

Universidad de Granada

Facultad de Farmacia

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica



**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS Y DERIVADOS
PEPTÍDICOS CON APLICACIONES SIGNIFICATIVAS EN
DESARROLLO DE FÁRMACOS, BIOTECNOLOGÍA Y
DIAGNOSIS.**

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

María Lourdes Soria Gila

Programa Oficial de Doctorado en Farmacia

GRANADA 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María Lourdes Soria Gila
ISBN: 978-84-9163-450-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48166>

Memoria de tesis doctoral presentada por la Lda. María Lourdes Soria Gila, con objeto de obtener el grado de Doctor con mención internacional por la Universidad de Granada.

La Doctoranda María Lourdes Soria Gila y los Directores de tesis D. Francisco Franco Montalbán, D. Juan Antonio Tamayo Torres y D. José Antonio Gómez Vidal, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, han sido respetados los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados y publicaciones.

Granada a de de 2016

DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. D. Francisco Franco Montalbán

Prof. Titular de Química Farmacéutica y Orgánica

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Fdo. D. Juan Antonio Tamayo Torres

Prof. Titular de Química Farmacéutica y Orgánica

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada.

D. José Antonio Gómez Vidal

Prof. Titular de Química Farmacéutica y Orgánica

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

DOCTORANDO

Fdo. Dña. María Lourdes Soria Gila

El trabajo presentado en esta memoria de tesis ha sido realizado gracias a la concesión de la beca predoctoral FPI (BES-2010-030257), de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Economía y Competitividad, incorporada al proyecto CTQ2009-07439. Igualmente, todo el material de laboratorio utilizado para el desarrollo de esta tesis doctoral y los gastos referidos al Centro de Instrumentación Científica (CIC) han sido financiados por este proyecto

Han sido realizadas dos estancias de investigación como complemento de formación, bajo la supervisión del Profesor Mark Bradley, en el facultad de Química de la Universidad de Edimburgo (Escocia, Reino Unido) gracias a la concesión de dos ayudas para estancias breves pertenecientes al programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Economía y competitividad, con códigos de referencia EEBB-I-13-07131 y EEBB-I-14-08607.

A mis padres y hermano, a quienes quiero más que a mi propia vida, los pilares responsables de mi fortaleza, felicidad y lucha continua. Sois mi todo. Esto VA POR VOSOTROS.

AGRADECIMIENTOS

Como poder empezar a redactar unos agradecimientos cuando hay tantísima gente a quien dar las gracias por su apoyo y ayuda desde que comenzó este proyecto. Espero no olvidar nombrar a nadie. Y si así fuese, por favor no se sienta ofendido, porque aunque su nombre aquí no conste, por seguro, tiene un hueco en mi corazón.

Comienzo con mis padres, Miguel y María, a quienes les debo todo, gracias a ellos soy quien soy, quienes han luchado, llorado y han hecho de tripas corazón, ante todas las circunstancias que han rodeado este trabajo, para darme esa inyección de apoyo que necesitaba sobre todo en los momentos finales. Jamás me he sentido sola en este proyecto, ni en lo bueno ni en lo “menos bueno”, os quiero infinito, GRACIAS.

A mi hermano precioso, Miguel Ángel, mi mano derecha en la vida, mi gemelo, aunque seamos muchas veces tan diferentes y sea el pequeño, siempre actúa con tanta madurez que muchas veces he dudado de quien es el mayor de los dos. Eres mi ejemplo a seguir, ese tesón, constancia y lucha admirables que jamás he observado en nadie más que en ti, capaz de tener esos valores tan arraigados como los tienes tú. Eres muy grande hermano. Infinitas veces gracias, por esas llamadas que reavivaban mis fuerzas cuando flaqueaban y aunque físicamente los kilómetros nos separen eres capaz de hacerme sentir que estas siempre a mi lado. GRACIAS HERMANO.

A mi martuki guapa, mi cuñaica que siempre me transmite ese positivismo, fuerza, alegría y me ha dado tirones de orejas también cuando me los tenía que dar. Junto con su familia tan bonita que nos acoge siempre como a uno más de su sangre. Igualmente familia ejemplar donde las haya, con esa lucha continua que te enchufan las ganas de vivir. Gracias

A Pedro, mi chititito, que no entendía, al principio, muy bien este proyecto en el que estaba involucrada y ha sabido estar a la altura en todo momento, con su cariño, sus miles de abrazos y palabras de apoyo, que no dejaban que me cayera ni un minuto. Gracias cariño.

A mi familia, mis tios, primos y mis abuelos, y sobre todo a mi Basi, sin ella no sería quien soy hoy día. Se que estas orgullosa de mi allí donde estás, esto va por ti abue.

A mis ángeles de la guarda, mis dos Anicas, no existen palabras de agradecimiento que puedan expresar todo lo que hacéis y habéis hecho por mí. No hay día q no sepa la suerte que tengo de que la vida os haya cruzado en mi camino, porque en los buenos y en los momentos “menos buenos” habéis estado a mi lado:

- Mi Anica Pérez, mi hermana, mi mentora, a la que he seguido los pasos lo mejor que he podido, aunque siempre el listón está bien alto y es inalcanzable. No he conocido corazón más grande que el tuyo, siempre agradecida por tu ayuda incondicional. Aunque nos separen miles de kilómetros, un simple correo electrónico nos conecta rápidamente como si estuviésemos en la misma ciudad. Te echo de menos pequeña. Gracias siempre mi niña.
- Mi amiga del alma Ana Conejo, símbolo de grandeza para mí. Por su inteligencia, su constancia, su forma de trabajo, por defender siempre lo que es justo para ti, a cuerpo y espada. Y transmitir todo lo que llevas dentro con esa naturalidad que te caracteriza. Por estar todo el tiempo ahí, escuchándome, aconsejándome y guiándome. Estaré agradecida a ti siempre. Eres preciosa por dentro y por fuera, gracias amiga.

A Vero y Manme, que son mi alegría. Con las que he reído y llorado todo este tiempo. Con las que he desconectado y conectado. Gracias siempre por todos vuestros consejos y guiarme, por todo lo que hemos vivido juntas y lo que seguiremos pasando, porque aunque estemos lejos en distancia con un simple mensaje o llamada os siento cerca, como si el tiempo no pasara. El cariño que os tengo prevalece y lo hará en mí como si estuviésemos juntas. Gracias mis pequeñuelas.

A mi Olgati guapa, con un corazón y sensibilidad enorme, que transmite allá por donde se mueve. Gracias Olgui por estar ahí siempre, por tu ayuda, por tus palabras, por todos los ratitos que has estado conmigo y los que nos queden.

A Rosario y Juanjo, por ser unas personas con unos valores intachables, por escucharme, por apoyarme, por ser un ejemplo a seguir, personas de las que se aprende cada día en todos los sentidos, tanto en el trabajo como de la vida. Gracias chicos.

A María Eugenia, mi Eu, de la que he aprendido cada día, por su manera de afrontar la vida, su coraje, su alegría, porque de ti aprendí que todo lo malo no es tan malo, sino que es menos bueno, ejemplo de una fortaleza y luchadora nata. Gracias guapa por estar ahí.

A Belén, mi pequeña artista, que no para ni un segundo. Gracias por transmitir siempre tus ganas de que con esfuerzo se consiguen los sueños.

A Sonia, mi niña preciosa, que se acordó de mí cuando escuchó de esta beca, gracias a ti pude comenzar este proyecto. Gracias por todos los momentos vividos fuera y dentro del laboratorio, por esos días de desconexión en tu pueblo, por esa familia tan bonita que tienes y por tu perseverancia en la vida y en el trabajo.

A Mariem por tus palabras siempre de apoyo y cariño. Gracias guapa.

Con todos vosotros he aprendido y sentido lo que significa la palabra amistad.

A mis compañeros de laboratorio, a todos los que habéis pasado y compartido momentos de trabajo, que habéis hecho que fueran alegres y agradables, por risas interminables y hacer que pareciera que el tiempo no pasaba allí dentro. A Javi con el que prácticamente empecé en tiempo con este proyecto, por tus chistacos y raticos de risas. A Pablo, por apoyarme siempre y deleitarnos con tus canciones ñoñas, gracias feo. A Manoli por su dulzura y ser una valiente, trabajando dentro y fuera del laboratorio.

A Fátima, por esas tardes de desconexión que se tornaban en noches flamencas. A Efres por los abrazos que nos dabas por las mañanas y esos momentos en los que desconectábamos todos juntos con una cervezuela en la mano y unos pollos asados en tu terraza. A mis niños de Méjico, a Ale, Mastas, Tania, Yudi, Davir, por todo vuestro cariño.

A Elsa, Chiky, Eva, Fia, Eugenio, Andrea, Clarissa, Alicia, Nicos, gracias por vuestro apoyo y ayuda en mi vivencia en Edimburgo y compartir juntos tantos buenos momentos. Experiencia inolvidable.

Gracias a todos porque habéis aportado a mi corazón siempre cosas preciosas durante este tiempo juntos.

SIN TODOS VOSOTROS NADA DE ESTO SERÍA POSIBLE. GRACIAS POR CRUZAROS EN MI CAMINO.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y

ACRÓNIMOS.....19

RESUMEN GENERAL.....21

SUMMARY.....25

1. INTRODUCCIÓN.....31

1.1. PÉPTIDOS31

1.1.1. ENLACE PEPTÍDICO..... 31

1.1.2. IRRUPCIÓN DE LOS PÉPTIDOS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA 32

1.1.3. IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS EN BIOTECNOLOGÍA 33

1.1.4. FÁRMACOS PEPTÍDICOS DESTACADOS A LO LARGO DE LA HISTORIA 34

1.1.5. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL USO DE LOS PÉPTIDOS EN EL MERCADO DE FÁRMACOS...37

1.1.6. ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS DESTACADAS EN EL USO DE PÉPTIDOS DESDE UN PUNTO DE VISTA TERAPÉUTICO 38

1.1.6.1. IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS EN LOS PROCESOS BIOLÓGICOS..... 38

1.1.6.1.1. VENTAJAS DEL USO DE PÉPTIDOS COMO FÁRMACOS 38

1.1.6.2. PUNTOS DÉBILES QUE ACTUALMENTE SE ENCUENTRAN SOMETIDOS A MEJORA..... 38

1.1.6.3. APLICACIONES NOVEDOSAS DESTACADAS 39

1.1.7. EVOLUCIÓN DE LOS PÉPTIDOS DURANTE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS, DESARROLLO CLÍNICO 39

1.1.8. OBJETIVOS GENERALES EN FUNCIÓN DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD..... 41

1.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS. BREVE INTRODUCCIÓN A LA SPPS 41

1.2.1. ELECCIÓN DEL SOPORTE SÓLIDO 44

1.2.2. GRUPOS PROTECTORES. ORTOGONALIDAD 45

1.2.2.1. GRUPO PROTECTOR FMOC..... 45

1.2.2.2. GRUPO PROTECTOR BOC..... 46

1.2.2.3. GRUPO PROTECTOR Dde 47

1.2.2.4. GRUPO PROTECTOR t-Bu. DE LOS GRUPOS ÁCIDOS DE CADENA LATERAL 47

1.2.3. MÉTODOS DE ACTIVACIÓN. AGENTES DE ACOPLAMIENTO. CARBODIIMIDAS Y DERIVADOS DE HIDROXILAMINA COMO ADITIVOS. 47

1.2.3.1. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DEL GRUPO CARBOXILO 48

1.2.4. MONITORIZACIÓN DE LAS REACCIONES DE ACOPLAMIENTO Y DESPROTECCIÓN 51

1.2.4.1. TEST DE DETECCIÓN DE AMINAS LIBRES. TEST DE KAISER Y TEST DEL CLORANILO..... 51

1.2.4.1.1. TEST DE NINHIDRINA O TEST DE KAISER. 51

1.2.4.1.2. TEST DEL CLORANILO 52

1.2.5. REACCIONES SECUNDARIAS INDESEADAS A EVITAR DURANTE ESTE TRABAJO..... 52

1.2.5.1. FORMACIÓN DE DICETOPIPERACINA 52

1.2.5.2. RACEMIZACIÓN	52
1.2.5.3. REACCIÓN DE FORMACIÓN DE ASPARTIMIDA	53
1.2.5.4. REACCIONES DE DESPROTECCION INCOMPLETA	54
1.2.5.5. REACCIONES DE ACOPLAMIENTO INCOMPLETAS. N-ACETILACIÓN	55
1.2.6. HIDROLISIS DEL SOPORTE SÓLIDO. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	55
1.2.7. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN	55

CAPITULO I

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y GLICOPÉPTIDOS INHIBIDORES DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA MEDIADAS POR EL DOMINIO PDZ DE LA nNOS, CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA. 57

1.ANTECEDENTES..... 59

1.1 INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA 59

1.2 ENZIMA OXIDO NÍTRICO SINTASA (nNOS), DOMINIO PDZ E INFLUENCIA DEL OXIDO NÍTRICO (NO) EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS..... 59

1.2.1 DOMINIO PDZ DE LA ENZIMA Nnos 61

1.2.2 LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA nNOS 63

1.2.3 PRODUCCIÓN DE NO A NIVEL NEURONAL, PARTICIPACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS 66

2. INTRODUCCIÓN..... 71

2.1 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y GLICOPÉPTIDOS CON AFINIDAD HACIA EL DOMINIO PDZ DE LA nNOS. ... 71

2.1.1 ELECCIÓN DE LA SECUENCIA LIDER..... 71

2.1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS Y DIFUSIÓN A TRAVÉS DE LA BHE 72

2.1.2.1. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA..... 72

3. OBJETIVOS 79

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 83

4.1. SÍNTESIS QUÍMICA..... 83

4.1.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y GLICOPÉPTIDOS MEDIANTE SPPS... 83

4.1.2. MODIFICACIONES EN LA METODOLOGÍA SINTÉTICA..... 88

4.1.3. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES EN LA SECUENCIA PEPTÍDICA 91

4.1.4. SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS 102

4.1.5. SÍNTESIS DE LOS GLICOSIDOS DERIVADOS..... 114

4.2. ENSAYO DE AFINIDAD STD 121

4.2.1. STD (SATURATION TRANSFER DIFFERENCE) 121

4.2.2. ESPECTROS STD..... 123

4.3. ENSAYO DE EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA (SPR) 131

4.3.1. SPR (SURFACE PLASMON RESONANCE) 131

4.3.2. ENSAYO	137
4.4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA	144
4.4.1. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD Y NEUROPROTECCIÓN	144
4.4.2. ESTUDIOS DE PENETRABILIDAD CELULAR	147
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	153
5.1. CONDICIONES GENERALES DE ANALISIS POR HPLC.....	153
5.2. SINTESIS DE PÉPTIDOS.....	157
5.2.1. SINTESIS DE LA SECUENCIA LIDER NH ₂ -Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH	157
5.2.2. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES INTRODUCIDAS EN LA SECUENCIA LIDER DFGDAV	161
5.2.3. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA AP-Peg-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH.....	162
5.2.4. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA NH ₂ -Peg2-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH	163
5.2.5. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA AP-Peg2-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH.....	164
5.2.6. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA 2[2-(2METOXIETOXI) ETOXI] ACÉTICO-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH.....	165
5.2.7. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA N-(Guanidin-)Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH).....	166
5.2.8. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA 4-Carbonil-1,2,3-triazol-Peg2-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH .	167
5.2.9. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA CARBOXIFLUORESCEINA- DFGDAV-COOH	168
5.2.10. SINTESIS DE LA SECUENCIA PARA EL CONTROL NEGATIVO NH ₂ -Asp-Phe-Gly-Lys-Ala-Val-COOH.....	169
5.2.11. SÍNTESIS DE LA 4-Carbonil-1,2,3-triazol-Asp-Phe-Gly-Lys-Ala-Val-COOH	172
5.2.12. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA LIDER VSPDFGDAV	173
5.2.13. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES INTRODUCIDAS EN LA SECUENCIA LIDER VSPDFGDAV	176
5.2.14. SÍNTESIS LINEAL DE LA SECUENCIA VSPDFGDAV	178
5.2.15. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES INTRODUCIDAS EN LA SECUENCIA LIDER VSPDFGDAV	179
5.2.16. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA AP-Peg-Val-Ser-Pro-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH.....	180
5.3. SÍNTESIS DE GLICOSIDOS.....	182
5.3.1. FORMACIÓN DE GLICOSIL-AMINOÁCIDOS DERIVADOS DE SERINA, TREONINA Y TIROSINA...182	
5.3.2. FORMACIÓN DE GLICOSIDOS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSA NO DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS NATURALES. GLICOLATO DE ETILO Y PARAHIPOXIBENZOATO DE ETILO	189
5.3.3. SÍNTESIS DEL GLUCOPIRANOSIL DERIVADO DEL ÁCIDO 1,2,3-TRIAZOL.....	191
5.3.4. FORMACIÓN DE GLICOSIDOS DERIVADOS DE GLICOLATO DE ETILO CON DISTINTOS AZUCARES	191

5.4. SÍNTESIS DE GLICOPEPTIDOS.....	194
5.4.1. MÉTODO GENERAL DE SÍNTESIS CONVERGENTE PARA LA FORMACIÓN DE GLICOPÉPTIDOS EN SPPS.....	194
5.4.2. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	194
5.4.3. DESPROTECCIÓN GRUPOS tBu.....	194
5.4.4. SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS MEDIANTE CLICK CHEMISTRY EN SPPS.....	194
5.4.5. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA HIDROGENACIÓN CATALÍTICA	195
5.5. ENSAYOS DE AFINIDAD	199
5.5.1. ENSAYOS STD	199
5.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS	201
5.6.1. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y NEUROPROTECCIÓN	201
5.7. ENSAYOS DE PENETRABILIDAD CELULAR.	201
5.7.1. PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN	202
6. CONCLUSIONES	205
7. BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO	211

ANEXO I

CAPITULO II

LIGANDOS DE PALADIO BASADOS EN SECUENCIAS PEPTÍDICAS, PARA LLEVAR A CABO LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAURA.....	213
1. INTRODUCCIÓN.....	217
2. ANTECEDENTES	225
2.1 REACCIONES DE ACOPLAMIENTO CRUZADO	225
2.2 CATÁLISIS.....	225
2.3 REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAURA.....	226
2.4 JUSTIFICACIÓN DEL USO DE TRIAZOLES COMO SISTEMAS DE COORDINACIÓN	229
2.5 IMPORTANCIA Y APLICACION DE LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAURA	230
3. OBJETIVOS	235
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	239
4.1 SÍNTESIS DE LIGANDOS PEPTÍDICOS.....	239
4.2 EVALUACIÓN Y ESTUDIO DE LOS DISTINTOS LIGANDOS	242
4.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN	243
4.2.2 ESTUDIO DE SUSTRATOS, SINTESIS DE BIARILOS	244
4.3 INCONVENIENTES ENCONTRADOS DURANTE LA REACCIÓN DE SUZUKI	249
4.3.1 REACCIONES INDESEADAS	250
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	253
5.1. METODOLOGÍA SINTÉTICA Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	253

5.2. CONDICIONES GENERALES DE ANALISIS POR HPLC.....	254
5.3. SÍNTESIS DE PEPTIDOTRIAZOLES COMO LIGANDOS EN SPPS.....	254
5.3.1. SÍNTESIS EN SOLUCIÓN DEL FRAGMENTO TRIAZÓLICO, ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO.	255
5.3.2 SÍNTESIS DE LA SECUENCIA 1,2,3-TRIAZOL-DFGKAV-COOH.....	255
5.3.2.1 ACOPLAMIENTO FMOC-ALA-OH.....	255
5.3.2.1.1. TEST DE KAISER O NINIDRINA, PARA LA DETECCIÓN DE AMINAS PRIMARIAS.	256
5.3.2.1.2. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO FMOC	256
5.3.2.2. ACOPLAMIENTO FMOC-LYS (BOC)-OH	256
5.3.2.3. ACOPLAMIENTO FMOC-GLY-OH.....	256
5.3.2.4. ACOPLAMIENTO FMOC-PHE-OH	257
5.3.2.5. ACOPLAMIENTO FMOC-ASP(OtBu)-OH	257
5.3.2.6. SÍNTESIS CONVERGENTE. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO	257
5.3.2.7. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	258
5.3.2.8. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC.....	258
5.3.2.9. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA.....	258
5.3.3. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-DFGK.....	259
5.3.3.1. ACOPLAMIENTO DE FMOC-GLY-OH	259
5.3.3.2. ACOPLAMIENTO DE FMOC-PHE-OH	259
5.3.3.3. ACOPLAMIENTO FMOC-ASP(OtBU)-OH.....	259
5.3.3.4. SÍNTESIS CONVERGENTE. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO	260
5.3.3.5. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	260
5.3.3.6. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC.....	260
5.3.3.7. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA.....	260
5.3.4. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-FGK.....	260
5.3.4.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	261
5.3.4.2 DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC.....	261
5.3.4.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA.....	261
5.3.5. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-GK	261
5.3.5.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	261
5.3.5.2 DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC.....	261
5.3.5.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA.....	261
5.3.6. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-K.....	262
5.3.6.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	262
5.3.6.2 DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC.....	262

5.3.6.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA.....	262
5.3.7. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-GKGK GK	262
5.3.7.1. ACOPLAMIENTO FMOC-LYS-(BOC)-OH	263
5.3.7.2. DETERMINACIÓN DE LA CARGA DE LA RESINA.....	263
5.3.7.3. ACOPLAMIENTO DE FMOC-GLY-OH.....	263
5.3.7.4. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	264
5.3.7.5. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC.....	264
5.3.7.6. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA.....	264
5.3.8. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-GGGK	264
5.3.8.1. ACOPLAMIENTO DE FMOC-GLY-OH	264
5.3.8.2. SÍNTESIS CONVERGENTE. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO.....	265
5.3.8.3. HIDRÓLISIS DE LA RESINA	265
5.3.8.4. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC.....	265
5.3.8.5. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA.....	265
5.4. PROCEDIMIENTO GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS BIFENÍLICOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAUURA.	265
5.4.1. SÍNTESIS DE BIARILOS DERIVADOS DE 4-BROMOANILINA.....	266
5.4.1.1. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-[1,1'-BIFENIL]-4-AMINA	266
5.4.1.2. SÍNTESIS DE [1,1'-BIFENIL]-4-AMINA.....	266
5.4.1.3. SÍNTESIS DE 4'-AMINO-[1,1'-BIFENIL]-4-OL.....	266
5.4.1.4. SÍNTESIS DE 3'-NITRO-[1,1'-BIFENIL]-4-AMINA.....	267
5.4.1.5. SÍNTESIS DE 4'-NITRO-[1,1'-BIFENIL]-4-AMINA.....	267
5.4.2. SÍNTESIS DE BIARILOS DERIVADOS DE CARBALDEHÍDO	267
5.4.2.1. SÍNTESIS DE 3'-METOXI-[1,1'-BIFENIL]-4-CARBALDEHÍDO	267
5.4.2.2. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-[1,1'-BIFENIL]-4-CARBALDEHÍDO	268
5.4.3. SÍNTESIS DE BIARILOS DERIVADOS DE METOXIFENILBORÓNICO.....	268
5.4.3.1. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-3-NITRO-1,1'-BIFENILO	268
5.4.3.2. SÍNTESIS DE 4-METOXI-4'-NITRO-1,1'-BIFENILO.....	268
5.4.3.3. SÍNTESIS DE 4-METOXI-4'-METIL-1,1'-BIFENILO.....	268
5.4.3.4. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-3-METIL-1,1'-BIFENILO.....	269
5.4.3.5. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-2-METIL-1,1'-BIFENILO.....	269
6. CONCLUSIONES	273
7. FUTURAS PERSPECTIVAS.....	277

ANEXO II

CHAPTER III

ACTIVITY-BASED PROBES FOR SELECTIVE IN SITU MONITORING OF CASPASE-3	279
1.BACKGROUND.....	283
2.INTRODUCTION.....	283
3.RESULTS AND DISCUSSION.....	287
3.1. SYNTHESIS AND FRET PAIR OPTIMIZATION OF THE PROBE LIBRARY FOR CASPASE-3 DETECTION	287
3.2. LOOKING FOR SELECTIVE TETRA-PEPTIDE SEQUENCES TOWARDS CASPASE-3 BY X ₂ AND X ₃ AMINO ACIDS MODIFICATIONS	289
3.3. KINETIC STUDIES OF THE FRET PROBE LIBRARY FOR CASPASE-3/-7.....	289
3.4. INCREASED SPECIFICITY FOR CASPASE-3	291
3.5. DETERMINING CASPASE-3 ACTIVITY IN CELLS.....	293
3.6. QUANTIFICATION OF ACTIVE CASPASE-3 IN LIVE CELLS.....	294
3.7. LIVE FLUORESCENCE IMAGING OF APOPTOTIC CELLS.....	294
4.EXPERIMENTAL	299
4.1. SOLID-PHASE SYNTHESIS OF DXXX-CPP	299
4.1.1. COUPLING THE FMOC-AMINO ACIDS AND FLUOROPHORES.....	299
4.1.2. FMOC-DEPROTECTION.....	299
4.1.3. Dde DEPROTECTION	299
4.1.4. CLEAVAGE WITH TRIFLUOROACETIC ACID.....	299
4.2. KINETIC ASSAYS WITH CASPASE-3/-7.....	299
4.3. CELL CULTURE CONDITIONS AND GENERAL PROTOCOL FOR CELLULAR UPTAKE EXPERIMENT	300
4.3.2. APOPTOSIS INDUCTION	300
5.CONCLUSION.....	303
REFERENCES	304
SUPPLEMENTARY DOCUMENTS	

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ac	acetilo
ACN	acetonitrilo
AcOEt	acetato de etilo
All	alilo
Bn	bencilo
Boc	<i>t</i> -butoxicarbonilo
Bz	benzoílo
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DIC	disopropilcarbodiimida
DIPEA	diisopropiletilamina
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DVB	divinilbenceno
ESI	ionización por electrospray
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FACs	citometría de flujo (Fluorescence activated cell sorting)
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
Gal	galactosa
Glc	glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina

Gly	glicina
h	hora
LCMS	Espectrometría de Masas por Cromatografía líquida (Chromatography Mass Spectrometry)
LRMS	Espectrometría de Masas de Baja Resolución (Low Resolution Spectroscopy)
Man	manosa
Me	metilo
min	minuto
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio
o/n	durante la noche
PEG	polietilenglicol
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SPE	extracción en fase sólida
STD	Espectroscopía RMN de <i>Diferencia</i> de Transferencia de <i>Saturación</i> (<i>Saturation transfer difference</i>)
SPR	resonancia de plasmón superficial (Surface plasmon resonance)
tBu	terc-butilo
TES	trietil silano
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía en capa fina (Thin layer chromatography)

RESUMEN GENERAL

Esta tesis doctoral aborda el estudio e importancia de los péptidos en distintos campos científicos y su aplicabilidad, siendo el gran abanico de posibilidades y la enorme capacidad de aplicación a diferentes niveles, el principal incentivo para su estudio. Además, se recoge una breve introducción a la síntesis en fase sólida, así como de trabajos previos y conclusiones importantes en estos campos.

La presente memoria se divide principalmente en tres capítulos, en los que se han sintetizado derivados peptídicos con diferentes fines, en los que se puede observar esta gran aplicabilidad. En cada capítulo se detallan los objetivos de consecución de las diferentes secuencias peptídicas, como su aplicabilidad y evaluación

La síntesis de los compuestos en los que se ha basado este trabajo, se ha llevado a cabo en fase sólida, esta es una química versátil, que permite introducir modificaciones estructurales en la secuencia diseñada, de manera sencilla, para así mejorar las propiedades de los compuestos, haciéndola una firme candidata para la obtención de compuestos de diferente naturaleza compatibles con ella, haciendo de esta, una síntesis química aplicable en diferentes campos.

Poder diseñar secuencias basándonos en una diana biológica, secuencias conocidas, o mediante estudios de afinidad, junto con imaginación y creatividad, han hecho de esta síntesis una estrategia que puede ser aprovechada para generar péptidos únicos, que nos permitan optimizar una respuesta biológica, y regularla mediante la intervención de secuencias afines a dianas biológicas e incluso obtener resultados en diferentes ámbitos. Así como el reto de diseñar, sintetizar y evaluar moléculas con capacidad de superar las limitaciones físicas y químicas de las membranas celulares y/o tejidos, que nos permitan el paso celular, detección, inducción, control de funciones e incluso la manipulación de reacciones químicas en el interior celular.

El **capítulo 1** describe la síntesis de distintos péptidos y glicopéptidos biológicamente activos, con el fin de mediar como inhibidores a través de las interacciones específicas proteína-proteína mediadas por el dominio PDZ de la enzima Óxido Nítrico Sintasa (nNOS). El trabajo contenido en este capítulo es continuación de la Tesis Doctoral defendida por la Dra. Ana María Pérez López (Universidad de Granada, 2010)

La secuencia de reconocimiento de la proteína PDZ-nNOS, ha llevado al diseño, síntesis y evaluación de una variedad de compuestos capaces de actuar como inhibidores de la interacción proteína-proteína, mediadas por este dominio. Este tipo de péptidos tiene capacidad para intervenir en las rutas bioquímicas relacionadas con la producción de óxido nítrico (NO), por lo que tienen elevada importancia desde el punto de vista terapéutico y farmacológico por su potencial uso como neuroprotectores. La secuencia peptídica de partida ha sido descrita y sintetizada en la tesis doctoral defendida por la Dra. Ana María Pérez López (Universidad de Granada, 2010).

Con el fin de permitir y mejorar el transporte y distribución de estos péptidos a través del sistema nervioso central (SNC) y cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), que limita este paso, se llevó a cabo la glicosilación de los compuestos, basándonos en estudios previos en los que mediante la unión a carbohidratos, el transporte a través de la BHE se veía favorecido y describían que la formación de derivados *O*-glicosídicos, y a su vez los derivados de D-glucosa, son los más activos y daban lugar a mejores resultados.

A su vez, para mejorar el paso a través de las membranas celulares y así observar la actividad, dichas secuencias peptídicas se modificaron estructuralmente con derivados de polietilenglicol (PEG) para favorecer su soporte sobre nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (magnetita), que debido a sus características físico-químicas constituyen uno de los sistemas de transporte de fármacos más prometedores, dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología.

La evaluación de la viabilidad celular, se llevó a cabo mediante ensayos de citotoxicidad a través del método MTT y la actividad neuroprotectora de estos compuestos se llevó a cabo *in vivo* sobre células neuronales de las líneas SH-SY5Y y SK-NBE(4) de neuroblastoma humano, las cuales expresan el receptor NMDA. La evaluación biológica la realizó el Profesor Rafael Salto y la Profesora María Dolores Girón (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada), mientras que la penetrabilidad celular, fue evaluada en estas mismas líneas celulares en el laboratorio biológico de la escuela de Química de la Universidad de Edimburgo, durante una de mis estancias doctorales en dicha universidad.

Los estudios de afinidad se llevaron a cabo *in vitro*, sobre el dominio PDZ y GST-PDZ aislados, mediante estudios STD y SPR. Los estudios SPR se realizaron en un instrumento SPR Biacore propiedad de la empresa GE Healthcare, durante una demostración en el CIC de la Universidad de Granada. El uso del instrumento se realizó por personal especializado de la empresa

El **capítulo 2**, describe el desarrollo de una variedad de ligandos de carácter peptídico, para llevar a cabo la formación de complejos de Paladio *in situ* capaces de catalizar reacciones de acoplamiento cruzado (cross coupling) mediadas por este metal. Éstas son consideradas de las reacciones más importantes en síntesis orgánica, debido a que permiten la conexión de dos fragmentos mediante la formación de enlaces Carbono-Carbono o Carbono-heteroátomo. De entre estas cabe destacar para la evaluación de la actividad de estos compuestos, el uso de la reacción de Suzuki-Miyaura.

La importancia de este trabajo, radica en el descubrimiento de ligandos afines a este metal, el cual media en numerosas reacciones de gran relevancia en síntesis orgánica, contando con las numerosas ventajas de que sean ligandos de carácter peptídico, capaces de remplazar a los actuales ligandos basados en fosfinas debido a que son compuestos más estables, mejoran el rendimiento de reacción, minimizan la cantidad de metal usado en este tipo de reacciones. Son compuestos sencillos de

sintetizar y manipular, viéndose a su vez todo ello favorecido por el bajo coste de reactivos y la minimización en los tiempos de producción.

En el **capítulo 3**, se detalla el desarrollo de una librería de sensores para monitorizar *in situ* la actividad enzimática de la Caspasa-3. Estas enzimas juegan un papel esencial durante la apoptosis celular, proceso implicado en enfermedades como el cáncer y enfermedades autoinmunes, y a su vez son capaces de interactuar específicamente con proteínas involucradas en el ciclo celular. Por tanto, el hecho de conocer el comportamiento de la apoptosis en estas células cancerígenas podría ser útil para la diagnosis y/o búsqueda de un tratamiento exitoso. Así se han sintetizado y evaluado, una variedad de compuestos basados en sistemas de transporte celular, que incluyen una carga de origen peptídico que contiene enlaces hidrolizables biológicamente, permitiendo la liberación de esta en el medio celular. Estos se encuentran marcados por moléculas fluorescentes que forman un sistema FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que absorben en la región del espectro del infrarrojo cercano (NIR) (bandas de absorción 12500-4000^{cm⁻¹}), con objeto de poder usarlos como técnica de detección *in vivo* en longitudes de onda capaces de ser observadas en el visible por el ojo humano permitiendo la detección de funciones celulares, y en este caso, el cáncer.

Se ha evaluado la eficacia del paso a través de las membranas celulares mediante la técnica de citometría de flujo (FACs) en células HEK, y un análisis cualitativo de la penetrabilidad celular se llevó a cabo mediante la observación en un microscopio Leica SP5 Confocal.

La evaluación de la afinidad, frente Caspasa-3 y caspasa-7 debido a su similitud estructural, con el fin de encontrar una secuencia específica de unión hacia la enzima Caspasa-3, y el seguimiento de la farmacocinética de la reacción se llevó a cabo mediante un Plate Reader (Biotek Synergy HT), recogiendo las señales fluorescentes correspondientes a las longitudes de onda de excitación y emisión, cada dos minutos, durante 1 hora.

La capacidad de detección de la actividad enzimática dentro de las células nos puede proveer de información vital, para la detección temprana de enfermedades y para desarrollo de tratamientos efectivos.

Este estudio se realizó frente a la línea celular derivada de cáncer de cuello uterino HeLa (siglas que provienen del nombre de Henrietta Lacks, de la cual provenían las células originales de este carcinoma cervical) y la línea celular de cáncer de riñón HEK (de sus siglas en inglés, Human Embryonic Kidney cells).

Este trabajo se llevó a cabo gracias a la ayuda concedida del Ministerio de Economía y Competitividad, para la financiación de estancias breves del personal investigador en formación con código EEBB-I-13-07131, con el fin de mejorar mi formación e impulsar el desarrollo de mi tesis doctoral. Se realizó bajo la supervisión del Profesor Mark Bradley. (Professor of High-Throughput Chemical Biology, School of Chemistry, University of Edinburgh)

SUMMARY

The present work addresses the study, relevance and applicability of peptides to different scientific fields. Also reported is a brief summary regarding solid-phase synthesis with previous work documented along with the most significant conclusions.

One of the challenges in medicine, pharmaceutical science and biotechnology is the creation of therapeutic agents that act only where and how we require.

Peptides play a crucial role in fundamental physiological and biochemical processes and are essential to many aspects of biomedical research. This work highlights their function as metal ligands to carry out organic reactions. Peptide synthesis is an important and growing area of Chemical Biology and biotechnology research.

The aims, synthesis, applicability and evaluations of the peptidic sequences used are detailed in each chapter.

Compounds were obtained using a solid-phase synthetic strategy. This is a powerful and versatile chemistry that allows us to modify and manipulate designed peptide sequences in a relatively quick and easy manner to improve functionality. This makes the approach a strong and excellent candidate to get several suitable compounds which is one of the main competitive edges as a synthetic strategy applicable to multiple fields.

Chapter 1

Chapter 1 describes the synthesis of biologically active peptides and glycopeptides, which act in the first instance as inhibitors of specific protein-protein interactions, mediated by the PDZ domain of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) and in the second act as neuroprotective drugs. This work is continuation of a previous work, the doctoral thesis of Dra. Ana María Pérez López, carried out at the University of Granada in 2010.

The recognition sequence of the PDZ-nNOS protein, enabled us to carry out the design, synthesis and evaluation of a broad variety of compounds able to act as inhibitors of the interactions mediated by this PDZ domain. These peptides have the ability to mediate the biochemistry routes related with nitric oxide (NO) production, which has relevance from both a therapeutic and pharmacological point of view, for potential use as neuroprotective drugs.

Glycosylation was carried out in some compounds with the aim of improving the delivery and distribution taking place in the Central Nervous System (CNS), which even includes crossing the blood brain barrier (BBB) which is normally a limiting factor for drug delivery. The design was based on previous reports in which carbohydrate binding improves delivery across the BBB.

Lead structures were modified to improve cellular uptake, neuroprotective activity, and also to facilitate adsorption with magnetite nanoparticles that acts as a nanocarrier system allowing us to improve these compounds as promising tools in the fields of biochemistry and biotechnology. Targeted delivery increases efficacy and decreases the side effects caused by overall therapeutic compound toxicity. The starting sequence was described and synthesized by Dra. Ana María Pérez-López during her doctoral thesis (University of Granada, 2010).

Evaluation of cell viability was carried out using MTT cytotoxicity assays. Assessment of the neuroprotective activity of the compounds was carried out *in vivo* in neuronal cells lines SH-SY5Y and SK-NBE(4) human neuroblastoma which express the NMDA receptors. These biological evaluation was performed by Professors Rafael Salto González and María Dolores Girón González (Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy , University of Granada), Whereas the cellular uptake was evaluated in the same cellular lines in the biological laboratory at the School of Chemistry of the University of Edinburgh during one of my short predoc-stays along the PhD,

Affinity assays were carried out *in vitro*, over isolated PDZ and PDZ- GST domains, by Saturation-Transfer Difference Spectroscopy (STD) and Surface Plasmon Resonance (SPR) assays. The SPR trials were performed using SPR- based analytical instrument called BIAcore by GE Healthcare Life Sciences Company during a detailed device demonstration. The workshop was conducted by a qualified employee.

Chapter 2

This chapter features an assortment of peptide ligands, capable of forming palladium complexes *in situ*, that are then able to catalyze palladium-mediated cross-coupling reactions. These reactions are considered of great importance in organic chemistry as they allow connection of two fragments *via* carbon-carbon or carbon-heteroatom bonds. Here we emphasize the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction to carry out the activity evaluation. We have developed a variety of new peptide-based ligands, all containing triazol units in the backbone chain, with the intention of replacing the usual phosphine ligands for our own ligands. The result is increased reaction yields and a decrease in the amount of metal catalyst required. Thus, these compounds appear attractive as ligands supports based on an easy synthesis and to handling.

In summary, the chapter deals with how unique sequences of natural amino acids in combination with triazol were designed and synthesized in order to create orthogonal functionality to form palladium complex catalyst *in situ* for cross coupling reactions.

Chapter 3

The ability to analyze and observe the activity of particular enzymes inside cells, occurring in specific biological processes, can provide vital information and additionally gives an accurate and more realistic picture of the behaviour of the enzyme.

A library of sensors design for monitoring enzymatic caspase-3 activity *in situ* has been developed. Caspases are mediators of apoptosis, programmed cell death. This process is involved in many diseases such as cancer and autoimmune disorders. Understanding apoptotic behavior in cancer cells could be useful for finding a successful treatment.

In this chapter, a variety of activity-based probes were designed and synthesised in order to develop selective caspase-3 sensors. Selective monitoring of caspase-3 activity *in situ* has potential for the diagnosis of multiple pathologies.

Small cleavable peptides (4 amino acids based on the specificity of Caspases 3) with an internal FRET pair attached to a cell delivery system (CPPM) would act as a sensitive reporter of internal protease function and hence report on cellular apoptosis. In order to improve selectivity towards caspase-3 function (over caspase-7) a variety of permutations of the well-known peptide cleavage sequence were explored.

Kinetic studies were performed by incubating caspase-3 and 7 with all sensors, with changes in fluorescence monitored over time, in the presence of increasing sensor concentrations. Cleavage was corroborated by MALDI-TOF MS. To confirm that the fluorescence increment was due to peptide cleavage, all sensors were incubated with high concentration of enzyme and analysed by mass spectrometry and fluorescence spectroscopy.

Probes were evaluated on HEK cells and cell apoptosis was induced by the well-known protein kinase inhibitor staurosporine (STS). All probes were observed to be nontoxic by MTT assay. Flow cytometry was used to analyze the mechanism of uptake of the fluorescently-labelled probe through the cell membrane. To support our findings based on flow cytometry analysis, HEK cells treated with the best sensors were analyzed further by confocal microscopy.

These results offer new diagnostic/therapeutic strategies against cancer.

The study was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through a short predoc-stay fellowship program with code EEBB-I-13-07131. The work was carried out under supervision of Mark Bradley (Professor of High-Throughput Chemical Biology, School of Chemistry, University of Edinburgh).

INTRODUCCIÓN

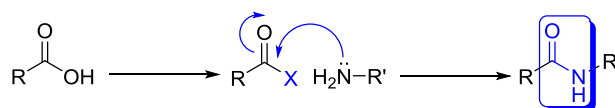
1. INTRODUCCIÓN

1.1. PÉPTIDOS

Los péptidos se definen como moléculas formadas por la unión covalente de dos o más aminoácidos, siendo arbitrario el límite máximo de aminoácidos que lo componen. Por tanto, según la longitud de la cadena peptídica, la definición puede ser variable, poniendo unos autores el límite en 50 aminoácidos, o 5000 Dalton (Da)¹, mientras que otros lo estipulan en 100 residuos de aminoácido, denominándose polipéptidos o proteínas, según corresponda en cada caso, los compuestos que superan este número de residuos. Normalmente la denominación de residuo refleja la pérdida de una molécula de agua cuando un aminoácido se une a otro.

Desde un punto de vista químico se puede definir a los péptidos como cadenas de dos o más aminoácidos unidos covalentemente a través de enlaces amida, denominados enlaces peptídicos. El enlace peptídico es un ejemplo de reacción de condensación, una reacción común en el organismo.

Para que esa reacción de condensación sea termodinámicamente favorable, el grupo carboxílico debe de ser químicamente modificado o activado para que el grupo hidroxilo de este sea eliminado fácilmente y se favorezca así la unión. Para llevar a cabo esta activación hacemos uso de carbodiimidas, cuyos beneficios y mecanismo de reacción se explica a continuación (**Esquema 1**).



Esquema 1. Mecanismo de reacción de formación de enlace amida.

1.1.1. ENLACE PEPTÍDICO

La unión entre dos aminoácidos se lleva a cabo por la reacción que se presenta entre el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro formando una amida mediante la pérdida de una molécula de agua. Esta unión covalente es a lo que se denomina enlace peptídico, el cual tiene una geometría planar y características de doble enlace como consecuencia de la estabilización por resonancia por conjugación entre el nitrógeno y el grupo carbonilo.

El enlace amida es plano y por tanto, el enlace peptídico tiene dos isómeros de rotación, siendo el más estable el *trans* (**figura 1**).

¹ Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR. Therapeutic peptides: Technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(6):638-642

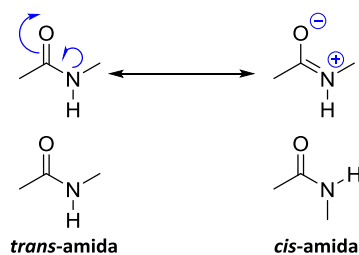


Figura 1. Isómeros de rotación del enlace peptídico.

Sintetizar químicamente cadenas de aminoácidos es una tarea difícil. Los primeros péptidos, como la oxitocina y la insulina, no se sintetizaron hasta la década de los cincuenta, medio siglo después de que en el laboratorio se enlazaran dos aminoácidos mediante enlaces peptídicos².

En los últimos 50 años se han llevado a cabo numerosos avances en la síntesis química de proteínas, siendo hoy en día una aproximación de alto rendimiento biológico en investigación y producción y desarrollo de fármacos.

1.1.2. IRRUPCIÓN DE LOS PÉPTIDOS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

El Centro para la Evaluación e Investigación del Medicamento de Estados Unidos (FDA, acrónimo de Food and Drugs Administration) tradicionalmente trata a los péptidos como fármacos convencionales, no como productos biológicos³. Esto conlleva al estudio de su composición y estructura, según la cual, la longitud máxima de un péptido es de 100 residuos de aminoácidos y, a una longitud mayor, se puede definir como proteínas.

La Agencia Europea del Medicamento (EMA, acrónimo de European Medicines Agency), no aporta distinción entre proteínas y péptidos por el tamaño o número de residuos de aminoácidos que los componen, sino que los trata como entidades biológicas cuando son extraídos de fuentes naturales⁴, o como entidades químicas moleculares convencionales si son sintetizadas químicamente. El proceso de aprobación para la obtención de la autorización de comercialización en toda la UE está centralizado. En cuanto a la fabricación, se sigue la guía diseñada por la FDA "Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing, and Controls Information for Synthetic Peptide Substances", en la que se

² Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. Vol 10. CRC Press; 1997

³ Food and Drug Administration. *Guidance for Industry on Biosimilars: Q & As Regarding Implementation of the BPCI Act of 2009: Questions and Answers Part II*. 2012

⁴ (a) Council E. Directive 2001/83/EC of the European parliament and of the council of 6 november 2001 on the community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal L*. 2001;311(28):11 (b) European Commission. Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use. H. a. Consumers; 2003

especifican las características necesarias para garantizar la identidad, pureza y actividad del péptido para así demostrar la consistencia entre diferentes lotes⁵.

1.1.3. IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS EN BIOTECNOLOGÍA

Los péptidos han emergido como una nueva clase de biomateriales debido a sus propiedades químicas, físicas y biológicas.

Basándose en la amplia variedad, funcionalidad y afinidad de estas pequeñas moléculas, y gracias al conocimiento de las relaciones estructura-actividad, estos tipos de compuestos han sido muy estudiados en los últimos tiempos.

Su papel funcional, su pequeño tamaño, su bajo coste sintético, su estabilidad y sus herramientas de síntesis hacen de los péptidos una familia de compuestos con un gran potencial y aplicabilidad en distintos campos de estudio. Debido a esto, se han convertido en objetivo para las industrias farmacéuticas y biotecnológicas, siendo un reto para el mercado el poder reproducirlos y diseñarlos racionalmente con una determinada finalidad.

En este trabajo, se muestra una variedad de aplicaciones de los péptidos en diferentes campos, desde la biología molecular y química médica, hasta la síntesis orgánica y biotecnología, pudiendo actuar como dianas farmacológicas, secuencias de reconocimiento, inhibidores de interacciones proteína-proteína, transportadores moleculares o incluso como ligandos y catalizadores, tanto a nivel sintético como a nivel celular⁶.

A nivel biológico, los péptidos ejercen diversos roles, entre los que destaca, sobre todo, su papel como señalizador y regulador molecular en una amplia variedad de procesos fisiológicos que los hace esenciales en muchos aspectos de la investigación biomédica, especialmente en la industria farmacéutica, donde se pueden encontrar nuevos candidatos farmacológicos⁷. La especificidad hacia dianas farmacológicas viene atribuida por las conformaciones estructurales que pueden adoptar en el espacio y por el estudio de secuencias específicas de reconocimiento hacia estas. Generalmente su baja toxicidad se debe a que son específicos, por tanto no interactúan con otros fármacos u otras proteínas del organismo y también a su rápida metabolización y consecuente descomposición en las unidades que los componen.

⁵ Swietlow A, Lax R. Quality control in peptide manufacturing: Specifications for GMP peptides. *Chimica oggi*. 2004;22(7/8):22-25 (b) Food and Drug Administration. Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing, and controls information for synthetic peptide substances. C. f. D. E. a. R. (CDER) and C. f. B. E. a. R. (CBER); 1994. p. 13

⁶ Uhlig T, Kyprianou T, Martinelli FG, et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*. 2014;4:58-69

⁷ Hancock RE, Sahl H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006;24(12):1551-1557

La **química médica** ha tratado de relacionar las funciones de las biomoléculas con su estructura, por lo que es muy importante conocer las dianas farmacológicas para el diseño y síntesis de compuestos que nos permitan influir en las funciones deseadas en cada caso, dando lugar al uso de péptidos como fármacos o para la detección de numerosas enfermedades. Estos estudios han dado lugar a la síntesis de compuestos más eficaces, afines, más estables metabólicamente, que incluso gracias a modificaciones estructurales han sido capaces de atravesar membranas celulares.

A nivel **terapéutico e industrial**, durante la última década, la comunidad científica ha aceptado a los péptidos y proteínas como fármacos viables hacia numerosas enfermedades, dando lugar a un auge en la investigación sobre éstos como dianas terapéuticas y como fármacos, siendo estudiadas todo tipo de biointeracciones, dando lugar al desarrollo de librerías peptídicas. El desarrollo de fármacos de carácter peptídico, obtiene gran relevancia, debido a la capacidad de desarrollar pequeñas moléculas, sencillas de manejar y preparar, con bajo coste.

1.1.4. FÁRMACOS PEPTÍDICOS DESTACADOS A LO LARGO DE LA HISTORIA

Emil Fischer fue el primer investigador que introdujo los conceptos de péptidos (Fischer and Fournau, 1901) y polipéptidos, y desarrolló los protocolos de síntesis para su obtención a partir del año 1900. A él se le sumó la participación de Theodor Curtius, posteriormente llamado padre de la química de péptidos. En el año 1932, se desarrolló el grupo protector Carbobenzoxi (Cbz, grupo protector N^α), por Bergmann y Zervas, el cual permitió el desarrollo de una química más compleja, mediante el uso de aminoácidos polifuncionales, ya que hasta entonces la síntesis de péptidos era una síntesis basada en acoplamientos sencillos y el proceso de avance en este área era lento⁸.

Básicamente después de este descubrimiento en el año 1935, se sintetizaron compuestos importantes, como la Carnosina⁹, un dipéptido que contiene L-histidina en su estructura, conseguido mediante condensación con cloruro de N-ftaloil alanilo. La cual se encuentra en numerosos tejidos, mayoritariamente en el músculo esquelético. Entre las funciones importantes en las que participa cabe destacar su papel como neurotransmisor, modulador de la actividad enzimática y quelante de distintos metales. Otro compuesto destacado fue la síntesis del Glutathion¹⁰, una biomolécula (GSH, tripéptido constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) que se encuentra en plantas y animales, cuya relevancia queda reflejada en las más de 40000 entradas encontradas en la base de datos de Medline¹¹.

⁸ (a) Kimmerlin T, Seebach D. '100 years of peptide synthesis': Ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies*. *The Journal of peptide research*. 2005;65(2):229-260, (b) Grant GA. Synthetic peptides. *Synthetic Peptides: A User's Guide: A User's Guide*. 2002:3

⁹ Sifferd RH, du Vigneaud V. A new synthesis of carnosine, with some observations on the splitting of the benzyl group from carbobenzoxo derivatives and from benzylthio ethers. *J Biol Chem*. 1935;108(3):753-761

¹⁰ Harington CR, Mead TH. Synthesis of glutathione. *Biochem J*. 1935;29(7):1602-1611

¹¹ Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(9):916-921

Casi 20 años después, en 1953, se sintetizó la molécula de la hormona Oxitocina (octapéptido), proclamado hasta entonces el mejor descubrimiento en el avance de síntesis de péptidos^{8a,12}.

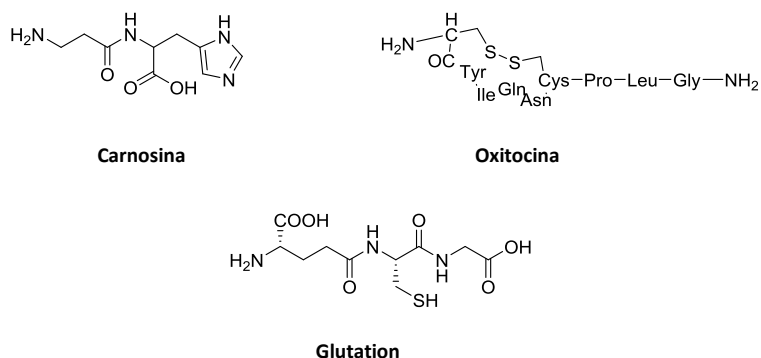


Figura 2. Estructuras de péptidos destacados a lo largo de la historia.

Pasado el tiempo, fue introducido por Carpino y McKay, el grupo protector tert-butoxicarboxílico (BOC), el cual se complementaba perfectamente con el grupo Cbz, para llevar a cabo una síntesis ortogonal y favorecer el desarrollo de esta química¹³.

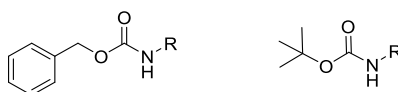


Figura 3. Grupos Cbz y BOC

Una vez introducida la Síntesis en fase sólida por Bruce Merrifield¹⁴, los avances fueron significativos y permitieron pasar de la síntesis de pequeñas proteínas, de un tamaño de 50 residuos de aminoácido, a la síntesis de cadenas largas, como por ejemplo destacar la secuencia del Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH)-1-TAT, constituido por 86 residuos de aminoácido^{8a,15}.

La Insulina fue el primer péptido en ser administrado terapéuticamente y ha sido usado los últimos 50 años para el tratamiento de la diabetes. Está constituida por 51 aminoácidos en dos cadenas (A y B) unidas por dos enlaces disulfuro¹⁶.

En 2003 fue aprobado por la FDA el péptido Enfuvirtide¹⁷, que fue comercializado por la empresa Roche con el nombre de Fuzeon® para el tratamiento por la infección del VIH-1. Su estructura

¹² Vigneaud Vd, Ressler C, Swan CJM, Roberts CW, Katsyannis PG, Gordon S. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J Am Chem Soc.* 1953;75(19):4879-4880

¹³ (a) Carpino LA. Oxidative reactions of hydrazines. IV. elimination of nitrogen from 1, 1-disubstituted-2-arenesulfonhydrazides 1-4. *J Am Chem Soc.* 1957;79(16):4427-4431, (b) McKay FC, Albertson NF. New amine-masking groups for peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* 1957;79(17):4686-4690

¹⁴ Merrifield B. The role of the support in solid phase peptide synthesis. *British polymer journal.* 1984;16(4):173-178

¹⁵ (a) Frankel AD, Biancalana S, Hudson D. Activity of synthetic peptides from the tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(19):7397-7401 (b) Chun R, Glabe CG, Fan H. Chemical synthesis of biologically active tat trans-activating protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1990;64(6):3074-3077

¹⁶ Brange J, Langkjær L. Insulin structure and stability. In: *Stability and characterization of protein and peptide drugs.* Springer; 1993:315-350

se corresponde con la siguiente secuencia de aminoácidos CH₃CO-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂. Este fármaco actúa bloqueando la entrada del virus HIV-1 en la célula receptora mediante la irrupción durante el proceso de fusión del virus a la membrana celular¹⁸.

La mayoría de los antibióticos usados en nuestra sociedad son derivados peptídicos. Por ejemplo las naturales penicilinas pueden ser diseccionadas en residuos monosustituidos de ácido acético, L-cisteína y D-Valina, mientras que la cefalosporina D, el building block de la mayoría de cefalosporinas semisintéticas, contienen en su cadena los residuos de ácido D- α -aminoadípico, L-Cisteína, α,β -dehidrovalina y ácido acético. Incluso por ejemplo, destacar el antibiótico Vancomicina (péptido tricíclico ramificado glicosilado, con actividad antibacteriana¹⁹ (figura 4) .Sin embargo existe un elevado número de péptidos y derivados descritos en literatura, que no son usados clínicamente como fármacos, debido a las restricciones en su tamaño y peso molecular.

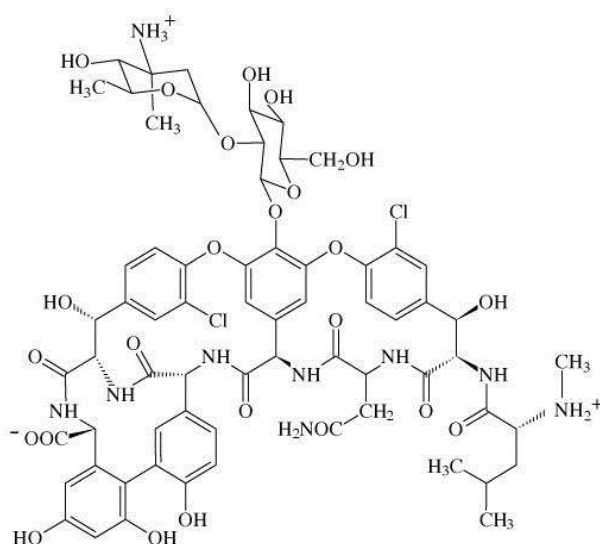


Figura 4 . Vancomicina²⁰

Los péptidos como fármacos han sido diseñados y sintetizados a partir de variaciones de secuencias modelo de péptidos naturales encontrados en el cuerpo humano, como en otros organismos vivos. Estos pueden ser sintetizados y diseñados para mejorar los factores de especificidad, estabilidad y toxicidad. Así por ejemplo en literatura se habla de D-aminoácidos los cuales presentan elevada resistencia a la proteólisis y por tanto son más estables *in vivo*²¹.

¹⁷ Fung HB, Guo Y. Enfuvirtide: A fusion inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther.* 2004;26(3):352-378

¹⁸ (a)Fletcher CV. Enfuvirtide, a new drug for HIV infection. *The Lancet.* 2003;361(9369):1577-1578 (b) Fuzeon [package insert]. Injection Instructions. Durham, NC, and Nutley, NJ: Trimeris Inc and Roche Laboratories Inc; 2003

¹⁹ Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(6):1317-1323

²⁰ Schäfer M, Schneider TR, Sheldrick GM. Crystal structure of vancomycin. *Structure.* 1996;4(12):1509-1515

²¹ Bessalle R, Kapitkovsky A, Gorea A, Shalit I, Fridkin M. All-D-magainin: Chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS Lett.* 1990;274(1):151-155

Más recientemente se ha enfatizado en la relación estructura actividad, con el fin de desarrollar compuestos peptidomiméticos, que intentan reproducir la función de un péptido bioactivo determinado, y así optimizar sus propiedades biológicas y farmacológicas.

Así lo que se pretende a lo largo de este trabajo es encontrar derivados peptídicos capaces de mimetizar, inducir y modular la interacción mediante reconocimiento de otras secuencias peptídicas, implicadas en interacciones proteína-proteína o proteína-receptor, para así actuar con un fin terapéutico. La creación de librerías peptídicas permite la opción de obtener una flexibilidad en la secuencias, durante la búsqueda de la sustancia de interés terapéutico.

1.1.5. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL USO DE LOS PÉPTIDOS EN EL MERCADO DE FÁRMACOS

La estructura de los péptidos a menudo es compleja, capaz de presentar diferentes conformaciones, dependiendo del medio en que se encuentre. Entre los factores que causaron problemas en el desarrollo de péptidos como fármacos para la industria farmacéutica, es su transporte específico hacia los órganos diana y su corta vida media, debido a que son metabolizados rápidamente en el organismo. Este problema, se ha solventado a través de modificaciones estructurales, que los hacen menos sensibles a la degradación por enzimas y fluidos biológicos, de entre ellas, caben destacar en este trabajo, estrategias de introducción de D-aminoácidos (durante el desarrollo de CPPM)²², o introducción de aminoácidos que hagan más o menos flexible al péptido (como el uso de PEG, o aminoácidos impedidos estéricamente, respectivamente)²³.

Otra ventaja importante que nos encontramos con este tipo de moléculas, es la versatilidad que ofrecen estructuralmente, al poder introducir en la cadena peptídica diferentes tipos de moléculas, e ir jugando con la especificidad de estas según la aplicabilidad que queramos darle. Por ejemplo, las modificaciones químicas permitirán generar péptidos bioactivos, para el tratamiento de diferentes enfermedades, como se muestra en los capítulos I y III de esta memoria.

Biológicamente, sus productos de degradación son aminoácidos o péptidos más pequeños, con lo que se minimiza el riesgo de toxicidad²⁴.

La mayoría de péptidos terapéuticos derivan de péptidos naturales y son agonistas de receptores por lo que se necesita poca cantidad y menor número de dosis del agonista para activar el receptor de interés¹⁹.

²² Lien S, Lowman HB. Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.* 2003;21(12):556-562

²³(a) Jain A, Jain SK. PEGylation: An approach for drug delivery. A review. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems.* 2008;25(5), (b) Bailon P, Won CY. PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(1):1-16, (c) Pasut G, Veronese FM. PEGylation for improving the effectiveness of therapeutic biomolecules. *Drugs Today (Barc).* 2009;45(9):687-695, (d) Mero A, Clementi C, Veronese FM, Pasut G. Covalent conjugation of poly (ethylene glycol) to proteins and peptides: Strategies and methods. In: *Bioconjugation protocols.* Springer; 2011:95-129

²⁴ Loffet A. Peptides as drugs: Is there a market? *Journal of Peptide Science.* 2002;8(1):1-7

1.1.6. ANALISIS DE CARACTERISTICAS DESTACADAS EN EL USO DE PÉPTIDOS DESDE UN PUNTO DE VISTA TERAPÉUTICO.

1.1.6.1. IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS EN LOS PROCESOS BIOLÓGICOS.

Debido a su carácter hidrofílico, los péptidos muestran habilidades limitadas a la hora de cruzar barreras fisiológicas. Incluso una vez dentro del sistema circulatorio, tienen una vida corta, debido a multitud de proteasas que provocan a una degradación agresiva, dando lugar a modificar las vías de administración de estos como fármacos^{19,25}.

1.1.6.1.1. VENTAJAS DEL USO DE PÉPTIDOS COMO FÁRMACOS

- . Son eficaces, seguros y bien tolerados en el organismo.
- . Ofrecen una alta selectividad y potencia como tales.
- . Ofrecen una metabolización previsible, lo cual genera numerosos beneficios a la hora de su estudio.
- . Son rápidos de sintetizar y de lanzar al mercado.
- . Se sintetizan mediante protocolos estandarizados, haciendo de ellos una química sencilla y fácil de manipular.

1.1.6.2. PUNTOS DEBILES QUE ACTUALMENTE SE ENCUENTRAN SOMETIDOS A MEJORA

a) Son química y físicamente inestables. Este problema está mejorando mediante el uso e inserción de modificaciones estructurales.

Durante este trabajo se han introducido para mejorar estos inconvenientes. En el capítulo I, podemos destacar el uso de glicósidos ensamblados a la secuencia peptídica para facilitar la penetrabilidad a través de la barrera hematoencefálica, así como modificaciones estructurales entre los espaciadores que confieren estas estructuras para mejorar sus características físicas y químicas (flexibilidad, rigidez, polaridad...). A nivel de la membrana celular en el capítulo III se han utilizado monómeros como D-aminoácidos durante la síntesis de la secuencia de CPPM para evitar el reconocimiento celular de estos por las distintas enzimas de membrana, como las proteasas y peptidasas, capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos y rompiendo la secuencia y por tanto impedir su función como transportadores moleculares.

b) Las cadenas peptídicas tienden a formar agregados, debido a interacciones hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno entre estas. Por lo que, a veces, como se comentará en el capítulo I, es necesario

²⁵ Adessi C, Soto C. Converting a peptide into a drug: Strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem.* 2002;9(9):963-978

el uso de agentes caotrópicos²⁶ o adición de DMSO como codisolvente orgánico²⁷, usados a lo largo de este trabajo, para así evitarlo y favorecer una buena disposición en el espacio. Un ejemplo de ello es la adición de ureas solubles o agentes iónicos caotrópicos, los cuales pueden interrumpir la formación de enlaces de hidrógeno y permitir incrementar los rendimientos en el acoplamiento. Así, también se ha observado que el aumento de la temperatura durante la reacción también ha sido un éxito para eliminar estas agregaciones y favorecer los acoplamientos durante la síntesis química.

c) Poseen un tiempo de vida corto y son eliminados rápidamente en el organismo.

d) Normalmente no se encuentran disponibles para su administración oral.

e) Tienen una baja permeabilidad de membrana. La cual es mejorada en este trabajo, mediante el uso de nanopartículas o espaciadores que confieren a la estructura una mejora en la permeabilidad, en el capítulo I, desde el uso de transportadores moleculares como basados en secuencias peptídicas (CPPM)²⁸, cuya carga positiva favorece la penetrabilidad en contraste con las cargas negativas encontradas en la superficie celular. (Capítulo III)

1.1.6.3. APLICACIONES NOVEDOSAS DESTACADAS

. Ofrecen nuevos avances en genómica, proteómica, y medicina personalizada, así como incremento de la seguridad y requerimientos de eficacia para nuevos fármacos.

. A su vez a nivel económico, ofrecen un incremento favorable debido a los beneficios que ellos ofrecen comentados anteriormente.

1.1.7. EVOLUCIÓN DE LOS PÉPTIDOS DURANTE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS, DESARROLLO CLÍNICO

El uso terapéutico de los péptidos se encuentra en pleno crecimiento. En 2011, hubo entre 500-600 péptidos en fase preclínica, y el año 2012 fue un logro para el sector de los péptidos a nivel farmacéutico, saliendo al mercado 5 péptidos con carácter terapéutico aprobados en Europa y 6 en USA. Este ha sido el mayor número de fármacos peptídicos aprobados en un año registrado²⁹, lo que ha supuesto una inyección de optimismo para este sector, circunstancia confirmada estadísticamente, apareciendo un 20% de péptidos aprobados frente a un 10% de pequeñas moléculas usadas con fines

²⁶ Albericio F. *Solid-phase synthesis: A practical guide*. CRC Press; 2000

²⁷ Hyde C, Johnson T, Sheppard R. Internal aggregation during solid phase peptide synthesis. dimethyl sulfoxide as a powerful dissociating solvent. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1992(21):1573-1575

²⁸ Peretto I, Sanchez-Martin RM, Wang XH, Ellard J, Mittoo S, Bradley M. Cell penetrable peptoid carrier vehicles: Synthesis and evaluation. *Chemical Communications*. 2003(18):2312-2313

²⁹ Kaspar AA, Reichert JM. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov Today*. 2013;18(17):807-817

terapéuticos³⁰. Así se ha visto incrementado el número de péptidos que entran en fase de ensayos clínicos desde 1, en 1970, hasta alrededor de 20 actualmente³⁰

En 2012, hubo en fase preclínica 128 péptidos como candidatos a fármacos, esto incluía a 40 en fase I, 74 en fase II y 14 en fase III. El auge y el desarrollo en el campo de los péptidos terapéuticos ha permitido una notable expansión y un aumento en el número de péptidos aprobados observados en 2012. En fase I, cabe destacar que más del 30% de los péptidos que representan este auge eran dirigidos hacia el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, el dolor y el cáncer. En fase II y fase III, destaca el cáncer como principal diana, contando con un porcentaje de péptidos entre el 15-40%, mientras que péptidos dirigidos hacia la cura o paliación de enfermedades infecciosas y del dolor, como dermatológicas, alergias y desordenes del sistema nervioso central, no se encuentran representadas por este tipo de fármacos en el mercado²⁹.

Además del tradicional diseño de péptidos, han emergido numerosas tecnologías para desarrollo de péptidos que representan las oportunidades y la dirección futura a la que se dirige este campo. Esto incluye el desarrollo de péptidos como transportadores moleculares como ruta alternativa enfocada a la mejora de las rutas de administración, tanto como el desarrollo de nuevos fármacos peptídicos conjugados a ellos.

Durante la pasada década, los péptidos han aumentado su rango de aplicación, hacia los campos de la medicina y la biotecnología. La investigación llevada a cabo en este campo sobre péptidos con fines terapéuticos está experimentando un auge por razones comerciales, pudiéndose destacar como ejemplo el fármaco LupronTM de laboratorios Abbott, para el tratamiento del cáncer de próstata, que alcanzó una cifra ventas de más de 2 billones de dólares en 2011. Actualmente hay más de 60 péptidos con fines terapéuticos aprobados por la FDA en el mercado y se espera un crecimiento significativo, con aproximadamente 140 fármacos peptídicos actualmente en ensayos clínicos y más de 500 en fase preclínica²⁹.

En términos económicos, el mercado global de péptidos ha predicho un incremento estimado desde 14,1 billones de dólares en 2011 hasta un 25,4 billones de dólares en 2018, destacando un subrayado aumento en la innovación de nuevos péptidos con fines terapéuticos desde 8,6 billones de dólares en 2011 (60%) hasta 17 billones de dólares (66%) en 2018^a.

Las áreas actualmente destacadas a las que se dirigen el uso terapéutico de péptidos como fármacos son las enfermedades metabólicas y la oncología, debido a la importante tasa de mortalidad debida a ellas²⁹.

^a. Research and markets, Transparency Market Research (2012) Peptide Therapeutics Market: Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2012–2018.

³⁰ Lax R. The future of peptide development in the pharmaceutical industry. *PharManufacturing: The international peptide review*. 2010;2:10-15

1.1.8. OBJETIVOS GENERALES EN FUNCIÓN DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se han diseñado y sintetizado distintas secuencias peptídicas para diversas aplicaciones tanto en el campo de la química médica, como para el control y mejora de distintas reacciones químicas a nivel sintético como a nivel biológico, que permiten el control y manipulación de diversas funciones biológicas mediante las reacciones químicas que tienen lugar en el organismo.

Así, cabe destacar la importancia de la relación que existe a la hora de encontrar secuencias peptídicas afines a distintas dianas farmacológicas o hacia metales de transición capaces de actuar como catalizadores de distintas reacciones químicas

Para llevar a cabo este trabajo, ha sido necesario basarnos en estudios previos, y centrarnos en el diseño de estas para:

. Encontrar un derivado, peptídico o glicopeptídico, de la secuencia afín descrita por la Dra. Ana María Pérez López en su tesis doctoral (Universidad de Granada, 2010) que permita mediante modificaciones estructurales y unión de fragmentos no peptídicos, mejorar su capacidad de penetración a través de las membranas celulares, favoreciendo el paso a través de la barrera hematoencefálica permitiendo así la distribución del péptido en el cerebro y en última instancia actúen como fármacos neuroprotectores.

. Diseñar una secuencia peptídica capaz de acomplejarse con el Paladio, que nos permitiese la formación *in situ* de complejos capaces de catalizar reacciones de acoplamiento cruzado tipo Suzuki-Miyaura, que no solamente mejoren las características de los actuales derivados de fosfinas como ligandos, sino que a su vez encontráramos ligandos no-tóxicos basados en la síntesis de péptidos que, como tales, mejoraran su estabilidad frente al uso de estas, incrementaran el rendimiento de estas reacciones y fuesen sencillos de manipular y de sintetizar, siendo una síntesis rápida y de bajo coste (Capítulo II).

. Usando secuencias de péptidos basados en sistemas de transporte molecular (CPPM) para insertar en su estructura unas secuencias peptídicas de reconocimiento selectivo de la enzima Caspasa-3, involucrada en el mecanismo de apoptosis celular, de manera que a partir de esta unión nos permita actuar como sensores químicos, para la detección del cáncer, abriéndonos un futuro prometedor en diversos campos y otras aplicaciones terapéuticas (Capítulo III).

1.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS. BREVE INTRODUCCIÓN A LA SPPS

En este trabajo la síntesis de péptidos se lleva a cabo en fase sólida (de las siglas en inglés SPPS, Solid-Phase Peptide Synthesis), por lo que es importante hacer una breve introducción de la misma y ver

qué ventajas presenta sobre la síntesis de péptidos en solución. El método clásico de síntesis de péptidos, hasta 1963, era llevado a cabo mediante síntesis en solución, la cual incluía un amplio rango de técnicas y procedimientos con el fin de llevar a cabo la preparación desde pequeñas moléculas a grandes construcciones moleculares. Bruce Merrifield³¹ fue pionero en introducir la síntesis en fase sólida (SPPS), con el fin de simplificar el tedioso trabajo de la síntesis en solución, facilitando por tanto el método de purificación de péptidos y permitiendo su automatización.

Los sintetizadores de péptidos de los que se dispone hoy día para este fin permiten programar la síntesis de la secuencia peptídica, dando lugar a una síntesis de péptidos más rápida, sencilla, fácil de manipular y limpia. Aunque no todo el mundo, por su elevado coste, puede disponer de esta instrumentación, el simple hecho de poder anclar a un soporte sólido (resina o soporte polimérico insoluble) moléculas, de forma manual, que posteriormente nos permitan realizar grandes construcciones moleculares de forma que no haya que purificar cada péptido intermedio de reacción, se traduce en una síntesis limpia, una reducción de tiempo y un aumento de producción, por tanto ha sido un gran avance para los investigadores que trabajamos en este campo.

Un simple exceso de reactivo, o aumento en la concentración nos puede dirigir rápidamente hacia una completa consecución de la reacción.

De entre los beneficios a destacar de este sistema de producción, nos encontramos, con que permite la eliminación del exceso de reactivo o de la producción de productos indeseados, no anclados a la cadena en crecimiento, mediante un simple sistema de filtración y lavado. Otra ventaja destacable es que las reacciones se llevan a cabo en el mismo reactor o recipiente, evitando pérdidas o disminución en el rendimiento de reacción, debidas al trasvase de producto.

Así este método de síntesis se basa en una estrategia de elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido³¹. El método de síntesis de péptidos en fase sólida presenta numerosas ventajas respecto a la síntesis de estos en solución:

- . Buenos rendimientos ya que, debido a la fijación del péptido al soporte sólido, se pueden emplear excesos de reactivos que se eliminan fácilmente tras sencillos y rápidos procesos de filtración y lavado. No se producen pérdidas de péptido ya que éste está anclado al soporte sólido.
- . Las operaciones de lavado y filtrado son más sencillas y susceptibles de automatización.
- . No hace falta purificar los productos intermedios, esto se traduce en una reducción de tiempo y en un aumento de la producción.

El principio en el que está basado la síntesis en fase sólida viene ilustrado a continuación (**figura 5**).

³¹ Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1963;85(14):2149-2154

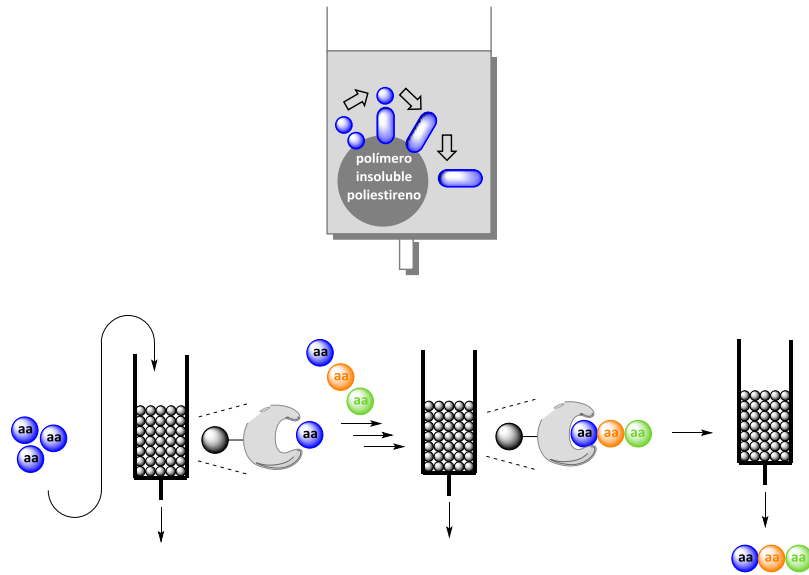
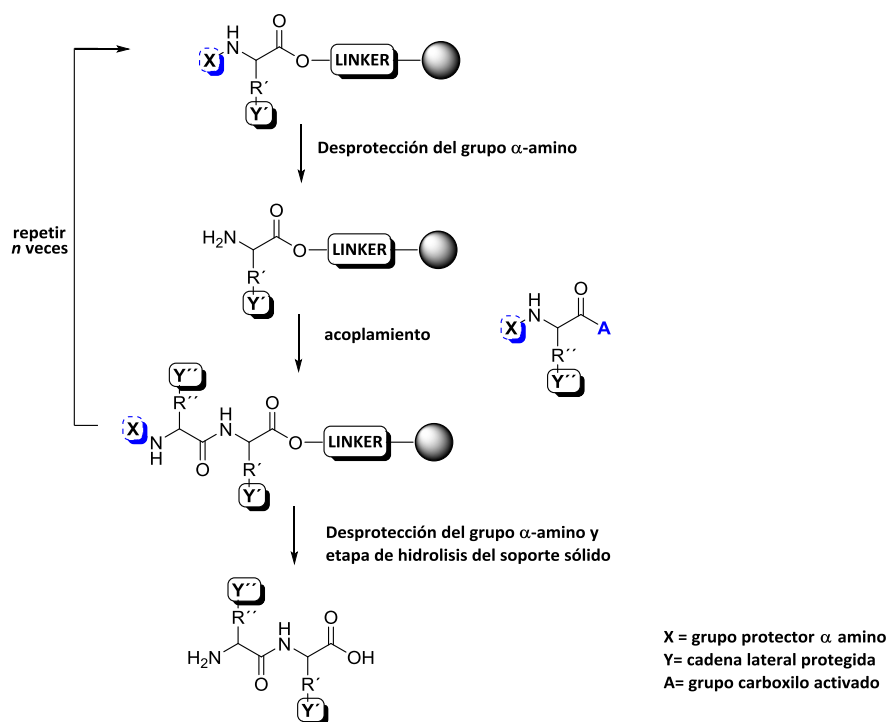


Figura 5. Representación gráfica del funcionamiento de la técnica SPPS.

El carbono terminal (C-terminal), de un aminoácido α -amino-protégido, es unido través de su grupo carboxilo a un grupo hidroxilo, cloro o amino anclado al soporte polimérico insoluble, dando lugar un enlace tipo éster o amida, según el tipo de soporte elegido para la síntesis, el cual una vez finalizada la secuencia sintética, dará lugar a un péptido con carbono terminal que finalizará en ácido o amida según el caso. Para ello, según la secuencia peptídica que se haya diseñado previamente, se determinará la elección del tipo de soporte a utilizar en cada caso. En este trabajo, se han utilizado dos tipos de resinas de poliestireno funcionalizadas, una de ellas es la cloruro 2-clorotritilo y la denominada Rink amide funcionalizada con un grupo amino-metilo (las cuales proporcionan la terminación de la secuencia peptídica en ácido y amida, respectivamente), cuya elección será justificada posteriormente, en este apartado.

La secuencia peptídica sigue una estrategia de crecimiento lineal C \rightarrow N, desde el C-terminal (una vez cargada la resina con el primer aminoácido) hasta el amino terminal (N-terminal). La síntesis se lleva a cabo a través de ciclos repetitivos de reacciones de N α -desprotección y acoplamiento de aminoácidos **Esquema 2**. Siendo n el número de acoplamientos correspondientes al número de aminoácidos que componen la secuencia peptídica³².

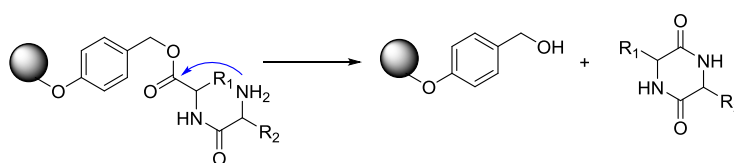
³² Chan W, White P. Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach 2000. .



Esquema 2. Síntesis de péptidos.

1.2.1. ELECCIÓN DEL SOPORTE SÓLIDO

Esta elección es determinante a lo largo del diseño y la síntesis, debido a que depende de esta estructura del extremo C-terminal y según su elección puede ayudarnos a evitar posibles reacciones secundarias, como por ejemplo durante el capítulo I, cabe justificar el uso de la resina 2-clorotritilo, en la que la formación de dicetopiperacina es suprimida cuando el C-terminal del péptido anclado a la resina está muy impedido, así aparte de ofrecernos un extremo carboxilo terminal, buscado, nos ayuda a evitar la reacción indeseada³³.



Esquema 3. Formación dicetopiperacina.

A su vez, la elección es muy importante debido a que condiciona tanto la etapa de liberación del péptido del soporte sólido, como la elección de los grupos protectores de los aminoácidos a utilizar durante el diseño de la secuencia, ya que durante esta reacción, en la mayoría de los casos se desprotege simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos.

³³ Barlos K, Gatos D, Kallitsis J, et al. Synthesis of protected peptide-fragments using substituted triphenylmethyl resins. *Tetrahedron Lett.* 1989;30(30):3943-3946

1.2.2. GRUPOS PROTECTORES. ORTOGONALIDAD³⁴

La cadena lateral de los aminoácidos debe de estar previamente protegida, con grupos protectores compatibles con la estrategia de síntesis a seguir y el tipo de soporte sólido. Deben ser estables durante el proceso de elongación de la cadena y finalmente poder ser eliminados fácilmente sin interferir durante el proceso de liberación del péptido de la resina ni durante la eliminación de otros grupos protectores.

1.2.2.1. GRUPO PROTECTOR FMOC

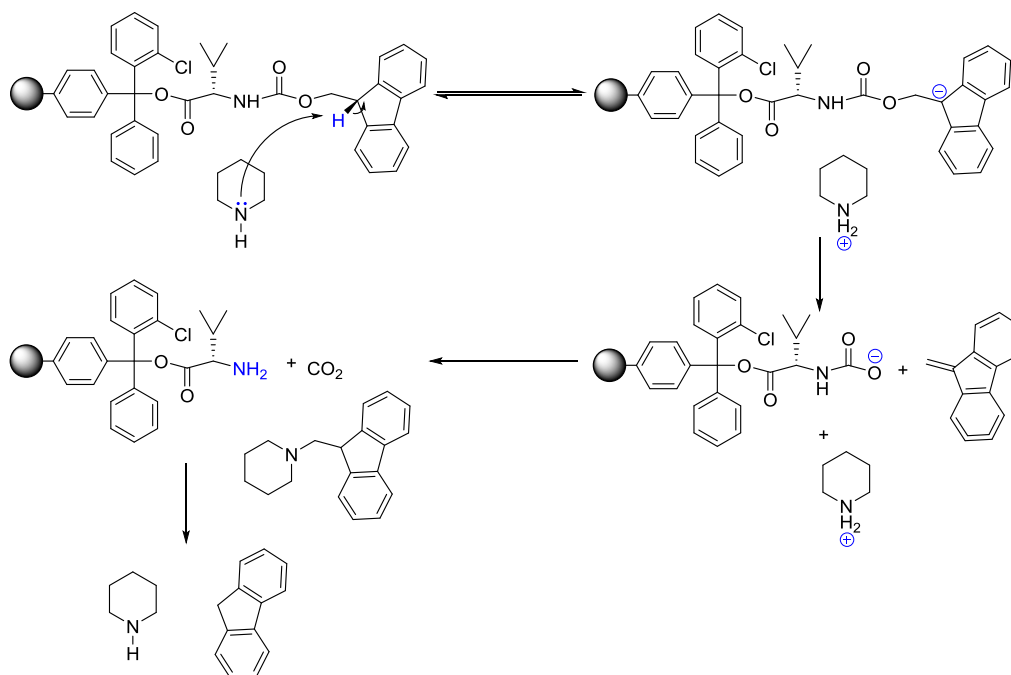
Debido a las estrategias basadas en la protección ortogonal, el grupo protector N^α, fluorenil-9-metoxicarboxílico (Fmoc), lábil a las bases, ha llegado a ser el más importante. Es estable en medio ácido, resiste la hidrólisis con TFA y por tanto es compatible con los grupos Boc/tBu. A su vez, es relativamente estable frente a aminas terciarias dependiendo de la concentración de base, disolvente y temperatura³⁵.

El grupo N^α de cada aminoácido a reaccionar, debe de estar protegido de esta manera, de forma temporal, previamente al acoplamiento, normalmente por un derivado de uretano, en nuestro caso. Este grupo es eliminado mediante β-eliminación inducida por base, dando lugar a la formación de dibenzofulveno y dióxido de carbono. La desprotección se lleva a cabo con una solución de piperidina al 20% en DMF³⁶. Mecanismo de desprotección viene desarrollado en el **esquema 4**.

³⁴ Barany G, Albericio F. Three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. *J Am Chem Soc.* 1985;107(17):4936-4942

³⁵ Atherton E, Bury C, Sheppard R, Williams B. Stability of fluorenylmethoxycarbonylamino groups in peptide synthesis. cleavage by hydrogenolysis and by dipolar aprotic solvents. *Tetrahedron Lett.* 1979;20(32):3041-3042

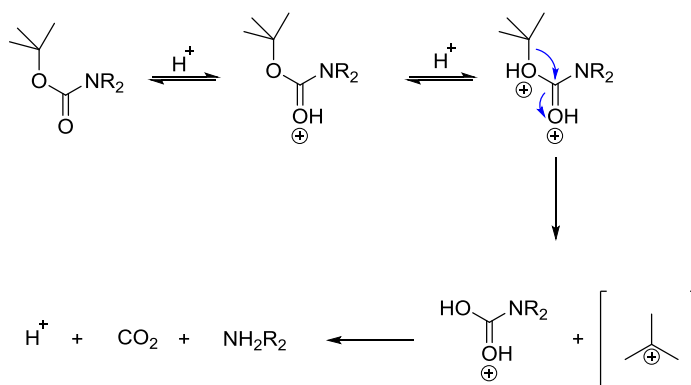
³⁶ (a) Carpino LA, Han GY. 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J Am Chem Soc.* 1970;92(19):5748-5749, (b) Fields GB. Methods for removing the fmoc group. In: *Peptide synthesis protocols*. Springer; 1995:17-27



Esquema 4. Mecanismo de reacción de desprotección del grupo Fmoc.

1.2.2.2. GRUPO PROTECTOR BOC

Este grupo es ampliamente usado sintéticamente para la protección de aminas, dando lugar a la formación de uretanos (RNHBoc). Comercialmente hemos adquirido los aminoácidos protegidos en su cadena NH_2 -lateral por este grupo protector. Este se puede eliminar selectivamente en medio ácido con una solución de ácido trifluoroacético (TFA). El mecanismo de desprotección viene descrito a continuación en el **esquema 5**³⁷.



Esquema 5. Mecanismo de desprotección de NHBoc

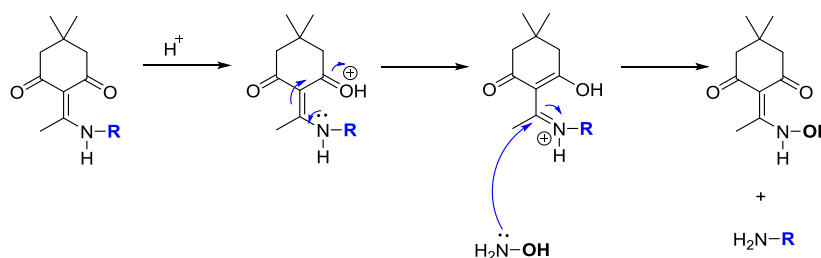
³⁷ (a) Protective groups in organic synthesis. 3rd edition by theodora W. greene (the rowland institute for science) and peter G. M. wuts (pharmacia and upjohn company). john wiley and sons, inc.: New york. 1999. 747 pp. ISBN 0-471-16019-9. - *J Am Chem Soc.* (- 2):- 426, (b) Carpino LA. New amino-protecting groups in organic synthesis. *Acc Chem Res.* 1973;6(6):191-198, (c) Kocienski PJ. *Protecting groups, 2005.* Georg Thieme Verlag; 2014

1.2.2.3. GRUPO PROTECTOR Dde

Este grupo protector 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo (Dde) se utiliza para la protección de aminas primarias en la cadena lateral. Se elimina con una solución de hidracina al 2% v/v en DMF³⁸.

Dde es estable bajo la desprotección de los grupos Fmoc y Boc, pero desafortunadamente el grupo Fmoc es eliminado bajo esas condiciones de desprotección, limitando la estrategia de protección Dde/Fmoc. Así mientras Fmoc es eliminado en medio básico, Dde es eliminado por nucleófilos (trans enaminación)³⁹. Por tanto para poder utilizar esta estrategia de síntesis durante el capítulo III, se usó una mezcla de NH₂OH·HCl /imidazol en NMP, en la que el grupo Fmoc es completamente estable⁴⁰.

El mecanismo de desprotección viene reflejado en el siguiente esquema de reacción (**Esquema 6**).



Esquema 6. Mecanismo de desprotección del grupo protector Dde.

1.2.2.4. GRUPO PROTECTOR t-Bu. DE LOS GRUPOS ÁCIDOS DE CADENA LATERAL

Los aminoácidos comercialmente se han obtenido protegidos en su cadena lateral carboxílica formando ésteres de tert-butilo. Su desprotección en nuestro caso se lleva a cabo mediante hidrólisis ácida del éster con una solución de TFA.

1.2.3. MÉTODOS DE ACTIVACIÓN. AGENTES DE ACOPLAMIENTO. CARBODIIMIDAS Y DERIVADOS DE HIDROXILAMINA COMO ADITIVOS.

Como se comentó anteriormente durante la definición de péptidos y enlace peptídico, el enlace amida o enlace peptídico, se lleva a cabo entre un grupo amina y un grupo carboxilo, con la consecuente pérdida de una molécula de agua. Para que este enlace tenga lugar es necesaria la activación del grupo carboxilo para hacerlo más electrófilo frente al ataque nucleofílico del grupo amina.

³⁸ Bycroft BW, Chan WC, Chhabra SR, Hone ND. A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1993(9):778-779

³⁹ Rubinov DB, Rubinova IL, Akhrem AA. Chemistry of 2-acylcycloalkane-1, 3-diones. *Chem Rev*. 1999;99(4):1047-1066

⁴⁰ Díaz-Mochón JJ, Bialy L, Bradley M. Full orthogonality between dde and fmoc: The direct synthesis of PNA-peptide conjugates. *Org Lett*. 2004;6(7):1127-1129

Existen diferentes estrategias y reactivos que ayudan a aumentar la electrofilia del grupo ácido, y a su vez minimizan el riesgo de racemización, capaces de generar intermedios de reacción muy reactivos, facilitando la formación del enlace amida. Éstos se denominan agentes de acoplamiento.

Para dicha activación, nos ayudamos del uso de agentes de acoplamiento, siendo las carbodiimidas las más usadas en síntesis de péptidos⁴¹. Cuando se emplean las carbodiimidas como agentes de acoplamiento, se recomienda el empleo de aditivos como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)⁴² u Oxima que aceleran la reacción y reducen el riesgo de racemización.

En este trabajo hemos hecho uso de la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), debido a la gran solubilidad de las ureas que se forman como subproductos. Junto a estos agentes de acoplamiento durante los primeros años de investigación, se utilizó como aditivo el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)⁴³, posteriormente sustituido por el 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo (Oxima), debido a su gran potencial como aditivo para la supresión de reacciones indeseadas como racemizaciones y para incrementar la eficiencia del acoplamiento. La Oxima posee un pK_a idéntico al HOBt ($pK_a=4,6$), y uno de los beneficios que aporta en cuanto a la seguridad durante la manipulación, es que no contiene la estructura triazólica del HOBt y HOAT, que confiere un carácter explosivo⁴⁴. De entre otras ventajas a destacar en su uso, es que puede usarse con el mismo protocolo de síntesis que el HOBt, ofrece resultados similares al uso del HOAt en síntesis de péptidos, y disminuye, más que el HOBt, los riesgos de epimerización en fragmentos de reacciones de condensación

Estos aditivos permiten acelerar el tiempo de reacción, reducen el riesgo de racemización y disminuyen la formación de subproductos no deseados.

1.2.3.1. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DEL GRUPO CARBOXILO.

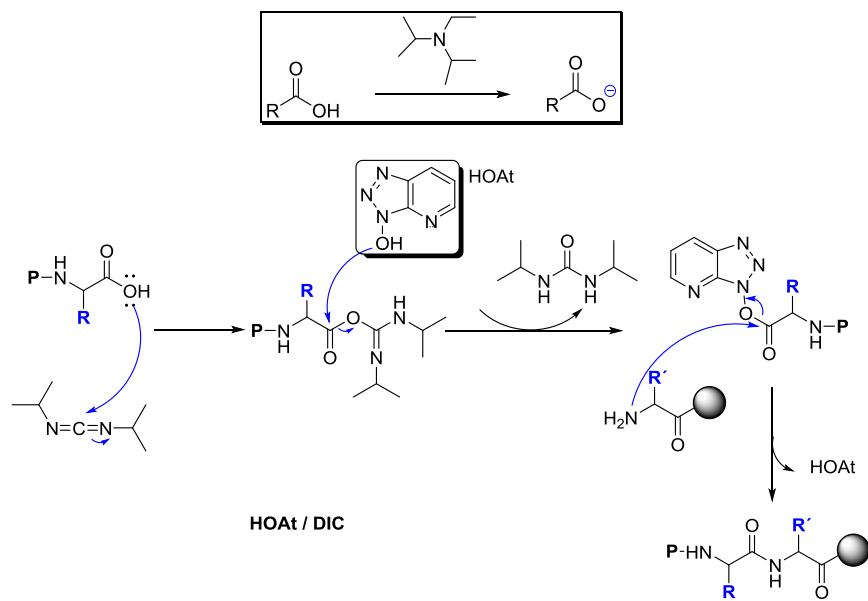
El ácido carboxílico es activado por la carbodiimida, el intermedio de reacción es atacado por el OH de la oxima y se da lugar a un nuevo intermedio de reacción activado, eliminando problemas de racemización. Finalmente, el grupo amino terminal anclado a la resina se acopla al intermedio de reacción, formándose el enlace peptídico.

⁴¹ Williams A, Ibrahim IT. Carbodiimide chemistry: Recent advances. *Chem Rev.* 1981;81(6):589-636

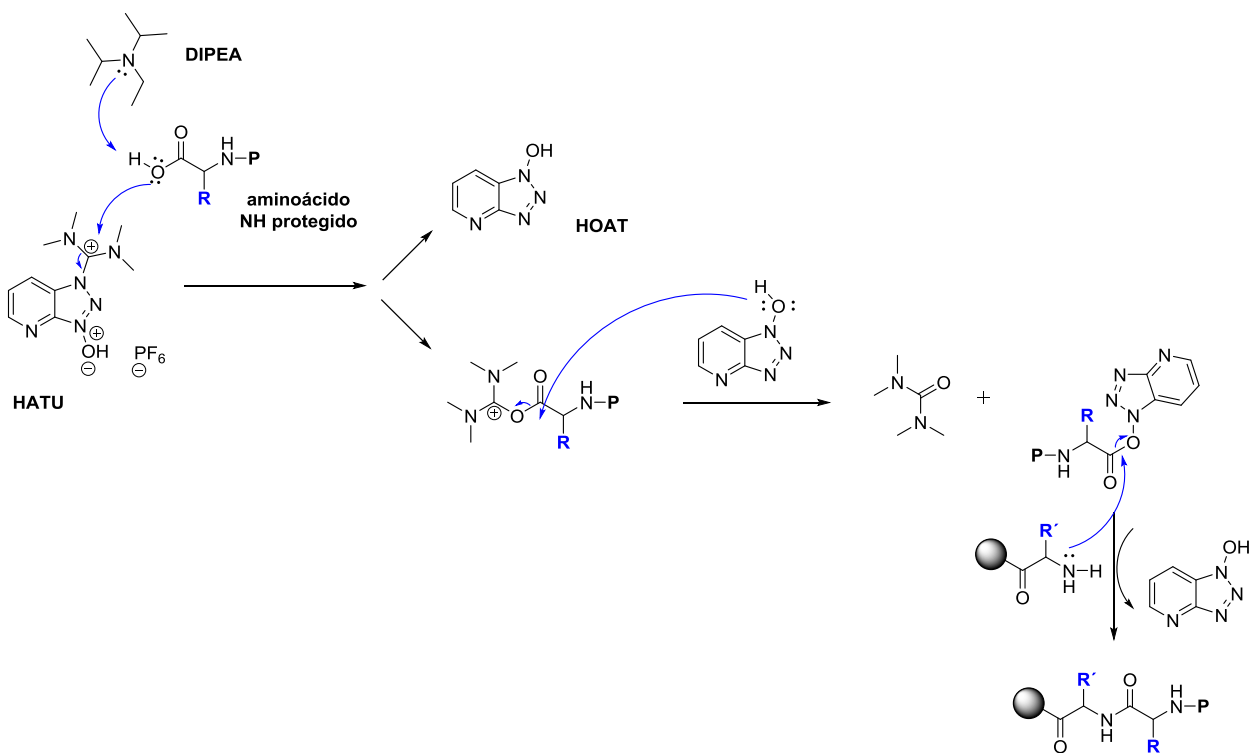
⁴² Konig W, Geiger R. A new method for synthesis of peptides: Activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. *Chem Ber.* 1970;103(3):788-798

⁴³ Subirós-Funosas R, El-Faham A, Albericio F. Aspartimide formation in peptide chemistry: Occurrence, prevention strategies and the role of N-hydroxylamines pp 8595-8606. *Tetrahedron.* 2011;67(45):8585e8593

⁴⁴ Subirós-Funosas R, Prohens R, Barbas R, El-Faham A, Albericio F. Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion [1]. *Chemistry—A European Journal.* 2009;15(37):9394-9403

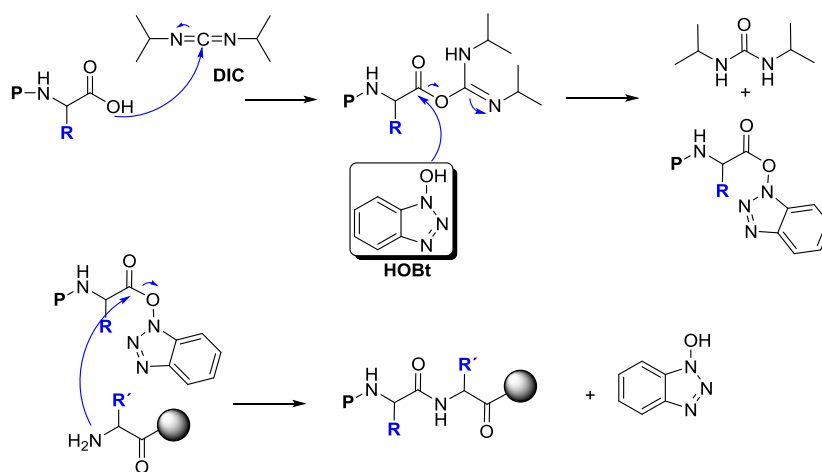


Esquema 7. Mecanismo de reacción usando HOAt/DIC

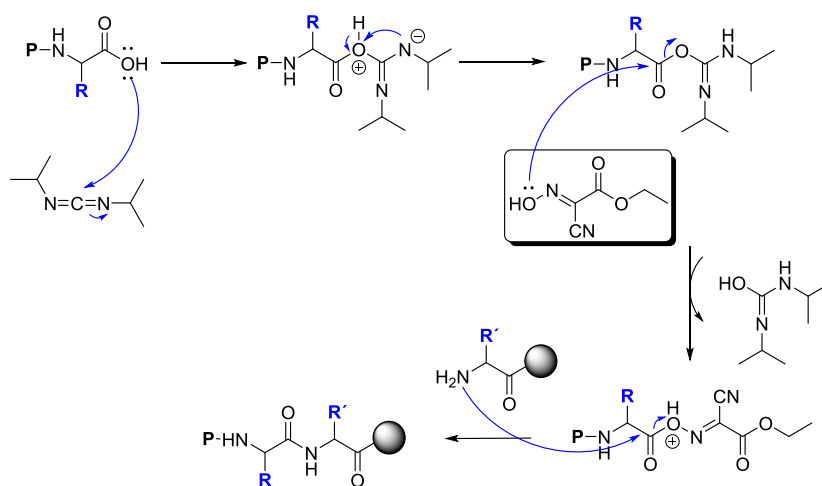


Esquema 8. Mecanismo de reacción usando HATU/HOAt/DIC

Mecanismos de reacción propuestos para la activación del grupo carboxilo a través de distintos agentes de acoplamiento



Esquema 9. Mecanismo de reacción usando HOBT/DIC



Esquema 10. Mecanismo de reacción usando OXIMA /DIC

Mecanismos de reacción propuestos para la activación del grupo carboxilo a través de distintos agentes de acoplamiento

1.2.4. MONITORIZACIÓN DE LAS REACCIONES DE ACOPLAMIENTO Y DESPROTECCIÓN.

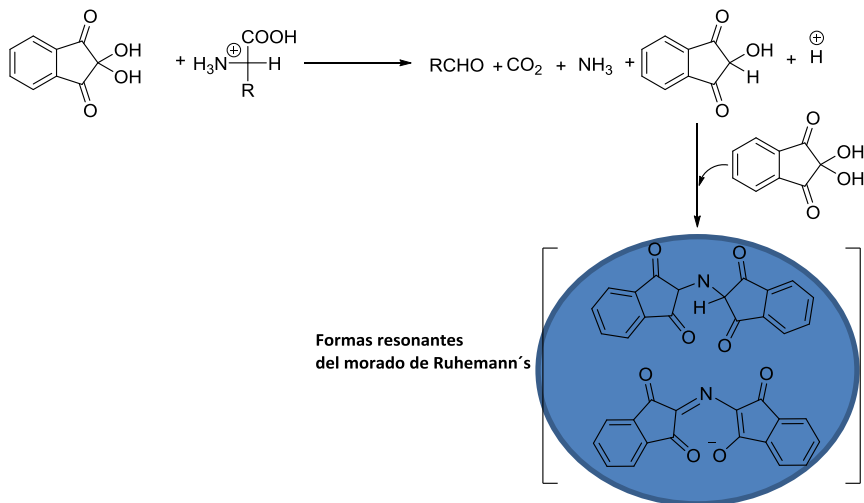
1.2.4.1. TEST DE DETECCIÓN DE AMINAS LIBRES. TEST DE KAISER Y TEST DEL CLORANILO

Una vez finalizado el coupling, realizado los lavados correspondientes se lleva a cabo el test cualitativo de detección de aminas primarias (test de ninhidrina o test de Kaiser) o test de detección de aminas secundarias (test del cloranilo) según proceda, para determinar si el acoplamiento se ha llevado a cabo de manera satisfactoria y continuar con la elongación de la cadena, mediante el siguiente acoplamiento, llevando a cabo la eliminación del grupo protector N^α del aminoácido acoplado.

1.2.4.1.1. TEST DE NINHIDRINA O TEST DE KAISER.

El test de ninhidrina, también conocido como test de Kaiser fue primeramente desarrollado por Moore y Stein⁴⁵, siendo adaptado por Kaiser⁴⁶ para síntesis de péptidos en fase sólida y optimizado por Sarin⁴⁷ para determinar cualitativamente los grupos amino libres en la resina.

Se basa en la reacción de la ninhidrina con las aminas, dotando al polímero insoluble (resina) de un color azul intenso al polímero insoluble. En este trabajo se utiliza como método cualitativo de detección de aminas primarias. Un test positivo se indica por el cambio de color de la resina a morado, indicando la presencia de aminas primarias. La ninhidrina reacciona con los grupos amino primarios dando el color conocido como morado de Ruhemann (Esquema 11).



Esquema 11. Mecanismo de detección de aminas primarias, test de Kaiser.

⁴⁵ MOORE S, STEIN WH. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem.* 1948;176(1):367-388

⁴⁶ KAISER, E., COLESCOTT, R., BOSSINGER, C. and COOK, P., 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, **34**(2), pp. 595-598

⁴⁷ SARIN, V.K., KENT, S.B., TAM, J.P. and MERRIFIELD, R.B., 1981. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*, **117**(1), pp. 147-157

1.2.4.1.2. TEST DEL CLORANILO

Se trata de un test colorimétrico, en el que cualitativamente permite detectar la presencia de aminas secundarias en SPPS. Un test positivo, tornará la resina de color verde-azul, indicando la presencia de los grupos amino secundarios libres. El cambio de color sucede al reaccionar las aminas secundarias libres, presentes en la alícuota de soporte sólido, con 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo), en presencia de acetaldehído⁴⁸.

1.2.5. REACCIONES SECUNDARIAS INDESEADAS A EVITAR DURANTE ESTE TRABAJO.

1.2.5.1. FORMACIÓN DE DICETOPIPERACINA

Comentada durante el apartado **1.2.1.** durante la elección del soporte sólido.

1.2.5.2. RACEMIZACIÓN.

Racemización es el término dado a la conversión que tiene un enantiómero en su imagen especular, es una reacción muy importante a evitar en síntesis de péptidos, ya que 19 de los 20 aminoácidos utilizados en proteínas son compuestos ópticamente activos, susceptibles a ella, y la conservación de la configuración L en los péptidos y proteínas es esencial para que preserven sus propiedades biológicas. Así, para llevar a cabo esta metodología sintética, es trascendental impedir que esta ocurra, ya que si tenemos una mínima tasa de racemización en cada residuo añadido, supondría un problema bastante importante a la hora de purificar el producto final, ya que nos encontraríamos con mezclas de productos distintos formados con aminoácidos D y L.

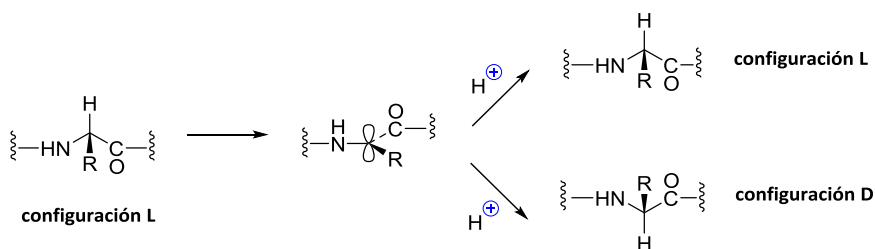
La etapa determinante de este riesgo de racemización, es la de activación y acoplamiento debido a que esta reacción es casi exclusivamente inducida por una base.

Los dos mecanismos por los que puede ocurrir son los siguientes:

- . Enolización directa. La cual puede darse durante la activación del aminoácido para su acoplamiento, donde el carbanión intermedio puede volver a protonarse sobre cualquier cara de la molécula. Este carbanión es un ion plano y dependiendo de la cara de elección, nos proporcionará un enantiómero u otro.

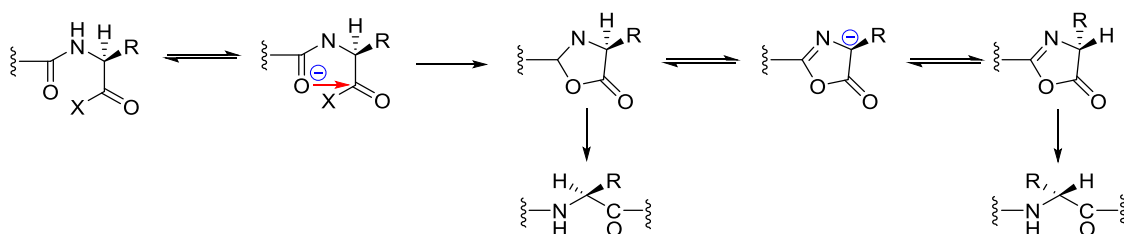
Los factores de los que depende esta, pueden ser controlados para evitarla, como la elección de la base, el disolvente, la velocidad de acoplamiento la cual también juega un papel importante, ya que este mecanismo se presenta en acoplamientos que son extremadamente lentos, cosa que no es muy común en la síntesis de péptidos.

⁴⁸ VOJKOVSKY, T., 1995. Detection of secondary amines on solid phase. *Peptide research*, **8**(4), pp. 236-237



Esquema 12. Racemización mediante enolización directa.

. A partir de la formación de oxazolona. A excepción de la prolina, los acil aminoácidos activados y los péptidos acilados pueden dar un compuesto heterocíclico bajo la influencia de una base. La velocidad de racemización por este mecanismo es mayor a la de la formación del enlace peptídico, pudiendo dar lugar a la racemización de los péptidos.

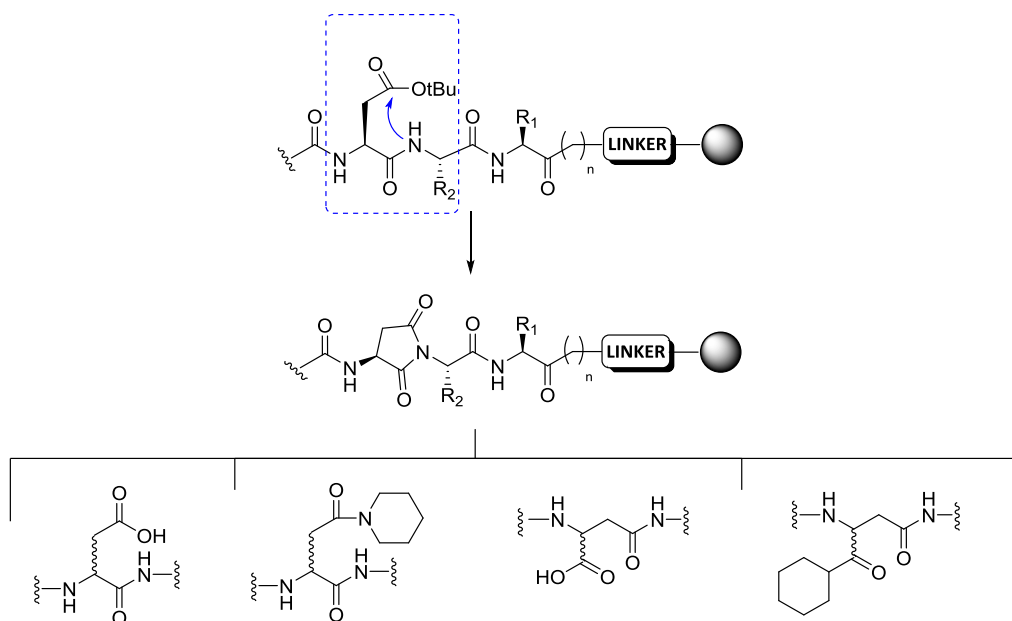


Esquema 13. Racemización a partir de la formación de oxazolona.

El riesgo de que se forme una oxazolona se reduce cuando el aminoácido está protegido por un derivado de uretano (comentados anteriormente en el apartado de grupos protectores), y en el caso de que se formase, ésta sería más resistente a racemización; de ahí que el uso de grupos protectores derivados de uretano sea muy usado en la síntesis de péptidos

1.2.5.3. REACCIÓN DE FORMACIÓN DE ASPARTIMIDA

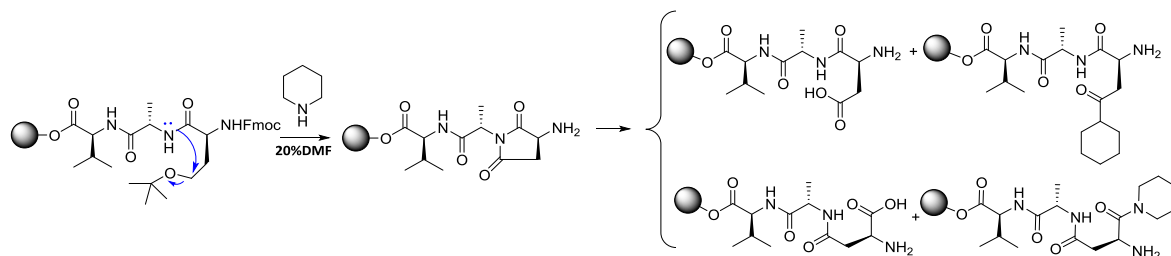
Esta reacción es catalizada tanto por ácido como por base. Por tanto puede ser generada durante la etapa final de cleavage como en las etapas de desprotección del grupo Fmoc. La que la ciclación viene acompañada de una posterior epimerización.



Esquema 14. Esquema general de formación de Aspartimida.

Cabe destacar que el grupo protector OtBu normalmente provee suficiente protección.

En el capítulo I, se describe como se ha optimizado la síntesis de la secuencia del péptido líder para evitar esta reacción indeseada, disminuir los tiempos de síntesis, así como la reducción del coste de reactivos, debido a la eliminación de varias reacciones de protección utilizadas en trabajos previos para evitar esta, mientras que en este trabajo se ha evitado mediante el uso de aditivos como la oxima a la solución usada para desprotección.



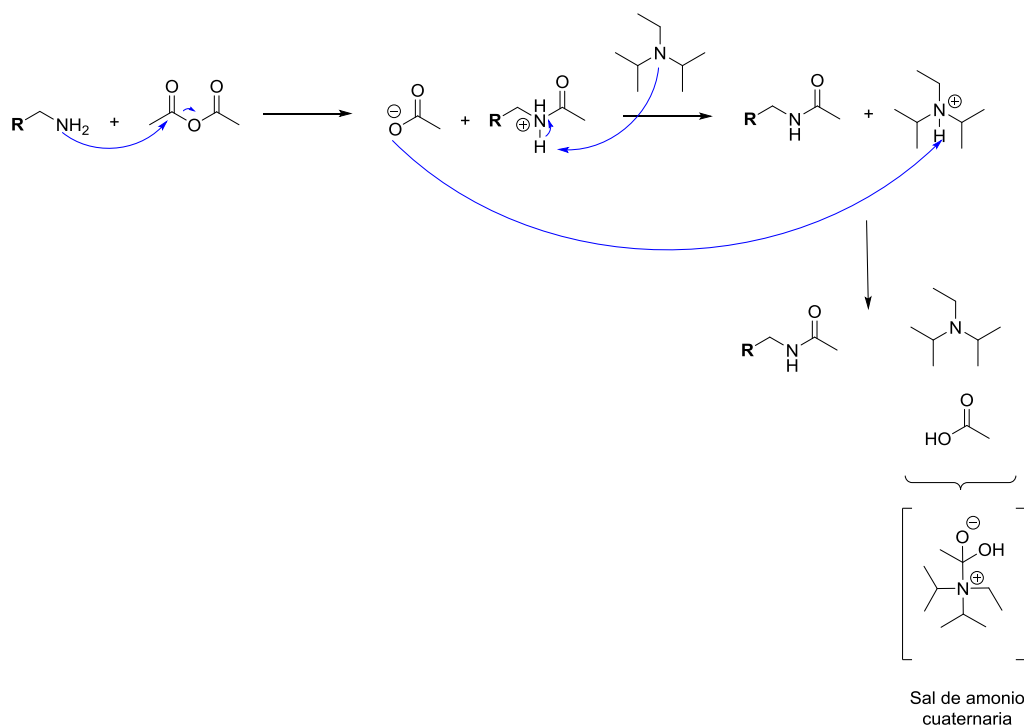
Esquema 15. Formación de Aspartimida en la secuencia líder del capítulo 1.

1.2.5.4. REACCIONES DE DESPROTECCION INCOMPLETA

Desprotecciones y /o acoplamiento parciales darán lugar a mezclas de productos indeseados, dando lugar a problemas durante la etapa de purificación, y a su vez disminución en los rendimientos de reacción. Por lo que son etapas muy importantes a tener en cuenta.

1.2.5.5. REACCIONES DE ACOPLAMIENTO INCOMPLETAS. N-ACETILACIÓN

Una de las soluciones a este problema, durante el transcurso de esta tesis, ha sido el uso de reacciones de acetilación para bloquear secuencias que se han acoplado parcialmente mediante la acilación de los grupos amino que hayan quedado libres, con el fin de evitar la aparición de secuencias que puedan obstaculizar la purificación del péptido final. Este es realizado con anhídrido acético (Ac_2O) y base piridina y/o DIPEA en DCM (**Esquema 16**).



Esquema 16. Mecanismo de reacción de N-Acetilación.

1.2.6. HIDROLISIS DEL SOPORTE SÓLIDO. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se trata del último paso en la síntesis de péptidos en el que el producto se separa del soporte sólido mediante hidrólisis ácida. En este mismo, se eliminan grupos protectores de cadenas laterales lábiles a los ácidos, a excepción de los grupos ortogonales a la reacción de acidólisis. La mezcla de reacción utilizada lleva en su seno junto la porción de TFA un scavenger, en nuestro caso TIS o TES, para neutralizar y atrapar los carbocationes reactivos generados durante este proceso con el fin de evitar reacciones indeseadas.

1.2.7. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN

Aunque la metodología de síntesis en fase sólida, ha sido optimizada a lo largo del tiempo, esto no implica que el proceso de producción de péptidos sea perfecto. Como comenté anteriormente durante el proceso de síntesis la obtención de la secuencia deseada con unos buenos niveles elevados de pureza y rendimiento puede verse truncada por reacciones de desprotección incompletas, formación de isómeros y otros productos secundarios indeseados, los cuales pueden ocurrir a lo largo de la síntesis, viéndose relacionado el rendimiento del producto final con la longitud de la cadena.

Así los métodos de purificación se basan normalmente en una combinación de métodos de separación dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos, teniendo en cuenta el tamaño, carga e hidrofobia. De manera que podemos destacar como técnicas de purificación, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de partición, la cromatografía de intercambio (IEC), la cromatografía líquida de alto rendimiento (de sus siglas en inglés, HPLC, high-performance liquid chromatography) y cromatografía de fase reversa (SPE). Esta junto con los tradicionales métodos (HPLC) son los métodos más usados hoy día como métodos de purificación, y los utilizados a lo largo de este trabajo.

La técnica de SPE se basa en el uso de ligandos hidrofóbicos como fase estacionaria (hidrocarburos n-alquilados), pudiendo encontrar columnas de tamaño C4, C8 ó C18, en función de la polaridad que sea necesaria utilizar. Así las moléculas apolares presentes en la solución acuosa serán capturadas por la fase estacionaria polar, donde se irá variando la polaridad de la concentración de la fase móvil, lo cual nos permitirá eluir diferencialmente las moléculas hidrofílicas, pudiendo así relacionar los tiempos de retención en función de la hidrofobia de las moléculas y la fase móvil. Este es uno de los métodos más utilizado debido a la facilidad en su manipulación y al rango de separaciones que ofrecen las distintas cadenas de hidrocarburos que las componen.

El enlace peptídico tiene una longitud de onda de absorción situada entre 210-220nm, con lo que las medidas realizadas en HPLC para caracterizar su pureza se encuentran en este rango, donde concretamente hemos usado 214nm.

Por tanto gracias al desarrollo y optimización de esta metodología, en este trabajo se ha llevado a cabo la producción de péptidos, como transportadores moleculares (CPPMs) de secuencias de reconocimiento específicas hacia moléculas diana con fines terapéuticos, como inhibidores de interacciones proteína-proteína, así como de péptidos como ligandos de unión hacia metales de transición para llevar a cabo reacciones de acoplamiento cruzado tipo Suzuki-Miyaura a nivel sintético.

Esta investigación proporciona un marco adecuado para una formación multidisciplinar en Química Médica y Biotecnología.

CAPITULO I

**SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y GLICOPÉPTIDOS INHIBIDORES DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-
PROTEÍNA MEDIADAS POR EL DOMINIO PDZ DE LA α NOS, CON ACTIVIDAD
NEUROPROTECTORA.**

1 ANTECEDENTES

1.1 INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

Las interacciones proteína-proteína controlan procesos de regulación esenciales para numerosas funciones vitales en los organismos vivos. Poder modular este tipo de interacciones de manera selectiva es una herramienta de especial interés y un reto para la industria farmacéutica, ya que abre un abanico de posibilidades a la hora de descubrir pequeños fármacos que actúen de forma selectiva y con gran potencial frente a diversas enfermedades reguladas por estas interacciones.

El desarrollo de compuestos capaces de modular este tipo de interacciones requiere previamente de un estudio preciso del diseño de estos fármacos para poder ser lo más selectivos posibles a la hora de actuar a nivel biológico. Este tipo de compuestos, debido a sus características físico-químicas y a las facilidades que nos aporta su síntesis química en fase sólida, presentan numerosas ventajas frente a los inhibidores de dianas clásicos, como por ejemplo cabe destacar la ya nombrada selectividad y la disminución de la toxicidad ya que están formados por residuos (secuencias de aminoácidos) biocompatibles con el organismo (que únicamente interactuarían con la diana farmacológica manteniendo intactas las demás funciones vitales)

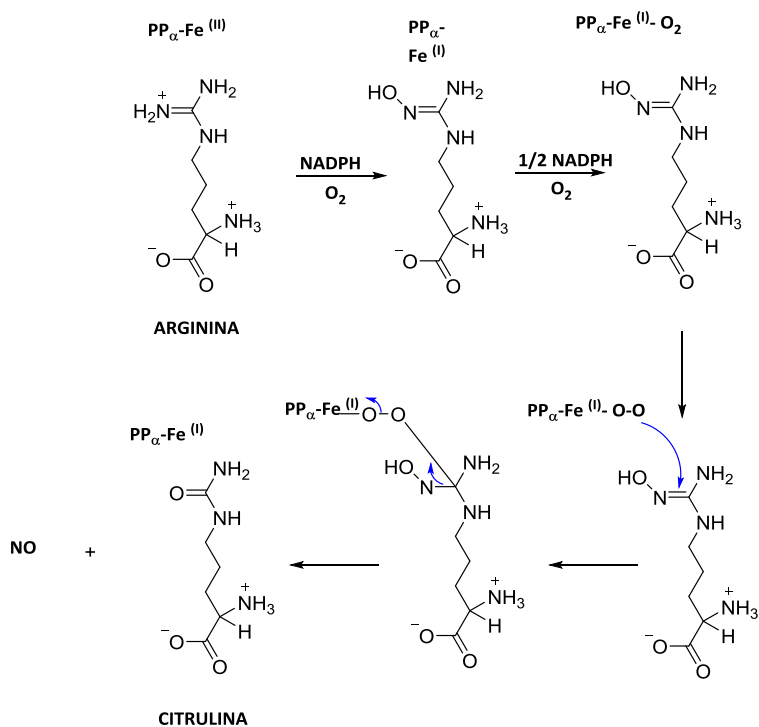
En este trabajo se llevó a cabo el diseño, síntesis y evaluación de la actividad de distintos péptidos y glicopéptidos, con el fin de interactuar como moduladores e inhibir este tipo de interacciones a nivel neuronal, concretamente en el dominio PDZ de la enzima Óxido Nítrico Sintasa. Estos compuestos, deberán inhibir de forma competitiva las interacciones mediadas por el dominio PDZ de la nNOS y actuar en última instancia como fármacos con actividad neuroprotectora. La secuencia peptídica de partida fue descrita y sintetizada en la tesis doctoral de la Dra. Ana María Pérez López (Universidad de Granada, 2010), siendo este proyecto continuación de dicha tesis.

Las interacciones específicas proteína-proteína mediadas por los dominios PDZ juegan un papel fundamental en las vías de señalización mediante formación de complejos multiprotéicos, coordinando y orientando así el flujo de información reguladora, lo cual será detallado a continuación.

1.2 ENZIMA OXIDO NÍTRICO SINTASA (nNOS), DOMINIO PDZ E INFLUENCIA DEL OXIDO NÍTRICO (NO) EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

La enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) es la enzima que cataliza la reacción de formación de Óxido Nítrico (NO) a partir de L-Arginina, en presencia de los cofactores Nicotin Adenina Dinucleótido fosfato (NADPH), flavin adenina dinucleotido (FAD), flavin mononucleótico (FMN)

tetrahidrobiopterina(BH4), y el grupo Hemo ¹ (Esquema 1). Durante la formación de NO participan 5 electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1,5 moles de NADPH y 2 de dioxígeno por cada mol de NO formado. La reacción consiste en una monooxigenación, incorporación de un átomo de O₂ al substrato, donde a su vez otro átomo se reduce hasta agua, obteniéndose la N-hidroxi-L-arginina (NOH-L-Arg) como producto intermedio y en que un electrón de la NADPH, otro de la NOH-L-Arg y el O₂ en forma de dioxígeno-hierro atacan al carbono guanidino de la NOH-L-Arg, facilitando la incorporación de O₂ y la excisión de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y dando lugar a L-citrulina. En este paso un átomo de O₂ se reduce hasta agua y otro se une al nitrógeno para formar el NO.



Esta enzima es un homodímero, en el que cada monómero contiene dos dominios principales, un dominio oxigenasa situado en su extremo N-terminal y un dominio reductasa situado en el extremo C-terminal². El dominio oxigenasa junto con los sitios de unión del grupo hemo y BH₄, son los responsables de la formación del homodímero, mientras que el dominio reductasa se une a FMN, FAD y NADPH³.

De acuerdo a sus características estructurales, su localización y actividad, en los vertebrados podemos distinguir tres tipos de isoformas de la enzima NOS, la nNOS (neuronal), la iNOS(inducible) y la

¹ R. G. Knowles and S. Moncada, "Nitric Oxide Synthases in Mammals," *The Biochemical Journal* 298 (Pt 2), no. Pt 2 (Mar 1, 1994), 249-258.

² John T. Groves and Charles CY Wang, "Nitric Oxide Synthase: Models and Mechanisms," *Current Opinion in Chemical Biology* 4, no. 6 (2000), 687-695.

³ Richard Bruckdorfer, "The Basics about Nitric Oxide," *Molecular Aspects of Medicine* 26, no. 1 (2005), 3-31.

eNOS (endotelial). Únicamente la isoforma nNOS contiene en su estructura un dominio de reconocimiento denominado PDZ (PSD-95 discs large/ZO-1 homology domain) localizado en el extremo N-terminal⁴.

Las enzimas nNOS y eNOS son calcio-dependientes (Ca²⁺) y producen de forma constitutiva NO a bajos niveles (en el rango nM). Sin embargo la iNOS es independiente de los niveles de Ca²⁺, la cual puede inducir producción de NO mediante estrés estimulado a niveles elevados (del orden μM).

Estas isoformas se encuentran distribuidas en diferentes tejidos e involucradas en diferentes actividades fisiológicas. Así por ejemplo, la enzima eNOS está localizada en las células endoteliales, e involucrada entre otras funciones, en el control del tono vascular, secreción de insulina o regulación de la función cardíaca y angiogénesis⁵. La iNOS, participa en la neurodegeneración crónica y enfermedades inmunológicas, así como tumores y enfermedades infecciosas y autoinmunes⁶. Mientras que la enzima nNOS es principalmente expresada en las neuronas^{4b} e implicada en la regulación de la actividad neuronal mediante modulación (principalmente modulación del flujo de Ca²⁺)⁷.

Como se destacó al comienzo del capítulo, nuestra investigación data sobre la mediación y control de las interacciones proteína-proteína para modular las enfermedades asociadas a estas. La única isoforma de la enzima NOS que posee un dominio PDZ de reconocimiento es la nNOS, haciendo de este un factor positivo a la hora de buscar una secuencia de reconocimiento que nos dotará de especificidad a la hora del diseño y la intervención.

1.2.1 DOMINIO PDZ DE LA ENZIMA Nnos

Existen numerosas proteínas que contienen dominios PDZ. Estos juegan un papel fundamental en el transporte, unión y localización de complejos en la señalización supramolecular, siendo así

⁴ (a) WK Alderton, CH Cooper and R. Knowles, "Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition," *Biochem.J* 357 (2001), 593-615.; Jay E. Brenman et al., "Interaction of Nitric Oxide Synthase with the Postsynaptic Density Protein PSD-95 and A1-Syntrophin Mediated by PDZ Domains," *Cell* 84, no. 5 (1996), 757-767.; D. Fulton et al., "Localization of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Phosphorylated on Serine 1179 and Nitric Oxide in Golgi and Plasma Membrane Defines the Existence of Two Pools of Active Enzyme," *The Journal of Biological Chemistry* 277, no. 6 (Feb 8, 2002), 4277-4284.

⁵ (a) S. Moncada, R. M. Palmer and E. A. Higgs, "Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology," *Pharmacological Reviews* 43, no. 2 (Jun, 1991), 109-142.; X. F. Figueroa et al., "In Vivo Assessment of Microvascular Nitric Oxide Production and its Relation with Blood Flow," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 280, no. 3 (Mar, 2001), H1222-31.

⁶ (a) M. Vig et al., "Inducible Nitric Oxide Synthase in T Cells Regulates T Cell Death and Immune Memory," *The Journal of Clinical Investigation* 113, no. 12 (Jun, 2004), 1734-1742.; Christian Bogdan, "Nitric Oxide and the Immune Response," *Nature Immunology* 2, no. 10 (2001), 907-916.

⁷ Erin M. Schuman and Daniel V. Madison, "Nitric Oxide and Synaptic Function," *Annual Review of Neuroscience* 17 (1994), 153-183.

identificados primeramente como regiones de secuencia homologa encontradas en diversas proteínas involucradas en la señalización⁸.

El nombre de PDZ se debe a las tres primeras proteínas en las que este fue identificado, como la PSD-95 (una proteína de 95KDa implicada en la señalización en la densidad postsináptica), DLG (la proteína *Drosophila melanogaster* Discs Large) y ZO-1 (Zonula occludens 1, proteína implicada en el mantenimiento de la polaridad epitelial. Puede decirse que estos dominios son extremadamente selectivos para secuencias específicas que forman parte del C-terminal, mientras que para secuencias de reconocimiento internas, se necesita otro modo de reconocerlas a través de requerimientos energéticos⁹.

Los dominios PDZ reconocen específicamente secuencias localizadas normalmente sobre los 5 residuos de aminoácidos de longitud, aunque en algunos casos, el reconocimiento se puede extender más allá de esos 5 residuos terminales¹⁰.

La nomenclatura para estos residuos de aminoácido sigue el siguiente esquema,(tabla 1) donde el residuo P0 corresponde al C-terminal, nombrándose así los demás residuos desde este hacia el extremo N-terminal como P-1, P-2,P-3.

Tabla 1. Ejemplos de ligandos de PDZ

DOMINIO PDZ	SECUENCIA CONSENSO DE UNIÓN ^a	PROTEÍNA LIGANDO	REFERENCIA
	P ₃ - P ₂ - P ₁ - P ₀		
Clase I	S/T X ^b ϕ ^c -COOH		
SINTROFINA	E S L V -COOH	Canales iónicos de entrada de Na⁺	Schultz y colaboradores.1998
PSD-95	E T D V -COOH	Canales de K+ tipo agitadores	Kim y colaboradores. 1995
Clase II	ϕ X ϕ -COOH		
hCASK	E Y Y V -COOH	Neurexina	Songyang y colaboradores. 1997
Eritrocito p55	E Y F I -COOH	Glycoforina C	Marfatia y colaboradores. 2000
Clase III	X X C -COOH		

⁸ Harald Tschesche, *Methods in Protein Biochemistry* Walter de Gruyter, 2011).

⁹ B. Z. Harris and W. A. Lim, "Mechanism and Role of PDZ Domains in Signaling Complex Assembly," *Journal of Cell Science* 114, no. Pt 18 (Sep, 2001), 3219-3231.

¹⁰ Martin Niethammer et al., "CRIPT, a Novel Postsynaptic Protein that Binds to the Third PDZ Domain of PSD-95/SAP90," *Neuron* 20, no. 4 (1998), 693-707.

Mint-1	D H W C	-COOH	Canales de Ca ²⁺ tipo N	Maximov y colaboradores. 1999
SITAC	Y X C	COOH	Antígeno L6	Borrel-Pages y colaboradores. 2000
Otros				
nNOS	G D X V	-COOH	MeIR	Stricker y colaboradores. 1997
MAGI PDZ	S/T W V	-COOH		Fuh y colaboradores. 2000
Diseñado desde AF6	K/R Y V	-COOH	Péptido sintetizado	Schneider y colaboradores. 1999

^a Por convenio, P₀ es el residuo C-terminal. P₁ es uno de los residuos ^b Denota un aminoácido (sin especificidad definida en esta posición para esta clase) ^c Denota un aminoácido hidrofóbico, normalmente V, I o L

La especificidad del dominio PDZ vino determinada primeramente por la naturaleza química de los huecos de unión P0 y P-2, aunque Stricker y colaboradores han demostrado que puede haber variaciones en la secuencia de reconocimiento, y que puede ser alterada sin significantes cambios en la secuencia compromiso de la estructura del dominio. Estudios previos han descrito que en el organismo humano existen 394 diferentes tipos de dominios PDZ, y que cada uno de ellos responde a distintas secuencias de reconocimiento, destacando así su especificidad, la cual podrá ser resuelta mediante estudios de proteómica a lo largo del tiempo.

La enzima nNOS contiene un dominio PDZ, con una secuencia consenso de aproximadamente 90 aminoácidos, que han mostrado su participación en distintos tipos de interacción proteína-proteína¹¹.

1.2.2 LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA nNOS

El dominio PDZ de la nNOS juega un papel fundamental en la localización de la nNOS en el sitio apropiado en las neuronas. Lo cual ha sido justificado mediante distintos estudios. Interacciones con otras proteínas que contienen este dominio dirigen a la proteína diana nNOS a distintos sitios fuera del citosol celular. Así, existen numerosas proteínas que compiten por la unión a este dominio, como son por ejemplo las proteínas PSD-95 y PSD-93 (proteínas de densidad postsináptica), que dirigen a nNOS hacia la membrana sináptica. La asociación entre nNOS-PSD-95 se da lugar a través de interacciones entre sus dominios PDZ (interacciones PDZ-PDZ). PSD-95 también interactúa con los receptores NMDA, a

¹¹ Kyung-Ok Cho, Carol A. Hunt and Mary B. Kennedy, "The Rat Brain Postsynaptic Density Fraction Contains a Homolog of the Drosophila Discs-Large Tumor Suppressor Protein," *Neuron* 9, no. 5 (1992), 929-942.

través de sus dominios PDZ, por tanto PSD-95 funciona como enlace de unión para permitir la señalización mediante los receptores NMDA/PSD-95 es esencial para la producción de NO a partir de glutamato. la proteína nNOS unida a la proteína PSD-95 localiza a la enzima nNOS en la densidad postsináptica ^{4b}.

Otra proteína es la denominada CAPON, aislada y localizada en el cerebro, que tiene afinidad a PDZ a través de la secuencia EIAV, cuyo extremo carboxilo terminal se une al dominio PDZ de la nNOSy compete con la anterior PSD-95y PSD-93 por la localización de nNOS en el citoplasma¹².

Aunque la mayor parte de la enzima nNOS se encuentra en el citosol celular, se cree que quizás otra de las funciones asociadas a ella sea la de transporte activo de proteínas celulares desde el núcleo celular al citosol, por tanto actuaría como regulador de la localización de proteínas nucleares. Según este estudio se ha encontrado una pequeña cantidad de enzima nNOS localizada en el núcleo¹³.

Existe otra proteína denominada PIN (Proteína Inhibidora de la enzima nNOSque se une a esta en el citosol celular actuando como inhibidora de su actividad¹⁴.

Se ha encontrado en numerosos estudios (como por ejemplo destacar el de Bonnie L. Firestein and David S. Bredt de la Universidad de San Francisco, California) una isoforma muscular de la proteína fosfofructoquinasa (PFK-M, de sus siglas en inglés) que interacciona con el dominio PDZ de la nNOS. El mecanismo por el que interacciona se encuentra formando el complejo nNOS-PFK-M, el cual podía entrar en competencia con distintos péptidos que tienen afinidad por el dominio PDZ de la nNOS. A nivel celular, la PFK-M se encuentra enriquecida en las neuronas que expresan la proteína nNOS .El producto de la afinidad de PFK es la fructosa-1,6-bisfosfato, el cual tiene carácter neuroprotector, pudiendo así contribuir en la neuroprotección de la nNOS debida a la interacción de nNOS con PFK ¹⁵.

Otro estudio paralelo con PFK-M de rata, determinó que sus cuatro últimos aminoácidos se correspondían a la secuencia EAAV, similar a la secuencia EIAV de la proteína CAPON. Para determinar el sitio de unión de los péptidos se llevaron a cabo experimentos con el dominio PDZ de la proteína nNOS fusionada a GST ¹⁶ (figura 1) .

¹² Samie R. Jaffrey et al., "CAPON: A Protein Associated with Neuronal Nitric Oxide Synthase that Regulates its Interactions with PSD95," *Neuron* 20, no. 1 (1998), 115-124.

¹³ Gary M. Riefler and Bonnie L. Firestein, "Binding of Neuronal Nitric-Oxide Synthase (nNOS) to Carboxyl-Terminal-Binding Protein (CtBP) Changes the Localization of CtBP from the Nucleus to the Cytosol A NOVEL FUNCTION FOR TARGETING BY THE PDZ DOMAIN OF nNOS," *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 51 (2001), 48262-48268.

¹⁴ (a) S. R. Jaffrey and S. H. Snyder, "PIN: An Associated Protein Inhibitor of Neuronal Nitric Oxide Synthase," *Science (New York, N.Y.)* 274, no. 5288 (Nov 1, 1996), 774-777.; U. Dressel et al., "A Dynamic Role for HDAC7 in MEF2-Mediated Muscle Differentiation," *The Journal of Biological Chemistry* 276, no. 20 (May 18, 2001), 17007-17013.

¹⁵ B. L. Firestein and D. S. Bredt, "Interaction of Neuronal Nitric-Oxide Synthase and Phosphofructokinase-M," *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 15 (Apr 9, 1999), 10545-10550.

¹⁶ Riefler and Firestein, *Binding of Neuronal Nitric-Oxide Synthase (nNOS) to Carboxyl-Terminal-Binding Protein (CtBP) Changes the Localization of CtBP from the Nucleus to the Cytosol A NOVEL FUNCTION FOR TARGETING BY THE PDZ DOMAIN OF nNOS*, Vol. 276ASBMB, 2001), 48262-48268.

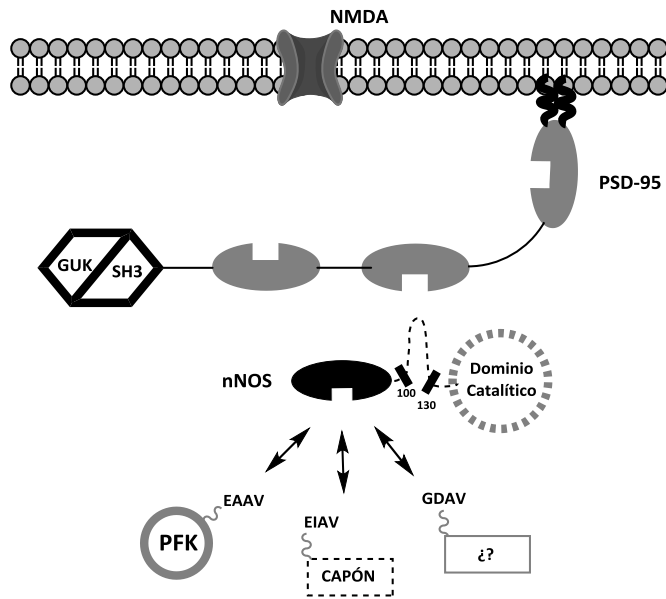


Figura 1. Afinidad por el dominio PDZ de la enzima nNOS.

Trabajos previos han determinado que el dominio PDZ de la nNOS tiene preferencia por péptidos cuya secuencia terminal es G(D/E)AV¹⁷ o EIAV¹². Este estudio lleva a la discusión final, de que la PFK enlaza específicamente con el dominio PDZ-nNOS y ese enlace es bloqueado por VSPDFGDAV el cual tiene un IC₅₀ de aproximadamente 5µM.

Como podemos observar existen numerosas proteínas capaces de interactuar con este dominio. Otro ejemplo de interacción que cabe destacar es la de la proteína CtBP, que fue originariamente aislada como una fosfoproteína celular que interacciona con el carboxilo terminal de la proteína adenovirus E1A y que regula negativamente las transformaciones oncogénicas. Mediante estudios de afinidad e interacción se observó que¹⁶ existía una secuencia peptídica VSPDFGDAV, la cual bloqueaba el sitio de unión de PDZ-nNOS con una IC₅₀ de 25nM¹⁷. La localización de CtBP en el citosol celular a través de la enzima nNOS la hace no disponible para interactuar con proteínas nucleares (histonas desacetilasas y factores de transcripción) y sin embargo obstaculiza la función de CtBP como un co-represor.

¹⁷ (a) Nicole L. Stricker et al., "PDZ Domain of Neuronal Nitric Oxide Synthase Recognizes Novel C-Terminal Peptide Sequences," *Nature Biotechnology* 15, no. 4 (1997), 336-342.; Jan Schepens et al., "The Neuronal Nitric Oxide Synthase PDZ Motif Binds to-G (D, E) XV* Carboxyterminal Sequences," *FEBS Letters* 409, no. 1 (1997), 53-56.

1.2.3 PRODUCCIÓN DE NO A NIVEL NEURONAL, PARTICIPACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

El Óxido Nítrico (NO) es una molécula gaseosa sintetizada por la enzima neuronal nNOS que puede ser estimulada cuando los receptores NMDA son activados y el calcio entra en las neuronas¹⁸. El calcio se une a la calmodulina y el complejo activa a la nNOS (figura 2). El primer estímulo necesario para la síntesis de NO en las neuronas centrales es la activación de los receptores NMDA. La sobreestimulación de estos receptores se encuentra relacionada con numerosos procesos neurodegenerativos, que incluyen la enfermedad de Stroke, corea de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica.

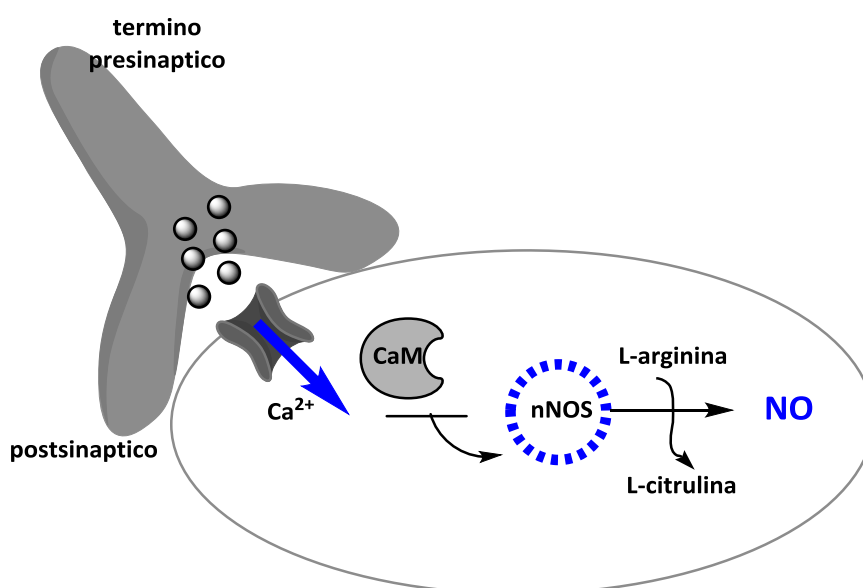


Figura 2. Formación de NO.

En su estructura transporta un electrón no apareado comportándose como un radical libre que reacciona rápidamente con otras moléculas. La gran reactividad del NO hace que pueda actuar de diversas formas según su estado de oxidación. Cuando se presenta en su forma reducida NO tiene una enorme capacidad lesiva, mientras que su forma oxidada NO^+ (ion nitrosonium) es protectora. Tiene una vida media muy corta, por ello solo puede detectarse a través de los metabolitos en los que se descompone (nitritos y nitratos). Participa en numerosas funciones fisiológicas de las que caben destacar su acción como relajante del músculo liso (responsable de la relajación intestinal e interviene en el mecanismo de erección peneana), neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, inhibidor de la agregación plaquetaria, inmunomodulador, citotóxico y mediador de las acciones de la glutamato en los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en el cerebro, piloerección y

¹⁸ Viktor Brovkovich et al., "Direct Electrochemical Measurement of Nitric Oxide in Vascular Endothelium," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19, no. 1 (1999), 135-143.

relajación de esfínter. Su acción lítica sobre varios tipos de células es utilizada por el sistema mononuclear fagocítico (monocito macrófagos y células de Von Kupffer) para destruir células extrañas (microorganismos) o propias degeneradas. Aunque pequeñas cantidades de NO median en la señalización fisiológica, un exceso en la producción esta está asociada a numerosas enfermedades del sistema nervioso central, fundamentalmente ligadas a isquemia cerebral o enfermedades neurodegenerativas, debido a que causa daño en los tejidos. Por tanto, el NO puede influir en la neurotoxicidad mediante inhibición metabólica y causar agotamiento en la energía celular, que es un precursor del daño isquémico que induce la muerte neuronal¹⁹.

A raíz de esto, surgió el debate de si el NO actúa como neuroprotector o neurotóxico en enfermedades neurodegenerativas.

El mecanismo de actuación del NO es bastante complejo cuando es producido en exceso. Puede llegar a inducir cascadas tóxicas (forma indirecta) mediante la activación de los mecanismos responsables de la liberación de aminoácidos excitotóxicos (AAE), o bien de forma directa por su capacidad de unirse a otros radicales libres, como por ejemplo al ión superóxido (O⁻) originando peroxinitrito (ONOO⁻). Este a su vez puede nitrar residuos de tirosina de determinadas proteínas, impidiendo las interacciones funcionales de las mismas a través de estos residuos poniendo en peligro la viabilidad celular. El ONOO⁻ no solamente es tóxico en sí mismo, sino que además se descompone en dióxido de nitrógeno (NO₂) e hidróxilo (OH⁻), siendo este último uno de los radicales libres más tóxicos en cuanto a su potencial de reacción. De esta forma, el NO contribuye considerablemente al daño oxidativo que tiene lugar en determinadas enfermedades neurodegenerativas y en el propio envejecimiento. Así, se están reconduciendo las posibles causas del deterioro y muerte neuronal que concurren en los procesos de isquemia, y en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, como una consecuencia de la acción tóxica del NO¹⁵.

Como se ha comentado anteriormente la producción de NO es necesaria por las innumerables funciones a las que está asociado e incluso debido a los importantes beneficios que aporta. Por tanto lo que se pretende conseguir en este proyecto es la mediación competitiva en las interacciones proteína-proteína del dominio PDZ de la nNOS para evitar esta sobreproducción de NO a nivel neuronal, que es la base patológica de numerosas enfermedades neurodegenerativas

Para ello, se han diseñado distintos compuestos que reconozcan e interaccionen específicamente con el sitio de unión de esa enzima, de manera que no se produzcan reacciones laterales dañinas o efectos secundarios irreversibles al organismo debido a la disminución en la producción de NO a nivel neuronal. Como se ha comentado, el NO se puede obtener por otros mecanismos en otras zonas del organismo, manteniendo los niveles vitales de producción. Al actuar de

¹⁹ Paramita Mukherjee et al., "Development of Nitric Oxide Synthase Inhibitors for Neurodegeneration and Neuropathic Pain," *Chemical Society Reviews* 43, no. 19 (2014), 6814-6838.

manera específica evitamos muchos de los efectos adversos producidos por la inhibición de algunos procesos fisiológicos mediados por otros receptores u otras interacciones proteína-proteína.

Ya que nNOS es la única isoforma que contiene el dominio PDZ, poder modular las interacciones debidas a este dominio permitirá controlar las enfermedades neurodegenerativas provocadas por la sobreproducción de NO asociadas a ella, haciendo de esta una diana farmacológica de elevado interés.

INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

2.1 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y GLICOPÉPTIDOS CON AFINIDAD HACIA EL DOMINIO PDZ DE LA nNOS.

2.1.1 ELECCIÓN DE LA SECUENCIA LIDER

Como se puede destacar de estudios previos de afinidad comentados anteriormente existe una secuencia consenso determinada por Stricker y colaboradores G(D/E)AV¹⁷ que presenta una elevada afinidad hacia el dominio PDZ de la nNOS.

En literatura destaca a su vez una secuencia peptídica definida por los aminoácidos VSPDFGDAV, la cual tenía un IC₅₀ de aproximadamente 5μM frente este dominio cuando competía frente a PFK-M¹⁵, mientras que esta misma secuencia VSPDFGDAV, bloquea el sitio de unión de PDZ-nNOS con una IC₅₀ de 25nM cuando compite por el sitio de unión con la proteína CtBP¹⁶.

Esa secuencia de reconocimiento la cual es capaz de competir fuertemente por el sitio de unión con unos resultados por encima de cualquier competencia estudiada hasta el momento. Por tanto, con el fin de mejorar su afinidad y a su vez hacerla accesible biológicamente a nivel celular para asegurar una penetrabilidad a través de la barrera hematoencefálica, para su mejor difusión, se han mejorado sus características físico-químicas (las cuales nos aportan los péptidos) a través de modificaciones y recortes en su estructura.

Basándonos en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, destacamos una secuencia peptídica compuesta por seis aminoácidos de secuencia DFGDAV con el fin de no solamente reducir los tiempos de síntesis y coste de reactivos, sino de aumentar la afinidad por el dominio PDZ-nNOS, con respecto a la secuencia descrita anteriormente constituida por nueve aminoácidos VSPDFGDAV. La síntesis, caracterización y actividad neuroprotectora de estas secuencias fue descrita por la Dra. Ana María Pérez López en su tesis doctoral (Granada, 2010).

Así quedan justificadas las modificaciones estructurales llevadas a cabo sobre las secuencias peptídicas líderes, como su unión a azúcares mediante estructuras glicosiladas favoreciendo la formación de glicopéptidos que nos permitan el paso a través de la Barrera hematoencefálica (BHE), la variación de los espaciadores que conforman la estructura de los glicopéptidos entre la secuencia peptídica y el azúcar con el fin de observar la variación de la afinidad según la rigidez o flexibilidad en la molécula que estos nos aportan. El marcar químicamente mediante un agente fluorescente algunas de las estructuras glicopeptídicas con el fin de observar biológicamente la penetrabilidad celular. Soportar las moléculas sobre nanopartículas ferromagnéticas para favorecer la penetrabilidad celular, y a su vez, modificar los espaciadores para aparte de hacer las secuencias más o menos polares favoreciendo su

adsorción sobre estas, para modificar su longitud de unión con respecto de la zona de reconocimiento y la nanopartícula.

2.1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS Y DIFUSIÓN A TRAVÉS DE LA BHE

Los péptidos tienen un elevado potencial como agentes farmacológicos para el tratamiento de numerosas enfermedades del sistema nervioso central (SNC).

El mayor obstáculo para dirigir fármacos con actividad terapéutica hacia el cerebro, es la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual controla la concentración y la entrada de solutos hacia el sistema nervioso central (SNC o CNS, de las siglas en inglés, Central Nervous System).

Los péptidos son generalmente compuestos solubles en agua y no permitirán la entrada al SNC mediante difusión pasiva (figura 2), debido a la existencia de la BHE, con lo que se han utilizado sistemas de transporte para mejorar la penetrabilidad²⁰.

2.1.2.1 LA BARRERAHEMATOENCEFÁLICA

La barrera hematoencefálica (BHE) es una extraordinaria barrera biológica, física y enzimática que controla estrechamente el paso de moléculas desde la sangre al cerebro, jugando un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis. Aísla el sistema nervioso central de las demás partes del cuerpo, dotándole de un medio óptimo para las funciones neuronales²¹.

Se localiza en las células endoteliales mediante una estrecha unión de los microvasos cerebrales²². A diferencia de muchos vasos sanguíneos periféricos, las células del endotelio cerebral, forman una membrana continua sin aperturas (Figura 1). La composición del fluido extracelular es controlada en un rango preciso, independiente de fluctuaciones en la sangre.

La naturaleza restrictiva de la BHE es muy fuerte y eficiente hacia un número de estrategias invasivas que se han desarrollado para abordar el problema de transporte de fármacos hacia el SNC. Menos del 2% de potentes neurofármacos son capaces de poder cruzarla. Sólo péptidos resistentes a las proteasas son capaces de actuar como transportadores de cargas a través del SNC. En la última década, ha habido avances significativos en el campo del transporte de fármacos, sin embargo, el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas continúa siendo un reto para los investigadores debido a la presencia de la BHE.

²⁰ Ken A. Witt et al., "Peptide Drug Modifications to Enhance Bioavailability and Blood-Brain Barrier Permeability," *Peptides* 22, no. 12 (2001), 2329-2343.

²¹ Roger Prades et al., "Applying the Retro-Enantio Approach to Obtain a Peptide Capable of Overcoming the Blood-Brain Barrier," *Angewandte Chemie* 127, no. 13 (2015), 4039-4044.

²² (a) T. S. Reese and M. J. Karnovsky, "Fine Structural Localization of a Blood-Brain Barrier to Exogenous Peroxidase," *The Journal of Cell Biology* 34, no. 1 (Jul, 1967), 207-217.; M. W. Brightman and T. S. Reese, "Junctions between Intimately Apposed Cell Membranes in the Vertebrate Brain," *The Journal of Cell Biology* 40, no. 3 (Mar, 1969), 648-677.

Los péptidos cuentan con una baja estabilidad metabólica, debido a que las proteasas del medio normalmente rompen los enlaces peptídicos en cuestión de segundos o minutos, confiriéndoles a los péptidos una limitada farmacocinética.

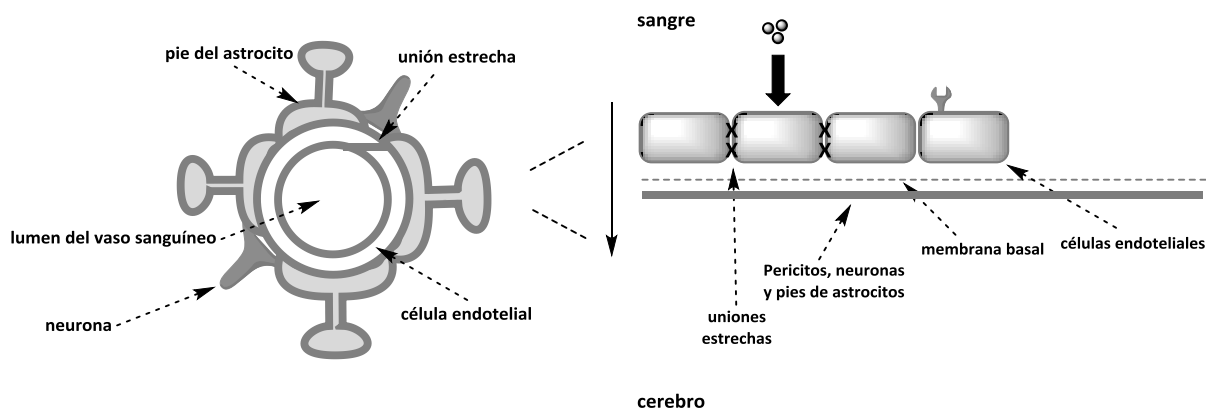


Figura 1. Morfología de la BHE

La BHE no es solo una barrera física, sino que también actúa como barrera enzimática, con células endoteliales que contienen un número de citosoles y membranas asociadas a las enzimas (como por ejemplo las peptidasas). Estas enzimas están dirigidas a la metabolización de solutos neuroactivos en la sangre. Dentro de las enzimas metabólicas peptidasas, se incluyen las aminopeptidasas, carboxipeptidasas, endopeptidasas y proteasas²³.

Estas enzimas afectan a la biodisponibilidad de muchos fármacos peptídicos ya que pueden sufrir degradación metabólica. Para incrementar esta estabilidad metabólica, los péptidos pueden ser modificados estructuralmente, como por ejemplo N-metilizar las zonas de la cadena peptídica propensas a la ruptura por las proteasas, o incluso el desarrollo de D-aminoácidos, que no son reconocidos por estas.

Por tanto, el diseño de moléculas pequeñas capaces de cruzar la BHE es un reto, debido a que el 98 % de los fármacos estudiados para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central no son capaces de alcanzar su diana farmacológica²⁴. Encontrar un sistema que permita transportar las moléculas a través de dicha barrera es una estrategia prometedora para lograr el transporte de fármacos al SNC.

Oldendorf y colaboradores demostraron que el paso de la glucosa y de aminoácidos a través de la BHE tenía lugar, mediante transportadores específicos. La glucosa era transportada rápidamente por un sistema transportador constituido por hexosas. También demostraron que la morfina, la codeína y la

²³ J. Brownlees and CH Williams, "Peptidases, Peptides, and the Mammalian Blood-brain Barrier," *Journal of Neurochemistry* 60, no. 3 (1993), 793-803.

²⁴ Benjamí Oller-Salvia, Meritxell Teixidó and Ernest Giralt, "From Venoms to BBB Shuttles: Synthesis and Blood-brain Barrier Transport Assessment of Apamin and a Nontoxic Analog," *Peptide Science* 100, no. 6 (2013), 675-686.

heroína cruzaban esta barrera en proporción a su solubilidad²⁵. Por tanto a partir de aquí, comienza nuestro reto.

2.1.2.2.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL TRANSPORTE

La habilidad de un péptido para cruzar la BHE depende de diferentes factores, como por ejemplo la composición, el tamaño, la flexibilidad, la conformación, propiedades bioquímicas de los aminoácidos que los componen y su disposición. Estos factores determinan la lipofilia, el potencial de los enlaces de hidrógeno y el peso molecular del péptido. A su vez, la composición peptídica también determina en parte el grado de unión a la proteína, la estabilidad enzimática, la capacidad de penetrar en los tejidos y la afinidad por los diferentes mecanismos de transporte²⁰.

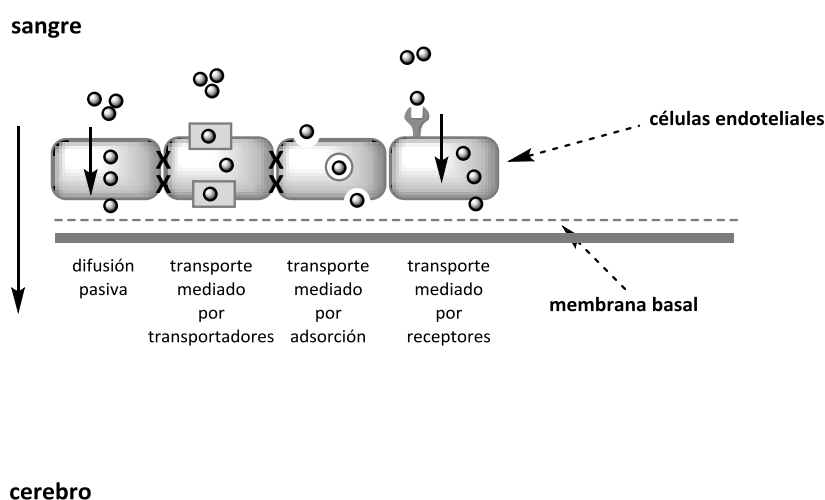


Figura 2. Mecanismos de transporte

Adicionalmente, la BHE limita su acceso a moléculas que superan los 400-600Da²⁶. Este efecto de peso molecular y/o volumen molecular de difusión del soluto, ha sido considerado como un factor considerable que afecta a la difusión pasiva de fármacos²⁷.

2.1.2.2.2. GLICOSILACIÓN COMO MÉTODO DE TRANSPORTE

Existen numerosas estrategias para mejorar el transporte de solutos a través de la BHE, como son el uso de profármacos, modificaciones químicas como la halogenación, el uso de transportadores LNAA, glicosilación, cationización, etc.

²⁵ W. H. Oldendorf, "Lipid Solubility and Drug Penetration of the Blood Brain Barrier," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 147, no. 3 (Dec, 1974), 813-815.

²⁶ Victor A. Levin, "Relationship of Octanol/Water Partition Coefficient and Molecular Weight to Rat Brain Capillary Permeability," *Journal of Medicinal Chemistry* 23, no. 6 (1980), 682-684.

²⁷ William M. Pardridge, "CNS Drug Design Based on Principles of Blood-brain Barrier Transport," *Journal of Neurochemistry* 70, no. 5 (1998), 1781-1792.; William M. Pardridge, "Blood-Brain Barrier Biology and Methodology," *Journal of Neurovirology* 5, no. 6 (1999), 556-569.

Nuestro trabajo se basa en el uso de la estrategia de glicosilación como medio de transporte, ya que se ha demostrado, que la glicosilación es una metodología muy útil a la hora de permitir y aumentar la biodistribución de péptidos en el cerebro.

Según varios estudios el uso de azúcares ha dado lugar mejoras en la permeabilidad de los péptidos a través de la BHE. La síntesis de glicopéptidos mejora el transporte y aumenta la estabilidad metabólica, por tanto su biodisponibilidad. Un ejemplo es el estudio de la glicosilación de deltorphin²⁸, en el que se ha mejorado los efectos analgésicos mediante glicosilación de opioides. En este trabajo el péptido original fue diseñado para dirigirse hacia el transportador GLUT-1²⁹. Sin embargo estudios posteriores mostraron que ese no era el mecanismo por el que se transportaba³⁰. Algunos estudios han observado que glicopéptidos de tamaño reducido han sido transportados a través de la BHE mediante el transportador Glut-2, el cual se ha encontrado en niveles muy bajos en el cerebro³¹. Otro mecanismo de transporte que se baraja para elucidar el transporte de glicopéptidos es la endocitosis³².

En literatura se encuentra que la mejora en el transporte no está relacionado con el incremento de lipofilia, debido a que la adición de glucosa reduce significativamente esta, sin embargo, reduce la difusión pasiva³³.

La BHE permite numerosos sistemas de transporte, tanto como para nutrientes, como para compuestos endógenos³⁴. Por tanto, se han utilizado estos sistemas como una potente estrategia para controlar el transporte de fármacos al cerebro, usando estructuras miméticas de nutrientes endógenos, para asegurarnos de su transporte al interior de este. El ejemplo prototipo de este es la levodopa (L-DOPA, L-3,4- dihidroxifenilalanina), precursor metabólico de la dopamina. Esta sustancia sustituye a la dopamina endógena de la que es deficitario el paciente con enfermedad de Parkinson, por tanto es usada para este tratamiento. Esta contiene los grupos amino y carboxílico, que permiten completar el transporte a través de la BHE, mediante un transportador neutral de aminoácidos (LNAA)³⁵. La levodopa

²⁸ (a) Lucia Negri et al., "Dermorphin and Deltorphin Glycosylated Analogues: Synthesis and Antinociceptive Activity After Systemic Administration," *Journal of Medicinal Chemistry* 42, no. 3 (1999), 400-404.; Roberto Tomatis et al., "Synthesis and Pharmacological Activity of Deltorphin and Dermorphin-Related Glycopeptides," *Journal of Medicinal Chemistry* 40, no. 18 (1997), 2948-2952.

²⁹ R. Polt et al., "Glycopeptide Enkephalin Analogues Produce Analgesia in Mice: Evidence for Penetration of the Blood-Brain Barrier," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, no. 15 (Jul 19, 1994), 7114-7118.

³⁰ Sarah A. Williams et al., "The Effect of Glycosylation on the Uptake of an Enkephalin Analogue into the Central Nervous System," in *Biology and Physiology of the Blood-Brain Barrier* Springer, 1996), 69-77.

³¹ (a) Masahiro Nomoto et al., "Improvement of Intestinal Absorption of Peptide Drugs by Glycosylation: Transport of Tetrapeptide by the Sodium Ion-dependent D-glucose Transporter," *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87, no. 3 (1998), 326-332.; Corinne Leloup et al., "Glucose Transporter 2 (GLUT 2): Expression in Specific Brain Nuclei," *Brain Research* 638, no. 1 (1994), 221-226.

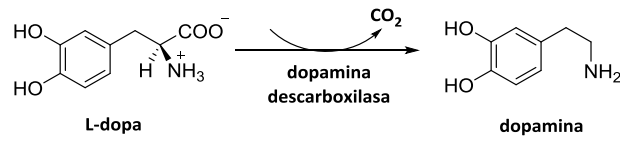
³² William A. Banks, Abba J. Kastin and Victoria Akerstrom, "HIV-1 Protein gp120 Crosses the Blood-Brain Barrier: Role of Adsorptive Endocytosis," *Life Sciences* 61, no. 9 (1997), PL119-PL125.

³³ Richard D. Egleton et al., "Improved Bioavailability to the Brain of Glycosylated Met-Enkephalin Analogs," *Brain Research* 881, no. 1 (2000), 37-46.

³⁴ (a) DAVID J. BEGLEY, "The Blood-brain Barrier: Principles for Targeting Peptides and Drugs to the Central Nervous System," *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48, no. 2 (1996), 136-146.; Akira Tsuji and Ikumi Tamai, "Carrier-Mediated Or Specialized Transport of Drugs Across the Blood-brain Barrier," *Advanced Drug Delivery Reviews* 36, no. 2 (1999), 277-290.

³⁵ LA Wade and R. Katzman, "Synthetic Amino Acids and the Nature of L-DOPA Transport at the Blood-brain Barrier," *Journal of Neurochemistry* 25, no. 6 (1975), 837-842.

absorbida es convertida a dopamina por la enzima dopadecarboxilasa (DDC), mediante descarboxilación.



Por tanto, a través de distintos estudios, se ha llegado a la conclusión de que la glicosilación podría ser una estrategia prometedora como mejora de la biodisponibilidad y sistemas de transporte de péptidos y proteínas como fármacos hacia el cerebro³⁶.

³⁶ Ivona Brasnjevic et al., "Delivery of Peptide and Protein Drugs Over the Blood-brain Barrier," *Progress in Neurobiology* 87, no. 4 (2009), 212-251.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

. Optimizar las nuevas metodologías de síntesis en fase sólida desarrolladas en el grupo de investigación, para la síntesis de nuevos inhibidores con el fin de aumentar la afinidad hacia el dominio PDZ de la nNOS.

. Síntesis y evaluación biológica de glicopéptidos, donde el fragmento de naturaleza peptídica queda unido mediante distintos espaciadores a monosacáridos que permitan el paso a través de la barrera hematoencefálica, para favorecer su distribución en el sistema nervioso central y por tanto ejercer su capacidad de acción e interferir en las rutas bioquímicas relacionadas con el óxido nítrico .

. Optimizar la ruta sintética, tanto en la SPPS como la preparación de glicósidos y glicopéptidos

. Síntesis de *O*-glicósidos funcionalizados con aminoácidos, para la obtención de *O*-glicopéptidos con afinidad hacia el dominio PDZ de la nNOS.

. Sintetizar glicopéptidos usando distintos azúcares.

. Modificar el espaciador entre la secuencia peptídica de reconocimiento y el azúcar, con el fin de observar las diferencias entre segmentos más o menos flexibles con respecto a su afinidad.

. Inhibir de forma competitiva las interacciones mediadas por el dominio PDZ de la nNOS y actuar como fármacos con actividad neuroprotectora.

. Encontrar un farmacóforo de menor tamaño y mayor afinidad y mejor penetrabilidad celular, que la obtenida por el nonapéptido líder, hacia la secuencia de reconocimiento del dominio PDZ de la enzima nNOS.

. Soportar y modificar estructuralmente, la secuencia peptídica de reconocimiento, sobre transportadores moleculares.

. Evaluar la afinidad de los compuestos sintetizados, hacia el dominio PDZ de la nNOS, a nivel aislado e intracelular.

. Analizar la citotoxicidad y la actividad neuroprotectora biológicamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

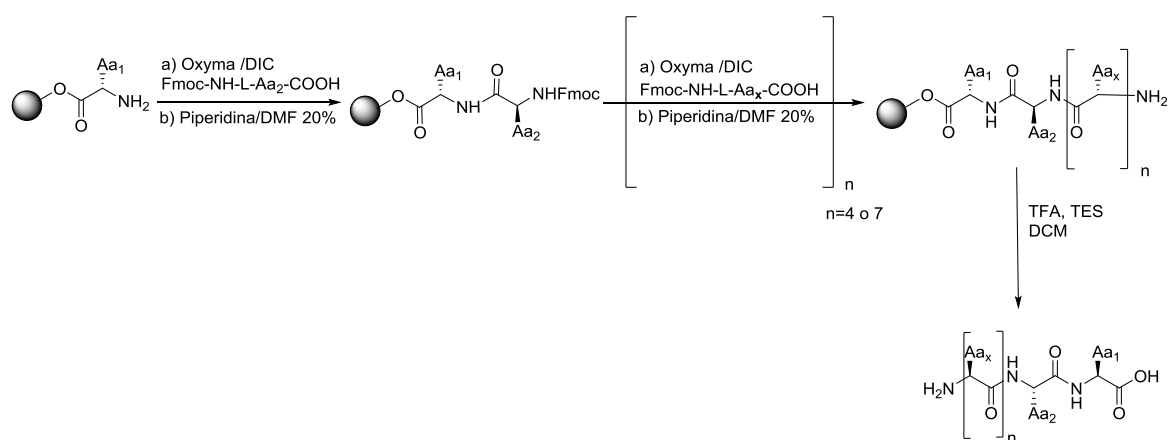
4.1. SÍNTESIS QUÍMICA

4.1.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y GLICOPÉPTIDOS MEDIANTE SPPS

Uno de los objetivos principales de este trabajo era la optimización de la ruta sintética llevada a cabo en SPPS, para aumentar el rendimiento del producto final, reducir tiempos de producción, coste de reactivos y evitar a su vez la formación de productos y reacciones secundarias indeseadas. Basándonos en la estrategia de síntesis en SPPS llevada a cabo en este grupo de investigación, durante la metodología sintética de estos compuestos se hicieron las modificaciones que se exponen a continuación.

Se decidió mejorar el protocolo de síntesis en fase sólida de las secuencias peptídicas líderes de interés, DFGDAV y VSPDFGDAV, que habían suscitado buenos resultados de afinidad hacia el dominio PDZ-nNOS mediante técnicas STD.

El esquema general seguido para la síntesis de péptidos y glicopéptidos derivados de estas secuencias líderes, que sigue la dirección C→N, se detalla a continuación (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema General de síntesis en fase sólida, donde n=4 estaría referido a la secuencia DFGDAV y n=7 para VSPDFGDAV

4.1.1.1. JUSTIFICACIÓN DEL USO DE LA RESINA CLORURO DE 2-CLOROTRITILLO.

Numerosos estudios han llegado a la conclusión de la importancia del carboxilo terminal para la unión hacia el dominio PDZ de la nNOS¹³ (como CtBP, PKF, etc). La resina cloruro de 2-clorotritililo nos permite mantener el extremo carboxilo terminal libre una vez que hidrolizamos la secuencia del soporte sólido de poliestireno y, además, inhibe la reacción secundaria indeseada de formación de

dicetopiperacina a través del impedimento estérico que proporciona su voluminoso linker de unión a este polímero (cloruro de 2-clorotritilo) (figura 1).

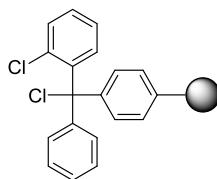


Figura 1. Resina funcionalizada con cloruro de 2-clorotritilo.

4.1.1.2. SÍNTESIS DE LOS BUILDING BLOCKS

La construcción del esqueleto peptídico se realiza mediante síntesis en fase sólida SPPS, sobre un soporte sólido de poliestireno, en un reactor de plástico.

Para que las reacciones de acoplamiento entre los aminoácidos que constituyen la cadena y el glicósido correspondiente sea óptima, los aminoácidos usados deben ser elegidos o acondicionarse en su defecto con los grupos funcionales adecuados. En este caso como grupos protectores se han empleado Fmoc (para el grupo amino) y el éster *tert*-butílico (para los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos). Por tanto, toda esta síntesis se realiza mediante protección ortogonal en la que la eliminación de los grupos protectores se puede llevar a cabo en cualquier orden, con reactivos y condiciones de reacción que no afectan a otro conjunto ortogonal de grupos protectores.

4.1.1.2.1. ACOPLAMIENTO DEL PRIMER AMINOÁCIDO.

Al comienzo de este estudio se comenzó a trabajar con la resina cloruro de 2-clorotritilo sin funcionalizar, con lo que se tenía que llevar a cabo la carga de esta con el primer aminoácido de la secuencia deseada. Para llevar a cabo este proceso y para evitar reacciones indeseadas, como la actuación de la humedad atmosférica, es necesario trabajar en condiciones inertes. El átomo de cloro del cloruro de 2-clorotritilo reacciona con el H₂O atmosférica dando lugar a una resina inservible (figura 2).

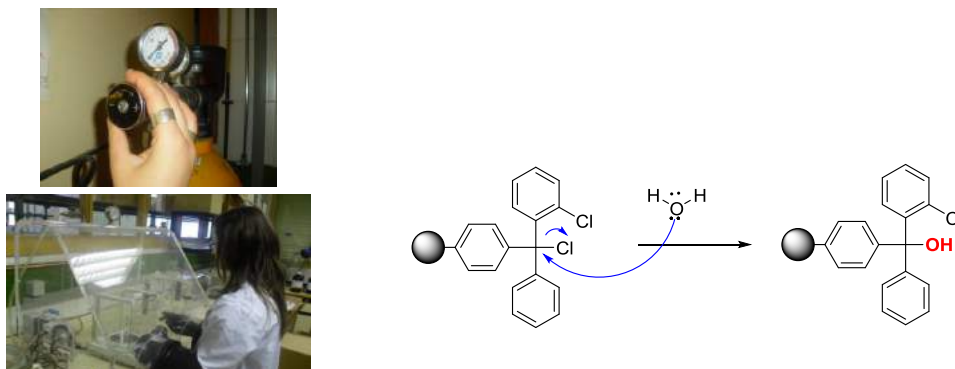


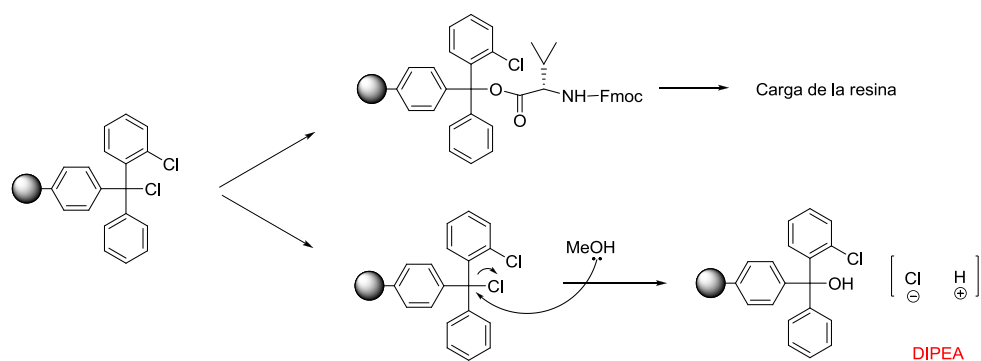
Figura 2. Cámara de guantes para atmósfera inerte de argón para evitar el bloqueo de los cloruros presentes en la resina.

La mayoría de los soportes sólidos utilizados en síntesis en fase sólida son de poliestireno y contienen un 1-2% de divinilbenceno (DVB). Esta resina de poliestireno se hincha en disolventes apróticos, siendo el factor de hinchado muy importante, ya que permite el control de la velocidad de la reacción. Al disponer los grupos funcionales a reaccionar en posiciones más accesibles a la reacción de acoplamiento da lugar a una disminución en los tiempos de reacción y reacciones completas. La compañía Aapptec hizo un estudio del factor de hinchado con distintos disolventes con resinas que contenían un 1% de DVB, siendo el factor de hinchado proporcionado por el DCM de un 5.2, frente al agua 1 (que no provoca hinchado) o DMF de un 3.5.

Por tanto, una vez pesada dentro de la cámara de guantes y sellada con un septum dentro de un reactor de plástico, se hincha la resina deshidratada con DCM anhidro para proporcionar el linker cloruro de 2-clorotritilo disponible espacialmente para la reacción de acoplamiento con el primer aminoácido. Después del tiempo de hinchado retiramos el disolvente con ayuda de un manifold y una bomba de vacío y añadimos la mezcla reactiva que contiene el aminoácido a cargar, en este caso Fmoc-Valina-OH comercial, protegido en su grupo α -amino por Fmoc, con DIPEA en DCM. La DIPEA (base no nucleofílica) proporciona el medio básico necesario para la formación del nucleófilo carboxilato, además de captar HCl generado durante la reacción, impidiendo la hidrólisis ácida de la resina. Una vez se ha unido el primer aminoácido a la resina, no se precisa de atmósfera de argón en las siguientes reacciones

Una vez realizado el primer acoplamiento se determina la carga de la resina, lo que nos da una idea de la cantidad de reactivo de partida y nos permite ajustar el exceso de reactivos a utilizar durante los siguientes acoplamientos.

Para bloquear la resina que ha quedado sin reaccionar se lava con una mezcla de DCM:MeOH:DIPEA en proporción 8:1.5:0.5. Se sustituyen los cloruros por grupos hidroxilo y se evitan reacciones secundarias en posteriores reacciones de acoplamiento (Esquema 2).

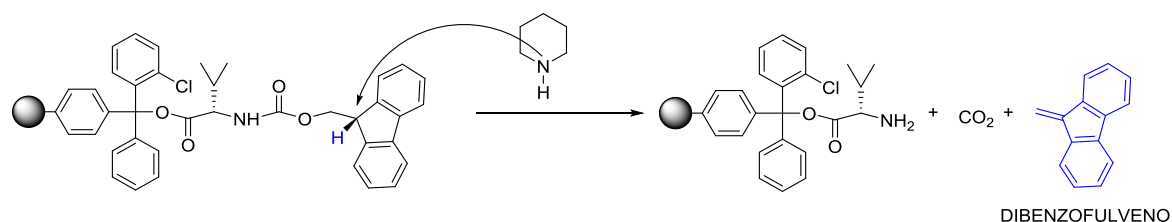


Esquema 2. Bloqueo resina sin reaccionar durante el primer acoplamiento.

4.1.1.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CARGA DE LA RESINA

La determinación de la carga de la resina se lleva a cabo mediante la resina previamente cargada y desinchada, a partir de una solución de piperidina al 20% en DMF. El grupo Fmoc es lábil a una solución de amina secundaria. La piperidina capta el protón del dibenzociclopentadienido, que sufre una eliminación para obtener el dibenzofulveno. Este posteriormente reacciona con el exceso de piperidina dando el aducto.

Este método se basa en la medida de absorción del compuesto liberado durante la ruptura del grupo protector Fmoc anclado sobre la resina. Este compuesto absorbe a una longitud de onda de 290nm, por tanto, sabiendo que la absorbancia es proporcional a la concentración del dibenzofulveno liberado (sistema conjugado), se calculan la masa y los moles que serán igual a los moles de Fmoc-Valina-OH unidos a esta (Esquema 3).



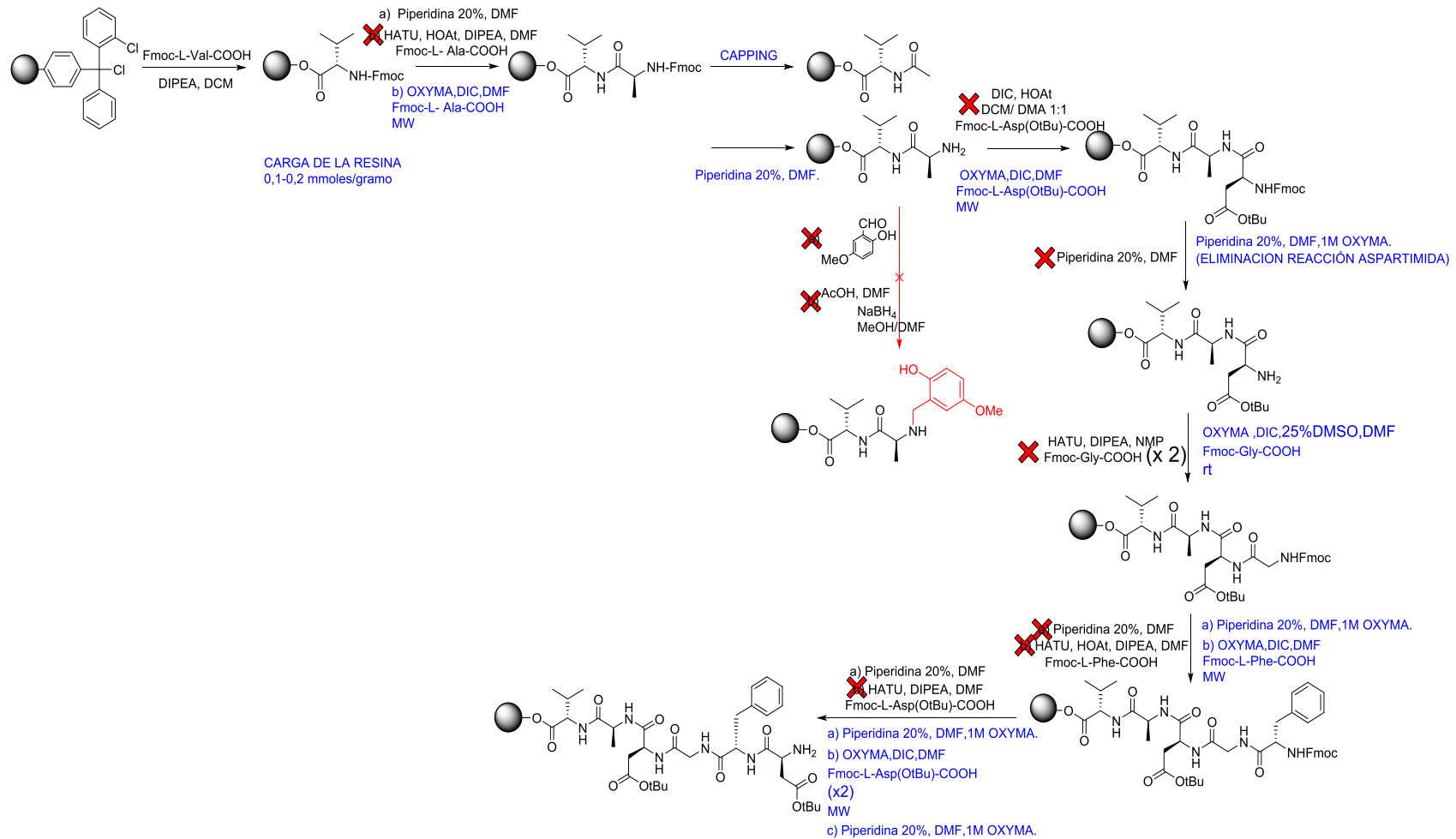
Esquema 3. Desprotección del grupo amino y formación de divenzofulveno.

Una cantidad óptima de carga de resina se encuentra entre 0.6-0.8mmoles/gramo. Una carga de resina elevada obstaculiza el acoplamiento de los siguientes aminoácidos y proporciona una menor exposición de las cadenas peptídicas a los reactivos de acoplamiento.

4.1.1.2.3. ACOPLAMIENTO DE LOS AMINOÁCIDOS QUE CONSTITUYEN LAS SECUENCIAS DETERMINADAS.

Para llevar a cabo los siguientes acoplamientos es necesario realizar la desprotección del grupo Fmoc, que ocurre mediante β -eliminación inducida por base (piperidina al 20% en DMF). La efectividad de esta reacción se mide con el test de Kaiser o de la ninhidrina. Una vez desprotegido el grupo amino este se encuentra disponible para el siguiente acoplamiento.

La metodología seguida por nuestro grupo de investigación para llevar a cabo las reacciones de acoplamiento fue optimizada. A continuación se muestra un esquema general de síntesis, con las variaciones sintéticas mejoradas, para poder observar el antes y el después de esta optimización (Esquema 4).



ESQUEMA 4. Modificaciones introducidas durante la síntesis del péptido líder.

4.1.2. MODIFICACIONES EN LA METODOLOGÍA SINTÉTICA

4.1.2.1. VARIACIÓN DE LA CARGA DE LA RESINA

Después de numerosos ensayos se decidió cargar la resina con una cantidad de aminoácido inicial no superior a los 0.1-0.2 mmoles/gramo, debido a que esto facilita una disposición espacial beneficiosa de los grupos amino para llevar a cabo los consecutivos acoplamientos. Mientras que si se trata con resinas más cargadas (0.6-0.8 mmoles/gramo), no conlleva unos acoplamientos óptimos.

4.1.2.2. USO DE LA OXIMA COMO AGENTE DE ACOPLAMIENTO Y ADITIVO EN EL COCKTAIL DE DESPROTECCIÓN

En el transcurso de este trabajo se decidió cambiar el uso del agente de acoplamiento HOBt por oxima debido a los numerosos beneficios que ofrecía, tanto por la formación de un intermedio más reactivo, como durante su manipulación, ya que en su estructura no contiene el grupo imidazol, que confiere un riesgo debido a su carácter explosivo. Estudios previos llevados a cabo sobre la oxima⁷⁴, informaban sobre la diversidad de aplicación y beneficios de su uso tanto como agente de acoplamiento, ya que favorece la formación de esteres altamente reactivos, como durante la prevención de reacciones indeseadas mediadas por base durante la estrategia de síntesis Fmoc/tBu.

Se ha usado la oxima en el cocktail de desprotección durante los acoplamientos críticos de la secuencia, con el fin de evitar reacciones como la de la aspartimida. Por tanto, una vez se probó la validez de esta aportación sobre nuestra secuencia, se eliminó la protección mediante el grupo Hmb (2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído) y la reacción de reducción de la imina sobre el resto de glicina anclado a la secuencia, reacciones previas al acoplamiento del Fmoc-Asp(OtBu)-OH. Esto conlleva la reducción en el número de reacciones, el coste y la efectividad en tiempo de síntesis.

Para favorecer este acoplamiento se hicieron ensayos con distintos agentes de acoplamiento y distintas condiciones de reacción, como por ejemplo la síntesis en microondas con los reactivos COMU/DIPEA⁷⁵, reduciendo los tiempos de reacción entre 6-8 minutos a 80°C. Estas condiciones no fueron suficientes para llevar a cabo el acoplamiento del residuo de Fmoc-Asp(OtBu)-OH sobre la secuencia, con lo que fue necesario una evaluación de distintas condiciones y mezclas de reacción, como puede observarse en la gráfica 1. Cabe destacar que las reacciones de acoplamiento y desprotección se llevaron a cabo usando los reactivos de acoplamiento oxima/DIC en DMF calidad síntesis de péptidos, siguiendo la estrategia de síntesis ortogonal Fmoc/tBu y una solución de piperidina al 20% en DMF en la

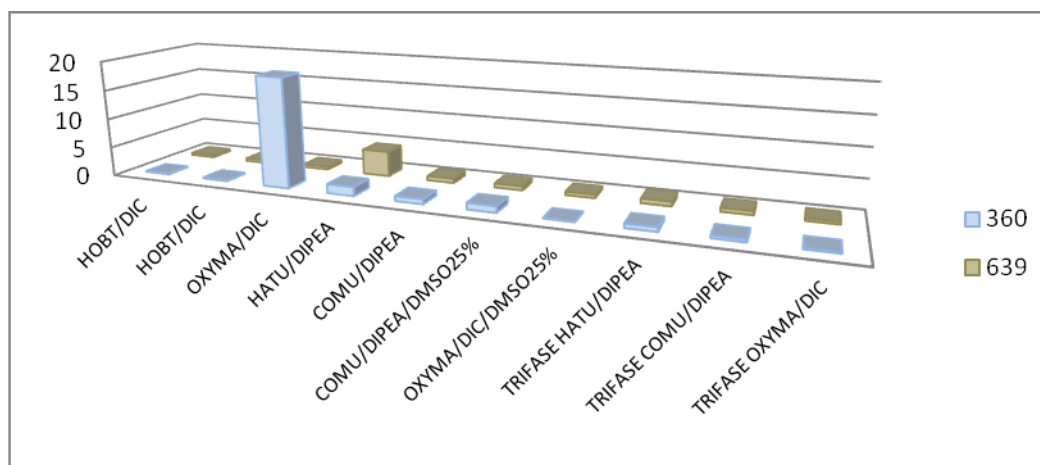
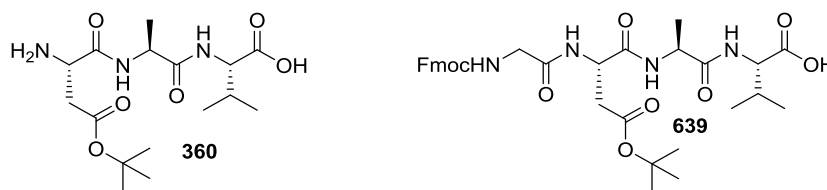
⁷⁴ Ramon Subirós-Funosas, Ayman El-Faham and Fernando Albericio, "Use of Oxyma as pH Modulatory Agent to be used in the Prevention of Base-driven Side Reactions and its Effect on 2-chlorotriyl Chloride Resin," *Peptide Science* 98, no. 2 (2012), 89-97.

⁷⁵ (a) Ayman El-Faham et al., "COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents," *Chemistry-A European Journal* 15, no. 37 (2009), 9404-9416.; Ramon Subiros-Funosas et al., "Microwave Irradiation and COMU: A Potent Combination for Solid-Phase Peptide Synthesis," *Tetrahedron Letters* 50, no. 45 (2009), 6200-6202.

mayoría de los casos para inducir por base la reacción de desprotección del grupo Fmoc mediante β -eliminación.

4.1.2.3. ELIMINACIÓN GRUPO PROTECTOR HMB

En el presente trabajo se describe la optimización de la síntesis de estas secuencias peptídicas líderes, que contienen en su secuencia los residuos de aminoácido Asp/Asn-Gly ⁷⁶. Ya que posee una elevada tendencia a la reacción de formación de la aspartimida durante la reacción de desprotección del grupo Fmoc. Para minimizar su formación se han usado numerosas estrategias, como el uso del grupo protector Hmb sobre el residuo de glicina. El mejor resultado se consigue llevando a cabo un acoplamiento normal del residuo de Aspartico sobre la glicina, seguido de la reducción de la imina de este grupo protector Hmb, posteriormente se añade oxima como aditivo sobre esa solución de desprotección. Esto conlleva una disminución de la basicidad necesaria para aportar a la síntesis de la secuencia, así como una disminución en los tiempos de síntesis y de exposición a más reacciones sobre el polímero y del coste de reactivos.



Gráfica 1. Relación de formación de tetrapéptido con respecto a tripéptido sin reaccionar, según el uso de distintos reactivos de acoplamiento y aditivos.

⁷⁶ Sotir Zahariev et al., "Synthesis of 'difficult' peptides Free of Aspartimide and Related Products, using Peptoid Methodology," *Tetrahedron Letters* 47, no. 25 (2006), 4121-4124.

Esta grafica representa el estudio realizado sobre el acoplamiento de Fmoc-Gly-OH con distintos agentes de acoplamiento y sus aditivos, evaluado mediante el aparato de HPLC-MS, pudiendo destacar mediante comparativas en el cálculo del área de las señales correspondientes al tripéptido de partida (Peso molecular 360) y al tetrapéptido final (peso molecular 639), observando, que el que mejor resultado era ofrecido por la mezcla oxima/DIC/DMSO 25%, la cual ofrecía un elevado acoplamiento, quedando apenas restos de tripéptido sin reaccionar, mientras que las demás soluciones ofrecían elevado acoplamiento, pero a su vez una elevada cantidad de tripéptido sin reaccionar. Así decidimos el uso de la Oxima/DIC/DMSO 25% para llevar a cabo la síntesis de nuestra secuencia peptídica.

4.1.2.4. DISOLVENTE ÚNICO DMF CALIDAD GRADO SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Eliminación y sustitución del uso de diclorometano (DCM) por DMF, calidad síntesis de péptidos, por contener posibles trazas de ácido y ser uno de los precursores involucrados en la disminución del rendimiento final, debido a que el soporte sólido utilizado es muy lábil a los ácidos.

4.1.2.5. ELIMINACIÓN DE REACCIONES DE DOBLE ACOPLAMIENTO

Para evitar una disminución en el rendimiento así como reacciones secundarias indeseadas, se eliminaron las reacciones de doble acoplamiento, para ello se decidió utilizar una solución de bloqueo de los extremos amino sin reaccionar mediante la acetilación (Figura 3).

Esta técnica se realiza tanto para reacciones inacabadas como para disminuir la carga de la resina. La reacción se llevó a cabo a través de un corto tratamiento del péptido anclado a la resina con un exceso de un derivado de ácido, anhídrido acético y una base, DIPEA y/o piridina. Una vez transcurridos aproximadamente 30 minutos, los reactivos fueron eliminados mediante filtración. Posteriormente la resina se lavó con DMF (calidad síntesis de péptidos) y se procedió a la posterior reacción de desprotección y consecuentes acoplamientos.

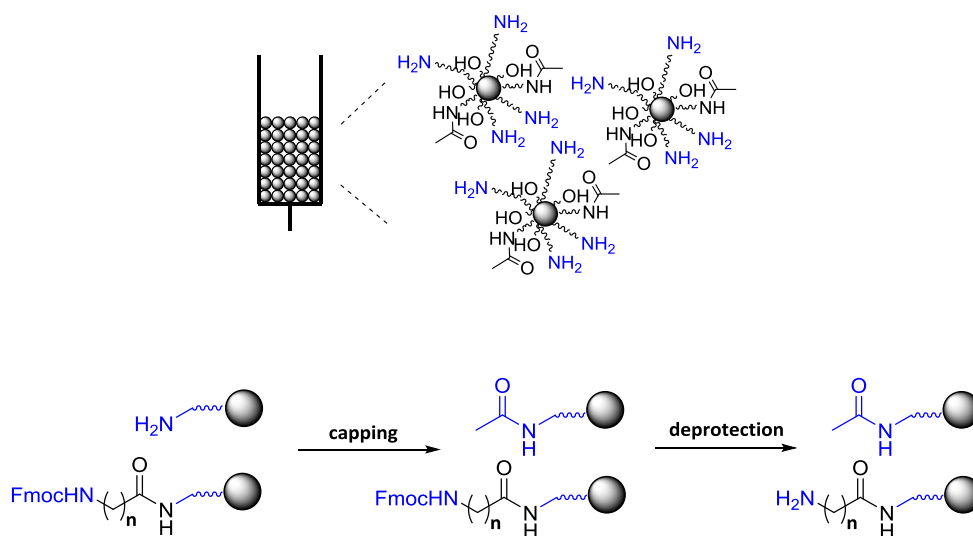


Figura 3. Disposición grupos amino. Bloqueo grupos amino sin reaccionar.

4.1.2.6. USO DE DMSO PARA FAVORECER EL ACOPLAMIENTO Y ROMPER LOS AGREGADOS.

La formación de agregados en SPPS puede causar lentas e incompletas desprotecciones y acoplamiento no completos. Esto se puede deber a numerosos factores, como por ejemplo el hecho de que la resina no se encuentre bien hinchada o formaciones de enlaces de hidrógeno entre los residuos de la misma secuencia peptídica⁷⁷. Este inconveniente no se puede predecir según la secuencia, pero sí se conoce que secuencias hidrofóbicas son más propensas a la formación de agregados.

Para evitar este problema nos podemos ayudar de varios protocolos de acción: la sonicación de la mezcla de reacción⁷⁸, los acoplamientos a alta temperatura⁷⁹, la adición a la mezcla de reacción de sales caotrópicas como CuLi, NaClO₄, KSCN⁸⁰, los detergentes no iónicos o la mezcla 1,3-dioxolan-2-ona⁸¹, reducir la carga de la resina y añadir a la mezcla de reacción DMSO⁸², que ha sido el utilizado en nuestro caso.

Durante la síntesis se empleó una mezcla de disolventes con DMSO con el fin de romper los posibles agregados, haciendo más disponibles los grupos amino libres susceptibles de acoplamiento. La solución contaba con un 25% de DMSO (grafica 1) sobre la concentración final. Para llegar a estas conclusiones se hizo una evaluación del acoplamiento con distintas mezclas de disolventes y de agentes de acoplamiento, que fue evaluado mediante HPLC-MS.

4.1.3. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES EN LA SECUENCIA PEPTÍDICA

Las modificaciones estructurales llevadas a cabo para mejorar las capacidades y habilidades ya encontradas en estas secuencias peptídicas, mediante estudios previos, han sido introducir en su estructura espaciadores de distinta naturaleza, para así conocer las posibles mejoras en su evaluación de la actividad frente las interacciones proteína-proteína, para mejorar su unión a transportadores moleculares como nanopartículas ferromagnéticas (unión llevada a cabo por colaboradores de la UGR), o introduciendo en su estructura una parte glicosídica, cuyos beneficios fueron descritos durante la

⁷⁷ E. Giralt, J. Rizo and E. Pedroso, "Application of Gel-Phase ¹³C-NMR to Monitor Solid Phase Peptide Synthesis," *Tetrahedron* 40, no. 20 (1984), 4141-4152.

⁷⁸ Hann Guang Chao, Michael S. Bernatowicz and Gary R. Matsueda, "Preparation and use of the 4-[1-[N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) Amino]-2-(Trimethylsilyl) Ethyl] Phenoxyacetic Acid Linkage Agent for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal Peptide Amides: Improved Yields of Tryptophan-Containing Peptides," *The Journal of Organic Chemistry* 58, no. 9 (1993), 2640-2644.

⁷⁹ (a) Leandro M. Varanda and M. TERESA M. MIRANDA, "Solid-phase Peptide Synthesis at Elevated Temperatures: A Search for an Optimized Synthesis Condition of Unsulfated cholecystokinin-12," *The Journal of Peptide Research* 50, no. 2 (1997), 102-108.; A. K. Rabinovich and J. E. Rivier, "Accelerated Protocols for Solid-Phase Peptide Synthesis at Elevated Temperature," *American Biotechnology Laboratory* 12, no. 7 (Jun, 1994), 48, 51.; BE Kaplan et al., "Solid-phase Synthesis and Characterization of Carcinoembryonic Antigen (CEA) Domains," *The Journal of Peptide Research* 52, no. 4 (1998), 249-260.

⁸⁰ MICHAEL W. PENNINGTON et al., "Synthesis of the Cardiac Inotropic Polypeptide anothopleurin-A," *International Journal of Peptide and Protein Research* 43, no. 5 (1994), 463-470.

⁸¹ L. Zhang et al., "Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis," *Intercept Ltd, Andover* (1994), 711-716.

⁸² E. Oliveira et al., "Comparative Evaluation of the Synthesis and Purification of Transmembrane Peptide Fragments Rat Bradykinin Receptor Fragment 64-97 as Model," *The Journal of Peptide Research* 49, no. 4 (1997), 300-307.

introducción y objetivos de este trabajo. Además se han añadido fragmentos fluorescentes a las secuencias líderes para el estudio de su penetrabilidad celular.

A continuación se describen las distintas modificaciones introducidas.

4.1.3.1. ESPACIADORES

Se han utilizado distintos espaciadores con la finalidad de estudiar la importancia de la conformación adecuada para mejorar la interacción frente a la proteína diana, aportar a nuestros productos flexibilidad (como por ejemplo el uso de derivados de polietilenglicol) o rigidez en la conformación, dotarles de la suficiente polaridad para soportarlos sobre nanopartículas ferromagnéticas y observar el beneficio mediante la mejora de la capacidad de penetrar a través de la membrana celular.

El acoplamiento de estos espaciadores se llevó a cabo mediante la misma estrategia de síntesis oxima/DIC, bajo sistemas ortogonales de desprotección, ya que en estas condiciones se obtuvieron los mejores resultados. Estos mismos fueron utilizados para la elongación de la cadena y facilitar la adsorción en nanopartículas durante la síntesis de péptidos, como espaciadores durante la síntesis de glicopéptidos, actuando como separadores y fragmentos de unión hacia el fragmento glicosídico.

Los espaciadores usados para la síntesis de derivados peptídicos fueron del tipo polietilenglicol (PEG), gamma aminobutírico y ácido 8-azido-3,6-dioxaoctanoico, cuya elección viene justificada a continuación.

4.1.3.1.1. DERIVADOS DE POLIETILENGLICOL

El uso de derivados de PEG en la cadena peptídica puede mejorar sus propiedades farmacológicas (figura 4, derivados usados). Los derivados voluminosos de PEG inhiben la degradación del péptido por las enzimas proteolíticas y, por tanto, esta unión (PEGylation) incrementa el tiempo de vida media del péptido en el organismo. Además el radio hidrodinámico de un péptido unido a este es mayor de lo normal, cruzando la sección de capilares glomerulares e impidiendo su salida del organismo por vía renal⁸³.

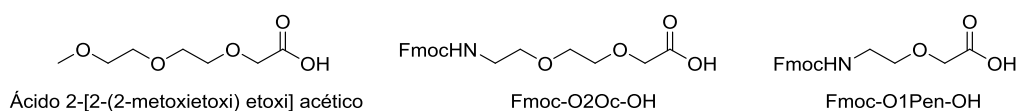
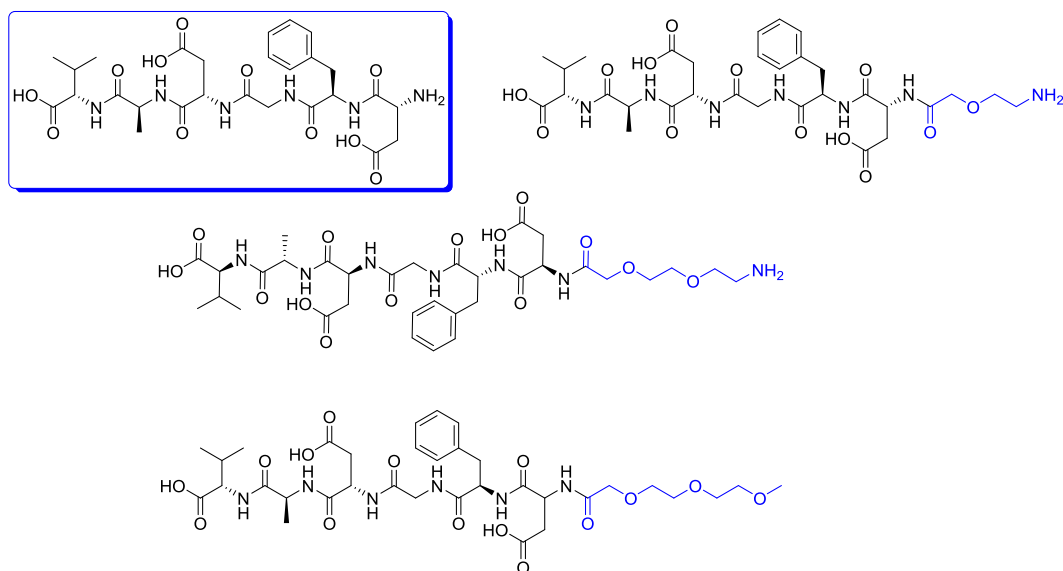


Figura 4. Derivados de PEG usados durante este trabajo.

Así las dosis necesarias de estos compuestos, para mantener los niveles terapéuticos en el organismo, serían bajas. Esta unión puede tener también efectos negativos, ya que su tamaño voluminoso puede prevenir la degradación y puede reducir la afinidad, debido a que por impedimento

⁸³ Andrew P. Chapman, "PEGylated Antibodies and Antibody Fragments for Improved Therapy: A Review," *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, no. 4 (2002), 531-545.

estérico no se encuentre disponible la unión con la molécula diana. Esta baja afinidad se compensa normalmente por el aumento en la vida media que este le aporta⁸⁴. Debido también a que se ve disminuida su eliminación por vía renal, estos péptidos se pueden acumular en el hígado, produciendo un síndrome macromolecular. Por tanto, hay que ser cautelosos en el diseño de estas moléculas con finalidad terapéutica.



Derivados de PEG

Figura 5. Productos derivados de la secuencia DFGDAV con PEG en el extremo amino terminal.

A su vez estos compuestos han sido soportados sobre nanopartículas ferromagnéticas para favorecer la penetrabilidad celular durante los estudios de neuroprotección (figura 5) y usados para la formación de derivados de glicopéptidos (como será descrito en el apartado glicopéptidos), con el fin de estudiar la implicación del espaciador en los estudios de neuroprotección y penetrabilidad celular y acoplados a ácido palmítico para incrementar su lipofilia y así favorecer su transporte a través de la membrana celular. Todo esto se describe a continuación durante este apartado de resultados y discusión.

4.1.3.1.2. GABA, ÁCIDO 4-FMOC-AMINOBUÉTICO

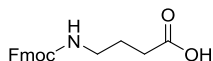


Figura 6. Ácido 4-Fmoc-aminobutírico

Es muy interesante conocer la respuesta que pueda ofrecer este derivado peptídico frente los ensayos de neuroprotección, ya que el GABA es un consolidado inhibidor de la neurotransmisión, y comúnmente tiene un papel funcional en el sistema nervioso central. Este aminoácido endógeno es

⁸⁴ Fabián León-Tamariz et al., "PEGylation of Cholecystokinin Prolongs its Anorectic Effect in Rats," *Peptides* 28, no. 5 (2007), 1003-1011.

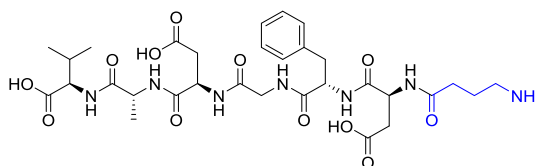
expresado en el CNS de vertebrados⁸⁵, en el sistema nervioso periférico⁸⁶ y en numerosos tejidos no neuronales⁸⁷. En el CNS, GABA actúa como GABA A receptores para ejercer una rápida acción inhibitoria, y en los receptores GABA, para mediar una lenta transmisión inhibitoria.⁸⁸

Aproximadamente el 30% de las sinapsis en el cerebro contienen receptores GABA A (Nutt, 2006), un subtipo de receptores GABA que media una rápida neurotransmisión inhibitoria, que están asociados con una variedad de desórdenes psiquiátricos (ansiedad, esquizofrenia) y neurológicos (epilepsia, insomnio) (Möhler, 2006; Charych et al., 2009).

Este es un aminoácido no proteico, considerado como un potente compuesto bioactivo. GABA ha sido ampliamente estudiado debido a sus numerosas funciones fisiológicas y efectos positivos en muchos desordenes metabólicos. La síntesis del GABA en el organismo ocurre de la misma manera que cuando se produce la síntesis de NO, en la que incremento del Ca^{2+} citosólico estimula la actividad glutamato descarboxilasa dependiente de calmodulina⁸⁹.

Algunos estudios han observado su papel en la neurotransmisión y determinado su implicación en la muerte neuronal inducida por isquemia cerebral, determinando que muchos procesos celulares producidos por la isquemia han mostrado alteración en la neurotransmisión por GABA. Inclúan cambios en el gradiente de Cl^- , reducción del ATP, incremento intracelular de Ca^{2+} , generación de especies reactivas de oxígeno y acumulación de ácido araquidónico e icosanoides.

Las estrategias de neuroprotección para incrementar la neurotransmisión de GABA, son dirigidas a ambos lados de la sinapsis mediante la prevención de su reabsorción e incremento de la actividad de los receptores de GABA con agonistas y moduladores alostéricos. En ese mismo estudio se discute como la disfunción de GABA en la neurotransmisión puede contribuir a muerte neuronal y como esta puede prevenirse mediante fármacos GABAérgicos⁹⁰.



⁸⁵ Eugene Roberts and Sam Frankel, "Gamma-Aminobutyric Acid in Brain: Its Formation from Glutamic Acid." *Journal of Biological Chemistry* 187 (1950), 55-63.

⁸⁶ Chikako Tanaka, "Gamma-Aminobutyric Acid in Peripheral Tissues," *Life Sciences* 37, no. 24 (1985), 2221-2235.

⁸⁷ Niranjala JK Tillakaratne, Lali Medina-Kauwe and K. Michael Gibson, "Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Metabolism in Mammalian Neural and Nonneural Tissues," *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 112, no. 2 (1995), 247-263.

⁸⁸ Kadeshia Dunn et al., "Current Perspective on the Location and Function of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) and its Metabolic Partners in the Kidney," *Journal of Nephrology and Urology Research* 2 (2014), 47-57.

⁸⁹ Ping Wang et al., "Neuronal Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Type A Receptors Undergo Cognate Ligand Chaperoning in the Endoplasmic Reticulum by Endogenous GABA," *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (2015), 188.

⁹⁰ Rochelle D. Schwartz-Bloom and Renu Sah, "Gamma-Aminobutyric acid A Neurotransmission and Cerebral Ischemia," *Journal of Neurochemistry* 77, no. 2 (2001), 353-371.

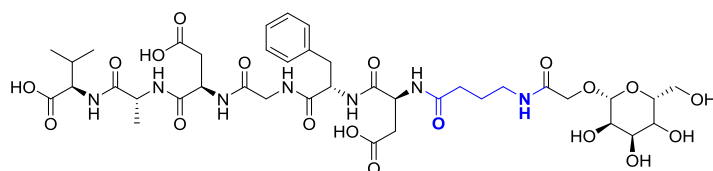


Figura 7. Compuestos sintetizados derivados de Gaba.

4.1.3.1.3. ÁCIDO 8-AZIDO-3,6-DIOXAOCANOICO (N3-O2OC-OH*CHA)

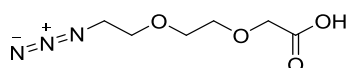


Figura 8. Ácido 8-azico-3,6-dioxaoctanoico

Este ácido es comercializado en forma de sal de ciclohexilamina, y acoplado al fragmento peptídico DFGDAV mediante los reactivos oxima/DIC. El compuesto derivatizado resultante es acoplado a través del resto azida, mediante la reacción de cicloadición *Click Chemistry*, al fragmento propargil-2,3,4,6-tetra-O-bencil-glucopiranososa en microondas con CuI. El producto formado es un derivado glicopéptido que contiene un grupo triazol en su estructura (Figura 9). Todas estas reacciones se desarrollan en fase sólida.

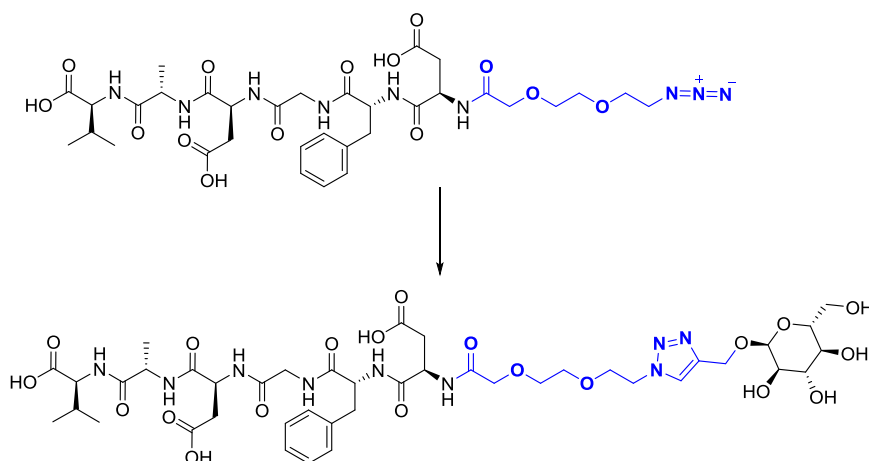


Figura 9. Compuestos sintetizados derivados del Ácido 8-azico-3,6-dioxaoctanoico

4.1.3.2. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES EN LA ESTRUCTURA LIDER DE PARTIDA

4.1.3.2.1. INTRODUCCIÓN DE UN RESTO DE LISINA

Con el fin de solventar los problemas acontecidos durante la síntesis de la secuencia líder DFGDAV, en la que se podían observar durante su caracterización por LCMS y HPLC restos importantes del pentapéptido precursor, se decidió variar el resto aspártico en tercera posición por Fmoc-Lys(Boc)OH, obteniendo el hexapéptido correspondiente de secuencia DFGKAV. Esta modificación, junto con las anteriormente comentadas durante la estrategia de síntesis, permitió estudiar distintas

condiciones de reacción. Esta misma secuencia fue acoplada al fragmento 6-azido-2,3,4-tri-O-bencil- α -D-metilglucopiranosido, mediante la estrategia de síntesis en SPPS HATU/HOAT/DIPEA.

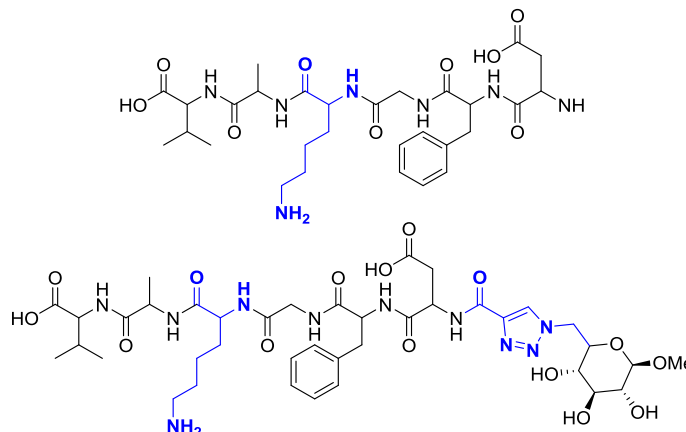


Figura 10. Modificaciones estructurales en la secuencia líder DFGDAV, introducción del residuo de L-Lisina (DFGKAV)

Durante la hidrogenación catalítica del glicopéptido se observó, mediante su caracterización en LCMS, que este compuesto se acoplaba al Pd, es decir, era capaz de formar un complejo con este metal. A partir de aquí surgieron numerosas preguntas que derivaron en la síntesis de peptidotriazoles como ligandos en la reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura (capítulo II).

4.1.3.2.2. INTRODUCCIÓN DE UN RESTO DE GUANIDINIO

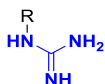


Figura 11. Guanidina

Durante la última década, las guanidinas han llamado mucho la atención como un valorado catalizador basado en los enlaces de hidrogeno, mientras han sido considerados como superbases orgánicas con una amplia aplicabilidad en síntesis.

Este fragmento estructural está presente en numerosos productos naturales y compuestos biológicamente activos, los cuales muestran atractivas propiedades y juegan un papel importante en la química médica. Entre estas interesantes aplicaciones, las guanidinas han sido estudiadas como superbases en síntesis orgánica, en organocatálisis, transportadores de intercambio de membrana y en péptidos o péptido miméticos, cuya función cabe destacar en este derivado. También hay que destacar que muchos compuestos derivados de guanidinio han sido empleados como dianas farmacológicas en el desarrollo de fármacos debido a su potente actividad biológica. Numerosos estudios están basados en el reconocimiento molecular de las guanidinas. Cabe destacar los sensores de guanidina que han llamado mucho la atención de numerosos grupos de investigación por su utilidad en el reconocimiento

molecular. Esta importante propiedad se debe a la habilidad del fragmento de guanidina por formar enlaces multidentados con sus grupos NH, dando lugar a una fuerte interacción que está dirigida al reconocimiento de numerosos grupos funcionales. Por ejemplo el grupo de Schmuck estudió el uso de los grupos guanidino en péptidos artificiales como sensores de nucleótidos⁹¹.

Una propiedad de elevado interés que aporta este tipo de fragmento es su habilidad para la penetrabilidad celular⁹², la cual hace a estos derivados peptídicos compuestos capaces de transportar agentes externos a través de las membranas⁹³.

Hay estudios que demuestran que otros derivados peptídicos con restos de guanidina y confieren actividad opioide. Los cambios en los grupos de guanidinio están dirigidos a conseguir diferentes propiedades con los receptores opiáceos *in vivo*⁹⁴ e *in vitro*⁹⁵. Esta es una interesante propiedad debido a que estos péptidos podrían actuar como alternativa para el tratamiento de, por ejemplo, la adición de cocaína, evitando los numerosos efectos secundarios de los tratamientos actuales

55

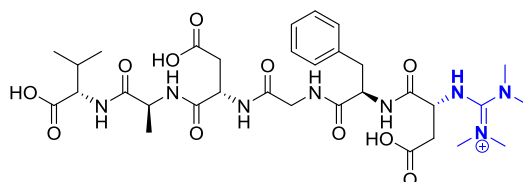


Figura 12. Derivado de Guanidina sintetizado

Por tanto es de gran interés el observar los resultados ofrecidos por este derivado peptídico (Figura 12) durante su evaluación biológica para evaluar su capacidad de penetrabilidad, haciendo al péptido líder más activo al encontrarse dentro de la célula.

⁹¹ Juan V. Alegre-Requena, Eugenia Marqués-López and Raquel P. Herrera, "Guanidine Motif in Biologically Active Peptides," *Australian Journal of Chemistry* 67, no. 7 (2014), 965-971.

⁹² Yoseop Kim, Sandra Binauld and Martina H. Stenzel, "Zwitterionic Guanidine-Based Oligomers Mimicking Cell-Penetrating Peptides as a Nontoxic Alternative to Cationic Polymers to Enhance the Cellular Uptake of Micelles," *Biomacromolecules* 13, no. 10 (2012), 3418-3426.

⁹³ (a) Sachin S. Gokhale and Vijayanti A. Kumar, "Amino/Guanidino-Functionalized N-(Pyrrolidin-2-Ethyl) Glycine-Based Pet-PNA: Design, Synthesis and Binding with DNA/RNA," *Organic & Biomolecular Chemistry* 8, no. 16 (2010), 3742-3750.; Manaswini Nanda and Krishna N. Ganesh, "4 (R/S)-Guanidinypropyl Collagen Peptides: On-Resin Synthesis, Complexation with Plasmid DNA, and the Role of Peptides in Enhancement of Transfection," *The Journal of Organic Chemistry* 77, no. 8 (2012), 4131-4135.; Kim, Binauld and Stenzel, *Zwitterionic Guanidine-Based Oligomers Mimicking Cell-Penetrating Peptides as a Nontoxic Alternative to Cationic Polymers to Enhance the Cellular Uptake of Micelles*, Vol. 13ACS Publications, 2012), 3418-3426.

⁹⁴ (a) Youness Touati-Jallabe et al., "Cyclic Peptides with a Diversely Substituted Guanidine Bridge: Solid-Phase Synthesis and Structural Analysis," *Chemistry-A European Journal* 17, no. 9 (2011), 2566-2570.; Youness Touati-Jallabe et al., "Cyclic Enkephalins with a Diversely Substituted Guanidine Bridge Or a Thiourea Bridge: Synthesis, Biological and Structural Evaluations," *Journal of Medicinal Chemistry* 56, no. 14 (2013), 5964-5973.

⁹⁵ Grazyna Weltrowska et al., "N-Terminal Guanidinylation of TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe) Peptides Results in Major Changes of the Opioid Activity Profile," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, no. 18 (2013), 5082-5085.

^a Intermedio de reacción sintetizado por el Dr. Fernando Sánchez-Cantalejo Jimena, durante su tesis doctoral.

4.1.3.2.3. TRIAZOL

Este espaciador fue incorporado a la estructura glicopéptica a través del azúcar de partida, 6-azido-2,3,4-tri-O-bencil- α -D-metilglucopiranosido^a, a través de la reacción de cicloadición mediante *Click Chemistry*. Una vez obtenido el derivado triazólico, fue acoplado mediante síntesis en fase sólida a la secuencia peptídica mediante los reactivos de acoplamiento HATU/HOAT/DIPEA.

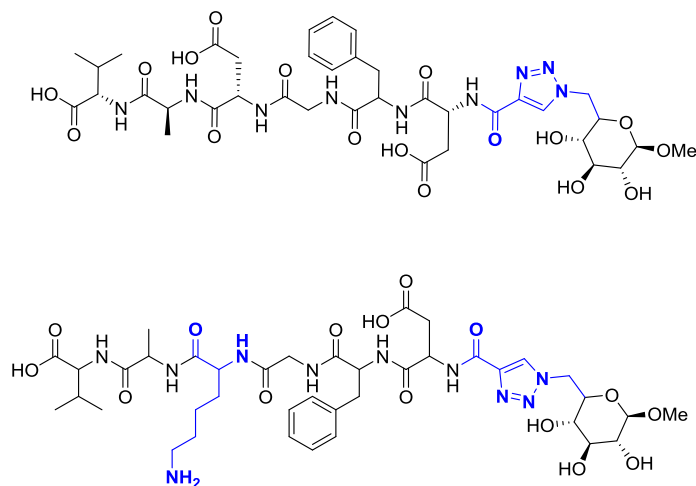


Figura 13. Glicopéptidos sintetizados derivados de triazol.

Se decidió sintetizar el péptido derivado de estas secuencias con el fin de estudiar la influencia de este resto y observar las diferencias respecto a los derivados glicopeptídicos en la actividad biológica (figura 14).

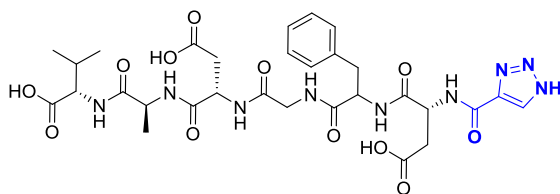


Figura 14. Derivado de triazol introducido en la secuencia líder DFGDAV.

4.1.3.2.4. ÁCIDO PALMÍTICO

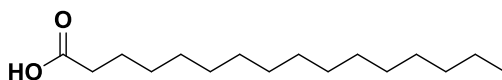


Figura 15. Ácido palmítico

Hay cada vez más evidencias de que la membrana plasmática y proteínas de unión de ácidos grasos que se encuentran en el citoplasma están involucradas en la penetrabilidad celular, transporte y metabolismo de ácidos grasos⁹⁶.

El mecanismo por el que los ácidos grasos transportadores de proteínas median la penetrabilidad de largas cadenas de ácidos grasos no se conoce muy bien, pero numerosos estudios han encontrado evidencia de su relación con la actividad de la acyl-CoA sintetasa⁹⁷.

Los ácidos grasos quizás actúen directa o indirectamente con las membranas, transportadores, canales iónicos y enzimas o receptores de hormonas y así regulan varias funciones celulares⁹⁸.

El proceso de penetrabilidad de los ácidos grasos a través de las membranas ha sido considerado como un proceso de transporte pasivo. Estudios recientes implican la presencia de diferentes proteínas lipídicas de unión que se encuentran tanto en el citosol celular como en las membranas y que están involucradas en la penetrabilidad y en el transporte intracelular de estos ácidos grasos (Figura 16)⁹⁹.

⁹⁶ AK Dutta-Roy, "Cellular Uptake of Long-Chain Fatty Acids: Role of Membrane-Associated Fatty-Acid-Binding/Transport Proteins," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 57, no. 10 (2000), 1360-1372.

⁹⁷ Jürgen Pohl et al., "New Concepts of Cellular Fatty Acid Uptake: Role of Fatty Acid Transport Proteins and of Caveolae," *Proceedings of the Nutrition Society* 63, no. 02 (2004), 259-262.

⁹⁸ (a) R. Uauy, P. Mena and A. Valenzuela, "Essential Fatty Acids as Determinants of Lipid Requirements in Infants, Children and Adults," *European Journal of Clinical Nutrition* 53 (1999), S66-S77.; Christopher D. Stubbs and Anthony D. Smith, "The Modification of Mammalian Membrane Polyunsaturated Fatty Acid Composition in Relation to Membrane Fluidity and Function," *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 779, no. 1 (1984), 89-137.

⁹⁹ (a) JH Veerkamp et al., "Structural and Functional Aspects of Cytosolic Fatty Acid-Binding Proteins," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 49, no. 6 (1993), 887-906.; JFC Glatz et al., "Cytoplasmic Fatty Acid Binding Protein: Significance for Intracellular Transport of Fatty Acids and Putative Role on Signal Transduction Pathways," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 48, no. 1 (1993), 33-41.; RM Kaikaus, NM Bass and RK Ockner, "Functions of Fatty Acid Binding Proteins," *Experientia* 46, no. 6 (1990), 617-630.; Judith Storch et al., "The Role of Membranes and Intracellular Binding Proteins in Cytoplasmic Transport of Hydrophobic Molecules: Fatty Acid-Binding Proteins," *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 115, no. 3 (1996), 333-339.

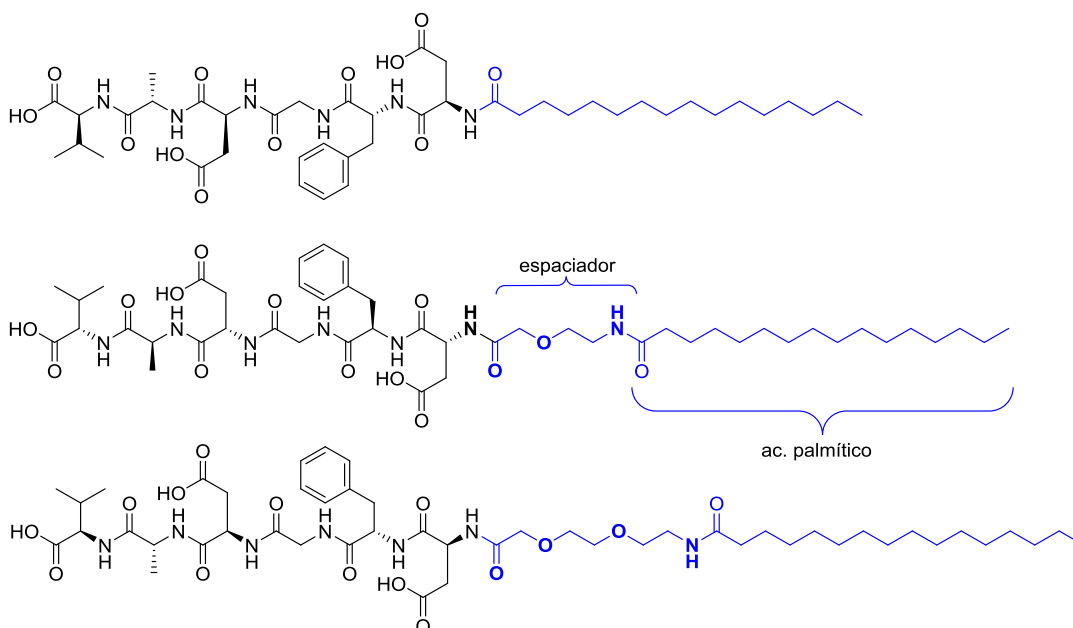


Figura 16. Derivados de la secuencia líder DFGDAV con ácido palmítico en su estructura.

4.1.3.2.5. DERIVADOS DE CARBOXIFLUORESCÉINA

5 secuencias peptídicas, de las sintetizadas hasta el momento, fueron elegidas para ser marcadas en solución con el compuesto 5(6)-carboxifluoresceína, cuyas longitudes de onda de excitación y emisión se corresponden con 494nm y 518nm respectivamente. Este marcado permitía hacer una evaluación de la penetrabilidad celular y toxicidad de estos compuestos, mediante citometría de flujo y ensayos MTT respectivamente. Este estudio se realizó con células de carcinoma de cervix humano HeLa, que será comentado durante el apartado de evaluación biológica.

4.1.3.3. REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CONVERGENTE EN SPPS. SÍNTESIS NONAPÉPTIDO DE SECUENCIA VSPDFGDAV

La síntesis de este compuesto se llevó a cabo, en un principio, siguiendo la descripción previa de la Dra. Ana María Pérez López en su tesis doctoral (Universidad de Granada, 2010), mediante síntesis convergente en fase sólida, por acoplamiento entre el fragmento tripeptídico sintetizado y el hexapéptido precursor.

Para la síntesis del fragmento tripeptídico, se llevó a cabo la carga de resina comercial, cloruro de 2-clorotritilo, con el residuo Fmoc-Pro-OH y se utilizaron los sistemas de acoplamiento HATU/HOAt/DIPEA y los mecanismos de desprotección expuestos anteriormente, para realizar los acoplamientos de los residuos de serina y valina. Una vez acoplada al fragmento la valina, esta se deja protegida con el grupo Fmoc para poder llevar a cabo con éxito el acoplamiento en fase sólida. Posteriormente, se hidroliza del soporte sólido sin desproteger y se llevó a cabo su purificación por SPE.

Una vez purificado y caracterizado se procedió a la síntesis en fase sólida de esta secuencia nonapeptídica mediante el acoplamiento convergente.

Con el objeto de reducir tiempos de producción y coste de reactivos, junto con el estudio de distintas mezclas de agentes de acoplamiento y condiciones, se intentó cambiar esta síntesis convergente por una lineal, una vez teníamos sintetizada la secuencia del hexapéptido líder. Además, se estudiaron distintas mezclas de agentes de acoplamiento y condiciones. Los siguientes acoplamientos de P, S, V con los reactivos oxima/Dic se llevaron a cabo de forma lineal, dando lugar a rendimientos óptimos y una síntesis sencilla y limpia.

Las modificaciones estructurales comentadas anteriormente han sido introducidas en esta secuencia dando lugar a una serie de derivados (figura 17), así como en la secuencia líder DFGDAV, acoplándole tanto residuos derivados de PEG, como restos de ácido palmítico. El objetivo es estudiar cómo afectan estas modificaciones a la capacidad de interacción con el dominio PDZ de la enzima nNOS y evaluar su penetrabilidad celular para observar si aumenta la distribución de estos derivados dentro de la célula.

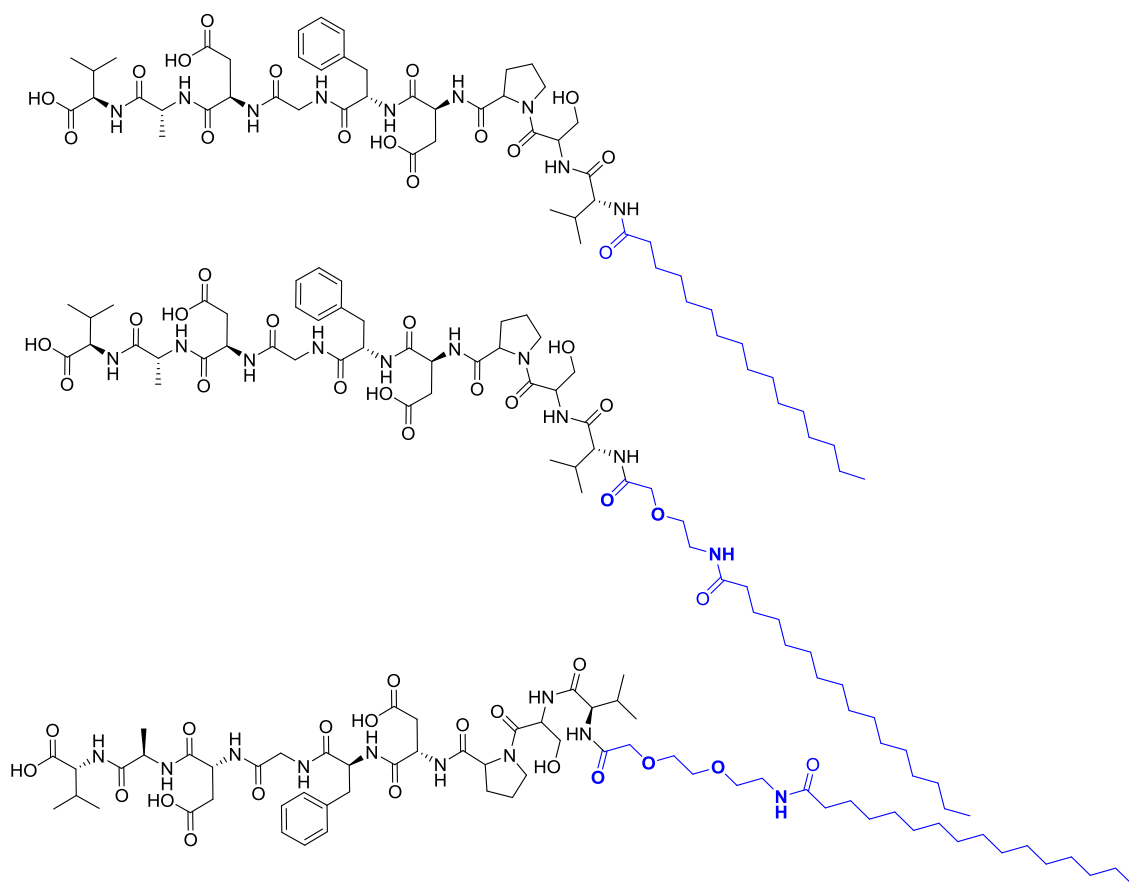


Figura 17. Derivados de la secuencia VSPDFGDAV con ácido palmítico.

4.1.4. SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS

4.1.4.1. QUÍMICA DE LOS CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos confieren una compleja variedad estructural que los hacen difíciles de sintetizar, purificar y analizar. Esto es debido a la dificultad de controlar y manipular la estereoquímica de la posición anomérica y la diversidad que nos ofrecen debido su la capacidad de unión.

Se han hecho numerosos esfuerzos para entender el papel de la glicosilación de proteínas o el desarrollo de glicopéptidos como herramientas en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Esto ha provocado el desarrollo de la metodología de síntesis de glicopéptidos durante las últimas décadas.

La completa eliminación de los grupos protectores es una etapa crucial durante la síntesis en fase sólida de péptidos y glicopéptidos, por el cuidado que confiere el evitar la degradación del producto final de la secuencia sintética. Por tanto, toda esta síntesis se lleva a cabo mediante protección ortogonal en la que la eliminación de los grupos protectores se puede llevar a cabo en cualquier orden, con reactivos y condiciones de reacción que no afectan a otro conjunto ortogonal de grupos protectores.

4.1.4.2. CONSIDERACIONES EN LA ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS

Los glicopéptidos pueden ser sintetizados mediante la unión de la fracción del carbohidrato al péptido deseado, o a través del uso de aminoácidos glicosilados como building blocks para ser incorporados a la secuencia peptídica mediante síntesis convergente o condensación. Esta última estrategia es actualmente considerada como la más segura y eficiente, y será utilizada debido a las ventajas que presenta, siendo la más conveniente para su uso en síntesis en fase sólida.

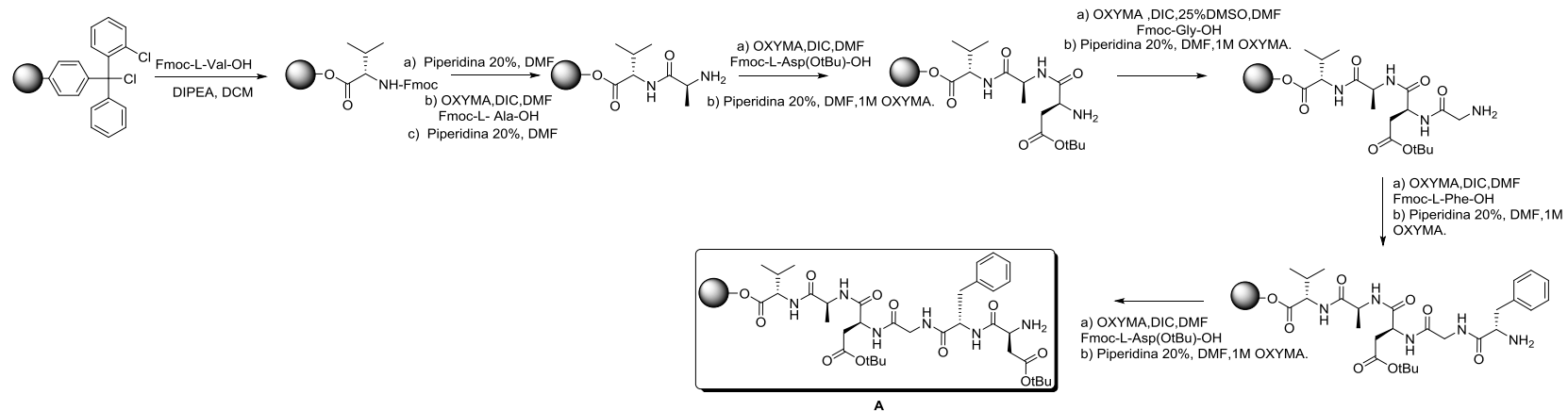
4.1.4.3. SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS

Dependiendo de la naturaleza del enlace glicosídico, podemos clasificar a los glicopéptidos en tres grandes grupos, *O*-glicopeptidos, *S*-glicopeptidos y *N*-glicopéptidos. Este trabajo de investigación se centra en la síntesis de *O*-glicosidos, ya que estudios previos han descrito que este tipo de enlace en combinación con derivados de D-glucosa confiere mejores resultados y son más activos. Con el fin de observar diferencias y/o beneficios con respecto al uso del fragmento de D-glucosa se realizaron modificaciones en el tipo de carbohidrato¹⁰⁰.

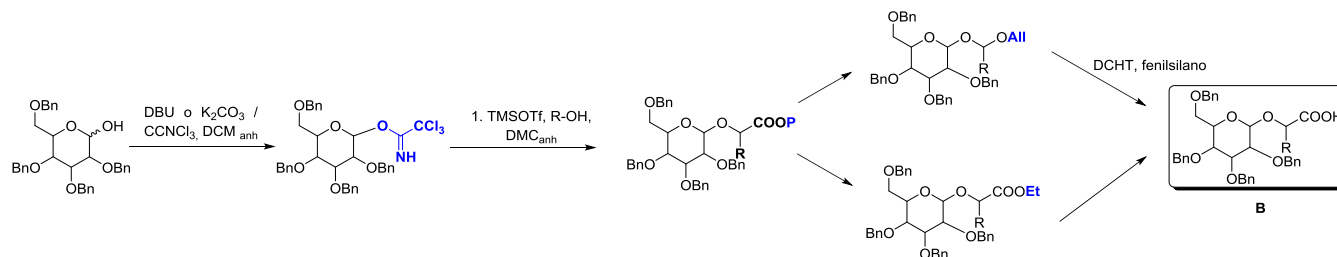
La síntesis de glicopéptidos se llevó a cabo en fase sólida mediante el acoplamiento del grupo N-terminal del hexapéptido DFGDAV, con la función carboxilo presente en el espaciador unido al resto

¹⁰⁰ (a) Robin Polt, Muthu Dhanasekaran and Charles M. Keyari, "Glycosylated Neuropeptides: A New Vista for Neuropsychopharmacology" *Medicinal Research Reviews* 25, no. 5 (2005), 557.; Joseph F. Poduslo and Geoffrey L. Curran, "Glycation Increases the Permeability of Proteins Across the Blood-Nerve and Blood-Brain Barriers," *Molecular Brain Research* 23, no. 1 (1994), 157-162.

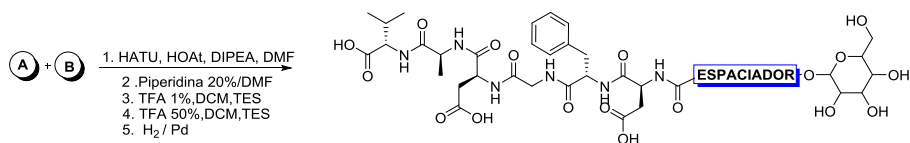
de carbohidrato. Se utilizó una resina funcionalizada con restos de cloruro de 2-clorotritilo, que permitió la obtención del fragmento A (Esquema 5). El fragmento B, con el resto de carbohidrato convenientemente protegido y unido al espaciador, se sintetiza según se describe en el Esquema 6. Finalmente el glicopéptido se obtiene mediante el acoplamiento entre los fragmentos A y B (Esquema 7). Debido a la diferente reactividad de los espaciadores se procedió a optimizar las condiciones de acoplamiento en esta síntesis convergente.



Esquema 5. Síntesis de la secuencia DFGDAV mediante SPPS.



Esquema 6. Síntesis de los glicosidos derivados



Esquema 7. Síntesis convergente en SPPS de los fragmentos A y B, hidrólisis del soporte sólido y desprotección de los grupos protectores.

4.1.4.3.1. REACCIÓN DE GLICOSIDACIÓN. ENLACE GLICOSÍDICO

Esta reacción permite la unión de carbohidratos a otras unidades de carbohidrato o a otras moléculas (aglicones) en presencia de un promotor. En este trabajo se llevó a cabo la unión de diferentes secuencias peptídicas a carbohidratos, mediante espaciadores, a través de la estrategia de síntesis convergente. El fragmento glicosídico se sintetizó en solución y se unió mediante síntesis convergente en fase sólida a la cadena peptídica anclada al polímero insoluble. El compuesto final fue liberado de este una vez completada la unión (Esquemas 5,6 y 7).

El enlace glicosídico se puede definir como el enlace formado mediante el desplazamiento de un buen grupo saliente en posición anomérica del azúcar (denominado glicosilo dador), por un grupo hidroxilo procedente de un aceptor. Esto da lugar a la formación de hemiacetales. Este es un proceso en equilibrio en el que estos se pueden interconvertir bajo catálisis mediada por ácido o por base, a través de su forma de cadena abierta. Estos dos diastereómeros los cuales difieren en la estereoquímica en el C-1 (posición anomérica), se conocen como anómeros, en el que sustituyente que se encuentra en posición axial se conoce como anómero α , mientras que si se encuentra en posición ecuatorial se denomina anómero β .

Aunque el concepto de este tipo de enlace es bastante simple, esta operación ha sido una reacción frustrante de realizar durante casi cien años, fueron Koenings y Knorr los que publicaron la primera reacción de glicosilación a comienzos del siglo XX, en la que formaban glicósidos a partir de dadores de glicosilo derivados de haluros⁶⁴.

Los fragmentos derivados de carbohidratos usados durante el transcurso de este trabajo, fueron adquiridos comercialmente y se muestran en la Figura 18.

⁶⁴ Wilhelm Koenigs and Eduard Knorr, "Ueber Einige Derivate Des Traubenzuckers Und Der Galactose," *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 34, no. 1 (1901), 957-981.

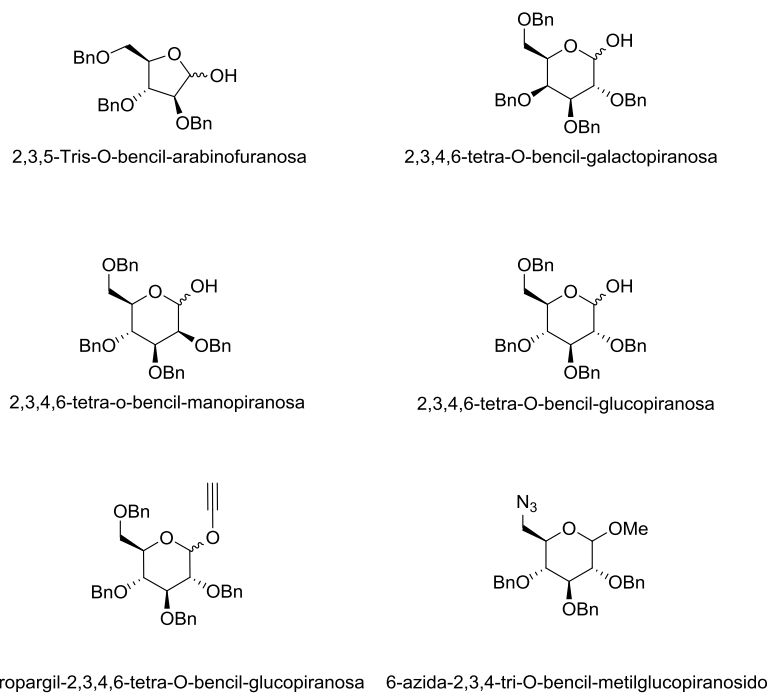


Figura 18. Derivados de carbohidratos usados durante el transcurso de este trabajo

En el caso de un anillo de seis miembros son posibles diferentes conformaciones, pero la más estable es la conformación tipo silla. Y en particular en la glucosa, el anómero más estable es el β , siendo por tanto la β -D-glucopiranososa la conformación más estable para ella, conocida como 4C_1 , donde todos sus sustituyentes están en posición ecuatorial (Figura 19). Por tanto, se puede decir que el anómero en posición ecuatorial es mucho más estable, existiendo solamente esta excepción, cuando se trata de un sustituyente de carácter electronegativo en posición anomérica, cuya posición más estable sería por tanto la posición axial (efecto anomérico).

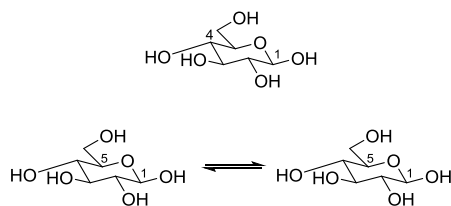
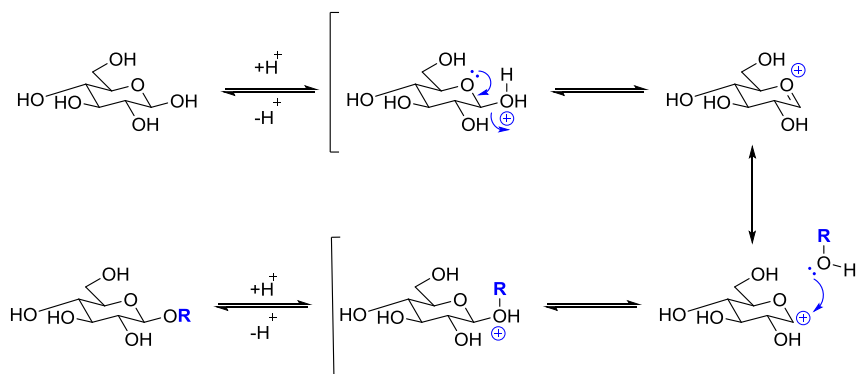


Figura 19. Conformación más estable para la D-Glucopiranososa

La reacción entre un alcohol y un azúcar para formar un acetal en presencia de un catalizador ácido se conoce como reacción de glicosidación de Fischer y su producto se denomina glicósido. Desde que Fischer desarrolló el método de glicosidación, se ha intentado optimizar la eficiencia de esta, siendo los métodos que reducen la toxicidad y respetan el medio ambiente los que actualmente se llevan a cabo.

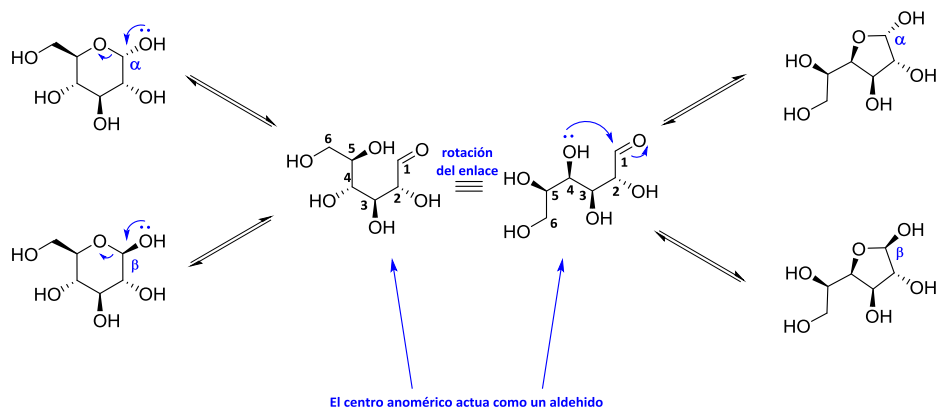
Esta reacción se encuentra en equilibrio, por tanto si este glicósido se trata con un ácido en medio acuoso, este será hidrolizado mediante reacción inversa (Esquema 8).



Esquema 8. Formación de glicósido en medio ácido

El mecanismo por el cual transcurre la reacción es S_N1 dando lugar a un carbocatión intermedio denominado catión glicosílico, que es atacado por un alcohol para dar el producto acetálico. Esta reacción se da mediante control termodinámico, por tanto el producto esperado es el más termodinámicamente estable.

Hay que destacar que la forma preferida de la glucosa en medio acuoso no es la α -glucosa, sino que nos encontramos con un equilibrio entre las formas α y β , siendo denominado este cambio en la rotación óptica como mutarrotación. Por tanto, en agua existe un equilibrio entre el aldehído de cadena abierta y la forma cíclica. Este aldehído quizás cicle para formar de nuevo un hemiacetal, siendo esta reacción catalizada por ácido o por base (Esquema 9).



Esquema 9. Mutarrotación.

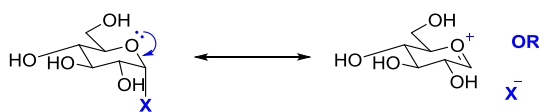
Una de las posibilidades es la regeneración del anillo de 6 miembros del anillo de piranosa, mediante el ataque del hidroxilo en posición 5 al C-1 del aldehído. Sin embargo, cabe la posibilidad de que este grupo hidroxilo ataque por la otra cara del aldehído, dando lugar a las formas α y β de la piranosa.

Es posible el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo en posición 4 sobre el aldehído, con posibilidad igualmente de ataque por ambas caras del aldehído, dando lugar a un anillo de 5 miembros, y por tanto a los productos de furanosa α y β .

Por tanto, teniendo en cuenta estas consideraciones, se puede encontrar la glucosa en numerosas formas. Cabe destacar que la forma más estable y que mayoritariamente encontramos es el anillo de 6 miembros con todas las posiciones en ecuatorial (anómero β), debido a que en medio acuoso el hidroxilo en posición anomérica se encuentra duramente solvatado incrementando el efecto estérico del sustituyente anomérico.

Cabe destacar que en el caso de la manosa, epímero de la glucosa en el C-2, el anómero α domina el equilibrio en concordancia con el efecto anomérico.

Este efecto anomérico consiste en que uno de los pares de electrones aislados del oxígeno del anillo, en posición anti-periplanar al enlace C-X en posición anomérica, pueden participar en la estabilización de la interacción de dos electrones. Como se comentó anteriormente, este efecto solo actúa cuando el sustituyente en posición anomérica es un átomo electronegativo, debido a que si este sustituyente se encontrara en posición ecuatorial no sería posible que el oxígeno del anillo orientase un par solitario de electrones antiperiplanar al enlace C-X y por lo tanto no podría estabilizar las interacciones electrónicas.



Esquema 10. Efecto anomérico

En términos de orbitales moleculares, esto se corresponde con una interacción $n \rightarrow \delta^*$, llamada donación parcial del par de electrones solitario del oxígeno del anillo (en un orbital n) hacia el orbital antienlazante δ^* , orbital del enlace C-X, así el efecto neto de esta interacción electrónica consiste en una deslocalización electrónica, y esto por tanto conlleva a una estabilización.

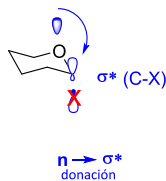


Figura 20. Efecto anomérico en términos de orbitales moleculares

Conociendo el comportamiento de estos fragmentos, como se puede observar es difícil gestionar una síntesis estereoselectiva, pero podemos destacar, que conociendo todos los factores que intervienen en la síntesis estereoselectiva, puede ser controlada.

Uno de los problemas de esta reacción es que debe darse bajo condiciones completamente anhidras, es decir, incluso pequeñas cantidades de agua podrían reaccionar competitivamente como nucleófilos. Por ello se utilizó tamiz molecular para captar las posibles moléculas de agua que puedan quedar en el medio, después de anhidrificar este. Si esto no se controlara podría causar problemas de regioselectividad ya que se formarían los anomeros α y β . Esta mezcla de productos dificultaría el paso final de purificación de estos compuestos.

Es importante encontrar un buen grupo saliente para que tenga lugar la reacción de sustitución, para ello hemos utilizado los grupos tricloroacetimidato.

4.1.4.3.2. IMPORTANCIA DEL CONTROL DE LA DISPOSICIÓN DEL CARBONO ANOMÉRICO

Para intentar controlar la disposición espacial del enlace glicosídico y/o evitar conseguir mezclas de anomeros, es muy importante el control de numerosos factores: temperatura, disolventes, el promotor, grupos protectores. Desde un punto de vista sintético, la eficiencia de la reacción de glicosilación no implica sólo altos rendimientos sino también alta regio- y estereoselectividad. La alta regioselectividad se puede conseguir mediante la protección selectiva de los grupos hidroxilo del aceptor de glicosilo.

4.1.4.3.3. IMPORTANCIA EN LA ELECCIÓN DE LOS GRUPOS PROTECTORES.

La estereoquímica del producto final puede verse influida y regulada por la elección de los grupos protectores, tanto los incorporados en los dadores como en los aceptores de glicosilo. Todos los grupos funcionales, excepto los que estén involucrados en la reacción, deben de ser protegidos, ya que cualquier factor puede afectar el éxito de la reacción.

En el caso de que los grupos protectores no fueran seleccionados correctamente, el éxito de la ruta sintética podría verse influenciada negativamente, o impedida, por la descomposición del producto en el proceso de eliminación de dichos grupos protectores en la reacción final. Por tanto, la estrategia de protección juega un papel fundamental, ya que estos grupos modulan las propiedades de toda la molécula.

Cabe destacar que el enlace glicosídico es un enlace lábil frente a ácidos y bases fuertes, con lo que los glicopéptidos podrían sufrir reacciones secundarias no deseadas, como β -eliminación o reacciones de epimerización respectivamente (figura 21).

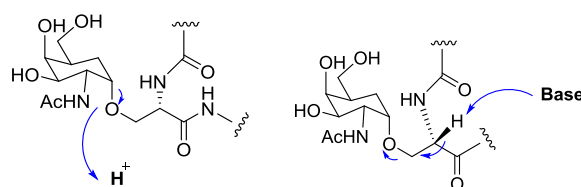


Figura 21. Enlace glicosídico es un enlace lábil frente a ácidos y bases fuertes

La elección de los grupos protectores adecuados es muy importante ya que permite llevar a cabo una síntesis sencilla basada en grupos protectores ortogonales.

4.1.4.3.3.1. PROTECCIÓN DE LOS GRUPOS HIDROXILO DEL CARBOHIDRATO

Es importante considerar la influencia electrónica y/o estérica de estos grupos en la reactividad de la molécula, y por lo tanto, en la formación del enlace glicosídico.

Numerosas investigaciones han establecido que el enlace *O*-glicosídico de monosacáridos comunes, como lo son la glucosa, manosa, galactosa, *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina sobrevive un tiempo limitado a la exposición con TFA (<2h), en ausencia de protección en los grupos hidroxilo⁶⁵. Sin embargo, una exposición elevada o la presencia de nucleófilos como el agua descomponen fracciones de oligosacárido.

A lo largo del tiempo para proteger los grupos hidroxilo del carbohidrato durante la síntesis de aminoácidos glicosilados se han utilizado los grupos protectores acetilo y benzoilo, ya que debido a su naturaleza electrón-atrayente son capaces de estabilizar el enlace glicosídico, durante la etapa de cleavage catalizada por ácidos debido a su naturaleza electron atrayente.

Sin embargo, cabe destacar que durante la reacción de eliminación de los grupos acilo, mediada por base, se han observado las reacciones secundarias de β -eliminación y epimerización de estereocentros peptídicos⁶⁶. Esto no ocurre para grupos acetilo. Mientras que los grupos benzoilo requieren unas condiciones más drásticas de eliminación, lo cual, da lugar a una β -eliminación y epimerización lentas, sugiriendo que este método de no es deseable para la protección de glicopéptidos.

Por tanto, justificamos el uso de éteres bencílicos como grupos protectores usados durante este proyecto, ya que son comúnmente usados durante la síntesis de oligosacáridos y recientemente

⁶⁵ (a) John Offer, Martin Quibell and Tony Johnson, "On-Resin Solid-Phase Synthesis of Asparagine N-Linked Glycopeptides: Use of *N*-(2-Acetoxy-4-Methoxybenzyl)(AcHmb) Aspartyl Amide-Bond Protection to Prevent Unwanted Aspartimide Formation," *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1*, no. 2 (1996), 175-182.; Laszlo Urge et al., "Fmoc-Protected, Glycosylated Asparagines Potentially Useful as Reagents in the Solid-Phase Synthesis of N-Glycopeptides," *Carbohydrate Research* 235 (1992), 83-93.; Laszlo Urge et al., "Synthesis and Conformational Analysis of N-Glycopeptides that Contain Extended Sugar Chains," *Tetrahedron* 50, no. 8 (1994), 2373-2390.

⁶⁶ Horst Kunz, "Synthesis of Glycopeptides, Partial Structures of Biological Recognition Components [New Synthetic Methods (67)]," *Angewandte Chemie International Edition in English* 26, no. 4 (1987), 294-308.

comienzan a usarse en síntesis de glicopéptidos en fase sólida⁶⁷. Hay que añadir, que este tipo de protección no es compatible con glicopéptidos que contengan en su estructura, cisteína, metionina, ni triptofano, hasta cierto punto, y que durante la etapa de liberación del producto del soporte sólido (cleavage), catalizada por TFA, da lugar a productos O-benzilados, derivados de esta protección, problema que se puede solventar, llevando a cabo esta etapa de desprotección catalizada por ácido en dos pasos⁶⁸.

En este trabajo se utilizó el grupo benzil éter, uno de los más comunes usados en química de carbohidratos (derivados adquiridos comercialmente). En nuestro caso hemos utilizado el producto comercial. Estos son fácilmente eliminados bajo condiciones suaves de hidrogenación catalítica, con un catalizador heterogéneo de Pd/C, durante el último paso de síntesis. Una vez liberado el glicopéptido de la resina y desprotegido los grupos t-Bu correspondientes. A esta reacción se llegó sin haber purificado previamente los intermedios de reacción. Después de este paso, se llevó a cabo la purificación mediante extracción en fase reversa.

4.1.4.3.3.2. PROTECCIÓN DEL GRUPO α -AMINO

Durante el transcurso de este proyecto, los grupos α -amino han sido protegidos por el grupo Fmoc, que es fácilmente eliminado con una solución de base débil como la piperidina al 20% en DMF. Ha sido demostrado que el uso de la piperidina, no causa β -eliminación de la unión O-glicosídica del glicopéptido⁶⁹.

Mediante la estrategia de síntesis en fase sólida llevada a cabo por el Fmoc, la etapa de hidrólisis del soporte sólido, así como la simultánea desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen la secuencia, normalmente se lleva a cabo con TFA, un ácido moderadamente fuerte.

Hay que destacar, que el enlace glicosídico de la mayoría de los sacáridos es estable frente al uso de TFA, incluso aunque a veces, sea necesario el uso de grupos protectores acilo, para obtener suficiente estabilidad.

⁶⁷ (a) Yoshiaki Nakahara, Yuko Nakahara and Tomoya Ogawa, "Solid-Phase Synthesis of an O-Linked Glycopeptide Based on a Benzyl-Protected Glycan Approach," *Carbohydrate Research* 292 (1996), 71-81.; Zhong-Wu Guo et al., "Solid-Phase Synthesis of the CD52 Glycopeptide Carrying an N-Linked Core Pentasaccharide Structure," *Angewandte Chemie International Edition in English* 36, no. 13-14 (1997), 1464-1466.

⁶⁸ Yoshiaki Nakahara et al., "Total Synthesis of B-Chain of Human α 2HS Glycoprotein," *Tetrahedron Letters* 38, no. 41 (1997), 7211-7214.

⁶⁹ Tatjana Vuljanic et al., "Piperidine is Preferred to Morpholine for Fmoc Cleavage in Solid Phase Glycopeptide Synthesis as Exemplified by Preparation of Glycopeptides Related to HIV gp120 and Mucins," *Tetrahedron* 52, no. 23 (1996), 7983-8000.

4.1.4.3.3. PROTECCIÓN DEL GRUPO α -CARBOXÍLICO

Los building blocks se han sintetizado mediante la glicosilación de aminoácidos α -amino protegidos con Fmoc, y la protección del grupo carboxílico protegida mediante un grupo alílico o tert-butilo⁷⁰. Cada uno de estos esteres puede ser eliminado selectivamente, en presencia del grupo Fmoc, mediante la reacción de dealilación catalizada por Pd(0), a través del tratamiento con nanopartículas de Pd(0) o mediante una solución de TFA, respectivamente. Después de la desprotección el grupo carboxílico liberado está disponible para ser activado por un agente de acoplamiento y llevar a cabo el consecuente acoplamiento.

4.1.4.3.4. PROTECCIÓN DEL GRUPO α -CARBOXÍLICO DE LOS ESPACIADORES.

Este grupo funcional es menos nucleófilo que el grupo amino, pero es conveniente protegerlo, para aumentar la solubilidad en disolventes orgánicos y evitar reacciones secundarias indeseadas como por ejemplo la polimerización.

De entre los métodos más comunes para proteger el grupo α -carboxilo podemos destacar la esterificación. En este trabajo la protección se lleva a cabo formando de esteres etílicos y derivados de alilo, ya que son fácilmente eliminados previamente a su participación durante la síntesis convergente (figura 22).

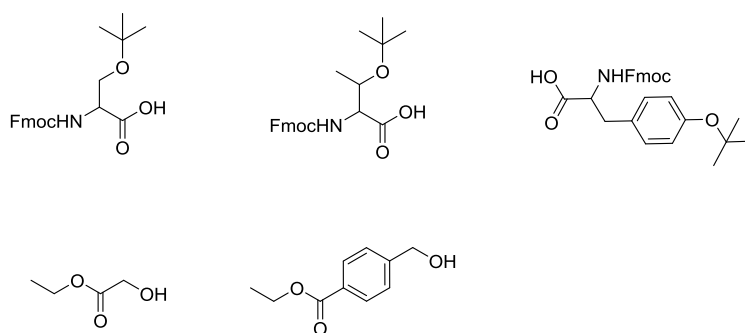


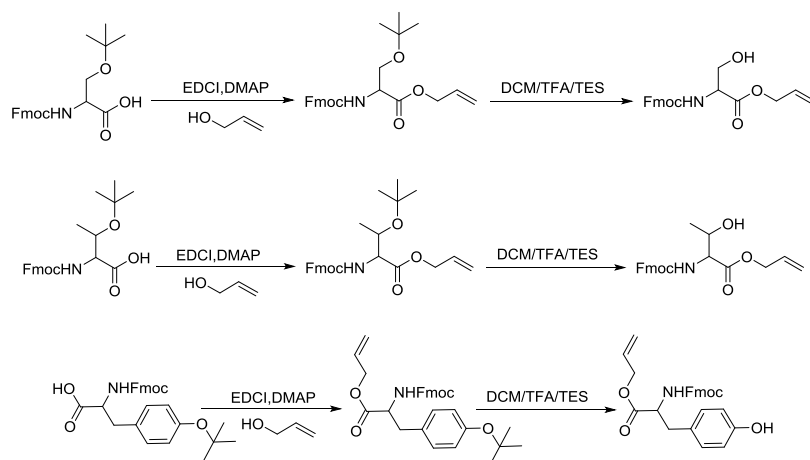
Figura 22. Espaciadores utilizados

4.1.4.3.4. FORMACIÓN DE DERIVADOS DE ALILO.

Los espaciadores alil derivados de los aminoácidos serina, treonina y tirosina se obtuvieron mediante la protección de la función ácida con un grupo protector que siguiera la síntesis ortogonal, fuera sencillo de incorporar y pudiera ser eliminado bajo condiciones de desprotección suaves. Para ello fue utilizado el alcohol alílico, EDCI como agente activante del grupo carboxilo y DMAP como catalizador

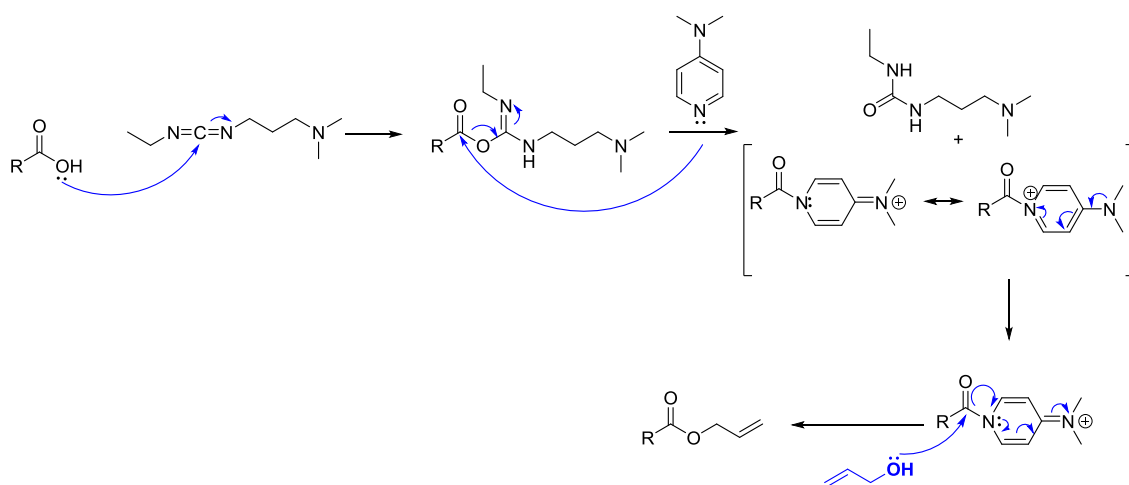
⁷⁰ (a) Morten Meldal, "Glycopeptide Synthesis," in *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications* Academic Press, Inc San Diego, 1994), 145-198.; H. G. Garg, K. von dem Bruch and H. Kunz, "Developments in the Synthesis of Glycopeptides Containing Glycosyl L-Asparagine, L-Serine, and L-Threonine," *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 50 (1994), 277-310.

(Esquema 11). Los derivados de ácido benzoico y 2-hidroxiacético fueron adquiridos comercialmente, protegidos en la función ácida.



Esquema 11. Formación de los espaciadores derivados de alilo.

El mecanismo de reacción se detalla en el esquema 12, en el que se produce el ataque del ácido a la carbodiimida (EDCI), seguido por el ataque al carbonilo del intermedio mediante el catalizador DMAP, el cual libera un derivado de urea. EL alcohol alílico ataca al intermedio y se obtiene el ácido carboxílico protegido con el grupo alilo.



Esquema 12. Mecanismo de reacción protección de ácidos con grupo alilo.

4.1.4.3.5. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO t-Bu DE LOS ESPACIADORES

Una vez llevada a cabo la protección del grupo carboxilo de los espaciadores mediante protección alílica, se procedió a la desprotección de la función alcohol, protegida mediante los grupos terc-butilo, a través de una mezcla de desprotección de TFA/TES/DCM en proporción 4.5:0.5:5, durante

1h. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de glicosidación sobre los derivados de azúcares correspondientes.

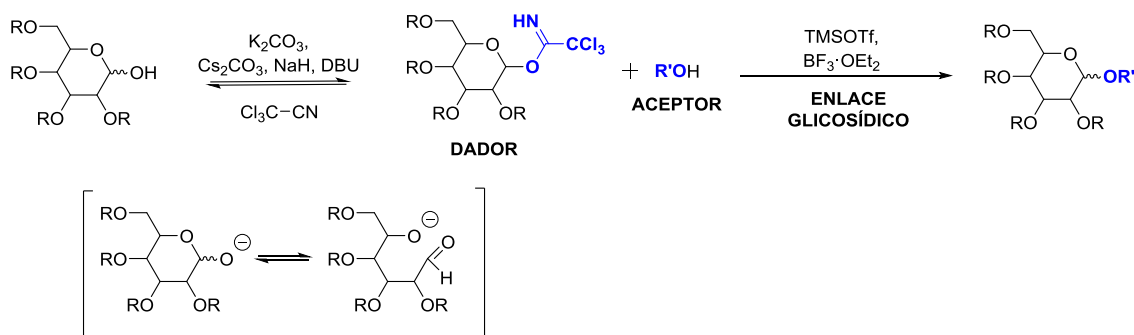
Después de la desprotección, el grupo carboxílico liberado, está disponible para ser activado y llevar a cabo la consecuente formación del glicósido correspondiente.

4.1.5. SÍNTESIS DE LOS GLICOSIDOS DERIVADOS

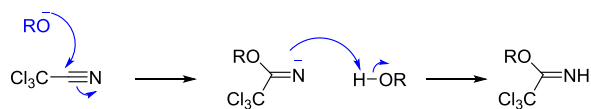
4.1.5.1. ELECCIÓN DEL GRUPO SALIENTE EN LA POSICIÓN ANOMÉRICA DEL DADOR

4.1.5.1.1. USO DE TRICLOROACETIMIDATOS COMO BUEN GRUPO SALIENTE

Su formación es sencilla y se obtiene mediante el tratamiento del grupo hidroxilo libre en posición anomérica, con tricloroacetnitrilo y una base (Esquema 13 y 14). Dependiendo del tipo de base utilizada, podrán ser obtenidos los tricloroacetimidatos α ó β .

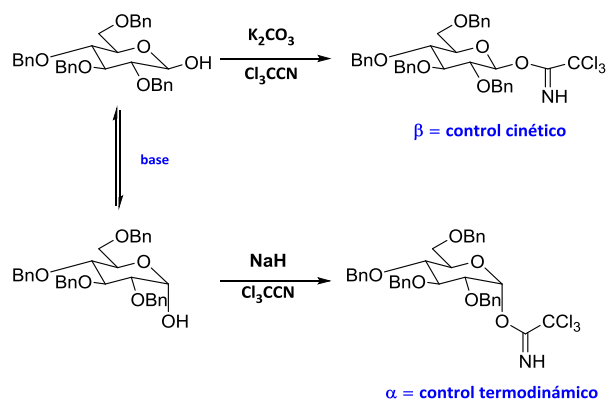


Esquema 13. Método de glicosilación de Schmidt del tricloroacetimidato.



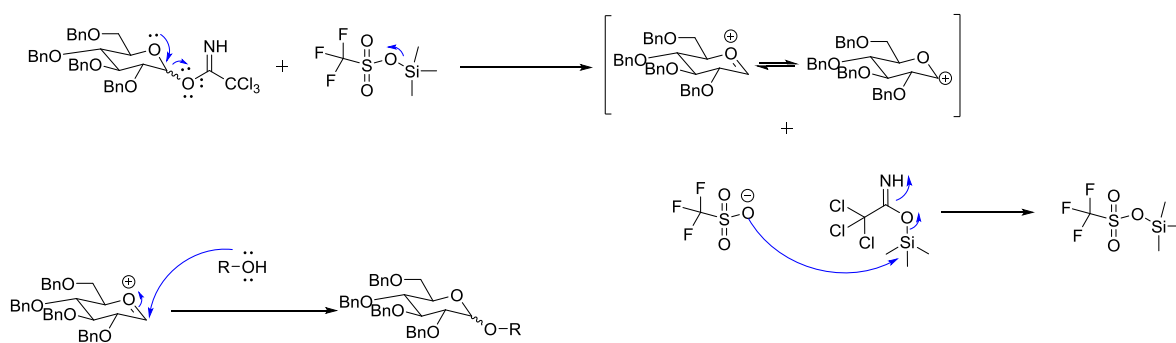
Esquema 14. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del imidato

Al utilizar como base débil el K_2CO_3 , antes de que se produzca el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo anomérico sobre el tricloroacetnitrilo, tiene lugar una mutarrotación. De esta forma el anómero β se obtiene preferentemente ya que el grupo hidroxilo en la posición ecuatorial β , es más nucleofilo que en la posición axial (Esquema 15).



Esquema 15. Dependencia del tipo de base y el control de reacción establecido

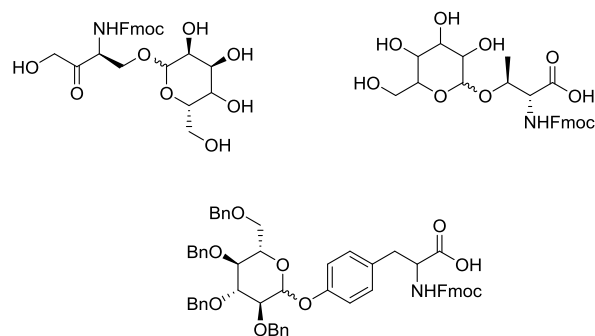
La activación de este tricloraacetimidato en posición anomérica se lleva a cabo mediante tratamiento con un ácido de Lewis, TMSOTf (Esquema 16). Normalmente sigue un mecanismo de reacción S_N2 con inversión en la configuración en el centro anomérico, aunque si nos encontramos con grupos protectores tipo éster en la posición 2 del dador glicosílico, la reacción podría darse mediante un mecanismo S_N1 .



Esquema 16. Mecanismo de reacción glicosidación. Método del tricloraacetimidato⁷¹

La utilización de grupos bencilos como grupos protectores, el empleo de TMSOTf como promotor y la base utilizada (DBU o K_2CO_3), para intentar controlar todos los parámetros y poder llevar a cabo la formación del anómero α , no fueron suficientes para poder controlar la estereoquímica y durante la síntesis se obtuvieron ambos anómeros (figura 23).

⁷¹ R. R. Schmidt and W. Kinzy, "Anomeric-Oxygen Activation for Glycoside Synthesis: The Trichloroacetimidate Method," *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 50 (1994), 21-123.



Glicosidos derivados de aminoácidos.

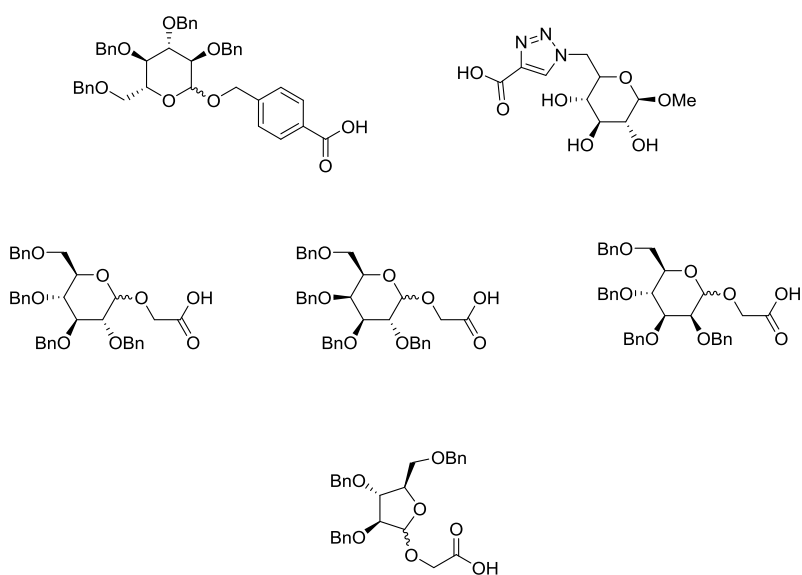
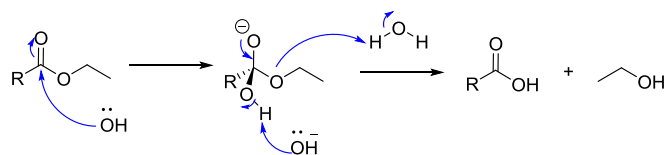


Figura 23. Glicosidos sintetizados durante este trabajo.

4.1.5.2. DESPROTECCIÓN DE LOS ESTERES ETÍlicos DEL FRAGMENTO GLICOSÍDICO.

Como se describió anteriormente la naturaleza de este enlace es lábil a los ácidos. Esta reacción es llevada a cabo mediante hidrólisis básica del grupo éster con LiOH en THF/H₂O como disolventes, adecuando esta desprotección a la naturaleza del fragmento glicosídico (Esquema 17).



Esquema 17. Mecanismo de desprotección esteres etílicos.

4.1.5.3. DESPROTECCIÓN DE ALILOS.

La metodología sintética seguida para llevar a cabo eliminación de estos grupos protectores, fue puesta a punto en nuestro grupo de investigación por la Dra. Ana M. Pérez López durante la síntesis del transportador molecular poliarginina R₈, mediante el uso de Pd(0) como catalizador soportado sobre

nanocápsulas.⁷² Esto permitió una desprotección, limpia, rápida, y aplicable hacia diversos tipos de ácidos, utilizando DCHT como ligando y fenilsilano como nucleófilo en THF/H₂O como disolventes en proporción 9:1

4.1.5.4. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO GLICOSIDICO EN FASE SÓLIDA.

Se llevaron a cabo numerosos estudios de reactivos de acoplamiento para que tuviese lugar un acoplamiento efectivo. Para ello se estudió el uso de los reactivos COMU/OXIMA/DIPEA en distintas proporciones. Al cabo de dos horas la reacción no tenía lugar (proporciones 3:3:6), o no se llevaba a cabo al 100% (3.9:4:8). Por tanto se decidió usar condiciones más drásticas y usar solo COMU y DIPEA pero la reacción no tenía lugar. Se formaron productos secundarios como el mostrado en a continuación (figura 24), capaz de dar mediante el test cualitativo de detección de aminas primarias un falso negativo.

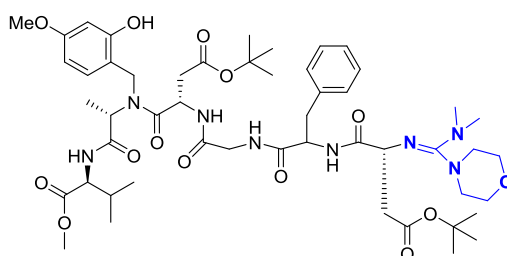
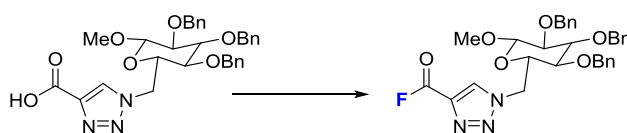


Figura 24. **Productos secundario formado**

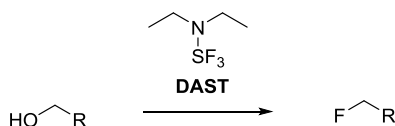
También se intentó poner a punto este acoplamiento con los reactivos HOBt /DIC, en microondas, pero no obtuvimos resultado, con lo que se decidió llevar a cabo la estrategia de formación de glicósidos derivados de flúor para hacerlos más reactivos (Esquema 18).



Esquema 18. **Formación de derivado de flúor para estudiar la reactividad**

Para llevar a cabo la síntesis de este derivado, se utilizaron distintas condiciones de reacción, utilizando como reactivo trifluoruro de (dietilamino) azufre (DAST) o trifluoruro de [di(metoxietil)amino] azufre (DEOXOFLUOR®) (Esquema 19).

⁷² Ana M. Pérez-López et al., "Synthesis of L-Octaarginine through Microencapsulated Palladium-Catalyzed Allyl Ester Deprotection," *Synlett* 25, no. 16 (2014), 2319-2322.



Esquema 19. DAST para la formación de derivados de fluor.

Se llevó a cabo la reacción con el carbohidrato derivado pero a la hora de llevar a cabo el acoplamiento con el residuo peptídico en fase sólida, este no tenía lugar, con lo que finalmente se utilizaron condiciones de reacción con los reactivos de acoplamiento HATU/HOAt /DIPEA, para activar en condiciones normales el grupo carboxílico, y tuvieron lugar finalmente con las proporciones 3.9:4:8 respectivamente. Los acoplamientos se llevaron a cabo bajo estas condiciones.

4.1.5.5. HIDROLISIS DEL PÉPTIDO ANCLADO A LA RESINA.

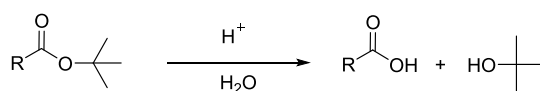
Esta etapa de cleavage, de liberación del péptido de la resina, es una etapa condicionante debido a que en la mayoría de los casos desprotege simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos. Por tanto, su elección debe ser a conciencia, ya que puede conllevar tanto a la disminución del rendimiento final de obtención del compuesto, por la formación de numerosos productos secundarios no deseados, como a la complicación durante el proceso de purificación.

Los péptidos sintetizados usando la estrategia de síntesis Fmoc/tBu pueden ser hidrolizados usando ácidos débiles, como el ácido TFA. Consecuencia del uso de ácidos es la presencia en el medio de potentes electrófilos, especies alquilantes. Estas pueden ser responsables de la alquilación de residuos especialmente susceptibles, por ello para disminuir esto en lo máximo posible, la hidrólisis es casi siempre llevada a cabo en presencia de "scavengers". Así, el proceso de liberación del péptido sintetizado desde la resina se llevó a cabo usando una mezcla de TFA/DCM/TES. El trietilsilano (TES) neutraliza los carbocationes formados como consecuencia de la hidrólisis y que podrían alterar la estructura del péptido final.

4.1.5.6. DESPROTECCIÓN GRUPOS PROTECTORES SECUENCIA PEPTÍDICA

Los grupos protectores de la secuencia glicopéptica que quedan en la secuencia una vez hidrolizada del soporte sólido son tBu y los grupos bencilo que protegen los grupos hidroxilo de los fragmentos de carbohidrato.

El mecanismo de la hidrólisis ácida de los ésteres de t-Bu se inicia con la protonación del éster. El intermedio resultante experimenta una ruptura heterolítica generando un carbocatión t-Bu, relativamente estable, que en medio acuoso se transforma en t-BuOH (Esquema 20).



Por tanto una vez desanclado el péptido o glicopéptido de la resina, se llevó a cabo la desprotección en solución de los grupos tBu, mediante un cocktail TFA/TES/DCM, al 45% de TFA. Se utilizó TES para neutralizar los carbocationes formados como consecuencia de la hidrólisis y que podrían alterar la estructura del péptido final.

4.1.5.7. HIDROGENACIÓN CATALÍTICA

Esta es la última reacción para obtener el glicopéptido objetivo, en la que se da la desprotección de los grupos bencilo del fragmento del carbohidrato.

Se llevó a cabo en un hidrogenador y hasta conseguir las condiciones idóneas, fueron utilizados distintos disolventes y reactivos:

TFA/H₂O, durante 24h con nanocápsulas de Pd, que no tuvo lugar.

Uso de MeOH como disolvente, con nanocápsulas de Pd.

Pd sobre carbón activo, daba lugar a la formación de ésteres metílicos en la secuencia peptídica desprotegida.

Así las mejores condiciones encontradas, para llevar a cabo la desprotección fueron el uso de dioxano /H₂O como disolvente y como reactivos HCl al 37% y Pd soportado sobre carbón activo en proporciones catalíticas, a una presión de 70 PSI.

4.1.5.8. PURIFICACIÓN SPE

La purificación de péptidos y glicopéptidos se llevó a cabo mediante purificación en fase reversa con cartuchos de SPE. Los cartuchos usados son con relleno de base de sílica, que tienen un tamaño u otro dependiendo de la polaridad que se busque.

La elección de un cartucho viene determinada por el tipo de compuesto, y la cantidad de analito. La fase elegida debe presentar una gran afinidad tanto por los analitos a extraer como por las interferencias a eliminar. La elección de dicha fase permitirá definir una selectividad específica a los compuestos de interés así como una capacidad de carga suficiente para su completa adsorción. Se puede buscar la retención del analito de interés para separarlo de las impurezas, las cuales no quedarían retenidas, como buscar que las impurezas queden retenidas y que sean los analitos de interés lo que no se retengan.

Durante este trabajo se usaron dos tipos de cartuchos C18 y C8 (figura 25), siendo el criterio de elección, según la hidrofilia de nuestros compuestos y de las impurezas que los acompañaban. Las C18, son las más hidrofóbicas. Estas son capaces de retener en su estructura compuestos no polares. Mientras que

las C8 tiene unas propiedades similares a C18, con la diferencia de que no tienen compuestos no polares debido a su corta cadena hidrocarbonada.

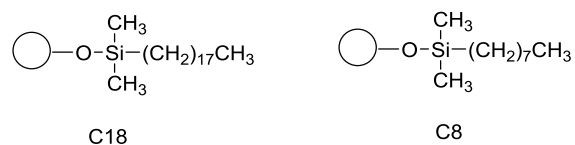


Figura 25. Tipo de relleno de cartucho

Una vez elegido el tipo más adecuado según la cantidad de compuesto a purificar se escoge el tamaño oportuno, sabiendo que para determinar la cantidad de fase es necesaria para asegurar la extracción completa. La capacidad de un cartucho se corresponde aproximadamente a un 5% de la masa de fase que contenga ese cartucho. Como disolvente se utilizó un gradiente de H₂O/acetonitrilo.

Una vez llevado a cabo el proceso de purificación y tras ser analizado por HPLC y determinado por LCMS, se procedió a la evaporación de disolvente y posterior liofilización del compuesto esperado, el cual fue de nuevo caracterizado por ESI-TOF y HPLC.

Después de todo este proceso los productos son guardados en viales sellados, en un congelador de -48°C.

4.2. ENSAYO DE AFINIDAD STD

4.2.1. STD (SATURATION TRANSFER DIFFERENCE)

La función biológica de una proteína depende de su interacción con una molécula ligando. Para entender las funciones biológicas es preciso conocer los fundamentos a nivel atómico sobre el reconocimiento de la proteína y ligando.

Han emergido nuevas técnicas espectroscópicas como poderosas herramientas para entender los procesos de unión a nivel molecular y utilizarlas como métodos de identificación de nuevas sustancias bioactivas. El conocimiento de los principios en los que se basan las interacciones biológicas proteína-receptor, permiten el desarrollo de potentes sustancias como candidatas para su uso como fármacos.

Teóricamente todos los parámetros espectroscópicos quizás sirvan como medida de la capacidad de unión entre un ligando y una proteína, pero en la práctica, sin embargo, solo los parámetros que pueden ser obtenidos de manera sencilla y con una alta sensibilidad son significativos. Como por ejemplo, las variaciones en el desplazamiento químico, los cambios en los tiempos de relajación, la variabilidad en las constantes de difusión, cambios de NOE's, o intercambio de saturación, sirven como medidas de capacidad de unión. En general existen dos aproximaciones experimentales.

. La primera se centra en el uso de señales de RMN del ligando y normalmente utiliza el efecto NOE entre la proteína y el ligando.

. La segunda, se basa en los cambios en el desplazamiento químico, de la proteína diana sobre la unión del ligando. Estas dos aproximaciones son complementarias y tienen distintas ventajas, mientras otras aproximaciones utilizan los cambios de comportamiento del ligando en la relajación o difusión sobre la unión a la proteína⁷³.

Para estudiar la afinidad de los compuestos sintetizados con la proteína GST-PDZ se han utilizado experimentos STD-NMR, que están basados en el Efecto Nuclear Overhauser (efecto NOE) y en la observación de la señal de resonancia del ligando. Esta es una fuente esencial de información estructural. Se basa en la observación del cambio de intensidad de la señal de resonancia de un núcleo debido a la transferencia de la magnetización, a través del espacio, de un spin a otro. Es una interacción dipolo-dipolo y como tal, depende de la distancia, por tanto señales debidas a protones situados a más de 5 Å de distancia serían difíciles de observar ya que proporcionan una señal demasiado débil.

Esta técnica ha sido usada durante años para caracterizar la estrecha unión entre el ligando y un complejo receptor, en nuestro caso la proteína GST-PDZ. Si un ligando muestra dos señales diferentes debido a un lento intercambio entre su estado libre y en el que se encuentra unido a la proteína, es

⁷³ Bernd Meyer and Thomas Peters, "NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors," *Angewandte Chemie International Edition* 42, no. 8 (2003), 864-890.

posible una transferencia de saturación entre ambos estados. Así, mediante esta técnica, las señales del ligando libre, y las señales del ligando unido, pueden ser identificadas mediante irradiación selectiva.

La técnica se lleva a cabo en solución en tubos de RMN de alta calidad, y se basa en la saturación de la proteína, mediante señales de irradiación selectivas hacia ella, esto quiere decir, que si el ligando que se encuentra en estado libre llega a unirse a esta, ocurre un intercambio de saturación, cuya señal es detectada, mediante un espectro de resonancia.

Por tanto, La proteína receptora es saturada mediante un pulso de saturación selectivo. En general, los pulsos de saturación consisten en una cascada de pulsos conformados de Gauss (Gauss-shaped). La duración en los tiempos de saturación normalmente se encuentran en el rango de 1-2segundos.El ligando es normalmente usado aproximadamente en un exceso 100molar sobre la proteína, dando lugar a que sean usadas bajas concentraciones de proteína, en el rango de los μM . El espectro de resonancia que se obtiene mediante esta técnica se trata de una resta entre el espectro de unión entre la proteína-ligando y el ligando libre, dando lugar por tanto a un espectro de RMN en el que únicamente las señales del ligando que reciben transferencia de saturación desde la proteína (vía difusión de spin del efecto NOE), son las que permanecen. Otras moléculas que permanecen en la solución, pero no se han unido a la proteína, presentaran la misma intensidad de señal en los espectros de resonancia on y off, con lo que como consecuencia, cuando se realiza la substracción de ambos espectros no aparecerán señales referentes a dichas moléculas (figura 1). Así, la diferencia en la intensidad debido a la transferencia de saturación puede ser cuantificada y constituye una indicación de la unión⁷⁴.

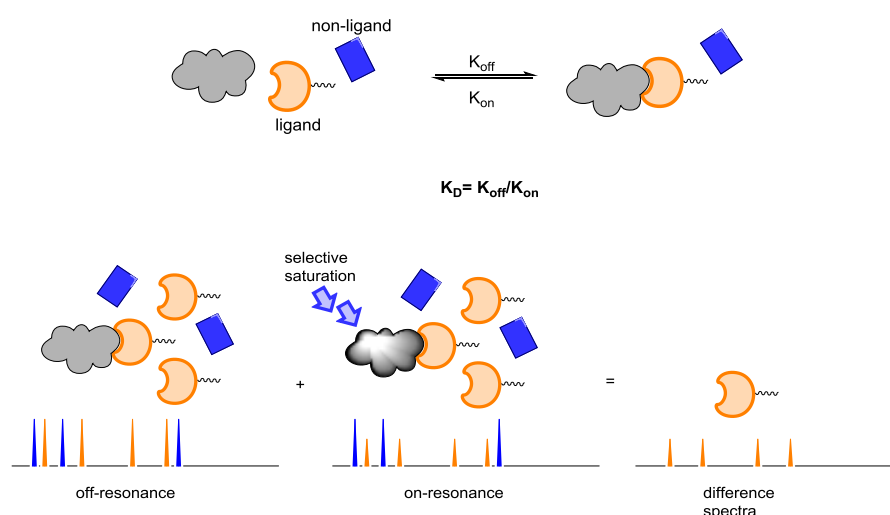


Figura 1. Espectros de resonancia on/off y STD.

La sensibilidad de los experimentos de STD, dependen de la eficiencia y la saturación selectiva de la señal de resonancia de la proteína, donde la resonancia del receptor (proteína) de un gran peso

⁷⁴ Aldino Viegas et al., "Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding," *Journal of Chemical Education* 88, no. 7 (2011), 990-994.

molecular, se satura en un corto espacio de tiempo, mientras la resonancia del ligando (péptido y derivados peptídicos) de pequeño peso molecular se perturba mínimamente⁷⁵.

Así durante el transcurso de este proyecto se ha optimizado esta metodología, ya puesta a punto durante la tesis doctoral de Dra. Ana María Pérez López (Universidad de Granada, 2010), para determinar la capacidad de interacción entre nuestros compuestos (propuestos como neurofármacos) y la proteína (dominio GST-PDZ de la nNOS) y su control negativo GST. La obtención de estos dominios fue llevada a cabo por los profesores Rafael Salto González y M.Dolores Girón González (Departamento de Biología y Bioquímica Molecular II, Universidad de Granada).

4.2.2. ESPECTROS STD

Las señales correspondientes a los protones de los azúcares en el caso de los glicopéptidos no se pueden observar claramente, ya que debido a su desplazamiento químico han quedado suprimidas junto con la señal del agua.

Como se puede observar en los espectros de STD la diferencia de intensidad de los espectros on y off se encuentra entre unas 10-200 veces menos que la intensidad del H-RNM de referencia.

4.2.2.1. EXPERIMENTO GST-PDZ y LSG-379

Después de la realización de la supresión de la señal de agua, realizar el H-RNM de la muestra y el barrido de radiación para determinar el punto de irradiación, se decide irradiar selectivamente a 5.88ppm.

Como señales, de interacción, a destacar se encuentran la debida a la cadena lateral aromática de la fenilalanina y el grupo metilo de la valina (Figura 2).

⁷⁵ Youlin Xia et al., "Clean STD-NMR Spectrum for Improved Detection of Ligand-protein Interactions at Low Concentration of Protein," *Magnetic Resonance in Chemistry* 48, no. 12 (2010), 918-924.

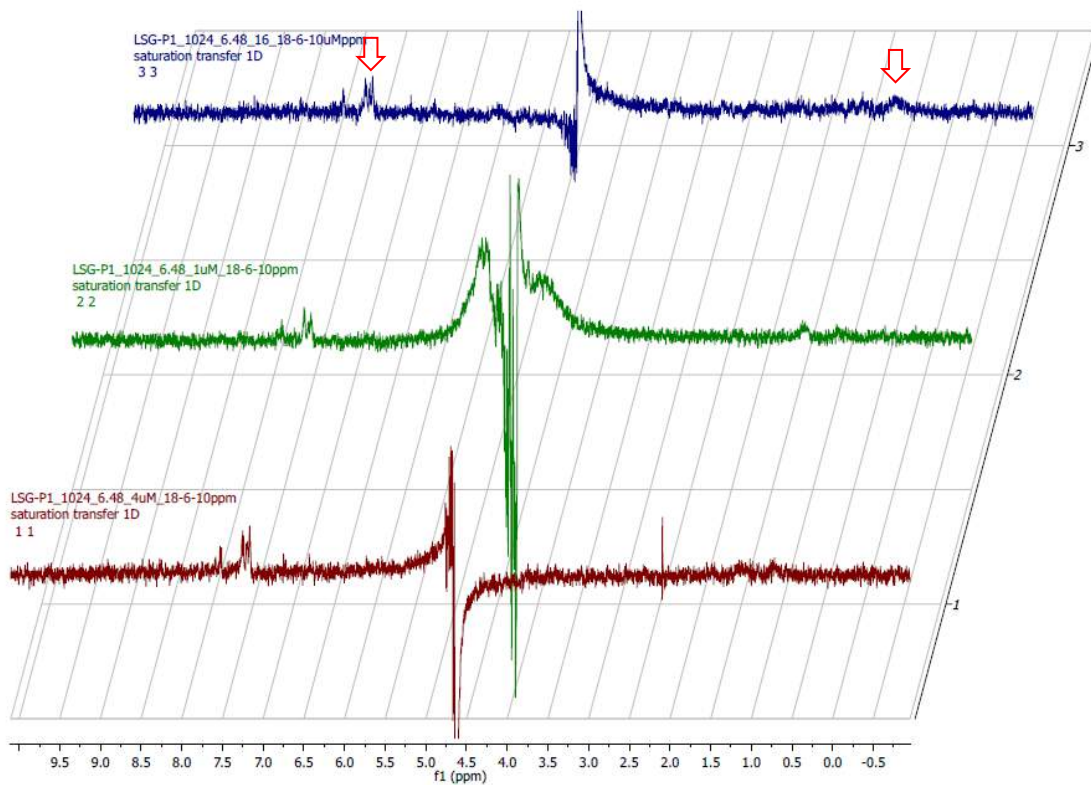
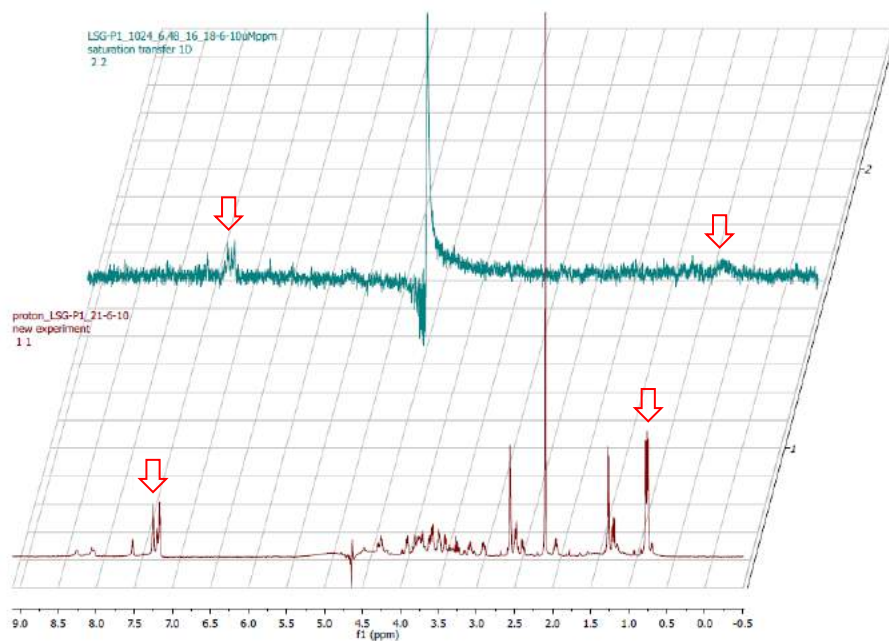
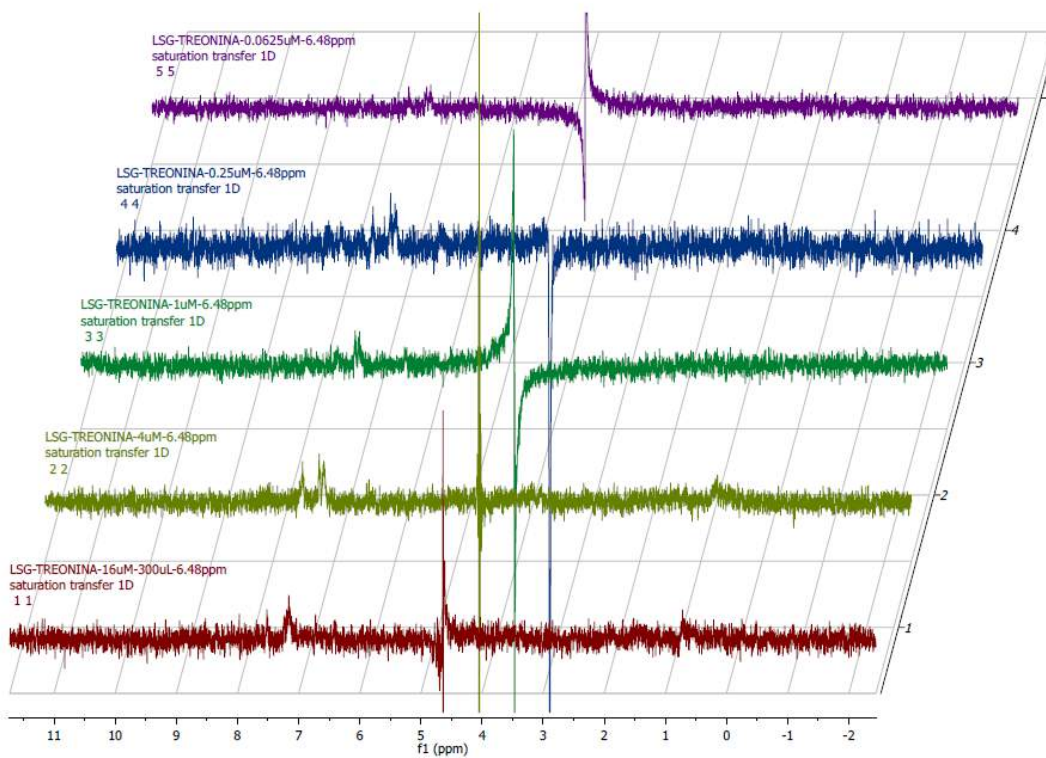
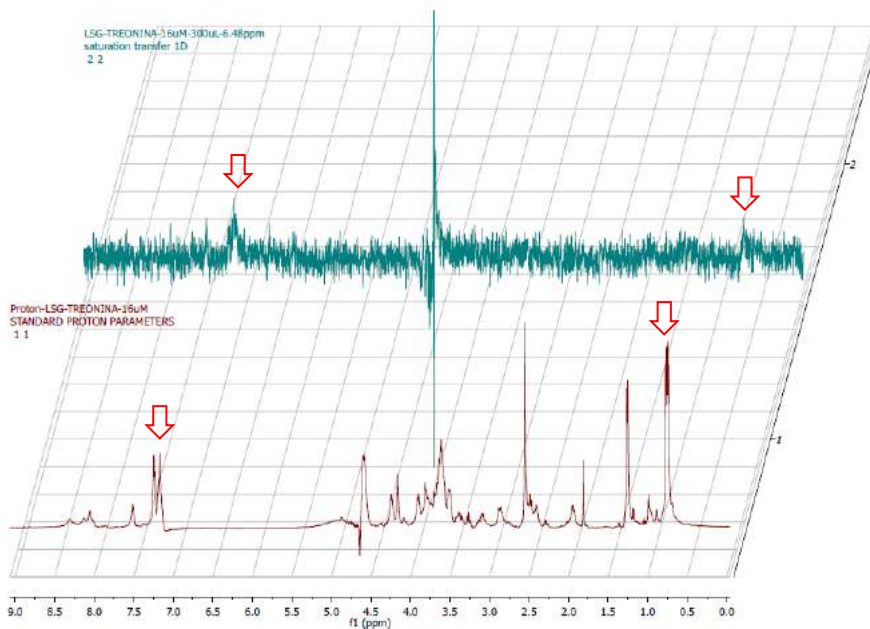


Figura 2.Experimento STD

Los experimentos se han llevado a cabo con el control positivo GST-PDZ a concentraciones de proteína 16uM, 4uM y 1uM. Observándose señales debidas a la interacción entre la proteína y nuestro ligando, en las zonas correspondientes al residuo de fenilalanina [$\delta = 7.3-7.2\text{ppm}$ (dd,2H,Ar,Phe) y $7.2-7.1$ (d,2-H Ar-Phe),t,1H,ArPhe)] y a la valina (0.75ppm,dd 6H,CH₃).

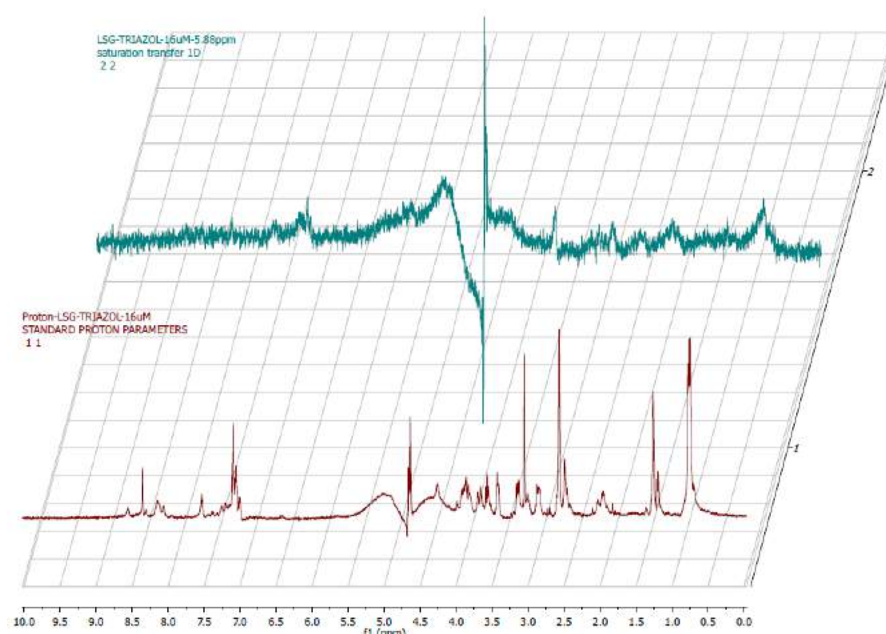
4.2.2.2. EXPERIMENTO GST-PDZ y LSG-383

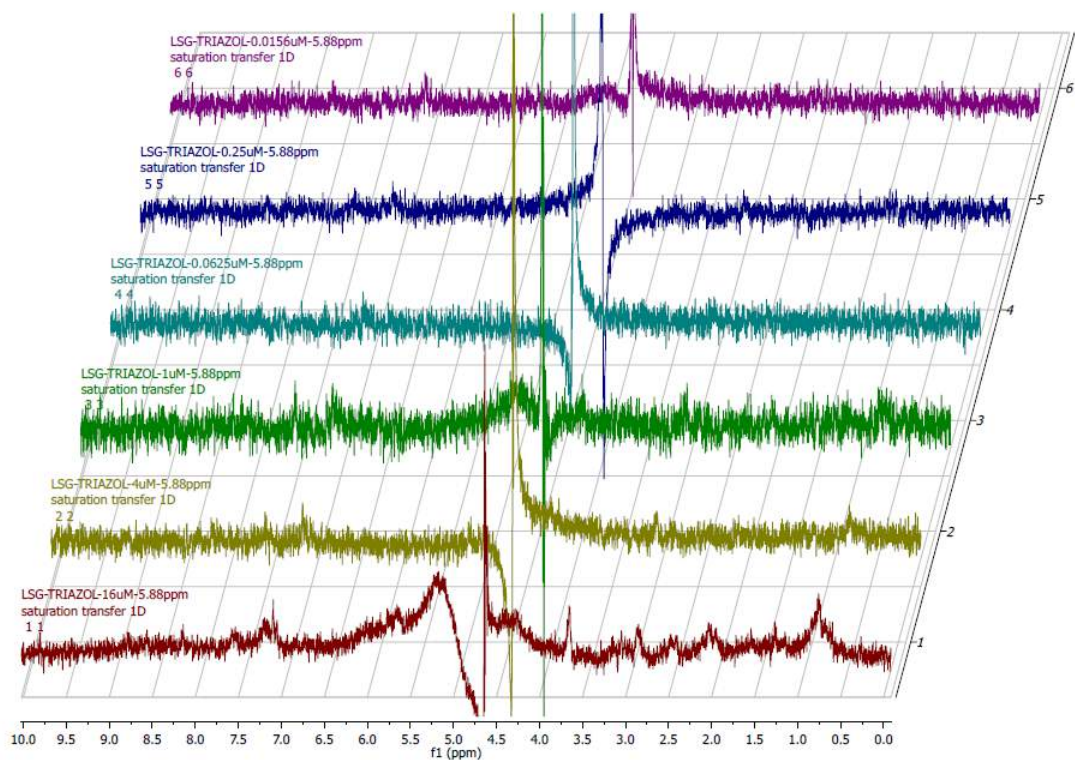
Después de la realización de la supresión de la señal de agua, realizar el H-RMN de la muestra y el barrido de radiación para determinar el punto de irradiación, se decide irradiar selectivamente a 6.48ppm



Los experimentos se han llevado a cabo con el control positivo GST-PDZ a concentraciones de proteína 16 μ M, 4 μ M, 1 μ M, 0.25 μ M y 0.0625 μ M. Se observan señales debidas a la interacción entre esta y nuestro ligando, en las zonas correspondientes al residuo de fenilalanina [δ =7.3-7.2ppm (dd,2H,Ar,Phe) y 7.2-7.1(d,2-H Ar-Phe),t,1H,ArPhe)] y a la valina (0.75ppm,dd 6H,CH₃).

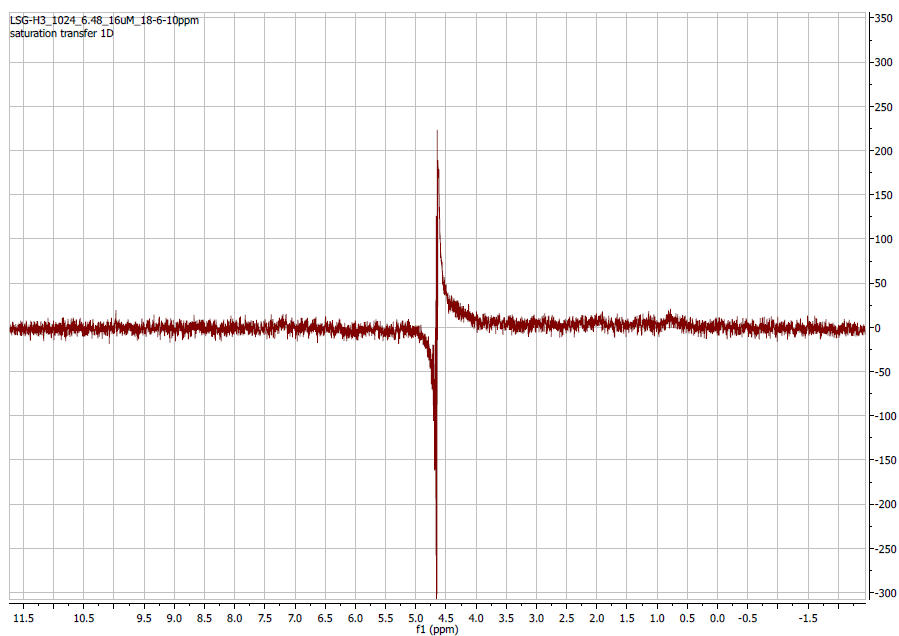
4.2.2.3. EXPERIMENTO GST-PDZ y LSG-371





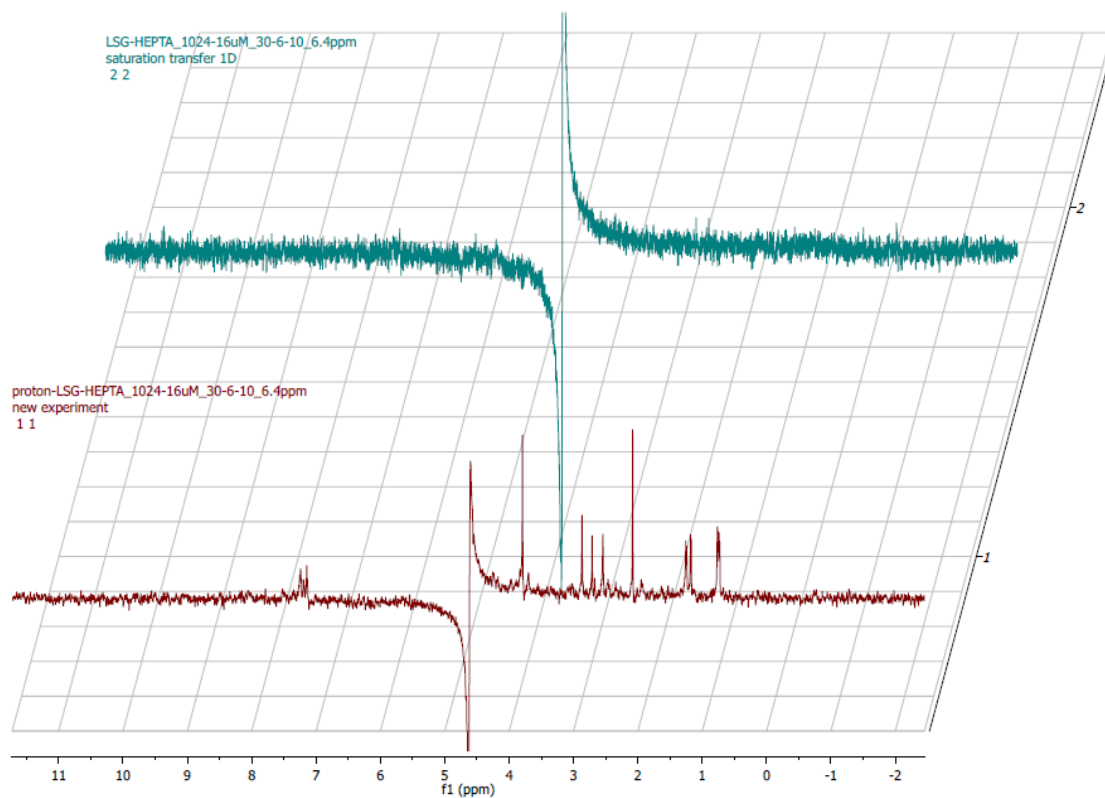
Los experimentos se han llevado a cabo con el control positivo GST-PDZ a concentraciones de proteína 16 μ M, 4 μ M, 1 μ M, 0.25 μ M y 0.0625 μ M. Se observan señales debidas a la interacción entre esta y nuestro ligando, en las zonas correspondientes al residuo de fenilalanina [δ =7.3-7.2ppm (dd,2H,Ar,Phe) y 7.2-7.1(d,2-H Ar-Phe),t,1H,ArPhe)] y a la valina (0.75ppm,dd 6H,CH₃).

4.2.2.4. EXPERIMENTO GST-PDZ y LSG-H3



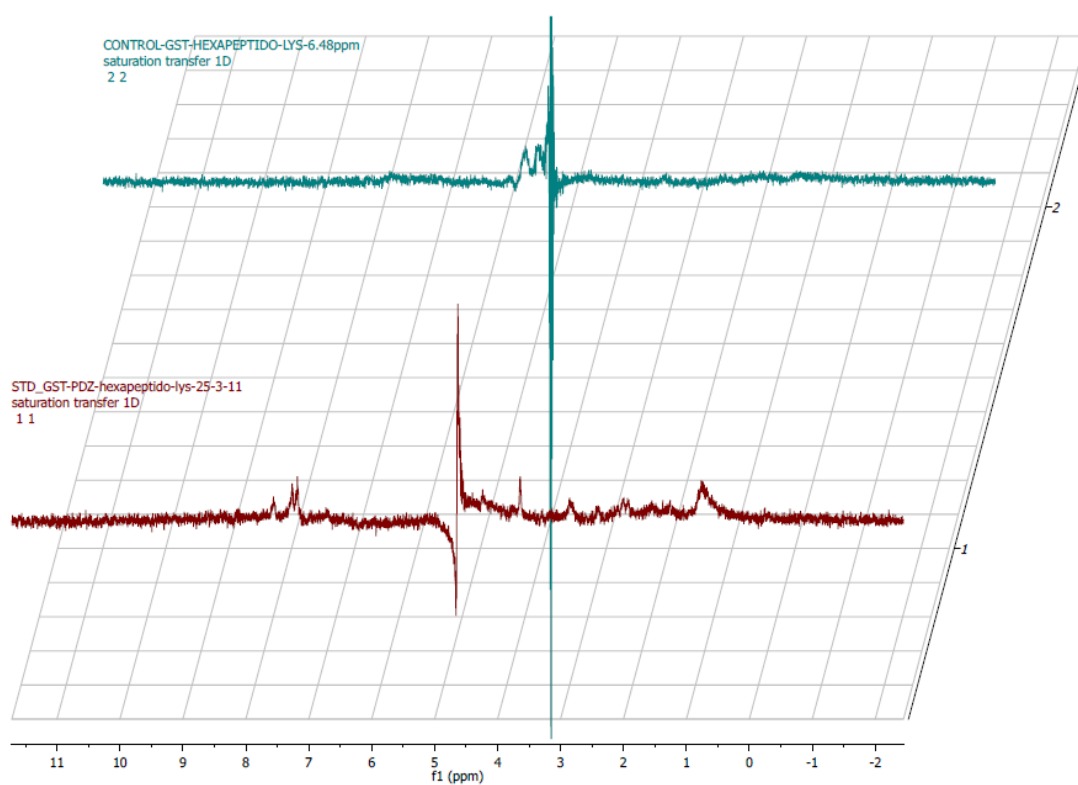
El experimento se ha llevado a cabo con el control positivo GST-PDZ a una concentración de proteína 16 μ M sin observar señales debidas a posibles interacciones.

4.2.2.5. EXPERIMENTO GST-PDZ y LSG-HEPTAPEPTIDO-SERINA



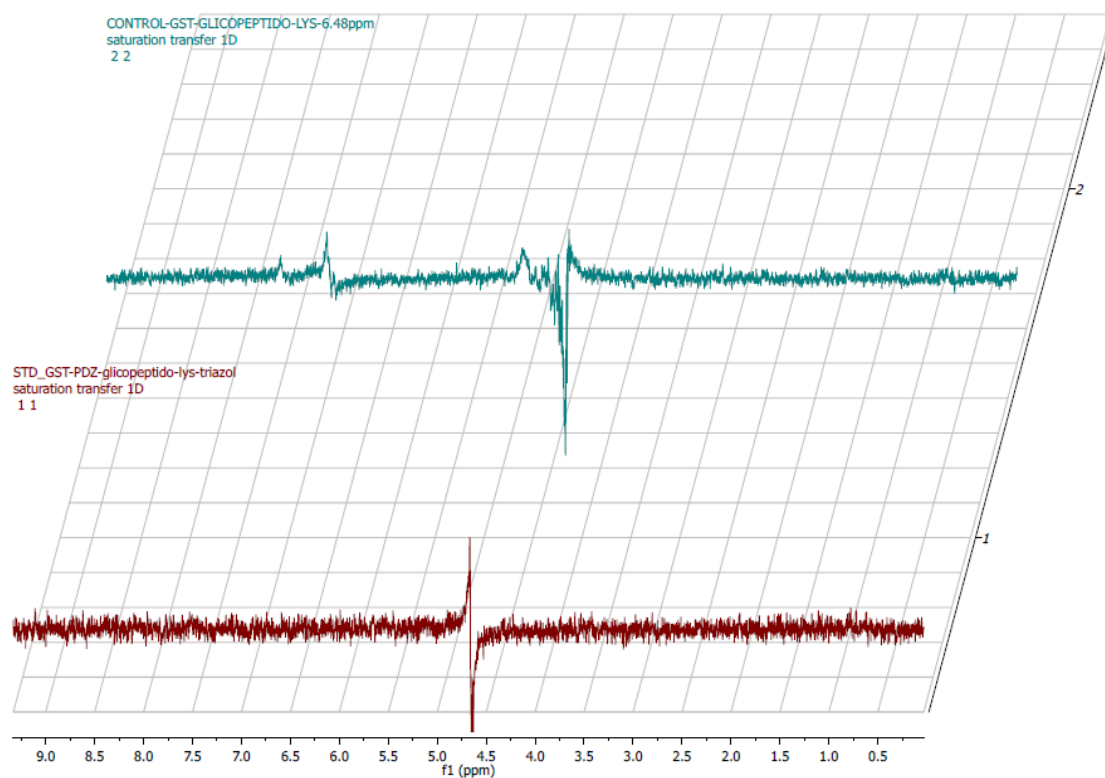
El experimento se ha llevado a cabo con el control positivo GST-PDZ a una concentración de proteína 16 μ M sin observar señales debidas a posibles interacciones.

4.2.2.6. EXPERIMENTO GST-PDZ y GST CON LSG-HEXAPEPTIDO LYS



El experimento se ha llevado a cabo con el control positivo GST-PDZ (espectro inferior) a una concentración de proteína 16 μ M observando señales debidas a posibles interacciones en las zonas de la fenilalanina y la valina, mientras que al realizar un control con la proteína de GST se obtiene un espectro de control negativo, que indica que no existen posibles interacciones entre este ligando y GST.

4.2.2.7. EXPERIMENTO GST-PDZ y GST CON LSG-GLICOPEPTIDO-LYS



En este caso, el experimento se ha llevado a cabo con el control positivo GST-PDZ (espectro inferior) a una concentración de proteína 16 μ M no observándose señales debidas a posibles interacciones mientras que al realizar un control con la proteína de GST (de control) se obtiene un espectro que indica que posibles interacciones entre este ligando y GST en las zona del espectro correspondiente a la fenilalanina.

4.3. ENSAYO DE EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA (SPR)

Estos estudios se realizaron en un instrumento SPR BIAcore propiedad de la empresa GE Healthcare. La manipulación del instrumento y búsqueda de condiciones adecuadas para llevar a cabo los experimentos fue llevada a cabo por personal especializado perteneciente la empresa. En esta tesis se realiza un análisis de los resultados obtenidos.

4.3.1. SPR (SURFACE PLASMON RESONANCE)

Esta técnica es una poderosa herramienta que nos permite cuantificar la interacción de una elevada variedad de biopolímeros con diferentes ligandos. Es empleada en distintas áreas para el descubrimiento de fármacos, caracterización de anticuerpos, proteómica, inmunogenética y aplicaciones en investigación en numerosas campos dedicados a las ciencias de la vida. A su vez, utilizada para análisis de alimentos, en la industria farmacéutica y por numerosas compañías dedicadas a la biotecnología.

Nos da información de unión, especificidad, afinidad, cinética y concentración, sin necesidad de marcar químicamente los compuestos para poder llevar a cabo su detección.

Esta técnica permite obtener información en tiempo real incluso sobre crudos de muestras, sin necesidad de que las muestras sean de elevada pureza.



Figura 1. Aparato de SPR Biacore™ y chip CM4

El sistema consta de un haz de luz polarizada que incide en un prisma, golpea una superficie de oro conductora, que se encuentra entre diferentes medios de refracción:

- . Un cristal, sensor de superficie, con elevando índice de refracción.
- . Un buffer, de bajo índice de refracción.

La luz atraviesa el prisma y la lámina, refracta sobre la superficie de oro y regresa a través del prisma al detector. Por tanto, los cambios detectados en el ángulo de refracción o en la longitud de onda que da la señal, son proporcionales al volumen de biopolímero unido cerca de la superficie. Un campo eléctrico intenso, conocido como onda evanescente, se genera cuando la luz golpea el cristal, este interactúa con los electrones (nube electrónica en la superficie de oro), generando cargas electrónicas densas denominadas plasmones, que generan una disminución en la intensidad de luz reflejada. La definición de plasmón se debe a los electrones que se encuentran en la película metálica.

La superficie de oro permite modificaciones estructurales mediante diferentes kits, para poder obtener una unión específica, según la naturaleza de las moléculas con las que estemos trabajando, con lo que permite una enorme versatilidad.

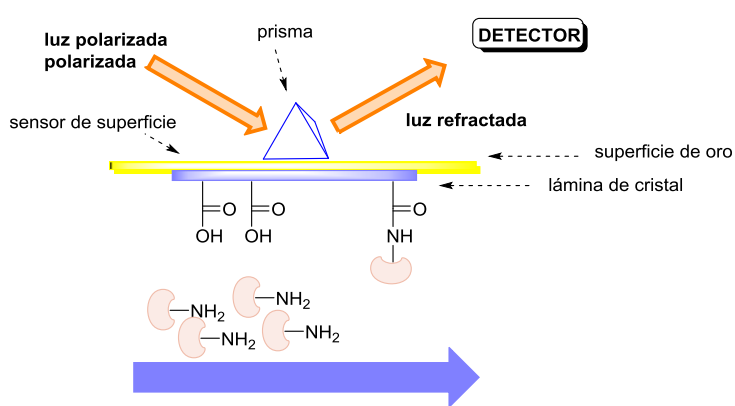


Figura 2. Representación esquemática del funcionamiento de la técnica SPR

Los electrones absorben la luz y generan un campo electromagnético que se genera a lo largo de la superficie del chip. Así cuando el péptido se une a la proteína, el ángulo de refracción cambia produciendo una variación en función del tiempo. A su vez ocurre un cambio en la masa del chip, debido a la formación del complejo proteína-ligando, que da lugar al cambio en el índice de refracción. Esta información se refleja en un gráfico denominado sensograma que refleja la afinidad de unión en unidades RU frente al tiempo (figura 2).

Los cambios en la superficie de oro se detectan rápidamente debido a su sensibilidad, a la presencia de biomoléculas o en la fina capa de oro. La alta sensibilidad de la respuesta óptica se debe a que la excitación colectiva de los electrones conductores cerca de la superficie de oro es muy eficiente. La intensidad de la luz reflejada disminuye cuando incide sobre los plasmones.

El ángulo de refracción es proporcional a la cantidad de materia unida en la superficie mediante la unión al ligando. Si la longitud de onda y el ángulo ajustado son los correctos, una onda de electrones excitados (resonancia de plasmón) se produce sobre la superficie de oro cambiándose el ángulo de luz reflejada. Este ángulo es sensible a la composición de la capa unida a la superficie de oro y al cambio de masa producido por la unión y disociación del analito al ligando.

Con esta medida se obtiene en tiempo real la asociación y disociación de la interacción, consiguiendo a partir del sensograma una información cuantitativa.

Nosotros pretendemos cuantificar la interacción de la proteína-proteína en tiempo real sin uso de marcadores. Esta técnica nos permite la medida de la afinidad de unión entre la proteína GST-PDZ unida a la superficie del chip y un ligando en disolución en la fase móvil. Utilizamos una superficie de oro cubierta por una matriz de dextrano (CM4), produciéndose la unión mediante atracción de cargas ya que los carboxilos del dextrano aportarían las cargas negativas, mientras que los grupos amino de la proteína actuarían como sitios de anclaje. Esta técnica permite la medida de la afinidad de unión entre una proteína (GST-PDZ) unida a la superficie y un ligando en disolución. La proteína se une a una superficie de oro cubierta por una matriz de dextrano mientras que fluye a flujo constante sobre esta superficie la fase móvil que contiene el ligando llevándose a cabo la unión.

4.3.1.1. TIPOS DE UNIÓN DE LA PROTEÍNA SOBRE LA SUPERFICIE DE ORO DEL CHIP.

a) INMOVILIZACIÓN COVALENTE

Es la unión más comúnmente usada.

La química usada para este tipo de unión, es el acoplamiento de aminas, con NHS/EDC (1:1) con los grupos carboxilo, que da lugar a ésteres de succinimida. Dichos grupos funcionales son altamente reactivos con aminas primarias, que se encuentran en nuestros ligandos peptídicos produciéndose la unión tipo covalente (figura 3).

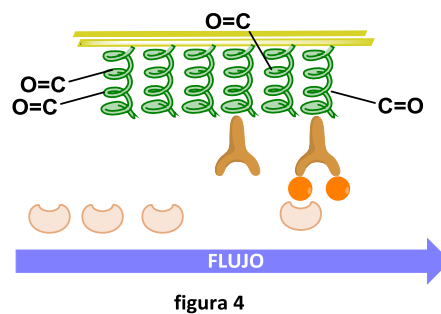
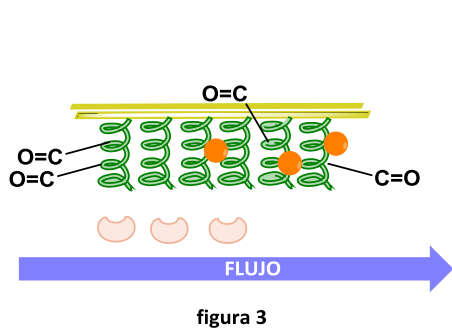
La succinimida sin reaccionar es neutralizada con etanolamina.

El flujo, como se observa en el esquema se encuentra invertido, para evitar problemas de acumulación/inmovilización por gravedad.

El problema de este método radica en la inmovilización de la proteína, ya que no nos permite orientarla y la unión es irreversible.

b) INMOVILIZACIÓN POR CAPTURA

Esta permite una unión reversible. Una de las ventajas es que nos permite orientar la proteína de forma correcta para que quede expuesta al ligando, mientras que la desventaja es que se inmoviliza menos proteína que de la forma covalente (Figura 4).



4.3.1.2. GENERALIDADES DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en un aparato de SPR Biacore™ X100, propiedad de la empresa GE Healthcare, durante una demostración por parte de personal especializado de la empresa, en las instalaciones del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

El material fungible utilizado para llevar a cabo los experimentos SPR (salvo las proteínas GST y GST-PDZ) fue financiado y gestionado por la empresa GE Healthcare.

4.3.1.2.1. CARACTERÍSTICAS PROTEÍNA GST-PDZ.

No se conoce el punto isoeléctrico de la proteína ya que es una proteína de fusión. Concentración de la proteína GST-PDZ = 1mg/ml, encontrándose el dominio PDZ en una concentración de 25uM.

Cantidad de proteína GST-PDZ usada = 10µg/ml

4.3.1.2.2. ANTICUERPO ANTI-GST

Anticuerpo usado = Anti-GST (30µg/ml)

El anticuerpo tiene dos sitios de unión, uno más fuerte y otro más débil, que se puede regenerar. Por tanto queremos bloquear la unión más fuerte con GST recombinante (KIT específico) y así evitar que la proteína quede unida de forma permanente, pudiendo reutilizar el chip para inmovilizar otra proteína GST.

4.3.1.2.3. BUFFER USADO

Tampón fosfato salino o buffer PBS (acrónimo de sus siglas en inglés, phosphate buffered saline)

4.3.1.2.4. CHIP USADOS

. **Sensor chip C1.** Este tipo de chips son usados cuando la interacción en solución es multivalente o muy fuerte.

Mantiene un amplio número de partículas tan cerca como le es posible de la superficie para mantener la sensibilidad. Reduce los efectos de avidéz a través de interacciones multivalentes. Es capaz de captar

en su superficie proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o pequeñas moléculas. Se acopla a grupos carboxilo en la superficie del sensor mediante los grupos -NH₂, -SH, -CHO, -OH o -COOH.

Este sensor no contiene una matriz en su superficie sino que se encuentra carboximetilado, lo cual le proporciona una baja capacidad de unión. Este tipo de unión permite que la interacción tenga lugar muy cerca de la superficie.

Estas características pueden ser muy beneficiosas cuando se trabaja con interacciones multivalentes, o moléculas grandes, complejos moleculares y partículas. Esta superficie también es muy útil para el uso de pocas interacciones que quizás sean afectadas por la presencia de dextrano.

. **Sensor chip CM4**, con matriz de carboximetil dextrano y nos ayudamos para la captura de la fijación del anticuerpo con GST (comercial).

Este tipo de sensor se usa cuando una muestra tiene elevadas cargas positivas. Mejora la sensibilidad cuando se monitorizan cierto tipo de interacciones. También se encuentra disponible para proteínas y ácidos nucleicos cargados negativamente. Es capaz de captar en su superficie, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o pequeñas moléculas. Y el acoplamiento a los grupos carboxilo del sensor se lleva a cabo mediante los grupos -NH₂, -SH, -CHO, -OH o -COOH.

La matriz de este está compuesta por dextrano carboximetilado covalentemente unido a la superficie de oro. Este tipo de matriz puede mejorar la sensibilidad en cierto tipo de interacciones. Debido a su reducida carga negativa (menor que la del chip CM5, con mayor carga de dextrano carboximetilado), es adecuado para el uso de moléculas cargadas negativamente.

4.3.1.2.5. FUENTE DE LUZ

Luz polarizada LED (NIR), aproximadamente a 670nm.

4.3.1.2.6. DETECTOR

Se trata de un detector diodo array, el cual mide la intensidad de luz reflejada.

El aparato consta de dos canales, en el canal 1 tenemos anticuerpo sin proteína, mientras que en el canal 2 tenemos anticuerpo con proteína. El ligando pasa por los dos canales, y el software resta la señal de cada canal, para ofrecernos la información.

4.3.1.2.7. LIGANDOS

Las disoluciones de analito se prepararon en el momento de llevar a cabo el experimento.

SAMPLE: LSG-18-03-a MW = 871.8421 AMOUNT: 0.1-0.3mg

SAMPLE: LSG-18-03-b MW = 842,8009 AMOUNT: 0.1-0.3mg

SAMPLE: LSG-18-03-c	MW = 947,9681	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-18-03-d	MW = 885,8687	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-18-03-e	MW = 622,6242	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-18-03-f	MW = 767,7807	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-18-03-g	MW = 723,7281	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-18-03-h	MW = 782,7920	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-01-04-a	MW = 717.2718	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-02-04-a	MW = 918.3495	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-03-04-a	MW = 860.4895	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-a	MW = 1011.4033	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-b	MW = 943.3658	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-c	MW = 927.3709	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-d	MW = 812.7749	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-e	MW = 842.3182	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-f	MW = 842.3182	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-g	MW = 1143.6427	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-h	MW = 905.9478	AMOUNT: 0.1-0.3mg
SAMPLE: LSG-2002-14-i	MW = 1005.5634	AMOUNT: 0.1-0.3mg

4.3.1.2.8. SENSOGRAMA

El sensograma muestra la respuesta óptica de unión (respuesta de unión en Unidades de Resonancia (RU)) frente al tiempo. (Grado del ángulo de desplazamiento)

Cuando ocurre un cambio en la masa cerca de la superficie del sensor (como resultado de la unión), cambia el ángulo de luz, por tanto varía el índice de refracción cerca de la superficie del sensor.

1 RU= 0.0001 desplazamiento en el ángulo SPR, lo cual equivale a $1\text{pg}/\text{mm}^2$ de molécula en la superficie.

Por tanto el tipo de información relevante que podemos extraer del sensograma es:

El grado de interacción (asociación, disociación o ambos) que a su vez nos permite obtener información de la cinética, la constante cinética y concentración de analito. La especificidad de unión, nos da información de las constantes de afinidad (para aplicaciones cuantitativas y /o semicuantitativas)

La determinación de la velocidad de reacción o cinética de la reacción, lo que se observa en el sensograma es la cinética de una interacción, como por ejemplo la velocidad de formación del complejo (K_a) y disociación (K_d). Si ocurre la unión de nuestros ligandos a la proteína GST-PDZ, la respuesta en el sensograma vendrá determinada por el incremento de la señal. Por tanto en este experimento, se determina la afinidad mediante la medida de la cinética, y el cálculo de la constante de disociación K_d (figura 5).



Figura 5. Constante K_d

Durante nuestro estudio se observó que teníamos respuesta concentración dependiente y perfil cinético. Al igual que heterogeneidad para la corrección, lo cual podía venir de la proteína que se podría estar uniendo al control negativo GST o a nuestro ligando.

4.3.2. ENSAYO

Lo primero que intentamos deducir es el tipo de unión al chip (tipo C1, sin dextrano, unido directamente sobre la superficie de oro) efectiva para llevar a cabo los experimentos (unión covalente o de captura).

La elección de este chip con un solo grupo carboxílico, se realiza para evitar interacciones no específicas a la superficie, debido a que algunos de nuestros ligandos son de naturaleza glicopeptídica. Mientras que los demás chip que contienen dextrano se utilizan para disponer de una matriz más hidrofílica, que aumenta la capacidad de unión del chip debido al incremento en el número de carboxilos.

Para ello realizamos una exploración del pH, hecho muy importante a tener en cuenta ya que el acoplamiento covalente no se puede repetir sobre la superficie del chip. Es muy importante evaluar la pre-concentración como estrategia de control de la inmovilización. Este se podría calcular a partir del punto isoeléctrico (P.I.) de la proteína GST-PDZ a utilizar, pero se trata de una proteína de fusión y por tanto no se conoce.

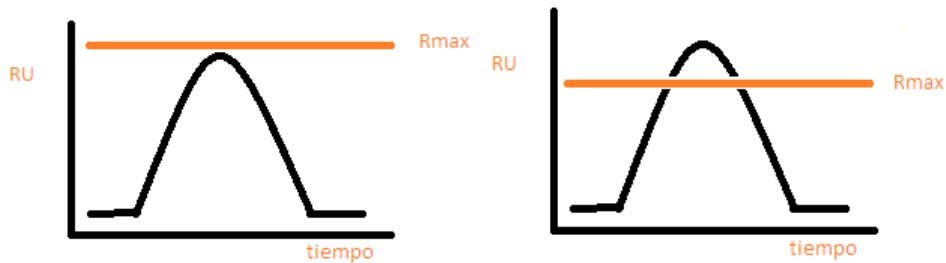
Así el pH óptimo para pre-concentrar = 0.5 -1 unidades de pH
└──────────┘
 Por debajo del P.I.

Así, mediante un pH scouting calculamos la Rmax (Respuesta Máxima), que tiene que tener un valor ≤ a 100 para que fuera efectivo una unión tipo covalente. Inyectando proteína diluida en Acetato de Etilo / buffer y determinando los parámetros de la siguiente ecuación:

$$R_{max} = (MW_{analito} / MW_{ligando}) \times R_L \times S_m \rightarrow \text{estequiometria (número de sitios de unión)}$$

↓
 Respuesta del ligando = cantidad inmovilizada de ligando

$$100 = (905 / 40100) \times R_L \times 1$$



Gráfica 1. Representación de Rmax.

La gráfica 1a, indicaría una Rmax óptima, calculada para un valor máximo de cantidad de ligando inmovilizado de entre unos 4500-5000, mientras que la gráfica 1b indicaría que la unión es no específica, que la estequiometría no es la correcta y/o que se han formado agregados.

Se quiso llegar a saturación con cada concentración con lo que cabía la opción de poner el flujo en 5µl/min o aumentar el tiempo de exposición del ligando. Se decidió poner 120 segundos de exposición.

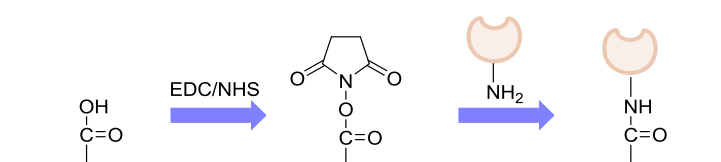
Para llevar a cabo el experimento, primero se activa el chip del sensor, mediante la activación de los grupos carboxilo a esteres activos durante 7 minutos. Esta activación del chip significa mantener una carga neta negativa durante el procedimiento de inmovilización, para pre-concentrar. Se intentó ionizar GST-PDZ a pH= 5.5 y 4 para llevar a cabo la fijación de este de forma covalente sobre el chip. Cuando se llevó a cabo este experimento, no se pudo llevar finalmente a cabo el cálculo del pH-óptimo, con lo que nos indicaba que el tipo de unión a realizar GST-PDZ-chip, no se podía llevar a cabo mediante unión covalente.

Por tanto según este ensayo la inmovilización se tenía que llevar a cabo mediante captura, sobre un chip tipo CM4 (con dextrano, aumenta el número de carboxilos disponibles y por tanto el ambiente hidrofílico). Esta tuvo lugar mediante la captura de proteína (inyección de 10µg/ml) durante 10 minutos de exposición, que llegó a capturar 918 ± 1000 (RL) que extrapolado en la ecuación anterior se

correspondía con un máximo de captura de 20.6, cuando el óptimo sería de 100 ($R_L = 5000$). Esto indicaba que nuestra señal iba a ser bastante pequeña y nos ofrece un pequeño rango de percepción, pero como primer experimento, nos era suficiente para realizar el ensayo.

Por tanto el proceso de captura puede resumirse en estos pasos:

- Pasar EDC/NHS + anticuerpo GST por los dos canales (7min + 5 min , respectivamente)
- Solución de etanolamina (pH=8.5) para llevar a cabo un capping mediante acilación. (7min)
- GST recombinante + regenerar con Glicina (pH= 2.1)
- Cambiar tampón (PBS+5%DMSO)
- Capturar la proteína.
- Interacción del ligando
- Lavar y regenerar el anticuerpo con Glicina, cada vez que se inyecta un ligando



Esquema 1

4.3.2.1. CORRECCIÓN DE LA CURVA DE DISOLVENTE.

Debido a la limitada solubilidad en agua del ligando, se incluyó un 5% de DMSO en el buffer de la solución móvil (PBS-P/5%DMSO). De acuerdo a esto, se prepararon unas alícuotas de esta usando 4.5% y 5.8% de DMSO en la solución tampón PBS-P, para preparar una curva de corrección del disolvente (tabla 1).

Tabla 1. Preparación de las soluciones de corrección de la curva de disolvente.

Buffer/Vial	2	3	4	5	6	7
4.5% DMSO	200	400	600	800	1000	1200
5.8% DMSO	1200	1000	800	600	400	200
Total volume	1400	1400	1400	1400	1400	1400

Las concentraciones de DMSO deberían cubrir un rango de aproximadamente -500RU a +1000RU relativas a la línea base de buffer correspondiente a 2% de DMSO. La curva de corrección de disolvente se muestra en la figura 6. Donde las líneas verticales marrones muestran el rango de respuesta de las muestras en la célula de referencia, mientras que el resto de la línea fuera de este rango fue extrapolada (línea azul) para realizar una buena corrección.

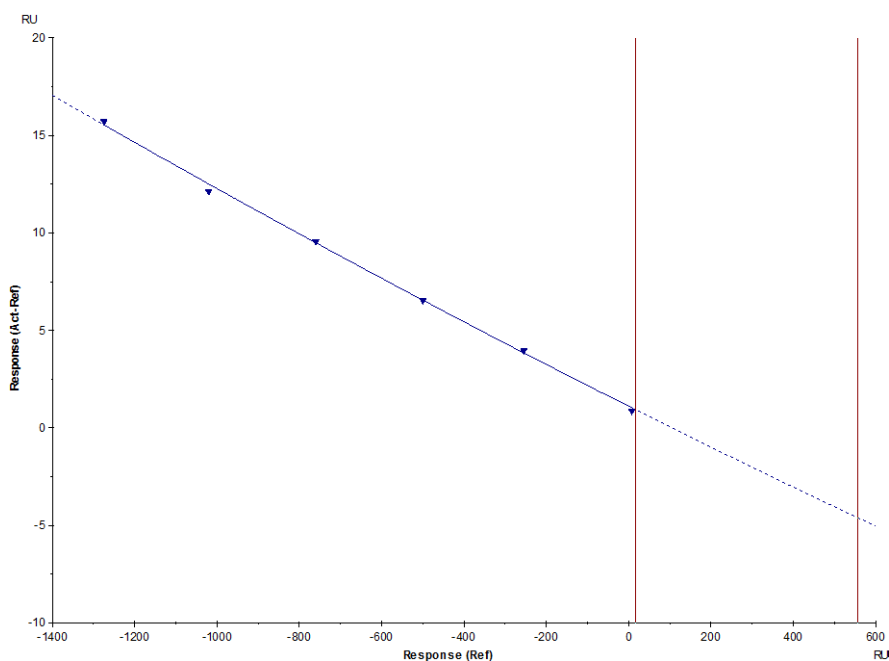


Figura 6. Curva de corrección del disolvente.

4.3.2.2. INMOVILIZACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-GST

El anticuerpo Anti-GST (GST Capture Kit, BR-10002-23) fue covalentemente inmovilizado sobre la célula de flujo de referencia del sensor Chip CM4 (de referencia BR-1005-39). La matriz de dextrano fue activada mediante una solución de EDC/NHS. El anticuerpo Anti-GST fue diluido a 30µg/ml en un buffer de inmovilización (10mM de acetato sódico pH 5.0) e inyectado sobre la superficie durante 5 minutos. El dextrano restante fue inactivado mediante la inyección de una solución de etanolamina 1M. El flujo de la solución durante la inmovilización fue de 10 µl/min. A esos niveles, la cantidad exacta de inmovilización del anticuerpo anti-GST no es crítica para la captura de proteínas de fusión GST. Este tipo de anticuerpo, contiene una fracción minoritaria de elevada afinidad, que es muy difícil de regenerar. Por tanto para evitar esa captura irreversible de proteína GST –PDZ en ese sitio, esta lugar de alta afinidad se bloqueó mediante GST recombinante, utilizando una inyección de GST-recombinante a 5 µg/ml en el buffer PBS-P+(28-9950-84) durante 3minutos, seguido de regeneración con una solución de glicina 10mM, pH 2.1, durante 2 minutos.

Los ensayos fueron llevados a cabo mediante el kit de acoplamiento de aminas BR-1000-50. (Figura 7)

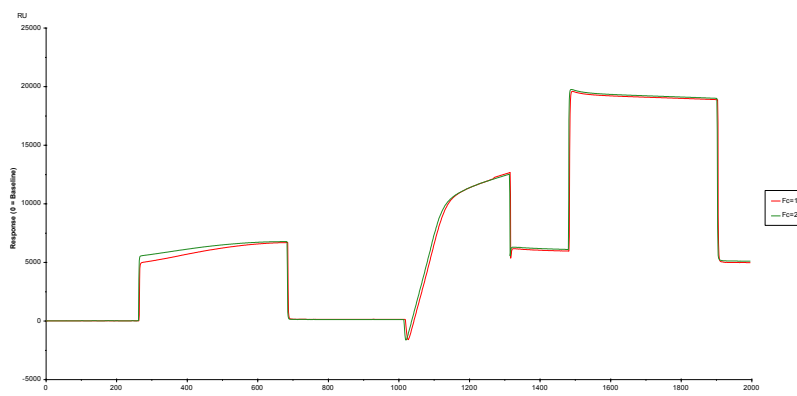


Figura 7. Inmovilización de anticuerpo Anti-GST sobre la superficie del sensor Chip CM4

4.3.2.3. ENSAYO DE AFINIDAD DEL PÉPTIDO VSPDFGDAV (LSG-2002-14-h)

La captura sobre la superficie de oro se realizará sobre el sensor chip CM4 de la proteína GST-PDZ que fue diluida en un buffer PBS-P+/5% DMSO a concentración 10 $\mu\text{g/ml}$, gradualmente cargado con una inyección de 10min a un flujo de 5 $\mu\text{l/min}$. El nivel de captura resultante fue de 640 RU.

Utilizamos como primer ligando de unión el compuesto VSPDFGDAV, cuya K_d se había determinado en literatura (0.1-0.2 μM), que fue usado como control positivo. Llevamos a cabo el estudio con concentraciones que iban desde 1 μM , 0.5 μM , 0.25 μM , 0.125 μM , 0.0625 μM preparadas sobre un buffer PBS-P+/5% DMSO, con el objetivo de realizar una gráfica y de ahí interpolar el valor exacto de K_d .

El sensograma que nos ofrece este ensayo destaca la siguiente información figura 8:

- . La estereoquímica no se corresponde con las proporciones 1:1.
- . Se observa bastante ruido de la línea base.
- . Junto con lo anteriormente comentado de que la R_{max} es de 20.6, se observa que se da unión, pero no podemos determinar una K_d exacta, ya que el máximo de cada curva no está bien definido para poder realizar una interpolación, aunque se estima que ronda los 0.1-0.5 μM . (unión máxima= saturación de pico/concentración)
- . La saturación máxima de pico se encuentra en 1 μM , llegando a un $R_{\text{max}}=5$, frente a la teórica de valor 20.6. Esta saturación nos indicaría por la regla de las 10 veces, que la K_d se encuentra aproximadamente sobre el valor de 100nm.

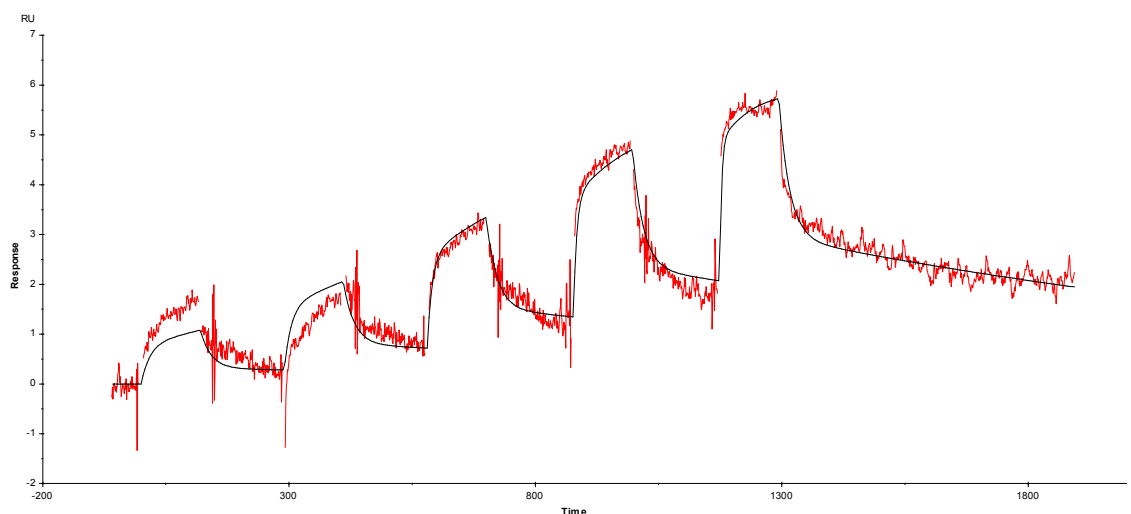


Figura 8 Ensayo de afinidad para el péptido control LSG-2002-14-h sobre la proteína GST-PDZ capturada en el sensor chip CM4.

. Se descartan interacciones no específicas con el dextrano, ya que superponiendo las curvas del canal 1 y 2, los máximos que se observan son planos. Esto indica que no coincide con un perfil de inmovilización.

Figura 9.

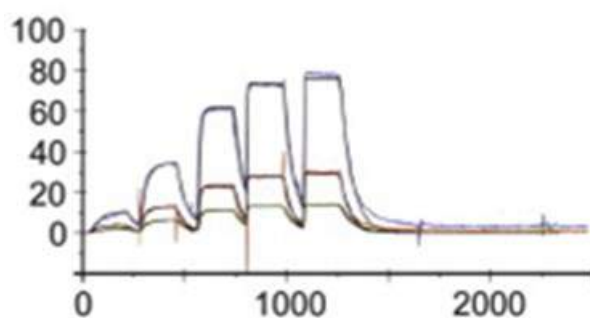


Figura 9.

La fase de asociación fue monitorizada durante 120 segundos, y la de disociación durante 600 segundos a con un flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ y 25°C. Finalmente la superficie fue regenerada durante dos minutos con la solución de glicina a 10mM, pH 2.1.

Tabla 2 Parámetros cinéticos.

k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)	K_{D1} (M)	k_{a2} (1/Ms)	k_{d2} (1/s)	K_{D2} (M)
2.200E5	0.04676	2.126E-7	1.403E4	6.933E-4	4.943E-8

La constante de asociación o K_a es la constante que describe la formación del complejo de una interacción simple de estequiometría 1:1. Las unidades de medida son $M^{-1}s^{-1}$

La constante de disociación o k_d , es la constante que describe la descomposición del complejo formado por estequiometría de interacción 1:1. Se mide en s^{-1} .

Por tanto para poder llevar a cabo una mejor determinación de esta evaluación, sería necesario repetirlo consiguiendo una captura de proteína con un valor de $R_{max} \leq 100$. Obteniendo una optimización de los tiempos de exposición y concentraciones determinadas, con el fin de realizar un experimento reproducible.

Los ensayos de las demás muestras no pudieron llevarse a cabo debido al poco tiempo del que nuestro grupo de investigación podía disponer del aparato.

Si dispusiéramos del aparato acoplado a SPR-MALDI TOF podríamos usarlo en otros experimentos con el fin de identificar la diana de unión

Debido a que la Universidad de Granada no dispone de este aparato, existe una técnica alternativa a esta, llamada ITC (Isothermal Titration Calorimetry)⁷⁶.

⁷⁶ Jean-Philippe Demers and Anthony Mittermaier, "Binding Mechanism of an SH3 Domain Studied by NMR and ITC," *Journal of the American Chemical Society* 131, no. 12 (2009), 4355-4367.

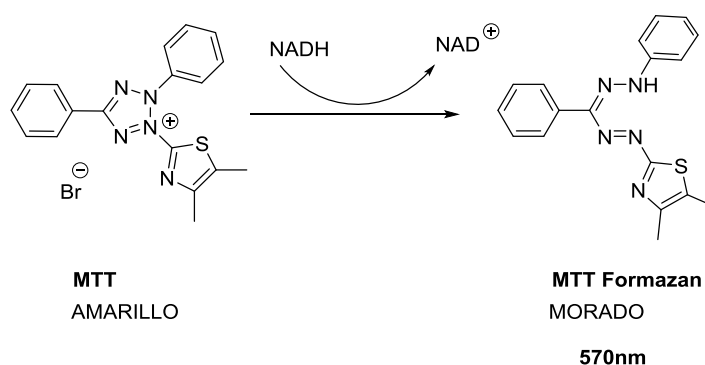
4.4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Los estudios de citotoxicidad y neuroprotección se han llevado a cabo frente al cultivo celular SH-SY5Y (Neuroblastoma humano). La línea celular SH-SY5Y es una sub-línea tres veces clonada derivada de la línea SK-N-SH obtenida por biopsia de la médula ósea.

4.4.1. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD Y NEUROPROTECCIÓN

La financiación y realización de estos estudios fue llevada a cabo por los profesores colaboradores Dr. Rafael Salto González y Dra. M Dolores Girón González, pertenecientes al departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

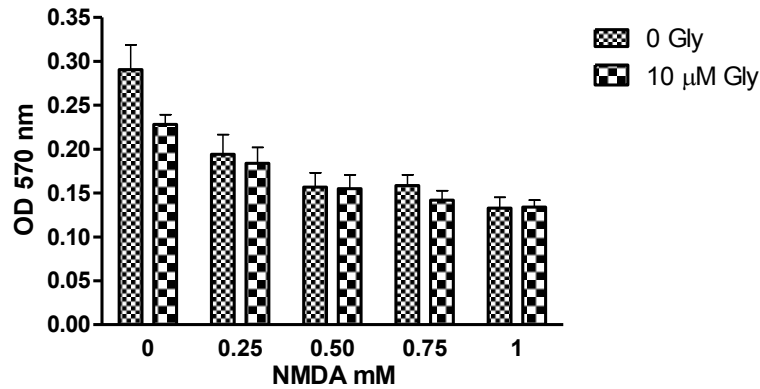
Este ensayo de viabilidad celular se basa en el metabolismo del sistema succinato-tetrazolium reductasa, el cual forma parte de la cadena respiratoria de la mitocondria y por tanto está sólo activo en células vivas, las cuales reducen el anillo de tetrazolio (amarillo) a Formazan, el cual absorbe a 570nm de longitud de onda⁷⁷.



Este ensayo permite evaluar si este tipo de fármacos protegen a las neuronas de la neurodegeneración inducida a las concentraciones establecidas de NMDA/Glicina⁷⁸. La glicina se conoce presentar afinidad hacia los receptores NMDA de la membrana celular y ser responsable de potenciar el efecto neurotóxico al que inducen estos. Así, previamente se hizo un estudio sobre la cantidad de estas necesarias para provocar la neurotoxicidad celular y estimar las cantidades adecuadas para realizar el ensayo, midiendo la viabilidad celular a 570nm.

⁷⁷ Tim Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," *Journal of Immunological Methods* 65, no. 1 (1983), 55-63.

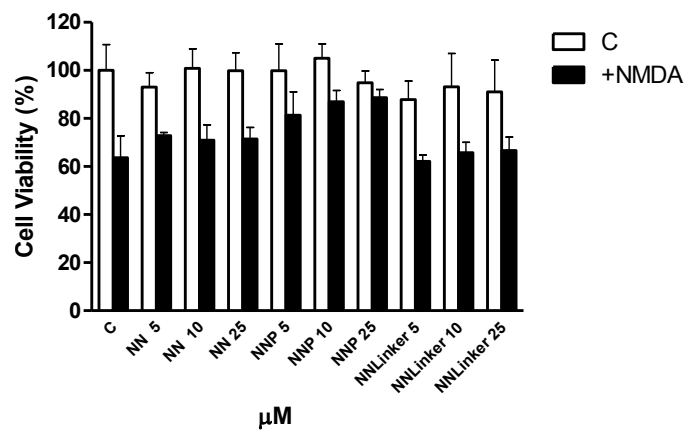
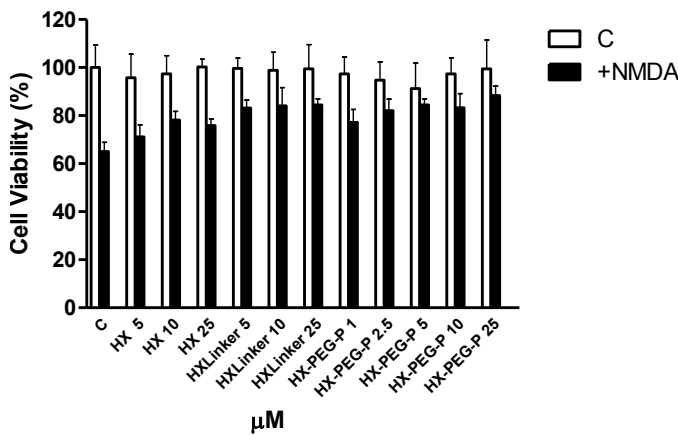
⁷⁸ (a) H. Cui et al., "PDZ Protein Interactions Underlying NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity and Neuroprotection by PSD-95 Inhibitors," *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, no. 37 (Sep 12, 2007), 9901-9915.; D. McNamara and R. Dingledine, "Dual Effect of Glycine on NMDA-Induced Neurotoxicity in Rat Cortical Cultures," *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 10, no. 12 (Dec, 1990), 3970-3976.; Mark A. Smith et al., "Amyloid- β Deposition in Alzheimer Transgenic Mice is Associated with Oxidative Stress," *Journal of Neurochemistry* 70, no. 5 (1998), 2212-2215.



Observando la gráfica, los mejores niveles para el estudio se corresponden con las concentraciones de 0.25mM de NMDA y 10μM de Glicina.

Los estudios a día de hoy, como se puede observar en las gráficas solamente se han podido llevar a cabo con 6 compuestos, cuyas siglas se corresponden con las secuencias:

HX	DFGDAV
HXLINKER	PALMITICO-O2PEN-DFGDAV
HX-PEG-P	PALMÍTICO-PEG-DFGDAV
NN	VSPDFGDAV
NNP	PALMÍTICO-VSPDFGDAV
NNLINKER	PALMÍTICO-O1PEN-VSPDFGDAV



El ensayo se han realizado a distintas concentraciones de producto, 5 μM, 10 μM y 25 μM, con 0.25 mM de NMDA y 10μM de Glicina.

De la información ofrecida por las gráficas se puede deducir que:

. Nuestros compuestos no producen toxicidad a esas concentraciones.

. Cuando se induce neurotoxicidad, las neuronas disminuyen su viabilidad al 65% aproximadamente (C, células sin compuesto inducidas a neurotoxicidad), observándose que todos nuestros compuestos ejercen la actividad neuroprotectora esperada, a excepción del NNLinker, el cual se observa que a esas concentraciones no ejerce ningún efecto sobre las mismas.

. Los compuestos con mejores resultados a destacar son los NNP a 10 μM y 25 μM , y HX-PEG-P a 25 μM , los cuales superan la viabilidad celular en un 85-90%, mejorando por tanto la viabilidad de las células en un 25-30%.

. Si se comparan las secuencias líderes en las que se basa este trabajo y a partir de las cuales se han realizado todas las modificaciones estructurales para aumentar su potencial (HX= DFGDAV y NN= VSPDFGDAV), se observa que la secuencia de menor tamaño HX ofrece mejor resultado neuroprotector. Y que en el caso del HX este efecto ha sido mejorado introduciendo en la secuencia derivados de PEG y ácido Palmítico, al igual que ocurre en el caso del nonapéptido a excepción del NNlinker.

. De este estudio por tanto, también podemos deducir, que es muy importante la localización de la secuencia de reconocimiento dependiendo de la longitud de nuestros compuestos, ya que debido a la estructura y longitud del espaciador como del transportador molecular al que se encuentre unida nuestra secuencia de interacción, así variará el efecto de neuroprotección ejercido. Esto podemos observarlo mejor en la siguiente figura.

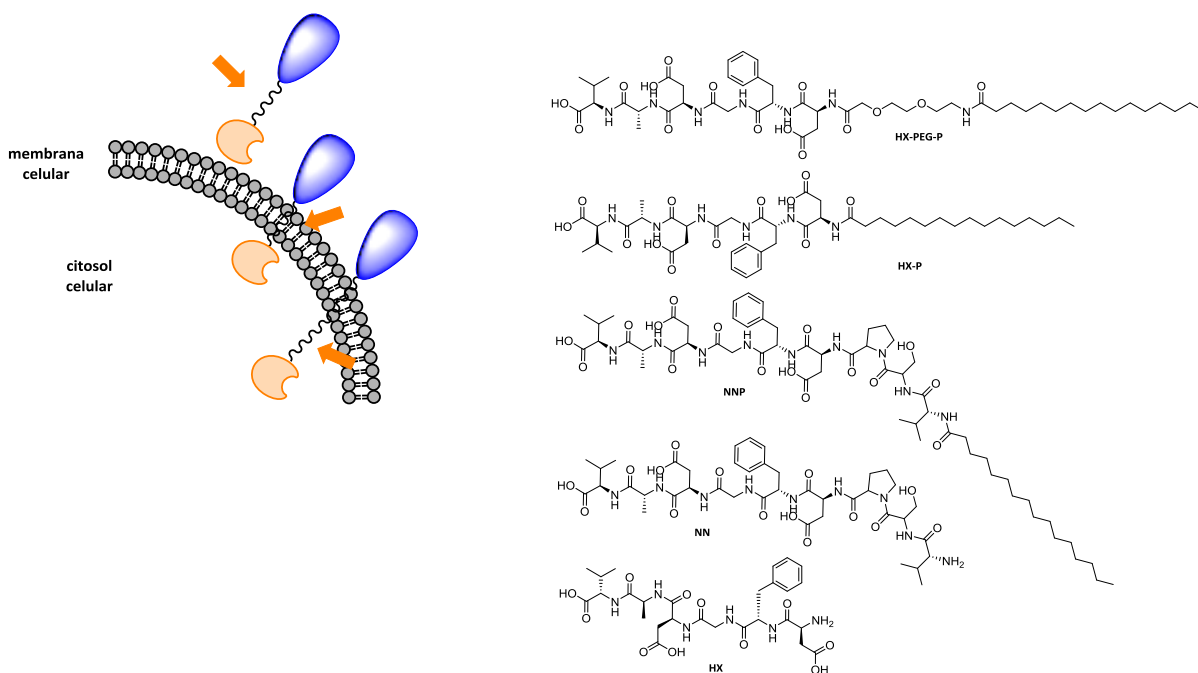


Figura 1. Dependencia de la longitud de los espaciadores y localización de la secuencia de reconocimiento.

Ya que como se habló durante la introducción a este trabajo, la proteína sobre la que queremos interactuar (dominio PDZ de la enzima nNOS) es una proteína de membrana, por tanto no podemos alejarnos mucho ni quedarnos cortos con la localización de nuestra secuencia para poder llevar a cabo la interacción deseada.

4.4.2. ESTUDIOS DE PENETRABILIDAD CELULAR

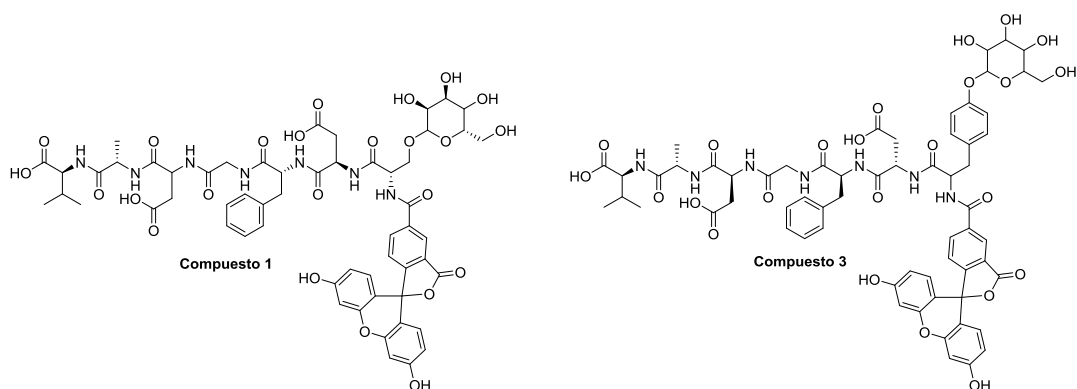
Estos estudios se llevaron a cabo durante una de mis estancias breves disfrutada gracias a la beca EEBB-I-13-07131. En el grupo de investigación del Prof. Mark Bradley, en la escuela de Química de la Universidad de Edimburgo.

Se llevaron a cabo sobre los cultivos celulares HeLa

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo mediante estudios MTT, como se comentó anteriormente, los cuales dieron resultados de toxicidad negativa (no tóxicos).

La metodología para observar tanto la citotoxicidad como la penetrabilidad celular, fue llevada a cabo incubando las células con nuestras muestras a una concentración de 10 μ M durante 24h. Para el ensayo de citotoxicidad se retiró después de ese tiempo el medio, y se añadió la solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio), 5mg/ml en medio de cultivo, durante 4h, posteriormente este es retirado y se añade la solución solubilizadora de MTT, y medimos la señal en el espectrofotómetro a 570nm.

Los estudios de penetrabilidad celular se llevaron a cabo mediante citometría de flujo (FACs, acrónimo de Fluorescence-activated cell sorting), sobre los compuestos 1,3,4,6,7, los cuales, por sus características estructurales, permitieron ser marcados con 5(6)-carboxifluoresceína. Destacar que los compuestos 1,3,4 son derivados de glicopéptidos, mientras que el resto son derivados de la secuencia líder del hexapéptido con distintos espaciadores derivados de PEG.



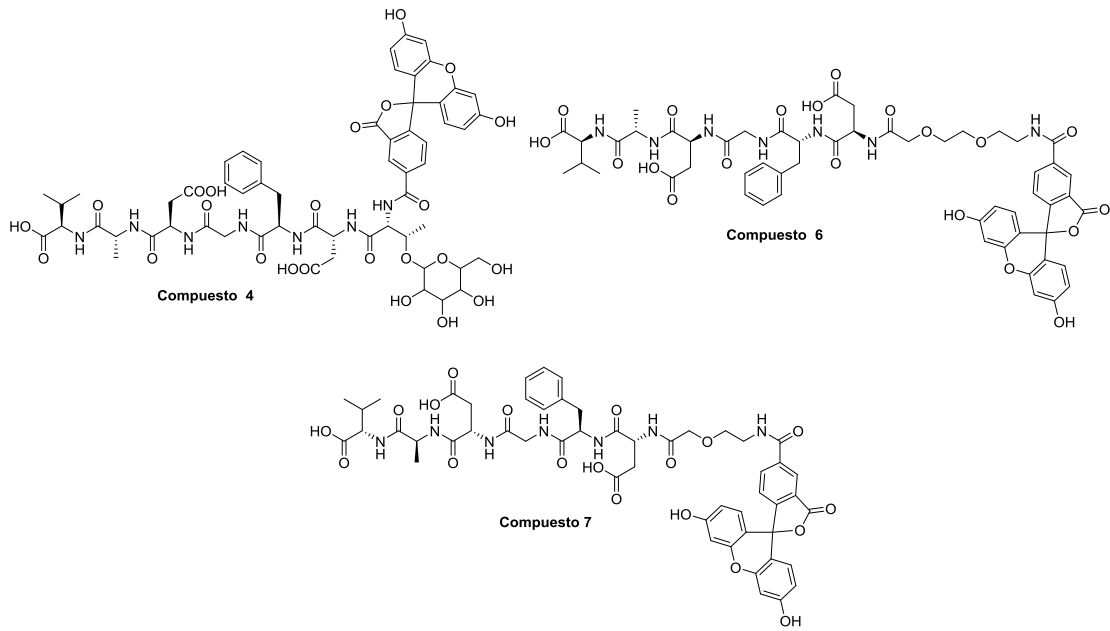
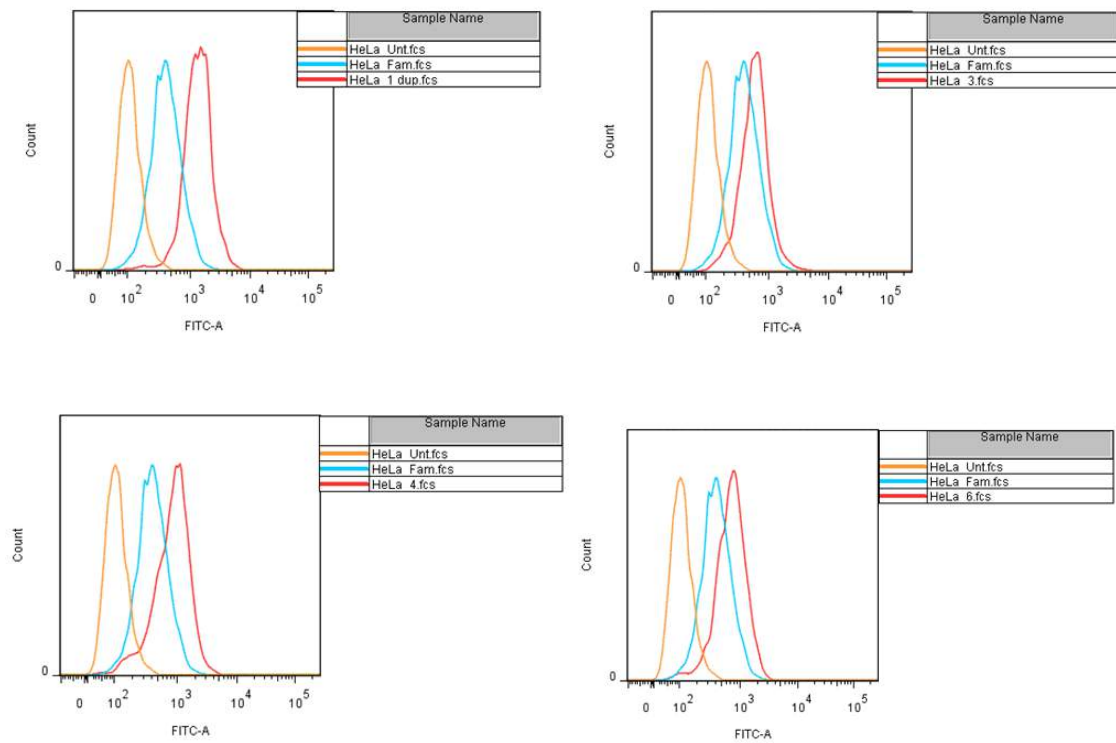


Figura 2. Compuestos marcados con 5(6)-Carboxifluoresceína

Representación gráfica de los ensayos de citometría de flujo que expresan el número de células que penetran en la célula frente señal de fluorescencia (FITC-A).



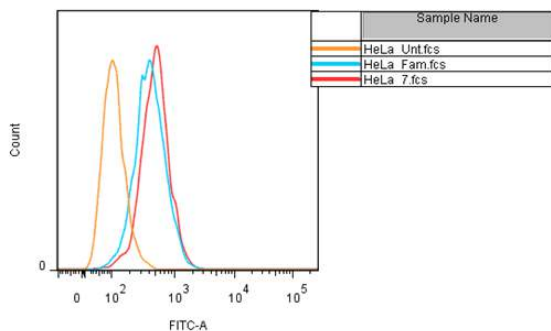


Figura 3. Representación gráfica de los ensayos de citometría de flujo que expresan en número de células que penetran en la célula frente a la señal de fluorescencia (FITC-A).

La señal roja indica en cada caso el número de células en las que ha penetrado cada uno de los compuestos frente a la señal de fluorescencia, con respecto a las células sin tratar (línea amarilla) y las células incubadas únicamente con 5(6)-carboxifluoresceína, con el fin de observar la diferencia entre la penetrabilidad de las células con nuestros compuestos y las demás en las que no han penetrado.

Se puede observar mejor con las siguientes gráficas de datos en la figura 4, en las que se muestra en la figura (a) que el compuesto 1 es el que ofrece mayor penetrabilidad celular frente a los demás. Siendo los compuestos 3 y 7 los que apenas penetran en las células.

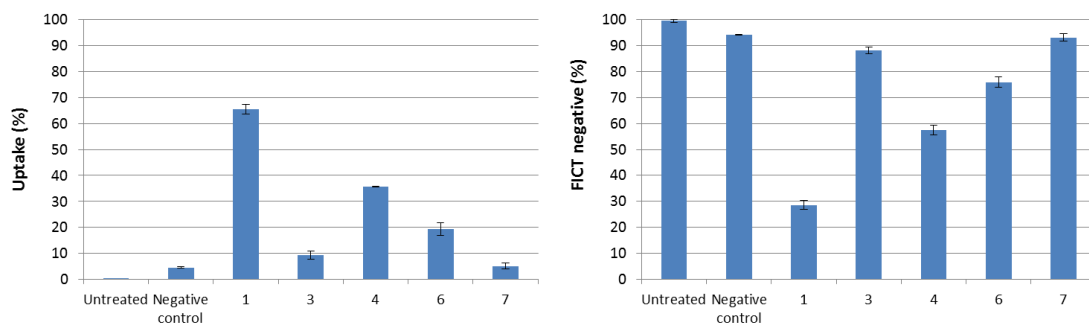


Figura 4. (a) Porcentaje de penetrabilidad celular en células HeLa a concentración 10uM, incubación o/n. **(b)** Porcentaje de células no fluorescentes en células HeLa a concentración 10uM, incubación o/n.

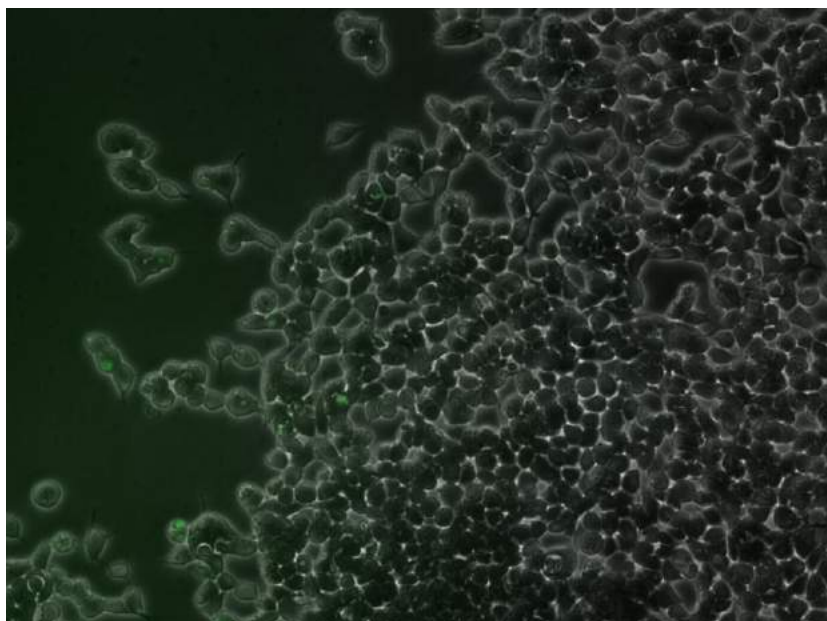


Figura 5. Muestra la penetrabilidad celular del compuesto 1 en células HeLa, mediante microscopia de fluorescencia confocal.

PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. CONDICIONES GENERALES DE ANALISIS POR HPLC

Todas las caracterizaciones llevadas a cabo mediante cromatografía HPLC durante este capítulo, se han realizado siguiendo los siguientes métodos de análisis.

CONDICIONES DE ANALISIS UPLC-ESI/TOF.

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.3 ml/min

Gradiente: t0 5%B, T15 95%B, T15.1 5%B, T final 17min.

Columna Acquity UPLC BEH C18 2.1x100mm. Tamaño de partícula: 1.7µm

Barrido de masas desde 200 hasta 2000 en modo positivo. Flujo del gas de solvatación: 600 l/h. Flujo del gas del cono: 25 l/h.

CONDICIONES DE ANALISIS UPLC ACOPLADO A SYNAPT G2 (Waters)

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.4 ml/min

Gradiente: t0 2%B, t15 98%B, T15.1 2%B , t final 17min 2%B..

Columna Acquity UPLC BEH C18 2.1x50mm. Tamaño de partícula 1.7µm

Barrido de masas desde 200 hasta 2000 en modo positivo .Flujo del gas de solvatación es igual a 600l/h. Flujo del gas del cono es igual a 25l/h.

CONDICIONES DE ANALISIS HPLC-ESI/TOF.

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Metanol + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8 ml/min

Gradiente: t0 85%B, t5 100%B, T20 100%B, t21 85%B, t final 25min.

Columna Nova pack C18 3.9mmx150mm.Tamaño de partícula: 4 µm

Barrido de masas desde 200 hasta 2000 en modo positivo. Flujo del gas de solvatación: 1000 l/h. Flujo del gas del cono: 100 l/h.

CONDICIONES DE ANALISIS HPLC

. MÉTODO GLICOP. 16min control termostato 90-10

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8 ml/min

Gradiente: t1 10%B, t10 100%B, T14 10%B, t16 10%B, tfinal 16min 10%B.

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: C8-30min-50-50-gradiente-C-D-fórmico

Canal C: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal D: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t5 50%D, t20 100%D, T25 100%D, t30 50%D, tfinal 30min 50%D.

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t1 10%B, t10 100%B, T20 100%B , t22 10%B, tfinal 22min 10%B..

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: GLICOPÉPTIDOS

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t2 10%B, t15 100%B, T22 100%B , t25 10%B, tfinal 25min 10%B..

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: 40H2O-60ACN.28min.c18

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t1 60%B, t20 100%B, T25 100%B, t28 60%B, tfinal 28min 60%B.

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: GLICOPEPTIDO 50-50

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t5 50%B, t15 100%B, T18 100%B, t20 50%B, tfinal 28min 50%B.

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: AZÚCAR CORTO

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t1 10%B, t4 100%B, T8 100%B, t12 10%B, tfinal 12min 10%B.

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: C8-19min-80-20-Gradiente

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t5 20%B, t15 100%B, T18 100%B, t19 20%B, tfinal 19min 20%B.

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

. MÉTODO: C8-45min-95-5-gradiente-1ml

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 1ml/min

Gradiente: t5 5%B, t35 100%B, T40 100%B, t45 5%B, tfinal 45min 5%B.

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

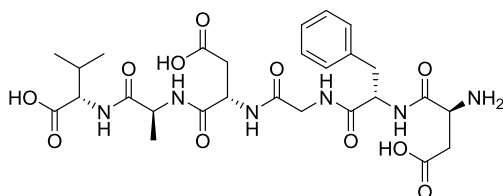
5.2. SINTESIS DE PÉPTIDOS

La síntesis se realiza en un reactor de plástico para SPPS. En el cual se pesa la resina H-Val-2-Clorotritilo. Ésta es prehinchada durante 12h con DMF grado síntesis de péptidos, libre de contener aminas secundarias que interferirían con las reacciones de acoplamiento, evitando así reacciones secundarias indeseadas y mezcla de productos. Una vez hinchada, se elimina el disolvente mediante filtración con una bomba de vacío en un sistema manifold, se lava 3 veces con DMF y a continuación se lleva a cabo la síntesis mediante un esquema de acoplamiento/desprotección, hasta formación de la secuencia peptídica.

Para que las reacciones de acoplamiento entre los aminoácidos que constituyen la cadena y el glicósido correspondiente sea óptima, los aminoácidos usados deben ser elegidos o acondicionarse en su defecto, con los grupos funcionales adecuados. En nuestro caso se ha elegido el esquema de protección Fmoc/tBu como grupos protectores de los grupos α -amino y carboxilo respectivamente.

La resina es activada mediante la liberación del grupo protector α -amino, en nuestro caso Fmoc, con una solución de piperidina al 20% v/v en DMF. Posteriormente, mediante el test colorimétrico de Kaiser, se verifica la completa desprotección observando la aparición de aminas primarias (resina de color morado), que nos indica que el grupo amino se encuentra libre y disponible para poder realizar los consecutivos acoplamientos.

5.2.1. SINTESIS DE LA SECUENCIA LIDER NH_2 -Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (DFGDAV, 18-03-e)



5.2.1.1. ACOPLAMIENTO DE Fmoc-Ala-OH

Se hinchan 200 mg (0.14 mmoles) de resina H-Val-2-clorotritilo (0.69-0.8 mmoles/gramo, 100~200 mesh, 1% DVB), con DMF calidad síntesis de péptidos durante 12 h, sobre un sistema de agitación horizontal para reactores en fase sólida. Una vez hinchada lavamos la resina con DMF para acondicionarla para la reacción.

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Ala-OH (0.55 mmoles, 172mg), HATU (0.54 mmoles, 205mg) HOAT (0.55 mmoles, 75mg) y DIPEA (1.10 mmoles, 188 μ L) en DMF (3ml, 0.2M) en este orden hasta su completa disolución y se añade sobre la resina.

La reacción se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente, mediante agitación horizontal.

Finalmente la resina se lava con DMF (3 x 4ml) y se realiza el test colorimétrico de Kaiser para detección de aminas primarias, que da resultado negativo, indicando de forma cualitativa que se ha producido un completo acoplamiento.

5.2.1.2. TEST DE KAISER O NINIDRINA, PARA LA DETECCIÓN DE AMINAS PRIMARIAS.

El test se lleva a cabo mediante el uso de tres reactivos:

Reactivo A (5 g ninhidrina en 100 mL de etanol).

Reactivo B (80 g de fenol líquido en 20 mL de etanol).

Reactivo C (solución acuosa al 0.001 M de cianuro potásico en 98 mL de piridina).

Se transfiere una alícuota de resina a un tubo de vidrio y se lava varias veces con EtOH. Se adicionan tres gotas de cada reactivo y la mezcla se calienta a 120°C durante 2-3 minutos. Un test positivo se observa mediante el cambio de color de la resina de amarillo a azul, esto indicaría que se encuentran presentes restos de aminas primarias.

5.2.1.3. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO FMOC

Estudios de estabilidad realizados sobre esta resina indican que la desprotección se debe realizar una vez terminado el acoplamiento, por tanto se desprotege rápidamente el grupo Fmoc usando piperidina al 20% en DMF (3 x 4ml) agitando durante intervalos cortos de tiempo de 2 minutos, e intercalando un lavado de DMF entre cada desprotección.

Posteriormente se vuelve a lavar con DMF (3 x 4ml) .Se realiza el test de Kaiser para detección de aminas primarias observándose un test positivo, el cual indica que el grupo amino se encuentra disponible para realizar el siguiente acoplamiento.

5.2.1.4. ACOPLAMIENTO DE Fmoc-Asp(OtBu)-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Asp(OtBu)-OH (0.55 mmoles, 226mg), Oxima (0.55 mmoles, 78mg) y DIC (1.10 mmoles, 188 µL) en DMF grado síntesis de péptidos (3 ml, 0.2M). Añadimos la solución sobre la resina y la reacción transcurre durante 2h mediante agitación horizontal. Una vez finalizada, eliminamos la mezcla de reacción mediante un sistema de vacío, se lava con DMF 3x3ml y se realiza el test de detección de aminas primarias. Se observa un test negativo que nos indica el completo acoplamiento.

Posteriormente se lleva a cabo la desprotección del grupo protector Fmoc rápidamente, como se detalla anteriormente en el **apartado 5.2.1.3.** con piperidina al 20% en DMF, y se vuelve a realizar el test de Kaiser para observar la completa desprotección del grupo amino y proseguir con el acoplamiento del siguiente aminoácido N^αprotegido.

5.2.1.5. ACOPLAMIENTO DE Fmoc-Gly-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Gly-OH, (0.55 mmoles, 164mg), Oxima (0.55 mmoles, 78mg) y DIC (1.10 mmoles, 188 μ L) en DMSO al 25% en DMF (0.4M). Una vez disuelta añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h con agitación horizontal. Una vez finalizada, eliminamos la mezcla de reacción mediante un sistema de vacío, se lava con DMF (3x3ml) y se realiza el test de detección de aminas primarias. Se observa un test negativo que nos indica el completo acoplamiento.

Se desprotege el grupo protector Fmoc rápidamente como se detalla anteriormente, con piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima⁷⁹. Se vuelve a realizar el test de Kaiser para observar la completa desprotección del grupo amino y proseguir con el acoplamiento del siguiente aminoácido N ^{α} protegido

5.2.1.6. ACOPLAMIENTO DE Fmoc-Phe-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Phe-OH, (0.55 mmoles, 213mg) Oxima (0.55 mmoles, 78mg) y DIC (1.10 mmoles, 188 μ L) en DMF (0.4M). Una vez disuelta añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal. Una vez finalizada, eliminamos la mezcla de reacción mediante un sistema de vacío, se lava con DMF (3x3ml) y se realiza el test de detección de Kaiser para la detección de aminas primarias. Se observa un test negativo que nos indica el completo acoplamiento.

Se desprotege el grupo protector Fmoc rápidamente como se comenta anteriormente, con piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxyma. Se vuelve a realizar el test de Kaiser para observar la completa desprotección del grupo amino y proseguir con el acoplamiento del siguiente aminoácido N ^{α} protegido

5.2.1.7. ACOPLAMIENTO DE Fmoc-Asp (OtBu)-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Asp (OtBu)-OH, (0.55 mmoles, 226mg), Oxima (0.55 mmoles, 78mg) y DIC (1.10 mmoles, 188 μ L) en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal. Una vez finalizada, eliminamos la mezcla de reacción mediante un sistema de vacío, se lava con DMF (3x3ml) y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias. Se observa un test negativo que nos indica el completo acoplamiento.

Se desprotege el grupo protector Fmoc rápidamente como se comenta anteriormente, con piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima. Se vuelve a realizar el test de Kaiser para observar la completa desprotección del grupo amino y proseguir con el acoplamiento del siguiente aminoácido N ^{α} protegido.

⁷⁹ R. Subirós-Funosas et al. / Tetrahedron 67 (2011) 8595- 8606

5.2.1.8. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se prepara una solución de hidrólisis al 0.5% de TFA (9.45 ml DCM: 0.5 ml TES: 0.05 ml TFA), se adiciona sobre la resina en un reactor de vidrio y se mantiene mediante agitación magnética horizontal durante 2h.

Transcurrido este tiempo se recoge el filtrado y se lava con DCM (3 x 4 ml). Se elimina el disolvente bajo presión reducida. El sirupo obtenido se precipita con éter dietílico (3 x 4 ml) y se elimina el sobrenadante para retirar las impurezas derivadas de la resina.

5.2.1.9. DESPROTECCIÓN DE los grupos tBu

Se prepara una solución de hidrólisis al 50% de TFA (4.5 ml DCM: 0.5 ml TES: 5 ml TFA), se adiciona sobre el sirupo obtenido anteriormente y se mantiene sobre agitación magnética durante 1h.

Eliminamos el disolvente bajo presión reducida y se precipita con éter dietílico (3 x 4 ml) para eliminar en el sobrenadante las impurezas derivadas de la resina.

5.2.1.10. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

El precipitado blanco se purifica por extracción en fase sólida usando cartuchos de ASPEC SPE Bond Elut C18, usando un gradiente desde 100% de agua (A), pasando por A:B (90:10,80:20,70:30,60:40,50:50,...) hasta 100% de acetonitrilo (B). El filtrado se recoge en viales que posteriormente son analizados mediante LC/MS y HPLC para la detección del compuesto puro. Una vez detectado mediante estos medios, se procede a eliminar el disolvente orgánico en el rotavapor a presión reducida y posterior liofilización.

El compuesto puro se analiza por HPLC y se determina su masa molecular por espectrometría de masas.

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para $C_{27}H_{39}N_6O_{11}$ (M+H)⁺ m/z 623.2677 encontrado 623.2681 (desviación 0.6ppm)

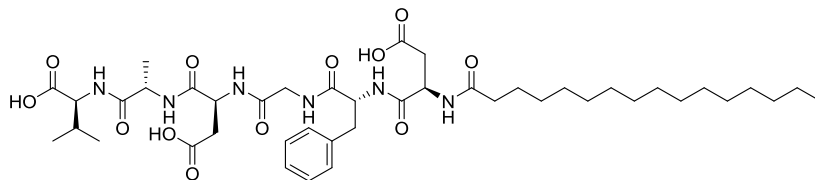
HPLC: Método GLICOP. 16 min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 7.652 min

Pureza = 86%

5.2.2. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES INTRODUCIDAS EN LA SECUENCIA LIDER DFGDAV

5.2.2.1. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA PEPTÍDICA AP-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (PALMÍTICO-DFGDAV-COOH, 03-04-a)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1. para la síntesis del fragmento hexapeptídico

de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp. Una vez realizado el test de kaiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino del residuo de aspártico (D), se procede al acoplamiento del ácido palmítico.

Se prepara una solución de ácido palmítico (0.32 mmoles, 82 mg) Oxima (0.32 mmoles, 46 mg) y DIC (0.64 mmoles, 100 μ l) en DMF (0.4M). Una vez completa la disolución se añade sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal. Una vez finalizada, eliminamos la mezcla de reacción mediante un sistema de vacío, se lava con DMF (3x3ml) y se realiza el test de detección de aminas primarias, se observa un test negativo que nos indica el completo acoplamiento.

Seguidamente se lleva a cabo la hidrolisis de la resina y la desprotección de los grupos tBu de la secuencia como viene descrito en los apartados 5.2.1.8. y 5.2.1.9. , en este mismo orden. Posteriormente se lleva a cabo la purificación del compuesto mediante cromatografía en fase reversa, como indica el procedimiento del apartado 5.2.1.10., pero en este caso usando cartuchos ASPEC SPE Bond Elut C8. Usando el mismo gradiente descrito, el filtrado se recoge en viales que posteriormente son analizados mediante LC/MS y HPLC para la detección del compuesto puro. Una vez detectado, se procede a eliminar el disolvente orgánico en el rotavapor a presión reducida y posterior liofilización.

El compuesto puro se analiza por HPLC y se determina su masa molecular por espectrometría de masas.

Caracterización del compuesto:

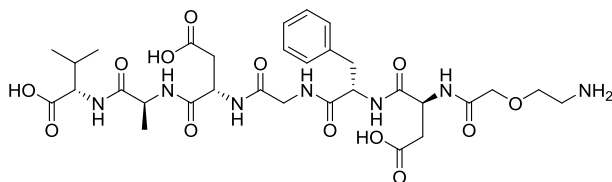
HRMS ESI: Calculado para $C_{43}H_{69}N_6O_{12}$ (M+H)⁺ m/z 861.4973, encontrado 861.4856 (desviación-2.0 ppm)

HPLC-ESI/TOF: CONDICIONES DE ANALISIS HPLC-ESI/TOF.

Tiempo de retención: 10.43min

Pureza = 96.96%

5.2.2.2. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA NH₂-Peg-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH(NH₂-O1Pen-DFGDAV-COOH, 18-03-g)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1. para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp. Una

vez realizado el test de Kaiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino del residuo de aspártico (D), se procede al acoplamiento del fragmento O1Pen derivado de PEG.

Se prepara una solución de Fmoc-O1OPen-OH, (0.28 mmoles, 95 mg), Oxima (0.28 mmoles, 39 mg) y DIC (0.55 mmoles, 87 μ l) en DMSO al 25% en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Se desprotege el grupo protector Fmoc rápidamente como comenté anteriormente en el apartado 5.2.1.3. con piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima.

5.2.2.2.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para C₃₉H₆₂N₇O₁₃ (M+H)⁺ m/z 836,4406, encontrado 836.4425 (desviación 2.3ppm)

HPLC ESI-TOF; Método: CONDICIONES DE ANALISIS HPLC-ESI/TOF

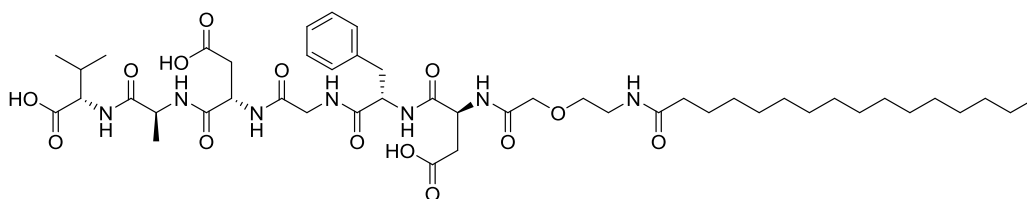
Tiempo de retención: 9.44min

Pureza = 100%

5.2.2.2.2. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

5.2.3. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA AP-Peg-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (PALMÍTICO-O1Pen-DFGDAV-COOH 20.03a)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.2. para la síntesis del fragmento NH₂-O1Pen-DFGDAV-COOH hasta la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino del residuo derivado de polietilenglicol, O1Pen (ácido 5-(fmoc-amino)-3-oxapentanoico). Se realiza el test de kaiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino de este residuo y se procede al acoplamiento del ácido palmítico.

Se prepara una disolución de ácido palmítico (0.28 mmoles, 71 mg), HATU (0.27 mmoles, 103mg), HOAT (0.28 mmoles, 38 mg) y DIPEA (0.53 mmoles, 95 ul) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.2M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.3.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.3.2. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.3.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Columna SPE C8, cuyo procedimiento viene descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

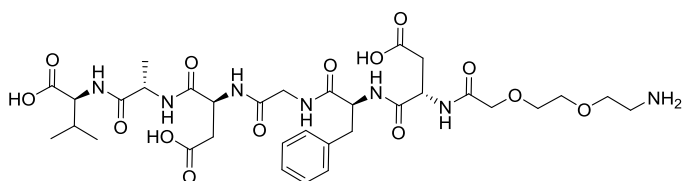
HRMS ESI: Calculado para C₄₇H₇₅N₇O₁₄ (M+H)⁺ m/z 961.5372, encontrado 961.5385 (desviación 1.4ppm)

HPLC: columna C8 **Método:** C8-30MIN-95-5-GRADIENTE

Tiempo de retención: 19.973

Pureza = 100%

5.2.4. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA NH₂-Peg2-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (NH₂-O2OC-DFGDAV-COOH, 18-03-f)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1. para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del

grupo Fmoc del Asp. Una vez realizado el test de kaiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino del residuo de aspártico (D), se procede al acoplamiento del fragmento Fmoc-O2OC-OH.

Se prepara una solución de Fmoc-O2Oc-OH, (0.28 mmoles, 106 mg) Oxima (0.28 mmoles, 39 mg) y DIC (0.55 mmoles, 87 µl) en DMSO al 25% en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Se desprotege el grupo protector Fmoc rápidamente como comenté anteriormente en el apartado 5.2.1.3. con piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima.

5.2.4.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

Caracterización del compuesto intermedio con tBu:

HRMS ESI: Calculado para $C_{41}H_{66}N_7O_{14}$ (M+H)⁺ m/z 880,4668, encontrado 880.4669 (desviación 0.1 ppm)

Método: CONDICIONES DE ANALISIS HPLC-ESI/TOF

Tiempo de retención: 12.403 min

Pureza = 100%

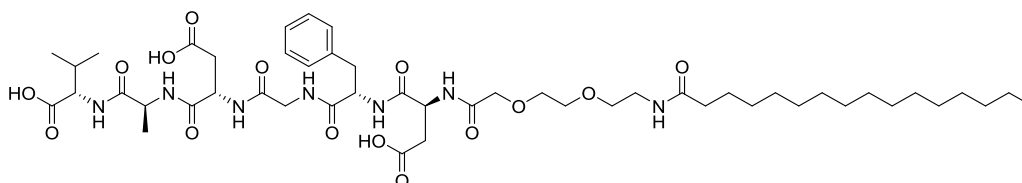
5.2.4.2. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

5.2.4.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10.

5.2.5. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA AP-Peg2-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (PALMÍTICO-O2OC-DFGDAV-COOH, 20-05-a)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.4. para la síntesis del fragmento de secuencia NH₂-O2OC-DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del fragmento derivado de PEG, O2OC. Se realiza el test de kaiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino de este residuo y se procede al acoplamiento del ácido palmítico.

5.2.5.1. ACOPLAMIENTO DEL ÁCIDO PALMÍTICO.

Se prepara una disolución de ácido palmítico (71 mg, 0.28 mmoles), HATU (103mg, 0.27 mmoles), HOAT (38 mg, 0.28mmoles) y DIPEA (95uL, 0.53mmoles) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.2M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.5.2. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.5.3. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éteretílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.5.4. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Columna SPE C8, cuyo procedimiento viene descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para $C_{49}H_{78}N_7O_{15}$ (M+H)⁺ m/z 1004.5556 encontrado 1004.5551 (desviación - 0.5ppm)

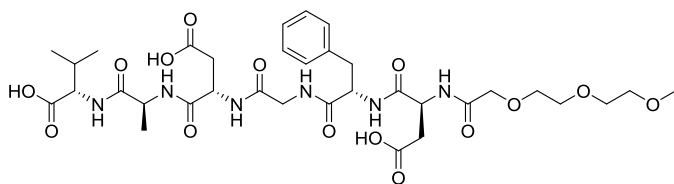
HPLC: C8

MÉTODO: C8 30min 95-5-Gradiente C-D-fórmico

Tiempo de retención: 22.394 min

Pureza = 100%

5.2.6. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA 2-[2-(2METOXIETOXI) ETOXI] ACÉTICO- Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (18-03-h)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1. para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp. Una vez realizado

el test de kaiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino del residuo de aspártico (D), se procede al acoplamiento del ácido 2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]acético.

Se prepara una solución de ácido 2-[2-(2-metoxietoxi) etoxi] acético (0.28 mmoles, 43µl) Oxima (0.28 mmoles, 39mg) y DIC (0.55 mmoles, 87µl) en DMSO al 25% en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Se desprotege el grupo protector Fmoc rápidamente como comenté anteriormente, con piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.6.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.6.2. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éteretílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.6.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

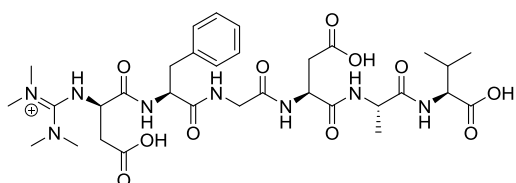
HRMS ESI Calculado para C₃₄H₅₁N₆O₁₅ (M+H)⁺ m/z 783.3412 encontrado 783.3402 (desviación -1.3 ppm)

HPLC: MÉTODO: GLICOP. 16min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 8.427 min, 8.541 min

Pureza = 100% (60%,40% respectivamente)

5.2.7. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA N-(Guanidin-)Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH



5.2.7.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.7.2. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.7.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

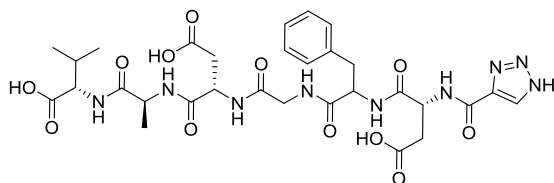
HRMS ESI Calculado para $C_{32}H_{49}N_8O_{11}$ (M+H)⁺ m/z 721.3521, encontrado 721.3516 (desviación -0.7 ppm)

HPLC-ESI/TOF: CONDICIONES DE ANALISIS HPLC-ESI/TOF

Tiempo de retención: 3.93min

Pureza =98%

5.2.8. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA 4-Carbonil-1,2,3-triazol-Peg2-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (TRIAZOL- DFGDAV-COOH, 0104-a)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1. para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp. Una vez realizado el test de kaiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino del residuo de aspártico (D), se procede al acoplamiento del fragmento del ácido 1,2,3-triazol.

5.2.8.1. SÍNTESIS DEL FRAGMENTO DE ÁCIDO 1,2,3-TRIAZOL.

En un vial de microondas bajo atmósfera inerte de argón, se prepara una disolución de ácido propiólico (5.7mmoles, 0.35ml) y trimetilsililazida (TMSN₃) (5.7mmoles, 0.75ml) y la reacción se lleva a cabo en microondas durante 1 h a 80°C. Una vez transcurrida la reacción, se observa un precipitado blanco en el fondo del vial de microondas. Se elimina el disolvente en el rotavapor mediante presión reducida. Se lava con éter dietílico frío y se precipita. (R= 70%)

5.2.8.2. ACOPLAMIENTO DE AMBOS FRAGMENTOS MEDIANTE SPSS EN MICROONDAS.

En un vial de microondas se prepara una solución de ácido 1,2,3-triazol (0.32mmoles, 37mg), Oxima (0.32mmoles, 46mg) y DIC (0.32mmoles, 50µl) en DMF (0.4M). Se añade sobre esta la resina

cargada con el fragmento de secuencia NH₂-DFGDAV y la reacción transcurre en microondas durante 40 minutos a 60°C.

Transcurrido ese tiempo, la suspensión se transvasa a un reactor de plástico. Se filtra y se lava con DMF (3x3ml).

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.8.3. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.8.4. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.8.5. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

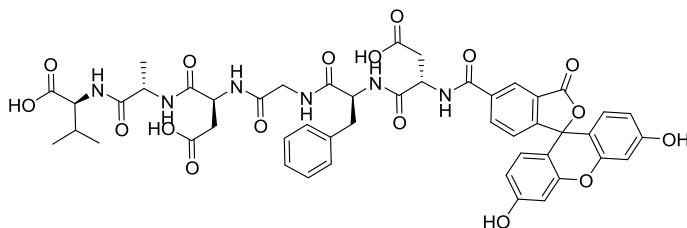
HRMS ESI Calculado para C₃₀H₄₀N₉O₁₂ (M+H)⁺ m/z 718.2796 encontrado 718.2801 (desviación 0.7ppm)

HPLC: MÉTODO: GLICOP. 16min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 7.934 min 62%

Tiempo de retención: 8.106 min 38%

5.2.9. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA CARBOXIFLUORESCINA- DFGDAV-COOH (0603-14-a) (HRMS 07.03.2014)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1. para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp. Una vez realizado el test de Kaiser para observar la

completa disponibilidad del grupo amino del residuo de aspártico (D), se procede al acoplamiento del ácido 5(6)-Carboxifluoresceína.

5.2.9.1. ACOPLAMIENTO DEL ÁCIDO 5(6)-CARBOXIFLUORESCÉINA

Se prepara una solución de ácido 5(6)-carboxifluoresceína (0.32 mmoles, 120mg) Oxima (0.32 mmoles, 46mg) y DIC (0.64 mmoles, 100µl) en DMF (0.2M). Una vez completa su disolución la añadimos sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.9.2. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.9.3. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.9.4. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

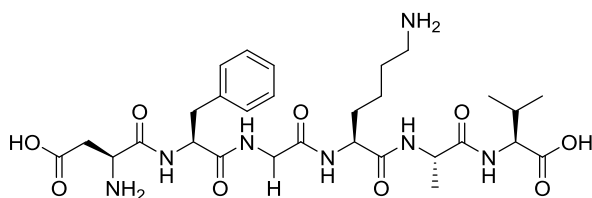
HRMS ESI Calculado para $C_{48}H_{49}N_6O_{17}$ (M+H)⁺ m/z 981.3154 encontrado 981.3158 (desviación 0.4ppm)

HPLC: **Método:** GLICOP. 16min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 9.290min

Pureza = 86%

5.2.10. SINTESIS DE LA SECUENCIA PARA EL CONTROL NEGATIVO NH₂-Asp-Phe-Gly-Lys-Ala-Val-COOH (DFGKAV ,1403-14b)



Se hinchan 200 mg (0.16 mmoles) de resina H-Val-2-clorotritilo (0.69-0-8 mmoles/gramo, 100~200 mesh, 1% DVB), con DMF calidad síntesis de péptidos durante 12 h, sobre un sistema de agitación horizontal para reactores

en fase sólida. Una vez hinchada lavamos la resina con DMF para acondicionarla para la reacción.

Preparamos una solución de reacción con Fmoc-Ala-OH (0.64mmoles, 200mg), HATU (0.64mmoles, 237mg) HOAT (0.64mmoles 87mg), y DIPEA (1.28 mmoles, 220 µl) en DMF (0.2M) en este

orden hasta su completa disolución y seguidamente la añadimos sobre la resina. La reacción se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente, mediante agitación horizontal.

Finalmente la resina se lava con DMF (3 x 4ml), y se realiza el test colorimétrico de Kaiser para aminas primarias el cual da resultado negativo, indicando de forma cualitativa un completo acoplamiento. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20% en DMF.

5.2.10.1. ACOPLAMIENTO FMOC-LYS (BOC)-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Lys-(Boc)-OH (0.64mmoles, 300mg) Oxima (0.64mmoles, 91mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 μ l) en DMF (0.2M). Una vez completa su disolución la añadimos sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20% en DMF. Se realiza el test de kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido para llevar a cabo el siguiente acoplamiento.

5.2.10.2. ACOPLAMIENTO FMOC-GLY-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Gly-OH (0.64mmoles, 190mg) Oxima (0.64mmoles, 91mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 μ l) en DMSO al 25% en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima (3x3ml). Se realiza el test de kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido para llevar a cabo el siguiente acoplamiento.

5.2.10.3. ACOPLAMIENTO FMOC-PHE-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Phe-OH (0.64mmoles, 248mg), Oxima (0.64mmoles, 91mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 μ l) en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de

piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima (3x3ml). Se realiza el test de kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido para llevar a cabo el siguiente acoplamiento.

5.2.10.4. ACOPLAMIENTO FMOC-ASP(OtBu)-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Asp-(OtBu)-OH (0.64mmoles, 263mg) Oxima (0.64mmoles, 91mg) y DIC (1.28 mmoles, 200µl) en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima (3x3ml). Se realiza el test de kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido.

5.2.10.5. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.8**.

5.2.10.6. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.9**.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.10.7. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.10**.

Caracterización del compuesto:

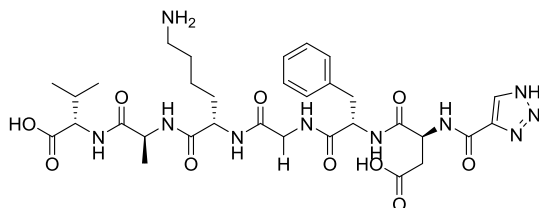
MALDI-TOF (02.10.2011): Valor teórico 658.3176 (M+Na)⁺ m/z encontrado 658.3170 (error 0.9114ppm)
(Matriz ACN/H₂O)

HPLC, método: C8-30MIN-95-5-GRADIENTE

Tiempo de retención: 11.953min

Pureza =100%

5.2.11. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA 4-Carbonil-1,2,3-triazol-Asp-Phe-Gly-Lys-Ala-Val-COOH (TRIAZOL-DFGKAV)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.10. para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGKAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp. Una vez realizado el test de

káiser para observar la completa disponibilidad del grupo amino del residuo de aspártico, se procede al acoplamiento del fragmento ácido 1,2,3-triazol (5.2.8.1).

5.2.11.5. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO ÁCIDO 1,2,3-TRIAZOL.

Se prepara una solución de ácido 1,2,3-triazol (0.64 mmoles, 73mg), Oxima (0.64 mmoles, 91mg) y DIC (1.28mmoles, 200µl) en DMF (0.4M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.11.6. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.11.7. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.11.8. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

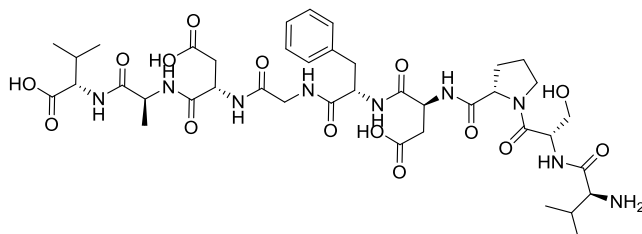
HPLC, Método: C8-30min-95-5-gradiente (13-01-2014)

Tiempo de retención: 12,871 min

Pureza = 100%

5.2.12. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA LIDER VSPDFGDAV

5.2.12.1. SÍNTESIS CONVERGENTE DE LA SECUENCIA NH₂-Val-Ser-Pro-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (VSPDFGDAV ,04.03.2014)



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1. para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp. Por otro

lado, realizamos la síntesis del fragmento tripeptídico de secuencia Fmoc-VSP-COOH, tomando de nuevo la resina cloruro de 2-clorotritilo y cargándola con Fmoc-Pro-OH.

5.2.12.1.1. SINTESIS DEL FRAGMENTO TRIPEPTIDICO DE SECUENCIA FMOC-VSP-COOH

5.2.12.1.1.1. CARGA DE LA RESINA CON FMOC-PRO-OH

La resina Cloruro de 2-Clorotritilo (1.54mmol/g, 100~200 mesh, 1% DVB) (0.31mmoles, 200 mg) se pesa en una cámara de guantes con atmosfera inerte de argón en un ambiente anhidro. Se hincha en DCM anhidro bajo argón durante 10 minutos. Se prepara una mezcla de reacción con Fmoc-Pro-OH (0.62mmoles, 208mg) y DIPEA (1.54mmoles, 263μl) en DCM anhidro (0.2M). A continuación, la mezcla de disolución se añade mediante inyección sobre la resina y se deja en agitación magnética suave durante 2 horas. Finalmente la resina se lava con DCM (3 x 4 mL) y con una mezcla DCM/MeOH/DIPEA (8:1.5:0.5) (2X3ml), durante 10 minutos. Una vez finalizado el bloqueo de los Cloruros de la resina que han quedado sin reaccionar con Fmoc-Pro-OH, con la mezcla anterior lavamos con DCM (3x3 ml) y deshinchamos la resina lavándola con MeOH (3x3ml) y aplicándole vacío durante 2h con ayuda de una bomba de membrana.

5.2.12.1.1.2. DETERMINACIÓN DE LA CARGA DE LA RESINA

Se toma una alícuota de resina, anteriormente deshinchada, en relación 1μM con respecto a la carga de resina comercial (0.65mg), se adicionan piperidina al 20% en DMF y se agita la suspensión 10 min, mediante agitación magnética. Transcurrido ese tiempo, se determina la absorbancia de la mezcla en un espectrofotómetro UV-visible a 290nm. La medida se realiza por triplicado y se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Carga} = \frac{\text{Absorbancia} \times V \text{ (ml)}}{\epsilon \text{ 290nm} \times \text{masa} \text{ (mg)}} \times 1000$$

Posteriormente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc, con el procedimiento descrito durante toda esta síntesis, con piperidina al 20% en DMF, (3x3ml) y se realiza el test del cloranilo. Los cálculos a realizar para determinar la cantidad de reactivos en los siguientes acoplamientos dependen de la carga de esta.

5.2.12.1.1.3. TEST DEL CLORANILO

Para una alícuota de resina (1-5 mg) se adicionan una gota de acetaldehído al 2% en DMF seguido de una gota de p-cloranilo al 2% en DMF. Se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos y la resina vira a color azul, el cual indica la presencia de aminas secundarias.

5.2.12.1.1.4. ACOPLAMIENTO FMOC-SER-(OtBu)-OH

Se prepara una disolución de Fmoc-ser-OtBu-OH (1.23mmoles, 473mg), Oxima (1.23mmoles, 175mg) y DIC (2.46 mmoles, 382 μ l) en DMF (0.2M). Una vez disuelto se añade sobre la resina en el reactor de plástico para llevar a cabo la reacción durante 2 h.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, la resina se lava con DMF y se realiza el test del cloranilo para la detección de aminas secundarias, el cual da negativo, indicando que la reacción se ha llevado a cabo. Seguidamente se procede a la desprotección del grupo Fmoc mediante la solución piperidina al 20% en DMF 3x 3ml. Realizamos el test de kaiser para observar completa desprotección y poder acoplar el siguiente aminoácido que constituye la secuencia.

5.2.12.1.1.5. ACOPLAMIENTO FMOC-VAL-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Val-OH (1.23mmoles, 420mg) Oxima (1.23mmoles, 175mg) y DIC (2.46 mmoles, 382 μ l) en DMF (0.2M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción **NO DESPROTEGER FMOC.**

5.2.12.1.1.6. HIDROLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.8.**

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco. Y se lleva a cabo la purificación mediante cromatografía de extracción en fase reversa siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10.

Caracterización del compuesto:

HPLC: C8-30MIN-95-5-GRADIENTE

Tiempo de retención: 20,434min

Pureza =100%

5.2.12.1.2. ACOPLAMIENTO FMOC-VSP-COOH A LA SECUENCIA PEPTÍDICA LIDER

Se prepara una solución de Fmoc-VSP-COOH (0.32mmoles ,185.33mg) Oxima (0.32mmoles, 45.47mg) y DIC (0.64mmoles, 100µl), en DMSO al 25% en DMF (0.4M). A continuación, la mezcla de disolución se añade mediante inyección sobre la resina y se deja en agitación magnética suave durante 2 horas. Finalmente la resina se lava con DMF (3X3ml) y se realiza el test de Kaiser de detección de aminas primarias, el cual dará resultado negativo, indicando que el acoplamiento se ha llevado a cabo.

Una vez observado ésto, se procede a la desprotección del grupo Fmoc del residuo de valina, con piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima se lava con DMF (3x3 ml), y nos disponemos a realizar el test de Kaiser para detectar el grupo amino libre, observando un test positivo.

5.2.12.1.2.1. HIDROLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.8.**

5.2.12.1.2.2. DESPROTECCIÓN DE GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.9.**

5.2.12.1.2.3. PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA, SPE.

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.10.**

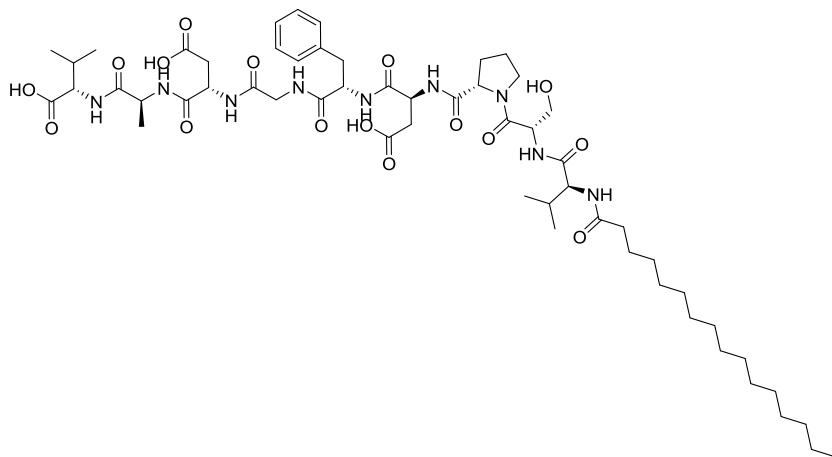
HPLC: C18-30MIN-90-10-GRADIENTE C-D-FÓRMICO

Tiempo de retención: 11,906min

Pureza =88%

5.2.13. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES INTRODUCIDAS EN LA SECUENCIA LIDER VSPDFGDAV

5.2.13.1. SÍNTESIS CONVERGENTE DE LA SECUENCIA AP-Val-Ser-Pro-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (PALMÍTICO-VSPDFGDAV, lsg-0104-1)



Se sigue el procedimiento de síntesis descrito en el apartado 5.2.12.1.1. para la formación del fragmento tripeptídico de secuencia NH₂-VSP hasta la desprotección del grupo amino del residuo de valina, donde

posteriormente será incorporado el ácido palmítico.

5.2.13.1.1. ACOPLAMIENTO DEL ÁCIDO PALMÍTICO

Se disuelve el ácido palmítico (262 mg, 1.03 mmoles), Oxima (146 mg, 1.03 mmoles), y DIC (320 μ L, 2.06 mmoles) en DMF (0.4M). Se añade sobre la resina del reactor cargada con la secuencia NH₂-VSP, en la que el grupo amino de la valina se encuentra disponible para llevar a cabo la reacción, con una carga de 0.25 mmoles/gramo. La reacción se lleva a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, la resina se lava con DMF y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que la reacción se ha llevado a cabo.

5.2.13.1.2. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se prepara una solución de hidrólisis al 0.5% de TFA (9.45 ml DCM: 0.5 ml TES: 0.05 ml TFA), se adiciona sobre la resina en un reactor de vidrio y se mantiene mediante agitación magnética horizontal durante 1 h.

Transcurrido este tiempo se recoge el filtrado y se lava con DCM (3x 4 ml). Se elimina el disolvente bajo presión reducida.

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para C₃₃H₆₂N₃O₆ (M+H)⁺ m/z 596,4639 encontrado 596,4646 (desviación 1,2 ppm)

5.2.13.2. ACOPLAMIENTO DE LOS FRAGMENTOS MEDIANTE SINTESIS CONVERGENTE EN SPPS

El acoplamiento se lleva a cabo mediante la disolución del fragmento Palmítico-VSP-COOH (191 mg, 0.32 mmoles), HATU (119 mg, 0.32 mmoles) y DIPEA (110 μ L, 0.64 mmoles) en DMSO al 25% en NMP (0.4M). La mezcla de reacción se añade sobre la resina del reactor cargada con la secuencia NH₂-DFGDAV, en la que el grupo amino de la valina se encuentra disponible para llevar a cabo la reacción, con una carga de 0.8mmoles/gramo. La reacción se lleva a cabo durante 2horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, la resina se lava con con NMP y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que la reacción se ha llevado a cabo.

5.2.13.2.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.13.2.2. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS PROTECTORES tBU DE LOS RESIDUOS DE ASPÁRTICO DE LA SECUENCIA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.13.2.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

El precipitado blanco se purifica por extracción en fase sólida usando cartuchos de ASPEC SPE Bond Elut C8, y usando un gradiente desde 100% de agua (A), pasando por A:B (90:10,80:20,70:30,60:40,50:50,...) hasta 100% de acetonitrilo (B)

Se obtiene un crudo que se analiza por HPLC y se determina su masa molecular por espectrometría de masas.

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI-TOF: Calculado para C₅₆H₉₀N₉O₁₆ (M+H)⁺ m/z 1144,6506 encontrado 1144,6528 (desviación 1,9ppm)

HPLC-ESI/TOF: LSG-NONA-P-SPE-15-04-2013 (C8)

Tiempo de retención: 9.97min **Pureza=** 93%

5.2.14. SÍNTESIS LINEAL DE LA SECUENCIA VSPDFGDAV

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1 para la síntesis del fragmento hexapeptídico de secuencia DFGDAV, hasta la desprotección del grupo Fmoc del Asp, y se procede al acoplamiento lineal de los demás residuos de aminoácido que conformaran la secuencia.

5.2.14.1 ACOPLAMIENTO DE FMOC-PRO-OH

Se disuelve el ácido **Fmoc-Pro-OH** (47 mg, 0.14 mmoles), Oxima (20 mg, 0.14 mmoles) y DIC (43 μ L, 0.28 mmoles) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.4M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realizó el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc con la mezcla de piperidina al 20% en DMF, 1M Oxima, mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.3.

Una vez finalizado los lavados de desprotección se realiza el test del cloranilo de detección de aminas secundarias, para poder proseguir con el siguiente acoplamiento.

5.2.14.2. TEST DEL CLORANILO

Para una alícuota de resina (1-5 mg) se adicionan una gota de acetaldehído al 2% en DMF seguido de una gota de *p*-cloranilo al 2% en DMF. Se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos y la resina vira a color azul, el cual indica la presencia de aminas secundarias.

5.2.14.3. ACOPLAMIENTO FMOC-SER-tBu-OH

Se disuelve el ácido **Fmoc-Ser-OH** (53 mg, 0.14 mmoles), Oxima (20mg, 0.14 mmoles), y DIC (43 μ L, 0.28 mmoles) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.2M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realizó el test del cloranilo para la detección de aminas secundarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc con la mezcla de piperidina al 20% en DMF, 1M Oxima, mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.3.

Una vez finalizado los lavados de desprotección se realiza el test de Kaiser de nuevo, dándose un test positivo, el cual nos indica que podemos proseguir con el siguiente acoplamiento.

5.2.14.4. ACOPLAMIENTO DE FMOC-VAL-OH

Se disuelve el ácido Fmoc-Val-OH (47 mg, 0.14 mmoles), Oxima (20 mg, 0.14 mmoles) y DIC (43 uL, 0.28 mmoles) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.2M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal. Se lava la resina con DMF y volvemos a llevar a cabo el acoplamiento durante 1 h de reacción.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realizó el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc con la mezcla de piperidina al 20% en DMF, 1M Oxima, mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.3**.

Una vez finalizado los lavados de desprotección se realiza el test de Kaiser de nuevo, dándose un test positivo, el cual nos indica que podemos proseguir con el siguiente acoplamiento.

5.2.15. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES INTRODUCIDAS EN LA SECUENCIA LIDER VSPDFGDAV

5.2.15.1. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA VSPDFGDAV-PALMÍTICO

5.2.15.1.1. ACOPLAMIENTO DEL ÁCIDO PALMÍTICO.

Se disuelve el ácido palmítico (36 mg, 0.14 mmoles), HATU (51 mg, 0.13 mmoles), HOAT (19 mg, 0.14 mmoles) y DIPEA (48uL, 0.28mmoles) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.2M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realizó el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.15.1.2. HIDROLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.15.1.3. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

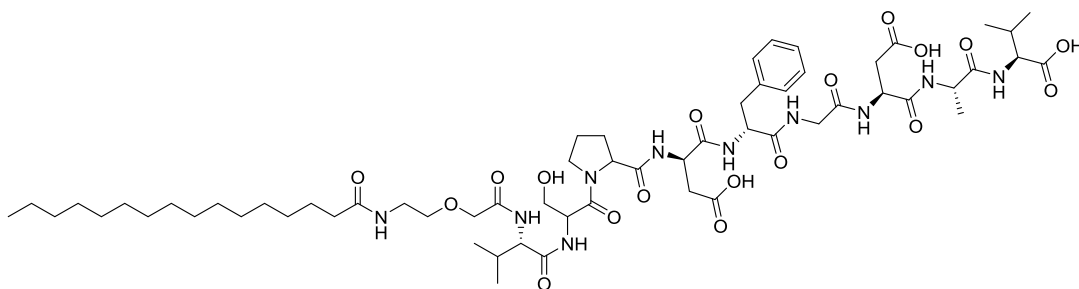
Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.15.1.4. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN FASER REVERSA SPE

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.10. con columna C8.

5.2.16. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA AP-Peg-Val-Ser-Pro-Asp-Phe-Gly-Asp-Ala-Val-COOH (VSPDFGDAV-O1Pen-PALMÍTICO, 27.05.a)



Se sigue el procedimiento descrito para la síntesis del fragmento líder VSPDFGDAV en el apartado X, sintetizado de forma lineal, hasta la desprotección del grupo Fmoc del residuo de valina. A continuación se prosigue con los competentes acoplamiento hasta constituir la secuencia.

5.2.16.1. ACOPLAMIENTO Fmoc-O1Pen-OH

Se disuelve el ácido Fmoc-O1Pen-OH (47 mg, 0.14 mmoles), Oxima (20 mg, 0.14 mmoles) y DIC (43 μ L, 0.28 mmoles) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.2M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal. Se lava la resina con DMF y volvemos a llevar a cabo el acoplamiento durante 1 h de reacción

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realizó el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc con la mezcla de piperidina al 20% en DMF, 1M Oxima, mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.3.

Una vez finalizado los lavados de desprotección se realiza el test de kaiser de nuevo, dándose un test positivo, el cual nos indica que podemos proseguir con el siguiente acoplamiento

5.2.16.2. ACOPLAMIENTO DEL ÁCIDO PALMÍTICO.

Se disuelve el ácido palmítico (36 mg, 0.14 mmoles), HATU (51 mg, 0.13 mmoles), HOAT (19 mg, 0.14 mmoles) y DIPEA (48 μ L, 0.28 mmoles) en una mezcla de DMSO al 25% en DMF (0.2M). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realizó el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.2.16.3. HIDROLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.8.

5.2.16.4. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.2.1.9.

Se precipita con éter etílico, obteniéndose un sólido blanco.

5.2.16.5. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA SPE

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado **5.2.1.10. con columna C8.**

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para $C_{60}H_{95}N_{10}O_{18}$ (M-H)⁺ m/z 1243,6904 encontrado 1243.6819 ($C_{60}H_{95}N_{10}O_{18}$),

HPLC: columna C8;

Método: C8-30min-50-50-gradiente-C-D-fórmico

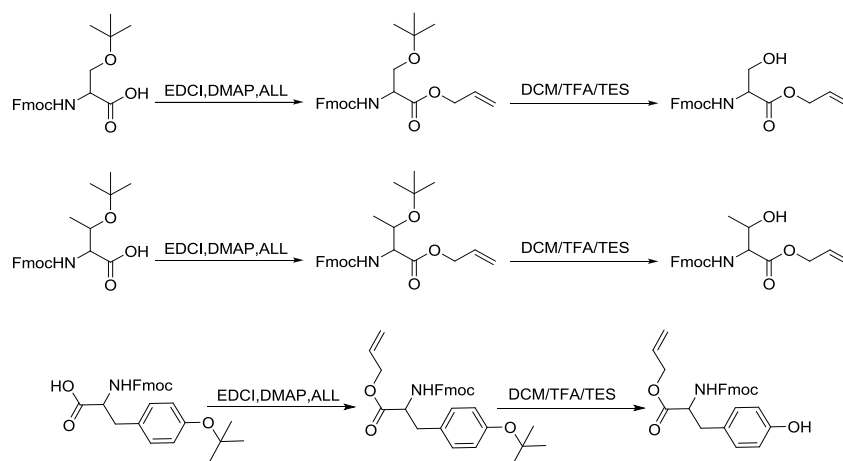
Tiempo de retención: 15.409min

Pureza = 100%

5.3. SÍNTESIS DE GLICOSIDOS

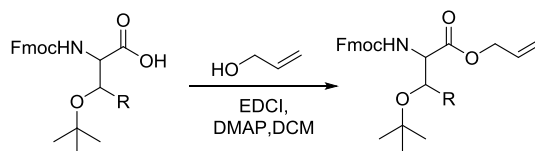
5.3.1. FORMACIÓN DE GLICOSIL-AMINOÁCIDOS DERIVADOS DE SERINA, TREONINA Y TIROSINA

Durante este trabajo, se sintetizaron una serie de O-glicopéptidos. Para ello, se siguió una estrategia de tipo convergente, en la cual, se sintetizaron en solución, glicósidos derivados de aminoácidos naturales serina, treonina, tirosina y no derivados de aminoácidos naturales, como derivados de ácido benzoico y ácido 2-hidroxiacético. Los glicósidos sintetizados se utilizaron adecuadamente protegidos, para poder seguir sin problemas un esquema ortogonal de protección/desprotección



Esquema 1. Protección y desprotección de los espaciadores derivados de aminoácidos naturales

5.3.1.1. MÉTODO GENERAL DE PROTECCIÓN ALÍLICA DEL GRUPO ÁCIDO DE LOS AMINODERIVADOS

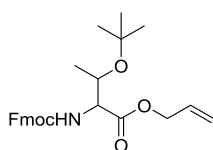


Bajo atmósfera de argón se prepara una solución de Fmoc-L-aa -(OtBu)-OH (1eq) comercial, EDCI (1.5eq), DMAP (0.05) y alcohol alílico (10eq) en diclorometano anhidro (0.15M). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2h. Se monitorizó mediante CCF para observar la formación de producto final en una mezcla de disolventes hexano/AcOEt 3:1.

A continuación se lava con salmuera y extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se seca con MgSO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor.

Se purificó mediante cromatografía en columna flash usando como eluyentes la mezcla hexano/AcOEt (3:1), (1:1). Obteniéndose un sirupo incoloro en cada caso. Los rendimientos de esta reacción se encuentran entre el 85-90% de rendimiento dependiendo del derivado.

5.3.1.1.1. SÍNTESIS DE TERT-BUTIL-ALIL-FMOC-L-SERINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de protección alílica para estos derivados, en el apartado 5.3.1.1.

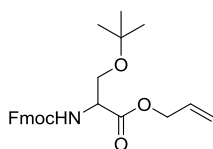
Se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente éter etílico/hexano (1:2).

Caracterización del compuesto:

HPLC: Método: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 12.427min **Pureza=** 92%

5.3.1.1.2. SÍNTESIS DE TERT-BUTIL-ALIL-FMOC-L-TREONINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de protección alílica para estos derivados, en el apartado 5.3.1.1.

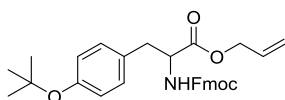
La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyentes Hexano/AcOet en proporción 3:1.

Caracterización del compuesto:

HPLC: Método: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 12.645min **Pureza=** 92%

5.3.1.1.3. SÍNTESIS DE TERT-BUTIL-ALIL-FMOC-L-TIROSINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de protección alílica para estos derivados, en el apartado 5.3.1.1.

Caracterización del compuesto:

HPLC: Método: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

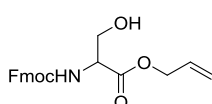
Tiempo de retención: 13.331min **Pureza=** 90%

5.3.1.2. MÉTODO GENERAL DE DESPROTECCIÓN DEL GRUPO tBu.



Se prepara una disolución de tert-butil-alil-Fmoc-L-aa en una mezcla de ácido trifluoroacético al 45% en diclorometano y trietilsilano (0,1M). Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se monitorizó mediante CCF para observar la formación de producto final en una mezcla hexano/AcOEt (3:1). Finalmente se evapora el disolvente en el rotavapor y el producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente hexano/AcOEt en distintas proporciones en cada caso. Se obtuvieron los compuestos pertinentes como sólidos blancos, con un rendimiento comprendido entre 85-90%.

5.3.1.2.1. SÍNTESIS DE ALIL-FMOC-L-SERINA



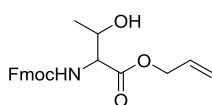
Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de desprotección de tBu para estos derivados, en el apartado 5.3.1.2. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema hexano/AcOEt

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para $C_{21}H_{22}NO_5$ (M+H)⁺ m/z 368.1498 encontrado 368.1500 (desviación 0.5ppm)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, 2H), 7.62 (d, 2H), 7.45 – 7.30 (m, 4H), 7.27 (s, 1H), 5.93 (ddd, 1H), 5.72 (d 1H), 5.39 – 5.23 (m, 2H), 4.71 (d, 2H), 4.58 – 4.34 (m, 3H), 4.25 (t, 1H), 4.00 (dd, 2H).

5.3.1.2.2. SÍNTESIS DE ALIL-FMOC-L-TREONINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de desprotección de tBu para estos derivados, en el apartado 5.3.1.2. .El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema hexano/AcOEt

en proporción 5:1.

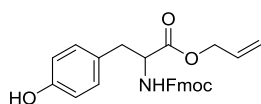
Caracterización del compuesto:

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, 2H), 7.61 (d, 2H), 7.36 (dt, 4H), 5.91 (ddd, 1H), 5.58 (d, 1H), 5.39 – 5.20 (m, 2H), 4.69 (d, 2H), 4.40 (dd, 4H), 4.25 (t, 1H), 4.12 (dd, 1H), 1.26 (dt, 3H).

HPLC, método: : GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 12,645 **Pureza=** 92%

5.3.1.2.3. SÍNTESIS DE ALIL-FMOC-L-TIROSINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de desprotección de tBu para estos derivados, en el apartado 5.3.2.1. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema hexano/AcOEt en proporción 5:1

Caracterización del compuesto:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (d, 2H), 7.60 – 7.48 (m, 2H), 7.37 (dt, 4H), 6.97 (d, 2H), 6.74 (d, 2H), 5.90 (ddd, 1H), 5.31 (dd, 3H), 4.72 – 4.32 (m, 6H), 4.22 (t, 1H), 3.07 (m, 1H).

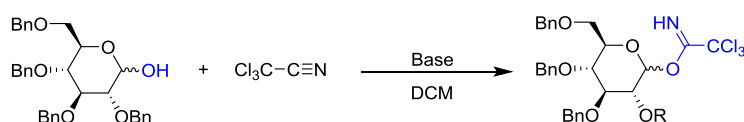
HPLC, método: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 13,331min **Pureza=** 89%

5.3.1.3. FORMACIÓN DE GLICOSIDOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS NATURALES.

5.3.1.3.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE SÍNTESIS DE O-GLICOSIL-TRICLOROACETIMIDATOS DERIVADOS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSA

La síntesis de estos compuestos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Schmidt en 1986, (Angew. Chem. 98, 213), en el que usaba O-glucosil-tricloroacetimidatos protegidos con bencilo como donadores de glucosilo para síntesis estereoselectivas.



Para llevar a cabo la síntesis de estos glucosil-tricloroacetimidados se utilizaron dos rutas, descritas a continuación.

RUTA A utilizando DBU como base. Bajo atmósfera de argón se prepara una solución de 2,3,4,6-tetra-O-bencil-glucopiranososa (1eq, 1.73 mmoles) comercial en diclorometano anhidro (0.2M) se adicionó DBU (1.1eq, 1.9 mmoles), y tricloroacetnitrilo (12.6eq, 22mmoles). Se mantuvo en agitación, a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente y el exceso de CCl_3CN se evaporaron a presión reducida. Se purificó por cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo (6:1). Se obtuvo un sirupo incoloro.

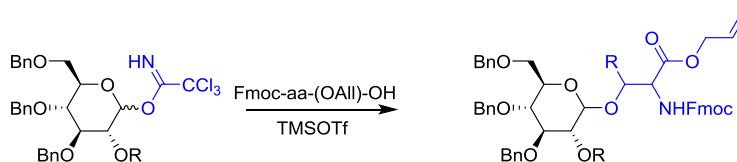
RUTA B utilizando K_2CO_3 como base. Bajo atmósfera de argón se solubiliza el azúcar de partida (1eq) en diclorometano anhidro (0.1M). Seguidamente y mediante presión positiva se añaden tricloroacetnitrilo (12.5eq) y carbonato potásico (4.8eq). La reacción se mantuvo en agitación durante toda la noche. Se

filtra sobre celita, se elimina el disolvente a presión reducida en el rotavapor y el compuesto obtenido se utiliza directamente para la siguiente reacción.

HRMS ESI Calculado para $C_{36}H_{36}NO_6NaCl_3$ $(M+Na)^+$ m/z 706.1506 encontrado 706.1506 (desviación 0ppm)

Por ambas rutas se obtienen los anómeros alfa y beta, sin embargo, la ruta b aunque es mucho más lenta, es más limpia.

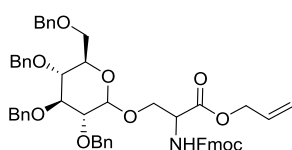
5.3.1.3.2. PROCEDIMIENTO GENERAL DE SÍNTESIS DE GLICOSIL-AMINOÁCIDOS DERIVADOS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSA



Se realiza vacío sobre el matraz de fondo redondo en el que se va a llevar a cabo la reacción, con tamiz molecular de 4Å durante dos horas. Transcurrido este tiempo, bajo atmósfera de argón, se prepara una disolución de glucopiranosiltricloroacetimidato (2eq), Fmoc-aa(OAlI)-OH (1eq) en diclorometano anhidro (0.05M). La mezcla de reacción se lleva a $-45^{\circ}C$ con un baño de hielo seco. Se mantiene en agitación durante 10 minutos a esta temperatura, donde posteriormente se adiciona TMSOTf (0.5q). La mezcla de reacción lentamente va elevando su temperatura hasta adquirir temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción a las dos horas (monitorizado por TLC con una mezcla hexano /éter etílico 1:1), la mezcla de reacción se neutraliza con DIPEA. Se lleva a cabo el lavado con salmuera y extracción con DCM. La fase orgánica se seca con $MgSO_4$ anhidro. Se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano /éter etílico en distintas proporciones según el alil derivado.

El rendimiento de esta reacción se encuentra entre el 70-85% dependiendo del derivado.

5.3.1.3.2.1. SÍNTESIS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL ALIL-FMOC-L-SERINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de síntesis de derivados de glicosil-aminoácidos, en el apartado 5.3.1.3.2. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema de disolventes hexano/éter etílico en las proporciones 5:1, 3:1,

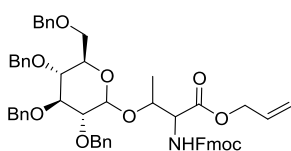
2:1, 1:1.(R=52%)

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para $C_{55}H_{56}NO_{10}$ (M+H)⁺ m/z 890.3904 encontrado 890.3910 (desviación 0.7ppm),

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.45 – 7.06 (m, 20H), 5.60 (d, 1H), 5.39 – 5.18 (m, 3H), 5.00 – 3.34 (m, 24H), 3.10 (dd, 1H).

5.3.1.3.2.2. SÍNTESIS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL ALIL-FMOC-L-TREONINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de síntesis de derivados de glicosil-aminoácidos, en el apartado 5.3.1.3.2. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema de disolventes hexano /éter etílico en las proporciones 5:1, 3:1 y

1:1

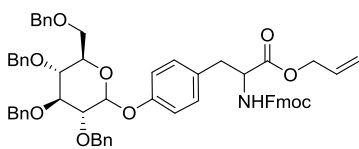
Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para $C_{56}H_{58}NO_{10}$ (M+H)⁺ m/z 904.4061 encontrado 904.4056 (desviación -0.6ppm)

HPLC, método: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

Tiempo de retención: 18,688min (65%) y 19,079min (35%)

5.3.1.3.2.3. SÍNTESIS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL ALIL-FMOC-L-TIROSINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de síntesis de derivados de glicosil-aminoácidos, en el apartado 5.3.1.3.2. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema de disolventes hexano/éter etílico

en las proporciones 5:1,3:1,1:1. Y se realizó una segunda purificación mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente la mezcla de disolventes DCM/MeOH (10:0.5)

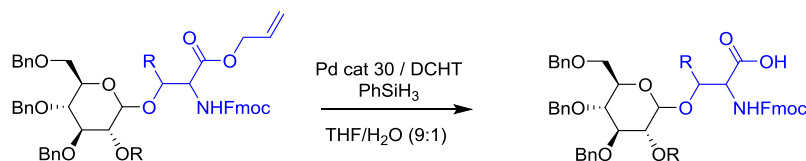
Caracterización del compuesto:

¹H NMR (400 MHz, cdcl₃) δ 7.74 (d, 2H), 7.55 (t, 2H), 7.43 – 7.19 (m, 39H), 7.19 – 7.15 (m, 2H), 7.15 – 7.11 (m, 2H), 7.00 (s, 8H), 6.63 (d, 1H), 5.42 (d, 1H), 5.26 (m, 3H), 5.05 – 4.26 (m, 27H), 4.25 – 3.61 (m, 21H), 3.56 (d, 3H), 3.06 (s, 4H).

HPLC, método: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

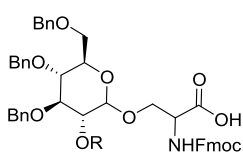
Tiempo de retención: 18,388min (70%) y 18,688min (30%)

5.3.1.3.3. PROCEDIMIENTO GENERAL DE DESPROTECCIÓN DEL GRUPO ALÍLICO DE LOS GLICOSIL-AMINOÁCIDOS DERIVADOS



Se burbujea argón sobre una suspensión de Pd(II) EnCat™ con una carga de 0.4 mmoles/g (0.2 equivalentes) en THF/H₂O 9:1 (0.05M) durante 10 minutos. Se adiciona a presión positiva DCHT (0.6 equivalentes, 0.06 mmoles) y el correspondiente derivado glicosilico protegido (1 equivalente, 0.1 mmol). Finalmente, se inyecta PhSiH₃ (12 equivalentes) y se deja burbujear argón durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra sobre una placa filtrante con Celita®, llevando a cabo lavados sobre el filtrado con acetato de etilo y salmuera. Posteriormente Se extrae la fase orgánica y se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida en el rotavapor. La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano /éter etílico en distintas proporciones según el glicosido derivado.

5.3.1.3.3.1. SÍNTESIS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL FMOC-L-SERINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de desprotección de glicosil-aminoácidos protegidos en su función carboxilo por un grupo alilo, en el apartado 5.3.1.3.3. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente la mezcla de disolventes DCM/MeOH en proporción 10:0.5. (R=76%)

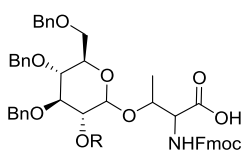
Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para C₅₂H₅₁NO₁₀Na (M+Na)⁺ m/z 872.3411 encontrado 872.3406 (desviación - 0.6ppm)

HPLC: Método: 40H₂O-60ACN.28min.c18

Tiempo de retención: 21.767,22.200 **Pureza=** 53% y 33% respectivamente.

5.3.1.3.3.2. SÍNTESIS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL FMOC-L-TREONINA

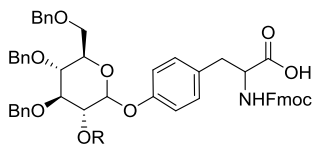


Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de desprotección de glicosil-aminoácidos protegidos en su función carboxilo por un grupo alilo, en el apartado 5.3.1.3.3. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema de disolventes hexano /éter etílico en las proporciones hexano/acetato de etilo (1:1)

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para $C_{53}H_{54}NO_{10}$ ($M+H$)⁺ m/z 864.3748 encontrado 864.3751 (desviación 0.3ppm)

5.3.1.3.3.3. SÍNTESIS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL FMOC-L-TIROSINA



Se lleva a cabo como viene descrito en el método general de desprotección de glicosil-aminoácidos protegidos en su función carboxilo por un grupo alilo, en el apartado 5.3.1.3.3. El producto se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente el sistema de disolventes hexano /éter etílico en proporción 1:1.

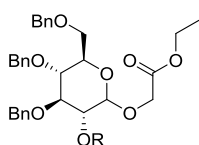
Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para $C_{56}H_{57}NO_{10}Na$ ($M+Na$)⁺ m/z 926,3880 encontrado 926,3881 (desviación 0.1ppm)

5.3.2. FORMACIÓN DE GLICOSIDOS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSA NO DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS NATURALES, GLICOLATO DE ETILO Y PARAHIDROXIBENZOATO DE ETILO.

Se realiza vacío sobre el matraz de fondo redondo en el que se va a llevar a cabo la reacción, con tamiz molecular de 4Å, durante dos horas. Transcurrido este tiempo, bajo atmósfera de argón, se prepara una disolución de glucopiranosiltricloroacetimidato (1eq), R-(COOEt)-OH (6eq) en éter etílico anhidro (0.2M). La mezcla de reacción se lleva a -30°C con un baño de hielo seco. Se mantiene en agitación durante 10 minutos a esta temperatura, donde posteriormente se adiciona TMSOTf (0.5q). La mezcla de reacción lentamente va elevando su temperatura hasta adquirir temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción a las dos horas (seguido por TLC hexano /éter etílico 1:1), la mezcla de reacción se neutraliza con DIPEA. Se lleva a cabo el lavado con salmuera y extracción con AcOEt. La fase orgánica se seca con $MgSO_4$ anhidro. Se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano /éter etílico en distintas proporciones según el éster derivado.

5.3.2.1. SÍNTESIS DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL ACETATO DE ETILO



Se sigue el procedimiento general de síntesis de glicósidos de 2,3,4,6-tetra-o-bencil-glucopiranososa no derivados de aminoácidos naturales, en el apartado 5.3.2.

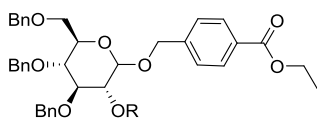
La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente la mezcla de disolventes Hexano/AcOEt (5:1) (R=51%)

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para $C_{39}H_{41}O_8Na$ ($M+Na$)⁺ m/z 649,2777 encontrado 649,2767 (desviación -1,5ppm)

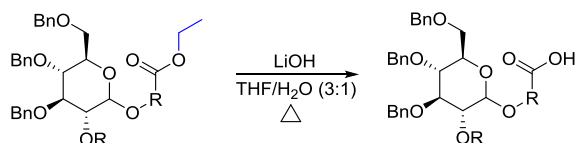
HPLC: CONDICIONES DE ANALISIS HPLC-ESI/TOF. **Tiempo de retención:** 9,29 min **Pureza=** 100%

5.3.2.2. SÍNTESIS DE 4-(2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL-METIL)-BENZOATO DE ETILO



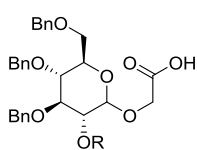
Se sigue el procedimiento general de síntesis de glicosil-aminoácidos derivados de 2,3,4,6-tetra-o-bencil-glucopiranososa en el apartado 5.3.2

5.3.2.3. PROCEDIMIENTO GENERAL DE DESPROTECCIÓN DE ESTERES DE ETILO PARA LOS GLICOSIDOS NO DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS.



Se prepara una solución del etil derivado (1 eq), LiOH (1eq) en THF/H₂O 3:1 (0.7M). La reacción transcurre a reflujo durante 5h. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo mediante CCF utilizando como eluyente la mezcla de disolventes éter etílico/hexano (1:1).

5.3.2.3.1. SÍNTESIS DEL ÁCIDO 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL ACÉTICO

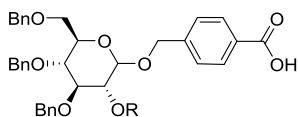


Se sigue el procedimiento general de desprotección de esteres de etilo descrito en el apartado 5.3.2.3.

La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente la mezcla de disolventes AcOEt/MeOH en proporción 20:1 (Rendimiento cuantitativo)

HRMS ESI Calculado para C₃₆H₃₈O₈Na (M+H)⁺ m/z 621.2464 encontrado 621.2463 (desviación -0.2ppm),

5.3.2.3.2. SÍNTESIS DEL ÁCIDO 4-(2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GLUCOPIRANOSIL-METIL) BENZOICO



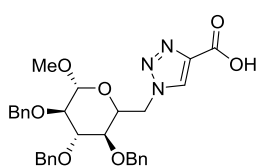
Se sigue el procedimiento general de desprotección de esteres de etilo descrito en el apartado 5.3.2.3.

La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente la mezcla de disolventes AcOEt/MeOH en proporción 20:1

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para C₄₂H₄₂O₈Na (M+Na)⁺ m/z 697.2777 encontrado 697.2784 (desviación 1ppm)

5.3.3. SÍNTESIS DEL GLUCOPIRANOSIL DERIVADO DEL ÁCIDO 1,2,3-TRIAZOL.



Se lleva a cabo mediante click chemistry en microondas, a 60C para evitar descarboxilación.

Caracterización del compuesto:

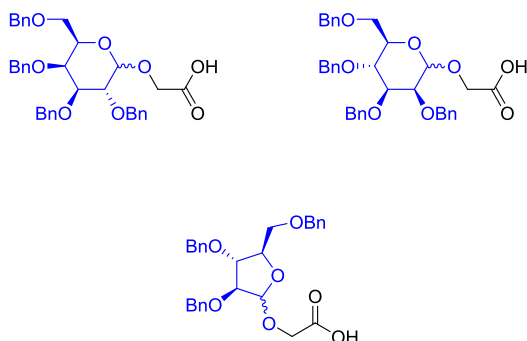
HRMS ESI Calculado para $C_{31}H_{33}N_3O_7Na$ ($M+Na$)⁺ m/z 582.2216 encontrado 582.2208 (-1.4ppm)

HPLC Método: GLICOPÉPTIDOS 22min control termostato 90-10

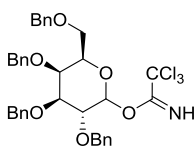
Tiempo de retención: 13,729min

Pureza =96%

5.3.4. FORMACIÓN DE GLICOSIDOS DERIVADOS DE GLICOLATO DE ETILO CON DISTINTOS AZUCARES

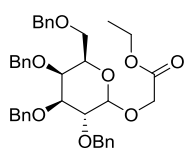


5.3.4.1. PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE FORMACIÓN DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-D-GALACTOPIRANOSIL TRICLOROACETONITRILLO



A una solución de 2,3,4,6-tetra-O-bencil-D-galactopiranososa (0.5 mmoles, 226 mg) en diclorometano anhidro (0.05 M) en un baño de hielo a 0°C, bajo atmosfera inerte de argón, se añade mediante presión positiva tricloroacetnitrilo (5 mmoles, 503 µl) y DBU (0.05 mmoles, 7.5 µl). Se mantiene esta temperatura durante 5 minutos, posteriormente se retira la fuente de frio y se deja que la mezcla de reacción eleve la temperatura hasta alcanzar temperatura ambiente. A continuación se mantiene la reacción en agitación durante 1 h. La formación de producto se sigue mediante CCF en una mezcla de hexano/AcOEt (3:1) como eluyente. Finalizada la reacción se elimina el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y el compuesto obtenido se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente la mezcla de disolventes ciclohexano/AcOet (7:1)

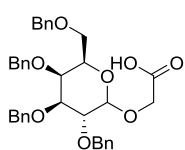
5.3.4.1.1. SÍNTESIS DEL GLICOSIDO 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-GALACTOPIRANOSIL ACETATO DE ETILO



Se realiza vacío sobre el matraz de fondo redondo en el que se va a llevar a cabo la reacción, con tamiz molecular de 4Å, durante dos horas. Transcurrido este tiempo, bajo atmósfera de argón, se prepara una disolución de

galactopiranosiltricloroacetimidato (0.181mmoles, 124mg), glicolato de etilo (0.22 mmoles.21 µl) en DCM anhidro (0.05 M). La mezcla de reacción se lleva a -78°C con un baño de hielo seco. Se mantiene en agitación durante 10 minutos a esta temperatura, donde posteriormente se adiciona TMSOTf (0.018 mmoles, 4 µl). Se retira el baño de hielo seco y la mezcla de reacción lentamente va elevando su temperatura hasta adquirir temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción a las dos horas (seguido por TLC hexano/éter etílico 1:1), la mezcla de reacción se neutraliza con Et₃N. Se evapora el disolvente en el rotavapor a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano /éter etílico en proporción 7:1.

5.3.4.1.1.1 .DESPROTECCIÓN DEL GRUPO ESTER ETÍLICO DEL CARBOXILO DERIVADO.



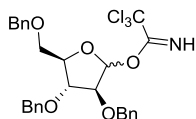
Se sigue el procedimiento general de desprotección de esteres de etilo descrito en el apartado 5.3.2.3. La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente la mezcla de disolventes AcOEt/MeOH 20:1

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI: Calculado para C₃₆H₃₈O₈Na (M+Na) m/z 621.2464 encontrado 621.2435 (desviación -4.7ppm)

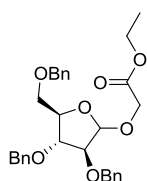
HPLC ESI/TOF Tiempo de retención = 11.58min.

5.3.4.2. PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE FORMACIÓN DE 2,3,5-TRI-O-BENCIL-β-D-ARABIRANOSIL TRICLOROACETONITRILLO



A una solución de 2,3,5-tri-O-bencil-β-D-arabinofuranosa (0.12 mmoles, 50 mg) en diclorometano anhidro (0.05 M) en un baño de hielo a 0°C, bajo atmosfera inerte de argón, se añade mediante presión positiva tricloroacetinitrilo (0.6 mmoles, 60 µl) y DBU (0.05 mmoles, 8 µl). Se mantiene esta temperatura durante 5 minutos, posteriormente se retira la fuente de frío y se deja que la mezcla de reacción eleve la temperatura hasta alcanzar temperatura ambiente, donde se mantiene la reacción en agitación durante 1 h. La formación de producto se sigue mediante CCF en una mezcla de hexano/AcOEt (3:1) como eluyente. Finalizada la reacción se elimina el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y el compuesto obtenido se purifica mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente la mezcla de disolventes ciclohexano/AcOet (7:1)

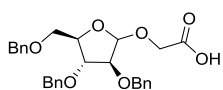
5.3.4.2.1. SÍNTESIS DEL GLICOSIDO 2,3,5-TRI-O-BENCIL-β-D-ARABIRANOSIL ACETATO DE ETILO



Se realiza vacío sobre el matraz de fondo redondo en el que se va a llevar a cabo la reacción, con tamiz molecular de 4Å, durante dos horas. Transcurrido este tiempo, bajo atmósfera de argón, se prepara una disolución de arabinofuranosiltricloroacetimidato

(1.77 mmoles, 1000 mg), glicolato de etilo (2.12 mmoles.21 μ l) en DCM anhidro (0.05 M). La mezcla de reacción se lleva a -78°C con un baño de hielo seco. Se mantiene en agitación durante 10 minutos a esta temperatura, donde posteriormente se adiciona TMSOTf (0.17 mmoles, 32 μ l). Se retira el baño de hielo seco y la mezcla de reacción lentamente va elevando su temperatura hasta adquirir temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción a las dos horas, seguido por TLC hexano /AcOEt (3:1), la mezcla de reacción se neutraliza con Et_3N . Se evapora el disolvente en el rotavapor a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano / AcOEt en proporción 7:1.

5.3.4.2.1.1. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO ESTER ETÍLICO DEL CARBOXILO DERIVADO.

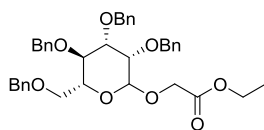


Se sigue el procedimiento general de desprotección de esteres de etilo descrito en el apartado 5.3.2.3. La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente la mezcla de disolventes AcOEt/MeOH

20:1

5.3.4.3. PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE FORMACIÓN DE 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-D-MANOPIRANOSIL TRICLOROACETONITRILLO

5.3.4.3.1. SÍNTESIS DEL GLICOSIDO 2,3,4,6-TETRA-O-BENCIL-MANOPIRANOSIL ACETATO DE ETILO



Se realiza vacío sobre el matraz de fondo redondo en el que se va a llevar a cabo la reacción, con tamiz molecular de 4\AA , durante dos horas. Transcurrido este tiempo, bajo atmósfera de argón, se prepara una disolución de manopiranosiltricloroacetimidato (0.181 mmoles, 124 mg), glicolato de etilo (0.22 mmoles.21 μ l) en DCM anhidro (0.05 M). La mezcla de reacción se lleva a -78°C con un baño de hielo seco. Se mantiene en agitación durante 10 minutos a esta temperatura, donde posteriormente se adiciona TMSOTf (0.018 mmoles, 4 μ l). Se retira el baño de hielo seco y la mezcla de reacción lentamente va elevando su temperatura hasta adquirir temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción a las dos horas, seguido por TLC hexano /AcOEt (3:1), la mezcla de reacción se neutraliza con Et_3N . Se evapora el disolvente en el rotavapor a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano / AcOEt en proporción 7:1

HRMS ESI Calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ m/z 649.2777 encontrado 649.2781 (desviación 0.6ppm)

HPLC-ESI/TOF Tiempo de retención: 13.25 min Pureza= 89%

5.4. SÍNTESIS DE GLICOPEPTIDOS

5.4.1. MÉTODO GENERAL DE SÍNTESIS CONVERGENTE PARA LA FORMACIÓN DE GLICOPÉPTIDOS EN SPPS

Se prepara una disolución de glicósil derivado desprotegido en su extremo carboxílico R-COOH (3 equivalentes), HATU (3.9 equivalentes) HOAT (4 equivalentes) y DIPEA (8eq) en DMF (0.2M) en este orden hasta su completa disolución. Seguidamente se añade sobre la resina en el reactor de plástico. La reacción se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente, mediante agitación horizontal.

Finalmente la resina se lava con DMF (3 x 4ml), y se realiza el test de Kaiser para aminas primarias observándose un test negativo, que indica el correcto acoplamiento.

5.4.2. HIDROLISIS DE LA RESINA

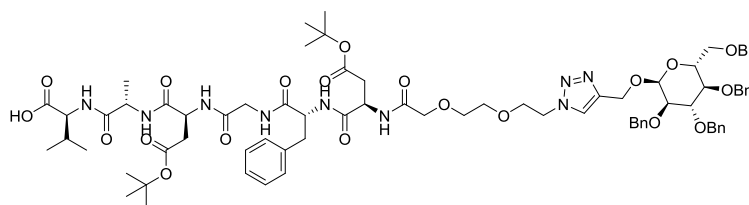
La hidrolisis de la secuencia peptídica del soporte sólido de poliestireno, se lleva a cabo en un reactor de vidrio, mediante una solución de TFA al 1% en DCM y TES durante 1 h. Una vez finalizada la reacción de hidrolisis, se recoge el filtrado y se elimina el disolvente a presión reducida en el rotavapor.

5.4.3. DESPROTECCIÓN GRUPOS tBu

Se prepara una solución de hidrólisis al 50% de TFA (4.5 ml DCM: 0.5 ml TES: 5 ml TFA), se adiciona sobre el sirupo obtenido anteriormente, y se mantiene sobre agitación magnética durante 1h.

Eliminamos el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y se lava con dietiléter frío (3 x 4 ml) y se elimina en el sobrenadante para sustraer las impurezas derivadas de los restos de resina.

5.4.4. SÍNTESIS DE GLICOPÉPTIDOS MEDIANTE CLICK CHEMISTRY EN SPPS.



En un vial de microondas se prepara una disolución del glucopiranosil derivado de alcohol propargílico (0.04mmoles, 23 mg), CuI (0.002mmoles), hexapéptido derivado de azida (0.02 eq) en DMF grado síntesis de péptidos (0.2 M). Se sella el vial y la reacción transcurre mediante absorción normal a 60°C en microondas durante una hora.

Caracterización del compuesto:

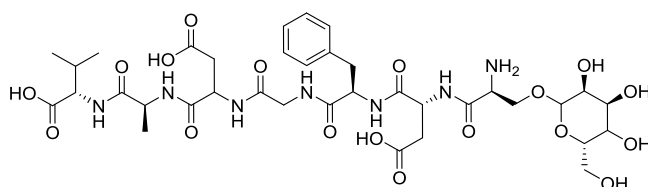
HRMS ESI Calculado para $C_{78}H_{102}N_9O_{20}$ (M+H)⁺ m/z 1484.7241 encontrado 1484.7239 (desviación - 0.1ppm)

5.4.5. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA HIDROGENACIÓN CATALÍTICA

Se prepara una disolución de glicopéptido en una mezcla dioxano/agua (2:1) con Pd-C al 10% como catalizador a una presión de 67 psi se lleva a cabo durante 4 horas a temperatura ambiente. La reacción se siguió mediante inyección en LC/MS. Una vez finalizada, se filtra sobre celita y se evapora el disolvente en el rotavapor a presión reducida. El glicopéptido obtenido se precipita en éter dietílico frío, se retira el sobrenadante. El glicopéptido desprotegido, se purifica mediante cromatografía en fase reversa, mediante cartuchos SPE C18 de 500mg. Utilizando un gradiente

5.4.5.1. GLICOPEPTIDO NH2-(D-GLUCOPIRANOSIL)-SER-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH

5.4.5.1.1. GLICOPEPTIDO-NH2-(D-GLUCOPIRANOSIL)-SER-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH INTERMEDIO CON BENCILOS Y SIN TBU



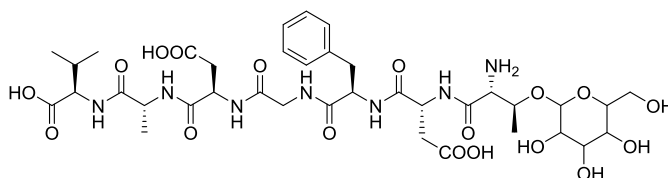
HRMS ESI Calculado para $C_{64}H_{78}N_7O_{18}$ (M+H)⁺ m/z 1232.5403 encontrado 1232.5438 (desviación 2.8ppm)

HPLC-ESI/TOF Tiempo de retención = 11.191 y 11.286min (41% y 59% respectivamente) Pureza =100%

5.4.4.1.2. GLICOPEPTIDO- NH2-(D-GLUCOPIRANOSIL)-SER-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH FINAL

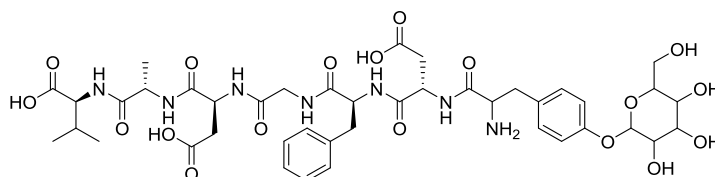
HRMS ESI Calculado para $C_{36}H_{54}N_7O_{18}$ (M+H)⁺ m/z 872.3525 encontrado 872.3513 (desviación -1.4 ppm)

5.4.5.2. GLICOPÉPTIDO NH2-(D-GLUCOPIRANOSIL)-THR-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH



HRMS ESI Calculado para $C_{37}H_{56}N_7O_{18}$ (M+H)⁺ m/z886.3682 encontrado 886.3680 (desviación -0.2ppm)

5.4.5.3. GLICOPÉPTIDO NH2-(D-GLUCOPIRANOSIL)-TYR-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH



5.4.5.3.1. GLICOPEPTIDO INTERMEDIO NH₂-(D-GLUCOPIRANOSIL)-SER-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH CON BENCILOS SIN TBU

HRMS ESI Calculado para C₇₀H₈₂N₇O₁₈(M+H)⁺ m/z 1308.5716 encontrado 1308.5721 (desviación 0.4ppm)

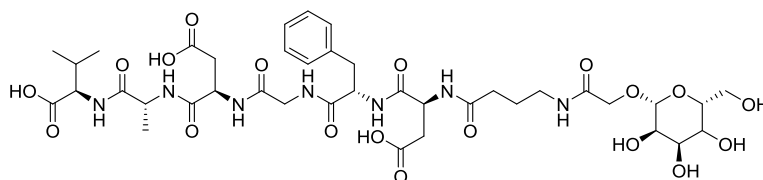
HPLC-ESI/TOF Tiempo de retención = 16.10min Pureza= 100%

5.4.5.3.2. GLICOPEPTIDO NH₂-(D-GLUCOPIRANOSIL)-TYR-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH FINAL (LSG 626)

HRMS ESI Calculado para C₄₂H₅₈N₇O₁₈ (M+H)⁺ m/z 948.3838 encontrado 948.3845 (desviación 0.7ppm)

HPLC, método GLICOPÉPTIDOS 20Min. Tiempo de retención = 14.970min Pureza= 85%

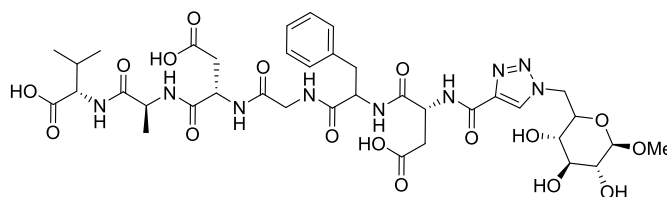
5.4.5.4. GLICOPÉPTIDO N-((D-GLUCOPIRANOSIL)-METIL-CARBONIL)-PEG-ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH (PEG= GABA) FINAL



HRMS ESI Calculado para C₃₉H₅₆N₇O₁₉(M-H)⁺ m/z 926.3631 encontrado 926.3623 (desviación -0.9ppm)

HPLC-ESI/TOF Tiempo de retención: 2.03 y 2.10min Pureza= 100%

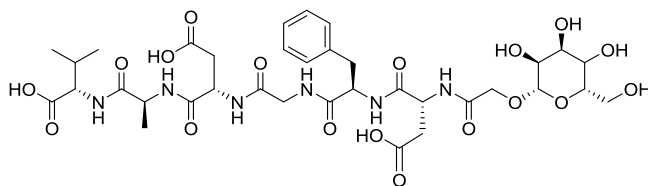
5.4.5.5. GLICOPÉPTIDO N-(N'-((D-GLUCOPIRANOSIL)-METIL-CARBONIL)AMINOBTANIL-) ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH



HRMS ESI Calculado para C₃₇H₅₂N₉O₁₇ (M+H)⁺ m/z 894.3481 encontrado 894.3478 (desviación -0.3 ppm)

HPLC, método =GLICOPÉPTIDOS CORTO. Tiempo de retención = 6,655min. Pureza =95%

5.4.5.6. GLICOPÉPTIDO N-((D-GLUCOPIRANOSIL-)METIL-CARBONIL-)ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH



5.4.5.6.1. GLICOPEPTIDO INTERMEDIO N-((D-GLUCOPIRANOSIL-)METIL-CARBONIL-)ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH SIN DESPROTEGER.

HRMS ESI Calculado para $C_{71}H_{91}N_6O_{18}$ $(M+H)^+$ m/z 1315.6390 encontrado 1315.6395 (desviación 0.4ppm)

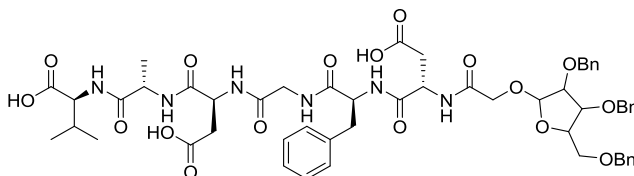
5.4.5.6.2. GLICOPEPTIDO INTERMEDIO N-((D-GLUCOPIRANOSIL-)METIL-CARBONIL-)ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH SIN TBU CON BENCILOS

HRMS ESI Calculado para $C_{63}H_{75}N_6O_{18}$ $(M+H)^+$ m/z 1203.5138 encontrado 1203.5148 (desviación 0.8ppm)

5.4.5.6.3. GLICOPEPTIDO N-((D-GLUCOPIRANOSIL-)METIL-CARBONIL-)ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH FINAL

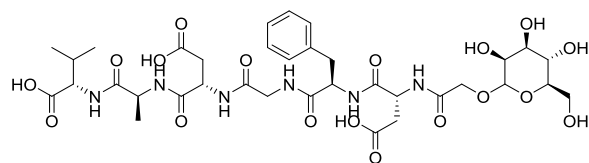
HRMS ESI Calculado para $C_{35}H_{51}N_6O_{18}$ $(M+H)^+$ m/z 843.3260 encontrado 843.3248 (desviación -1.4 ppm)

5.4.5.7. GLICOPEPTIDO N-((D-ARABINOFURANOSIL-)METIL-CARBONIL-)ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH



HRMS ESI Calculado para $C_{55}H_{66}N_6O_{17}$ $(M+H)^+$ m/z 1105.4382 encontrado 1105.4375 (desviación -0.6ppm)

5.4.5.8. GLICOPEPTIDO N-((D-MANOPIRANOSIL-)METIL-CARBONIL-)ASP-PHE-GLY-ASP-ALA-VAL-COOH FINAL



HRMS ESI Calculado para $C_{35}H_{51}N_6O_{18}(M+H)^+$ m/z 843.3260 encontrado 843.3286 (desviación 3.1ppm)

5.5. ENSAYOS DE AFINIDAD

5.5.1. ENSAYOS STD

5.5.1.1. APARATO

Los experimentos STD se llevaron a cabo en el Centro de Instrumentación Científica, con la ayuda del Dr. Alí Haidour Benamín, en el Espectrómetro de RMN de 600 MHz (4 canales) VARIAN DIRECT DRIVE, provisto de una sonda de triple resonancia $^1\text{H} \{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ de detección indirecta con gradientes XYZ de 5 mm, sonda de cuádruple resonancia $^1\text{H} \{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}\}$ de detección indirecta con gradientes XYZ de 5 mm, criosonda de triple resonancia $\{^1\text{H}, ^{19}\text{F}\} \{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$, regulador de temperatura sin nitrógeno líquido y sistema de sintonización automática en el canal de ^1H . Se trabaja a una temperatura constante de 25°C

EL primer paso para llevar a cabo el experimento es la supresión de la señal de agua (120 scans). En segundo lugar se realiza un espectro de resonancia H-RMN al ligando, habiéndole suprimido la señal de agua (1D DPGSE wáter suppression) (120-240 scans) y realizar un barrido a 4 scans para observar donde poder irradiar. El tercer paso es realizar el espectro de STD, con la experiencia 1D Saturation Transfer Difference a 1024 scans

Hay que tener en cuenta para este tipo de experimentos que las moléculas pequeñas se relajan lentamente y se encuentran en un equilibrio dinámico en solución entre el estado libre y el estado de unión mientras que las moléculas grandes, se relajan muy rápidamente. Así, tiempos largos de adquisición aseguran la detección de la magnetización que se transfiere a la unión de pequeñas moléculas. Pero hay que tener en cuenta que si el ligando es una proteína con un elevado peso molecular, es aconsejable emplear tiempos cortos de adquisición. La señal sustraída debida a la diferencia entre los espectros es ofrecida por el software VNMRJ.⁸⁰

5.5.1.2. CONTROL POSITIVO GST-PDZ

La obtención del dominio PDZ como comenté anteriormente llevada a cabo por nuestros colaboradores se obtuvo mediante unión a proteínas de fusión, en este caso GST (Glutation S-transferasa).

5.5.1.3. CONTROL NEGATIVO GST

La concentración de GST es de 1mg/ml (Pm= 27000Da) (37µM). La concentración final de GST para el ensayo será de 20µM. Será de 20µM y no de 16µM como la proteína GST-PDZ, para asegurarnos y no tener dudas de que si sale negativo es porque es negativo.

⁸⁰ Venkitakrishnan RP, Benard O, Max M, Markley JL, Assadi-Porter FM. Use of NMR saturation transfer difference spectroscopy to study ligand binding to membrane proteins. In: *Membrane protein structure and dynamics*. Springer; 2012:47-63

5.5.1.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS

Volumen total en el tubo de RMN será de 600 μ l. Durante el ensayo se irá reduciendo la concentración de proteína en función de si hay interacción o no, que nos indique afinidad de esta con el ligando. De manera que se empieza con una concentración de proteína igual a 16 μ M, disminuyendo cada vez, en 4 veces su concentración, hasta llegar a 0.0625 μ M en algunos casos.

La concentración de ligando en el tubo se mantendrá constante siempre a una concentración de 500 μ M.

Los disolventes usados son agua deuterada (D₂O) y DMSO, y una solución de tampón PBS.

Las muestras se preparan en el mismo momento de la experiencia.

5.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS

5.6.1. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y NEUROPROTECCIÓN

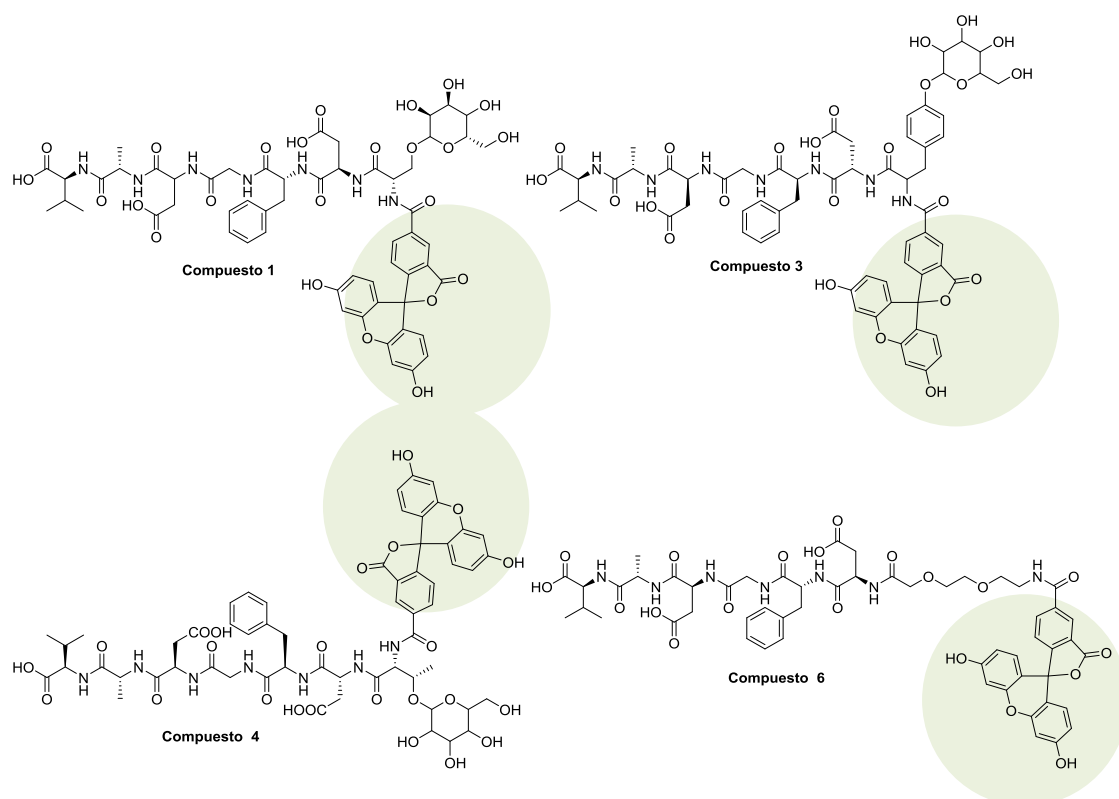
Los ensayos se llevaron a cabo en la línea celular SH-SY5Y (Neuroblastoma Humano). En los compuestos:

HX	DFGDAV
HXLINKER	PALMITICO-O2PEN-DFGDAV
HX-PEG-P	PALMÍTICO-PEG-DFGDAV
NN	VSPDFGDAV
NNP	PALMÍTICO-VSPDFGDAV
NNLINKER	PALMÍTICO-O1PEN-VSPDFGDAV

Fueron realizados por los doctores, D. Rafael Salto y Dña. María Dolores Girón, pertenecientes al departamento de Bioquímica y Biología molecular II, de la Facultad de Farmacia, en la Universidad de Granada.

5.7. ENSAYOS DE PENETRABILIDAD CELULAR.

Estos ensayos se llevaron a cabo en la línea celular HeLa, en los siguientes compuestos marcados con 5(6)-Carboxifluoresceína (figura 1).



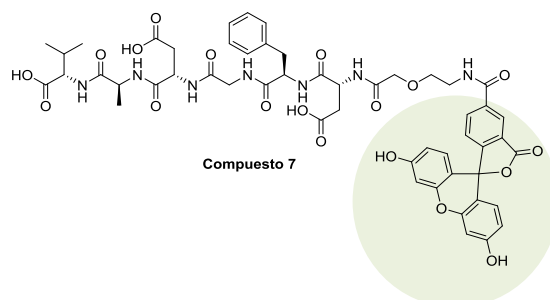


Figura 1 . Compuestos marcados con 5(6)-Carboxifluoresceína

5.7.1. PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN

Las células se cultivaron en DMEM con 4mM de glutamina (con elevado contenido en glucosa ,4.5 mg/ml), 100 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml estreptomycin y 25 mg/ml de anfotericina B y 10% de FBS. Las células se incubaron a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂.

Para observar tanto la citotoxicidad como la penetrabilidad celular, las células fueron incubadas con los compuestos 1,3, 4, 6 y 7, a una concentración de 10µM durante 24h. Se retira el medio y se añade la solución de MTT, 5mg/ml en medio de cultivo. A las 4h se retira la solución y se añade la solución solubilizadora de MTT. Se mide la señal en el espectrofotómetro a 570nm.

Los estudios de penetrabilidad celular se llevaron a cabo mediante citometría de flujo, FACs.

Se corrobora la penetrabilidad celular mediante observación por microscopia confocal.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Durante el transcurso de este trabajo, se ha llevado a cabo la puesta a punto de la metodología y purificación de los compuestos sintetizados (péptidos y glicopéptidos). Así se ha llevado a cabo la optimización de la síntesis, tanto de la secuencia peptídica para mejorar el rendimiento, evitar reacciones secundarias no deseadas y a su vez reducir el tiempo de síntesis, como la optimización de la síntesis en solución de los glicósidos, debido a como se comentó anteriormente en la introducción, se trata de compuestos muy sensibles a diversas condiciones y debíamos de tener muchos factores en cuenta para evitar su descomposición o hidrolisis

Se han acoplado distintos derivados de polietilenglicol a las secuencias peptídicas sintetizadas, de reconocimiento del dominio PDZ-nNOS (hexapéptido y nonapéptido), para aumentar la solubilidad, favorecer su soporte sobre nanopartículas ferromagnéticas y observar *in vivo* el efecto neuroprotector.

Se han sintetizado glicopéptidos derivados de distintos azúcares a partir de las secuencias peptídicas líderes DFGDAV y VSPDFGDAV, con el fin de permitir en futuros estudios, observar el paso de estos compuestos a través de la barrera hematoencefálica, favorecer su difusión en las neuronas y ejercer el efecto neuroprotector esperado.

Modificaciones estructurales en la secuencia DFGDAV líder cambiando el aspártico en posición 3 por Fmoc-Lys-(NH₂Boc)-OH con el fin de observar durante la puesta a punto de la metodología la dificultad del acoplamiento del residuo de aspártico en la posición 3 o en la 6. Una vez solventado este problema durante la metodología se llevó a cabo para su estudio la formación del derivado glicopéptido, con el resto de azúcar derivado de 1-metoxi-2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-glucopiranos, con triazol como espaciador.

Se encontró una solución a los problemas de acoplamiento durante las secuencias complicadas mediante el uso de DMSO como aditivo a la mezcla de disolventes, el cual rompía los agregados y facilitaba este, incluso era capaz de eliminar las indeseadas reacciones dobles de acoplamiento.

Se llevó a cabo la formación de glicósidos derivados fluorados, para llevar a favor de la reactividad y por tanto la reacción de acoplamiento entre los fragmentos, durante la formación del glicopéptido correspondiente, aunque posteriormente se decidió modificar los reactivos de acoplamiento y ahorrar esta reacción, con los beneficios que todo lo que ello conlleva.

El espaciador utilizado influye de forma decisiva en la reacción de acoplamiento entre el péptido y el resto de carbohidrato. De este modo se han optimizado las condiciones de acoplamiento llegando a unas condiciones generales para los espaciadores utilizados.

La búsqueda de una óptima desprotección de los grupos bencilo correspondientes a los fragmentos glicosídicos, dio lugar al estudio de distintos disolventes y condiciones de reacción para llevar a cabo esta hidrogenación catalítica de forma efectiva.

Se ha llevado a cabo el estudio de la citotoxicidad y neuroprotección de una de las librerías de compuestos mediante ensayos MTT, los cuales no muestran citotoxicidad, pudiendo destacar resultados de neuroprotección de interés de los compuestos NNP a concentraciones de 10 μM y 25 μM , y HX-PEG-P a 25 μM .

De los estudios de neuroprotección podemos destacar la elevada importancia de la localización dentro de la célula, de la secuencia de reconocimiento líder de nuestros compuestos, debida a la longitud del espaciador usado en cada caso.

Se han observado mejores resultados de neuroprotección por parte de la secuencia DFGDAV (HX) frente a la liderada en literatura VSPDFGDAV (NN). En el caso del HX este efecto ha sido mejorado introduciendo en la secuencia derivados de PEG y ácido Palmítico, al igual que ocurre en el caso de las modificaciones estructurales en el NN a excepción de la introducción en la secuencia del linker (NNlinker = Palmítico-O1Pen- VSPDFGDAV), el cual disminuye considerablemente la viabilidad celular, en función de los resultados ofrecidos por los demás compuestos. Quizás se deba a que ya se trata de una longitud demasiado elevada, que localiza a la secuencia de reconocimiento lejos de poder interactuar con el dominio PDZ de la enzima nNOS.

Se ha observado la importancia del beneficio de acoplar ácido palmítico a las diferentes secuencias peptídicas, durante los ensayos de neuroprotección, ya que el porcentaje de viabilidad celular se ve favorecidos en relación a los compuestos líderes como tales.

Se ha llevado a cabo un estudio de penetrabilidad celular sobre 5 de los compuestos en células HeLa. Estos fueron marcados con 5(6)-carboxifluoresceína para llevar a cabo el estudio mediante citometría de flujo. De estos cabe destacar el compuesto 1 (glicopéptido derivado β -D-glucopiranososa con serina como espaciador) el cual ofrece una elevada penetrabilidad con respecto a los demás estudiados. Siendo a su vez observada mediante imágenes por microscopía confocal.

Se ha validado la K_d del nonapéptido líder mediante estudios SPR. (0,1-0,2 μM).

Se ha evaluado la interacción proteína-proteína de los ligandos más característicos mediante estudios STD-RMN, observándose los resultados esperados. De los que caben destacar los glicopéptidos derivados de la secuencia del hexapéptido, los compuestos LSG-379 (glicopéptido derivado 2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-glucopiranososa con serina como espaciador) LSG-383 (glicopéptido derivado de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-glucopiranososa con treonina como espaciador) y el LSG-371 (glicopéptido derivado de 2,3,4,6-tetra-O-bencil- β -D-glucopiranososa con triazol como espaciador) los cuales muestran

elevada interacción con el dominio PDZ de la enzima nNOS hasta una concentración de proteína de 1 μ M.

Por tanto, se ha observado que el dominio PDZ-nNOS tiene especificidad hacia el extremo C-terminal de los ligandos y la inhibición de las correspondientes interacciones confiere neuroprotección.

Aún no han podido ser ensayados la mayoría de los compuestos desarrollados en este trabajo, pudiendo obtener ligeras pinceladas, como se pueden observar en estas conclusiones, de la relevancia de este trabajo.

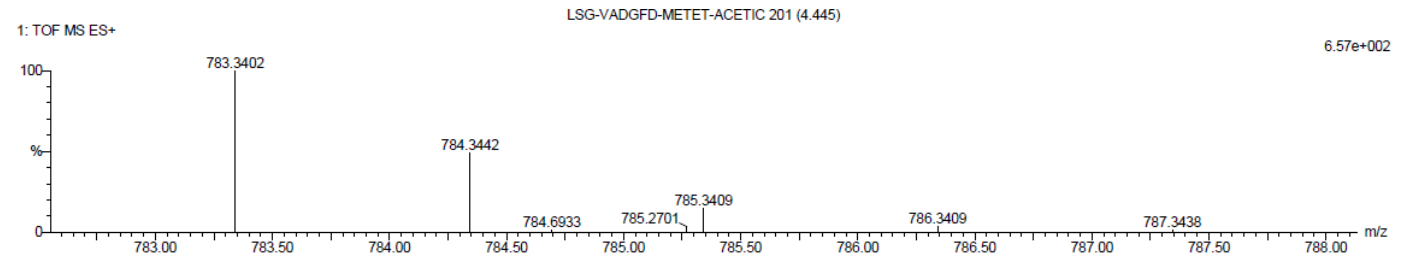
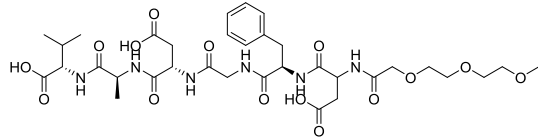
Todos estos resultados están pendientes de publicación.

BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO

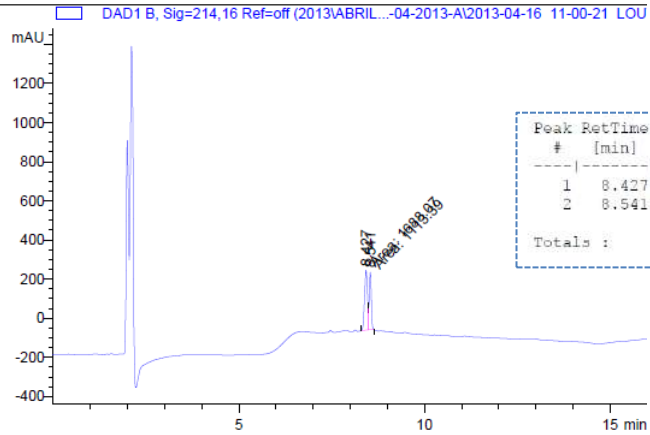
7. BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO

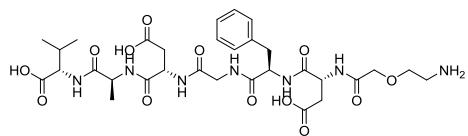
Con este trabajo se ha pretendido obtener fármacos capaces de interferir en las interacciones proteína-proteína mediadas por la enzima nNOS, con lo que aparte de permitir el transporte a través de la BHE, mejorar su biodistribución en el cerebro, aumentar su biodisponibilidad proporcionando una vida media más duradera, y el hecho de poder intervenir específicamente con la diana farmacológica sin que se realicen cambios en el organismo que puedan dañar o modificar otras funciones, han permitido que este estudio sea de gran interés en este campo.

**ANEXO I
PÉPTIDOS**



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
783.3402	783.3412	-1.0	-1.3	12.5	4.1	C34 H51 N6 O15
	783.3388	1.4	1.8	9.5	7.1	C32 H52 N6 O15 Na

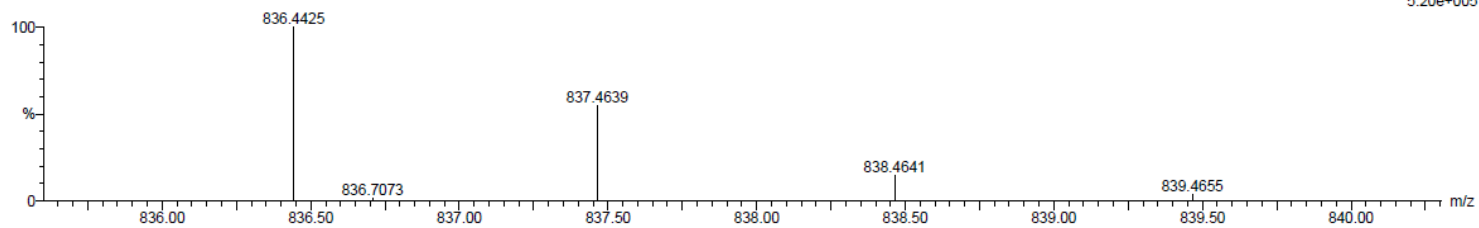




LSG-HEXAP-O1PEN 263 (10.127)

13/6232

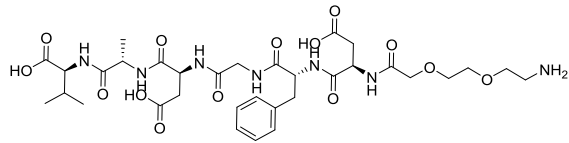
1: TOF MS ES+
5.20e+005



Minimum: -1.5
Maximum: 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
836.4425	836.4406	1.9	2.3	12.5	2539.8	C39 H62 N7 O13
	836.4382	4.3	5.1	9.5	4377.2	C37 H63 N7 O13 Na

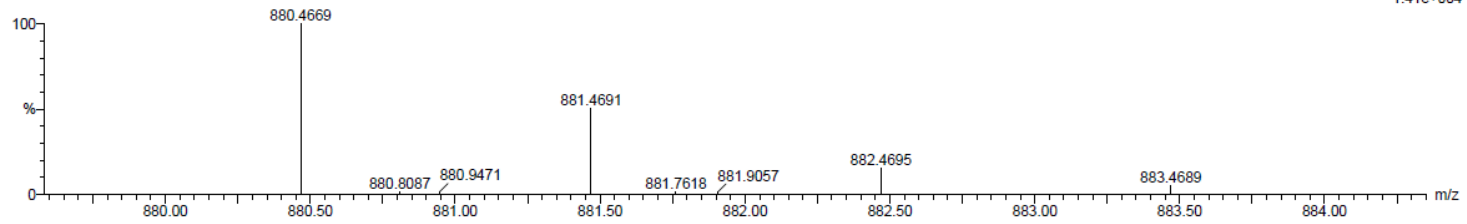
=



LSG-HEXAP-O2OCOH 370 (14.237)

13/6231

1: TOF MS ES+
1.41e+004



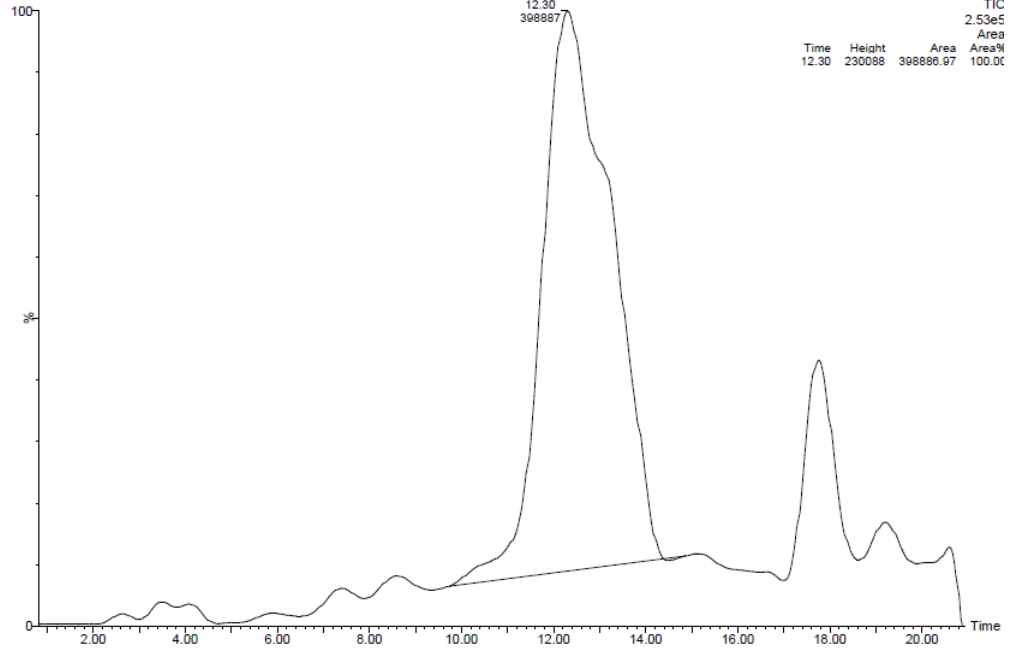
Minimum: -1.5
Maximum: 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
880.4669	880.4668	0.1	0.1	12.5	0.9	C41 H66 N7 O14
	880.4644	2.5	2.8	9.5	13.0	C39 H67 N7 O14 Na

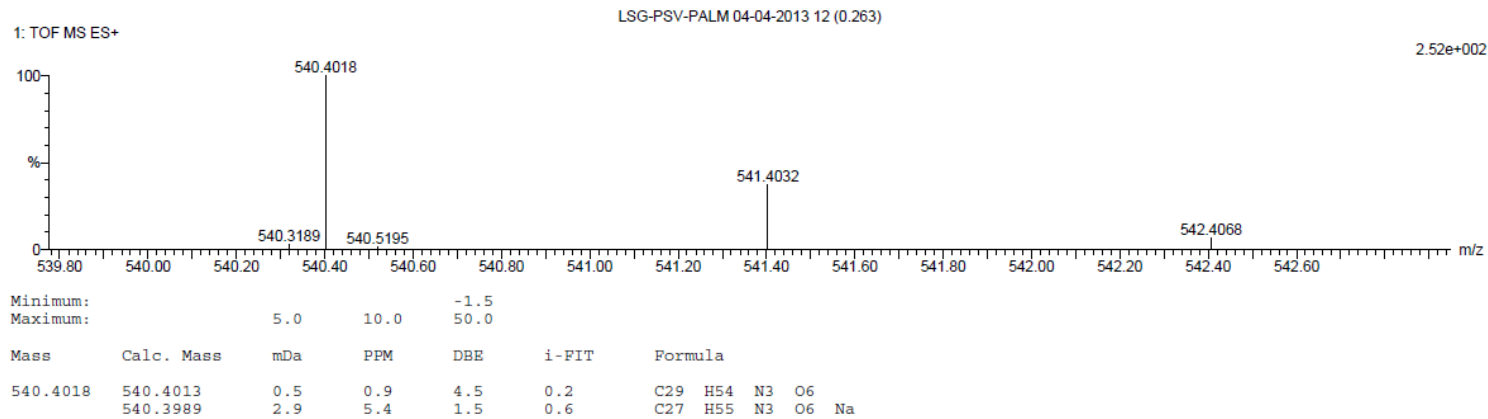
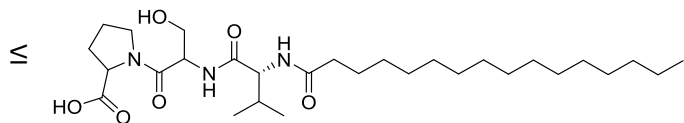
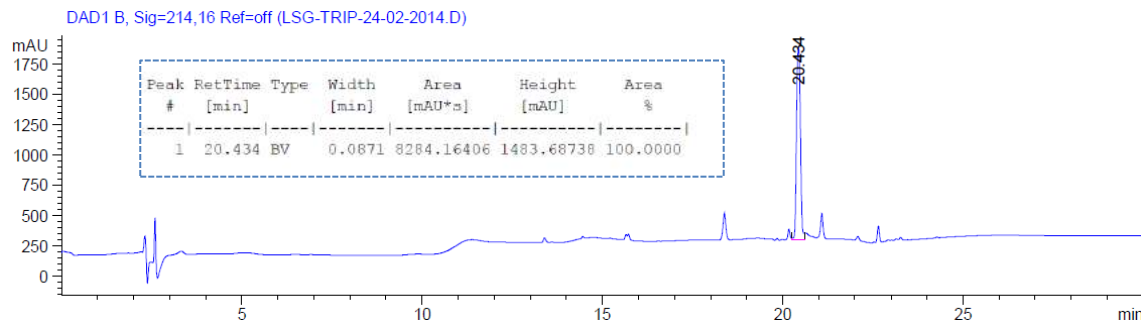
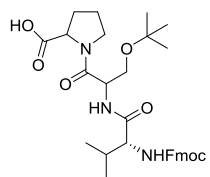
13/6231

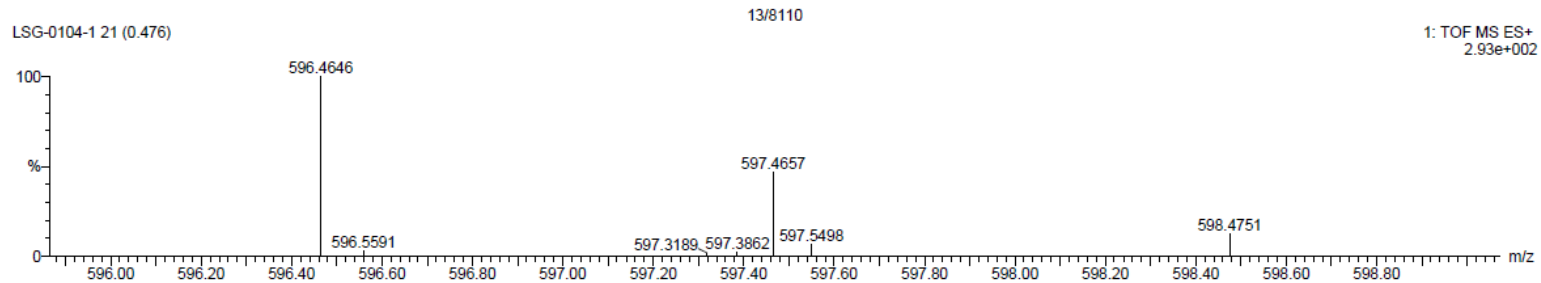
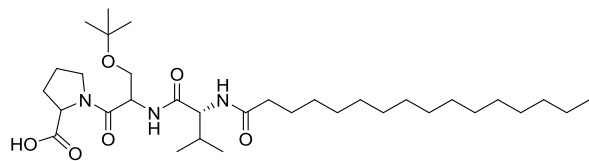
LSG-HEXAP-O2OCOHAAsm (SG, 10x6); Sm (SG, 10x6)

TOF MS ES+



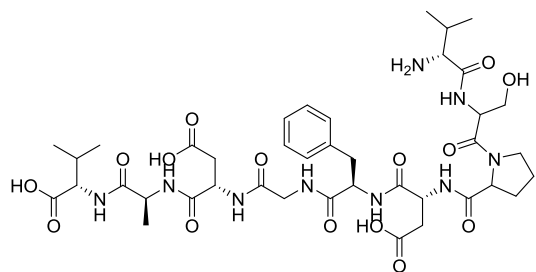
AU



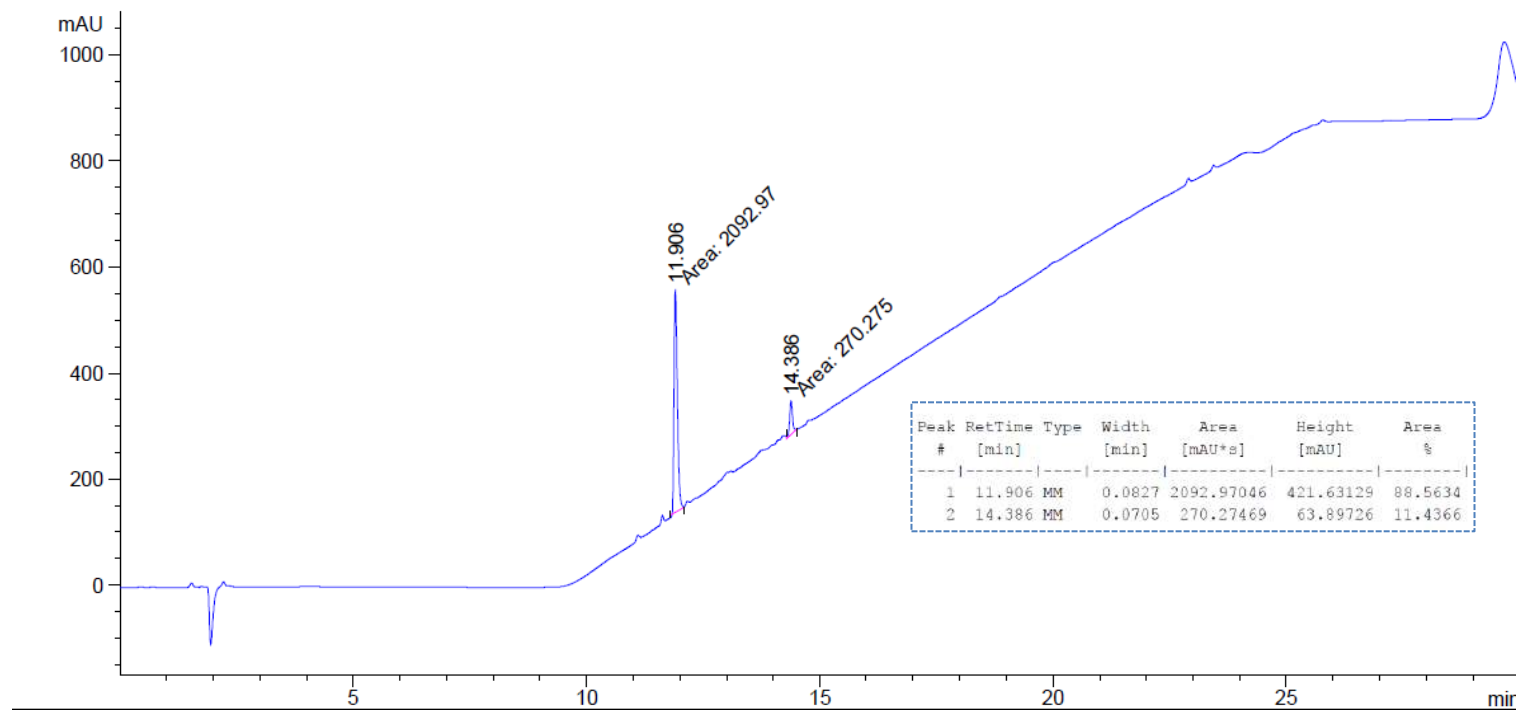


Minimum: -1.5
Maximum: 50.0

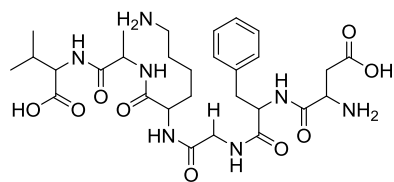
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
596.4646	596.4639	0.7	1.2	4.5	2.4	C33 H62 N3 O6
	596.4628	1.8	3.0	6.5	3.0	C32 H59 N7 O2 Na
	596.4615	3.1	5.2	1.5	4.0	C31 H63 N3 O6 Na
	596.4612	3.4	5.7	5.5	4.6	C29 H58 N9 O4
	596.4598	4.8	8.0	0.5	5.9	C28 H62 N5 O8



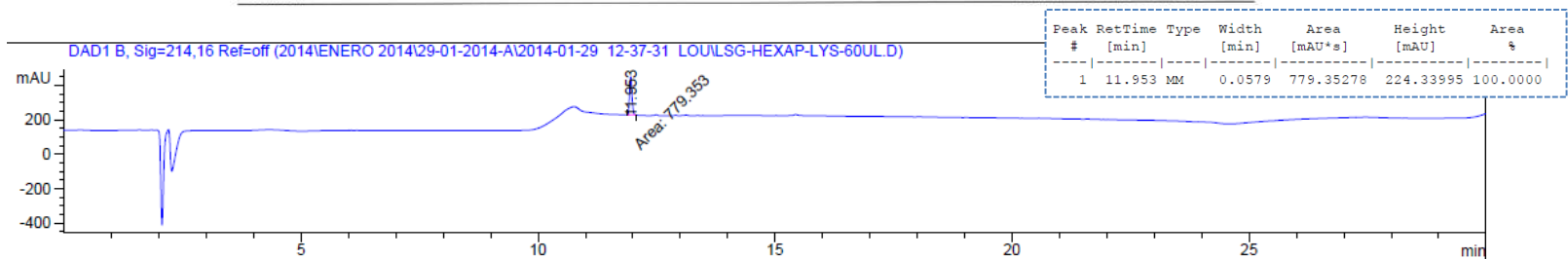
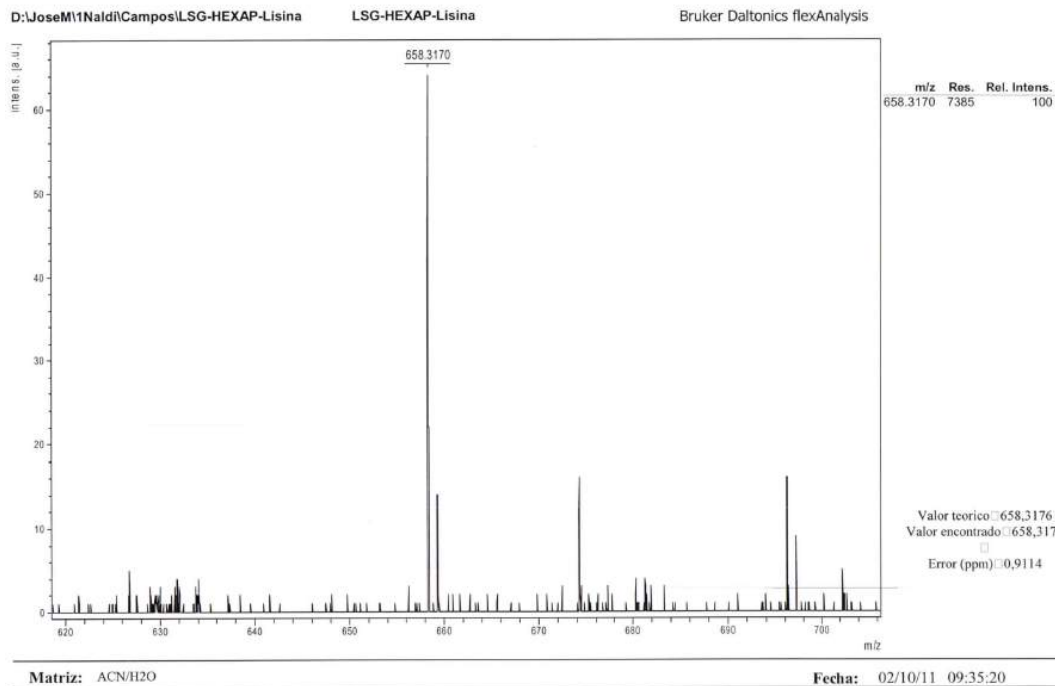
DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2014\OCTUBRE 2014\06-10-2014-A\2014-10-06 16-57-20 PACO\NONA.D)

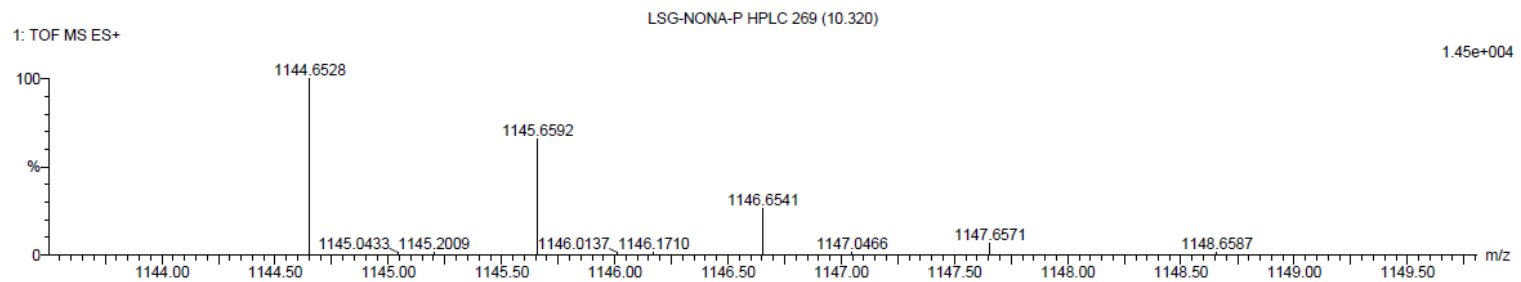
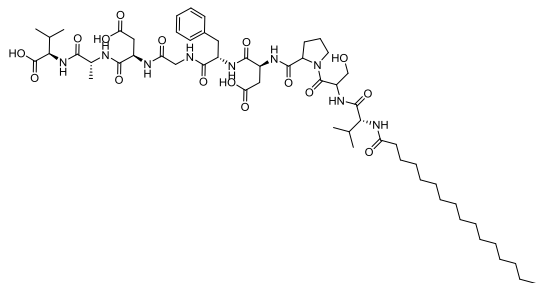


VIII



XI



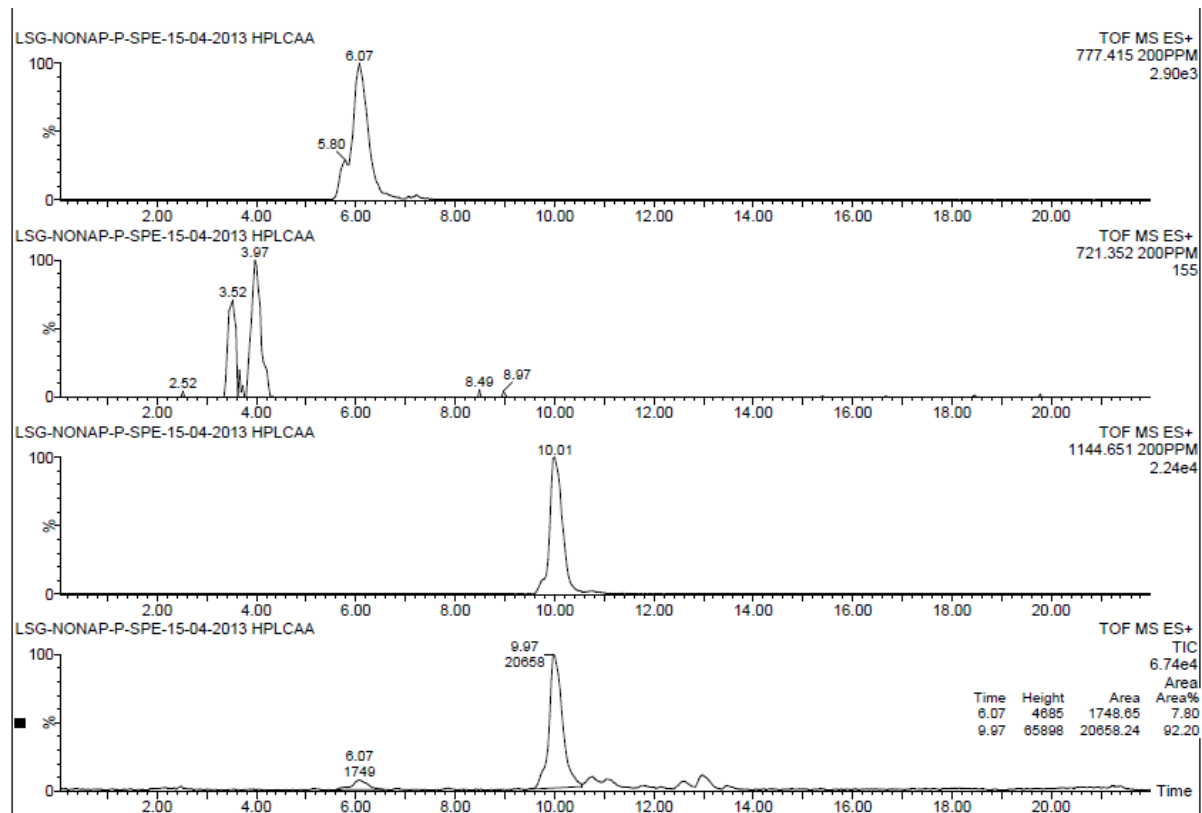


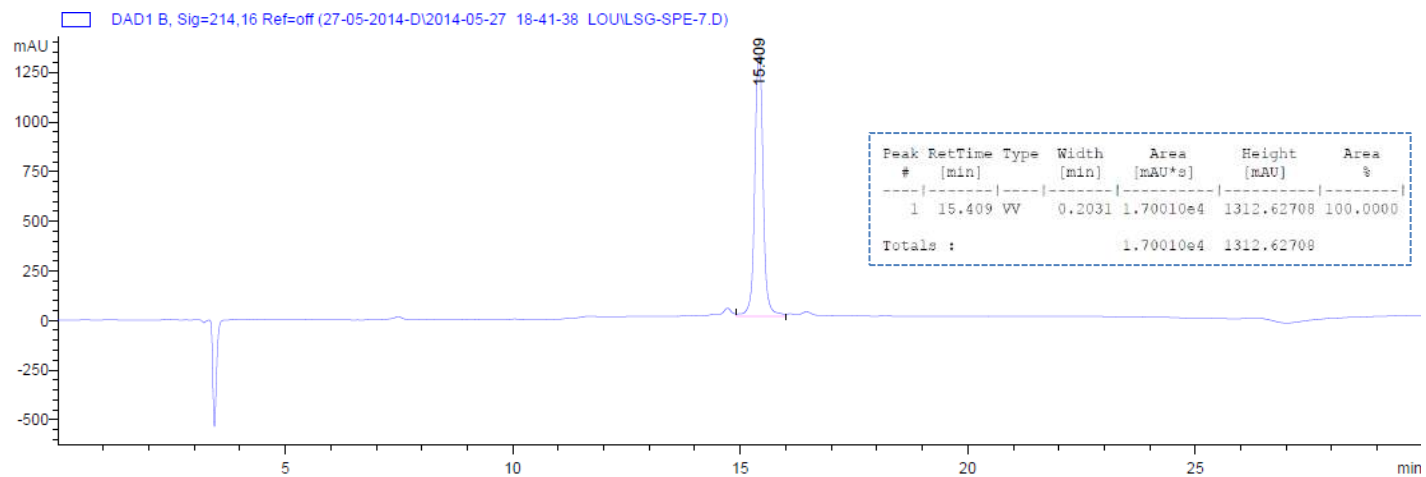
Minimum: 5.0 10.0 -1.5

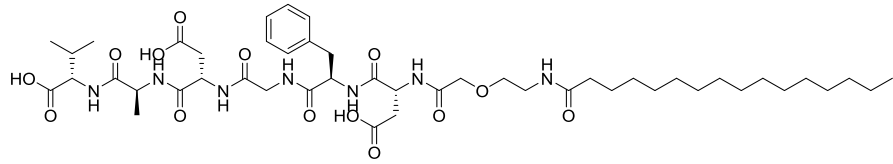
Maximum: 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1144.6528	1144.6506	2.2	1.9	16.5	6.5	C56 H90 N9 O16
	1144.6524	0.4	0.3	11.5	1430.9	C55 H95 N7 O16 Cl
	1144.6481	4.7	4.1	13.5	13.2	C54 H91 N9 O16 Na
	1144.6500	2.8	2.4	8.5	1383.6	C53 H96 N7 O16 Na Cl

X



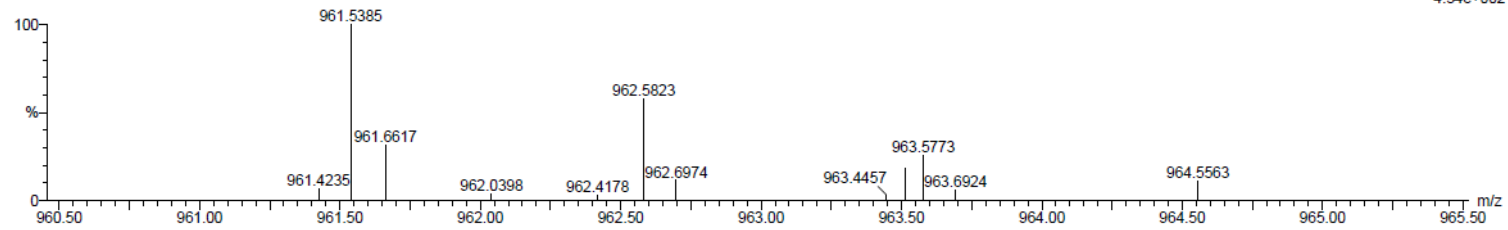




LSG-VADGFD-O1PEN-PALMITIC 80 (1.762)

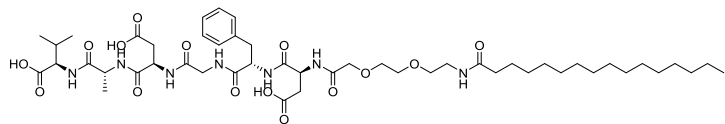
13/7743

1: TOF MS ES+
4.34e+002



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
961.5385	961.5372	1.3	1.4	14.0	1.6	C47 H75 N7 O14
	961.5348	3.7	3.8	11.0	2.0	C45 H76 N7 O14 Na

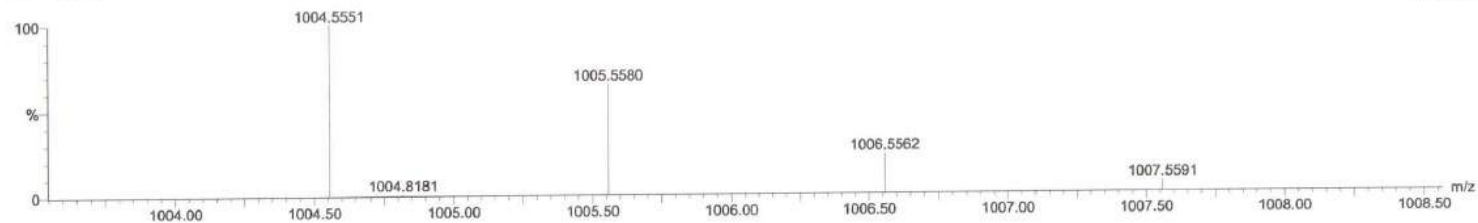


C: 0-49 H: 0-200 N: 0-7 O: 0-15 Na: 0-1

LSG-H-02OC-P 4 (0.092)

1.12e+004

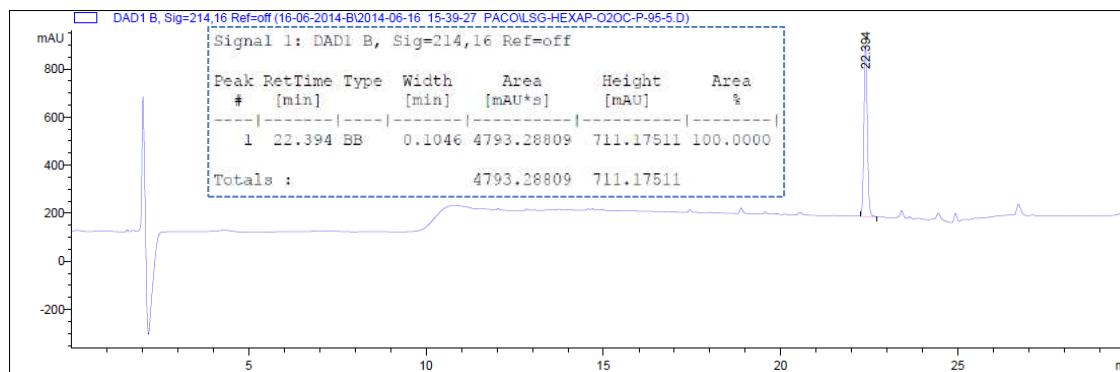
1: TOF MS ES-

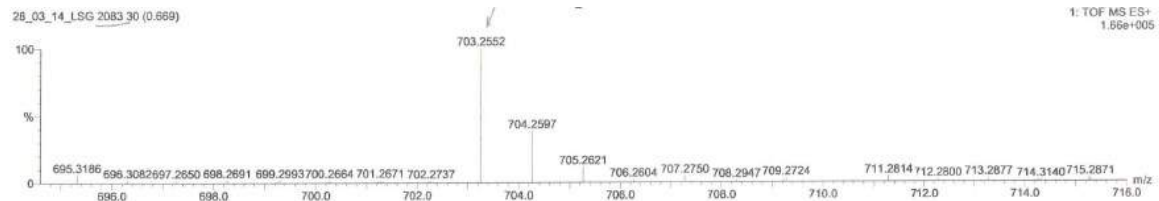
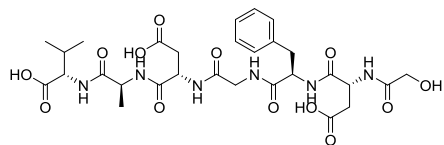


Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 50.0

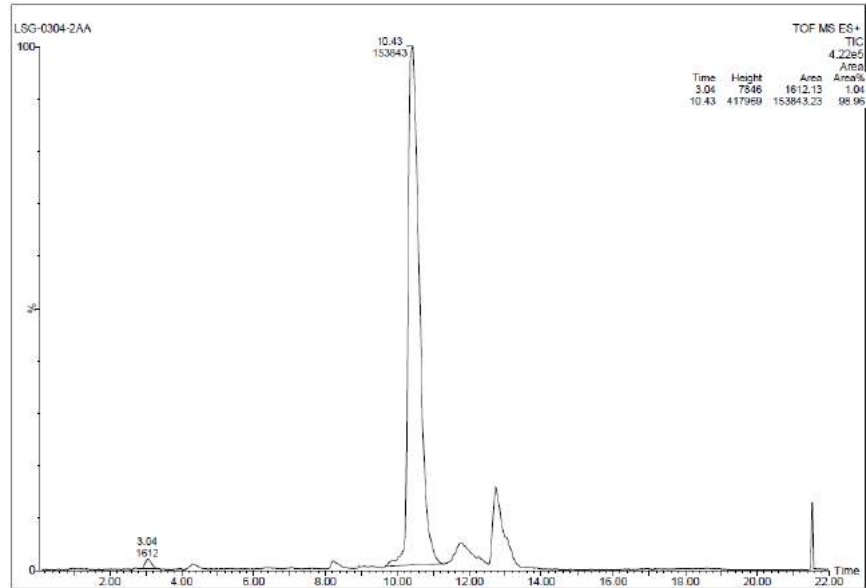
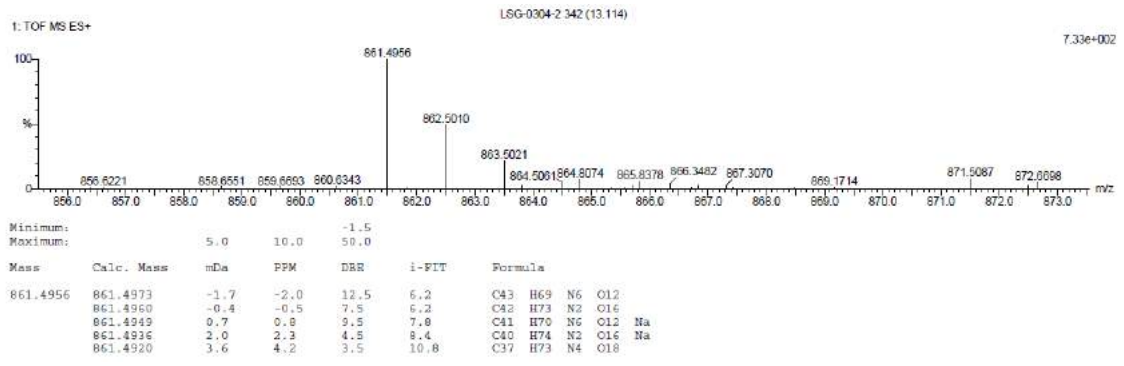
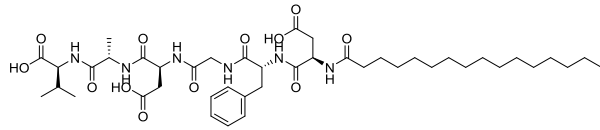
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1004.5551	1004.5556	-0.5	-0.5	14.5	33.0	C49 H78 N7 O15
	1004.5532	1.9	1.9	11.5	65.7	C47 H79 N7 O15 Na

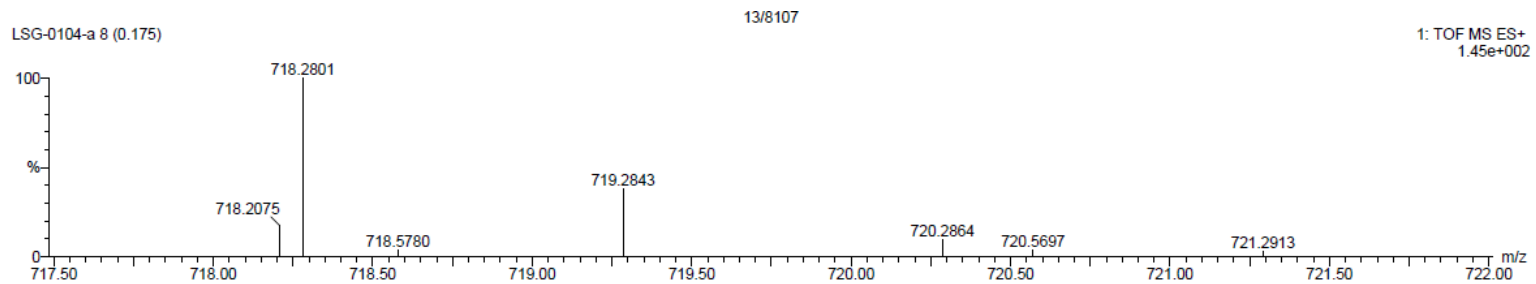
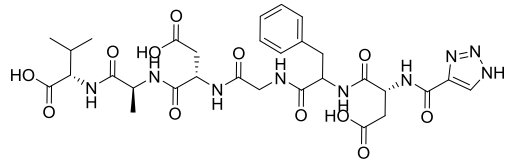
XX



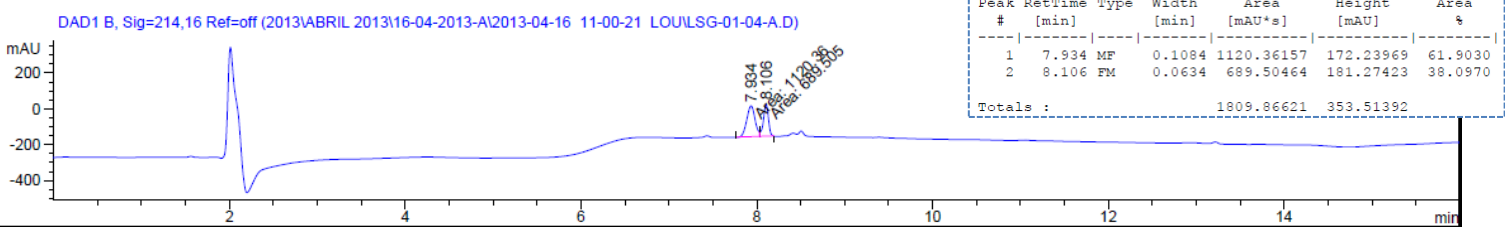


Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
703.2552	703.2551	0.1	0.1	23.5	1023.3	C27 H28 N20 O3 Na
	703.2551	0.1	0.1	12.5	583.6	C29 H40 N6 O13 Na
	703.2556	-0.4	-0.6	5.5	6607.0	C14 H36 N18 O14 Na
	703.2548	0.4	0.6	16.5	778.1	C27 H35 N12 O11
	703.2557	-0.5	-0.7	28.5	1773.0	C43 H35 N4 O6
	703.2546	0.6	0.9	30.5	1780.6	C42 H32 N8 O2 Na
	703.2543	0.9	1.3	0.5	7961.5	C13 H40 N14 O18 Na
	703.2543	0.9	1.3	23.5	1173.9	C42 H39 O10
	703.2543	0.9	1.3	34.5	1740.4	C40 H27 N14
	703.2562	-1.0	-1.4	10.5	371.0	C30 H43 N2 O17
	703.2562	-1.0	-1.4	21.5	660.6	C28 H31 N16 O7
	703.2540	1.2	1.7	4.5	8456.7	C11 H35 N20 O16
	703.2564	-1.2	-1.7	17.5	478.6	C30 H36 N10 O9 Na
	703.2538	1.4	2.0	7.5	876.0	C28 H44 N2 O17 Na
	703.2538	1.4	2.0	18.5	1130.9	C26 H32 N16 O7 Na
	703.2567	-1.5	-2.1	3.5	6093.1	C15 H39 N14 O18
	703.2535	1.7	2.4	11.5	1079.1	C26 H39 N8 O15
	703.2570	-1.8	-2.6	33.5	2475.2	C44 H31 N8 O2
	703.2570	-1.8	-2.6	-0.5	5685.6	C17 H44 N8 O20 Na
	703.2533	1.9	2.7	25.5	1180.7	C41 H36 N4 O6 Na
	703.2573	-2.1	-3.0	29.5	2588.8	C46 H36 N2 O4 Na
	703.2530	2.2	3.1	29.5	1153.3	C39 H31 N10 O4
	703.2575	-2.3	-3.3	26.5	708.5	C29 H27 N20 O3
	703.2575	-2.3	-3.3	15.5	251.9	C31 H39 N6 O13

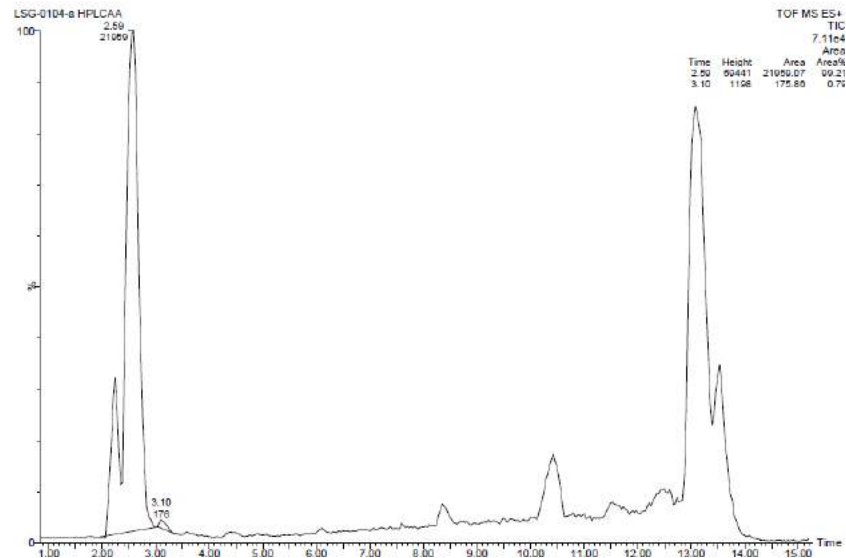
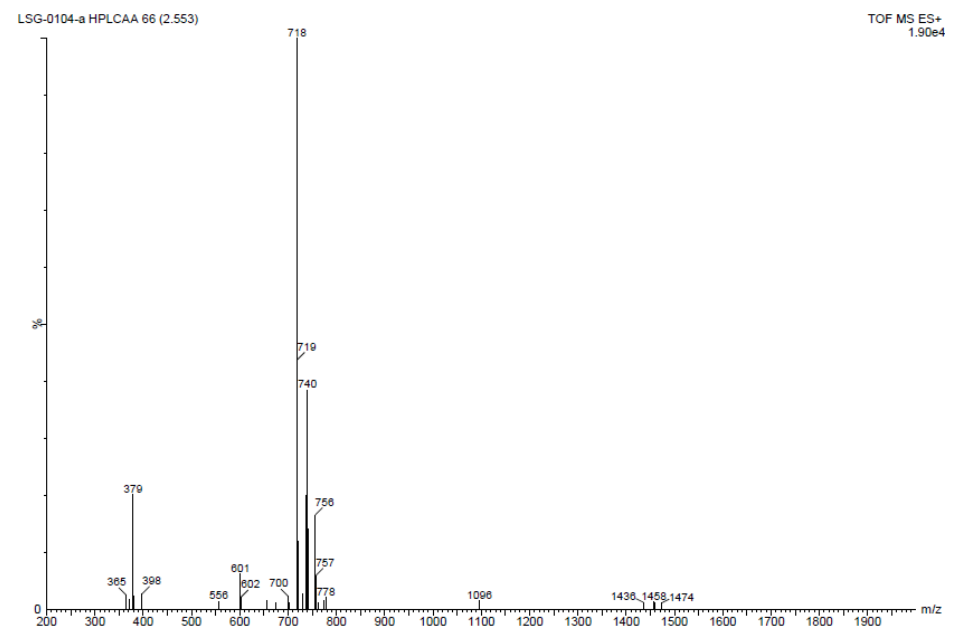
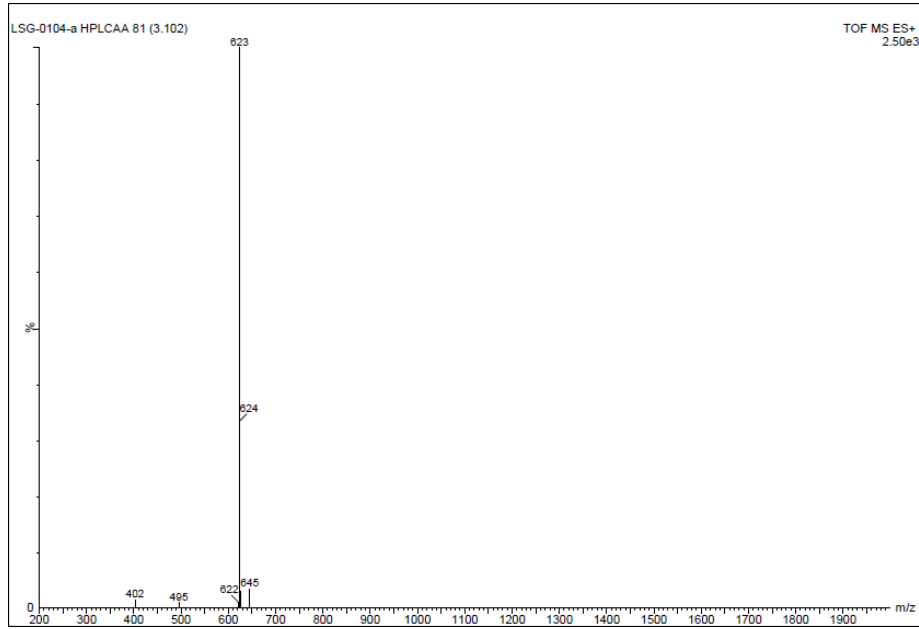


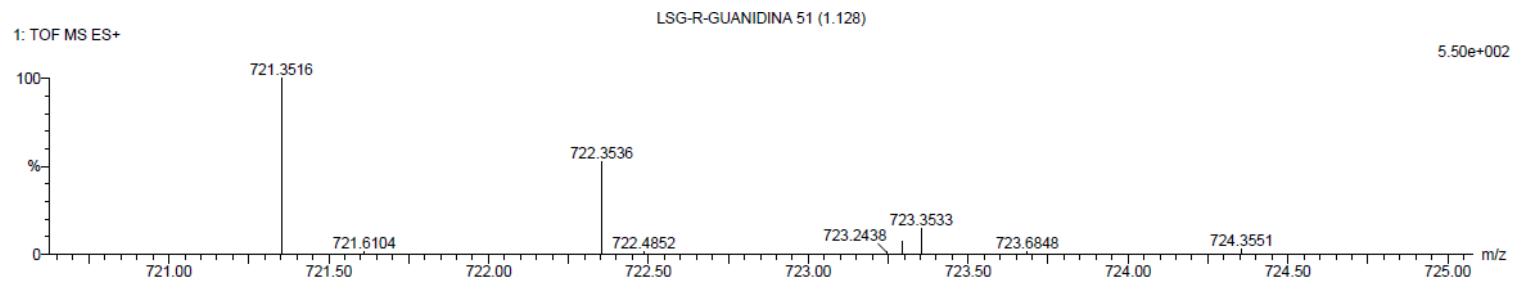
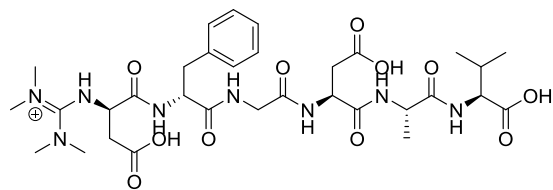


Minimum:										
Maximum:		5.0	10.0			-1.5				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-PIT	Formula				
718.2801	718.2796	0.5	0.7	15.5	0.0	C30	H40	N9	O12	
	718.2783	1.8	2.5	10.5	0.1	C29	H44	N5	O16	
	718.2772	2.9	4.0	12.5	0.1	C28	H41	N9	O12	Na
	718.2831	-3.0	-4.2	3.5	1.7	C21	H45	N9	O17	Na
	718.2759	4.2	5.8	7.5	0.4	C27	H45	N5	O16	Na

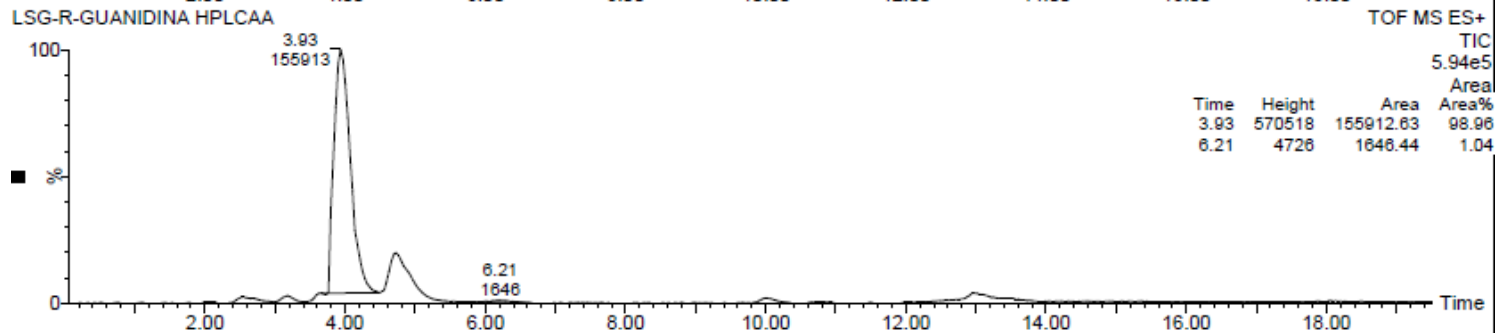
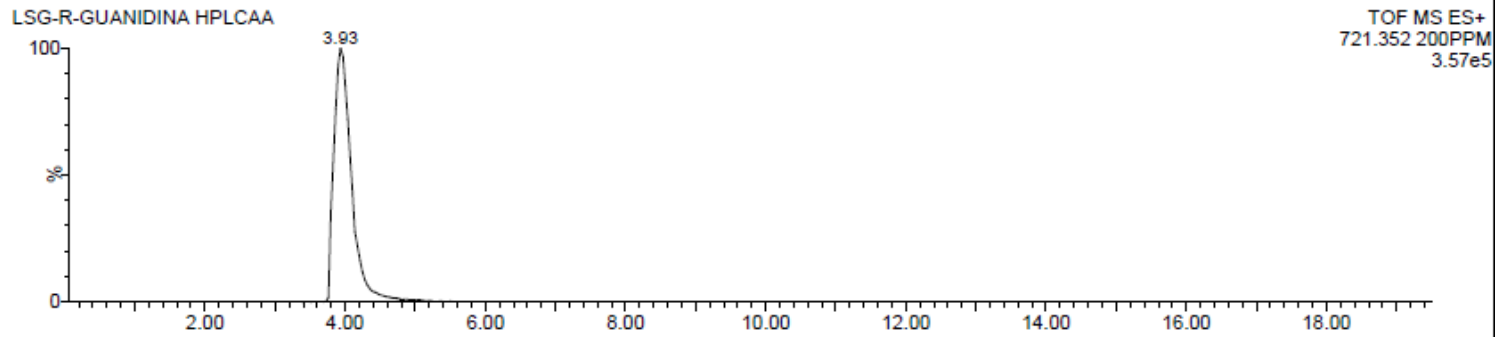
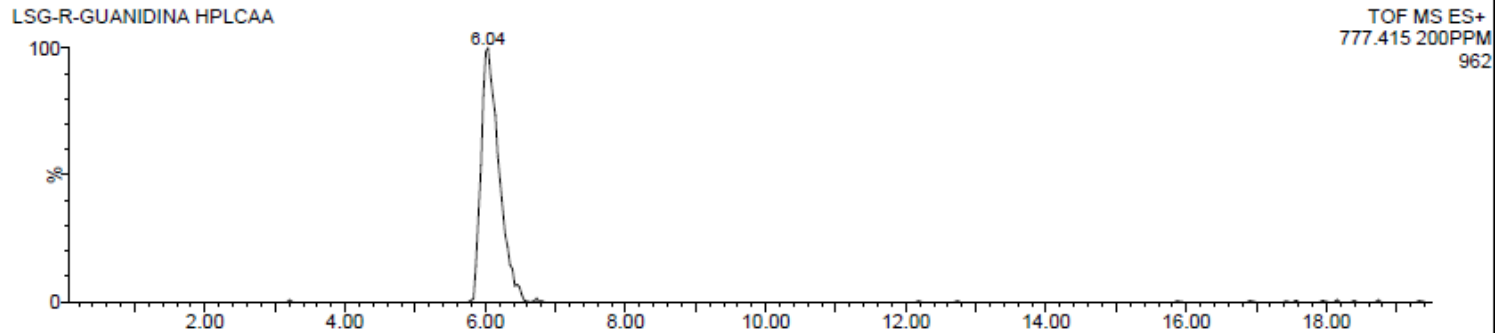


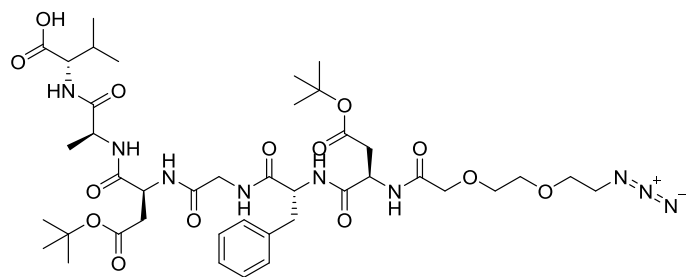
III/IX





Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
721.3516	721.3521	-0.5	-0.7	12.5	9.3	C32 H49 N8 O11
	721.3507	0.9	1.2	7.5	12.3	C31 H53 N4 O15

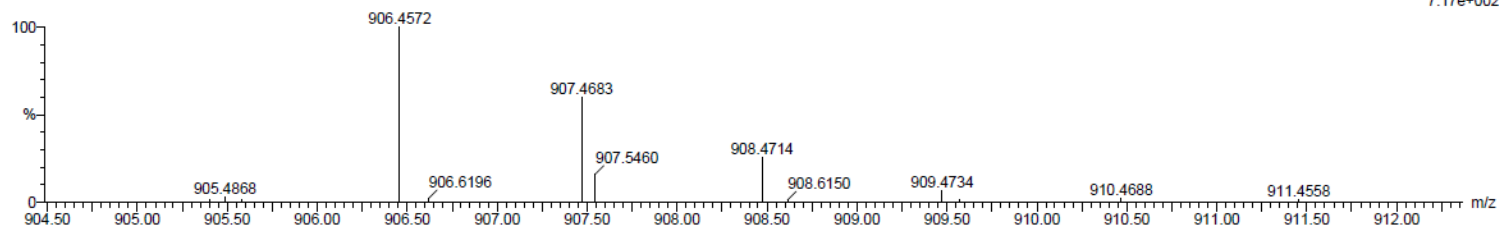




1: TOF MS ES+

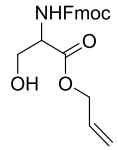
LSG-GLIA-H-FES-NS 10 (0.351)

7.17e+002

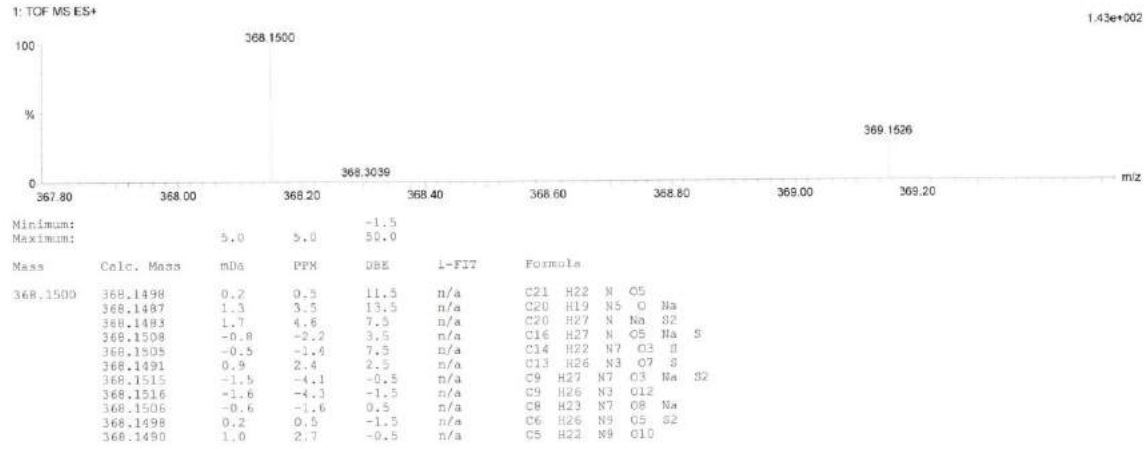


Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
906.4572	906.4573	-0.1	-0.1	14.5	15.3	C41 H64 N9 O14
	906.4549	2.3	2.5	11.5	20.1	C39 H65 N9 O14 Na

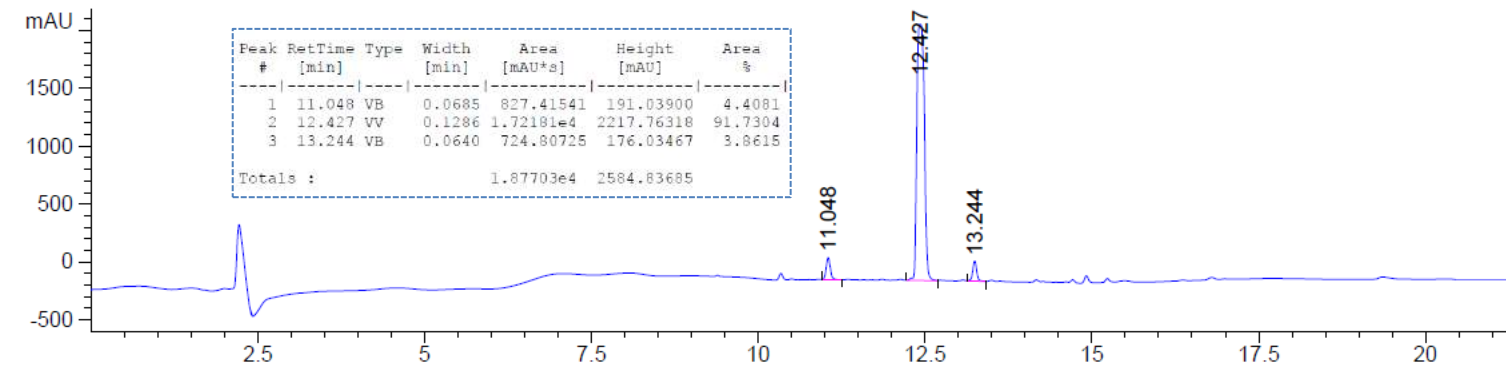
GLICOSIDOS Y GLICOPÉPTIDOS



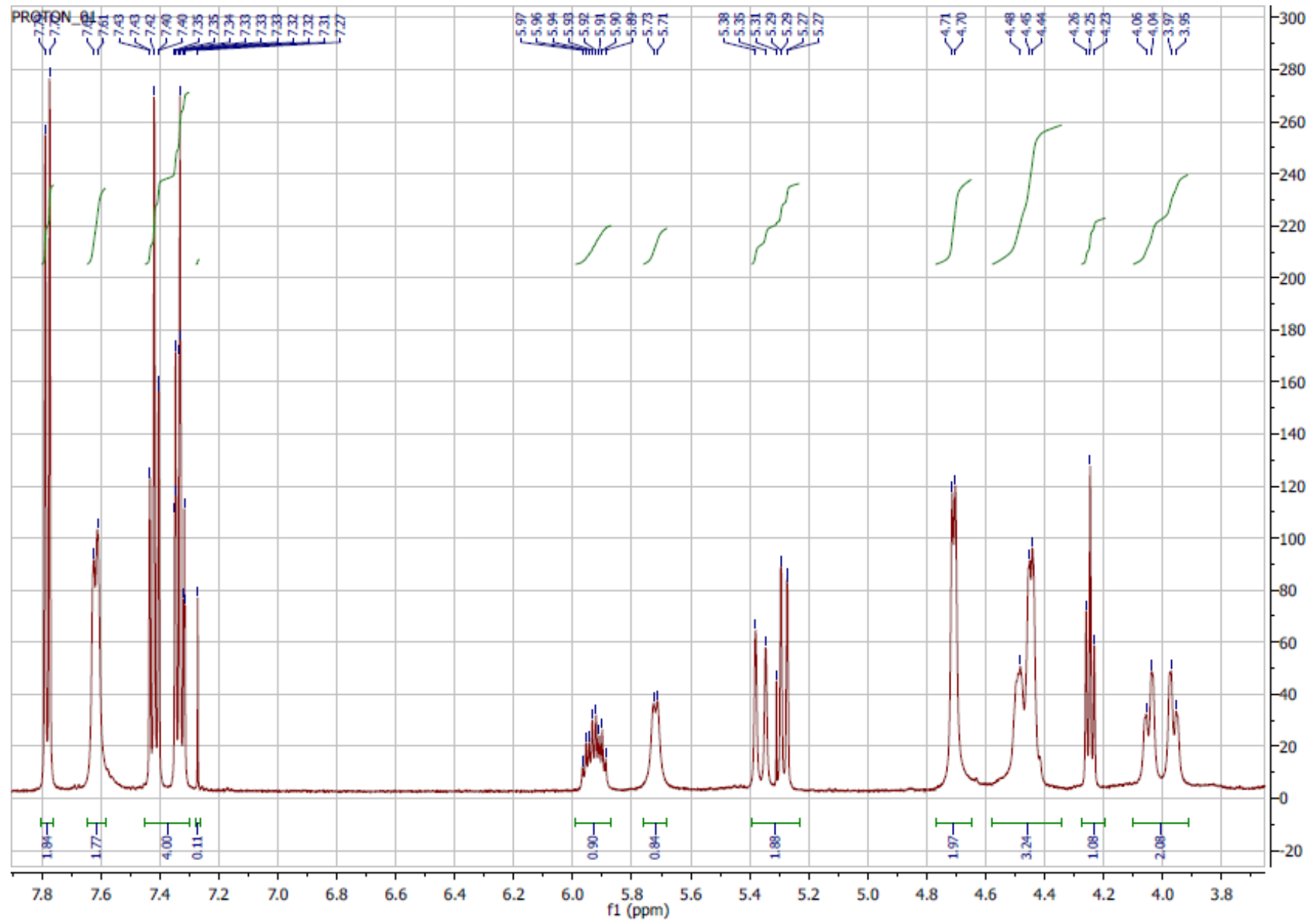
AIXX

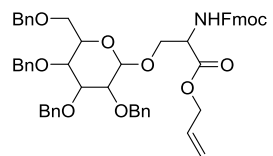


DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2012\MAYO2012\22-05-2012-B\2012-05-22 12-21-05 LOU\FMOC-SER-OALL-OH.D)



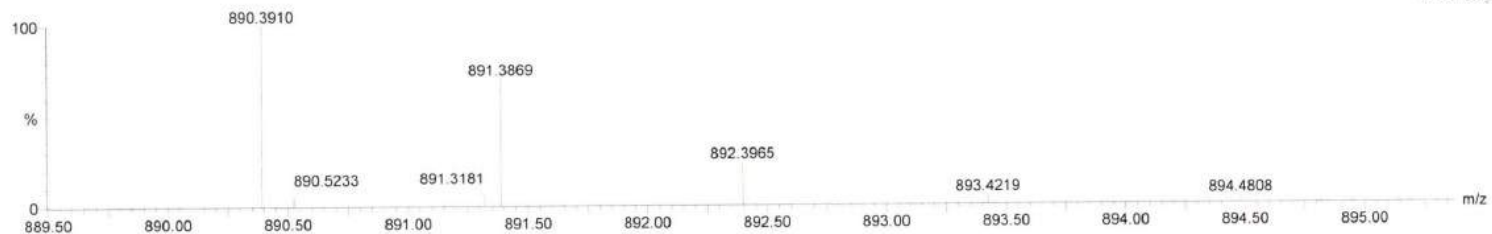
AXX





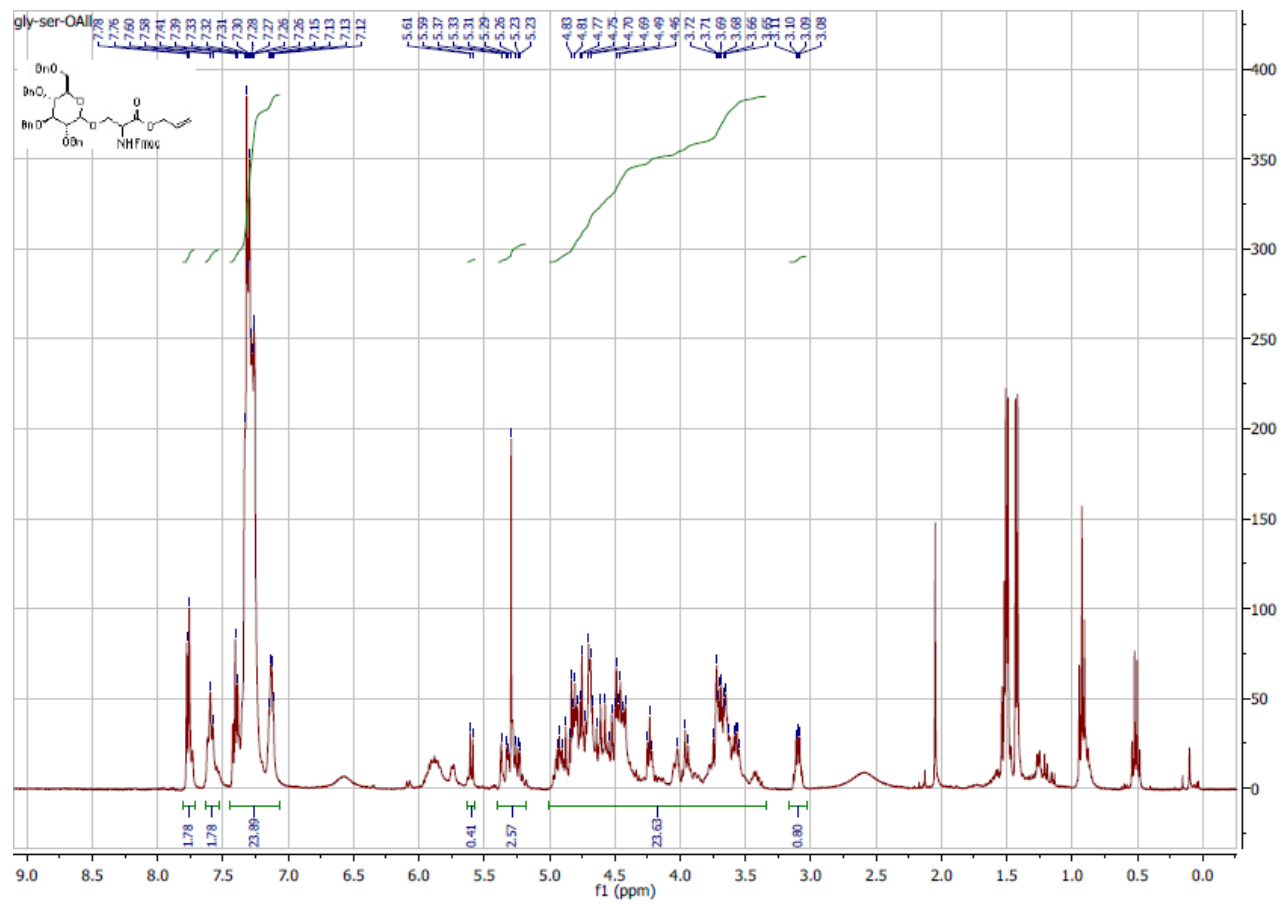
1: TOF MS ES+

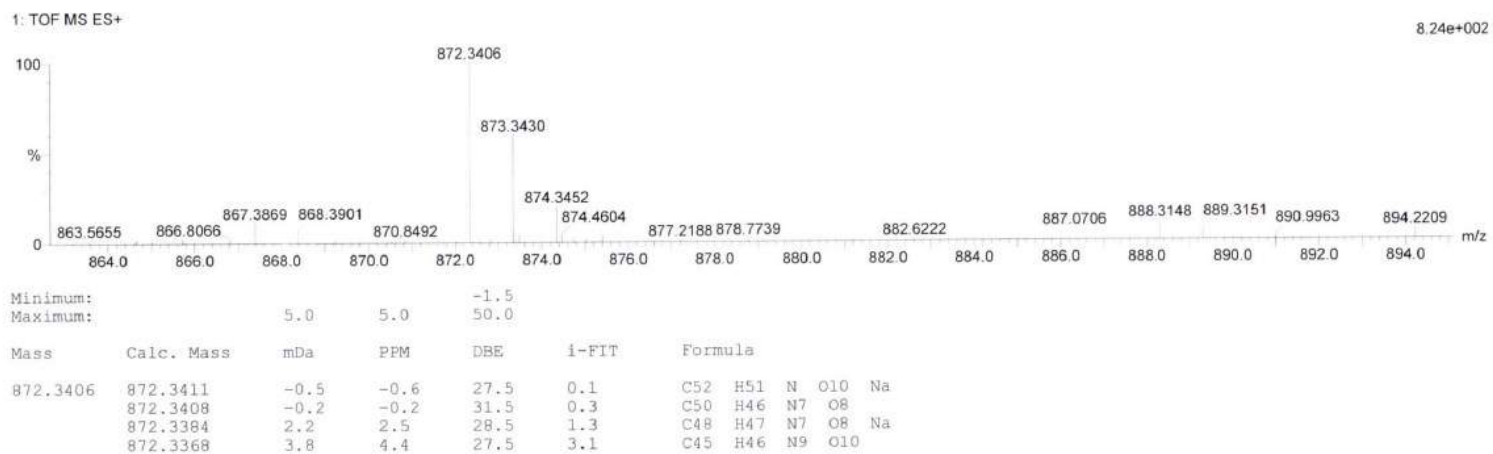
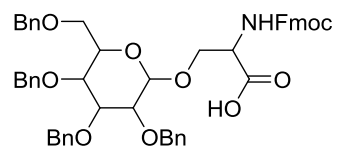
1.18e+002



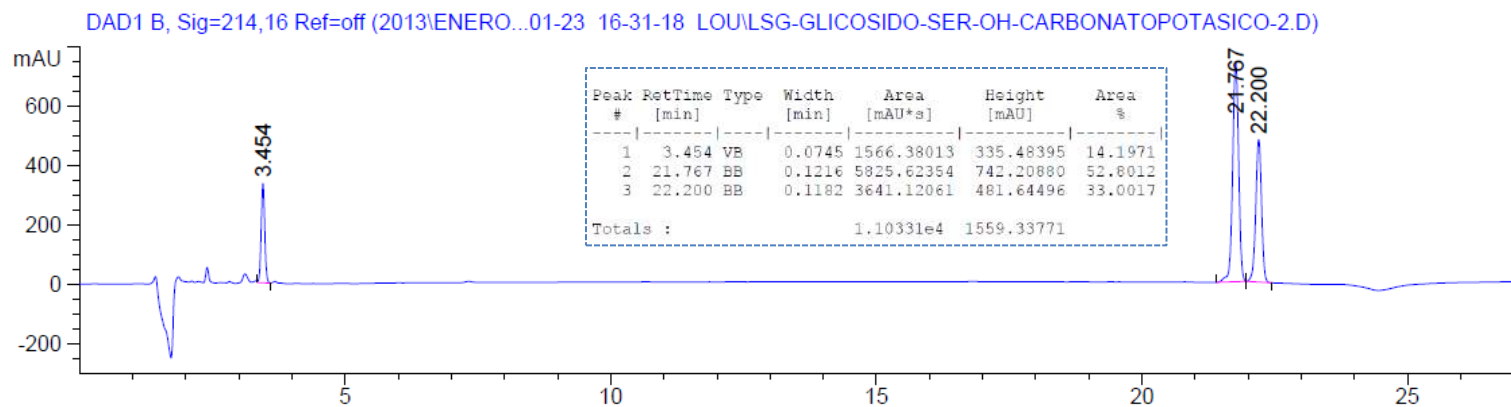
Minimum: -1.5
Maximum: 50.0

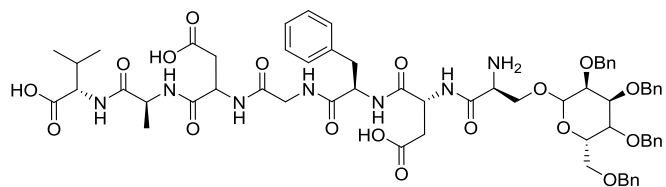
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
890.3910	890.3904	0.6	0.7	28.5	0.4	C55 H56 N O10A
	890.3880	3.0	3.4	25.5	0.7	C53 H57 N O10 Na





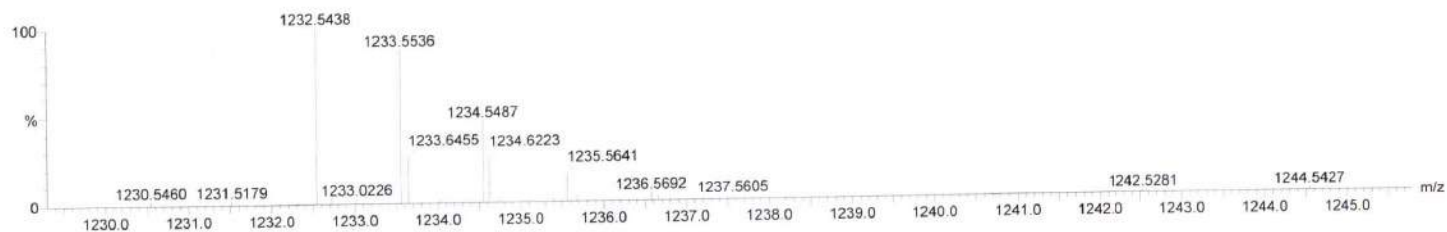
III/XX





1: TOF MS ES+

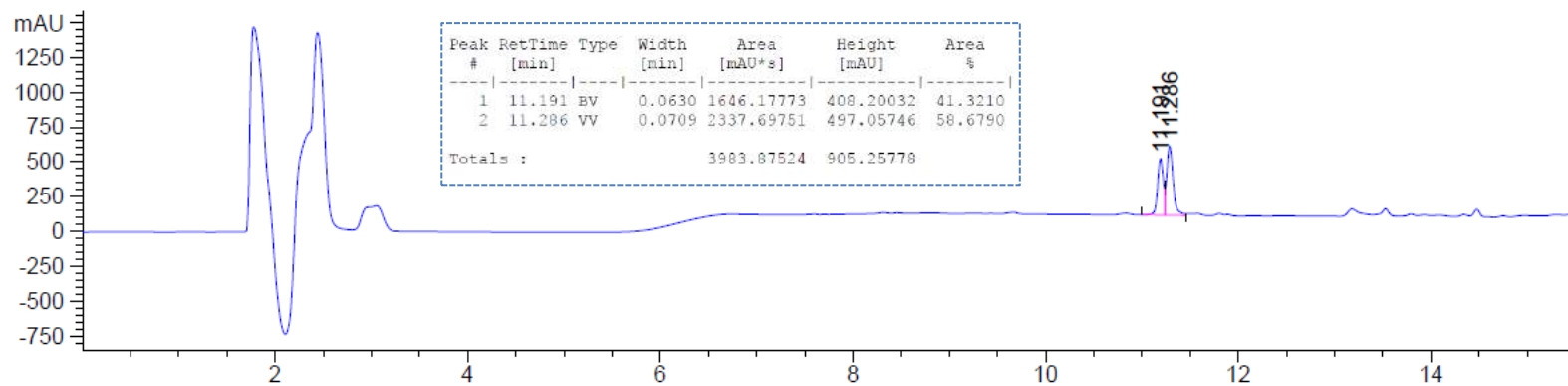
5.07e+002



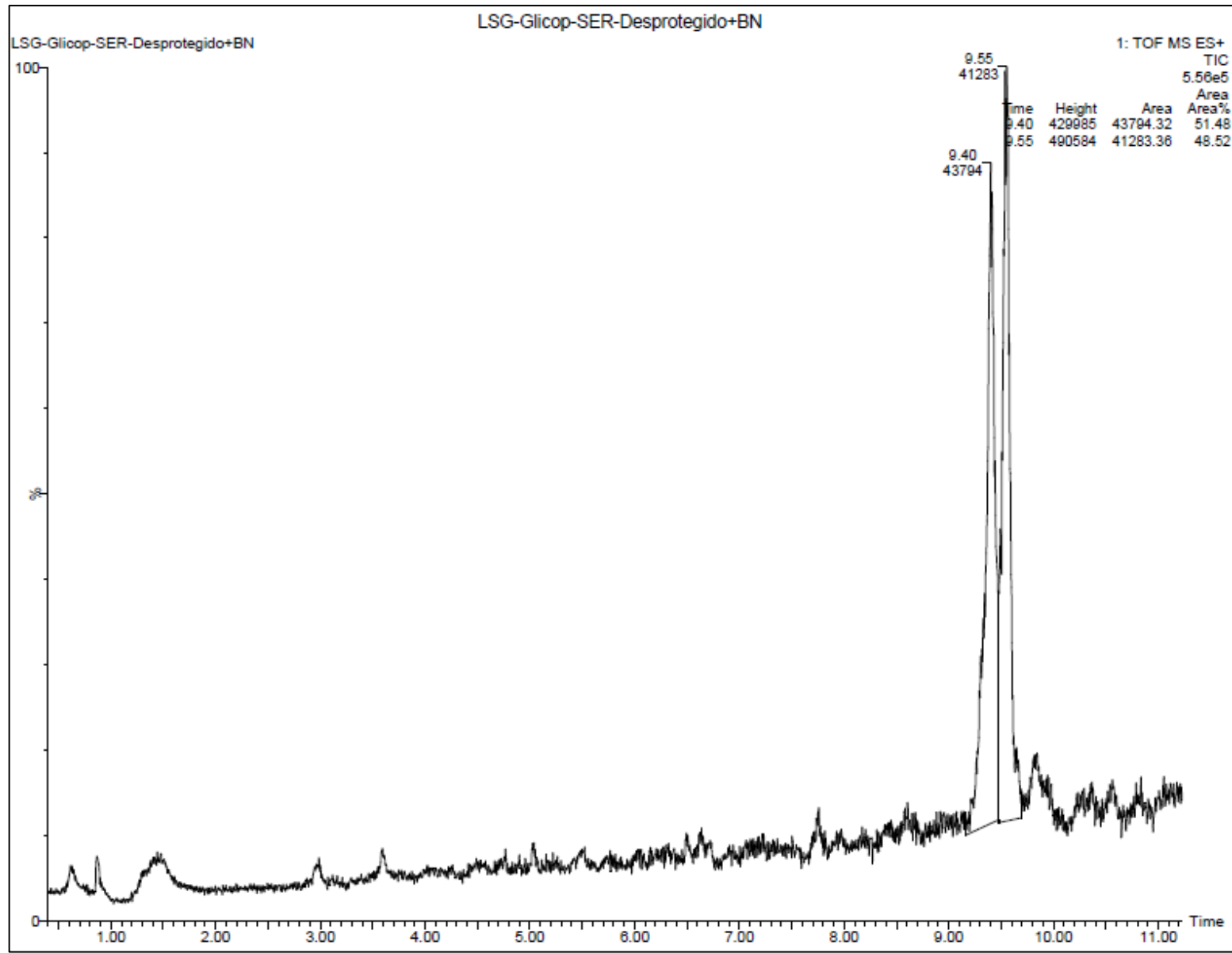
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1232.5438	1232.5403	3.5	2.8	29.5	10.3	C64 H78 N7 O18
	1232.5379	5.9	4.8	26.5	13.3	C62 H79 N7 O18 Na

XIXX

DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2013\FEBRE...2013\13-02-2013-A\2013-02-13 11-48-45 LOU\LSG-GLICOP-SER-BN.D)



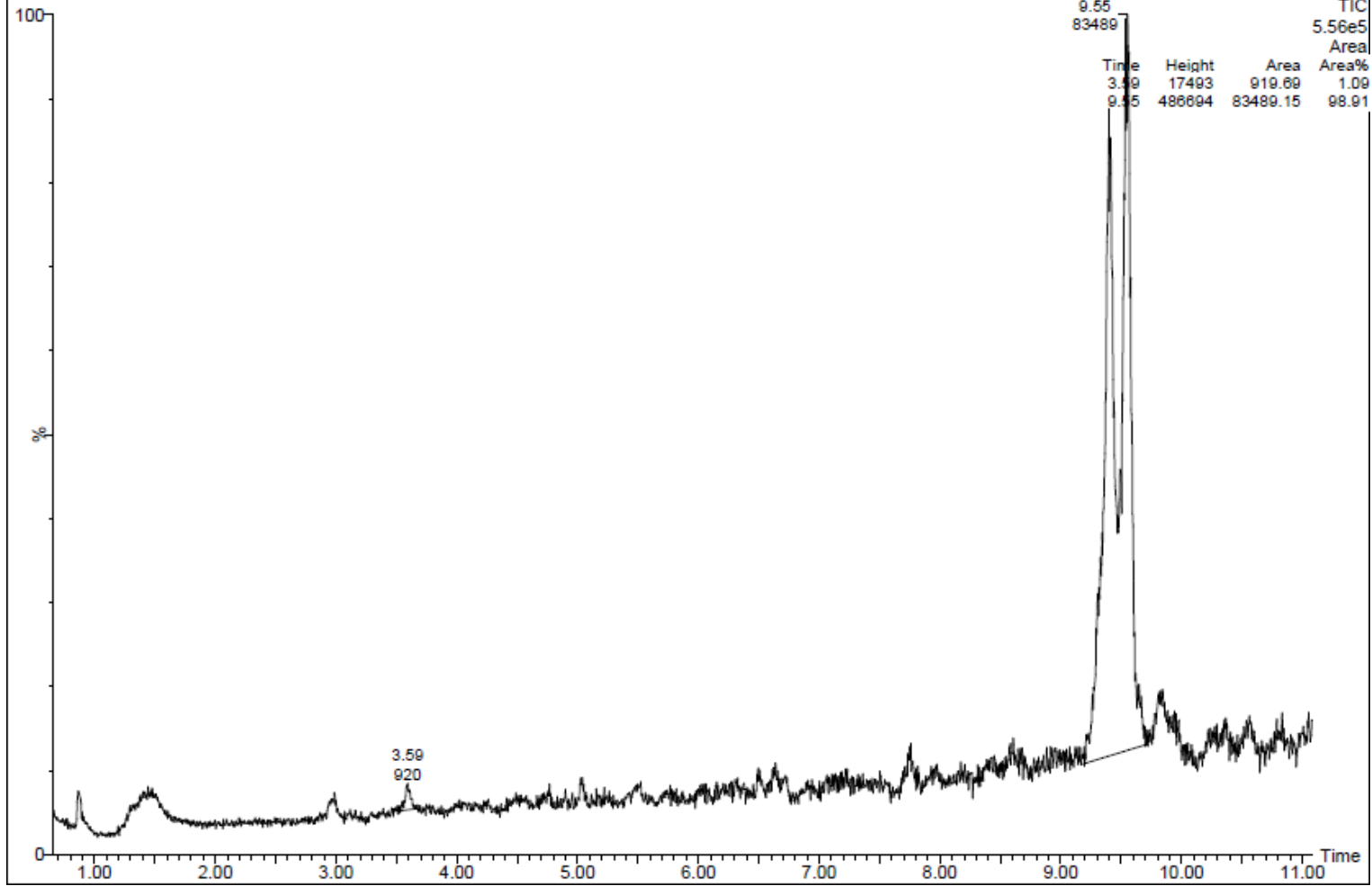
XXX



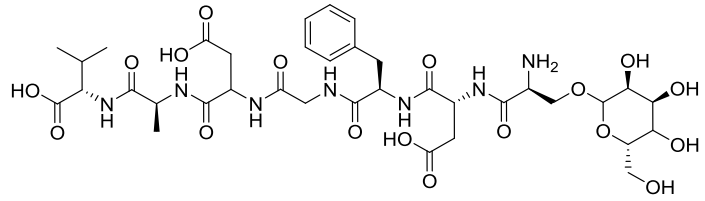
LSG-Glicop-SER-Desprotegido+BN

LSG-Glicop-SER-Desprotegido+BN

1: TOF MS ES+



XXXX



1: TOF MS ES+

4.22e+002



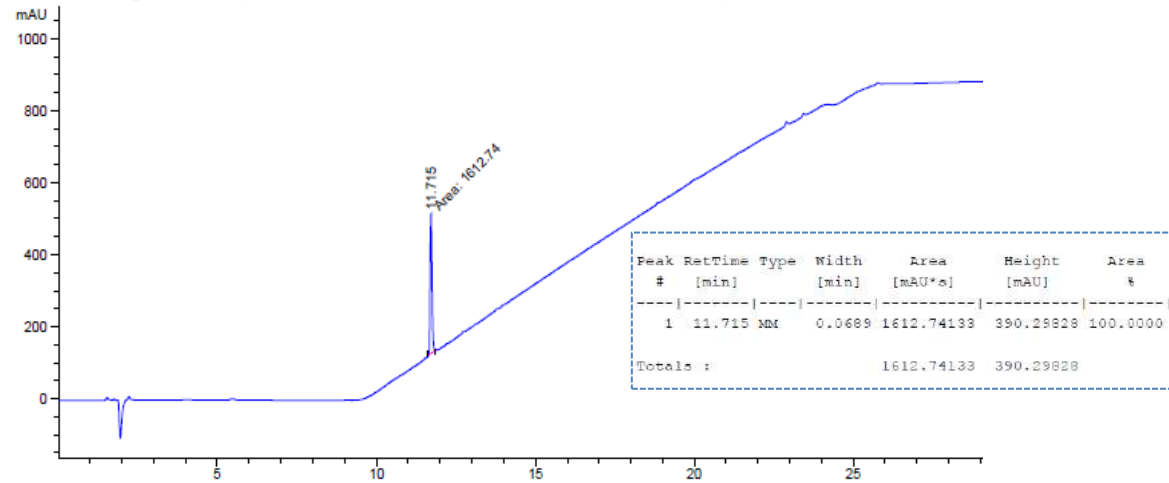
Minimum:
Maximum:

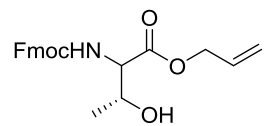
5.0	10.0	-1.5
		50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
872.3513	872.3525	-1.2	-1.4	13.5	8.8	C36 H54 N7 O18
	872.3501	1.2	1.4	10.5	11.7	C34 H55 N7 O18 Na

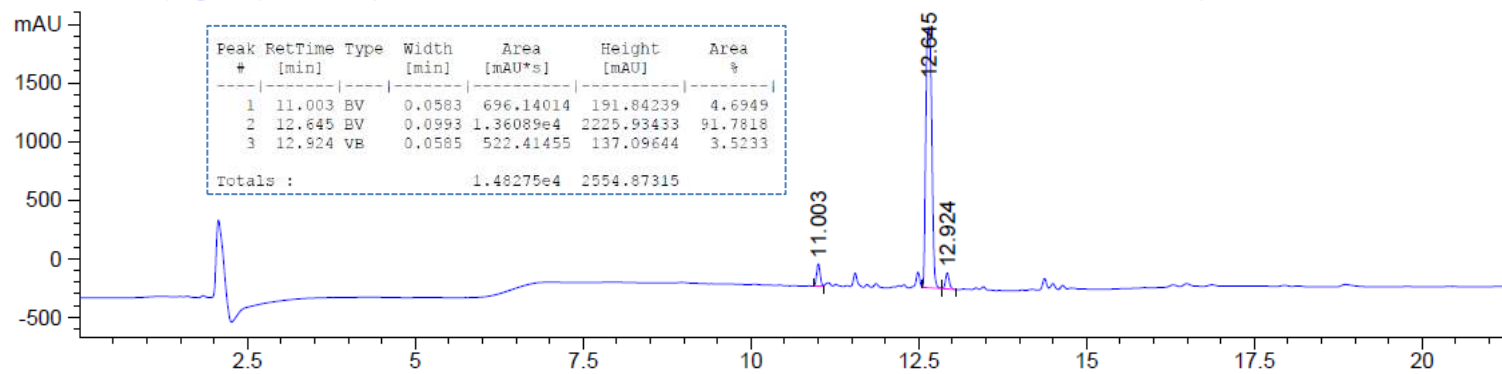
IIXXX

DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2014/OCTUBRE 2014/06-10-2014-A/2014-10-06 16-57-20 PACO\18-03-A.D)

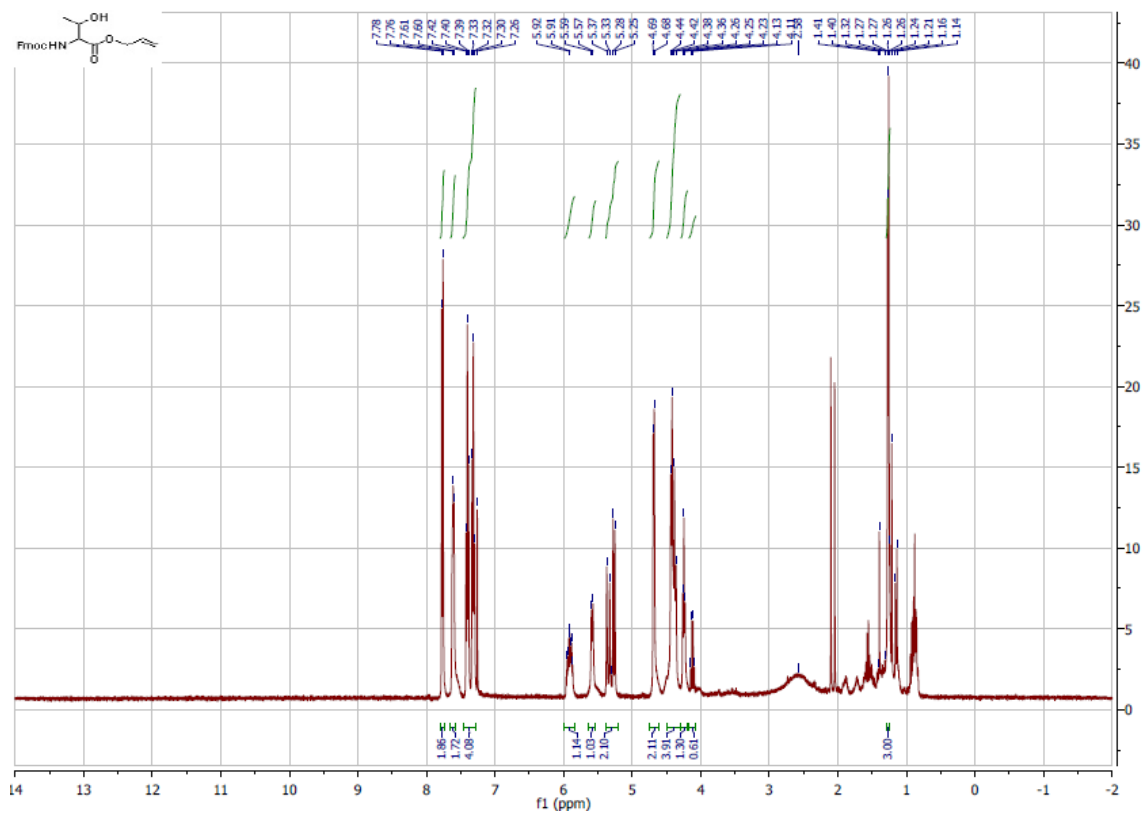


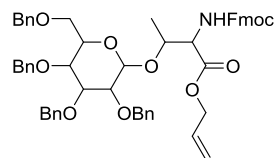


DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2012MAY02012\22-05-2012-B\2012-05-22 12-21-05 LOU\FMOC-THR-OALL-OH.D)



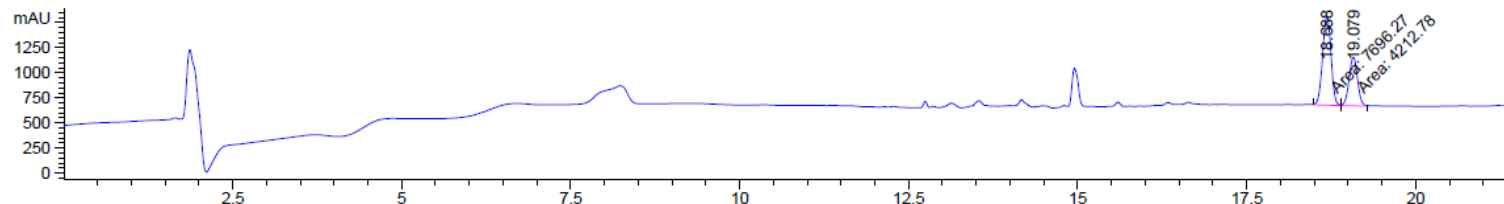
IIIXXX



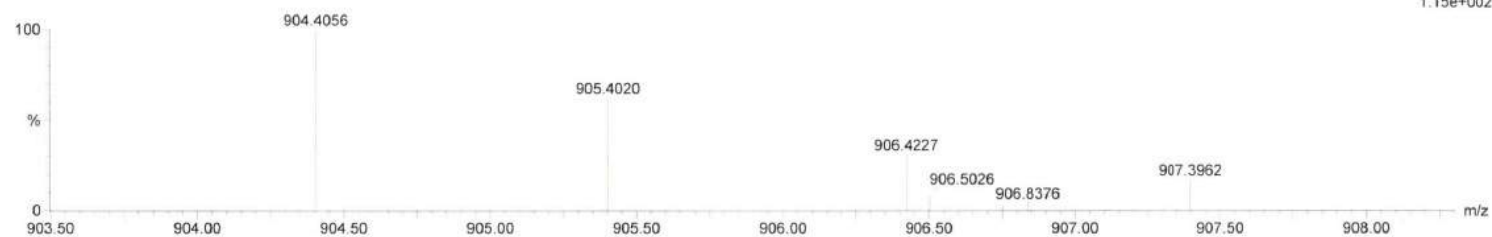


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	18.688	MF	0.1453	7696.27197	882.81281	64.6254
2	19.079	FM	0.1444	4212.77539	486.34305	35.3746
Totals :				1.19090e4	1369.15585	

DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2012VABRIL 2012\25-04-2012-AILSG-GLICOSIDO-THR-ALLOC-22MIN-20GRADOS.D)



1: TOF MS ES+

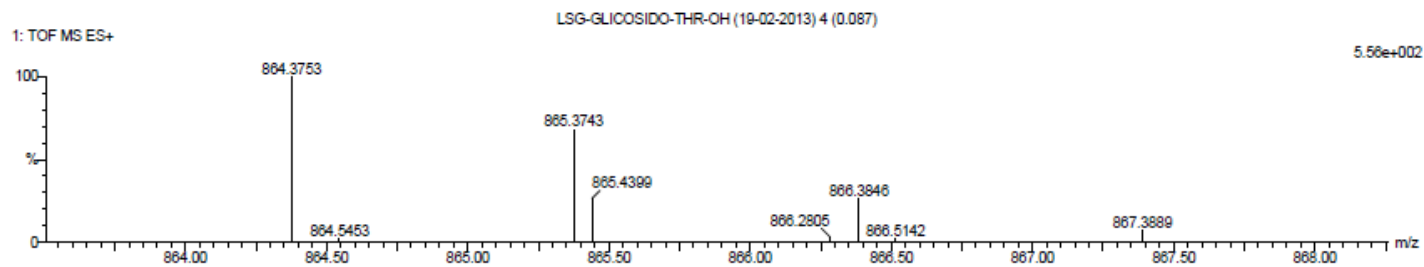
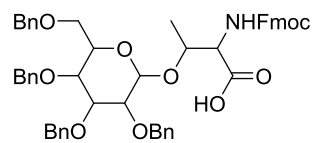


Minimum:
Maximum:

10.0 5.0 -1.5
50.0

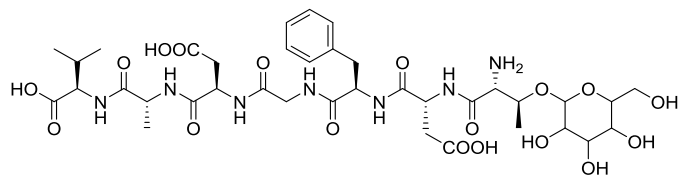
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
904.4056	904.4061	-0.5	-0.6	28.5	1.5	C56 H58 N O10
	904.4050	0.6	0.7	30.5	1.8	C55 H55 N5 O6 Na
	904.4037	1.9	2.1	25.5	1.9	C54 H59 N O10 Na
	904.4034	2.2	2.4	29.5	2.1	C52 H54 N7 O8

XXXX



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	1-FIT	Formula
864.3753	864.3748	0.5	0.6	27.5	4.4	C53 H54 N O10
	864.3724	2.9	3.4	24.5	6.9	C51 H55 N O10 Na

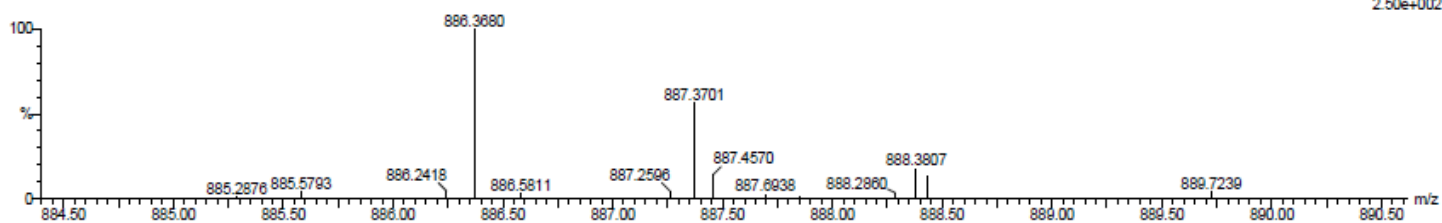
XXXX



LSG-GLICOP-THR-HG(0-08-2011) 20 (0.43g)

13/3706

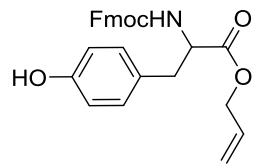
1: TOF MS ES+
2.50e+002



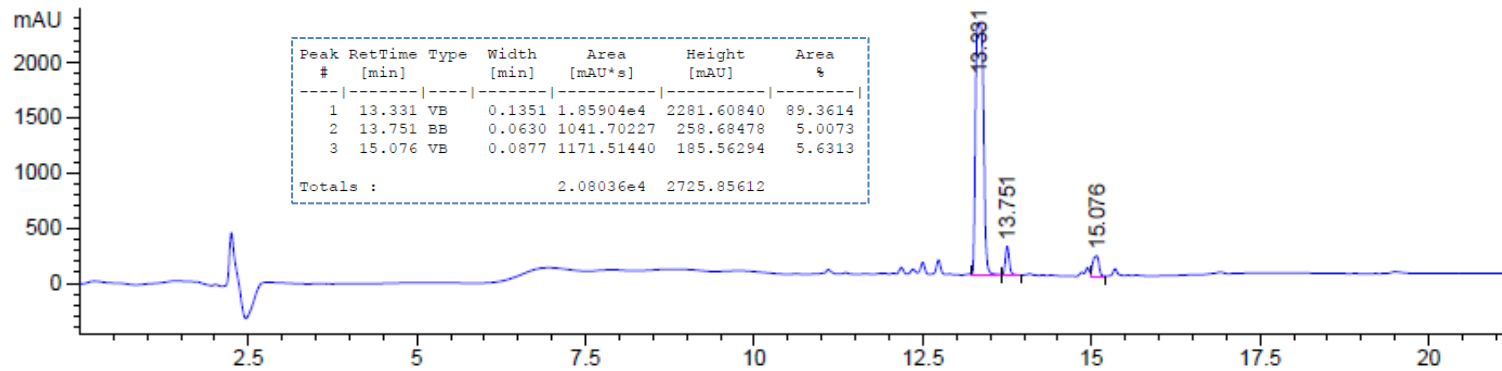
Minimum: -1.5
Maximum: 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	1-FIT	Formula
886.3680	886.3682	-0.2	-0.2	13.5	2.7	C37 H56 N7 O18
	886.3658	2.2	2.5	10.5	4.0	C35 H57 N7 O18 Na

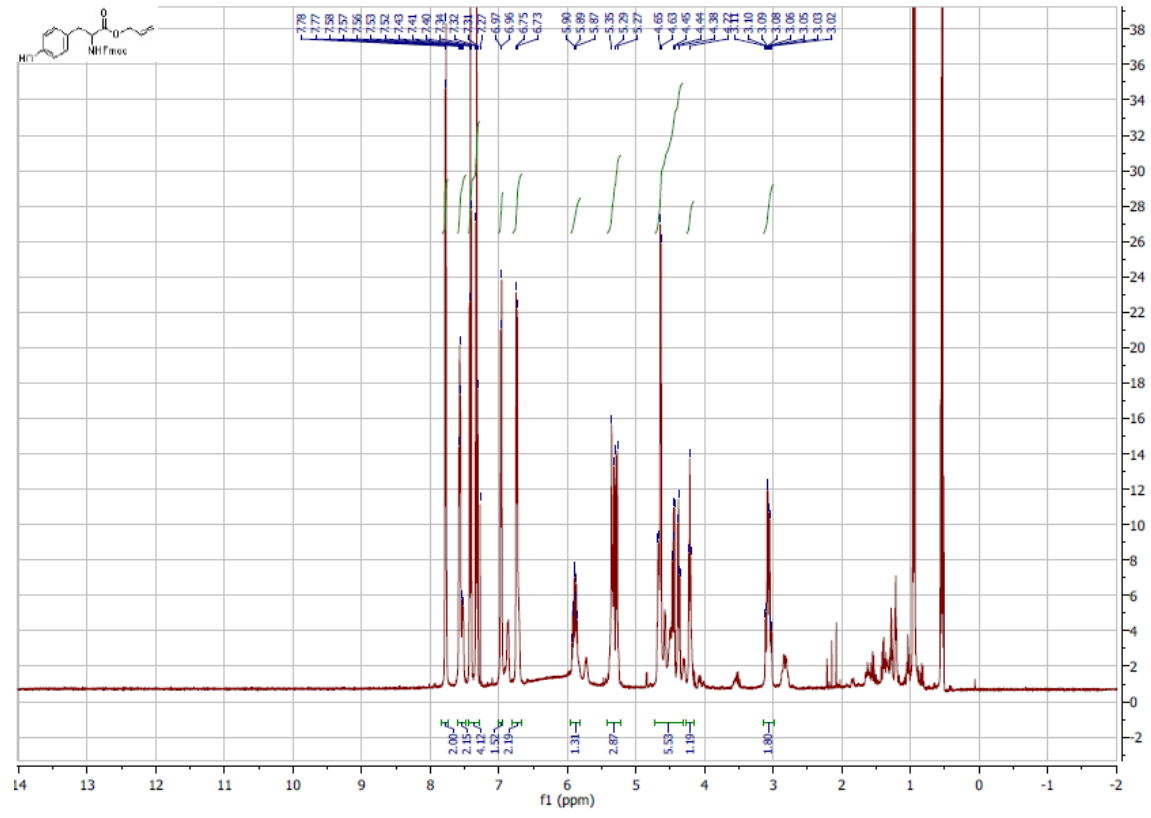
II\XXX

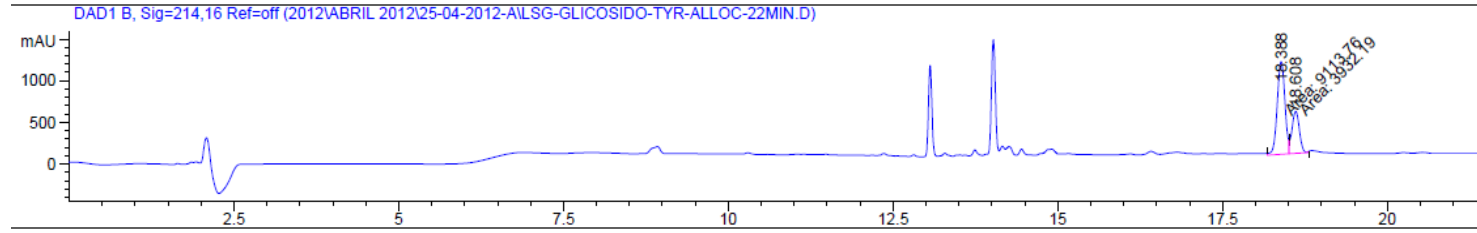
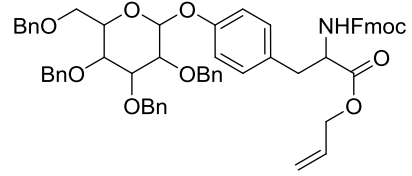


DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2012\MAYO2012\22-05-2012-B\2012-05-22 12-21-05 LOU\FMOC-TYR-OALL-OH.D)



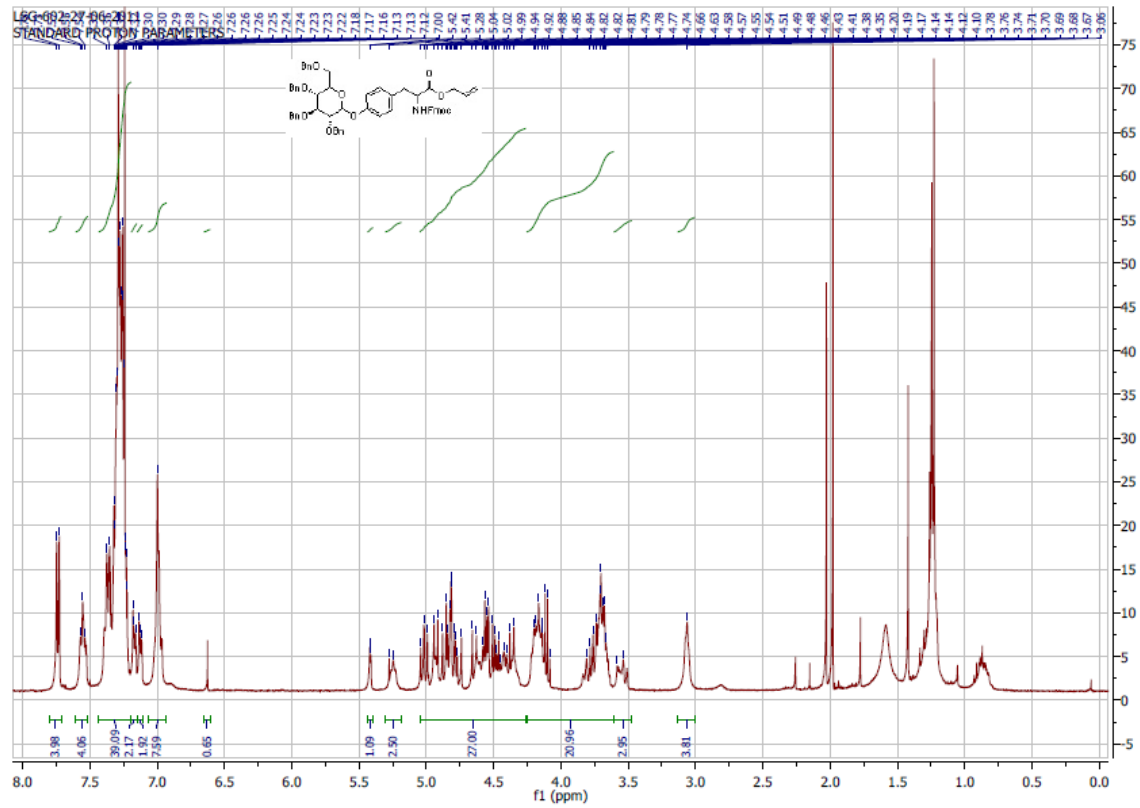
III\XXX

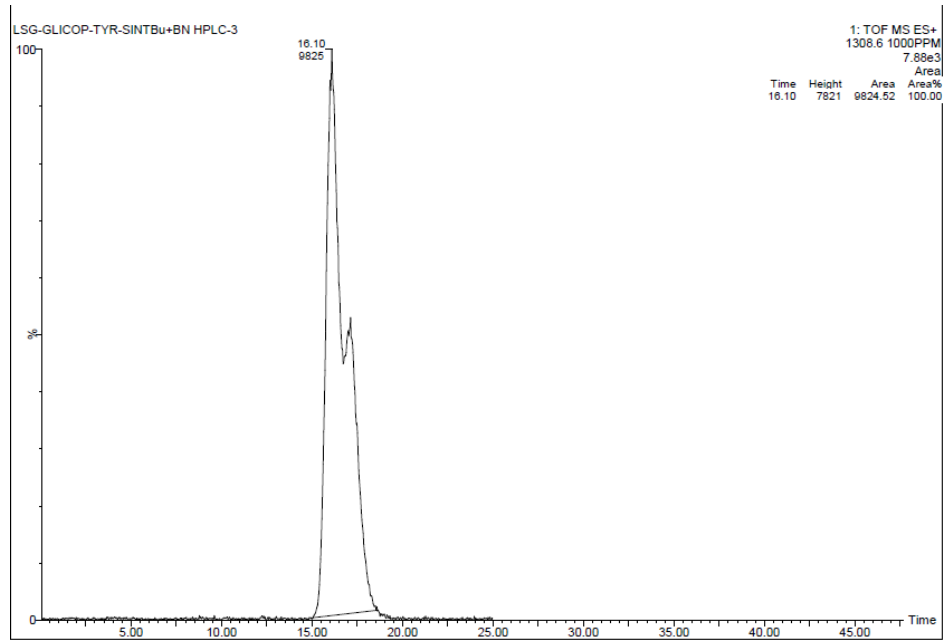


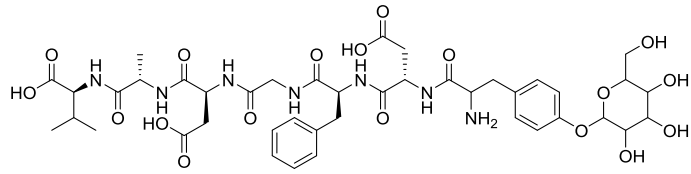


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	18.388	MF	0.1360	9113.75684	1116.94971	69.8589
2	18.608	FM	0.1290	3932.18506	508.19971	30.1411
Totals :				1.30459e4	1625.14941	

17X

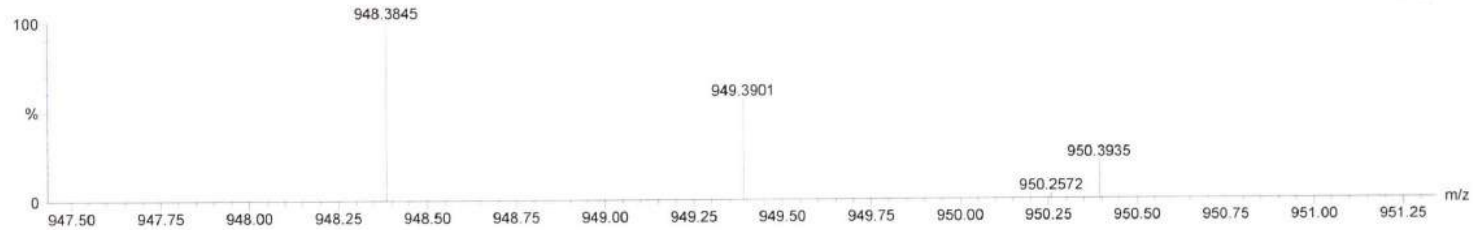






LSG-626 3 (0.070)

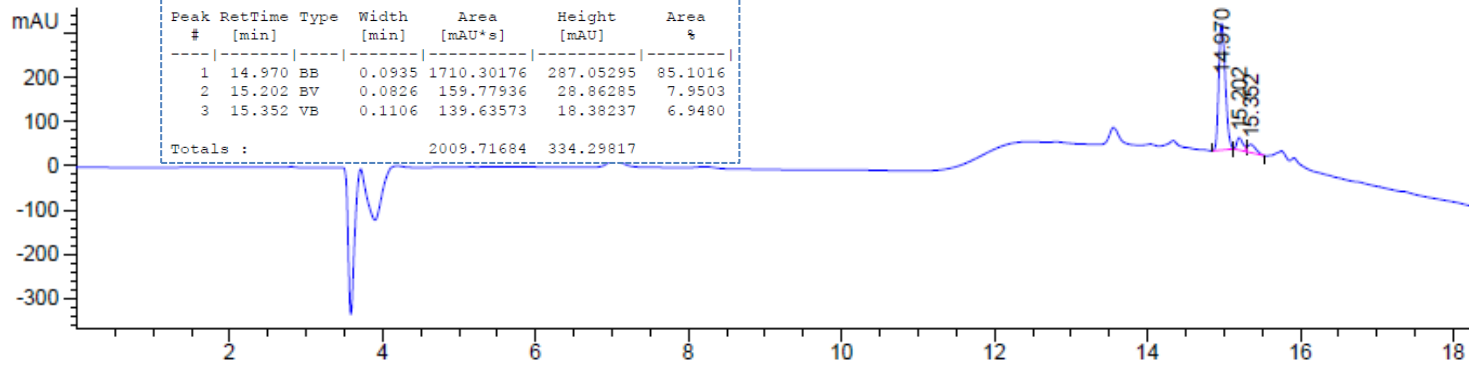
1: TOF MS ES+
1.03e+003

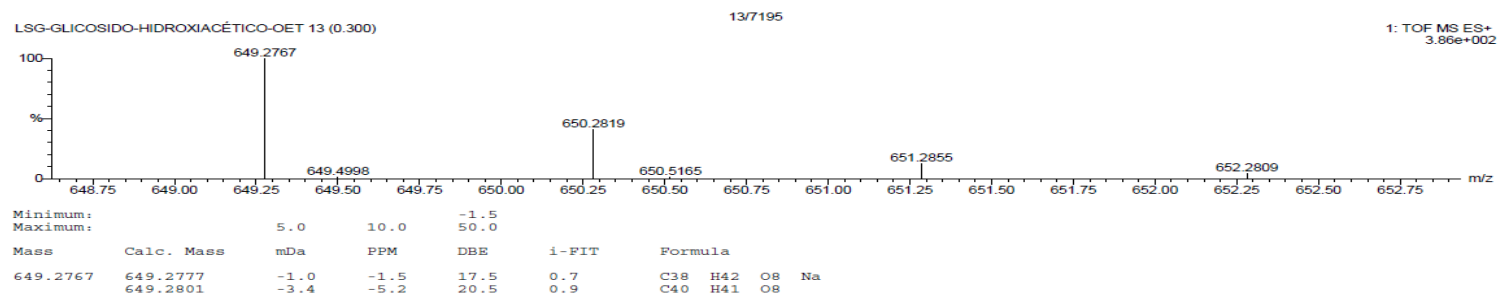
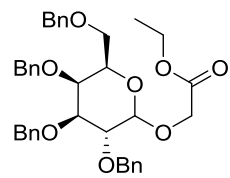


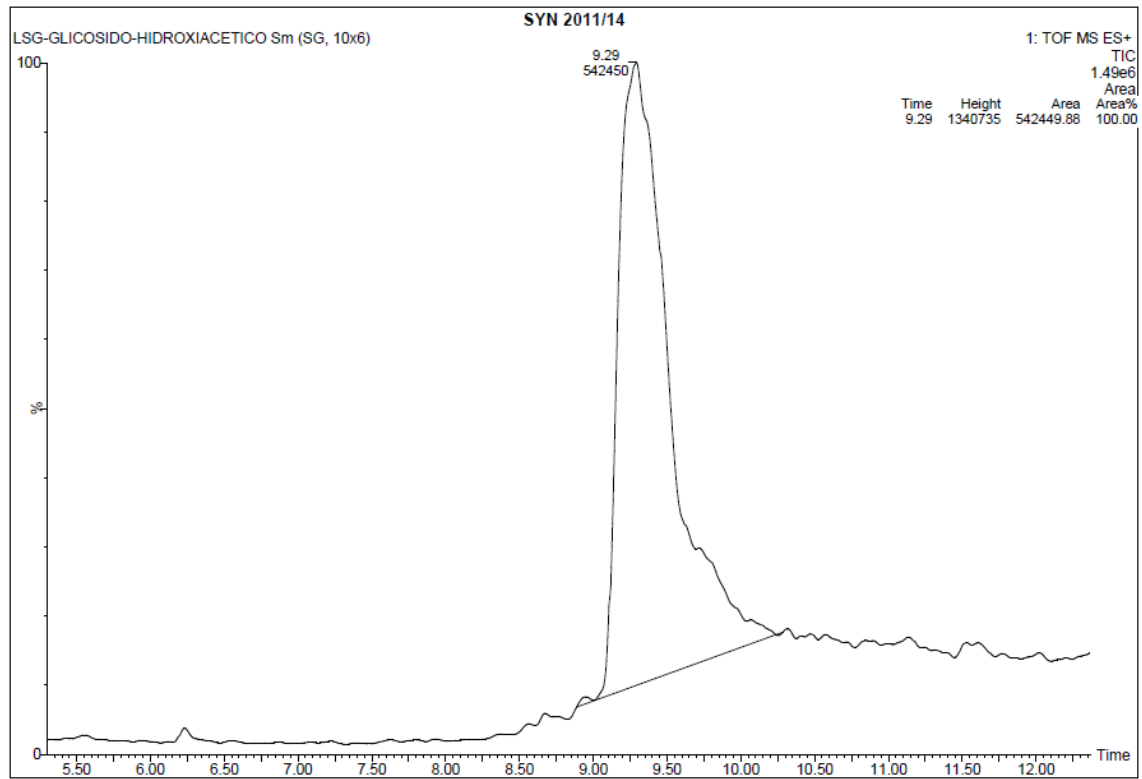
Minimum:				-1.5			
Maximum:	5.0	5.0		40.0			
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula	
948.3845	948.3838	0.7	0.7	17.5	5.5	C42 H58 N7 O18	

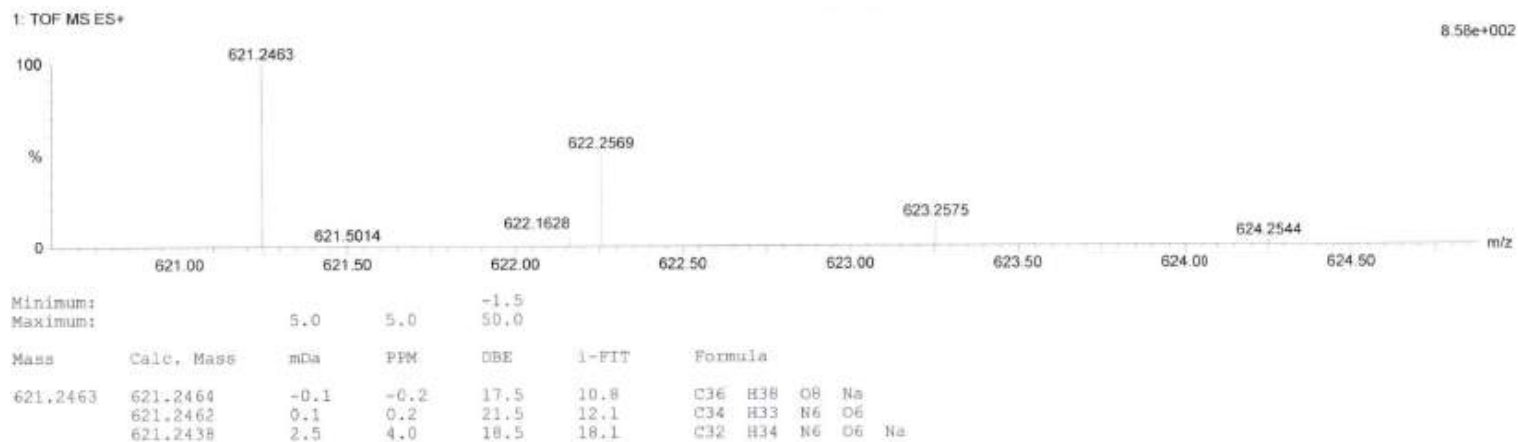
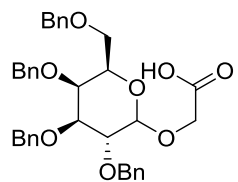
ATX

DAD1 B, Sig=214 16 Ref=off (2013\FEBRE_013\18-02-2013-A\2013-02-18 18-42-44 LOULSG-GLICOPP-TYR-HG.D)

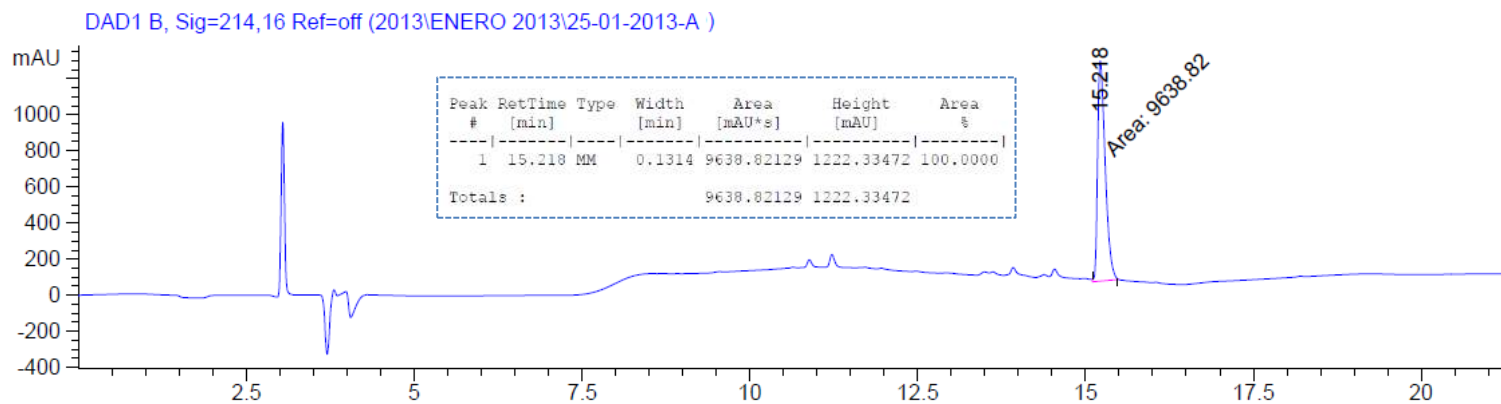


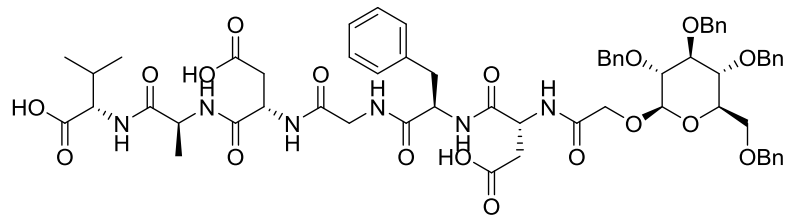




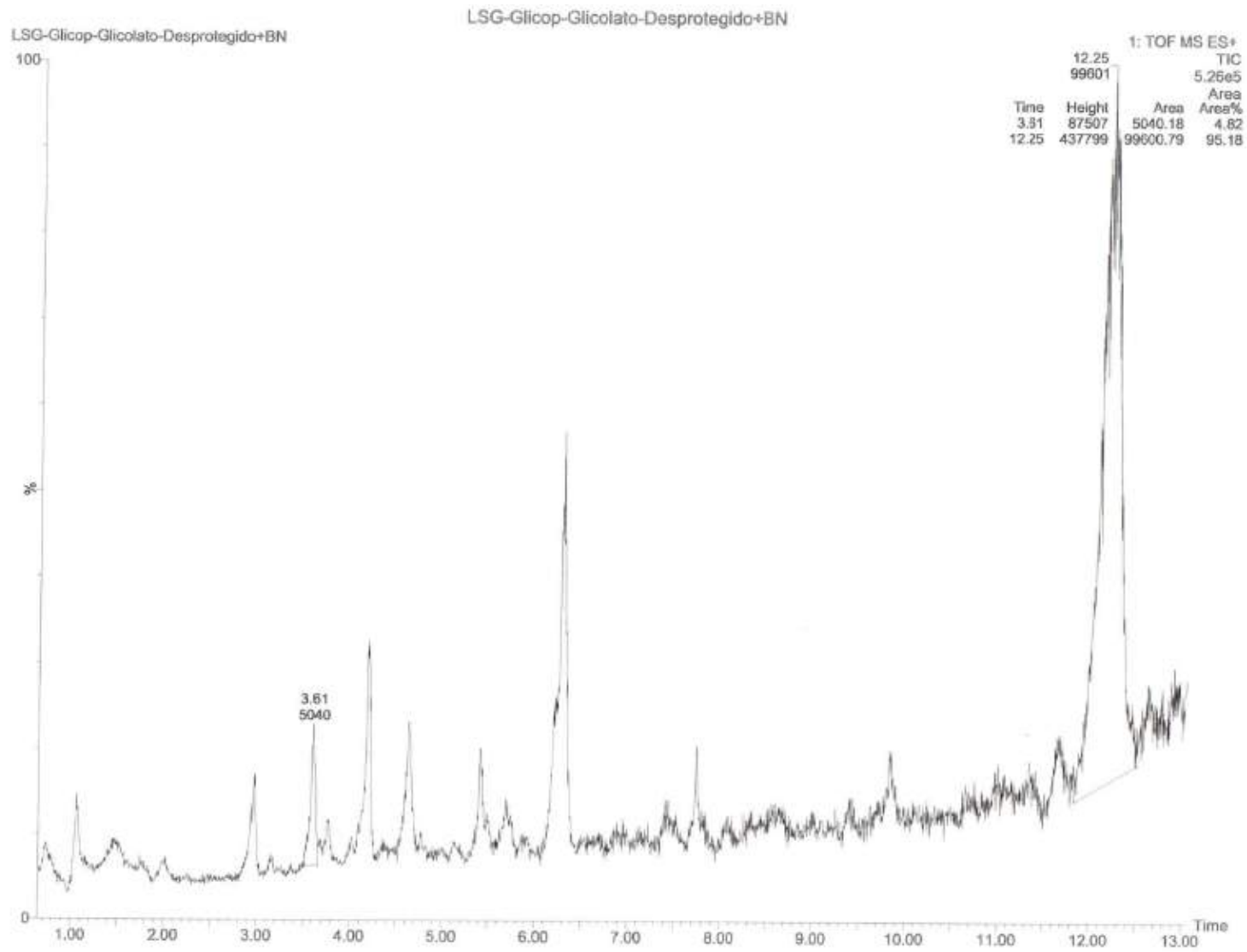


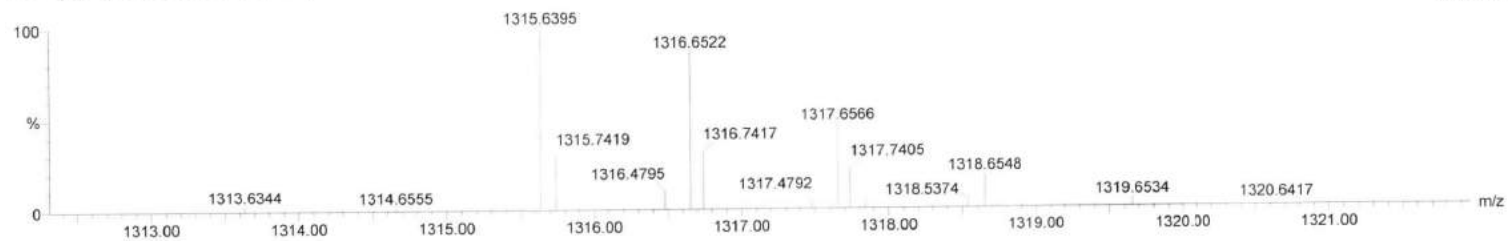
XLVII





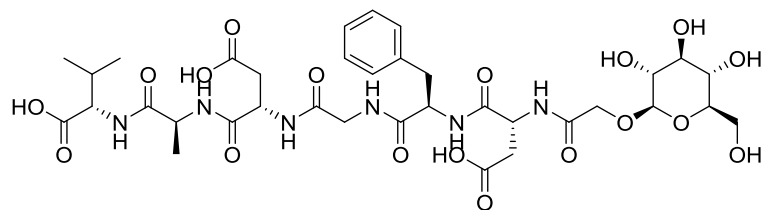
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1203.5148	1203.5138	1.0	0.8	29.5	0.6	C63 H75 N6 O18
	1203.5114	3.4	2.8	26.5	1.0	C61 H76 N6 O18 Na





Minimum: -1.5
Maximum: 50.0

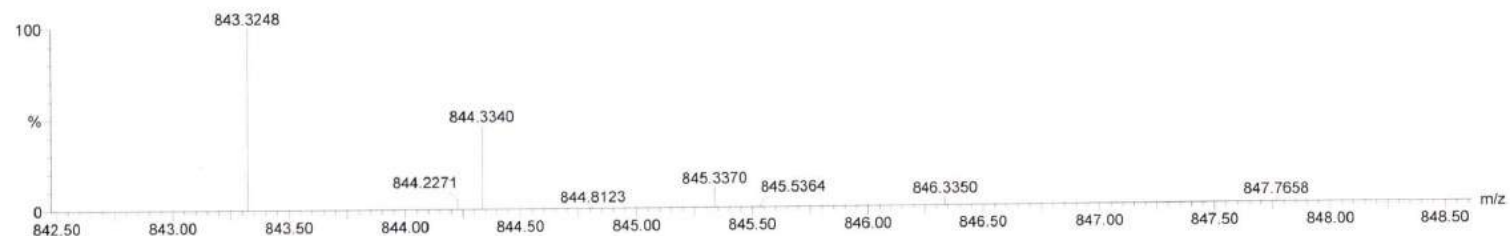
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1315.6395	1315.6390	0.5	0.4	29.5	3.2	C71 H91 N6 O18
	1315.6379	1.6	1.2	31.5	3.8	C70 H88 N10 O14 Na
	1315.6366	2.9	2.2	26.5	4.7	C69 H92 N6 O18 Na
	1315.6363	3.2	2.4	30.5	5.3	C67 H87 N12 O16
	1315.6339	5.6	4.3	27.5	7.3	C65 H88 N12 O16 Na



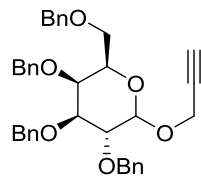
LSG-GLICOP-GLICOLATO HIDROGENADO 9 (0.212)

1.65e+002

1: TOF MS ES+

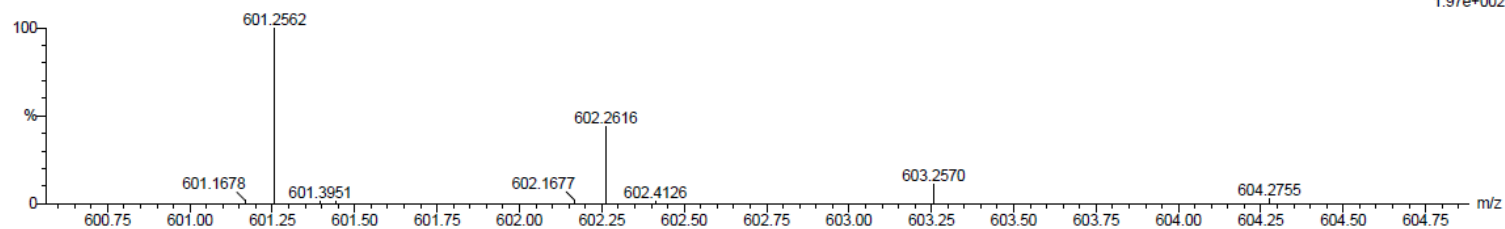


Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
843.3248	843.3260	-1.2	-1.4	13.5	0.4	C35 H51 N6 O18
	843.3236	1.2	1.4	10.5	0.5	C33 H52 N6 O18 Na
	843.3239	0.9	1.1	6.5	87.4	C34 H60 N4 O15 Br
	843.3214	3.4	4.0	3.5	87.8	C32 H61 N4 O15 Na Br
	843.3198	5.0	5.9	2.5	88.3	C29 H60 N6 O17 Br
	843.3231	1.7	2.0	4.5	104.8	C34 H65 N6 O8 Br2
	843.3207	4.1	4.9	1.5	105.1	C32 H66 N6 O8 Na Br2
	843.3217	3.1	3.7	-0.5	105.1	C33 H69 N2 O12 Br2
	843.3274	-2.6	-3.1	0.5	118.1	C5 H3 N O7 Na Br8
	843.3258	-1.0	-1.2	-0.5	118.1	C2 H2 N3 O9 Br8



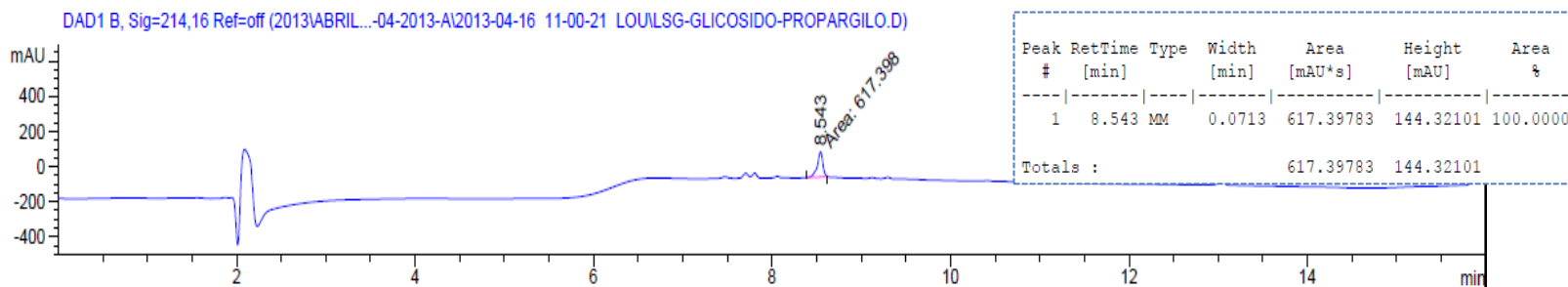
LSG-PROPARGILO 89 (1.975)

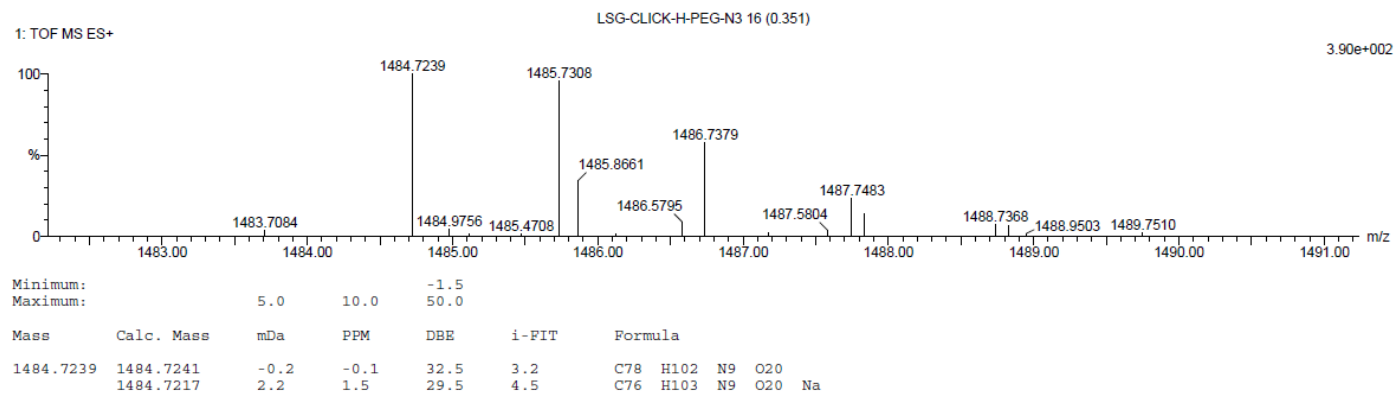
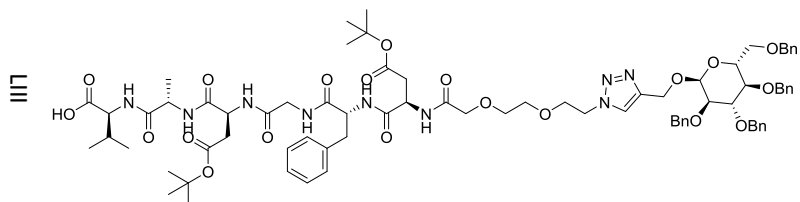
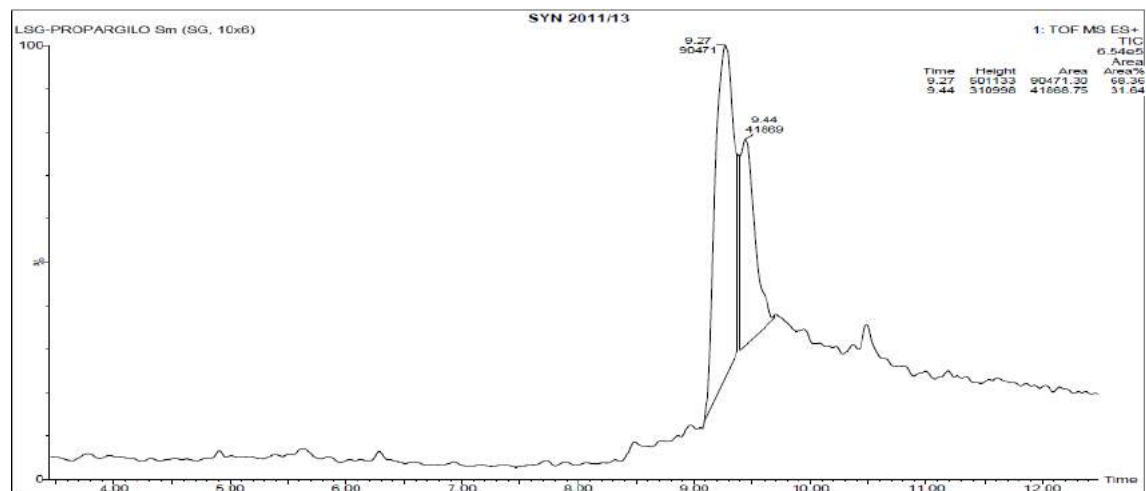
1: TOF MS ES+
1.97e+002

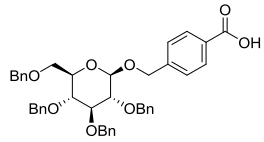


Minimum:				-1.5		
Maximum:	5.0	10.0		50.0		
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
601.2562	601.2566	-0.4	-0.7	18.5	0.1	C37 H38 O6 Na
	601.2590	-2.8	-4.7	21.5	0.0	C39 H37 O6

III

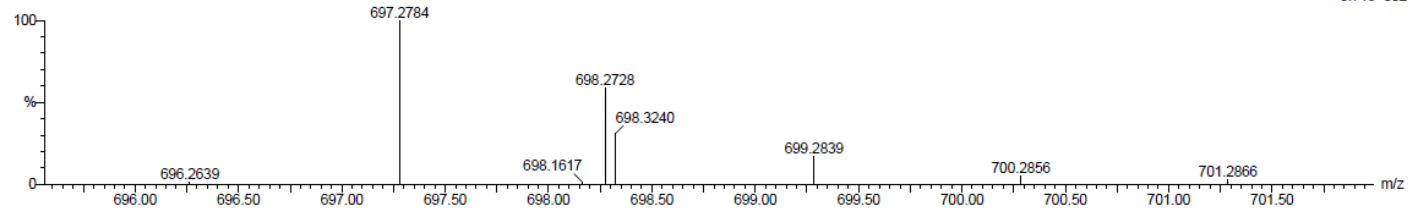






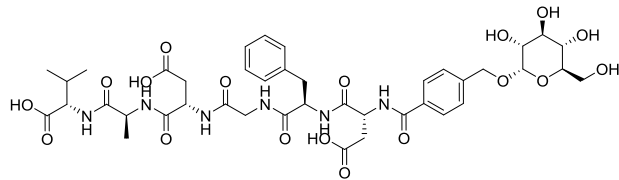
LSG-GLICOSIDO-BENZOICO 159 (3.508)

1: TOF MS ES+
3.71e+002



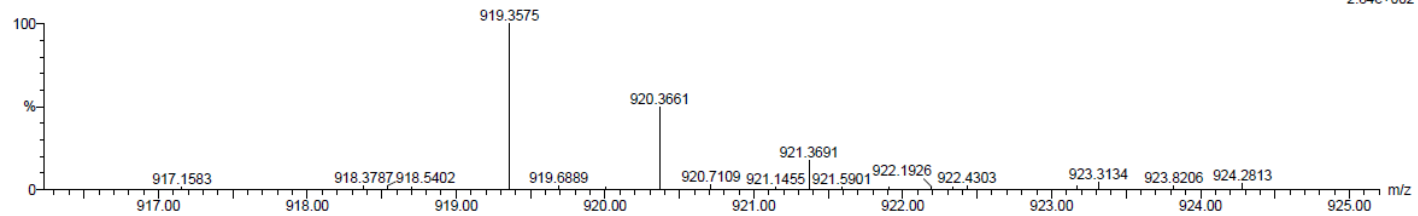
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
697.2784	697.2777	0.7	1.0	21.5	3.9	C42 H42 O8 Na
	697.2801	-1.7	-2.4	24.5	2.4	C44 H41 O8

LV

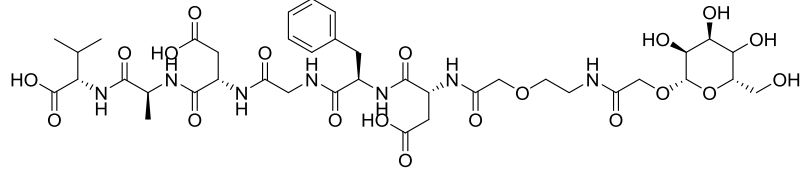


LSG-0204-a HPLC 69 (2.655)

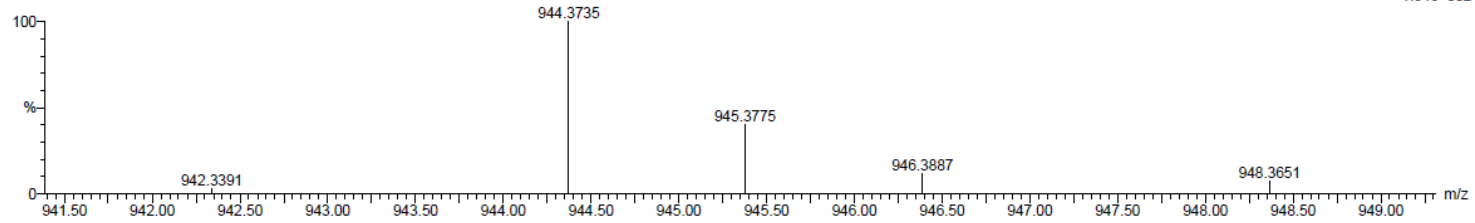
1: TOF MS ES+
2.84e+002



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
919.3575	919.3573	0.2	0.2	17.5	0.2	C41 H55 N6 O18
	919.3549	2.6	2.8	14.5	0.7	C39 H56 N6 O18 Na

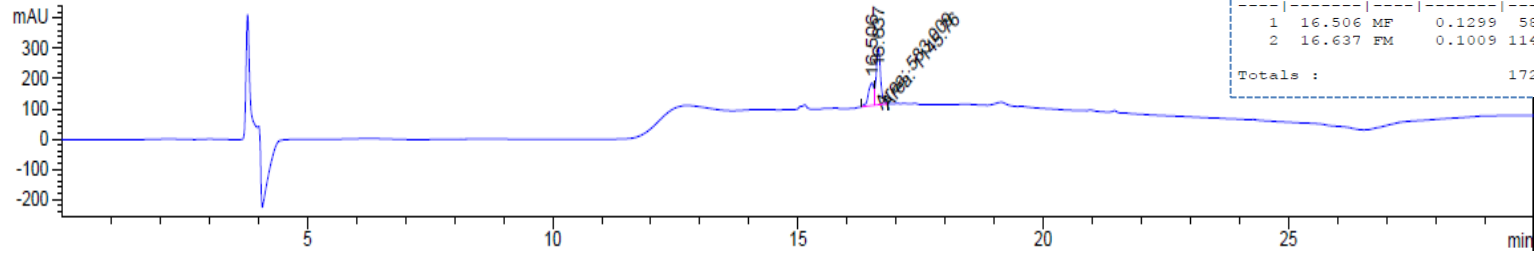


1.100 MS EST

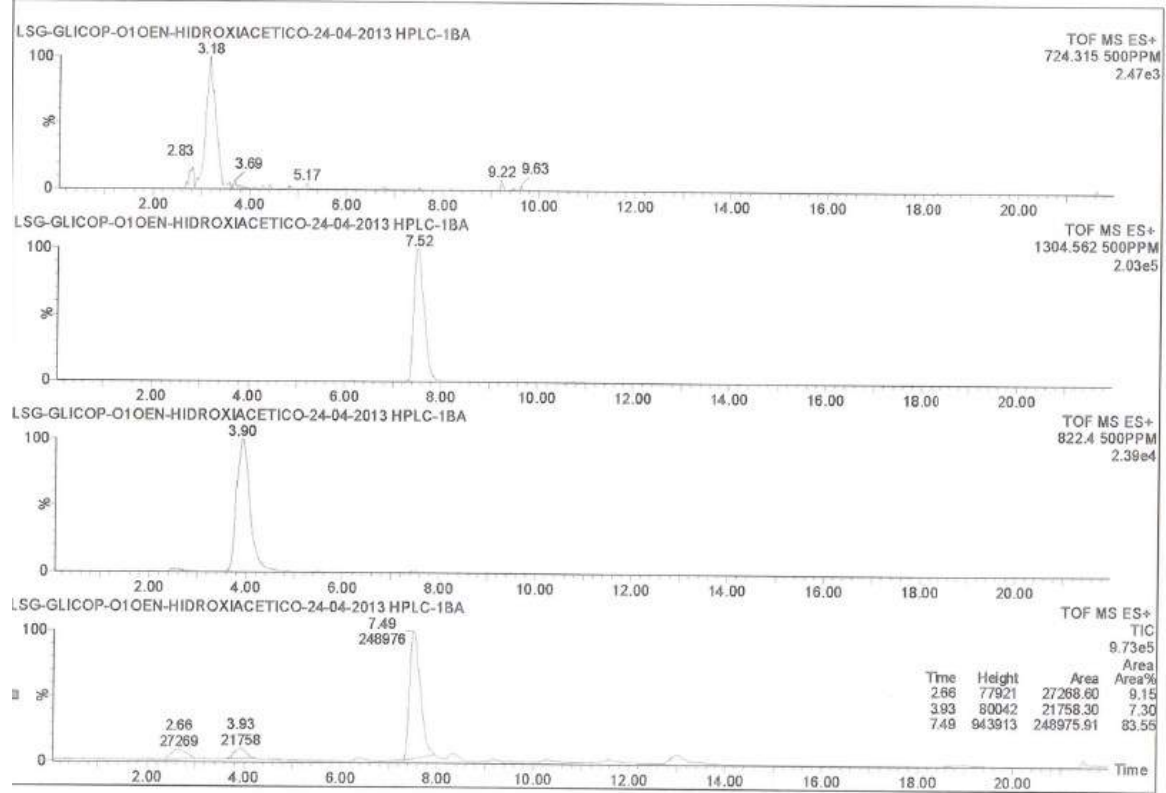


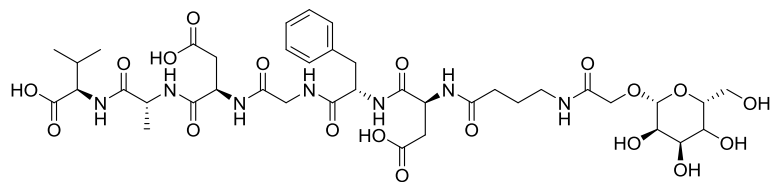
Minimum:									
Maximum:	5.0	10.0	-1.5	50.0					
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula			
944.3735	944.3737	-0.2	-0.2	14.5	1.0	C39	H58	N7	O20
	944.3713	2.2	2.3	11.5	0.5	C37	H59	N7	O20 Na

DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off (2013MAYO ...0-05-2013-BI2013-05-10 10-57-30 LOULSG-GLICOPP-O1PEN-HA-HG.D)



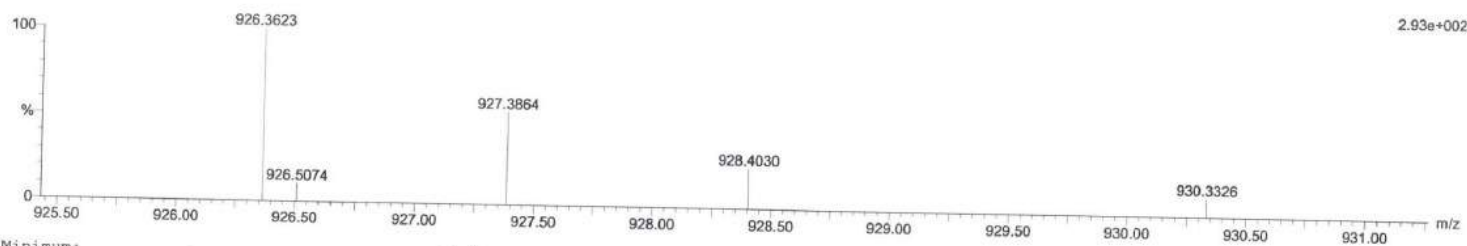
Signal 1: DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	16.506	MF	0.1299	583.00946	74.81303	33.7240
2	16.637	FM	0.1009	1145.75891	189.30986	66.2760
Totals :				1728.76837	264.12289	





1: TOF MS ES-

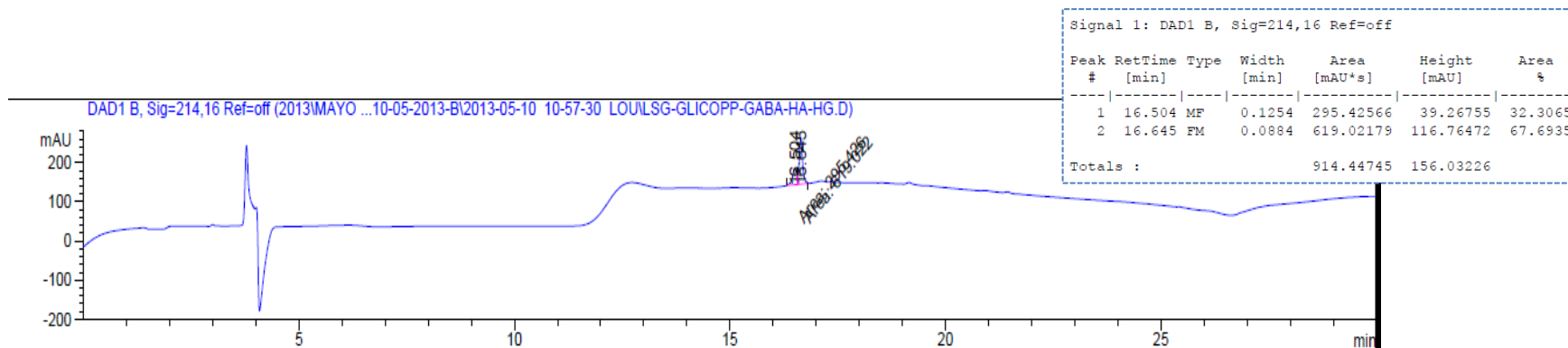
LSG-GLICOPP-GABA-HA-HGneg 3 (0.074)

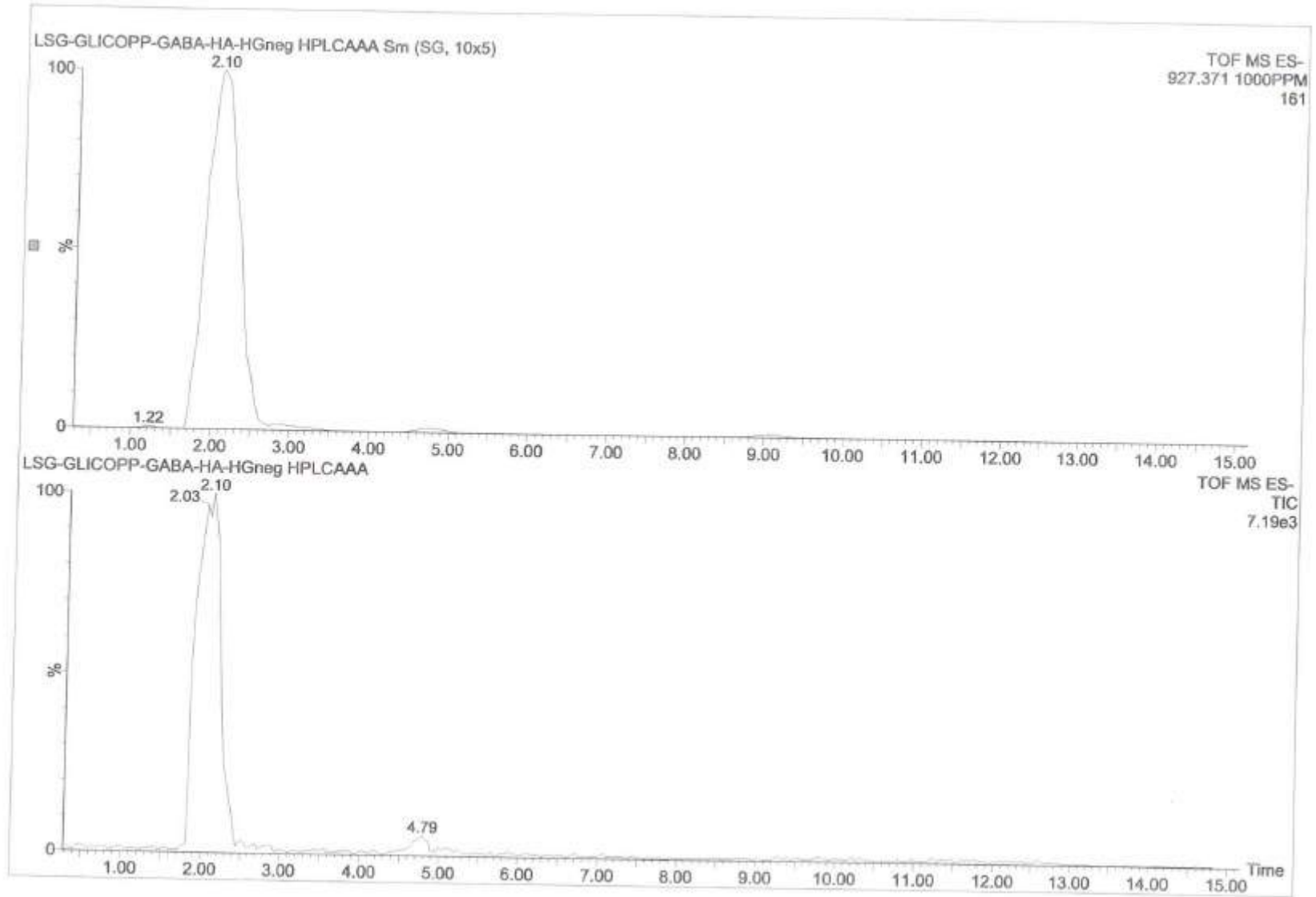


Minimum: -1.5
Maximum: 50.0

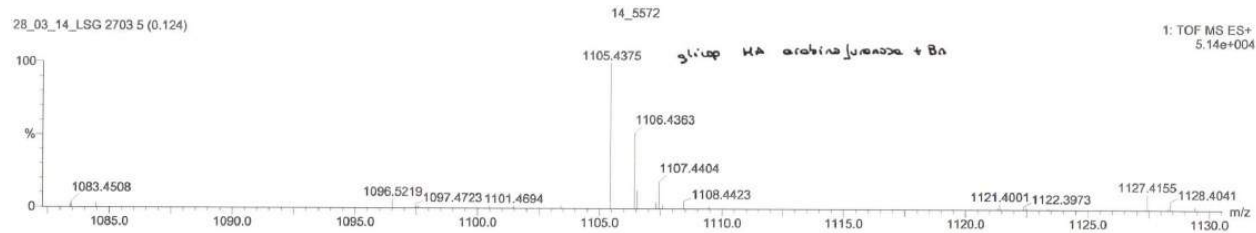
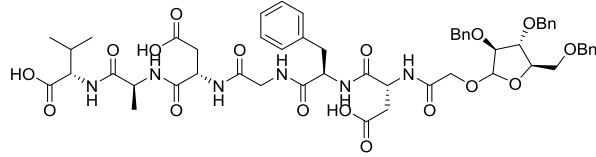
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
926.3623	926.3631	-0.8	-0.9	15.5	5.1	C39 H56 N7 O19

11/17





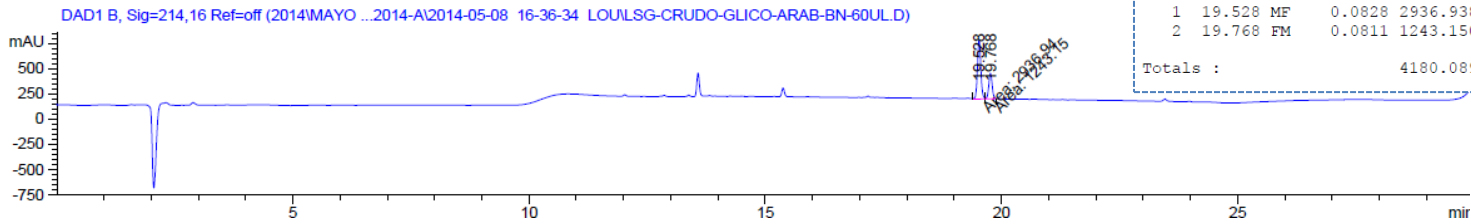
GLICOPÉPTIDO HA ARABINOFURANOSA

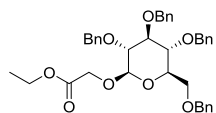


Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1105.4375	1105.4371	0.4	0.4	17.5	37.7	C37 H61 N20 O20
	1105.4379	-0.4	-0.4	29.5	628.7	C53 H61 N12 O15
	1105.4369	0.6	0.5	31.5	588.9	C52 H58 N16 O11 Na
	1105.4382	-0.7	-0.6	25.5	678.8	C55 H66 N6 O17 Na
	1105.4382	-0.7	-0.6	36.5	777.0	C53 H54 N20 O7 Na
	1105.4366	0.9	0.8	24.5	462.4	C52 H65 N8 O19
	1105.4387	-1.2	-1.1	18.5	16.3	C40 H62 N18 O18 Na
	1105.4393	-1.8	-1.6	34.5	819.8	C54 H57 N16 O11
	1105.4355	2.0	1.8	26.5	424.1	C51 H62 N12 O15 Na
	1105.4396	-2.1	-1.9	30.5	872.7	C56 H62 N10 O13 Na
	1105.4352	2.3	2.1	30.5	390.8	C49 H57 N18 O13
	1105.4347	2.8	2.5	14.5	122.0	C35 H62 N20 O20 Na
	1105.4406	-3.1	-2.8	39.5	1032.1	C55 H53 N20 O7
	1105.4406	-3.1	-2.8	28.5	930.6	C57 H65 N6 O17
	1105.4342	3.3	3.0	21.5	287.0	C50 H66 N8 O19 Na
	1105.4409	-3.4	-3.1	24.5	993.7	C59 H70 O19 Na
	1105.4409	-3.4	-3.1	35.5	1088.5	C57 H58 N14 O9 Na
	1105.4339	3.6	3.3	25.5	256.0	C48 H61 N14 O17
	1105.4411	-3.6	-3.3	21.5	39.6	C42 H61 N18 O18
	1105.4414	-3.9	-3.5	17.5	46.8	C44 H66 N12 O20 Na
	1105.4420	-4.5	-4.1	33.5	1148.1	C58 H61 N10 O13
	1105.4328	4.7	4.3	27.5	237.9	C47 H58 N18 O13 Na
	1105.4422	-4.7	-4.3	23.5	1214.9	C60 H66 N4 O15 Na
	1105.4422	-4.7	-4.3	40.5	1325.5	C58 H54 N18 O5 Na

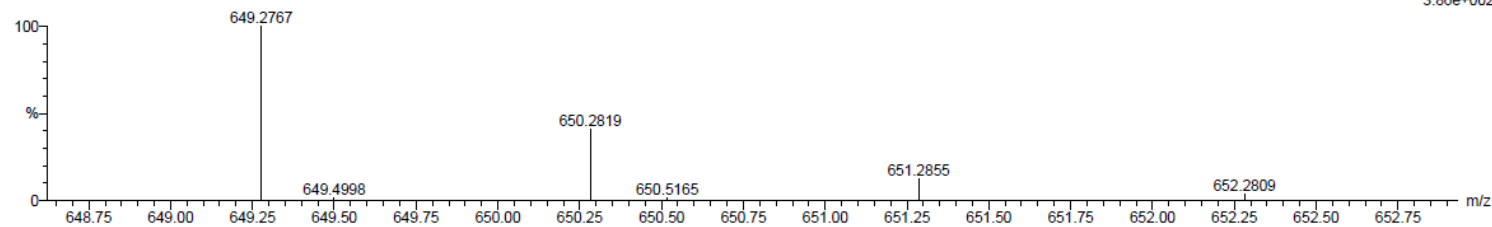
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	19.528	MF	0.0828	2936.93872	591.09888	70.2602
2	19.768	FM	0.0811	1243.15063	255.32002	29.7398
Totals :				4180.08936	846.41890	





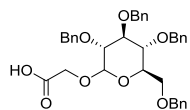
LSG-GLICOSIDO-HIDROXIACETICO-OET 13 (0.300)

1: TOF MS ES+
3.86e+002



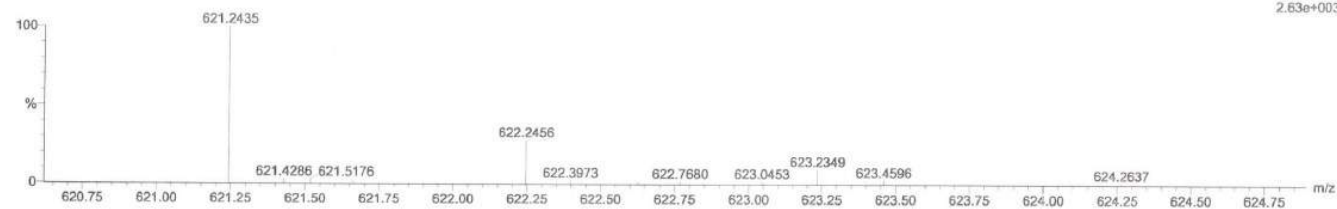
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
649.2767	649.2777	-1.0	-1.5	17.5	0.7	C38 H42 O8 Na
	649.2801	-3.4	-5.2	20.5	0.9	C40 H41 O8

XI

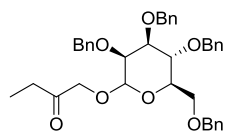


1: TOF MS ES+

2.63e+003



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
621.2435	621.2464	-2.9	-4.7	17.5	51.1	C36 H38 O8 Na

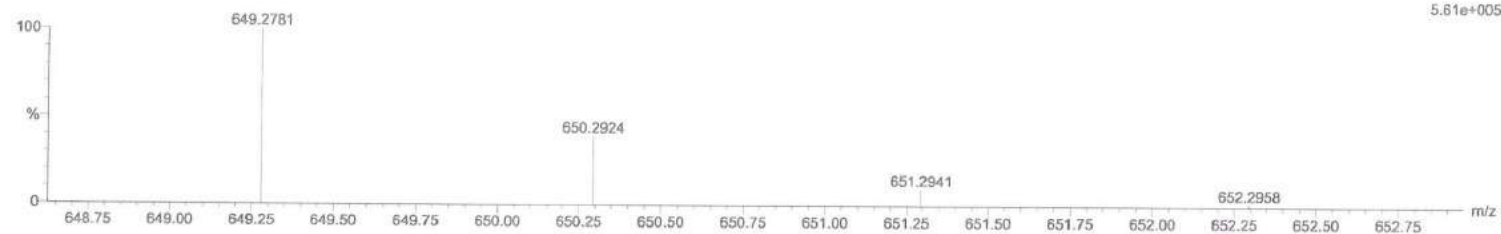


1: TOF MS ES+

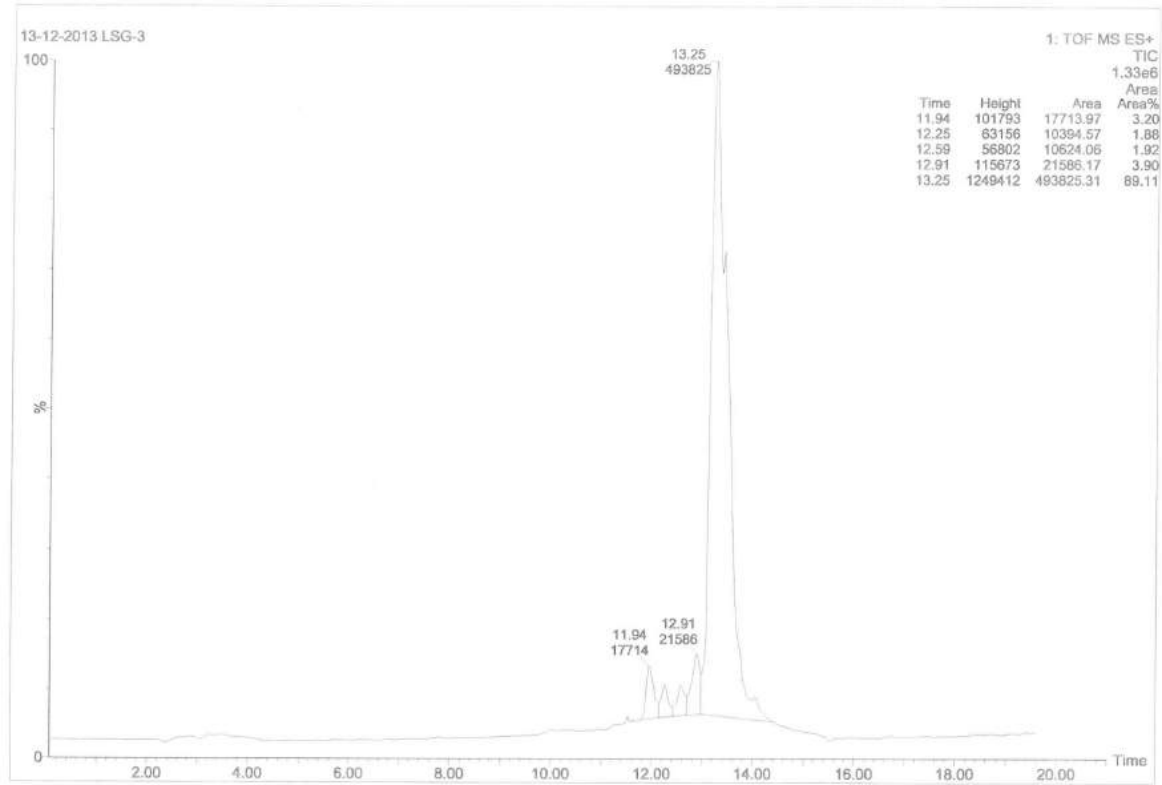
13-12-2013 LSG-3 345 (13.251)

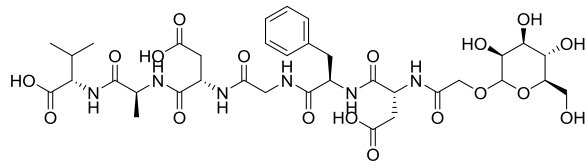
glycoside HA. manginana

5.81e+005



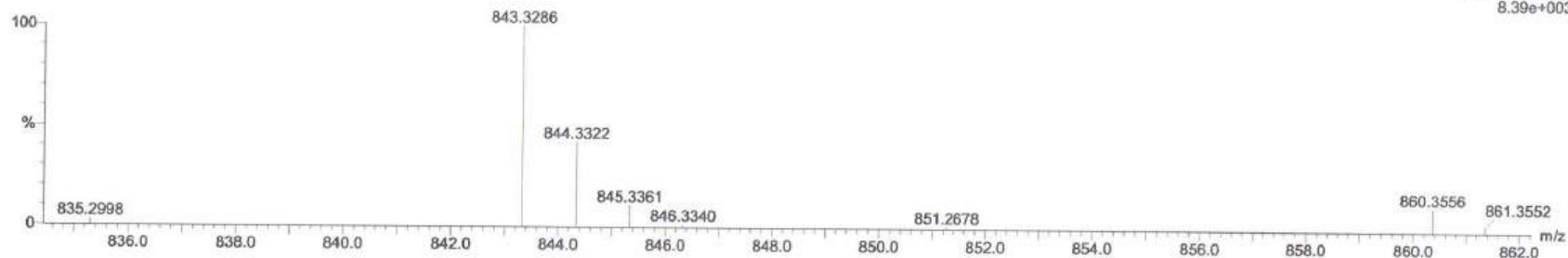
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
649.2781	649.2777	0.4	0.6	17.5	1132.6	C38 H42 O8 Na
	649.2766	1.5	2.3	-1.5	11800.0	C22 H49 O21



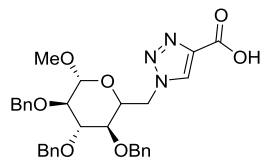


14_04_09_LSG manop hg 336 (1.314)

1: TOF MS ES+
8.39e+003

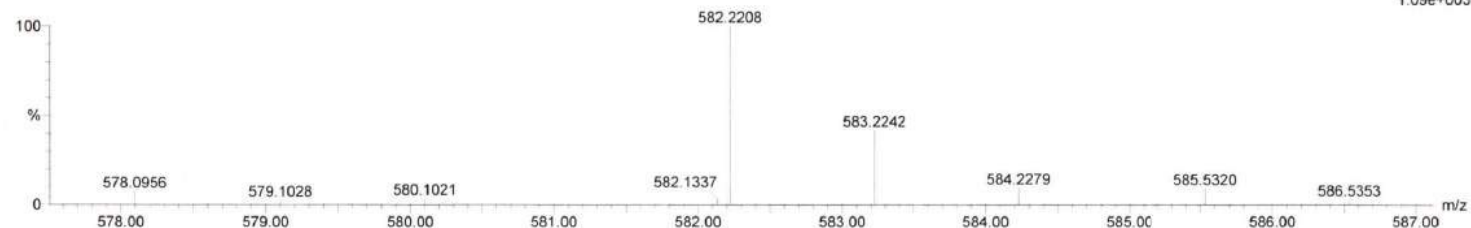


Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
843.3286	843.3249	3.7	4.4	15.5	12.9	1.1	C34 H48 N10 O14 Na
	843.3273	1.3	1.5	18.5	13.6	1.9	C36 H47 N10 O14
	843.3260	2.6	3.1	13.5	13.8	2.1	C35 H51 N6 O18
	843.3276	1.0	1.2	14.5	13.9	2.1	C38 H52 N4 O16 Na
	843.3263	2.3	2.7	9.5	14.2	2.5	C37 H56 O20 Na
	843.3287	-0.1	-0.1	12.5	14.3	2.5	C39 H55 O20
	843.3289	-0.3	-0.4	19.5	14.5	2.7	C39 H48 N8 O12 Na
	843.3300	-1.4	-1.7	17.5	15.2	3.5	C40 H51 N4 O16
	843.3308	-2.2	-2.6	6.5	15.8	4.0	C27 H52 N10 O19 Na
	843.3313	-2.7	-3.2	22.5	16.9	5.1	C41 H47 N8 O12
	843.3316	-3.0	-3.6	18.5	17.4	5.7	C43 H52 N2 O14 Na
	843.3258	2.8	3.3	27.5	19.9	8.1	C50 H48 N2 O9 Na
	843.3255	3.1	3.7	31.5	20.2	8.5	C48 H43 N8 O7



Lourdes 03 33 (0.741)

1: TOF MS ES+
1.09e+003

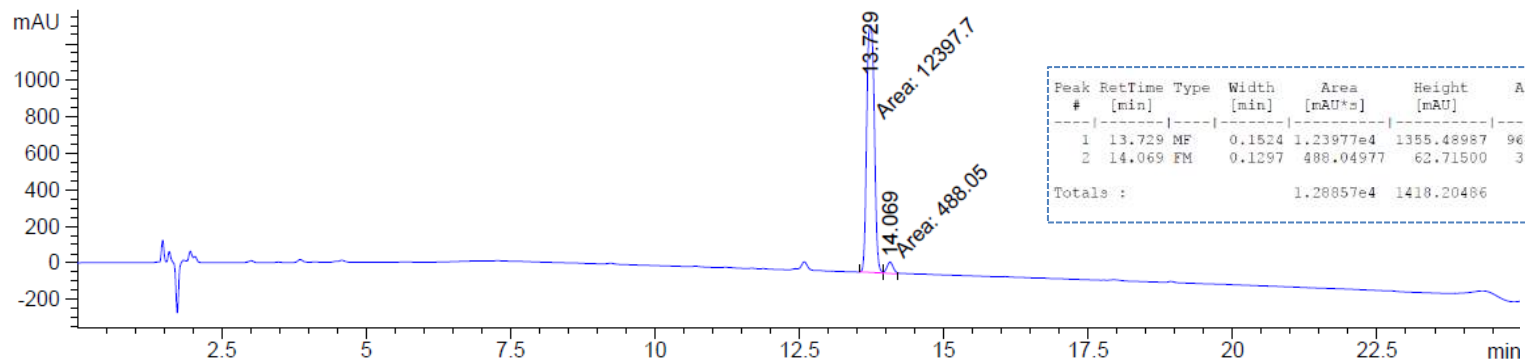


Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 40.0

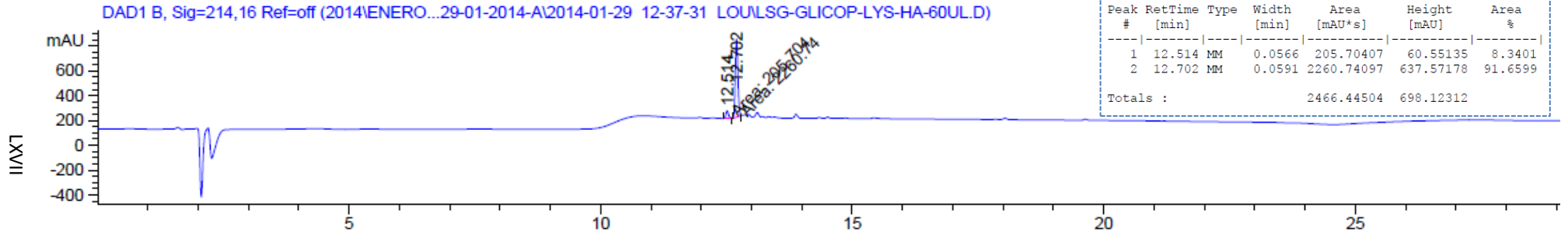
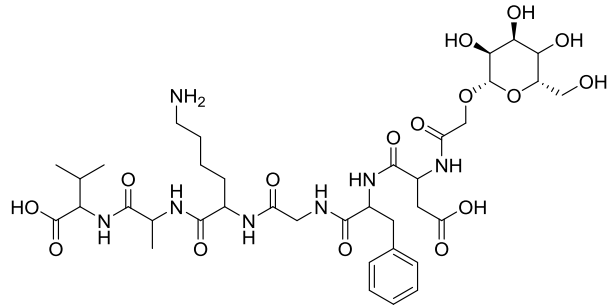
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
582.2208	582.2216	-0.8	-1.4	16.5	3.0	C31 H33 N3 O7 Na
	582.2198	1.0	1.7	29.5	3.8	C43 H29 N Na
	582.2222	-1.4	-2.4	32.5	6.5	C45 H28 N
	582.2182	2.6	4.5	28.5	1.6	C40 H28 N3 O2

AXT

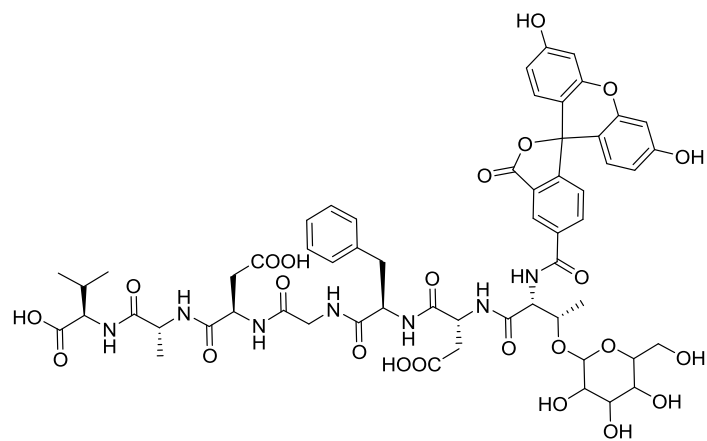
DAD1 B, Sig=214,8 Ref=360,100 (2010\16_12...0_B\2010-12-16 16-42-35 LOURDES\LSG_GLICOSIDO_TRIAZOL(2).D)



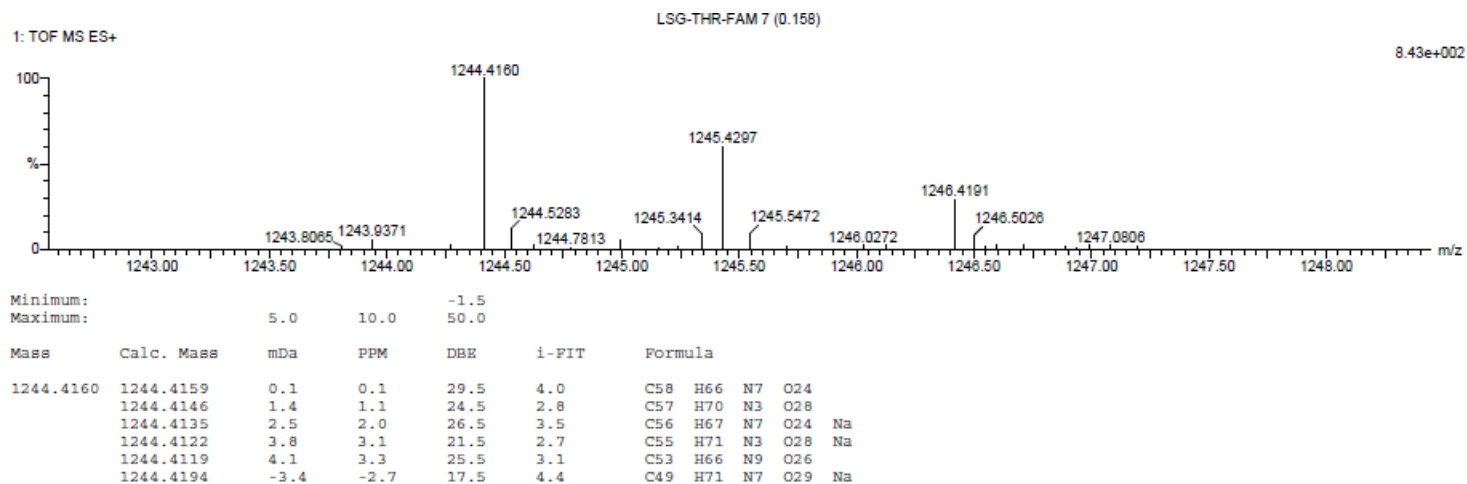
GLICOPEPTIDO-HA-LISINA

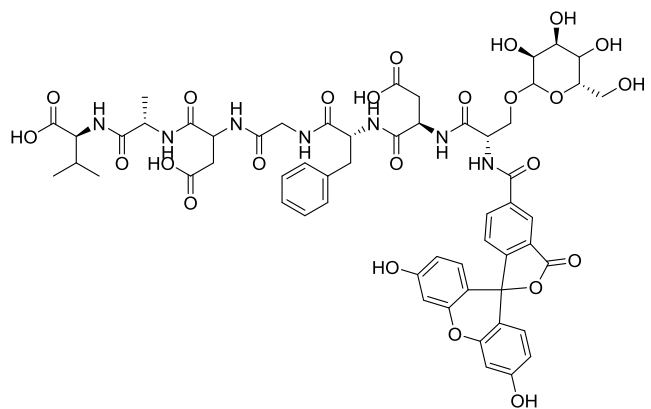


COMPUESTOS MARCADOS CON 5,6-CARBOXIFLUORESCÉINA

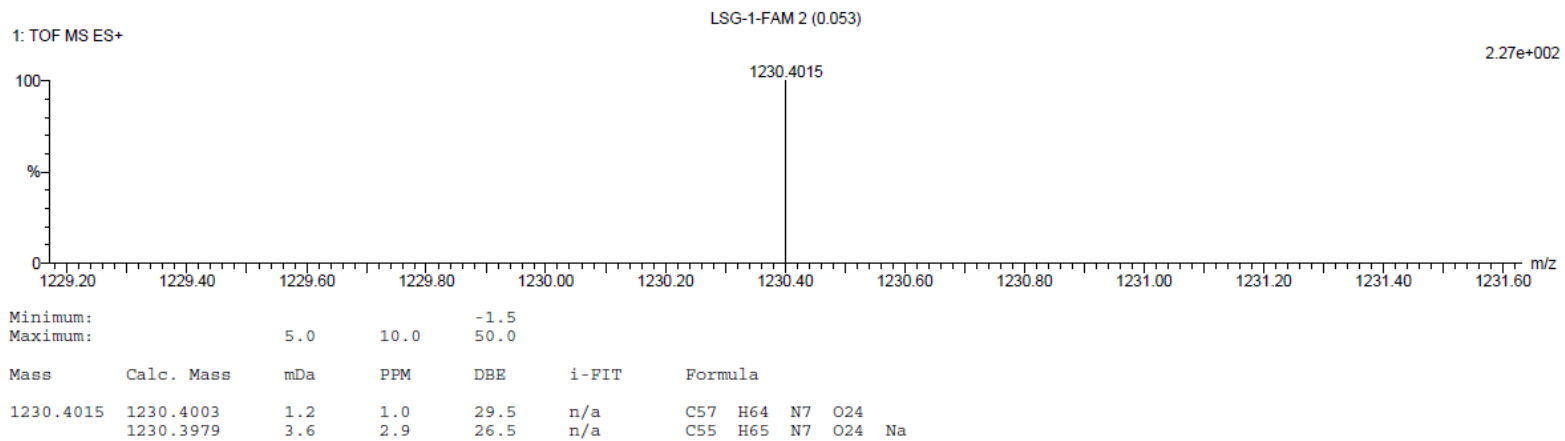


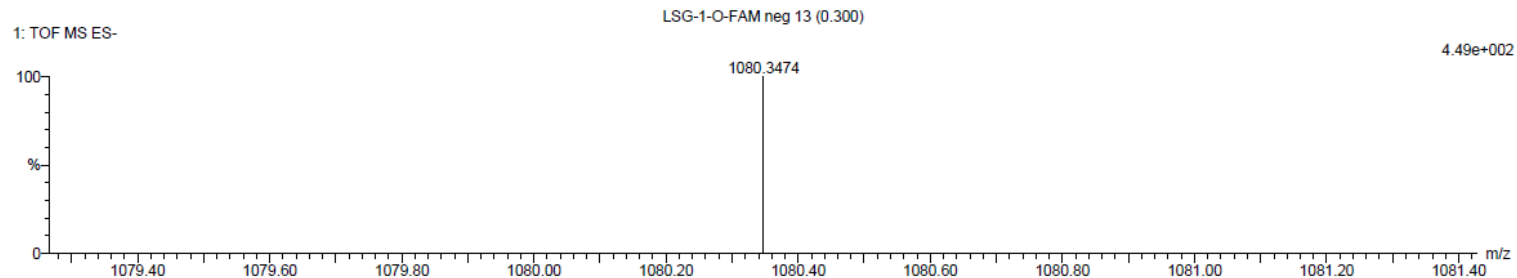
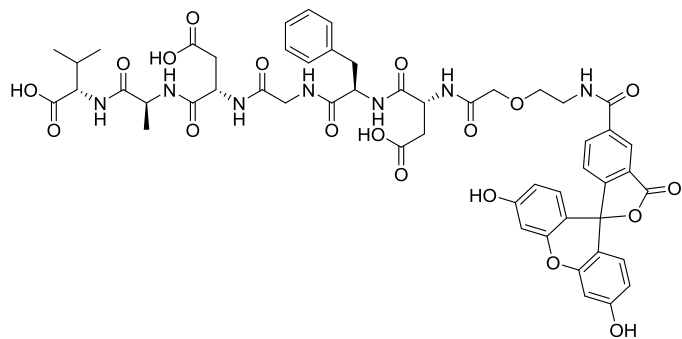
LVIII





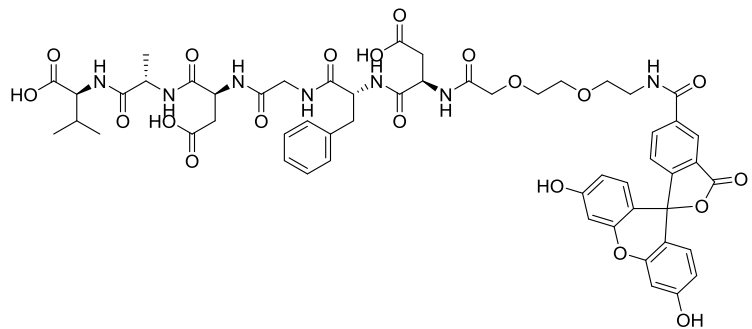
XIX7





Minimum:						
Maximum:	5.0	10.0		-1.5		50.0
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1080.3474	1080.3474	0.0	0.0	29.5	n/a	C52 H54 N7 O19
	1080.3450	2.4	2.2	26.5	n/a	C50 H55 N7 O19 Na

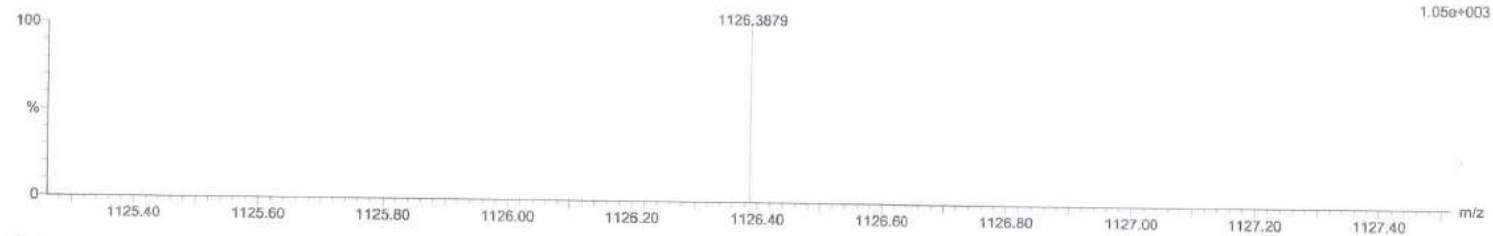
XXT



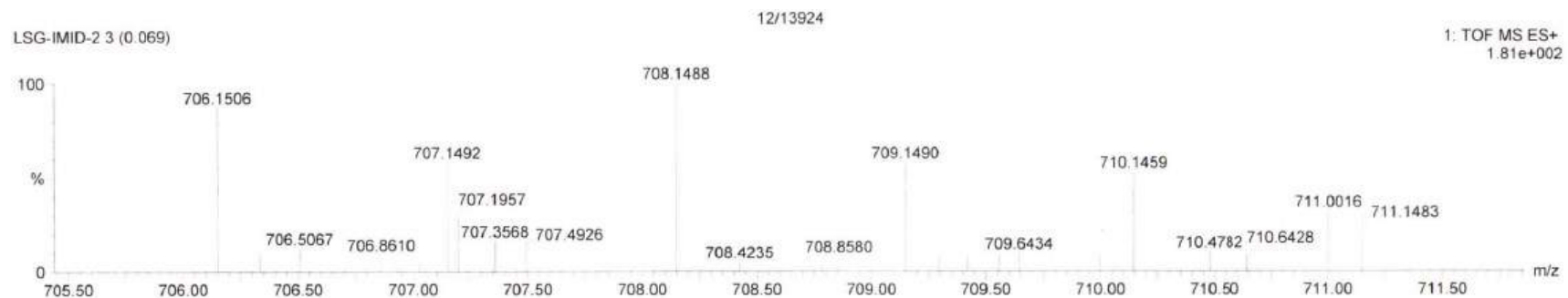
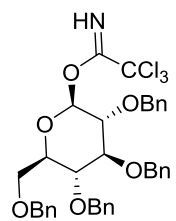
C: 0-54 H: 0-1000 N: 0-10 O: 0-20 Na: 0-1

1: TOF MS ES+

LSG-1-O-FAM 3 (0.074)



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1126.3879	1126.3893	-1.4	-1.2	28.5	n/a	C54 H60 N7 O20
	1126.3869	1.0	0.9	25.5	n/a	C52 H61 N7 O20 Na



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
706.1506	706.1506	0.0	0.0	17.5	6.2	C36 H36 N O6 Na C13
	706.1517	-1.1	-1.6	13.5	8.2	C33 H37 N O7 F Na C13

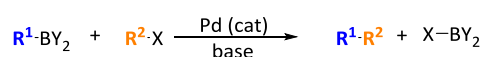
CAPITULO II

LIGANDOS DE PALADIO BASADOS EN SECUENCIAS PEPTÍDICAS, PARA LLEVAR A CABO LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAURA.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Paladio son consideradas unas de las más importantes en síntesis orgánica⁴⁸. Permiten la conexión de dos fragmentos mediante la formación de un enlace carbono-carbono o carbono-heteroátomo. La reacción de acoplamiento cruzado C-C de Suzuki-Miyaura⁴⁹ una de las más utilizadas dada la importancia que nos aporta a la hora de sintetizar este tipo de compuestos mediante la unión de fragmentos, así como sus relevantes características, como su elevada eficiencia catalítica, su alta tolerancia hacia el uso de numerosos y diferentes tipos de grupos funcionales y la facilidad de usar directamente reactivos disponibles comercialmente. La importancia y la enorme contribución de este tipo de reacciones al desarrollo de la Química han quedado patentes con la concesión del premio Nobel de Química de 2010 a los Profesores Suzuki, Negishi y Heck que estudiaron y desarrollaron las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio



R¹=alquilo, alqueno, alilo, alquino, arilo

R²= alqueno, arilo, alquilo

X= Cl, Br, I, OTf, OPO(OR)₂

Esquema 1. Reacción de acoplamiento cruzado catalizada por Paladio.

La reacción es llevada a cabo en presencia de Pd como catalizador junto con fosfinas⁵⁰ o carbenos N-heterocíclicos (NHC) como ligandos⁵¹, pero el uso de estos compuestos como tales presenta numerosas desventajas, como por ejemplo su sensibilidad al oxígeno que requiere de atmósfera inerte para

⁴⁸ (a) Davies AG. Book review: Metal-catalyzed cross-coupling reactions. F. Diederich and P. J. Stang (eds) Wiley-VCH, Weinheim, 1998. *Applied Organometallic Chemistry*. 1998; 12(12):878-878. (b) Mulzer J. Palladium reagents in organic synthesis. von R. F. Heck. Academic Press, New York 1985. ISBN 0-12-336140-0. *Angewandte Chemie*. 1987; 99(4):377-378. (c) Collman JP. *Principles and applications of organotransition metal chemistry*. Mill Valley, Calif.: University Science Books; 1987

⁴⁹ Miyaura N, Suzuki A. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chem Rev*. 1995;95(7):2457-2483

⁵⁰ (a) Billingsley KL, Anderson KW, Buchwald SL. A highly active catalyst for Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of heteroaryl compounds. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006; 45(21):3484-3488. (b) Fleckenstein CA, Plenio H. 9-fluorenylphosphines for the Pd-catalyzed Sonogashira, Suzuki, and Buchwald-Hartwig coupling reactions in organic solvents and water. *Chem Eur J*. 2007; 13(9):2701-2716. (c) Fleckenstein CA, Plenio H. Efficient Suzuki-Miyaura coupling of (hetero) aryl chlorides with thiophene- and furanboronic acids in aqueous n-butanol. *J Org Chem*. 2008; 73(8):3236-3244. (d) Hoshi T, Nakazawa T, Saitoh I, et al. Biphenylene-substituted ruthenocenylphosphine for Suzuki-Miyaura coupling of aryl chlorides. *Org Lett*. 2008; 10(10):2063-2066. (e) Martin R, Buchwald SL. Palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands. *Acc Chem Res*. 2008;41(11):1461-1473

⁵¹ (a) Altenhoff G, Goddard R, Lehmann CW, Glorius F. An N-heterocyclic carbene ligand with flexible steric bulk allows Suzuki cross-coupling of sterically hindered aryl chlorides at room temperature. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003; 42(31):3690-3693. (b) Diebolt O, Braunstein P, Nolan SP, Cazin CSJ. Room-temperature activation of aryl chlorides in Suzuki-Miyaura coupling using a [Pd(μ-cl)(NHC)]₂ complex (NHC = N-heterocyclic carbene). *Chem Commun*. (27):3190 (c) Kantchev E, O'Brien C, Organ M. Palladium complexes of N-heterocyclic carbenes as catalysts for cross-coupling reactions. A synthetic chemist's perspective. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007;46(16):2768-2813. (d) Marion N, Navarro O, Mei J, Stevens ED, Scott NM, Nolan SP. Modified (NHC) Pd(allyl)Cl (NHC = N-heterocyclic carbene) complexes for room-temperature Suzuki-Miyaura and Buchwald-Hartwig reactions. *J Am Chem Soc*. 2006;128(12):4101-4111. (e) Micksch M, Strassner T. Palladium(II) complexes with chelating biscarbene ligands in the catalytic Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2012;2012(35):5872-5880 (f) O'Brien CJ, Kantchev EAB, Valente C, et al. Easily prepared air- and moisture-stable Pd-NHC (NHC=N-heterocyclic carbene) complexes: A reliable, user-friendly, highly active palladium precatalyst for the Suzuki-Miyaura reaction. *Chemistry - A European Journal*. 2006;12(18):4743-4748. (g) Organ M, Çalimsiz S, Sayah M, Hoi K, Lough A. Pd-PEPPSI-IPent: An active, sterically demanding cross-coupling catalyst and its application in the synthesis of tetra-ortho-substituted biaryls. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(13):2383-2387

llevarlas a cabo, su complicada síntesis, elevados tiempos de producción o incluso se requieren reactivos de partida de elevado coste.

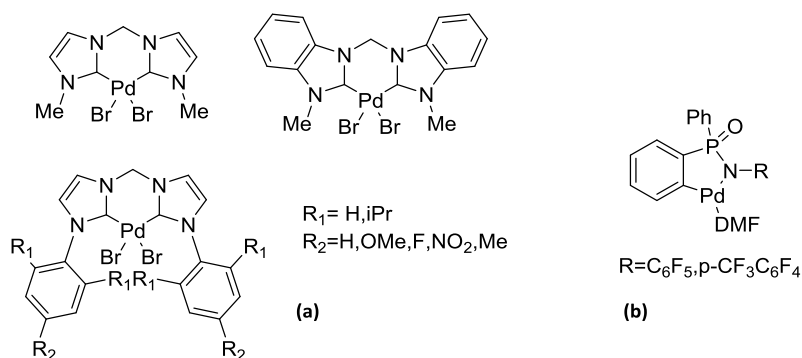


Figura 1. Ejemplos de ligandos a) Complejos bis(NHC)-palladium bromide⁵², b) Paladacyclos derivados de arilfosfinamidas⁵³.

Metales como el paladio han jugado un papel relevante en el desarrollo de este tipo de reacciones, demostrando su aplicabilidad en la industria química y farmacéutica

Ha sido estudiado el uso de aminoácidos como ligandos externos para controlar la selectividad y la reactividad de los catalizadores. Incluso han sido diseñados aminoácidos monoprottegidos como ligandos quirales, dando lugar a la formación de complejos Pd II/amino ácido, capaces de catalizar la activación asimétrica de los enlaces proquirales C(sp²)-H y C(sp³)-H para formar productos quirales con nuevos enlaces C-C⁵⁴. Igualmente en literatura han sido estudiados otro tipo de aminoácidos como ligandos⁵⁵, descrito péptidos funcionalizados formando complejos con metales de transición en numerosas reacciones de adición asimétrica y reacciones de sustitución⁵⁶, e incluso algunos ejemplos de catalizadores peptídicos desarrollados para la reacción de Strecker⁵⁷.

⁵² Micksch M, Strassner T. Palladium(II) complexes with chelating biscarbene ligands in the catalytic suzuki-miyaura cross-coupling reaction. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2012;2012(35):5872-5880

⁵³ Wu G, Han F, Zhao Y. Palladacycles derived from arylphosphinamides for mild Suzuki-Miyaura cross-couplings. *RSC Advances*. 2015;5(85):69776-69781

⁵⁴ Shi B, Mangel N, Zhang Y, Yu J. PdII-Catalyzed enantioselective activation of C(sp²)-H and C(sp³)-H bonds using monoprotected amino acids as chiral ligands. *Angewandte Chemie International Edition*. 2008;47(26):4882-4886, Chan KS, Wasa M, Chu L, Laforteza BN, Miura M, Yu J. Ligand-enabled cross-coupling of C(sp³)-H bonds with arylboron reagents via Pd(II)/Pd(0) catalysis. *Nature chemistry*. 2014;6(2):146-150

⁵⁵ (a) Pettit LD, Bezer M. Complex formation between Palladium(II) and amino acids, peptides and related ligands. *Coord Chem Rev*. 1985; 61(0):97-114, (b) Rosenberg B, Vancamp L. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969;222:385-386

⁵⁶ (a) Christensen CA, Meldal M. Efficient Solid-Phase synthesis of Peptide-Based phosphine ligands: Towards combinatorial libraries of selective transition metal catalysts. *Chemistry-A European Journal*. 2005; 11(14):4121-4131 (b) Josephsohn NS, Kuntz KW, Snapper ML, Hoveyda AH. Mechanism of enantioselective Ti-catalyzed Strecker reaction: Peptide-based metal complexes as bifunctional catalysts. *J Am Chem Soc*. 2001;123(47):11594-11599. (c) Porter JR, Wirschun WG, Kuntz KW, Snapper ML, Hoveyda AH. Ti-catalyzed regio- and enantioselective synthesis of unsaturated α -amino nitriles, amides, and acids. catalyst identification through screening of parallel libraries. *J Am Chem Soc*. 2000;122(11):2657-2658. (d) Degrado SJ, Mizutani H, Hoveyda AH. Modular peptide-based phosphine ligands in asymmetric catalysis: Efficient and enantioselective Cu-catalyzed conjugate additions to five-, six-, and seven-membered cyclic enones. *J Am Chem Soc*. 2001;123(4):755-756. (e) Porter JR, Traverse JF, Hoveyda AH, Snapper ML. Enantioselective synthesis of arylamines through Zr-catalyzed addition of dialkylzinc to imines. Reaction development by screening of parallel libraries. *J Am Chem Soc*. 2001;123(5):984-985. (f) Luchaco-Cullis CA, Mizutani H, Murphy KE, Hoveyda AH. Modular pyridinyl peptide ligands in asymmetric catalysis: Enantioselective synthesis of quaternary carbon atoms through copper-catalyzed allylic substitutions. *Angewandte Chemie International Edition*. 2001;40(8):1456-1460 (g) Traverse JF, Hoveyda AH, Snapper ML. Enantioselective synthesis of propargylamines through Zr-catalyzed addition of mixed alkynylzinc reagents to arylimines. *Org Lett*. 2003;5(18):3273-3275. (h) Akullian LC, Snapper ML, Hoveyda AH. Three-component enantioselective synthesis of propargylamines through Zr-catalyzed additions of alkyl zinc reagents

La base del diseño de péptidos pequeños y el hecho de sacar partido del uso de las propiedades que los caracterizan como ligandos, está inspirado en los sistemas biológicos. Estos péptidos poseen centros quirales y enlaces de hidrogeno que permiten su estabilización, considerándose una gran elección para construir un sistema ordenado⁵⁸. Es por tanto razonable pensar que se puede jugar con esta diversidad de compuestos a lo largo de este trabajo de investigación como una potente herramienta de síntesis. Avances recientes en literatura han mostrado un gran número de exitosas estrategias para mejorar distintas características hasta ahora conocidas de la reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura, como la velocidad de reacción, la mejora del rendimiento del producto final y el incremento de la estabilidad frente al aire de los ligandos a base de nitrógeno.

Compuestos 1,2,3-triazólicos han surgido como ligandos prometedores en catálisis⁵⁹, para mejorar el diseño de nuevos ligandos o sustratos privilegiados, para así acelerar la reacción catalizada por el metal de transición como para mejorar el diseño de algunos catalizadores dirigiéndolos hacia una mejor estabilización. Progresos recientes en el área de las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Paladio, han mostrado un incremento en el uso de quelatos basados en nitrógeno como ligandos⁶⁰. En este trabajo se muestra la síntesis de ligandos peptídicos que contienen en su estructura

to alkynylimines. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003;42(35):4244-4247 (i) Mampreian DM, Hoveyda AH. Efficient Cu-catalyzed asymmetric conjugate additions of alkylzinc reagents to aromatic and aliphatic acyclic nitroalkenes. *Org Lett*. 2004;6(16):2829-2832

⁵⁷ (a) Sigman MS, Jacobsen EN. Schiff base catalysts for the asymmetric strecker reaction identified and optimized from parallel synthetic libraries. *J Am Chem Soc*. 1998;120(19):4901-4902 (b) Sigman MS, Vachal P, Jacobsen EN. A general catalyst for the asymmetric strecker reaction. *Angewandte Chemie International Edition*. 2000;39(7):1279-1281. (c) Vachal P, Jacobsen EN. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the strecker reaction. *J Am Chem Soc*. 2002;124(34):10012-10014

⁵⁸ (a) Moriuchi T, Morimoto K, Sakamoto Y, Hirao T. Molecular structures of Dipeptide-Palladium (II) conjugated complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2012;2012(29):4669-4674. (b) Schneider JP, Kelly JW. Templates that induce alpha-helical, beta-sheet, and loop conformations. *Chem Rev*. 1995;95(6):2169-2187. (c) Nowick JS, Smith EM, Pairish M. Artificial beta-sheets. *Chem Soc Rev*. 1996;25(6):401-415. (d) Moriuchi T, Hirao T. Highly ordered structures of peptides by using molecular scaffolds. *Chem Soc Rev*. 2004;33(5):294-301. (e) Van Staveren DR, Metzler-Nolte N. Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem Rev*. 2004;104(12):5931-5986. (f) Kirin SI, Kraatz H, Metzler-Nolte N. Systematizing structural motifs and nomenclature in 1, n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chem Soc Rev*. 2006;35(4):348-354. (g) Moriuchi T, Hirao T. Ferrocene-peptide bioconjugates. In: *Bioorganometallic chemistry*. Springer; 2006:143-175. (h) Metzler-Nolte N, Salmain M. The bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules*. 2008:499-639. (i) Lataifeh A, Beheshti S, Kraatz H. Designer peptides: Attempt to control peptide structure by exploiting ferrocene as a scaffold. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2009;2009(22):3205-3218. (j) Ohmura SD, Moriuchi T, Hirao T. Chirality organization of aniline oligomers through hydrogen bonds of amino acid moieties. *J Org Chem*. 2010;75(22):7909-7912. (k) Moriuchi T, Ohmura SD, Morita K, Hirao T. Hydrogen-Bonding-Induced chirality organization and stabilization of redox species of Polyaniline-Unit molecules by introduction of amino acid pendant groups. *Chemistry—An Asian Journal*. 2011;6(12):3206-3213

⁵⁹ (a) Duan H, Sengupta S, Petersen JL, Akhmedov NG, Shi X. Triazole-Au (I) complexes: A new class of catalysts with improved thermal stability and reactivity for intermolecular alkyne hydroamination. *J Am Chem Soc*. 2009;131(34):12100-12102. (b) Hao E, Wang Z, Jiao L, Wang S. "Click" tetradentate ligands. *Dalton Transactions*. 2010;39(10):2660-2666. (c) Hua C, Vuong KQ, Bhadbhade M, Messerle BA. New rhodium (I) and iridium (I) complexes containing mixed Pyrazolyl-1, 2, 3-triazolyl ligands as catalysts for hydroamination. *Organometallics*. 2012;31(5):1790-1800 (d) Özçubukçu S, Ozkal E, Jimeno C, Pericas MA. A highly active catalyst for Huisgen 1, 3-dipolar cycloadditions based on the tris (triazolyl) methanol-cu (I) structure. *Org Lett*. 2009;11(20):4680-4683. (e) Ozkal E, Ozçubukçu S, Jimeno C, Pericas MA. Covalently immobilized tris(triazolyl)methanol-cu(I) complexes: Highly active and recyclable catalysts for CuAAC reactions. *Catal Sci Technol*. (1):195. (f) Sangtrirutnugul P, Maisopa P, Chaicharoenwimolkul L, Sunsiri A, Somsook E, Reutrakul V. Tripodal Click-ligands for copper-catalyzed ATRP. *J Appl Polym Sci*. 2013;127(4):2757-2763

⁶⁰ (a) Kostas ID, Coutsolelos AG, Charalambidis G, Skondra A. The first use of porphyrins as catalysts in cross-coupling reactions: A water-soluble palladium complex with a porphyrin ligand as an efficient catalyst precursor for the Suzuki-Miyaura reaction in aqueous media under aerobic conditions. *Tetrahedron Lett*. 2007;48(38):6688-6691. (b) Amadio E, Bertoldini M, Scrivanti A, et al. Synthesis, crystal structure, solution behavior and catalytic activity of a palladium(II)-allyl complex containing a 2-pyridyl-1,2,3-triazole bidentate ligand. *Inorg Chim Acta*. 2011;370(1):388-393. (c) Amadio E, Scrivanti A, Chessa G, et al. Synthesis, characterization and low temperature self assembling of (eta3-allyl)palladium complexes with 2-pyridyl-1,2,3-triazole bidentate ligands. study of the catalytic activity in Suzuki-Miyaura reaction. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2012;716(0):193-200. (d) Liu P, Yan M, He R. Bis(imino)pyridine palladium(II) complexes as efficient catalysts for the Suzuki-Miyaura reaction in water. *Applied Organometallic Chemistry*. 2010;24(2):131-134. (d) Montoya V, Pons J, Branchadell V, et al. Highly efficient pyridylpyrazole

este fragmento de ácido 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico ya que se trata de ligandos fuertemente dadores de nitrógeno con numerosos modos de coordinación ⁶¹.

Los 1,2,3-triazoles se conocen desde finales del siglo 19, cuando Werner y Striasny describieron el 2-fenilbenzotriazol-1-óxido ⁶². La capacidad de unión al anillo triazólico se postuló en 1937 ⁶³, y en 1976 cuando se cristalizó el primer compuesto de coordinación ⁶⁴. Esos amido-triazoles que poseen propiedades σ -donantes debidas al nitrógeno desprotonado del triazol, son bien conocidos por formar complejos estables con metales de transición ⁶⁵.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos desarrollado una nueva variedad de ligandos basados en sistemas peptídicos, que contienen una unidad triazólica unida a su estructura. Se ha conseguido reemplazar los ligandos basados en fosfinas por nuestros compuestos, con el fin de ofrecer una mejora sobre estas, como la estabilidad frente al oxígeno, el incremento del rendimiento de reacción y disminución de la cantidad de catalizador. Esta aporta un inmenso beneficio, no solamente de coste, sino tanto para la eficacia de la reacción como en la gestión de los desechos producidos por este tipo de síntesis catalizadas por metales de transición.

El ácido 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico, se ha sintetizado mediante Click Chemistry en microondas, como se mencionó durante la introducción. Y la cadena peptídica se sintetizó mediante SPPS. Este tipo de química fácil de desarrollar y manejar, permite la introducción de modificaciones estructurales para disfrutar de mayor versatilidad al construir este tipo de ligandos o introducir una síntesis de ligandos nuevos (o librerías peptídicas), a la vez que pueden ser sintetizados a modo de building blocks, ya que admiten ser combinados con un amplio rango de materiales, en nuestro caso, las

ligands for the heck reaction. A combined experimental and computational study. *Organometallics*. 2008;27(6):1084-1091. (e) Perez JA, Pons J, Solans X, Font-Bardia M, Ros J. Synthesis and characterisation of palladium(II) and platinum(II) compounds containing pyrazole-derived ligands: Crystal structure of [PdCl₂(HL1)] (HL1 = 3-phenyl-5-(2-pyridyl)pyrazole). *Inorg Chim Acta*. 2005;358(3):617-622. (f) Lee D, Jin M. An extremely active and general catalyst for suzuki coupling reaction of unreactive aryl chlorides. *Org Lett*. 2010;13(2):252-255

⁶¹ (a) Keij FS, de Graaff RA, Haasnoot JG, Reedijk J. Synthesis and co-ordination chemistry of a novel dinucleating chelating triazole ligand. the crystal structure of bis- μ -[4-amino-3, 5-bis (pyridin-2-yl)-1, 2, 4-triazole-N', μ -N 1, μ -N 2, N '']-bis [aquachloro-nickel (II)] dichloride tetrahydrate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 1984(10):2093-2097. (b) Graves BJ, Hodgson DJ. Metal ion interactions with 8-azapurines. synthesis and structure of dichlorobis (8-azaadenine) mercury (II) and tetraaquabis (8-azahypoxanthinato) mercury (II). *Inorg Chem*. 1981;20(7):2223-2229. (c) Aromí G, Barrios LA, Roubeau O, Gamez P. Triazoles and tetrazoles: Prime ligands to generate remarkable coordination materials. *Coord Chem Rev*. 2011;255(5-6):485-546

⁶² Werner A, Stiasny E. Ueber nitroderivate des azo-, azoxy- und hydrazo-benzols. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1899;32(3):3256-3282

⁶³ Wilson RF, Wilson LE. Preparation of palladium (II) chloride-1, 2, 3-benzotriazole coördination Compounds1. *J Am Chem Soc*. 1955;77(23):6204-6205

⁶⁴ Meunier-Piret J, Piret P, Putzeys J-, Van Meerssche M. Structure cristalline du complexe de l'hexakis-(benzotriazolyl)-hexakis(allylamine)-trisnickel(II) avec la triphénylphosphine oxyde. *Acta Crystallographica Section B*. 1976;32(3):714-717

⁶⁵ (a) Dai Q, Gao W, Liu D, Kapes LM, Zhang X. Triazole-based monophosphine ligands for palladium-catalyzed cross-coupling reactions of aryl chlorides. *J Org Chem*. 2006;71(10):3928-3934. (b) Littke AF, Fu GC. A convenient and general method for Pd-catalyzed Suzuki cross-couplings of aryl chlorides and arylboronic acids. *Angewandte Chemie International Edition*. 1998;37(24):3387-3388. (c) Littke AF, Dai C, Fu GC. Versatile catalysts for the Suzuki cross-coupling of arylboronic acids with aryl and vinyl halides and triflates under mild conditions. *J Am Chem Soc*. 2000;122(17):4020-4028. (d) Netherton MR, Dai C, Neuschütz K, Fu GC. Room-temperature alkyl-alkyl Suzuki cross-coupling of alkyl bromides that possess β hydrogens. *J Am Chem Soc*. 2001;123(41):10099-10100. (e) Kirchhoff JH, Dai C, Fu GC. A method for Palladium-Catalyzed Cross-Couplings of simple alkyl chlorides: Suzuki reactions catalyzed by [Pd₂ (dba)₃]/PCy₃. *Angewandte Chemie*. 2002;114(11):2025-2027. (f) Kirchhoff JH, Netherton MR, Hills ID, Fu GC. Boronic acids: New coupling partners in room-temperature Suzuki reactions of alkyl bromides. crystallographic characterization of an oxidative-addition adduct generated under remarkably mild conditions. *J Am Chem Soc*. 2002;124(46):13662-13663. (g) Zhou J, Fu GC. Suzuki cross-couplings of unactivated secondary alkyl bromides and iodides. *J Am Chem Soc*. 2004;126(5):1340-1341

unidades de 1,2,3-triazol. Por tanto, el uso de péptidos como building blocks y este tipo de síntesis química, hacen de esta metodología una herramienta apropiada para llevar a cabo el desarrollo de librerías de nuevos ligandos, siendo posible a través de la funcionalización de las cadenas peptídicas y la fracción de triazol. Estas modificaciones estructurales pueden regular la alta quimio, regio y estereoselectividad de este tipo de ligandos.

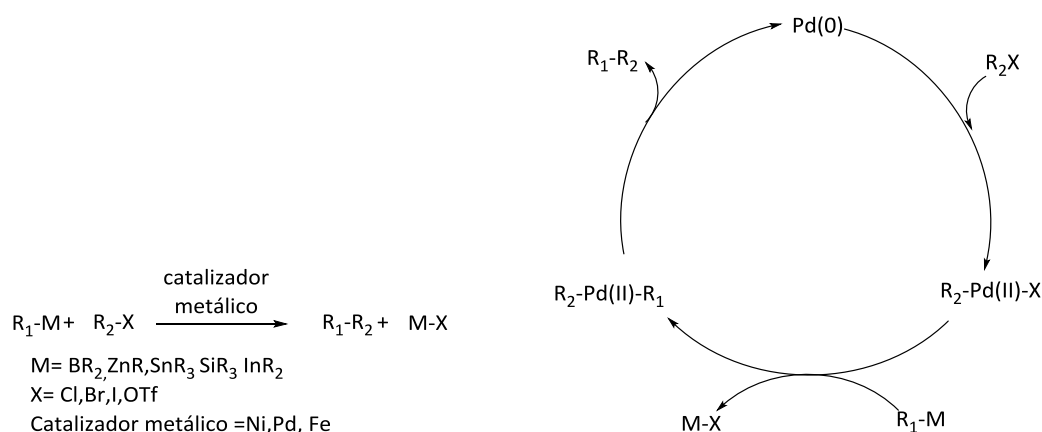
Se ha dirigido elevada atención hacia las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, ya que debido a estas y a su naturaleza, nos permiten mejorar las interacciones con los entornos biológicos, como la solubilidad, estabilidad, permeabilidad y toxicidad.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES.

2.1 REACCIONES DE ACOPLAMIENTO CRUZADO

La reacción de acoplamiento cruzado se puede definir como una reacción entre un nucleófilo orgánico (generalmente un compuesto organometálico) y un halogenuro o pseudohalogenuro orgánico catalizada por complejos de metales de transición⁶⁶. Esta metodología sintética constituye una herramienta muy útil en síntesis orgánica debido a su elevada versatilidad y ha recibido mucha atención en los últimos años.



Esquema 2. Esquema general de reacción y ciclo catalítico general, para las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Pd.

2.2 CATÁLISIS

La catálisis es el proceso por el cual se aumenta la cinética de una reacción química, debido a la participación de un compuesto llamado catalizador. Este, no es consumido durante el proceso catalítico pero si es susceptible de sufrir modificaciones durante el mismo. La presencia del catalizador reduce la energía de activación incrementando la velocidad de la reacción. Al reducir la energía de activación una mayor fracción de las colisiones moleculares tendrán la energía necesaria para alcanzar el estado de transición y superar la barrera cinética incluso nos permite disminuir la temperatura de reacción.

Los complejos de metales de transición se utilizan ampliamente en este tipo de catálisis ya que poseen capas electrónicas parcialmente vacías y permiten variabilidad en los números de oxidación, así como versatilidad en la coordinación de ligandos.

El uso de Pd como catalizador supuso un gran avance en síntesis orgánica. Debido a que productos cuya síntesis era extremadamente difícil, o imposible han sido recientemente sintetizados empleando especies de Paladio como tal. A su vez, la utilización de este, frente a otros metales de

⁶⁶ Negishi E, Liu F. Palladium-or Nickel-Catalyzed Cross-Coupling with organometals containing zinc, magnesium, aluminum, and zirconium. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*. 1998:1-47

transición presenta varias ventajas como menor coste, menor toxicidad frente otros metales, y menos sensibilidad al oxígeno o la humedad que otros metales⁶⁷.

En base a todo esto, podemos distinguir dos tipos de catálisis, homogénea o heterogénea.⁶⁸ Este trabajo se ha llevado a cabo basándonos en el tipo de catálisis homogénea, que se define como la catálisis en la que los reactivos y el catalizador a reaccionar se encuentran en la misma fase formando un sistema homogéneo. Mientras que por definición en una catálisis heterogénea el catalizador se encuentra en una fase diferente a los reactivos.

De entre las ventajas e inconvenientes a destacar de este tipo de catálisis frente a la heterogénea podemos destacar que la reacción transcurre mediante condiciones de reacción suaves, los catalizadores actúan con una alta selectividad y actividad, y nos proporcionan una elevada difusión en el medio para favorecer la efectividad de la reacción. El mayor inconveniente es la complicada recuperación de este tipo de catalizadores⁶⁹.

2.3 REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAUURA

La reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura, se descubrió en 1979 y hoy día es uno de los métodos más utilizados para la formación de enlaces C-C. Los reactivos que intervienen en este tipo de reacciones son haluros aromáticos o vinílicos con un ácido o éster borónico en condiciones básicas y en presencia de una cantidad catalítica de una especie de Pd (0). Todo ello en un disolvente orgánico o una mezcla de disolvente orgánico y agua. En nuestro caso, la especie de Pd (0) es generada *in situ* desde la adición de diacetato de Paladio (Pd (OAc)₂).

Esta metodología es efectiva para la construcción tanto de dienos conjugados como de biarilos sustituidos, que son compuestos de elevada importancia en química orgánica⁷⁰ debido a su presencia en muchos productos naturales⁷¹. Este trabajo se ha centrado en la síntesis de biarilos (acoplamientos Csp²-Csp²), y es posible que en un futuro cercano se pueda extrapolar esta metodología hacia otro tipo de reacciones.

El mecanismo de reacción transcurre mediante uno de los primeros ciclos catalíticos propuestos **Esquema 2**, aunque se ha aceptado posteriormente un proceso alternativo que es la cuaternización del átomo de boro con la base formando un anión hidroxiboronato [R'B(OH)₃] – (Ar=R')

⁶⁷ (a) Zapf A, Beller M. Fine chemical synthesis with homogeneous palladium catalysts: Examples, status and trends. *Topics in Catalysis*. 2002;19(1):101-109. (b) Blaser H, Indolese A, Schnyder A, Steiner H, Studer M. Supported palladium catalysts for fine chemicals synthesis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2001;173(1):3-18. (c) Tucker CE, de Vries JG. Homogeneous catalysis for the production of fine chemicals. Palladium-and nickel-catalysed aromatic carbon-carbon bond formation. *Topics in Catalysis*. 2002;19(1):111-118. (d) De Vries JG. The Heck reaction in the production of fine chemicals. *Canadian Journal of Chemistry*. 2001;79(5-6):1086-1092

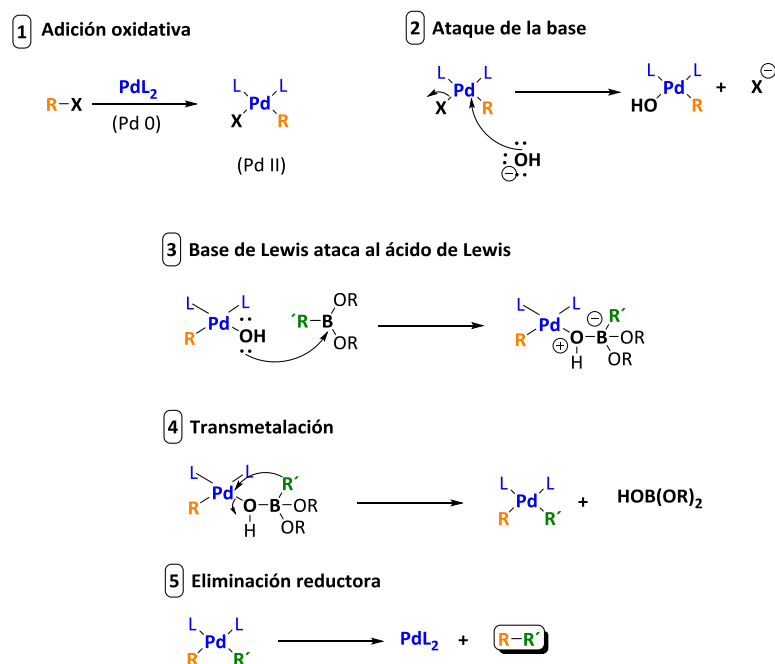
⁶⁸ (a) Kurosawa H, Yamamoto A. *Fundamentals of molecular catalysis*. Vol 3. Elsevier; 2003. (b) Bing Z, Hermans S, Somorjai G. Nanotechnology in catalysis. *Ottawa: Springer*. 2007:3

⁶⁹ Crabtree RH, Fajarnés EP. *Química organometálica de los metales de transición*. Universitat Jaume I; 1997

⁷⁰ Hassan J, Sevignon M, Gozzi C, Schulz E, Lemaire M. Aryl-aryl bond formation one century after the discovery of the Ullmann reaction. *Chem Rev*. 2002;102(5):1359-1470

⁷¹ (a) Bringmann G, Menche D. Stereoselective total synthesis of axially chiral natural products via biaryl lactones. *Acc Chem Res*. 2001;34(8):615-624. (b) Lloyd-Williams P, Giralt E. Atropisomerism, biphenyls and the Suzuki coupling: Peptide antibiotics. *Chem Soc Rev*. (3):145

, en el que se aumenta la nucleofilia del grupo orgánico para su transferencia al producto de adición oxidativa $R'-Pd(II)-X$ ⁷² (Esquema 3).



Esquema 3. Mecanismo desglosado del ciclo catalítico propuesto para la reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura.

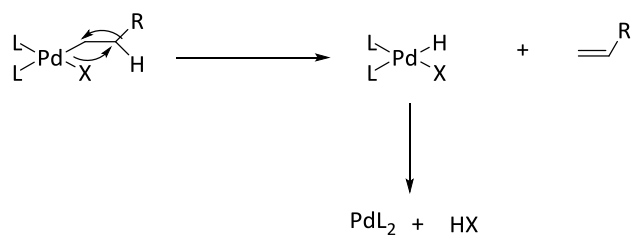
La especie catalítica activa es un complejo de Paladio (0), que puede proceder de un complejo Pd (0) o ser reducido a partir de un complejo de Pd (II) por un agente reductor o el propio reactivo organometálico.

El primer paso es la adición oxidativa del paladio al halogenuro o pseudohalogenuro orgánico R-X, para formar la especie de órgano-paladio (II). La adición oxidativa se lleva a cabo con la retención de la estereoquímica en haluros vinílicos mientras que se produce inversión en haluros de arilo y haluros de bencilo. La adición oxidativa generalmente tiene lugar desde la forma *cis* del complejo de Pd, por tanto un complejo *trans* reaccionaría inmediatamente después de darse isomerización a su correspondiente complejo *cis*.

Los haluros de alquilo que contienen hidrógenos en β , son raramente utilizados en reacciones de acoplamiento cruzado debido a que durante el paso de adición oxidativa puede darse la reacción de β -eliminación de la especie de organopaladio ($R_2-Pd(II)-X$) y formarse un derivado alquenílico del electrófilo, que hace que la reacción vaya muy despacio o no tenga lugar, debido a su competencia con la reacción de acoplamiento cruzado⁷³.

⁷² (a) Moreno-Mañas M, Pérez M, Pleixats R. Palladium-catalyzed suzuki-type self-coupling of arylboronic acids. A mechanistic study. *J Org Chem.* 1996;61(7):2346-2351. (b) Reactions MC. ; De Meijere, A., Diederich, F., Eds. 2004

⁷³ (a) Tsuji J. *Palladium reagents and catalysts: New perspectives for the 21st century.* John Wiley & Sons; 2006 (b) Negishi E, Gagneur S. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling involving alkylmetals or alkyl electrophiles: Palladium-Catalyzed Cross-Coupling involving saturated alkylmetals. *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis.* 2002:597-618. (c) Miyaura N, Suzuki A. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chem Rev.* 1995;95(7):2457-2483



Esquema 4. β -eliminación del hidruro

La adición oxidativa de haluros hacia el complejo de Pd (0) para formar el haluro de organopaladio, es a menudo la etapa determinante en el ciclo catalítico (**Esquema 3**). Se ha representado por pasos para clarificar el mecanismo pero se trata de un ciclo catalítico. En el segundo paso la reacción con la base produce el intermedio, y a su vez, actúa activando el complejo de paladio, favoreciendo la formación de la especie $\text{RPd}(\text{OR})\text{L}_2$ (base=OR) a partir de RPdXL_2 y facilitando de esta forma la transmetalación con organoboranos.

Durante la etapa de transmetalación se describe el intercambio de ligandos entre dos centros metálicos. Esta ocurre en presencia de una base, de manera que activa el complejo de paladio, favoreciendo la formación de la especie $\text{ArPd}(\text{OR})\text{L}_2$ (base=OR) a partir de ArPdXL_2 , facilitando de esta forma la transmetalación con organoboranos. Esta etapa no ocurre fácilmente entre el haluro de organopaladio y el organoborano, debido a la baja nucleofilia del grupo orgánico en el átomo de boro. Sin embargo esta puede verse favorecida por la cuaternización del boro, como fue comentado anteriormente, para obtener el correspondiente complejo. Así la cuaternización de trialkil boranos acelera efectivamente la transmetalación dirigiéndose a la formación de haluro de paladio.

La última etapa del ciclo es la eliminación reductora, en la que se reestablece el Pd (0) de partida, como catalizador, cerrándose así el ciclo catalítico.

Aunque el mecanismo de adición oxidativa y eliminación reductora son razonablemente bien entendidos y fundamentales en las reacciones de acoplamiento cruzado llevadas a cabo por organometales, es menos conocida la etapa de transmetalación debido a que el mecanismo es altamente dependiente del organometal o de las condiciones de reacción usadas para el acoplamiento.

Es importante destacar varias cuestiones, como por ejemplo, la etapa de adición oxidante, se puede ver afectada por el impedimento estérico en el entorno del complejo de Pd así como por factores electrónicos mientras que la transmetalación es en muchos casos el paso determinante de la velocidad de reacción. Por último y en resumen, la eliminación reductora se ve favorecida por la disposición *cis* de los grupos orgánicos, así como por el empleo de ligandos bidentados (estos favorecen esta geometría

cis, y por tanto esta etapa de eliminación reductora) en la especie catalítica ya que favorecen la formación del enlace carbono-carbono, regenerando así la especie catalíticamente activa⁷⁴.

Y en segundo lugar, destacar la importancia de la presencia y tipo de base en estas reacciones. Las reacciones de acoplamiento cruzado de compuestos organoboranos con haluros orgánicos o triflatos, reaccionan selectivamente en presencia de una base cargada negativamente, como carbonato potásico o carbonato sódico, fosfatos, hidróxidos y alcóxidos, usados en una solución acuosa o como una suspensión en dioxano o DMF. Se comentó anteriormente que se encuentra involucrada en la esfera de coordinación del paladio y la formación de Ar-Pd-L2-OR o de Ar-PdL2-X, y acelera la etapa de transmetalación^{26c}.

2.4 JUSTIFICACIÓN DEL USO DE TRIAZOLES COMO SISTEMAS DE COORDINACIÓN

Los triazoles son heterociclos aromáticos de cinco miembros que contienen 3 átomos de nitrógeno en su estructura. Estos se preparan mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar, entre un alquino y una azida. Esta reacción de ciclación es conocida como la cicloadición de Huisgen, ya que fue descubierta por este en los años 60. El anillo de 1,2,3-triazol puede unirse al ión metálico mediante 5 modos de coordinación diferentes (**figura 2**)⁷⁵.

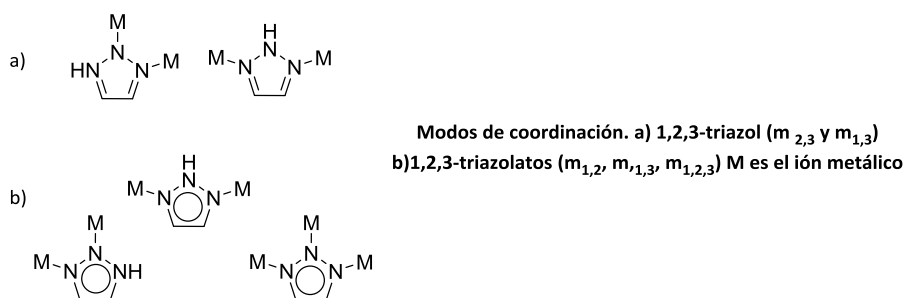


Figura 2. Tipos de coordinación del anillo 1,2,3-triazol

Este heteroareno puede actuar como ligando dinuclear mediante los modos de unión 2,3- y 1,3- (apartado a, figura 2). Y el anillo desprotonado puede actuar como un ligando dinuclear o trinuclear (1,2- 1,3- 1,2,3-)(apartado b, figura 2). Esta variedad en los puntos de coordinación nos proporciona una elevada versatilidad en la preparación de materiales de coordinación, por sus propiedades σ -donantes debidas al nitrógeno desprotonado del anillo de triazol.

⁷⁴ (a) Echavarren AM, Cardenas DJ, de Meijere A, Diederich F. *Metal-catalyzed cross-coupling reactions*. Wiley, Weinheim; 2004. (b) Amatore C, Jutand A. Structural and mechanistic aspects of palladium-catalyzed cross-coupling. In: *Handbook of organopalladium chemistry for organic synthesis*. John Wiley & Sons, Inc.; 2002; 2003:943-972. 10.1002/0471212466.(c) Espinet P, Echavarren AM. The mechanisms of the stille reaction. *Angewandte Chemie International Edition*. 2004;43(36):4704-4734

⁷⁵ Aromí G, Barrios LA, Roubeau O, Gamez P. Triazoles and tetrazoles: Prime ligands to generate remarkable coordination materials. *Coord Chem Rev*. 2011;255(5-6):485-546.

A su vez, cabe nombrar, que a finales de 2009, numerosos estudios describían la estructura cristalina y de rayos X de 1,2,3-triazoles que contenían polímeros de coordinación⁷⁶.

El N-heterociclo, 1,2,3-triazol, tiene gran potencial en química de coordinación como ligando dador de N, debido a su síntesis sencilla y tolerancia de numerosos grupos funcionales durante la reacción de acoplamiento mediante 1,3-cicloaddición. Los ligandos que contienen dadores de N con hibridación sp^2 han sido ampliamente usados en síntesis de complejos metálicos, donde la fuerza del enlace Metal-Nitrógeno, depende tanto del grado de σ -covalencia en el enlace como de algunos efectos de enlace π , particularmente en el caso de ligandos con nitrógenos dadores aromáticos⁷⁷.

2.5 IMPORTANCIA Y APLICACION DE LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAURA

Las reacciones de acoplamiento cruzado se han convertido en una herramienta muy valiosa en síntesis orgánica debido a su elevada versatilidad y quimioselectividad que permiten realizar nuevas aproximaciones a problemas sintéticos.

Dada la enorme versatilidad alcanzada, estos acoplamientos se han utilizado para la obtención de una gran variedad de compuestos orgánicos, especialmente productos naturales⁷⁸.

Las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio son destacadas por poder llevar a cabo reacciones como desarrollo de medicamentos a pequeña escala como gran escala.

La importancia que esta reacción tiene en síntesis ha hecho que la búsqueda de condiciones de reacción más respetuosas con el medioambiente (Green Chemistry) haya sido uno de los objetivos de muchos grupos de investigación centrados en este tipo de química. Cabe destacar el uso del agua en este tipo de reacciones no solo por estos motivos medioambientales, o por motivos económicos, sino por la habilidad de crear enlaces de hidrógeno que establecen una reactividad inusual en los procesos catalizados por metales de transición que pocas veces se han podido observar utilizando otros tipos de disolventes orgánicos.

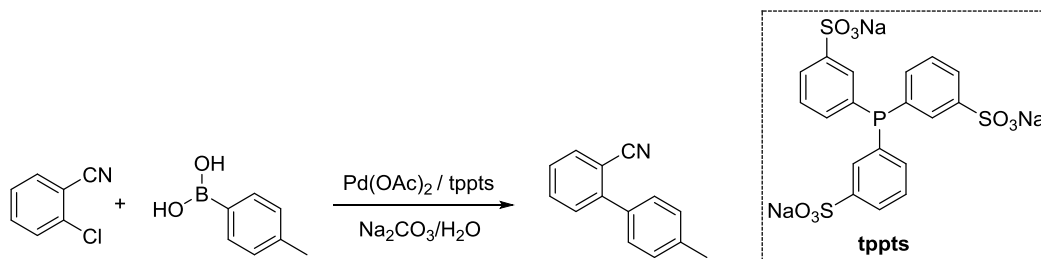
Uno de los campos en los que más se ha aplicado esta metodología es la síntesis de biarilos, en concreto la síntesis de antiinflamatorios no esteroideos que contienen esta estructura en su composición. Debido a la presencia de estos biarilos simétricos en infinidad de productos que exhiben propiedades interesantes es la razón que ha motivado el desarrollo de rutas sintéticas alternativas

⁷⁶ Allen FH. The cambridge structural database: A quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*. 2002;58(3):380-388.

⁷⁷ Hua C, Vuong KQ, Bhadbhade M, Messerle BA. New rhodium (I) and iridium (I) complexes containing mixed Pyrazolyl-1, 2, 3-triazolyl ligands as catalysts for hydroamination. *Organometallics*. 2012;31(5):1790-1800.

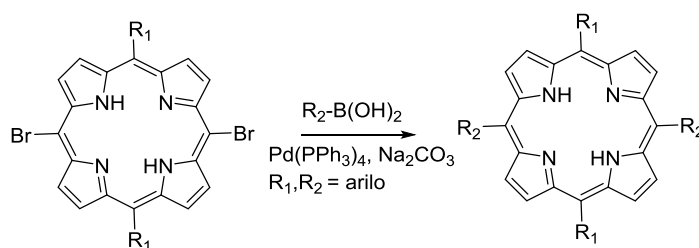
⁷⁸ Tsuji J. *Palladium reagents and catalysts*. Wiley & sons; 1995.

Uno de los ejemplos es la preparación del biarilo precursor para el fármaco Sartan[®], desarrollado a nivel industrial por las compañías Clarian y Zeneca, un tipo de fármaco utilizado para la regulación de la presión sanguínea. Para el que Clariant utiliza tppts como ligando, mientras Zeneca usa alquilfosfinas impedidas estéricamente⁷⁹.



Esquema 5. Síntesis biarilo precursor Sartan[®]

Otro ejemplo de aplicación de este es el uso de la reacción de Suzuki-Miyaura para la generación de porfirinas. Debido a que las porfirinas y metaloporfirinas son interesantes moléculas diana, debido a sus innumerables aplicaciones⁸⁰.



Esquema 6. Síntesis de porfirinas mediante Suzuki-Miyaura

También es usada para la síntesis de derivados de tiofeno, que actúan como building blocks para numerosos productos naturales y no naturales ya que poseen propiedades y características para su aplicación en la industria farmacéutica y ciencias de los materiales. Más específicamente los politiofenos, poseen interesantes propiedades eléctricas y ópticas no lineales⁸¹.

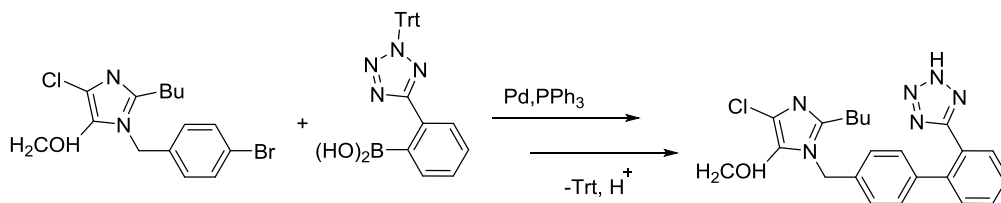
Por tanto la aplicación de esta reacción en la síntesis de productos naturales, no naturales y otros compuestos bioactivos la hace de especial interés tanto en la industria farmacéutica, como en numerosos campos.

⁷⁹ Van Leeuwen PW. *Homogeneous catalysis: Understanding the art*. Springer Science & Business Media; 2006

⁸⁰ (a) Vaz B, Alvarez R, Nieto M, Paniello AI, de Lera AR. Suzuki cross-coupling of meso-dibromoporphyrins for the synthesis of functionalized A 2 B 2 porphyrins. *Tetrahedron Lett.* 2001;42(42):7409-7412. (b) Muzzi CM, Medforth CJ, Voss L, et al. Novel dodecaarylporphyrins: Synthesis and dynamic properties. *Tetrahedron Lett.* 1999;40(34):6159-6162. (c) Tse MK, Zhou Z, Mak TC, Chan KS. Regioselective bromination and subsequent suzuki cross-coupling of highly electron deficient 5, 10, 15, 20-tetrakis (trifluoromethyl) porphyrin. *Tetrahedron.* 2000;56(39):7779-7783. (d) Yu L, Lindsey JS. Investigation of two rational routes for preparing p-phenylene-linked porphyrin trimers. *Tetrahedron.* 2001;57(45):9285-9298. (e) Aratani N, Osuka A. Synthesis of m-eso-meso linked hybrid porphyrin arrays by pd-catalyzed cross-coupling reaction. *Org Lett.* 2001;3(26):4213-4216. (f) Dai W, Mak WL. First synthesis of dioxadithiaporphycene with a benzene ring fused onto the double bond. *Tetrahedron Lett.* 2000;41(52):10277-10280

⁸¹ Charas A, Morgado J, Martinho J, Alcácer L, Cacialli F. Tuning the optoelectronic properties of polyfluorenes by copolymerisation with thiophene moieties. *Synth Met.* 2002;127(1):251-254

Otro compuesto destacado de aplicación de la reacción de acoplamiento cruzado Suzuki-Miyaura a nivel industrial es el acoplamiento usado para la preparación del fármaco Losartan® (Esquema 7).



Esquema 7. Preparación Losartan®.

Para la síntesis de este compuesto tiene lugar la reacción de Suzuki-Miyaura, que se lleva a cabo en THF en presencia de agua y K_2CO_3 como base. El grupo tritilo (Trt) se usa como grupo protector y es eliminado después de la reacción de acoplamiento en medio ácido⁸².

Por tanto basándonos en estos estudios encontrados en literatura, llevando a cabo modificaciones estructurales en las secuencias peptídicas, jugando con la flexibilidad, nucleofilia y puntos de coordinación, se pueden llevar a cabo síntesis de librerías peptídicas dirigidas a distintos fines.

Esta metodología usada para el desarrollo de síntesis de ligandos, tanto el diseño de estas secuencias se muestra como una herramienta fascinante en el campo de la biotecnología, con numerosas posibilidades y aplicaciones, tanto en la materia de síntesis orgánica como en la biología, debido a que en un futuro se puede intentar sintetizar secuencias peptídicas con capacidad de penetrabilidad en las células, con habilidades de formar complejos con metales de transición para poder manipular reacciones dentro de las células, a modo de cómo lo realizan los sistemas biológicos.

Así, este trabajo trata del diseño y síntesis de ligandos, formados a partir de la combinación de un fragmento triazólico con unas secuencias de aminoácidos naturales, para crear complejos de paladio capaces de catalizar *in situ* reacciones de acoplamiento cruzado.

Esta primera parte del trabajo ha estado relacionada con la búsqueda del ligando oportuno, que nos diera una efectividad superior a la trifenilfosfina, actualmente comercializada para estos fines, ensayando estos con distintos sustratos. Por tanto, otra aplicación futura, y el siguiente paso después de este estudio, sería el de identificar y caracterizar los sitios de unión y la estructura del complejo formado *in situ*.

⁸² Smith GB, Dezeny GC, Hughes DL, King AO, Verhoeven TR. Mechanistic studies of the Suzuki cross-coupling reaction. *J Org Chem.* 1994;59(26):8151-8156

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

En base a que la aplicación de los metales de transición en Síntesis Orgánica ha experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas, por las facilidades que nos aportan promoviendo métodos sencillos para la formación de enlaces C-C y C-heteroátomo, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos: Sintetizar una librería de ligandos basados en secuencias peptídicas que nos permitan encontrar un ligando que mejore el rendimiento de la reacción de acoplamiento en comparación con el ligando comercial trifenilfosfina.

- . Poner a punto las condiciones de reacción de referencia de Suzuki-Miyaura de acoplamiento cruzado que nos permitiesen evaluar eficazmente e identificar el mejor ligando.

- . Encontrar las mejores condiciones de reacción (disolventes, ratio entre ligando y metal, temperatura, proporciones de reactivos) para la formación de compuestos biarílicos a través de la reacción de acoplamiento cruzado Suzuki-Miyaura.

- . Evaluar la reacción de arilación Suzuki-Miyaura llevada a cabo por los complejos de Paladio formados *in situ* a través de ligandos de naturaleza peptídica, llevando a cabo diferentes reacciones de acoplamiento cruzado para evaluar la influencia de estos en el rendimiento de la reacción.

- . Mejorar el potencial catalítico del ligando trifenilfosfina, mediante el uso de nuestros compuestos, que debido a su naturaleza peptídica aportan numerosos beneficios ya comentados durante la introducción de este capítulo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es conocida la amplia gama de actividades en las que están involucradas las proteínas en los sistemas biológicos, incluyendo sus capacidades como catalizadores en numerosas reacciones metabólicas. Estas aptitudes los hacen ser una familia de compuestos con un elevado potencial de aplicación en los campos de la biotecnología, biología molecular y síntesis orgánica.

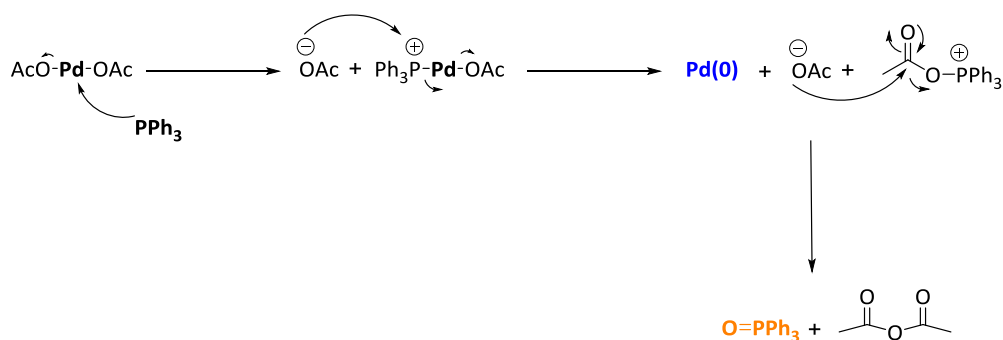
Así, debido a sus exclusivas propiedades químicas, físicas y biológicas y el abanico de aplicaciones que estos ofrecen, los péptidos están emergiendo como una nueva clase de biocatalizadores generados *in situ*

4.1 SÍNTESIS DE LIGANDOS PEPTÍDICOS

Con el objeto de mejorar las capacidades aportadas por los derivados de fosfina como ligandos en la reacción de Suzuki-Miyaura, fueron sintetizados diferentes secuencias peptídicas, que contienen 1,2,3-triazol, para encontrar el ligando más efectivo que al formar el complejo *in situ* con el Pd fuese capaz de permitir mejorar el rendimiento y las características ofrecidas por los ligandos de fosfina comerciales. En nuestro caso para poder encontrar el mejor aporte, el trabajo se basó en la comparación de nuestros ligandos peptidotriazoles sintetizados, con la generalmente usada trifenílfosfina disponible comercialmente (PPh₃).

Debido a las numerosas y beneficiosas características que nos ofrecen nuestros ligandos al estar basados en secuencias de aminoácidos con los beneficios que ello conlleva. y teniendo en cuenta a su vez que la metodología sintética por la que se llevan a cabo (SPPS) permite una síntesis química sencilla, de bajo coste, fácil de manejar y capaz de disminuir los tiempos de producción. A su vez este tipo de ligandos permite reducir la cantidad de metal y de ligando necesarios para llevar a cabo este tipo de reacciones. El descubrimiento y desarrollo de estas pequeñas moléculas con capacidad catalítica y de formar complejos de Paladio *in situ*, hacen de estos ligandos una herramienta prometedora en el campo de la catálisis.

Así, conociendo todo lo anteriormente nombrado, nuestro estudio comenzó tomando una reacción modelo para llevar a cabo la puesta a punto de las condiciones de reacción y a su vez, para poder evaluar la efectividad de los ligandos, basada en un sistema catalítico muy usado, el par Pd(OAc)₂/PPh₃ (ligando monodentado). Reacción de la 4-bromoanilina con 3-nitrobencenoborónico, K₂CO₃ y el sistema catalítico Pd(OAc)₂/PPh₃, para obtener el producto 3'-nitro-[1,1'-bifenil]-4-amino. El mecanismo por el que se forma la especie reactiva Pd(0) a partir de la intervención de la PPh₃, viene identificado en el siguiente esquema, donde la reducción de Pd(II) genera la especie reactiva Pd(0) acompañada de la formación de óxido de trifenílfosfina y anhídrido acético (Esquema 1).



Esquema 1. Formación del óxido de trifenilfosfina.

Estos ligandos basados en péptidos permiten ser evaluados en un elevado rango de disolventes, incluido el agua, que hace destacable su aplicación y desarrollo en la química verde.

En primer lugar se diseñó y realizó un estudio con diferentes secuencias peptídicas sintetizadas con 1,2,3-triazol en su estructura (peptidotriazoles). Dos de ellas fueron elegidas por ofrecer los mejores resultados (compuesto 1 y 2, esquema 1) estabilizando el paladio metálico en su estructura formando el complejo *in situ*. El diseño de estas estructuras se llevó a cabo teniendo en cuenta que los grupos amida ofrecen dos átomos de unión muy potentes, como el oxígeno y el nitrógeno, que permiten formar complejos con los protones e iones metálicos⁸³.

La lisina y la fenilalanina juegan un papel destacable en la secuencia peptídica. La lisina ofrece un brazo flexible y un grupo reactivo amina primaria en la cadena lateral preparado para la unión al metal. El brazo flexible de la cadena lateral nos ofrece un amplio rango de posibilidades frente a posibles conformaciones estables, en el estado libre y en el estado coordinado. Mientras el anillo fenólico de la fenilalanina ejerce un efecto en la estabilidad y la coordinación junto con las propiedades del anillo triazólico. Probablemente estos efectos ocurren a través de interacciones intermoleculares ejercidas por superposiciones π aromáticas o interacciones electrostáticas, que probablemente causan la estabilización de las geometrías de coordinación. Esto hace que se consideren importantes en la actividad catalítica.

La síntesis de peptidotriazoles como ligandos, se llevó a cabo mediante la metodología (SPPS), utilizando como soporte sólido la resina cloruro de 2-clorotritilo, que nos permite mantener el grupo carboxílico terminal, ejercer una síntesis ortogonal y unas condiciones de hidrólisis del soporte sólido ácidas suaves.

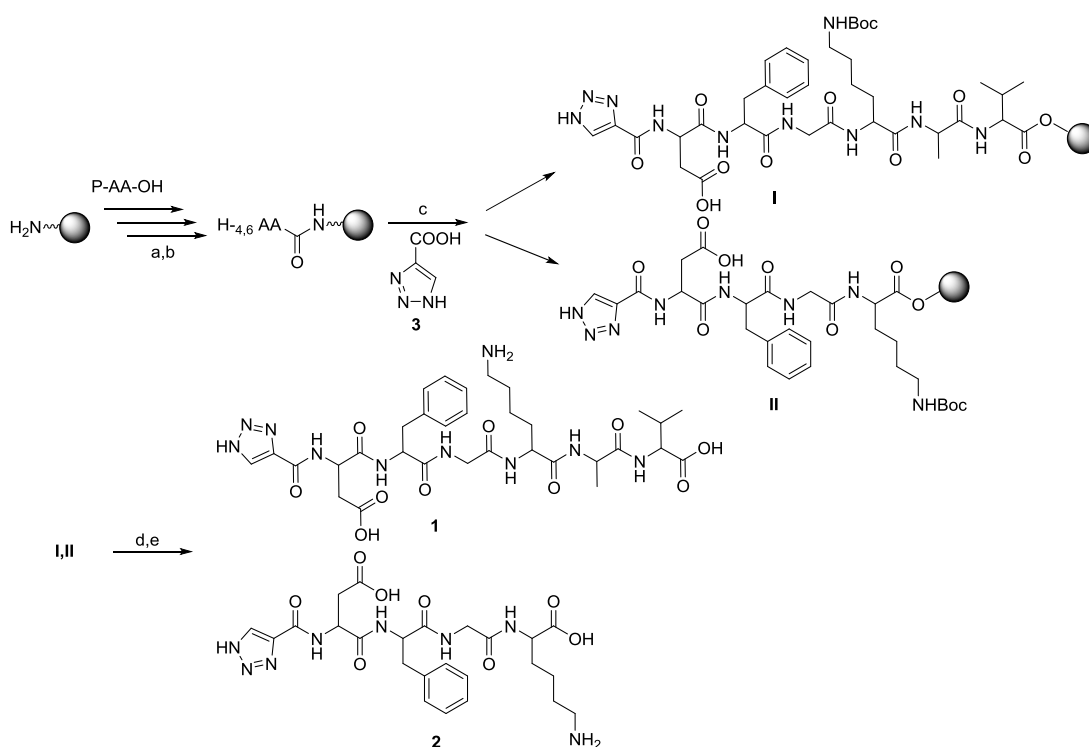
La secuencia de la cadena peptídica fue sintetizada usando derivados de aminoácidos Fmoc-amino protegidos disponibles comercialmente, siguiendo el procedimiento estándar de síntesis Fmoc-

⁸³ Sigel H, Martin RB. Coordinating properties of the amide bond. stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem Rev.* 1982;82(4):385-426

SPPS⁸⁴. Esta metodología de síntesis SPPS la hacen adecuada para la generación de estos peptidotriazoles como ligandos en reacciones de catálisis.

El proceso de síntesis comienza en la amina primaria libre del soporte sólido 2-clorotritilo, precargada comercialmente con Fmoc-Valina-OH y Fmoc-Lisina-OH respectivamente, en los ligandos 1 y 2. Los acoplamiento se llevaron a cabo con *N*- α -Fmoc-aminoácidos protegidos con los agentes de acoplamiento etil-2-ciano-2-hidroxiiminoacetato (Oxima) usando como aditivo *N,N'*-Diisopropilcarbodiimida, (DIC y como disolvente *N,N*-Dimetilformamida (DMF) calidad grado síntesis de péptidos, que fue usada en toda la síntesis incluida en este trabajo.

Los grupos protectores Fmoc fueron eliminados mediante β -eliminación inducida por base usando piperidina al 20% (v/v) en DMF, y los consecutivos acoplamiento con los siguientes aminoácidos Fmoc-protectidos sobre el extremo amino terminal libre se llevaron a cabo usando como reactivos de acoplamiento Oxima/DIC en DMF (**Esquema 2**)



Esquema general de SPPS de los ligandos 1 y 2, con resina cloruro de 2-clorotritilo precargada comercialmente con H-Val-OH y H-Lys-OH respectivamente. a) Acoplamiento del aminoácido Fmoc-N-amino protegido (P-AA-OH) con Oxima/Dic en DMF, 2h. b) Piperidina/DMF 2:8. c) 1,2,3-triazol, Oxima/Dic, DMF, 2h. d) Mezcla de hidrólisis TFA/TES/DCM (1:5:94), 1h. e) mezcla de desprotección tBu y Boc TFA/TES/DCM (45:5:50), 2h.

Esquema 2. Procedimiento general de síntesis en fase sólida de los ligandos 1 y 2.

⁸⁴ Chan WC, White PD. *Fmoc solid phase peptide synthesis*. Oxford University Press; 2000

El acoplamiento eliminación del grupo protector Fmoc fue monitorizada mediante el test de Kaiser que se basa en la reacción de ninidrina con las aminas, y es una prueba sensible para la detección de aminas primarias⁸⁵.

La síntesis de los 1,2,3-triazoles previamente se llevaba a cabo en dos pasos a partir del propiolato de etilo con TMSN₃ formando el 1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato de etilo intermedio y posterior hidrolisis para dar el ácido correspondiente. Posteriormente se sintetizó, con buenos rendimientos, usando ácido propiólico y trimetilsililazida (TMSN₃), mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolar en un solo paso haciendo uso del aparato de microondas bajo atmósfera de argón^a.

El acoplamiento de ambos fragmentos se llevó a cabo mediante síntesis convergente en fase sólida de acuerdo con el procedimiento estándar Fmoc-SPPS descrito anteriormente mediante la estrategia Oxima/DIC.

El aislamiento o *cleavage* de los compuestos del soporte sólido, se llevaba a cabo mediante la hidrolisis con 1% v/v de ácido trifluoroacético (TFA) y trietilsilano (TES) en DCM, durante una hora en reactores de vidrio con placa filtrante. Posteriormente la mezcla de reacción se filtra y los ligandos peptídicos precipitan por la adición de éter dietílico refrigerado. Posteriormente se aíslan mediante centrifugación. Se secan y los crudos se analizan por LCMS y purifican por extracción en fase reversa (SPE, solid phase extraction)

4.2 EVALUACIÓN Y ESTUDIO DE LOS DISTINTOS LIGANDOS

Con el fin de comparar y evaluar nuestros ligandos peptidotriazólicos con los ligandos derivados de fosfina, se decidió usar la reacción de acoplamiento cruzado Suzuki-Miyaura, cuyas condiciones de reacción en microondas usando trifenilfosfina como ligando estaban descritas en literatura con un ratio 1:3 (5 moles % de Pd y 15 moles % de ligando respectivamente, con respecto al derivado de haluro de arilo)

Fueron sintetizadas diferentes secuencias de compuestos que se evaluaron con estas condiciones de reacción. Se concluyó que el compuesto 1 era el más eficaz, (**Esquema 1**), y por tanto enfocamos nuestra atención en la optimización de estas condiciones de reacción respecto a la cantidad óptima de ligando y catalizador ya que debido a su efectividad, con respecto a la trifenilfosfina como ligando, para obtener rendimientos elevados e incluso cuantitativos, eran requeridas cantidades más pequeñas de ambos.

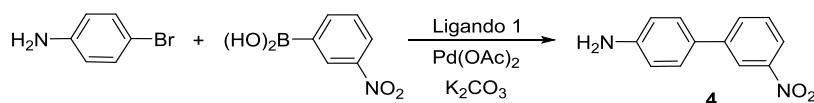
⁸⁵ Kaiser E, Colecott R, Bossinger C, Cook P. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem.* 1970;34(2):595-598

^a Reacción puesta a punto por la investigadora Tania Ivonne Ramírez-Candelero (TIR) durante sus estancias en el grupo de investigación.

4.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN

Así para evaluar la actividad catalítica, y encontrar las condiciones de reacción adecuadas hacia la reacción de acoplamiento cruzado Suzuki-Miyaura, se utilizó en primer lugar como modelo la reacción entre la 4-bromoanilina y el ácido 3-nitrofenilborónico en presencia de la base K_2CO_3 . Donde además se estudió el comportamiento de la reacción en diferentes mezclas de disolventes (THF:H₂O y DMF:H₂O), el ratio entre la cantidad de ligando y Paladio, la temperatura de reacción y los tiempos de reacción.

Tabla 1. Optimización de las condiciones de reacción.



Entrada ^d	Pd(OAc) ₂ (mmol) ^a	Ligando 1 (mmol) ^a	DMF-H ₂ O (ml)	Rendimiento ^b
1	5%	10%	1-0.3	-
2	10%	5%	1-0.3	72 %
3	5%	5%	1-0.3	19 %
4	5%	5%	2-0.5	-
5	5%	2%	1-0.3	-
6	5%	2%	0.5-0.25	57 % ^c
7	5%	2%	0.33-0.17	88 %

Condiciones de reacción: 1eq de haluro de arilo, 1.2 eq de ácido aril borónico, 5 % mmol Pd(OAc)₂ en relación al haluro de arilo, 4 eq de base K₂CO₃, MW 100 °C, 2 h. ^a % mmol de ligando en relación al haluro de arilo. ^b Rendimiento del compuesto puro después de columnar cromatográficamente. ^c Temperatura ambiente. ^d Estudio llevado a cabo por las investigadoras **Alejandra Ramirez-Villalba Y Tania Ivonne Ramirez-Candellero.**

Como se muestra en la tabla, las mejores condiciones de reacción para obtener el producto **4**, 4-amino-3'-nitro-1,1'-bifenilo (entrada 7) fueron 5% moles y 2% moles de Paladio y ligando 1 respectivamente, dando lugar a un 88% de rendimiento de reacción, usando la mezcla de disolventes DMF:H₂O en un ratio 0.33:0.17 (2:1). Por tanto el ratio de disolventes juega un importante papel en la reacción de Suzuki-Miyaura.

La gran ventaja de estos ligandos es la habilidad de disminuir su porcentaje de participación en la reacción y la cantidad de metal necesaria para incrementar el rendimiento en este tipo de reacciones, a la vez que cabe destacar que por su naturaleza peptídica estos ligandos son solubles en agua, con todos los beneficios que ello conlleva. (Aportación a la Green Chemistry)

En literatura podemos encontrar recientemente nuevos ligandos, como por ejemplo las tiosemicarbazonas⁸⁶ y complejos de Paladio que contienen ligandos derivados de bases de Schiff⁸⁷. Pero el hecho de encontrar un método sintético para sintetizar ligandos capaces de ofrecernos un acoplamiento rápido y efectivo, así como la capacidad de admitir numerosos grupos funcionales, es aun importante para el desarrollo de catalizadores efectivos para numerosas aplicaciones en reacciones de acoplamiento.

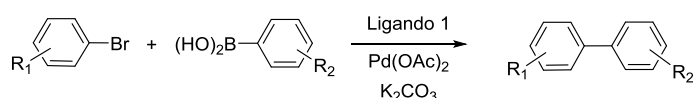
Cabe destacar que el hexapéptido (compuesto 1) es un ligando muy efectivo frente el comercialmente usado trifenilfosfina, con las numerosas ventajas anteriormente nombradas a lo largo de este estudio.

4.2.2 ESTUDIO DE SUSTRATOS, SINTESIS DE BIARILS

Para examinar las generalidades del protocolo catalítico y hasta dónde abarcaba el rango de aplicación, se estudió la reacción anterior con una variedad de haluros de arilo acoplada con distintos ácidos borónicos, bajo las anteriormente optimizadas condiciones de reacción.

Se observó que nuestro ligando toleraba un amplio rango de grupos funcionales ofreciendo elevados rendimientos y que incluso mejoraba los rendimientos que aportaba la comercial trifenilfosfina. Así haluros de arilo con grupos funcionales electrón donantes o electrón atrayentes pudieron ser eficientemente acoplados con ácidos borónicos en 2 horas a 100° de temperatura bajo condiciones de microondas. También cabe destacar que fue efectivo el acoplamiento de ácidos aril borónicos con grupos electrón donantes o electrón atrayentes (**tabla 2**).

Tabla 2. Estudio de distintos sustratos y rendimiento de reacción.



Entrada	R ₁	R ₂	Ligando 1 (% mmol) ^a	Rendimiento ^b
1	4-NH ₂	4-OMe	2 %	68 %
2	4-NH ₂	3-OMe	2 %	97 %
3	4-NH ₂	4-Cl	2 %	73 %
4	4-NH ₂	-H	2 %	98 %
5	4-NH ₂	4-OH	2 %	65 %
6	4-NH ₂	2-NO ₂	2 %	-

⁸⁶ Kostas ID, Heropoulos GA, Kovala-Demertzi D, et al. Microwave-promoted Suzuki–Miyaura cross-coupling of aryl halides with phenylboronic acid under aerobic conditions catalyzed by a new palladium complex with a thiosemicarbazone ligand. *Tetrahedron Lett.* 2006;47(26):4403-4407

⁸⁷ Kostas ID, Steele BR, Terzis A, Amosova SV, Martynov AV, Makhaeva NA. New palladium complexes with s-or Se-Containing Schiff-Base ligands as efficient catalysts for the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling reaction of aryl bromides with phenylboronic acid under aerobic conditions. *European journal of inorganic chemistry.* 2006;2006(13):2642-2646

7	4-NH ₂	3-NO ₂	2 %	99 %
8	4-NH ₂	4-NO ₂	2 %	75 %
9	4-CHO	4-OMe	2 %	50 % (a 50 °C no va)
10	4-CHO	3-OMe	2 %	58 %
11	4-CHO	3-NO ₂	2 %	78 %
12	3-NO ₂	4-OMe	2 %	25 %
13	4-NO ₂	4-OMe	2 %	95%
14	2-Me	4-OMe	2 %	98 %
15	3-Me	4-OMe	2 %	100 %
16	4-Me	4-OMe	2 %	92 %
17	4-Clorotolueno	4-OMe	2 %	6 %
18	4-Cloroanilina	4-OMe	2 %	-

Condiciones de reacción: 0.082 mmol de haluro de arilo (1 eq.), 0.098 mmol de ácido aril borónico (1.2 eq), 5 % mmol Pd(OAc)₂ en relación al haluro de arilo, 0.33 mmol de K₂CO₃ (4 eq.), 330 ml de DMF, 170 ml de H₂O, MW 100 °C, 2 h. ^a % mmol de ligando en relación al haluro de arilo. ^b Rendimiento del compuesto puro después de columnar cromatográficamente. **Condiciones de reacción:** 0.082 mmol de haluro de arilo (1 eq.), 0.098 mmol de ácido aril borónico (1.2 eq), 5 % mmol Pd(OAc)₂ en relación al haluro de arilo, 0.33 mmol de K₂CO₃ (4 eq.), 330 mL de DMF, 170 mL de H₂O, MW 100 °C, 2 h. ^a % mmol de ligando en relación al haluro de arilo. ^b Rendimiento del compuesto puero después de columnar cromatográficamente.

La formación del biarilo correspondiente en la entrada número 15 de la tabla 2 (3-bromotolueno y ácido 4-metoxifenil borónico), ofrece el mejor resultado con un rendimiento cuantitativo.

Fueron observados rendimientos moderados durante el transcurso del acoplamiento de la 4-bromoanilina, que contiene un grupo fuertemente activante orto/para dirigente (entradas 1,3,5,8, tabla 2). El estudio de nuestro ligando con este sustrato y sus derivados nos ofreció muy buenos resultados, siendo los resultados más efectivos observados los acoplamientos del ácido fenilborónico y 3-nitrofenilborónico (entradas 4 y 7 respectivamente) con fuertes grupos desactivantes y prácticamente rendimiento cuantitativo.

Desafortunadamente la reacción con el ácido 2-nitrofenilborónico, no surtió efecto.

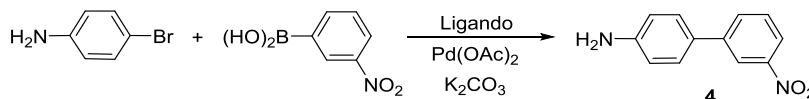
El ligando 1, ofrece menor rendimiento de reacción para 4-bromobenzaldehído (entradas 9 y 10, tabla 2) y con grupos electrón desactivantes como los nitrofenil derivados en las posiciones 2 y 3 (entrada 12 y 13, tabla 2), a su vez, nos aporta resultados muy prometedores con grupos electrón donantes (entradas 14-16, tabla 2).

Estimulados con estos resultados, se estudió la actividad de los cloruros de arilo con grupos moderadamente desactivantes (entradas 17-18). Desafortunadamente los resultados no fueron satisfactorios, consiguiendo un 6% de rendimiento con el ácido 4-metoxifenilborónico.

Se pretendía disminuir el tamaño de este ligando efectivo, para disminuir aún más los tiempos de producción, el coste de los materiales y con el fin de obtener un ligando aún más efectivo, que fuese

capaz a su vez de poder mejorar los resultados anteriormente visibles con derivados de aldehído. Así después de diseñar y sintetizar varias secuencias, destacó el compuesto **2** (esquema 1) cuya secuencia se corresponde con la secuencia peptídica DGFK y una unidad de triazol, T (TDFGK, **tabla 3**).

Tabla 3. Estudio de diferentes ligandos y su ratio respecto al Pd, en THF:H₂O.

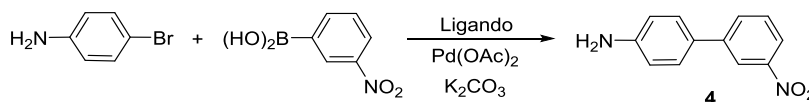


Entrada	Ligando	Pd(OAc) ₂ (mmol) ^a	Ligando (mmol) ^a	DMF-H ₂ O (ml)	THF:H ₂ O (ml)	RENDIMIENTO ^b
1	TGGGK	5%	15%	-	3:1	22%
2	TDFGK	5%	15%	-	3:1	11%
3	TDFGK	5%	5%	-	3:1	70%
4	TDFGK	5%	2.5%	-	3:1	40%
5	TGKGK GK	5%	15%	-	3:1	27%

Condiciones de reacción: 1eq de bromuro de arilo, 1.2eq de ácido aril borónico, 2eq de K₂CO₃, MW 150°C, 3h. ^a %mmoles en relación al haluro de arilo. ^b Rendimiento del compuesto puro después de la columna cromatográfica. T= triazol, G=Glicina, K=lisina, D=aspártico, F=fenilalanina.

Se sintetizó el compuesto **2** (tabla 3, entradas 2,3,4) y se llevó a cabo la reacción con las proporciones propuestas para la trifenilfosfina comercial (entrada 2), obteniendo un rendimiento del 11%. Esto indica que probablemente este compuesto no se coordina con el Pd en esa proporción 1:3y posiblemente la proporción de ligando necesaria para obtener un buen rendimiento de reacción sea menor. Al añadir esa cantidad de ligando se podría estar realizando una captura total del paladio, que no permita que la reacción se produzca de forma óptima. Así se varió el ratio (tabla 3, entradas 3 y 4) obteniendo un rendimiento considerable cuando la proporción entre el ligando 2 y el Pd era 1:1.

Tabla 4. Estudio de diferentes ligandos y su ratio respecto al Pd, en DMF:H₂O. Comparación con la PPh₃ comercial.



Entrada	Ligando	Pd(OAc) ₂ (mmol) ^a	Ligando (mmol) ^a	DMF-H ₂ O (ml)	THF:H ₂ O (ml)	RENDIMIENTO ^b
1	PPh ₃	5%	5%	1:0.3	-	34%

2	PPh ₃	5%	15%	1:0.3	-	55%
3	TGK	5%	5%	1:0.3	-	75%
4	TK	5%	5%	1:0.3	-	65%
5	TK	5%	1%	1:0.3	-	52%
6	TDFGK	5%	5%	2:0.5	-	42%

Condiciones de reacción: 1eq de bromuro de arilo, 1.2eq de ácido aril borónico, 4 eq de K₂CO₃, MW 100°C, 2h. ^a %mmol en relación al haluro de arilo. ^b Rendimiento del compuesto puro después de la columna cromatográficamente. . T= triazol, G=Glicina, K=lisina, D=aspártico, F=fenilalanina.

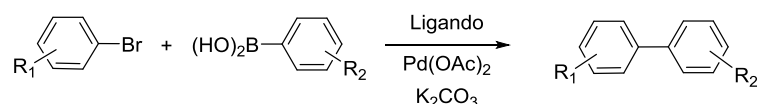
Con el fin de encontrar ligandos que nos permitiesen llevar a cabo reacciones impedidas estéricamente o difíciles de sintetizar (**tabla 4**), y seguir mejorando las condiciones de reacción (disminuir los tiempos de síntesis y de reacción a 2h y 100°C de temperatura) decidimos a su vez aumentar los equivalentes de base, ya que se conoce su influencia en la esfera de coordinación del paladio y la formación del complejo ya que aumenta la nucleofilia del grupo orgánico unido al átomo de boro, acelerando el paso de transmetalación⁸⁸. Nuestro objetivo era conseguir un ligando con un tamaño relativamente pequeño que nos proporcionara unos rendimientos elevados y mejorase como tal todas las aportaciones y beneficios que hasta día de hoy podría ofrecernos un ligando como la PPh₃ comercial.

Durante esta etapa de la investigación, se observa que si se variaba el ratio en una proporción 1:1 entre la PPh₃ comercial y el Pd, en estas nuevas condiciones (tabla 4, entrada 1,) o incluso si no modificábamos este ratio (entrada 2, tabla 4), los rendimientos eran moderados, mientras que con nuestros demás ligandos en esas condiciones, el rendimiento era mayor (entrada 3-6, tabla 4).

Tras observar los resultados obtenidos, decidimos hacer un estudio más exhaustivo de los ligandos 1 y 2, con objeto de evaluar la influencia de los sustituyentes de distintos sustratos en el rendimiento de reacción y la tolerancia de nuestros ligandos frente a cualquier tipo de sustrato.

⁸⁸ Moreno-Mañas M, Pérez M, Pleixats R. Palladium-catalyzed suzuki-type self-coupling of arylboronic acids. A mechanistic study. *J Org Chem.* 1996;61(7):2346-2351, Martin AR, Yang Y. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboronic acids with organic electrophiles. *Acta Chem Scand.* 1993;47:221-221

Tabla 5. Síntesis de distintos biarilos, evaluación del ligando 2, para comparar su eficacia frente el ligando 1



Entrada ^c	R ₁	R ₂	Tetrapeptido (% mmol) ^a	Rendimiento ^b
1	4-NH ₂	3-NO ₂	2	67 %
2	3-NO ₂	3-NO ₂	2	82 %
3	2-Me	3-NO ₂	2	58 %
4	4-CHO	4-OMe	2	56 %
5	4-CHO	3-NO ₂	5	84 %
6	4-CHO	3-NO ₂	4	87 %
7	4-CHO	3-NO ₂	3	96 %
8	4-CHO	3-NO ₂	2.5	79 %
9	4-CHO	3-NO ₂	2	73 %
10	4-CHO	3-NO ₂	1.5	71 %
11	4-CHO	3-NO ₂	1	47 %
12	4-CHO	3-NO ₂	-	48 %
13	4-NH ₂	3-NO ₂	15 % Ph ₃ P	67 y 64 %
14	4-NH ₂	3-NO ₂	2 % Ph ₃ P	38

Condiciones de reacción: 0.082 mmoles de haluro de arilo (1eq.), 0.098 mmoles de ácido borónico (1.2 eq), 5% mmoles de Pd(OAc)₂ en relación al haluro de arilo, 0.3 mmoles de K₂CO₃, 330 ml de DMF, 170 ml de H₂O, Microondas 100°C, 2h. ^a % mmoles de ligando en relación al haluro de arilo. ^b Rendimiento del compuesto puro (HPLC) después de columnar comatográficamente. ^c Estudio de coordinación llevado a cabo por las investigadoras **Alejandra Ramírez-Villalba Y Tania Ivonne Ramírez-Candellero**

Durante el transcurso de la evaluación de estos dos ligandos, se observó que la coordinación de estos dos ligandos con el Paladio no era la misma, por tanto el encontrar las mejores condiciones de reacción del ligando 2 fueron objeto de estudio en el grupo de investigación (**tabla 5**)

Usando el mismo porcentaje de ambos ligandos, el ligando 1 es mucho más efectivo que el ligando 2.

Cabe mencionar que durante el transcurso de la reacción se observó la formación de paladio negro, hecho recogido en literatura, con otros catalizadores usados para la reacción de Suzuki-Miyaura que contenían en su estructura triazol y observaban también la conversión de paladio negro⁸⁹.

⁸⁹ Pettit LD, Bezer M. Complex formation between palladium(II) and amino acids, peptides and related ligands. *Coord Chem Rev.* 1985;61(0):97-114

Cabe destacar que los resultados indican al ligando 1 como la mejor especie que estabiliza al Pd(0). Obteniendo excelentes resultados con un 2%mol de ligando y 5% mol de Paladio en las reacciones entre haluros de arilo con varios grupos electrón atrayente y electrón donantes.

Posteriormente se trabajó para observar la influencia, con haluros de arilo con grupos inactivados desactivados electrónicamente, obteniendo los biarilos correspondientes con excelentes rendimientos. También cabe destacar la importancia del uso de sustituyentes en posiciones orto en los anillos aromáticos y grupos voluminosos, los cuales fueron bien tolerados, y ofrecieron elevados rendimientos (tabla 2 y 5).

La caracterización de los ligandos y los compuestos biarílicos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas de alta y baja resolución, HPLC y HPLC-MS y RMN en cada caso, y se determinó el rendimiento de cada reacción mediante purificación en cromatografía en columna flash.

4.3 INCONVENIENTES ENCONTRADOS DURANTE LA REACCIÓN DE SUZUKI

Uno de los inconvenientes en el transcurso de esta reacción es la reacción de homoacoplamiento, que se produce cuando el acoplamiento cruzado transcurre muy lentamente bien por impedimentos estéricos o por efectos electrónicos, por tanto hay competencia entre el haluro de arilo y el ácido arilborónico. Esta reacción en nuestro caso se contempla como una reacción competitiva no deseada⁹⁰. Este homoacoplamiento o dimerización, depende del tipo de sustrato y de las condiciones de reacción, así como del tipo de base empleada⁹¹. A su vez, distintos estudios descritos en literatura, han comprobado que la presencia de oxígeno acelera este proceso. La reacción del O₂ con el catalizador de Pd(0) forma un peroxocomplejo, el cual reacciona con el arilborónico para generar un aducto, que reaccionará con una segunda molécula de arilborónico, conduciendo así la presencia de O₂ a la síntesis simétrica de biarilos⁹².

Otros problemas típicos encontrados durante las reacciones de acoplamiento cruzado Suzuki-Miyaura, son la saponificación de esteres, racemización de compuestos ópticamente activos o condensación aldólica de derivados carbonílicos.

Aunque los impedimentos estéricos no son el factor determinante en la formación de biarilos sustituidos por este método, se obtienen rendimientos menores o directamente la reacción no tiene lugar, cuando se lleva a cabo el acoplamiento con ácidos arilborónicos sustituidos en orto. Al igual que hemos encontrado un problema de acoplamiento cuando hemos usado como sustratos derivados de cloruros de arilo, estos habrían contribuido a un elevado aporte debido a que son reactivos mucho más

⁹⁰ Segelstein B, Butler T, Chenard B. Equilibration of the oxidative addition product of tetrakis (triphenylphosphine) palladium and electron-rich aryl halides leads to product scrambling in the stille reaction. *J Org Chem.* 1995;60(1):12-13

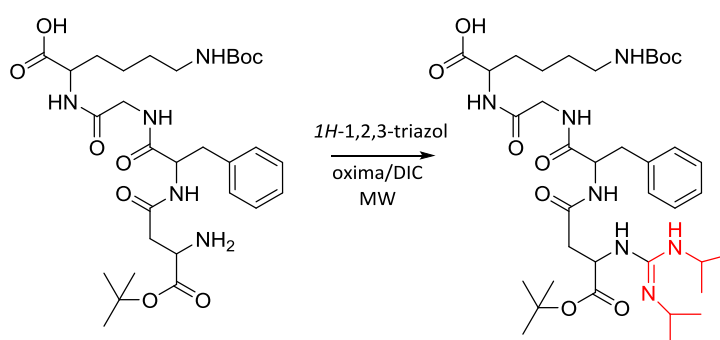
⁹¹ Dörwald FZ. Side reactions in organic synthesis. *A Guide to Successful Synthesis Design.* 2005

⁹² Adamo C, Amatore C, Ciofini I, Jutand A, Lakmini H. Mechanism of the palladium-catalyzed homocoupling of arylboronic acids: Key involvement of a palladium peroxo complex. *J Am Chem Soc.* 2006;128(21):6829-6836, Amatore C, Carre E, Jutand A, M'Barki MA. Rates and mechanism of the formation of zerovalent palladium complexes from mixtures of pd (OAc) 2 and tertiary phosphines and their reactivity in oxidative additions. *Organometallics.* 1995;14(4):1818-1826

baratos que los bromuros de arilo, causan menos desecho y como tales son menos reactivos que los derivados de Br y iodo. Así el aporte de nuestros ligandos a esta reacción hubiese sido destacable. No obstante, no deja de ser un reto durante las aplicaciones futuras de esta investigación.

4.3.1 REACCIONES INDESEADAS

En el transcurso de estas reacciones se han solventado las reacciones de diversificación y competencia nucleofílica del aditivo DIC, mediante la desgasificación óptima de la mezcla de reacción y el llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente, disminuyendo la proporción de este en la mezcla de reacción (**Esquema 3**).



Esquema 3. Reacción secundaria indeseada de formación de guanidino por competencia nucleofílica.

PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. METODOLOGÍA SINTÉTICA Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los espectros de RMN y masas de alta resolución de los compuestos aquí presentados se han llevado a cabo en el centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Los espectros RMN de ^1H se han realizado en espectrómetros Varian Inova Unity de 300MHz y Varian Direct Drive de 400MHz, utilizando el CDCl_3 deuterado en todos los casos. Los desplazamientos químicos δ se expresan en ppm, y las constantes de acoplamiento J se expresan en Hz (ciclos por segundos). El aspecto y la multiplicidad de señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; q, quintuplete; m, multiplete.

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se han realizado en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal, Waters LCT Premier XE mediante ionización por electrospray (ESI-TOF) en modo positivo o en negativo, utilizándose un equipo BRUKER modelo AUTOFLEX. Estos espectros han sido realizados por el Centro de Instrumentación Científica (C.I.C.) de la Universidad de Granada.

Los espectros de masas de baja resolución (LRMS) se realizaron mediante ionización por electrospray (ESI) combinado con una cromatografía líquida de alta resolución (LCMS). Se utilizó el equipo LC_MS Agilent Technologies 1200 (6110 Quadrupole LC/MS) con columnas Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm y Beckman Ultrasphere Octyl C8 4.6 x 250 mm. Estas se llevan a cabo rutinariamente en nuestro laboratorio de investigación del Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica de la Facultad de Farmacia.

Los disolventes anhidros y demás disolventes empleados, como acetato de etilo, éter etílico, DMF y DMF calidad síntesis de péptidos, fueron adquiridos comercialmente con el mejor grado de calidad disponible, usándose sin previa purificación.

Los pasos de síntesis en fase sólida se controlaron de forma rutinaria de forma cualitativa mediante los test de Kaiser, para la detección de aminas primarias y de Cloranilo, para la detección de aminas secundarias, como se trató en las condiciones generales de capítulo I.

La purificación de los ligandos se llevó a cabo mediante cromatografía en fase reversa SPE (de las siglas en inglés, Solid Phase Extraction) con columnas Varian ASPEC Bond Elut C18 o Supelco DSC-C8 usando como eluyente un gradiente de Acetonitrilo-Agua (0→100%). Posteriormente fueron liofilizados en un Liofilizador TELSTAR CRYODOS-50 y la pureza de los productos fue confirmada mediante HPLC acoplado a un detector UV/Visible detector o un detector diodo-array, usándose las columnas XTerra RP C18 4.7 x 250 mm, Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm o Beckman Ultrasphere Octyl C8 4.6 x 250 mm

La síntesis química asistida por microondas se ha llevado a cabo en el aparato Biotage Initiator instrument en tubos sellados de Pyrex (Biotage AB, tamaño 0.5 mL).

Los procesos de reacción se controlaron de forma rutinaria mediante cromatografía en capa fina (CCF), en cromatofolios Merck AL de Silicagel 60 F254, observándose posteriormente en lámparas de luz ultravioleta, utilizándose ocasionalmente reveladores de yodo, y soluciones de permanganato potásico, ninhidrina y cerio.

La purificación de los compuestos biarílicos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando Silicagel Merck 60 (230-400 mesh ASTM).

Para comprobar la pureza se analizaron de forma habitual los HPLC de los compuestos sintetizados en un equipo PERKIN ELMER modelo SERIES 200 con detector de fotodiodos PERKIN ELMER modelo SERIES 200 con columnas XTerra RP C18 4.7 x 250 mm, o en un equipo Agilent 1200 Series con detector UV/Visible con columnas Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical 4.6 x 150 mm, 5 micron.

5.2. CONDICIONES GENERALES DE ANALISIS POR HPLC

Todas las caracterizaciones de productos de este capítulo han sido llevadas a cabo mediante cromatografía HPLC siguiendo el siguiente método de análisis:

MÉTODO: C8-30min-95-5-GRADIENTE

Canal A: agua + 0.1% de ácido fórmico

Canal B: Acetonitrilo + 0.1% de ácido fórmico

Flujo: 0.8ml/min

Gradiente: t5 5%B, t20 100 %B, T25 10 0%B, t30 5 %B, t final 30 min 5 %B..

Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm; detector $\lambda = 214$ nm

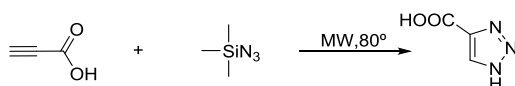
5.3. SÍNTESIS DE PEPTIDOTRIAZOLES COMO LIGANDOS EN SPPS.

Se ha jugado con la naturaleza activante/desactivante y posición de los sustituyentes en los anillos para observar la influencia en el rendimiento de la reacción. Por tanto se han obtenido compuestos derivados de la anilina, nitrofenil derivados, tolueno derivados y aldehído derivados.

La construcción del esqueleto peptídico se realiza en reactores de plástico para SPPS, sobre los que se pesa la resina H-Val-2-clorotritilo (0.69-0.8 mmoles/gramo, 100~200 mesh, 1% DVB), esta es preinchada con DMF grado síntesis de péptidos, la cual está libre de contener aminas secundarias que

interferirían en nuestras reacciones de acoplamiento, dando lugar a reacciones secundarias indeseadas y mezcla de productos. Una vez hinchada, se elimina el disolvente mediante filtración, ayudándonos de una bomba de vacío en un sistema manifold, se lava con DMF (3x-ml), para eliminar posibles residuos y a continuación se lleva a cabo la formación la síntesis mediante un esquema de acoplamiento/desprotección, hasta formación de la secuencia peptídica.

5.3.1. SÍNTESIS EN SOLUCIÓN DEL FRAGMENTO TRIAZÓLICO, ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO.



En un vial de microondas bajo atmósfera inerte de argón, se prepara una disolución de ácido propiólico (5.7mmoles, 0.35ml) y trimetilsililazida (TMSN₃) (5.7mmoles, 0.75ml), el vial se sella y la reacción se lleva a cabo en microondas durante 1 h a 80°C. Una vez transcurrida la reacción, se observa un precipitado blanco en el fondo del vial de microondas. Se soporta sobre un matraz y se elimina el disolvente en el rotavapor mediante presión reducida. Se lava con éter dietílico frío y se precipita. (R= masa es de 435.6mg) (14.11.2013)

HRMS ESI: Calculado para C₃H₃N₃O₂Na (M+Na)⁺ m/z 136.0123 encontrado 136.0120 (desviación -2.2ppm)

5.3.2 SÍNTESIS DE LA SECUENCIA 1,2,3-TRIAZOL-DFGKAV (05.12.2013) 14.01.2014

Se hinchan 200 mg (0.16 mmoles) de resina H-Val-2-clorotritilo (0.69-0.8 mmoles/gramo, 100~200 mesh, 1% DVB), con DMF calidad síntesis de péptidos durante 12 h, sobre un sistema de agitación horizontal para reactores en fase sólida.

Una vez hinchada lavamos la resina con DMF para acondicionarla para la reacción.

5.3.2.1 ACOPLAMIENTO FMOC-ALA-OH

Preparamos una solución de reacción con Fmoc-Ala-OH (0.64 mmoles, 200 mg), HATU (0.64 mmoles, 237 mg) HOAT (0.64 mmoles 87 mg), y DIPEA (1.28 mmoles, 220 µl) en DMF (0.2 M) en este orden hasta su completa disolución y seguidamente la añadimos sobre la resina. La reacción se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente, mediante agitación horizontal.

Finalmente la resina se lava con DMF (3 x 4ml), y se realiza el test colorimétrico de Kaiser para aminas primarias el cual da resultado negativo, indicando de forma cualitativa un completo acoplamiento. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20 % en DMF. Se vuelve a realizar el test de Kaiser, para observar un resultado positivo que nos indique la desprotección del grupo amino para llevar a cabo el siguiente acoplamiento.

5.3.2.1.1. TEST DE KAISER O NINIDRINA, PARA LA DETECCIÓN DE AMINAS PRIMARIAS.

El test se lleva a cabo con estos tres reactivos:

Reactivo A (5 g ninhidrina en 100 mL de etanol).

Reactivo B (80 g de fenol líquido en 20 mL de etanol).

Reactivo C (solución acuosa al 0.001 M de cianuro potásico en 98 mL de piridina).

Se toma una alícuota de resina y se transfiere a un tubo de vidrio donde se lava varias veces con EtOH. Se adicionan tres gotas de cada reactivo y la mezcla se calienta a 120°C durante 2-3 minutos. Un positivo en el test se observa mediante el cambio de color de la resina de amarillo a azul, esto indicaría que se encuentran presentes restos de aminas primarias.

5.3.2.1.2. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO FMOC

Estudios de estabilidad que realizamos sobre la resina indicaron que la desprotección se debía de realizar justamente una vez terminado el acoplamiento, por tanto desprotegemos rápidamente el grupo Fmoc usando piperidina al 20% en DMF (3 x 4ml) agitando durante intervalos cortos de tiempo de 2 minutos e intercalando un lavado con DMF entre cada desprotección.

Posteriormente se vuelve a lavar con DMF (3 x 4ml). Se realiza el test de Kaiser para detección de aminas primarias observándose un test positivo, el cual indica que el grupo amino se encuentra disponible para realizar el siguiente acoplamiento.

5.3.2.2. ACOPLAMIENTO FMOC-LYS (BOC)-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Lys-(Boc)-OH (0.64 mmoles, 300 mg) Oxima (0.64 mmoles, 91 mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 µl) en DMF (0.2 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20% en DMF. Se realiza el test de kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido para llevar a cabo el siguiente acoplamiento.

5.3.2.3. ACOPLAMIENTO FMOC-GLY-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Gly-OH (0.64 mmoles, 190 mg) Oxima (0.64 mmoles, 91 mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 µl) en DMSO al 25 % en DMF (0.4 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20 % en DMF, 1M de Oxima (3x3ml). Se realiza el test de kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido para llevar a cabo el siguiente acoplamiento.

5.3.2.4. ACOPLAMIENTO FMOC-PHE-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Phe-OH (0.64 mmoles, 248 mg) Oxima (0.64 mmoles, 91 mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 µl) en DMF (0.4 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20 % en DMF, 1M de Oxima (3x3ml). Se realiza el test de kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido para llevar a cabo el siguiente acoplamiento.

5.3.2.5. ACOPLAMIENTO FMOC-ASP(OtBu)-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Asp-(OtBu)-OH (0.64 mmoles, 263 mg) Oxima (0.64 mmoles, 91 mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 µl) en DMF (0.4 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Seguidamente se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc del grupo amino con una solución de piperidina al 20 % en DMF, 1M de Oxima (3x3ml). Se realiza el test de Kaiser, que da resultado positivo, indicando que el grupo amino se encuentra desprotegido para llevar a cabo el acoplamiento del fragmento del ácido 1,2,3-triazol-4-carboxílico.

5.3.2.6. SÍNTESIS CONVERGENTE. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO

Se prepara una solución de ácido 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico (0.64 mmoles, 73 mg) Oxima (0.64 mmoles, 91 mg) y DIC (1.28 mmoles, 200 µl) en DMF (0.4 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.3.2.7. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se prepara una solución de hidrólisis al 0.5% de TFA (9.45 ml DCM: 0.5 ml TES: 0.05 ml TFA), se adiciona sobre la resina en un reactor de vidrio y se mantiene mediante agitación magnética horizontal durante 2 h.

Transcurrido este tiempo se recoge el filtrado y se lava con DCM (3 x 4 ml). Se elimina el disolvente bajo presión reducida. El sirupo obtenido se precipita con dietiléter (3 x 4 ml) y se elimina el sobrenadante para retirar las impurezas derivadas de la resina.

5.3.2.8. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC

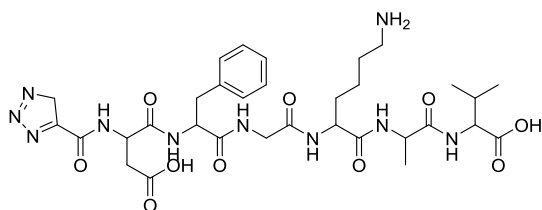
Se prepara una solución de hidrólisis al 50 % de TFA (4.5 ml DCM: 0.5 ml TES: 5 ml TFA), se adiciona sobre el sirupo obtenido anteriormente y se mantiene sobre agitación magnética durante 1 h.

Eliminamos el disolvente bajo presión reducida y se precipita con dietiléter (3 x 4 ml) para eliminar en el sobrenadante las impurezas derivadas de la resina. Se obtiene un sólido blanco que se purificará mediante la técnica SPE, cuyo procedimiento viene descrito a continuación.

5.3.2.9. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

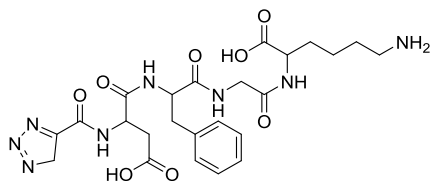
El precipitado blanco se purifica por extracción en fase sólida con cartuchos de ASPEC SPE Bond Elut C18, usando un gradiente desde 100 % de agua (A), pasando por A:B (90:10,80:20,70:30,60:40,50:50,...) hasta 100 % de acetonitrilo (B). El filtrado se recoge en viales que posteriormente son analizados mediante LC/MS y HPLC para la detección del compuesto puro. Una vez detectado mediante estos medios, se procede a eliminar el disolvente orgánico en el rotavapor a presión reducida y posterior liofilización.

El compuesto puro se analiza por HPLC y se determina su masa molecular por espectrometría de masas.



Caracterización del compuesto (anexo capítulo 1)

5.3.3. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-DFGK



Partimos de la resina comercial cloruro de 2-clorotritilo, cargada comercialmente con $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)}$. Se pesa sobre un reactor de plástico (0.144 mmoles, 200 mg). Se hincha 12 h con DMF, calidad síntesis de péptidos. Transcurrido el tiempo se elimina el disolvente mediante vacío con ayuda de un

Manifold. Se lava con DMF 3x3ml. Se procede a realizar el acoplamiento de Fmoc-Gly-OH.

5.3.3.1. ACOPLAMIENTO DE FMOC-GLY-OH

Se prepara una disolución de ácido Fmoc-Gly-OH (0.58 mmoles, 171 mg), HATU (0.56 mmoles, 214 mg), HOAT (0.58 mmoles, 80 mg) y DIPEA (1.15 mmoles, 198 μl) en DMF (0.2 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción se lleva a cabo durante 2 horas mediante agitación horizontal. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se lava la resina con DMF y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

Se desprotege el grupo amino con la solución piperidina al 20% en DMF 3x3ml. Se lava con DMF y se procede de nuevo a realizar el test de Kaiser, observándose la disponibilidad el grupo amino, test positivo, para llevar a cabo el siguiente acoplamiento que constituye la secuencia.

5.3.3.2. ACOPLAMIENTO DE FMOC-PHE-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Phe-OH (0.58 mmoles, 223 mg) Oxima (0.58 mmoles, 82 mg) y DIC (1.15 mmoles, 180 μl) en DMF (0.2 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo, se lava la resina con DMF y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Procedemos a la desprotección del grupo amino del residuo de fenilalanina como se viene procediendo con la solución de piperidina al 20% en DMF, en el apartado 5.3.2.1.2.

5.3.3.3. ACOPLAMIENTO FMOC-ASP(OtBU)-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Asp-(OtBu)-OH (0.58 mmoles, 237 mg) Oxima (0.58 mmoles, 79 mg) y DIC (1.15 mmoles, 198 μl) en DMF (0.4 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo, se lava la resina con DMF y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Procedemos a la desprotección del grupo amino del residuo de fenilalanina como se viene procediendo

en el apartado 5.3.2.1.2. , pero con la solución de piperidina al 20% en DMF, 1M de Oxima. Se realiza test de Kaiser, observandose un test positivo para llevar a cabo la siguiente reacción.

La resina se deshincha con MeOH 3x3ml y ayuda de la bomba de vacío durante 2 h.

5.3.3.4. SÍNTESIS CONVERGENTE. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO

Se prepara una solución de ácido 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico (0.28 mmoles, 33 mg) ,Oxima (0.28 mmoles, 41 mg) y DIC (0.58 mmoles, 90 µl) en DMF (0.2 M). Una vez completa su disolución, añadimos la solución sobre la resina de secuencia NH₂-DFGK (0.072mmoles, 100mg). La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal. Posteriormente se lava la resina con DMF y se realiza el test de káiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.3.3.5. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.7

5.3.3.6. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.8

5.3.3.7. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.9

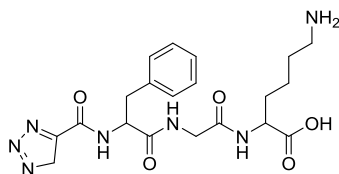
Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para C₃₃H₉N₈O₁₀ (M+H)⁺ m/z 717.3572 encontrado 717.3574 (desviación 0.3ppm)

HPLC: Columna C18; λ=214nm; **Método:** C8-30min-95-5-gradiente; **Tiempo de retención:** 11.922min;

Pureza = 100%

5.3.4. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-FGK



5.3.3.4.

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3. hasta el acoplamiento de la Fmoc-Phe-OH y posterior liberación del grupo amino. Se lleva a cabo el acoplamiento del fragmento 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico mediante el procedimiento descrito en el apartado

5.3.4.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.7

5.3.4.2 DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.8

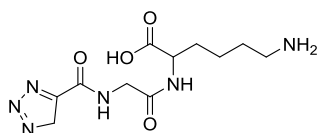
5.3.4.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.9

Caracterización del compuesto:

HPLC: Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$; tiempo de retención: 12.574min; pureza =100%

5.3.5. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-GK



Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3. hasta el acoplamiento de la Fmoc-Gly-OH y posterior liberación del grupo amino.

Se lleva a cabo el acoplamiento del fragmento 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.4.

5.3.5.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.7

5.3.5.2 DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.8

5.3.5.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

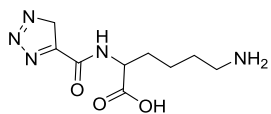
Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.9

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para $C_{11}H_{19}N_6O_4$ (M+H)⁺ m/z 299.1468 encontrado 299.1465 (desviación -1.0ppm)

HPLC: Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$; tiempo de retención: 4.750min ; pureza = 94%

5.3.6. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-K



Se pesa la resina comercial NH₂-Lys(Boc)-OH sobre un reactor de plástico para SPPS. Se hincha con DMF calidad grado síntesis de péptidos durante 12 h. Transcurrido ese tiempo se retira el disolvente con ayuda de una bomba de vacío y se lava con DMF para acondicionarla.

Posteriormente se lleva a cabo el acoplamiento del fragmento 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.4.

5.3.6.1. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se realiza mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.7

5.3.6.2 DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.8

5.3.6.3. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

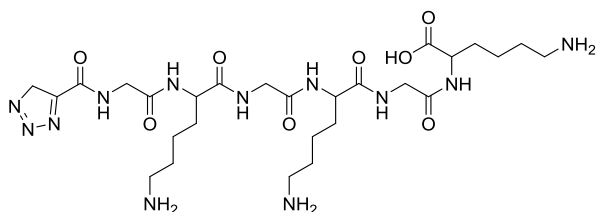
Se efectúa mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.9

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para C₉H₁₆N₅O₃ (M+H)⁺ m/z 242.1253 encontrado 242.1248 (desviación -2.1ppm)

HPLC: Columna C18; λ=214nm; tiempo de retención: 5.748min; pureza = 100 %

5.3.7. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-GKGK GK



Para llevar a cabo la síntesis de esta secuencia, se procede a la manipulación de la resina cloruro de 2-clorotritilo con carga comercial de 1.54 mmoles/gramo, bajo atmósfera de argón, en una cámara de guantes. Se pesa en un reactor de plástico para síntesis en SPPS (0.62 mmoles, 405 mg). Se sella en estas condiciones con ayuda de un septum y se hincha con DCM anhidro durante 1h. A continuación retiramos con ayuda de una bomba de vacío el disolvente y llevamos a cabo la carga de la resina con Fmoc-Lys-(Boc)-OH.

5.3.7.1. ACOPLAMIENTO FMOC-LYS-(BOC)-OH

Bajo atmósfera de argón se prepara una solución de Fmoc-Lys-(Boc)-OH (1,24 mmoles, 585 mg) y DIPEA (3.12 mmoles, 535 μ l) en DCM anhidro (0.2 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Posteriormente se lava la resina con DCM y a continuación con la solución DCM/MeOH/DIPEA (8:1.5:0.5) 2X3ml durante 10 minutos para bloquear los Cloruros de la resina que han quedado sin reaccionar con Fmoc-Lys-(Boc)-OH. Se lava con DCM 3x3ml y deshinchamos la resina lavándola con MeOH 3x3ml y aplicándole vacío durante 2 h con ayuda de una bomba de membrana.

5.3.7.2. DETERMINACIÓN DE LA CARGA DE LA RESINA

Para la determinación de ésta, se toma una alícuota de resina, anteriormente deshinchada, en relación 1 μ M con respecto a la carga de resina comercial (0.65 mg), se adicionan piperidina al 20 % en DMF y se agita la suspensión 10 min mediante agitación magnética. Transcurrido ese tiempo, se determina la absorbancia de la mezcla en un espectrofotómetro UV-visible a 290nm. La medida se realiza por triplicado y se aplica la siguiente ecuación.

$$\text{Carga} = \frac{\text{Absorbancia} \times V \text{ (ml)}}{\epsilon \text{ 290nm} \times \text{masa (mg)}} \times 1000$$

Posteriormente, se hincha de nuevo la resina y procedemos a la desprotección del grupo amino del residuo de lisina como se viene procediendo en el apartado 5.3.2.1.2. Se realiza el test del Kaiser. Los cálculos a realizar para determinar la cantidad de reactivos en los siguientes acoplamientos dependen de la carga de esta.

5.3.7.3. ACOPLAMIENTO DE FMOC-GLY-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Gly-OH (0.51 mmoles, 152 mg) Oxima (0.51 mmoles, 73 mg) y DIC (0.51 mmoles, 80 μ l) en DMF (0.2 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina. La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal.

Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción. Procedemos a la desprotección del grupo amino del residuo de glicina como se viene procediendo en el apartado 5.3.2.1.2.

Se realiza el test de Kaiser para la detección de aminas primarias y se observa un claro positivo, que nos permite proseguir con los demás acoplamientos hasta completar la secuencia.

Los siguientes acoplamientos se llevan a cabo mediante la repetición sucesiva de los procedimientos descritos en los apartados 5.3.7.2 y 5.3.7.3. Teniendo en cuenta que para los acoplamientos del resto de lisina descrito en el apartado 5.3.7.2. no es necesario el uso de DCM anhidro, sino que en su defecto, éste se sustituye por DMF .

5.3.7.4. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.7

5.3.7.5 DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC

Se realiza mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.8

5.3.7.6. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

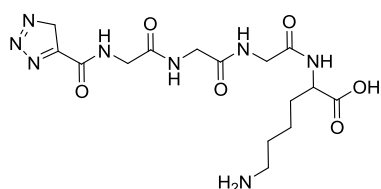
Se efectúa mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.9

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para $C_{27}H_{49}N_{12}O_8$ (M+H)⁺ m/z 669.3796 encontrado 669.3801 (desviación 0.7ppm)

HPLC: Columna C18; $\lambda=214$ nm; tiempo de retención: 5.611min; Pureza = 100%

5.3.8. SÍNTESIS DE LA SECUENCIA T-GGGK



Se pesa la resina comercial NH_2 -Lys-(Boc)-OH sobre un reactor de plástico para SPPS. Se hincha con DMF calidad grado síntesis de péptidos durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se retira el disolvente con ayuda de una bomba de vacío y se lava con DMF para acondicionarla. Se retira el disolvente y se procede al coplamiento de Fmoc-Gly-OH.

5.3.8.1. ACOPLAMIENTO DE FMOC-GLY-OH

Se prepara una solución de ácido Fmoc-Gly-OH (0.58 mmoles, 173 mg), Oxima (0.58 mmoles, 83 mg) y DIC (1.16 mmoles, 18 μ l) en DMF (0.2 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina (0.145mmoles, 200mg). La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal. A continuación se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

Se lleva a cabo la desprotección del grupo Fmoc, como se indica en el apartado 5.3.2.1.2.

Este mismo procedimiento se lleva a cabo dos veces más, hasta completar la secuencia NH₂-GGGK, y posteriormente se procede al acoplamiento del fragmento 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico.

5.3.8.2. SÍNTESIS CONVERGENTE. ACOPLAMIENTO FRAGMENTO ÁCIDO 1H-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXÍLICO

Se prepara una solución de ácido 1H-1,2,3-triazol-4-carboxílico (0.58 mmoles, 66 mg), Oxima (0.58 mmoles, 83 mg) y DIC (1.16 mmoles, 182 µl) en DMF (0.2 M). Una vez completa su disolución añadimos la solución sobre la resina de secuencia NH₂-DFGK (0.072 mmoles, 100 mg). La reacción transcurre durante 2 h sobre agitación horizontal a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo se lava la resina con DMF y se realiza el test de kaiser para la detección de aminas primarias, el cual da negativo, indicando que se ha llevado a cabo la reacción.

5.3.8.3. HIDRÓLISIS DE LA RESINA

Se realiza mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.7

5.3.8.4. DESPROTECCIÓN DE LOS GRUPOS tBu y BOC

Se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.8

5.3.8.5. PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE REVERSA

Se efectúa mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3.2.9

Caracterización del compuesto:

HRMS ESI Calculado para C₁₅H₂₅N₈O₆ (M+H)⁺ m/z 413.1897 encontrado 413.1901 (desviación 1.0ppm)

HPLC: Columna C18; λ=214nm; tiempo de retención: 5.718min; Pureza = 100%

5.4. PROCEDIMIENTO GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS BIFENÍLICOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO CRUZADO SUZUKI-MIYAUURA.

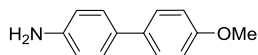
Se prepara una disolución de haluro de arilo (1eq, 0.082mmoles), fenilborónico derivado (1.2 eq, 0.101 mmoles), Pd(OAc)₂ (5 % mol) y ligando (2 % mol) en DMF (0.3 M). Se adiciona una solución acuosa de carbonato potásico 1.8 M. Se burbujea la reacción durante 15 minutos bajo argón y la reacción se lleva a cabo en microondas a 100°C durante 2 horas.

Tras enfriamiento de la mezcla de reacción se realiza una extracción líquido-líquido con acetato de etilo y salmuera. La fase orgánica se seca con MgSO₄. Se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida en el rotavapor.

Los productos finales fueron purificados mediante cromatografía en columna flash utilizando como eluyente la mezcla de disolventes AcOEt/Hexano en distintas proporciones, según el biaril derivado.

5.4.1. SÍNTESIS DE BIARILS DERIVADOS DE 4-BROMOANILINA

5.4.1.1. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-[1,1'-BIFENIL]-4-AMINA



Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

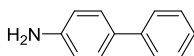
Caracterización del compuesto

$^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, 2H), 7.43 (d, 2H), 7.05 (d, 2H), 6.74 (d, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.82 (s, 3H)

HPLC (Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$): 100% puro, tiempo de retención 15.079 min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}$ $(\text{M}+\text{H})^+$ 200.1075, encontrado 200.1064 (desviación - 5.5ppm)

5.4.1.2. SÍNTESIS DE [1,1'-BIFENIL]-4-AMINA



Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

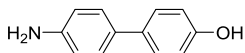
Caracterización del compuesto

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.43, 7.29, 7.16 and 6.65 (4 m, 9 H, Ph), 3.17(bs, 2H, NH_2)

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$ 100% puro, tiempo de retención 15.829 min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}$ $(\text{M}+\text{H})^+$ 170.0970, encontrado 170.0956 (desviación - 8.2ppm)

5.4.1.3. SÍNTESIS DE 4'-AMINO-[1,1'-BIFENIL]-4-OL



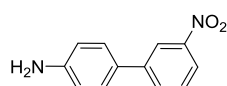
Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

Caracterización del compuesto

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$; 94%puro; tiempo de retención = 11.759min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}$ $(\text{M}+\text{H})^+$ 186.0919, encontrado 186.0914 (desviación - 2.7ppm)

5.4.1.4. SÍNTESIS DE 3'-NITRO-[1,1'-BIFENIL]-4-AMINA



Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

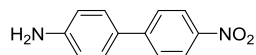
Caracterización del compuesto

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.42 (bs, 1H, *Ph*-NO₂), 8.13 (bd, 1 H, *Ph*-NO₂), 7.88 (bd, 1 H, *Ph*-NO₂), 7.57 (t, 1 H $J = 8.0$ Hz, *Ph*-NO₂), 7.49 and 6.82 (2 d, 4 H, $J = 6.4$ Hz, *Ph*-NH₂), 3.87 (s, 2 H, NH₂)

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$ 100 % puro, tiempo de retención 15.460 min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 215,0821, encontrado 215.0804 (desviación - 7.9ppm)

5.4.1.5. SÍNTESIS DE 4'-NITRO-[1,1'-BIFENIL]-4-AMINA



Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4

Caracterización del compuesto

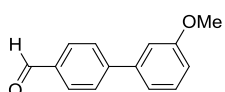
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.14, 7.56, 7.37, 7.17 and 6.67 (5 m, 8 H, Ph), 3.77 (s, 2H, NH₂)

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$ 100 % puro, tiempo de retención 15.300 min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 215.0821, encontrado 215.0811 (desviación - 4.6ppm)

5.4.2. SÍNTESIS DE BIARILOS DERIVADOS DE CARBALDEHÍDO

5.4.2.1. SÍNTESIS DE 3'-METOXI-[1,1'-BIFENIL]-4-CARBALDEHÍDO



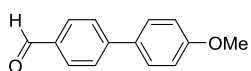
Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

Caracterización del compuesto

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$: 91% puro, tiempo de retención 20.538 min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 213.0916, encontrado 213.0912 (desviación -1.9 ppm)

5.4.2.2. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-[1,1'-BIFENIL]-4-CARBALDEHÍDO



Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

Caracterización del compuesto

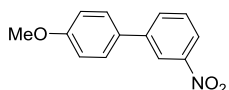
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 9.94 (s, 1 H, CHO), 7.84, 7.62, 7.50, 7.16 and 6.91 (5 m, 8 H, Ph), 3.77 (s, 3H, OMe)

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$ 100% puro, tiempo de retención 18.816min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_2$ $(\text{M}+\text{H})^+$ 213.0916, encontrado 213.0914 (desviación - 0.9ppm)

5.4.3. SÍNTESIS DE BIARILOS DERIVADOS DE METOXIFENILBORÓNICO.

5.4.3.1. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-3-NITRO-1,1'-BIFENILO

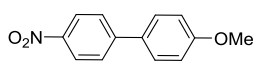


Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.3.2

Caracterización del compuesto

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, 2H), 7.60 (d, 2H), 7.49 (d, 2H), 6.93 (d, 2H), 3.79 (s, 3H, OMe).

5.4.3.2. SÍNTESIS DE 4-METOXI-4'-NITRO-1,1'-BIFENILO.

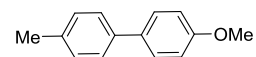


Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.3.2

Caracterización del compuesto

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, 2H), 7.55 (dd, 4H), 6.93 (d, 2H), 3.79 (s, 3H, OMe).

5.4.3.3. SÍNTESIS DE 4-METOXI-4'-METIL-1,1'-BIFENILO



Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

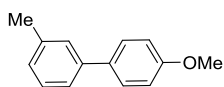
Caracterización del compuesto

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.44-7.33 (m, 4 H, Ph), 7.15-7.12 (m, 2 H, Ph), 6.89-6.86 (m, 2 H, Ph), 3.75 (s, 3 H, OMe), 2.29 (s, 3 H, Me)

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$ 100% puro, tiempo de retención 21.783min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 199.1123, encontrado 199.1132 (desviación 4.5 ppm)

5.4.3.4. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-3-METIL-1,1'-BIFENILO



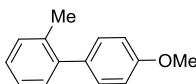
Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

Caracterización del compuesto

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.42 (dd, 4H), 7.16 (d, 2H), 6.90 (d, 2H), 3.78 (s, 3H, OMe), 2.32 (s, 3H, Me).

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$: 100% puro, tiempo de retención 22.045 min.

5.4.3.5. SÍNTESIS DE 4'-METOXI-2-METIL-1,1'-BIFENILO



Se sigue el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 5.4.

Caracterización del compuesto

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.00-6.94 (m, 6H, Ph), 6.70-6.66 (m, 4H, Ph), 3.57 (s, 3H, MeO), 2.00 (s, 3H, Me)

HPLC Columna C18; $\lambda=214\text{nm}$: 100% puro, tiempo de retención 22.291 min.

HRMS-ESI: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 199.1123, encontrado 199.1137 (desviación 7 ppm)

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo la síntesis de ligandos de carácter peptídico, para su empleo en la reacción de Suzuki-Miyaura eliminando el uso de ligandos derivados de fosfina. El rendimiento de la reacción ha mejorado en comparación con ligandos fosfínicos, ya que se ve favorecido por la afinidad hacia la formación de dicho complejo y por el aumento de solubilidad del ligando favoreciendo este tipo de catálisis homogénea. Son capaces de formar complejos de paladio *in situ*, aludiendo a las ventajas que ello conlleva. Su estudio se ha realizado a través de la formación de biarilos mediante la reacción de Suzuki-Miyaura.

Estos a su vez han mostrado una elevada eficiencia catalítica hacia esta reacción de acoplamiento, que es comparable y, en algunos casos, mejora los rendimientos ofrecidos por otros sistemas catalíticos disponibles en literatura. Así con el objetivo de mejorar la eficiencia de esta reacción, este trabajo trata sobre el descubrimiento de ligandos de Paladio solubles y compatibles con el agua como medio de reacción.

Se ha demostrado el amplio rango de tolerancia de este tipo de ligandos frente a numerosos grupos funcionales en distintos sustratos, jugando a su vez con el carácter de los sustituyentes y los impedimentos estéricos que estos podían suscitar para observar su capacidad.

Se han desarrollado diferentes peptidotriazoles como ligandos, fácilmente desarrollados por la metodología de síntesis en fase sólida que permite una gran diversidad y aplicación en química combinatoria con las ventajas que esto conlleva como su estabilidad, disponibilidad y manipulación. La metodología sintética hace posible el desarrollo de compuestos de manera simultánea, el llevar a cabo la formación del complejo *in situ* en fase sólida, e incluso intentar su recuperación una vez finalizada la reacción

Los complejos de paladio desarrollados *in situ*, mostraron una gran efectividad como catalizadores para la reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura bajo condiciones de reacción suaves. Aunque la coordinación al ión metálico aún no se conoce, estos resultados parecen indicar que el ligando 1 es el más activo. Se han puesto a punto las condiciones de reacción apropiadas para llevar a cabo la reacción de acoplamiento cruzado tipo Suzuki-Miyaura utilizando los ligandos más relevantes estudiados, que ofrecen elevados rendimientos y cargas bajas de catalizador y ligando, con los beneficios que esto conlleva. El estudio de distintas proporciones de catalizador y ligando permite deducir, que nuestros compuestos se coordinan de forma diferente con respecto al Pd.

Todos estos resultados están pendientes de publicación.

FUTURAS PERSPECTIVAS

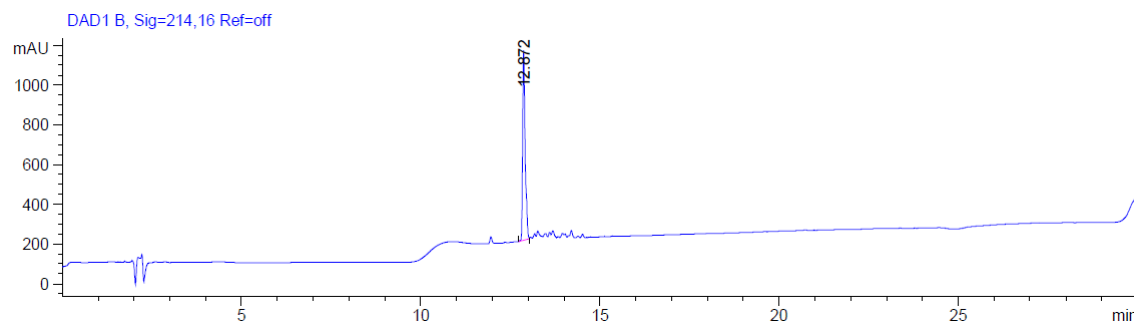
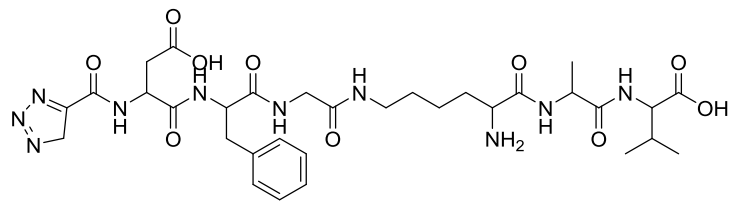
7. FUTURAS PERSPECTIVAS

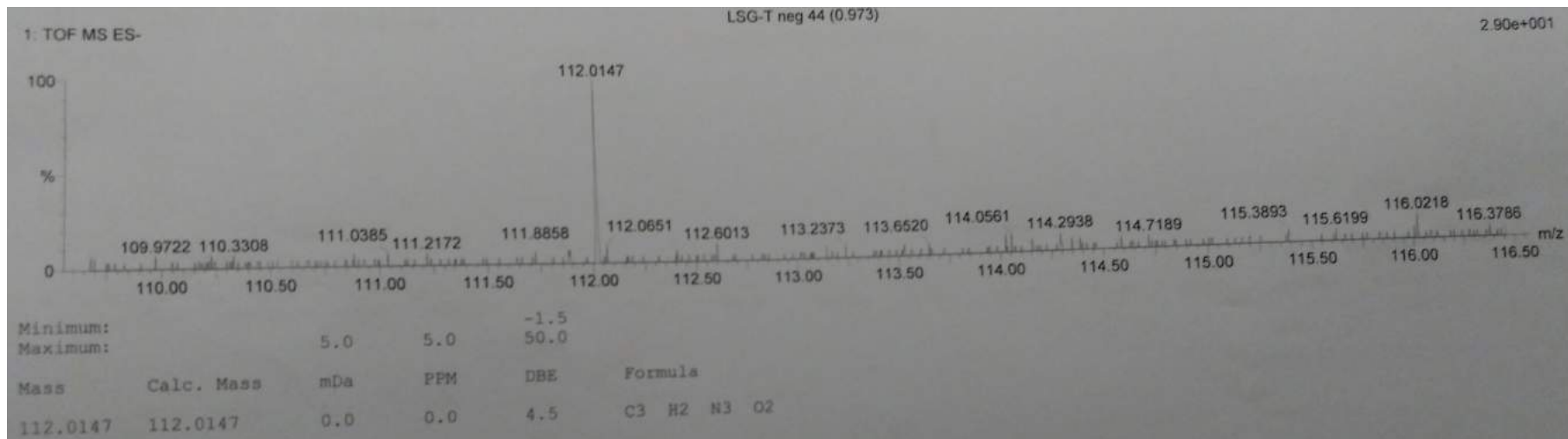
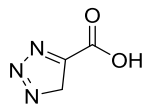
El uso de aminoácidos como catalizadores junto con péptidos de secuencias sencillas, han llegado a ser un importante subgrupo como catalizadores asimétricos. Su habilidad para llevar a cabo una variedad de transformaciones se complementa por su disponibilidad, estabilidad y fácil manipulación. A día de hoy los aminoácidos y derivados peptídicos de diferente longitud son usados como catalizadores asimétricos. En el presente, en literatura, se habla de secuencias con elevado éxito en este campo, que contienen prolina en su estructura, esto es en parte debido a su amina secundaria y a su limitada flexibilidad estructural, una cualidad que ha sido considerada como ventajosa en la investigación de catalizadores asimétricos. El uso de complejos péptido-metálicos como catalizadores asimétricos está demostrando un elevado progreso en este tipo de catálisis. Cada nuevo descubrimiento de aminoácidos y péptidos basados en catalizadores refuerza e intensifica la apreciación de los químicos orgánicos del potencial de la naturaleza del catalizador de elección⁹³.

Así, futuros estudios, quizás incluyan el diseño de nuevos derivados que incorporen o eliminen más grupos funcionales para mejorar el incremento de la coordinación al metal de transición, catalice de manera efectiva la reacción y disminuyan aún más las cantidades catalíticas de metal. Por tanto, se intentaría recuperar la especie catalizadora de la mezcla de reacción con la finalidad de observar si es reciclable, llevar a cabo el estudio de los demás ligandos que suscitaban buenos resultados y buscar nuevas aplicaciones en distintos tipos de reacciones catalizadas por Paladio.

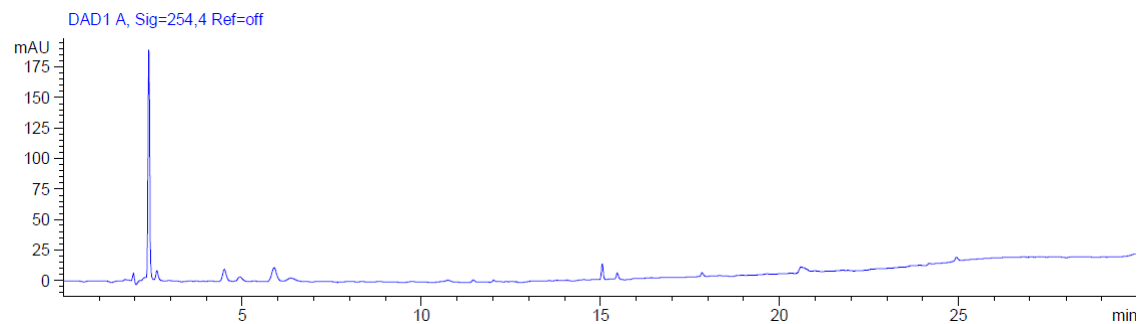
⁹³ Jarvo ER, Miller SJ. Amino acids and peptides as asymmetric organocatalysts. *Tetrahedron*. 2002;58(13):2481-2495

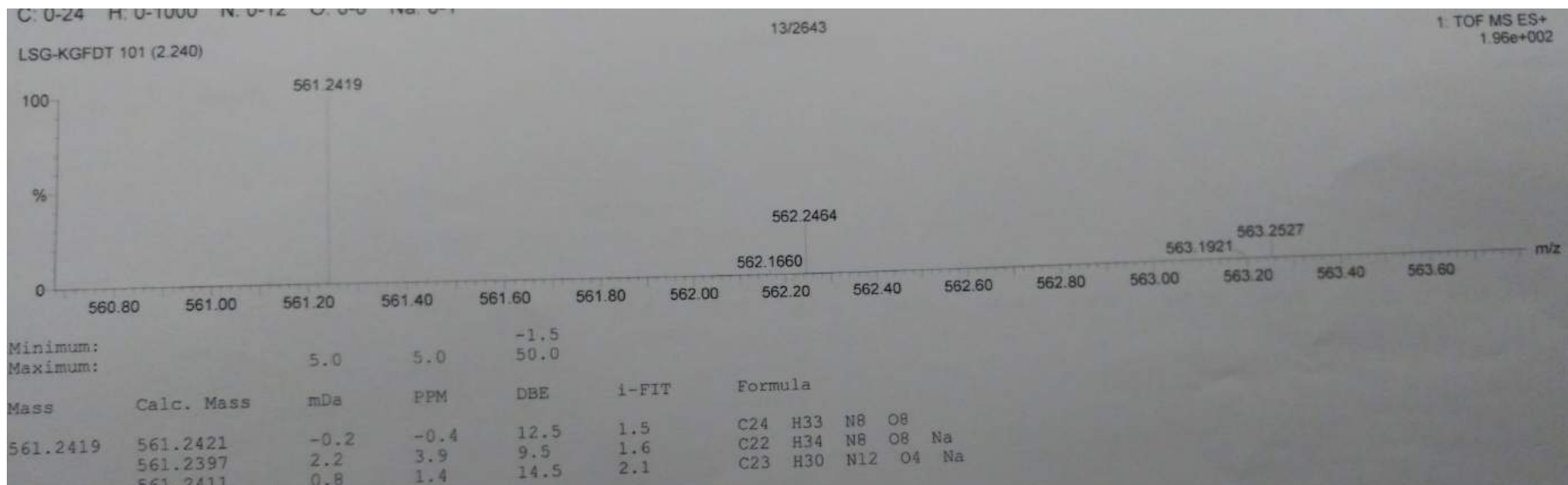
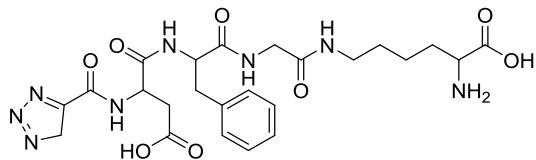
ANEXO II



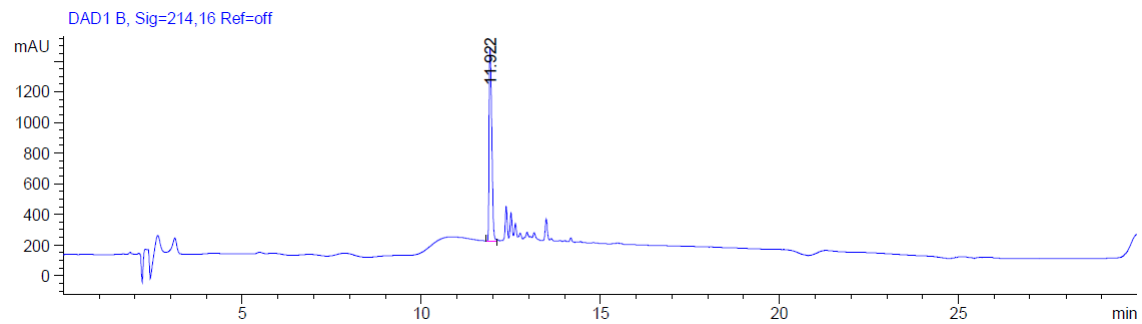


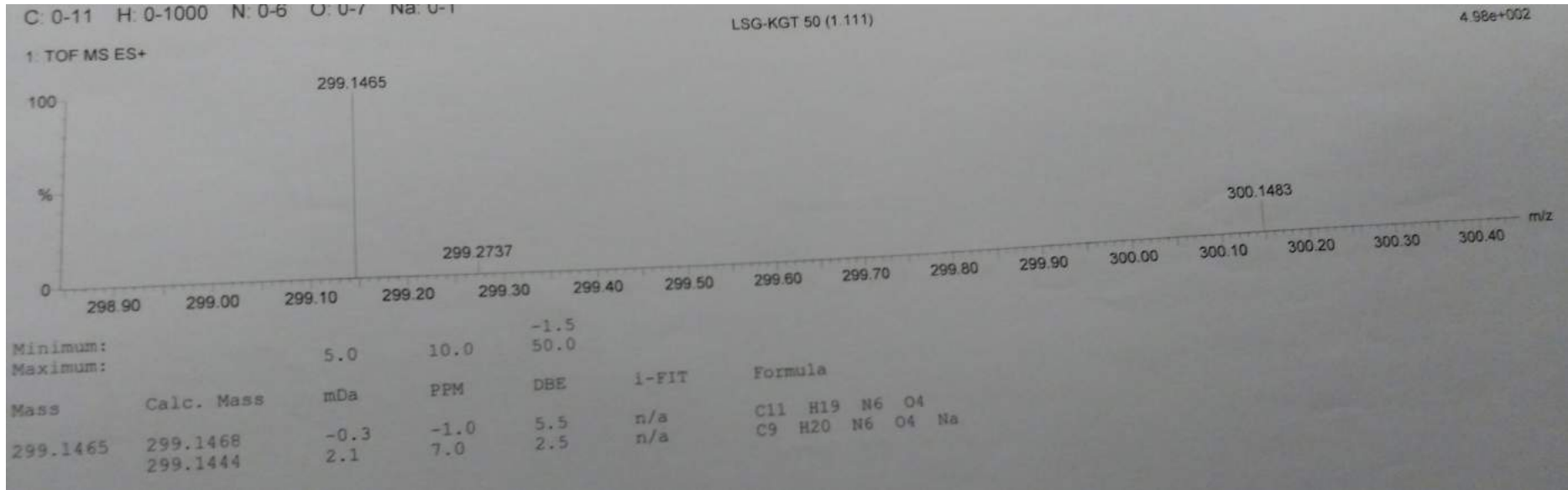
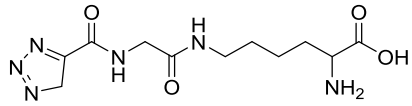
=



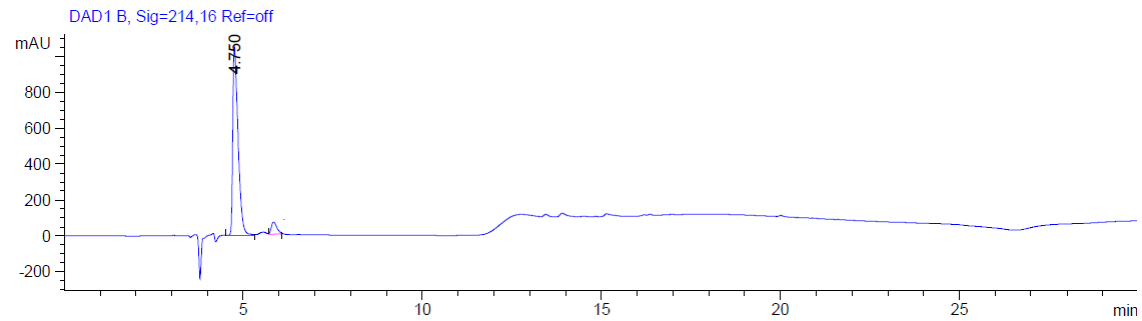


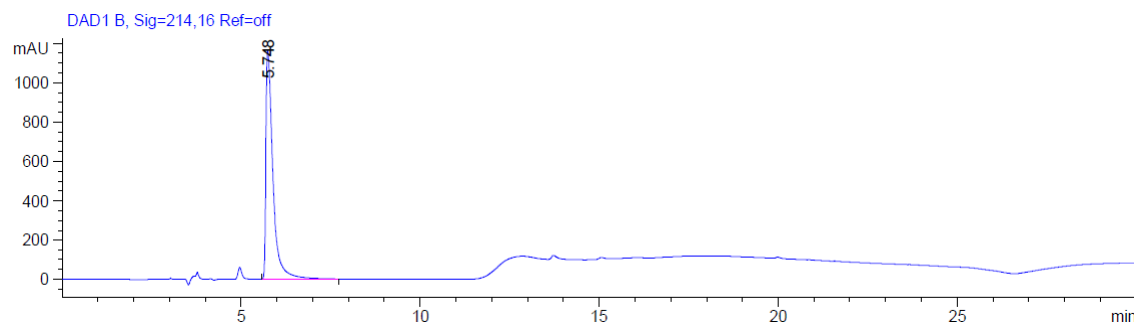
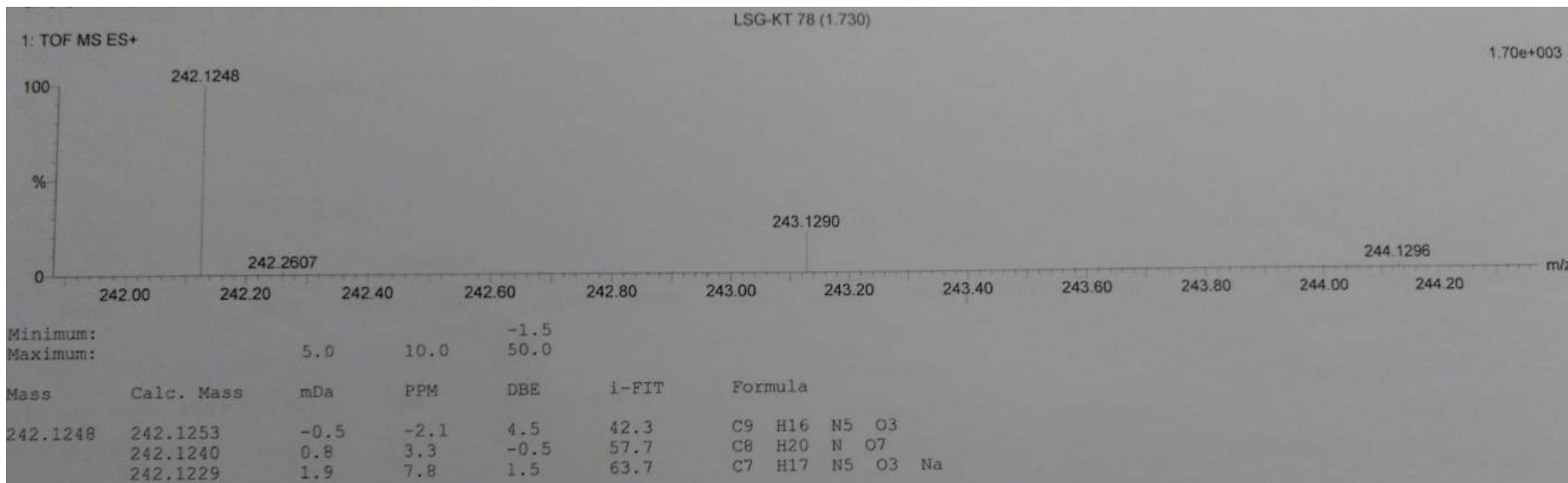
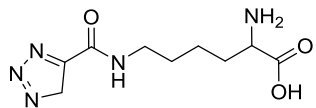
III

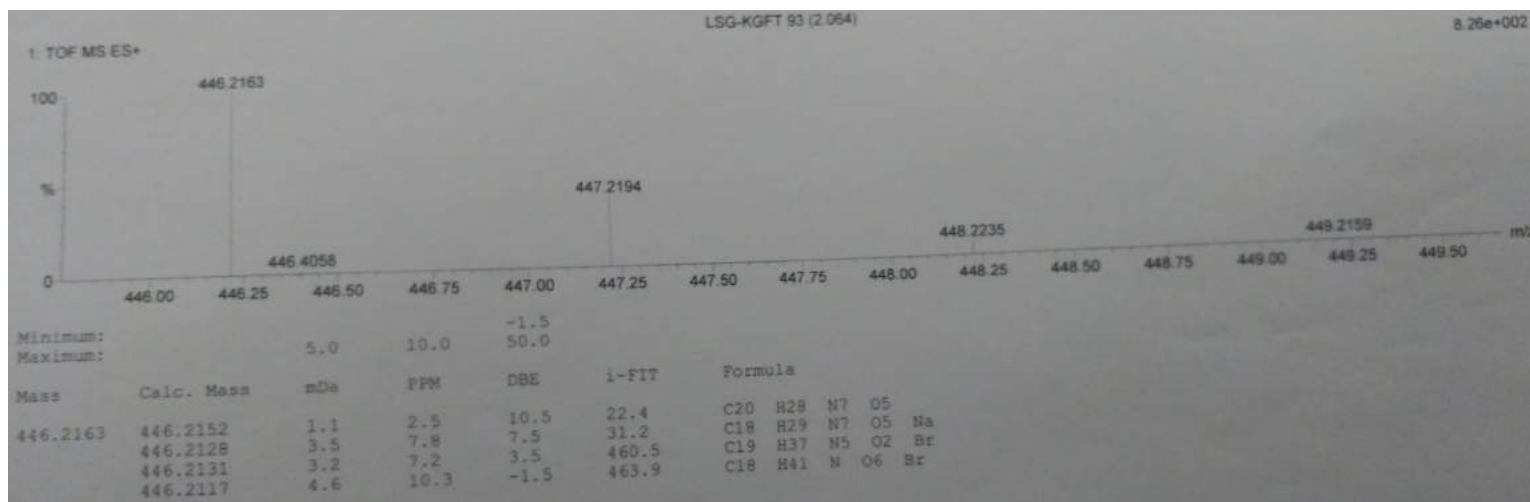
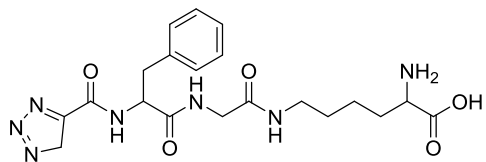




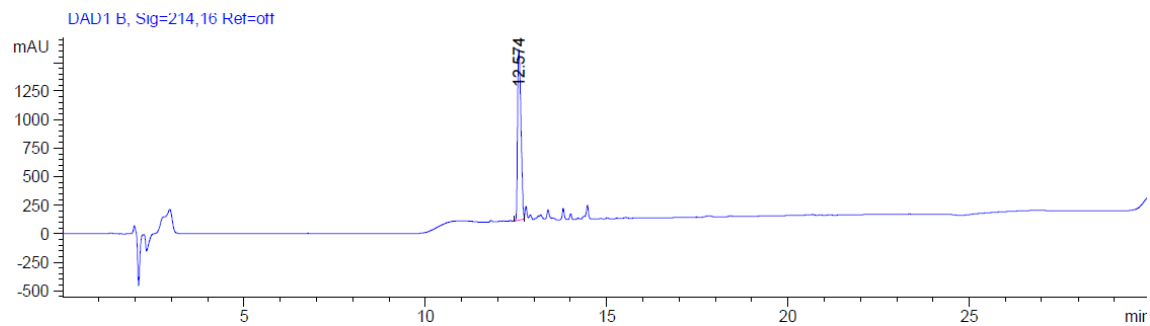
W

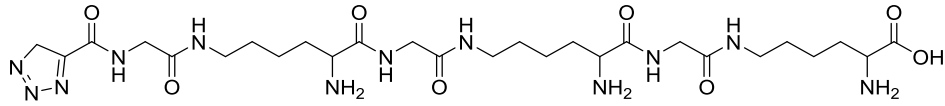






W





247 formula(e) evaluated with 2 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

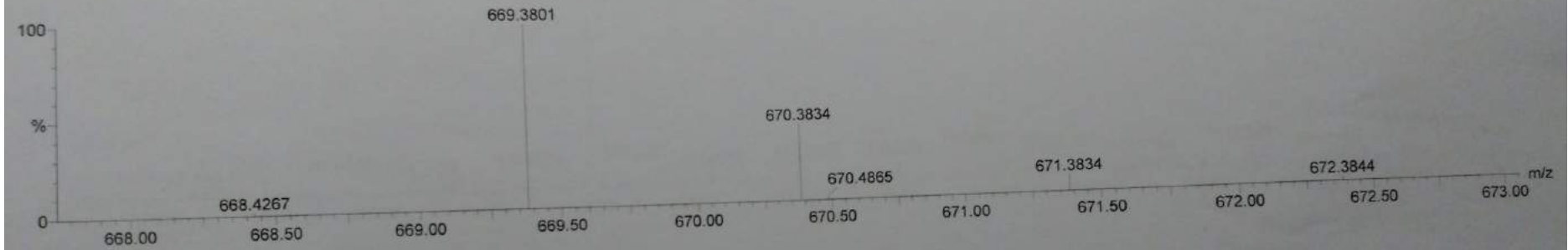
Elements Used:

C: 0-27 H: 0-1000 N: 0-12 O: 0-8 Na: 0-1

13/2642

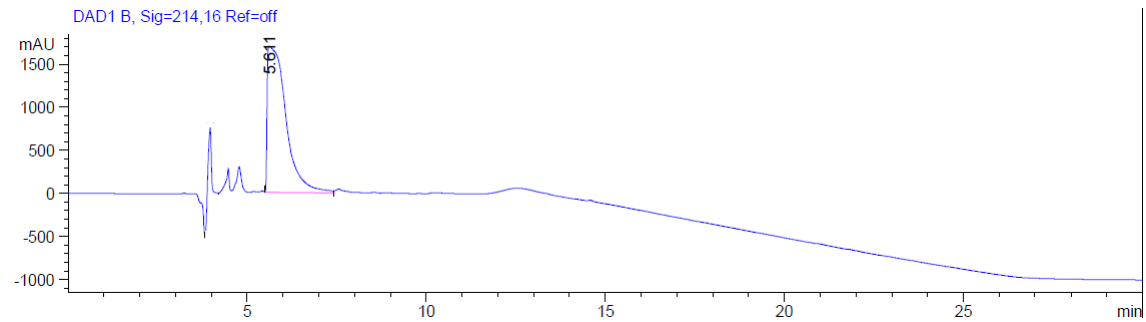
1: TOF MS ES+
7.07e+002

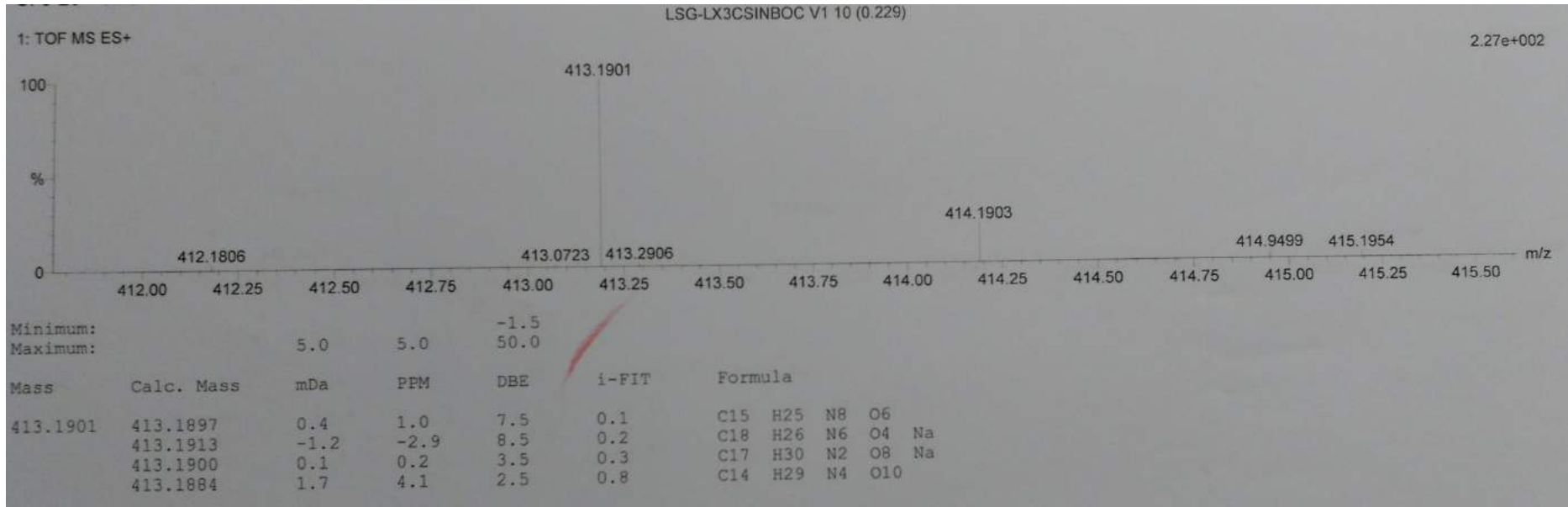
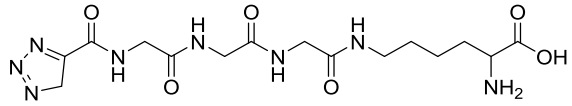
LSG-KGKGKGT 12 (0.263)



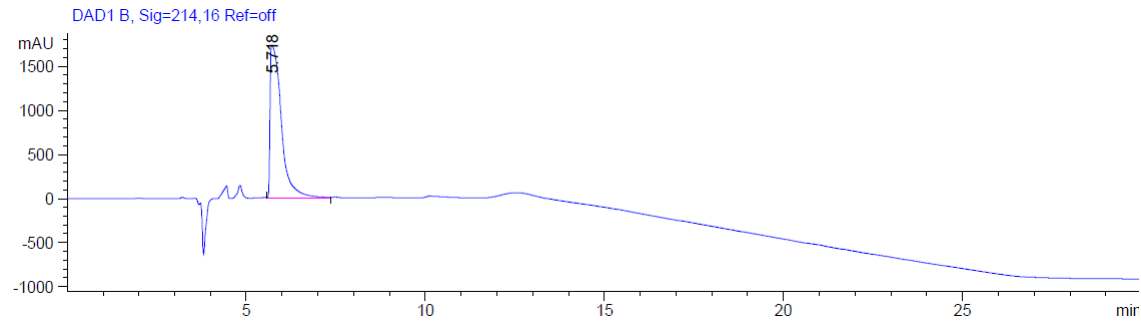
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
669.3801	669.3796	0.5	0.7	9.5	3.5	C27 H49 N12 O8
	669.3772	2.9	4.3	6.5	6.7	C25 H50 N12 O8 Na

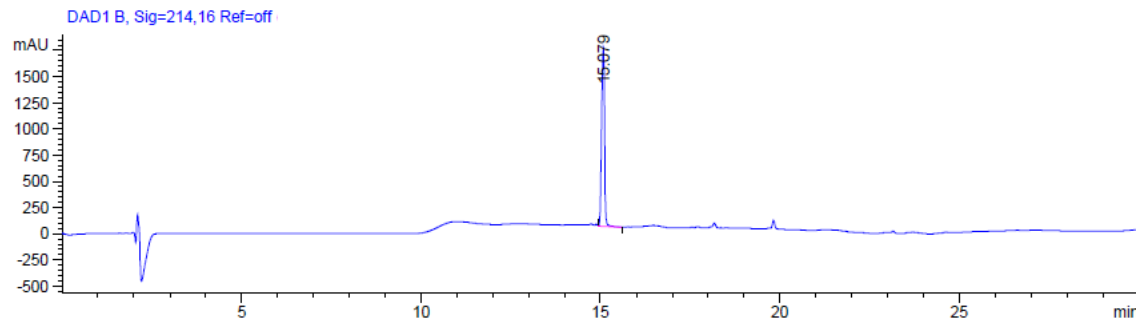
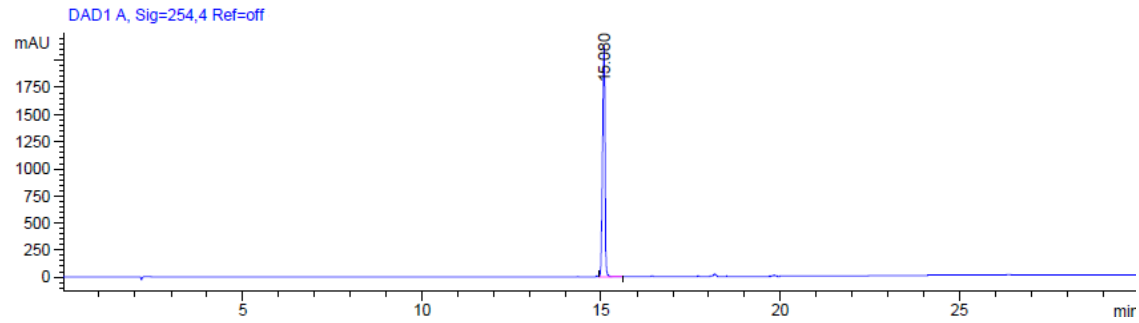
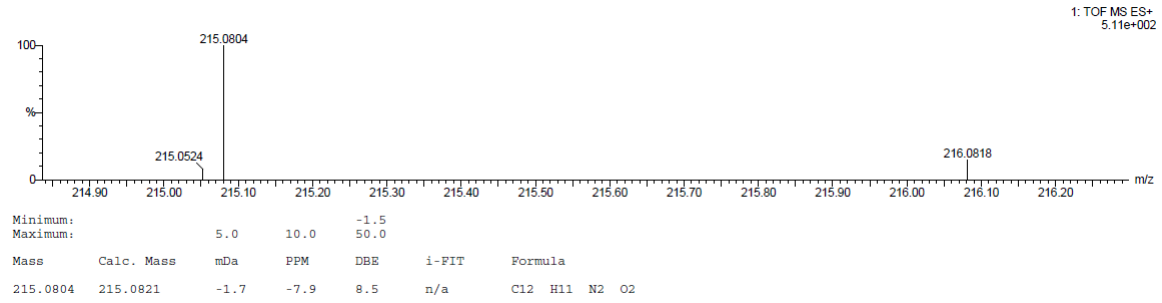
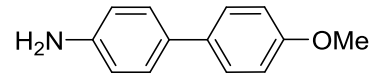
VII



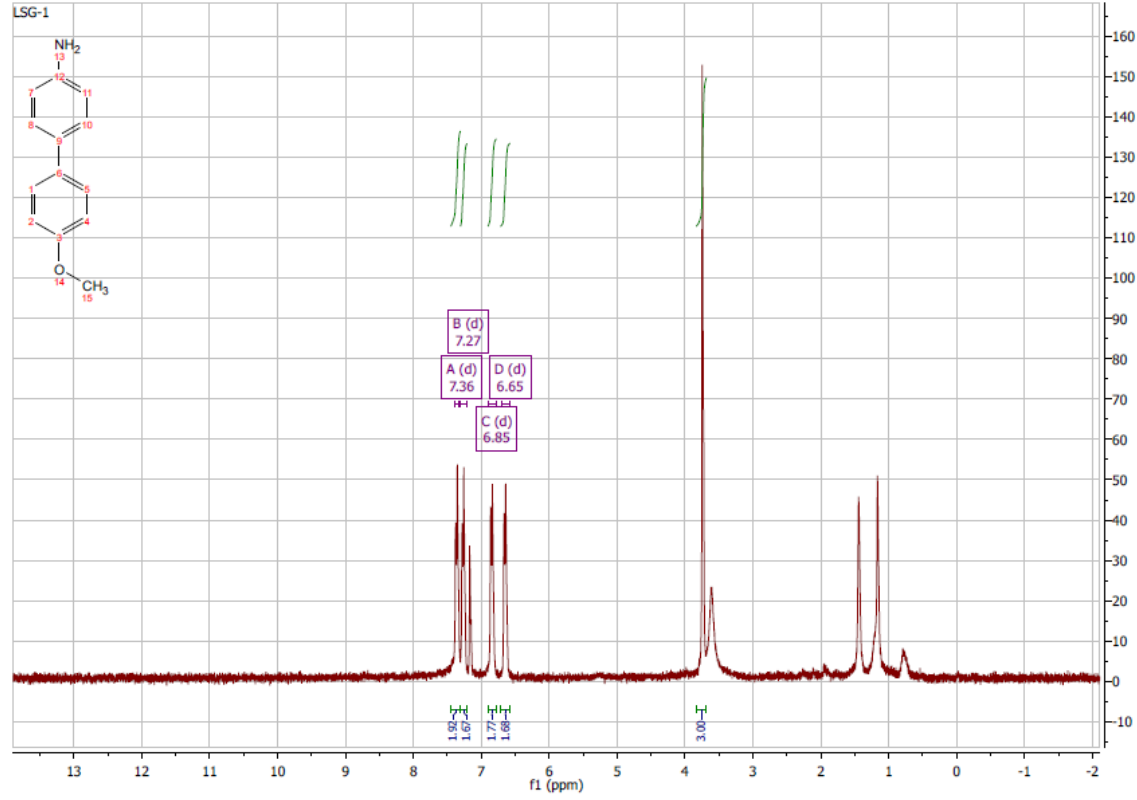


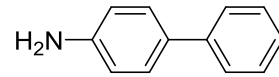
VIII



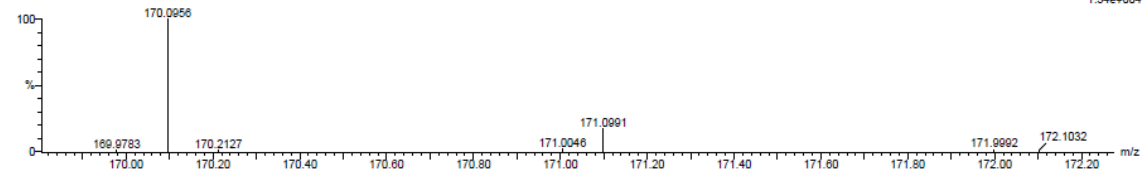


X



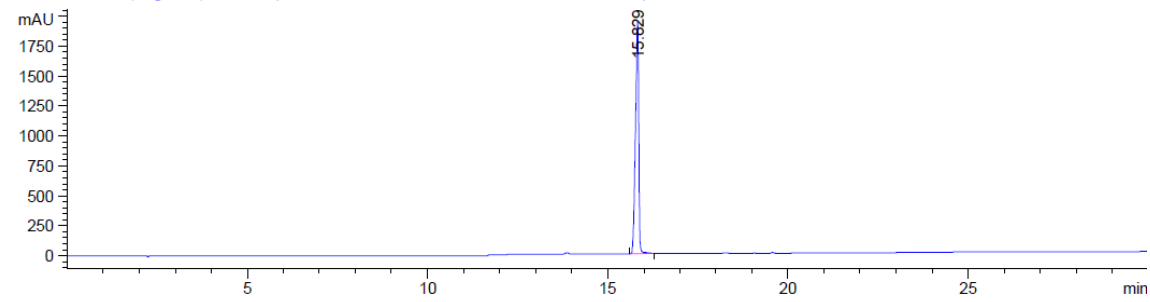


1: TOF MS ES+
1.34e+004

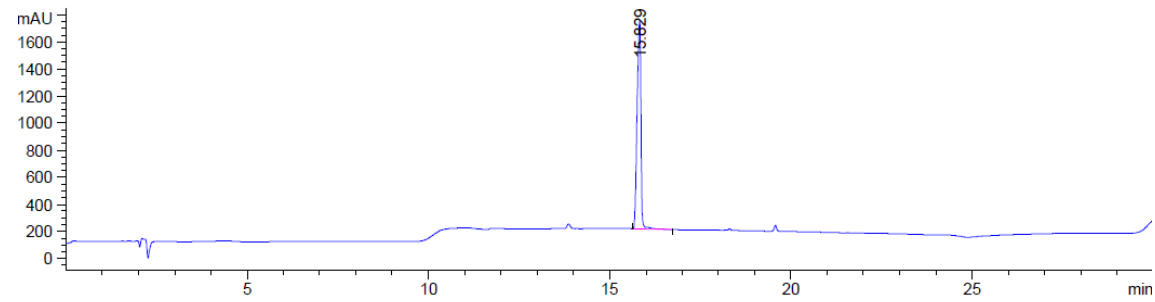


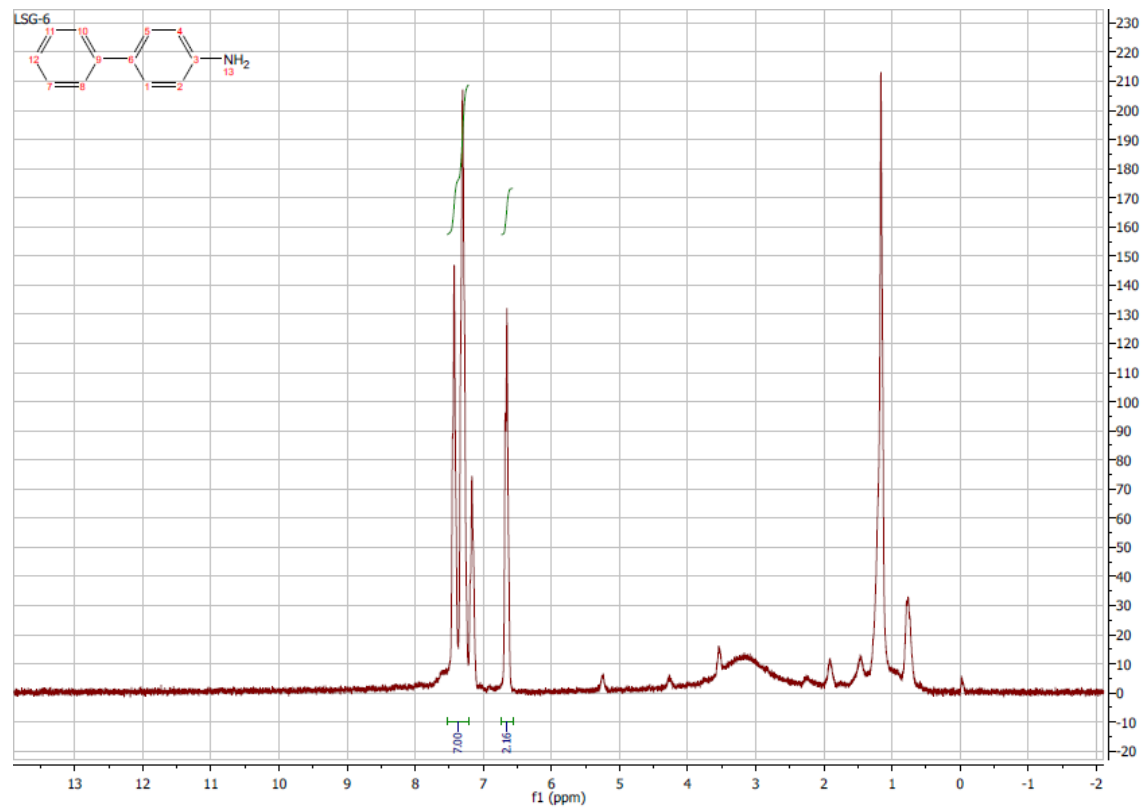
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	I-PIT	Formula
170.0956	170.0970	-1.4	-8.2	7.5	55.2	C12 H12 N

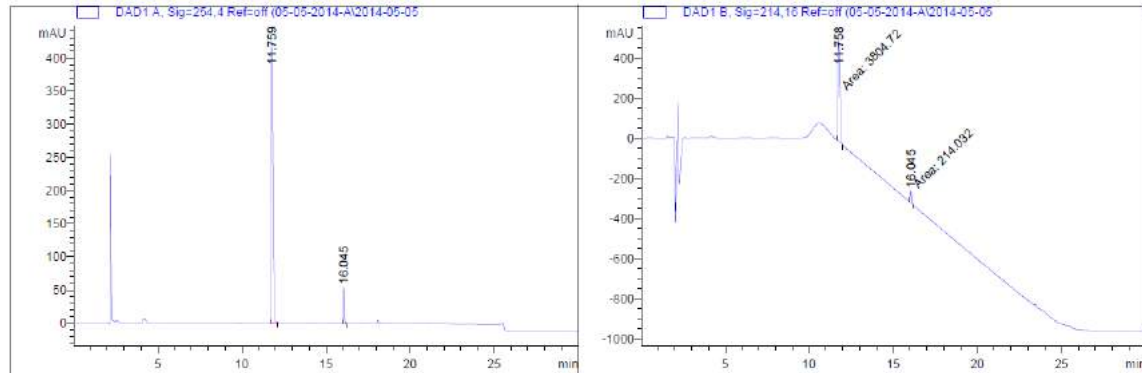
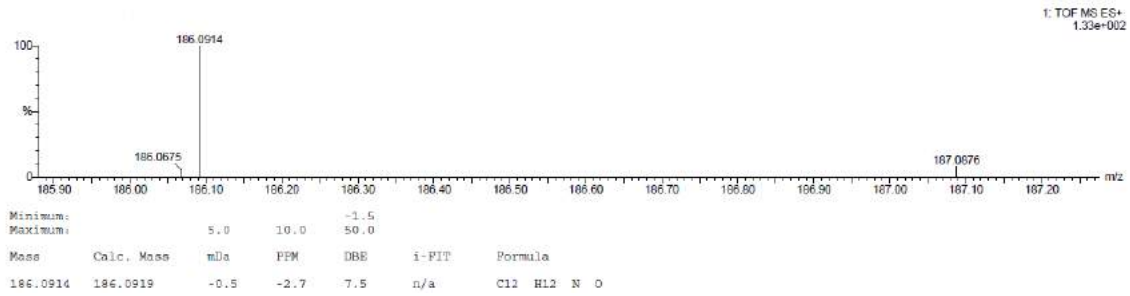
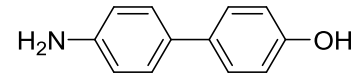
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off



DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off





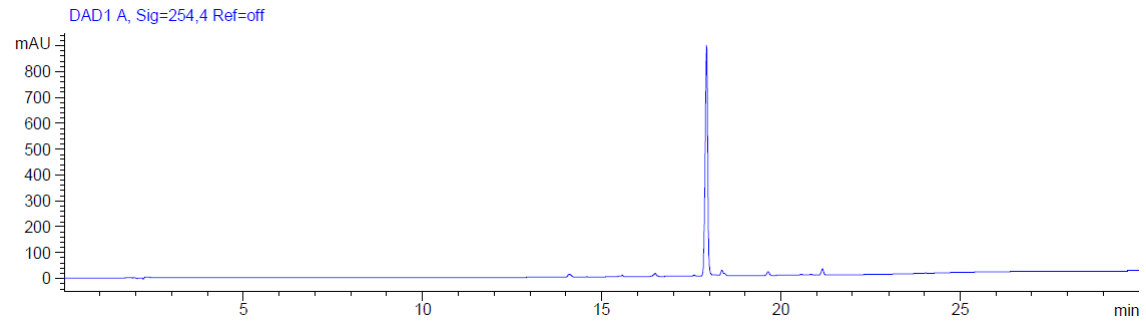
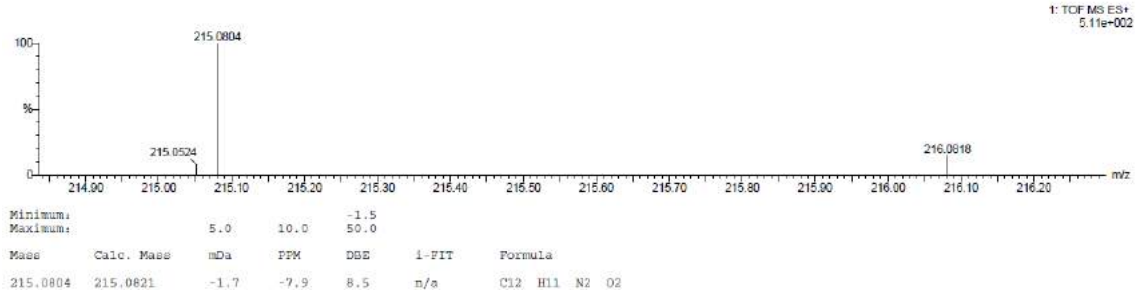
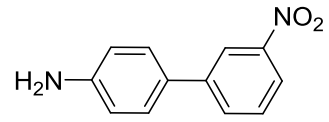


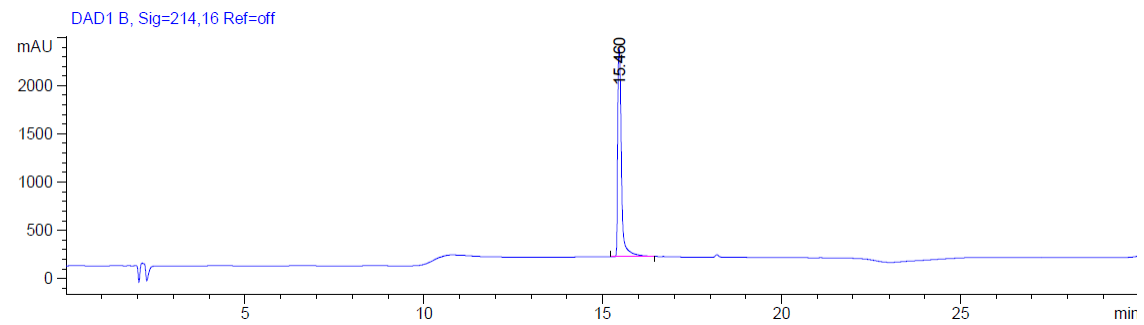
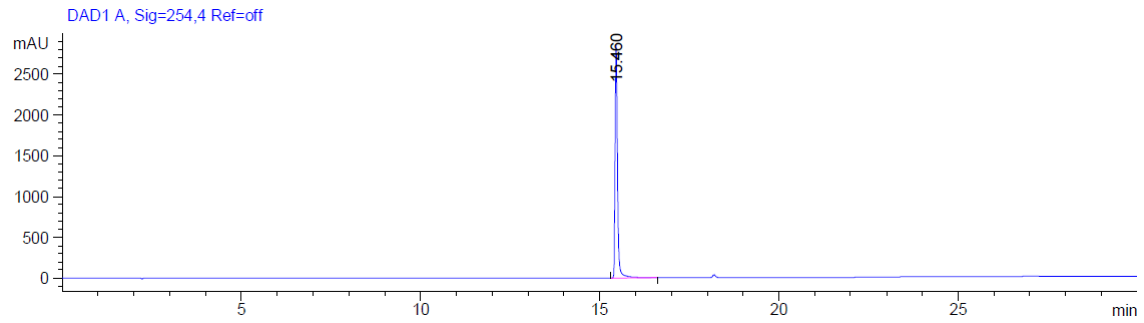
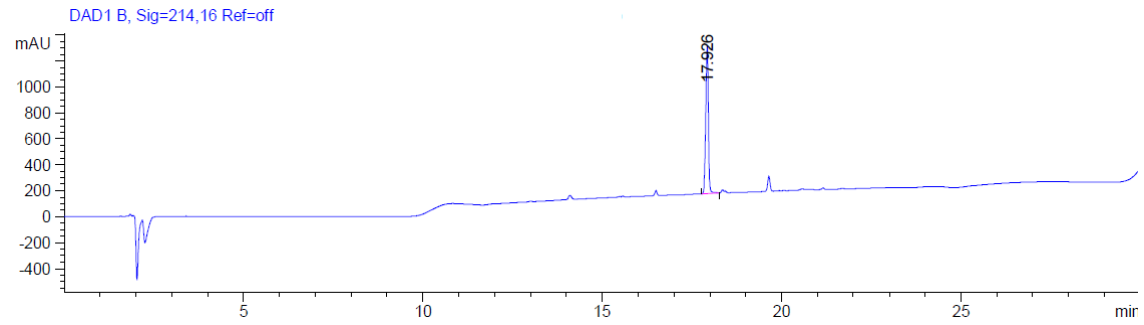
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

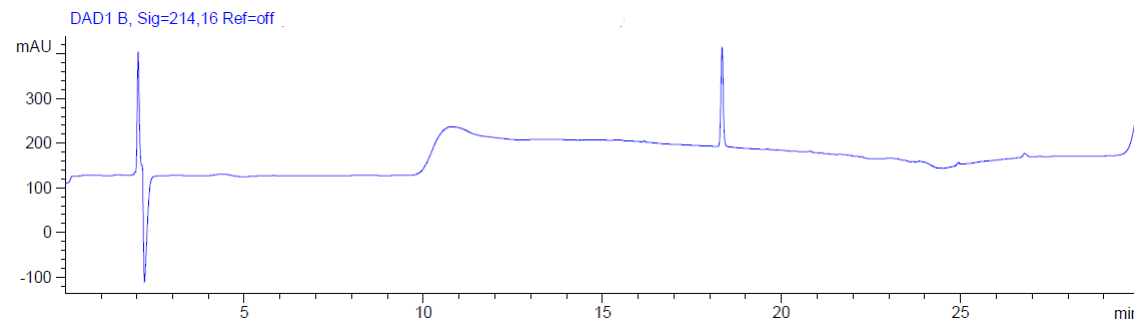
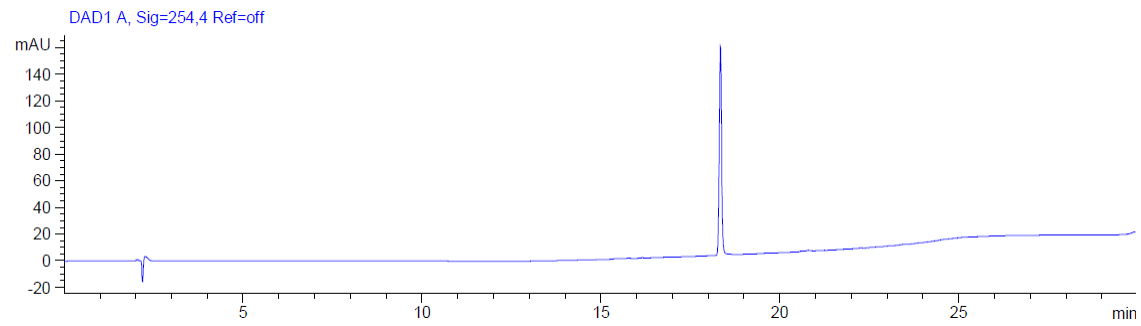
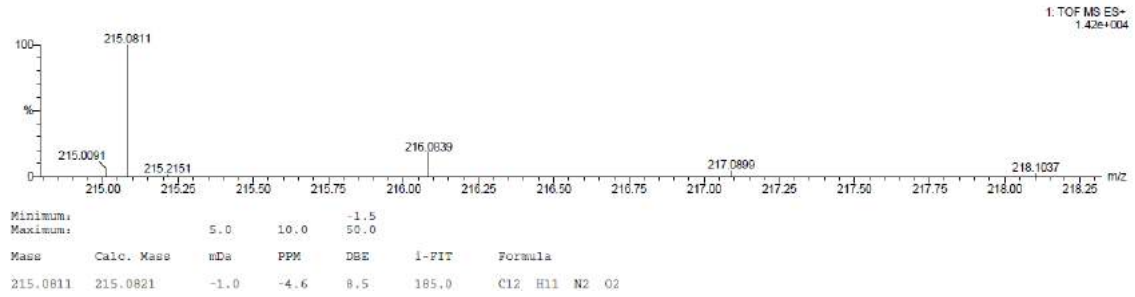
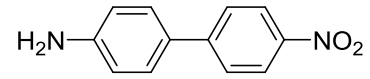
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.759	BV	0.1213	3258.78296	425.88437	93.6901
2	16.045	BE	0.0608	219.47511	54.71178	6.3099
Totals :				3478.25807	480.59615	

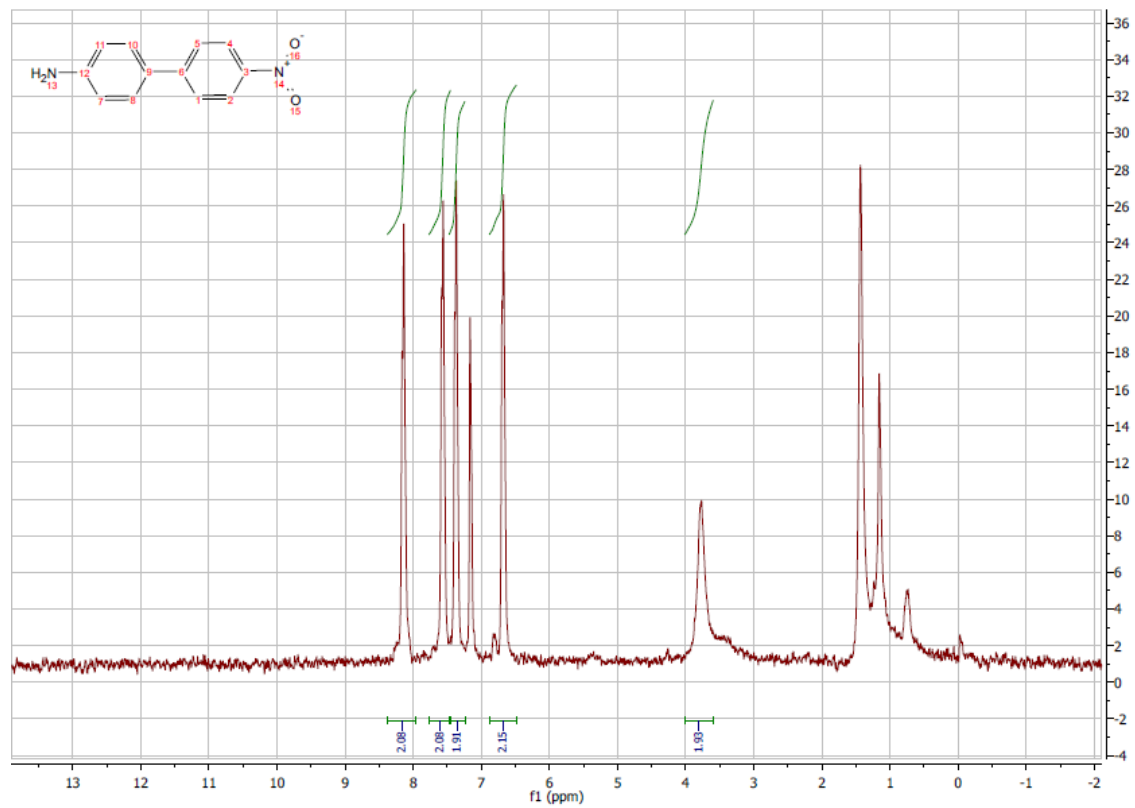
Signal 2: DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off

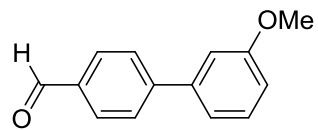
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.758	MM	0.1266	3804.71582	500.69781	94.6742
2	16.045	MM	0.0615	214.03210	57.97527	5.3258
Totals :				4018.74792	558.67308	



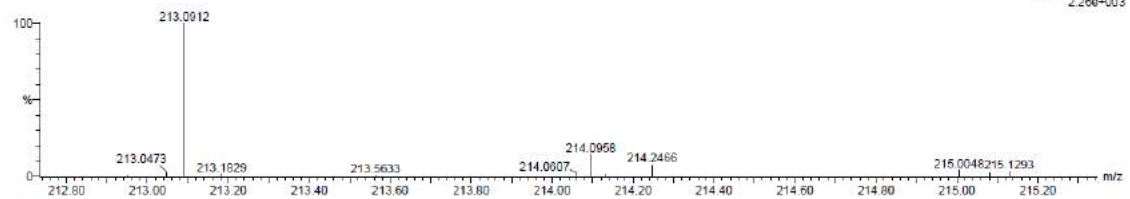






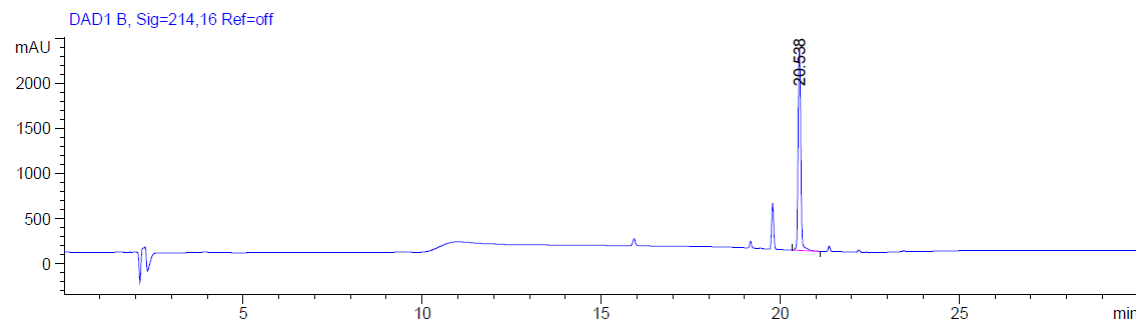
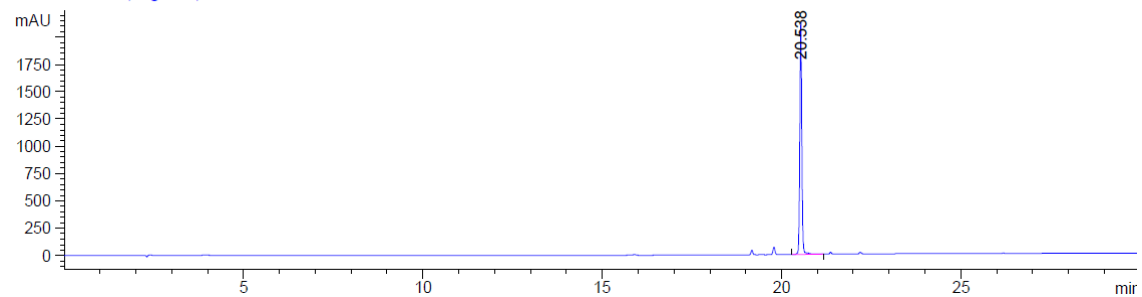


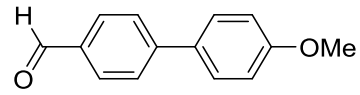
1: TOF MS ES+
2.26e-003



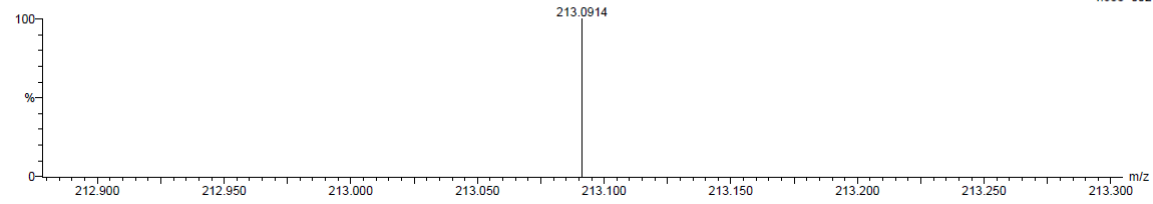
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBR	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
213.0912	213.0916	-0.4	-1.9	8.5	66.2	0.6	C14 H13 O2

DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off



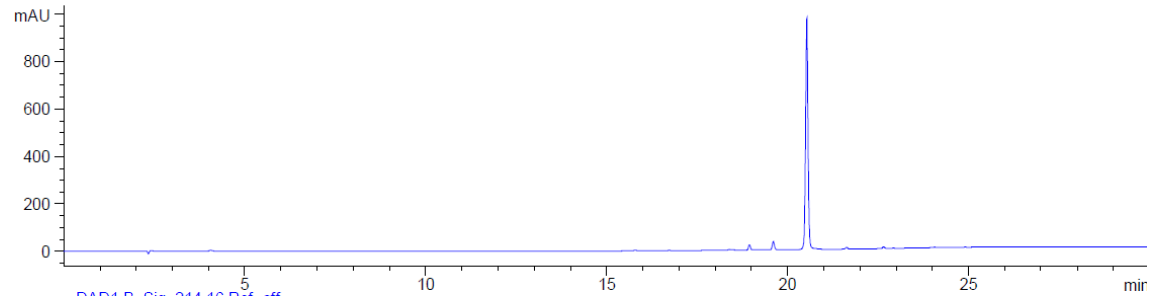


1: TOF MS ES+
4.65e+002

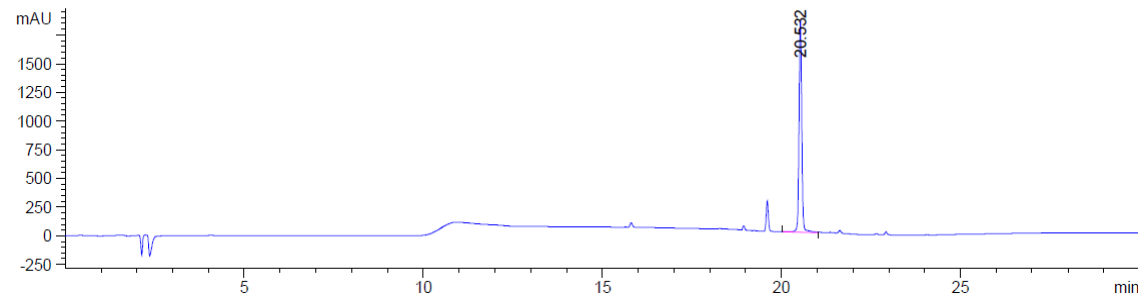


Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
213.0914	213.0916	-0.2	-0.9	8.5	21.1	0.0	C14 H13 O2

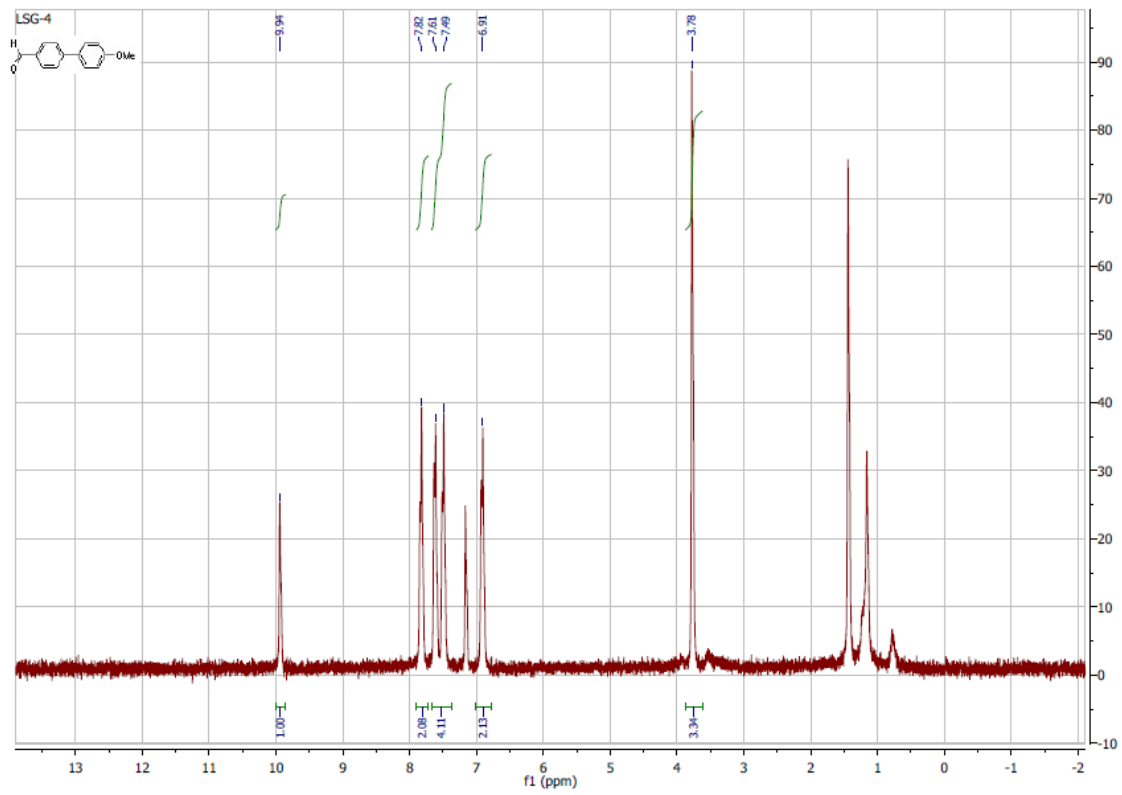
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

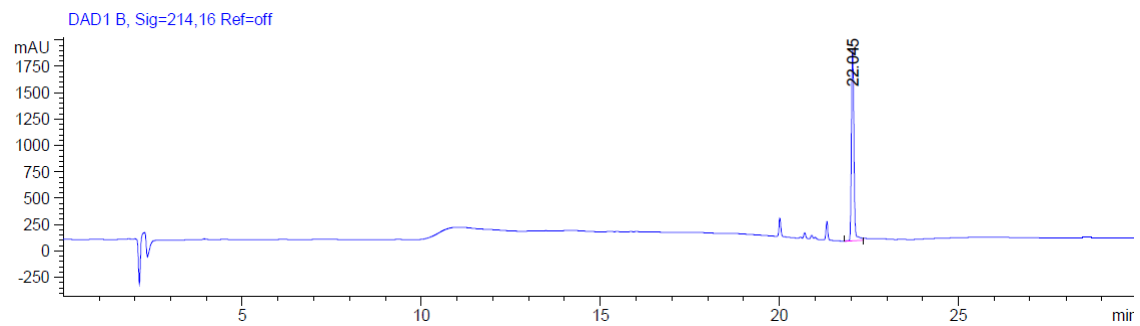
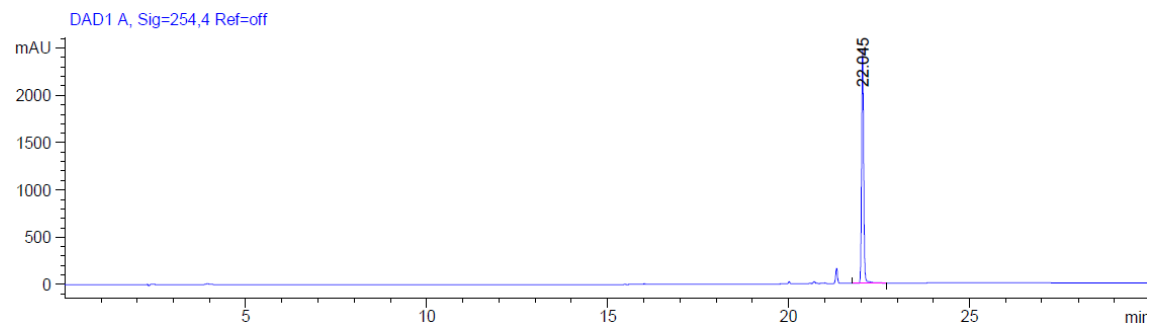
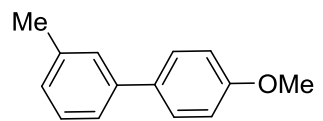


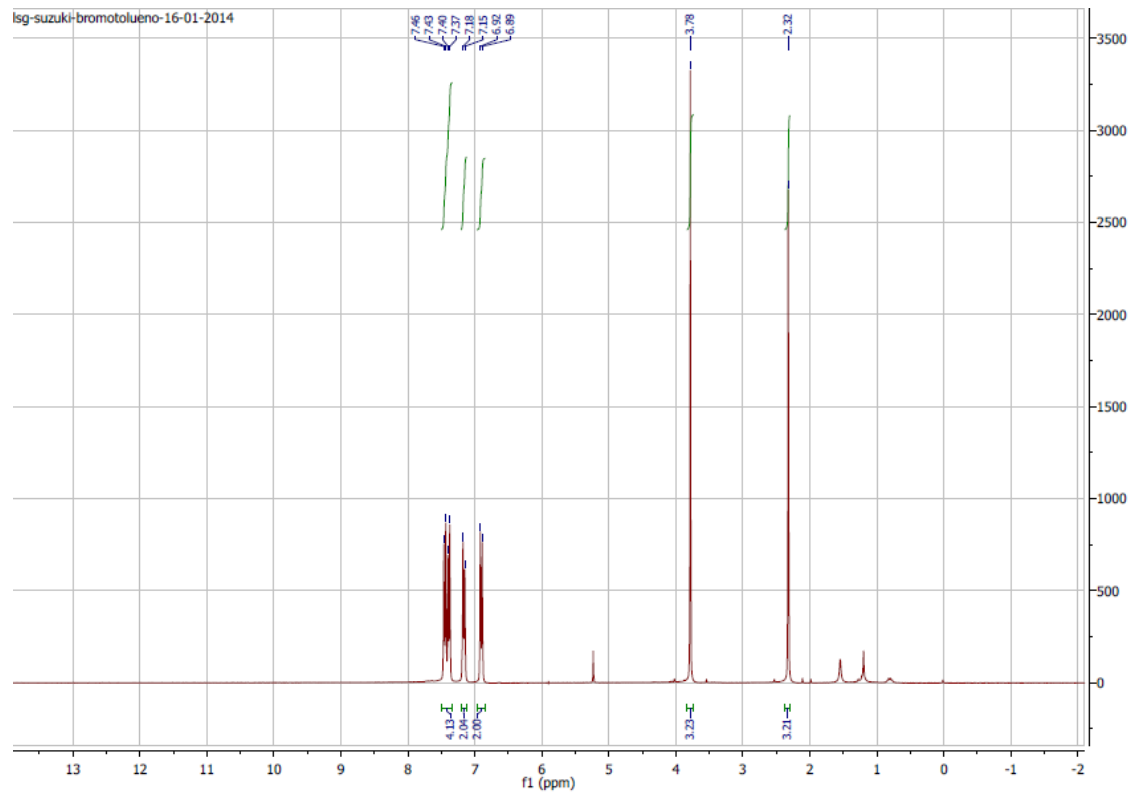
DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off

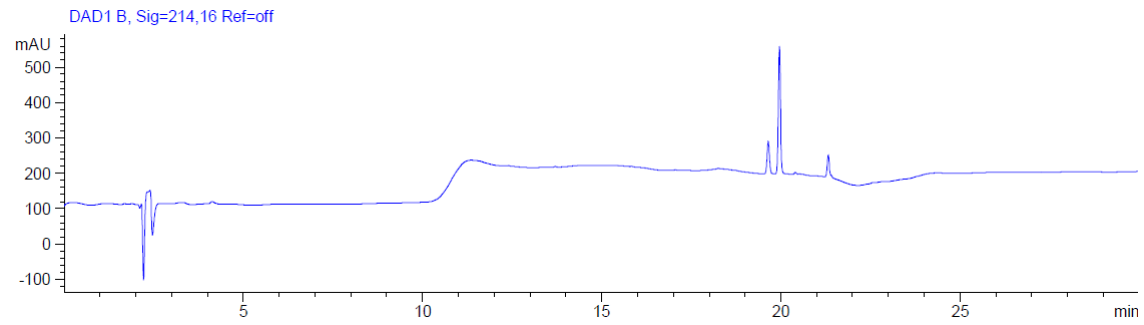
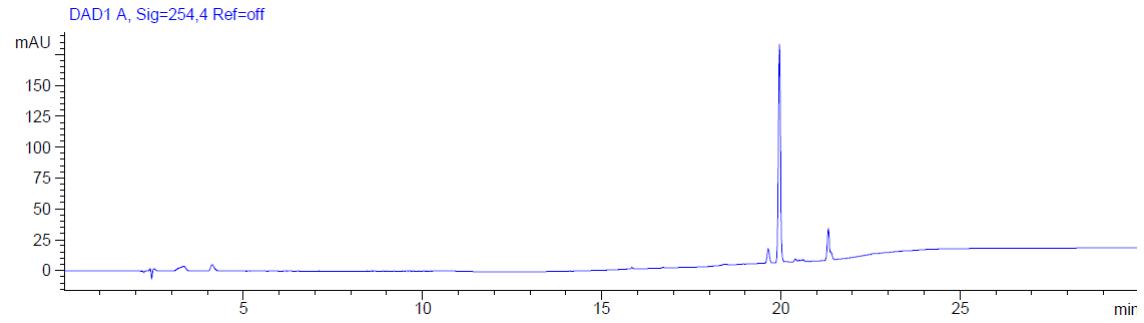
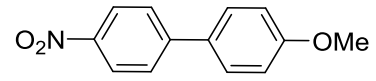


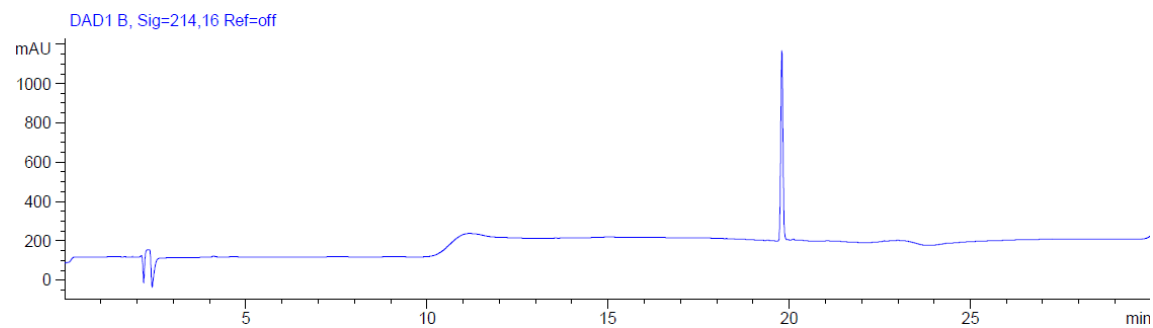
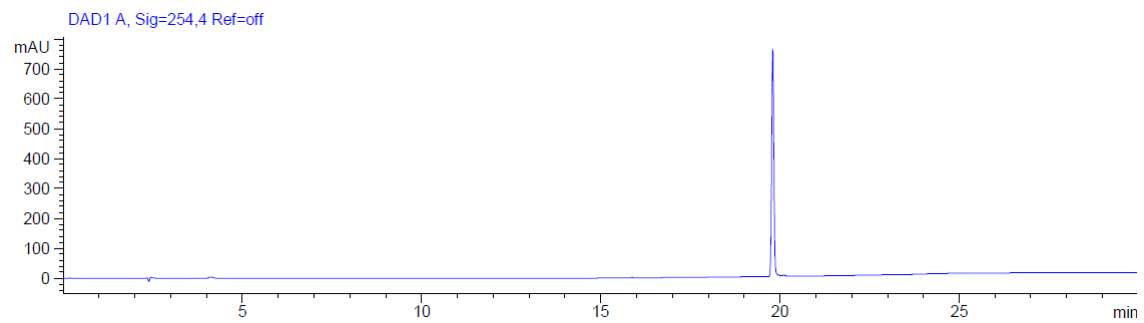
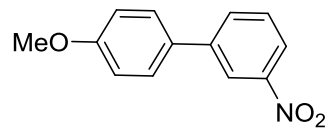
XX



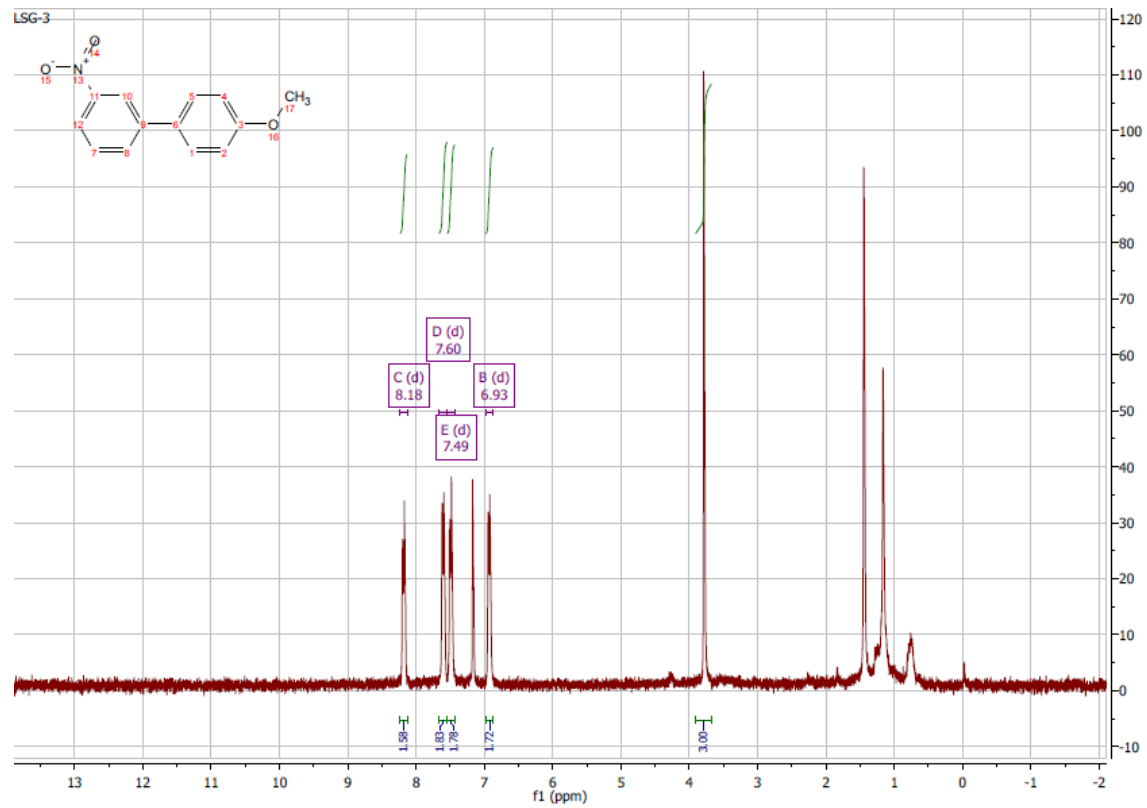


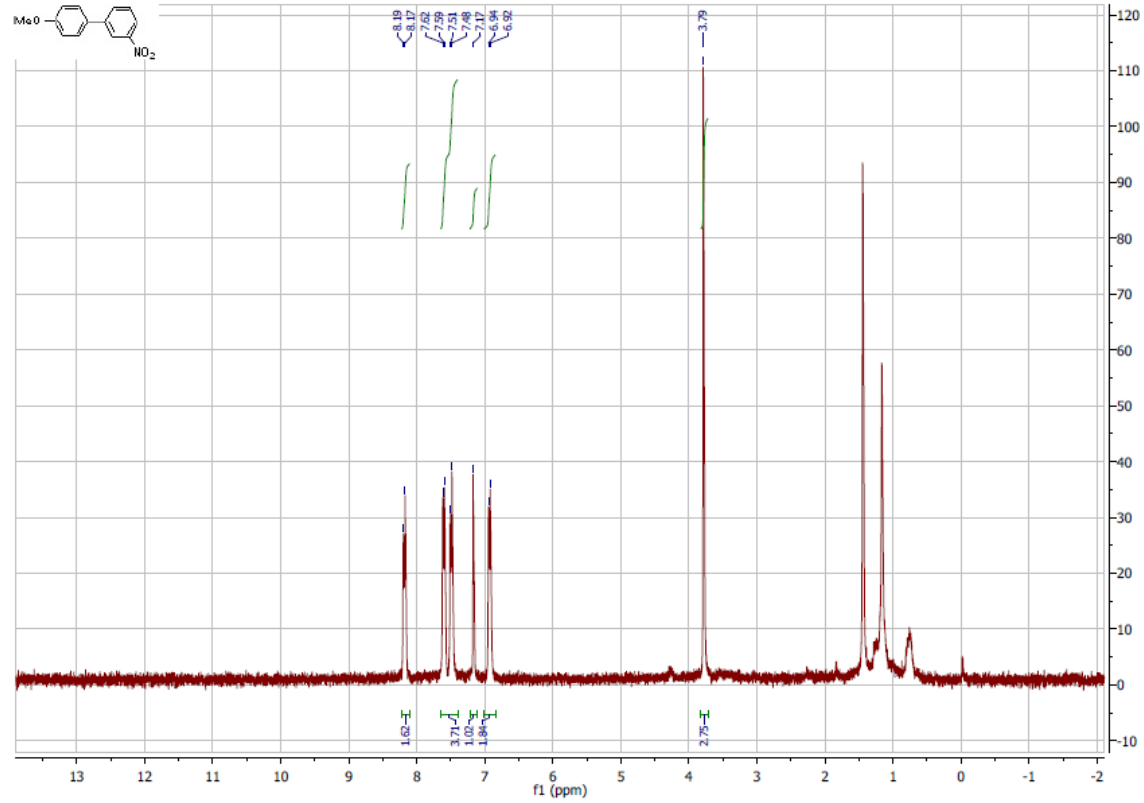


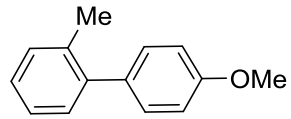




XXX







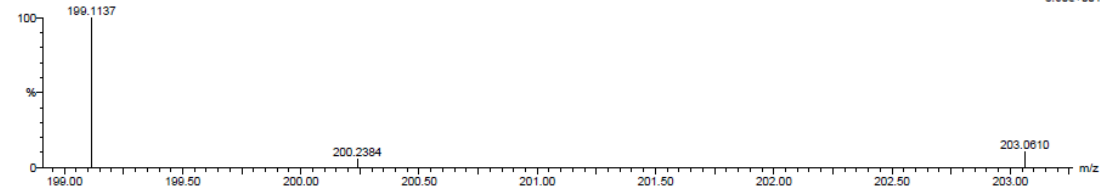
Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

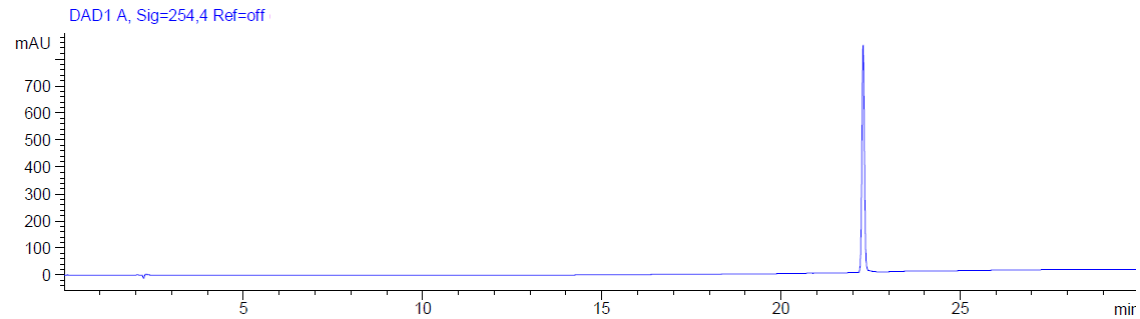
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for I-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 40 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 10-50 H: 0-200 O: 0-20 Na: 0-1
 LSG-1108-8 322 (1.255)

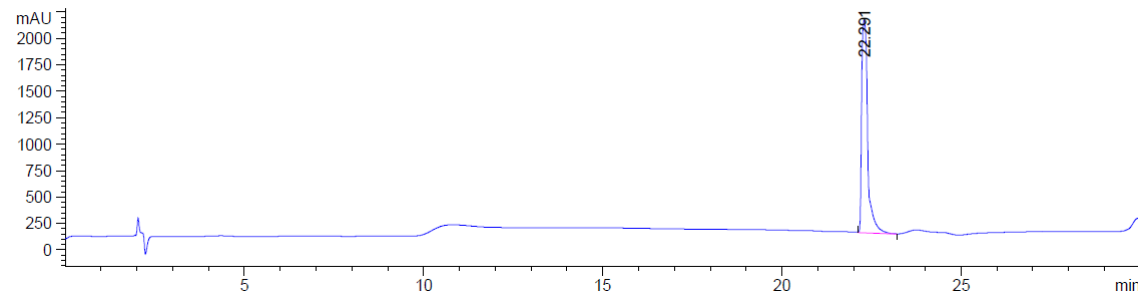
1: TOF MS ES+
 8.90e+001



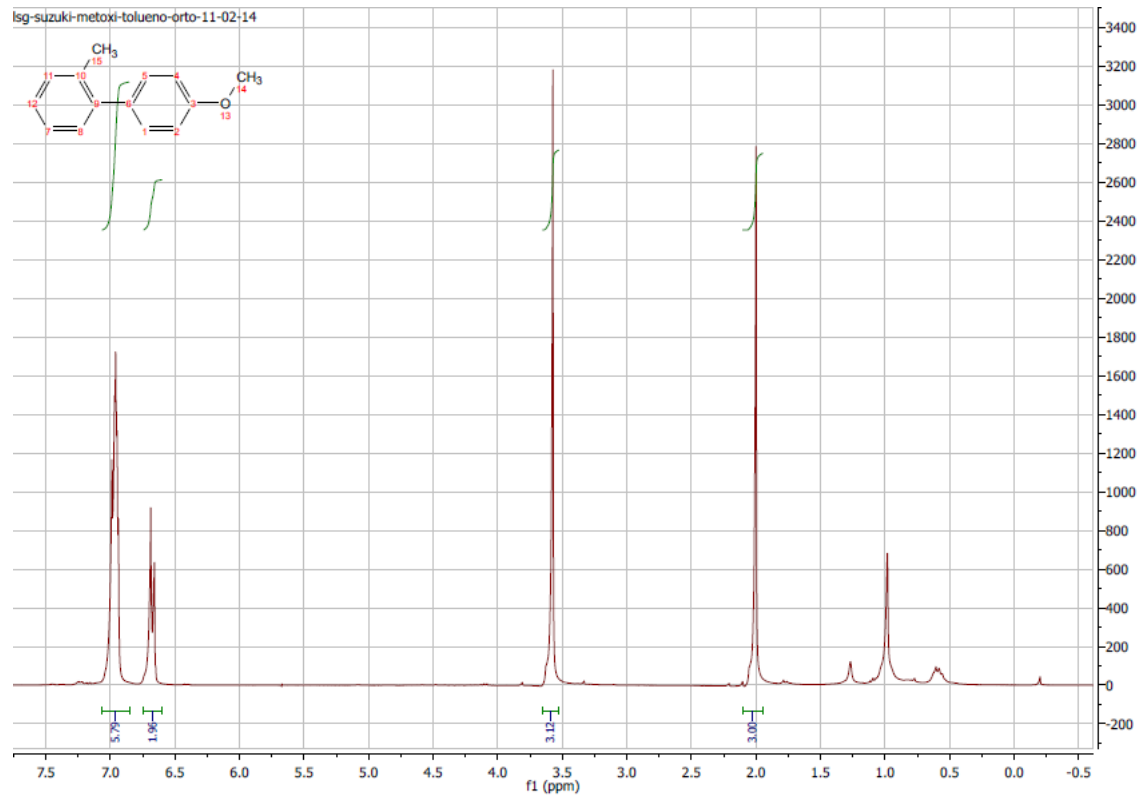
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
199.1137	199.1123	1.4	7.0	7.5	20.7	0.0	C14 H15 O

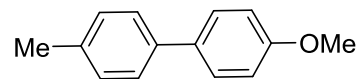


DAD1 B, Sig=214,16 Ref=off



XXX





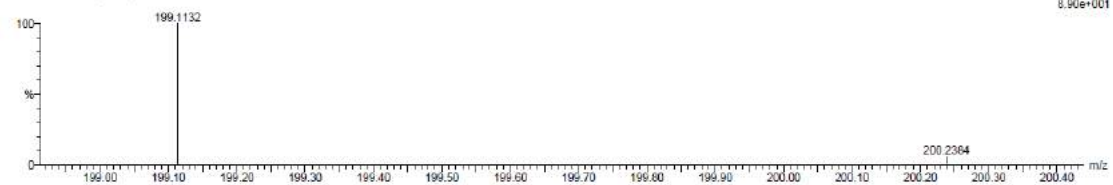
Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

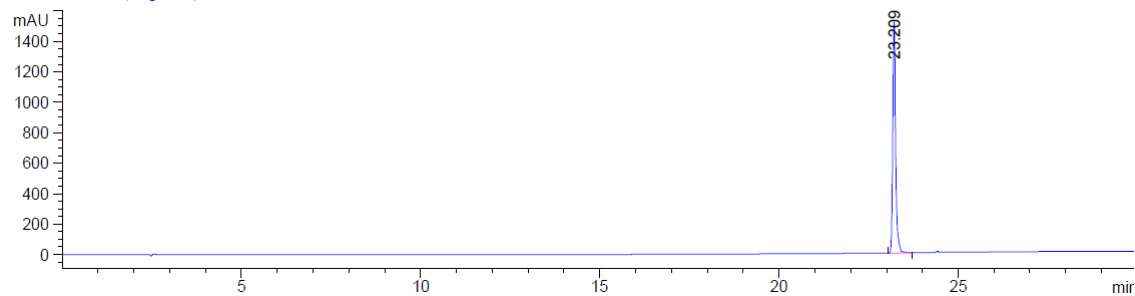
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 40 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 10-50 H: 0-200 O: 0-20 Na: 0-1
 LSG-1100-1 322 (1.255)

1: TOF MS ES-
 8.90e+001

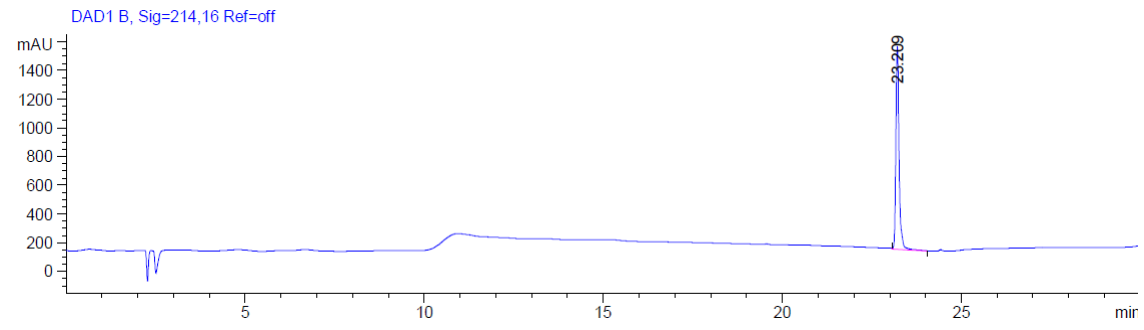


Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
199.1132	199.1123	0.9	4.5	7.5	21.1	6.0	C14 H15 O

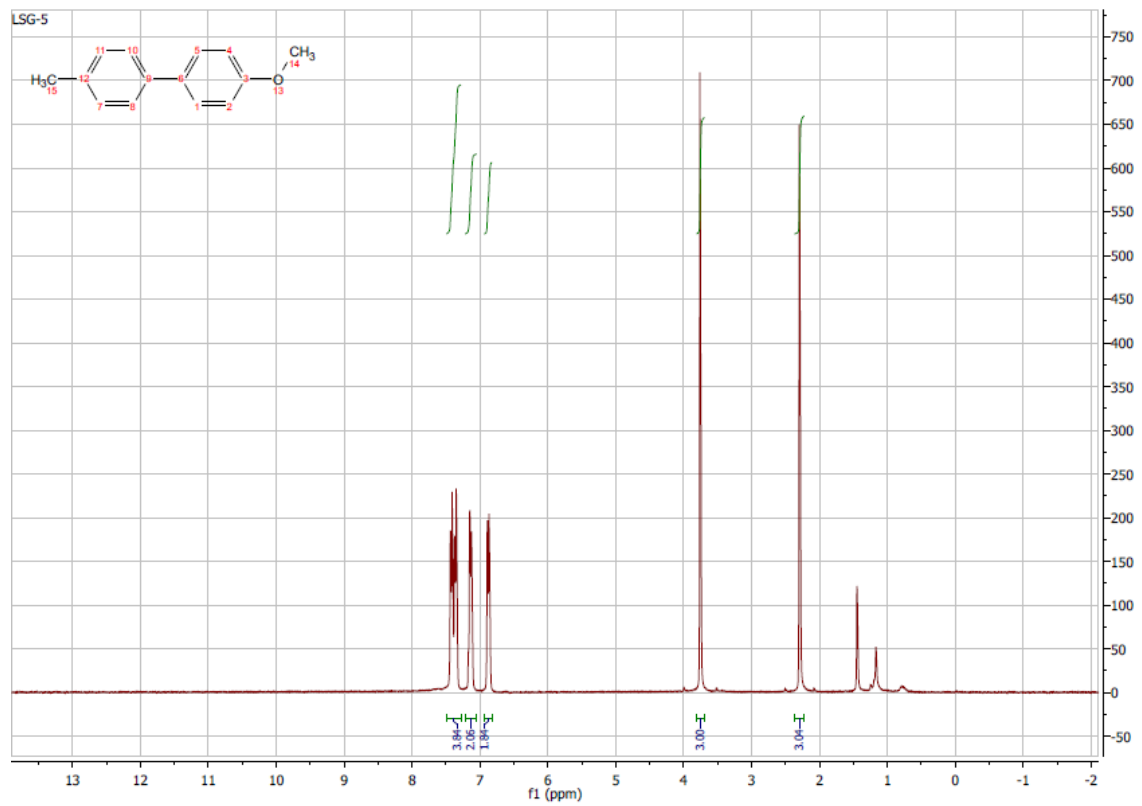
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off



XXXX



IIIXXX



CHAPTER III

ACTIVITY-BASED PROBES FOR SELECTIVE IN SITU MONITORING OF CASPASE-3

This work was funded by Ramon Areces Foundation of Spain, grant to the PhD. Ana María Pérez-López. I joined the project thanks to the short-term Fellowship for Pre-doctoral studies with code EEBB-I-13-07131 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The research was conducted in Mark Bradley Research Group under his supervision, in the School of Chemistry at the University of Edinburgh.

BACKGROUND AND INTRODUCTION

1. BACKGROUND

Caspase-3 is an executioner protease which orchestrates the cleavage of a cascade of proteins involved in cellular apoptosis. Here, a series of activity-based probes were designed and synthesised as selective sensors of caspase-3. Based on the caspase-3/7 cleavable sequence DEVD, a variety of well-established modifications over the positions 1', 2 and 3 were carried out in order to increase caspase-3 affinity. Since cellular access to such sensors can often be limited by their poor solubility they were conjugated to a peptide-based delivery system to allow efficient cellular delivery. The most selective activity-based probe (DLDPK) peptoid delivery system conjugated was able to quantify caspase-3 expressed in apoptotic cells. The ability to monitor, selectively, caspase-3 activity *in situ* has potential application for the imaging of multiple pathologies.

2. INTRODUCTION

Fluorescence is one of the most attractive molecular imaging modalities for the detection/analysis of biomolecules owing to its high sensitivity/selectivity, and aptness for living cells, and tissue^{1,2}.

Activity-based fluorescent probes have emerged as useful, accessible tools to enable the study of protease function *in vitro* and *in vivo* and have been used to help elucidate the roles of proteases in the progression of diseases such as in cancer³⁻⁸, neurodegenerative disorders⁹⁻¹², and sepsis^{13,14}. An important family of proteases are the caspases, which exist within cells as inactive zymogens with their cleavage giving active enzymes which initiate cellular apoptosis,¹⁵⁻¹⁹ the process of programmed cell death.²⁰⁻²² Inappropriate control of the apoptosis machinery has been implicated in many diseases,^{23,24} notably cancer.^{25,26}

One of the most important caspases is caspase-3, which specifically cleaves or activates many important cellular substrates as part of the apoptotic cascade.²³⁻²⁸ Caspase-3 is of particular interest because its decreased activity is a prognostic indicator of chemoresistance in cancer such as breast and ovarian.^{29,30} In this context, the ability to evaluate the activity of caspase-3 levels inside of cells would provide important predictive pharmacodynamics to identify patients for whom discontinuation of ineffective toxic treatments is warranted, for example, due to acquired drug resistance, and for monitoring the efficacy of a wide range of current and future anticancer drugs.³¹ Unfortunately, there exist a dearth of chemical tools to selectively monitor caspase-3 activity inside cells and *in vivo* due to its close homology with the executioner protease caspase-7.³²⁻³⁴

Current caspase-directed activity-based fluorescence probes are able to detect caspase activity *in situ* although, they display substantial promiscuity and cannot be used to monitor specific caspases within cells.^{35,36} These probes typically contain a four-residue peptide recognition sequence (e.g. Caspase-3/7: DEVD) established historically via combinatorial library optimization^{37,38} although assuming that all determinants of caspase specificity are provided by the X₁-X₄ positions,^{37,39} although more recently using mass spectrometry-

RESULTS AND DISCUSSION

3. RESULTS AND DISCUSSION

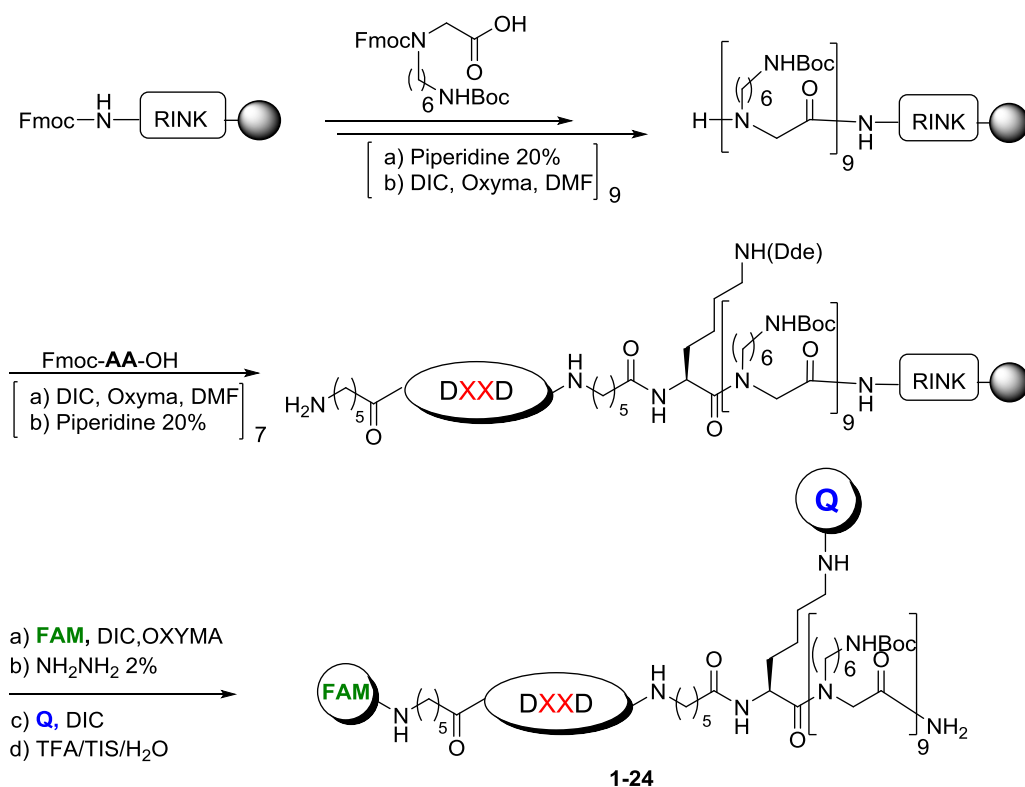
3.1. SYNTHESIS AND FRET PAIR OPTIMIZATION OF THE PROBE LIBRARY FOR CASPASE-3 DETECTION.

The synthesis of the generic FAM-Ahx-DXXD-Ahx-K(Quencher)-CPPM based probe is shown in **Scheme 1**. The cell penetrating peptide mimetic (CPPM) was synthesized using an Fmoc strategy with microwave assisted heating⁵⁰ using a Rink amide-functionalized aminomethyl polystyrene resin. The peptides were attachment directly to the CPPM delivery system using an orthogonal Fmoc/Dde approach allowing multi-point labeling of the peptides (carboxyfluorescein at the amino terminus, while after Dde deprotection the quencher was coupled to the free amino group of lysine) before TFA mediated cleavage of the peptide from the resin. The peptides were purified by HPLC to give the desired sensors **1-24** (**Table 1**). Tetrapeptides **5-14** containing d-amino acids (**15-24**), were synthesized as negative controls.

Table 1. 24-member FRET probe library based on FAM-Ahx-Sequence-Ahx-K(Quencher)-CPPM

Probe	Sequence	Quencher	Probe	Sequence	Quencher
1^a	DEVD	MR	8/18	DNVD/dnvd	MR
2^a	DEVD	TAMRA	9/19	DVVD/dvvd	MR
3^a	DEVD	BHQ1	10/20	DGPD/dGpd	MR
4^a	DPVD	MR	11/21	DAPD/dapd	MR
5/15	DGVD/dGvd	MR	12/22	DLPD/dlpd	MR
6/16	DAVD/davd	MR	13/23	DNPD/dnpd	MR
7/17	DLVD/dlvd	MR	14/24	DVPD/dvpd	MR

^a This previous work was carried out by Emma R. Marsden and Ana María Pérez-López (PhD at Mark Bradley Research Group).



Scheme 1. General synthesis of the library of caspase-3 activity-based fluorescence probes.

To optimize caspase-3 probes, fluorescence studies were undertaken to determine the most suitable quencher for fluorescein. Three different quenchers were evaluated, Methyl Red (**MR**), **TAMRA** and **BHQ1**^a, with the fluorescence increase after cleavage of the probe based on the peptide sequence **DEVD** (the established cleave sequence for caspase-3/-7) was determined with recombinant human caspase-3 and 7. The most efficient FRET pair was Methyl Red/Carboxyfluorescein which showed a $ca \approx 5$ -fold increase in fluorescence following treatment with caspase-3 and -7 (**Figure 2**), whilst other FRET pairs did not demonstrate any significant fluorescence increase.

^a This previous work was carried out by Emma R. Marsden and Ana María Pérez-López (PhD at Mark Bradley Research Group).

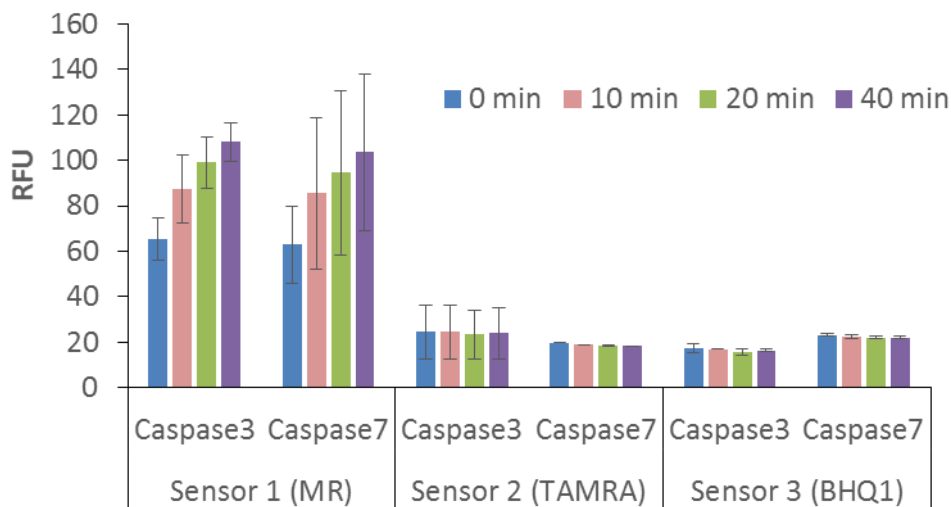


Figure 2. Relative fluorescence increase of FRET probes **1**, **2** and **3** (6 μ M) after incubation with caspase-3 and -7 (20 nM) at 0, 10, 20 and 40 min (n = 3).

3.2. LOOKING FOR SELECTIVE TETRA-PEPTIDE SEQUENCES TOWARDS CASPASE-3 BY X_2 AND X_3 AMINO ACIDS MODIFICATIONS

In order to improve selectivity towards caspase-3 function (over caspase-7) a variety of permutations of the well-known peptide cleavage sequence “DEVD” was explored. Previous reports have demonstrated that all caspase-3-sensitive sequences contain an Asp residue, assigned as position X_1 , and 80% contained an Asp residue at the X_4 position. The frequency of occurrence of amino acids at the X_3 and X_2 positions being much more variable, with no clear preference being detected at the X_3 position, although about 20% of the sequences contained Glu at this position and about 15% Phe or Val. It is known that approximately 40% of caspase-3-sensitive sequences contain Val at the X_2 position.⁵¹ However, substitution of Pro at the X_2 position to increase specificity for caspase-3 over caspase-7 is consistent with results from small-molecules microarrays (SMMs) previously published.⁵² Therefore, the X_3 and X_2 modifications of the DEVD sequence were carried out to enable the selective sequences for caspase-3 to be determined. Thus the X_3 position was exchanged to Pro, Gly, Ala, Leu, Asn and Val, based on previous publications, and the X_2 position was fixed as Val (sensors **1-9**) or Pro (sensors **10-14**) (**Table 1**).^{52,53} All of the tetra-peptide permutation sequences were attached to the CPPM delivery system.

3.3. KINETIC STUDIES OF THE FRET PROBE LIBRARY FOR CASPASE-3/-7

Kinetic studies were performed by incubating caspase-3 and 7 with all sensors at 37 °C, with the changes in fluorescence intensity monitored over time, in the presence of increasing concentrations of sensor DXVD and DXPD (data was analyzed using non-linear regression analysis *via* GraphPad Prisma 5 and gave the

kinetic parameters K_M and k_{cat}). None of the d-amino acids containing sequences (X-Y) or sensor **4** (DPVD), which has a Pro residue at position X_3 showed any change in fluorescence intensity over time.

Comparison of the kinetic parameters for the library (DXVD) shows that although, the majority of the X_3 perturbations had lower catalytic efficiencies for caspase-7 than caspase-3, the improved selectivity was never more than 5-fold higher (DGVD (**5**)). The only sensor which showed improved selectivity towards caspase-7, was DAVD (**6**) (k_{cat} $1.4 \mu M^{-1} min^{-1}$ for caspase-7 and k_{cat} $0.7 \mu M^{-1} min^{-1}$ for caspase-3).

The kinetic parameters of the library based on DXPD showed that substitution of proline at the X_2 position increased specificity for caspase-3 over caspase-7 consistent with results published previously.⁵² As expected, all of the DXPD probes demonstrated better catalytic efficiency for caspase-3 versus caspase-7 in all cases better affinity (lower K_M) and larger k_{cat} towards caspase-3. Leu or Val at the X_3 position ((**12**) and (**14**)) showed the better results compared to Asn (**13**). DLPD (**12**) ($k_{cat}/K_M = 5.8 \mu M^{-1} min^{-1}$) and DVPD (**14**) ($k_{cat}/K_M = 8.1 \mu M^{-1} min^{-1}$) showing much greater selectivity for caspase-3 (4- and 6-fold higher k_{cat}/K_M , respectively) compared to the conventional sequence DEVD ($k_{cat}/K_M = 1.4 \mu M^{-1} min^{-1}$).

Table 2. Kinetic analysis of probes **1**, **5-14** ($n = 3$) with caspase-3 and caspase-7.

Probe	Caspase-3			Caspase-7		
	K_M (μM)	K_{cat} (min^{-1})	$\frac{K_{cat}}{K_M}$ ($\mu M^{-1} min^{-1}$)	K_M (μM)	K_{cat} (min^{-1})	$\frac{K_{cat}}{K_M}$ ($\mu M^{-1} min^{-1}$)
1	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.04	1.4	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.1
5	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.03	1.7	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3
6	1.5 ± 0.4	1.1 ± 0.1	0.7	14.0 ± 3.4	19.2 ± 1.6	1.4
7	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.1
8	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.04	2.0	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.03	1.3
9	1.8 ± 0.4	1.4 ± 0.1	0.8	4.1 ± 0.6	1.8 ± 0.1	0.4
10	0.7 ± 0.4	0.55 ± 0.2	0.8	0.3 ± 0.05	0.2 ± 0.01	0.6
11	0.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	3.4	4.9 ± 2.1	1.6 ± 0.3	0.3
12	0.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	5.8	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.07	0.7
13	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.2	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.06	0.8
14	0.2 ± 0.04	1.7 ± 0.1	8.1	3.6 ± 0.9	1.4 ± 0.2	0.4

All sensors based on DXPD showed rapid enzymatic cleavage by caspase-3 (Figure 1S, supplementary documents). The cleavage of all sensors showed much slower rates with caspase-7, showing little increments in fluorescent signal after 2 hours. The percentage of fluorescence increment after incubation with caspase-7 during 2 h (assuming 100% fluorescence signal after incubation with caspase-3) was around 50% for DAPD (**11**) or DVPD (**14**) and for sensors DLPD (**12**) or DNPD (**13**) was only 20%.

Due to the kinetic studies showed better selectivity towards caspase-3 at low enzyme concentrations and to confirm how specific were our library of sensors (**DXP**) for caspase-3 versus caspase-7, all of them were incubated with high concentration of enzyme (caspase-3 or -7 at 0.4 μM) and analysed by MALDI-TOF mass spectrometry. All the sensors were cleaved by caspase-3 at X_1 position as expected and original peaks for **DXP**-CPPM disappeared after 2h, however they were cleaved partially by caspase-7 at high concentration. After 2 hours caspase-7 incubation, sensors **DAPD** (**11**), **DLPD** (**12**), **DNPD** (**13**) and **DVPD** (**14**) original m/z peak corresponding to **DXP**-CPPM (about 18%, 33%, 35% and 18% of total ions, respectively) were detected by mass spectrometry. Surprisingly, these sensors were cleaved at X_1' position (an additional aminohexanoic acid) instead of X_1 by caspase-7 as it shows in the **Figure 3B** for sensor **12** (**Figure 2S-4S**, supplementary documents).

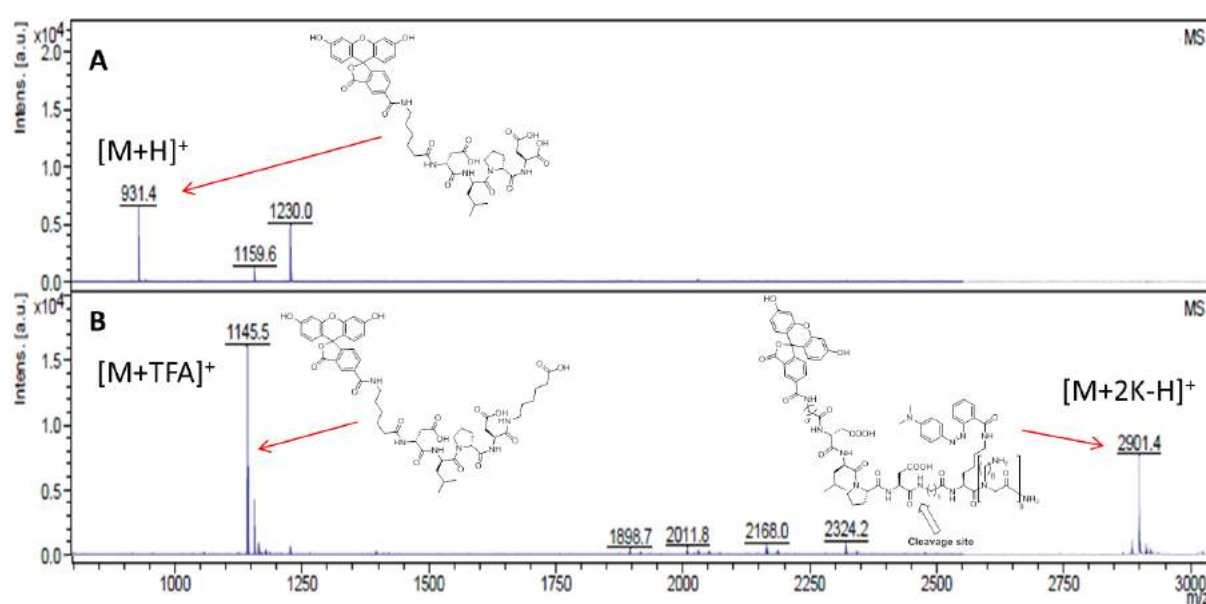


Figure 3. MALDI-TOF-MS spectrum of sensor **DLPD**-CPPM (**12**) sequence at 20 μM in the presence of caspase-3 (**A**) / 7 (**B**) (0.4 μM) after 2 hours incubation.

3.4. INCREASED SPECIFICITY FOR CASPASE-3

Sensor **DLPD** (**12**) was selected as the most specific for caspase-3 due to its kinetic parameters at low concentrations (k_{cat} 5.8 $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ for caspase-3 and k_{cat} 0.7 $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ for caspase-7), and the cleavage yield at high concentrations by mass spectrometry (100% cleavage yield at X_1 position by caspase-3 and 65% cleavage yield at X_1' position by caspase-7). As far as, this sensor was still able to be cleaved by caspase-7 at X_1' position and in order to block this position, different strategies were carried out. Sensor **DLPD** (**12**) was resynthesized using 1) d-Lys or N-Methyl-Lys as a quencher supporter, and 2) changing of Ahx position in the sequence to **DLPD**-Lys-Ahx instead of **DLPD**-Ahx-Lys (following SPPS procedure used before, **Scheme 1**). Three novel sensors were synthesized (**25-27**) with **DLPD** sequence as the caspase-3 recognized tetra-peptide sequence.

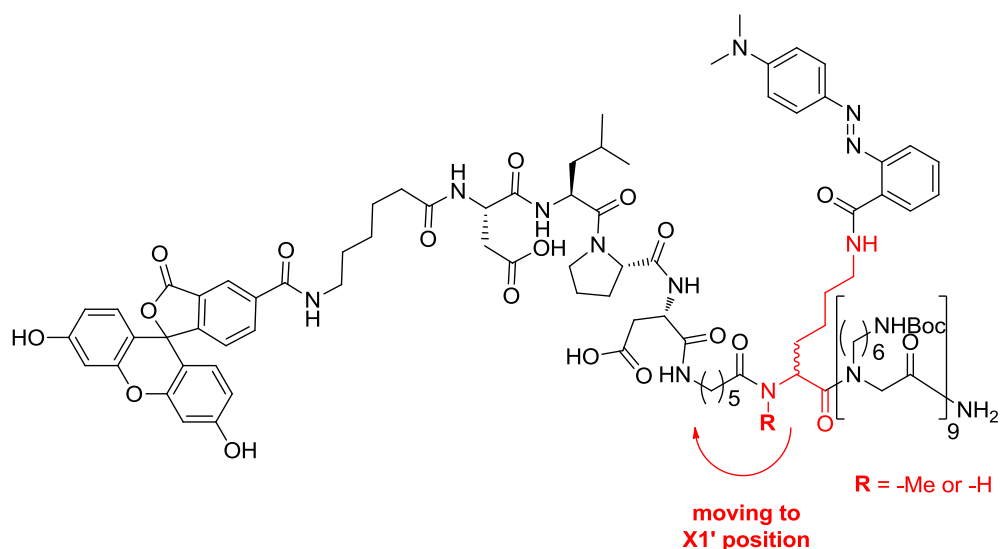


Figure 4. Structural modifications of sensor DLPD-CPPM (**12**): FAM-DLPD-Ahx-dLys(MR)-CPPM (**25**), FAM-DLPD-Ahx-Lys(Me)-CPPM (**26**) and FAM-DLPD-Lys(MR)-Ahx-CPPM (**27**).

Finally, kinetic studies were performed with sensors **25-27** (data analyzed using non-linear regression analysis *via* GraphPad Prisma 5). Sensor **27** had a K_M of $1.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$, k_{cat} of $2.1 \pm 0.8 \text{ min}^{-1}$ and a catalytic efficiency (K_{cat}/K_M) of $0.5 \pm 0.08 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ for caspase-3. Caspase-7 did not show any cleavage of the probe. As long as sensor **25** was cleavage by caspase-3 and -7 indiscriminately, sensor **26** was not cleavage at all for any of these caspases (**Figure 5S-6S**, supplementary documents). Fortunately, sensor **27** FAM-DLPD-Lys(MR)-Ahx-CPPM, showed the most specific activity against caspase-3 and it was not cleaved at all by caspase-7 at low/high concentrations. In the **Figure 5**, MALDI-TOF mass spectrometry is showed for caspase-3/-7 at high concentrations ($0.3 \mu\text{M}$).

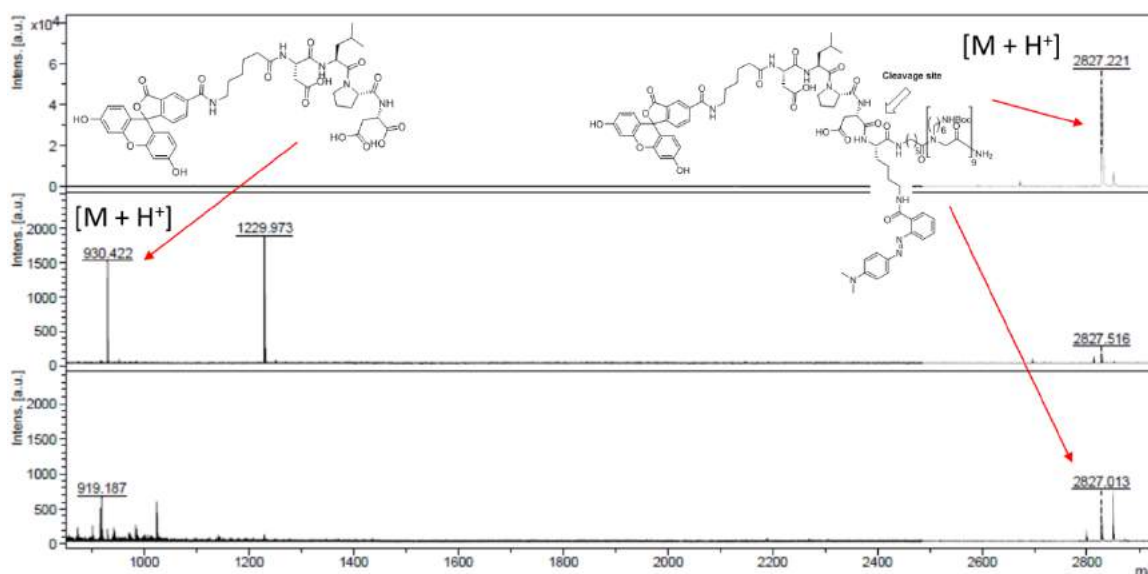


Figure 5. MALDI-TOF of sensor **27** (10 μ M) (A) and sensor **27** (10 μ M) + Cas-3 (B) or -7 (C) after 120 min incubation. Caspase concentrations were at 0.3 μ M.

3.5. DETERMINING CASPASE-3 ACTIVITY IN CELLS.

Caspase-3 activity inside HEK cells was evaluated with probe **27**. The desired sensors were attached to a carrier system to enable them to cross the cell membrane, while cell apoptosis was induced by the well-known protein kinase inhibitor staurosporine (STS), which activates caspase-3. All probes were observed to be nontoxic at the concentrations tested (10 μ M).

The selective sensor for caspase-3 (**27**) showed a 2.5-fold higher increase in the fluorescence intensity subsequent apoptosis stimulation by staurosporine addition. When sensor **27** was added to cells that had not been treated with staurosporine the peptide substrate was not cleaved. The increment of fluorescence intensity for sensor **27** (DLPDK) is an indicator of an improvement in the selectivity if we compared to the sensor **12** (DLPD) which cleavage non-specifically. Therefore, these results show that sensor **27** (DLPDK), which demonstrates a great specificity to caspase-3, displayed less MFI increment due to the cleavage was carried out only by caspase-3. However, this sensor **27** (DLPDK) still kept acceptable fluorescence intensity increment for quantification. This thus enables the sensitive detection of caspase-3 activity. Histograms (see **Figure 6**) present the difference in fluorescence of untreated cells and treated cells with sensor **27** clearly show a significant fluorescence increment after cleavage.

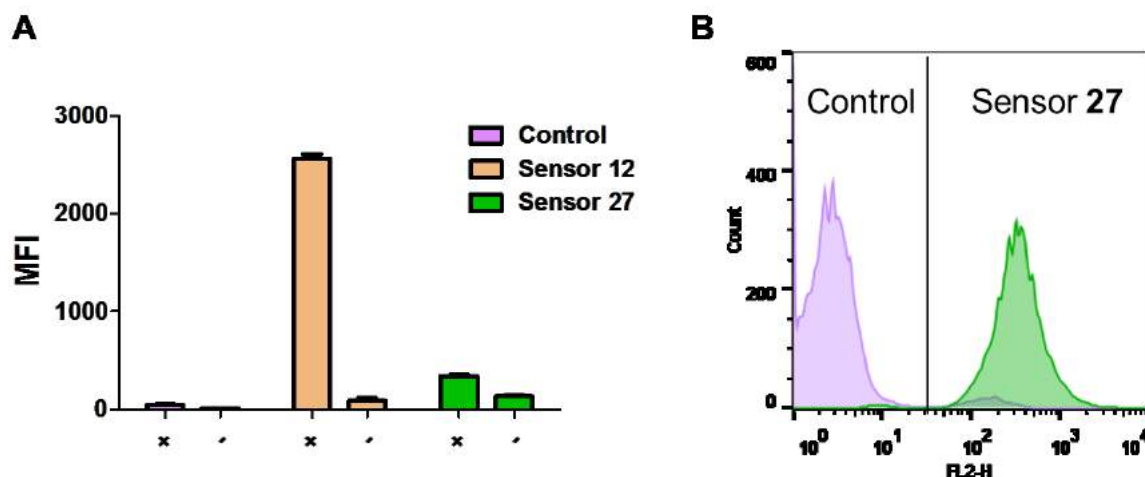


Figure 6. (A) Mean Fluorescence Intensity increment of untreated HEK cells (-) and HEK cells with Staurosporine (+) with sensors **12** and **27** at 10 μ M (n = 3). (B) Histograms of HEK cells untreated as a control (violet) and HEK cells treated with sensor **27** at 10 μ M + STS (green).

3.6. QUANTIFICATION OF ACTIVE CASPASE-3 IN LIVE CELLS

The fluorescence increase, as measured by flow cytometry with the most selective sensors for caspase-3 **DLPDK (27)** allows an estimation of the amount of caspase-3 in an apoptotic cell (Supplementary documents). These calculations suggest that the concentration of caspase-3 in apoptotic cells is approximately 0.55 ± 0.02 nM in the execution phase of apoptosis.⁵⁴ Active caspase concentrations are also staurosporine concentration and incubation time dependents. Despite these proteases (caspase-3 and -7) presented nearby concentrations in cells, exhibit clear differences in their activity; in general the majority of the substrates studied (e.g. XIAP, Bid or gelsolin) have been more efficiently cleaved by caspase-3 than caspase-7, therefore caspase-3 is consider as an important proteases involves in different cellular functions.⁵⁵

3.7. LIVE FLUORESCENCE IMAGING OF APOPTOTIC CELLS

The biocompatibility of the probe allows explore their potential in live-cell imaging of caspase-3 activation. To support our findings based on flow cytometry analysis, HEK cells which were treated with sensors **1**, **6**, **27**, were analyzed by confocal microscopy. All of these sensors showed a fluorescence increment in the cytoplasm of apoptotic cells after Staurosporine incubation (**Figure 10S**, Supplementary documents). As can be seen in **Fig. 7A-C**, cells treated with **27** and induced to undergo apoptosis, the sensor was cleaved and fluorescence was detected in the cytoplasm. This suggests that the apoptosis-sensing probe was cleaved by caspase-3 when apoptosis was induced. None of control d-amino acid-probes (**15-24**) showed any fluorescence inside cells after incubation with Staurosporine.

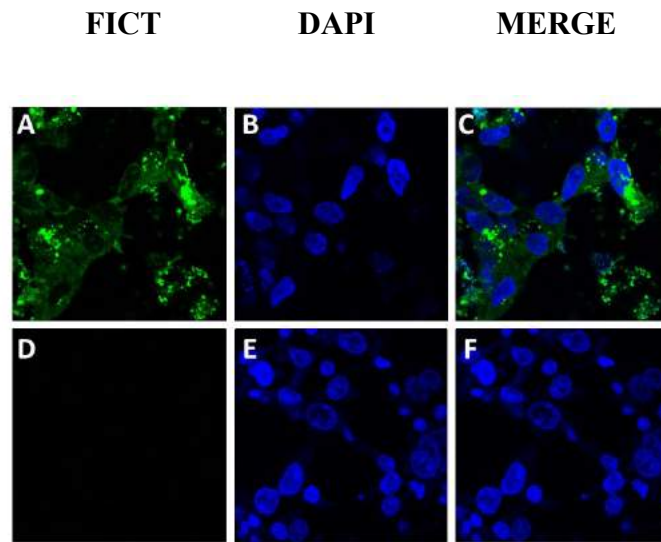


Figure 7. Confocal microscopy images of HEK cells with 10 μ M of sensor 27 (DLDPK). (A, B, C) sensor 27 in cells treated with Staurosporine at 1 μ M and (D, E, F) sensor 27 in cells without Staurosporine.

EXPERIMENTAL

4. EXPERIMENTAL

4.1. SOLID-PHASE SYNTHESIS OF DXXX-CPP⁴⁹.

A highly-optimised microwave-based solid-phase strategy was used to synthesise the cell penetrating peptides. An aminomethyl-PS (% DVB) resin functionalised with a Rink amide type linker was used for the synthesis of the peptides. An Fmoc-based reaction scheme was followed to obtain the desired sensors as described below.

4.1.1. COUPLING THE FMOC-AMINO ACIDS AND FLUOROPHORES.

The resin (1 eq) was pre-swollen in DCM, washed with DMF which was added a pre-activated mixture of the carboxylic acid (3 eq) and DIC/oxyma (3 eq of each) in DMF. This reaction mixture (0.1 M in amino acid) was stirred in the microwave for 20 minutes at 60°C.

4.1.2. FMOC-DEPROTECTION

The resin was stirred with 20% piperidine in DMF for 10 minutes, washed with DMF and treated again with 20% of piperidine in DMF. The reaction mixture was again stirred for 10 minutes at room temperature before washing the resin with DMF, DCM and MeOH.

4.1.3. Dde DEPROTECTION

Hydrazine 2% (v/v) was added to the resin and reaction shaken for 10 minutes (x2). The resin was then washed using DMF, DCM and MeOH.

4.1.4. CLEAVAGE WITH TRIFLUOROACETIC ACID

A solution of TFA/TIS/DCM (90:5:5) was added to the resin (20 µL of the cleavage cocktail per mg of resin) and left to shake for 5 hours before washing with DCM. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and the desired compound precipitated using diethyl ether.

4.2. KINETIC ASSAYS WITH CASPASE-3/-7.

One unit of caspase-3/7 (R and S system, MN, USA) was added to 100 µL of Caspase assay buffer with the probes (**1-14**) at concentrations from 8 µM to 0.1 µM in a 96-well plate. The final concentration of caspase-3/7 was 20 nM (**1-9**) or 15 nM (**10-14**). Fluorescence signals were collected on a Biotek Synergy HT Plate Reader. Control samples had the same composition but no enzyme. All experiments were measured at excitation/emission wavelengths of 485/528 nm with measures obtained for each concentration of the substrate, every 2 min (n = 3). The rate (µM/min) was calibrated using a 5(6)-carboxyfluorescein conversion

factor (0.0055 $\mu\text{M}/\text{RFU}$) and data plotted against time (min). For initial cleavage rate (0-5 min), plots were fitted using linear regression analysis and the Michaelis-Mente data generated using GraphPad Prism 5.

4.3. CELL CULTURE CONDITIONS AND GENERAL PROTOCOL FOR CELLULAR UPTAKE EXPERIMENT

Cells were cultured in DMEM supplemented with 4 mM glutamine containing high glucose (4.5 mg/mL) and supplemented with 100 units/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin and 25 mg/mL amphotericin B, and 10% FBS. The cells were maintained in an incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

4.3.1. CELL VIABILITY WAS MEASURED USING AN MTT ASSAY⁵⁶.

Using HeLa and HEK cells with 10 μM samples tested overnight.

4.3.2. APOPTOSIS INDUCTION.

HEK cells were seeded onto a 48-well plate at a density of 4×10^4 cells per mL. After 12 hours, the media was removed and replaced with fresh media containing samples (**1-14**) at 10 μM , and selected wells were treated with Staurosporine (1 μM). After 5 hours, cells were washed twice with PBS, detached with trypsin/EDTA, harvested with 2% fetal bovine serum (FBS) in PBS supplemented with Trypan Blue (0.04%) for analysis on a BD FACS Aria[®] flow cytometer. For confocal microscopy, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and the nuclei stained with Hoechst-33342 (1% w/v in PBS). Cellular fluorescence of cells was analysed using an Inverted Leica DM IRB with filter I3 (450-490 nm) and a Leica SP5 Confocal (FICT and DAPI channel).

CONCLUSION

5. CONCLUSION

A library of probes for monitoring the enzymatic activity of caspase-3 *in situ* was synthesized with permutations of the X₂ and X₃ positions of the sequence DEVD, showing improved selectivity for caspase-3 versus caspase-7. The probes based on, DXPD demonstrated greater selectivity for caspase-3 over 7 (with which it shares 77% active site identify). To improve the specificity towards caspase-3, the sequence was also modified at X₁, getting the best selectivity with the sequence DLPDK-Ahx (sensor **27**). When used with HEK cells, **27** showed a 2.5-fold fluorescent increase after cleavage and was able to measure Caspase-3 enzymatic activity inside cells *in situ* in real-time. This allowed crude quantification of enzymatic activity and concentration of the enzyme per cell ($\approx 0.55 \pm 0.02$ nM). Further work is aimed at the use of *in vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) imaging techniques, especially for cancer NIRF molecular imaging which requires stable, highly specific and sensitive molecular probes.

REFERENCES

- 1 E. Dean, A. Greystoke, M. Ranson and C. Dive, *Exp Cell Res*, 2012, **318**, 1252–1259.
- 2 H. Chen, H. Yuan, L. Josephson and D.E. Sosnovik, *Theranostics*, 2012, **2**, 148–155.
- 3 F.Y. Tsai, D.C. Greenbaum, J.H. Hager, M. Bogyo and D. Hanahan, *Cancer Cell*, 2004, **5**, 443–453.
- 4 A.E. Speers and B.F. Cravatt, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 535–546.
- 5 M.G. Paulick and M. Bogyo, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2008, **18**, 97–106.
- 6 L.E. Edgington, A.B. Berger, G. Blum, V.E. Albrow, M.G. Paulick, N. Lineberry and M. Bogyo, *Nat. Med.*, 2009, **15**, 967–973.
- 7 D.K. Nomura, M.M. Dix and B.F. Cravatt, *Nat. Rev. Cancer*, 2010, **10**, 630–638.
- 8 L.E. Edgington, M. Verdoes, A. Ortega, N.P. Withana, J. Lee, S. Syed, M.H. Bachmann, G. Blum and M. Bogyo, *M. J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 174–182.
- 9 R.K. Graham, Y. Deng, E. Slow, B. Haigh, N. Bissada, G. Lu, J. Pearson, J. Shehadeh, L. Bertram, Z. Murphy, S.C. Warby, C.N. Doty, S. Roy, C.L. Wellington, B.R. Leavitt, L.A. Raymond, D.W. Nicholson and M.R. Hayden, *Cell*, 2006, **125**, 1179–1191.
- 10 M.J. Leyva, F. Degiacomo, L.S. Kaltenbach, J. Holcomb, N. Zhang, J. Gafni, H. Park, D.C. Lo, G.S. Salvesen, L.M. Ellerby and J.A. Ellman, *Chem. Biol.*, 2010, **17**, 1189–1200.
- 11 L.E. Edgington, B.J. van Raam, M. Verdoes, C. Wierschem, G.S. Salvesen and M. Bogyo, *Chem. Biol.*, 2012, **19**, 340–352.
- 12 M. D’Amelio, M. Sheng and F. Cecconi, *Trends Neurosci.*, 2012, **35**, 700–709.
- 13 R.S. Hotchkiss, K.C. Chang, P.E. Swanson, K.W. Tinsley, J.J. Hui, P. Klender, S. Xanthoudakis, S. Roy, C. Black, E. Grimm, R. Aspiotis, Y. Han, D.W. Nicholson and I.E. Karl, *Nat. Immunol.*, 2000, **1**, 496–501.
- 14 R.S. Hotchkiss and D.W. Nicholson, *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, **6**, 813–822.
- 15 A. Porter, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 509–510.
- 16 J.C. Timmer and G.S. Salvesen, *Cell Death Differ.*, 2007, **14**, 66–72.
- 17 A.U. Luthi, and S.J. Martin, *Cell Death Differ.*, 2007, **14**, 641–650.
- 18 P. Van Damme, L. Martens, J. Van Damme, K. Hugelier, A. Staes, J. Vandekerckhove and K. Gevaert, *Nat. Methods*, 2005, **2**, 771–777.
- 19 U. Fischer, R.U. Janicke and K. Schulze-Osthoff, *Cell Death Differ.*, 2003, **10**, 76–100.

- 20 M.J. Arends and A.H. Wyllie, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 1991, **32**, 223-254.
- 21 R.E. Ellis, J.Y. Yuan and H.R. Horvitz, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1991, **7**, 663-698.
- 22 S. Tanuma, In *Apoptosis in Normal Development and Cancer*; Sluysers, M., Ed.; Taylor and Francis: London, **1996**; pp 39–59.
- 23 C.B. Thompson, *Science*, 1995, **267**, 1456-1462.
- 24 D.W. Nicholson, *Nature*, 2000, **407**, 810-816.
- 25 A.H. Wyllie, C.O. Bellamy, V.J. Bubb, A.R. Clarke, S. Corbet and L. Curtis, *Br. J. Cancer*, 1999, **80**, 34-37.
- 26 C.S. Potten and C. Booth, *Comp Biochem Physiol.*, 1997, **118**, 473-478.
- 27 D.R. Green, *Cell*, 2000, **102**, 1–4.
- 28 M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata, *Nature*, 1998, **391**, 43–50.
- 29 E. Devarajan, A.A. Sahin, J.S. Chen, R.R. Krishnamurthy, N. Aggarwal, A.M. Brun, A. Sapino, F. Zhang, D. Sharma, X.H. Yang, A.D. Tora and K. Mehta, *Oncogene*, 2002, **21**, 8843–8851.
- 30 H. Ai, K.L. Hazelwood, M.W. Davidson and R.E. Campbell, *Nat. Methods*, 2008, **5**, 401–403.
- 31 A.P. Savitsky, A. L. Rusanov, V. Zherdeva, T. Gorodnicheva, M.G. Khrenova and A.V. Nemukhin, *Theranostics*, 2012, **2**, 215-226.
- 32 D. Demon, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, A. Deceuninck, J. Van Durme, J. Verspurten, K. Helsens, F. Impens, M. Wejda, J. Schymkowitz, F. Rousseau, A. Madder, J. Vandekerckhove, W. Declercq, K. Gevaert and P. Vandenabeele, *Mol Cell Proteomics*, 2009, **12**, 2700-2714.
- 33 M. Lamkanfi, T.D. Kanneganti, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, I. Vanoverberghe, J. Vandekerckhove, P. Vandenabeele, K. Gevaert and G. Nunez, *Mol. Cell. Proteomics*, 2008, **7**, 2350–2363.
- 34 K. Kuida, T.S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic and R.A. Flavell, *Nature*, 1996, **384**, 368–372.
- 35 J. Agniswamy, B. Fang and I.T. Weber, *FEBS J.*, **2007**, **274**, 4752–4765.
- 36 G.P. McStay, G.S. Salvesen and D.R. Green, *Cell Death Differ.*, 2008, **15**, 322–331.
- 37 N.A. Thornberry, T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman and D.W. Nicholson, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 17907–17911.

- 38 M. Germain, E.B. Affar, D. D'Amours, V.M. Dixit, G.S. Salvesen and G.G. Poirier, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 28379–28384.
- 39 S. Mahrus, J.C. Trinidad, D.T. Barkan, A. Sali, A.L. Burlingame and J.A. Wells, *Cell*, 2008, **134**, 866–876.
- 40 M.M. Dix, G.M. Simon and B.F. Cravatt, *Cell*, 2008, **134**, 679–691.
- 41 A.J. O'Donoghue, A.A. Eroy-Reveles, G.M. Knudsen, J. Ingram, M. Zhou, J.B. Statnekov, A.L. Greninger, D.R. Hostetter, G. Qu, D.A. Maltby, M.O. Anderson, J.L. Derisi, J.H. McKerrow, A.L. Burlingame and C.S. Craik, *Nat. Methods*, 2012, **9**, 1095–1100.
- 42 J.M. Cardenas-Maestre, A.M. Perez-Lopez, M. Bradley, R.M. Sanchez-Martin, *Macromol. Biosci.*, 2014, **14**, 923-928.
- 43 M. Garcia-Calvo, E.P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D.W. Nicholson and N.A. Thornberry, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 32608-32613.
- 44 W. Yang, J. Guastella, J.C. Huang, Y. Wang, L. Zhang, D. Xue, M. Tran, R. Woodward, S. Kasibhatla, B. Tseng, J. Drewe and S.X. Cai, *Br. J. Pharmacol.*, 2003, **140**, 402-412.
- 45 Y. Han, A. Giroux, E.L. Grimm, R. Aspiotis, S. Francoeur, C.I. Bayly, D.J. McKay, S. Roy, S. Xanthoudakis, J.P. Vaillancourt, D.M. Rasper, J. Tam, P. Tawa, N.A. Thornberry, E.P. Paterson, M. Garcia-Calvo, J.W. Becker, J. Rotonda, D.W. Nicholson and R. Zamboni, *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 805-808.
- 46 J.W. Becker, J. Rotonda, S.M. Soisson, R. Aspiotis, C. Bayly, S. Francoeur, M. Gallant, M. Garcia-Calvo, A. Giroux, E. Grimm, Y. Han, D. McKay, D.W. Nicholson, E. Peterson, J. Renaud, S. Roy, N. Thornberry and R. Zamboni, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 2466-2474.
- 47 N. Micale, R. Vairagoundar, A.G. Yakovlev and A.P. Kozikowski, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 6455-6458.
- 48 B. Laxman, D.E. Hall, M.S. Bhojani, D.A. Hamstra, T.L. Chenevert, B.D. Ross and A. Rehemtulla, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 2002, **99**, 16551-16555.
- 49 M.A. Fara, J.J. Diaz-Mochon and M. Bradley, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 1011-1014.
- 50 A. Unciti-Broceta, F. Diezmann, C.Y. Ou-Yang, M.A. Fara and M. Bradley, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **3**, 959-966.
- 51 S. Lien, R. Pastor, D. Sutherlin and H.B. Lowman, *Protein J.*, 2004, **23**, 413-425.
- 52 H. Wu, J. Ge, P. Yang, J. Wang, M. Uttamchandani and S. Yao. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 1946-1954.
- 53 K. Boulware and P. Daugherty, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 2006, **103**, 7583-7588.

- 54 M. Brentnall, L. Rodriguez-Menocal, R. Ladron De Guevara, E. Cepero and L.H. Boise, *BMC Cell Biology*, 2013, **14**, 32.
- 55 J.G. Walsh, S.P. Cullen, C. Sheridan, A.U. Luthi, C. Gerner and S.J. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 2008, **105**, 12815-12819.
- 56 T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55-63.

SUPPLEMENTARY DOCUMENTS

Supplementary documents

1. General information	III
2. Characterisation of the compounds synthesized	IV
3. Kinetics studies of the FRET probe library for Caspase-3/-7	V
4. Cell viability assays	XI
5. Localization of apoptotic cells by flow cytometry	XI
6. Quantification of active caspase-3 concentration in apoptotic cells	XII
7. Fluorescence microscopy of cells	XIV

1. GENERAL INFORMATION

All solvents and reagents were obtained from commercial suppliers and used without purification, unless otherwise stated.

Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight (MALDI-TOF) mass spectra were performed using a Bruker UltraflexExtreme MALDI TOFTOF instrument and analysed with the Bruker Daltonics flexAnalysis software. For peptoid analysis, sinapic acid was used as a matrix and positive ion mass spectra were reported.

Low resolution electrospray mass spectrum (ES/MS) was recorded on an Agilent Technologies LC/MSD 1100 Quadrupole Mass Spectrometer (QMS) with an electrospray ion source.

Microwave reactions were carried out using a Biotage Initiator instrument in sealed heavy-walled Pyrex tubes (Biotage AB, size 5 mL or 20 mL).

Fluorescence spectrophotometry was performed on a Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader from BioTek. Reader control is via BioTek's Gen5™ Data Analysis Software.

High pressure liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on an Agilent 1100 analytical system using the following eluents:

A: H₂O + 0.1% FA

B: MeOH + 0.1% FA

Analytical HPLC were performed on Supelco Discovery® C18, 5 µm, 5 cm column coupled to a Polymer laboratories 100 ES evaporative light scattering detector (ELSD). HPLC grade eluents was employed, at a flow rate of 1 mL/min., eluting with eluents A and B, 5 to 95% B over 8 min, then 95% B for 1 min.

Semi-preparative reverse phase-HPLC purifications were performed on an Eclipse XDB-C18 column (9.4 x 250 mm, 5 µm), at a flow rate of 2 mL/min. Detection was carried out at 254 nm. The following gradient was used: 5 to 50 % A over 6 min, 50 to 100% B for 30 min.

Cell cultures were performed in a Heracell 150 incubator from Heraeus.

Cell experiments were carried out in a Herasafe KS 18 class II negative-flow cabinet from Heraeus.

Cell viability was assessed using a BioTek microplate reader Synergy HT measuring absorbance at 490 and 630 nm.

Microscopy of live cells was imaged on a Leica fluorescence microscope (DM IRB) under bright light and the desired excitation wavelength (Filter I3 (450-490 nm)). Leica SP5 Confocal (FICT and DAPI channel).

Flow cytometry was performed on a BD FACS Aria® System using the BD FACS Diva® software. The data were analysed using the software Flowjo® 7.5.

2. CHARACTERISATION OF THE COMPOUNDS SYNTHESIZED

Probe	Sequence	MW [calc.]	MALDI-TOF	ELSD purity (%)
1	DEVd	(M+H) ⁺ 2845.8	2845.1	100
2	DEVd	(M+H) ⁺ 2837.7	2837.1	92
3	DEVd	(M+H) ⁺ 2883.7	2883.9	75
4	DPVd	(M+H) ⁺ 2813.8	2813.3	93
5	DGVd	(M+H) ⁺ 2774.6	2774.2	97
6	DAVd	(M+H) ⁺ 2788.6	2788.3	99
7	DLVd	(M+H) ⁺ 2829.8	2829.4	96
8	DNVd	(M+H) ⁺ 2829.8	2829.4	98
9	DVVd	(M+H) ⁺ 2816.6	2816.3	99
10	DGPD	(M+TFA-H) ⁺ 2881.7	2881.6	93
11	DAPD	(M+TFA-H) ⁺ 2895.7	2895.5	95
12	DLPD	(M+TFA-H) ⁺ 2937.8	2934.3	90
13	DNPD	(M+TFA-H) ⁺ 2938.7	2937.4	94
14	DVPD	(M+TFA-H) ⁺ 2923.7	2923.0	100
15	dGvd	(M+Na+K) ⁺ 2832.7	2832.4	100
16	davd	(M+Na+K) ⁺ 2847.7	2847.5	100
17	dIvd	(M+Na+K) ⁺ 2889.7	2889.3	100
18	dNvd	(M+Na+K) ⁺ 2890.7	2890.3	100
19	dVvd	(M+Na+K) ⁺ 2875.7	2875.4	100
20	dGpd	(M+Na+K) ⁺ 2831.7	2831.4	100
21	dApd	(M+Na+K) ⁺ 2845.7	2845.5	100
22	dIpd	(M+Na+K) ⁺ 2887.7	2887.4	100
23	dNpd	(M+Na+K) ⁺ 2888.7	2888.3	100
24	dVpd	(M+Na+K) ⁺ 2873.7	2873.4	100
25	DLPD-Ahx-k	(M + H) ⁺ 2827.7	2827.5	100
26	DLPD-Ahx-K(Me)	(M + 2Na - H) ⁺ 2633.6	2633.2	100
27	DLPD-K-Ahx	(M + H) ⁺ 2827.7	2827.7	100

Table 1S. MALDI-TOF-MS and HPLC (ELSD) analysis of sensors.

3. KINETIC STUDIES OF THE FRET PROBE LIBRARY FOR CASPASE 3/7

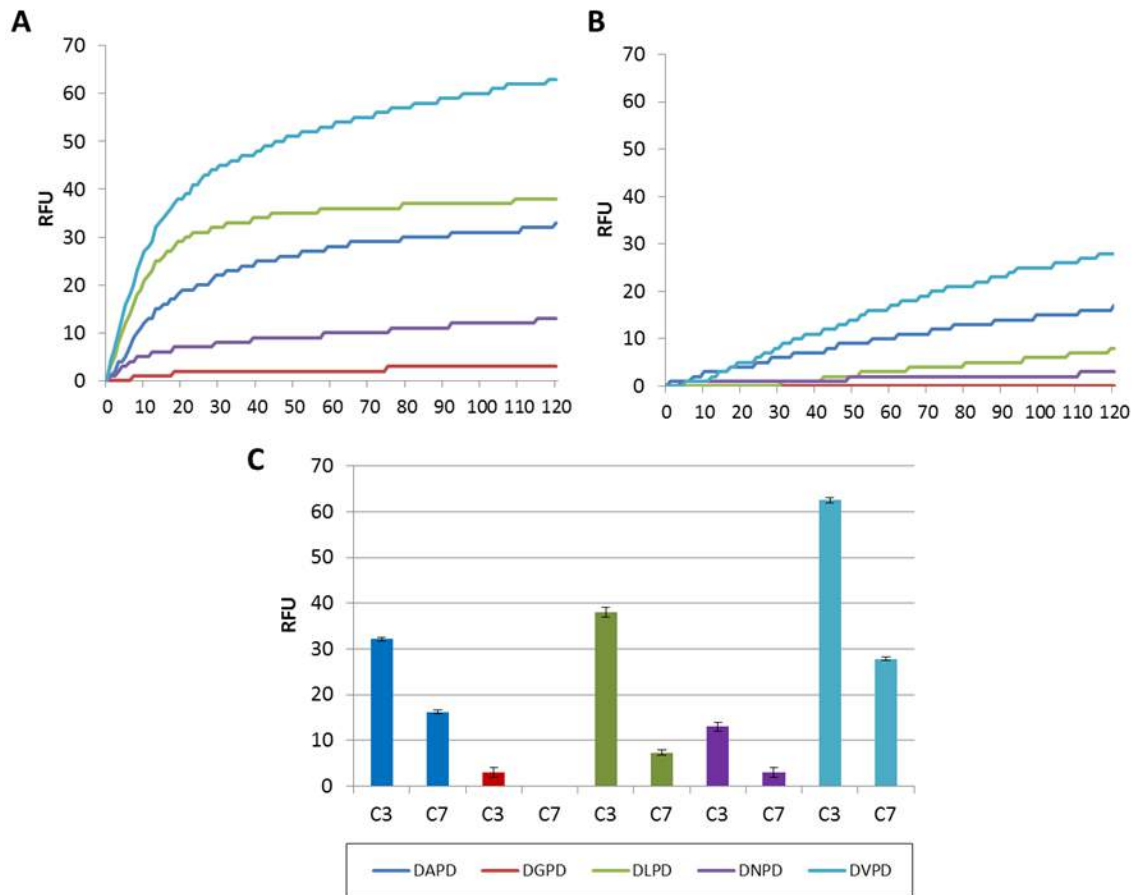


Figure 1S. (A-B) Kinetic plot of **11-14** (20 μ M) + Cas-3/7 (0.4 μ M) after 120 mins incubation. (C) Fluorescence increment of sensors (**11-14**) (20 μ M) + Cas-3/-7 (0.4 μ M) at 120 mins incubation. Measures at excitation/emission wavelengths of 485/528 nm (n = 3).

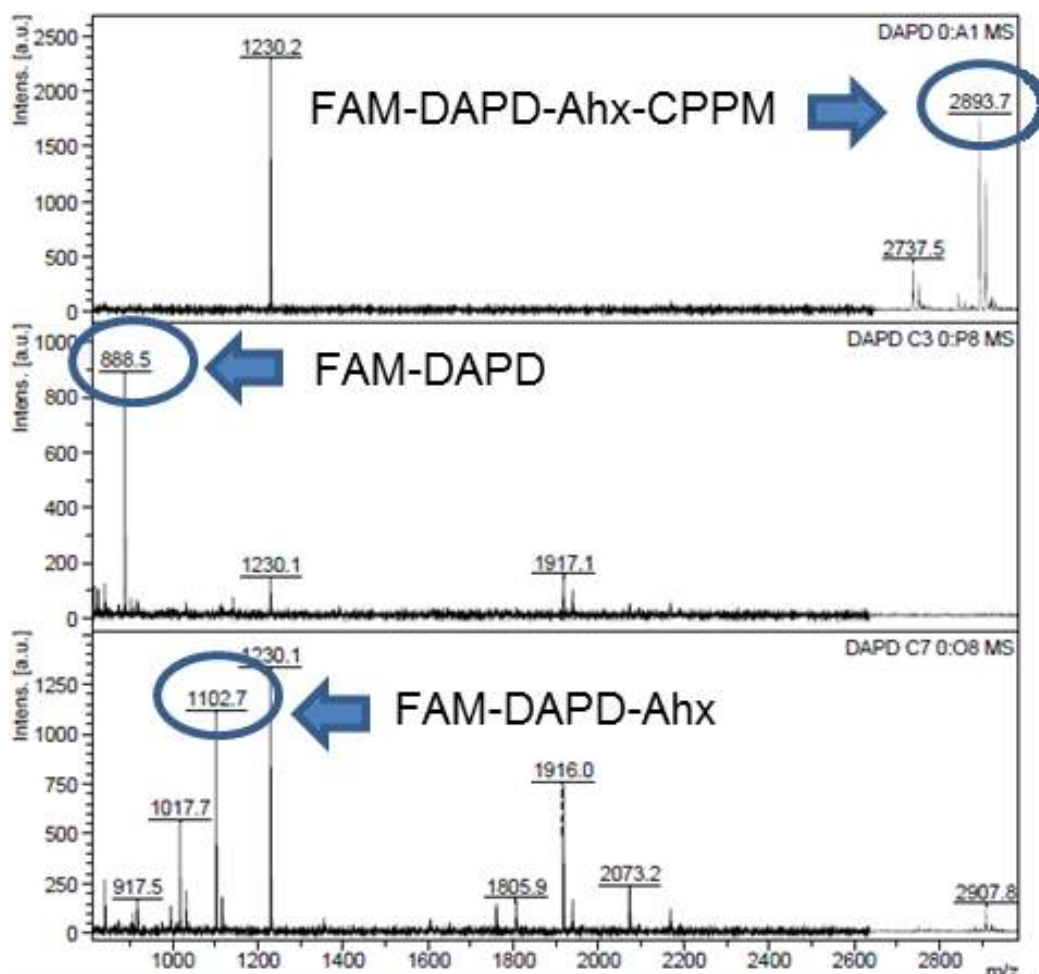


Figure 2S. MALDI-TOF spectrum of sensor DAPD-CPPM (**11**) at 20 μ M (above) and incubated with caspase-3 (mid) or caspase-7 (below) at 0.4 μ M during 2 h.

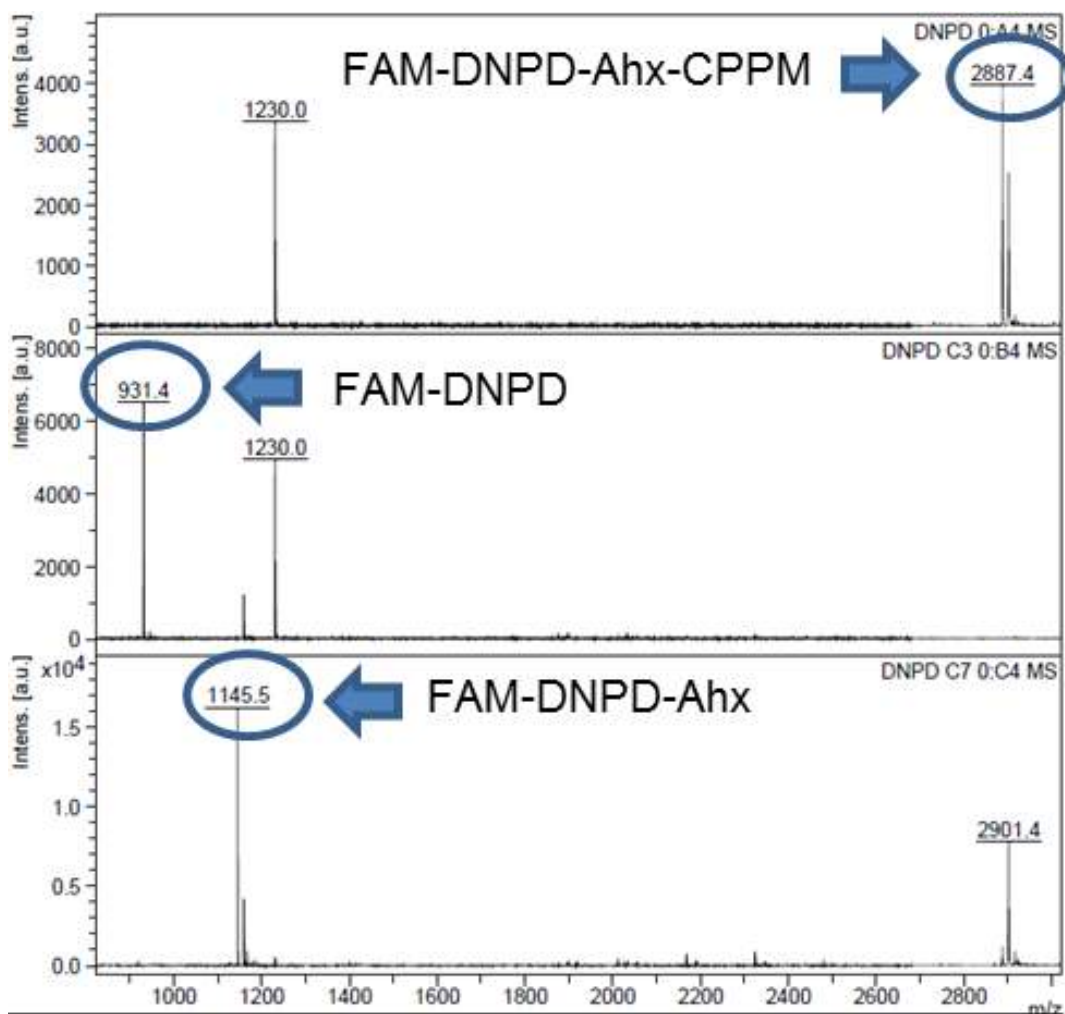


Figure 35. MALDI-TOF spectrum of sensor DNPD-CPPM (**13**) at 20 μ M (above) and incubated with caspase-3 (mid) or caspase-7 (below) at 0.4 μ M during 2 h.

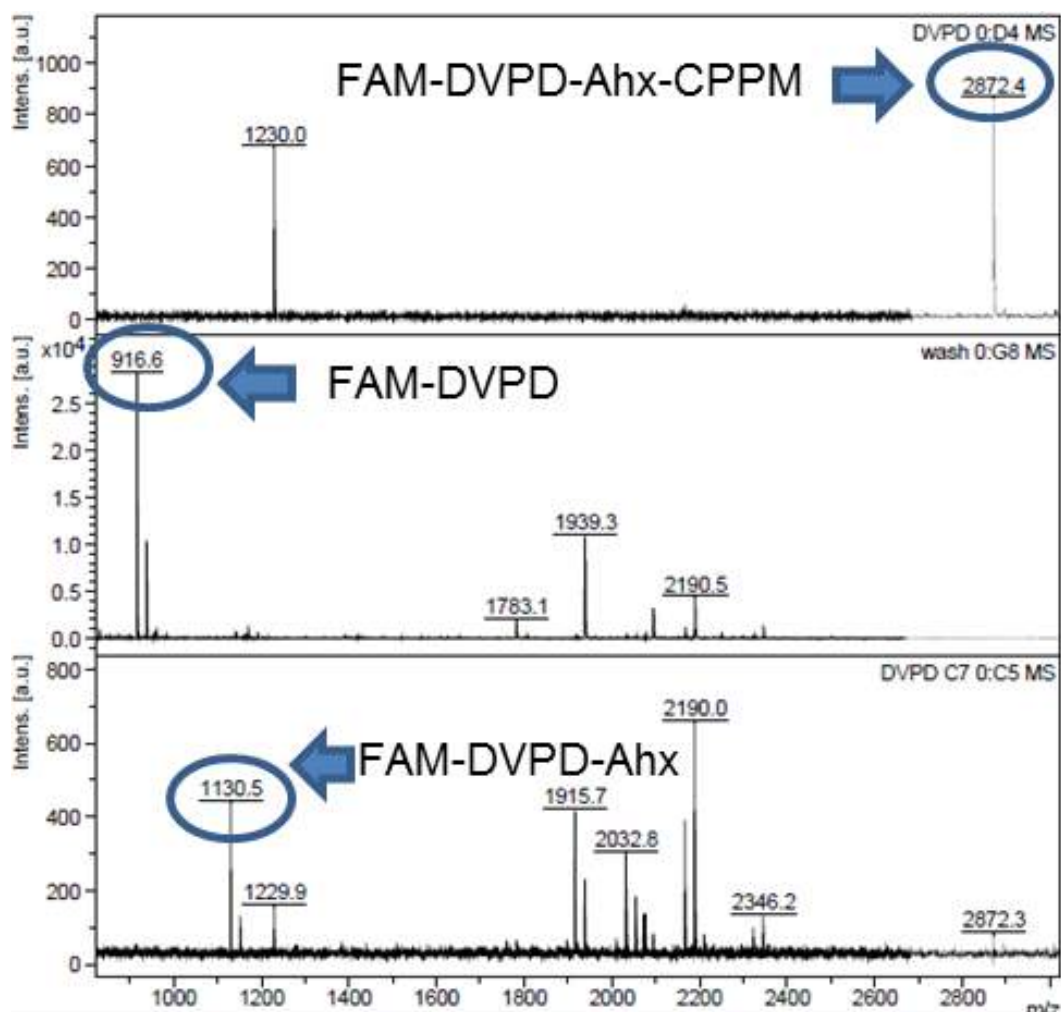


Figure 4S. MALDI-TOF spectrum of sensor DVPD-CPPM (14) at 20 μ M (above) and incubated with caspase-3 (mid) or caspase-7 (below) at 0.4 μ M during 2 h.

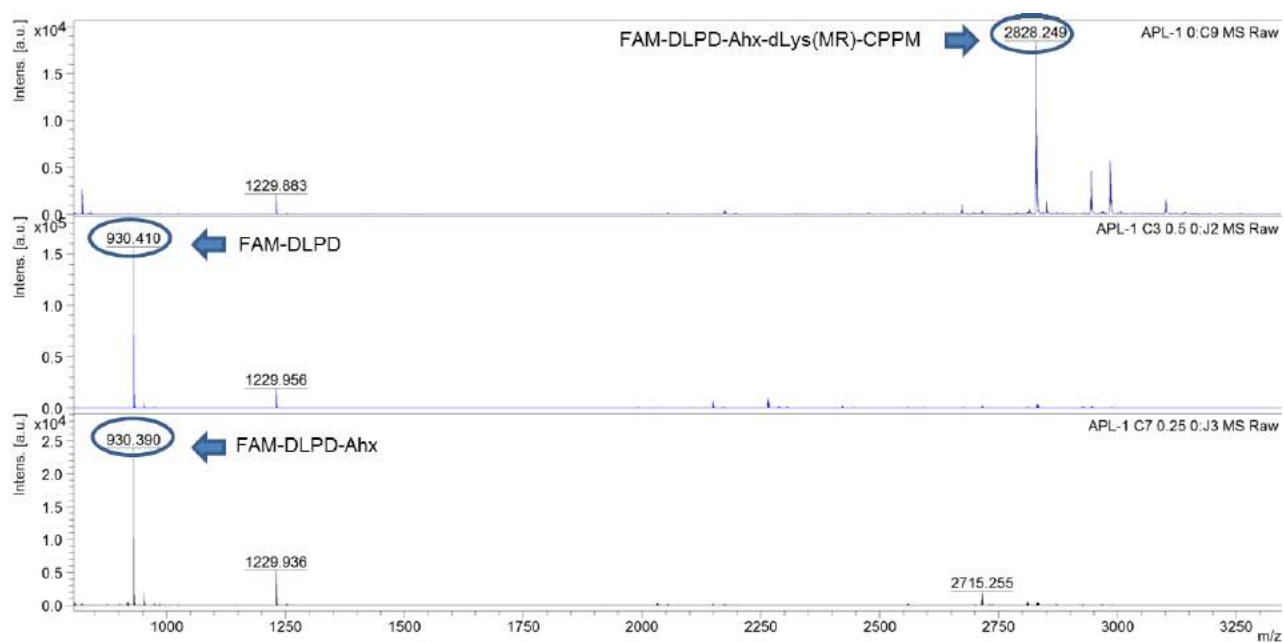


Figure 5S. MALDI-TOF spectrum of sensor FAM-DLPD-Ahx-dLys(MR)-CPPM (25) at 10 μM (above) and incubated with caspase-3 (mid) or caspase-7 (below) at 0.3 μM during 2 h.

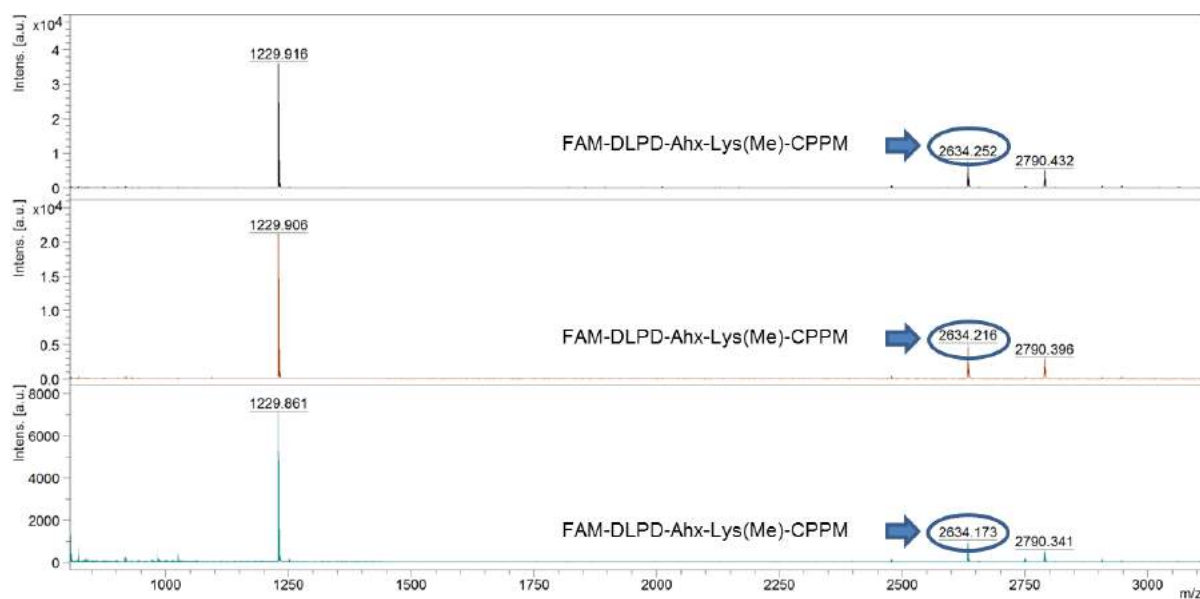


Figure 6S. MALDI-TOF spectrum of sensor FAM-DLPD-Ahx-Lys(Me)-CPPM (26) at 10 μM (above) and incubated with caspase-3 (mid) or caspase-7 (below) at 0.3 μM during 2 h.

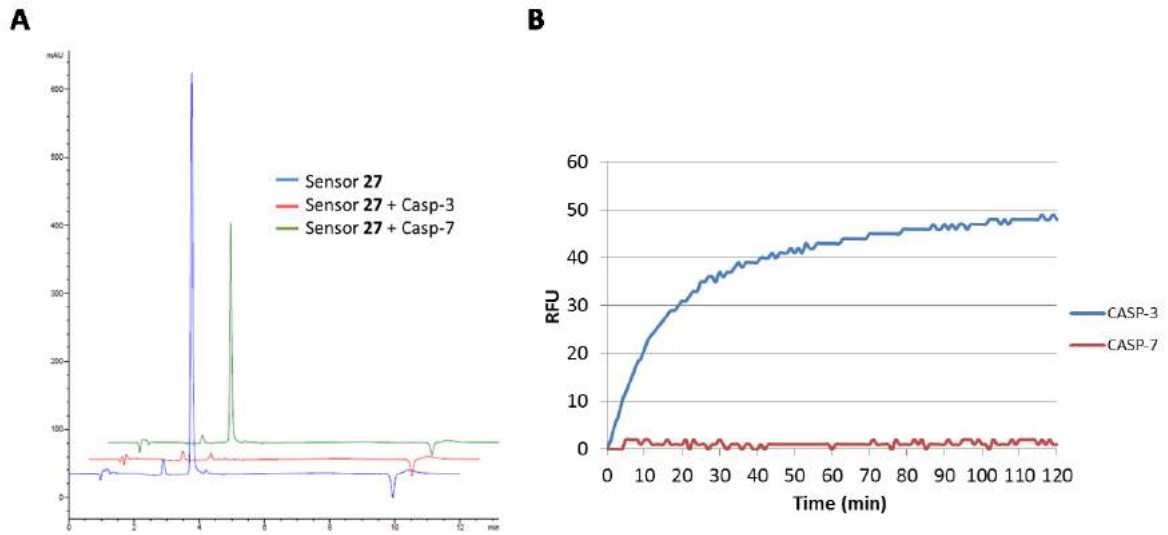


Figure 7S. (A) HPLC (254 nm) of sensor **27** (10 μ M) + Cas-3/-7 (0.3 μ M) after 120 min incubation (B) Kinetic plot of sensor **27** (0.6 μ M) + Cas-3/-7 (15 nM) after 120 min incubation. Measures at excitation/emission wavelengths of 485/528 nm.

4. CELL VIABILITY ASSAYS

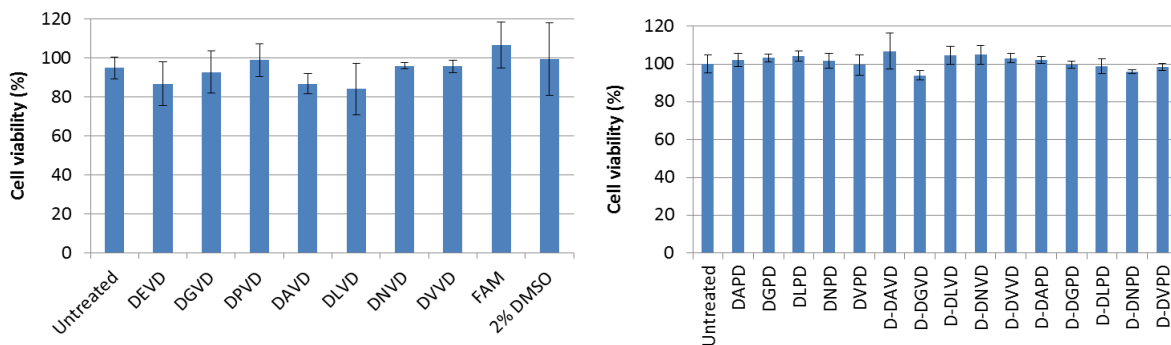


Figure 8S. Cell viability (MTT) assays of HEK cells after incubation with the library of caspase activity-based sensors at 10 μ M.

5. LOCALIZATION OF APOPTOTIC CELLS BY FLOW CITOMETRY

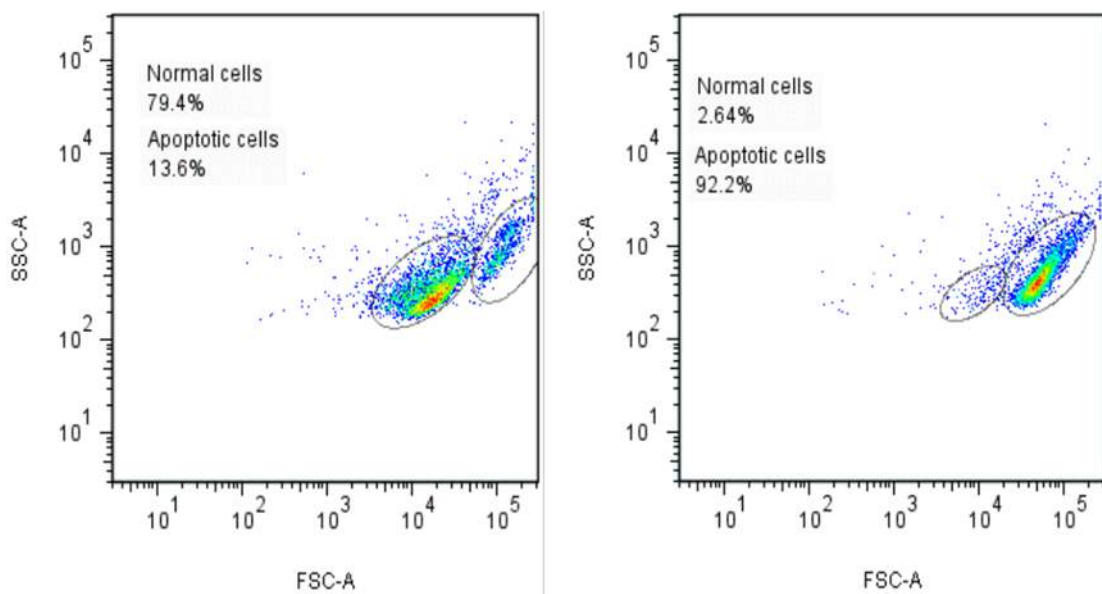


Figure 9S. Morphology (SSC-A) and size (FSC-A) of HEK293T cells measured by FACS to identify different cell populations (right) after 4 h incubation with STS 1 μ M and (left) non STS.

6. QUANTIFYING OF ACTIVE CASPASE-3 CONCENTRATION INSIDE CELLS.

Sensor **27** (DLDPK) for quantifying caspase-3 per cell.

1. Calculate FAM-DLDPK released per cell:

Fluorescein-labelled microspheres (2% SC, 0.12 mmol/g),¹ were used to perform the standard curve FI versus FAM quantity (nmol) by flow cytometry:

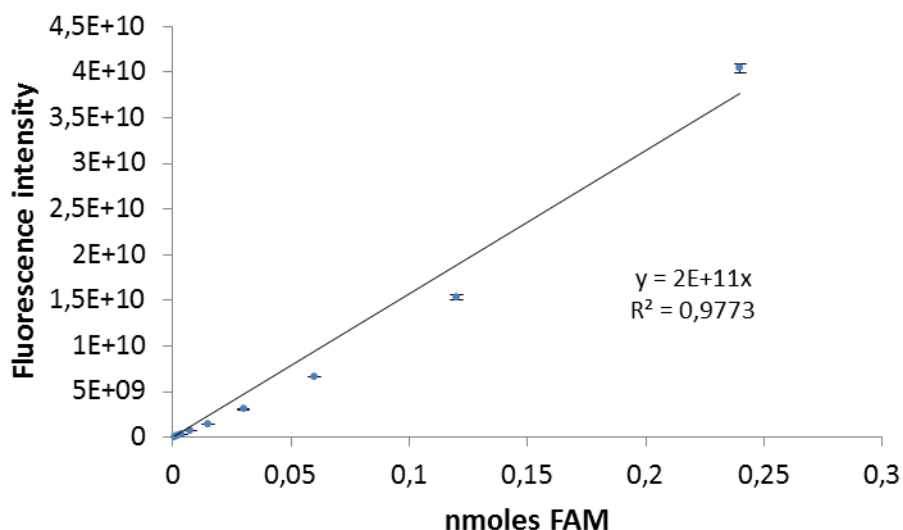


Figure 10S. FAM standard curve to determine conversion factor (2×10^{11} MFI/nmol) representing FI (Fluorescence Intensity) versus FAM quantity (nmol).

To determine the concentration of FAM-DLDPK released per cell (nmol/cell) = $[FI/cell - FI_0/cell]/2 \times 10^{11}$
FI/nmol

Assuming 20 μm cell diameter and 2/3 of that for the nucleus, the cytoplasmic volume of HEK293T cell is 3 μl (VC).²

FAM-DLDPK released per cell (M) = FAM-DLDPK released per cell (fmol/cell)/3000 fl

2. Calculate the rate of product formation V_0 :

$V_0 = d[P]/dt = \text{FAM-DLDPK released per cell (mM)}/18000 \text{ sec}$

¹ a) A. uncit-Broceta, E.M.V. Johansson, R.M. Yusop, R.M. Sanchez-Martin and M. Bradley, *Nat. Protocol*, 2012, **7**, 1207-1218. b) J.M. Cardenas-Maestre and R.M. Sanchez-Martin, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 1720-1722.

² Y. Liu, X. Yan and T. Zhou, *PLOS one*, 2013, **8**, 8.

3. At high substrate concentrations (enzyme saturation) so to quantify the concentration of the enzyme per cell:

$$k_{cat} = V_{max}/[E]$$

$$k_{cat} = 0.04 \text{ s}^{-1} \text{ (sensor 27 DLDPK)}$$

[E] = enzyme concentration per cell (nM)

$$[\text{Cas3}] = 0.55 \pm 0.02 \text{ nM}$$

4. Quantifying the number of molecules per cell of caspase3 and caspase7:

$$N^{\circ}E \text{ (number of enzyme molecules per cell)} = [E] \times V \times C \times N_A$$

$$N_A = 6.023 \times 10^{23} \text{ molecules/mol}$$

$$N^{\circ} \text{ Cas3} = 989.49 \text{ molecules/cell}$$

Sensor 27	fmol FAM/cell	FAM (mM)	V (mM)/min	[E] (nM)	E molecules/cell
Average	0,001035	0,000345	0,00000115	0,55	989,49
SD ±	3,04138E-05	1,0138E-05	3,37931E-08	0,02	29,08

Table 2S. Data analysis of caspase-3 (sensor 27) per cell.

7. FLUORESCENCE MICROSCOPY OF CELLS.

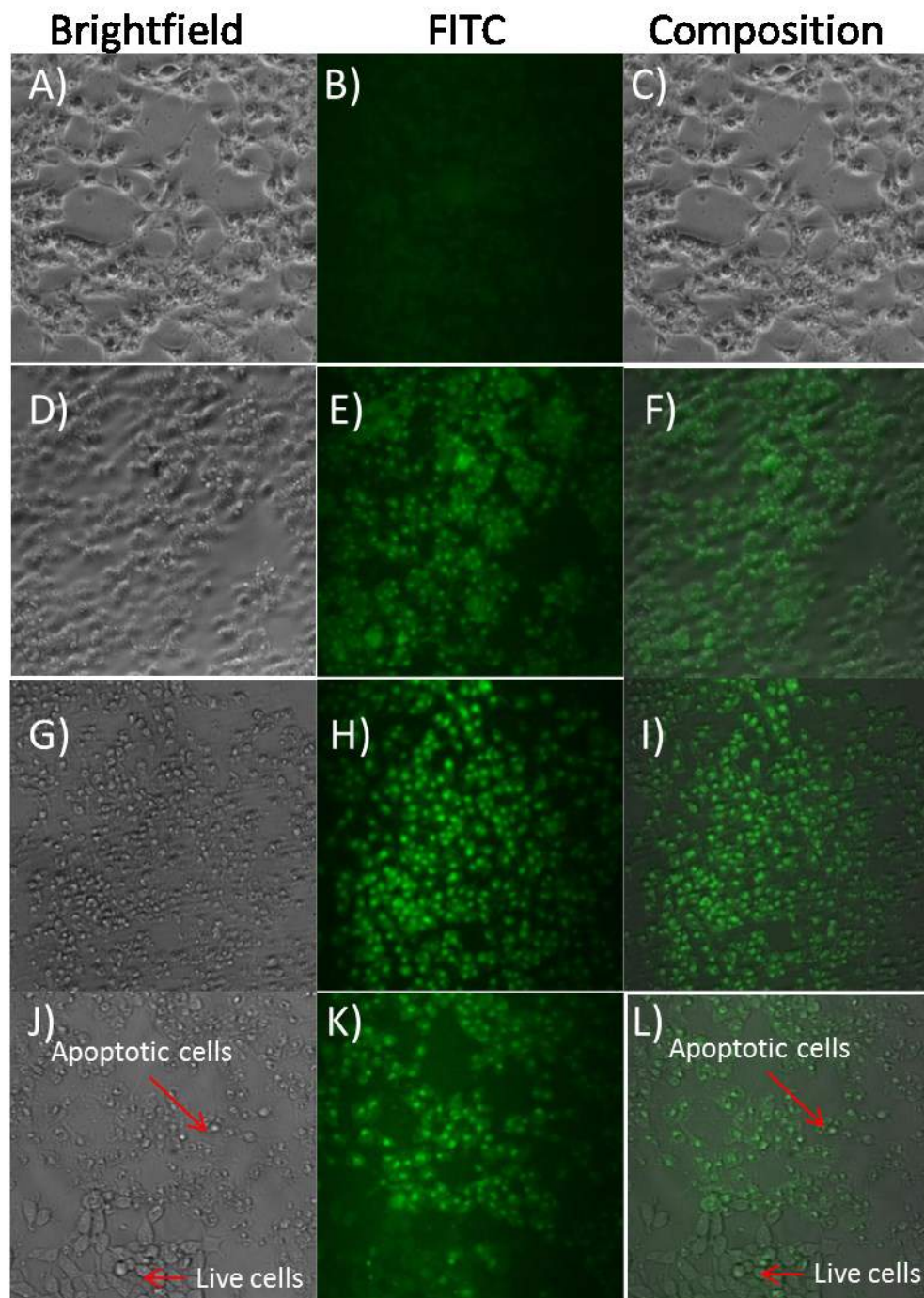


Figure 11S. HEK cells untreated (A, B, C) and treated with sensor 1 (D, E, F), sensor 6 (G, H, I) and sensor 27 (J, K, L) at 10 μ M after STS 1 μ M addition. In Fig. L, only apoptotic cells showed fluorescence signal.