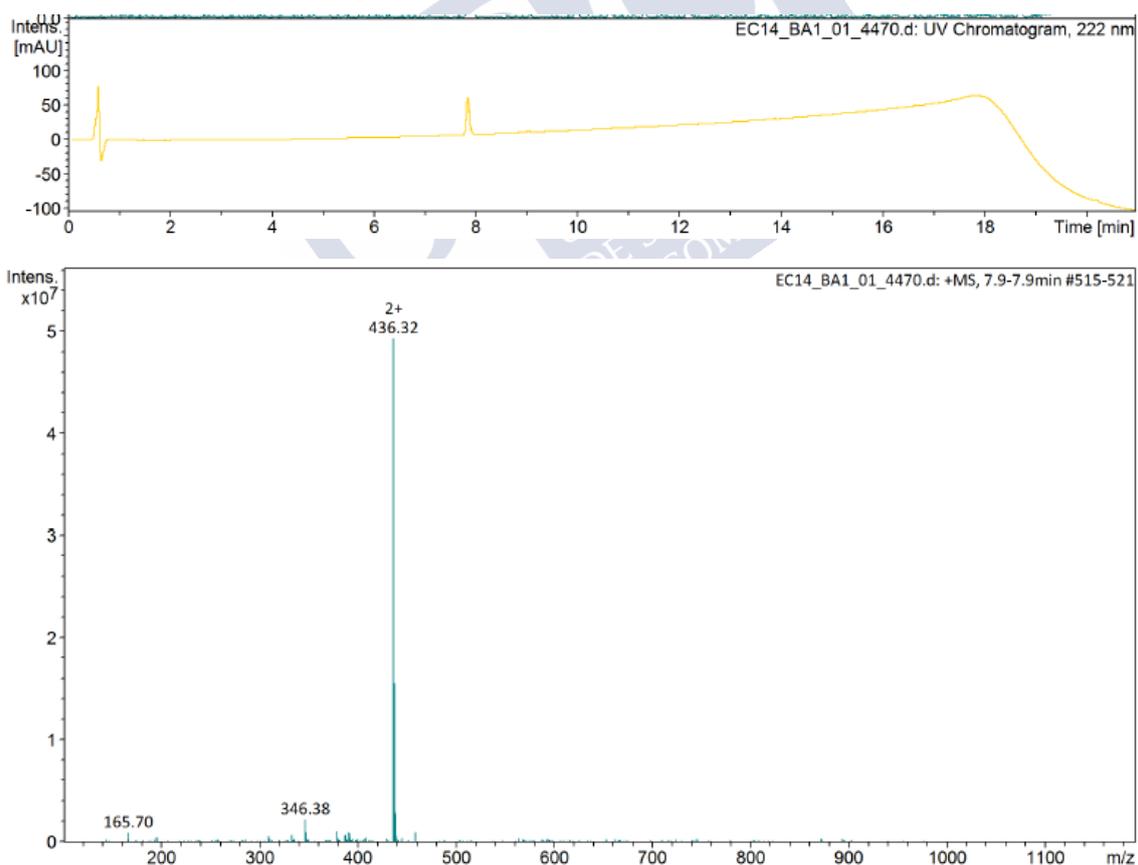
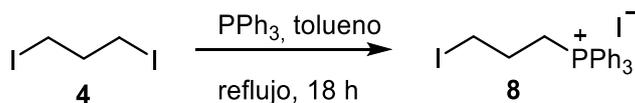


Figura 16 Arriba, espectro de HPLC del compuesto **7**; abajo, espectro MS del mismo compuesto.

Síntesis del (3-iodopropil) trifenilfosfonio (8).

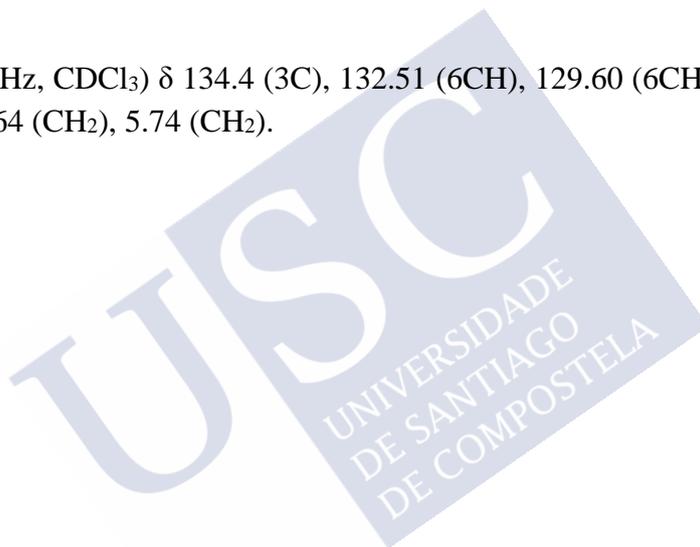


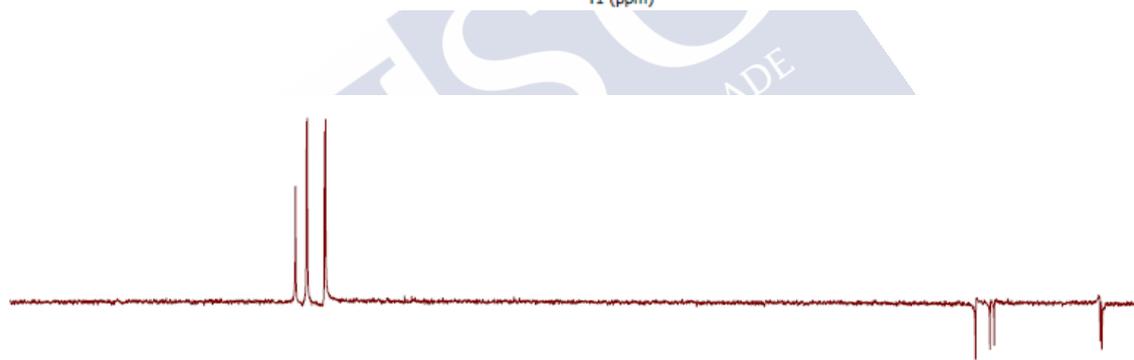
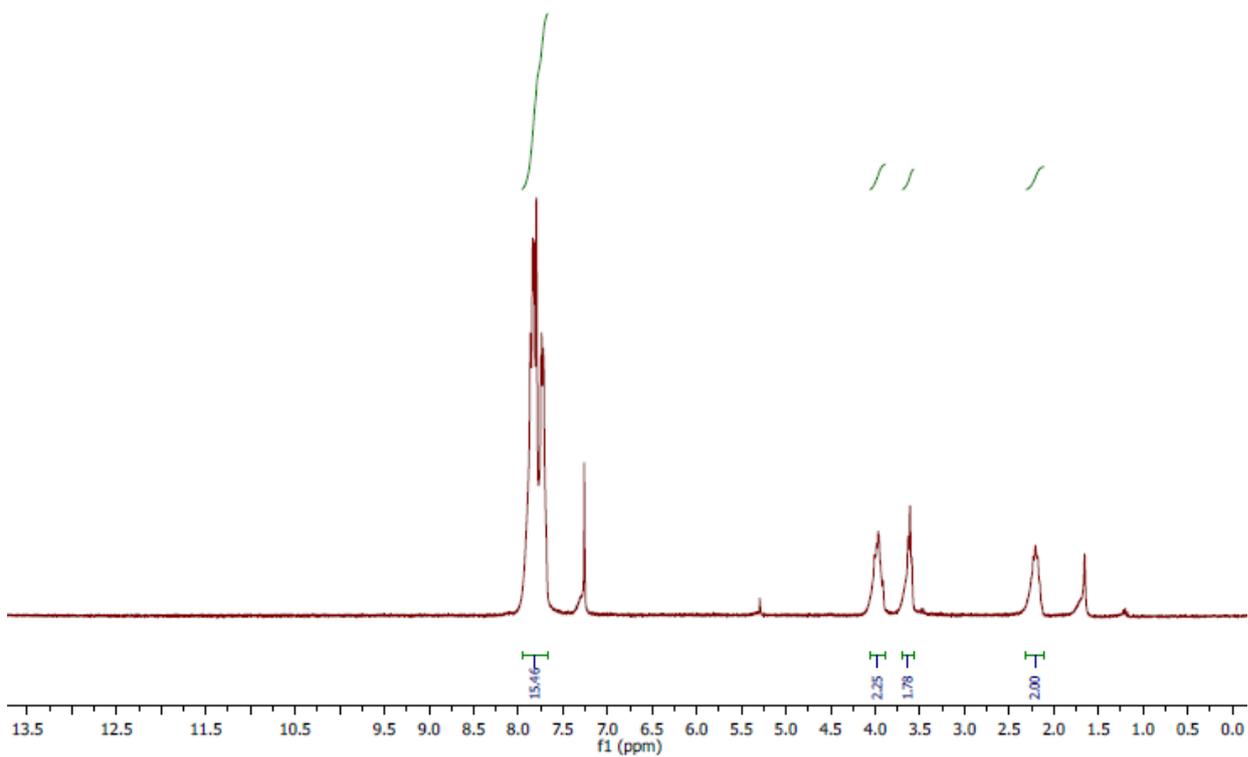
En un matraz seco se disuelve PPh₃ (2 g, 7.6 mmol) en tolueno (15 mL) a 95 °C y, a continuación, se añade **4** (1.8 mL, 0.02 mol). La mezcla resultante se calienta a reflujo, bajo agitación, durante 20 h.

La mezcla se concentra a sequedad, se disuelve en el mínimo volumen de CH₂Cl₂ (0.5 mL) y se añade éter (40 mL) observándose la formación de un sólido en suspensión que se aísla por centrifugación para obtener **8** como un sólido amarillo (3.9 g, 94 %).

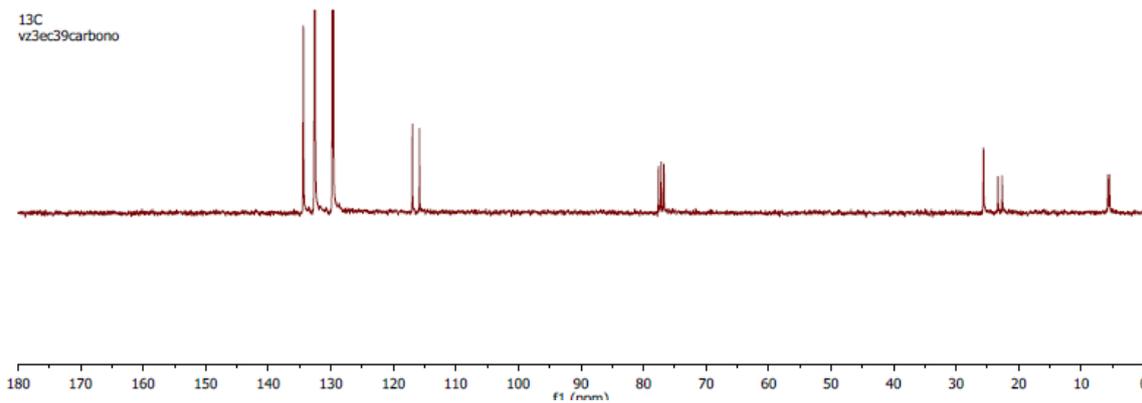
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.96-7.67 (m, 15H), 3.97 (m, 2H), 3.62 (m, 2H), 2.21 (m, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 134.4 (3C), 132.51 (6CH), 129.60 (6CH), 116.95 (3CH), 25.63 (CH₂), 22.64 (CH₂), 5.74 (CH₂).

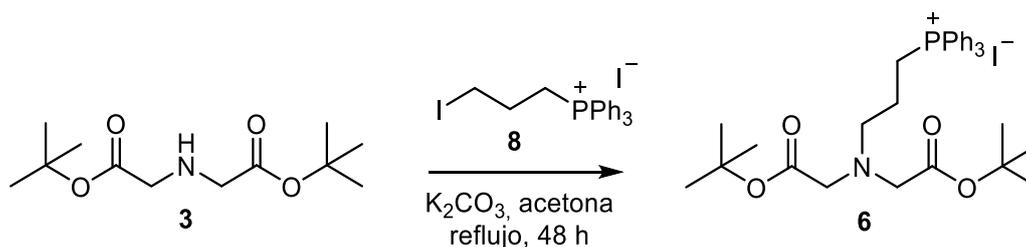




¹³C
vz3ec39carbono



Síntesis del di-tert-butil 2,2'-((3-(trifenil-λ4-fosfaneil)propil)azanedil)diacetato (6).



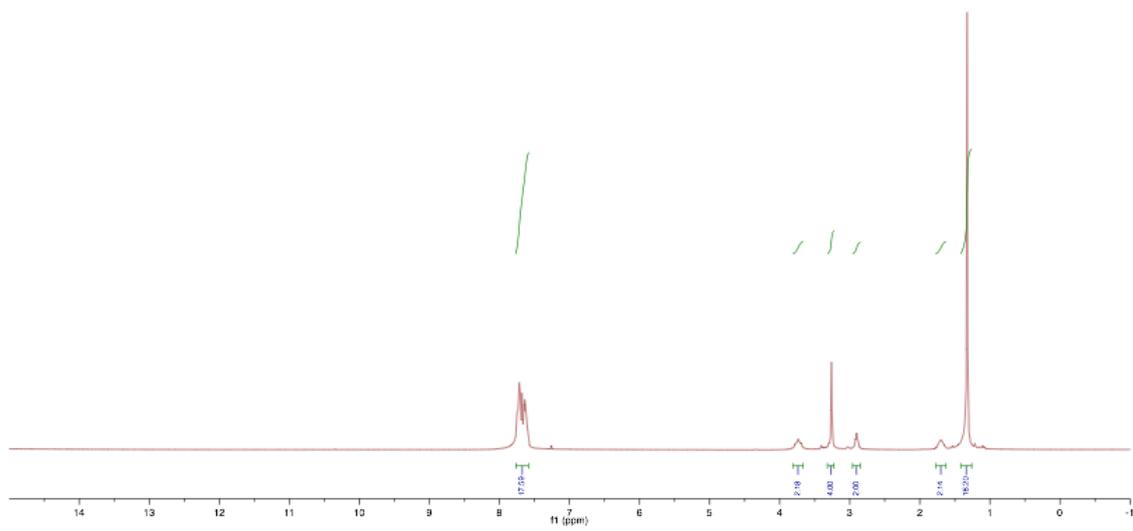
En un matraz Schlenk seco, bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelven **3** (928 mg, 1.66 mmol), **8** (340 mg, 1.38 mmol) y K_2CO_3 (381 mg, 2.76 mmol) en acetona seca (14 ml). La mezcla resultante se agita a reflujo durante 48 h.

Se deja que la mezcla alcance t.a. y se concentra a sequedad. El residuo resultante se redissuelve en $CHCl_3$ (15 mL) y sobre la suspensión resultante se añade agua (15 mL). La mezcla se deja con agitación durante 1 h hasta observar la desaparición de sólido en suspensión. Se separan las fases en un embudo de extracción, y la acuosa se extrae con $CHCl_3$ (2×15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NaCl sat (15 mL), se secan con Na_2SO_4 y se concentran a sequedad. El residuo resultante se purifica por columna en gel de sílice (CH_2Cl_2 , luego 20% a 50% EtOAc/ CH_2Cl_2 , luego 2% MeOH/ CH_2Cl_2). Se obtiene **6** como un sólido blanco (216 mg, 23 %).

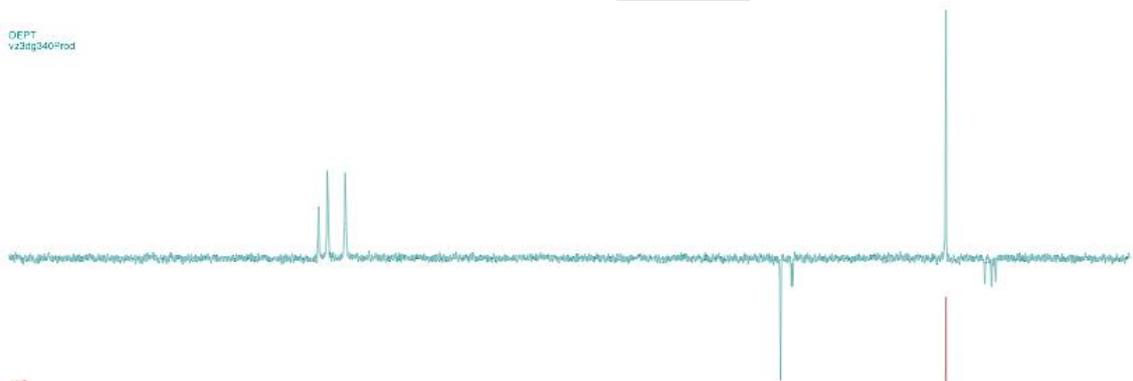
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.79-7.56 (m, 15H), 3.74 (dd, $J = 15.3, 12.6$ Hz, 2H), 3.26 (s, 4H), 2.90 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.32 (s, 18H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.5 (2CO), 135.0 (3CH), 133.5 (d, $J = 10.0$ Hz, 6CH), 130.4 (d, $J = 12.5$ Hz, 6CH), 118.05 (d, $J = 86.2$ Hz, 3C), 81.1 (2C), 56.2 (CH_2), 54.3 (d, $J = 16.2$ Hz, CH_2), 28.0 (6 CH_3), 21.3 (CH_2), 19.9 (d, $J = 52.7$ Hz, CH_2) ppm.

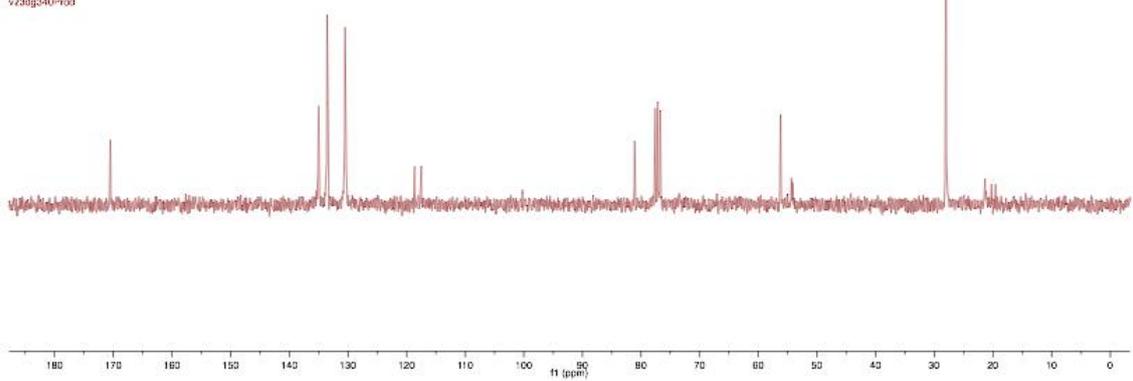
¹H
vz3dg340Prod



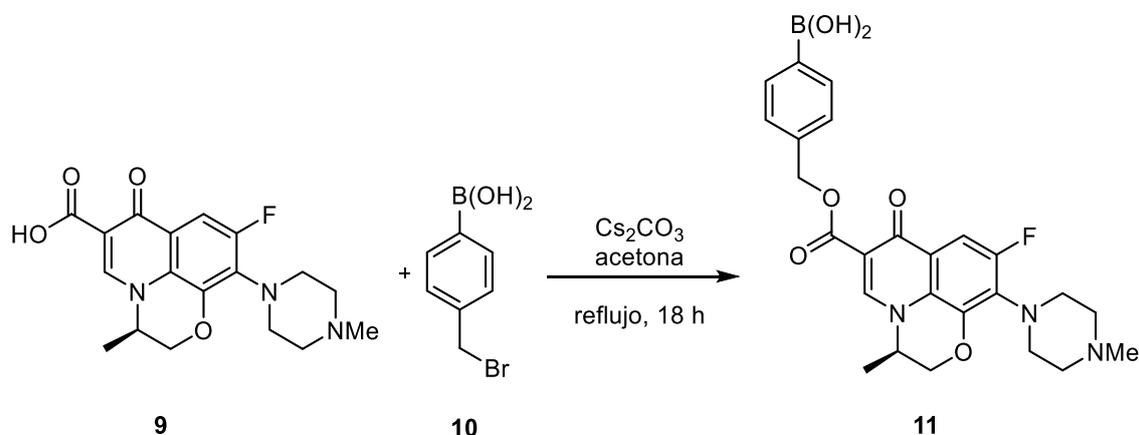
OEPT
vz3dg340Prod



¹³C
vz3dg340Prod



Síntesis del ácido (R)-4-(((9-fluoro-3-metil-10-(4-metilpiperazin-1-il)-7-oxo-2,3-dihidro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinolina-6-carbonil)oxi)metil)fenil)borónico (11).



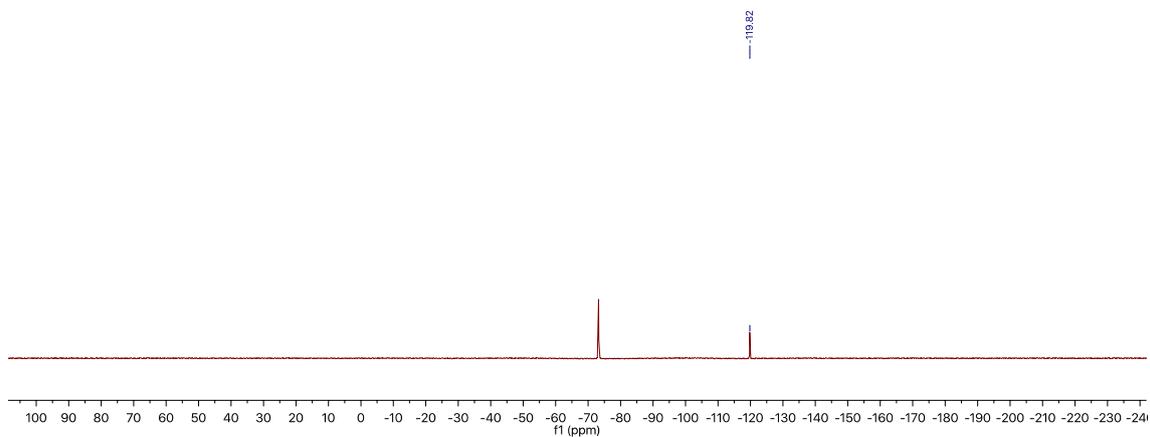
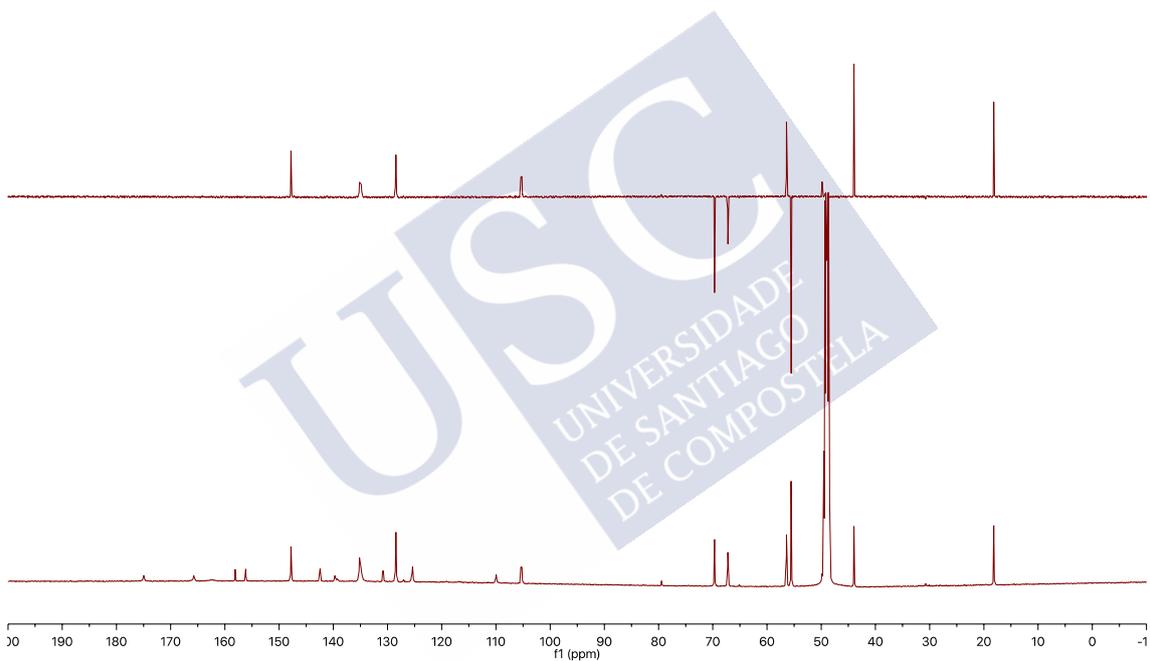
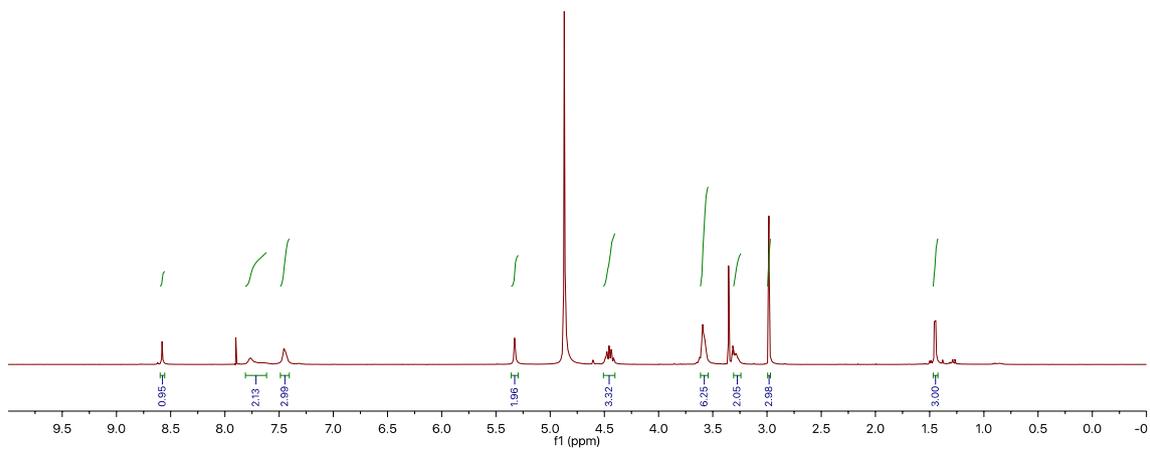
En un matraz Schlenk seco, bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelven **9** (75 mg, 0.21 mmol) y el carbonato de cesio (68 mg, 0.21 mmol) en acetona seca (3.78 mL). Agitamos durante 10 min a 50 °C y, posteriormente, se añade **10** (40 mg, 0.19 mmol) lentamente. La mezcla resultante se calienta a reflujo durante 18 h.

Se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica mediante HPLC en fase reversa (20 a 40 % B en 23 min; producto a 14.5 min) para obtener el producto deseado **11** (23 mg, 35 %) como un sólido verde.

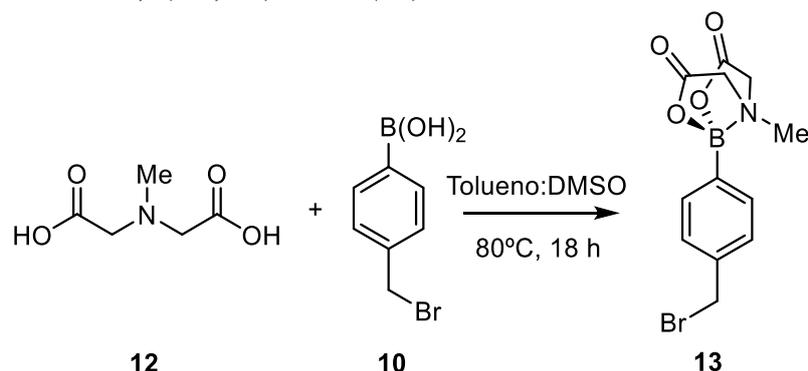
¹H-NMR (500 MHz, MeOD-d⁴) δ: 8.58 (s, 1H), 7.81-7.58 (m, 2H), 7.49-7.37 (m, 3H), 5.33 (s, 2H), 4.51-4.39 (m, 3H), 3.64-3.55 (m, 6H), 3.31-3.24 (m, 2H), 2.98 (s, 3H), 1.45 (d, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-d⁴) δ: 174.9 (CO), 165.7 (CO), 158.1 (C), 156.1 (C), 147.8 (2CH), 142.5 (C), 139.7 (C), 135.2 (CH), 134.8 (CH), 130.9 (CB), 128.4 (2CH), 125.4 (C), 109.9 (C), 105.3 (d, CF), 69.7 (CH₂), 67.2 (CH₂), 56.4 (CH), 55.5 (4CH₂), 43.9 (CH₃), 18.9 (CH₃) ppm.

¹⁹F-NMR (282 MHz, MeOD-d⁴) δ: -119.82 ppm.



Síntesis del 8-(4-(bromometilfenil)-4-metildihidro-4λ4,8λ4-[1,3,2]oxazaborolo[2,3-b][1,3,2]oxazaborole-2,6(3H,5H)-diona (13).



En un schlenk seco provisto de barra magnética, bajo atmósfera de nitrógeno, se añaden tamices moleculares (aproximadamente 30mg) y se prepara una disolución de **12** (50 mg, 0.34 mmol) y **10** (73 mg, 0.34 mmol) en tolueno seco (5.5 mL) y DMSO seco (0.6 mL). La mezcla se agita durante 18 h a 80 °C.

La mezcla se filtra sobre celita y el filtrado resultante se concentra a presión reducida, obteniéndose **13** como un sólido blanco. La obtención y pureza de este derivado se comprueba mediante HPLC.

HPLC-MS (ESI) (m/z, 5-95%B, $t_R = 7.7$ min). Calculado ($[M+H]^+$, $[C_{12}H_{13}BBrNO_4]^+$ =325.95; encontrado =326.17)

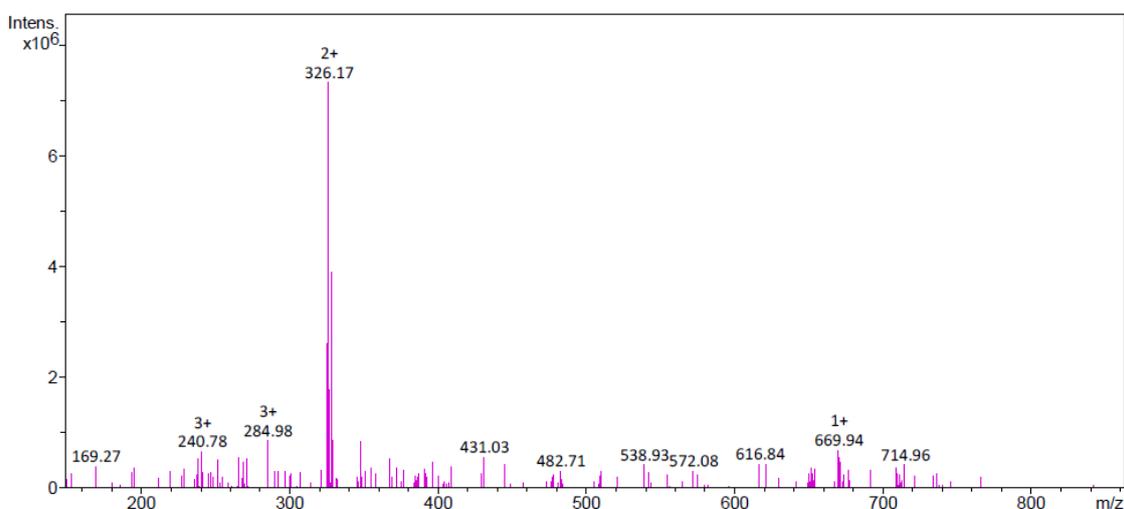
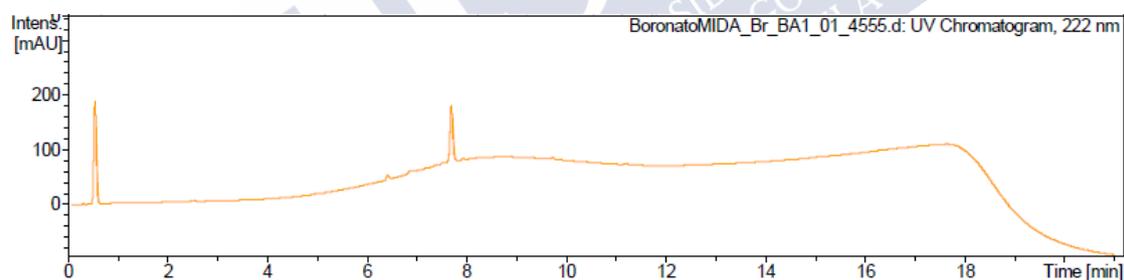
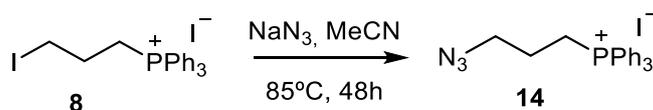


Figura 17 Arriba, espectro de HPLC del compuesto **13**; abajo, espectro MS del mismo compuesto.

Síntesis del (3-azidopropil)trifenilfosfonio (14).

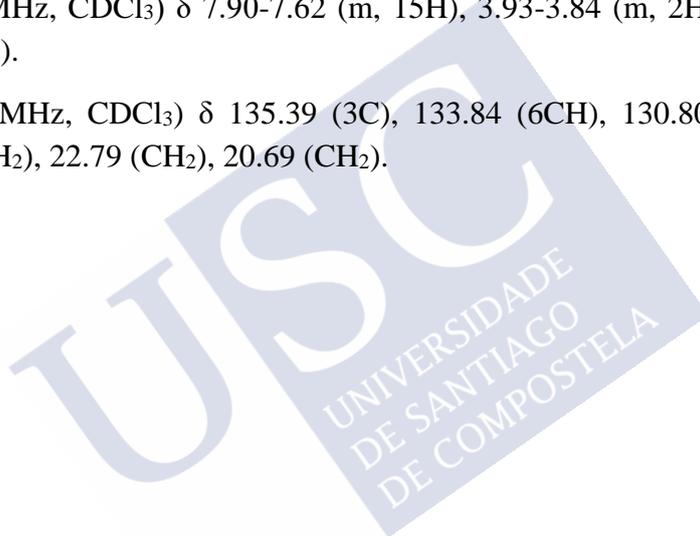


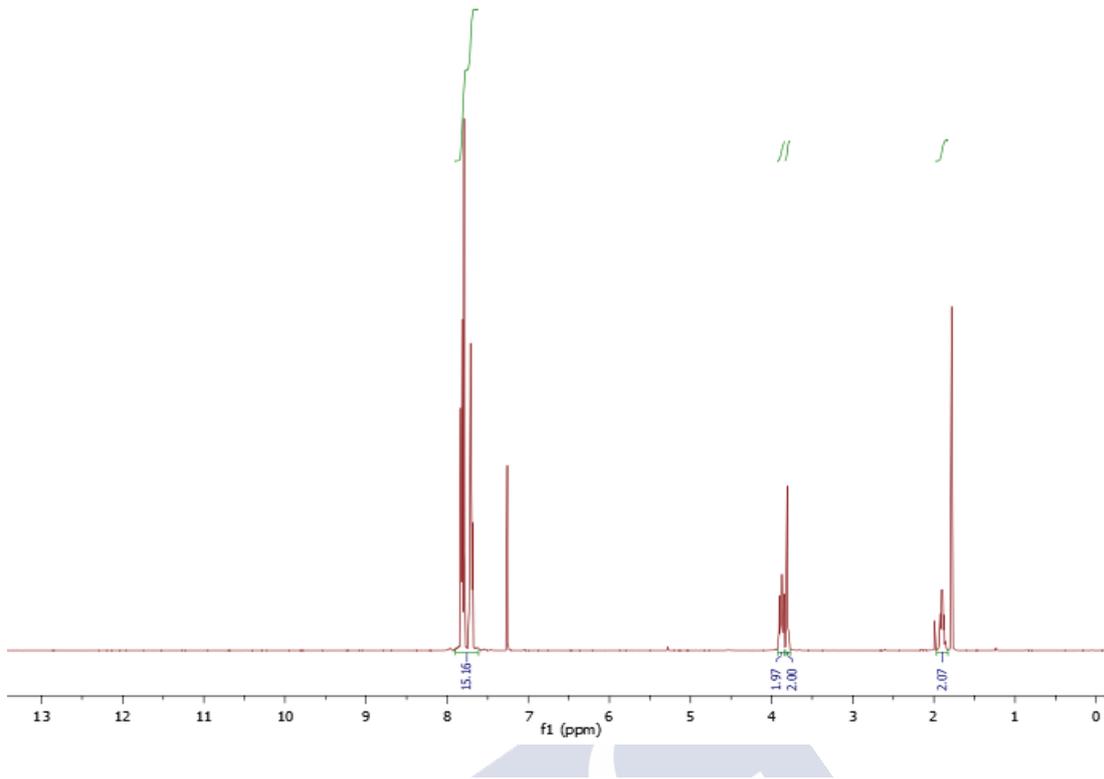
En un matraz de fondo redondo seco, que contiene azida sódica (232 mg, 3.6 mmol), se añade CH_3Cl (4 mL) y, posteriormente, **8** (500 mg, 0.9 mmol) lentamente. La mezcla resultante se calienta a reflujo a 85°C durante 48 h.

Se deja que la mezcla alcance t.a. y se añade agua destilada (5 mL). La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (2×10 mL) y el conjunto de fases orgánicas se secan con MgSO_4 . Se obtiene **14** como un sólido blanco (970 mg, 96 %). La obtención y pureza de este derivado se comprueba mediante HPLC.

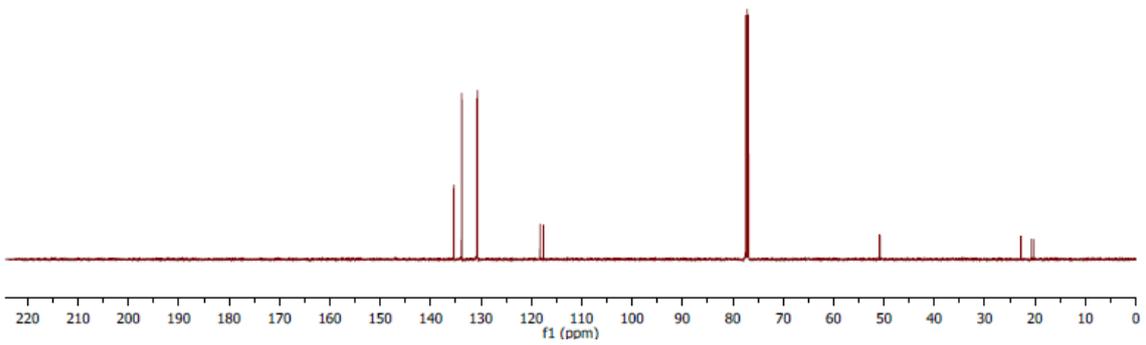
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.90-7.62 (m, 15H), 3.93-3.84 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 1.97-1.83 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 135.39 (3C), 133.84 (6CH), 130.80 (6CH), 117.58 (3CH), 50.92 (CH_2), 22.79 (CH_2), 20.69 (CH_2).

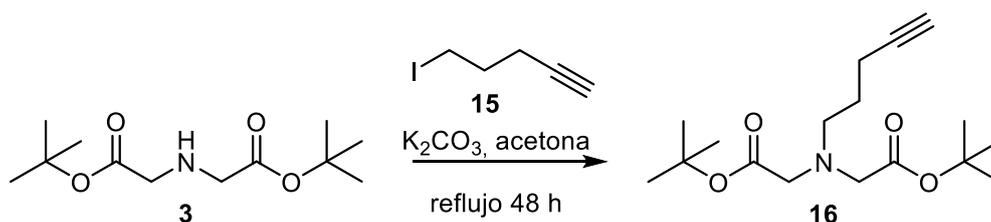




vz3ec37
vz3ec37



Di-tert-butil 2,2'-(pent-4-in-1-ilazanedil)diacetato (16).

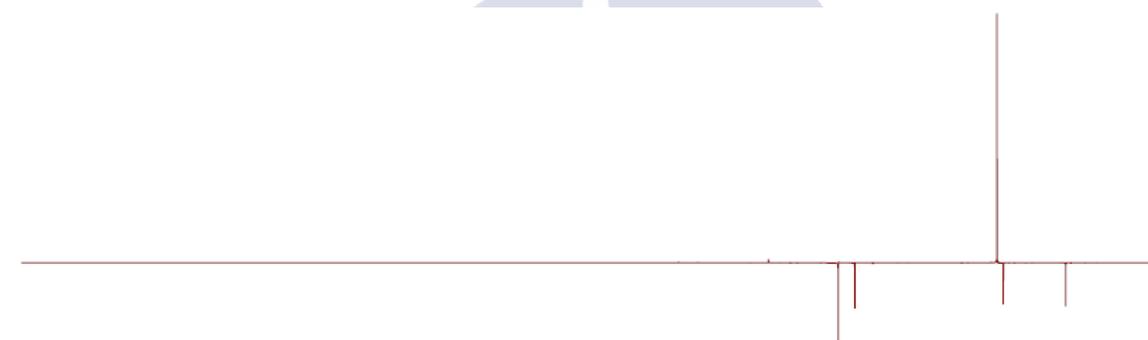
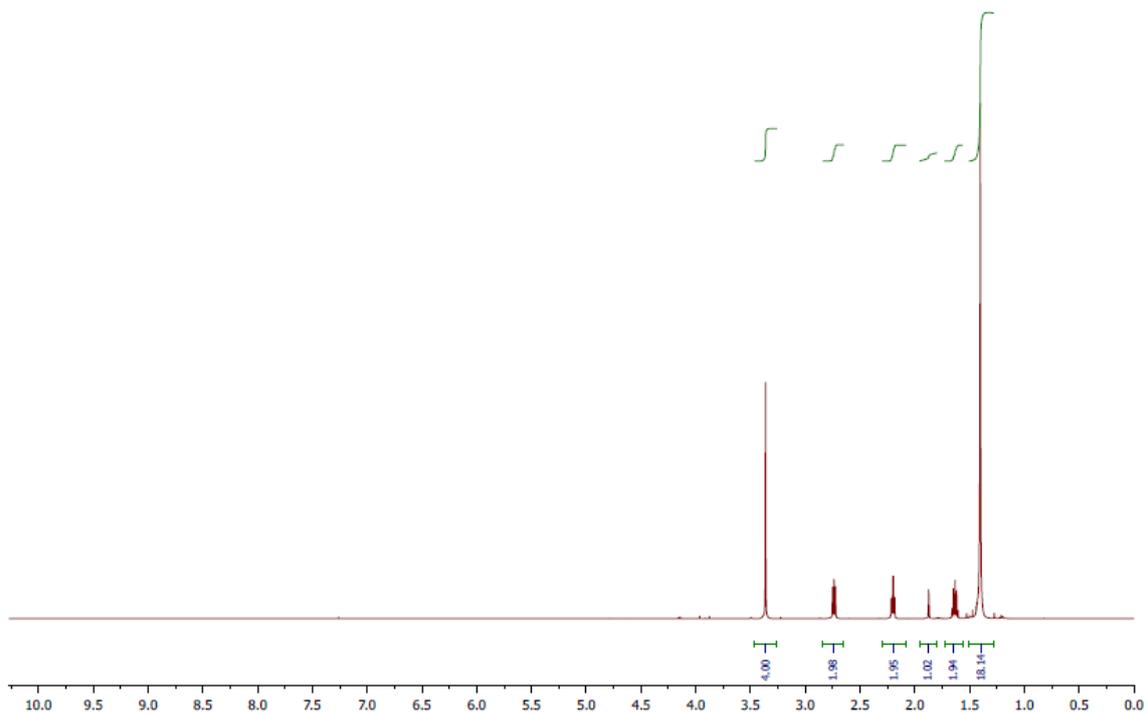


En un matraz de fondo redondo seco, bajo atmósfera de N_2 , se introduce secuencialmente **3** (500 mg, 2.04 mmol), **15** (593 mg, 3.1 mmol) y K_2CO_3 (563 mg, 4.1 mmol). A continuación, se añade acetona seca (20 mL) y la mezcla resultante se calienta a reflujo durante 48 h.

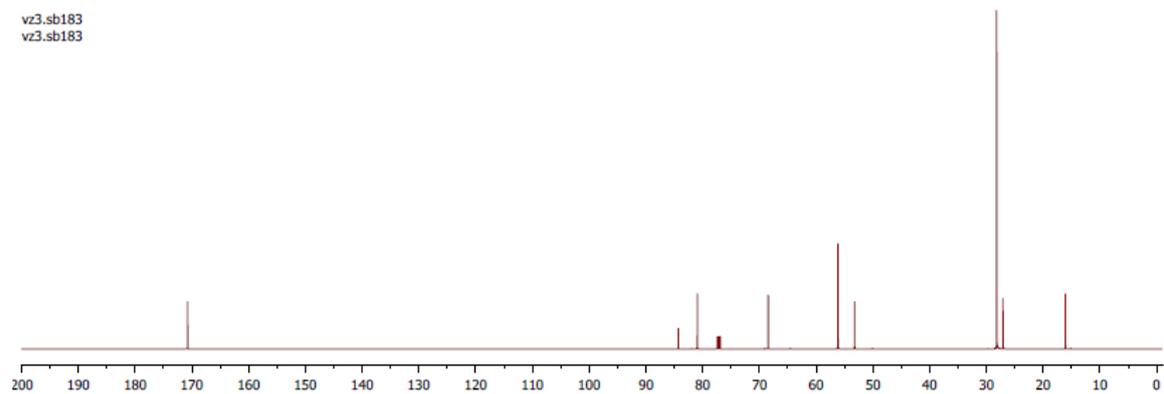
Se deja que la mezcla alcance t.a. y se concentra a sequedad. El residuo resultante se redissuelve en $CHCl_3$ (30 mL) y sobre la suspensión resultante se añade agua (30 mL). La mezcla se deja con agitación durante 1 h hasta observar la desaparición de sólido en suspensión. La mezcla se separa en un embudo de extracción, y la fase acuosa se extrae con $CHCl_3$ (2×30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución saturada de $NaCl$ (30 mL), se secan con Na_2SO_4 y se concentran a sequedad. El residuo resultante se purifica por columna (SiO_2 , DCM) para obtener **16** como un sólido blanco (345 mg, 54 %).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.36 (s, 4H), 2.81-2.67 (m, 2H), 2.20 (td, $J = 7.1, 2.7$ Hz, 2H), 1.87 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.70-1.58 (m, 2H), 1.47-1.35 (m, 18H).

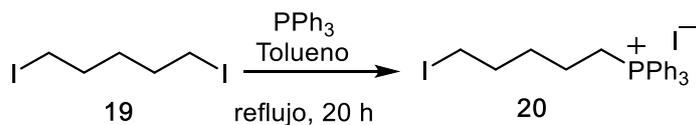
^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 170.74 (2CO), 84.28 (C), 80.94 (2C), 68.45 (CH), 56.15 (2 CH_2), 53.23 (CH_2), 28.19 (6 CH_3), 27.08 (CH_2), 16.08 (CH_2).



vz3.sb183
vz3.sb183



Síntesis del (5-iodopentil)trifenilfosonio (20).

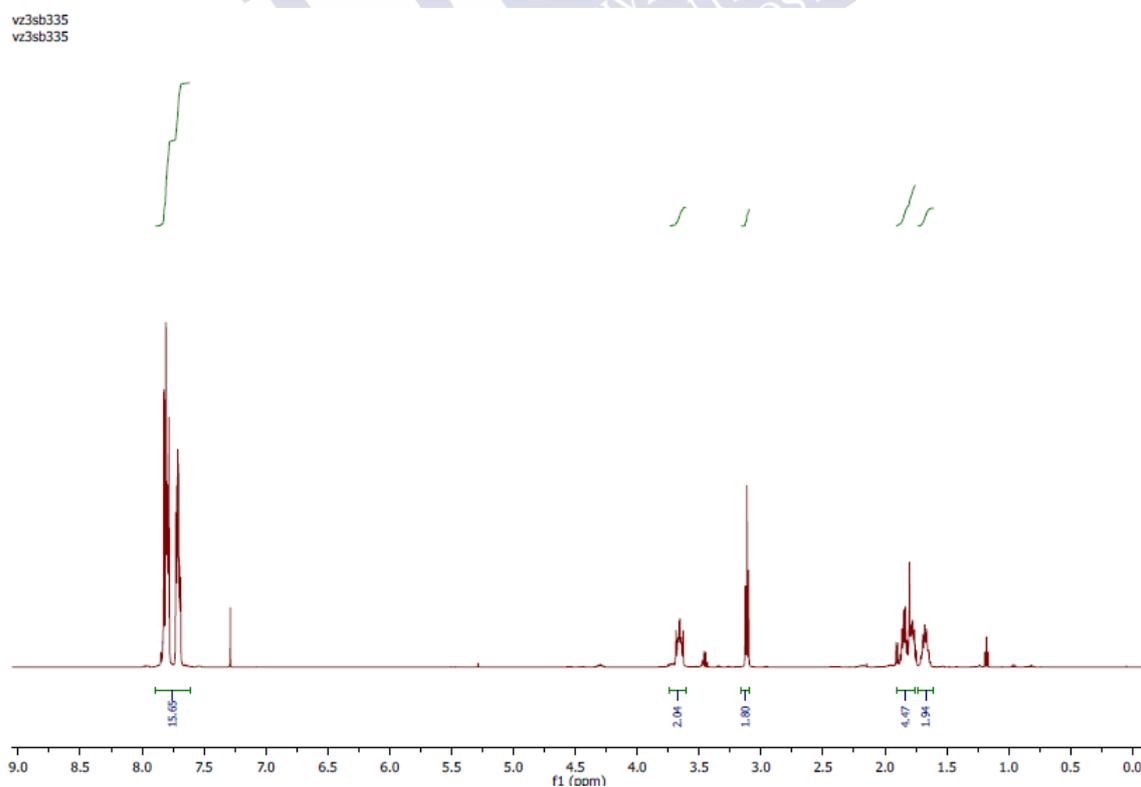


En un matraz seco, bajo N_2 , se prepara una disolución de **19** (500 mg, 0.031 mmol) y PPh_3 (202 mg, 0.015 mmol) en tolueno (1.5 mL). La mezcla resultante se desoxigena mediante burbujeo de N_2 durante 10 min y se calienta a reflujo durante 18h.

Se deja que la mezcla alcance t.a. y se concentra a sequedad, se disuelve en el mínimo volumen de CH_2Cl_2 (0.5 mL) y se añade éter (40 mL) observándose la formación de un sólido en suspensión que se aísla por centrifugación. El residuo resultante se purifica por columna (SiO_2 , primero CH_2Cl_2 , luego 5% MeOH/ CH_2Cl_2) para obtener **20** como un sólido amarillo (203 mg, 58 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.89-7.61 (m, 15H), 3.73-3.61 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.90-1.76 (m, 4H), 1.73-1.61 (m, 2H).

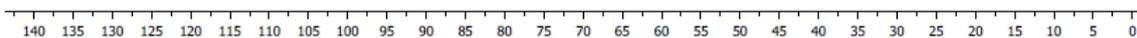
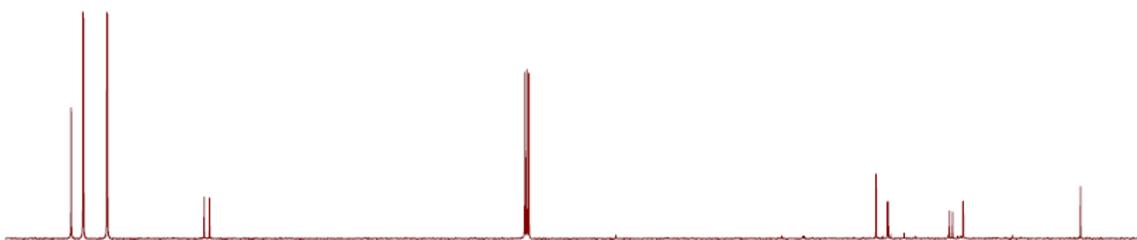
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 135.25 (3C), 133.72 (6CH), 130.60 (6CH), 117.87 (3CH), 32.66 (CH_2), 31.23 (CH_2) 23.10 (CH_2), 21.59 (CH_2), 6.62 (CH_2).



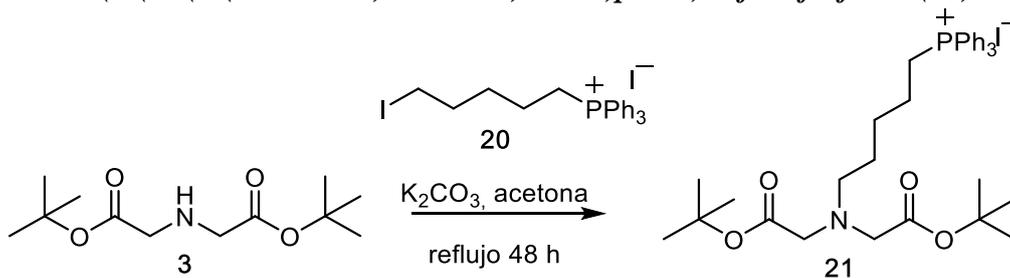
vz3sb335
vz3sb335 2 2



vz3sb335
vz3sb335 1 1



Síntesis del (5-(bis(2-(tert-butoxi)-2-oxoetil)amino)pentil) trifenilfosfonio (21).



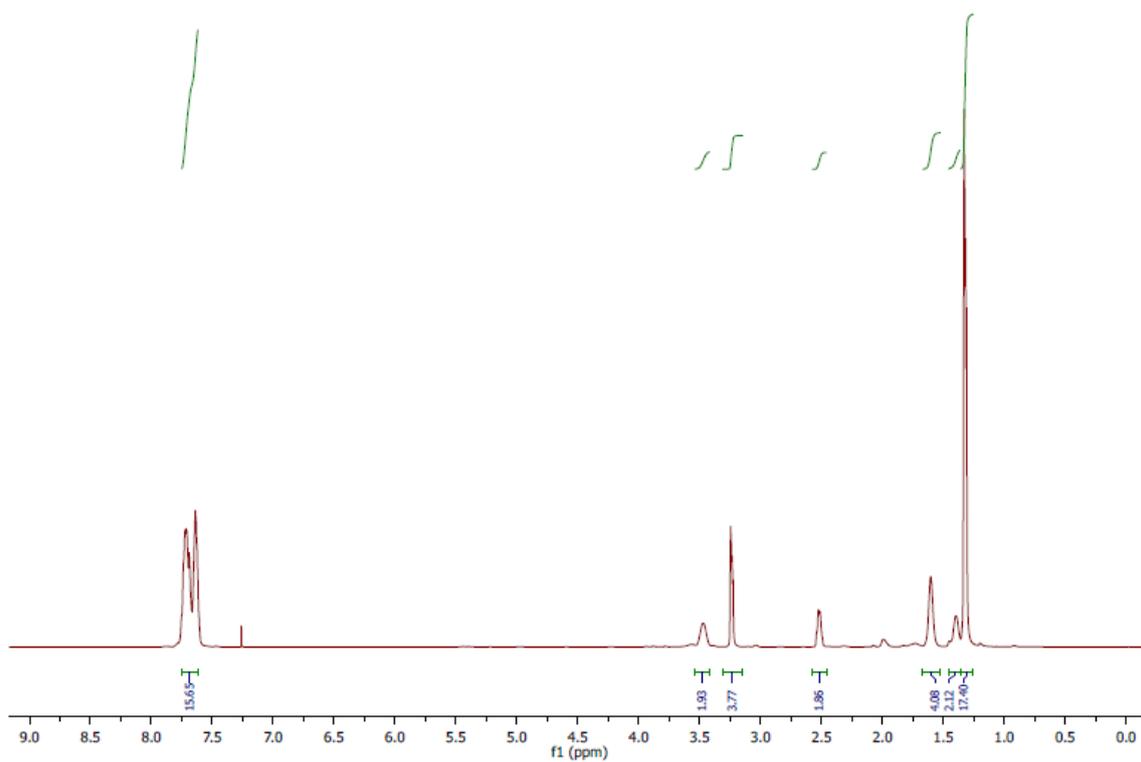
En un matraz Schlenk seco, bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelven **3** (152 mg, 0.62 mmol), **20** (400 mg, 0.68 mmol) y K_2CO_3 (171 mg, 1.24 mmol) en acetona seca (6.2 ml). La mezcla resultante se agita a reflujo durante 48 h.

Se deja que la mezcla alcance t.a. y se concentra a sequedad. El residuo resultante se redissuelve en $CHCl_3$ (15 mL) y sobre la suspensión resultante se añade agua (15 mL). La mezcla se deja con agitación durante 1 h hasta observar la desaparición de sólido en suspensión. Se separan las fases en un embudo de extracción, y la acuosa se extrae con $CHCl_3$ (2×15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NaCl sat (15 mL), se secan con Na_2SO_4 y se concentran a sequedad. El residuo resultante se purifica por columna en gel de sílice (CH_2Cl_2 , luego 5% 5% MeOH/ CH_2Cl_2) para obtener **21** como un sólido blanco (180 mg, 42%).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.75-7.62 (m, 15H), 3.54-3.42 (m, 2H), 3.24-(s, 4H), 2.51 (m, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.41 (m, 2H), 1.30 (s, 18H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.7 (2CO), 135.2 (3CH), 133.5 (6CH), 130.5 (6CH), 117.95 (3C), 80.8 (2C), 56.2 (CH₂), 53.28 (CH₂), 28.1 (6CH₃), 27.8 (CH₂) 27.2 (CH₂), 23.2 (CH₂), 22.7 (CH₂) ppm.

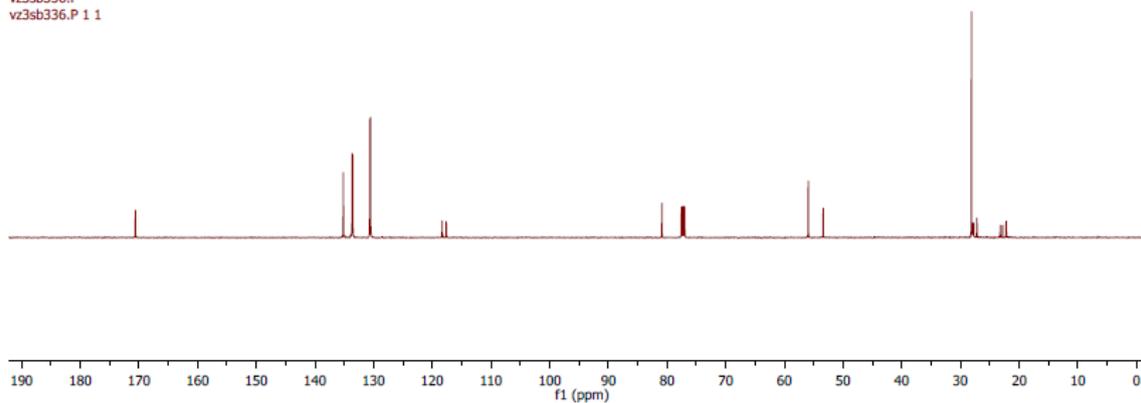
vz3sb336.P
vz3sb336.P



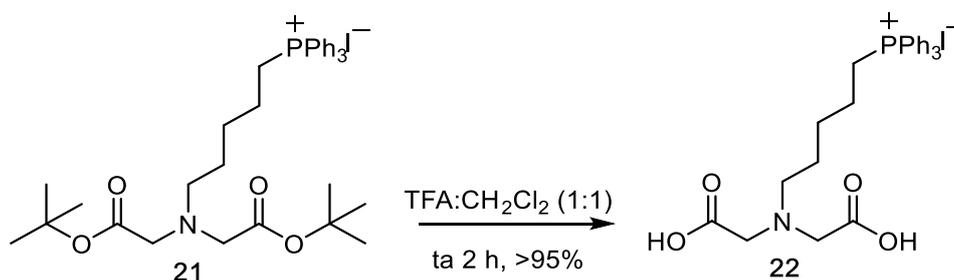
vz3sb336.P
vz3sb336.P 2 2



vz3sb336.P
vz3sb336.P 1 1



Síntesis del (5-(bis(carboximetil)amino)pentil)trifenilfosfonio (22).



En un matraz aforado se prepara una disolución de **21** (100 mg, 0.142 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL). Sobre esta disolución se añade TFA (2 mL) lentamente y la mezcla resultante se mantiene con agitación a t.a. durante 2 h.

La mezcla se concentra a sequedad y con la ayuda de DCM se pasa el residuo a un falcon. Se concentra hasta un volumen menor/o igual a 0.5 mL y se añade éter (40 mL) observándose la formación de un sólido en suspensión que se aísla por centrifugación (x3) para obtener **22** (75 mg, 93%) como un sólido blanco. La obtención y pureza de este derivado se comprueba mediante HPLC.

HPLC-MS (ESI) (m/z, 5-95%B, t_R = 6.3 min). Calculado ([M+H]⁺, [C₂₇H₃₁NO₄P]⁺ =464.52; encontrado =465.41)

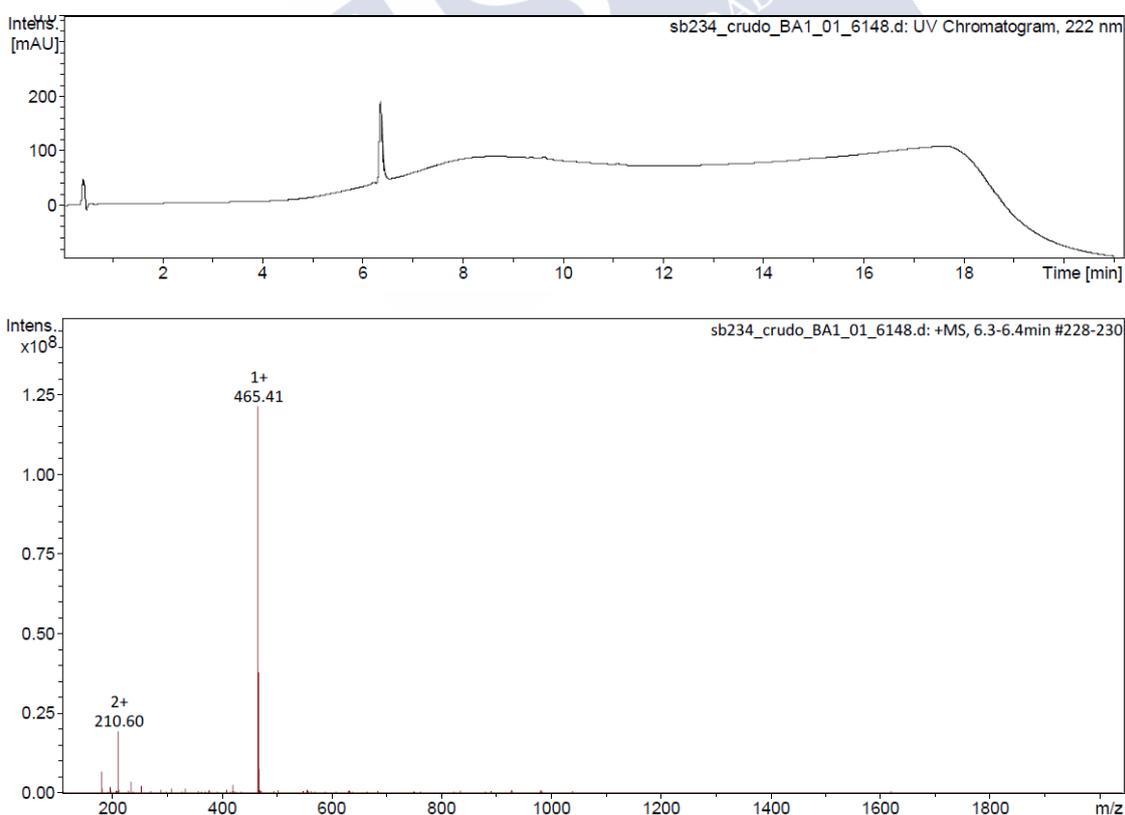
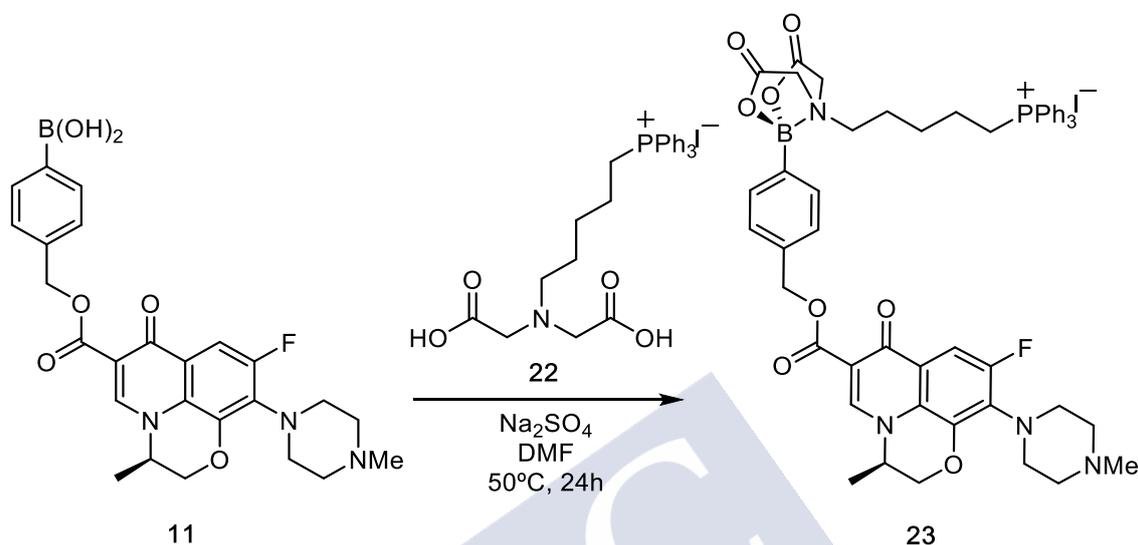


Figura 18. Arriba, espectro de HPLC del compuesto **22**; abajo, espectro MS del mismo compuesto.

Síntesis del (R) - (5- (8- (4 - (((9-fluoro-3-metil-10- (4-metilpiperazin-1-il) -7-oxo-2,3-dihidro-7H- [1 , 4] oxazino [2,3,4-ij] quinolina-6-carbonil) oxi) metil) fenil) -2,6-dioxotetrahidro-8H-4l4,8l4- [1,3,2] oxazaborolo [2,3 -b] [1,3,2] oxazaborol-4-il) pentil) trifenilfosfonio (23).



En un Schlenk seco provisto de barra magnética y tamices moleculares, en atmósfera de nitrógeno, se añade **11** (20 mg, 0.1 mmol), **22** (33 mg, 0.07 mmol) y se disuelven en DMF (3 mL). La mezcla se mantiene con agitación a 50 °C durante 18 h.

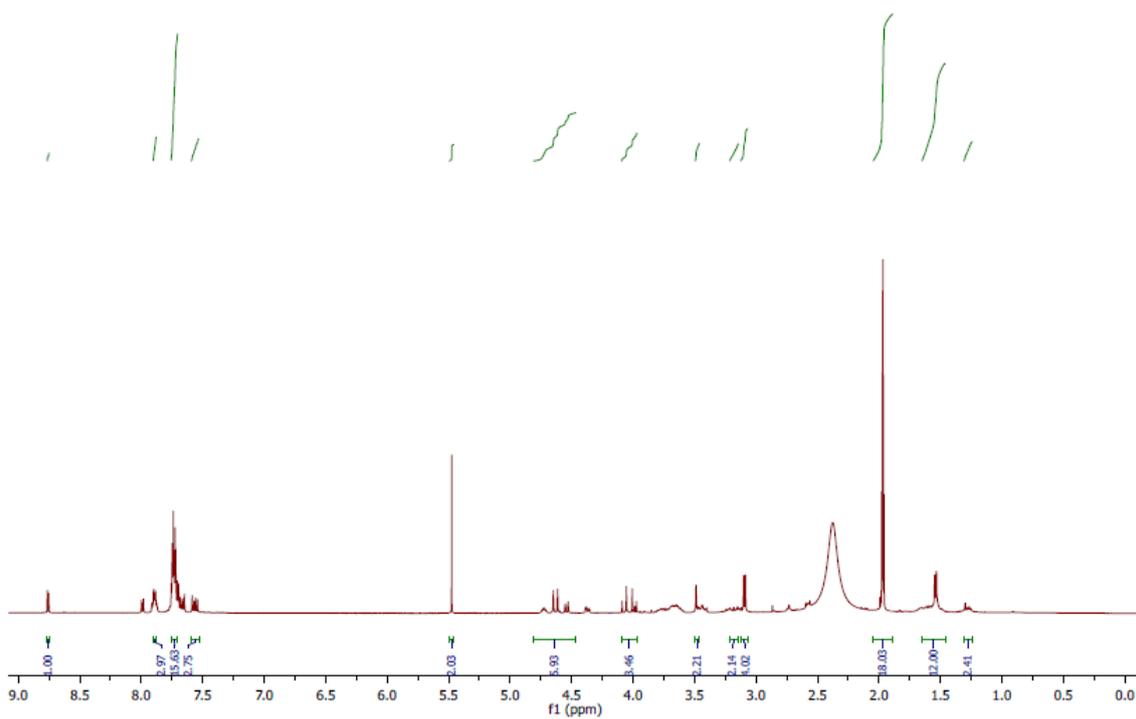
Se elimina el disolvente a presión reducida y el sólido resultante se purifica mediante HPLC en fase reversa (5 a 75% B en 23min, producto a 17 min). Se obtiene **23** (5 mg, 13%) como un sólido blanco.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.75 (s, 1H), 7.90-7.87 (m, 2H), 7.75-7.70 (m, 15H), 7.59-7.52 (m, 3H), 5.7 (s, 2H), 4.81-4.46 (m, 6H), 4.09-3.96 (m, 3H), 3.49-3.46 (m, 2H), 3.21-3.14 (m, 2H), 3.12-3.06 (m, 4H), 2.74-2.68 (m, 2H), 2.60 (m, 2H), 1.65-1.46 (m, 7H), 1.31-1.21 (m, 2H) ppm.

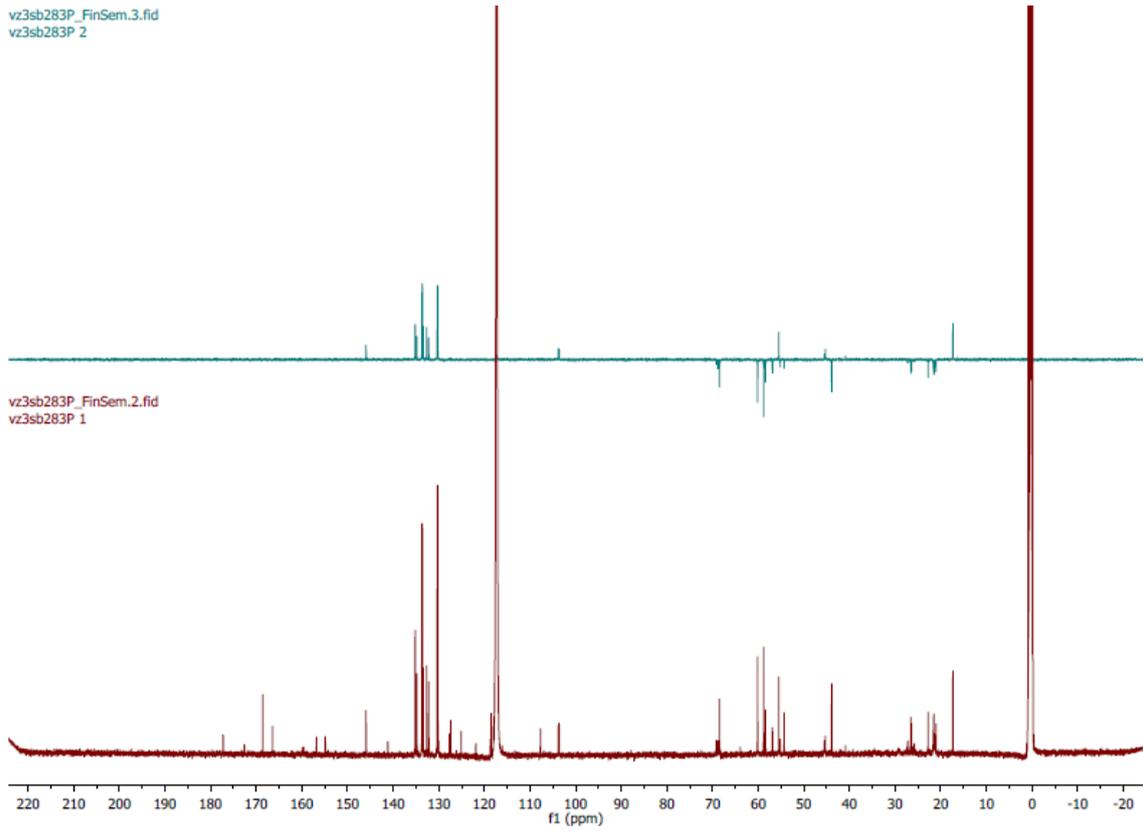
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 172.6 (CO), 168.5 (2CO), 166.4 (CO), 159.7 (C), 156.9 (C), 154.8 (C), 145.9 (2CH), 141.1 (C), 135.2 (4CH), 133.7 (7CH), 130.4 (CB), 130.2 (6CH), 127.6 (2CH), 125.1 (C), 117.3 (3C), 107.3 (C), 103.7 (d, CF), 87.8 (2C), 69.1 (CH₂), 68.6 (CH₂), 60.2 (CH₂), 58.7 (CH₂), 55.5 (4CH₂), 54.3 (CH), 43.9 (CH₃), 26.6 (CH₂), 26.4 (CH₂), 22.8 (CH₂), 21.1 (CH₂) ppm, 17.3 (CH₃) ppm.

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ: -122.46 ppm.

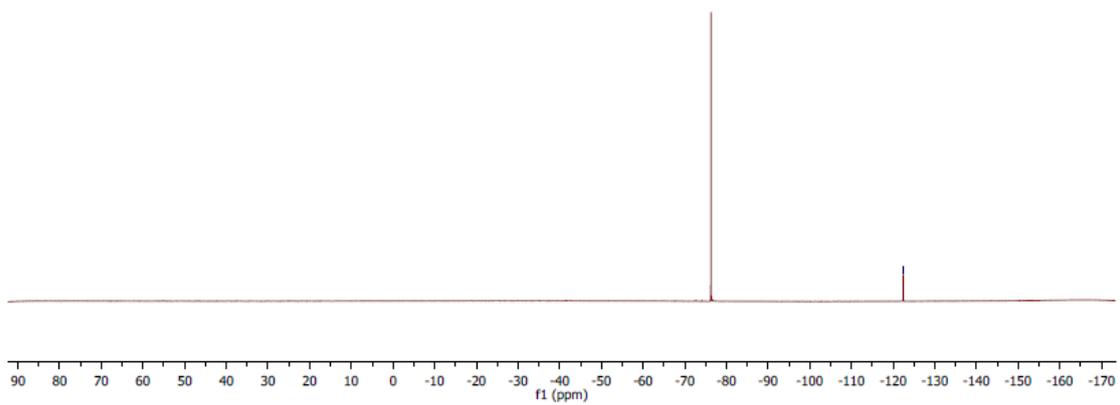
vz3sb283P_FinSem
vz3sb283P



vz3sb283P_FinSem.3.fid
vz3sb283P 2

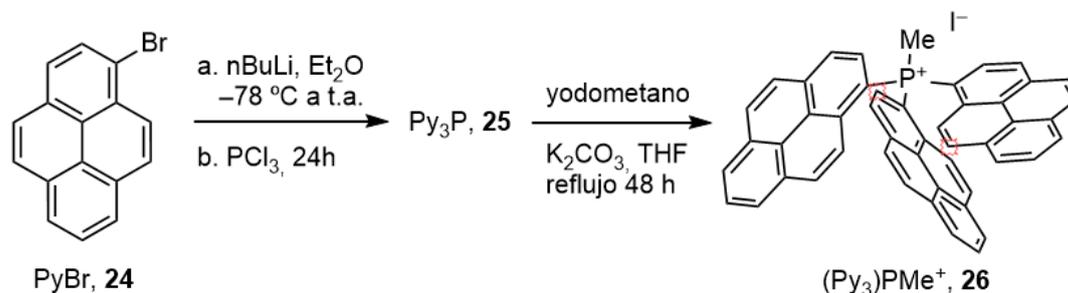


-122.46



Síntesis del derivado del pireno

Síntesis del metiltri(piren-1-il)fosfonio (26)



En un Schlenk seco provisto de barra magnética, bajo N₂, se suspende **24** (500 mg, 1.8 mmol) en éter seco (17 ml) a temperatura ambiente. A continuación, se enfría la mezcla a -78°C en un baño acetona/hielo seco y añado ⁿBuLi (1.9 mmol) lentamente, gota a gota. Se agita durante 1 h a 0 °C en un baño de H₂O/hielo y se añade PCl₃ (81 mg, 0.6 mmol) lentamente. Se agita a temperatura ambiente durante 18 h. Se concentra el disolvente a presión reducida y se lava dos veces con MeOH (2 × 10mL).

A continuación, en un Schlenk seco provisto de barra magnética, bajo N₂, se disuelve el crudo de reacción **25** (125 mg, 0.2 mmol) en THF seco (2 ml). A continuación, se añade PCl₃ (28 mg, 0.197mmol) lentamente, gota a gota, y se agita a temperatura ambiente durante 18h.

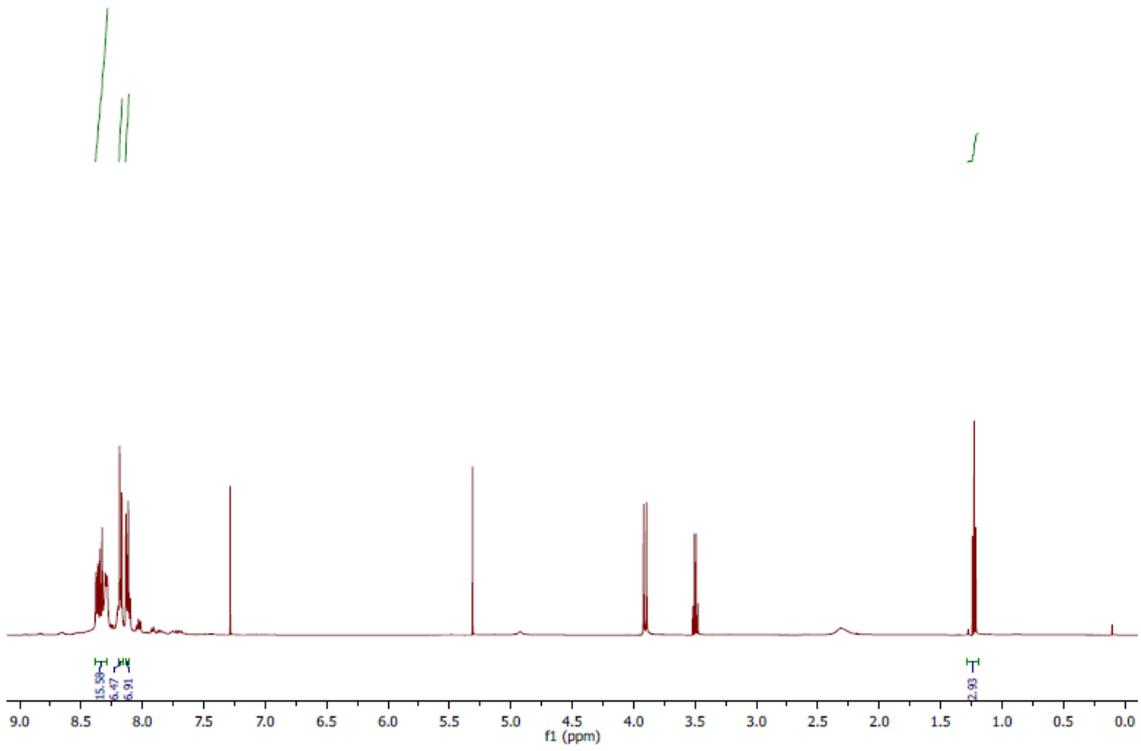
La mezcla se concentra a sequedad, se redisuelve en CH₂Cl₂ (0.5 mL) y se añade éter (40 mL) observándose la formación de un sólido en suspensión que se aísla por centrifugación (×3). El residuo resultante se purifica en columna (SiO₂ larga, primero CH₂Cl₂; luego 2%MeOH/CH₂Cl₂) para obtener **26** (48 mg, 32%) como un sólido amarillo. La obtención y pureza de este derivado se comprueba mediante HPLC.

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-d₄) δ: 8.38 - 8.28(m, 15H), 6.19 - 6.16 (m, 6H), 6.13 - 6.11 (m, 6H), 1.23 (t, 3H).

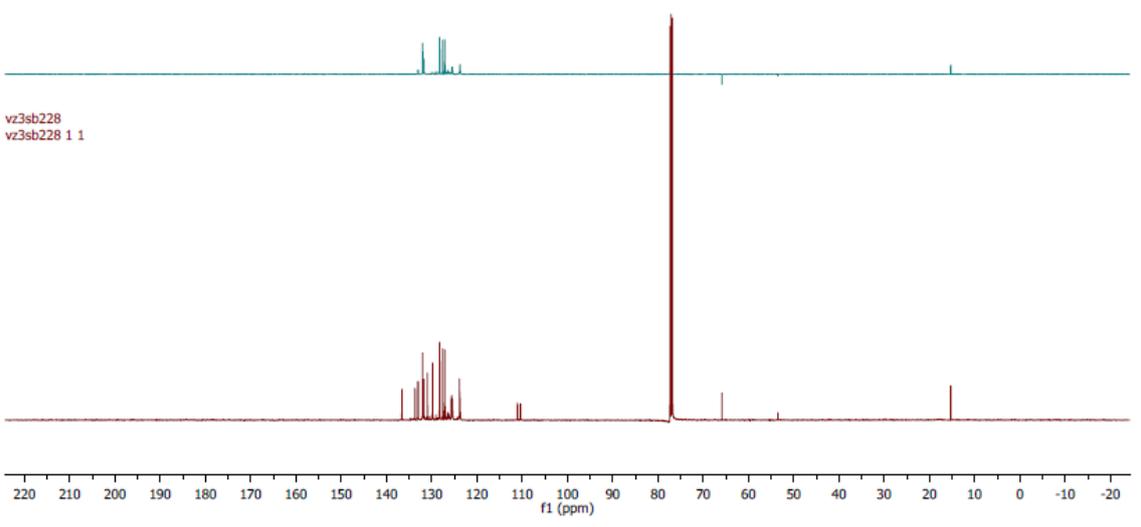
¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-d₄) δ: 133.7 (6C), 131.9 (6CH), 130.9 (6C), 129.7 (6C), 128.2 (6CH), 127.5 (9CH), 125.6 (3C), 125.4 (6CH), 15.2 (CH₃) ppm.

HPLC-MS (APCI). Calculado ([M+H]⁺, [C₄₉H₃₀P]⁺ = 649.75; encontrado = 649.20)

vz3sb228
vz3sb228



vz3sb228
vz3sb228 2 2



vz3sb228
vz3sb228 1 1

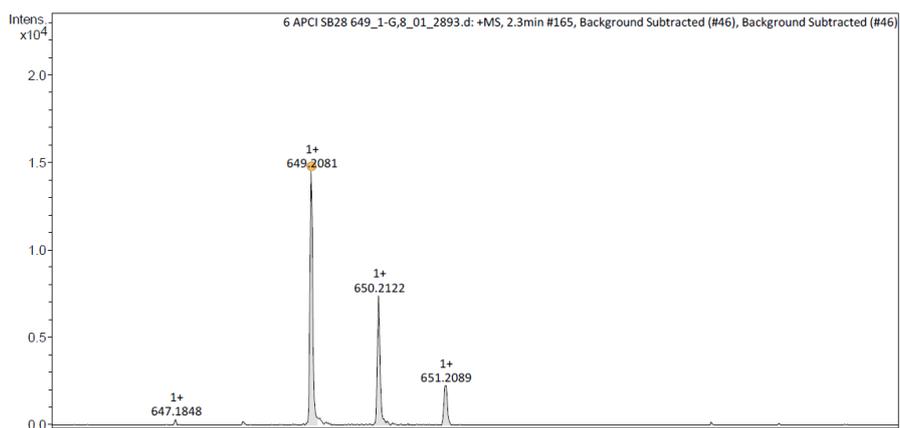


Figura 19 Espectro de MS-APCI del compuesto **25**.



Caracterización de los ligandos peptídicos.

Los ligandos peptídicos se caracterizaron por espectroscopía de masas (MALDI-TOF). En todos los casos los péptidos se encuentran como sales de TFA (por tanto, las masas incluyen en su estructura un TFA por cada residuo de Arg). Las masas finales para cada uno de ellos son:

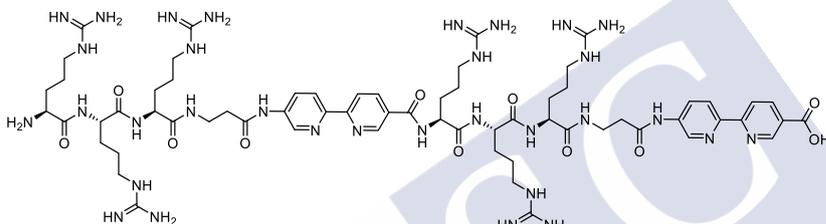
27. 2174 g/mol

28. 3254 g/mol

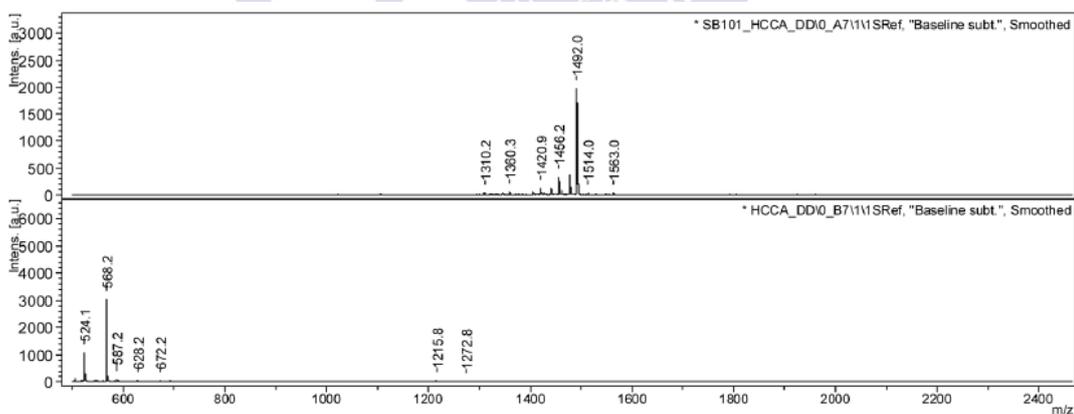
29. 2156 g/mol

30. 3236 g/mol

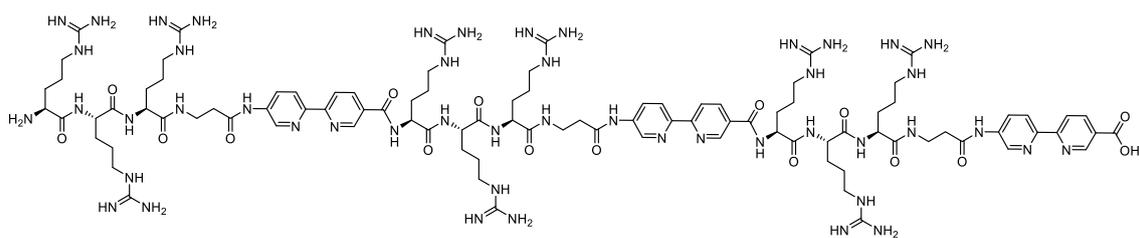
a) (R₃-Bpy)₂ (27)



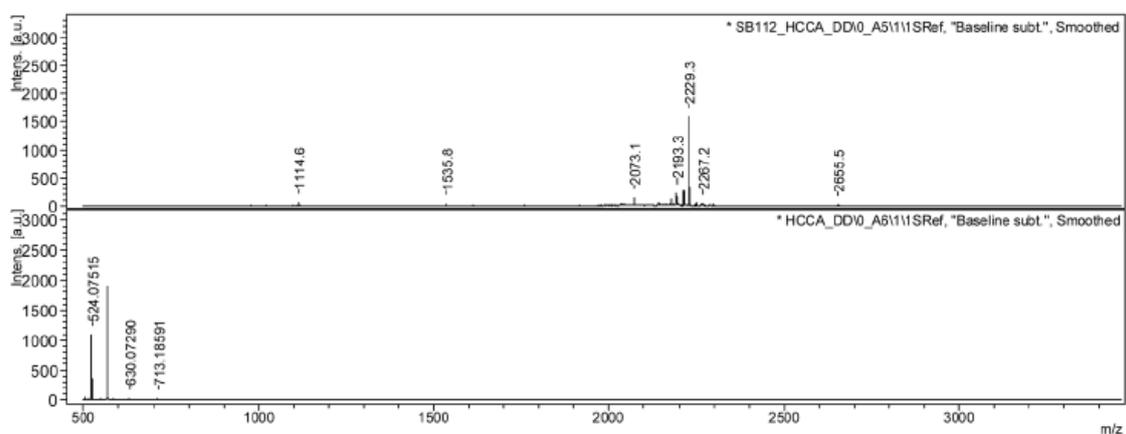
MALDI-TOF: m/z calc. para C₆₄H₉₈N₃₂O₁₁: 1490.8, encontrado [M+H]⁺: 1492.0



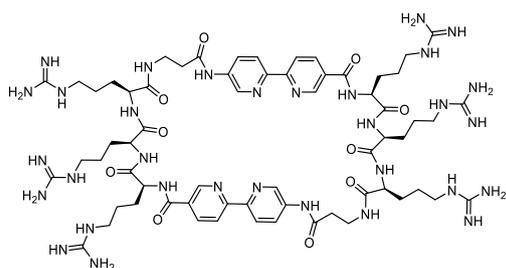
b) (R₃-Bpy)₂ (28)



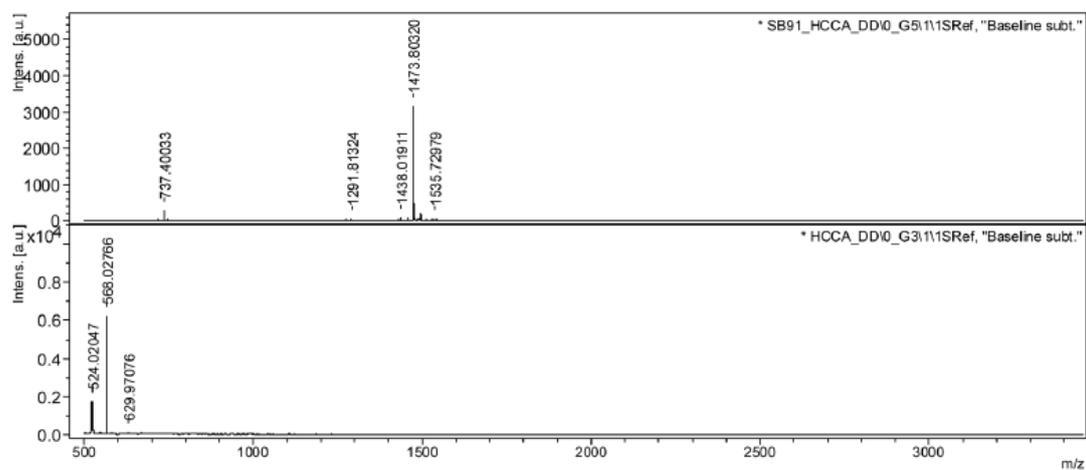
MALDI-TOF: m/z calc. para $C_{96}H_{147}N_{48}O_{16}$: 2228.2, encontrado $[M+H]^+$: 2229.3



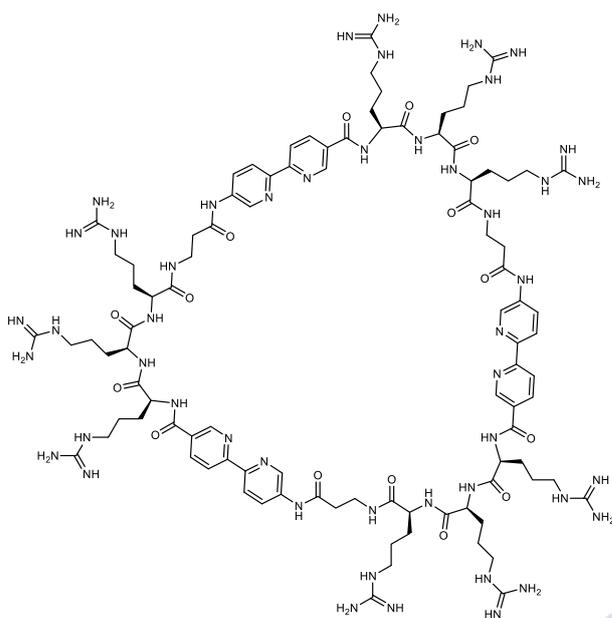
c) Ciclo-(R₃-Bpy)₂ (29)



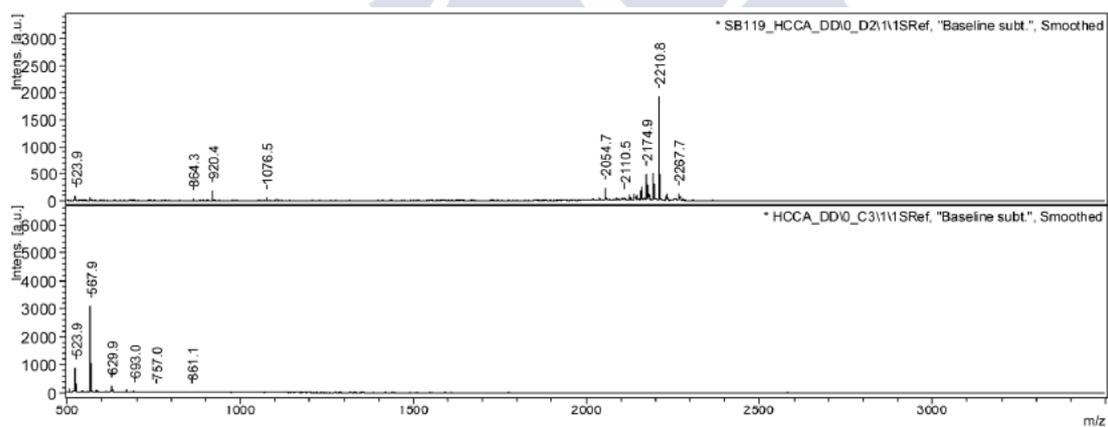
MALDI-TOF: m/z calc. para C₆₄H₉₆N₃₂O₁₀: 1472.80, encontrado [M+H]⁺: 1473.8



d) Ciclo-(R₃-Bpy)₃ (30)



MALDI-TOF: m/z calc. para C₉₆H₁₄₅N₄₈O₁₅: 2210.2, encontrado: 2210.8

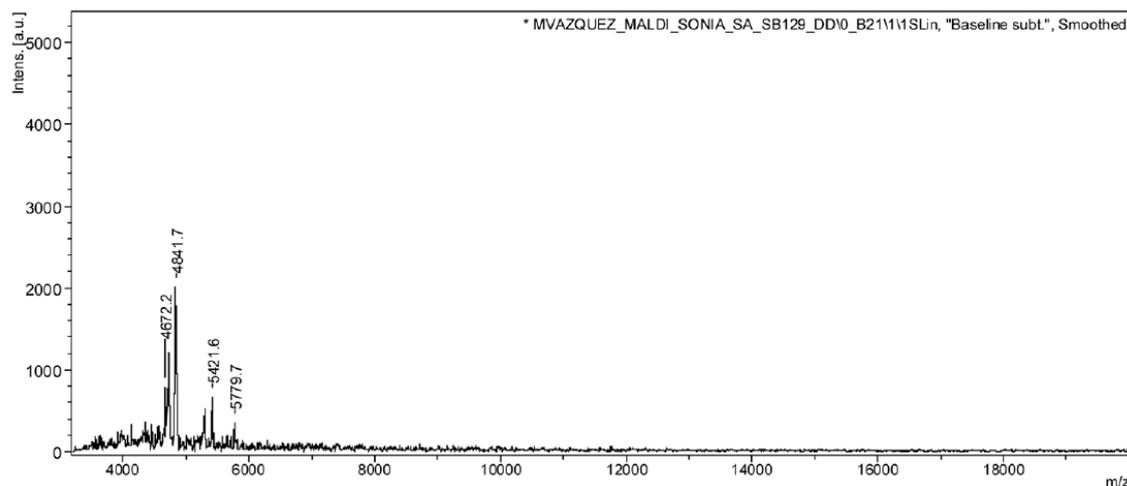
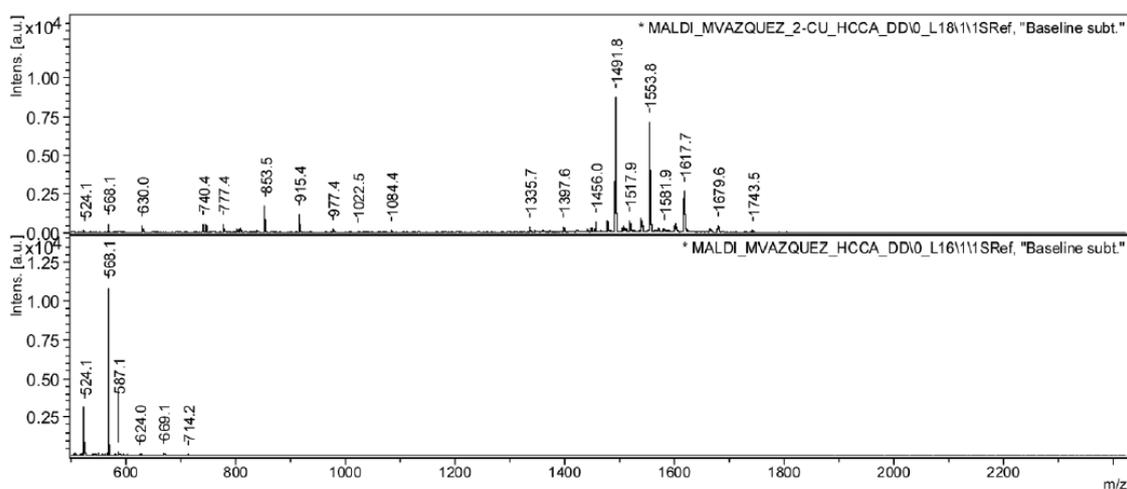


Caracterización de los ligandos metalopéptidos de Cu(II).

Espectrometría de masas- MALDI-TOF

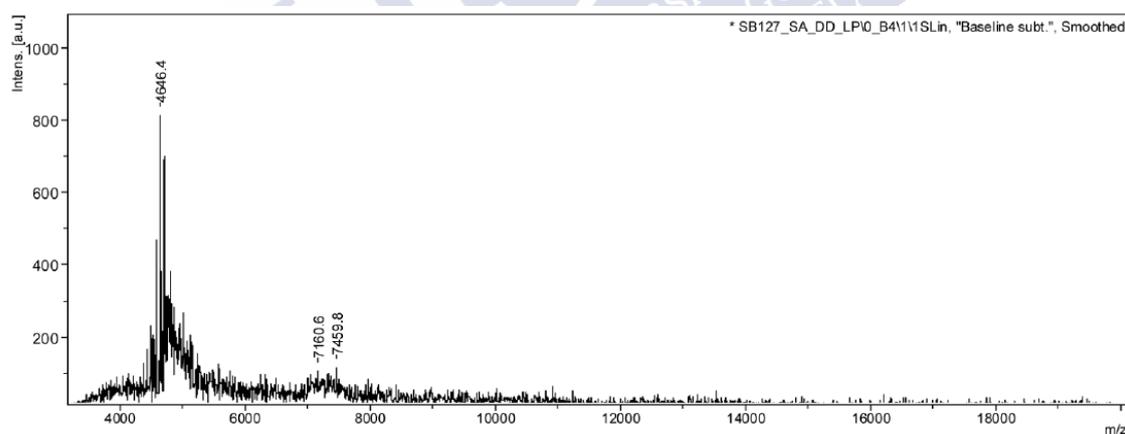
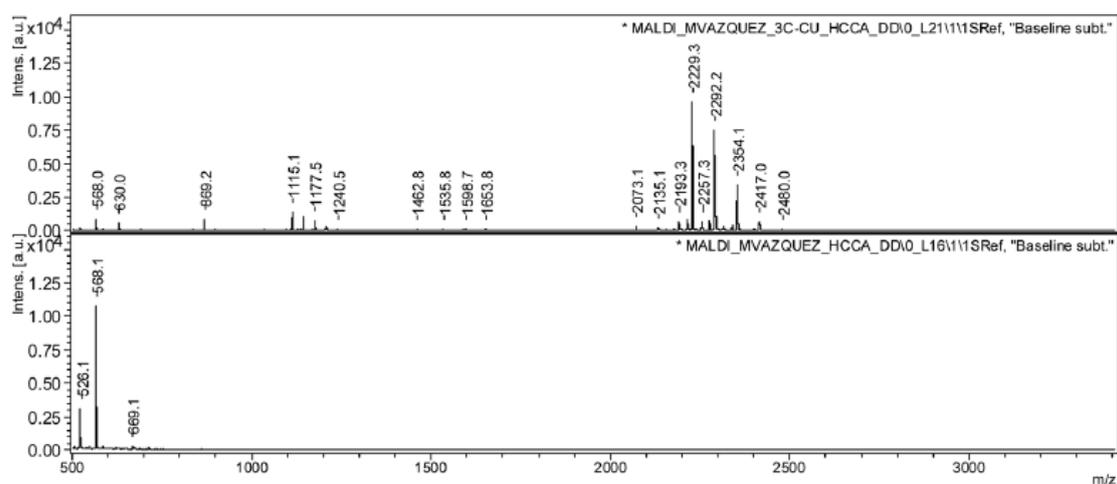
a) 27/Cu(II)

MALDI-TOF: m/z calc. para $[M+H]^+$ $C_{64}H_{99}N_{32}O_{11}$: 1491.8, encontrado: 1491.8; calc. para $[M+Cu]^{2+}$ $C_{64}H_{98}N_{32}O_{11}Cu$: 1554.3, encontrado: 1553.8; calc. para $[M+2Cu]^{4+}$ $C_{64}H_{98}N_{32}O_{11}Cu_2$: 1617.8, encontrado: 1617.7; calc. para $[M+3Cu]^{6+}$ $C_{64}H_{98}N_{32}O_{11}Cu_3$: 1681.3, encontrado: 1679.6; calc. para $[M+4Cu]^{8+}$ $C_{64}H_{98}N_{32}O_{11}Cu_4$: 1745.8, encontrado: 1743.5; calc. para $[3M+5Cu+H_2O]^{10+}$ $C_{192}H_{296}N_{96}O_{34}Cu_5$: 4807.9, encontrado: 4809.3; calc. para $[3M+5Cu+2H_2O]^{10+}$ $C_{192}H_{298}N_{96}O_{35}Cu_5$: 4825.9, encontrado: 4825.9; calc. para $[3M+5Cu+O+2H_2O]^{8+}$ $C_{192}H_{298}N_{96}O_{36}Cu_5$: 4841.9, encontrado: 4841.6; calc. para $[3M+5Cu+2O+2H_2O]^{6+}$ $C_{192}H_{298}N_{96}O_{37}Cu_5$: 4857.9, encontrado: 4857.5.



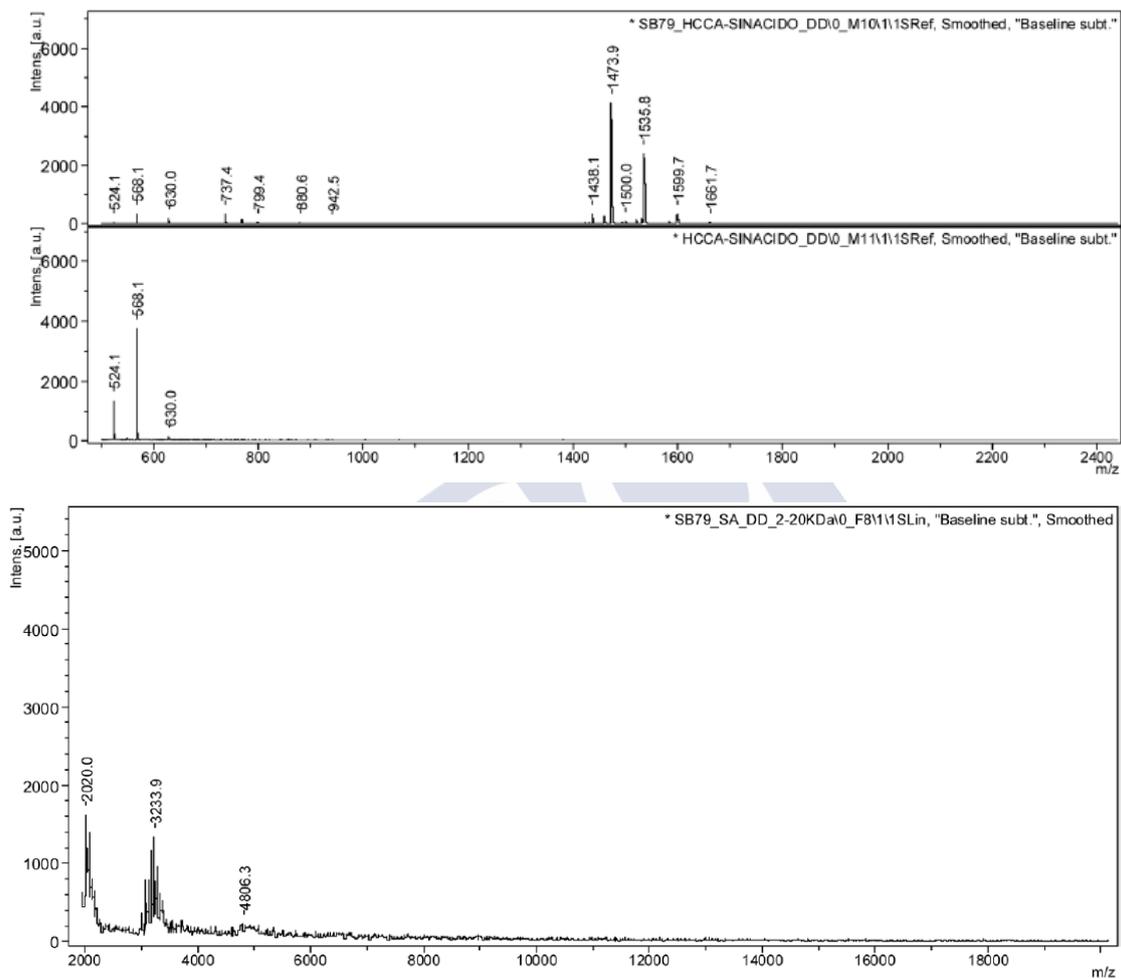
b) 28/Cu(II)

MALDI-TOF: m/z calc. para $[M+H]^+$ $C_96H_{147}N_{48}O_{16}$: 2228.2, encontrado: 2229.3; calc. para $[M+Cu]^{2+}$ $C_96H_{146}N_{48}O_{16}Cu$: 2290.7, encontrado: 2292.2; calc. para $[M+2Cu]^{4+}$ $C_96H_{146}N_{48}O_{16}Cu_2$: 2354.2, encontrado: 2354.1; calc. para $[M+3Cu]^{6+}$ $C_96H_{146}N_{48}O_{16}Cu_3$: 2417.7, encontrado: 2417.0; calc. para $[M+4Cu]^{8+}$ $C_96H_{146}N_{48}O_{16}Cu_4$: 2481.2, encontrado: 2480.0; calc. para $[2M+2Cu]^{4+}$ $C_{192}H_{292}N_{96}O_{32}Cu_2$: 4581.4, encontrado: 4584.0; calc. para $[2M+3Cu]^{6+}$ $C_{192}H_{292}N_{96}O_{32}Cu_3$: 4644.9, encontrado: 4646.4; calc. para $[2M+4Cu]^{8+}$ $C_{192}H_{292}N_{96}O_{32}Cu_4$: 4708.4, encontrado: 4709.1; calc. para $[2M+5Cu+2O]^{6+}$ $C_{192}H_{292}N_{96}O_{34}Cu_5$: 4803.9, encontrado: 4805.4.



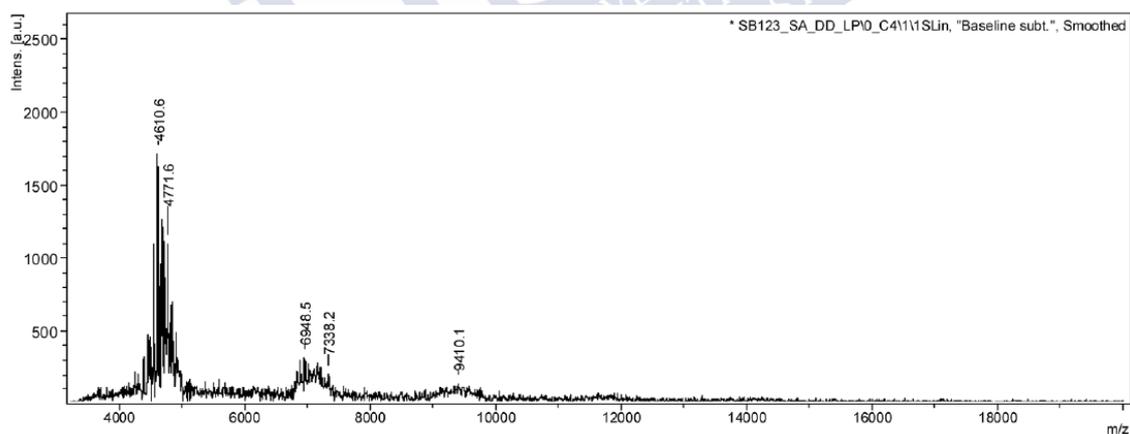
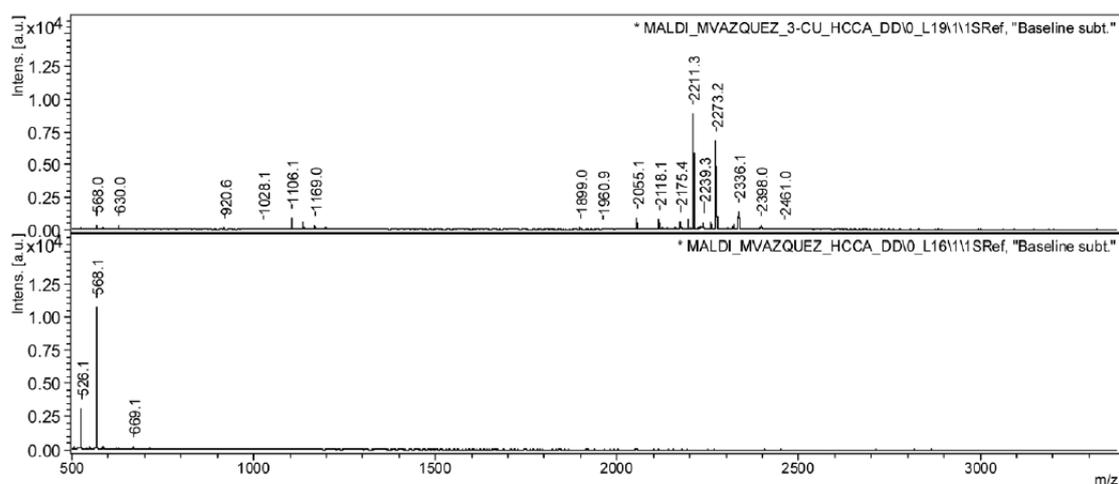
c) 29/Cu(II)

MALDI-TOF: m/z calc para $[M+H]^+$ $C_{64}H_{97}N_{32}O_{10}$: 1473,8, encontrado: 1473.9, calc. para $[M+Cu]^{2+}$ $C_{64}H_{96}N_{32}O_{10}Cu$: 1537.3, encontrado: 1535.8; $[M+2Cu]^{4+}$ calc. para $C_{64}H_{96}N_{32}O_{10}Cu_2$: 1600.8, encontrado: 1599.7; calc. para $[M+3Cu]^{6+}$ $C_{64}H_{96}N_{32}O_{10}Cu_3$: 1664.3, encontrado: 1661.7; calc. para $[M+4Cu]^{8+}$ $C_{64}H_{96}N_{32}O_{10}Cu_4$: 1727.8, encontrado: 1725.5; calc. para $C_{128}H_{192}N_{64}O_{22}Cu_4 [2M+4Cu+2O]^{4+}$: 3231.6, encontrado: 3233.9.



d) 30/Cu(II)

MALDI-TOF: m/z calc. para $[M+H]^+$ $C_96H_{145}N_{48}O_{15}$: 2210.2, encontrado: 2211.3; calc. para $[M+Cu]^{2+}$ $C_96H_{144}N_{48}O_{15}Cu$: 2272.7, encontrado: 2273.2; calc. para $[M+2Cu]^{4+}$ $C_96H_{144}N_{48}O_{15}Cu_2$: 2336.2, encontrado: 2336.1; calc. para $[M+3Cu]^{6+}$ $C_96H_{144}N_{48}O_{15}Cu_3$: 2399.7, encontrado: 2398.0; calc. for $[M+4Cu]^{8+}$ $C_96H_{144}N_{48}O_{15}Cu_4$: 2463.2, encontrado: 2461.0; calc. para $[2M+2Cu]^{4+}$ $C_{192}H_{288}N_{96}O_{30}Cu_2$: 4545.4, encontrado: 4547.4; calc. para $[2M+3Cu]^{6+}$ $C_{192}H_{288}N_{96}O_{30}Cu_3$: 4608.9, encontrado: 4610.6; calc. para $[2M+3Cu+2O]^{2+}$ $C_{192}H_{288}N_{96}O_{32}Cu_3$: 4640.9, encontrado: 4645.1; calc. para $[2M+4Cu]^{8+}$ $C_{192}H_{288}N_{96}O_{30}Cu_4$: 4672.4, encontrado: 4673.9; calc. para $[2M+4Cu+2O]^{4+}$ $C_{192}H_{288}N_{96}O_{32}Cu_4$: 4704.4, encontrado: 4707.7.



Valoraciones de fluorescencia y constantes de estabilidad

Las valoraciones de fluorescencia se realizaron añadiendo a las disoluciones de los diferentes péptidos (**27**, **28**, **29**, **30**) de una concentración conocida (2 μM) en buffer fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6.5), alícuotas de una disolución stock CuCl_2 (como fuente de iones Cu(II)) en agua. Tras cada adición se midió el correspondiente espectro de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$). Los perfiles de valoración resultantes se ajustaron a través del programa Dynafit para diferentes modelos de unión con el fin de encontrar la estequiometría y la afinidad de los péptidos por los iones metálicos.

El programa *DynaFit* ajusta los datos experimentales numéricamente, utilizando un algoritmo multidimensional de Newton-Raphson para resolver las ecuaciones no lineales que describen el equilibrio. *DynaFit* utiliza archivos de texto sin formato llamados *scripts* que contienen información sobre el modelo químico subyacente a los datos experimentales, valores experimentales, las concentraciones iniciales de los reactivos y también la información sobre la ubicación de los archivos.

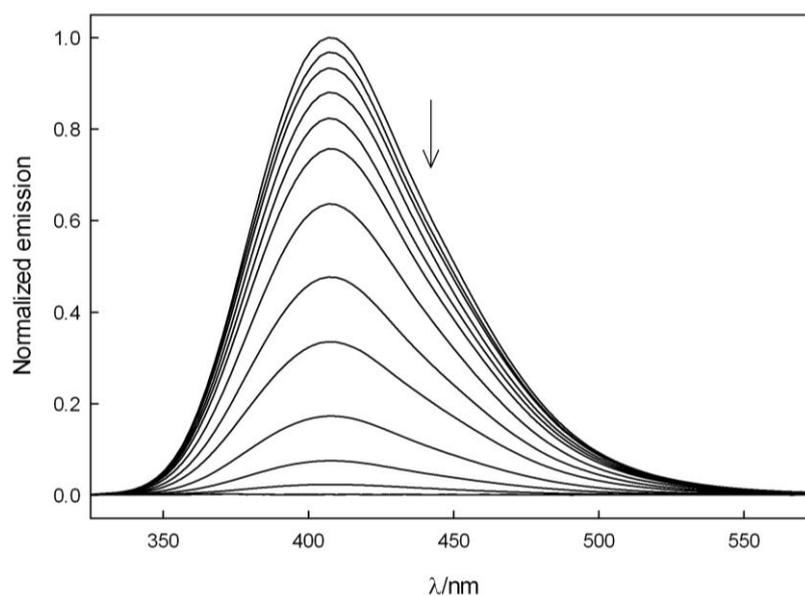
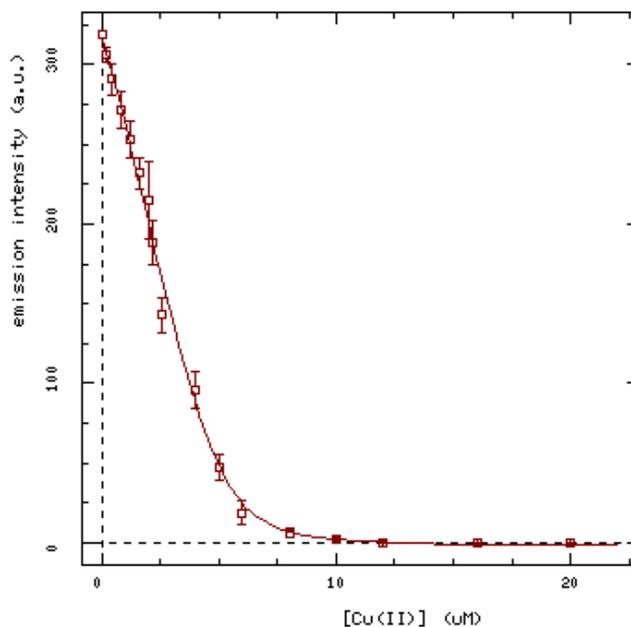


Figura 20 Espectros de fluorescencia de una disolución 2 μM del ligando peptídico **27** en tampón fosfato (1 mM), NaCl (10 mM), pH 6,5 y su evolución después de la adición de alícuotas de una disolución acuosa de CuCl_2 (200 μM) hasta llegar a la saturación.

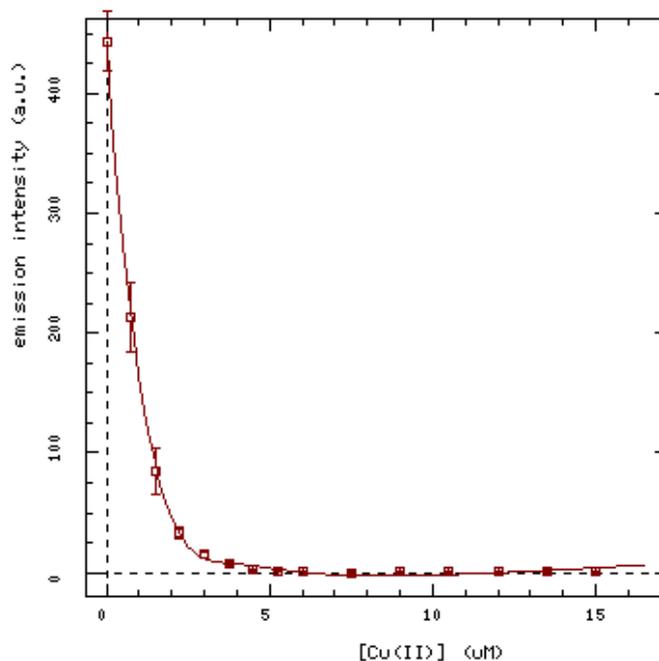
a) $(R_3\text{-Bpy})_2 + \text{Cu(II)}$ / (equilibrio 1:2)

Consideramos un equilibrio global 1:2 (un péptido, dos metales) que contiene como intermedio el complejo 1:1 $K_D^{1:1} = 0.5(0.13) \mu\text{M}$.



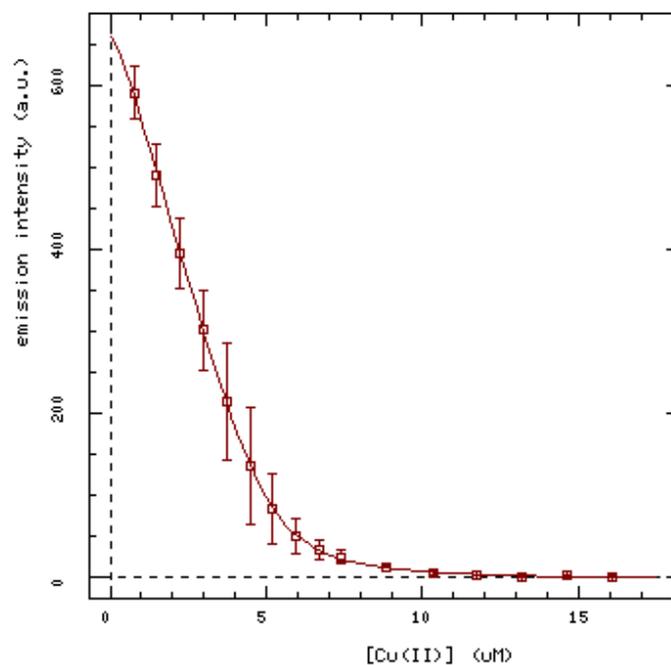
b) $(R_3\text{-Bpy})_3 + \text{Cu(II)}$ / (modelo mixto 1:1, 1:2 and 2:3)

El mejor ajuste se obtuvo mediante un modelo complejo que contenía las especies 1:1, 1:2 (un péptido, dos metales) y 2:3 (dos péptidos, tres metales) $K_D^{1:1} = 0.24(0.71) \mu\text{M}$ y $K_D^{1:2} = 0.3(0.55) \mu\text{M}$.



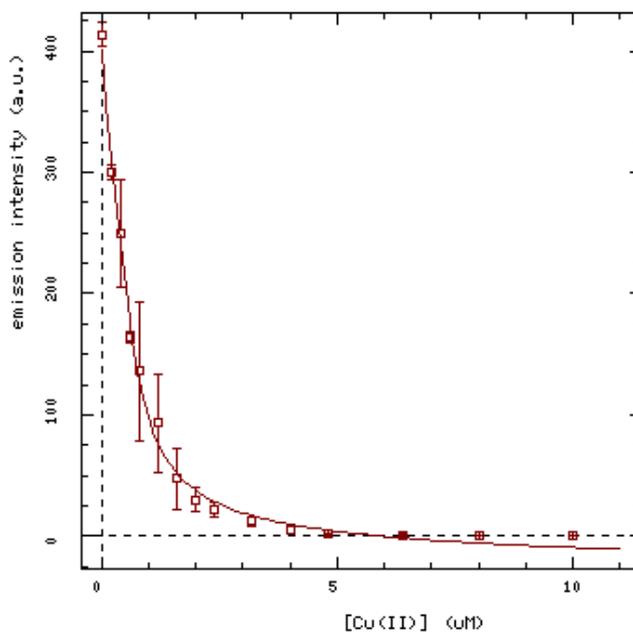
c) Ciclo-(R₃-Bpy)₂ + Cu(II) / (equilibrio 1:2)

Los datos experimentales se ajustaron a un modelo 1:2 (un péptido, dos metales) $K_D^{1:2} = 0.445(0.017) \mu\text{M}$.



d) Ciclo-(R₃-Bpy)₃ + Cu(II) / (modelo mixto 1:1, 2:1, y de orden superior)

La constante de disociación aparente para el modelo combinado (una etapa) fue $K_D^{2:1} = 0.168(0.056) \mu\text{M}$.



Script de DynaFit usado en el análisis de las valoraciones por fluorescencia

[task]

task = fit
data = equilibria

[mechanism]

$P + M \rightleftharpoons C1$: Kd1 dissociation
 $C1 + C1 \rightleftharpoons C2$: Kd2 dissociation

[constants]

Kd1 = 5.10 ?
Kd2 = 20.05 ?

[concentrations]

P = 2.0

[responses]

M = 0.0
P = 100.0 ?
C1 = 10.0 ?
C2 = 10.0 ?

[data]

variable M
offset auto ?
directory ./exper/ciclo3bpy/Fe(II)/data
sheet ciclo3bpyFe.csv
columns 2, 3, 4, 5

[output]

directory ./exper/ciclo3bpy/Fe(II)/out

[settings]

{Filter}

AverageReplicates = y

{Output}

XAxisLabel = [M(II)] (uM)
YAxisLabel = emission intensity (a.u.)
BlackBackground = n

Estudios de UV-Vis

Para obtener más información sobre la formación de los metalopéptidos y su comportamiento coordinativo, se llevaron a cabo estudios de UV-Vis. A una disolución del ligando peptídico en tampón fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6.5), se añadió un volumen específico de una disolución madre de CuCl₂ en agua hasta alcanzar las condiciones de saturación del metal, de acuerdo con los cálculos estequiométricos basados en los estudios de fluorescencia. Los espectros de UV-Vis se registraron antes y después de la adición de los iones Cu (II). Los espectros mostrados son el promedio de 3 repeticiones (Figura 21 y Figura 22).

Los coeficientes de extinción de cada uno de los péptidos son los siguientes:

26. $\epsilon = 56566 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

27. $\epsilon = 84849 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

28. $\epsilon = 56566 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

29. $\epsilon = 84849 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

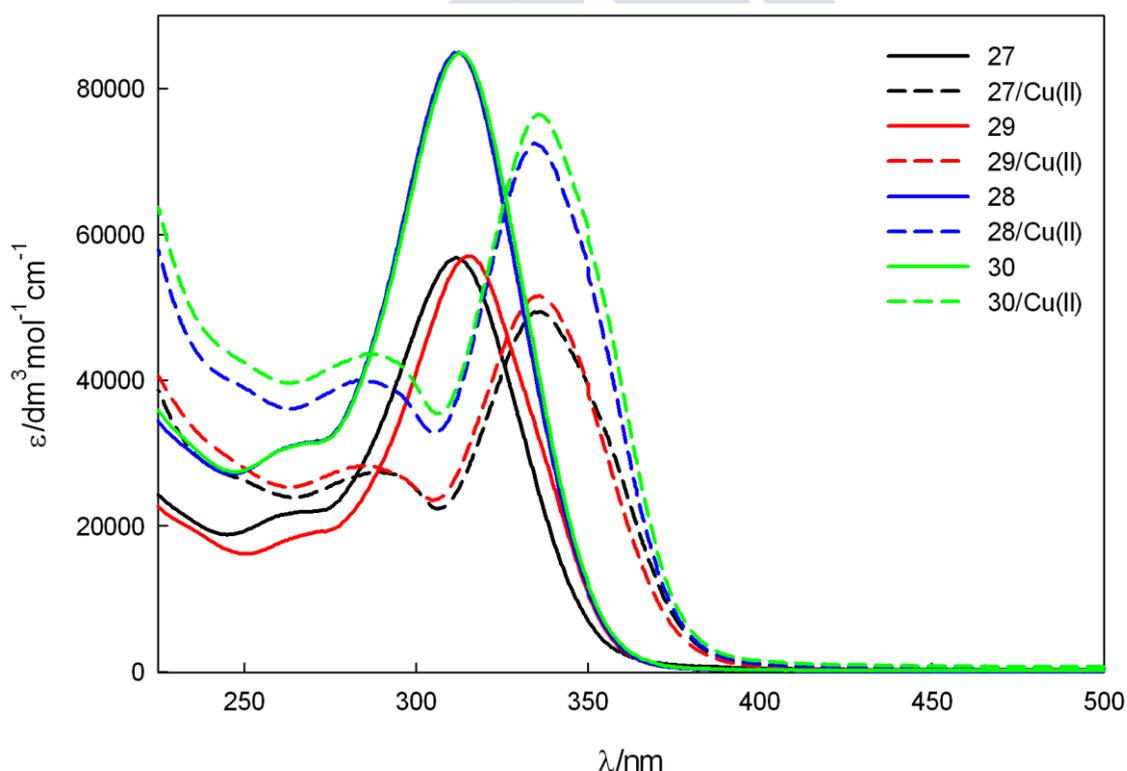


Figura 21 Espectro de UV-vis de los ligandos peptídicos (**27**: 5.37 μM ; **28**: 5.03 μM ; **29**: 6.52 μM ; **30**: 5.34 μM) antes (línea continua) y después (línea de puntos) de la adición de iones Cu(II) (**27/Cu**: 3 eq.; **28/Cu**: 4 eq.; **29/Cu**: 3 eq.; **30/Cu**: 5 eq.) en buffer fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6.5).

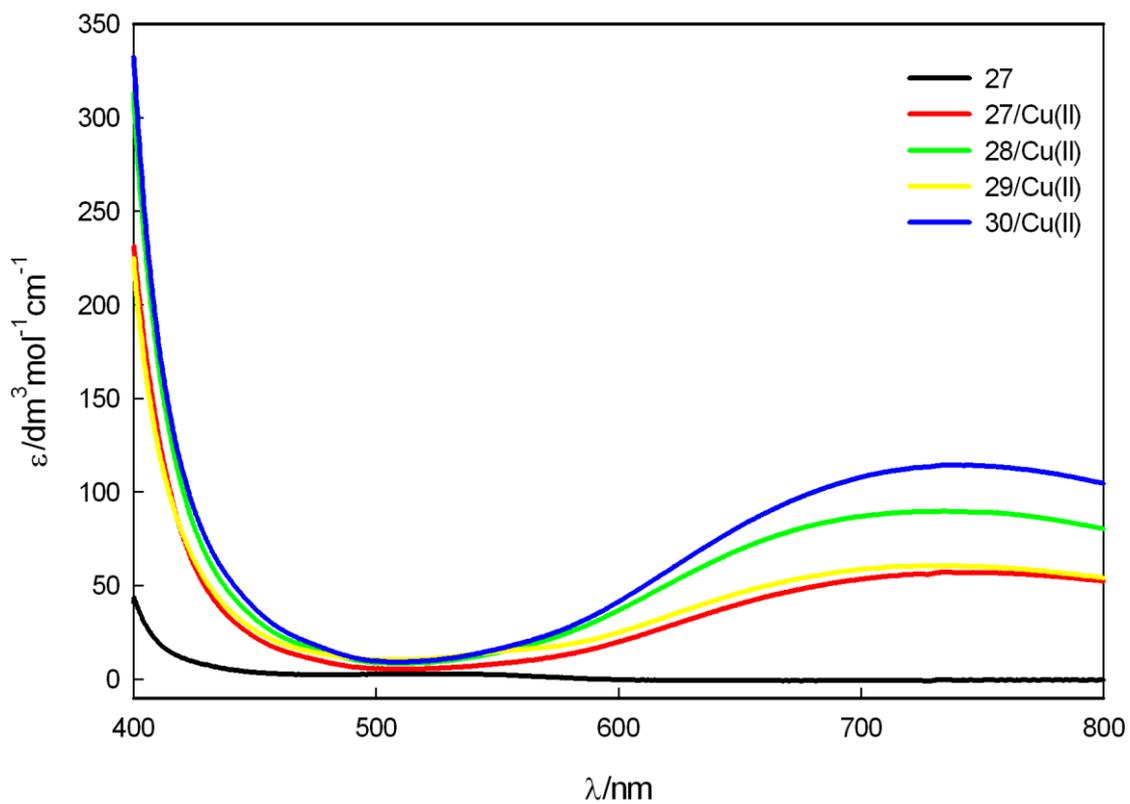


Figura 22 Espectro de UV-vis del ligando peptídico libre **27** (500 μM) y de los ligandos peptídicos **27**, **28**, **29** y **30** (500 μM) después de la adición de iones Cu(II) (**27/Cu**: 2 eq.; **28/Cu**: 4 eq.; **29/Cu**: 3 eq.; **30/Cu**: 5 eq.) en buffer fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6.5).

Dicroísmo circular

A una disolución 10 μM del péptido seleccionado (**27**, **28**, **29**, **30**) en tampón fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6,5), se añadió un volumen específico de una disolución madre de CuCl_2 en agua hasta alcanzar las condiciones de saturación del metal, de acuerdo con los cálculos estequiométricos basados en los estudios de fluorescencia. Los espectros de CD de los péptidos se registraron antes y después de la adición de los iones metálicos. Los espectros mostrados son el promedio de 3 repeticiones (Figura 23).

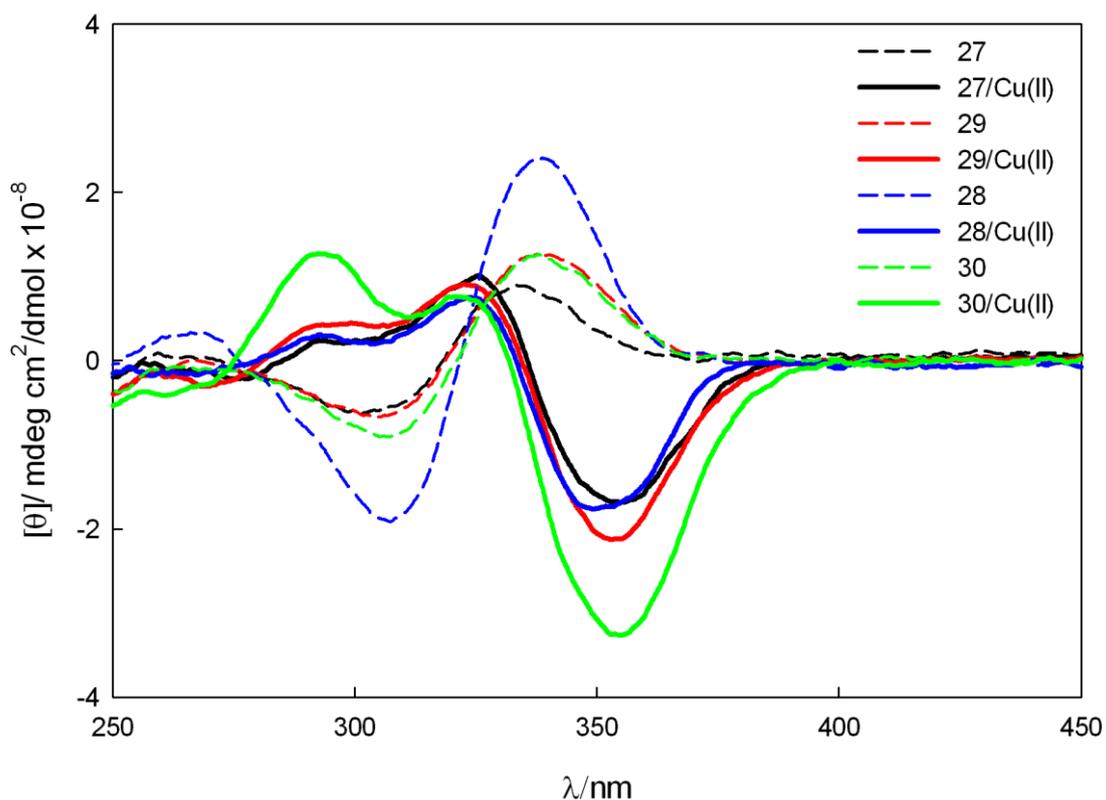


Figura 23 Espectros de CD de los ligandos peptídicos (10 μM) antes (línea de puntos) y después (línea continua) de la adición de iones Cu(II) (**27**/ Cu : 3 eq.; **28**/ Cu : 4 eq.; **29**/ Cu : 3 eq.; **30**/ Cu : 5 eq.) en buffer fosfato (1 mM, NaCl 10 mM, pH 6.5).



