

Departament de Química Orgànica
FACULTAT DE QUÍMICA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de Doctorat de Química Orgànica
Bienni 2000-2002

CONTRIBUCIONS AL DISSENY, SÍNTESI I APLICACIONS
DE QUIMIOTEQUES COMBINATÒRIES DE PEPTOIDES

Memòria presentada per optar
al títol de Doctor en Química per
Núria Cortés Barea

Director:

Àngel Messeguer i Peypoch
Professor d'Investigació
Dept. de Química Orgànica Biològica
IIQAB-CSIC

Tutor:

Antoni Riera Escalé
Catedràtic de Química Orgànica
Dept. de Química Orgànica
Facultat de Química, UB

Que tinguem sort,
que trobem tot el que ens va mancar
ahir.

I així pren, i així pren
tot el fruit que et pugui donar
el camí que, a poc a poc,
escrus per demà.

Que demà, que demà
mancarà el fruit de cada pas;
per això malgrat la boira,
cal caminar.

Lluís Llach

A tots els que m'heu ajudat al llarg del camí

AGRAÏMENTS

Malgrat saber que aquest és el millor moment per agrair-vos les mil i una coses que em vénen al cap i que m'han ajudat a arribar fins aquí, sé que no ho podria fer d'una forma breu. Espero que alguns de vosaltres sigueu capaços de llegir entre línies el que no he escrit, però que espero us hagi dit alguna vegada, per compartir amb mi els moments més feliços d'aquests últims anys i, sobretot, per ajudar-me a somriure en els més difícils.

En primer lloc, al meu director de tesi, el Dr. Àngel Messeguer. Sé que un simple gràcies es queda curt per agrair-te tota la confiança que sempre has dipositat en mi, des del primer dia. No només confiança, si no una seguretat en mi i en la meva feina que ni jo mateixa tenia en molts moments. Per això t'agraeixo enormement les teves paraules d'ànim, de comprensió i d'entusiasme per la química, que feien que sempre que entrava al teu despatx en sortís amb les energies renovades. Tot i els meus *buenos* característics, espero no haver defraudat les teves expectatives. I per descomptat, també t'agraeixo la bona rebuda i el carinyo que, des d'aquell dia a Palamós, sempre m'has ofert i demostrat fora del laboratori.

Al Dr. Francesc Camps, director de l'IIQAB, per admetre'm al seu centre, i al Dr. Antoni Riera, Catedràtic del Departament de Química Orgànica de la Facultat de Química, per acceptar ser el tutor d'aquest treball.

Vull estendre el meu agraïment al Dr. Jordi Bujons, amb qui vaig començar a treballar al 309 i del qual he après molt durant aquests anys. Al Dr. Francisco Sánchez, per estar sempre disposat a solucionar qualsevol dubte existencial d'RMN. Al Dr. Albert Manich, per ajudar-me tant amablement en la part dels dissenys d'experiments. A la Roser i la Dori per tantes hores compartides al servei de masses i ajudar-nos a resoldre els infinits problemes amb l'aparell. I a la Dra. Francesca Reig per permetre'm utilitzar el seu fluorímetre.

A tots els grups col·laboradors que han participat amb tant d'entusiasme en la realització dels assaigs biològics: el grup del Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Eix, el grup del Dr. Enrique Pérez-Payá de la Fundació Valenciana d'Investigacions Biomèdiques de València i el laboratori de Bioinvestigació de Merck Farma i Química, S. A. Gràcies especialment a la Beta, la Puig, la Clàudia i la Gema. I gràcies també a la Mar i l'Eliana del grup de l'Enrique, per tractar-me tan bé a València i ajudar-me a realitzar els estudis de fluorescència.

To Prof. Kevin Burgess from the University of Texas A & M, for accepting me in his research group and for relying on my job. Thanks so much for our lunch conversations on Saturdays, an escape for the european people of the lab! I would like to thank my colleagues in his laboratory, specially to Aurore for helping me since the day I arrived there, and Juan and Miguel for being always a reason to speak in Spanish.

A les *secres*, la Josefina i l'Àngels, per l'estimació que sempre m'han demostrat i el seu interès per saber com estava i com m'anaven les coses, fins i tot des de la llunyania.

Vull agrair també la concessió d'una beca predoctoral per part de la Generalitat de Catalunya, sense la qual no s'hauria pogut realitzar aquest treball d'investigació.

I a la llarga llista de tots els que en algun moment o altre hem coincidit al 309. Els més antics, els de sempre, els d'ara....

Primerament, gràcies a tu Isabel, gran companya de congressos i viatges, per ensenyar-me tot sobre la combinatòria, ajudar-me tant als meus inicis i estar sempre disposada a resoldre dubtes i problemes.

A les altres veteranes, Maia, Su i Anna M., a qui molt sincerament us agraeixo l'ajuda i l'amistat que em vau oferir en aquells primers anys, i els bons moments que vam compartir dins i fora del lab. Al Marc, per la seva gran simpatia i per ser la meva altra referència combinatòria, i al Jordi G., per aquella època de bromes que tant em va fer riure. I a tants altres..... a la Marisa, Eyleen, Mònica i Òscar. A l'Ade, per la seva gran ajuda en la purificació dels productes per HPLC. Al Raúl (*alies Raülito*), per la seva simpatia i amistat. I a l'Ana B., per ser una gran ajuda en la part de reactivitat.

A la Noemí, companya de tesi des que tot això va començar i de tants moments viscuts al 309. Recordes tot el que hem rigut plegades? Espero que quan tornis no baixis d'aquest tren de bona sort en què has pujat allà. Al Rafa, atent i carinyós amb les noies del 309 (i de fora!), sempre disposat a donar-nos un cop de mà a nivell informàtic i a incrementar la nostra cultureta amb els seus reportatges d'investigació. *A veure quants minuts aguanto sense riure?* I les *galleguiñas*, la Cristina (*Ah! Pero hoy hay cena?*), i a la Sandra, aquesta noia tant treballadora que ens ha revolucionat el lab amb la seva simpatia i sinceritat, i que va tenir la gran idea de començar la rotació de sopars-309.

A la Glòria, només he pogut compartir amb tu l'etapa final de la tesi però ha estat suficient per poder disfrutar de la teva professionalitat, simpatia, alegria, optimisme, espontaneïtat i generositat sense límits. *Mil milions de gràcies*, per estar sempre disposada a escoltar, ajudar i animar a tothom!

A l'Annita, *revolucionària inconformista*, companya de bromes infinites, plena d'una alegria, sensibilitat i dolçor que fàcilment ens encomana. El diminutiu del teu nom només et fa més gran com a persona. Ets genial, *baby!*

I al Jordi, *l'Esca*, el meu company de taula, un bon amic i una de les millors persones que he conegut mai. T'agraeixo molt la teva amistat sincera en els moments difícils i el teu gran sentit de l'humor que tant m'ha fet riure, sobretot de mi mateixa. Espero que puguem seguir compartint junts les mariscades i pastissades de la Carne durant molt de temps.

Mmmmm.....m'oblido *d'algú?*

No puc deixar d'esmentar a la gran *troupe dels eliseros*, amb qui en algun moment o altre hem compartit lab, sopars o partits de lliga... a la Carne, l'Hèctor, la Mika, la Núria S., el Xavi, el Javi, el Dani, el Mark, la Begoña..... Però especialment al Roger, pel carinyo i tendresa que sempre m'ha demostrat, i al Pablo, per aquesta alegria i simpatia que desprèn allà on va.

I mil gràcies al grupet d'*Aggieñolis*, sense ells aquells quatre mesos en la profunditat americana haguessin estat força diferents. Gràcies a les racions de pa amb tomàquet de l'Àlex, la Mar i l'Agu, *a todos los cafés y consejos de Joaquín, y en definitiva al cariño y simpatía que todos me ofrecisteis, Loli, Javi, Cris, Mirta y Ángel*. Ens veurem aviat?

I com no, a tot el meu grupet de Sant Cugat i rodalies per ajudar-me a desconnectar els caps de setmana. Sé que a alguns us haig d'agrair especialment *aquells nou mesos*, dels que tantes vegades fem broma però que van ser molt importants per mi, durant els quals em va donar l'empenta i la il·lusió que llavors necessitava. Gràcies a les nenes, Laia, Marta, Crisis i Vega, i als nens, Raimon, Jaume L., Julio, Jaume R., Jordi i Pepe. A la Bàrbara, *por aquella tarde de agosto*, i a la Bea, que tot i la distància sempre ha estat present en els moments importants. Però sobretot, a la Mònica, per tants moments que hem compartit des de fa ja uns quants anys i per tot el que sense saber-ho m'has ajudat; i a l'Anna, simplement per ser com ets, una increïble gran persona, per estar sempre que t'he necessitat, per tots els cafès que m'has hagut d'aguantar i per haver compartit amb mi un viatge impressionant.

A mis tíos, por acogerme siempre tan bien cada vez que iba a Valencia y por interesaros y preocuparos tanto por mi, incluso en los momentos más difíciles.

També voldria agrair molt sincerament a la Maria Dolors, la Núria i el Sergi, per haver-me rebut amb els braços oberts des del primer dia i per tot el carinyo que sempre m'heu demostrat.

I, finalment, les paraules més carinyoses per les persones més importants de la meva vida.

Als meus pares i al meu germà, sé que no hi ha línies suficients per descriure tot el que us haig d'agrair a vosaltres. Per ser com sou, per haver estat al meu costat sempre, per haver-me recolzat i donar-me suport quan l'he necessitat. Per no haver-me fallat mai. Per sentir el vostre carinyo cada dia i compartir amb mi els moments més feliços i amargs d'aquests últims anys. Gràcies, per donar-m'ho TOT i per donar-me TANT.

I a tu, Quim, de tots, al que més difícil se'm fa poder resumir en unes línies tot el que et voldria dir i agrair, per haver estat al meu costat i ajudar-me tant durant una bona part d'aquesta etapa que arriba al seu final. Per ser un gran company de laboratori sempre disposat a ajudar tothom, per ser el meu millor amic i una gran persona. Per ser molt més. Per ajudar-me a resoldre amb paciència infinita els meus maldecaps informàtics i animar-me tant en aquests últims mesos. Per creure en mi. Per estimar-me tan dolçament, intentar entendre el més difícil i fer-me sentir tan bé al teu costat. *Per no deixar que res m'apagui el somriure*. Com un dia vam dir, hem lluitat molt per aprendre a caminar junts. I seguim fent passes endavant...

Això ja s'acaba...

A tots, gràcies.

SUMARI GENERAL

Abreviatures	xiii
1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	1

PART I. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES. ESTUDIS DE REACTIVITAT. ACTIVITAT BIOLÒGICA

Sumari part I	19
2. INTRODUCCIÓ	23
3. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES	27
4. ESTUDIS DE REACTIVITAT DE LES AMINES DE LA QUIMIOTECA	41
5. ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PEPTOIDES	61
6. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	91

PART II. SÍNTESI DE PEPTOIDES ÀCIDS. APLICACIONS

Sumari part II	125
7. INTRODUCCIÓ	129
8. OBTENCIÓ DE PEPTOIDES ÀCIDS	135
9. IMMOBILITZACIÓ D'UN PEPTOIDE A UN SUPORT SÒLID	161
10. ESTUDIS DE DIMERITZACIÓ-CICLACIÓ DELS PEPTOIDES ÀCIDS	175
11. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	183

PART III. ASSAIGS DE FLUORESCÈNCIA. FOSFORILACIÓ DE LA SERINA. FOSFORILACIÓ DEL PÈPTID LRRAS-AMC

Sumari part III	207
12. INTRODUCCIÓ	243
13. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DE LA SERINA AMB AMC	213
14. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DEL PÈPTID LRRAS-AMC	223
15. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	229

PART IV. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTIDOMIMÈTICS DE TrkA

Sumari part IV	241
16. INTRODUCCIÓ	243
17. SÍNTESI DE DOS MONÒMERS DE LA QUIMIOTECA	249
18. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	263
CONCLUSIONS	275
ANNEXE	229
BIBLIOGRAFIA	297

ABREVIATURES

Abs	absorbància
ac	absorció complexa
ACN	acetonitril
Ala (A)	L-Alanina
AMC	7-amino-4-metilcumarina
AMPA	àcid (<i>RS</i>)-2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolil)propioníc
Arg (R)	L-Arginina
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
CCP	cromatografia capa prima
CDK	ciclina dependent de quinasa
CL-EM	cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses
CG-EM	cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
col.	col·laboradors
d	doblet
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-è
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometà
dd	doble doblet
ddd	doble doble doblet
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DKP	2,5-piperazindiona
DMAP	dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	àcid desoxirribonucleic
DNM	Daunomicina
DVB	divinilbenzè
DIEA	diisopropiletilamina
EDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida

eq.	equivalent
EM	espectroscopia de masses
EMAR	espectroscopia de masses d'alta resolució
Et ₃ N	triethylamina
Et ₂ O	èter dietílic
Fmoc	<i>N</i> ^ζ -Fluoroenilmetoxicarbonil
Ft	ftalimido
gDQCOSY	gradient Double-Quantum Filtered Correlated Spectroscopy
gHSQC	gradient Heteronuclear Single-Quantum Correlation
HATU	hexafluorofosfat de 2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HBTU	hexafluorofosfat de 2-(1H-benzotriazole-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HOBT	<i>N</i> -hidroxibenzotriazole
IC ₅₀	concentració al 50% de l'activitat màxima
ITBA	iodur de tetrabutylamoni
KA	àcid kaínic
Leu (L)	L-Leucina
lit.	literatura
LPS	lipopolisacàrid
m	multiplet
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
MDR	resistència a múltiples fàrmacs
MTT	metiltiazoldifeniltetrazole
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NGF	factor de creixement nerviós
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NMDA	àcid <i>N</i> -metil-D-aspartic
PAGE	gel d'electroforesi de poliacrilamida
PKA	proteïna quinasa A
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil
pNA	<i>p</i> -nitroanilina
pRB	proteïna retinoblastoma

PyAOP	hexafluorofosfat de 7-azobenzotriazole-1-il-oxi-tris-pirrolidini-fosfoni
PyBOP	hexafluorofosfat de benzotriazole-1-il-oxi-tris-pirrolidini-fosfoni
q	quadruplet
rdt.	rendiment
rpm	revolucions per minut
Ser (S)	L-Serina
t	triplet
t.a.	temperatura ambient
td	triple doblet
TFA	àcid trifluoroacètic
TNBS	àcid 2,4,6 trinitrobenzensulfònic
t _r	temps de retenció
TrK	Tirosina quinasa A
Tx	Taxol
VRP	Verapamil

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1.1. QUÍMICA COMBINATÒRIA EN BIOMEDICINA

Tradicionalment, la font de compostos amb activitat terapèutica s'ha basat en la síntesi seqüencial de molècules així com en l'aïllament de productes naturals d'extractes vegetals. No obstant, aquestes estratègies són lentes i, a més, els assaigs d'activitat biològica eren processos llargs i complexos.

En els últims anys, el procés d'identificació de nous fàrmacs ha experimentat una important transformació degut als avenços aconseguits en les àrees de la bioquímica, la biologia i la bioinformàtica. Per una banda, els resultats de la seqüenciació del genoma humà han obert una important via d'identificació de proteïnes susceptibles de convertir-se en noves dianes terapèutiques i, per l'altra, la robotització, automatització i miniaturització d'una àmplia gamma d'assaigs *in vitro* ha conduït al desenvolupament d'assaigs biològics d'alt rendiment (HTS, *High Throughput Screening*). A més, per facilitar el disseny racional de nous fàrmacs cada vegada es fa més palesa la necessitat d'aplicar estudis estructurals i computacionals per obtenir resultats de relació estructura-activitat (SAR, *structure-activity relationships*), així com analitzar el mode d'interacció molècula-diana (*docking*).

Així doncs, aquests avenços han posat de manifest la necessitat de disposar d'una elevada quantitat de molècules per ser avaluades en front de les dianes terapèutiques d'interès. Per respondre a aquesta demanda, durant els anys 90 va néixer la Química Combinatòria com una alternativa molt potent per crear grans col·leccions de compostos.

La química combinatòria és una metodologia dirigida al disseny i construcció de col·leccions de compostos estructuralment relacionats, anomenades quimioteques, d'una forma sistemàtica, ràpida i simultània. Les quimioteques estan estructurades amb un esquelet central, del qual en deriva una àmplia diversitat química introduïda per les fonts de diversitat. Les quimioteques combinatòries tenen interès en la identificació de compostos actius davant una determinada propietat biològica, química o física (vegeu Figura 1.1).

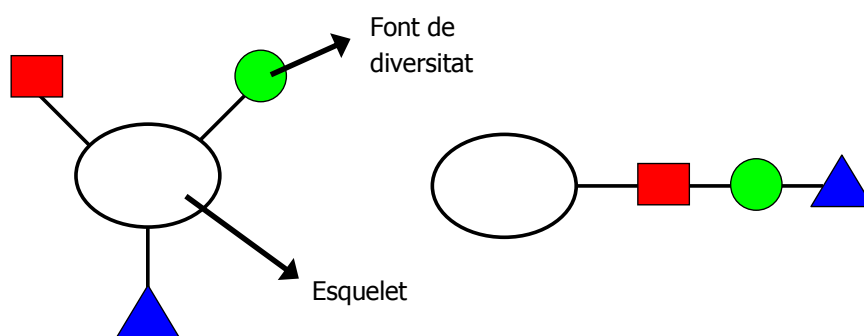


Figura 1.1. Esquema representatiu d'una hipotètica quimioteca, amb un esquelet central del qual deriven les diferents fonts de diversitat.

La síntesi orgànica tradicional es realitza seguint una estratègia lineal i sovint convergent per obtenir un compost final d'estructura determinada. A la Figura 1.2 (A) quedaria representada la química on el reactiu A reaccionaria amb el reactiu B per obtenir el producte AB. En canvi, la síntesi orgànica combinatòria permet obtenir molts més productes per cada reacció, tot combinant un nombre limitat de reactius. En la Figura 1.2 (B) la química combinatòria queda exemplificada on els reactius de tipus A (A_1, A_2, \dots, A_n) reaccionarien amb els reactius de tipus B (B_1, B_2, \dots, B_n) per obtenir els productes $A_{1-n}B_{1-n}$ provinents de la combinació de tots els reactius emprats. Si apliquem aquest principi combinatori a diferents passos de reacció, la quantitat de compostos obtinguda s'incrementa exponencialment, la qual cosa evidencia la capacitat de la química combinatòria per generar diversitat estructural.

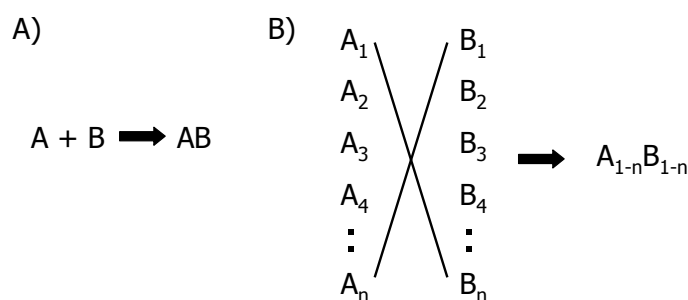


Figura 1.2. Esquema representatiu de la síntesi orgànica tradicional (**A**) i de la síntesi orgànica combinatòria (**B**), on A i B representen els reactius i AB el producte obtingut.

En la Figura 1.3 es mostra l'esquema del procediment seguit usualment per a la recerca d'un fàrmac i el paper que exerceix la química combinatòria, tant en la identificació de nous compostos com en la optimització dels candidats que passen a ser avaluats en els estudis avançats de la fase preclínica. Tot i la tecnologia desenvolupada en els últims anys, les etapes d'optimització del compost, els assaigs preclínic i sobretot els clínics fan que el procés global d'identificació de nous fàrmacs encara sigui car i molt lent (de 6 a 12 anys).

Inicialment, s'identifica la diana terapèutica d'interès i es dissenya un assaig biològic que permeti avaluar de forma ràpida i eficient els compostos disponibles. En aquest punt del procés té lloc el disseny de la quimioteca d'acord amb les característiques de la diana que es vol estudiar, en cas que es coneguin. Una alternativa seria el disseny de la quimioteca el més divers possible per aquells receptors dels quals no se'n coneix l'estructura i la forma d'interacció. Les molècules que s'identifiquen del cribratge de la quimioteca en els assaigs biològics amb activitat, afinitat i selectivitat per a la diana terapèutica es coneixen com a caps de sèrie o *hits*, i entren a la següent fase del procés. Les molècules caps de sèrie esdevenen el punt de partida per a la optimització i desenvolupament d'altres molècules amb millores en la seva activitat, afinitat, selectivitat i falta de toxicitat. La química combinatòria també juga un paper important en aquesta etapa del procés per dissenyar i sintetitzar quimiotèques més reduïdes que presentin les modificacions necessàries de l'estructura química, així com millores en la bioassequibilitat, solubilitat, absorció o possibles efectes secundaris. El cribratge d'aquesta nova quimioteca en els assaigs biològics condueix al descobriment i identificació d'una estructura optimitzada o *lead* que es sotmet a estudis preclínic per determinar si és tòxica per a l'organisme i si presenta les característiques adequades per una bona administració, distribució, metabolisme i excreció del compost de l'organisme, proves conegudes com ADME. En cas de superar aquestes proves, el candidat

entra en la fase clínica i esdevé un potencial nou fàrmac. En els últims anys, la informàtica ha permès el desenvolupament de mètodes *in silico* aplicats tant al disseny de l'estructura dels compostos de les quimioteques, per a la identificació de *hits*, com a l'optimització del cap de sèrie, per a la identificació de *leads*.

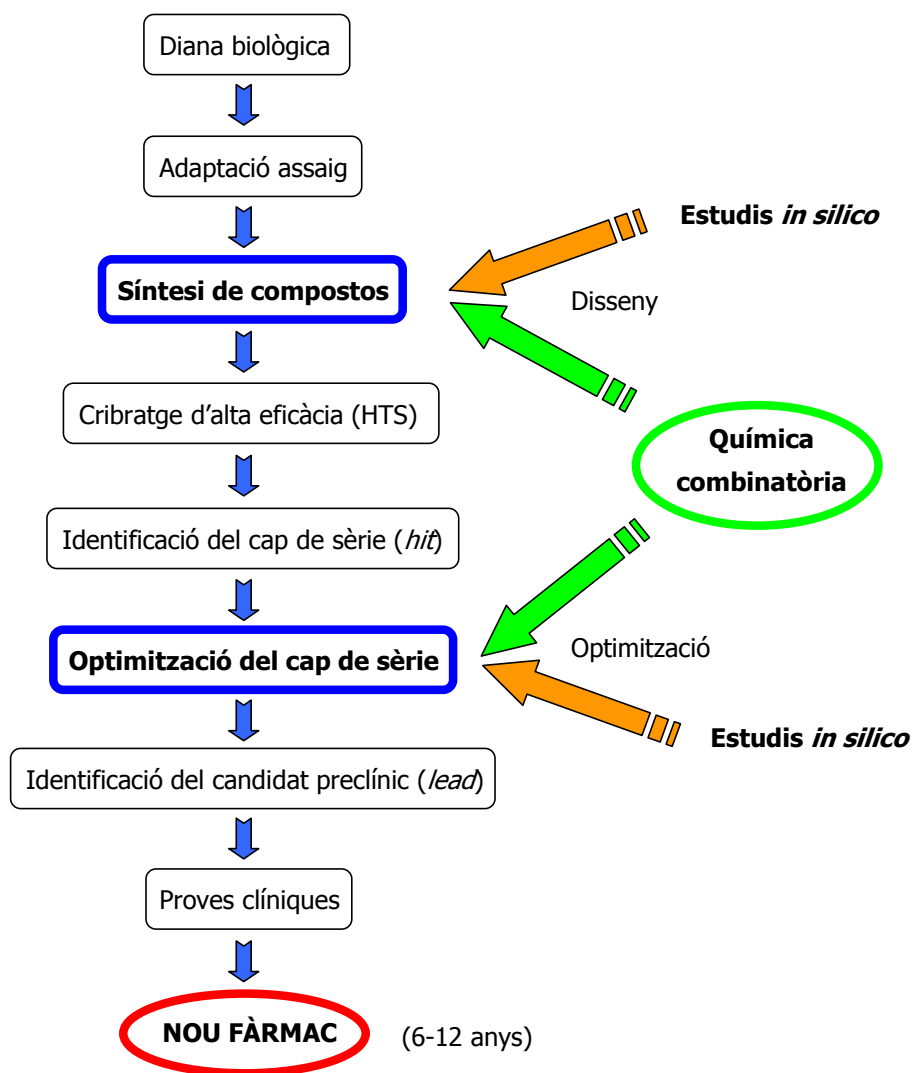


Figura 1.3. Esquema representatiu de les diferents etapes que inclouen el procés de descobriment d'un fàrmac i el paper que juga la química combinatòria.

Així doncs, l'aplicació de l'estratègia combinatòria en el procés de desenvolupament d'un fàrmac ha estat de gran utilitat en les àrees biomèdiques, en simplificar i accelerar el procés de preparació i optimització de compostos d'interès terapèutic. A més, en els últims anys s'ha anat extenent l'ús de la química combinatòria a camps molt diversos, com la ciència de materials,^{5,6} el reconeixement molecular,^{7,8} la química de polímers⁹ o la recerca de nous catalitzadors.¹⁰⁻¹²

1.2. QUÍMICA COMBINATÒRIA. INICIS

Una de les eines més importants per al desenvolupament de la química combinatòria ha estat la síntesi en fase sòlida. L'any 1963 Merrifield va introduir la fase sòlida per sintetitzar un tetrapèptid sobre un suport sòlid format per clorometilestirè copolimeritzat amb divinilbenzè.¹³ A partir d'aquest moment, la química de pèptids en fase sòlida va anar evolucionant fins aconseguir sintetitzar un gran nombre de pèptids amb bons rendiments i pureses elevades.

Geysen va publicar a l'any 1984 la síntesi de la primera quimioteca de pèptids en *multipins* de poliestirè funcionalitzat,¹⁴ i un any més tard Houghten va introduir la metodologia de les bossetes de te (*tea bags*) amb resina de poliestirè per a la síntesi múltiple de pèptids.¹⁵ Posteriorment, Furka va desenvolupar la metodologia de síntesi de divisió i mescla (*split & mix*) per sintetitzar una quimioteca de 27 tetrapèptids.¹⁶

Fins als anys 90, la química combinatòria s'aplicava únicament a la síntesi de pèptids i oligonucleòtids, fins que Bunin i Ellman van publicar l'any 1992 la primera quimioteca discreta d'1,4-benzodiazepines en fase sòlida.¹⁷ A partir d'aquesta publicació, l'aplicació de la química combinatòria i la fase sòlida a la síntesi de quimiotèques de molècules orgàniques de baix pes molecular ha estat en contínua expansió.^{18,19}

Tot i que també s'han sintetitzat quimiotèques en dissolució,²⁰⁻²³ la síntesi en fase sòlida és la metodologia més emprada en química combinatòria. A continuació s'explicaran les característiques més remarcables de la fase sòlida i de la fase soluble, així com altres aspectes importants de l'estratègia combinatòria que cal tenir en compte.

1.3. ASPECTES GENERALS DE LA QUÍMICA COMBINATÒRIA

A l'hora de dissenyar una quimioteca mitjançant l'estratègia combinatòria s'han de tenir en compte una sèrie de consideracions. D'una banda, cal determinar els blocs de construcció (*building blocks*) o fonts de diversitat que millor representin l'espai de diversitat que ens interressi estudiar i que condicionaran el procés sintètic de la quimioteca. De l'altra, s'ha de decidir si la síntesi es realitzarà en fase sòlida o en dissolució, així com el tipus de format de la quimioteca. Aquests aspectes s'explicaran a continuació.

1.3.1. BLOCS DE CONSTRUCCIÓ. FONTS DE DIVERSITAT

Ja s'ha comentat que la síntesi d'una quimioteca es pot enfocar des de dos punts de vista. Si interessa explorar un ampli espai de diversitat química per identificar un nou cap de sèrie amb activitat davant una diana biològica, la quimioteca estarà constituïda per un gran nombre de compostos. En canvi, si es vol optimitzar un cap de sèrie ens interessarà sintetitzar quimiotèques més petites i focalitzades que intentin millorar l'activitat del compost, modificant d'una forma sistemàtica els grups que són importants en la interacció del lligand amb la diana, i per tant aplicarem una diversitat química més limitada i específica, preparant un nombre més reduït de compostos.

Així doncs, cal determinar les fonts de diversitat o blocs de construcció que s'aplicaran a l'esquelet central de les molècules de la quimioteca. Aquest és un punt molt important en el disseny d'una quimioteca ja que s'han donat casos en què un compost que podria esdevenir potencial fàrmac s'ha desestimat quan s'estava avaluant en les proves clíniques, amb les consegüents pèrdues econòmiques i de temps per a les empreses farmacèutiques. Per aquest motiu s'estan desenvolupant estudis amb la finalitat de poder predir si un compost té possibilitats d'arribar al mercat.

Per exemple, al 1997 Lipinski i col. van establir una sèrie de regles que havia de complir un compost identificat amb activitat per ser considerat com un bon candidat a fàrmac.²⁴ Per altra banda, s'han desenvolupat tècniques d'algoritmes genètics amb la intenció de minimitzar el nombre de substàncies a ser sintetitzades,²⁵ així com d'altres programes informàtics que han desenvolupat mètodes *in silico* per a la identificació de *hits* i *leads*.²⁶⁻²⁸ Més recentment, amb els avenços aconseguits en l'àrea de la genòmica i la proteòmica, ha sorgit una altra especialitat, la farmacogenòmica, la qual permetria dissenyar en un futur fàrmacs individualitzats per a cada pacient segons les seves característiques genètiques.

1.3.2. SÍNTESI EN FASE SÒLIDA. SÍNTESI EN DISSOLUCIÓ

La preparació de quimiotèques es pot dur a terme en fase sòlida (síntesi heterogènia) o en dissolució (síntesi homogènia). La síntesi en fase sòlida presenta certs avantatges respecte la síntesi en dissolució, com ara:

- i. Facilitat d'ús d'excessos de reactius per aconseguir conversions quantitatives.
- ii. Purificació del producte per eliminació de dissolvents, reactius en excés i subproductes de reacció no units a la resina per simple filtració i rentat del suport sòlid.
- iii. Automatització de les etapes sintètiques.
- iv. Aplicació a la síntesi múltiple en paral·lel o de mescles.

No obstant, la síntesi en fase sòlida també presenta inconvenients importants, com són: necessitat d'adaptar la química en dissolució a la fase sòlida, etapes addicionals d'ancoratge i escissió de la fase sòlida, síntesi a un escalat limitat, impossibilitat de purificació de productes secundaris ancorats, dificultat en el control de l'evolució de les reaccions d'intermedis, dificultat de l'ús de reactius heterogenis com catalitzadors i restricció de la varietat de dissolvents per adquirir un grau d'inflement adequat de la resina.

En canvi, la síntesi en dissolució permet dur a terme un ampli ventall de reaccions orgàniques, no té cap limitació a nivell de quantitats de producte i el control de l'evolució de les reaccions es realitza pels mètodes tradicionals establerts. Tot i això, l'ús d'excessos de reactius i l'aïllament del producte es veuen limitats als mètodes tradicionals de purificació (tècniques cromatogràfiques, extraccions, evaporacions, etc.), ja que l'ús de resines segrestadores o *scavengers* i de reactius sobre suport sòlid encara resulta car.^{29,30}

Fins aquí sembla que la síntesi en fase sòlida es limiti a treballar amb resines polimeritzades de poliestirè, Tentagel, poliacrilamida, etc., però també hi ha altres tipus de suports sòlids que permeten identificar de forma inequívoca els productes sintetitzats individualment, com les varetes o *pins* polimèrics,^{14,31} les làmines de vidre³² o membranes de cel·lulosa.^{33,34}

Per altra banda, la síntesi en fase homogènia també es pot dur a terme en fase líquida, on es treballa amb suports com ara el polímer de polietilenglicol monometil èter desenvolupat per Janda i col.³⁵ Aquest polímer és soluble en molts dissolvents orgànics, de manera que el substrat es manté en dissolució durant la síntesi, però en contacte amb èter dietílic el polímer cristal·litza i facilita la purificació del producte. D'aquesta manera s'aprofiten els avantatges de la síntesi en fase sòlida i de la síntesi en dissolució.

En qualsevol cas, treballar en fase homogènia o heterogènia dependrà del tipus de química que ens interressi aplicar i/o del tipus de quimiotèques que es vulgui sintetitzar.

1.3.3. FORMATS DE LES QUIMIOTEQUES

Un altre factor a tenir en compte a l'hora de dissenyar una quimioteca és la seva estructura, que pot ser de productes espacialment separats o definits, o bé de mescles controlades.

1.3.3.1. Quimiotèques de definits. Síntesi múltiple en paral·lel

La síntesi en paral·lel de productes individuals, en dissolució o en fase sòlida, condueix a quimiotèques de definits o discrets, les quals estan formades per compostos únics i aïllats de forma individual. El cribratge o avaluació d'aquest tipus de quimioteca davant una determinada diana biològica té l'avantatge que la identificació dels compostos actius és immediata i directa. L'inconvenient és que el nombre d'assaigs a realitzar és tan gran com compostos tingui la quimioteca, motiu pel qual es requereix que el procés estigui automatitzat i robotitzat.

Aquesta metodologia de treball és la que prefereixen aplicar les indústries farmacèutiques perquè del cribratge de la quimioteca no hi ha possibilitat d'error i s'identifica de forma inequívoca el compost més actiu per tècniques analítiques rutinàries, sense ser necessari els processos de deconvolució i de resíntesi que requereixen les quimiotèques de mescles.

1.3.3.2. Quimiotèques de mescles controlades

En les quimiotèques de mescles controlades és on s'aplica pròpiament el concepte combinatori. Aquest tipus de quimiotèques permeten obtenir una gran col·lecció de compostos per ser avaluats de forma conjunta davant una determinada diana biològica amb un mínim nombre d'assaigs biològics. Aquesta metodologia és similar al procés que té lloc al sistema immunitari, en el qual quan un antigen entra al nostre cos es posa en contacte amb una gran col·lecció d'anticossos i només l'anticòs que s'hi uneix millor és escollit i reproduït a gran escala per donar lloc a la resposta immunitària.

La principal dificultat d'aquesta metodologia recau en la identificació dels compostos amb més activitat ja que, després del cribratge inicial, cal realitzar un procés de deconvolució i/o de resíntesi dels compostos individuals més actius per confirmar els resultats obtinguts amb les mescles.

A continuació s'explicaran les dues metodologies més emprades per a la síntesi de mescles.

1.3.3.2.1. Divisió i mescla (*split & mix*)

Furka va desenvolupar la metodologia de divisió i mescla (*split & mix*) per a la síntesi en fase sòlida (vegeu Figura 1.4).¹⁶

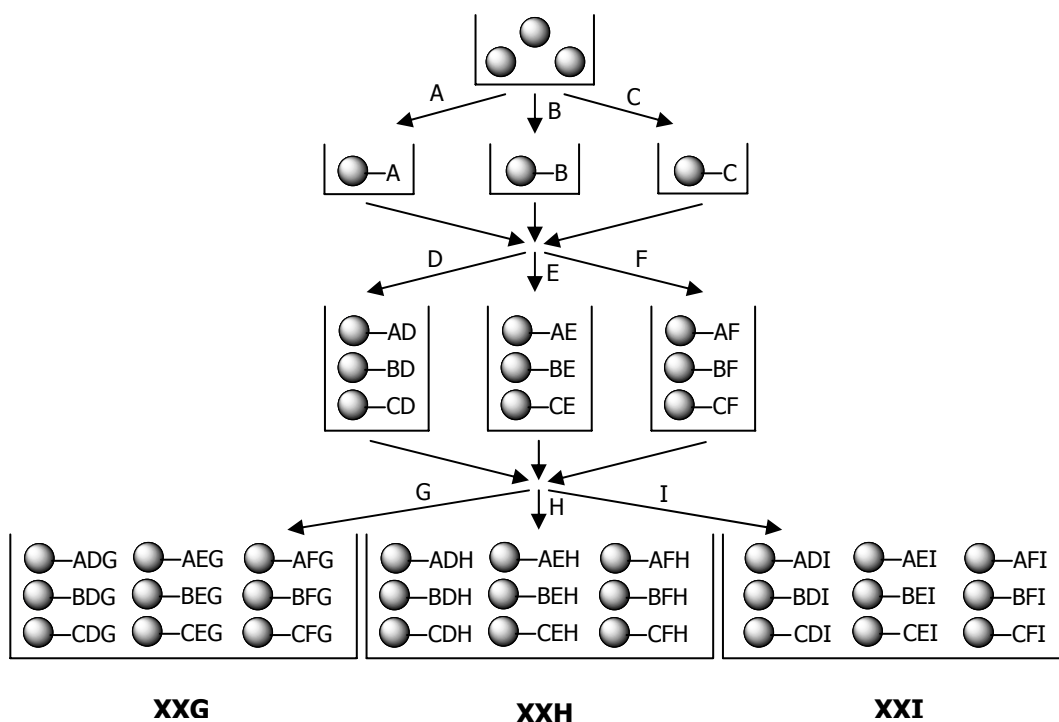


Figura 1.4. Esquema representatiu de la metodologia de divisió i mescla amb tres fonts de diversitat i tres elements de diversitat a cada una. S'obtenen 27 compostos distribuïts en 3 mescles de 9 compostos.

Inicialment, la resina es divideix en tantes porcions com diversitat es vulgui introduir, és a dir, com reactius diferents es vulguin fer reaccionar en aquella font de diversitat, i es disposa en reactors separats (tres reactius, A, B i C en el cas de la Figura 1.4). Després de dur a terme la reacció, la resina de tots els reactors es mescla i es torna a dividir segons la

nova diversitat que es vagi a introduir (D, E i F en la Figura 1.4). Aquest procés es repeteix tantes vegades com fonts de diversitat haguem definit en el disseny de la quimioteca.

En aquesta metodologia només hi ha un reactiu per reactor, de tal manera que s'eviten els problemes de diferència de reactivitat entre reactius de naturalesa diversa. A cada granet de resina es troba únicament un compost (*one bead-one compound*), concepte introduït per primera vegada per Lam,^{36,37} del qual només la última posició és coneguda.

1.3.3.2.2. Rastreig posicional

La metodologia de rastreig posicional consisteix en fer reaccionar mescles de reactius a l'hora d'introduir la diversitat química (vegeu Figura 1.5).

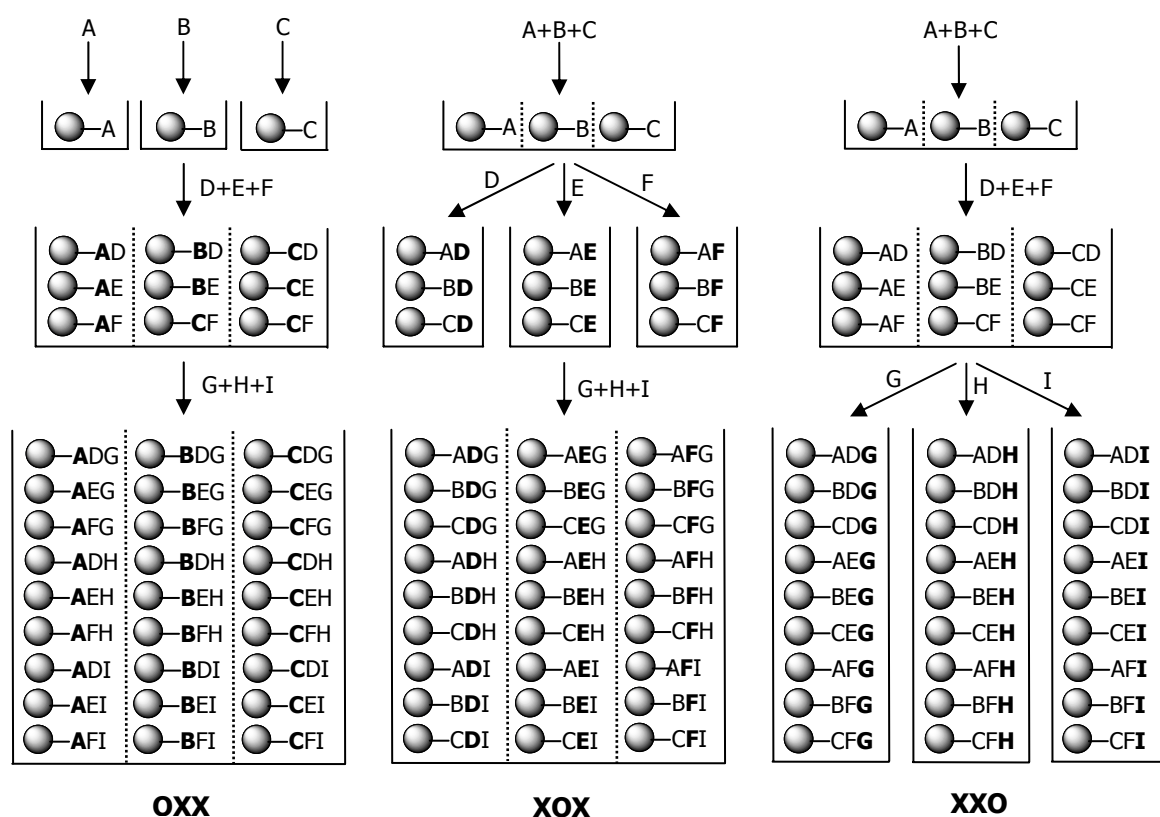


Figura 1.5. Esquema representatiu de la metodologia de rastreig posicional amb 3 fonts de diversitat i 3 elements de diversitat a cadascuna. S'obtenen 3 subquimiotecques amb 27 compostos repetits a cadascuna. Cada subquimioteca conté una posició definida (O) mentre que les altres dues són aleatòries (X).

La quimioteca es subdivideix en tantes subquimiotèques com fonts de diversitat es vulguin introduir, on cada subquimioteca tindrà una posició de diversitat definida i coneguda (**O**), en la qual s'ha fet reaccionar cada reactiu per separat, i les altres posicions seran aleatòries (**X**), és a dir, s'haurà fet reaccionar una mescla de tots els reactius introduïts en aquella font de diversitat. Cada subquimioteca tindrà Z^n compostos diferents, repetits en totes elles i distribuïts en les mescles que componen cada una de les subquimiotèques, on Z representa el nombre d'elements introduïts en cada font de diversitat i n és el nombre de fonts de diversitat. En el cas d'una quimioteca hipotètica amb 3 fonts de diversitat en què cadascuna s'introdueixin un nombre diferent d'elements, cada subquimioteca tindrà $Z_1 \times Z_2 \times Z_3$ compostos diferents distribuïts entre les seves mescles, on Z_1 , Z_2 i Z_3 representen el nombre d'elements introduïts a cada font de diversitat.

La limitació d'aquesta metodologia recau en el fet que els reactius introduïts en cada font de diversitat han de tenir velocitats de reacció similars o bé s'han d'ajustar les concentracions relatives de cadascun en funció de les seves reactivitats, per poder assegurar una concentració similar de tots els productes en les mescles finals de la quimioteca.³⁸

1.3.3.2.3. Identificació dels compostos d'una quimioteca de mescles

La identificació dels compostos més actius en quimiotèques de mescles es pot dur a terme mitjançant diferents estratègies que es poden agrupar en tres categories:

- a. *Microanàlisi*: per microseqüenciació i espectrometria de masses.
- b. *Codificació amb mètodes químics o electrònics*: per unió d'un marcador a cada partícula en el moment en què s'acobla cada diversitat, gravant-se la història sintètica de cada granet de resina.
- c. *Deconvolució*: la deconvolució és el procés que permet deduir els compostos més actius d'una quimioteca de mescles d'acord amb el format en què s'hagi sintetitzat la quimioteca, en format de divisió i mescla o en format de rastreig posicional.

Deconvolució iterativa i deconvolució recursiva. Divisió i mescla.

De les mescles d'una quimioteca sintetitzada segons el format de divisió i mescla se'n coneix la última posició de diversitat. El cribratge o avaluació de les mescles davant una

determinada diana biològica seleccionarà aquells elements de diversitat de la última posició que mostren més activitat (H en la Figura 1.6). A continuació es resintetitza la quimioteca però la última posició queda definida amb els elements de diversitat més actius seleccionats en el primer cribratge, de tal manera que el nou cribratge seleccionarà els elements de diversitat amb més activitat per a la posició anterior (D en la Figura 1.6). Aquest procés té lloc de forma iterativa fins que es seleccionin els elements de diversitat amb més activitat per a cada posició de la quimioteca, identificant-se en últim terme el/els compostos amb més activitat (en el cas de la quimioteca de la Figura 1.6, la resíntesi tindria lloc dues vegades fins identificar CDH).

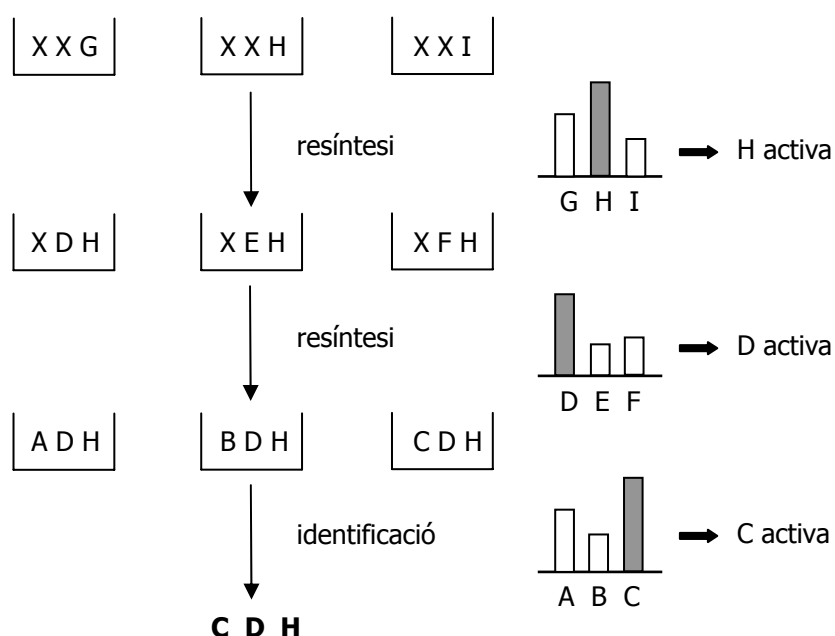


Figura 1.6. Deconvolució iterativa i de resíntesi en el format de divisió i mescla, fins a la identificació de compost més actiu CDH. **X** representa una posició no definida.

L'inconvenient d'aquest procés és que s'ha de resintetitzar la quimioteca tantes vegades com fonts de diversitat s'hagin introduït i, a més, és possible que es seleccionin més d'un element de diversitat per a cada posició, fet que incrementaria el nombre de resíntesis que s'haurien de realitzar.

Una alternativa a aquest procés iteratiu és la deconvolució recursiva on es separa una porció de resina a cada etapa d'introducció de diversitat, per estalviar temps a l'hora de resintetitzar la quimioteca en el procés deconvolutiu. Aquesta estratègia la va seguir el grup de Janda per sintetitzar una quimioteca de pentapèptids.³⁵

Deconvolució per rastreig posicional.

Houghten i col. van desenvolupar aquesta estratègia, amb la qual un únic assaig biològic permet identificar els compostos més actius d'una quimioteca de mesclades sintetitzada en format de rastreig posicional.^{39,40} L'assaig biològic selecciona les mesclades de la quimioteca que mostren més activitat per a cada font de diversitat, i en funció de la posició que defineixen aquelles mesclades es pot identificar l'element de diversitat introduït per a cada mescla en aquella posició determinada (vegeu Figura 1.7). La combinació dels elements amb més activitat per a cada font de diversitat condueix a la identificació dels compostos individuals més actius de la quimioteca.

Aquesta metodologia requereix un procés addicional de validació, ja que en treballar amb mesclades de productes, es poden produir falsos positius en seleccionar una mescla activa com a resultat de la suma de petites activitats de diversos compostos que hi són presents. La validació d'aquest procés consisteix en resintetitzar els compostos identificats amb més activitat de forma individual i tornar a realitzar els assaigs biològics per confirmar els resultats de la quimioteca de mesclades.

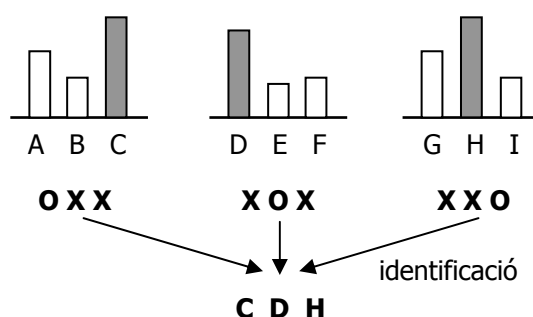


Figura 1.7. Deconvolució per rastreig posicional fins a la identificació del compost més actiu CDH. **O** representa una posició definida i **X** una posició aleatòria.

1.3.4. ALTRES ESTRATÈGIES COMBINATÒRIES

L'aplicació de tècniques computacionals a l'hora de dissenyar una quimioteca o bé per optimitzar compostos que presenten activitat biològica té cada vegada més importància i repercussió en l'àrea de la química combinatòria.

Les **quimiotèques virtuals** són quimiotèques dissenyades de forma virtual, és a dir, amb eines computacionals segons bases de dades electròniques.⁴¹ A l'hora de dissenyar aquestes quimiotèques es tenen en compte una sèrie de descriptors químics que defineixen algunes característiques que hauran de tenir els compostos, com lipofília, moment dipolar, grups funcionals i inclús determinades característiques estructurals en funció del receptor amb què hauran d'interaccionar. Els programes informàtics seleccionen aquells compostos que, per una banda, permetin cobrir un espai de diversitat prou ampli i, per l'altra, la seva síntesi estigui a l'abast del químic. Aplicant determinats models que permetin avaluar l'activitat biològica dels compostos, es realitza un cribratge virtual de la quimioteca per identificar aquells compostos amb més activitat, teòricament, els quals hauran de ser sintetitzats de forma real i tornar a ser avaluats per confirmar els resultats dels programes informàtics.

Recentment, s'ha originat un altre concepte combinatori, el de les **quimiotèques dinàmiques**,^{42,43} basat en la síntesi d'una col·lecció de compostos que inicialment es troben en equilibri, però que la composició de la quimioteca evoluciona de forma dinàmica durant l'avaluació d'una determinada propietat o davant una determinada diana biològica (vegeu Figura 1.8). El desplaçament de l'equilibri condueix a l'increment de la concentració del compost amb més activitat, el qual es pot aïllar i identificar en determinats casos.

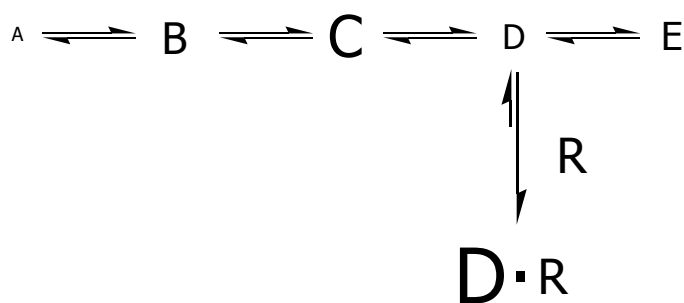


Figura 1.8. Representació esquemàtica de la interconversió dels components d'una quimioteca (A, B, C, D i E) per processos d'equilibri i el canvi de distribució dels mateixos davant d'un receptor (R). La representació de les lletres il·lustra la concentració de producte.

1.4. ELS PEPTOIDES

Ja hem comentat que l'estratègia combinatòria va néixer als anys 90, principalment al voltant de la química dels pèptids. No obstant, els fàrmacs peptídics acostumen a presentar una elevada inestabilitat metabòlica i una baixa absorció intestinal. Una solució interessant per al sector farmacèutic consisteix en el desenvolupament de peptidomimètics, compostos estructuralment semblants als pèptids, que presentin millores a nivell de biodisponibilitat per via oral i millor resistència a la degradació per part de l'organisme.

Entre les diferents estructures peptidomimètiques, fa uns anys que el nostre grup d'investigació es va interessar en els peptoides. Formalment, aquests compostos són oligòmers de glicines *N*-substituïdes. Es diferencien estructuralment dels pèptids en les cadenes laterals, les quals recauen en l'àtom de nitrogen de l'enllaç amida i no en el carboni ζ (vegeu Figura 1.9). Aquesta diferència estructural els confereix una major estabilitat a la hidròlisi i una menor polaritat, característiques que es tradueixen en una elevada resistència a les proteases de l'organisme, millor absorció intestinal i, a més, una llibertat conformacional més gran.^{44,45}

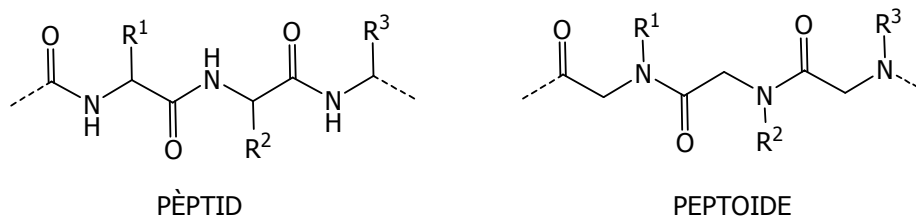


Figura 1.9. Estructura d'un pèptid i d'un peptoid. R^1 , R^2 i R^3 representen la diversitat introduïda per les cadenes laterals.

Per altra banda, la diversitat química en els peptoides es pot introduir a través d'amines primàries, com es detallarà més extensament en la part I d'aquesta memòria. Aquest fet posa en evidència el potencial combinatori que presenten aquest tipus d'estructures i el seu interès per identificar compostos bioactius.

1.5. OBJECTIUS

L'objectiu global en què s'emmarca aquesta tesi és la recerca de nous compostos actius davant de diferents dianes biològiques amb interès terapèutic. Degut al gran impacte de la química combinatòria en la recerca de molècules farmacològicament actives i d'acord amb l'experiència i els coneixements del nostre grup de recerca dels darrers anys en l'àmbit combinatori, es va plantejar la preparació d'una quimioteca de peptoides amb la finalitat de trobar activitat davant diferents dianes biològiques.

Així doncs, els objectius plantejats a l'inici d'aquest treball i els objectius que se'n van derivar posteriorment van ser els següents:

1. Disseny i síntesi d'una quimioteca optimitzada de peptoides (trímers d'*N*-alquilglicines) en el format de rastreig posicional.
2. Validació dels resultats biològics derivats del cribratge de la quimioteca davant diferents dianes biològiques amb interès terapèutic realitzats per altres grups d'investigació.
3. Optimització del procediment d'obtenció de peptoides amb un extrem carboxílic terminal (peptoides àcids), en fase sòlida i en dissolució.
4. Derivatització dels peptoides: biotinilització, acoblament a un suport sòlid i dimerització-ciclació.
5. Disseny d'un assaig de fluorescència per a determinar l'activitat de la proteïna quinasa A.

En la última part d'aquesta tesi també s'esmentarà el treball realitzat durant una estada al laboratori del Prof. Kevin Burgess de la Universitat de Texas A&M, amb l'objectiu de sintetitzar una quimioteca de peptidomimètics per mimetitzar els girs η del factor de creixement nerviós (NGF).

**PART I. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES.
ESTUDIS DE REACTIVITAT.
ACTIVITAT BIOLÒGICA**

SUMARI PART I

2. INTRODUCCIÓ	23
2.1. Antecedents	24
3. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES	27
3.1. Síntesi en fase sòlida	27
3.1.1. Elecció del suport sòlid	28
3.1.2. Manipulació de la resina	30
3.2. Format de la quimioteca	30
3.3. Criteri de nomenclatura dels peptoides	31
3.4. Diversitat de la quimioteca	32
3.4.1. Elecció de les fonts de diversitat	32
3.4.2. Proves de reactivitat	33
3.5. Procediment per a la síntesi de la quimioteca	34
3.5.1. Plantejament de la síntesi	34
3.5.2. Procediment general per a la síntesi d'una quimioteca de mescles	36
3.6. Procediment per a la síntesi individual de peptoides	38
4. ESTUDIS DE REACTIVITAT DE LES AMINES DE LA QUIMIOTECA	41
4.1. Estudis de reactivitat per CG	42
4.1.1. Assaigs de reactivitat en dissolució. Assaigs amb el clorur de cloroacetil	42
4.1.2. Assaigs de reactivitat en fase sòlida. Formació de glicinamides i de DKPs	44
4.1.2.1. Assaigs de reactivitat per a la formació de glicinamides <i>N</i> -substituïdes	44
4.1.2.2. Assaigs de reactivitat per a la formació de 2,5-piperazindiones (DKPs)	46
4.2. Estudis de reactivitat per HPLC	48
4.2.1. Obtenció de les benzamides	49
4.2.1.1. Optimització de les condicions d'elució per HPLC	52
4.2.2. Determinació de les rectes de calibració de les benzamides	53
4.2.3. Estudi de la reactivitat de les onze amines en fase sòlida utilitzant mescles equimolars en l'etapa d'acoblament	54
4.2.4. Estudi de la reactivitat de les onze amines en fase sòlida utilitzant mescles equireactives en l'etapa d'acoblament	56

4.2.5. Estudi de la reactivitat en dissolució	56
4.3. Conclusions de la reactivitat de les amines de la quimioteca	58
5. ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PEPTOIDES	61
5.1. Càncer	62
5.1.1. Resistència a múltiples fàrmacs (MDR)	62
5.1.1.1. Cribratge de la quimioteca	64
5.1.2. Control del cicle cel·lular	69
5.1.3. Cribratge de la quimioteca	70
5.2. Analgèsia. Receptor TRPV1	74
5.2.1. Cribratge de la quimioteca	75
5.3. Neuroprotecció. Receptor d'NMDA	79
5.3.1. Cribratge de la quimioteca	80
5.4. LPS	83
5.4.1. Cribratge de la quimioteca	84
5.5. Conclusions de l'activitat biològica	88
6. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	91
6.1. Consideracions generals	91
6.1.1. Instrumentació de la síntesi en fase sòlida	93
6.1.2. Controls qualitius en fase sòlida	94
6.1.2.1. Test del cloranil	94
6.1.2.2. Test del TNBS	95
6.1.3. Instrumentació de la síntesi en dissolució	95
6.2. Síntesi de la quimioteca de peptoides-II	96
6.3. Procediment general de la síntesi de peptoides	100
6.4. Estudi de la reactivitat de les amines de la quimioteca	104
6.4.1. Estudi per CG	104
6.4.1.1. Reacció en dissolució del clorur de cloroacetil amb mescleres equimolars d'amines	104
6.4.1.2. Reacció de substitució nucleòfila de clorur en fase sòlida utilitzant mescleres equimolars d'amines. Formació de glicinamides <i>N</i> -substituïdes	105
6.4.1.3. Formació de 2,5-piperazindiones en fase sòlida en introduir mescleres equimolars d'amines en la segona aminació	106

6.4.2. Estudi per HPLC	108
6.4.2.1. Reacció de substitució nucleòfila de derivats halogenats utilitzant mescles equimolars d'amines	108
6.4.2.1.1. Preparació de les benzamides d'un conjunt d'onze amines representatives de la quimioteca	108
6.4.2.1.1.1. Obtenció de la 4-bromometilbenzamida (2)	108
6.4.2.1.1.2. Procediment general de substitució nucleòfila de la 4-bromometilbenzamida (2) per les onze amines escollides	109
6.4.2.1.1.3. Obtenció de les benzamides 4 i 8 en fase sòlida	113
6.4.2.1.2. Obtenció del patró per a les rectes de calibració	114
6.4.2.1.3. Procediment generalment d'obtenció de les rectes de calibració de les benzamideses	115
6.4.2.1.4. Estudi de la reactivitat de les onze amines en fase sòlida utilitzant mescles equimolars	117
6.4.2.1.5. Estudi de la reactivitat de les onze amines en fase sòlida utilitzant mescles equireactives	118
6.4.2.1.6. Estudi de la reactivitat de les onze amines en dissolució utilitzant mescles equimolars	119
6.4.2.1.7. Estudi de la reactivitat de les onze amines en dissolució utilitzant mescles equireactives	120

2. INTRODUCCIÓ

En el context de la seva Tesi Doctoral,⁴⁶ Marc Humet va optimitzar i desenvolupar la síntesi d'una quimioteca de peptoides (trímers d'*N*-alquilglicines) en fase sòlida i en el format de rastreig posicional, formada per 10648 compostos.^{47,48}

Aquesta quimioteca va ser assajada vers diverses dianes terapèutiques: bloquejadors de receptors d'NMDA,^{49,50} inhibidors de l'acetilcolinesterasa, antimicrobians⁴⁸ i bloquejadors de l'activitat del canal TRPV1.⁴⁷ Es van identificar diferents compostos amb una elevada activitat, els quals estan actualment en procés d'optimització.

No obstant, en el decurs dels diferents processos de deconvolució, a l'hora de resintetitzar de forma individual determinats peptoides, es va comprovar la formació de subproductes ciclats a causa de l'atac nucleòfil d'una amina terciària d'una de les cadenes laterals de l'oligòmer sobre el cloroderivat corresponent, després de les etapes d'acilació.* Aquest fet s'havia produït quan en la primera i/o segona fonts de diversitat hi havia una amina amb un nitrogen terciari addicional. Per aquest motiu, en les diferents mescles de la

* L'esquema sintètic de la quimioteca s'explicarà a l'apartat 3.5.

quimioteca no hi havia tots els peptoides que s'esperava o bé aquests s'havien format en proporcions inferiors, i a més s'hi trobaven alguns productes de ciclació no esperats, com els que es mostren a la Figura 2.1.

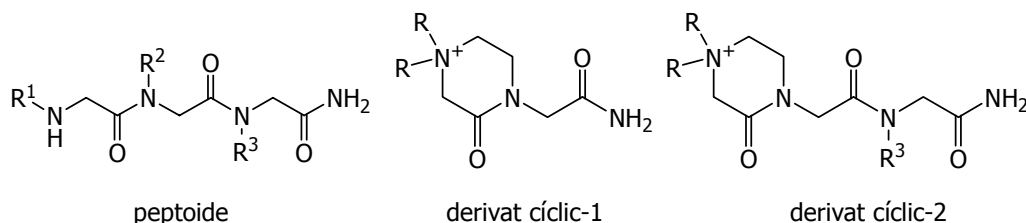


Figura 2.1. Compostos obtinguts en la quimioteca de peptoides-I. Els derivats cíclics es van obtenir quan en la primera i/o en la segona font de diversitat (cíclic-1 i cíclic-2, respectivament) hi havia una amina amb un nitrogen terciari addicional.

En el transcurs la seva Tesi Doctoral,⁵¹ Isabel Masip va aprofundir en aquest problema i el va aprofitar per sintetitzar una quimioteca de compostos cíclics de tetraalquilamoni,⁵² la qual va ser assajada vers diferents dianes terapèutiques, entre les quals destaquen el receptor TRPV1, involucrat en el dolor inflamatori, i el fenotip de MDR, involucrat en la resistència a múltiples fàrmacs.

Tot i obtenir bons resultats amb la quimioteca de peptoides-I, els problemes esmentats podrien haver conduït a l'obtenció de falsos negatius en el procés de cribratge, degut a que les mescles no contenien tots els peptoides que s'esperava o almenys es trobaven en concentracions inferiors a les esperades. Per aquest motiu, es va plantejar la síntesi d'una segona quimioteca de peptoides (peptoides-II) en què s'evités la formació dels compostos ciclats. Aquesta quimioteca es va sintetitzar juntament amb Isabel Masip i Marisa Guardiola.

2.1. ANTECEDENTS

La síntesi de quimiotèques de pèptids en fase sòlida ha permès la identificació de seqüències amb una elevada activitat biològica *in vitro* davant de determinades dianes.⁵³ No obstant, els pèptids presenten limitacions en la seva aplicació farmacèutica degut als problemes en la seva activitat *in vivo*, ja esmentats anteriorment. Aquests problemes fan necessària la seva modificació per aconseguir millorar aquests desavantatges i desenvolupar compostos amb activitats *in vivo* acceptables.

En aquest sentit, s'ha realitzat un gran esforç per desenvolupar peptidomimètics, compostos estructuralment semblants als pèptids per tal de mantenir la seva activitat biològica, però que no presenten els desavantatges mencionats. Entre els peptidomimètics més interessants es troben les glicines *N*-substituídes o peptoides, els quals seran l'objecte d'estudi d'aquesta memòria.

Formalment, les cadenes laterals del carboni ζ de l'esquelet peptídic es traslladen cap el nitrogen de l'enllaç amida en l'esquelet dels peptoides, donant lloc a amides disubstituídes. Aquesta diferència estructural confereix una estabilitat més elevada a la hidròlisi i una menor polaritat. Aquestes característiques es tradueixen en una elevada resistència a les proteases de l'organisme i millor absorció intestinal.⁴⁴ A més, hi ha una llibertat conformacional més gran degut a l'absència de l'estructura secundària característica dels pèptids, en no formar-se ponts d'hidrogen intramoleculars entre l'hidrogen d'amida i els carbonils. Així mateix, l'absència de quiralitat i l'àmplia varietat de blocs de construcció (*building blocks*) fan dels peptoides uns bons candidats per interaccionar amb diferents dianes terapèutiques.⁴⁵

La primera síntesi de peptoides en fase sòlida aplicada a la química combinatòria va ser realitzada per Simon i col.⁴⁵ emprant l'estratègia estàndard dels pèptids, amb *N*-alquilglicines protegides amb Fmoc, com a components monomèrics sintetitzats prèviament, i amb PyBop o PyBrop com a agents d'acoblament (vegeu Figura 2.2, part superior).

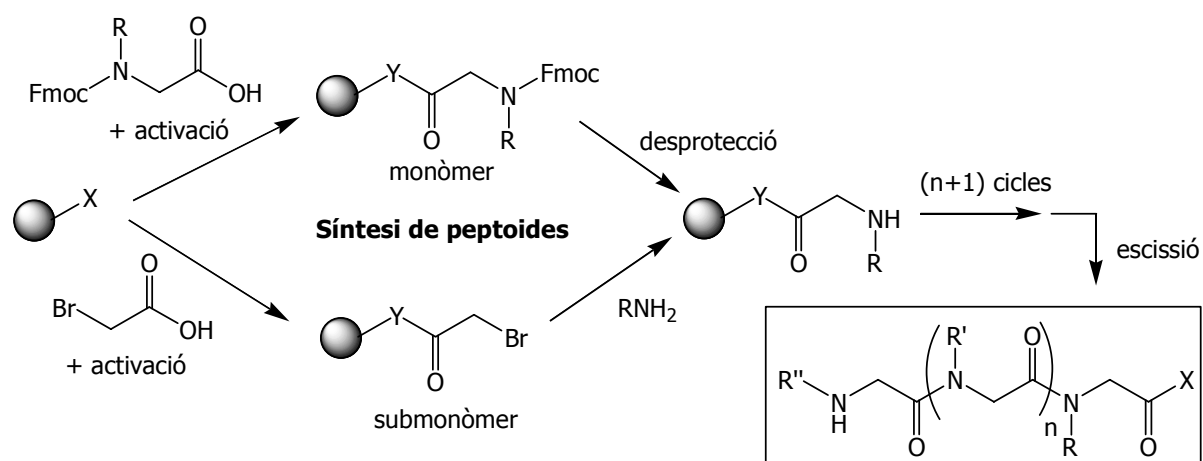


Figura 2.2. Síntesi en fase sòlida de peptoides. Dalt: acoblament d'*N*-alquilglicines protegides amb Fmoc.⁴⁵ Baix: acoblament de submonòmers, haloàcids i amines primàries.⁵⁴ $\text{X}=\text{NH}_2, \text{OH}$; $\text{Y}=\text{NH}, \text{O}$.

Per altra banda, Zuckermann i col.^{54,55} van plantejar una síntesi més senzilla mitjançant l'aproximació del submonòmer, on cada cicle implica dues etapes: la formació de l'enllaç amida amb àcid bromoacètic emprant DIC com a agent activant i el desplaçament de l'àtom de brom per una amina primària, obtenint el monòmer corresponent d'*N*-alquilglicina. La successió d'aquests cicles conduiria al compost desitjat (vegeu Figura 2.2, part inferior).

Liskamp i Kruijtzter van descriure la síntesi de peptoides en dissolució basada en l'acoblament d'unitats d'*N*-alquilglicina protegides amb Fmoc.⁵⁶ En aquest cas, treballar en dissolució pot ser adequat per obtenir peptoides concrets a gran escala, tot i que cal utilitzar menys equivalents de reactius per facilitar la seva eliminació i la purificació del compost final.

L'estratègia del submonòmer presentava certs avantatges respecte l'estratègia d'*N*-alquilglicines: la possibilitat d'emprar un gran nombre d'amines primàries comercials en l'etapa d'acoblament per obtenir quimiotèques amb una àmplia diversitat i l'eliminació de les etapes de síntesi prèvia dels monòmers. Amb aquesta metodologia, Zuckermann i col. van sintetitzar una quimioteca mitjançant el format de divisió i mescla, de la qual es van identificar, entre d'altres, antagonistes del receptor ζ_1 -adrenèrgic amb una activitat de l'ordre nanomolar.²⁰

Així doncs, degut als avantatges esmentats, es va seguir l'estratègia del submonòmer per a la síntesi de la quimioteca de peptoides-II en fase sòlida, de forma anàloga a com s'havia fet en la quimioteca de peptoides-I. En aquest cas, les amines amb una amina terciària en la seva cadena lateral es van introduir únicament en la tercera font de diversitat, per evitar la formació dels compostos ciclats.

En aquest sentit, en el context de la seva Tesi Doctoral, Joaquim Messeguer està treballant en la síntesi d'unitats d'*N*-alquilglicina per aquelles amines que contenen un nitrogen addicional en la seva estructura. D'aquesta manera es podrà sintetitzar, en un futur pròxim, una quimioteca de peptoides amb aquest tipus d'amines en la primera i/o segona fonts de diversitat sense tenir els problemes de formació dels subproductes cíclics de la quimioteca de peptoides-I.

3. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES

3.1. SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

Un dels principals avantatges que presenta la síntesi en fase sòlida és la facilitat amb la qual els compostos poden ser aïllats en cada etapa sintètica, eliminant les impureses i altres productes de reacció no units a la resina per filtració i rentat del suport sòlid. Això proporciona la possibilitat de realitzar síntesis d'una forma ràpida i paral·lela que generin quimioteques combinatòries. Amb tot, s'han de tenir en compte una sèrie de consideracions.

És necessari que la seqüència sintètica sigui fàcilment adaptable a la fase sòlida, tenint en compte els aspectes mecànics de la resina escollida, la qual haurà de suportar les condicions requerides per a la síntesi.

Les etapes d'introducció de diversitat haurien de ser ràpides i transcórrer de forma anàloga per a tots els reactius emprats ja que, especialment en les síntesis amb mesclures, una diferència de reactivitat pot implicar que no es formin tots dels compostos esperats, obtenint-se més quantitat d'aquells en què els reactius presenten unes condicions de reactivitat més favorables. Quan es treballa en síntesi en paral·lel de compostos individuals, aquest aspecte

no resulta tan important ja que una menor reactivitat es pot arribar a compensar amb els excessos de reactius que s'empren per assegurar la màxima conversió. Això és cert, sempre i quan aquesta diferència de reactivitat no provoqui demores importants en la finalització de la reacció, amb la qual cosa el concepte de síntesi en paral·lel perdria sentit.

Com s'ha esmentat, en una síntesi en fase sòlida es solen utilitzar grans excessos de reactius per assegurar conversions elevades. Això es degut a que el control de l'evolució dels processos pot resultar complex. Així doncs, quan la reacció ho permet es controla per anàlisi de l'aparició o desaparició de determinats grups funcionals sobre la pròpia resina, mitjançant tests qualitius colorimètrics (test de la ninhidrina, del cloranil, de l'àcid pícric, del TNBS, etc). En altres casos s'ha de procedir a l'escissió dels compostos de la fase sòlida i dur a terme les anàlisis amb les tècniques convencionals de la síntesi en dissolució, com RMN, CG-MS, CL-MS o MALDI. No obstant, també trobem a la bibliografia procediments per analitzar l'evolució de les reaccions sense haver d'escindir el producte de la resina, com l'anomenat angle màgic en RMN,⁵⁷⁻⁶⁰ tot treballant amb resines de tipus TentaGel, o per espectroscopia d'IR.^{60,61}

Una vegada optimitzada la síntesi, els excessos de reactius permeten accelerar les reaccions i assegurar que tinguin conversions elevades en temps més curts, i inclús en moltes ocasions cada etapa sintètica es fa per duplicat.

3.1.1. ELECCIÓ DEL SUPORT SÒLID

La resina emprada per a la síntesi de la quimioteca va ser del tipus Rink amida. L'ús d'una resina de tipus amida, enlloc d'una resina Wang o d'altres resines amb una funcionalització de tipus ester, va ser degut, principalment, a que el fet de presentar un impediment estèric i una densitat electrònica més grans minimitza els problemes potencials d'aminòlisi que ocorren amb suports sòlids de tipus ester,⁶² especialment en les etapes d'acoblament d'amina (on s'utilitza un elevat excés de reactiu) i en presència de grups bàsics nucleòfils (vegeu Figura 3.1).

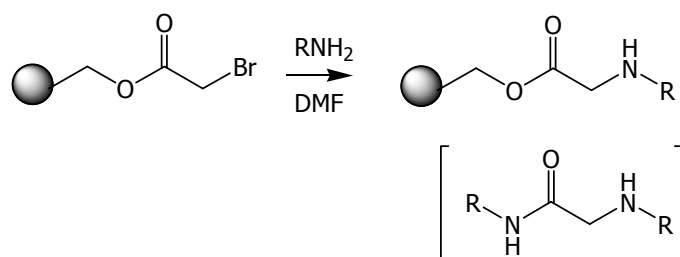


Figura 3.1. Esquema de l'etapa d'acoblament d'una amina primària en una resina de tipus ester. Formació del producte desitjat d'acoblament i del subproducte d'aminòlisi.

La resina Rink amida consisteix en un esquelet de poliestirè amb un 1% de divinilbenzè (DVB). El grau de DVB emprat permet arribar a una solució de compromís entre l'estabilitat mecànica i el grau d'inflat de la resina. La resina Rink aconseguix un grau d'inflament òptim amb els dissolvents DCM i DMF. La molècula d'unió o *linker* entre el polímer i la molècula a sintetitzar constitueix l'anomenada molècula Rink amida AM (vegeu Figura 3.2).

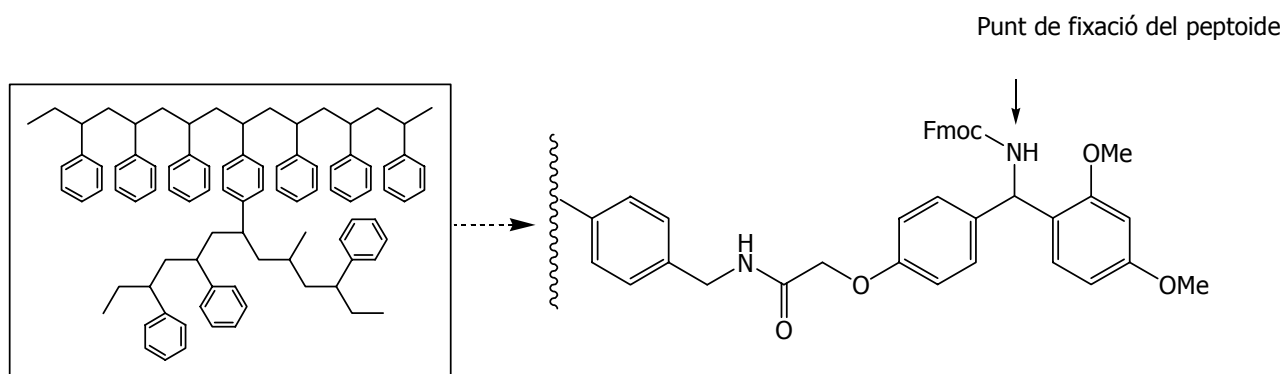


Figura 3.2. Resina Rink amida: esquelet de poliestirè amb un 1% de DVB (esquerra). Molècula d'unió o *linker* (dreta).

Una vegada el grup protector Fmoc és eliminat, el grup amino unit a la resina es pot acilar fàcilment emprant mètodes estàndard per a la formació de l'enllaç amida. L'amida resultant és estable a una gran varietat de condicions de reacció, però s'escindeix en medi àcid fort (TFA). La resina és tant més làbil al medi àcid com més estable sigui el catió format en l'escissió. En aquest cas, la presència dels grups alcoxi augmenten la labilitat en establir el carbocatió intermediari. Després de l'escissió del suport sòlid, la resina no pot ser reutilitzada ja que el grup amino resta unit a la molècula sintetitzada.

3.1.2. MANIPULACIÓ DE LA RESINA

Per facilitar la manipulació de la resina i degut al format del rastreig posicional emprat per a la síntesi de la quimioteca, es va escollir la tècnica de les *bosses de te* desenvolupada per R. Houghten.¹⁵ Les bossetes estaven formades per una malla de polipropilè de dimensions 5 x 5 cm que contenia 400 mg de resina Rink amida (vegeu Figura 3.3). D'aquesta manera, les bosses eren permeables a reactius i dissolvents però no deixaven passar els grànuls de la resina. Cadascuna de les bosses estaven segellades tèrmicament i etiquetades de forma permanent per poder identificar-les al llarg de tota la síntesi. Aquestes bosses es van preparar al laboratori del Dr. Enrique Pérez-Payá, a la Universitat de València.



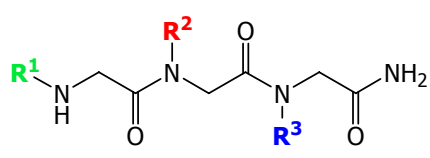
Figura 3.3. Bossa de te amb resina Rink amida emprada per a la síntesi de la quimioteca.

3.2. FORMAT DE LA QUIMIOTECA

La quimioteca es va dissenyar seguint el format de rastreig posicional i es va limitar a la introducció de tres fonts de diversitat, degut a que generalment els compostos biològicament més actius tenen pesos moleculars inferiors a 600 Da.

Tant en la primera com en la segona posicions de diversitat (R^3 i R^2 , respectivament) es van emprar 16 amines primàries i per a la tercera posició (R^1) se'n van emprar 20. D'aquesta manera es van obtenir dues subquimiotèques amb 16 bossetes o mesclades cadascuna i 320 compostos per mescla, i una tercera subquimioteca amb 20 mesclades i 256 compostos per mescla. En total es van obtenir 5120 peptoides diferents en el conjunt de la quimioteca, on cada compost es trobava per triplicat en estar present en les tres subquimiotèques.

Cadascuna de les tres subquimiotèques donava informació sobre la posició del trímer que es definia en aquella subquimioteca. Les mescles o bosses numerades de l'1 a la 20 tenien definida la tercera font de diversitat (R^1), les mescles de la 21 a la 36 tenien definida la segona (R^2) i les mescles de la 37 a la 52 tenien definida la primera font de diversitat (R^3) (vegeu Figura 3.4). D'aquesta manera, una de les posicions estava definida (O) en cada mescla per una determinada amina i les altres dues posicions eren aleatòries (X), és a dir, eren una mescla de les 16 o 20 amines emprades, depenent de la posició.

	Número de mescla	R^1	R^2	R^3
	1-20	O	X	X
	21-36	X	O	X
	37-52	X	X	O

O Cadena lateral definida
X Cadena lateral aleatòria

Figura 3.4. Esquelet bàsic comú a la quimioteca de peptoides i organització de les mescles en funció de la posició del trímer que defineixen. Les fonts de diversitat es denoten com R^1 , R^2 i R^3 .

3.3. CRITERI DE NOMENCLATURA DELS PEPTOIDES

La forma d'anomenar els peptoides en aquest treball s'ha fet seguint el criteri emprat en els pèptids, és a dir, començant per l'extrem *N*-terminal i acabant pel C-terminal. Aquest ordre és l'invers del procés de síntesi. Per aquest motiu i per tal d'evitar confusions, la introducció de les fonts de diversitat durant la síntesi es denota en sentit contrari, començant per R^3 (primera font de diversitat) i acabant per R^1 (tercera font de diversitat).

Per altra banda, al llarg d'aquesta memòria s'anomenaran els peptoides definits d'una forma abreujada per tal de facilitar la seva identificació (vegeu Figura 3.5). Així doncs, començant per l'extrem *N*-terminal i acabant pel C-terminal s'anomenaran les amines que defineixen cada posició del peptoide, tenint en compte la numeració de les amines que s'especificarà a la Figura 3.6 del següent apartat.

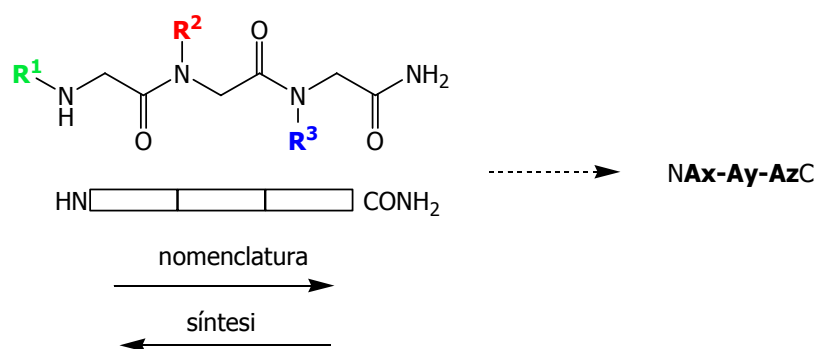


Figura 3.5. Sentit escollit per a la nomenclatura dels peptoides i criteri utilitzat per anomenar-los, on Ax indica l'amina de la tercera posició de diversitat (R^1), Ay l'amina de la segona posició (R^2) i Az l'amina de la primera (R^3).

3.4. DIVERSITAT DE LA QUIMIOTECA

3.4.1. ELECCIÓ DE LES FONTS DE DIVERSITAT

Tenint en compte diferents criteris d'assequibilitat comercial i econòmica, es van escollir 20 amines primàries. En general, es van emprar les mateixes amines que en la quimioteca de peptoides-I, però es van eliminar aquelles que no havien donat cap resultat positiu en les dianes assajades amb la primera quimioteca. Per altra banda, amb l'objectiu d'evitar la formació de compostos ciclats no desitjats, es van eliminar de la primera i segona posicions (R^3 i R^2) aquelles amines que tenien un nitrogen terciari addicional, però sí que es van introduir en la tercera posició (R^1), perquè en els resultats del cribratge de la quimioteca de peptoides-I es van identificar compostos actius que contenien aquest tipus d'amina.

En general, les amines escollides van ser totes del tipus $R\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$, per intentar que tinguessin reactivitats similars, i es mostren a la Figura 3.6. Aquest conjunt d'amines tenia una funcionalització variada per conferir a la quimioteca una elevada diversitat, però evitant la presència d'altres grups funcionals a la seva estructura que poguessin donar reaccions secundàries, tals com alcohols, tiols, àcids carboxílics, etc., o que fos necessari una protecció addicional durant la síntesi de la quimioteca. Les amines **A6**, **A16**, **A19** i **A21** amb un nitrogen terciari addicional a la cadena lateral es van introduir únicament en la tercera posició de diversitat (R^1).

Així doncs, les amines escollides presentaven diferències d'hidrofobicitat, d'aromaticitat, de càrrega, de dimensió, de forma, de flexibilitat, de capacitat de formar ponts d'hidrogen i amb grups donadors o electroatracients d'electrons.

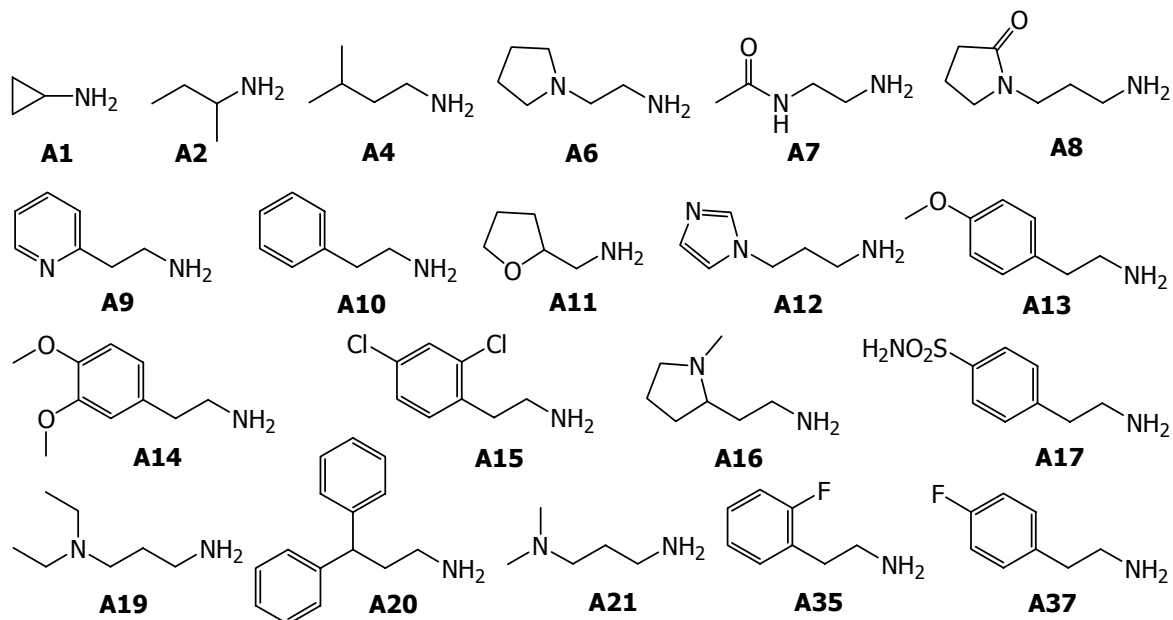


Figura 3.6. Conjunt d'amines emprades en la quimioteca de peptoides-II. Les amines **A6**, **A16**, **A19** i **A21** es van introduir només en la tercera font de diversitat (R^1).

3.4.2. PROVES DE REACTIVITAT

En la quimioteca de peptoides-I es va realitzar un assaig d'equiactivitat d'un conjunt d'amines de la quimioteca previ a la síntesi de la mateixa. A la Figura 3.7 s'ha esquematitzat l'assaig, el qual va consistir en la reacció de substitució nucleòfila de la cloroacetamida amb 2 eq. de dues amines diferents, emprant la ciclohexilamina com amina de referència, amb Et_3N i iodur de tetrabutilamoni (ITBA).

Les amines estudiades van ser l'**A10**, l'**A13**, l'**A15** i l'**A20**, i es van comparar els productes obtinguts per ^1H -RMN, quantificant les integrals dels hidrògens del carboni ζ del grup carbonil. Els resultats van mostrar que les reactivitats d'aquest conjunt d'amines no presentaven diferències significatives.

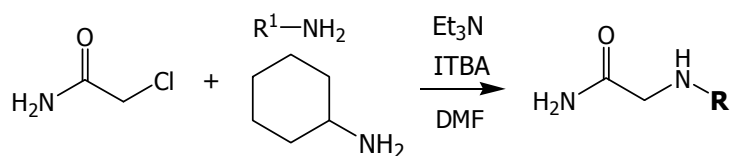


Figura 3.7. Esquema general de substitució nucleòfila de la cloroacetamida emprant mescles equimolars d'una de les amines en estudi (**A10**, **A13**, **A15** o **A20**) i l'amina de referència, la ciclohexilamina.

D'acord amb aquests resultats, es va dur a terme la síntesi de la quimioteca de peptoides-II. No obstant, posteriorment a la síntesi i en funció dels resultats obtinguts del cribratge de la quimioteca davant diferents dianes biològiques, es va realitzar un estudi de reactivitat més aprofundit i amb resultats força diferents, el qual s'explicarà a l'apartat 4 d'aquesta memòria.

3.5. PROCEDIMENT PER A LA SÍNTESI DE LA QUIMIOTECA

3.5.1. PLANTEJAMENT DE LA SÍNTESI

La seqüència plantejada per a la síntesi de la quimioteca de peptoides-II es mostra a la Figura 3.8. La síntesi va comportar un total de 8 etapes, de les quals la desprotecció del grup Fmoc dels grups amino units a la resina, les etapes d'acilació i tots els rentats realitzats entre les diferents etapes de síntesi van ser comunes a totes les mescles. En les etapes d'aminació, les mescles que definien una de les posicions de diversitat es van separar, mentre que les altres mescles es van mantenir juntes.

Les condicions emprades per a la síntesi ja havien estat optimitzades durant la quimioteca de peptoides-I per Marc Humet, tot i que es va evitar l'ús del clorur de cloroacetil perquè donava lloc a coloracions molt fosques de la resina. En el seu lloc, es va emprar l'àcid cloroacètic amb DIC com agent activant, tal i com Zuckermann i col. van suggerir posteriorment al seu plantejament inicial en l'aproximació del submonòmer per a la síntesi de peptoides.⁶³

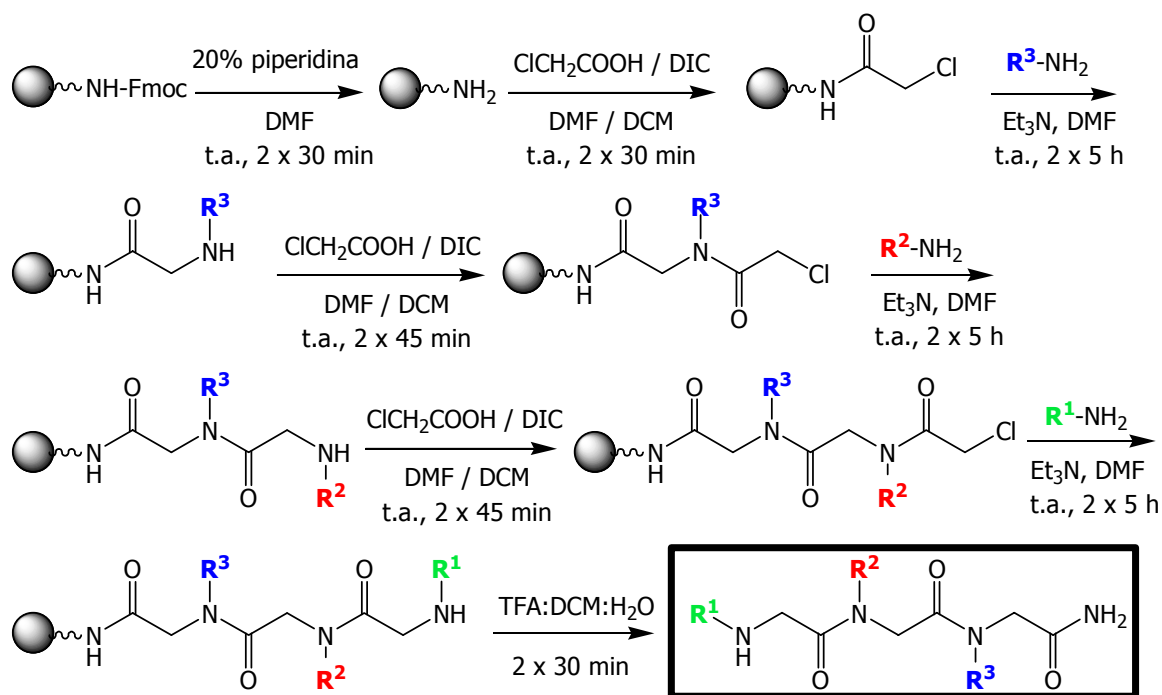


Figura 3.8. Esquema plantejat per a la síntesi de la quimioteca de peptoides-II: etapes de desprotecció, d'acilació i d'aminació successives, i d'escissió final.

Per altra banda, la utilització de grans volums de dissolvents degut a la metodologia de les bossetes de resina va implicar l'ús de concentracions baixes de reactius. Per aquest motiu i per tal d'obtenir una màxima conversió, es va utilitzar un excés de reactius de 20 eq. i es van realitzar totes les etapes per duplicat, allargant el temps de reacció fins a 5 h en les etapes d'acoblament d'amina. No obstant, Kodadek i col. van descriure a l'any 2002 la síntesi de peptoides fent servir un forn de microones domèstic de 1000 W de potència per accelerar les etapes d'acilació i d'aminació, emprant 15 s per a cada reacció i per duplicat. En aquestes condicions van obtenir millors resultats de rendiments i pureses que els obtinguts en una síntesi convencional a temperatura ambient (30 min per a les reaccions d'acilació i 2 h per a les d'aminació, ambdues per duplicat).⁶⁴ Molt recentment, Blackwell i col. han fet servir un forn de microones comercial per sintetitzar peptoides homopentàmers, emprant 25 s a 35 °C per a les etapes d'acilació i 90 s a 95 °C per a les d'aminació.⁶⁵

3.5.2. PROCEDIMENT GENERAL PER A LA SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE MESCLES

Per sintetitzar una quimioteca amb el format de rastreig posicional, s'ha de seguir una metodologia concreta en les etapes d'introducció de diversitat, com s'ha esquematitzat en la Figura 3.9.

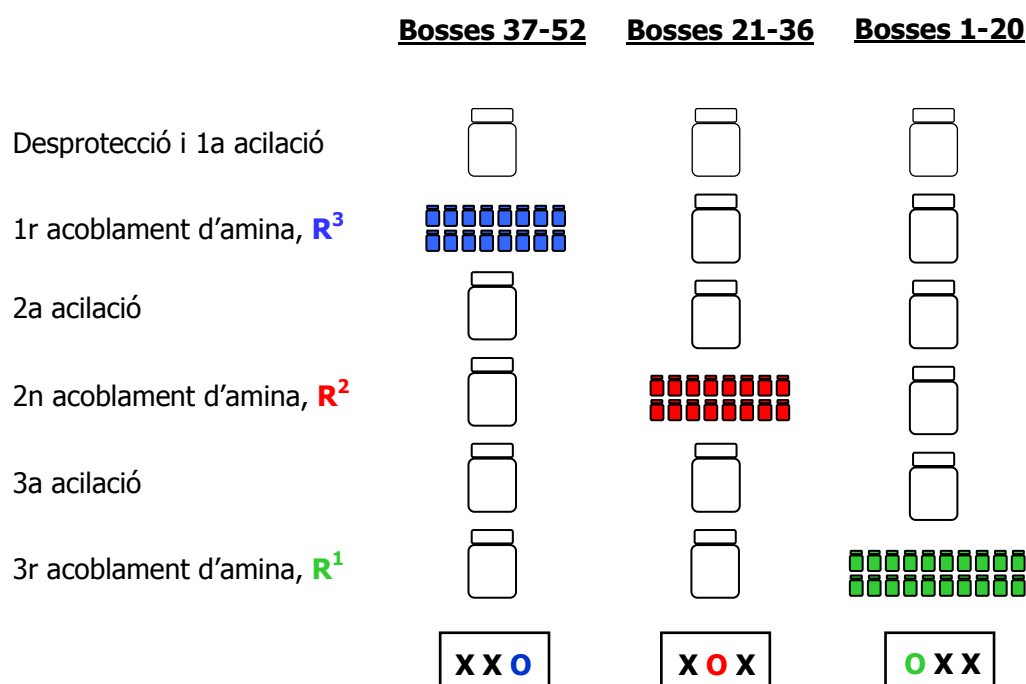


Figura 3.9. Esquema de la manipulació i organització de les diferents bossetes en la síntesi de la quimioteca de peptoides-II en el format de rastreig posicional. **O**: posició definida; **X**: posició aleatòria.

Per una banda, les bossetes de cada quimioteca es van posar juntes en ampolles de polipropilè d'1 litre per realitzar les etapes comunes de desprotecció del grup Fmoc, d'acilacions i de rentats entre cada etapa sintètica. En canvi, en les etapes d'introducció de diversitat, les bossetes de la quimioteca que havien de tenir la posició definida es van separar en ampolles de polipropilè de 50 ml i cadascuna d'elles es va fer reaccionar amb la seva corresponent amina (20 eq.) en DMF i amb Et₃N. La resta de les bossetes, amb les posicions no definides per aquell acoblament, posicions aleatòries, es van fer reaccionar conjuntament en les ampolles d'1 litre amb una mescla equimolar de les amines (20 eq. de cada amina) en DMF i amb Et₃N.

El control de les diferents etapes es va realitzar amb els tests qualitius del TNBS, per amines primàries, i del cloranil, per amines secundàries, sobre un peptoide control definit que es va sintetitzar en paral·lel a la quimioteca i en les mateixes condicions de reacció que la resta de peptoides. Per aquest control es van escollir amines que podien resultar problemàtiques a la síntesi degut al seu volum i als substituents que presentaven. En aquest cas, es va sintetitzar el peptoide N20-15-17C (**1**), i en finalitzar cada etapa es va tallar un extrem de la bosseta per extreure uns granets de resina i es va tornar a segellar. Els tests corresponents van donar positiu en totes les etapes.

Després de l'escissió final de la resina, no es va poder determinar la puresa dels peptoides degut a la presència d'un nombre tan elevat de compostos (256 o 320 peptoides) en cada mescla. No obstant, les anàlisis per CL-EM del peptoide control **1** (vegeu Figura 3.10) van confirmar el seu pes molecular i van mostrar un perfil cromatogràfic amb una puresa superior al 90%. El peptoide control també es va caracteritzar mitjançant els espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN, tot i que l'assignació de tots els senyals no va ser possible degut a la presència de diferents conformers del peptoide.

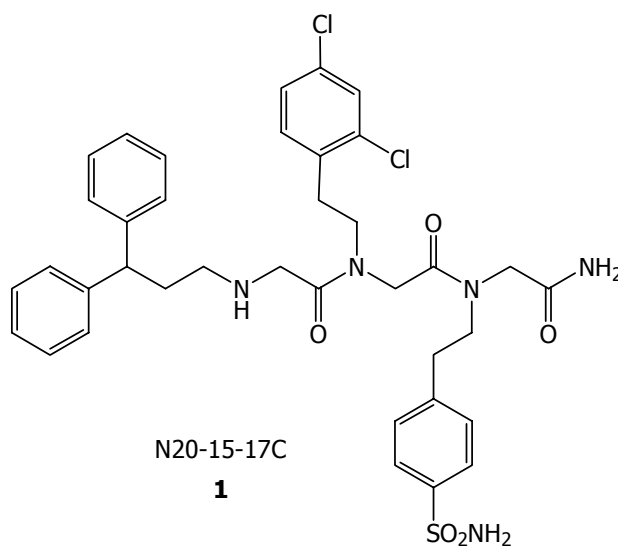


Figura 3.10. Estructura del peptoide control **1** sintetitzat de forma paral·lela a la síntesi de la quimioteca de peptoides-II.

Els peptoides es trobaven en forma de sals de trifluoroacetat, en provenir de l'evaporació dels dissolvents del còctel de tall de la fase sòlida. Sense cap purificació addicional, les mescles de la quimioteca es van dividir en mostres alíquotades i es van liofilitzar a una

concentració de 5 mg/ml, el que suposava una concentració aproximada de 30 μ M per peptòide en cada mescla. Finalment, es van distribuir aquestes mostres alíquotes entre els diferents grups que van dur a terme els assaigs d'activitat biològica contra les diferents dianes d'interès terapèutic.

3.6. PROCEDIMENT PER A LA SÍNTESI INDIVIDUAL DE PEPTÒIDES

El cribratge de les mescles de la quimioteca de peptòides-II davant diferents dianes biològiques d'interès terapèutic va conduir a la identificació de peptòides amb activitat, com s'explicarà de forma detallada a l'apartat 5 d'aquesta primera part de la memòria. Per validar els resultats del cribratge va ser necessari resintetitzar els peptòides identificats amb activitat de forma individual, per tornar-los a assajar.

La seqüència seguida per a la síntesi de peptòides de forma individual es va realitzar de forma anàloga a la que es va realitzar per a la síntesi de la quimioteca de peptòides-II (vegeu Figura 3.8), però en aquest cas cada posició del trímer estava definida per una amina determinada. A més, la síntesi dels peptòides es va realitzar de forma paral·lela i en xeringues de polipropilè de 10 ml de capacitat, en comptes de les bossetes de te que es van fer servir per a la síntesi de la quimioteca.

Els perfils cromatogràfics d'HPLC dels crús de reacció després de l'escissió dels peptòides de la resina van mostrar pureses, generalment, superiors al 90%. A la Figura 3.11 es mostren els perfils cromatogràfics dels crús de reacció d'alguns dels peptòides, a mode d'exemple. Aquestes mostres són les que es van enviar als laboratoris encarregats de fer l'assaig biològic, però en cas que es requerís una puresa més elevada, els peptòides es van purificar per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir uns rendiments finals de l'entorn del 40-60% i amb pureses superiors al 98% per HPLC, en tots els casos. Els peptòides es van identificar pel seu espectre de masses i per les seves dades espectroscòpiques. No obstant, la presència de diferents conformacions dels peptòides va conduir a uns espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN molt complexos, fent necessària la realització dels experiments gDQCOSY i gHSQC per confirmar l'assignació dels senyals del confòrmer majoritari en cada cas.

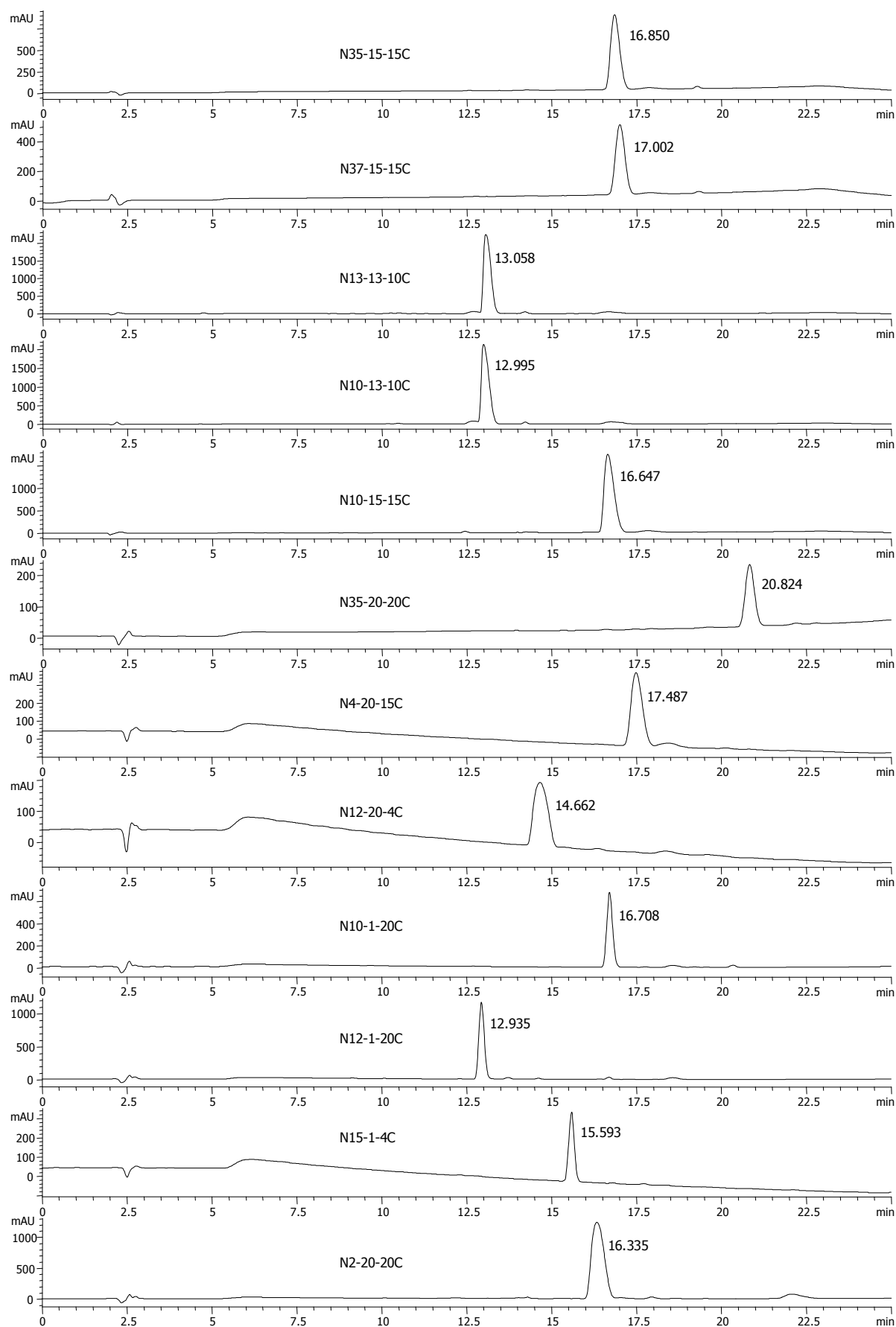


Figura 3.11. Perfils cromatogràfics d'HPLC dels crús de reacció de 12 peptoides que van mostrar activitat davant alguna de les dianes biològiques estudiades. Al costat de cada pic cromatogràfic s'indica el seu temps de retenció per HPLC, en min.

4. ESTUDIS DE REACTIVITAT DE LES AMINES DE LA QUIMIOTECA

Tal i com s'ha comentat anteriorment, en sintetitzar una quimioteca de mescles és important realitzar un estudi previ per avaluar les possibles diferències de reactivitat que poden haver entre els reactius emprats en les diferents fonts de diversitat. Aquest estudi resulta molt important en el format de rastreig posicional on es treballa amb mescles de reactius en les etapes d'introducció de diversitat. L'existència de diferències de reactivitat pot implicar que no es formin tots els productes esperats o que aquests es trobin en les mescles finals en concentracions inferiors a les esperades, podent-se produir falsos negatius durant el cribratge de les mescles davant una diana biològica.

També s'ha comentat que a l'hora de dissenyar i sintetitzar la quimioteca de peptoides-II es van tenir en compte els resultats dels assaigs de reactivitat que s'havien realitzat a la quimioteca de peptoides-I, els quals no havien mostrat diferències significatives entre les quatre amines estudiades.

No obstant, el fet que als assaigs biològics realitzats fins aquell moment havien donat més activitat aquells peptoides que contenien en alguna de les seves posicions determinades

amines, mentre que altres amines no mostraven aparentment activitat, ens va conduir a pensar en la necessitat de realitzar un estudi molt més ampli i detallat de la reactivitat de totes les amines emprades en la quimioteca.

En aquest capítol de la tesi s'explicaran els diferents assaigs de reactivitat realitzats, així com els mètodes de detecció, d'anàlisi i de comparació de les 20 amines de la quimioteca de peptoides-II. Al final del capítol es farà un breu resum comparant les diferències observades en la reactivitat d'aquestes amines.

4.1. ESTUDIS DE REACTIVITAT PER CG

Inicialment, es va pensar en la tècnica de CG per analitzar i quantificar els productes presents en una mateixa mescla, per ser una tècnica prou precisa i amb una elevada resolució per diferenciar compostos amb temps de retenció molt semblants ja que, generalment, s'obtenen pics reproduïbles i suficientment estrets perquè no es solapin.

4.1.1. ASSAIGS DE REACTIVITAT EN DISSOLUCIÓ. ASSAIGS AMB EL CLORUR DE CLOROACETIL

Els assaigs de reactivitat de les amines de la quimioteca en dissolució amb el clorur de cloroacetil es van dur a terme distingint dos grups d'amines depenent de la presència o absència de substituents aromàtics en la seva estructura, per tal de facilitar la seva comparació per CG. A cada grup es va afegir una amina com a referència, concretament l'amina **A11**, per al grup sense substituents aromàtics, i l'amina **A15**, per al grup amb substituents aromàtics.

Així doncs, la reacció d'acilació es va realitzar fent reaccionar el clorur de cloroacetil amb una mescla equimolar de 4/5 amines, amb la seva corresponent amina de referència, emprant DCM com a dissolvent i K_2CO_3 com a base per captar l'HCl generat a la reacció. L'**A17** es va descartar en aquest estudi en no ser soluble en el dissolvent de reacció (vegeu Figura 4.1).

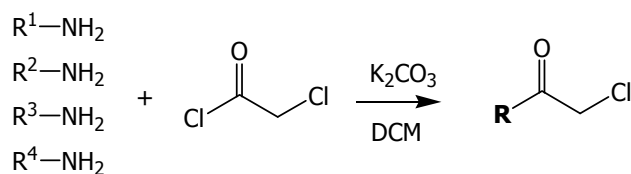


Figura 4.1. Esquema general d'acilació amb el clorur de cloroacetil emprant mescles equimolars d'amines, on **R** pot ser R¹, R², R³ o R⁴.

Les mescles de les amides resultants es van analitzar per CG, comparant les seves àrees en relació a l'amida de la corresponent amina de referència. A la Taula 4.1 es mostren els valors obtinguts, així com la relació d'àrees de les amines de partida respecte les amines de referència, i a la Taula 4.2 es mostra la relació d'àrees de les amines de referència i dels seus corresponents productes d'acilació. En el cas de l'amina **A12**, el producte d'acilació no va ser detectat per CG. Les amides de cada mescla es van identificar per CG-EM.

Taula 4.1. Relacions d'àrees per CG de les amines i dels productes d'acilació resultants respecte les corresponents referències, les quals es mostren en negreta. Les amines **A1**, **A2** i **A4** no es van detectar per CG en ser molt volàtils. L'**A17** no es va incloure en aquest estudi en no ser soluble en DCM.

Amina	Àrea amina / Àrea A11	Àrea amida / Àrea amida 11	Amina	Àrea amina / Àrea A15	Àrea amida / Àrea amida 15
A1	-	0.58	A9	0.69	0.45
A2	-	0.37	A10	1.07	0.95
A4	-	0.44	A13	0.96	0.87
A6	1.13	0.85	A14	0.92	0.88
A7	0.41	0.14	A15	1	1
A8	1.15	0.42	A17	-	-
A11	1	1	A20	1.01	0.63
A12	0.92	-	A35	0.99	0.98
A16	1.54	0.68	A37	1.02	0.90
A19	0.95	0.70			
A21	0.75	0.36			

Taula 4.2. Relacions d'àrees per CG de les amines de referència i dels seus productes d'acilació resultants.

Amina	Àrea A11 / Àrea A15	Àrea amida 11 / Àrea amida 15
A11	0.52	0.60
A15	1	1

Val a dir que l'anàlisi i comparació dels valors obtinguts dels productes d'acilació per CG que s'expliquen a continuació es van realitzar tenint en compte els valors relatius inicials de les amines per CG, ja que una de les possibles causes de les diferències observades en els valors de reactivitat de les amines podrien ser fruit, simplement, de la diferent manera de cremar els productes al detector del cromatògraf de gasos.

En termes generals, s'observa com les amines amb substituents aromàtics mostren un comportament similar entre elles, a excepció de l'amina **A9**, probablement degut al seu caràcter heteroaromàtic, i l'**A20**, probablement degut a la presència de dos anells aromàtics, les quals van mostrar una reactivitat inferior respecte les altres amines aromàtiques, al voltant del 65%. Per altra banda, entre les amines sense substituents aromàtics s'observa una reactivitat molt més dispersa entre elles i inferior al de les amines aromàtiques. Cal destacar les amines **A7** i **A8** que van mostrar tan sols un 35% de reactivitat, ambdues amb un enllaç amida en la seva cadena lateral. Les amines **A1**, **A2** i **A4** van mostrar també valors baixos de reactivitat probablement degut a que són les amines més petites de la quimioteca. En el cas de les amines **A16** i **A21** es va observar una reactivitat al voltant del 45%, ambdues amb una amina terciària en la seva cadena lateral, però aquesta disminució de reactivitat no es va observar de forma tan important en les altres dues amines que també contenen un grup amino terciari (**A6** i **A19**), les quals van mostrar una reactivitat al voltant del 75%.

Aquests resultats van donar una idea inicial de la diferència de reactivitat que hi podia haver entre les amines de la quimioteca. No obstant, les etapes de la síntesi de la quimioteca on es va introduir la diversitat i, per tant, on es va poder produir competència i diferència de reactivitat entre les amines, eren reaccions de substitució nucleòfila sobre el cloroderivat unit a la fase sòlida, i no una reacció d'acilació en dissolució. Per tal de poder obtenir resultats més afins als que es van poder produir durant la síntesi de la quimioteca, es van realitzar els estudis en fase sòlida que s'expliquen a continuació.

4.1.2. ASSAIGS DE REACTIVITAT EN FASE SÒLIDA. FORMACIÓ DE GLICINAMIDES I DE DKPS

4.1.2.1. Assaigs de reactivitat per a la formació de glicinamides *N*-substituïdes

De forma anàloga a la síntesi de peptoides, es va plantejar l'esquema general descrit a la Figura 4.2 per a l'obtenció de glicinamides *N*-substituïdes, com a model per fer competir les amines en l'etapa d'acoblament. Es va pensar que els resultats obtinguts en aquest estudi de reactivitat de les amines en fase sòlida es podria estendre a les tres posicions de diversitat presents en els peptoides de la quimioteca. D'aquesta manera, els residus finals amb les mescles de les glicinamides *N*-substituïdes obtingudes es podien analitzar i quantificar fàcilment per CG. La comparació i quantificació per $^1\text{H-RMN}$ semblava prou complicada en treballar amb mescles de 5 o 6 glicinamides. Així doncs, es van emprar mescles equimolars de 5 o 6 amines, amb la corresponent amina de referència (**A11** o **A15**), en l'etapa d'introducció de diversitat per atac nucleòfil de les amines primàries sobre el cloroderivat unit a la fase sòlida.

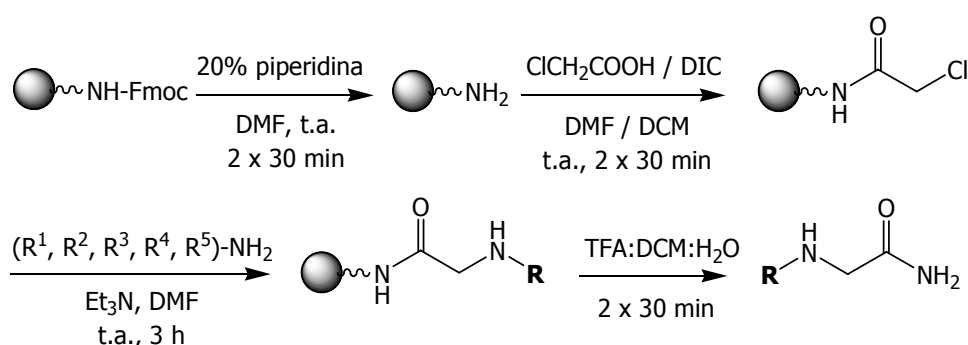


Figura 4.2. Esquema general per a la síntesi de glicinamides *N*-substituïdes en fase sòlida emprant mescles equimolars d'amines, on **R** pot ser $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4$ o R^5 .

Després de l'escissió final, es va procedir a l'anàlisi i quantificació de les mescles de les glicines. Tot i confirmar per CL-EM la presència de totes les glicinamides esperades, per CG va resultar difícil la seva quantificació i comparació perquè els cromatogrames obtinguts eren molt complexos i mostraven una gran quantitat de pics. Probablement, durant l'etapa d'escissió amb TFA es van tallar fragments de *linker* o espaiador de la pròpia resina. De fet, segons la nostra experiència en fase sòlida durant aquests anys, a l'hora de sintetitzar molècules orgàniques de pes molecular baix en fase sòlida i caracteritzar-les per RMN sense

purificar-les prèviament, s'obtenen espectres de ^1H -RMN que mostren la presència de *linker* provinent de l'escissió del producte de la resina.

Amb aquests resultats, es va plantejar un segon estudi en fase sòlida que intentés solucionar aquests problemes.

4.1.2.2. Assaigs de reactivitat per a la formació de 2,5-piperazindiones (DKPs)

L'opció de sintetitzar DKPs com a model per fer competir les amines en les etapes d'acoblament va ser deguda a que, per una banda, el tipus de reacció d'acoblament era anàleg al que es produïa en la síntesi dels peptoides però, per altra banda i a diferència d'aquests, l'interval de pesos moleculars de les DKPs permetia detectar-les i quantificar-les fàcilment per CG. A més, el fet que fossin molècules més grans que les glicinamides *N*-substituídes i que en la seva síntesi hi hagués una etapa addicional de ciclació en medi bàsic després de l'escissió amb TFA, semblava reduir els problemes que havien aparegut durant l'anàlisi de les glicinamides per CG.

Així doncs, seguint l'esquema sintètic de la quimioteca de peptoides-II, es va plantejar l'esquema general descrit a la Figura 4.3 per sintetitzar DKPs en fase sòlida. Aquest esquema sintètic havia estat optimitzat per Isabel Masip en el transcurs de la seva Tesi Doctoral.⁵¹

El primer acoblament d'amina es va fixar amb l'amina **A10** i la introducció de la font de diversitat va tenir lloc només en el segon acoblament afegint una mescla equimolar de 5/6 amines, amb la corresponent amina de referència (**A11** o **A15**). Per realitzar aquest estudi es va escollir un conjunt de 12 amines com a representatives de les 20 amines de la quimioteca (vegeu Taula 4.3). Finalment, després de l'etapa d'escissió va tenir lloc una etapa addicional de ciclació en medi bàsic per obtenir les mescles de DKPs.

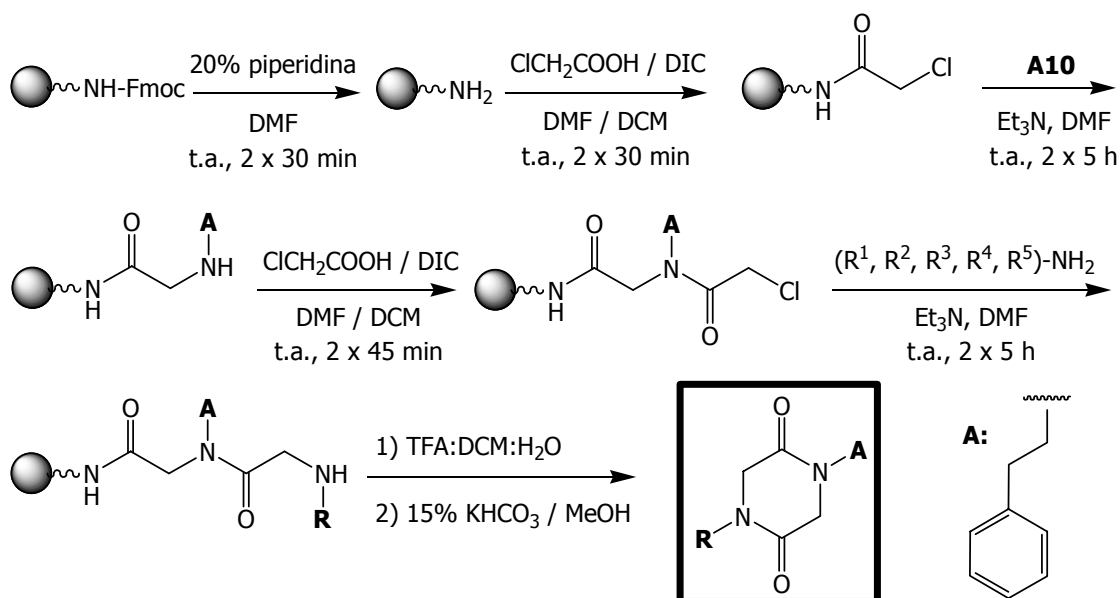


Figura 4.3. Esquema general per a la síntesi de DKPs en fase sòlida. El primer acoblament es va fixar amb l'amina **A10**, mentre que en la introducció de la segona font de diversitat es van emprar mescles equimolars d'amines. **R** pot ser R^1 , R^2 , R^3 , R^4 o R^5 .

Els residus de les mescles de les DKPs es van analitzar per CG, comparant les seves àrees en relació a la DKP de referència en cada cas (**A11-A10** o **A15-A10**). Els valors obtinguts es mostren a la Taula 4.3, així com la relació d'àrees de les DKPs de referència, mostrades a la Taula 4.4. En el cas de la DKP *N*-(2-feniletil)-*N'*[2-(4'-sulfamoïlfenil)etil]-2,5-piperazindiona (**A17-A10**) no va ser possible la detecció per CG. La identificació de les DKPs de cada mescla es va dur a terme per CG-EM.

Taula 4.3. Relacions d'àrees per CG de les DKPs sintetitzades respecte les corresponents DKPs de referència, les quals es mostren en negreta.

DKP (R^1 - R^2)	Àrea DKP (R^1 - R^2) / Àrea DKP (A11-A10)	DKP (R^1 - R^2)	Àrea DKP (R^1 - R^2) / Àrea DKP (A15-A10)
A1-A10	0.42	A9-A10	0.97
A2-A10	0.21	A13-A10	1.50
A4-A10	2.55	A14-A10	1.31
A6-A10	2.05	A15-A10	1.00
A8-A10	1.06	A17-A10	-
A11-A10	1.00	A35-A10	1.03

Taula 4.4. Relacions d'àrees per CG de les DKPs de referència.

DKP (R ¹ -R ²)	Àrea DKP (A11-A10) / Àrea DKP (A15-A10)
A11-A10	0.80
A15-A10	1.00

En termes generals, tornem a observar un comportament força similar entre les amines amb substituents aromàtics, si bé les amines amb un grup metoxi a l'anell aromàtic (**A13** i **A14**) van mostrar una reactivitat més elevada que la resta d'amines aromàtiques. Igualment, entre les amines no aromàtiques es torna a observar uns valors de reactivitat molt més dispersos entre elles, amb un comportament variable i difícil d'explicar.

En aquest punt, es va veure la importància d'aprofundir l'estudi de la reactivitat de les amines en fase sòlida, però sense haver de manipular i purificar les mescles finals de restes d'espaiador o *linker* de la resina, per evitar possibles pèrdues d'algun dels productes que conduïssin a errors en la seva quantificació i en la determinació de la reactivitat de la seva corresponent amina. Com alternativa a les tècniques de CG i de RMN, es va pensar en l'anàlisi i quantificació de les mescles per HPLC, on els problemes esmentats a l'apartat 4.1.2.1 no havien d'afectar l'elució dels productes ni interferir als cromatogrames d'HPLC, d'acord amb la nostra experiència en l'anàlisi de peptoides per aquesta tècnica.

4.2. ESTUDIS DE REACTIVITAT PER HPLC

A l'hora de pensar en la realització d'un estudi comparatiu de les amines per HPLC seguint l'esquema sintètic que s'ha mostrat a la Figura 4.2, se'ns va plantejar un problema addicional degut al fet que en el grup d'amines no aromàtiques no era possible la detecció de les seves corresponents glicinamides per HPLC en no tenir un grup cromòfor en la seva estructura. Per aquest motiu, ens vam plantejar un esquema sintètic alternatiu descrit a la Figura 4.4, on es va substituir l'àcid cloroacètic per l'àcid 4-clorometilbenzoic en l'etapa d'acilació. La introducció de la font de diversitat per l'atac nucleòfil de mescles equimolars de 5/6 amines primàries va donar lloc a mescles de benzamides *N*-substituïdes, fàcilment detectables per HPLC.

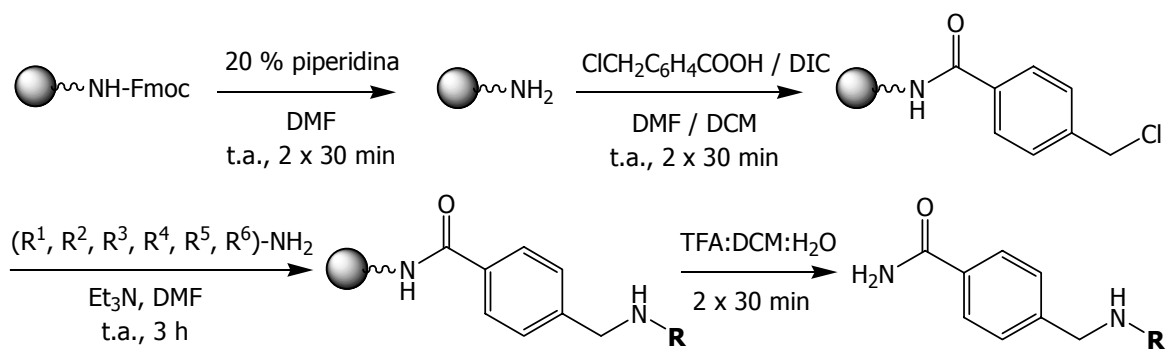


Figura 4.4. Esquema general de síntesi de benzamides en fase sòlida emprant mescles equimolars d'amines en l'etapa d'acoblament, on **R** pot ser $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5$ o R^6 .

Per altra banda, a l'hora de pensar en la quantificació de les benzamides de les mescles per HPLC es va pensar, en primer lloc, en trobar unes condicions d'elució òptimes que permetessin diferenciar cada benzamida d'una mescla i, en segon lloc, en l'obtenció d'una recta de calibració per a cada benzamida respecte una referència interna. Per fer aquest estudi de reactivitat es va escollir un conjunt d'11 amines com a representatives del total de les 20 de la quimioteca (en la Figura 4.7 es troben les benzamides sintetitzades per a les amines escollides).

4.2.1. OBTENCIÓ DE LES BENZAMIDES

Inicialment, calia obtenir les benzamides del conjunt d'amines escollides per tal d'obtenir les rectes de calibració. La síntesi de les benzamides es va realitzar seguint l'esquema mostrat a la Figura 4.5.

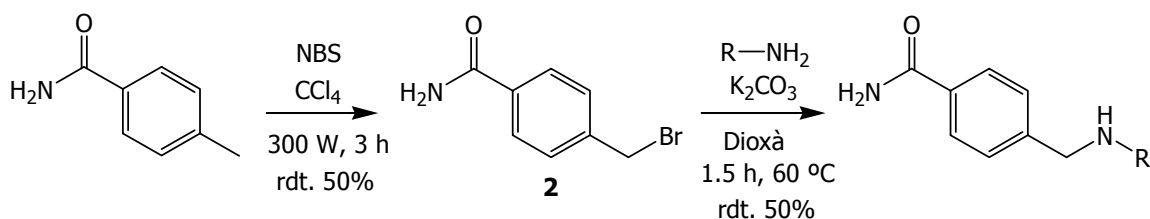


Figura 4.5. Esquema general per a la síntesi de benzamides en dissolució: primerament té lloc la bromació de la 4-metilbenzamida per obtenir el compost bromat **2**, seguida de la substitució nucleòfila del brom per una amina primària.

Primerament, es va obtenir la 4-bromometilbenzamida (**2**) mitjançant la reacció de bromació de la 4-metilbenzamida amb NBS i amb irradiació de llum blanca, en CCl₄. Es va obtenir com a producte secundari de la reacció el compost dibromat, a més de substrat de partida sense reaccionar, ambdós de difícil separació del compost monobromat **2**. La purificació es va dur a terme per successives recristal·litzacions d'AcOEt i CHCl₃ i es van descartar aquelles fraccions recristal·litzades amb pureses inferiors al 95% per CG, per tal d'evitar la presència de producte dibromat en les reaccions posteriors amb les amines, motiu pel qual el rendiment de la reacció va ser únicament d'un 50%. Cal destacar les dades espectroscòpiques de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN de **2** referents al grup metilè, amb un singlet a $\tau = 4.59$ ppm i a $\tau = 32.8$ ppm, respectivament.

Seguint el procediment experimental descrit per Isabel Masip en la seva Tesi Doctoral⁵¹ en reaccions d'atac nucleòfil d'amines primàries sobre derivats clorats en dissolució, es van fer reaccionar 3 eq. d'amina i de K₂CO₃ amb el compost bromat **2**, en dioxà. Amb un temps de reacció d'1.5 h i a 60 °C es van aconseguir conversions completes per a totes les amines. L'addició de 3 eq. d'amina es va fer per accelerar la reacció i evitar la formació de productes de dialquilació.

L'eliminació de l'excés d'amina es podia realitzar per mètodes d'extracció o per evaporació. Tot i poder emprar el mètode d'eliminació més adient per a cada amina tenint en compte les seves característiques de volatilitat i presència de grups protonables, es va preferir pensar en un mateix mètode d'extracció. D'aquesta manera s'optimitzaria el procés d'eliminació que seria necessari a l'hora de fer els estudis de reactivitat en dissolució, en els quals es requeria un únic mètode d'eliminació per als excessos de totes les amines, com s'explicarà a l'apartat 4.2.5. Així doncs, es va plantejar l'ús d'una resina segrestadora que permetés eliminar amines primàries d'una mescla de reacció en presència d'amines secundàries.

Eliminació de l'excés d'amina. Utilització d'una resina segrestadora

Actualment són assequibles una sèrie de resines funcionalitzades que permeten realitzar una ràpida purificació del producte final d'una síntesi en dissolució, per eliminació dels reactius en excés o de productes secundaris de la reacció.^{66,67}

En aquest cas es va emprar una resina segrestadora de tipus electrofílic que permetés eliminar l'excés d'amina primària en presència d'una amina secundària, producte de la

reacció. La resina en qüestió estava funcionalitzada amb un grup aldehyd, concretament un polímer de poliestirè 4-benziloxibenzaldehid de tipus Wang aldehyd HL (vegeu Figura 4.6).

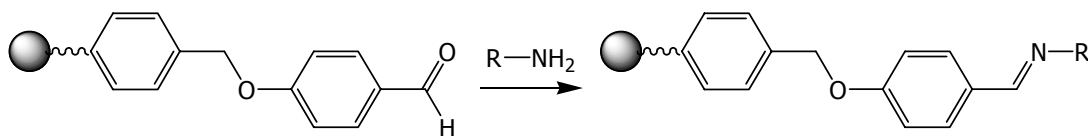


Figura 4.6. Segrest d'una amina primària amb una resina de tipus Wang aldehyd.

Isabel Masip va assajar diverses condicions i va optimitzar l'ús d'aquest suport polimèric amb diverses amines de la seva quimioteca. Els millors resultats es van obtenir fent reaccionar l'excés d'amina amb la resina segrestadora de tipus aldehyd (3 eq. respecte l'excés d'amina) en un forn microones, a 350 W de potència i durant 20 min (en intervals d'1 min). Amb aquestes condicions, els excessos de les amines de les reaccions anteriors es van eliminar, tot i que en els casos de les amines **A9** i **A12** van ser necessaris 20 min addicionals, i amb l'**A20** 1 h en total.

Els residus finals es van purificar per cromatografia en capa prima preparativa, per obtenir les onze benzamides que es mostren a la Figura 4.7, amb uns rendiments al voltant del 50%. No obstant, en els casos de les benzamides **4** i **8** (de les amines **A6** i **A12**, respectivament) la purificació per CCP va resultar complicada, en ser productes de difícil elució i extracció degut a la seva polaritat. Per aquest motiu i únicament per aquestes dues amines, es van realitzar dues síntesis en fase sòlida i en paral·lel seguint el procediment descrit a la Figura 4.4, amb una purificació final per HPLC a escala semipreparativa, amb uns rendiments del 38% per a la benzamida **4** i del 25% per a la benzamida **8**.

Les benzamides es van identificar per espectrometria de masses i per espectroscopia de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN. Cal destacar els senyals dels espectres de ^1H -RMN referents al grup metilè, en variar el desplaçament químic de $\tau = 4.59$ ppm en **2** a al voltant $\tau = 3.8$ ppm en les benzamides, i de ^{13}C -RMN en variar el desplaçament químic de $\tau = 32.8$ ppm en **2** a al voltant $\tau = 53.8$ ppm.

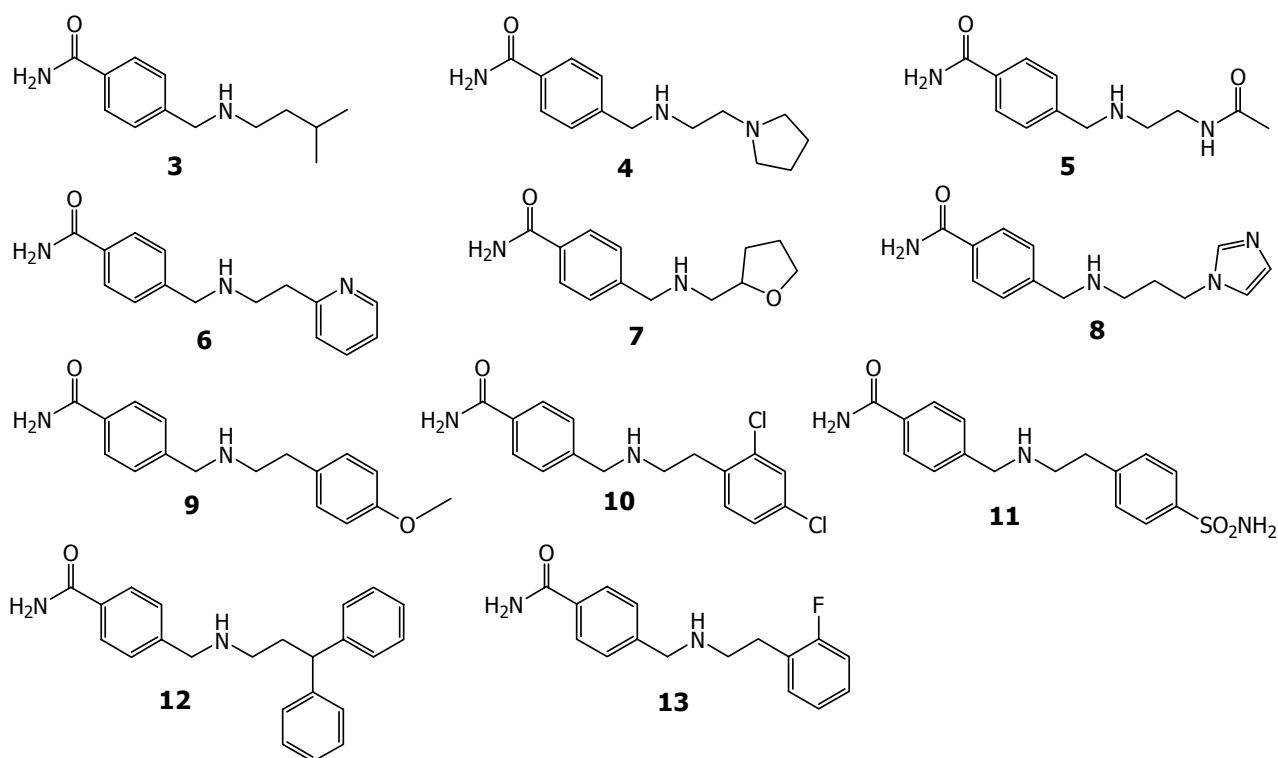


Figura 4.7. Conjunt de les onze benzamides sintetitzades. A excepció de les benzamides **4** i **8**, les quals es van sintetitzar en fase sòlida, la resta es van sintetitzar en dissolució.

4.2.1.1. Optimització de les condicions d'elució per HPLC

Per analitzar per HPLC les benzamides presents en les mescles dels estudis de reactivitat, calia un sistema d'elució que permetés diferenciar-les suficientment entre elles. Cal tenir en compte que en la tècnica d'HPLC els pics obtinguts no acostumen a tenir tant bona resolució com en el cas de la tècnica de CG, sinó que generalment s'obtenen pics amb una base més ample i inclús, depenent del tipus de compost i de les condicions d'elució, es poden arribar a observar cues.

Així doncs, es van assajar diverses condicions d'elució: es va variar el tipus de columna de fase inversa utilitzada (columna C18 o C8), els eluents utilitzats (H₂O o una dissolució HCOOH-Et₃N 20 mM per a la fase aquosa, i ACN o MeOH per a la fase orgànica), el pH d'elució (pH=2 o 5) i el programa d'elució. Finalment, per a la majoria de les benzamides es va decidir treballar amb una columna C18 i amb un sistema d'eluents de tampó HCOOH-Et₃N 20 mM a pH=5 per a la fase aquosa i ACN per a la fase orgànica. No obstant, en el cas de la benzamida **4**, degut a la presència d'un grup amino terciari en la seva cadena lateral, es va obtenir una millor resolució quan la mostra estava protonada per dissolució en H₂O amb 0.1% de TFA, i en el cas de la benzamida **7** va ser necessari un canvi d'eluents per obtenir

una bona resolució: H₂O amb 0.1% de TFA per a la fase aquosa i ACN amb 0.07% per a la fase orgànica.

4.2.2. DETERMINACIÓ DE LES RECTES DE CALIBRACIÓ DE LES BENZAMIDES

Una vegada establert el sistema d'elució més adequat per a cada benzamida, es va escollir un patró de referència per determinar les rectes de calibració de cadascuna. Calia que aquest patró fos estable químicament i que tingués un temps de retenció prou diferent al de les onze benzamides per no interferir en la seva anàlisi. Es va escollir l'*N*-3,3-difenilpropilacetamida (**14**), fàcilment sintetitzada a partir de l'acetilació de l'amina **A20** amb anhídrid acètic i piridina (vegeu Figura 4.8).

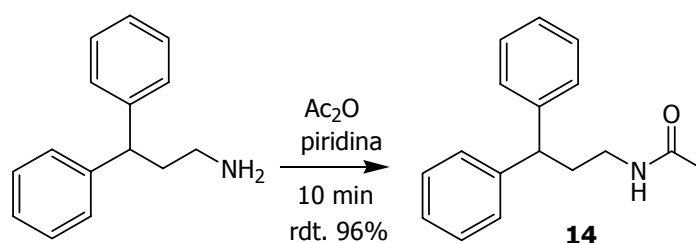


Figura 4.8. Reacció d'acetilació de l'**A20** amb anhídrid acètic i piridina per obtenir el patró de referència **14**.

Seguidament, per a cada benzamida es van preparar cinc dissolucions de diferent concentració (entre 0.06 i 0.60 σ M), afegint a cadascuna un volum fix d'una dissolució del compost de referència **14**, i es van analitzar per HPLC a 220 nm. A partir de la relació d'àrees i de la relació de les concentracions de cada benzamida en relació al patró **14**, es van determinar les corresponents rectes de calibració que es mostren a la Taula 4.5. Els coeficients de regressió lineal de totes elles van ser superiors a 0.99.

Taula 4.5. Equacions de les rectes de calibració determinades per a les onze benzamides estudiades. Al costat de cada benzamida s'indica la corresponent amina emprada per a la seva síntesi.

Benzamida	Amina	Equació	Benzamida	Amina	Equació
3	A4	$y=0.826x - 0.007$	9	A13	$y=1.102x + 0.019$
4	A6	$y=0.397x + 0.046$	10	A15	$y=1.841x - 0.062$
5	A7	$y=0.648x + 0.006$	11	A17	$y=1.141x + 0.012$
6	A9	$y=0.872x + 0.019$	12	A20	$y=1.501x - 0.027$
7	A11	$y=0.588x - 0.028$	13	A35	$y=0.973x - 0.020$
8	A12	$y=0.587x - 0.006$			

4.2.3. ESTUDI DE LA REACTIVITAT DE LES ONZE AMINES EN FASE SÒLIDA UTILITZANT MESCLES EQUIMOLARS EN L'ETAPA D'ACOBLEMENT

Seguint l'esquema que s'ha descrit a la Figura 4.4, es van realitzar dues reaccions en fase sòlida i en paral·lel. La introducció de diversitat va tenir lloc per l'atac nucleòfil d'una mescla equimolar de 6 amines, emprant una concentració similar a la utilitzada per a la síntesi de la quimioteca de peptoides-II, sobre el cloroderivat unit a la resina. Els dos subgrups d'amines es van escollir de forma aleatòria, intentant únicament que els seus temps de retenció per HPLC diferissin el màxim possible. Per altra banda, es va escollir l'amina **A15** com a referència interna en els dos subgrups per tal que al final es poguessin referenciar els resultats obtinguts de totes les amines respecte l'**A15**. Cadascuna de les dues reaccions es va realitzar per duplicat. Després de l'etapa d'escissió, els residus de les mescles de les benzamides es van liofilitzar i, sense cap tipus de tractament addicional, es van analitzar per HPLC, afegint el patró de referència **14** i tenint en compte les condicions d'elució més adients determinades per a cada benzamida a l'apartat 4.2.1.1. A la Figura 4.9 es mostra el perfil cromatogràfic obtingut d'un dels residus, a mode d'exemple.

A partir de l'anàlisi de les mostres per HPLC i tenint en compte les corresponents rectes de calibració de cada benzamida, es van determinar els valors de reactivitat relativa i els factors d'equireactivitat[†] en fase sòlida de les 11 amines corresponents a les benzamides sintetitzades en relació a l'amina **A15**. La mitjana dels resultats obtinguts dels dos duplicats de cada reacció es mostren a la Taula 4.6.

[†] El factor d'equireactivitat s'ha calculat a partir de la inversa del valor de reactivitat relativa a **A15**, és a dir a 1.

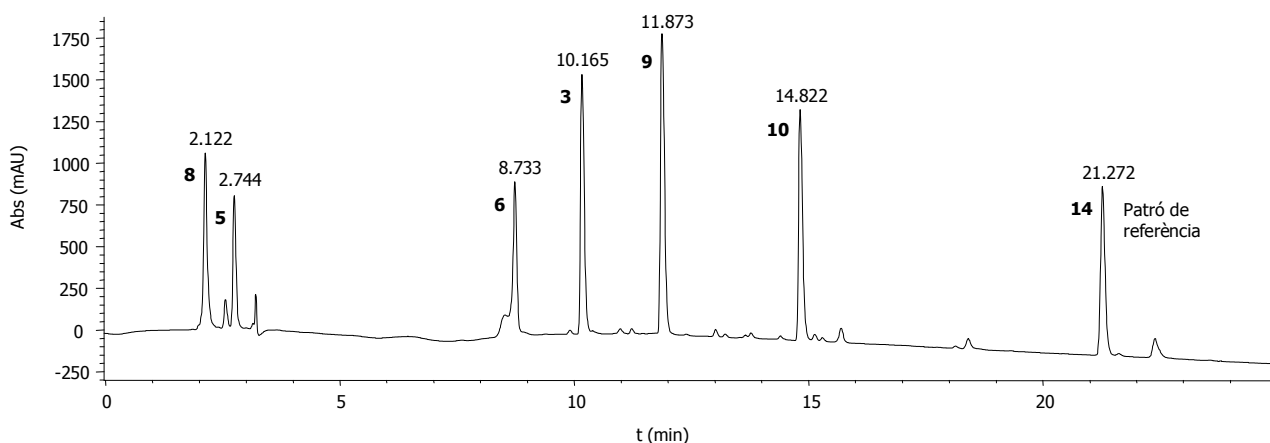


Figura 4.9. Perfil cromatogràfic d'HPLC del residu obtingut d'una de les mescles de benzamides amb el patró de referència **14**. Als pics corresponents a cada compost de la mescla s'indica el seu temps d'elució, en min.

Taula 4.6. Valors de reactivitat i factors d'equireactivitat en fase sòlida determinats per a les 11 amines estudiades en relació a l'**A15**. S'han subdividit les amines en dos grups segons si tenen substituents aromàtics o no, per facilitar el seu estudi comparatiu.

	A4	A6	A7	A11	A12	A9	A13	A15	A17	A20	A35
Reactivitat relativa	2.27	4.67	1.22	2.05	1.90	1.57	2.04	1.00	1.30	1.72	1.08
Factor d'equireactivitat	0.44	0.21	0.82	0.49	0.53	0.64	0.49	1.00	0.77	0.58	0.93

Aquests resultats van mostrar una gran dispersió de valors de reactivitat. Cal destacar el cas de l'amina **A6**, amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral, la qual va mostrar una reactivitat molt superior a la resta d'amines. En canvi, l'amina que va mostrar menys reactivitat va ser, sorprenentment, l'**A15**, que és l'amina aromàtica clorada en posició *orto* i *para*, i una de les que va donar bons resultats d'activitat en el cribratge de la quimioteca vers el fenotip de MDR, com s'explicarà a l'apartat d'activitat biològica (vegeu apartat 5.1.1).

En aquest punt, calia confirmar els resultats anteriors i comprovar si variant les concentracions de cada amina en l'etapa d'acoblament, tot aplicant els factors de correcció d'acord amb els corresponents factors d'equireactivitat, s'aconseguia contrarestar la reactivitat de les amines i, en conseqüència, obtenir concentracions similars de cada benzamida en les mescles finals.

4.2.4. ESTUDI DE LA REACTIVITAT DE LES ONZE AMINES EN FASE SÒLIDA UTILITZANT MESCLES EQUIREACTIVES EN L'ETAPA D'ACOBLEMENT

De forma anàloga a l'apartat anterior, es van realitzar dues reaccions en fase sòlida i en paral·lel, afegint una mescla de 6 amines amb les concentracions ajustades d'acord amb els corresponents factors de reactivitat determinats. Igualment, cada reacció es va realitzar per duplicat. En aquest cas, l'anàlisi dels residus de les mescles de les benzamides resultants per HPLC van mostrar els valors de reactivitat de les onze amines corresponents a les benzamides sintetitzades en relació a l'**A15** que s'indiquen a la Taula 4.7.

Taula 4.7. Valors de reactivitat determinats per a les 11 amines estudiades en fase sòlida respecte l'**A15**, després d'haver aplicat durant la síntesi de les benzamides els factors d'equireactivitat corresponents a cada amina.

	A4	A6	A7	A9	A11	A12	A13	A15	A17	A20	A35
Reactivitat relativa	1.23	0.91	0.85	1.16	1.05	1.29	1.12	1.00	1.18	1.15	1.16

Els nous valors de reactivitat obtinguts van mostrar com, efectivament, després de tenir en compte els factors de correcció de cada amina, la seva reactivitat va ser molt similar gairebé en tots els casos. Caldria destacar l'amina **A6**, la qual va disminuir considerablement la concentració de la seva corresponent benzamida en les mescles finals. En canvi, en els casos de les amines **A4** i **A12**, encara semblaven mostrar una reactivitat superior a les altres amines.

Aquests resultats van fer plantejar el mateix estudi anterior però en dissolució, per determinar si podia haver diferències respecte la fase sòlida.

4.2.5. ESTUDI DE LA REACTIVITAT DE LES ONZE AMINES EN DISSOLUCIÓ

Seguint l'esquema descrit a la Figura 4.5 per a la síntesi de les benzamides en dissolució, es van realitzar dues reaccions en paral·lel, on la introducció de diversitat va tenir lloc per l'atac nucleòfil d'una mescla equimolar de 6 amines sobre la 4-bromometilbenzamida (**2**). Els dos subgrups d'amines van ser els mateixos que els escollits en fase sòlida i cada reacció es

va realitzar per duplicat. Aquest estudi en dissolució va ser realitzat en col·laboració amb Ana Beloqui.

Després de l'eliminació dels excessos d'amina amb la resina segrestadora de tipus Wang aldehid i radiació de microones, els residus resultants de les mescles de les benzamides es van analitzar per HPLC amb el patró de referència **14**, de forma anàloga a com es van analitzar les mescles de l'estudi de reactivitat en fase sòlida. D'aquesta manera, es van determinar els valors de reactivitat i els factors d'equireactivitat de les 11 amines corresponents a les benzamides sintetitzades en dissolució en relació a l'amina **A15**. La mitjana dels resultats obtinguts dels dos duplicats de cada reacció es mostren a la Taula 4.8.

Taula 4.8. Valors de reactivitat i factors d'equireactivitat en dissolució determinats per a les 11 amines estudiades en relació a l'**A15**.

	A4	A6	A7	A11	A12	A9	A13	A15	A17	A20	A35
Reactivitat relativa	2.65	3.38	3.22	2.90	2.80	2.71	2.76	1.00	1.93	1.59	1.61
Factor d'equireactivitat	0.38	0.30	0.31	0.34	0.36	0.37	0.37	1.00	0.52	0.63	0.62

En termes generals, es va observar com el comportament de reactivitat de les amines no aromàtiques era força similar. En canvi, entre les amines aromàtiques, destaquen les amines **A17** (amb un grup sulfona), **A20** (amb dos grups fenils) i **A35** (fluorada en posició *orto*) que van mostrar una reactivitat lleugerament inferior a la resta d'amines. Igualment a la fase sòlida, l'amina aromàtica clorada **A15** va ser la que va mostrar els valors de reactivitat més baixos.

Es van repetir les reaccions en dissolució, però ajustant les concentracions de les amines en funció dels seus factors d'equireactivitat, de forma anàloga a com s'havia fet en fase sòlida. Els resultats dels factors de reactivitat de les onze amines corresponents a les benzamides sintetitzades en relació a l'**A15** es mostren a la Taula 4.9.

Taula 4.9. Valors de reactivitat en dissolució determinats per a les 11 amines estudiades en relació a l'**A15**, després d'haver aplicat durant la síntesi de les benzamides els factors d'equiactivitat corresponents a cada amina.

	A4	A6	A7	A9	A11	A12	A13	A15	A17	A20	A35
Reactivitat relativa	1.55	0.96	1.35	1.99	1.18	1.51	1.66	1.00	1.10	1.36	1.23

Els valors de reactivitat obtinguts de les amines en dissolució en referència a l'**A15** van mostrar com, després de tenir en compte i aplicar els factors d'equiactivitat determinats per a cada amina, la concentració de les corresponents benzamides en les mesclades finals va tendir a igualar-se, tot i que en la majoria dels casos encara mostraven un comportament de reactivitat força superior a l'amina **A15**, la menys reactiva de totes.

4.3. CONCLUSIONS DE LA REACTIVITAT DE LES AMINES DE LA QUIMIOTECA

Al llarg d'aquest capítol de reactivitat s'han explicat els diferents tipus de reacció i mètodes d'anàlisi que es van dur a terme per estudiar i comparar la reactivitat de les 20 amines de la quimioteca de peptoides-II.

Si bé els primers estudis realitzats i analitzats per CG van donar uns primers indicis sobre possibles diferències en la velocitat de reacció de les amines, la necessitat d'estudiar la seva reactivitat d'una forma més pròxima a la que es va produir en les etapes d'introducció de diversitat en la síntesi de la quimioteca de peptoides-II, ens va portar al plantejament i a la realització d'un estudi més acurat i analitzat per HPLC.

En aquest estudi per HPLC es van obtenir els valors de reactivitat del conjunt d'amines seleccionades com a representatives de la quimioteca en relació a l'amina **A15**, els quals es van determinar en fase sòlida i en dissolució i s'han recollit a la Taula 4.10.

Taula 4.10. Valors de reactivitat de les 11 amines estudiades en relació a l'**A15**, determinats en fase sòlida i en dissolució. S'han subdividit les amines en dos grups, segons si tenen substituents aromàtics (esquerre) o no (dreta), per tal de facilitar el seu estudi comparatiu.

Reactivitat relativa	A4	A6	A7	A11	A12	A9	A13	A15	A17	A20	A35
En fase sòlida	2.27	4.67	1.22	2.05	1.90	1.57	2.04	1.00	1.30	1.72	1.08
En dissolució	2.65	3.38	3.22	2.90	2.80	2.71	2.76	1.00	1.93	1.59	1.61

En termes generals, s'ha pogut observar una gran dispersió en la reactivitat de les amines en fase sòlida, tant entre les amines aromàtiques com entre les no aromàtiques, posant de manifest les diferències existents entre elles a nivell d'estructura, de volum, de volatilitat, de caràcter polaritzable o d'hidrofobicitat. En canvi, en dissolució, les amines no aromàtiques van mostrar valors de reactivitat força similars, mentre que entre les amines aromàtiques els valors de reactivitat van ser més dispersos, els quals evidenciaven les diferències d'aquest grup a nivell de volum i/o dels substituents aromàtics (halògens, grup sulfona o grup metoxi). Cal destacar l'amina **A6** (amb un nitrogen terciari addicional en la cadena lateral) com la més reactiva de totes les amines estudiades, i l'amina **A15** (clorada en posició *orto* i *para*) com la menys reactiva, tant en fase sòlida com en dissolució.

Per altra banda, cal constatar que, a excepció de les amines **A6** i l'**A20** (amb dos grups fenils), en totes les altres amines es va produir un augment de la reactivitat en dissolució respecte la fase sòlida. Aquest augment va ser considerable en l'amina **A7** (amb un enllaç amida en la cadena lateral) i l'**A9** (amina piridínica).

No obstant, tot i l'existència de diferències en la reactivitat de les amines en fase sòlida i en dissolució, s'ha pogut comprovar la correcció i amortiment d'aquesta diferència amb l'ajust de les quantitats d'amina, en funció dels seus factors d'equiactivitat, durant la síntesi de les corresponents benzamides. Com es pot observar a la Taula 4.11, aquest fet s'ha pogut constatar per a totes les amines en fase sòlida, tot i que en dissolució encara es van observar diferències importants en la reactivitat entre algunes d'elles, principalment les amines **A4**, **A9**, **A12** i **A13**.

Taula 4.11. Valors de reactivitat de les 11 amines estudiades en relació a l'**A15**, determinats en fase sòlida i en dissolució, després d'haver aplicat durant la síntesi de les benzamides els seus corresponents factors d'equireactivitat.

Reactivitat relativa	A4	A6	A7	A11	A12	A9	A13	A15	A17	A20	A35
En fase sòlida	1.23	0.91	0.85	1.16	1.05	1.29	1.12	1.00	1.18	1.15	1.16
En dissolució	1.55	0.96	1.35	1.18	1.51	1.99	1.66	1.00	1.10	1.36	1.23

Així doncs, els resultats d'aquest estudi de reactivitat han evidenciat la importància i la necessitat de la realització d'aquest tipus d'estudi quan es porten a terme síntesis de quimiotèques de mescles on les etapes d'introducció de diversitat impliquen l'addició de mescles de reactius. Aquesta necessitat, per tant, és inqüestionable en el cas d'una síntesi seguint el format de rastreig posicional amb reactius que difereixen prou entre ells, escollits per tal que la diversitat de la quimioteca sigui gran, com és el cas de la quimioteca de peptoides-II.

Aquest inconvenient detectat condueix a pensar en la possibilitat que durant el cribratge de la quimioteca davant les dianes biològiques es poguessin haver produït falsos negatius degut a que compostos potencialment actius no fossin detectats perquè estiguessin a concentracions inferiors a les esperades. Malgrat tot, en el següent capítol s'explicaran els bons resultats derivats del cribratge de la quimioteca, en els quals l'amina **A15**, la menys reactiva, va mostrar una gran activitat en alguna de les posicions del trímer de glicines *N*-substituídes, tot conduint a la identificació de peptoides amb activitats biològiques molt interessants.

En aquest sentit, aquest estudi de reactivitat ens va portar a pensar en la possibilitat, en un futur pròxim, del plantejament i la síntesi d'una tercera quimioteca de peptoides on les concentracions inicials de les amines estarien ajustades d'acord amb els seus factors d'equireactivitat, solucionant així els problemes derivats de la diferència de reactivitat entre elles.

5. ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PEPTOIDES

Un dels objectius més importants de la recerca biomèdica és la identificació de noves molècules cap de sèrie amb interès terapèutic. Amb aquesta finalitat es va dur a terme el cribratge de la quimioteca de peptoides-II davant de diferents dianes biològiques disponibles en diversos grups de recerca, de l'àmbit públic i privat, amb qui el nostre grup es va posar en contacte. En aquest sentit, per validar la quimioteca de peptoides-I i després d'haver detectat els problemes de ciclació esmentats anteriorment, es van tornar a assajar algunes de les dianes ja estudiades amb aquesta quimioteca.

Al llarg d'aquest capítol es mostraran els resultats més rellevants obtinguts en el cribratge de la quimioteca de peptoides-II. Cal mencionar que, després del cribratge i deconvolució inicial de les mesclures, els compostos identificats amb més activitat es van resintetitzar en fase sòlida de forma individual, tal i com s'ha comentat a l'apartat 3.6, i es van purificar per HPLC a escala semipreparativa per realitzar altres assaigs addicionals i confirmar els resultats obtinguts amb les mesclures originals.

5.1. CÀNCER

5.1.1. RESISTÈNCIA A MÚLTIPLES FÀRMACS (MDR)

El càncer és un dels majors problemes de salut del món amb més de sis milions de casos nous cada any i és la segona causa de mort en la població espanyola. Fins ara, els procediments per curar determinats càncers com la leucèmia, el limfoma o tumors unifocals que es propaguen per metàstasi comprenen majoritàriament la cirurgia, la radiació, la quimioteràpia i la immunoteràpia.

El fenotip de MDR o resistència a múltiples fàrmacs és la causa principal de la ineficàcia de la quimioteràpia en el tractament del càncer.⁶⁸ Aquest fenotip descriu la capacitat de resistència de les cèl·lules canceroses o neoplàsiques de les línies tumorals per sobreviure exposades a agents anticancerígens citostàtics tan emprats com les antraciclins, alcaloides de la vinca o taxans.^{69,70} Aquesta resistència acostuma a ser deguda a la sobreexpressió de la glicoproteïna transmembrànica transportadora P-gp,^{71,72} i a la sobreexpressió d'altres proteïnes homòlogues a P-gp (MRPs), entre les quals destaca la proteïna transmembrànica transportadora MRP1, la qual també indueix resistència a múltiples fàrmacs.^{73,74}

A la Figura 5.1 s'ha representat esquemàticament el fenotip de MDR.

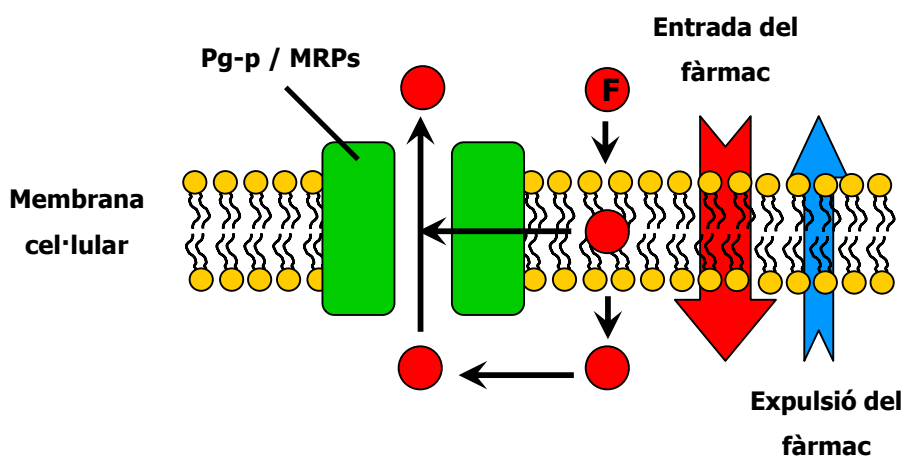


Figura 5.1. Procés d'entrada d'un fàrmac (F) a l'interior de la cèl·lula i de la seva expulsió (total o parcialment) per efecte de les proteïnes transmembràniques Pg-p i MRPs.

En resum, els compostos o fàrmacs entren a l'interior cel·lular per difusió passiva i són detectats a la membrana cel·lular per les proteïnes transmembràniques Pg-p i MRPs, les quals actuen com una bomba d'eflux unidireccional de macromolècules i expulsen els agents citostàtics de l'interior cel·lular. Amb aquesta acció es disminueix la seva eficàcia en no assolir la concentració necessària per produir l'efecte citotòxic.

Per aquest motiu, les proteïnes P-gp i MRP1 han esdevingut dianes terapèutiques en la quimioteràpia contra diferents tipus de càncer, tals com leucèmia, càncer de pulmó, càncer de pit i ovaris, tumors cerebrals i de coll, el sarcoma de Kaposi i neuroblastomes infantils.^{71,75}

Hi ha dues estratègies per augmentar la concentració intracel·lular de fàrmacs antitumorals. Per una part, el desenvolupament d'agents reversors de resistència o de quimiosensibilitzadors que inhibeixin el transport i eliminació dels fàrmacs cap a l'exterior cel·lular. Per una altra part, el desenvolupament d'anàlegs antitumorals que siguin capaços de ser retinguts a l'interior cel·lular, ja sigui perquè no són reconeguts per la bomba d'expulsió o perquè tenen una cinètica d'acció molt més ràpida que la pròpia bomba.⁷⁶

S'han descrit un gran nombre de moduladors o quimiosensibilitzadors que competeixen pels llocs d'unió del fàrmac a la molècula transportadora i permeten mantenir una concentració suficient del fàrmac a l'interior cel·lular perquè produeixi un efecte terapèutic. Entre aquests moduladors destaquen els bloquejadors dels canals de calci com el verapamil (VRP), detergents com el Triton X-100 i agents immunosupressors com la Ciclosporina A. El problema d'aquests quimiosensibilitzadors és que tenen una toxicitat elevada i efectes secundaris a les concentracions necessàries perquè mostrin activitat. Per aquest motiu es necessiten noves substàncies reversores/quimiosensibilitzadores del fenotip de MDR amb efectes citotòxics baixos.

En el nostre cas, es va assajar l'estratègia d'identificar antagonistes de les proteïnes transportadores P-gp i MRP1 amb la quimioteca de peptoides-II i desenvolupar, així, nous quimiosensibilitzadors del fenotip de MDR.^{77,78}

5.1.1.1. Cribratge de la quimioteca

El procés de cribratge de la quimioteca de peptoides-II sobre el fenotip de MDR per trobar inhibidors de les proteïnes P-gp i MRP1 va ser realitzat per la Dra. Maria José Abad, del grup del Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Elx.

Els sistemes cel·lulars emprats van ser unes línies resistents de leucèmia linfofocítica murina L1210R, les quals sobreexpressen la proteïna P-gp, i de leucèmia promielocítica humana HL60R, les quals sobreexpressen la proteïna MRP1. El cribratge de la quimioteca es va realitzar amb assaigs *in vitro* i *in vivo* amb la daunomicina (DNM), la qual va ser la primera antraciclina emprada amb eficàcia.⁷⁹

L'assaig del cribratge *in vitro* de la quimioteca amb la línia cel·lular L1210R es va basar en la determinació de l'acumulació intracel·lular de DNM per citometria de flux, aprofitant les característiques fluorescents de l'antineoplàsic. Aquest assaig consisteix en la incubació de les suspensions cel·lulars de densitat 1×10^6 cel/ml en tampó PBS amb la DNM ($3 \mu\text{M}$) i amb les mescles controlades de la quimioteca (0.1 mg/ml) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durant 1 h, i en presència o absència de verapamil ($5 \mu\text{M}$, VRP), el qual es va escollir com l'agent quimiosensibilitzador de referència.⁸⁰

El cribratge de les tres subquimiotèques va donar els resultats que es mostren en la Figura 5.2. D'acord amb el format de rastreig posicional de la quimioteca, el procés de cribratge amb només 52 assaigs (un per mescla) va permetre extreure informació d'un total de 5120 compostos, identificant aquells que van presentar una major activitat com a reversors del fenotip de MDR.

Cal dir que els resultats mostrats a la Figura 5.2 són els valors d'un dels assaigs que es va realitzar a una concentració de mescla de 0.1 mg/ml , però les mostres més actives seleccionades en aquesta gràfica no coincideixen en tots els casos amb les mescles que es van escollir finalment amb valors d'acumulació de DNM més alts, ja que la selecció es va realitzar tenint en compte també els resultats dels assaigs realitzats a una concentració de mescla de 0.05 mg/ml . La disminució de la concentració va implicar un increment significatiu de l'activitat quimiosensibilitzadora, tot indicant que la citotoxicitat d'alguns compostos de les mescles emmascaraven la seva activitat reversora.

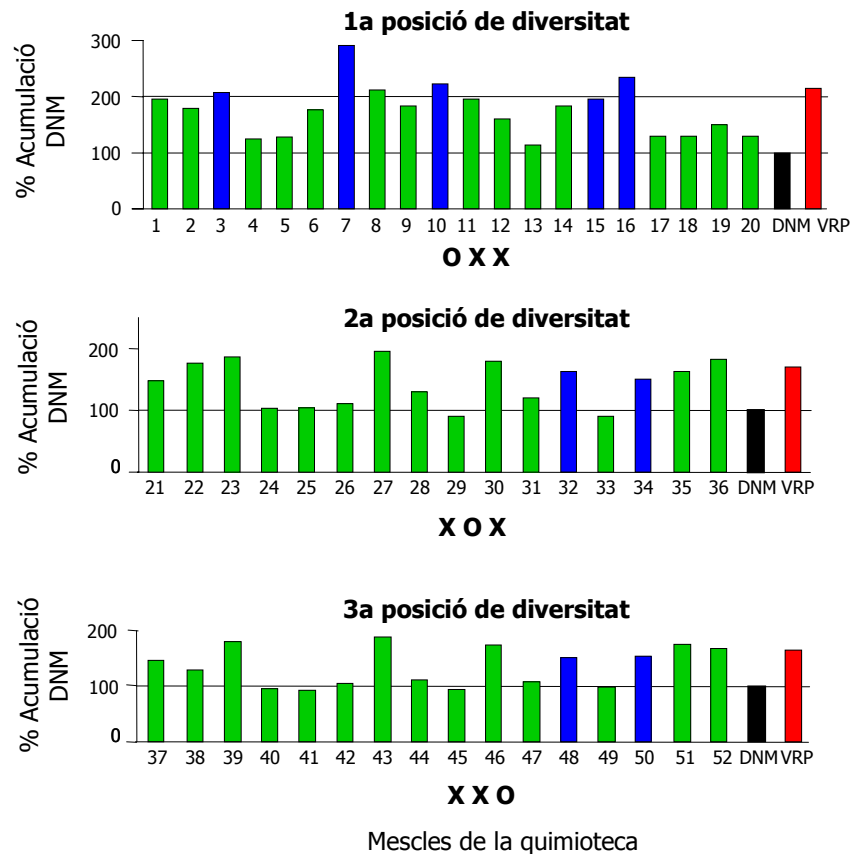


Figura 5.2. Resultats del cribratge de la quimioteca de peptoides-II en l'assaig per a la identificació d'antagonistes de la proteïna transportadora P-gp. En verd es mostren els resultats obtinguts de cada mescla a una concentració de 0.1 mg/ml i en blau es mostren les mescles més actives seleccionades a 0.1 mg/ml. A nivell de comparació, es mostra en negre un 100% d'acumulació de DNM i en vermell els resultats obtinguts amb el verapamil (5 σ M), com a quimiosensibilitzador de referència.

Del cribratge de la quimioteca es van seleccionar les mescles que contenen a la posició R¹ (*N*-terminal) les amines **A4**, **A10**, **A13**, **A35** i **A37**, com les més actives, i les amines **A15** i **A20** tant a les posicions R² com R³. Les 20 combinacions d'aquestes amines van conduir a 20 peptoides, els quals es van resintetitzar individualment i es van tornar a assajar per validar la quimioteca i escollir els compostos més actius. Els resultats obtinguts a una concentració de peptoides de 5 σ M s'han mostrat a la Figura 5.3.

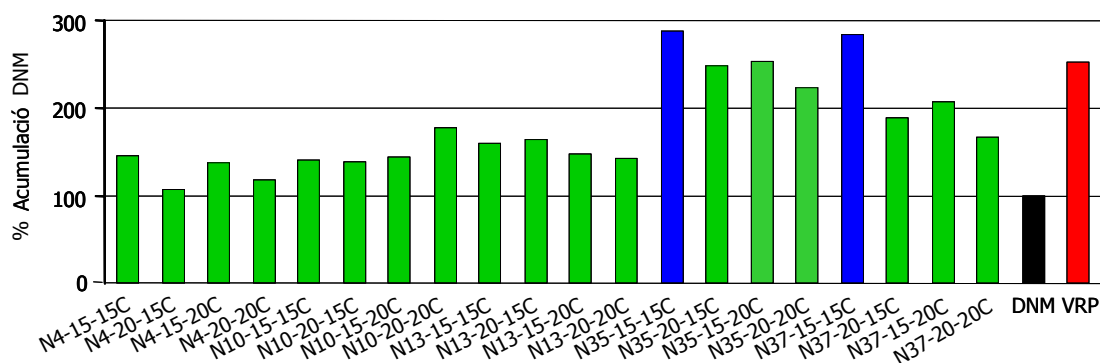


Figura 5.3. Resultats del cribratge dels 20 peptoides definits en l'assaig per a la identificació d'antagonistes de la proteïna transportadora P-gp. En verd es mostren els resultats obtinguts dels peptoides a una concentració de 5 σ M i en blau es mostren els dos peptoides més actius seleccionats a 5 σ M. A nivell de comparació, es mostra en negre un 100% d'acumulació de DNM i en vermell els resultats obtinguts amb el verapamil a 5 σ M, com a quimiosensibilitzador de referència.

Del cribratge dels 20 peptoides definits com a antagonistes de la proteïna P-gp i reversors del fenotip de MDR es van identificar aquells que tenien amines fluorades en la primera posició (**A35** i **A37**) com a compostos amb activitats més elevades. Concretament, l'acumulació de DNM en el interior de la cèl·lula va ser superior (280%) a la del verapamil (250%) en els peptoides N35-15-15C (**15**) i N37-15-15C (**16**), ambdós amb l'amina **A15** en la segona i la tercera posició del trímer (vegeu Figura 5.4), tot suggerint que aquests compostos tenien activitat quimiosensibilitzadora, presumiblement deguda a la inhibició de l'activitat extrusora de P-gp.

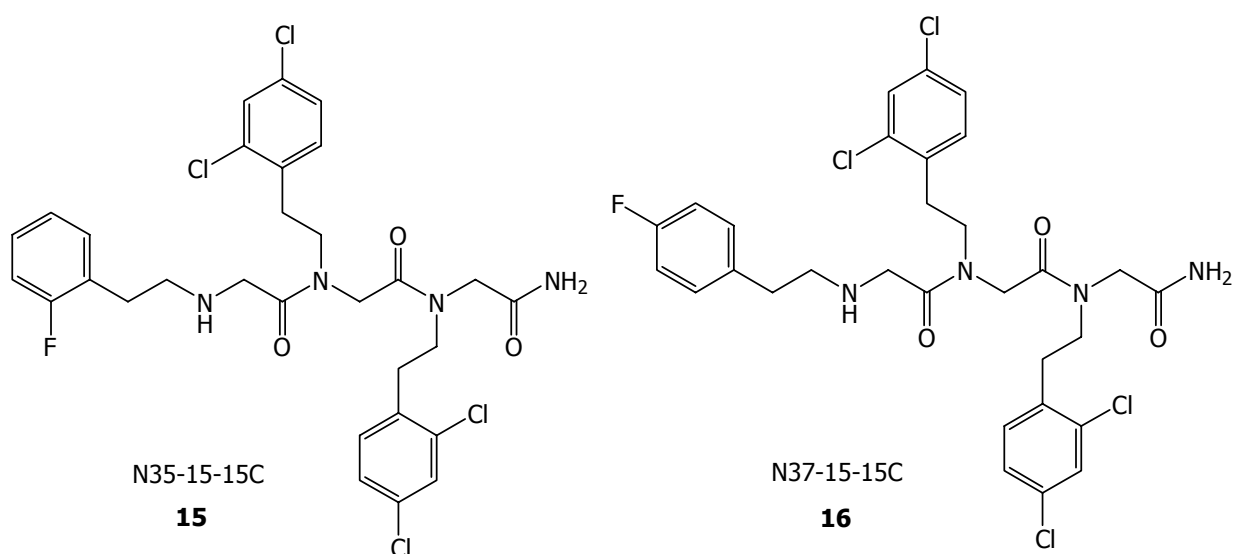


Figura 5.4. Peptoides més actius obtinguts del cribratge de la quimioteca de peptoides-II davant la seva capacitat reversora del fenotip de MDR.

La realització dels assaigs de citotoxicitat cel·lular es van realitzar mitjançant el mètode de reducció de l'MTT (metiltiazoldifeniltetrazole), el qual permet determinar la viabilitat cel·lular gràcies a la deshidrogenasa mitocondrial que es troba activa únicament en les cèl·lules viables. Aquest enzim converteix el reactiu d'MTT en una sal de formazan de color blau que es pot valorar espectrofotomètricament, de tal manera que l'absorbància mesurada és proporcional al nombre de cèl·lules viables de la mostra. Els resultats dels assaigs van mostrar que aquests dos peptoides N35-15-15C i N37-15-15C disminuïen fins a tres vegades el grau de resistència de les cèl·lules leucèmiques, de forma similar al VRP, sense presentar citotoxicitat i degut, probablement, al bloqueig de l'efecte d'expulsió dels fàrmacs per la proteïna P-gp. Les IC_{50} dels compostos van ser de $3.5 \pm 2.1 \sigma M$ per a N35-15-15C i de $4.3 \pm 1.9 \sigma M$ per a N37-15-15C.

Altres assaigs similars amb els dos peptoides **15** i **16** en la línia cel·lular HL60R van mostrar, igualment, una activitat quimiosensibilitzadora més elevada per al peptoid N35-15-15C amb una IC_{50} de $2.1 \pm 0.2 \sigma M$, tot inhibint l'efecte d'expulsió dels fàrmacs per la proteïna transportadora MRP1.

Per altra banda, Isabel Masip va realitzar estudis de modelatge molecular amb el programa Catalyst[®] per avaluar les característiques estructurals dels dos peptoides per interaccionar amb la proteïna P-gp.^{77,78} Es va comprovar com els dos peptoides seleccionats, així com el compost Tariquidar (XR9591) que és un antagonista molt potent i específic de P-gp,⁸¹ s'ajustaven de forma satisfactòria en algunes de les seves conformacions al model farmacofòric generat prèviament amb cinc compostos que s'enllacen presumiblement al mateix lloc de la proteïna, el (R)-verapamil, rodamina 123, vinblastina, colquicina i calceïna AM. Es va comprovar com, per un bon ajust, era molt important la presència en l'estructura dels dos peptoides de dos grups hidrofòbics (aromàtics o cadenes alifàtiques), un anell aromàtic i un acceptor de pont d'hidrogen.

Així doncs, els resultats obtinguts van indicar que els 2 peptoides identificats N35-15-15C i N37-15-15C eren bons antagonistes de les proteïnes transportadores P-gp i MRP1, i potencials quimiosensibilitzadors del fenotip MDR, i es van considerar prou valuosos per ser patentats.

Aquests dos peptoides esdevenen un nou esquelet farmacofòric per al desenvolupament de nous fàrmacs quimiosensibilitzadors o reversors del fenotip MDR, més actius i selectius, per a una millora de la quimioteràpia en la lluita contra el càncer. En aquest sentit, la gran

llibertat conformacional existent en els peptoides podria donar lloc a problemes de selectivitat produïts per interaccions no desitjades amb altres dianes. Per aquest motiu, ens vam plantejar la realització d'un estudi d'optimització dels peptoides N35-15-15C i N37-15-15C per millorar la seva activitat i selectivitat davant aquesta diana. La síntesi dels compostos anàlegs a aquests peptoides, però conformacionalment més restringits, s'està realitzant actualment al nostre laboratori per Alejandra Moure, en el context de la seva Tesi Doctoral.

5.1.2. CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR

La proliferació cel·lular està regulada per un cicle que comprèn quatre etapes o fases (vegeu Figura 5.5).

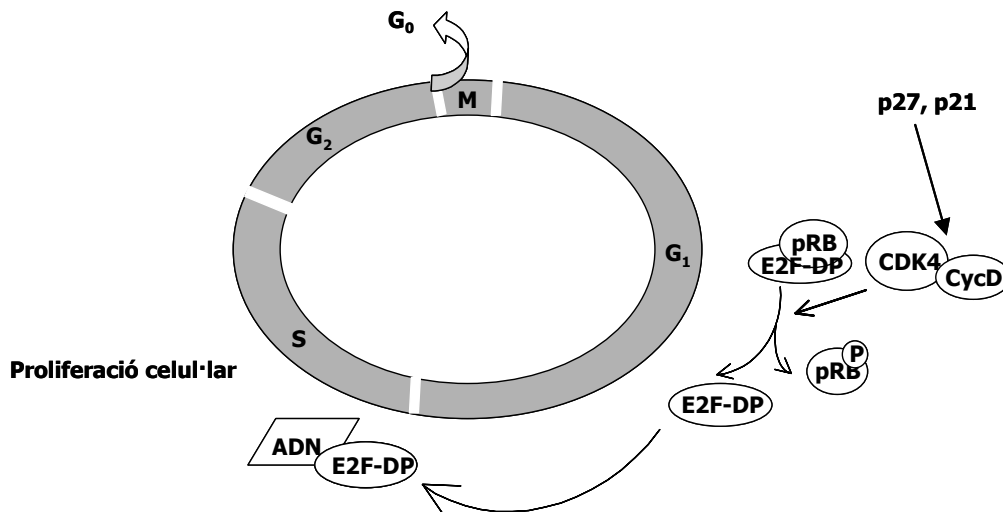


Figura 5.5. Diferents fases del cicle cel·lular: G₁ (síntesi de proteïnes i d'ARN), S (síntesi d'ADN i duplicació de la cromatina), G₂ (síntesi de proteïnes i d'ARN), M (mitosi i divisió cel·lular), G₀ (estat inactiu). Intervenció d'E2F, CDKs i CKIs.

La gran majoria de les cèl·lules al cos humà romanen en un estat inactiu sense dividir-se, en l'anomenada fase G₀. No obstant, determinats senyals o estímuls externs poden decidir si una cèl·lula entra en l'estat G₁ (síntesi de proteïnes i d'ARN) i continua el cicle normal de divisió cel·lular amb les diferents fases que el contenen, les quals són la fase S (síntesi d'ADN i duplicació de la cromatina), la fase G₂ (síntesi de proteïnes i d'ARN) i la fase M (mitosi i divisió cel·lular), o contràriament, continua en l'estat inactiu G₀ o entra en una fase d'apoptosi i mort cel·lular.

Concretament, els factors de transcripció E2F intervenen de forma crucial en el progrés de la fase G₁ a la fase S del cicle cel·lular, on es produeix la síntesi i replicació de l'ADN. Normalment E2F es troba unit a DP (essencial per la unió a ADN) i reprimat per unió a una proteïna de retinoblastoma (pRB). Quan aquesta proteïna es fosforila per l'acció de quinases dependents de ciclins (CDKs), es trenca la unió E2F-DP ∝ pRB i s'allibera E2F-DP, el qual activa la transcripció genètica necessària per a la síntesi de l'ADN, a la fase S del cicle cel·lular.⁸² Per altra banda, l'activitat del complex de quinasa (CDK + ciclina) està regulada per inhibidors específics de CDKs (CKI), entre els quals hi ha les proteïnes p15, p16, p21 i

p27, les quals actuen unint-se al complex i provoquen la inhibició de la fosforilació de pRB, aturant d'aquesta manera el cicle cel·lular.⁸³

Les cèl·lules tumorals han desenvolupat diferents mecanismes per evitar els controls que regulen la proliferació cel·lular i l'apoptosi, de manera que la divisió cel·lular es manté sempre activada i les cèl·lules no entren en fase d'apoptosi.

Un dels fàrmacs antineoplàsics més àmpliament utilitzat és el Taxol,^{84,85} el qual és capaç d'induir arrest en fase G₂/M, és a dir, és capaç d'aturar el cicle cel·lular en el procés de trànsit de la fase G₂ a M i d'induir apoptosi mitjançant diversos mecanismes encara no coneguts completament. No obstant, el Taxol comporta importants efectes secundaris degut a que indueix apoptosi en cèl·lules tumorals, però també en cèl·lules sanes.

Així doncs, les proteïnes quinases dependents de ciclins (CDKs) i les seves proteïnes inhibidores (CKI), les quals juguen un paper molt important en el cicle cel·lular, esdevenen dianes d'elevat interès terapèutic per al tractament del càncer.

5.1.2.1. Cribratge de la quimioteca

Els assaigs biològics referents a la inhibició de la proliferació cel·lular i inducció d'apoptosi els va realitzar la Dra. Gema Tarrasón del Laboratori de Bioinvestigació de Merck Farma i Química, S. A.

Cal comentar que, quan es va cribrar la quimioteca de peptoides-I es van identificar quatre peptoides amb una inhibició de la proliferació cel·lular força elevada. Aquests peptoides no contenien amines conflictives en cap posició del trímer, motiu pel qual es va decidir no tornar a repetir els mateixos assaigs amb la quimioteca de peptoides-II. No obstant, s'han inclòs aquests resultats en la memòria degut a tot el treball realitzat, posteriorment, referent als peptoides seleccionats amb més activitat.

La quimioteca de peptoides-I es va cribrar en un assaig de proliferació cel·lular amb cèl·lules humanes d'adenocarcinoma de còlon de tipus HT29. L'assaig va consistir en la incubació de les cèl·lules amb les mescles de peptoides (5 mg/ml) durant 72 h, en presència o absència d'una dosi baixa de Taxol (11 nM) per determinar si els peptoides tenien un

efecte sinèrgic amb el Taxol. La quantificació de la viabilitat cel·lular es va realitzar mitjançant l'assaig d'MTT.[‡]

Les mostres seleccionades amb una inhibició de la proliferació cel·lular més elevada van conduir a la identificació de les amines **A4**, **A5**, **A10** i **A13** per a la posició R¹ (*N*-terminal), l'amina **A13** per a la posició R² i l'**A10** per a R³. Les quatre combinacions d'aquestes amines van conduir a la identificació de quatre peptoides, els quals es van resintetitzar individualment i es van tornar a assajar per validar la quimioteca. Els resultats obtinguts van mostrar una inhibició de la proliferació cel·lular amb unes IC₅₀ prou acceptables de 35 σM per N13-13-10C i 40 σM per N10-13-10C (vegeu Figura 5.6), mentre que per N4-13-10C i N5-13-10C van ser força més grans, de 100 σM (a nivell comparatiu, l'IC₅₀ del Taxol és 11 nM). En cap dels quatre peptoides es va observar un efecte sinèrgic amb el Taxol.

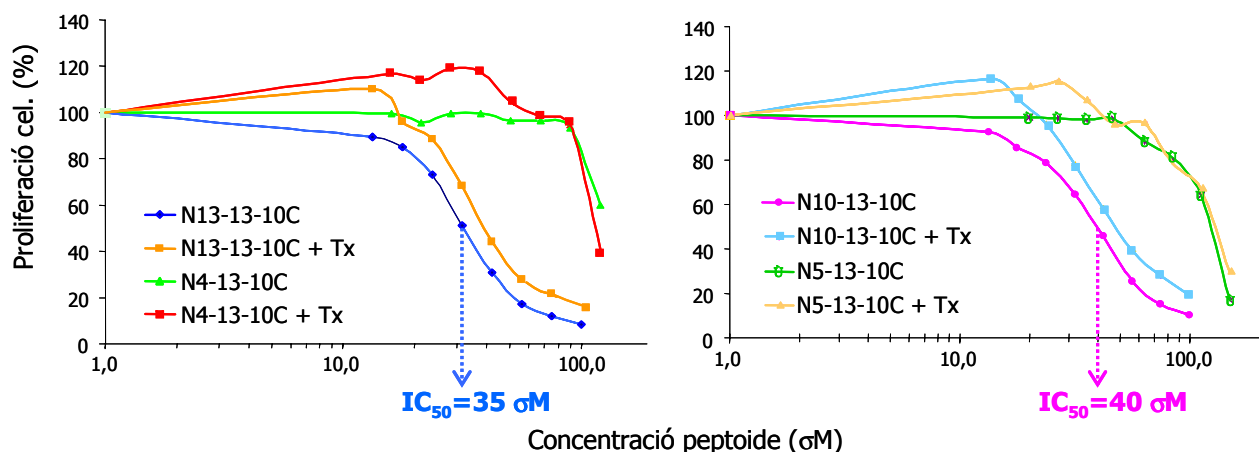


Figura 5.6. Determinació de la proliferació cel·lular a diferents concentracions de peptoides N13-13-10C, N10-13-10C, N4-13-10C i N5-13-10C, en presència i absència de Taxol (11 nM, Tx). En blau es mostra la IC₅₀ del N13-13-10C i en rosa la del N10-13-10C.

També es va estudiar si els quatre peptoides seleccionats produïen un efecte proapoptòtic en les cèl·lules HT29, després de 72 h de tractament. Les cèl·lules es van tenyir amb iodur de propidi i l'anàlisi de fragmentació del DNA es va realitzar per citometria de flux. Es van observar evidències importants de la presència del pic sub-G₁ en les cèl·lules tractades amb els peptoides N13-13-10C i N10-13-10C. La presència del pic sub-G₁ indica que ha tingut lloc la degradació del DNA per un efecte apoptòtic. Aquests resultats indicaven que els peptoides N13-13-10C i N10-13-10C havien induït apoptosi entre un 50-70% de les

[‡] L'assaig d'MTT s'ha explicat a l'apartat 5.1.1.1.

cèl·lules, mentre que els peptoides N4-13-10C i N5-13-10C no van induir cap efecte. Aquest efecte es va observar també en altres línies cel·lulars, com ara l'adenocarcinoma de còlon humà de tipus LoVo, el glioblastoma humà (T98g), la leucèmia miàlgica crònica (K562) i l'adenocarcinoma de pulmó humà (MDA.MB).

A la Figura 5.7 es mostren els resultats de l'anàlisi de dosi-resposta del pic sub-G₁ després de tractar cèl·lules HT29 amb diferents concentracions dels peptoides N13-13-10C o N10-13-10C. A mode de comparació, també es mostren els nivells del pic sub-G₁ detectats en cèl·lules control (no tractades amb cap inhibidor) i en cèl·lules tractades amb Taxol.

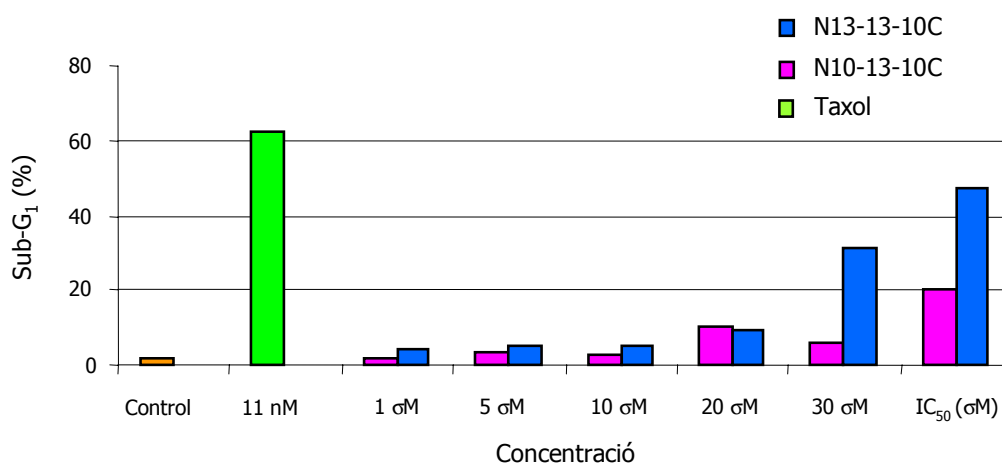


Figura 5.7. Anàlisi de dosi-resposta del pic sub-G₁ després de 72 h de tractar cèl·lules HT29 amb diferents concentracions dels peptoides N13-13-10C i N10-13-10C. A nivell de comparació es mostren els nivells del pic sub-G₁ detectats a les cèl·lules control i a les cèl·lules tractades amb Taxol.

Per altra banda, després d'incubar les cèl·lules amb els dos peptoides N13-13-10C i N10-13-10C durant 24 i 48 h, es van detectar nivells elevats de les proteïnes p21 i p27, les quals són inhibidors específics de quinases.

Aquests resultats semblaven indicar que l'acció dels peptoides N13-13-10C i N10-13-10C no consistia en inhibir l'activitat de les quinases dependents de ciclines (CDKs), sinó en sobreactivar els inhibidors específics de quinases, concretament les proteïnes p21 i p27. D'aquesta manera inhibien la proliferació de línies cel·lulars tumorals en creixement exponencial, tot induint un arrest o una parada del cicle cel·lular en fase G₁. Aquests resultats es van considerar suficientment valuosos com per haver patentat aquests dos peptoides. Un dels pròxims objectius és la realització d'estudis més extensos per explicar el seu mecanisme d'acció, així com l'acumulació de les proteïnes p21 i p27.

Així doncs, el peptoide N10-13-10C i, principalment, l'N13-10-13C (vegeu Figura 5.8) són capaços de modular el cicle cel·lular, induir apoptosi i mort cel·lular, esdevenint un nou esquelet farmacofòric per al desenvolupament de nous fàrmacs per a la teràpia contra el càncer.

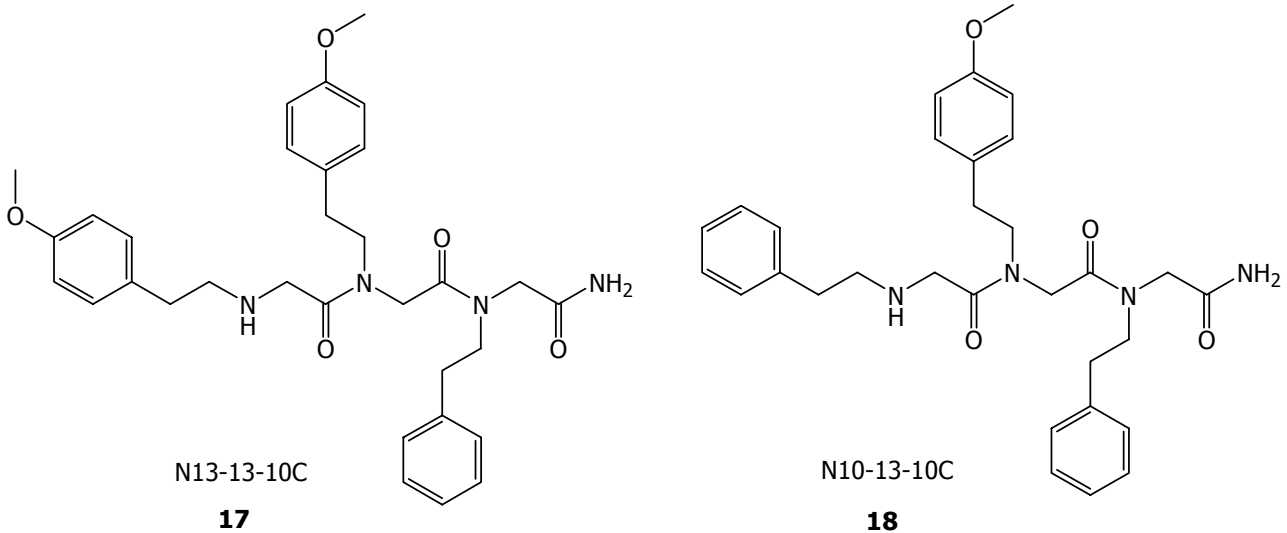


Figura 5.8. Peptoides més actius obtinguts del cribratge de la quimioteca de peptoides-I en front de la seva capacitat d'inhibició de la proliferació cel·lular i d'inducció d'apoptosi.

Aquests dos peptoides constitueixen una eina molt útil en l'estudi de noves dianes moleculars involucrades en la inducció del procés apoptòtic. En aquest sentit, es va plantejar la possibilitat d'identificar les proteïnes diana del peptoide N13-13-10C fent servir la tècnica de cromatografia d'afinitat mitjançant dos tipus d'estratègies: amb columnes de sefarosa EAH que tenien el peptoide enllaçat covalentment, i amb columnes d'agarosa-monoavidina amb el peptoide biotinitat. La preparació d'aquestes columnes i els resultats de l'estudi que se'n va derivar es detallen al capítol 9 de la segona part d'aquesta memòria.

5.2. ANALGÈSIA. RECEPTOR TRPV1

El dolor, ja sigui transitori o crònic, representa un greu problema social i econòmic ja que és patit per un gran nombre de persones arreu del món. La sensació de dolor s'inicia quan les terminacions nervioses de les neurones sensorials (nociceptors) s'activen davant d'estímulos nocius externs de diferent naturalesa i transmeten la informació als centres processadors de la sensació del dolor.

Es calcula que aproximadament un 50% del tractament del dolor és ineficaç, degut a la manca d'especificitat i als efectes secundaris que provoca, així com dependència. Així doncs, la identificació de nous compostos que millorin el tractament i la prevenció del dolor esdevé un objectiu molt important.

Gràcies a la caracterització i clonació del canal de la subunitat 1 vanilloide (TRPV1), s'han començat a aclarir els mecanismes de transmissió del dolor.⁸⁶ Aquest receptor de membrana consisteix en un canal iònic no selectiu amb una elevada permeabilitat a l'ió Ca^{2+} quan està activat per capsaïcina (vegeu Figura 5.9).⁸⁷ A més, aquest canal també s'obre quan es troba exposat a una temperatura nociva ($>42\text{ }^{\circ}\text{C}$) o a un pH baix, i la seva activitat està fortament modulada per l'acció de reguladors inflamatoris. Aquests fets condueixen a pensar que el canal TRPV1 està involucrat en les vies de dolor i que exerceix una funció determinant en la transducció dels estímulos nocius tèrmics i químics en les terminals nervioses dels teixits perifèrics.^{88,89}

Els analgèsics tradicionals es divideixen en dues classes, opiàcids i antipirètics, els quals no mostren una elevada selectivitat i presenten efectes secundaris, com ara dependència i tolerància.⁹⁰ En aquest context, la recerca de nous moduladors o antagonistes específics de l'activitat de TRPV1 a través del control dels canals iònics constitueix una estratègia d'elevat interès per al tractament del dolor.

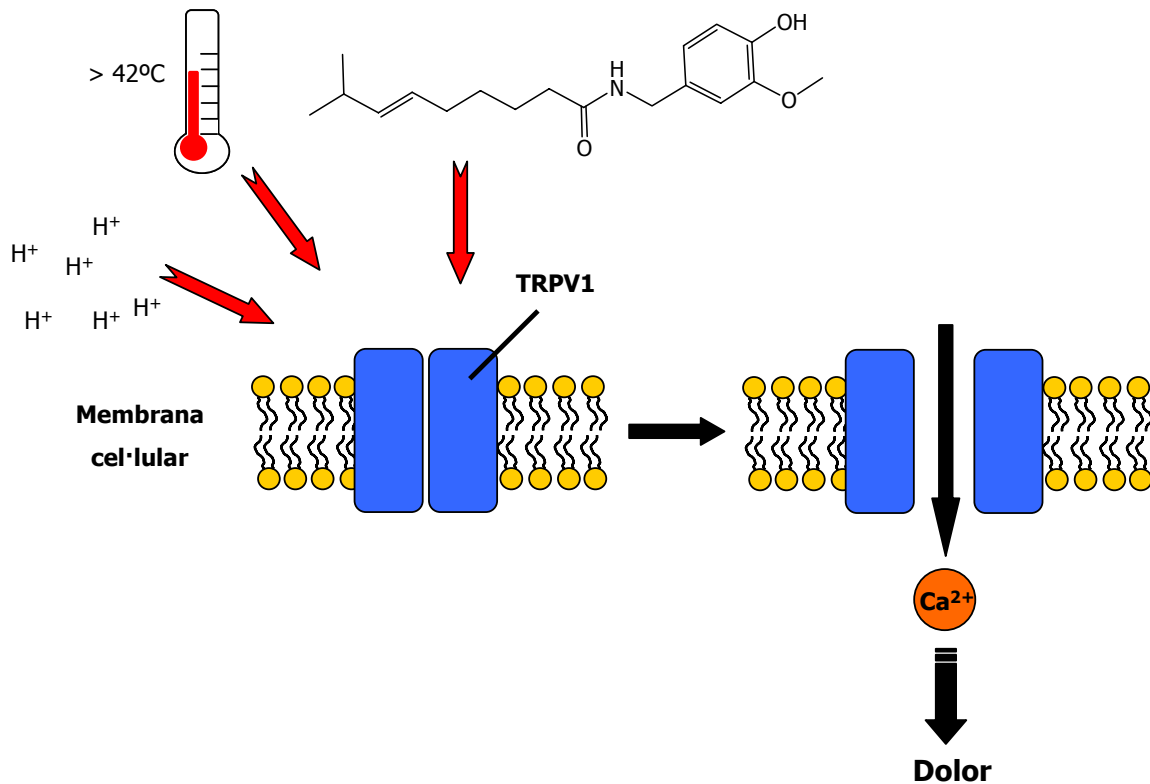


Figura 5.9. Activació i obertura del canal iònic TRPV1 per capsaïcina, una alta temperatura o un pH àcid. Entrada d'ions a l'interior cel·lular, en particular d'ions Ca^{2+} , conduïnt a la sensació de dolor.

5.2.1. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA

Els assaigs biològics referents al cribratge de la quimioteca de peptoides-II respecte l'activitat bloquejadora del canal TRPV1 van ser realitzats per la Dra. Carolina Garcia, del grup del Dr. Antonio Ferrer Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Elx.

El model emprat per als assaigs *in vitro* van ser ovòcits de granota del tipus *Xenopus laevis* expressats de forma heteròloga amb canals recombinants de TRPV1,⁹¹ per microinjecció dels corresponents cADN i cARN que els codifiquen.

Després de 2 dies de la microinjecció, es posen en contacte els ovòcits que expressen els receptors amb l'agonista, la capsaïcina. En el moment en què els canals estan completament oberts, es determina la intensitat màxima ($I_{m\grave{a}x}$) del corrent mitjançant el pinçament del voltatge de la membrana amb dos microelèctrodes. Un cop estabilitzat el corrent, l'ovòcit es tracta amb una solució de capsaïcina en presència dels compostos a avaluar, els peptoides en aquest cas, els quals si són capaços de bloquejar els canals, produiran una disminució del corrent elèctric (I_{bloq}) i la mesura del corrent (I_{mescla}), una vegada estigui estabilitzat, indicarà la mesura de la resposta bloquejadora de les mescles de peptoides segons la relació

$[1-(I_{\text{mescla}}/I_{\text{màx}})] \times 100 = \% \text{ de resposta bloquejadora}$ o, el que és el mateix, $(I_{\text{bloq}}/I_{\text{màx}}) \times 100 = \% \text{ (vegeu Figura 5.10)}$. Aquesta relació reflecteix la capacitat d'un compost o una mescla d'actuar com a antagonista de TRPV1, amb una capacitat bloquejadora del canal que és reversible.

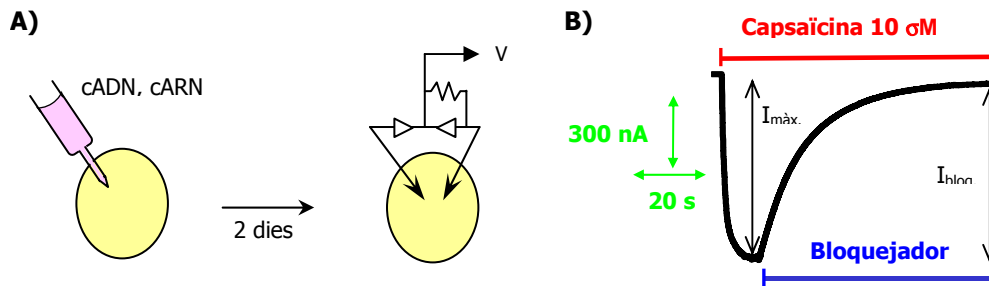


Figura 5.10. Model *in vitro* per a la mesura de la capacitat d'un antagonista bloquejador de l'activitat del canal TRPV1: A) esquema de l'assaig electrofisiològic; B) resposta obtinguda per un bloquejador de l'activitat de TRPV1 activat per capsaicina.

Els resultats del cribratge de la quimioteca de peptoides-II respecte la seva activitat bloquejadora del canal TRPV1 es mostren en la Figura 5.11.

Del cribratge de la quimioteca es van seleccionar les mescles que van mostrar una capacitat de bloqueig superior al 80%. Així doncs, es van identificar les amines **A13**, **A15**, **A20**, **A35**, **A16** i **A19** per R¹ (N-terminal), i les amines **A15** i **A20** tant per les posicions R² com R³. La combinació d'aquestes amines va conduir a la identificació de 24 peptoides. No obstant, es va decidir no resintetitzar-los de forma individual i tornar-los a assajar en aquest cas perquè dos d'aquests peptoides ja s'havien seleccionat en el cribratge de la primera quimioteca de peptoides.^{46,47}

Aquests dos peptoides més actius van correspondre a l'N16-15-15C i l'N19-15-15C, els quals presenten un substituent amb un nitrogen terciari en l'extrem N-terminal i anells aromàtics clorats en les altres dues posicions (vegeu Figura 5.12). Aquests dos compostos actuen com antagonistes no competitiu de TRPV1 mitjançant un lloc d'unió diferent al de la capsaicina. Les IC₅₀ d'aquests compostos van ser d'1.0 μM i 2.6 μM, respectivament.

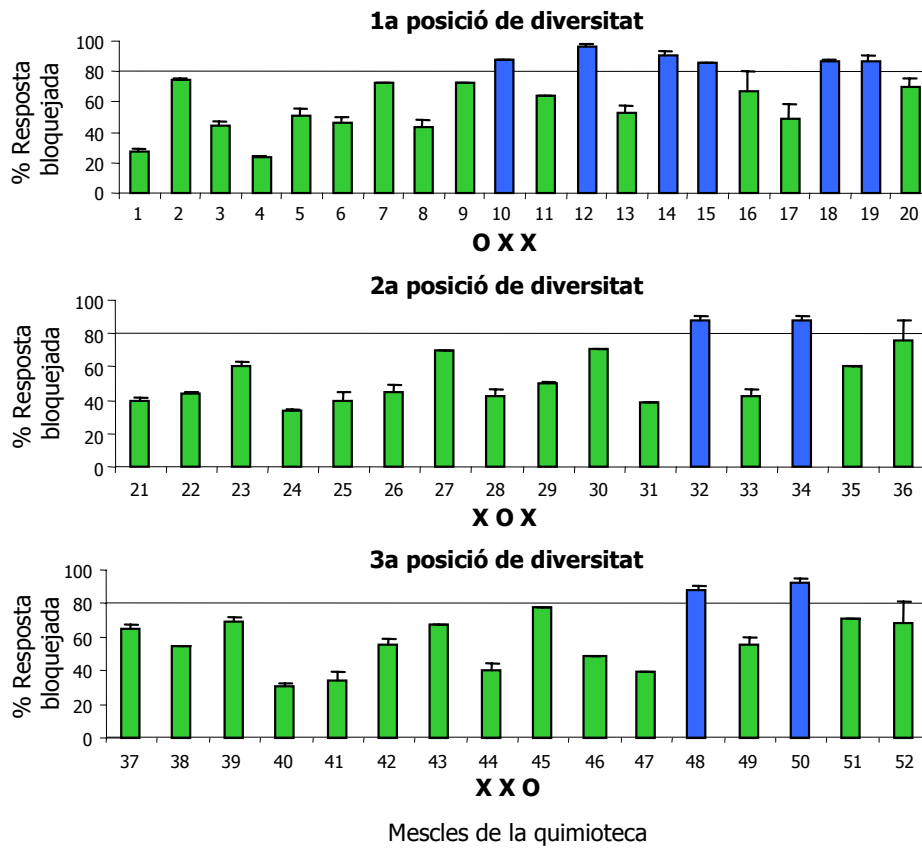


Figura 5.11. Resultats del cribatge de la quimioteca de peptoides-II respecte l'activitat bloquejadora del canal TRPV1. En verd es mostren els resultats obtinguts de cada mescla a una concentració de 100 µg/ml i en blau es mostren les mescles més actives seleccionades a 100 µg/ml.

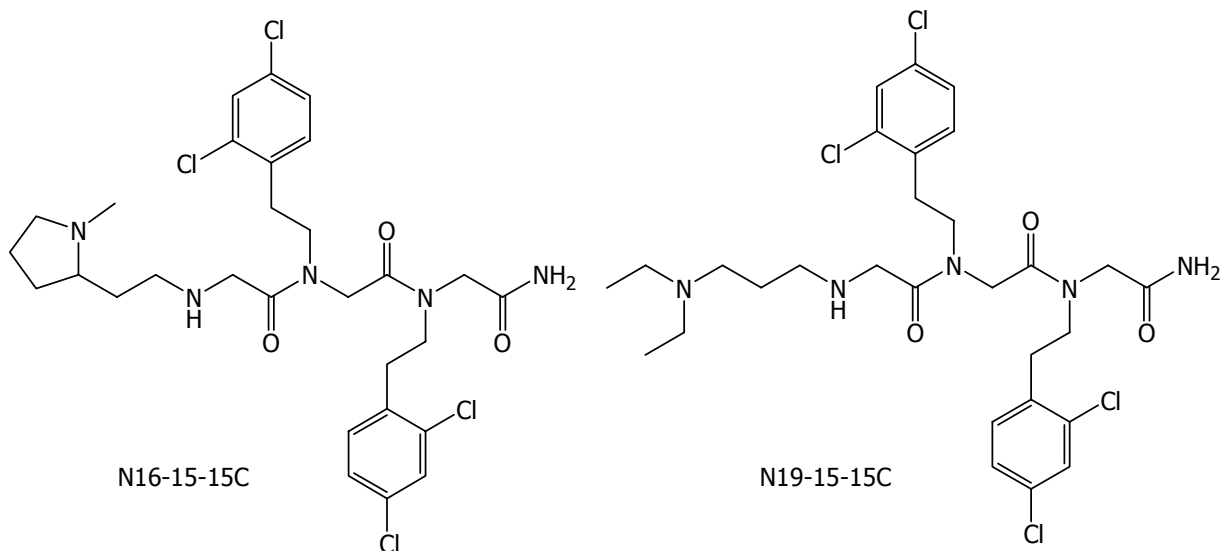


Figura 5.12. Peptoides més actius obtinguts del cribatge de la quimioteca de peptoides-I en front de la seva capacitat bloquejadora del canal TRPV1, els quals també han mostrat una elevada activitat en el cribatge de la quimioteca de peptoides-II enfront d'aquesta diana.

Estudis *in vivo* amb ratolins i amb l'assaig de la placa calenta, van demostrar que l'administració intraperitoneal dels dos compostos provocava una disminució significativa de la nocicepció tèrmica, així com una atenuació de la hiperalgèsia tèrmica i química.

Aquests resultats van permetre validar la quimioteca de peptoides-I, tot i el problema detectat amb els compostos ciclats no desitjats que s'havien obtingut en les mescles d'aquella quimioteca, ja comentat amb anterioritat en aquesta part de la memòria. D'aquesta manera es va posar de manifest la reproduïbilitat del cribratge de les dues quimiotèques de mescles, identificant-se en ambdós casos els dos peptoides més actius com a bloquejadors de TRPV1.

5.3. NEUROPROTECCIÓ. RECEPTOR D'NMDA

Malalties neurològiques com els vessaments cerebrals i l'epilèpsia, o neurodegeneratives com la malaltia de Huntington, malaltia de Parkinson, malaltia d'Alzheimer o l'esclerosi amiotròfica lateral, estan relacionades amb la sobreestimulació de receptors de glutamat com els receptors d'NMDA, AMPA o KA.^{§,92}

El glutamat (Glu) és un neurotransmissor excitatori en mamífers que activa diferents tipus de receptors, els quals es poden classificar en ionotròpics, associats a l'obertura de canals iònics, i metabotròpics, associats a proteïnes G que modulen l'activitat de diversos enzims. La mort neuronal està relacionada amb l'activació excessiva dels receptors ionotròpics, especialment del tipus NMDA. A la Figura 5.13 s'ha esquematitzat el procés d'activació dels receptors de tipus AMPA i NMDA.

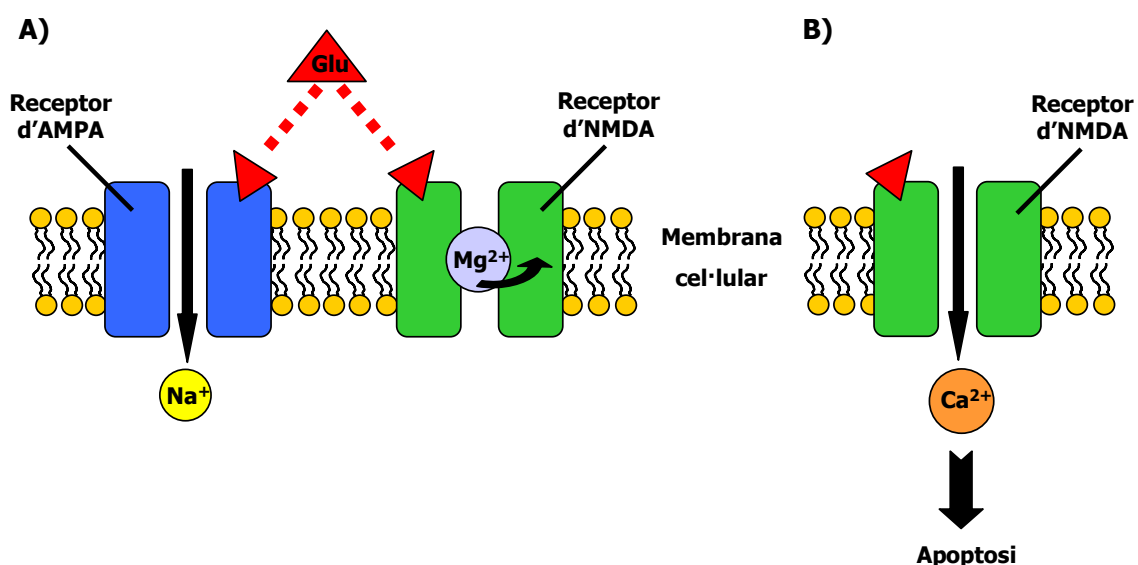


Figura 5.13. A) Activació dels receptors de tipus AMPA i d'NMDA pel glutamat (Glu), entrada a l'interior de la cèl·lula d'ions Na⁺ i desbloqueig dels ions Mg²⁺. B) Entrada a l'interior cel·lular d'ions Ca²⁺, fet que pot conduir a l'apoptosi o mort cel·lular.

Es coneix que una activació perllongada del receptor de tipus AMPA per part del glutamat provoca l'entrada d'ions Na⁺ a l'interior cel·lular i una consegüent disminució del potencial de membrana. Aquest canvi condueix al desbloqueig dels ions Mg²⁺ del receptor d'NMDA, el qual també es troba activat pel glutamat, i provoca el pas d'ions Ca²⁺ cap a l'interior de la

[§] NMDA: àcid *N*-metil-D-aspartic; AMPA: àcid (*RS*)-2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolil)propionic; KA: àcid kaïníc.

cèl·lula. Aquest augment de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} provoca una cascada de reaccions posteriors que acaben generant òxid nítric i cGMP. Aquestes alteracions condueixen, en últim terme, al procés d'apoptosi o de necrosi cel·lular (vegeu Figura 5.13).⁹³

La mort neuronal induïda per glutamat pot ser amortida pel bloqueig dels receptors d'NMDA amb un antagonista selectiu o mitjançant la interferència en alguna de les etapes de la cascada posterior dels esdeveniments intracel·lulars.

Per aquests motius, els receptors de tipus NMDA es consideren unes dianes terapèutiques importants en el camp de la neuroprotecció i es persegueix el desenvolupament d'antagonistes selectius del glutamat de moderada afinitat pels receptors. A més, cal que aquestes estratègies terapèutiques modulin l'activitat dels receptors sobreactivats, però que no disminueixin la transmissió sinàptica degut a la inhibició del neurotransmissor del glutamat, raó per la qual caldria que tinguessin una capacitat bloquejadora reversible i ràpida.

5.3.1. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA

Els assaigs biològics referents al cribratge de la quimioteca de peptoides-II respecte la seva capacitat bloquejadora dels receptors de tipus NMDA van ser realitzats per la Dra. Carolina Garcia, del grup del Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Elx.

El model emprat per als assaigs *in vitro* van ser ovòcits de granota del tipus *Xenopus laevis* expressats amb les unitats NR1 i NR2A del receptor d'NMDA. L'assaig consisteix en posar en contacte els ovòcits que expressen els receptors amb l'agonista, el glutamat, i amb el coagonista, la glicina, i mesurar el corrent de la cèl·lula quan tots els canals es troben oberts al pas de Ca^{2+} , mitjançant el pinçament del voltatge de membrana amb dos microelèctrodes (vegeu Figura 5.10 de l'apartat 5.2, A), obtenint-se un valor màxim d'intensitat de corrent ($I_{\text{màx}}$). Posteriorment, es tracten els ovòcits amb una dissolució de glutamat en presència dels compostos a avaluar, en aquest cas les mesclades de peptoides, i, si aquests són capaços de bloquejar els canals, el corrent iònic disminueix. Un cop s'ha establitzat aquest corrent, la seva mesura (I_{mescla}) condueix a la resposta bloquejadora dels peptoides i, per tant, a la seva capacitat com a agonista d'NMDA, segons la relació

$[1-(I_{\text{mescla}}/I_{\text{màx}})] \times 100 = \% \text{ de resposta bloquejadora del canal o, el que és el mateix, } (I_{\text{bloq}}/I_{\text{màx}}) \times 100 = \%$ (vegeu Figura 5.10 de l'apartat 5.2, B).

Els resultats obtinguts del cribratge de la quimioteca de peptoides-II respecte la seva activitat bloquejadora dels canals del receptor d'NMDA es mostren en la Figura 5.14. En el procés de deconvolució es van seleccionar les amines per a cada una de les tres posicions del peptoides que van mostrar una eficàcia neuroprotectora amb una activitat bloquejadora superior al 65%. Així doncs, les amines seleccionades per R¹ (N-terminal) van ser l'**A12**, **A13** i **A20**, per R² van ser l'**A15** i **A20** i per a R³ (C-terminal) **A10**, **A15** i **A35**. La resíntesis dels 18 peptoides resultants, la va dur a terme la Dra. Isabel Masip. Aquests compostos seran avaluats per poder continuar amb els estudis de recerca de nous antagonistes del receptor d'NMDA amb característiques neuroprotectores.

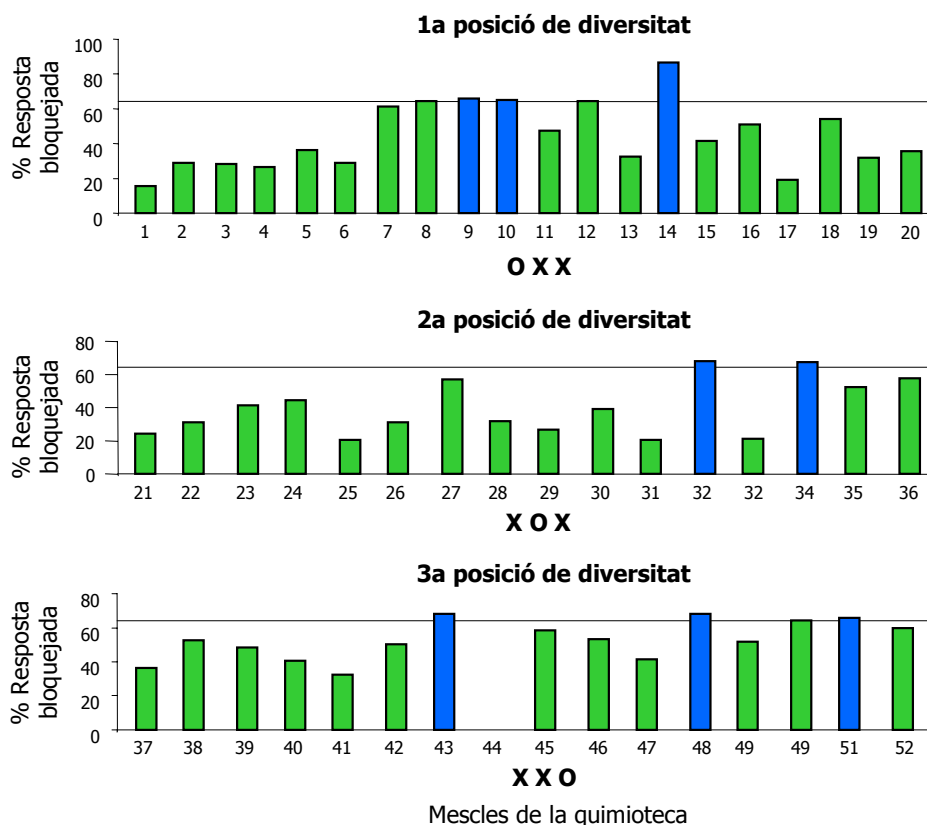


Figura 5.14. Resultats del cribratge de la quimioteca de peptoides-II respecte l'activitat bloquejadora del receptor d'NMDA. En verd es mostren els resultats obtinguts de cada mescla a una concentració de 50 $\mu\text{g/ml}$ i en blau es mostren les mescles més actives seleccionades a 50 $\mu\text{g/ml}$. La mescla 44 no es va poder analitzar en no disposar de mostra suficient.

En aquest sentit, del cribratge de la quimioteca de peptoides-I davant aquesta diana, es van identificar els peptoides N20-19-7C i N20-20-7C com a bons inhibidors de l'activitat del canal del receptor d'NMDA (un 85% de bloqueig a una concentració de 100 μ M) amb una IC_{50} de $24 \pm 3 \mu$ M i $22 \pm 2 \mu$ M.^{49,50} De l'estudi d'aquests compostos es va identificar que l'**A20** en l'extrem *N*-terminal jugava un paper molt important en l'activitat del peptoid, i que la glicina N20C mostrava una activitat neuroprotectora *in vitro* i *in vivo* força interessant (vegeu Figura 5.15).

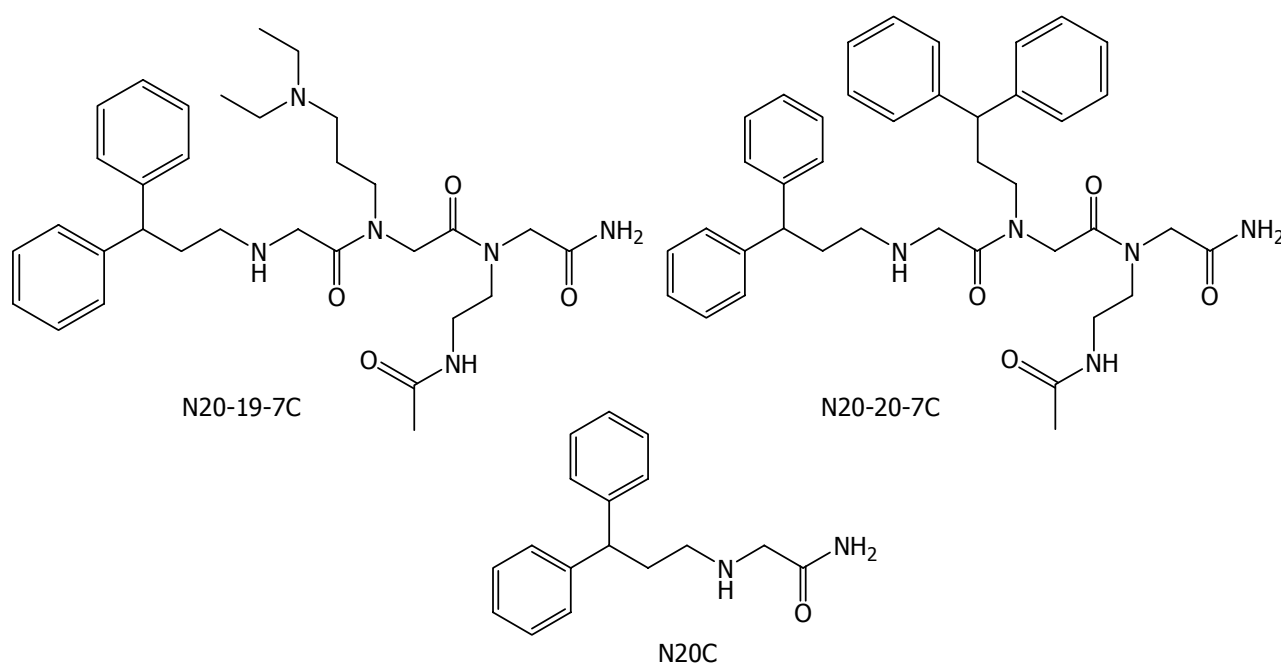


Figura 5.15. Peptoides més actius obtinguts del cribratge de la quimioteca de peptoides-I en front de la seva capacitat bloquejadora del receptor d'NMDA. La glicina N20C també va mostrar activitat enfront d'aquesta diana.

Tot i que en el cribratge de la quimioteca de peptoides-II no s'han identificat aquests dos peptoides, sí que apareix l'**A20** seleccionada en les posicions R^1 (*N*-terminal) i R^2 , la qual cosa és una prova addicional de validació de les dues quimiotèques de mescles.

5.4. LPS

LPS (lipopolisacàrid) o endotoxina és el component majoritari de la paret cel·lular dels bacteris Gram-negatius i és un important activador del sistema inflamatori innat. LPS activa els macròfags o cèl·lules del sistema immune per induir la producció de citokines proinflamatòries i d'altres substàncies inflamatòries, i és considerat una de les principals molècules causants del *shock* endotòxic i de la consegüent mortalitat en pacients sèptics.⁹⁴ Fins ara, encara no hi ha fàrmacs al mercat dirigits contra LPS.

L'estructura molecular d'LPS consisteix bàsicament en dues regions: una part hidrofílica externa formada per carbohidrats i una part interna formada per lípids A. Aquest caràcter amfipàtic li permet organitzar-se en micel·les en els medis aquosos.

El mecanisme pel qual LPS és reconegut pels macròfags i és capaç d'induir la resposta inflamatòria s'ha esquematitzat a la Figura 5.16.

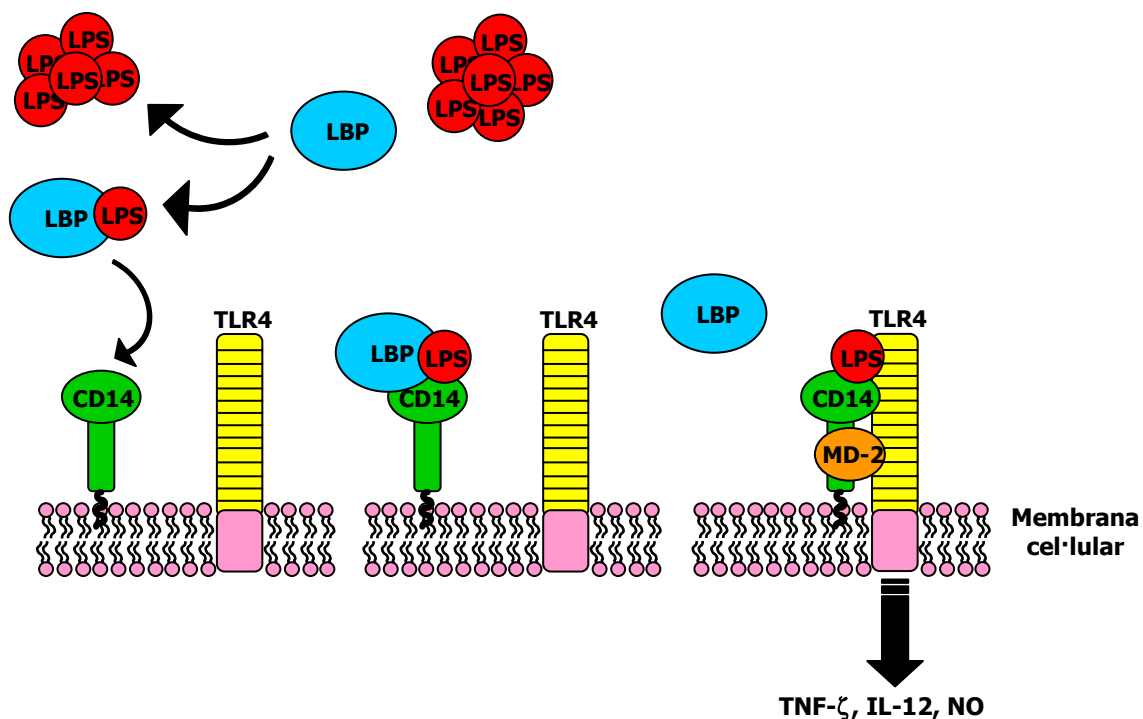


Figura 5.16. Mecanisme de reconeixement d'LPS a la superfície dels macròfags i inducció de la resposta inflamatòria per estimular les citokines proinflamatòries, TNF- ζ i IL-12, o substàncies inflamatòries, l'òxid nítric. Intervenien la proteïna LBP, el receptor CD14, la proteïna MD-2 i el receptor de tipus Toll TLR4.

En una primera etapa, la proteïna LBP, present al flux sanguini i secretada pel sistema immunològic, s'enllaça a les micel·les d'LPS i transfereix un únic monòmer d'LPS al receptor CD14, una molècula de glicosilfosfatidilinositol, formant-se un complex ancorat a la superfície del macròfag.^{95,96} El complex format no és capaç de generar senyals transmembrànics cap a l'interior cel·lular, així que s'enllaça amb el receptor de tipus Toll TLR4 mitjançant una proteïna secretada per LPS, MD-2.^{97,98} El nou complex format activa els senyals per iniciar una cascada de reaccions intracel·lulars que, en últim terme, estimulen les citoquines proinflamatòries, com ara el factor de necrosis tumoral TNF- ζ o l'interleuquina IL-12, així com substàncies inflammatòries, tals com l'òxid nítric.

Actualment, hi ha diferents famílies de pèptids antimicrobians que s'enllacen a LPS i inhibeixen el seu enllaç amb LBP, aturant el procés inflamatori.^{99,100} Així doncs, el disseny de molècules orgàniques de baix pes molecular que es poguessin enllaçar a LPS i neutralitzar la seva acció tòxica és un objectiu en el tractament del *shock* endotòxic.

5.4.1. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA

Els assaigs biològics referents al cribratge de la quimioteca de peptoides-II respecte la seva capacitat neutralitzadora de l'activitat d'LPS van ser realitzats per la Dra. Puig Mora, del grup del Dr. Pérez-Payá de la Fundació Valenciana d'Investigacions Biomèdiques de València.

L'assaig es va realitzar amb la detecció de monòmers d'LPS mitjançant el test cromogènic de *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL, de BioWhittaker).¹⁰¹ Primerament, es van incubar les mescles dels peptoides (250 μ M) amb LPS (0.036 mg/ml) durant 45 min i a 37 °C. Seguidament, es va afegir el reactiu LAL i la mescla es va deixar reaccionant durant 6 min a 37 °C. Aquest reactiu conté una proteïna que s'activa en presència d'LPS (sense neutralitzar) i catalitza l'alliberació de *p*-nitroanilina (pNA) del substrat incolor cromogènic Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA, després d'una incubació de 10 min. Finalment, es va mesurar fotomètricament el pNA alliberat a 405 nm. Els resultats del cribratge es mostren a la Figura 5.17.

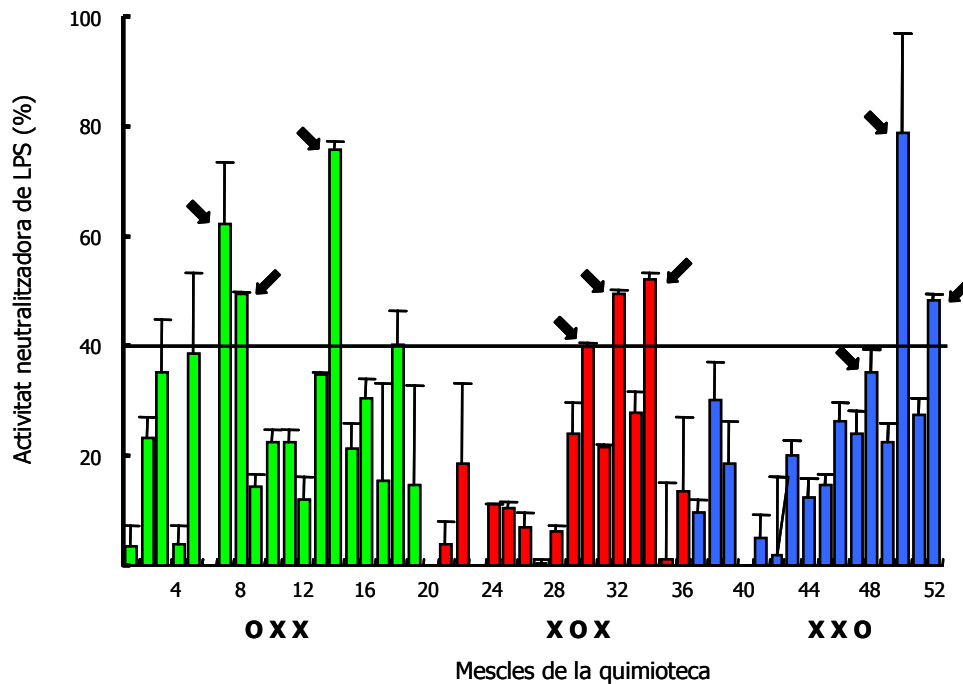


Figura 5.17. Resultats del cribratge de la quimioteca de peptoides-II respecte l'activitat neutralitzadora d'LPS. En verd es mostren les mescles que tenien definides la tercera font de diversitat R¹, en vermell les mescles de la segona font de diversitat R² i en blau les de la primera R³, a una concentració de mescla de 250 σ M.

Dels resultats obtinguts del cribratge es van seleccionar aquelles mescles que mostraven més d'un 40% d'activitat neutralitzadora d'LPS.¹⁰² Es van identificar les amines **A10**, **A11** i **A20** per la posició R¹ (N-terminal), les amines **A13**, **A15** i **A20** per la R², i l'**A15**, **A20** i **A37** per R³. D'aquesta primera selecció, es van escollir aquelles mescles que presentaven una IC₅₀ inferior a 200 σ M, descartant així l'**A10** per R¹, l'**A15** per R², i l'**A37** per R³. La combinació de les 6 amines restants va conduir a la identificació de 8 peptoides, els quals es van tornar a resintetitzar i es van tornar a assajar. Els resultats es van comparar amb dos pèptids d'elevada afinitat per enllaçar-se a LPS, polimixina B (PMB)¹⁰³ i LALF-14¹⁰⁴ (vegeu Taula 5.1).

Els resultats obtinguts van mostrar els peptoides N11-20-20C (**19**) i N20-13-20C (**20**) (vegeu Figura 5.18) com a potents neutralitzadors d'LPS amb uns valors d'IC₅₀ de 40 σ M i 50 σ M, respectivament. Altres assaigs addicionals amb lípids A d'*Escherichia coli* i aquests dos peptoides van indicar que no presentaven inhibició i que, per tant, possiblement s'enllaçaven a la part superficial hidrofílica d'LPS, contràriament als pèptids sintètics descrits que neutralitzen LPS enllaçant-se a la part hidrofòbica interna de les micel·les (lípid A).^{101,105}

Taula 5.1. Activitat biològica dels 8 compostos definits de la quimioteca de peptoides-II com a neutralitzadors d'LPS. En negreta es mostren els dos peptoides més actius. En el cas del peptoid N20-13-15C no es va poder determinar l'IC₅₀ per problemes de solubilitat.

Peptoides	Activitat neutralitzadora de LPS (IC ₅₀ , μ M)
N11-13-20C	> 250
N11-13-15C	> 250
N11-20-15C	70
N11-20-20C	40
N20-20-20C	125
N20-20-15C	> 250
N20-13-20C	50
N20-13-15C	n.d.
PMB ^a	< 10 ⁻⁴
LALF-14 ^b	64

^aBTBB(BfLBBT), on s'han utilitzat les lletres del codi dels aminoàcids: B, diaminobutirat; f, D-fenilamina. La seqüència entre parèntesis està ciclada.

^fG(CKPTFRRLKWKYKC)G. La seqüència entre parèntesis està ciclada.

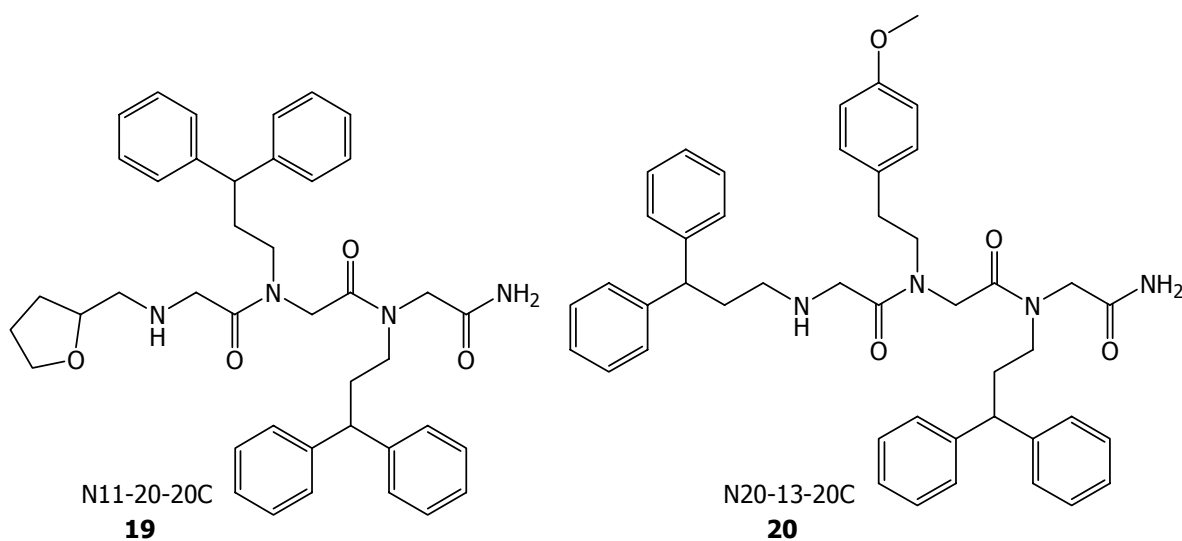


Figura 5.18. Peptoides més actius obtinguts del cribratge de la quimioteca de peptoides-II davant de la seva capacitat neutralitzadora de l'activitat d'LPS.

També es van realitzar assaigs antimicrobians amb el peptoide N11-20-20C i es va comprovar com no presentava activitat antimicrobiana. A més, es van realitzar assaigs *in vivo* amb ratolins per mesurar la quantitat de la citoquina proinflamatòria TNF- ζ present al sèrum i alliberada en últim terme per l'acció d'LPS, i es va comprovar com, en particular per al peptoide N20-13-20C, disminuïen de forma significativa els nivells de TNF- ζ .¹⁰²

Així doncs, aquests dos peptoides neutralitzadors de l'activitat d'LPS esdevenen un nou esquelet farmacofòric de molècules orgàniques de baix pes molecular capaces d'interferir en interaccions lípid-proteïna.

5.5. CONCLUSIONS DE L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PEPTOIDES

El fet que les cadenes laterals dels peptoides recaiguin en l'àtom de nitrogen de l'enllaç amida en comptes del carboni en ζ al carbonil, com és el cas dels pèptids, evita la formació de ponts d'hidrogen intramoleculars, augmentant d'aquesta manera el seu grau de llibertat conformacional. Aquesta flexibilitat els permet adoptar diverses conformacions, com s'observa en la gran complexitat dels espectres de $^1\text{H-RMN}$ i de $^{13}\text{C-RMN}$, i els facilita la seva interacció amb múltiples dianes d'interès terapèutic.

Per resumir els resultats obtinguts del cribratge de la quimioteca de peptoides-II davant de les diferents dianes estudiades, s'han recollit a la Taula 5.2 les amines seleccionades amb més activitat, per a cada posició del trímer i en cadascun dels assaigs realitzats.

Taula 5.2. Amines més actives seleccionades per a les posicions R^1 , R^2 i R^3 de la quimioteca de peptoides-II a cada diana assajada.

Diana terapèutica	R^1	R^2	R^3
MDR	A4, A10, A13, A35, A37	A15, A20	A15, A20
Cicle cel·lular	A4, A5, A10, A13	A13	A10
Analgesia	A13, A15, A20, A35,	A15, A20	A15, A20
NMDA	A12, A13, A20	A15, A20	A10, A15, A35
LPS	A10, A11, A20	A13, A15, A20	A15, A20, A37

Del conjunt d'amines seleccionades amb més activitat, s'observa com de les 20 amines primàries utilitzades per a la introducció de diversitat de la quimioteca, únicament 4 es troben presents en alguna de les posicions del trímer en gairebé tots els assaigs realitzats. Es tracta de les amines aromàtiques **A10**, **A13**, **A15**, **A20**, i, a excepció de la diana de cicle cel·lular, una de les dues amines fluorades, **A35** o **A37**. Curiosament, en les posicions de diversitat R^2 i R^3 únicament es van seleccionar amines aromàtiques.

Un dels principals inconvenients que poden presentar les quimiotèques de mescles sintetitzades en format de rastreig posicional en comparació a aquelles sintetitzades en format de divisió i mescla, o de les quimiotèques de definits, és el fals negatiu. És a dir, quan

es realitza el primer cribratge d'una quimioteca davant una diana determinada, el procés de deconvolució selecciona les mescles més actives i s'identifiquen els reactius més actius per a cada font de diversitat, donant lloc a la identificació dels corresponents compostos amb més activitat. No obstant, l'existència de diferències importants de concentració en els compostos de les mescles pot produir que compostos poc actius mostrin una activitat elevada degut a que es troben en una alta concentració, mentre que compostos moderadament actius, o fins i tot amb activitats elevades, no es detectin perquè es troben en concentracions més baixes a les esperades. És per aquest motiu que cal validar els resultats d'aquest primer cribratge, resintetitzant els compostos de forma individual i tornant-los a assajar en un segon torn d'assaigs. Aquest procés de validació permet confirmar o no l'activitat dels compostos inicialment identificats, però no permet detectar aquells actius que no van ser seleccionats durant el cribratge inicial.

En aquest punt, cal recordar que els resultats obtinguts dels assaigs de reactivitat de les amines en fase sòlida (vegeu apartat 4.2), mostraven que les amines **A15** i **A35** tenien velocitats de reacció inferiors a la resta d'amines. Aquest fet conduïa a pensar que alguns dels 5120 peptoides de la quimioteca, concretament aquells que contenien una, dues o tres amines poc reactives en la seva estructura, es podien trobar en les mescles finals a una concentració inferior a l'esperada, respecte altres peptoides. En conseqüència, es podia esperar que el cribratge de la quimioteca davant les dianes estudiades no hagués detectat algun d'aquests peptoides, en cas de ser actius. Per confirmar aquesta suposició caldria repetir els assaigs biològics amb les mescles d'una tercera quimioteca de peptoides sintetitzada tenint en compte els factors d'equiactivitat de cada amina, determinats a l'apartat 4.2.3, per assegurar la mateixa concentració de tots els peptoides en les mescles finals.

Tot i aquest problema detectat en la diferència de reactivitat de les amines, hi ha diverses raons que ens permeten validar la quimioteca de peptoides-II:

1) Al llarg d'aquest capítol d'activitat biològica de la quimioteca de peptoides-II davant diferents dianes terapèutiques s'ha comentat com els processos de cribratge, deconvolució i validació de la quimioteca han conduït a la identificació, fins ara, de dos potents inhibidors o reversors del fenotip de MDR (N35-15-15C i N37-15-15C), dos inhibidors de la proliferació cel·lular i inductors d'apoptosi (N13-13-10C i N10-13-10C), dos potents bloquejadors del canal TRPV1 (N16-15-15C i N19-15-15C) i dos

neutralitzadors de l'activitat d'LPS (N11-20-20C i N20-13-20C). En alguns casos, les activitats mostrades han estat suficientment importants i valuoses per haver donat lloc a diverses publicacions i patents.

2) En els processos de cribratge i validació de la quimioteca de peptoides-II davant les dianes de TRPV1 i del receptor d'NMDA, es van seleccionar algunes de les amines més actives per a les diferents posicions de diversitat que ja s'havien seleccionat en el cribratge de la quimioteca de peptoides-I.

3) Entre les amines més actives seleccionades davant les dianes assajades, es troben les amines menys reactives estudiades, l'**A15** i l'**A35**.

4) En la tercera posició del trímer, R¹ (N-terminal), la diversitat s'amplia i trobem seleccionades les amines no aromàtiques **A4**, **A5**, **A11**, **A12**, **A16** i **A19**. Aquest fet semblaria indicar que la posició N-terminal del peptoides juga un paper clau en la interacció amb les dianes estudiades i, per tant, podria ser la posició de diversitat del peptoides més important per optimitzar la seva estructura.

Finalment, cal remarcar que en el nostre laboratori s'està treballant en un procés d'optimització de les estructures dels peptoides més actius en cada cas a través de la síntesi de compostos conformacionalment més restringits que augmentin l'activitat i millorin la selectivitat cap a la diana d'interès. En aquest sentit, els compostos heterocíclics són considerats una de les famílies més interessants en la recerca d'estructures cap de sèrie, ja que es caracteritzen per tenir un esquelet relativament rígid al qual s'hi poden afegir diferents grups farmacofòrics. A més, mostren millors característiques de conformitat farmacocinètica. Actualment, Alejandra Moure i Glòria Sanclimens estan treballant en el procés d'optimització dels peptoides més actius esmentats en aquest capítol.

6. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

6.1. CONSIDERACIONS GENERALS

Tots els reactius comercials es van emprar sense purificació prèvia. Els dissolvents utilitzats van ser de qualitat per a síntesi, excepte en la manipulació de productes finals, on es van emprar dissolvents de qualitat per a anàlisi de residus. Els dissolvents anhidres es van preparar seguint els procediments descrits a la literatura.¹⁰⁶

L'evolució de les reaccions en dissolució es va seguir per cromatografia de gasos (CG) o cromatografia en capa prima (CCP). Les anàlisis per CCP es van realitzar sobre cromatofolis de sílica de 0.2 mm de gruix sobre suport d'alumini Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ i sobre cromatofolis d'alúmina de 0.2 mm de gruix sobre suport d'alumini Merck Aluminiumoxid 60 F₂₅₄. El revelat de les plaques es va fer amb llum ultraviolada de $\zeta = 254$ nm.

Les anàlisis per CG es van realitzar en un aparell Hewlett Packard 5890 Series II amb detector d'ionització de flama (FID), amb un integrador HP3396 Series II i columnes capil·lars SPB-5 (diàmetre intern 0.25 mm, diàmetre de partícula 0.25 μ m) de 12 a 15 m de longitud, emprant heli com a gas portador.

Les anàlisis per HPLC en l'estudi de reactivitat d'amines es van realitzar emprant un aparell Hewlett Packard 1100 Series equipat amb una columna de fase inversa Kromasil 100 C18 de 5 μ m (25 x 0.46 cm) de Scharlau. Com a eluents es van utilitzar H₂O amb HCOOH-Et₃N 20 mM a pH=5.0, i ACN. El programa d'elució seguit va consistir en un gradient: 2 min a 5% d'ACN, de 5% a 80% d'ACN en 23 min i 2 min a 80% d'ACN, tot mantenint un flux constant d'1 ml/min i detecció a 220 nm.

Les anàlisis per HPLC per determinar la puresa dels peptoides es van realitzar amb una columna de fase inversa de tipus Kromasil 100 C8 de 5 μ m (15 x 0.46 cm) de Teknokroma. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 2 min a 20% d'ACN, de 20% a 80% en 17 min i 1 min a 80% d'ACN.

Les purificacions d'algunes de les benzamides sintetitzades es van realitzar sobre cromatofolis de sílica de 2 mm gruix sobre suport d'alumini Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ i sobre cromatofolis d'alúmina de 2 mm de gruix sobre suport d'alumini Merck Aluminiumoxid 60 F₂₅₄. Per altres compostos es va realitzar una purificació per HPLC a escala semipreparativa mitjançant un sistema de dues bombes Waters 510, un detector-controlador de gradients d'Applied Biosystems (783 Programable Absorbance Detector) i fent servir una columna de tipus Kromasil 100 C8 de 5 μ m (250 x 20 cm) de Scharlau. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 15 min a 5% d'ACN, de 5% a 80% en 60 min, de 80% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Detecció a 220 nm.

Les purificacions dels peptoides es van realitzar per HPLC a escala semipreparativa amb el mateix sistema de bombes anterior i la mateixa columna. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 10 min a 10% d'ACN, de 10% a 75% en 65 min, de 75% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Detecció a 220 nm.

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de protó (¹H-RMN) i de carboni (¹³C-RMN) es van realitzar en un aparell Varian Unity 500 (¹H-500 MHz, ¹³C-125 MHz), un Varian Unity 300 (¹H-300 MHz, ¹³C-75 MHz) o en un Varian Gemini 200 (¹H-200 MHz, ¹³C-50 MHz). El desplaçament químic dels senyals s'expressa en l'escala τ en parts per milió. Per a cada senyal de protó figura entre parèntesis la multiplicitat, la integració i el valor de les constants d'acoblament (J) en Hz, així com la seva assignació. Per indicar les multiplicitats observades s'han emprat les abreviacions següents: s (singlet), d (doblet), dd (doble doblet), ddd (doble doblet de doblets), t (triplet), td (triple doblet), q (quadruplet), m (multiplet), ac

(absorció complexa), i una "a" darrera de les anteriors abreviacions per indicar que el senyal és ample.

Els espectres de masses (EM) d'alguns compostos es van obtenir en un espectrofotòmetre Fisons MD800 acoblat a un cromatògraf de gasos model 8000 Series i proveït d'una columna capil·lar Hewlett Packard HP-5 de 25 m i un detector d'ions positius de tipus quadrupolar. Els espectres es van enregistrar emprant ionització per impacte electrònic (IE) a 70 eV, i els fragments obtinguts s'indiquen amb la seva relació massa/càrrega (m/z) i entre parèntesis la seva proporció relativa (%).

Els espectres de masses enregistrats amb la tècnica d'*electrospray-ionization* (ESI) es van recollir en un sistema Hewlett Packard Series 1100 LC/MSD constituït per un cromatògraf de líquids acoblat a un detector de diodes i un espectròmetre de masses.

Els punts de fusió es van determinar en un aparell Reichert-Jung model 286238 amb una sonda Crison T-637 per mesurar la temperatura.

Les mesures de masses d'alta resolució (EMAR) es van realitzar a la Unidade de Espectrometría de Masas de la Universidad de Santiago de Compostela.

6.1.1. INSTRUMENTACIÓ DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

La resina emprada per a la síntesi de compostos en fase sòlida va ser un polímer de poliestirè reticulat amb un 1% de divinilbenzè i funcionalitzat amb Fmoc-aminometil-RAM (Rink amida) com a braç d'unió entre el polímer i la molècula sintetitzada. La resina va ser subministrada per Rapp Polymere, amb una dimensió de partícula de 200-400 mesh i un grau de funcionalització entre 0.70 i 0.79 meq/g de resina protegida, depenent del lot.

Per fer la síntesi en fase sòlida es van utilitzar xeringues de polipropilè de 5 o 10 ml, de la marca Fortuna, equipades amb una placa porosa de polietilè que actuava com a filtre. Per a la síntesi de la quimioteca es van fer servir bossetes formades d'una malla de polipropilè de dimensions 5 x 5 cm.

Per mesurar el volum de dissolvents de forma sistemàtica es van fer servir dosificadors automàtics de la casa Optifix®: model Solvents, per als dissolvents (DMF, DCM i iPrOH) i model Safety, per a la mescla d'escissió, formada majoritàriament per àcid trifluoroacètic (TFA).

L'agitació de les xeringues i de les bossetes es va fer en un agitador de vaivé, model HS501 Digital de IKA Labortechnik, a una velocitat d'agitació entre 200 i 300 rpm, en funció de les condicions de treball (vegeu Figura 6.1).

El rentat de la resina en les xeringues es va realitzar en un aparell distribuïdor de buit Visiprep SPE, amb vàlvules de control de flux, de 24 posicions, de la marca Supelco (vegeu Figura 6.1).



Figura 6.1. Esquerre: Agitador de vaivé emprat en la síntesi en fase sòlida. Dreta: Aparell per filtrar i rentar la resina, de la casa Supelco.

L'adaptador de vidre de sis sortides per a l'evaporació múltiple va ser subministrat per Trallero & Schlee.

Es va utilitzar una liofilitzadora del model FreeZone[®]6 Liter Freeze Dry system de LabConco i un evaporador centrífuga del model Univap d'Uniscience.

6.1.2. CONTROLS QUALITATIUS EN FASE SÒLIDA

Per visualitzar bé el color adquirit pels grans de resina es va fer servir una lupa (model SDZ-TR-P de Kyowa Optical).

6.1.2.1. Test del cloranil¹⁰⁷

En un portaobjectes es van disposar 1-3 mg de resina i es va afegir una gota d'una dissolució d'acetaldehid al 2% en DMF i una gota d'una dissolució de cloranil al 2% en DMF. Després de 3 min a t.a., el color blau/verd de la resina indica la presència d'amines

secundàries. En presència d'amines primàries la resina adquireix una tonalitat blau cel. En els altres casos la resina queda incolora.

6.1.2.2. Test del TNBS¹⁰⁸

En un portaobjectes es van disposar 1-3 mg de resina i es va afegir una gota d'una dissolució d'*N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) al 10% i una gota d'una dissolució d'àcid 2,4,6-trinitrobenzensulfònic (TNBS) a l'1% en DMF. Després d'1 min a t.a., una coloració vermella indica la presència d'amines primàries; en altre cas la resina queda incolora.

6.1.3. INSTRUMENTACIÓ DE LA SÍNTESI EN DISSOLUCIÓ

Les 11 benzamides es van sintetitzar en un Carousel Reaction StationTM de Radleys Discovery Technologies (Figura 6.2).



Figura 6.2. Aparell de síntesi múltiple en paral·lel en dissolució, de la casa Radleys.

La resina segrestadora emprada per a l'eliminació d'amines primàries consistia en un polímer de poliestirè reticulat amb un 2% de divinilbenzè i funcionalitzat amb 4-benziloxibenzaldehyd (resina Wang aldehyd HL). La resina va ser subministrada per Novabiochem, amb una partícula de dimensió de 200-400 mesh i un grau de funcionalització de 2.80 meq/g.

El forn de microones utilitzat per accelerar l'eliminació d'amines en la síntesi de les benzamides va ser de tipus domèstic de la casa comercial LG *intellowave* de 700 W de potència màxima.

6.2. SÍNTESI DE LA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES-II

Es van omplir 55 bossetes convenientment etiquetades (52 bosses per a mescles i tres per al peptoide control N20-15-17C) amb 400 mg (0.70 mmol/g, 0.28 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Les bossetes es van separar en tres grups, depenent de la posició que tindrien definida, 1-20, 21-36 i 37-52, i es van disposar en tres ampolles de polipropilè de rosca ampla amb 378, 306 i 306 ml de DMF respectivament, per procedir a l'inflat inicial.** Es va posar un control a cada ampolla. Les ampolles es van mantenir en agitació durant 5 min i seguidament es va buidar el dissolvent.

Desprotecció: es va preparar una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF (990 ml) i es va repartir entre les tres ampolles en les mateixes proporcions que per a l'inflat de la resina. Les bossetes es van mantenir en agitació mecànica durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, es va buidar el dissolvent i es va tornar a repetir l'operació durant 30 min més. Es va buidar el dissolvent i es van rentar les bossetes amb DMF (3 x 306 o 378 ml), iPrOH (3 x 306 o 378 ml) i DCM (3 x 306 o 378 ml). En cada rentat les ampolles es van mantenir en agitació durant 5 min. Una de les bossetes control es va obrir per un extrem, es van extreure uns granets de resina i es va fer el test del TNBS, el qual va donar positiu per a la desprotecció (vermell). Seguidament es va tornar a segellar la bosseta.

Acilació: es va preparar una dissolució d'àcid cloroacètic (29.1 g, 5.6 mmol/bossa, 20 eq.) en 990 ml d'una mescla DCM/DMF (1:1). La mescla es va afegir a les tres ampolles amb les bossetes i seguidament s'hi va afegir l'*N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (48 ml, 5.6 mmol/bossa, 20 eq.). Les ampolles es van mantenir en agitació durant 30 min a t.a. Transcorregut aquest temps, es va buidar el dissolvent i es va repetir tota l'operació. Es van rentar les bossetes amb DCM (3 x 306 o 378 ml), iPrOH (3 x 306 o 378 ml) i DMF (3 x 306 o 378 ml). En cada rentat les ampolles es van mantenir en agitació durant 5 min. Es van agafar uns granets de resina d'una de les mostres control i es va fer el test del TNBS, el qual va donar positiu per a la formació d'amides (incolor).

** El dissolvent ha de cobrir completament les bosses quan aquestes es mantenen en agitació.

Acoblament d'amina (R³): les 16 bossetes numerades de la 37 a la 52 i els tres controls es van posar individualment en ampolles de 50 ml. Cada ampolla individual es va omplir amb: 17 ml de DMF, 780 μ l (5.6 mmol, 20 eq.) de Et₃N i l'amina corresponent (5.6 mmol, 20 eq.) (vegeu Taula 6.1) per definir la tercera posició.

La resta de bosses, amb la tercera posició aleatòria, es van mantenir en les ampolles d'1 litre. Igualment, l'ampolla que contenia les bosses 21-36 es va omplir amb 275 ml de DMF i 12.5 ml de Et₃N, i la de les bosses 1-20 amb 345 ml de DMF i 15.5 ml de Et₃N. Finalment, en les dues ampolles es va posar una mescla equimolar de les 16 amines, és a dir, 20 eq. de cada amina.

Taula 6.1. Quantitats d'amina necessàries (20 eq.) per a la primera posició de diversitat (R³, C-terminal) de la quimioteca de peptoides-II.^{††}

Bossa	Amina	Quantitat	Bossa	Amina	Quantitat
37	A1	387 μ l	45	A12	668 μ l
38	A2	566 μ l	46	A13	819 μ l
39	A4	650 μ l	47	A14	945 μ l
40	A7	571 mg	48	A15	845 μ l
41	A8	785 μ l	49	A17	1121 mg
42	A9	670 μ l	50	A20	1183 mg
43	A10	703 μ l	51	A35	730 μ l
44	A11	578 μ l	52	A37	730 μ l

Les ampolles es van mantenir en agitació durant 5 h a t.a. Transcorregut aquest temps, es va buidar cada ampolla i es va tornar a omplir en les mateixes condicions, agitant durant 12 h. Es va buidar el dissolvent i les bossetes individuals es van tornar a reunir en una única ampolla d'1 litre. Es va procedir als rentats de les bossetes amb DMF (3 x 306 o 378 ml), iPrOH (3 x 306 o 378 ml) i DCM (3 x 306 o 378 ml). En cada rentat les ampolles es van mantenir en agitació durant 5 min. El test del cloranil va donar positiu per amines secundàries (blau) en les mostres control.

^{††} Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

2a acilació: es va procedir de la mateixa forma que en la primera acilació, però el temps de reacció va ser de 45 min cada vegada. El test del cloranil va donar positiu per amides (incolor).

2n acoblament d'amina, R²: es va procedir de forma anàloga a R³, però en aquest cas es van separar en ampolles individuals les bossetes numerades de la 21 a la 36. Les quantitats emprades de cada amina, tant en les bossetes amb la segona posició definida, individuals, com en les de posició aleatòria, van ser les mateixes que les indicades a la Taula 6.1. El test del cloranil va donar positiu per amines secundàries (blau).

3a acilació: procediment igual que en la segona acilació.

3r acoblament d'amina, R¹: es va procedir com anteriorment, però en aquest cas es van separar en ampolles individuals les bossetes numerades de l'1 a la 20. Les quantitats emprades de cada amina, tant en les bossetes amb la primera posició definida, individuals, com en les de posició aleatòria, van ser les mateixes que en les altres dues aminacions, però es van incorporar 4 amines més, amb un nitrogen terciari addicional, com es mostra en la Taula 6.2. El test del cloranil va donar positiu per amines secundàries (blau).

Taula 6.2. Quantitats d'amina necessàries (20 eq.) per a la tercera posició de diversitat (R¹, N-terminal) de la quimioteca de peptoides-II. En negreta es mostren les 4 amines que es van afegir a les altres 16 en aquest acoblament.**

Bossa	Quantitat	Volum / Pes	Bossa	Amina	Quantitat
1	A1	387 σl	11	A14	945 σl
2	A2	566 σl	12	A15	845 σl
3	A4	650 σl	13	A17	1121 mg
4	A7	571 mg	14	A20	1183 mg
5	A8	785 σl	15	A35	730 σl
6	A9	670 σl	16	A37	730 σl
7	A10	703 σl	17	A6	710 σl
8	A11	578 σl	18	A16	812 σl
9	A12	668 σl	19	A19	883 σl
10	A13	819 σl	20	A21	705 σl

** Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

Escissió de la resina: després dels rentats, les bossetes es van assecat bé, mantenint-les sota l'aspiració de la campana extractora durant 2 h, fins que la resina no es va notar humida. A continuació, es va tallar cadascuna de les bossetes i la resina es va transferir a tubs de vidre de 25 ml roscats amb sèptum de tefló resistent a l'àcid.^{§§} Seguidament s'hi van afegir 4 ml d'un còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2) (v/v/v), tornant-se la resina de color granatós. Les mescles es van mantenir en agitació a t.a. durant 30 min.

A continuació es va filtrar cada mescla a través d'una xeringa de polipropilè de 10 ml amb una placa porosa de polietilè, recollint els filtrats en matrassos de 25 ml. Cada resina es va tornar a posar en els tubs respectius, repetint l'operació amb 4 ml més de còctel. Després de filtrar una segona vegada, es van ajuntar els filtrats de les dues fraccions i es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda emprant un adaptador de vidre que permet realitzar sis evaporacions a la vegada. Per acabar d'eliminar les traces d'aigua i d'àcid, es van realitzar rentats amb ACN (2 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, les 52 mescles es van liofilitzar per acabar obtenint en tots els casos un oli groguenc com a residu.

Cadascuna de les mescles es va dividir en mostres alíquotes a una concentració de 5 mg/ml, el que suposava una concentració mitjana de 10 mM (aproximadament 30 μ M per peptoide en cada mescla).

El peptoide control N20-15-17C (**1**) es va identificar per CL-EM, amb una puresa superior al 90%. També es va caracteritzar pels seus espectres de ressonància de ¹H-RMN i ¹³C-RMN, tot i que l'assignació dels diferents senyals no va ser possible degut a la gran complexitat dels espectres, en tenir diferents conformacions del peptoide i no haver purificat la mostra per HPLC a escala semipreparativa.

[N-(3,3-Difenilpropil)glicil]-[N-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-N-[2-(4'-sulfamoílfenil)etil]glicinamida

(N20-15-17C) (1)

¹H-RMN (300 MHz, D₂O, acetona-d₆): 7.90-7.80 (ac, 3H, H_{Ar}), 7.60-7.20 (ac, 14H, H_{Ar}), 4.20-3.60 (ac, 7H, (3 x NCH₂CO) + 1H (CHPh₂)), 3.55-2.40 (ac, 6H, (3 x NCH₂CH₂) + 6H (3 x NCH₂CH₂)).

¹³C-RMN (125 MHz, D₂O, acetona-d₆): 173.0-166.0, 143.6, 134.9, 130.3, 129.3, 127.8, 127.2, 126.8, 61.0, 52.0-46.0.

CL-EM: 738.2, 740.2, 742.2 (M+H, Cl₂)⁺

^{§§} El procés d'escissió es va realitzar en tongades de 12 mescles.

6.3. PROCEDIMENT GENERAL DE LA SÍNTESI DE PEPTOIDES

En una xeringa de 10 ml que contenia 600 mg (0.66 mmol/g, 0.40 mmol) de resina de poliestirè AM RAM es van afegir 5 ml de DMF per inflar-la. Seguidament es va filtrar el dissolvent i es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc.

Desprotecció: es va afegir una dissolució de 5 ml de piperidina al 20% (v/v) en DMF a la resina i la mescla es va deixar reaccionant durant 30 min. Després d'eliminar el dissolvent per filtració es va repetir l'operació. A continuació es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La desprotecció de la resina es va comprovar mitjançant de test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell).

Acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va afegir una dissolució de 190 mg (2.0 mmol, 5 eq.) d'àcid cloroacètic en 5 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament, es van afegir 310 μ l (2.0 mmol, 5 eq.) de DIC i la mescla es va agitar mecànicament durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). La desaparició de l'amina primària es va comprovar amb el test del TNBS, el qual va donar positiu per aquesta reacció (incolor).

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 5 ml de DMF es van afegir 2.0 mmol (5 eq.) d'amina primària i 275 μ l (2.0 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla es va agitar durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps l'excés de reactius es va eliminar i es va repetir l'operació. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La presència d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranil (color blau).

La *segona acilació* es va dur a terme de la mateixa manera que la primera, exceptuant que el temps de reacció va ser d'1 h.

La *segona aminació*, *tercera acilació* i *tercera aminació* es van dur a terme de forma anàloga a les descrites anteriorment.

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament, s'hi van afegir 5 ml d'un còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2, v/v), tornant-se la resina de color granatós. La mescla es va deixar agitant durant 30 min a t.a. A continuació es va filtrar la mescla en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi i el filtrat es va recollir en un

matràs de 25 ml. La resina es va tornar a posar al tub i es va repetir l'operació. Els filtrats de les dues fraccions es van ajuntar i els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir uns 250-350 mg de residu (rdts. entre el 80-90%), amb pureses generalment superiors al 90% per HPLC. Els peptoides es van identificar per CL-EM.

A la Figura 3.11 de l'apartat 3.6 s'han mostrat els perfils cromatogràfics dels crús d'alguns dels peptoides, a mode d'exemple.

[*N*-(2-Feniletil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida

(N10-15-15C)

CL-EM: 637.1, 639.1, 641.1, 643.1 (M + H, Cl₄)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3,3-difenilpropil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicinamida

(N35-20-20C)

CL-EM: 699.4 (M+H)⁺

[*N*-(Isopentil)glicil]-[*N*-(3,3-difenilpropil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida

(N4-20-15C)

CL-EM: 625.3, 627.3, 629.3 (M + H, Cl₂)⁺

[*N*-(3-(1'-Imidazolil)propil)glicil]-[*N*-(3,3-difenilpropil)glicil]-*N*-(isopentil)glicinamida

(N12-20-4C)

CL-EM: 561.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-Feniletil)glicil]-[*N*-(ciclopropil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicinamida

(N10-1-20C)

CL-EM: 527.3 (M+H)⁺

[*N*-(3-(1'-Imidazolil)propil)glicil]-[*N*-(ciclopropil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicinamida

(N12-1-20C)

CL-EM: 531.3 (M+H)⁺

[*N*-[2-(2',4'-Diclorofenil)etil]glicil]-[*N*-(ciclopropil)glicil]-*N*-(isopentil)glicinamida

(N15-1-4C)

CL-EM: 471.2, 473.2, 475.2 (M+H, Cl₂)⁺

[*N*-(1-Metilpropil)glicil]-[*N*-(3,3-difenilpropil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicinamida

(N2-20-20C)

CL-EM: 633.4 (M+H)⁺

La purificació dels peptoides més actius, es va dur a terme per HPLC a escala semipreparativa amb un rendiment final de l'entorn del 40-60% i pureses superiors en tots els casos al 98% per HPLC. Les assignacions dels senyals dels espectres dels peptoides de $^1\text{H-RMN}$ i $^{13}\text{C-RMN}$ van ser confirmades pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del confòrmer majoritari en cada cas.

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida⁷⁷

(N35-15-15C) (15)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD): 7.50 (ac, 1H, H_{Ar}), 7.40 (ac, 2H, H_{Ar}), 7.32 (ac, 4H, H_{Ar}), 7.20 (ac, 1H, H_{Ar}), 7.12 (ac, 2H, H_{Ar}), 4.2-3.8 (ac, 6H, 3 x COCH_2N), 3.60 (ac, 2H, NCH_2CH_2), 3.52 (ac, 2H, NCH_2CH_2), 3.23 (ac, 2H, NCH_2CH_2 (N_t)), 3.12-2.92 (ac, 6H, 3 x NCH_2CH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CD_3OD): 170.6 (CO), 169.7 (CO), 167.2 (CO), 161.6 (C_{Ar}), 136.0 (2 x C_{Ar}), 134.8 (2 x C_{Ar}), 134.2 (2 x C_{Ar}), 133.7 (CH_{Ar}), 133.4 (CH_{Ar}), 132.2 (C_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 125.8 (CH_{Ar}), 116.6 (CH_{Ar}), 50.6 (COCH_2N), 50.0 (COCH_2N), 49.4 (NCH_2CH_2), 49.0 (NCH_2CH_2), 48.8 (COCH_2N), 48.5 (NCH_2CH_2), 32.8 (NCH_2CH_2), 31.7 (NCH_2CH_2), 26.9 (NCH_2CH_2).

CL-EM: 655.1 (M+H)⁺

EMAR per $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{Cl}_4\text{FN}_4\text{O}_3$: Calculada: 545.0681 (M-C₇H₆F)

Determinada : 545.0661

[*N*-(2-(4'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida⁷⁷

(N37-15-15C) (16)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD): 7.50 (ac, 1H, H_{Ar}), 7.40 (ac, 2H, H_{Ar}), 7.34-7.20 (ac, 5H, H_{Ar}), 7.06 (ac, 2H, H_{Ar}), 4.2-3.8 (ac, 6H, 3 x COCH_2N), 3.60 (ac, 2H, NCH_2CH_2), 3.50 (ac, 2H, NCH_2CH_2), 3.17 (ac, 2H, NHCH_2CH_2), 3.10-2.89 (ac, 6H, 3 x NCH_2CH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CD_3OD): 172.4 (CO), 170.1 (CO), 167.7 (CO), 162.5 (C_{Ar}), 136.6 (2 x C_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 134.8 (2 x C_{Ar}), 134.1 (2 x C_{Ar}), 133.8 (CH_{Ar}), 133.4 (CH_{Ar}), 131.6 (2 x CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 116.6 (2 x CH_{Ar}), 50.0-48.8 (3 x COCH_2N), 49.9 (HNCH_2CH_2 (N_t)), 49.2 (NCH_2CH_2), 49.1 (NCH_2CH_2), 32.7 (NCH_2CH_2), 32.3 (NCH_2CH_2), 31.7 (NCH_2CH_2).

CL-EM: 655.1 (M+H)⁺

EMAR per $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{Cl}_4\text{FN}_4\text{O}_3$: Calculada: 545.0681 (M-C₇H₆F)

Determinada: 545.0654

**[*N*-(2-(4'-Metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N*-(2-feniletil)glicinamida
(N13-13-10C) (17)**

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): 7.70-7.00 (9H, H_{Ar}), 6.90-6.80 (ac, 4H, H_{Ar}), 4.30-3.80 (ac, 6H, 3 x COCH₂N), 3.75-3.73 (s, 6H, 2 x CH₃O), 3.60-3.15 (ac, 4H, 2 x NCH₂CH₂), 3.00 (ac, 2H, NHCH₂CH₂), 2.90-2.60 (ac, 6H, 3 x NCH₂CH₂).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): 173.4 (CO), 170.2 (CO), 167.5 (CO), 160.2 (2 x C_{Ar}), 139.7 (C_{Ar}), 131.9 (2 x C_{Ar}), 131.3 (2 x CH_{Ar}), 130.8 (4 x CH_{Ar}), 130.2 (2 x CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 115.4 (4 x CH_{Ar}), 55.7 (2 x CH₃O), 51.2 (NCH₂CH₂), 51.1 (NCH₂CH₂), 50.1 (NCH₂CH₂), 49.1 (COCH₂N), 48.8 (COCH₂N), 47.9 (COCH₂N), 35.3 (NCH₂CH₂), 34.6 (NCH₂CH₂), 32.2 (NCH₂CH₂).

CL-EM: 561.2 (M+H)⁺

EMAR per C₃₂H₄₀N₄O₅ : Calculada: 439.2345 (M-C₈H₉O)

Determinada: 439.2315

**[*N*-(2-Feniletil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N*-(2-feniletil)glicinamida
(N10-13-10C) (18)**

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): 7.30-7.05 (12H, H_{Ar}), 6.90-6.80 (ac, 2H, H_{Ar}), 4.30-3.80 (ac, 6H, 3 x COCH₂N), 3.70 (s, 3H, CH₃O), 3.60-3.15 (ac, 4H, 2 x NCH₂CH₂), 3.00 (ac, 2H, NHCH₂CH₂), 2.90-2.60 (ac, 6H, 3 x NCH₂CH₂).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): 173.1 (CO), 169.9 (CO), 167.0 (CO), 159.7 (C_{Ar}), 139.7 (2 x C_{Ar}), 131.9 (C_{Ar}), 131.3 (2 x CH_{Ar}), 130.8 (2 x CH_{Ar}), 129.9 (4 x CH_{Ar}), 129.5 (2 x CH_{Ar}), 114.9 (2 x CH_{Ar}), 55.6 (CH₃O), 51.2 (NCH₂CH₂), 51.1 (NCH₂CH₂), 50.1 (NCH₂CH₂), 49.1 (COCH₂N), 48.8 (COCH₂N), 47.8 (COCH₂N), 35.3 (NCH₂CH₂), 34.5 (NCH₂CH₂), 33.0 (NCH₂CH₂).

CL-EM: 531.2 (M+H)⁺

EMAR per C₃₁H₃₈N₄O₄ : Calculada: 530.2893

Determinada: 530.2903

***N*-(Tetrahidrofurfuril)glicil]-[*N*-(3,3-difenilpropil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicinamida
(N11-20-20C) (19)¹⁰²**

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.32-7.20 (16H, H_{Ar}), 7.15 (ac, 4H, H_{Ar}), 4.10 (m, 1H, OCH), 4.03-3.95 (ac, 7H, 6H (3 x COCH₂) + 1H (CHPh₂)), 3.90 (ac, 1H, CHPh₂), 3.90-3.80 (ac, 2H, OCH₂), 3.38 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH), 3.29 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH), 3.21 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH), 3.12 (ac 2H, HNCH₂CH), 2.86 (ac, 2H, HNCH₂CH), 2.42-2.25 (ac, 4H, 2 x NCH₂CH₂CH), 2.09 (m, 2H, CH₂CH(O)CH₂NH), 1.93 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.57 (m, CH₂CH(O)CH₂NH).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.9 (CO), 170.5 (CO), 169.7 (CO), 145.8 (2 x C_{Ar}), 144.5 (2 x C_{Ar}), 129.6 (8 x CH_{Ar}), 128.8 (8 x CH_{Ar}), 127.4 (4 x CH_{Ar}), 75.2 (OCH), 69.5 (OCH₂), 52.7 (NHCH₂CH), 50.7 (COCH₂N), 50.3 (CHPh₂), 49.8 (COCH₂N), 49.5 (CHPh₂), 48.2 (NCH₂CH₂CH), 48.2 (NCH₂CH₂CH), 48.1 (COCH₂N), 34.4 (CH₂CHPh₂), 33.9 (CH₂CHPh₂), 30.2 (CH₂CH(O)CH₂NH), 26.4 (OCH₂CH₂).

EMAR per $C_{41}H_{48}N_4O_4$: Calculada: 660.3676

Determinada: 660.3647

[*N*-(3,3-Difenilpropil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicinamida (N20-13-20C) (20)¹⁰²

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.33-7.04 (22H, H_{Ar}), 6.83-6.81 (ac, 2H, H_{Ar}), 4.20-3.77 (ac, 8H, 6H (3 x COCH₂) + 2H (2 x CHPh₂)), 3.71 (s, 3H, CH₃O), 3.52 (ac 2H, NCH₂CH₂), 3.29 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH), 2.91 (ac, 2H, HNCH₂CH₂CH), 2.72 (ac, 2H, NCH₂CH₂), 2.47-2.27 (ac, 4H, 2 x CH₂CHPh₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 173.5 (CO), 170.4 (CO), 169.7 (CO), 159.8 (C_{Ar}), 145.8 (2 x C_{Ar}), 144.7 (2 x C_{Ar}), 131.3 (CH_{Ar}), 130.8 (2 x CH_{Ar}), 129.8 (8 x CH_{Ar}), 128.7 (8 x CH_{Ar}), 127.8 (4 x CH_{Ar}), 115.3 (2 x CH_{Ar}), 55.7 (CH₃O), 51.1 (COCH₂N), 50.6 (COCH₂N), 50.4 (CHPh₂), 50.1 (COCH₂N), 49.8 (CHPh₂), 48.9 (NCH₂CH₂CH), 48.3 (NCH₂CH₂), 47.9 (NCH₂CH₂CH), 34.8 (CH₂CHPh₂), 33.9 (NCH₂CH₂), 32.5 (CH₂CHPh₂).

EMAR per $C_{45}H_{51}N_4O_4$: Calculada: 711.3910 (M+H)⁺

Determinada: 711.3897

6.4. ESTUDI DE LA REACTIVITAT DE LES AMINES DE LA QUIMIOTECA

6.4.1. ESTUDI PER CG

6.4.1.1. Reacció en dissolució del clorur de cloroacetil amb mescles equimolars d'amines

Els estudis de reactivitat de les amines en dissolució es van portar a terme distingint dos grups d'amines depenent de la presència o absència de substituents aromàtics en la seva estructura, per facilitar la seva comparació per CG. A cada grup s'hi va afegir una amina com a referència, concretament les amines **A11**, per al grup sense substituents aromàtics, i l'**A15**, per al grup amb substituents aromàtics.

A una dissolució de 16 μ l (0.20 mmol) de clorur de cloroacetil en 2 ml de DCM es van afegir 83 mg (0.60 mmol, 3 eq.) de K₂CO₃. Seguidament, s'hi van afegir 0.4/0.5 mmol (2/2.5 eq.) d'una mescla equimolar de 4/5 amines amb la seva corresponent amina de referència (vegeu Taula 6.3). L'amina **A17** es va descartar en aquest estudi en no ser soluble en DCM. Després de 10 min de reacció, el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i les mescles de productes obtingudes es van analitzar per CG, comparant l'àrea relativa dels productes obtinguts. Els productes de cada mescla es van identificar per CG-EM.

Els resultats de reactivitat obtinguts, referenciats a les amines **A11** i **A15**, s'han indicat a la Taula 4.1 de l'apartat 4.1.1.

Taula 6.3. Quantitats d'amina necessàries en cada grup per a la reacció amb el clorur de cloroacetil. En negreta es mostren les amines escollides com a referència.

Amina	Volum	Amina	Volum	Amina	Volum	Amina	Volum	Amina	Volum	Amina	Volum
A1	7 σl	A2	10 σl	A8	14 σl	A11	10 σl	A10	13 σl	A9	12 σl
A4	12 σl	A7	10 σl	A11	10 σl	A15	15 σl	A13	15 σl	A15	15 σl
A6	13 σl	A16	14 σl	A12	12 σl	A19	16 σl	A14	17 σl	A20	13 σl
A8	14 σl	A11	10 σl	A15	15 σl	A21	13 σl	A15	15 σl	A37	13 σl
A11	10 σl			A35	13 σl						

6.4.1.2. Reacció de substitució nucleòfila de clorur en fase sòlida utilitzant mescles equimolars d'amines. Formació de glicinamides *N*-substituïdes

Es van preparar 5 xeringues de 5 ml (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) que contenien 100 mg de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat 6.3, es va procedir a la desprotecció i acilació. Els tests van donar positiu en cada cas.

La segona aminació es va dur a terme afegint en quatre de les xeringues una mescla equimolar (1.58 mmol/amina, 20 eq./amina) de 5/6 amines en 5 ml de DMF, amb la corresponent amina de referència (**A11** o **A15**) tal i com s'ha explicat a l'apartat 6.4.1.1, i en la cinquena xeringa una mescla equimolar (1.58 mmol/amina, 20 eq./amina) de les 2 amines de referència en 5 ml de DMF (vegeu Taula 6.4). A cada xeringa es van afegir també 220 σl (1.58 mmol, 20 eq.) de Et₃N. La mescla es va agitar durant 3 h, a t.a. i a 200 rpm.

Després de l'etapa d'escissió, es va obtenir un oli groguenc que es va analitzar per CG comparant l'àrea relativa dels productes obtinguts. Les glicinamides *N*-substituïdes de cada mescla es van identificar per CL-EM. Els resultats obtinguts s'han indicat en l'apartat 4.1.2.1.

Taula 6.4. Quantitats d'amina necessàries en cada xeringa per a la substitució nucleòfila del cloroderivat en fase sòlida (quantitats arrodonides a 0 o 5). En negreta es mostren les amines escollides com a referència.

Amina	Volum	Amina	Volum	Amina	Volum	Amina	Volum / Pes	Amina	Volum
A1	109 σ	A2	160 σ	A9	189 σ	A14	267 σ	A11	163 σ
A7	151 σ	A4	183 σ	A10	198 σ	A15	238 σ	A15	238 σ
A11	163 σ	A6	200 σ	A13	231 σ	A17	316 mg		
A12	189 σ	A8	222 σ	A15	238 σ	A20	211 σ		
A19	249 σ	A11	163 σ	A37	207 σ	A35	206 σ		
A21	199 σ	A16	229 σ						

6.4.1.3. Formació de 2,5-piperazindiones en fase sòlida en introduir mescles equimolars d'amines en la segona aminació

En 3 xeringues de 5 ml que contenen 465 mg (0.66 mmol/g, 0.31 mmol) de resina de poliestirè AM RAM s'hi van afegir 3 ml de DMF per inflar-la. Seguidament es va filtrar el dissolvent i es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc, segons el procediment descrit a l'apartat 6.3. La desprotecció total de la resina va ser comprovada mitjançant el test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell).

Acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va afegir una dissolució de 145 mg (1.55 mmol, 5 eq.) d'àcid cloroacètic en 3 ml d'una mescla DCM/DMF (1:1). Seguidament s'hi van afegir 245 σ de DIC (1.55 mmol, 5 eq.) i la mescla es va agitar mecànicament durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DMF (3 x 3 ml). La desaparició de l'amina primària es va comprovar amb el test del TNBS, el qual va donar positiu per aquesta reacció (incolor).

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 3 ml de DMF s'hi van afegir 195 σ (1.55 mmol, 5 eq.) d'**A10** i 215 σ (1.55 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla es va agitar durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar i es va repetir l'operació. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). La presència d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranil (color blau).

La *segona acilació* es va dur a terme de la mateixa manera que la descrita anteriorment, si bé el temps de reacció va ser d'1 h.

La *segona aminació* es va dur a terme de forma anàloga a la primera, però afegint en dues de les xeringues una mescla equimolar (0.31 mmol/amina, 1 eq./amina) de 5/6 amines en 3 ml de DMF amb la corresponent amina de referència (**A11** o **A15**), tal i com s'ha explicat a l'apartat 6.4.1.1, i en la tercera xeringa una mescla equimolar (0.31 mmol/amina, 1 eq./amina) de les 2 amines de referència en 3 ml de DMF (vegeu Taula 6.5). Per fer aquest estudi es va escollir un conjunt de 12 amines com a representatives de les 20 de la quimioteca.

Taula 6.5. Quantitats d'amina necessàries en cada xeringa en el segon acoblament per a la formació de DKPs. En negreta es mostren les amines escollides com a referència.

Amina	Volum	Amina	Volum / Pes	Amina	Volum
A1	21 μ l	A9	37 μ l	A11	32 μ l
A2	31 μ l	A13	45 μ l	A15	46 μ l
A4	36 μ l	A14	52 μ l		
A6	39 μ l	A15	46 μ l		
A8	43 μ l	A17	62 mg		
A11	32 μ l	A35	40 μ l		

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 4 ml d'un còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2), tornant-se la resina de color granatós. La mescla es va deixar agitant durant 30 min a t.a. i a 200 rpm. A continuació, la mescla es va filtrar en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi i el filtrat es va recollir en un matràs de 25 ml. La resina es va tornar a posar al tub i es va repetir l'operació. Els filtrats de les dues fraccions es van ajuntar i els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. L'oli groguenc que es va obtenir va ser transvasat a un tub de vidre de 10 ml mitjançant 2 ml de MeOH.

Ciclació: sobre la dissolució metanòlica anterior s'hi van afegir 4 ml d'una dissolució de KHCO_3 al 15%. La mescla es va deixar sense agitació durant tota la nit. Transcorregut aquest temps el dissolvent orgànic es va eliminar en un evaporador de centrifuga i el dissolvent aquós es va eliminar per liofilització. El sòlid blanc que es va obtenir es va resuspendre en 3 ml de CHCl_3 , es va sonicar durant 5 min en una bany d'ultrasons i es va centrifugar 5 min a 3000 rpm. El sobrenedant es va recollir i es va evaporar a pressió reduïda per obtenir un oli groguenc. Les DKPs resultants de cada grup es van analitzar per CG comparant les seves àrees relatives, exceptuant la *N*-(2-feniletíl)-*N'*-(2-(4'-sulfamoílfenil)etil)-2,5-piperazindiona la qual no va poder ser detectada per CG. Les DKPs de cada mescla es van identificar per CG-EM. Els resultats obtinguts s'han indicat a la Taula 4.3 de l'apartat 4.1.2.2.

6.4.2. ESTUDI PER HPLC

6.4.2.1. Reacció de substitució nucleòfila de derivats halogenats utilitzant mescles equimolars d'amines

6.4.2.1.1. Preparació de les benzamides d'un conjunt d'onze amines representatives de la quimioteca

6.4.2.1.1.1. Obtenció de la 4-bromometilbenzamida (**2**)

A una suspensió d'1.50 g (0.01 mol) de 4-metilbenzamida en 100 ml de CCl_4 s'hi van afegir 2.40 g (0.01 mmol, 1.2 eq.) d'*N*-bromosuccinimida (NBS). La mescla de reacció es va irradiar amb llum blanca (300 W) i es va mantenir en agitació durant 3 h. Passat aquest temps, el control per CG va mostrar el producte monobromat, com a producte majoritari, i, en menor proporció, producte dibromat i reactiu de partida sense reaccionar. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda fins obtenir un sòlid groguenc, el qual es va rentar amb H_2O (3 x 20 ml). La purificació del producte monobromat es va dur a terme per successives recristal·litzacions d'AcOEt i CHCl_3 , per obtenir 1.20 g d'un sòlid blanc (rdt. 50%). Per tal d'evitar la presència de producte dibromat en les reaccions posteriors amb les amines, es van descartar les fraccions recristal·litzades amb pureses inferiors al 95% per CG, motiu pel qual el rendiment de la reacció va ser més baix.

4-Bromometilbenzamida (2)¹⁰⁹

Pf: 179-181 °C (lit. 185-187 °C)¹⁰⁹

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): 7.84 (d, J=8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.50 (d, J=8.1 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.59 (s, 2H, CH₂).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): 171.7 (CO), 143.5 (C_{Ar}), 134.7 (C_{Ar}), 130.2 (2 x CH_{Ar}), 129.1 (2 x CH_{Ar}), 32.8 (CH₂).

CG-EM: 213, 215 (M, Br, 5), 134 (100), 106 (26), 90 (20), 89 (20).

6.4.2.1.1.2. Procediment general de substitució nucleòfila de la 4-bromometilbenzamida (2) per les onze amines escollides

Seguint el procediment experimental descrit per Isabel Masip en la seva Tesi Doctoral,⁵¹ es van afegir 145 mg (1.05 mmol, 3 eq.) de K₂CO₃ i 1.05 mmol (3 eq.) de l'amina primària corresponent dissolts en 2 ml de dioxà^{***} en un tub d'assaig de vidre de 100 ml amb tap roscat acoblable a l'aparell de Carousel de Radleys (vegeu Taula 6.6). Seguidament s'hi van afegir 75 mg (0.35 mmol) de la 4-bromometilbenzamida (**2**) dissolts en 1 ml de dioxà calent i la mescla de reacció es va mantenir en agitació durant 1.5 h. Passat aquest temps, les sals es van filtrar i es van rentar amb dioxà (2 x 2 ml). Els filtrats recollits es van evaporar a pressió reduïda.

Taula 6.6. Quantitats d'amina necessàries per a l'acoblament amb la 4-bromometilbenzamida (quantitats arrodonides a 0 o 5).

Amina	Volum	Amina	Quantitat
A4	122 σl	A13	154 σl
A6	133 σl	A15	158 σl
A7	101 σl	A17	210 mg
A9	126 σl	A20	320 mg
A11	108 σl	A35	222 σl
A12	125 σl		

*** El dioxà es va anhidritzar mitjançant una destil·lació sobre CaH₂.

Eliminació de l'excés d'amina. Utilització d'una resina segrestadora.

A un tub de vidre de 10 ml amb tap roscat de tefló s'hi va addicionar una dissolució del cru anterior en 2 ml de dioxà i 750 mg (2.8 mmol/g, 3 eq. relatiu a l'excés d'amina) d'una resina de poliestirè de tipus 4-benziloxibenzaldehyd. La mescla de reacció es va escalfar en un forn de microones a 350 W durant 20 min (interval·ls d'1 min, separats per 15 s), tot controlant la desaparició de l'amina primària lliure per CG.^{†††} Seguidament, la resina es va filtrar en una xeringa de 5 ml de polipropilè amb placa porosa de polietilè. La resina es va rentar amb dioxà (3 x 2 ml) i MeOH (3 x 2 ml). Els extractes orgànics recollits es van evaporar a pressió reduïda. Els olis o sòlids obtinguts es van purificar per CCP de sílica eluint amb una mescla CHCl₃/MeOH (10:1), per a les benzamides **3**, **9**, **10**, **12** i **13**, i amb AcOEt/MeOH (1:1) amb un 1% d'etilendiamina, per a les benzamides **5** i **6**. En el cas de les benzamides **7** i **11**, els residus es van purificar per cromatografia en capa prima preparativa d'alúmina eluint amb una mescla CHCl₃/MeOH (15:1). Malauradament, les benzamides **4** i **8** no es van poder purificar per CCP, motiu pel qual es va optar per una síntesi alternativa en fase sòlida (vegeu apartat 6.4.2.1.1.3). En tots els casos es van obtenir rendiments al voltant del 50%.

4-[(*N*-Isopentilamino)metil]benzamida (3)

Pf: 77-79 °C

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.77 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.42 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.10 (d, 2H, CONH₂), 3.85 (s, 2H, PhCH₂), 2.64 (t, J=7.5 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 1.62 (ac, 2H, 1H (CH₂CH) + 1H (NH)), 1.41 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 0.89 (d, J=6.5 Hz, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 169.4 (CO), 145.1 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 128.3 (2 x CH_{Ar}), 127.6 (2 x CH_{Ar}), 53.8 (PhCH₂), 47.8 (NHCH₂CH₂), 39.3 (NHCH₂CH₂), 26.3 (CH₂CH), 22.8 (2 x CH₃).

EMAR per C₁₃H₂₀N₂O: Calculada: 220.1576

Determinada: 220.1574

4-[(*N*-(2'-Acetamidoetil)amino)metil]benzamida (5)

Pf: 137-139 °C

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.86 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.46 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.84 (s, 2H, PhCH₂), 3.34 (t, J=6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCO), 2.72 (t, J=6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCO), 1.95 (s, 3H, COCH₃).

^{†††} En els casos de les amines **A9** i **A12** van ser necessaris 20 min addicionals, i amb l'**A20** 1 h en total.

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 173.6 (CO), 172.1 (CO), 144.9 (C_{Ar}), 133.7 (C_{Ar}), 129.5 (2 x CH_{Ar}), 128.9 (2 x CH_{Ar}), 53.6 (PhCH₂), 49.5 (CH₂CH₂NHCO), 39.9 (CH₂CH₂NHCO), 22.6 (CH₃).

EMAR per C₁₂H₁₇N₃O₂: Calculada: 235.1321

Determinada: 235.1322

4-[(*N*-(2'-(2''-Piridinil)etil)amino)metil]benzamida (6)

Pf: 94-96 °C

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 8.44 (d, J=4.5 Hz, 1H, H_{Pir}), 7.84 (d, J=8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.74 (dd, J=8.0, 1.5 Hz, 1H, H_{Pir}), 7.41 (d, J=8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.30 (d, J=8.0 Hz, 1H, H_{Pir}), 7.24 (dd, J=8.0, 5.0 Hz, 1H, H_{Pir}), 3.84 (s, 2H, PhCH₂), 2.97 (ac, 4H, 2H (NHCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CH₂)).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.1 (CO), 160.9 (C_{Pir}), 149.7 (CH_{Pir}), 144.8 (C_{Ar}), 138.7 (CH_{Pir}), 133.8 (C_{Ar}), 129.5 (2 x CH_{Ar}), 128.9 (2 x CH_{Ar}), 124.9 (CH_{Pir}), 123.1 (CH_{Pir}), 53.8 (PhCH₂), 49.7 (NHCH₂CH₂), 38.3 (NHCH₂CH₂).

EMAR per C₁₅H₁₇N₃O: Calculada: 255.1372

Determinada: 255.1375

4-[(*N*-(2'-Tetrahidrofurfuril)metil)amino)metil]benzamida (7)

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.86 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.44 (d, J=8 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.02 (m, 1H, CHOCH₂), 3.86-3.65 (ac, 4H, 2H (PhCH₂) + 1H (OCH_{a,b}) + 1H (OCH_{a,b})), 2.63 (ac, 2H, 1H (NHCH_{a,b}CH) + 1H (NHCH_{a,b}CH)), 2.01-1.50 (ac, 4H, 1H (CHCH_{a,b}CH₂CH₂O) + 1H (CHCH_{a,b}CH₂CH₂O) + 1H (CHCH₂CH_{a,b}CH₂O) + 1H (CHCH₂CH_{a,b}CH₂O)).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.1 (CO), 144.6 (C_{Ar}), 133.7 (C_{Ar}), 129.5 (2 x CH_{Ar}), 128.9 (2 x C_{Ar}), 79.0 (CHOCH₂), 68.8 (OCH₂), 54.1 (PhCH₂), 53.8 (NHCH₂CH), 30.4 (CHCH₂CH₂), 26.6 (CHCH₂CH₂).

EMAR per C₁₃H₁₈N₂O₂: Calculada: 234.1368

Determinada: 234.1369

4-[(*N*-(2'-(4''-Metoxifenil)etil)amino)metil]benzamida (9)

Pf: 123-125 °C

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.84 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.41 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.10 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.84 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.86 (s, 2H, PhCH₂), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.80 (ac, 4H, 2H (NHCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CH₂)).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.1 (CO), 159.8 (C_{Ar}), 144.0 (C_{Ar}), 134.0 (C_{Ar}), 132.5 (C_{Ar}), 130.6 (2 x CH_{Ar}), 129.7 (2 x CH_{Ar}), 128.9 (2 x CH_{Ar}), 115.0 (2 x CH_{Ar}), 55.6 (OCH₃), 53.6 (PhCH₂NH), 51.5 (NHCH₂CH₂), 35.4 (NHCH₂CH₂).

EMAR per C₁₇H₂₀N₂O₂: Calculada: 284.1525

Determinada: 284.1527

4-[(*N*-(2'-(2'',4''-Diclorofenil)etil)amino)metil]benzamida (10)

Pf: 125-127 °C

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.77 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.36 (s, 1H, H_{Ar}), 7.17 (d, J=0.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.08 (da, 2H, CONH₂), 3.87 (s, 2H, PhCH₂), 2.90 (ac, 4H, 2H (NHCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CH₂)), 1.52 (sa, 1H, NH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 169.4 (CO), 144.7 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 134.8 (C_{Ar}), 132.7 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 131.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 128.3 (2 x CH_{Ar}), 127.6 (2 x CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 53.4 (PhCH₂), 48.7 (NHCH₂CH₂), 33.7 (NHCH₂CH₂).

EMAR per C₁₆H₁₆Cl₂N₂O: Calculada: 323.0640 (M + H)⁺

Determinada: 323.0662

4-[(*N*-(2'-(4''-Sulfamoïlfenil)etil)amino)metil]benzamida (11)

Pf: 177-179 °C

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.83 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.81 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.41 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.84 (s, 2H, PhCH₂), 2.89 (ac, 4H, 2H (NHCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CH₂)).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.1 (CO), 146.0 (C_{Ar}), 145.2 (C_{Ar}), 143.0 (C_{Ar}), 133.8 (C_{Ar}), 130.3 (2 x CH_{Ar}), 129.5 (2 x CH_{Ar}), 128.9 (2 x CH_{Ar}), 127.4 (2 x CH_{Ar}), 53.8 (PhCH₂), 51.0 (NHCH₂CH₂), 36.5 (NHCH₂CH₂).

EMAR per C₁₆H₁₉N₃O₃S: Calculada: 334.1147 (M + H)⁺

Determinada: 334.1174

4-[(*N*-(3',3'-Difenilpropil)amino)metil]benzamida (12)

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.82 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.35 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.20 (ac, 10H, H_{Ar}), 3.97 (t, J=7.5 Hz, 1H, CHPh₂), 3.75 (s, 2H, PhCH₂), 2.55 (t, J=7.5 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 2.29 (m, 2H, NHCH₂CH₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.0 (CO), 146.1 (2 x C_{Ar}), 144.3 (C_{Ar}), 133.8 (C_{Ar}), 129.6 (4 x CH_{Ar}), 129.5 (2 x CH_{Ar}), 128.9 (2 x CH_{Ar}), 128.8 (4 x CH_{Ar}), 127.3 (2 x CH_{Ar}), 53.7 (PhCH₂), 50.5 (CHPh₂), 49.5 (NHCH₂CH₂), 35.9 (NHCH₂CH₂).

EMAR per C₂₃H₂₄N₂O: Calculada: 344.1889

Determinada: 344.1889

4-[(*N*-(2'-(2''-Fluorofenil)etil)amino)metil]benzamida (13)

Pf: 108-110 °C

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.84 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.41 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.25-7.01 (ac, 4H, H_{Ar}), 3.84 (s, 2H, PhCH₂), 2.84 (ac, 4H, 2H (NHCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CH₂)).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.1 (CO), 162.6 (J_{C-F}=242.4 Hz, C_{Ar}), 144.4 (C_{Ar}), 133.9 (C_{Ar}), 132.1 (J_{C-F}=4.6 Hz, CH_{Ar}), 129.6 (2 x CH_{Ar}), 129.3 (J_{C-F}=7.9 Hz, C_{Ar}), 128.9 (2 x

CH_{Ar}), 127.5 (J_{C-F}=16.0 Hz, CH_{Ar}), 125.4 (J_{C-F}=3.7 Hz, CH_{Ar}), 116.3 (J_{C-F}=22.1 Hz, CH_{Ar}), 53.6 (PhCH₂), 50.0 (NHCH₂CH₂), 29.8 (NHCH₂CH₂).

EMAR per C₁₆H₁₇FN₂O: Calculada: 273.1325 (M + H)⁺

Determinada: 273.1345

6.4.2.1.1.3. Obtenció de les benzamides **4** i **8** en fase sòlida

Es van preparar dues xeringues de 5 ml amb 300 mg (0.79 mmol/g, 0.24 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat 6.3, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc.

Sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, s'hi va afegir una dissolució de 205 mg (1.20 mmol, 5 eq.) d'àcid 4-clorometilbenzoic en 3 ml d'una mescla DCM/DMF (1:1). Seguidament s'hi van afegir 190 μ l (1.20 mmol, 5 eq.) de DIC i la mescla es va agitar mecànicament durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DMF (3 x 3 ml). La desaparició de l'amina primària es va comprovar amb el test del TNBS, el qual va donar positiu per aquesta reacció (incolor).

A una suspensió de la resina acilada en 3 ml de DMF s'hi van afegir 1.20 mmol (5 eq.) d'amina primària (150 μ l d'**A6**; 145 μ l d'**A12**) i 165 μ l (1.20 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla es va agitar mecànicament durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar i es va repetir l'operació. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). La presència d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranil (color blau).

L'etapa d'escissió de la resina es va realitzar seguint el procediment descrit a l'apartat 6.3. L'oli groguenc obtingut es va redissoldre en 3 ml d'aigua i es va assegurar un pH àcid amb HCl 1 M. Seguidament la dissolució es va basificar amb NaOH 2 M i es va transvasar a un embut d'extracció, on es va extreure el producte amb AcOEt (3 x 5 ml). Els extractes orgànics es van ajuntar, assecar sobre MgSO₄ i, després de filtrar, es van evaporar a pressió reduïda. El residu obtingut es va analitzar per HPLC i RMN observant-se unes impureses importants en els dos casos. Tal i com s'ha explicat a l'apartat 6.4.2.1.1.2, la dificultat de purificar aquests productes per CCP va comportar la purificació dels residus per HPLC a escala semipreparativa. Es va obtenir un rdt. del 38% per a la benzamida **4** i un rdt. del 25% per a la benzamida **8**.

4-[(*N*-(2'-(1''-Pirrolidinil)etil)amino)metil]benzamida (4)

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.95 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.62 (d, J=8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.34 (s, 2H, PhCH₂), 3.60-3.42 (ac, 8 H, 2H (NHCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CH₂) + 4H (CH₂NCH₂)), 2.12 (t, J=6.5 Hz, 4H, CH₂CH₂NCH₂CH₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 169.6 (CO), 144.7 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 128.3 (2 x CH_{Ar}), 127.6 (2 x C_{Ar}), 55.9 (2 x NCH₂CH₂CH₂CH₂), 54.3 (PhCH₂), 53.6 (NHCH₂CH₂), 47.7 (NHCH₂CH₂), 23.5 (2 x NCH₂CH₂CH₂CH₂).

EMAR per C₁₄H₂₁N₃O: Calculada: 247.1685
Determinada: 247.1691

4-[(*N*-(3'-(1''-Imidazolil)propil)amino)metil]benzamida (8)

Pf: 100-102 °C

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.85 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.63 (s, 1H, H_{Imid}), 7.42 (d, J=8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.11 (s, 1H, H_{Imid}), 6.95 (s, 1H, H_{Imid}), 4.09 (t, J=7.0 Hz, 2H, CH₂N), 3.81 (s, 2H, PhCH₂), 2.57 (t, J=7.5 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 2.00 (m, 2H, NHCH₂CH₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.1 (CO), 144.5 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Imid}), 133.8 (C_{Ar}), 129.6 (2 x CH_{Ar}), 129.0 (C_{Imid}), 128.9 (2 x CH_{Ar}), 120.6 (C_{Imid}), 53.8 (PhCH₂), 46.6 (CH₂N), 45.8 (NHCH₂CH₂), 31.7 (NHCH₂CH₂).

EMAR per C₁₄H₁₈N₄O: Calculada: 258.1481
Determinada: 258.1488

6.4.2.1.2. Obtenció del patró per a les rectes de calibració

A una dissolució de 65 μ l (0.50 mmol) de 3,3-difenilpropanamina (**A20**) en 100 μ l (1.10 mmol, 2.2 eq.) d'anhidrid acètic, es van afegir 100 μ l (1.20 mmol, 2.4 eq.) de piridina^{†††} i la mescla es va deixar en agitació durant 10 min. Passat aquest temps es va realitzar un control per CG on es va comprovar la desaparició de l'**A20**. Els reactius en excés s'hi van eliminar per evaporació a pressió reduïda, per obtenir 121 mg d'un sòlid blanc (rdt. 96%) (**14**).

***N*-3,3-difenilpropilacetamida (14)¹¹⁰**

Pf: 97-99 °C (lit. 101-102 °C)¹¹⁰

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7.25 (ac, 10H, H_{Ar}), 5.48 (sa, 1H, NHCO), 3.94 (t, J=7.8 Hz, 1H, Ph₂CH), 3.21 (q, J=6.4 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCO), 2.26 (dt, J=7.8 Hz, 6.4 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCO), 1.85 (s, 3H, COCH₃).

^{†††} La piridina es va destil·lar prèviament i recollir sobre tamissos moleculars.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 170.0 (CO), 144.2 (2 x C_{Ar}), 128.6 (4 x CH_{Ar}), 127.7 (4 x CH_{Ar}), 126.4 (2 x CH_{Ar}), 49.3 (Ph₂CH), 38.6 (CHCH₂CH₂), 35.2 (CHCH₂CH₂), 23.2 (CH₃).

CG-EM: 253 (M, 20), 194 (22), 181 (15), 167 (30), 73 (100), 43 (25), 30 (35).

6.4.2.1.3. Procediment general d'obtenció de les rectes de calibració de les benzamides

Es va preparar 1 ml d'una dissolució de concentració aproximadament de 3 mM de cada benzamida. A partir d'aquesta dissolució mare s'hi van preparar 5 dissolucions més diluïdes, afegint 10 μ l d'una dissolució del patró **14** d'una concentració 0.41 μ M (4.1 mg en 2 ml d'ACN) i el volum necessari d'una dissolució aquosa de HCOOH-Et₃N 20 mM, pH=5.0, fins a un volum total de 200 μ l. Degut a problemes cromatogràfics amb les benzamides **4** i **7**, es van preparar les 5 dissolucions d'igual forma, però afegint-hi H₂O (amb 0.1% de TFA) fins un volum total de 200 μ l. En el cas de la benzamida **7** els eluents utilitzats van ser H₂O (amb 0.1% de TFA) i ACN (amb 0.07% de TFA). Les dissolucions es van analitzar per HPLC a 220 nm i a partir de la relació d'àrees i de concentracions de cada benzamida amb el patró **14**, es van determinar les rectes de calibració de totes les benzamides, les quals es mostren a la Figura 6.3.

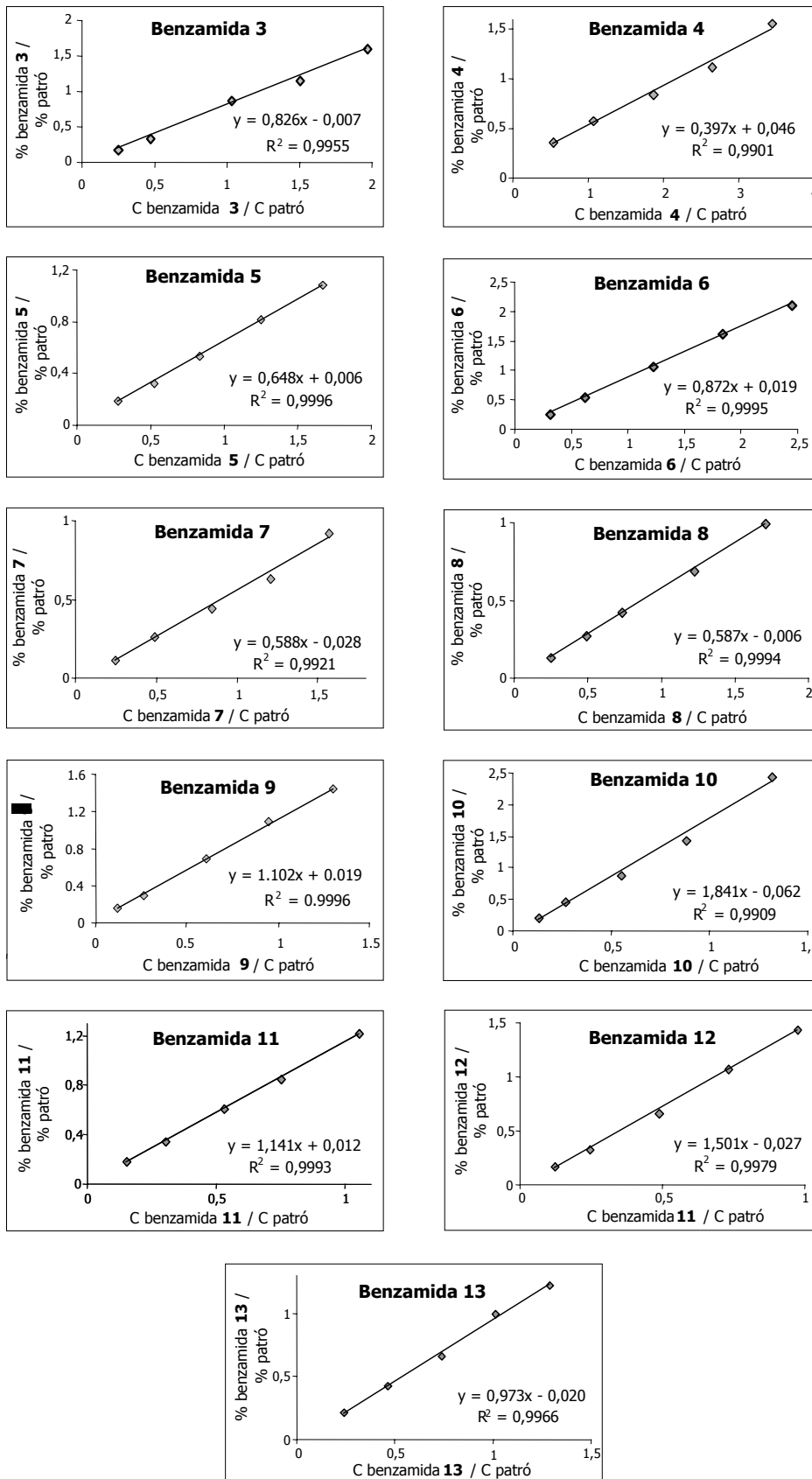


Figura 6.3. Rectes de calibració per a les benzamides **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12** i **13** obtingudes per HPLC fent servir el compost **14** com a referència interna.

6.4.2.1.4. Estudi de la reactivitat de les onze amines en fase sòlida utilitzant mescles equimolars

Es van preparar 4 xeringues de 10 ml que contenien 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat 6.4.2.1.1.3, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a l'acilació amb l'àcid 4-clorometilbenzoic. Els tests van donar positiu en cada cas.

L'aminació es va dur a terme afegint a cada xeringa 5 ml de DMF que contenien una mescla equimolar (1.58 mmol/amina, 20 eq.) de 6 amines (cada mescla es va realitzar per duplicat) amb l'amina **A15** com a referència (vegeu Taula 6.7) i 220 μ l (1.58 mmol, 20 eq.) de Et₃N. Les mescles es van agitar durant 3 h a t.a. i a 200 rpm.

Taula 6.7. Quantitats d'amina necessàries en cada xeringa per a l'etapa d'acoblament en fase sòlida (quantitats arrodonides a 0 o 5). En negreta es mostra l'**A15** escollida com a referència.

Grup A	Quantitat	Grup B	Quantitat
A4	186 μ l	A6	203 μ l
A7	153 μ l	A11	165 μ l
A9	191 μ l	A15	241 μ l
A12	191 μ l	A17	320 mg
A13	234 μ l	A20	338 mg
A15	241 μ l	A35	209 μ l

Després de l'etapa d'escissió, es va obtenir un oli groguenc que es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 26/27 mg dels residus del grup A i 36/40 mg dels del grup B.

Seguidament es van preparar dissolucions dels residus obtinguts d'una concentració aproximada de 5 mg en 200 μ l d'ACN. Tal i com es van preparar les dissolucions de les rectes de calibració (vegeu apartat 6.4.2.1.3), a 40 μ l de les dissolucions anteriors dels residus s'hi van afegir 10 μ l del patró **14** d'una concentració 0.41 μ M i 150 μ l d'una dissolució aquosa de HCOOH-Et₃N 20 mM, pH=5.0. En el cas dels residus del grup B es va preparar també una dissolució anàloga a l'anterior, però afegint 150 μ l d'H₂O (amb 0.1% de TFA).

A partir de l'anàlisi de les mostres per HPLC i tenint en compte les rectes de calibració corresponents de cada benzamida, es van determinar els valors de reactivitat relativa i els factors d'equireactivitat^{§§§} en fase sòlida de les 11 amines respecte l'amina de referència **A15**, els quals s'han mostrat a la Taula 4.6 de l'apartat 4.2.3.

6.4.2.1.5. Estudi de la reactivitat de les onze amines en fase sòlida utilitzant mesclures equireactives

Es van preparar 4 xeringues de 10 ml que contenien 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat 6.4.2.1.4, es va procedir a les etapes de desprotecció, acilació i aminació. L'aminació es va dur a terme variant la quantitat de cada amina afegida en funció dels factors d'equireactivitat respectius obtinguts en fase sòlida (vegeu Taula 6.8).

Taula 6.8. Quantitats d'amina necessàries en cada xeringa per l'etapa d'acoblament en fase sòlida, després d'aplicar els factors d'equireactivitat respectius. En negreta es mostra l'**A15** (1.6 mmol, 20 eq.) escollida com a referència.

Grup A	mmol	Quantitat	Grup B	mmol	Quantitat
A4	0.70	81 μ l	A6	0.33	42 μ l
A7	1.30	125 μ l	A11	0.77	79 μ l
A9	1.01	120 μ l	A15	1.58	241 μ l
A12	0.84	100 μ l	A17	1.22	244 mg
A13	0.77	113 μ l	A20	0.92	194 mg
A15	1.58	241 μ l	A35	1.47	192 μ l

Després de l'escissió de la resina i de la liofilització final es van obtenir 26/27 mg dels residus del grup A i 24/25 mg dels del grup B.

Dels resultats dels dos residus de cada grup, es van obtenir els nous valors de reactivitat en fase sòlida de les onze amines en relació a l'**A15**, els quals s'han mostrat a la Taula 4.7 de l'apartat 4.2.4.

^{§§§} El factor d'equireactivitat s'ha calculat a partir de la inversa del valor de reactivitat relativa a **A15**, és a dir a 1.

6.4.2.1.6. Estudi de la reactivitat de les onze amines en dissolució utilitzant mescles equimolars

L'estudi de reactivitat en dissolució va ser realitzat en col.laboració amb Ana Beloqui. Seguint el procediment experimental descrit a l'apartat 6.4.2.1.1.2, en un tub d'assaig de vidre de 100 ml amb tap roscat acoblable al Carousel de Radleys es van afegir 78 mg (0.56 mmol, 3 eq.) de K_2CO_3 i una mescla equimolar (0.56 mmol/amina, 3 eq.) de 6 amines (cada mescla es va realitzar per duplicat), amb l'amina **A15** com a referència, dissoltes en 2 ml de dioxà (vegeu Taula 6.9). A continuació, s'hi van afegir 40 mg (0.19 mmol) de la 4-bromometilbenzamida (**2**) dissolts en 1 ml de dioxà calent i la mescla es va mantenir en agitació durant 1.5 h.

Taula 6.9. Quantitats d'amina necessàries en cada grup per a la reacció d'acoblament en dissolució. En negreta es mostra l'**A15** escollida com a referència.

Grup A	Quantitat	Grup B	Quantitat
A4	65 σ	A6	71 σ
A7	54 σ	A11	58 σ
A9	67 σ	A15	84 σ
A12	70 σ	A17	112 mg
A13	82 σ	A20	119 mg
A15	84 σ	A35	73 σ

Després de filtrar les sals, es va procedir a l'eliminació de l'excés d'amina afegint 2.98 g (3.2 mmol/g, 3 eq. relatiu a l'excés d'amines) de resina de poliestirè de tipus 4-benziloxibenzaldehyd i escalfant les mescles en un forn de microones a 350 W durant 40 min (interval·ls d'1 min, separats per 15 s) en el cas de les mescles del grup A i 1 h en el cas de les mescles del grup B. Seguidament, la resina es va filtrar i es va rentar amb dioxà (3 x 2 ml) i MeOH (3 x 2 ml). Els extractes orgànics recollits es van ajuntar i evaporar a pressió reduïda. Es van obtenir olis groguencs que es van redissoldre en una mescla d' H_2O/ACN i es van liofilitzar, per obtenir 46/50 mg dels residus del grup A i 42/54 mg dels residus del grup B.

Seguidament es van preparar les dissolucions dels residus amb el patró **14** i es van analitzar per HPLC. A partir de les corresponents rectes de calibració es van determinar els valors de reactivitat relativa en dissolució i els factors d'equireactivitat en dissolució de les 11 amines en relació a l'amina de referència **A15**, els quals s'han mostrat a la Taula 4.8 de l'apartat 4.2.5.

6.4.2.1.7. Estudi de la reactivitat de les onze amines en dissolució utilitzant mescles equireactives

Seguint el procediment descrit a l'apartat 6.4.2.1.6, en un tub d'assaig de vidre de 100 ml amb tap roscat acoblable al Carousel de Radleys es van afegir 78 mg (0.56 mmol, 3 eq.) de K_2CO_3 i una mescla de 6 amines en 2 ml de dioxà, variant la quantitat de cada amina afegida en funció dels seus factors d'equireactivitat corresponents en dissolució (vegeu Taula 6.10). Seguidament, s'hi van afegir 40 mg (0.19 mmol) de la 4-bromometilbenzamida (**2**) dissolts en 1 ml de dioxà calent i la mescla es va mantenir en agitació durant 1.5 h.

Taula 6.10. Quantitats d'amina necessàries en cada xeringa per a l'etapa d'acoblament en dissolució, després d'aplicar els factors d'equireactivitat respectius. En negreta es mostra l'**A15** escollida com a referència.

Grup A	mmol	Quantitat	Grup B	mmol	Quantitat
A4	0.21	24 μ l	A6	0.17	21 μ l
A7	0.17	16 μ l	A11	0.19	58 μ l
A9	0.21	25 μ l	A15	0.56	84 μ l
A12	0.20	24 μ l	A17	0.29	58 mg
A13	0.21	31 μ l	A20	0.37	78 mg
A15	0.56	84 μ l	A35	0.36	47 μ l

Després de filtrar les sals, es va procedir a l'eliminació de l'excés d'amina afegint 5.10 g (3.2 mmol/g, 3 eq. relatiu a l'excés d'amines) de resina de poliestirè de tipus 4-benziloxibenzaldehyd als residus del grup A i 6.90 g als residus del grup B. Després del tractament amb microones i de la liofilització final, es van obtenir 46/50 mg dels residus del grup A i 42/54 mg dels residus del grup B.

Dels resultats dels dos residus de cada grup, es van obtenir els nous valors de reactivitat de les onze amines en dissolució en relació a l'**A15**, els quals s'han mostrat a la Taula 4.9 de l'apartat 4.2.5.

PART II. SÍNTESI DE PEPTOIDES ÀCIDS.
APLICACIONS

SUMARI PART II

7. INTRODUCCIÓ	129
7.1. Antecedents	130
8. OBTENCIÓ DE PEPTOIDES ÀCIDS	135
8.1. Criteri de nomenclatura dels peptoides àcids	135
8.2. Hidròlisi de peptoides	135
8.2.1. Hidròlisi de peptoides en medi àcid	136
8.2.2. Hidròlisi de peptoides en medi bàsic	137
8.2.3. Hidròlisi de peptoides en fase sòlida. Disseny d'experiments	139
8.2.3.1. Elecció dels factors a estudiar en el procediment d'escissió	140
8.2.3.2. Plantejament del disseny d'experiments	141
8.2.3.3. Resultats del disseny d'experiments	142
8.2.4. Hidròlisi de peptoides amb resina d'intercanvi iònic. Disseny d'experiments	143
8.2.4.1. Elecció dels factors a estudiar en la reacció d'hidròlisi	143
8.2.4.2. Plantejament del disseny d'experiments	144
8.2.4.3. Resultats del disseny d'experiments	144
8.2.4.4. Anàlisi de dades	145
8.2.4.5. Hidròlisi de peptoides amb resina Amberlyst-15	147
8.3. Síntesi de peptoides àcids en fase sòlida	149
8.3.1. Plantejament de la síntesi	149
8.3.2. Elecció del suport sòlid	150
8.3.3. Síntesi de peptoides àcids amb resina clorur de 2-clorotritil	152
8.3.4. Intentos de síntesi de peptoides àcids amb altres resines	156
8.3.5. Síntesi de peptoides àcids aplicant l'estratègia del "safety-catch linker"	157
8.4. Conclusions de l'obtenció de peptoides àcids	160
9. IMMOBILITZACIÓ D'UN PEPTOIDE A UN SUPORT SÒLID	161
9.1. Acoblament d'un peptoides-biotinilat a una matriu d'agarosa	162
9.1.1. Obtenció del peptoides àcid N13-13-10COOH biotinilat per l'extrem carboxílic C-terminal	163
9.1.2. Obtenció del peptoides N13-13-10C biotinilat per l'extrem N-terminal	165
	125

9.2. Acoblament d'un peptoide àcid a una matriu de sefarosa	167
9.2.1. Primeres proves d'acoblament amb l'àcid 3-fenilpropioníic	169
9.2.1.1. Determinació de la recta de calibració	169
9.2.1.2. Proves d'acoblament	169
9.2.2. Acoblament de N13-13-10COOH a una columna de sefarosa	170
9.2.2.1. Determinació de la recta de calibració	170
9.2.2.2. Acoblament a la matriu de sefarosa	170
9.3. Activitat biològica	171
9.3.1. Activitat biològica del peptoide biotinilat	171
9.3.2. Activitat biològica del peptoide enllaçat a sefarosa	173
10. ESTUDIS DE DIMERITZACIÓ I CICLACIÓ DELS PEPTOIDES ÀCIDS	175
10.1. Estudis de dimerització i ciclació en dissolució	177
10.2. Estudis de dimerització en fase sòlida i ciclació en dissolució	180
11. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	183
11.1. Consideracions generals	183
11.1.1. Controls qualitativs en fase sòlida. Test de ninhidrina	184
11.2. Obtenció de peptoides àcids	184
11.2.1. Hidròlisi de peptoides	184
11.2.1.1. Prova d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C en medi àcid	184
11.2.1.2. Proves d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C en medi bàsic	185
11.2.1.3. Proves d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C en fase sòlida. Disseny d'experiments	186
11.2.1.4. Hidròlisi de peptoides amb resina Amberlyst-15. Disseny d'experiments	186
11.2.1.4.1. Procediment experimental del disseny d'experiments amb el peptoide N10-15-15C	186
11.2.1.4.2. Procediment general per a la hidròlisi de peptoides catalitzada per la resina Amberlyst-15	187
11.2.2. Síntesi de peptoides àcids en fase sòlida	188
11.2.2.1. Amb resina clorur de 2-clorotritil	188
11.2.2.1.1. Procediment general	188
11.2.2.1.2. Proves d'escissió de la resina	190

11.2.2.2. Amb resina clorur de tritol. Intent de síntesi del peptoide N37-13-15COOH	191
11.2.2.3. Amb resina Wang tricloroacetimidat. Intents de síntesi del peptoide N37-13-15COOH	191
11.2.2.4. Amb resina TentaGel. Intent de síntesi del peptoide N37-13-15COOH	192
11.2.2.5. Utilitzant l'estratègia " <i>safety-catch linker</i> ". Intent de síntesi del peptoide N37-13-15COOH	192
11.3. Acoblament d'un peptoide a biotina	194
11.3.1. Obtenció del peptoide àcid N13-13-10COOH biotinilat per l'extrem C-terminal	194
11.3.1.1. Síntesi del biotinilat d' <i>N</i> -succinimidil (22)	194
11.3.1.2. Acoblament de l'espaiador 1,6-hexandiamina a la biotina	194
11.3.1.3. Acoblament de N13-13-10COOH a <i>N</i> -(6-aminohexil)biotinamida	195
11.3.2. Obtenció del peptoide N13-13-10C biotinilat per l'extrem <i>N</i> -terminal	196
11.3.2.1. Síntesi de H ₂ N-(CH ₂) ₆ -NHCH ₂ CO-N13-13-10C en fase sòlida	196
11.3.2.2. Acoblament de H ₂ N-(CH ₂) ₆ -NHCH ₂ CO-N13-13-10C a la biotina	197
11.4. Acoblament d'un peptoide àcid a una columna de sefarosa	198
11.4.1. Recta de calibració de l'àcid 3-fenilpropioníc	198
11.4.2. Proves d'acoblament de l'àcid 3-fenilpropioníc a sefarosa	199
11.4.3. Recta de calibració del peptoide àcid N13-13-10COOH	201
11.4.4. Acoblament de N3-13-10COOH a sefarosa	201
11.4.4.1. Procediment general	201
11.4.4.2. Determinació del percentatge de N13-13-10COOH acoblat a la sefarosa	202
11.5. Reaccions de dimerització i ciclació de peptoides àcids	203
11.5.1. Dimerització i ciclació en dissolució. Procediment general	203
11.5.2. Dimerització en fase sòlida i ciclació	203

7. INTRODUCCIÓ

Al llarg de la part I de la memòria s'ha explicat el disseny i la síntesi de la quimioteca de peptoides-II i s'han comentat alguns dels resultats obtinguts del seu cribratge davant de diferents dianes d'interès terapèutic.

Concretament, en l'apartat 5.1.2 de l'activitat biològica de la quimioteca en l'àrea del càncer, s'ha comentat com una de les estratègies més atractives per inhibir la proliferació cel·lular de les línies tumorals és la búsqueda de noves molècules orgàniques de pes molecular baix capaces d'interferir amb reguladors de la divisió del cicle cel·lular, com les ciclins dependents de kinases (CDKs). La regulació de l'activitat de les CDKs es pot dur a terme mitjançant dos tipus d'aproximacions: per inhibició dels reguladors de les CDKs (ciclins, inhibidors de CDKs, o quinases i fosfatases implicades en l'activació de les CDKs) o per inhibició directa de l'activitat de les CDKs. Aquesta segona aproximació és la més àmpliament estudiada i ha portat a la identificació de potents inhibidors, entre els quals destaquen les famílies de purines,¹¹¹ d'oxindoles,¹¹² de pirimidines¹¹³ i de quinazolines.¹¹⁴

Del cribratge de la quimioteca de peptoides-II es van identificar els peptoides N13-13-10C i N10-13-10C com a bons moduladors del cicle cel·lular i inductors d'apoptosi. No obstant, tot i que no estava clar el mecanisme d'acció dels dos peptoides per arribar a induir apoptosi, els estudis realitzats semblaven indicar que la seva acció no consistia en inhibir l'activitat de les CDKs, sinó en sobreactivar les proteïnes p21 i p27, les quals són inhibidors específics de les quinases involucrades en el cicle cel·lular. Així doncs, aquests dos peptoides esdevenen un nou esquelet farmacofòric per al desenvolupament de nous fàrmacs per a la teràpia en la lluita contra el càncer i constitueixen una eina útil per a l'estudi de noves dianes involucrades en la inducció del procés apoptòtic.

En aquest context, va sorgir el plantejament d'un nou projecte per identificar la diana o dianes que interaccionaven amb aquests peptoides per a desencadenar el procés apoptòtic i de mort cel·lular. Per aquest estudi es va treballar amb el peptoid més actiu, l'N13-13-10C (**17**).

7.1. ANTECEDENTS

Una de les tècniques més utilitzades per identificar la diana amb què interacciona un determinat compost amb elevada selectivitat consisteix en avaluar la capacitat d'interacció d'aquest compost davant una sèrie de proteïnes aïllades i purificades prèviament. No obstant, aquest mètode requereix l'expressió, la purificació i l'assaig de forma individual per a cada proteïna, convertint-se en un procés llarg i tediós. A més, d'aquesta manera només s'avalua el conjunt determinat de proteïnes que siguem capaços d'expressar, deixant sense avaluar un gran nombre de proteïnes que podrien interaccionar de forma favorable i selectiva amb el compost d'interès.

Per solucionar aquests inconvenients, Knockaert i col.¹¹⁵ van desenvolupar una tècnica alternativa a l'anterior basada en la identificació de la diana o dianes d'un compost per cromatografia d'afinitat, amb el compost immobilitzat en un suport sòlid, tal i com s'exemplifica a la Figura 7.1.

En la tècnica de la cromatografia d'afinitat el compost o lligand potencial s'enllaça covalentment a un suport sòlid mitjançant un espaiador o *linker*. El lloc d'unió de l'espaiador al compost s'ha d'estudiar amb cura per tal que quedi prou lluny del lloc de reconeixement amb la proteïna i no afecti la seva interacció, i el suport sòlid acostuma a ser en aquests

casos una matriu d'agarosa o de sefarosa. Seguidament es posa en contacte el compost enllaçat a la matriu amb un extracte proteic de diferents tipus de cèl·lules i teixits, i després de realitzar una sèrie de rentats per eliminar les proteïnes que no s'han enllaçat amb el compost, té lloc l'etapa d'elució de les proteïnes que s'han retingut, les quals es separen en un gel d'electroforesi de poliacrilamida i s'identifiquen microseqüencialment. Amb aquesta tècnica Knockaert i col. van identificar les dianes de dos inhibidors de CDKs, el purvalanol i les paulones.¹¹⁵⁻¹¹⁷

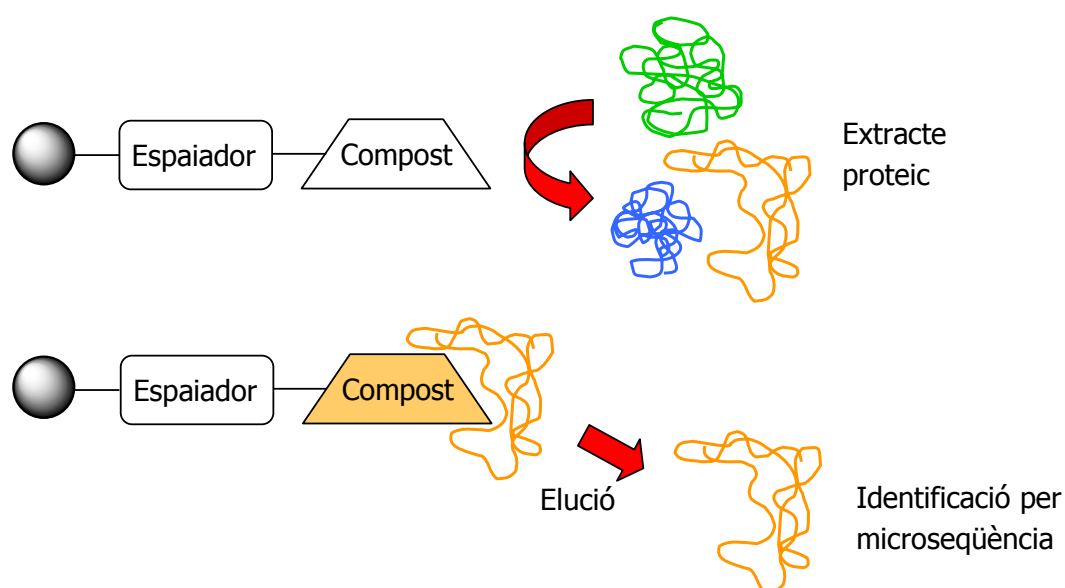


Figura 7.1. Cromatografia d'afinitat, purificació i identificació de les proteïnes d'un extracte cel·lular que interaccionen amb un compost, el qual ha estat immobilitzat a un suport sòlid mitjançant un espaiador.

A la bibliografia trobem altres tipus de suports sòlids utilitzats per als assaigs d'interacció amb proteïnes on es realitza la síntesi dels compostos i el seu cribratge al mateix suport, sense ser necessària l'etapa d'escissió i del cribratge posterior en dissolució, entre els quals destaquen les membranes de cel·lulosa³⁴ i la resina de tipus Tentagel.¹¹⁸

Amb aquests antecedents i en col·laboració amb la Dra. Clàudia Cases del Laboratori de Bioinvestigació de Merck Farma i Química, S. A., es va plantejar la possibilitat d'immobilitzar el peptòide N13-13-10C (**17**) a un suport sòlid seguint dues estratègies:

- ♥ Enllaçar el peptòide N13-13-10C-biotinilat a una columna d'agarosa-avidina.
- ♥ Enllaçar el peptòide N13-13-10C a una columna de sefarosa EAH.

Aquest estudi podria servir de base, a més, per aplicar-lo a altres casos de peptoides identificats davant de dianes proteiques desconegudes.

Per dur a terme les estratègies anteriors, calia obtenir el peptoide amb un àcid carboxílic al seu extrem C-terminal per poder enllaçar-lo als grups amino del corresponent espaiador. Aprofitant la nostra experiència en la síntesi en fase sòlida de peptoides, es van plantejar dues maneres d'obtenir peptoides àcids amb rendiments elevats i pureses acceptables, les quals s'han esquematitzat a la Figura 7.2.

Per una banda, es podria dur a terme la hidròlisi en dissolució de l'amida terminal dels peptoides (vegeu Figura 7.2, A) i, per l'altra, es podrien sintetitzar els peptoides àcids en fase sòlida seguint l'estratègia del submonòmer de Zuckermann i col.,^{54,55} però amb resines que permetin l'obtenció d'un extrem àcid després de l'escissió final (vegeu Figura 7.2, B).

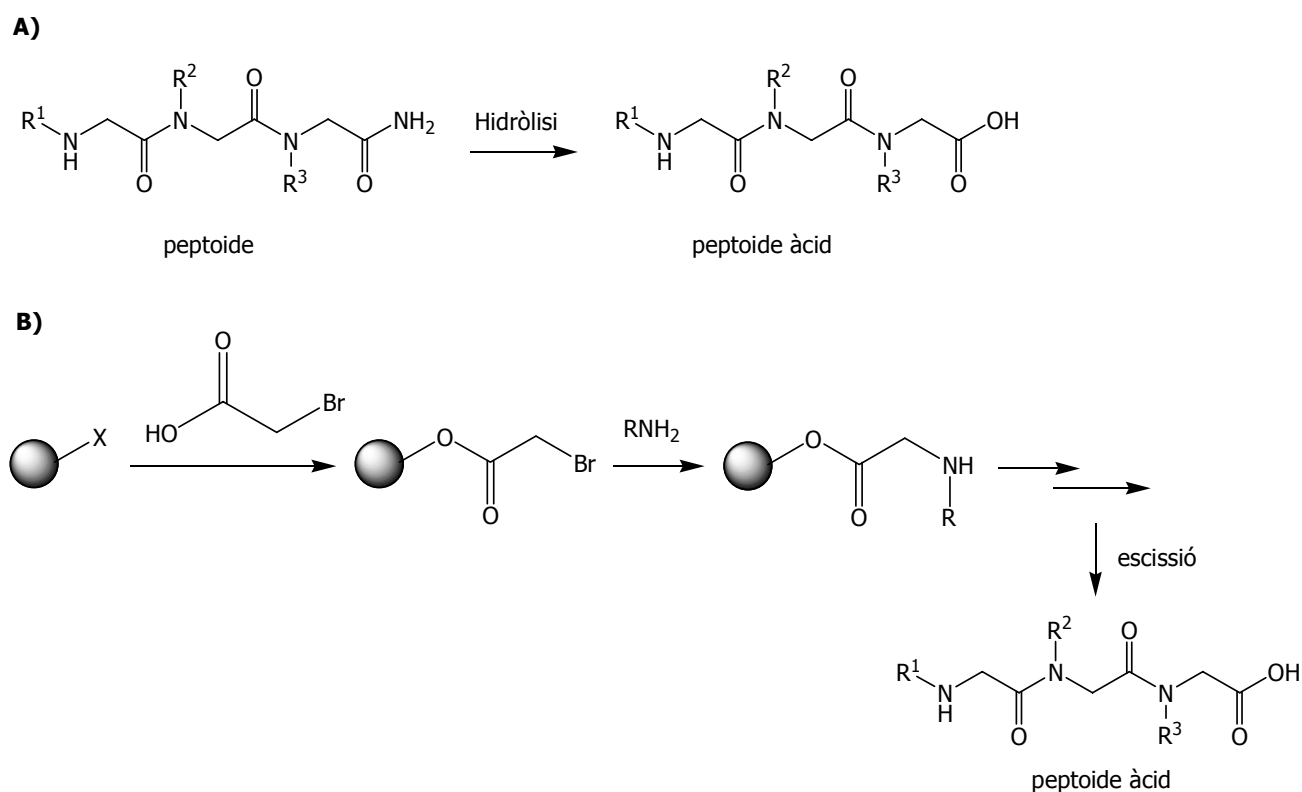


Figura 7.2. Dues estratègies per obtenir peptoides àcids: hidròlisi de peptoides en dissolució (A) i síntesi de peptoides àcids en fase sòlida emprant l'estratègia del submonòmer (B). X= OH, Cl.

Per altra banda, dels estudis realitzats per fer reaccionar el peptoide àcid de N13-13-10C pel seu extrem carboxílic, es va observar la capacitat d'un peptoide àcid per formar dímers cíclics en dissolució amb l'activació apropiada, tot aprofitant la presència en la seva

estructura d'una amina secundària *N*-terminal i d'un àcid carboxílic terminal. D'aquestes observacions se'n va derivar un estudi d'optimització de síntesi de peptoides dímers i de peptoides dímers-cíclics en dissolució, el qual s'explicarà també al llarg d'aquesta segona part de la memòria.

Cal recordar que tot i que un compost cap de sèrie mostri una activitat i selectivitat elevades davant una determinada diana, generalment encara continua estant lluny de l'activitat que mostra un bon anticòs davant la seva proteïna diana, amb una constant d'equilibri d'afinitat de l'ordre de 10^9 M. No obstant, els anticossos presenten una sèrie de limitacions, ja que el seu procés de producció és car, llarg i tediós, i a més han de mantenir una estructura tridimensional per poder dur a terme les seves funcions. Per aquest motiu, una estratègia que presenta gran interès en la recerca de nous fàrmacs és enllaçar dos o més lligands no competitiu amb una afinitat moderada per una determinada proteïna diana, de tal manera que es generi un compost bivalent amb una elevada afinitat per a la proteïna en qüestió.¹¹⁹⁻¹²¹ L'elecció de l'espaiador amb la longitud i la geometria més adequades seria un punt clau en aquesta estratègia.

En el cas dels peptoides, el fet d'haver modificat la seva estructura per tenir un àcid carboxílic en l'extrem C-terminal obre una via molt interessant per poder acoblar al peptoides altres molècules amb activitat biològica per una determinada diana, amb l'objectiu d'obtenir lligands bivalents amb una afinitat i selectivitat pel receptor més elevada que la de cada molècula per separat.

8. OBTENCIÓ DE PEPTOIDES ÀCIDS

8.1. CRITERI DE NOMENCLATURA DELS PEPTOIDES ÀCIDS

La forma d'anomenar els peptoides àcids es fa seguint el mateix criteri emprat per als peptoides, el qual s'ha detallat a l'apartat 3.3 de la part I de la memòria.

Per evitar confusions a l'hora de diferenciar els peptoides dels peptoides àcids, s'especificarà la terminació $-COOH$ per anomenar els peptoides àcids en la seva forma abreujada, l'**NAx-Ay-AzCOOH**, on **Ax**, **Ay** i **Az** indiquen les amines utilitzades a cada posició de diversitat (R^1 , R^2 i R^3).

8.2. HIDRÒLISI DE PEPTOIDES

La hidròlisi de l'amida terminal d'un peptoide per obtenir el seu corresponent peptoide àcid va ser la primera opció que es va plantejar, aprofitant que ja es tenia optimitzada la síntesi de peptoides en fase sòlida amb rendiments de l'entorn del 40-60%, després d'una

purificació final per HPLC a escala semipreparativa, i amb pureses superiors en tots els casos al 98% per HPLC.

En la bibliografia hi ha diferents mètodes per hidrolitzar amides primàries: amb hidròxid sòdic,¹²² peròxid sòdic,¹²³ àcid sulfúric,^{124,125} tetraòxid de dinitrogen¹²⁶ o amb l'ús de resines d'intercanvi iònic.¹²⁷⁻¹³⁰

No obstant, calia un mètode d'hidròlisi que permetés hidrolitzar de forma selectiva una amida primària terminal davant de les amides disubstituïdes internes de l'estructura d'un peptòide. En el cas dels trímers d'*N*-alquilglicina trobem dues amides disubstituïdes internes susceptibles de ser hidrolitzades (vegeu Figura 8.1).

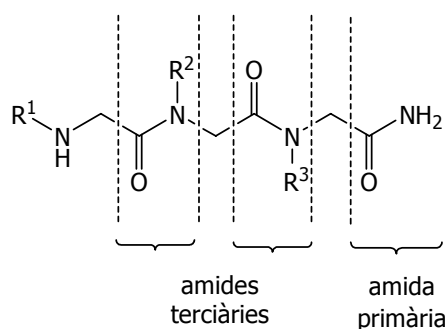


Figura 8.1. Amides terciàries centrals i amida primària terminal d'un peptòide, trímer d'*N*-alquilglicina.

Deponent de la naturalesa del compost i de la seva solubilitat, pot ser més adequat treballar en medi àcid o bàsic. Així doncs, es van realitzar diferents proves d'hidròlisi en medi àcid, en medi bàsic i amb resina d'intercanvi iònic, fins a trobar les condicions òptimes per a la hidròlisi. Per realitzar les diferents proves es va fer servir l'*N*10-15-15C, com a peptòide model, el qual es va sintetitzar en fase sòlida tal i com s'ha explicat a l'apartat 3.6. No es va realitzar cap purificació addicional després de l'escissió del peptòide de la resina, amb la idea d'establir un mètode general d'obtenció de peptòides àcids on, si calia, es realitzés la purificació del compost a l'etapa final de la síntesi.

8.2.1. HIDRÒLISI DE PEPTOIDES EN MEDI ÀCID

Seguint el procediment per hidrolitzar amides primàries mitjançant una reacció de diazotització descrita per Ladenheim i col.,¹²⁵ es va fer reaccionar el peptoide N10-15-15C dissolt en una mescla d'H₂SO₄ 1 M/ACN amb NaNO₂. Cal tenir en compte que el NaNO₂ s'ha d'afegir en un gran excés al medi de reacció (20-100 eq.) degut a la volatilitat de l'àcid nítrós que es genera, el qual és el causant de la diazotització de l'amida primària. Després de 2 h de reacció, una alíquota del cru es va analitzar per HPLC i es va observar la desaparició del peptoide ($t_r=16.8$ min) i l'aparició de dos nous pics ($t_r=1.6$ i 3.8 min). No obstant, les anàlisis per espectrometria de masses d'aquest cru de reacció no van mostrar la presència del peptoide àcid.

Tot i variar la quantitat de NaNO₂ adicionada a la reacció, en cap cas no es va arribar a observar la presència del peptoide àcid. També es va realitzar una prova anàloga a l'anterior però en un 10% d'H₂SO₄, sense afegir NaNO₂ i mantenint la mescla de reacció en condicions d'ebullició durant 2 h. Els resultats de la reacció van tornar a ser negatius.

8.2.2. HIDRÒLISI DE PEPTOIDES EN MEDI BÀSIC

La hidròlisi del peptoide N10-15-15C en medi bàsic es va dur a terme amb una dissolució de NaOH al 10%. Per accelerar la reacció es va escalfar la mescla fins a 90 °C durant 2 h, fins que per HPLC es va observar la desaparició del peptoide ($t_r=16.8$ min) i l'aparició de 3 nous pics amb percentatges d'àrea per HPLC força similars (vegeu Figura 8.2).

Les anàlisis per espectrometria de masses van mostrar la presència del peptoide àcid N10-15-15COOH ($t_r=17.8$ min), així com els productes resultants de la hidròlisi d'una de les amides terciàries del peptoide, l'N10-15COOH i l'N15COOH ($t_r=13.4$ i 9.3 min, respectivament). L'estructura dels tres productes obtinguts es mostra a la Figura 8.3.

Per minimitzar aquestes hidròlisis no desitjades, es van variar tres factors perquè les condicions de reacció fossin més suaus i selectives: la concentració de la dissolució de NaOH (5, 10 i 15%), la temperatura de reacció (t.a., 50, 65 i 80 °C) i el temps de reacció (entre 5 min i 3 h). Igualment, es van realitzar diverses proves utilitzant radiació de microones. No obstant, en cap cas no es va poder evitar completament la hidròlisi de l'amida terciària que s'havia observat, obtenint-se el peptoide àcid amb pureses inferiors al 75% per HPLC.

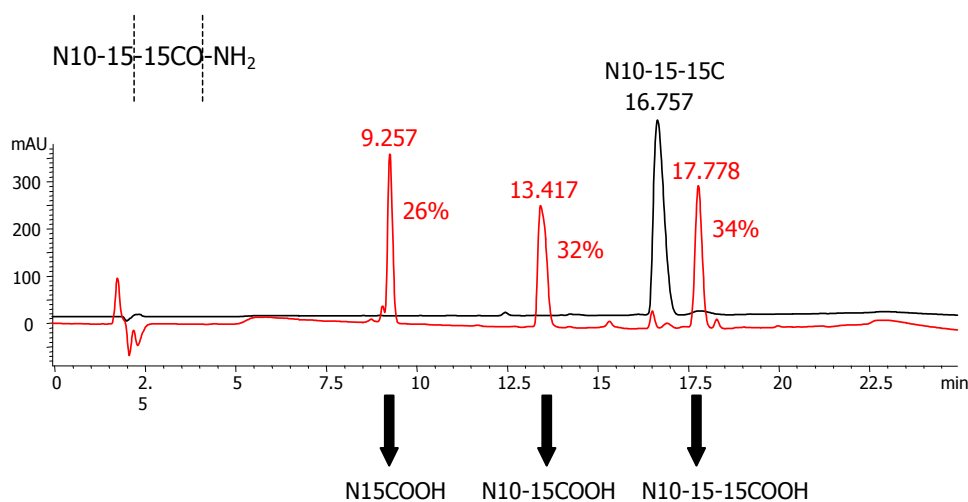


Figura 8.2. Perfil cromatogràfic del peptòide N10-15-15C (color negre) i de la hidròlisi en medi bàsic de l'amida primària terminal i d'una de les amides terciàries del peptòide (color vermell). A cada pic s'indica el seu temps de retenció (en min.), així com el seu percentatge per HPLC.

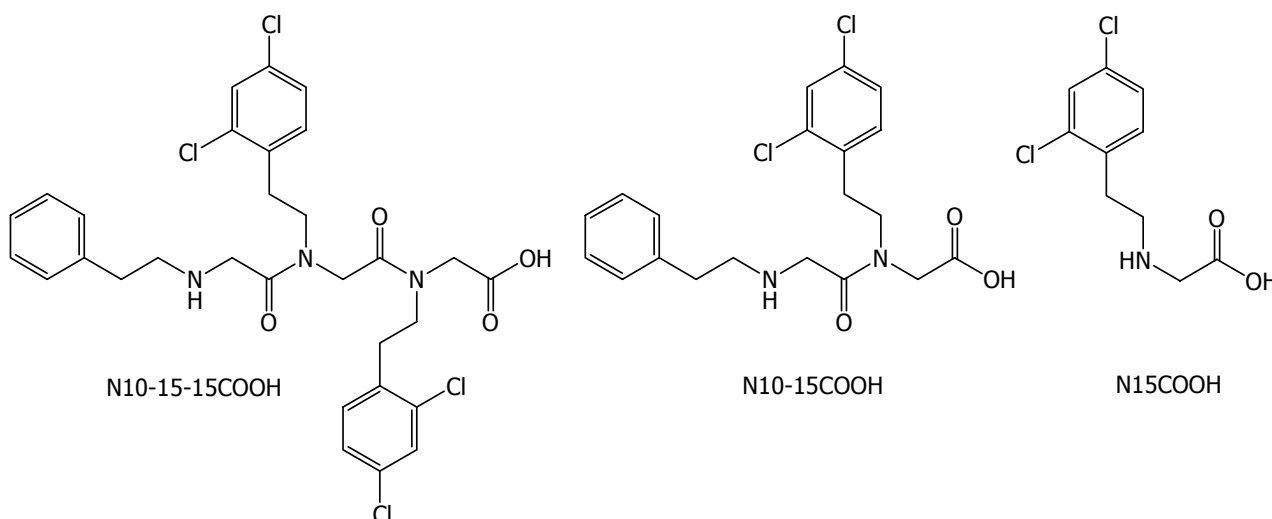


Figura 8.3. Estructura del peptòide àcid N10-15-15COOH, així com dels subproductes d'hidròlisi N10-15COOH i N15COOH.

Cal fer constar que, curiosament, en totes les proves realitzades amb el peptòide en estudi N10-15-15C, l'amida terciària que es va hidrolitzar va ser la més pròxima a l'extrem carboxílic, i en cap cas no es van observar els productes provinents de la hidròlisi de l'amida terciària més pròxima a l'extrem *N*-terminal, l'*N*10COOH i l'*N*15-15COOH.

Tot i la possibilitat de purificar el peptòide àcid dels altres dos subproductes formats per HPLC a escala semipreparativa, es va decidir continuar amb aquest estudi d'hidròlisi per trobar les condicions per poder establir un mètode general d'obtenció de peptòides àcids

amb pureses suficientment elevades, que no requerís la necessitat d'una purificació addicional per HPLC, la qual seria inviable quan es treballés amb un nombre elevat de peptoides àcids.

8.2.3. HIDRÒLISI DE PEPTOIDES EN FASE SÒLIDA. DISSENY D'EXPERIMENTS

Al llarg de la primera part de la memòria s'ha comentat com la síntesi de peptoides en fase sòlida amb resina de tipus Rink amida va permetre obtenir peptoides amb uns rendiments i unes pureses prou elevades. El procediment d'escissió utilitzat en una síntesi convencional de peptoides en fase sòlida requereix un còctel de TFA/DCM/H₂O de proporcions 60:40:2, el qual s'afegeix a la resina i la mescla resultant es manté en agitació a temperatura ambient i durant 30 min (vegeu Figura 8.4, A).

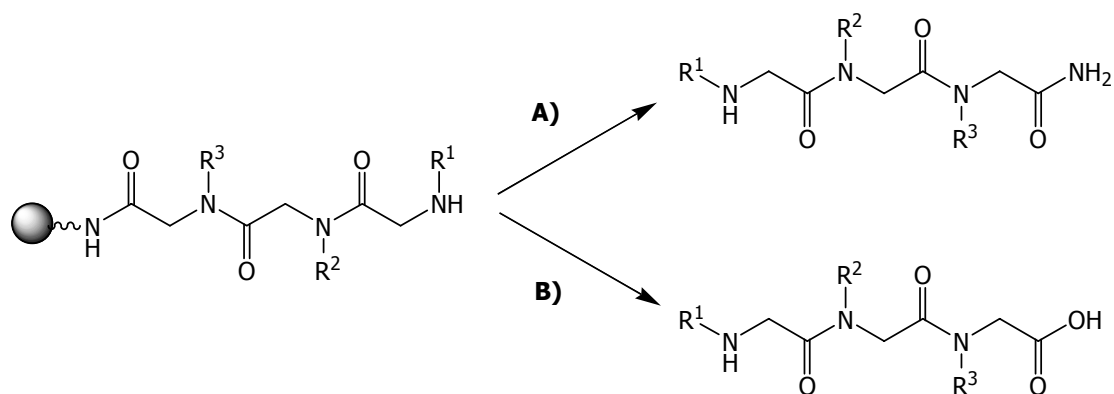


Figura 8.4. Etapa d'escissió d'un peptoid de la resina. Procediment A: còctel d'escissió convencional per obtenir peptoides. Procediment B: escissió de la resina per obtenir peptoides amb un extrem carboxílic.

Ens vam plantejar variar les condicions del còctel d'escissió perquè permetés obtenir directament el peptoid àcid en aquesta etapa (vegeu Figura 8.4, B). D'aquesta manera no caldria haver de realitzar una hidròlisi addicional després de l'escissió i, possiblement, s'evitaria la formació dels productes secundaris d'hidròlisi no desitjats que s'havien observat en medi bàsic.

Per estudiar els factors més importants involucrats en l'escissió d'un peptoid de la resina d'una forma sistemàtica es pot procedir de dues formes diferents.¹³¹ Una consisteix en variar sistemàticament els paràmetres que creiem que poden influir en el sistema i estudiar el

resultat obtingut per decidir el nou canvi que cal fer. L'altra forma consisteix en el plantejament de les tècniques del disseny d'experiments, les quals segueixen un pla de treball que estalvia un gran esforç, ja que modifiquen les variables d'una manera dirigida i amb un mínim nombre d'experiments per tal que aportin la informació necessària.

Per desenvolupar un disseny d'experiments, primer cal introduir els factors. Aquests elements són aquelles variables independents que tenen una influència sobre el sistema que es vol estudiar i condueixen a una resposta determinada. Els factors poden ser incontrolats, controlables constants i controlables no constants mentre s'aplica l'experiment. Per altra banda, els factors poden ser quantitius, com ara la temperatura o la concentració d'un reactiu, o qualitius, com la presència o absència d'un catalitzador. Un pla detallat d'una sèrie d'experiments pot donar la informació necessària per diferenciar les variables essencials de les no essencials, així com la direcció cap al resultat òptim.

Per fer l'estudi del disseny factorial complet s'haurien de realitzar n^f combinacions d'experiments on n és el nombre de nivells emprats per a cada factor i f els factors estudiats. Com es pot veure, el nombre d'experiments augmenta ràpidament en fer-ho el nombre de factors i molt més en augmentar el nombre de nivells. Per aquest motiu, en una primera fase de la recerca s'empren els dissenys factorials parcials, els quals permeten avaluar els efectes principals, les interaccions entre dues variables i les interaccions multivariables treballant amb una fracció del disseny complet. A partir de l'anàlisi estadística dels resultats, s'obtenen les dades que permeten descriure el procés com una funció polinòmica depenent de cada variable essencial, la qual inclou termes lineals, termes quadràtics i termes d'interacció de segon ordre. Els coeficients dels factors descriuen la importància de cada factor estudiat, així com les interaccions entre les variables. Amb aquesta funció es pot buscar les condicions òptimes de cada factor per a obtenir un valor màxim o mínim segons ens convingui.

En el tractament de les dades per a cada resposta s'empren programes d'anàlisi estadística, com el programa Statgraphics,¹³² els quals donen les taules ANOVA on es veu el canvi provocat en la resposta per efecte d'un factor en passar del nivell baix al nivell alt que hem determinat prèviament.

Així doncs, es va desenvolupar un disseny d'experiments per trobar les condicions òptimes de formació de peptoides àcids en l'etapa d'escissió de la fase sòlida. Aquest treball es va realitzar amb la col·laboració del Dr. Albert Manich de l'IIQAB (CSIC).

8.2.3.1. Elecció dels factors a estudiar en el procediment d'escissió

A partir de les condicions del còctel d'escissió convencionals utilitzades per escindir els peptoides del suport sòlid (60TFA : 40DCM : 2H₂O, t.a., 30 min), es van escollir els factors que podien influir en el procediment d'escissió: el percentatge de TFA (**% de TFA**), el percentatge d'H₂O (**% d'H₂O**), la temperatura de la mescla d'escissió (**T**) i el temps d'escissió (**t**). Cadascun d'aquests factors es va estudiar a tres nivells: alt, mig i baix (vegeu Taula 8.1). Aquests tres nivells es van escollir de manera que les condicions estàndard del procediment d'escissió van determinar el nivell mig, i a partir d'elles es van escollir valors més elevats (nivell alt) i menors (nivell baix), per estudiar l'efecte que provocaven sobre l'escissió del peptoides de la resina.

Taula 8.1. Valors numèrics dels tres nivells escollits per a cada factor estudiat al disseny d'experiments per a l'escissió del peptoides N10-15-15C de la resina.

FACTOR	NIVELL		
	Baix	Mig	Alt
% de TFA	40	60	80
% d'H ₂ O	0.5	2	8
T (°C)	10	25	40
t (min)	15	30	60

8.2.3.2. Plantejament del disseny d'experiments

En els nostres estudis es va plantejar emprar un disseny d'experiments parcial segons la metodologia descrita per Box-Behnken.¹³³ El nombre d'experiments a realitzar en aquest disseny factorial parcial es relaciona amb la fórmula n^{f-1} , on n és el nombre de nivells emprats per a cada factor (en el nostre cas, $n=3$) i f és el nombre de factors estudiats (en el nostre cas, $f=4$), donant lloc a 27 experiments. Aquesta matriu d'experiments ens permetia modificar les variables d'una forma racional i amb un mínim d'experiments.

8.2.3.3. Resultats del disseny d'experiments

Es va procedir a la realització dels 27 experiments per a l'escissió del peptòide N10-15-15C de la resina, emprant cadascuna de les variables establertes en el disseny d'experiments parcial (vegeu Taula 8.2).

Els residus resultants de cada experiment es van analitzar per HPLC, però només es va observar el peptòide N10-15-15C i en cap cas no es va observar el corresponent peptòide àcid N10-15-15COOH.

Així doncs, les variacions dels factors estudiats no van afectar al procediment d'escissió del peptòide de la resina, motiu pel qual vam abandonar aquesta via per obtenir peptòides àcids.

Taula 8.2. Valors determinats en el disseny d'experiments parcial per a cadascun dels quatre factors estudiats pel procediment d'escissió del peptòide N10-15-15C de la resina.

Experiment	% TFA	% H ₂ O	T (°C)	t (min)
1	40	0.5	25	30
2	80	0.5	25	30
3	40	8	25	30
4	80	8	25	30
5	60	2	10	15
6	60	2	40	15
7	60	2	10	60
8	60	2	40	60
9	40	2	25	15
10	80	2	25	15
11	40	2	25	60
12	80	2	25	60
13	60	0.5	10	30
14	60	8	10	30
15	60	0.5	40	30
16	60	8	40	30
17	40	2	10	30
18	80	2	10	30
19	40	2	40	30
20	80	2	40	30
21	60	0.5	25	15
22	60	8	25	15
23	60	0.5	25	60
24	60	8	25	60
25	60	2	25	30
26	60	2	25	30
27	60	2	25	30

8.2.4. HIDRÒLISI DE PEPTOIDES AMB RESINA D'INTERCANVI IÒNIC. DISSENY D'EXPERIMENTS

Ja s'ha comentat en aquest capítol que un dels mètodes emprats per hidrolitzar selectivament amides primàries davant amides secundàries i terciàries, fa servir unes condicions d'hidròlisi suaus mitjançant l'ús de resines d'intercanvi iònic. Concretament, les més utilitzades són resines àcides amb grups sulfònics, Amberlyst-15 i Amberlite IR 120.¹²⁷⁻¹³⁰

Així per exemple, Greenlee i Thorsett¹²⁷ van fer servir la resina Amberlyst-15 (amb 15 eq.) per hidrolitzar selectivament diferents famílies de carboxamides no substituïdes en presència d'altres amides en l'estructura, incloent enllaços peptídics, i d'altres grups funcionals susceptibles de ser hidrolitzats. La reacció es va dur a terme entre 60 i 100 °C, i durant un temps de reacció variable, depenent de la carboxamida en qüestió.

Seguint aquest procediment, es va dur a terme la hidròlisi del peptoid N10-15-15C amb resina de tipus Amberlyst-15. Es van realitzar unes proves inicials que van mostrar una hidròlisi del peptoid de forma selectiva en la seva amida terminal, observant-se per HPLC únicament un pic corresponent al peptoid àcid i en cap cas els subproductes d'hidròlisi de les amides terciàries. No obstant, tot i ser una reacció selectiva, la velocitat d'hidròlisi era bastant lenta. Aquests resultats inicials ens van portar al plantejament d'un segon disseny d'experiments per estudiar els factors més importants involucrats en la hidròlisi d'un peptoid amb resina d'intercanvi iònic que aportés la informació necessària per trobar les condicions òptimes de formació de peptoides àcids.

8.2.4.1. Elecció dels factors a estudiar en la reacció d'hidròlisi

Per escollir els factors claus que podien influir en el sistema per a la hidròlisi dels peptoides, ens vam basar en els paràmetres més importants que es van estudiar en la hidròlisi selectiva de diferents carboxamides amb resina Amberlyst-15 pel grup de Greenlee i Thorsett.¹²⁷

Així doncs, els factors que es van decidir estudiar van ser: el nombre d'equivalents de resina Amberlyst-15 (**eq. resina Amberlyst**), la temperatura de la reacció (**T**), el temps de reacció (**t**) i el percentatge d'H₂O en la mescla de reacció (**% d'H₂O**). Cadascun d'aquests factors es va estudiar a tres nivells: alt, mig i baix (vegeu Taula 8.3). Aquests nivells es van

definir a partir dels valors utilitzats per a cada factor en les proves inicials d'hidròlisi que es van realitzar.

Taula 8.3. Valors numèrics dels tres nivells escollits per a cada factor estudiat al disseny d'experiments per a la hidròlisi del peptoide N10-15-15C amb resina d'intercanvi iònic.

FACTOR	NIVELL		
	Baix	Mig	Alt
eq. resina Amberlyst	10	20	30
T (°C)	30	60	90
t (min)	30	60	120
% d'H ₂ O	2	4	8

8.2.4.2. Plantejament del disseny d'experiments

Tal i com s'ha explicat a l'apartat 8.2.3.2, es va plantejar un disseny d'experiments parcial. El nombre de nivells emprats per a cada factor va ser de 3 ($n=3$) i el nombre de factors estudiats va ser de 4 ($f=4$), donant lloc a 27 experiments (n^{f1}).

8.2.4.3. Resultats del disseny d'experiments

Es va procedir a la realització dels 27 experiments per dur a terme la hidròlisi del peptoide N10-15-15C, emprant cadascuna de les variables establertes en el disseny d'experiments parcial (vegeu Taula 8.4).

Els residus resultants de cada experiment es van analitzar per HPLC i es va determinar la quantitat present del peptoide N10-15-15C i del peptoide àcid N10-15-15COOH (percentatges determinats per HPLC, vegeu Taula 8.4). En aquest cas, es van poder seleccionar dos experiments d'aquest estudi, el 4 i el 16, els quals mostraven valors de conversió per HPLC en peptoide àcid superiors al 90% (96 i 94%, respectivament).

Taula 8.4. Valors determinats en el disseny d'experiments parcial per a cadascun dels quatre factors estudiats en la hidròlisi de N10-15-15C amb resina d'intercanvi iònic. Es mostren els percentatges de peptoide N10-15-15C i de peptoide àcid N10-15-15COOH presents a cada experiment, determinats per HPLC. En negreta es mostren els dos experiments que van mostrar percentatges de conversió al peptoide àcid superiors al 90%, per HPLC.

Experiment	Resina Amberlyst (eq.)	T (°C)	t (min)	% d'H ₂ O	% peptoide	% peptoide àcid
1	10	30	60	4	93	7
2	30	30	60	4	91	9
3	10	90	60	4	33	67
4	30	90	60	4	4	96
5	20	60	30	2	85	15
6	20	60	120	2	45	55
7	20	60	30	8	87	13
8	20	60	120	8	58	42
9	10	60	60	2	93	7
10	30	60	60	2	53	47
11	10	60	60	8	82	18
12	30	60	60	8	72	28
13	20	30	30	4	94	6
14	20	90	30	4	31	69
15	20	30	120	4	86	14
16	20	90	120	4	6	94
17	10	60	30	4	91	9
18	30	60	30	4	74	26
19	10	60	120	4	73	27
20	30	60	120	4	35	65
21	20	30	60	2	88	12
22	20	90	60	2	13	87
23	20	30	60	8	95	5
24	20	90	60	8	13	87
25	20	60	60	4	70	30
26	20	60	60	4	70	30
27	20	60	60	4	70	30

8.2.4.4. Anàlisi de dades

Per dur a terme l'anàlisi estadística de les dades es va emprar el programa Statgraphics,¹³² el qual permet obtenir les taules d'ANOVA per a cadascuna de les respostes. Aquestes taules avaluen la importància de cada efecte comparant el quadrat de la mitja amb el valor estimat de l'error experimental, obtenint-se els valors de P (probabilitat que l'efecte observat sigui degut a l'atzar). Tots els valors de P inferiors a 0.05 indiquen que són significativament diferents de zero i, per tant, que hi ha un efecte rellevant. En canvi, els valors de P superiors a 0.1 poden ser deguts a l'atzar i no es tenen en consideració en la

següent taula d'ANOVA. Aquesta metodologia es repeteix fins que queden únicament els factors amb valors de P inferiors a 0.05. A partir d'aquest moment, el procés es pot descriure com una funció polinòmica dependent de cada variable essencial. Aquesta funció descriu la relació de la resposta en cadascun dels factors estudiats per uns coeficients, els quals mostren la importància de cada factor i de les interaccions entre les variables.

Així doncs, segons l'estudi de les dades obtingudes dels 27 experiments es van obtenir els coeficients dels factors que inflüen en el procés d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C, ajustant-se a la funció següent: ****

$$\begin{aligned} \% \text{ Peptoide} = & 104.73 - 0.23 \times \text{eq. resina Amberlyst} + 1.42 \times T - 2.75 \times t - 12.5 \times \% \\ & \text{d'H}_2\text{O} - 0.02 \times \text{eq. resina Amberlyst} \times T - 0.53 \times \text{eq. resina Amberlyst} \times t + 0.75 \\ & \times \text{eq. resina Amberlyst} \times \% \text{ d'H}_2\text{O} - 0.02 \times T^2 \end{aligned}$$

El programa Statgraphics ens va indicar que els factors **eq. resina Amberlyst**, **T** i **t** jugaven un paper important en la hidròlisi del peptoide, mentre que el factor **% d'H₂O** no semblava tenir un efecte rellevant.

A partir dels valors determinats pel programa per a cada factor, per obtenir un 0% de peptoide en el residu final, i dels valors emprats per a cada factor en els experiments 4 i 16, en els quals es va obtenir una conversió en peptoide àcid superior al 90%, es van establir els valors òptims dels quatre factors per a un procediment general d'hidròlisi d'un peptoide (vegeu Taula 8.5).

Amb aquestes condicions de reacció establertes es va dur a terme la hidròlisi del peptoide N10-15-15C, obtenint-se una conversió en peptoide àcid N10-15-15COOH pràcticament quantitativa, tal i com es pot veure a la Figura 8.5.

Tanmateix, l'elevat nombre d'equivalents de resina Amberlyst-15 necessaris per a la reacció d'hidròlisi (30 eq.) ens va fer plantejar la possibilitat de la seva reutilització per altres reaccions d'hidròlisi. Així doncs, després de realitzar una primera reacció d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C, es va rentar la resina amb una dissolució aquosa de NaCl al 5% i amb una dissolució d'HCl al 10%, i finalment es va rentar amb metanol. Amb aquesta resina es va

**** Per realitzar els càlculs, els valors del factor temps s'han tingut en compte segons la fórmula 15×2^x , on $x=1, 2$ i 3 per $t=30, 60$ i 120 min, respectivament. En el cas dels valors del factor $\% \text{ d'H}_2\text{O}$, la fórmula emprada va ser 2^x , on $x=1, 2$ i 3 per $2, 4$ i 8% d'H₂O, respectivament.

realitzar una segona reacció d'hidròlisi amb N10-15-15C, observant-se el mateix perfil cromatogràfic que a la primera reacció. D'aquesta manera va quedar demostrat que la resina Amberlyst-15 es podia reutilitzar.

Taula 8.5. Valors òptims de cada factor estudiat determinats pel programa Statgraphics i pels experiments 4 i 16 del disseny d'experiments per a la hidròlisi de N10-15-15C amb resina d'intercanvi iònic. També s'indiquen els valors òptims establerts per a un procediment general d'hidròlisi.

	Resina Amberlyst (eq.)	T (°C)	t (min)	% d'H₂O
Programa Statgraphics	25	90	70	2
Exp. 4	30	90	60	4
Exp. 16	20	90	120	4
Condicions establertes	30	90	120	4

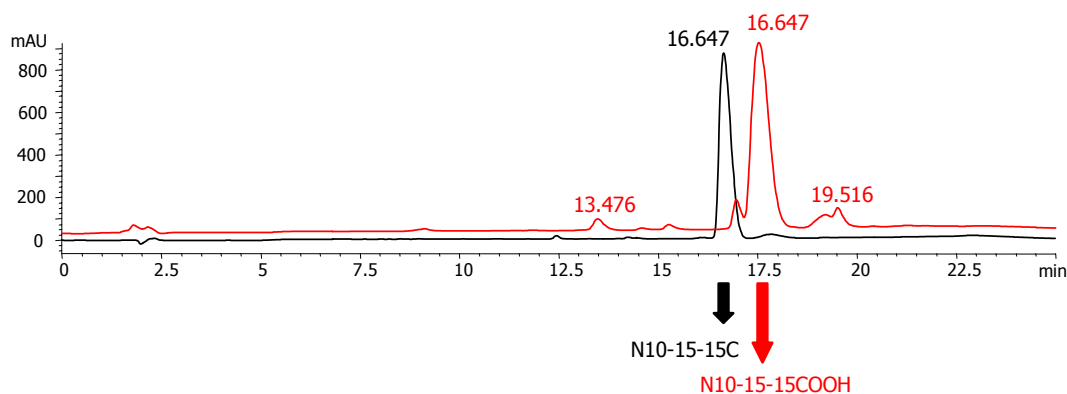


Figura 8.5. Perfil cromatogràfic d'HPLC del peptòide N10-15-15C (color negre) i del residu de la reacció d'hidròlisi (color vermell).

8.2.4.5. Hidròlisi de peptoides amb resina Amberlyst-15

Amb les condicions òptimes determinades amb el disseny d'experiments per al procediment general d'obtenció de peptoides àcids amb resina Amberlyst-15, es va dur a terme la hidròlisi de diferents peptoides: N13-13-10C, N10-13-10C, N10-20-20C, N13-15-20C, N4-15-20C, N12-1-20C i N37-15-15C.

En tots els casos les conversions van resultar quantitatives i els crus de reacció van mostrar pureses superiors al 90% per HPLC (vegeu Figura 8.6).

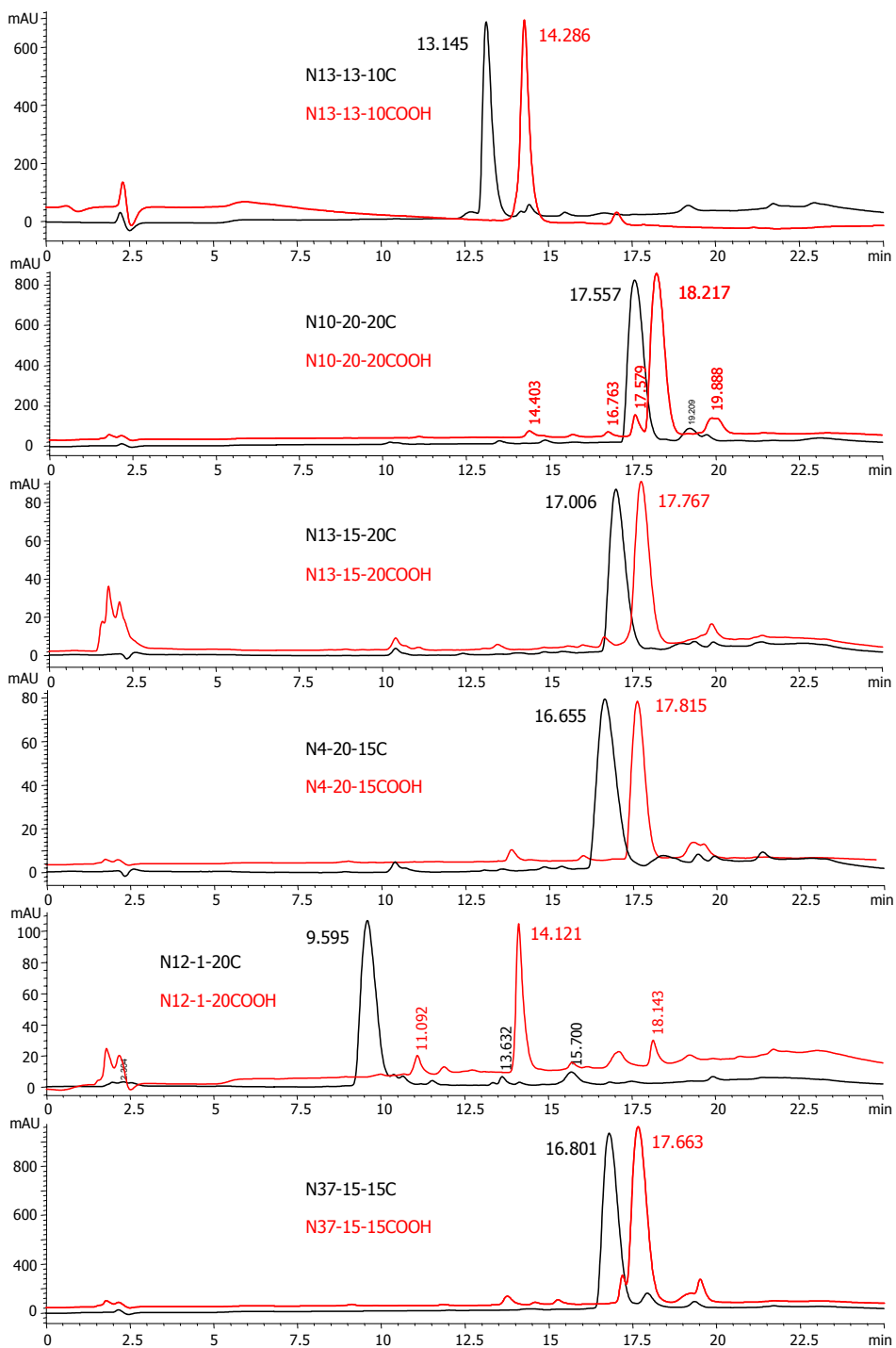


Figura 8.6. Perfils cromatogràfics d'HPLC dels crus de reacció de peptoides (color negre) i dels residus resultants de la seva hidròlisi per obtenir els corresponents derivats àcids (color vermell).

8.3. SÍNTESI DE PEPTOIDES ÀCIDS EN FASE SÒLIDA

La síntesi en fase sòlida de molècules orgàniques de pes molecular baix ha tingut un gran impacte per a la síntesi de quimiotèques de compostos amb interès en l'àmbit farmacèutic. Generalment, el compost es troba ancorat al suport sòlid mitjançant un enllaç amida que permet l'obtenció de productes amb amides primàries terminals després de l'etapa d'escissió, o bé mitjançant un enllaç ester, el qual proporciona productes amb un àcid carboxílic terminal.

Tot i haver optimitzat un mètode general d'hidròlisi de l'amida terminal dels peptoides en dissolució per obtenir peptoides àcids amb la resina Amberlyst-15, vam plantejar-nos la possibilitat de sintetitzar els peptoides àcids en fase sòlida, d'una forma anàloga a la síntesi de peptoides. D'aquesta manera s'evitaria l'etapa addicional d'hidròlisi en dissolució.

Al llarg d'aquest apartat s'explicaran els diferents tipus de resina utilitzats per a la síntesi de peptoides àcids i els resultats obtinguts en cada cas. Es va fer un esforç d'optimització de la síntesi per obtenir peptoides àcids amb rendiments i pureses acceptables que no requerissin d'una purificació final del residu obtingut, ja que ens interessava la idea de sintetitzar una quimioteca de peptoides àcids en un futur.

8.3.1. PLANTEJAMENT DE LA SÍNTESI

La seqüència plantejada per a la síntesi general de peptoides àcids en fase sòlida es mostra a la Figura 8.7.

És una seqüència anàloga a la seguida per a la síntesi de peptoides en fase sòlida mostrada a l'apartat 3.5.1, però el grup funcional de la resina permet tenir esters enllaçats a la fase sòlida, de tal manera que després de l'etapa d'escissió final s'obtenen peptoides amb un àcid carboxílic terminal.

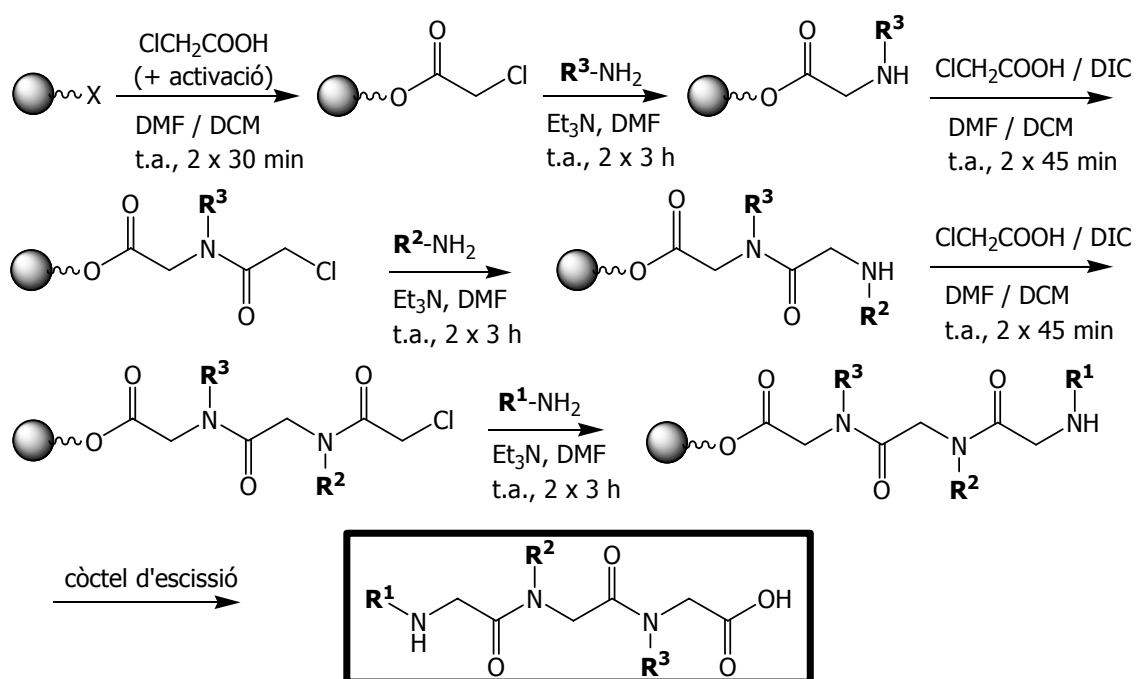


Figura 8.7. Plantejament sintètic per obtenir peptoides àcids en fase sòlida: etapes d'acilacions i d'aminacions successives, i d'escissió final. En la primera etapa d'acilació, l'activació de l'àcid cloroacètic depèn dels grups funcionals units a la resina. En l'etapa d'escissió final, el còctel emprat depèn també del tipus de resina utilitzada. $\text{X}=\text{Cl}, \text{OH}$.

8.3.2. ELECCIÓ DEL SUPORT SÒLID

Als catàlegs comercials trobem un ampli ventall de resines que tenen acoblats els espaiadors o *linkers* amb les funcionalitats adequades per enllaçar àcids carboxílics i, després de dur a terme la seqüència sintètica desitjada, procedir a l'escissió per obtenir un compost amb un àcid carboxílic terminal.

Entre els diferents tipus d'espaiadors trobem aquells que es poden escindir de la resina en condicions fortament àcides, com és el cas de la resina de Merrifield,^{13,134} la qual requereix l'ús d'àcids com HBr o HF per eliminar els grups protectors utilitzats durant la síntesi i/o per l'escissió final del producte de la resina.

Per evitar treballar en condicions tan àcides, s'han desenvolupat altres tipus d'espaiadors que contenen grups donadors d'electrons (grups metoxi, alcoxi o fenils), els quals estableixen el carbocatió generat en el procés d'escissió i que, en conseqüència, disminueixen l'acidesa necessària per a l'escissió del producte de la resina. Entre els espaiadors que s'escindeixen en condicions àcides més suaus es troben els espaiadors de tipus Wang,¹³⁵ SASRIN,^{136,137} Rink,¹³⁸ HAL¹³⁹ i tritil^{140,141} (vegeu Figura 8.8).

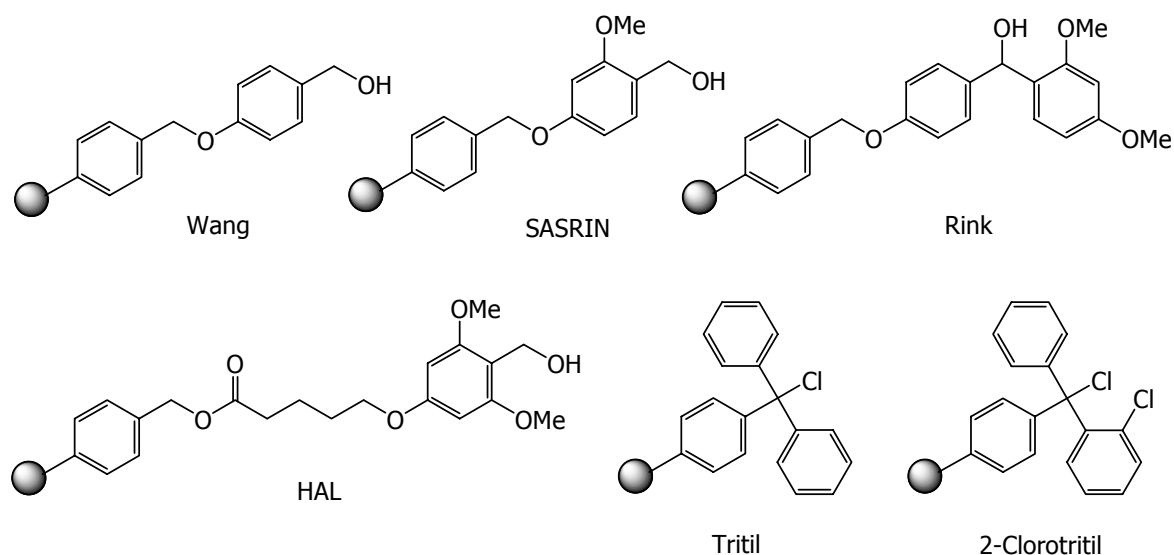


Figura 8.8. Espaiadors que s'escindeixen en condicions àcides suaus i que permeten una funcionalització de tipus ester.

Entre aquests espaiadors, els que són de tipus alcohol *p*-alcoixibenzilíc presenten un inconvenient important per a la química de pèptids. Després de la introducció del segon aminoàcid i de la desprotecció del grup amino, a l'hora de continuar amb la síntesi del pèptid pot tenir lloc una reacció secundària de ciclació intramolecular i formació de dicetopiperazines (DKPs, dipèptid cíclic),⁶² les quals provoquen el trencament de la cadena peptídica i la formació de grups hidroximetil en el suport sòlid que poden ser susceptibles de tornar a ser acilats, continuar la síntesi i donar lloc a pèptids de dimensió més petita.

Un altre inconvenient que presenten els espaiadors basats en una funcionalització de tipus ester benzilíc, és l'aminòlisi potencial que pot tenir lloc en les etapes d'acoblament d'amina (on s'utilitza un elevat excés de reactiu), en presència de grups bàsics nucleòfils. La reacció d'aminòlisi està afavorida quan a l'espaiador es troben grups atraients d'electrons, mentre que la presència de grups donadors d'electrons disminueixen la velocitat de reacció i desafavoreixen l'aminòlisi.¹⁴² Per exemple, la resina Wang és menys làbil a nucleòfils¹⁴³ i l'escissió de l'ester enllaçat a la resina per una amina és més difícil que aquelles resines que tenen un espaiador amb un àcid hidroximetilbenzoic (HMB) o amb una oxima desenvolupades per Sheppard¹⁴⁴ i Kaiser,¹⁴⁵ respectivament, per sintetitzar pèptids amb una amida terminal i un ampli ventall d'alquilamides. Per altra banda, si les amines nucleòfiles són molt voluminoses també pot produir una disminució en la velocitat de la reacció d'aminòlisi.

En el cas que ens interessa, aquestes reaccions secundàries podien representar problemes importants per a la síntesi de peptoides àcids en fase sòlida i podien constituir un obstacle per obtenir rendiments i pureses elevades (vegeu Figura 8.9).

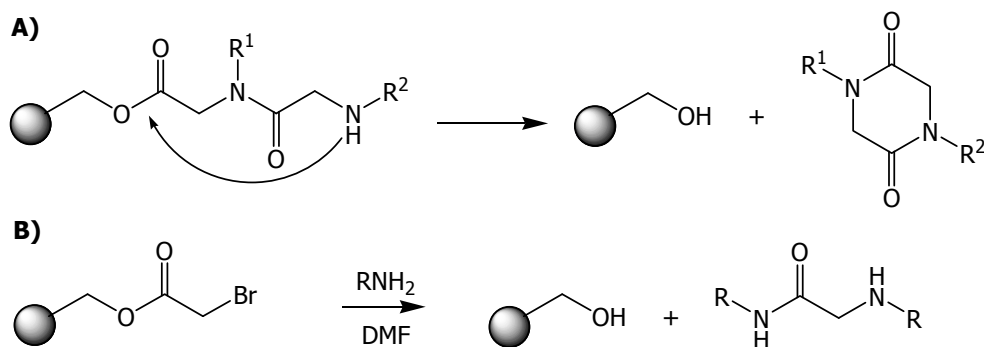


Figura 8.9. Reaccions secundàries que poden tenir lloc durant la síntesi de peptoides àcids en fase sòlida. A: formació de dicetopiperazines. B: Reacció d'aminòlisi, la qual pot tenir lloc durant les etapes d'acoblament d'amina d'un peptoides, trímer d'*N*-alquilglicina.

Una alternativa a les resines de tipus alcohol *p*-alcoxibenzilic són les resines de tipus tritil. El grup tritil és suficientment voluminós per mostrar un impediment estèric que faci difícils les ciclacions intramoleculares al nivell dipeptídic i, per tant, eviti la formació de DKPs. Roques i col.¹⁴⁶ van fer servir l'espaiador 2-clorotritil per sintetitzar un peptoides àcid, un dímer d'*N*-alquilglicina, amb un 78% de rendiment, una millora espectacular en comparació amb el 0% de rendiment obtingut fent servir un espaiador de tipus Wang, degut a la formació quantitativa de DKPs. Tot i això, com a subproducte també van obtenir la corresponent DKP.

Amb aquests antecedents, es va decidir emprar la resina clorur de 2-clorotritil com a primera opció per sintetitzar peptoides àcids en fase sòlida.

8.3.3. SÍNTESI DE PEPTOIDES ÀCIDS AMB RESINA CLORUR DE 2-CLOROTRITIL

La síntesi en fase sòlida de peptoides àcids amb la resina clorur de 2-clorotritil es va dur a terme seguint l'esquema sintètic de la Figura 8.7, de forma anàloga a com es va realitzar la síntesi de peptoides amb la resina Rink amida, tret d'algunes diferències. En aquest cas, la síntesi va comportar un total de 7 etapes. En no haver grups protectors dels grups funcionals de la resina, no va ser necessària una etapa de desprotecció prèvia a la síntesi del compost.

En la primera etapa d'acilació no va caldre tampoc l'activació de l'àcid cloroacètic amb DIC, sinó que simplement es va afegir DIEA per captar l'àcid clorhídric generat. Les etapes posteriors d'aminacions i acilacions van ser anàlogues a la síntesi de peptoides.

Finalment, l'etapa d'escissió es va realitzar en condicions àcides més suaus. Es van realitzar diverses proves amb còctels d'escissió de diferent grau d'àcidesa: TFA/DCM (50:50, 20:80, 10:90, 5:95 o 2.5:97.5) i AcOH/DCM (1:1 o 1:4). Els resultats obtinguts no van mostrar cap diferència en el rendiment i la puresa dels residus resultants, motiu pel qual es va decidir treballar en les condicions més suaus AcOH/DCM (1:4).

No obstant, a diferència dels residus obtinguts de l'escissió dels peptoides de la fase sòlida, on s'obtenia un pic majoritari amb pureses generalment superiors al 90% per HPLC, en aquest cas es van observar dos pics importants per HPLC. Concretament, en la síntesi del peptoide àcid N13-13-10COOH, l'anàlisi per espectrometria de masses dels dos pics obtinguts per HPLC va mostrar que el pic majoritari (al voltant del 75-80% per HPLC) corresponia al peptoide àcid esperat N13-13-10COOH, mentre que el pic minoritari corresponia a una fracció del peptoide àcid, l'N13-13COOH.

Així doncs, el residu resultant de l'etapa d'escissió es va purificar per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir el peptoide àcid N13-13-10COOH (**21**) amb un rendiment final del 23% i una puresa superior al 98% per HPLC (vegeu Figura 8.10).

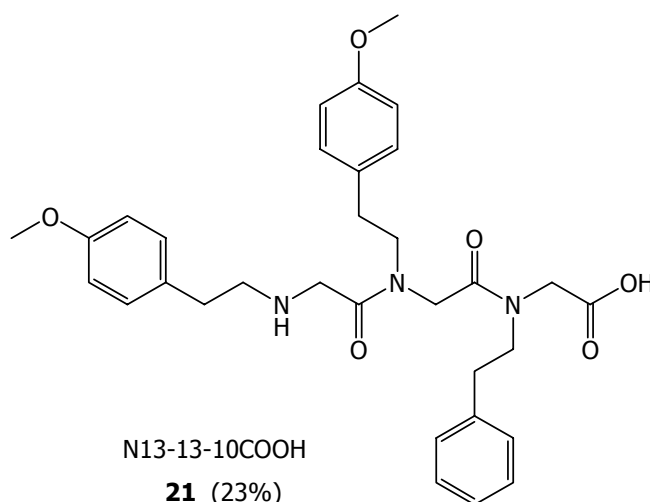


Figura 8.10. Peptoide àcid N13-13-10COOH sintetitzat en resina clorur de 2-clorotritil i purificat per HPLC a escala semipreparativa.

El producte **21** es va identificar pel seu espectre de masses (CL-EM, EMAR), obtenint el pic molecular $562.2 (M + H)^+$, així com per les seves dades espectroscòpiques. La presència de diferents conformacions del peptoide àcid va conduir a uns espectres de $^1\text{H-RMN}$ i $^{13}\text{C-RMN}$ complexos, fent necessària la realització dels experiments gDQCOSY i gHSQC per confirmar l'assignació dels senyals del confòrmer majoritari.

El rendiment final de la síntesi d'aquest peptoide àcid (rdt. 23%) va ser inferior al rendiment de síntesi i purificació de peptoides (a l'entorn del 40-60%). Aquesta diferència i la formació d'un fragment del peptoide àcid com a subproducte, ens van fer plantejar els possibles problemes ocorreguts durant la síntesi.

Per confirmar la formació d'aquest subproducte en la síntesi de peptoides àcids en resina de tipus clorur de 2-clorotritil, es va realitzar la síntesi d'altres peptoides àcids, i en tots els casos es van obtenir pureses, generalment, de l'entorn del 75-80% per HPLC, amb la presència del fragment del peptoide àcid com a subproducte

Ja hem comentat que Roques i col.¹⁴⁶ van observar que en sintetitzar un peptoide àcid, un dímer d'*N*-alquilglicina, en resina clorur de 2-clorotritil, tenia lloc la formació de la DKP corresponent, tot i que en petita proporció respecte el peptoide. En el nostre cas, va tenir lloc, almenys en una petita part, la formació de la DKP corresponent després de realitzar el segon acoblament d'amina, en detectar un pic per HPLC procedent dels filtrats de reacció d'una massa corresponent a la DKP (vegeu Figura 8.9, A). Aquest podria ser un dels motius que explicarien el baix rendiment obtingut.

Per altra banda, ens vam plantejar el fet que en la primera acilació no reaccionessin tots els clorurs de la resina, però que durant la segona etapa d'acilació es continués amb el procés normal de síntesi, donant lloc a la formació d'un fragment del peptoide àcid. No obstant, es va descartar aquesta possibilitat degut a que després de la primera acilació s'havia dut a terme una etapa de capturació dels clorurs que no havien reaccionat amb metanol.

Pensant que el problema fos que la primera aminació no fos quantitativa, es va sintetitzar el peptoide realitzant la primera acilació i la primera aminació per triplicat. No obstant, el resultat final no va millorar de forma significativa.

Un altre inconvenient de la resina de tipus tritil és la seva elevada labilitat al medi àcid. Per exemple, s'ha observat que si l'HCl generat durant una síntesi en aquest tipus de resina

no és convenientment neutralitzat, pot produir l'escissió del producte de la resina.¹⁴⁷ També s'ha detectat que determinats agents d'acoblament com l'HOBt o el BTC (carbonat de bis(triclorometil)), utilitzat en la química de pèptids per l'acoblament d'aminoàcids *N*-alquilats, poden produir l'escissió prematura del pèptid de la resina trítill, si no són convenientment neutralitzats.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Així doncs, es va plantejar la possibilitat que l'àcid cloroacètic utilitzat en excés a la síntesi pogués ser capaç d'escindir part del producte unit a la resina. Per estudiar-ho es va sintetitzar el peptoida àcid N4-15-15COOH substituïnt l'àcid cloroacètic pel clorur de cloroacetil en la segona i tercera etapes d'acilació, en absència d'una base terciària per neutralitzar l'HCl generat durant l'acilació, i en presència de Et₃N o amb una base més forta, la DBU. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 8.11.

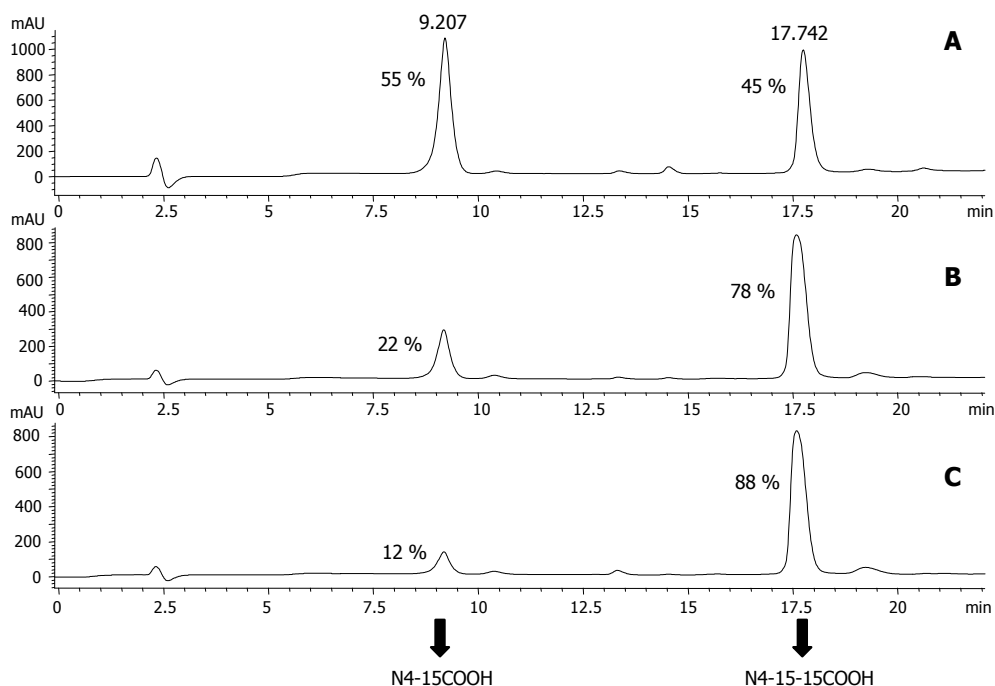


Figura 8.11. Síntesi del peptoida àcid N4-15-15COOH en resina clorur de 2-clorotritill, emprant clorur de cloroacetil en la segona i tercera etapes d'acilacions, en absència de base (A), amb Et₃N (B) i amb DBU (C).

Efectivament, es va observar com la presència de base disminuïa l'escissió prematura del compost de la resina, evitant així la formació del fragment del peptoida àcid N4-15COOH. No obstant, tot i fer servir la base DBU i mantenir la resina en medi bàsic uns minuts abans d'afegir el clorur de cloroacetil, no es va poder evitar completament aquest problema, observant-se fins un 12% del subproducte àcid per HPLC.

Continuant amb aquest estudi, es va sintetitzar el peptòide àcid N4-15-15COOH amb altres agents acilants, com l'èster actiu de l'àcid cloroacètic amb NHS, el 2-cloroacetat d'*N*-succinimidil, i amb l'anhídrid cloroacètic, amb DIEA o DBU. En cap cas no es va aconseguir obtenir uns perfils cromatogràfics d'HPLC del residu de la reacció que mostressin el peptòide àcid amb pureses superiors al 85%.

Per altra banda, també es va plantejar la possibilitat que hagués tingut lloc la reacció secundària d'aminòlisi durant les etapes d'acoblament degut a la presència d'un excés tan gran (5 eq.) d'amina bàsica nucleòfila (vegeu Figura 8.9, B). No obstant, creiem que aquesta reacció secundària no estava afavorida en aquest cas perquè, com s'ha comentat anteriorment, la reacció d'aminòlisi està desafavorida quan a l'espaiador s'hi troben grups donadors d'electrons i quan les amines introduïdes són molt voluminoses.¹⁴² En aquest sentit, es va realitzar una prova afegint menys equivalents d'amina en les etapes d'acoblament (2.5 eq.) i durant menys temps de reacció (1.5 h). No obstant, no es van apreciar diferències significatives en el perfil cromatogràfic d'HPLC del residu obtingut del peptòide àcid. A més, en els filtrats de les reaccions d'acoblament no es va detectar cap pic per HPLC que es pogués assignar a subproductes d'aminòlisi.

En resum, es va comprovar que la resina clorur de 2-clorotritil presentava diversos problemes per a dur a terme la síntesi de peptòides àcids en fase sòlida. Per aquest motiu es va treballar amb altres tipus d'espaiadors.

8.3.4. INTENTS DE SÍNTESI DE PEPTÒIDES ÀCIDS AMB ALTRES RESINES

Per estudiar la síntesi de peptòides àcids en altres fases sòlides diferents a la clorur de 2-clorotritil es va escollir com a peptòide model l'*N*37-13-15COOH.

Seguint amb les resines de tipus tritil, es va treballar amb la resina clorur de tritil. No obstant, el perfil cromatogràfic d'HPLC del residu final i l'anàlisi per espectrometria de masses va mostrar un pic minoritari (5%) corresponent al peptòide àcid i un pic majoritari (85%), la massa del qual no es va poder atribuir a cap estructura.

Per altra banda, es va intentar realitzar la seqüència del peptòide sobre una resina de tipus Wang, concretament la resina tricloroacetimidat Wang. Aquesta és una resina Wang activada amb un grup tricloroacetimidat per facilitar l'acoblament d'un àcid carboxílic.^{150,151}

Les reaccions es van seguir i controlar per espectroscopia d'infraroig i per HPLC. No obstant, a partir del segon acoblament no es va observar cap tipus de producte enllaçat a la resina, el que ens va fer pensar en la formació de la corresponent DKP de forma quantitativa.

Intents de síntesi del peptoid àcid amb una resina de polietilenglicol TentaGel MB PHB van conduir a resultats igualment infructuosos. A partir del segon acoblament no es va observar cap tipus de producte enllaçat a la resina, el que ens va fer pensar que la formació quantitativa de la corresponent DKP.

En aquest sentit, una alternativa possible per treballar amb la resina de tipus Wang i evitar la ciclació intramolecular i la formació quantitativa de la DKP, seria seguir l'estratègia utilitzada a la química dels pèptids. En aquesta estratègia s'introdueix el segon aminoàcid protegit en el seu extrem *N*-terminal en forma de tritil per tal que, en escindir aquest grup protector amb 0.2-1% de TFA, el grup amino quedi protonat fins a l'acoblament de l'aminoàcid següent en condicions de neutralització *in situ* amb DIEA.^{152,153} En el cas que ens ocupa, aquesta estratègia es podria dur a terme introduint amines protegides prèviament amb el grup tritil, seguint l'estratègia del submonòmer de Zuckermann,^{54,55} o bé introduint *N*-alquilglicines protegides amb el grup tritil sintetitzades prèviament, seguint l'estratègia sintètica de Simon i col.⁴⁵ L'inconvenient d'aquesta metodologia consisteix en la síntesi prèvia de les amines o les glicines protegides amb el grup tritil.

8.3.5. SÍNTESI DE PEPTOIDES ÀCIDS APLICANT L'ESTRATÈGIA DEL "SAFETY-CATCH LINKER"

Ja hem comentat que, generalment, un compost es troba ancorat a la fase sòlida mitjançant un enllaç amida que permet l'obtenció de productes amb amides primàries terminals després de l'etapa d'escissió, o bé mitjançant un enllaç ester, el qual proporciona productes amb un àcid carboxílic terminal. No obstant, en ocasions cal que l'escissió tingui lloc per un desplaçament nucleòfil amb amines o alcohols per poder donar lloc als corresponents productes en forma d'amida *N*-substituïda o d'ester (vegeu Figura 8.12).

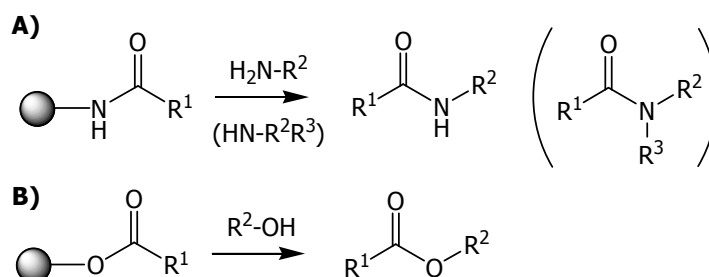


Figura 8.12. Possibilitats en l'etapa d'escissió d'una síntesi en fase sòlida: desplaçament nucleòfil amb amines per obtenir les corresponents amides *N*-substituïdes (A), o amb alcohols per obtenir els corresponents esters (B).

En aquest sentit, es va desenvolupar l'estratègia del "*safety-catch linker*". Aquesta estratègia fa servir un tipus d'espaiador que és adequadament activat després d'haver finalitzat la síntesi del compost en la resina i en condicions nucleòfiles permet l'escissió del producte. Entre aquests tipus d'espaiadors trobem els derivats d'acilsulfonamides, els quals van ser inicialment desenvolupats per Kenner.¹⁵⁴

Així doncs, es va plantejar la utilització d'aquest tipus d'espaiadors per dur a terme la síntesi de peptoides en fase sòlida de la forma habitual i, després d'activar la sulfonamida, escindir el compost per donar lloc a un peptoide amb un àcid carboxílic terminal. El derivat d'acilsulfonamida que es va escollir per aquest objectiu va ser l'espaiador desenvolupat per Ellman i col.,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ enllaçat a una resina de tipus Rink amida (vegeu Figura 8.13).

El plantejament sintètic que es va proposar es mostra a la Figura 8.13. Breument, el procés sintètic consistiria en 10 etapes de reacció. Després de l'etapa de desprotecció dels grups amino units a la resina, tindria lloc l'acoblament de l'espaiador mitjançant una reacció d'acilació amb l'àcid 4-sulfamoilbenzoic. Les següents etapes d'acilacions i aminacions consecutives per sintetitzar el peptoide es realitzarien de forma anàloga a una síntesi de peptoides en fase sòlida. Seguidament, es procediria a l'activació de l'espaiador mitjançant l'alquilació del nitrogen de la sulfonamida amb iodoacetoni-tril o diazometà. En aquesta etapa caldria considerar la possibilitat de protegir l'amina secundària terminal d'un peptoide per evitar que es metilés. Una opció seria la protecció amb un grup tritil per poder-lo eliminar posteriorment en condicions àcides suaus ja que el grup Fmoc no és estable a les condicions de la reacció de cianometilació.¹⁵⁸ Finalment, tindria lloc l'etapa d'escissió nucleòfila, amb l'H₂O actuant com a nucleòfil per obtenir els peptoides àcids amb un àcid carboxílic en l'extrem C-terminal.

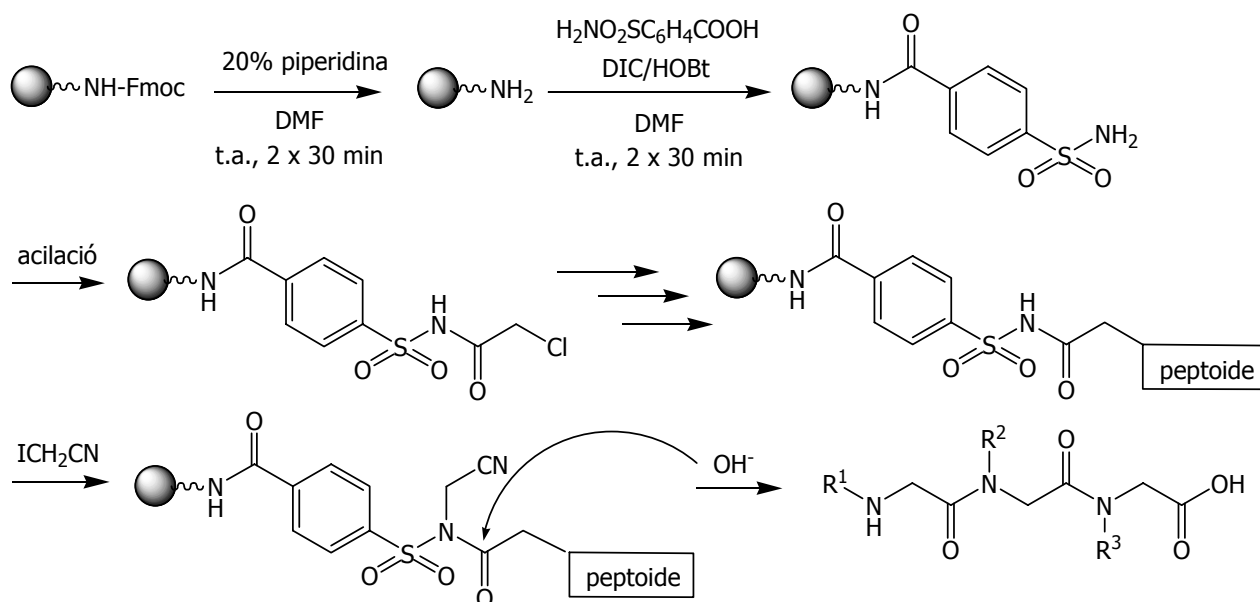


Figura 8.13. Esquema plantejat per a la síntesi de peptoides àcids en fase sòlida utilitzant l'estratègia del "safety-catch linker", emprant un espaiador de tipus acilsulfonamida i una resina del tipus Rink amida. En la primera etapa d'acilació s'introdueix l'àcid 4-sulfamoilbenzoic. Les etapes següents d'acilacions i aminacions tenen lloc de forma anàloga a una síntesi de peptoides en fase sòlida. Finalment, s'activa la sulfonamida mitjançant l'alquilació del nitrogen de la sulfonamida i s'escindeix el peptoides de la resina per l'atac nucleòfil de grups hidroxil, per conduir a l'obtenció dels peptoides àcids.

No obstant, la síntesi del peptoides N37-13-15COOH seguint aquesta estratègia va resultar molt problemàtica. Després de la introducció de la sulfonamida, es va realitzar una sèrie de reaccions en paral·lel per determinar les millors condicions de reacció per dur a terme l'acilació de la sulfonamida, fent servir diferents tipus d'agents acilants, com ara clorur de cloroacetil, àcid cloroacètic, àcid bromoacètic, anhídrid cloroacètic o anhídrid bromoacètic. Depenent de l'agent acilant utilitzat, es van emprar diferents tipus d'agents activants, com ara DIC, HOBt, PyBOP i DMAP. En algunes de les reaccions es va mantenir un medi bàsic, amb Et₃N, DIEA o DBU, i a diferent temperatura de reacció, -20 °C, t.a., 60 °C o fent ús de radiació de microones. També es va variar el nombre d'equivalents dels reactius afegits, així com el temps de reacció.

Els millors resultats es van obtenir fent servir anhídrid cloroacètic i DMAP, amb DBU i a t.a., o amb DIEA i a 60 °C. No obstant, en aquestes condicions la reacció d'acilació no era quantitativa, sinó que s'obtenia només un 70-85% de producte acilat (per HPLC).

Així doncs, es va decidir no continuar amb la seqüència en no poder introduir millores a nivell de conversió, de rendiment i de puresa en relació a la síntesi de peptoides àcids amb la resina clorur de 2-clorotritil.

8.4. CONCLUSIONS DE L'OBTENCIÓ DE PEPTOIDES ÀCIDS

Al llarg d'aquest llarg capítol s'ha comentat extensament l'esforç que es va realitzar per optimitzar un procediment general d'obtenció de peptoides àcids. Ens vam centrar en dues estratègies alternatives: la hidròlisi de peptoides en dissolució i la síntesi en fase sòlida.

La primera estratègia aprofitava el fet que ja estava optimitzada la síntesi de peptoides en fase sòlida, amb bons rendiments i pureses elevades, i només calia una etapa addicional d'hidròlisi per obtenir els peptoides àcids. L'optimització del procediment d'hidròlisi selectiu de l'amida primària d'un peptoide en dissolució amb resina d'intercanvi iònic Amberlyst-15, es va dur a terme amb un pla de treball basat en un disseny d'experiments. Amb les condicions d'hidròlisi òptimes determinades, es va procedir a la hidròlisi de diferents tipus de peptoides, mostrant en tots els casos conversions quantitatives i pureses superiors al 90% per HPLC.

La segona estratègia va utilitzar un procediment anàleg i paral·lel a la síntesi de peptoides en fase sòlida, però variant la funcionalització de la resina emprada. D'aquesta manera, l'escissió del compost de la resina conduïa directament al peptoide àcid, sense cap etapa d'hidròlisi addicional. L'optimització del procediment de síntesi d'un peptoide àcid en fase sòlida va comportar una recerca bibliogràfica important per escollir l'espaiador i la resina més apropiats. Fins ara, els millors resultats es van obtenir amb la resina clorur de 2-clorotritil, tot i que els rendiments de la síntesi i la puresa dels peptoides àcids van ser inferiors als obtinguts en una síntesi convencional d'un peptoide amb resina Rink amida.

Amb aquests resultats, un dels objectius plantejats per a un futur pròxim és la síntesi d'una quimioteca de peptoides àcids. La presència d'un grup carboxílic terminal en l'estructura d'un peptoide pot ser molt atractiva i interessant com a punt d'anclatge per dur a terme reaccions de condensacions per obtenir molècules més grans o més funcionalitzades.

9. IMMOBILITZACIÓ D'UN PEPTOIDE A UN SUPORT SÒLID

A la introducció d'aquesta segona part de la memòria, s'ha comentat com l'objectiu principal d'obtenir peptoides àcids radicava en el nostre interès per immobilitzar-los a un suport sòlid, per intentar identificar interacció amb dianes mitjançant cromatografia d'afinitat.

Concretament, el peptoide d'interès era l'N13-13-10C (**17**) i es va voler estudiar i identificar la diana o dianes amb què interaccionava per desencadenar el procés apoptòtic i de mort cel·lular. Per dur a terme aquest estudi es van seguir dues estratègies diferents per immobilitzar el derivat àcid N13-13-10COOH (**21**) a un suport sòlid:

- ♥ Immobilització del peptoide N13-13-10C-biotinilat a una columna d'agarosa-avidina.
- ♥ Immobilització del peptoide N13-13-10COOH a una columna de sefarosa EAH.

9.1. ACOBLAMENT D'UN PEPTOIDE-BIOTINILAT A UNA MATRIU D'AGAROSA

La primera estratègia seguida per a l'estudi qualitatiu i quantitatiu de receptors amb columnes d'afinitat es basa en la interacció no covalent extremadament forta entre la vitamina H, la biotina, i la glicoproteïna de la clara de l'ou blanc, l'avidina, amb una constant d'associació de l'ordre de 10^{15} M^{-1} .^{159,160} L'esquema d'aquesta tècnica s'ha exemplificat a la Figura 9.1.

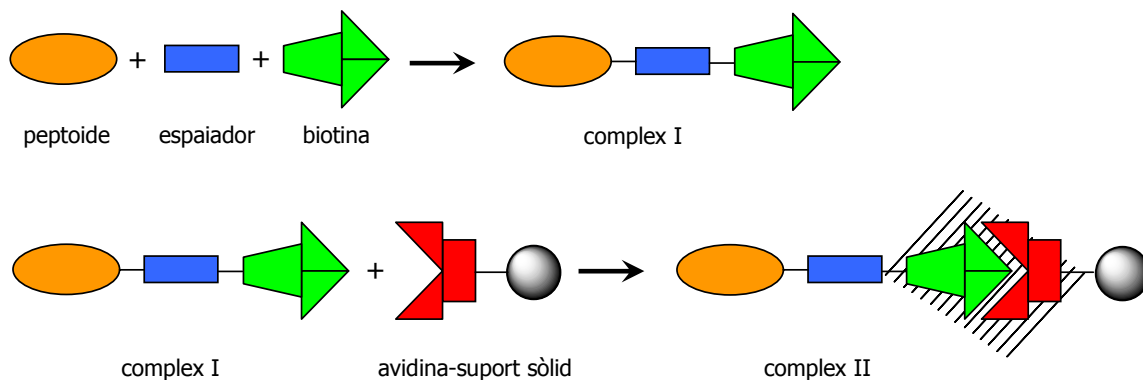


Figura 9.1. Immobilització d'un peptíde a un suport sòlid: acoblament d'un peptíde a la biotina mitjançant un espaiador bifuncional per formar el complex I, i interacció del complex I amb l'avidina enllaçada a un suport sòlid, per formar el complex II.

En primer lloc, la biotina s'ha d'enllaçar covalentment a la molècula d'estudi, en aquest cas el peptíde N13-13-10C, mitjançant un braç espaiador bifuncional. Seguidament, l'avidina s'enllaça covalentment a un suport sòlid, el qual pot ser una matriu de sefarosa o d'agarosa. I finalment, en posar en contacte el compost biotínilat amb l'avidina enllaçada al suport sòlid, es produeix la forta interacció entre la biotina i l'avidina que condueix a la consegüent immobilització del peptíde en el suport sòlid.

Un dels punts importants en aquest plantejament sintètic va ser definir el lloc d'unió entre el peptíde i l'espaiador perquè no afectés la seva activitat biològica. Es van pensar en dues possibilitats: derivatitzar el peptíde N13-13-10C per l'extrem *N*-terminal, o bé en derivatitzar el corresponent peptíde àcid N13-13-10COOH per l'extrem *C*-terminal (vegeu Figura 9.2).

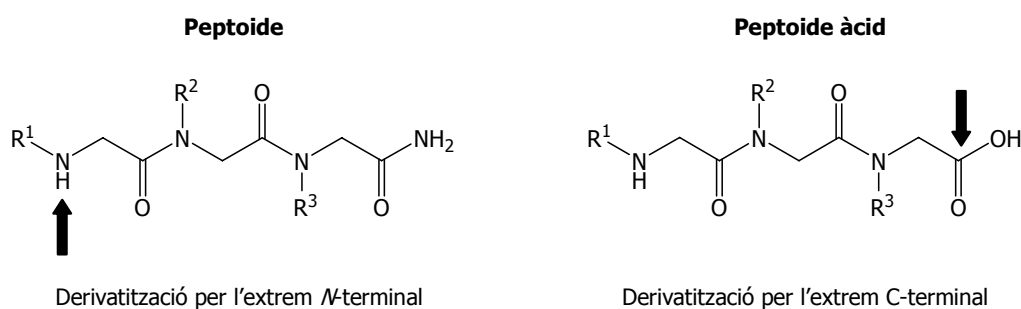


Figura 9.2. Dues estratègies possibles per enllaçar un peptoide a una columna d'afinitat: mitjançant una derivatització per l'extrem *N*-terminal del peptoide o mitjançant una derivatització per l'extrem C-terminal del seu corresponent peptoide àcid.

L'altre punt important que calia definir era el tipus de braç espaiador que seria més adequat per a l'acoblament. Per una banda, la longitud del braç espaiador havia de ser suficientment llarga per evitar possibles impediments estèrics que interferissin en la interacció entre la molècula biotinitada i l'avidina, i havia de permetre que tant la biotina com el compost poguessin arribar als llocs d'interacció i de reconeixement amb els seus corresponents receptors.¹⁶¹ Per altra banda, els llocs d'unió del braç espaiador a la biotina i al compost s'havien de localitzar en una posició de les molècules que no interferís amb la seva activitat biològica. A la bibliografia es troben diversos tipus d'espaiadors que compleixen aquestes característiques, tot i que els més àmpliament utilitzats per enllaçar-se a la biotina són l'àcid κ -aminocaproic i la lisina (per la seva cadena lateral).¹⁶² En el nostre cas, el braç espaiador bifuncional escollit va ser l'1,6-hexandiamina, d'una llargada suficient perquè no es produïssin interferències en les interaccions amb cada receptor i amb dos grups amino per unir-se als grups carboxílics de la biotina i del peptoide àcid.

9.1.1. OBTENCIÓ DEL PEPTOIDE ÀCID N13-13-10COOH BIOTINILAT PER L'EXTREM CARBOXÍLIC C-TERMINAL

La derivatització del peptoides àcid N13-13-10COOH pel seu extrem C-terminal es va dur a terme seguint la seqüència que es mostra a la Figura 9.3.

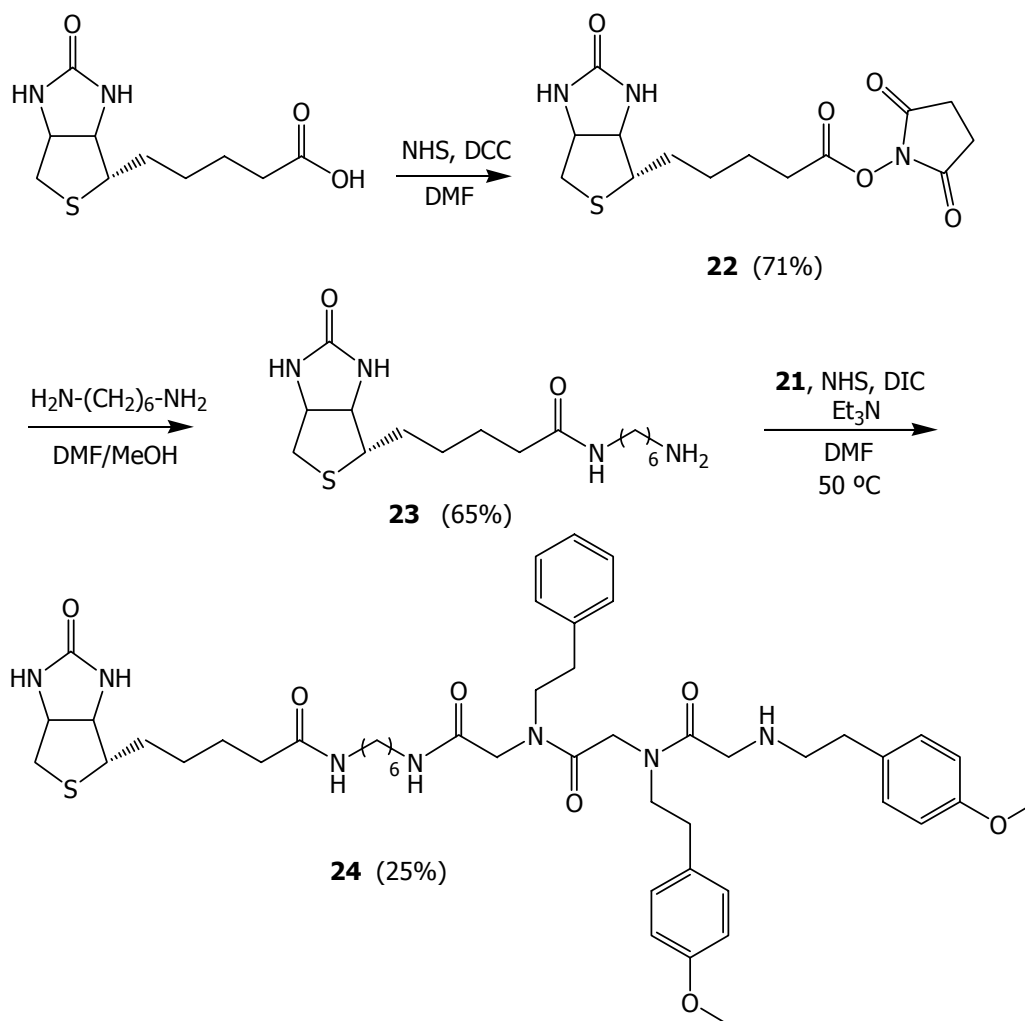


Figura 9.3. Seqüència sintètica seguida per a l'obtenció del peptoides N13-13-10COOH biotinilat pel seu extrem C-terminal mitjançant un braç espaiador d'1,6-hexandiamina.

Primerament, es va activar el grup carboxílic de la biotina amb NHS i DCC en DMF, obtenint l'ester actiu **22** amb un 71% de rendiment.¹⁶² L'acoblament del braç espaiador es va realitzar afegint el compost **22** sobre una dissolució de 10 eq. d'1,6-hexandiamina en una mescla de DMF i MeOH, en alíquotes de 0.1 eq. de l'ester actiu cada 10 min, per minimitzar la formació de producte de bisbiotinilació. El control per CL-EM del cru de reacció va mostrar un 10% del subproducte bisbiotinilat, el qual es va separar del producte desitjat monobiotinilat **23** per cromatografia en columna, amb un 65% de rendiment. Cal destacar

les dades espectrocòpiques de ^1H -RMN del CH_2 en ζ al grup carbonil, en variar el seu desplaçament químic de $\tau=2.61$ ppm en **22** a $\tau=2.04$ ppm en **23**. Com alternativa a aquest procediment, Ginanneschi i col.¹⁶³ van publicar posteriorment a la nostra feina una ruta sintètica on evitaven la formació del subproducte de bisbiotinilació, tot fent servir el reactiu comercial monoprotegit hidrocloreur d'*N*-Boc-1,6-hexandiamina, per obtenir **23** amb un rendiment de reacció després de la desprotecció del 79%.

Finalment, l'acoblament entre el compost biotinilat **23** i el peptoide àcid **21** (apartat 8.3.3) es va dur a terme amb NHS i DIC, en DMF i a 50 °C. L'evolució de la reacció es va controlar per HPLC fins que es va observar la desaparició del peptoide àcid **21** i l'aparició d'un nou pic majoritari. Després de 7 h de reacció, es va procedir a la purificació del cru de reacció per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir el peptoide-biotinilat per l'extrem C-terminal **24** amb un 25% de rendiment. El producte es va identificar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular 886.5 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, així com per les seves dades espectroscòpiques. La presència de diferents conformacions del compost va conduir a uns espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN molt complexos, fent necessària la realització dels experiments gDQCOSY i gHSQC per confirmar l'assignació dels senyals del confòrmer majoritari. Destaca el desplaçament químic de ^1H -RMN del CH_2 en ζ al grup amino de **23**, en variar de $\tau=2.52$ ppm a $\tau=4.31$ - 3.82 ppm en **24**.

Cal esmentar que, a més d'aquestes condicions de reacció, també es va fer servir un altre sistema d'acoblament utilitzat en la química de pèptids per accelerar les reaccions de formació d'amides, el qual fa servir PyBOP com agent d'acoblament. No obstant, es va observar la formació d'altres subproduts de reacció, entre els quals va cridar l'atenció la formació del producte provinent d'una reacció de dimerització i ciclació intramolecular entre dues molècules de peptoide àcid, degut a la presència d'un grup amino i d'un grup carboxílic terminals en la mateixa molècula. Aquesta reacció serà més àmpliament comentada en el capítol 10 d'aquesta segona part.

9.1.2. OBTENCIÓ DEL PEPTOIDE N13-13-10C BIOTINILAT PER L'EXTREM *N*-TERMINAL

La derivatització del peptoide N13-13-10C pel seu extrem *N*-terminal es va dur a terme seguint el plantejament sintètic que es mostra a la Figura 9.4.

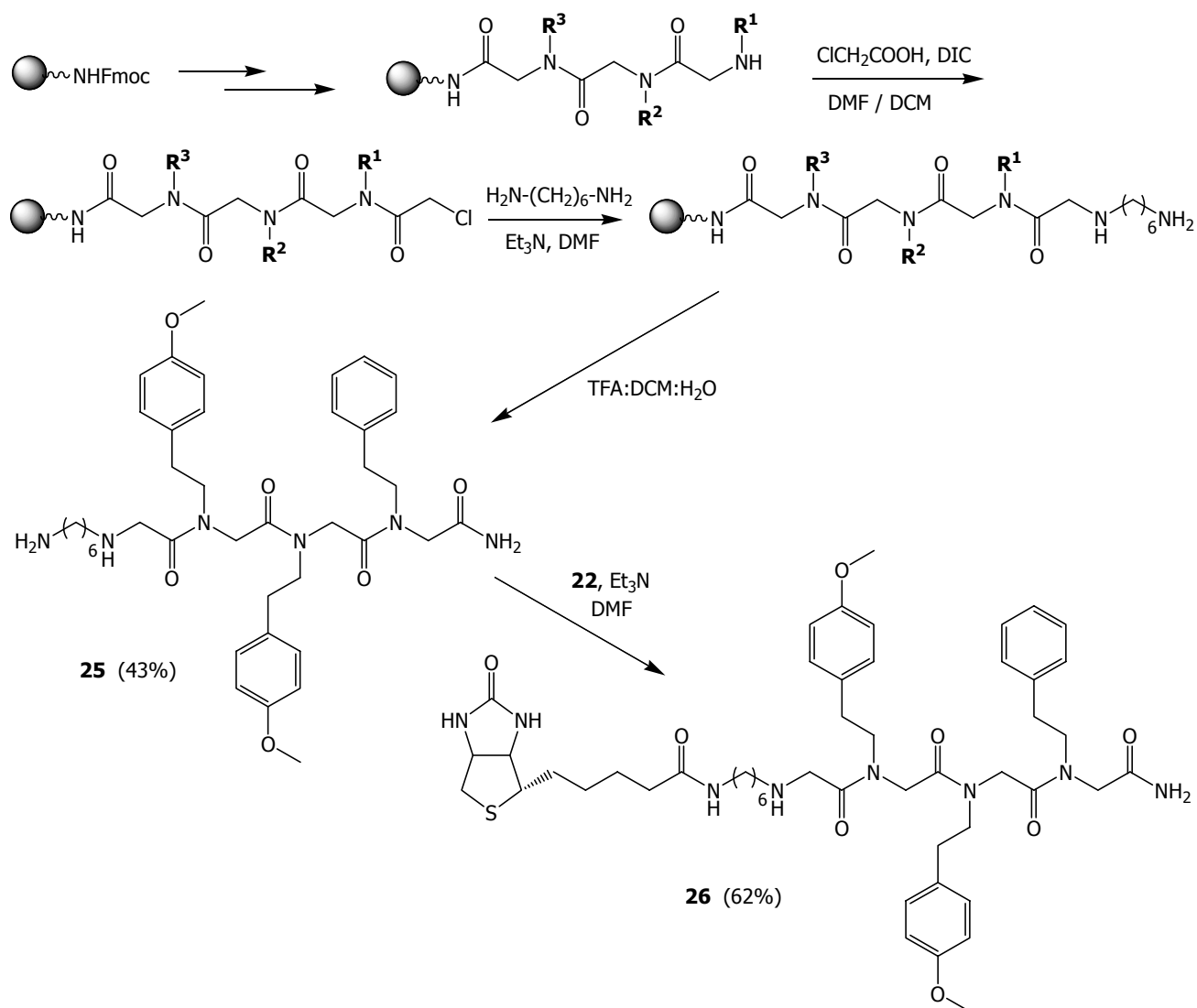


Figura 9.4. Seqüència sintètica seguida per a l'obtenció del peptòide N13-13-10C biotinitat pel seu extrem *N*-terminal mitjançant un braç espaiador d'1,6-hexandiamina. R^1 , R^2 : $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4-\text{pOCH}_3$, R^3 : $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$.

Primerament, es va dur a terme la síntesi en fase sòlida del peptòide N13-13-10C seguint el procediment estàndard amb resina de tipus Rink amida. Després del tercer acoblament amb l'amina **A13**, va tenir lloc una quarta acilació amb àcid cloroacètic i DIC com agent activant, i seguidament un quart acoblament amb l'espaiador 1,6-hexandiamina. Les reaccions en fase sòlida es van controlar amb els test qualitius del cloranil per amines secundàries i del TNBS per amines primàries, els quals van donar positius per a cada reacció. Finalment, va tenir lloc l'etapa d'escissió del compost de la resina amb el còctel de tall format per TFA:DCM:H₂O i la purificació del residu resultant per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir el peptòide **25** amb un 43% de rendiment. El producte es va identificar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular $717.4 (M + H)^+$, però la presència de diferents conformacions del compost va conduir a uns espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN molt

complexos, fent necessària la realització dels experiments gDQCOSY i gHSQC per confirmar l'assignació dels senyals del confòrmer majoritari. Destaca la presència dels 12H corresponents als 6 CH₂ de l'espaiador, distribuïts amb els 2 CH₂ dels extrems situats a camps més baixos, a τ =2.96-2.53 ppm, i els altres 4 CH₂ centrals amb un desplaçament químic a τ =1.67-1.41 ppm.

L'acoblament del peptoide **25** i de l'èster actiu de la biotina **22** es va dur a terme amb Et₃N i en DMF, a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es va controlar per HPLC i després de 15 min. de reacció es va observar la desaparició del peptoide de partida **25** i l'aparició d'un nou pic majoritari. La purificació del cru de reacció resultant per HPLC a escala semipreparativa va conduir al peptoide-biotinilat per l'extrem *N*-terminal **26**, amb un 62% de rendiment. El compost es va identificar per espectrometria de masses, obtenint el pic molecular 943.5 (M + H)⁺. Igualment que amb el compost **25**, la presència de diferents conformacions del compost va conduir a uns espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN molt complexos, fent necessària la realització dels experiments gDQCOSY i gHSQC per confirmar l'assignació dels senyals del confòrmer majoritari. Cal destacar la variació del desplaçament químic de ¹H-RMN del CH₂ en ζ al grup carbonil de **22**, a τ =2.61 ppm, cap a camps més alts en **26**, a τ =2.05 ppm, així com la variació del desplaçament de CH₂ en ζ a l'amina primària de **25**, a τ =2.96-2.53 ppm, cap a camps lleugerament més baixos en **26**, a τ =3.01 ppm.

L'acoblament dels compostos biotinilats **24** i **26** a la matriu d'agarosa amb avidina enllaçada covalentment s'explicaran a l'apartat 9.3.1.

9.2. ACOBLAMENT D'UN PEPTOIDE ÀCID A UNA Matriu DE SEFAROSA

La segona estratègia utilitzada per a l'estudi qualitatiu i quantitatiu de receptors amb columnes d'afinitat es va basar en la interacció covalent entre el peptoide N13-13-10COOH (**21**) i una matriu de sefarosa EAH 4B, com s'ha esquematitzat a la Figura 9.5.

En aquest cas, la sefarosa tenia enllaçat covalentment l'espaiador bifuncional 1,6-hexandiamina, amb una càrrega de 7-12 σ mol grups amino/ml gel sec. Després de passar el peptoide àcid per la columna de sefarosa i fer una etapa de rentats, es va analitzar la quantitat d'N13-13-10COOH acoblat a la columna mitjançant l'anàlisi dels rentats amb una recta de calibració, prèviament determinada per al peptoide àcid N13-13-10COOH.

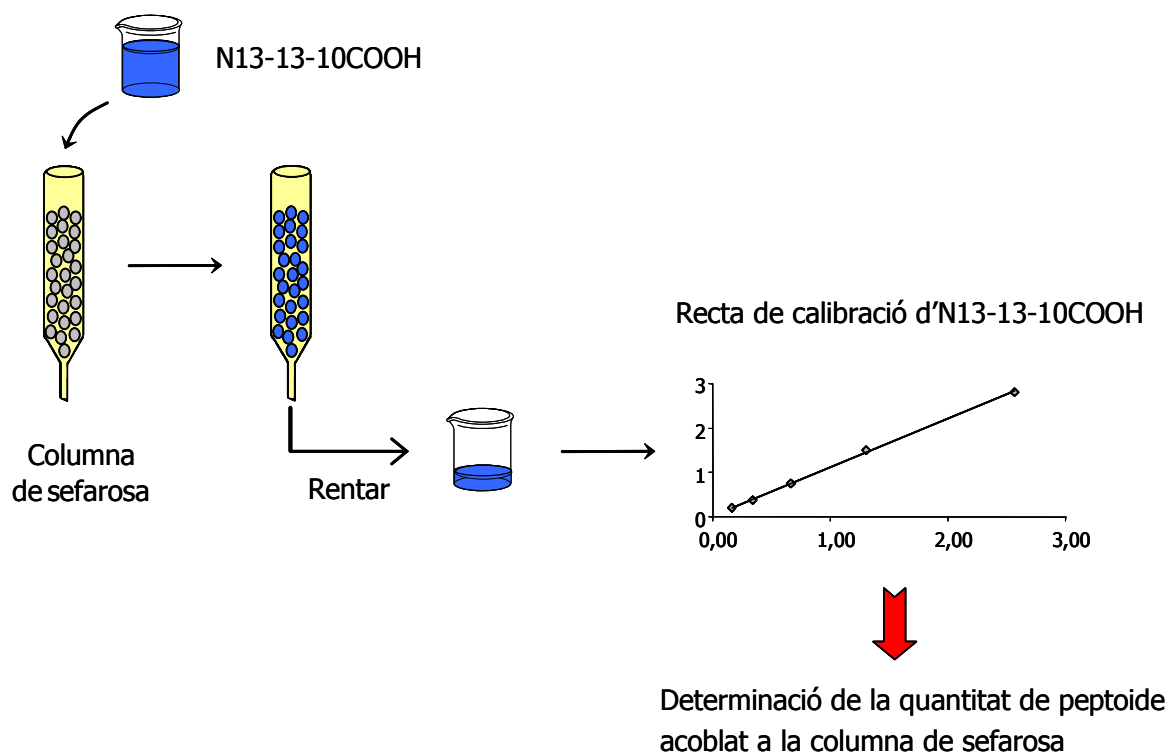


Figura 9.5. Acoblament del peptòide àcid N13-13-10COOH a una columna de sefarosa i determinació del peptòide acoblat mitjançant l'anàlisi dels rentats amb la recta de calibració d'N13-13-10COOH.

Resultats preliminars realitzats de l'estudi de les columnes d'afinitat dels compostos biotinitats **24** i **26**, els quals s'explicaran a l'apartat 9.3.1, semblaven indicar que la interacció del peptòide amb la seva proteïna diana es produïa a prop de l'extrem *N*-terminal. Per aquest motiu es va decidir que el lloc d'unió entre el peptòide N13-13-10COOH i la sefarosa es realitzaria per l'extrem *C*-terminal.

Per optimitzar les condicions de reacció per enllaçar el peptòide àcid N13-13-10COOH a la matriu de sefarosa, es va realitzar un estudi previ amb un model, l'àcid 3-fenilpropioníic, i es va determinar el percentatge de compost àcid enllaçat a la matriu mitjançant la realització d'una recta de calibració per HPLC.

9.2.1. PRIMERES PROVES D'ACOBLEMENT AMB L'ÀCID 3-FENILPROPIÒNIC

9.2.1.1. Determinació de la recta de calibració

Primerament, calia escollir un patró de referència per poder determinar les rectes de calibració del model, l'àcid 3-fenilpropiònic, per HPLC. Es va escollir com a patró de referència el peptoide N15-20-20C, sintetitzat seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 3.6, en tenir un temps de retenció per HPLC prou diferent al dels dos àcids en estudi.

Seguidament, es van preparar cinc dissolucions d'àcid de diferent concentració (entre 0.05 i 0.84 mg/ml), afegint a cadascuna un volum fix d'una dissolució de concentració 1.12 mg/ml del compost de referència N15-20-20C, i es van analitzar per HPLC a 220 nm. A partir de la relació d'àrees i de la relació de les concentracions de l'àcid 3-fenilpropiònic respecte el compost de referència, es va determinar la corresponent recta de calibració amb un coeficient de regressió lineal de 0.9985.

9.2.1.2. Proves d'acoblament

Es van preparar 6 xeringues de polipropilè de 2 ml de capacitat amb 0.5 ml de gel de sefarosa. Com agents activants d'un àcid carboxílic *in situ* al medi de reacció, es va utilitzar l'*N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), degut a la solubilitat en dissolvents orgànics de la corresponent urea formada durant la reacció, amb HOBt o NHS, així com l'1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), degut a la solubilitat en dissolvents aquosos de la corresponent urea formada. Aquests tres sistemes d'acoblament es van fer reaccionar en medi bàsic amb DIEA o en medi àcid a pH=4.5, amb una mescla d'H₂O/dioxà (1:1) com a dissolvent de reacció.

Després de 12 h de reacció, es van analitzar els filtrats de cada reacció per HPLC, després d'afegir el peptoide de referència. En les reaccions en medi bàsic es va recuperar quantitativament l'àcid 3-fenilpropiònic, indicació que no havia tingut lloc l'acoblament a la matriu de sefarosa. En medi àcid, els millors resultats es van obtenir amb el sistema d'acoblament amb DIC i NHS, on es va detectar en el filtrat només un 5% de l'àcid 3-fenilpropiònic inicial, fet que suggeria un 95% d'acoblament de l'àcid a la matriu de sefarosa.

Així doncs, es van utilitzar aquestes condicions d'acoblament per enllaçar el peptòide àcid N13-13-10COOH a la sefarosa.

9.2.2. ACOBLAMENT D'N13-13-10COOH A UNA COLUMNA DE SEFAROSA

9.2.2.1. Determinació de la recta de calibració

La recta de calibració del peptòide àcid N13-13-10COOH es va realitzar de forma anàloga a la recta de calibració de l'àcid 3-fenilpropioní, fent servir el mateix patró de referència, el peptòide N15-20-20C. La relació dels percentatges d'àrea per HPLC i la relació de les corresponents concentracions dels dos peptòides va donar lloc a la recta de calibració següent, amb un coeficient lineal superior a 0.999:

$$\%_{\text{N13-13-10COOH}} / \%_{\text{patró}} = 1.092 \times C_{\text{N13-13-10COOH}} / C_{\text{patró}} + 0.023 \quad (R^2=0.9993)$$

9.2.2.2. Acoblament a la matriu de sefarosa

L'acoblament del peptòide àcid N13-13-10COOH a la matriu de sefarosa es va realitzar emprant les condicions d'acoblament determinades amb l'àcid 3-fenilpropioní. En una xeringa de 10 ml de capacitat es van afegir 2.5 ml de gel de sefarosa, els reactius d'acoblament DIC i NHS en els dissolvents de reacció, H₂O (pH=4.5)/dioxà (1:1), i una quantitat estequiomètrica del peptòide àcid en relació als grups amino de la sefarosa. Després de 24 h d'agitació, la mescla de reacció es va filtrar i el gel es va rentar per tal de procedir al seu emmagatzematge i conservació.

Mitjançant la recta de calibració del peptòide àcid N13-13-10COOH es va determinar la quantitat de peptòide no enllaçat a la sefarosa present al filtrat de la reacció i als rentats posteriors de la matriu. Els resultats obtinguts van indicar que un 19% del peptòide àcid afegit a la reacció no es va enllaçar al gel, i que, per tant, es podia concloure que la columna de sefarosa contenia acoblat a l'entorn d'un 80% del peptòide N13-13-10COOH.

Cal remarcar que, segons les especificacions del lot utilitzat, la càrrega del gel de sefarosa era d'entre 7 i 12 μ mol grups amino/ml de gel sec, i que tots els càlculs realitzats es van dur a terme considerant una càrrega mitjana de 10 μ mol grups amino/ml de gel sec.

Aquesta aproximació podria ser una font d'error i podria haver conduït a uns resultats lleugerament diferents respecte el veritable percentatge d'acoblament, tot i que creiem que no van constituir errors importants a tenir en consideració.

9.3. ACTIVITAT BIOLÒGICA

Els estudis realitzats per identificar les dianes d'interacció del peptoide N13-13-10C mitjançant la tècnica de cromatografia d'afinitat, els va dur a terme la Dra. Clàudia Cases del Laboratori de Bioinvestigació de Merck Farma i Química, S. A.

9.3.1. ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL PEPTOIDE BIOTINILAT

Primerament, es va realitzar un assaig de proliferació cel·lular amb cèl·lules humanes d'adenocarcinoma de còlon de tipus HT29 amb el peptoide N13-13-10C (**17**), amb el peptoide biotinilat per l'extrem C-terminal (**24**) i amb el peptoide biotinilat per l'extrem N-terminal (**26**), per tal de comparar l'activitat inhibidora dels tres compostos (vegeu Figura 9.6).

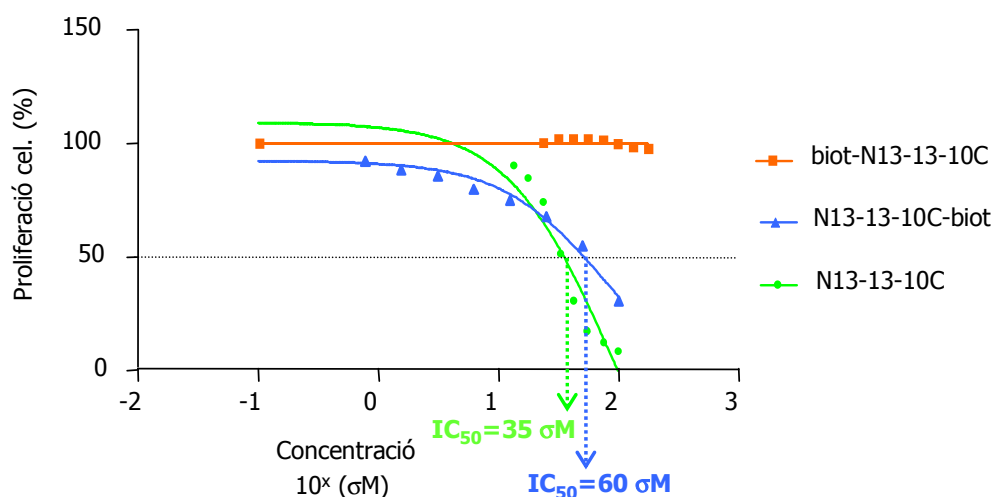


Figura 9.6. Determinació de la proliferació (%) en cèl·lules HT29 tractades amb el peptoide biotinilat per l'extrem C-terminal **24** (N13-13-10C-biot) i per l'extrem N-terminal **26** (biot-N13-13-10C), i amb el peptoide **17** (N13-13-10C), després de 72 h.

Es va observar com el compost més actiu continuava sent el peptòide **17** ($IC_{50}=35 \sigma M$), mentre que el peptòide biotinilat per l'extrem C-terminal **24** mostrava una activitat inferior amb una IC_{50} de $60 \sigma M$, probablement degut a l'impediment estèric provocat per la biotina i l'espaiador sobre l'activitat del peptòide. El peptòide biotinilat per l'extrem N-terminal **26** no va mostrar inhibició de la proliferació cel·lular, indicació que el punt de reconeixement amb el receptor es trobava a l'extrem N-terminal. Per aquest motiu es va decidir continuar els assaigs de cromatografia d'afinitat únicament amb el compost biotinilat **24**.

Les columnes d'avidina enllaçades a agarosa les va subministrar la casa comercial Pierce. El assaigs de cromatografia d'afinitat s'han esquematitzat a la Figura 9.7.

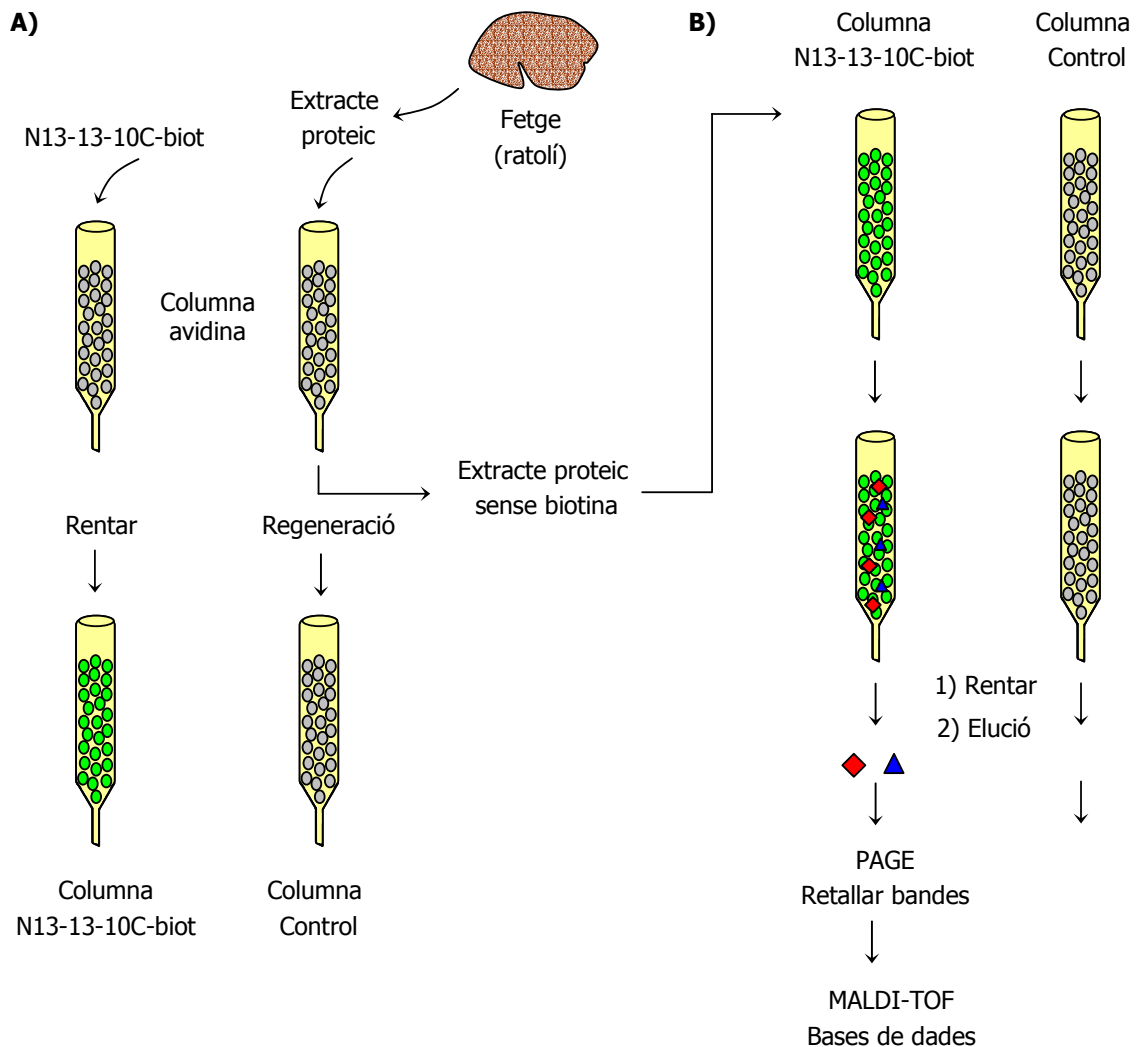


Figura 9.7. Procés seguit per a l'assaig de cromatografia d'afinitat per acoblar el peptòide biotinilat **24** a una columna d'avidina (A) i identificar les proteïnes d'un extracte de fetge de ratolí que queden retingudes a la columna (B). Paral·lelament es va fer una columna control de l'assaig.

Primerament es va fer passar una dissolució del compost biotinitat **24** per una columna d'agarosa-avidina, i es van realitzar uns rentats per eliminar el compost que no s'havia enllaçat. Paral·lelament, es va fer passar un extracte proteic de cèl·lules de fetge de ratolí per una columna d'agarosa-avidina per eliminar la possible biotina present a l'extracte proteic (vegeu Figura 9.7, A). Aquest extracte es va fer passar per la columna on hi havia immobilitzat el peptòide, així com per la columna sense peptòide (control de l'assaig, vegeu Figura 9.7, B). Després de rentar les columnes per eliminar l'extracte proteic no enllaçat, es van eluir les proteïnes retingudes per rentats amb unes dissolucions de biotina 2 mM, de KCl 0.5 M, de KCl 1 M i amb una dissolució de pH=2.8. Amb els filtrats de cada rentat es va realitzar un gel d'electroforesi de poliacrilamida (PAGE) i les bandes més intenses del gel es van aïllar per identificar les proteïnes per espectrometria de masses MALDI-TOF.

Aquest assaig d'afinitat va conduir a la identificació d'Alfa-actinina 4, Hsp90, PDI p55 i Ras GTPasa, com a proteïnes que interaccionen amb el peptòide N13-13-10C. Aquests resultats es van voler confirmar amb el peptòide enllaçat a la columna de sefarosa.

9.3.2. ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL PEPTÒIDE ENLLAÇAT A SEFAROSA

Ja s'ha comentat que els resultats de l'assaig de proliferació cel·lular amb els compostos biotinitats van mostrar que l'extrem *N*-terminal del peptòide N13-13-10C era important per l'activitat antiproliferativa. Per aquest motiu, es va decidir preparar la columna de sefarosa únicament amb el peptòide enllaçat per l'extrem C-terminal.

Es va fer passar un extracte proteic de cèl·lules de fetge i de cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon de tipus HT29 de ratolí per la columna de sefarosa amb el peptòide acoblat i per una columna sense peptòide, com a control d'aquest assaig d'afinitat, de forma anàloga a com es va realitzar a l'assaig de cromatografia d'afinitat amb la columna d'avidina (vegeu Figura 9.7, B). A continuació es van fer diferents rentats amb 0.5 M de KCl, 1 M de KCl i 3 M de KCl per eluir les proteïnes retingudes a la columna, i amb els filtrats de cada rentat es va realitzar un gel d'electroforesi de poliacrilamida. Les bandes més intenses del gel de poliacrilamida es van aïllar i les proteïnes es van identificar per espectrometria de masses MALDI-TOF.

En termes generals, aquest assaig d'afinitat va conduir a la identificació de les mateixes proteïnes que s'havien identificat en la cromatografia d'afinitat amb el peptòide biotinitat:

Alfa-actinina 4, Hsp90, PDI p55 i Ras GTPasa. Aquests resultats van validar els assaigs realitzats de cromatografia d'afinitat, tant amb agarosa-avidina i com amb sefarosa.

Així doncs, els assaigs de cromatografia d'afinitat van permetre identificar proteïnes que interaccionaven amb el peptòide N13-13-10C d'un extracte de cèl·lules de fetge de ratolí, i que, per tant, podien constituir dianes potencials d'aquest peptòide. En col·laboració amb el Laboratori de Bioinvestigació de Merck Farma i Química, S. A., s'haurà de determinar si la interacció del peptòide i les dianes és directa o indirecta a través de proteïnes pont.

10. ESTUDIS DE DIMERITZACIÓ I CICLACIÓ DELS PEPTOIDES ÀCIDS

Al llarg d'aquesta segona part de la memòria, s'ha comentat que el nostre interès en obtenir peptoides àcids va ser amb la finalitat d'immobilitzar el peptoide N13-13-10C pel seu extrem C-terminal a un suport sòlid i poder dur a terme estudis d'interacció amb receptors potencials proteics que donessin informació de l'activitat antiproliferativa detectada.

També s'ha explicat a l'apartat 9.1.1 que quan es va dur a terme l'acoblament del peptoide àcid N13-13-10COOH a la biotina amb PyBOP i DIEA, es va observar la formació del subproducte de dimerització-ciclació del peptoide. Basant-nos en aquest fet, es va plantejar la possibilitat de sintetitzar dímers i dímers-cíclics de peptoides per comprovar si la combinació de dos peptoides amb una activitat moderada per una diana determinada permetia obtenir una molècula amb una activitat i selectivitat més elevada per la mateixa diana que la de cada peptoide per separat (vegeu Figura 10.1).

L'obtenció de peptoides cíclics va semblar una via interessant per augmentar l'afinitat i selectivitat dels peptoides per determinades dianes. Aquest fet s'ha comprovat amb diferents

exemples en el camp dels pèptids i peptidomimètics, en sintetitzar compostos cíclics que presentaven activitats de gran interès terapèutic, com l'Apicidina A,¹⁶⁴ les ciclosporines,¹⁴⁹ l'Omfalotina A,^{148,149} lligands selectius del receptor CCK-B¹⁶⁵ o lligands amb alta afinitat per als dominis Grb2 SH3.¹⁶⁶

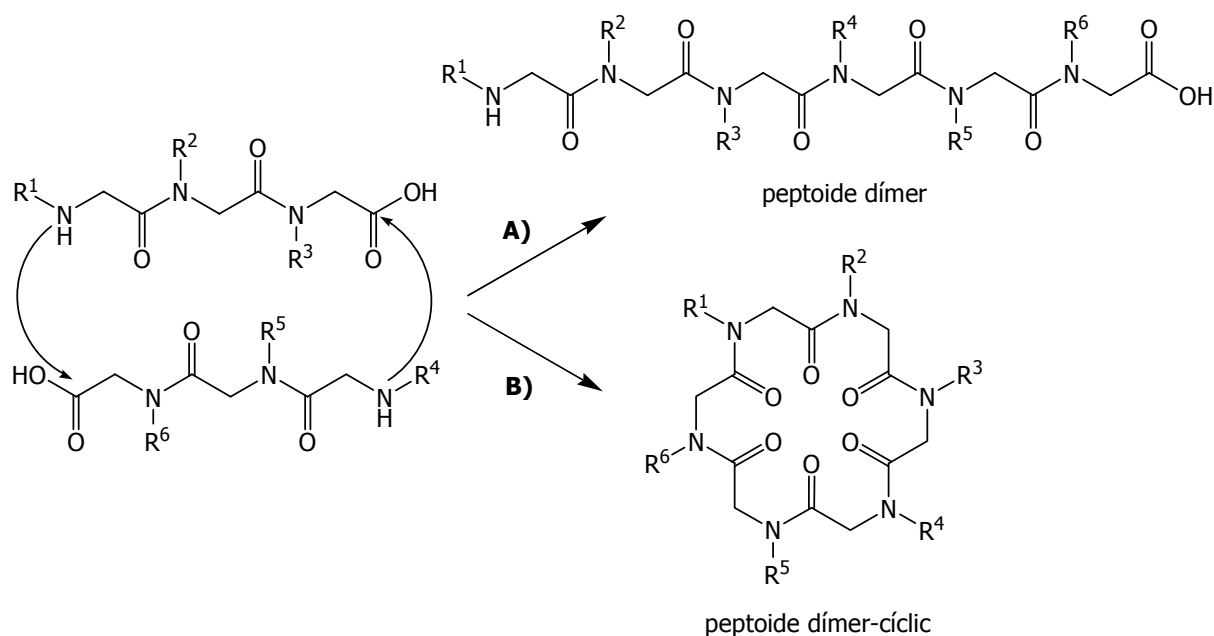


Figura 10.1. Reacció de dimerització (A) i ciclació intramolecular (B) entre dues molècules de peptide amb un extrem carboxílic, amb PyBOP i DIC com agents activants. Si $R^1=R^4$, $R^2=R^5$ i $R^3=R^6$ s'obtidrien homodímers; en cas contrari, s'obtidrien heterodímers.

Així doncs, es va decidir estudiar i optimitzar aquestes reaccions de dimerització i de ciclació intramolecular. D'aquesta manera, seria possible en un futur pròxim el plantejament d'una quimioteca de peptoides dímers i/o de peptoides dímers-cíclics per assajar davant de les diferents dianes terapèutiques d'interès, en particular les que enclouen interaccions proteïna-proteïna. En aquestes quimiotèques trobaríem compostos formats a partir de dues molècules d'un mateix peptide (homodímers) i compostos formats a partir de dues molècules de peptoides diferents (heterodímers).

10.1. ESTUDIS DE DIMERITZACIÓ I CICLACIÓ EN DISSOLUCIÓ

Es van realitzar diverses proves d'acoblament per determinar les millors condicions per a la dimerització i les millors condicions per a la ciclació intramolecular, en dissolució. El peptoides àcid model que es va fer servir en aquest estudi va ser l'N13-13-10COOH (**21**).

Primerament, es va observar que fent servir NHS i DIC o DCC, en DMF i amb Et₃N, les reaccions de dimerització i de ciclació eren molt lentes. Després de 20 h de reacció, encara quedava un 38% de peptoides àcid **21** sense reaccionar (control per HPLC) i es va detectar per espectrometria de masses (CL-EM) la formació de l'intermedi d'acoblament entre el peptoides i la carbodiimida, és a dir l'*O*-acilisorurea, en un 5% per HPLC, així com un 37% de peptoides dímer i un 20% de peptoides dímer-cíclic (vegeu Figura 10.2).

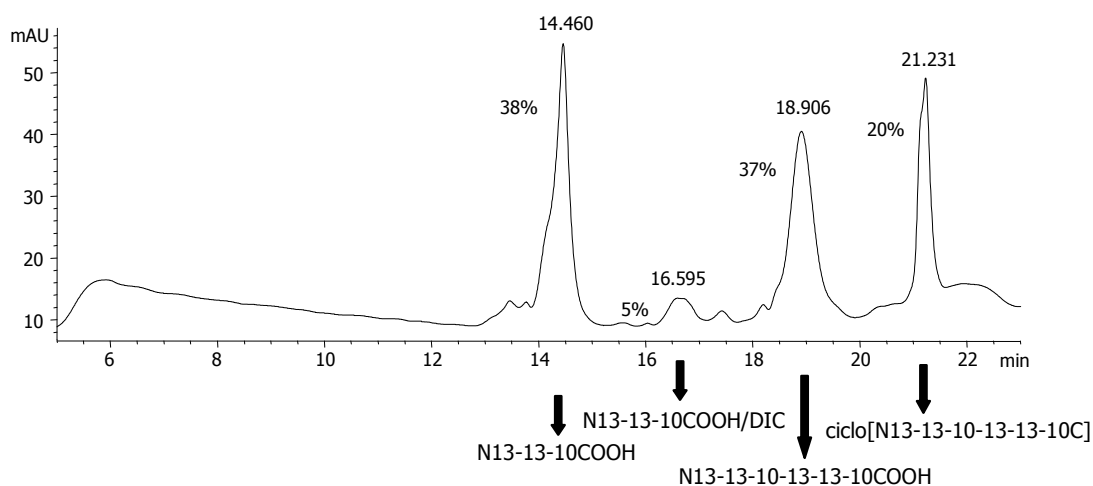


Figura 10.2. Perfil cromatogràfic per HPLC de la reacció de dimerització i ciclació del peptoides àcid N13-13-10COOH (tr=14.5 min) amb NHS i DIC. Formació de l'*O*-acilisorurea entre N13-13-10COOH i DIC (tr=16.6 min), del peptoides dímer (tr=18.9 min) i del peptoides dímer-cíclic (tr= 21.2 min). La identificació de cada pic es va realitzar per CL-EM.

Tot i que es va repetir la reacció anterior a 60 °C per accelerar la velocitat de les reaccions de dimerització i de ciclació no es van obtenir resultats satisfactoris i va quedar, igualment, peptoides àcid **21** sense reaccionar.

Contràriament, si s'utilitzava PyBOP i DIC com a reactius d'acoblament, en DMF i amb Et₃N o DIEA, les reaccions es completaven en 30 min i s'obtenien perfils cromatogràfics

d'HPLC més nets que en el cas anterior, on pràcticament només s'observava el producte de dimerització-ciclació com a majoritari de la reacció, en un 75% per HPLC (vegeu Figura 10.3).

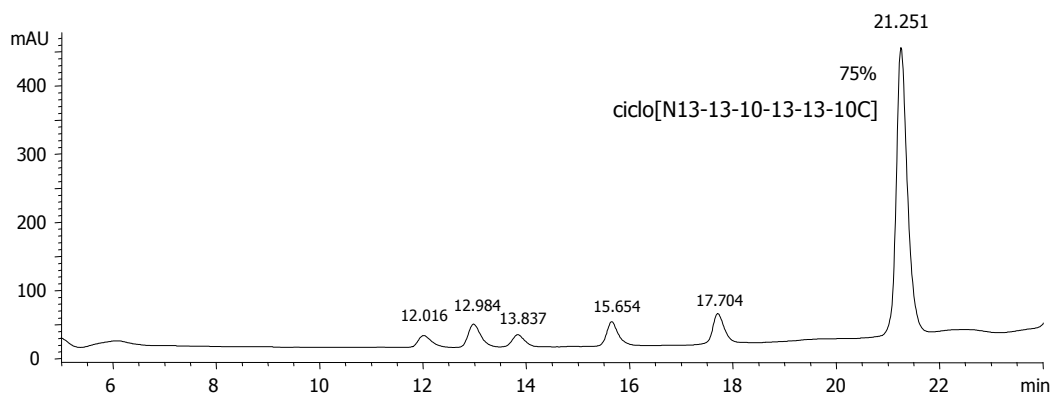


Figura 10.3. Perfil cromatogràfic per HPLC de la reacció de dimerització-ciclació del peptòide àcid N13-13-10COOH amb PyBOP i DIC. Formació del peptòide homodímer-cíclic ciclo[N13-13-10-13-13-10C] (tr=21.3 min), com a producte majoritari de la reacció.

Es van analitzar amb més cura les condicions d'acoblament de la reacció anterior i es va comprovar que només amb PyBOP les reaccions transcorrien satisfactòriament, sense caldre l'addició de la carbodiimida, i que les reaccions requerien del medi bàsic, proporcionat per Et₃N o DIEA. En aquestes condicions, en cap cas no es va poder observar per HPLC la presència del peptòide dímer, sinó únicament del peptòide dímer-cíclic.

Així doncs, es va dur a terme la reacció de dimerització-ciclació del peptòide àcid **21** en dissolució amb PyBOP i DIEA, en DMF. El residu resultant es va purificar per HPLC a escala semipreparativa per obtenir el peptòide homodímer ciclo[N13-13-10-13-13-10C] (**27**) amb un 14% de rendiment (vegeu Figura 10.4). El producte es va identificar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular 1087.5 (M + H)⁺. No obstant, no es va poder realitzar l'assignació dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN degut a que la presència de diferents conformacions de l'homodímer ciclat va conduir a uns espectres molt complexos.

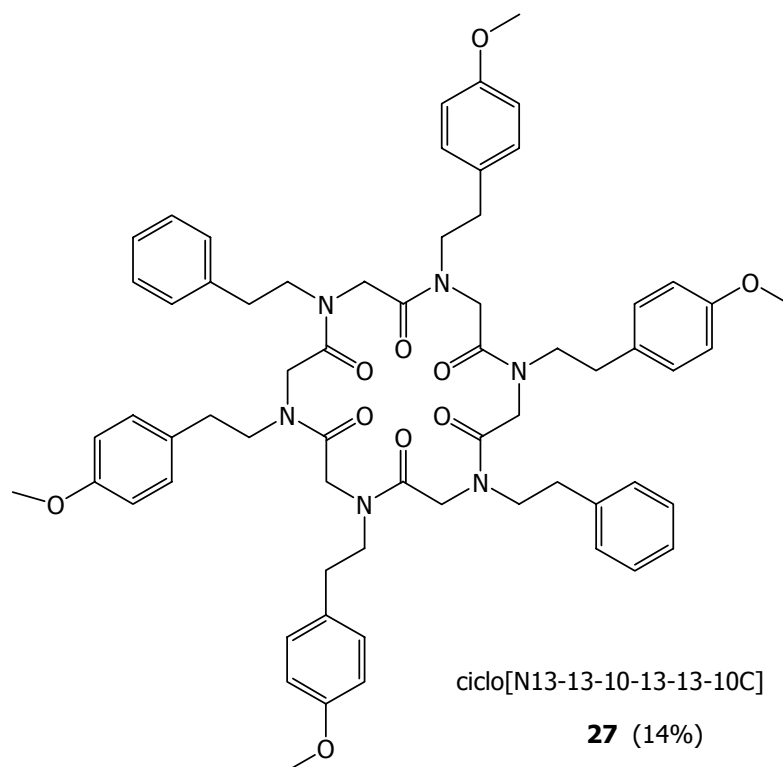


Figura 10.4. Peptide ciclo[N13-13-10-13-13-10C] resultant de la dimerització i ciclació del peptide àcid N13-13-10COOH.

Tot i que, aparentment, el perfil de la reacció anterior per HPLC analític era prou net i s'obtenia majoritàriament el producte dímer-cíclic **27**, a l'hora de purificar el compost per HPLC a escala semipreparativa es va observar un perfil cromatogràfic força diferent i difícil de purificar. És possible que durant la reacció tingués lloc la formació d'altres oligòmers, cíclics o sense ciclar, en menor proporció, els quals no es van detectar per l'HPLC en quedar distribuïts en la línia de base, però sí en purificar una mostra més concentrada. Aquesta explicació també podria ser la raó d'obtenir un rendiment de reacció tan baix (rdt. 14%).

Un altre factor a tenir en compte és que l'agent d'acoblament utilitzat, PyBOP, és probablement massa voluminós per situar-se dins de la cavitat formada per dues molècules de peptide (vegeu Figura 10.5) i per tant podria afavorir la formació d'altres oligòmers.

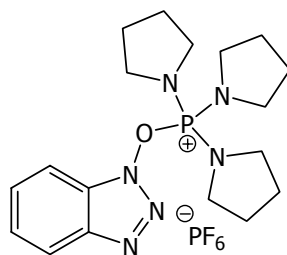


Figura 10.5. Estructura de l'agent d'acoblament PyBOP.

Així doncs, amb el procediment de dimerització i ciclació en dissolució amb PyBOP i DIEA hi ha dos problemes:

- ∅ No es pot controlar la formació del peptòide dímer perquè s'obté únicament peptòide dímer-ciclat.
- ∅ S'obtenen altres productes d'oligomerització difícils de detectar i de controlar.

Amb la finalitat de resoldre aquests problemes i millorar la síntesi de peptòides dímers i de peptòides dímers-cíclics es va dur a terme un estudi de dimerització en fase sòlida i de ciclació en dissolució.

10.2. ESTUDIS DE DIMERITZACIÓ EN FASE SÒLIDA I CICLACIÓ EN DISSOLUCIÓ

Per dur a terme aquest estudi de dimerització en fase sòlida i ciclació en dissolució es va escollir com a peptòide àcid model l'*N*37-13-15COOH. El procediment sintètic que es va seguir es mostra a la Figura 10.6.

La síntesi del peptòide àcid *N*37-13-15COOH es va realitzar en resina clorur de 2-clorotritil, seguint el procediment descrit a l'apartat 8.3.3. Després del tercer acoblament d'amina, la resina es va dividir en dues parts iguals. Amb la meitat de la resina es va fer una etapa addicional de protecció de l'extrem *N*-terminal del peptòide amb el grup Fmoc, abans de procedir a l'escissió del peptòide. Aquesta etapa de protecció va resultar molt important per tal que, posteriorment, s'acoblés correctament aquest peptòide àcid protegit *N*-Fmoc-37-13-15COOH a l'altra part de la resina que contenia el peptòide *N*37-13-15COOH enllaçat,

utilitzant DIC com agent activant. En les proves que es van realitzar sense protegir l'extrem *N*-terminal del peptoid no es va observar acoblament, tot i afegir diferents agents d'acoblament, com ara HOBt o PyBOP.

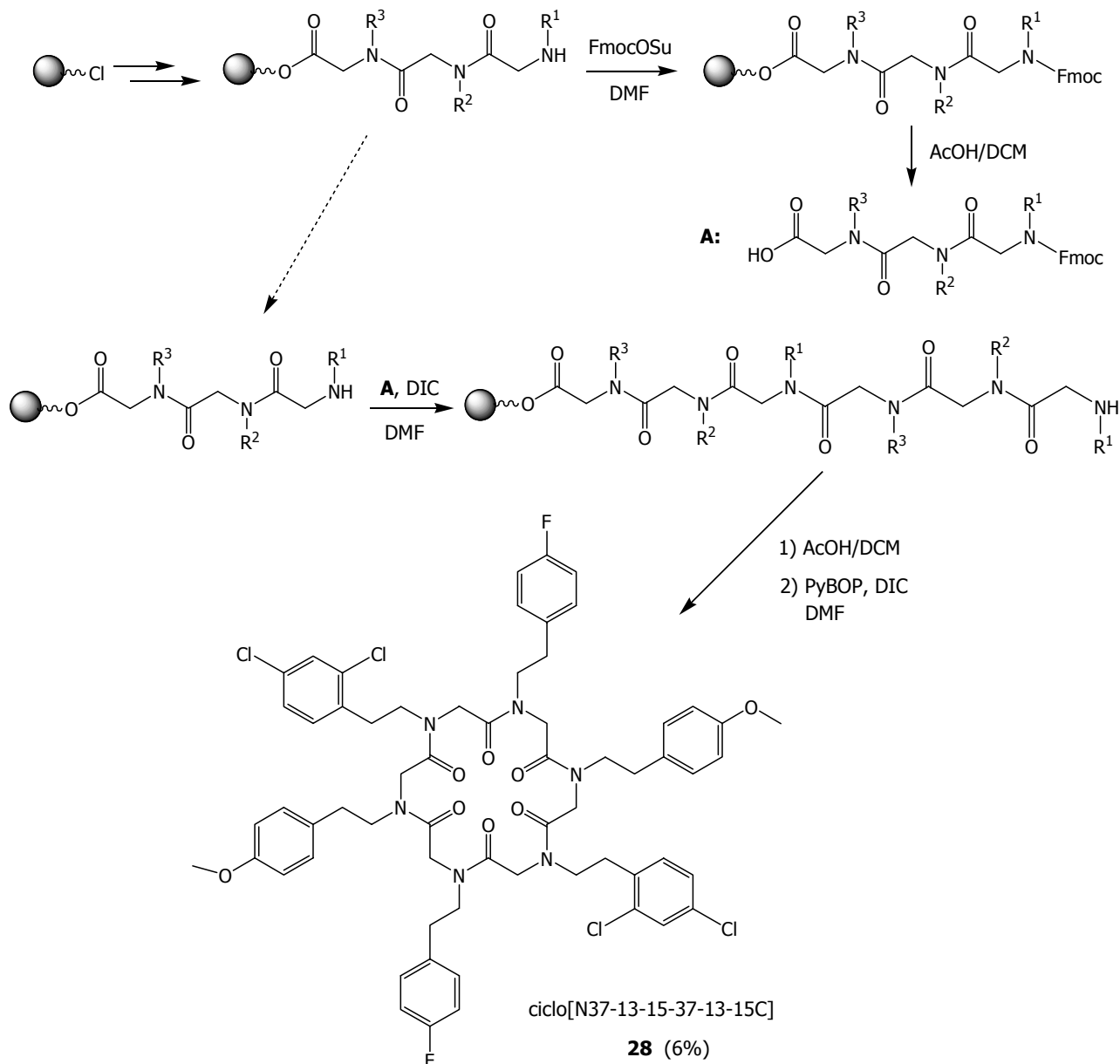


Figura 10.6. Seqüència sintètica seguida per obtenir peptoides dímers en fase sòlida i ciclació en dissolució. Síntesi del peptoid N37-13-15COOH en fase sòlida i divisió de la resina en dues parts: una part de la resina es protegeix amb el grup Fmoc i el peptoid protegit s'acobla a l'altra part de la resina per obtenir el peptoid dimeritzat. Després de l'escissió de la resina té lloc l'etapa de ciclació intramolecular en dissolució. R¹: -CH₂CH₂C₆H₄-*p*F, R²: -CH₂CH₂C₆H₄-*p*OCH₃ i R³: -CH₂CH₂C₆H₃-(*o,p*)Cl.

Seguidament, va tenir lloc l'etapa de desprotecció dels grups Fmoc i l'escissió del dímer àcid N37-13-15-37-13-15COOH de la resina. L'etapa de ciclació intramolecular es va dur a

terme en dissolució amb PyBOP i DIEA, de forma anàloga a l'apartat anterior. El residu resultant es va purificar per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir el peptòide homodímer ciclo[N37-13-15-37-13-15C] (**28**) amb un 6% de rendiment. El producte **28** es va identificar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular 1199.4 (M + H)⁺. No obstant, igualment que amb l'homodímer ciclat **27**, no es va poder realitzar l'assignació dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN degut a que la presència de diferents conformacions de l'homodímer ciclat va conduir a uns espectres molt complexos.

A diferència de la dimerització i ciclació en dissolució de l'apartat anterior, aquesta seqüència sintètica permetia la formació de dímers i, en cas de desitjar-ho, afavoria la seva ciclació intramolecular per obtenir majoritàriament els productes dímers-cíclics, tot disminuint la possibilitat de formació d'altres oligòmers al cru de reacció.

No obstant, la purificació del compost final per HPLC a escala semipreparativa va resultar complicada degut a la presència de diversos subproductes de reacció. Tal i com s'ha explicat a l'apartat 8.3.3, la síntesi en fase sòlida de peptòides àcids amb resina clorur de 2-clorotritil donava lloc al peptòide àcid majoritàriament (N37-13-15COOH) en un 80-85% per HPLC, però també al peptòide àcid provinent de dues unitats de glicina (N37-13COOH) en un 15-20% per HPLC. En no partir d'un peptòide àcid amb una puresa elevada, es van anar formant altres subproductes d'acoblament que van donar lloc a un perfil cromatogràfic final amb diversos pics importants, tot i que el pic majoritari va ser el corresponent al producte dímer-cíclic desitjat.

Així doncs, optimitzar un procediment general per a la síntesi de peptòides àcids en fase sòlida esdevé un objectiu crucial per obtenir peptòides dímers i peptòides dímers-cíclics amb bons rendiments de reacció i pureses elevades. Aquest inconvenient ens va fer ajornar el plantejament del disseny i la síntesi d'una quimioteca de peptòides dímers i d'una quimioteca de peptòides dímers-cíclics fins que s'hagi pogut aconseguir l'optimització de la síntesi de peptòides àcids en fase sòlida amb pureses superiors al 90-95% per HPLC.

Tot i així, l'existència de diferents compostos dímers o compostos dímers-cíclics en una mateixa mostra podria resultar interessant per un primer cribratge en la recerca de noves molècules moduladores d'interaccions proteïna-proteïna, on la dimensió dels lligands pot ser un factor crucial per a la interacció amb la diana.

11. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

11.1. CONSIDERACIONS GENERALS

Les reaccions químiques, instrumentació i reactius referides a la Part II es van realitzar tenint en compte les consideracions generals descrites en l'apartat 6.1

Les resines emprades per a la síntesi de peptoides àcids van ser clorur de 2-clorotritil, clorur de tritil i Wang tricloroacetimidat, formades per un polímer de poliestirè reticulat amb un 1% de divinilbenzè, i TentaGel, formada per un polímer de poliestirè i polietilenglicol. En tots els casos es van deixar en un dessecador tota una nit abans d'utilitzar-les.

El gel de EAH sefarosa 4B estava format per una unió covalent d'1,6-diaminohexà a la sefarosa 4B. Es presentava en un 20% d'etanol i contenia una càrrega de 7-12 σ mol grups amino/ml gel sec. Va ser subministrat per Amersham Biosciences.

El DCM, la DMF i el dioxà utilitzats en la síntesi de peptoides àcids i dels productes biotinilitzats van ser destil·lats sobre CaH_2 .

Les anàlisis per HPLC per determinar l'evolució de les reaccions amb la biotina es van realitzar amb una columna de fase inversa de tipus Kromasil 100 de 5 μm (25 x 0.46 cm) de Scharlau. Eluents: tampó fosfat 100 mM (pH=6.0) i MeOH; gradient: 7 min a 10% de MeOH, de 10% a 40% en 8 min, de 40% a 60% en 10 min, de 60% a 100% en 5 min i 1 min a 100% de MeOH.

Els espectres d'IR en fase sòlida es van enregistrar en un aparell Bomen Michelson Series MB120 i les absorcions s'indiquen en cm^{-1} .

11.1.1. CONTROLS QUALITATIUS EN FASE SÒLIDA. TEST DE NINHIDRINA

Els controls qualitius en fase sòlida es van realitzar de la forma habitual amb els tests del cloranil i del TNBS. La introducció del "*safety-catch linker*" es va seguir amb el test de ninhidrina:

en un microtub es van disposar 1-3 mg de resina i s'hi van afegir dues gotes d'una dissolució A, dues gotes d'una dissolució B i dues gotes d'una dissolució C. El tub es va escalfar a 120 °C durant 4 min. Un color blau intens de la resina indica la presència d'amines primàries lligades a la resina, una tonalitat verda o blava indica la presència d'amines secundàries, i en altre cas la resina queda incolora.

- ∅ Solució A: 40 mg de fenol en 10 ml d'etanol.
- ∅ Solució B: 2 ml d'una dissolució aquosa de KCN 1 mM en 98 ml de piridina.
- ∅ Solució C: 2.5 g de ninhidrina en 50 ml d'etanol.

11.2. OBTENCIÓ DE PEPTOIDES ÀCIDS

11.2.1. HIDRÒLISI DE PEPTOIDES

11.2.1.1. Prova d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C en medi àcid

Seguint el procediment experimental descrit per Ladenheim i col.,¹²⁵ a una dissolució de 10 mg (0.02 mmol) d'N10-15-15C⁺⁺⁺⁺ en 1 ml d'una mescla d'H₂SO₄ 1 M/ACN (20:1) es van

⁺⁺⁺⁺ La síntesi del peptoide N10-15-15C es va fer seguint el procediment descrit a l'apartat 6.3. Per aquestes proves el residu final no es va purificar per HPLC a escala semipreparativa.

afegir 28 mg (0.41 mmol, 20 eq.) de NaNO₂. La mescla de reacció es va refredar a 0 °C en un bany de gel i es va mantenir en agitació durant 1 h. Passat aquest temps es va fer una segona addició de NaNO₂. Després de 2 h de reacció, es va analitzar una alíquota del cru per HPLC (vegeu condicions d'anàlisi de peptoides de l'apartat 6.1), on es va observar la desaparició del peptoide (t_r= 16.8 min) i l'aparició de dos nous pics (t_r= 1.6 i 3.8 min). No obstant, les anàlisis per espectrometria de masses d'aquest cru de reacció no van mostrar la presència del peptoide àcid.

També es va realitzar una prova anàloga a l'anterior però en 10% d'H₂SO₄, sense afegir NaNO₂, i mantenint la mescla en ebullició durant 2 h. En cap cas no es va poder determinar per espectrometria de masses el peptoide àcid.

11.2.1.2. Proves d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C en medi bàsic

A una dissolució de 10 mg (0.02 mmol) d'N10-15-15C en 0.5 ml de MeOH es va afegir 1 ml d'una dissolució de NaOH al 10%. La mescla de reacció es va escalfar a 90 °C i es va mantenir en agitació durant 2 h. Passat aquest temps, es va analitzar una alíquota del cru per HPLC, on es va observar la desaparició del peptoide (t_r= 16.8 min) i l'aparició de 3 nous pics (t_r= 9.3, 13.4 i 17.8 min). Les anàlisis per CL-EM van mostrar la presència del peptoide àcid (t_r=17.8 min), així com dels productes resultants de la hidròlisi d'una de les amides *N,N'*-disubstituïda del peptoide, l'N10-15COOH i l'N15COOH (t_r=13.4 i 9.3 min, respectivament).

Per minimitzar aquestes hidròlisis no desitjades es va variar la concentració de la dissolució de NaOH (5, 10 i 15%), així com la temperatura de reacció (t.a., 50, 65 i 80 °C), i es van fer controls per HPLC a diferents temps de reacció (entre 5 min i 3 h). Igualment, es van realitzar diverses proves utilitzant radiació de microones. En cap cas no es va poder obtenir el peptoide àcid amb una puresa superior al 75% per HPLC.

[*N*-(2-Feniletil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicina (N10-15-15COOH)

CL-EM: 637.8, 639.8, 641.8, 643.8 (M + H, Cl₄)⁺

[*N*-(2-Feniletil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicina (N10-15COOH)

CL-EM: 408.9, 410.9, 412.9 (M + H, Cl₂)⁺

***N*-[2-(2',4'-Diclorofenil)etil]glicina**

(N15COOH)

CL-EM: 247.9, 249.9, 251.9 (M + H, Cl₂)⁺

11.2.1.3. Proves d'hidròlisi del peptoide N10-15-15C en fase sòlida. Disseny d'experiments

El procediment experimental emprat per al disseny d'experiments on es van estudiar els factors de **% de TFA**, **% d'H₂O**, **T** i **t** va utilitzar els valors per cada nivell que s'han mostrat a la Taula 8.1 de l'apartat 8.2.3.1.

Per aquest estudi es van fer servir tubs d'assaig de vidre de 100 ml amb tap roscat acoblables al Carousel de Radleys, en els quals es van afegir 10 mg del peptoide N10-15-15C unit a resina de poliestirè AM RAM (per la síntesi del peptoide vegeu apartat 6.3) a 1 ml de DCM i els valors determinats de **% de TFA** i **% d'H₂O**, a una **T** i durant un **t** determinats mostrats a la Taula 8.2 de l'apartat 8.2.3.3. Passat el temps de reacció, cada residu es va filtrar a través d'una xeringa de 3 ml de polipropilè amb placa porosa de polietilè i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. Els residus finals es van analitzar per HPLC (detecció a 220 nm), però en cap cas no es va observar el peptoide àcid desitjat N10-15-15COOH.

11.2.1.4. Hidròlisi de peptoides amb resina Amberlyst-15.¹²⁷ Disseny d'experiments

11.2.1.4.1. Procediment experimental del disseny d'experiments amb el peptoide N10-15-15C

El procediment experimental emprat per al disseny d'experiments on es van estudiar els factors **eq. de resina Amberlyst-15**, **T**, **t** i **% d'H₂O** va utilitzar els valors per a cada nivell que s'han mostrat a la Taula 8.3 de l'apartat 8.2.4.1.

Per aquest estudi es van fer servir tubs d'assaig de vidre de 100 ml amb tap roscat acoblables al Carousel de Radleys, en els quals es van afegir 5 mg (7.8 σ mol) del peptoide N10-15-15C dissolts en 1 ml de dioxà i seguidament es van afegir els valors de **% d'H₂O** i

d'eq. de resina **Amberlyst-15** (4.7 meq./g), tot mantenint la mescla de reacció en agitació als valors de **T** i durant un **t** que s'han mostrat a la Taula 8.4 de l'apartat 8.2.4.3. Passat el temps de reacció, cada cru es va filtrar a través d'una xeringa de 3 ml de polipropilè amb placa porosa de polietilè, i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. Els crus resultants es van analitzar per HPLC (detecció a 220 nm), per obtenir els percentatges de peptoide i de peptoide àcid mostrats a la Taula 8.4 de l'apartat 8.2.4.3. En els experiments **4** i **16** es van obtenir valors de conversió superiors al 90% de peptoide àcid.

11.2.1.4.2. Procediment general per a la hidròlisi de peptoides catalitzada per la resina Amberlyst-15.

A una dissolució de 8 μ mol de peptoide en 1 ml de dioxà (amb un 4% d'H₂O) es van afegir 50 mg (4.7 meq./g, 30 eq.) de resina Amberlyst-15, rentada prèviament amb MeOH. La mescla de reacció es va escalfar a 90 °C i es va mantenir en agitació durant 2 h. Passat aquest temps, el cru de reacció es va analitzar per HPLC per comprovar la desaparició del peptoide. Seguidament, aquest residu es va filtrar en una xeringa de 3 ml de polipropilè amb placa porosa de polietilè, i la resina es va rentar amb dioxà (amb un 10% de Et₃N) per recuperar el peptoide àcid. Els filtrats es van ajuntar i evaporar a pressió reduïda, per obtenir entre 4-4.5 mg d'un oli groguenc amb pureses al voltant del 90% per HPLC.

Els perfils cromatogràfics d'HPLC dels crus de reacció d'alguns dels peptoides que es van hidrolitzar s'han mostrat a la Figura 8.6 de l'apartat 8.2.4.5.

[*N*-(2-(4'-Metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N*-(2-feniletil)glicina (N13-13-10COOH) (21)

CL-EM: 562.5 (M + H)⁺

[*N*-(2-Feniletil)glicil]-[*N*-(3,3-difenilpropil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicina (N10-20-20COOH)

CL-EM: 682.4 (M + H)⁺

[*N*-(2-(4'-Metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicina (N13-15-20COOH)

CL-EM: 690.2, 692.2, 694.2 (M + H, Cl₂)⁺

**[*N*-(Isopentil)glicil]-[*N*-(3,3-difenilpropil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicina
(N4-20-15COOH)**

CL-EM: 626.3, 628.3, 630.3 (M + H, Cl₂)⁺

**[*N*-(3-(1'-Imidazolil)propil)glicil]-[*N*-(ciclopropil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicina
(N12-1-20COOH)**

CL-EM: 532.3 (M + H)⁺

**[*N*-(2-(4'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-
diclorofenil)etil]glicina**

(N37-15-15COOH)

CL-EM: 656.1, 658.1, 660.1, 662.1 (M + H, Cl₄)⁺

11.2.2. SÍNTESI DE PEPTOIDES ÀCIDS EN FASE SÒLIDA

11.2.2.1. Amb resina clorur de 2-clorotritil

11.2.2.1.1. Procediment general

En una xeringa de 10 ml que contenia 525 mg (1.49 mmol/g, 0.78 mmol) de resina de poliestirè clorur de 2-clorotritil es van addicionar 5 ml de DCM per tal d'inflar-la. Seguidament, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va procedir a l'acilació.

Acilació: sobre la resina inflada amb DCM, es va afegir una dissolució de 369 mg (3.9 mmol, 5 eq.) d'àcid cloroacètic en 5 ml de DCM. Seguidament s'hi van afegir 680 μ l de DIEA (3.9 mmol, 5 eq.) i la mescla es va agitar mecànicament durant 5 min, a t.a. i a 200 rpm. Passat aquest temps, es va fer una segona addició de 340 μ l de DIEA (2.0 mmol, 2.5 eq.) i la mescla es va agitar durant 40 min més. Transcorregut aquest temps, s'hi van afegir 400 μ l de MeOH i la mescla es va agitar durant 15 min més. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml).

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 5 ml de DMF es van afegir 3.9 mmol (5 eq.) d'amina primària i 680 μ l (3.9 mmol, 5 eq.) de DIEA. La mescla es va agitar durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, s'hi van afegir 400 μ l de MeOH i la mescla es va agitar durant 15 min més. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va

repetir l'operació. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La presència d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranil (color blau).

Segona acilació: sobre la resina es va afegir una dissolució de 370 mg (3.9 mmol, 5 eq.) d'àcid cloroacètic en 5 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament es van afegir 610 μ l (3.9 mmol, 5 eq.) de DIC i la mescla es va agitar mecànicament durant 45 min, a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). La desaparició de l'amina primària es va confirmar amb el test del cloranil (incolor).

La *segona aminació* es va dur a terme de forma anàloga a la primera.

La *tercera acilació* es va realitzar d'igual forma que la segona acilació.

La *tercera aminació* es va dur a terme de forma anàloga a les descrites anteriorment.

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 5 ml d'un còctel d'escissió format per DCM/AcOH (4:1), tornant-se la resina de color granatós. La mescla es va deixar agitant durant 30 min a t.a. A continuació la mescla es va filtrar en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi i el filtrat es va recollir en un matràs de 25 ml. La resina es va tornar a posar al tub i es va repetir l'operació. Els filtrats de les dues fraccions es van ajuntar i els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir uns 450-550 mg de residu, amb pureses generalment a l'entorn del 75-80% per HPLC.

Un alternativa a aquest procediment experimental per obtenir pureses de l'entorn del 85% per HPLC va consistir en substituir l'àcid cloroacètic emprat en les etapes d'acilació pel clorur de cloroacetil (3.9 mmol, 5 eq.), el qual es va afegir sobre la resina prèviament acondicionada amb DBU (3.9 mmol, 5 eq.).

La purificació del peptòide àcid N13-13-10COOH es va dur a terme per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir 100 mg del peptòide **21** amb una puresa superior al 98% per HPLC (rdt. global 23%). Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 15 min a 5% d'ACN, de 5% a 80% en 60 min, de 80% a 100% en 10 min i 10 min a 100%

d'ACN; flux 5 ml/min. Les assignacions dels senyals dels espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN d'aquest compost es van confirmar pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del confòrmer majoritari.

**[*N*-(2-(4'-Metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N*-(2-feniletíl)glicina
(N13-13-10COOH) (21)**

^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD): 7.34-7.09 (ac, 9H, H_{Ar}), 6.90-6.83 (ac, 4H, H_{Ar}), 4.24-3.80 (ac, 6H, 3 x COCH_2), 3.75-3.74 (s, 6H, 2 x CH_3O), 3.66-3.42 (ac, 2H, NCH_2CH_2), 3.32 (ac, 2H, NCH_2CH_2), 3.20-3.00 (ac, 2H, NCH_2CH_2), 2.96-2.58 (ac, 6H, 3 x NCH_2CH_2).

^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD): 172.3 (COOH), 170.2 (CO), 167.5 (CO), 160.2 (2 x C_{Ar}), 139.9 (C_{Ar}), 131.9 (2 x C_{Ar}), 131.3 (2 x CH_{Ar}), 130.8 (4 x CH_{Ar}), 130.5 (2 x CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 115.4 (4 x CH_{Ar}), 55.7 (2 x CH_3O), 51.4 (NCH_2CH_2), 51.2 (NCH_2CH_2), 50.1 (NCH_2CH_2), 49.1 (COCH_2N), 48.8 (COCH_2N), 47.8 (COCH_2N), 35.4 (NCH_2CH_2), 33.6 (NCH_2CH_2), 32.3 (NCH_2CH_2).

EMAR per $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_6$: Calculada: 562.2839 ($\text{M} + \text{H}$)⁺
Determinada : 562.2915

11.2.2.1.2. Proves d'escissió de la resina

En 7 tubs de vidre de 10 ml roscats amb sèptums de tefló resistents a l'àcid, es van afegir 30 mg de peptoide N37-13-15COOH unit a resina clorur de 2-clorotritil (sintetitzat segons el procediment descrit a l'apartat 11.2.2.1.1) i 500 μl d'un còctel d'escissió format per TFA/DCM (50:50, 20:80, 10:90, 5:95 o 2.5:97.5), AcOH/DCM (1:1) o H_2O /DCM (1:1). Les mescles es van deixar agitant durant 30 min a t.a. A continuació els dissolvents es van filtrar i evaporar a pressió reduïda.

Els residus obtinguts es van redissoldre en 1 ml d'ACN, i es van preparar noves dissolucions a partir de 10 μl de les dissolucions anteriors, 50 μl del peptoide N15-20-20C d'una concentració 1.2 mg/ml, el qual va actuar com a referència, i 140 μl d'ACN. L'anàlisi d'aquestes dissolucions per HPLC a 220 nm van mostrar perfils idèntics en totes elles, exceptuant el residu provinent del còctel d'escissió amb H_2O /DCM (1:1), on només es va observar el peptoide de referència.

11.2.2.2. Amb resina clorur de tritil. Intent de síntesi del peptòide N37-13-15COOH

En una xeringa de 10 ml que contenia 300 mg (1.40 mmol/g, 0.42 mmol) de resina de poliestirè clorur de tritil es van dur a terme les etapes d'acilacions i aminacions seguint el procediment descrit a l'apartat 11.2.2.1.1. En la primera aminació es van afegir 315 μ l d'**A15**, en la segona aminació 305 μ l d'**A13** i en la tercera aminació 275 μ l d'**A37**. El test del cloranil no va donar positiu després de la segona i tercera aminacions (incolor). Després de l'escissió final, l'anàlisi del residu per HPLC i EM va mostrar només un 5% del peptòide àcid i un 85% d'un pic, la massa del qual no es va poder atribuir a cap estructura.

11.2.2.3. Amb resina Wang tricloroacetimidat. Intents de síntesi del peptòide N37-13-15COOH

En una xeringa de 5 ml que contenia 200 mg (0.66 mmol/g, 0.13 mmol) de resina de poliestirè Wang tricloroacetimidat es van afegir 3 ml de DCM per tal d'inflar-la. Seguidament, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va procedir a l'acilació.

Acilació: sobre la resina inflada amb DCM, es va afegir una dissolució de 92 mg (0.66 mmol, 5 eq.) d'àcid bromoacètic en 3 ml de DCM i la mescla es va agitar mecànicament durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). La desaparició del grup tricloroacetimidat de la resina i la presència del grup carbonil del grup acil es van controlar mitjançant espectroscòpia d'infraroig: desaparició de les bandes d'absorció característiques de tensió N-H (3333 cm^{-1}) i de tensió C=N (1663 cm^{-1}), i l'aparició de la banda d'absorció característica de tensió C=O (1742 cm^{-1}).

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 3 ml de DMF es van afegir 100 μ l (0.66 mmol, 5 eq.) d'**A15** i 115 μ l (0.66 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va agitar mecànicament durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius es va repetir l'operació. En acabar, es va rentar la resina amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). El test del cloranil no va ser determinant per poder confirmar la presència d'una amina secundària (color verdós). Per aquest motiu es va tallar una petita part de la resina amb un còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2). L'anàlisi del producte d'escissió d'aquesta mostra per HPLC i EM va confirmar l'acoblament de l'**A15**.

Segona acilació: es va realitzar de forma anàloga a la primera acilació, però afegint 105 μ l de DIC.

Segona aminació: es va dur a terme com la primera aminació (95 μ l d'**A13**, 0.66 mmol, 5 eq.). No obstant, el test del cloranil va resultar negatiu per la presència d'amines secundàries (incolor), i l'anàlisi d'una petita part de la resina per HPLC i EM no va poder confirmar el segon acoblament en no trobar l'EM esperat. Es va decidir no continuar la síntesi del peptòide àcid per aquest procediment.

Diversos intents de síntesi fent servir amb àcid cloroacètic en comptes d'àcid bromoacètic en les etapes d'acilació van conduir a resultats igualment negatius.

11.2.2.4. Amb resina TentaGel. Intent de síntesi del peptòide N37-13-15COOH

En una xeringa de 5 ml que contenia 200 mg (0.43 mmol/g, 0.09 mmol) de resina de polietilenglicol TentaGel MB PHB es van dur a terme les diferents etapes d'acilacions i aminacions seguint els procediments descrits a l'apartat 11.2.2.3, exceptuant que el dissolvent de totes les reaccions va ser la DMF i que a la primera acilació es van afegir també 67 μ l (0.43 mmol, 5 eq.) de DIC i 11 mg (0.09 mmol, 1 eq.) de DMAP. Igualment, després de la segona aminació, els resultats d'HPLC i EM no van mostrar el producte esperat, motiu pel qual no es va continuar la síntesi.

11.2.2.5. Utilitzant l'estratègia "safety-catch linker". Intent de síntesi del peptòide N37-13-15COOH

Es van preparar diverses xeringues de 5 ml amb 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després d'inflar la resina amb 2 ml de DMF i de filtrar el dissolvent, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc.

Desprotecció: es va afegir una solució de 2 ml de piperidina al 20% (v/v) en DMF a la resina i la mescla es va deixar reaccionant durant 30 min. Després d'eliminar el dissolvent per filtració, es va repetir l'operació. A continuació es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). La desprotecció de la resina va ser comprovada mitjançant de test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell).

Introducció del "safety-catch linker": sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va afegir una dissolució de 79 mg (0.40 mmol, 5 eq.) d'àcid 4-sulfamoilbenzoic en 1 ml de DMF i una dissolució de 54 mg (0.40 mmol, 5 eq.) d'HOBt en 1 ml de DMF. Seguidament es van afegir 65 μ l (0.40 mmol, 5 eq.) de DIC i la mescla es va agitar mecànicament durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). La reacció es va seguir amb el test de ninhidrina, el qual va donar positiu (incolor). Una petita part de la resina es va tallar amb un còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2). L'anàlisi d'aquesta mostra per HPLC i EM va confirmar la introducció de l'espaiador.

Acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va intentar introduir la primera unitat d'acil utilitzant les diverses condicions de reacció que es mostren a continuació. Si no s'especifica el contrari, es van afegir 5 eq. de tots els reactius. En tots els casos la mescla es va agitar mecànicament a 200 rpm, i després d'eliminar l'excés de reactius per filtració, el procés es va repetir. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). Una petita part de la resina es va tallar amb el còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2) i es va analitzar per HPLC i EM.

- a. clorur de cloroacetil i Et₃N en DMF, 2 h
- b. clorur de cloroacetil (10 eq.) i Et₃N (10 eq.) en DMF, 2 h
- c. àcid cloroacètic, DIC i HOBt en DMF, 2 h
- d. àcid bromoacètic, DIC i HOBt en DMF, 2 h
- e. clorur de cloroacetil i Et₃N en DMF, 70 °C, 2 h
- f. clorur de cloroacetil i Et₃N en DMF, 70 °C, 12 h
- g. clorur de cloroacetil i Et₃N en DMF, radiació de microones (5 cicles de 20 min a 350 W)
- h. àcid cloroacètic, PyBOP i DIEA en DCM a -20 °C
- i. clorur de cloroacetil i DIEA en DCM a -20 °C**
- j. anhídrid cloroacètic, DMAP (1 eq.) i DIEA en DMF, 2 h**
- k. anhídrid cloroacètic (20 eq.), DMAP i DIEA (20 eq.) en DMF, 2 h
- l. anhídrid cloroacètic (20 eq.), DMAP i DIEA (20 eq.) en DMF, 60 °C, 2 h**
- m. anhídrid cloroacètic (20 eq.) i DMAP en DMF, 2 h
- n. anhídrid cloroacètic, DMAP (1 eq.) i DBU (10 eq.) en DMF, 2 h**
- o. anhídrid cloroacètic (20 eq.), DMAP i DBU (20 eq.) en DMF, 2 h
- p. anhídrid bromoacètic (10 eq.), DMAP (1 eq.) i DIEA (10 eq.) en DMF, 2 h

Després de l'anàlisi per HPLC dels crús de reacció de les mescles, es van obtenir els millors resultats en els casos **i**, **j**, **l** i **n**, amb un 70-85% de producte acilat. En no ser possible

millorar aquesta conversió, es va decidir no continuar la síntesi del peptoide àcid per aquest procediment.

11.3. ACOBLAMENT D'UN PEPTOIDE A BIOTINA

11.3.1. OBTENCIÓ DEL PEPTOIDE ÀCID N13-13-10COOH BIOTINILAT PER L'EXTREM C-TERMINAL

11.3.1.1. Síntesi del biotinilat d'*N*-succinimidil (**22**)

Seguint el procediment experimental descrit per Wilchek i col.,^{162,167} es van afegir 130 mg (1.12 mmol, 1.1 eq.) de NHS i 230 mg (1.12 mmol, 1.1 eq.) de DCC a una dissolució de 250 mg (1.02 mmol) de biotina en 3 ml de DMF. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 12 h. Passat aquest temps, la urea es va filtrar i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu obtingut es va rentar amb Et₂O (3 x 10 ml) i iPrOH (3 x 10 ml), i es va recristal·litzar d'iPrOH. Es van obtenir 252 mg d'un sòlid blanc (rdt. 71%).

Biotinilat d'*N*-succinimidil (**22**)¹⁶⁸

Pf: 209-211 °C (lit. 212-214 °C)¹⁶⁸

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-d₆): 6.30 (s, 1H, NHCONH), 6.27 (s, 1H, NHCONH), 4.30 (t, J=7.5 Hz, 1H, CHCHS), 4.15 (ac, 1H, CHCH₂S), 3.10 (ac, 1H, CHCHS), 2.83 (ac, 5H, 1H (CH_{a,b}S) + 4H (2 x COCH₂CH₂CO)), 2.61 (ac, 3H, 1H (CH_{a,b}S) + 2H (CH₂COO)), 1.69-1.40 (ac, 6H, 2H (CH₂CH₂CH₂CH₂COO) + 2H (CH₂CH₂CH₂CH₂COO) + 2H (CH₂CH₂CH₂CH₂COO)).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-d₆): 170.0 (2 x CO), 168.7 (COO), 162.5 (CO), 60.9 (CHCHS), 59.1 (CHCH₂S), 55.0 (CHCHS), 39.7 (CHCH₂S), 29.9 (CH₂COO), 27.7 (CHCH₂CH₂), 27.4 (CHCH₂CH₂), 25.3 (2 x COCH₂CH₂CO), 24.1 (CH₂CH₂COO).

CL-EM: 342.2 (M + H)⁺

11.3.1.2. Acoblament de l'espaiador 1,6-hexandiamina a la biotina

Una dissolució de 100 mg (0.29 mmol) de l'ester actiu **22** en 1 ml de DMF es va afegir en alíquotes de 100 µl cada 10 min sobre una dissolució de 340 mg (2.93 mmol, 10 eq.) d'1,6-hexandiamina en 1 ml d'una mescla DMF:MeOH (1:1), tot mantenint la mescla de reacció en agitació i a t.a. Després de 30 min des de l'última addició, es va fer un control per CL-EM on es va confirmar la desaparició del compost **22** i l'aparició dels productes

d'acoblament monobiotinilat i bisbiotinilat (90 i 10% respectivament per HPLC). Seguidament, els dissolvents es van evaporar a pressió reduïda.

Al cru de reacció resultant es van fer uns rentats amb H₂O (3 x 3 ml) i una microdestil·lació per eliminar l'excés de l'1,6-hexandiamina. Per separar el subproducte bisbiotinilat es va realitzar una purificació per cromatografia en columna de fase inversa C18 eluint primerament amb una mescla d'H₂O/MeOH (95:5), seguidament amb H₂O/MeOH (1:1) i finalment amb MeOH. Es van ajuntar les fraccions que contenien només el producte biotinilat **23** i es van evaporar a pressió reduïda, per obtenir 65 mg d'un sòlid blanc amb una puresa del 94% per HPLC (rdt. 65%).

***N*-(6-Aminohexil)biotinamida (**23**)¹⁶³**

Pf: 173-176 °C (lit. 179-182 °C)¹⁶³

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-d₆): 7.62 (sa, 1H, CONHCH₂), 6.32 (s, 1H, HNCONH), 6.27 (s, 1H, HNCONH), 4.30 (dd, J=7.8, 5.1 Hz, 1H, CHCHS), 4.13 (ac, 1H, CHCH₂S), 3.17-2.97 (ac, 3H, 1H (CHCHS) + 2H (CONHCH₂)), 2.81 (dd, J=12.6, 5.4 Hz, 1H, CH_{a,b}S), 2.57 (d, J=12.6 Hz, 1H, CH_{a,b}S), 2.52 (m, 2H, CH₂NH₂), 2.04 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CONH), 1.65-1.23 (ac, 14H, 8H (CONHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂) + 6H (CHCH₂CH₂CH₂CH₂CONH)).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-d₆): 171.6 (CONH), 162.0 (HNCONH), 60.9 (CHCHS), 59.1 (CHCH₂S), 55.2 (CHCHS), 39.6 (CH₂NH₂), 38.2 (CH₂S), 35.1 (CONHCH₂), 29.0 (CH₂), 28.0 (CH₂), 27.9 (CH₂), 26.2 (CH₂), 26.0 (2 x CH₂), 25.2 (CH₂).

CL-EM: 343.2 (M + H)⁺

11.3.1.3. Acoblament d'N13-13-10COOH a *N*-(6-aminohexil)biotinamida

A una dissolució de 50 mg (0.09 mmol) de peptoide àcid N13-13-10COOH (**21**) (apartat 11.2.2.1.1) en 3 ml de DMF, es van afegir 46 mg (0.13 mmol, 1.5 eq.) del compost **23** i 16 mg (0.13 mmol, 1.5 eq.) de NHS. Seguidament s'hi van afegir 21 µl de DIC (0.13 mmol, 1.5 eq.) i 37 µl (0.18 mmol, 2 eq.) d'Et₃N. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a 50 °C durant 7 h. Passat aquest temps, es va realitzar un control per HPLC, on es va observar la desaparició del peptoide àcid i l'aparició d'un nou pic majoritari. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i el cru de reacció resultant es va purificar per HPLC a escala semipreparativa. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 5 min a 15% d'ACN, de 15% a 75% en 80 min, de 75% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN;

flux 5 ml/min. Es van obtenir 20 mg de la glicinamida **24** (rdt. 25%) amb una puresa del 98% per HPLC.

Les assignacions dels senyals dels espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN d'aquest compost es van confirmar pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del confòrmer majoritari.

[*N*-(6-(Biotinamido)hexil)-*N'*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[*N'*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N'*-(2-feniletíl)glicinamida (24)

^1H -RMN (500 MHz, dimetilsulfòxid- d_6): 7.77-7.65 (ac, 2H, 2 x CONH), 7.34-7.10 (ac, 9H, H_{Ar}), 6.91-6.84 (ac, 4H, H_{Ar}), 6.35 (da, 2H, 2 x HNCONH), 4.31-3.82 (ac, 10, 1H (CHCH₂S) + 1H (CHCHS) + 6H (3 x COCH₂N) + 2H (CH₂NHCOCH₂N)), 3.71 (s, 6H, 2 x CH₃O), 3.50-3.30 (ac, 6H, 3 x NCH₂CH₂), 3.10-2.98 (ac, 5H, 1H (CHCHS) + 4H (2 x CONHCH₂)), 2.89-2.54 (ac, 8H, 1H (CH_{a,b}S) + 1H (CH_{a,b}S) + 6H (3 x NCH₂CH₂)), 2.04 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CONH), 1.68-1.19 (ac, 14H, 8H (CONHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂) + 6H (CHCH₂CH₂CH₂CH₂CONH)).

^{13}C -RMN (125 MHz, dimetilsulfòxid- d_6): 171.7 (2 x CONH), 168.4 (CO), 167.8 (CO), 166.2 (CO), 162.6 (HNCONH), 158.1 (2 x C_{Ar}), 138.9 (C_{Ar}), 130.6 (2 x C_{Ar}), 129.8 (2 x CH_{Ar}), 129.4 (4 x CH_{Ar}), 128.6 (2 x CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 113.8 (4 x CH_{Ar}), 61.0 (CHCHS), 59.1 (CHCH₂S), 55.3 (CHCHS), 54.9 (2 x CH₃O), 49.5-46.9 (3 x NCH₂CO + 3 x NCH₂CH₂), 39.8 (CH₂S), 38.2 (2 x CONHCH₂), 35.1 (NHCOCH₂), 33.9 (NCH₂CH₂), 33.2 (NCH₂CH₂), 33.0 (NCH₂CH₂), 28.8 (CH₂), 28.1 (CH₂), 27.9 (CH₂), 25.9 (2 x CH₂), 25.2 (2 x CH₂).

EMAR per C₄₈ H₆₈ N₇ O₇ S: Calculada: 886.4823 (M + H)⁺

Determinada: 886.4897

11.3.2. OBTENCIÓ DEL PEPTOIDE N13-13-10C BIOTINILAT PER L'EXTREM *N*-TERMINAL

11.3.2.1. Síntesi de H₂N-(CH₂)₆-NHCH₂CO-N13-13-10C en fase sòlida

En una xeringa de 10 ml que contenia 600 mg (0.66 mmol/g, 0.40 mmol) de resina de poliestirè AM RAM es van seguir els procediments descrits a l'apartat 6.3 per sintetitzar el peptoide N13-13-10C. Es van afegir 250 μl (1.98 mmol, 5 eq.) d'**A10** en la primera aminació i 295 μl (1.98 mmol, 5 eq.) d'**A13** en la segona i tercera aminacions. Després de la tercera aminació, va tenir lloc una quarta etapa d'acilació anàloga a les anteriors.

Introducció de l'espaiador: a una suspensió de la resina acilada en 4 ml de DMF es van afegir 930 mg (8.0 mmol, 20 eq.) d'1,6-hexandiamina dissolts en 1 ml de DMF i 1.1 ml (8.0 mmol, 20 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va agitar mecànicament durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir l'operació. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La presència d'una amina primària es va confirmar mitjançant el test del TNBS (color vermell).

Després de l'etapa d'escissió, el cru de reacció resultant es va purificar per HPLC a escala semipreparativa. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 5 min a 15% d'ACN, de 15% a 75% en 80 min, de 75% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Es van obtenir 130 mg de la glicinamida **25** (rdt. 43%) amb una puresa del 98% per HPLC.

Les assignacions dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN d'aquest compost es van confirmar pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del confòrmer majoritari.

[N-(6-Aminohexil)glicil]-[N-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-N-(2-feniletíl)glicinamida (25)

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.38-7.05 (ac, 9H, H_{Ar}), 6.92-6.81 (ac, 4H, H_{Ar}), 4.26-3.84 (ac, 6H, 3 x NCH₂CO), 3.75 (s, 6H, 2 x CH₃O), 3.66-3.20 (ac, 8H, 6H (3 x NCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CO)), 2.96-2.53 (ac, 10H, 6H (3 x NCH₂CH₂) + 2H (H₂NCH₂) + 2H (CH₂NHCH₂CO)), 1.67-1.41 (ac, 8H, 4 x CH₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 170.7 (CO), 170.2 (CO), 167.5 (CO), 166.8 (CO), 159.8 (2 x C_{Ar}), 139.9 (C_{Ar}), 131.7 (2 x C_{Ar}), 131.4 (2 x CH_{Ar}), 130.8 (4 x CH_{Ar}), 129.9 (2 x CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 114.9 (4 x CH_{Ar}), 55.6 (2 x CH₃O), 51.3-47.9 (3 x NCH₂CH₂ + 3 x NCH₂CO + NHCH₂CO + CH₂NHCH₂CO), 40.5 (H₂NCH₂), 34.2 (NCH₂CH₂), 33.8 (NCH₂CH₂), 33.6 (NCH₂CH₂), 28.3 (CH₂), 27.0 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.7 (CH₂).

EMAR per C₄₀ H₅₇ N₆ O₆: Calculada: 717.4261 (M + H)⁺

Determinada: 717.4332

11.3.2.2. Acoblament de H₂N-(CH₂)₆-NHCH₂CO-N13-13-10C a la biotina

A una dissolució de 80.0 mg (0.11 mmol) del compost **25** en 1.5 ml de DMF es van afegir 38 mg (0.11 mmol) del biotinilat d'*N*-succinimidil (**22**) i 23 μ l (0.17 mmol, 1.5 eq.) de Et₃N.

La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 15 min. Passat aquest temps, es va realitzar un control per HPLC, on es va observar la desaparició del peptòide unit a l'espaiador i l'aparició d'un nou pic majoritari. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i el cru de reacció resultant es va purificar per HPLC a escala semipreparativa. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 10 min a 30% d'ACN, de 30% a 65% en 65 min, de 65% a 100% en 15 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Es van obtenir 65 mg de la glicinamida **26** amb una puresa del 98% per HPLC (rdt. 62%).

Les assignacions dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN d'aquest compost es van confirmar pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del confòrmer majoritari.

[*N*-(6-Biotinamidohexil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N*-(2-feniletíl)glicinamida (26**)**

¹H-RMN (500 MHz, dimetilsulfòxid-d₆): 8.77 (sa, 2H, CONH₂), 7.70 (sa, 1H, CONHCH₂), 7.35-7.09 (ac, 9H, H_{Ar}), 6.91-6.81 (ac, 4H, H_{Ar}), 6.35 (da, 2H, 2 x HNCONH), 4.32-3.82 (ac, 8H, 1H (CHCH₂S) + 1H (CHCHS) + 6H (3 x NCH₂CO)), 3.71 (s, 6H, 2 x CH₃O), 3.54-3.28 (ac, 8H, 2H (NHCH₂CO) + 6H (3 x NCH₂CH₂)), 3.09 (ac, 1H, CHCHS), 3.01 (ac, 2H, CONHCH₂), 2.89-2.58 (ac, 10H, 1H (CH_{a,b}S) + 1H (CH_{a,b}S) + 2H (CH₂NHCH₂CO) + 6H (3 x NCH₂CH₂)), 2.05 (t, J=7.0 Hz, 2H, CH₂CONH), 1.69-1.23 (ac, 14H, 8H (CONHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂) + 6H (CHCH₂CH₂CH₂CH₂CONH)).

¹³C-RMN (125 MHz, dimetilsulfòxid-d₆): 171.8 (CONH), 169.9 (CO), 168.4 (CO), 167.8 (CO), 166.2 (CO), 162.6 (HNCONH), 157.6 (2 x C_{Ar}), 138.9 (C_{Ar}), 130.6 (2 x C_{Ar}), 129.9 (2 x CH_{Ar}), 129.5 (4 x CH_{Ar}), 128.5 (2 x CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 113.8 (4 x CH_{Ar}), 61.0 (CHCHS), 59.1 (CHCH₂S), 55.3 (CHCHS), 54.9 (2 x CH₃O), 49.5-46.9 (3 x NCH₂CO + NHCH₂CO + CH₂NHCH₂CO + 3 x NCH₂CH₂), 39.8 (CH₂S), 38.2 (CONHCH₂), 35.2 (CH₂CONH), 33.9 (NCH₂CH₂), 33.1 (NCH₂CH₂), 32.2 (NCH₂CH₂), 28.9 (CH₂), 28.1 (CH₂), 28.0 (CH₂), 25.8 (CH₂), 25.5 (2 x CH₂), 25.1 (CH₂).

EMAR per C₅₀ H₇₁ N₈ O₈ S: Calculada: 943.5037 (M + H)⁺

Determinada: 943.5095

11.4. ACOBLAMENT D'UN PEPTOIDE ÀCID A UNA COLUMNA DE SEFAROSA

11.4.1. RECTA DE CALIBRACIÓ DE L'ÀCID 3-FENILPROPIÒNIC

Seguint el procediment de preparació de les rectes de calibració de les benzamides (vegeu apartat 6.4.2.1.3), es van preparar 5 dissolucions per definir la recta de calibració de l'àcid 3-fenilpropiònic a partir d'una dissolució de concentració 1.12 mg/ml i afegint a totes elles 50 μ l d'una dissolució d'1.18 mg/ml del peptoide de referència N15-20-20C^{****} fins un volum total de 200 μ l. De l'anàlisi de les dissolucions per HPLC i a partir de la relació d'àrees entre l'àcid i el patró es va determinar la recta de calibració de l'àcid 3-fenilpropiònic (vegeu Figura 11.1).

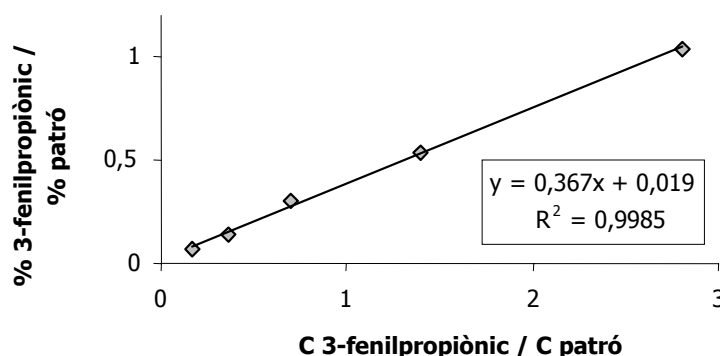


Figura 11.1. Representació de la recta de calibració de l'àcid 3-fenilpropiònic. A l'eix X es mostra la relació de concentracions i a l'eix Y es mostra la relació de % d'àrees per HPLC entre l'àcid i el patró. Detecció a 220 nm.

11.4.2. PROVES D'ACOBAMENT DE L'ÀCID 3-FENILPROPIÒNIC A SEFAROSA

La EAH sefarosa 4B es trobava en una suspensió d'un 20% d'etanol, motiu pel qual es va realitzar una primera etapa de rentat del gel, prèvia a l'acoblament amb el peptoide.

Rentat del gel: es va decantar l'etanol en 4 ml del gel, i es va rentar amb 320 ml d'una dissolució de NaCl 0.5 M. Seguidament, s'hi van fer uns rentats amb 40 ml d'una mescla d'H₂O (pH=4.5)/dioxà (1:1), i es va deixar assecar al buit.

^{****} El peptoide de referència N15-20-20C es va sintetitzar segons el procediment descrit a l'apartat 6.3.

A continuació s'hi van afegir 430 mg del gel sec (aproximadament 0.5 ml, 5 σ mol)^{§§§§} en 8 xeringues de 2 ml, a 6 de les quals s'hi van afegir 0.75 mg (5 σ mol, 1 eq.) d'àcid 3-fenilpropioníc en unes condicions d'acoblament que es detallen a la Taula 11.1. A les altres dues xeringues es van afegir DIC i NHS en medi àcid i en medi bàsic (amb DIEA), sense afegir l'àcid 3-fenilpropioníc, com a blancs de reacció. Les mescles de reacció es van mantenir en agitació mecànica durant 12 h a t.a. i a 200 rpm.

Taula 11.1. Condicions d'acoblament del 3-fenilpropioníc a la sefarosa.

En medi àcid		En medi bàsic	
1 ml d'H ₂ O (pH=4.5)/dioxà (1:1)		1 ml d'H ₂ O/dioxà (1:1)	
a	16 σ l (20 eq.) de DIC 13.5 mg (20 eq.) d'HOBt	d	16 σ l (20 eq.) de DIC 13.5 mg (20 eq.) d'HOBt 17 σ l (20 eq.) DIEA
b	16 σ l (20 eq.) de DIC 11.6 mg (20 eq.) de NHS	e	16 σ l (20 eq.) de DIC 11.6 mg (20 eq.) de NHS 17 σ l (20 eq.) DIEA
c	19.2 mg (20 eq.) d'EDC	f	19.2 mg (20 eq.) d'EDC 17 σ l (20 eq.) DIEA

Després de 12 h de reacció, es van filtrar les diverses mescles i els filtrats es van evaporar a pressió reduïda i es van redissoldre en 1 ml d'una mescla d'H₂O/ACN (1:1). De les dissolucions anteriors es van prendre mostres de 150 σ l i es van afegir 50 σ l d'una dissolució del peptòide patró N15-20-20C de concentració 1.18 mg/ml. L'anàlisi per HPLC d'aquestes dissolucions tenint en compte la recta de calibració de l'àcid, va conduir a la conclusió que només en el cas **b** es va obtenir menys d'un 5% d'àcid 3-fenilpropioníc en el filtrat de la reacció, el que implicava un acoblament de l'àcid 3-fenilpropioníc a la sefarosa del 95%. En cap dels casos en medi bàsic no es va produir pràcticament l'acoblament desitjat.

Es va realitzar una última prova, amb les mateixes condicions que en el cas **b**, però amb 1 ml d'H₂O/dioxà (1:1), sense acidificar. El resultat va ser igualment satisfactori.

^{§§§§} La càrrega del gel era d'entre 7-12 σ mol grups amino/ml gel sec, segons les especificacions del lot. Per realitzar els càlculs es va considerar una càrrega de 10 σ mol grups amino/ml gel sec.

11.4.3. RECTA DE CALIBRACIÓ DEL PEPTOIDE ÀCID N13-13-10COOH

Seguint el procediment de preparació de les rectes de calibració de les benzamides (vegeu apartat 6.4.2.1.3), es van preparar 5 dissolucions per definir la recta de calibració de N13-13-10COOH a partir d'una dissolució de concentració 1.03 mg/ml i afegint a totes elles 50 μ l d'una dissolució de concentració 1.18 mg/ml del peptòide de referència N15-20-20C fins un volum total de 200 μ l.

De l'anàlisi de les dissolucions per HPLC, i a partir de la relació d'àrees entre el peptòide àcid i el patró, es va determinar la recta de calibració de l'N13-13-10COOH (vegeu Figura 11.2).

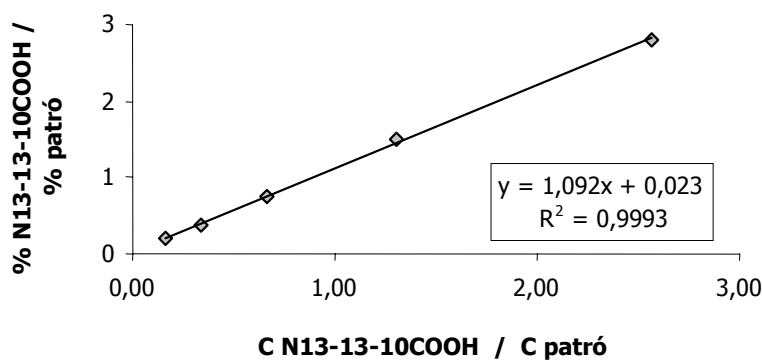


Figura 11.2. Representació de la recta de calibració de l'N13-13-10COOH. A l'eix X es mostra la relació de concentracions i a l'eix Y es mostra la relació de % d'àrees per HPLC entre l'N13-13-10COOH i el patró. Detecció 220 nm.

11.4.4. ACOBLAMENT D'N13-13-10COOH A SEFAROSA

11.4.4.1. Procediment general

En una xeringa de 10 ml es van addicionar 2.5 ml de suspensió de gel en etanol. Després de filtrar l'etanol, es va procedir al rentat del gel.

Rentat: es va rentar amb 200 ml d'una dissolució de NaCl 0.5 M (80 ml/ml de gel). Seguidament, s'hi van fer uns rentats amb 25 ml d'una mescla d'H₂O (pH=4.5)/dioxà (1:1) (10 ml/ ml de gel), i es va deixar assecar al buit. El volum de gel sec va ser d'aproximadament 2 ml (20 μ mol, 10 μ mol/ml gel sec).

Acoblament: sobre el gel rentat i sec, es van afegir 12 mg (20 μ mol, 1eq.) de peptòide àcid N13-13-10COOH dissolts en 3 ml d'una mescla d'H₂O (pH=4.5)/dioxà (1:1), 46 mg

(0.4 mmol, 20 eq.) de NHS dissolts en 1 ml de la mescla dissolvent i 65 μ l (0.4 mmol, 20 eq.) de DIC dissolts en 1 ml de la mescla dissolvent. La mescla de reacció es va mantenir en agitació mecànica durant 24 h a t.a. i a 200 rpm. Passat aquest temps, els reactius en excés es van eliminar per filtració i es va procedir al rentat del gel. Aquest extracte es va guardar per un anàlisi posterior (vegeu apartat 11.4.4.2).

Rentat final: es van fer uns rentats del gel amb 30 ml d'una mescla d'una dissolució tampó d'acetat sòdic 0.1 M i NaCl 0.5 M (pH=4.0)/dioxà (1:1), i amb 30 ml mescla d'una dissolució tampó Tris-HCl 0.1 M i NaCl 0.5 M (pH=8.0)/dioxà (1:1). Els filtrats d'aquests rentats es van guardar per a un anàlisi posterior. Aquesta operació es va repetir 3 vegades. Seguidament es va rentar el gel amb H₂O (3 x 30 ml) i amb etanol (3 x 30 ml).

Emmagatzematge: finalment, es van afegir 2 ml d'etanol al gel per conservar-lo.

11.4.4.2. Determinació del percentatge d'N13-13-10COOH acoblat a la sefarosa

Els filtrats obtinguts dels primers rentats del gel amb les dues mescles de les dissolucions dels tampons amb dioxà (vegeu apartat 11.4.4.1) es van evaporar a pressió reduïda, es van redissoldre en 2 ml d'ACN i es van centrifugar. De cadascuna d'aquestes mostres es van preparar unes dissolucions amb 150 μ l del sobrenedant i afegint 50 μ l d'una dissolució de concentració 1.18 mg/ml del peptòide de referència N15-20-20C. Igualment es va preparar una dissolució amb 150 μ l de l'extracte obtingut de la mescla de reacció i afegint 50 μ l del patró.

De l'anàlisi de les dissolucions anteriors per HPLC i aplicant la recta de calibració d'N13-13-10COOH determinada a l'apartat 11.4.3, es van obtenir els següents resultats:

- € Extracte: 1.7 mg d'N13-13-10COOH
- € Rentats: 0.5 mg d'N13-13-10COOH

Aquests resultats van conduir a determinar el percentatge d'N13-13-10COOH no acoblat a la sefarosa, un 19%, i, per tant, es va concloure que la columna de sefarosa contenia acoblat N13-13-10COOH en un 81%.

11.5. REACCIONS DE DIMERITZACIÓ I CICLACIÓ DE PEPTOIDES ÀCIDS

11.5.1. DIMERITZACIÓ I CICLACIÓ EN DISSOLUCIÓ. PROCEDIMENT GENERAL

A una dissolució de 130 mg (0.23 mmol) de peptoide àcid N13-13-10COOH (apartat 11.2.2.1.1) en 1 ml de DMF, es van afegir 180 mg (0.35 mmol, 1.5 eq.) de PyBOP i 80 μ l (0.46 mmol, 2 eq.) de DIEA. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es va fer un control per HPLC, on es va confirmar la desaparició del peptoide àcid N13-13-10COOH i l'aparició d'un nou pic majoritari (85% per HPLC). El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i es va purificar per HPLC a escala semipreparativa. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 15 min a 50% d'ACN, de 50% a 90% en 20 min, 15 min a 90%, de 90% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Es van obtenir 17 mg de producte dimeritzat i ciclat (**27**) amb una puresa del 94% per HPLC (rdt. 14%).

No es va poder realitzar l'assignació dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN d'aquest compost degut a que la presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos.

Ciclo{[N-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[N-(2-feniletíl)glicil]-[N-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[N-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[N-(2-feniletíl)glicil]} (**27**)

EMAR per C₆₄H₇₅N₆O₁₀: Calculada: 1087.5466 (M + H)⁺

Determinada: 1087.5549

11.5.2. DIMERITZACIÓ EN FASE SÒLIDA I CICLACIÓ

En una xeringa de 3 ml que contenia 100 mg (1.49 mmol/g, 0.15 mmol) de resina de poliestirè clorur de 2-clorotritil es va sintetitzar el peptoide àcid N37-13-15COOH seguint el procediment descrit a l'apartat 11.2.2.1.1. Després de la tercera aminació i un cop rentada i seca la resina, es va dividir en dues parts iguals (0.08 mmol/xeringa), les quals es van afegir a dues xeringues de 3 ml.

A una de les xeringues es va realitzar una etapa addicional de protecció del grup amino terminal amb el grup Fmoc, afegint 135 mg (0.4 mmol, 5 eq.) de FmocOSu en 2 ml de DMF. La mescla de reacció es va mantenir en agitació mecànica durant 2 h a t.a. i 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Seguidament la resina es va

rentar amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). El test del cloranil va resultar positiu per formació d'amides (incolor). Finalment es va dur a terme l'etapa d'escissió del producte de la resina, per obtenir 60 mg de producte (rdt. 95%). El producte es va confirmar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular 840.2 (M + H)⁺ amb patró isotòpic de 2 àtoms de clor.

A la segona xeringa (0.08 mmol), es van afegir els 60 mg (0.07 mmol, 0.9 eq.) d'*N*-Fmoc-37-13-15COOH dissolts en 2 ml de DMF i 65 μ l (0.40 mmol, 5 eq.) de DIC. La mescla de reacció es va mantenir en agitació mecànica durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Seguidament, la resina es va rentar amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). El test del cloranil va resultar positiu per a la formació d'amides (incolor). Seguidament, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a l'escissió del producte de la resina, per obtenir 62 mg de producte dimeritzat amb una puresa per HPLC del 58% (pic majoritari). El producte es va confirmar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular 1218.3 (M + H)⁺ amb patró isotòpic de 4 àtoms de clor.

Finalment, va tenir lloc l'etapa de ciclació. A una dissolució dels 62 mg (0.05 mmol) del dímer obtinguts parcialment impurificats en 2 ml de DMF es van afegir 40 mg (0.07 mmol, 1.5 eq.) de PyBOP i 17 μ l (0.10 mmol, 2 eq.) de DIEA. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es va fer un control per HPLC on es va confirmar la desaparició del dímer i l'aparició d'un nou pic majoritari. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i es va procedir a la purificació per HPLC a escala semipreparativa. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 15 min a 50% d'ACN, de 50% a 90% en 20 min, 15 min a 90%, de 90% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Es van obtenir 10 mg del producte dimeritzat i ciclats (**28**) amb una puresa del 94% per HPLC (rdt. 6%). No es va poder realitzar l'assignació dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN d'aquest compost degut a que la presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos.

Ciclo{[*N*-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]} (28)

EMAR per C₆₂H₆₅Cl₄F₂N₆O₈: Calculada: 1199.3508 (M + H)⁺

Determinada: 1199.3586

PART III. ASSAIGS DE FLUORESCÈNCIA.

FOSFORILACIÓ DE LA SERINA.

FOSFORILACIÓ DEL PÈPTID LRRAS-AMC

SUMARI PART III

12. INTRODUCCIÓ	209
12.1. Antecedents	210
13. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DE LA SERINA AMB AMC	213
13.1. Estudis de fluorescència dels derivats cumarínics d' <i>N</i> -Fmoc-Ser i d' <i>N</i> -Fmoc-Ser(PO ₃ H ₂)	214
13.1.1. Síntesi d' <i>N</i> -Fmoc-Ser-AMC	214
13.1.2. Síntesi d' <i>N</i> -Fmoc-Ser(PO ₃ H ₂)-AMC	216
13.1.3. Estudis de fluorescència	217
13.2. Estudis de fluorescència dels derivats cumarínics d' <i>N</i> -acetil-Ser i d' <i>N</i> -acetil-Ser(PO ₃ H ₂)	218
13.2.1. Síntesi d' <i>N</i> -acetil-Ser-AMC	218
13.2.2. Síntesi d' <i>N</i> -acetil-Ser(PO ₃ H ₂)-AMC	219
13.2.3. Estudis de fluorescència	220
14. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DEL PÈPTID LRRAS-AMC	223
14.1. Síntesi del pèptid cumarínic LRRAS-AMC	223
14.2. Estudis de fluorescència del pèptid cumarínic LRRAS-AMC	224
15. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	229
15.1. Consideracions generals	229
15.2. Síntesi d' <i>N</i> -Fmoc-Ser-AMC i <i>N</i> -Fmoc-Ser(PO ₃ H ₂)-AMC	230
15.2.1. Síntesi d' <i>N</i> -Fmoc-Ser(^t Bu)-AMC (29). Diferents condicions de reacció	230
15.2.1.1. Acoblament amb HATU	230
15.2.1.2. Altres condicions d'acoblament	231
15.2.2. Síntesi d' <i>N</i> -Fmoc-Ser-AMC (30)	231
15.2.3. Síntesi d' <i>N</i> -Fmoc-Ser(PO ₃ H ₂)-AMC (31)	232
15.2.3.1. Acoblament amb HOBt i DIC	232
15.2.3.2. Altres condicions d'acoblament	233
15.3. Síntesi d' <i>N</i> -acetil-Ser-AMC i <i>N</i> -acetil-Ser(PO ₃ H ₂)-AMC	233
15.3.1. Síntesi d' <i>N</i> -acetil-Ser-AMC (32)	233
	207

15.3.2. Síntesi d' <i>N</i> -acetil-Ser(PO ₃ H ₂)-AMC (33)	234
15.4. Síntesi del pèptid H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-AMC (36)	235
15.4.1. Síntesi de H-Ser(^t Bu)-AMC (34)	235
15.4.2. Síntesi del pèptid H-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH	236
15.4.3. Protecció del pèptid amb el grup Boc (35)	236
15.4.4. Obtenció de H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-AMC (36)	237
15.5. Assaig de fosforilació del pèptid 36 amb PKA	238

12. INTRODUCCIÓ

L'avaluació d'un compost o fàrmac potencial per interaccionar amb una determinada diana i mostrar activitat es porta a terme mitjançant un assaig biològic que permeti determinar l'efecte provocat pel compost en l'activitat de la proteïna o diana en qüestió mitjançant la mesura d'una determinada propietat química o física.

Al llarg de la primera part d'aquesta memòria s'han explicat els assaigs biològics realitzats de les mescles de la quimioteca de peptoides-II davant diferents dianes d'interès terapèutic, en col·laboració amb altres grups d'investigació. Aquests grups tenien posat a punt la metodologia i el procediment que s'havia de seguir per poder avaluar la interacció d'un compost amb una determinada diana.

Així doncs, recordem que en el cas del fenotip de resistència a múltiples fàrmacs (MDR), l'assaig del cribratge *in vitro* es va basar en la determinació de l'acumulació intracel·lular de la daunomicina per citometria de flux, aprofitant la fluorescència intrínseca d'aquesta antraciclina (vegeu apartat 5.1.1).

Els assaigs de citotoxicitat referents a MDR i a la inhibició de la proliferació cel·lular es van realitzar mitjançant el mètode de reducció de l'MTT (metiltiazoldifeniltetrazole), el qual permet determinar la viabilitat cel·lular gràcies a la deshidrogenasa mitocondrial que es troba activa únicament en les cèl·lules viables. Aquest enzim converteix el reactiu d'MTT en una sal de formazan de color blau que es pot valorar espectrofotomètricament, de tal manera que l'absorbància mesurada és proporcional al número de cèl·lules viables de la mostra (vegeu apartat 5.1.1 i 5.1.2).

En el cas de l'analgèsia, es va fer el cribratge de la quimioteca de peptoides davant l'activitat bloquejadora del canal TRPV1, un canal iònic no selectiu amb una elevada permeabilitat a l'ió Ca^{2+} quan està activat per capsaïcina, mitjançant un assaig electrofisiològic. Aquest assaig consistia en la mesura de la intensitat de corrent de la cèl·lula mitjançant el pinçament del voltatge de la membrana amb dos microelèctrodes, quan el canal estava obert o tancat per l'acció bloquejadora dels peptoides (vegeu apartat 5.2).

En neuroprotecció, el cribratge de la quimioteca respecte la seva capacitat bloquejadora dels receptors d'NMDA, els quals es troben activats pel glutamat, també es va realitzar mitjançant el mateix tipus d'assaig electrofisiològic anterior (vegeu apartat 5.3).

En LPS, es va cribrar la quimioteca de peptoides respecte la seva capacitat neutralitzadora de l'activitat de LPS, mitjançant el test cromogènic de *Limulus* Amebocyte Lysate. Aquest assaig consisteix en afegir el reactiu LAL que conté una proteïna que s'activa en presència de LPS (sense neutralitzar) i catalitza l'alliberació de *p*-nitroanilina (pNA) del substrat incolor cromogènic Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. L'absorbància de pNA mesurada espectrofotomètricament dona informació de la capacitat dels peptoides per neutralitzar l'activitat de LPS (vegeu apartat 5.4).

Així doncs, la posta a punt d'un assaig biològic esdevé un punt clau en el procés d'avaluació de l'activitat d'un compost davant una diana determinada.

En aquesta tercera part de la memòria s'explicarà el disseny d'un assaig de fluorescència dut a terme per a determinar l'activitat de la proteïna quinasa dependent de c-AMP o proteïna quinasa A (PKA). Aquest treball es va realitzar en col·laboració amb el grup d'investigació del Dr. Enrique Pérez-Payá de la Fundació Valenciana d'Investigacions Biomèdiques de València.

12.1. ANTECEDENTS

Les cèl·lules desenvolupen mecanismes de resposta als estímuls externs mitjançant l'activació de mecanismes intracel·lulars per part de les proteïnes quinases, principalment, les quals estan involucrades en un ampli ventall de processos biològics, entre els quals destaquen la divisió cel·lular i l'apoptosi. Aquests enzims catalitzen de forma reversible la fosforilació dels residus de serina, treonina o tirosina presents als substrats proteics, tot transferint el γ -fosfat de l'ATP als grups hidroxils de les cadenes laterals del substrat.¹⁶⁹

Als humans trobem al voltant de 2000 tipus de quinases diferents classificades en tres grups segons el tipus de substrat sobre el que actuen: les quinases serina-treonina (S/TKs), les quinases tirosina (TKs) i les quinases anomenades de funció dual (DFKs) que inclouen els altres dos tipus de quinases. Aquests enzims esdevenen dianes potencials d'elevat interès per al disseny de nous fàrmacs per al tractament de malalties en què hi ha un descontrol en el procés de divisió cel·lular. No obstant, el fet que hi hagi un nombre tan gran de proteïnes quinasa diferents dificulta la identificació de molècules orgàniques que interaccionin selectivament amb una quinasa determinada.

Per poder identificar molècules que inhibeixin les proteïnes quinasa i aturin la cascada de reaccions que provoquen a la cèl·lula, cal desenvolupar mètodes sensibles i aplicables a la monitorització de la seva activitat com a resposta als estímuls externs. Una possibilitat és la detecció del grup fosfat basada en la mesura de ^{32}P , però s'han desenvolupat altres mètodes basats en canvis de fluorescència induïts per la fosforilació que provoquen aquestes proteïnes.

Una estratègia utilitzada per alguns d'aquests mètodes inclou petits substrats peptídics que contenen un grup fluoròfor molt a prop del lloc de fosforilació, el qual indueix un canvi d'intensitat de fluorescència degut a la fosforilació (vegeu Figura 12.1, A).^{170,171} Tot i això, el canvi de fluorescència observat no acostuma a ser gaire important, de l'entorn d'un 20%. Una estratègia alternativa implica pèptids dissenyats de tal manera que a l'extrem *N*- o *C*-terminal continguin la seqüència peptídica que pot interaccionar amb la quinasa en estudi i un grup fluoròfor separat de la diana peptídica per un espaiador, generalment format per una prolina i una glicina. D'aquesta manera es genera un lloc receptor d'ions M^{2+} format pels grups carboxilats presents al grup fluoròfor i pel nou fosfat introduït després de la fosforilació de la proteïna per la quinasa.^{172,173} La coordinació a Ca^{2+} o Mg^{2+} implica un canvi de conformació del pèptid i indueix un canvi de fluorescència (vegeu Figura 12.1, B).

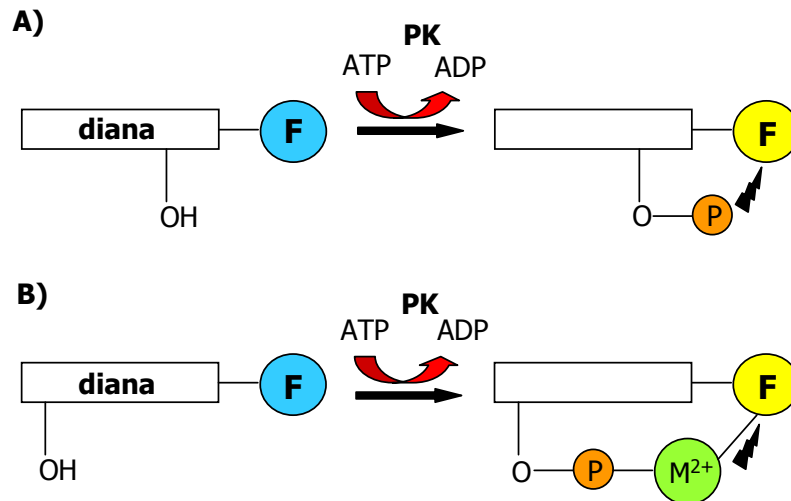


Figura 12.1. Representació esquemàtica dels mètodes de detecció de la fosforilació d'un substrat per una proteïna quinasa mitjançant la mesura del canvi induït en la fluorescència d'un grup fluoròfor (F) enllaçat al substrat, on aquest es troba adjacent al residu a fosforilar (A), o bé es troba més allunyat del residu a fosforilar, de tal manera que es crea la conformació adequada per a la coordinació del fosfat i del fluoròfor amb un ió de Ca²⁺ o Mg²⁺ (B).

Shults i Imperiali van seguir aquesta segona estratègia per determinar el canvi de fluorescència del substrat Ac-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Pro-Sox-NH₂ induït per la fosforilació del residu de la serina per la PKA, fent servir com a grup fluoròfor l'aminoàcid Sox.¹⁷³ La fosforilació va implicar un augment de la intensitat de fluorescència de fins a un 300%.

En el nostre laboratori ens vam plantejar la possibilitat de seguir la primera estratègia per desenvolupar un mètode sensible per mesurar d'una forma fàcil i ràpida la fosforilació d'un determinat substrat per la PKA. Com a grup fluoròfor es va pensar en la 7-amino-4-metilcumarina (AMC), àmpliament utilitzada en estudis d'especificitat de substrats per a proteases, degut a que es pot detectar fàcilment per absorbància ($\zeta_{\text{abs}}=355$ nm) o per fluorescència ($\zeta_{\text{ex}}=365$ nm i $\zeta_{\text{em}}=440$ nm).¹⁷⁴⁻¹⁷⁹ Com a substrat es va pensar en una seqüència peptídica basada en el pèptid utilitzat generalment per la PKA, l'anomenat *kemptide* (LRRASLG).^{180,181} La diana peptídica de reconeixement de PKA és del tipus RXXS, RRXS i RRXSXG (la més activa). Basant-nos en aquestes dianes, vam pensar en sintetitzar el pèptid Leu-Arg-Arg-Ala i enllaçar-li un residu de serina amb l'AMC acoblada per l'extrem C-terminal.

La posta a punt d'aquest assaig fluorescent permetria dur a terme el cribratge de la quimioteca de peptoides-II davant la seva capacitat d'inhibir la fosforilació del substrat LRRAS-AMC per la PKA, d'una forma senzilla i ràpida de mesurar.

13. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DE LA SERINA AMB AMC

Al llarg d'aquest capítol s'explicarà l'estudi realitzat per detectar possibles diferències en la intensitat de fluorescència dels derivats cumarínics de la serina respecte els derivats cumarínics de la serina fosforilada. En cas que aquestes diferències fossin suficientment importants, permetria establir un mètode general de detecció de la fosforilació d'un substrat cumarínic per la PKA mitjançant la mesura de fluorescència del substrat abans i després de la fosforilació.

Inicialment, es va pensar en la preparació del derivat cumarínic de la serina i de la serina fosforilada fent servir el grup Fmoc per protegir l'extrem *N*-terminal de l'aminoàcid. Tal i com s'explicarà més endavant, posteriorment es va decidir canviar el grup protector per un acetil per evitar un possible emmascarament en el canvi de fluorescència provocat per l'efecte d'un grup tant voluminós com és l'Fmoc.

13.1. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DELS DERIVATS CUMARÍNICS D'*N*-FMOC-SER I D'*N*-FMOC-SER(PO₃H₂)

13.1.1. SÍNTESI D'*N*-FMOC-SER-AMC

Per dur a terme la reacció d'acoblament entre la serina *N*-Fmoc-Ser(^tBu)-OH, amb l'extrem amino protegit amb Fmoc i amb l'hidroxil de la cadena lateral protegit amb el grup ^tBu, i l'AMC, es van emprar inicialment els agents d'acoblament convencionals més utilitzats per activar un àcid i formar un enllaç amida amb una amina, formant *in situ* l'ester activat amb NHS o HOBT i les carbodiimides DCC o DIC. Com a dissolvents de reacció es van emprar DMF o THF amb un 3% de DMF per solubilitzar l'AMC. El seguiment de la reacció es va realitzar per HPLC, per detecció a la longitud d'ona d'absorció màxima de l'AMC (340 nm). En aquestes condicions, la reacció d'acoblament tenia lloc molt lentament.

La màxima conversió en el producte *N*-Fmoc-Ser(^tBu)-AMC (**29**) es va aconseguir fent servir HOBT i DIC en THF amb un 3% de DMF, escalfant la mescla de reacció fins a 60 °C (vegeu Figura 13.1). No obstant, només es va observar un 17% de conversió per HPLC, després de 5 dies de reacció.

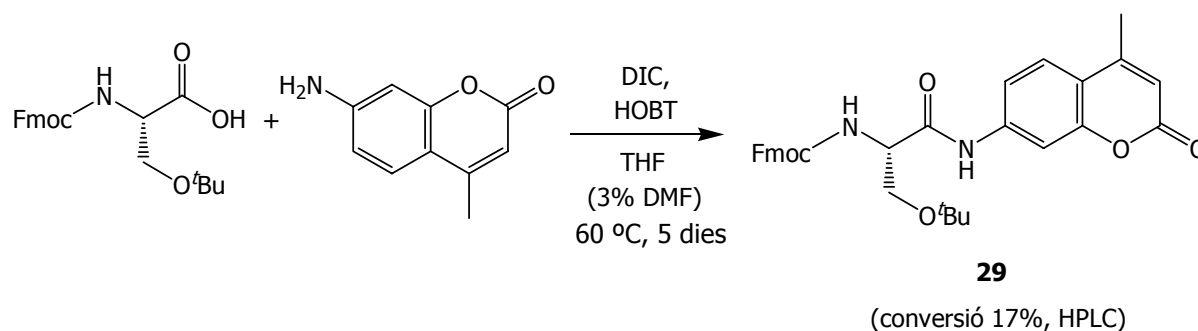


Figura 13.1. Reacció d'acoblament d'*N*-Fmoc-Ser(^tBu) amb AMC fent servir DIC i HOBT com agents d'acoblament, per obtenir el producte **29**, amb una conversió del 17% per HPLC.

Una alternativa a les carbodiimides per dur a terme l'acoblament de l'aminoàcid amb l'AMC, va ser l'ús del cloroformiat d'isobutil amb Et₃N però, tot i escalfar la mescla de reacció a 60 °C, pràcticament no es va observar acoblament.

Es va pensar que el fet que l'AMC fos una amina primària poc nucleòfila podria ser el factor limitant en aquesta reacció d'acoblament. Per aquest motiu, es van emprar altres

agents d'acoblament emprats en la química de pèptids per als acoblaments difícils amb aminoàcids que presenten impediment estèric, com les sals de fosfoni i les sals d'amini.

Entre les sals de fosfoni, els reactius descrits més utilitzats són el BOP, el PyBOP i el PyAOP.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Els derivats de pirrolidini, PyBOP i PyAOP, són els més recomanables degut a que són més reactius i no donen lloc a un producte secundari tòxic com és l'hexametilfosfotriamida, com passa quan s'utilitza BOP.

Les sals d'amini són anàlogues a les sals de fosfoni però tenen un àtom de carboni en comptes de l'àtom de fòsfor. Entre les més utilitzades destaquen l'HBTU i l'HATU.¹⁸⁵ Carpino i col. van descriure que, entre les sals d'amini, l'HATU donava lloc a millors rendiments d'acoblament i provocava menor racemització.¹⁸⁶

Amb aquests antecedents, es va decidir emprar el reactiu d'acoblament PyBOP en medi bàsic amb DIEA, en DMF com a dissolvent i amb HOBt o DMAP per accelerar la reacció. No obstant, en aquests casos tampoc es va observar pràcticament conversió al derivat cumarínic desitjat.

Finalment, es va seguir el procediment descrit per Ellman i col. per a la síntesi d'una quimioteca de pèptids fluorescents amb AMC en format de rastreig posicional.¹⁷⁹ Així doncs, es va fer reaccionar l'*N*-Fmoc-Ser(^tBu)-OH amb l'AMC emprant el reactiu HATU en medi bàsic amb col·lidina (2,4,6-trimetilpiridina) i amb DMF com a dissolvent (vegeu Figura 13.2).

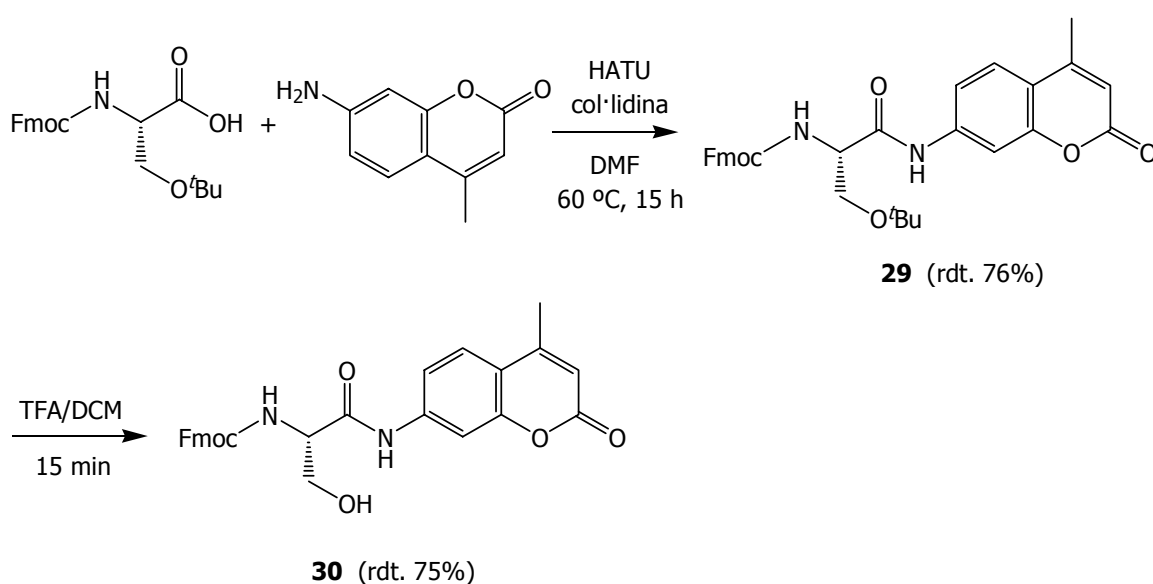


Figura 13.2. Reacció d'acoblament d'*N*-Fmoc-Ser(^tBu) amb AMC fent servir el reactiu d'acoblament HATU per obtenir **29**; desprotecció final del grup ^tBu per obtenir el derivat cumarínic **30**.

Després de 15 h de reacció a 60 °C, es va observar per HPLC un 80% de conversió en el producte d'acoblament cumarínic i es va obtenir l'*N*-Fmoc-Ser(^tBu)-AMC (**29**) amb un rendiment del 76%. El producte **29** es va identificar per espectrometria de masses, així com per les seves dades espectroscòpiques. Cal destacar les dades de ¹H-RMN dels 2H diastereotòpics del CH₂ de la cadena lateral de la serina, mostrant un doble doblet a un desplaçament químic de $\tau = 3.58$ ppm.

Seguidament es va desprotegir el grup hidroxil de la cadena lateral de la serina amb TFA/DCM, per obtenir el derivat *N*-Fmoc-Ser-AMC (**30**) amb un 75% de rendiment. El producte es va identificar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular 507.2 (M + Na)⁺. Les dades espectroscòpiques de ¹H-RMN van mostrar la variació del desplaçament químic del CH de la cadena lateral de la serina de $\tau = 4.35$ -4.22 ppm cap a camps més baixos, a $\tau = 4.68$ ppm, així com l'evolució del doble doblet dels 2H diastereotòpics del CH₂ de **29** cap a un doblet a $\tau = 3.71$ ppm. Igualment, es va observar la desaparició dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN característics del grup *tert*-butílic de **29**, a $\tau = 1.10$ ppm i $\tau = 72.9$ i 27.0 ppm, respectivament.

13.1.2. SÍNTESI D'*N*-FMOC-SER(PO₃H₂)-AMC

Per dur a terme la reacció d'acoblament entre la serina fosforilada *N*-Fmoc-Ser(PO₃H₂)-OH, amb l'extrem amino protegit amb Fmoc, i l'AMC es va seguir, inicialment, el procediment seguit per obtenir el derivat cumarínic **29**. Així doncs, es va emprar el reactiu d'acoblament HATU en medi bàsic amb col·lidina (2,4,6-trimetilpiridina) i amb DMF com a dissolvent. No obstant, tot i escalfar la mescla de reacció a 60 °C durant 20 h no es va observar acoblament per HPLC. Altres agents d'acoblament emprats com PyBOP i DIC, amb o sense DIEA, o NHS i DCC, tampoc no van mostrar conversió en el derivat cumarínic per HPLC.

Finalment, els millors resultats es van obtenir formant *in situ* l'èster activat amb HOBt i DIC. Com a dissolvents de reacció es van emprar THF amb un 3% de DMF per solubilitzar l'AMC, i la mescla de reacció es va tenir a reflux durant 20 h (vegeu Figura 13.3). El seguiment de la reacció es va realitzar per HPLC, per detecció a la longitud d'ona d'absorció màxima de l'AMC (340 nm), on es va observar un 80% de conversió en el producte d'acoblament i es va obtenir **31** amb un rendiment del 75%. La identificació del producte es va realitzar mitjançant espectrometria de masses, obtenint el pic molecular 587.1 (M + Na)⁺,

i per espectroscopia de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN. Cal destacar les dades de ^1H -RMN del CH i del CH_2 de la cadena lateral de la serina fosforilada, observant-se uns senyals complexos amb un desplaçament químic a $\tau = 4.50$ i 4.04 ppm, respectivament.

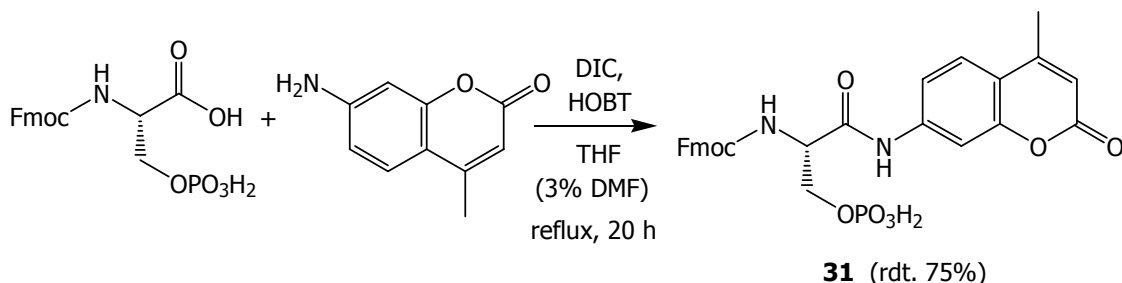


Figura 13.3. Reacció d'acoblament d'*N*-Fmoc-Ser(PO_3H_2) amb AMC fent servir HOBT i DIC per obtenir el derivat cumarínic **31**.

13.1.3. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA

Els estudis de fluorescència dels derivats cumarínics **30** i **31** es van realitzar al laboratori de la Dra. Francesca Reig de l'IIQAB-CSIC.

Es van preparar dissolucions dels dos compostos de concentració aproximadament d' $1 \mu\text{M}$ en tampó fosfat sòdic 100 mM a $\text{pH}=8.0$ amb un 1% de DMF per solubilitzar els compostos. Els espectres d'emissió de fluorescència es van obtenir per excitació a la longitud d'ona d'absorció màxima dels dos derivats cumarínics ($\lambda_{\text{Abs.màx.}}=326 \text{ nm}$), els quals es mostren a la Figura 13.4.

Tal i com es pot observar, els espectres d'emissió de fluorescència del derivat cumarínic **30** i del derivat cumarínic fosforilat **31** van mostrar una petita diferència d'intensitat a 370 nm i en l'interval de 440 fins a 520 nm , però no es va observar una diferència significativa d'intensitat de fluorescència en la longitud d'ona d'emissió màxima ($\lambda_{\text{Em.màx.}}=392 \text{ nm}$).

Amb aquests resultats ens vam plantejar la possibilitat que el grup protector Fmoc utilitzat per als derivats cumarínics **30** i **31**, pogués interferir i emascarar d'alguna forma la intensitat de fluorescència dels dos compostos degut al gran volum d'aquest grup. Per aquest motiu, es va decidir sintetitzar el derivat cumarínic i el derivat cumarínic fosforilat canviant el grup protector per un més petit, com és el grup acetil.

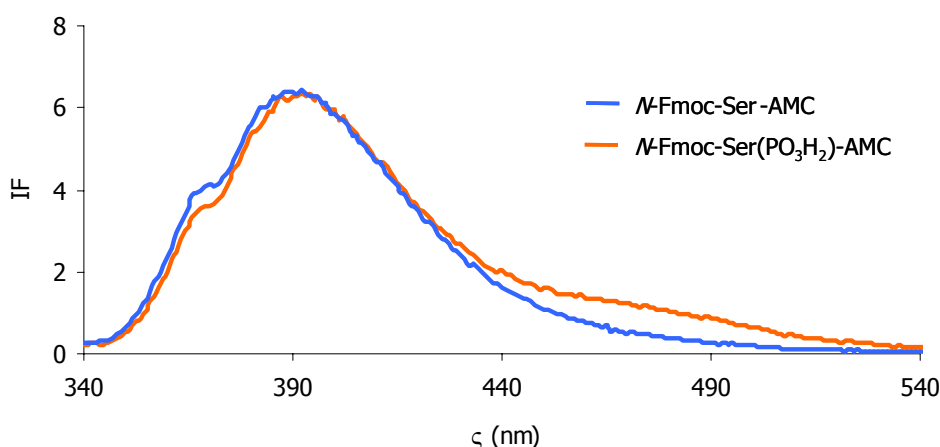


Figura 13.4. Espectres d'emissió de fluorescència, en un interval de 200 nm, dels derivats cumarínics **30** (*N*-Fmoc-Ser-AMC) i **31** (*N*-Fmoc-Ser(PO_3H_2)-AMC), després d'excitar-los a la seva longitud d'ona d'absorció màxima ($\lambda_{\text{Abs.màx.}} = 326 \text{ nm}$) i mesurar la intensitat de fluorescència emesa (IF).

13.2. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DELS DERIVATS CUMARÍNICS D'*N*-ACETIL-SER I D'*N*-ACETIL-SER(PO_3H_2)

13.2.1. SÍNTESI D'*N*-ACETIL-SER-AMC

La síntesi d'*N*-acetil-Ser-AMC es va dur a terme mitjançant la desprotecció del grup Fmoc del derivat cumarínic **30** amb dietilamina en DMF i l'acetilació posterior del grup amino amb piridina i anhídrid acètic (vegeu Figura 13.5).

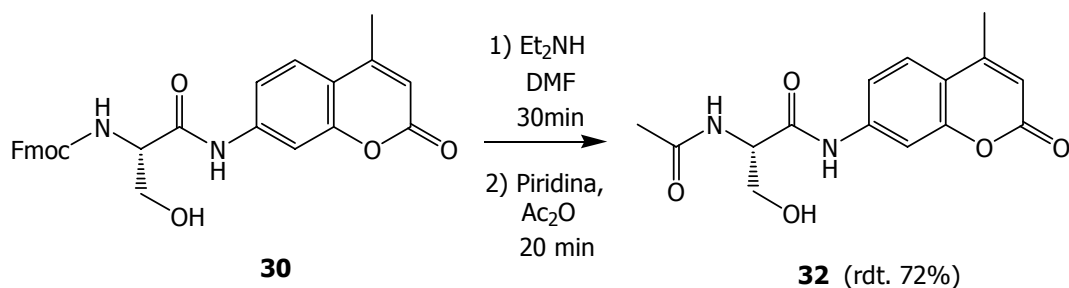


Figura 13.5. 1) Desprotecció del grup Fmoc de **30**; 2) acetilació del grup amino per obtenir el derivat cumarínic **32**.

Es va obtenir el derivat cumarínic **32** amb un rendiment global del 72%. El producte **32** es va identificar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular $305.1 (M + H)^+$, així com per les dades espectroscòpiques de $^1\text{H-RMN}$ i $^{13}\text{C-RMN}$. Cal destacar la desaparició dels senyals característics del grup Fmoc de **30**, i la introducció del grup acetil, amb senyals de $^1\text{H-RMN}$ i $^{13}\text{C-RMN}$ amb un desplaçament químic a $\tau=1.90$ ppm, i $\tau=169.3$ i 22.3 ppm, respectivament.

13.2.2. SÍNTESI D'N-ACETIL-SER(PO₃H₂)-AMC

La síntesi d'N-acetil-Ser(PO₃H₂)-AMC es va dur a terme mitjançant la desprotecció del grup Fmoc del derivat cumarínic **31** amb dietilamina en DMF, i la posterior acetilació del grup amino amb NaHCO₃ al 10% i anhídrid acètic (vegeu Figura 13.6). També es va intentar acetilar, sense èxit, amb piridina i anhídrid acètic, tal i com s'havia fer per obtenir **32**.

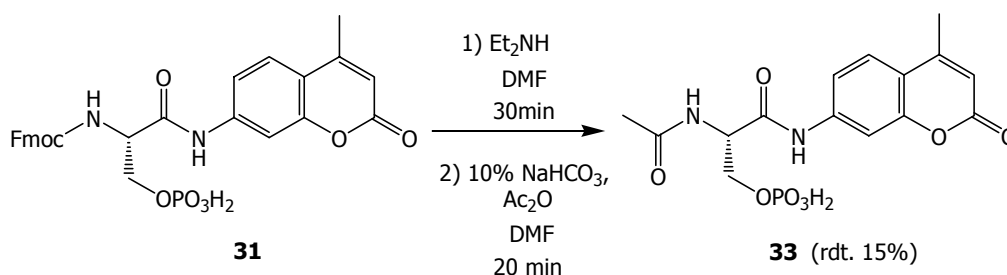


Figura 13.6. 1) Desprotecció del grup Fmoc de **31**. 2) Acetilació del grup amino per obtenir el derivat cumarínic fosforilat **33**.

La purificació del producte final va resultar complicada degut a la seva elevada polaritat. Per cromatografia de sílica en capa prima o columna el compost quedava molt retingut i era molt difícil extreure'l del suport. Per aquest motiu es va decidir purificar-lo per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir el derivat cumarínic fosforilat **33** amb un rendiment del 15%. El rendiment tan baix obtingut va ser, probablement, degut a que l'elevada polaritat del compost va dificultar la seva elució per l'HPLC. El producte **33** es va identificar per espectrometria de masses, obtenint el pic molecular $385.1 (M + H)^+$. Igualment que en **32**, cal destacar la introducció del grup protector acetil, amb senyals de $^1\text{H-RMN}$ i $^{13}\text{C-RMN}$ amb un desplaçament químic a $\tau=1.90$ ppm, i $\tau=169.3$ i 22.4 ppm, respectivament.

13.2.3. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA

Els estudis de fluorescència dels derivats cumarínics **32** i **33** es van realitzar al laboratori del Dr. Pérez-Payá de la Fundació Valenciana d'Investigacions Biomèdiques de València, en col·laboració amb la Dra. Mar Orzáez.

Es van preparar dissolucions aquoses dels dos compostos de concentració aproximadament d'1.3 μ M. Els espectres d'emissió de fluorescència es van obtenir per excitació a la longitud d'ona d'absorció màxima dels dos derivats cumarínics ($\zeta_{\text{Abs.màx.}}=324$ nm), els quals es mostren a la Figura 13.7. Tal i com es pot observar, l'espectre d'emissió de fluorescència del derivat cumarínic **32** va mostrar una intensitat de fluorescència d'un 22% més gran que la del derivat cumarínic fosforilat **33**, en la seva longitud d'ona d'emissió màxima ($\zeta_{\text{Em.màx.}}=390$ nm). També es van enregistrar els espectres d'emissió de fluorescència dels dos compostos a pH fisiològic amb tampó PBS, els quals van mostrar igualment aquesta diferència d'intensitat de fluorescència.

Per confirmar aquests resultats es van enregistrar els espectres d'emissió de fluorescència dels dos compostos estudiats a diferents concentracions de mostra i es va representar la intensitat de fluorescència màxima ($\zeta_{\text{Em.màx.}}=390$ nm) a cada concentració, com es mostra a la Figura 13.8. Es va observar com a mesura que la concentració de les mostres augmentava, la diferència d'intensitat de fluorescència entre els dos compostos també s'anava incrementant lleugerament.

Tot i no ser una gran diferència d'intensitat de fluorescència entre el derivat cumarínic **32** i el derivat cumarínic fosforilat **33**, estava dins de l'ordre d'intensitat del voltant del 20% que presentaven altres grups fluoròfors adjacents al lloc de fosforilació que es troben a la bibliografia.^{170,171} Per aquest motiu vam decidir continuar amb l'AMC com a grup fluorescent per l'estudi de fluorescència i fosforilació del pèptid Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-AMC.

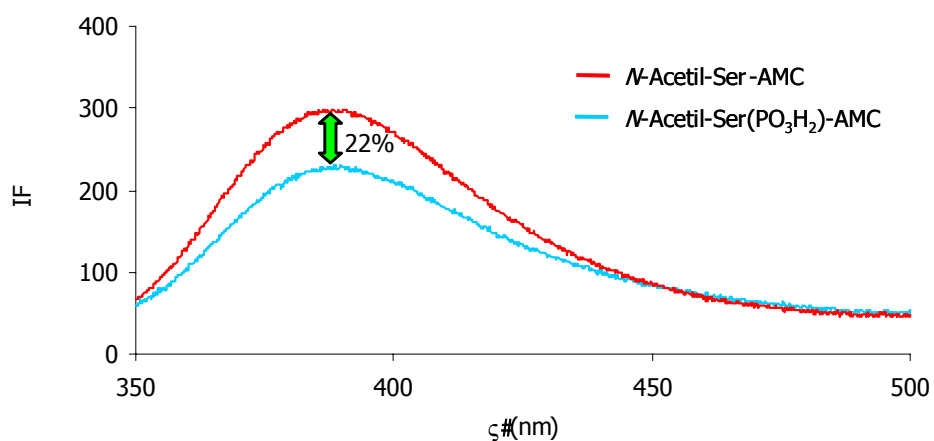


Figura 13.7. Espectres d'emissió de fluorescència, en un interval de 150 nm, dels derivats cumarínics **32** (*N*-Acetil-Ser-AMC) i **33** (*N*-Acetil-Ser(PO_3H_2)-AMC), després d'excitar-los a la seva longitud d'ona d'absorció màxima ($\zeta_{\text{Abs.màx.}}=324$ nm) i mesurar la intensitat de fluorescència emesa (IF).

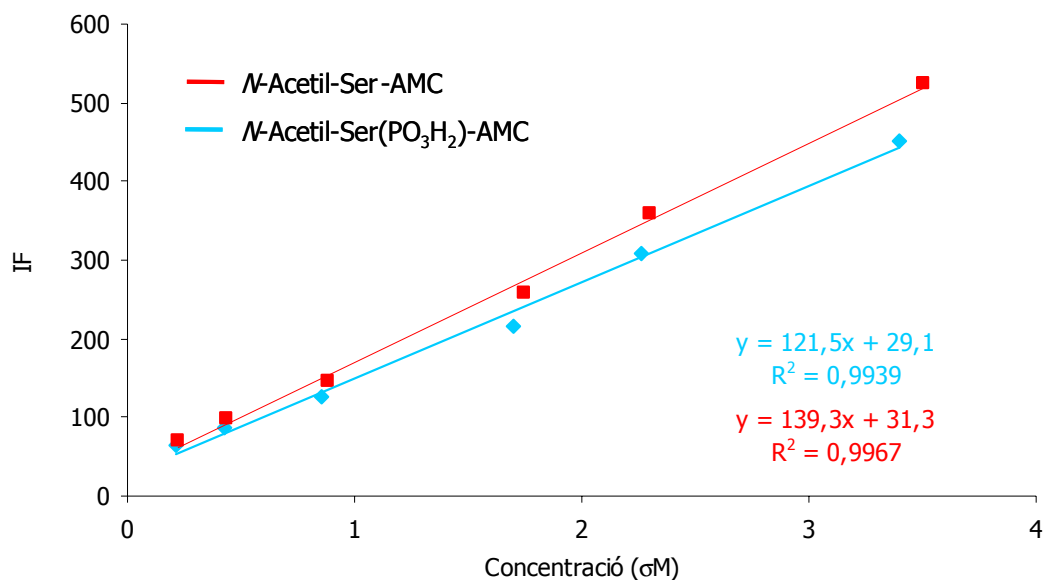


Figura 13.8. Representació del màxim d'intensitat d'emissió de fluorescència ($\zeta_{\text{Em.màx.}}=390$ nm) a diferents concentracions del derivats cumarínics **32** (*N*-Acetil-Ser-AMC) i **33** (*N*-Acetil-Ser(PO_3H_2)-AMC).

14. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DEL PÈPTID LRRAS-AMC

14.1. SÍNTESI DEL PÈPTID CUMARÍNIC LRRAS-AMC

La síntesi del pèptid cumarínic LRRAS-AMC es va realitzar seguint el plantejament sintètic de la Figura 14.1. Primerament es va dur a terme la desprotecció del grup Fmoc d'*N*-Fmoc-Ser(^tBu)-AMC (**29**) (apartat 13.1.1) amb dietilamina en DMF, per obtenir la serina cumarínica H-Ser(^tBu)-AMC (**34**) amb un rendiment del 70%. El producte **34** es va identificar per espectrometria de masses i per espectroscopia de ¹H-RMN i ¹³C-RMN. Cal destacar la desaparició dels senyals característics del grup Fmoc, així com la variació del desplaçament químic de ¹H-RMN del grup amino protegit a $\tau=8.28$ ppm en **29** cap a camps més alts, amb un desplaçament del grup amino desprotegit a $\tau=4.05$ ppm.

Per altra banda, la síntesi del pèptid H-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH es va realitzar al laboratori del Dr. Enrique Pérez-Payá, per Ana Giménez. La resina utilitzada va ser del tipus clorur de 2-clorotritil i les cadenes laterals de les arginines es trobaven protegides amb el grup Pmc. Es va alliberar el pèptid de la resina amb un còctel d'escissió format per DCM amb un 2% de TFA. Seguidament es va procedir a la protecció en dissolució de l'extrem *N*-terminal del pèptid amb el grup Boc seguint el procediment experimental de Keller i col.,¹⁸⁷

amb NaOH 1 M i dicarbonat de di-*tert*-butil en alcohol *tert*-butílic, per obtenir el pèptid protegit *N*-Boc-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH (**35**) amb un rendiment del 70% sense purificar i una puresa del 90% per HPLC. El pèptid **35** es va identificar per espectrometria de masses, obtenint el pic molecular 1147.6 (M + H)⁺.

L'acoblament del derivat cumarínic **34** i del pèptid **35** es va realitzar amb l'agent d'acoblament PyBOP i amb DIEA, en DMF. Després de 10 h de reacció, es va observar una conversió en el pèptid cumarínic del 90% per HPLC. Finalment, es va procedir a la desprotecció del pèptid amb un còctel format per TFA/DCM/H₂O/triisobutilsilà (70:20:5:5) durant 4 h, i a la purificació del producte resultant per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir el pèptid cumarínic H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-AMC (**36**) amb un rendiment del 34%. El producte **36** es va identificar pel seu espectre de masses, obtenint el pic molecular 759.4 (M + H)⁺.

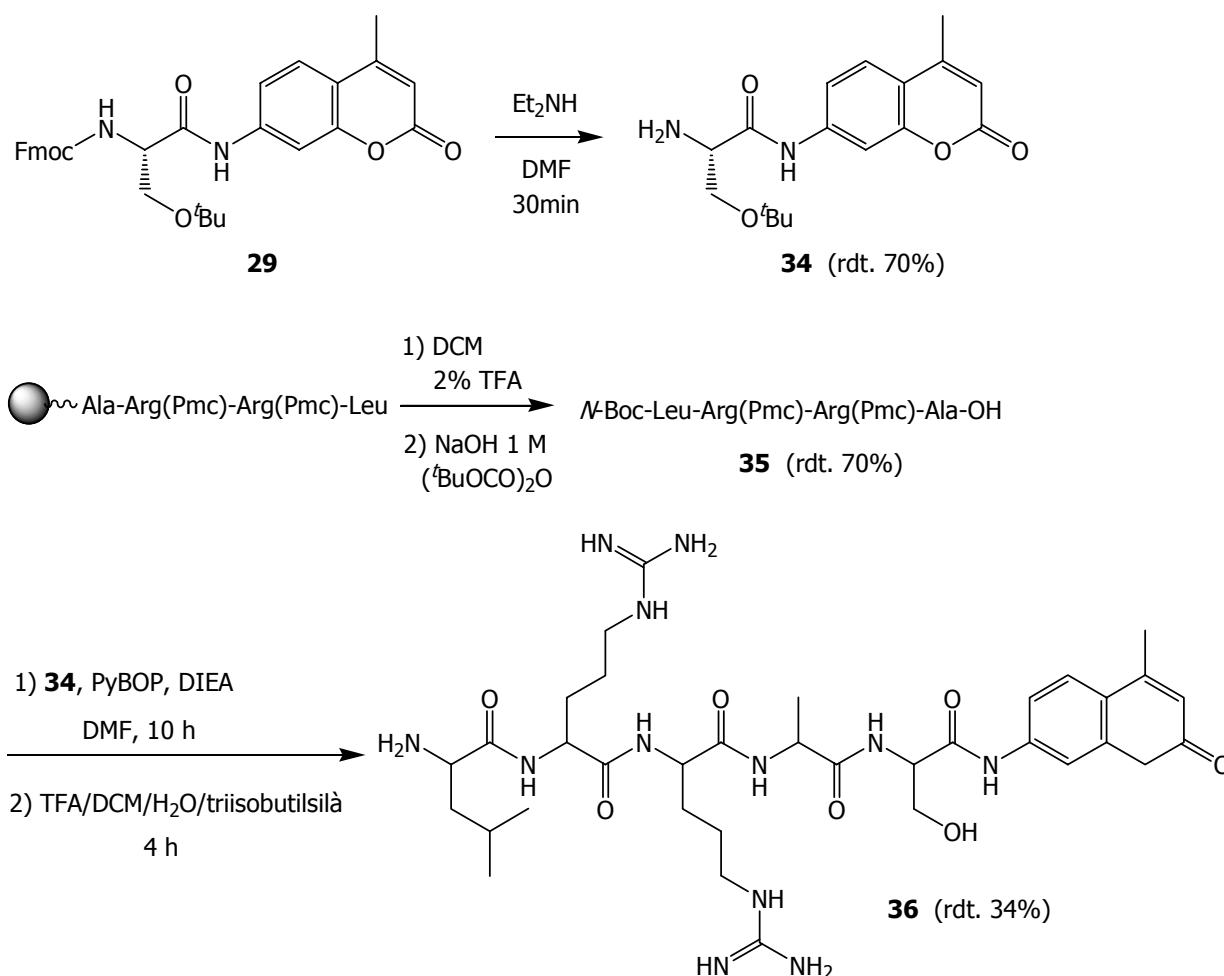


Figura 14.1. Plantejament sintètic seguit per a la síntesi del pèptid cumarínic LRRAS-AMC: desprotecció del grup Fmoc de **29** per obtenir **34**, acoblament al pèptid *N*-Boc-LR(Pmc)R(Pmc)A (**35**) i desprotecció total per obtenir el pèptid cumarínic **36**.

14.2. ESTUDIS DE FLUORESCÈNCIA DEL PÈPTID CUMARÍNIC LRRAS-AMC

Els estudis de fosforilació i fluorescència del pèptid cumarínic LRRAS-AMC (**36**) es van realitzar al laboratori del Dr. Pérez-Payá en col·laboració amb Eliana Sirvent.

La reacció de fosforilació del pèptid **36** es va realitzar segons l'esquema plantejat a la Figura 14.2.

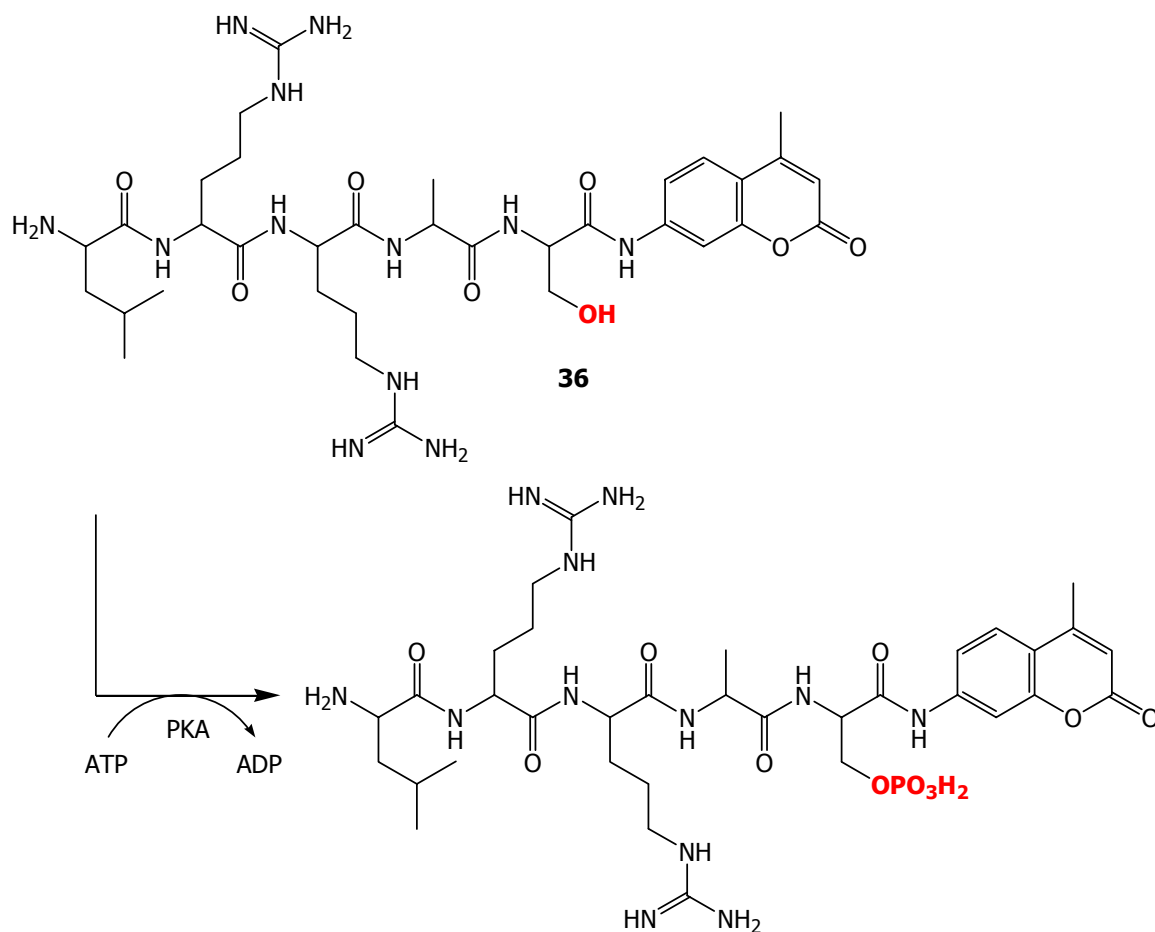


Figura 14.2. Fosforilació del pèptid cumarínic H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-AMC (**36**) per la proteïna quinasa dependent de c-AMP, PKA, en presència d'ATP, MgCl₂ i en tampó TRIS (en vermell es mostra la fosforilació del pèptid).

La mescla de reacció es va preparar en tampó TRIS (50 mM), amb ATP (2 mM), MgCl₂ (8 mM), el pèptid cumarínic **36** (250 μM) i la proteïna quinasa dependent de c-AMP, la PKA (80 unitats, 80 u/σl, 1.73 mg/ml). Paral·lelament, es va realitzar un control de la reacció sense afegir la PKA i un segon control afegint ADP en comptes d'ATP, per determinar si la presència d'ATP en excés en la mescla de reacció podia influir en la mesura de la intensitat de fluorescència del pèptid cumarínic fosforilat. Es van prendre tres alíquotes de mostra de

les tres mescles a temps inicial ($t_0=0$ min), on el pèptid no estava fosforilat, i després de 2 h de reacció, on el pèptid es trobava fosforilat completament. Quatre de les alíquotes, dues alíquotes per a cada temps de reacció, es van analitzar al fluorímetre, i per aturar les reaccions es van fer servir dos sistemes: es van posar en gel o s'hi afegir EDTA per complexar el $MgCl_2$. Les altres alíquotes, als dos temps de reacció, es van analitzar per HPLC i s'hi va afegir àcid tricloroacètic per precipitar l'enzim i aturar la reacció.

Els espectres d'emissió de fluorescència es van obtenir per excitació a la longitud d'ona d'absorció màxima del pèptid ($\zeta_{Abs.màx.}=324$ nm) a temps 0 min i després de 2 h de reacció. Tant en les alíquotes en què s'havia aturat la reacció en gel com en les que s'havia afegit EDTA no es van observar diferències significatives en la intensitat de fluorescència. A la Figura 14.3 es mostren els espectres d'emissió de fluorescència de les alíquotes tractades amb EDTA, a mode d'exemple.

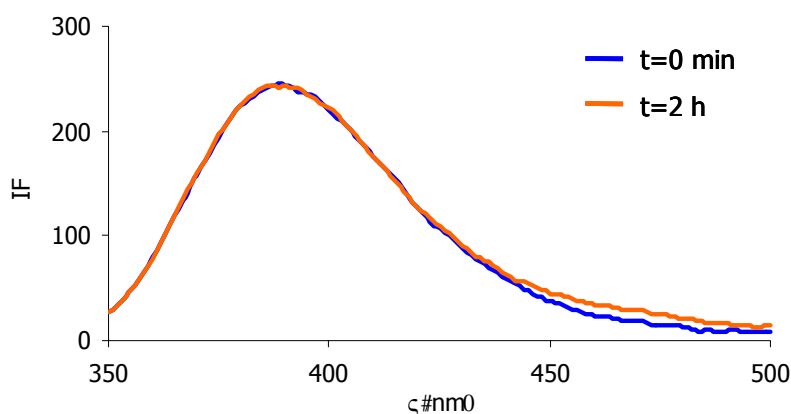


Figura 14.3. Espectres d'emissió de fluorescència de les alíquotes de la reacció de fosforilació del pèptid LRRAS-AMC (**36**) a un temps de reacció de 2 min i 2 h, després d'excitar el pèptid a la seva longitud d'ona d'absorció màxima ($\zeta_{Abs.màx.}=324$ nm) i mesurar la intensitat de fluorescència emesa (IF).

A aquestes alíquotes de la mescla de reacció s'hi va afegir un 50% de trifluoroetanol, el qual és un inductor d'estructura secundària de pèptids, i es van tornar a enregistrar els espectres d'emissió de fluorescència. En el cas de les alíquotes a temps de reacció de 2 h es va observar un lleuger augment en la intensitat de fluorescència, però no es va considerar una diferència significativa per confirmar la fosforilació del pèptid.

Les altres al·lòquotes de les mescles de reacció a temps 0 min i 2 h, les quals es van aturar amb àcid tricloroacètic per precipitar l'enzim, es van analitzar per HPLC (detecció 220 nm). Els perfils cromatogràfics enregistrats s'han mostrat a la Figura 14.4.

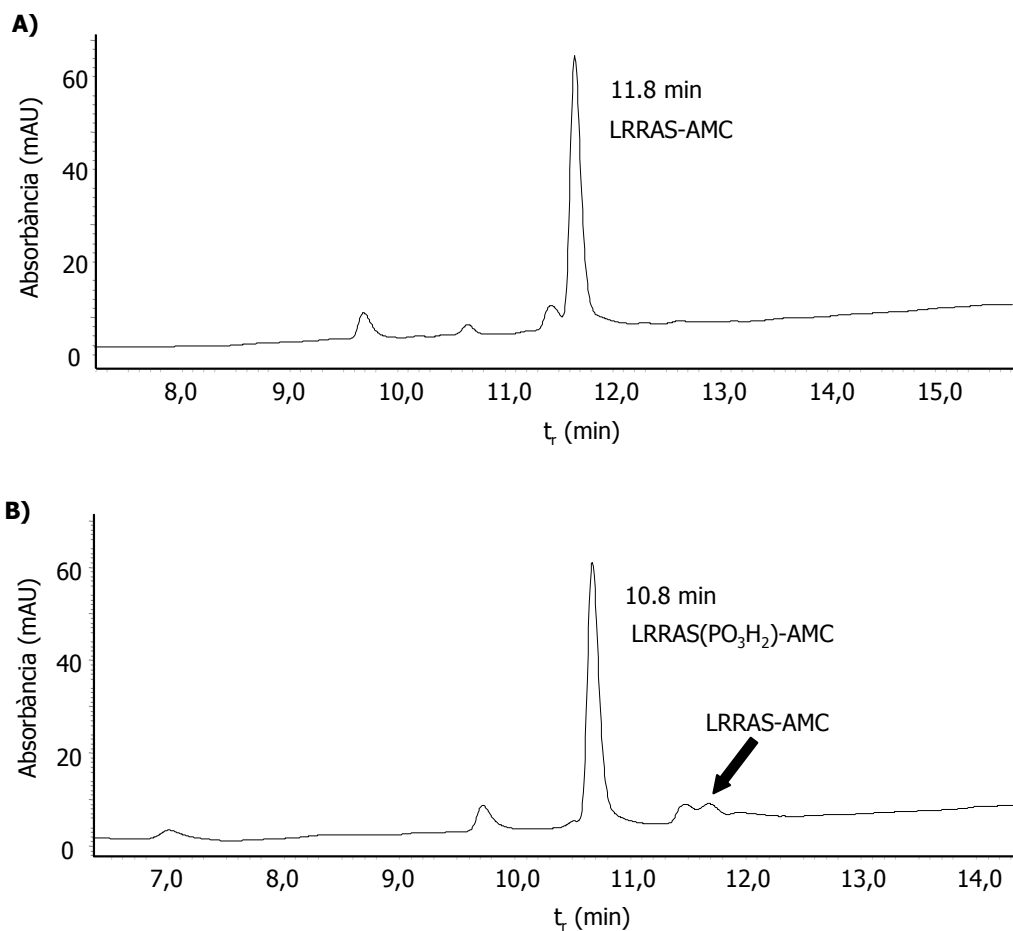


Figura 14.4. Perfils cromatogràfics d'HPLC de les al·lòquotes de la reacció de fosforilació del pèptid cumarínic LRRAS-AMC a temps 0 min (A) i 2 h (B). Detecció 220 nm.

Tal i com es pot observar als perfils cromatogràfics d'HPLC, la fosforilació de la cadena lateral de la serina del pèptid cumarínic **36** va ser pràcticament completa en 2 h de reacció, tot observant-se la desaparició del pic corresponent al pèptid LRRAS-AMC ($t_r=11.8$ min) i l'aparició del pic corresponent al pèptid fosforilat LRRAS(PO₃H₂)-AMC ($t_r=10.8$ min). El pèptid fosforilat es va identificar per espectrometria de masses, detectant el pic molecular 837.4 (M - H)⁻.

Aquests resultats van indicar que la proteïna quinasa PKA catalitzava la reacció de fosforilació de la serina en el pèptid cumarínic LRRAS-AMC i que aquesta reacció la podíem controlar per HPLC. Malauradament, no va ser possible seguir la reacció per fluorescència, en

no variar pràcticament la intensitat de fluorescència emitida pel grup AMC, després d'haver-se iniciat la reacció.

Així doncs, l'estratègia seguida amb el grup fluoròfor AMC situat en una posició adjacent al lloc de fosforilació del pèptid, no va permetre assolir el cinquè objectiu d'aquesta tesi, en no poder posar a punt un assaig de fluorescència per dur a terme el cribratge de la quimioteca de peptoides-II davant la capacitat d'inhibir la fosforilació del substrat LRRAS-AMC per la PKA.

15. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

15.1. CONSIDERACIONS GENERALS

Les reaccions químiques, instrumentació i reactius referides a la Part II es van realitzar tenint en compte les consideracions generals descrites en l'apartat 6.1.

La DMF i el THF utilitzats en la síntesi dels productes cumarínics es van destil·lar prèviament sobre CaH_2 i Na, respectivament.

L'aparell Biotage utilitzat per a la purificació amb columnes de sílica és de la companyia Biotage Inc., amb columnes empaquetades amb gel de sílica Kp-sil (32-63 μm , 60 Å) de tipus 40+S i 40+M.

Les anàlisis per HPLC per determinar l'evolució de les reaccions es van realitzar amb una columna de fase inversa de tipus Kromasil 100 de 5 μm (25 x 0.46 cm) de Scharlau. Eluents: H_2O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 1 min a 20% d'ACN, de 20% a 80% en 17 min i 1 min a 80% d'ACN. En el cas dels derivats fosforilats es va fer servir un gradient que consistia en 1 min a 10% d'ACN, de 10% a 80% en 22 min i 1 min a 80% d'ACN. Detecció a 220 nm i a 340 nm (ζ màxima d'absorció de l'AMC).

El sintetitzador utilitzat en la síntesi del pèptid és del tipus Applied Biosystems model 433A.

El fluorímetre utilitzat pels estudis de fluorescència dels derivats cumarínics és del tipus Jasco FP-6500 Spectrofluorometer.

L'HPLC utilitzat pels estudis de fosforilació del pèptid cumarínic LRRAS-AMC és del tipus Elite Lachrom Merck Hitachi Diode array detector L-2450, amb una columna Tecknocroma C18. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 1 min a 10% d'ACN, de 10% a 80% en 22 min i 1 min a 80% d'ACN (detecció a 220 nm).

15.2. SÍNTESI D'N-FMOC-SER-AMC I N-FMOC-SER(PO₃H₂)-AMC

15.2.1. SÍNTESI D'N-FMOC-SER(^tBu)-AMC (29). DIFERENTS CONDICIONS DE REACCIÓ

15.2.1.1. Acoblament amb HATU

Seguint el procediment experimental descrit per Ellman i col.,¹⁷⁹ es van afegir 58 mg (0.33 mmol) de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) a una dissolució de 125 mg (0.33 mmol) d'N-Fmoc-Ser(^tBu)-OH en 1 ml de DMF i la mescla es va agitar durant 5 min a t.a. Passat aquest temps s'hi van afegir 188 mg (0.50 mmol, 1.5 eq.) d'HATU i 88 μ l (0.66 mmol, 2.0 eq.) de 2,4,6-trimetilpiridina. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a 60 °C durant 15 h. Passat aquest temps, es va realitzar un control de la reacció per HPLC amb detecció a 340 nm on es va observar una conversió del 80% en el producte cumarínic d'acoblament. Tot i mantenir la mescla de reacció durant 6 h més, no es va observar cap canvi en la conversió, motiu pel qual es va decidir evaporar el dissolvent a pressió reduïda. Seguidament es va redissoldre el residu obtingut en 15 ml d'AcOEt i es van fer uns rentats per eliminar l'AMC amb una dissolució d'HCl 2 N (3 x 10 ml) i una dissolució saturada de NaCl (3 x 10 ml). La fase orgànica es va assecar sobre Na₂SO₄ i es va evaporar a pressió reduïda. El residu final es va purificar per cromatografia de sílica en columna utilitzant el sistema Biotage i eluint amb una mescla de dissolvents CHCl₃/MeOH (1.5% de MeOH). Es van obtenir 133 mg d'un sòlid groguenc (rdt. 76%).

7-(*N*-Fmoc-*O*-*tert*-butil-*L*-serinamido)-4-metilcumarina (29)

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-*d*₆, 45°C): 10.38 (s, 1H, CONHPh), 8.28 (s, 1H, OCONH), 7.86 (d, J=7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.77 (d, J= 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.71 (ac, 3H, H_{Ar}), 7.52 (dd, J=8.7, 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.42-7.30 (ac, 4H, H_{Ar}), 6.24 (s, 1H, C=CHCO), 4.35-4.22 (ac, 4H, 1H (PhCHPh) + 2H (CH₂OCO) + 1H (NHCHCO)), 3.58 (dd, J=6.3 Hz, 2H, 1H (CH_{a,b}O^tBu) + 1H (CH_{a,b}O^tBu)), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.10 (s, 9H, ^tBu).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-*d*₆, 45°C): 169.7 (CONH), 159.8 (COO), 155.0 (OCONH), 153.5 (C_q), 152.8 (C_{Ar}), 143.7 (2 x C_{Ar}), 142.0 (2 x C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 127.4 (2 x CH_{Ar}), 126.8 (2 x CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 125.1 (2 x CH_{Ar}), 119.9 (2 x CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 115.0 (C_{Ar}), 112.2 (C=CHCO), 105.7 (CH_{Ar}), 72.9 (C(CH₃)₃), 65.7 (CH₂OCO), 61.7 (CH₂O^tBu), 56.1 (NHCHCO), 46.5 (CHCH₂O), 27.0 (3 x C(CH₃)₃), 17.7 (CH₃).

EMAR per C₃₂H₃₂N₂O₆: Calculada: 563.2158 (M + Na)⁺
 Determinada: 563.2150

15.2.1.2. Altres condicions d'acoblament

Altres condicions i agents d'acoblament utilitzats per dur a terme la reacció entre l'*N*-Fmoc-Ser(^tBu)-OH i l'AMC es resumeixen a continuació:

- a. PyBOP, HOBT i DIEA en DMF
- b. PyBOP, DMAP i DIEA en DMF
- c. NHS i DCC en DMF
- d. NHS i DIC en THF (+3% de DMF) a 60 °C
- e. **HOBT i DIC en THF (+3% de DMF) a 60 °C**
- f. Cloroformiat d'^tBu i Et₃N en ACN a 60 °C

Només en el cas **e** es va aconseguir obtenir fins un 17% de conversió per HPLC després de 5 dies de reacció. En els altres casos pràcticament no va tenir lloc l'acoblament.

15.2.2. SÍNTESI D'*N*-FMOC-SER-AMC (30)

La desprotecció del grup *tert*-butil d'*N*-Fmoc-Ser(^tBu)-AMC (apartat 15.2.1.1) es va realitzar afegint 6 ml d'una mescla DCM/TFA (1:1) a 130 mg (0.24 mmol) de **29**. La mescla de reacció es va mantenir en agitació durant 15 min. Passat aquest temps, els dissolvents es van evaporar a pressió reduïda, per obtenir 116 mg d'un sòlid groguenc (rdt. global 75%).

7-(*N*-Fmoc-L-serinamido)-4-metilcumarina (30)

Pf: 205-207 °C

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-d₆, 45°C): 10.38 (s, 1H, CONHPh), 7.86 (d, J=6.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.77 (d, J= 2.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.71 (ac, 3H, H_{Ar}), 7.52 (dd, J=8.7, 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.42-7.31 (ac, 4H, H_{Ar}), 6.24 (sa, 3H, 1H (C=CHCO) + 1H (OH) + 1H (OCONH)), 4.68 (m, 1H, NHCHCO) 4.35-4.23 (ac, 3H, 1H (PhCHPh) + 2H (CH₂OCO)), 3.71 (d, J=5.4 Hz, 2H, CH₂OH), 2.39 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-d₆, 45°C): 169.7 (CONH), 159.8 (COO), 155.0 (OCONH), 153.5 (C_q), 152.8 (C_{Ar}), 143.6 (2 x C_{Ar}), 142.0 (2 x C_{Ar}), 140.5 (C_{Ar}), 127.4 (2 x CH_{Ar}), 126.8 (2 x CH_{Ar}), 125.6 (CH_{Ar}), 125.0 (2 x CH_{Ar}), 119.8 (2 x CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 115.0 (C_{Ar}), 112.1 (C=CHCO), 105.7 (CH_{Ar}), 65.7 (CH₂OCO), 61.5 (CH₂OH), 56.1 (NHCHCO), 46.5 (CHCH₂O), 17.7 (CH₃).

EMAR per C₂₈H₂₄N₂O₆: Calculada: 507.1532 (M + Na)⁺

Determinada: 507.1525

15.2.3. SÍNTESI D'N-FMOC-SER(PO₃H₂)-AMC (31)**15.2.3.1. Acoblament amb HOBt i DIC**

A una dissolució de 100 mg (0.25 mmol) d'*N*-FmocSer(PO₃H₂)-OH en 3 ml de THF (amb un 3% de DMF) es van afegir 43 mg (0.25 mmol) d'AMC, 50 mg (0.37 mmol, 1.5 eq.) d'HOBt i 58 µl (0.37 mmol, 1.5 eq.) de DIC. La mescla de reacció es va mantenir en agitació i a reflux durant 20 h. Passat aquest temps, es va realitzar un control de la reacció per HPLC amb detecció a 340 nm on es va observar una conversió del 80% en el producte cumarínic d'acoblament. Tot i mantenir la mescla de reacció durant 5 h més, no es va observar cap canvi en la conversió, motiu pel qual es va decidir evaporar el dissolvent a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per CCP de sílica eluint amb una mescla de CHCl₃/DCM (1:1) (amb un 4% de DMF), però l'elevada polaritat del producte va fer difícil extreure'l de la sílica, essent necessària l'extracció amb MeOH. Després d'evaporar a pressió reduïda l'extracte metanòlic, el residu es va redissoldre en 15 ml de d'AcOEt i es van filtrar les partícules de sílica. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda per obtenir 105 mg d'un oli groguenc amb una puresa del 93% per HPLC a 220 nm (rdt. 75%).

7-(*N*-Fmoc-*O*-fosfo-*L*-serinamido)-4-metilcumarina (31)

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-*d*₆, 45°C): 11.05 (s, 1H, CONHPh), 7.85 (d, J=7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.78 (d, J=1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.71 (d, J=6.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.63 (d, J=8.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.53 (dd, J=8.7, 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.41-7.29 (ac, 4H, 2 x H_{Ar} + 2 x H_{Ar}), 6.22 (s, 1H, C=CHCO), 4.50 (ac, 1H, NHCHCO) 4.30-4.16(ac, 3H, 1H (PhCHPh) + 2H (CH₂OCO)), 4.04 (ac, 2H, CH₂OP), 3.55 (sa, PO₃H₂), 2.37 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-*d*₆, 45°C): 169.3 (CONH), 159.8 (COO), 155.0 (OCONH), 153.4 (C_q), 152.8 (C_{Ar}), 143.6 (2 x C_{Ar}), 142.2 (C_{Ar}), 140.5 (2 x C_{Ar}), 127.4 (2 x CH_{Ar}), 126.9 (2 x CH_{Ar}), 125.4 (CH_{Ar}), 125.2 (2 x CH_{Ar}), 119.8 (2 x CH_{Ar}), 115.4 (CH_{Ar}), 114.9 (C_{Ar}), 112.1 (C=CHCO), 105.8 (CH_{Ar}), 69.2 (CH₂OCO), 62.6 (CH₂OP), 60.2 (NHCHCO), 46.5 (CHCH₂O), 17.7 (CH₃).

EMAR per C₂₈H₂₅N₂O₉P: Calculada: 587.1195 (M + Na)⁺
 Determinada: 587.1213

15.2.3.2. Altres condicions d'acoblament

Altres condicions i agents d'acoblament utilitzats per dur a terme la reacció entre l'*N*-Fmoc-Ser(PO₃H₂)-OH i l'AMC es resumeixen a continuació:

- a. HATU i col·lidina en DMF a 60 °C
- b. PyBOP i DIC en DMF
- c. PyBOP, DIC i DIEA en DMF
- d. NHS i DCC en DMF

En cap cas no es va observar pràcticament reacció d'acoblament.

15.3. SÍNTESI D'*N*-ACETIL-SER-AMC I *N*-ACETIL-SER(PO₃H₂)-AMC

15.3.1. SÍNTESI D'*N*-ACETIL-SER-AMC (32)

Seguint el procediment descrit a l'apartat 15.2.2, es van sintetitzar 110 mg d'*N*-Fmoc-Ser-AMC (30). A continuació es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a l'acetilació posterior.

Desprotecció: a una dissolució de 110 mg (0.23 mmol) de 30 en 1 ml de DMF es van afegir 48 μ l (0.46 mmol, 2 eq.) de dietilamina. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es va fer un anàlisi del cru per HPLC a

220 nm on es va confirmar la desprotecció completa del grup Fmoc. Seguidament el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda.

Acetilació: al cru anterior es van afegir 37 μ l (0.46 mmol, 2 eq.) de piridina i 43 μ l (0.46 mmol, 2 eq.) d'anhidrid acètic, i la mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 20 min. Passat aquest temps, es van evaporar els reactius en excés a pressió reduïda i el cru de reacció es va purificar per CCP de sílica eluint amb una mescla de CHCl₃/MeOH (10:1). Es van obtenir 50 mg d'un sòlid groguenc (rdt. 72%).

7-(*N*-Acetil-L-serinamido)-4-metilcumarina (32)

Pf: 215-217 °C

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-d₆, 45°C): 10.40 (sa, 1H, CONHPh) 8.05 (sa, 1H, CONHCH), 7.79 (d, J=2.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.69 (d, J= 8.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (dd, J=8.7, 2.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.23 (s, 1H, C=CHCO), 4.47 (m, 1H, NHCHCO), 3.66 (d, J=5.7 Hz, 2H, CH₂OH), 3.23 (sa, 1H, OH), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.90 (s, 3H, CH₃CO).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-d₆, 45°C): 169.9 (CONHPh), 169.3 (CH₃CONH), 159.8 (COO), 153.5 (C_q), 152.8 (C_{Ar}), 142.2 (C_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 115.3 (CH_{Ar}), 114.9 (C_{Ar}), 112.1 (C=CHCO), 105.7 (CH_{Ar}), 61.5 (CH₂OH), 56.0 (NHCHCO), 22.3 (CH₃CO), 17.7 (CH₃).

EMAR per C₁₅ H₁₆ N₂ O₅: Calculada: 305.1059 (M + H)⁺

Determinada: 305.1136

15.3.2. SÍNTESI D'*N*-ACETIL-SER(PO₃H₂)-AMC (33)

Seguint el procediment descrit a l'apartat 15.2.3.1, es van sintetitzar 300 mg d'*N*-Fmoc-Ser(PO₃H₂)-AMC (**31**). Seguidament es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a l'acetilació posterior.

Desprotecció: a una dissolució de 300 mg (0.53 mmol) de **31** en 1 ml de DMF es van afegir 110 μ l (1.06 mmol, 2 eq.) de dietilamina. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es va fer un anàlisi del cru per HPLC on es va confirmar la desprotecció completa del grup Fmoc. Seguidament el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda.

Acetilació: el cru anterior es va redissoldre en 1.5 ml de DMF i s'hi va afegir 1.5 ml d'una dissolució de NaHCO₃ al 10% i 100 μ l (1.06 mmol, 2 eq.) d'anhidrid acètic. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 20 min. Passat aquest temps, els dissolvents

es van evaporar a pressió reduïda i el residu resultant es va purificar per HPLC a escala semipreparativa. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 10 min a 10% d'ACN, de 10% a 60% en 75 min, de 60% a 100% en 20 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Es van obtenir 30 mg d'un sòlid groguenc (rdt. 15%).

7-(*N*-Acetil-*O*-fosfo-*L*-serinamido)-4-metilcumarina (33)

Pf: 127-129 °C

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-*d*₆): 10.88 (s, 1H, CONHPh), 8.50 (sa, 1H, CONHCH), 7.79 (d, J=0.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.71 (d, J= 5.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51 (dd, J=5.4, 0.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.26 (s, 1H, C=CHCO), 4.68 (t, J=5.5 Hz, 1H, NHCHCO), 4.04 (dd, J=5.5 Hz, 2H, CH₂OH), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.90 (s, 3H, CH₃CO).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-*d*₆): 169.6 (CONH), 168.6 (CH₃CONH), 160.0 (COO), 153.6 (C_q), 153.1 (C_{Ar}), 141.9 (C_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 115.4 (CH_{Ar}), 115.3 (C_{Ar}), 112.4 (C=CHCO), 105.9 (CH_{Ar}), 64.7 (CH₂P), 53.8 (NHCHCO), 22.4 (CH₃CO), 18.0 (CH₃).

EMAR per C₁₅ H₁₇N₂O₈P: Calculada: 385.0723 (M + H)⁺

Determinada: 385.0789

15.4. SÍNTESI DEL PÈPTID H-LEU-ARG-ARG-ALA-SER-AMC (36)

15.4.1. SÍNTESI DE H-SER(^tBu)-AMC (34)

Seguint el procediment descrit a l'apartat 15.2.1.1, es van sintetitzar 400 mg d'*N*-Fmoc-Ser(^tBu)-AMC (**29**). Seguidament es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc.

Desprotecció: a una dissolució de 400 mg (0.74 mmol) de **29** en 2 ml de DMF es van afegir 150 μ l (1.48 mmol, 2 eq.) de dietilamina. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es va fer un anàlisi del cru de reacció per HPLC on es va confirmar la desprotecció del grup Fmoc. Seguidament el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i el residu es va purificar per cromatografia de sílica en columna utilitzant el sistema Biotage i eluint amb una mescla de dissolvents CHCl₃/MeOH (12:1). Es van obtenir 215 mg del compost **34** (rdt. global 70%).

7-(*O*-*tert*-Butil-*L*-serinamido)-4-metilcumarina (34)¹⁸⁸

Pf: 125-127 °C

¹H-RMN (300 MHz, dimetilsulfòxid-*d*₆, 35°C): 7.81 (d, J=1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.68 (dd, J=8.7, 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.55 (d, J=8.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.23 (s, 1H, C=CHCO), 4.05 (s, 2H,

NH₂), 3.47 (ac, 3H, 1H (NHCHCO) + 2H (CH₂O^tBu)), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.10 (s, 9H, ^tBu).

¹³C-RMN (75 MHz, dimetilsulfòxid-d₆, 35°C): 173.1 (CONH), 159.9 (COO), 153.6 (C_q), 152.9 (C_{Ar}), 142.0 (C_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 114.9 (C_{Ar}), 112.1 (C=CHCO), 105.6 (CH_{Ar}), 72.5 (C(CH₃)₃), 64.3 (CH₂^tBu), 56.1 ((NHCHCO), 27.2 (3 x C(CH₃)₃), 17.8 (CH₃).

CL-EM: 319.2 (M + H)⁺

15.4.2. SÍNTESI DEL PÈPTID H-LEU-ARG(Pmc)-ARG(Pmc)-ALA-OH

La síntesi del pèptid H-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH es va realitzar al laboratori del Dr. Enrique Pérez-Payá a la Fundació Valenciana d'Investigacions Biomèdiques de València per Ana Giménez. La resina utilitzada va ser del tipus clorur de 2-clorotritil. Les cadenes laterals de les arginines es trobaven protegides amb el grup Pmc i l'extrem amino terminal de la leucina estava desprotegit. Una vegada sintetitzat el pèptid (0.1 mmol), es va procedir a la seva escissió de la resina.

Escissió de la resina: la resina es va transferir a un tub de vidre de 25 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 10 ml d'un còctel d'escissió format per DCM amb un 2% de TFA, tornant-se la resina de color granatós. La mescla es va deixar agitant mecànicament durant 4 h a t.a. i a 200 rpm. A continuació la mescla es va filtrar i al filtrat s'hi van afegir 30 ml d'èter metil *tert*-butílic fred per precipitar el pèptid i es va deixar al congelador a -80 °C durant 4 h. La mescla es va centrifugar a 3 °C i 3000 rpm durant 30 min. Després de decantar, es va recollir el precipitat, es va redissoldre en àcid acètic glacial i es va liofilitzar. Es van obtenir 84 mg del pèptid d'una puresa del 90% per HPLC a 220 nm (rdt. 81%).

H-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH

CL-EM: 1047.6 (M + H)⁺

15.4.3. PROTECCIÓ DEL PÈPTID AMB EL GRUP BOC (35)

Seguint el procediment experimental descrit per Keller i col.,¹⁸⁷ a una dissolució de 80 mg (0.08 mmol) del pèptid H-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH en 200 µl de NaOH 1 M, s'hi van afegir 35 mg (0.16 mmol, 2.0 eq.) de dicarbonat de di-*tert*-butil dissolts en 200 µl d'alcohol *tert*-butílic. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 3 h. Passat aquest

temps, el cru de reacció es va analitzar per HPLC on es va confirmar la protecció del pèptid. Seguidament la mescla de reacció es va acidificar amb 1 ml d'àcid cítric al 10% i el pèptid es va extreure amb AcOEt (3 x 2 ml). Els extractes orgànics es van ajuntar, assecar sobre MgSO₄ i evaporar a pressió reduïda. Es van obtenir 76 mg del pèptid protegit amb una puresa del 90% per HPLC (rdt. 87%).

***N*-Boc-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH (35)**

CL-EM: 1147.6 (M + H)⁺

15.4.4. OBTENCIÓ DE H-LEU-ARG-ARG-ALA-SER-AMC (36)

A una dissolució de 75 mg (0.07 mmol) del pèptid *N*-Boc-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ala-OH (**35**) en 5 ml de DMF s'hi van afegir 25 mg (0.08 mmol, 1.2 eq.) del compost **34**, 73 mg (0.14 mmol, 2.0 eq.) de PyBOP i 24 μ l (0.14 mmol, 2.0 eq.) de DIEA. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 10 h. Passat aquest temps es va realitzar un control de la reacció per HPLC on es va observar una conversió del 90% en el pèptid cumarínic. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i es va procedir a la desprotecció del pèptid.

Desprotecció: el residu anterior es va transvasar a un tub de vidre de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid i s'hi van afegir 3 ml d'un còctel format per TFA/DCM/H₂O/triisobutilsilà (70:20:5:5). La mescla resultant es va agitar mecànicament durant 4 h a t.a. i a 200 rpm. Passat aquest temps, s'hi van afegir 20 ml d'èter metil *tert*-butilíic fred per precipitar el pèptid i la mescla es va deixar al congelador a -80 °C durant 4 h. Seguidament, la mescla es va centrifugar a 3 °C i 3000 rpm durant 30 min. Després de decantar, el precipitat es va recollir, es va redissoldre en àcid acètic glacial i es va liofilitzar. El residu obtingut es va purificar per HPLC a escala semipreparativa. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; gradient: 10 min a 1% d'ACN, d'1% a 80% en 80 min, de 80% a 100% en 20 min i 10 min a 100% d'ACN; flux 5 ml/min. Es van obtenir 18 mg del peptid cumarínic **36** amb una puresa del 95% per HPLC a 220 nm (rdt. 34%).

7-[(Leucil-arginil-arginil-alanil)serinamido]4-metilcumarina (36)

EMAR per C₃₄H₅₄N₁₂O₈: Calculada: 759.4188 (M + H)⁺

Determinada: 759.4260

15.5. ASSAIG DE FOSFORILACIÓ DEL PÈPTID 36 AMB PKA

L'assaig de fosforilació del pèptid LRRAS-AMC (**36**) per la proteïna quinasa PKA es va dur a terme afegint 3 μ l d'ATP (175 mM), 2 μ l de MgCl₂ (1 M) i 30 μ l de tampó TRIS (500 mM) a 264 μ l d'una dissolució de **36** (250 μ M). Seguidament s'hi va afegir 1 μ l de la PKA (80 μ g/ μ l, 1.73 mg/ml), subministrada per la casa comercial Promega, i la mescla de reacció es va incubar a 30 °C i a 300 rpm en un agitador "Thermomixer comfort". A una de les mescles control no es va afegir la PKA i a l'altra mescla control es van afegir 3 μ l d'ADP (175 mM) en comptes de l'ATP. A temps de reacció 0 min i 2 h es van extreure tres alíquotes de 40 μ l de cada reacció: a una primera alíquota s'hi van afegir 60 μ l d'H₂O i es va posar en gel, a una segona alíquota s'hi van afegir 10 μ l d'EDTA 500 mM i 50 μ l d'H₂O, i a la tercera alíquota s'hi va afegir 60 μ l d'àcid tricloroacètic al 30% per precipitar l'enzim.

A 20 μ l de les dissolucions de les dues primeres alíquotes als dos temps de reacció 0 min i 2 h, a les quals es va aturar la reacció amb gel o EDTA, s'hi van afegir 580 μ l d'H₂O i es van enregistrar els espectres d'emissió de fluorescència.

La tercera alíquota als dos temps de reacció 0 min i 2 h, a les quals es va afegir l'àcid tricloroacètic, es va centrifugar durant 10 min a 13.000 rpm i a 50 μ l del sobrenedant s'hi van afegir 250 μ l d'H₂O per enregistrar el cromatograma d'HPLC (detecció a 220 nm).

**PART IV. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA
DE PEPTIDOMIMÈTICS DE TRKA**

SUMARI PART IV

16. INTRODUCCIÓ	243
16.1. Neurotrofines i tirosina quinases	243
16.2. Antecedents	244
17. SÍNTESI DE DOS MONÒMERS DE LA QUIMIOTECA	249
17.1. Síntesi en dissolució. Format de la quimioteca	249
17.2. Diversitat de la quimioteca	250
17.3. Síntesi de dos monòmers de la quimioteca	250
17.3.1. Síntesi del monòmer A	250
17.3.1.1. Estratègia sintètica A. Anàlisi retrosintètica	250
17.3.1.1.1. Obtenció del 2-iodo-4-nitro- <i>sec</i> -butoxibenzè (38)	253
17.3.1.1.2. Obtenció del 3-oxa-5-hexinilcarbamat de <i>tert</i> -butil (40)	253
17.3.1.2. Estratègia sintètica B. Anàlisi retrosintètica	254
17.3.1.2.1. Obtenció de l' <i>N</i> -(3-oxa-5-hexinil)ftalimida (42)	255
17.3.1.2.2. Obtenció del monòmer A (45)	255
17.3.2. Síntesi del monòmer B	257
17.3.2.1. Estratègia sintètica C. Anàlisi retrosintètica	257
17.3.2.1.1. Intents d'obtenció del monòmer B	258
17.3.2.2. Estratègia sintètica D. Anàlisi retrosintètica	259
17.3.2.2.1. Intents d'obtenció de 3-oxa-6-(2'-fluoro-5'-nitro)fenil-5-hexinamina	260
17.3.2.3. Estratègia sintètica E. Anàlisi retrosintètica	261
18. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	263
18.1. Consideracions generals	263
18.2. Obtenció del 6-(5'-nitro-2'- <i>sec</i> -butoxi)fenil-3-oxa-5-hexinilcarbamat de <i>tert</i> -butil (45)	263
18.2.1. Estratègia sintètica A	263
18.2.1.1. Síntesi de 4-fluoro-3-iodonitrobenzè (37)	263
18.2.1.2. Síntesi del 2-iodo-4-nitro- <i>sec</i> -butoxibenzè (38)	264
18.2.1.3. Síntesi de 2-hidroxietilcarbamat de <i>tert</i> -butil (39)	264
18.2.1.4. Síntesi del 3-oxa-5-hexinilcarbamat de <i>tert</i> -butil (40)	265
	241

18.2.2. Estratègia sintètica B	265
18.2.2.1. Síntesi de l' <i>N</i> -(2-hidroxietil)ftalimida (41)	265
18.2.2.2. Síntesi de l' <i>N</i> -(3-oxa-5-hexinil)ftalimida (42)	266
18.2.2.3. Síntesi de la ftalimida 43	266
18.2.2.4. Desprotecció del grup ftalimido del derivat 43	267
18.2.2.5. Síntesi del carbamat 45 . Monòmer A	268
18.3. Obtenció de 6-(2'-metoxycarbonilmetoxi-5'-nitro)fenil-3-oxa-5-hexinilcarbammat de <i>tert</i> -butil (48)	269
18.3.1. Estratègia sintètica C	269
18.3.1.1. Síntesi de 2-iodo-1-metoxycarbonilmetoxi-4-nitrobenzè (46)	269
18.3.1.2. Síntesi de la ftalimida 47	269
18.3.1.3. Intents de síntesi del monòmer B (48)	270
18.3.1.3.1. Desprotecció del grup ftalimido de 47 amb metilamina. Protecció amb el grup Boc.	270
18.3.1.3.2. Desprotecció del grup ftalimido de 47 amb hidrazina. Protecció amb el grup Boc.	271
18.3.2. Estratègia sintètica D	272
18.3.2.1. Síntesi de la ftalimida 49	272
18.3.2.2. Desprotecció del grup ftalimido de 49 amb hidrazina	272

16. INTRODUCCIÓ

En aquesta última part de la memòria s'explicarà el treball realitzat durant una estada de quatre mesos al laboratori del Prof. Kevin Burgess del Departament de Química Orgànica de la Universitat Texas A&M de College Station (Texas, EE.UU.).

16.1. NEUROTROFINES I TIROSINA QUINASES

Les neurotrofines són hormones del factor de creixement que regulen el desenvolupament i el manteniment del sistema nerviós central i perifèric. Dins d'aquesta família de proteïnes es troben el factor de creixement nerviós (NGF), la neurotrofina-3 (NT-3), el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) i la neurotrofina-4/5 (NT-4/5).¹⁸⁹

Les neurotrofines són proteïnes d'aproximadament 25 kDa i es troben en forma dimèrica. Presenten una gran homologia de seqüència entre elles, del voltant del 50%, però els residus dels extrems *N*- i C-terminals així com els residus de les regions de gir η són molt variables i

juguen un paper clau en la interacció i activació dels seus receptors, les tirosina quinases (Trk).

Els receptors transmembrànics Trk presenten també una elevada homologia en la seva seqüència. El seu domini extracel·lular es pot subdividir en cinc dominis i el seu domini intracel·lular conté el centre actiu, amb residus de tirosina que en ser fosforilats provoquen una cascada de senyals que, en últim terme, modulen el creixement i la diferenciació neuronal.

Els receptors Trk presenten una elevada afinitat per les neurotrofines, de l'ordre de 10^{11} M, però aquestes no són lligands específics perquè poden interaccionar amb múltiples tirosina quinases i també amb el receptor p75, amb el qual s'enllacen a una velocitat més elevada, però amb una constant d'afinitat menor de l'ordre de 10^9 M. Aquesta absència d'especificitat i de selectivitat degut a la interacció de les neurotrofines amb múltiples receptors pot provocar efectes secundaris no desitjats, amb implicacions en el dolor i la neuropatia, el càncer i en malalties neurodegeneratives com ara l'Alzheimer.

Una possible solució per modular aquests efectes secundaris és trobar agonistes o antagonistes dels receptors de Trk i/o de p75. Així doncs, el desenvolupament de lligands dimèrics de baix pes molecular i estables a la proteòlisi que interaccionin selectivament amb els receptors de neurotrofines esdevé un objectiu de gran interès en biomedicina.

16.2. ANTECEDENTS

En els últims anys, s'ha fet un gran esforç en el grup del Prof. Kevin Burgess per a l'estudi, el disseny i la síntesi de lligands artificials que mimetitzin les regions d'interacció (*hot spot*) de les neurotrofines NT-3 i NGF amb el seus corresponents receptors, les tirosina quinases TrkC i TrkA, respectivament, per regular el senyal de transducció mitjançant l'activació o desactivació de l'activitat de la tirosina quinasa.¹⁹⁰⁻¹⁹⁶

A la Figura 16.1 es mostra l'estructura dimèrica de la neurotrofina NGF, així com el complex format per la interacció de NGF amb el domini 5 del seu receptor, el qual es considera el domini més important involucrat en l'elevada afinitat d'aquest lligand per la TrkA i en la consegüent inducció de la resposta biològica.¹⁸⁹

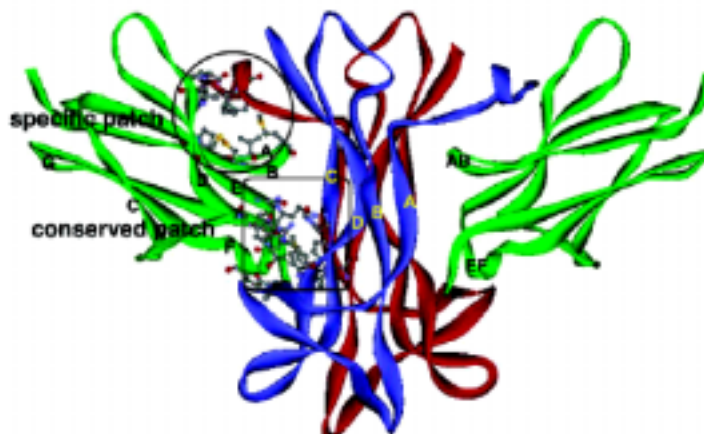


Figura 16.1. Estructura del complex format per la interacció de la neurotrofina dimèrica NGF (color blau i vermell) amb el domini 5 del receptor TrkA (color verd).

Els compostos sintetitzats es van dissenyar per mimetitzar els girs η de les regions "hot spot" de les neurotrofines NGF i NT-3, amb grups farmacòfors a les cadenes laterals que corresponien exactament amb els residus d'aminoàcids $i + 1$ i $i + 2$ de les regions de gir de les neurotrofines (vegeu Figura 16.2).

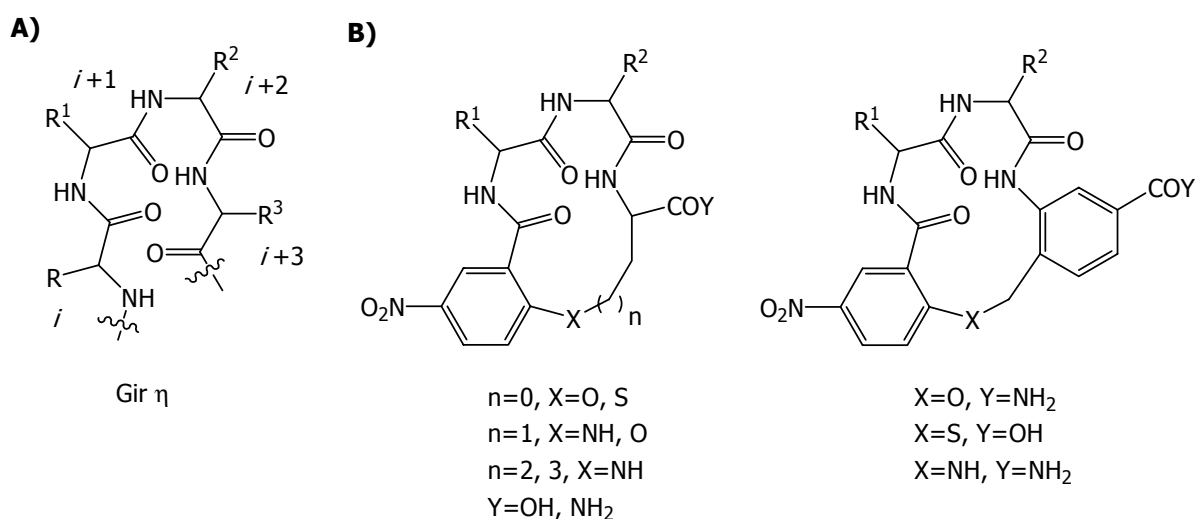


Figura 16.2. A) Estructura dels girs η de les regions "hot spot" de les neurotrofines NGF i NT-3. B) Estructura de peptidomimètics sintetitzats per mimetitzar els girs η de NGF i NT-3. R^1 i R^2 constitueixen les fonts de diversitat dels peptidomimètics.

Estudis bioquímics realitzats als últims anys han posat de manifest que moltes funcions biològiques estan relacionades amb canvis conformacionals en receptors situats a la superfície cel·lular induïts per interaccions multivalents. La multivalència és un bon mecanisme per augmentar la força total d'interacció entre un lligand i el seu receptor, sobretot per lligands amb una afinitat relativament baixa. Una forma òbvia d'augmentar la capacitat d'unió d'un receptor per un substrat determinat és la combinació de dos fragments receptors a través d'enllaços covalents. Aquests estudis han esdevingut un punt d'inflexió en la investigació de nous agents terapèutics.

Concretament, les interaccions divalents en reconeixement molecular s'han estudiat en molts sistemes.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ En aquest sentit, a la bibliografia trobem diverses estratègies sintètiques desenvolupades per tenir un esquelet central que permeti la formació de molècules dimèriques, tant en fase sòlida com en dissolució.²⁰⁰⁻²⁰³

En el cas de les neurotrofines, al laboratori del Prof. Burgess es va optimitzar un procediment per sintetitzar molècules bivalents a partir de compostos monovalents sense haver d'utilitzar grups protectors a les cadenes laterals ni agents activants, a través de l'acoblament de dues molècules de peptidomimètic a un esquelet central de triazina mitjançant un espaiador (vegeu Figura 16.3).¹⁹⁴

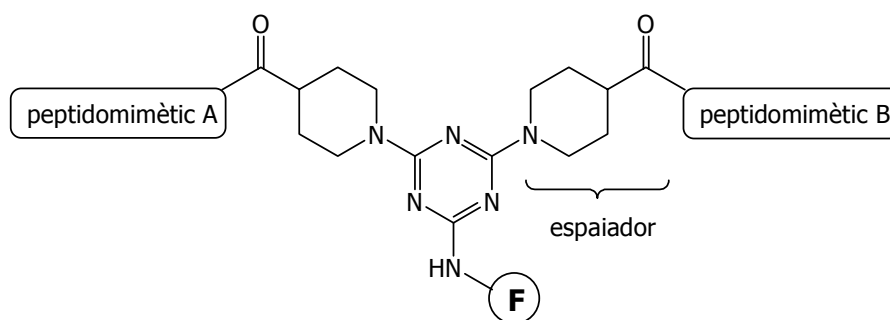


Figura 16.3. Estructura general d'un lligand bivalent basat en un esquelet central de triazina, el qual conté un grup fluoròfor (F). Si les dues molècules de peptidomimètics A i B són iguals, parlarem de lligands homobivalents i si són diferents parlarem d'heterobivalents.

La longitud de l'espaiador era un punt important a estudiar per tal que la geometria adoptada pel lligand fos l'adequada per interaccionar amb el receptor. Aquest procediment constituïa una estratègia molt interessant per sintetitzar quimioteques de molècules homobivalents o heterobivalents per ser assajades com agonistes o antagonistes de TrkA. A

més, de l'esquelet de triazina es va derivar un grup fluoròfor per facilitar la detecció als assaigs biològics i millorar la solubilitat dels compostos en medis aquosos.

Amb aquests antecedents, es va decidir sintetitzar una quimioteca de peptidomimètics, molècules homobivalents i heterobivalents, en dissolució i formada a partir de monòmers amb una estructura general com la que es mostra a la Figura 16.4, en la qual es van mantenir les distàncies geomètriques més adequades per mimetitzar les regions de gir η de la neurotrofina NGF, obtingudes amb estudis de modelatge molecular realitzats amb anterioritat al laboratori.

La meua participació en aquest projecte va consistir en la síntesi de dos monòmers, d'un conjunt de 13 molècules escollides per formar la diversitat de la quimioteca de peptidomimètics.

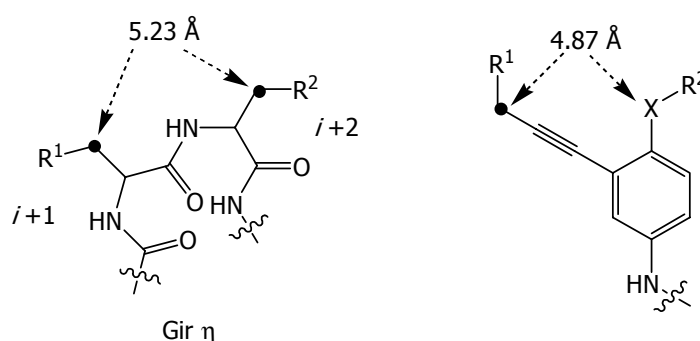


Figura 16.4. Estructura general dels monòmers per a la quimioteca de molècules bivalents que mimetitzin les regions de gir η de NGF.

Per altra banda, durant l'estada al laboratori del Prof. Burgess es va començar a dissenyar un procediment general per sintetitzar semipeptoides cíclics en dissolució que mimetitzessin els girs η de NGF (vegeu Figura 16.2), amb l'estructura general que es mostra a la Figura 16.5.

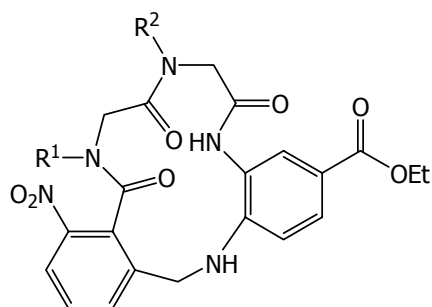


Figura 16.5. Estructura general de semipeptoides cíclics, on R^1 i R^2 constitueixen les fonts de diversitat dels peptidomimètics.

Per establir un procediment que permetés treballar en dissolució a una escala més gran que l'habitual en la fase sòlida, era important evitar la purificació dels intermedis de síntesi per cromatografia de sílica o per HPLC a escala semipreparativa. Així doncs, per agilitar el procés, la purificació dels intermedis de síntesi es va limitar a evaporacions, recristal·litzacions i/o extraccions àcid-base.

El treball realitzat per sintetitzar semipeptoides cíclics en dissolució no s'ha inclòs en aquesta memòria degut a que l'estudi del disseny i la optimització del procediment de síntesi es trobava en una etapa molt preliminar en finalitzar l'estada al laboratori del Prof. Burgess.

17. SÍNTESI DE DOS MONÒMERS DE LA QUIMIOTECA

17.1. SÍNTESI EN DISSOLUCIÓ. FORMAT DE LA QUIMIOTECA

En la part I d'aquesta memòria s'ha comentat que un dels principals avantatges que presenta la síntesi en fase sòlida és la facilitat amb què es poden purificar els compostos units a la resina, a través de l'eliminació de les impureses i altres productes de reacció no units a la fase sòlida per filtració i rentat del suport sòlid.

No obstant, la síntesi de la quimioteca de peptidomimètics del receptor TrkA es va plantejar en dissolució mitjançant un procediment estratègic desenvolupat amb anterioritat al laboratori del Prof. Burgess. Aquest procés es basava en la reacció selectiva d'amines amb triazines, utilitzant K_2CO_3 i en DMSO, sense ser necessari la protecció de cadenes laterals ni la utilització d'agents d'acoblament i, per tant, evitant haver de purificar els compostos finals (vegeu Figura 17.1).¹⁹⁴

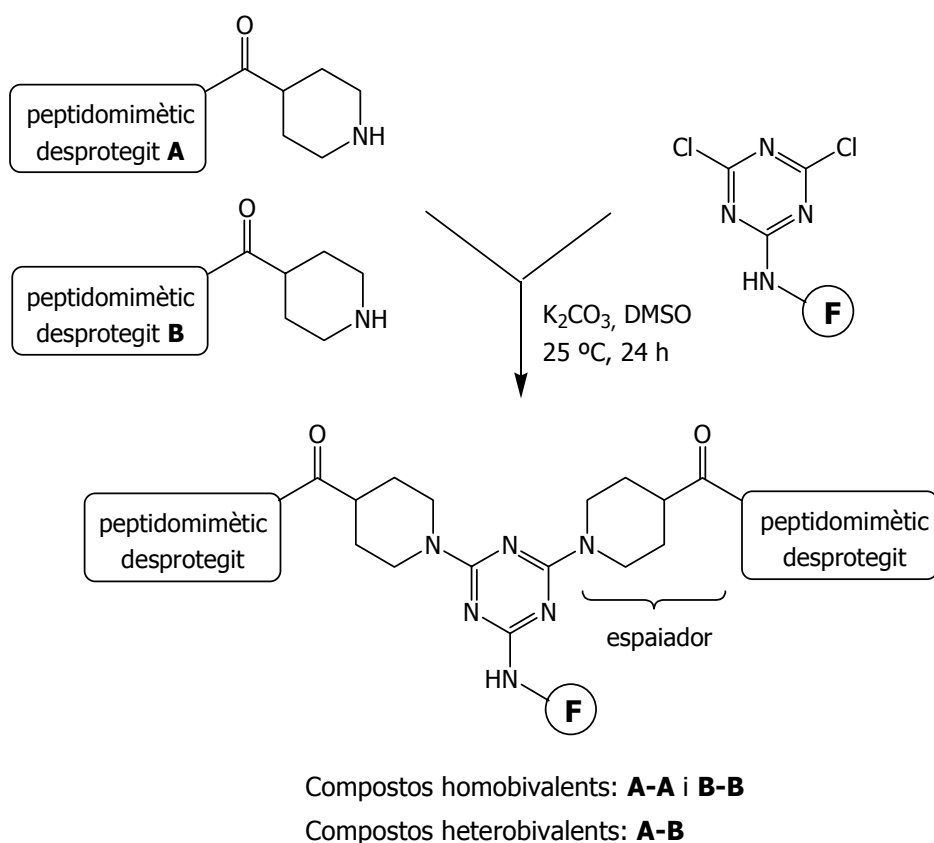


Figura 17.1. Esquema sintètic plantejat per a la síntesi de la quimioteca de peptidomimètics de TrkA, per obtenir mescles de compostos homobivalents i heterobivalents. F: grup fluoròfor.

Aquest procediment permetia obtenir mescles de compostos homobivalents (**A-A** i **B-B** en la Figura 17.1) i heterobivalents (**A-B** en la Figura 17.1), per ser assajades com agonistes o antagonistes del receptor TrkA.

Així doncs, es va escollir el format de rastreig posicional per sintetitzar la quimioteca de peptidomimètics. D'acord amb aquest format, es treballaria amb mescles de reactius, peptidomimètics desprotegits, tot i que en cada mescla només es pretenia fer reaccionar dos monòmers del conjunt que formava la diversitat de la quimioteca per obtenir mescles controlades amb un màxim de 3 compostos bivalents a cadascuna (dos compostos homobivalents i un compost heterobivalent).

17.2. DIVERSITAT DE LA QUIMIOTECA

Basant-se en l'estructura general de la Figura 16.4, es va pensar en sintetitzar els 13 compostos de la Figura 17.2 per constituir els monòmers de la quimioteca de peptidomimètics del receptor TrkA. Una vegada sintetitzats aquests compostos, es procediria a la reducció del grup nitro per tenir un grup amino a l'estructura i a la desprotecció del grup Boc present en alguns dels monòmers, per dur a terme la síntesi de la quimioteca amb l'acoblament dels 13 monòmers a l'esquelet central de triazina mitjançant un espaiador.

Dels 13 monòmers sintetitzats de la Figura 17.2, s'explicarà el procediment seguit per a la síntesi dels dos compostos seleccionats en color blau (**A** i **B**).

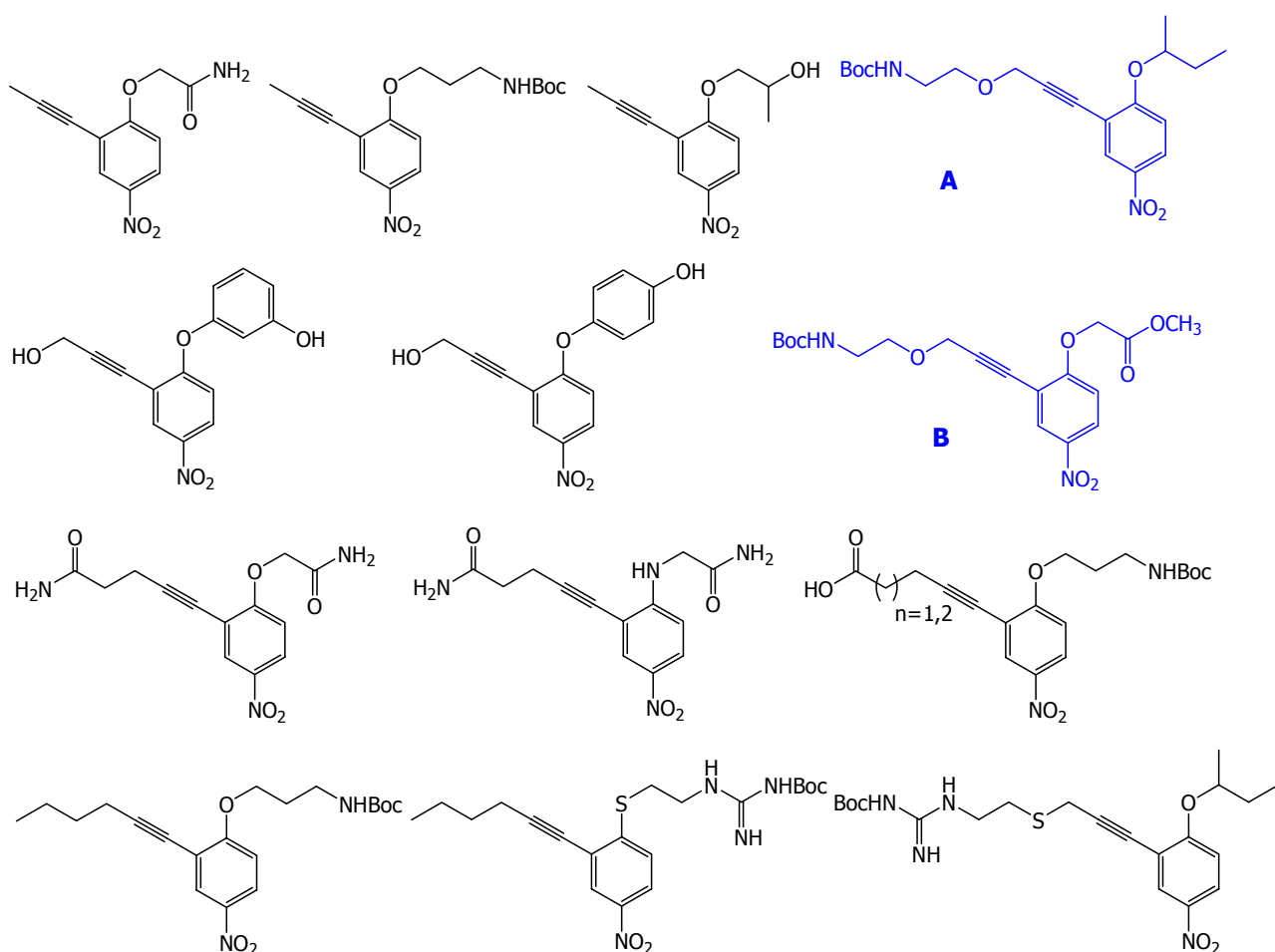


Figura 17.2. Estructura dels 13 monòmers que formaven la diversitat de la quimioteca de peptidomimètics de TrkA.

17.3. SÍNTESI DE DOS MONÒMERS DE LA QUIMIOTECA

17.3.1. SÍNTESI DEL MONÒMER A

17.3.1.1. Estratègia sintètica A. Anàlisi retrosintètica

Inicialment, es va plantejar l'anàlisi retrosintètica que es mostra a la Figura 17.3. El monòmer **A** s'obté a partir d'una reacció de Sonogashira entre el 3-oxa-5-hexinilcarbammat de *tert*-butil i el 2-iodo-4-nitro-*sec*-butoxibenzè. Aquest últim compost s'obté a partir del 2-butanol i del 4-fluoro-3-iodonitrobenzè, el qual provindria de la iodació del 4-fluoronitrobenzè. Per altra banda, el 3-oxa-5-hexinilcarbammat de *tert*-butil provindria d'una reacció de substitució nucleòfila entre el bromur propargílic i el 2-hidroxietilcarbammat de *tert*-butil, el qual provindria de la protecció de l'etanolamina amb el grup Boc.

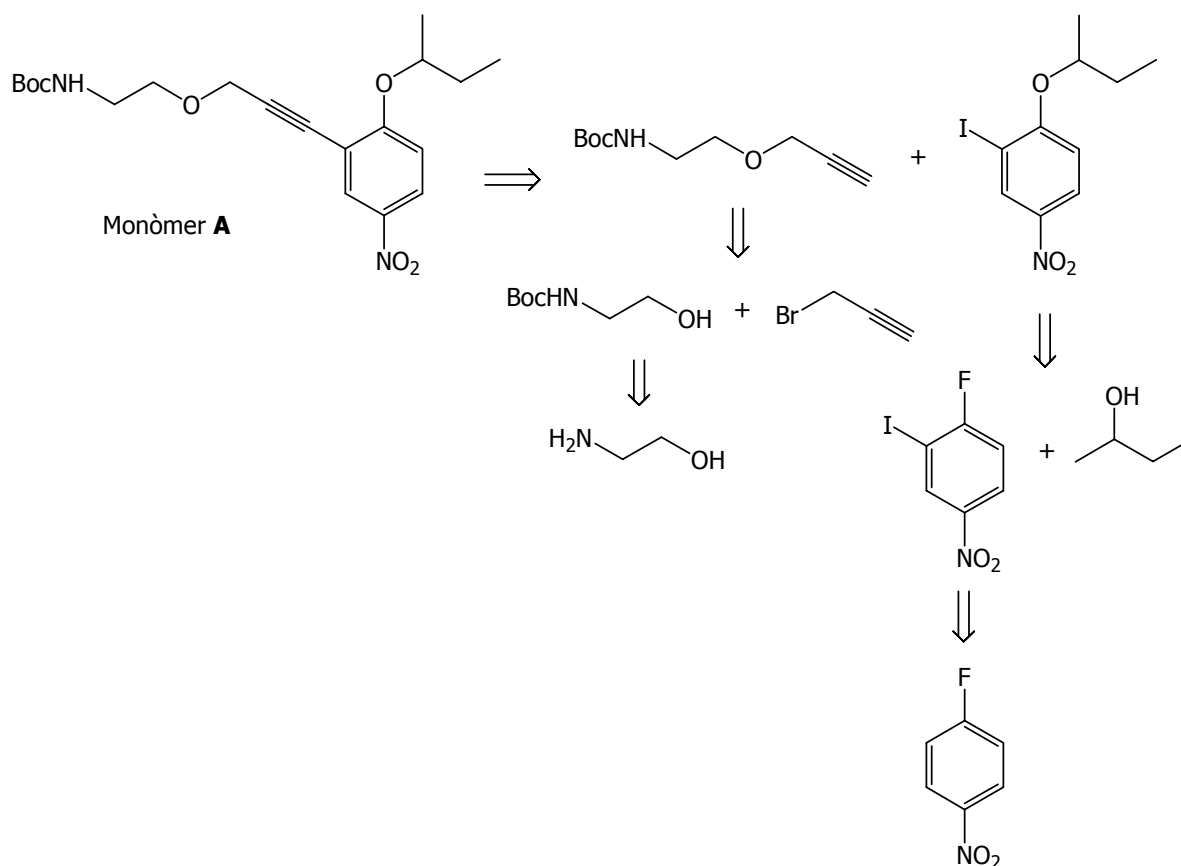


Figura 17.3. Anàlisi retrosintètica per a la formació del monòmer **A**.

17.3.1.1.1. *Obtenció del 2-iodo-4-nitro-sec-butoxibenzè (38)*

La síntesi del 2-iodo-4-nitro-*sec*-butoxibenzè es va realitzar seguint l'esquema proposat a la Figura 17.4. Primerament, es va dur a terme la iodació del 4-fluoronitrobenzè seguint el procediment descrit per Olah i col.,²⁰⁴ amb *N*-iodosuccinimida en àcid trifluorometansulfònic, per obtenir el compost iodat **37** amb un 74% de rendiment. Seguidament, va tenir lloc la reacció de substitució nucleòfila aromàtica de l'àtom de fluor de **37** amb 2-butanol i ^tBuOK com a base en THF, per obtenir el compost **38** amb un 90% de rendiment. Cal destacar les dades espectroscòpiques de ¹H-RMN de **38** referents al CH aromàtic en posició orto al grup *sec*-butoxi, en variar el desplaçament químic de $\tau = 7.21$ ppm en **37** cap a camps més alts en **38**, amb un desplaçament a $\tau = 6.80$ ppm. A més, amb l'absència de l'àtom de fluor, van desaparèixer les constants d'acoblament d'H i C amb el F.

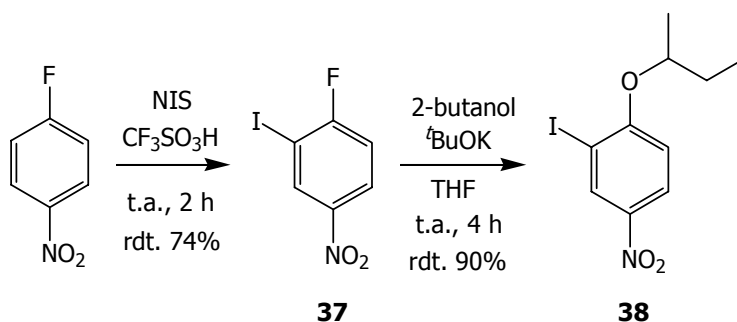


Figura 17.4. Esquema sintètic per obtenir el compost **38**: reacció de iodació del 4-fluoronitrobenzè per obtenir el compost iodat **37** i reacció de S_NAr amb 2-butanol per obtenir **38**.

17.3.1.1.2. *Obtenció del 3-oxa-5-hexinilcarbammat de tert-butil (40)*

Per dur a terme la síntesi del 3-oxa-5-hexinilcarbammat de *tert*-butil es va seguir l'esquema proposat a la Figura 17.5. Primerament, la protecció del grup amino de l'etanolamina amb el grup protector Boc es va realitzar seguint el procediment descrit per Callahan i col.,²⁰⁵ amb dicarbonat de di-*tert*-butil i Et₃N en DCM. Es va obtenir el compost **39** amb un 98% de rendiment. Seguidament, es va dur a terme la reacció de substitució nucleòfila del bromur propargílic amb el compost **39** i NaH en THF. No obstant, les dades espectroscòpiques de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN van indicar la presència d'una mescla de productes: el compost **40** desitjat i el subproducte de dialquilació provinent de la reacció del grup amino protegit amb el bromur propargílic.

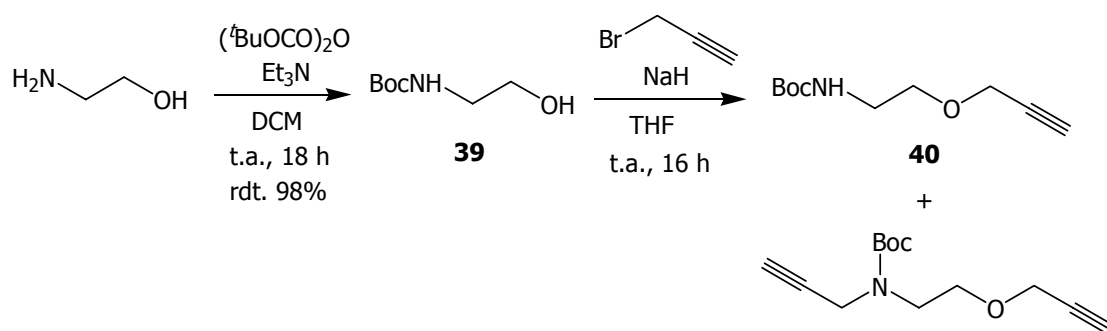


Figura 17.5. Esquema sintètic proposat per obtenir el 3-oxa-5-hexinilcarbamtat de *tert*-butil: protecció de l'etanolamina amb el grup Boc per obtenir **39** i reacció de S_{N} amb el bromur propargílic per obtenir **40**.

Així doncs, es va decidir canviar el grup protector de l'etanolamina durant tot el procediment sintètic i introduir el grup Boc en la última etapa per obtenir el monòmer **A**.

17.3.1.2. Estratègia sintètica B. Anàlisi retrosintètica

L'anàlisi retrosintètica plantejada a la Figura 17.6 per a la formació del monòmer **A** és anàloga a la que s'ha mostrat a la Figura 17.3.

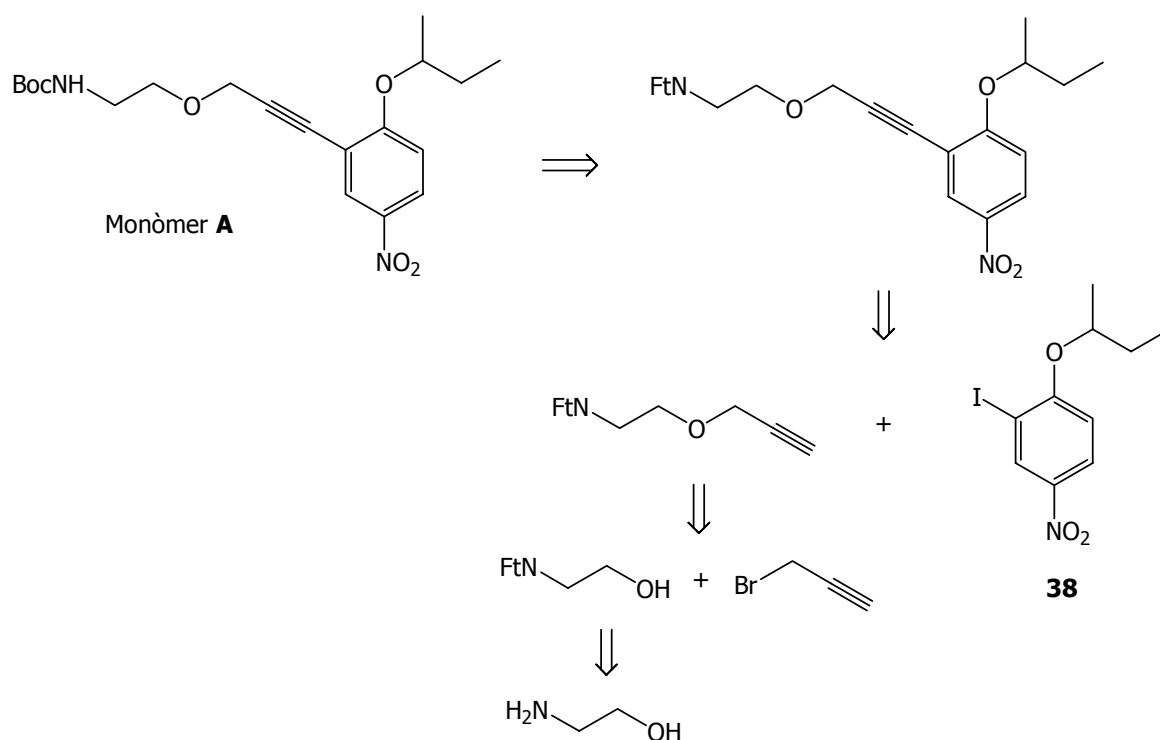


Figura 17.6. Anàlisi retrosintètica per a la formació del monòmer **A**. El grup protector ftalimido (Ft) utilitzat durant tota la síntesi és substituït pel grup protector Boc en l'etapa final per obtenir el monòmer **A**.

En aquesta nova estratègia sintètica es va canviar el grup protector Boc de l'etanolamina pel grup ftalimido, per evitar la formació del producte secundari de dialquilació observat durant la reacció amb el bromur propargílic. Així doncs, hi ha una etapa final addicional de desprotecció del grup ftalimido i de protecció amb el grup Boc per obtenir el monòmer **A**.

17.3.1.2.1. Obtenció de l'*N*-(3-oxa-5-hexinil)ftalimida (**42**)

La síntesi del compost **42** es va realitzar seguint l'esquema proposat a la Figura 17.7. La protecció del grup amino de l'etanolamina amb el grup ftalimido es va realitzar seguint el procediment descrit per Wolfrom i col.,²⁰⁶ amb anhídrid ftàlic i en benzè. Després de mantenir la mescla de reacció durant 20 h a reflux es va obtenir la ftalimida **41** amb un 62% de rendiment. Seguidament, es va dur a terme la reacció de substitució nucleòfila del bromur propargílic amb el compost **41** i NaH en THF, per obtenir el derivat **42** amb un 71% de rendiment. Cal destacar les dades espectroscòpiques de ¹H-RMN de **42** referents al fragment propargílic, un doblet a $\tau=4.16$ ppm corresponent al CH₂ i un triplet a $\tau=2.37$ ppm corresponent al CH.

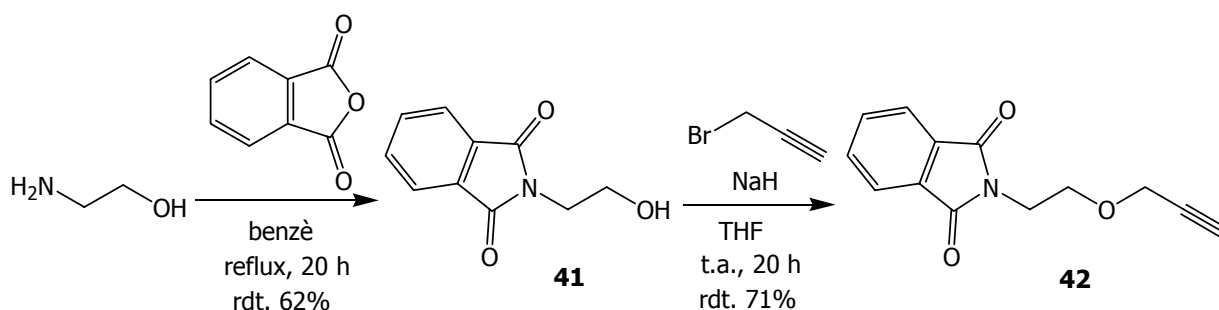


Figura 17.7. Esquema sintètic seguit per obtenir l'*N*-(3-oxa-5-hexinil)ftalimida: protecció de l'etanolamina amb el grup ftalimido per obtenir **41** i reacció de S_N amb el bromur propargílic per obtenir **42**.

17.3.1.2.2. Obtenció del monòmer **A** (**45**)

El procediment sintètic seguit per obtenir el monòmer **A** es mostra a l'esquema de la Figura 17.8. Primerament, es va dur a terme la reacció de Sonogashira entre els compostos **38** i **42** amb Et₃N i amb els catalitzadors Pd(PPh₃)₄ i CuI, en DCM, per obtenir el derivat **43** amb un 91% de rendiment. Cal destacar les dades espectroscòpiques de ¹H-RMN de **43**

referents al CH-6 aromàtic, en variar el desplaçament químic de $\tau=8.66$ ppm en **38** a $\tau=8.20$ ppm en **43**.

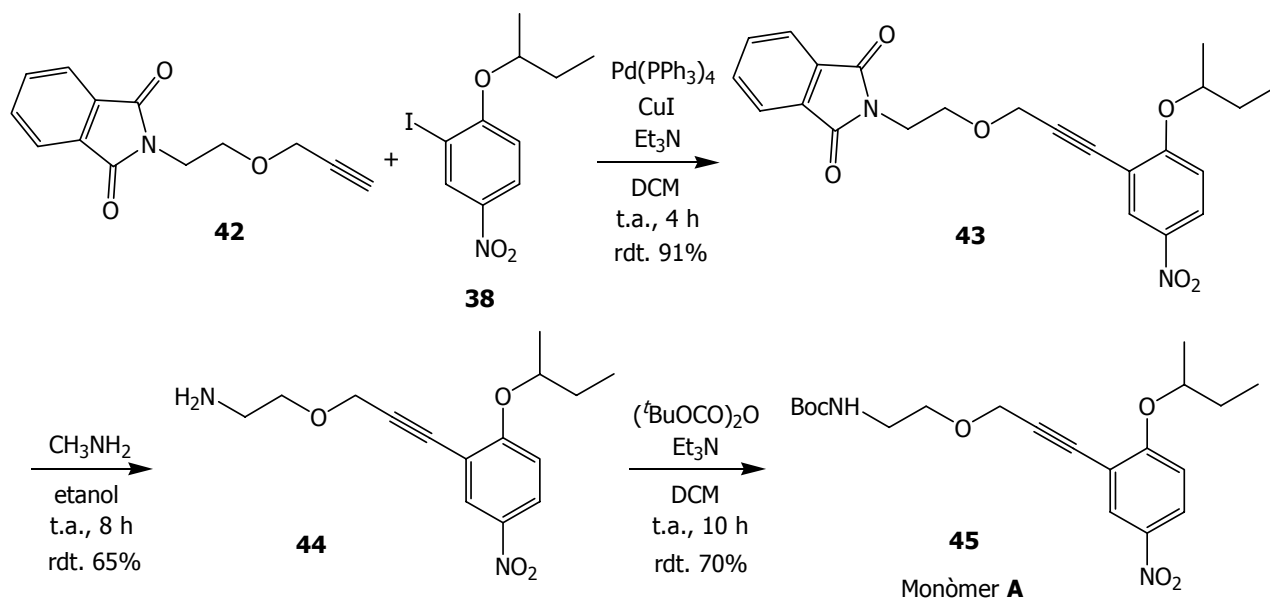


Figura 17.8. Esquema sintètic seguit per obtenir el monòmer **A**: reacció de Sonogashira amb els compostos **38** i **42** per obtenir el derivat **43**, desprotecció del grup ftalimido i protecció final amb Boc per obtenir el monòmer **A** (**45**).

El grup ftalimido de **43** es va eliminar amb metilamina i en etanol, seguint el procediment descrit per Wolfe i col.,²⁰⁷ per obtenir el compost desprotegit **44** amb un 65% de rendiment. Les dades espectroscòpiques de ^1H -RMN de **44** van confirmar la desaparició dels senyals dels doblats a $\tau=7.83$ i 7.69 ppm corresponents als CH aromàtics del grup ftalimido, així com els senyals de ^{13}C -RMN a $\tau=168.5$, 134.1 , 132.3 i 123.5 ppm corresponents als carbonils i carbonis aromàtics del grup ftalimido.

Finalment, la protecció de **44** amb dicarbonat de di-*tert*-butil i Et_3N en DCM va conduir al monòmer **A** (**45**) amb un 70% de rendiment. La introducció del grup Boc es va confirmar per ^1H -RMN, amb l'aparició d'un singlet a $\tau=1.44$ ppm amb una integració de 9H corresponents als grups metils, així com per ^{13}C -RMN pels senyals a $\tau=156.1$, 77.4 i 28.6 ppm, corresponents al carbonil, carboni quaternari i metils del grup protector, respectivament.

17.3.2. SÍNTESI DEL MONÒMER B

17.3.2.1. Estratègia sintètica C. Anàlisi retrosintètica

De forma anàloga al procés sintètic seguit per obtenir el monòmer **A**, es va plantejar l'esquema retrosintètic mostrat a la Figura 17.9 per obtenir el monòmer **B**.

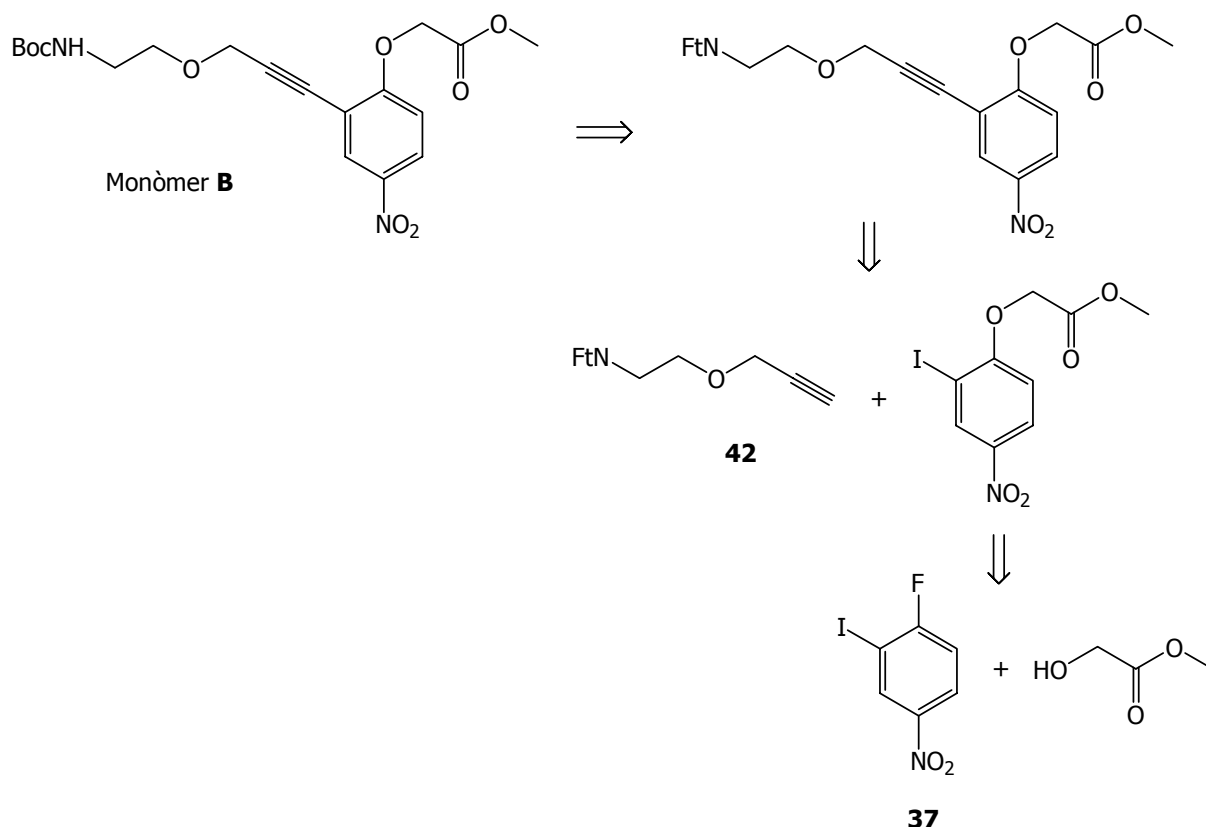


Figura 17.9. Anàlisi retrosintètica per a la formació del monòmer **B**. El grup protector ftalimido (Ft) utilitzat durant tota la síntesi és substituït pel grup protector Boc en l'etapa final per obtenir el monòmer **B**.

Així doncs, el grup protector ftalimido seria substituït pel grup protector Boc en la última etapa del procés sintètic, després de dur a terme la reacció de Sonogashira entre el compost **42** i el 2-iodo-1-metoxycarbonilmetoxi-4-nitrobenzè. Aquest últim compost s'obtindria a partir del glicolat de metil i del compost iodat **37**.

17.3.2.1.1. Intents d'obtenció del monòmer **B**

La seqüència sintètica seguida per obtenir el monòmer **B** es mostra a l'esquema de la Figura 17.10.

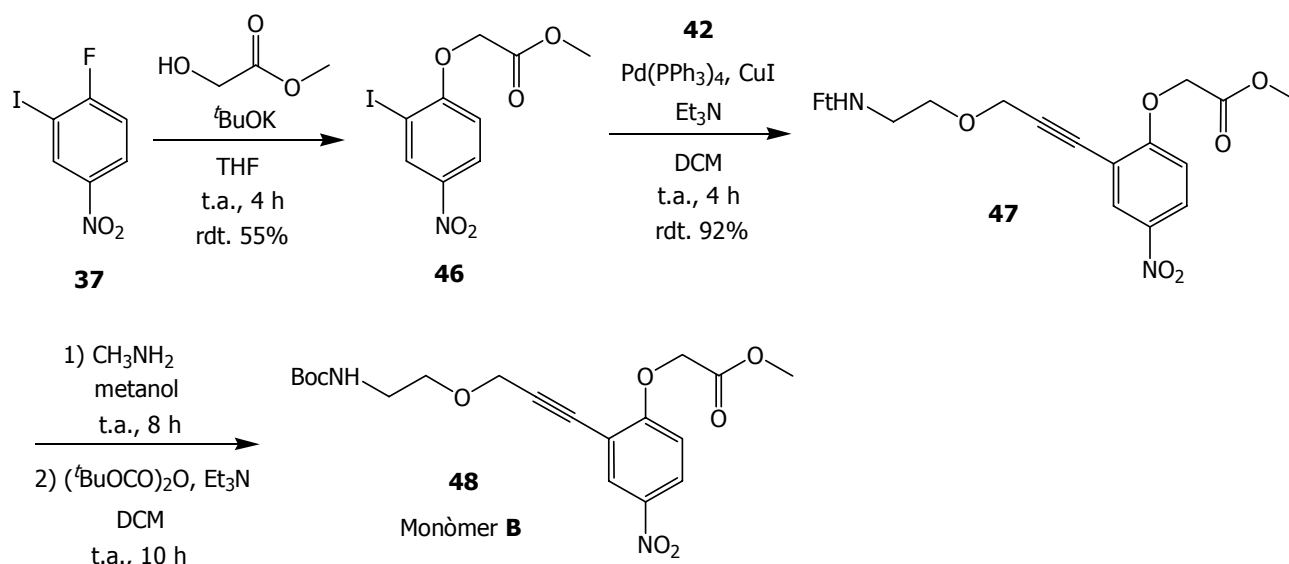


Figura 17.10. Esquema sintètic seguit per obtenir el monòmer **B**. La reacció de Sonogashira entre els compostos **42** i **46**, el qual es va obtenir a partir de la reacció de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ entre el compost **37** i el glicolat de metil, va conduir al compost **47**. La desprotecció del grup ftalimido de **47** i la protecció amb Boc conduiria al monòmer **B** desitjat.

Primerament va tenir lloc la reacció de substitució nucleòfila aromàtica de l'àtom de fluor del compost **37** amb glicolat de metil i $t\text{-BuOK}$ com a base, en THF, per obtenir el compost **46** amb un 55% de rendiment. Cal destacar les dades espectroscòpiques de ^1H -RMN referents al CH aromàtic en posició orto al grup metoxycarbonilmetoxi, en variar el seu desplaçament químic de $\tau = 7.21$ ppm en **37** a $\tau = 6.74$ ppm en **46**. A més, amb l'absència de l'àtom de fluor van desaparèixer les constants d'acoblament d'H i C amb el F.

La reacció de Sonogashira amb els compostos **42** i **46** es va dur a terme amb Et_3N i amb els catalitzadors $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ i CuI, en DCM. Es va obtenir el derivat **47** amb un 92% de rendiment. Destaquen els senyals espectroscòpics de ^1H -RMN del grup ftalimido de **47**, amb dos doblats a $\tau = 8.20$ i 8.12 ppm, així com el senyal referent al CH-6 aromàtic, el qual va variar el desplaçament químic de $\tau = 8.69$ ppm en **46** a $\tau = 8.20$ ppm en **47**.

La desprotecció del grup ftalimido de **47** es va dur a terme, primerament, de forma anàloga a com es va realitzar pel compost **43**, amb metilamina i etanol.²⁰⁷ No obstant, la

gran polaritat del compost desprotegit feia difícil la seva purificació per cromatografia de sílica en columna o per un procés d'extracció àcid/bàsic, motiu pel qual es va decidir introduir el grup Boc, amb dicarbonat de di-*tert*-butil i Et₃N en DCM, al mateix residu de la reacció de desprotecció anterior. No obstant, les dades espectroscòpiques de ¹H-RMN i ¹³C-RMN del residu obtingut mostraven la presència d'una mescla de productes: el carbamat **48** desitjat (monòmer **B**) i el producte provinent d'una hidròlisi de l'èster metílic del compost **47** i la posterior esterificació amb etanol, durant l'etapa de desprotecció del grup ftalimido.

Així doncs, es va decidir dur a terme el procediment de desprotecció del grup ftalimido de **47** amb metilamina però amb metanol com a dissolvent i, posteriorment, en el mateix cru de reacció es va procedir a la introducció del grup Boc. No obstant, es va obtenir el compost **48** desitjat amb un rendiment de tant sols el 9%, i els espectres de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN van confirmar la presència del producte impurificat amb senyals que no es van poder assignar.

17.3.2.2. Estratègia sintètica D. Anàlisi retrosintètica

Veient l'aparent incompatibilitat entre la desprotecció del grup ftalimido i la presència d'un èster metílic, es va decidir canviar l'estratègia sintètica per l'esquema mostrat a la Figura 17.11.

En aquesta ruta sintètica el grup protector ftalimido seria substituït pel grup protector Boc per obtenir l'*N*-[6-(2'-fluoro-5'-nitro)fenil-3-oxa-5-hexinil]ftalimida, prèviament a la reacció de substitució nucleòfila aromàtica amb el glicolat de metil que conduiria al monòmer **B** desitjat.

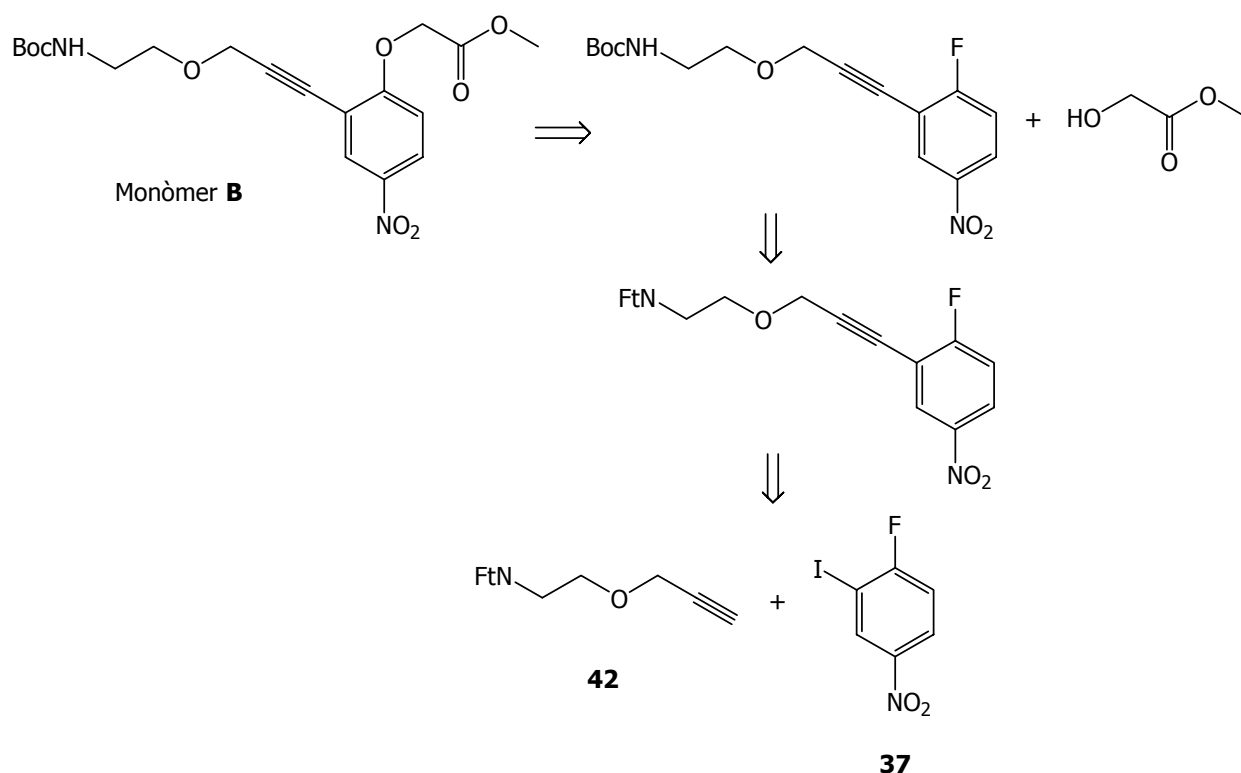


Figura 17.11. Anàlisi retrosintètica proposada per a l'obtenció del monòmer **B**. La substitució del grup protector ftalimido pel grup Boc tindria lloc prèviament a la S_NAr del glicolat de metil amb el compost fluorat.

17.3.2.2.1. Intents d'obtenció de 3-oxa-6-(2'-fluoro-5'-nitro)fenil-5-hexinamina

La seqüència sintètica seguida per obtenir el compost desprotegit 3-oxa-6-(2'-fluoro-5'-nitro)fenil-5-hexinamina es mostra a la Figura 17.12.

La reacció de Sonogashira entre els compostos **37** i **42** es va realitzar amb Et₃N i amb els catalitzadors Pd(PPh₃)₄ i CuI, en DCM, per obtenir el compost **49** amb un 91% de rendiment. La desprotecció del grup ftalimido de **49** es va dur a terme amb hidrazina i etanol, seguint el procediment descrit per Grigg i col.,²⁰⁸ en comptes de seguir el procediment de desprotecció amb metilamina i etanol per evitar la possible reacció secundària de substitució nucleòfila entre la metilamina i el fluor del compost **49**. Tot i que l'anàlisi per ¹H-RMN i ¹³C-RMN del residu obtingut va donar evidències de la desprotecció en no observar-se els senyals característics del grup ftalimido, no es va poder confirmar la presència del compost desprotegit.

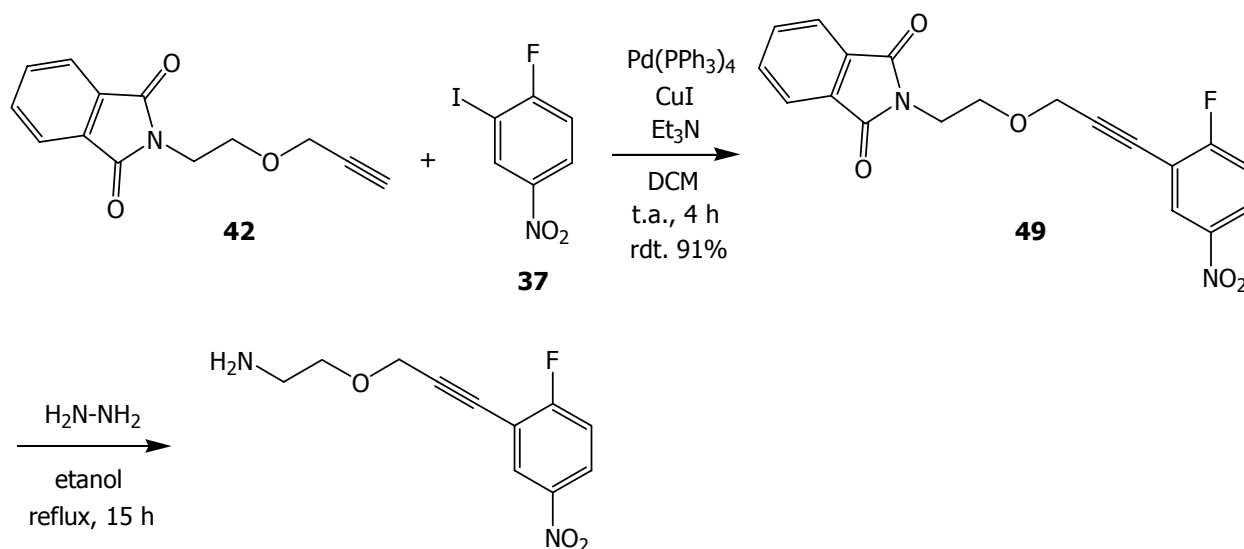


Figura 17.12. Esquema sintètic seguit per obtenir el 3-oxa-6-(2'-fluoro-5'-nitro)fenil-5-hexinamina: reacció de Sonogashira entre els compostos **42** i **37** per obtenir **49**, i desprotecció del grup ftalimido de **49**.

17.3.2.3. Estratègia sintètica E. Anàlisi retrosintètica

Finalment, es va proposar l'anàlisi retrosintètica mostrada a la Figura 17.13. La reacció de Sonogashira amb els compostos **40** i **46** conduiria al monòmer desitjat **B**. El compost **40** s'obtindria prèviament de la desprotecció del grup ftalimido de **42** i protecció amb Boc.

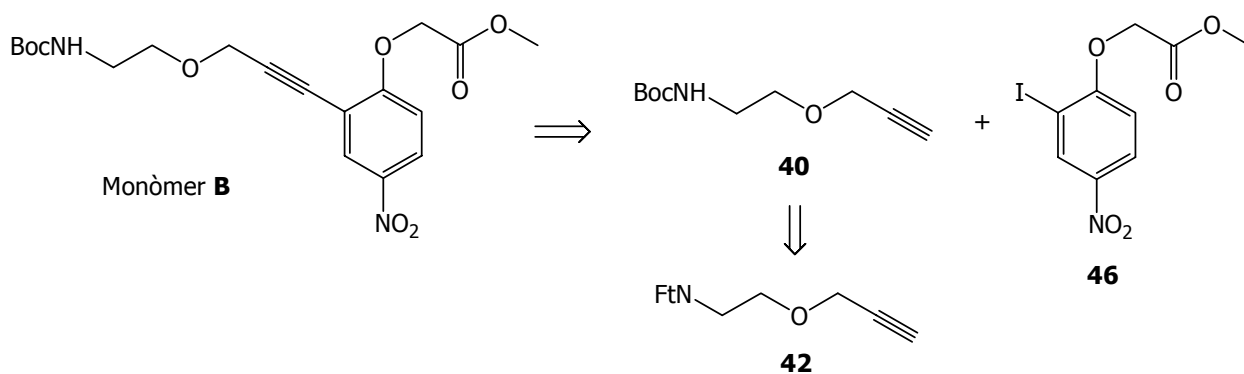


Figura 17.13. Esquema sintètic proposat per a l'obtenció del monòmer **B**: desprotecció del grup ftalimido de **42** i protecció amb Boc prèviament a la reacció de Sonogashira amb el compost **46**.

Malauradament, l'estada de quatre mesos al laboratori del Prof. Burgess va finalitzar sense haver-se pogut explorar aquesta nova via per obtenir el monòmer **B**.

Actualment, s'estan sintetitzant nous monòmers per ampliar la diversitat de la quimioteca, i s'està treballant en el disseny i la síntesi d'espaiadors de longitud variable,

curta, mitjana i llarga. D'aquesta manera la diversitat de la quimioteca estaria molt més ampliada, en tenir compostos bivalents amb espaiadors de diferents longituds per intentar identificar els compostos amb més activitat com antagonistes o agonistes del receptor TrkA. Els resultats obtinguts amb el cribratge de la quimioteca de peptidomimètics del receptor TrkA es recolliran pròximament en una publicació del grup.

18. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

18.1. CONSIDERACIONS GENERALS

Les reaccions químiques, instrumentació i reactius referides a la Part IV es van realitzar tenint en compte les consideracions generals descrites en l'apartat 6.1.

18.2. OBTENCIÓ DEL 6-(5'-NITRO-2'-*SEC*-BUTOXI)FENIL-3-OXA-5-HEXINILCARBAMAT DE *TERT*-BUTIL (45)

18.2.1. ESTRATÈGIA SINTÈTICA A

18.2.1.1. Síntesi del 4-fluoro-3-iodonitrobenzè (37)

Seguint el procediment experimental descrit per Olah i col.,²⁰⁴ es van afegir 3.20 g (14.2 mmol) de NIS en diverses fraccions a una dissolució de 2.00 g (14.2 mmol) de 4-fluoronitrobenzè en 6.3 ml (71.1 mmol, 5 eq.) d'àcid trifluorometansulfònic, refredada a 0 °C amb agitació. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 2 h. Seguidament s'hi van afegir 10 ml d'aigua freda i es van fer extraccions amb DCM (3 x

25 ml). Els extractes orgànics es van ajuntar i rentar amb una dissolució aquosa de bisulfít sòdic al 10% (3 x 30 ml) i amb H₂O (3 x 30 ml). A continuació la fase orgànica es va assecat amb CaCl₂ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per recristal·lització de DCM/hexà, per obtenir 2.8 g d'un sòlid marronós (**37**) (rdt. 74%).

4-Fluoro-3-iodonitrobenzè (**37**)²⁰⁹

Pf: 52-54 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.67 (dd, J=5.4, 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.25 (ddd, J=6.9, 4.2, 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.21 (dd, J=9.0, 6.9 Hz, 1H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 165.0 (J_{C-F}=254.9 Hz, C_{Ar}), 144.6 (C_{Ar}), 135.5 (J_{C-F}=3.5 Hz, CH_{Ar}), 126.0 (J_{C-F}=9.0 Hz, CH_{Ar}), 116.2 (J_{C-F}=26.6 Hz, CH_{Ar}), 81.5 Hz (J_{C-F}=28.5 Hz, C_{Ar}).

18.2.1.2. Síntesi del 2-iodo-4-nitro-*sec*-butoxibenzè (**38**)

A una suspensió d'1.39 g (12.4 mmol, 1.1 eq.) de ^tBuOK en 30 ml de THF, refredada a 0 °C en un bany d'aigua i gel i amb agitació, es van afegir 1.1 ml (12.4 mmol, 1.1 eq.) de 2-butanol. Després de 10 min d'agitació, s'hi van afegir 3.00 g (11.2 mmol) del compost **37** i la mescla de reacció es va agitar a t.a. durant 4 h. Seguidament s'hi van afegir 10 ml d'H₂O i es van fer extraccions amb AcOEt (3 x 50 ml). Els extractes orgànics es van assecat sobre MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda, per obtenir 3.3 g d'un oli taronjós (**38**) (rdt. 90%).

2-Iodo-4-nitro-*sec*-butoxibenzè (**38**)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.66 (d, J=2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.20 (dd, J=9.0, 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.80 (d, J=9.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.50 (m, 1H, CHCH₃), 1.80 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.39 (d, J=6.3 Hz, 3H, CHCH₃), 1.04 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 162.2 (C_{Ar}), 141.9 (C_{Ar}), 135.5 (CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 111.3 (CH_{Ar}), 86.9 (C_{Ar}), 78.0 (CH), 29.2 (CH₂), 19.1 (CH₃), 9.8 (CH₃).

18.2.1.3. Síntesi del 2-hidroxietilcarbammat de *tert*-butil (**39**)

Seguint el procediment experimental descrit per Callahan i col.,²⁰⁵ es van afegir 24 g (0.11 mol, 1.1 eq.) de dicarbonat de di-*tert*-butil i 14.6 ml (0.11 mmol, 1.1 eq.) de Et₃N a una dissolució de 6 ml (0.10 mol) d'etanolamina en 100 ml de DCM. La mescla de reacció es va mantenir en agitació durant 18 h. Passat aquest temps, el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El cru resultant es va redissoldre en 50 ml d'AcOEt i es va rentar amb una

dissolució d'HCl al 5% (3 x 60 ml), una dissolució de Na₂CO₃ al 5% (3 x 60 ml) i una dissolució saturada de NaCl (3 x 60 ml). La fase orgànica es va assecar sobre MgSO₄ i es va evaporar el dissolvent a pressió reduïda, per obtenir 15.8 g d'un oli (**39**) (rdt. 98%).

2-Hidroxiethylcarbammat de *tert*-butil (**39**)²⁰⁵

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.82 (ac, 4H, 2H (NHCH₂CH₂) + 2H (NHCH₂CH₂)), 2.75 (sa, 1H, OH), 1.43 (s, 9H, ^tBu).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 157.2 (CO), 79.5 (C_q), 59.7 (CH₂), 42.5 (CH₂), 28.0 (3 x CH₃).

18.2.1.4. Síntesi del 3-oxa-5-hexinilcarbammat de *tert*-butil (**40**)

Seguint el procediment experimental descrit per Martín-Matute i col.,²¹⁰ es va afegir una dissolució d'1 g (6.25 mmol) del carbamat **39** en 1 ml de THF en diverses addicions a una suspensió de 210 mg (6.25 mmol, 80% en toluè) de NaH en 5 ml de THF, refredada a 0 °C en un bany d'aigua i gel i amb agitació. Després de 10 min d'agitació, la mescla es va tractar amb 980 mg (6.9 mmol, 1.1 eq., 80% en toluè) de bromur propargílic i l'agitació es va continuar a t.a. durant 16 h. Seguidament s'hi van afegir 5 ml d'H₂O i es van fer extraccions amb AcOEt (3 x 10 ml). Els extractes orgànics es van assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla de CHCl₃/MeOH (10:1). No obstant, els espectres de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN de l'eluat van mostrar una barreja de productes, amb el compost **40** i un subproducte de reacció provinent d'una dialquilació del carbamat **39** durant la reacció amb el bromur propargílic.

18.2.2. ESTRATÈGIA SINTÈTICA B

18.2.2.1. Síntesi de l'*N*-(2-hidroxiethyl)ftalimida (**41**)

Seguint el procediment experimental descrit per Wolfrom i col.,²⁰⁶ una dissolució de 7.9 ml (0.13 mol) d'etanolamina en 25 ml de benzè es va afegir sobre una suspensió de 19.4 g (0.13 mol) d'anhídrid ftàlic en 100 ml de benzè. La mescla de reacció es va mantenir en agitació i a reflux durant 20 h. Després de deixar refredar la mescla de reacció fins a t.a., el producte va precipitar en forma cristal·lina. Seguidament el precipitat es va filtrar i es va rentar amb benzè fred (3 x 10 ml). Es van obtenir 15.4 g d'un sòlid blanc (**41**) (rdt. 62%).

***N*-(2-Hidroxietil)ftalimida (41)²⁰⁷**

Pf: 126-128 °C (lit. 127-128 °C)²¹¹

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.84 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.71 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.88 (ac, 4H, 2H (NCH₂CH₂) + 2H (NCH₂CH₂)), 2.62 (sa, 1H, OH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 168.8 (2 x CO), 134.8 (2 x CH_{Ar}), 133.1 (2 x C_{Ar}), 123.5 (2 x CH_{Ar}), 59.7 (CH₂OH), 41.2 (NCH₂).

18.2.2.2. Síntesi de l'*N*-(3-oxa-5-hexinil)ftalimida (42)

Seguint el procediment descrit per Martín-Matute i col.,²¹⁰ es van afegir 13.3 g (69.6 mmol) de la ftalimida **41** en diverses fraccions a una suspensió de 2.59 g (76.5 mmol, 1.1 eq., 60% en oli mineral) de NaH en 10 ml de THF, refredada a 0 °C i amb agitació,. Després de 10 min, la mescla es va tractar amb 10.9 g (76.5 mmol, 1.1 eq., 80% en toluè) de bromur propargílic, i es l'agitació va continuar a t.a. durant 20 h. Seguidament s'hi van afegir 10 ml d'H₂O i es van fer extraccions amb AcOEt (3 x 20 ml). Els extractes orgànics es van assecar sobre MgSO₄ i es va evaporar el dissolvent a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per recristal·lització d'AcOEt/hexà per obtenir 8.1 g d'un sòlid groguenc (**42**) (rdt. 71%).

***N*-(3-Oxa-5-hexinil)ftalimida (42)**

Pf: 79-81 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.84 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.71 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.16 (d, J=2.7 Hz, 2H, OCH₂C), 3.91 (t, J=5.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.79 (t, J=5.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.37 (t, J=2.7 Hz, 1H, CCH).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 168.8 (2 x CO), 134.1 (2 x CH_{Ar}), 132.3 (2 x C_{Ar}), 123.4 (2 x CH_{Ar}), 79.4 (CCH), 75.0 (CCH), 66.5 (NCH₂CH₂), 58.0 (OCH₂C), 37.4 (NCH₂CH₂).

18.2.2.3. Síntesi de la ftalimida 43

Seguint el procediment experimental descrit per Campbell,²¹² a una dissolució de 3.26 g (10.2 mmol) del compost **38** i 2.56 g (11.2 mmol, 1.1 eq.) de la ftalimida **42** en 20 ml de DCM es van afegir 0.19 g (1.01 mmol, 0.1 eq.) de CuI, 0.58 g (0.51 mmol, 0.05 eq.) de Pd(PPh₃)₄ i 7 ml (50.8 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va agitar sota atmosfera de nitrogen durant 4 h a t.a. Seguidament la suspensió resultant es va diluir amb 200 ml d'AcOEt i es va rentar amb una dissolució d'HCl al 5% (3 x 100 ml), una dissolució de Na₂CO₃ al 5% (3 x 100 ml) i una dissolució saturada de NaCl (3 x 100 ml). La fase orgànica

es va assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El producte resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla d'hexà/AcOEt (3:1). Es van obtenir 3.9 g d'un oli groguenc (**42**) (rdt. 91%). Tot i que a la part aromàtica es van observar algunes petites impureses, la ftalimida **43** es va utilitzar a la següent etapa de reacció sense cap purificació addicional.

***N*-[6-(5'-Nitro-2'-*sec*-butoxi)fenil-3-oxa-5-hexinil]ftalimida (**43**)**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.20 (d, J=3.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.14 (dd, J=9.0, 3.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.83 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.69 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.87 (d, J=9.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.50-4.40 (ac, 3H, 2H (OCH₂C) + 1H (CH₃CH)), 3.98-3.88 (ac, 4H, 2H (NCH₂CH₂) + 2H (NCH₂CH₂)), 1.74 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.36 (d, J=6.3, 3H, CH₃CH), 1.00 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 168.5 (2 x CO), 164.0 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 134.1 (2 x CH_{Ar}), 132.3 (2 x C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 125.8 (CH_{Ar}), 123.5 (2 x CH_{Ar}), 113.8 (C_{Ar}), 112.2 (CH_{Ar}), 90.7 (CH₂C), 81.2 (C_{Ph}), 77.4 (CH₃CH), 66.5 (NCH₂CH₂), 58.7 (OCH₂C), 37.5 (NCH₂CH₂), 29.2 (CH₃CH₂), 19.2 (CH₃CH), 9.7 (CH₃CH₂).

CL-EM: 423.2 (M + H)⁺

18.2.2.4. Desprotecció del grup ftalimido del derivat **43**

Seguint el procediment experimental descrit per Wolfe i col.,²⁰⁷ es van dissoldre 3.70 g (8.8 mmol) de la ftalimida **43** en 30 ml d'etanol calent. Després de refredar la dissolució fins a t.a., s'hi van afegir 9.6 ml (19.3 mmol, 2.2 eq., 2 M en THF) de metilamina, i la mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 8 h. Passat aquest temps, es va realitzar un control per CCP, revelant amb ninhidrina, per confirmar la presència d'una amina primària. Seguidament el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i el cru resultant es va redissoldre en 15 ml de DCM. El producte es va extreure amb una dissolució d'HCl al 5% (3 x 20 ml) i després de basificar els extractes àcids amb una dissolució de NaOH al 5% (3 x 25 ml), es van fer extraccions amb DCM (3 x 30 ml). Els extractes orgànics es van assecar amb MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 1.6 g d'un oli groguenc (**44**) (rdt. 65%).

6-(5'-Nitro-2'-*sec*-butoxi)fenil-3-oxa-5-hexinamina (44**)**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.28 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.15 (dd, J = 9.3, 3.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.90 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.52-4.42 (ac, 3H, 2H (OCH₂C) + 1H (CH₃CH)), 3.68 (t, J = 5.1 Hz, 2H, NH₂CH₂CH₂), 2.92 (ac, 4H, 2H (NH₂CH₂CH₂) + 2H (NH₂CH₂CH₂)), 1.80 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.37 (d, J = 6.3, 3H, CH₃CH), 1.00 (t, J = 7.2, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 163.9 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 113.9 (C_{Ar}), 112.3 (CH_{Ar}), 91.2 (CH₂C), 80.8 (C_{Ph}), 77.3 (CH₃CH), 72.5 (NH₂CH₂CH₂), 59.1 (OCH₂C), 42.0 (NH₂CH₂CH₂), 29.2 (CH₃CH₂), 19.2 (CH₃CH), 9.7 (CH₃CH₂).

18.2.2.5. Síntesi del carbamat 45. Monòmer A

Seguint el procediment experimental descrit per Callahan i col.,²⁰⁵ a una dissolució d'1.60 g (5.5 mmol) del compost **44** en 10 ml de DCM es van afegir 1.31 g (6.02 mmol, 1.1 eq.) de dicarbonat de di-*tert*-butil i 0.8 ml (6.02 mmol, 1.1 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va mantenir en agitació durant 10 h. Passat aquest temps, el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu resultant es va redissoldre en 10 ml d'AcOEt i es va rentar amb una dissolució d'HCl al 5% (3 x 15 ml), una dissolució de Na₂CO₃ al 5% (3 x 15 ml) i una dissolució saturada de NaCl (3 x 15 ml). La fase orgànica es va assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla d'hexà/AcOEt (4:1). Es van obtenir 1.4 g d'un oli groguenc (**45**) (rdt. 70%).

6-(5'-Nitro-2'-*sec*-butoxi)fenil-3-oxa-5-hexinilcarbamat de *tert*-butil (**45**)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.28 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.15 (dd, J = 9.3, 3.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.90 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.95 (sa, 1H, OCONH), 4.52-4.42 (ac, 3H, 2H (OCH₂C) + 1H (CH₃CH)), 3.68 (t, J = 5.1 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.39 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.78 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.37 (d, J = 6.3, 3H, CH₃CH), 1.01 (t, J = 7.2, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 164.0 (C_{Ar}), 156.1 (CO), 140.6 (C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 113.8 (C_{Ar}), 112.2 (CH_{Ar}), 90.8 (CH₂C), 81.2 (C_{Ph}), 79.9 (C(CH₃)₃), 77.4 (CH₃CH), 69.2 (NCH₂CH₂), 59.1 (OCH₂C), 40.5 (NCH₂CH₂), 29.2 (CH₃CH₂), 28.6 (3 x C(CH₃)₃), 19.2 (CH₃CH), 9.7 (CH₃CH₂).

EMAR per C₂₀ H₂₈N₂O₆: Calculada: 415.1947 (M+Na)⁺

Determinada: 415.1801

18.3. OBTENCIÓ DEL 6-(2'-METOXCARBONILMETOXI-5'-NITRO)FENIL-3-OXA-5-HEXINILCARBAMAT DE *TERT*-BUTIL (48)

18.3.1. ESTRATÈGIA SINTÈTICA C

18.3.1.1. Síntesi del 2-iodo-1-metoxycarbonilmetoxi-4-nitrobenzè (46)

A una suspensió d'1.39 g (12.4 mmol, 1.1 eq.) de ^tBuOK en 30 ml de THF, refredada a 0 °C i amb agitació, es van afegir 1.11 g (12.4 mmol, 1.1 eq.) de glicolat de metil. Després de 10 min d'agitació, s'hi van afegir 3.03 g (11.2 mmol) del compost **37** i la mescla es va mantenir en agitació a t.a. durant 4 h. Passat aquest temps, s'hi van afegir 10 ml d'H₂O i es van fer extraccions amb AcOEt (3 x 50 ml). Els extractes orgànics es van assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla d'hexà/AcOEt (4:1). Es van obtenir 2.0 g d'un sòlid groguenc (**46**) (rdt. 55%).

2-Iodo-1-metoxycarbonilmetoxi-4-nitrobenzè (46)

Pf: 122-124 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.69 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.21 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.74 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.82 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 167.8 (CO), 161.6 (C_{Ar}), 142.7 (C_{Ar}), 135.6 (CH_{Ar}), 125.6 (CH_{Ar}), 110.8 (CH_{Ar}), 85.7 (C_{Ar}), 66.4 (CH₂), 52.9 (CH₃).

18.3.1.2. Síntesi de la ftalimida 47

Seguint el procediment experimental descrit per Campbell,²¹² a una dissolució d'1.80 g (5.3 mmol) del compost **46** i 1.35 g (5.9 mmol, 1.1 eq.) del compost **42** en 10 ml de DCM es van afegir 0.10 g (0.53 mmol, 0.1 eq.) de CuI, 0.31 g (0.27 mmol, 0.05 eq.) de Pd(PPh₃)₄ i 3.7 ml (26.70 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va agitar sota atmosfera de nitrogen durant 4 h a t.a. Seguidament la suspensió resultant es va diluir amb 200 ml d'AcOEt i es va rentar amb una dissolució d'HCl al 5% (3 x 100 ml), una dissolució de Na₂CO₃ al 5% (3 x 100 ml) i una dissolució saturada de NaCl (3 x 100 ml). La fase orgànica es va assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El producte resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla d'hexà/AcOEt (2:1). Es van obtenir 2.2 g d'un sòlid groguenc (**47**) (rdt. 92%).

***N*-[6-(2'-Metoxicarbonilmetoxi-5'-nitro)fenil-3-oxa-5-hexinil]ftalimida (47)**

Pf: 115-117 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.20 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.12 (dd, J = 9.3, 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.80 (dd, J = 5.7, 3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.67 (dd, J = 5.7, 3 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.78 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.82 (s, 2H, OCH₂CO), 4.44 (s, 2H, OCH₂C), 3.98-3.88 (ac, 4H, 2H (NCH₂CH₂) + 2H (NCH₂CH₂)).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 168.4 (CO), 168.0 (2 x CO), 162.9 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 134.1 (2 x CH_{Ar}), 132.2 (2 x C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 123.4 (2 x CH_{Ar}), 113.6 (C_{Ar}), 111.5 (CH_{Ar}), 91.8 (C_q), 80.4 (C_q), 66.6 (CH₂), 65.9 (CH₂), 58.7 (CH₂), 52.7 (CH₃), 37.5 (CH₂).

CL-EM: 439.1 (M + H)⁺

18.3.1.3. Intents de síntesi del monòmer B (48)*18.3.1.3.1. Desprotecció del grup ftalimido de 47 amb metilamina. Protecció amb el grup Boc.*

Seguint el procediment experimental descrit per Wolfe i col.,²⁰⁷ es van dissoldre 100 mg (0.23 mmol) de la ftalimida **47** en 6 ml d'etanol calent. Després de refredar la dissolució fins t.a., s'hi van afegir 250 μ l (0.50 mmol, 2.2 eq., 2 M en THF) de metilamina, i la mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 8 h. Seguidament el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i el residu resultant es va redissoldre en 15 ml de DCM. El producte es va extreure amb una dissolució d'HCl al 5% (3 x 20 ml), i després de basificar els extractes àcids amb una dissolució de NaOH al 5% (3 x 25 ml) es van fer extraccions amb DCM (3 x 30 ml). Els extractes orgànics es van assecar amb MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda. Es van obtenir únicament 10 mg de producte i els espectres de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN no van resultar concluent per poder confirmar la presència del producte desprotegit.

Es va pensar que en aquest cas el producte desprotegit no es va extreure pràcticament en el procés d'extracció dut a terme. Per aquest motiu es va repetir el mateix procediment de desprotecció, però un cop evaporat el dissolvent a pressió reduïda, es va procedir a la protecció del grup amino terminal amb Boc en el mateix cru de reacció.²⁰⁵ Es va redissoldre el cru de reacció en 2 ml de DCM i es van afegir 55 mg (0.25 mmol, 1.1 eq.) de dicarbonat de di-*tert*-butil i 35 μ l (0.25 mmol, 1.1 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 10 h. Passat aquest temps, el dissolvent es va evaporar a pressió

reduïda. El cru resultant es va redissoldre en 10 ml d'AcOEt i es va rentar amb una dissolució d'HCl al 5% (3 x 15 ml), una dissolució de Na₂CO₃ al 5% (3 x 15 ml) i una dissolució saturada de NaCl (3 x 15 ml). La fase orgànica es va assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla d'hexà/AcOEt (2:1). Es van obtenir 60 mg d'un oli groguenc, però els espectres de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN van mostrar una barreja de productes: el carbamat **48**, en menor proporció, i el producte provinent d'una hidròlisi de l'èster metílic del compost **47** i la posterior esterificació amb etanol, durant l'etapa de desprotecció del grup ftalimido.

Es va repetir d'igual forma el procediment de desprotecció del grup ftalimido però ara en metanol, i posteriorment, en el mateix cru de reacció es va procedir a la protecció amb el grup Boc. El producte resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla d'hexà/AcOEt (2:1). No obstant, es van obtenir únicament 8 mg del carbamat **48**. Els espectres de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN van confirmar la presència del producte, però impurificat amb senyals que no es van poder assignar.

*18.3.1.3.2. Desprotecció del grup ftalimido de **47** amb hidrazina. Protecció amb el grup Boc.*

Seguint el procediment experimental descrit per Grigg i col.,²⁰⁸ a una dissolució de 100 mg (0.23 mmol) de la ftalimida **47** en 2 ml de MeOH es van afegir 12 μ l (0.25 mmol, 1.1 eq.) d'hidrazina monohidratada. La mescla de reacció es va mantenir en agitació i a reflux durant 8 h. Passat aquest temps el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i es va procedir a la protecció amb el grup Boc en el mateix cru de reacció. El residu resultant es va purificar per cromatografia en columna tipus flaix eluint amb una mescla d'hexà/AcOEt (2:1) i recollint 3 productes diferents. No obstant, cap dels espectres de ¹H-RMN i de ¹³C-RMN dels tres productes obtinguts es van poder atribuir al carbamat **48**.

18.3.2. ESTRATÈGIA SINTÈTICA D

18.3.2.1. Síntesi de la ftalimida 49

Seguint el procediment experimental descrit per Campbell,²¹² a una dissolució de 3.28 g (12.3 mmol) del compost **37** i 3.10 g (13.51 mmol, 1.1 eq.) del compost **42** en 24 ml de DCM s'hi van afegir 0.23 g (1.2 mmol, 0.1 eq.) de CuI, 0.71 g (0.62 mmol, 0.05 eq.) de Pd(PPh₃)₄ i 8.6 ml (61.40 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va agitar sota atmosfera de nitrogen durant 4 h a t.a. Seguidament la suspensió resultant es va diluir amb 200 ml d'AcOEt i es va rentar amb una dissolució d'HCl al 5% (3 x 100 ml), una dissolució de Na₂CO₃ al 5% (3 x 100 ml) i una dissolució saturada de NaCl (3 x 100 ml). La fase orgànica es va assecar amb MgSO₄ i el dissolvent es va evaporar a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per recristal·lització d'hexà/DCM. Es van obtenir 4.10 g d'un sòlid groguenc (**49**) (rdt. 91%).

N-[6-(2'-Fluoro-5'-nitro)fenil-3-oxa-5-hexinil]ftalimida (**49**)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.26 (dd, J=5.7, 2.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.18 (m, 1H, H_{Ar}), 7.83 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.70 (dd, J=5.4, 3.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.21 (dd, J=9.0, 8.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.44 (s, 2H, CH₂), 3.95 (ac, 4H, 2H (NCH₂CH₂) + 2H (NCH₂CH₂)).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 168.4 (2 x CO), 165.0 (J_{C-F}=261.9 Hz, C_{Ar}), 144.1 (C_{Ar}), 134.1 (2 x C_{Ar}), 132.2 (2 x C_{Ar}), 129.6 (J_{C-F}=3.5 Hz, CH_{Ar}), 125.9 (J_{C-F}=10.0 Hz, CH_{Ar}), 123.5 (2 x CH_{Ar}), 116.5 (J_{C-F}=23.5 Hz, CH_{Ar}), 113.2 (C_{Ar}), 93.1 (C_q), 77.8 (C_q), 66.9 (CH₂), 58.6 (CH₂), 37.5 (CH₂).

18.3.2.2. Desprotecció del grup ftalimido de 49 amb hidrazina

Seguint el procediment experimental descrit per Grigg i col.,²⁰⁸ a una dissolució de 200 mg (0.54 mmol) de la ftalimida **49** en 10 ml d'etanol s'hi van afegir 19 ml (0.59 mmol, 1.1 eq.) d'hidrazina monohidratada. La mescla de reacció es va mantenir en agitació i a reflux durant 15 h. Passat aquest temps la mescla de reacció es va tractar amb 5 ml de NaOH 1 M i es van fer extraccions amb CHCl₃ (3 x 20 ml). Els extractes orgànics es van ajuntar, assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda. Els espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN del residu obtingut van mostrar la desaparició del grup ftalimido, però l'assignació dels senyals dels espectres no va poder confirmar la presència del compost desprotegit.

CONCLUSIONS

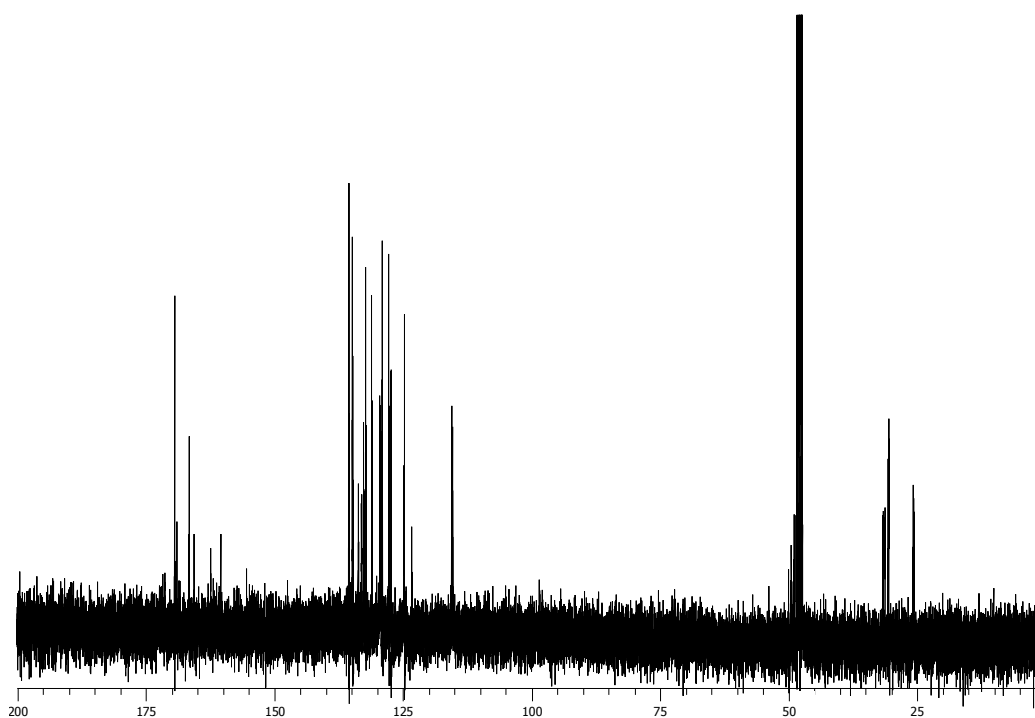
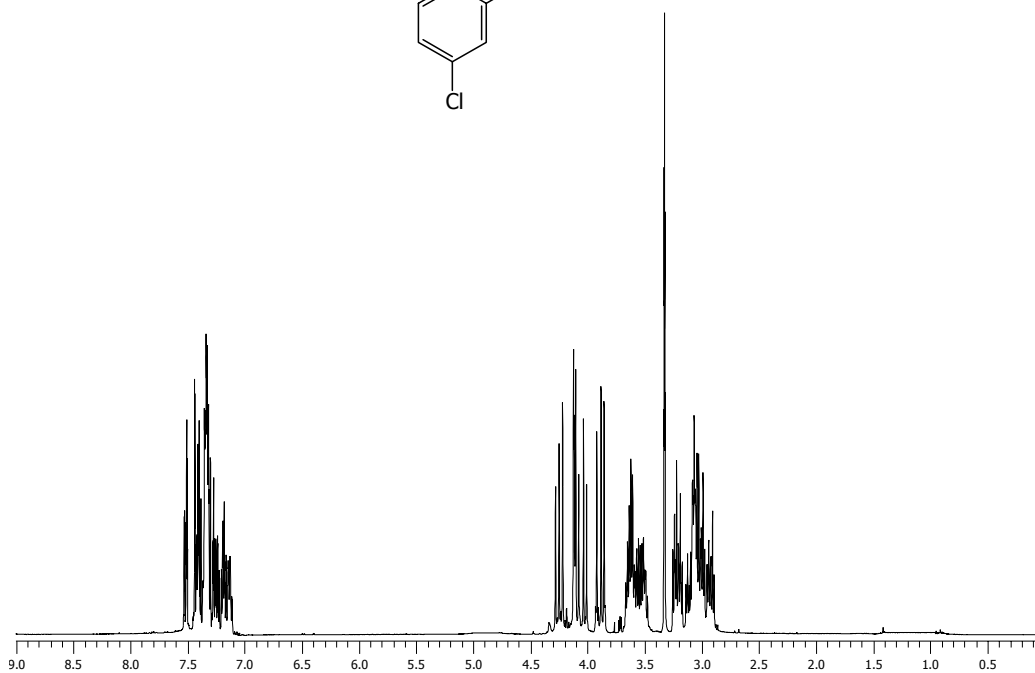
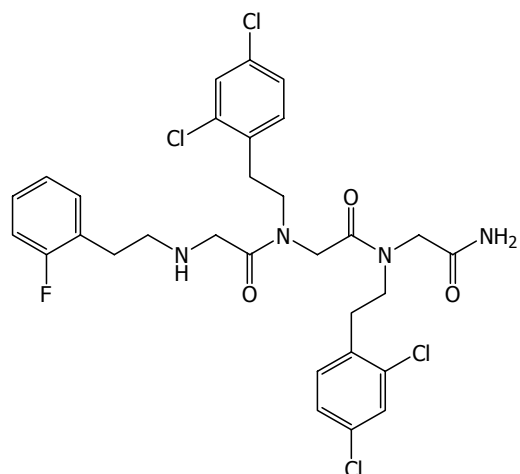
1. S'ha sintetitzat una quimioteca de mescles de 5120 peptoides (trímers d'*N*-alquilglicina) en fase sòlida i en format de rastreig posicional. La síntesi d'aquesta quimioteca (peptoides-II) s'ha optimitzat respecte la quimioteca de peptoides-I, sintetitzada amb anterioritat al laboratori.
2. S'ha realitzat un estudi de reactivitat de les amines introduïdes en les fonts de diversitat de la quimioteca. S'han determinat les reactivitats relatives i els factors d'equireactivitat d'onze amines representatives del conjunt de la diversitat, en fase sòlida i en dissolució. S'ha comprovat la correcció i amortiment de la diferència existent en la reactivitat amb l'ajust de les quantitats d'amina addicionades en l'etapa d'introducció de diversitat, en funció dels seus factors d'equireactivitat.
3. En col·laboració amb altres grups d'investigació, el cribratge, deconvolució i validació de la quimioteca davant de diverses dianes biològiques ha permès identificar diversos candidats a caps de sèrie. Cal destacar dos potents inhibidors o reversors del fenotip de MDR (N35-15-15C i N37-15-15C), dos inhibidors de la proliferació cel·lular i inductors d'apoptosi (N13-13-10C i N10-13-10C), dos potents bloquejadors del canal TRPV1 (N16-15-15C i N19-15-15C) i dos neutralitzadors de l'activitat d'LPS (N11-20-20C i N20-13-20C).
4. S'ha realitzat un estudi d'obtenció de peptoides amb un extrem carboxílic terminal (peptoides àcids), seguint dues estratègies: per hidròlisi de peptoides en dissolució i per síntesi en fase sòlida. L'optimització del procés d'hidròlisi en dissolució s'ha dut a terme mitjançant un disseny d'experiments factorial, obtenint excel·lents resultats de pureses i rendiments. La síntesi de peptoides àcids en fase sòlida ha implicat treballar amb diferents tipus de resines. D'entre elles, la clorur de 2-clorotritil va donar els millors rendiments i pureses. En resum, de les dues estratègies assajades, la primera és la de preferència.
5. S'ha realitzat un estudi d'obtenció de peptoides dímers i peptoides dímers-cíclics, en fase sòlida i dissolució. S'han sintetitzat els peptoides ciclo[N13-13-10-13-13-10C] i ciclo[N37-13-15-37-13-15C] amb pureses moderades i baixos rendiments. Aquests estudis d'optimització de peptoides àcids, dímers i dímers-cíclics, han constituït un punt d'inici per al plantejament del disseny i síntesi de noves quimiotèques combinatòries de mescles dintre del grup d'investigació.

6. S'ha intentat desenvolupar un assaig de fluorescència per a cribrar la quimioteca de peptoides davant la seva capacitat d'inhibir la fosforilació del substrat LRRAS-AMC per la proteïna quinasa A. Malauradament, s'ha comprovat que el grup fluoròfor AMC adjacent al lloc de fosforilació del pèptid, no ha induït pràcticament cap diferència d'intensitat de fluorescència després de la reacció de fosforilació per la PKA.

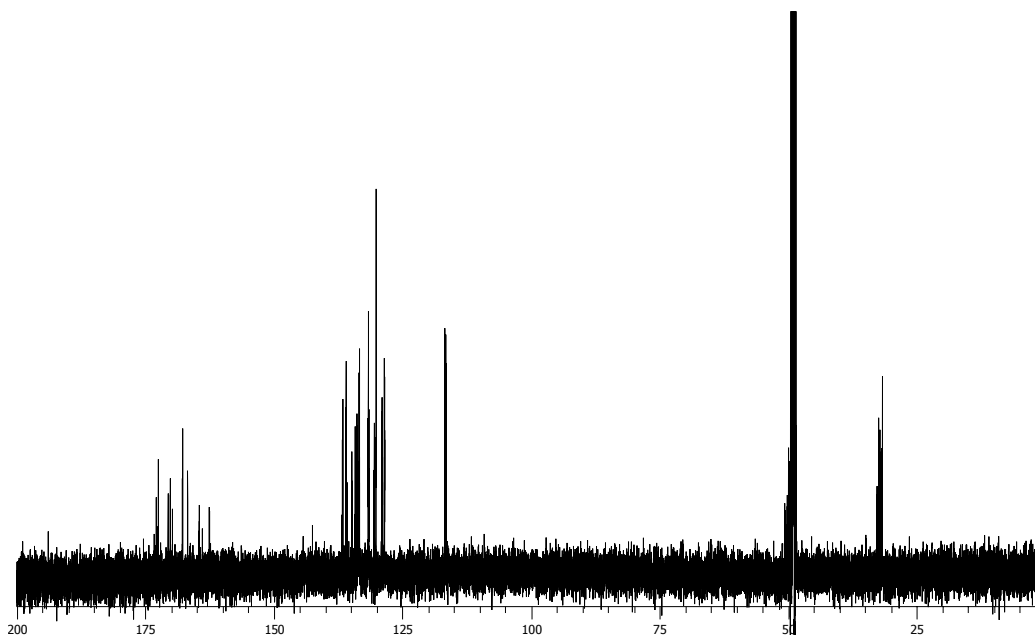
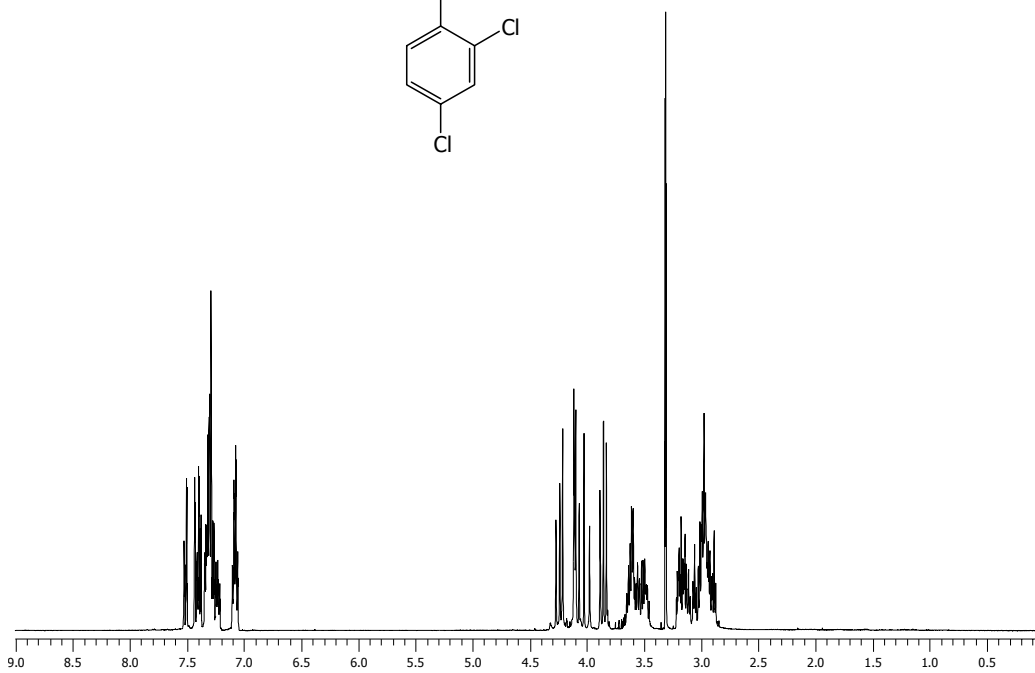
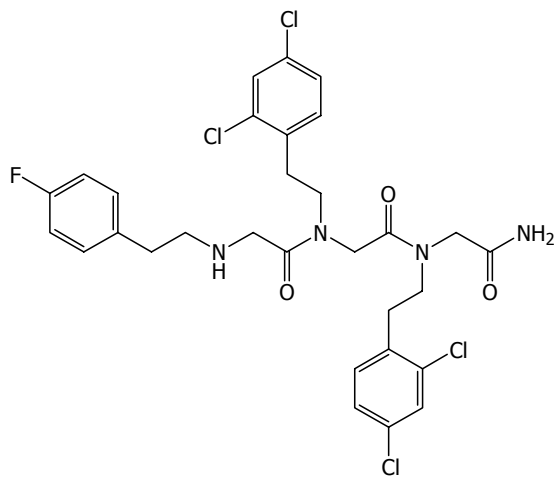
Globalment, aquest treball reflecteix la validesa de la utilització i aplicació de la química combinatòria, en concret de quimiotèques de mescles controlades, per a la recerca de compostos amb activitats biològiques. No obstant, en funció de les dades que es coneguin del receptor i/o dels llocs d'interacció, és convenient dissenyar la quimioteca de forma més focalitzada, com és el cas de la quimioteca de peptidomimètics de la neurotrofina NGF, o de forma més diversa, com és el cas de la quimioteca de peptoides. En aquest disseny, tant si és inicial com si és d'optimització d'un cap de sèrie, és cada vegada més evident la importància i necessitat de l'ús d'eines computacionals i d'estudis *in silico* per cobrir el màxim espai de diversitat i estalviar temps i costos d'experimentació al laboratori.

ANNEXE

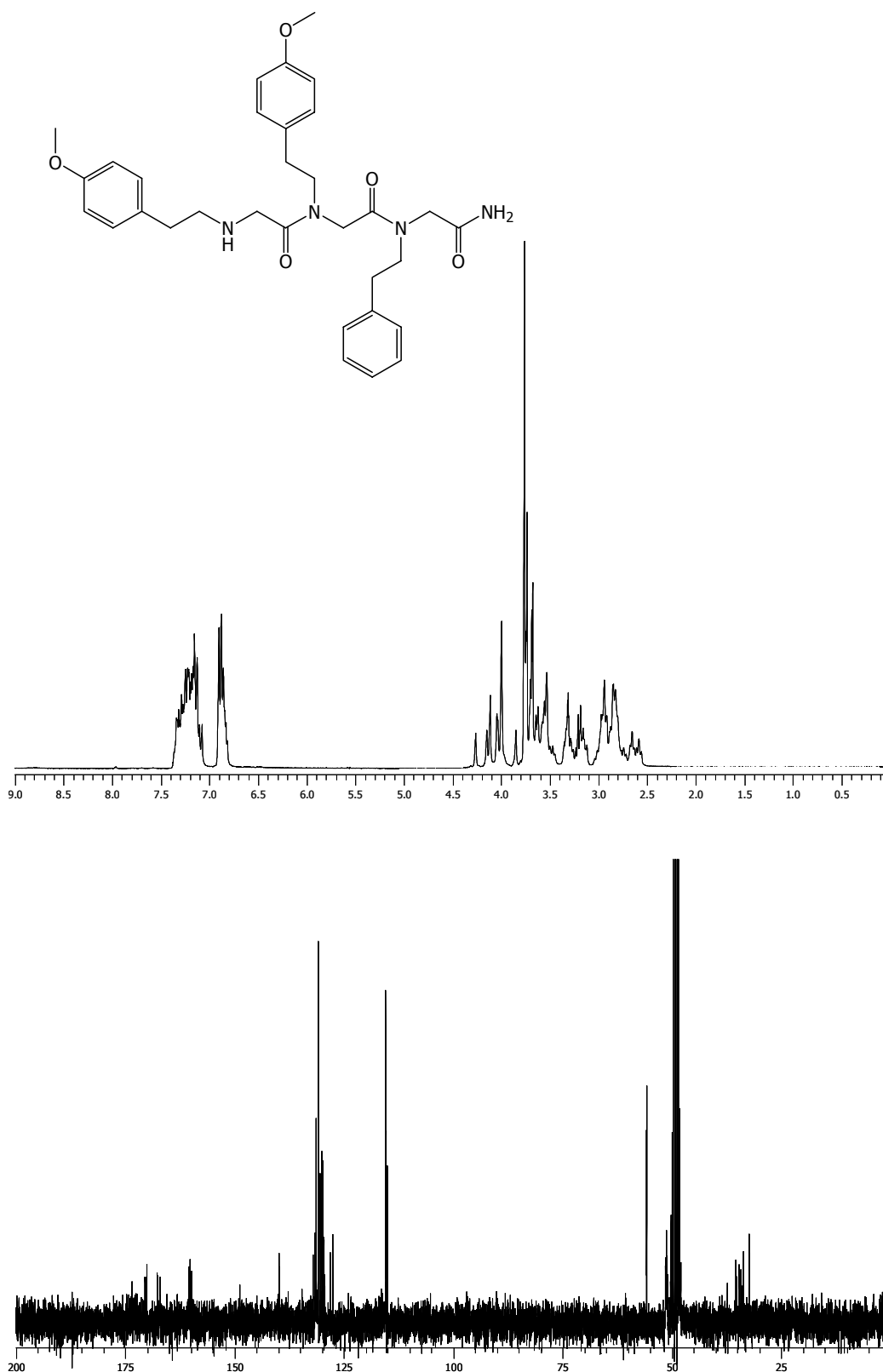
Compost 15



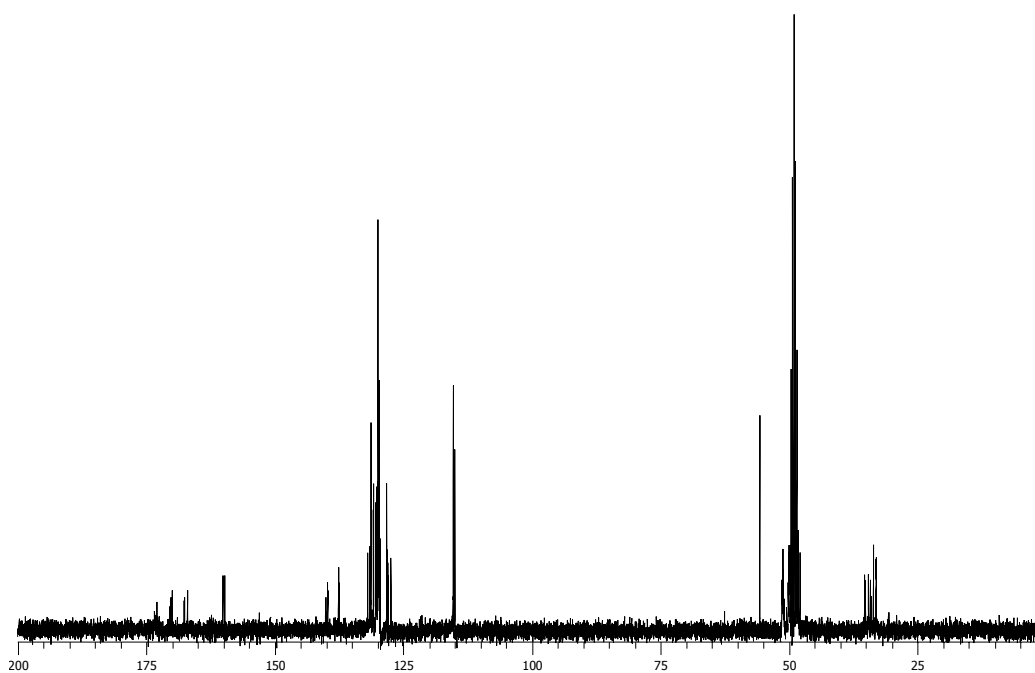
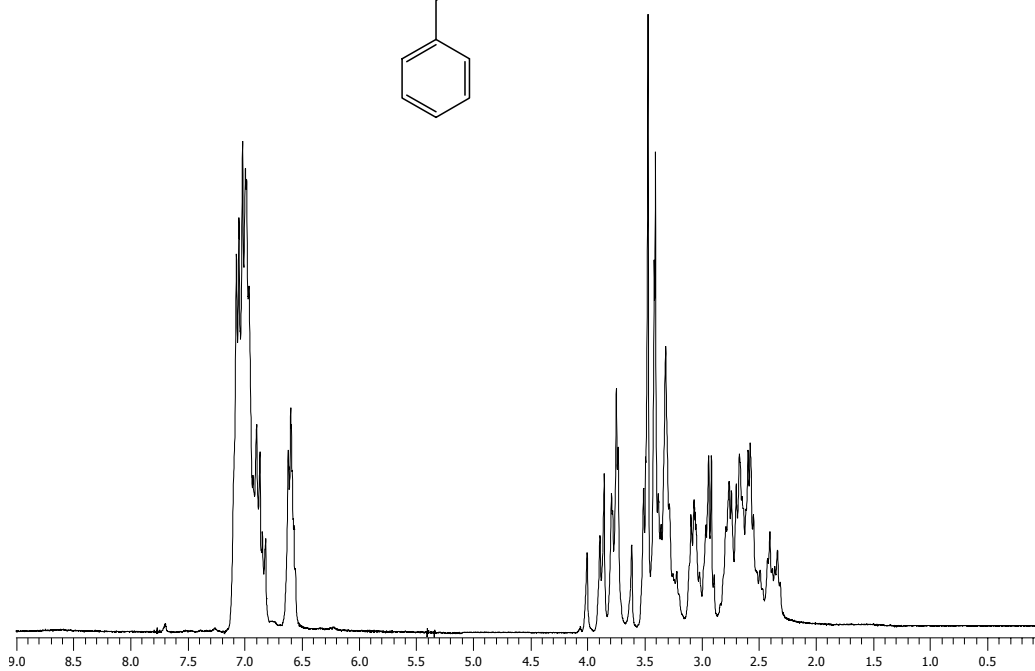
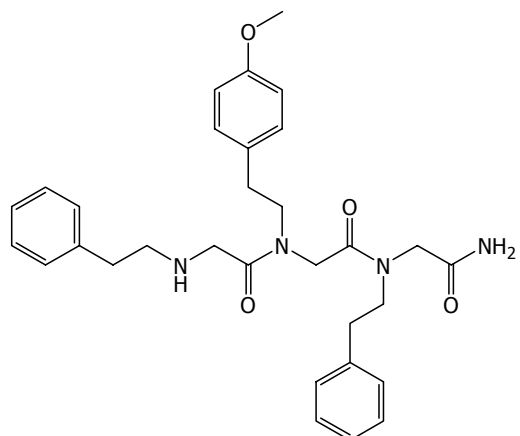
Compost 16



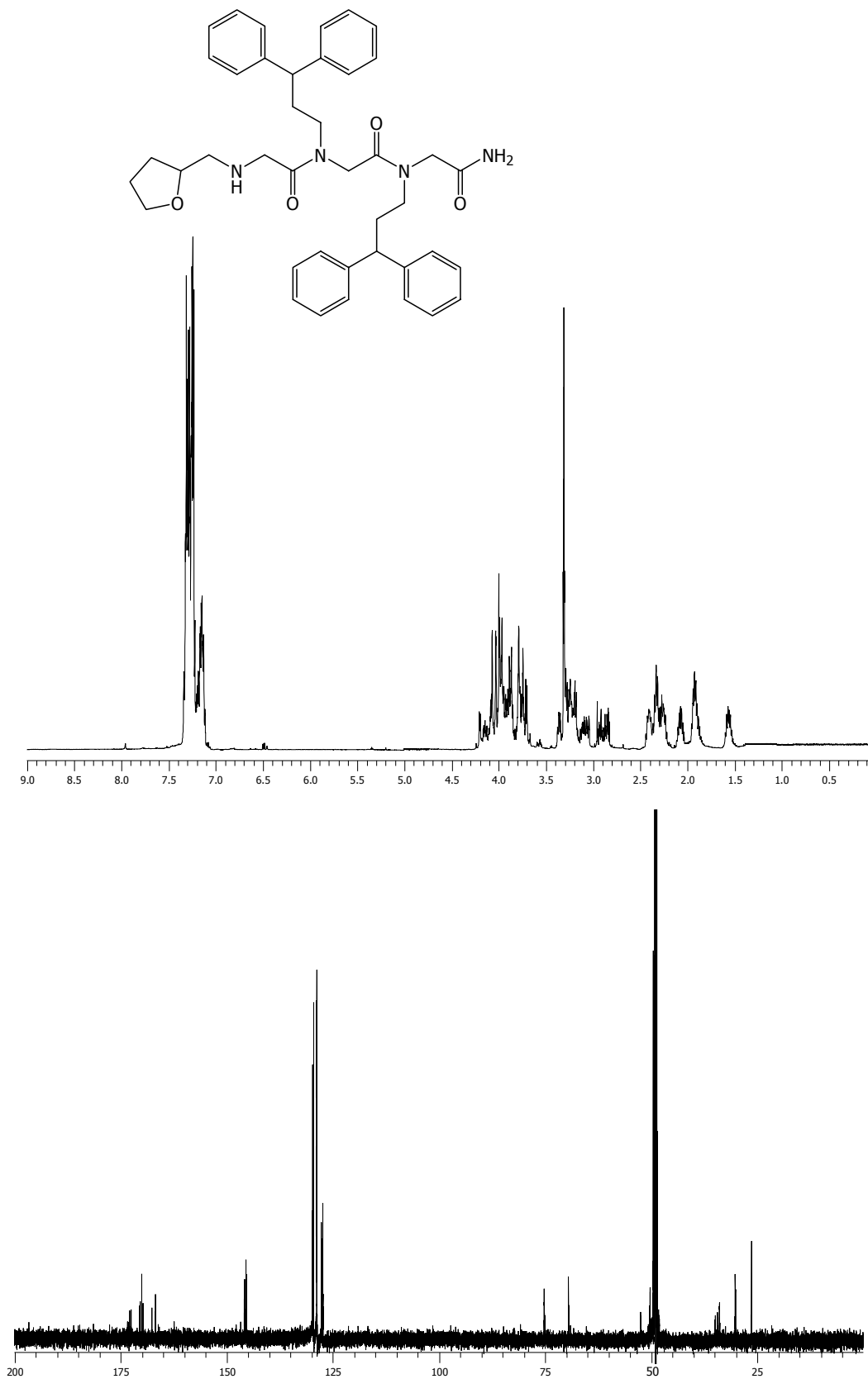
Compost 17



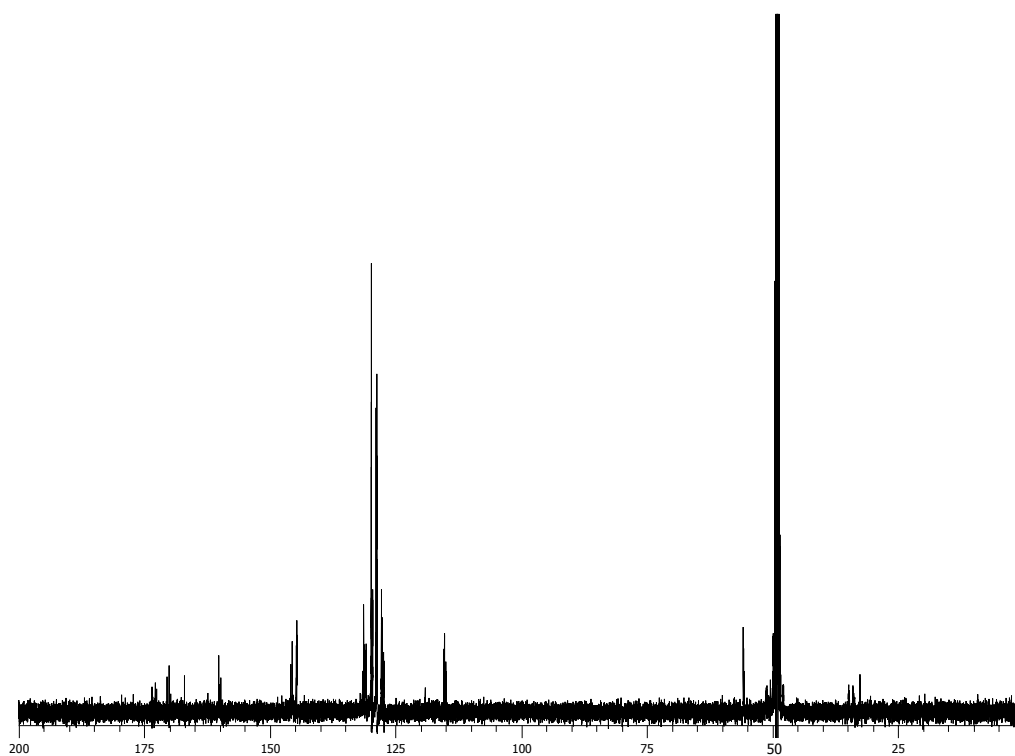
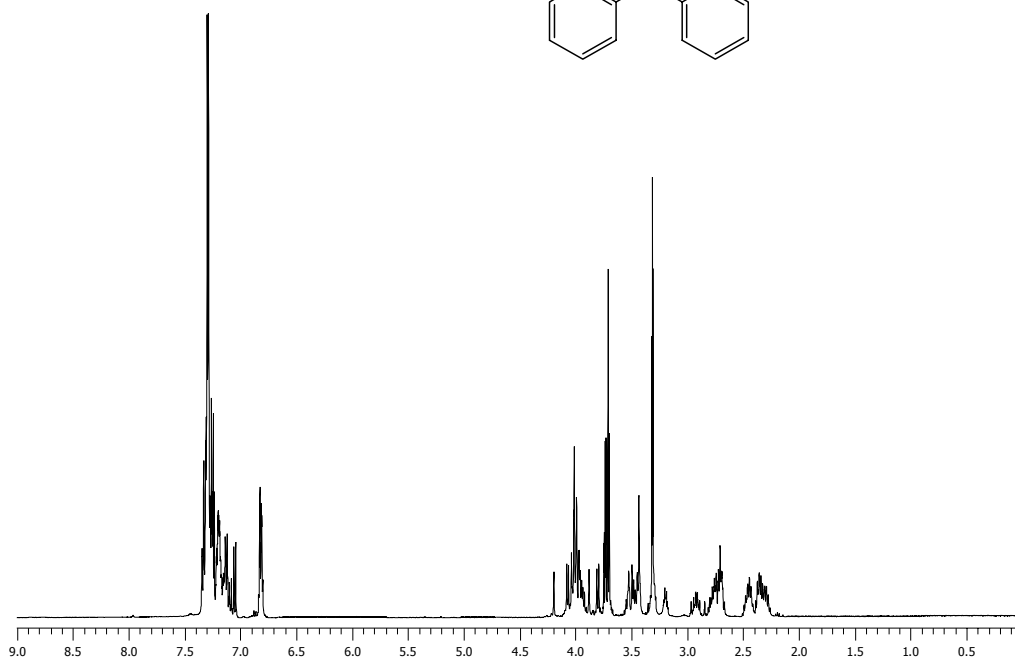
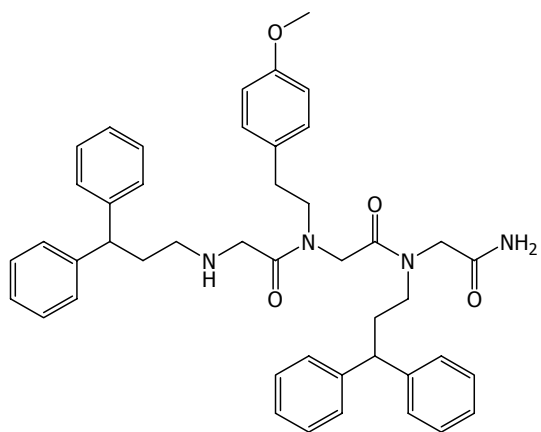
Compost 18



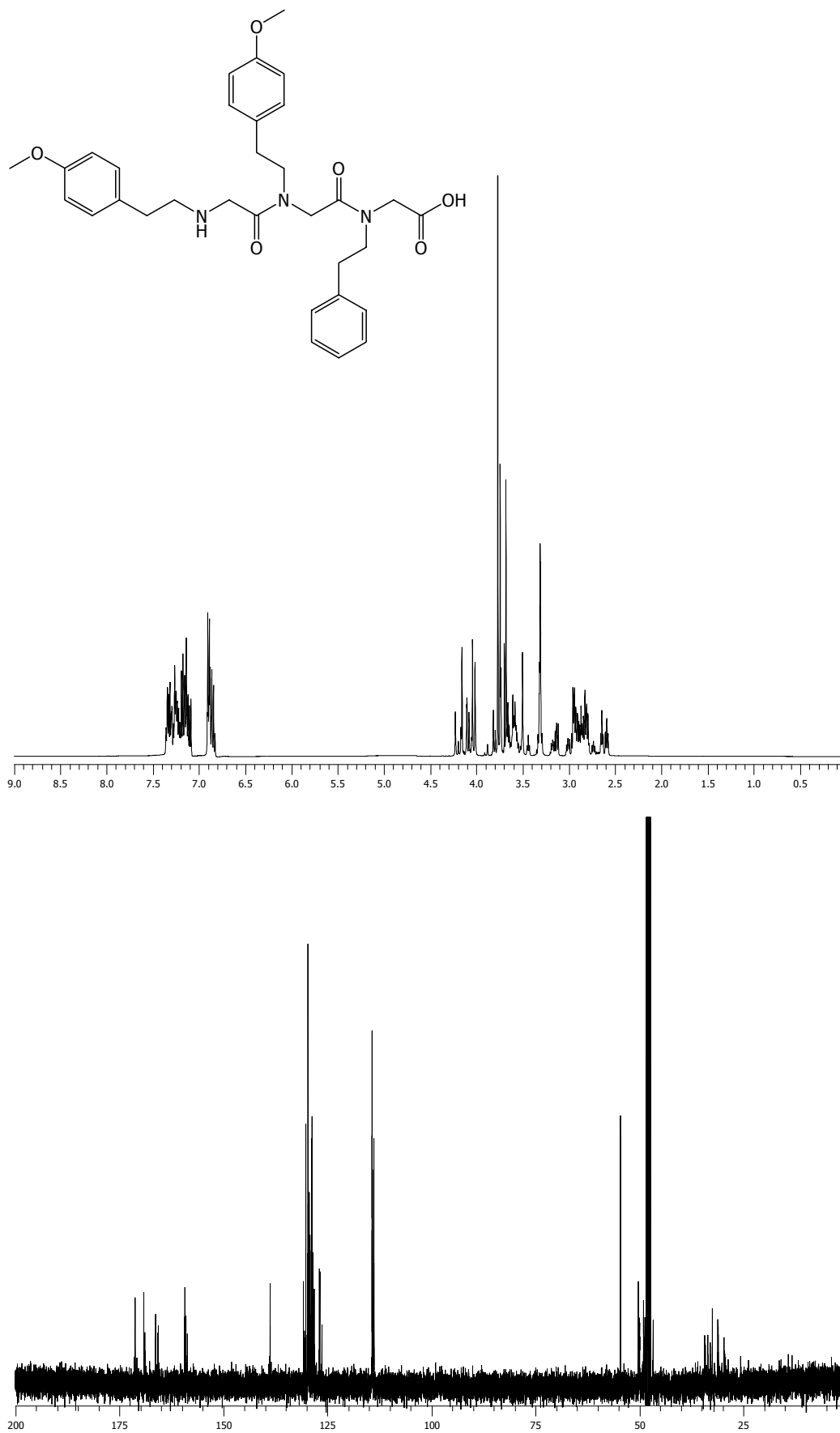
Compost 19



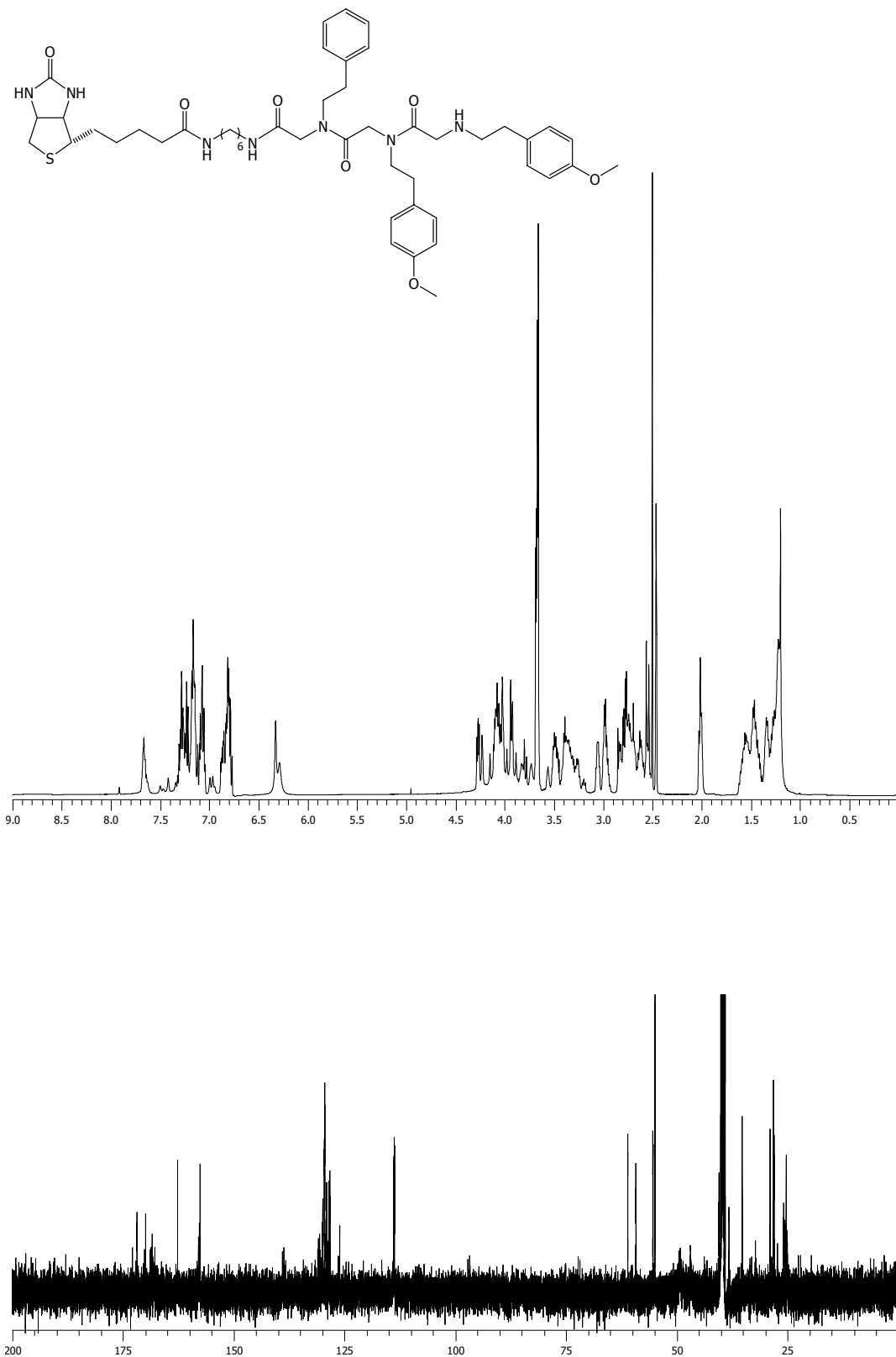
Compost 20



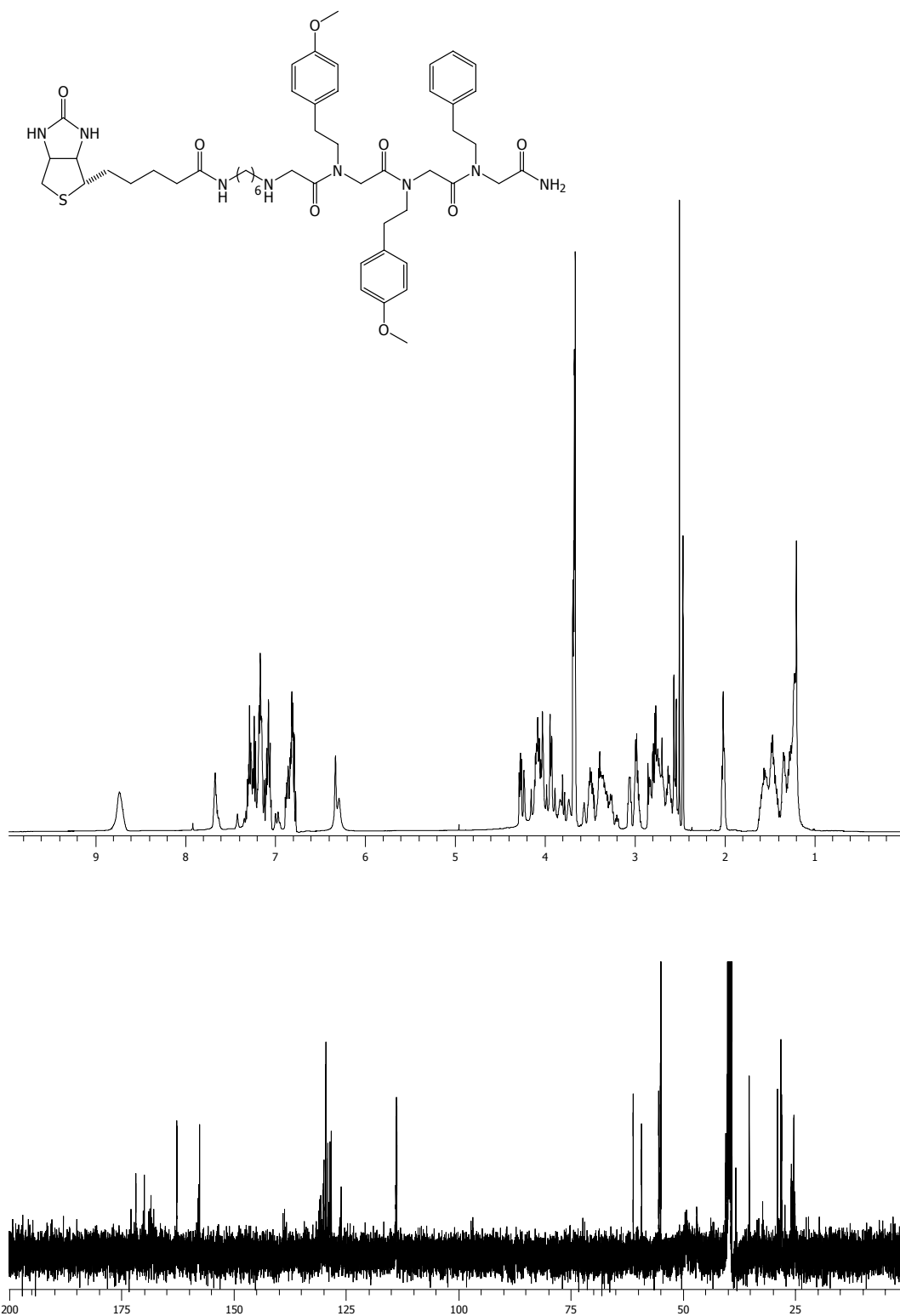
Compost 21



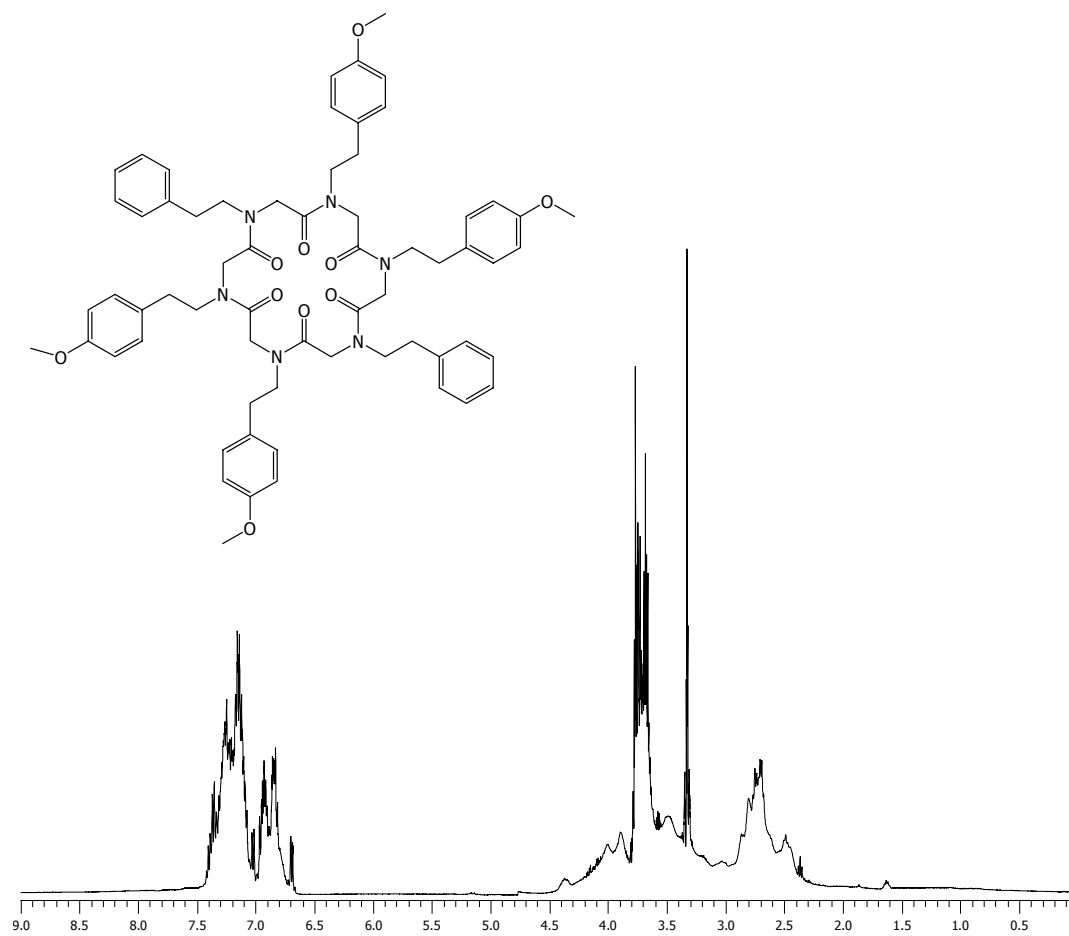
Compost 24



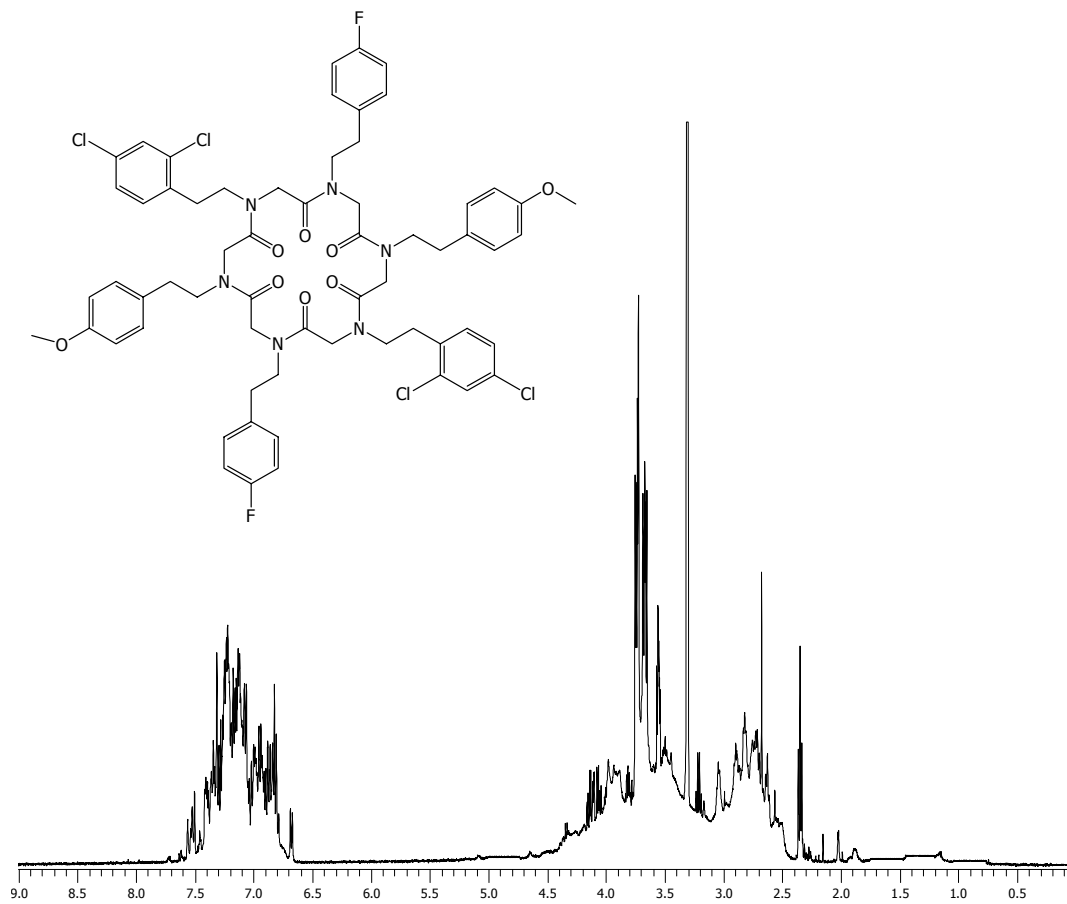
Compost 26



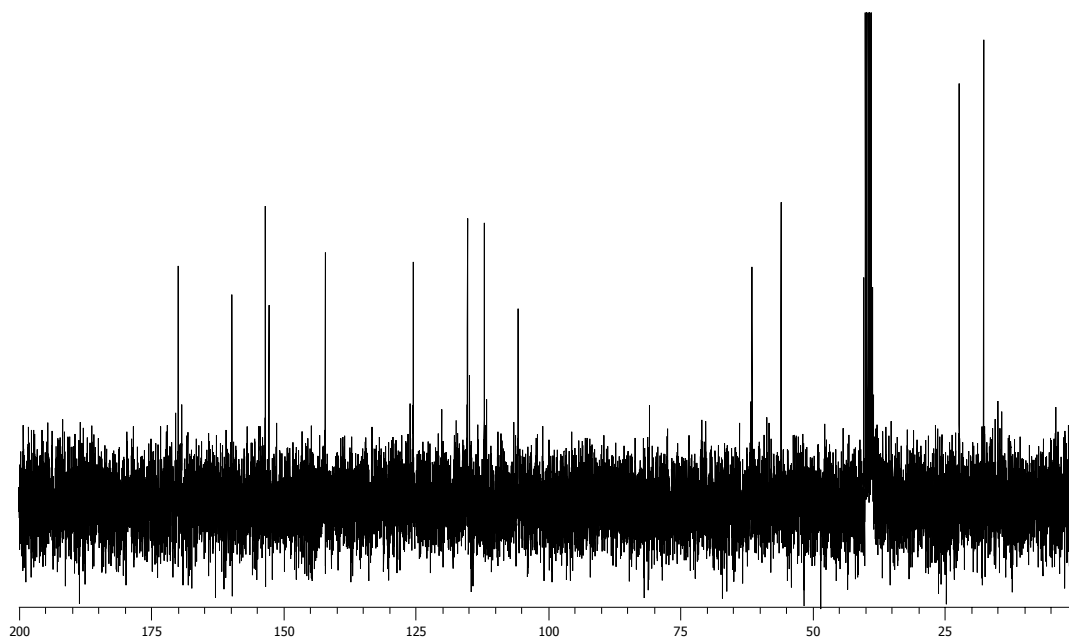
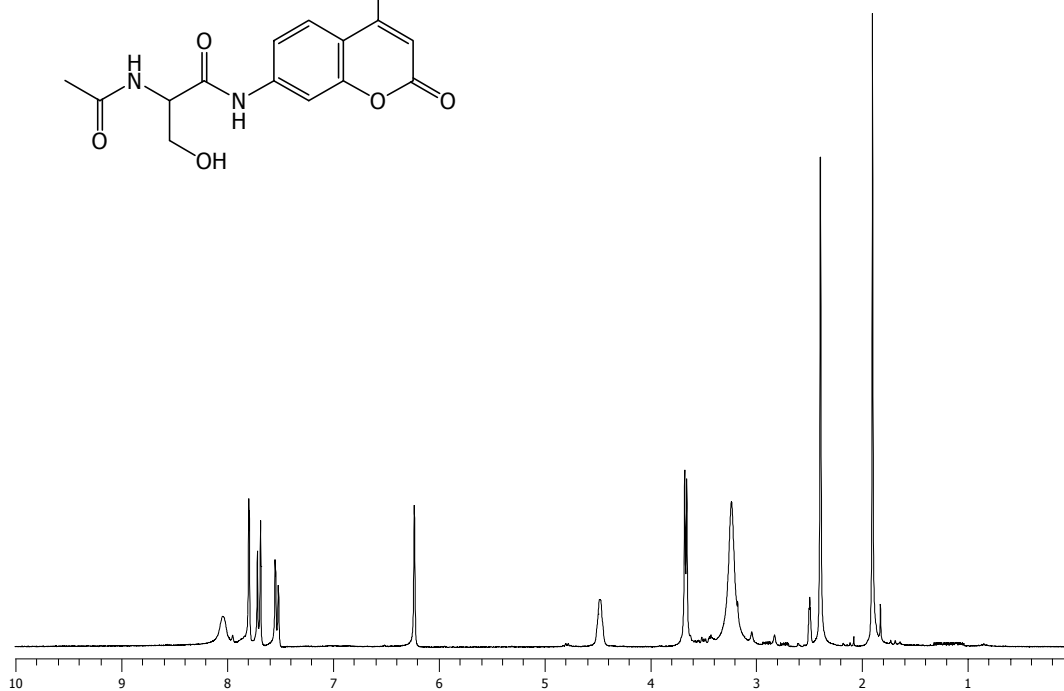
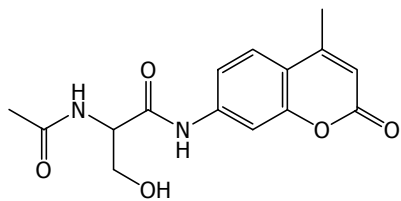
Compost 27



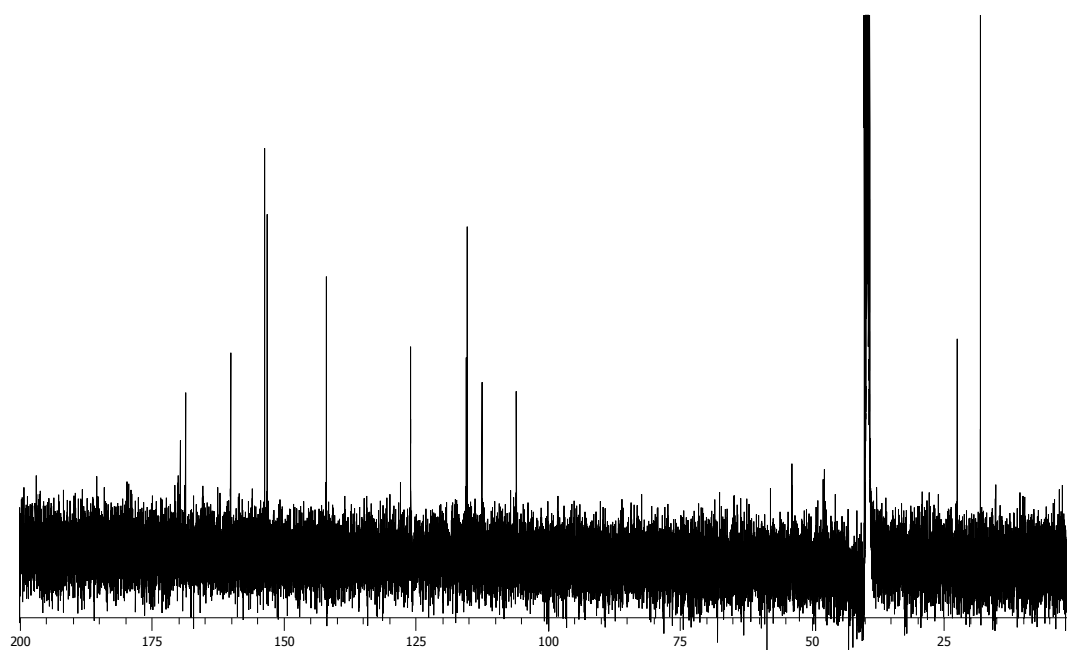
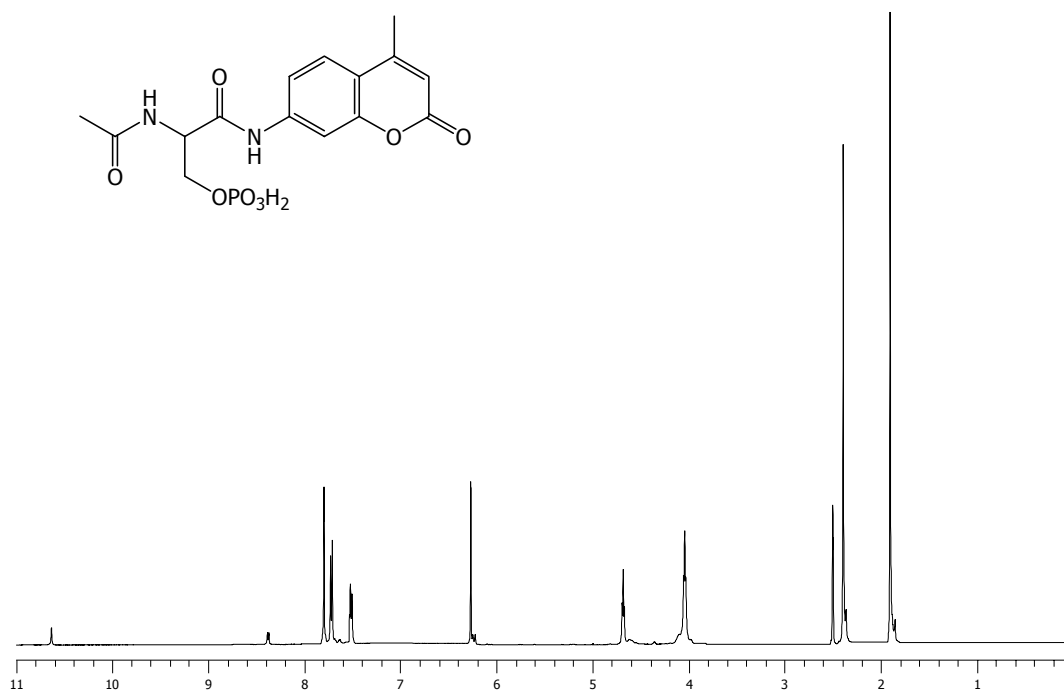
Compost 28



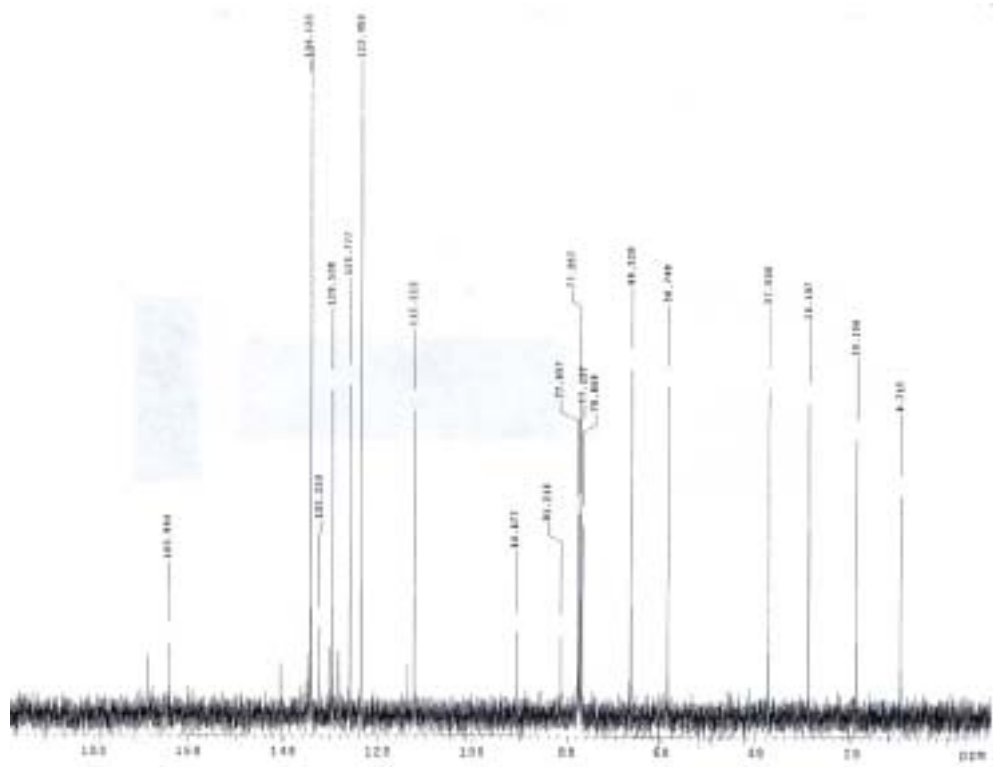
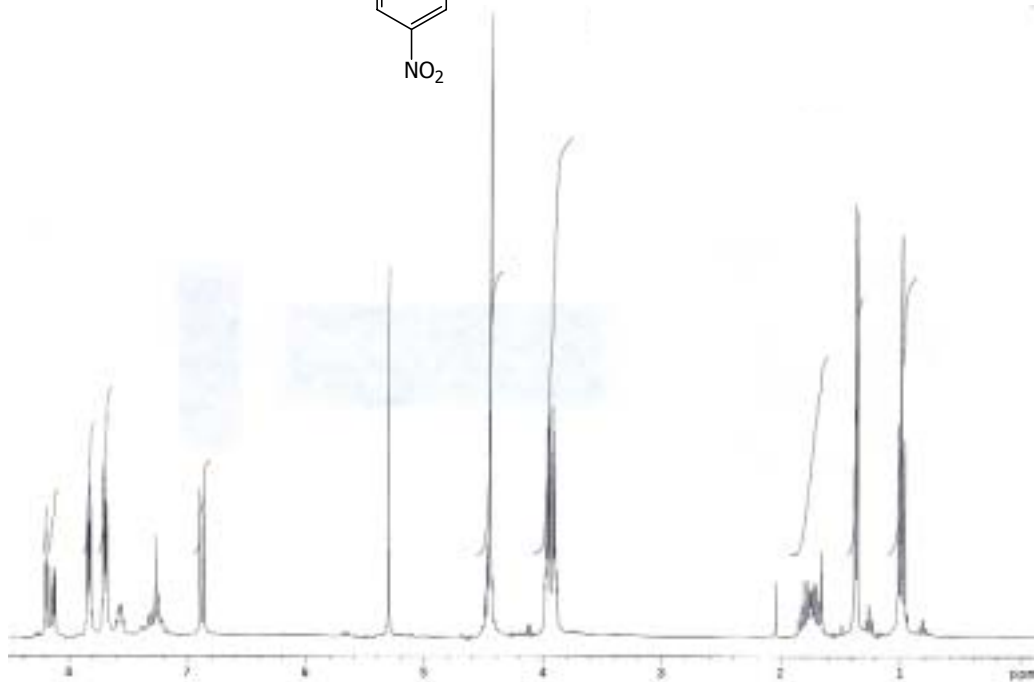
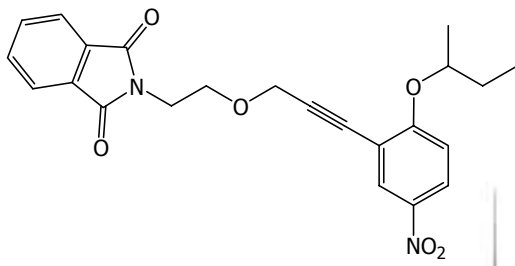
Compost 32



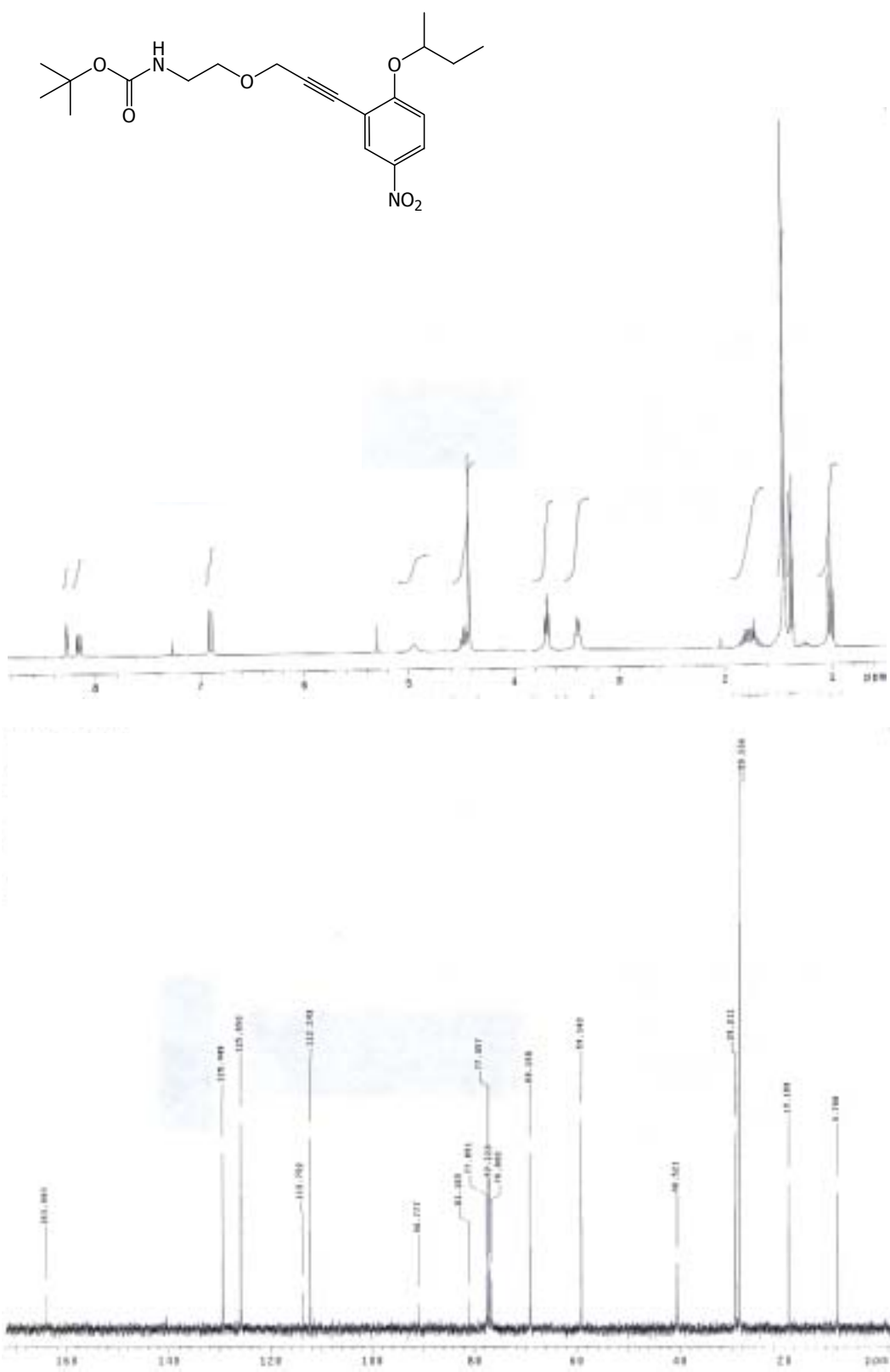
Compost 33



Compost 43



Compost 45



BIBLIOGRAFIA

- (1) Jung, G.; Beck-Sickinger, A. G. Methods for multiple syntheses and their application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 367-386.
- (2) Wilson, S. R.; Czanik, A. W. *Combinatorial chemistry: synthesis and application.*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1997**.
- (3) Terret, N. K. *Combinatorial Chemistry.*; Oxford University Press: Oxford, New York, Tokyo, **1998**.
- (4) Pavia, M. R.; Sawyer, T. K.; Moos, W. H. The generation of molecular diversity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 387-396.
- (5) Xiang, X. -D.; Sun, X.; Briceño, G.; Lou, Y.; Wang, K. -S.; Chang, H.; Wallace-Freedman, W. G.; Chen, S. -W.; Schultz, P. G. A Combinatorial Approach to Materials Discovery. *Science* **1995**, *268*, 1738-1740.
- (6) Briceño, G.; Chang, H.; Sun, X.; Schultz, P. G.; Xiang, X. D. A Class of Cobalt Oxide Magnetoresistance Materials Discovered with Combinatorial Synthesis. *Science* **1995**, *270*, 273-275.
- (7) Boyce, R.; Li, G.; Nestler, H. P.; Suenaga, T.; Still, W. C. Peptidosteroidal Receptors for Opioid Peptides. Sequence-Selective Binding Using a Synthetic Receptor Library. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7955-7956.
- (8) Rothman, J. H.; Still, W. C. Peptide-binding antibiotics: a solid-phase assay for screening libraries of vancomycin mimics for selective d-Ala-d-Ala binding. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3159-3164.
- (9) Brocchini, S. T.; Kohn, J. Combinatorial Approach for Polymer Design. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4553-4554.
- (10) Bein, T. Efficient Assays for Combinatorial Methods for the Discovery of Catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 323-325.
- (11) Maier, W. F. Combinatorial Chemistry-Challenge and Chance for the Development of New Catalysts and Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1216-1218.
- (12) Shimizu, K. D.; Snapper, M. L.; Hoveyda, A. H. High-Throughput Strategies for the Discovery of Catalysts. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1885-1889.
- (13) Merrifield, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- (14) Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998-4002.
- (15) Houghten, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131-5135.

- (16) Furka, A.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. General Method for Rapid Synthesis of Multicomponent Peptide Mixtures. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- (17) Bunin, B. A.; Ellman, J. A. A General and Expedient Method for the Solid-Phase Synthesis of 1,4-Benzodiazepine Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10997-10998.
- (18) Thompson, L. A.; Ellman, J. A. Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- (19) Balkenhohl, F.; von dem Bussche-Hünnefeld, C.; Lansky, A.; Zechel, C. Combinatorial Synthesis of Small Organic Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2288-2337.
- (20) Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A.; Simon, R. J.; Banville, S. C.; Brown, E. G.; Wang, L.; Richter, L. S.; Moos, W. H. Discovery of Nanomolar Ligands for Transmembrane G-Protein-Coupled from a Diverse *N*-(Substituted)glycine Peptoid Library. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678-2685.
- (21) Bailey, N.; Dean, A. W.; Judd, D. B.; Middlemiss, D.; Storer, R.; Watson, S. P. A convenient procedure for the solution phase preparation of 2-aminothiazole combinatorial libraries. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1409-1414.
- (22) Han, H.; Janda, K. D. Azatides: Solution and Liquid Phase Syntheses of a New Peptidomimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2539-2544.
- (23) Martin, S. W.; Romine, J. L.; Chen, L.; Mattson, G.; Antal-Zimanyi, I. A.; Poindexter, G. S. Application of Solution-Phase Parallel Synthesis to Preparation of Trisubstituted 1,2,4-Triazoles. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 35-37.
- (24) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- (25) Weber, L.; Wallbaum, S.; Broger, C.; Gubernator, K. Optimization of the biological activity of combinatorial compound libraries by a genetic algorithm. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2280-2282.
- (26) Augen, J. The evolving role of information technology in the drug discovery process. *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 315-323.
- (27) Bajorath, J. Rational drug discovery revisited: interfacing experimental programs with bio- and chemo-informatics. *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 989-995.
- (28) Hansch, C.; Kurup, A.; Garg, R.; Gao, H. Chem-Bioinformatics and QSAR: A Review of QSAR Lacking Positive Hydrophobic Terms. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 649-672.
- (29) Kaldor, S. W.; Siegel, M. G.; Fritz, J. E.; Dressman, B. A.; Hahn, P. J. Use of Solid Supported Nucleophiles and Electrophiles for the Purification of Non-Peptide Small Molecules Libraries. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7193-7196.

- (30) Kaldor, S. W.; Fritz, J. E.; Tang, J.; McKinney, E. R. Discovery of antirhinoviral leads by screening a combinatorial library of ureas prepared using covalent scavengers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 3041-3044.
- (31) Valerio, R. M.; Bray, A. M.; Campbell, R. A.; DiPasquale, A.; Margellis, C.; Rodda, S. J. Multipin Peptide Synthesis at the Micromole Scale using 2-Hydroxyethyl Methacrylate Grafted Polyethylene Supports. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1993**, *42*, 1-9.
- (32) Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. Light-directed Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- (33) Frank, R.; Döring, R. Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031-6040.
- (34) Heine, N.; Ast, T.; Schneider-Mergener, J.; Reineke, U.; Germeroth, L.; Wenschuh, H. Synthesis and screening of peptoid arrays on cellulose membranes. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9919-9930.
- (35) Han, H.; Wolfe, M. M.; Brenner, S.; Janda, K. D. Liquid-phase Combinatorial Synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6419-6423.
- (36) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- (37) Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnák, V. The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- (38) Ostresh, J. M.; Winkle, J. H.; Hamashin, V. T.; Houghten, R. A. Peptide Libraries: Determination of Relative Reaction Rates of Protected Amino Acids in Competitive Couplings. *Biopolymers* **1994**, *34*, 1681-1689.
- (39) Dooley, C. T.; Houghten, R. A. The Use of Positional Scanning Synthetic Peptide Library for the Rapid Determination of Opioid Receptor Ligands. *Life Sci.* **1993**, *52*, 1509-1517.
- (40) Pinilla, C.; Appel, J. R.; Blondelle, S. E.; Dooley, C. T.; Eichler, J.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A. Versatility of Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries for the identification of Individual Compounds. *Drug Dev. Res.* **1994**, *33*, 133-145.
- (41) Walters, W. P.; Stahl, M. T.; Murcko, M. A. Virtual Screening an Overview. *Drug Discovery Today* **1998**, *3*, 160-178.
- (42) Ganesan, A. Strategies for the Dynamic Integration of Combinatorial Synthesis and Screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2828-2831,
- (43) Cousins, G. R. L.; Poulsen, S. -A.; Sanders, J. K. M. Dynamic combinatorial libraries of pseudo-peptide hydrazone macrocycles. *Chem. Commun.* **1999**, 1575-1576.
- (44) Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. Proteolytic studies of homologous peptide and *N*-substituted glycine peptoid oligomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2657-2662.

- (45) Simon, R. J.; Kania, R.; Zuckermann, R. N.; Hueber, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberf, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Barlett, P. A. Peptoids: A modular approach to drug discovery. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9367-9371.
- (46) Humet, M.; *Disseny, síntesi i avaluació d'una quimioteca de peptoides en el format de rastreig posicional*; Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona, **2002**.
- (47) García-Martínez, C.; Humet, M.; Planells-Cases, R.; Gomis, A.; Caprini, M.; Viana, F.; Peña, E.; Sanchez-Baeza, F.; Carbonell, T.; Felipe, C.; Pérez-Payá, E.; Belmonte, C.; Messeguer, A.; Ferrer-Montiel, A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2374-2379.
- (48) Humet, M.; Carbonell, T.; Masip, I.; Sánchez-Baeza, F.; Mora, P.; Cantón, E.; Gobernado, M.; Abad, C.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A. A Positional Scanning Combinatorial Library of Peptoids As a Source of Biological Active Molecules: Identification of Antimicrobials. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 597-605.
- (49) Planells-Cases, R.; Montoliu, C.; Humet, M.; Fernández, A. M.; García-Martínez, C.; Valera, E.; Merino, J. M.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A.; Felipo, V.; Ferrer-Montiel, A. A Novel *N*-Methyl-D-aspartate Receptor Open Channel Blocker with in Vivo Neuroprotectant Activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 163-173.
- (50) Montoliu, C.; Humet, M.; Canales, J-J.; Burda, J.; Planells-Cases, R.; Sánchez-Baeza, F.; Carbonell, T.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A.; Ferrer-Montiel, A.; Felipo, V. Prevention of in Vivo Excitotoxicity by a Family of Trialkylglycines, a Novel Class of Neuroprotectants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 29-36.
- (51) Masip, I.; *Utilització d'estratègies de química combinatòria per a la identificació de molècules amb potencial interès en biomedicina*; Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona, **2002**.
- (52) Masip, I.; Ferrándiz-Huertas, C.; García-Martínez, C.; Ferragut, J. A.; Ferrer-Montiel, A.; Messeguer, A. Synthesis of a Library of 3-Oxopiperazinium and Perhydro-3-oxo-1,4-diazepinium Derivatives and Identification of Bioactive Compounds *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 135-141.
- (53) Houghten, R. A.; Dooley, C. T. The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the determination of peptide ligands in radio-receptor assays: opioid peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 405-412.
- (54) Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(*N*-substituted glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646-10647.
- (55) Figliozzi, G. M.; Goldsmith, R.; Ng, S. C.; Banville, S. C.; Zuckermann, R. N. Synthesis of *N*-Substituted Glycine Peptoid Libraries. *Methods in Enzymology* **1996**, *267*, 437-447.
- (56) Kruijtzter, J. A. W.; Liskamp, R. M. J. Synthesis in Solution of Peptoids using Fmoc-protected *N*-substituted Glycines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6969-6972,

- (57) Luo, Y.; Ouyang, X.; Armstrong, R. W.; Murphy, M. M. A Case Study of Employing Spectroscopic Tools for Monitoring Reactions in the Development Stage of a Combinatorial Chemistry Library. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8719-8722.
- (58) Ruhland, T.; Andersen, K.; Pedersen, H. Selenium-Linking Strategy for Traceless Solid-Phase Synthesis: Direct Loading, Aliphatic C-H Bond Formation upon Cleavage and Reaction Monitoring by Gradient MAS NMR Spectroscopy. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9204-9211.
- (59) Warrass, R.; Lippens, G. Quantitative Monitoring of Solid Phase Organic Reactions by High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2946-2950.
- (60) Cironi, P.; Álvarez, M.; Albericio, F. A Combination of Different Spectroscopic Techniques to Monitor the "in situ" Solid-phase Synthesis of Organic Molecules. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 61-68.
- (61) Yan, B.; Kumaravel, G.; Anjaria, H.; Wu, A.; Petter, R. C.; Jewell, C. F.; Wareing, R. Infrared Spectrum of a Single Resin Bead for Real-Time Monitoring of Solid-Phase Reactions. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5736-5738.
- (62) Scott, B. O.; Siegmund, A. C.; Marlowe, C. K.; Pei, Y.; Spear, K. L. Solid Phase Organic Synthesis (SPOS): A novel route to diketopiperazines and diketomorpholines. *Molec. Div.* **1995**, *1*, 125-134.
- (63) Burkoth, T. S.; Fafarman, A. T.; Charych, D. H.; Connolly, M. D.; Zuckermann, R. N. Incorporation of Unprotected Heterocyclic Side Chains into Peptoid Oligomers via Solid-Phase Submonomer Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8841-8845.
- (64) Olivos, H. J.; Prasanna, G. A. Reddy, M. M.; Salony, D.; Kodadek, T. Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis of Peptoids. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4057-4059.
- (65) Gorske, B. C.; Jewell, S. A.; Guerard, E. J.; Blackwell, H. E. Expedient Synthesis and Design Strategies for New Peptoid Construction. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1521-1524.
- (66) Booth, R. J.; Hodges, J. C. Solid-Supported Reagent Strategies for Rapid Purification of Combinatorial Synthesis Products. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 18-26.
- (67) Shuttleworth, S. J.; Allin, S. M.; Wilson, R. D.; Nasturica, D. Functionalised Polymers in Organic Chemistry; Part 2. *Synthesis* **2000**, *8*, 1035-1074.
- (68) Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyba, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. Biochemical, Cellular and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 361-398.
- (69) Sharom, F. J. The P-glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs? *J. Membr. Biol.* **1997**, *160*, 161-175.
- (70) Pastan, I.; Gottesman, M. Multidrug resistance in human cancer. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 1388-1393.
- (71) Bellamy, W. T. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 161-183.

- (72) Tan, B.; Piwnica-Worms, D.; Ratner, L. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr. Opin. Oncology*. **2000**, *12*, 450-458.
- (73) Cole, S. P. C.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M.; Deeley, R. G. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science* **1992**, *258*, 1650-1654.
- (74) Lautier, D.; Canitror, I.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Multidrug resistance mediated by multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 967-977.
- (75) Schwab, D.; Fischer, H.; Tabatabaei, A.; Poli, S.; Huwyler, J. Comparison of in Vitro P-Glycoprotein Screening Assays: Recommendations for Their Use in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1716-1725.
- (76) Garnier-Suillerot, A.; Marbeuf-Gueye, C.; Salerno, M.; Loetchutinat, C.; Fokt, I.; Krawczyk, M.; Kowalczyk, T.; Priebe, W. Analysis of Drug Transport Kinetics in Multidrug-resistant Cells: Implications for Drug Action. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 51-64.
- (77) Masip, I.; Cortés, N.; Abad, M. J.; Guardiola, M.; Pérez-Payá, E.; Ferragut, J.; Ferrer-Montiel, A.; Messeguer, A. Design and synthesis of an optimized positional scanning library of peptoids: identification of novel multidrug resistance reversal agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1929-1932.
- (78) Abad-Merin, M. J.; Cortés, N.; Masip, I.; Pérez-Payá, E.; Ferragut, J. A.; Messeguer, A.; Ferrer-Montiel, A. Trimers of *N*-Alkylglycines are potent modulators of the multidrug resistance phenotype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, En prensa.
- (79) Dubost, M.; Ganter, P.; Maral, R.; Ninet, L.; Pinnert, S. Rubomycin, antibiotic with Cytostatic Properties. *Cancer Chemother. Rep.* **1964**, *41*, 35-36.
- (80) Robert, J.; Jarry, C. Multidrug Resistance Reversal Agents. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4805-4817.
- (81) Mistry, P.; Stewart, A. J.; Dangerfield, W.; Okiji, S.; Liddle, C.; Bootle, D.; Plumb, J. A.; Templeton, D.; Charlton, P. *In vitro* and *in vivo* reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 749-758.
- (82) Chellappan, S. P.; Hiebert, S.; Mudryj, M.; Horowitz, J. M.; Nevins, J. R. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **1991**, *65*, 1053-1061.
- (83) Sherr, C. J.; Roberts, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 1149-1163.
- (84) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- (85) Nicolaou, K. C.; Dai, W. M.; Guy, R. K. Chemistry and biology of taxol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *106*, 15-44.

- (86) Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **1997**, *389*, 816-824.
- (87) Liu, L.; Simon, S. A. A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 738-741.
- (88) Tominaga, M.; Caterina, M. J.; Malmberg, A. B.; Rosen, T. A.; Gilvert, H.; Skinner, K.; Raumann, B. E.; Basbaum, A. I.; Julius, D. The Coned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-producing stimuli. *Neuron* **1998**, *21*, 531-543.
- (89) Caterina, M. J.; Julius, D. The Vanilloid Receptor: a Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 487-517.
- (90) Williams, M.; Kowaluk, E. A.; Arneric, S. P. Emerging Molecular Approaches to Pain Therapy. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1481-1500.
- (91) Ferrer-Montiel, A. V.; Montal, M. Structure-function relations in ligand-gated ion channels: reconstitution in lipid bilayers and heterologous expression of *Xenopus oocytes*. *Methods* **1994**, *6*, 60-69.
- (92) Bräuner-Osborne, H.; Egebjerg, J.; Nielsen, E. M.; Krosgaard-Larse, P. Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2609-2645.
- (93) Yu, S. P.; Yeh, C. H.; Strasser, U.; Tian, M.; Choi, D. W. NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science* **1999**, *284*, 336-339.
- (94) Heine, H.; Rietschel E. T.; Ulmer, A. J. The biology of endotoxin. *Mol. Biotechnol.* **2001**, *19*, 279-296.
- (95) Yu, B.; Wright, S. D. Catalytic Properties of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4100-4105.
- (96) Tobias, P. S.; Soldau, K.; Gegner, J. A.; Mintz, D.; Ulevitch, R. J. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10482-10488.
- (97) Aderem, A.; Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **2000**, *406*, 782-787.
- (98) Takeda, K.; Akira, S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells* **2001**, *6*, 733-742.
- (99) Fidai, S.; Farmer, S. W.; Hancock, R. E. Interaction of cationic peptides with bacterial membranes. *Methods Mol. Biol.* **1997**, *78*, 187-204.
- (100) Scott, M. G.; Vreugdenhil, A. C.; Buurman, W. A.; Hancock, R. E.; Gold, M. R. Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 549-553.

- (101) González-Navarro, H.; Mora, P.; Pastor, M.; Serrano, L.; Mingarro, I.; Pérez-Payá, E. Identification of peptides that neutralize bacterial endotoxins using beta-hairpin conformationally restricted libraries. *Mol. Divers.* **2000**, *5*, 117-126.
- (102) Mora, P.; Masip, I.; Cortés, N.; Marquina, R.; Merino, R.; Merino, J.; Carbonell, T.; Mingarro, I.; Messeguer, A.; Pérez-Payá, E. Identification from a Positional Scanning Peptoid Library of *in vivo* Active Compounds that Neutralize Bacterial Endotoxins. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1965-1968.
- (103) Morrison, D. C.; Jacobs, D. M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* **1976**, *13*, 813-818.
- (104) Ried, C.; Wahl, C.; Miethke, T.; Wellnhofer, G.; Landgraf, C.; Schneider-Mergener, J.; Hoess, A. High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant Limulus anti-lipopolysaccharide factor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28120-28127.
- (105) Taylor, A. H.; Heavner, G.; Nedelman, M.; Sherris, D.; Brunt, E.; Knight, D.; Ghrayeb, J. Lipopolysaccharide (LPS) neutralizing peptides reveal a lipid A binding site of LPS binding protein. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17934-17938.
- (106) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. L. *Purification of Laboratory Chemicals*; Pergamon Press: Oxford, **1980**.
- (107) Vojtkovsky, T. Detection of Secondary Amines on Solid Phase. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 236-237.
- (108) Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-phase Peptide Synthesis using 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic Acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260-264.
- (109) Fernandez-Ferri, P.; Ubeda, A.; Guillén, I.; Lasri, J.; González-Rosende, M. E.; Akssira, M.; Sepúlveda-Arques, J. Synthesis and evaluation of 2-tosylamino and 2-tosyliminopyrimidine derivatives as inhibitors of some leukocyte functions. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 289-296.
- (110) Benjamin, B.; Zuccarello, W. A.; Cohen, S. R.; Frishmuth, G. J.; Scaricaciottoli, D. Synthesis and Adrenocortical Inhibiting Activity of Substituted Diphenylalkylamines. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 271-276.
- (111) Chang, Y. T.; Gray, N. S.; Rosanina, G. R.; Sutherlin, D. P.; Know, S.; Norman, T. C.; Sarohia, R.; Leost, M.; Meijer, L.; Schultz, P. G. Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 361-375.
- (112) Kent, L. L.; Hull-Campbell, N. E.; Lau, T.; Wu, J. C.; Thompson, S. A.; Nori, M. Characterization of Novel Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *260*, 768-774.
- (113) Arris, C. E.; Boyle, F. T.; Calvert, A. H.; Curtin, N. J.; Endicott, J. A.; Garman, E. F.; Gibson, A. E.; Golding, B. T.; Grant, S.; Griffin, R. J.; Jewsbury, P.; Johnson, L. N.; Lawrie, A. M.; Newell, D. R.; Noble, M. E. M.; Sausville, E. A.; Schultz, R.; Yu, W. Identification of Novel Purine and Pyrimidine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors with Distinct Molecular Interactions and Tumor Cell Growth Inhibition Profiles. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2797-2804.

- (114) Shewchuk, L.; Hassell, A.; Wisely, B.; Rocque, W.; Holmes, W.; Veal, J.; Kuyper, L. F. Binding mode of the 4-anilinoquinazoline class of protein kinase inhibitor: X-ray crystallographic studies of 4-anilinoquinazolines bound to cyclin-dependent kinase 2 and p38 kinase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 133-138.
- (115) Knockaert, M.; Gray, N.; Damiens, E.; Chang, Y. T.; Grellier, P.; Grant, K.; Fergusson, D.; Mottram, J.; Soete, M.; Dubremetz, J. F.; Le Roch, K.; Doerig, C.; Schultz, P. G.; Meijer, L. Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 411-422.
- (116) Knockaert, M.; Meijer, L. Identifying *in vivo* targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 819-825.
- (117) Knockaert, M.; Lenormand, P.; Gray, N.; Schultz, P.; Pouyssegur, J.; Meijer, L. p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. *Oncogene* **2002**, *21*, 6413-6424.
- (118) Alluri, P. G.; Reddy, M. M.; Bachhawat-Sikder, K.; Olivos, H. J.; Kodadek, T. Isolation of Protein Ligands from Large Peptoid Libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13995-14004.
- (119) Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **1996**, *274*, 1531-1534.
- (120) Maly, D. J.; Choong, I. C.; Ellman, J. A. Combinatorial target-guided ligand assembly: identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2419-2424.
- (121) Kodadek, T.; Reddy, M. M.; Olivos, H. J.; Bachhawat-Sikder, K.; Alluri, P. G. Synthetic Molecules as Antibody Replacements. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 711-718.
- (122) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's. Textbook of practical organic chemistry*; Longman Group Limited London and New York, **1978**.
- (123) Vaughn, H. L.; Robbins, M. D. A Rapid Procedure for the Hydrolysis of Amides to Acids. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1187-1189.
- (124) Stadler, A.; Pichler, S.; Horeis, G.; Kappe, C. O. Microwave-enhanced reactions under open and closed vessel conditions. A case study. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3177-3183.
- (125) Ladenheim, H.; Bender, M. L. Acylium Ion Formation in the Reactions of Carboxylic Acid Derivatives. I. Application of the H_R Acidity Function to the Diazotization of Benzamide in Sulfuric Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1895-1900.
- (126) Kim, Y. H.; Kim, K.; Park, Y. J. Facile conversion of amides to the acids and/or anhydrides using dinitrogen tetroxide. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 27, 3893-3894.
- (127) Greenlee, W. J.; Thorsett, E. D. Mild Conversion of Carboxamides and Carboxylic Acid Hydrazides to Acids and Esters. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5351-5353.
- (128) Collins, R. F. Selective amide hydrolysis by an ion exchange resin. *Chem. and Ind.* **1957**, 736.
- (129) Bolton, P. D.; Henshall, T. Catalysis by ion-exchange resins. Part I. The hydrolysis of amides in aqueous solutions. *J. Chem. Soc.* **1962**, 1226-1232.

- (130) Bolton, P. D.; Henshall, T. Catalysis by ion-exchange resins. Part II. The hydrolysis of amides in aqueous-organic solvents. *J. Chem. Soc.* **1962**, 3369-3372.
- (131) Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. *Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*, Editorial Reverté, S. A.; Barcelona, **1989**.
- (132) *StatgraphicsPlus*; Manugistics, Inc.: Rockville, Maryland, USA, **1995**.
- (133) Box, G. E. P.; Behnken, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* **1960**, *2*, 455-475.
- (134) Merrifield, R. B. Solid-phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry* **1964**, *3*, 1385-1389.
- (135) Wang, S. S. *p*-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and *p*-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid-Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- (136) Mergler, M.; Nyfeler, R.; Tanner, R.; Gosteli, J.; Grogg, P. Peptide Synthesis by a Combination of Solid-Phase and Solution Methods. I: A New Very Acid-Labile Anchor Group for the Solid-Phase Synthesis of Fully Protected Peptide Fragments. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.
- (137) Mergler, M.; Nyfeler, R.; Tanner, R.; Gosteli, J.; Grogg, P. Peptide Synthesis by a Combination of Solid-Phase and Solution Methods. II: Synthesis of Fully Protected Peptide Fragments on 2-Methoxy-4-alkoxy benzyl Alcohol Resin. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4009-4012.
- (138) Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxydiphenyl methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 33, 3787-3790.
- (139) Albericio, F.; Barany, G. Hypersensitive Acid-Labile (HAL) Tris(Alkoxy)benzyl Ester Anchoring for Solid-Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1015-1018.
- (140) Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, I.; Papaioannou, D.; Sotiriu, P. Application of 4-polystyryltriphenylmethyl chloride to the synthesis of peptides and amino acid derivatives. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1079-1081,
- (141) Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Yao, W.; Schaefer, W. Preparation of protected peptide fragments using triphenylmethyl resins. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- (142) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- (143) Barn, D. R.; Morphy, R.; Rees, D. C. Synthesis of an Array of Amides by Aluminium Chloride Assisted Cleavage of Resin-Bound Esters. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3213-3216.
- (144) Atherton, E.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using N ζ 4fluorenylmethoxycarbonyl amino acids on polyamide supports.

- Synthesis of substance P and acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 538-546.
- (145) DeGrado, W. F.; Kaiser, E. T. Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. The preparation of protected peptide fragments. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295-1300.
- (146) Anne, C.; Fournie-Zaluski, M. C.; Roques, B. P.; Cornille, F. Solid phase synthesis of peptoid derivatives containing a free C-terminal carboxylate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8973-8974.
- (147) Thern, B.; Rudolph, J.; Jung, G. Triphosgene as highly efficient reagent for the solid-phase coupling of *N*-alkylated amino acids. Total synthesis of cyclosporin O. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5013-5016.
- (148) Thern, B.; Rudolph, J.; Jung, G. Total Synthesis of the Nematicidal Cyclododecapeptide Omphalotin A by Using Racemization-Free Triphosgene-Mediated Couplings in the Solid Phase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2307-2309.
- (149) Sewald, N. Efficient, Racemization-Free Peptide Coupling of *N*-Alkyl Amino Acids by Using Amino Acid Chlorides Generated In situ. Total Syntheses of the Cyclopeptides Cyclosporin O and Omphalotin A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4661-4663.
- (150) Phoon, C. W.; Oliver, S. F.; Abell, C. The Use of Trichloroacetimidate-activated Resin for Ester Formation. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7959-7962.
- (151) Hanessian, S.; Xie, F. Polymer-Bound *p*-Alkoxybenzyl Trichloroacetimidates: Reagents for the Protection of Alcohols as Benzyl Ethers on Solid-Phase. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 733-736.
- (152) Alsina, J.; Giralt, E.; Albericio, F. Use of *N*-Tritylamino Acids and PyAOP for the Suppression of Diketopiperazine Formation in Fmoc/^tBu Solid-Phase Peptide Synthesis Using Alkoxybenzyl Ester Anchoring Linkages. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4195-4198.
- (153) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441-5452.
- (154) Kenner, G. W.; McDermott, J. R.; Sheppard, R. C. Safety catch principle in solid phase peptide synthesis. *Chem. Commun.* **1971**, 636-637.
- (155) Backes, B. J.; Ellman, J. A. Carbon-Carbon Bond-Forming Methods on Solid Support. Utilization of Kenner's "Safety-Catch" Linker. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11171-11172.
- (156) Backes, B. J.; Virgilio, A. A.; Ellman, J. A. Activation Method to Prepare a Highly Reactive Acylsulfonamide "Safety-Catch" Linker for Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055-3056.
- (157) Backes, B. J.; Ellman, J. A. An Alkanesulfonamide "Safety-Catch" Linker for Solid-Phase Synthesis. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- (158) Yang, L.; Morriello, G. Solid phase synthesis of "head-to-tail" cyclic peptides using a sulfonamide "safety-catch" linker: the cleavage by cyclization approach. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197-8200.

- (159) Green, N. M. Avidin. III. The nature of the biotin-binding site. *Biochem. J.* **1963**, *89*, 599-609.
- (160) Hofmann, K.; Finn, F. M.; Kiso, Y. Avidin-Biotin Affinity Columns. General Methods for Attaching Biotin to Peptides and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3585-3590.
- (161) Hashimoto, M.; Liu, Y.; Fang, K.; Li, H. Y.; Campiani, G.; Nakanishi, K. Preparation and Biological Properties of Biotinylated PhTX Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1181-1194.
- (162) Wilchek, M.; Bayer, E. A. Applications of avidin-biotin technology: literature survey. *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 14-45.
- (163) Sabatino, G.; Chinol, M.; Paganelli, G.; Papi, S.; Chelli, M.; Leone, G.; Papini, A. M.; Luca, A.; Ginanneschi, M. A New Biotin Derivative-DOTA Conjugate as a Candidate for Pretargeted Diagnosis and Therapy of Tumors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3170-3173.
- (164) Berst, F.; Ladlow, M.; Holmes, A. B. Solid-phase synthesis of apicidin A and a cyclic tetrapeptoid analogue. *Chem. Commun.* **2002**, 508-509.
- (165) Didier, E.; Horwell, D. C.; Pritchard, M. C. Synthesis and CCK-B binding affinities of cyclic analogues of the potent and selective CCK-B receptor antagonist CI-988. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8471-8490.
- (166) Vidal, M.; Liu, W. Q.; Lenoir, C.; Salzmann, J.; Gresh, N.; Garbay, C. Design of Peptoid Analogue Dimers and Measure of Their Affinity for Grb2 SH3 Domains. *Biochemistry* **2004**, *43*, 7336-7344.
- (167) Becker, J. M.; Wilchek, M.; Katchalski, E. Irreversible Inhibition of Biotin Transport in Yeast by Biotinyl-*p*-nitrophenyl Ester. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 10, 2604-2607.
- (168) Heitzmann, H.; Richards, F. M. Use of the Avidin-Biotin Complex for Specific Staining of Biological Membranes in Electron Microscopy *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3537-3541.
- (169) Bridges, A. J. Chemical Inhibitors of Protein Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2541-2571.
- (170) Bowman, B. F.; Peterson, J. A.; Stull, J. T. Pre-steady-state Kinetics of the Activation of Rabbit Skeletal Muscle Myosin Light Chain Kinase by Ca²⁺/Calmodulin. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5346-5354.
- (171) Post, P. L.; Trybus, K. M.; Taylor, D. L. A Genetically Engineered, Protein-based Optical Biosensor of Myosin II Regulatory Light Chain Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12880-12887.
- (172) Chen, C. A.; Yeh, R. H.; Lawrence, D. S. Design and Synthesis of a Fluorescent Reporter of Protein Kinase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3840-3841.
- (173) Shults, M. D.; Imperiali, B. Versatile Fluorescence Probes of Protein Kinase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14248-14249.
- (174) Zimmerman, M.; Yurewicz, E.; Patel, G. A New Fluorogenic Substrate for Chymotrypsin. *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 258-262.

- (175) Kanaoka, Y.; Takahashi, T.; Nakayama, H. A New Fluorogenic Substrate for Aminopeptidase. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 362-363.
- (176) Kunugi, S.; Fukuda, M.; Hayashi, R. Action of serine carboxypeptidases on endopeptidase substrates, peptide-4-methyl-coumaryl-7-amides. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *153*, 37-40.
- (177) Linn, C. P.; Mize, P. D.; Hoke, R. A.; Quante, J. M.; Pitner, J. B. Synthesis of Serine-AMC-Carbamate: A Fluorogenic Tryptophanase Substrate. *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 400-404.
- (178) Kunugi, S.; Nishino, N.; Mihara, H.; Tandt, W. R. D.; Scharpé, S. N-D-Biotinyl-7-amino-4-methylcoumarin as a Novel Fluorogenic Substrate for the Determination of Biotinidase Activity. *Chem. Lett.* **1997**, 391-392.
- (179) Backes, B. J.; Harris, J. L.; Leonetti, F.; Craik, C. S.; Ellman, J. A. Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 187-193.
- (180) Pomerantz, A. H.; Allfrey, V. G.; Merrifield, R. B.; Johnson, E. M. Studies on the mechanism of phosphorylation of synthetic polypeptides by a calf thymus cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 4261-4265.
- (181) Keup, B. E.; Graves, D. J.; Benjamin, E.; Krebs, E. G. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4888-4894.
- (182) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. Peptide coupling reagents. IV. *N*-[Oxytris(dimethylamino)phosphonium]benzotriazole hexafluorophosphate. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219-1222.
- (183) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP \Rightarrow : a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- (184) Coste, J.; Frérot, E.; Pantaloni, A.; Dufour, M.-N.; Jouin, P. PyBOP \Rightarrow and PyBroP: two reagents for the difficult coupling of the ζ ξ -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.
- (185) Dourtoglou, V.; Ziegler, J. C.; Gross, B. O-Benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium hexafluorophosphate: a new and effective reagent for peptide coupling. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- (186) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. Efficiency in Peptide Coupling: 1-hydroxy-7-azabenzotriazole vs. 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3561-3564.
- (187) Keller, O.; Keller, W. E.; Look, G.; Wersin, G. *Org. Synth. Coll. Vol. VII*; John Willey & Sons, Inc.: New York/ Chichester/ Brisbane/ Toronto/ Singapore, **1990**; Vol. 7, 70-75.
- (188) Sheppeck II, J. E.; Kar, H.; Hong, H. A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5329-5333.
- (189) Pattarawarapan, M.; Burgess, K. Molecular Basis of Neurotrophin-Receptor Interactions. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5277-5291.

- (190) Reyes, S.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Burgess, K. Preferred Secondary Structures as a Possible Driving Force for Macrocyclization. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9809-9818.
- (191) Burgess, K. Solid-Phase Syntheses of η -Turn Analogues To Mimic or Disrupt Protein-Protein Interactions. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 826-835.
- (192) Jiang, L.; Burgess, K. Fluorinated and iodinated templates for syntheses of η -turn peptidomimetics. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8743-8750.
- (193) Pattarawarapan, M.; Zaccaro, M. C.; Saragovi, U. H.; Burgess, K. New Templates for Syntheses of Ring-Fused, C¹⁰ η -Turn Peptidomimetics Leading to the First Reported Small-Molecule Mimic of Neurotrophin-3. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4387-4390.
- (194) Pattarawarapan, M.; Reyes, S.; Xia, Z.; Zaccaro, M. C.; Saragovi, H. U.; Burgess, K. Selective Formation of Homo- and Heterobivalent Peptidomimetics. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3565-3567.
- (195) Lee, H. B.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Burgess, K. Syntheses of second generation, 14-membered ring η -turn mimics. *Chem. Commun.* **2003**, 1674-1675.
- (196) Lee, H. B.; Zaccaro, M. C.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Saragovi, H. U.; Burgess, K. Syntheses and Activities of New C¹⁰ η -Turn Peptidomimetics. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 701-713.
- (197) Spencer, D. M.; Wandless, T. J.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. Controlling Signal Transduction with Synthetic Ligands. *Science* **1993**, *262*, 1019-1024.
- (198) DeFrees, S. A.; Kosch, W.; Way, W.; Paulson, J. C.; Sabesan, S.; Halcomb, R. L.; Huang, D. H.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H. Ligand Recognition by E-Selectin: Synthesis, Inhibitory Activity, and Conformational Analysis of Bivalent Sialyl Lewis x Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 66-79.
- (199) Breslow, R.; Yang, Z.; Ching, R.; Trojandt, G.; Odobel, F. Sequence Selective Binding of Peptides by Artificial Receptors in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3536-3537.
- (200) Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755-2794.
- (201) Brouwer, A. J.; van der Linden, H. J.; Liskamp, R. M. J. Combinatorial Chemistry for Ligand Development in Catalysis: Synthesis and Catalysis Screening of Peptidosulfonamide Tweezers on the Solid Phase. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1750-1757.
- (202) Pattarawarapan, M.; Chen, J.; Steffensen, M.; Burgess, K. A Rigid Linker-Scaffold for Solid-Phase Synthesis of Dimeric Pharmacophores. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 102-116.
- (203) Blackwell, H. E.; Clemons, P. A.; Schreiber, S. L. Exploiting Site-Site Interactions on Solid Support to Generate Dimeric Molecules. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1185-1188.

- (204) Olah, G. A.; Wang, Q.; Sandford, G.; Prakash, G. K. S. Iodination of Deactivated Aromatics with *N*-Iodosuccinimide in Trifluoromethanesulfonic Acid (NIS-CF₃SO₃H) via in Situ Generated Superelectrophilic Iodine (I) Trifluoromethanesulfonate. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3194-3195.
- (205) Callahan, J. F.; Ashton-Shue, D.; Bryan, H. G.; Bryan, W. M.; Heckman, G. D.; Kinter, L. B.; McDonald, J. E.; Moore, M. L.; Schmidt, D. B.; Silvestri, J. S.; Stassen, F. L.; Sulat, L.; Yim, N. C. F.; Huffman, W. F. Structure-Activity Relationships of Novel Vasopressin Antagonists Containing C-Terminal Diaminoalkanes and (Aminoalkyl)guanidines. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 391-396.
- (206) Wolfrom, M. L.; Chaney, A. Preparation of Polyvinylamine Perchlorate. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 1319-1321.
- (207) Wolfe, S.; Hasan, S. K. Five-membered rings. II. Inter and intramolecular reactions of simple amines with *N*-substituted phthalimides. Methylamine as a reagent for removal of a phthaloyl group from nitrogen. *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 3572-3579.
- (208) Blaney, P.; Grigg, R.; Rankovic, Z.; Thornton-Pett, M.; Xu, J. Fused and bridged bi- and tri-cyclic lactams via sequential metallo-azomethine ylide cycloaddition-lactamisation. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1719-1737.
- (209) Chambers, R. D.; Skinner, C. J.; Atherton, M. J.; Moilliet, J. S. Elemental fluorine. Part 4. Use of elemental fluorine for the halogenation of aromatics. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1996**, *14*, 1659-1664.
- (210) Martín-Matute, B.; Nevado, C.; Cárdenas, D. J.; Echavarren, A. M. Intramolecular Reactions of Alkynes with Furans and Electron Rich Arenes Catalyzed by PtCl₂: The Role of Platinum Carbenes as Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5757-5766.
- (211) Wenker, H. Syntheses from Ethanolamine. IV. A Synthesis of η -Chloroethyl Phthalimide. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 422.
- (212) Campbell, I. B. *Organocopper Reagents. A Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, U. K., **1995**, 217-235.

