

UCH-FC
DOC-@
L864
C.1

**DISEÑO Y SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE
PEPTIDOMIMÉTICOS CON POSIBLE APLICACIÓN A
LA TERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

Por

JOHN JAIRO LÓPEZ AREIZA

Marzo del 2003



Director de tesis:

Dr. Bruce K Cassels

Codirector:

Dr. Thomas Ruckle (Serono, Ginebra-Suiza)

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN


TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de doctorado presentada por el candidato

JOHN JAIRO LÓPEZ AREIZA

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química, en el examen de Defensa de tesis rendido el día 16, del mes de Enero del año 2003.

Director de Tesis: **Dr: Bruce K Cassels**


.....

Codirector de tesis: **Dr: Thomas Rückle**

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr: Raúl Quijada (Presidente)


.....

Dr: Fernando Castañeda

Dr: Juan Asenjo

Dr: Octavio Monasterio


.....

Dr: Manuel Cortés

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a mi amada esposa ELIZABETH y a mis dos hijos ALISON y ALEXANDER por su apoyo incondicional en esta dificil etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Tengo que agradecer a mucha gente e instituciones. Espero que si olvido a alguien me logren perdonar:

Al Instituto Milenio y a su director Dr. Ricardo Maccioni por su apoyo económico y por promover el trabajo científico multidisciplinario del cual tanto he aprendido.

A mi director de tesis y amigo Dr. Bruce K Cassels por su confianza, su paciencia y por haberme enseñado tantas cosas además de la química.

A mi codirector de tesis Dr. Thomas Rückle (Serono, Ginebra-Suiza) por compartir conmigo sus conocimientos y por mantener mis pies en tierra firme.

Al Dr. Claudio Soto por haber apoyado este proyecto y a su grupo de investigación por el desarrollo de los ensayos biológicos que aquí se presentan.

A Serono Pharmaceutical Research Institute y en especial al Dr. Serge Halazy por su apoyo y su constante interés en este proyecto.

Al grupo de investigación Química Biodinámica, mi segundo hogar, a cada uno de sus integrantes por las discusiones que me enriquecieron tanto, no solo como científico si no como persona.

INDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE DE MATERIAS	V
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 QUÉ ES LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.2 CUADRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	5
1.2.1 <i>Etapa temprana</i>	6
1.2.2 <i>Etapa intermedia</i>	7
1.2.3 <i>Etapa tardía</i>	7
1.3 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	8
1.4 LA TERAPIA DE LA ENFERMEDAD	9
1.4.1 <i>Terapias colinérgicas</i>	10
1.4.2 <i>Terapias no colinérgicas</i>	13
1.4.3 <i>Anti-inflamatorios</i>	15
1.4.4 <i>Otras áreas de investigación</i>	15
1.5 LA FORMACIÓN DE A β PODRÍA DESENCADENAR LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	16
1.6 LA CONFORMACIÓN DE A β DETERMINA LA FORMACIÓN DE AMILOIDE	22
1.7 PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS PROTEÍNAS AMILOIDES	24
1.8 LA INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN DE A β COMO UNA ESTRATEGIA EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS PARA LA TERAPIA DE LA EA	27
1.8.1 <i>Inhibidores no peptídicos</i>	28
1.8.2 <i>Inhibidores peptídicos</i>	29
1.8.3 <i>Peptidomiméticos y el desarrollo de farmacos</i>	33
1.8.4 <i>Clases de peptidomiméticos</i>	34
1.9 AZAPÉPTIDOS Y AZÁTIDOS	41
1.9.1 <i>Azapéptidos y su importancia biológica</i>	41
1.10 SÍNTESIS DE AZAPÉPTIDOS	44

1.10.1	<i>Síntesis de azapéptidos usando isocianatos</i>	45
1.10.2	<i>Síntesis de azapéptidos usando ésteres activados</i>	46
1.10.3	<i>Síntesis de azapéptidos usando azólidos</i>	48
1.10.4	<i>Síntesis de azapéptidos usando cloruros de acilo</i>	49
1.11	ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS AZAPÉPTIDOS	50
1.12	AZÁTIDOS	51
1.13	SÍNTESIS DE AZÁTIDOS	52
1.14	SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA	56
1.14.1	<i>Tipos de soportes utilizados en síntesis en fase sólida</i>	59
1.14.2	<i>Los conectores ("Linkers")</i>	62
1.15	OBJETIVO GENERAL.....	66
1.16	OBJETIVOS ESPECIFICOS	66
1.17	HIPÓTESIS DE TRABAJO	67
2	MATERIALES Y MÉTODOS	68
2.1	LA SÍNTESIS DE LOS MONÓMEROS.....	68
2.1.1	<i>Obtención de hidrazonas protegidas</i>	69
2.1.2	<i>Reducción de hidrazonas</i>	73
2.1.3	<i>Síntesis del intermediario 16</i>	76
2.1.4	<i>Esquema general para la síntesis del intermediario 19</i>	80
2.1.5	<i>Síntesis del intermediario 21</i>	84
2.2	PROCEDIMIENTOS GENERALES:	86
2.2.1	<i>Lavado de la resina:</i>	87
2.2.2	<i>Remoción de grupos protectores</i>	87
2.3	ESQUEMA GENERAL DE LA SÍNTESIS DE AC-L-P ^A F-F-D-NH ₂	89
2.3.1	<i>Síntesis del intermediario 22</i>	91
2.3.2	<i>Síntesis del intermediario 23</i>	92
2.3.3	<i>Síntesis del intermediario 24</i>	92
2.3.4	<i>Síntesis del intermediario 25</i>	93
2.3.5	<i>Síntesis del intermediario 26</i>	93
2.3.6	<i>Síntesis del intermediario 27</i>	94
2.3.7	<i>Síntesis del intermediario 28</i>	95
2.3.8	<i>Síntesis del intermediario 29</i>	96
2.3.9	<i>Síntesis del intermediario 30</i>	97
2.3.10	<i>Síntesis del intermediario 31</i>	98
2.3.11	<i>Síntesis del intermediario 32</i>	98
2.3.12	<i>Síntesis del intermediario 33</i>	99
2.4	ESQUEMA GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE AC-L-P-F ^A -F-D-NH ₂	100
2.4.1	<i>Síntesis del intermediario 34</i>	101
2.4.2	<i>Síntesis del intermediario 35</i>	102
2.4.3	<i>Síntesis del intermediario 36</i>	102
2.4.4	<i>Síntesis del intermediario 37</i>	103
2.4.5	<i>Síntesis del intermediario 38</i>	104
2.4.6	<i>Síntesis del intermediario 39</i>	105
2.4.7	<i>Síntesis del intermediario 40</i>	106

2.4.8	<i>Síntesis del intermediario 41</i>	106
2.4.9	<i>Síntesis del intermediario 42</i>	107
2.4.10	<i>Síntesis del intermediario 43</i>	108
2.4.11	<i>Síntesis del intermediario 44</i>	108
2.4.12	<i>Síntesis del intermediario 45</i>	109
2.4.13	<i>Síntesis del intermediario 46</i>	110
2.5	ESQUEMA GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE AC-L-P ^A -F ^A -F-D-NH ₂	111
2.5.1	<i>Síntesis del intermediario 47</i>	112
2.5.2	<i>Síntesis del intermediario 48</i>	113
2.5.3	<i>Síntesis del intermediario 49</i>	113
2.5.4	<i>Síntesis del intermediario 50</i>	114
2.5.5	<i>Síntesis del intermediario 51</i>	114
2.5.6	<i>Síntesis del intermediario 52</i>	115
2.5.7	<i>Síntesis del intermediario 53</i>	116
2.6	EVALUACION DE LA ESTABILIDAD FRENTE A PROTEASAS.....	116
2.7	DETERMINACIÓN DEL PODER INHIBITORIO DE AGREGACIÓN DE A β	117
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	118
3.1	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AZAAMINOÁCIDOS.....	118
3.2	REACCIONES MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE DIAZÁTIDOS.....	119
3.3	SÍNTESIS DE LAS MOLÉCULAS PROPUESTAS.....	124
3.4	SON LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE AGREGACION DE A β ...?.....	127
3.5	ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS FRENTE A PROTEASAS.....	128
4	CONCLUSIONES	136
5	PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS	138
6	PROYECCIONES A FUTURO DE ESTA TESIS	139
7	ÍNDICE	141
8	BIBLIOGRAFÍA	142

LISTA DE TABLAS

Tabla: 1 Hidrazonas obtenidas, P (#) = Producto número; Pf = Punto de fusión; Rend. = Rendimiento de la reacción; aaa = azaaminoácido.....	70
Tabla: 2 Reducción de las hidrazonas.....	73
Tabla: 3 Diferentes condiciones de reacción evaluadas para la síntesis de diazátidos usando componentes presintetizados.....	120
Tabla: 4 Condiciones evaluadas para la síntesis de un diazátido usando condiciones "one pot"; A = Trifosgeno; B = Bispentafluorofenilcarbonato, C = Carbonildimidazol.....	123
Tabla: 5 Actividad inhibitoria de agregación A β de los compuestos sintetizados.....	128
Tabla: 6 Concentración remanente (μ M) de los compuestos en función del tiempo frente a dos sistemas proteicos (homogeneizado de cerebro de rata y plasma sanguíneo).	129
Tabla: 7 Parámetros del modelo lineal de los datos de estabilidad de los compuestos frente a proteasas	129

LISTA DE FIGURAS

Figura: 1 Estimación del número de personas con demencia para los años 2000-2025. ...4	4
Figura: 2 Zopiclona, Zolpidem, Temazepam.9	9
Figura: 3 Galantamina, Tacrina, Fisostigmina, Rivastigmina y Donepezilo.11	11
Figura: 4 (i) Cevimelina (ii) Talsaclidina.....12	12
Figura: 5 Venlafaxina, Fluoxetina, Sertralina, Citalopram y Paroxetina.13	13
Figura: 6 Trazodona14	14
Figura: 7: Propentofilina14	14
Figura: 8 Vitamina E (α -Tocoferol).....16	16
Figura: 9: Representación esquemática de la PPA mostrando la localización del β A....19	19
Figura: 10 Representación estructural del pentapéptido LVFFA.....20	20
Figura: 11 Etiología de la amiloidosis cerebral y posibles niveles de intervención en el desarrollo de estrategias terapéuticas22	22
Figura: 12 Secuencia primaria del péptido beta amiloide (1-43).....26	26
Figura: 13 Inhibidores de agregación de $A\beta$ no peptídicos29	29
Figura: 14 Representación estructural de la secuencia peptídica Ac-QKLVFF-NH ₂31	31
Figura: 15 (I) Secuencia 17-21 del β A y (II) Secuencia del inhibidor de agregación $i\beta A_5$32	32
Figura: 16 Obtención de peptidomiméticos por modificación de la cadena lateral: 1) uso de aa no naturales; 2) sustitución de L aa por D-aa.....35	35
Figura: 17 Obtención de peptidomiméticos por medio de modificaciones del esqueleto amídico originados por intercambio individual de grupos funcionales o átomos.36	36
Figura: 18 Obtención de peptidomiméticos a través de modificaciones del esqueleto amídico.37	37
Figura: 19 Sulfomicina, un antibiótico natural.....38	38
Figura: 20 Leu-encefalina y uno de sus análogos retro-inverso, un caso exitoso del uso de peptidomiméticos.....39	39
Figura: 21 Estructura representativa de un peptoide comparado con un péptido normal.40	40
Figura: 22 Azavalina-3-angiotensina II bovina, primer azaanálogo de un producto natural.42	42
Figura: 23 (Aza-G9)-oxitocina: la introducción de nitrógeno en el lugar del C- α de la glicina 9 produjo un compuesto con 1.5 veces la actividad producto natural.42	42
Figura: 24 Aza-análogo de la eleidosina.....43	43
Figura: 25 Rutas para la síntesis de azapéptidos.44	44
Figura: 26 Uso de isocianatos en la obtención de azapéptidos: a) Con alquilhidracinas; b) Con alquilhidracidas.....45	45
Figura: 27 Síntesis de azapéptidos usando ya sea activación sobre lado N- o C-terminal.47	47
Figura: 28 Síntesis de azapéptidos usando azólidos.....48	48

Figura: 29 Síntesis de un inhibidor de renina aza-modificado por medio del método del cloruro de acilo.	49
Figura: 30 Esquema de un péptido, un azapéptido y un azátido	52
Figura: 31 Síntesis soportada en fase líquida de un azátido.....	54
Figura: 32 Síntesis de azaaminoácidos protegidos y activados para la obtención de un azátido según ref 99.	55
Figura: 33 (i) Leucina-encefalina; (ii) Version azátida de (i).	56
Figura: 34 Representación esquemática de los elementos involucrados en una síntesis en fase sólida	58
Figura: 35 Representación estructural de la resina de Merrifield mostrando una porción del copolímero poliestireno/DVB.....	60
Figura: 36 Resina de Merrifield o clorometil.....	61
Figura: 37 Resina hidroximetil.....	61
Figura: 38 Resina amino metil.	62
Figura: 39 Algunas resinas sensibles a condiciones ácidas.....	63
Figura: 40 1) Conector clorotritilo; 2) Conector fenilfluorenilo	65
Figura: 41 Síntesis de monómeros activados.	68
Figura: 42 Obtención de las hidrazonas	69
Figura: 43 Reducción de las hidrazonas.....	73
Figura: 44 Sistema de numeración del compuesto 13.....	75
Figura: 45 Esquema general para la síntesis de 16.....	76
Figura: 46 Síntesis del intermediario 14	77
Figura: 47 Síntesis del intermediario 15	78
Figura: 48 Síntesis del intermediario 16	79
Figura: 49 Esquema general para síntesis del intermediario 19.....	80
Figura: 50 Síntesis del intermediario 17	81
Figura: 51 Síntesis del intermediario 18	82
Figura: 52 Síntesis del intermediario 19.	83
Figura: 53 Esquema general para la síntesis del intermediario 21.....	84
Figura: 54 Síntesis del intermediario 20	84
Figura: 55 Síntesis del intermediario 21	85
Figura: 56 Esquema general para la síntesis de Ac-L-P ^A -F-F-D-NH ₂	89
Figura: 57 Resina Rink amida.....	90
Figura: 58 Síntesis del intermediario 22	91
Figura: 59 Síntesis del intermediario 23	92
Figura: 60 Síntesis del intermediario 24	92
Figura: 61 Síntesis del intermediario 25	93
Figura: 62 Síntesis del intermediario 26	93
Figura: 63 Síntesis del intermediario 27	94
Figura: 64 Síntesis del intermediario 28	95
Figura: 65 Síntesis del intermediario 29	96
Figura: 66 Síntesis del intermediario 30	97
Figura: 67 Síntesis del intermediario 31	98
Figura: 68 Síntesis del intermediario 32	98

Figura: 69 Síntesis del intermediario 33	99
Figura: 70 Esquema general para la síntesis de Ac-L-P-F ^A -F-D-NH ₂	100
Figura: 71 Síntesis del intermediario 34	101
Figura: 72 Síntesis del intermediario 35	102
Figura: 73 Síntesis del intermediario 36.....	102
Figura: 74 Síntesis del intermediario 37	103
Figura: 75 Síntesis del intermediario 38	104
Figura: 76 Síntesis del intermediario 39	105
Figura: 77 Síntesis del intermediario 40	106
Figura: 78 Síntesis del intermediario 41	106
Figura: 79 Síntesis del intermediario 42	107
Figura: 80 Síntesis del intermediario 43	108
Figura: 81 Síntesis del intermediario 44	108
Figura: 82 Síntesis del intermediario 45	109
Figura: 83 Síntesis del intermediario 46	110
Figura: 84 Esquema sintético general para la síntesis de Ac-L-P ^A -F ^A -F-D-NH ₂	111
Figura: 85 Síntesis del intermediario 47	112
Figura: 86 Síntesis del intermediario 48	113
Figura: 87 Síntesis del intermediario 49	113
Figura: 88 Síntesis del intermediario 50	114
Figura: 89 Síntesis del intermediario 51	114
Figura: 90 Síntesis del intermediario 52	115
Figura: 91 Síntesis del intermediario 53	116
Figura: 92 Síntesis de 20 por una vía “rápida”.....	119
Figura: 93 Reacción modelo para el acoplamiento de diazátidos usando componentes presintetizados.	120
Figura: 94 Cromatograma (HPLC) de la mezcla cruda de la mejor reacción (Rend = 0.2 %) de síntesis de diazátidos usando componentes presintetizados.....	121
Figura: 95 Según la literatura la imposibilidad de formar el isocianato intermediario (iii) explicaría el fracaso en la obtención de diazátidos usando componentes del tipo (ii)	122
Figura: 96 Síntesis de un diazátido usando condiciones “one pot”.....	123
Figura: 97 Cromatograma (HPLC) de la mezcla cruda de la mejor reacción de síntesis de diazátidos usando condiciones “one pot”	124
Figura: 98 El compuesto patrón y sus miméticos.	125
Figura: 99 Estabilidad en homogeneizado de cerebro de rata.....	130
Figura: 100 Estabilidad en plasma sanguíneo	130
Figura: 101 Tiempo de vida media de los compuestos	132
Figura: 102 Acción de una proteasa de serina sobre un azapéptido.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS

A = Alanina

A β = Péptido beta-amiloide

aa = Aminoácido(s)

aaa = Azaaminoácido

Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂: Secuencia aminocídica Ac-Leucina-azaProlina-azaFenilalanina-Fenilalanina-Ácido aspártico-NH₂

Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂: Secuencia aminocídica Ac-Leucina-azaProlina-Fenilalanina-Fenilalanina-Ácido aspártico-NH₂

Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂: Secuencia aminoacídica Ac-Leucina-Prolina-azaFenilalanina-Fenilalanina-Ácido aspártico-NH₂

AcOH: Ácido acético

Ac-QKLVFF-NH₂: Secuencia aminoacídica Ac-Glutamina-Lisina-Leucina-Valina-Fenilalanina-Fenilalanina-NH₂

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AG: Argogel

Alloc: Aliloxicarbonil

βA^{10-42} : Fragmento de la secuencia peptídica del péptido beta-amiloide que comprende los aminoácidos 10 a 42

βA^{10-43} : Fragmento de la secuencia peptídica del péptido beta-amiloide que comprende los aminoácidos 10 a 43

βA^{1-42} : Una de las formas encontradas del péptido beta-amiloide que consta de 42 aminoácidos

βA^{1-43} : Una de las formas encontradas del péptido beta-amiloide que consta de 43 aminoácidos

Boc; boc: *t*-Butiloxicarbonil

BzBr: Bromuro de bencilo

C_6H_{12} : Ciclohexano

CC: Cromatografía de Columna

CDI: Carbonildiimidazol

CH_2Cl_2 = DCM = Diclorometano

^{13}C NMR: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

DIEA = DIPEA = Diisopropiletilamina

Dimap: Dimetilaminopiridina

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DVB: Divinilbenceno

EA: Enfermedad de Alzheimer

EtOH: Etanol

F: Fenilalanina

FDA: Food and Drug Administration

Fmoc: 9-Fluoreniloxicarbonil

HATU: 2-(1*H*-Benzotrazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato

¹HNMR: Resonancia Magnética Nuclear de protones

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

HPLC-PREP: Cromatografía de líquidos preparativa de alta eficiencia

iβA₅: Pentapéptido inhibidor de la agregación del péptido beta amiloide

L: Leucina

LC-MS: Cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas

MeOH: Metanol

MTT: Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2*H*-tetrazolio

NGF: Factor de crecimiento neural

Nitro-Z: 4-nitro-benciloxycarbonil

NMP: 1-metil-2-pirrolidinona

NP: Nitrofenilo

Nuc = nu = nucleófilo

PBS: Buffer de fosfato salino a pH 7.4

Pd/C: Paladio soportado sobre carbón activado al 10 %

PEG: Polietilenglicol

PEGA (Polietilenglicol/dimetilacrilamida)

PIP: Piperidina

Pol: Polímero. Para este caso se trata de la matriz inerte del soporte el cual consiste del copolímero de poliestireno entrecruzado con paradivinilbenceno al 1.5 %

PPA: Proteína precursora de amiloide

PRI: Péptidos retroinverso

Rend: Rendimiento

sA β : Péptido beta-amiloide soluble

SD: Síndrome de Down

T.A: Temperatura ambiente

Tcp: Triclorofenil

TEA: Trietilamina

TFA: Ácido trifluoroacético

TFMSA: Acido trifluormetanosulfonico

TG: Tentagel

THF: Tetrahidrofurano

TLC: Cromatografía en capa fina

TMSOTf: Trimetilsililtriflato

TRIPHOSG: Trifosgeno

V: Valina

Z: Benciloxycarbonil

ZCl: Cloroformiato de bencilo

RESUMEN

En este trabajo de tesis se abordó el problema del diseño y síntesis en fase sólida peptidomiméticos con posible aplicación a la terapia de la enfermedad de Alzheimer.

Se escogieron los azapeptidos y como candidatos para ser los miméticos del pentapeptido Ac-L-P-F-F-D-NH₂, el cual se ha reportado con buena actividad biológica como inhibidor de agregación del péptido beta amiloide (A β),

Teniendo en cuenta los dos principales puntos de ruptura como lo indicaron ensayos de hidrólisis enzimática del compuesto de referencia (Ac-L-P-F-F-D-NH₂), se propuso la síntesis de las siguientes moléculas Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂, Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂ y Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂ (El superíndice "A" sobre el símbolo de un aminoácido indica que se trata de un azaaminoácido).

La síntesis de las moléculas propuestas requirió del desarrollo de una nueva metodología sintética la cual fue patentada y el autor del presente trabajo es el inventor principal. Esta nueva metodología permite reemplazar ya sea parcial o totalmente átomos de carbono- α del esqueleto carbonado por átomos de nitrógeno, para obtener azapeptidos o azátidos respectivamente. Los ensayos biológicos *in vitro* mostraron que los compuestos eran activos como inhibidores de agregación de A β y que sus estabildades frente a hidrólisis enzimática (En plasma sanguíneo y en homogenizado de cerebro de rata) había aumentado notoriamente.

SUMMARY

In this thesis the problem of design and solid-phase synthesis of peptidomimetics with possible application to the treatment of Alzheimer's disease was tackled

Aza-peptides were chosen as candidates to mimic the pentapeptide Ac-L-P-F-F-D-NH₂, since the latter has been reported as good beta amiloid (A β) peptide aggregation inhibitor.

Taking into account the main points of cleavage as indicated by the products of enzymatic degradation of the reference compound, the following molecules were proposed: Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂, Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂ and Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂ (the superscript "A" on an aminoacid symbol means that this is an azaaminoacid).

The synthesis of the proposed molecules required the development of a new synthetic methodology which was patented and of which the author is the main inventor. This new methodology allows the α -carbon atoms in the backbone of a peptide to be replaced by nitrogen atoms either partially or totally in order to get aza-peptides or azatides respectively. The *in vitro* biological assays showed that the compounds were active as A β aggregation inhibitors and their stabilities against enzymatic hydrolysis (in blood plasma and in rat brain homogenate) were strongly increased.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 QUÉ ES LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden progresivo del cerebro que causa la pérdida de memoria y cambios en el comportamiento y la personalidad. Esta enfermedad es la causa más común de demencia en el adulto mayor, estimándose que el 10% de la población mundial que sobrepasa los 65 años padece demencia senil ocasionada por la misma.^{1,2} Esta cifra se incrementa paulatinamente con la edad, alcanzando un valor cercano al 50% para la población mundial mayor de 85 años.

En la Figura: 1 se puede observar que en tan sólo 25 años, 34 millones de personas padecerán demencia. Esta cifra gana importancia cuando se coloca dentro del contexto del incremento de la expectativa de vida y del envejecimiento debido principalmente a al mejoramiento de la nutrición infantil y la curación de enfermedades infecciosas de la población en los países en desarrollo. Hoy en día el 66% de las personas con demencia viven en los países en desarrollo pero para el 2025 este porcentaje se incrementará al 75%. Más de la mitad de estas personas padecen la EA.

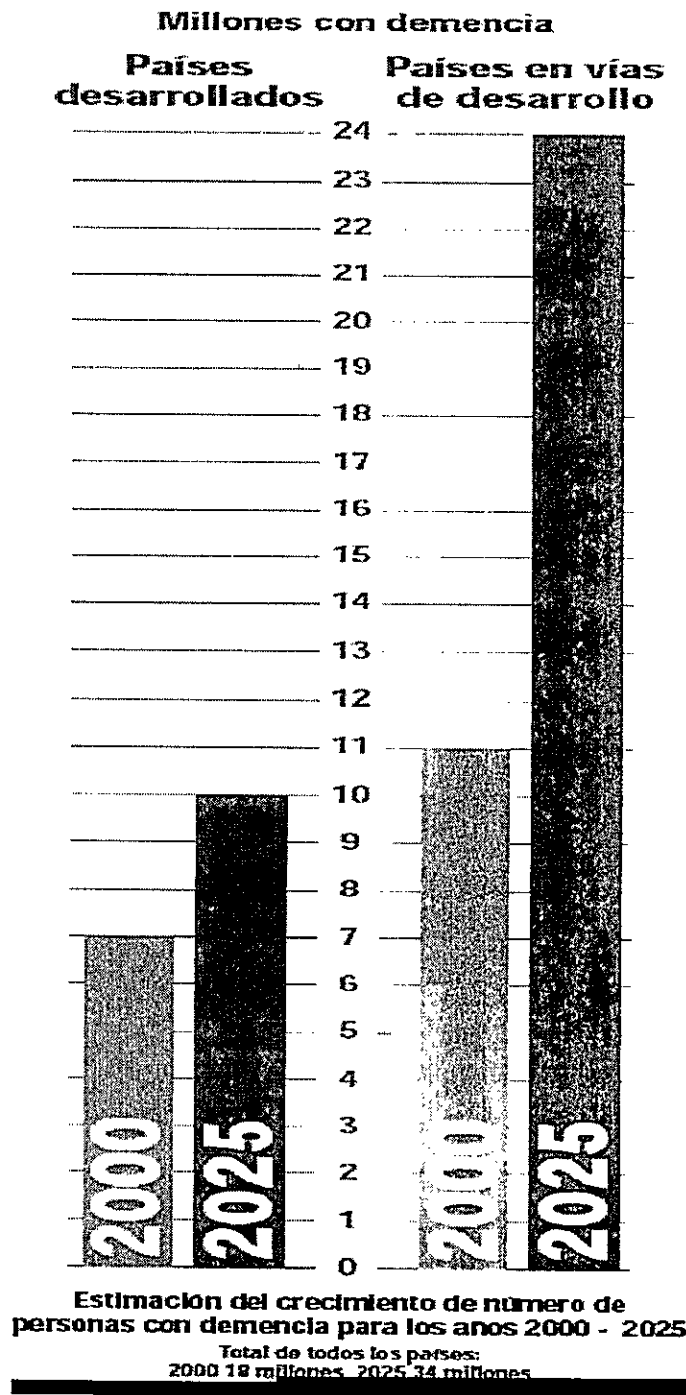


Figura: 1 Estimación del número de personas con demencia para los años 2000-2025³.

Alois Alzheimer⁴ fue el primero en observar cambios neuronales en los pacientes con la afección que posteriormente recibió su nombre. El rasgo más importante que encontró fue la muerte neuronal en regiones específicas del cerebro acompañada de la presencia de depósitos anormales de naturaleza proteica tanto intra como extracelularmente. La EA se presenta preferentemente (90%) en la forma conocida como esporádica, vale decir que los pacientes no tienen antecedentes familiares de la enfermedad y al parecer no hay una modificación del material genético que sea responsable de su manifestación. Por su parte, la forma hereditaria se presenta aproximadamente en un 10% de los casos, se manifiesta a edades más tempranas que la EA esporádica y los síntomas clínicos son más severos. La edad es el factor de riesgo más importante para desarrollar la EA.

1.2 CUADRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Una característica patológica de la EA es la pérdida progresiva de la función cognitiva que aparece tanto esporádicamente como heredada genéticamente. Esta se manifiesta inicialmente como una pérdida progresiva de la memoria de corto alcance, vale decir las personas olvidan cosas que han vivido recientemente. Por otra parte la personalidad y el carácter tienden a modificarse, los pacientes suelen ponerse irritables presentando una gran agitación, tendiendo a discutir y cuestionar todo y descuidando su apariencia externa. A medida que la enfermedad avanza, los pacientes presentan problemas a nivel de la memoria de larga duración y el pensamiento abstracto. En las etapas más avanzadas de la enfermedad los pacientes se vuelven confusos y pierden su orientación

en el tiempo y el espacio, perdiendo noción de la fecha en que se encuentran y el lugar donde viven, así como el reconocimiento de familiares, etc. Las personas dejan de conversar, presentan cambios frecuentes en su estado anímico, sufren de incontinencia urinaria y fecal y en casos extremos se vuelven incapaces de cuidarse por si mismas, terminando en la postración extrema. Más exactamente el cuadro clínico de la EA se puede dividir en las tres etapas que a continuación se describen.

1.2.1 ETAPA TEMPRANA

Esta primera etapa muchas veces es catalogada de forma incorrecta por profesionales, familiares y amigos como vejez o como un rasgo normal del proceso de envejecimiento. Por ser una enfermedad gradual es difícil de precisar el momento exacto de su comienzo. La persona puede:

Tener dificultades con el lenguaje

Tener pérdida de memoria significativa, especialmente reciente

Estar desorientada en el tiempo

Perderse en lugares conocidos

Tener dificultad en tomar decisiones

Carecer de iniciativa y motivación

Manifestar señales de depresión y agresión

Dormir mal o con el ciclo del sueño cambiado

Perder el interés por ciertas actividades y entretenimientos

1.2.2 ETAPA INTERMEDIA

A medida que avanza la enfermedad los problemas se van haciendo más evidentes y restrictivos.

La persona tiene dificultad en la vida cotidiana y puede tornarse muy olvidadiza especialmente acerca de episodios recientes y nombres de personas

Es incapaz de vivir sola sin problemas

No puede cocinar, limpiar o salir de compras

Puede tornarse extremadamente dependiente

Necesita ayuda para su higiene personal, ir al baño, lavarse y vestirse

Tiene una acentuada dificultad con el habla, comienza a deambular y muestra otros comportamientos anormales

Se pierde en la casa y en el barrio

Puede tener alucinaciones

1.2.3 ETAPA TARDÍA

Esta etapa es de total dependencia e inactividad, los problemas de memoria son muy serios y se hace más notable el deterioro físico. La persona puede:

Tener dificultades al comer

No reconocer a familiares, amigos y objetos conocidos

Tener dificultad en entender e interpretar situaciones

Perdersse dentro de su propia casa

Tener dificultades al caminar

Tener incontinencia urinaria y fecal

Comportarse de forma inapropiada en público

Permanecer en silla de ruedas o postrada en cama

1.3 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Es de suma importancia realizar un diagnóstico precoz. Hay muchos síntomas que pueden confundirse con un cuadro demencial, sin llegar a serlo. Sólo con un estudio exhaustivo, minucioso e interdisciplinario, se puede arribar al diagnóstico probable de EA. También es fundamental realizar un buen interrogatorio al familiar más cercano, juntamente con estudios de laboratorio, examen físico y neurológico completos, tests neuropsicológicos, electroencefalogramas e imágenes (tomografías por Resonancia Magnética Nuclear, mapeo cerebral), etc.

El diagnóstico de la EA se realiza habitualmente evaluando el cuadro clínico y descartando otras causas de demencia. De esta forma se tiene un 80 a 90% de probabilidad de efectuar un diagnóstico adecuado, el cual sólo se confirma mediante el estudio neuropatológico del cerebro una vez que el paciente ha fallecido. Una manera en que se podría tener certeza de un diagnóstico en vida podría ser a través de la biopsia cerebral, procedimiento que, en general, no se realiza, por los riesgos que involucra. En los últimos años se ha intentado contribuir al diagnóstico mediante el uso de diversas técnicas que permiten obtener imágenes del cerebro y también a través de la identificación de marcadores bioquímicos (es decir sustancias que se encuentren

alteradas en sus niveles en los pacientes) en líquidos biológicos como el plasma o el líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, hasta ahora estos métodos solo ayudan en parte a descartar otras causas de demencia y el diagnóstico se basa fundamentalmente en la evaluación clínica.

1.4 LA TERAPIA DE LA ENFERMEDAD

Uno de los síntomas a tratar en la etapa temprana de la enfermedad es la dificultad para conciliar el sueño, para lo cual se recurre el uso de hipnóticos. Cuando hay demencia, las pastillas para dormir se usan principalmente cuando la persona ha tomado el hábito de ir a dormir en horarios inusuales, o tiene el “sueño cambiado” (está levantada durante la noche y duerme durante el día). La mayoría de los hipnóticos actúan a corto plazo y son buenos para inducir el sueño, pero no necesariamente mantendrán al individuo dormido durante toda la noche. Entre las drogas mas comúnmente empleadas figuran: Zopiclona (Zimovane, Imovane), Zolpidem (Stillnoct, Nocte), Temazepam (Restoril) ver Figura: 2

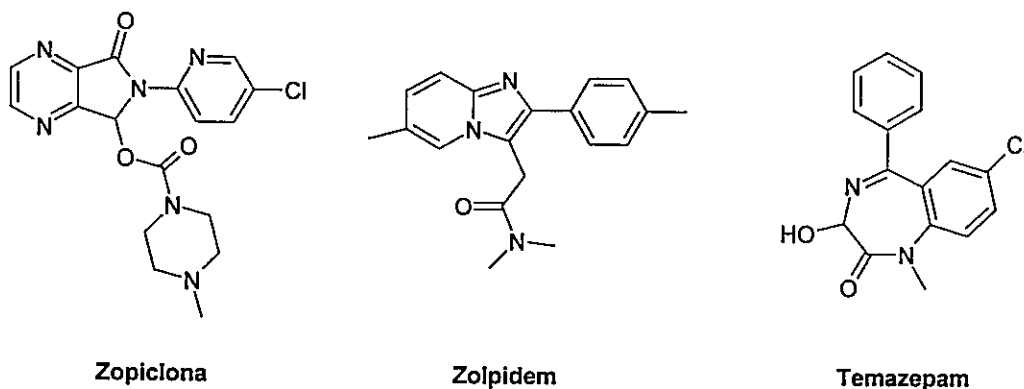


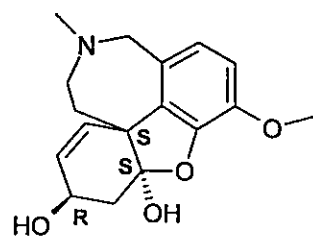
Figura: 2 Zopiclona, Zolpidem, Temazepam.

Otros compuestos pueden retardar el progreso de la enfermedad en algunos casos. La investigación continúa identificando tratamientos que pueden demorar la aparición de los síntomas de la EA y se busca activamente medicamentos que puedan aliviar la patología subyacente. Las estrategias terapéuticas pueden ser clasificadas en los siguientes tipos:

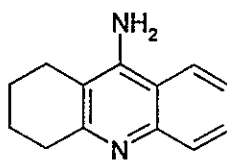
1.4.1 TERAPIAS COLINÉRGICAS

Un problema central en la EA es el deterioro del sistema colinérgico central⁵. Los mejoradores de la función colinérgica: galantamina, tacrina, fisostigmina, rivastigmina, y donepezilo (ver Figura: 3) basan su efecto terapéutico en la inhibición de la acetilcolinesterasa, a excepción de la galantamina la cual presenta un efecto dual no solo como inhibidor de la acetilcolinesterasa sino también como modulador sináptico (pre y post) en receptores nicotínicos^{6,7}. Esta particularidad de la galantamina que es uno de los pocos medicamentos aprobados por la FDA en el tratamiento de la EA podría abrir la puerta al estudio de otros sistemas (glutamatérgico, serotoninérgico por ejemplo) como base para el desarrollo de nuevos fármacos.

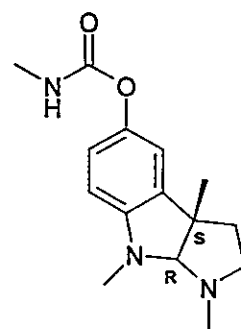
La galantamina, la fisostigmina, la rivastigmina y el donepezilo son los medicamentos más utilizados pues producen una mejora, aunque leve y transitoria, en la pérdida de memoria y en el tratamiento de la demencia. Sin embargo, ninguna de estas drogas constituye un éxito rotundo en la terapia de la EA⁸ debido a que no afectan de manera importante la patogénesis y patofisiología de la enfermedad que aún están en discusión⁹.



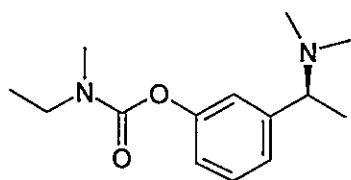
Galantamina



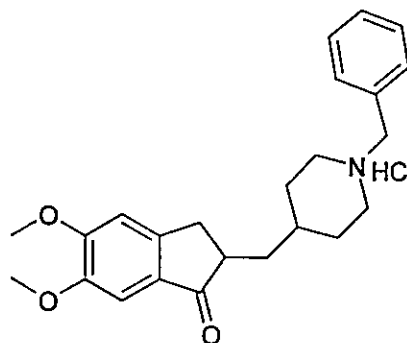
Tacrina



Fisostigmina



Rivastigmina



Donepezilo

Figura: 3 Galantamina, Tacrina, Fisostigmina, Rivastigmina y Donepezilo.

La acción de estas drogas está dirigida a estimular las neuronas colinérgicas que todavía sobreviven en el cerebro, manteniendo durante más tiempo la acetilcolina liberada en las sinapsis al inhibir su degradación. Los ensayos clínicos^{10,11,12} han demostrado que esto mejora o estabiliza la función cognitiva y el funcionamiento general en las actividades de la vida diaria en algunas personas. Hay tres síntomas de comportamiento bien documentados que pueden ser tratados positivamente con estos fármacos, a saber: la apatía¹³, la agitación¹⁴ y los síntomas psicóticos¹⁵ (especialmente alucinaciones visuales). Esta respuesta sólo dura mientras aún quedan suficientes neuronas viables

que siguen produciendo acetilcolina, de modo que a medida que la enfermedad progresa, estos medicamentos pierden su efectividad. Varios inhibidores de acetilcolinesterasa han demostrado ser fáciles de tomar, generalmente en una o dos dosis diarias y son seguras en tratamientos prolongados. Los efectos colaterales son relativamente pocos (algunas náuseas y síntomas gastrointestinales).

Otra estrategia que se ha considerado es el uso de agonistas muscarínicos que han mostrado que pueden aumentar el clearance de A β de fluidos cerebrospinales. Por ejemplo la Cevimelina¹⁶, un fármaco utilizado en el tratamiento de la xerostomía (sequedad de la boca) asociada a la enfermedad de Sjögren o la Talsaclidina¹⁷. Desafortunadamente la talsaclidina no pasó de la fase II en los ensayos clínicos, pero constituye un éxito en el sentido que abrió la puerta al desarrollo de fármacos para la terapia de la enfermedad de Alzheimer con mecanismos de acción diferentes tales como la neurotransmisión glutamatérgica y serotoninérgica (ver Figura: 4).

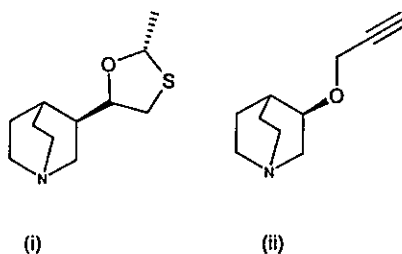


Figura: 4 (i) Cevimelina (ii) Talsaclidina

1.4.2 TERAPIAS NO COLINÉRGICAS

Se han estudiado otros sistemas del cerebro, entre ellos el serotoninérgico¹⁸, que están estrechamente relacionados con la depresión ya sea en una persona con EA o sin ella. Los antidepresivos más empleados en la actualidad son los ISRSs (Inhibidores Selectivos de Recaptación de Serotonina), tales como Venlafaxina (Efexor), Fluoxetina (Prozac), Fluvoxamina (Luvox), Sertralina (Lustral, Zoloft), Citalopram (Cipramil) y Paroxetina (Paxil, Seroxat) (ver Figura: 5) También se han realizado investigaciones interviniendo en los sistemas dopaminérgico¹⁹ y noradrenérgico²⁰, pero los resultados en lo que respecta al tratamiento de la demencia no han sido satisfactorios.

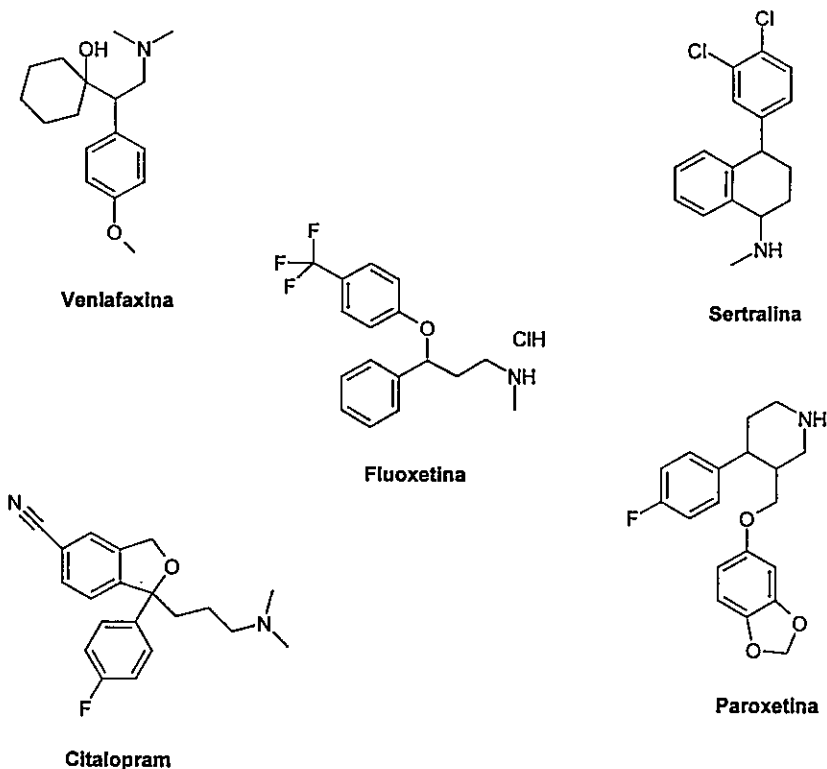


Figura: 5 Venlafaxina, Fluoxetina, Sertralina, Citalopram y Paroxetina.

Por supuesto estos sistemas están implicados en la depresión, con o sin demencia. También hay evidencia que sugiere que la agresión en la demencia puede responder a un tratamiento con ISRSs.

El antidepresivo Trazodona²¹ (ver Figura: 6) es utilizado frecuentemente como tranquilizante en las personas que sufren de demencia.

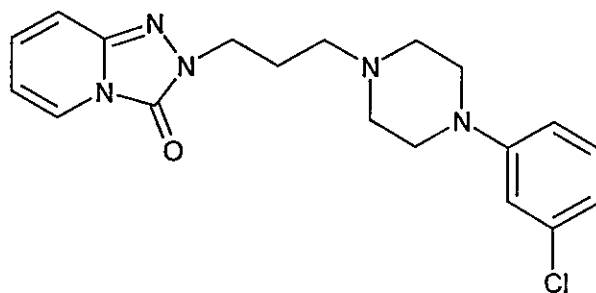


Figura: 6 Trazodona

La propentofilina (ver Figura: 7), un vasodilatador cerebral utilizado en el tratamiento del asma y los dolores de cabeza, tiene una acción diferente siendo particularmente significativo su efecto sobre las células gliales²². Generalmente se considera que estas células son parte del sistema de soporte de las neuronas en el cerebro, pero también poseen otras importantes funciones y, al ser activadas, pueden liberar sustancias tóxicas. La propentofilina inhibe su activación, disminuye su participación en la destrucción de las neuronas y se piensa que puede retardar el progreso de la enfermedad.

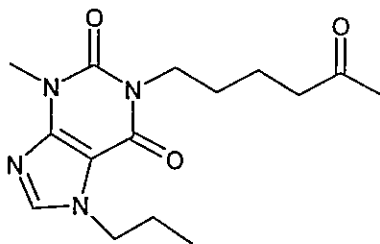


Figura: 7: Propentofilina

1.4.3 ANTI-INFLAMATORIOS

Las personas que padecen artritis y las mujeres que reciben tratamientos de reemplazo hormonal post-menopáusico presentan incidencia reducida de la EA. Esto parece deberse a una modificación en el proceso inflamatorio, que participaría en la destrucción neuronal en la EA²³. Como consecuencia de estas observaciones se está considerando el uso de antiinflamatorios y estrógenos como posibles tratamientos y también como preventivos de la EA. Hasta el momento no existen suficientes resultados como para recomendarlos como terapia. Además ambas clases de drogas tienen efectos colaterales si su uso es prolongado y éstos exceden los beneficios comprobados.

1.4.4 OTRAS ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Un área de interés que cada vez gana más atención es el estrés oxidativo²⁴ inducido por la acumulación de metales de transición (especialmente hierro) en el cerebro. Esto se relaciona con la neurodegeneración causada por la producción de radicales libres en cantidades que superan la capacidad de defensa de las células. El conocimiento de estos procesos está conduciendo hacia nuevos tratamientos y drogas que interrumpirían los mecanismos dañinos que ocurren en el cerebro.

La vitamina E (ver Figura: 8) es un ejemplo de compuestos que parecen proteger el cerebro del daño causado por los radicales libres.

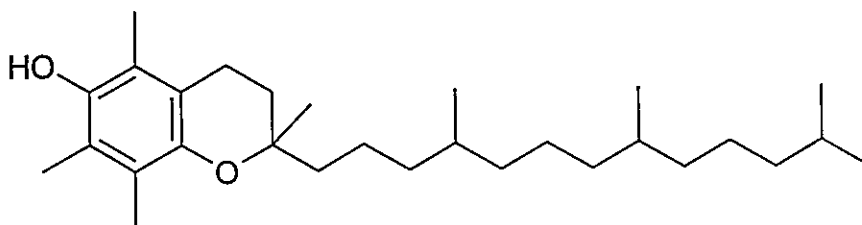


Figura: 8 Vitamina E (α -Tocoferol)

El factor de crecimiento neural (NGF) promueve el desarrollo de neuronas colinérgicas²⁵, pero lamentablemente, debido a su naturaleza peptídica y elevado peso molecular (118 aa, 13.26 KDa), tiene todos los inconvenientes asociados a péptidos en lo que respecta a baja biodisponibilidad, pobre permeabilidad frente a membranas biológicas, pobre estabilidad frente a proteasas etc .

1.5 LA FORMACIÓN DE A β PODRÍA DESENCADENAR LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Como se mencionó antes, los depósitos anormales encontrados en el cerebro de los pacientes que padecen la enfermedad son de naturaleza proteica y se encuentran tanto intra- como extracelularmente. Los depósitos intracelulares son agregados de filamentos rectos y helicoidales compuestos principalmente de una forma hiperfosforilada de la proteína de citoesqueleto conocida como Tau que posteriormente se agregan formando los llamados ovillos neurofibrilares²⁶.

Extracelularmente estos depósitos son agregados amorfos insolubles constituidos de fragmentos proteináceos conocidos como Amiloide beta (A β). El término amiloide (“semejante al almidón”) fue acuñado por Virchow en el siglo XIX para describir depósitos amorfos que invaden los espacios extracelulares de un tejido. Esta definición luego se amplió para cubrir las propiedades de tinción del amiloide, que incluyen su habilidad de presentar una birrefringencia verde brillante después de ser teñido con Rojo Congo y su afinidad por el fluorocromo Tioflavina T. Ambas propiedades de tinción están en correlación con la hipótesis de Glenner²⁷ de que las unidades de proteínas que contienen varios tipos de filamentos de amiloide comparten una cantidad sustancial de conformación de hoja plegada- β .

A β aparece en la forma de placas seniles o placas neuríticas y depósitos amiloides cerebrovasculares²⁸. En la EA, la presencia y frecuencia de las placas neuríticas se correlacionan bien con la gravedad de la incapacidad cognitiva, la pérdida de células neuronales y la falta de neurotransmisores que la caracterizan^{2,28}. La pérdida de memoria y la incapacidad cognitiva han sido relacionadas con la muerte neuronal y con la destrucción de las sinapsis²⁹, aunque por mucho tiempo los científicos se han dedicado al desarrollo de estrategias ya sea para prevenir la formación de placas o redissolverlas. También existen evidencias recientes que apoyan la idea de la formación de placas como un mecanismo de defensa contra el A β fibrilar³⁰. Si estas ideas prosperasen podrían dar un vuelco rotundo en la dirección del desarrollo de estrategias para luchar contra tan penosa enfermedad.

En 1984 Glenner y Wong, usando clorhidrato de guanidina, solubilizaron las fibras de amiloide de fracciones ricas en amiloide cerebrovascular provenientes de pacientes con síndrome de Down y de pacientes con EA³¹. Así aislaron un péptido hidrofóbico de 4.2-4.5 kDa al que llamaron péptido β -amiloide (β A). Este péptido en su forma agregada está compuesto de unidades idénticas del péptido en un arreglo antiparalelo de conformación de hoja plegada- β y que exhibe las propiedades de tinción de un amiloide. La secuencia completa fue elucidada por Kang³² en 1987. Existen pruebas de que su tamaño depende de su origen. Así: si el β A proviene de placas seniles tiene mayoritariamente 42-43 *aa* de largo, en cambio el β A que proviene de los depósitos cerebrovasculares tiene 39-40 *aa* y es más soluble que el anterior³³.

Basados en la secuencia aminocídica del β A y usando técnicas de clonación de ADNc, fue posible aislar el ADN complementario que codifica el β A como una parte de una Proteína Precursora de Amiloide (PPA)^{34,35,36}.

Estos estudios demostraron que el dominio del β A está codificado en el extremo C-terminal de la PPA, como parte de una glicoproteína transmembranar (ver Figura: 9).

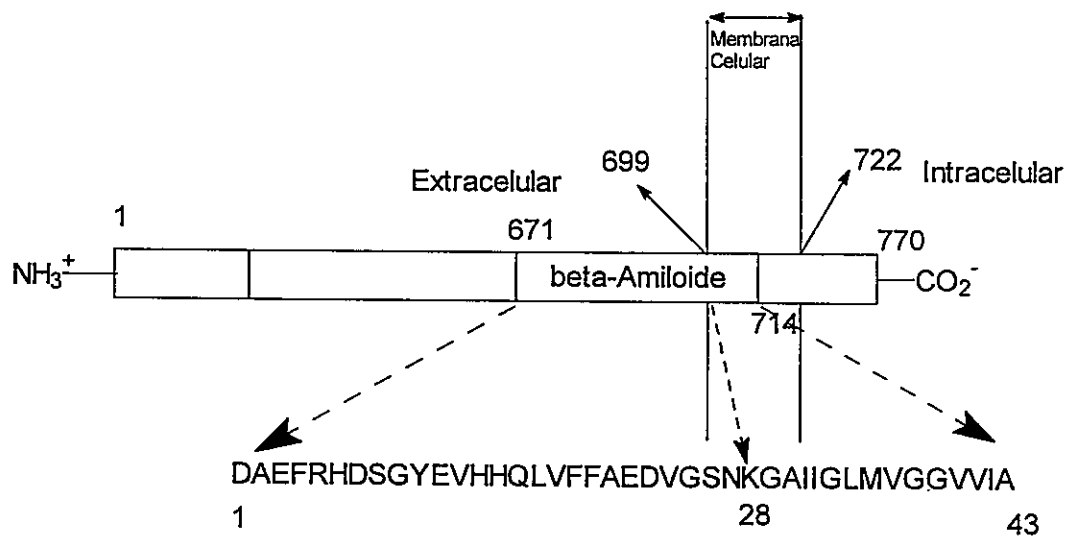


Figura: 9: Representación esquemática de la PPA mostrando la localización del β A

Por medio de técnicas de mapeo físico se ha localizado el gen que codifica la PPA en el cromosoma 21, en el límite de las bandas 21q y 21q22³⁷. Esto pone a la PPA dentro de la región que caracteriza el Síndrome de Down (SD), lo que sugiere que el desarrollo de placas neuríticas en pacientes con SD es debido a la sobreproducción de PPA ocasionada por el cromosoma 21 adicional. De hecho el 100% de los cerebros examinados de pacientes de edad mediana que padecen SD contienen grandes cantidades de placas neuríticas, depósitos cerebrovasculares de amiloide y ovillos neurofibrilares idénticos a los presentes en pacientes con EA³⁸.

Se han realizado estudios *in vitro* que demuestran que el péptido β A de por sí ya tiene las características necesarias para agregarse y formar fibras³⁹. La fuerza directora de este plegamiento radica principalmente en la región hidrofóbica 17-21 que posee la secuencia aminoacídica LVFFA de β A^{40,41,42}, (ver Figura: 10).

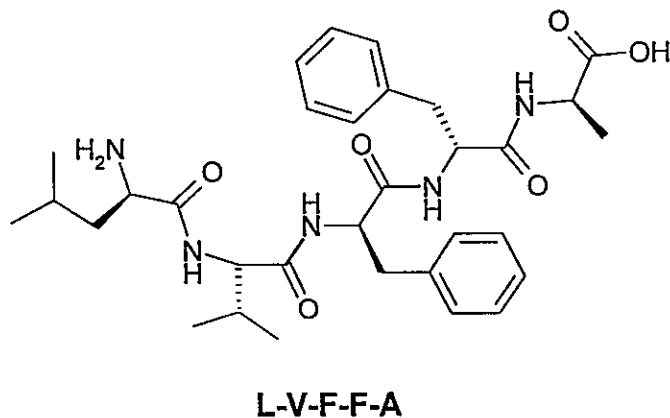


Figura: 10 Representación estructural del pentapéptido LVFFA.

Existen fuertes indicios de que una anomalía relacionada con el péptido β A es el evento central que desencadena el proceso de la EA. Entre estas evidencias, se puede señalar el hecho de que algunos de los individuos que desarrollan EA de tipo hereditaria, presentan mutaciones en el gen que codifica la PPA, localizado en el cromosoma 21. Además, se ha encontrado que las personas adultas que presentan el SD caracterizado por la existencia de 3 copias del cromosoma 21, padecen de la EA en prácticamente un 100% de los casos y a una edad mucho menor que las personas que no presentan esta trisomía, lo que sugiere que un mayor número de copias del gen de la PPA sería responsable de la temprana aparición de la enfermedad. Por otra parte, estudios en personas con altas posibilidades de presentar la EA, ya sea por tener antecedentes familiares o por padecer del SD, han determinado que la primera señal de la enfermedad es la aparición de depósitos del péptido $A\beta$ en la corteza cerebral. Finalmente, se ha descrito la creación de modelos animales de la EA, en las que se ha sobreexpresando el

gen humano de la PPA alterado con mutaciones asociadas a la EA hereditaria⁴³. Estos animales desarrollan típicas placas amiloides en el cerebro, las cuales inducen daño neuronal y alteraciones conductuales.

Hace unos años se descubrió que el péptido A β , además de encontrarse en forma de agregados fibrilares en los depósitos de amiloide, está también normalmente circulando en una forma soluble (sA β) en el plasma y líquido cefalorraquídeo, tanto de individuos normales como de aquellos afectados por EA^{44,45}. Considerando que A β es un producto normal del metabolismo, producido en muchos tipos celulares distintos, una de las preguntas fundamentales en la biología básica de la EA es: ¿Cuál es el mecanismo, y qué factores determinan que un péptido que normalmente se encuentra en forma soluble llegue a adoptar una forma fibrilar que resulta ser tóxica para las neuronas?

Considerando la importancia del amiloide en la EA, muchos grupos de investigación se han dedicado al diseño de estrategias para inhibir la formación de depósitos amiloidogénicos. Existen varios niveles en los que se podría intervenir para bloquear el efecto negativo del amiloide sobre el cerebro (ver Figura: 11):

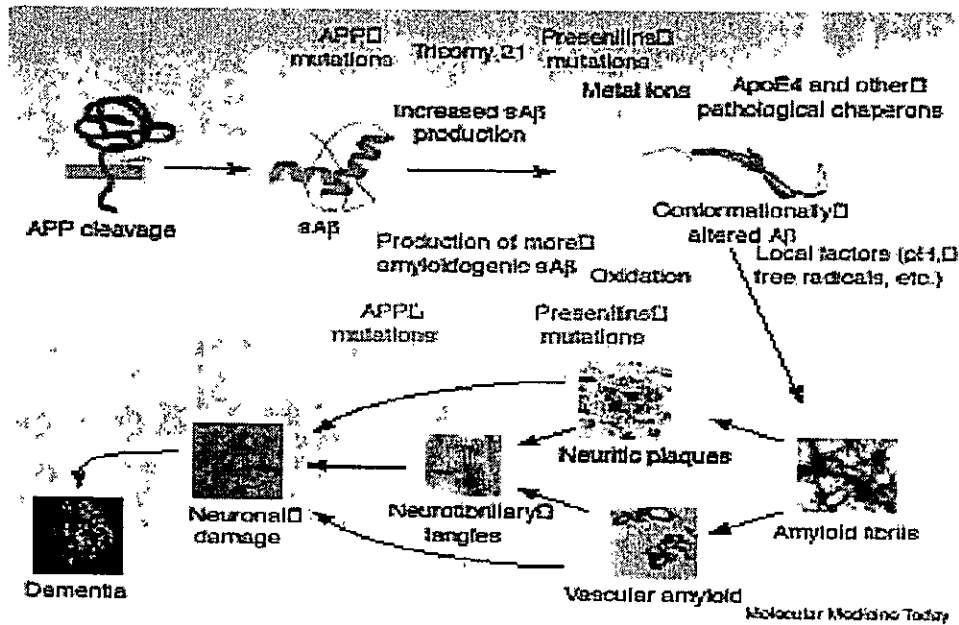


Figura: 11 Etiología de la amiloidosis cerebral y posibles niveles de intervención en el desarrollo de estrategias terapéuticas⁴⁶

Inhibir la expresión del gen que codifica la PPA.

Disminuir el procesamiento de la PPA que da origen a Aβ.

Bloquear la formación y depósito de amiloide.

Ayudar a la eliminación del amiloide del cerebro.

Prevenir el efecto tóxico del amiloide.

1.6 LA CONFORMACIÓN DE Aβ DETERMINA LA FORMACIÓN DE AMILOIDE

El péptido Aβ consiste de al menos dos secciones con diferentes propiedades: un fragmento hidrofóbico que se estructura ordenadamente como lo que se conoce como

hoja- β y un segmento cuya composición permite tanto que se mantenga en forma desordenada o se estructure como hoja- β . Una hipótesis de trabajo es que *la estructura adoptada por este último fragmento de A β determina las propiedades de agregación del péptido*⁴⁷. Para evaluar esta hipótesis se han realizado experimentos que conducen a analizar el efecto de sustituciones aminoacídicas puntuales en esta región sobre la estructura del péptido y su capacidad de formación de amiloide. Con el objetivo de producir un cambio relativo en la tendencia de A β para ordenarse o desordenarse, se diseñaron en forma teórica mutaciones que no produjeran cambios significativos en las propiedades iónicas o hidrofóbicas de A β , pero que indujeran un cambio detectable de la tendencia de A β para adoptar la conformación de hoja- β ³⁹. Un péptido sintético homólogo a la secuencia 1-40 de A β conteniendo el único reemplazo de la valina 18 por una alanina, mostró un descenso importante en su tendencia a adoptar la estructura de hoja- β en comparación al péptido sin modificaciones. Este cambio en la estructura se correlacionó con una disminución notable en la habilidad del péptido modificado para dar origen a fibras de amiloide. Otra sustitución aminoacídica que se estudió en el mismo trabajo fue el cambio de ácido glutámico 22 por glutamina. Esta mutación está presente en los individuos que padecen una enfermedad relacionada a la EA conocida como hemorragia cerebral con amiloidosis del tipo holandés. Un péptido homólogo a A β que contiene esta sustitución forma fibrillas de amiloide en mucho mayor cantidad y en forma más rápida que el péptido normal (sin modificaciones) y presenta un mayor porcentaje de estructura de hoja- β . Estos resultados sugieren que la transición conformacional entre la estructura desordenada y la ordenada como hoja- β modula la

formación de amiloide dando origen a dos especies conformacionales en solución: una capaz y la otra incapaz de formar fibras amiloides. Estos resultados permiten suponer que la secuencia de aminoácidos de A β posibilita la adopción de dos estados conformacionales alternativos y que la forma soluble de A β que normalmente se encuentra circulando en plasma y líquido cefalorraquídeo humano corresponde a la del péptido con estructura desordenada, que podría de esta manera ser considerado como la forma normal (no tóxica) de A β . Por otro lado el estado ordenado en hoja - β sería la forma patológica de A β que da origen a los tóxicos depósitos de amiloide en el cerebro.

Como se discutió anteriormente las pruebas existentes indican que la formación de amiloide estaría modulada por al menos dos propiedades intrínsecas de la proteína amiloidogénica: un alto grado de hidrofobicidad y la tendencia a adoptar una estructura de hoja- β . La hidrofobicidad sería importante para provocar la agregación de la proteína, debido a la necesidad de los fragmentos hidrofóbicos de asociarse con otros grupos de características similares. Por su parte, la conformación en hoja - β es la que daría a los agregados formados la morfología fibrilar y sus propiedades tóxicas.

1.7 PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS PROTEÍNAS AMILOIDES

La presencia de agregados de fibras de proteínas no es una característica única de la EA⁴⁸. También es típica de amiloidosis sistémicas. Los depósitos de amiloides de diferentes fuentes son en su mayoría insolubles bajo condiciones fisiológicas. Ellos tienen en común las propiedades de tinción ya mencionadas, una ultraestructura fibrilar no ramificada y un patrón característico de difracción de rayos X⁴⁹, pero debido a que el

amiloide es insoluble pero no cristalino, no existen datos de alta resolución que permitan establecer en forma satisfactoria su estructura molecular. Además no existen secuencias comunes que caractericen a todas las proteínas amiloides. Existen estudios *in vitro* de plegamiento de proteínas que indican la existencia de una correlación casi perfecta entre la insolubilización y la formación de estructuras de hoja- β ⁵⁰, pero también se han observado muchas proteínas insolubles con poca o ninguna estructura de hoja- β . La insolubilidad de los depósitos de amiloide puede ser debida más a un arreglo intermolecular común que a una estructura secundaria común⁵¹, y aquí se pone de manifiesto nuestro desconocimiento frente a las bases físico-químicas de la insolubilidad de esta clase de proteínas.

Como se mencionó antes, el tamaño del péptido β A depende de su origen. Así, el β A que proviene de placas seniles contiene tres *aa* adicionales (43 *aa*) en el dominio C-terminal comparado con el β A recuperado de depósitos cerebrovasculares, el cual tiene 40 *aa* y es más soluble que el anterior. Los residuos 1-28 corresponden al dominio N-terminal que se encuentra extracelularmente. La región 29-42 del β A, que corresponde al dominio C-terminal, se encuentra inserto en la membrana y es rica en *aa* hidrofóbicos como valina y leucina los que comúnmente se encuentran en proteínas con estructura de hoja plegada- β y raramente se encuentran en proteínas con estructuras de α -hélices o de plegamiento aleatorio. En la Figura: 12 se puede observar la secuencia primaria del β A (1-43).

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGSIIGLMVGGVVIA
 ↓ ↓ ↓ ↓
 1 17 21 43

Figura: 12 Secuencia primaria del péptido beta amiloide (1-43)

Algunos cálculos basados en la secuencia anterior permiten proponer las siguientes características estructurales para la forma soluble de β A:

La probabilidad de encontrar una conformación de hebra- β es alta dentro de la región C-terminal mas allá del residuo 28.

La región 9-21 tiene mayor posibilidad de ser una α -hélice que una hebra- β

Es posible que existan dos vueltas- β entre los residuos 6-8 y los residuos 23-27

Con estas predicciones empíricas y ayudados por un programa de modelación molecular se propuso un modelo teórico que optimizado consiste de dos hebras- β separadas por una vuelta- β que forma una pequeña hélice- α ³⁹.

Un acercamiento bastante productivo para estudiar la solubilidad de β A ha sido la síntesis de fragmentos o de la secuencia completa de este péptido^{52,53}. Es interesante ver como los fragmentos pequeños se parecen en su forma de agregarse al amiloide que se encuentra naturalmente. De hecho, Gorevic mostró que las secuencias 1-28, 12-28 y 14-28 conducen a la formación de fibras *in vitro*; también mostró que no es necesario el dominio hidrofóbico que está mas allá del residuo 28 para la formación de fibras sino que éste más bien sirve para insolubilizar el β A. Se ha mostrado que el dominio C-terminal del β A determina la velocidad de formación de fibras amiloides más que la

estabilidad y las propiedades estructurales del amiloide⁵⁴. La sustitución de algunos de los residuos hidrofóbicos por otros hidrofílicos en la región 17-21 del β A generó un péptido incapaz de agregarse⁵⁵, lo que sugiere que la insolubilidad de β A se debe principalmente a sus *residuos hidrofóbicos*

Con todos los anteriores antecedentes se puede pensar que el proceso patológico que conduce a la EA podría ser interrumpido por fármacos que tengan uno o varios de los siguientes mecanismos terapéuticos:

- Inhibición de proteasa para inhibir la formación de $A\beta$ a partir de la PPA⁵⁶.
- Alteración del metabolismo de PPA por manipulación farmacológica de las rutas de transducción de señales⁵⁷.
- Inhibición de la formación de fibras por moléculas pequeñas.
- Incremento en el proceso de remoción (clearance) del péptido $A\beta$ o de los depósitos de β A y la inhibición del efecto neurotóxico del amiloide.

1.8 LA INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN DE $A\beta$ COMO UNA ESTRATEGIA EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS PARA LA TERAPIA DE LA EA

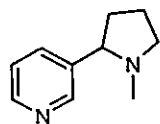
Como se ha discutido antes, el $A\beta$ soluble es un componente normal de los fluidos biológicos. Su agregación inicialmente para formar la llamadas fibrillas neurotóxicas y después las placas neuríticas son procesos estrechamente relacionados con la patología de la enfermedad, así que la inhibición de la agregación aparece como una de las alternativas posibles para el desarrollo de fármacos orientados a la terapia de la EA.

Hasta ahora en la literatura se han reportado compuestos de muy diversa naturaleza química y/o perfil farmacológico. Aquí, para simplificar, esos compuestos serán clasificados solamente con respecto a su naturaleza ya sea peptídica o no peptídica.

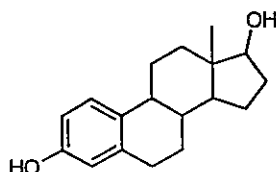
1.8.1 INHIBIDORES NO PEPTÍDICOS

En los últimos 10 años se ha informado acerca de una cantidad apreciable de compuestos de naturaleza química muy diversa y todos con la propiedad de inhibir la formación de fibras o de disminuir la toxicidad del péptido A β , como puede observarse (ver Figura: 13). Dentro de la clase de compuestos *no peptídicos* se tienen sustancias que van desde sales inorgánicas como el silicato de sodio⁵⁸ Na₄SiO₄ (el cual fue descrito como inhibidor de la agregación de A β inducida por Al⁺³), el fluorocromo rojo congo⁵⁹, el esteroide estradiol usado en el tratamiento para compensar la pérdida hormonal que sufre la mujer con la menopausia⁶⁰, la hormona pineal melatonina, que ha mostrado tener propiedades protectoras frente a células de neuroblastoma que han sido expuestas al péptido A β , el alcaloide nicotina⁶¹ que también presenta propiedades neuroprotectoras, el antibiótico rifampicina⁶², utilizado en el tratamiento de la tuberculosis y la lepra, que inhibe la agregación y formación de fibras en un ensayo *in vitro* utilizando A β 1-40 de origen sintético, y también una serie de benzofuranos que se han descrito como sustancias promisorias en el desarrollo de inhibidores de agregación de A β . Como puede observarse, la naturaleza química de las sustancias es tan diversa que aparentemente no tienen ninguna característica común. Un tema interesante a

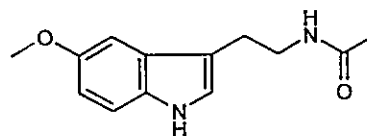
desarrollar en el futuro sería buscar esas similitudes que no saltan a la vista, tal vez con la ayuda de programas computacionales de cálculos teóricos.



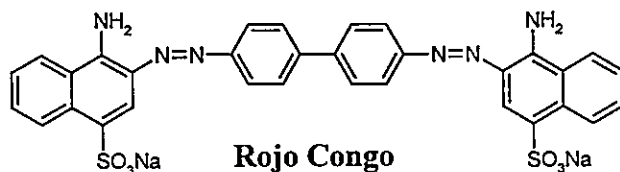
Nicotina



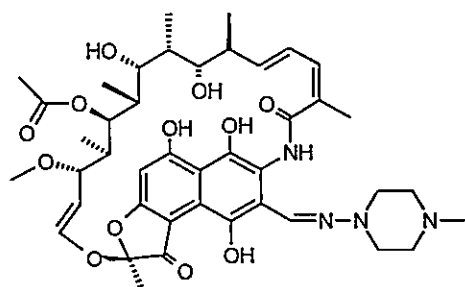
Estradiol



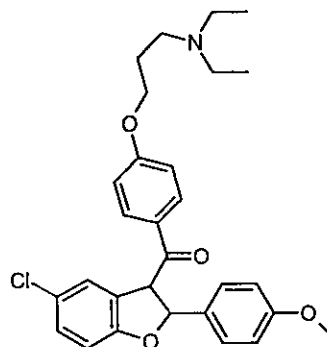
Melatonina



Rojo Congo



Rifampicina



SKF-74625

Figura: 13 Inhibidores de agregación de Aβ no peptídicos

1.8.2 INHIBIDORES PEPTÍDICOS

Péptidos sintéticos que contienen ya sea en forma parcial o total la secuencia de Aβ han sido muy usados para estudiar la formación de amiloide *in vitro*, ya que al ser incubados

en condiciones apropiadas forman agregados semejantes a fibras amiloides, exhibiendo las características morfológicas y estructurales típicas de ellas. Una estrategia que ha dado buenos resultados en el entendimiento de las relaciones estructura-actividad con respecto a la agregación de A β , ha sido estudiar el efecto de reemplazar algunos aminoácidos específicos en la secuencia de A β . Utilizando esta técnica se ha descrito que al reemplazar aminoácidos hidrofóbicos por otros más hidrofílicos en la porción interna de A β (residuos 17-21), disminuye la tendencia del péptido resultante para generar amiloide. La formación de amiloide es también dependiente de la acidez del medio. Así por ejemplo, se ha demostrado que el pH de la solución determina la velocidad de formación de amiloide⁶³. Es importante destacar que en estos experimentos se observó una relación directa entre la modificación de la conformación de A β en solución y su habilidad para formar amiloide.

La idea de inhibir el proceso de agregación del β A usando moléculas peptídicas pequeñas es una alternativa que ha sido evaluada por varios laboratorios⁶⁴. Por ejemplo, C. Hilbich trabajó con péptidos sintéticos orientados a identificar los factores estructurales implicados en la agregación del β A. Descubrió un par de péptidos de 32 *aa* y 33 *aa* análogos de los segmentos de β A¹⁰⁻⁴² y β A¹⁰⁻⁴³ y de β A¹⁻⁴² y β A¹⁻⁴³ respectivamente que podían inhibir la actividad amiloidogénica del β A.

En 1996 L. O. Tjernberg^{65,66} usó un modelo sistemático para la identificación de secuencias de unión en el β A y diseñó ligandos estables frente a proteasas que se unen a tales secuencias con la hipótesis de que inhibirían el proceso de agregación de β A. La

estructura de la molécula más efectiva de esta serie se representa a continuación (ver Figura: 14):

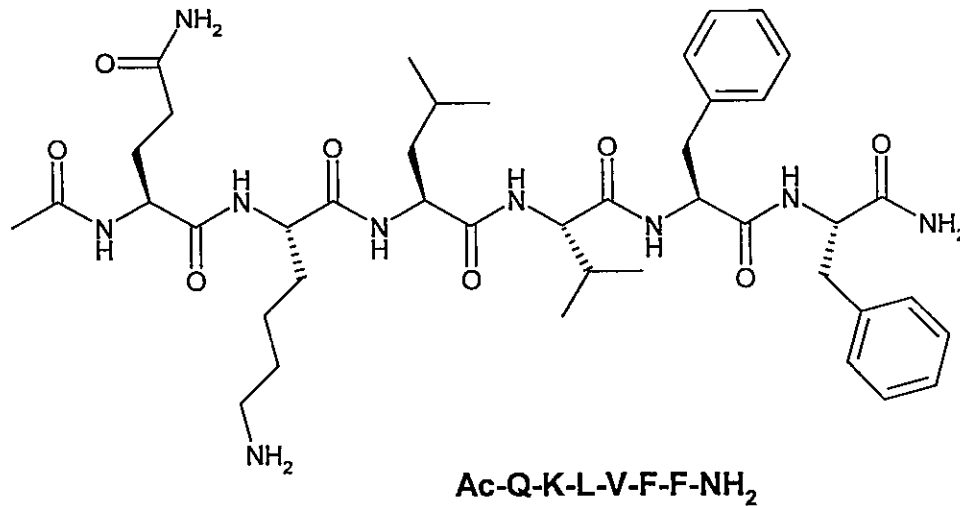


Figura: 14 Representación estructural de la secuencia peptídica Ac-QKL VFF-NH₂.

En el mismo año C. Soto⁴² diseñó una serie de péptidos basados en la hipótesis de que “la formación de amiloide podría ser inhibida por péptidos homólogos a β A pero con baja probabilidad de formar hoja plegada- β ”. En ese trabajo se diseñaron péptidos de entre 4 y 11 *aa* de largo, presentando resultados muy alentadores no solo frente a la inhibición de la formación de fibras sino también por su capacidad de redissolver placas neuríticas ya formadas. La base de su diseño se centró en la región mas hidrofóbica en el dominio *N*-terminal del β A (17-21; LVFFA) que por trabajos anteriores se había demostrado que era la región que dirige el proceso de plegamiento en hoja- β del β A⁶⁷. La secuencia de dos de sus mejores péptidos ($i\beta$ A₅) es la siguiente(ver Figura: 15):

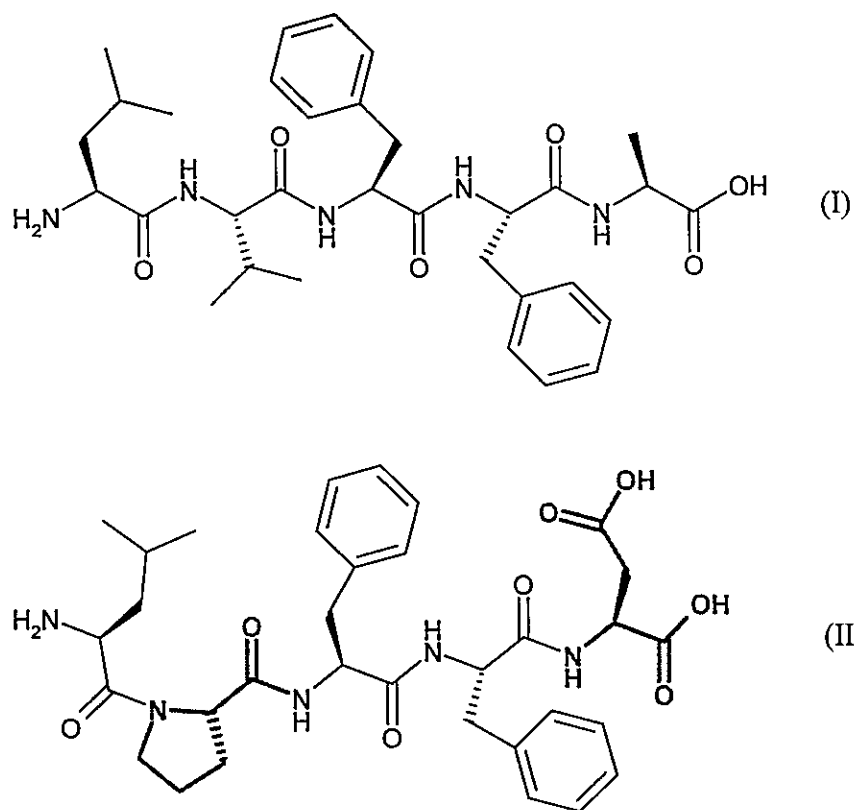


Figura: 15 (I) Secuencia 17-21 del β A y (II) Secuencia del inhibidor de agregación $i\beta A_5$

Se puede observar que el $i\beta A_5$ presenta 2 cambios de *aa* en total y que dentro de la región 17-21 antes mencionada se sustituyó la valina 18 y la alanina 21 por una prolina y un aspartato respectivamente. La razón del primer cambio se debe a las características únicas de la prolina que puede considerarse como un *aa* rompedor de hojas- β del péptido ($i\beta A_5$). En lo que respecta al cambio de la alanina 21 por el aspartato, este último también tiene el mismo efecto de romper hojas beta por ser un residuo cargado, además de favorecer la solubilidad de la molécula en agua. También evaluó su enantiómero, formado íntegramente por D-aminoácidos, que solucionó el problema de la baja resistencia de los péptidos formados por L-aminoácidos frente a la proteólisis,

obteniendo la misma actividad. Aunque los resultados de los trabajos detallados anteriormente son impresionantes, también dejan la sensación de que aún falta mucho por hacer para superar las desventajas inherentes al uso de péptidos en el desarrollo de fármacos como su pobre farmacocinética (incluyendo rápida proteólisis, metabolismo, pobres propiedades para el transporte y rápida excreción).

1.8.3 PEPTIDOMIMÉTICOS Y EL DESARROLLO DE FARMACOS.

J. Gante en 1994 definió un peptidomimético⁶⁸ como una sustancia que tiene una estructura secundaria así como también otras características estructurales análogas a las de un péptido, las cuales le permiten desplazar el péptido original de enzimas o receptores. Como resultado el efecto del péptido original puede ser inhibido (antagonista o inhibidor) o duplicado (agonista). A través del concepto de peptidomiméticos se pueden modular las interacciones del análogo (el peptidomimético) con enzimas o receptores. Además se puede alargar la duración de la acción pues el producto sintético puede resultar ser menos susceptible a la rápida degradación enzimática que sufre un péptido. La generación de peptidomiméticos está basada en el conocimiento de las propiedades conformacionales, topológicas y electrónicas del péptido original y del sitio activo o enzima con el cual éste interactúa. En el diseño de peptidomiméticos como sustancias potencialmente bioactivas se deben tomar en cuenta dos factores estructurales fundamentales:

- Un “docking” favorable: es decir, se debe favorecer una conformación que encaje lo mejor posible en el sitio activo. Si es necesario, la conformación puede ser estabilizada introduciendo elementos de rigidez.
- La ubicación de grupos funcionales (hidrofilicos o hidrofóbicos) en posiciones definidas tales que se favorezcan las interacciones requeridas (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o hidrofóbicas).

1.8.4 CLASES DE PEPTIDOMIMÉTICOS

Existen muchas modificaciones posibles sobre un péptido para obtener un peptidomimético. De acuerdo con el tipo de modificación y desde un punto de vista estructural, *a grosso modo* los peptidomiméticos pueden ser clasificados en dos grupos principales:

- Los que presentan modificaciones de la cadena lateral.
- Los que presentan modificaciones del esqueleto amídico.

1.8.4.1 MODIFICACIONES DE LA CADENA LATERAL

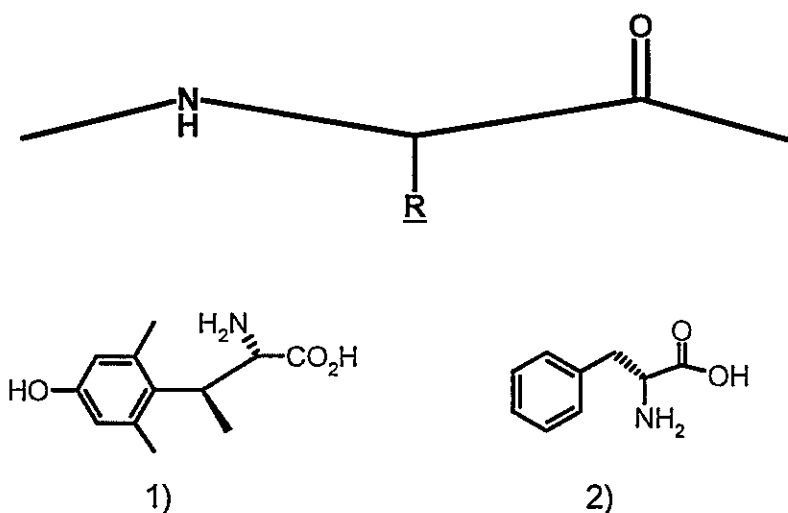


Figura: 16 Obtención de peptidomiméticos por modificación de la cadena lateral: 1) uso de aa no naturales; 2) sustitución de L aa por D-aa

Una estrategia posible y bastante conocida para modificar las cadenas laterales consiste en reemplazar un aminoácido natural por otro no natural, es decir con su cadena lateral modificada. La práctica más común es el uso de D-aminoácidos. Otros casos son modificaciones como la introducción de grupos metilos en las posiciones 2' y 6' de la tirosina. Se ha reportado que esta modificación restringe los grados de libertad rotacional del anillo aromático con respecto a los de la tirosina, lo que puede favorecer conformaciones bioactivas⁶⁹ (ver Figura: 16).

1.8.4.2 MODIFICACIONES DEL ESQUELETO AMÍDICO

Intercambio individual de grupos funcionales

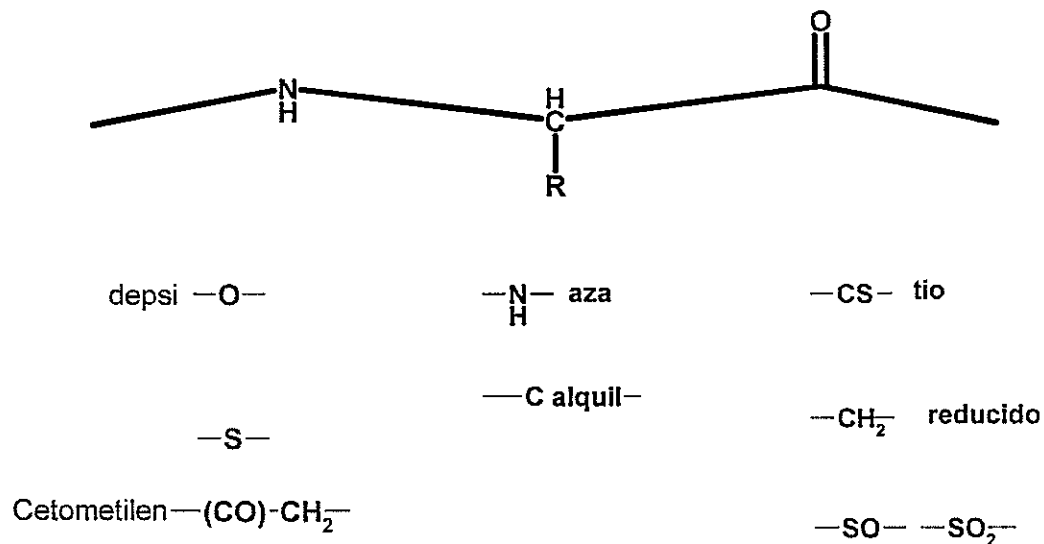


Figura: 17 Obtención de peptidomiméticos por medio de modificaciones del esqueleto amídico originados por intercambio individual de grupos funcionales o átomos.

Cuando se habla de modificaciones al esqueleto amídico se hace referencia ya sea al intercambio individual isostérico o isoelectrónico de unidades en la cadena peptídica (por ejemplo el carbono- α , el nitrógeno amídico, el oxígeno del carbonilo, el carbonilo completo, etc) o a la introducción de fragmentos adicionales que alargan el esqueleto amídico. Ejemplos de intercambios se pueden observar en la Figura: 17

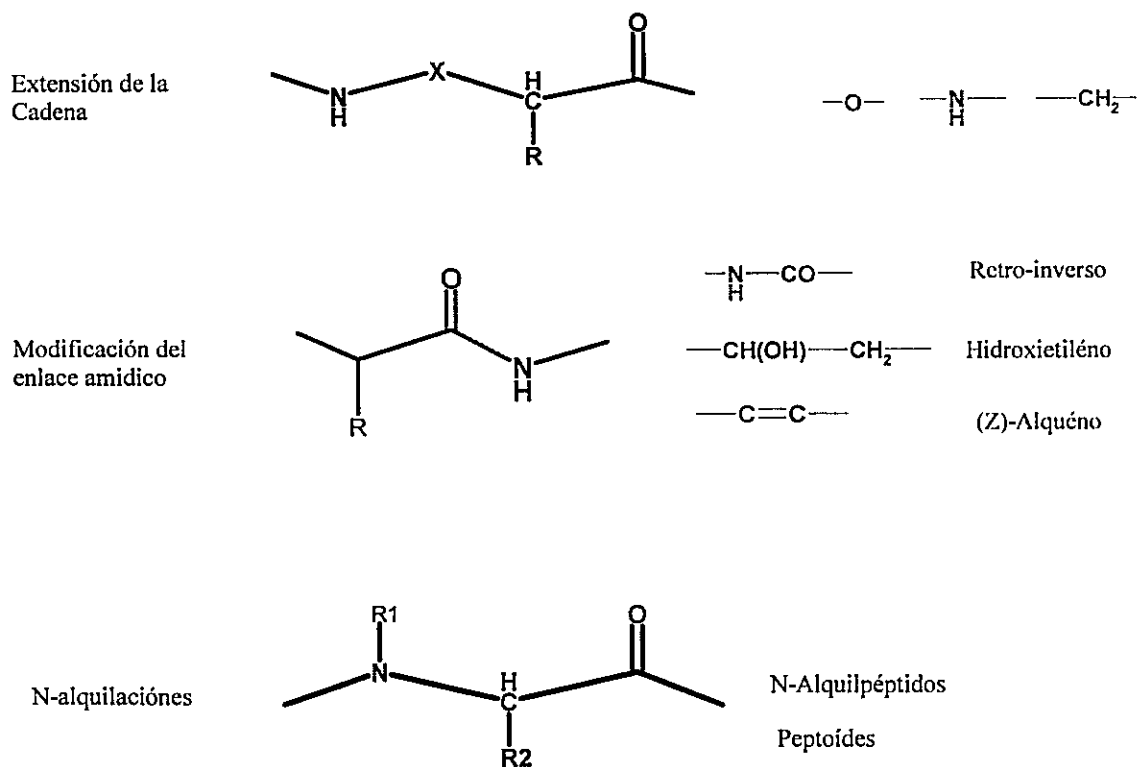


Figura: 18 Obtención de peptidomiméticos a través de modificaciones del esqueleto amídico.

La introducción de fragmentos adicionales que alargan el esqueleto amídico, la sustitución completa de la función amida y las *N*-alquilaciones son los casos más importantes en esta clase de peptidomiméticos (ver Figura: 18).

En el caso de los peptidomiméticos generados por el intercambio individual de un átomo o un grupo de átomos de la cadena peptídica por otros se pueden citar los *depsipéptidos*, peptidomiméticos en los cuales el nitrógeno ha sido reemplazado por oxígeno. Compuestos de este tipo son encontrados en forma natural, presentan interesantes propiedades antibióticas y su síntesis en fase sólida ha sido recientemente publicada⁷⁰. Los *tiopéptidos* son péptidos en los cuales el oxígeno del grupo carbonilo

ha sido reemplazado por un átomo de azufre. Éstos han servido de modelo interesante en el estudio teórico del proceso de isomerización (racemización) de aa naturales⁷¹.

La *Sulfomicina*, un antibiótico aislado en 1978 por Abe y col⁷² a partir de *Streptomyces viridochromogenes*, constituye otro ejemplo de tiopéptido que debido a su excelente acción antibiotica y estructura única ha despertado interés sintético⁷³ y bioquímico⁷⁴ (ver Figura: 19).

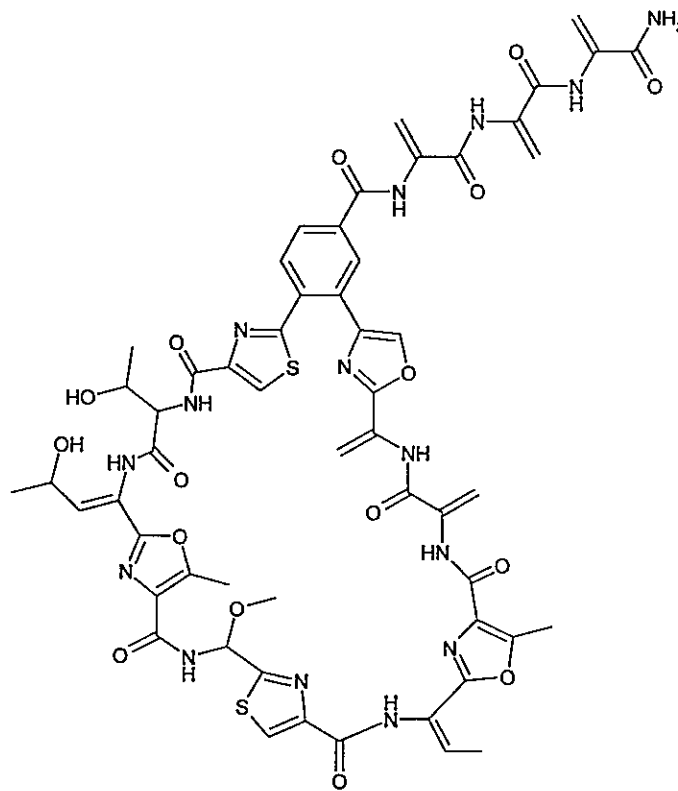


Figura: 19 Sulfomicina, un antibiótico natural.

Se ha reportado también la síntesis en fase sólida de los que se conocen como *péptidos reducidos*. En este caso el grupo carbonilo ha sido reemplazado por un grupo metileno⁷⁵. Otra modificación que ha sido ampliamente explotada la constituyen los

que se conocen como *péptidos retro-inverso* (PRI). Para entender la naturaleza de los PRI es necesario recordar que el enlace peptídico le confiere al esqueleto amídico una dirección. Así los péptidos y proteínas son estructuras no palindrómicas. Por convención la descripción y escritura de un péptido o proteína se debe hacer desde el lado *N*-terminal (escrito a la izquierda) hacia el lado *C*-terminal (escrito a la derecha) y de esta definición se puede intuir que un isómero retro de un péptido es aquél en el cual la dirección de la secuencia aminoacídica está invertida⁷⁶. Muchos péptidos retro-inverso con significativa actividad biológica han sido reportados. Por ejemplo, en 1979 se sintetizó el primer análogo⁷⁷ del tipo retro-inverso de la *Leu-encefalina*, un pentapéptido que se une a receptores de opiáceos. El nuevo compuesto resultó ser no solamente más activo sino también más estable frente a la degradación enzimática (ver Figura: 20).

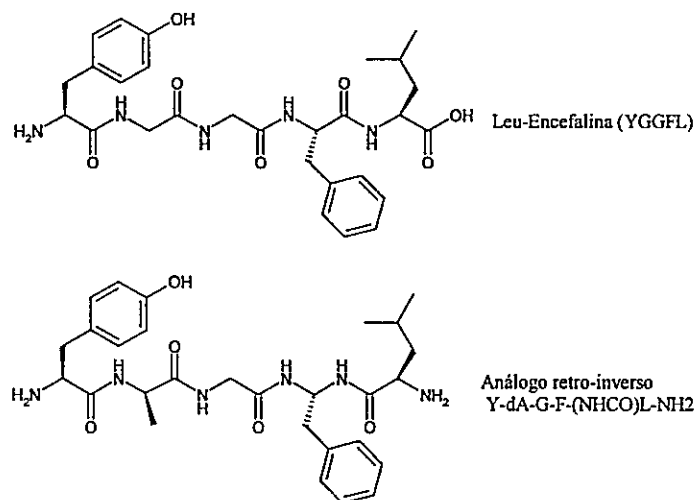


Figura: 20 Leu-encefalina y uno de sus análogos retro-inverso, un caso exitoso del uso de peptidomiméticos.

Una alternativa que será más adelante explicada en detalle será el concepto de los azapéptidos.

Los oligómeros de glicina *N*-alquilada o peptoides son peptidomiméticos en los cuales los grupos alquilo corresponderían a las cadenas laterales del péptido que se quiera optimizar por este método. Si se considera una secuencia cualquiera (ver Figura: 21), su análogo en versión peptoide tendría las cadenas laterales desplazadas en una posición en dirección hacia el extremo *N*-terminal. La síntesis de peptoides y algunas de sus propiedades biológicas han sido publicadas^{78,79}

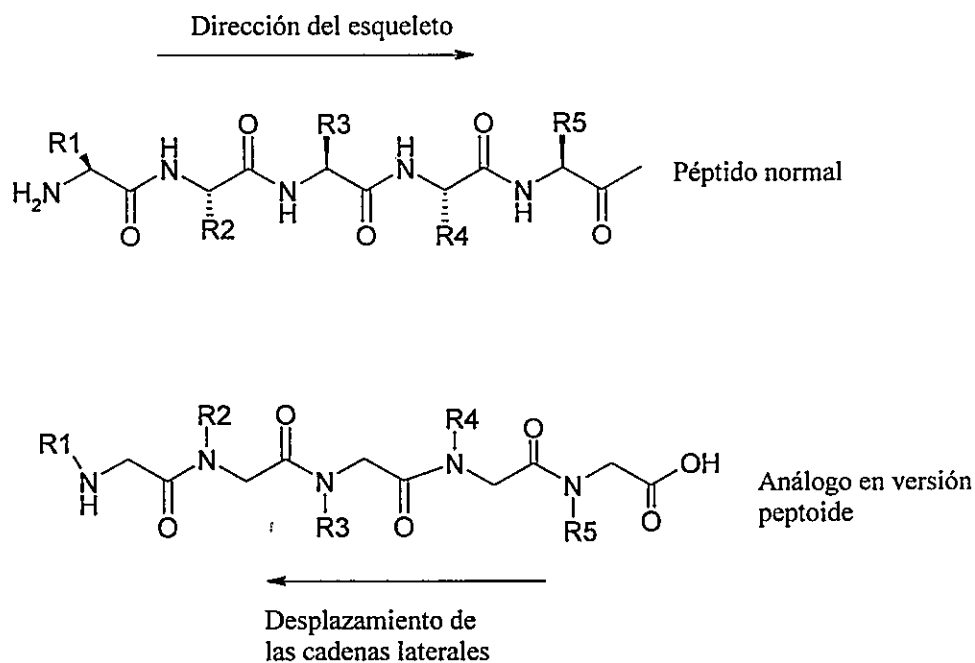


Figura: 21 Estructura representativa de un peptoide comparado con un péptido normal.

Los β -péptidos son oligómeros constituidos por β -aminoácidos. A su vez un β -aminoácido constituye la mínima modificación en alargar el esqueleto carbonado. En

otras palabras, se ha introducido un grupo metileno entre el nitrógeno amídico y el carbono alfa. Los β -péptidos constituyen uno de los modelos no naturales que más han contribuido al entendimiento de la estructura de proteínas y al plegamiento de la mismas.

1.9 AZAPÉPTIDOS Y AZÁTIDOS

1.9.1 AZAPÉPTIDOS Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA

El termino azapéptido⁸⁰ se refiere a una clase de peptidomimético de modificación del esqueleto amídico en el cual *uno o varios* átomo(s) de carbono- α del esqueleto amídico ha(n) sido remplazado(s) por nitrógeno, pero manteniéndose en la molécula estructuras de naturaleza claramente peptídica. Desde el punto de vista biológico los azapéptidos han demostrado ser una clase muy útil de péptidomiméticos⁸¹. Hess⁸² y colaboradores fueron los primeros en sintetizar un análogo aza de un producto natural, la azavalina-3-angiotensina II bovina (ver Figura: 22). Usando un protocolo estándar diseñado para evaluar la presión sanguínea, este producto fue menos activo que la sustancia de referencia, pero presentó una mayor duración de acción.

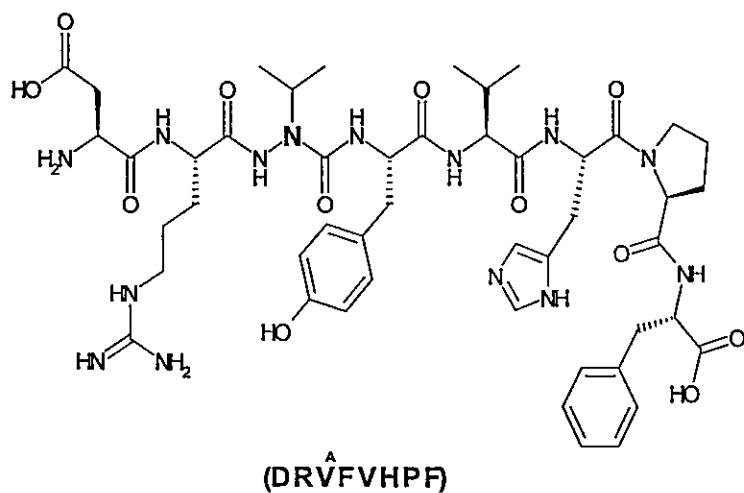


Figura: 22 Azavalina-3-angiotensina II bovina, primer azaanálogo de un producto natural.

En análogos de la hormona peptídica oxitocina se observó tanto pérdida como incremento en la eficacia dependiendo de la posición de la introducción del azaaminoácido incorporado. Así, por ejemplo, aunque el análogo (Aza-G5)-oxitocina no tuvo efecto en útero de rata, el análogo (Aza-G9)-oxitocina fue 1.5 veces más potente que la hormona natural⁸³ (ver Figura: 23).

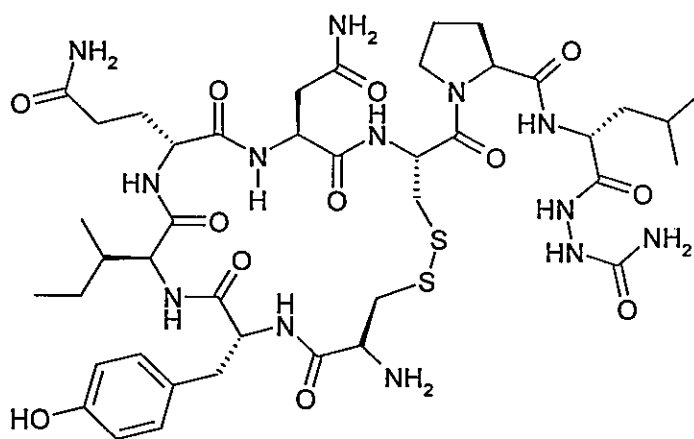


Figura: 23 (Aza-G9)-oxitocina: la introducción de nitrógeno en el lugar del C- α de la glicina 9 produjo un compuesto con 1.5 veces la actividad producto natural.

Otro caso de importancia en la aplicación del concepto de azapéptidos como peptidomiméticos es la eleidosina^{84,85,86}. En este caso se observó no solo un incremento de entre 3 y 4 veces de la actividad sino también un prolongación de la misma debido a la inhibición de la degradación enzimática (ver Figura: 24).

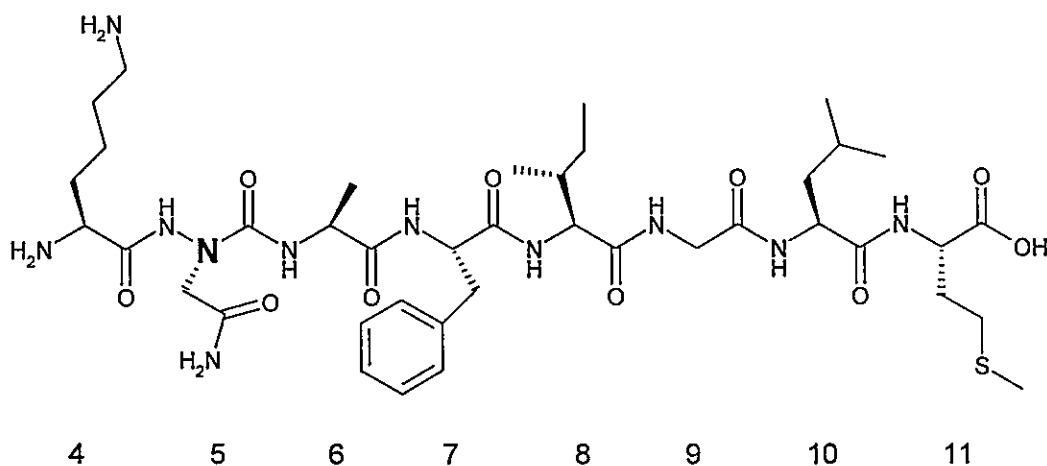


Figura: 24 Aza-análogo de la eleidosina

Más recientemente se han diseñado azapéptidos para modular la respuesta inmune en células T (CD4⁺)⁸⁷ e inhibidores de proteasas de cisteína⁸⁸.

1.10 SÍNTESIS DE AZAPÉPTIDOS

La síntesis de los residuos de azaaminoácidos generalmente se basa en una combinación entre la química de la hidracina y la química de los péptidos. En la Figura: 25 se presentan posibles rutas sintéticas para la obtención de azapéptidos.

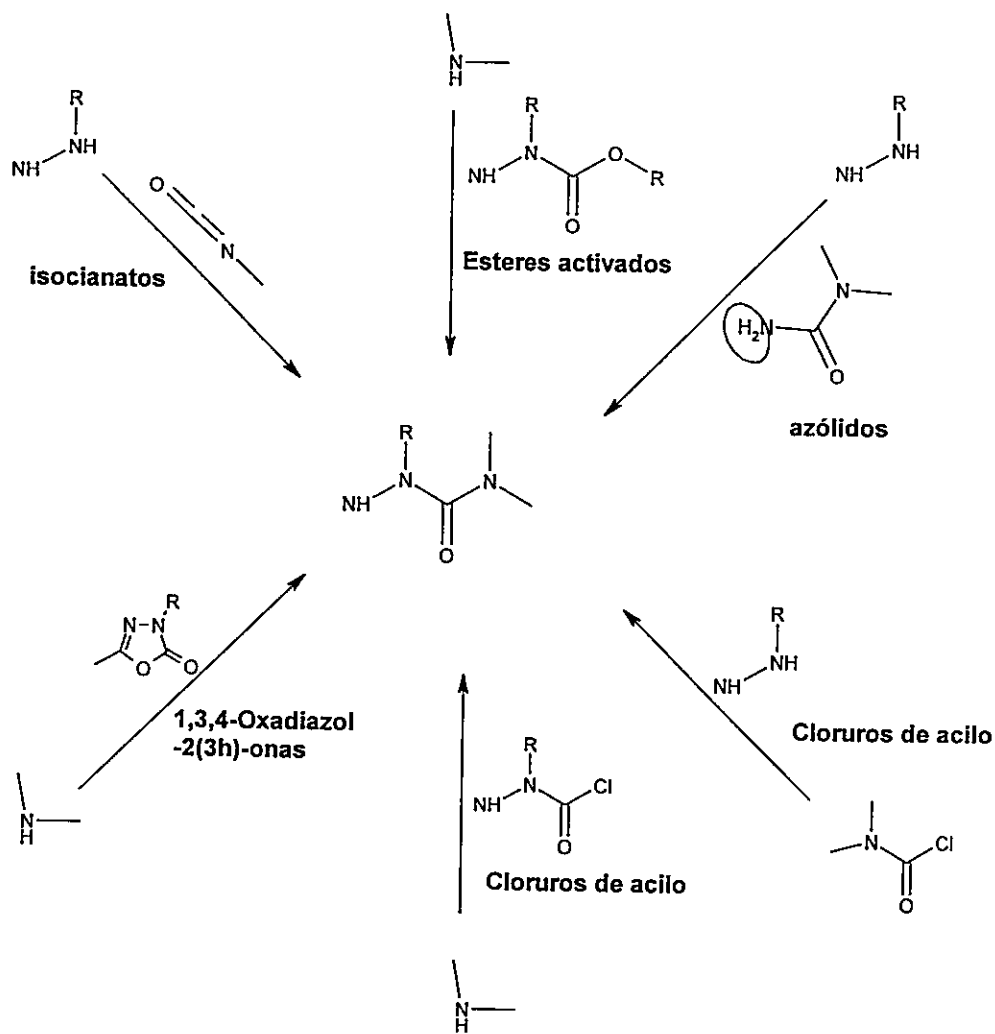


Figura: 25 Rutas para la síntesis de azapéptidos.

1.10.1 SÍNTESIS DE AZAPÉPTIDOS USANDO ISOCIANATOS

Una de la prácticas más comunes para unir un azaaminoácido y un aminoácido consiste en agregar hidracinas o hidracidas a α -isocianatos de ésteres de ácidos grasos. Usando hidrato de hidracina y alquilhidracinas se obtienen los correspondientes diaazapéptidos modificados en el residuo correspondiente al lado *N*-terminal. La reacción del grupo amino sustituido está favorecida, lo que conduce preferentemente a la sustitución en alfa⁸⁹. En este caso se obtiene el lado *N*-terminal libre, pero si lo que se requiere es obtener el compuesto análogo con el lado *N*-terminal protegido, entonces se utilizan las correspondientes hidracidas con el grupo benciloxicarbonilo (Z) o *t*-butiloxicarbonilo (Boc) como compuestos de reactividad apropiada para tal acoplamiento^{90, 91} (ver Figura: 26)

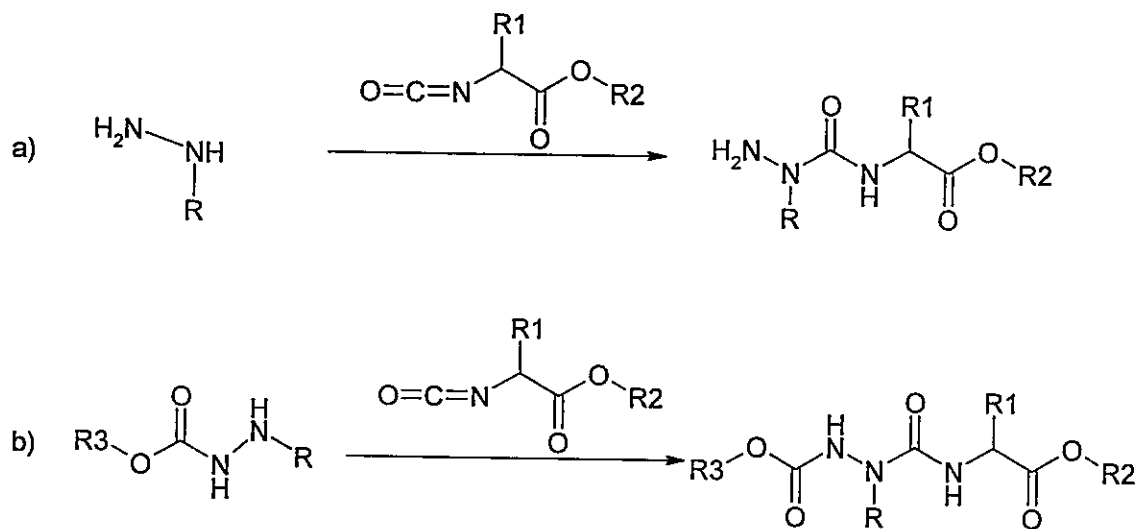


Figura: 26 Uso de isocianatos en la obtención de azapéptidos: a) Con alquilhidracinas; b) Con alquilhidracidas.

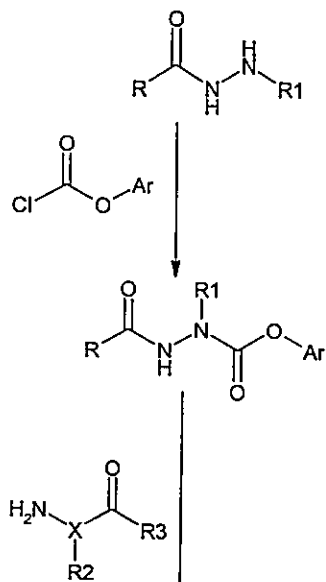
La síntesis de los materiales de partida como las alquilhidracinas protegidas ha sido descrita^{91,92,93}. Tales materiales, es decir las unidades que introducen el azaaminoácido,

se preparan por la reacción de hidracina protegida con un aldehído o cetona que genera, tras reducción, la cadena lateral del azaaminoácido en cuestión.

1.10.2 SÍNTESIS DE AZAPÉPTIDOS USANDO ÉSTERES ACTIVADOS

La inclusión de ésteres activados de azaaminoácidos y azapéptidos con activación en el lado *C*-terminal o en el lado *N*-terminal (ver Figura: 27) es una estrategia considerablemente más flexible para la preparación de azapéptidos comparada con el uso de isocianatos que en ocasiones son de difícil manejo o de difícil acceso. Hasta el momento los ésteres activados que se han usado son de fenilo⁹⁴, nitrofenilo^{84,93}, (NP) o 2,4,5-triclorofenilo⁹¹ (TcP)

Activación del lado C-terminal



Activación del lado N-terminal

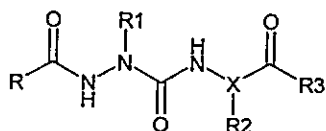
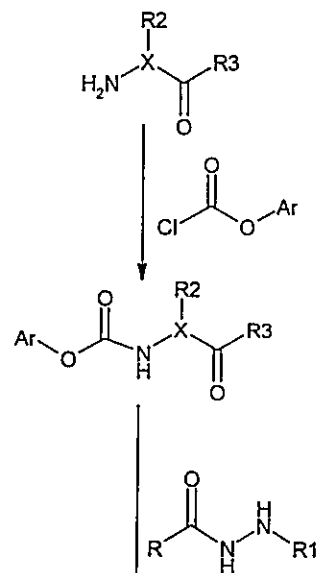


Figura: 27 Síntesis de azapéptidos usando ya sea activación sobre lado *N*- o *C*-terminal.

Los ésteres *C*-activados son preparados mediante la reacción de hidracidas con cloroformatos de arilo, mientras que los ésteres *N*-activados se preparan mediante la reacción de un grupo amino terminal libre de un aminoácido o un azaaminoácido, también con cloroformatos. El uso de esta ruta permite una gran flexibilidad desde el punto de vista sintético. Por ejemplo, se pueden preparar no solo azapéptidos sino, en teoría, se pueden preparar también oligómeros de azaaminoácidos.

1.10.3 SÍNTESIS DE AZAPÉPTIDOS USANDO AZÓLIDOS

De la misma manera que los ésteres *N*-activados, los correspondientes azólidos (1-acilazoles) pueden ser usados para la síntesis de azapéptidos. Entre ellos se incluyen imidazólidos y 1,2,4-triazólidos los cuales pueden ser preparados a partir de α -isocianatos de ácidos grasos e imidazol o 1,2,4-triazol. El método es básicamente el mismo, es decir, estos intermediarios reaccionan con hidracidas y liberan imidazol o 1,2,4-triazol (ver Figura: 28).

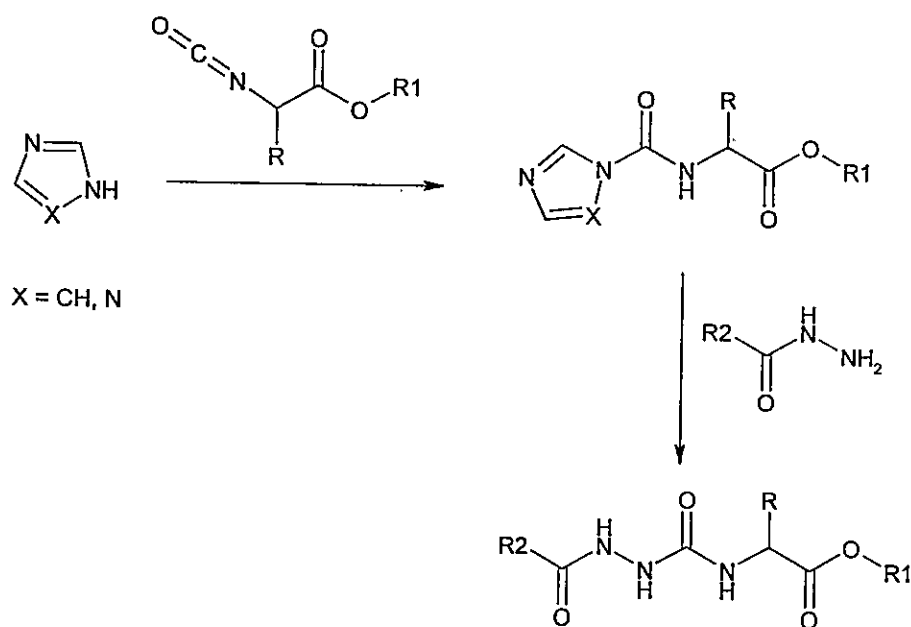


Figura: 28 Síntesis de azapéptidos usando azólidos.

1.10.4 SÍNTESIS DE AZAPÉPTIDOS USANDO CLORUROS DE ACILO

El método del cloruro de acilo para unir dos aminoácidos tiene su paralelo en la síntesis usando dos azaaminoácidos. Por ejemplo, se ha reportado que la Z-hidracina reacciona con fosgeno para producir el cloruro de azaglicina-Z, pero el acoplamiento de este producto con residuos de aminoácidos o azaaminoácidos no es factible⁹⁵. Como se verá más adelante, uno de los principales logros de esta tesis fue el hecho de haber demostrado la factibilidad de este tipo de reacciones.

Los derivados *N*-alquilados como el cloruro de Z-azaleucina son más estables (que la azaglicina-Z) y el primero pudo ser acoplado con el éster metílico del tripéptido leucil-valil-fenilalanina para producir el correspondiente azatetrapéptido (el que fue un inhibidor de renina⁹⁶) (ver Figura: 29).

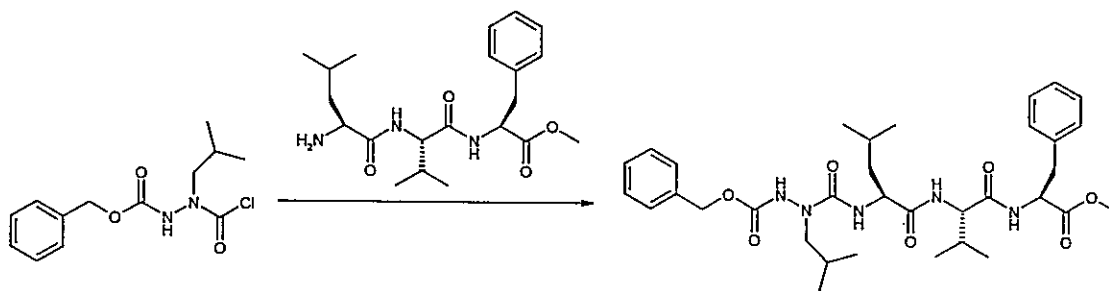


Figura: 29 Síntesis de un inhibidor de renina aza-modificado por medio del método del cloruro de acilo.

1.11 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS AZAPÉPTIDOS

El conocimiento profundo de los parámetros estructurales y fisicoquímicos de una familia de compuestos es el arma más importante para el diseño de moléculas o la interpretación de propiedades biológicas de las mismas. En el caso de los azapéptidos subsiste el mismo problema y, aunque existen muy pocos experimentos con esa modificación, recurrir a las analogías y diferencias entre un átomo de carbono con hibridación sp^3 y una amina terciaria pueden ayudar mucho. El cambio $\alpha C/N$ que representa el paso de un péptido a un azapéptido, desde el punto de vista meramente estructural, no representa un gran cambio en el estado estérico de la molécula. Esto se debe a las distancias atómicas y ángulos de enlace similares, e idénticas cadenas laterales. Sin embargo, debido al hecho de que el centro quiral se pierde y que la naturaleza del fragmento $-RN-CO-NH-$ es tan diferente comparada con un péptido normal, se podría decir que las relaciones isostéricas entre péptidos y azapéptidos no son muy cercanas. Por ejemplo, en un azapéptido existe una mayor área mesomérica lo que debido al par libre adicional de electrones del nuevo nitrógeno puede conducir a una extensión de la planaridad⁸⁴ en el esqueleto comparado con la de un péptido cualquiera. Esta limitación de los grados de libertad rotacionales les permite a las cadenas laterales de los azapéptidos adoptar una conformación intermedia entre las de un aminoácido de configuración L y uno de configuración D. También se han realizado mediciones que demuestran que la acidez del grupo NH unido a un αN es mayor en los azapéptidos⁹⁴ comparada con la de los péptidos correspondientes. Este hecho puede favorecer la formación de puentes de hidrógeno más fuertes y además es más difícil

protonar el grupo NH a pH fisiológico⁹⁷. Todos los cambios mencionados anteriormente modifican indudablemente la absorción, el transporte, la distribución, la unión con enzimas o receptores y la estabilidad metabólica de estos análogos (azapéptidos) de una molécula biológicamente activa.

1.12 AZÁTIDOS

Los azátidos (también conocidos como oligómeros de azaaminoácidos) son compuestos en los cuales átomos de nitrógeno reemplazan *todos* los átomos de carbono- α en el esqueleto amídico de un péptido. Por lo tanto, en la estructura molecular no existe ninguna parte de naturaleza peptídica (ver Figura: 30). Con este cambio isostérico en el esqueleto se tiene un polímero que es más resistente a la acción enzimática, lo que ha probado ser útil en el desarrollo de inhibidores de proteasas de cisteína y serina⁹⁸. Con la sustitución de un carbono estereogénico por un nitrógeno resulta una molécula aquiral en la que la orientación de los grupos de la cadena lateral es más flexible.

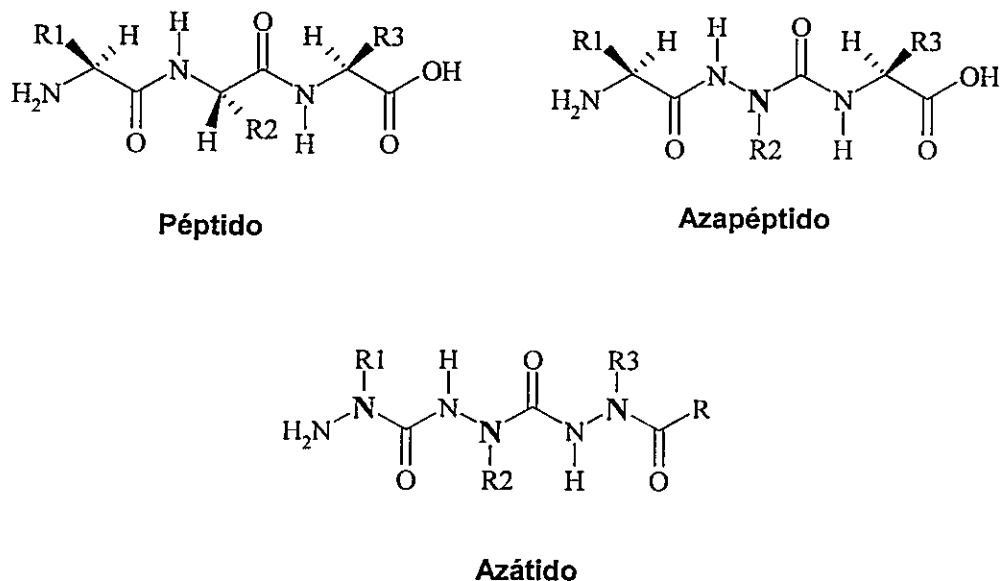


Figura: 30 Esquema de un péptido, un azapéptido y un azátido

Una de las ventajas de esta clase de peptidomiméticos es su amplia y directa accesibilidad sintética, lo que no es el caso de otros peptidomiméticos de modificación en el esqueleto. En principio esto posibilita que cualquier *aa* o grupo de *aa* sea incluido.

1.13 SÍNTESIS DE AZÁTIDOS

Aunque la química y propiedades farmacológicas de los azapéptidos se conocen desde hace más de treinta años, la síntesis de un verdadero oligómero de azaaminoácidos (un azátido) recién fue publicada por K. D. Janda en 1996⁹⁹, de manera que la historia de este tipo de compuestos es muy corta y se carece de información acerca de aspectos tan importantes como sus propiedades estructurales, reactividad, actividad biológica, toxicidad, etc.

Janda describe la síntesis en fase líquida de azátidos a través del acoplamiento de monómeros protegidos con estructura de alquil- o arilhidracina. Esos monómeros se conocen como α -aza-aminoácidos. Aunque la síntesis de diazátidos (o sea, azadipéptidos) en solución realizada por Janda presenta rendimientos muy alentadores (82-92 %), siendo los valores más altos para los compuestos con los grupos alquilo menos demandantes estericamente hablando, la síntesis de oligómeros superiores requiere de la versatilidad que produce una síntesis secuencial, ya sea usando síntesis en fase sólida o síntesis en fase líquida.

K.D. Janda patentó¹⁰⁰ una metodología y publicó un artículo⁹⁹ en los que reclama ser el primero en desarrollar una *síntesis en fase líquida de azátidos*

A diferencia de la síntesis en fase sólida, que se realiza sobre un soporte insoluble, la síntesis corrientemente designada como en *fase líquida* se realiza usando el éter monometílico del polietilenglicol (PEG) de 5000 g/mol el cual se comporta como un soporte polimérico soluble. Sin embargo, debido a problemas de precipitación inoportuna o solubilización incompleta, su uso no se ha difundido mucho en el ámbito de la síntesis orgánica.

La metodología usa unidades (azaaminoácidos) de la misma manera secuencial con la que se sintetizan péptidos. La metodología descrita se ilustra en el siguiente esquema sintético (ver Figura: 31).

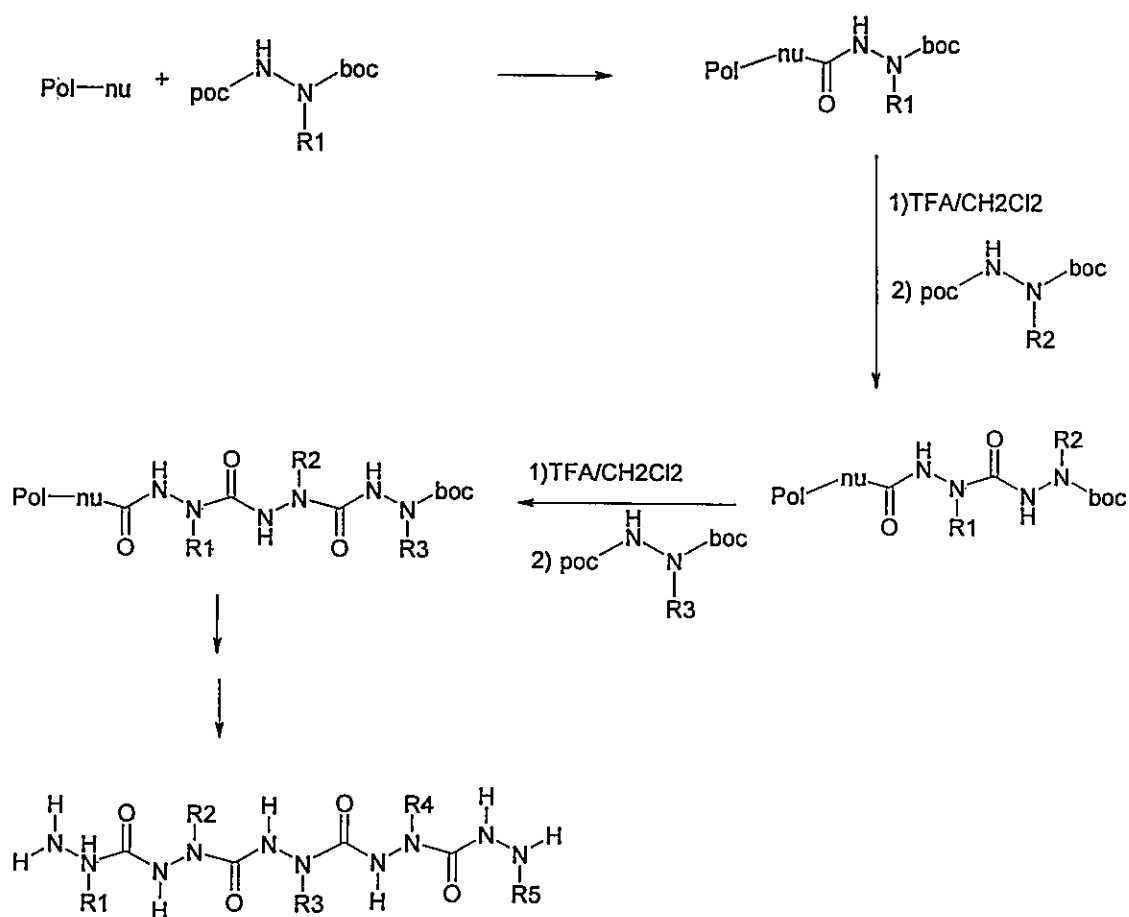


Figura: 31 Síntesis soportada en fase líquida de un azídido.

En esta síntesis se utilizaron de manera iterativa como unidades estructurales azaaminoácidos presintetizados. La preparación de éstos se basó en la reacción de hidracina con haluros de alquilo y la posterior protección del nitrógeno alquilado con el grupo Boc. Finalmente la reacción del azaaminoácido protegido, con el bis-(pentafluorofenil)carbonato conduce a un carbamato suficientemente activado para favorecer la reacción de acoplamiento con otro componente de la misma naturaleza (Figura: 32).

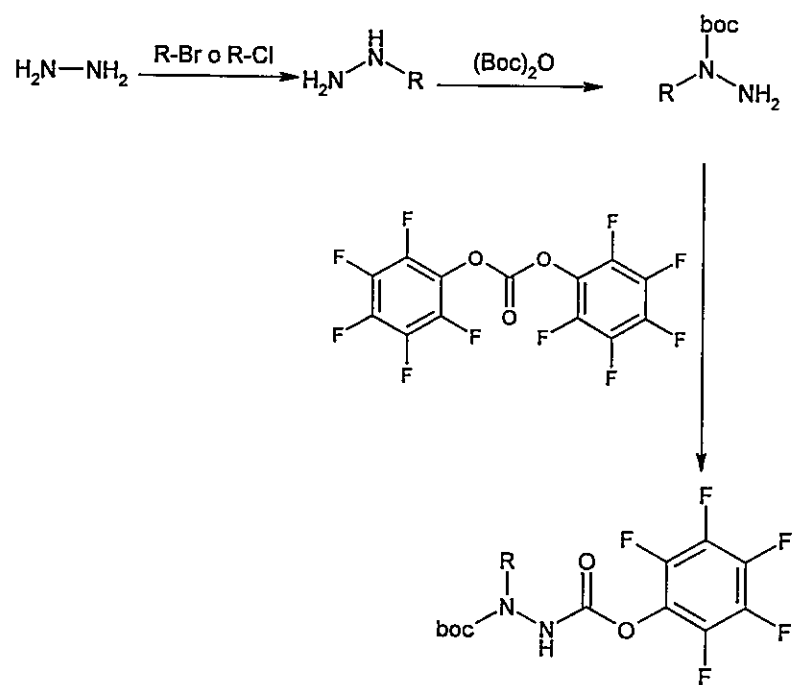


Figura: 32 Síntesis de azaaminoácidos protegidos y activados para la obtención de un azátido según ref 99.

En ese artículo la molécula a ser mimetizada fue la Leu-encefalina (YGGFL), un pentapéptido con afinidad por receptores de opioides. Desafortunadamente los ensayos biológicos con el azátido indicaron que la molécula no presentaba la actividad esperada (ver Figura: 33).

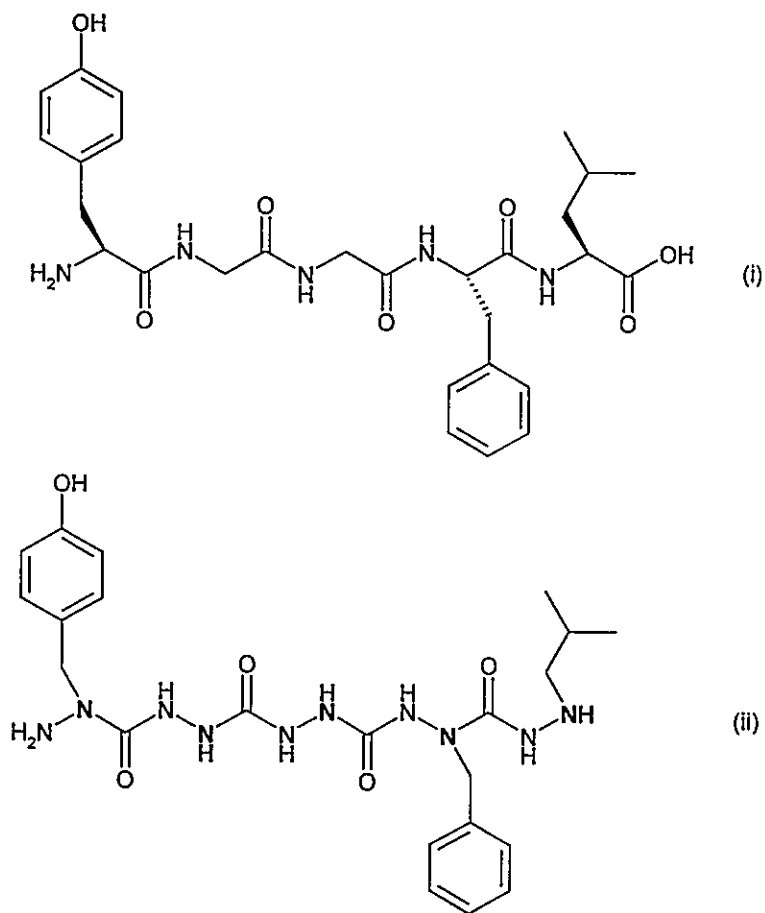


Figura: 33 (i) Leucina-encefalina; (ii) Version azátida de (i).

Es una verdadera lástima que hasta la actualidad, el trabajo de K.D. Janda es el único desarrollado en el ámbito de los azátidos, pues aunque sus resultados biológicos sean decepcionantes, esta clase de péptidomiméticos representa un fértil campo de investigación.

1.14 SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

En 1963 Merrifield propuso una ingeniosa técnica para la síntesis de péptidos la que le valió el premio Nobel en química en 1986¹⁰¹. En ella la síntesis de una cadena

aminoacídica se efectúa de manera más eficiente y más fácil de automatizar si el primer aminoácido se une covalentemente a un soporte insoluble (un polímero) y luego se va alargando la cadena a través de pasos de protección, acople y desprotección. Con esta estrategia se reduce el paso de la purificación de los intermediarios a una simple filtración o lavado del soporte. Además permite realizar síntesis complejas o de muchos pasos todas en un solo reactor disminuyendo así las pérdidas al trasvasar. Esquemáticamente los elementos principales para el desarrollo de síntesis en fase sólida son:

Un *soporte polimérico*, un *espaciador* (opcional) y un *conector* (ver Figura: 34). Más adelante se realizará un análisis más detallado acerca de los tipos de *soportes* y *conectores*. Los espaciadores no serán considerados separadamente ya que aunque se utilizan muy ampliamente su diversidad no es grande. El caso más clásico es el uso de resinas que son copolímeros de polietileno/divinilbenceno/polietilenglicol. Estas resinas fueron desarrollados y comercializadas por Bayer con nombres como Tentagel® (TG) y Argogel® (AG).

El PEGA (PoliEtilenGlicol/dimetilAcrilamida) es otro material muy polar el cual produce un soporte con propiedades de hinchamiento y absorción de agua sin precedentes y posee un interior flexible que permite el acceso de una variedad de macromoléculas tales como enzimas. Sin embargo su baja estabilidad mecánica y su alto costo hace difícil su manejo. En el caso del TG y AG el polietilenglicol (PEG) es un espaciador que se utiliza con el objetivo de :

Aumentar la hidrofilia del soporte y favorecer la solvatación de sustratos en medios polares.

Disminuir la rigidez asociada a una matriz polietilénica, posibilitando la interacción de sustratos unidos al soporte con macromoléculas como enzimas.

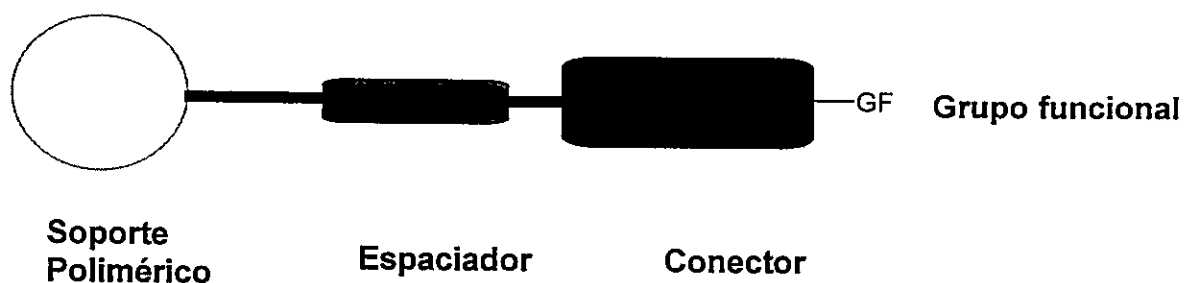


Figura: 34 Representación esquemática de los elementos involucrados en una síntesis en fase sólida

El incremento masivo en el número de publicaciones describiendo el uso de soportes poliméricos solo en el década pasada es una clara demostración del impacto de la síntesis en fase sólida en la comunidad química. Ningún otro desarrollo en lo que a metodología se refiere ha generado tal efervescencia de crecimiento o ha tenido tan profundas implicaciones en la manera como la síntesis se realiza en síntesis orgánica. Las ventajas ganadas con esta metodología son sorprendentes, entre las cuales se podrían mencionar cuatro como las más importantes:

La facilidad con la que la síntesis se realiza, ya que las reacciones pueden ser completadas en solo tres pasos: adición de reactivos; filtrado y lavado de la resina.

La eliminación de los pasos de purificación en medio de la síntesis, porque para cada paso de una síntesis de varios pasos la única purificación necesaria es un lavado de la resina y solo cuando el producto es liberado de la resina se realiza una purificación convencional.

La posibilidad de utilizar concentraciones altas de reactivos con el fin de forzar buenos rendimientos.

La inherente naturaleza de síntesis en paralelo de la fase sólida.

Para que una síntesis en fase sólida sea práctica se deben considerar muy detenidamente varios factores tales como la elección correcta del soporte sólido y el modo de unión y liberación del producto de la resina. La eficiencia en el anclaje y la posterior remoción del producto en condiciones que no lo degraden exigen una correcta elección del grupo conector ("Linker").

1.14.1 TIPOS DE SOPORTES UTILIZADOS EN SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

Las perlas de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno han sido el material más usado desde que Merrifield describió su empleo en 1963 (ver Figura: 35).

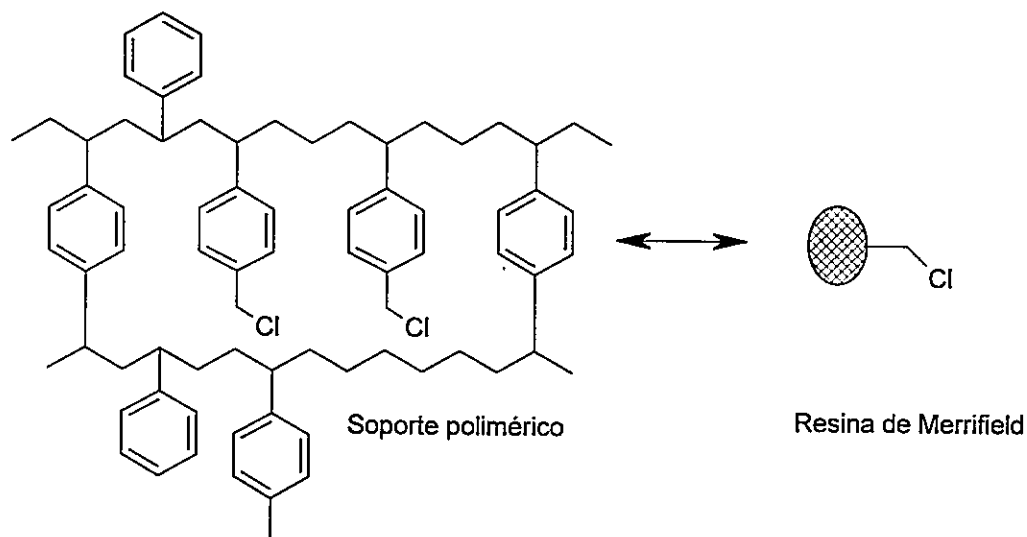


Figura: 35 Representación estructural de la resina de Merrifield mostrando una porción del copolímero poliestireno/DVB.

Las resinas que se utilizan en la actualidad en síntesis en fase sólida han cambiado muy poco desde entonces. Esos soportes insolubles tienen una estructura tipo gel la cual permite fácilmente la penetración de los solventes y reactivos a los sitios donde la síntesis se realiza. Existe un delicado balance entre el grado de entrecruzamiento y la propiedades del soporte. Así por ejemplo las resinas entrecruzadas con un 5 % de DVB son muy estables mecánicamente, pero no se hinchan bien al tratarlas con solventes reduciendo así los sitios accesibles. Por otro lado, si el entrecruzamiento es muy bajo, la estabilidad mecánica del soporte empieza a ser un problema. Por lo general los soportes más utilizados tienen entre 1 y 2 % de entrecruzamiento con DVB. Los tres soportes poliestirénicos más comunes son:

a) El clorometil poliestireno, o resina de Merrifield, originalmente preparado por postderivatización de la resina usando clorometil metil éter y SnCl_4 . Más recientemente ha sido preparado usando mezclas de clorometil estireno/estireno/DVB. Esta resina es ampliamente utilizada para el anclaje de conectores por formación de éteres (ver Figura: 36).

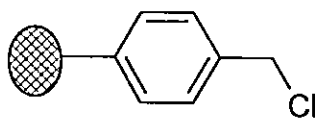


Figura: 36 Resina de Merrifield o clorometil.

b) El hidroximetilpoliestireno preparado a partir de la resina de Merrifield por esterificación con acetato de potasio seguido por la saponificación o la reducción del ester¹⁰²(ver Figura: 37).

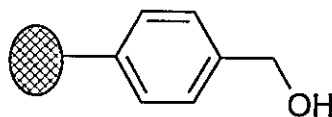


Figura: 37 Resina hidroximetil.

c) El aminometilpoliestireno, preparado por medio de la sustitución por la ftalimida de potasio de la resina de Merrifield y la posterior hidracinólisis. Esta resina permite unir numerosos conectores a la resina por medio de enlaces amídicos, los cuales son estables bajo condiciones fuertemente ácidas. Hasta hoy constituye uno de los soportes más utilizados (ver Figura: 38)

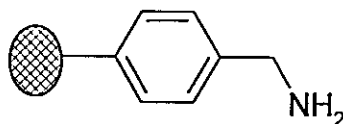


Figura: 38 Resina amino metil.

Estas resinas son las que se denominan como *resinas integrales* pues el conector, ya sea el clorometilo, aminometilo o hidroximetilo, se introducen en el proceso de elaboración del polímero. Luego, una vez obtenido el polímero, estas resinas integrales se derivatizan y así se ha generado una gran variedad de conectores suplementarios que permiten la fijación de casi cualquier grupo funcional a la resina.

1.14.2 LOS CONECTORES (“LINKERS”)

El punto de unión entre el conector y el soporte sólido debería ser químicamente estable durante la síntesis y la liberación de la molécula de la resina, tal como para cualquier grupo protector para química en solución. El rendimiento para su acoplamiento y liberación debería ser tan cuantitativo como sea posible. En combinación la unidad RESINA-ESPACIADOR-CONECTOR debe ser entonces considerada en síntesis en fase sólida como un grupo protector insoluble e inmovilizador. En los últimos 15 años se han desarrollado mas de 200 conectores diferentes, lo que permite que hoy se pueda

realizar un amplio rango de reacciones complejas permitiendo que se tenga una gran diversidad en términos de condiciones de liberación de productos de una manera selectiva^{103,104}

Es muy frecuente que en la bibliografía especializada los conectores se clasifiquen de acuerdo a las condiciones de reacción necesarias para la liberación del producto. Es así como se conocen siete grupos:

a) Conectores liberados en condiciones ácidas: la mayoría de los conectores lábiles frente a ácidos fueron desarrollados para la síntesis de péptidos y tienen su origen en el uso de los grupos protectores mono- o dialcoxibencilo o tritilo. Fueron desarrollados para permitir la liberación bajo condiciones ácidas pero no tan extremas como las necesarias en el caso de la resina de Merrifield (HF, TFA, TFMSA). La fortaleza del ácido requerido para inducir la liberación está relacionada con los sustituyentes electrodonores del anillo aromático que estabilicen el catión bencílico que se forma como intermediario. Así, a mayor estabilización por resonancia debida a los grupos arilo o alcoxiarilo, más débil podrá ser el ácido necesario para la liberación.

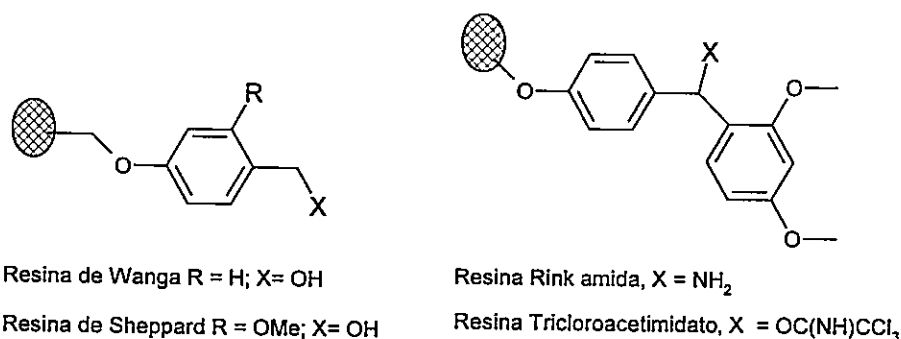


Figura: 39 Algunas resinas sensibles a condiciones ácidas.

La Resina de Wang: es sin duda una de las resinas mas utilizadas. La liberación de ésteres se realiza normalmente con mezclas de TFA/DCM liberando ácidos carboxílicos. Se ha publicado un método¹⁰⁵ mediante el cual se pueden liberar alcoholes (primarios secundarios o terciarios). En ese método se funcionaliza la resina de Wang para obtener el tricloroacetimidato el cual se acopla con el alcohol. La liberación se logra tratando la resina con TFA/DCM y un catalizador de Lewis. El conector de Wang también se ha utilizado para la inmovilización de aminas al derivatizar primero la resina con el 4-nitrofenil-cloroformiato¹⁰⁶ para unir los producto como carbamatos. Otra posibilidad para unir aminas es la aminación reductiva del aldehído de Wang. Otro conector muy popular es el de Sheppard el cual al portar un grupo metoxilo adicional permite que la liberación se realice con TFA/DCM al 5 % (ver Figura: 39).

La Resina de Rink fue también desarrollada para la síntesis de péptidos con el lado C-terminal como amida. Luego se extendió su uso para inmovilizar aminas¹⁰⁷, amidas sustituidas, tioles y alcoholes¹⁰⁸ (ver Figura: 39).

Otros: el conector tritilo se utiliza también para la inmovilización de ácidos aminas y alcoholes tiene buena resistencia a ácidos. A partir de este sistema y para obtener una resistencia a ácidos mayor aún se diseñó el conector fenilfluorenilo. Este conector difiere del tritilo en que dos de los anillos fenilos están unidos formando un sistema fluorenilo. En ese sistema el catión formado para la liberación está desestabilizado por su carácter antiaromático y como resultado el conector es más estable comparado con el sistema tritilo (ver Figura: 40).

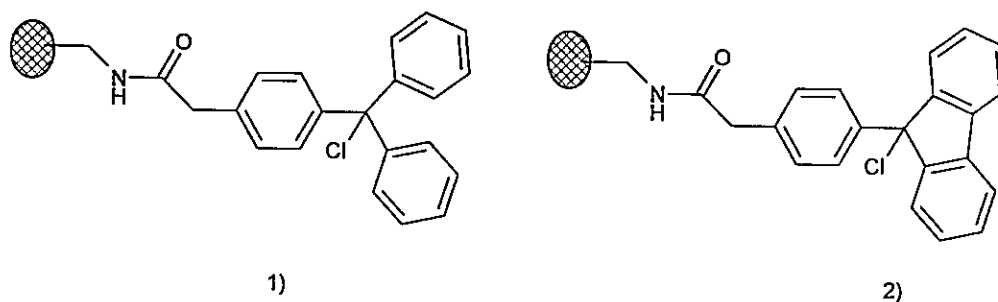


Figura: 40 1) Conector clorotritilo; 2) Conector fenilfluorenilo

Conectores liberados nucleofilicamente: en esta clase se encuentran resinas en las que la liberación del producto se realiza con el uso de bases, lo que implica que al final se requiere una operación adicional de purificación. La resina hidroximetilo después de ser transformada en el cloroformiato unido a la resina fue utilizada para producir dihidropiridonas. Las condiciones de clivaje aplicadas fueron NaOH en metanol¹⁰⁹. Los anteriores conectores son los más ampliamente usados y entre ellos se encuentra el que se usó en este trabajo de tesis. Ya que éste no pretende ser un trabajo detallado en el área de la síntesis en fase sólida solo se hará mención de la existencia de otras clases de conectores con sus referencias para que el lector interesado pueda dirigirse a tópicos específicos: Conectores liberados fotolíticamente^{110,111}; liberados por procedimientos con asistencia de metales¹¹²; liberados en condiciones reductivas¹¹³; liberados en condiciones oxidativas¹¹⁴; liberados sobre la base de reacciones de cicloadición y cicloconversión¹¹⁵. Existe un excelente artículo de revisión bibliográfica en el cual Bradley¹¹⁶ y colaboradores han cubierto en forma detallada el tema de los conectores en fase sólida, sus aplicaciones, sus ventajas, desventajas y condiciones de liberación.

1.15 OBJETIVO GENERAL

Diseñar y sintetizar peptidomiméticos (azapeptidos y azátidos), partiendo del prototipo Ac-L-P-F-F-D-NH₂, que se espera que inhiban la agregación de β A y que sean estables frente a proteasas.

1.16 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Diseñar secuencias azapeptídicas que pudieran ser de interés para mejorar la farmacocinética de la secuencia Ac-L-P-F-F-D-NH₂.
2. Sintetizar y caracterizar los azaaminoácidos protegidos necesarios para obtener las moléculas propuestas.
3. Sintetizar la secuencia Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂, con la intención de estudiar el efecto sobre la actividad inhibitoria de la agregación de A β y la resistencia frente a proteasas al introducir un nitrógeno muy cerca de un enlace peptídico que se quiere proteger (el enlace peptídico entre la prolina 2 y la fenilalanina 3).
4. Sintetizar la secuencia Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂, con la intención de estudiar el efecto sobre la actividad inhibitoria de la agregación de A β y la resistencia frente a proteasas al introducir un nitrógeno sobre el enlace peptídico entre la fenilalanina 3 y la fenilalanina.
5. Sintetizar la secuencia Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂, con la intención de estudiar el efecto sobre la actividad inhibitoria de la agregación de A β y la resistencia frente a proteasas de la introducción de dos azaaminoácidos

que combinan en una sola molécula las modificaciones presentadas en los dos compuestos precedentes, lo que permitiría además de estudiar las consecuencias sobre la actividad inhibitoria y la resistencia frente a proteasas demostrar la generalidad de la metodología sintética aquí aplicada.

6. Familiarizarse con las técnicas de evaluación de la actividad inhibitoria de agregación de A β en ensayos *in vitro* de los compuestos así como interpretar los resultados obtenidos.
7. Familiarizarse con las técnicas de evaluación de la resistencia a hidrólisis enzimática de los compuestos en ensayos *in vitro* así como interpretar los resultados obtenidos.

1.17 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a las características estructurales y electrónicas tan particulares de los azapapéptidos, sería posible obtener compuestos análogos de Ac-L-P-F-F-D-NH₂ que conserven la actividad inhibitoria de la agregación de A β mostrada por la secuencia a mimetizar, pero que presenten una mejor estabilidad frente a proteasas.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los análisis se realizaron en los equipos que se describirán a continuación:

HPLC. Columna Waters Symmetry C8, 50 x 4.6 mm, condiciones MeCN/H₂O, 5 a 100% (8 min), lectura de absorbancia 230-400 nm.

LC-MS: Waters ZMD (ES).

ESPECTROMETRO DE MASAS: PE-SCIEX API 150 EX (API y ESI).

HPLC-PREP: Waters Prep LC4000 sistema equipado con columnas Prep Nova-Pak[®] HR C186 μm 60 Å, 40 x 30 mm (muestras hasta 100 mg) o 40 x 300 mm (muestras hasta 1 g).

¹H-NMR: Bruker DPX-300.

2.1 LA SÍNTESIS DE LOS MONÓMEROS

Como se puede observar en el esquema general de reacción la obtención de monómeros protegidos y activados consta de tres pasos (ver Figura: 41)

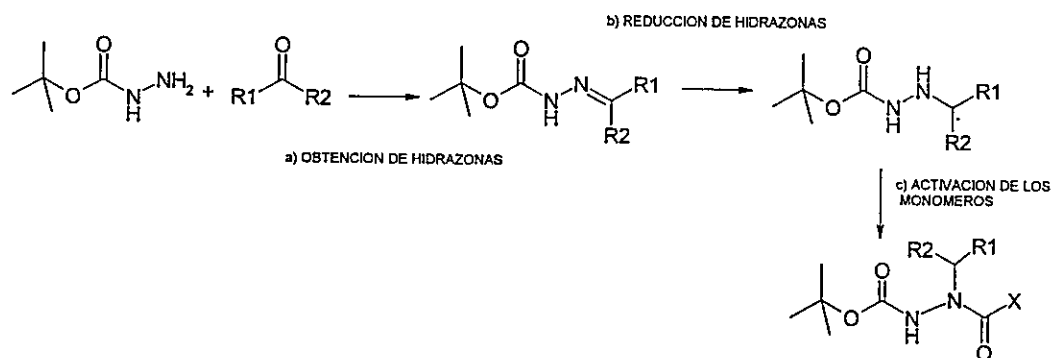


Figura: 41 Síntesis de monómeros activados.

2.1.1 OBTENCIÓN DE HIDRAZONAS PROTEGIDAS

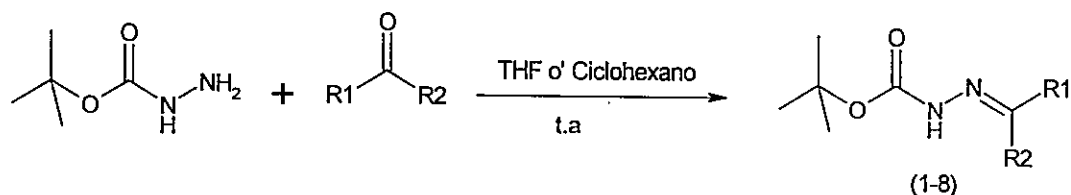


Figura: 42 Obtención de las hidrazonas

El procedimiento general fue el siguiente: *tert*-butil carbazato fue disuelto en ciclohexano o THF (ver Figura: 42). A esta solución se le agregó gota a gota y a temperatura ambiente otra solución de un equivalente del aldehído o cetona correspondiente disuelto en el mismo solvente y la mezcla fue magnéticamente agitada por el tiempo indicado en la Tabla: 1. En los casos donde la reacción condujo a la aparición de cristales, éstos se filtraron y se recrystalizaron en el solvente indicado. En los demás casos, después de evaporar el solvente el residuo aceitoso fue cristalizado en el solvente indicado.

La síntesis de los compuestos (1-13) y su caracterización ya habían sido reportados en 1975¹¹⁷ así que la identidad de los productos se realizó por la asignación de homologación de sus espectros de protones, carbono trece y/o puntos de fusión o ebullición. Sin embargo, en esa oportunidad sólo se aislaron los productos mayoritarios sin considerar la posible formación de isómeros geométricos. En el trabajo actual, al analizar los espectros de RMN de ¹H de las mezclas crudas de reacción, se detectó en algunos casos la formación de pares de compuestos muy semejantes que parecían ser isómeros E/Z alrededor del doble enlace carbono-nitrógeno. Una observación así no parece haber sido descrita antes, si bien teóricamente cabría esperarla. Por lo tanto, se

decidió intentar la separación y caracterización de los posibles isómeros. Esta tarea resultó ser más laboriosa de lo esperado puesto que en algunos casos la concentración de uno de los isómeros era muy baja o porque su separación por CC no fue exitosa.

P (#)	Precursor del aaa	R ₁	R ₂	Pf (°C)	Rend. (%)	t (h)	Solvente
1	Boc-V ^A	CH ₃	CH ₃	104	81	6	C ₆ H ₁₂
2	Boc-L ^A	CH(CH ₃) ₂	H	90-91	85	6	C ₆ H ₁₂
3	Boc-I ^A	CH ₂ CH ₃	CH ₃	76-78	93	12	C ₆ H ₁₂
4	Boc-F ^A	C ₆ H ₅	H	184-186	80	2	THF/C ₆ H ₁₂
5	Boc-Y ^A	C ₆ H ₄ -p-OCH ₂ C ₆ H ₅	H	154-155	79	2	THF/C ₆ H ₁₂
6	Boc-K ^A	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHBoc	H	120-122	43	12	C ₆ H ₁₂
7	Boc-D ^A (E)	COOEt	H	111-113	60	12	Tolueno
8	Boc-D ^A (Z)	COOEt	H	106-109	10	12	Tolueno

Tabla: 1 Hidrazonas obtenidas, P (#) = Producto número; Pf = Punto de fusión; Rend. = Rendimiento de la reacción; aaa = azaaminoácido.

DATOS ESPECTROSCOPICOS

Compuesto 1

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.48 (s, 9H, t-Butilo); 1.79 (s, 3H, CH₃); 2.00 (s, 3H, CH₃) 7.43 (bs, 1H, CO-NH-).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 15.8(CH₃) 25.2 (CH₃) 28.2(C(CH₃)₃) 80.7(C, t-Butilo) 149.7 (C=N) 152.8 (CO).

Compuesto 2

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.09(d, 6H, $J=6.84$ Hz, $-(\text{CH}_3)_2$) 1.42(s, 9H, t-Butilo); 2.6 (oct, 1H, CH); 7.05(d, 2H, $J=5.7$ Hz, $-\text{N}=\text{CH}-$) 7.72(bs, 1H, $\text{CO}-\text{NH}-$)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 19.8 ($(\text{CH}_3)_2$) 28.3($(\text{CH}_3)_3\text{C}$) 31.28(CH), 80.84 (C, t-Butilo), 152.28 (C=N) 153 (CO).

Compuesto 3

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.11(t, 3H, $J=7.52$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) 1.51(s, 9H, t-Butilo); 1.79 (s, 3H, $\text{C}=\text{CH}_3$); 2.32(Q, 2H, $J=7.49$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) 7.38(bs, 1H, $\text{CO}-\text{NH}-$)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 23.16 (CH_3CH_2) 28.52($(\text{CH}_3)_3\text{C}$) 29.71($\text{CH}_3-\text{C}=\text{N}$) 32.53 (CH_3CH_2), 81.13 (C, t-Butilo), 153.36 (CO o C=N) 154.24 (C=N o CO).

Compuesto 4

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.53 (s, 9H, t-Butilo); 7.32 (m, 3H, $2m, 1p$); 7.65(m, 2H, $2o$); 7.88(bs, 1H, CONH); 8.32(bs, 1H, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ph}$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 28.26($(\text{CH}_3)_3\text{C}$) 81.37 (C, t-Butilo), 127.14(C_{2m}) 128.50(C_{2o}) 129.73 (C_p) 133.97 (C_{ipso}), 143.66($-\text{N}=\text{CH}-\text{Ph}$), 152.54 (CO).

Compuesto 5

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.52(s, 9H, t-Butilo); 5.04 (s, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$); 6.92(d, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, $2o$, sistema bisustituido); 7.36(m, 5H, protones aromáticos sistema monosustituido) 7.58(d, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, $2p$, sistema bisustituido); 7.78(bs, 1H, CONH) 8.13(bs, 1H, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ph}$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 28.23($(\text{CH}_3)_3\text{C}$) 69.95($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 81.10 (C, t-Butilo), 127.14(C_{2m}) 128.50(C_{2o}) 129.73 (C_p) 133.97 (C_{ipso}), 143.66($-\text{N}=\text{CH}-\text{Ph}$), 152.54 (CO).

Compuesto 6

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.45 (s, 9H, t-Butilo) ; 1.51 (s, 9H, t-Butilo); 1.73 (m, 2H, CH_2); 2.35 (m, 2H, CH_2); 3.17 (m, 2H, CH_2); 4.70 (bs, 1H, -C-NH-Boc); 7.19 (m, 1H, $\text{CH}=\text{N}$ -); 7.71 (s, 1H, CO-NH-N).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 156.51(CO); 155.99 (CO) 146.19(-N=CH-); 81.07 (C, t-Butilo) 80.27 (C, t-Butilo); 39.87(CH_2) 29.49 (CH_2); 28.48($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 28.34($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 26.99 (CH_2).

Compuesto 7

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.32(t, 3H, $J = 7.2\text{ Hz}$, - CH_3); 1.51 (s, 9H, t-Butilo); 4.30 (q, 2H, $J = 7.2\text{ Hz}$, - CH_2 -); 7.53 (s, 1H, CO-NH-N); 8.98 (s, 1H, N=CH-CO)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 13.93(- CH_3) 28.07($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 61.31(O- CH_2); 82.30(C, t-Butilo); 126.13 (-N=CH-); 151.91(N=CH-CO-O) 162.05(O-CO-N)

Compuesto 8

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.33(t, 3H, $J = 7.2\text{ Hz}$, - CH_3); 1.52 (s, 9H, t-Butilo); 4.30 (q, 2H, $J = 7.2\text{ Hz}$, - CH_2 -); 7.53 (s, 1H, CO-NH-N); 8.73 (s, 1H, N=CH-CO)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 14.16(CH_3) 28.12($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 61.52(O- CH_2); 82.83(C, t-Butilo); 134.13 (-N=CH-); 151.51(N=CH-CO-O) 162.50(O-CO-N).

2.1.2 REDUCCIÓN DE HIDRAZONAS

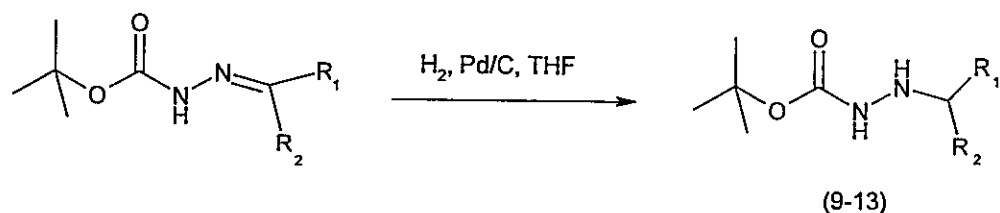


Figura: 43 Reducción de las hidrazonas.

El procedimiento general para la obtención los compuestos (9-13) fue el siguiente (ver Figura: 43): la hidrazona protegida fue disuelta en el solvente indicado en la Tabla: 2 y se agregó paladio metálico (al 10%) soportado sobre carbón activado. La suspensión fue hidrogenada con agitación en un hidrogenador de Parr convencional con reactor de vidrio (60-80 PSI) a temperatura ambiente por el tiempo indicado en la misma tabla, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite[®], el solvente se evaporó a sequedad y el producto (todos fueron líquidos) fue purificado, ya sea por cromatografía en columna de gel de sílice o por destilación a presión reducida.

P (#)	aaa Protegido	R ₁	R ₂	Solvente	Rend. (%)	t (h)
9	Boc-V ^A	CH ₃	CH ₃	THF	78	5
10	Boc-L ^A	CH(CH ₃) ₂	H	THF	48	3
11	Boc-I ^A	CH ₂ CH ₃	CH ₃	THF	52	4
12	Boc-F ^A	C ₆ H ₅	H	THF/ MeOH	87	0.25
13	Boc-Y ^A	C ₆ H ₄ -p-OCH ₂ C ₆ H ₅	H	THF/ MeOH	100	0.25

Tabla: 2 Reducción de las hidrazonas.

Compuesto 9:

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.98(d, 6H, $J = 6.25\text{Hz}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.42 (s, 9H, *t*-Butilo), 3.10 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.79(bs, 1H, N-NH-), 6.30(bs, 1H, CO-NH-N).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 20.28($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 28.07($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 50.45(NH-CH-), 79.89(C, *t*-Butilo), 156.70(CO).

Compuesto 10

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.93(d, 6H, $(-\text{CH}_3)_2$) 1.46(s, 9H, *t*-Butilo); 1.73(sep, 1H, $J = 6.70\text{ Hz}$, CH); 2.66 (d, 2H, $J = 6.8\text{ Hz}$, -N-NH- CH_2 -) 3.88(bs, 1H, CO-N-NH-), 6.25(bs, 1H, -CO-NH-NH-)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 20.57($(\text{CH}_3)_2$) 26.88(CH₂), 28.38($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 59.97(-CH-), 80.33 (C, *t*-Butilo), 156.83 (CO).

Compuesto 11:

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.91(t, 3H, $J = 7.45\text{ Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) 1.00(d, 3H, $J = 6.26\text{ Hz}$ CH- CH_3), 1.46(s, 9H, *t*-Butilo); 2.91 (m, 1H, -CH-); 4.03(bs, 1H, CO-N-NH-) 7.14(bs, 1H, CO-NH-)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 9.95 (CH_2-CH_3) 17.73(-CH- CH_3), 25.501(- CH_2 -), 28.29($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 56.56(-CH-), 80.21 (C, *t*-Butilo), 156.82 (CO).

Compuesto 12

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.51(s, 9H, *t*-Butilo); 3.94 (s, 2H, O- CH_2 -Ph); 4.11(bs, 1H, -CO-N-NH); 6.67(bs, 1H, -CO-NH-NH), 7.26(m, 5H, phenyl)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 28.56($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) 56.11(-O- CH_2 -Ph), 80.71(C, *t*-Butilo), 127.83(C_{ipso}), 128.80(C_{2m}), 129.47 (C_{2o}), 138.10 (C_p), 157.18(CO).

Compuesto 13

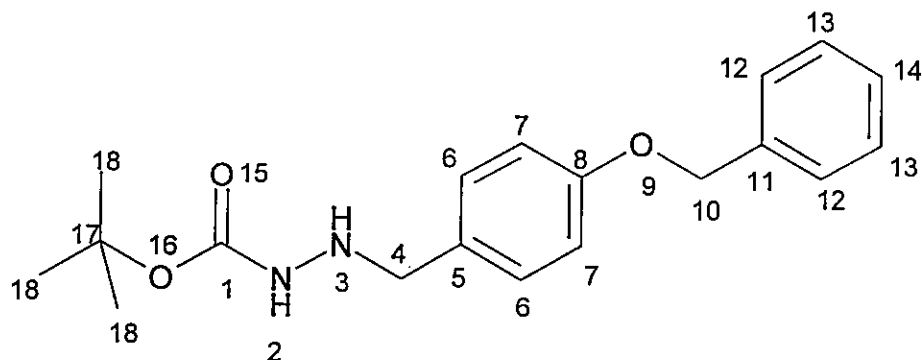


Figura: 44 Sistema de numeración del compuesto 13

^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ 1.40(s, 9H, t-Butilo); 3.80 (s, 2H, NH- CH_2 -); 5.09(s, 2H, O- CH_2 -Ph) 6.96(d, 2H, $J = 9.00\text{Hz}$, 2o, sistema AB); 7.24(d, 2H, $J = 9.00\text{Hz}$, 2p, sistema AB); 7.38(m, 5H, protones aromáticos sistema monosustituido) 8.22(bs, 1H, CONH).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 28.5(C18); 54.3(C4) 69.9(C10) 81.1(C17); 114.8(C7); 127.9(C12); 128.1(C14); 128.7(C13); 130.0(C6); 130.2(C5); 152.7(C8); 157.1(C1)

2.1.3 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 16

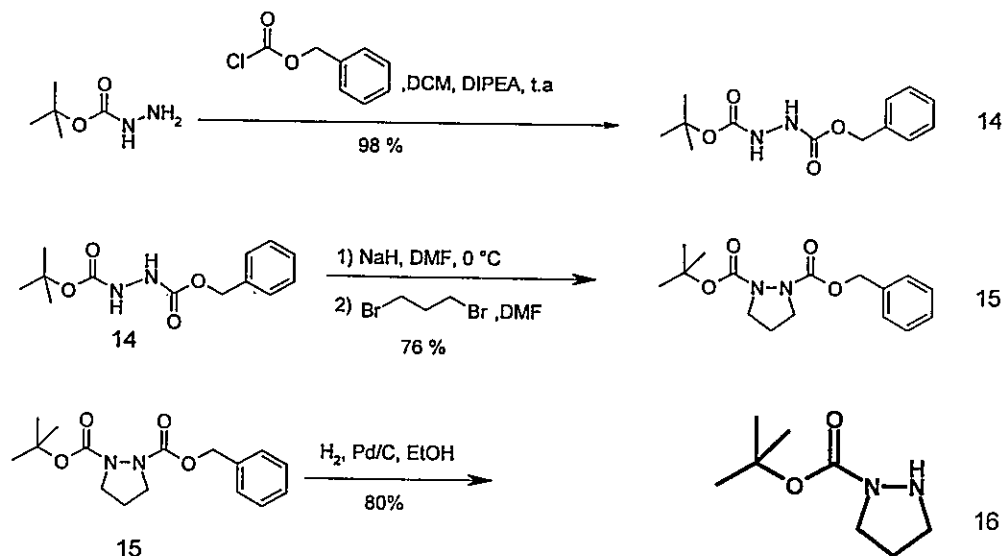


Figura: 45 Esquema general para la síntesis de 16

La formación del anillo de 5 miembros con dos nitrógenos vecinos (pirazolidina) de la azaprolina fue lograda básicamente de acuerdo con una metodología ya descrita (Dutta y col.)⁹¹ En este método el primer paso consiste en la protección del nitrógeno libre del *t*-butilcarbazato, con Z. Luego de la remoción de los dos protones amídicos con la formación (evidenciada por la formación de una especie coloreada) de un dianión usando una base fuerte como el hidruro de sodio se forma el anillo al agregar 1,3-dibromopropano y una amina terciaria para capturar el HBr formado. El último paso es la remoción del grupo Z por medio la hidrogenación catalítica. A continuación se detallan los procedimientos experimentales para la síntesis de la molécula (4) y de sus intermediarios (ver Figura: 45).

2.1.3.1 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 14

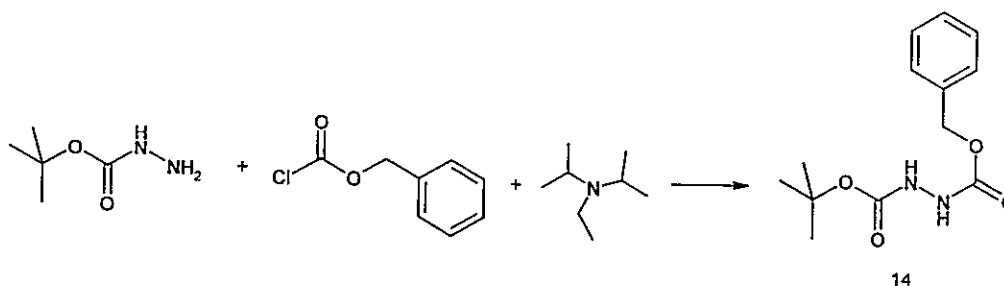


Figura: 46 Síntesis del intermediario 14

Se disolvieron 10 g (75,7 mmoles) de *tert*-butil-carbazato en 400 ml de DCM, luego se agregó gota a gota una solución de 25.9 ml (151,3 mmoles) de DIPEA en 100 ml de DCM. Finalizada la adición y en la misma forma se agregó una solución de 11.8 ml (83,23. mmoles) de cloroformiato de bencilo (Z-Cl) en 100 ml de DCM. Esta mezcla fue agitada magnéticamente por 12 horas, extraída con HCl 0.1 N (5 × 200 ml), con salmuera (5 × 200 ml), la fase orgánica fue secada con MgSO₄ anhidro y el solvente evaporado al vacío. El residuo fue un aceite amarillento (20.2 g, 99% de rendimiento). El análisis por TLC mostró un solo compuesto, el que presentó un tiempo de retención en HPLC de 3.1 min, el LC-MS mostró (M-1)⁻ = 265.22.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.48 (s, 9H, *t*-Butilo); 5.19(s, 2H, -CH₂-Ph); 6.39(bs, 1H, -CO-NH-) 6.63(bs, 1H, -CO-NH-); 7.37(m, 5H, fenil)

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 28,5(C(CH₃)₃); 68.2(-CH₂-Ph); 82.24(C, *t*-Butilo); 128.94; 136.00; 158.40(*t*-butil-O-CO-).

2.1.3.2 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 15

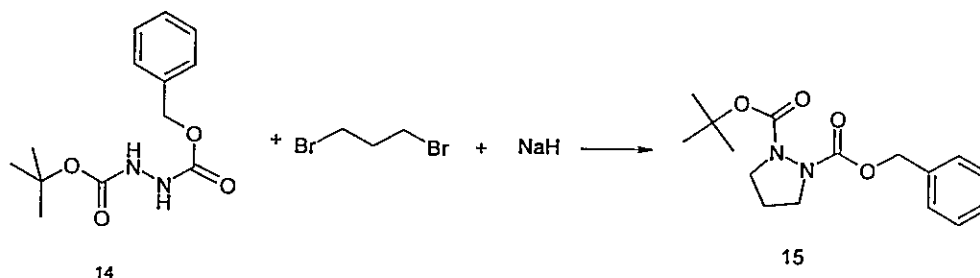


Figura: 47 Síntesis del intermediario 15

En un balón de tres bocas de 500 ml bien seco, se mezclan 1.5 g de NaH (suspensión al 60% en aceite de parafina, 37.5 mmoles) en 100 ml de DMF. La mezcla fue enfriada a 0 ° C y se agregó gota a gota una solución de 3.9 g de 14 (18.8 mmoles; ver Figura: 47). Cuando la mezcla se tornó rojiza se agregó otra solución de 1.91 ml de 1,3-dibromopropano (18.8 mmoles) en 100 ml de DMF. 30 minutos después la mezcla fue retirada del baño de enfriamiento, se le permitió llegar a temperatura ambiente y se dejó en agitación por una noche. El solvente fue evaporado al vacío, el producto crudo diluido con EtOAc (100 ml), el polvo blanco que precipitó fue removido por filtración, la solución fue extraída con salmuera (3 × 50 ml), secada con MgSO₄ anhidro y después de evaporar el solvente se obtuvo un aceite amarillo (5.4 g rend = 75 %) con los siguientes datos: HPLC (3.81 min) LC-MS; LC-MS; (M+1)⁺ = 207; (M-1)⁻ = 265.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.35(s, 9H, t-Butilo); 1.97(m, CH₂); 3.20(m, CH₂) 3.85(m, CH₂); 5.10(m, 2H, -CH₂-Ph); 7.27(m, 5H, fenilo).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 26.0(CH₂-CH₂-CH₂-) 28.46(C(CH₃)₃); 46.6(N-CH₂); 47.1(N-CH₂); 68.4(-CH₂-Ph); 60.78; 81.96(C, t-Butilo); 128.3(-CH-, aromático);

128.4(-CH-, aromático); 128.8(-CH-, aromático); 136.6(-C-, aromático); 156.6.(t-butil-O-CO-); 157.1(Bz-O-CO-).

Este producto se utilizó en el siguiente paso sintético sin ninguna purificación

2.1.3.3 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 16

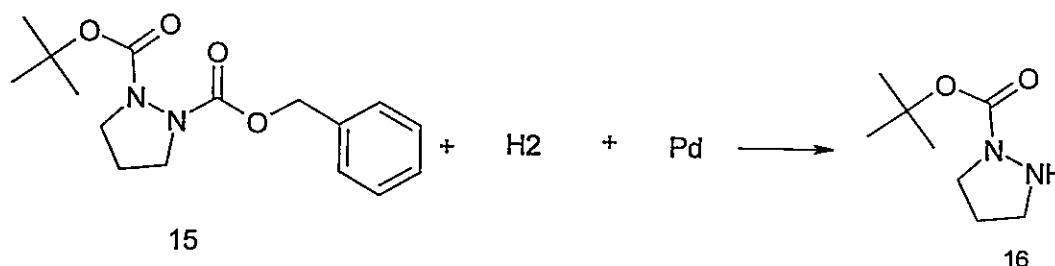


Figura: 48 Síntesis del intermediario 16

4 g de 15 (13.0 mmoles) se disuelven en 250 ml de MeOH, añadiendo 0.8 g de paladio en carbono activado al 10 % (ver Figura: 48). La mezcla se puso en un hidrogenador de Parr con reactor de acero inoxidable, y se hidrogenó a 110 PSI con agitación por una noche. Luego la suspensión se filtró a través de Celite®, el solvente se evaporó al vacío y el producto crudo (un aceite amarillo claro) se purificó por CC eluyendo con C₆H₁₂:EtOAc(8:2). datos: HPLC (1.81 min) LC-MS; LC-MS; (M+1)⁺ = 173; (M-1)⁻ = 171.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.42(s, 9H, (C(CH₃)₃)); 1.95(m, 2H,-CH₂-); 3.00(m, 2H,-CH₂-) 3.36(m, 2H,-CH₂-); 3.75(bs, 1H, -N-NH-).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 28.4(C(CH₃)₃); 28,8(CH₂-CH₂-CH₂-); 45.96(N-CH₂); 48.17(N-CH₂); 80.57(C, t-Butilo); 155.45(t-butil-O-CO-).

2.1.4 ESQUEMA GENERAL PARA LA SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 19

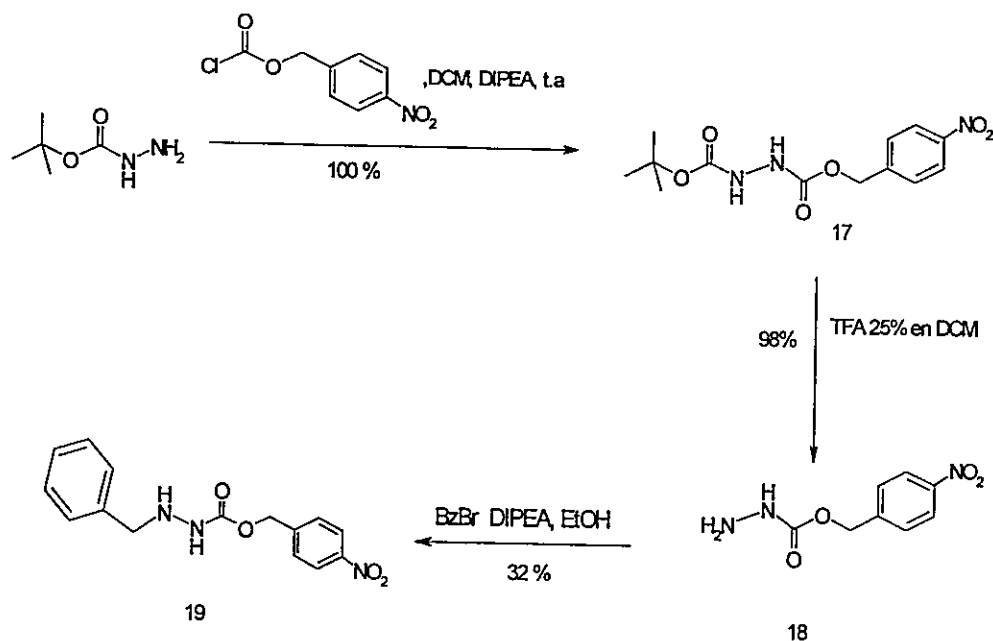


Figura: 49 Esquema general para síntesis del intermediario 19.

Para la introducción de la aza-fenilalanina se recurrió primero a la protección de la Boc-aza-fenilalanina con el grupo protector 4-nitro-benciloxicarbonilo (Nitro-Z) para obtener el intermediario, 17 el que puede ser visto como una hidracina con un grupo protector en cada nitrógeno, por un lado el grupo *t*-butiloxicarbonil (Boc) y por el otro el grupo Nitro-Z. Ambos son grupos protectores para aminas mutuamente ortogonales, es decir, se eliminan en condiciones diferentes. El siguiente paso es la desprotección en medio ácido (TFA) del nitrógeno protegido con Boc. Por último se realizó una alquilación directa con BzBr (ver Figura: 49).

2.1.4.1 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 17

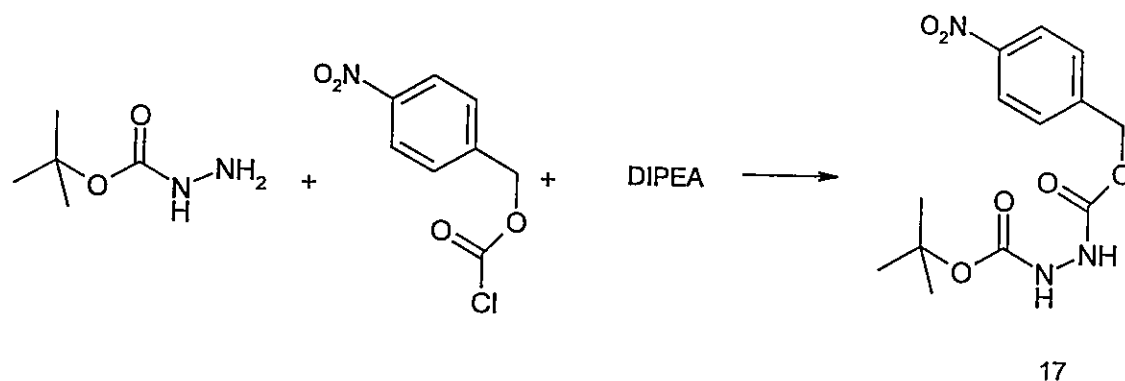


Figura: 50 Síntesis del intermediario 17

Se disolvieron 1.23 g (9.28 mmol) de *t*-butilcarbazato y 3.1 ml (15.6 mmol) de DIPEA en 50 ml de DCM. A esta solución se le agregó gota a gota una solución de 2,00 g (9.28 mmol) de cloroformiato de 4-nitrobencilo en 50 ml de DCM, la mezcla fue agitada magnéticamente por 20 minutos, la solución fue extraída con HCl 0.1 N (3 × 30 ml), la fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro y el solvente evaporó vacío. El producto crudo, un sólido amarillento (2.45 g, 89 % de rendimiento) fue el esperado.

HPLC, 3.5 min (92 %), LC-MS = 1.65 min; (M+1)⁺ = 212; (M-1)⁻ = 310.2 (ver Figura: 50).

Datos espectroscópicos:

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.47(s, 9H, *t*-butilo); 5.32(s, 2H, -CH₂-Ph); 6.45(bs, 1H, boc-NH-) 6.82(bs, 1H, Z-NH); 7.54(d, 2H, *J* = 9.00Hz, 2*o*, sistema AB), 8.23(d, 2H, *J* = 9.00Hz, 2*p*, sistema AB).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 28.50(C(CH₃)₃); 66.46(-CH₂-Ph-); 82.50(C,*t*-butil); 124.16(-2(CH)- aromático); 128.56(-2(CH)-aromático); 143.41(-C- aromático); 148.10(-C- aromático); 154.00(-CO-NH-); 170.30(-CO-NH-).

2.1.4.2 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 18

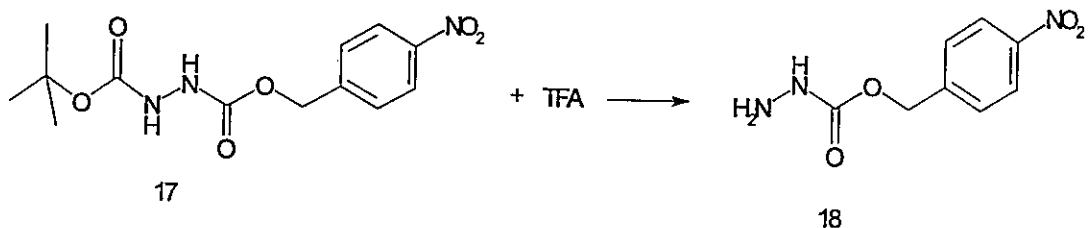


Figura: 51 Síntesis del intermediario 18

Se disolvieron 2.4 g (7.7 mmoles) de 17 en 6 ml de DCM. Luego se agregó gota a gota 2 ml de TFA, la mezcla fue agitada por 2 horas, el solvente evaporado al vacío y se agregaron 5 ml de Et₂O. Los cristales blancos formados (1.2 g, 74% de rendimiento) se removieron por filtración. La masa detectada y con los datos espectroscópicos estuvieron de acuerdo con la estructura esperada: el HPLC mostró un solo pico a Tr = 1.41 minutos, y 0.96 en el LC-MS; (M⁺)⁺ = 212 ;(M-1)⁻ = 210.26 (ver Figura: 51)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.23(bs, 2H, -NH₂-); 5.1(s, 2H, -CH₂-Ph-); 6.00(bs, 1H, -CO-NH-); 7.35 d, 2H, J = 9.00Hz, 2o, sistema AB); 8.1 (d, 2H, J = 9.00Hz, 2p, sistema AB).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 66.70(-CH₂-Ph); 123.16(-(CH)₂- aromático); 124.56(-(CH)₂- aromático); 141.41(-C- aromático); 147.10(-C- aromático); 168.50(-CO-).

2.1.4.3 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 19

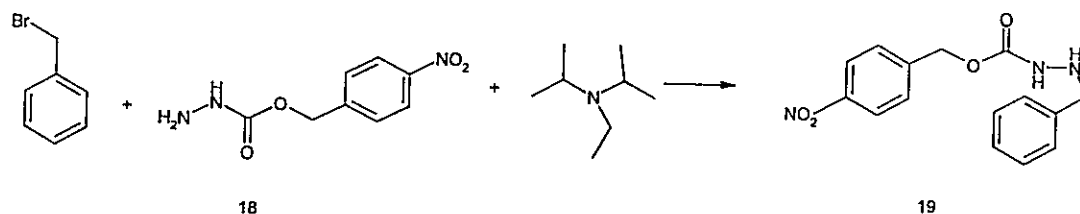


Figura: 52 Síntesis del intermediario 19.

Se disolvieron 5.2 g de 18 (24.6 mmol) y 6.9 ml de DIPEA (40.9 mmol) en 120 ml EtOH. A esta mezcla se agregó una solución de 2.4 ml BzBr (20.5 mmol) en 50 ml de EtOH, la solución se sometió a reflujo por una noche, el solvente fue evaporado al vacío y luego a la mezcla de reacción se le agregaron 150 ml de EtOAc. El sólido blanco formado fue eliminado por filtración, el solvente fue evaporado y el producto crudo sometido a purificación por CC, eluyendo con $C_6H_{12}:EtOAc$ (8:2) dando 2.2 g (36 % de rendimiento) de un material que presentó los siguientes parámetros (ver Figura: 52):

HPLC; 3.42 min, LC-MS 1.74 min; $(M+)^+ = 302.25$; $(M-1)^- = 300.24$

1H NMR (DMSO, 300 MHz): δ 3.34(bs, 1H-NH-Ph,); 3.91(s, 2H, -CH₂-Ph); 5.2(s, 2H, -CH₂-Z-NO₂) 7.31(m, 5H, -Ph); 7.57(d, 2H, $J = 9.00$ Hz, 2o, sistema AB). 8.22(d, 2H, $J = 9.00$ Hz, 2p, sistema AB); 8.79(bs, 1H, -CO-NH-).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz): δ 54.55(-CH₂-Ph); 64.43(-CH₂-Z-NO₂); 123.86(-(CH)₂-aromático); 127.20(-(CH)₂-aromático); 128,43(-(CH)₂-aromático) ;128.80(-(CH)₂-aromático); 138.93(-C-aromático); 145.19(-C-aromático); 147.27(-C-aromático); 156.91(-C-aromático);166.67(-CO-NH-).

2.1.5 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 21

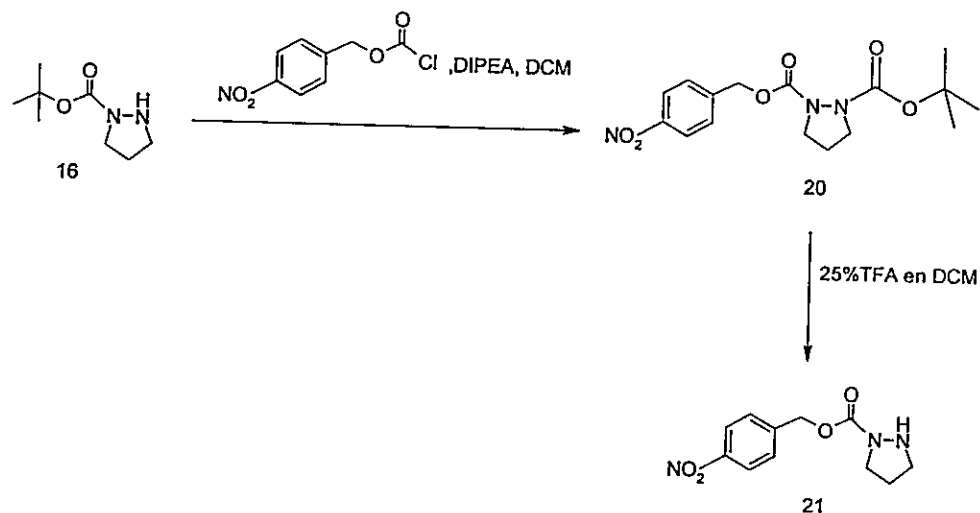


Figura: 53 Esquema general para la síntesis del intermediario 21.

En esta síntesis se partió con una molécula ya antes preparada (ver Figura: 53), la azaprolina protegida con Boc 16. Ésta se aciló con el cloroformiato de 4-nitrobencilo y por último se removió el grupo Boc en medio de TFA para obtener el producto.

2.1.5.1 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 20

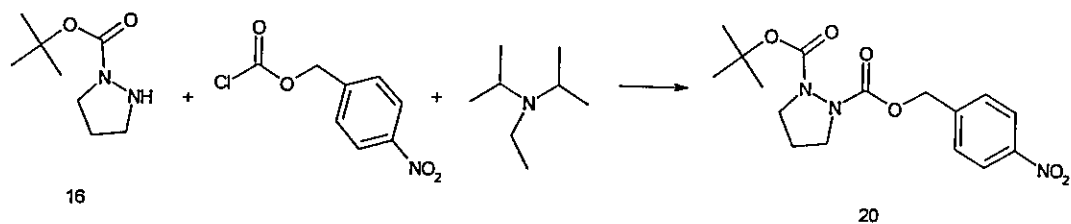


Figura: 54 Síntesis del intermediario 20

Se disolvieron 3.8 g de 16 (22.1 mmol) y 7.5 ml (5.7 g, .44.13.. mmol) de DIPEA en 50 ml de DCM. A esta solución se le agregó gota a gota otra solución de cloroformiato de 4 nitrobencilo (4.7 g, 22.1 mmol) en 50 ml de DCM. La mezcla de reacción se agitó por 2 horas, se extrajo con HCl 0.1 N (3 × 20 ml), la solución orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, el solvente se evaporó al vacío y el producto crudo se purificó por CC eluyendo con C₆H₁₂:THF (60:40). El producto, un sólido blanco (1.7 g, 43 %), presentó las siguientes características: HPLC, 3.8 min; LC-MS, 1.83 min; (M+1)⁺ = 352.22 (ver Figura: 54).

Datos espectroscópicos:

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.39(s, 9H, *t*-butil); 2.00(m, 2H, -CH₂-); 3.25(m, 2H,-CH₂-) 3.88(m, 2H,-CH₂-); 5.20(m, 2H,-CH₂-Z-nitro), 7.47(d, 2H, *J* =9.00Hz, 2*o*, sistema AB), 8.14(d, 2H, *J* = 9.00Hz, 2*o*, sistema AB).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 26.00(-CH₂-); 28.50(C(CH₃)₃); 46.53(-CH₂-); 47.51(-CH₂-); 66.52(-CH₂-Z-nitro); 82.27(C,*t*-butil); 124.06(-(CH)₂- aromático); 128.52-(CH)₂- aromático); 144.10(-C- aromático); 147.95(-C- aromático); 156.48(-CO-O-*t*-butil),168.00.(-CO-O-Z-nitro).

2.1.5.2 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 21

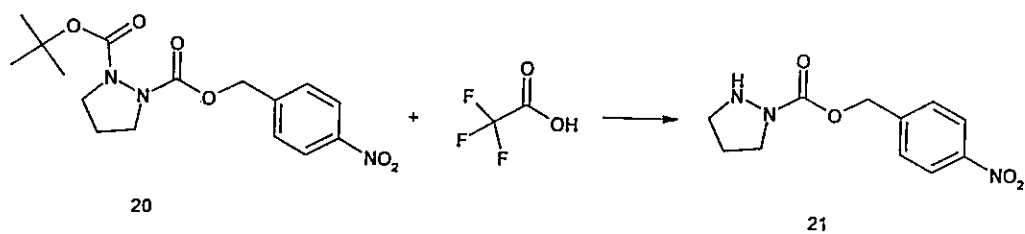


Figura: 55 Síntesis del intermediario 21

Se disolvieron 3.2 g (9.11 mmol) de **20** en 15 ml de DCM, luego se agregaron gota a gota 5 ml de TFA y la mezcla de reacción se agitó por 2 horas (ver Figura: 55). El solvente fue evaporado a sequedad, al residuo aceitoso se le agregaron 150 ml de éter etílico y los cristales blancos se recogieron por filtración (2.8 g, 80% de rendimiento). La HPLC mostró solo un pico con un tiempo de retención de 1.38 min y 1.16 min en el LC-MS; $(M+1)^+ = 252.33$

Datos espectroscópicos:

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 2.13(m, 2H, $-\text{CH}_2-$); 3.26(m, 2H, $-\text{CH}_2-$) 3.58(m, 2H, $-\text{CH}_2-$); 5.32(m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 7.67(d, 2H, $J = 9.00\text{Hz}$, 2o, sistema AB), 8.23(d, 2H, $J = 9.00\text{Hz}$, 2o, sistema AB), 9.3(bs, 1H, $-\text{NH}-$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 25.69($-\text{CH}_2-$); 46.35($-\text{CH}_2-$); 46.78($-\text{CH}_2-$); 66.22($-\text{CH}_2-\text{Z-nitro}$); 123.87($-2(\text{CH})-$ aromático); 128.67($-2(\text{CH})-$ aromático); 144.29($-\text{C-}$ aromático); 147.48($-\text{C-}$ aromático); 153.76($-\text{CO-O-}$).

2.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES:

A continuación se detallan algunos procedimientos experimentales que se aplican de manera rutinaria en la síntesis en fase sólida, tales como: lavado de resina después de cada paso sintético, remoción de un grupo protector (Boc, Fmoc, Alloc, nitroZ, Z, Bz, etc.), el test de Kaiser, el test para aminas secundarias y la liberación del producto de la resina.

2.2.1 LAVADO DE LA RESINA:

El lavado de la resina después de un paso sintético constituye un pilar del éxito de la síntesis en fase sólida puesto que es la operación homóloga a la purificación que se realiza en la síntesis en solución. Las condiciones del lavado dependen de la reacción que se realice, pero básicamente se trata del uso de disolventes o mezclas de ellos que barren un buen rango de polaridad y que además pueden hinchar la resina para que la purificación sea mas efectiva. Por ejemplo:

Después de realizar el acoplamiento de un aminoácido o un azaaminoácido a la resina (1 g) que se encuentra en un reactor de fase sólida se le trata con 8 ml de DCM, se agita en un agitador orbital por 5 minutos, el solvente se evacúa y el proceso se repite dos veces más. El mismo ciclo se repite pero con DMF y finalmente se efectúa un último ciclo con DCM.

Existen protocolos de lavado específicos: por ejemplo después de la eliminación de un grupo protector. En tales casos el procedimiento de lavado será explicado en detalle al momento de ser aplicado.

2.2.2 REMOCIÓN DE GRUPOS PROTECTORES.

Fmoc: la resina se suspende en 8 ml de solución al 25 % de piperidina en DMF, se agita por 25 minutos en un agitador orbital, el solvente se evacúa y se aplica el procedimiento general de lavado. El ciclo completo se repite una vez.

Alloc: En un reactor de fase sólida de 500 ml se suspende la resina (p. ej. 9.0 g; 0.27 mmol/g) en una solución de 6.0 ml (5.2 g, 48.6. mmol) de PhSiH_3 en 80 ml de DCM,

la mezcla se agita por 5 minutos bajo atmósfera de N_2 , luego se agrega una solución de 560 mg (0.5. mmol) de $Pd(PPh_3)_4$ en 80 ml de DCM y la mezcla es agitada en un agitador orbital por otros 20 min bajo atmósfera de N_2 . El solvente se evacúa y el ciclo completo se repite tres veces más.

Nitro-Z : En un reactor de fase sólida de 250 ml se ponen la resina (p. ej. 8.5 g, 0.27 mmol/g) y se suspende en 100 ml de DMF, por 20 minutos. La DMF se evacúa y se agrega 100 ml de una solución 2 M en $SnCl_2$, 1.6 M en AcOH y 0.01 M en fenol con DMF como solvente. La mezcla se agita por dos horas, el solvente se evacúa y el ciclo se repite dos veces más.

Test de Kaiser¹¹⁸: se utiliza para detectar grupos amino libres. Se toman unos pocos mg de la resina y se depositan en una ampolla de vidrio, se agrega tres gotas de cada uno de los reactivos del kit (solución de ninhidrina al 6% en etanol; solución de fenol al 80% en etanol; solución saturada de cianuro de potasio en piridina), se calienta a 120 °C por 5 minutos, una coloración azul de las perlas se toma como un indicativo de grupos aminos libres en la resina.

Prueba del Cloranilo para aminas secundarias: se colocan una pocas perlas de resina en un tubo de ensayo y se agregan tres gotas de una solución al 2 % de acetaldehído en DMF y tres gotas de una solución al 2 % de cloranilo en DMF. La mezcla se deja a 23 °C por 5 minutos. La aparición de un color azul en la resina es un indicativo de presencia de aminas secundarias¹¹⁹.

2.3 ESQUEMA GENERAL DE LA SÍNTESIS DE AC-L-P^AF-F-D-NH₂

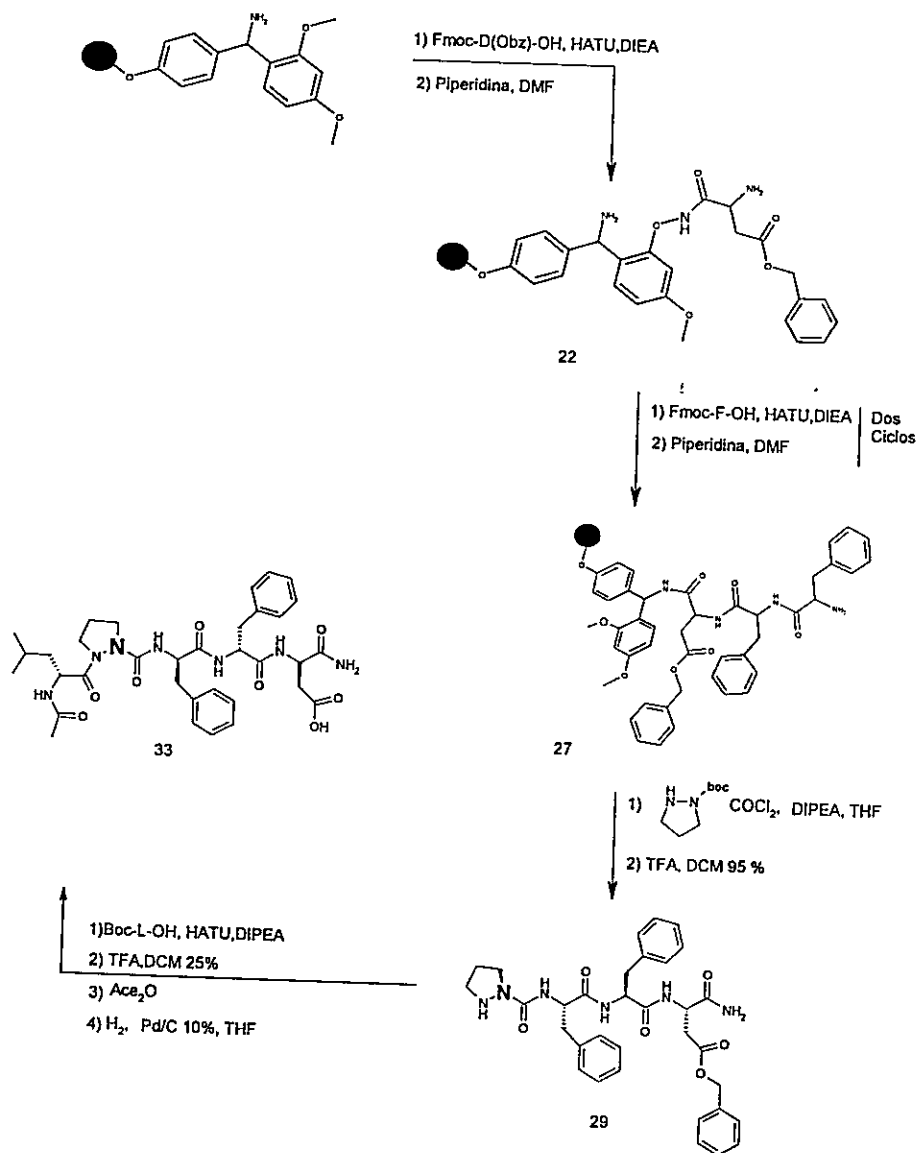


Figura: 56 Esquema general para la síntesis de Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂.

En lo sucesivo la presencia de una letra "A" como superíndice sobre el código de un aminoácido indica que ese residuo corresponde a un azaaminoácido, por ejemplo como

en este caso, el primer compuesto a sintetizar responde a una secuencia peptidomimética en la cual el aminoácido prolina ha sido reemplazado por una azaprolina (ver Figura: 56).

La resina que se utilizó en estas síntesis fue la resina Rink amida pues si se observa la estructura de la molécula deseada se ve que el objetivo es obtener un azapéptido que tiene su lado C terminal no como ácido carboxílico libre sino como amida. La resina Rink amida es un soporte ampliamente utilizado en la síntesis de péptidos C-modificados. Tiene una excelente estabilidad en medio básico y la liberación del producto de la resina se realiza con TFA (ver Figura: 57).

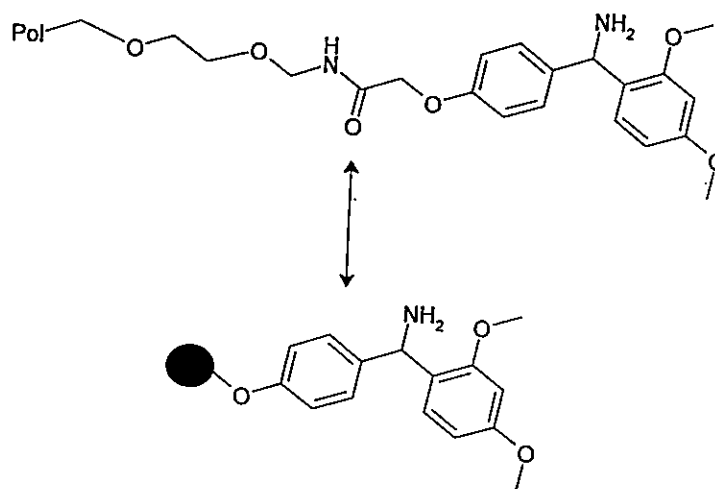


Figura: 57 Resina Rink amida

2.3.1 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 22

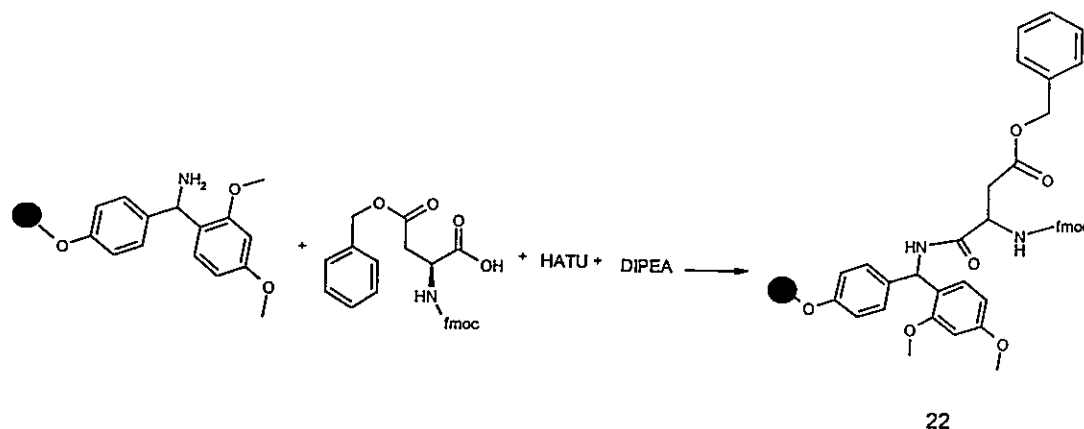


Figura: 58 Síntesis del intermediario 22

En un reactor de fase sólida se colocaron 11.7 g de resina con 0.23 mmol/g de carga (ver Figura: 58), se realizó un lavado como el descrito en el procedimiento general y se realizó el test de Kaiser que fue positivo. Luego la resina se suspendió en 100 ml de NMP y se sometió a agitación en un agitador orbital. Entre tanto se preparó una solución de 1.8 g (4.1 mmoles) de Fmoc-D (OBz)-OH, 2.05 g (5.4 mmoles) de HATU y 1.74 g (13.5 mmoles) de DIPEA en 100 ml de NMP. Cuando esta solución se tornó amarilla se agregó sobre la resina en el reactor, el conjunto se agitó por 2 horas y se lavó como se mencionó antes. El test Kaiser fue ahora positivo indicando que el acoplamiento fue total.

2.3.2 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 23

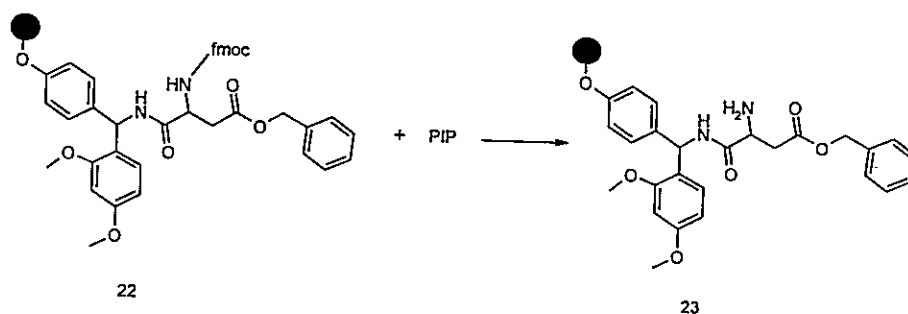


Figura: 59 Síntesis del intermediario 23

La desprotección del grupo amino protegido con Fmoc fue realizada de acuerdo con el método general. El test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 59).

2.3.3 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 24

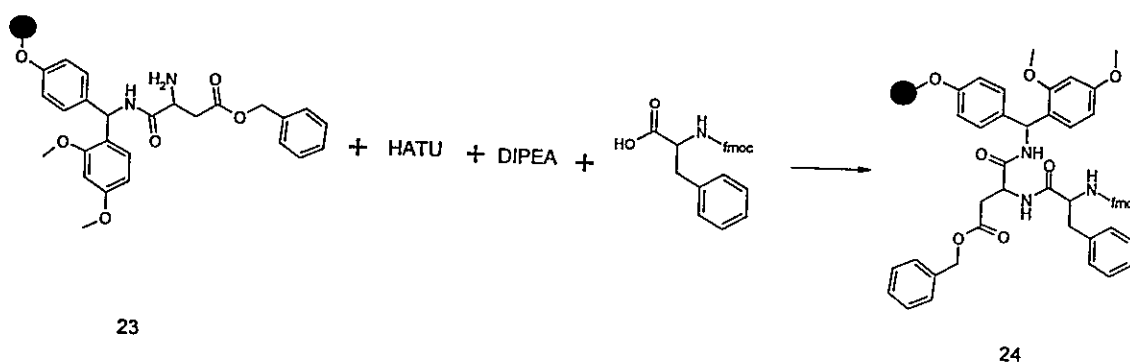


Figura: 60 Síntesis del intermediario 24

Se suspendieron 11.74 g de 23 en 100 ml de NMP, con agitación. Separadamente se preparó una solución de 1.56 g (4.1 mmoles) de Fmoc-F-OH, 2.05 g (5.4 mmoles) de HATU y 1.745 g (13.5 mmoles) de DIPEA en 100 ml de NMP. Una vez que esta última solución adquirió un color amarillo, se agregó en una sola porción sobre la suspensión

de resina. La mezcla fue agitada por dos horas, el solvente se evacuó y se realizó el lavado de costumbre. El test de Kaiser fue negativo (ver Figura: 61).

2.3.4 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 25

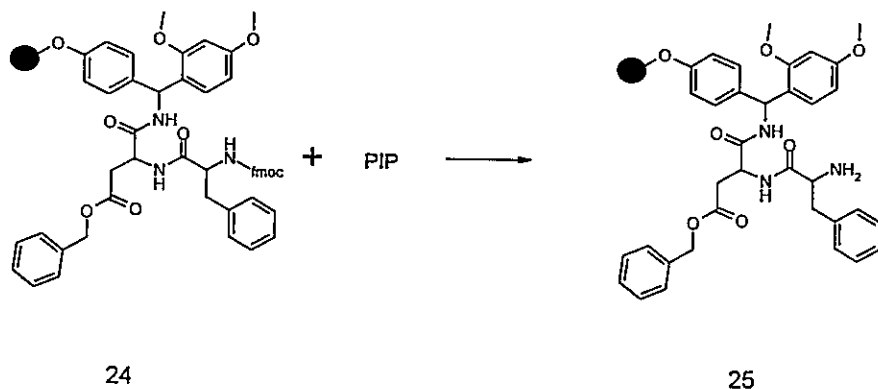


Figura: 61 Síntesis del intermediario 25

La desprotección se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento general para la remoción de Fmoc. El test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 61).

2.3.5 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 26

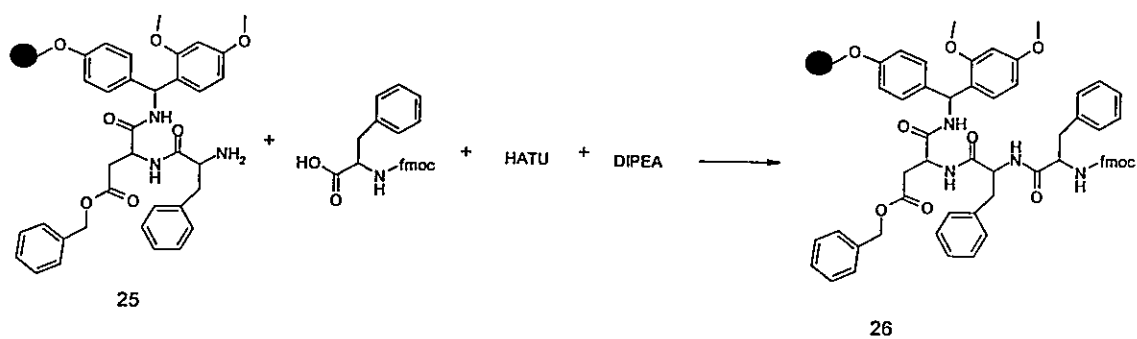


Figura: 62 Síntesis del intermediario 26

Se suspendieron 11.74 g de **25** en 100 ml de NMP, agitando. En paralelo se preparó una solución de 1.6 g (4.0 mmoles) de Fmoc-F-OH, 2.05 de HATU y 1.7 g (13 mmoles) de DIPEA en 100 ml NMP. Una vez que la solución había adquirido un color amarillo, se agregó en una sola porción sobre la suspensión de resina. La mezcla fue agitada por dos horas, el solvente se evacuó y se realizó el lavado de costumbre. El test de Kaiser fue negativo (ver Figura: 62).

2.3.6 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 27

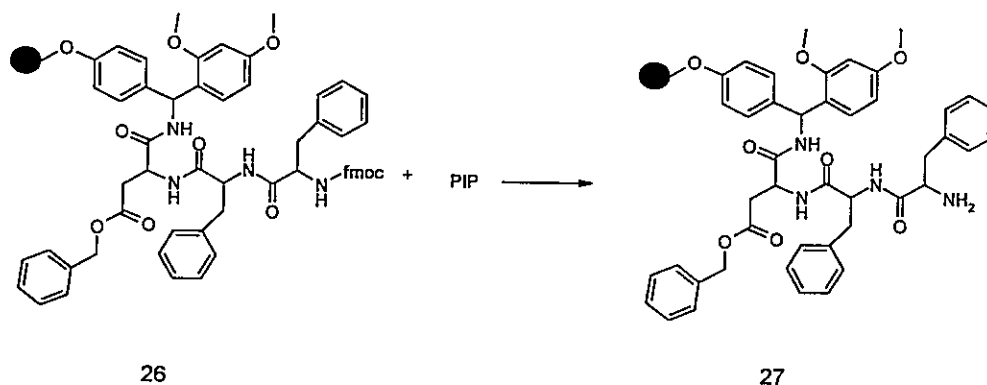


Figura: 63 Síntesis del intermediario 27

La desprotección se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento general para la remoción de Fmoc. El test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 63).

2.3.7 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 28

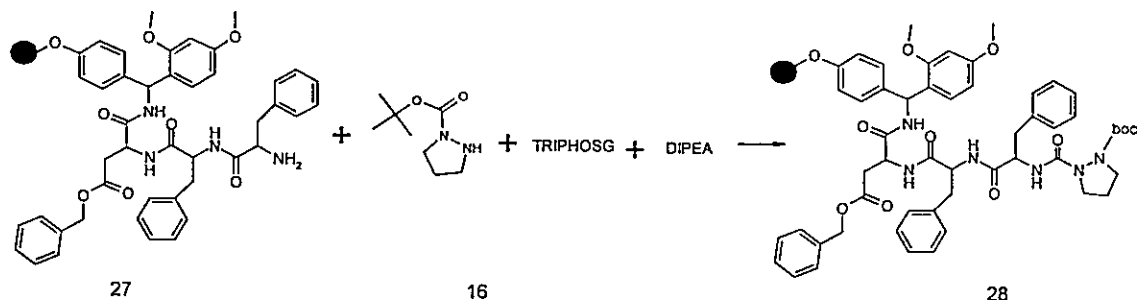


Figura: 64 Síntesis del intermediario 28

Se disolvieron 3 mg (0.01 mmoles) de trifosgeno en 1 ml de THF seco y se llevaron a un baño a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y bajo atmosfera de nitrógeno. A esta solución se le agregó una solución de 6 mg (0.03 mmoles) de 16, 24 μL (0.14 mmoles) de DIPEA disueltos en 1 ml de THF

La mezcla se agitó magnéticamente por 1 hora y luego esta solución fue agregada sobre una suspensión de 100 mg de 27 en 2 ml de THF que se encontraba a la misma temperatura y bajo atmosfera de nitrógeno. El conjunto se agitó por 30 minutos, se agregó una solución de 160 μL de DIPEA en 2 ml de THF, se retiró del baño de enfriamiento y se siguió agitando a temperatura ambiente por una noche. El medio de reacción fue evacuado y la resina lavada de la manera habitual. Después de esto el test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 64).

2.3.8 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 29

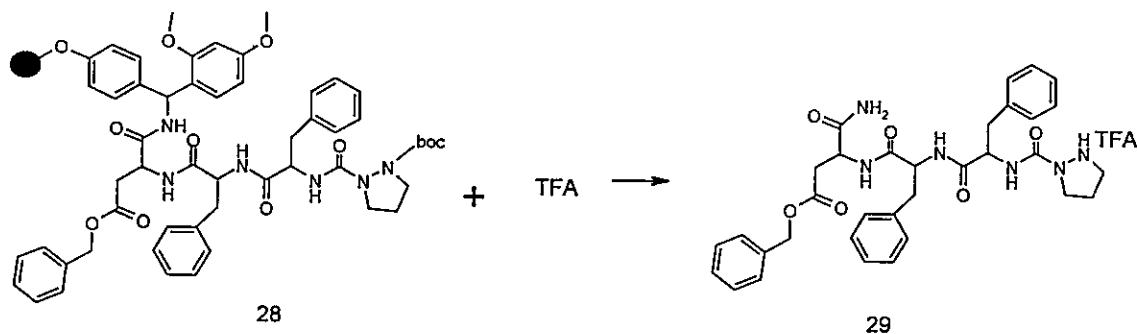


Figura: 65 Síntesis del intermediario 29

7.1 g de la resina 28 fue tratada con 20 ml de TFA al 95 % por 20 minutos por dos veces. Las soluciones ácidas se juntaron, el solvente se evaporó casi hasta sequedad, al aceite rojizo se le agregaron 40 ml de Et₂O, el sólido que precipitó se purificó por HPLC-PREP y se se obtuvo 42 mg (30 % de rendimiento) de un compuesto con Tr 3.6 minutos en la HPLC, 1.82 en la LC-MS: (M+1)⁺ = 615.56, (M-1)⁻ = 613.84 (ver Figura: 65).

2.3.9 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 30

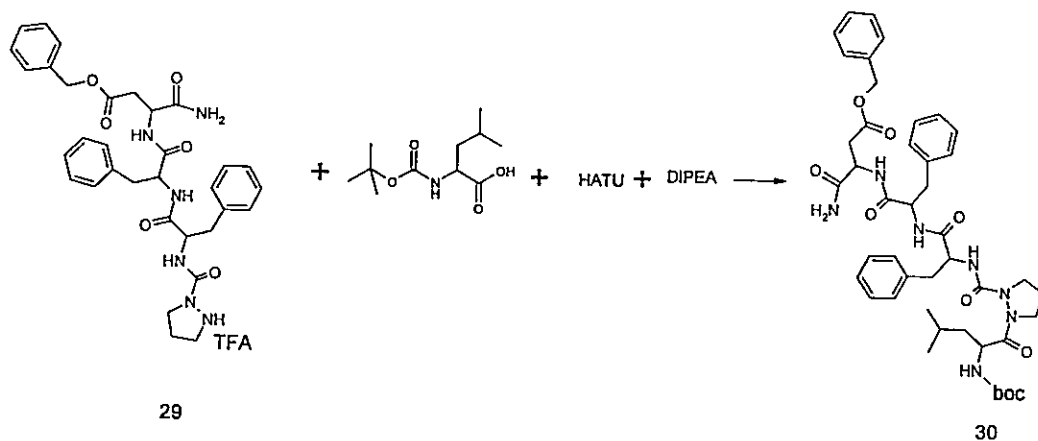


Figura: 66 Síntesis del intermediario 30

Se disolvieron 42 mg (0.07 mmoles) de la sal trifluoroacética de **29** y 58 μ l (0.34 mmoles) de DIPEA en 3 ml de DCM. A esta solución se le agregó una solución recién preparada de 24 mg (0.10 mmoles) de Boc-L-OH, 52 mg (0.14 mmoles) de HATU y 60 μ l (0.34 mmoles) de DIPEA en 4 ml de DCM. El conjunto se agitó magnéticamente por 2 horas, la mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de DCM y se lavó sucesivamente con NaOH 1 N (2 \times 10ml), ácido cítrico 10% (2 \times 10ml) y salmuera (2 \times 10 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, el solvente se evaporó y el producto crudo (32 mg) fue suficientemente puro para continuar con el siguiente paso: HPLC 5.2 (86.26 %); LC-MS, (M+1)⁺ = 827.98, (M-1)⁻ = 825.95 (ver Figura: 66).

2.3.10 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 31

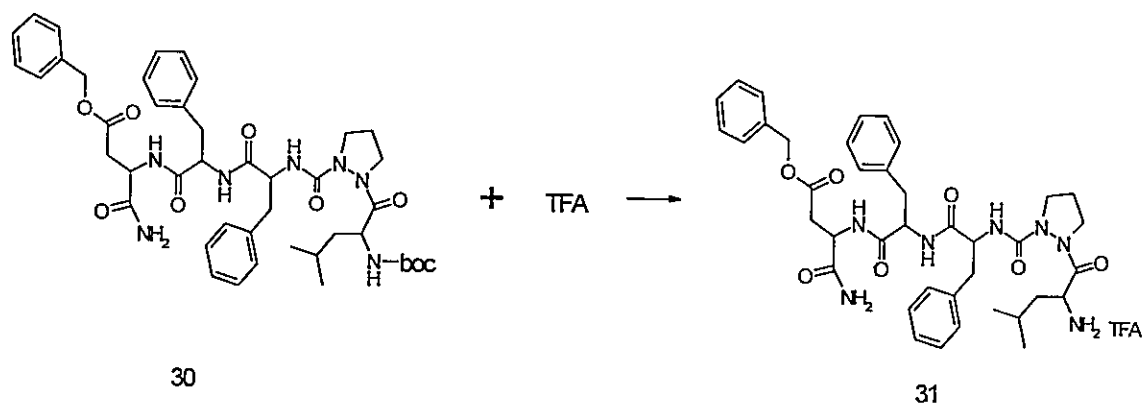


Figura: 67 Síntesis del intermediario 31

32 mg (0.06 mmoles) de **30** se disolvieron en 3 ml de TFA al 25% en DCM. La solución fue agitada por dos horas, el solvente se evaporó y al crudo se le agregaron 10 ml de Et₂O. El sólido resultante era un compuesto casi puro con las siguientes características (22 mg, 98 % de rendimiento), Tr = 3.38 min en la HPLC (86.85%) y 1.71 min en la LC-MS (M+1)⁺ = 728.05; (M-1)⁻ = 726.5 (ver Figura: 67).

2.3.11 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 32

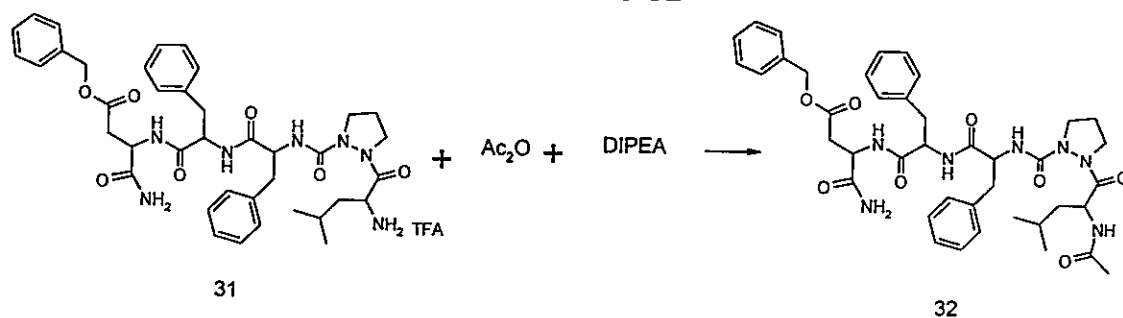


Figura: 68 Síntesis del intermediario 32

Se disolvieron 10 mg (0.01 mmoles) de **31** y 8 μl (0.05 mmoles) de DIPEA en 5 ml de DCM. A esta solución se le agregó gota a gota una solución de 11 μl (0.12 mmoles) de

Ac₂O en 2 ml de DCM y la mezcla fue agitada por dos horas. La HPLC mostró un pico principal a Tr = 4.4 min (49.3%), y 1.33 min para la LC-MS: (M+1)⁺ = 770.14; (M-1)⁻ = 768.00 (ver Figura: 68).

2.3.12 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 33

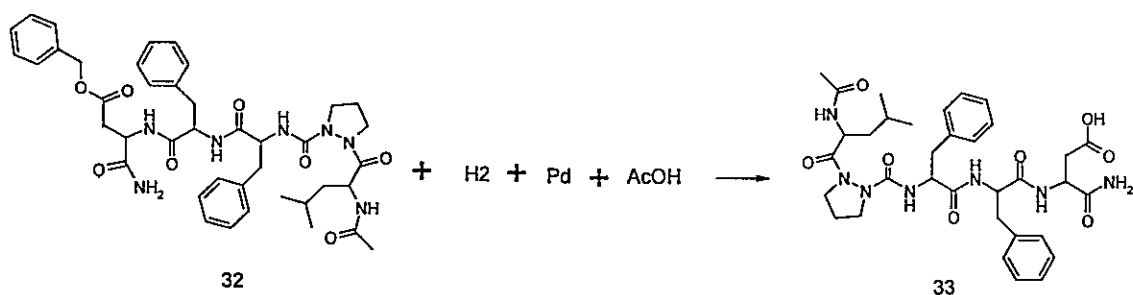


Figura: 69 Síntesis del intermediario 33

Se disolvieron 90 mg (0.12 mmoles) de **32** en 100 ml de MeOH, se agregó (2 gotas) de AcOH como catalizador, 50 mg (0.47 mmoles) de Pd/C 10 % y la mezcla se sometió a hidrogenación en un hidrogenador de Parr a 100 PSI. Una hora después la mezcla de reacción se filtró a través de Celite[®], el solvente se evaporó y el producto crudo se purificó por HPLC-PREP. Se obtuvieron 44 mg (55 % de rendimiento) de **33** con Tr = 3.36 min en la HPLC (98.96%) y 1.27 min en la LC-MS (M+1)⁺ = 679.99; (M-1)⁻ = 677.99 (ver Figura: 69).

2.4 ESQUEMA GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE AC-L-P-F^A-F-D-NH₂

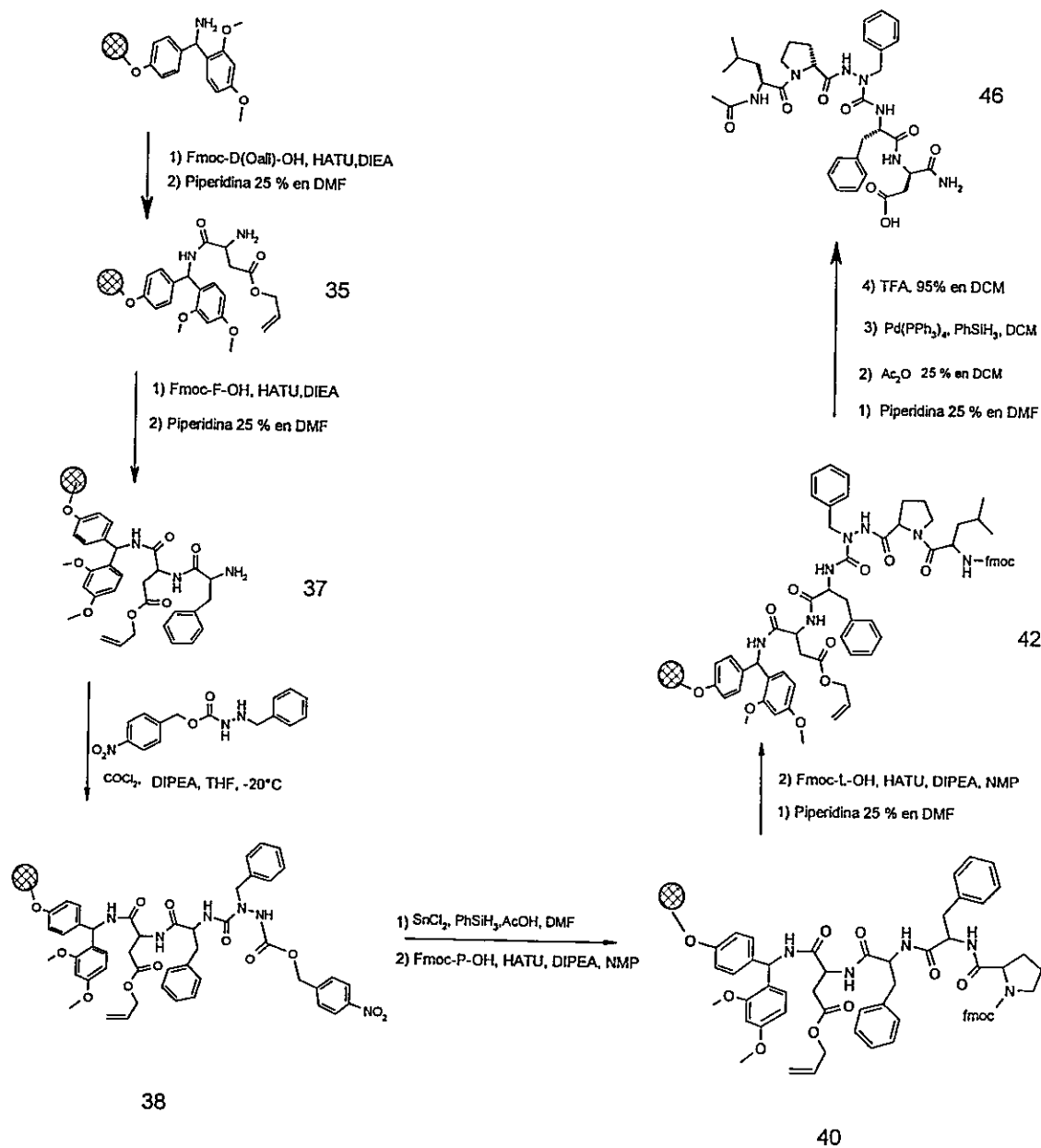


Figura: 70 Esquema general para la síntesis de Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂

En el esquema general para la síntesis de Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂ (ver Figura: 70) se empezó con la inserción de ácido aspártico con el grupo alilo como protector de la cadena lateral, a diferencia del péptido anterior en el que el aspartato se protegió con un grupo bencilo. En este caso se evitó el uso de este grupo pues su eliminación (por hidrogenación catalítica) no es compatible con el ahora introducido grupo *N*-bencilo que porta la azafenilalanina. También, para lograr hacer una síntesis completa en fase sólida, se recurrió al uso del grupo protector Nitro-Z el cual fue separado en condiciones reductivas con SnCl₂. El resto de la síntesis siguió las mismas pautas que para la molécula anterior. A continuación se detalla cada uno de los pasos sintéticos por separado.

2.4.1 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 34

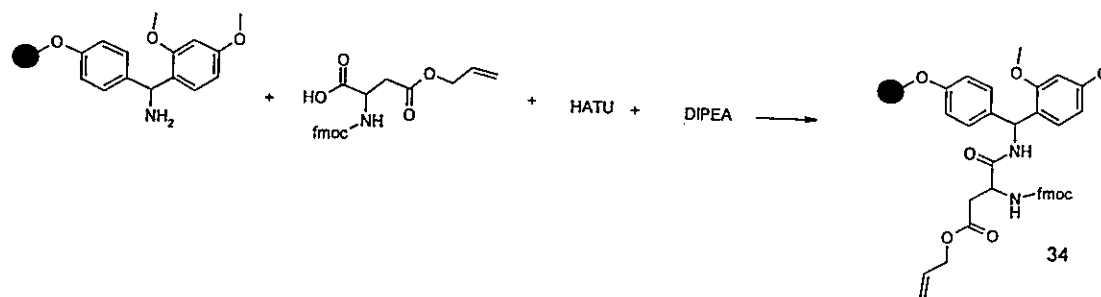


Figura: 71 Síntesis del intermediario 34

En un reactor de fase sólida de 500 ml se depositaron 25 g de resina Rink amida (0.23 mmol/g), se le realizó el lavado de rutina antes descrito, se realizó el test de Kaiser el cual fue positivo, se suspendió la resina en 100 ml de NMP y se llevó a agitación en un agitador orbital. En forma paralela se preparó una solución de 4.0 g (10.3 mmoles) de

Fmoc-D(Oalloc)-OH, 5.1 g (13.5 mmoles) de HATU y 5.7 ml (33.7 mmoles) de DIPEA en 100 ml de NMP. Cuando esta solución se había tornado amarilla se agregó sobre la suspensión de la resina, todo el conjunto se agito por dos horas, la solución se evacuó y se realizó el lavado de rigor. El test de Kaiser fue negativo (ver Figura: 71).

2.4.2 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 35

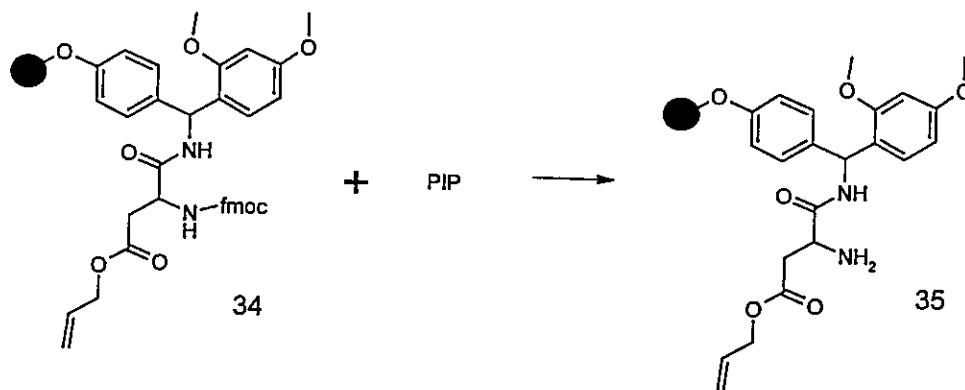


Figura: 72 Síntesis del intermediario 35

La remoción del grupo protector Fmoc se realizó de acuerdo al protocolo antes descrito.

El test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 72).

2.4.3 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 36

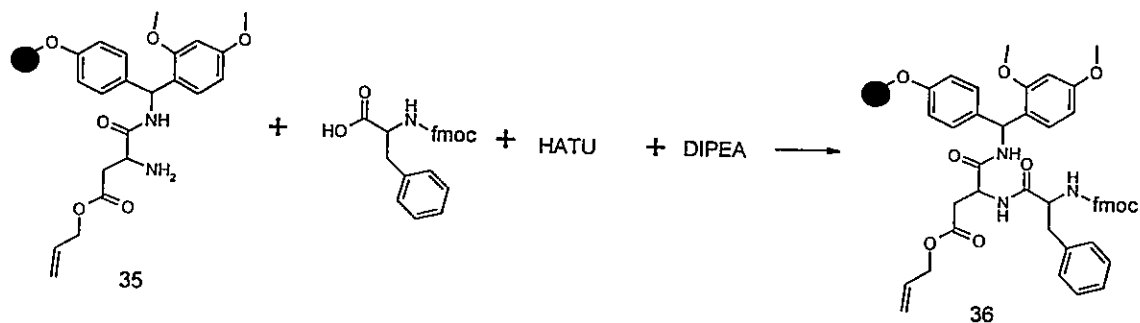


Figura: 73 Síntesis del intemediario 36

La resina **35** procedente del paso anterior se suspendió en 100 ml de NMP y se llevó a agitación en un agitador orbital. En forma paralela se preparó una solución de 3.92 g (1.5 eq) de Fmoc-F-OH, 5.1 g (2.0 eq) de HATU y 5.7 ml (5 eq) de DIPEA en 100 ml de NMP. Cuando esta solución se había tornado amarilla se agregó sobre la suspensión de la resina, todo el conjunto se agitó por dos horas, la solución se evacuó y se realizó el lavado de rigor. El test de Kaiser fue negativo (ver Figura: 73).

2.4.4 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 37

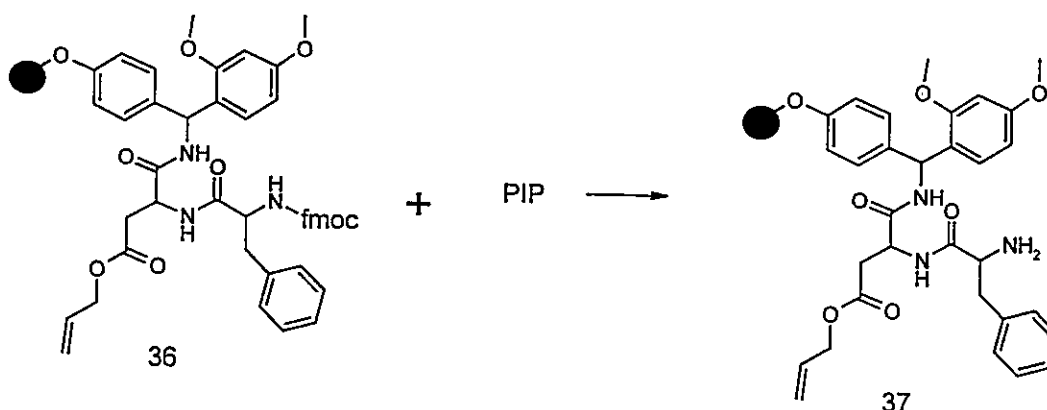


Figura: 74 Síntesis del intermediario 37

La remoción del grupo protector Fmoc se realizó de acuerdo al protocolo antes descrito.

El test de Kaiser fue positivo(ver Figura: 74).

2.4.5 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 38

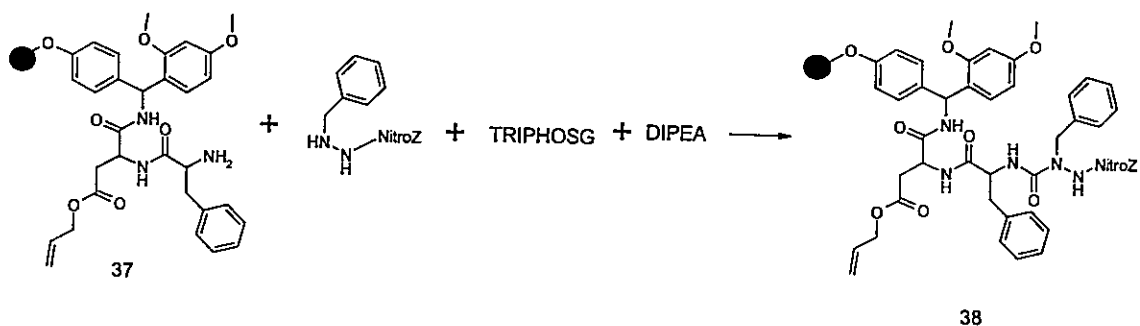


Figura: 75 Síntesis del intermediario 38

A una solución enfriada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 35 mg (0.12 mmoles) de trifosgeno en 5 ml de THF se le agregó una solución de 105 mg (0.35 mmoles) de **19** y 210 μl (1.2 mmoles) de DIPEA en 2.5 ml de THF, Esta mezcla fue agitada bajo atmósfera de N_2 por 2 horas y luego se agregó a una suspensión también enfriada de 720 mg de la resina **37** en 15 ml de THF. Dos horas después la mezcla fue retirada del baño de enfriamiento y se dejó en agitación por una noche a temperatura ambiente. El test de Kaiser fue negativo. Se realizó la liberación de una pequeña muestra de la resina con TFA 95 %. La HPLC mostró solo un pico a 4.31 min y la LC-MS con 1.98 min $(\text{M}+1)^+ = 646.93$; $(\text{M}-1)^+ = 644.79$ (ver Figura: 75).

2.4.6 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 39

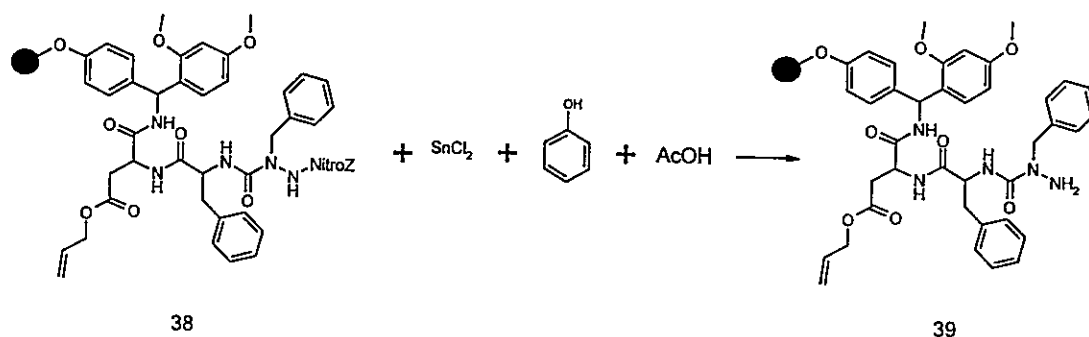


Figura: 76 Síntesis del intermediario 39

La resina **38** (25 g, 0.27 mmol/g) fue pretratada con 200 ml de DMF por 20 minutos, luego el DMF fue evacuado y el sólido fue tratado tres veces con 200 ml de una solución 2 M en SnCl_2 ; 1.6 mM en AcOH y 0.01 M en fenol en DMF, por 2 horas cada vez. Luego el solvente se evacuó y la resina se lavó secuencialmente con DMF; DCM:TEA 9:1; DMF y finalmente con DCM (2 \times 100 ml, 5 min, 2 veces con cada solvente. El test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 76).

La resina **39** se dividió en dos porciones de aproximadamente 12 g cada una. Una de ellas se usaría para continuar con la síntesis de $\text{Ac-L-P}^{\text{A}}\text{-F}^{\text{A}}\text{-F-D-NH}_2$. y la otra para efectuar la síntesis del compuesto $\text{Ac-L-P}^{\text{A}}\text{-F}^{\text{A}}\text{-F-D-NH}_2$.

2.4.7 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 40

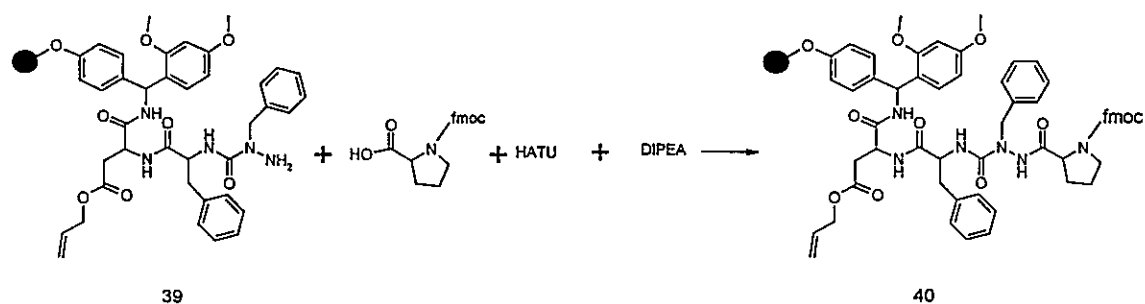


Figura: 77 Síntesis del intermediario 40

La resina 39 (8.5 g) fue suspendida en 100 de NMP y se mantuvo bajo agitación en un agitador orbital. En forma paralela se prepara una solución de 1.2 g (3.44 mmoles) de Fmoc-P-OH, 1.7 g (4.6 mmoles) de HATU y 1.9 ml (11.5 mmoles) de DIPEA. Cuando esta solución se había tornado amarilla se agregó sobre la resina, el conjunto se agitó por dos horas, el solvente se evacuó y la resina se lavó de la manera usual. El test para aminas secundarias fue negativo(ver Figura: 77).

2.4.8 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 41

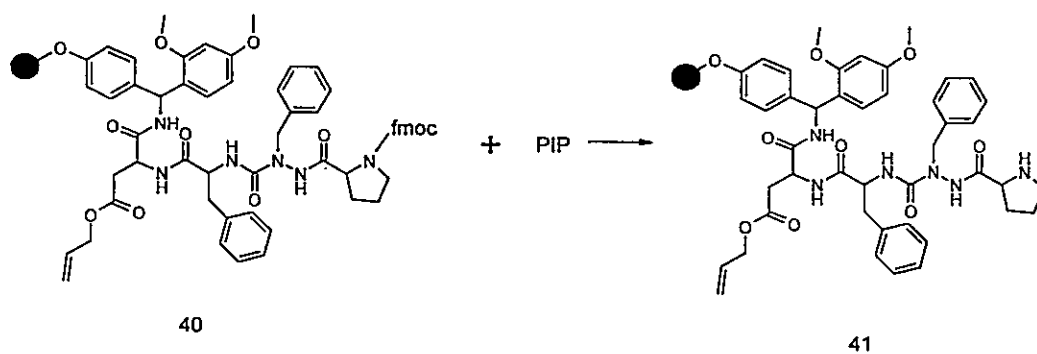


Figura: 78 Síntesis del intermediario 41

La remoción del grupo protector Fmoc se realizó de acuerdo al protocolo antes descrito. El test para aminas secundarias fue positivo. LC-MS; $(M-1)^+ = 562.35$ (ver Figura: 78).

2.4.9 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 42

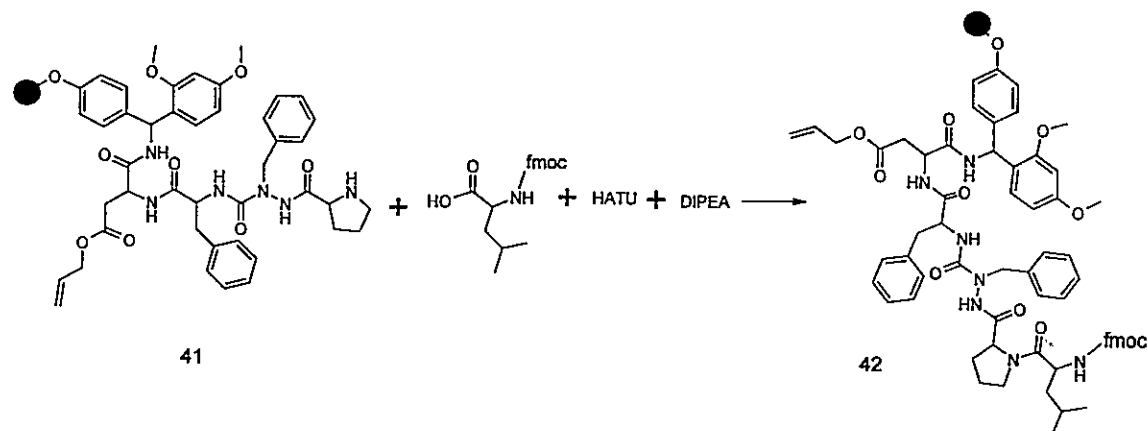


Figura: 79 Síntesis del intermediario 42

La resina 41 (8.5 g) fue suspendida en 100 de NMP y se llevó a agitación en un agitador orbital. En forma paralela se preparó una solución de 1.2 g (1.5 eq) de Fmoc-L-OH, 1.7 G (2.0 eq) de HATU y 1.9 ml (5 eq) de DIPEA. Cuando la solución se hubo tornado amarilla se agregó sobre la resina, el conjunto se agitó por dos horas, el solvente se evacuó y la resina se lavó de la manera usual. El test de Kaiser fue negativo (ver Figura: 79).

2.4.10 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 43

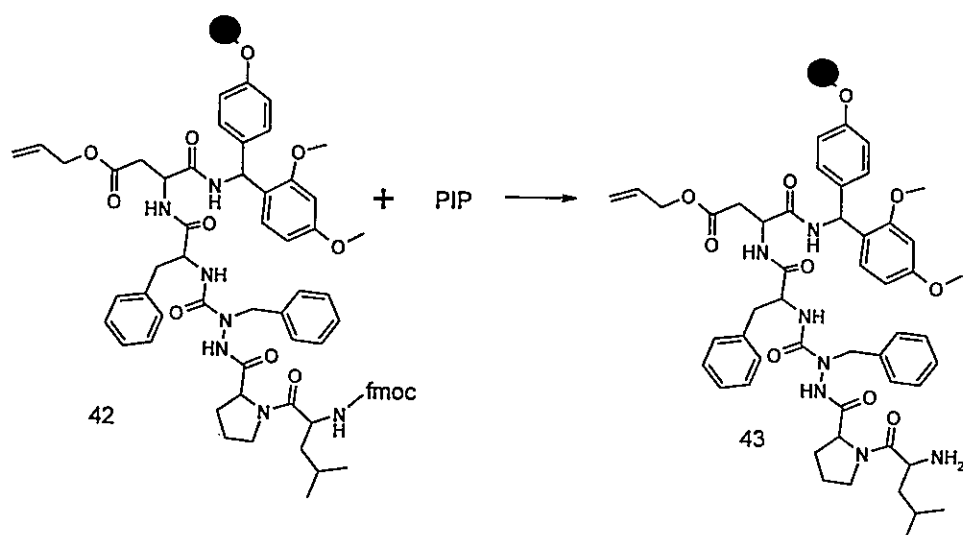


Figura: 80 Síntesis del intermediario 43

La remoción del grupo protector Fmoc se realizó de acuerdo al protocolo antes descrito.

El test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 80).

2.4.11 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 44

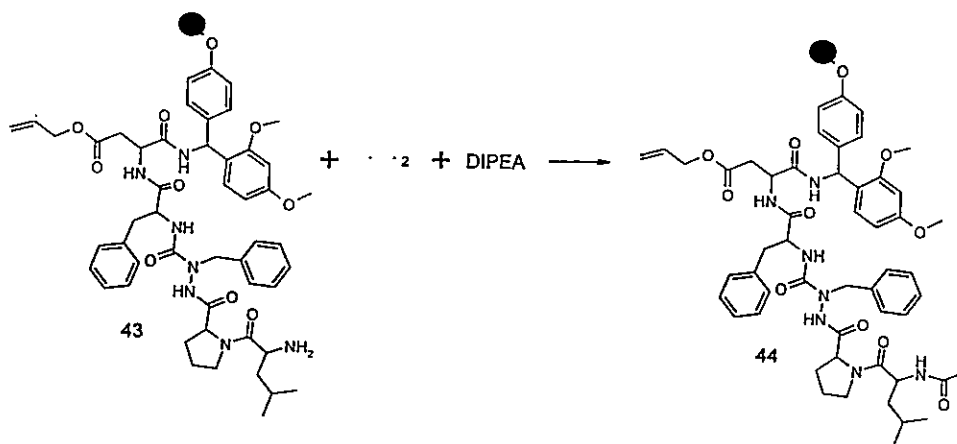


Figura: 81 Síntesis del intermediario 44

8.5 g de la resina 43 se suspendieron en una solución de 1.6 ml(9.18 mmoles) de DIPEA en 150 ml de DCM. A esta suspensión se le agregó una solución de 2.16 ml de Ac₂O (22.9 mmoles) en 50 ml de DCM, la mezcla fue agitada por 3 horas, el medio evacuado y la resina lavada de la manera usual. El test de Kaiser fue negativo. LC-MS; (M+1)⁺ = 720.12; (M-1)⁻ = 718.28 (ver Figura: 81).

2.4.12 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 45

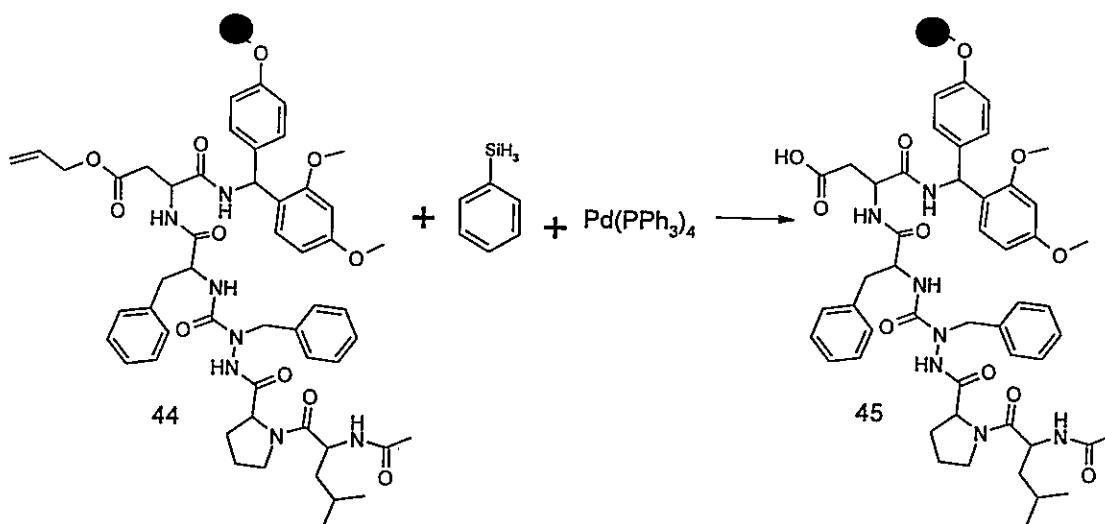


Figura: 82 Síntesis del intermediario 45

En un reactor de fase sólida de 500 ml se suspendieron 8.5 g (0.27 mmol/g) de la resina 44 en una solución de 5.6 ml PhSiH₃ (20^o eq), en 80 ml DCM, bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó por 5 minutos, luego se agregó una solución de 530 mg (0.2 eq) de Pd(PPh₃)₄ en 80 ml de DCM, la mezcla se agitó nuevamente por 20 minutos, el medio de reacción se evacuó y el ciclo completo se repitió 4 veces. Luego la resina fue lavada con DMF:H₂O (9:1), 3 × 150 ml; DMF 3 × 150 ml; DCM 3 × 150 ml por 5 minutos cada vez (ver Figura: 82).

2.4.13 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 46

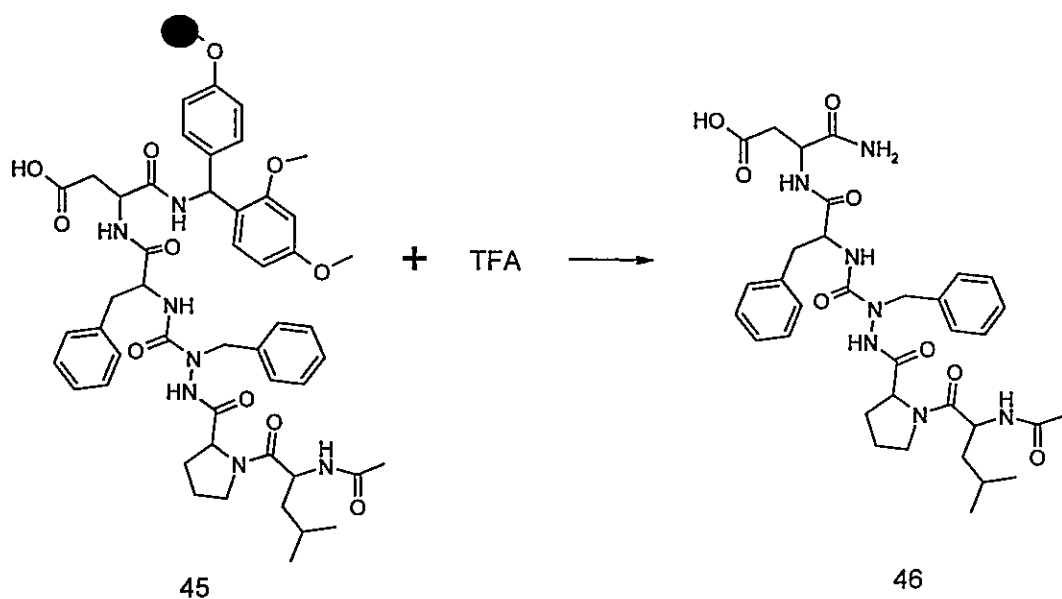


Figura: 83 Síntesis del intermediario 46

La resina **45** fue tratada con 150 ml de TFA por tres horas, la solución ácida se evacuó y la resina se lavó con DCM 3×150 ml. Las soluciones ácidas se juntaron y el solvente se evaporó al vacío. El producto crudo se purificó por HPLC-PREP, dando 48 mg (3.2 % de rendimiento). Presentó $T_r = 2.9$ minutos en la HPLC y 1.34 minutos en la LC-MS; LC-MS; $(M+1)^+ = 680.40$; $(M-1)^- = 678.10$ (ver Figura: 83).

2.5 ESQUEMA GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE AC-L-P^A-F^A-F-D-NH₂

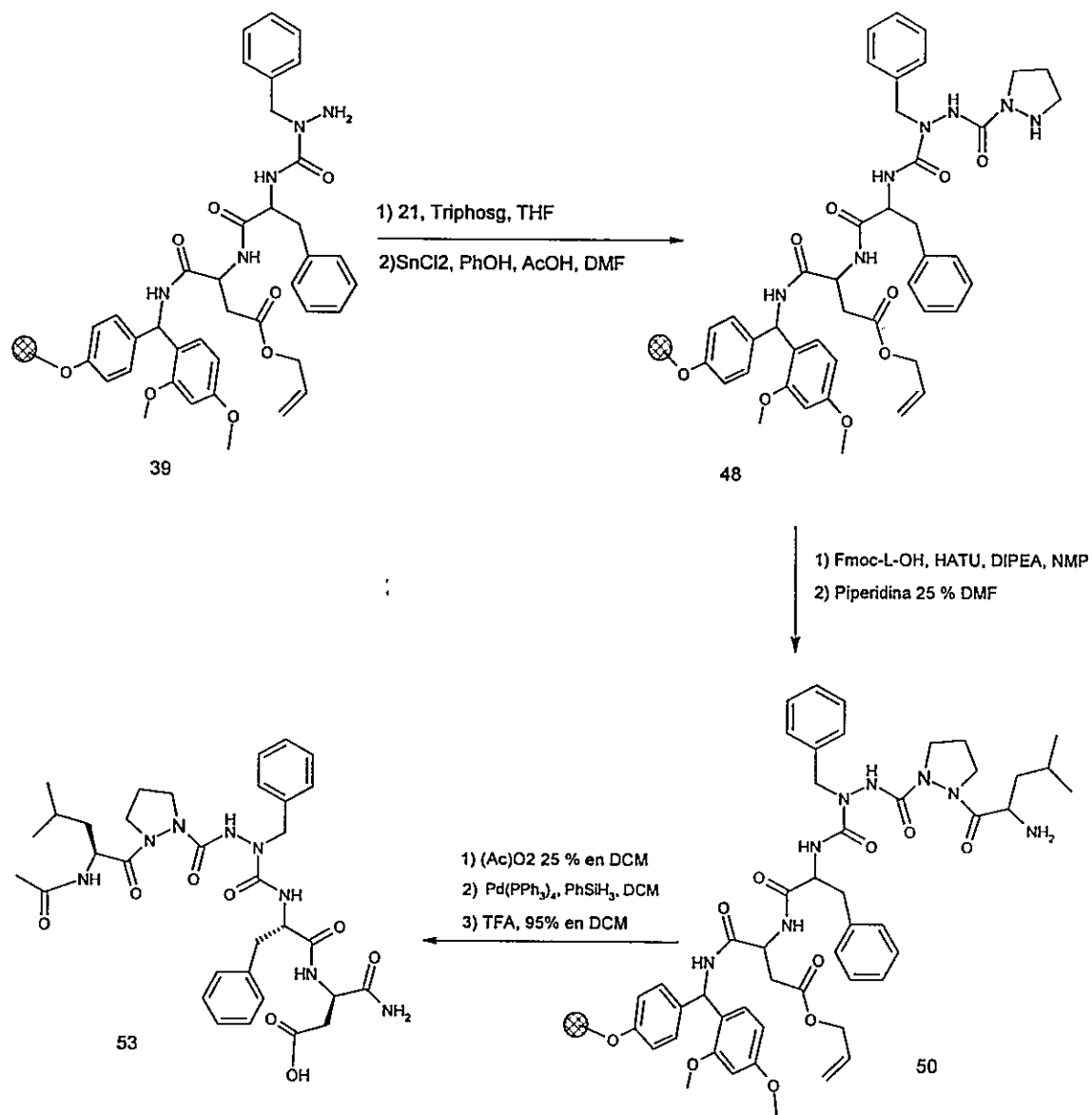


Figura: 84 Esquema sintético general para la síntesis de Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂.

La síntesis de Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂ partió con el uso del intermediario común inmovilizado **39** que proviene de la síntesis de Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂. El primer paso consistió en el acoplamiento del intermediario **21** para la introducción de la aza-prolina. La remoción del grupo protector nitroZ dejó la nueva resina lista para la introducción de la fmoc-leucina, después de la desprotección en medio básico. La acetilación del lado *N*-terminal con Ac₂O protege el producto final contra la acción de exopeptidasas. Posteriormente la remoción del grupo protector alloc en condiciones reductivas permitió que la cadena lateral del ácido aspártico quedara como ácido libre. Finalmente la liberación del producto de la resina se realizó en medio ácido (TFA) (ver Figura: 84). Los detalles de cada paso sintético se describen a continuación:

2.5.1 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 47

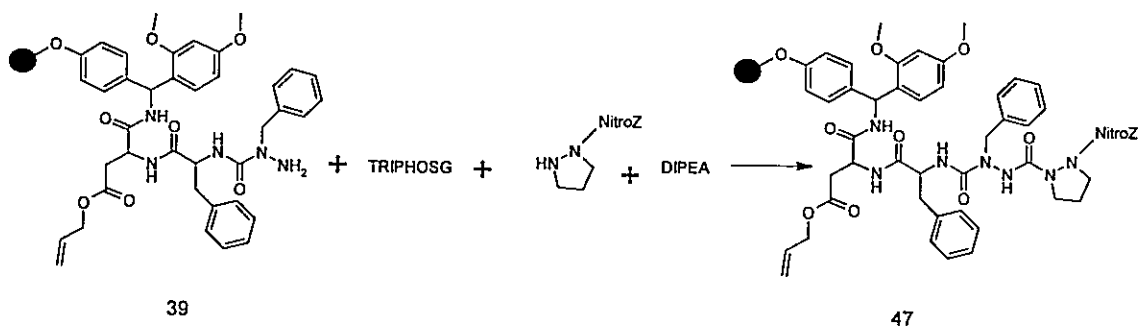


Figura: 85 Síntesis del intermediario 47

A una solución enfriada (-20 °C) de 433 mg (1.5 mmoles) de trifosgeno en 15 ml de THF seco y bajo atmósfera de N₂ se le agregó una solución de 1.6 g (6.4 mmoles) de **21** y 800 μl (2.0 mmoles) de DIPEA en 10 ml de THF. Esta mezcla fue agitada por 2 horas y luego se adicionó sobre una suspensión de 9.0 g de la resina **39**, 2 ml de DIPEA y 250 ml de THF. Después de la última adición la mezcla se agitó por 2 horas más, se retiró

del baño de enfriamiento y se dejó en agitación por una noche. Después de realizar una liberación de unos pocos miligramos se confirmó según la HPLC que la reacción no había sido completa. Luego el proceso se repitió, al cabo de lo cual el test de Kaiser fue claramente negativo y la HPLC mostró un pico principal a 3.6 minutos y 2.09 para la LC-MS. $(M+1)^+ = 745.5$; $(M-1)^+ = 742.81$ (ver Figura: 85).

2.5.2 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 48

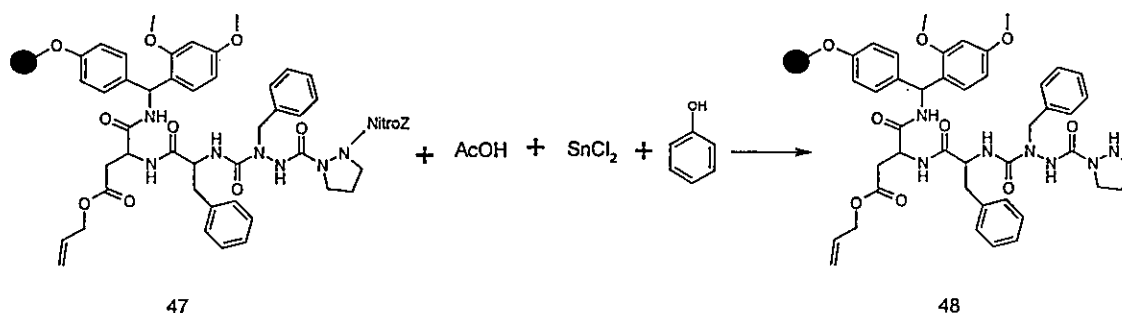


Figura: 86 Síntesis del intermediario 48

Para la remoción del grupo protector se recurrió al mismo procedimiento que se usó en la síntesis del intermediario. 39. El test para aminas secundarias fue positivo (ver Figura: 86).

2.5.3 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 49

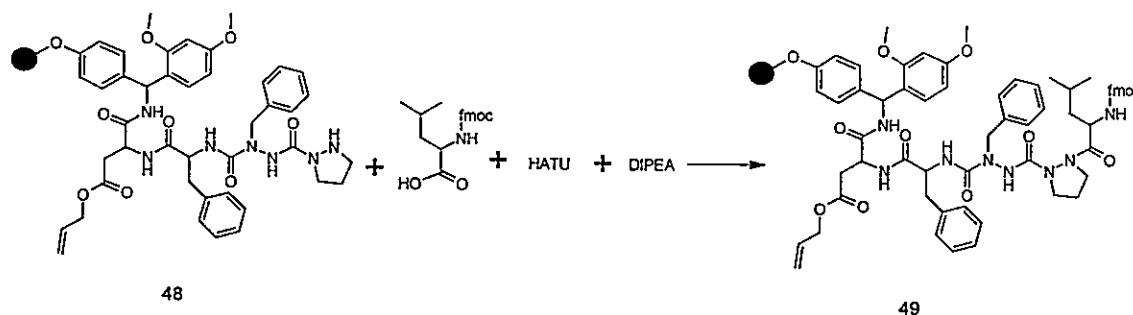


Figura: 87 Síntesis del intermediario 49

La resina, **48** (9.0 g) fue suspendida en 100 de NMP y se llevó a agitación en un agitador orbital. En forma paralela se preparó una solución de 1.3 g (3.6 mmoles) de Fmoc-L-OH, 1.7 g (4.9 mmoles) de HATU y 1.9 ml (12.1 mmoles) de DIPEA. Cuando la solución se hubo tornado amarilla se agregó sobre la resina, el conjunto se agitó por dos horas, el solvente se evacuó y la resina se lavó de la manera usual. El test de Kaiser fue negativo (ver Figura: 87).

2.5.4 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 50

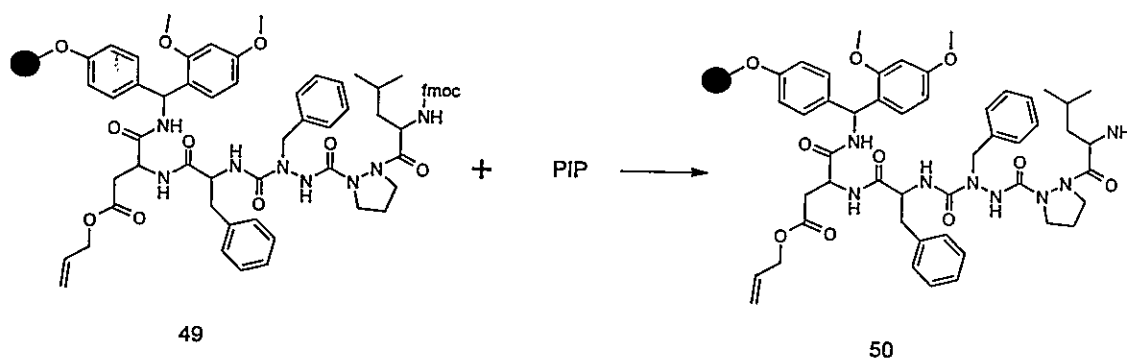


Figura: 88 Síntesis del intermediario 50

La remoción del grupo protector Fmoc se realizó de acuerdo al protocolo antes descrito. El test de Kaiser fue positivo (ver Figura: 88).

2.5.5 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 51

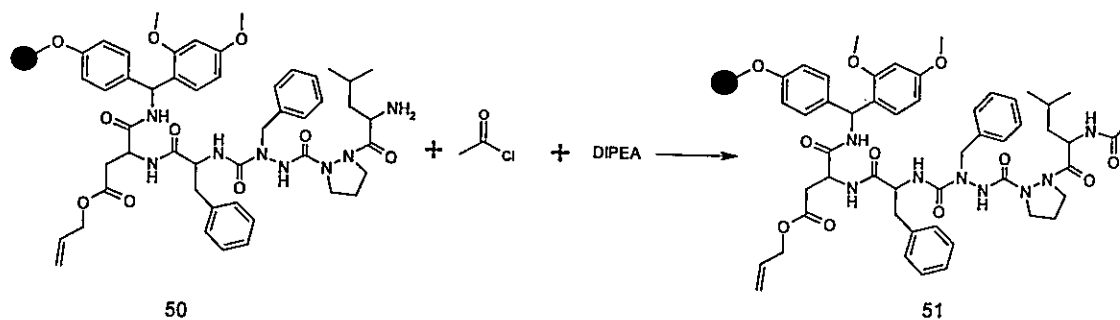


Figura: 89 Síntesis del intermediario 51

9.0 g (0.27 mmoles/g) de la resina **50** fue suspendida en 100 ml de DCM y 0.8 ml (4.86 mmoles) de DIPEA, el conjunto se agitó por 20 minutos, luego se le agregó una solución de 0.21 ml (3.6 mmoles) de AcCl en 20 ml de DCM, el conjunto fue agitado por 2 horas, el medio de reacción evacuado y la resina lavada de la manera usual (ver Figura: 89).

2.5.6 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 52

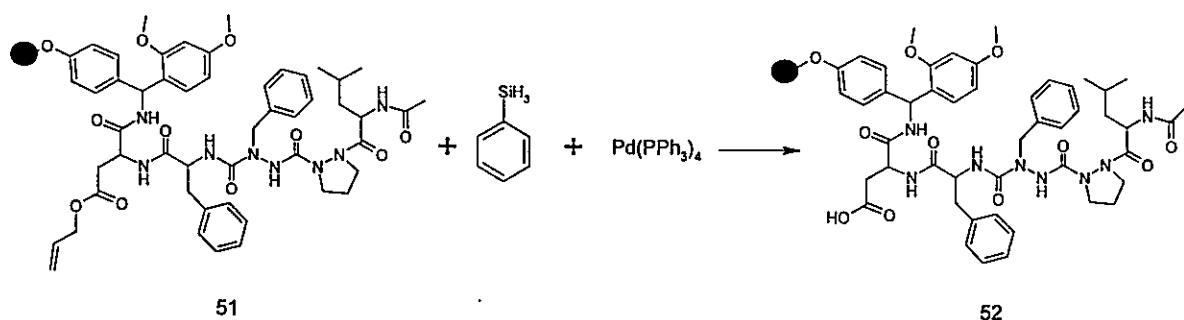


Figura: 90 Síntesis del intermediario 52

La resina **51** (9 g, 0.27 mmol/g) fue tratada bajo atmósfera de N_2 y con agitación con una solución de 5.9 ml de PhSiH_3 (5.2 g, 48.6 mmoles) en 80 ml de DCM por 5 minutos, luego se le agregó otra solución de 562 mg (0.5 mmoles) de $\text{Pd(PPh}_3)_4$ en 80 ml de DCM, la mezcla fue agitada nuevamente por 20 minutos, el medio se evacuó y el ciclo completo se repitió cuatro veces. Luego el medio fue evacuado y la resina lavada dos veces con cada uno de los siguientes solventes o mezclas: $\text{DMF:H}_2\text{O}$ (9:1) 2×150 , DMF 2×150 ml, DCM 2×150 ml por 5 minutos cada vez (ver Figura: 90).

2.5.7 SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO 53

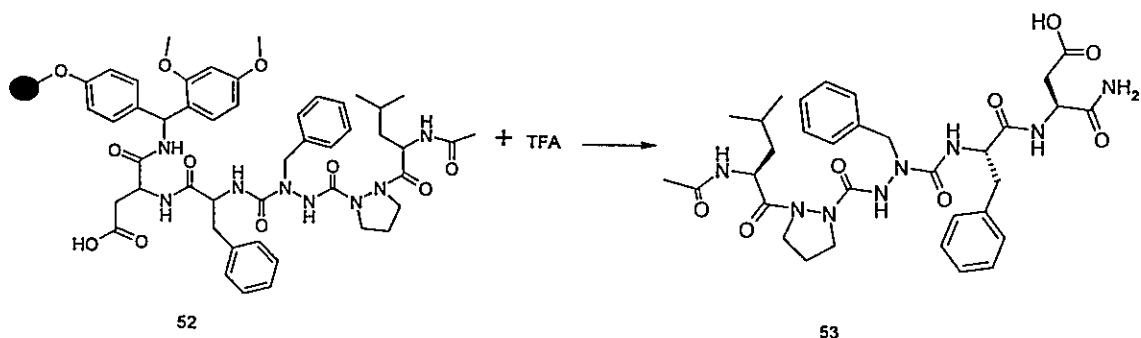


Figura: 91 Síntesis del intermediario 53

La resina **52** (9.0 g, 0.27 mmol/g) fue tratada con 150 ml de TFA a 50 °C por 10 minutos, la solución ácida fue evacuada y la resina lavada con DCM 3 × 150 ml. Las soluciones ácidas se juntaron, el solvente se evaporó al vacío, y el producto crudo se purificó por HPLC-PREP. El producto (1 mg) en la HPLC tuvo un tiempo de retención de 2.4 minutos y 1.33 en la LC-MS. $(M+1)^+ = 681.40$; $(M-1)^- = 679.00$ (ver Figura: 91)

2.6 EVALUACION DE LA ESTABILIDAD FRENTE A PROTEASAS

Ensayo *in vitro* de la estabilidad de las moléculas: Los péptidos se prepararon como soluciones 1 mM en PBS. Se toman 20 μ l de esta solución y se diluyen con 80 μ l de una solución fresca ya sea de plasma sanguíneo humano o de homogeneizado de cerebro de rata (en 1X PBS, 0.5% X-100 Triton). La solución se incubaba a 37°C por 24 horas.

La reacción se detiene agregando un cocktail completo de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania). Las proteínas del plasma o del

homogeneizado de rata se precipitan agregando un volumen de mezcla de reaccion en cuatro volumnes de Metanol frio (0 °C) dejando en reposo por 1 hora a -20°C. Las ampollas con las proteínas precipitadas se centrifugan (10000 × g, 10 min, 4°C) y la pella se separa por filtración y el sobrenadante que contiene el péptido se concentra al vacío hasta reducir su volumen a una quinta parte. El producto crudo se analiza por HPLC en fase reversa y el área del pico (detección por UV a 205 nm) que corresponde al péptido intacto se compara con el área del pico obtenido con 20 µl de la misma solución madre de péptido incubado en agua.

2.7 DETERMINACIÓN DEL PODER INHIBITORIO DE AGREGACIÓN DE Aβ.

Ensayo celular para evaluar la actividad. Se preparan soluciones de Aβ₁₋₄₂ de una concentración de 0.5 mg/ml en Tris 0.1 M, pH 7.4. Estas soluciones se incuban solas o con las moléculas a evaluar a diferentes concentraciones por 36 h a 37°C con buena agitación. Al final del período de incubación se agrega la cantidad necesaria de la solución a un medio de células PC12 tal que la concentracion final de Aβ sea 5.5 µM. Las células se incuban por 24 horas y luego la viabilidad celular se evalúa usando el método del MTT siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche, Mannheim, Alemania).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AZAAMINOÁCIDOS

En el desarrollo de esta tesis se sintetizó una gama de componentes protegidos con Boc para la introducción de diferentes azaaminoácidos (F^Λ, P^Λ, Y^Λ, I^Λ, L^Λ, D^Λ...etc.). La mayoría de ellos se preparó en dos pasos: el primero consistente en la obtención de las hidrazonas formadas entre el *tert*-butilcarbazonato y el aldehído o cetona correspondiente (ver Tabla: 1) y el segundo en la reducción de las hidrazonas (ver Tabla: 2).

En la primera etapa se detectó por medio del análisis de datos espectroscópicos la presencia de isómeros geométricos que variaban en su relación de concentraciones dependiendo del componente en cuestión. Tales isómeros no han sido reportados aun en la literatura, dado que los datos publicados para tales hidrazonas se basan el isómero mayoritario purificado. Aunque en el presente trabajo se invirtió algún tiempo tratando de separar y caracterizar las parejas de isómeros, no se se tuvo éxito en tal empresa. En algunos casos su separación no fue posible debido a la similitud de su comportamiento cromatográfico y en otros la concentración del isómero minoritario no fue lo suficientemente alta como para hacer práctica su separación.

En la síntesis del intermediario 21 se evaluó la ruta mostrada en la Figura: 92 pero desafortunadamente, el paso de la formación del heterociclo solo condujo a una compleja mezcla de productos sin evidencia del producto. Esto podría entenderse si se tiene en cuenta el grupo nitro pudo haber sido reducido por el hidruro de sodio ya sea

hasta la amina aromática correspondiente o a cualquiera de las especies previas a su reducción (Nitroso, Hidroxilamina, Azo..etc). Por ese motivo ese intermediario se sintetizó partiendo del componente 16 y no de la manera rápida mostrada en la figura Figura: 92.

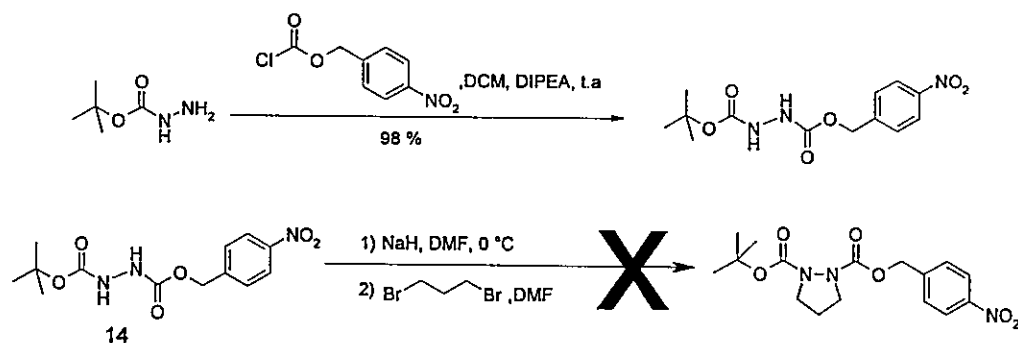


Figura: 92 Síntesis de 20 por una via “rápida”

3.2 REACCIONES MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE DIAZÁTIDOS

El esquema sintético que se quería desarrollar fue inspirado en el trabajo de Janda,⁹⁹ lo que implicó que como primer paso se tenía la síntesis de azaaminoácidos *activados* y *protegidos* para luego acoplarlos con otros azaminoácidos. En el presente caso los agentes activantes que dieron mejores resultados fueron el bispentafluorofenilcarbonato y el cloroformiato de 4-nitrobencilo. El azaaminoácido escogido en primer término para desarrollar la química de activación fue la azafenilalanina por razones de detección en el UV (ver Figura: 93). Como segundo azaaminoácido se escogió el 4-nitrobenzilcarbazonato (derivado de azaglicina) debido a que se espera que la azaglicina

sea peor nucleófilo de toda la familia de azaaminoácidos. De esta manera se podría especular que si se encontraban condiciones de reacción adecuadas para esta pareja sería muy probable que éstas se pudieran extrapolar a cualquier otra pareja de azaaminoácidos. Los resultados y las condiciones evaluadas se indican en la Tabla: 3 Como puede verse, aquí se comprueba lo antes establecido en la literatura acerca de la reactividad de esta clase de azaaminoácidos, pero lo importante de esta experiencia fue que se logró aislar y caracterizar el producto esperado aunque en un rendimiento desprovisto de utilidad práctica (0.2%) que, sin embargo, demostró que la reacción se produce.

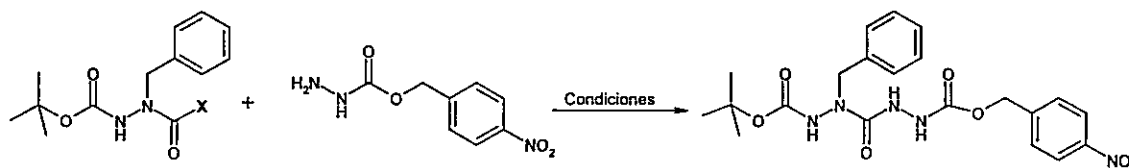


Figura: 93 Reacción modelo para el acoplamiento de diazátidos usando componentes presintetizados.

Aza-aminoácido (X)	Condiciones				Rendimiento
	Solv	Base	Temp.	Tiempo	
4-nitrofenolato	THF	-	t.a	48h	n.d.
4-nitrofenolato	THF	DMAP	50°C	48h	n.d.
4-pentafluorofenolato	THF	DMAP	50°C	48h	Trazas en masas
4-nitrofenolato	DMF	TEA	50°C	48h	Trazas en masas
4-pentafluorofenolato	DMF	TEA	50°C	48h	Trazas en masas
4-pentafluorofenolato	DMF	TEA	100°C	48h	0.2%

Tabla: 3 Diferentes condiciones de reacción evaluadas para la síntesis de diazátidos usando componentes presintetizados.

El siguiente cromatograma muestra un pico con tiempo de retención 4.1 minutos (0.2 % de rendimiento) que, según la LC-MS, corresponde al producto esperado. Los picos mayoritarios corresponden a materiales de partida y a compuestos no identificados (ver Figura: 94).

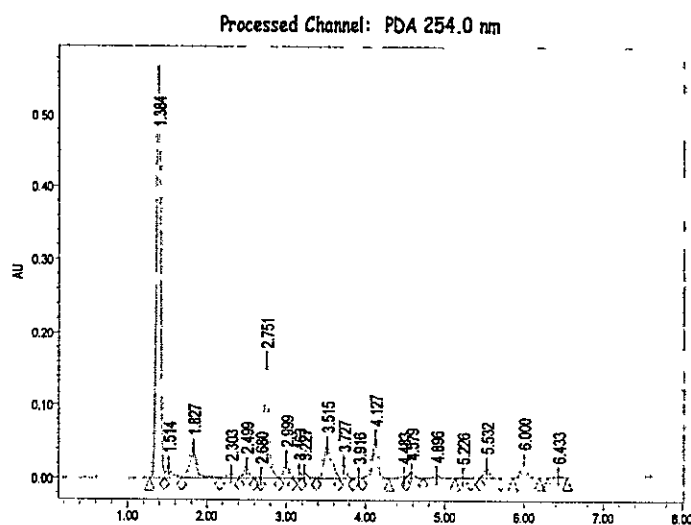


Figura: 94 Cromatograma (HPLC) de la mezcla cruda de la mejor reacción (Rend = 0.2 %) de síntesis de diazátidos usando componentes presintetizados

Los resultados anteriores condujeron a la búsqueda de otras condiciones y metodologías sintéticas diferentes para resolver el problema de la poca reactividad de los derivados de azaaminoácidos ya descrita en la literatura. En el artículo ya citado de Janda⁹⁹ se plantea que los carbamatos (i) no son en realidad la especie activa al momento del acoplamiento sino más bien intermediarios con estructuras de isocianato (iii) y que por esa razón los azaaminoácidos con el patrón de sustitución que se propone en esta tesis (ii) no se pueden acoplar (ver Figura: 95)

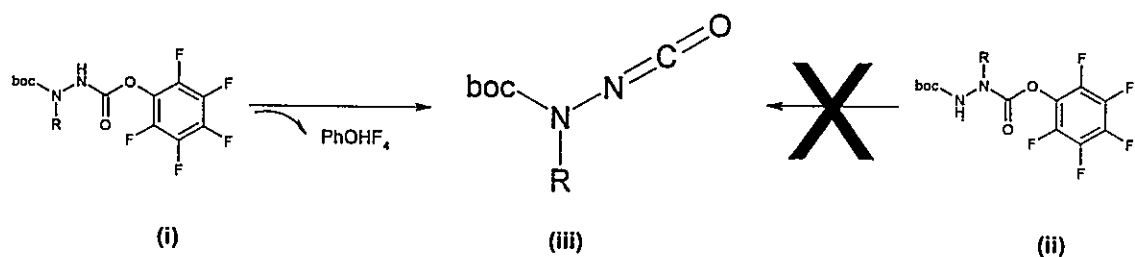


Figura: 95 Según la literatura la imposibilidad de formar el isocianato intermediario (iii) explicaría el fracaso en la obtención de diazátidos usando componentes del tipo (ii)

La solución a tal problema se encontró después de razonar que si se está tratando con especies que son pésimos nucleófilos la posibilidad de sintetizar, purificar por CC y almacenar una especie como (ii) sin descomposición es un indicio de cuán estable (poco reactiva) es tal especie. Frente a un mal nucleófilo no es una buena práctica usar ese tipo de unidades “activadas” así que se recurrió al uso de condiciones “one pot” (ver Figura: 96) de manera que la especie activa se formara *in situ* y se acoplara inmediatamente con el Boc-azaaminoácido. Se probaron varios agentes acilantes y condiciones de reacción (ver Tabla: 4) Tabla: 4) y se encontraron condiciones en las que el acoplamiento se lograba con buenos rendimientos demostrando que la hipótesis de la necesidad de formación de un isocianato intermediario no es una condición absoluta y necesaria.

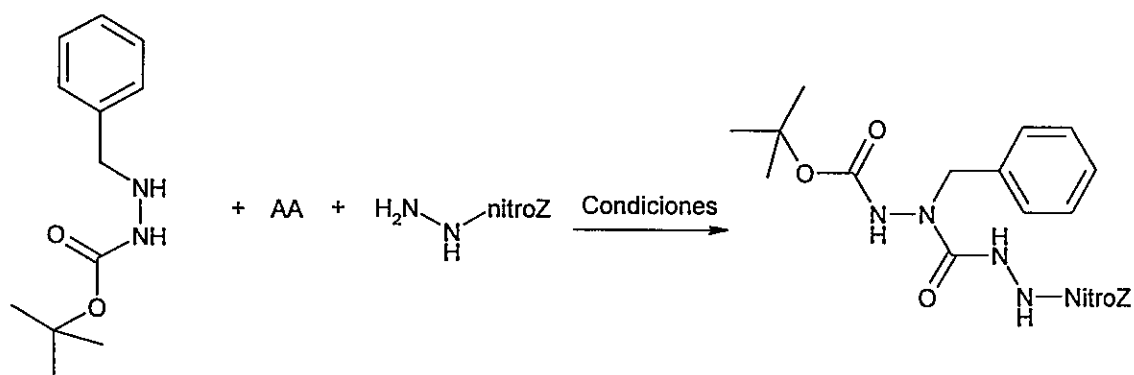


Figura: 96 Síntesis de un diazótido usando condiciones “one pot”

AA = Agente Acilante	Condiciones				% Rend (HPLC)
	Solvente	Base	Temp.	Tiempo	
B	DCM	DMAP 2 eq.	t.a	2 h	Trazas en masas
B	NMP	DMAP 2 eq.	100°C	15 h	Trazas en masas
A	DCM	DMAP 2 eq.	t.a	15 h	Trazas en masas
C	DCM	DMAP 2 eq.	t.a	15 h	Trazas en masas
A	Dioxano	DIEA 6 eq.	t.a	4 h	12
A	THF	DIEA 6 eq.	0°C	12 h	8
A	THF	DIEA 6 eq.	-20°C	12 h	7
A	THF	DIEA 6 eq.	-20°C	4 h	70
B	THF	DIEA 6 eq.	-20°C	4 h	47
A	THF	DIEA 8 eq.	-20°C/t.a./- 20°C	5 h	28
B	THF	DIEA 8 eq.	-20°C/t.a./- 20°C	5 h	7

Tabla: 4 Condiciones evaluadas para la síntesis de un diazótido usando condiciones “one pot”; A = Trifosgeno; B = Bispentafluorofenilcarbonato, C = Carbonildimidazol.

A continuación se muestra el cromatograma (HPLC) de la mezcla cruda de la reacción más exitosa lograda usando condiciones “one pot” (70 % de rendimiento). Como era de esperar, los mejores resultados se obtuvieron con el uso de un electrófilo energético como el trifosgeno (A). También se obtuvieron buenos resultados con bis-(pentafluorofenil)carbonato (B). Si se comparan los cromatogramas (Figura: 94 y Figura: 97) se puede apreciar directamente el logro significativo que representa aplicar estas nuevas condiciones.

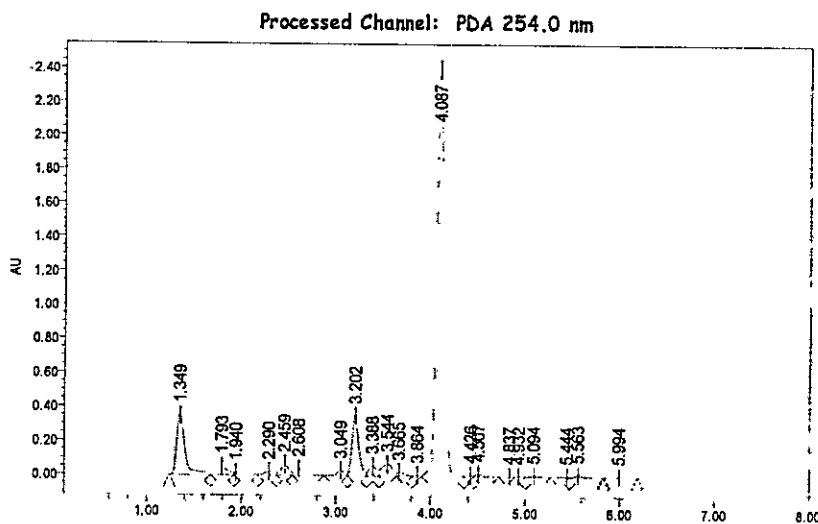


Figura: 97 Cromatograma (HPLC) de la mezcla cruda de la mejor reacción de síntesis de diazátidos usando condiciones “one pot”

3.3 SÍNTESIS DE LAS MOLÉCULAS PROPUESTAS

Teniendo en cuenta la información no publicada de que al someter el compuesto patrón (iAβ5) a diferentes mezclas de proteasas los enlaces más susceptibles de hidrólisis o “débiles” de la molécula eran los enlaces peptídicos entre la P2 y la F3 y entre la F3 y

la F4 se decidió sintetizar en primer término los compuestos Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂, Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂ y Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂ (ver Figura: 98).

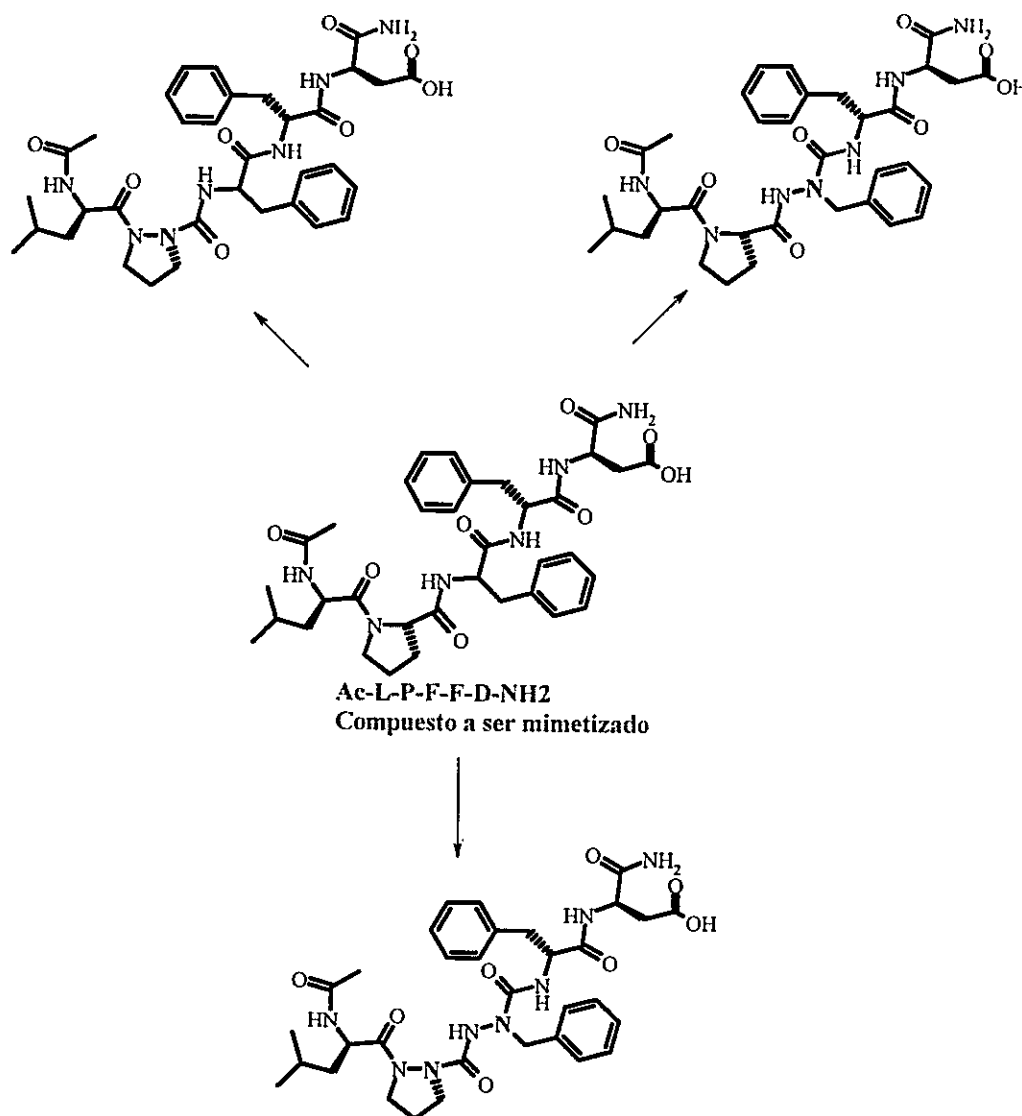


Figura: 98 El compuesto patrón y sus miméticos.

En la síntesis de las moléculas propuestas la elección como soporte polimérico de la resina Rink amida se debió a que las moléculas objetivos tienen el lado C-terminal

modificado como amida y con este soporte es posible unir un ácido carboxílico y liberar una amida. Además, por su estabilidad frente a medios básicos este soporte es compatible con el uso del grupo protector Fmoc. En cada uno de los pasos sintéticos desarrollados en fase sólida el seguimiento del curso de la reacción se hizo de una manera cualitativa usando pruebas como el test de Kaiser o el test para aminas secundarias. En estos casos la única información que se obtenía era de si se el grupo amino estaba libre o protegido. En algunas ocasiones se realizó una liberación parcial (hecho sobre unos pocos miligramos de resina) cuyo producto se analizó ya sea por HPLC o LC-MS. Si se encontraba la masa molecular del producto esperado y se observaba la desaparición de la masa molecular del material de partida, se tomó esta información como criterio suficiente para continuar con el siguiente paso sintético.

La síntesis del primer compuesto, Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂ (ver Figura: 56), utilizó una metodología mixta que combinó síntesis en fase sólida y síntesis en solución. Esta heterogeneidad se debió a la necesidad de introducir el componente aza-Prolina-Boc pues, una vez fijado éste a la resina, la remoción del grupo Boc hizo que no solo se lograra la desprotección sino que además la molécula se soltara de la resina. Esto hizo que la síntesis fuera más laboriosa, pero aunque se encontró un método desarrollado por K. Burgess¹²⁰ para la remoción de Boc sin necesidad de usar TFA, (empleando TMSOTf y 2,6-lutidina), desafortunadamente al aplicarlo no fue posible remover el grupo protector.

Con la intención de desarrollar una metodología completamente en fase sólida para la síntesis de los compuestos venideros se decidió recurrir al uso de otro grupo

protector diferente de Boc para la introducción del azaaminoácido. Fue así como se decidió utilizar el grupo 4-nitrobenciloxycarbonilo (NitroZ)¹²¹, el cual puede ser removido usando condiciones reductivas como el SnCl₂ con cantidades catalíticas de ácido acético y fenol. El uso de este grupo protector permitió que toda la secuencia se pudiera realizar en fase sólida de acuerdo con lo previsto.

El rendimiento global de las síntesis varió entre 1 y 3 %, lo que a primera vista luce como un rendimiento muy bajo. En realidad esto no es así, pues teniendo en cuenta que cada síntesis tiene alrededor de 14 pasos el rendimiento promedio de cada paso oscila entre 72 y 78 % respectivamente, lo cual es muy satisfactorio en una primera aproximación.

3.4 SON LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE AGREGACION DE Aβ...?

Cuando se compararon los compuestos Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂ y Ac-L-P^A-F^A-F-D-NH₂ con la molécula de referencia Ac-L-P-F-F-D-NH₂ se observó que ambos fueron menos solubles (1 mg/ml), lo cual podía dificultar los ensayos biológicos. Aunque habría sido deseable realizar experimentos adicionales para corroborar tal insolubilidad, éstos no fueron desarrollados debido a la poca cantidad de producto disponible.

De corroborarse esta menor solubilidad de los compuestos esto sería esperable, pues teniendo en cuenta que un azapéptido es una molécula más plana que la molécula mimetizada, su flexibilidad restringida podría tener el efecto de exponer más los grupos lipofílicos disminuyendo su solubilidad en agua. De cualquier manera estos son datos

preliminares. En un futuro con la síntesis de una mayor cantidad de compuesto se podrán realizar ensayos completos para evaluar de manera fidedigna la solubilidad de tales compuestos.

El ensayo se realizó con soluciones saturadas de los compuestos (1 mg/ml) en PBS, desgraciadamente a estas bajas concentraciones el efecto inhibitor de la agregación no es alto, no solo para los compuestos sino también para el compuesto de referencia, lo que hace más inciertas las comparaciones. Así después de la incubación se encontró:

COMPUESTO	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Ac-L-P-F-F-D-NH ₂	17.60 ± 2.90
Ac-L-P ^A -F-F-D-NH ₂	8.80 ± 2.90
Ac-L-P-F ^A -F-D-NH ₂	0.60 ± 2.90

Tabla: 5 Actividad inhibitoria de agregación Aβ de los compuestos sintetizados.

Como puede verse en la Tabla: 5 ni los peptidomiméticos ni el compuesto de referencia tienen una buena actividad inhibitoria. A esta concentración, aunque la solubilidad es menor, la estabilidad de los nuevos compuestos hace que éstos sean interesantes como candidatos para continuar su desarrollo como sustancias de utilidad farmacológica.

3.5 ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS FRENTE A PROTEASAS

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de estabilidad del compuesto de referencia (Ac-L-P-F-F-D-NH₂) y de los compuestos Ac-L-P^A-F-F-D-NH₂ (Aza-Pro) y Ac-L-P-F^A-F-D-NH₂ (Aza-Fen) sintetizados en esta tesis se muestran en la Tabla: 6

Compuesto	Sistema proteico	Tiempo (h)						
		0	0.5	1	2	4	6	24
Ref	Homogeneizado	200	116	48	3.6	3.6	4	4
Aza-Pro	Homogeneizado	200	188	184	184	178	178	160
Aza-Fen	Homogeneizado	200	178	178	174	180	174	142
Ref	Plasma	200	194	194	192	188	188	148
Aza-Pro	Plasma	200	182	194	192	196	196	186
Aza-Fen	Plasma	200	0	192	194	192	194	186

Tabla: 6 Concentración remanente (μM) de los compuestos en función del tiempo frente a dos sistemas proteicos (homogeneizado de cerebro de rata y plasma sanguíneo).

A pesar de tratarse de un sistema complejo de proteasas y sustratos en lugar de un ensayo con una proteasa específica y un sustrato único, el análisis estadístico de los datos mostró que estos se ajustan bastante bien a un modelo de una cinética de pseudo-primer orden (ver Tabla: 7).

Datos de	$\ln[\text{compuesto}] = A + BT$		
	A	B	r^2
Ref en homogeneizado	5.60 ± 0.28	-2.05 ± 0.25	0.97
Aza-Pro en homogeneizado	5.24 ± 0.01	-0.01 ± 0.001	0.79
Aza-Fen en homogeneizado	5.22 ± 0.02	-0.011 ± 0.002	0.83
Ref en plasma	5.29 ± 0.01	-0.012 ± 0.001	0.99
Aza-Pro en plasma	5.28 ± 0.01	-0.002 ± 0.001	0.68
Aza-Fen en plasma	5.28 ± 0.01	-0.002 ± 0.001	0.66

Tabla: 7 Parámetros del modelo lineal de los datos de estabilidad de los compuestos frente a proteasas

Luego cuando se graficó el logaritmo natural de la concentración remanente del compuesto en función del tiempo para ambos sistemas proteicos, se produjeron líneas rectas de ecuación $\ln[\text{Compuesto}] = A + BT$. (ver Figura: 99 y Figura: 100)

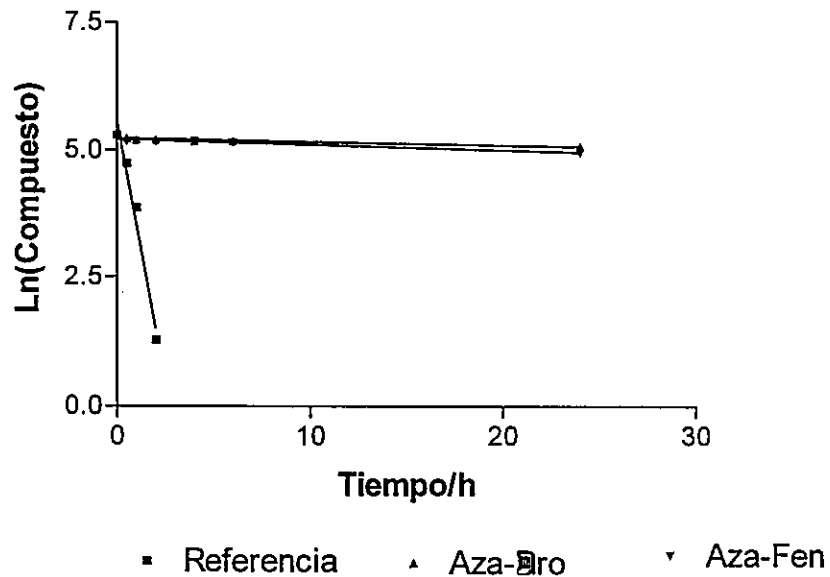


Figura: 99 Estabilidad en homogeneizado de cerebro de rata

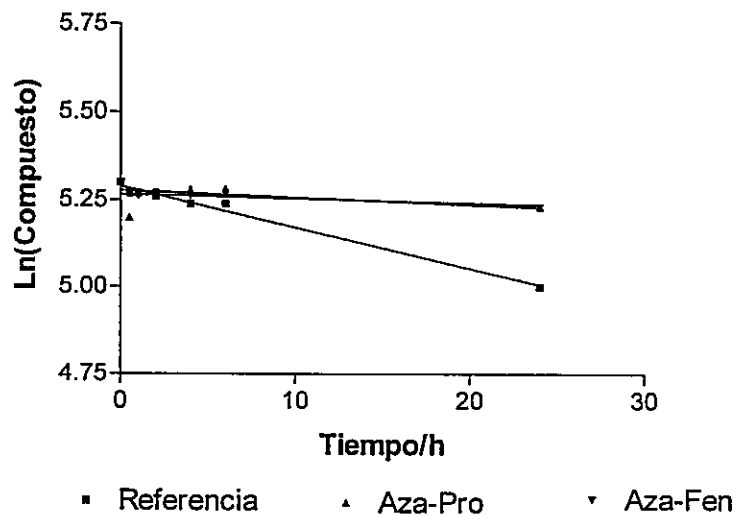


Figura: 100 Estabilidad en plasma sanguíneo

En esta ecuación, el signo negativo de la pendiente (B) esta en acuerdo con el seguimiento de la desaparición de un sustrato en función del tiempo, su magnitud da una idea de la velocidad de la degradación, así una pendiente muy negativa indica que la degradación es rápida mientras que una pendiente cercana a cero es una indicación de que la reacción se esta dando muy lentamente.

Como puede observarse directamente de las figuras (Figura: 99 y Figura: 100) la velocidad de la degradación de los compuestos es menor que la del compuesto de referencia.

El calculo del tiempo de vida media de los compuestos (ver Figura: 101) en ambos sistemas da una idea clara idea cuantitativa del grado de mejoramiento de la estabilidad de los compuestos, por ejemplo en al caso de los compuestos en homogeneizado de cerebro de rata se observa que el compuesto de referencia solo tiene 0.02 días (29 minutos) el compuesto Aza-Pro presenta un tiempo de vida media de 3.79 días y el compuesto Aza-fen presenta un tiempo de vida media de 13.86 días, los que representan 189 y 693 veces el tiempo de vida media del compuesto de referencia respectivamente

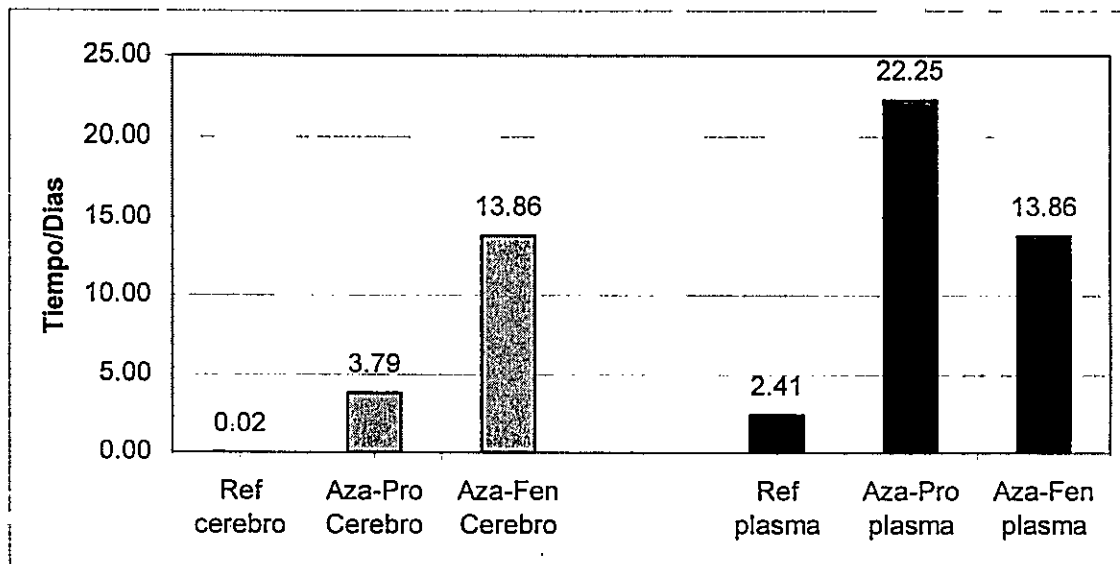


Figura: 101 Tiempo de vida media de los compuestos

La interpretación de los excelentes resultados de estabilidad encontrados y que confirmaron una de las hipótesis de este trabajo se basa en un balance entre los factores diferenciales a los que se hizo referencia en el apartado “propiedades estructurales de los azapéptidos”. Un factor que debería ser importante es el hecho que en los azapéptidos el nitrógeno amídico es más ácido comparado con el de un péptido normal. Esta menor basicidad haría que en el paso en el que la enzima y el sustrato forman un estado intermediario tetrahédrico, la protonación del nitrógeno amídico sería cuantitativamente menor, lo que disminuiría la velocidad del proceso catalítico. Además tal estado intermediario también podría ser estabilizado por el par libre del nitrógeno extra.

Como se quiere remarcar en la Figura: 98, los dos enlaces “débiles” de la molécula patrón (los marcados con rojo) son “protegidos” contra la hidrólisis

enzimática al pasar de una estructura puramente peptídica a una estructura tipo azapéptido pues los enlaces amídicos se transforman en enlaces tipo urea.

La urea es un grupo funcional que en el laboratorio requiere condiciones más extremas de hidrólisis comparada con las amidas. Esta baja reactividad puede explicarse si se considera una urea como una “diamida” en la cual los dos átomos de nitrógeno están en conjugación con el grupo carbonilo.

Se ha planteado que la alta resistencia de los azapéptidos comparada con los péptidos frente a la hidrólisis enzimática radica en un mecanismo de inactivación de proteasas¹²². Por ejemplo, si se considera el caso de una proteasa de serina (ver Figura: 102), en el primer paso del ciclo catalítico, se da la formación reversible y rápida del complejo enzima-inhibidor, seguida por una lenta acilación del grupo hidroxilo de la serina (esto debido a la baja reactividad del grupo carbonilo del azapéptido) del sitio activo. La enzima acilada (una carbazil enzima), como consecuencia de los efectos electrónicos, es mucho más estable frente a la hidrólisis comparada con la enzima acilada de la manera usual (es decir una acil enzima).

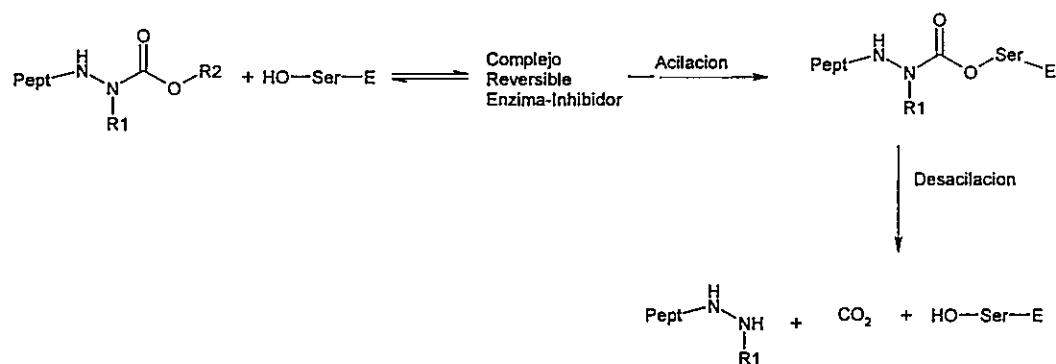


Figura: 102 Acción de una proteasa de serina sobre un azapéptido.

Obsérvese que mientras en la hidrólisis de un péptido, la desacilación de la enzima libera el lado *C*-terminal del nuevo fragmento, en el caso de los azapéptidos se producen un fragmento que carece del grupo carboxilo y CO_2 .

4 CONCLUSIONES

En la obtención de las hidrazonas necesarias para la síntesis de los azaaminoácidos según la estrategia desarrollada en esta tesis, se detectó la presencia de isomería geométrica alrededor del enlace imídico. La descripción de estos pares de compuestos no se ha registrado aun en la literatura.

Aunque la bibliografía científica⁹⁹ había descrito la síntesis de azátidos como solo posible en una dirección (N a C), la cual no es compatible con la metodología utilizada para obtener péptidos debido a los problemas de racemización que enfrenta cualquier síntesis de esa naturaleza, aquí se demostró que también es posible la síntesis en la dirección C a N. Este hallazgo permite pensar en un futuro desarrollo de síntesis automatizadas de pequeñas colecciones de peptidomiméticos (azátidos y azapéptidos) dentro de un mismo lote lo que aumenta la probabilidad de encontrar moléculas optimizadas con el uso del concepto de azapéptidos.

Si bien los rendimientos globales promedio por paso de las síntesis en fase sólida aquí desarrolladas fueron mayores del 70 %, estos rendimientos no son considerados buenos en general en este formato de síntesis. Una posible explicación podría ser que el uso de TFA puro como medio de liberar el compuesto final de la resina catalice la descomposición del producto. Tal inconveniente podría superarse si se encontrase otras condiciones de liberación de los productos de la resina Rink amida, condiciones que hasta el momento no existen en la literatura, o bien desarrollando un soporte análogo a esta resina que permita el liberación en condiciones más suaves.

El trabajo realizado constituye una prueba simultánea de dos conceptos: que azapéptidos de estructura adecuada pueden servir como inhibidores de la agregación de A β y que estos compuestos son más estables frente a proteasas que los péptidos de secuencia similar. Si se tiene en cuenta que un solo peptapéptido (como el compuesto de referencia Ac-L-P-F-F-D-NH₂) puede generar una familia de 32 peptidomiméticos (constituida por el péptido, azapéptidos y un azátido) en los se tendrían todas las posibles permutaciones de átomos de carbono por átomos de nitrógeno, el verdadero potencial de este clase de peptidomiméticos como inhibidores de la agregación de A β solo se conocerá cuando se pueda evaluar toda la familia completa, pues es muy posible que en algunos casos, debido a la naturaleza tan particular de los azapéptidos y los azátidos se pueda lograr una molécula que se sea activa oralmente, lo que constituiría un verdadero paradigma en el desarrollo de cualquier estrategia terapéutica.

Por último, el mejoramiento de la estabilidad frente a proteasas que presentan los azapéptidos sintetizados en este trabajo permite pensar en su aplicación al diseño de otros péptidos pequeños de utilidad farmacológica y abre la puerta a la posibilidad de aplicar este concepto en el diseño de fármacos no peptídicos en los que la presencia de un enlace amídico constituya un punto débil de la molécula.

5 PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS

Se patento el desarrollo de una nueva metodologia sintetica para la obtencion de
"AZAPEPTIDOS y AZATIDOS"

Lopez, J,J; Rückle T; **EP 02102673. 7**, Dic 02 2002.

En la actualidad se esta preparando un manuscrito para ser publicado tan pronto como la
empresa SERONO, propietaria de los derechos de la patente, de su autorización para
publicar.

6 PROYECCIONES A FUTURO DE ESTA TESIS

A pesar de que en esta tesis se demostró que la síntesis de péptidos, azapéptidos y azátidos es posible dentro de una estrategia de síntesis de C a N terminal de manera sistematizada, para hacer esta estrategia aun mas útil se deberían considerar los siguientes factores en trabajos futuros:

Implementar la remoción del grupo protector Boc bajo condiciones apróticas, por ejemplo con el uso de ácidos de Lewis.

Mejorar los rendimientos en la remoción del grupo protector Nitro-Z.

En el mercado existen fármacos de naturaleza peptídica (Nociceptin, Endomorphin-1, Endothelin-1, Damgo, Mastoparan, Pepstatin A, Ciclosporinas...etc). Tales sustancias enfrentan todos los problemas farmacocinéticos que los péptidos tienen. La metodología desarrollada en esta tesis podría ser utilizada para mejorar tales fármacos desde el punto de vista farmacocinético. Un ejemplo práctico sería realizar ensayos de hidrólisis enzimática con alguno de los péptidos antes mencionados o con alguna droga no peptídica que presente un enlace tipo amida, para determinar cual(es) es(son) el(los) producto(s) principal(es) de degradación. Con esta información se podría proponer cual sería(n) el(los) producto(s) a sintetizar.

7 ÍNDICE

Alios Alzheimer	5	Nitro-Z remoción de	102
Alloc remoción de	102	Ovillos neurofibrilares.....	22, 24
Aluminio y la agregación de A β	34	Oxitocina	50
Amiloide.....	22	Paroxetina	16
Aminometil resina	71	Paxil.....	16
Azapéptidos definición de.....	49	Peptidomiméticos definición de	39
Azátidos definición de.....	60	Péptidos Reducidos	45
Azavalina 3-angiotensina II (Bovina)	49	Péptidos retro-inverso.....	45
Células T	52	PPA en la EA.....	24
Cipramil.....	16	PRI	45
Citalopram.....	16	Propentofilina	19
Cloranilo prueba de	103	Prozac	16
Depsipéptidos	44	Resina de Rink.....	73
Donezepilo	11	Resina de Sheppard	73
Efexor	16	Resina de Wang.....	73
Eloidosina.....	51	Resina fenilfluorenilo	74
Encefalina.....	46	Resina tritilo	74
Estradiol en la terapia de la EA.....	34	Rifampicina	34
Estrés Oxidativo en la EA	20	Rojo Congo.....	22
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	21	Rojo congo en la EA.....	34
Fisostigmina®	11	Seroxat.....	16
Fluoxetina.....	16	Sertralina.....	16
Fluvoxamina.....	16	Silicato de sodio en la EA	33
Fmoc remoción de.....	102	Síndrome de Down en la EA	24
Hidrazonas obtención de	79	Síntesis en fase líquida definición de	62
Hidrazonas reducción de	84	Sulfomicina.....	44
Hidroximetil resina.....	70	Tacrina®	11
Inhibidores de proteasas de cisteína	52	Tau proteina en la EA.....	21
Lustral.....	16	Test de Kaiser	102
Luvox	16	Tioflavina T	22
MejoradoresColinergicos	11	Tiopéptidos	44
Melatonina en la EA.....	34	Trazodona.....	18
Merrifield resina de	70	Venlafaxina.....	16
Nicotina en la EA	34	Vitamina E en la terapia de la EA	20
		Zolofl	16

8 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Katzman, R.. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *314*, 964-973.
- 2 Inestrosa, N. *Geriatrka* **1992**, *4*,122-127
- 3 Tomado del boletín conmemorativo del día mundial de la enfermedad de Alzheimer del 21 de Septiembre del 2000, de la fundación "Alzheimer Disease International"
- 4 Alzheimer, A. *Geriatrische Med.* **1907**,*64*, 146-148
- 5 Levey, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13541-13546.
- 6 Fischer, W., Wictorin, K., Bjorklund, A., Williams, L. R., Varon, S. & Gage, F. H. (1987) Bores, G. M., Huger, F. P., Petko, W., Mutlib, A. E., Camacho, F., Rush, D. K., Selk, D. E., Wolf, V., Kosley, R. W., Jr., Davis, L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 728-738.
- 7 Schratzenholz, A., Pereira, E. F., Roth, U., Weber, K. H., Albuquerque, E. X. & Maelicke, A.. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 1-6.
- 8 Cooper, J. *Arch. Intern. Med.* **1991**, *151*, 245-249.
- 9 Kelnert-Folks in *Psychotropic drugs* (Segunda edición) Ed Mosby, **1997**, pag 414.
- 10 Wilkimson, D. *Expert Rew. Neurotherapeutics* **2001**, *1*, 61-69
- 11 Simona Capsoni., Sabina Giannotta., Antonino Cattaneo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12432-12437.
- 12 Grutzendler J, Morris JC. *Drugs* **2001**; *61.*, 41-52.
- 13 Rosler, M, *International Journal of Clinical Practice*, **2002**, *127*, 20-36.
- 14 Teri L, Logsdon R, Peskind E, Raskind M, Weiner M, Tractenberg R, Foster N, Schneider LS, Sano M, Whitehouse P, Tariot P, Mellow A, Auchus A, Grundman M, Thomas RG, Schafer K, Thal L. *Research and Practice in Alzheimer's Disease and Other Dementias* **2001.**, 27-31.
- 15 Daniel, D. *Journal of Clinical Psychiatry* **2000**, *61*, 49-52.
- 16 Fisher A, Michealson DM, Brandeis R, Haring R, Chapman S, Pittel Z.. *Ann N Y Acad Sci.* **2000**, *920*, 315-20.

-
- 17 Hock, C., Maddalena, A., Heuser, I., Naber, D., Oertel, W., von der Kammer, H., Wienrich, M., Raschig, A., Deng, M., Growdon, J.H., Nitsch, R.M. *Ann NY Acad Sci*, **2000**, *920*, 285-291. desafortunadamente la Talsaclidina que llego fase II fue descartada por falta de eficacia.
- 18 Lai KPL, Tsang SWY, Francis PT, Keene J, Hope T, Esiri MM, Spence I, Chen CPL *NeuroReport* (2002), *13*(9), 1175-1178.
- 19 Lesley, P PCT Int. PPAI. **2001**, WO 0172741
- 20 Feinstein, D. *Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, 2434-2442.
- 21 Thal, L. *Research and Practice in Alzheimer's Disease* **2002**, *6*, 232-236.
- 22 Eikelenboom, P. *Drugs of Today* **2002**, *38*, 429-443.
- 23 Jaffe, A. B., Toran Allerand, C. D., Greengard, P. and Gandy, S. E, *J.Biol. Chem* **1994**, *269*, 13065-13068.
- 24 Yoshiike Y., Tanemura K., Murayama O., Akagi T., Murayama M., Sato S., Sun X., Tanaka N., and Takashima A *J. Biol. Chem* , **2001**, *276*, 32293-32299.
- 25 Hefti, F *J. Neurosci.* **1986**, *6*, 2155-2162.
- 26 Kosik, K. *Trends Neurosci* **1991**, *14*, 218-219.
- 27 Glenner, G. *N. Engl. J. Med.* **1980**, *302*, 1283-1292.
- 28 G. Blessed, B.E. Tomlinson, M. Roth., *Br. J. Psychiat* **1968**, *114*, 797-811.
- 29 DeKosky ST, Scheff SW., *Ann Neurol* **1990**, *27*, 457-464.
- 30 Cuajungco MP, Goldstein LE, Nunomura A, Smith MA, Lim JT, Atwood CS, Huang X, Farrag YW, Perry G, Bush AI. *J. Biol Chem*, **2000**, *275*, 19439-19442.
- 31 Glenner, G., Wong, C., *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1984**, *120*, 885-890.
- 32 Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A. *Nature* **1987**, *325*, 733-736.
- 33 Prelli, F., Castaño, E. M., Glenner, G. G. and Frangione, B. *J. Neurochem* **1988**, *51*, 648-651.
- 34 Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GAP, St. George-Hyslop P, Van Keuren M, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL., *Science*, **1987**, *235*, 880-884.
- 35 Goldgaber, D., Lehman, M. I., McBride, O. W., Suffiotti, U., Gajdusek, D. C. *Science*, **1987**, *235*, 877-880.

-
- 36 Tang J., Lemaire H.-G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L.,
Ra Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B. *Nature*, **1987**, *325*,
733-736.
- 37 Wilcox AS, Warrington JA, Gardiner K, Berger R, Whiting P, Altherr MR,
Wasmuth JJ, Patterson D, Sikela JM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; *89*:5857-61.
- 38 Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G. *Neurosci Lett* **1989**, *97*, 232-238.
- 39 Soto, C., Brañes, M.C., Alvarez, J. & Inestrosa, N.C. *J. Neurochem* **1994**, *63*, 1191-
1198.
- 40 Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, I. T. M. and Zagorski, M. G. *J. Mol. Biol.* **1992**,
225, 1075-1093.
- 41 Wood, S.J., Wetzel, R., Martin, J.D., and Hurle, M.R.. *Biochemistry* **1995**, *34*, 724-
730.
- 42 Soto, C., Kindy, M. S., Baumann, M., and Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res.
Comm.* **1996**, *226*, 672-680.
- 43 Mullan, M. & Crawford, F. *Mol. Neurobiol.* **1994**, *9*, 15-22.
- 44 Shoji M; Golde TE; Ghiso J; Cheung TT; Estus S; Shaffer LM; Cai XD; McKay
DM; Tintner R; Frangione B. *Science* **1992**, *258*, 126-128.
- 45 Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski
BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ. *Nature* **1992**, *359*, 322-
325.
- 46 Soto, C. *Molecular Medicine Today*, **1999**, *5*, 343-350.
- 47 Kelly, J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 11-17.
- 48 Castano, E.M.; Frangione, B.. *Lab Invest* **1988**, *58*, 122-132.
- 49 Inouye H., Fraser, P.E., and Kirschner, D.A.. *Biophysical Journal* **1993**, *64*: 502-
519.
- 50 Haase-Pettingell, C. A., King J., *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*: 4977-4983.
- 51 Lansbury, P. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6865-6870.
- 52 Castano, E.M.; Ghiso, J.; Prelli, F.; Gorevic, P.D.; Migheli, A.; Frangione, B. *Biochem.
Biophys. Res. Commun* **1986**, *141*, 782-789.

-
- 53 Gorevic, P.D., Castano, E.M., Sarma, R., Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1987** *147*, 854-862.
- 54 J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, Jr. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.
- 55 Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Read, J., Masters, C.L., Beyreuther, K. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 149-163.
- 56 Citron M, TS. Diehl, A. Capell, C. Haass, DB. Teplow, DJ. Selkoe. *Neuron* **1996**, *16*, 171-179.
- 57 Buxbaum, J. D., Gandy, S. E., Cicchetti, P., Ehrlich, M. E., Czernik, A. J., Fracasso, R. P., Ramabhadran, T. V., Unterbeck, A. J. and Greengard, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 6003-6006.
- 58 Fasman, G. D., Perczel, A. and Moore, C. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, *92*, 369-371.
- 59 Lorenzo A., Yanker, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *91*, 12243-12247.
- 60 Singh M, Sétáló Jr. G, Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD. *J. Neurosci* **1999**, *19*, 1179-1188.
- 61 Salomon AR, Marcinowski KJ, Friedland RP, Zagorski MG. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13568-13578.
- 62 Tomiyama, T., Shoji, A., Kataoka, K. *J. Biol. Chem*, **1996**, *271*, 6839-6844.
- 63 K. Ma, EL Clancy, Y. Zhang, DG Ray, K. Wollenberg, MG Zagorski.. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8698-8706.
- 64 Gordon, David J., Sciarretta, Kimberly L., Meredith, Stephen C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237-8245.
- 65 L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt. *J. Biol. Chem* **1996**, *271*, 8545-8548.
- 66 Tjernberg, L. O., Lilliehöök, C., Callaway, D.J.E., Näslund, J., Hahne, S., Thyberg, J., Terenius, L. and Nordstedt, C, *J. Biol. Chem* **1997**, *272*, 12601-12605.
- 67 Soto, C., Castaño, E. M., Frangione, B. Inestrosa, N. C. *J. Biol. Chem* **1995**, *270*, 3063-3067.
- 68 Gante, J. *Angew.Chem. Int. Engl.* **1994**, *33*, 1699-1720.

-
- 69 D. Jiao, K.C. Russell, V. J. Hruba, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3511-3520
- 70 O. Kuisle, E. Quiñoá, R. Riguera *Tet. Letters*, **1999**, *40*, 1203-1206.
- 71 Roland A. Breitenmoser, Heinz Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 786-796.
- 72 Abe, H.; Kushida, K.; Shiobara, Y.; Kodama, M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1401-1404.
- 73 Kaneko, K. *J Antibiot (Tokyo)* **1969**, *22*, 12-27.
- 74 Gwendolyn D. Fate, Charles P. Benner, Stephen H. Grode, and Terry J. Gilbertson *J. Am. Chem. Soc* **1996**, *118*, 11363-11368.
- 75 Sasaki, Y., Abe, J *J. Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 13-17.
- 76 Chorev, M., Goodman, M. A. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 266-273.
- 77 Chorev, M.; Shavitz, R.; Goodman, M.; Minick, S.; Guillemen, R. *Science* **1979**, *204*, 1210-1212.
- 78 Zuckerman, R.N.; Kerr, J.M.; Kent, S.B.H.; Moos, W.H.; *J. Am. Chem. Soc* **1992**, *114*, 10646-10647.
- 79 Simon, R.J., Kania, R.S., Zuckerman, R.N., Huebner, V.D., Jewell, D.A., Banville, S., Ng, S., Wang, L., Rosenberg, S., Marlowe, C.K., Spellmeyer, D., Tan, R., Frankel, A.D., Santi, D.V., Cohen, F.E., and Barlett, P.A.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 9367-9371.
- 80 En la literatura tambien se conocen como α -azapéptidos, aqui por simplicidad se usará el término azapéptidos
- 81 Gante, J. *Synthesis* **1989**, 405-413.
- 82 Hans-Jürgen Hess, Walter T. Moreland,; Gerald D. Laubach *J. Am. Chem Soc* **1963**, *85*, 4041-4042.
- 83 Niedrich, H., *J. Prakt. Chem* **1972**, *314*, 769.
- 84 Niedrich, H. Oehme, C., *J. Prakt. Chem* **1972**, *314*, 759.
- 85 Oehme, P., Niedrich, H., Vogt, W.E., Berseck, C., Bergmann, J., Reich, J.G., Falck, M., Pirrwitz, J. Jung, F. *Acta Biologica et Medica Germanica* **1972**, *28*, 109-120.
- 86 Oehme, P., Bergman, J Falk, M., *et al Acta. Biol. Med. Germ.* **1970**, *25*, 613.
- 87 Hart, M.J., C. Beeson *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3700-3709.

-
- 88 Wiczerzak,E., Drabik,P., Lankiewicz,L., Oldziej,S., Grzonka,Z., Abrahamson,M., Grubb,A., Bromme,D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4202-4211.
- 89 Gante, J. *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 540.
- 90 Gante, J. *Chem. Ber* **1964**, *97*, 983.
- 91 Dutta, A., *Morley, J.J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 1712-1720.
- 92 Hans-Jürgen Hess, Walter T. Moreland,; Gerald D. Laubach *J. Am. Chem Soc* **1963**, *85*, 4041-4042.
- 93 Powers, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 639.
- 94 Gray, C. J., Ireson, J.C., Parker, R. C. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 739.
- 95 Gante, J. *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 2551.
- 96 Parry, M.. *Chem. Biol. Pept. Proc. 3ed. Amer. Pept. Symp.* **1972**, 541.
- 97 Greenlee, W. J., Thorsett, E.D., *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *122* 791.
- 98 J. Magrath., R. H. Abeles *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4279-4283.
- 99 Han H, Janda KD: . *J. Am. Chem Soc* **1996**, *118*, 2539-2544.
- 100 Janda KD WO 97/35199.
- 101 Merrifield, B. *J. Am. Chem. Soc* **1963**, *85*, 2149-2154.
- 102 Wang, S. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1235.
- 103 Bunin, B. A. "The Combinatorial Index"; Academic Press: SanDiego, 1998; Capitulo 3.
- 104 Novabiochem. "The Combinatorial Chemistry Catalog; 2001", Solid Phase Organic Synthesis Notes.
- 105 Fang, X ., Hanessian, S. *Tetrahedron Lett* **1998**, *39*, 733-736.
- 106 Manabe S., Nakahara Y., Ito Y. *Synlett* **2000**, 1241-1244.
- 107 Katritzky, A.R., Xie, L., Zhang, G. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 7011-7014.
- 108 Garigipati, R. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 6807-6810.
- 109 Chen, C., Munoz, B. *Tetrahedron Lett* **1998**, *39*, 3401-3404.
- 110 Brown, B.B., Wagner, D.S., & Geysen, H.M. *Mol Diversity* **1995**, *1*, 4-12 .
- 111 Holmes, C.P., Jones, D.G.. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318-2321.

-
- 112 Trost, B. *Acc Chem Res*, **1980**, *13*, 385-393.
- 113 Khan, S., Sivanandalah, K, M.. *Synthesis* **1978**, 750.
- 114 Deegan, T.L.; Gooding, O.W.; Baudart, S.; Porco, J.A., Jr. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 4973-4976.
- 115 Whitehouse, D. L.; Nelson, K. H.; Savinov, S. N.; Austin, D. J. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 7139.
- 116 F. Guillier, D. Orain, M. Bradley. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- 117 Dutta, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 1712.
- 118 Kaiser E, *Anal. Biochem.* **34**, 595 (1970)
- 119 Vojkovsky, T. *Peptide Research*, **1995**, *8*, 236-237.
- 120 A. J. Zhang, D. H. Russell, J. Zhu, K. Burgess. *Tetrahedron Lett* **1998**, *39*, 7439-7442.
- 121 Hocker, M. D., Caldwell, C. G., Macsata, R. W., Lyttle, M. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 310-315.
- 122 Giordano, C., Calabretta, R., Gallina, C. *Il Farmaco* **1991** *46*, 1497-1516.