



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E
INORGÁNICA

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

Diseño y Síntesis de Sondas Moleculares para
Detección por Espectrometría de Masas

Trabajo Fin de Máster

Rafael García López

Oviedo, Julio, 2024

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

Trabajo Fin de Máster

Curso 2023/2024

D. Rafael García López, graduado en Química, ha realizado la Memoria titulada “*Diseño y Síntesis de Sondas Moleculares para Detección por Espectrometría de Masas*” bajo la tutela de D. Félix Rodríguez Iglesias, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

El tutor certifica que la citada Memoria ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, autorizando su presentación para que sea calificada como **Trabajo Fin de Máster del Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible** correspondiente al curso académico 2023/2024.

Oviedo, 2 de Julio de 2024

Fdo.:

(Alumno)

Fdo.:

(Tutor)

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	5
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo.	8
1.2 Sondas moleculares.	9
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Síntesis y diseño de polímeros para su uso en análisis por ICP-MS. 10	
2.2 Síntesis de dendrímeros.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	25
4.1 Ruta sintética para acceder a la sonda de un solo ligando (1).	25
4.1.1 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-(pinacolboranil)bencil)-1,4,7,10- tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de <i>tert</i> -butilo (6).....	26
4.1.2 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-hidroxibencil)-1,4,7,10- tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)-triacetato de <i>tert</i> -butilo (5).....	26
4.1.3 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)- 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de <i>tert</i> -butilo (3)..	27
4.1.4 Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)- 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacético (1).....	30
4.2 Ruta sintética del dendrímero de 1º generación (2).	32
4.2.1 Síntesis del 4-(4-metoxifenil)hepta-1,6-dien-4-ol (15).	34
4.2.2 Síntesis del 1-(4-alilhepta-1,6-dien-4-il)-4-metoxibenceno (14)..	34

4.2.3 Síntesis del 4-(3-hidroxiopropil)-4-(4-metoxifenil)hepta-1,7-diol (13).	37
4.3 Utilidad de la sonda molecular 1 en análisis por ICP-MS.....	39
5. PARTE EXPERIMENTAL	42
5.1 Aspectos generales	42
5.2 Procedimientos experimentales.....	44
5.2.1 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-(pinacolboranil)bencil)-1,4,7,10- tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de <i>tert</i> -butilo (6).....	44
5.2.2 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-hidroxibencil)-1,4,7,10-tetraazaciclo dodecano-1,4,7-triil)-triacetato de <i>tert</i> -butilo (5).	45
5.2.3 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)- 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de <i>tert</i> -butilo (3)..	46
5.2.4 Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)- 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacético (1).....	47
5.2.5 Síntesis del 4-(4-metoxifenil)hepta-1,6-dien-4-ol (15).	48
5.2.6 Síntesis del 1-(4-ailhepta-1,6-dien-4-il)-4-metoxibenceno (14)..	49
5.3 Determinación de anticuerpos en una muestra.....	50
5.3.1 Reducción del anticuerpo monoclonal anti-CD20.....	50
5.3.2 Marcaje del anticuerpo monoclonal anti-CD20.....	50
6. CONCLUSIONES	51
7. BIBLIOGRAFÍA.....	52

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AMBN – 2,2'-Azobis(2-metilbutironitrilo)

AROP – Polimerización aniónica por apertura de anillo

CTA – Tritiocarbonato de di-1-feniletilo

DCM – Diclorometano

DCC – *N,N*-Diciclohexilcarbodiimida

DIPEA – *N,N*-Diisopropiletilamina

DMA – *N,N*-dimetilacrilamida

DMF – Dimetilformamida

DOTA – Ácido 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrail) tetraacético

DTPA – Ácido pentético

EDC – 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Et₂O – Dietil éter

HBTU – *N,N,N',N'*-Tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)uronio hexafluorofosfato, *O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato

Hex – Hexano

ICP-AES – Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente

ICP-MS – Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo

MeOH – Metanol

NAS – *N*-acriloxisuccinimida

RAFT – en inglés *adición-fragmentación reversible cadena de transferencia*

R_i – Factor de retención

RMN – Resonancia Magnética Nuclear

¹BA – Acrilato de *tert*-butilo

TCEP – Tris(2-carboxietil)fosfina

TFA – Ácido trifluoroacético

THF – Tetrahidrofurano

RESUMEN

Una sonda molecular es una molécula o grupo de moléculas que facilita el estudio de otras sustancias. Con el objetivo de desarrollar una sonda que permitiese la determinación cuantitativa de la concentración de anticuerpos, se diseñó una molécula para su utilización en marcaje y detección a través de ICP-MS.

El contenido de esta memoria se separa en los siguientes apartados: introducción, antecedentes, objetivos, discusión de los resultados, desarrollo experimental, conclusiones y bibliografía.

Para una mejor comprensión de la utilidad de la sonda y el razonamiento detrás de su diseño, en la introducción se recogen algunos aspectos en materia de Química Analítica. Seguidamente, la sección de antecedentes incluye estudios previos sobre moléculas con funciones y estructura similares a la molécula que se pretende sintetizar.

A continuación, se explican los objetivos del proyecto, alrededor de la síntesis de una sonda molecular para la detección de anticuerpos por ICP-MS.

Se incluye una discusión sobre los resultados, en la que se plantea la síntesis de una molécula que puede ser utilizada como sonda molecular, y se discuten los resultados obtenidos en la síntesis y en los estudios de su eficacia para el análisis químico de un anticuerpo.

En el apartado de desarrollo experimental se detalla el proceso de síntesis realizado, y se incluyen los experimentos de caracterización realizados a los productos e intermedios.

Por último, la memoria finaliza con una conclusión y se adjunta su bibliografía.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo.

Existen diversos métodos para la medida de elementos químicos en concentraciones de traza (ICP-AES, fotometría de emisión de llama, espectroscopía de absorción atómica...). Entre éstos, destaca el ICP-MS, una metodología muy extendida debido a su capacidad para determinar múltiples elementos simultáneamente en tiempos de análisis cortos.^{1,2}

Esta técnica consiste en la generación de un aerosol a partir de una muestra líquida, el cuál es atomizado y posteriormente ionizado en una antorcha de plasma. Los iones generados se aceleran a través de un campo eléctrico, y se separan al atravesar un campo magnético perpendicular en función de su relación masa:carga (m/z). El impacto de estos iones contra un detector resulta en una señal eléctrica, cuya intensidad está relacionada con la concentración de ese elemento en la muestra.³

Aunque surgió como una técnica que permitía detectar trazas de metales en líquidos, hoy en día se utiliza para la caracterización de compuestos tanto inorgánicos como orgánicos, y su uso se ha extendido a diversos campos, como la industria farmacéutica o alimentaria.^{1,2}

A pesar de ser una técnica muy ventajosa, el ICP-MS no puede usarse para la determinación cuantitativa de algunos elementos. Algunos son demasiado ligeros (H, He), otros no pueden ser ionizados por plasma de argón (F, Ne), los que están presentes en el aire y el plasma no solo no pueden medirse si no que generan grandes picos y ruido en el espectro (Ar, C, N, O), y existe el caso particular del azufre (S), que forma especies poliatómicas y tiene un potencial de ionización alto, lo que lo reduce la sensibilidad de la medida.⁴ Esto limita la utilidad del ICP-MS

cuando se trabaja con moléculas orgánicas que no presentan metales, como puede ser un anticuerpo, en el que ninguno de los átomos que lo integra pueda ser determinado correctamente. A raíz de este problema han surgido las sondas moleculares, que permiten modificar estas moléculas introduciendo átomos que pueden ser detectados con mayor sensibilidad.

1.2 Sondas moleculares.

Las sondas, marcas, o etiquetas, son moléculas utilizadas para facilitar el análisis químico de una muestra. Las sondas se unen a la molécula que se desea medir, y les confiere una propiedad que permite que pueda ser detectada a través de una técnica de análisis. Algunos ejemplos son las sondas fluorescentes, que permiten medir por fluorimetría moléculas no luminiscentes, o el radiomarcaje, que introduce isótopos radioactivos en moléculas que no emiten radiación.^{5,6}

También existen sondas que pueden ser utilizadas en ICP-MS, generalmente son moléculas que contienen varios átomos de un metal de transición. Como el peso molecular de estos metales es mucho mayor que el del resto de átomos en la molécula, se genera un pico en una región del espectro sin interferencias.⁶

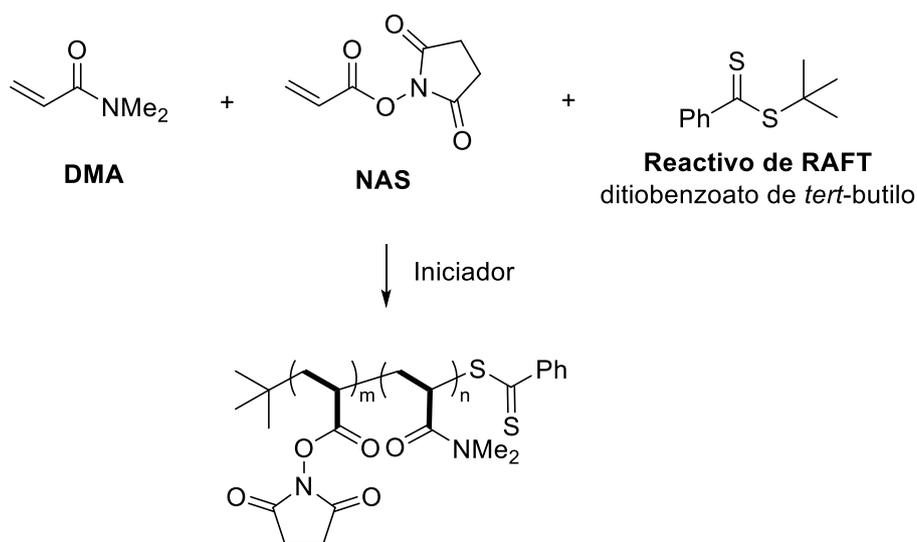
2. ANTECEDENTES

2.1 Síntesis y diseño de polímeros para su uso en análisis por ICP-MS.

La señal obtenida por ICP-MS aumenta de manera lineal con el número de átomos que entran al detector. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de átomos de metal que contenga la sonda molecular mayor será la señal obtenida y mayor será la sensibilidad del proceso.⁶

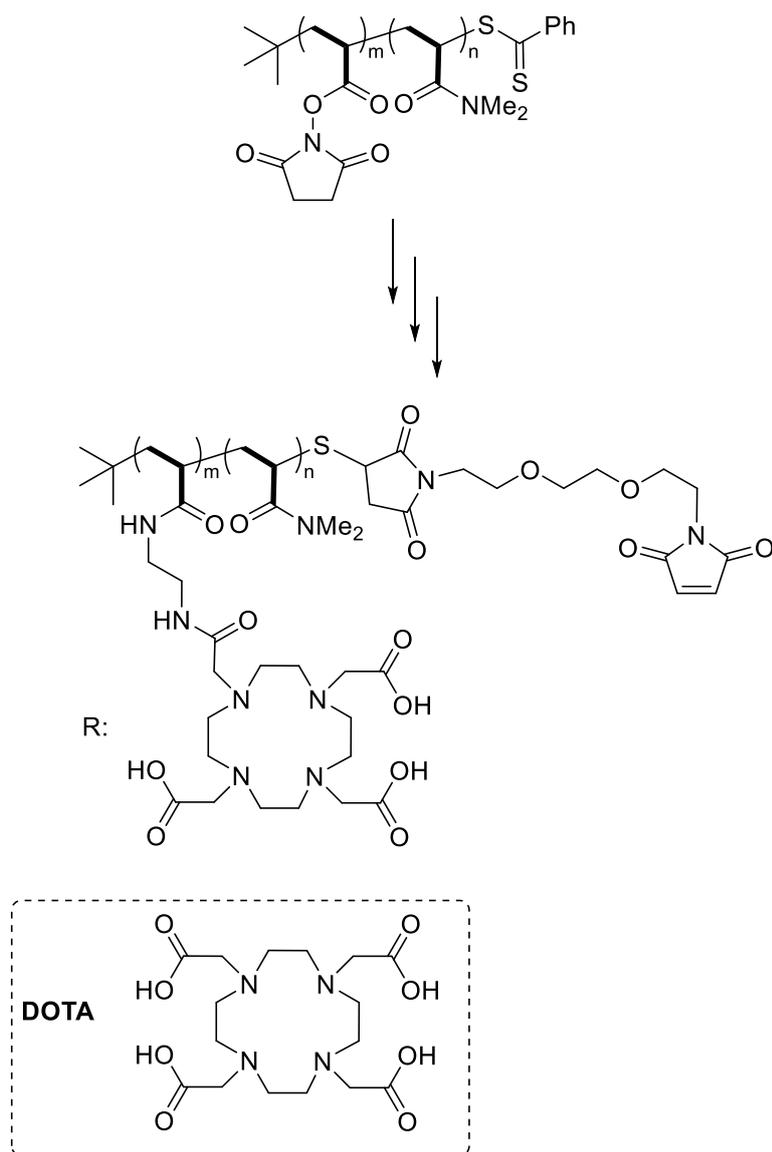
Una estrategia de marcado que aprovecha este fundamento es el uso de polímeros como sonda. El tamaño del polímero permite la introducción de un número elevado de grupos quelantes, que a su vez pueden alojar gran cantidad de átomos metálicos. A continuación, se describen algunos ejemplos de polímeros que contienen en su estructura ligandos que permiten coordinar metales, y que son utilizados como sondas para detección por ICP-MS.

En 2007, Xudong Lou *et al*, describieron el proceso de síntesis de un copolímero DMA-co-NAS por polimerización RAFT (Esquema 1).⁶



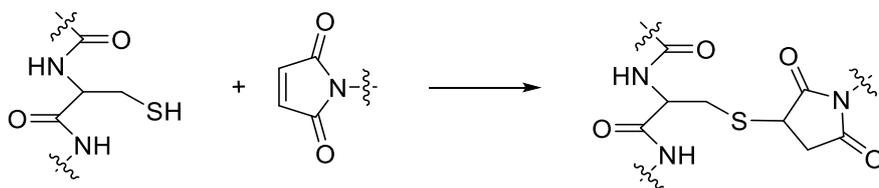
Esquema 1: Síntesis de copolímero DMA-co-NAS.

Tras someter al copolímero a una serie de transformaciones, se consiguió incorporar a la estructura un derivado del ligando DOTA en las posiciones del polímero que provenían de la succinimida. Los derivados del DOTA pueden coordinar eficientemente una gran variedad de átomos metálicos, y suelen utilizarse para coordinar lantánidos. También se adicionó un sistema bismaleimido, que sirve de punto de unión con la biomolécula (Esquema 2).⁶



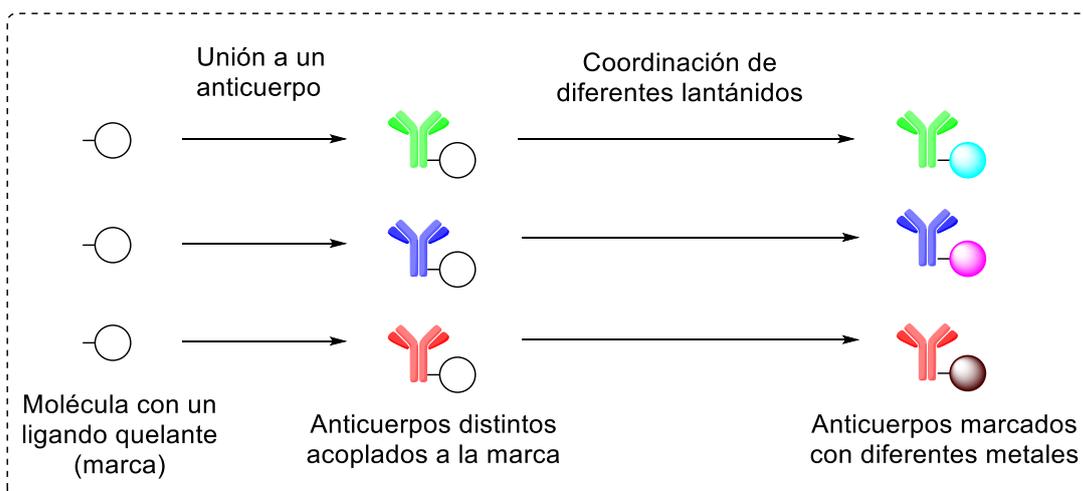
Esquema 2: Funcionalización del copolímero.

El grupo maleimida presente en la estructura puede reaccionar con tioles, a través de un proceso de adición al doble enlace C-C de la maleimida. Esto permite la unión del polímero a distintas biomoléculas que contengan tioles, como por ejemplo el aminoácido cisteína (Esquema 3). En concreto, en el trabajo del que procede esta síntesis, el copolímero se pudo unir exitosamente a cinco anticuerpos distintos, lo que permitió el análisis simultáneo de cinco antígenos diferentes presentes en células de ratón (Esquema 4).⁶

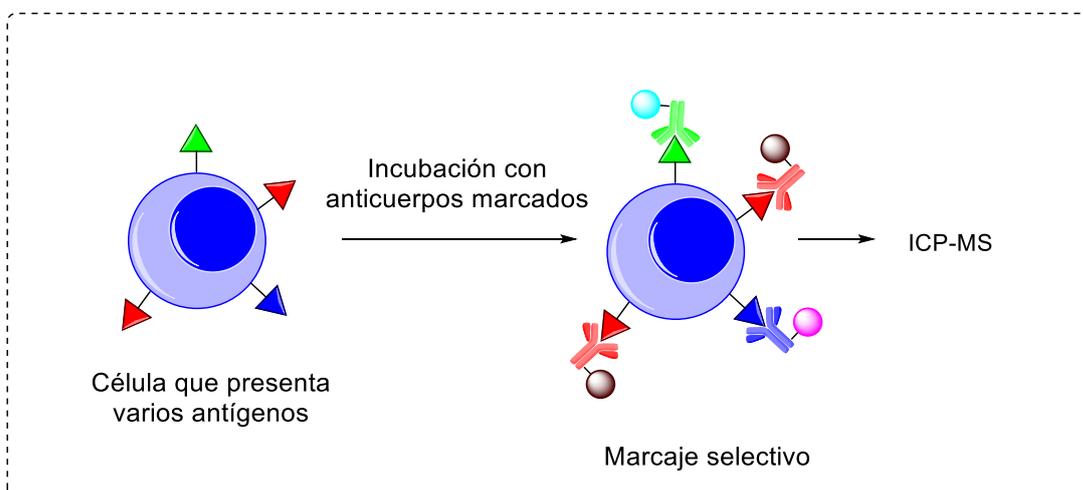


Esquema 3: Adición de la cisteína de un péptido a un sistema maleimido.

Marcaje de anticuerpos



Inmunoensayo



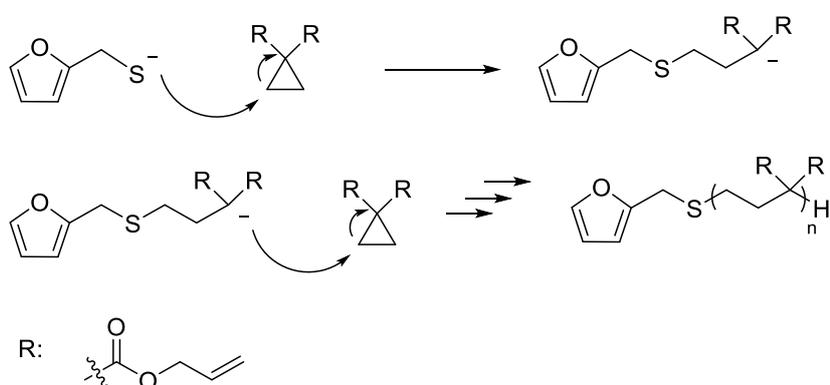
La concentración de los metales coordinados se puede obtener por medio de ICP-MS, y está correlacionada con la concentración de anticuerpos y sus correspondientes antígenos.

Esquema 4: Análisis simultáneo de varios antígenos por medio de un inmunoensayo.

En 2010 Daniel Majonis *et al* describieron también una síntesis de polimerización RAFT, para la preparación de un polímero de ¹³BA. Se utilizó AMBN como iniciador de la polimerización, y se hizo reaccionar el acrilato de *tert*-butilo (¹³BA) en presencia de CTA, un tritocarbonato que se utiliza como reactivo de RAFT. (Esquema 5).⁷

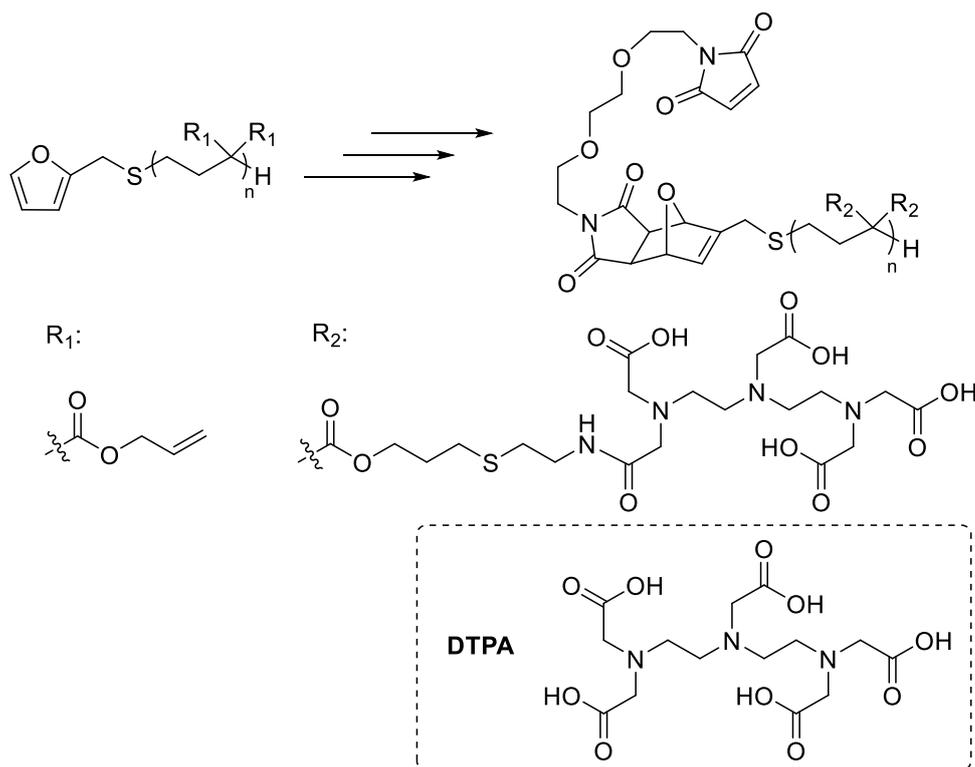
Otra síntesis de un polímero con propiedades quelantes fue descrita en 2012 por Nicolas Illy, *et al.* En la publicación describen una polimerización aniónica por apertura de anillo (AROP), con la peculiaridad de utilizar como monómero un ciclopropano.⁸

Se comienza desprotonando un tiol que actúa como iniciador. El sulfuro ataca al anillo de un ciclopropano y su apertura genera un carbanión que puede actuar como nucleófilo, atacando a otro anillo y alargando la cadena. (Esquema 7).^{8,9}



Esquema 7: Mecanismo de la síntesis de un polímero a través de AROP.

El polímero obtenido se sometió a una serie de transformaciones para incorporar a su estructura un grupo maleimida y un ligando con gran capacidad coordinativa. En este caso, el grupo maleimida se introdujo llevando a cabo una reacción de Diels-Alder a través del resto furano del polímero. Por otra parte se acoplaron derivados del ligando DTPA a la unidad constitucional del polímero, de forma que pudiera coordinar metales (Esquema 8).⁸



Esquema 8: Funcionalización del polímero.

Si se compara este polímero con los anteriores, se puede observar que cada una de sus unidades constitucionales soporta dos grupos quelantes en lugar de uno. Esta mayor densidad de sustituyentes se traduce en una cantidad mayor de metales que pueden ser soportados, creando una sonda aún más sensible.⁸

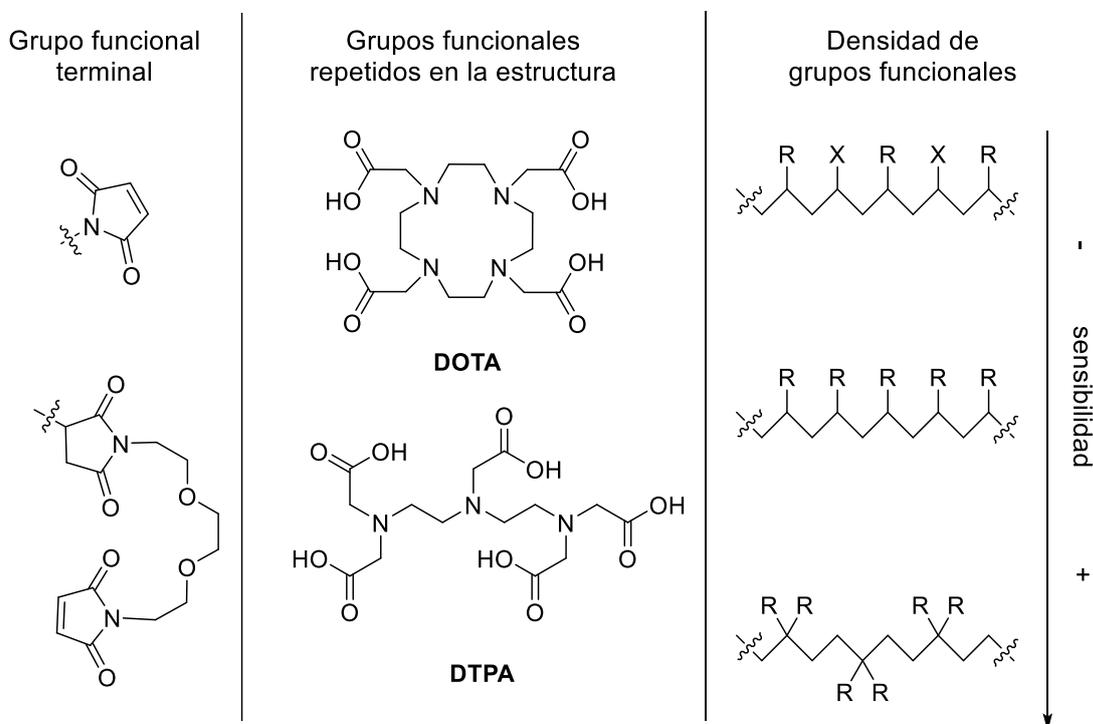
A pesar de las ventajas que ofrece el uso de estas macromoléculas como sondas, también cuentan con ciertas limitaciones. Es imposible conocer el número exacto de ligandos que contiene cada molécula de polímero, y este número varía de una molécula a otra, con lo cual la señal que se obtendrá al utilizarlas en análisis tendrá pequeñas variaciones. Las moléculas de polímero más largas contendrán un mayor número de ligandos que las más cortas, por lo que albergarán un mayor número de átomos de metal, y resultarán en señales más intensas durante las mediciones. Aunque existen formas de controlar el crecimiento de los polímeros durante su síntesis, reducir el índice de dispersión del producto sigue siendo un reto desde el punto de vista sintético.

Teniendo en cuenta estos ejemplos de síntesis de polímeros para su uso como sondas moleculares, podemos distinguir una serie de patrones (Esquema 9):

1) Aunque exista una gran variedad de estrategias de acoplamiento sonda-anticuerpo (a través de aminas y carbonilos presentes en el anticuerpo, utilizando sondas sintetizadas a partir de fragmentos de ADN, etc),¹⁰ parece ser que la incorporación de un grupo maleimida a la posición terminal de la sonda es la estrategia por excelencia.

2) Las sondas contienen grupos quelantes, especializados en la coordinación de lantánidos. Los derivados del DOTA y el DTPA parecen ser los ligandos más utilizados.¹⁰

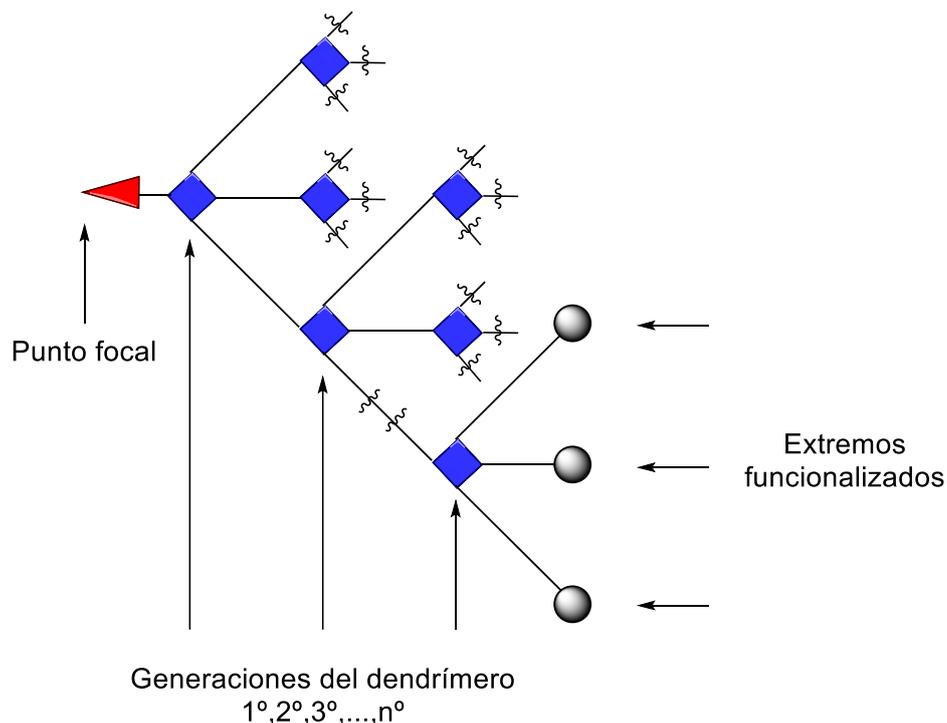
3) Se busca que la sonda contenga la mayor densidad posible de ligandos quelantes, ya que una mayor densidad de átomos metálicos coordinados supondrá una mayor sensibilidad.



Esquema 9: Tendencias en la síntesis de sondas moleculares.

2.2 Síntesis de dendrímeros.

Dentro de la clasificación de polímeros, existen unas moléculas que presentan una construcción arborescente (Esquema 10). Estas macromoléculas, denominadas dendrímeros, poseen una estructura definida, al contrario que los polímeros lineales, que poseen una distribución de tamaños probabilística.



Esquema 10: Estructura general de un dendrímero.

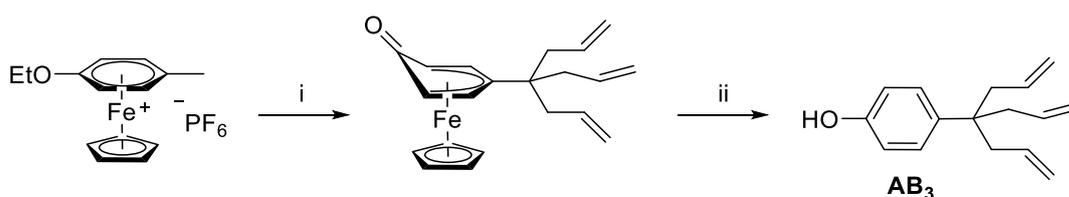
Como hemos visto antes, a la hora de sintetizar polímeros para su uso como sondas moleculares se busca reducir el índice de dispersión del proceso. Debido a que el número de átomos metálicos que coordina cada molécula de sonda depende de su longitud, un alto índice de dispersión reducirá la reproducibilidad y precisión de los análisis, puesto que cada molécula generará una señal ligeramente diferente.

Teniendo esto en cuenta, sintetizar un dendrímero que funcione como sonda molecular parece una idea atractiva, ya que todas las moléculas de sonda serán idénticas. En todo caso, hasta donde sabemos, no se han descrito sondas

moleculares con estructura dendrímica con aplicación en detección a través de ICP-MS.

A continuación, se recogen algunos ejemplos encontrados en la literatura sobre la síntesis de dendrímeros. En concreto, dendrímeros con una ramificación trialílica, que como se verá más adelante, podrían aplicarse al diseño y preparación de una sonda molecular. Estos ejemplos están relacionados con el trabajo que se recoge en esta memoria.

En 1999, Valérie Sartor *et al*, describen una síntesis organometálica de un derivado del fenol que contiene en su estructura una ramificación en tres alilos, al que nos referiremos como AB₃ (Esquema 11).¹¹

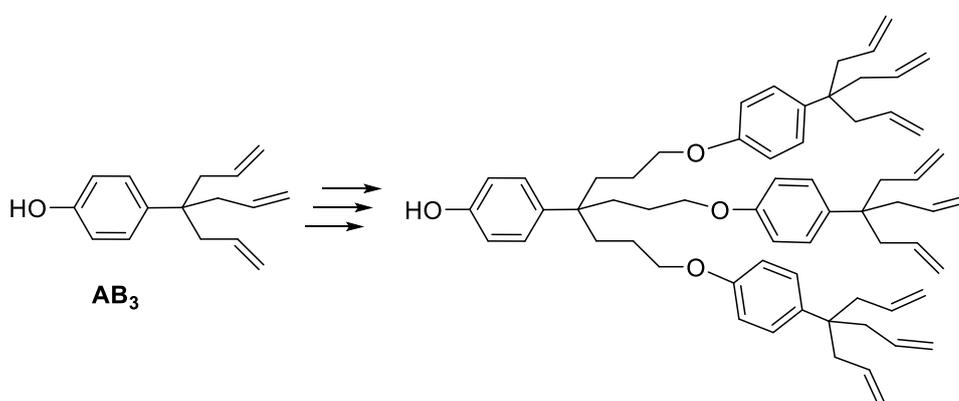


(i) *t*-BuOK, THF, CH₂=CH-CH₂Br, 10d, -50 °C, rt, 50%

(ii) MeCN, 4h, rt, 70%

Esquema 11: Síntesis organometálica del derivado del fenol AB₃.

En esta misma publicación demuestran el potencial de este tipo de estructuras para la síntesis de dendrímeros (Esquema 12).¹¹



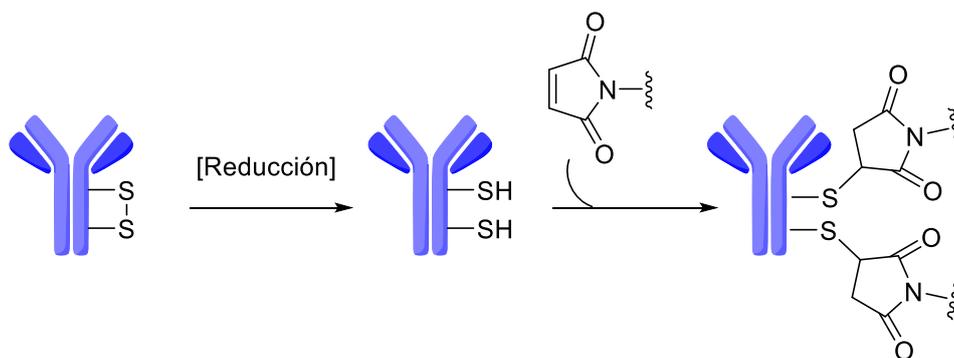
Esquema 12: Preparación de dendrímeros utilizando AB₃.

Basándonos en este trabajo, y otros relacionados con la síntesis y funcionalización del dendrón AB₃,^{12,13} se pensó en diseñar una sonda molecular para la detección a través de ICP-MS. Así, en los apartados que aparecen a continuación en esta memoria, se describen el diseño y primeros estudios acerca de una sonda molecular con estructura dendrímica, y su potencial uso para detección a través de ICP-MS.

3. OBJETIVOS

Se plantea la síntesis de una sonda molecular que pueda ser utilizada en la determinación cuantitativa de anticuerpos por medio de ICP-MS. Por tanto, el diseño de esta molécula deberá incluir: un punto de unión que permita el acoplamiento a anticuerpos, funcionalidades quelantes que permitan coordinar metales para su detección por ICP-MS, y una estructura repetitiva de modo que la molécula pueda coordinar un número relativamente elevado de átomos metálicos. De acuerdo con las ideas expuestas en los antecedentes de la memoria, se propone lo siguiente:

- 1) Como punto de unión: Se utilizará un grupo maleimida, siendo esta una estrategia ampliamente utilizada en el campo de marcaje de anticuerpos.^{6-8,10,14} La mayoría de los anticuerpos presentan puentes disulfuro que pueden ser reducidos a tioles, que a su vez se pueden adicionar a los grupos maleimida (Esquema 13).



Esquema 13: Unión al anticuerpo a través del grupo maleimido.

- 2) Como funcionalidad quelante: Se escogió un derivado del DOTA, que puede coordinar de forma eficiente metales lantánidos. Los lantánidos son comúnmente utilizados como marcadores en ensayos químicos, esto se debe a que pueden ser detectados con gran sensibilidad por medio de ICP-MS.¹⁰ Para introducir átomos de un lantánido en una molécula

orgánica es necesario soportarlos de alguna forma. Los azaciclos, sistemas cíclicos con múltiples grupos amino presentes en el anillo, se han popularizado como ligandos que mantienen cationes de distintos lantánidos fuertemente coordinados, entre ellos destacan los derivados del DOTA. Los grupos ácido carboxílico presentes en estas moléculas confieren solubilidad en medio acuoso a la sonda, necesaria para realizar la conjugación de la sonda a biomoléculas (Figura 1).^{6,15,16}

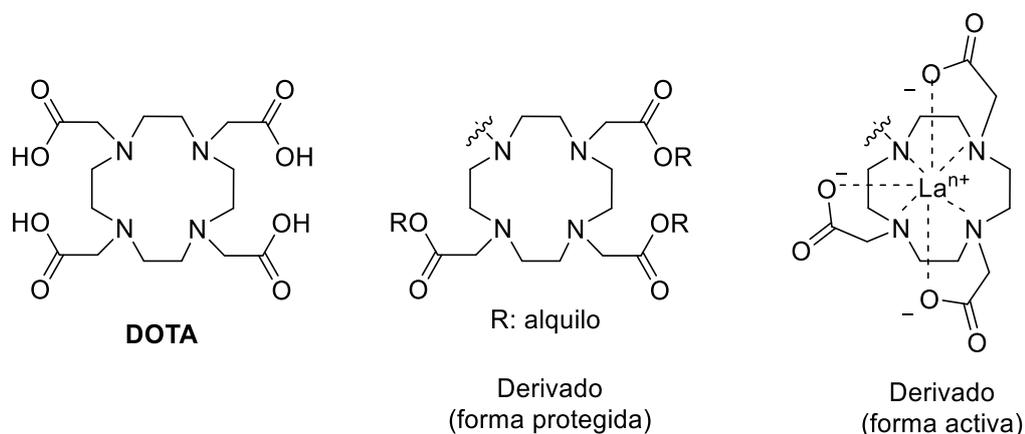


Figura 1: El DOTA, una molécula quelante con preferencia por los lantánidos, y un derivado de este, en forma protegida de éster y en forma activa de carboxilato.

- 3) Como estructura repetitiva: Se propone un dendrímero. Un aspecto importante en la síntesis de sondas moleculares poliméricas es la minimización del índice de dispersión del polímero sintetizado. Una menor variabilidad en el tamaño de las distintas moléculas de sonda proporciona unos resultados más precisos y reproducibles cuando se utiliza en análisis, de modo que un dendrímero, que posee una estructura con un tamaño definido, presenta una ventaja sobre el uso de polímeros.

En la Figura 2, se representa la estructura propuesta de acuerdo con estos tres puntos.

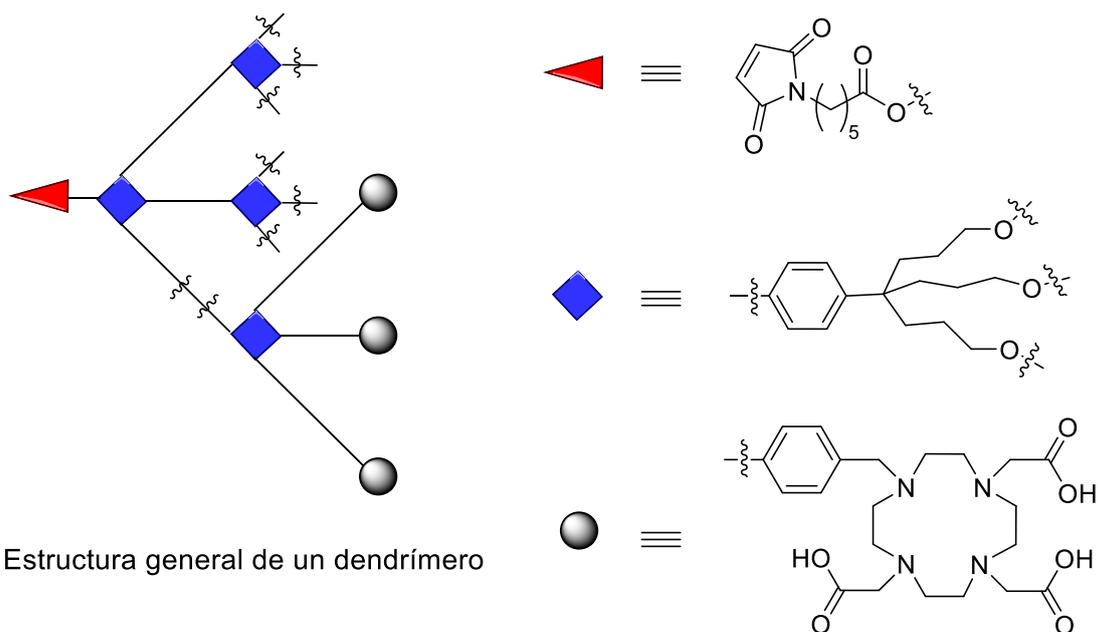


Figura 2: Estructura de la sonda molecular propuesta.

Antes de abordar la síntesis de la sonda con estructura de dendrímtero, y como prueba de concepto, se sintetizará la molécula lineal **1** (Figura 3) que contiene el punto de anclaje al anticuerpo (maleimida) y un único ligando quelante (derivado de DOTA).

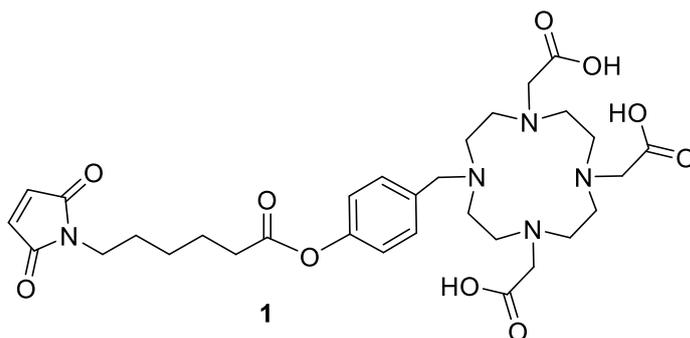


Figura 3: Sonda molecular lineal (**1**).

Se determinará si esta molécula tiene capacidad de unirse a un anticuerpo, se evaluará su capacidad de coordinar metales lantánidos, y finalmente se comprobará si puede llevar a cabo la detección a través de ICP-MS.

Después se continuará con la síntesis del dendrímero que contiene tres ligandos quelantes (**2**) (Figura 4).

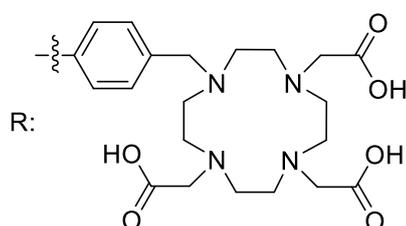
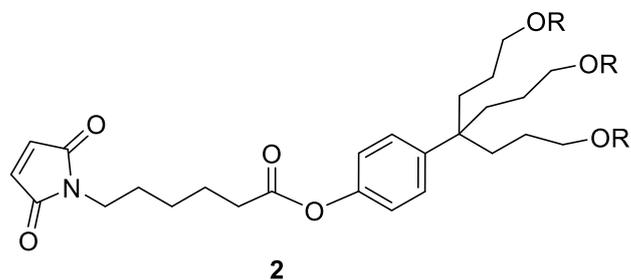


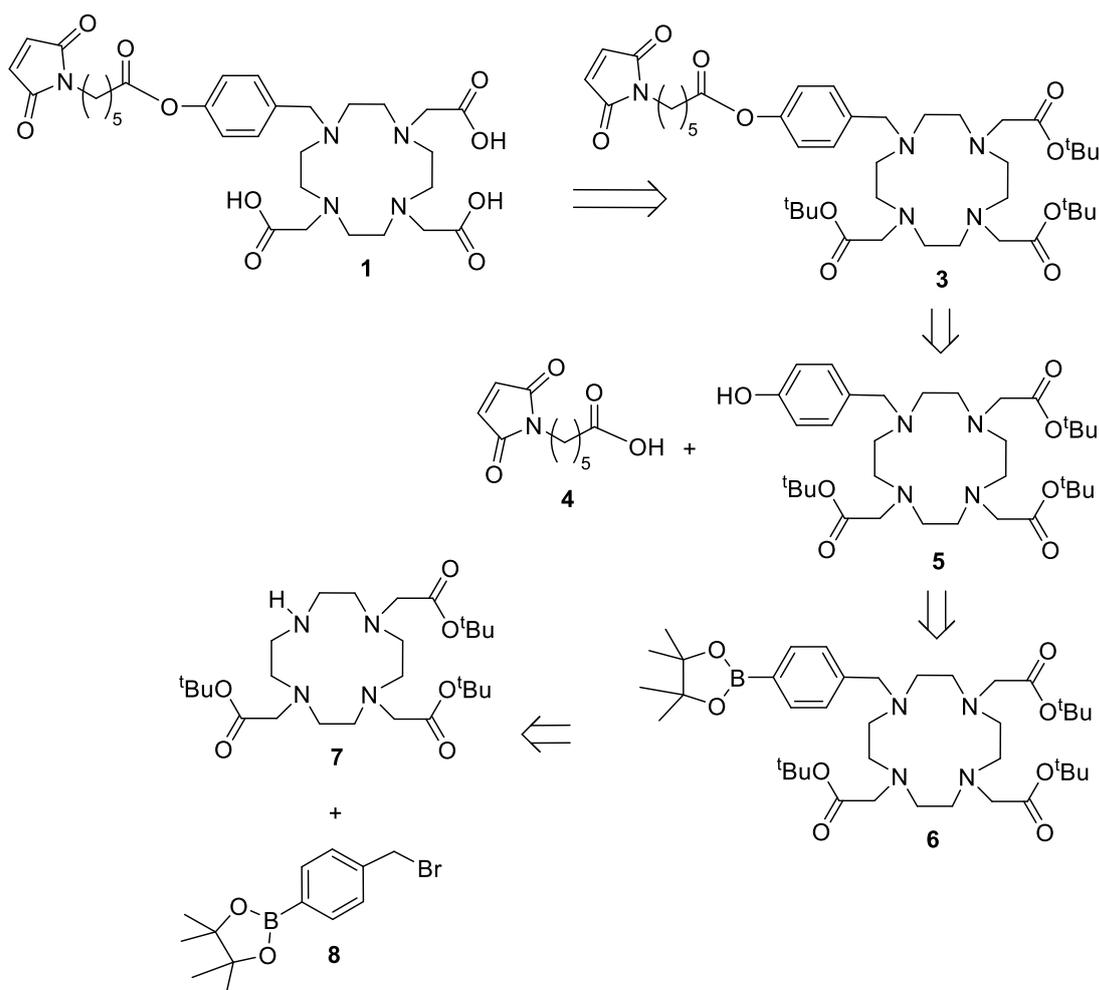
Figura 4: Sonda molecular dendrímica (**2**).

Aunque el objetivo final es la síntesis de moléculas con un gran número de ligandos, que pueden coordinar muchos átomos metálicos, tal y como se representa en la Figura 2, esto excede el alcance de este trabajo.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Ruta sintética para acceder a la sonda de un solo ligando (1).

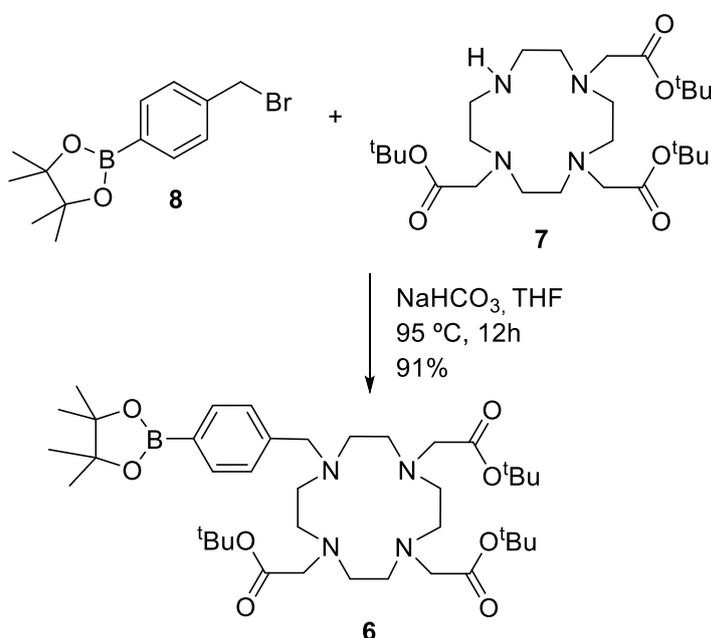
Para construir la molécula **1**, soluble en agua, se propone sintetizar el triéster **3**, soluble en disolventes orgánicos, y acceder a **1** en un paso final de hidrólisis de los ésteres de *tert*-butilo. La molécula **3** se podría sintetizar por medio de una esterificación entre el ácido 6-maleimido-hexanoico (**4**) y el fenol **5**. Por otra parte, el fenol **5** se podría obtener oxidando el enlace C-B de la molécula **6**, que se habría sintetizado realizando una alquilación del derivado comercial del DOTA **7** con el bromuro **8**, también comercial (Esquema 14).



Esquema 14: Retrosíntesis de la molécula **1**.

4.1.1 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-(pinacolboranil)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de *tert*-butilo (6).

Para poder introducir la funcionalidad 4-hidroxibencilo en el azaciclo **7** se realizó una *N*-alquilación de la amina secundaria utilizando el bromuro bencílico **8**. Se usó bicarbonato de sodio como base, y la reacción se llevó a cabo bajo argón a 95 °C durante 12h. El crudo de reacción se purificó por columna de sílica gel utilizando una mezcla DCM/MeOH como eluyente. Se obtuvo **6** como un sólido blanco amarillento con un rendimiento del 91% (Esquema 15).

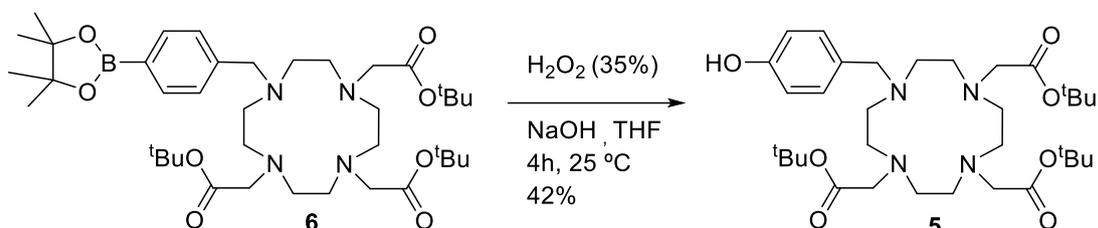


Esquema 15: Síntesis de **6**.

4.1.2 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-hidroxibencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de *tert*-butilo (5).

Para obtener el fenol deseado (**5**) se realizó la correspondiente oxidación del dioxiborolano **6**. La reacción se llevó a cabo mezclando una disolución de **6** en THF, con una disolución acuosa de hidróxido de sodio y otra de peróxido de hidrógeno.

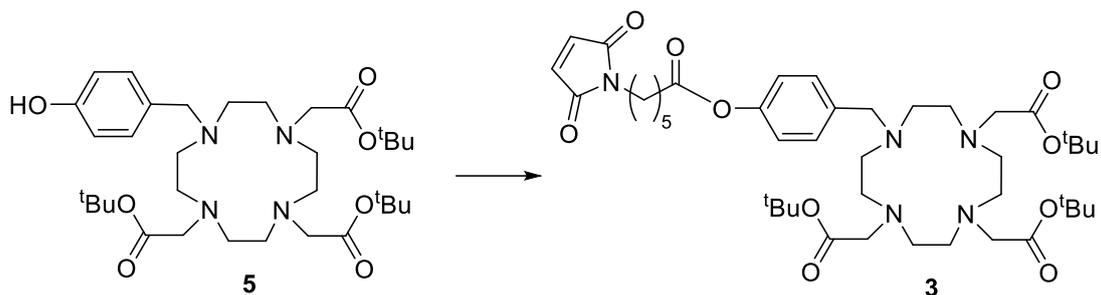
Tras cuatro horas de reacción a temperatura ambiente, se procedió a la purificación por columna de sílica utilizando una mezcla de DCM/MeOH como eluyente. Se obtuvo **5** como un sólido blanco amarillento con un rendimiento del 42% (Esquema 16).



Esquema 16: Síntesis de **5**.

4.1.3 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de *tert*-butilo (**3**).

Una vez sintetizado el fenol **5**, se pasó a estudiar la reacción de esterificación con el ácido 6-maleimidohexanoico (**4**). Esta reacción se realizó varias veces probando diferentes condiciones, que se recogen en la Tabla 1. Se intentó llevar a cabo la reacción utilizando los agentes de activación EDC y DDC, y también se intentó realizar la esterificación utilizando el cloruro de ácido **9**, preparado a partir del ácido 6-maleimidohexanoico (**4**). Ninguno de estos intentos resultó en el acoplamiento deseado (Tabla 1, entradas 1-3). Finalmente, se encontró que el agente de activación HBTU permite llevar a cabo la reacción con éxito. Para ello la reacción se realizó en diclorometano en presencia de un exceso de DIPEA, y se dejó 12 horas a 0 °C (Tabla 1, entrada 4). El crudo de reacción resultante se purificó por columna de sílica gel utilizando DCM/MeOH como eluyente y se obtuvo **3** como un sólido blanquecino con un 92% de rendimiento.



Entrada	Condiciones	Rendimiento
1	4, 5 , EDC, DCM, 0 °C, 12h	0%
2	4, 5 , DDC, DIPEA, DCM, 0 °C, 12h	0%
3	1) Preparación de 9 : 4 , ClCOCOCl, DCM, 12h 2) Esterificación: 9 , 5 , NEt ₃ , 0 °C, 12h	0%
4	4, 5 , HBTU, DIPEA, DCM, 0 °C, 12h	92%

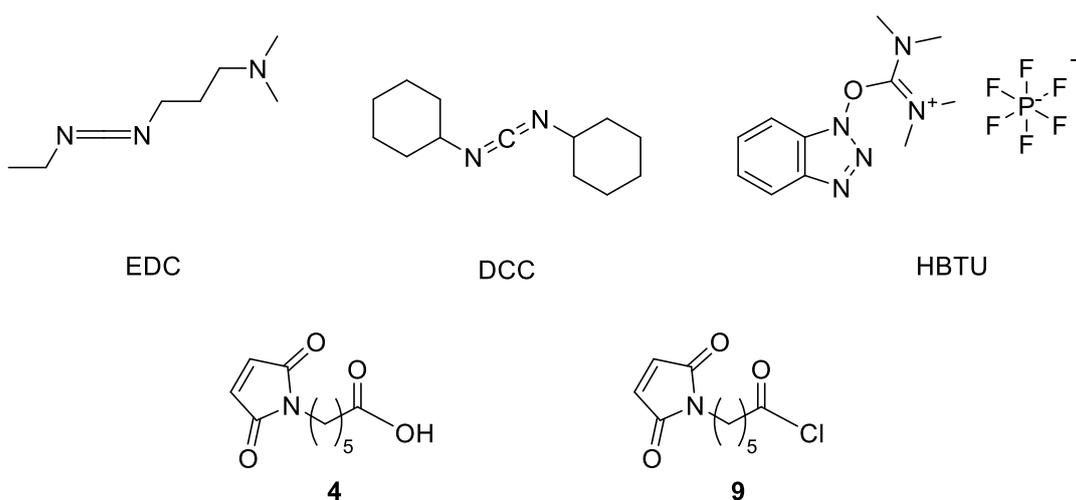


Tabla 1: Síntesis de **3** y condiciones que se estudiaron.

En la Figura 3 se representa el espectro de ^1H -RMN de **3**. Aparecen dos dobletes en 7.49 ppm y 7.03 ppm que corresponden a los dos pares de protones equivalentes del anillo aromático, un singulete en 6.72 que integra por los dos protones que pertenecen a los hidrógenos del anillo de maleimida, y un multiplete entre 1.50 ppm y 1.42 ppm que integra por veintisiete protones y que corresponde a los *tert*-butilos de los ésteres. También podemos señalar varios multipletes entre 3.57 ppm y 1.24 ppm que se corresponden con los protones de la cadena alifática que une el grupo maleimida y el carbonilo del éster.

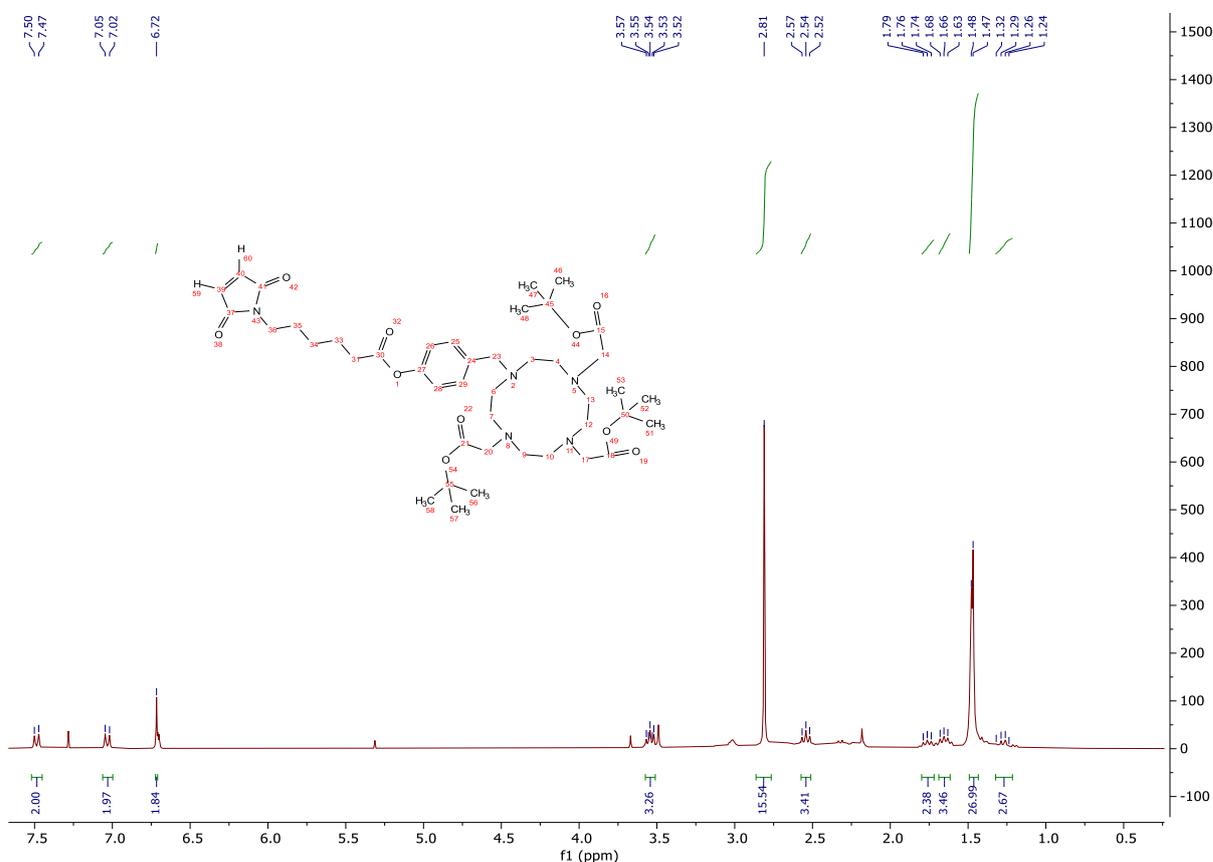
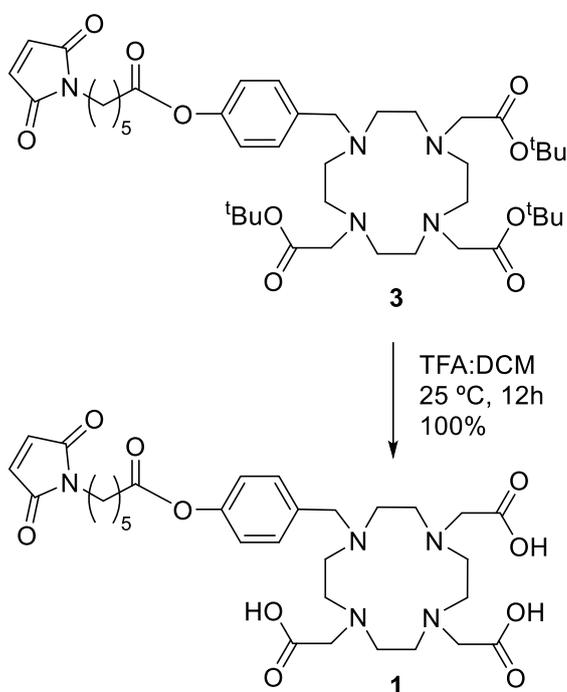


Figura 3: Espectro ^1H -RMN de **3**.

4.1.4 Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacético (1).

Por último, los ésteres de *tert*-butilo presentes en el azaciclo han de ser hidrolizados para que la sonda sea soluble en agua, lo cual es necesario para llevar a cabo la bioconjugación con los anticuerpos. La hidrólisis de los ésteres de **3** se realizó utilizando una disolución de TFA/DCM, dejándola actuar 12 horas a temperatura ambiente (Esquema 17). Tras una simple evaporación del disolvente, se obtuvo el compuesto **1** de manera cuantitativa.



Esquema 17: Síntesis de **1**.

En la Figura 3 se representa el espectro de ^1H -RMN de **1**. La desprotección de los ésteres de *tert*-butilo se pudo confirmar puesto que la señal en la región alrededor de 1.40 ppm, que correspondía a los veintisiete protones de los tres grupos *tert*-butilo en el triéster **3**, no aparece en este espectro.

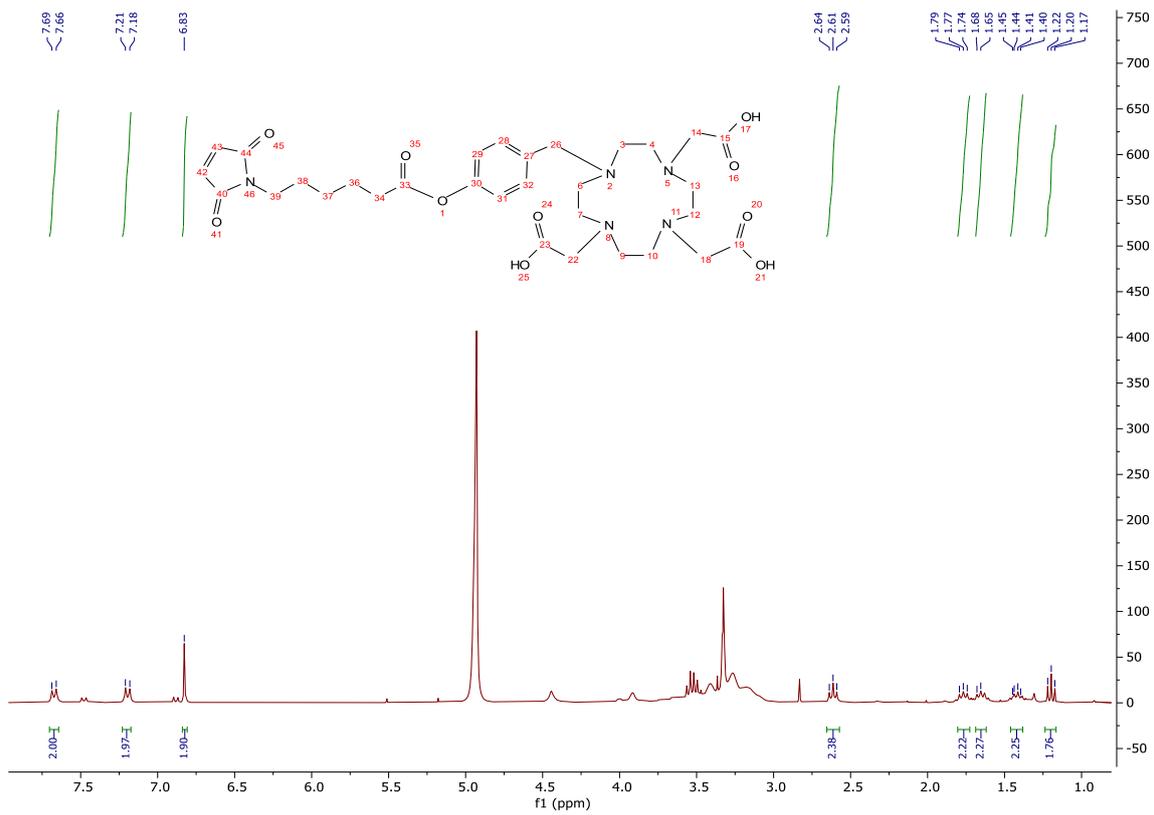
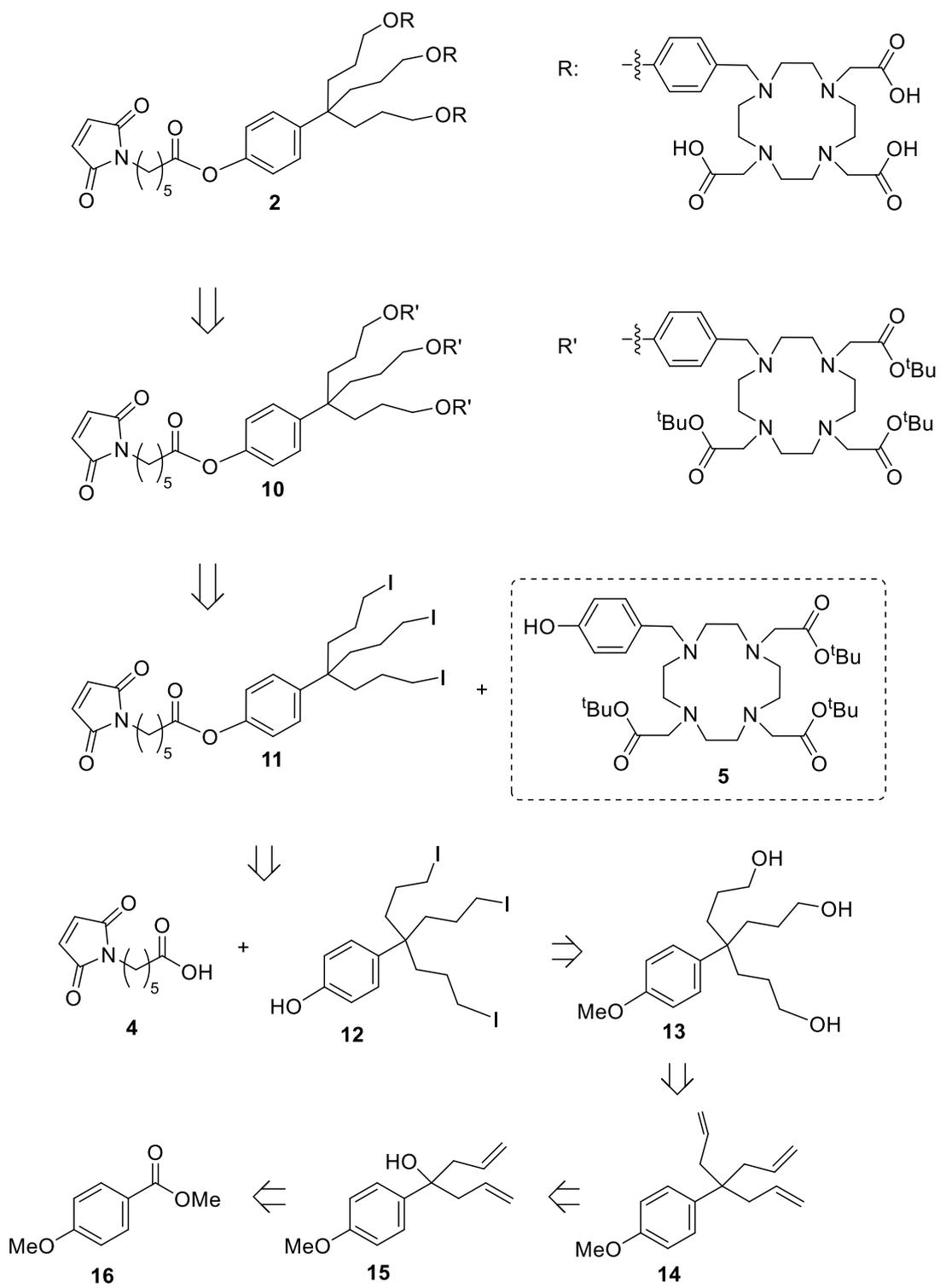


Figura 4: Espectro 1H-RMN de 1.

4.2 Ruta sintética del dendrímero de 1^o generación (2).

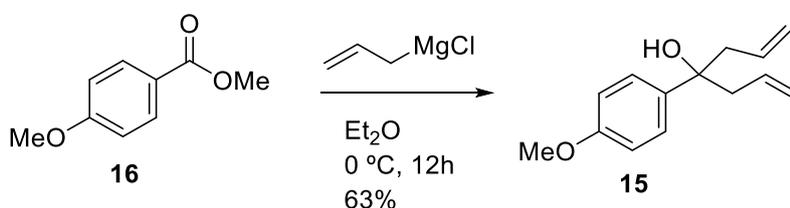
Tras la síntesis de la sonda molecular con un único ligando **1**, se iniciaron los estudios encaminados a la síntesis del dendrímero de 1^o generación **2**, que contiene en su estructura tres ligandos capaces de coordinar metales lantánidos. Para esto, se diseñó una síntesis convergente. El compuesto **2**, provendría del compuesto **10** tras la hidrólisis de los ésteres de *tert*-butilo de los ligandos quelantes. A su vez el compuesto **10** se podría preparar a partir del dendrímero **11** y el intermedio **5**, el fenol preparado durante la síntesis de **1**. El dendrímero **11** se puede obtener por medio de una esterificación entre el ácido carboxílico **4** y el fenol **12**. El fenol **12** se podría sintetizar a partir del triol **13**, que a su vez se podría preparar funcionalizando el trieno **14** a través de una hidroboración-oxidación. El trieno **14** se podría obtener a partir del alcohol **15**, que se podría preparar desde el éster comercial **16** (Esquema 18).



Esquema 18: Síntesis convergente de **2**.

4.2.1 Síntesis del 4-(4-metoxifenil)hepta-1,6-dien-4-ol (15).

Para la síntesis del alcohol **15** se partió del 4-metoxi-benzoato de metilo comercial **16**. Al tratarlo con un exceso de cloruro de alilmagnesio, se obtuvo, después de una hidrólisis, el alcohol **15**. La reacción se realizó bajo argón y a 0 °C, añadiendo una disolución del compuesto magnesiano a una disolución del éster **16**. Tras la adición, se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente y se paró tras 12 horas. El crudo de reacción se purificó por columna de sílica gel usando una disolución de Hex/Et₂O como eluyente. De esta forma se obtuvo el alcohol **15** con un rendimiento del 63% (Esquema 19).



Esquema 19: Síntesis de 15.

4.2.2 Síntesis del 1-(4-ailhepta-1,6-dien-4-il)-4-metoxibenceno (14).

Para introducir el tercer alilo se hizo reaccionar el compuesto **15** con una disolución de aliltrimetilsilano en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, ambos en exceso. La reacción se llevó a cabo a -78 °C y bajo argón. El crudo se purificó por columna de sílica gel usando una disolución de Hex/Et₂O como eluyente. Se comprobó que tanto la relación de reactivos como el tiempo de reacción tenían un efecto relevante en la eficacia del proceso. Así, cuando se utilizó un exceso de 5 equivalente de silano y de trifluoruro de boro con respecto a **15**, y la reacción se detuvo tras 10 minutos, se obtuvo el compuesto **14** con un rendimiento muy bajo del 10% (Tabla 2, entrada 1). La síntesis de **14** se repitió alargando el tiempo de reacción hasta 12 horas, pero de esta forma no se obtuvo producto (Tabla 2, entrada 2). También se llevó a cabo la reacción utilizando 10 equivalentes de silano y de trifluoruro de boro, con un tiempo

de reacción de 2 horas, pero se obtuvo **14** con un rendimiento de tan solo el 5% (Tabla 2, entrada 3). Los mejores resultados se consiguieron con un control estricto del tiempo de reacción, de forma que se detuvo rápidamente la reacción añadiendo agua tras 5 minutos, así se pudo obtener **14** con un rendimiento moderado del 49% (Tabla 2, entrada 4).

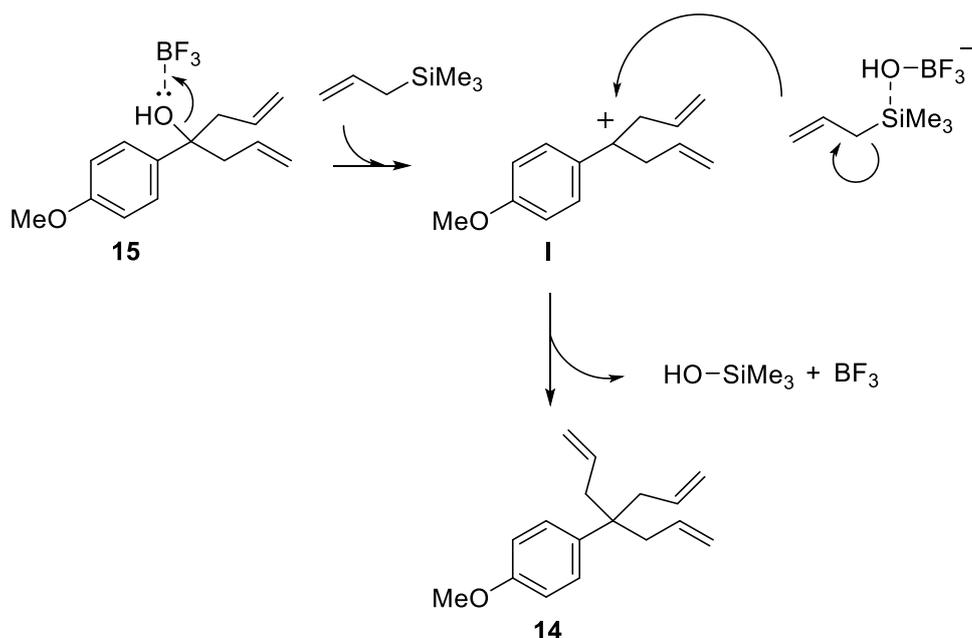
Entrada	Equivalentes 15 :silano:BF ₃ ·Et ₂ O	Tiempo de reacción	Rendimiento
1 ^a	1:5:5	10 min	10%
2 ^b	1:5:5	12h	0%
3 ^b	1:10:10	2h	5%
4 ^b	1:5:5	5 min	49%

^a La reacción se paró evaporando primero el disolvente, y después añadiendo agua.

^b La reacción se paró añadiendo agua al medio de reacción, controlando la temperatura.

Tabla 2: Síntesis de **14** y condiciones que se estudiaron.

En cuanto al mecanismo de este proceso, se propone que el trifluoruro de boro activa el alcohol, favoreciendo la formación del carbocatión **I**. A su vez, el anión [BF₃(OH)]⁻ generado activa el aliltrimetilsilano, que ataca al carbocatión **I** resultando en el compuesto **14** (Esquema 20).



Esquema 20: Mecanismo de la síntesis 14.

En la Figura 6 se representa el espectro $^1\text{H-RMN}$ de **14**. Se observa un par de dobletes entre 7.25 ppm y 6.86 ppm con una constante de acoplamiento $J = 9.0$ Hz, que corresponden a los protones del anillo aromático. Entre 5.65 ppm y 5.51 ppm se encuentra un multiplete que integra por tres protones, en 5.02 ppm un doblete ($J = 7.4$ Hz) que integra por tres protones, y en 4.99 un singulete que integra también por tres protones. Estas tres señales se corresponden con cada uno de los protones de las olefinas equivalentes de **14**. A 3.81 ppm se encuentra otro singulete, que integra por tres protones y que corresponde a los hidrógenos del grupo metoxi. Finalmente, el doblete a 2.44 ppm ($J = 7.1$ Hz) que integra por seis protones, proviene de los tres metilenos equivalentes de la molécula.

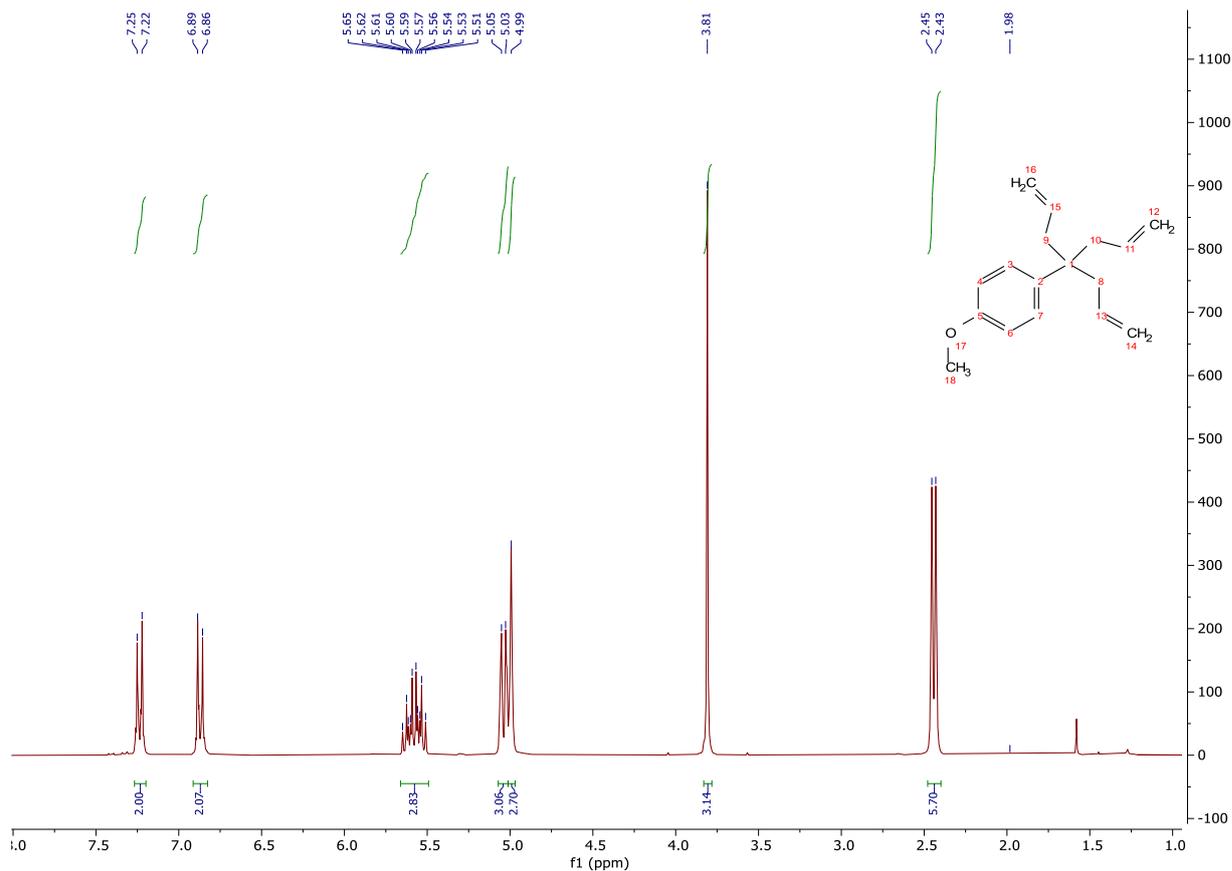


Figura 6: Espectro 1H-RMN de 14.

4.2.3 Síntesis del 4-(3-hidroxipropil)-4-(4-metoxifenil)hepta-1,7-diol (13).

Una vez se perfeccionó la síntesis del trieno **14** y se pudo obtener una cantidad considerable de material, se procedió a la síntesis del triol **13**, a través de una hidroboración-oxidación de los dobles enlaces C-C del trieno **14**.

Para ello se preparó un borano impedido, el disiamilborano, que se adicionó a la olefina, y después se oxidó con una disolución básica de peróxido de hidrógeno (Tabla 3, entrada 1). Tras purificarlo por columna se pudo aislar tan solo una pequeña cantidad de producto, que sorprendentemente resultó ser material de partida.

El proceso se intentó de nuevo utilizando borano (Tabla 3, entrada 2), pensando que su mayor reactividad frente al disiamilborano daría un mejor resultado, pero

tampoco pareció reaccionar, por lo que la síntesis del compuesto **13** no se pudo completar debido a la falta de tiempo.

Entrada	(a)	Rendimiento
1	HB(sia) ₂	0%
2	BH ₃	0%

Tabla 3: Síntesis de 15 y condiciones que se estudiaron.

4.3 Utilidad de la sonda molecular 1 en análisis por ICP-MS.

La sonda molecular con un único ligando **1** se utilizó para medir la concentración del anticuerpo monoclonal anti-CD20. Este anticuerpo se utiliza en el tratamiento de enfermos de leucemia, y actúa uniéndose a las proteínas CD20 presentes en los glóbulos blancos cancerosos, estimulando la reacción del sistema inmunitario.

Primero se realizó un estudio de la capacidad coordinativa de la sonda. Se añadió una disolución comercial de Tb^{3+} 1000 ppm (2% HNO_3) a una disolución acuosa de la sonda **1**, para que los iones metálicos se coordinasen a los ligandos quelantes de la sonda. Esto se repitió incrementando progresivamente la relación molar Tb : sonda (Figura 7), utilizando mayores cantidades de disolución de terbio durante la preparación de la muestra.

Las disoluciones de sonda se midieron por ICP-MS, los espectros superpuestos se encuentran representados en la Figura 7.

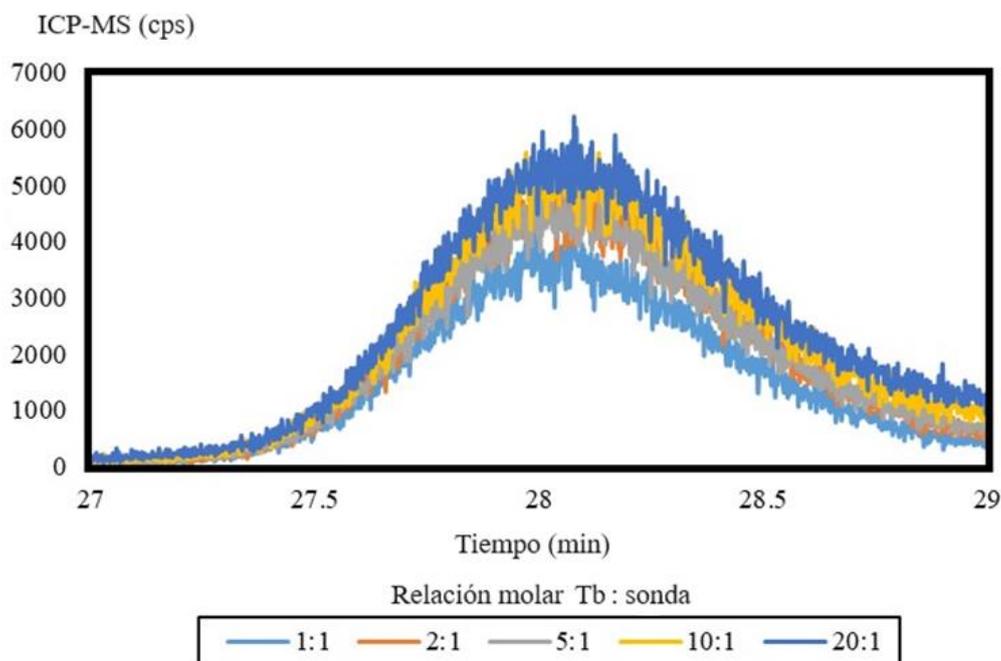


Figura 7: Espectros de masas superpuestos de varias muestras de sonda 0,35 $\mu\text{g/mL}$. Cada una se preparó con una concentración distinta de terbio.

Se puede observar que una mayor cantidad de terbio incrementa la señal obtenida, por lo que es necesario utilizar excesos del metal para que todos los ligandos de la disolución de sonda consigan coordinar algún ion. El exceso necesario para maximizar la señal obtenida se encuentra dentro de un rango aceptable, por lo que se puede afirmar que la sonda es capaz de coordinar lantánidos adecuadamente.

También se quiso comprobar la efectividad de la sonda en el marcaje de anticuerpos. Para ello se redujo el anticuerpo monoclonal anti-CD20, que contiene en su estructura puentes disulfuro, formando así tioles a los que se podría acoplar la sonda. Se siguió el procedimiento indicado en un kit de marcaje comercial de modelo Maxpar, utilizando las disoluciones tampón provistas por el kit (referidas únicamente como buffer-R, buffer-W, buffer-C, buffer-PBS), y se usó una disolución de TCEP como reductor de puentes disulfuro.

Se mezcló la disolución de anticuerpos reducida con un exceso de la disolución preparada en el experimento anterior (Tb : sonda 10:1), y se incubó durante 90 minutos a 37 °C. Se centrifugó la mezcla dentro de un filtro de exclusión por tamaño, de forma que la sonda que no se hubiese acoplado a anticuerpos se pudiera separar al ser mucho más pequeña que los anticuerpos.

Se analizó el contenido de la muestra por medio de ICP-MS. Además del espectro de masas realizado por el ICP-MS, la cámara de nebulización del aparato contiene un espectrómetro UV/Vis, ambos espectros se encuentran superpuestos en la Figura 8.

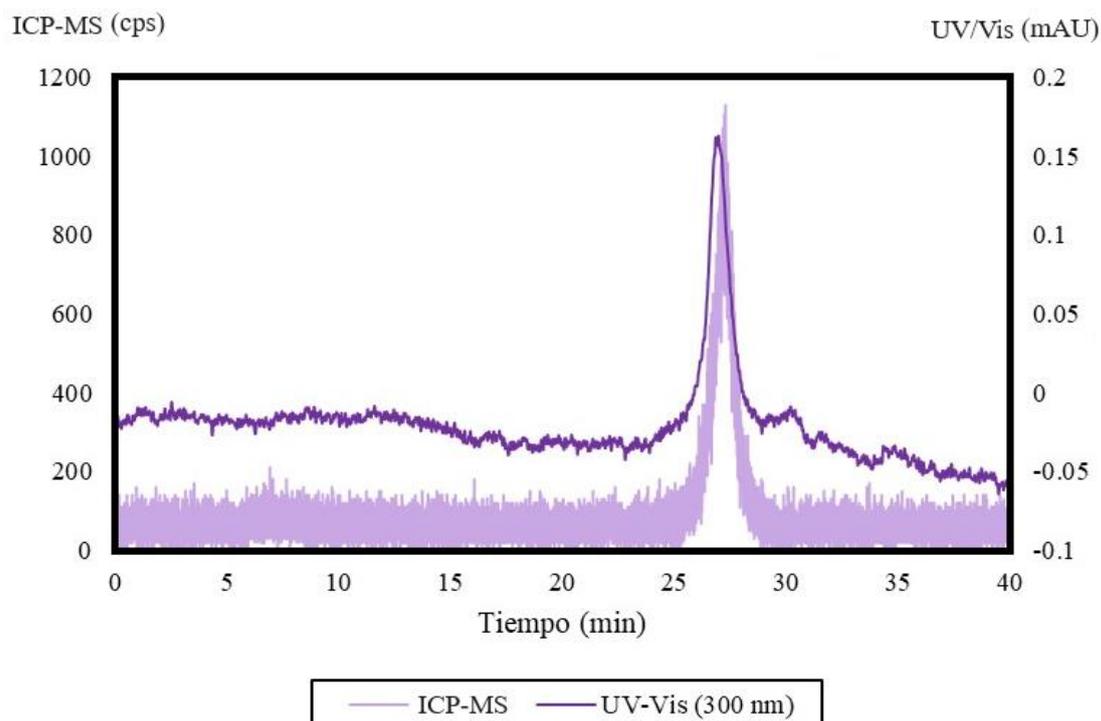


Figura 8: Espectros de masas y UV/Vis de una muestra de anticuerpos marcados de concentración 0,5 mg/mL.

La intensidad del espectro UV/Vis viene dada como unidades de absorbancia (mAU), y la del espectro de masas en cuentas por segundo (cps), lo que representa el número de iones que golpean el detector cada segundo. La presencia de un pico en el espectro de masas en la región que le corresponde al terbio confirma tanto la capacidad de la sonda de coordinar iones de lantánidos como de acoplarse a anticuerpos.

El resultado de estos estudios parece confirmar la utilidad de la molécula diseñada para su aplicación como sonda para detección a través de ICP-MS. En cualquier caso, el trabajo habría de completarse con la síntesis de una sonda de tipo dendrímero, que pudiera acoger un número mayor de iones metálicos.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Aspectos generales

Condiciones de trabajo

En el caso de las reacciones realizadas bajo atmósfera inerte: fueron llevadas a cabo en atmósfera inerte de argón (99,99%), aplicando técnicas de Schlenk, y equipados con tubos con tapones herméticos provistos de válvula. El material de vidrio fue secado y evacuado previamente a su utilización.

En el caso de reacciones realizadas a baja temperatura: para reacciones llevadas a cabo a una temperatura de 0 °C se empleó un baño de hielo y agua, para aquellas que requiriesen temperaturas inferiores a 0 °C se utilizó un baño de acetona, enfriada a la temperatura necesaria utilizando nitrógeno líquido.

En el caso de reacciones realizadas a alta temperatura: se empleó un baño de silicona calentado a través de una placa calefactora con un termómetro de contacto.

Disolventes

Todos los disolventes empleados en reacciones bajo atmósfera inerte fueron secados con agentes deshidratantes adecuados y destilados previamente a su uso.

Cromatografía

En el caso de la cromatografía de capa fina (TLC): se realizó utilizando placas de gel de sílice 60 sobre soporte de aluminio, y se revelaron utilizando luz UV ($\lambda=254$) tras bañarlas en colorantes como una disolución de vainillina o cerio-molibdeno, dependiendo del compuesto.

En el caso de la purificación mediante cromatografía de columna: se llevó a cabo utilizando gel de sílice 60. La mezcla de eluyentes varió dependiendo del

compuesto, aunque generalmente fueron mezclas DCM/MeOH o Hex/Et₂O, dependiendo del R_f de los compuestos a purificar.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de ¹H-RMN fueron realizados en los equipos Bruker AV-300 (300 MHz) y Bruker DPX-300 (300 MHz). Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (Si(CH₃)₄). Los datos se indican en cada producto de la siguiente manera: desplazamiento químico, multiplicidad (s: singulete, sa: singulete ancho, d: doblete, dd: doble doblete, dt: doble triplete, dq: doble cuatriplete, t: triplete, tt: triple triplete, tq: triple cuatriplete, q: cuatriplete, m: multiplete), constantes de acoplamiento (J) expresadas en Hz, integración y asignación. Los espectros de ¹³C se registraron en los espectrómetros Bruker AV-300 (75 MHz) y Bruker DPX-300 (75 MHz) con desacoplamiento de protón. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (Si(CH₃)₄).

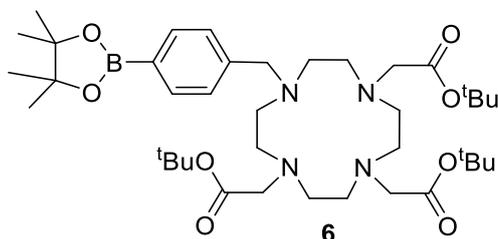
Espectrómetro de masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo

Los espectros de masas se realizaron con un espectrómetro modelo iCAP-TQ ICP-MS, compuesto por dos cuadrupolos en posición vertical y una celda de colisión/reacción entre ambos. El equipo debe ser puesto a punto de forma diaria para optimizar la sensibilidad y controlar la formación de óxidos. Para ello se optimizan parámetros como los flujos de gases, la posición de la antorcha y las corrientes aplicadas en las lentes. Esta se efectúa de manera autónoma por el equipo suministrándole una disolución de Li, Co, In, Ba, Ce y U en concentraciones de 1 µg/L.

5.2 Procedimientos experimentales

5.2.1 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-(pinacolboranil)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de *tert*-butilo (**6**).

En un matraz Schlenk de alta presión se disolvieron 700 mg de **7** (1.14 mmol), 677 mg de **8** (2.28 mmol) y 478 mg de bicarbonato de sodio (5.7 mmol), en 15 mL de THF bajo argón. Se selló el matraz y se dejó agitando a 95 °C 12 horas. La disolución se filtró a través de un papel y se lavó el residuo con 2 mL de metanol. Se evaporaron los disolventes y se realizó una purificación por cromatografía de columna, utilizando como eluyente una mezcla DCM:MeOH 45:1, y aumentando gradualmente la concentración de metanol hasta llegar a DCM:MeOH 4:1, obteniéndose el 2,2',2''-(10-(4-(pinacolboranil)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de *tert*-butilo (**6**).



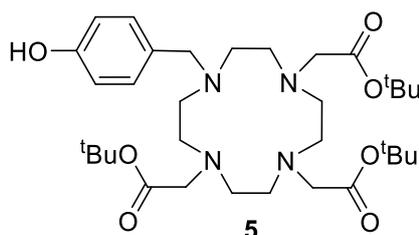
Rendimiento: 91%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.72 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.97 (s, 2H), 2.35 (s, 6H), 1.41 (s, 27H), 1.30 (bs, 16H), 1.19 (s, 12H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.40, 172.49, 141.13, 135.21, 129.43, 83.91, 82.75, 82.28, 59.78, 55.76, 27.99, 24.87.

5.2.2 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-hidroxibencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)-triacetato de *tert*-butilo (5).

Se disolvieron en un matraz 832 mg de **6** (0.84 mmol) en 7 mL de THF, se le añadió 1.1 mL de una disolución acuosa 3M de NaOH y 0.3 mL de una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno 35% (w/w). Se dejó agitando 4 horas a temperatura ambiente, tras las que se extrajo con DCM (2 x 10mL). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron con Na₂SO₄ y se evaporaron los disolventes. El crudo se purificó por medio de columna cromatográfica, utilizando como eluyente una mezcla DCM:MeOH 45:1, y aumentando gradualmente la concentración de metanol hasta llegar a DCM:MeOH 6:1, obteniéndose 2,2',2''-(10-(4-hidroxibencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)-triacetato de *tert*-butilo (**5**).



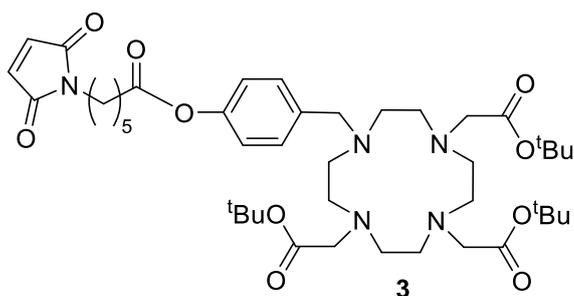
Rendimiento: 42%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.40 (s, 2H), 2.76 – 2.57 (m, 6H), 1.45-1.35 (m, 27H), 1.19 (bs, 12H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.17, 172.23, 169.79, 157.45, 130.77, 126.85, 116.23, 82.97, 82.34, 81.89, 75.02, 58.91, 55.78, 55.56, 28.08, 27.85, 24.83.

5.2.3 Síntesis del 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de *tert*-butilo (3).

En un matraz Schlenk se disolvieron 230 mg de **5** (0.37 mmol), 230 mg de **4** (1.11 mmol) y 209 mg de HBTU (0.56 mmol), en 10 mL de DCM. Se añadieron 0.45 mL de DIPEA y se dejó agitando 12 horas. Se evaporaron los disolventes y se realizó una purificación por cromatografía de columna, utilizando como eluyente una mezcla DCM:MeOH 20:1, y aumentando gradualmente la concentración de metanol hasta llegar a DCM:MeOH 3:1, obteniéndose el 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de *tert*-butilo (**3**).



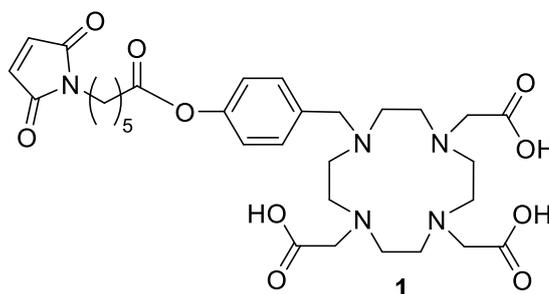
Rendimiento: 92%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.72 (s, 2H), 3.57 – 3.52 (m, 2H), 2.81 (bs, 16H), 2.57 – 2.52 (m, 2H), 1.80 – 1.72 (m, 2H), 1.69 – 1.62 (m, 2H), 1.47 (d, *J* = 3.5 Hz, 27H), 1.32 – 1.24 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.55, 172.58, 170.88, 150.07, 135.12, 134.14, 131.15, 121.90, 82.86, 82.38, 58.87, 55.87, 55.61, 38.61, 37.54, 34.03, 28.23, 27.92, 27.84, 26.18, 24.32.

5.2.4 Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacético (1).

Se disolvieron en un matraz 50 mg de **3** en 2 mL de una disolución 1:1 (v/v) de DCM:TFA, y se dejó agitando 12 horas. Se evaporaron los disolventes a vacío y se hizo precipitar añadiendo 4mL de Et₂O, obteniendo ácido 2,2',2''-(10-(4-((6-maleimidohexanoil)oxi)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacético (**1**) de manera cuantitativa.



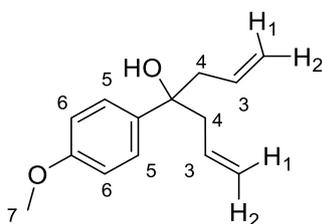
Rendimiento: Cuantitativo

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ: 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.83 (s, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.67 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.46 – 1.38 (m, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ: 172.05, 171.23, 159.51, 159.00, 133.96, 122.52, 117.46, 113.64, 47.05, 46.76, 37.50, 36.91, 33.32, 29.31, 27.78, 25.72, 24.11, 23.89, 22.81.

5.2.5 Síntesis del 4-(4-metoxifenil)hepta-1,6-dien-4-ol (**15**).

Se disolvieron 831 mg de **16** (5 mmol) en 45 mL de Et₂O en un Schlenk, y se colocó en un baño de hielo a 0 °C. Una vez se enfrió la disolución, se añadieron 25 mL de una disolución 1 M de cloruro de alilmagnesio en Et₂O lentamente, controlando que la reacción no sea violenta. Cuando se terminó la adición del magnesiano, se retiró el baño y se dejó agitando 12 horas. Se evaporaron los disolventes y se realizó una purificación por cromatografía de columna, utilizando como eluyente una mezcla Hex: Et₂O 7:3, y aumentando gradualmente la concentración de metanol hasta llegar a Hex: Et₂O 2:1, obteniéndose el 4-(4-metoxifenil)hepta-1,6-dien-4-ol (**15**).



15

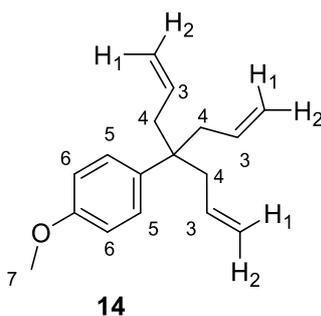
Rendimiento: 64%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₅), 6.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₆), 5.71 – 5.53 (m, 2H, H₃), 5.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₁), 5.07 (s, 2H, H₂), 3.81 (s, 3H, H₇), 2.71 – 2.44 (m, 4H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.21, 137.88, 133.57, 126.51, 119.12, 113.40, 74.80, 55.22, 46.91.

5.2.6 Síntesis del 1-(4-ailhepta-1,6-dien-4-il)-4-metoxibenceno (**14**).

Se disolvieron 2.6 mL de aliltrimetilsilano (16 mmol) en 4 mL de DCM en un matraz Schlenk bajo argón. Habiéndose enfriado previamente todas las disoluciones a -78 °C y agitando, se añaden 2 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (16 mmol) y una disolución de 350 mg del alilcarbinol **15** (1.6 mmol) en 1.5 mL de DCM. La reacción se paró tras 5 minutos, separándola del baño frío y añadiendo 30 mL de agua tibia. Se extrajo con DCM (3 x 10 mL). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron con Na_2SO_4 , y se evaporaron los disolventes. Se realizó una purificación por cromatografía de columna, utilizando como eluyente una mezcla Hex: Et_2O 10:1, obteniéndose el 1-(4-ailhepta-1,6-dien-4-il)-4-metoxibenceno (**14**).



Rendimiento: 49%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H_5), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_6), 5.65 – 5.51 (m, 3H, H_3), 5.04 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H, H_1), 4.99 (s, 3H, H_2), 3.81 (s, 3H, H_7), 2.44 (d, $J = 7.1$ Hz, 6H, H_4).

5.3 Determinación de anticuerpos en una muestra.

Para la preparación de la muestra de sonda acoplada al anticuerpo monoclonal anti-CD20 se siguieron los siguientes pasos.

5.3.1 Reducción del anticuerpo monoclonal anti-CD20.

Se añadieron 390 μL de buffer-R a 10 μL de una disolución de 10 mg/mL del anticuerpo, y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g. Por otra parte, se preparó una disolución reductora mezclando 8 μL de una disolución 0.5 M de TCEP y 992 μL de buffer-R. Se mezclaron 100 μL de la disolución reductora con 100 μL de la disolución de anticuerpo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron 300 μL de buffer-C y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g, se añadieron otros 400 μL de buffer-C y se repitió el centrifugado.

5.3.2 Marcaje del anticuerpo monoclonal anti-CD20.

En primer lugar, se coordinó el metal a la sonda, para ello se mezclaron 5 μL de una disolución acuosa de 0.175 mg/mL de **1**, 428.5 μL de una disolución acuosa de Tb^{3+} 1000 ppm (2% HNO_3), y 556.5 μL de una disolución acuosa de acetato de amonio 50 mM.

Se mezcló con la disolución de anticuerpo reducido y se incubó durante 90 minutos a 37 °C. Después, se añadieron 200 μL de buffer-W y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g. Esto se repitió tres veces más utilizando 400 μL de buffer-W. Se añadieron 80 μL de buffer-W y se tomó una alícuota de 20 μL de disolución, que se mezcló con 142 μL de buffer-PBS para dar una disolución de concentración de anticuerpo 0.5 mg/mL.

6. CONCLUSIONES

Se han diseñado dos estrategias sintéticas para obtener sondas moleculares que puedan ser utilizadas en el marcaje de anticuerpos para análisis por ICP-MS. Las sondas moleculares son una herramienta imprescindible para la determinación de compuestos que no pueden analizarse de forma convencional, por lo tanto, el estudio de rutas que permitan su síntesis es de gran importancia tanto en el campo de la Química Orgánica como de la Química Analítica.

La primera, basada en la síntesis divergente de una sonda de una cadena, se desarrolló exitosamente, el proceso consta de cuatro etapas y demostró un rendimiento relativamente alto, del 35% en promedio.

La segunda, que se trataba de la síntesis convergente de un dendrímero, no pudo completarse en el tiempo dedicado a este proyecto, llegando únicamente al intermedio 1-(4-ailihepta-1,6-dien-4-il)-4-metoxibenceno (**14**).

La sonda molecular con un único ligando **1** que fue sintetizada pudo acoplarse al anticuerpo monoclonal anti-CD20, y es capaz coordinar lantánidos de forma efectiva, demostrando ser una opción viable como marcador de anticuerpos. Aunque son necesarios más estudios sobre la síntesis del dendrímero **2**, el éxito de la sonda **1** demuestra que este tipo de estructuras tienen un potencial que puede ser explotado en el campo de la Química Analítica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Wilschefski, S. C.; Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev* **2019**, *40* (3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>.
- (2) Pröfrock, D.; Prange, A. Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Environmental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends. *Applied spectroscopy* **2012**, *66*, 843–868. <https://doi.org/10.1366/12-06681>.
- (3) Thomas, R. A Beginner's Guide to ICP-MS. *Spectroscopy* **2001**, *16*, 75.
- (4) McCurdy, E.; Woods, G.; Sugiyama, N. Accurate, Low-Level Sulfur Analysis by ICP-MS Using MS/MS with Oxygen Reaction Cell Gas. **2020**, *35*, 27–34.
- (5) Brom, M.; Joosten, L.; Oyen, W. J.; Gotthardt, M.; Boerman, O. C. Improved Labelling of DTPA- and DOTA-Conjugated Peptides and Antibodies with ¹¹¹In in HEPES and MES Buffer. *EJNMMI Res* **2012**, *2*, 4. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-4>.
- (6) Lou, X.; Zhang, G.; Herrera, I.; Kinach, R.; Ornatsky, O.; Baranov, V.; Nitz, M.; Winnik, M. A. Polymer-Based Elemental Tags for Sensitive Bioassays. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46* (32), 6111–6114. <https://doi.org/10.1002/anie.200700796>.
- (7) Majonis, D.; Herrera, I.; Ornatsky, O.; Schulze, M.; Lou, X.; Soleimani, M.; Nitz, M.; Winnik, M. A. Synthesis of a Functional Metal-Chelating Polymer and Steps toward Quantitative Mass Cytometry Bioassays. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (21), 8961–8969. <https://doi.org/10.1021/ac101901x>.
- (8) Illy, N.; Majonis, D.; Herrera, I.; Ornatsky, O.; Winnik, M. A. Metal-Chelating Polymers by Anionic Ring-Opening Polymerization and Their Use in Quantitative

Mass Cytometry. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (8), 2359–2369.
<https://doi.org/10.1021/bm300613x>.

(9) Illy, N.; Boileau, S.; Penelle, J.; Barbier, V. Metal-Free Activation in the Anionic Ring-Opening Polymerization of Cyclopropane Derivatives. *Macromolecular Rapid Communications* **2009**, *30* (20), 1731–1735.
<https://doi.org/10.1002/marc.200900303>.

(10) de Bang, T. C.; Husted, S. Lanthanide Elements as Labels for Multiplexed and Targeted Analysis of Proteins, DNA and RNA Using Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *72*, 45–52.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.021>.

(11) Sartor, V.; Djakovitch, L.; Fillaut, J.-L.; Moulines, F.; Neveu, F.; Marvaud, V.; Guittard, J.; Blais, J.-C.; Astruc, D. Organoiron Route to a New Dendron for Fast Dendritic Syntheses Using Divergent and Convergent Methods. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (12), 2929–2930. <https://doi.org/10.1021/ja983868m>.

(12) Nlate, S.; Plault, L.; Felpin, F.-X.; Astruc, D. Fast and Scalable Route to Aryl Polyallyl Dendrons and Dendrimers. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2008**, *350* (9), 1419–1424. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800163>.

(13) Rosario-Amorin, D.; Wang, X.; Gaboyard, M.; Clérac, R.; Nlate, S.; Heuzé, K. Dendron-Functionalized Core–Shell Superparamagnetic Nanoparticles: Magnetically Recoverable and Reusable Catalysts for Suzuki C–C Cross-Coupling Reactions. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15* (46), 12636–12643.
<https://doi.org/10.1002/chem.200901866>.

(14) Brückner, K.; Zitterbart, R.; Seitz, O.; Beck, S.; Linscheid, M. W. Solid Phase Synthesis of Short Peptide-Based Multimetal Tags for Biomolecule Labeling. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1021/bc500082k>.

(15) Mizukami, S.; Tonai, K.; Kaneko, M.; Kikuchi, K. Lanthanide-Based Protease Activity Sensors for Time-Resolved Fluorescence Measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14376–14377. <https://doi.org/10.1021/ja800322b>.

(16) Lippert, A. R.; Gschneidner, T.; Chang, C. J. Lanthanide-Based Luminescent Probes for Selective Time-Gated Detection of Hydrogen Peroxide in Water and in Living Cells. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (40), 7510–7512. <https://doi.org/10.1039/C0CC01560A>.