



GRUPO
QUÍMICA
MEDICINAL



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias

DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POTENCIALES AGENTES DE IMAGEN HÍBRIDOS TETRAZINA-BODIPY

Bach. Mariana Sofía Brandes Lamas

Tutor: Dr. Marcos Couto

Co-Tutor: Dra. María Fernanda García

Grupo de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica
Facultad de Ciencias, UdelaR
Montevideo, Uruguay.

Indice

DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POTENCIALES AGENTES DE IMAGEN HÍBRIDOS TETRAZINA-BODIPYS	1
Indice	2
Agradecimientos	4
Resumen	5
Abreviaturas	6
I. Introducción	7
II. Marco Teórico	9
II.I Fotoluminiscencia y Sondas Fluorescentes	9
II.II Fluorocromos	12
II.III Bioconjugación	15
II.III.a Estrategia de conjugación Bio-ortogonal.	16
II.III.b Reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones	16
II.III.c Aplicaciones de la reacción entre TZ y TCO en imagen molecular	18
III. Objetivos	20
III.I Objetivo general	20
III.II Objetivos específicos	20
IV. Materiales y Métodos	21
IV.I Materiales	21
IV.I.a Síntesis Orgánica	21
IV.I.b Evaluación Biológica	21
IV.II Métodos	22
IV.II.a Síntesis orgánica	22
IV.II.b Caracterización fisicoquímica	25
IV.II.c Caracterización in vitro del compuesto 4	26
V. Resultados y Discusión	29
V.I Química	29
V.I.a Estudios fotofísicos	41
V.I.b Determinación del coeficiente de reparto	49
V.II Biología	52
V.II.a Conjugación trastuzumab-TCO	52
V.II.b Reacción bio-ortogonal <i>in vitro</i> sobre el anticuerpo	53

V.II.c	Número de TCO reactivos por molécula de anticuerpo	54
V.II.d	Cinética de la reacción bio-ortogonal	55
V.II.e	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	58
V.II.f	Citometría de flujo	59
VI.	Conclusiones y perspectivas	64
VII.	Bibliografía	65

Agradecimientos

A mi familia, que me acompañó a lo largo de toda mi carrera. Siempre estuvieron pendientes de mí y son un apoyo incondicional en ambos mis logros y mis fracasos.

A Santi, que siempre está para darme aliento e impulsarme a más.

A mis tutores, Marcos y Fer, por su paciencia infinita y apoyo continuo durante todo este proceso.

A Mercedes Gonzales y Hugo Cerecetto por abrirme las puertas al Laboratorio de Química Medicinal y ser una parte instrumental de mi formación como investigadora y docente.

A mis compañeros de laboratorio por los innumerables días compartidos, siempre hicieron momentos frustrantes mucho más ligeros.

A mis amigos, los que me acompañaron en toda la carrera ya sea porque la hicimos juntos o por su compañía constante desde afuera.

Especialmente a Cata y a Cami, que hicieron que la carrera fuera una experiencia espectacular, llena de recuerdos lindos.

Resumen

La imagenología molecular implica visualizar la expresión de moléculas típicas de un proceso biológico mediante la acumulación selectiva de un agente de imagen en el sistema blanco. Un agente de imagen específicamente dirigido a un blanco molecular está constituido por una molécula vector conjugada a una sonda radioactiva o fluorescente. Los derivados de BODIPYs (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos), son compuestos químicos que por sus propiedades químicas y ópticas, han sido ampliamente utilizados para la generación de compuestos fluorescentes. En este trabajo se propone el desarrollo de un nuevo agente de imagen derivado de BODIPY pasible de ser conjugado a una biomolécula en ambientes acuosos y en entornos biológicos mediante la reacción de cicloadición entre los grupos funcionales 1,2,4,5-tetrazina y *trans*-cicloocteno. Para ello, inicialmente se realizó la síntesis de formil-BODIPY (compuesto **3**) y posteriormente se conjugó con la metiltetraina a través del grupo funcional aminoxi, obteniéndose el producto deseado. El producto obtenido fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas y se evaluaron sus propiedades ópticas. Seguidamente se estudió la reacción de cicloadición con el derivado *trans*-cicloocteno *in vitro* y su efecto sobre las propiedades fluorescentes del conjugado. De esta forma fue posible constatar un incremento de la intensidad de fluorescencia de hasta 5 veces su valor inicial. Además, se evaluó su eficacia como marcador molecular *in vitro* mediante electroforesis y ensayos de ELISA. También se constató la velocidad de reacción sobre la superficie del anticuerpo monoclonal.

Abreviaturas

ACN: acetonitrilo

BF₃·OEt₂: eterato de trifluoruro de boro

BODIPY: 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

CC: cromatografía en columna

CCF: cromatografía en capa fina

Cy5: indodicarbocianina

COSY: espectroscopía de resonancia magnética bidimensional (del inglés, correlation spectroscopy)

DCM: diclorometano

DCE: dicloroetano

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Eq: equivalentes

EtOH: etanol

FRAP: recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (del inglés, *fluorescence recovery after photobleaching*)

FRET: transferencia de energía fluorescente por resonancia (del inglés, *fluorescence resonance energy transfer*)

Her2/herceptin: trastuzumab

HMBC: resonancia magnética nuclear de correlación (del inglés, *heteronuclear multiple bond correlation*)

HPLC: cromatografía líquida de alta performance (del inglés, *high performance liquid chromatography*)

HSQC: resonancia magnética nuclear de correlación (del inglés, *heteronuclear single quantum coherence*)

MeOH: metanol

p-TsOH: ácido *p*-toluensulfónico

PBS: amortiguador de fosfato salino (del inglés, phosphate buffered saline)

PET: transferencia de electrones fotoinducida (del inglés, *photoinduced electron transfer*)

PFA: paraformaldehído

POCl₃: cloruro de fosforilo

RMN: resonancia magnética nuclear

T.A.: temperatura ambiente

TBET: transferencia de energía a través de enlace (del inglés, *through bond energy transfer*)

TCO: *trans*-cicloocteno

THF: tetrahidrofurano

Tz: tetrazina

UV: ultravioleta

I. Introducción

La imagenología abarca diferentes modalidades de imagen. Las técnicas más tradicionales incluyen, en orden cronológico: la radiografía, la microscopía electrónica, el ultrasonido, la resonancia magnética nuclear, las tomografías de emisión de positrones, la resonancia magnética y la tomografía computada. La imagen óptica es una de las modalidades de imagen más versátil y más utilizada tanto en la práctica clínica como en investigación. Incluye técnicas basadas en diferentes características de la interacción de la luz con los tejidos como son: la absorción, la emisión, la reflectividad, la dispersión, la polarización y la fluorescencia. Dichas características se utilizan como fuente de contraste en las imágenes.¹

Muchas de las técnicas mencionadas anteriormente se desarrollaron para visualizar cambios macroscópicos a nivel físico y fisiológico en los seres vivos. Por lo tanto, no permiten identificar las modificaciones a nivel molecular que provocan dicho tipo de cambios. La imagenología molecular en cambio, se encarga de visualizar y cuantificar, en tiempo real y de forma no invasiva, los sucesos bioquímicos a nivel celular y subcelular dentro de células vivas, tejidos y organismos. Para ello suele combinar el uso de instrumentos especializados, sondas moleculares y características intrínsecas de los tejidos como fuente de contraste de la imagen.² Las técnicas de imagen molecular pueden brindar información tanto cuantitativa como cualitativa de procesos normales y patológicos a nivel celular y subcelular. Más relevante aún, muchas de estas técnicas pueden ser utilizadas *in vivo* ya que fueron diseñadas con el objetivo de no ser invasivas para el organismo a estudiar. Las técnicas de imagen óptica y de medicina nuclear son técnicas de imagenología molecular. Estas se basan en la utilización de agentes de imagen blanco específicos que contienen en su composición sondas fluorescentes o átomos radiactivos respectivamente. El uso de estos agentes idealmente permite obtener información acerca de los cambios celulares y subcelulares que ocurren en tiempo real y con gran resolución. Debido a lo mencionado previamente, la imagenología molecular ha revolucionado como se observan y caracterizan las distintas vías moleculares en toda su complejidad y dinamismo dentro de los organismos vivos.^{3,4}

Dentro de la imagenología molecular óptica, la imagenología de fluorescencia permite estudiar la ubicación y concentración de moléculas en solución, en células, tejidos y hasta organismos íntegros. Dicha estrategia es imprescindible en el estudio de estructuras y funciones celulares, vías de señalización e interacciones moleculares dentro de los sistemas biológicos. Para cumplir con todas las funciones mencionadas, se utilizan distintas técnicas de fluorescencia que pueden aplicarse tanto *in vitro* como *in vivo*. Dentro de las técnicas mencionadas se encuentran: la transferencia de energía fluorescente por resonancia (FRET), la recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP), la citometría de flujo, la microscopía de fluorescencia, la microscopía confocal de fluorescencia y la tomografía de fluorescencia.^{5,6} Todas las técnicas mencionadas requieren del uso de diversas sondas fluorescentes capaces de unirse a diferentes moléculas problema y emitir una señal de contraste detectable.

Debido a que en las estrategias de fluorescencia se detectan fotones de baja energía, en aplicaciones *in vivo* la profundidad que se puede alcanzar a nivel tejido es poca. La capacidad de penetración de la señal se encuentra limitada a pocos centímetros debido a la interacción de la luz con los distintos

componentes de los tejidos a estudiar. En particular, dicha limitación es causada por la absorción y dispersión de la luz de los propios tejidos en estudio. Además, en la mayoría de los ensayos de diagnóstico (e.g. citopatología, citometría de flujo, microscopía) la señal de fondo producida por el marcado con ligandos fluorescentes suele ser un problema a optimizar.⁷ Debido a las limitantes mencionadas, sigue haciendo falta producir fluorocromos biocompatibles y eficientes que tengan una señal de fondo nula. Para ello, se continúan desarrollando nuevos fluorocromos con mejores rendimientos cuánticos, alta fotoestabilidad, estabilidad química y baja citotoxicidad.

La química bioortogonal tiene como fin la funcionalización de moléculas de interés con sondas de diversos tipos para su análisis. Para ello emplea diferentes reacciones químicas compatibles con sistemas biológicos que son selectivas y rápidas. El objetivo final es modificar específicamente a las moléculas blanco con grupos funcionales particulares y ajenos a los sistemas biológicos para luego utilizar dichos grupos en procesos de ligación covalente con una sonda de elección.⁸

En el presente trabajo se buscó combinar la síntesis de fluoróforos y una estrategia de química bioortogonal con las cuales el grupo de investigación posee experiencia,⁹⁻¹² para desarrollar un agente de imagen nuevo con características ópticas y fisicoquímicas óptimas para su aplicación *in vitro* e *in vivo*.

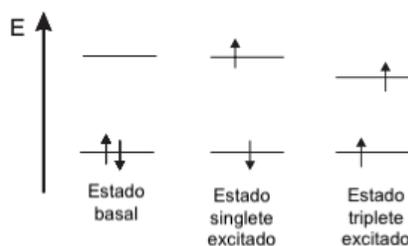
II. Marco Teórico

II.1 Fotoluminiscencia y Sondas Fluorescentes

El fenómeno de fotoluminiscencia se caracteriza por la emisión espontánea de luz producida por una sustancia que se encuentra en un estado energético excitado debido a una previa absorción de fotones. Dependiendo de la naturaleza del estado excitado del cual surge la emisión, se pueden diferenciar dos procesos: fluorescencia y fosforescencia.¹³

La mayoría de las moléculas en su estado electrónico basal se encuentran en un estado singulete (S_0) con sus electrones apareados con spines opuestos. Cuando estas se exponen a ondas electromagnéticas y absorben energía, suelen pasar a un estado singulete excitado (i.e. S_1 , S_2). Es decir, que al incidir sobre una molécula con un haz de luz de determinada longitud de onda, se puede promover uno de los dos electrones de spin opuesto - que se encuentran en un orbital molecular basal - a un orbital molecular de mayor energía, sin cambiar la multiplicidad de spin. Este tipo de transiciones se denominan transiciones singulete-singulete. Además, dependiendo de la energía absorbida, el electrón puede pasar a cualquier estado vibracional de cualquier estado singulete excitado.¹⁴

Existen casos en los cuales al excitar a un electrón, este además de ser promovido a un estado excitado, cambia la multiplicidad de su espín. De esta forma, quedan dos electrones con espines paralelos en la molécula. Estos estados excitados se denominan estados triplete (i.e. T_1) y presentan menores energías a iguales configuraciones que sus contrapartes en estado singulete. En la [Figura II. 1.](#) se puede observar una representación de lo explicado anteriormente.



[Figura II.1.](#) Representación de los niveles de energía de los diferentes estados con sus espín correspondientes.

El proceso de absorción de fotones por parte de una molécula suele suceder en el entorno de los 10^{-15} s. Luego de que una molécula es excitada tras la absorción de energía, la misma permanece en el estado excitado un tiempo determinado. En dicho tiempo, la molécula puede experimentar distintos procesos no radiativos para luego retornar, de forma espontánea, al estado basal (S_0) a través de un proceso radiativo. Para explicar los procesos radiativos y no radiativos que ocurren luego del fenómeno de absorción de la luz, se suele utilizar un diagrama de Perrin-Jablonski como el que se muestra en la [Figura II.2.](#) En el diagrama, se pueden observar distintos niveles de energía para el estado singulete (S_0 , S_1 y S_2) y para el estado triplete (T_1 y T_2). Cada uno de los estados electrónicos de energía representados tiene asociados diferentes estados vibracionales de energía en los que las moléculas se pueden hallar. Además, se encuentran explicitadas en el diagrama algunas de las distintas transiciones entre estados que se pueden dar. La absorción de energía está representada por

las flechas verticales ascendentes. Estas comienzan desde el estado vibracional más bajo del estado electrónico singlete basal (S_0) porque la mayoría de las moléculas se encuentran en dicho estado a temperatura ambiente. No obstante, la excitación de una molécula puede darse desde un estado vibracional excitado del estado S_0 . Esto último explica que los espectros de absorción y fluorescencia puedan solaparse como se muestra más adelante.¹⁵

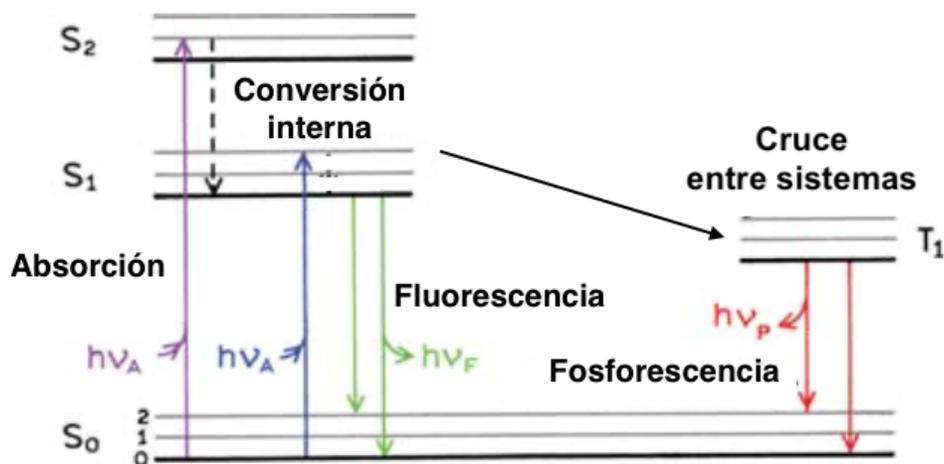


Figura II.2. Diagrama de Perrin-Jablonski. Las líneas verticales azul y violeta se corresponden con fenómenos de absorción. En verde se puede observar el decaimiento radiativo a través de fluorescencia. En rojo se puede observar el decaimiento radiativo a través de fosforescencia. La línea punteada se corresponde con el fenómeno de conversión interna. La línea continua transversal representa el fenómeno de cruce entre sistemas.

Una vez que las moléculas absorben energía, suelen perder parte de la misma debido a la relajación vibracional. La energía vibracional excedente puede ser transferida al disolvente a través de colisiones efectivas entre la molécula excitada y las moléculas del disolvente que la rodean. Además, si las moléculas son excitadas a estados electrónicos mayores que S_1 , pueden experimentar un proceso de conversión interna hacia S_1 . Este proceso es una transición no radiativa que se da entre dos estados electrónicos excitados que poseen la misma multiplicidad de spin. En solución, a este proceso le sigue la relajación vibracional hacia el nivel vibracional más bajo del estado electrónico S_1 . Estas transiciones suelen ocurrir en el orden de los 10^{-12} s luego de la excitación. La conversión interna desde el nivel S_1 al S_0 también es posible pero menos eficiente ya que hay una diferencia de energía mucho mayor entre los niveles S_1 y S_0 que entre los niveles S_2 y S_1 .

El entrecruzamiento de sistemas es otra transición no radiativa posible. Esta se da entre dos estados vibracionales isoenergéticos correspondientes a estados vibracionales de diferentes multiplicidades alrededor de los 10^{-9} s. A modo de ejemplo, una molécula excitada en el nivel vibracional 0 del estado S_n puede moverse al nivel vibracional isoenergético del estado triplete T_n . Luego, la relajación vibracional lleva a la molécula al estado vibracional más bajo del estado electrónico T_1 . Este tipo de transición es posible si hay una correspondencia entre el momento magnético de spin y el momento magnético de orbital.

Se denomina fosforescencia al decaimiento radiativo de una molécula desde el estado T_1 al estado basal. Para que dicho fenómeno suceda, la molécula debe atravesar el proceso explicado en el párrafo anterior. La vida media de una molécula en el estado excitado T_1 se encuentra entre 10^{-6} y 10 s. Dichos tiempos extensos se deben a que las transiciones del tipo $T_1 \rightarrow S_0$ son transiciones prohibidas. Además, debido a la lentitud de la emisión, el fenómeno de fosforescencia no se observa comúnmente en solución a temperatura ambiente ya que otros procesos compiten con el mismo.

El decaimiento radiativo de una molécula dado desde un estado excitado singulete se denomina fluorescencia. Aunque la emisión de un fotón es un proceso igual de rápido que la absorción de un fotón, las moléculas excitadas permanecen en el estado S_1 una cierta cantidad de tiempo antes de decaer por alguna de las vías ya mencionadas. Debido a esto, luego de excitar una población de moléculas con un pulso de luz corto se observa una disminución exponencial de la intensidad de fluorescencia a un tiempo característico. El tiempo característico mencionado refleja la vida media promedio de las moléculas en el estado excitado S_1 y suele encontrarse entre los 10^{-10} y 10^{-7} s.

El espectro de fluorescencia se encuentra desplazado hacia longitudes de onda mayores (menor energía) respecto al espectro de absorción debido a la pérdida de energía del estado excitado causada por la relajación vibracional. Siguiendo la regla de Stokes, la longitud de onda emitida por fluorescencia siempre debe ser mayor a la longitud de onda absorbida. Aún así, en la mayoría de los casos, el espectro de absorción de una molécula suele solaparse con el espectro de emisión de fluorescencia. Esto puede explicarse si se tiene en cuenta que a temperatura ambiente, alguna fracción de las moléculas del compuesto a observar se encuentran en un estado vibracional mayor al 0 del estado electrónico basal. Dicho fenómeno puede minimizarse disminuyendo la temperatura.¹⁵

Por otro lado, existen procesos de relajación para las moléculas excitadas que son no radiativos y se dan a través de las interacciones intermoleculares. Algunos ejemplos de estas últimas interacciones mencionadas son: formación de excímeros, cambios conformacionales, transferencias de protones, transferencias de electrones, transferencia de carga intermolecular. El proceso de relajación de una molécula en particular va a ser determinado por el tiempo en el cual ocurren los diferentes fenómenos para dicha molécula. La misma va a relajarse con mayor probabilidad por el proceso que ocurra más rápido.¹⁵

Los disolventes producen un efecto sobre los espectros observados de las diferentes moléculas. Dichos efectos pueden ser generales o específicos para un fluoróforo. Los efectos generales de un disolvente sobre la fluorescencia de una molécula van a depender de su polaridad. Esto se debe a que involucran la interacción de un dipolo permanente del fluoróforo, que se mantiene tanto en el estado basal como en el estado excitado del mismo, con el campo inducido por las moléculas del disolvente. La interacción lleva a las moléculas del disolvente a reorganizarse alrededor de las moléculas del fluoróforo y estabilizan a las moléculas que se encuentran en estado excitado. Una constante dieléctrica mayor suele provocar un corrimiento de la fluorescencia hacia longitudes de onda aún mayores (menos frecuencia). A su vez, cuanto más apolares son los fluoróforos, menos se ven afectados por la polaridad de los disolventes.

Los efectos específicos de un disolvente sobre la fluorescencia de una molécula van a deberse a la interacción química que haya entre las moléculas excitadas del fluoróforo y las moléculas del disolvente que la rodean. Las interacciones posibles más importantes son la formación de enlaces de

hidrógeno, interacciones del tipo ácido-base y la transferencia de carga donde un electrón del fluoróforo se transfiere a otro grupo al excitarse.

Los efectos específicos de los disolventes suelen acompañar a los efectos generales, en particular los solventes muy polarizables suelen ser capaces de formar enlaces de hidrógeno. Los efectos específicos de los disolventes ocurren cuando el solvente reacciona con el fluoróforo por lo que solo se necesita una pequeña cantidad del disolvente reactivo para observar su efecto. Además, la especie nueva formada suele poseer una banda característica nueva de fluorescencia.^{16,17}

Se le denomina quenching a los procesos que producen una disminución de la intensidad de fluorescencia de una solución. Dentro de estos procesos se encuentra el quenching colisional, proceso en el cual el fluoróforo en su estado excitado decae debido al contacto con otra molécula. Un quencher común es el oxígeno molecular que puede encontrarse disuelto en soluciones. A su vez, hay procesos no moleculares que producen una disminución en la intensidad de fluorescencia observada. Un ejemplo de esto último es la atenuación de la luz incidente producida por las propias moléculas del fluoróforo u otra molécula absorbente. Si el fluoróforo se encuentra a una concentración muy elevada, las moléculas que se encuentran más cercanas a la fuente de luz van a absorber todos los fotones disponibles. Esto provoca que las moléculas que se encuentran en porciones de la solución más lejanas a la fuente no reciban fotones por lo que no se logran excitar y no pueden emitir. De esta forma, la intensidad de fluorescencia observada se corresponderá con la emisión de una porción de las moléculas en solución. Debido a esto, las soluciones muy concentradas de fluoróforos suelen emitir menos fluorescencia que las soluciones de concentración intermedia.

La fluorescencia es una propiedad importante de las moléculas que se puede cuantificar mediante el estudio del rendimiento cuántico de la molécula y la vida media. El rendimiento cuántico de fluorescencia está dado por la relación entre los fotones emitidos por fluorescencia durante todo el proceso de relajación y los fotones absorbidos por la molécula, por lo que el valor siempre es menor a 1.¹⁸ Este valor se puede hallar de forma relativa, reportándose en relación a estándares conocidos siguiendo la Ecuación II.1.¹⁹

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left(\frac{A_{ST}}{A_x} \right) \left(\frac{E_x}{E_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_x}{\eta_{ST}} \right)^2$$

Ecuación II.1. *Definición de rendimiento cuántico relativo. ST hace referencia a los valores correspondientes al compuesto estándar. X hace referencia a los valores relativos al compuesto problema. A representa los valores de absorbancia, E representa la intensidad de fluorescencia integrada y η es el índice de refracción del medio utilizado.*

II.II Fluorocromos

Las moléculas fluorescentes se denominan fluorocromos o fluoróforos. Dichas moléculas suelen ser compuestos orgánicos aromáticos. Existen fluorocromos naturales químicos como la quinina y el cofactor NADH y también sintéticos. Para el desarrollo de los segundos, suelen utilizarse como bloques de construcción los compuestos observados en la Figura II.3. También existen moléculas

fluorescentes proteicas ya que tres de los aminoácidos aromáticos que las componen son fluorocromos. Los aminoácidos mencionados son el triptofano, la tirosina y la fenilalanina.

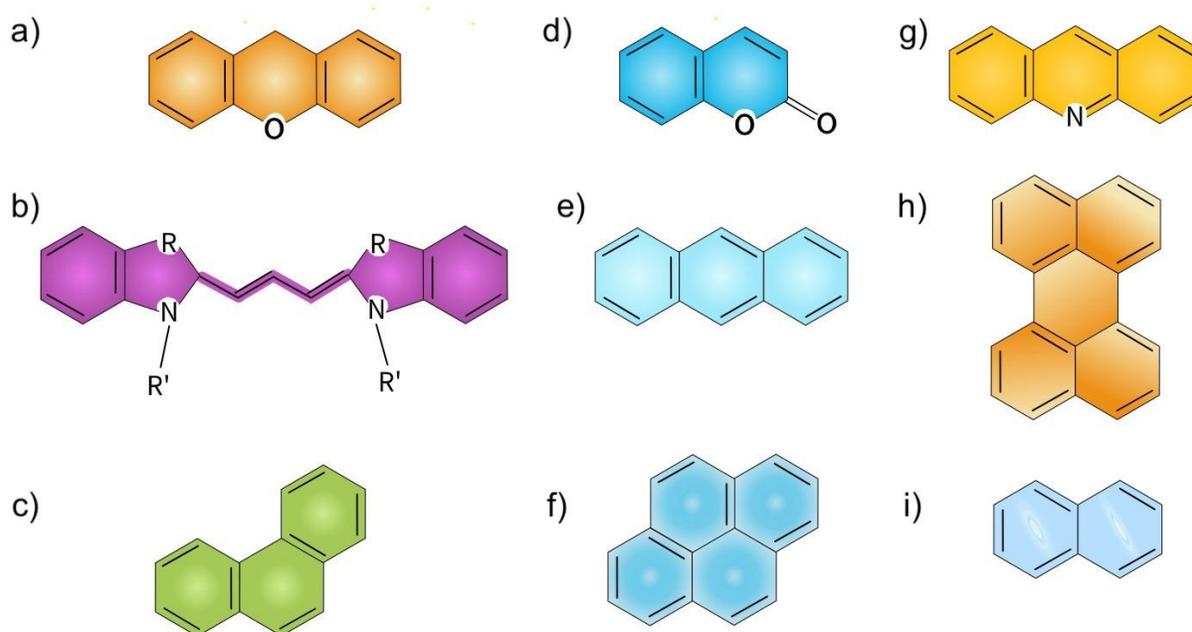


Figura II.3. Ejemplos de bloques de construcción para moléculas fluorescentes. Estos son: **a)** xanteno, **b)** cianina, **c)** fenatreno, **d)** cumarina, **e)** antraceno, **f)** pireno, **g)** acridina, **h)** perileno, **i)** naftaleno. (Los colores representados son a modo de ejemplo ya que los máximos de fluorescencia reales serán afectados por el disolvente utilizado y los sustituyentes que presenten dichos compuestos.)

Otra familia importante de fluorocromos son los derivados de borodipirrometano, los 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos (también conocidos por su marca registrada por Molecular Probes, Inc.: BODIPYs). Los mismos fueron descubiertos accidentalmente en 1968 por Treibs y Kreuzer al combinar 2,4-dimetilpirrol y anhídrido acético en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}$.²⁰ Sin embargo, los mismos no fueron de interés general hasta mediados de los años 90 cuando comenzaron a ensayarse como base para láseres de colorante, componentes para células fotoeléctricas y agentes de imagen. Estos compuestos, cuyo rango de emisión va desde el verde al infrarrojo cercano, son compuestos químicos que por sus propiedades químicas y ópticas, han sido ampliamente utilizados para la generación de compuestos fluorescentes.²¹ Dentro de las características mencionadas se destacan una fuerte absorción de la luz visible, elevado coeficiente de absortividad molar ($\epsilon_\lambda > 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), espectros de absorción y emisión agudos que presentan un pequeño corrimiento de Stokes (alrededor de 10 nm) e intensidades de fluorescencia elevadas (rendimiento cuántico, $\Phi = 0.5\text{--}0.9$). También es importante destacar que casi no presentan transiciones al estado triplete y que la vida media de su fluorescencia suele encontrarse en los nanosegundos. Además, estos compuestos son generalmente estables frente a la luz y a otras moléculas, sus propiedades no suelen depender de la polaridad del disolvente en el que se encuentran, no suelen agregarse en solución y pueden ser funcionalizados para mejorar su solubilidad.

En la **Figura II.4.** se puede observar la estructura base del BODIPY. La posición del carbono central (C8) de la misma se denomina como *meso*, al igual que en el dipirrometano. Los carbonos adyacentes

al nitrógeno (C3 y C5) se denominan como carbonos α mientras que los restantes (C6 y C7) son carbonos β .

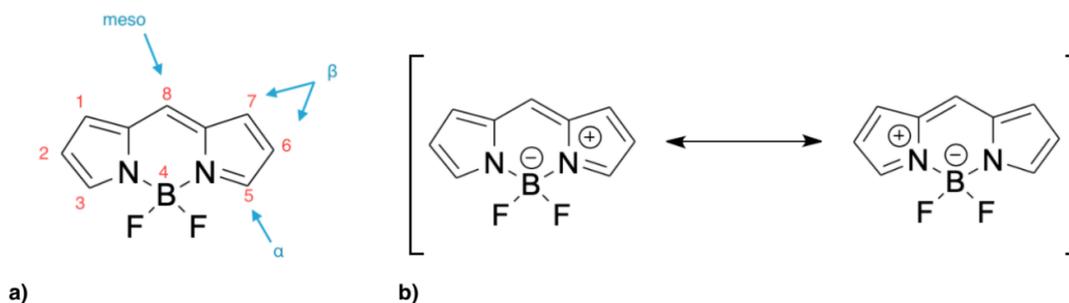


Figura II.4. a) Estructura central BODIPY con su enumeración IUPAC. b) Estructuras resonantes con cargas formales explicitadas.

Las estrategias de síntesis de los distintos núcleos centrales de BODIPYs surgen de la química de porfirinas. En las estrategias como la mostrada en la [Figura II.5.](#), se da primero la condensación del pirrol con un electrófilo - pueden utilizarse distintos cloruro de ácido o aldehídos aromáticos - en medio ácido para formar el dipirrometano correspondiente. Luego se produce la oxidación del dipirrometano al dipirrometeno correspondiente utilizando DDQ (2,3-Dicloro-5,6-Diciano-1,4-benzoquinona) o cloranil. Este paso suele hacerse de forma directa debido a la inestabilidad que presentan los dipirrometanos frente a la luz, el oxígeno y los ácidos. Luego se agrega una base en exceso y eterato de trifluoruro de boro para formar el producto final complejoado con boro.

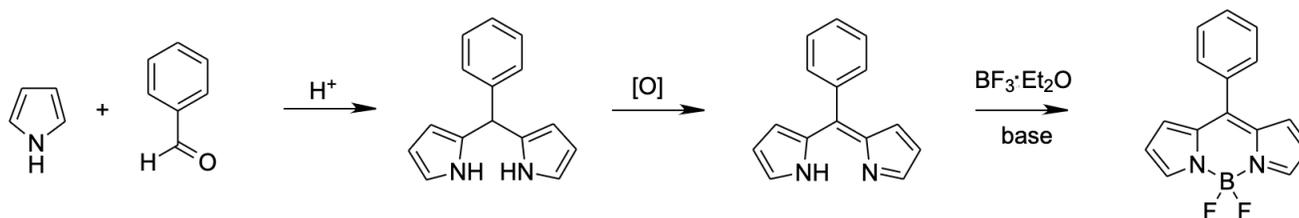


Figura II.5. Estrategia de síntesis de BODIPYs utilizando benzaldehído como electrófilo.

En la estrategia de síntesis exhibida en la [Figura II.6.](#), primero se da la condensación del pirrol con un grupo acilo que puede ser provisto por cloruros de ácido, anhídridos u ortoésteres. Dicha condensación provoca la formación de un intermedio acilado en la posición C2 del pirrol que muy rápidamente reacciona con otra molécula de pirrol para formar el derivado dipirrometeno correspondiente. A su vez, se puede utilizar esta metodología para obtener dipirrometenos asimétricos si en este paso de reacción se logra aislar el acilpirrol producido. Una vez aislado, mediante otra condensación en medio ácido, se agrega un derivado de pirrol diferente al utilizado inicialmente. Una vez obtenido el acilpirrol, se produce el derivado borado de la misma forma que en la estrategia descrita anteriormente.

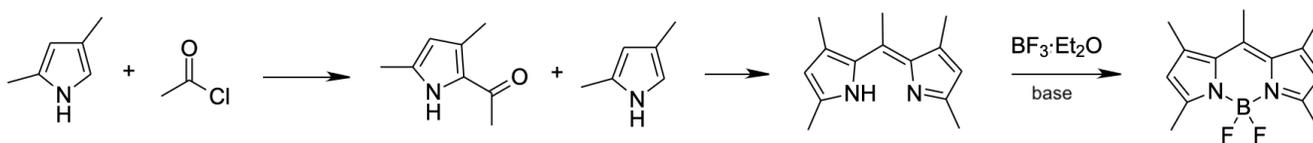


Figura II.6. Estrategia de síntesis de BODIPYs a través de un intermediario dipirrometeno.

Una tercera estrategia, mostrada en la **Figura II.7.**, implica la autocondensación de un pirrol-2-carbaldehído mediada por oxiclورو de fósforo. En primer lugar se colocan a reaccionar un derivado pirrol-carbaldehído de interés junto con POCl_3 a temperatura ambiente. En dicho proceso se forma el dipirrometeno correspondiente mediante la autocondensación del pirrol-carbaldehído. Se ha propuesto que en este proceso se pierde un carbono en forma de monóxido de carbono. Luego, se termina de formar el compuesto mediante la adición de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

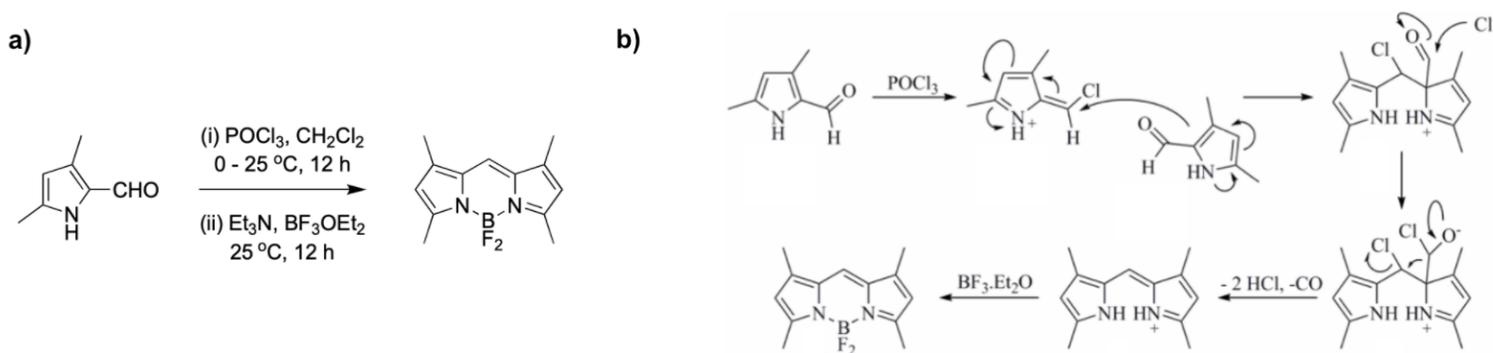


Figura II.7. a) Estrategia de síntesis de BODIPYs utilizando oxiclورو de fósforo. b) Mecanismo de reacción propuesto.

II.III Bioconjugación

De forma amplia, el término bioconjugación hace referencia a la unión de dos o más moléculas mediante un enlace covalente que tiene como resultado la obtención de una molécula de mayor complejidad que combina las propiedades individuales de ambas. De esta forma se pueden combinar tanto compuestos sintéticos como naturales con características individuales conocidas para obtener entidades híbridas que mantengan dichas características y sean capaces de cumplir un propósito específico.²²

La química bio-conjugacional es sumamente importante en la síntesis de sondas así como también en el acople de sondas de imagen con pequeñas moléculas, macromoléculas o nanoestructuras. Existe en la literatura una amplia colección de reacciones químicas y bioquímicas para marcar una gran variedad de grupos funcionales localizados en objetivos moleculares de forma específica en condiciones diversas que van desde *in vitro* hasta *in vivo*. La selección de una estrategia adecuada de bioconjugación es de gran importancia para lograr marcar de forma exitosa las moléculas objetivo para imagenología. A la hora de realizar dicha selección se debe tener en cuenta la compatibilidad de las reacciones a elegir con la molécula objetivo y el medio de reacción, así como también la eficiencia de

la marcación. El marcado de moléculas con fluoróforos o radionucleidos de periodo de semidesintegración corta de corta vida media requiere reacciones con un rendimiento elevado y cinética rápida.

Debido a sus diversos roles como mediadores de actividades y funciones en los organismos, las proteínas suelen ser un blanco preferencial a transformar para lograr realizar una acción de interés tanto *in vitro* como *in vivo*. Debido a lo mencionado anteriormente es que también son un blanco preferencial para las modificaciones bio-conjugacionales. La unión de una proteína a su ligando puede servir como una herramienta de detección y análisis de dicho ligando; siempre que la proteína pueda ser observada mediante algún método. Producir proteínas marcadas con alta especificidad por un ligando de interés es uno de los roles más importantes de las técnicas de bioconjugación. Idealmente, al producir un derivado conjugado de una proteína, la misma debería retener su actividad intacta y sumar una nueva función que le permita ser detectada. A modo de ejemplo, un anticuerpo marcado con un fluoróforo debe ser capaz de reconocer a su antígeno de igual forma que el anticuerpo libre y además emitir fluorescencia.^{22,23}

II.III.a Estrategia de conjugación Bio-ortogonal.

Las distintas reacciones químicas bio-ortogonales han surgido como herramientas capaces de realizar modificaciones químicas sobre biomoléculas en los entornos celulares. Estas implican el uso de grupos funcionales que no suelen encontrarse en los sistemas biológicos, que reaccionan selectivamente entre sí, en un medio acuoso y que son inertes frente a otras funcionalidades biológicas. Entre las reacciones descritas recientemente como bio-ortogonales se destaca la reacción de cicloadición [4+2] entre 1,2,4,5-tetrazinas (TZ) y *trans*-cicloocteno (TCO) como una novedosa herramienta de bioconjugación.^{24,25} En la [Figura II.8](#) se puede observar un esquema de la reacción mencionada.

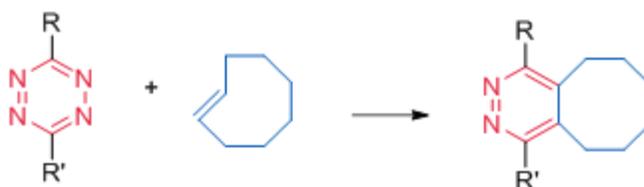


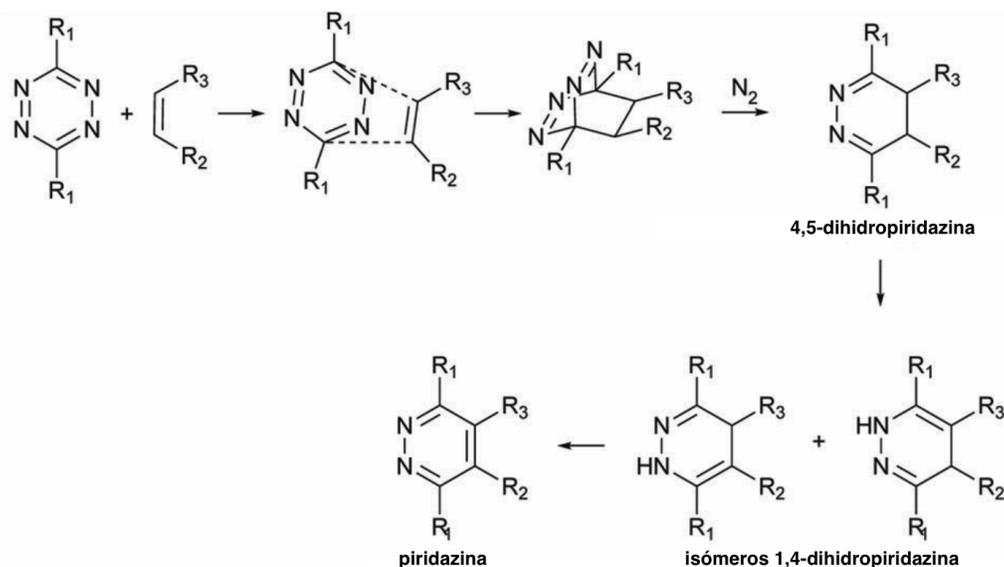
Figura II.8. Reacción de cicloadición entre 1,2,4,5-tetrazinas y *trans*-cicloocteno.

Las reacciones del tipo “click” de cicloadición son muy rápidas. Esto tiene como ventaja que se puede dar a concentraciones bajas, similares a las concentraciones intracelulares de proteínas. Además se dan en condiciones acuosas a pH similar al fisiológico con una alta selectividad. Estas características permiten que dicha reacción sea óptima para aplicaciones biológicas.²⁴

II.III.b Reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones

Las 1,2,4,5-tetrazinas pueden reaccionar a temperatura ambiente con dienofilos ricos en electrones mediante la reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones (IEDDA, del inglés: *Inverse electron-demand Diels–Alder reaction*). Esta reacción se da mediante una adición-1,4 entre el sistema dieno (-C=N-N=C-) de la tetrazina deficiente en electrones y un alqueno, formando un sistema bicíclico

tensionado como se muestra en la [Figura II.9](#). Luego, se produce rápidamente la liberación de un equivalente de N_2 a través de un mecanismo de retro-cicloadición [4+2], para dar la correspondiente 4,5-dihidropiridazina. Dicho compuesto se isomeriza a su 1,4-dihidro-isómero para posteriormente oxidarse a su piridazina correspondiente.²⁴ En la [Figura II.9](#) se puede observar de forma esquemática el mecanismo desarrollado anteriormente.



[Figura II.9](#). Mecanismo de reacción dado entre 1,2,4,5-tetrazinas y un alqueno.

Se han estudiado las cinéticas de las reacciones de Diels-Alder de demanda inversa de electrones entre tetrazinas deficientes en electrones con varios dienofilos lineales y cíclicos.^{14,26} Entre los estudiados, el *trans*-cicloocteno - compuesto que presenta una elevada tensión estructural - fue el reactivo que presentó la cinética más rápida. Las diferencias en constantes de velocidad presentan un aumento de entre 1-3 órdenes de magnitud.^{1,27,28}

Debido a la cinética rápida que presenta la reacción mencionada anteriormente, la misma fue de interés para su aplicación como reacción para bio-conjugaciones. Las tetrazinas obtenidas en el trabajo de Sauer et al. se hidrolizan en agua de forma muy rápida por lo que se estudiaron otras tetrazinas sustituidas.²⁶ El grupo de Fox y colaboradores reemplaza como sustituyente de la tetrazina a los ésteres y grupos trifluorometílicos - que como sustituyentes desplazan fuertemente a los electrones - por grupos aromáticos.²⁹ Dicha sustitución permitió obtener derivados más estables en medio acuoso. Luego, el grupo de Weissleder sustituyó a la tetrazina con un grupo de bencilamina para mejorar aún más la estabilidad y solubilidad de estos compuestos en agua.³⁰ Esto permitió utilizar esta reacción en la bioconjugación de forma efectiva. Algunas de las tetrazinas utilizadas en bioconjugación se muestran en la [Figura II.10](#). Estas reacciones son ortogonales a una gran variedad de estructuras y pueden darse con altos rendimientos en la mayoría de los disolventes orgánicos, en agua, en lisados celulares o también en el medio celular.^{1,30}

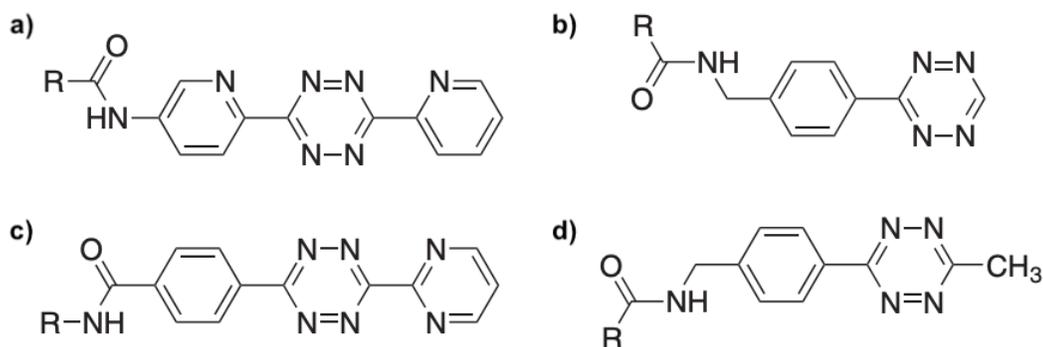


Figura II.10. Ejemplos de tetrazinas sustituidas utilizadas en bioconjugación.

II.III.c Aplicaciones de la reacción entre TZ y TCO en imagen molecular

Tanto el TCO como la tetrazina son inertes frente a nucleófilos del tipo amina o tiol y presentan una elevada especificidad de reacción dentro de los medios biológicos. Además, las reacciones IEDDA se dan con cinéticas rápidas aún cuando la concentración de los reactivos es muy pequeña. Debido a esto, las ligaciones basadas en reacciones IEDDA son de las más utilizadas dentro de las reacciones tipo “click” como herramientas para las estrategias de pre-marcado.³¹

En las estrategias típicas de pre-marcado con reacciones bio-ortogonales, como la mostrada en la [Figura II.11.](#), se utiliza un proceso en dos etapas en el cual la molécula que reconoce al blanco y la sonda se administran por separado. En la primera etapa, se une al blanco molecular primero un anticuerpo - cuyo antígeno es específico de la molécula blanco o célula blanco - conjugado a TCO. De esta forma nuestro blanco se encuentra pre-marcado con el conjunto anticuerpo-TCO. Luego, en una segunda etapa, se administra la sonda unida a una tetrazina para obtener el marcado molecular a través de la reacción de cicloadición correspondiente.³² Se obtiene generalmente un acople eficiente a los 30 minutos del agregado de la tetrazina marcada, a concentraciones sub-micromolar de la misma. Estudios de citometría e imágenes de microscopía confocal muestran que el avance de la reacción depende de forma proporcional al número de moléculas de TCO que se obtengan en cada anticuerpo.³³

Este tipo de procedimiento permite en primer lugar, disminuir el tiempo de biodistribución de la sonda a utilizar. En segundo lugar, permite reducir la captación inespecífica del compuesto por parte de células y tejidos no blanco a través de la incorporación de conectores.³⁴

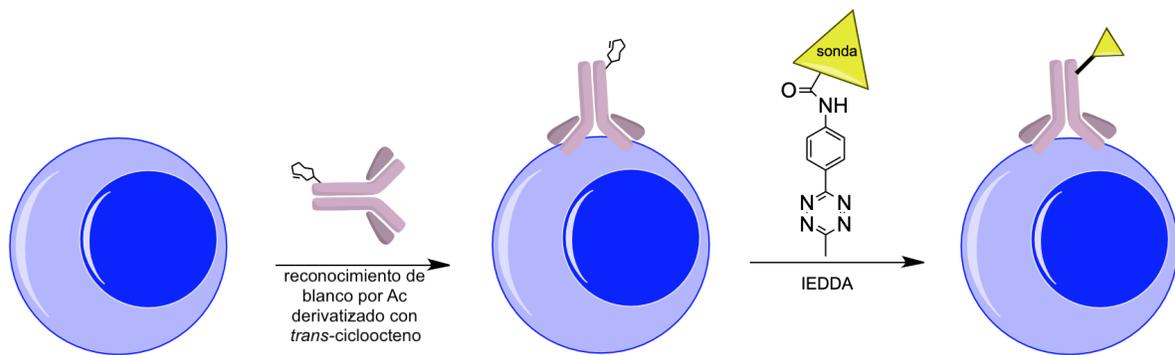


Figura II.11. Estrategia de marcado utilizando pre-marcado.

Recientemente, la química bio-ortogonal ha sido combinada con la utilización de fluoróforos para la visualización de procesos biológicos. Los fluoróforos como sonda mejoran el contraste de imagen. El contraste de imagen es la diferencia entre la señal de mayor intensidad y la señal de menor intensidad de dos puntos de una imagen. Este es importante porque sin él no se puede diferenciar entre la señal de fondo y el límite de resolución del lente utilizado.³⁵

III. Objetivos

III.I Objetivo general

El objetivo general de esta tesina de grado consiste en obtener un derivado de BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos) acoplado al sistema 1,2,4,5-tetrazina y su evaluación como agente de imagen en sistemas biológicos.

III.II Objetivos específicos

- a) Diseño, síntesis y caracterización de un derivado de BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos) acoplado al sistema 1,2,4,5-tetrazina.
- b) Estudiar sus propiedades ópticas.
- c) Evaluar las propiedades fisicoquímicas de estabilidad e hidrofiliicidad/hidrofobicidad.
- d) Estudiar la reacción de cicloadición entre el derivado desarrollado y un derivado *trans*-cicloocteno y evaluar su uso como herramienta de conjugación de biomoléculas.
- e) Estudiar la reacción de cicloadición como estrategia de marcación de biomoléculas en entornos biológicos.
- f) Aplicar la herramienta de bioconjugación desarrollada, en la marcación de un anticuerpo monoclonal (Trastuzumab (Herceptin®)) dirigido específicamente contra receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (c-erbB-2, HER2) utilizando un abordaje de pre-marcado.

IV. Materiales y Métodos

IV.I Materiales

IV.I.a Síntesis Orgánica

Los reactivos utilizados para desarrollar este trabajo experimental fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Algunos de los disolventes anhidros utilizados fueron obtenidos comercialmente de Sigma-Aldrich y el resto fueron destilados y secados previo a su uso en el laboratorio.

Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizó sílica con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254). El revelado de dichas placas fue realizado utilizando luz ultravioleta de 260 nm. La purificación de los productos se llevó a cabo a través de cromatografía en columna y en capa fina preparativa utilizando sílica.

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes especificados en cada caso y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y los multiplicidades se expresan utilizando las abreviaciones estándar: s = singulete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dd = doble doblete, dt = doble triplete y sa = señal ancha. Las constantes de acoplamiento (J) se encuentran expresadas en Hz. Los espectros de correlación homonuclear COSY, y heteronuclear HSQC y HMBC fueron obtenidos utilizando las secuencias de pulsos disponibles en el software del equipo. Todos los espectros obtenidos se analizaron mediante el programa informático Mnova.³⁶

La espectrometría de masas se realiza en un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo TSQ Fortis™, utilizando una fuente de ionización por electrospray. El voltaje de ionización utilizado fue 3000 V, se utilizó una polaridad positiva y una temperatura de ionización de 100 °C.

Los datos espectroscópicos en el UV-Visible fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50. Los datos respecto a la emisión fluorescente de los compuestos en solución se obtuvieron empleando el equipo ChronosFD de ISS. Los datos de absorbancia de los anticuerpos y los conjugados realizados se tomaron empleando el equipo UV-1603 de Shimadzu Corporation. Los datos de emisión del compuesto **4** conjugado a Herceptin-TCO se realizaron en el equipo In-Vivo MS FX PRO de Bruker BioSpin y se analizan utilizando el software de dicho equipo.

Los estudios de HPLC se realizaron en un equipo Agilent Serie Infinity 1200. Para el análisis de compuestos orgánicos se utilizó una columna C18 (Restek, 10 μm , 250 x 4.8 mm), uno de los detectores UV se estableció a 280 nm y el otro a 480 nm.

IV.I.b Evaluación Biológica

Los medios de cultivo se obtienen de Capricorn Scientific. La solución de TripLE™ Express se obtiene de Gibco. El DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) utilizado es preparado según el protocolo

estipulado por el Laboratorio de Genómica Viral y Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.³⁷ El mismo se filtra (filtros de 0.22 μm) y se esteriliza mediante autoclave a 121°C durante 21 minutos.

La línea celular de carcinoma ductal humano BT-474 utilizada fue obtenidas de la colección celular de la ATCC (American Tissue Culture Collection, código ATCC HTB-20™). Dichas células se cultivan a 37°C en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) con 10% de FBS (Suero Fetal Bovino) como suplemento en una atmósfera de 5% de CO₂ (dióxido de carbono). Los experimentos de citometría de flujo son realizados en un equipo BD Accuri™ C6.

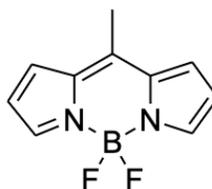
IV.II Métodos

IV.II.a Síntesis orgánica

Síntesis de compuesto 1

Se agregan 0.5 mL (470 mg, 7 mmol) de pirrol destilado en 60 mL de dicloroetano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno en un balón de 250 mL. A dicha mezcla se le agregan gota a gota 0.25 mL de cloruro de acetilo (3.5 mmol). La reacción se deja toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Luego, se añadieron al balón de reacción 3 mL (21 mmol) de trietilamina y 8 mL (65 mmol) de eterato de trifluoruro de boro (BF₃·Et₂O) sobre un baño de hielo y se dejó reaccionar 1 h más. Luego se realiza un lavado con agua del crudo y la fase orgánica obtenida se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante CC, utilizando sílica como fase estacionaria y una mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo 10:1 (v/v). Del proceso de purificación se aisló una banda amarilla fluorescente bajo luz UV de 360 nm. La fracción fluorescente fue secada bajo presión reducida y se obtuvo una masa de 7 mg, por lo que el rendimiento fue del 3%.

Caracterización espectroscópica de compuesto 1



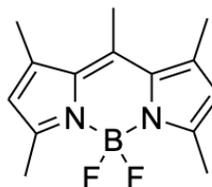
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} (ppm): 7.76 (s, 2H, -pirrol-H), 7.23 (s, 2H, -pirrol-H), 6.47 (s, 2H, -pirrol-H), 2.59 (s, 3H, -CH₃). ¹³C-NMR δ_{C} (ppm): 146 (-CAr), 143 (-CAr), 135 (-CAr), 128 (-CAr), 118 (-CAr), 16 (-CH₃).

Síntesis de compuesto 2

Se agregan 0.7 mL (650 mg, 7 mmol) de 2,4-dimetilpirrol en 60 mL de dicloroetano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno en un balón de 250 mL. A dicha mezcla se le agregan gota a gota 0.25 mL de cloruro de acetilo (3.5 mmol). La reacción se deja toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Luego, se añadieron al balón de reacción 6 mL (42 mmol) de trietilamina y 8 mL (65 mmol) de eterato de trifluoruro de boro (BF₃·Et₂O) sobre un baño de hielo y se dejó reaccionar 1 h más. Luego se realiza un lavado con agua del crudo y la fase orgánica obtenida se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra

y se evapora a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando sílica como fase estacionaria y una mezcla de DCM/hexano 1:1 (v/v). Del proceso de purificación se aisló una banda amarilla fluorescente bajo luz UV de 360 nm. La fracción fluorescente fue secada bajo presión reducida y se obtuvo una masa de 133 mg, por lo que el rendimiento fue del 40%.

Caracterización espectroscópica de compuesto 2

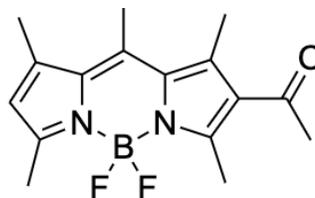


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 6.24 (s, 2H, -pirrol-H), 2.78 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.73 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.68 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.58 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.47 (s, 3H, $-\text{CH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 156.4 ($-\text{CAr}$), 155.3 ($-\text{CAr}$), 148.4 ($-\text{CAr}$), 147.6 ($-\text{CAr}$), 143.2 ($-\text{CAr}$), 139.2 ($-\text{CAr}$), 135.8 ($-\text{CAr}$), 131.2 ($-\text{CAr}$), 129.3 ($-\text{CAr}$), 123.2 ($-\text{CH}$), 121.8 ($-\text{CH}$), 17.3 ($-\text{CH}_3$), 16.5 ($-\text{CH}_3$), 15.9 ($-\text{CH}_3$), 14.7 ($-\text{CH}_3$), 13.6 ($-\text{CH}_3$).

Síntesis de compuesto 3

Primero, se disuelven 360 mg (1,37 mmol) de BODIPY en 60 mL de dicloroetano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno en un balón de 100 mL. En otro balón de 100 mL bajo atmósfera de nitrógeno se colocan 0.5 mL de *N,N* dimetilformamida (DMF) anhidro y en frío (0 - 5 °C) se le añaden gota a gota 0.5 mL de cloruro de fosforilo (POCl_3). Seguidamente, dicha mezcla se deja llegar a temperatura ambiente y se le agregan, empleando jeringa y aguja, los 60 mL de la solución de BODIPY. La mezcla de reacción se coloca con agitación a 50 °C y bajo calentamiento a reflujo durante tres horas. Luego de pasado el tiempo establecido, se retira la reacción del calor y se deja llegar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se detiene con una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) hasta alcanzar un pH de 7-8 unidades. Se procede a extraer la mezcla utilizando diclorometano (DCM) destilado. Al culminar con el proceso de extracción se evapora el disolvente a presión reducida. El producto crudo fue purificado mediante columna cromatográfica utilizando sílica como fase estacionaria y DCM como fase móvil. Se obtuvo como resultado un sólido rojo, 300 mg, rendimiento de 75 %.³⁸

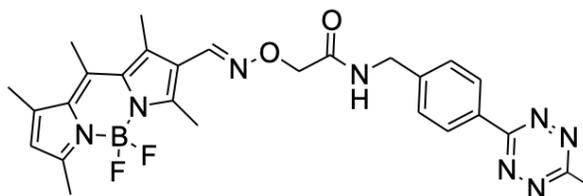
Caracterización espectroscópica de compuesto 3



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 10.10 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 6.24 (s, 1H, -pirrol-H), 2.78 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.73 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.68 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.58 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.47 (s, 3H, $-\text{CH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 186.1 ($-\text{CHO}$), 159.8 ($-\text{CAr}$), 154.9 ($-\text{CAr}$), 145.4 ($-\text{CAr}$), 143.6 ($-\text{CAr}$), 140.1 ($-\text{CAr}$), 134.8 ($-\text{CAr}$), 130.8 ($-\text{CAr}$), 125.7 ($-\text{CAr}$), 124.4 ($-\text{CAr}$), 123 ($-\text{CH}$), 17.9 ($-\text{CH}_3$), 17.1 ($-\text{CH}_3$), 14.9 ($-\text{CH}_3$), 13.9 ($-\text{CH}_3$), 12.6 ($-\text{CH}_3$).

Síntesis de compuesto 4

En un balón de 5 mL se disuelven 16 mg (0.055 mmol) del compuesto **3** en tetrahidrofurano (THF). En otro balón se disuelven 8.5 mg de oxiaminometil-tetrazina en 1 mL de buffer amonio-anilina (pH 4.6, 0.3M anilina). Luego se procede a mezclar el contenido de ambos balones y se deja reaccionar tapado a temperatura ambiente durante quince horas realizando controles mediante CCF durante una hora. Una vez cumplido el tiempo correspondiente se realizan extracciones de la mezcla de reacción con DCM y se evapora el crudo de reacción a vacío hasta llegar a sequedad. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en capa fina preparativa utilizando sílica de fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo:hexano (8:2) como fase móvil. Una vez corrida la placa, se aísla la banda de $R_f = 0.2$ y se resuspende la sílica en DCM para disolver el producto. Luego, la mezcla se filtra al vacío y se evapora en evaporador rotatorio hasta sequedad para obtener un sólido naranja. El rendimiento del proceso es de un 81%.



Caracterización espectroscópica de compuesto 4

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 8.53 (d, 2H, Ar-H), 8.27 (s, 1H, =CH), 7.51 (d, 2H, Ar-H), 6.72 (s, 1H, N-H), 6.16 (s, 1H, -pirrol-H), 4.71 (s, 2H, $-\text{CH}_2$), 4.66 (d, 2H, $-\text{CH}_2$), 3.08 (s, 3H, Tz- CH_3), 2.65 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.58 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.53 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 2.46 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

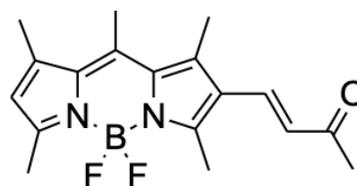
Síntesis de compuesto 5

Las distintas rutas sintéticas ensayadas para la obtención del compuesto **5** se presentan en la [Tabla IV.1](#). También se incluyen las estrategias de purificación empleadas y el rendimiento obtenido para cada caso.

Tabla IV.1. Condiciones ensayadas para la preparación del compuesto 5.

Reactivos	Condiciones	Purificación	Rendimiento
Compuesto 3 (100 mg), acetona (624 μ L)	<i>p</i> -TsOH (80 mg), Na ₂ SO ₄ , EtOH (20 mL), 80°C, 72h	Extracciones DCM / H ₂ O, Cc en sílica y DCM:MeOH (98:2)	-
Compuesto 3 (10 mg), acetona (50 μ L)	DIPEA (10 μ L), DCM (5 mL), N ₂ (g), 120 h	Extracciones DCM / H ₂ O, Cc en sílica y DCM:MeOH (98:2)	-
Compuesto 3 (10 mg), acetona (50 μ L)	K ₂ CO ₃ (7,7 mg), 18-corona-6 (15 mg), DCM (5 mL), N ₂ (g), 120 h	Extracciones DCM / H ₂ O, Cc en sílica y DCM:MeOH (98:2)	-
Compuesto 3 (10 mg), acetona (50 μ L)	NaOH (2.2 mg), DCM (5 mL), N ₂ (g), 120 h	Extracciones DCM / H ₂ O, Cc en sílica y DCM:MeOH (98:2)	-
Compuesto 3 (100 mg), acetona (644 μ L)	<i>p</i> -TsOH (79 mg), Na ₂ SO ₄ , DCM (20 mL), 60°C, 72h, N ₂ (g)	Extracciones NaHCO ₃ / DCM, cromatografía en capa fina en sílica y DCM	5%
Compuesto 3 (100 mg), PhPceton (146 mg)	THF (5 mL), 48 h	Extracciones DCM / H ₂ O, cromatografía en capa fina en sílica y DCM	-
Compuesto 3 (50 mg), PhPceton (73 mg)	Trietilamina (0.03 mL), DCM (15 mL), 72 h	Extracciones DCM / H ₂ O, cromatografía en capa fina en sílica y DCM	15%

Caracterización espectroscópica de compuesto 5



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ _H (ppm): 7.56 (d, 1H, =CH, J = 16.4 Hz), 6.43 (d, 1H, =CH, J = 16.4 Hz), 6.16 (s, 1H, -pirrol-H), 2.67 (s, 3H, -CH₃), 2.66 (s, 3H, -CH₃), 2.55 (s, 3H, -CH₃), 2.50 (s, 6H, -CH₃), 2.45 (s, 3H, -CH₃), 2.36 (s, 3H, -CH₃).

IV.II.b Caracterización fisicoquímica

Determinación de los espectros de absorción y emisión

Para realizar los espectros de emisión y absorción de fluorescencia en el equipo ChronosFD se realizaron soluciones 1 μM y 10 μM en los siguientes disolventes: acetonitrilo, metanol, PBS y tolueno.

Determinación de los espectros de absorbancia

Para realizar los espectros de absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 se realizan soluciones de 1 μM a partir de la solución stock del compuesto **4** (1 mg/mL en AcN) en los siguientes disolventes: acetona, acetonitrilo, metanol y PBS.

Determinación de perfiles de HPLC de los compuestos

Se determinaron los perfiles de HPLC del compuesto **3**, del compuesto **4** y de la Tz de partida utilizando el **método 2**. El **método 2** utilizado implica un flujo isocrático de 50% Agua/TFA 0.1% (A) y 50% ACN (B) durante 22 min (1 mL/min).

Determinación de la estabilidad del Compuesto **4**

La estabilidad *in vitro* del compuesto **4** se evaluó en primer lugar a 25°C en PBS. Para ello, luego de 1, 2, 4, y 8 h de incubación se controló por HPLC el estado del mismo. Además, se evaluó la estabilidad del compuesto **4** en cuatro soluciones de diferentes pH: acetato (pH = 3.5), acetato (pH = 4,6), bicarbonato (pH = 9,1) y buffer fosfato (pH = 11). Luego de una incubación de 2 h en las mismas, se evaluó la integridad del compuesto mediante HPLC. El método 1 utilizado consiste de un gradiente lineal Agua/TFA 0.1% (A) y AcN (B), 0-20 min 0-100% B 2-22 min 100-0% B. El método 2 utilizado implica una mezcla constante de 50% Agua/TFA 0.1% (A) y 50% AcN (B) durante 22 min. Para el análisis que implican anticuerpos se utilizó una columna de proteína Waters. El método 3 utilizado consiste de 100% buffer fosfato (pH = 7) filtrado (A) durante 30 min.

Determinación del coeficiente de reparto

La determinación del coeficiente de reparto fue realizada mediante la técnica "Shake-flask".³⁹ Para ello se incubó con agitación durante 24 horas una concentración de 10 μM de compuesto **4** en 3 mL de una mezcla 1:1 de octanol:PBS. Dicho proceso se realiza por triplicado. Luego de cumplido el tiempo de incubación se separa la fase acuosa y orgánica. Se mide mediante fluorescencia la concentración de compuesto **4** en cada una de dichas fases por triplicado. Con los resultados obtenidos se calcula el log P utilizando la Ecuación IV.1.

$$\log D = \log \left(\frac{[C]_{\text{octanol}}}{[C]_{\text{PBS}}} \right)$$

Ecuación IV.1. Definición del coeficiente de reparto para soluciones en PBS.

Determinación del rendimiento cuántico

La determinación del rendimiento cuántico fue realizada de forma relativa, utilizando el método de punto único con el compuesto **2** como standard.^{40,41} Para ello se realizaron medidas de absorbancia de soluciones 1 μM para ambos compuestos en metanol, utilizando la misma longitud de onda en ambos casos. La longitud de onda utilizada debe ser la misma que se utilice después como longitud de onda de excitación. Según los valores de absorbancia obtenidos, se realizaron diluciones de dichas soluciones de forma tal de lograr una absorbancia de entre 0.04 y 0.05 UA en cada una. No se realizan medidas de absorbancia de 0.05 UA directamente debido al error que conllevaría. Luego, se utilizan las soluciones realizadas para obtener espectros de emisión de fluorescencia, excitando a 490 nm. Utilizando el software del fluorímetro, se integra la curva de emisión obtenida del espectro para ambos compuestos. Una vez obtenidos todos los datos necesarios, se calculó el rendimiento cuántico relativo del compuesto **4**. Como se utiliza el mismo disolvente para ambos fluoróforos, la [Ecuación II.1](#) mencionada en el marco teórico se puede simplificar a la siguiente expresión:

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left(\frac{A_{ST}}{A_x} \right) \left(\frac{E_x}{E_{ST}} \right)$$

Ecuación IV.2. *Definición de rendimiento cuántico relativo. ST hace referencia a los valores correspondientes al compuesto estándar. X hace referencia a los valores relativos al compuesto problema. A representa los valores de absorbancia y E representa la intensidad de fluorescencia integrada.*

Con esta última expresión se halla el valor del rendimiento cuántico relativo del compuesto **4**.

IV.II.c Caracterización *in vitro* del compuesto **4**

Conjugación de trastuzumab con TCO

Para conjugar con TCO se eligió el anticuerpo comercial trastuzumab (anticuerpo anti-HER2). Para la conjugación del mismo, en primer lugar se toman con jeringa estéril 0.3 mL de la solución stock de trastuzumab (440 mg en 20 mL). El volumen obtenido se purifica utilizando un centricon de 30 kDa. Luego se mide la absorbancia a 280 nm de la solución obtenida y se calcula la concentración de dicha solución ($\epsilon = 1.4 \text{ cm mg}^{-1} \text{ mL}$). Una vez obtenida la solución de anticuerpo, se realiza la conjugación con NHS-TCO en una relación molar 10:1 TCO:trastuzumab. Para la conjugación entonces se le agregan 20 μL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (1M, pH = 9.5) a una alícuota de 2 mg (13 nmol) del anticuerpo y se controla la solución resultante con tiras de pH. Luego, se adicionan lentamente 7 μL de NHS-TCO disuelto en DMSO (Click Chemistry Tools, 5 mg/mL, 160 nmol) y PBS (pH = 7.4, 0.3 osmolar) en una cantidad suficiente para lograr un volumen final de 500 μL . La mezcla de reacción obtenida se incuba 30 min en agitación y oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se purifica por PD-10 con PBS (pH = 7.4, 0.3 osmolar) y se determina la concentración final de la misma forma descrita anteriormente. La disolución obtenida se almacena a 4 °C para su uso.

Titulación del conjugado trastuzumab-TCO con el compuesto 4

El número de TCO reactivos por molécula de Herceptin se determinó realizando la cicloadición para relaciones molares crecientes del compuesto 4 respecto al trastuzumab-TCO. En particular, se incubaron alícuotas de 100 µg del anticuerpo conjugado con 1, 3, 5, 7, 9 y 10 equivalentes del compuesto 4. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min. Luego, se sembraron alícuotas de cada reacción en un gel de poliacrilamida al 10% y se resolvieron mediante electroforesis utilizando un buffer de corrida TAE al 1%. Se adquieren y procesan las imágenes del gel utilizando el software Bruker Multispectral. Se determinó la cantidad de compuesto 4 unido mediante la fluorescencia asociada a las bandas de trastuzumab-TCO. Luego también se realizó la tinción de proteínas con azul de Coomassie para confirmar la ubicación de las bandas trastuzumab-TCO y el marcador de peso molecular.

ELISA

Para realizar el ensayo de elisa se utiliza una placa de 96 pocillos (Greiner bio-one 655061). En primer lugar se incuba toda la noche 100 µL de una solución del receptor Her2 recombinante humano (4 µg/µL, YCP1045 Speed BioSystems) a los pocillos problema y 100 µL de una solución de BSA (4 µg/µL) a los pocillos control. Al otro día, se descarta la solución de los pocillos y se realizan tres lavados con PBS-Tween 0.2%. Luego, se adicionan 300 µL de solución de bloqueo PBS-BSA 5% a todos los pocillos y se deja incubar 1 h. Después de descartar la solución de bloqueo, se realizan otros tres lavados con PBS-Tween 0.2%. A continuación, se realizan los tratamientos correspondientes de los pocillos. A dos pocillos (uno con BSA y otro con HER2 siempre) se les adiciona 100 µL de trastuzumab-TCO 0.1 µg/µL conjugado el día anterior. A otros dos pocillos se les adiciona trastuzumab-TCO-compuesto 4 0.1 µg/µL, también conjugado el día anterior. Por último, al último par de pocillos se les adiciona trastuzumab-TCO-Cy3 0.1 mg/mL conjugado previamente. Las soluciones mencionadas se dejan incubar durante 1 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se realizan tres lavados con PBS-Tween 0.2%. Luego se adicionan 100 µL de compuesto 4 (7 eq) a los pocillos donde se incubó trastuzumab-TCO y se deja reaccionar durante 1 h a 37 °C. Se elimina la solución y se realizan tres lavados con PBS-Tween 0.2% sobre estos últimos pocillos. Para finalizar, se mide la fluorescencia de los pocillos de la placa.

Cultivo Celular

Para realizar los subcultivos de las células primero se lavan los cultivos con una solución de buffer DPBS (pH = 7.4 y osmolaridad = 0.3). Este paso permite eliminar completamente el medio de cultivo suplementado de las células y por lo tanto asegurar que sus componentes no interfieran con la acción del método químico elegido para disgregar las células del cultivo. Luego de realizado el lavado, se utiliza una solución de tripsina-EDTA (0.05% m/v en buffer DPBS) o TrypLE™ Express para obtener la suspensión de células que será utilizada para realizar el subcultivo o el ensayo pertinente. El EDTA colabora quelando el ion calcio que participa en las uniones celulares mediadas por cadherinas, provocando su desorganización y facilitando el acceso a las proteasas. La solución de TrypLE™ Express utilizada presenta una proteasa recombinante pura y EDTA (1.1 mM). Como dicha enzima no

es de origen animal se encuentra libre de otros posibles contaminantes proteicos y resulta en un disgregado celular más suave y controlado.

Citometría de flujo

Para realizar los ensayos de citometría de flujo se crece la línea celular a ensayar con su medio de cultivo correspondiente a 37 °C y en atmósfera controlada con 5% de CO₂ hasta obtener un 85% de confluencia. Una vez alcanzada dicha confluencia, se levantan las células utilizando TrypLE™, se centrifugan y se cuentan. Una vez contadas las células, las mismas se lavan con un volumen apropiado de PBS 0.5% BSA. Las mismas se centrifugan y se fijan con una solución de 2% de PFA en frío durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo estipulado, las células se centrifugan y lavan dos veces con PBS 0.5% BSA. Luego se realiza el bloqueo de las células, para ello se incuban con una solución de PBS 5% BSA durante 20 minutos. Tras realizar el bloqueo, se realizan dos lavados con PBS 0.5% BSA. Al finalizar los lavados, se realizan alícuotas de forma tal de obtener 3×10^5 células en 200 µL para cada condición a ensayar. Se incuban a las alícuotas con los anticuerpos marcados durante 2 horas a 4 °C y a 37 °C. Después de que se realiza la tinción se lavan las células dos veces con PBS 0.5% BSA. Por último, se resuspenden las células en 200 µL de PBS.

V. Resultados y Discusión

V.I Química

En la presente tesina de grado se planteó como objetivo químico central el diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de al menos un compuesto híbrido capaz de actuar como sonda fluorescente y de reaccionar de forma bio-ortogonal, al portar el fragmento tetrazina, con un derivado *trans*-cicloocteno (Figura V.I.1.). Como primera aproximación para cumplir con dicho objetivo se realizó el diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de una sonda fluorescente BODIPY y derivados estructurales de ésta. Para ello, se aprovecharon, además de las características excelentes de los mismos como fluoróforos, el “*know how*” adquirido de los trabajos de investigación previos realizados en el grupo^{11,12}. Además, se seleccionaron derivados de tetrazina según la experiencia en química bio-ortogonal previa del grupo y se adquirieron de proveedores reconocidos.^{9,10}

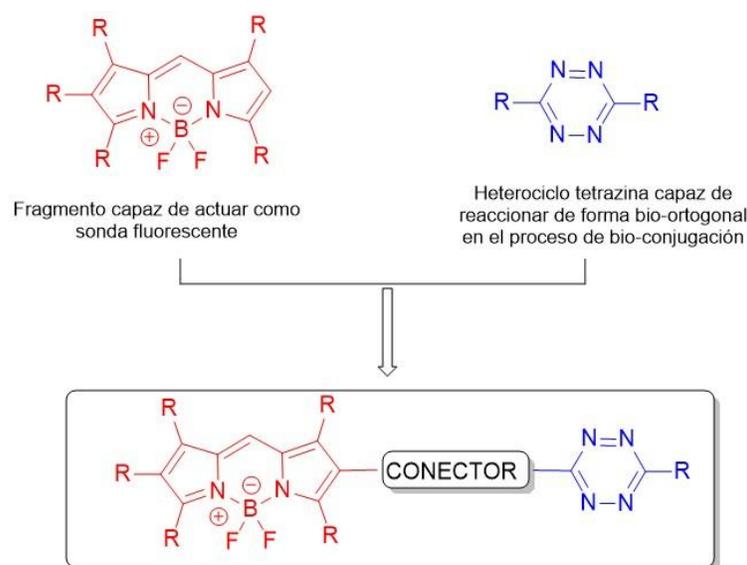


Figura V.I.1. Esquema de la estrategia de trabajo planteada. Representación de la estructura química general de la sonda fluorescente BODIPY, del fragmento tetrazina y del producto híbrido objeto de dicho trabajo final de tesis.

En primer lugar, se buscó preparar 8-metil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos (8-metilBODIPY) siguiendo la estrategia mostrada en la Figura V.I.2. Para ello, se agregaron 2 equivalentes de pirrol recién destilado en 60 mL de diclorometano que fue previamente destilado y secado. A la solución anterior se le agregó 1 equivalente de cloruro de acetilo gota a gota y se dejó 12 h a temperatura ambiente con agitación. De esta forma, se pretende lograr que el pirrol excedente se encuentre disponible para reaccionar con el 2-acetilpirrol formado para producir el dipirrometeno de interés. Transcurrido el tiempo establecido, se agregan 3 mL (21 mmol) de trietilamina y 8 mL (65 mmol) de eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) en baño de hielo para formar el complejo borado fluorescente. Una vez agregados dichos reactivos, la mezcla se deja reaccionar 2 h más. Se obtiene un crudo rojo oscuro. Para el work-up, se realiza un lavado con agua del crudo y la fase orgánica obtenida se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando sílica como fase estacionaria y una

mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo 10:1 (v/v) como fase móvil.⁴² Se aislaron dos bandas, una naranja y una rosada; ambas resultaron ser fluorescentes a 280 nm y 400 nm. Luego, ambas fracciones se secaron a presión reducida para obtener masas de 0.3 mg y 0.1 mg respectivamente. Dichas bandas se analizaron mediante RMN y se determinó que el producto de interés se corresponde con la banda rosada. El rendimiento de la reacción obtenido fue de 3 %, lo cual fue muy desalentador como rendimiento de un reactivo de partida para el producto de interés. La reacción se realizó una vez más, cambiando el disolvente por DCM anhidro, pero no se logró mejorar el rendimiento obtenido. Cabe destacar que en la bibliografía utilizada se plantea un rendimiento de entre un 21% y un 33% para la obtención del producto, debido a lo cual se había seleccionado dicha estrategia de síntesis. Aunque se intentaron emular las condiciones sintéticas planteadas, no se obtuvieron resultados semejantes.

Es importante resaltar que las posiciones α de los dipirrometenos y del núcleo BODIPY son susceptibles a ser atacadas por nucleófilos. Se encuentran reportes en bibliografía de casos en los cuales una vez formado el intermediario dipirrometeno en la síntesis del núcleo BODIPY, dicho intermediario es atacado en posición α por una molécula adicional de pirrol.⁴² Se plantea entonces que la banda naranja observada durante el proceso de purificación se deba a la formación de dicho producto secundario.

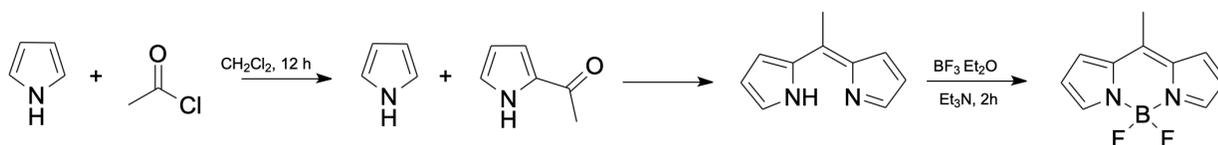


Figura V.1.2. Estrategia de síntesis de 8-metilBODIPY.

El rendimiento de la síntesis del 8-metilBODIPY fue extremadamente bajo como para poder utilizarlo como reactivo de partida para la ruta sintética de interés. Debido a esto, se buscó diseñar una ruta sintética alternativa para la preparación del BODIPY de partida. Para ello se eligió utilizar el 2,4-dimetilpirrol como reactivo para la preparación de 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (1,3,5,7,8-pentametilBODIPY, (Figura V.1.3). Utilizando un pirrol sustituido, se protegen las posiciones α , intentando evitar la formación de productos secundarios. La síntesis se realizó de forma similar al proceso sintético anterior. Para dicha reacción se agregaron 2 equivalentes de 2,4-dimetilpirrol recién destilado en 60 mL de diclorometano seco, bajo atmósfera de nitrógeno. A esta disolución se le agregó gota a gota, un equivalente de cloruro de acetilo. La mezcla de reacción se dejó toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Luego, se añadieron al balón de reacción 6 mL (42 mmol) de trietilamina y 8 mL (65 mmol) de éterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) sobre un baño de hielo para formar el complejo fluorescente. Tras agregar los últimos dos reactivos a la mezcla de reacción, la misma se deja en agitación durante 1 h. Para el work-up, se realiza un lavado con agua del crudo y la fase orgánica obtenida se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando sílica como fase estacionaria y una mezcla de DCM/hexano 1:1 (v/v) como fase móvil. Del proceso de purificación se aisló una banda amarilla fluorescente bajo luz UV de 360 nm. La fracción fluorescente fue secada bajo presión reducida y se

obtuvo una masa de 0.254 g, por lo que el rendimiento fue del 40 %. El producto obtenido fue analizado mediante RMN, pudiendo determinar su estructura y su pureza.

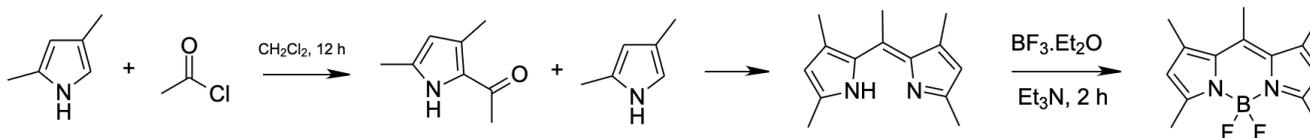


Figura V.I.3. Estrategia de síntesis de 1,3,5,7,8-pentametilBODIPY.

En la química del pirrol, la deslocalización del par de electrones libre del nitrógeno del mismo provee de una mayor densidad de carga negativa a los carbonos del anillo permitiendo que reaccione a través de reacciones de sustitución electrofílica aromática. Esto sucede también en los demás sistemas π excedentes como el furano y el tiofeno.⁴³ Dichas reacciones producen de forma mayoritaria derivados sustituidos en la posición α , es decir, sobre el C2. Esto puede explicarse analizando los intermedios de reacción posibles producidos en la reacción luego de ataques sobre cada una de las posiciones. En la **Figura V.I.4** se puede observar la deslocalización de cargas producida cuando un electrófilo se adiciona tanto en posición α como en posición β . Como se puede observar en la figura mencionada, en los ataques sobre la posición α la carga positiva generada se distribuye entre tres átomos (N, C3 y C5) mientras que en los ataques sobre la posición β se distribuye entre dos átomos (N, C2). Como en los ataques sobre la posición α se da una redistribución de cargas por resonancia entre más átomos, el intermedio catiónico a formar es más estable y por lo tanto, la barrera energética a sobrepasar para obtenerlo es más pequeña.⁴⁴ Esto último puede observarse en el diagrama de energía potencial de la **Figura V.I.4**.

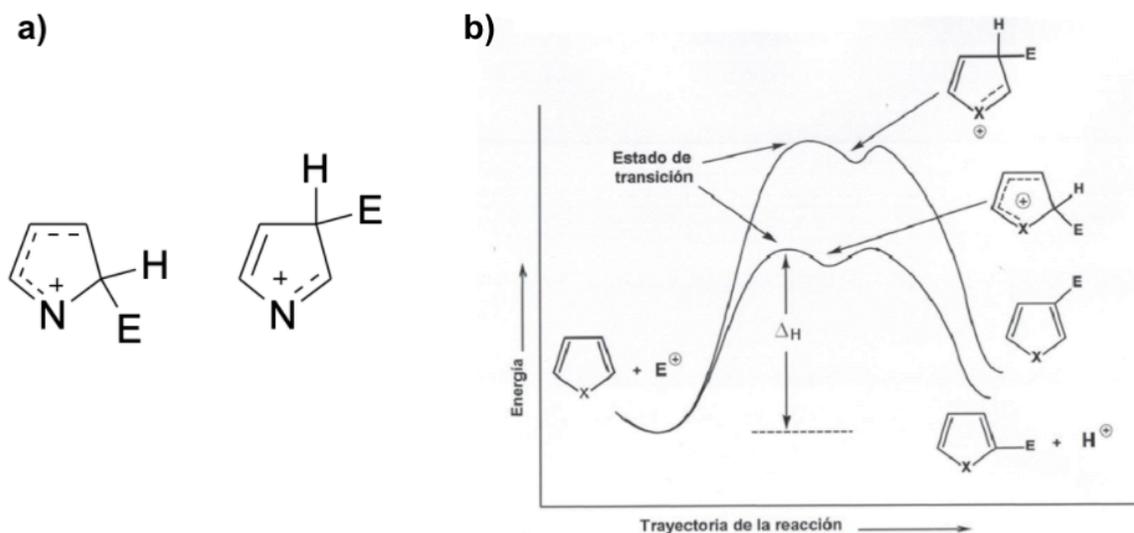
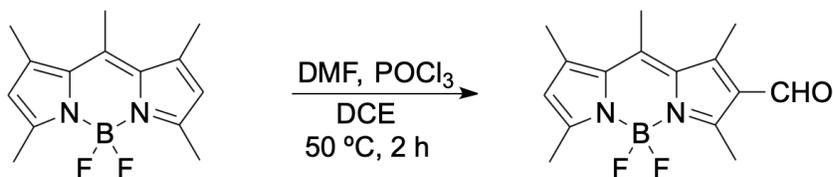


Figura V.I.4. a) Deslocalización de cargas del intermediario de reacción. b) Diagrama de energía potencial vs. coordenada de reacción

Una vez formado el intermediario catiónico, se recupera la aromaticidad del heterociclo mediante la pérdida del protón del carbono α . El derivado 2-acetilpirrol formado a través de dicha sustitución electrofílica aromática vuelve a reaccionar en la ruta de síntesis planteada. En este caso, el pirrol

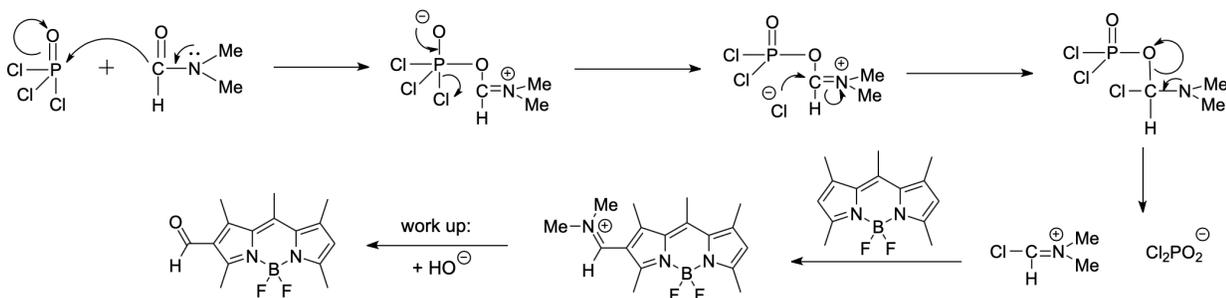
excedente presente en la mezcla de reacción actúa como nucleófilo en otra sustitución electrofílica aromática, atacando al carbonilo del 2-acetilpirrol para formar el metil-dipirrometeno correspondiente. La descripción del mecanismo sintético planteado es válida para las dos síntesis de derivados BODIPY realizadas.

Una vez que se obtuvo el reactivo de partida en cantidades suficientes, se realizó la síntesis del compuesto **3**, mediante la acilación de 1,3,5,7,8-pentametilBODIPY. Dicho compuesto se logró sintetizar con un rendimiento del 65 % siguiendo la estrategia planteada en la [Figura V.I.5](#). En primer lugar, se mezclan con agitación magnética en un balón con atmósfera de nitrógeno y sobre un baño de hielo, DMF anhidro y un equivalente de oxiclórico de fósforo. Por otro lado, en otro balón se disuelve un equivalente del compuesto **2** (1,3,5,7,8-pentametil BODIPY) bajo atmósfera de nitrógeno en DCE anhidro. Luego se agrega el contenido del segundo balón al primero y se lleva la mezcla de reacción a 50 °C en un baño de aceite. La reacción transcurre durante 2 horas y luego se realiza el work-up del crudo. El mismo presenta un aspecto rojo oscuro, no traslúcido. Luego de agregar un volumen suficiente de una solución saturada de bicarbonato de sodio de forma tal de alcanzar un pH = 7, se realizan extracciones de la fase acuosa con DCM. Una vez obtenida la fase orgánica, esta se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora al vacío. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna. La primera banda de dicha cromatografía corresponde al pentametil bodipy sin reaccionar y la segunda banda se corresponde con el compuesto **3**.



[Figura V.I.5](#). Estrategia de síntesis para la formilación del BODIPY.

La adición de uno o dos grupos funcionales aldehído a las posiciones β del complejo bodipy central se encuentra bien caracterizada en la literatura.^{38,45-47} Esta reacción se da a través de un mecanismo del tipo Vilsmeier-Haack,⁴⁸ mostrado paso a paso en el [Esquema V.I.1](#), en el cual en primer lugar se forma *in situ* el electrófilo de Vilsmeier mediante la interacción de un equivalente de DMF con un equivalente de POCl₃. Una vez formado el ion iminio electrófilo, la reacción procede a través de un mecanismo de sustitución electrofílica aromática, en este caso, sobre una de las posiciones β del BODIPY. Para lograr obtener el grupo aldehído como producto final debe darse la hidrólisis del ión iminio mediante el agregado de una solución básica.



Esquema V.I.1. Mecanismo de Vilsmeier-Haak adaptado a la síntesis descrita.

Para lograr identificar los productos intermedios y los productos finales, en esta tesis de grado se ha trabajado, fundamentalmente, con la técnica de RMN. La misma constituye una herramienta fundamental para la determinación estructural de compuestos orgánicos. Entre sus características principales se destacan: 1- Requiere pequeñas cantidades de muestra; 2- Generalmente permite recuperar la muestra analizada; 3- Proporciona gran cantidad de información acerca de la estructura del compuesto; 4- En el caso de moléculas relativamente sencillas puede proporcionar la estructura de la misma; 5- se puede utilizar con gran variedad de núcleos: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P (ya que cualquier átomo con número atómico o masa atómica impar tiene *spin nuclear* y se puede analizar mediante un equipo de resonancia).

Como se menciona en el punto 3, en los espectros de RMN se puede recabar información diversa sobre las moléculas analizadas. En el caso del espectro unidimensional de resonancia magnética de protón, ^1H -RMN, dentro de esta información se puede destacar: el número de protones diferentes que presenta la molécula, la cantidad presente de cada tipo de protón, el entorno químico de los distintos protones encontrados (característica que se refleja en el desplazamiento químico de los protones) y la relación existente entre los grupos de protones vecinos (reflejado en la multiplicidad/desdoblamiento de las señales). En el espectro de ^1H -RMN correspondiente al compuesto **3** ([Figura V.I.6](#)) se pueden observar todas las características mencionadas anteriormente.

Los espectros unidimensionales de resonancia magnética nuclear de carbono, ^{13}C -RMN, también nos brindan información estructural importante. Con esta técnica se puede obtener información respecto al número de carbonos diferentes presentes en la molécula problema y del entorno químico de dichos carbonos. Como el tiempo de relajación de los distintos carbonos es diferente, en este caso no se puede extrapolar el número de átomos que presentan el mismo comportamiento de la integración de las señales. Asimismo, como el ^{13}C no es un isótopo muy abundante, en estos espectros no se observan acoplamientos entre carbonos vecinos.

Los espectros de RMN bidimensionales también aportaron información importante para la elucidación estructural de los productos de interés obtenidos en este trabajo final. En particular, se utilizaron las técnicas COSY, HSQC y HMBC que serán descritas a continuación. La espectroscopía de correlación homonuclear, también denominada por su acrónimo del inglés COSY, es una espectroscopía en dos dimensiones de resonancia magnética nuclear de protón. En estos espectros se exponen las relaciones entre protones a través de dos y en algunas situaciones de tres enlaces de distancia. Es decir, se observan todos los acoplamientos que cada hidrógeno de la molécula tiene con los hidrógenos que lo rodean. Las espectroscopías de correlación heteronuclear entre ^{13}C y ^1H nos dan

información sobre la conectividad entre los distintos átomos de carbono y los distintos átomos de hidrógeno. En el caso de los espectros de HSQC (del inglés, *Heteronuclear Single-Quantum Coherence*) la información dada sobre los acoplamientos entre núcleos distintos está limitada a un enlace de distancia. Los espectros de HMBC (del inglés, *Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity*) en cambio, permiten obtener información de acoplamientos a largas distancias: entre dos y cuatro enlaces.

Analizando la Figura V.I.6 se puede identificar que la señal que aparece a mayor desplazamiento químico (absorción a campos magnéticos bajos), 10.10 ppm, se corresponde con el protón del grupo funcional aldehído (Ha), con área de integración relativa igual a 1. Como era de esperarse esta señal presenta multiplicidad de tipo singulete. El desplazamiento observado es consecuencia del efecto atractor de electrones que presenta el oxígeno y de la circulación de electrones dada en el doble enlace. Ambos efectos producen la desprotección del núcleo del protón aldehídico al reducir la densidad de electrones alrededor del mismo, lo que provoca que el campo magnético aplicado efectivo sea mayor y por lo tanto, que la señal se encuentre a campo abajo. La siguiente señal observada en el espectro se encuentra a 6.24 ppm y se corresponde con el protón del heterociclo (Hg). Esta señal también presenta una integración relativa igual a 1 y multiplicidad de tipo singulete. En este caso, el desplazamiento químico observado puede explicarse mediante la deslocalización de electrones que ocurre en el BODIPY. Luego, las cinco señales correspondientes a protones metílicos del compuesto **3** (15H) pueden asignarse a los singuletes ubicados en la región de desplazamientos químicos menor a 3 ppm con integración relativa para cada una de ellas igual a 3. Estas últimas señales mencionadas se encuentran señaladas en la Figura V.I.6 con un recuadro.

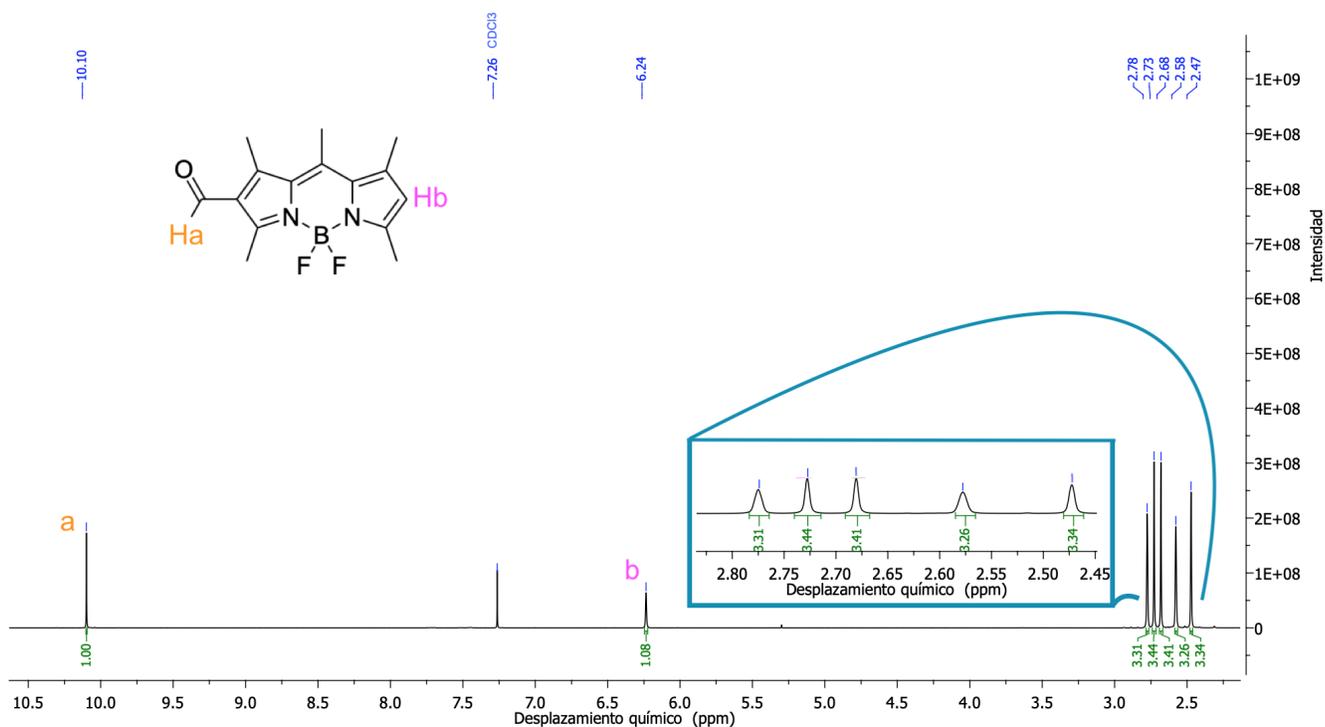


Figura V.I.6. Espectro ^1H -RMN correspondiente al compuesto **3** analizado utilizando el software MestReNova. El compuesto **3** se señala especificando los distintos protones correspondientes en el espectro.

A partir del compuesto **3**, se plantean las dos estrategias de síntesis para la preparación de entidades híbridas (Figura V.I.7). En primer lugar, se buscó conjugar el compuesto **3** directamente con un derivado de tetrazina. En segundo lugar, se buscaron estrategias para realizar la condensación aldólica del compuesto **3** con acetona para luego realizar la conjugación con un derivado de tetrazina. Estas estrategias se trabajaron en paralelo.

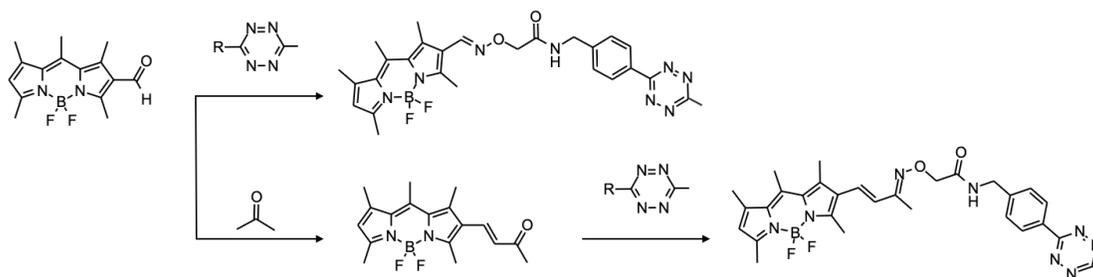


Figura V.I.7. Estrategias de síntesis planteadas a partir del compuesto **3**.

Para sintetizar el compuesto **4** se siguió la estrategia de reacción mostrada en la Figura V.I.8. Al culminar el proceso sintético se purificó y secó el producto, obteniéndose un rendimiento de 81,2%. Para confirmar la estructura de la molécula obtenida se realizaron los correspondientes estudios espectroscópicos, ^1H -RMN, COSY, HSQC, HMBC y ^{13}C -RMN. En la Figura V.I.9 se puede observar el espectro ^1H -RMN correspondiente.

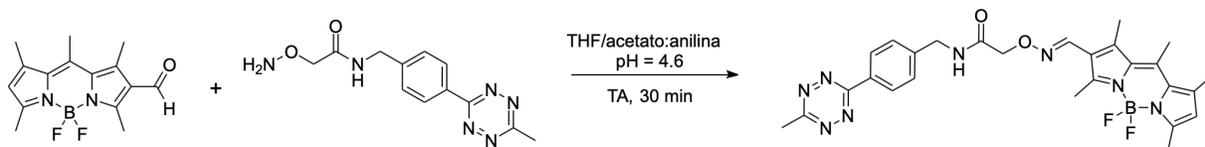


Figura V.I.8. Estrategia de síntesis correspondiente al compuesto 4.

Analizando el espectro de ^1H -RMN mostrado en la [Figura V.I.9](#), se puede observar que no se encuentra la señal ubicada a 10.10 ppm en el espectro, lo que indica la ausencia del grupo funcional aldehído, perteneciente a uno de los reactivos de partida, en el producto aislado. La señal a mayor desplazamiento químico en este espectro se ubica a 8.53 ppm, presenta una integración igual a 2 y se corresponde con los protones aromáticos Ha:Ha'. Dicho desplazamiento químico se diferencia del resto de los protones debido a dos efectos desblindantes. El primero es un efecto propio de los anillos aromáticos cuyos electrones deslocalizados producen una corriente que genera un campo magnético inducido anular que hacia las afueras del anillo, donde se encuentran estos protones, refuerza el campo aplicado. El segundo efecto se debe a la cercanía del heterociclo tetrazina. La sumatoria de ambos efectos provocan que los protones en cuestión resuenen a campos más bajos. La multiplicidad de espín para este conjunto de núcleos es del tipo doblete con una $J = 8.4$ Hz sugiriendo que se está frente a un sistema *para*-disustituido. Se puede deducir que el siguiente doblete presente en el espectro, cuya señal se encuentra ubicada a 7.51 ppm, también se corresponde con el sistema fenilo debido a que presenta una $J = 8.2$ Hz, muy similar a la de los protones Ha:Ha', una integración relativa de 2 y presenta un desplazamiento químico coherente con protones aromáticos. Además, al examinar estas dos señales se puede observar que las intensidades de las mismas se encuentran distorsionadas: las líneas internas se encuentran aumentadas respecto a las líneas externas. Este fenómeno se denomina de forma coloquial como efecto techo y se puede utilizar como indicio de hacia qué zona del espectro están los protones que acoplan con cada tipo de núcleo. Continuando con el análisis del espectro, la señal ubicada en 8.27 ppm presenta una multiplicidad de singulete y una integración relativa de 1. Esta señal se corresponde con el protón del grupo imino presente en el compuesto (Hb). Cabe destacar que los grupos imino ($\text{C}=\text{N}$) no presentan libre rotación por lo que dichos grupos funcionales posibilitan la formación de isómeros geométricos *Z/E* al formar parte de las moléculas. En el espectro obtenido se observa una única señal en esta posición, lo que indica la presencia de un solo isómero geométrico: el isómero E. La siguiente señal a analizar en el espectro se encuentra a 6.72 ppm. Esta presenta una integración relativa de 1 y un perfil más ancho que el resto de las señales observadas. Dicha señal ancha es típica de protones susceptibles al intercambio en solución como son los protones enlazados directamente a nitrógeno de los grupos amida. Debido a lo mencionado anteriormente podemos concluir que la señal se corresponde al protón Hd representado en la estructura del compuesto 4 en la [Figura V.I.9](#). Se puede verificar esta asignación mediante la multiplicidad de la señal ya que, siguiendo la regla $n + 1$, la multiplicidad debería ser igual a 3 debido al acoplamiento con los dos protones Hg. A continuación, la siguiente señal del espectro a analizar se encuentra a 6.16 ppm, presenta una integración relativa de 1 y una multiplicidad del tipo singulete. Esta señal también se encuentra en el espectro de ^1H -RMN del compuesto 3 con un desplazamiento químico muy similar (6.24 ppm) y se corresponde con el protón heterocíclico de la estructura central BODIPY (He). Las siguientes señales presentes en el espectro se corresponden con los dos pares de

protones metilénicos del compuesto **4**. Ambas señales presentan una integración relativa de dos 2. La señal ubicada campo abajo en el espectro presenta una multiplicidad del tipo singulete. Debido a esto, dicha señal se asigna a los protones Hf ya que en la molécula los mismos no poseen protones vecinos. La señal ubicada campo arriba presenta una multiplicidad del tipo doblete con un $J = 6.2$ Hz y se atribuye entonces a los protones Hg. Para poder definir con certeza con qué protones se están acoplando los mismos, se analizará más adelante en el trabajo la espectroscopía de correlación bidimensional homonuclear COSY del compuesto **4**.

Las señales que restan por analizar del espectro presentado en la [Figura V.I.9](#) se corresponden todas a protones metílicos. A 3.08 ppm se observa una señal con multiplicidad de tipo singulete y área de integración relativa de 3 que se corresponde con el grupo metilo que sustituye al fragmento tartrazina del compuesto. Los protones de este grupo se encuentran más desprotegidos del campo magnético aplicado por el efecto desblindante del fragmento tetrazina al cual se encuentran enlazados. Las señales restantes del espectro, todas con multiplicidad de tipo singulete, se corresponden con los 15 protones metílicos descritos previamente como sustituyentes del fragmento BODIPY en el espectro del compuesto **3** ([Figura V.I.6](#)).

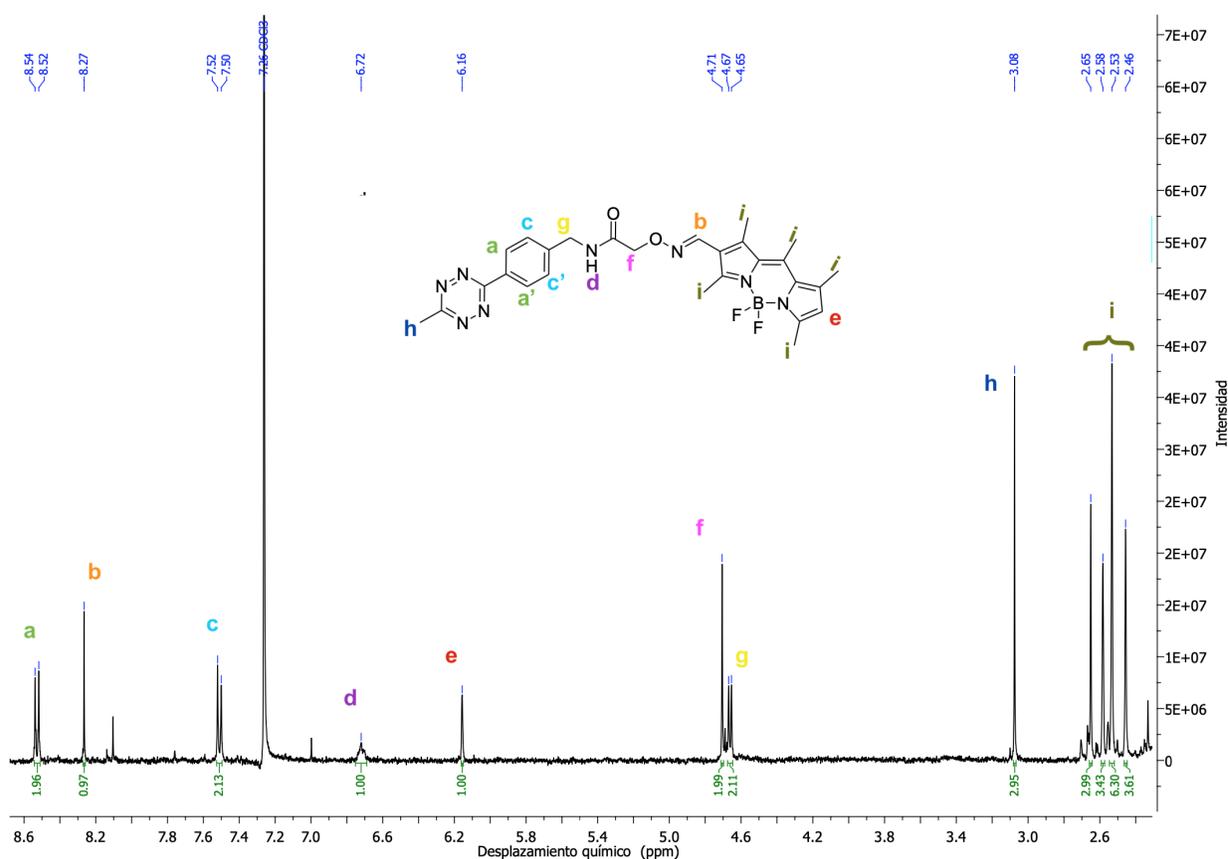


Figura V.I.9. Espectro ¹H-RMN correspondiente al compuesto **4** analizado utilizando el software MestReNova. El compuesto **4** se encuentra incluido en la figura, sobre el mismo se han etiquetado los distintos protones presentes y dichas etiquetas se corresponden con las señales identificadas en el espectro.

Las asignaciones de las señales realizadas anteriormente se corroboraron mediante espectroscopía de correlación bidimensional heteronuclear HMBC y espectroscopía de correlación bidimensional homonuclear COSY. Como se comentó anteriormente, los experimentos del tipo HMBC permiten detectar y relacionar protones y carbonos que se encuentran a 2 o 3 enlaces de distancia, como es el caso del metilo que sustituye a la tetrazina ([Figura V.I.10](#)). En el espectro mostrado, se puede observar una señal en la intersección de las proyecciones de las señales producidas en los dos espectros que forman los ejes (^{13}C , ^1H), ubicadas en 167 ppm ($\delta^{13}\text{C}$) y 3.08 ppm ($\delta^1\text{H}$) respectivamente. La presencia de dicha señal indica el acoplamiento entre los núcleos involucrados y demuestra que la conectividad planteada entre los mismos es la correcta. Además, poder determinar esta señal es de suma importancia debido a que en determinadas condiciones, el heterociclo de tetrazina puede sufrir reacciones de apertura de ciclo. Dichas reacciones conllevan la pérdida de acetonitrilo como se puede observar más adelante, en el análisis de la espectrometría de masas realizada para el compuesto **4**. Debido a lo mencionado anteriormente, la persistencia del acoplamiento en cuestión es indicativa de la conservación de dicho fragmento dentro del producto obtenido.

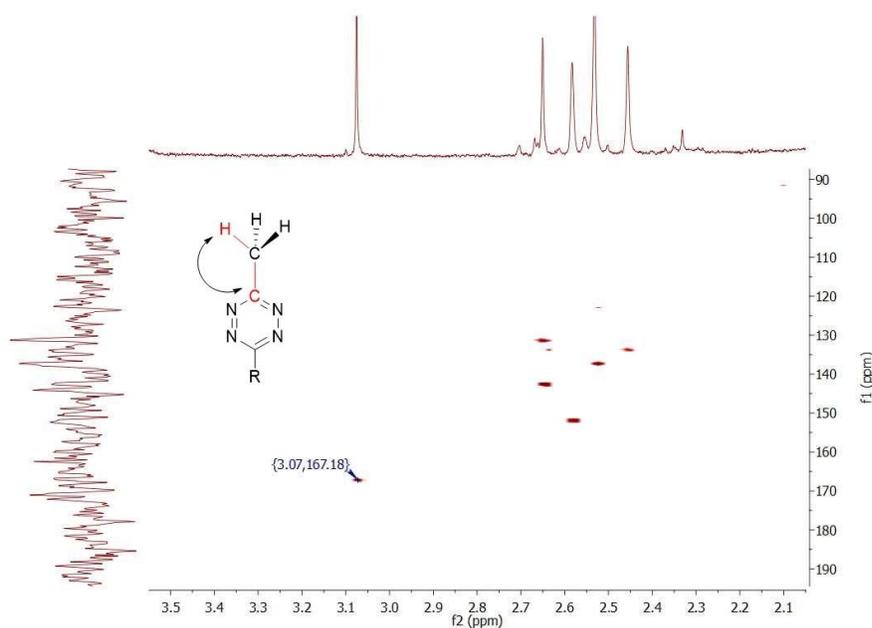


Figura V.I.10. Espectro HMBC correspondiente al compuesto **4** analizado utilizando el software MestReNova.

En la figura se encuentra incluida la estructura del segmento tetrazina correspondiente al compuesto **4**.

En el espectro COSY se puede observar los acoplamientos que presenta cada protón con sus correspondientes protones vecinales (si los presenta). Debido a esto, las señales observadas en la diagonal del espectro son triviales y se corresponden con las señales de autocorrelación de los protones de la molécula. El resto del espectro es simétrico respecto a este eje, de forma tal que se representan las señales de acoplamiento de los protones correspondientes a $\delta_{\text{Ha}}\delta_{\text{Hb}}$ a un lado de la diagonal y las señales correspondientes a $\delta_{\text{Hb}}\delta_{\text{Ha}}$ al otro lado de la diagonal. En el espectro mostrado en la [Figura V.I.11](#) se puede observar un conjunto de señales en la intersección de los desplazamientos químicos 6.73 y 4.66 que también se puede observar al otro lado de la diagonal, en la intersección de los desplazamientos químicos 4.67 y 6.70. Ambas señales evidencian la correlación

entre los núcleos que producen las señales individuales. En este caso, las señales resaltadas evidencian la correlación entre los dos núcleos metínicos asignados a Hg y el protón Hd.

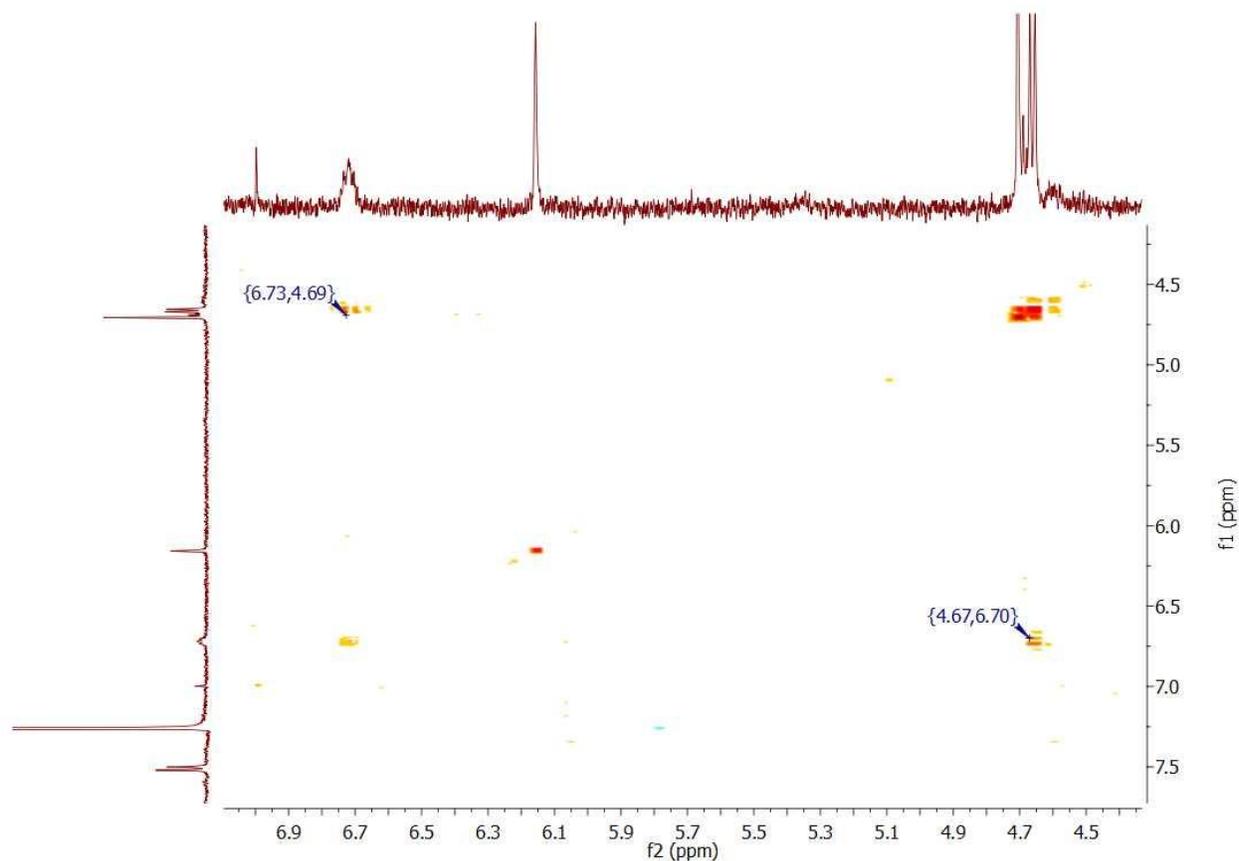


Figura V.I.11. Espectro COSY correspondiente al compuesto **4** analizado utilizando el software MestReNova. Se encuentran señalados los desplazamientos químicos correspondientes a los protones Hd (δ 6.70) y Hg (δ 4.67).

Además de los espectros de resonancia magnética nuclear, se utilizó la espectrometría de masas para confirmar la estructura del compuesto **4**. Dicha técnica está basada en la obtención de iones a partir de la vaporización de moléculas orgánicas. Luego, los iones obtenidos son separados según la relación de masa atómica y carga que presentan (m/z). Por último, los iones inciden sobre el detector y se recuentan las señales obtenidas. De esta forma se obtiene un gráfico de barras verticales en el cual se observan los diferentes fragmentos iónicos de las moléculas por su m/z y su abundancia respecto al resto de los fragmentos detectados. El espectro obtenido para el compuesto **4** se puede observar a continuación en la [Figura V.I.12](#).

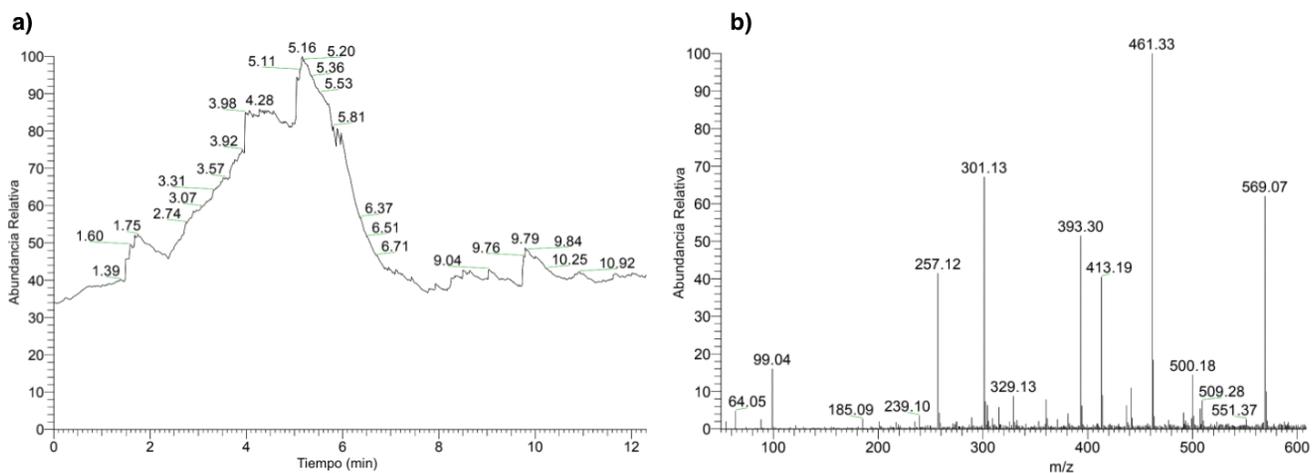


Figura V.I.12. a) Cromatograma correspondiente al experimento de espectrometría de masas del compuesto **4**.
b) Espectro de masas correspondiente al minuto 6 del cromatograma.

En el espectro observado en la [Figura V.I.12](#) se puede destacar un pico correspondiente a una relación m/z de 569.14. Dicha señal se corresponde con el ión molecular del compuesto **4** sumado el valor de peso molecular del sodio ($[M+Na]^+$). Dicho pico no es el que representa la mayor abundancia en el espectro. La señal correspondiente a un valor de 461 m/z es la señal más intensa presente en el espectro obtenido. En la [Figura V.I.13](#) se proponen dos patrones de fragmentación posibles para la población de moléculas ionizadas del compuesto **4**. Los patrones mencionados explican algunas de las señales de menor relación m/z observadas en el espectro. En el patrón de fragmentación de la sección a) de la figura mencionada anteriormente, se propone una estructura para el ión más abundante. La estructura propuesta es parte de un patrón de fragmentación típico de tetrazinas.⁴⁹ Dicho patrón implica la pérdida de acetonitrilo y nitrógeno molecular por parte de la tetrazina. Además, se propone que el compuesto **4** pierde un átomo de flúor para obtener la estructura correspondiente a la relación m/z en cuestión. Fragmentaciones aún mayores explican la señal obtenida para la relación m/z de 413. En particular, dicha señal implica la pérdida de otro átomo de flúor y otra molécula de acetonitrilo. Por último, en la sección b) de la [Figura V.I.13](#) se presenta un patrón de fragmentación en el cual se conserva la estructura del fragmento tetrazina pero dicho fragmento se escinde del fragmento pentametil-BODIPY a través de la ruptura del enlace N-O del compuesto **4**. Sumado a la pérdida de un protón, se obtiene entonces una estructura adecuada para la señal correspondiente a 257.

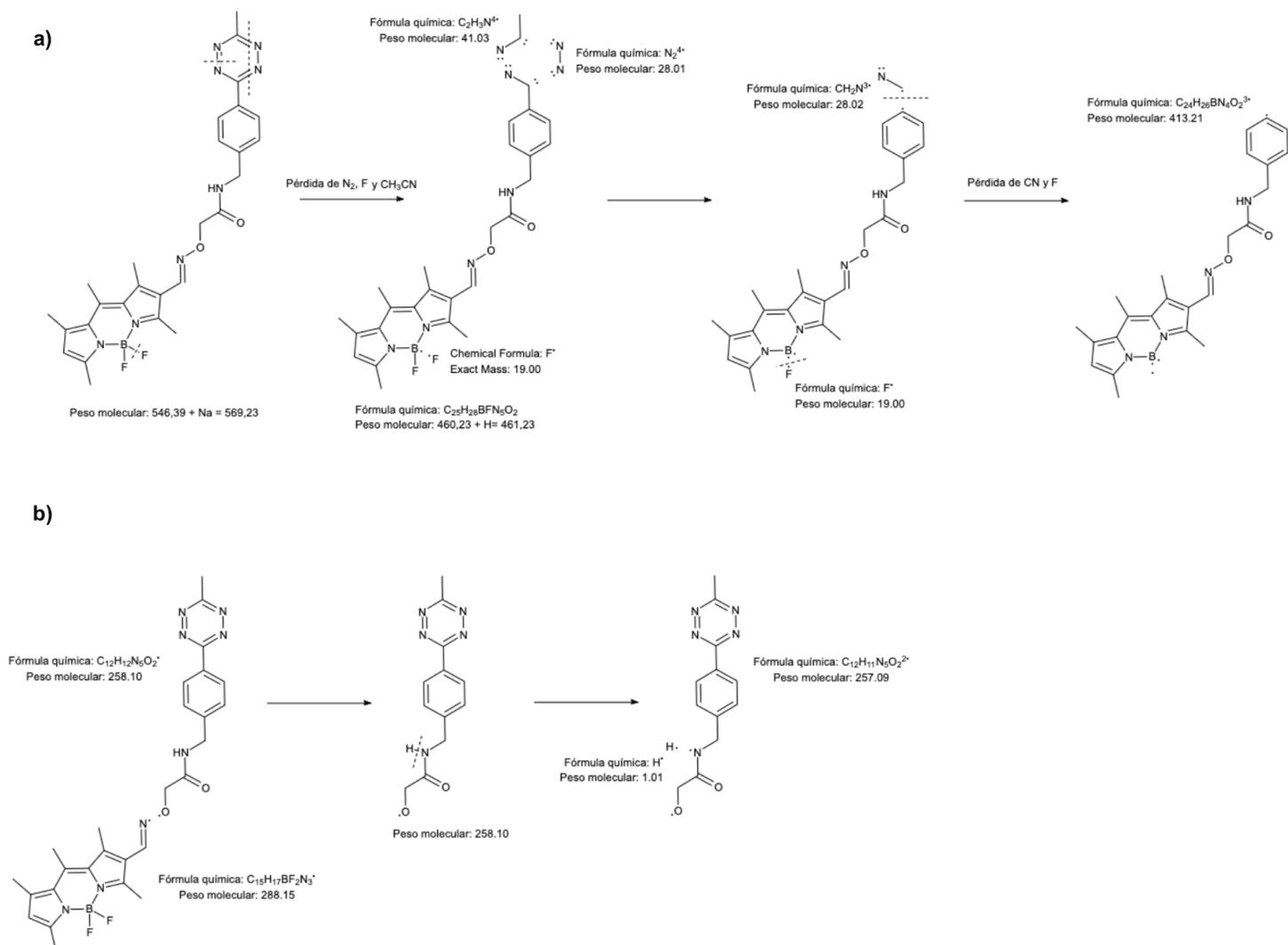


Figura V.I.13. Fragmentos propuestos. a) Patrón de fragmentación 1 propuesto para algunos iones del compuesto 4. b) Patrón de fragmentación 2 propuesto para otros iones del compuesto 4.

Para realizar la síntesis del compuesto **5** se siguieron las estrategias de síntesis mostradas en la Figura V.I.14. Como primera aproximación para obtener el producto en cuestión, se buscó realizar la condensación aldólica en medio ácido, utilizando *p*-TsOH y etanol como disolvente. La reacción se siguió mediante CCF durante 72 h pero no se observó la formación de una nueva especie fluorescente. Luego, se realizó la condensación aldólica en medio básico. En esta instancia, se evaluaron tres condiciones diferentes (Figura V.I.14), utilizando tres bases distintas. Además, la reacción se realizó en atmósfera de N_2 y utilizando DCM como disolvente. Se siguieron las reacciones mediante CCF pero solo se observó la degradación del compuesto **3**. Uno de los posibles problemas de esta aproximación puede ser la poca solubilidad de las bases utilizadas en el disolvente elegido. Se volvió a ensayar la reacción en condiciones de condensación aldólica en medio ácido, cambiando el disolvente por DCM y utilizando atmósfera de N_2 . Al seguir el avance de reacción en dichas condiciones, sí se pudo observar la formación de un nuevo compuesto fluorescente. Una vez que se dejó de observar - de forma cualitativa - un aumento en la intensidad de la banda del producto

obtenido, se procedió a realizar el work-up y la purificación del crudo de reacción. A partir de este método se logró obtener el producto **5** con un rendimiento de reacción del 5%.

Dado el bajo rendimiento de reacción obtenido utilizando estrategias de reacción del tipo condensación aldólica, se buscó encontrar otra estrategia que mejorara el resultado obtenido. Para ello, se resolvió utilizar condiciones de reacción del tipo Wittig.⁵⁰ Luego de sintetizar el iluro correspondiente (Figura V.I.14), se procedió a realizar la condensación con el compuesto **3**. En este caso, también se ensayaron dos condiciones diferentes, obteniendo el producto **5** en solo una de ellas. Dicha reacción presentó un rendimiento del 15% para la obtención del compuesto de interés.

Dicho compuesto se caracterizó mediante ¹H-RMN. Más adelante, se buscará conjugar dicho producto con un derivado de tetrazina para obtener otra sonda capaz de participar de reacciones bio-ortogonales.

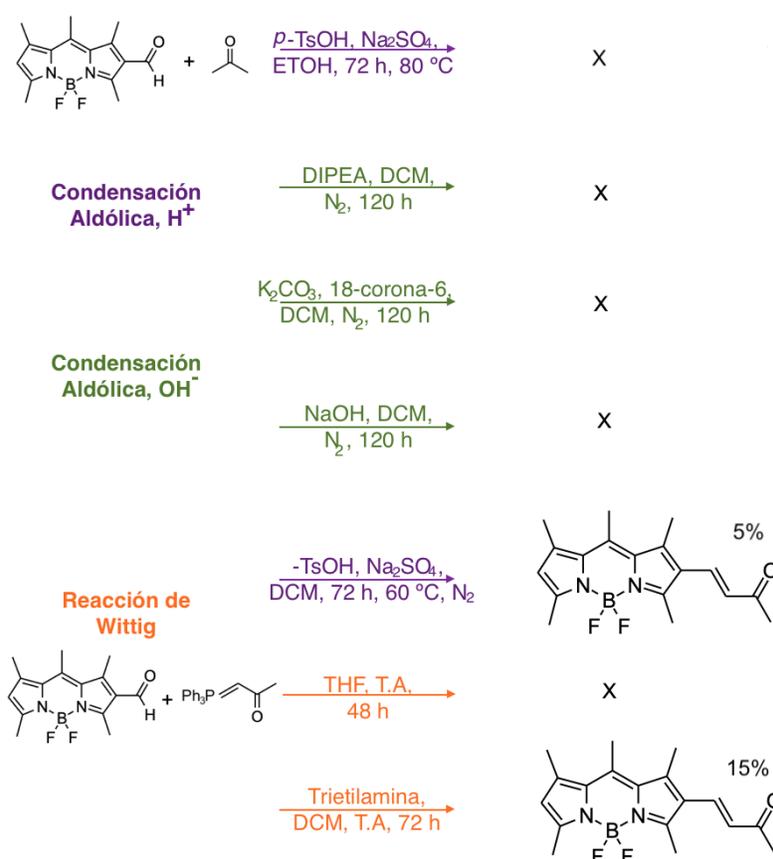


Figura V.I.14. Estrategias de reacción utilizadas para sintetizar el compuesto **5**.

Un aspecto relevante a resaltar de la etapa de purificación de nuestros intermedios y productos finales fue la aparición de señales correspondientes a impurezas en los espectros de ¹H-RMN realizados luego de la aislación de dichos productos a través de CCF preparativa. Al utilizar este método de purificación, se encontraron de forma sistemática las mismas señales en todos los productos aislados. Las señales mencionadas se encuentran resaltadas en los espectros de ¹H-RMN mostrados en la Figura V.I.15. También fueron encontradas estas señales en productos obtenidos por otros integrantes del laboratorio que se encontraban trabajando en otras línea de investigación. Debido a esto, se

dedujo que la contaminación debía ser un extractable de algunos de los implementos de laboratorio utilizados en común. Además, analizando las señales observadas en los espectros se planteó la posibilidad de que el contaminante sea un plastificante como por ejemplo: didecil ftalato.

Se realizaron varias pruebas para intentar detectar el origen de dicha contaminación con plastificantes. Entre estas, se sustituyó el uso de jeringas descartables estériles para sembrar las placas preparativas por jeringas de vidrio y capilares del mismo material. Este cambio no eliminó la aparición de la impureza. Luego, se sustituyeron los septos utilizados en las reacciones. Se incubaron los septos previamente utilizados en las condiciones de reacción para intentar obtener una muestra de la impureza, pero no se logró encontrar la impureza en la muestra obtenida a partir de los septos. Resta corroborar que la impureza pueda encontrarse en la sílica utilizada para las preparativas o en su envase ya que es el último punto en común entre los distintos productos contaminados.

Cabe destacar que dicha contaminación no se encuentra en los espectros de productos purificados a través de CC. Además, a través de dicho método, fue posible eliminar el contaminante de los productos afectados.

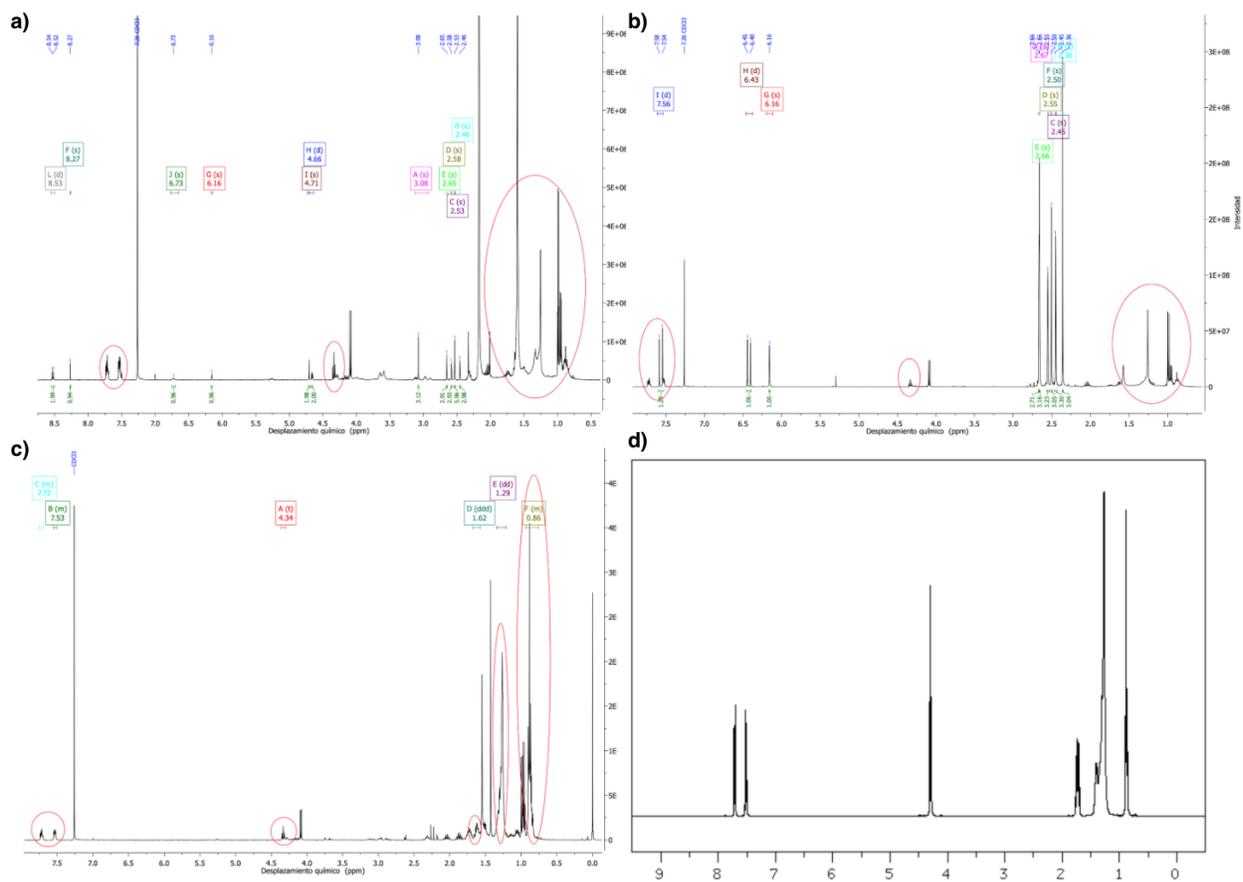


Figura V.I.15. Espectro ¹H-RMN correspondiente a algunos de los compuestos sintetizados contaminados junto al espectro del posible contaminante propuesto. a) ¹H-RMN correspondiente al compuesto 4. b) ¹H-RMN correspondiente al compuesto 5. c) ¹H-RMN correspondiente al contaminante. d) ¹H-RMN correspondiente al didecil ftalato.⁵¹

V.I.a Estudios fotofísicos

Una vez determinada la estructura del compuesto **4** y confirmar que el mismo se encuentra puro, se procedió a realizar la caracterización de las propiedades fisicoquímicas del mismo. En primer lugar se realizaron estudios de excitación y emisión de la luz en distintos disolventes. Para ello se realizaron soluciones de 1 μM y 10 μM en tolueno, acetonitrilo, metanol y PBS. Las mismas fueron medidas utilizando una longitud de onda de excitación de 515 nm y una longitud de onda de emisión de 540 nm. Los espectros correspondientes a las soluciones de concentración 1 μM obtenidos se encuentran exhibidos en la [Figura V.I.15](#). En dicha figura se puede observar el pequeño corrimiento de Stokes que presentan los espectros. La diferencia entre los picos se encuentra en el rango de 20 nm.

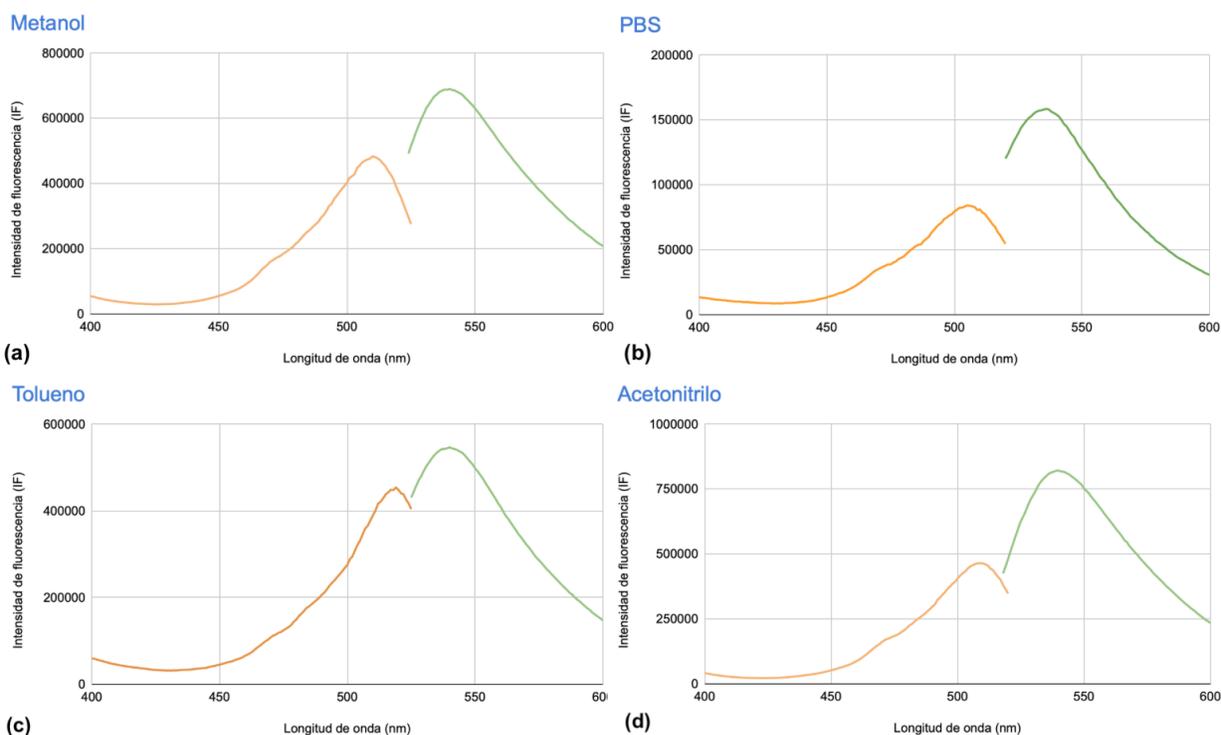


Figura V.I.15. Espectros de emisión y excitación del compuesto **4** en distintos disolventes. Las curvas en naranja se corresponden con los espectros de excitación mientras que las curvas en verde se corresponden con los espectros de emisión. Los disolventes utilizados son: **a)** metanol, **b)** PBS, **c)** tolueno y **d)** acetonitrilo.

Los valores máximos de intensidad de fluorescencia obtenidos en los distintos espectros de excitación y emisión para las soluciones 1 μM se pueden observar en la [Tabla V.I.1](#). En dicha tabla, los disolventes se encuentran en orden de polaridad creciente. Como se puede observar, los valores de longitud de onda correspondientes a los máximos de emisión en los diferentes disolventes no presentan una variación significativa entre sí. Como se mencionó en el marco teórico, los efectos que los disolventes pueden tener sobre la emisión de los fluoróforos depende de su polaridad. En este caso, como no hay una variación de los máximos de emisión hacia longitudes de onda mayores conforme aumenta la polaridad de los disolventes, podemos afirmar que no hay un efecto de los disolventes en la emisión del compuesto **4**. A su vez, tampoco hay un patrón claro de variación de la intensidad de fluorescencia obtenida en relación a la polaridad del disolvente utilizado.

Tabla V.I.1. Valores de los máximos de emisión obtenidos a partir de los estudios de fluorescencia realizados.

Disolvente	URF _{máx} Emisión	$\lambda_{máx}$ Emisión
Tolueno	54.7 x 10 ⁴	540 nm
MeOH	69.0 x 10 ⁴	540 nm
AcN	82.2 x 10 ⁴	540 nm
PBS	15.9 x 10 ⁴	536 nm

En segundo lugar, se realizaron los espectros de absorbancia del compuesto **4** en distintos disolventes. Para ello se utilizaron las soluciones de concentración 1 μ M previamente preparadas para los solventes: acetona, acetonitrilo, metanol y PBS. Se obtuvieron los espectros de absorbancia en el rango de longitudes de onda entre los 350 y los 520 nm como se puede observar en la Figura V.I.16. Asimismo, en la Tabla V.I.2 se exponen los coeficientes de absorptividad molar obtenidos para cada disolvente y los respectivos máximos de absorción.

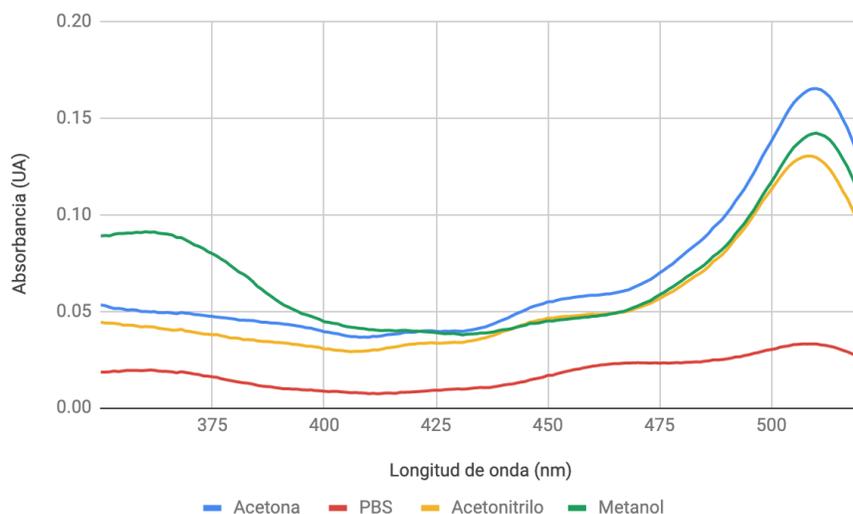


Figura V.I.16. Espectros de absorbancia del compuesto **4** en distintos disolventes. En azul se observa la absorbancia correspondiente a la solución en acetona. En rojo se observa la absorbancia correspondiente a la solución en PBS. En amarillo se observa la absorbancia correspondiente a la solución en acetonitrilo. En verde se observa la absorbancia correspondiente a la solución en metanol.

Como se puede observar en la Figura V.I.16., los espectros del compuesto **4** presentan dos máximos de absorbancia. El pico de absorbancia correspondiente a 350 nm es un pico ancho y poco intenso. El pico correspondiente a los 520 nm es más agudo e intenso. Dicha señal se corresponde a transiciones del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y es el que será utilizado para realizar las medidas de concentración del compuesto **4** en el presente trabajo.

Tabla V.I.2. Datos de longitud de onda correspondientes a los máximos de absorbancia y los coeficientes de absorptividad molar obtenidos.

Disolvente	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$ Absorbancia
Acetona	16.5×10^3	510 nm
MeOH	14.2×10^3	510 nm
AcN	13.0×10^3	508 nm
PBS	3.3×10^3	506 nm

Una vez obtenido el espectro de absorbancia del compuesto **4** se procedió a realizar su perfil de HPLC utilizando el método 1 y siguiendo la absorbancia a 480 nm. Se eligió dicha absorbancia dentro de las disponibles entre los detectores del equipo. El perfil obtenido se puede observar en la Figura V.I.17. Se puede destacar del mismo que hay una única señal presente y tiempo de retención de 19 minutos 40 segundos. Como se observa solo un pico se puede comprobar nuevamente la pureza del compuesto.

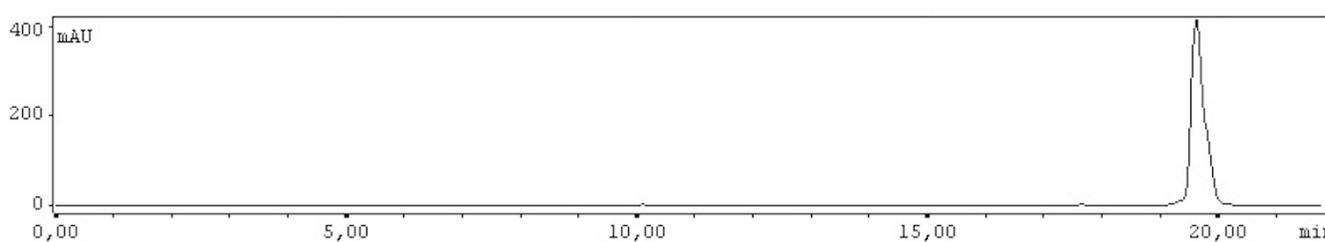


Figura V.I.17. Perfil de HPLC del compuesto **4** utilizando el método 1.

Una vez determinado el perfil de HPLC del compuesto **4** utilizando el método 1, se procedió a realizar ensayos de estabilidad *in vitro* de dicha molécula. Los resultados de los ensayos de estabilidad se evalúan por HPLC y se comparan con el obtenido en la Figura V.I.17. La evaluación de la estabilidad del compuesto **4** fue realizada utilizando cinco soluciones amortiguadoras diferentes: acetato (pH = 3.5), acetato (pH = 4,6), fosfato/PBS (pH = 7), bicarbonato (pH = 9,1) y buffer fosfato (pH = 11).

En primer lugar, se incubó al compuesto **4** en PBS a 25°C y se realizaron observaciones de alícuotas tomadas a distintos tiempos mediante el seguimiento de la absorbancia a 480 nm en HPLC. Se evaluó la mezcla al inicio de la incubación (T0) y también a una (T1), dos (T2), cuatro (T3) y ocho (T4) horas de iniciada la misma. Los resultados obtenidos pueden observarse a continuación en la Figura V.I.18.

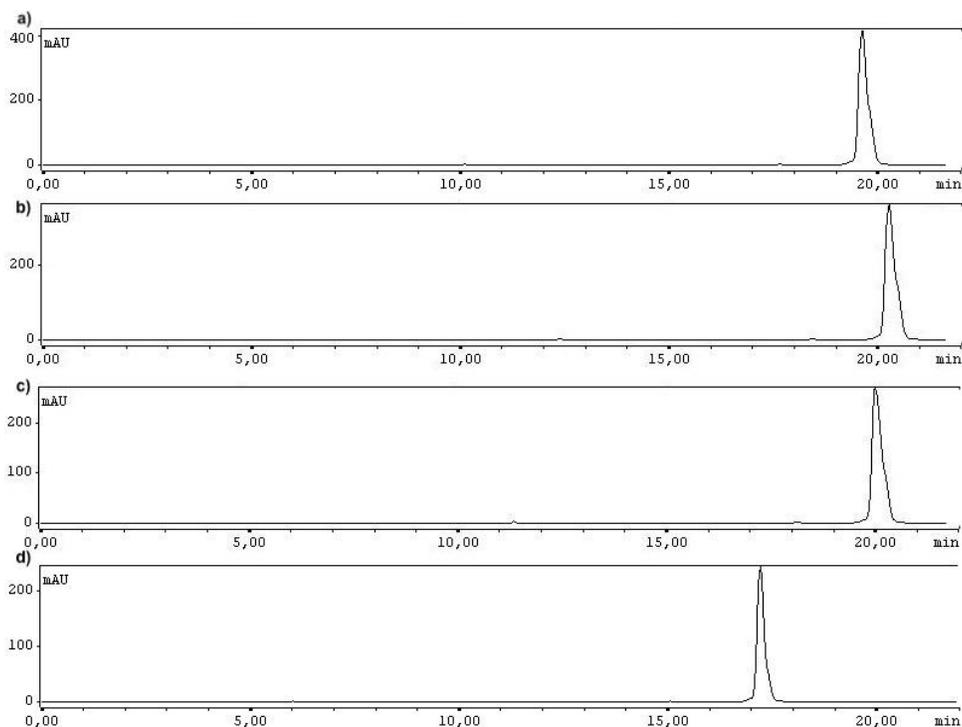


Figura V.I.18. Perfil de HPLC de estabilidad en PBS (pH = 7.4) durante 8h. **a)** Perfil de la alícuota tomada luego de una hora de incubación (T1). **b)** Perfil de la alícuota tomada luego de dos horas de incubación (T2). **c)** Perfil de la alícuota tomada luego de cuatro horas de incubación (T3). **d)** Perfil de la alícuota tomada luego de ocho horas de incubación (T4).

Como se puede observar en la [Figura V.I.18](#) no hay un aumento en la cantidad de señales presentes en el perfil de HPLC a medida que transcurre el tiempo de incubación en la solución amortiguadora. A su vez, tampoco se modifica la forma de la señal observada para el compuesto **4** en ninguno de los perfiles obtenidos. La señal permanece aguda y presenta la misma intensidad en todos los perfiles. Dicho esto, sí se puede visualizar un cambio en el tiempo de retención de la molécula luego de transcurridas las 8 h de incubación. La señal correspondiente al compuesto **4** luego de las 8 h presenta un tiempo de retención de 17 minutos 10 segundos. Debido a dicho cambio, se analizaron los cromatogramas presentados por el equipo de HPLC para los picos de las cuatro corridas y no se observaron cambios en los mismos. Como todos los cromatogramas son iguales, es difícil determinar si el cambio en el tiempo de retención observado a las 8 h de incubación se debe a la descomposición del producto. Para poder resolver esta interrogante sería oportuno realizar ensayos de HPLC acoplados a espectrometría de masas de alícuotas de los diferentes tiempos de incubación.

A su vez, se evaluó la estabilidad del compuesto **4** luego de una incubación de dos horas a distintos valores de pH para las siguientes soluciones amortiguadoras: acetato (pH = 3.5), acetato (pH = 4,6), bicarbonato (pH = 9,1) y fosfato (pH = 11).

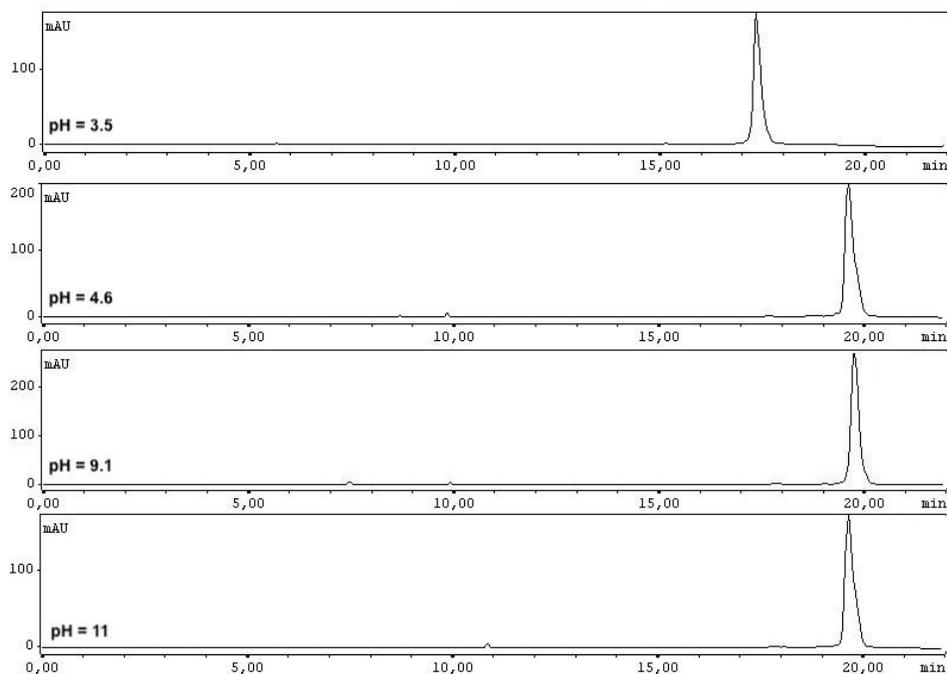


Figura V.I.19. Perfiles de HPLC a distintos pH. En orden de arriba hacia abajo: pH = 3.5, pH = 4.6, pH = 9.1 y pH = 11.

En la [Figura V.I.19](#) se puede resaltar que los perfiles para las alícuotas incubadas a los pH = 4.6, pH = 9.1 y pH = 11 son prácticamente iguales entre sí e iguales también al perfil inicial mostrado para el compuesto **4** en la [Figura V.I.17](#). Debido a esto, se puede concluir que el compuesto **4** es estable durante al menos 2 horas a dichos pH.

Respecto al perfil correspondiente a la incubación a pH = 3.5, se puede observar un cambio en el tiempo de retención de la molécula. Dicho tiempo de retención es menor, de 17 minutos con 25 segundos. Asimismo, las demás características del perfil de HPLC obtenido se mantienen igual a las del patrón mostrado en la [Figura V.I.17](#). Esto último podría implicar que el cambio en el tiempo de retención podría deberse a un cambio en la protonación del compuesto **4** y no a una descomposición del mismo. Para comprobar dicho supuesto se podría realizar el ensayo nuevamente pero utilizando un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas. De esta forma, se podría obtener el perfil de señales correspondientes a la estructura presente en el pico de tiempo de retención 17 minutos con 25 segundos. En el espectro de masas obtenido se puede buscar la presencia del ion molecular correspondiente a la masa del compuesto **4** o también se puede comparar el espectro con el obtenido en la [Figura V.I.12](#).

La determinación del rendimiento cuántico fue realizada de forma relativa, utilizando el método de punto único con el compuesto **2** como standard. Para ello se realizaron medidas de absorbancia a 490 nm de soluciones 1 μM para ambos compuestos y a partir del resultado obtenido se realizaron cálculos para obtener una dilución de cada compuesto que presente entre 0.04 y 0.05 UA. Como la concentración de ambas soluciones debe ser la misma, se realizó una dilución al tercio de las soluciones iniciales. La concentración final de cada compuesto en su respectiva solución fue de 0.33 μM . Luego, se realizaron los espectros de emisión de fluorescencia de las soluciones 0.33 μM

preparadas en metanol. Una vez obtenidas las curvas, estas se integran utilizando el software del espectrofluorímetro. Por último, se calculó el rendimiento cuántico relativo del compuesto **4** utilizando la Ecuación IV.2. mencionada en materiales y métodos.

Como se muestra en la Tabla V.I.3, el rendimiento cuántico relativo obtenido para el compuesto **4** es $\Phi = 0.25$. Se encuentra reportado en bibliografía la disminución de fluorescencia de una gran variedad de fluoróforos conjugados a tetrazinas, dentro de los que se incluyen derivados de la familia BODIPY.^{21,52-54} El efecto de quenching de la tetrazina generalmente se ve revertido luego de la cicloadición con un dienófilo. Debido a esto, las moléculas conjugadas tetrazina-fluoróforo en cuestión presentan un fenómeno de encendido una vez que la tetrazina se convierte en su derivado piridazina correspondiente. Se han reportando aumentos desde 5 y hasta 10^3 veces el valor de fluorescencia luego de la reacción mencionada.^{21,53}

Tabla V.I.3. Datos obtenidos del rendimiento cuántico relativo.

Molécula	Disolvente	Φ_f [%]
Compuesto 2	Metanol	0.95 ⁴¹
Compuesto 4	Metanol	0.25

En la literatura se encuentran varios mecanismos como posibles fuentes del quenching causado por la conjugación de tetrazinas a fluoróforos, estos son: transferencia de electrones fotoinducida (PET), la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) y la transferencia de energía a través de enlace (TBET). El mecanismo que explica de forma más probable el quenching en una molécula dada depende de la estructura de dicha molécula. Los sistemas capaces de actuar a través de FRET requieren que haya un solapamiento importante entre el espectro de emisión del fluoróforo y el espectro de absorción de la tetrazina (cuyo máximo suele encontrarse alrededor de los 520 nm). Además, es importante que la distancia entre las dos estructuras sea menor a 90 Å y que los dipolos de transición de ambas estén alineados. Si las moléculas en cuestión presentan conectores flexibles entre la tetrazina y el fluoróforo, el último punto deja de ser relevante ya que se posibilita que haya muchas orientaciones diferentes entre los dipolos. Al haber muchas posibilidades, por probabilidad, en alguna de ellas la orientación será propicia para que el fenómeno suceda.⁵⁵ En el caso del compuesto **4**, hay un solapamiento importante entre el espectro de emisión del BODIPY fluoróforo y el espectro de absorción de la tetrazina utilizada. Además, ambos núcleos se encuentran unidos a través de un conector flexible. Debido a esto, el efecto de quenching observado podría atribuirse a un mecanismo del tipo FRET.

Por otro lado, en el caso de los sistemas TBET la conjugación entre el fluoróforo y la tetrazina está dada por conectores conjugados rígidos y torsionados que evitan la coplanaridad entre ambas estructuras. Debido a que la estructura del compuesto **4** no posee este tipo de características, el mecanismo de tipo TBET no aplica como posible causa del quenching observado.

El fenómeno de PET implica la transferencia de un electrón desde un donante rico en electrones hacia un aceptor deficiente en electrones luego de la absorción de fotones. En el caso del compuesto **4**, este fenómeno se daría desde el estado excitado del BODIPY hacia el anillo de tetrazina deficiente en electrones. Una forma de evaluar, como primera aproximación, si hay un fenómeno de PET en una molécula problema es evaluando la dependencia de la fluorescencia con la polaridad del disolvente.⁵⁶

Dado que hay cambios en la intensidad de fluorescencia en los espectros obtenidos para distintos disolventes pero dichos cambios no presentan un patrón concreto, no se puede afirmar con certeza que haya incidencia del fenómeno en el quenching del compuesto **4**.

En el segmento anterior se propuso que la disminución del rendimiento cuántico del compuesto **4** podría deberse a un efecto de quenching causado por el fragmento tetrazina de la molécula. Según la bibliografía además, dicho efecto debería revertirse una vez que el fragmento tetrazina reacciona con un dienófilo como el TCO. Para comprobar dicho fenómeno, se procedió a medir la emisión de fluorescencia a 540 nm de soluciones 1 μM ($500\ \mu\text{L}$, 5×10^{-10}) del compuesto **4** antes y después de la adición de NHS-TCO ($5\ \mu\text{L}$, $1.8\ \text{mM}$, 9×10^{-9} mol). La reacción mostrada en la [Figura V.I.20](#) se realizó para todos los disolventes ensayados en los experimentos previos de fluorescencia. En todos los casos, se dio un tiempo de reacción de 40 minutos para realizar los espectros de fluorescencia correspondientes.

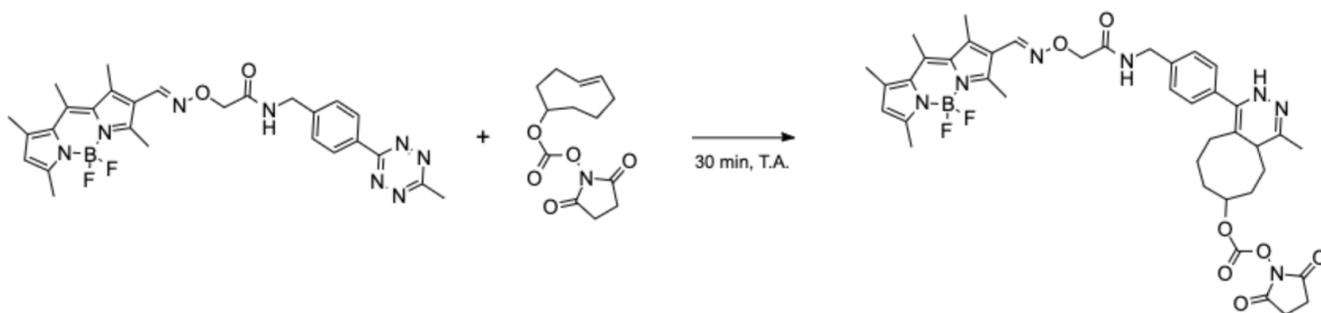


Figura V.I.20. Estrategia de reacción tipo “click” entre dienófilo (NHS-TCO) y el compuesto **4**. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente ($25\ ^\circ\text{C}$).

Los espectros de fluorescencia obtenidos antes y después de la incorporación de TCO a la solución se encuentran en la [Figura V.I.21](#). En todos los disolventes utilizados menos en tolueno se pudo observar un aumento en la intensidad de fluorescencia del derivado dihidropiridazina del compuesto **4**. El aumento de intensidad de fluorescencia obtenido es de hasta 5 veces la intensidad inicial. Si bien el efecto de “encendido” del fluoróforo sintetizado no presenta los órdenes de magnitud de otras sondas reportadas²¹, esta característica es muy conveniente a la hora de utilizar la sonda en ensayos con células o *in vivo*. El efecto de “encendido” de la sonda al reaccionar con TCO permite disminuir la señal de fondo observada en los experimentos en los que se utilice. Además, podría permitir evitar ciertos pasos de lavado en algunos experimentos, como por ejemplo en ensayos de marcado intracelular.

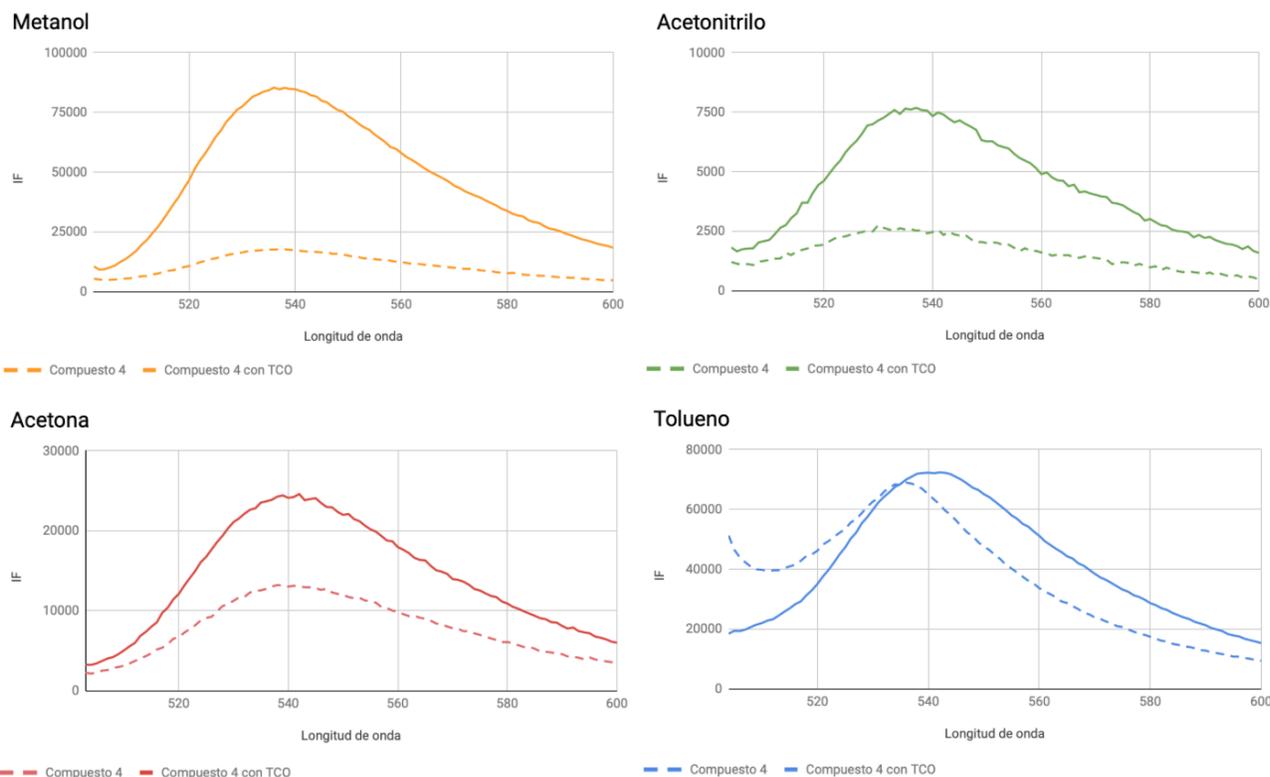


Figura V.I.21. Espectros de emisión del compuesto **4** ($1 \mu\text{M}$) y el derivado dihidropiridazina producto de la reacción de cicloadición ($1 \mu\text{M}$) en distintos disolventes. Las líneas punteadas se corresponden con la emisión del compuesto **4** y las líneas continuas se corresponden con la emisión del derivado dihidropiridazina de dicho compuesto.

El resultado obtenido para el tolueno no es lo esperado, ya que no se observa ningún aumento en la intensidad de fluorescencia luego de la incubación con NHS-TCO. Para confirmar que en dicho disolvente no ocurre un aumento de la intensidad de fluorescencia se repitió el experimento utilizando una solución más concentrada de tolueno. Para ello se realizó una solución de concentración $10 \mu\text{M}$ del compuesto **4** en tolueno a la cual se le agregó NHS-TCO ($5 \mu\text{L}$, 1.8 mM). Se siguió la emisión de dicha solución midiendo la intensidad de fluorescencia a 540 nm durante una hora. Como se puede observar en la [Figura V.I.22](#), sí hay un aumento en la intensidad de fluorescencia luego de la incubación con TCO en tolueno. El resultado observado en la [Figura V.I.21](#) puede deberse a un error de manipulación a la hora de adicionar el volumen adecuado de TCO a la solución.

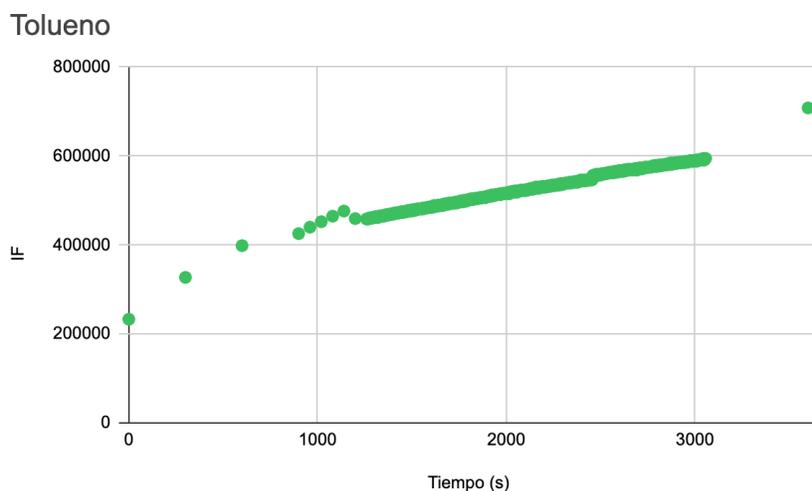


Figura V.I.22. Seguimiento de la Intensidad de fluorescencia a 540 nm en el tiempo. Se adquirió la intensidad de fluorescencia a 540 nm ($\lambda_{exc} = 510 \text{ nm}$) a diferentes tiempos durante una hora de reacción entre el compuesto **4** ($10 \mu\text{M}$) y NHS- TCO utilizando tolueno como disolvente.

A continuación, en la **Tabla V.I.4** se muestran los valores de aumento de fluorescencia obtenidos para los diferentes disolventes utilizados.

Tabla V.I.4. Datos correspondientes a los ensayos de aumento de fluorescencia .

Disolvente	Aumento de fluorescencia	Concentración (μM) Compuesto 4
Tolueno	3	10
Tolueno	1	1
Acetona	2	1
MeOH	5	1
AcN	3	1

Para comprobar los resultados obtenidos sería conveniente repetirlos, aumentando el número de reacciones realizadas por disolvente. Con un número de experimentos mayor se podría evitar las discrepancias como las encontradas para la solución realizada en tolueno. A su vez, si bien se verificó que el fragmento tetrazina actúa como quencher en el fluoróforo diseñado y que dicho efecto se reduce luego de la reacción con un dienófilo, sería conveniente establecer el efecto de encendido del compuesto **4** dado en PBS a pH fisiológico. Hay reportes de conjugados BODIPY-tetrazina que presentan un mayor efecto de encendido cuando se utiliza agua como medio de reacción.²¹

V.I.b Determinación del coeficiente de reparto

La lipofilia de las moléculas es un descriptor fisicoquímico que indica la afinidad que presenta un soluto por un ambiente no acuoso. Dicha característica es importante para el desarrollo de moléculas que serán aplicadas en ambientes biológicos. Esto se debe a que la lipofilia incide en la capacidad de los compuestos para interactuar en dichos ambientes y cumplir la función para la cual fueron diseñados. Además de la lipofilia, hay otras características de los compuestos que se tienen en cuenta a la hora

de intentar predecir las solubilidad y permeabilidad como por ejemplo el peso molecular y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno.⁵⁷

Para medir la lipofilia de un compuesto se suele utilizar como parámetro el coeficiente de partición P, expresado en forma logarítmica. Este es útil como aproximación para modelar interacciones de moléculas con proteínas o regiones hidrofóbicas de las membranas celulares y se define como el cociente de concentraciones de una única especie entre dos fases, una orgánica y una acuosa, en condiciones de equilibrio. Cuando se utiliza como fase acuosa una solución de PBS a pH = 7.4, el parámetro se denomina coeficiente de distribución y se expresa como: $\log D_{7.4}$. Este último parámetro permite tener en cuenta las posibles ionizaciones que los compuestos pueden sufrir a pH fisiológico y es por lo tanto un mejor descriptor del comportamiento de las moléculas.⁵⁸

El rango óptimo de $\log D_{7.4}$ para la lipofilia de fármacos se encuentra entre 0 y 3. Los compuestos con dicho rango presentan un buen equilibrio entre permeabilidad y solubilidad en ambientes biológicos. Los compuestos muy hidrofílicos ($\log D_{7.4} < 0$) suelen presentar una permeabilidad muy pobre mientras que los compuestos muy lipofílicos ($\log D_{7.4} > 5$) presentan inestabilidad metabólica y alta toxicidad. Además, los compuestos muy lipofílicos suelen presentar problemas de solubilidad lo que dificulta su uso en ensayos en medio acuoso y la determinación de las concentraciones reales utilizadas.⁵⁹

Los fluoróforos también deben presentar un compromiso entre una buena solubilidad en agua y una buena permeabilidad de membrana para su uso en ensayos biológicos. Si bien no hay un estudio sistemático que relacione la actividad de las sondas con su valor de $\log D_{7.4}$ (y $\log P$), generalmente también se toma un rango intermedio como óptimo⁶⁰⁻⁶². Dicho esto, en bibliografía se encuentran varias excepciones en las que algunos fluoróforos utilizados con buenos resultados presentan una lipofilia elevada ($\log D_{7.4} > 5$)^{62,63} o una hidrofilia elevada ($\log D_{7.4} < -1$)^{64,65}. En la [Tabla V.1.5](#) se muestran a modo de ejemplo, algunos fluoróforos comerciales junto a sus valores de $\log D_{7.4}$ reportados.

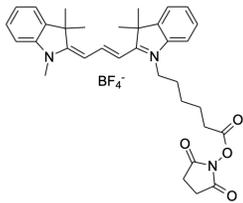
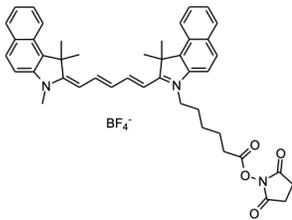
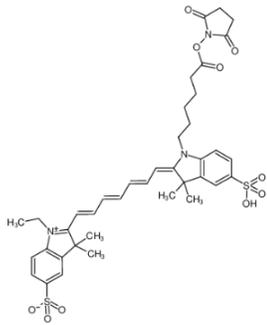
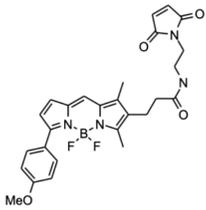
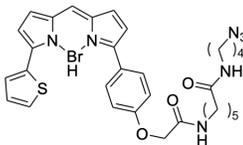
Cabe destacar la escasez de datos reportados de $\log D_{7.4}$ o $\log P$ de las sondas fluorescentes comerciales y no comerciales reportadas en la bibliografía. Muchos de los fluoróforos comerciales presentan su solubilidad descrita en términos cualitativos. En particular, hasta la fecha no se han observado reportes de dichos valores para sondas fluorescentes que presenten fragmentos del tipo tetrazina.

El método elegido para determinar el $\log D_{7.4}$ para el compuesto **4** fue el método “shake-flask” haciendo uso de la fluorescencia del compuesto **4**.⁶⁶ Para ello en primer lugar se realizaron los espectros de excitación y emisión del compuesto **4** en octanol (10 μM). Una vez obtenidos los espectros, se incubó con agitación durante 24 horas una concentración de 10 μM de compuesto **4** en 3 mL de una mezcla 1:1 de octanol:PBS. Dicho proceso se realiza por triplicado. Luego de cumplido el tiempo de incubación se separan las fases acuosas y orgánicas. Se mide mediante fluorescencia la concentración de compuesto **4** en cada una de dichas fases por triplicado. Con los resultados obtenidos se calcula el $\log D_{7.4}$ utilizando la [Ecuación IV.1](#). Se obtuvo un valor de $\log D_{7.4}$ de 1.04 ± 0.09 en las condiciones evaluadas.

El valor obtenido de $\log D_{7.4}$ para el compuesto **4** es un valor intermedio aunque un poco más hidrofílico que la media de los observados en la bibliografía mencionada. Dicho dato es prometedor

respecto a la posible actividad *in vitro* e *in vivo* de la sonda. Igualmente, debido a la diversidad de resultados observados en la bibliografía, no se puede predecir con seguridad qué tipo de actividad será más compatible (i.e. marcado intracelular, de anticuerpos).

Tabla V.I.5. Valores de $\log D_{7,4}$ para fluoróforos comerciales de uso frecuente.

Fluoróforo	Estructura	LogD	Referencia
Cy3 NHS ester		3.29	65
Cy5 NHS ester		-0.98	67
Cy7 NHS ester		7.87	68
BODIPY-TMR M		-1.96	65
BODIPY-TR-N3		0.88	61

Una vez determinadas las características fisicoquímicas del compuesto de interés, se procedió a evaluar su actividad *in vitro*.

V.II Biología

Como primera aproximación a la utilización del compuesto **4** como sonda fluorescente, se buscó evaluar su posible conjugación a anticuerpos a través de reacciones IEDDA utilizando TCO. Para ello, en primer lugar se buscó conjugar un anticuerpo de interés a TCO, utilizando un método previamente optimizado en el laboratorio.^{9,10}

V.II.a Conjugación trastuzumab-TCO

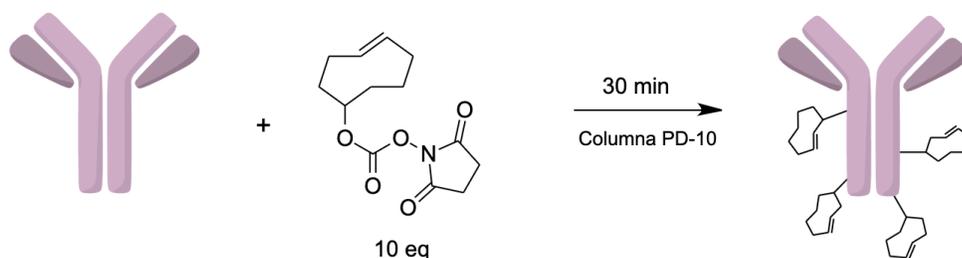


Figura V.II.1. Estrategia de conjugación. Los TCO representados son a modo de ilustración.

Para la conjugación del anticuerpo trastuzumab, primero se prepara una solución stock del mismo a partir de la solución stock comercial (trastuzumab, 440 mg / 20 mL). Para ello se toman 0.2 mL de la solución comercial stock y se eliminan los excipientes mediante centrifugación con PBS en un Amicon 30 kDa. Luego se mide la absorbancia a 280nm del anticuerpo retenido ($\epsilon = 1.4$ mg/mL) y se determina la concentración de la solución stock obtenida. El proceso mencionado se realizó repetidas veces en el transcurso del presente trabajo y las concentraciones de anticuerpo libre de excipientes se encontraron siempre dentro del rango de 6 a 9 mg/mL de trastuzumab.

El procedimiento para conjugar el anticuerpo trastuzumab con TCO-NHS implica modificar 2mg de dicho anticuerpo (22 mg/mL en PBS) con 10 equivalentes molares de TCO (5 mg/mL DMSO) en un volumen de 500 μ L de PBS. En la Figura V.II.1 se muestra de forma esquemática la estrategia. El pH de la reacción se ajusta a un valor de 9 unidades de pH mediante el uso de un buffer de bicarbonato de sodio 1M (pH = 11). La reacción de conjugación se lleva a cabo bajo agitación y protegida de la luz durante 30 minutos. El anticuerpo anti HER2 modificado se purifica mediante una columna de exclusión molecular PD-10, eluyendo con PBS y controlando las fracciones eluidas mediante medidas de absorbancia a 280 nm.⁶⁹ La disolución se conserva a 4 °C. La conjugación a TCO también se realizó en varias oportunidades, obteniendo concentraciones de aproximadamente 1.5 mg/mL de trastuzumab-TCO.

Una vez realizada la conjugación del anticuerpo, se procedió a evaluar la reacción del tipo “click” *in vitro* sobre la macromolécula funcionalizada.

V.II.b Reacción bio-ortogonal *in vitro* en anticuerpo monoclonal

Para estudiar la reacción bio-ortogonal *in vitro* de forma cualitativa, se incubó el compuesto **4** y el anticuerpo conjugado a TCO en una relación molar 1:1. En particular, se mezcló 0.1 mg de trastuzumab-TCO conjugado el día anterior (6.7×10^{-10} mol, 76 μ L, stock 1.32 mg/mL), junto con un equivalente de compuesto **4** (6.7×10^{-10} mol, 0.36 μ L, stock 1 mg/mL) en oscuridad y con agitación durante una hora. A su vez, para confirmar que el compuesto **4** se une al anticuerpo únicamente a través de las moléculas de TCO se realizó un control de unión inespecífica. Para ello, se realizó en paralelo la misma reacción pero con anticuerpo libre de TCO y 10 equivalentes del compuesto **4**. A su vez, como control positivo de dicha reacción se realizó el mismo procedimiento pero conjugando trastuzumab-TCO con un equivalente de Cy3 comercial. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, los crudos de reacción obtenidos se purificaron a través de amicon 30 kDa. De esta forma se buscó eliminar el excedente de fluoróforo que no reaccionó, de forma tal de que no interfiriera en el ensayo. En esta primera instancia también se separó una alícuota sin purificar para comprobar la relevancia de este paso. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante electroforesis, sembrando alícuotas (1 μ g de anticuerpo por pocillo) de las reacciones mencionadas en un gel de poliácridamida. El gel obtenido se reveló en primer lugar utilizando fluorescencia, excitando a una longitud de onda de 480 nm. Luego, dicho gel fue revelado con azul de Coomassie. En la [Figura V.II.2](#) se pueden observar los resultados obtenidos.

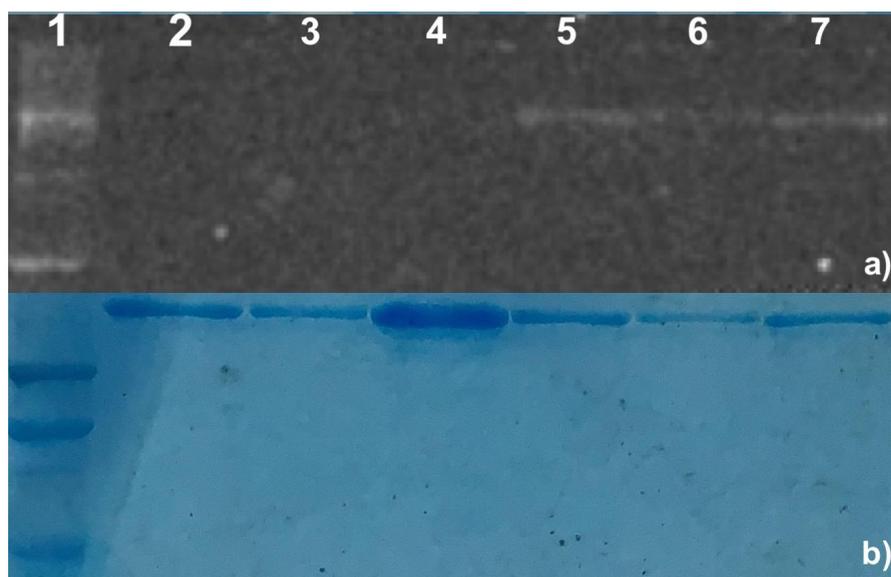


Figura V.II.2. *Corrida de electroforesis de la reacción de tipo “Click”. En a) se puede observar el revelado fluorescente y en b) el revelado con azul de Coomassie. Los carriles fueron sembrados en el siguiente orden: 1) marcador de peso molecular, 2) anticuerpo sin excipientes, 3) anticuerpo-TCO, 4) anticuerpo incubado con compuesto **4** sin TCO, 5) anticuerpo-TCO-compuesto **4**, 6) anticuerpo-TCO-Cy3 y 7) anticuerpo-TCO-compuesto **4** sin purificar*

A partir de los resultados del gel observados en la [Figura V.II.2](#), se puede determinar que todas las bandas presentan el mismo peso molecular y este se corresponde con la banda de 150 kDa del marcador de peso molecular utilizado. Cabe destacar que se observa una única banda por carril, lo que permite establecer que no hubo degradación del anticuerpo en las condiciones de reacción

utilizadas. A su vez, se puede visualizar un error en el volumen de sembrado en el carril 4, ya que dicha banda presenta un mayor tamaño que las demás.

En los resultados obtenidos para el revelado con fluorescencia se puede observar que solo los tres últimos carriles presentan una banda. En primer lugar, esto permite establecer que la reacción del tipo “click” realizada *in vitro* fue exitosa ya que ambos el control realizado con Cy3 y la reacción con el compuesto **4** presentan anticuerpos marcados con sus respectivas sondas. A su vez, la ausencia de banda en el carril 4 implica que no hay interacciones inespecíficas entre el anticuerpo y el compuesto **4**. Es decir, no hay unión de la sonda al anticuerpo a través de interacciones no covalentes.

A partir de los resultados de este gel además se puede determinar que la sonda sintetizada en este trabajo puede ser utilizada como marcador para revelado de geles mediante fluorescencia utilizando un solo equivalente del marcador.

V.II.c Número de TCO reactivos por molécula de anticuerpo

Luego de comprobar que la reacción de cicloadición entre el anticuerpo conjugado y el compuesto **4** se puede realizar *in vitro*, se realizaron ensayos de titulación del mismo para establecer la cantidad promedio de moléculas de TCO que se unieron por molécula de anticuerpo.^{32,34,69} Para estos análisis se incuban 100 µg del anticuerpo (stock trastuzumab-TCO 3.3 µg / µL) conjugado con equivalentes crecientes del compuesto **4** (stock 1 mg / mL) en oscuridad durante 1 hora. Las distintas reacciones se purifican y se analizan mediante una electroforesis SDS-PAGE revelada primero con fluorescencia y luego con tinción de proteínas. Una vez obtenido el gel, el mismo se fotografía utilizando un haz de 480 nm y se analiza la intensidad de fluorescencia obtenida para las distintas bandas correspondientes a las distintas concentraciones de fluoróforo. Para esto último, se utiliza el programa de análisis del equipo. En dicho programa se establecen los carriles a analizar y se reconocen las bandas presentes en cada uno. Luego, se delimita el ancho de banda a utilizar y dicho programa reporta las intensidades de fluorescencia correspondientes a cada banda. A su vez, se revela el gel con azul de coomassie para corroborar que la concentración de anticuerpo sea la misma en los diferentes carriles y que el mismo no se haya degradado.

En la [Figura V.II.3](#), se muestran en primer lugar, los dos revelados realizados para el gel de titulación del anticuerpo conjugado. También, se pueden observar en la imagen las intensidades de fluorescencia obtenidas al realizar la reacción de cicloadición a concentraciones crecientes del compuesto **4**. El comportamiento de la intensidad de fluorescencia aumenta de forma constante hasta alcanzar una meseta a los entre los 9 y 10 equivalentes. Como las bandas observadas a través de la tinción proteica presentan todas un mismo tamaño, se puede concluir que las diferencias observadas en el revelado con fluorescencia se deben a diferencias en la cantidad de sonda unida al anticuerpo. Este experimento nos permite establecer la cantidad de moléculas de TCO promedio disponibles que se unieron al anticuerpo a través del protocolo de conjugación utilizado.

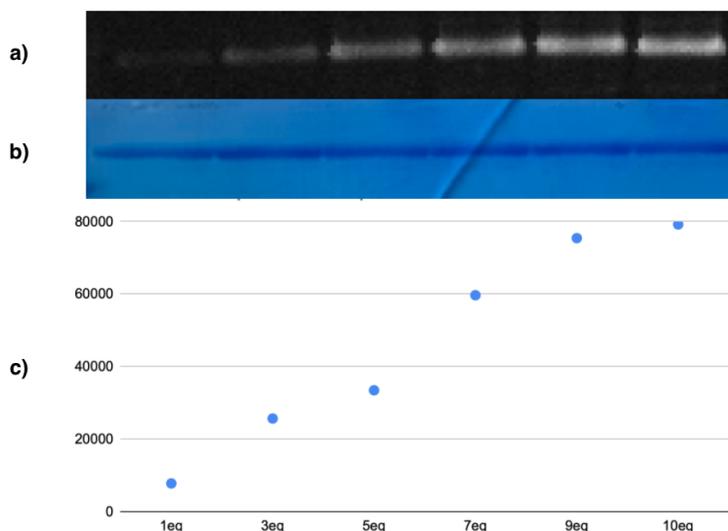


Figura V.II.3. **a)** Revelado con fluorescencia del gel de titulación. **b)** Revelado con azul de Coomassie del gel de titulación. El orden de sembrado en el gel es el mismo establecido en el eje horizontal del gráfico. **c)** Gráfico de intensidad de fluorescencia obtenida a equivalentes crecientes de compuesto **4** unido al anticuerpo conjugado.

V.II.d Cinética de la reacción bio-ortogonal

Se realizaron ensayos de cinética de la reacción de tipo click entre las moléculas de TCO conjugadas a los anticuerpos y el compuesto **4**. Estos ensayos se realizan asumiendo las 10 moléculas de TCO por anticuerpo que se determinaron previamente en la titulación. Al utilizar un solo equivalente del compuesto **4** se logra obtener una concentración de un orden menor respecto a la concentración de TCO y por lo tanto, se puede asumir que la concentración de TCO libre no se modifica en el transcurso de la reacción ($[TCO] = [TCO]_0$ en todo momento). De esta forma, se establecen condiciones de pseudo primer orden. En estas condiciones, se puede sustituir la constante de velocidad de la reacción de segundo orden por una constante nueva que se suele denominar k_{obs} por ser la constante observada durante el experimento realizado. Esta constante nueva incluye la constante de velocidad de la reacción original y también el término correspondiente a la concentración del reactivo constante, como se muestra en la [Ecuación V.1](#).

$$v = k [TCO]_0^m [\text{compuesto } 4]^n$$

$$v = k_{obs} [\text{compuesto } 4]^n$$

Ecuación V.1. Transformación de la constante de velocidad para la reacción de pseudo primer orden planteada en el ensayo de cinética realizado.

Se ensayan diferentes concentraciones de anticuerpo conjugado a TCO (5, 7.5 y 10 μM) mezclando las mismas con un equivalente de compuesto **4** en un volumen de reacción final de 135 μL en PBS a 25 $^\circ\text{C}$. Luego, a los 15, 30, 45, 60, 120, 180 y 300 segundos de comenzada la reacción, se toman alícuotas de 18 μL que se hacen reaccionar con un exceso de tetrazina- NH_2 (Click Chemistry tools) para detener la reacción. Dichas alícuotas se siembran en un gel de poliacrilamida para realizar una electroforesis. Luego, las bandas se analizan utilizando el software Bruker Multispectral. Para ello, se

establece un área para delimitar las diferentes bandas y se mide la intensidad de fluorescencia de las mismas tras una excitación a 480 nm.

En la Figura V.II.4 se pueden observar las curvas de intensidad de fluorescencia corregida respecto al tiempo obtenidas para las tres concentraciones ensayadas. Sobre estos gráficos, se realiza el ajuste de cada curva a la ecuación mostrada a continuación (Ecuación V.2.). De la constante correspondiente al exponente obtenido en cada ajuste, se obtiene la k_{obs} para cada concentración. Las tres k_{obs} obtenidas luego se grafican respecto a la concentración de TCO utilizada para cada ensayo y se ajusta el gráfico obtenido a una recta. Dicha recta debe pasar por cero y de la pendiente de la misma se obtiene la constante de segundo orden de la reacción.

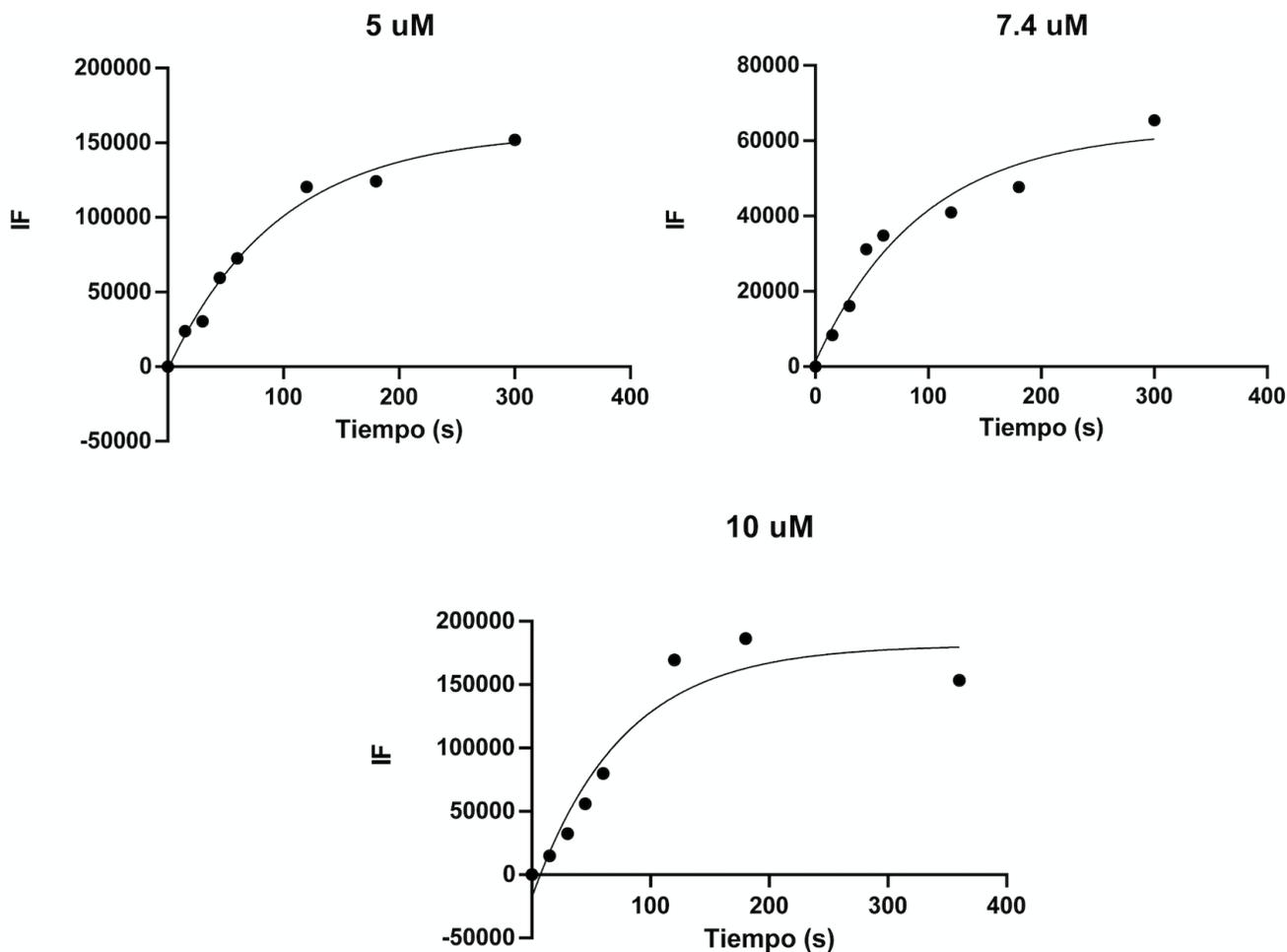


Figura V.II.4. a) Curvas de intensidad de fluorescencia respecto al tiempo para las siguientes concentraciones de compuesto 4: 5 μM , 7.4 μM y 10 μM . b) Curva de % de compuesto 4 unido respecto al tiempo para la concentración 5 μM . c) Curva de % de compuesto 4 unido respecto al tiempo para la concentración 7.4 μM . d) Curva de % de compuesto 4 unido respecto al tiempo para la concentración 10 μM .

$$[P] = [A]_0 [1 - e^{-k_{\text{obs}} t}]$$

$$k_{\text{obs}} = k [B]_0$$

Ecuación V.2. Ecuación correspondiente al ajuste de datos cinéticos. En este caso, $[A]_0$ es la concentración inicial de compuesto 4 y $[B]_0$ es la concentración de TCO.

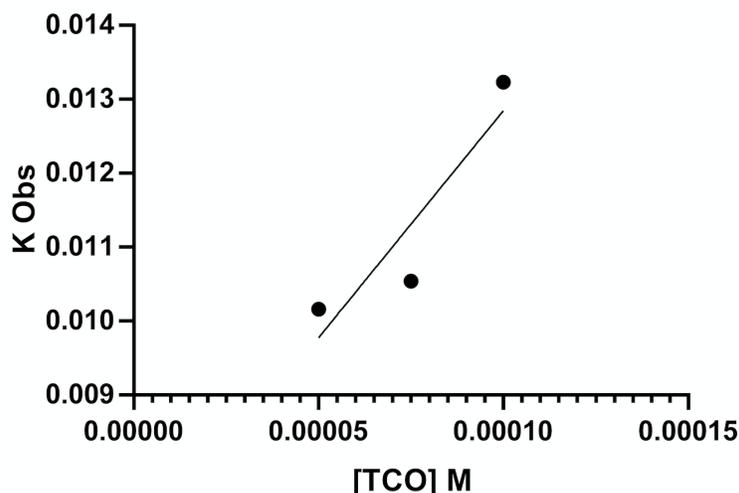


Figura V.II.5. Gráfico de k_{obs} respecto a la concentración de TCO. La ecuación de ajuste obtenida es una recta cuya pendiente es $66 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El R^2 obtenido es de 0.9235.

A partir del valor de la pendiente correspondiente a la recta observada en la Figura V.II.5 se determinó el valor de la constante de segundo orden para la reacción bio-ortogonal *in vitro* ensayada. Dicho valor es de $66 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Comparando dicho resultado con los encontrados en bibliografía para otros derivados de tetrazinas, se puede observar que dicha constante de velocidad no presenta los mismos órdenes de magnitud reportados. El valor obtenido es un orden menor a los valores reportados para algunas metil-tetrazinas y varios órdenes menor que los reportados para tetrazinas sin metilar.³⁰ La diferencia de reactividad entre metil-tetrazinas y tetrazinas sin metilar se encuentra descrita en la bibliografía⁷⁰. Las metil-tetrazinas presentan velocidades de reacción menores pero mayor estabilidad. Dicho esto, es importante resaltar que la mayoría de los estudios cinéticos reportados no fueron realizados sobre la superficie de un anticuerpo, como fue ensayado en este trabajo. Dichos análisis suelen realizarse incubando únicamente el dienófilo y la tetrazina elegidos y el análisis se realiza siguiendo la pérdida de absorbancia de la tetrazina a 520 nm. Además, hay bibliografía donde se reportan discrepancias en los resultados obtenidos para estudios cinéticos de un mismo par de reactivos TCO y tetrazina según el método utilizado. Cuando se obtiene la constante de segundo orden a partir de las moléculas libre en solución se obtiene un valor mayor a cuando se realiza el estudio utilizando un anticuerpo conjugado a TCO.^{30,32}

Es importante resaltar también que la constante de segundo orden obtenida es bastante mayor a algunas de las constantes reportadas para otras reacciones bio-ortogonales.⁷¹⁻⁷³

V.II.e ELISA

Para evaluar la efectividad del compuesto **4** como sonda fluorescente en aplicaciones biológicas *in vitro* se realiza un ensayo de ELISA como se establece en materiales y métodos. En primer lugar, para sensibilizar la placa, se incuba durante toda la noche 100 μL de una solución de Her2 (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en los pocillos problema (fila 2) y 100 μL de una solución de BSA (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en los pocillos control (fila 1). Al siguiente día, se descarta la solución de los pocillos y se realizan tres lavados con PBS-Tween 0.2%. Luego, se adiciona 300 μL de solución de bloqueo PBS-BSA 5% a todos los pocillos y se deja incubar 1 h. De esta forma se asegura de cubrir todos los espacios con capacidad de unión proteica que no fueron cubiertos en la sensibilización previa realizada. Así, se logran evitar las uniones inespecíficas de la sonda a las paredes del pocillo. Después de descartar la solución de bloqueo, se realizan otros tres lavados con PBS-Tween 0.2%. Una vez lavada la placa, se les adiciona a un pocillo de cada fila 100 μL de trastuzumab-TCO 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ conjugado el día anterior. A otro par de pocillos adicionales se les adiciona trastuzumab-TCO-compuesto **4** 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, también conjugado el día anterior. Al último par de pocillos se les adiciona trastuzumab-TCO-Cy3 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ conjugado previamente. Las soluciones mencionadas se dejan incubar durante 1 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se realizan tres lavados con PBS-Tween 0.2% en todos los pocillos. Luego se adicionan 100 μL de compuesto **4** (7 eq, 2.6 μL de stock 1 mg/mL) a los pocillos restantes y se incuba durante 1 h a 37 °C. Se elimina la solución y se realizan tres lavados con PBS-Tween 0.2% en estos últimos pocillos utilizados. Por último, se mide la fluorescencia de los pocillos de la placa.

En la [Figura V.II.6](#) se puede observar de forma cualitativa los resultados obtenidos de la placa. A su vez, en la [Tabla V.II.1](#) se exponen los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos utilizando una estrategia similar a la planteada anteriormente para los gels correspondientes a los ensayos de titulación y cinética. En este caso en particular, se establecen círculos de áreas iguales dentro de los cuales el software mide la fluorescencia observada. Se reportan solamente los valores de intensidad de fluorescencia donde dicha característica es detectada (**fila b**).

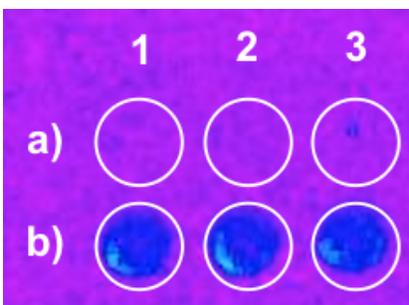


Figura V.II.6. Revelado fluorescente de placa de ELISA. Los pocillos de la **fila a** se corresponden con el control realizado con BSA. Los pocillos de la **fila b** se corresponden con la incubación con Her2. 1) Pocillos incubados con trastuzumab-TCO-Cy3. 2) Pocillos incubados con trastuzumab-TCO-compuesto **4**. 3) Pocillos incubados con trastuzumab-TCO y luego compuesto **4**.

Tabla V.II.1. Datos correspondientes a los pocillos de la fila b.

Pocillo	Intensidad de fluorescencia
1b	2610
2b	3738
3b	5739

A partir de la imagen de la placa enseñada en la [Figura V.II.6](#) se puede establecer que las sondas utilizadas lograron reconocer los pocillos en los cuales se encontraba el receptor HER2 ya que solo estos presentan una señal de intensidad de fluorescencia detectable. Asimismo, en los resultados se puede observar que el marcado con la sonda conjugada in situ fue igual o más exitoso que el correspondiente a las sondas conjugadas previamente. En la [Tabla V.II.1](#) se puede observar que hay un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia producida por el pocillo 3b respecto a los otros dos pocillos. Esto podría explicarse debido a que los anticuerpos previamente conjugados y la reacción bio-ortogonal in situ se realizaron con diferentes relaciones estequiométricas. Para las sondas previamente conjugadas, se utilizó una relación estequiométrica 1:1 entre el trastuzumab-TCO y los fluoróforos a la hora de realizar la reacción bio-ortogonal. Por otro lado, para la sonda conjugada in situ se utilizó una relación 7:1 de equivalentes del compuesto **4** respecto al anticuerpo.

De los resultados obtenidos también se puede destacar que no hay un aumento de la intensidad de fluorescencia del pocillo **3a**. Dicho resultado permite establecer que la incubación con el compuesto **4** no produjo un aumento en la señal de fondo en el ensayo o si la produjo es despreciable su efecto en la intensidad de fluorescencia detectada. Esto implica que el compuesto **4** no interacciona de forma inespecífica con otros componentes del sistema.

A partir de estos resultados, se puede establecer que el compuesto **4** además de ser útil como sonda en electroforesis en gel, también es útil en inmunoensayos.

V.II.f Citometría de flujo

Para continuar evaluando la efectividad del compuesto **4** como sonda fluorescente en aplicaciones biológicas *in vitro* se procedió a utilizar el conjugado obtenido del mismo con trastuzumab como marcador en ensayos de citometría de flujo. Los experimentos de citometría de flujo se realizan siempre por duplicado.

La línea celular elegida para el experimento fue la línea BT-474 de ATCC. Dicha selección se debe a que como línea de cáncer de mama humana se encuentra reportada la sobreexpresión de HER2 en las mismas. Además, dicha línea se comercializa como positiva para HER2 (HER2+). Debido a esto, la selección de dicha línea permite asegurar que las células presentan el antígeno que el anticuerpo utilizado reconoce. De esta forma, se eliminan posibles dudas sobre si la ausencia de señal se relaciona a una falla en la sonda o la ausencia del receptor en las células. Es decir, aseguramos que se observe una población positiva si la sonda funciona correctamente. Además, se incluyeron en el experimento dos controles positivos. En uno de los controles las células fueron teñidas con un marcador molecular comercial, un anticuerpo anti-HER2 unido a FITC (Abcam ab106674). Para el

segundo control positivo, se realizó la tinción con un conjugado trastuzumab-FITC realizado en el laboratorio, utilizando el mismo anticuerpo utilizado en los demás experimentos.

Para analizar los datos experimentales obtenidos a partir del ensayo de citometría de flujo planteado se realizó la estrategia de gating mostrada en la [Figura V.II.7](#). La población celular analizada en dicha figura se corresponde con las células sin marcar. En primer lugar se define la población de células totales a analizar que fue denominada como “Población total” en el dot plot SSC-A vs. FSC-A. Se busca que en dicha población haya 10.000 eventos para todas las muestras a ensayar. Dicha selección de población además busca descartar del análisis los debris celulares que se caracterizan por presentar bajos SSC y FSC. Estos suelen ser causados por la manipulación del cultivo al llevar a cabo el experimento. Luego, dentro de la población “Población total” se seleccionan los eventos singletes en el dot plot FSC-H vs. FSC-A. Dicha población se denomina “Singletes” y representan las células que fueron reconocidas por el detector del equipo como partículas aisladas. Dentro de la población “Singletes” se define la población negativa para las diferentes tinciones utilizadas.

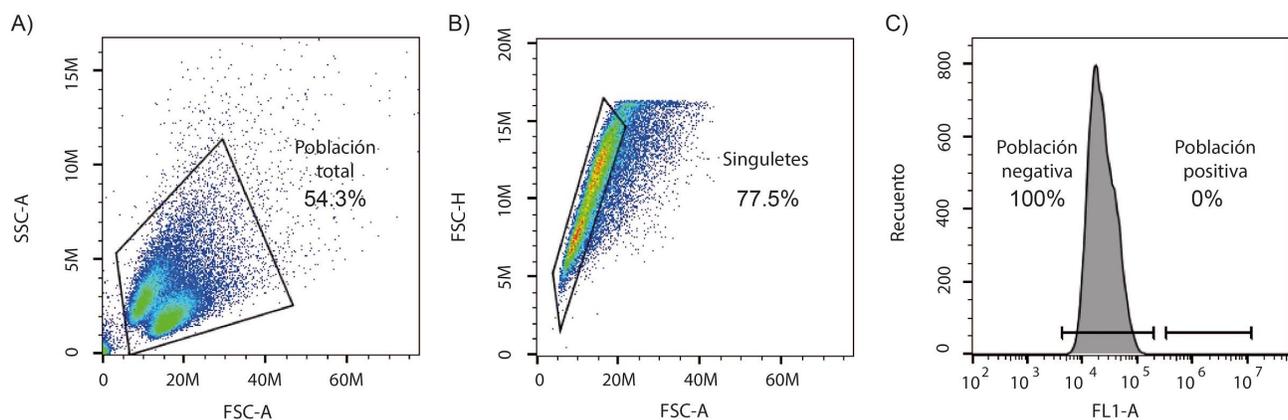


Figura V.II.7. Estrategia de gating realizada para el análisis de datos obtenidos a partir de ensayos de citometría de flujo. Se expone a modo de ejemplo la estrategia utilizada en el análisis de los datos obtenidos a partir de las células BT-474 sin marcar utilizadas como control negativo. A) Selección de población “Población total”. B) Selección de población “Singletes”. C) Selección de población negativa para las tinciones.

En la [Figura V.II.7](#), se puede observar que hay dos conjuntos de eventos de los cuales un conjunto de células presentaría un mayor tamaño que el otro conjunto. Al haber partido de un cultivo de células homogéneo como se muestra en la [Figura V.II.8](#), se asume que todos los eventos observados se corresponden a la misma población de células. Además, en el gráfico FSC-H vs. FSC-A se puede observar un comportamiento en común de la mayoría de los eventos por lo que asumir la población como única no parecería presentar mayores inconvenientes.

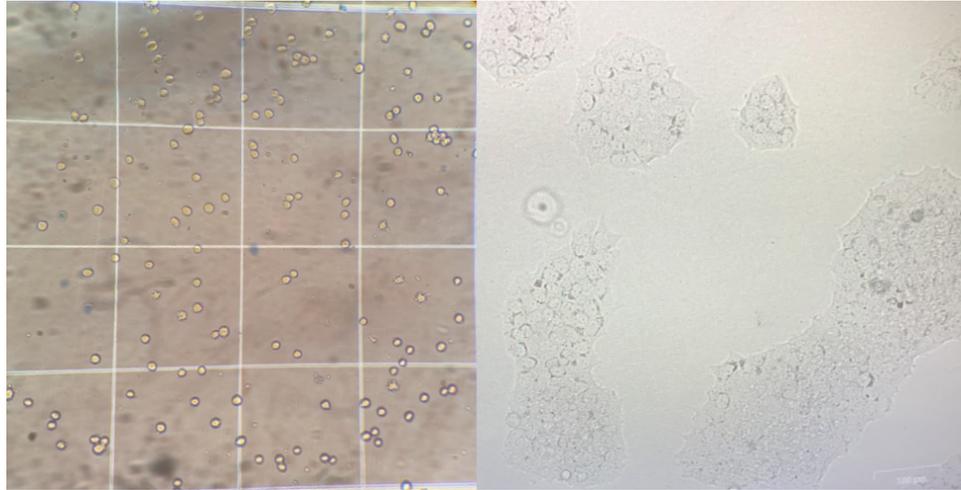


Figura V.II.8. *Células BT-474. En la imagen de la derecha se puede observar el cultivo celular utilizado para realizar el ensayo de citometría de flujo. En la imagen de la izquierda se pueden observar las células BT-474 en la cámara de Neubauer teñidas con azul de tripán para realizar el conteo de células viables.*

El experimento de citometría de flujo fue realizado por duplicado. A partir de los datos experimentales obtenidos para cada uno de los tres marcadores utilizados y aplicando la estrategia de gating mencionada anteriormente, se realizan los gráficos mostrados en la Figura V.II.9. En la sección **B)** de dicha figura se puede observar que en uno de los controles positivos presenta dos poblaciones de células: una población de células con una mayor intensidad de fluorescencia y otra con una intensidad de fluorescencia igual al control. Para este control positivo que fue realizado utilizando el marcador conjugado en el laboratorio utilizando Herceptin y FITC, se puede observar un 23.7% de células positivas. A partir de este resultado, se puede validar que el protocolo de citometría utilizado permite identificar células que presentan HER2 y que el trastuzumab utilizado funciona correctamente.

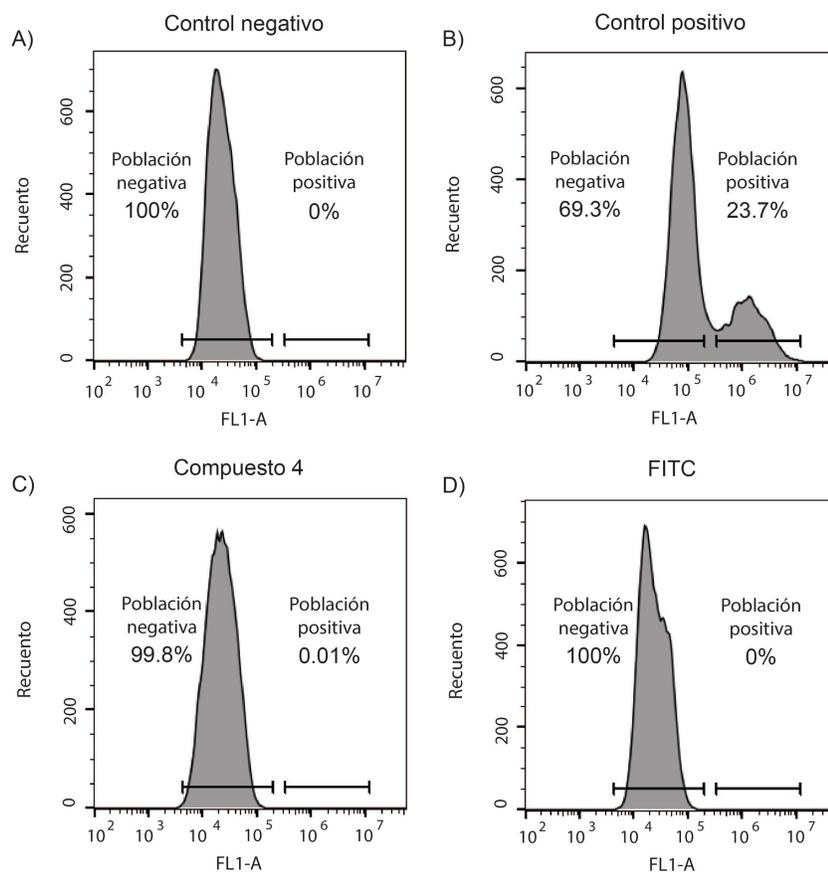


Figura V.II.9. Histogramas obtenidos a partir de los datos de citometría de flujo para las tres sondas fluorescentes utilizadas. **A)** Células sin teñir. **B)** Células teñidas con Herceptin-FITC realizado en el laboratorio. **C)** Células teñidas con la sonda Herceptin-compuesto 4. **D)** Células teñidas con el anticuerpo anti-HER2-FITC comercial.

Al analizar la tinción realizada con el conjugado trastuzumab-compuesto 4 se puede concluir que este no funcionó como tinción ya que el comportamiento observado es igual al del control negativo. Esto puede deberse a que la conjugación con el anticuerpo se realizó en una proporción 1:1 de equivalentes de trastuzumab y compuesto 4. Es decir, que la señal producida no es suficiente para ser detectada. Dado que a partir de los datos de la titulación sabemos que se pueden conjugar hasta 10 equivalentes del compuesto 4 por molécula de anticuerpo, se propuso realizar conjugados con mayor proporción de fluoróforo. En particular se realizaron dos sondas adicionales: una con 4 equivalentes de compuesto 4 por anticuerpo y otra con 8 equivalentes de compuesto 4 por anticuerpo. Por una problemática del equipo, no se pudieron realizar los ensayos de citometría para estos conjugados.

Además, se puede observar en la sección D) de la [Figura V.II.9](#) que no se obtuvo el resultado esperado para el otro control positivo. La tinción con el anticuerpo anti-HER2 conjugado a FITC comercial no funcionó ya que no se observa una población positiva para HER2 en los resultados obtenidos de la citometría de flujo. Dado este resultado, se decidió analizar el anticuerpo mediante HPLC y electroforesis en gel para verificar en qué condiciones se encuentra el mismo.

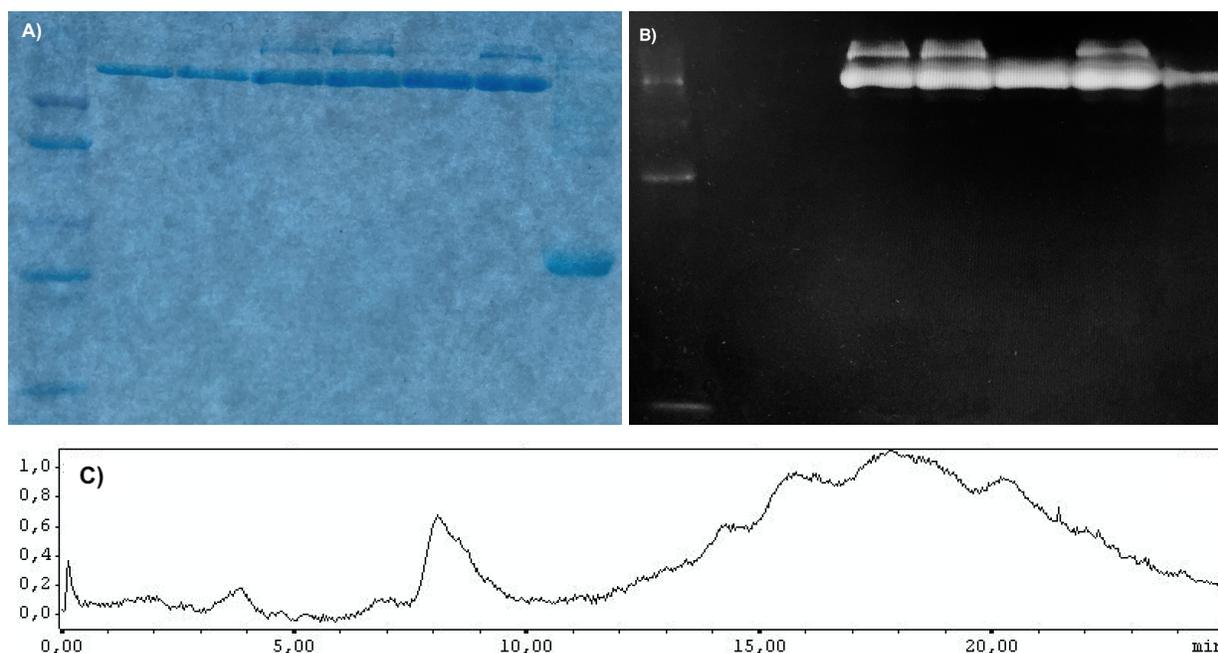


Figura V.II.10. Ensayos de integridad del anticuerpo comercial anti-HER2-FITC. A) Imagen de electroforesis en gel de poliacrilamida, carriles en orden de izquierda a derecha: marcador de peso molecular, trastuzumab, trastuzumab-TCO, sonda trastuzumab-compuesto 4 (4 equivalentes), sonda trastuzumab-compuesto 4 (8 equivalentes), sonda trastuzumab-Cy3 (4 equivalentes), sonda trastuzumab-Cy3 (8 equivalentes) y anticuerpo anti-HER2-FITC comercial. B) Imagen de electroforesis en gel revelado con un haz de luz a 490 nm. C) Perfil de HPLC del anticuerpo anti-HER2-FITC comercial obtenido utilizando el método 3.

Al observar el carril correspondiente a la sonda comercial en la imagen de la electroforesis realizada (Figura V.II.10. A), se puede concluir que el mismo se encuentra degradado. En dicho carril se presentan varias bandas de diferente peso molecular donde solo debería haber una banda. Además, la banda de mayor intensidad, es decir, la que representa la mayor cantidad de proteína, no se corresponde con el peso molecular del anticuerpo (150 KDa). También, se puede observar en la imagen del gel revelado a 490 nm (Figura V.II.10. B) que hay una banda que fluoresce con poca intensidad con un desplazamiento correspondiente a 150 KDa en el carril. Dicha banda casi no se observa en la tinción con azul de Coomassie por lo que solo una pequeña proporción del anticuerpo se encuentra en buenas condiciones. Aún así, como los resultados de la citometría fueron negativos, la porción de anticuerpo íntegro no es suficiente para realizar una tinción en las condiciones recomendadas por la hoja de datos del producto. En la imagen obtenida a partir de la corrida de HPLC del anticuerpo comercial se puede observar que hay varios picos presentes de baja intensidad que absorben a 280 nm. Esto quiere decir que hay diferentes fragmentos proteicos con distintos tamaños presentes en la muestra inyectada. Estos resultados reafirman los obtenidos a través de la electroforesis. A partir de todos los resultados obtenidos se puede concluir que el anticuerpo comercial se encuentra degradado.

VI. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se logró diseñar, sintetizar y caracterizar una sonda fluorescente pasible a reaccionar con dienofilos tensionados mediante una reacción de demanda inversa de electrones de Diels-Alder. Para ello se sintetizaron y funcionalizaron con éxito compuestos fluorescentes derivados de la familia BODIPY. Luego, se conjugó el fluoróforo obtenido (compuesto **3**) con una tetrazina, obteniendo una sonda fluorescente (compuesto **4**) con el potencial de participar en reacciones bio-ortogonales. Se caracterizó el producto obtenido mediante diferentes técnicas permitiendo confirmar su estructura y determinar su pureza. A su vez, se determinaron las capacidades ópticas y fisicoquímicas del mismo. Algunas de las propiedades mencionadas fueron determinadas utilizando un número de repeticiones por experimento bajo. Sería conveniente repetir dichos experimentos a la brevedad, aumentando el número de repeticiones, con el fin de poder reportar los datos obtenidos con sus correspondientes análisis estadísticos.

Luego de caracterizar al compuesto obtenido, se ensayaron sus posibles aplicaciones *in vitro*. Se pudo verificar la disminución del efecto de quenching intramolecular tras la reacción del fragmento tetrazina con TCO y determinar el factor de encendido de la molécula obtenida. A su vez, se determinó la constante cinética de segundo orden para la reacción de cicloadición sobre la superficie de un anticuerpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumab). Asimismo, se confirmó su utilidad como sonda fluorescente para marcado en electroforesis en gel y en ensayos de ELISA. También, se buscó determinar el valor de la sonda compuesta por el compuesto **4** conjugado a trastuzumab-TCO (1:1) como sonda para experimentos de citometría de flujo en células BT474. A partir de dichos experimentos no se obtuvieron los resultados esperados ya que la sonda no permitió distinguir las células marcadas de las células sin marcar de control.

A futuro se buscará repetir los ensayos de citometría de flujo aumentando el número de equivalentes del fluoróforo conjugados por anticuerpo. Con dicho fin se realizaron conjugaciones de anticuerpos con 4 y 8 equivalentes de compuesto **4** pero no pudieron ser ensayados en células debido a un mal funcionamiento del equipo y a la imposibilidad de solucionarlo debido al contexto actual. A su vez, se pretende realizar un ensayo de tinción de las mismas células utilizadas para la citometría de flujo, con los diferentes conjugados obtenidos durante el trabajo para ensayos de microscopía confocal. Como última aplicación, sería deseable ensayar el fluoróforo como sonda para estudios *in vivo* de animales pequeños mediante imágenes ópticas de fluorescencia.

A su vez, se buscará repetir el proceso sintético utilizado para la obtención del compuesto **4** utilizando un derivado de tetrazina sin metilar. De obtenerse el producto, se repetirán los ensayos cinéticos realizados para el compuesto **4**, esperando obtener constantes de velocidad mayores.

Por último, se pretende obtener un conjugado entre el compuesto **5** y un derivado de tetrazina para obtener una sonda adicional. Una vez halladas las condiciones de reacción para obtener dicho producto, se podrán realizar sobre el mismo los ensayos de caracterización fisicoquímica ya realizados para el compuesto **4**. A su vez, se podrán comparar los resultados de dicha sonda con los obtenidos en este trabajo.

Por último, resulta interesante evaluar la posibilidad de reducir la imina presente en el compuesto **4** y el futuro derivado del compuesto **5** para obtener compuestos con mayor estabilidad. Dicha reacción puede realizarse utilizando NaCNBH_3 .

VII. Bibliografía

1. Long, N. & Wong, W.-T. *The Chemistry of Molecular Imaging* | Wiley.
2. James, M. L. & Gambhir, S. S. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol. Rev.* **92**, 897–965 (2012).
3. Jaffer, F. A. & Weissleder, R. Molecular Imaging in the Clinical Arena. *JAMA* **293**, 855 (2005).
4. Massoud, T. F. & Gambhir, S. S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.* **17**, (2003).
5. Taraska, J. W. & Zagotta, W. N. Fluorescence applications in molecular neurobiology. *Neuron* **66**, 170–189 (2010).
6. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science, 2017).
7. Pirovano, G., Roberts, S., Kossatz, S. & Reiner, T. Optical Imaging Modalities: Principles and Applications in Preclinical Research and Clinical Settings. *J. Nucl. Med.* **61**, 1419–1427 (2020).
8. Patterson, D. M., Nazarova, L. A. & Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **9**, 592–605 (2014).
9. García, M. F. Estudio de reacciones bio-ortogonales con aplicación en el diagnóstico de cáncer. (Facultad de Química, Universidad de la República, 2018).
10. García, M. F. *et al.* 99mTc-bioorthogonal click chemistry reagent for in vivo pretargeted imaging. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1209–1215 (2016).
11. Rodríguez, G. Desarrollo de agentes fluorescentes derivados de agentes con actividad anti-Tripanosoma cruzi. (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2015).
12. Rodríguez, G. *et al.* Synthesis and in vivo proof of concept of a BODIPY-based fluorescent probe as a tracer for biodistribution studies of a new anti-Chagas agent. *RSC Adv.* **7**, 7983–7989 (2017).
13. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer US, 2006).
doi:10.1007/978-0-387-46312-4.

14. Sauer, M., Hofkens, J. & Enderlein, J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules* | Wiley.
15. Silverstein, T. P. Principles of Physical Biochemistry (van Holde, Kersal E.; Johnson, W. Curtis; Ho, P. Shing). *J. Chem. Educ.* **76**, 474 (1999).
16. Saroja, G., Soujanya, T., Ramachandram, B. & Samanta, A. 4-Aminophthalimide Derivatives as Environment-Sensitive Probes. *J. Fluoresc.* **8**, 405–410 (1998).
17. Perochon, E., Lopez, A. & Tocanne, J. F. Fluorescence properties of methyl 8-(2-anthroyl) octanoate, a solvatochromic lipophilic probe. *Chem. Phys. Lipids* **59**, 17–28 (1991).
18. Williams, A. T. R., Winfield, S. A. & Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst* **108**, 1067–1071 (1983).
19. Sandison, D. R., Piston, D. W., Williams, R. M. & Webb, W. W. Quantitative comparison of background rejection, signal-to-noise ratio, and resolution in confocal and full-field laser scanning microscopes. *Appl. Opt.* **34**, 3576–3588 (1995).
20. Li, L., Nguyen, B. & Burgess, K. Functionalization Of The 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 3112–3116 (2008).
21. Carlson, J. C. T., Meimetis, L. G., Hilderbrand, S. A. & Weissleder, R. BODIPY–Tetrazine Derivatives as Superbright Bioorthogonal Turn-on Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 6917–6920 (2013).
22. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. (Academic Press, 2013).
23. *Molecular Imaging II*. (Springer-Verlag, 2008). doi:10.1007/978-3-540-77496-9.
24. Oliveira, B. L., Guo, Z. & Bernardes, G. J. L. Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4895–4950 (2017).
25. Kozma, E., Demeter, O. & Kele, P. Bio-orthogonal Fluorescent Labelling of Biopolymers through Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactions. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **18**, 486–501

(2017).

26. Sauer, J. *et al.* 1,2,4,5-Tetrazine: Synthesis and Reactivity in [4+2] Cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2885–2896 (1998).
27. THALHAMMER, F., WALLFAHRER, U. & SAUER, J. Reaktivität Einfacher Offenkettiger und Cyclischer Dienophile bei Diels-Alder-Reaktionen mit Inversem Elektronenbedarf. *Reakt. Einfacher Offenkettiger Cyclischer Dienophile Bei Diels-Alder-Reakt. Mit Inversem Elektronenbedarf* **31**, 6851–6854 (1990).
28. Selvaraj, R. & Fox, J. M. trans-Cyclooctene—a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 753–760 (2013).
29. Blackman, M. L., Royzen, M. & Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13518–13519 (2008).
30. Karver, M. R., Weissleder, R. & Hilderbrand, S. A. Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation. *Bioconjug. Chem.* **22**, 2263–2270 (2011).
31. Mushtaq, S., Yun, S.-J. & Jeon, J. Recent Advances in Bioorthogonal Click Chemistry for Efficient Synthesis of Radiotracers and Radiopharmaceuticals. *Molecules* **24**, 3567 (2019).
32. Devaraj, N. K., Upadhyay, R., Haun, J. B., Hilderbrand, S. A. & Weissleder, R. Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **48**, 7013–7016 (2009).
33. Kang, K., Park, J. & Kim, E. Tetrazine ligation for chemical proteomics. *Proteome Sci.* **15**, 15 (2017).
34. García, M. F. *et al.* Synthesis of hydrophilic HYNIC-[1,2,4,5]tetrazine conjugates and their use in antibody pretargeting with ^{99m}Tc. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 5275–5285 (2018).
35. Amos, W. B. & White, J. G. How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. *Biol. Cell* **95**, 335–342 (2003).
36. Willcott, M. R. MestRe Nova. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13180–13180 (2009).

37. Yumpu.com. Solucion PBS - Universidad Autónoma de San Luis Potosí. *yumpu.com*
<https://www.yumpu.com/es/document/read/14197493/solucion-pbs-universidad-autonoma-de-san-luis-potosi>.
38. Wu, W., Cui, X. & Zhao, J. Hetero Bodipy-dimers as heavy atom-free triplet photosensitizers showing a long-lived triplet excited state for triplet–triplet annihilation upconversion. *Chem. Commun.* **49**, 9009–9011 (2013).
39. Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-107-partition-coefficient-n-octanol-water-shake-flask-method_9789264069626-en.
40. Fery-Forgues, S. & Lavabre, D. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *J. Chem. Educ.* **76**, 1260 (1999).
41. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **107**, 4891–4932 (2007).
42. Zhang, M. *et al.* One-pot efficient synthesis of pyrrolylBODIPY dyes from pyrrole and acyl chloride. *RSC Adv.* **2**, 11215–11218 (2012).
43. Ram, V. J., Sethi, A., Nath, M. & Pratap, R. *The Chemistry of Heterocycles - 1st Edition*.
44. Katritzky, A. R., Ramsden, C. A., Joule, J. A. & Zhdankin, V. V. *Handbook of Heterocyclic Chemistry (3rd Edition)*. (Elsevier, 2010).
45. Jiao, L. *et al.* β -Formyl-BODIPYs from the Vilsmeier–Haack Reaction. *J. Org. Chem.* **74**, 7525–7528 (2009).
46. Kang, J. *et al.* A solvent depend on ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid and its application in living cells. *Dyes Pigments* **136**, 852–858 (2017).
47. Wang, J.-B., Fang, X.-Q., Pan, X., Dai, S.-Y. & Song, Q.-H. New 2, 6-modified Bodipy sensitizers for dye-sensitized solar cells. *Chem. Asian J.* **7**, 696–700 (2012).
48. Bruckner, R. *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*.

(Springer-Verlag, 2010). doi:10.1007/978-3-642-03651-4.

49. Weininger, S. J. & Thornton, E. R. Probable Formation of Cyclobutadiene-Type Cations in the Mass-Spectral Decomposition of Pyridazines and Tetrazines. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 2050–2054 (1967).
50. Wube, A. A. *et al.* Design, synthesis and antimycobacterial activities of 1-methyl-2-alkenyl-4(1H)-quinolones. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 567–579 (2011).
51. Didecyl phthalate(84-77-5) 1H NMR.
https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_84-77-5_1HNMR.htm.
52. Devaraj, N. K., Hilderbrand, S., Upadhyay, R., Mazitschek, R. & Weissleder, R. Bioorthogonal turn-on probes for imaging small molecules inside living cells. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49**, 2869–2872 (2010).
53. Beliu, G. *et al.* Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy. *Commun. Biol.* **2**, 1–13 (2019).
54. Dumas-Verdes, C. *et al.* BODIPY-Tetrazine Multichromophoric Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2525–2535 (2010).
55. Chen, Y., Tsao, K. & Keillor, J. W. Fluorogenic protein labelling: a review of photophysical quench mechanisms and principles of fluorogen design. *Can. J. Chem.* (2014)
doi:10.1139/cjc-2014-0405.
56. Neuteboom, E. E., Meskers, S. C. J., Beckers, E. H. A., Chopin, S. & Janssen, R. A. J. Solvent Mediated Intramolecular Photoinduced Electron Transfer in a Fluorene-Perylene Bisimide Derivative. *J. Phys. Chem. A* **110**, 12363–12371 (2006).
57. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, (2001).
58. Bhal, S. K., Kassam, K., Peirson, I. G. & Pearl, G. M. The Rule of Five Revisited: Applying Log

- D in Place of Log P in Drug-Likeness Filters. *Mol. Pharm.* **4**, 556–560 (2007).
59. Di, L. & Kerns, E. H. Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, (2003).
60. Romieu, A. *et al.* The first comparative study of the ability of different hydrophilic groups to water-solubilise fluorescent BODIPY dyes. *New J. Chem.* **37**, 1016–1027 (2013).
61. Cunningham, C. W. *et al.* Uptake, Distribution and Diffusivity of Reactive Fluorophores in Cells: Implications Toward Target Identification. *Mol. Pharm.* **7**, 1301–1310 (2010).
62. Montaña, A. R. *et al.* In Vivo Nerve-Specificity of Rhodamines and Si-rhodamines. *Proc. SPIE--Int. Soc. Opt. Eng.* **11222**, (2020).
63. Mottram, L. F., Forbes, S., Ackley, B. D. & Peterson, B. R. Hydrophobic analogues of rhodamine B and rhodamine 101: potent fluorescent probes of mitochondria in living *C. elegans*. *Beilstein J. Org. Chem.* **8**, 2156–2165 (2012).
64. Hyun, H. *et al.* 700-nm Zwitterionic Near-Infrared Fluorophores for Dual-Channel Image-Guided Surgery. *Mol. Imaging Biol.* **18**, 52–61 (2016).
65. Hughes, L. D., Rawle, R. J. & Boxer, S. G. Choose Your Label Wisely: Water-Soluble Fluorophores Often Interact with Lipid Bilayers. *PLOS ONE* **9**, e87649 (2014).
66. Andrés, A. *et al.* Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **76**, 181–191 (2015).
67. In vivo target-specific activatable near-infrared optical labeling of humanized monoclonal antibodies | Molecular Cancer Therapeutics. <https://mct.aacrjournals.org/content/8/1/232>.
68. Cy7 NHS ester CAS NO (477908-53-5)-Molbase.
<https://www.molbase.com/moldata/3194129.html>.
69. Rossin, R. *et al.* In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3375–3378 (2010).
70. Wagner, J. A., Mercadante, D., Nikić, I., Lemke, E. A. & Gräter, F. Origin of Orthogonality of

Strain-Promoted Click Reactions. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **21**, 12431–12435 (2015).

71. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004).
72. Baskin, J. M. *et al.* Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16793–16797 (2007).
73. Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A. & Boons, G.-J. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **47**, 2253–2255 (2008).