



Inhibidores de distintas ARNt sintetasas de *Plasmodium falciparum* como potenciales agentes antimaláricos

Alba López Ibáñez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Tesis Doctoral

INHIBIDORES DE DISTINTAS ARNt SINTETASAS DE
PLASMODIUM FALCIPARUM COMO POTENCIALES
AGENTES ANTIMALÁRICOS

Memoria presentada por:

Alba López Ibáñez

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona
Programa de Doctorado: Química Orgánica

Dirigida por:

Revisada por:

Dra. Miriam Royo Expósito

Dr. Fernando Albericio Palomera

Barcelona, 2013



La presente tesis doctoral ha sido financiada por el consorcio *Mephitis* mediante el proyecto del VIIFP de la Comunidad Europea correspondiente a la convocatoria HEALTH-2007-2.3.2-12, que lleva por título “*Targeting protein synthesis in the apicoplast*

and cytoplasm of Plasmodium” Grant agreement number: 223024.

Dicho consorcio está formado por distintos grupos de investigación con el objetivo general de contribuir en la investigación de la síntesis de proteínas del *Plasmodium* así como, explorar nuevos fármacos antimaláricos (<http://www.mephitis.eu>).

A les àvies Angelina i Natàlia,

a la mare i al pare,

a l'Eloi, a la Vane i al Toni

Sembla mentida però finalment ha arribat l'hora d'escriure els agraïments; aquelles úniques paraules que molts dels que tingui aquesta tesis entre les seves mans llegiran.

Doncs bé, en primer lloc, m'agradaria donar-li les gràcies al Fernando i en especial a la Míriam, per brindar-me l'oportunitat d'endinsar-me dins del món de la ciència i obrir-me les portes a la investigació, en un projecte que ni fet a mida. *Gràcies per comptar amb mi durant aquest temps.*

Per altre banda vull aprofitar l'ocasió agrair una vegada més al meu col·lega i mentor Rob. Sense ell aquesta tesis no tindria sentit. *Aan jouw zijde heb ik veel geleerd en ook genoten van scheikunde. Dank je wel dat je mijn gids en meester was in deze periode, zonder jou zou ik niet zover gekomen zijn.*

També vull agrair tot el suport que he rebut per part dels companys de UQC que m'han obsequiat amb el seu suport tant dins com fora del laboratori, ajudant-me a tirar endavant en els moments més complicats, quan semblava que tot penjava d'un fil. *No em puc imaginar com deu ser fer la tesis sense vosaltres!!*

No puc deixar de banda tota l'ajuda, paciència i formació que he obtingut per part de la gent del laboratori de traducció genètica del IRB, *especialment per part de la Noelia; Gràcies per adoptar-me i fer-me sentir part del vostre gran món microscòpic.*

A tots aquells que heu fet l'esforç de llegir-vos i corregir, encara que sigui una petita part d'aquesta tesis; *Moltes gràcies.*

Als germans Corbella i particularment a la Eulàlia; *Gràcies, “fliu”, per aquesta magnífica portada.*

A tota la resta: familiars, amics i a tots aquells que formeu part de mi, em coneixeu prou com per saber que sóc de les que pensen que un fet val més que mil paraules, i aquestes se les emporta el vent... Però donat que no sé si aviat tornaré a tenir una altra ocasió per dedicar-vos uns agraïments, aprofito la ben entesa per donar-vos les gràcies per donar-me suport durant aquest projecte i per acompanyar-me cada dia en aquesta aventura que és la vida.

A tots vosaltres, gràcies per ser-hi!!!!

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANEXOS

Abreviaturas y acrónimos.

	soporte polimérico
λ	longitud de onda
$[\alpha]$	rotación óptica específica
AA-AMP	intermedio aminoacil-adenilato
ac	solución acuosa
ACH	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
ACN	acetonitrilo
ACQ	6-aminoquinolil- <i>N</i> -hidroxisuccinimidil carbamato
ACTs	terapias de combinación con artemisina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina trifosfato
Alloc	aliloxicarbonilo
AMP	aminoacil-adenilato
AMPs	péptidos catiónicos antibacterianos naturales
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ARS	aminoacil-ARNt sintetasa
ATP	adenosina trifosfato
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc ₂ O	bicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
CCF	cromatografía en capa fina
cispentacina	ácido (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-aminociclopentanocarboxílico
CPPs	cell penetrating peptides

DBAD	azodicarboxilato de dibencilo
DCAD	azodicarboxilato de di- <i>p</i> -clorobencilo
DCM	diclorometano
DEAD	azodicarboxilato de dietilo
DIAD	azodicarboxilato de diisopropilo
DPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DLM	diseño de ligandos múltiples
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DV	vacuola digestiva
EDC·HCl	hidrocloruro de 1-etil-3(3'-(dimetilamino)propil)carbodiimida
eq	equivalente
Et ₂ O	dietiléter
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonilo
Fmoc-Amp(Alloc)-OH	ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-Fmoc-amino-1-Alloc-pirrolidina-2-carboxílico
Fmoc-Amp(Boc)-OH	ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-Fmoc-amino-1-Boc-pirrolidina-2-carboxílico
GS	GlidScore
HOBt·H ₂ O	1-hidroxibenzotriazol monohidratado
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HsKRS	Lisil-ARNt sintetasa humana
Hz	hertz
icofungipen	ácido (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-amino-4-metilenciclopentanocarboxílico
IEC	ciclo asexual intraeritrocítico
J	constante de acoplamiento
LDH	lactato deshidrogenasa
LM	ligandos múltiples

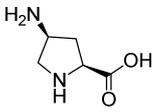
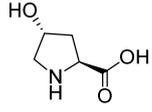
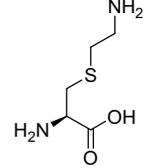
m/z	relación masa/carga
MBHA	<i>p</i> -metilbenzhidrilamina
min	minuto
MS (ES ⁺)	espectrometría de masas por electroespray
MTBE	<i>tert</i> -butil-metil-éter
PBS	tampón fosfato salino
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenilfosfina)-paladio(0)
PfKRS-1	Lisil-ARNt sintetasa citosólica de <i>P. falciparum</i>
PfKRS-2	Lisil-ARNt sintetasa apicoplástica de <i>P. falciparum</i>
PMB	<i>p</i> -metoxibencil éter
ppm	partes por millón
RBC	glóbulos rojos humanos
RMN	resonancia magnética nuclear
RP-HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa
Ru(COD)(Me-alilo) ₂	<i>bis</i> -(2-metilalilo) (1 5-ciclooctadieno) rutenio (II)
s	sólido
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
t.a.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TIS	triisopropilsilano
t _R	tiempo de retención
Trt	tritilo
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
δ	desplazamiento químico

Anexo 1. Aminoácidos naturales.

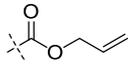
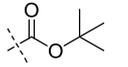
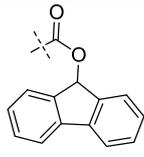
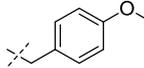
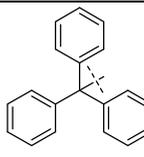
Aminoácido		Estructura
Asp (D)	L-ácido aspártico	
Glu (E)	L-ácido glutámico	
Ala (A)	L-alanina	
Arg (R)	L-arginina	
Asn (N)	L-asparagina	
Cys (C)	L-cisteína	
Phe (F)	L-fenilalanina	
Gly (G)	L-glicina	
Gln (Q)	L-glutamina	
His (H)	L-histidina	

Ile (I)	L-isoleucina	
Leu (L)	L-leucina	
Lys (K)	L-lisina	
Met (M)	L-metionina	
Pro (P)	L-prolina	
Ser (S)	L-serina	
Tyr (T)	L-tirosina	
Thr (T)	L-treonina	
Trp (W)	L-triptófano	
Val (V)	L-valina	

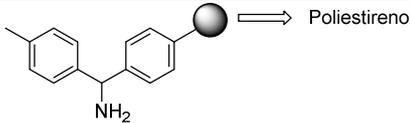
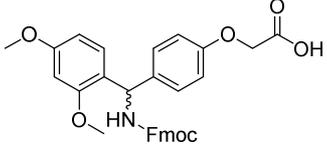
Anexo 2. Aminoácidos especiales empleados en el presente trabajo.

Aminoácido	Estructura
ácido (2S,4S)-4-amino-L-prolina (Amp)	
L-hidroxiprolina	
L-tialisina	

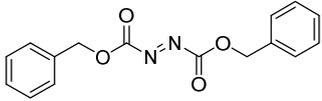
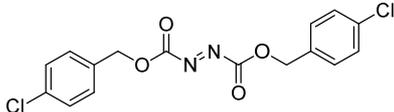
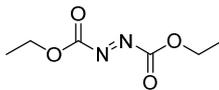
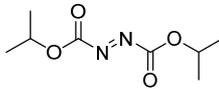
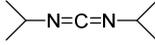
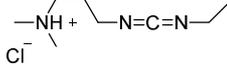
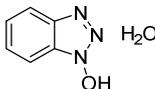
Anexo 3. Grupos protectores empleados en el presente trabajo.

Abreviatura	Compuesto	Estructura
Alloc	aliloxycarbonilo	
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonilo	
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonilo	
PMB	<i>p</i> -metoxibencil éter	
Trt	Tritilo	

Anexo 4. Soportes sólidos y espaciadores bifuncionales utilizados en el presente trabajo.

Nombre	Estructura
Resina MBHA <p>(<i>p</i>-metilbenzhdrilamina)</p>	
espaciador bifuncional Rink Amida <p>ácido <i>p</i>-{(R,S)-α-[1-(9-fluorenil)metoxicarbonilamino]-2,4-dimetoxibencil}-fenoxiacético</p>	

Anexo 5. Agentes de acoplamiento y aditivos utilizados en la síntesis de compuestos en fase sólida y en solución descrita en el presente trabajo

Abreviatura	Compuesto	Estructura
DBAD	azodicarboxilato de dibencilo	
DCAD	azodicarboxilato de di- <i>p</i> -clorobencilo	
DEAD	azodicarboxilato de dietilo	
DIAD	azodicarboxilato de diisopropilo	
DPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida	
EDC·HCl	hidrocloruro de 1-etil-3(3'(dimetilamino)propil)carbodiimida	
HOBt·H ₂ O	1-hidroxibenzotriazol	

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 LA MALARIA CAUSADA POR <i>P. FALCIPARUM</i>	3
1.2 CICLO DE VIDA DEL <i>P. FALCIPARUM</i>	4
1.3 TERAPIAS CONTRA LA MALARIA	5
1.3.1 Quimioterapia antimalárica	5
1.3.2 Resistencia farmacológica.....	8
1.4 DIANAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA MALARIA	9
1.4.1 Dianas citosólicas	9
1.4.2 Dianas en las membranas	10
1.4.3 Dianas en la vacuola digestiva	10
1.4.4 Dianas mitocondriales	11
1.4.5 Dianas en el apicoplasto.....	12
1.5 EL GENOMA DE <i>P. FALCIPARUM</i>	16
1.5.1 La traducción genética del <i>Plasmodium</i>	16
1.6 AMINOACIL ARNT SINTETASA (ARS).....	17
1.6.1 ARS del <i>P. falciparum</i>	20
1.6.2 ARS como dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria	21
1.7 OBJETIVOS GENERALES.....	23
REFERENCIAS.....	24

2. DISEÑO Y SÍNTESIS DE MIMÉTICOS DE LISIL-AMP

2.1 INTRODUCCIÓN	33
2.1.1 Intermedio AA-AMP	33
2.1.2 Miméticos del intermedio AA-AMP	34
2.1.3 Lisil-ARNt sintetasas (LysRS) del <i>P. falciparum</i>	37
2.2 OBJETIVOS	38
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
2.3.1. Diseño de la quimioteca virtual de miméticos de Lisil-AMP	39
2.3.2. <i>Docking</i> de la quimioteca virtual de miméticos de Lisil-AMP	40
2.3.3. Síntesis de la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP	41
2.3.3.1 Síntesis en solución de los precursores	42
2.3.3.2 Síntesis en fase sólida de la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP	44
2.3.4. Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vitro</i> de los miméticos de Lisil-AMP.....	48
2.3.5. Síntesis en solución de los compuestos Lisil-AMP seleccionados	52
2.3.6. Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vitro</i> de los compuestos de Lisil-AMP seleccionados	54
2.3.6.1. Ensayos de aminoacilación <i>in vitro</i>	55

2.3.7. Evaluación <i>in silico</i> de los compuestos de Lisil-AMP seleccionados	57
2.3.8. Evaluación <i>in vivo</i> de los compuestos de Lisil-AMP seleccionados	58
2.3.8.1 Modelo <i>zebrafish</i>	58
2.3.8.2 Modelo murino	59
2.4 CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS.....	63

3. DISEÑO Y SÍNTESIS DE LIGANDOS MÚLTIPLES BASADOS EN LOS β -AMINOACIDOS CISPENTACINA E ICOFUNGIPEN

3.1 INTRODUCCIÓN	69
3.1.1 Diseño de ligandos múltiples (DLM).....	69
3.1.2 Cispentacina	70
3.1.3 Icofungipen	74
3.2. OBJETIVOS	75
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
3.3.1. Diseño virtual de la quimioteca de LM.....	76
3.3.2. <i>Docking</i> de la quimioteca virtual de LM.....	77
3.3.3. Síntesis asimétrica de la cispentacina.....	79
3.3.4. Síntesis de derivados de la cispentacina.....	82
3.3.5. Síntesis de derivados de los ácidos (1S,2S) y (1R,2R)-2-aminociclopentanocarboxílico.....	86
3.3.6. Análisis de aminoácidos de los derivados de los ácidos (1R,2S), (1S,2S) y (2R,2S)-2-aminociclopentanocarboxílico	88
3.3.7. Evaluación <i>in vitro</i> de los derivados de los ácidos (1R,2S),(1S,2S) y (2R,2S)-2-aminociclopentanocarboxílico.....	89
3.3.8. Síntesis parcial del icofungipen	92
3.3.8.1 Síntesis parcial asimétrica del icofungipen.....	93
3.3.8.2 Síntesis alternativa del ácido 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxílico	96
3.4 CONCLUSIONES	98
REFERENCIAS.....	99

4. DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL BENZIMIDAZOL

4.1 INTRODUCCIÓN	105
4.1.1. Características generales de los benzimidazoles	105
4.1.2. Síntesis de los benzimidazoles	105
4.1.3. Aplicaciones farmacológicas generales de los benzimidazoles.....	107
4.1.4. Los benzimidazoles como inhibidores de ARNt sintetasas.....	108
4.1.5. Actividad antimalárica de los benzimidazoles	109
4.2 OBJETIVOS	111

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
4.3.1. Búsqueda de nuevos inhibidores de distintas ARS de <i>P. falciparum</i>	112
4.3.2. Resultados del <i>docking</i> virtual	113
4.3.3. Diseño de la quimioteca de derivados del benzimidazol.....	115
4.3.4. Síntesis de la quimioteca de derivados del benzimidazol	116
4.3.4.1 Síntesis de los núcleos del benzimidazol derivados de aminoácidos	116
4.3.4.2 Síntesis de los derivados del benzimidazol	119
4.3.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la quimioteca de derivados del benzimidazol	120
4.3.5.1 Evaluación de la actividad antimalárica.....	120
4.3.5.2 Ensayos de aminoacilación	125
4.3.5.3 Evaluación de la actividad antibacteriana	125
4.3.5.4 Evaluación de la citotoxicidad.....	128
4.3.5.5 Evaluación de la actividad hemolítica.....	129
4.3.6. Evaluación <i>in vivo</i> de la quimioteca de derivados del benzimidazol.....	130
4.3.6.1 Modelo <i>zebrafish</i>	130
4.3.6.2 Modelo murino	135
4.4 CONCLUSIONES	137
REFERENCIAS.....	138

5. DISEÑO Y SÍNTESIS DE γ -PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROLINA

5.1 INTRODUCCIÓN	143
5.1.1. Péptidos penetradores de membranas celulares (CPPs)	143
5.1.2. Tipos de péptidos penetradores de membranas celulares	144
5.1.3. Mecanismos de internalización de los péptidos penetradores de membranas celulares.....	145
5.1.4. Aplicaciones de los péptidos penetradores de membranas celulares	148
5.2 OBJETIVOS	150
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	151
5.3.1. Diseño de la quimioteca γ -péptidos derivados de la prolina	151
5.3.2. Síntesis de la quimioteca de γ -péptidos derivados de la prolina.....	152
5.3.3. Cuantificación del contenido péptidico de los compuestos de la quimioteca.....	158
5.3.4. Evaluación <i>in vivo</i> del γ -péptido P 37	158
5.3.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la quimioteca de γ -péptidos.....	159
5.3.5.1 Evaluación de la actividad antimalárica de los γ -péptidos.....	159
5.3.5.2 Evaluación de la actividad hemolítica de los γ -péptidos.....	163
5.4 CONCLUSIONES	164
REFERENCIAS.....	165

EXPERIMENTAL**1. MATERIALES Y MÉTODOS**

1.1 DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	171
1.2 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS.....	171
1.2.1 Cromatografía.....	171
1.2.2 RP-HPLC-Preparativo.....	172
1.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS.....	172
1.3.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	172
1.3.2 HPLC-MS Analítico.....	172
1.3.3 Experimentos de RMN.....	173
1.3.4 Rotación óptica específica.....	173
1.3.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	173
1.3.6 Análisis de aminoácidos.....	173
1.3.7 Cuantificación del contenido peptídico por UV.....	174
1.4 PROTOCOLOS GENERALES PARA LA SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA.....	174
1.4.1 Ensayo cualitativo de ninhidrina (test de Kaiser).....	175
1.4.2 Ensayo cualitativo de cloroanilo.....	175
1.4.3 Tratamiento inicial de la resina.....	176
1.4.4 Protocolos generales de la síntesis manual en fase sólida.....	176

2. SÍNTESIS DE LA QUIMIOTECA DE MIMÉTICOS DE LISIL-AMP

2.1 SÍNTESIS EN SOLUCIÓN DE LOS PRECURSORES.....	178
2.2 SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE LA QUIMIOTECA DE MIMÉTICOS DE LISIL-AMP.....	181
2.2.1 Caracterización de la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP sintetizados en fase sólida.....	182
2.3 SÍNTESIS EN SOLUCIÓN DE LOS MIMÉTICOS DE LISIL-AMP SELECCIONADOS.....	184
2.3.1. Procedimiento general para la obtención de los miméticos de Lisil-AMP seleccionados.....	185
2.3.2 Caracterización de los miméticos de Lisil-AMP seleccionados sintetizados en solución.....	190

3. SÍNTESIS DE LA QUIMIOTECA DE LIGANDOS MÚLTIPLES

3.1 SÍNTESIS ASIMÉTRICA DEL ÁCIDO (1R, 2S)-2-AMINOCICLOPENTANOCARBOXÍLICO; CISPENTACINA.....	191
3.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA LA SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ÁCIDO (1R,2S), (1S,2S) Y (1R,2R)-2-AMINOCICLOPENTANOCARBOXÍLICO.....	193
3.2.1 Caracterización de los compuestos intermedios derivados del ácido (1R,2S), (1S,2S) y (1R,2R)-2-aminociclopentanocarboxílico.....	196
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA QUIMIOTECA DE DERIVADOS DEL ÁCIDO (1R,2S), (1S,2S) Y (1R,2R)-2- AMINOCICLOPENTANOCARBOXÍLICO.....	198

3.3.1. Resumen de la caracterización de la quimioteca de derivados del ácido (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>), (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) y (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2-aminociclopentanocarboxílico	205
3.4 SÍNTESIS ASIMÉTRICA PARCIAL DEL ÁCIDO (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-AMINO-4-METILENCICLOPENTANOCARBOXÍLICO; ICOFUNGIPEN.....	206
3.4.1. Síntesis de succinato de (-) dimentilo	207
4. SÍNTESIS DE LA QUIMIOTECA DE DERIVADOS DEL BENZIMIDAZOL	
4.1 SÍNTESIS DE LOS NÚCLEOS DEL BENZIMIDAZOL DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS	208
4.1.1. Procedimiento general para la síntesis de de los núcleos del benzimidazol derivados de aminoácidos (sintetizados por el Dr. Rob Hoen)	210
4.2 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LA QUIMIOTECA DE DERIVADOS DEL BENZIMIDAZOL	212
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA QUIMIOTECA DE DERIVADOS DEL BENZIMIDAZOL	212
4.3.1 Resumen de la caracterización de la quimioteca de derivados del benzimidazol ...	231
5. SÍNTESIS DE LA QUIMIOTECA DE γ-PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROLINA	
5.1 SÍNTESIS DEL ÁCIDO (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-FMOC-AMINO-1-ALLOC-PIRROLIDINA-2- CARBOXÍLICO	235
5.2 SÍNTESIS DE γ -PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.....	235
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LA QUIMOIOTECA DE γ -PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROLINA.....	236
6. ENSAYOS BIOLÓGICOS	
6.1 ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	240
6.1.1 Cultivo de eritrocitos humanos	240
6.1.2 Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	241
6.1.3 Cultivo de células humanas HEK 293T	245
6.1.4 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	246
6.2 ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	248
6.2.1 Evaluación de toxicidad de los compuestos con <i>zebrafish</i> (<i>Danio Reiro</i>).....	248
6.2.2. Evaluación de la actividad antimalárica de los compuestos en modelos murinos..	248
REFERENCIAS.....	250

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción

1.1 La malaria causada por *P. falciparum*

Plasmodium es un parásito del género de protistas del filo apicomplexa del que se conocen 175 especies; de estas, se han identificado cinco especies parasitarias que causan malaria en humanos; *P. falciparum*, la especie más mortal en humanos, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, que ha sido detectada recientemente¹. El ciclo de infección del parásito afecta al sistema nervioso, al sistema hepático y al sistema renal del huésped. Sus síntomas son parecidos a un estado gripal incluyendo dolor de cabeza, náuseas y ciclos de fiebres altas. Los casos severos de malaria causados por *P. falciparum* pueden provocar estados de coma, insuficiencia respiratoria, anemia severa e incluso la muerte. Las mujeres embarazadas, los niños menores de 5 años y los ancianos son particularmente susceptibles a las infecciones de este parásito.

En el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estimaron para 2010, 219 millones de casos de malaria y 660.000 muertes en todo el mundo. Aunque la mayoría de casos y muertes provocadas por la malaria (el 90%) se producen en África, aproximadamente la mitad de la población mundial está expuesta a su contagio (Figura 1. 1). El incremento en la prevención y los esfuerzos para controlar dicha enfermedad han reducido la tasa de mortalidad un 26% desde el año 2000.²

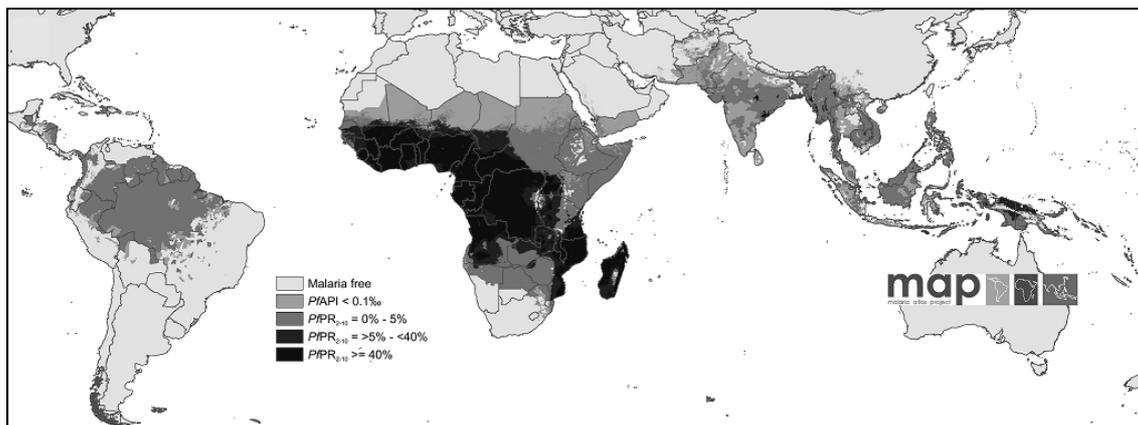


Figura 1. 1. Distribución geográfica del endemismo de *Plasmodium falciparum* en 2010, en el que se indican las predicciones del índice de *P. falciparum* (PfPR) de 2 a 10 años vista³.

Las características biológicas más destacadas en que se sustenta la eficacia de este parásito son su alto índice de multiplicación asexual, su capacidad para invadir eritrocitos de todas las edades y el carácter elusivo que presenta frente al sistema inmune del huésped⁴. Teniendo en cuenta el gran impacto que causa este patógeno en la salud humana, los resultados limitados que se han alcanzado para su erradicación, no obstante

el enorme esfuerzo invertido, ponen de manifiesto el desconocimiento actual de las bases biológicas del parásito, así como la gran complejidad de esta enfermedad⁵.

1.2 Ciclo de vida del *P. falciparum*

El *P. falciparum* tiene un ciclo biológico muy complejo, en el que interviene un agente vector, la hembra del mosquito *Anopheles*, y un huésped vertebrado, entre los que se encuentra el ser humano entre otros animales (Figura 1. 2).

El ciclo empieza con la picadura de un mosquito hembra *Anopheles* portadora de esporozoítos del parásito en sus glándulas salivales. Los esporozoítos entran en el cuerpo y migran al hígado, donde infectan los hepatocitos mediante una división asexual múltiple, transformándose en merozoítos que, tras lisis de las células hepáticas, entran en el torrente sanguíneo. Cabe remarcar que dos especies del *Plasmodium* (*vivax* y *ovale*) son capaces de permanecer latentes en la etapa hepática, en forma de hipnozoítos, hasta un máximo de 30 años después de la infección inicial en el ser humano⁶. Posteriormente, en la etapa eritrocítica o sanguínea, los merozoítos infectan los eritrocitos, estableciendo un nuevo ciclo periódico, conocido como ciclo asexual intraeritrocítico (IEC), que dura aproximadamente 48 horas. El proceso de invasión de los merozoítos, que empieza entre los 7 y 15 días posteriores a la infección inicial, consta de distintas etapas y comporta numerosas interacciones moleculares, algunas de las cuales siguen siendo desconocidas. El IEC se inicia con una reorientación del polo apical del merozoítos para formar uniones estrechas con la membrana superficial del eritrocito. A continuación, la invasión del huésped viene mediada por una vacuola conocida como *parasitophorous vacuole* (PV)⁷. Una vez dentro del eritrocito, el parásito se desarrolla en distintos estadios morfológicos conocidos como anillo (*ring*), trofozoítos y esquizonte (*schizont*).

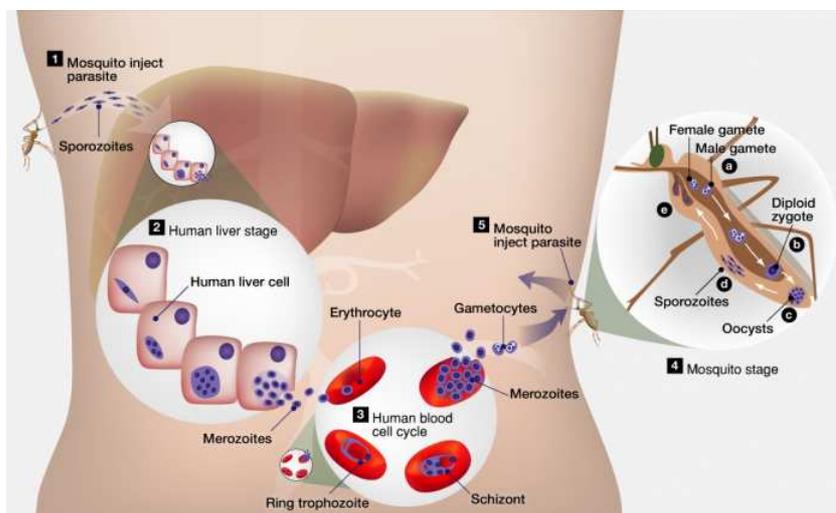


Figura 1. 2. Ciclo de vida del *P. falciparum*, en el que intervienen el mosquito *Anopheles* como vector, donde tiene lugar el estadio sexual del parásito y el huésped, el ser humano, donde se produce el ciclo asexual de este. Ilustración extraída de <http://marudg.wordpress.com/tag/malaria/>

Todos los síntomas que causa la malaria están asociados a este periodo, durante cuyo transcurso el parásito segrega numerosas proteínas que son expuestas en la superficie de los eritrocitos infectados; estas proteínas, no son reconocidas de forma efectiva por el sistema inmunitario del huésped.

En su fase tardía, los merozoítos, (esto es, los esquizontes), sufren múltiples divisiones mitóticas. Cada esquizonte da lugar aproximadamente a 16 merozoítos nuevos, que serán liberados al torrente sanguíneo mediante la lisis del eritrocito. Algunos de ellos se diferencian en células sexuales, gametocitos femeninos y masculinos, que serán transportados de nuevo por una hembra de *Anopheles*. Es en el mosquito donde tiene lugar el ciclo sexual del *Plasmodium*. La unión de los gametos en su intestino forma un cigoto móvil que se divide y da lugar a nuevos esporozoítos, que son transportados a las glándulas salivares, completándose así el ciclo vital del parásito⁸.

1.3 Terapias contra la malaria

Las infecciones provocadas por parásitos son una importante causa de morbilidad y mortalidad mundial. La quimioterapia tiene un papel muy importante no sólo en el tratamiento individual de pacientes, sino también a nivel global para controlar, reducir e intentar erradicar la transmisión de infecciones. Hoy en día, aunque son muchos los esfuerzos realizados por los investigadores, las vacunas para prevenir enfermedades transmitidas por parásitos como la malaria, la leishmaniosis o la esquistosomiasis están aún en fase de desarrollo^{9,10}.

Las investigaciones para combatir la malaria se centran en desarrollar vacunas eficientes, controlar el mosquito que ejerce de vector y crear nuevos fármacos¹¹. Los métodos para controlar el mosquito *Anopheles*, no han sido del todo efectivos, aunque han ayudado a reducir la mortalidad¹². Para frenar la creciente resistencia de los parásitos, ante los fármacos existentes, numerosas investigaciones se centran en la búsqueda de agentes capaces de inhibir dianas terapéuticas esenciales e independientes de los mecanismos de resistencia de los parásitos¹³.

1.3.1 Quimioterapia antimalárica

La quinina, un alcaloide presente en la corteza del quino, fue el primer tratamiento efectivo contra la malaria en el siglo XVII. Su uso como monoterapia antipalúdica duró hasta el 1940, cuando fue reemplazada por la cloroquina que aparte de ser un compuesto más económico, presentaba mayor eficacia y tolerabilidad. Aunque desde 2006 la OMS no recomienda el tratamiento de la malaria con quinina como monoterapia, se sigue utilizando

en casos severos de malaria y en combinación con otros antibióticos para combatir las cepas resistentes a la artemisina¹⁴.

La cloroquina, pertenece al grupo de las 4-aminoquinolinas, del cual se han sintetizado distintos derivados como la amodiaquina y la piperaquina. Fue el primer antimalárico sintético y el que ha demostrado una mayor eficacia hasta la fecha. No obstante, la lenta degradación del fármaco, con un tiempo de vida medio de 60 días, expone al parásito un periodo prolongado durante el cual la concentración del fármaco no es terapéutica, induciendo una rápida aparición de resistencia.

Durante décadas se ha investigado el modo de acción de las 4-aminoquinolinas, siendo la cloroquina el fármaco más estudiado. Su carácter de base débil permite que el fármaco atraviese las membranas celulares, hasta llegar a la vacuola digestiva (DV) del parásito, donde es desprotonado debido al pH ácido de esta y acumulado en su interior. Una vez dentro de la DV, la cloroquina se une a la hematina, provocando la muerte del parásito como se describirá posteriormente¹⁵.

La aparición de cepas resistentes a la cloroquina¹⁶, pocos años después de su introducción, forzó el uso de otros fármacos para el tratamiento de la malaria. Son ejemplos fármacos como el antifólico sulfadoxina en combinación con la pirimetamina; un inhibidor de la síntesis de purinas y pirimidinas, la mefloquina; un derivado de la quinina conocida comercialmente como Lariam[®] o bien el Malarone[®] que combina la atovacuona con el proguanilo. Sin embargo, el uso de dichos fármacos no fue efectivo para controlar la enfermedad, siendo remplazados por el producto natural artemisina, aislado de la planta *A. annua* y sus derivados sintéticos^{17,18,19} más solubles, como la arteméter, la artesunante y la dihidroartemisina (Figura 1. 3).

Hoy en día, para tratar la malaria se recomienda el uso de combinaciones de fármacos con distintos modos de acción, retardando de este modo el desarrollo de nuevas resistencias. Desde 2001 la OMS recomienda el uso de terapias de combinación con artemisina (ACTs) en todas las áreas endémicas para combatir la malaria²⁰. La artemisina y sus derivados destacan por su rápida eficacia y se combinan con fármacos como lumefantrina, mefloquina, amodiaquina, sulfamidas/pirimetamina, piperaquina y clorproguanilo/dapsona que son de acción retardada.

Actualmente no se conoce ningún tratamiento de la malaria con la misma eficacia y tolerabilidad que el uso de ACTs. No obstante, la implantación de las ACTs está limitada por su elevado coste económico, así como el escaso número de fármacos multicomponentes existentes que facilitan su administración y control del tratamiento. Además, el reciente descubrimiento de la resistencia *in vivo* de *P. falciparum* frente al tratamiento con ACTs en algunas zonas de Tailandia y Camboya²¹, donde históricamente

se detectaron los primeros focos resistentes de otros antimaláricos, ponen de manifiesto la necesidad inmediata de descubrir nuevos fármacos.

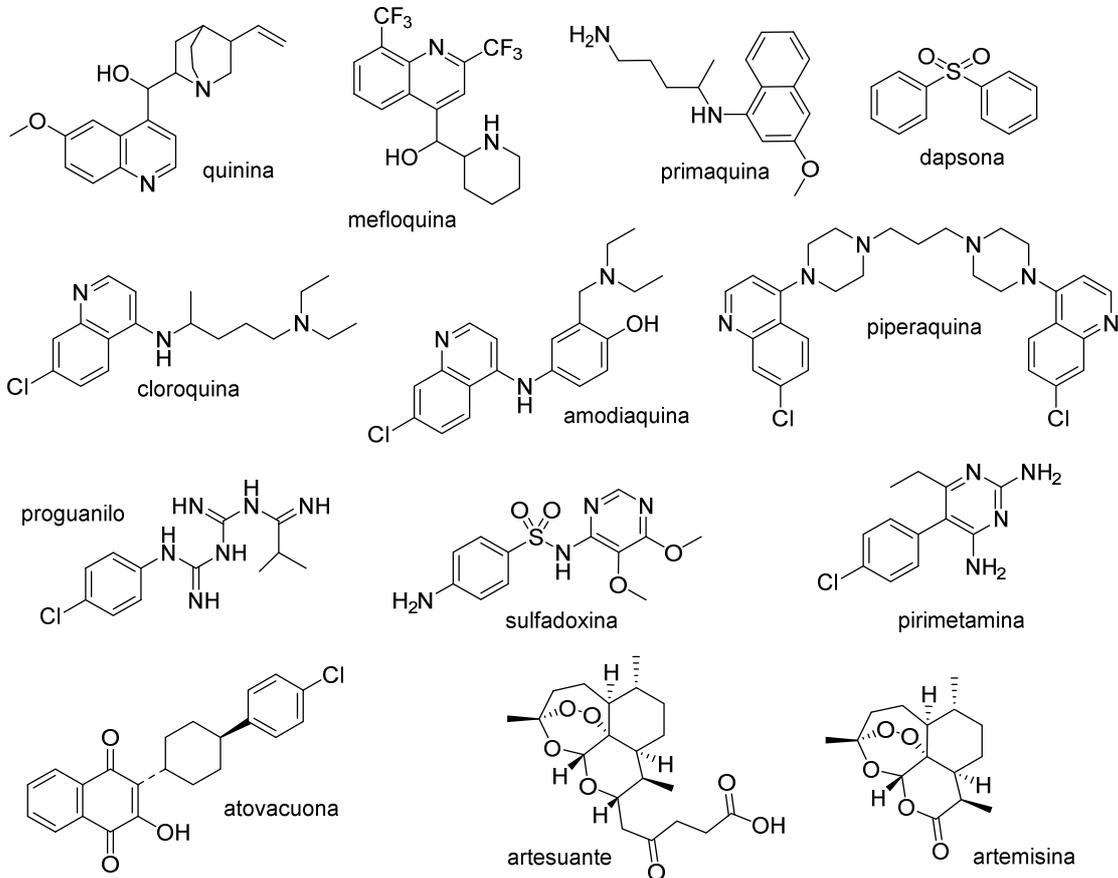


Figura 1. 3. Estructura química de algunos fármacos antipalúdicos.

Por otro lado, se encuentran en desarrollo diferentes vacunas, aunque actualmente no existe ninguna completamente efectiva contra la malaria. El candidato más prometedor, que se encuentra en fase clínica III avanzada²², es la vacuna RTS,S, conocida también como Mosquirix, desarrollada por PATH, GlaxoSmithkline (GSK) y la fundación de Bill & Melinda Gates. Esta vacuna actúa a nivel pre-eritrocitario y se basa en la proteína *circumsporozoite* (CSP). Dicha proteína es la más abundante en la membrana de los esporozoítos y es imprescindible para que el parásito invada los eritrocitos²³. Se ha demostrado que RTS,S, es una vacuna segura y con un buen índice de tolerabilidad. Su administración ha reducido los episodios clínicos y severos de malaria a un 50% de los niños tratados, de edades comprendidas entre 5 y 17 meses, y a una tercera parte de los bebés asistidos, de entre 6 y 12 semanas de vida. Se prevé que hasta 2015 no saldrá dicha vacuna al mercado.

Para erradicar la malaria, además de campañas de prevención para controlar el vector que la transmite y herramientas diagnósticas rápidas y fiables, se requieren fármacos que sean tolerables, eficaces y económicos. Pues, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y, del estado inmune del paciente, así como de su naturaleza, son necesarias combinaciones de fármacos con diferentes modos de acción para garantizar la salud pública mundial.

1.3.2 Resistencia farmacológica

En las últimas décadas, el tratamiento de la malaria ha sido complejo y muchas veces ineficaz, debido a un diagnóstico difícil y tardío, seguido por un tratamiento escaso e inadecuado. Todo esto se suma a una creciente resistencia, en distintas zonas endémicas, hacia todos los fármacos empleados hasta la fecha^{24,25} (Tabla 1. 1).

Fármacos antimaláricos	Año de introducción del fármaco	Año de aparición de la resistencia	Periodo de uso
Quinina	1632	1910	278
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanilo	1948	1949	1
Sulfonamidas/Pirimetamina	1967	1967	<1
Mefloquina	1977	1982	5
Atovacuona	1996	1996	<1
Artemisina y derivados	1971	2006	35

Tabla 1. 1. Fecha de la introducción del fármaco y del descubrimiento de resistencia frente a *P. falciparum*²⁶

La resistencia farmacológica se debe en gran medida a la evolución espontánea del parásito. Las mutaciones genéticas de los parásitos permiten una cierta tolerabilidad al fármaco debido a una disminución de la afinidad hacia la diana terapéutica²⁷. El mecanismo molecular de la resistencia hacia algunos fármacos antimaláricos ha sido atribuido a una menor concentración intracelular del fármaco (disminución del influjo y un aumento del eflujo o secuestro del compuesto). Algunas fuentes causantes son la administración de dosis farmacológicamente insuficientes, así como el creciente uso de profilácticos antimaláricos por parte de los viajeros. Dichos factores contribuyen a la supervivencia y reproducción de los parásitos²⁸ que se reflejan en un aumento de casos de malaria. La resistencia farmacológica comporta un riesgo para la salud pública²⁹ que podría prevenirse mediante la combinación de antimaláricos con distintos mecanismos de acción, siempre y cuando su dosis sea correcta y esté estrictamente controlada³⁰.

1.4 Dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria

En las dos últimas décadas, numerosos avances en la investigación de la malaria han tenido lugar gracias a la secuenciación genómica de distintas especies apicomplejas, así como el genoma de *P. falciparum*. Hoy en día se sigue desconociendo la funcionalidad de muchos de los genes y de las proteínas expresadas por el parásito. Sin embargo, los avances en transcriptómica, proteómica y herramientas bioinformáticas han permitido ampliar los conocimientos de las bases bioquímicas del parásito. Dichas herramientas han permitido detectar nuevas dianas terapéuticas³¹, algunas de las cuales no han sido validadas. Las dianas terapéuticas descubiertas hasta la fecha pueden ser clasificadas según su localización³².

1.4.1 Dianas citosólicas

En el citosol tienen lugar numerosas vías metabólicas que involucran un gran número de enzimas. La mayoría de ellas resultan esenciales para la supervivencia del parásito, por lo que se consideran posibles dianas terapéuticas. No obstante, muchas vías metabólicas están conservadas evolutivamente. Es decir, tanto el parásito como el huésped las comparten, hecho que dificulta inhibirlas selectivamente. Sin embargo, se han detectado algunas que son susceptibles de ser inhibidas sin causar toxicidad en humanos, como es el caso de la síntesis del ácido fólico³³.

Distintos compuestos como la pirimetamina, el proguanilo, la sulfadoxina y la dapsona han mostrado actividad frente a parásitos y bacterias, inhibiendo selectivamente la dihidrofolato reductasa (PfDHFR) o la dihidropteroato sintetasa (PfDHPS). Estas dos enzimas son esenciales para la producción de ADN, ARN y proteínas. A pesar de ser una diana terapéutica validada para el tratamiento de la malaria, la resistencia debida a mutaciones en las enzimas antes nombradas aparece rápidamente tras la administración del fármaco³⁴.

Por otro lado, el *P. falciparum* no es capaz de sintetizar purinas, por lo que utiliza intermedios en la ruta de degradación de los nucleótidos del huésped para la síntesis de nuevos nucleótidos. La principal fuente de purinas para el parásito proviene de la hipoxantina, por lo que se considera a la enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPR) una potencial diana terapéutica³⁵.

La glucólisis, a partir de la cual se obtiene energía mediante la oxidación de la glucosa, es otra vía metabólica del parásito que puede ser alterada. Una de las enzimas más expresadas en *P. falciparum* es la lactato deshidrogenasa (LDH). Dicha enzima es indispensable para el ciclo de vida anaeróbico del parásito. Se ha demostrado que la

enzima LDH del *P. falciparum* difiere de la enzima homóloga humana por lo que puede ser inhibida selectivamente. El compuesto que valida dicha diana terapéutica es el gosispol, un polifenol derivado de la planta del algodón, que compite con NADH para unirse a la enzima del parásito³⁶ (Figura 1. 4).

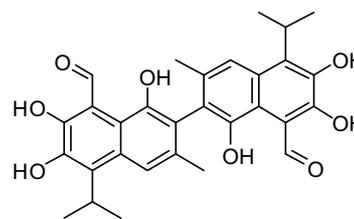


Figura 1. 4. Estructura química del gosispol.

1.4.2 Dianas en las membranas

Teniendo en cuenta la gran cantidad de fosfolípidos que necesita el parásito para la producción de membranas, la síntesis de fosfolípidos constituye una diana terapéutica sugestiva para el tratamiento de la malaria. El *P. falciparum* secuestra la colina sintetizada por el huésped para formar la fosfatidilcolina; el fosfolípido de membrana más abundante del parásito. A partir del descubrimiento del modo de acción y la efectividad antimalárica *in vitro* e *in vivo*³⁷ del compuesto G25, se ha identificado la inhibición del transporte de la colina como estrategia terapéutica.

Las quinasas, como la proteína dependiente de calcio del *P. falciparum* (PfCDPK1), se consideran posibles dianas terapéuticas³⁸. A partir de métodos computacionales y estudios filogenéticos, se han encontrado diferencias significativas entre las proteínas quinasas del parásito y del huésped. Dicha enzima puede ser inhibida selectivamente sin alterar la funcionalidad de las homólogas del huésped³⁹.

Otra ruta importante para la supervivencia del parásito es el transporte de nutrientes a través de las membranas celulares. Aunque los mecanismos de transporte del parásito siguen siendo poco comprendidos, es sabido que las vías endógenas del transporte de los eritrocitos infectados están alteradas. Estas pueden ser inhibidas selectivamente gracias a las divergencias con los mecanismos de transporte de los eritrocitos sanos⁴⁰.

1.4.3 Dianas en la vacuola digestiva

El *P. falciparum* contiene una vacuola digestiva donde la hemoglobina de los eritrocitos es degradada, liberándose el grupo hemo. Durante dicho proceso se forma α -hematina que el parásito polimeriza formando cristales insolubles de hemozoina (β -hematina). Así se evita la permeabilización de la membrana celular que conlleva a la muerte del parásito. Este proceso de desintoxicación es esencial para el *Plasmodium*. Algunos fármacos antimaláricos como la cloroquina inhiben dicho proceso (Figura 1. 5).

Aunque se desconoce la diana específica de la artemisina y sus derivados, algunas investigaciones apuntan a una alteración de la vacuola digestiva. En este caso, la toxicidad del fármaco proviene de la formación de radicales libres que producen estrés oxidativo y causan la muerte del parásito. No obstante, otras investigaciones identifican la diana

terapéutica de la artemisina fuera de la vacuola digestiva, inhibiendo concretamente el retículo sacro-endoplasmático Ca^{2+} -ATPasa (SERCA)⁴¹.

Cabe mencionar que la hidrólisis de la hemoglobina está mediada por metaloaminoproteasas cisteína y aspártico proteasas (falcipainas y plasmepsinas respectivamente). Se ha demostrado que la inhibición de ambas clases de proteasas provoca un efecto sinérgico antimalárico⁴². Existen distintos fármacos comerciales utilizados en el tratamiento de la diabetes, la trombosis y el cáncer entre otros que actúan inhibiendo dichas enzimas⁴³. Sin embargo, actualmente no existe en el mercado ningún fármaco antimalárico con este modo de acción.

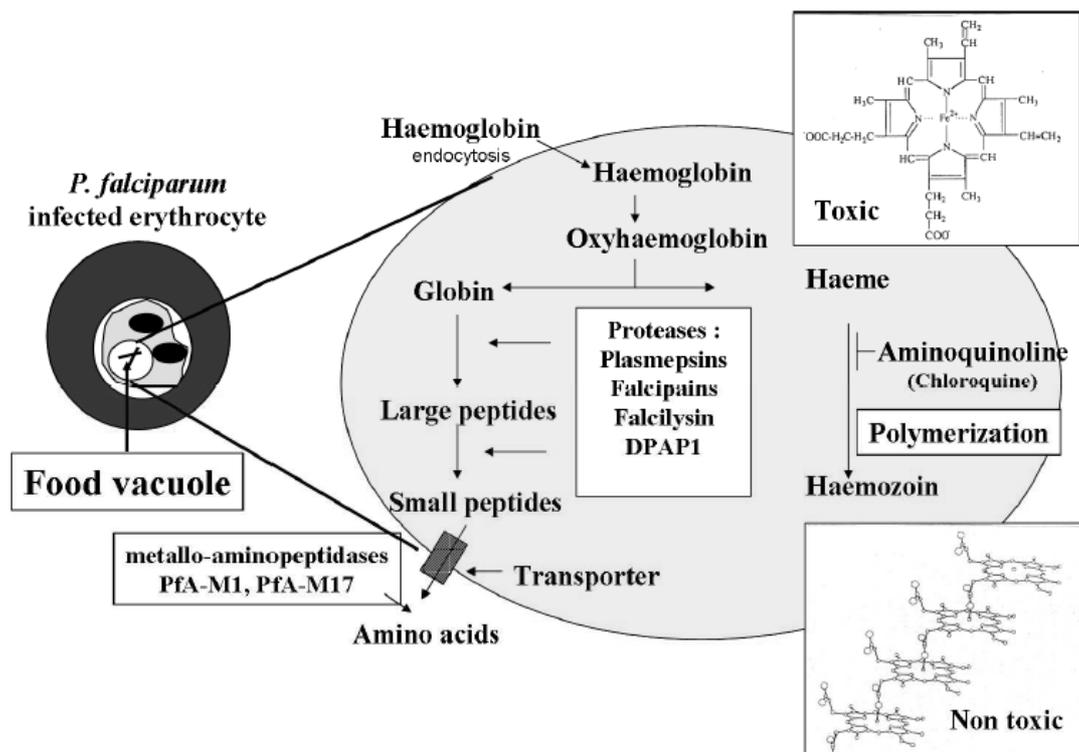


Figura 1. 5. Mecanismos de la degradación de la hemoglobina y hemo desintoxicación en eritrocitos infectados por *P. falciparum*. Figura extraída de Mambu y Grellier, 2008⁴⁴.

1.4.4 Dianas mitocondriales

La atovacuona, un antimalárico relativamente nuevo, inhibe el transporte de los electrones actuando en el ubiquinol citocromo-c-reductasa (complejo III). Dicho fármaco colapsa el potencial de membrana mitocondrial. El compuesto tiene una potente actividad antimalárica, aunque no obstante las mutaciones en dicha enzima aparecen rápidamente, lo que conlleva una resistencia al fármaco, por lo que no resulta apropiado su uso como monoterapia⁴⁵.

1.4.5 Dianas en el apicoplasto

El apicoplasto es un orgánulo presente en todos los apicomplejos, con excepción de *Cryptosporidium spp.* Tiene carácter bacteriano, está evolutivamente bien conservado y fue descubierto hace relativamente poco⁴⁶. Aunque es un orgánulo esencial para la supervivencia del parásito, se desconoce su funcionalidad principal.

Si bien su origen sigue siendo motivo de debate⁴⁷, la hipótesis más aceptada explica la integración de dicho orgánulo mediante una endosimbiosis secundaria. La primera simbiosis se originó entre una cianobacteria y una célula eucariota, dando lugar a un alga, seguida de una segunda simbiosis entre el alga y otra célula eucariota, explicándose así la procedencia de las cuatro membranas de diferente composición que rodean al orgánulo⁴⁸ (Figura 1. 6). Una de las peculiaridades de este orgánulo es su similitud con el cloroplasto de las plantas, aunque carece de funcionalidad fotosintética, por lo que se sospecha que el alga que fue endocitada tiene un origen común con los dinoflagelados.

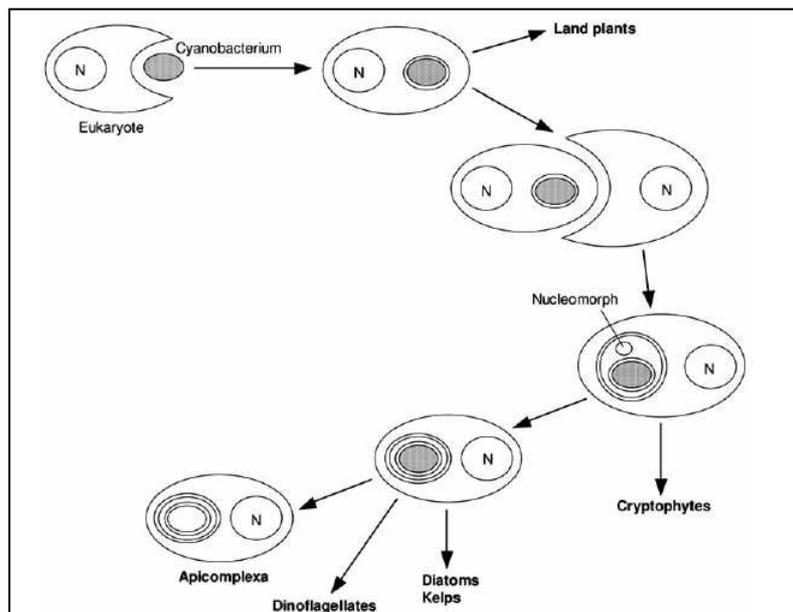


Figura 1. 6. Filogenia simplificada del apicoplasto; hipótesis del origen del apicoplasto, procedente de una endosimbiosis secundaria. Figura extraída de Wiesner, J., 2008.⁴⁸

Partiendo de la información del genoma del *P. falciparum* y utilizando métodos bioinformáticos, se han identificado distintas rutas metabólicas del apicoplasto⁴⁹ como son la síntesis anaeróbica de ácidos grasos, la síntesis de isoprenoides, la síntesis del grupo hemo y la biogénesis de clústers Fe-S (Figura 1. 7). Estas rutas metabólicas, aparte de ser esenciales para el parásito son de origen bacteriano, por lo que difieren completamente de las rutas análogas utilizadas por las células eucariotas del huésped⁵⁰.

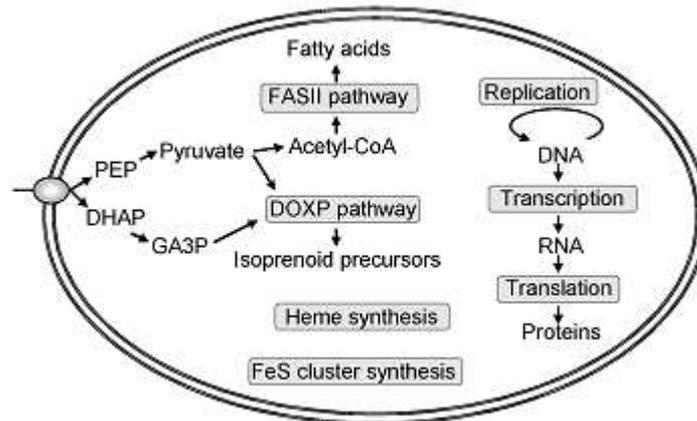


Figura 1. 7. Funciones biológicas y rutas metabólicas que tienen lugar en el apicoplasto. (Figura adaptada de Botté, C. Y, 2012⁴⁹).

No obstante, para que un compuesto alcance e interfiera con la funcionalidad del apicoplasto, tiene que cruzar como mínimo siete membranas celulares entre ellas la plasmática de un eritrocito infectado, la de la vacuola parasitaria, la plasmática del *P. falciparum* y las cuatro membranas que envuelven el apicoplasto. Aunque no cabe duda de que el apicoplasto es una diana terapéutica difícil de alcanzar, algunos antibióticos han sido utilizados para combatir infecciones provocadas por parásitos apicomplejos durante su estadio asexual, que tiene lugar en los eritrocitos del huésped⁴⁸.

La mayoría de ellos actúan interceptando la maquinaria de replicación, transcripción y traducción del ADN bacteriano del apicoplasto. Son ejemplos de estos antibióticos las quinolinas y fluoroquinolinas (norfloxacino y ciprofloxacina) o la rifampicina, un inhibidor de la ARN polimerasa bacteriana que también es efectivo para el tratamiento de la malaria. Se ha demostrado que algunos antibióticos clásicos como las tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina y minociclina), los macrólidos (espiramicina y azitromicina), las lincosamidas (lincomicina, clindamicina y pirlimicina) y el cloranfenicol inhiben las funcionalidades del apicoplasto, por lo que han sido utilizados como terapia antipalúdica. (Figura 1. 8).

Los compuestos que actúan interfiriendo la codificación proteica a nivel apicoplástico tienen una característica común: su actividad tiene efecto retardado. Los parásitos mueren durante el segundo ciclo intracelular de infección, o lo que sería lo mismo, a las 96 horas de la administración del fármaco.

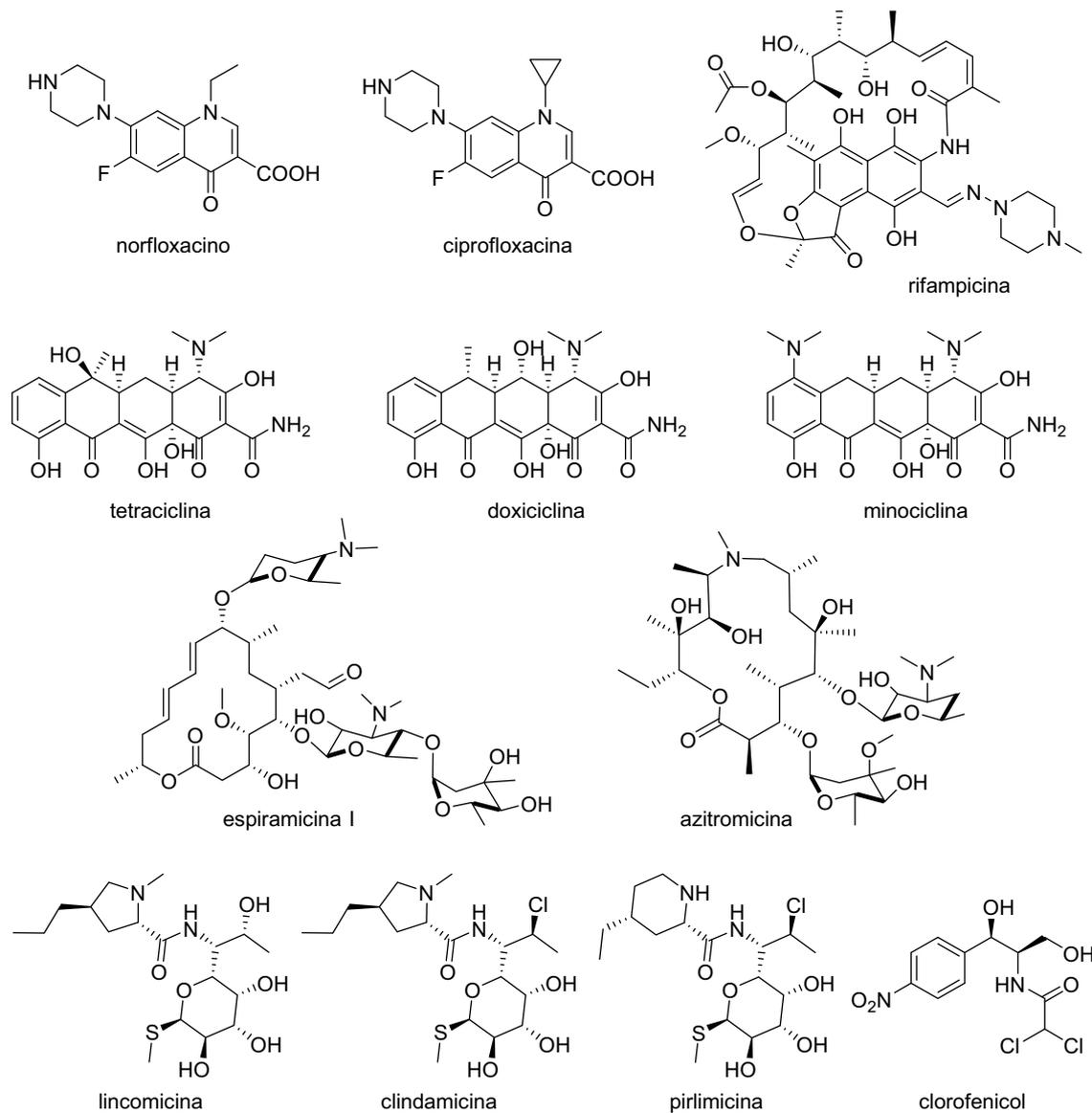


Figura 1. 8. Antibióticos clásicos que actúan en el apicoplasto. Figura extraída de Wiesner, J., 2008⁴⁸.

Este retraso en la actividad es conocido como *delayed death effect* y se mantiene aunque

el fármaco sea eliminado por completo antes del primer ciclo de infección, que dura aproximadamente 48 horas⁵¹ (Figura 1. 9). Aparentemente, la inhibición de la expresión génica del apicoplasto no interfiere con las funciones metabólicas del orgánulo y el parásito

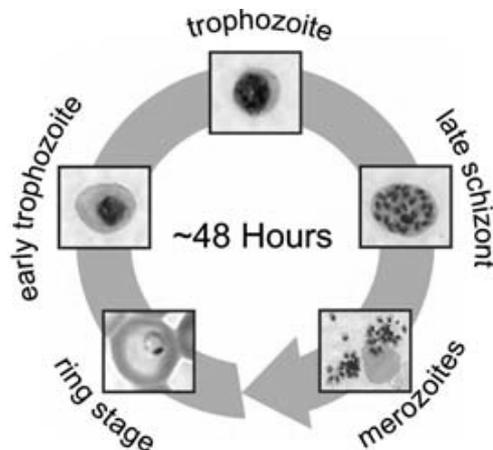


Figura 1. 9. Tinciones de Giemsa durante los distintos estadios morfológicos que sufren los merozoitos de *P. falciparum* durante su ciclo asexual intraeritrocítico (IEC) que dura aproximadamente 48h. Figura extraída de Bozdech, Z., 2003⁵¹.

es capaz de crecer y reproducirse con normalidad, liberando nuevos merozitos. No obstante, una vez las células hijas establecen una nueva infección, su apicoplasto es incapaz de importar y procesar proteínas codificadas en el núcleo. Esto bloquea la segregación y la división celular, por lo que los merozitos no son capaces de completar su ciclo vital y mueren. Dicha característica pone de manifiesto que los fármacos que inhiben el apicoplasto son de actuación lenta, por lo que pueden usarse a nivel clínico como terapia combinada con fármacos de actuación rápida o bien como profilácticos.

Por el contrario, los compuestos que inhiben directamente enzimas involucradas en procesos metabólicos que tienen lugar en el apicoplasto, como la tiolactomicina y el triclosán⁵² en la síntesis de ácidos grasos o la fosmidomicina⁵³, que inhibe la síntesis de los isoprenoides (Figura 1. 10) no presentan *delayed death effect* (Tabla 1. 2).

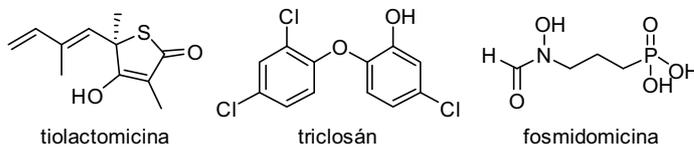


Figura 1. 10. Antibióticos que inhiben procesos metabólicos del apicoplasto y no producen *delayed death effect*.

Actividad metabólica	Fármaco	Diana terapéutica	<i>Delayed death effect</i>
Replicación del ADN	ciprofloxacina	plástido ADN topoisomerasa II (gyrA)	*
Transcripción ARN	rifampicina	plástido RNA polimerasa (rpoB)	**
Traducción de proteínas	clindamicina	plástido 23S rRNA (rrnL)	sí
	eritromicina		sí
	azitromicina		sí
	spiramicina		sí
	micrococcina		sí
	cloranfenicol		sí
	doxiciclina	plástido 16S rRNA (rrnS)	sí
	tetraciclina		sí
	amitamicina	factor de elongación Tu (tufA)	no
Biosíntesis IPP	fosmidomicina	DOXP reductoisomerasa	no
Biosíntesis de ácidos grasos	tiolactomicina	β -cetoacilo-APC sintetasa III (fabH)	no
	triclosán	enoil-ACP reductasa (fabI)	no

Tabla 1. 2. Fármacos que tienen como diana terapéutica el apicoplasto de *P. falciparum*^{54,55}. *La ciprofloxacina es más activa a las 96 horas que a las 48 horas, pero la diferencia de IC₅₀ no es suficientemente significativa como para considerarlo *delayed death effect*⁵⁶. **En la literatura existe controversia sobre el efecto de la rifampicina; algunos autores consideran que su actuación es retardada, mientras que otros opinan que su administración no presenta *delayed death effect*^{57,51}.

1.5 El genoma de *P. falciparum*

El *P. falciparum* contiene un genoma de 22.8 Mb compuesto por 14 cromosomas lineales, un genoma circular apicoplástico y un genoma lineal mitocondrial. Cada uno de estos tres orgánulos (Figura 1. 11) requiere de su propia maquinaria de transcripción y traducción genética para la supervivencia del parásito⁵⁸.

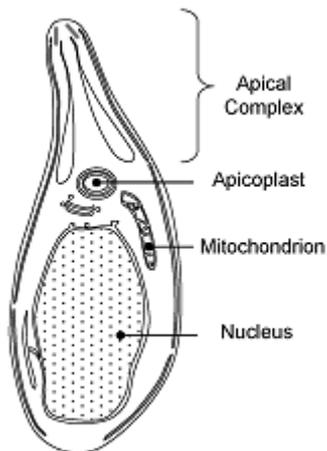


Figura 1. 11. Esquema estructural del *P. falciparum* donde se muestra el complejo apical y los tres orgánulos que contienen ADN. (Figura adaptada de Botté, C. Y, 2012⁴⁹).

Se estima que un 60% del marco abierto de lectura (ORF) del genoma de dicho parásito diverge en la similitud de su secuenciación con respecto al genoma del resto de organismos conocidos⁵⁹. El genoma de *P. falciparum* codifica proteínas más largas que los genes homólogos de otras especies y contiene un alto índice (~80%) de regiones A-T.

Se ha demostrado que al menos el 60% del genoma del *P. falciparum* se transcribe durante el estadio intraerocitario. Dicha transcripción está extremadamente regulada mediante una cascada de transcripciones que ocurre una sola vez por ciclo y en el momento idóneo. Primero se transcriben los genes que corresponden a procesos celulares generales como la síntesis de proteínas. Posteriormente, se transcriben funcionalidades más específicas como los genes involucrados en la invasión de eritrocitos⁶⁰.

1.5.1 La traducción genética del *Plasmodium*

A pesar de que el sistema de traducción genética de *P. falciparum* sigue estando poco caracterizado, la información que se puede obtener es extremadamente útil para la identificación de nuevos compuestos quimioterapéuticos⁵⁸.

Como se ha señalado anteriormente, el *Plasmodium* contiene tres orgánulos donde tiene lugar la traducción genética. Los mecanismos de traducción del citoplasma tienen carácter eucariótico, mientras que los otros dos orgánulos tienen componentes procarióticos.

En el genoma nuclear del *P. falciparum* se han encontrado 46 genes ARNt que codifican 45 ARNt isoaceptores distintos. El genoma apicoplástico contiene 35 genes que codifican 26 ARNt isoaceptores. La característica más notable es que el genoma nuclear del parásito difiere de los eucariotas porque existe una sola copia para cada ARNt isoaceptor.

En el citoplasma se transcriben aproximadamente 5385 genes codificados por el genoma nuclear, mientras que el genoma circular del apicoplasto, de solo 35 Kb, codifica menos de 50 genes⁶¹, entre ellos los que están relacionados con procesos metabólicos básicos como ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), proteínas ribosomales y factores de elongación Tu (EF-Tu). En general, el apicoplasto codifica menos de 50 proteínas⁶². Sin embargo, el proteoma del apicoplasto es suplementado con proteínas codificadas en el núcleo. Dichas proteínas son posteriormente transportadas mediante un péptido señal al apicoplasto. Se calcula que un total de 551 proteínas sintetizadas en el núcleo del parásito tienen como destino el apicoplasto⁶³.

Por otro lado, el genoma de la mitocondria del *Plasmodium*, de solo 6Kb, es el más pequeño que se conoce hasta la fecha. El genoma mitocondrial no codifica genes de ARNt, pero sí pequeños fragmentos de ARNr, por lo que importa el ARNt y las proteínas necesarias para la traducción. En la mitocondria se codifican tan sólo tres proteínas: las subunidades I y III del citocromo c oxidasa (Cox1 y Cox3) y el citocromo b (Cytb)⁶⁴. Aunque se desconoce la maquinaria de transcripción de dicho orgánulo, hay evidencias indirectas, como la resistencia al atovaquona mediante la mutación del Cytb⁶⁵, que sugieren que la transcripción y la traducción en la mitocondria es activa y esencial.

1.6 Aminoacil ARNt sintetasa (ARS)

Las enzimas ARS son muy específicas, esenciales y conservadas. Cada especie contiene como mínimo 20 ARS distintas, una por cada aminoácido. Dichas enzimas son las responsables de la síntesis proteica mediante la traducción de la información genética contenida en el ARN mensajero (ARNm). La inserción de un aminoácido en una determinada posición durante la síntesis de proteínas viene determinada por los codones (unidades de trinucleótidos) del ARNm⁶⁶. Éstos son reconocidos por el anticodón presente en el ARNt. El reconocimiento entre los tripletes del mensajero y los anticodones de los ARNt cargados con su correspondiente aminoácido, así como el establecimiento de los enlaces peptídicos entre dos aminoácidos sucesivos tiene lugar en los ribosomas (Figura 1. 12 A).

Los ribosomas son unas estructuras o partículas citoplasmáticas formadas por ribonucleoproteínas (unión de ARN ribosómicos con proteínas ribosomales). La estructura general de los ribosomas procarióticos y eucarióticos difieren en tamaño y constan de una subunidad pequeña, una subunidad grande y dos sedes. La sede aminoacídica (Sede A) es la entrada de los ARNt cargados con un aminoácido (aminoacil-ARNt) y la sede peptídica (Sede P) donde se encuentran los ARNt cargados con un péptido (peptidil-

ARNt). Los ribosomas presentes en los cloroplastos y mitocondrias de células eucariotas, así como los del apicoplasto, tienen carácter bacteriano (Figura 1. 12 B).

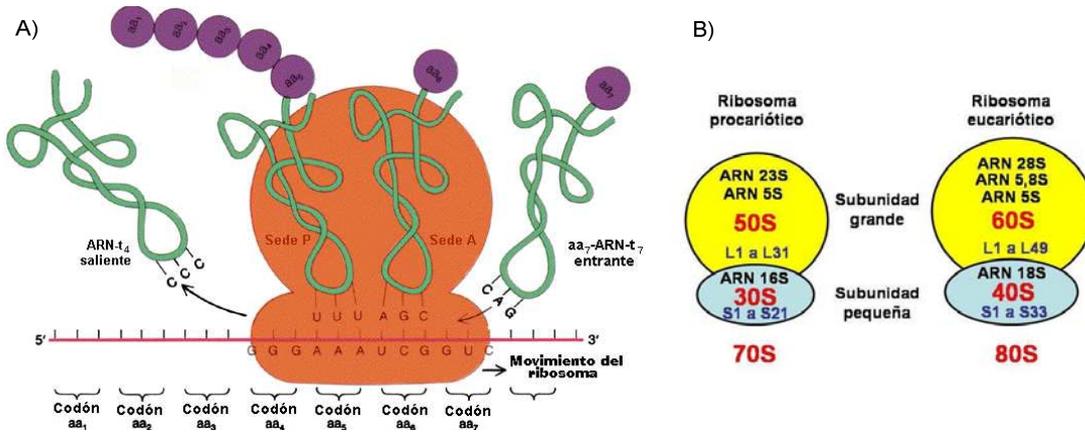


Figura 1. 12. A) Elongación de la traducción; síntesis de proteínas. B) Subunidades de los ribosomas procarionóticos y eucarióticos. Ilustración extraída de www.ucm.es.

La activación de los aminoácidos para formar los complejos de transferencia es el paso previo necesario para que pueda comenzar la traducción. Esta activación viene medida por los enzimas ARS que se encargan de catalizar la esterificación de un aminoácido específico o su precursor, con uno de los ARNt correspondiente para formar el complejo aminoacilo-ARNt. El mecanismo de la reacción enzimática se da en dos etapas (Figura 1. 13).

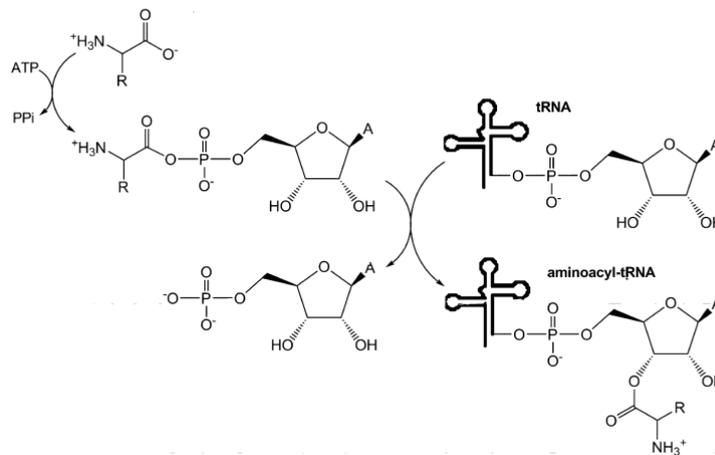


Figura 1. 13. Esquema de la reacción catalizada por las ARS que tiene lugar en dos etapas. Las ARS de clase I aminoacilan el hidroxilo 2'-OH de la adenosina, mientras que las de clase II lo hacen en el 3'-OH. Figura extraída de Vondenhoff, G. H. M., 2011⁶⁷.

En la primera de ellas se forma el intermedio AA-AMP mediante un aporte energético. Se une una molécula de adenosina trifosfato (ATP) al correspondiente aminoácido, liberando una molécula de pirofosfato (PPi). En la segunda etapa, también conocida como de carga,

el complejo se une a la molécula apropiada de ARNt. Se transfiere el aminoácido a uno de los dos hidroxilos (2' o 3') del último nucleótido al extremo 3' del ARNt correspondiente (Figura 1. 14).

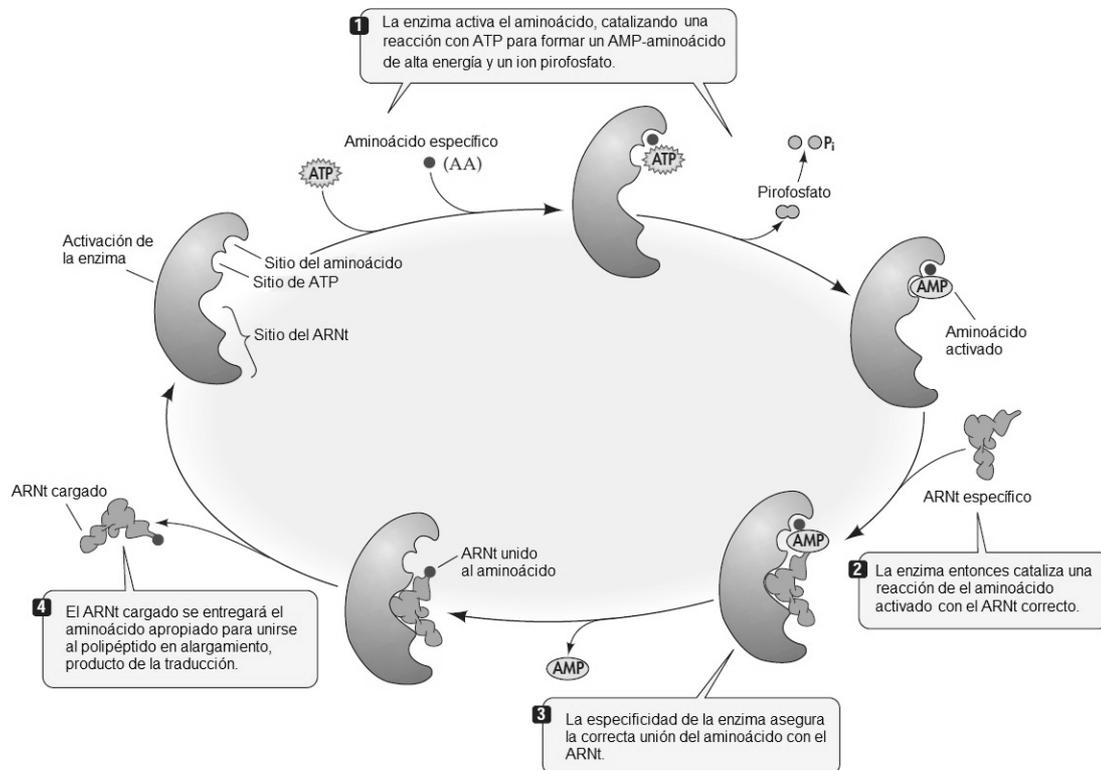


Figura 1. 14. Proceso catalítico de las enzimas ARS. La ARS contiene un dominio catalítico (donde ocurren las dos reacciones antes descritas), y un dominio de unión al anticodón (que interactúa mayormente con la región del anticodón del ARNt, y se asegura de unir el ARNt correcto a cada aminoácido). Además, algunas ARS poseen sitios adicionales de unión al ARNt y dominios de edición que hidrolizan las moléculas aminoacil-ARNt incorrectamente emparejadas. Ilustración extraída de <http://temasbiologiamolecular.blogspot.com>.

A pesar de la conservación en el mecanismo de acción de las ARS, estas enzimas se pueden dividir en dos clases distintas según su estructura⁶⁸. Esta clasificación se basa en la secuencia de los residuos que forman el centro activo de la enzima, que repercute en distintas conformaciones para la unión del ATP y del ARNt. La clase I posee dos motivos de secuencias muy conservadas. Su aminoacilación ocurre en el extremo 2'-OH del nucleótido de adenosina y es usualmente una proteína monomérica o dimérica (una o dos subunidades respectivamente). Por su parte, la clase II posee tres motivos de secuencias altamente conservadas. Su aminoacilación ocurre en el extremo 3'-OH del nucleótido adenosina. Usualmente es una proteína dimérica o tetramérica (dos o cuatro unidades respectivamente). No obstante hay algunas excepciones como la fenilalanina-ARNt sintetasa que aunque pertenece a la clase II, produce aminoacilación en el extremo 2'-OH⁶⁹.

Independientemente de dónde esté el aminoacilo inicialmente conectado al nucleótido, el 2'-O-aminoacil-ARNt finalmente migra a la posición 3' a través de un proceso de transesterificación.

1.6.1 ARS del *P. falciparum*

El *P. falciparum* tan sólo codifica 37 ARS, cifra aparentemente suficiente para traducir el genoma nuclear, apicoplástico y mitocondrial⁷⁰. El genoma de cada orgánulo presenta diferencias en la utilización de los codones, pero cada aminoácido es utilizado como mínimo una vez en cada orgánulo. Teóricamente se esperaría encontrar como mínimo 60 ARS distintas, 20 para cada orgánulo. Esta reducción en número implica que diversas ARS son activas en más de un orgánulo.

La distribución subcelular de la mayoría de ARS de *P. falciparum* se basa en predicciones computacionales. La mayoría de las ARS se encuentran en el apicoplasto y el citosol, pero no en la mitocondria (Tabla 1. 3).

	ARS	Mitocondria	Apicoplasto	Citosol
Clase I	Arg		1	1
	Cys		1	
	Glu		1	1
	Gln	?	*	1
	Ile		1	1
	Leu		1	1
	Met		1	1
	Tyr		1	1
	Trp		1	1
	Val		1	1
Clase II	Ala		1	
	Asp		1	1
	Asn		1	1
	Gly		1	
	His		1	1
	Lys		1	1
	Phe		2	2
	Pro		1	1
	Ser		1	1
	Thr		1	

Tabla 1. 3. Predicción de la localización subcelular de las ARS del *P. falciparum*⁷¹. * Se predice que existe una amidotransferasa para Gln-ARNt^{Gln} localizada en el apicoplasto.

Recientemente se ha demostrado que tres de las ARS de *P. falciparum* que sólo están presentes en el genoma citosólico (GlyRS, AlaRS y ThrRS) se pueden localizar tanto en el citosol como en el apicoplasto pero no en la mitocondria⁷². Se prevé que las ARS mitocondriales se aminoacilen en el citosol y, una vez cargadas con el aminoácido correspondiente, son transportadas al orgánulo, como es el caso del protozoo apicomplejo *Toxoplasma gondii*⁷³.

Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente, que es posible inhibir selectivamente la IleRS apicoplástica de *P. falciparum* sin alterar la funcionalidad de la enzima homóloga

citosólica⁷⁴. El ácido pseudomónico, la mupirocina, es el fármaco que inhibe dicha enzima, causando el efecto retardado (*delayed death effect*) característico de la inhibición apicoplástica del *P. falciparum*.

1.6.2 ARS como dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria

Desde un punto de vista teórico, las ARS son potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria por cuanto: a) son esenciales pues su inhibición conlleva a la inviabilidad celular y muerte del parásito; b) son enzimas altamente expresadas durante el ciclo asexual intraeritrocítico (IEC) que tiene lugar en el huésped; c) aunque no se conoce su estructura de rayos-X son estructuralmente viables para diseñar modelos homólogos. Utilizando la información del genoma de distintos microorganismos e herramientas bioinformáticas se pueden identificar nuevos compuestos capaces de inhibir las ARS⁷⁵.

Además, las ARS son dianas terapéuticas validadas ya que se ha demostrado que existen compuestos, en su mayoría antibióticos y antifúngicos, capaces de inhibir su funcionalidad. Se conocen distintos productos naturales que son capaces de inhibir la actividad de las ARS de distintos microorganismos. Son ejemplos los antibióticos como la borrelidina⁷⁶, la furanomicina⁷⁷, la granaticina⁷⁸, la indolmicina⁷⁹, la ocratoxina A⁸⁰ y la cispentacina⁸¹ (Figura 1. 15).

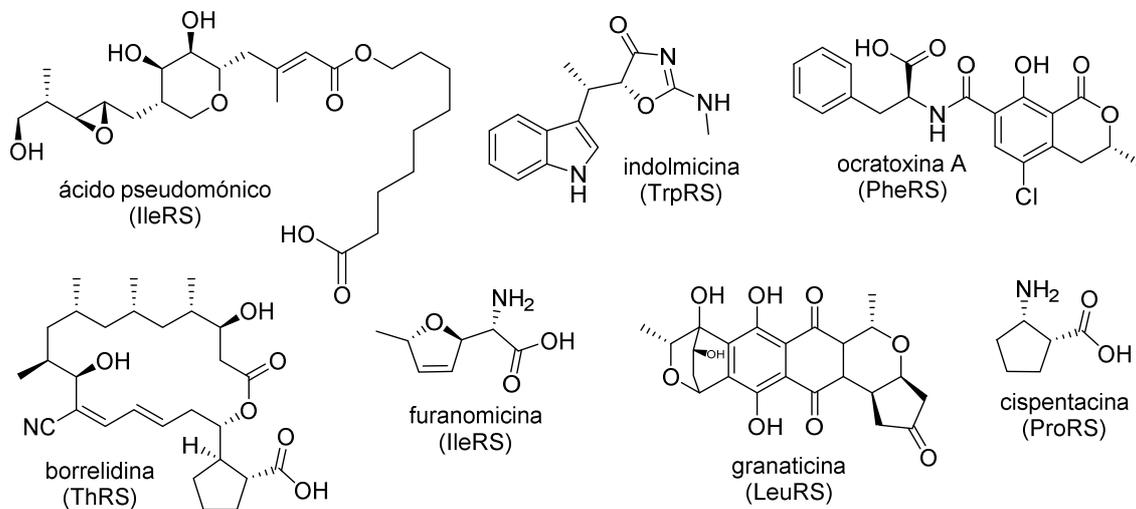


Figura 1. 15. Estructura de algunos productos naturales inhibidores de las enzimas ARS. Entre paréntesis se indica la ARS específica de cada compuesto. Figura adaptada de Kim, S., 2003⁸².

Un ejemplo de aplicación clínica de este tipo de compuestos es la mupirocina. Dicho antibiótico es utilizado hasta la fecha para controlar las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Sin embargo, recientemente se han detectado algunas cepas resistentes a dicho fármaco⁸³.

Numerosas investigaciones se han centrado en el diseño y síntesis de compuestos no hidrolizables que mimetizan el intermedio aminoacil-adenilato (AA-AMP). El AA-AMP, está presente en las dos etapas de la reacción catalizada por las ARS. Dichos compuestos bloquean el centro activo de la enzima e inhiben su funcionalidad. Se ha demostrado que algunos miméticos de AA-AMP causan actividad antibacteriana⁸². Sin embargo, este tipo de compuestos, presentan limitaciones a causa de su baja actividad penetradora, aunque algunos de ellos han mostrado efectividad *in vitro* e *in vivo*. Se describirá este tipo de compuestos más detenidamente en el capítulo 1 de la presente tesis.

Por otro lado, la selectividad es la característica imprescindible para que un fármaco sea efectivo y no cause toxicidad al huésped; así, todas las ARS del *P. falciparum* tienen su enzima homóloga humana. No obstante, existen diferencias filogenéticas que otorgan cierta divergencia estructural a las enzimas, por lo que podrían ser inhibidas selectivamente. Un ejemplo de ello es la cladosporina, un metabolito secundario con carácter antifúngico producido por *Cladosporium cladosporioides*. Dicho compuesto, también conocido como asperentina, es capaz de inhibir selectivamente la Lisil-tRNA sintetasa citosólica del *P. falciparum*. El compuesto muestra una potencia 100 veces mayor para la enzima parasitaria en comparación con la potencia detectada para la enzima homóloga humana. Dicha selectividad viene determinada por las diferencias secuenciales del centro activo de la enzima de ambas especies⁸⁴.

Se presenta así la posibilidad de diseñar compuestos que inhiban específicamente las ARS del patógeno sin afectar las enzimas homologas humanas. Además, cabe recordar que las enzimas ARS apicoplásticas tienen origen bacteriano. En algunos casos, las ARS eucarióticas y las procarióticas difieren en los mecanismos de reconocimiento del ARNt. Un ejemplo de ello es la TyrRS eucariótica, que no es capaz de acilar la tRNA^{Tyr} de las bacterias y viceversa. En este caso concreto, la selectividad se debe a la divergencia secuencial de un par de bases que se encuentran en el centro activo de la enzima⁸⁵.

Se concluye así que las ARS citoplasmáticas y apicoplásticas del *P. falciparum* pueden ser inhibidas selectivamente, por lo que pueden considerarse potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria.

1.7 Objetivos generales

El objetivo principal de esta tesis es el de diseñar y sintetizar distintas quimiotecas de compuestos que actúen como inhibidores específicos y selectivos de las enzimas aminoacil-ARNt sintetasas del *Plasmodium falciparum* para el tratamiento de la malaria.

Los compuestos sintetizados serán evaluados *in vitro* e *in vivo* para determinar su actividad antimalárica. Se valorará también la capacidad de inhibir las funcionalidades del apicoplasto del *P. falciparum*.

Para realizar dichos estudios, se cuenta con información biológica del *Plasmodium falciparum* a nivel molecular y celular proporcionada por los distintos grupos de investigación que forman parte del proyecto, así como la realización de algunos ensayos biológicos de los compuestos sintetizados.

Referencias

- ¹ Oddoux, O.; Debourgogne, A.; Kantele, A.; Kocken, C. H.; Jokiranta, T. S.; Vedy, S.; Puyhardy, J. M.; Machouart, M. Identification of the five human *Plasmodium* species including *P. knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2011**, *30*, 597-601.
- ² World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2012.
- ³ Gething *et al.* A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malaria J*, **2011**, *10*, 378-394.
- ⁴ Mackinnon M. J.; Marsh, K. The selection landscape of malaria parasites. *Science*, **2010**, *328*, 866-871.
- ⁵ Callaway, E. Malaria research should go 'back to basics'. *Nature*, **2007**, *449*, 266.
- ⁶ White, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria J*, **2011**, *10*, 297.
- ⁷ Baum, J.; Maier, A. G.; Good, R. T.; Simpson, K. M.; Cowman, A. F. Invasion by *P. falciparum* merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. *PLoS Pathog*, **2005**, *1*, 299-309.
- ⁸ Miller, L. H.; Baruch, D.I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **2002**, *415*, 673-679.
- ⁹ Abath, F.G.; Montenegro, S.M.; Gomes, Y. M. Vaccines against human parasitic diseases: an overview. *Acta Trop*, **1998**, *71*, 237-254.
- ¹⁰ malERA Consultative Group on Vaccines. A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med*, **2011**, *8*, e1000398.
- ¹¹ Rosenthal, P. J. Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Emerg Infect Dis*, **1998**, *4*, 49-57.
- ¹² Alonso, P.L.; Lindsay, S.W.; Armstrong, J.R.; Conteh, M.; Hill, A.G.; David P.H, Fegan, G.; de Francisco, A.; Hall, A.J.; Shenton, F.C. The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. *Lancet*, **1991**, *337*, 1499-502.
- ¹³ Bush, K. Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clin Microbiol Infec*, **2004**, *10*, 10-17.
- ¹⁴ Petersen, I.; Eastman, R.; Lanzer, M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett*. **2011**, *585*, 1551-62.
- ¹⁵ Slater, A. F. G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*, **1993**, *57*, 203-235.
- ¹⁶ Jiang, H.; Joy, D.A.; Furuya, T.; Su, X.Z. Current understanding of the molecular basis of chloroquine-resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Postgrad Med*, **2006**, *52*, 271-286.
- ¹⁷ Dinio, T.; Gorka, A. P.; McGinniss, A.; Roepe, P.D.; Morgan, J. B. Investigating the activity of quinine analogues versus chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem*, **2012**, *20*, 3292-3297.
- ¹⁸ Shanks, G. Treatment of falciparum malaria in the age of drug resistance. *Symposium*, **2006**, *52*, 277-280.

- ¹⁹ World Health Organization. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010, **2010**.
- ²⁰ World Health Organization. Global plan for artemisinin resistance containment, **2011**.
- ²¹ Phyto, A. P.; Nkhoma, S.; Stepniewska, K.; Ashley, E. A.; Nair, S.; McGready, R.; Moo, C.; Al-Saai, S.; Dondorp, A. M.; Lwin, K. M.; Singhasivanon, P.; Day, N.; White, N. J.; Anderson, T. J.; Nosten, F. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*, **2012**, *26*, 1960-1966.
- ²² The RTS,S clinical trials partnership. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med*, **2012**, *367*, 2284-2295.
- ²³ Plasmeyer, M.L.; Reiter, K.; Shimp, R.L.; Kotova, S.; Smith, P. D.; Hurt, D. E.; House, B.; Zou, X.; Zhang, Y.; Hickman, M.; Uchime, O.; Herrera, R.; Nguyen, V.; Glen, J.; Lebowitz, J.; Jin, A. J.; Miller, L. H.; MacDonald, N. J.; Wu, Y.; Narum, D. L. Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J Biol Chem*, **2009**, *284*, 26951-26963.
- ²⁴ Newton, P. N.; Dondorp, A.; Green, M.; Mayxay, M.; White, N. J. Counterfeit artesunate antimalarials in Southeast Asia. *Lancet*, **2003**, *362*, 169.
- ²⁵ Mohanty, S.; Mishra, S.; Pati, S.; Pattnaik, J.; Das, B. Complications and mortality patterns due to *Plasmodium falciparum* malaria in hospitalized adults and children, Rourkela, Orissa, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **2003**, *97*, 69-70.
- ²⁶ Wongsrichanalai, C.; Pickard, A. L.; Wernsdorfer, W. H.; Meshnick, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*, **2002**, *2*, 209-28.
- ²⁷ Hayton, K.; Su, X. Genetic and biochemical aspects of drugs resistance in malaria parasites. *Curr Drug Targets Infect Dis*, **2004**, *4*, 1-10.
- ²⁸ White, N. J.; Pongtavornpinyo, W. The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **2003**, *270*, 545-54.
- ²⁹ Wongsrichanalai, C.; Pickard, A.L.; Wernsdorfer, W. H.; Meshnick, S. R.; Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*, **2002**, *2*, 209-18.
- ³⁰ World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria, 2th edition, **2010**.
- ³¹ Grellier, P.; Depoix, D.; Schrével, J.; Florent, I. Discovery of new targets for antimalarial chemotherapy. *Parasite*, **2008**, *15*, 219-225.
- ³² Rosenthal, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol.*, **2003**, *206*, 3735-3744.
- ³³ Plowe, C. V. Folate antagonists and mechanisms of resistance. In antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. *Ed P J Rosenthal*, **2001**, 173-190.
- ³⁴ Gregson, A.; Plower, C. V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol. Rev.*, **2005**, *57*, 117-145.

- ³⁵ Keough, D. T.; Ng, A. L.; Winzor, D. J.; Emmerson, B. T.; Jersey, J. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme. *Mol Biochem Parasitol*, **1999**, *98*, 29-41.
- ³⁶ Razakantoanina, V.; Nguyen Kim, P. P.; Jaureguiberry, G. Antimalarial activity of new gossypol derivatives. *Parasitol Re.*, **2000**, *86*, 665-668.
- ³⁷ Wengelnik, K.; Vidal, V.; Ancelin, M. L.; Cathiard, A. M.; Morgat, J. L.; Kocken, C. H.; Calas, M.; Herrera, S.; Thomas, A. W.; Vial, H. J. A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. *Science*, **2002**, *295*, 1311-1314.
- ³⁸ Kato, N.; Sakata, T.; Breton, G.; Le Roch, K. G.; Nagle, A.; Andersen, C.; Bursulaya, B.; Henson, K.; Johnson, J.; Kumar, K. A.; Marr, F.; Mason, D.; McNamara, C.; Plouffe, D.; Ramachandran, V.; Spooner, M.; Tuntland, T.; Zhou, Y.; Peters, E. C.; Chatterjee, A.; Schultz, P. G.; Ward, G. E.; Gray, N.; Harper, J.; Winzeler, E. A. Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. *Nat Chem Biol*, **2008**, *4*, 347-56.
- ³⁹ Leroy, D.; Doerig, C. Drugging the Plasmodium kinome: the benefits of academia-industry synergy. *Trends Pharmacol Sci*, **2008**, *29*, 241-249.
- ⁴⁰ Kirk, K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev*, **2001**, *81*, 495-537.
- ⁴¹ Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; Van Goethem, I. D.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **2003**, *424*, 957-61.
- ⁴² Semenov, A.; Olson, J. E.; Rosenthal, P. J. Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**, *42*, 2254-2258.
- ⁴³ McKerrow, J. H.; Rosenthal, P. J.; Swenerton, R.; Doyle, P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr Opin Infect Dis*, **2008**, *21*, 668-672.
- ⁴⁴ Mambu, L.; Grellier, P. Antimalarial compounds of traditionally used medicinal plants, in bioactive natural products, detection, isolation, and structural determination, 2nd edition. *Molyneux, R.J. & Colgate, S.M. CRC Press*, **2008**, 491.
- ⁴⁵ Vaidya, A. B. Atovaquone-proguanil combination. in antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. *Ed P J Rosenthal*, **2001**, 203-218.
- ⁴⁶ McFadden, G. I.; Reith, M. E.; Munholland, J.; Lang-Unnasch, N. Plastid in human parasites. *Nature*, **1996**, *381*, 482.
- ⁴⁷ Obornik, M.; Janouskovec, J.; Chrudimsky, T.; Julius Lukes, J. Evolution of the apicoplast and its hosts: From heterotrophy to autotrophy and back again International. *J Parasitol*, **2009**, *39*, 1-12.
- ⁴⁸ J. Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Heinrich, S.; Schlitzer, M.; Joma, H. The plastid-like organelle of apicomplexan parasites as drug target. *Curr Pharm Design*, **2008**, *14*, 855-871.
- ⁴⁹ Botté, C. Y.; Dubar, F.; McFadden, G. I.; Maréchal, E.; Biot, C. *Plasmodium falciparum* apicoplast drugs: targets or off-targets? *Chem Rev*, **2012**, *112*, 1269-1283.

- ⁵⁰ Ralph, S. A.; van Dooren, G. G.; Waller, R. F.; Crawford, M. J.; Fraunholz, M. F.; Foth, B. J.; Tonkin, C. J.; Roos, D. S.; McFadden, G. I. Tropical infectious diseases: Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*, **2004**, *2*, 203-216.
- ⁵¹ Bozdech, Z.; Llinas, M.; Pulliam, B. L.; Wong, E. D.; Zhu, J.; DeRisi, J. L. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Bio.*, **2003**, *1*, 85-100.
- ⁵² Waller, R. F.; Ralph, S. A.; Reed, M. B.; Su, V.; Douglas, J. D.; Minnikin, D. E.; Cowman, A. F.; Besra, G. S.; McFadden, G. I. A Type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**, *47*, 297-301.
- ⁵³ Zhang, B.; Watts, K.M.; Hodge, D.; Kemp, L. M.; Hunstad, D.A.; Hicks, L. M.; Odom, A.R. A second target of the antimalarial and antibacterial agent fosmidomycin revealed by cellular metabolic profiling. *Biochem*, **2011**, *50*, 3570-3577.
- ⁵⁴ Ramya, T, N, C.; Mishra, S.; Karm, K. Inhibitors of nonhousekeeping functions of the apicoplast defy delayed death in *Plasmodium falciparum*. *Antimicro Agents Chemothe*, **2007**, *51*, 307-316.
- ⁵⁵ Ralph, S. A.; D'Ombrain, M. C.; McFadden, G. I. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist Updat*, **2001**, *4*, 145-51.
- ⁵⁶ Dahl, E. L.; Rosenthal, P. J. Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicro Agents Chemother*, **2007**, *51*, 3485-3490.
- ⁵⁷ Dahl, E. L.; Rosenthal, P. J. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends in Parasitol*, **2008**, *24*, 279-284
- ⁵⁸ Jackson, K. E.; Habib, S.; Frugier, M.; Hoen, R.; Khan, S.; Pham, J.S.; Ribas de Pouplana, L.; Royo, M.; Santos, M.A.; Sharma, A.; Ralph, S.A. Protein translation in *Plasmodium* parasites. *Trends Parasitol*, **2011**, *27*, 467-476.
- ⁵⁹ Rajewska, M.; Wegrzyn, K.; Konieczny, I. AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *Microbiol Rev*, **2012**, *36*, 408-34.
- ⁶⁰ Bozdech, Z.; Llinas, M.; Pulliam, B. L.; Wong, E. D.; Zhu, J.; DeRisi, J. L. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*, **2003**, *1*, 85-100.
- ⁶¹ Wilson, R. J.; Denny, P. W.; Preise, P.R.; Rangachari, K.; Roberts, K.; Roy, A.; Whyte, A.; Strath, M.; Moore, D. J.; Moore, P. W.; Williamson, D. H. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*, **1996**, *261*, 155-172.
- ⁶² Lim, L.; McFadden, G. I. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Phil Trans R Soc B*, **2010**, *365*, 749-763.
- ⁶³ Gardner, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **2002**, *419*, 498-511.
- ⁶⁴ Feagin, J. E. The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol Biochem Parasitol*, **1992**, *52*, 145-148.

- ⁶⁵ Afonso, A.; Neto, Z.; Castro, H.; Lopes, D.; Alves, A. C.; Tomás, A. M.; Rosário, V. D. Plasmodium chabaudi chabaudi malaria parasites can develop stable resistance to atovaquone with a mutation in the cytochrome b gene. *Malaria J*, **2010**, *9*, 135.
- ⁶⁶ Ibba, M.; Söll, D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, **2000**, *69*, 617-650.
- ⁶⁷ Vondenhoff, G. H. M.; Van, A. A. Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as potential antibiotics. *Europ J Med Chem*, **2011**, *46*, 5227-5236.
- ⁶⁸ Delarue, M. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr Opin Struct Biol*, **1995**, *5*, 48-55.
- ⁶⁹ Schimmel, P. R.; Söll, D. Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annu Rev Biochem*, **1979**, *48*, 601-648.
- ⁷⁰ Bhatt, T.K.; Kapil, C.; Khan, S.; Jairajpuri, M. A.; Sharma, V.; Santoni, D.; Silvestrini, F.; Pizzi, E.; Sharma, A. A genomic glimpse of aminoacyl-tRNA synthetases in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*, **2009**, *10*, 644.
- ⁷¹ Novoa, E. V. Evolution of the gene translation machinery and its applications to drug discovery. *Tesis doctoral, UB*, **2012**.
- ⁷² Jackson, K. E.; Pham, J.S.; Kwek, M.; De Silva, N. S.; Allen, S. M.; Goodman, C. D.; McFadden, G. I.; de Poupiana, L. R.; Ralph, S. A. Dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to the apicoplast and cytosol in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*, **2012**, *42*, 177-86.
- ⁷³ Esseiva, A. C.; Naguleswaran, A.; Hemphill, A.; Schneider, A. Mitochondrial tRNA import in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 42363-42368.
- ⁷⁴ Istvan, E. S.; Dharia, N. V.; Bopp, S. E.; Gluzman, I.; Winzeler, E. A.; Goldberg, D. E. Validation of isoleucine utilization targets in *Plasmodium falciparum*. *PNAS*, **2011**, *108*, 1627-1632.
- ⁷⁵ Ribas de Poupiana, L.; Bori, T. S.; Castro, M. D. M.; Geslain, R. A screening method for identifying new aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors. EP 2064338, **2010**.
- ⁷⁶ Nass, G.; Poralla, K.; Zahner, H. Effect of the antibiotic borrelidin on the regulation of threonine biosynthetic enzymes in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **1969**, *34*, 84-91.
- ⁷⁷ Tanaka, K.; Tamaki, M.; Watanabe, S. Effect of furanomycin on the synthesis of isoleucyl-tRNA. *Biochim Biophys Acta*, **1969**, *195*, 244-245.
- ⁷⁸ Oglivie, A.; Wiebauer, K.; Kersten, W. Inhibition of leucyltransfer ribonucleic acid synthetase. *Biochem J.*, **1975**, *152*, 511-515.
- ⁷⁹ Werner, R. G.; Thorpe, L. F.; Reuter, W.; Nierhaus, K. H. Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase. *Eur J Biochem*, **1976**, *68*, 1-3.
- ⁸⁰ Konrad, I.; Roschenthaler, R. Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Lett.*, **1977**, *83*, 341-347.
- ⁸¹ Konishi, M.; Nishio, M.; Saitoh, K.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H. Cispenitacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J Antibiot*, **1989**, *42*, 1749-1755.

⁸² Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E. C.; Choi, S. Y. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2003**, *61*, 278-288.

⁸³ Walker, E. S.; Vasquez, J. E.; Dula, R.; Bullock, H.; Sarubbi, F. A. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Does mupirocin remain effective? *Infect Control Hosp Epidemiol*, **2003**, *24*, 342-346.

⁸⁴ Hoepfner, D. et al. Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* Lysyl-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin. *Cell Host & Microbe*, **2012**, *11*, 654-663.

⁸⁵ Quinn, C. L.; Tao, N.; Schimmel, P. Species-specific micro-helix aminoacylation by a eukaryotic pathogen tRNA synthetase dependent on a single base pair. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 12489-12495.

CAPÍTULO 2

DISEÑO Y SÍNTESIS DE MIMÉTICOS DE LISIL-AMP

Los compuestos con la lisina como aminoácido de reconocimiento tratados en este capítulo han sido sintetizados por el Dr. Rob Hoen.

Asimismo han colaborado la Dra. Eva Novoa, que ha llevado a cabo el *screening* virtual, Noelia Camacho en la evaluación *in vitro*, Pedro Vieira en la realización de los ensayos de toxicidad con el modelo *zebrafish* y Patricia Marín en la evaluación *in vivo* en modelos murinos de la quimioteca de compuestos objeto del presentes capítulo.

Parte de este capítulo ha sido publicado; Hoen, R.; Novoa, EM.; López, A.; Camacho, N.; Cubells, L.; Vieira, P.; Santos, M.; Marín-García, P.; Bautista, JM.; Cortés, A.; Ribas de Pouplana, LI.; Royo, M. Selective inhibition of an apicoplastic aminoacyl-tRNA synthetase from *Plasmodium falciparum*. *ChemBioChem*, **2013**, *14*, 499-509.

2.1 Introducción

2.1.1 Intermedio AA-AMP

Aunque se conocen muchos compuestos potencialmente antimicrobianos que actúan a nivel de traducción genética; concretamente inhibiendo las ARNt sintetetasas, casi ninguno de ellos es efectivo a nivel terapéutico¹. Muchos de estos compuestos no son selectivos, provocando alteraciones y efectos adversos en los huéspedes, otros tienen una baja potencia terapéutica o son químicamente inestables. Además, en la mayoría de casos, los parásitos han desarrollado resistencia frente a ellos disminuyendo su eficacia hasta dejarlos fuera de uso.

Como se ha mencionado con anterioridad, las ARS se caracterizan por ser enzimas esenciales y muy conservadas en cada especie. Uno de los prerrequisitos de cualquier potencial fármaco basado en la inhibición de este tipo de enzimas es que sea selectivo, es decir que sea capaz de inhibir la ARS del microorganismo en cuestión sin alterar las enzimas del huésped. Las diferencias entre las ARS eucariotas y procariotas son suficientemente grandes para desarrollar fármacos selectivos². No obstante, los patógenos eucariotas como los hongos y los parásitos apicomplejos (*P. falciparum* y *Trypanosoma spp.*), presentan secuencias con un alto porcentaje de homología con las correspondientes enzimas ARS humanas, siendo más difícil la selectividad entre especies. En nuestro caso, el fármaco ideal tendría que tener más afinidad para interactuar con las enzimas del plásmido de *P. falciparum*, que con las ARS homólogas eucariotas y mitocondriales humanas. La inhibición selectiva de las ARS de *P. falciparum* conllevaría a un aumento del ARNm no traducido que se acumularía en el ribosoma, activando una cascada de señales que comportaría la inhibición de la síntesis proteica y provocaría consecuentemente la muerte del parásito.

El diseño y síntesis de compuestos antimicrobianos selectivos frente a ARS patógenas, con propiedades farmacocinéticas viables e independientes de los mecanismos de resistencia de los parásitos es una tendencia al alza en los últimos años³. Muchos de los compuestos sintéticos que inhiben selectivamente las ARS patógenas están inspirados en el intermedio aminoacil-adenilato (AA-AMP) que se forma durante la reacción enzimática^{4,5}.

Como se ha mencionado en la introducción, el mecanismo de la reacción enzimática que llevan a cabo las ARS se compone de dos etapas (Figura 2. 1). El compuesto AA-AMP actúa en las dos etapas del proceso de formación del complejo aminoacil-ARNt. Además, la unión de la enzima con el complejo AA-AMP es dos o tres veces superior a la unión del

sustrato natural (aminoácido + ATP) ya que forma parte de una reacción irreversible y es necesario un aporte de energía para su formación. Sumando todos estos factores, un compuesto mimético del intermedio AA-AMP, capaz de bloquear el centro activo de la enzima u obstaculizar la interacción proteína-ARN que tiene lugar fuera de este, conllevaría a la inhibición de la síntesis de proteínas, siendo un potencial fármaco para actuar sobre este tipo de dianas terapéuticas.¹

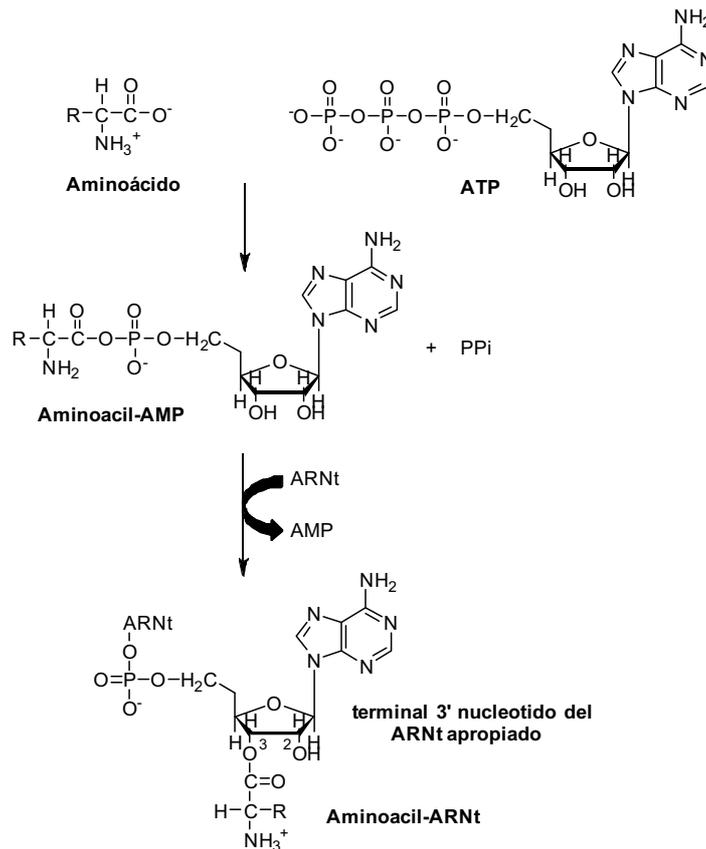


Figura 2. 1. Mecanismo de la síntesis de proteínas llevada a cabo por enzimas ARS.

2.1.2 Miméticos del intermedio AA-AMP

Los estudios descritos de diseño y síntesis de inhibidores de ARS basados en el intermedio aminoacil-adenilato se focalizan en demostrar la posible inhibición de las enzimas ARS mediante la generación de análogos del intermedio AA-AMP. Estos, interaccionan potencialmente con el centro activo de la enzima conservando la afinidad y siendo además químicamente más estables que el intermedio natural, es decir menos lábiles que la molécula de ATP que lo forma^{6,7}. El intermedio AA-AMP está formado por el aminoácido correspondiente unido a una molécula de ATP; que a su vez se compone de adenosina (adenina y ribosa como β -D-ribofuranosa) y tres grupos fosfatos, siendo un

compuesto altamente hidrolizable. La hidrólisis del ATP formando ADP + Pi, libera una gran cantidad de energía debido a una mayor estabilización de los compuestos hidrolizados por resonancia, disminución de la tensión eléctrica y energía de solvatación. Esto la convierte en una molécula fundamental para la realización de muchas funciones biológicas.

Se han descrito diversas estrategias para obtener compuestos análogos más estables como por ejemplo reemplazar el grupo carbonilo del aminoácido por un grupo metileno⁶ o substituir el grupo fosfato por grupos menos hidrolizables como el sulfamato, la sulfonamida, el fosfonato o la fosfamida^{8,9,10}. La base nitrogenada adenina que forma parte del complejo intermedio, también ha sido objeto de modificación sintética. En algunos casos, se ha considerado esencial la presencia de la base nitrogenada adenina para el reconocimiento enzima-sustrato y por lo tanto un grupo inmodificable desde un punto de vista sintético¹¹. Por otro lado, la modificación de la adenina o su reemplazamiento por distintos grupos heterocíclicos aromáticos ha conllevado a un aumento *in vivo* de la eficacia de algunos antimicrobianos^{9,12} (Figura 2. 2).

Aparte de que sean estables y activos, la condición indispensable que convierte estos miméticos del intermedio AA-AMP en un buen fármaco es sobre todo su selectividad, es decir, que sean capaces de actuar únicamente en las ARS de los microorganismos sin alterar el funcionamiento de las enzimas homólogas humanas. Este prerrequisito es el más complejo de lograr ya que muchos miméticos del intermedio AA-AMP son activos pero no selectivos⁸. No obstante, algunos investigadores han conseguido resultados esperanzadores en esta dirección como es el caso de la indolmicina¹³, un potente inhibidor de la TrpRS bacteriana o bien, algunos de los derivados aminoacilo sulfamatos que inhiben selectivamente la Arg, His y Thr ARS de *Staphylococcus aureus*¹⁴.

Desafortunadamente, la mayoría de miméticos del intermedio AA-AMP conocidos hasta la fecha, presentan una baja permeabilidad a través de las células que les impide llegar a la diana terapéutica, volviéndose inactivos en ensayos *in vivo*¹⁵. Sin embargo, se conocen algunas estrategias para dirigir el compuesto al interior celular, como es el caso del péptido Microcin C que contiene en su estructura un péptido *troyano* que está asociado covalentemente al inhibidor y cuya función es transportarlo y liberarlo en el interior de la célula¹⁶.

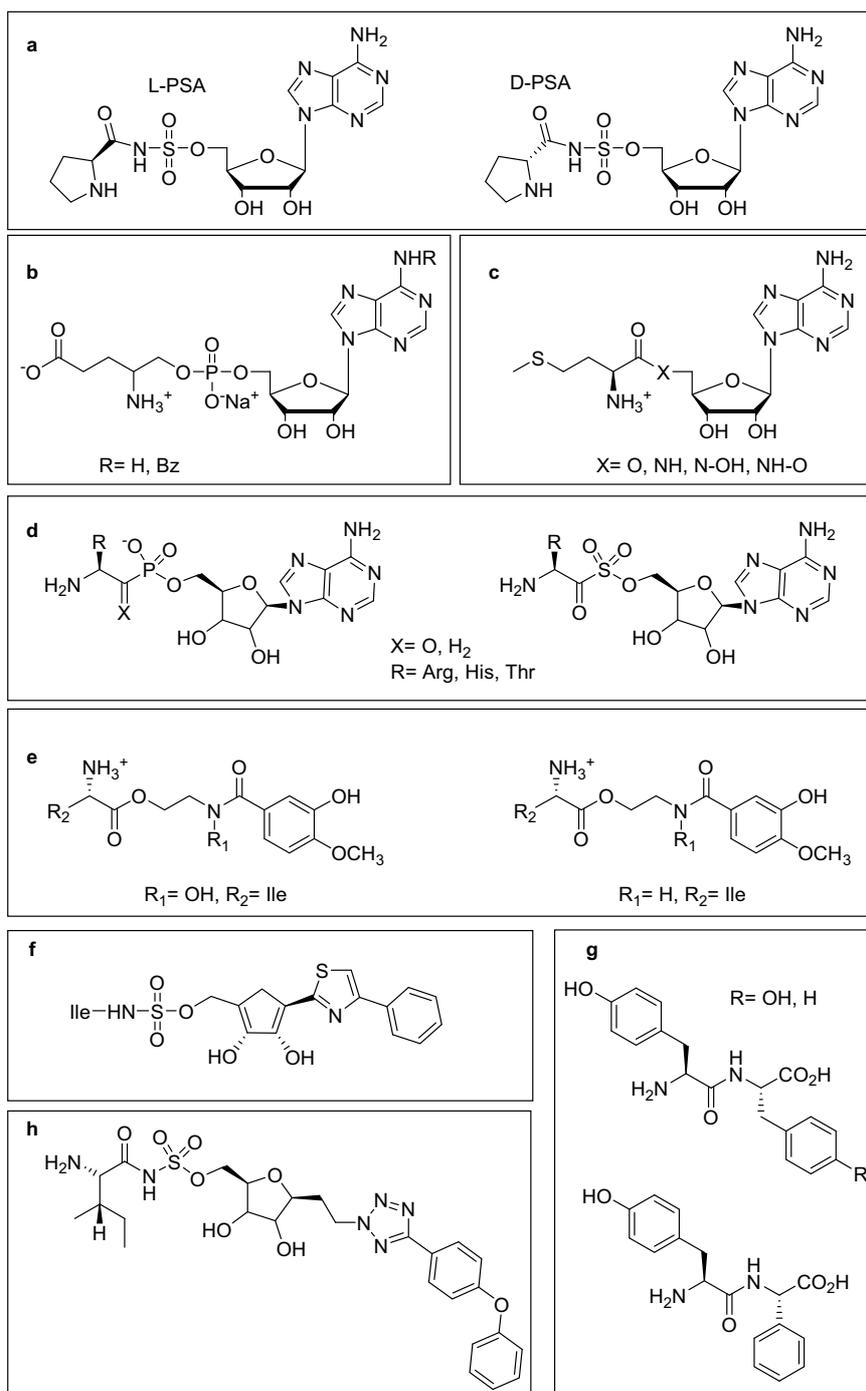


Figura 2. 2. Miméticos del Intermedio AA-AMP; a) Análogos de la prolil-adenilato que inhiben la ProRS bacteriana y humana⁸; b) Miméticos de la glutamil-adenilato¹¹; c) Análogos de la metionil-adenilato³⁵; d) Aminoalquilo y aminoacil sulfamatos-adenilatos de Arg, His y Thr¹⁴; e) Hidroxamatos miméticos del Ile y Met AA-AMP³⁴; f) Derivado de tiazol como mimético a la adenina que inhibe LeuRS¹²; g) Dipéptidos tirosilo-arilo¹⁷ inhibidores de TyrRS; h) Miméticos de isoleucilo-adenilato⁹.

Gracias a los avances biotecnológicos recientes que han permitido la secuenciación genómica de distintas especies procariontas y eucariotas^{18,19} así como el conocimiento de algunas estructura de las enzimas ARS por rayos X, se han podido predecir algunas estructuras del complejo ARNt sintetasa²⁰. Además, el uso de técnicas de *high-throughput*

screening (HTS) para la búsqueda de nuevos agentes capaces de inhibir las ARS han abierto un camino hacia el diseño de nuevos fármacos^{21,22,23}.

2.1.3 Lisil-ARNt sintetasa (LysRS) del *P. falciparum*

Los parásitos del género *Plasmodium* poseen tres compartimientos subcelulares que contienen genes; el núcleo, la mitocondria y el apicoplasto. Cada uno de los cuales necesita su propia maquinaria de transcripción del ADN y transcripción del ARNm para la supervivencia de parásito. No obstante sólo 37 de los 60 genes teóricos que codifican las ARS en *P. falciparum* han sido detectados, hecho que implica que algunas enzimas ARS-ARNt sintetasa como GlyRS, AlaRS, CysRS y ThrRS están presentes sólo en un genoma del parásito y son activas en más de un orgánulo celular^{24,25}. A diferencia de las ARS anteriormente nombradas, la LysRS de *P. falciparum* contiene dos genes que la codifican; uno se localiza en el citosol del parásito (PfKRS-1), mientras que la otra se encuentra en el apicoplasto (PfKRS-2)²⁶. En general, se considera que las enzimas apicoplásticas descienden de una cianobacteria²⁷ y filogenéticamente difieren tanto de las enzimas eucariotas como de las citosólicas. El apicoplasto como se ha explicado anteriormente, es un orgánulo esencial para la viabilidad del parásito, implicado entre otras funciones en la síntesis de ácidos grasos y la biosíntesis de terpenos. La inhibición de la síntesis de proteínas en este orgánulo provoca la muerte del parásito una generación después de ser tratado con el fármaco, efecto conocido como “*delayed death effect*”. Si se inhibe el funcionamiento del apicoplasto, el parásito no puede sintetizar la maquinaria necesaria para seguir el ciclo de infección, lo que comporta una disminución del rango de invasión del parásito a las 96 horas.

Teniendo esto en cuenta, la enzima apicoplástica Lisil-ARNt sintetasa del *P. falciparum* (PfKRS-2) es un buen objetivo para el diseño de nuevos fármacos selectivos debido a la distancia evolutiva que le separa de la Lisil-ARNt sintetasa humana (HsKRS).

Hay que añadir que recientemente, se ha descrito un metabolito secundario procedente de un hongo, conocido como *cladosporin*, con poder antifúngico, insecticida y antibacteriano que es capaz de inhibir electivamente la Lisil-ARNt sintetasa citosólica del *P. falciparum*, siendo 100 veces más efectivo contra la enzima parasitaria que contra la enzima homóloga humana²⁸. Luego, se confirma que la enzima Lisil-ARNt sintetasa es una potencial diana terapéutica antimalárica.

2.2 Objetivos

Anteriormente, en nuestro laboratorio se diseñaron y sintetizaron una serie de compuestos miméticos del complejo intermedio Lisil-adenilato que mostraron ser inhibidores *in vitro* frente a la Lisil-ARNt sintetasa de *Trypanosoma brucei*²⁹. Tomando como punto de partida la estructura básica los tres compuestos que mostraron mayor porcentaje de inhibición (Figura 2. 3), se decidió diseñar una quimioteca virtual de compuestos miméticos al intermedio Lisil-AMP.

Mediante *screening* virtual se evaluó la potencial capacidad de interacción de los compuestos de la quimioteca frente a los centros activos de la enzima LysRS humana (HsKRS) adquirida en PDB (código 3BJU) y el modelo de la proteína homóloga apicoplástica LysRS de *P. falciparum* (PfKRS-2). El modelo de esta última enzima fue creado a partir de la secuencia genómica de la proteína por la Dra. Eva Novoa del laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona.

Con los resultados obtenidos *in silico*, el objetivo del presente capítulo es el diseño, síntesis y evaluación biológica, de una familia de compuestos potencialmente inhibidores de la enzima apicoplástica PfKRS-2 basándonos en las estructuras seleccionadas previamente mediante *screening virtual*.

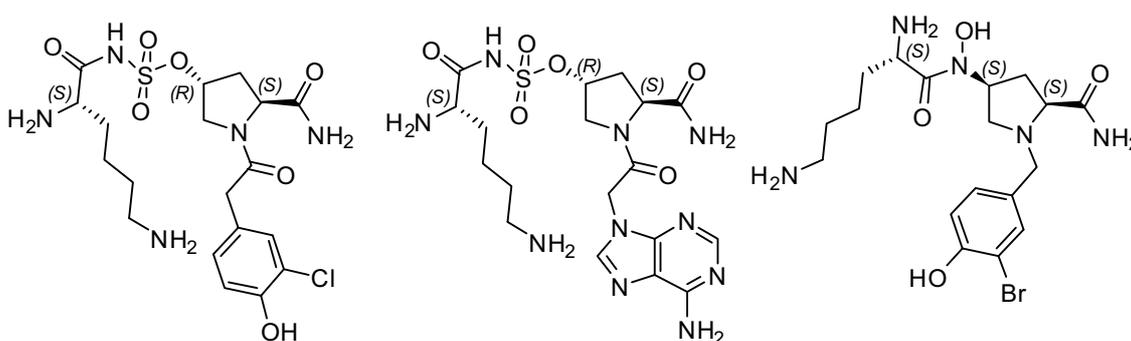


Figura 2. 3. Estructuras de los inhibidores de LysRS de *Trypanosoma brucei*²⁹.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1. Diseño de la quimioteca virtual de miméticos de Lisil-AMP

Para poder realizar el *screening virtual* con el cual determinar potenciales estructuras que preferencialmente interaccionaran con la enzima apicoplastica PfKRS-2, se diseñó una quimioteca virtual de compuestos derivados del intermedio Lisil-AMP y miméticos del sustrato natural.

En el diseño de esta quimioteca virtual, se impusieron una serie de pre-requisitos: a) considerar sólo los posibles puntos de modificación que no alterasen la estructura base de los *hits*²⁹; b) la disponibilidad comercial de los reactivos de partida y c) la dificultad sintética para su obtención.

Para construir la quimioteca, se utilizó un derivado de la prolina como mimético de la ribosa (presente en el sustrato natural), que actuará como núcleo estructural de los nuevos compuestos, sobre el cual, se introducirán distintos grupos que generarán diversidad. Se preservó la presencia del aminoácido lisina, que forma parte de la estructura del compuesto natural, para facilitar el reconocimiento enzima-sustrato. Además se tomó en consideración los resultados previos obtenidos²⁹ en los que la presencia de un grupo carboxamida en la posición α del residuo de prolina era importante para la actividad de dichos compuestos.

Con estas premisas se decidió introducir la diversidad en tres grupos de los compuestos inhibidores de LysRS de *Trypanosoma brucei* de los cuales nos inspiramos para generar la quimioteca; a) además del grupo sulfamato^{30,31,32} que sustituía al grupo fosfato del intermedio natural, se decidió ensayar otros grupos miméticos o bioisósteres del mismo que presentaran más resistencia a la hidrólisis por proteasas como hidroxamatos^{33,34}, amidas³⁵ y ésteres³⁴ (R_1), b) lisina y tialisina como aminoácidos (R_2) y c) distintos compuestos aromáticos comerciales (R_3) como análogos de la adenina. En el diseño de la quimioteca virtual, también se consideraron todos los posibles isómeros estereoquímicos de la prolina, obteniendo finalmente de más de 1.760 compuestos virtuales (Figura 2. 4).

2.3.2. Docking de la quimioteca virtual de miméticos de Lisil-AMP

El estudio de la potencial interacción de los componentes de la quimioteca virtual con el centro activo de las enzimas estudiadas, fue realizado por Eva Novoa dentro del proyecto Mephitis.

Para ello, se realizó el cálculo de *docking* del los compuestos con los centros activos de la enzima Lisil-ARNt sintetasa humana (HsKRS) y la enzima homóloga del *apicoplasto* de *P. falciparum* (PfKRS-2). Los resultados obtenidos para cada compuesto se clasificaron según la energía de interacción enzima-sustrato calculada con el método *GlideScore*³⁶ (GS). Mediante este proceso se pudieron clasificar los compuestos en tres grupos distintos según la disposición espacial y el modo de interacción del análogo con el centro activo de la enzima; 1) compuestos en los que sólo se observa la interacción con la lisina o tialisina; 2) compuestos en los que la enzima sólo reconoce los heterociclos que mimetizan la adenina y; 3) compuestos en los que tanto el aminoácido como el heterociclo ocupan el centro activo de la enzima. En general, los compuestos que forman parte de este último grupo, presentan valores del GS más elevados lo que en teoría implica una mayor interacción por la enzima (Tabla resumen en el apartado 2.2.1 de la experimental).

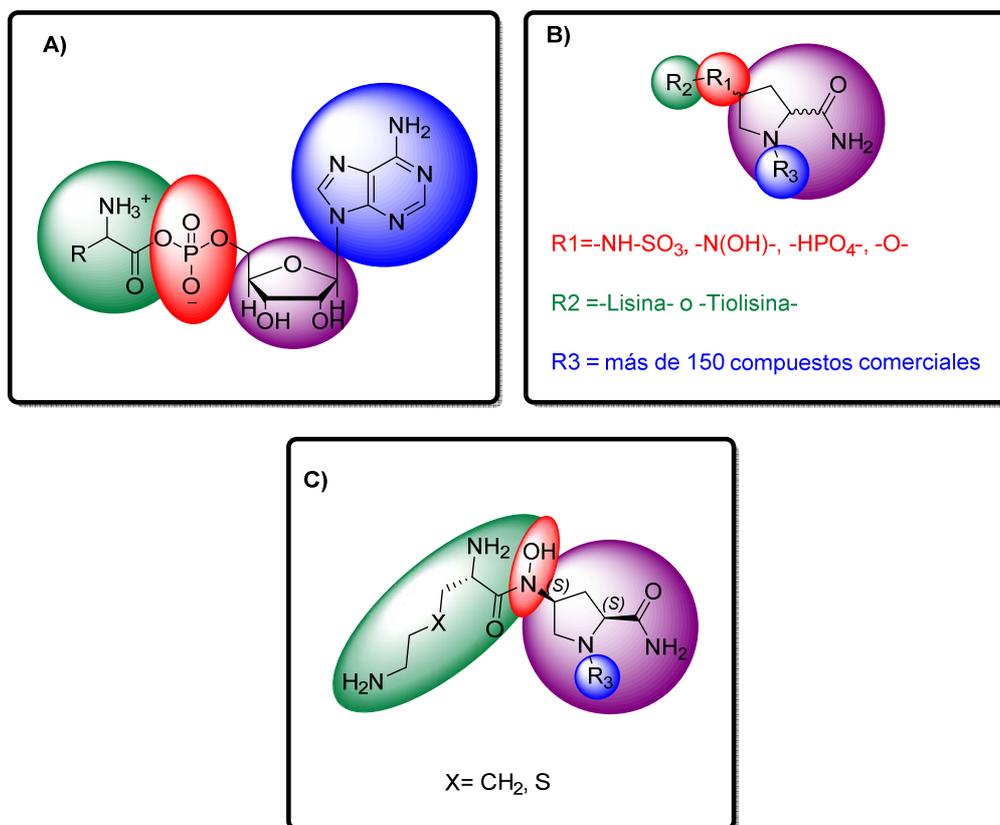


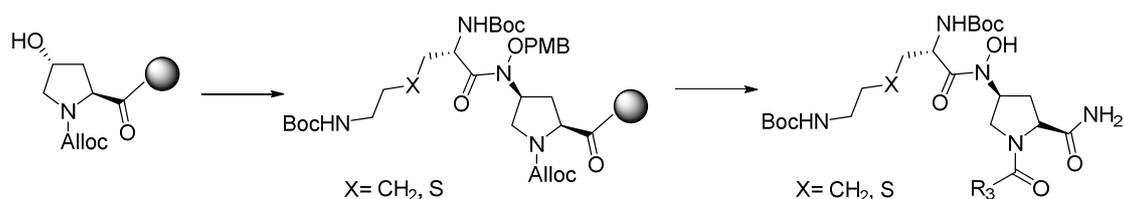
Figura 2. 4. A) Estructura del compuesto intermedio aminoacilo-adenilato; B) Esqueleto general de la quimioteca virtual de miméticos del intermedio Lisil-adenilato; C) Estructura general seleccionada a partir de los resultados del *docking* virtual, para sintetizar los compuestos que formarán parte de la quimioteca.

En base a estos resultados se seleccionaron compuestos que potencialmente eran competidores del sustrato natural, es decir, los que mostraron una buena interacción con la enzima de *P. falciparum* y también los que presentaron una diferencia significativa entre las interacciones de HsKRS y PfKRS-2, asegurando una buena selectividad entre ambas especies. Siguiendo estos dos criterios, 36 compuestos de los 1.764 iniciales fueron seleccionados. Al realizar un examen de la estructura de los derivados elegidos, se observó que un 70% mantenían la quiralidad (*S,S*) de la amino prolina y presentaban el grupo hidroxamato como mimético al acilfosfato del sustrato natural. Considerando estas preferencias estructurales como premisas se diseñó y sintetizó una quimioteca de 50 compuestos 25 de los cuales contenían la tialisina como aminoácido de reconocimiento y 25 análogos con la lisina en esta posición sintetizados por el Dr. Rob Hoen. En ambas estructuras se modificó solamente el grupo R₃ con distintos compuestos heterocíclicos comerciales que potencialmente se podían considerar análogos de la adenina (Figura 2. 4 C).

2.3.3. Síntesis de la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP

Siguiendo una síntesis previa que se había realizado en nuestro laboratorio de compuestos similares²⁹, se decidió sintetizar la quimioteca manualmente con una metodología en fase sólida siguiendo una estrategia de síntesis ortogonal (Esquema 2. 1) que combina el uso de los grupos protectores Boc/Alloc que posteriormente serán eliminados de forma selectiva.

En rasgos generales, la estrategia sintética desarrollada consistía en el acoplamiento de la Alloc-L-hidroxiprolina al soporte polimérico, seguido de la incorporación del ácido *N*-Boc-hidroxámico de lisina o tialisina protegido y la *N*-acilación de la prolina previamente desprotegida. En esta última etapa, antes de la escisión de los productos de la resina, es donde se introduce la diversidad de los compuestos que componen cada una de las dos sub-quimiotecas, de las cuales en esta tesis se sintetizó la que tiene la tialisina como aminoácido de reconocimiento.



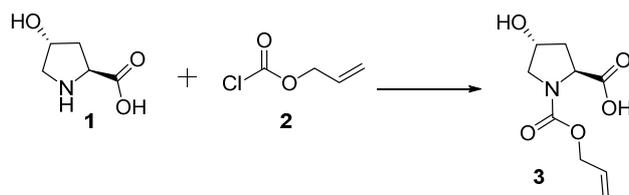
Esquema 2. 1. Estrategia general para la síntesis de la quimioteca de hidroxamatos en fase sólida.

Esta estrategia requería la síntesis previa en solución de los distintos precursores que forman la estructura básica de los compuestos.

2.3.3.1 Síntesis en solución de los precursores

Alloc-L-hidroxirolina

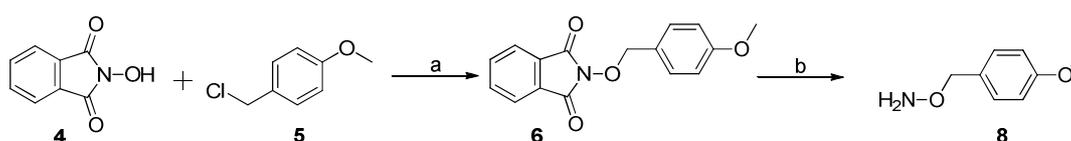
La síntesis del precursor Alloc-L-hidroxirolina se realizó mediante la reacción de la amina de la L-hidroxirolina **1** en condiciones básicas con cloroformiato de alilo **2** obteniendo el compuesto aceitoso **3** con un 79% de rendimiento (Esquema 2. 2).



Esquema 2. 2. Síntesis de Alloc-L-Hidroxirolina **3**. Condiciones; THF/H₂O (1:1), NaOH 4M (pH 9), 0 °C, 1 h, 79% rendimiento, 96% pureza.

O-(4-metoxibencil)hidroxilamina

Para la obtención del ácido hidroxámico protegido de la tialisina **18** fue necesario sintetizar el precursor O-(4-metoxibencil)hidroxilamina **8** (Esquema 2. 3). Para ello se procedió a realizar la reacción de la N-hidroxiftalimida **4** con 1-(clorometil)-4-metoxibenceno **5** en DMF a 90 °C durante 1 hora, generándose el producto 2-((4-metoxibencil)oxi)isoindolina-1,3-diona **6** que precipitó en medio acuoso como sólido blanco con un 79% de rendimiento³⁷. Posteriormente se eliminó el grupo protector ftalimida con N-metilhidrazina, en EtOH a reflujo 1.5 h. El crudo de la reacción se resuspendió en Et₂O obteniendo el producto **8** en forma de aceite amarillo con un rendimiento del 72%³⁸. Los productos **6** y **8** no son estables en las condiciones de HPLC-MS, por lo que fueron caracterizados por RMN.

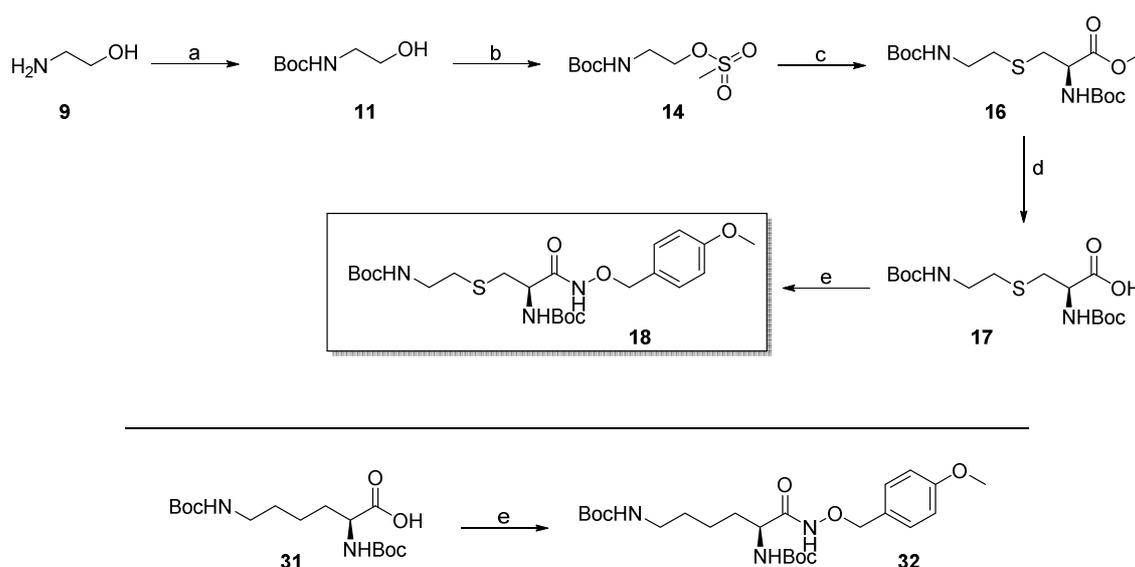


Esquema 2. 3. Síntesis de O-(4-metoxibencil)hidroxilamina **8**. Condiciones; a) Et₃N (2.4 eq) en DMF, 90 °C, 1 h, 79% rendimiento, 97% pureza; b) CH₃NHNH₂ (1.1 eq), EtOH, reflujo, 1.5 h, 72% rendimiento, 98% pureza determinada por RMN.

Boc-tialisina(Boc)-NH-OPMB²⁹

El derivado protegido del ácido hidroxámico de la tialisina **18** (Esquema 2. 4) se sintetizó a partir del 2-aminoetanol **9**, del cual se protegió la amina con Boc haciéndola reaccionar con *tert*-butil-(2-hidroxietil)carbamato a 0 °C en condiciones estándar³⁹ obteniendo el producto **11** con un rendimiento del 99%. Posteriormente se formó el derivado metansulfonato **14** a partir de **11** y cloruro de metansulfonilo en presencia de piridina anhidra obteniendo el producto en forma de aceite amarillo con un rendimiento del 91%. Posteriormente se

procedió a la *S*-alquilación del producto comercial *N*-Boc-L-cisteína metil éster con **14** y Cs_2CO_3 (s) como base inorgánica soluble en disolventes orgánicos⁴⁰. El producto generado **16** se utilizó posteriormente tal como se obtuvo al no poder ser purificado mediante cromatografía *flash* ni al utilizar sílica como fase estacionaria ya que se produce una β -eliminación en el producto **16** obteniendo el 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)acrilato de metilo como subproducto, ni cuando se utilizó alúmina por la baja resolución que se obtenía. Para hidrolizar el éster metílico **16** se evaluaron varias condiciones de reacción; utilizando distintos disolventes (Et_2O , $\text{Et}_2\text{O}/\text{DCM}$ (1:1, v/v), DCM , THF, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v)) y dos bases inorgánicas sólidas (KOSiMe y LiOH). Aunque los silanolatos son solubles en medio orgánico y está descrito su uso para la obtención de las correspondientes sales carboxílicas⁴¹, se encontró que a la escala de trabajo (~30 g de partida) obteníamos mejores resultados al utilizar LiOH (s) en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), ya que daba una mejor conversión de la reacción y el crudo que se generaba era más fácil de purificar. Estas condiciones permiten eliminar por filtración el exceso de LiOH (s) no solubilizado en la mezcla de reacción y de esta manera obtener el ácido carboxílico **17** con un rendimiento del 56% en dos etapas.



Esquema 2. 4. Síntesis de Boc-tialisina(Boc)-NH-OPMB **18** y Boc-Lys(Boc)-NH-OPMB **32**. Condiciones; a) Boc_2O (1 eq), $\text{DCM}_{\text{anh.}}$, 0 °C, 1.5 h, 99% rendimiento, 99% pureza; b) cloruro de metansulfonilo (1.2 eq), piridina anh. (2 eq), $\text{DCM}_{\text{anh.}}$, atmosfera N_2 , 0 °C, t.a., 50 min, 91% rendimiento, 98% pureza; c) *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-cisteína metil éster (1 eq), Cs_2CO_3 (s) (1.2 eq), DMF, 0 °C - t.a., 4 h.; d) LiOH (s) (5 eq), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1, v/v), t.a., 18 h, 56% rendimiento en 2 etapas, 87% pureza; e) O-(4-metoxibencil)hidroxilamina **8** (1 eq), EDC·HCl (1 eq), HOBT· H_2O (1 eq), DCM , t.a., 15 h, 75% rendimiento, 86% pureza.

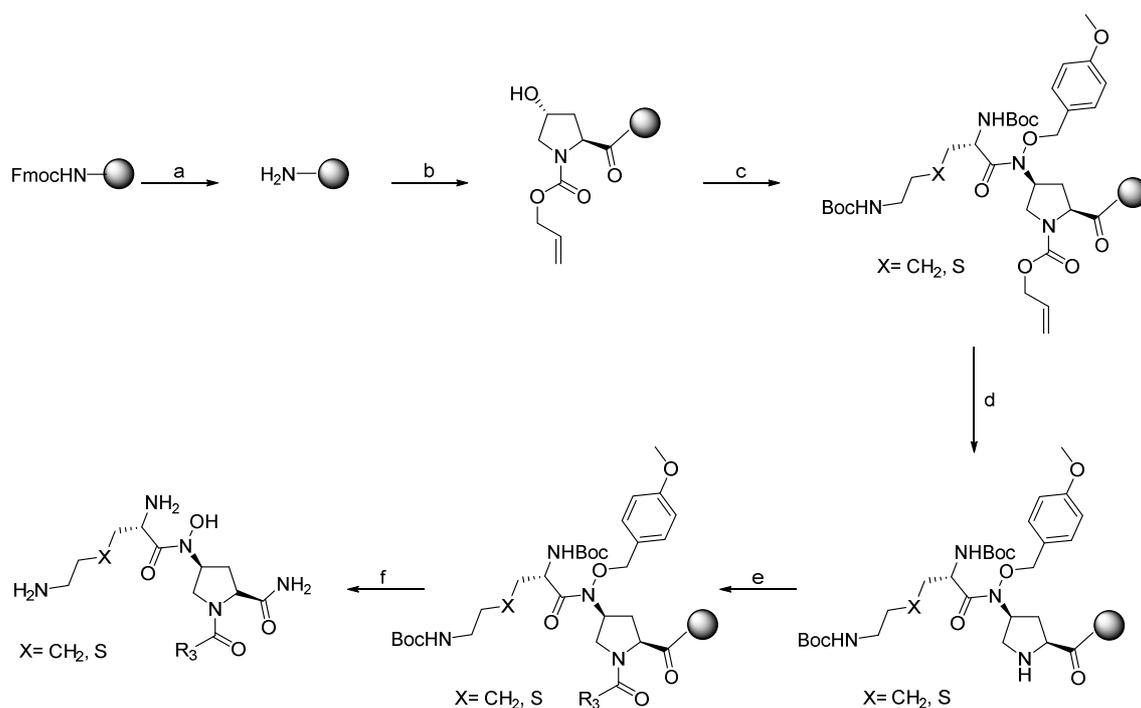
Finalmente el derivado hidroxámico protegido **18** se obtuvo haciendo reaccionar la hidroxilamina protegida **8** con la Boc-L-tialisina(Boc)-OH **17** utilizando EDC·HCl y HOBT· H_2O como sistema de acoplamiento. El producto final precipitó en una mezcla de

DCM/Hexano (4:1, v/v) a 4 °C como un sólido blanco. El rendimiento total del proceso completo desde la transformación del 2-aminoetanol **9** hasta la síntesis de **18** fue del 39%.

El ácido hidroxámico derivado de la lisina **32**, fue sintetizado por el Dr. Rob Hoen, y se obtuvo con un rendimiento del 71% utilizando el mismo procedimiento que se describe en la última etapa (e) de la síntesis del compuesto **18** pero partiendo del compuesto **31** (Esquema 2. 4).

2.3.3.2 Síntesis en fase sólida de la quimioteca de miéticos de Lisil-AMP

Los compuestos miméticos de Lisil-adenilato se sintetizaron manualmente en fase sólida utilizando 300 mg (168 mmoles) de la resina Fmoc-Rink-MBHA por compuesto (Esquema 2. 5). Se eligió este soporte polimérico ya que nos permitía realizar una estrategia Alloc/Boc y permitía obtener los compuestos en forma de carboxamida mediante acidólisis con TFA sin tener que recurrir a la hidrólisis con HF anhidro para la escisión de los compuestos finales (ver protocolos en el apartado 4.1 de la experimental).



Esquema 2. 5. Síntesis de miméticos de Lisil-adenilato en fase sólida. Condiciones; a) 20% piperidina en DMF (2 x 20 min); b) **3**, DPCDI (5 eq) y HOBt·H₂O (5 eq) en DMF, 2 h; c) **18** (7 eq), DIAD (21 eq) y PPh₃ (21 eq) en DCM anh., 15 h; d) Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq), PhSiH₃ (10 eq) en DCM (2 x 20 min); e) RCOOH (5 eq), DPCDI (5 eq) y HOBt·H₂O (5 eq) en DMF, 2 h; f) TFA/DCM/TIS (95: 2.5: 2.5, v/v/v), 4 h.

Una vez eliminado el grupo Fmoc de la resina se introdujo la L-hidroxi prolina protegida **3** utilizando DPCDI/HOBt·H₂O como sistema de acoplamiento. Sobre la Alloc-hidroxi prolina-resina, se incorporó el compuesto **18** (**32** en el caso de los derivados de la lisina) mediante

una reacción de Mitsunobu, que conlleva la inversión del centro estereogénico del alcohol de la hidroxiprolina y la obtención del derivado hidroxilamida (paso c, Esquema 2. 5).

La reacción de Mitsunobu fue un paso crítico para la obtención de los derivados de la tialisina. Para optimizar este paso se realizaron distintos ensayos tanto en fase sólida como en solución utilizando en este caso el análogo (4*R*)-4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de metilo (obtenido de la reacción de **3** con trimetilsilildiazometano). Se evaluaron varios compuestos azodicarboxilato (DIAD, DEAD, DCAD, DBAD y ADDP), dos aminas estéricamente menos impedidas y comercialmente asequibles (1-hexanamina y 4-fenilbutilamina), dos fosfinas (PPh₃ y TBP) y distinto número de equivalentes de los reactivos utilizados. Con los resultados de estos ensayos se llegó a la conclusión de que era imprescindible recurrir a un elevado número de equivalentes de PPh₃ y DIAD, así como secar todos los reactivos en una estufa de vacío a 30 °C durante 15 horas antes de su utilización para que la reacción de Mitsunobu tuviera lugar (Tabla 2. 1). Finalmente, en la síntesis de los compuestos se utilizaron 7 eq del derivado del ácido hidroxámico de la tialisina **18** y 21 eq de PPh₃ y de DIAD. A pesar del proceso de optimización realizado, la poca reproducibilidad de la reacción nos obligó a sintetizar los compuestos de tres en tres, descartando la idea inicial de sintetizar el esqueleto común de los compuestos de una sola vez. Seguramente, esta falta de reproducibilidad viene dada por la dificultad de mantener las condiciones anhidras que requiere la reacción en la síntesis en fase sólida. Para confirmar que la reacción entre el grupo hidroxilo **3** y el derivado del ácido hidroxámico de la tialisina **18** se había dado, se procedió a la acidólisis de una alícuota de la resina con TFA/DCM/TIS (95:2.5:2.5 v/v/v) a t.a. durante 4 horas, escindiendo así el compuesto del soporte sólido y comprobando mediante HPLC-MS su obtención.

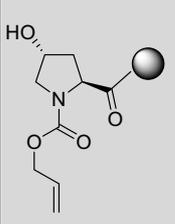
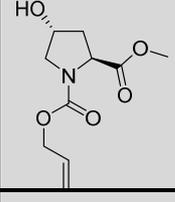
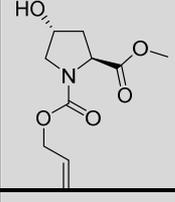
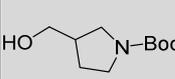
Fase sólida		DIAD 7 eq	PPh ₃ 7 eq	hexilamina 7 eq
				4-fenilbutilamina 7 eq
En solución		DEAD 7 eq	PPh ₃ 7 eq	Boc-Lys(Boc)-NH-OMPB 7 eq
		DCAD 7 eq		
	ADDP 7 eq			
	DBAD 7 eq			
		DIAD 2 eq	PPh ₃ 2 eq	Boc-Lys(Boc)-NH-OMPB 2 eq
				Boc-Tialis(Boc)-NH-OMPB 2 eq
	DIAD 2 eq	TBP 2 eq	hexilamina 2 eq	
			O-(4-metoxifenil)hidroxilamina 2 eq	
	DIAD 2 eq	TBP 2 eq	Boc-Lys(Boc)-NH-OMPB 2 eq	
			Boc-Lys(Boc)-NH-OMPB 2 eq	

Tabla 2. 1. Distintas pruebas realizadas de la reacción de Mitsunobu en fase sólida y en solución con DCM anhidro a t.a. durante 15 h.

Superada esta etapa de la síntesis y una vez eliminado el grupo protector Alloc con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y PhSiH_3 en $\text{DCM}_{\text{anh.}}$, se dividió la resina en tantas partes iguales como compuestos a sintetizar, procediendo a acilar la *N*-hidroxiprolina con el ácido carboxílico correspondiente utilizando como agentes acoplantes DIPCDI y $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$. En este punto, se introdujeron distintos ácidos heterocíclicos (R_3) comerciales que mimetizan a la adenina del sustrato natural y proporcionan diversidad a la quimioteca.

Se siguió el mismo esquema sintético para obtener los análogos derivados de la lisina. En dicho caso la reacción de Mitsunobu funcionó correctamente con 7 eq de DIAD y 7 eq de PPh_3 , pudiendo proceder a la obtención del esqueleto común de los compuestos de una sola vez.

Se procedió a realizar la escisión del compuesto final del soporte sólido mediante acidólisis con $\text{TFA}/\text{DCM}/\text{TIS}$ (95:2.5:2.5 v/v/v). Cuando se analizaron los crudos de los mismos, se detectó, en la mayoría de casos tanto en los derivados con la tialisina como los de la lisina, un subproducto con una masa molecular 15 unidades inferior al compuesto deseado, que se atribuyeron a derivados tipo éster. Durante la purificación que se realizó en medio básico, la mayoría de estos ésteres se hidrolizaron liberando la tialisina, obteniéndose productos con una masa molecular de 161 unidades inferiores al producto deseado (Figura 2. 5).

Los compuestos y los subproductos hidrolizados fueron purificados mediante Prep-HPLC-MS en medio básico con distintos gradientes, colectando las fracciones mediante detección por MS (ver tabla resumen en el apartado 2.2.1 de la experimental). Se calculó la pureza de las distintas fracciones recogidas y liofilizadas por HPLC-MS analítico en medio básico (A: $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{CO}_3$ (20 mM, pH 9); B: ACN) a 50 °C con gradientes lineales de 0-50% de B en 3.5 min a $\lambda = 214$ nm. Cinco de los compuestos derivados de la tialisina descompusieron después de su purificación y no pudieron ser obtenidos. Los productos y los subproductos con purezas superiores al 85% se entregaron a una concentración 1 mM en H_2O al laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona encabezado por Dr. Lluís Ribas para evaluar su actividad *in vitro* frente a *P. falciparum*.

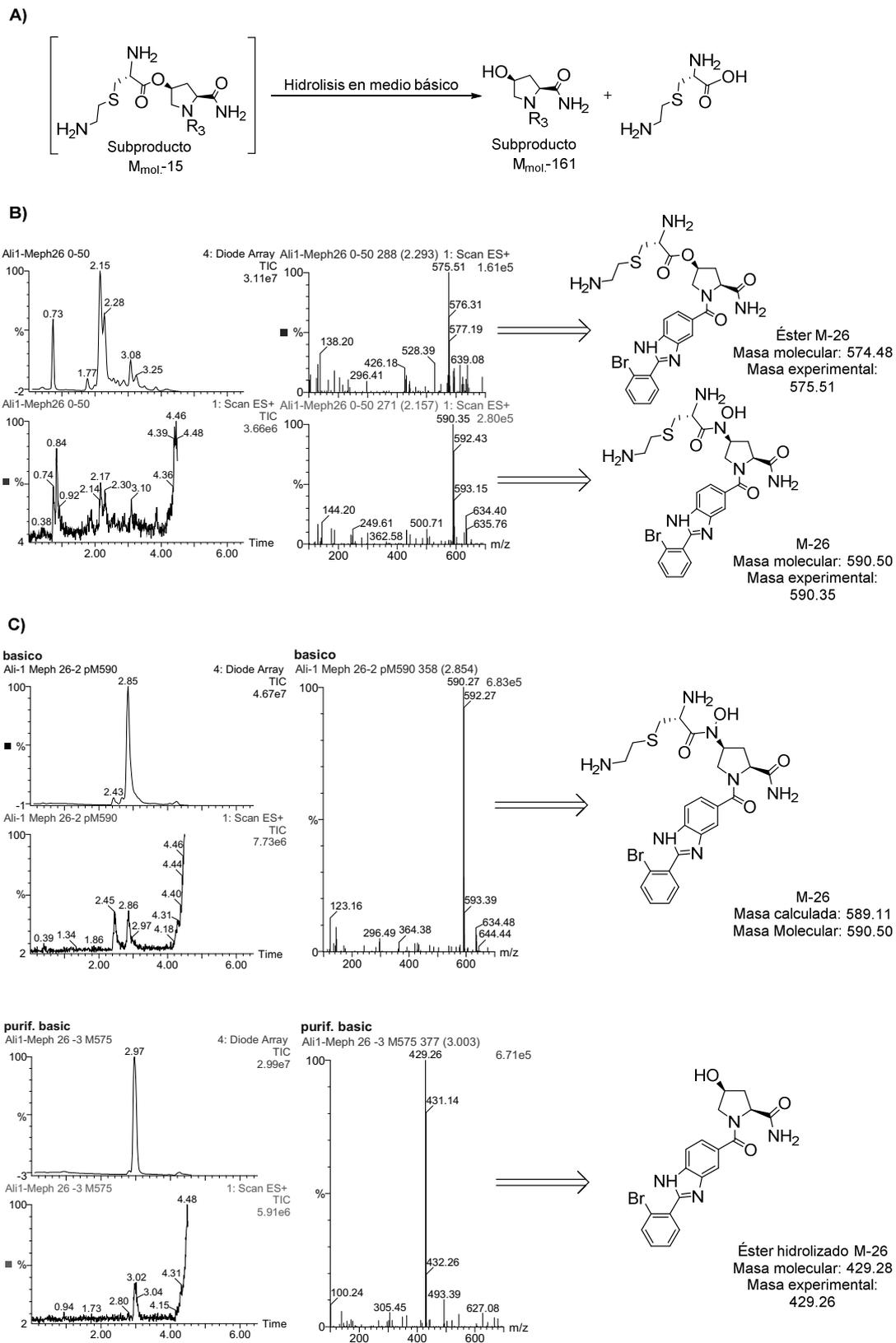


Figura 2. 5. A) Esquema general de la hidrólisis en medio básico del subproducto obtenido en la síntesis de los compuestos en fase sólida. Se ilustra, a modo de ejemplo, el espectro de HPLC-MS en medio básico del compuesto **M-26**; (B) antes de su purificación donde se observa la masa del producto y la del subproducto y (C) después de la purificación obteniendo por separado el producto y el subproducto hidrolizado.

2.3.4. Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de los miméticos de Lisil-AMP

Una vez obtenida la quimioteca de los miméticos de Lisil-AMP se procedió a evaluar la capacidad antimalarica *in vitro* de los mismos. Para ello se infectaron los glóbulos rojos humanos (RBC) con parásitos *P. falciparum* de la cepa 3D7A, y se determinó la capacidad de los compuestos de disminuir la parasitemia en un cultivo, inhibiendo el crecimiento de los parásitos. Así, después de sincronizar el cultivo con sorbitol, para asegurarse de que todo los parásitos se encuentran en el estadio de trofozoitos jóvenes denominados anillos o *rings*, se incubaron concentraciones distintas de los compuestos en cultivos con parasitemias del 1 y el 0.1% durante 48 y 96 horas respectivamente. La actividad antiparasitaria *in vitro* de los compuestos sintetizados se estimaron mediante el ensayo de Lactato Deshidrogenasa (LDH) y los resultados se confirmaron mediante microscopía óptica (ver protocolo en el apartado 6.1.2. de la experimental).

El ensayo de Lactato Deshidrogenasa es un ensayo colorimétrico indirecto donde se calcula la proliferación parasitaria a partir de la medición de la actividad de la enzima LDH de *P. falciparum*. En este ensayo se determina la transformación el 3-acetilpiridina adenina dinucleótido (APAD) a APADH, siendo este un derivado sintético de la coenzima natural nicotinamida adeniana dinucleótido (NAD) que es rápidamente transformado por la enzima pLDH pero no por la LDH humana⁴². A medida que APADH se va formando, el cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) se reduce generando formazán que es detectado por UV (Figura 2. 6).

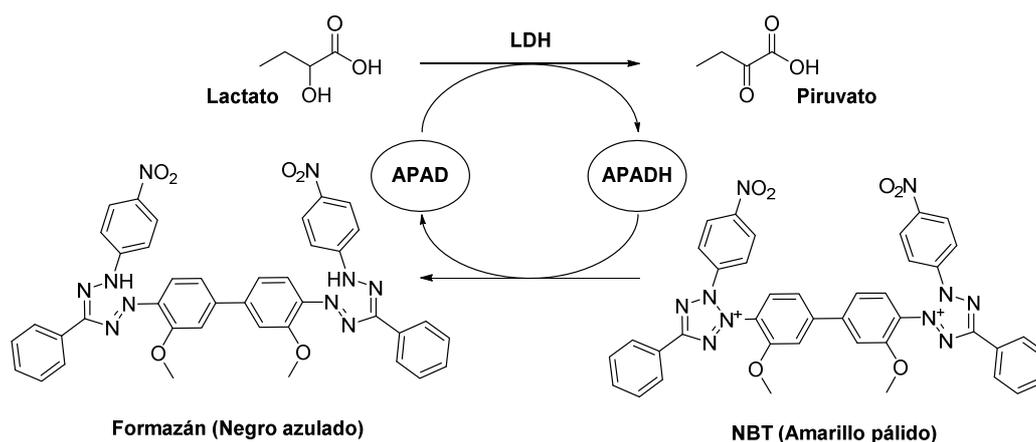


Figura 2. 6. Esquema general de la formación del formazán en el ensayo LDH.

Los primeros resultados mostraron que del total de compuestos que forman la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP, tres de los derivados de la tialisina y dos de la lisina, eran activos a 50 μ M (Figura 2. 7).

Los compuestos más activos *in vitro* a 50 μM **M-12**, **M-33** y **M-37** fueron capaces de inhibir la parasitemia entre un 70 y un 80%, mientras que a 5 μM sólo los compuestos **M-12**, **M-24** y **M-26** mostraron actividad moderada a las 96 horas. Sin embargo, el dato más característico es la diferencia entre la actividad a las 48 y 96 horas de los compuestos **M-26** y **M-37** a 50 μM . Los resultados indican que posiblemente, estos dos compuestos pueden inhibir selectivamente la Lisil-ARNt sintetetas apicoplásticas mostrando un considerable decrecimiento de la población del parásito a las 96 horas (*delayed death effect*).

Otro dato a tener en cuenta es que ningún subproducto hidrolizado dio actividad *in vitro*, indicando, que posiblemente la pérdida del aminoácido disminuye la interacción enzima-sustrato.

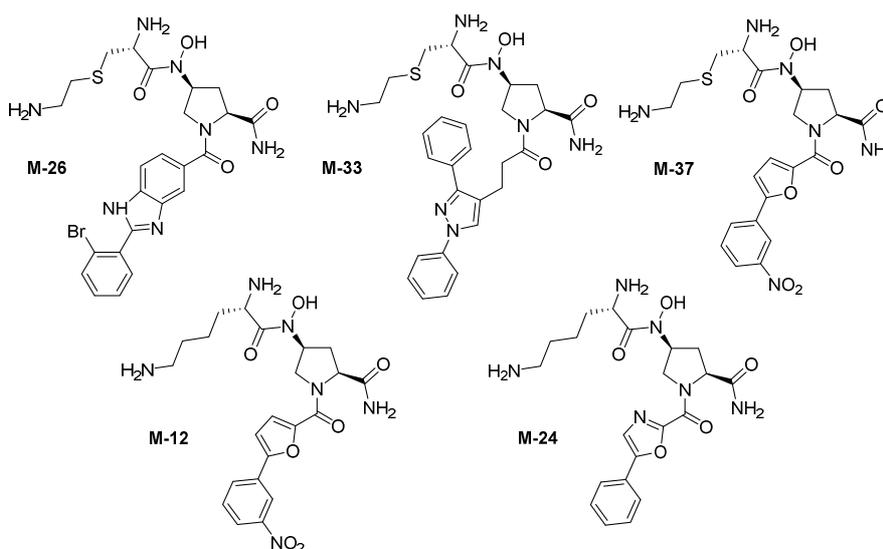
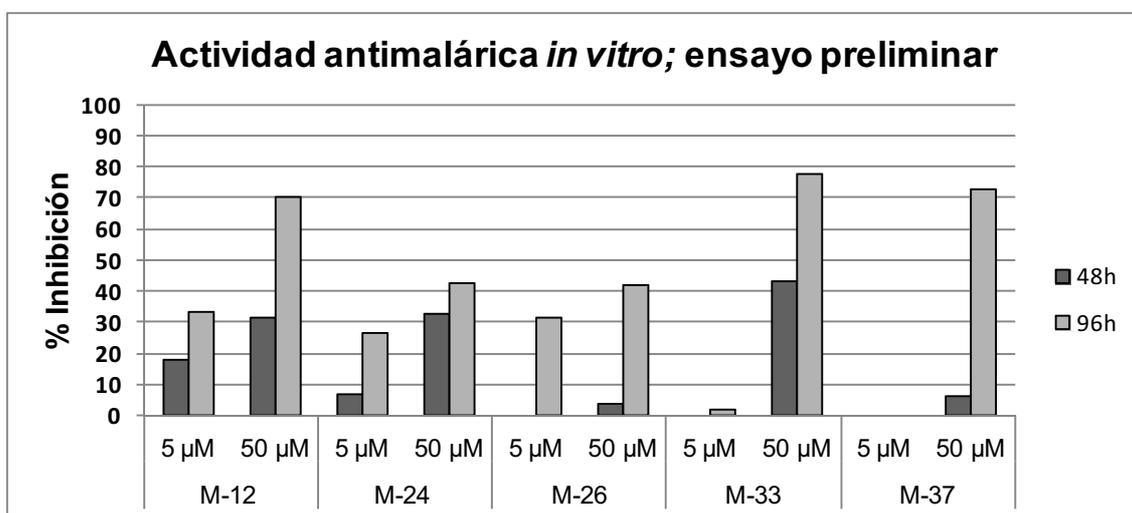


Figura 2. 7. Resultados *in vitro* de la inhibición de la parasitemia calculadas mediante el ensayo de LDH y estructura de los compuestos que mostraron actividad antimalárica *in vitro* a 50 μM .

Analizando los resultados asociados a aquellos compuestos que presentan mejor porcentaje de inhibición *in vitro* y mejor interacción con el centro activo *in silico* (Tabla 2. 2) se pueden poner de manifiesto algunas concordancias/discordancias entre los resultados *in silico* y los obtenidos *in vitro*. Para ello tendremos en cuenta la teoría que afirma que la inhibición del apicoplasto de *P. falciparum* implica la incapacitación del parásito a realizar la duplicación del genoma de dicho orgánulo durante la división celular⁴³, e inhabilita la producción de la maquinaria bioquímica necesaria para llevar a cabo un nuevo ciclo de infección⁴⁴, causando así la muerte y una disminución de la parasitemia a las 96 horas.

- Los cinco compuestos que han mostrado actividad *in vitro* a 50 μ M, a excepción de **M-24**, presentaron unos valores relativos de GS altos frente a la proteína parasitaria apicoplástica (PfKRS-2). Se prevé que dichos compuestos se disponen espacialmente en el centro activo de la enzima interaccionando con los residuos que reconocen tanto el aminoácido como el grupo heterocíclico que mimetiza a la adenina. El compuesto con una interacción mayor ($GS_{pF} = -12.9$, $GS_{Hs} = -9.6$) pertenece a **M-01**, siendo este el análogo a **M-26**.

- El compuesto **M-24** es uno de los más activos *in vitro* a bajas concentraciones, pero no presenta selectividad a concentraciones más elevadas, hecho que se correlaciona con los resultados *in silico* donde se pronosticaba mayor interacción por la enzima humana que por la apicoplástica de *P. falciparum*.

- El compuesto **M-33** es el más activo *in vitro* a las 96 horas a 50 μ M siendo también el que presenta una mayor afinidad enzima-sustrato *in silico*. Aunque dicho compuesto no muestra tanta selectividad por el apicoplasto como **M-26** y **M-37**, la inhibición de la parasitemia a las 96 horas es casi el doble que la registrada *in vitro* a las 48 horas.

- Parece ser que el aminoácido juega un papel más importante en este tipo de estructuras que el reflejado en los valores registrados *in silico*; si se analizan los resultados obtenidos para todos los miméticos sintetizados (ver tabla resumen en el apartado 2.2.1 de la experimental), en general, no se observa una afinidad mayor frente a PfKRS-2 para los compuestos que tienen a la tialisina como aminoácido de reconocimiento respecto a sus análogos formados con la lisina. No obstante, los resultados *in vitro* muestran más selectividad apicoplástica para los compuestos formados con tialisina; pues ninguno de los compuestos activos con la lisina como aminoácido muestran una diferencia de actividad sustancial en la inhibición de la parasitemia a las 48 y 96 horas.

Las parejas de compuestos análogos **M-01/M-26** y **M-12/M-37** se diferencian entre ellos por el aminoácido de reconocimiento. La puntuación relativa GS predice una mayor actividad y selectividad de los derivados de la lisina (**M-01** y **M-12**) frente a sus equivalentes (**M-26** y **M-37**). Sin embargo, el compuesto **M-01** no ha mostrado actividad *in*

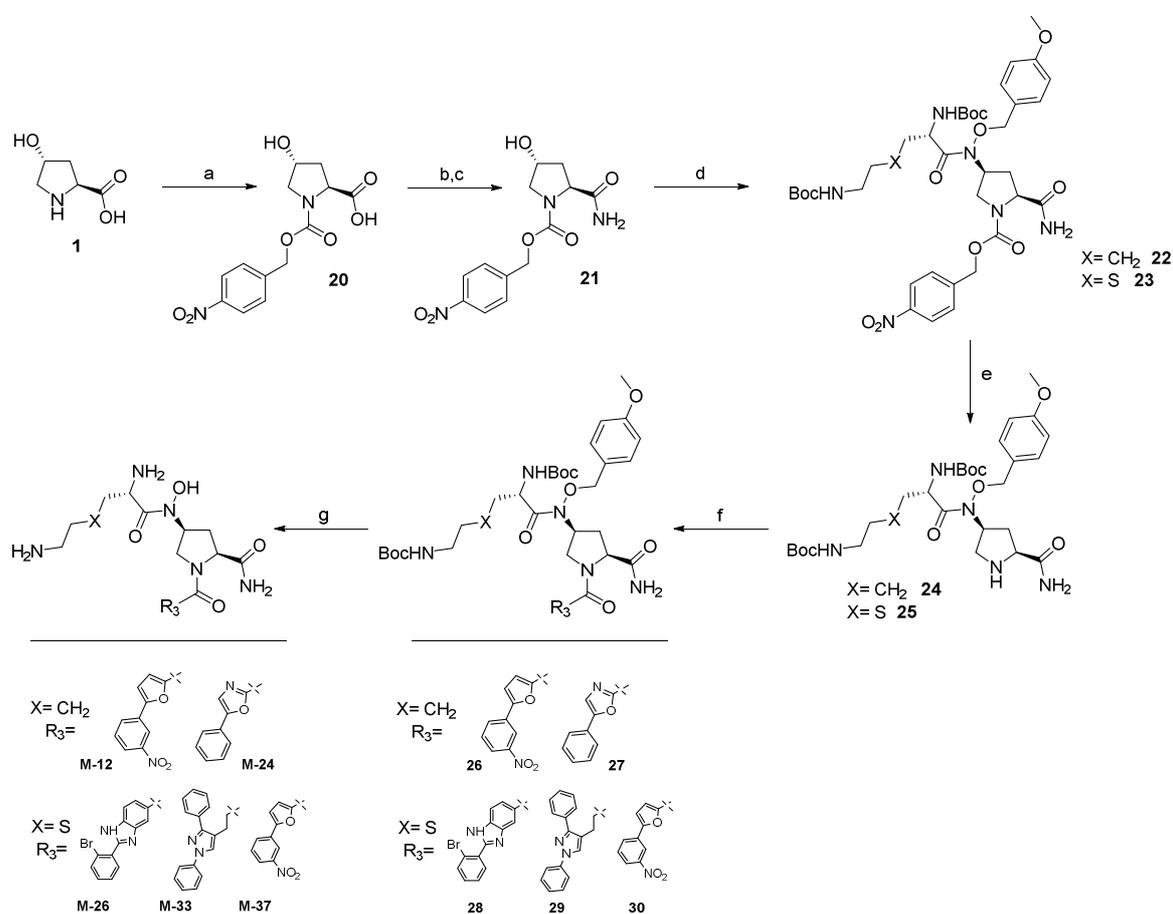
vitro a 50 μM y los compuestos **M-26** y **M-37** formados con la tialisina parecen ser más selectivos frente a PfKRS-2 que **M-12**.

Compuesto	<i>In silico</i>				% Inhibición <i>in vitro</i>			
	Tipo de unión enzima-sustrato		Puntuación GS		48 h		96 h	
	pF	HS	pF	HS	5 μM	50 μM	5 μM	50 μM
M-12	lisina-adenilato	adenina	-11.0	-9.1	17.6	31.7	33.2	70.4
M-24	-	lisina-adenilato	-9.5	-11.6	6.7	32.6	26.4	42.4
M-26	lisina-adenilato	lisina	-11.9	-10.9	0	3.9	31.3	41.6
M-33	lisina-adenilato	adenina	-12.0	-9.9	0	43.5	1.9	77.9
M-37	lisina-adenilato	adenina	-10.5	-8.2	0	6.2	0	72.7

Tabla 2. 2 Resumen de los resultados obtenidos *in silico* e *in vitro* de los compuestos activos.

2.3.5. Síntesis en solución de los compuestos Lisil-AMP seleccionados

Para caracterizar y ensayar *in vitro* e *in vivo* los compuestos seleccionados mediante el ensayo de inhibición de la parasitemia, se procedió a resintetizar los compuestos seleccionados. En esta ocasión se realizó un esquema de síntesis distinto en solución (Esquema 2. 6) con el fin de mejorar el rendimiento obtenido, así como, evitar los inconvenientes que habían surgido durante el proceso de síntesis de los compuestos en fase sólida y su posterior purificación.



Esquema 2. 6. Síntesis en solución de los miméticos de Lisil-adenilato seleccionados. Condiciones; a) clorocromato de *p*-nitrobencilo, NaOH 2 M en DCM, 0 °C, 1 h, 57% rendimiento, pureza >99%; b) EDC·HCl (1.2 eq), HOBT·H₂O (1.2 eq) en ANC_{anh}, 0 °C, 14 h, pureza >99%; c) NH₄OH (ac.) al 32%, 0 °C, 30 min, 66% rendimiento; d) **18** (1.2 eq), DEAD (3 eq), PPh₃ (3 eq) en DCM_{anh.}, t.a., 15 h; e) Pd/C al 10%, H₂, en MeOH, t.a., 15 h; f) R₃COOH (1 eq), EDC·HCl (1.2 eq), HOBT·H₂O (1 eq), en DCM/DMF (9:1, v/v), t.a., 18 h; f) DCM/TFA (3:2, v/v), t.a., 18 h.

En esta estrategia de síntesis se utilizó la L-hidroxiprolina **1** como material de partida, cuya amina se hizo reaccionar con cloroformiato de *p*-nitrobencilo en medio básico obteniendo un sólido amarillo que correspondía al ácido (2*S*,4*R*)-4-hidroxi-((4-nitrobenciloxi)carbonil)pirrolidina-2-carboxílico **20** que precipita en medio ácido como una mezcla de rotámeros con un 57% de rendimiento⁴⁵. En esta estrategia se utilizó el cloroformiato de *p*-nitrobencilo como grupo protector de la amina de la L-hidroxiprolina **1** en vez del grupo alilo utilizado en la síntesis de fase sólida, para facilitar su manipulación y poder seguir la reacción por HPLC-UV. El carbamato de nitrobencilo es más estable frente a hidrólisis ácidas y su eliminación mediante hidrogenólisis es más efectiva que el carbamato de bencilo. Posteriormente se trata **20** con hidróxido de amonio acuoso al 32% en presencia de los agentes acoplantes EDC·HCl y HOBt·H₂O generando el derivado carboxamida **21** como mezcla de rotámeros con un rendimiento del 66% después de su purificación mediante cromatografía *flash* automatizada⁴⁶. Los derivados de tipo hidroxamato protegidos **22** y **23** se obtienen a partir de **21** y **18** (**32** en los derivados de la lisina) mediante la reacción de Mitsunobu utilizando PPh₃ y DEAD, en condiciones anhidras y bajo atmosfera de argón, siendo indispensable secar previamente los reactivos de partida en la estufa de vacío a 30 °C durante 15 horas.

Dado que es mucho más fácil trabajar en condiciones anhidras en solución que en fase sólida, la reacción de Mitsunobu funcionó mucho mejor y además se requirieron menos equivalentes de los reactivos de partida. No obstante, el óxido de trifenilfosfina formado, resultó imposible de aislar tanto por cromatografía *flash* automatizada como por precipitación. Se decidió utilizar el crudo en la siguiente etapa del proceso de síntesis dado que el óxido de trifenilfosfina no afectaba a la siguiente reacción.

Los compuestos **24** y **25** se obtuvieron mediante hidrogenólisis de los compuestos **22** y **23** respectivamente con Pd/C al 10% en MeOH. Llegado a este punto, el crudo **24** se dividió en dos partes iguales, mientras que el compuesto **25** se dividió en tres, para acilar la amina de la prolina con distintos ácidos carboxílicos (R₃COOH), utilizando EDC·HCl y HOBt·H₂O como agentes acoplantes. Se eliminó el grupo Boc de los compuestos resultantes con una mezcla de TFA al 40% en DCM. Llegados a este punto, se requirió purificar los compuestos justo después de concentrar los crudos a sequedad, evitando de este modo la descomposición del producto. Los compuestos se purificaron mediante Prep-HPLC-MS en medio básico. Las distintas fracciones se liofilizaron y aquellas que no alcanzaron una purezas superior al 95% a $\lambda = 214$ nm, fueron repurificadas, esta vez en medio ácido, hasta alcanzar la pureza requerida para los ensayos *in vitro*. Los compuestos finales, mezcla de dos rotámeros, se caracterizaron mediante RMN ¹H, ¹³C, HMQC y HRMS (ES⁺).

Durante esta síntesis, no se observó en ninguna etapa analizada por HPLC-MS, el éster con 15 unidades menos de masas respecto al producto deseado, obtenido en la síntesis en fase sólida. Aunque los rendimientos alcanzados eran mejorables, fueron superiores siguiendo esta ruta sintética.

2.3.6. Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de los compuestos Lisil-AMP seleccionados

Los compuestos resintetizados se entregaron, esta vez a una concentración 5 mM en medio acuoso al laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona dirigido por el Dr. Lluís Ribas de Pouplana, con la finalidad de confirmar la actividad *in vitro* contra *P. falciparum* y estimar la IC₅₀ de los compuestos así como, ensayar la selectividad de los mismos frente a la enzima Lisil-AMP apicoplástica y a la enzima homóloga humana tal y como se había predicho mediante los experimentos de *docking*.

Se ensayó la actividad antiparasitaria de los compuestos *in vitro* en un cultivo de RBC humanos infectados con *P. falciparum* de la cepa 3D7A analizando la inhibición de la proliferación del parásito mediante citometría de flujo a las 48 y 96 horas de la incubación de los compuestos, confirmando los resultados por microscopía óptica (ver protocolo en el apartado 6.1.2. de la experimental). Mediante esta técnica, utilizando SYTO[®]11 como marcador de la proliferación parasitaria, se obtienen unos resultados más fiables que utilizando el ensayo de LDH, pudiéndose detectar selectivamente las células rojas invadidas por *P. falciparum* en el estadio de trofozoitos inmaduros (anillo o *rings*) y consecuentemente descartando los parásitos en estadios más avanzados.

Una vez confirmada la actividad antiparasitaria *in vitro* de los cinco compuestos seleccionados a 50 µM mediante citometría de flujo, se calculó la IC₅₀ a través de las curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de los resultados de citometría de flujo ensayando los compuestos a distintas concentraciones (Figura 2. 8).

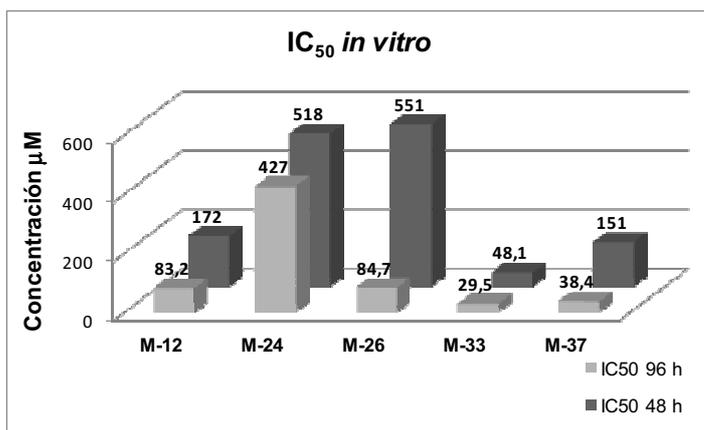


Figura 2. 8. Valores de IC₅₀ (µM) de los compuestos seleccionados *in vitro* calculadas con el software *Prism GraphPad*.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de la síntesis de esta quimioteca era inhibir específicamente la Lisil-ARNt sintetasa apicoplástica del *P. falciparum* procurando una selectividad entre especies, se decidió seleccionar los compuestos **M-26** y **M-37** para seguir analizando su actividad *in vitro* frente a la enzima apicoplástica PfKRS-2, pues eran los que mostraron mayor diferencia de actividad a las 48 y 96 horas.

2.3.6.1 Ensayos de aminoacilación *in vitro*

Para investigar la selectividad y especificidad de dichos compuestos a las enzimas en cuestión, se llevaron a cabo ensayos de aminoacilación *in vitro*. Se utilizó la proteína purificada de Lisil-ARNt apicoplástica (PfKRS-2) y citosólica (PfKRS-1) de extractos de *P. falciparum*, así como la proteína purificada Lisil-ARNt humana (HsKRS) de extractos celulares, requiriendo también el uso de la lisina marcada radioactivamente (³H]-lisina) y el ARNt^{Lys} transcrito *in vitro* para cuantificar la inhibición enzimática (ver protocolo en la apartado 6.1.2 de la experimental).

Los dos compuestos **M-26** y **M-37** inhibieron la actividad de la enzima apicoplástica de *P. falciparum* (PfKRS-2) a 100 µM, pues durante el ensayo de aminoacilación de dicha proteína no se registro la unión de [³H]-lisina en el ARNt^{Lys}, lo que indica que ambos compuestos bloquean el centro activo de la enzima apicoplástica alterando su funcionamiento (Figura 2. 9. B y F). Cuando se realizó el mismo ensayo para la enzima citosólica de *P. Falciparum* (PfKRS-1) y la enzima humana (HsKRS) se observó que la actividad de ambas enzimas permanecía prácticamente inalterada (Figura 2. 9. C, D y G, H respectivamente).

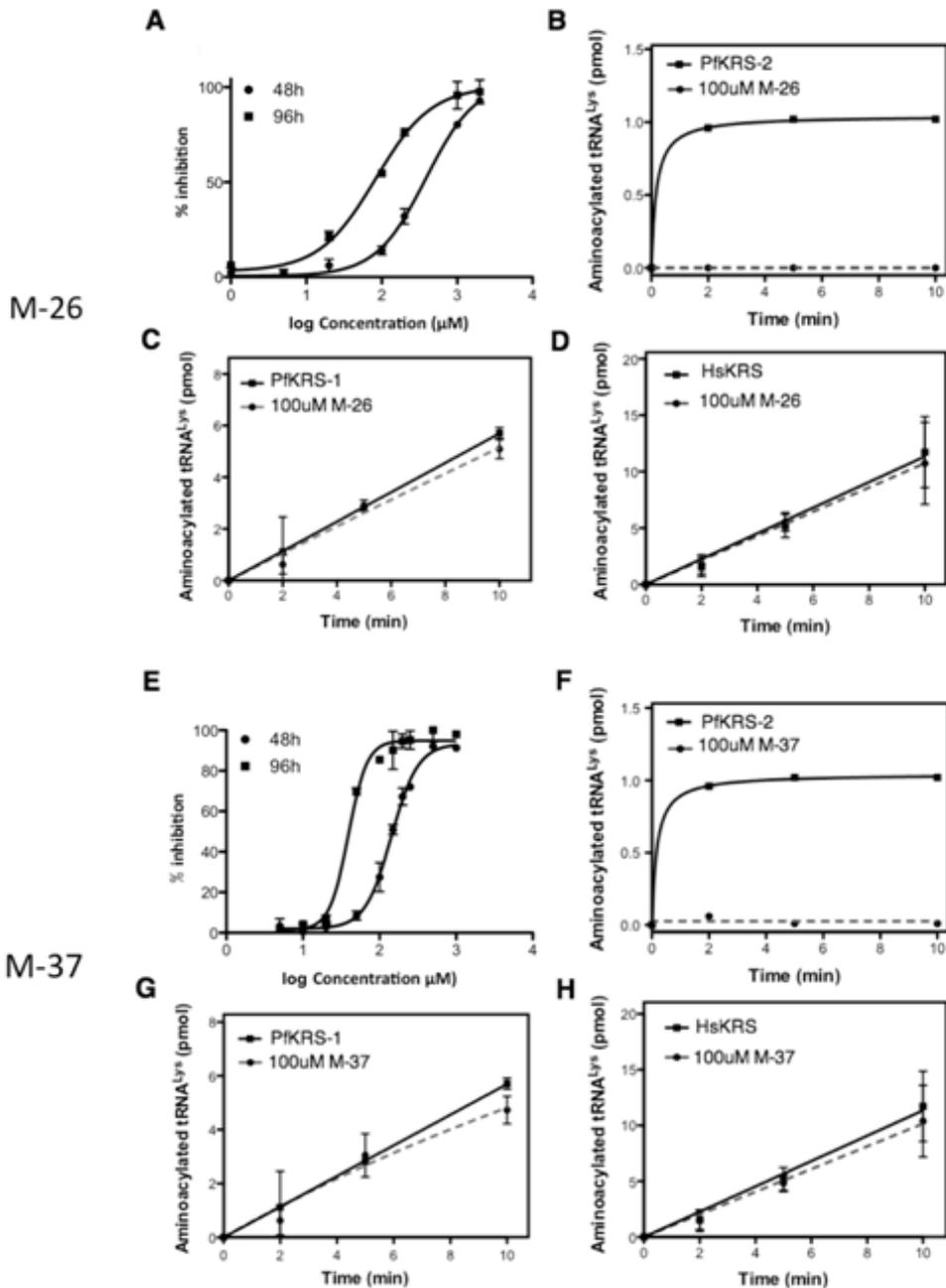


Figura 2. 9. Resultados de los ensayos de aminoacilación de las enzimas Lisil-ARNt; PfKRS-1, PfKRS-2 y HsKRS *in vitro* a una concentración 100 μ M a distintos tiempos. La actividad enzimática sin inhibidor está representada por una línea continua, mientras que la línea discontinua representa los pmoles de [3 H]-lisina acilada en presencia de los compuestos.

Para confirmar que **M-26** y **M-27** eran inhibidores específicos de la Lisil-ARNt sintetasa y que no afectaban al funcionamiento del resto de ARS del parásito, se realizó el ensayo de aminoacilación en las mismas condiciones, esta vez utilizando otra enzima plasmódica Trp-ARNt sintetasa (PfwRS) observando que ninguno de los dos compuestos era capaz de inhibir su actividad (Figura 2. 10).

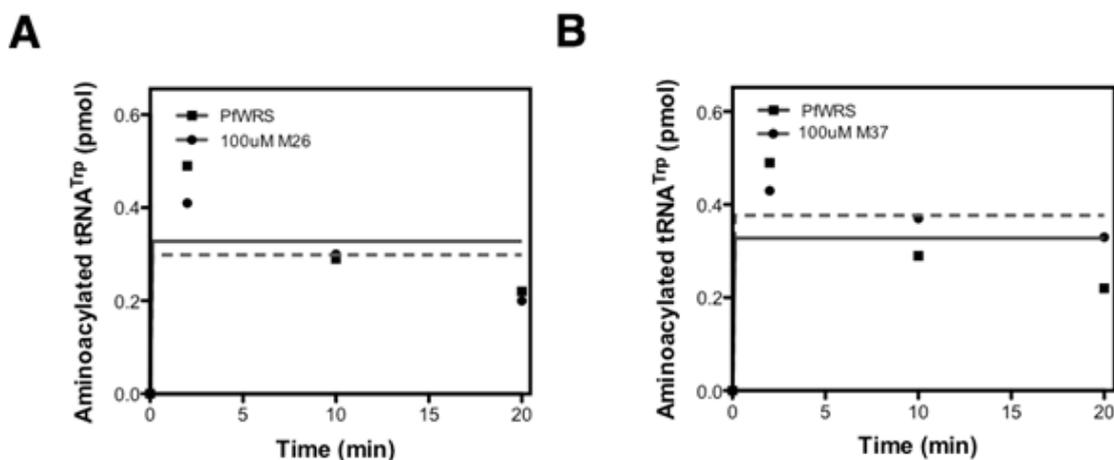


Figura 2. 10. Resultados de los ensayos de aminoacilación de la enzima Trp-ARNt sintetasa (PfWRS) de *P. falciparum*.

Con los resultados obtenidos *in vitro*, se afirma que los compuestos **M-26** y **M-37** son inhibidores específicos de la Lisil-ARNt sintetasa apicoplástica de *P. falciparum*.

2.3.7. Evaluación *in silico* de los compuestos Lisil-AMP seleccionados

Como se ha descrito anteriormente, los compuestos que presentan una unión enzima-sustrato parecida al ligando natural AA-AMP, es decir, tanto el análogo del aminoácido como el de la adenina se unen al centro activo de la enzima, presentan una mayor interacción, siendo teóricamente mejor inhibidores. Los compuestos **M-26** y **M-37** tienen una disposición espacial y una interacción con la enzima PfKRS-2 parecida al intermedio Lisil-adenilado (LAD). Contrariamente no presentan tal interacción con la enzima humana HsKRS (Figura 2. 11). Sabiendo que los residuos de la enzima involucrados en el reconocimiento de la lisina se conservan en ambas especies, pero que otros residuos involucrados en el reconocimiento del sustrato y que forman parte del centro activo de la enzima, son diferentes entre especies, sugiere que el disímil modo de acoplamiento enzima-sustrato que presentan dichas enzimas es debido a restricciones estéricas.

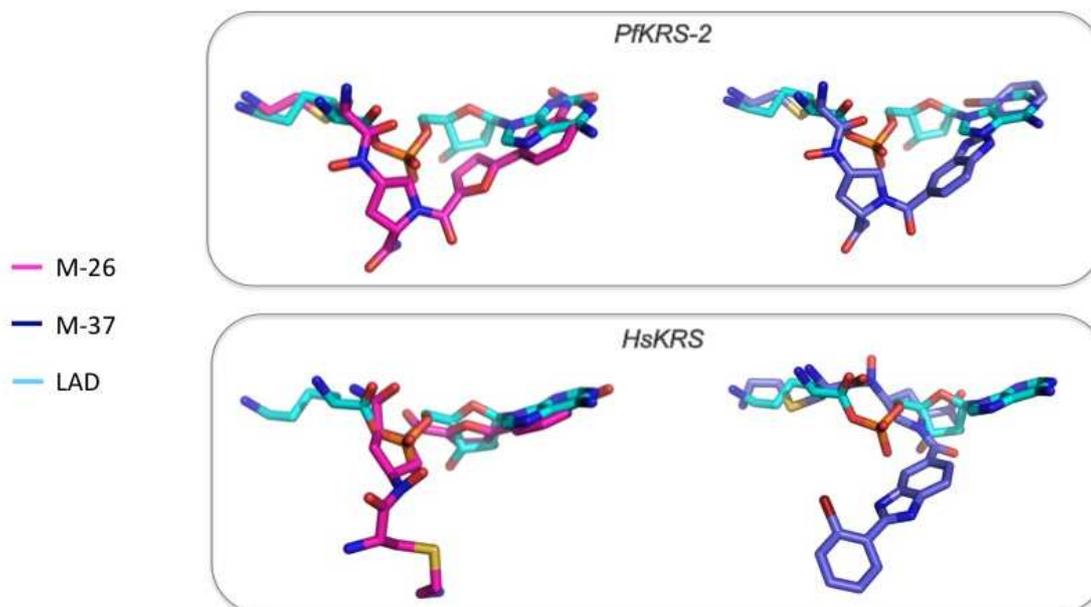


Figura 2. 11. Estructuras en 3D modeladas *in silico* del intermedio Lisil-adenilato (LAD) y los compuestos **M-26** y **M-37** en el centro activo de la enzima PfKRS-2 (superior) y HSKRS (inferior).

2.3.8. Evaluación *in vivo* de los compuestos Lisil-AMP seleccionados

2.3.8.1 Modelo *zebrafish*

Los miméticos de la Lisil-AMP **M-26** y **M-37** fueron enviados a Portugal al grupo del Dr. Manuel Santos (*ARN Biology Laboratory- University of Aveiro*) para evaluar la genotoxicidad así como los posibles efectos adversos en el proceso de embriogénesis usando *zebrafish* como modelo animal (ver protocolo en el apartado 6.2.1 de la experimental).

Los peces *zebrafish* son modelos vertebrados utilizados en ensayos preclínicos que permite identificar toxicidades graves provocadas por los compuestos a ensayar pudiendo extrapolar los resultados obtenidos frente animales vertebrados superiores como los mamíferos. Los embriones de *zebrafish* desarrollan la mayoría de organismos presentes en los mamíferos incluyendo el sistema cardiovascular, nervioso y digestivo en menos de una semana. Además sus características; tamaño pequeño, transparencia y la habilidad de absorber los compuestos presentes en el agua, hacen que sea un modelo interesante para predecir la toxicidad de los compuestos.

Mediante la observación de los embriones durante su desarrollo de 0 a 72 horas, se pueden detectar malformaciones o retraso del crecimiento embrionario, alteraciones en la

pigmentación relacionadas con malformaciones de la cresta neural y/o edema pericárdico por afectación del sistema cardiovascular y circulatorio⁴⁷.

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos, se utilizaron 10 embriones en cada ensayo, a las concentraciones de IC₅₀ de los compuestos obtenidas anteriormente a las 96 horas en la evaluación *in vitro*. El crecimiento embrionario se observó cada 24 horas hasta finalizar el ensayo a las 72 horas, tiempo necesario para el desarrollo completo del pez.

Durante el ensayo de toxicidad no se detectó ninguna anomalía en los embriones tratados con los compuestos **M-26** y **M-37** comparándolos con el crecimiento de los embriones *wild type* usados como control (Figura 2. 12). Hecho que indica que los compuestos elegidos no muestran efectos secundarios graves en modelos vertebrados, siendo este un primer paso necesario para poder seguir investigando la actividad antimalárica de **M-26** y **M-37** *in vivo*.

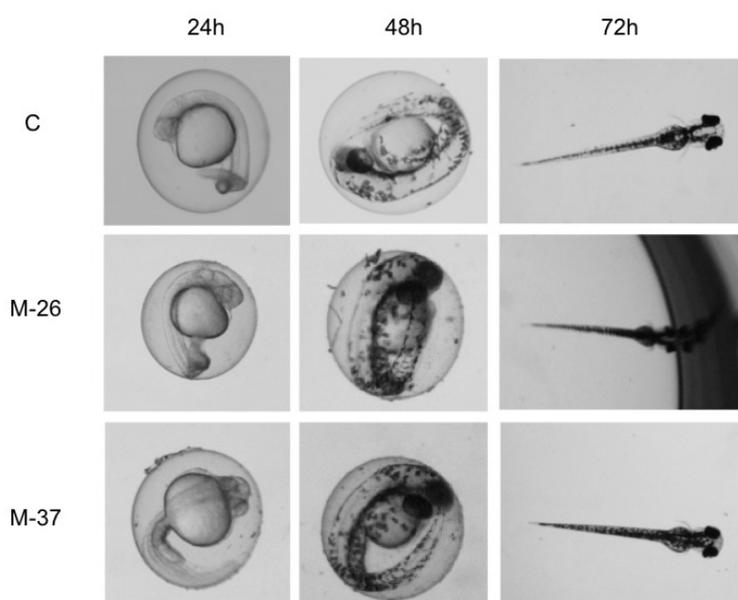


Figura 2. 12. Fotografías tomadas durante el ensayo de toxicidad con el modelo *zebrafish*, a las 24, 48 y 72 h siguientes al tratamiento de los embriones con los compuestos **M-26** y **M-37**.

2.3.8.2 Modelo murino

Sabiendo que los compuestos no mostraban efectos tóxicos en seres vertebrados, se enviaron los compuestos **M-26** y **M-37** a Madrid al grupo del Dr. José M. Bautista (*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV-Universidad Complutense de Madrid*) donde se evaluó su actividad en ratones de la cepa BALB/cAnNHsd inoculados con 2×10^7 eritrocitos murinos infectados por *Py17XL* (*P. yoelii*) (ver protocolo el apartado 6.2.2 de la experimental).

El estudio experimental del *P. falciparum* es particularmente problemático ya que no se puede mantener todo el ciclo de vida del parásito *in vitro* y además no existen modelos animales infectados con *P. falciparum* ya que dicho parásito afecta casi exclusivamente a los eritrocitos humanos. Aunque algunas investigaciones se centran en conseguir un modelo murino infectado con *P. falciparum*⁴⁸, actualmente, la solución para estudiar la malaria en modelos animales se basa en el uso de distintas especies de *Plasmodium* no patogénicas para humanos, pero que afectarían a los roedores como es el caso de *P. yoelii* que se aisló en murinos africanos y se ha podido mantener en laboratorios de experimentación animal.

Los compuestos **M-26** (25 mg/kg día) y **M-37** (9.75 mg/kg día) se administraron a las 2 horas de la infección siguiendo el tratamiento durante los 3 días siguientes. Las dosis utilizadas fueron ajustadas en función de la solubilidad y de la IC₅₀ de los compuestos *in vitro*. Se utilizaron murinos tratados con cloroquina con dosis suficientes (5 mg/kg día) para observarse un 100% de la actividad antimalárica del compuesto como control.

Desafortunadamente, ninguno de los dos compuestos **M-26** y **M-37** mostró actividad antimalárica *in vivo* frente a *P. yoelii*. No obstante, el compuesto **M-37** retrasó un poco la hiperparasitemia de los ratones y la muerte por malaria (Figura 2. 13).

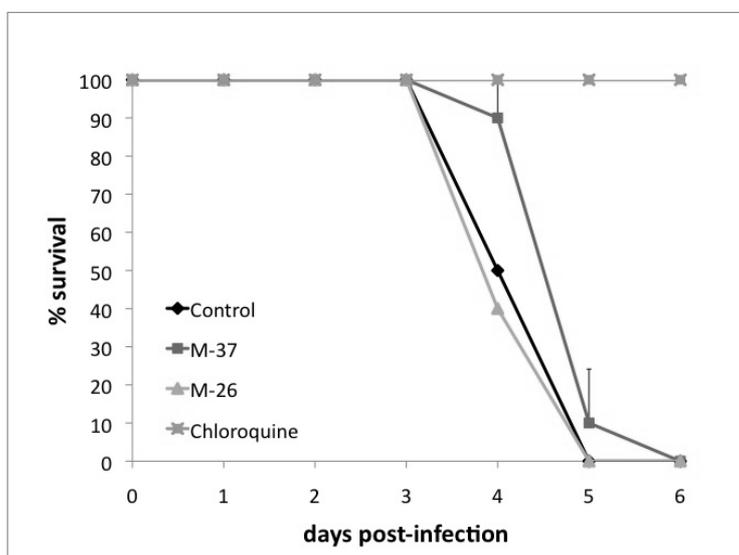


Figura 2. 13. Resultados del ensayo *in vivo* con modelos murinos de la cepa BALB/cAnNHsd infectados por *Py17XL*.

La poca actividad registrada de los compuestos ensayados *in vivo* se puede deber a muchos factores; en primer lugar, el modelo utilizado está infectado con una especie de *Plasmodium* distinta a los ensayos efectuados *in vitro*. Aunque dicho modelo está aceptado para evaluar la actividad preclínica de fármacos antimaláricos, la secuencia genómica de ambas especies difiere bastante entre sí pudiendo afectar en el modo de

acción de los compuestos ensayados.⁴⁹ Por otro lado, no se ha efectuado un estudio farmacocinético y farmacodinámico de los compuestos. Así pues, no podemos descartar la posibilidad de que dichos compuestos sean de eliminación rápida de tal forma que el tiempo de actuación sea insuficiente para mostrar actividad. Tampoco se ha estudiado la estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos, pues es probable que no alcance la diana terapéutica o sean rápidamente degradados en plasma⁵⁰. Otro punto a tener en cuenta es la dosis administrada, en este caso, posiblemente menor de lo necesaria para observar un efecto antimalárico *in vivo*. No se pudieron realizar ajustes en la administración de los compuestos por falta de su disposición.

2.4 Conclusiones

Combinando los resultados obtenidos de las predicciones proporcionadas por herramientas computacionales, la síntesis y la evaluación de la actividad, tanto *in vitro* como *in vivo*, de una quimioteca de derivados del intermedio lisil-adenilato, se ha demostrado que dos compuestos miméticos de la Lisil-AMP son capaces de inhibir específicamente *in vitro* la enzima apicoplástica PfKRS-2 sin alterar el funcionamiento de la enzima homóloga humana HsKRS, confirmando así, que ambas enzimas difieren desde un punto de vista evolutivo y estructural.

Dichos compuestos, muestran una actividad antimalárica moderada *in vitro* y aunque desafortunadamente no muestran actividad *in vivo* en modelos murinos infectados por *P.yoelii*, no se les atribuye ningún efecto genotóxico en modelos *zerafish*.

Finalmente, mediante esta investigación podemos validar la enzima apicoplástica Lisil-ARNt sintetasa de *P. falciparum* (PfKRS-2) como una potencial diana farmacológica selectiva y específica para el tratamiento de la malaria, que abre un nuevo camino para el desarrollo de fármacos antipalúdicos.

Referencias

- ¹ Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *App Microb Biotech*, **2003**, *61*, 278-288.
- ² Ochsner, U. A.; Sun, X.; Jarvis, T.; Critchley, I.; Janjic, N. Aminoacyl-tRNA synthetases: essential and still promising targets for new anti-infective agents *Expert Opin Investig Drugs*, **2007**, *16*, 573-593.
- ³ Gadakh, B & Aerschot, A. V. Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as antimicrobial agents: a patent review from 2006 till present. *Expert Opin Ther Patents*, **2012**, *22*, 1453-1465.
- ⁴ Ding, D.; Meng, Q.; Gao, G.; Zhao, Y.; Wang, Q.; Nare, B.; Jacobs, R.; Rock, F.; Alley, M. R.; Plattner, J. J.; *et al.* Design, synthesis, and structure-activity relationship of *Trypanosoma brucei* leucyl-tRNA synthetase inhibitors as antitrypanosomal agents. *J Med Chem*, **2011**, *54*, 1276-1287.
- ⁵ Van de Vijver, P.; Ostrowski, T.; Sproat, B.; Goebels, J.; Rutgeerts, O.; Van Aerschot, A.; Waer, M. and Herdewijn, P. Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as potent and synergistic immunosuppressants. *J Med Chem*, **2008**, *51*, 3020-3029.
- ⁶ Cassio, D.; Lemoine, F.; Waller, J. P.; Sandrin, E.; Boissonnas, R. A. Selective inhibition of aminoacyl synthetases by aminoalkyl adenylates ribonucleic acid. *Biochem*, **1967**, *6*, 827-836.
- ⁷ Southgate, C. B; Dixon, H. B. Phosphonate analogues of aminoacyl adenylates. *Biochem J*, **1978**, *175*, 461-465.
- ⁸ Heacock, D.; Forsyth, C. J.; Shiba, K.; Musiter-Forsyth, K. Synthesis and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitory of prolyl adenylate analogs. *Bioorganic Chem*, **1996**, *24*, 273-289
- ⁹ Hill, J. M.; Yu, G, Shue, Y. K.; Zydowsky, T. M.; Rebek, J. (Cubist Pharmaceuticals Inc.). Aminoacyl adenylate minics as novel antimicrobial and antiparasitic agents. *US patent 5,726,195*, **1998** (a).
- ¹⁰ Cubist Pharmaceuticals Inc. Aminoacyl sulfamides for the treatment of hyperproliferative disorders. *WO 98/41215*, **1998** (b).
- ¹¹ Desjardins, M.; Garneau, S.; Desgagnés, J.; Lacoste, L.; Yang, F.; Lapointe, J.; Chênevert, R. Glutamyl adenylate analogues are inhibitors of glutamyl-tRNA synthetase. *Bioorganic Chem*, **1998**, *26*, 1-13.
- ¹² Yu, X. Y.; Hill, J. M.; Yu, G.; Wang, W.; Kluge, A. F.; Wendler, P.; Gallant, P. Synthesis and structure-activity relationships of a series of novel thiazoles as inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, *9*, 375-380.
- ¹³ Werner, R. G.; Thorpe, L. F.; Reuter, W.; and Nierhaus, K. H. Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase. *Biochem J*, **1976**, *68*, 1-3.
- ¹⁴ Forrest, A. K.; Jarvest, R. L.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A.J.; Sheppard, R.J. Aminoalkyl adenylate and aminoacyl sulfamate intermediate analogues differing greatly in affinity for their cognate *Staphylococcus aureus* aminoacyl tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem Lett.*, **2000**, *10*, 1871-1874.
- ¹⁵ Ataide, S. F.; Ibbá, M.; Small molecules: big players in the evolution of protein synthesis. *ACS Chem Biol*, **2006**, *1*, 285-297.

- ¹⁶ Vijver, P.V.; Vondenhoff, G.; Kazakov, T.S.; Semenova, E.; Kuznedelov, K.; Metlitskaya, A.; Aerschot, A. V.; Severinov, K. Synthetic Microcin C analogs targeting different aminoacyl-tRNA synthetases. *J Bact*, **2009**, *191*, 6273-6280.
- ¹⁷ Jarvest, R. L.; Berge, J. M.; Houge-Frydrych, C. S. V.; Janson, C.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A.; Saldanha, A.; Qiu, X. Interaction of tyrosyl aryl dipeptides with *S. aureus* tyrosyl tRNA synthetase: inhibition and crystal structure of a complex. *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, *9*, 2859-2862.
- ¹⁸ Duchene, A. M.; Giritch, A.; Hoffmann, B.; Cognat, V.; Lancelin, D.; Peeters, N. M.; Zaepfle, M.; Maréchal-Drouard, L.; Small, I. D. Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, **2005**, *102*, 16484-16489.
- ¹⁹ Bonnefond, L.; Fender, A.; Rudinger-Thirion, J.; Giege, R.; Florentz, C.; Sissler, M. Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochem* **2005**, *44*, 4805-4816.
- ²⁰ Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/Welcome.do).
- ²¹ SmithKline Beechman PLC. 2-NH-pyridones and pyrimidin131s as MRS inhibitors. WO 00/71524 A. **2000** (a).
- ²² SmithKline Beechman PLC. Benzimidazole derivatives and their use as methionyl-tRNA synthetase inhibitors. WO 00/71522 A1. **2000** (b).
- ²³ Merck & Co Inc. Novel prolines as antimicrobial agents. WO 00/66119. **2000** (a).
- ²⁴ Jackson, K. E.; Habib, S.; Frugier, M.; Hoen, R.; Khan, S.; Pham J. S.; Ribas de Pouplana, LI.; Royo M.; Santos, MA. S.; Sharma, A.; Ralph, S. A. Protein translation in *Plasmodium* parasites. *Trends Parasitol*, **2011**, *27*, 467-476.
- ²⁵ Jackson, K. E.; Pham, J. S.; Kwek M.; De Silva, N. S.; Allen, S. M.; Goodman, C. D.; McFadden, G. I.; Ribas de Pouplana, LI.; Ralph, S. A. Dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to the apicoplast and cytosol in *Plasmodium falciparum*. *Inter J Parasitol*, **2012**, *42*, 177-186.
- ²⁶ Foth, B. J. and McFadden, G. I. The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol*, **2003**, *224*, 57-110.
- ²⁷ Brown, J. R. Ancient horizontal gene transfer. *Nat Rev Genet*, **2003**, *4*, 121-132.
- ²⁸ Hoepfner, D.; McNamara, C. W.; Lim, C. S.; Studer, C.; Riedl, R.; Aust, T.; McCormack, S. L.; Plouffe, D. M.; Meister, S.; Schuierer, S.; Plikat, U.; Hartmann, N.; Staedtler, F.; Cotesta, S.; Schmitt, E. K.; Petersen, F.; Supek, F.; Glynn, R.J.; Tallarico, J.A.; Porter, J. A.; Fishman, M. C.; Bodenreider, C.; Diagana, T.T; Movva, N.R.; Winzeler, E. A. Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* lysyl-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin. *Cell Host Microbe*, **2012**, *11*, 654-663.
- ²⁹ Farrera-Sinfreu, J.; Español, Y.; Geslain, R.; Guitart, T.; Albericio, F.; Ribas de Pouplana, L.; Royo, M. Solid-phase combinatorial synthesis of a lysyl-tRNA synthetase (LysRS) inhibitory library. *J Comb Chem*, **2008**, *10*, 391-400.
- ³⁰ Brown, P.; Richardson, C. M.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Osborne, N. F.; Pope, A. J.; Walker, G. Molecular recognition of tyrosinyl adenylate analogues by prokaryotic tyrosyl tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem*, **1999**, *7*, 2473-2485.

- ³¹ Forrest, A. K.; Jarvest, R. L.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A. J.; Sheppard, R. J. Analogues of SB-203207 as inhibitors of tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**, *10*, 2263-2266.
- ³² Lee, J.; Kim, S. E.; Lee, J. Y.; Kim, S.Y.; Kang, S. U.; Seo, S. H.; Chun, M. W.; Kang, T.; Choi, S.Y.; Kim, H. O. alkoxysulfamide, N-hydroxysulfamide, and sulfamate analogues of methionyl and isoleucyl adenylates as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**, *13*, 1087-1092.
- ³³ Lee, J.; Kang, S. U.; Kim, S. Y.; Kim, S. E.; Jo, Y. J.; Kim, S. Vanilloid and isovanilloid analogues as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**, *11*, 965-968.
- ³⁴ Lee, J.; Kang, S. U.; Kim, S. Y.; Kim, S. E.; Kang, M. K.; Jo, Y. J.; Kim, S. Ester and hydroxamate analogues of methionyl and isoleucyl adenylates as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**, *11*, 961-964.
- ³⁵ Lee, J.; Kang, S. U.; Kang, M. K.; Chun, M. W.; Jo, Y. J.; Kwak, J. H.; Kim, S. methionyl adenylate analogues as inhibitors of methionyl-tRNA synthetase. *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, *9*, 1365-1370.
- ³⁶ Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, E.; Francis, P.; Shenkin, P. SGLide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem*, **2004**, *47*, 1739-1749.
- ³⁷ Zhu, G.; Yang, F.; Balachandran, R.; Hk, P.; Vallee, R. B.; Curran, D. B.; Day, B. W. Synthesis and biological evaluation of purealin and analogues as cytoplasmic dynein heavy chain inhibitors. *J Med Chem*, **2006**, *49*, 2063-2076.
- ³⁸ Ruda, G. F.; Alibu, V. P.; Mitsos, C.; Bidet, O.; Kaiser, M.; Brun, R.; Barrett, M. P.; Gilbert, I. H. Synthesis and biological evaluation of phosphate prodrugs of 4-phospho-d-erythronohydroxamic acid, an inhibitor of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Chem Med Chem*, **2007**, *2*, 1169-1180.
- ³⁹ Van Vliet, L. D.; Ellis, T.; Foley, P. J.; Liu, L.; Pfeffer, F. M.; Russell, R. A.; Warrenner, R. N.; Hollfelder, F.; Waring M. J. Molecular recognition of DNA by rigid [n]-polynorbornane-derived bifunctional intercalators: synthesis and evaluation of their binding properties. *J Med Chem*, **2007**, *50*, 2326-2340.
- ⁴⁰ Michael Brands, M.; Grande Y. C.; Endermann, R.; Gahlmann, R.; Krüger, J.; Raddatz, S. Pyrimidinone antibiotics-heterocyclic analogues with improved antibacterial spectrum. *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**, *13*, 2641-2645.
- ⁴¹ E. D. Laganis, E. D.; Chenard, B.L. Metal silanolates: organic soluble equivalents for O²⁻. *Tetrahedron Lett*, **1984**, *25*, 5831-5834.
- ⁴² Gomez, M. S.; Piper, R. C.; Hunsaker, L. A.; Royer, R. E.; Deck, L. M.; Makler, M. T.; Vander Jagt, D. L. Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite *P. falciparum*. *Molec Biochem Parasitol*, **1997**, *90*, 235-246.
- ⁴³ Yeh, E.; DeRisi, J. L. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*, **2011**, *9*, e1001138.
- ⁴⁴ He, C.Y.; Shaw, M. K.; Pletcher, C. H.; Striepen, B.; Tilney, L. G.; et al. A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Embo J.*, **2001**, *20*, 330-339.

-
- ⁴⁵ Kang, Y. K.; Shin, K. J.; Yoo, K. H.; Seo, K. J.; Hong, C.Y.; Lee, C.Y.; Park, S. Y.; Kim, D. J.; Park, S. W. Synthesis and antibacterial activity of new carbapenems containing isoxazole moiety. *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**, *10*, 95-99.
- ⁴⁶ Nakamura, T.; Noguchi, T.; Kobayashi, H.; Miyachi, H.; Hashimoto, Y. Mono- and dihydroxylated metabolites of thalidomide: synthesis and TNF- α production-inhibitory activity. *Chem Pharm Bull*, **2006**, *54*, 1709-1714.
- ⁴⁷ McGrath, P.; Li, CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Disc Today*, **2008**, *13*, 394-401.
- ⁴⁸ Angulo-Barturen, I.; Jimenez-Díaz, MB.; Mulet, T.; Rullas, J.; Herreros, E.; Ferrer, S.; Jiménez, E.; Mendoza, A.; Regadera, J.; Rosenthal, P. J.; Bathurst, I.; Pompliano, D. L.; Federico Gómez de las Heras, F.; Gargallo-Viola, D. Selection of competent strains in non-myelodepleted mice engrafted with human erythrocytes. *PLoS One*, **2008**, *3*, 2252.
- ⁴⁹ Carlton, J. M. et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, **2002**, *419*, 512-519.
- ⁵⁰ Marion FlipoM.; Charton, J.; Hocine, A.; Dassonneville, S.; Benoit Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. Hydroxamates: relationships between structure and plasma stability. *J Med Chem*, **2009**, *52*, 6790-6802.

CAPÍTULO 3

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE LIGANDOS
MÚLTIPLES BASADOS EN LOS
 β -AMINOÁCIDOS CISPENTACINA E
ICOFUNGIPEN**

Para la realización de este capítulo se ha contado con la colaboración de la Dra. Eva Novoa, que ha llevado a cabo el *screening* virtual y Noelia Camacho que ha evaluado la actividad *in vitro* de la quimioteca de compuestos aquí presentes.

3.1 Introducción

3.1.1 Diseño de ligandos múltiples (DLM)

La tendencia en química médica para el diseño racional de fármacos que puedan actuar simultáneamente en más de una diana terapéutica, ha aumentado en los últimos años, dejando atrás la filosofía “*magic bullet*”; un único fármaco para cada enfermedad” de Paul Ehrlich¹. Para el tratamiento de enfermedades complicadas como los trastornos neurológicos, el cáncer y HIV entre otras, se requiere de compuestos con actividades múltiples, capaces de interactuar con distintas dianas terapéuticas simultáneamente, es decir con toda una red farmacológica.

Desde hace años, el tratamiento de muchas enfermedades se realiza mediante la administración de un cóctel de fármacos con distintos modos de acción, capaces de aumentar sinérgicamente su eficacia². Son ejemplos la terapia de combinación con artemisina (ACTs) para el tratamiento de la malaria o el tratamiento contra HIV. Un cóctel de fármacos supone la toma de dos o más comprimidos individuales. Sin embargo, los beneficios de dicha terapia muchas veces se ven alterados por la gran cantidad de efectos secundarios así como, por el incumplimiento del tratamiento por parte del paciente sobretodo en enfermedades asintomáticas como la hipertensión³.

Aunque algunos médicos prefieren recetar combinaciones de fármacos para el tratamiento de una enfermedad, ya que supone un menor coste económico y una mayor flexibilidad a la hora de ajustar la dosis terapéutica, una alternativa que disminuye los efectos secundarios son los fármacos multicomponentes; es decir dos o más fármacos son administrados en un sólo comprimido^{4,5}. Recientemente, varios fármacos de este tipo han salido al mercado como Advair[®] para el asma, Advicor[®] para la hipercolesterolemia, Combivir[®] para HIV, Vytorin[®] para combatir las enfermedades cardiovasculares⁶ o Augmentin[®] donde la sinergia entre clavulanato de potasio y amoxicilina aumenta la actividad del antibiótico. No obstante, este tipo de terapia presenta una clara desventaja; no todos los pacientes tienen el mismo metabolismo dando lugar a relaciones farmacodinámicas y farmacocinéticas complejas.

Sumando los avances en el ámbito molecular y genético con los avances en técnicas *in silico*, el diseño racional de fármacos se ha visto incrementado gracias a la posibilidad de utilizar dichas herramientas para la creación de redes farmacológicas.^{7,8} Actualmente, son muchas las investigaciones que se centran en el diseño de ligandos múltiples (DLM) para hallar nuevos medicamentos. El concepto de ligandos múltiples se refiere a los fármacos administrados en un sólo comprimido y con un sólo agente farmacológico capaz de

modular más de una diana terapéutica^{9,10}. Los ligandos múltiples presentan varias ventajas; ofrecen una predicción farmacocinética y farmacodinámica más fiable, reducen posibles adversidades entre medicamentos y resulta un tratamiento menos fatigoso para el paciente.

Conceptualmente, existen dos métodos para generar DLM; conocer un compuesto activo frente a una de las dianas terapéuticas de interés siendo también capaz de interactuar mínimamente con otras dianas terapéuticas o bien conocer dos compuestos, cada uno de los cuales interactúa con una diana concreta pero ambas están terapéuticamente relacionadas¹¹.

Los DLM se pueden clasificar en: 1) Conjugados: donde los dos farmacóforos están unidos covalentemente a un grupo espaciador (*linker*) más o menos largo. Existen espaciadores estables que mantienen los dos farmacóforos unidos para interactuar con receptores próximos en el espacio o bien los hidrolizables que liberan los dos fármacos simultáneamente. Generalmente esta clase de espaciadores contienen un enlace tipo éster, que puede ser hidrolizado por esterasas o bien mediante un óxido nítrico¹²; 2) Fusionados: ambos farmacóforos están unidos formando una sola unidad con dos “caras” diferenciables y 3) Fundidos: normalmente son moléculas pequeñas consideradas estructuras privilegiadas con pequeñas variaciones que son capaz de interactuar con dos receptores a la vez¹³ (Figura 3. 1).

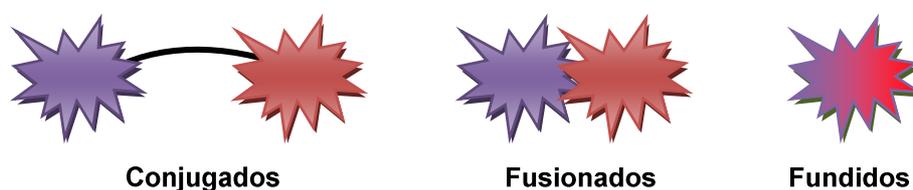


Figura 3. 1. Clasificación de ligandos múltiples según el grado de interacción entre los farmacóforos.

Un ejemplo de DLM conjugados son los ligandos heterobivalentes sintetizados recientemente en nuestro laboratorio¹⁴ que resultan de la unión, de un agonista de D₂R y un antagonista A_{2A}R mediante un espaciador. Dichos compuestos conjugados presentan una afinidad mayor por los receptores A_{2A}-D₂ que los compuestos monovalente por sí solos, constituyendo un nuevo concepto para el tratamiento del Parkinson.

3.1.2 Cispentacina

El ácido (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico comúnmente llamado cispentacina o FR-109615 es un β-aminoácido que se extrajo por primera vez del caldo de cultivo de *Bacillus Cereus* y poco tiempo después fue también aislado de un cultivo de *Streptomyces setonii*

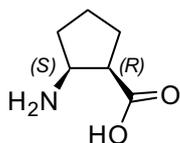


Figura 3. 2
Estructura química
de la cispentacina.

(Figura 3. 2). Su descubrimiento así como sus propiedades fisicoquímicas y biológicas fueron descritas simultáneamente por distintos grupos de investigación en 1989^{15,16,17}. No obstante la mezcla racémica del compuesto se había sintetizado con anterioridad, aunque no se le había atribuido ninguna propiedad biológica^{18,19,20}. Tiene particular interés que el enantiómero (1*S*,2*R*) es totalmente inactivo.

La cispentacina es soluble en medio acuoso y tiene propiedades anfóteras. Muestra poca actividad *in vitro* pero posee una excelente actividad antibiótica y antifúngica *in vivo* frente a distintas especies del género *Candida*, especialmente con *C. albicans* y no muestra toxicidad (1 g/kg) en modelos murinos. Esta diferencia de actividad *in vitro* e *in vivo* indica que es un compuesto que se absorbe correctamente por el sistema gastrointestinal y tiene una larga semivida de eliminación¹⁶.

Al largo de los años se han descrito múltiples síntesis de dicho compuesto. La primera síntesis de la mezcla racémica fue en 1972, mediante una cicloadición [2+2] de clorosulfonil isocianato a un ciclopenteno seguido por una hidrólisis del la β-lactama intermedia¹⁸. Los compuestos enantioméricamente puros, se obtuvieron a partir de la mezcla racémica mediante la formación de dipéptidos y la posterior resolución diastereoisómerica seguida de una degradación de Edman²¹. Pero no fue hasta 1993 que se describió la primera síntesis asimétrica de la cispentacina obtenida por una adición de Michel diastereoselectiva²². No obstante, desde su descubrimiento hasta la fecha se han descrito distintas estrategias para alcanzar el producto enantioméricamente puro, como por ejemplo la cicloadición intramolecular diastereoselectiva de una nitrona,²³ la resolución de la mezcla racémica catalizada enzimáticamente por lipasas²⁴ o la hidrogenación asimétrica de olefinas cíclicas tetrasustituidas²⁵ (Figura 3. 3).

Otras investigaciones se centraron en descubrir el modo de acción de la cispentacina. Esta se transporta al interior de *C. albicans* utilizando un transporte específico de aminoácidos facilitado por permeasas, compitiendo con el sustrato natural L-prolina entre otros aminoácidos. La entrada de la cispentacina al interior celular es también dependiente de bombas H⁺-ATPasa. La ARNts no es capaz de acilar la cispentacina como si de un aminoácido se tratara, no obstante, el compuesto inhibe la incorporación *in vitro* de [¹⁴C]-Lisina en una proteína y [³H]-adenina en el RNA, e *in vitro* se ha observado la inhibición de Pro-ARNt sintetasa. La cispentacina por sí sola no inhibe la biosíntesis de los aminoácidos *in vivo*, pero interfiere en mecanismos de regulación elevando las concentraciones de distintos aminoácidos²⁶.

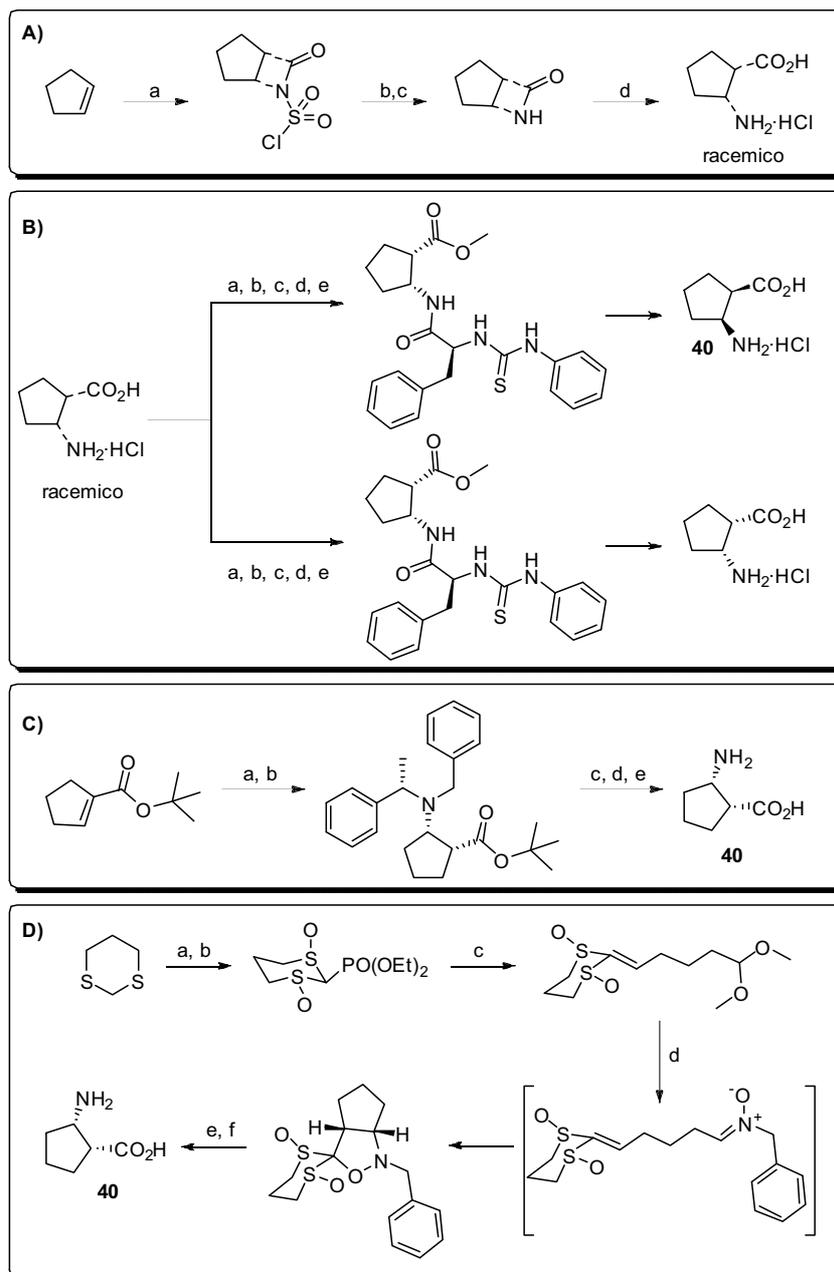


Figura 3. 3. Distintas síntesis de (-)-*cis*-(1*R*,2*S*)-cispentacina³³. A) Síntesis racémica de β -aminoácidos vía cicloadición [2+2]; a) ClSO_2NOC , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 8-10 h, posteriormente t.a., 18 h, 46%; b) KI , NaHSO_4 ; c) NaOH , pH 7, 45%; d) $\text{HCl}_{\text{conc.}}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 45%. B) Síntesis de (-)-*cis*-(1*R*,2*S*)-cispentacina y (+)-*cis*-(1*S*,2*R*)-cispentacina; a) SOCl_2 , MeOH ; b) N -Boc-L-Phe, $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$, $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$, DCM ; c) cristalización fraccionada; d) 4 -N-HCl, AcOEt ; e) isotiocianato de fenilo, EtOH , reflujo; f) 4 -N-HCl, DCM ; g) H_2O , pH 6.7, resina de intercambio aniónico. C) Síntesis asimétrica de (-)-*cis*-(1*R*,2*S*)-cispentacina vía adición de Michel diastereoselectiva; a) Litio (S)-(α -metilbencil)bencilamida, THF , $-95\text{ }^\circ\text{C}$; b) 2,6-di-*terc*-butil-fenol, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 65%, >98% de; c) AcOH , H_2 , Pd/C ; d) HCl metanólico; e) cromatografía de intercambio iónico Dowex 50X8-200. D) Síntesis asimétrica de (-)-*cis*-(1*R*,2*S*)-cispentacina vía cicloadición intramolecular de una nitrona diastereoselectivamente; a) NCS , benceno, t.a., 24 h; $\text{P}(\text{OEt})_3$, $60\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h, 78%; b) 2-hidroperoxipropano-2-il-benceno, $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$, (+)-Tarttrato de dietilo, DCM , 72h, 43%, > 98% e.e. c) 5,5-dimetoxipentanal, LiOH , THF , $80\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h, 80%; d) i) $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$, acetona, $60\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, ii) BnNH_2HCl , NaHCO_3 , t.a., 16 h, 70%; e) Pd/C , AcOH , H_2 , 48 h, 65%, f) $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$, Et_3N , EtOH , $40\text{ }^\circ\text{C}$, H_2 , 4 h, 85%.

Estudios SAR de relación estructura-actividad de β-aminoácidos derivados de la cispentacina (Figura 3. 4) demuestran que tanto el grupo amino primario como el grupo carboxílico son esenciales, siendo el enantiómero ácido (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico, el único que presenta actividad²⁷. El derivado ácido (1*R*,2*S*)-2-aminociclohex-3-enocarboxílico, aunque originalmente fue diseñado como fungicida y herbicida²⁸ para inhibir el cofactor enzimático fosfato de piridoxal (PLP), mostro una fuerte actividad *in vitro* frente a *C. albicans*. No obstante, dicho compuesto fue descartado en estudios toxicológicos, a diferencia del derivado ácido (1*R*,2*S*)-2-amino-4-metilciclopentanocarboxílico conocido como icofungipen (BAY 10-8888 o PLD-118) que dio una actividad parecida a la (1*R*,2*S*)-cispentacina e actualmente se encuentra en fase clínica II a cargo de la farmacéutica *Pliva* con licencia de Bayer.

Por otro lado, algunos dipéptidos, sobre todo aquellos con carácter hidrofóbico como Ile, Leu, Phe y Val, exhiben también actividad frente a *C. albicans*. La estereoquímica (L)-α-aminoácido unido a la cispentacina es esencial para la actividad, ya que los análogos sintetizados con (D)-aminoácidos fueron inactivos. La actividad del dipéptido está asociada a su ruptura mediante proteólisis, liberando la molécula de cispentacina dentro de la célula una vez traspasada la membrana plasmática, actuando estos compuestos como un pro-fármaco.

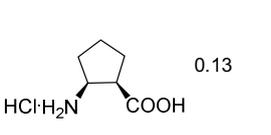
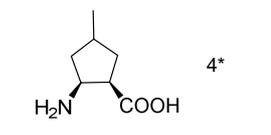
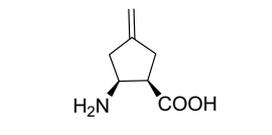
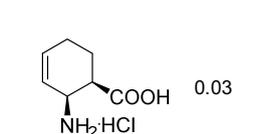
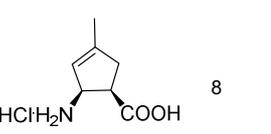
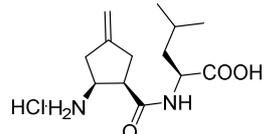
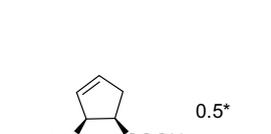
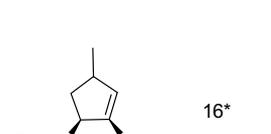
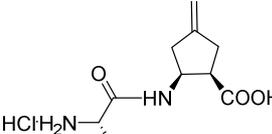
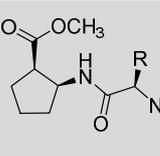
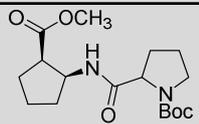
Estructura	IC ₅₀ (mg/L)	Estructura	IC ₅₀ (mg/L)	Estructura	IC ₅₀ (mg/L)
	0.13		4*		0.13
	0.03		8		16
	0.5*		16*		2

Figura 3. 4. Estudios SAR; actividad *in vitro* de algunos β-aminoácidos frente *C. albicans*. *Mezcla racémica.²⁹

Recientemente, se han sintetizado dipéptidos mediante la acilación de la amina de (1*R*,2*S*)-cispentacina con los aminoácidos esenciales Gly, Ala, Val, Leu y Phe, NH-Boc protegidos. Dichos compuestos han sido evaluados *in vitro* frente a *P. falciparum*, con dos cepas distintas; una de ellas sensible (CS) e otra resistente a la cloroquina (CR) con resultados satisfactorios (Tabla 3. 1).

Estructura general	R	IC ₅₀ CS (μM)	IC ₅₀ CR (μM)
	H	18.44	19.87
	CH ₃	17.14	21.87
	CH(CH ₃) ₂	12.14	14.52
	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	9.41	9.21
	CH ₂ C ₆ H ₅	8.96	9.67
		14.56	16.31

Los Phe y Leu dipéptidos, con una IC₅₀ ~9 μM *in vitro*, fueron también evaluados *in vivo en modelos murinos*, sin observarse actividad antimalárica con dosis de 50 y 100 mg/kg día³⁰.

Tabla 3. 1. Estructura y cálculo de la IC₅₀ de los dipéptidos sintetizados y evaluados *in vitro* frente a *P. falciparum* por Shate. M *et al*³⁰.

3.1.3 Icofungipen

El ácido (1*R*,2*S*)-2-amino-4-metilciclopentanocarboxílico conocido y citado anteriormente como icofungipen, presenta el mismo modo de acción que la cispentacina del cual es un derivado sintético. Este, se acumula dentro de las células de los hongos mediante el transporte activo de permeasas de isoleucina, leucina y valina (Figura 3. 5). Presenta actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* inhibiendo específicamente Ile-ARNt sintetasa. Es activo contra distintas especies de hongos como *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton* entre otros, siendo también activo contra algunas bacterias Gram-positivas^{31,32,33}. Sus propiedades farmacocinéticas así como la fácil administración oral, alta solubilidad, tolerabilidad y eliminación, más que no presenta efectos secundarios graves, hacen que sea un buen antifúngico. Según los científicos de Pliva, el compuesto no parece ser metabolizado por el citocromo P450, siendo esta, la enzima principal en el metabolismo de los fármacos, lo que disminuye el riesgo de interacción con otros, pudiendo ser útil en terapias combinadas de fármacos^{34,35}.

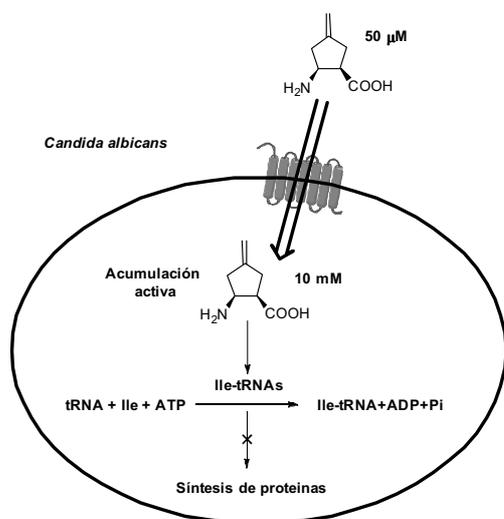


Figura 3. 5. Mecanismo de acción del icofungipen.

3.2. Objetivos

Los parásitos de *P. falciparum*, presentan una alta resistencia frente a fármacos debido a la rápida evolución que les caracteriza. Actualmente, para el tratamiento de la malaria, se administra una combinación de fármacos con artemisina (ACTs). Pese a todos los esfuerzos para frenar la resistencia que presentan los parásitos frente a los fármacos conocidos hasta la fecha, en los últimos años se ha detectado un crecimiento de casos de malaria en zonas endémicas.

Las ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas que presenta el diseño racional de ligandos múltiples para el descubrimiento de compuestos capaces de actuar a distintos niveles subcelulares, que sean capaces de generar respuestas eficaces para el tratamiento de enfermedades complicadas e incluso retrasen la aparición de resistencia al fármaco son una alternativa atractiva para el diseño de nuevos antipalúdicos.

Por todo ello, el objetivo principal de este capítulo es diseñar y sintetizar una quimioteca de ligandos múltiples que sean capaces de interactuar con distintas enzimas ARNt sintetetasas del *P. falciparum*, disminuyendo de este modo el riesgo de crear resistencias. Estos compuestos duales estarán formados por cispentacina e icofungipen como farmacóforos separados por un aminoácido como espaciador (Figura 3. 6).

Hasta la fecha no se ha investigado la actividad antiparasitaria, de ninguno de los dos compuestos, pero se han descrito dipéptidos formados con β -aminoácidos con actividad antimalárica, lo que ofrece una esperanza en esta dirección.³⁰

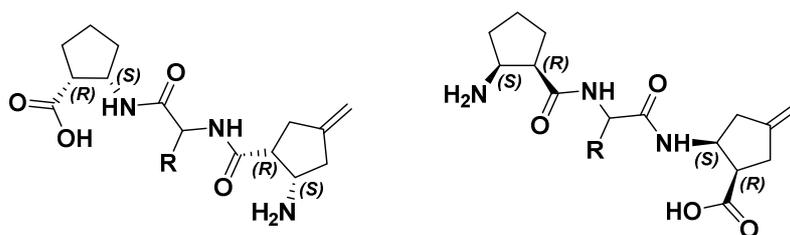


Figura 3. 6. Esquema estructural de la familia de compuestos DLM antimaláricos; Unión de cispentacina e icofungipen mediante un aminoácido que actúa de espaciador o *linker*.

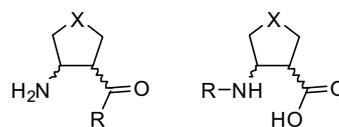
3.3 Resultados y discusión

3.3.1. Diseño virtual de la quimioteca de LM

Elegimos la cispentacina y el icofungipen para formar ligandos múltiples por sus propiedades farmacológicas y farmacodinámicas ya nombradas. Son moléculas solubles en medio acuoso, de bajo peso molecular, reconocidas y transportadas por proteasas y no presentan toxicidad. Ambas actúan inhibiendo específicamente dos enzimas ARNt sintetetas distintas de hongos y bacterias. Por otro lado, el espaciador, un L-aminoácido podría ser reconocido por proteasas, transportando el compuesto al interior celular y una vez dentro liberar ambos farmacóforos, o bien, podría ser reconocido por la ARNt sintetetas del aminoácido espaciador bloqueando el centro activo de la enzima, impidiendo así la proliferación y causando la muerte al parásito.

En primer lugar se diseña una quimioteca virtual de 24 compuestos dipeptídicos de la cispentacina y del icofungipen (Figura 3. 7), con la finalidad de hallar el espaciador óptimo; el aminoácido idóneo para conectar posteriormente ambos fármacos formando un compuesto dual. Además, viendo que los dos compuestos son estructuralmente muy parecidos pero cada uno bloquea una ARNt sintetasa de *C. albicans* distinta, se quiere analizar si el aminoácido unido al fármaco, puede contribuir en la selectividad del compuesto por la enzima, siendo el dipéptido formado capaz de interactuar con una enzima ARNt sintetasa distinta a las descritas en la literatura.

Los L-aminoácidos elegidos para construir la quimioteca virtual fueron Ile, Phe, Leu, Nor, Ala y Gln por su carácter hidrofóbico o su polaridad que pueden ayudar a travesar membranas. Para explorar la relación entre la estructura y la actividad de los compuestos, se unió el aminoácido mediante un enlace peptídico al grupo ácido del fármaco, dejando la amina libre y viceversa, uniéndolo al grupo amina dejando el grupo carboxílico libre. Explorando así la importancia de ambos grupos (libres o acilados) para el reconocimiento de la enzima y la disposición espacial del dipéptido en el centro activo.



X= -CH₂, -CH=CH₂
R= L-Ile, L- Phe, -LNor, L-Ala y L-Gln

Figura 3. 7. Esquema general de los dipéptidos que forman la quimioteca virtual.

Esta primera quimioteca virtual se analizó *in silico*, considerando todas las configuraciones posibles de los β-aminoácidos, frente a las enzimas apicoplásticas Ile-ARNt y Pro-ARNt sintetasa de *P. falciparum*. Por otro lado también se calculó el *docking* con Gln-ARNt

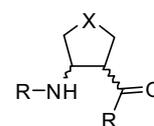
sintetasa citoplasmática de *P. falciparum* para estudiar la influencia del aminoácido unido al fármaco en el reconocimiento enzima-sustrato, así como, para realizar posteriormente ensayos de aminoacilación *in vitro* con dicha enzima pudiendo comparar así los resultados obtenidos *in silico* e *in vitro*.

3.3.2. Docking de la quimioteca virtual de LM

La estructura de las proteínas y el estudio de los compuestos *in silico* fue realizado por la Dra. Eva Novoa del laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona, dentro del proyecto Mephitis.

La mayoría de valores de *GlideScore* obtenidos con el *docking* de la quimioteca virtual de dipéptidos frente a las proteínas PfPRS, PfIRS y PfQRS fueron nulos, hecho que se atribuyó al tamaño de los compuestos; demasiado pequeños para interactuar con la mayoría de residuos que forman el centro activo de las enzimas. Tan sólo se predijo una leve interacción ($GS < -5.50$) entre los dipéptidos formados por el aminoácido natural de carga de la enzima en cuestión, es decir; Ile para PfIRS y Gln para PfQRS indistintamente del β -aminoácido (cispentacina o icofungipen) al que estuviera unido y de la estereoquímica de éste. Este resultado no es de extrañar; si existe una ARNt sintetasa para cada enzima, los centros activos de éstas, están formados por distintos residuos que interactúan con el aminoácido para llevar a cabo la reacción de aminoacilación de forma selectiva y específica. Cabe remarcar, que también se predijo una leve interacción entre los compuestos formados por la L-fenilalanina con las enzimas PfIRS y PfQRS. No se obtuvo ningún resultado del *docking* con la PfPRS, pues ni los farmacóforos ni los aminoácidos ensayados fueron reconocidos por la enzima.

Decidimos diseñar una nueva librería virtual de tripéptidos, aumentando así el peso molecular y el volumen del compuesto que podría facilitar la interacción enzima-sustrato (Figura 3. 8). Para ello unimos un aminoácido en cada extremo libre del β -aminoácido. Posteriormente se predijeron *in silico* las interacciones de dichos compuestos con las enzimas PfIRS y PfQRS, obteniendo unos resultados más esperanzadores (Tabla 3. 2).



X= $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$
R= L-Ile, L- Phe, -LNor, L-Ala y L-Gln

Figura 3. 8. Esquema general de los tripéptidos que forman la quimioteca virtual.

El estudio de las interacciones enzima-sustrato en 3D, pronosticó que el anillo de la fenilalanina ocupaba el mismo espacio que la adenina del sustrato intermedio natural (AA-AMP), mientras que el β -aminoácido ocupaba la misma cavidad que la ribosa del intermedio AA-AMP (Figura 3. 9).

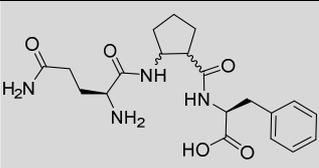
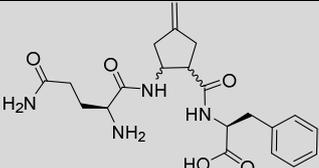
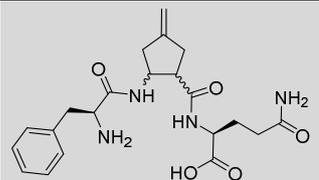
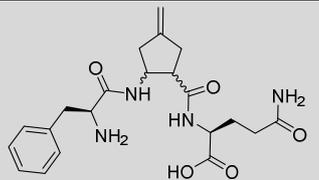
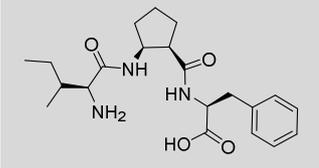
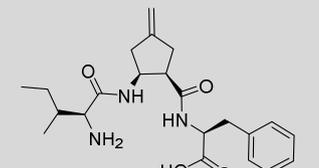
Gln-ARNt sintetasa <i>P. falciparum</i>					
Estructura	Estequiometría	GS	Estructura	Estequiometría	GS
	1R,2S	-7.92		1R,2S	-8.57
	1S,2R	-8.67		1S,2R	-8.33
	1S,2S	-8.36		1S,2S	-9.11
	1R,2R	-6.58		1R,2R	-8.36
	1R,2S	-8.91		1R,2S	-8.77
	1S,2R	-8.63		1S,2R	-9.40
	1S,2S	-9.72		1S,2S	-9.15
	1R,2R	-6.00		1R,2R	-8.98
Ile-ARNt sintetasa <i>P. falciparum</i>					
Estructura	Estequiometría	GS	Estructura	Estequiometría	GS
	1R,2S	-7.27		1R,2S	-5.93

Tabla 3. 2. Estructuras, estereoquímica del β-aminoácido y valores de GS de los tripéptidos con mayor afinidad por las proteínas PfQRS (superior) y PfIRS (inferior).

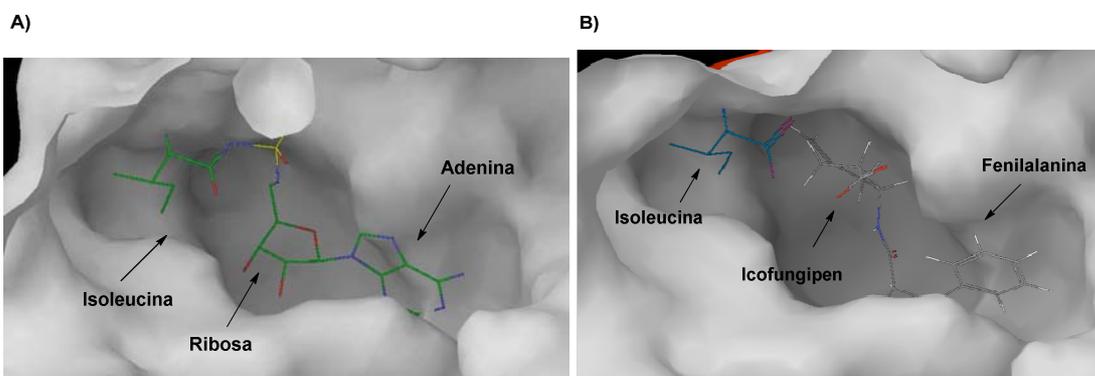


Figura 3. 9. 3D del centro activo de la Ile-ARNt sintetasa apicoplástica de *P.falciparum*, interaccionando con distintos sustratos; A) Posición que adopta el intermedio natural Ile-AMP en el centro activo de la enzima; B) Posición que adopta el dipéptido formado por el icofungipen unido covalentemente a L-fenilalanina cuando está presente el aminoácido natural de la enzima, en este caso Ile.

Considerando estos resultados se decidió sintetizar la cispentacina, el icofungipen y una primera quimioteca de compuestos dipeptídicos con Phe como aminoácido. A estos últimos compuestos se les uniría al otro extremo libre del β-aminoácido los aminoácidos Ile o Gln para intentar aumentar la interacción enzima-sustrato, formando así tripéptidos. (Figura 3. 10). Para ensayar el efecto de la estereoselectividad y aumentar el número de

compuestos a ensayar *in vitro* se decidió sintetizar los mismos compuestos con los isómeros *trans* de la cispentacina; los ácidos (1*S*,2*S*) y (1*R*,2*R*)-2-aminociclopentanocarboxílicos).

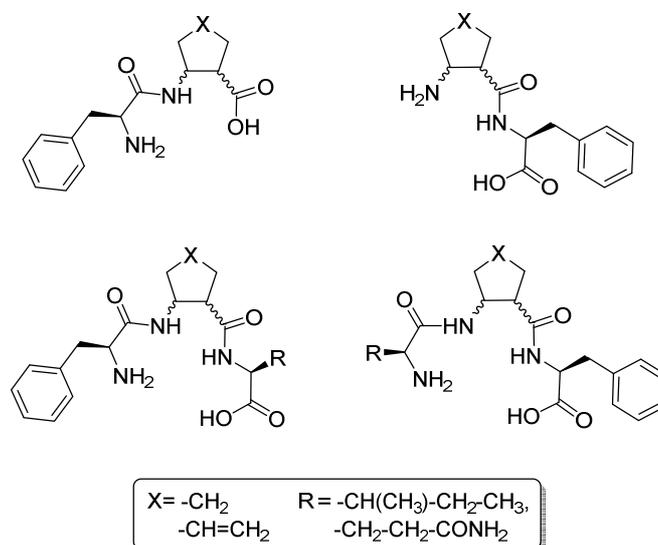


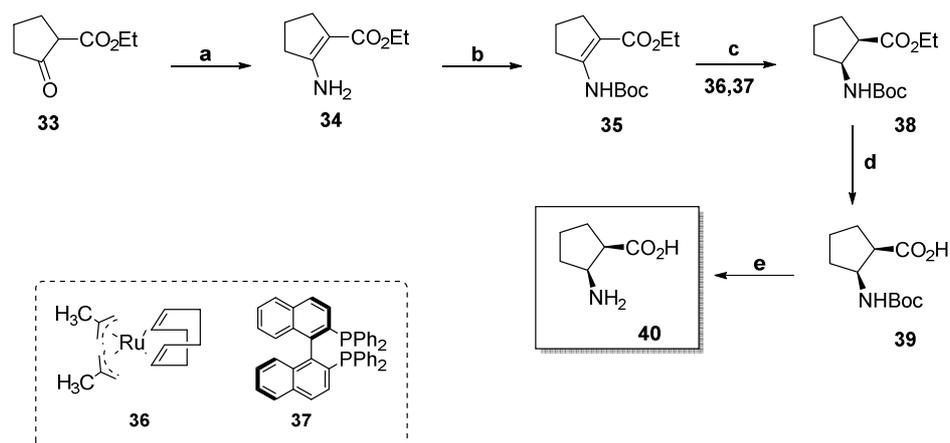
Figura 3. 10. Estructura general de la primera generación de la biblioteca formada por compuestos di- y tri-peptídicos.

Una vez sea evaluada la actividad antimalárica de estos compuestos *in vitro*, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y tras valorar que combinación es más idónea, se diseñará y sintetizará una segunda familia de derivados de dichas estructuras, que contengan los dos farmacóforos unidos por un espaciador de carácter peptídico, formando así una quimioteca de ligandos múltiples posibles inhibidores de distintas ARS de *P. falciparum* o de otros patógenos.

3.3.3. Síntesis asimétrica de la cispentacina

Para evitar obtener mezclas enantioméricas del ácido *cis*-2-aminociclopentanocarboxílico teniendo que recurrir posteriormente a una resolución racémica química o biológica poco eficientes para obtener el enantiómero de interés puro, se decidió sintetizar la cispentacina utilizando la hidrogenación enantioselectiva de derivados cíclicos β-acilaminoacrilato catalizada por un complejo quiral organometálico de rutenio (Esquema 3. 1).^{25,36}

Se sintetizó el β-enaminoéster cíclico 2-aminociclopentenocarboxilato de etilo **34** tratando la cetona cíclica 2-oxociclopentenocarboxilato de etilo **33** con un exceso de acetato de amonio en MeOH anhidro obteniéndose el sólido **34** con un rendimiento excelente. Posteriormente se protegió la amina con el grupo *tert*-butoxicarbonilo utilizando dicarbonato de di-*tert*-butilo en medio básico consiguiendo el aceite 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentenocarboxilato de etilo **35** con un rendimiento del 44%.



Esquema 3. 1. Síntesis asimétrica de la cispentacina. Condiciones; a) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$, $\text{MeOH}_{\text{anh.}}$, t.a, 18 h, 99% rendimiento; b) Boc_2O , Et_3N , EtOH , reflujo, 10 h, 44% rendimiento; c) $\text{Ru}(\text{COD})(\text{Me-allyl})_2$ (2 x 3%), (*R*)-(+)-BINAP (2 x 3%), $\text{HBF}_4 \cdot \text{OEt}_2$ (2 x 6%), H_2 , 50 bar, EtOH , 48 h, 26% rendimiento; d) $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}_{(\text{s})}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1, v/v), 30 °C, 10 h, 85% rendimiento; e) HCl 4 M en 1,4-dioxano, t.a. 50 min, 98% rendimiento.

Como esta etapa de reacción era muy lenta a temperatura ambiente y por HPLC-MS no se observaba una conversión substancial, se decidió evaluar varias condiciones para optimizar la reacción (Tabla 3. 3). Al utilizar piridina como base, se produjo una sustitución nucleófila del grupo Boc sobre el anillo de la piridina imposible de separar del producto por cromatografía *flash*. Al utilizar la base no nucleófila *N,N'*-diisopropiletilamina (DIEA), la reacción resultó ser muy lenta y con el paso del tiempo se formaban más subproductos sin conseguir una conversión superior al 42% pasadas 24 horas. Por último se ensayó la reacción con Et_3N siendo ésta una base no nucleófila pero más fuerte que DIEA. Al utilizar Et_3N como base y disolvente a la vez, calentando la reacción a 90 °C durante 10 horas, se obtuvieron resultados aceptables. El 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentenocarboxilato de etilo **35** se purificó por cromatografía *flash* obteniéndose el producto con una pureza del 88%.

Boc ₂ O (eq)	Base	(eq)	Disolvente	T	t (h)	Conversión (%)	
						34	35
1	Piridina	1	THF	t.a.	15	100	0
3		3	-	80 °C	12	50	30
2	DIEA	2	1,4-dioxano	80 °C	4	93	6
3		2	80 °C	24	40	42	
1.2	Et₃N	2	DCM	t.a.	15	82	10
2		5	DCM	t.a.	15	79	12
2		5	-	90 °C	10	0	60

Tabla 3. 3. Condiciones utilizadas para proteger con un grupo Boc la amina del β-enaminoéster cíclico **34**. La conversión de la reacción se calculó por HPLC-MS a $\lambda = 270$ nm.

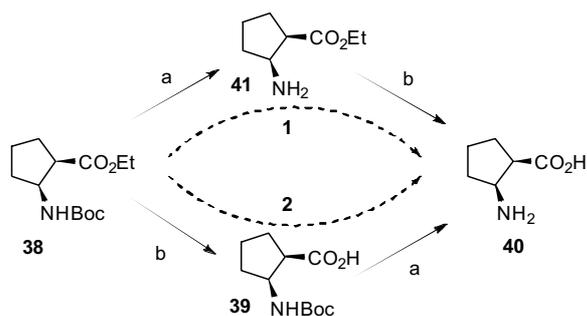
Posteriormente, se hidrogenó enantioselectivamente la *N*-enamina Boc protegida **35** utilizando como catalizador el complejo de Ru(COD)(Me-allyl)₂ **36** y el ligando quiral R-(+)-BINAP **37**. Desde el descubrimiento de dicho compuesto organofosforado³⁷ son muchas las síntesis descritas que lo utilizan para catalizar hidrogenaciones enantioselectivas de β -cetoésteres α -sustituidos, derivados cíclicos β -acilaminoacrilatos, olefinas y enamidas tetrasustituidas entre otros.^{38,39,40,41} La baja racemización que se obtiene utilizando este tipo de ligandos se debe al impedimento estérico que proporciona el ángulo diedro formado por las caras aromáticas del compuesto que dan rigidez al complejo, logrando transformar el sustrato con muy buenos excesos enantioméricos.

Para realizar la reacción de hidrogenación asimétrica es esencial utilizar condiciones anhidras así como pesar el complejo **36** y el ligando organofosforado **37** en una caja seca, pues son sensibles al aire. El catalizador quiral Ru(R-(+)-BINAP)(Me-allyl)₂ se preparó *in situ* seguido de su protonación con HBF₄·OEt₂. Posteriormente se canuló sobre el sustrato **35** dentro de un reactor donde se efectuó la hidrogenación a alta presión. Se ensayaron distintas condiciones de reacción. En la mejor de ellas, se obtuvo una conversión del sustrato del 35%, recuperando un 42% del reactivo de partida **35**. Las condiciones probadas (Tabla 3. 4) mostraron que para que la reacción tuviera lugar se necesitaban tiempos largos. Las mejor condiciones, pero no las óptimas, consistieron en realizar la hidrogenación en dos turnos, es decir añadir nuevo catalizador a las 24 horas y dejar reaccionar la mezcla 48 horas más. El producto (1*R*,2*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxilato de etilo **38**, un sólido blanco que fue purificado por cromatografía *flash* con un rendimiento del 26%.

Ru(Me-allyl) ₂ (COD) (% mmolar)	(<i>R</i>)-(+) -BINAP (% mmolar)	HBF ₄ ·OEt ₂ (% mmolar)	H ₂ P (bar.)	t (h)	Conversión (%)
5	5	10	50	10	0
5	5	10	50	24	15
5	10	15	50	24	25
5	5	10	50	48	30
3+3	3+3	6+6	50	(24+48)	35

Tabla 3. 4. Condiciones utilizada para la hidrogenación asimétrica de **35**. La conversión de la reacción fue calculada por ¹H RMN.

Llegados a este punto, para conseguir la cispentacina **40** podíamos optar por dos rutas distintas (Esquema 3. 2); eliminar primero el grupo Boc dejando la amina libre y proseguir con la hidrólisis del éster (ruta 1) o bien hidrolizar el grupo éster etílico y desproteger la amina posteriormente (ruta 2).



Esquema 3. 2. Rutas posibles para la obtención de **40**. Condiciones; a) HCl 4M en 1,4-dioxano, t. a., 30-50 min; b) Ba(OH)₂·8H₂O_(s) (3 eq), H₂O/THF (1:1), 30 °C, 10 h.

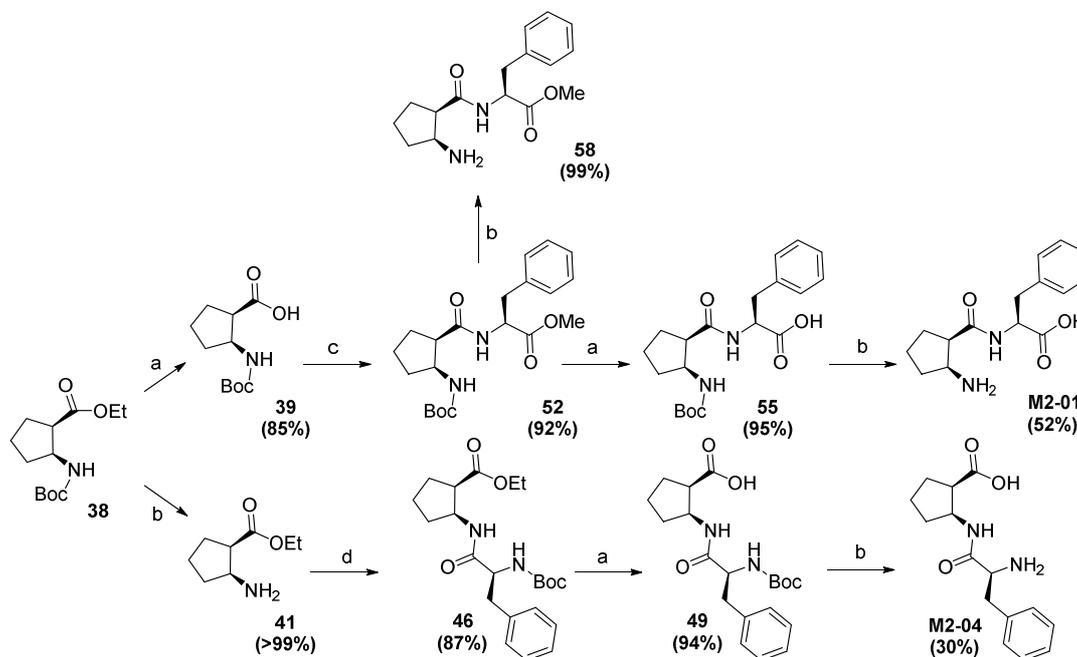
La ruta 1 dio problemas durante la purificación de la cispentacina **40** debido a la gran cantidad de sales producidas durante la hidrólisis del (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxilato de etilo **41**. Se intentaron eliminar las sales pasando el compuesto por una columna de intercambio catiónico SCX asegurándonos previamente la protonación de la amina en medio ácido, pero al intentar extraer las sales con H₂O y H₂O/MeOH (1:1) el producto también se desanclaba de la columna. Intentamos formar la sal del producto con HCl 4 M en 1,4-dioxano para purificar posteriormente el producto mediante una columna SCX pero el precipitado formado no se disolvió correctamente. La solución para obtener la cispentacina **40** fue seguir la otra estrategia planteada (ruta 2); para ello primero se hidrolizó una alícuota del éster etílico **38** con Ba(OH)₂·8H₂O_(s) en una mezcla de H₂O/THF (1:1, v/v). No se utilizó LiOH_(s) porque en pruebas anteriores se detectó epimerización en el C1 del compuesto al utilizar dicha base. La mezcla de la reacción se pasó a través de una columna de intercambio iónico Dowex 50WX4-50 reduciendo el número de sales en el crudo. El ácido (1*R*,2*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxílico **39** se obtuvo como sólido blanco después de ser liofilizado con un rendimiento del 85%. Posteriormente se eliminó el grupo protector Boc y se precipitó el ácido (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico **40** en Et₂O obteniendo un sólido blanco con un rendimiento del 98%. Se caracterizó el producto por ¹H, ¹³C-RMN y HRMS (ES⁺) y se calculó su rotación óptica específica siendo ésta del mismo signo, es decir levógiro, como la descrita en la literatura¹⁵.

3.3.4. Síntesis de derivados de la cispentacina

A partir de (1*R*,2*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxilato) de etilo **38**, procedimos a la síntesis de los dipéptidos y tripéptidos derivados de la cispentacina. Para ello utilizamos los L-aminoácidos comerciales Phe, Ile y Gln protegidos por el grupo carboxílico con un éster metílico (L-AA-OMe) o bien *N*-protegidos por el grupo *tert*-butoxido (Boc-L-AA) y utilizando la Boc-glutamina tritilo amida protegida (Boc-L-Gln(Trt)-OH).

El compuesto **38** se dividió en dos partes iguales; en una de ellas, se hidrolizó el éster, utilizando el procedimiento anteriormente descrito con Ba(OH)₂·8H₂O_(s) y neutralizando el crudo con columna de intercambio iónico Dowex 50WX4-50, obteniendo el compuesto

ácido (1*R*,2*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxílico **39** con un rendimiento del 87%. Con la parte restante se procedió a la eliminación del grupo Boc con una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano a t.a. obteniéndose el (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxilato de etilo **41** con un rendimiento superior al 99%.



Esquema 3. 3. Síntesis derivados dipeptídicos de la cispentacina. Condiciones; a) Ba(OH)₂·8H₂O_(s) (2 o 3 eq), H₂O/THF (1:1, v/v), t.a. a 30 °C, 1-10 h; b) HCl 4 M en 1,4-dioxano, t. a., 30-50 min; c) L-Phe-OMe (1.2 eq), EDC·HCl (1.2 eq), HOBT·H₂O, Et₃N (3 eq), t.a., 12-18 h; d) Boc-L-Phe (1.2 eq), EDC·HCl (1.2 eq), HOBT·H₂O, Et₃N (3 eq), t.a., 12-18 h.

Posteriormente se hizo reaccionar **39** y **41** con el aminoácido L-Phe-OMe y Boc-L-Phe respectivamente utilizando EDC·HCl y HOBT·H₂O como agentes acoplantes, obteniéndose así los dos primeros dipéptidos protegidos **46** y **52** con rendimientos del 87 y 92% respectivamente (Esquema 3. 3). Seguidamente se procedió a la hidrólisis del éster **46** y a la eliminación del grupo Boc de **52** utilizando los mismos procedimientos anteriormente descritos, logrando los compuestos **49** y **58** con un rendimiento del 94 y 99% respectivamente. Una pequeña alícuota de los compuestos **49** y **58** se hidrolizó totalmente para adquirir los dipéptidos finales **M2-01** y **M2-04** que serían posteriormente purificados por Prep-HPLC-MS.

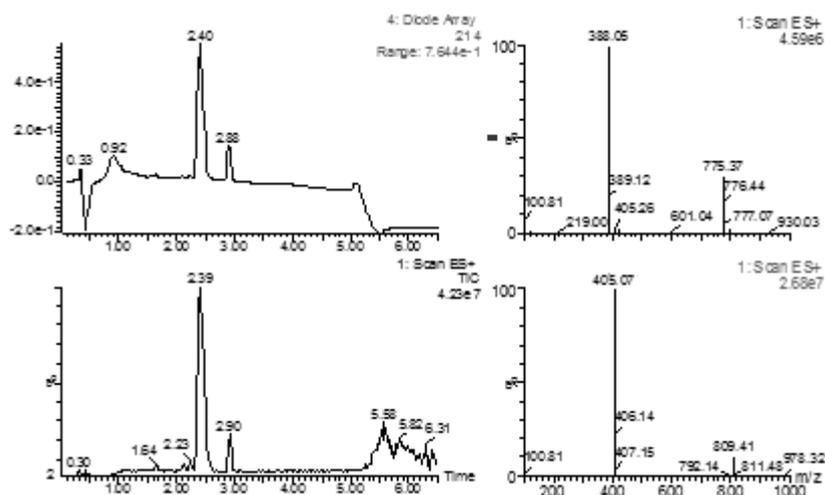
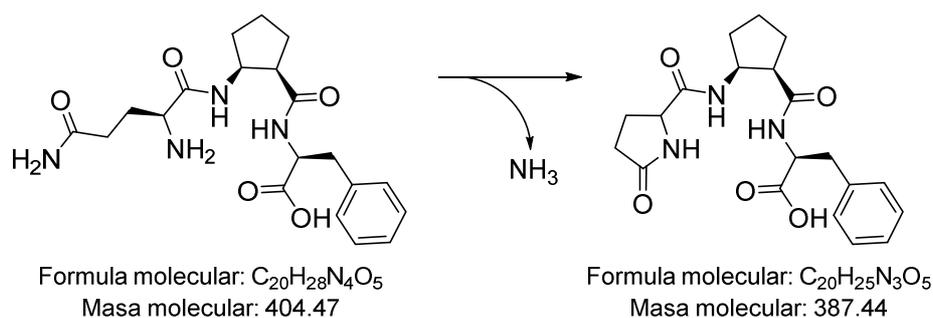


Figura 3. 11. Obtención del subproducto derivado del ácido piroglutámico por ciclación intramolecular espontánea en medio ácido de la glutamina.

Durante la síntesis de los compuestos intermedios descritos anteriormente, no fue necesario purificar los crudos obtenidos en las etapas de acoplamiento de aminoácidos, pues en general, las reacciones transcurrían de forma limpia y después de proceder a una extracción líquido-líquido, eliminando en la fase acuosa el exceso de reactivos, se obtenían los crudos con purzas superiores al 80% detectadas por HPLC-MS a $\lambda = 214$ nm (ver tabla en la apartado 3.2.1 de la experimental). Los productos finales fueron purificados por Prep-HPLC-MS a distintos gradientes lineales en condiciones ácidas detectando la masa molecular + 1 de los compuestos. Las purzas de los liofilizados se determinaron por HPLC-MS analítico a $\lambda = 214$ nm en condiciones ácidas (A: $H_2O:HCOOH$ (99.9:0.1, v/v); B: $ACN:HCOOH$ (99.3:0.7, v/v)), con gradiente lineales de 5-100% de B en 4.5 min, a un flujo de 1 ml/min (ver tabla en la apartado 3.3.1 de la experimental). En conjunto se sintetizó el ácido carboxílico (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentano **40** y seis derivados de este, dos del los cuales eran dipéptidos y los cuatro restantes tripéptidos, todos con purzas superiores al 92% a excepción del producto **M2-16** con una pureza del 83% (Figura 3. 12). Los compuestos fueron disueltos en H_2O a una concentración 5 mM y entregados al laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona para proceder a los ensayos de actividad *in vitro* frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum*.

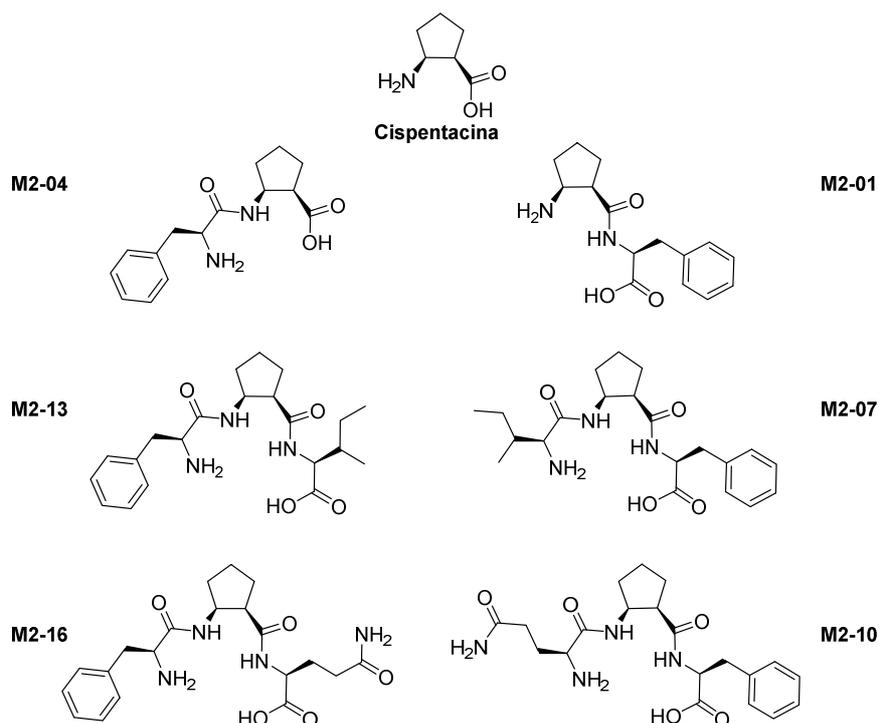


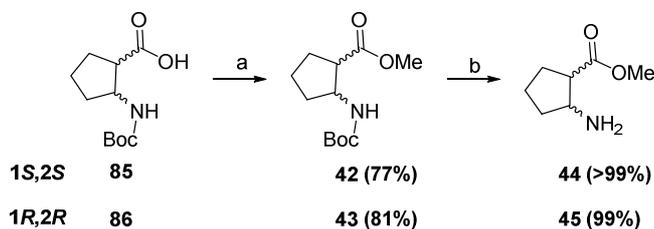
Figura 3. 12. Estructura de los derivados sintetizados de la cispentacina.

3.3.5. Síntesis de derivados de los ácidos (1S,2S) y (1R,2R)-2-aminociclopentanocarboxílico

El enantiómero ácido (1S,2R)-2-aminociclopentanocarboxílico no muestra actividad biológica frente a *C. albicans*. Tampoco se ha descrito ninguna actividad de sus diastereoisómeros *trans* (1S,2S) y (1R,2R) como inhibidores de ARS. No obstante, desconocemos si dichos compuestos o derivados peptídicos de estos diastereoisómeros *trans* serán capaces de interactuar con ARS de *P. falciparum* inhibiendo su funcionalidad enzimática. Por otro lado, con los resultados obtenidos con el *docking* virtual, no pudimos predecir que isomería geométrica sería más favorable, así pues optamos por sintetizar a partir de los compuestos comerciales ácido (1S,2S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxílico **85** y su enantiómero ácido (1R,2R)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxílico **86**, los dipéptidos y tripéptidos análogos con el fin de explorar su actividad antimalárica frente a *P. falciparum* *in vitro* y poder correlacionar la actividad de los compuestos con su estructura, pues según la isomería geométrica *cis-trans* los compuestos adoptan una disposición distinta en el espacio que puede favorecer o no a la interacción entre la enzima y el inhibidor.

Para ello, se formó el éster metílico de los compuestos **85** y **86** disueltos en MeOH con una solución de trimetilsilildiazometano 2 M en Et₂O obteniéndose los derivados **42** y **43** con un rendimiento del 77 y 81 % respectivamente (Esquema 3. 5). Se utilizó TMSD al ser una alternativa menos explosiva y tóxica que el agente alquilante diazometano. Posteriormente

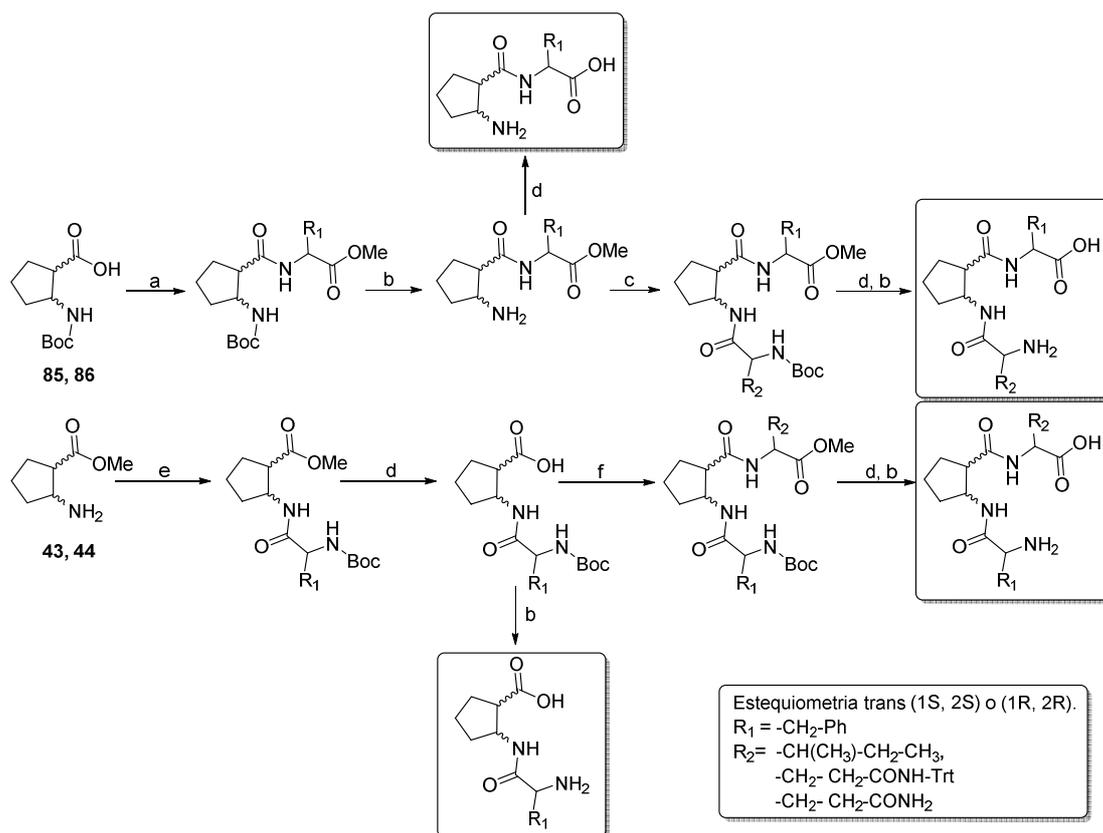
se eliminó en condiciones ácidas el grupo Boc de la amina obteniendo el (1*S*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxilato de metilo **44** y su enantiómero **45** con un rendimiento del 99% en ambos casos.



Esquema 3. 5. Síntesis de (1*S*,2*S*) y (1*R*,2*R*)-2-aminociclopentanocarboxilato de metilo. Condiciones; a) TMSD 2M en Et₂O, MeOH, 0 °C, 10 min, 77 y 81% rendimiento respectivamente; b) HCl 4 M en 1,4-dioxano, t.a, 30 min, 99% rendimiento en ambos casos.

A partir de los 4 bloques sintéticos **85**, **86**, **44** y **45** se sintetizó el resto de derivados, utilizando la misma ruta sintética que la descrita anteriormente para los derivados de la cispentacina basada en acoplamiento entre aminoácidos y desprotecciones de los grupos funcionales convenientes para formar los di- y tri- péptidos correspondientes (Esquema 3. 6) (ver tabla en la apartado 3.2.1 de la experimental).

En total se sintetizaron 12 compuestos clasificados en dos grupos, cada uno de ellos compuesto por seis compuestos según su isomería (1*S*,2*S*) y (1*R*,2*R*). Dentro de cada subgrupo dos de los compuestos eran dipéptidos (**M2-02**, **M2-05** y **M2-03**, **M2-06**) y los cuatro restantes tripéptidos (**M2-08**, **M2-11**, **M2-14**, **M2-16** y **M2-09**, **M2-12**, **M2-15** y **M2-18**). Los métodos de purificación fueron los mismos que los utilizados con los derivados de la cispentacina. Una vez purificados, los compuestos fueron disueltos en H₂O a una concentración 5 mM y entregados al laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona para proceder con los ensayos de actividad antimalárica *in vitro* (ver tabla en la apartado 3.3.1 de la experimental).



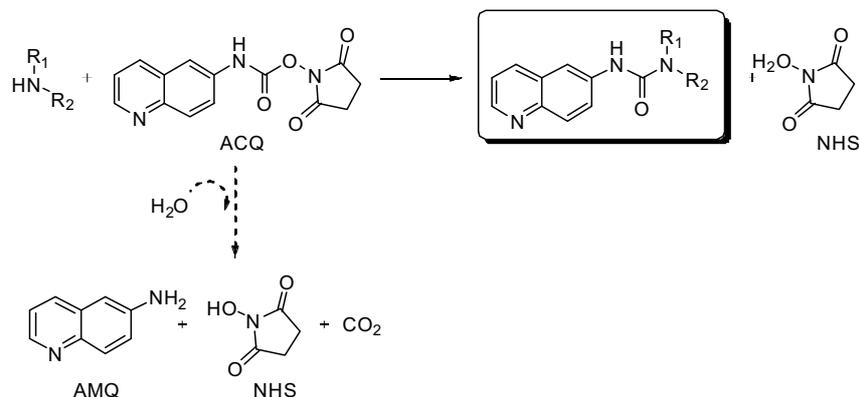
Esquema 3. 6. Síntesis de los derivados di y tri-peptídicos del ácido (1S,2S) y (1R,2R)-2-aminociclopentanocarboxílico. Condiciones; a) L-Phe-OMe (1.2 eq), EDC·HCl (1.2 eq), HOBt·H₂O, Et₃N (3 eq), t.a., 12-18 h; b) HCl 4 M en 1,4-dioxano, t.a., 30-50 min; c) Boc-L-Ile (1.2 eq) o Boc-L-Gln(Trt)-OH (1.2 eq), EDC·HCl (1.2 eq), HOBt·H₂O, Et₃N (3 eq), t.a., 12-18 h; d) Ba(OH)₂·8H₂O_(s) (2 eq), H₂O/THF (1:1, v/v), t.a., 1-2 h; e) Boc-L-Phe- (1.2 eq), EDC·HCl (1.2 eq), HOBt·H₂O, Et₃N (3 eq), t.a., 12-18 h; f) L-Ile-OMe (1.2 eq) o L-Gln-OMe (1.2 eq), EDC·HCl (1.2 eq), HOBt·H₂O, Et₃N (3 eq), t.a., 12-18 h.

3.3.6. Análisis de aminoácidos de los derivados de los ácidos (1R,2S), (1S,2S) y (2R,2S)-2-aminociclopentanocarboxílico

Como los productos liofilizados pueden retener agua y sales que pueden modificar la concentración exacta de los productos disueltos utilizados en los ensayos de actividad antimalárica *in vitro*, decidimos elegir al azar 3 productos (**M2-04**, **M2-13** y **M2-15**) de los 18 compuestos sintetizados con la finalidad de cuantificar el contenido de aminoácidos presente en los compuestos y extrapolar los resultados obtenidos al resto de derivados.

Los análisis de aminoácidos fueron llevados a cabo por los servicios científicos y técnicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB) por HPLC-UV después de hidrolizar y derivatizar las muestras con 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidilcarbamato (AQC). Dicho compuesto reacciona rápidamente con aminoácidos primarios y secundarios formando productos estables detectables por UV o fluorescencia. El exceso del reactivo AQC es hidrolizado a

AMQ, NHS y CO₂ sin interferir en la detección de los aminoácidos derivatizados⁴² (Esquema 3. 7).



Esquema 3. 7. Derivatización con ACQ de los aminoácidos previamente hidrolizados e hidrólisis del exceso de ACQ.

El compuesto con menor cantidad de aminoácidos detectados fue **M2-15** con un 88%, seguido por **M2-04** con un 89% y **M2-13** con un 99%. Teniendo en cuenta la media de los resultados obtenidos estimamos que los compuestos contenían aproximadamente un 3% de agua y sales retenidas en el producto sólido liofilizado.

3.3.7. Evaluación *in vitro* de los derivados de los ácidos (1*R*,2*S*),(1*S*,2*S*) y (2*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico

La cispentacina y los 17 compuestos sintetizados fueron entregados a una concentración 5 mM en medio acuoso al laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona encabezado por Dr. Lluís Ribas para ensayar su actividad *in vitro* contra *P. falciparum*.

Se evaluó la capacidad de los compuestos para inhibir el crecimiento de los cultivos previamente sincronizados de *P. falciparum* de la cepa 3D7A a las 48 y 96 horas posteriores de su adición al medio de cultivo. La parasitemia de los cultivos se determinó por citometría de flujo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.1.2.6 de la experimental.

El ácido (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico **40** no mostró actividad antimalárica *in vitro* a bajas concentraciones (Figura 3. 13). A 250 μM y transcurridas 48 horas se calculó una inhibición del crecimiento del cultivo inferior al 10% sin registrarse actividad antimalárica a las 96 horas. Estos resultados podrían explicarse por dos motivos; el compuesto se degrada y pierde eficacia con el tiempo sin llegar a la diana terapéutica o bien el efecto antimalárico es tan pequeño que los parásitos logran restablecer la parasitemia del cultivo en un sólo ciclo. No obstante, al duplicarse dicha concentración, se

observó un notable aumento de la actividad antimalárica a las 96 horas inhibiendo el 95% de la parasitemia que no se correlacionó con la actividad explorada a las 48 horas que fue del 25%. Estos resultados, no anulan ninguna de las conjeturas anteriores pues la concentración administrada es suficientemente grande para ser tóxica y/o saturar el cultivo sin poder apreciarse signos de descomposición del compuesto. Los datos adquiridos a 500 μM nos sugieren que el compuesto tiene una baja permeabilidad celular y/o actúa a nivel apicolástico. A falta de un estudio *in vitro* más detallado para estudiar la actividad del compuesto en un ensayo de aminoacilación con las proteínas purificadas de *P. falciparum*, no podemos afirmar ni rechazar ninguna de las suposición aquí planteadas.

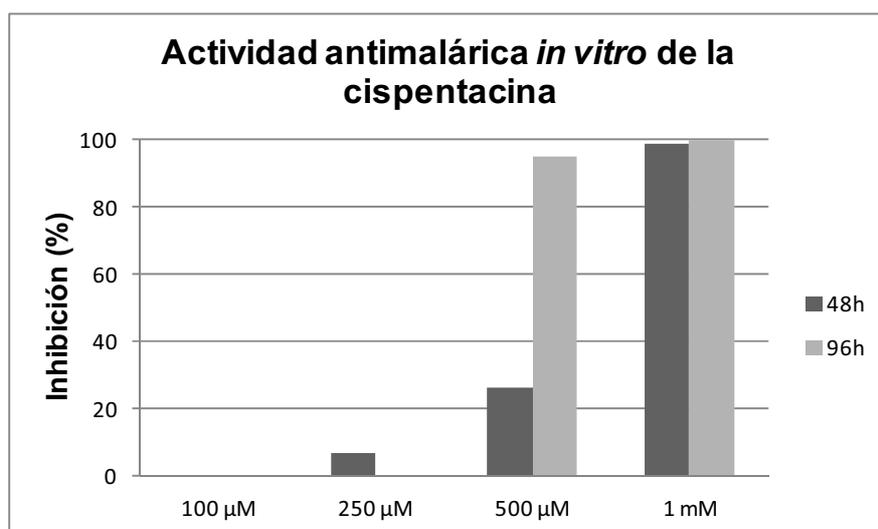


Figura 3. 13. Ensayo *in vitro* de la inhibición parasitaria en un cultivo de 3D7A de *P. falciparum* tratado con distintas concentraciones del ácido carboxílico (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico, **40**.

Los derivados sintetizados de los ácidos 2-aminociclopentanocarboxílicos fueron evaluados a 100 μM , a excepción del compuesto **M2-09** que no pudo ser disuelto en las condiciones del ensayo. Ninguno de los compuestos ensayados mostró una inhibición superior al 10%. En la mayoría de casos el porcentaje de inhibición a las 96 horas llega a cuadruplicar el valor registrado en el primer ciclo de infección (Figura 3. 14).

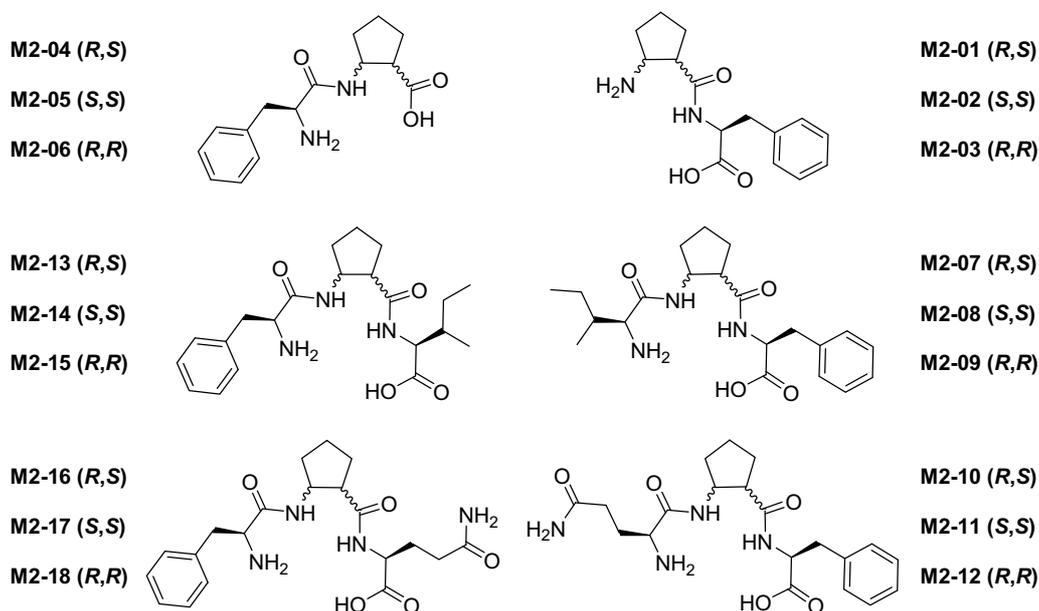
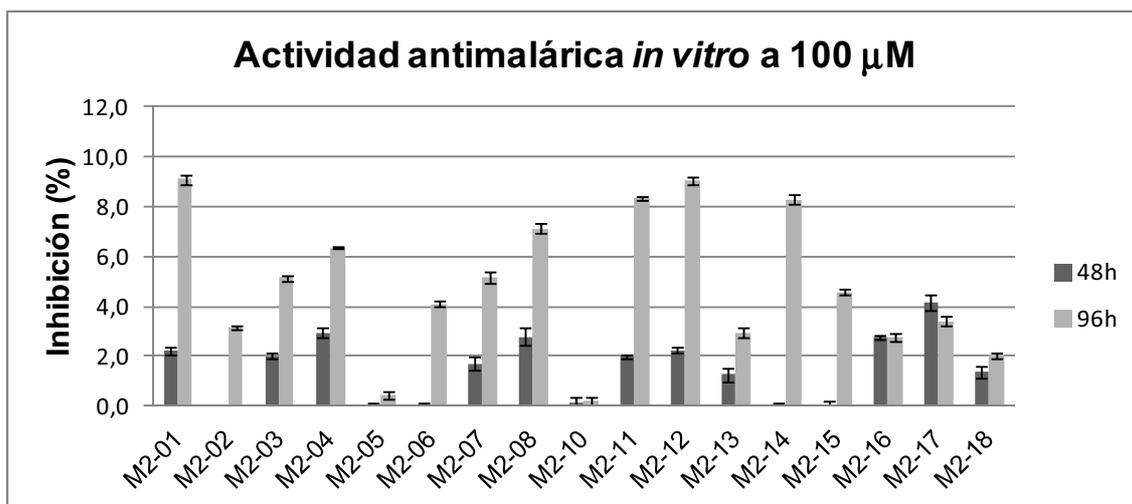


Figura 3. 14. Ensayo de la actividad antimalárica *in vitro* de los derivados peptídicos de los ácidos (1R,2S), (1S,2S) y (2R,2S)-2-aminociclopentanocarboxílicos a 100 μ M frente a un cultivo de 3D7A de *P. falciparum*.

Con los resultados obtenidos no podemos hacer un estudio detallado de la relación entre la actividad y las estructuras de los derivados. Sin embargo, los β -aminoácidos que forman el enlace peptídico a través de su ácido carboxílico y la amina de la L-fenilalanina mostraron mayor actividad que en los que la fenilalanina se unía a través de la amina del β -aminoácido (Figura 3. 15). Por otro lado, no podemos especificar que estereoisómero del β -aminoácido presenta mayor bioactividad.

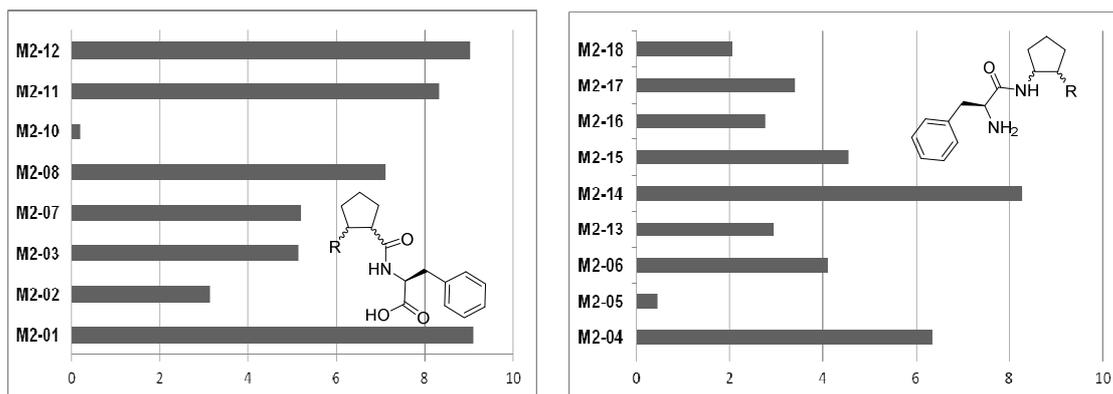


Figura 3. 15. Inhibición de los cultivos de *P. falciparum* a 100 μ M a las 96 h.

La unión de un L- α -aminoácido al β -aminoácido cíclico aumenta la actividad antimalárica *in vitro* respecto al β -aminoácido por sí sólo, pues la cispentacina **40** es menos activa que los péptidos sintetizados. Los compuestos formados son más hidrofóbicos, debido al anillo aromático de la fenilalanina, aumentando la posibilidad de atravesar las membranas celulares por sí solos.

En general, creemos que esta quimioteca de compuestos no muestra actividad antimalárica *in vitro* porque no son correctamente transportados al interior de la célula. No hemos podido realizar ensayos de aminoacilación frente a *P. falciparum* por problemas en la purificación de las enzimas y en la conjugación de los aminoácidos con la ARNt correspondiente, con lo que no podemos descartar dicha hipótesis. Por otro lado, no se han ensayado los efectos antibacterianos o antifúngicos de estos derivados en otros organismos sin poder descartar tampoco, que los parásitos causantes de la malaria tengan un transporte específico de aminoácidos distinto a los utilizados por otros organismos como *C. albicans*.

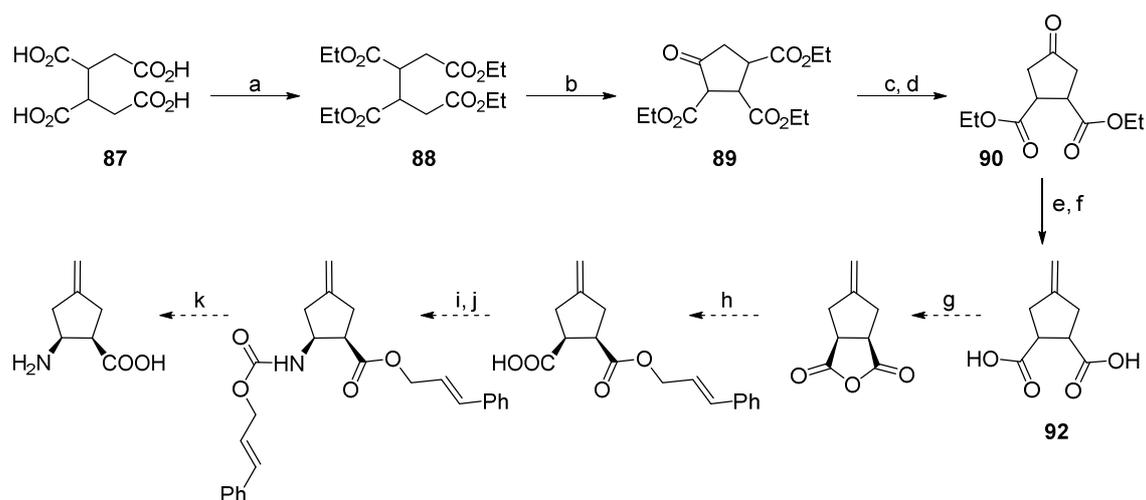
3.3.8. Síntesis parcial del icofungipen

Después del descubrimiento de la cispentacina a finales de los ochenta muchas investigaciones se centraron en la actividad biológica de β -aminoácidos derivados de este. El descubrimiento del icofungipen llegó pocos años más tarde y desde entonces han sido múltiples las patentes publicadas de dicho compuesto^{43,44,45}. Actualmente el icofungipen está siendo desarrollado por la farmacéutica PLIVA y se encuentra desde 2005 en fase clínica II.⁴⁶

3.3.8.1. Síntesis parcial asimétrica del icofungipen

Para llevar a cabo la síntesis asimétrica del icofungipen seguimos el esquema publicado en 2003 por J. Mittendorf^{29,47} con algunas modificaciones (Esquema 3. 8). Para ello, se parte de una esterificación de Fischer del ácido comercial 1,2,3,4-butanotetracarboxílico **86** con cloruro de tionilo⁴⁸ en EtOH obteniéndose el compuesto derivado tetraetiléster **88** cuantitativamente. Mediante una ciclación intramolecular de Dieckmann con Na_(s) en tolueno obtuvimos el β-cetoéster cíclico; 4-oxociclopentano-1,2,3-tricarboxilato de trietilo **89** con un 85% de rendimiento⁴⁹.

Esta ciclación está descrita en la literatura utilizando metóxido de sodio (NaOMe) en MeOH, pero cuando realizamos la reacción con 4.8 eq de NaOMe a t.a. durante 2 horas observamos por HPLC-MS una mezcla de productos que procedían de la transesterificación metílica de los distintos ésteres de butano-1,2,3,4-tetracarboxilato de tetraetilo **88**. Para evitar dichas transesterificaciones, realizamos la reacción con Na_(s) logrando una conversión completa del reactivo, al producto deseado.



Esquema 3. 8. Síntesis asimétrica del icofungipen. Condiciones: a) SOCl₂ (6 eq) en EtOH de 0-80 °C, 30 h, rendimiento >99%; b) Na_(s) en tolueno, 12 h a t.a. y 4 h a 80 °C, 85% de rendimiento; c) HCl_(ac.) concentrado, 100 °C, 12 h d) EtOH, H₂SO_{4(ac.)} catalítico, 80 °C, 15 h, 60% rendimiento en 2 etapas.; e) Ph₃PMeBr_(s) (1.4 eq), t-BuOK_(s) (1.4 eq) en THF_{anh.}; f) KOH_(s) (3 eq) en H₂O, t.a., 15 h ; g) (EtCO)₂O, 135 °C; h) (2E)-3-fenil-2-propen-1-ol (1.5 eq), quinina (1.0 eq), tolueno, -15 °C, 4 h ; i) (PhO)₂PON₃, NEt₃, tolueno, 90 °C; j) 3-fenil-2-propen-1-ol (1.2 eq), tolueno, reflujo; k) Pd(OAc)₂ (0.05 mol%), PPh₃ (1 mol%), morfolina, EtOH, 3-mercapto-1,2,4-triazolo (0.1 eq).

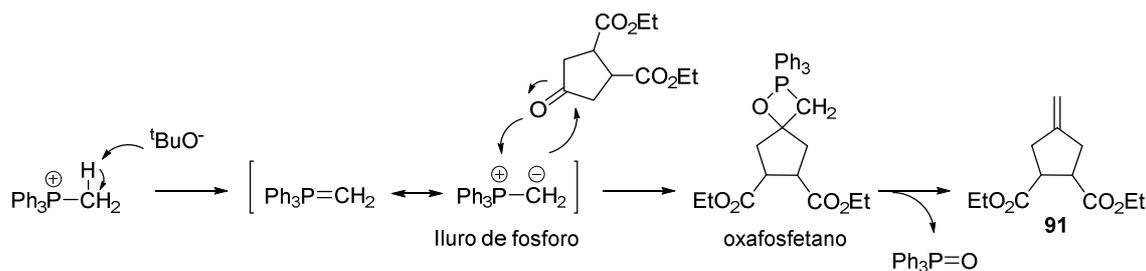
Para obtener el compuesto 4-oxociclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo **90** se requería hidrolizar previamente los ésteres etílicos y proceder posteriormente a la descarboxilación del ácido β-cetocarboxílico. Para optimizar este paso se realizaron distintos ensayos (Tabla 3. 5). Finalmente para llevar a cabo ambos procesos en una sola etapa, prescindiendo de la extracción y purificación del ácido intermedio 4-oxociclopentano-1,2,3-

tricarboxílico, utilizamos HCl_(ac.) al 35% a 100 °C. Una vez eliminado el disolvente y el H₂O formados durante la reacción, esterificamos de nuevo los ácidos carboxílicos disolviendo el crudo con EtOH y acidificando la mezcla con trazas catalíticas de H₂SO_{4 (ac.)} al 96%. El producto 4-oxociclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo **90** fue destilado al vacío a 178 °C obteniéndose el producto como un aceite transparente con un rendimiento total del 60%.

Ácido o base	Disolvente	T (°C)	t (h)	Observaciones
HCl _(ac.) concentrado (5 eq)	MeOH	40	15	Transesterificaciones
HCl _(ac.) 6 M		100	15	Mezcla de productos hidrolizados y esterificados. Descarboxilación de alguno de ellos.
BBr ₃ (4 eq)	DCM	0-t.a.	15	Reacción muy lenta; sólo se hidroliza uno de los ésteres.
LiOH _(s) (20 eq)	H ₂ O/MeOH (1:1)	t.a.	15	Todos los ésteres se hidrolizan. Subproducto mayoritario de [M+1]= 162.70.
NaOH _(s) (3 eq)	H ₂ O	60	6	Se hidroliza un sólo éster.
HCl _(ac.) concentrado	-	100	12	Hidrólisis de los tres ésteres y descarboxilación.

Tabla 3. 5. Condiciones utilizadas para la hidrólisis de los ésteres etílicos del compuesto **89**.

La síntesis asimétrica del icofungipen se complicó en la siguientes dos etapas donde la cetona cíclica **90** se transforma en su derivado 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo **91** mediante la reacción de Wittig seguida por una hidrólisis de los diésteres, para obtener el ácido 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxílico **92**. En la primera etapa se formar el iluro de fosforo *in situ* haciendo reaccionar la sal comercial Ph₃PMeBr con ^tBuOK_(s) en THF en condiciones anhidras y bajo atmosfera de argón a t.a. durante 2 horas. Posteriormente se enfría la reacción con un baño de etilenglicol y nieve carbónica (-12 °C y -15 °C) y se añade gota a gota el 4-oxociclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo **90** disuelto en THF anhidro durante 1 hora, formándose el intermedio oxafosfetano que después de una reorganización electrónica dará paso al cicloalqueno **91**, formándose el óxido de tirifenilfosfina como subproducto de la reacción (Esquema 3. 9). Posteriormente se hidrolizan los ésteres con una solución acuosa de KOH a t.a. durante 15 horas. Para purificar el producto, se evapora el disolvente orgánico, se filtran los sólidos precipitados y se lavan con H₂O. La fase acuosa se extrae con AcOEt para eliminar el Ph₃PO restante y se acidifica con HCl_(ac.) al 35% hasta pH 2 a 0 °C momento en el que el producto debería precipitar. Aunque observamos la formación del producto ácido 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxílico **92** nunca fuimos capaces de aislarlo.



Esquema 3. 9. Formación del derivado cicloalqueno **91** mediante la transformación del ciclopentanona disustituida **90**.

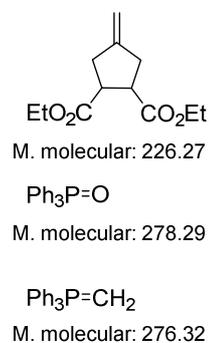
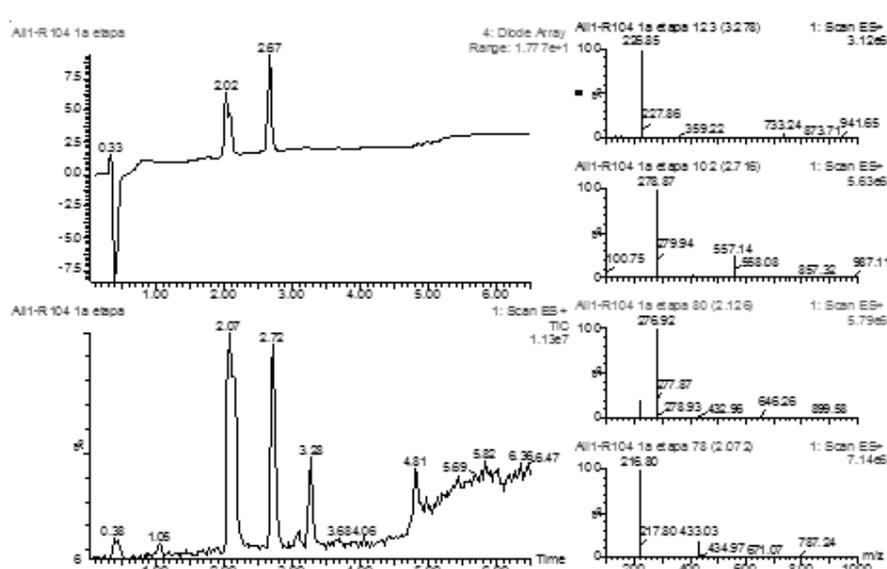
Detectamos la $[M+H]^+$ del 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxilado de dietilo **91** y del ácido 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxílico **92** en los espectros de HPLC-MS al monitorizar las reacciones, aunque no los pudimos cuantificar. Las dos posibles razones por las cuales el compuesto **92** no precipita son; la escala utilizada y la conversión de la reacción. En la literatura donde se describe la reacción, ésta se lleva a cabo a partir de 274 kg⁴⁷ del 4-oxociclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo **90** mientras que nosotros partimos como máximo de 10 g del compuesto. Por otro lado, también se observó por HPLC-MS un subproducto de $[M+H]^+ = 216.80$ que no fuimos capaces de identificar, aunque posiblemente es un derivado que contiene fenilfosfina, pues adsorbe a $\lambda = 224$ nm como PPh_3O y PPh_3CH_2 . No sabemos si dicho producto se forma durante la reacción o proviene del reactivo de partida Ph_3PMeBr , pero probablemente afecta a la conversión de la reacción (Figura 3. 16).

Para cuantificar la reacción de Wittig extrajimos el 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo **91** del crudo de la reacción. Para ello evaporamos el disolvente de la reacción y redisolvimos el crudo en DCM, donde precipitaron parte de los subproductos derivados de la fosfina. Después de extraer la fase orgánica y evaporar el disolvente, se purificó el crudo por cromatografía *flash* manual utilizando hexano/ Et_2O (7:3, v/v) como sistema de elución. Se obtuvo el compuesto **91** con un 2% de rendimiento, que caracterizamos por 1H RMN.

Para asegurarnos de que el iluro de fosforo se formaba correctamente, hicimos otra prueba con tetrametilpiperidina de litio ($LiTMP$) como base no nucleófila pero más fuerte que $tBuOK$. Para ello, generamos la base *in situ* en condiciones anhidras a partir de TMP (3 eq) y $n-BuLi$ 1.6 M en hexano (3.5 eq) en THF_{anh} , manteniendo la reacción entre -20 °C y -50 °C durante 2 horas. Posteriormente añadimos una disolución de Ph_3PMeBr (1.8 eq) en THF_{anh} a -20 °C. Por HPLC-MS observamos la formación del iluro pero no la masa $[M+H]^+ = 216.80$ del subproducto, descartando la posibilidad de que proviniese del reactivo de partida. A partir de este punto procedimos a realizar la reacción sin más modificaciones. No se detectó por HPLC-MS ni el reactivo de partida 4-oxociclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo **90** ni el producto 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxilado de dietilo **91**.

Para estudiar la procedencia o formación del subproducto de $[M+H]^+ = 216.80$ podríamos haber optado por utilizar otra sal de fosfonio generada *in situ* mediante una sustitución nucleófila entre un haloalcano y la trifenilfosfina, no obstante decidimos cambiar de estrategia para generar el ácido 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxílico **92**.

A)



B)

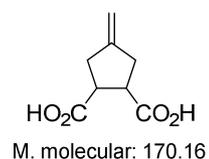
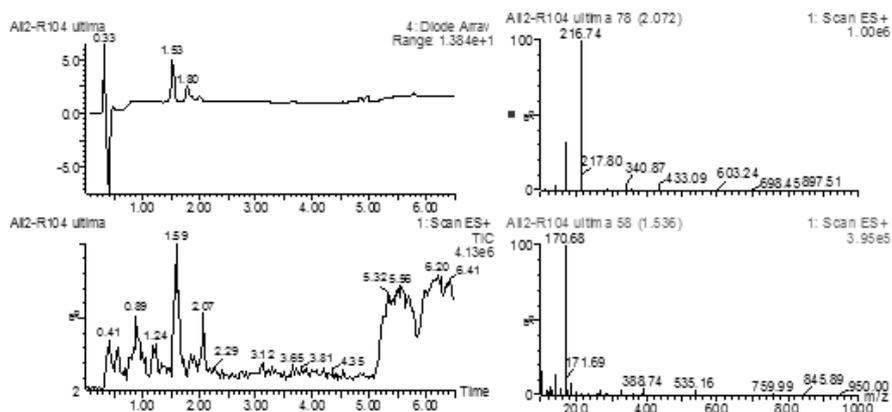
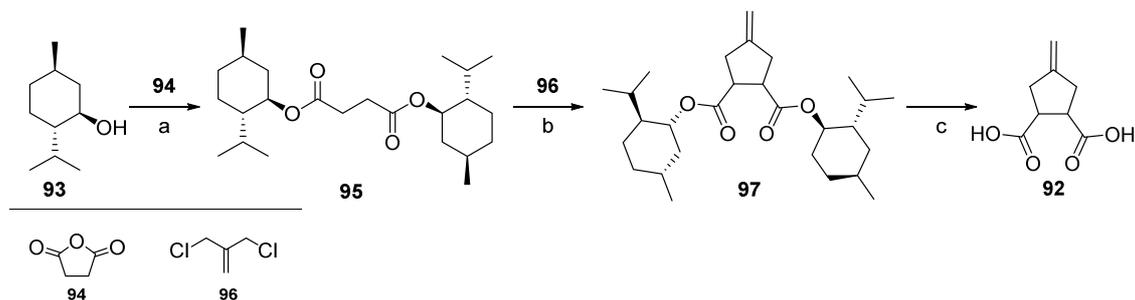


Figura 3. 16. A) Espectro de HPLC-MS de la reacción de Wittig con la cetona cíclica **90**, donde se observa la formación del compuesto **91**, el iluro de fosforo, Ph₃PO y el subproducto de $[M+H]^+ = 216.80$ no identificado; B) Espectro de HPLC-MS de la fase acuosa acidificada (pH 2) después de la hidrólisis de **91** con KOH, donde se observa de $[M+H]^+$ del compuesto **92**.

3.3.8.2. Síntesis alternativa del ácido 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxílico

Como no fuimos capaces de transformar la ciclopentanona disustituida **90** en su derivado metilenciclopentano **91** mediante la reacción de Wittig con buenos rendimientos, decidimos utilizar otra estrategia sintética, con menos etapas de síntesis, para preparar el ácido 4-metilenciclopentano-1,2-dicarboxílico **92** (Esquema 3. 10). Una vez logrado dicho

compuesto, proseguiríamos con la síntesis asimétrica del icofungipen según el esquema 3. 8 anteriormente citado.



Esquema 3. 10. Síntesis alternativa del ácido 4-metilciclopentano-1,2-dicarboxílico 91. Condiciones; a) L-mentol (2 eq), anhídrido succínico (1 eq), *p*-TsOH_{cat.}, en tolueno 24 h a 150 °C, 81% rendimiento; b) TMP (3 eq) y *n*-BuLi 1.6 M en hexano (3 eq) en THF_{anh.}, -20 °C, atm. N₂, 3-cloro-2-clorometil-1-propano (1 eq), -78 °C, 15 h.; c) KOH_(s), MeOH/H₂O (9:1, v/v), 60 °C, 4 h.

Siguiendo el protocolo descrito por Pokorski⁵⁰ se sintetizó el sólido cristalino succinato de (-) dimentilo **95** con un rendimiento del 81% partiendo de L-mentol **93** y anhídrido succínico **94**, catalizando la reacción con ácido *p*-toluensulfónico monohidratado. Seguidamente se preparó la base tetrametilpiperidina de litio (LiTMP) *in situ* en condiciones anhidras a -20 °C y bajo atmósfera de N₂. Posteriormente añadimos gota a gota una disolución de succinato de (-) dimentilo **95** en THF_{anh.}. Se dejó reaccionar la mezcla durante 1 hora a -78 °C para formar el dianión, haciéndolo reaccionar posteriormente con el 3-cloro-2-clorometil-1-propeno **96** durante 15 horas obteniendo un aceite. Proseguimos al tratamiento de la reacción añadiendo una solución saturada de NH₄Cl_(ac.) y acidificando la solución con HCl_(ac.) al 5% hasta pH 3. Analizando la fase orgánica por TLC (hexano/Et₂O (7:3, v/v)) se observó un sólo producto que fue purificado por cromatografía manual con sílica. Dicho compuesto fue determinado por RMN ¹H como L-mentol. Así pues, no se obtuvo el compuesto **97** procedente de una adición electrofílica tal y como esperábamos⁵¹, sino que obtuvimos la hidrólisis del succinato de (-) dimentilo.

Las condiciones anhidras así como la temperatura condicionan el rendimiento de la reacción pudiendo ser la causa por la que la reacción no hubiera tenido lugar. Podríamos haber intentado obtener el producto **97** modificando los equivalentes de LiTMP o utilizando una base no nucleófila más débil que también fuera capaz de formar y estabilizar el anión dienolato. También podríamos haber utilizado el 3-bromo-2-clorometil-1-propeno como dihaluro para dirigir el primer paso de la adición electrofílica.

No obstante, cuando supimos que los compuestos derivados de los ácidos (1*R*,2*S*), (1*S*,2*S*) y (2*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico no mostraban actividad antimalarica *in vitro* decidimos abandonar la síntesis del icofungipen y sus derivados para centrarnos en otras quimiotecas de compuestos.

3.4 Conclusiones

Se ensayó la actividad antimalárica *in vitro* de una quimioteca formada por derivados peptídicos de los ácidos (1*R*,2*S*), (1*S*,2*S*) y (2*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico con la intención de sintetizar una quimioteca de ligandos múltiples utilizando un espaciador de carácter peptídico entre los β -aminoácidos cispentacina e icofungipen, siendo éstos inhibidores específicos de la Pro-ARNt sintetasa y Ile-ARNt sintetasa de *C. albicans* respectivamente.

Dichos compuestos no mostraron actividad *in vitro* frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum* a concentraciones $>100 \mu\text{M}$. No se pudieron realizar ensayos de aminoacilación *in vitro* con dichos compuestos por problemas en la purificación y funcionalización de las enzimas Pro, Ile y Gln ARNt sintetasa de *P. falciparum*. Consecuentemente, no podemos descartar que dichos compuestos no alcancen la diana terapéutica.

Dado las dificultades sintéticas halladas para la obtención del ácido (1*R*,2*S*)-2-amino-4-metilciclopentanocarboxílico (icofungipen) y los resultados *in vitro* anteriormente expuestos, se decidió abandonar la síntesis de la quimioteca de ligandos múltiples para centrarnos en la síntesis de otras quimiotecas de compuestos, con actividad antimalárica, más prometedores.

Referencias

- ¹ Kaufmann, S.H.E. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. *Nat Rev Drug Discov*, **2008**, 7, 373.
- ² Al-Lazikani, B.; Banerji, U.; Workman, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotech*, **2012**, 30, 679-692.
- ³ Eisen, S. A.; Miller, D. K.; Woodward, R. S.; Spitznagel, E.; Przybeck, T. R.. The effect of prescribed daily dose frequency on patient medication compliance. *Arch Intern Med*, **1990**, 150, 1881-1884.
- ⁴ Keith, C. T.; Borisy, A.A. and Stockwel, B.R. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discov*, **2005**, 4, 71-78.
- ⁵ Borisy, A. A. et al. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**, 100, 7977-7982.
- ⁶ Flores, N. A. Ezetimibe + simvastatin (Merck/Schering-Plough). *Curr Opin Investig Drugs*, **2004**, 5, 984-92.
- ⁷ Nacher, J. C. and Schwartz, J. M. A global view of drug-therapy interactions. *BMC Pharmacol.*, **2008**, 8, 5.
- ⁸ Kuhn, M.; Szklarczyk, D.; Franceschini, A.; von Mering, C.; Jensen, L. J.; Bork, P. STITCH 3: zooming in on protein-chemical interactions. *Nucleic Acids Res*, **2012**, 40, 876-880.
- ⁹ Hopkins, A.L.; Mason, J.S.; Overington, J.P. Can we rationally design promiscuous drugs? *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16, 127-136.
- ¹⁰ Dessalew, N. & Workalemahu, M. On the paradigm shift towards multitarget selective drug design. *Curr Comput Aided Drug Des*, **2008**, 4, 76-90.
- ¹¹ Morphy, R. and Rankovic, Z. The physicochemical challenges of designing multiple ligands. *J Med Chem*, **2006**, 49, 4961-4970.
- ¹² Morphy, R.; Kay, C. and Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J Med Chem*, **2005**, 48, 6523-6543.
- ¹³ Morphy, R.; Kay, C. and Rankovic, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *DDT*, **2004**, 9, 641-651.
- ¹⁴ Soriano, A.; Ventura, R.; Molero, A.; Hoen, R.; Casadó, V.; Cortés, A.; Fanelli, F.; Albericio, F.; Lluís, C.; Franco, R.; Royo, M. Adenosine A_{2A} receptor-antagonist/dopamine D_2 receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A_{2A} - D_2 receptor heteromers. *J Med Chem*, **2009**, 52, 5590-602.
- ¹⁵ Konishi, M.; Nishio, M.; Saitoh, K.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H. Cispentacin; a new antifungal antibiotic. *J Antibiot*, **1989**, 42, 1749-1755.
- ¹⁶ Oki, T.; M. Hirano, K. Tomatsu, K. Numata & H. Kamei. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. II. In vitro and in vivo antifungal activities. *J Antibiot*, **1989**, 42, 1756-1762.
- ¹⁷ Iwamoto, T.; Tsujii, E.; Ezaki, M.; Fujie, A.; Hashimoto, S.; Okuhara, M.; Kohsaka, M. and Imanaka, H. FR109615, a new antifungal antibiotic from *Streptomyces setonii*. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activity. *J Antibiot*, **1990**, 43, 1-7.

- ¹⁸ Nativ, E. and Rona, P. 2-Azabicyclo[3.2.0]heptane-3-one. *Isr J Chem*, **1972**, *10*, 55-58.
- ¹⁹ Gabor, B.; Lajos, G.; Gyorgy, D.; Istyan, P. and Zoltan, E. Stereochemical studies. II. The synthesis of *cis*- and *trans*-2-amino-1-cyclopentane, -1-cyclohexane and -1-cycloheptanecarboxamide derivatives. *Acta Chim Acad Sci Hung*, **1976**, *89*, 61-84.
- ²⁰ Marc, P.; Denise, B.; Michel, D. and Nadine F. Preparation of 2-aminocyclopentane carboxylic acid derivatives. I. Separation of the isomers. *Bull Soc Chim Fr*, **1977**, *9*, 995-998.
- ²¹ Kawabata, K.; Inomoto, Y.; Sakana, K.; Iwamoto, T.; Hashimoto, S. Synthesis and structure determination of FR109615, a new antifungal antibiotic. *J Antibiot*, **1990**, *43*, 513-518.
- ²² Davies, S. G.; Osomu, I.; Walters Iain AS. An expeditious asymmetric synthesis of (-)-(1*R*,2*S*)-cispentacin. *Synlett*, **1993**, 461-463.
- ²³ Aggarwal, V. K.; Roseblade, S.; Alexander, R. The use of enantiomerically pure ketene dithioacetal bis(sulfoxides) in highly diastereoselective intramolecular nitronc cycloadditions. Application in the total synthesis of the β -amino acid (-)-cispentacin and the first asymmetric synthesis of *cis*-(3*R*, 4*R*)-4-amino-pyrrolidine-3-carboxylic acid. *Org Biomol Chem*, **2003**, *1*, 684-691.
- ²⁴ Theil, F and Ballschu, S. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of cispentacin. *Tetrahedron Asymmetry*, **1996**, *7*, 3565-3572.
- ²⁵ Tang, W.; Wu, S.; Zhang, X. Enantioselective hydrogenation of tetrasubstituted olefins of cyclic β -(acylamino)acrylates. *JACS*, **2003**, *125*, 9570-9571.
- ²⁶ Capobianco, J. O.; ZAKula, D.; Coen, M .L.; Coldman, R. C. Anti-Candida activity of cispentacin: the active transport by amino acid permeases and possible mechanisms of action. *Biochem Biophys Res Commun*, **1993**, *190*, 1037-44.
- ²⁷ Oki, H.; Inamoto, Y.; Kawabata, K.; Kamimura, T.; Sakane, Z. Synthesis and antifungal activity of FR 109615 analogs. *J Antibiot*, **1991**, *44*, 546-549.
- ²⁸ Kunisch, F.; Babczinski, P.; Arlt, D.; Plempel, M. Ger. Offen. Substituted 2-cylcohexen-1-yl-amine fungicidal and herbicidal agents. DE 4028046 A1, *Chem Abstr*, **1992**, *117*, 20486.
- ²⁹ Mittendorf, J.; Kunisch, F.; Matzke, M.; Militzer, H-C.; Schmidt, A.; Schönfeld, W. Novel antifungal β -amino acids: synthesis and activity against *Candida albicans*. *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**, *13*, 433-436.
- ³⁰ Shate, M.; Thavaselvam, D.; Srivastava, A. K.; Kaushik, M. P. Synthesis and antimalarial evaluation of cyclic β -amino acid-containing dipeptides. *Molecules*, **2008**, *13*, 432-443.
- ³¹ Ziegelbauer, K. Decreased accumulation or increased isoleucyl-tRNA synthetase activity confers resistance to the cyclic β -amino acid BAY10-8888 in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1998**, *42*, 1581-1586.
- ³² Vidmantas Petraitis, V.; Petraitiene, R.; Kelaher, A. M.; Sarafandi, A. A.; Sein, T.; Mickiene, D.; Bacher, J.; Groll, A. H.; Walsh, T. J. Efficacy of PLD-118, a novel inhibitor of *Candida* isoleucyl-tRNA synthetase, against

experimental oropharyngeal and esophageal candidiasis caused by fluconazole-resistant *C. albicans*. *Amino acids*, **2004**, *48*, 3959-3967.

³³ Kuhl, A.; Haln, M. G.; Dumic, M.; Mittendorf, J. Alicyclic β -amino acids in medicinal chemistry. *Amino acids*, **2005**, *29*, 89-100.

³⁴ Ziegelbauer, K.; Babczinski, P.; Schönfeld, W. Molecular mode of action of the antifungal β -amino acid BAY 10-8888. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**, *42*, 2197-2205.

³⁵ Dorrell, S. Overcoming drug-resistant yeast infections. *DDT*, **2002**, *7*, 332-333.

³⁶ Zhang, X.; Tang, W. Preparation of chiral cyclic amino acids and derivatives. US 2004/0242889 A1, **2004**.

³⁷ Noyori, R.; Ohkuma, T.; Kitamura, M.; Takaya, H.; Sayo, N.; Kumobayashi, H.; Akutagawa, S. Asymmetric hydrogenation of β -keto carboxylic esters. a practical, purely chemical access to β -hydroxy esters in high enantiomeric purity. *J Am Chem Soc*, **1987**, *109*, 5856-5858.

³⁸ Lubell, W. D.; Kitamura, M.; Noyori, R. Enantioselective synthesis of β -amino acids based on BINAP-ruthenium(II) catalyzed hydrogenation. *Tetrahedron-Asymmetry*, **1991**, *2*, 543-554.

³⁹ Douglas, A. W.; DiMichele, L.; King, S.A.; Verhoeven, T. R.; Ruthenium-phosphine complex catalysts for asymmetric hydrogenations. US005596113A, **1997**.

⁴⁰ Jerphagnon, T.; Renaud, J-L.; Demonchaux, P.; Ferreira, A.; Bruneau, C. Enantioselective hydrogenation of β -acylamino acrylates catalyzed by rhodium(I) monophosphite complexes. *Adv Synth Cata.*, **2004**, *346*, 33-36.

⁴¹ Mashima, K.; Kusano, K.; Sate, N.; Matsumura, Y.; Nozaki, K.; Kumobayashi, H.; Sayo, N.; Hori, Y.; Ishizaki, T.; Akutagawa, S.; Takaya, H. Cationic BINAP-Ru(II) halide complexes: highly efficient catalysts for stereoselective asymmetric hydrogenation of α - and β -functionalized ketones. *J Org Chem*, **1994**, *59*, 3064-3076.

⁴² Cohen, S.A.; Michaud, D. P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, **1993**, *211*, 279-287.

⁴³ Mittendorf, J.; Kunisch, F.; Matzke, M.; et al (Bayer AG). Cyclopentane and pentene β -amino acids. **1993**, EP 571870.

⁴⁴ Mittendorf, J.; Arold, H.; Fey, P.; Matzke, M.; Militzer, H. C.; Mohrs, K. H. (Bayer AG). High enantio-selective process for producing pure enantiomeric cyclopentane and cyclopentene- β -amino acids. DE 4400749, US 5962724, WO 9519337.

⁴⁵ Mittendorf, J. (Bayer AG). Efficient and highly enantioselective process for the preparation of enantiomerically pure cyclopentane- β -amino acids. DE 19617772, EP 0805145, JP 1998087586, US 5877343.

⁴⁶ Yeates C. Icofungipen (PLIVA). *Curr Opin Investig Drugs*, **2005**, *6*, 8338-8344.

⁴⁷ Mittendorf, J.; Benet-Buchholz, J.; Fey, P.; Mohrs, K-H. Efficient asymmetric synthesis of β -amino acid BAY 10-8888/PLD-118, a novel antifungal for the treatment of yeast infections. *Synthesis*, **2003**, *1*, 130-140.

⁴⁸ Mahler, M. E.; Palmer, M. J. The synthesis of novel *trans*-oxabicyclo[3,3,0]octane systems as potential inhibitors of HIV protease. *Synlett*, **1997**, 2, 193-195.

⁴⁹ Kurosawa, K.; Obara, H. *Bull Chem Soc Jpn*, **1966**, 39, 525-530.

⁵⁰ Pokorski, J. K.; Myers, M. C.; Appella, D. H. Cyclopropane PNA: observable triplex melting in a PNA constrained with a 3-membered ring. *Tetrahedron Lett*, **2005**, 46, 915-917.

⁵¹ Akihiro Misumi, A.; Iwanaga, K.; Furuta, K.; Yamamoto, H. Simple asymmetric construction of carbocyclic framework. direct coupling of dimethyl succinate with 1, ω -dihalides. *J Am Chem Soc*, **1985**, 107, 3343-3345.

CAPÍTULO 4

DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL BENZIMIDAZOL

La mitad de los compuestos presentes en este capítulo han sido sintetizados por el Dr. Rob Hoen.

Asimismo han colaborado la Dra. Eva Novoa, que ha llevado a cabo el *screening* virtual, la Dra. Joëlle Rudinger-Thirion y Shirin Fatma en la realización de los ensayos de aminoacilación con ARS de *P. falciparum* y de *E. Coli* respectivamente, Ana Raquel Soares en los ensayos de toxicidad con el modelo *zebrafish* y Patricia Marín en la evaluación *in vivo* en modelos murinos de la quimioteca de compuestos objeto del presente capítulo.

Los resultados aquí obtenidos están pendientes de publicación.

4.1 Introducción

4.1.1. Características generales de los benzimidazoles

Los benzimidazoles son compuestos heterocíclicos aromáticos. Estos compuestos bicíclicos provienen de la fusión entre un benceno y un imidazol. La numeración sistemática del anillo de benzimidazol confiere la posición 1 al grupo -NH. Cuando ninguna de las

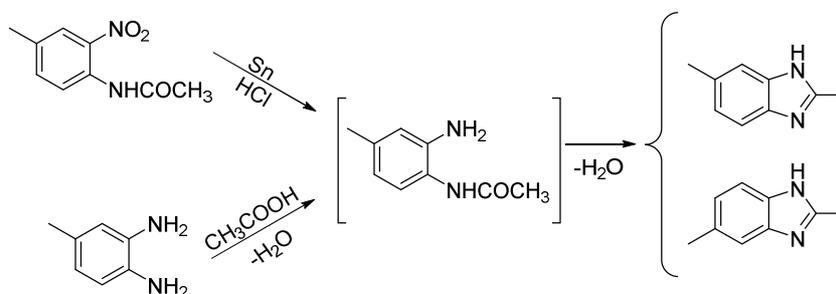


Figura 4. 1. Tautomería de benzimidazol

dos posiciones del átomo de N (-NH- o -N=) está substituida, el compuesto posee ambas característica ácidas y básicas. Además, cuando la posición 1 (-NH) no está substituida, existe un equilibrio tautomérico mediante un proceso intramolecular que involucra más de una molécula de benzimidazol o bien mediante interacción con solventes próticos, siendo las posiciones 5 y 6 químicamente equivalentes (Figura 4. 1). En general, los benzimidazoles son productos cristalinos y relativamente insolubles en H₂O. Las siete posiciones que forman el núcleo del benzimidazol pueden ser substituidas con una gran variedad de entidades químicas. Cabe remarcar que la mayoría de benzimidazoles bioactivos tienen las posiciones 1,2 y/o 5 y 6 substituidas¹.

4.1.2 Síntesis de los benzimidazoles

Dentro de la familia de los heterocíclicos, el esqueleto del benzimidazole es una de las estructuras más investigadas tanto en el sector farmacológico como en el desarrollo de nuevos materiales². El 2,5 o 2,6-dimetilbenzimidazol fue el primer compuesto derivado del benzimidazol sintetizado, en 1872 por Hoebrecker mediante la reducción del 2-nitro-4-metilacetanilida y la posterior pérdida de H₂O. En 1875, Ladenburg obtuvo el mismo compuesto mediante el reflujo del 3,4-diaminotolueno en ácido acético³ (Esquema 4. 1).



Esquema 4. 1. Síntesis del primer derivado de benzimidazol por Hoebrecker (superior) y Ladenburg (inferior).

Desde entonces hasta la fecha, el método clásico para sintetizar derivados benzimidazoles 1 o 2-substituidos es mediante una condensación entre *O*-fenilendiaminas y aldehídos, ácidos carboxílicos o derivados de este como ésteres, haluros de ácido y amidas, empleando ácido clorhídrico, ácido polifosfórico, ácido bórico o ácido *p*-toluensulfónico como catalizadores⁴. Debido a la falta de diferenciación entre los dos átomos de N presentes en la molécula, generalmente, este tipo de reacciones conducen a la obtención de una mezcla de regioisómeros. Numerosas investigaciones se han centrado en optimizar las condiciones de la reacción⁵. Por otro lado, las *N*-arilamidinas⁶ y las *O*-nitroanilinas⁷ también han sido utilizadas como material de partida para la síntesis de benzimidazoles (Figura 4. 2).

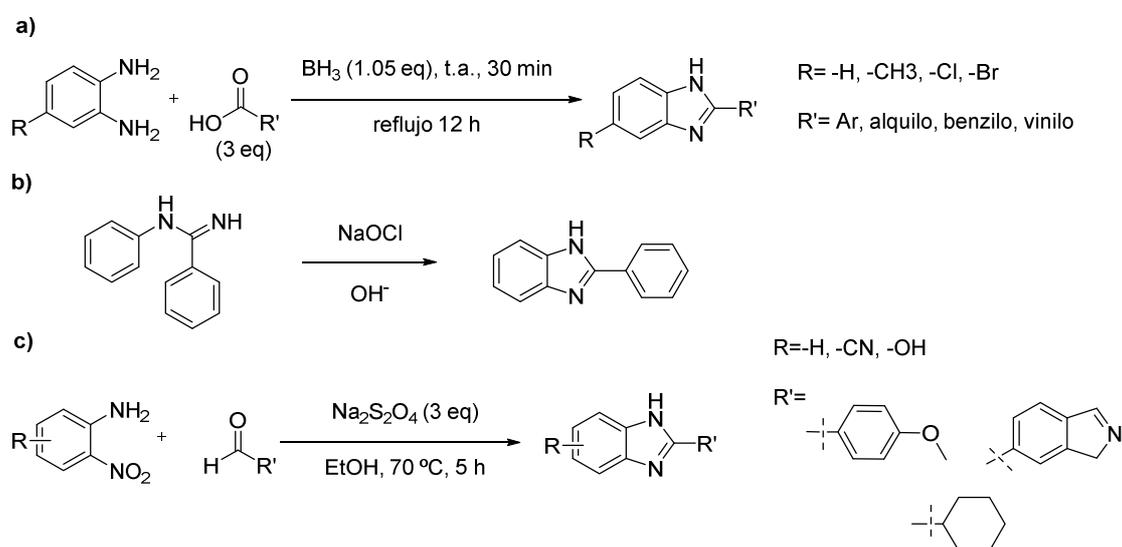


Figura 4. 2. Síntesis clásicas del benzimidazoles 2-substituidos utilizando como material de partida; a) de 1,2-fenilendiaminas⁵, b) *N*-arilamidinas⁶, c) *O*-nitroanilinas⁷.

Sabiendo la potencialidad de dichos compuestos como moléculas de gran relevancia farmacológica, múltiples investigaciones se han centrado en nuevas rutas sintéticas para su obtención. Entre ellas la síntesis asistida por microondas⁸ y la síntesis en fase sólida⁹ para funcionalizar de forma específica y selectiva el anillo del benzimidazol, adquiriendo así una amplia variedad de estructuras.

Dentro de la familia de los benzimidazoles, en concreto los 1,2-disubstituidos y sus derivados, representan una parte importante de los compuestos bioactivos. Clásicamente, las alternativas más utilizadas para la síntesis de dichos compuestos son las reacciones de *N*-alquilación y *N*-arilación de benzimidazoles 2-substituidos. Dichos métodos no albergan la posibilidad de dirigir la regioselectividad de los productos y están limitados a la disponibilidad del material de partida. Uno de los métodos más utilizados para diferenciar los dos átomos de N, es la *N*-acilación de *O*-nitroanilinas precedidas de una reducción y posterior ciclación del compuesto así como la utilización de benzimidazoles

2-halosustituidos, utilizando por ejemplo 2-cloro o 2-bromobenzimidazoles como material de partida para preparar *O*-nitroanilinas *N*-sustituidas¹⁰. Por otro lado, el método de arilaminación-ciclación catalizadas por metales como paladio, cobre o cobalto permite la construcción de benzimidazoles complejos de forma regioselectiva¹¹ (Figura 4. 3).

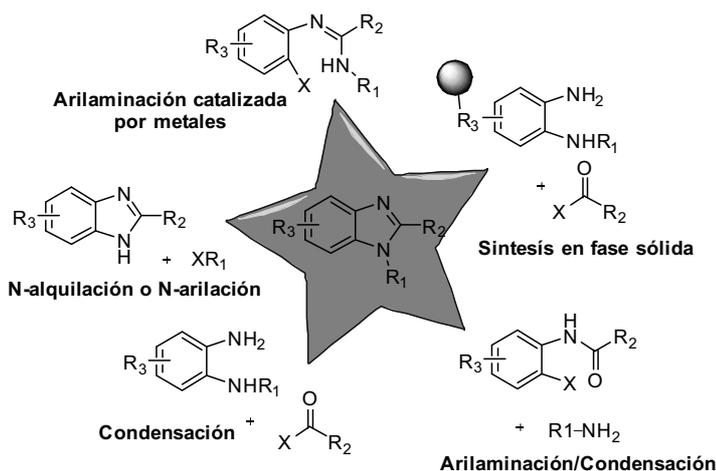


Figura 4. 3. Métodos utilizados para la obtención de benzimidazoles 1,2-disustituidos¹¹.

4.1.3. Aplicaciones farmacológicas generales de los benzimidazoles

El benzimidazol más prominente encontrado en la naturaleza es el 5,6-dimetil-1-(α -D-ribosil)benzimidazol¹², un ligando axial del cobalto implicado en la formación de la vitamina B₁₂, sintetizada por arqueas y bacterias¹³. Cuando se descubrió que la vitamina B₁₂ era capaz de estimular la proliferación de las bacterias, más que el fragmento formado por el benzimidazol y otros derivados de este podían reprimir dicho crecimiento, la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos se centró en el esqueleto del benzimidazol.

Desde entonces y hasta la fecha, el núcleo del benzimidazol, ha sido considerado una estructura privilegiada en el campo de la investigación. Se han llevado a cabo, numerosos estudios que correlacionan la actividad y la estructura de dichos derivados. Históricamente los compuestos derivados del benzimidazol han sido utilizados como agentes antihelmínticos tanto en veterinaria como en medicina humana como es el caso de los fármacos Albendazol[®] y Mebendazol[®]. También han sido utilizados como antifúngicos en la agricultura. Hoy en día, muchos derivados de dicha estructura, son recetados para el tratamiento de distintas enfermedades, pues presentan propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas inmejorables como antidiabéticos, antihipertensivos, antiulcerosos, analgésicos, antivirales, antitumorales, antipsicóticos, antihistamínicos o bien como antiparasitarios entre otras^{14,15} (Figura 4. 4). Un ejemplo, es el fármaco más vendido durante el 2012 en U.S.A¹⁶; el Nexium[®], genéricamente conocido como esomeprazol que es el enantiómero *S* de la mezcla racémica omeprazol. Dicho compuesto es un inhibidor de la bomba de protones (H^+ y K^+ -ATPasa), que reduce la secreción gástrica y está indicado contra el tratamiento de la dispepsia, la úlcera péptica y enfermedades relacionadas con el reflujo gastroesofágico.

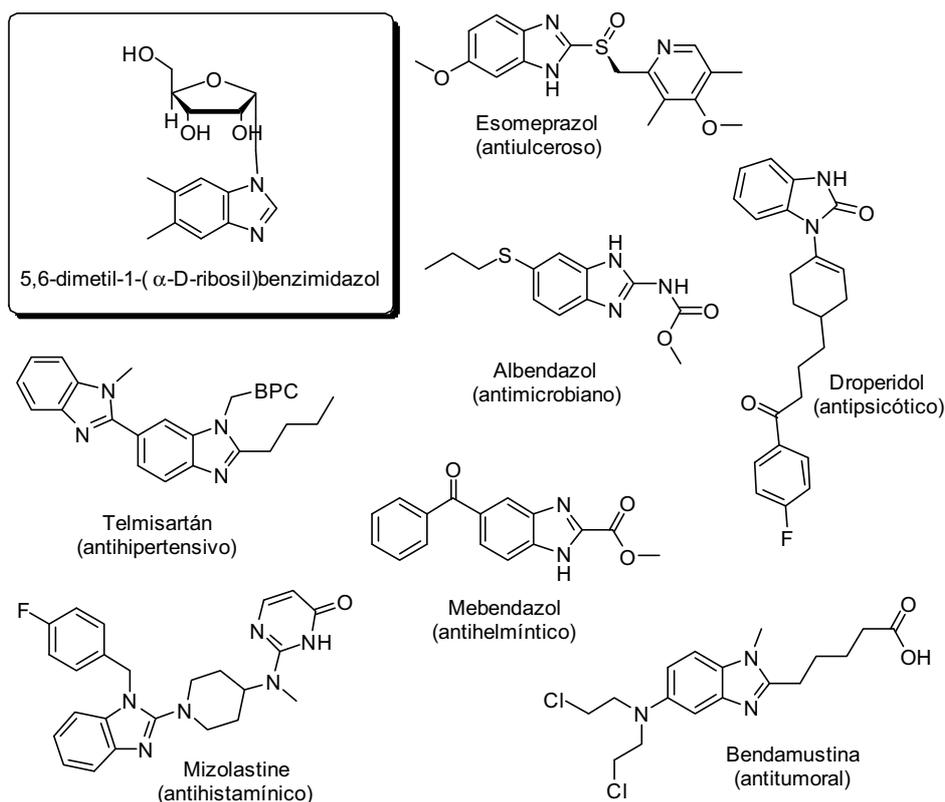
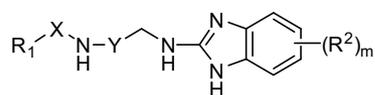


Figura 4. 4. Estructuras de algunos fármacos comerciales derivados del benzimidazol con diversos efectos terapéuticos.

4.1.4. Los benzimidazoles como inhibidores de ARNt sintetasas

Como se ha expuesto anteriormente, en la literatura se describen muchos compuestos basados en el anillo de benzimidazol con distintas propiedades farmacológicas, aunque no siempre se conoce la diana y el modo de acción de dichos compuestos. Aunque no se han descrito muchos derivados de benzimidazoles con propiedades inhibitoras de las ARNt sintetasa, el grupo farmacéutico Galaxo SmithKline, ha patentado unos derivados con actividad antibacteriana, que inhiben específicamente la metionil-ARNt sintetasa de *S. aureus* mostrando valores de IC_{50} en el rango de 3-700 nM^{17,18} (Figura 4. 5). Así pues, los benzimidazoles pueden ser también, una estructura privilegiada en este ámbito ya que han mostrado la capacidad de interactuar específicamente con las ARS, abriendo un abanico de posibilidades para el diseño de nuevos fármacos antibacterianos y antiparasitarios.



$R_1 = Ar$
 $(R_2)_m = H, X, CH_2$ o CHR_3 donde R_3 es un alquilo o Ar
 $Y =$ alcano o cicloalcano

Figura 4. 5. Estructura general de los compuestos antimicrobianos patentados por Galaxo SmithKline que actúan inhibiendo la MRS de *S. aureus*.

4.1.5. Actividad antimalárica de los benzimidazoles

El dramático incremento de casos de malaria diagnosticados, hacen indispensable una búsqueda exhaustiva de nuevos compuestos antimaláricos para tratar de afrontar la creciente resistencia que presentan los parásitos. Sabiendo la importancia del esqueleto del benzimidazol en la química médica y después de que distintos compuestos mostraran actividad como antiparasitarios y como antiprotozoarios¹⁹, algunas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos derivados con propiedades antimaláricas.

Un ejemplo, es una familia de híbridos sintetizados a partir de benzimidazol y la pentamidina. Dicha diamidina aromática, es utilizada en el tratamiento de la neumonía provocada por *Pneumocystis jirovecii*, siendo también efectiva contra *Trypanosoma bucei*. Dichos híbridos, han sido ensayados como antiprotozoarios frente

distintas especies, siendo uno de ellos activo *in vitro* frente a *Plasmodium berghei*²⁰ (Figura 4. 6).

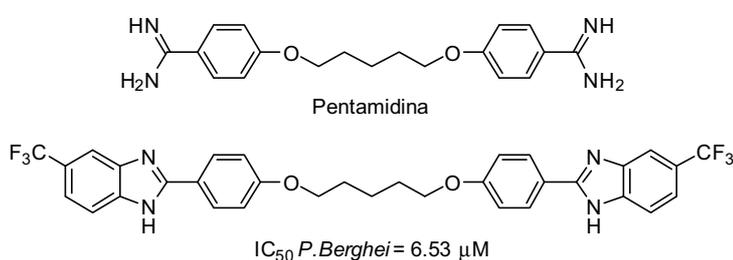


Figura 4. 6. Benzimidazol derivado de la pentamidina con actividad antimalárica *in vitro*

Por otro lado, se ha publicado recientemente, una librería de 26 compuestos derivados del bis(oxifenileno)benzimidazol, ensayados frente distintos parásitos donde 8 de los compuestos mostraron actividad antimalárica *in vitro* con valores de IC₅₀ comprendidos entre 180 y 410 nM²¹.

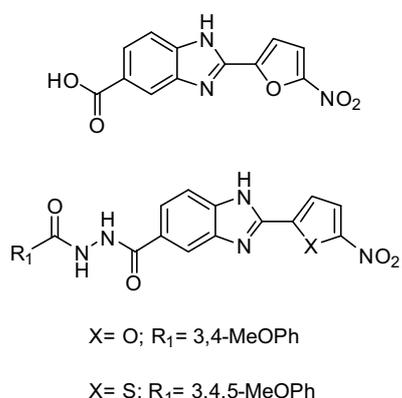


Figura 4. 7. Inhibidores de la síntesis de hemozoina, con actividad antimalárica.

Otro ejemplo es el recientemente estudio donde se han sintetizado y ensayado *in vitro* e *in vivo* frente a *P. falciparum* una familia de compuestos derivados del benzimidazol-5-carbohidrazida²² (Figura 4. 7). Dichos compuestos, tienen el mismo modo de acción que la cloroquina, es decir, inhiben la cristalización de α -hematina en hemozoina (β -hematina) incapacitando el proceso de detoxificación único y esencial que lleva a cabo el parásito para su supervivencia.

Otras investigaciones, se han centrado en la aplicación para el tratamiento de la malaria de compuestos derivados del benzimidazol con propiedades farmacológicas ya conocidas. Como es el caso del estudio *in vitro* de los fármacos omeprazol, lansoprazol, rabeprazol y pantoprazol para evaluar su eficacia como inhibidores de la bomba de protones (H⁺ y K⁺-ATPasa), frente a tres cepas distintas de *P. falciparum*, obteniendo resultados esperanzadores²³ (Figura 4. 8).

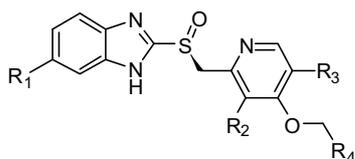


Figura 4. 8. Estudio *in vitro* de fármacos inhibidores de la bomba de protones frente a la cepa D6 (sensible a cloroquina y pirimetamina), W2 (resistente a cloroquina y pirimetamina) TM91C235 (resistente a cloroquina, pirimetamina, mefloquina, sulfadoxina y quinina) de *P. falciparum*.

Fármaco	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (M)		
					D6	W2	TM91C235
Rabeprazol	H	CH ₃	H	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	9.8	10.0	7.0
Lansoprazol	H	CH ₃	H	CF ₃	9.3	7.5	11.2
Omeoprazol	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	H	27.1	28.3	76.4
Pantoprazol	OCHF ₂	OCH ₃	H	H	73.3	53.3	39.3

4.2 Objetivos

Para luchar contra el rápido cambio evolutivo generado por las mutaciones y/o la transferencia genética que caracterizan a las bacterias y a los parásitos, es imprescindible generar nuevos fármacos con distintos mecanismos de acción. A poder ser, éstos deberían interferir con más de una diana farmacológica, para retrasar o en el mejor de los casos evitar la aparición de resistencias.

Como punto de partida para el diseño y la síntesis de nuevos compuestos, se analizaron *in silico* más de 35.500 compuestos virtuales frente a distintas enzimas ARNt sintetasas de *P. falciparum*. A partir de los resultados obtenidos decidimos crear una quimioteca centrada en el anillo del benzimidazol, con la esperanza de conseguir compuestos con carácter dual, es decir que fueran capaces de inhibir a más de una enzima ARS.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1. Búsqueda de nuevos inhibidores de distintas ARS de *P. falciparum*

Desde 1996 no se han introducido en fase clínica ningún compuesto antimalárico, hecho que pone de manifiesto por un lado la dificultad intrínseca de descubrir y desarrollar nuevos compuestos antipalúdicos y por otro, la falta de recursos económicos tanto públicos como privados destinados a erradicar la malaria²⁴.

Apostando por las enzimas ARNt sintetasas como diana terapéutica farmacológicamente asequibles, selectivas y poco investigadas en el ámbito de la malaria, decidimos ensayar *in silico* una familia de compuestos virtuales frente a tres ARS de *P. falciparum* con la esperanza de predecir estructuras capaces de inhibir más de una enzima, es decir compuestos duales.

Se seleccionaron las enzimas LysRS-2, GlnRS y IleRS-2 de *P. falciparum* para llevar a cabo el *screening* virtual, debido a la distancia filogénica que presentan estas enzimas con las homólogas eucariotas. Como se ha referenciado anteriormente, el parásito contiene dos genes que codifican la LysRS. Una de estas enzimas, la LysRS-2, se encuentra en el apicoplasto y tiene origen bacteriano. Además se trata de una diana terapéutica potencialmente accesible como se ha demostrado en el capítulo 1 de esta tesis. Recientemente, también, se han validado las dos enzimas IleRS de *P. falciparum*²⁵. Además, se ha descubierto que el antibacteriano mupirocina es capaz de inhibir selectivamente la enzima apicoplastica IleRS-2 del parásito, dejando inalterada la enzima citosólica²⁵. Finalmente, también se eligió la GlnRS que está presente sólo en un genoma del parásito y aunque se trate de una enzima citosólica, tiene origen bacteriano²⁶.

La quimioteca virtual fue construida por el Dr. Rob Hoen, a partir de 72 compuestos inhibidores selectivos de distintas especies de la LysRS y otros 829 de la IleRS descritos en la literatura. Para ampliar el número de estructuras a ensayar *in silico*, se les sumaron a dichos compuestos otros obtenidos de distintas quimiotecas virtuales comerciales (~ 3.000 compuestos de FDA drugs, ~ 1.800 moléculas de la librería química Prestwick y ~ 30.000 moléculas más de ZINC). En total se ensayaron *in silico* más de 35.500 compuestos. Los ensayos de *docking* fueron realizados por la Dra. Eva Novoa del laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona.

4.3.2. Resultados del *docking* virtual

Los resultados del ensayo *in silico* predijeron que 141 compuestos interferían selectivamente con la enzima PfLysRS, 161 más lo hacían con PfGlnRS y sólo 16 de ellos con PflleRS. Algunos de estos compuestos fueron capaces de bloquear virtualmente el centro activo de más de una enzima de *P. falciparum*; obteniendo 6 estructuras duales para LysRS-GlnRS y otras 3 para LysRS-IleRS. No se obtuvo ninguna estructura común para las enzimas GlnRS y IleRS (Figura 4. 9).

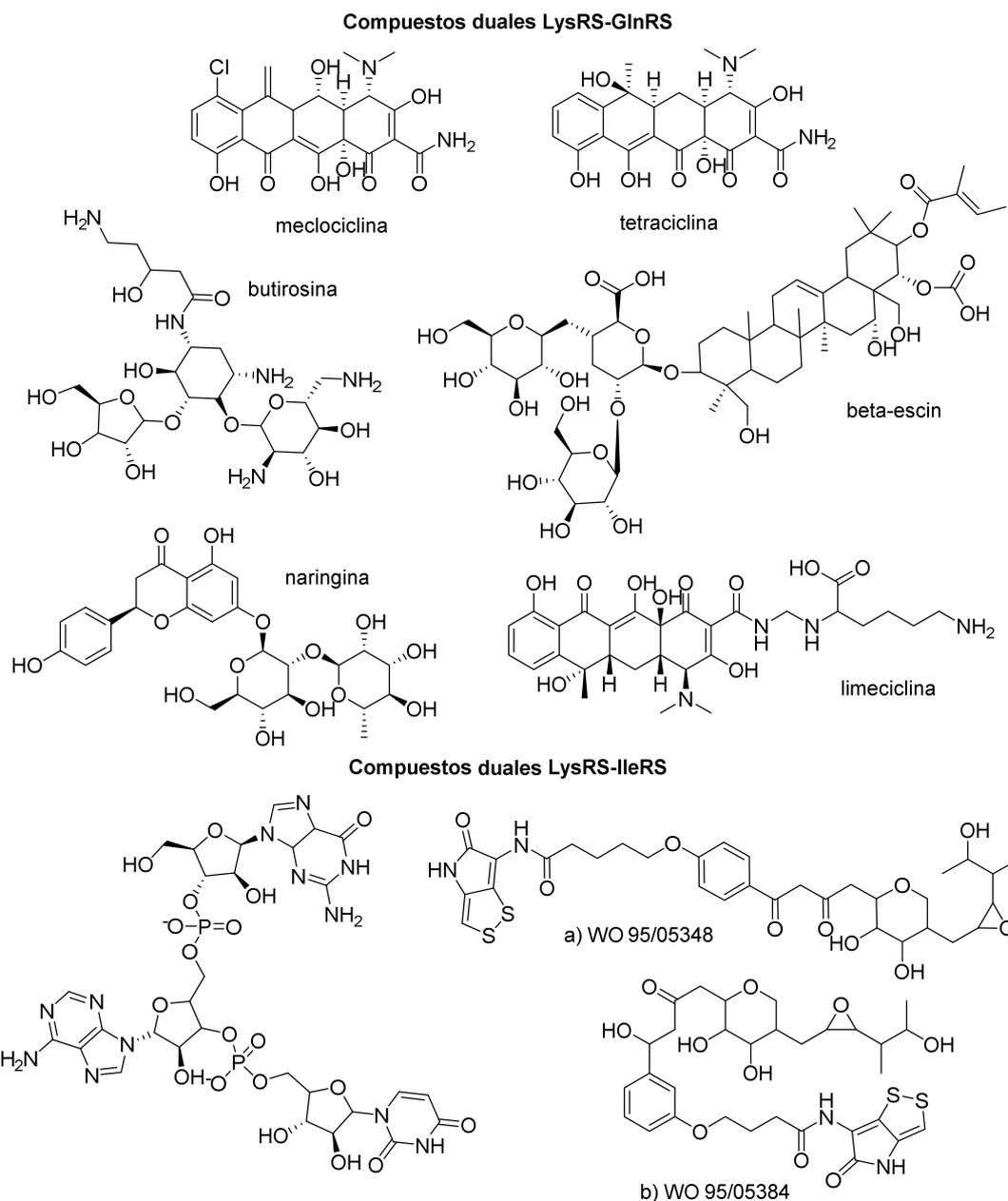


Figura 4. 9. Estructura de los compuestos que han mostrado mediante *screening virtual* una posible interacción con dos de las enzimas ensayadas.

Unas de las estructuras seleccionadas por *docking* como compuestos duales capaces de inhibir tanto la LysRS como la GlnRS de *P. falciparum*, fueron los derivados de la tetraciclina. Este tipo de compuestos inhiben la unión entre el complejo aminoacil-ARNt y el ribosoma, impidiendo las síntesis peptídica.

Las tetraciclinas han sido recetadas desde su descubrimiento en 1945, como antibióticos capaces de actuar contra distintos microorganismos. También se han utilizado como terapia combinada en el tratamiento de la malaria y como agentes profilácticos para su prevención²⁷. No obstante, decidimos descartar la estructura de la tetraciclina como núcleo básico para la síntesis de una quimioteca de compuestos duales. Los motivos fueron por un lado la resistencia²⁸ creada por un gran número de microorganismos a dichos compuestos y por otro, las escasas posiciones químicamente modificables que ofrece dicha estructura. Aunque cabe remarcar que recientemente, distintos grupos de investigación, están llevando a cabo nuevas estrategias sintéticas para su obtención^{29,30}.

El resto de estructuras adquiridas como compuestos duales mediante el ensayo *in silico*, también fueron descartadas como posibles núcleos para la síntesis de una quimioteca; básicamente no prometían una síntesis rápida y económica para la obtención del esqueleto principal ni sus posibles derivados. Sin embargo, cuando estudiamos los resultados de *docking* obtenidos para cada enzima, observamos que el esqueleto benzimidazol formaba parte de un gran número de estructuras seleccionadas tanto para PfLysRS como para PfGlnRS (Figura 4. 10).

Aunque dichos compuestos no mostraron potencial interacción dual por si solos *in silico*, decidimos centrarnos en la estructura del benzimidazol para construir una nueva quimioteca de compuestos. Los motivos para elegir dicho núcleo fueron; a) el esqueleto del benzimidazol es una estructura privilegiada desde el punto de vista farmacológico, b) puede ser substituido y modificado químicamente en distintas posiciones del anillo, proporcionando un sinfín de derivados con características estructurales diversas y c) los compuestos seleccionados cumplen como mínimo tres de las características para ser considerados moléculas con potencial utilidad terapéutica según la regla de Lipinski³¹. Dicha regla predice una baja absorción y/o permeabilidad a los compuestos que contienen un peso molecular superior a los 500 Dalton, más de 5 enlaces H donadores y 10 aceptores.

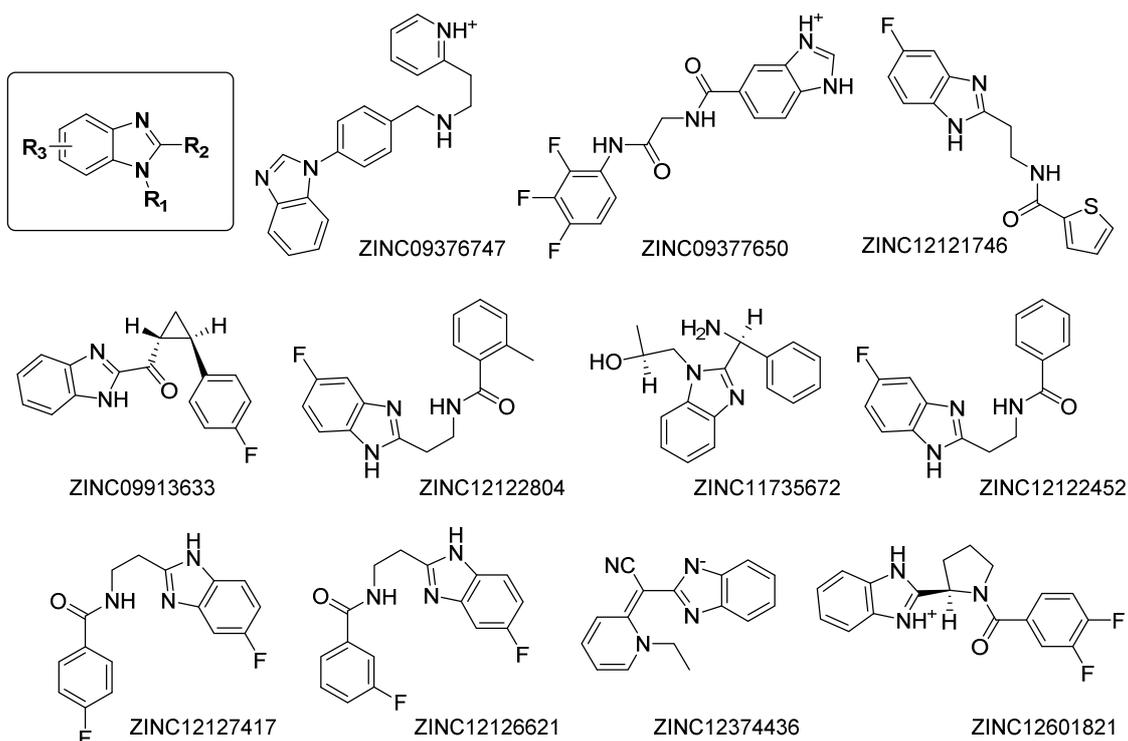


Figura 4. 10. Estructuras basadas en el esqueleto del benzimidazol que podrían inhibir selectivamente PflLysRS o bien PflGlnRS según los resultados obtenidos por *docking*.

4.3.3. Diseño de la quimioteca de derivados del benzimidazol

A partir de un análisis retrosintético (Figura 4. 11) y un estudio estructural de los compuestos elegidos, diseñamos la quimioteca.

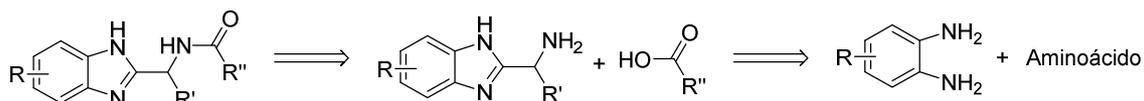


Figura 4. 11. Análisis retrosintético de los derivados de benzimidazol

Para ello requeríamos de a) distintas *O*-fenilendiaminas para probar el efecto de distintos sustituyentes, b) distintos aminoácidos para formar el núcleo central de los compuestos y para proporcionar distintas longitudes y disposiciones espaciales y por último c) distintos grupos heterocíclicos. Decidimos utilizar productos de partida comerciales y económicamente asequibles. Finalmente, decidimos sintetizar 10 núcleos distintos que modificaríamos mediante una *N*-acilación con 5 compuestos heterocíclicos para construir una quimioteca de 50 derivados del benzimidazol (Figura 4. 12).

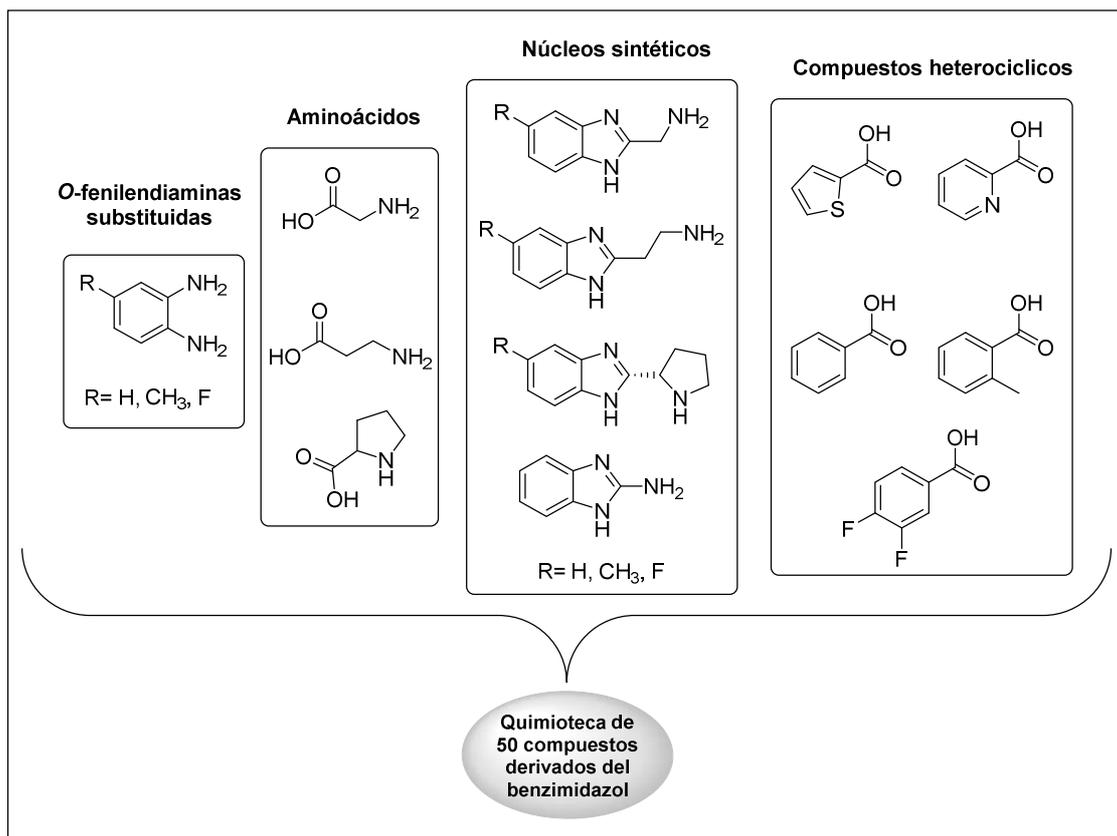


Figura 4. 12. Diseño de la quimioteca de derivados de benzimidazol. A partir de 10 núcleos sintéticos distintos y 5 ácidos carboxílicos aromáticos cíclicos obtuvimos una familia de 50 compuestos distintos.

4.3.4. Síntesis de la quimioteca de derivados del benzimidazol

4.3.4.1. Síntesis de los núcleos del benzimidazol derivados de aminoácidos

De la quimioteca planteada se requería sintetizar 7 de los 10 núcleos estructurales a partir de los cuales formaríamos distintos derivados, los otros 3 bloques sintéticos restantes; 2-aminobenzimidazol **98**, dihidrocloruro de (1*H*-benzimidazol-2-il)metanamina **99** y 2-(1*H*-benzimidazol-2-il)etanamina **100** se adquirieron de casas comerciales (Figura 4. 13).

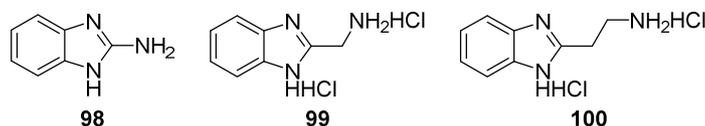
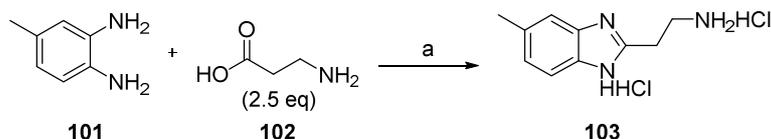


Figura 4. 13. Compuestos comerciales utilizados como núcleos estructurales para la síntesis de la quimioteca.

Para obtener el resto de los núcleos, se siguieron distintas estrategias sintéticas. Así, la obtención del dihidrocloruro de 2-(5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)etanamina **103** (Esquema 4. 2) se realizó a partir de la condensación de la 1,2-diamino 4-metilbenceno **101** con el ácido 3-aminopropiónico (β -alanina) **102** en una solución de HCl 5.5 M a reflujo. El

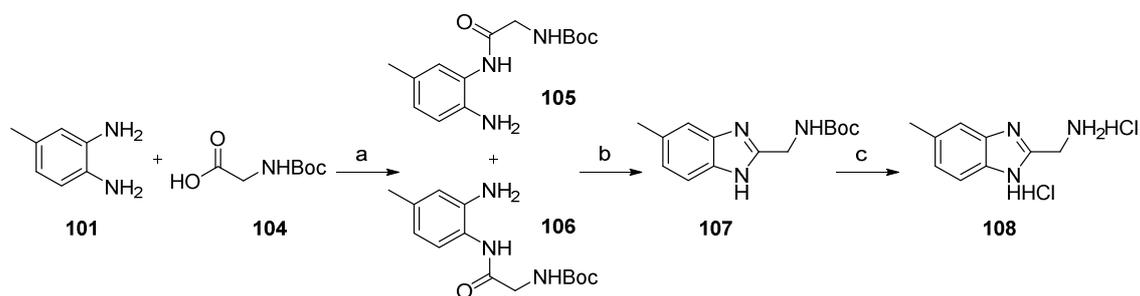
producto, precipitó en forma de sal en el medio de la reacción, se aisló por filtración y se recrystalizó en EtOH con un rendimiento del 69%.



Esquema 4. 2. Síntesis del núcleo sintético **103**, siguiendo el método clásico para la obtención de benzimidazoles. Condiciones; a) HCl 5.5 M a 130 °C durante 24 h, 69% rendimiento, 97% pureza.

El dihidrocloruro de 5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)metanamina **108**, se intentó obtener de manera similar substituyendo la β -alanina **102** por glutamina, pero el avance de la reacción fue mucho más lento, la conversión fue menor y el producto no precipitó en las condiciones de reacción.

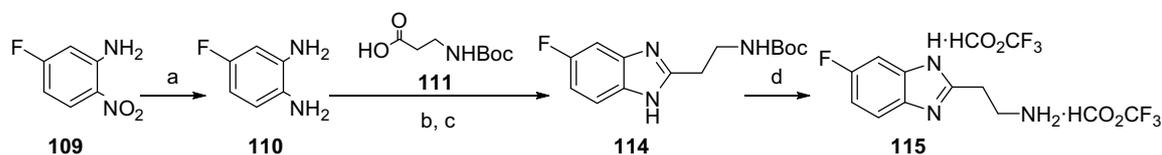
Como alternativa (Esquema 4. 3), *N*-acilamos la 1,2-diamino-4-metilbenzo **101** con *N*-Boc-glicina **104** utilizando EDC·HCl y HOBt como sistema de acoplamiento, obteniendo una mezcla de dos regioisómeros **105** y **106**. Por HPLC-MS se observaron trazas del compuesto *N,N*-diacilado. A continuación, se realizó una condensación intramolecular de los compuestos de la mezcla catalizada con ácido acético (~ 0.05 M) y posterior purificación del crudo, mediante cromatografía *flash* automatizada para eliminar las trazas del compuesto *N,N*-diacilado, se obtuvo el producto *tert*-butil((5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)metil)carbamato **107** con una pureza del 99% y un rendimiento del 32% en dos etapas. Finalmente para obtener el producto deseado **108**, se eliminó el grupo protector Boc con una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano. El dihidrocloruro de 5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)metanamina **108**, precipitó en el medio de la reacción y se aisló por filtración obteniendo una sal con una pureza superior al 99% y un rendimiento del 78%.



Esquema 4. 3. Síntesis del dihidrocloruro de 5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)metanamina **108** a partir de la *N*-acilación y posterior ciclación del compuesto. Condiciones; a) EDC·HCl (1.2 eq), HOBt (1.2 eq), DCM, t.a., 14 - 48 h, b) AcOH (0.05 M), 65 °C, 18 h, 32% rendimiento en 2 etapas, 99% pureza; c) HCl 4 M en 1,4-dioxano, t.a., 2 h, 78% rendimiento, pureza >99%.

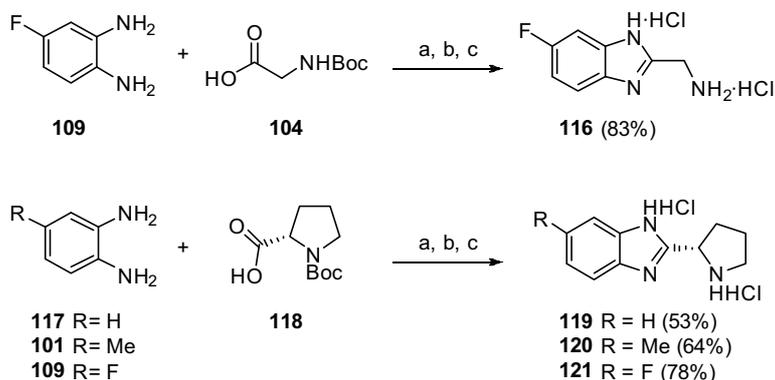
Aunque el compuesto 4-fluoro-1,2-fenilendiamina **110** se puede adquirir en casas comerciales utilizamos como precursor el 5-fluoro-2-nitroanilina **109** que poseíamos

previamente en el laboratorio, para sintetizar los derivados del benzimidazol 5(6)-fluoro-substituidos. A partir de la reducción de la nitroanilina **109** catalizada por Ni-Raney utilizando hidracina monohidratada como fuente de hidrogeno. Después de filtrar la solución sobre Celite[®], obtuvimos la 1,2-diamina 4-fluorobenceno **110** con un rendimiento del 90% y una pureza del 83%. Posteriormente acilamos la amina con el ácido 3-(*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoico **111** y ciclamos el compuesto utilizando el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, obteniendo el *tert*-butil(2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)carbamato **114**, con una pureza superior al 99% y un rendimiento del 42% en dos etapas. Eliminamos del grupo Boc con TFA/THF (2:1, v/v), pues el compuesto **114** no se solubilizó con HCl 4 M en 1,4-dioxano. Finalmente, precipitamos el ditrifluoroacetato de 2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etilamina **115** en EtOH con una pureza del 96% y un rendimiento del 90% (Esquema 4. 4).



Esquema 4. 4. Síntesis del ditrifluoroacetato de 2-(6-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etilamina **115**. Condiciones; a) $\text{H}_2\text{NNH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, Ni-Raney, EtOH, 78 °C, 2.5 h, 90% rendimiento, 82% pureza; b) ácido 3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoico **111**, EDC·HCl, HOBT, DCM, t.a, 18 h; c) AcOH (0.05 M), 65 °C, 18 h, 42% rendimiento en 2 etapas, pureza >99%; d) TFA/ THF (2:1, v/v), t.a, 18 h, 90% rendimiento, pureza >99%.

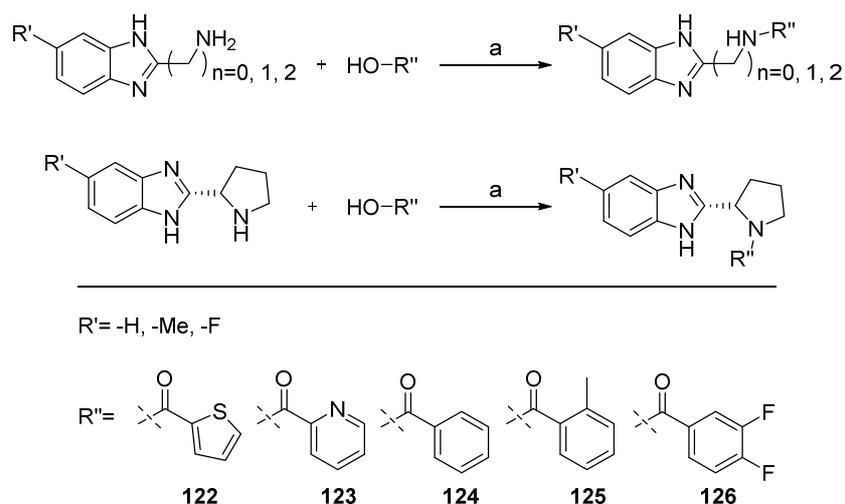
Los tres núcleos de benzimidazol derivados de la L-prolina **119**, **120** y **121** y el dihidrocloruro de 2-(6-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)metanamina **116**, los sintetizó el Dr. Rob Hoen siguiendo el mismo procedimiento de *N*-acilación, ciclación y desprotección descrito anteriormente, obteniendo los productos con una pureza > 98% (Esquema 4. 5).



Esquema 4. 5. Síntesis de los núcleos sintéticos **116**, **119**, **120** y **121**. Condiciones; a) EDC·HCl (1.2 eq), HOBT (1.2 eq), en DCM, t.a., 14 h, b) AcOH (0.05M), 75 °C, 16 h; c) HCl 4 M en 1,4-dioxano, t.a., 2 h.

4.3.4.2. Síntesis de los derivados del benzimidazol

Una vez sintetizados los distintos núcleos del benzimidazol derivados de aminoácidos, procedimos a la síntesis de los compuestos que forman la quimioteca. Para ello se *N*-aciló cada núcleo del benzimidazol con cinco ácidos carboxílicos aromáticos distintos (**122-126**) utilizando EDC·HCl y HOBT como agentes acoplantes (Esquema 4. 6). La mayoría de los compuestos precipitaron en el medio de reacción y fueron aislados por filtración. El resto, fueron purificados por cromatografía *flash* automatizada utilizando DCM/MeOH (4:1, v/v) como sistema de elución.



Esquema 4. 6. Síntesis de los derivados de benzimidazol. Condiciones; a) EDC·HCl (1eq), HOBT (1 eq), Et₃N (4 eq), ácido carboxílico correspondiente (1 eq), DCM, t.a., 15 h.

En todas las reacciones de *N*-acilación donde se utilizó el bloque sintético ditrifluoroacetato de 2-(6-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etilamina **115**, se obtuvo un subproducto de masa molecular 275.07 que fue aislado y purificado. Se determinó y caracterizó el compuesto por RMN (¹H y ¹³C) como 2,2,2-trifluoro-*N*-(2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)acetamida **M3-51** (Figura 4. 14), resultado de la *N*-acilación del derivado de benzimidazol con el ácido trifluoroacético que provenía de la sal de ditrifluoroacetato de 2-(6-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etilamina **115**.

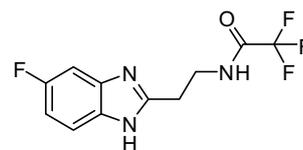


Figura 4. 14. Estructura química del 2,2,2-trifluoro-*N*-(2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)acetamida **M3-51**.

En total se obtuvieron 51 derivados del benzimidazol (Tabla 4. 1) 25 de los cuales fueron sintetizados por el Dr. Rob Hoen. Los productos se obtuvieron en forma sólida con purezas superiores al 95% determinadas por HPLC-MS a $\lambda = 214$ nm. La mayoría de los compuestos precipitaron en condiciones acuosas, por lo que se disolvieron los compuestos

en MeOH o bien en DMSO a una concentración 5 mM para evaluar su actividad antimalárica *in vitro*.

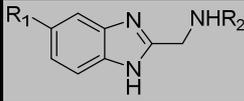
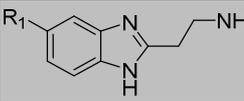
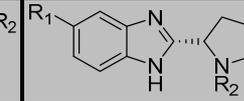
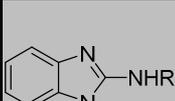
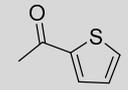
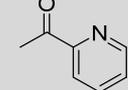
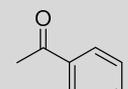
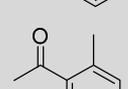
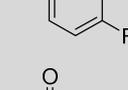
R ₂	R ₁										
		H	CH ₃	F	H	CH ₃	F	H	CH ₃	F	
		M3-03	M3-08	M3-13	M3-27	M3-22	M3-02	M3-32	M3-36	M3-41	M3-46
		M3-04	M3-09	M3-14	M3-18	M3-23	M3-28	M3-33	M3-37	M3-42	M3-47
		M3-05	M3-10	M3-15	M3-19	M3-24	M3-29	M3-34	M3-38	M3-43	M3-48
		M3-06	M3-11	M3-16	M3-20	M3-25	M3-30	M3-35	M3-39	M3-44	M3-49
		M3-07	M3-12	M3-17	M3-21	M3-26	M3-31	M3-01	M3-40	M3-45	M3-50
		-	-	-	-	-	M3-51	-	-	-	-

Tabla 4. 1. Resumen de las estructuras de los compuestos que forman la quimioteca de los derivados de benzimidazol.

4.3.5. Evaluación *in vitro* de la quimioteca de derivados del benzimidazol

4.3.5.1. Evaluación de la actividad antimalárica

Para ensayar la actividad antimalárica de los compuestos, se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento de un cultivo de la cepa 3D7A de *P. falciparum* previamente sincronizado con sorbitol. Para ello, se utilizaron cultivos de eritrocitos humanos al 3% infectados con el parásito en estadio anillo o *ring* (1 y 0.1% de parasitemia). Los compuestos se incubaron a una concentración final de 75 μM durante 48 y 96 horas respectivamente (Figura 4. 15). La lectura de la proliferación parasitaria se evaluó por citometría de flujo utilizando SYTO®11 como marcador celular fluorescente. Los resultados se confirmaron por microscopía (ver protocolos en la apartado 6.1.1 de la experimental).

Analizando los resultados obtenidos en este primer ensayo se pueden citar algunas correlaciones entre la estructura y la actividad antimalárica de los compuestos (Figura 4.15). Podemos agrupar los compuestos según:

a) El sustituyente en la posición 5 del anillo del benzimidazol:

En términos generales cuando se substituye la posición 5 del anillo del benzimidazol aumenta la actividad de los compuestos respecto a los que no están substituidos. No se muestra diferencia significativa entre la actividad de los compuestos que poseen en dicha posición un grupo atractor de electrones (-F) o un grupo donador (-CH₃). Como por ejemplo **M3-27**, **M3-18**, **M3-19**, **M3-20** y **M3-21** que contienen un H en la posición 5 del anillo del benzimidazol frente a los compuestos **M3-22**, **M3-23**, **M3-24**, **M3-25** y **M3-26** que contienen un metilo en dicha posición o bien los flúor derivados **M3-02**, **M3-028**, **M3-29**, **M3-30** y **M3-31**.

b) El aminoácido que forma parte de su estructura:

Dejando de lado los compuestos derivados del 2-aminobenzimidazol que son los que han mostrado más actividad antimalárica *in vitro*, los compuestos formados por la β-alanina como espaciador, presentan mayor porcentaje de inhibición que los compuestos formados por la glicina como por ejemplo **M3-08** vs **M3-22**, **M3-09** vs **M3-23** o **M3-14** vs **M3-28** entre otros. Por otro lado, los derivados formados con la L-prolina son los que han mostrado menor actividad.

c) El núcleo sintético:

En términos generales los compuestos que han mostrado más actividad antimalárica a las 48 y 96 horas, están formados por el nucleó 1*H*-benzimidazol-2-substituido, es decir, los compuestos; **M3-46**, **M3-47**, **M3-48**, **M3-49** y **M3-50**.

d) El residuo ácido carboxílico aromático con el que están derivatizados:

En general, los compuestos que mostraron más actividad fueron los resultantes de la *N*-acilación con el ácido carboxílico 3,4-difluorobenzoico **126** es decir, los compuestos **M3-07**, **M3-21**, **M3-26**, **M3-31**, **M3-17**, **M3-50**.

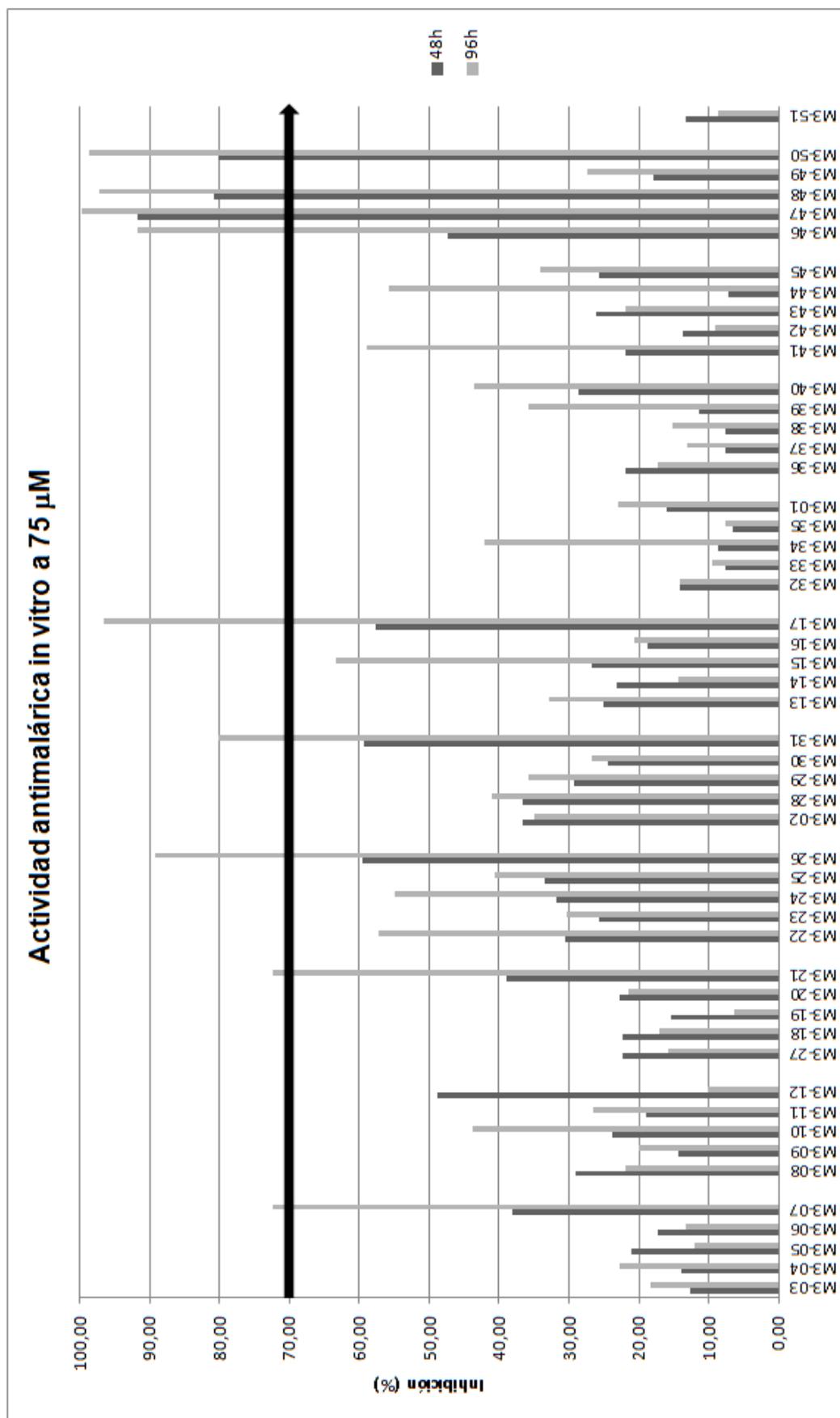


Figura 4. 15. Actividad antimalárica *in vitro* de los derivados del benzimidazol a 75 µM a las 48 y 96 h de su incubación. Los compuestos se presentan agrupados según su núcleo sintético.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los compuestos que a 75 μM mostraron una inhibición del crecimiento de la parasitemia superior al 70% respecto al cultivo control, para seguir ensayando su actividad *in vitro* a concentraciones más bajas (50 y 25 μM) (Figura 4.16).

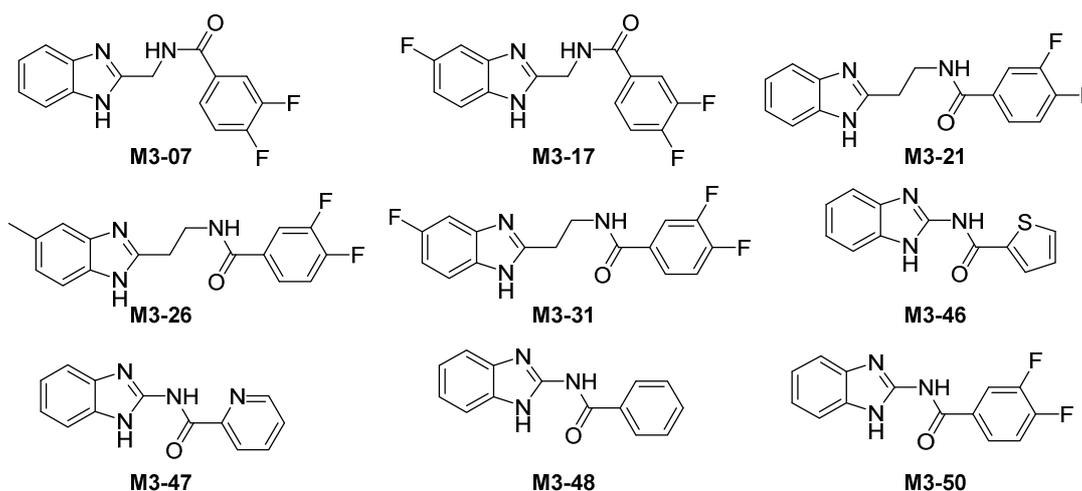
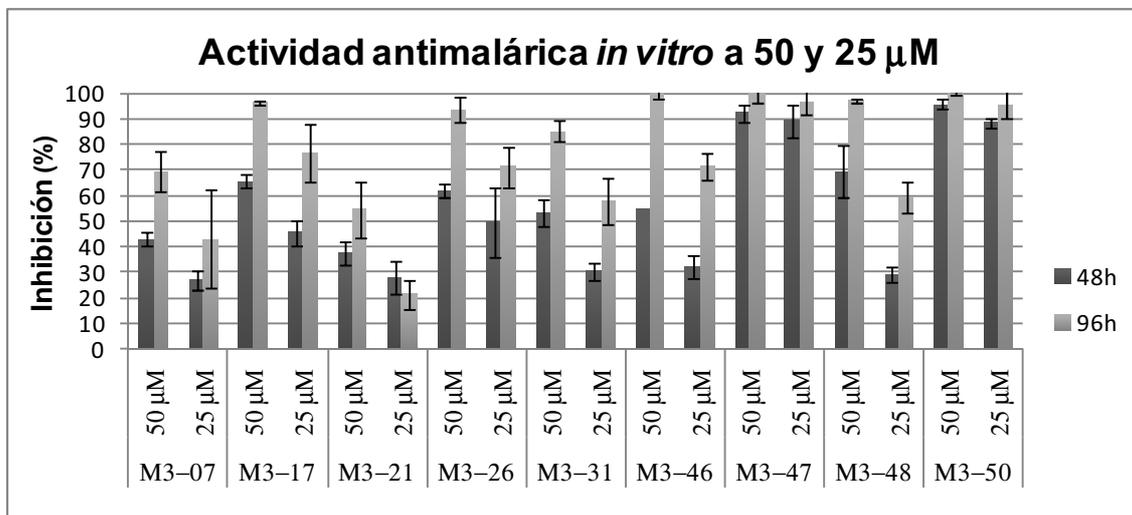


Figura 4. 16. Estructura y actividad antimalárica *in vitro* a 50 y 25 μM de los compuestos seleccionados frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum*. Los resultados se presentan en términos de inhibición de la proliferación parasitaria (%) tomando como referencia el cultivo control mediante citometría de flujo.

Ninguno de los compuestos estudiados presentó *delayed death effect*, a excepción de **M3-17** y **M3-46** que mostraron un leve efecto. La diferencia entre la inhibición de la parasitemia a las 48 y a las 96 horas de la mayoría de los compuestos, no era substancialmente grande como para asumir que los compuestos actuaban a nivel apicoplástico.

Después de ensayar la actividad antimalárica a 50 y 25 μM de los compuestos seleccionados, decidimos descartar los compuestos **M3-07**, **M3-21** y **M3-31**, pues a 25 μM mostraron un notable descenso de la actividad. Los compuestos **M2-47** y **M2-50** fueron los

más activos, ambos inhibían el 90% de la proliferación parasitaria a las 96 horas a una concentración de 25 μM . Aún así, decidimos calcular la IC_{50} de todos los compuestos que a una concentración de 25 μM y pasadas 96 horas de la incubación, inhibían el 60% de la parasitemia del cultivo.

Para calcular la IC_{50} , determinamos mediante citometría de flujo la concentración de cada compuesto a la cual obteníamos una inhibición de la parasitemia superior al 90% e inferior al 10%. Ensayamos los compuestos a distintas concentraciones dentro de dicho rango procediendo al cálculo de la IC_{50} a través de las curvas dosis-respuesta obtenidas. Los valores de IC_{50} fueron determinados mediante el software *Prisma GraphPad* con un nivel de confianza del 95%.

Todos los compuestos mostraron un valor de IC_{50} inferior a 40 μM (Figura 4. 17), siendo los compuestos **M3-47** y **M3-50** los más activos, tal y como se había predicho con los ensayos preliminares (Figura 4. 16). La diferencia de magnitud entre los valores de IC_{50} obtenidos a las 48 y 96 horas son relativamente pequeños en todos los casos. Se atribuyen a una acción prolongada del compuesto y no a la inhibición específica de las enzimas apicoplásticas como se ha comentado anteriormente. Los compuestos ensayados presentaron una actividad antimalárica moderada al ser comparados con los valores de IC_{50} obtenidos para la cloroquina. No obstante, los derivados del benzimidazol podrían ser un nuevo punto de partida para el diseño y síntesis de nuevos compuestos antipalúdicos.

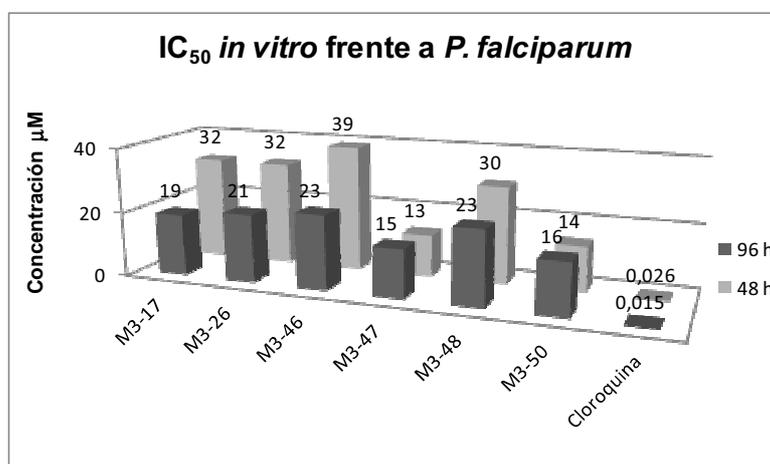


Figura 4. 17. Valores de IC_{50} (μM) de los compuestos seleccionados *in vitro* calculados con el software *Prisma GraphPad* mediante curvas de dosis-respuesta a distintas concentraciones (100, 75, 50, 40, 25, 20, 15, 10 y 5 μM).

4.3.5.2. Ensayos de aminoacilación

Al no obtener experimentalmente una diferencia significativa entre la actividad antimalárica de los compuestos registrada a las 48 y 96 horas (*delayed death effect*), descartamos que dichos compuestos inhibieran la enzima apicoplástica PfLysRS. No pudimos realizar ensayos de aminoacilación *in vitro* con la enzima GlnRS de *P. falciparum* por problemas en la purificación de la enzima y la reproducibilidad del ensayo. Tampoco tuvimos la posibilidad de hacer ensayos de aminoacilación con IleRS-2 de *P. falciparum* pues no conocíamos ningún grupo que trabajara con dicha enzima.

Para investigar si los benzimidazoles seleccionados (**M3-17**, **M3-26**, **M3-46**, **M3-47**, **M3-48** y **M3-50**) podían inhibir otras ARNt sintetasas de *P. falciparum*, se mandaron los compuestos al departamento de *Architecture et Réactivité de l'ARN* en el *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg* (CNRS), donde la Dra. Joëlle Rudinger-Thirion, realizó ensayos de aminoacilación con las enzimas TryRS, AspRS y AsnRS de *P. falciparum*. Se predice, mediante estudios computacionales, que estas tres enzimas están doblemente codificadas, estando presentes tanto en el citosol como en el apicoplasto del parásito.

Para ello se disolvieron los compuestos a una concentración de 50 mM en DMSO a excepción de **M3-47** que fue disuelto a 25 mM por problemas de solubilidad. Se realizó el ensayo de aminoacilación de cada compuesto a una concentración final de 50 μ M, utilizando las tres proteínas purificadas, los tres aminoácidos marcados radioactivamente ($[^3\text{H}]$) y el ARN transcrito para cada aminoácido (ver protocolo en el apartado 6.1.2.8 de la experimental).

En ninguno de los casos se registró inhibición de la actividad enzimática, descartando estas tres enzimas como posibles dianas farmacológicas de los compuestos ensayados.

4.3.5.3. Evaluación de la actividad antibacteriana

Como se ha descrito anteriormente, elegimos la enzima citosólica GlnRS y las apicoplásticas LysRS-2 y IleRS-2 de *P. Falciparum* para realizar el *docking* virtual en busca de nuevos fármacos selectivos. Desde un punto de vista filogenético estas enzimas son cercanas a las homólogas bacterianas y distantes de las humanas. Como no pudimos determinar la diana terapéutica de los derivados de benzimidazol, decidimos ensayar su actividad antibacteriana frente a *E. Coli*.

Para ello evaluamos la capacidad de inhibir la proliferación de un cultivo de *E. Coli* de la cepa NovaBlue[®] Gigasingles a partir de la curva del crecimiento bacteriano. Se decidió mediante ensayos preliminares, estudiar el crecimiento bacteriano durante las 6 horas posteriores de la adición del compuesto al medio del cultivo. Durante esta fase exponencial

del crecimiento bacteriano, se podía registrar el comportamiento de los compuestos sin llegar a la fase estacionaria o de saturación del cultivo (Figura 4. 18). Se evaluaron los compuestos a 100, 50 y 25 μM y se midió la viabilidad bacteriana a través de la densidad del cultivo registrada por absorbancia a $\lambda = 600 \text{ nm}$ (ver protocolo en la apartado 6.1.4.3 de la experimental).

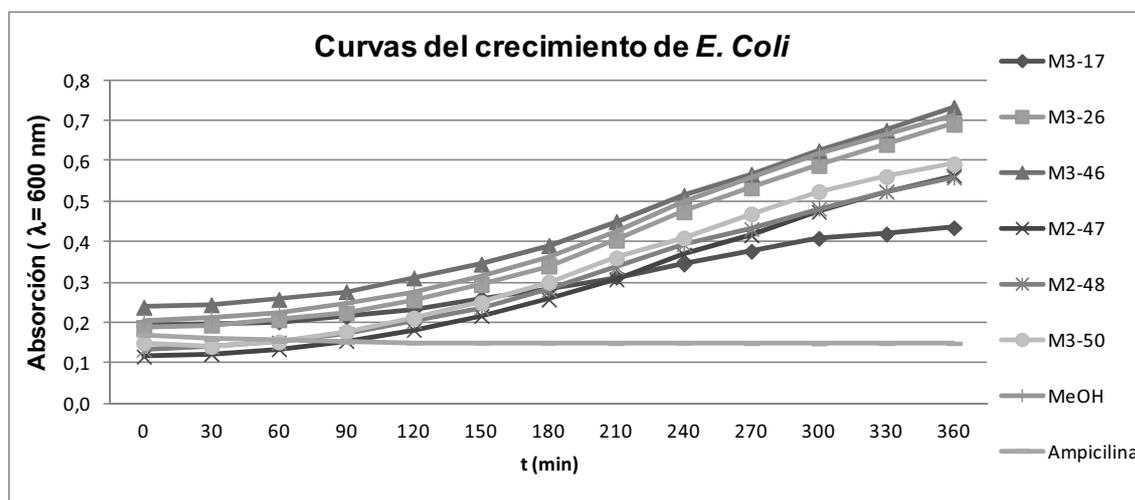


Figura 4. 18. Cinética del crecimiento de un cultivo de *E. Coli* durante las 6 h posteriores a la agregación de los compuestos ensayados a 100 μM . Se hizo una lectura de la densidad del cultivo cada 30 min. Se tomó como referencia la lectura de la absorbancia del cultivo tratado con MeOH. Se utilizó ampicilina como control positivo.

Haciendo una lectura de los resultados registrados a concentraciones elevadas (100 μM), pudimos clasificar los compuestos en tres grupos distintos según su actividad (Figura 4. 19); a) los compuestos **M3-26** y **M3-46** mostraron un comportamiento análogo al control negativo (MeOH), es decir, no afectaron significativamente al crecimiento bacteriano, manteniendo la viabilidad bacteriana por encima del 90% al finalizar el ensayo, b) los derivados del benzimidazol **M3-47**, **M3-48** y **M3-50** retrasaron levemente el crecimiento, inhibiendo aproximadamente un 20% la proliferación de *E. Coli* con respecto al control negativo y c) el compuesto **M3-17** mostró una actividad antibacteriana moderada, retrasando e inhibiendo un 40% el crecimiento bacteriano. Sin embargo, a concentraciones relativamente bajas 50 y 25 μM ningún compuesto mostró actividad antimicrobiana, manteniendo la densidad bacteriana por encima del 90%, a excepción del benzimidazol **M3-17**, que mostró una toxicidad algo mayor (85% viabilidad).

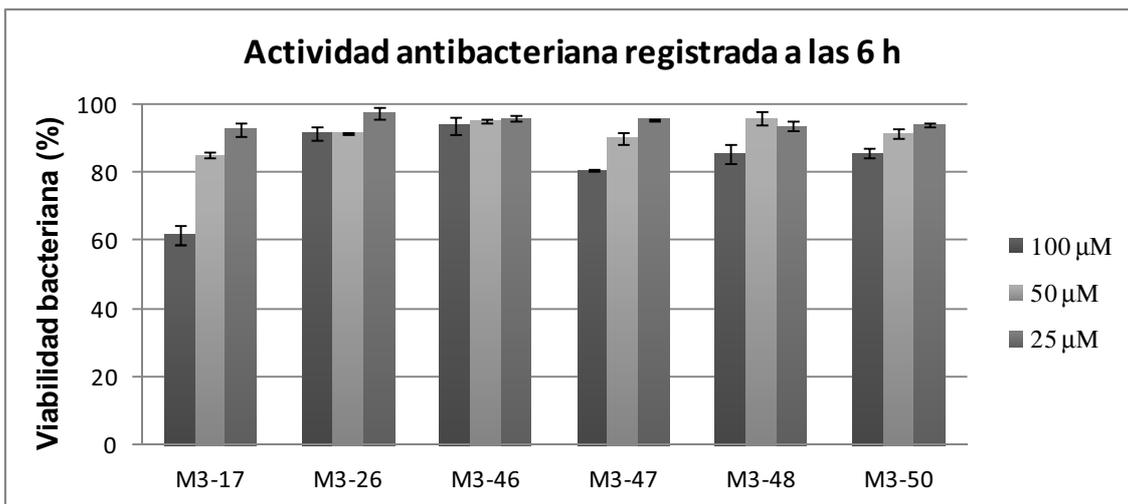


Figura 4. 19. Ensayo de proliferación del crecimiento de un cultivo de *E. Coli* a las 6 h del tratamiento con los derivados de benzimidazol seleccionados a 100, 50 y 25 μM . Los resultados se presentan en términos de viabilidad celular (%) y están referenciados al cultivo control.

Si la diana terapéutica de estos benzimidazoles fueran las enzimas ARS de *P. falciparum*, esperaríamos, una inhibición del crecimiento bacteriológico mayor que el registrado.

Para descartar la posibilidad de que el sistema de eflujo, utilizado para eliminar los compuestos tóxicos al exterior celular, de la bacteria *E. coli* fuera la causa por la cual no registramos un efecto antibacteriano marcado de los compuestos, decidimos realizar ensayos de aminoacilación con la proteína Gln-tRNA de *E. Coli*. Dichos ensayos fueron elaborados por Shirin Fatma del *Department of Chemistry* en *Wayne State University*, de Detroit (ver protocolo en el apartado 6.1.4.4 de la experimental).

Los compuestos, fueron evaluados a 5, 100 y 200 μM (Figura 4. 20), sin interferir en el funcionamiento de la enzima bacteriana. Se determinó la cantidad de pmoles de ^3H -Gln-tRNA^{Gln} generada por la enzima sin observarse ninguna diferencia significativa con respecto al control. El compuesto **M2-47** no pudo ser evaluado por problemas de solubilidad.

Ensayo de aminoacilación E. Coli (200 μM)

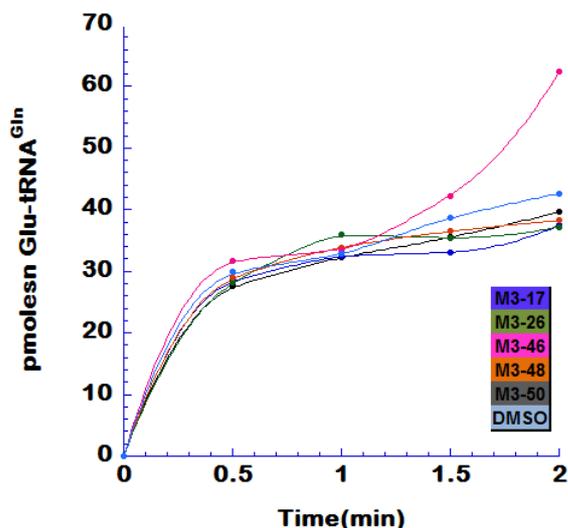


Figura 4. 20. Resultados del ensayo de aminoacilación *in vitro* de la enzima Gln-ARNt de *E. Coli*. Los benzimidazoles ensayados a 200 μM no interfieren en el funcionamiento de la enzima.

4.3.5.4. Evaluación de la citotoxicidad

Determinamos la citotoxicidad de los compuestos utilizando el ensayo de proliferación WST-1 con la línea celular HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*) adquiridas en el laboratorio de *Traducció genètica* del *Institut de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona.

El fundamento del ensayo de proliferación celular es cuantificar con un análisis espectroscópico el crecimiento y la viabilidad celular de un cultivo. En este caso se utiliza el reactivo WST-1 que es metabolizado por las enzimas mitocondriales deshidrogenasa de las células viables, transformándolo en sales solubles de formazán detectables por absorbancia a $\lambda = 460$ nm (ver protocolo en la apartado 6.1.3 de la experimental).

Se decidió ensayar los compuestos a 100 y 50 μM , considerando que triplicar y duplicar respectivamente las concentraciones adquiridas para la IC_{50} frente *P. falciparium*, proporcionaba una ventana terapéutica razonable. Se añadieron las soluciones de los compuestos en los cultivos celulares de HEK-293T y se incubaron las células durante un periodo de 24, 48 y 72 horas. Se determinó la formación del formazán a distintos tiempos, adquiriendo una lectura óptima de la proliferación celular a las 4 horas de la adición de WST-1.

Los benzimidazoles ensayados mostraron una citotoxicidad moderada frente a la línea celular HEK-293T (Figura 4. 21). A concentraciones elevadas (100 μM) y después de incubar los compuestos durante 24 horas, ningún compuesto mostró una viabilidad superior al 80%. Los compuestos **M3-17**, **M3-26** y **M3-47** fueron los que mostraron una toxicidad mayor, manteniendo la viabilidad celular alrededor del 60%. En la mayoría de casos no se observó un cambio significativo de la actividad al disminuir a la mitad la concentración de los compuestos a ensayar. Los compuestos **M3-46**, **M3-48** y **M3-50** que mostraron menor citotoxicidad a 100 μM , tan sólo aumentaron la viabilidad celular entre el 1 y el 7%, mientras que resto alcanzaron un aumento entre el 8 y el 12%.

En la mayoría de casos la viabilidad celular se mantuvo o disminuyó al aumentar el tiempo de incubación de los compuestos. Esta toxicidad creciente podría estar relacionada con la farmacocinética del compuesto aunque no se ha estudiado si estos compuestos se acumulan en el interior celular, tardan en degradarse o forman metabolitos con carácter tóxico durante dicho proceso. Otro factor que podría estar relacionado con la toxicidad es la poca solubilidad de los compuestos en el medio del cultivo, pues a concentraciones elevadas (200 μM) los compuestos precipitaron.

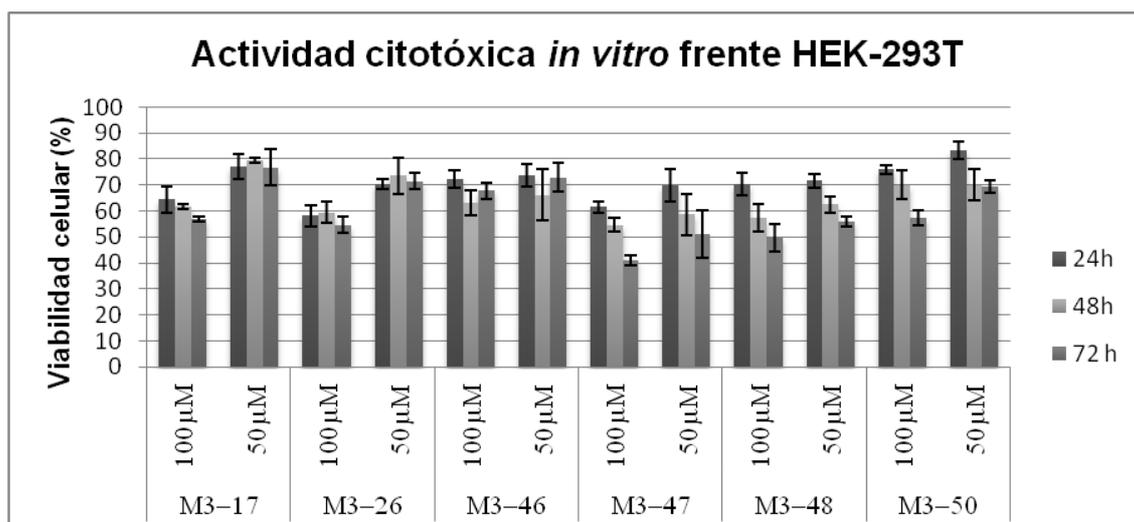


Figura 4. 21. Ensayo de citotoxicidad con la línea celular HEK-293T de los benzimidazoles seleccionados a 100 y 50 µM a distintos tiempos mediante el método de proliferación celular WST-1. Los resultados se presentan en términos de viabilidad celular (%) y están referenciados al cultivo control.

4.3.5.5. Evaluación de la actividad hemolítica

La hemólisis anémica es decir, la disminución del número de glóbulos rojos debido a una reducción del tiempo de vida de los eritrocitos, puede ser inducida por el uso de fármacos ya sea mediante una toxicidad directa del fármaco, un metabolito de éste o un excipiente en la formulación del compuesto terapéutico (hemólisis tóxica) o bien, como causa de una reacción inmunológica (hemólisis alérgica)³². La hemólisis inducida por el uso de fármacos es relativamente extraña, aunque puede suponer un síntoma de toxicidad severo. Un ejemplo es el caso de la primaquina, una 8-aminoquinolina efectiva contra el paludismo que ha sido utilizada como terapia única o bien combinada con la cloroquina para combatir la resistencia parasitaria. El uso de dicho fármaco, ha sido limitado, pues induce anemia hemolítica, particularmente en aquellos individuos deficientes de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa³³. Además, el parásito de la malaria en el estadio de trofozoito degrada la hemoglobina para su subsistencia, hecho que provoca una anemia severa, siendo ésta, una de las causas de la mortalidad infantil por malaria³⁴.

Por todo ello, creímos interesante determinar la ruptura o lisis de la membrana de los eritrocitos causada por los derivados de benzimidazol a distintas concentraciones mediante un ensayo de hemólisis *in vitro*, detectando por análisis espectroscópico la liberación de la hemoglobina en el sobrenadante (ver protocolo en el apartado 6.1.1 de la experimental).

Tras incubar durante 3 horas los compuestos seleccionados a una concentración final de 100, 50 y 25 μM , no se observó una liberación significativa de la hemoglobina indicando que dichos derivados del benzimidazol no alteran las membranas de los eritrocitos al ser transportados al interior celular (Tabla 4. 2).

Concentración (μM)	Lisis (%)					
	M2-17	M2-26	M2-46	M2-47	M2-48	M2-50
100	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.01	1.44 \pm 0.41	0.00 \pm 0.11	0.15 \pm 0.63	0.26 \pm 0.04
50	0.00 \pm 0.10	0.00 \pm 0.09	0.00 \pm 0.09	0.00 \pm 0.05	0.00 \pm 0.14	0.00 \pm 0.18
25	0.00 \pm 0.15	0.00 \pm 0.14	0.00 \pm 0.03	0.00 \pm 0.13	0.00 \pm 0.06	0.00 \pm 0.09

Tabla 4. 2. Activada hemolítica *in vitro* de los derivados del benzimidazol a distintas concentraciones, referenciando los resultados al 100% de lisis obtenidos con el tratamiento de los eritrocitos con Tritón-X.

4.3.6. Evaluación *in vivo* de la quimioteca de derivados del benzimidazol

4.3.6.1. Modelo *zebrafish*

Los benzimidazoles seleccionados fueron enviados a Portugal al grupo del Dr. Manuel Santos (*ARN Biology Laboratory University of Aveiro*) para evaluar su toxicidad así como posibles efectos adversos en el proceso de embriogénesis usando *zebrafish* como modelo animal. Todos los experimentos se realizaron acorde con la ley europea (1010/63/EU) para la experimentación animal utilizando la metodología estándar³⁵.

Para ello, se disolvieron los compuestos en DMSO (**M3-47** y **M3-48**) o MeOH (**M3-17**, **M3-26** y **M3-46**) a una concentración entre 60 y 150 mM, para realizar disoluciones finales de 1mM en H₂O, a excepción de **M3-50** que no pudo ser ensayado por problemas de solubilidad. Se analizaron por microscopía los embriones a las 4 horas posteriores de ser fertilizados y se eligieron aquellos que mostraron un desarrollo normal (10 embriones para cada ensayo). Posteriormente se añadieron los compuestos a distintas concentraciones (de 5 a 100 μM) en el medio. Para evaluar la toxicidad de los compuestos se observó el crecimiento de los embriones cada 24 horas durante los 4 días posteriores al tratamiento. Los ensayos se realizaron por duplicado (ver protocolo en la apartado 6.2.1 de la experimental).

A altas concentraciones (50, 75 y 100 μM) los compuestos **M3-26**, **M3-46** y **M3-48** fueron letales para el 100% de los embriones (Figura 4. 22). El compuesto **M3-48**, resultó ser el más tóxico; una concentración final de 5 μM fue suficiente para inducir la muerte a más del 50% de los embriones a las 48 horas del tratamiento, mientras que a concentraciones mayores se observó un 100% de mortalidad a las 24 horas. El benzimidazol **M3-26**, a una concentración de 30 μM causó una mortalidad del 5% a las 72 horas, pero al aumentar la

concentración a 50 μM mostró una letalidad del 100% de los embriones a las 24 horas del inicio del ensayo. Un comportamiento muy parecido se registró para el compuesto **M3-46**, que a concentraciones superiores a 40 μM indujo a la mortalidad del 100% de los embriones a las 48 horas del tratamiento.

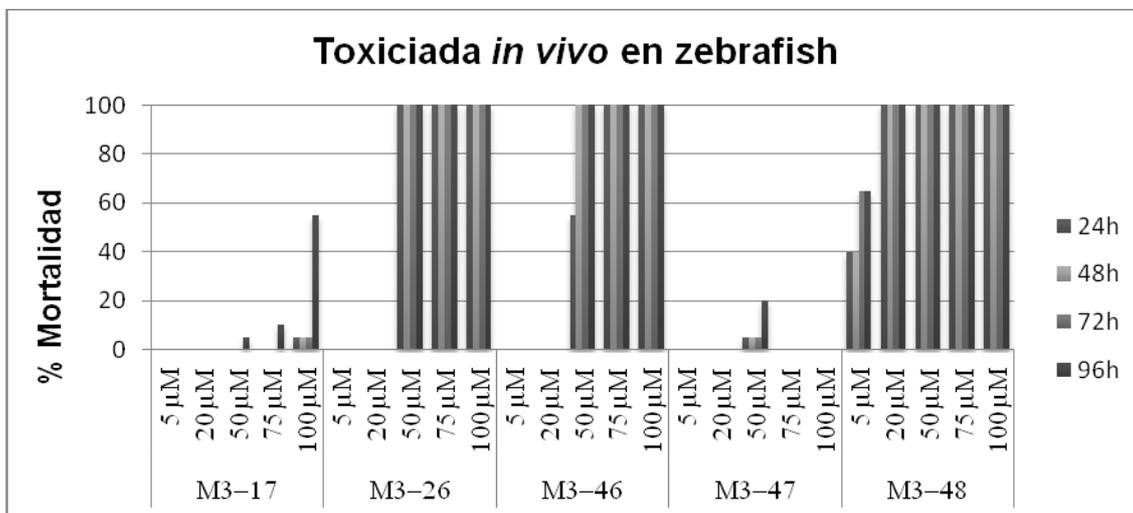


Figura 4. 22. Ensayo de toxicidad *in vivo* de los benzimidazoles seleccionados con actividad antimalárica frente al modelo animal *zebrafish*. Registro del efecto letal de los compuestos a distintas concentraciones, usando como control embriones tratados con la máxima concentración de DMSO y MeOH utilizadas para solubilizar los compuestos.

Una conducta muy distinta se registró al tratar los embriones de *zebrafish* con los benzimidazoles **M3-17** y **M3-47**. El compuesto **M3-17** a 100 μM causó una mortalidad del 50% de a las 96 horas del tratamiento, mientras que a 75 μM sólo se registró una letalidad del 10% de los embriones durante el mismo periodo de tiempo. La concentración máxima ensayada para **M3-17** durante la cual no se registró ningún signo de nocividad en todo el ensayo, fue a 20 μM . El compuesto **M3-47** fue el que mostró menor índice de letalidad en todas las concentraciones ensayadas. Se repitió el ensayo con dicho compuesto por motivos de coherencia en los resultados, pues a 50 μM se observó más mortalidad (20% a las 96 horas) que a 75 y 100 μM , pero no se registraron cambios significativos en los resultados.

Además de la mortalidad inducida por los benzimidazoles, la presencia de anomalías morfológicas y fisiológicas de los embriones durante el ensayo, es un buen indicador de la toxicidad de los compuestos. Para ello, se monitorizó el desarrollo de los embriones durante las 96 horas posteriores de su tratamiento, para registrar diversas alteraciones específicas;

a) Retraso en el desarrollo embrionario (evaluación a las 24 horas)

Sólo los compuestos **M3-46** y **M3-48** indujeron un observable retraso en el desarrollo embrionario a las 24 horas del inicio del ensayo (Figura 4. 23). Dicha anomalía afectó a un 90% de los embriones tratados con **M3-48** a una concentración de 5 μ M. El resto de concentraciones evaluadas para dicho compuesto ocasionó la muerte de los embriones. Se registró un retraso embrionario del 5% cuando se evaluó **M3-46** a 30 μ M, pero a 40 μ M dicho retraso, afectó al 100% de los embriones.

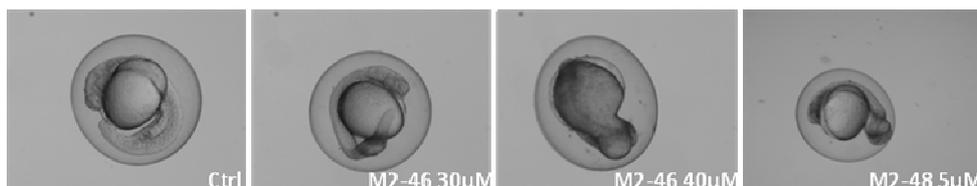


Figura 4. 23. Desarrollo embrionario a las 24 h del inicio del ensayo. Los benzimidazoles **M3-46** y **M3-48** causaron un retraso del crecimiento embrionario a 40 y 5 μ M respectivamente. No se observó ninguna anomalía de los embriones tratados con **M3-46** a 30 μ M respecto los controles.

b) Alteración de la pigmentación (evaluación a las 48 horas)

Una alteración o un retraso de la pigmentación de los embriones de *zebrafish* está directamente relacionada con una afectación de la formación de la cresta neural en vertebrados³⁶.

Sólo los compuestos **M3-46** a 20 μ M y **M3-47** a concentraciones superiores a 30 μ M alteraron dicha pigmentación (Figura 4. 24). Cabe resaltar una vez más que los resultados obtenidos para **M3-47** no son correlativos con las concentraciones evaluadas. Creemos que dicho comportamiento podría estar relacionado con una mala homogenización de la solución madre utilizada (1 mM) o bien, que el compuesto precipita en el medio del ensayo sin ser perceptible a simple vista.

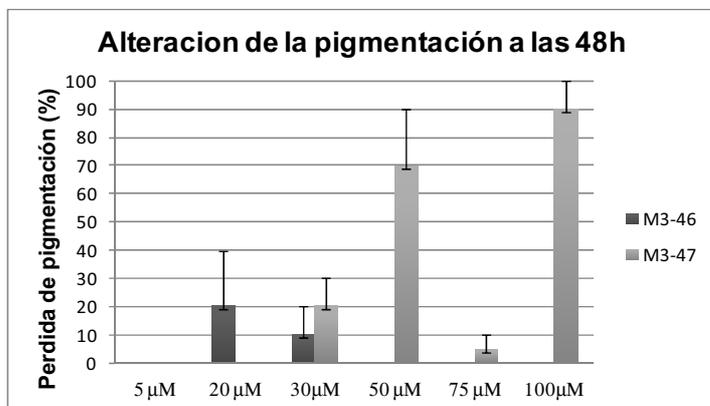


Figura 4. 24. Alteraciones en la pigmentación de los embriones de *zebrafish* registradas a las 48 h del inicio del ensayo como índice de una posible afectación de la cresta neural en vertebrados. Se registraron alteraciones en los embriones tratados con **M3-47** (>30 μ M) y aquellos tratados con **M3-46** (a altas concentraciones dicho compuesto resultó letal).

c) Edema pericárdico (evaluación a las 72 horas).

La observación de un edema pericárdico en *zebrafish* a las 72 horas del inicio del ensayo, indica una posible anomalía en el sistema cardiovascular y/o una alteración del sistema circulatorio en los vertebrados, indicando una toxicidad aguda.

Dos de los compuestos que mostraron ser más letales para los embriones (**M3-46** y **M3-48**), produjeron una inflamación de la membrana que recubre el corazón a concentraciones cercanas o incluso inferiores a la IC_{50} calculada para *P. falciparum* (Figura 4. 25). El caso más extremo fue el provocado por **M3-48** que a 5 μ M afectó a un 80% de los embriones. Por otro lado, el compuesto **M3-46** afectó gravemente el pericardio a 30 μ M.

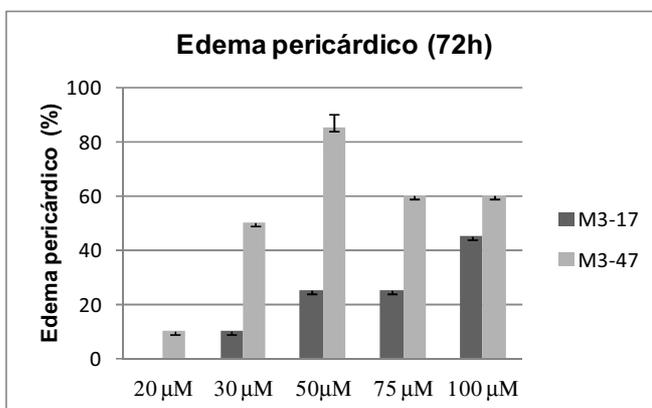
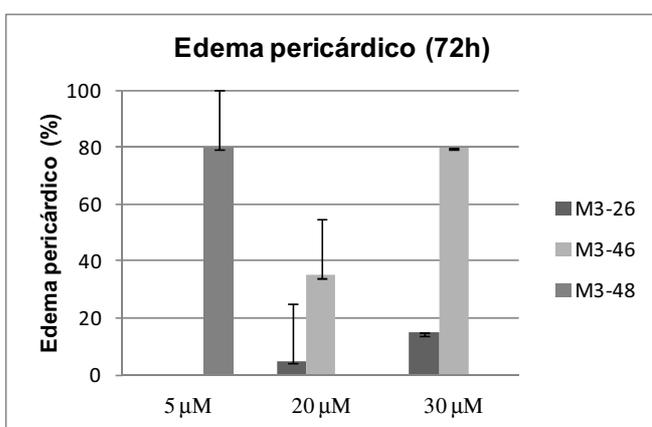


Figura 4. 25. Edema pericárdico registrado a las 72 h del inicio del ensayo. En la gráfica superior se muestran los compuestos más tóxicos de los cuales no se pudo registrar el efecto a concentraciones superiores por mortalidad de los embriones. En la gráfica inferior se muestran los compuestos menos tóxicos de los cuales no se observó ninguna alteración de los embriones a bajas concentraciones (5 y 15 μ M).

Sin embargo, es sorprendente que el compuesto **M3-26**, que es letal a concentraciones cercanas a 50 μ M, pues no se ensayó su efecto a 40 μ M, produzca un edema pericárdico relativamente pequeño a 30 μ M afectando sólo a un 10% de los embriones. Los compuestos menos letales, **M3-17** y **M3-47**, mostraron una afectación del pericardio correlativa con la concentración. Los síntomas más agudos se obtuvieron al ensayar los compuestos a 100 μ M, afectando a un 40 y 60% de los embriones respectivamente. No obstante, a concentraciones que duplican la IC_{50} calculada para *P. falciparum*, se obtuvo

una afectación de tan sólo un 10% para los embriones tratados con **M3-17** y un 50% para aquellos expuestos al benzimidazol **M3-47**.

d) Eclosión (evaluación a las 72 horas)

En condiciones normales, los embriones de *zebrafish* eclosionan a las 72 horas. Algunos compuestos pueden afectar a las enzimas responsables de eliminar la membrana que rodea a los huevos maduros denominada corión, retrasando así el nacimiento de los peces. Todos los benzimidazoles ensayados retrasaron el nacimiento de los peces a distintas concentraciones (Figura 4. 26).

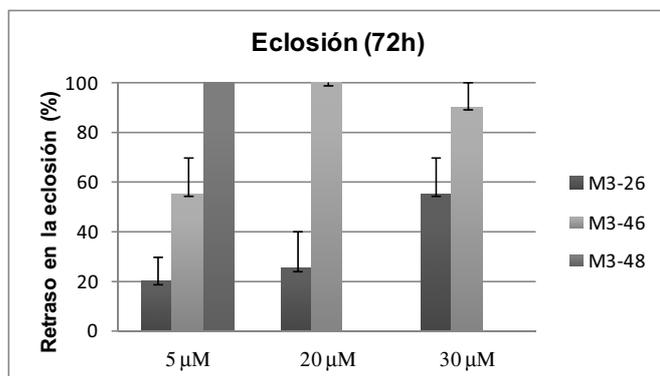
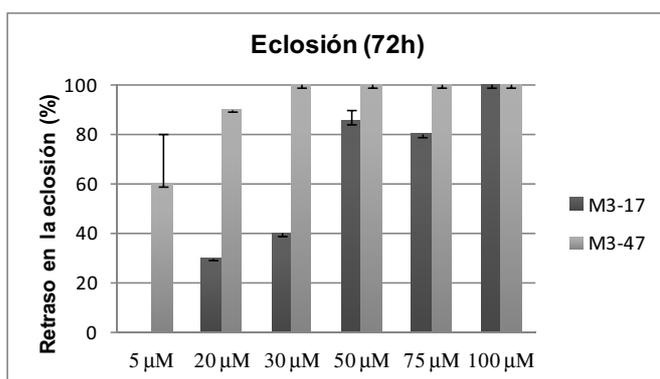


Figura 4. 26. Retraso en el nacimiento de los peces *zebrafish* provocados por el tratamiento de los benzimidazoles a distintas concentraciones. En la gráfica superior se muestran los compuestos que expusieron más índice de mortalidad durante el ensayo y en la gráfica inferior se muestran los menos letales.

El compuesto más tóxico, **M3-48**, mostró un retraso de la eclosión al 100% los embriones tratados a 5 µM, mientras que **M3-46** mostró el mismo efecto a 20 µM. No obstante fue necesaria una concentración de 30 µM de **M3-26** retrasar la eclosión al 50% de los embriones. No se pudo evaluar el efecto de este compuesto a 50 µM por mortalidad prematura de los embriones. El compuesto **M3-47**, que no mostró letalidad durante el ensayo, retrasó notablemente la eclosión a bajas concentraciones, afectando a un 60% de los embriones tratados a 5 µM. El efecto del benzimidazol **M3-17** fue menos pronunciado a bajas concentraciones, siendo necesaria una concentración de 50 µM para afectar al 80% de los embriones.

Considerando los resultados obtenidos en el ensayo de *zebrafish* donde se evaluó la mortalidad, el retraso del crecimiento embrionario, la inducción al edema pericárdico y el retraso en la eclosión clasificamos a los compuestos **M3-26**, **M3-46** y **M3-48** como altamente tóxicos y no aptos para su uso en vertebrados. Por otro lado, **M3-47** causa un importante retraso de la eclosión a bajas concentraciones e induce edema pericárdico cuando se ensaya a concentraciones que duplican a la IC₅₀ registrada para *P. falciparum*. Con todo, los benzimidazoles **M3-17** y **M3-47** muestran una baja toxicidad, pues no

muestran ser letales a altas concentraciones, indicando que son compuestos prometedores para el tratamiento de infecciones causadas por *P. falciparum* en vertebrados.

4.3.6.2. Modelo murino

Los benzimidazoles más prometedores, **M3-17** y **M3-47**, fueron enviados a Madrid al grupo del Dr. José M. Bautista (*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV-Universidad Complutense de Madrid*) para evaluar la actividad antimalárica *in vivo* en ratones de la cepa BALB/cAnNHsd inoculados con 2×10^7 eritrocitos murinos infectados por *Py17XL* (*P. yoelii*) (ver protocolo en la apartado 6.2.2. de la experimental).

Se utilizaron 5 ratones para evaluar la actividad antimalárica de cada compuesto, administrándoles por inyección intraperitoneal una dosis (2.4 mg/kg.día) a las 2 horas de la infección del murino con *P. yoelii* y manteniendo el tratamiento durante los 3 días posteriores. En este caso, la baja solubilidad de los compuestos limitó la dosis administrada siendo esta muy inferior a la que le correspondería teniendo en cuenta que la dosis estandarizada para la cloroquina en este tipo de ensayos es de 5 mg/kg.día.

El compuesto **M3-17** no fue efectivo para erradicar la hiperparasitemia inducida a los ratones, sin embargo el compuesto **M3-47** mostró una notable actividad antimalárica (Figura 4. 27). Durante los tres días posteriores al tratamiento, un 80% de los ratones se mantuvo con vida, cifra que disminuyó hasta el 60% a partir del octavo día. Desde del noveno día y durante los cinco días restantes tan sólo uno de los ratones sobrevivió

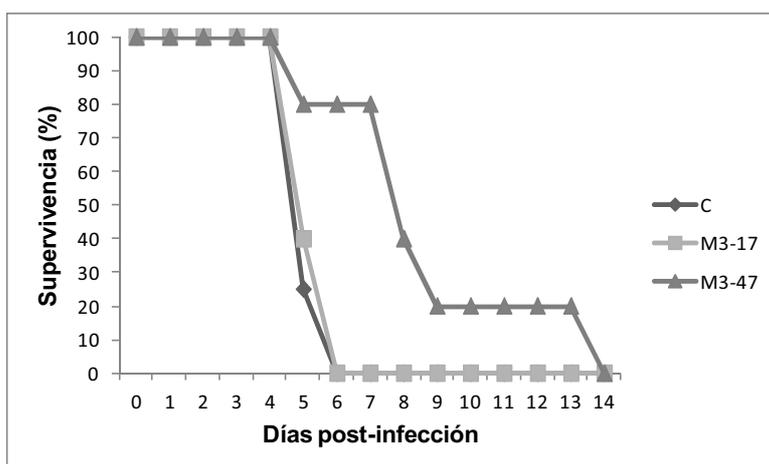


Figura 4. 27. Resultado del ensayo *in vivo* con modelos murinos de la cepa BALB/cAnNHsd infectados con *Py17XL* donde se evalúa la supervivencia de los ratones tratados. Se administra una dosis (2.4 mg/kg.día) del benzimidazol **M3-17** y **M3-47** durante los 4 primeros días.

Al obtener estos resultados tan esperanzadores para el **M3-47**, decidimos sintetizar de nuevo el compuesto y reevaluar su actividad *in vivo*. El efecto del compuesto fue totalmente discordante con los resultados observados en el primer ensayo (Figura 4. 28).

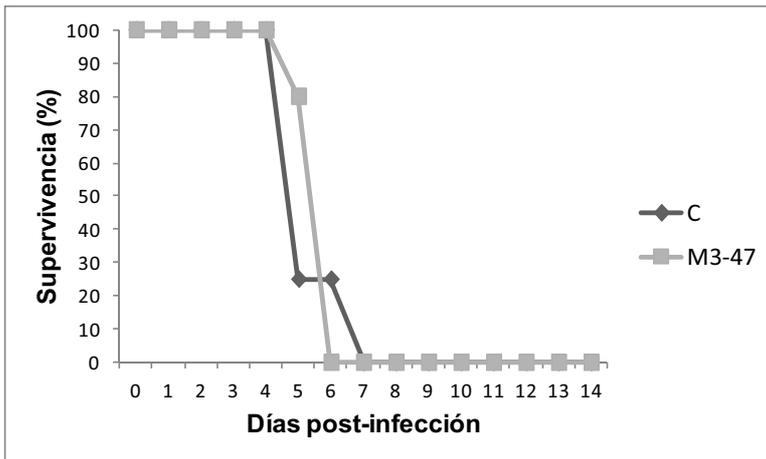


Figura 4. 28. Resultado de la réplica del ensayo *in vivo* con modelos murinos de la cepa BALB/cAnNHsd infectados con *Py17XL*. Se administra una dosis diaria del benzimidazol **M3-47** durante los 4 primeros días. Los resultados de este ensayo fueron discordantes con los obtenidos en primer lugar por causa de homogenización de la muestra.

En este segundo ensayo no se registró actividad inhibitoria de la hiperparasitemia inducida en los ratones. Estas derivaciones pueden ser causa de la insolubilidad del compuesto, pues nos notificaron que el benzimidazol **M3-47** no pudo ser solubilizado del todo hecho que influyó negativamente en los resultados. Probablemente no todos los ratones ensayados recibieron la misma cantidad del compuesto por falta de homogeneidad de la muestra analizada.

4.4 Conclusiones

A partir de sustituciones químicas en las posiciones 2 y 5 del esqueleto del benzimidazol se pueden sintetizar un número elevado de derivados, ofreciendo la posibilidad de crear familias de compuestos de forma rápida y eficiente.

Se ha demostrado que el anillo de benzimidazol puede ser una estructura privilegiada para la síntesis de compuestos con actividad antimalaria. Distintos derivados de esta estructura han mostrado eficacia *in vitro* frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum* en el rango μM , aunque no han sido efectivos para inhibir la hiperparasitemia provocada en murinos con *P. yoelii* a bajas concentraciones.

No se ha podido demostrar la diana terapéutica de estos compuestos, aunque presentan cierta selectividad frente a *P. falciparum*. Parece que dichos compuestos no actúan a nivel apicoplástico, pues no se ha registrado una diferencia significativa de la actividad a las 48 y 96 horas (*delayed death effect*). Es por ello que se ha descartado la posibilidad de que inhiban selectivamente la LysRS apicoplástica de *P. falciparum*. No obstante, no podemos descartar que estos derivados actúen inhibiendo a la enzima GlnRS citosólica de *P. falciparum*, para la cual fueron diseñados. Aunque no sabemos su modo de acción, podemos afirmar que no son capaces de inhibir las enzimas TryRS, ASpRS y AsnRS de *P. falciparum*.

Los benzimidazoles seleccionados con actividad antimalárica no han sido efectivos como antibacterianos frente a *E. Coli* a altas concentraciones, ni tampoco han inhibido a la enzima Gln de la bacteria en ensayos de aminoacilación con la proteína purificada.

Se ha demostrado que no causan la lisis de los eritrocitos humanos, ni presentan una actividad citotóxica elevada frente a la línea celular humana HEK-293T. No obstante, una vez evaluados sus efectos genotóxicos en el modelo de *zebrafish* la mayoría de los compuestos se han considerado tóxicos para su uso en vertebrados.

Consideramos que el gran inconveniente que presentan estos compuestos es su insolubilidad en medio acuoso, por lo que creemos que sería interesante optimizarla e estudiar su modo de acción frente a *P. falciparum* para detectar a nivel molecular su diana terapéutica.

Referencias

- ¹ Bansal, Y. and Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorg Med Chem*, **2012**, *20*, 6208-6236.
- ² Kim, S.K.; Choi, S. W.; Jeon, W. S.; Park, J. O.; Ko, T.; Chang, H. and Lee, J. C. Cross-linked benzoxazine-benzimidazole copolymer electrolyte membranes for fuel cells at elevated temperature. *ACS Macromol*, **2012**, *45*, 1438-1446.
- ³ Wright, J.B. The chemistry of the benzimidazoles. *Chem Rev*, **1951**, *48*, 397-541.
- ⁴ Ingle, R. G. and Magar, D. D. Heterocyclic chemistry of benzimidazoles and potential activities of derivatives. *Int J Drug Res Tech*, **2011**, *1*, 26-32.
- ⁵ Cui, W.; Kargbo, R. B.; Sajjadi-Hashemi, Z.; Ahmed, F. and Gauuan, J. F. Efficient one-pot synthesis of 2-substituted benzimidazoles from triacyloxyborane intermediates. *Synlett*, **2012**, 247-250.
- ⁶ Grenda, V. J.; Jones, R. J.; Gal, G.; Letzinger, M. Novel preparation of benzimidazoles from N-arylamidines. new synthesis of thiabendazole. *J Org Chem*, **1965**, *30*, 259-261.
- ⁷ Yang, D.; Fokas, D.; Li, J.; Yu, L.; C. M. A versatile method for the synthesis of benzimidazoles from o-nitroanilines and aldehydes in one step via a reductive cyclization. *Synthesis*, **2005**, *1*, 47-56.
- ⁸ Lu, J.; Yang, B. and Bai, Y. Microwaves irradiation synthesis of 2-substituted benzimidazoles using PPA as a catalyst under solvent-free conditions. *Synth Commun*, **2002**, *32*, 3703-3709.
- ⁹ Bräse, S.; Gil, C.; and Knepper K. The recent impact of solid-phase synthesis on medicinally relevant benzoannelated nitrogen heterocycles. *Bioorg Med Chem*, **2002**, *10*, 2415-2437.
- ¹⁰ Blatch, A. J.; Chetina, O. V.; Howard, J. A. K.; Patrick, L. G. F.; Smethurst, C. A. and Whiting, A. synthesis and structure of bifunctional N-alkylbenzimidazole phenylboronate derivatives. *Org Biomol Chem*, **2006**, *4*, 3297-3302.
- ¹¹ Carvalho, L. C. R; Fernandes, E. and Marques M. MB. Developments towards regioselective synthesis of 1,2-disubstituted benzimidazoles. *Chem Eur J*, **2011**, *17*, 12544-12555.
- ¹² Barker, H. A.; Smyth, R. D.; Weissbach, H.; Toohey, J. I.; Ladd, J. N. and Volcani, B. E. Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing benzimidazole or 5,6- dimethylbenzimidazole. *J Biol Chem*, **1960**, *235*, 480-488.
- ¹³ Townsend, L. B. and Wise, D.S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol Today*, **1990**, *6*, 107-112.
- ¹⁴ Spasov, A. A.; Yozhitsa, I. N.; Bugaeva, L. I.; Anisimova, V. A. Benzimidazole derivatives: Spectrum of pharmacological activity and toxicological properties. *Pharma Chem J*, **1999**, *33*, 232-243.
- ¹⁵ Walia, R.; Hedaitullah, M.; Naaz, S. F.; Iqbal, K.; Lamba, H. S. Benzimidazole derivatives- An overview. *IJRPC*, **2011**, *1*, 2231-2781.
- ¹⁶ <http://www.drugs.com/stats/top100/2012/sales>

- ¹⁷ SmithKline Beecham PLC. Benzimidazole derivatives and their use as methionyl-tRNA synthetase inhibitors. WO 00/71522 A1, **2000b**.
- ¹⁸ Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl Microbiol Biotech*, **2003**, *61*, 278-288.
- ¹⁹ Navarrete-Vázquez, G.; Rojano-Vilchis, M.; Yépez-Mulia, L.; Meléndez, V.; Gerena, L.; Hernández-Campos, A.; Castillo, F.; Hernández-Luis, F. Synthesis and antiprotozoal activity of some 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole bioisosteres. *Eur J Med Chem*, **2006**, *41*, 135-141.
- ²⁰ Torres-Gomez, H.; Hernandez-Nunez, E.; Leon-Rivera, I.; Guerrero-Alvarez, J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Argotte-Ramos, R.; Rodriguez-Gutierrez, M. C.; Chan-Bacab, M.J.; Navarrete-Vazquez, G. Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazolepentamidine hybrids. *Bioorg Med Chem Lett*, **2008**, *18*, 3147-3151.
- ²¹ Mayence, A.; Eynde, J.J.V.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yarlett, N.; Huang, T.L. Bis(oxyphenylene)benzimidazoles: a novel class of anti-*Plasmodium falciparum* agents. *Bioorg Med Chem*, **2011**, *19*, 7493-7500.
- ²² Camacho, J.; Barazarte, A.; Gamboa, N.; Rodrigues, J.; Rojas, R.; Vaisberg, A.; Gilman, R. Charris, J. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole-5-carbohydrazide derivatives as antimalarial, cytotoxic and antitubercular agents. *Bioorg Med Chem*, **2011**, *19*, 2023-2029.
- ²³ Riel, M. A.; Kyle, D. E.; Bhattacharjee, A. K.; Milhous, W. K. Efficacy of proton pump inhibitor drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro and their probable pharmacophores. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**, *46*, 2627-32.
- ²⁴ Gamo, F. J.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J. L.; Vanderwall, D. E.; Green, D. V. S.; Kumar, V.; Hasan, S.; Brown, J. R.; Peishoff, C. E.; Cardon, L. R.; Garcia-Bustos, J. F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, **2010**, *465*, 305-312.
- ²⁵ Istvan, E. S.; Dharia, N. V.; Bopp, S. E.; Gluzman, I.; Winzeler, E. A.; Goldberg, D. E. Validation of isoleucine utilization targets in *Plasmodium falciparum*. *PNAS*, **2011**, *180*, 1927-1632.
- ²⁶ Bhatt, T. K.; Kapil, C.; Khan, S.; Jairajpuri, M. A.; Sharma, V.; Santoni, D.; Silvestrini, F.; Pizzi, E. and Sharma, A. (2009). A genomic glimpse of aminoacyl-tRNA synthetases in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*, **2009**, *10*, 644.
- ²⁷ Chopra, I. and Roberts, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2001**, *65*, 232-260.
- ²⁸ Thaker, M.; Spanogiannopoulos, P.; Wright, G. D. The tetracycline resistome. *Cell. Mol Life Sci*, **2010**, *67*, 419-431.

²⁹ Sun, C.; Wang, Q.; Brubaker, J. D.; Wright, P. M.; Lerner, C. D.; Noson, K.; Charest, M.; Siegel, D. R.; Wang, Y-M.; Myers, A. G. A robust platform for the synthesis of new tetracycline antibiotics. *J Am Chem Soc*, **2008**, *130*, 17913-17927.

³⁰ Burke, M. D. Flexible tetracycline synthesis yields promising antibiotics. *Nature Chem Biol*, **2009**, *5*, 77-79.

³¹ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Paul J. Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, **2001**, *46*, 3-26.

³² Dausset, J. and Contu, L. Drug-Induced Hemolysis. *Annu Rev Med*, **1967**, *18*, 55-70.

³³ Bowman, Z. S.; Oatis, J. E.; Jr.; Whelan, J. L.; David J. Jollow, D. J.; McMillan, D. C. Primaquine-induced hemolytic anemia: susceptibility of normal versus glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther*, **2004**, *309*, 79-85.

³⁴ Garratty, G. Drug-induced immune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2009**, 73-79.

³⁵ Kimmel, C.B., et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, **1995**, *203*, 253-310.

³⁶ Kelsh, R. N., et al., Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development*, **1996**, *123*, 369-89.

CAPÍTULO 5

DISEÑO Y SÍNTESIS DE γ -PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROLINA

Para la realización de este capítulo se ha contado con la colaboración de Patricia Marín que ha evaluado la actividad *in vivo* en modelos murinos de la quimioteca de compuestos aquí presentes.

5.1 Introducción

5.1.1. Péptidos penetradores de membranas celulares (CPPs)

Una de las dificultades que la química médica debe afrontar con mayor frecuencia es la síntesis de nuevos fármacos capaces de atravesar las membranas celulares e interactuar con la diana terapéutica intracelular para la cual fueron diseñados. Numerosas moléculas que actúan de forma selectiva ofreciendo una actividad potencial *in vitro*, han resultado ser inactivas o poco eficaces *in vivo* por su incapacidad para alcanzar su diana molecular y producir la respuesta celular deseada. Por este motivo, se han desarrollado distintos mecanismos para facilitar el transporte y la internalización celular de moléculas bioactivas, mejorando de este modo su efectividad¹.

En los últimos años, el uso de péptidos como transportadores de fármacos conocidos como *cell penetrating peptides* (CPPs) por su capacidad de atravesar las membranas celulares, han sido una de las aplicaciones más exploradas como alternativa a otros sistemas de transporte intracelular como la electroporación², el uso de liposomas³ o sistemas virales⁴ entre otros. Los CPPs presentan algunas ventajas respecto a estos otros métodos, como una reducida citotoxicidad, una eficacia demostrada frente a distintas líneas celulares y una mayor facilidad de administración del fármaco. Además, algunos de ellos han presentado propiedades terapéuticas intrínsecas. No obstante, su rápida degradación enzimática hace esencial aplicar dosis mayores para mantener su biodisponibilidad, hecho que puede conllevar a un aumento de la toxicidad. Aunque entre la comunidad científica, existe una controversia en referencia al uso de los CPPs como sistema de liberación de fármacos por su baja selectividad frente a distintos tipos celulares, generalmente se considera que en un futuro, los CPPs pueden ser sistemas efectivos y selectivos para la administración de fármacos⁵.

Si bien existen CPPs con una gran diversidad de secuencias, hecho que dificulta la predicción de si un péptido tendrá la propiedad de penetrar en las células, todos ellos mantienen unas características comunes⁶; son péptidos relativamente pequeños formados como mucho por 30 aminoácidos, con un cierto carácter catiónico (regiones con carga positiva) e hidrofóbico (regiones apolares) otorgándoles una propiedad anfipática que favorece su interacción con la membrana citoplasmática e internalización.

5.1.2. Tipos de péptidos penetradores de membranas celulares

La mayoría de los CPPs descritos en la literatura son péptidos de origen natural. Suelen ser derivados de secuencias peptídicas responsables de la internalización celular de proteínas de membrana o bien proteínas que por sí solas son capaces de atravesarlas⁷. Históricamente, la primera secuencia de una proteína capaz de atravesar las membranas celulares fue hallada en 1988, cuando se demostró que un fragmento de 86 aminoácidos denominado Tat, procedente de la proteína HIV-1, era capaz de entrar en el interior celular y translocarse en el núcleo^{8,9}. Posteriormente, Joliot¹⁰ y colaboradores descubrieron que la tercera hélice que forma el homeodominio de la proteína de *Antennapedia de Drosophila*, conocida como péptido penetratina o pAntp, es capaz de penetrar en las células. En 1997 Vivès y colaboradores identificaron la mínima secuencia del péptido Tat necesaria para la penetración celular¹¹. Durante 1996 y 1997 se descubrieron distintos péptidos con las mismas propiedades. Dichos péptidos están basados en secuencias ricas en Arg y Lys (*signal-sequence-based peptides*) responsables de facilitar el transporte en el núcleo celular^{12,13,14}. En el año 1998 aparecieron en la literatura los primeros péptidos sintéticos con propiedades penetradoras. Así, Pooga¹⁵ y colaboradores describieron el transportan, un péptido sintético de 27 aminoácidos formado por 12 aminoácidos del neuropéptido galanina unido mediante una Lys al C terminal del péptido mastoparan, mientras que el grupo de Oehlke¹⁶ describió un péptido de 18 aminoácidos, ambos, con propiedades penetradoras. Desde entonces y hasta la fecha, numerosos CPPs sintéticos han sido descritos como por ejemplo kFGF¹⁷ o γ -péptidos basados en la prolina¹⁸.

Los CPPs pueden ser clasificados en tres grupos según su secuencia peptídica y su modo de unión a los lípidos¹⁹;

- a) Amfipáticos primarios; como transportan o su análogo TP10²⁰ que contienen más de 20 aminoácidos. Generalmente están formados por secuencias hidrofóbicas con residuos hidrofílicos a lo largo de su estructura primaria. Además de la endocitosis, el mecanismo de internalización celular propuesto para este tipo de péptidos es mediante una transducción de señal directa ya sea mediante la formación de un poro o bien mediante la formación de micelas invertidas en la bicapa lipídica. Este grupo de péptidos tienen la propiedad de interactuar con lípidos de membranas naturales y aniónicos. Algunos de ellos como TP10, son tóxicos a bajas concentraciones.
- b) Amfipáticos secundarios; que contienen un menor número de aminoácidos en su secuencia como la penetratina o pVEC. Forman hélices α o laminas β al interactuar con los fosfolípidos de la membrana.

- c) Péptidos no amfipáticos; son péptidos bastante más pequeños que el resto y están formados por un elevado número de aminoácidos catiónicos (Arg), como Tat 48-60. Se unen a las membranas con un cierto contenido de lípidos aniónicos.

Péptido penetrador	Secuencia
Tat 48-60	GRKKRRQRRRPPQ
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
Amphipatic model peptide	KLALKLALKALKAAALKLA
Signal sequence-based peptide	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKY
pVEC	LLILRRRIRKQAHASK
kFGF	AAVALLPAVLLALLAP
Peptide 1	γ -aminoproline derived peptide
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL

Tabla 5. 1. Principales péptidos penetradores (CPPs).

5.1.3. Mecanismos de internalización de los péptidos penetradores de membranas celulares

Actualmente, el mecanismo de acción por el cual los CPPs son capaces de atravesar las membranas celulares sigue siendo un enigma; no todas las familias de péptidos siguen un mismo mecanismo de internalización y a menudo, un mismo CPPs puede mostrar distintos patrones según las condiciones del experimento utilizado. No obstante, todos los mecanismos planteados se basan en una primera etapa donde el péptido con carácter catiónico interacciona electrostáticamente con la membrana. Se han propuesto dos grupos de mecanismos posibles; la difusión pasiva o penetración directa y la endocitosis.

La difusión pasiva es un mecanismo energético- y receptor-independiente, asociado a una desestabilización de la membrana y posterior internalización del péptido. Este mecanismo depende de la secuencia peptídica, siendo más probable a altas concentraciones y más favorable para los péptidos amfipáticos primarios como el transportan.

Dentro de este grupo podemos encontrar distintos mecanismos (Figura 5. 1) como a) la micela invertida acorde con la hipótesis de que la carga positiva del péptido interacciona con la carga negativa de los fosfolípidos de la membrana y posteriormente, entran en juego los residuos hidrofóbicos para la internalización peptídica²¹; b) *carpet model*, este mecanismo es el más extendido para los péptidos con propiedades antibacterianas²²,

donde después de la interacción electrostática entre el péptido y la membrana, hay una rotación del péptido hacia el interior celular, estableciéndose interacciones hidrofóbicas que perturban el empaquetamiento lipídico de la membrana permitiendo así la internalización del péptido, y; c) formación de un poro, siendo este un mecanismo típico para los CPPs que forman hélices α anfipáticas como los péptidos con propiedades antibacterianas²³, donde los residuos hidrofóbicos están en contacto con los fosfolípidos de membrana, disponiendo los residuos hidrofílicos hacia el exterior, formando un canal o poro.

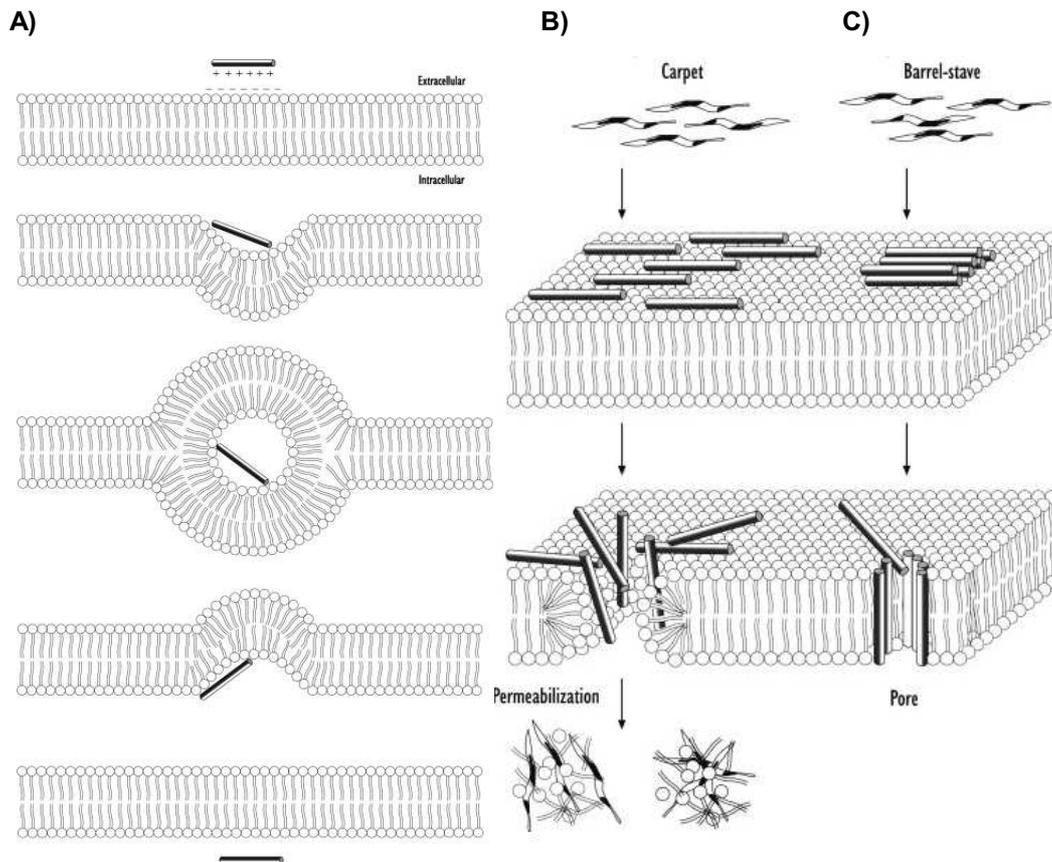


Figura 5. 1. Ilustración de los mecanismos de difusión pasiva propuestos para la internalización de los CPPs²⁴. A) miscela invertida; B) *Carpet model*; C) formación de un poro. Figura extraída de Lungberg, P and Langel, Ü, 2003²⁴.

La endocitosis, es un mecanismo complejo, energético- y receptor-dependiente, muy importante para el funcionamiento celular, siendo responsable de la internalización de nutrientes extracelulares, la regulación de la expresión de receptores de la membrana y el mantenimiento de la polaridad de ésta entre otras funcionalidades²⁵. Este mecanismo puede ser subdividido en cuatro categorías (Figura 5. 2); a) endocitosis mediada por clatrina, donde las moléculas se unen a receptores de membrana, induciendo a una cascada de señales moleculares que activan a la proteína clatrina del interior celular,

conllevando, a una invaginación de la membrana, formando así vesículas que transportan las moléculas al interior celular; b) endocitosis mediada por caveolas, que reside en invaginaciones de la membrana plasmática, en regiones ricas en caveolina además de proteínas periféricas y colesterol, que posteriormente se transforman en vesículas; c) macropinocitosis, proceso mediante el cual se incorporan grandes cantidades de fluido extracelular por invaginaciones de la membrana celular que se fusionará de nuevo, introduciendo el medio externo en el interior celular y d) fagocitosis, proceso por el cual los fagocitos internalizan partículas sólidas como las bacterias.

Endocitosis

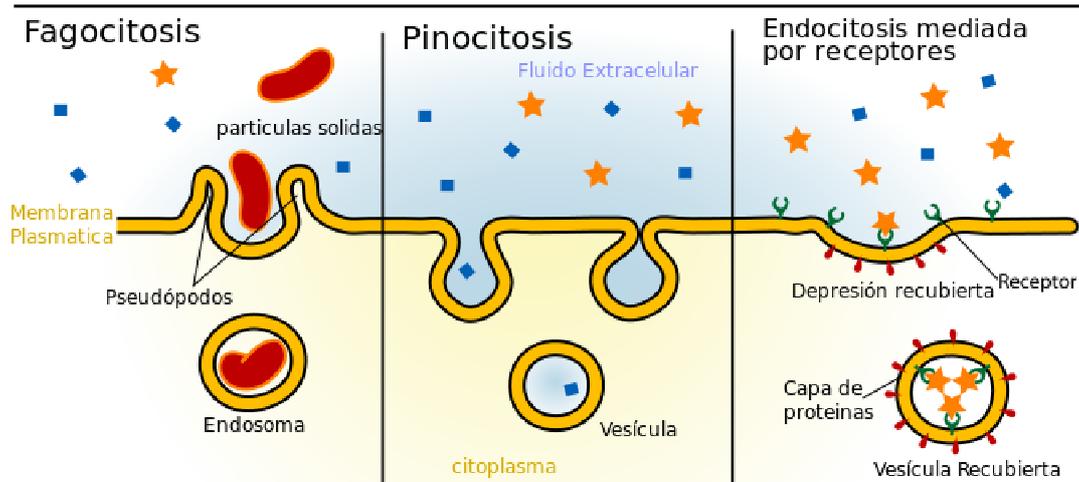


Figura 5. 2. Ilustración de los mecanismos de endocitosis (© Mariana Ruiz Villarreal).

Los primeros estudios de internalización de los CPPs sugirieron que los péptidos como Tat y pAntp travesaban las membranas celulares mediante un transporte pasivo es decir energético- y receptor-independiente^{11, 21}. No obstante, estudios recientes sugieren que el mecanismo mayoritario involucrado en este proceso es la endocitosis^{26,27}. Estas divergencias son fruto de los métodos biológicos y biofísicos utilizados para determinar el mecanismo de internalización de los CPPs. Es sabido que los métodos de fijación celular utilizados como el tratamiento con metanol, acetona, etanol o incluso el uso de paraformaldehído producen una permeabilización artefactual²⁷. Por otro lado, las técnicas empleadas para la cuantificación como la fluorimetría, la citometría de flujo y la microscopia confocal pueden dar falsos positivos al no discriminar entre la cantidad de péptido internalizado y el retenido en la membrana plasmática, si no se siguen protocolos como la digestión con tripsina antes de la cuantificación²⁸ o tratamientos con ditionitio²⁹. Cabe remarcar que el proceso por el cual los CPPs atraviesan las membranas celulares no es único y depende de la concentración y de las características estructurales del péptido.

5.1.4. Aplicaciones de los péptidos penetradores de membranas celulares

La aplicación más extendida para los CPPs es su uso como transportadores de moléculas bioactivas que por sí solas son incapaces de travesar las membranas celulares. Los péptidos más estudiados para este uso son Tat y penetratina a las cuales se les ha unido una amplia variedad de moléculas mediante enlaces covalentes o bien por interacciones físicas, normalmente electrostáticas, entre el péptido y el fármaco. No obstante, el uso de estos transportadores tienen algunos inconvenientes como su baja resistencia a las proteasas, poca selectividad celular y su toxicidad intrínseca.

Aparte de usar los péptidos como transportadores de fármacos, desde que se descubrieron los péptidos catiónicos antibacterianos naturales (AMPs) en 1970³⁰, algunas investigaciones se han centrado en su diseño. Según su estructura secundaria, los AMPs se pueden agrupar en cuatro grupos; laminas- β , hélices- α , *loops* y péptidos extendidos³¹. Estos péptidos han demostrado una potente actividad contra bacterias, virus, protozoos y hongos³², además de ser eficaces contra microorganismos multiresistentes, motivo por el cual ha aumentado su interés para el uso terapéutico³³. No obstante, su aplicabilidad se ha visto reducida por su poca selectividad, causando efectos tóxicos no deseados en células humanas y por su rápida degradación proteolítica, aunque existen estrategias para la síntesis de péptidos que ofrecen una mayor resistencia a las proteasas como por ejemplo utilizar D-aminoácidos o bien N-acilar la amina terminal del péptido en cuestión³⁴.

En la literatura se describen algunos péptidos con propiedades antibacterianas como Pep-1-K actuando en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistentes³⁵ o péptidos con actividad frente *Leishmania donovani*³⁶, como son ejemplo algunos γ -péptidos sintetizados en nuestro laboratorio³⁷.

Algunos AMPs han mostrado actividad como antimaláricos, si bien se desconoce o es todavía incierto su modo de acción como son ejemplo las defensinas antimicrobianas sintéticas³⁸, gramicidinas³⁹, péptidos naturales que provienen de una cianobacteria como *symplostantin 4*⁴⁰ o el péptido hidrofóbico

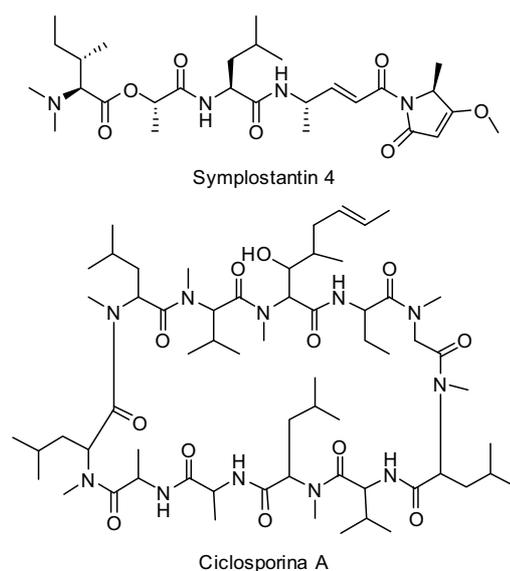


Figura 5. 3. Estructura de los péptidos con actividad antimalárica Symplostantin 4 y Ciclosporina A.

inmunosupresor ciclosporina A (CsA)⁴¹ producido por el hongo *Tolypocladium inflatum* entre otros péptidos (Figura 5. 3). Aunque muy pocos péptidos con actividad antimalárica han sido evaluados *in vivo* frente a modelos murinos, y ninguno de ellos ha llegado a fases pre-clínicas debido a su rápida degradación metabólica, poca selectividad, falta de información toxicológica y alto coste económico, este tipo de compuestos ofrecen algunas ventajas respecto a los fármacos actuales como una menor vulnerabilidad a crear resistencias. Son pues, una potencial alternativa para el tratamiento de la malaria⁴².

5.2 Objetivos

Anteriormente, en nuestro laboratorio se sintetizaron una serie de γ -péptidos derivados de la prolina con propiedades CPPs⁴³. Con la intención de explorar las posibles propiedades antimicrobiales, la quimioteca de γ -péptidos sintetizada por el Dr. Daniel Carbajo, fue ensayada frente distintos parásitos (*Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*) en el laboratorio del Dr. Reto Brun in *The Swiss Tropical and Public Health Institute* (Swiss TPH). Tres de los péptidos ensayados mostraron actividad antimalárica frente a la cepa K1 de *P. falciparum* (Figura 5. 4) y otros dos fueron activos frente a *T. b. rhodesiense*; un parásito protista que causa la tripanosomiasis africana, conocida también como la enfermedad de sueño.

El γ -péptido 37 (**P 37**), aparte de ser el que mostró mayor actividad *in vitro* frente a la cepa K1 de *P. falciparum*, presenta unas características estructurales diversas al resto de los

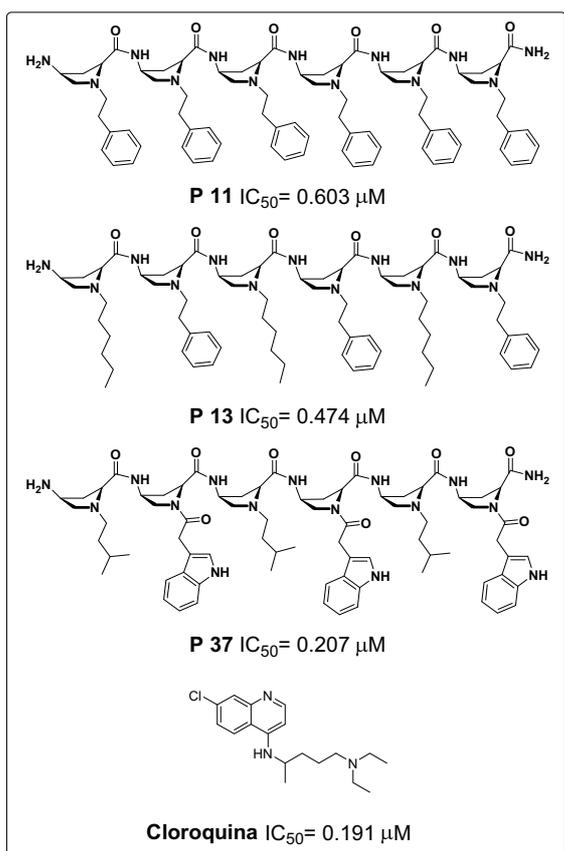


Figura 5. 4. Estructura e IC₅₀ de los tres γ -péptidos sintetizados por el Dr. Carbajo que mostraron actividad frente a *P. falciparum* en ensayos *in vitro* llevados a cabo en el Swiss TPH.

péptidos de la quimioteca; la cadena lateral indólica que lo forma mimetiza al triptófano. Creemos que esta característica, sumada a las propiedades anfipáticas que presentan los γ -péptidos, es la responsable de la actividad antimalárica. Por otro lado, el **P 37** mostró una viabilidad celular superior al 95% en estudios de citotoxicidad con la línea celular HeLa a 25 μ M a las 24 horas de su incubación. No obstante, el **P 37** marcado con carboxifluorosceína (γ -CF-**P 37**) no mostró propiedades penetradoras al ser incubado durante 2 horas a 25 μ M en células HeLa, en estudios de citometría de flujo.

A partir de estos resultados, decidimos sintetizar una familia de γ -péptidos derivados de la prolina basándonos en la estructura del **P 37**, con la finalidad de estudiar la relación entre la estructura de los compuestos y su actividad frente a *P. falciparum*.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1. Diseño de la quimioteca γ -péptidos derivados de la prolina

En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo de síntesis en fase sólida para la obtención de γ -péptidos basados en (2S,4S)-4-amino-L-prolina, capaces de formar estructuras estables en medio acuoso gracias a las restricciones conformacionales que presenta dicho aminoácido^{18,44}. Estos γ -péptidos además de tener propiedades CPPs, muestran una mayor resistencia a las proteasas y una menor citotoxicidad si son comparados con otros CPPs descritos en la literatura. El uso del aminoácido trifuncional (2S,4S)-4-amino-L-prolina como monómero para la síntesis del esqueleto de los péptidos, ofrece la posibilidad de generar una quimioteca de compuestos en fase sólida de forma rápida y eficaz gracias al esquema de protección ortogonal que permite introducir grupos funcionales distribuidos a lo largo de la secuencia.

Esta nueva familia de γ -péptidos se basa en la estructura del **P 37** que mostró actividad antimalárica *in vitro*, a la cual se introdujeron modificaciones en las cadenas laterales con la intención de explorar como afectan a la actividad distintos parámetros estructurales como; a) la longitud óptima del γ -péptido (**P 37-2M**, **P 37-3M**, **P37-4M** y **P 37-5M**); b) la disposición secuencial de las cadenas laterales mediante la síntesis del retropéptido 37 (**RP 37**); c) el uso de distintos tipos de grupos indólicos que pueden afectar a la estructura secundaria del péptido dándole un plegamiento distinto utilizando el ácido 4-(1*H*-indol-3-il)butanoico (**P 37-A**) o el ácido 3-(1*H*-indol-3-il)propanoico (**P 37-B**); d) el estudio de compuestos más hidrofóbicos construidos utilizando como miméticos de las cadenas laterales el ácido 2-(1-metil-1*H*-indol-3-il)acético (**P 37-C**, **P 37-H** y **P 37-I**), distintas cadenas alifáticas cíclicas derivadas del ciclohexano que pueden influir en el carácter lipofílico (**P 37-F** y **P 37-G**); y por último e) el estudio de la *N*-acetilación de la amina terminal del péptido en la capacidad de penetración de este (**P 37-E**). También se sintetizó un péptido *N*-acilado con cisteína (**P 37-D**) que en caso de ser activo podría ser conjugado covalentemente a un esqueleto dendrímérico, sintetizados en nuestro laboratorio, para aumentar la biodisponibilidad del péptido (Figura 5. 5).

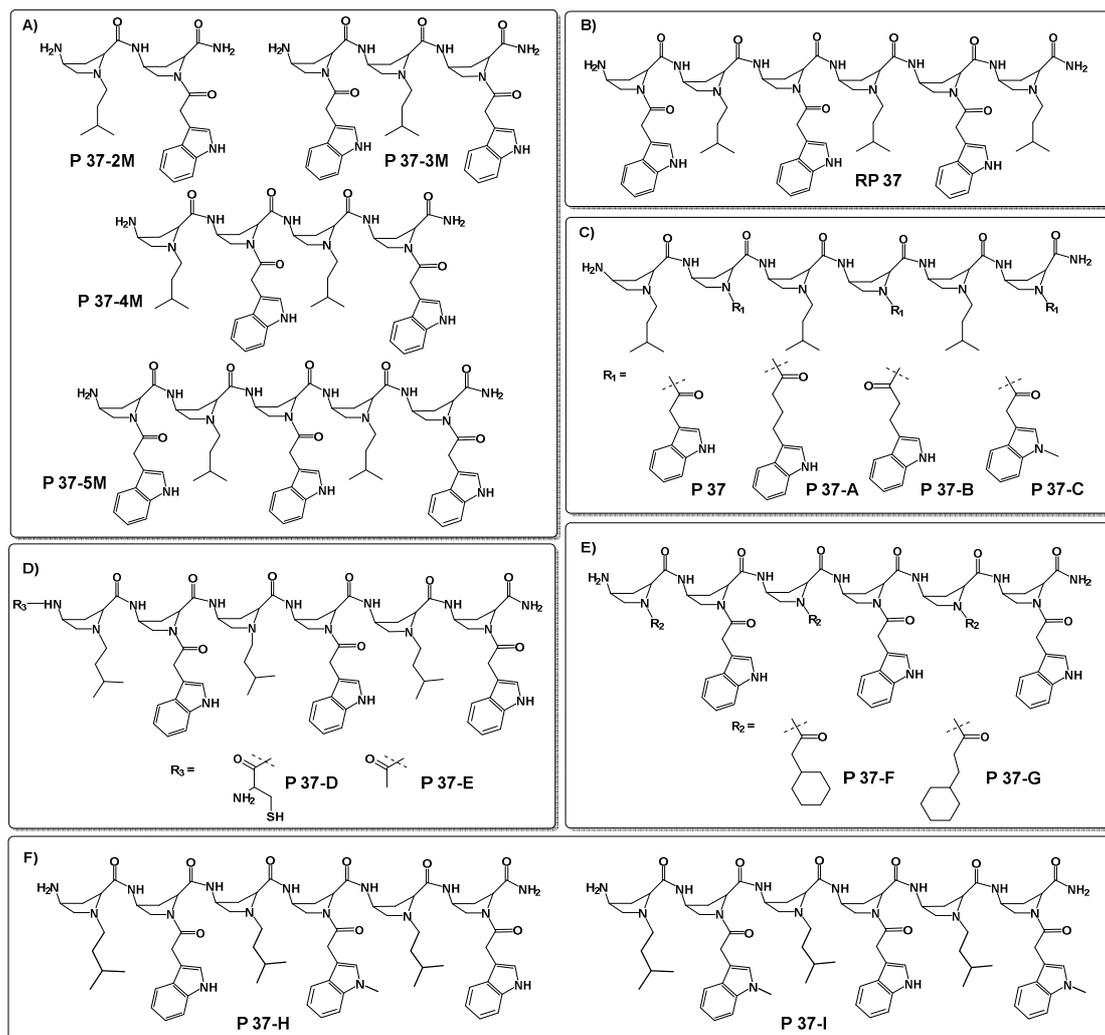


Figura 5. 5. Estructura general de la nueva familia de γ -péptidos derivados del **P 37**. A) Di-, tri-, tetra- y penta-monomeros de **P 37**; B) retro-péptido; C) distintas cadenas laterales indólicas; D) *N*-acetilación o *N*-acilación de la amina terminal; E) distintas cadenas alifáticas cíclicas derivadas del hexano y F) Modificación de **P 37** alternando los ácidos 2-(1-metil-1*H*-indol-3-il)acético y 2-(1*H*-indol-3-il)acético.

5.3.2. Síntesis de la quimioteca de γ -péptidos derivados de la prolina

La síntesis de esta librería formada por γ -péptidos fue llevada a cabo en fase sólida utilizando 100-150 mg de la resina MBHA (0.63 mmoles/g) por péptido (ver protocolo en el apartado 1.4 de la experimental). La estrategia sintética utilizada, está basada en un esquema ortogonal con los grupos protectores fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) / *tert*-butoxicarbonilo (Boc) / aliloxicarbonilo (Alloc).

La mayoría de los compuestos que forman esta quimioteca son hexaméricos con un esqueleto común formado por el monómero *cis*- γ -amino-prolina; utilizando el ácido (2*S*,4*S*)-4-Fmoc-amino-1-Boc-pirrolidina-2-carboxílico (Fmoc-Amp(Boc)-OH) **127**. El grupo

Fmoc, protege temporalmente la γ -amina del monómero, por donde se realizará la elongación del esqueleto péptido, mientras que el grupo Boc protege de manera semipermanente la α -amina, que tras su eliminación, será derivatizada con distintas cadenas laterales para la síntesis de los γ -péptidos heterómeros; es decir, con distintos tipos de cadenas laterales.

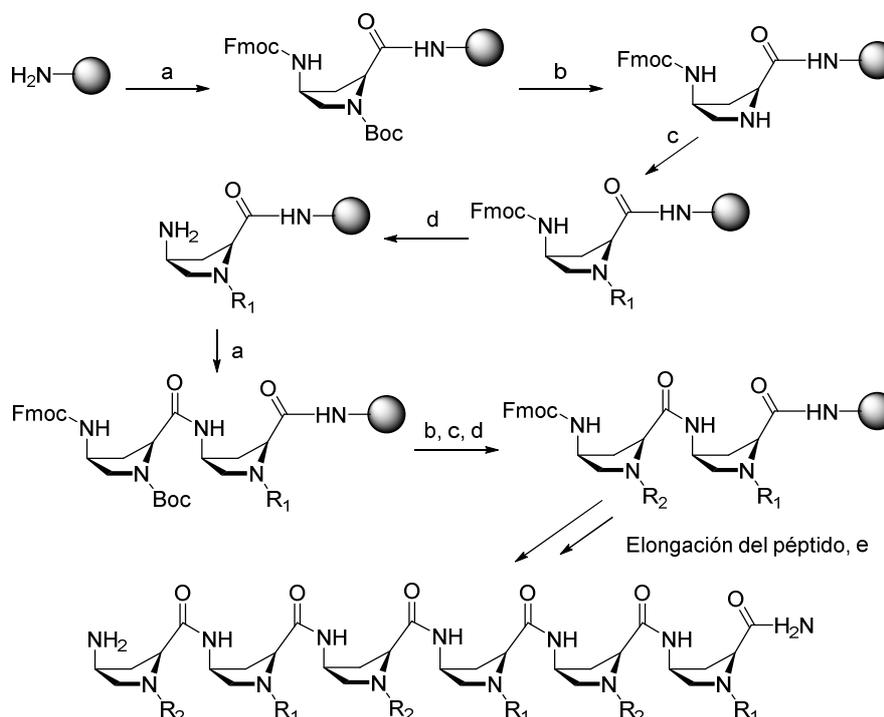
En primer lugar, se sintetizaron los péptidos secuencialmente utilizando el monómero Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** (Esquema 5. 1). Para ello, después de acondicionar el soporte polimérico mediante un protocolo de lavados, se unió el monómero Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** utilizando *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DPCDI) y *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) como sistema de acoplamiento. Posteriormente se desprotegió la α -amina con un tratamiento ácido (TFA/DCM, 2:3, v/v) y se introdujo la cadena lateral correspondiente, mediante *N*-acilación utilizando DPCDI y HOBt como agentes acoplantes o bien mediante *N*-alquilación realizando una aminación reductiva del aldehído correspondiente con cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN). Una vez derivatizada la α -amina, se desprotegió el grupo Fmoc con un tratamiento básico (piperidina/DMF, 1:4, v/v), acoplando posteriormente otro monómero (Fmoc-Amp(Boc)-OH) **127** con la finalidad de alargar el péptido de forma sucesiva por la γ -amina e introducir la derivatización de la α -amina alternando dos cadenas laterales distintas.

En el caso del péptido que contienen la amina terminal acetilada **P 37-E**, una vez eliminado el último grupo Fmoc del extremo *N*-terminal, se trató el péptido con DIEA (10 eq) y anhídrido acético (5 eq). Para la obtención del péptido cisteína terminal **P 37-D** se utilizó Fmoc-L-Cys(trt)-OH (4 eq) y los agentes acoplantes DPCDI y HOBt antes de la escisión acidolítica del péptido.

Finalmente, una vez construido el péptido, este se desancló del soporte polimérico mediante un tratamiento acidolítico con HF anhidro y un 10% de anisol como agente capturador de radicales libres. Los péptidos se precipitaron en MTBE, se disolvieron en una disolución de AcOH/H₂O (1:9, v/v), se liofilizaron y se purificaron en RP-HPLC-Preparativo. Todas las etapas de síntesis fueron controladas con el test de ninhidrina⁴⁵ para detectar aminas primarias o bien con el test de cloroanilo⁴⁶ para las aminas secundarias.

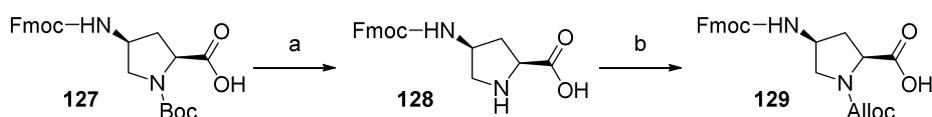
Mediante esta estrategia se sintetizaron todos los γ -péptidos de la quimioteca a excepción de **P 37-A** y **P 37-B**. Al analizar los crudos de ambos péptidos por HPLC-MS se detectaron múltiples productos, algunos de los cuales, procedían de una *N*-acilación incompleta de los ácidos 4-(1*H*-indol-3-il)butanoico y 3-(1*H*-indol-3-il)propanoico respectivamente. Creemos que los efectos estéricos que puede suponer una cadena más larga respecto al ácido 2-

(1*H*-indol-3-il)acético utilizado para la obtención del **P 37**, influye negativamente en la síntesis de dichos péptidos.



Esquema 5. 1. Síntesis general en fase sólida de los γ -péptidos de la quimioteca. Condiciones; acondicionamiento del soporte polimérico; TFA/DCM (2:3, v/v) (1 x 1min y 1 x 30 min), DIEA/DCM (1:9, v/v) (3 x 3 min); a) Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** (3 eq), DPCDI (3 eq), HOBT, (3 eq) en DMF, 2 h; b) TFA/DCM (2:3) (1 x 1min y 1 x 30 min), DIEA/DCM (1:9, v/v) (3 x 3 min); c) ácido carboxílico correspondiente (5 eq), DIC (5 eq) y HOBT·H₂O (5 eq) en DMF, 2 h o aldehído correspondiente (5 eq) en DMF/AcOH (9.9:0.1, v/v), 30 min y NaBH₃CN (5 eq) en MeOH, 2 h; d) piperidina/DMF (2:8, v/v) (1 x 1 min y 2 x 20 min); e) HF (5 ml/g de resina), 2 h a 0 °C.

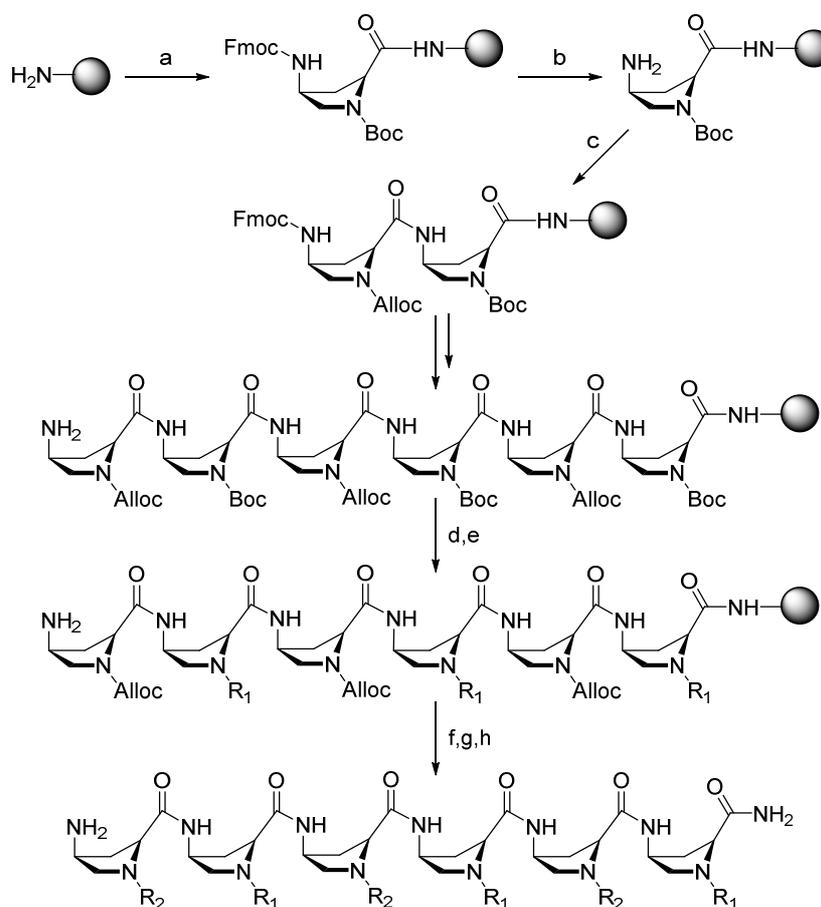
Para evadir esta restricción, recurrimos a otra estrategia sintética ortogonal basada en acoplamientos secuenciales de los monómeros Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** y el ácido (2*S*,4*S*)-4-Fmoc-amino-1-Alloc-pirrolidina-2-carboxílico (Fmoc-Amp(Alloc)-OH) **129** que nos permitiría introducir tres cadenas laterales equivalentes en un sólo paso de síntesis una vez construido el esqueleto peptídico. Para ello previamente se tuvo que sintetizar el monómero (Fmoc-Amp(Alloc)-OH) **129**, partiendo del aminoácido comercial Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** (Esquema 5. 2).



Esquema 5. 2. Síntesis de Fmoc-Amp(Alloc)-OH **129**. Condiciones; a) TFA/DCM (2:3, v/v), t.a., 1 h; b) Alloc-Cl, H₂O/1,4-dioxano (1:1), pH 4, t.a., 4 h, 94% rendimiento, 85% pureza.

En primer lugar se eliminó el grupo Boc de este, con una solución de TFA/DCM (2:3, v/v). Posteriormente se hizo reaccionar la α -amino libre con cloroformiato de alilo en H₂O/1,4-dioxano (1:1, v/v) ajustando previamente el pH a 9 con una solución saturada de NaHCO₃ (ac.). Una vez finalizada la reacción se ajustó el pH a 4 con HCl (ac.) 1 M, se extrajo el producto con AcOEt y se purificó por cromatografía *flash* automática obteniéndose el producto con un 85% de pureza

Una vez con el monómero Fmoc-Amp(Alloc)-OH **129** sintetizado se procedió a la síntesis del esqueleto γ -peptídico a través de acoplamientos secuenciales de los aminoácidos Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** y Fmoc-Amp(Alloc)-OH **129** (Esquema 5. 3).



Esquema 5. 3. Síntesis en fase sólida de los γ -péptidos **P 37-A** y **P 37-B**, construyendo en primer lugar el esqueleto peptídico e derivatizándolo posteriormente. Condiciones; acondicionamiento del soporte polimérico; TFA/DCM (2:3, v/v) (1 x 1min y 1 x 30 min), DIEA/DCM (1:9, v/v) (3 x 3 min); a) Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** (3 eq), DPCDI (3 eq), HOBt, (3 eq) en DMF, 2 h; b) piperidina/DMF (2:8, v/v) (1 x 1 min y 2 x 20 min); c) Fmoc-Amp(Alloc)-OH **129** (3 eq), DIC (3 eq), HOBt, (3 eq) en DMF, 2 h; d) (i) TFA/DCM (2:3, v/v) (1 x 1min y 1 x 30 min), DIEA/DCM (1:9, v/v) (3 x 3 min); e) ácido carboxílico correspondiente (5 eq), DPCDI (5 eq) y HOBt-H₂O (5 eq) en DMF, 2 h; f) (Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq), PhSiH₃(10 eq) en DCM (2 x 20 min), 0.5% dietilcarbamato en DMF (3 x 10 min); g) isovaleraldehído (5 eq) en DMF/AcOH (9.9:0.1, v/v), 30 min y NaBH₃CN (5 eq) en MeOH, 2 h; e) HF (5 ml/g de soporte polimérico), 2 h a 0 °C.

Una vez construido el hexámero se eliminaron los grupos protectores Boc y se *N*-acilaron las tres α -aminas libres con el ácido indólico correspondiente, introduciendo simultáneamente las tres cadenas laterales. Posteriormente se eliminó el grupo Alloc de las α -amino restantes con un tratamiento con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.1 eq) y PhSiH_3 (10 eq) en DCM y se procedió a la *N*-alquilación con una aminación reductiva del isovaleraldehído utilizando cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN) como reductor. Una vez construido el péptido, se procedió a su escisión del soporte polimérico y purificación utilizando el mismo procedimiento que en la estrategia anterior.

Utilizando esta segunda estrategia obtubimos el péptido **P 37-B** pero no el **P 37-A**, aunque por HPLC-MS observamos su formación, su síntesis no fue cuantitativa, pues obtubimos muchos subproductos provenientes de una *N*-acilación no completa, hecho que impidió su purificación por RP-HPLC-Preparativo.

Cabe remarcar que en los espectros de HPLC-MS de los crudos de todos los γ -péptidos sintetizados se observarán muchos subproductos, hecho que complicó su purificación y afectó notablemente al rendimiento total de la síntesis (Figura 5. 6).

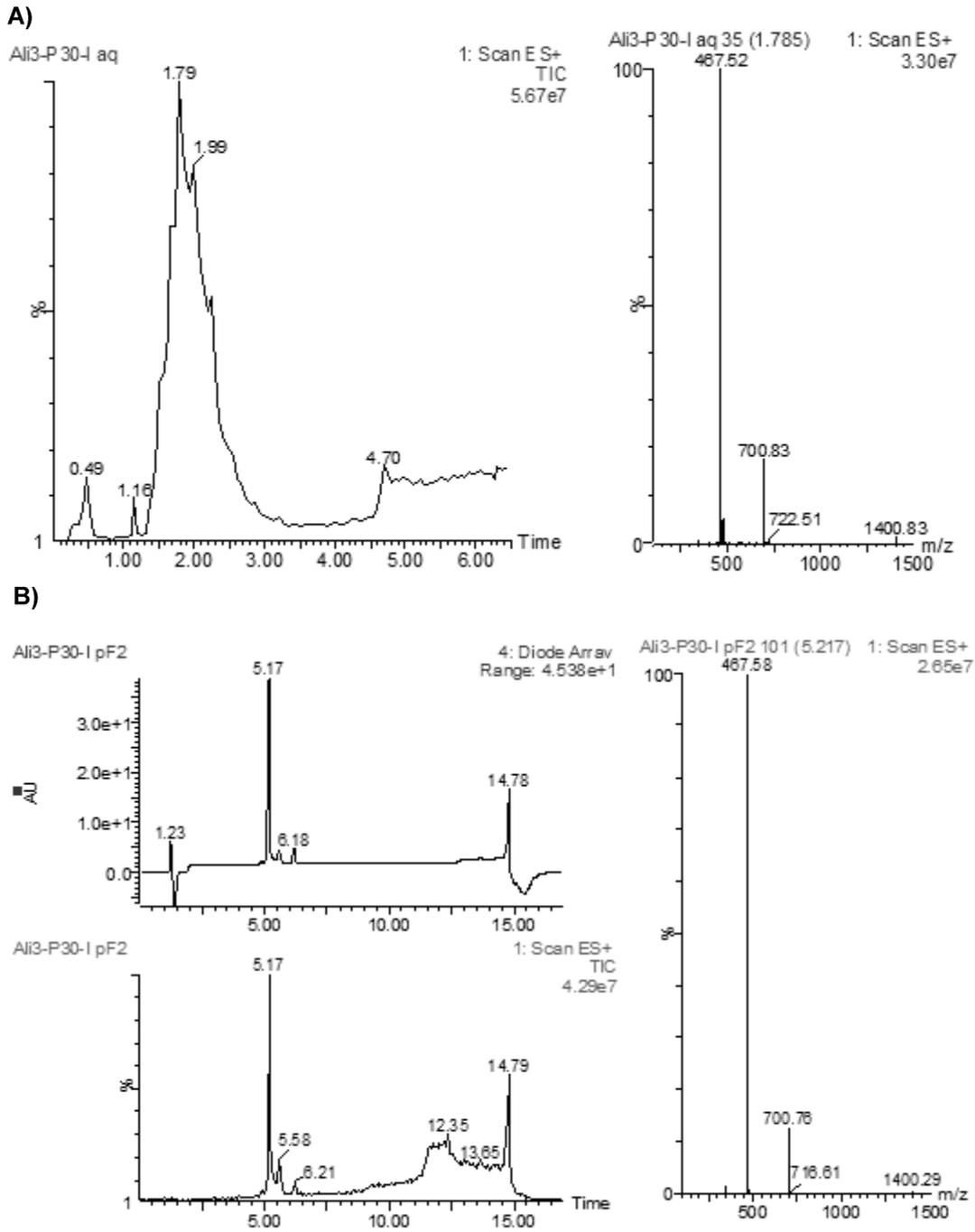


Figura 5. 6. Espectro de HPLC-MS del γ -péptido **P 37-I** A) antes y B) después de su purificación por RP-HPLC-Preparativo.

5.3.3. Cuantificación del contenido péptidico de los compuestos de la quimioteca

Los productos liofilizados pueden retener agua y sales, por lo que decidimos cuantificar por HPLC-analítico la concentración exacta de los productos antes de ensayar su actividad *in vitro* frente a *P. falciparum*.

Para ello disolvimos los compuestos a una concentración teórica de 5 mM en MeOH y generamos una serie de diluciones para calcular el contenido peptídico de cada compuesto, empleando una recta de calibrado de los tres ácidos indólicos utilizados en la síntesis de los γ -péptidos (Figura 5. 7). A partir del área obtenida bajo el pico de absorbancia de los ácidos indólicos detectados a $\lambda = 280$ nm y a una concentración conocida, cuantificamos la concentración exacta de las disoluciones madre de los γ -péptidos de la quimioteca (ver apartado 1.3.6 de la experimental).

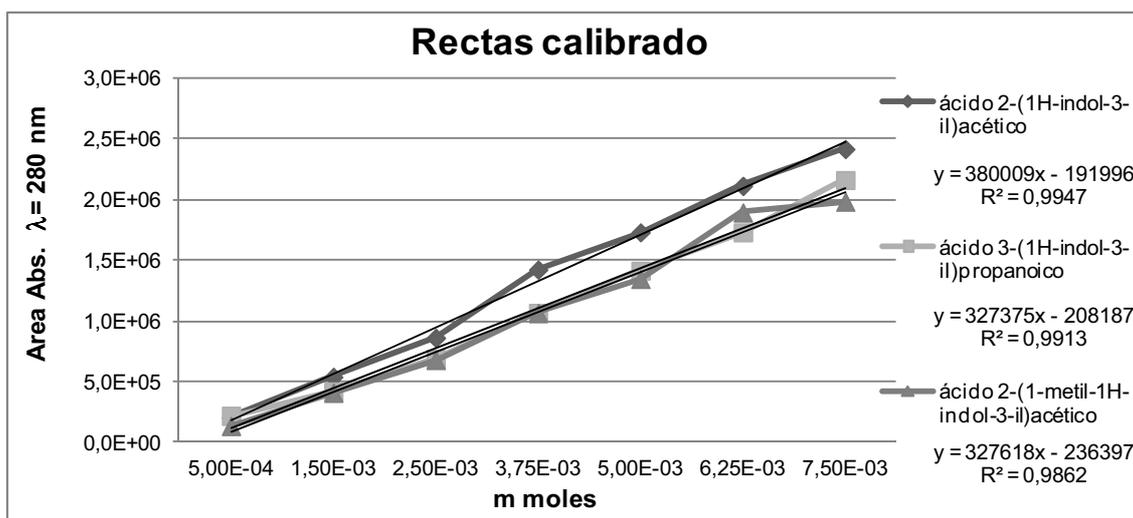


Figura 5. 7. Rectas de calibrado de los tres distintos ácidos indólicos utilizados para la síntesis de los γ -péptidos creadas a partir del área obtenida bajo el pico de absorción de los compuestos a $\lambda = 280$ nm a una concentración conocida. A partir de estas rectas de calibrado se recalcula el contenido peptídico de los compuestos disueltos en MeOH.

5.3.4. Evaluación *in vivo* del γ -péptido P 37

Sabiendo de antemano la actividad antimalárica del **P 37**, decidimos ensayar su actividad antimalárica en ratones de la cepa BALB/cAnNHsd inoculados con 2×10^7 eritrocitos murinos infectados por *Py17XL* (*P. yoelii*) en el grupo del Dr. José M. Bautista (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV-Universidad Complutense de Madrid).

Se utilizaron 5 ratones para evaluar la actividad antimalárica del γ -péptido a tres concentraciones distintas (0.3 mg/kg, 3 mg/kg y 30 mg/kg) administrándoles por inyección intraperitoneal una dosis a las 2 horas de la infección del murino con *P. yoelii* y manteniendo el tratamiento durante los 3 días posteriores (Figura 5. 8) (ver protocolo en el apartado 6.2.2 de la experimental).

Sólo se observó actividad del γ -péptido a 3 y 30 mg/kg día, retrasando a un 20% de los ratones la muerte por hiperparasitemia durante dos días más respecto al control. La baja solubilidad del compuesto en medio acuoso y el hecho que se obtuvieran los mismos resultados cuando se administró el compuesto a 3 mg/kg día y a una dosis 10 veces superior a ésta, nos hace creer que la dosis administrada en este segundo caso no se ajusta a la esperada, suponiéndose un valor inferior al teórico.

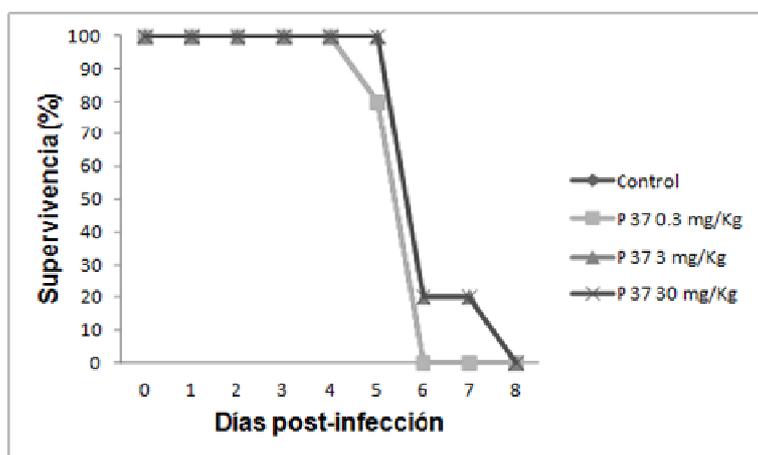


Figura 5. 8. Resultado del ensayo *in vivo* con modelos murinos de la cepa BALB/cAnNHsd infectados con *Py17XL* donde se evalúa la supervivencia de los ratones tratados, administrándose una dosis del γ -péptido **P 37** durante los 4 primeros días.

5.3.5. Evaluación *in vitro* de la quimioteca de γ -péptidos

5.3.5.1. Evaluación de la actividad antimalárica de los γ -péptidos

Se ensayó la actividad antimalárica de la quimioteca de γ -péptidos, evaluando su capacidad para inhibir del crecimiento de un cultivo de la cepa 3D7A de *P. falciparum* previamente sincronizados con sorbitol. Para ello, se utilizaron cultivos de eritrocitos humanos al 3% infectados con el parásito en estadio anillo o *ring* (1 y 0.1% de parasitemia). Los compuestos se incubaron a una concentración final de 20 μ M durante 48 y 96 horas respectivamente. La lectura de la proliferación parasitaria se evaluó por citometría de flujo utilizando SYTO[®]11 como marcador celular fluorescente y se confirmaron los resultados por microscopía (ver protocolos en el apartado 6.1.2 de la experimental).

A partir de los resultados obtenidos a 20 μM (Figura 5. 9), se puede establecer una clara relación entre la estructura y la actividad de los γ -péptidos. Por un lado el γ -péptido dimérico **P 37-2M** y el trimérico **P 37-3M** no presentan una actividad antimalárica remarcable respecto al resto de compuestos, poniendo de manifiesto que se necesita una longitud mínima de la cadena peptídica formada por lo menos de 4 monómeros para que los compuestos sean notablemente activos. Por otro lado, los γ -péptidos que no tienen la γ -amina terminal libre, **P 37-D** y **P 37-E**, son los que mostraron menor actividad, inhibiendo a dicha concentración la parasitemia por debajo del 10% a 48 y 96 horas, indicando que la γ -amina terminal tiene un papel importante en la actividad. Por último, los compuestos que contienen tres de las α -aminas aciladas del esqueleto peptídico, a partir del ácido 2-ciclohexilacético **P 37-F** y el ácido 3-ciclohexilpropanoico **P 37-G**, presentan menor actividad que el resto. Este descenso de la actividad puede ser causa de la estructura secundaria y del carácter lipofílico del γ -péptido.

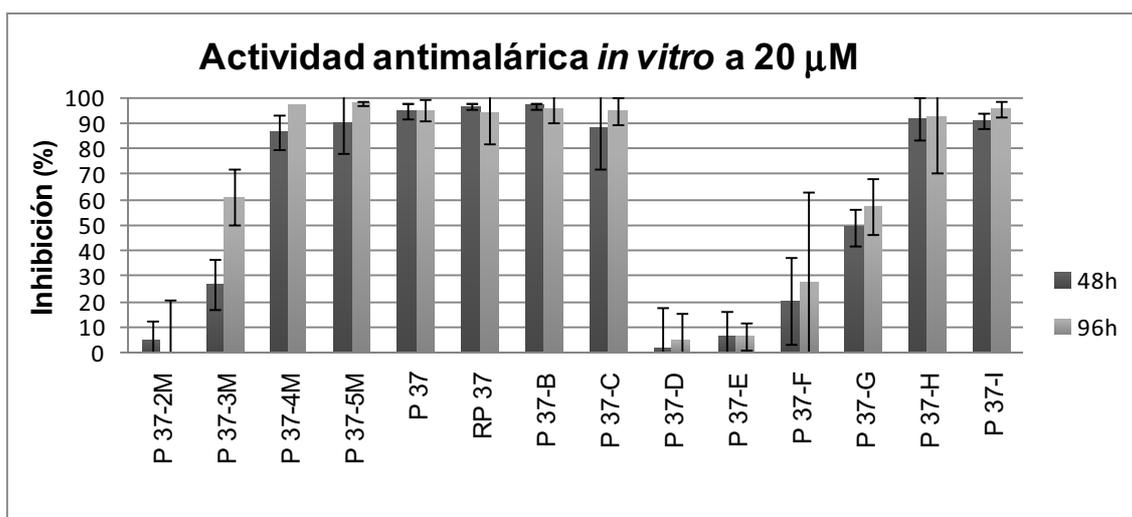


Figura 5. 9. Actividad antimalárica *in vitro* a 20 μM de la quimioteca de γ -péptidos frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum*. Los resultados se presentan en términos de inhibición de la proliferación parasitaria (%) tomando como referencia el cultivo control mediante citometría de flujo.

Los compuestos que mostraron mayor actividad en el primer ensayo de inhibición, fueron evaluados a 10 y 5 μM (Figura 5. 10). Todos ellos inhibieron la parasitemia por encima del 90% a 10 μM . Se observó una disminución de la actividad del compuesto tetrámero **P 37-4M** y pentámero **P 37-5M** a 5 μM , por lo que descartamos ambos γ -péptidos para los ensayos posteriores, certificando que la longitud óptima del esqueleto de los péptidos es de seis monómeros de Amp, aunque no se sintetizaron ni ensayaron péptidos con una longitud mayor.

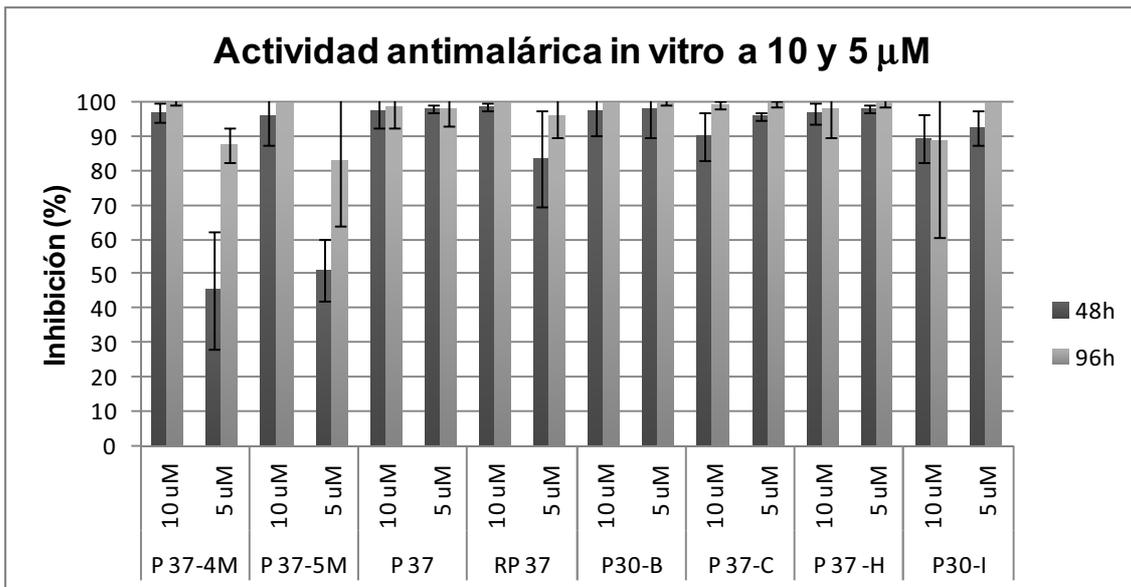


Figura 5. 10. Actividad antimalárica *in vitro* a 10 y 5 μ M de los γ -péptidos más activos frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum*. Los resultados se presentan en términos de inhibición de la proliferación parasitaria (%) tomando como referencia el cultivo control mediante citometría de flujo.

Se determinó la IC_{50} de los γ -péptidos más activos, a través de una curva dosis-respuesta con el software *Prisma GraphPad* con un nivel de confianza del 95% (Figura 5. 11). Para ello se ensayaron los compuestos a distintas concentraciones, determinando la inhibición de la parasitemia del cultivo de *P. falciparum* a 48 y 96 horas por citometría de flujo.

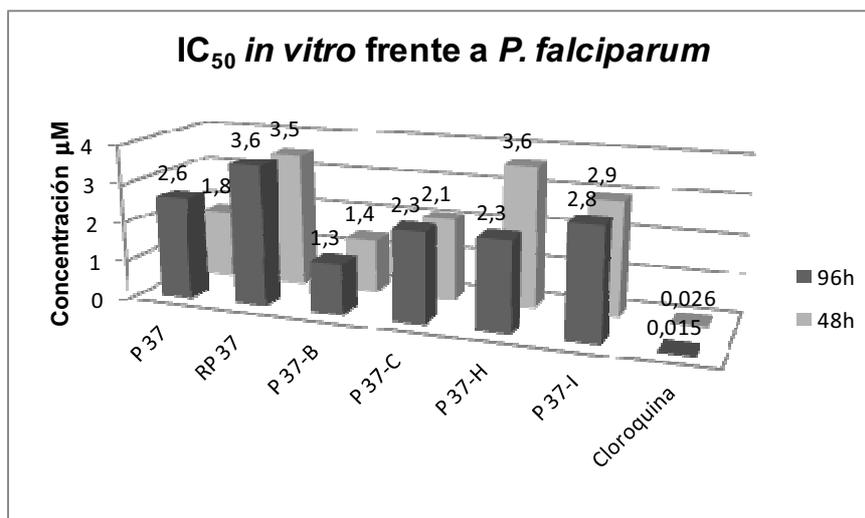


Figura 5. 11. Valores de IC_{50} (μ M) *in vitro* de los γ -péptidos más activos calculados con el software *Prisma GraphPad* mediante curvas de dosis-respuesta a distintas concentraciones (5, 3, 1.5 y 0.75 μ M).

Todos los compuestos mostraron un valor de IC_{50} inferior a $4 \mu M$, siendo el **P 37-B** el más activo con una IC_{50} de 1.4 y $1.3 \mu M$ a 48 y 96 horas respectivamente. Cabe remarcar que los valores de IC_{50} obtenidos para el **P 37** frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum* son mayores que los obtenidos en el laboratorio Swiss TPH frente a la cepa K1. No obstante el valor de IC_{50} obtenido para la cloroquina se asemeja a los valores encontrados en la literatura para la cepa 3D7A ($IC_{50} = 0.024 \mu M$)⁴⁷.

Ninguno de los compuestos ofrece una potencia mucho mayor a las 96 que a las 48 horas, por lo que cabe esperar que la diana terapéutica de estos compuestos no sea el apicoplasto ya que parece que no altera su funcionalidad

Aunque no se establece una diferencia significativa entre las IC_{50} podemos agrupar según las estructuras los γ -péptidos (Figura 5. 12) en tres grupos para evaluar su actividad frente al péptido **P 37**; a) el retropeptido **RP 37** muestra una actividad ligeramente inferior al **P 37**, indicando que la disposición de las cadenas laterales juega cierto papel en la actividad, aunque no se han ensayado todas las combinaciones posibles b) parece ser que el grupo amina del indol no establece interacciones que afecten a la actividad del compuesto, pues se han obtenido resultados muy parecidos cuando se ha utilizado el indol *N*-metilado (**P 37-C**, **P 37-H** y **P 37-I**) y el indol con la amina libre (**P 37**). Además, dentro de este grupo, no podemos establecer una correlación entre la actividad y el carácter hidrofílico de los compuestos; c) El **P 37-B** muestra una actividad ligeramente superior al **P 37**, hecho que puede estar correlacionado con el carácter hidrofóbico creciente del γ -péptido así como una posible estructura secundaria otorgada por una cadena más larga del anillo indólico.

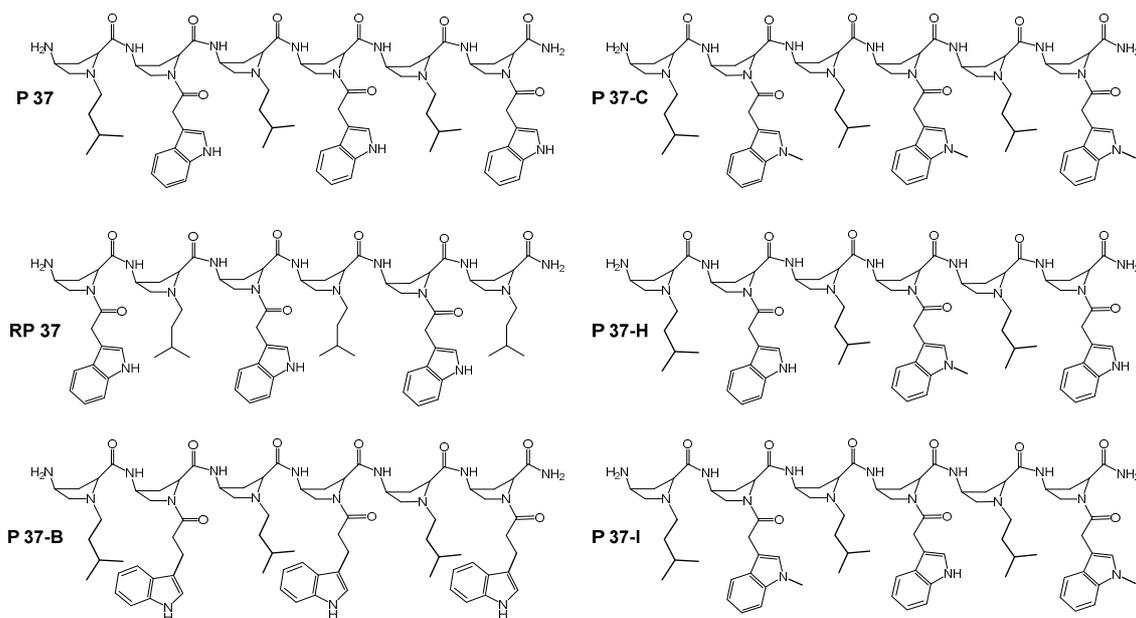


Figura 5. 12. Estructura de los γ -péptidos que mostraron más actividad *in vitro* frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum* y de los cuales se calculó su IC_{50} .

5.3.5.2. Evaluación de la actividad hemolítica de los γ -péptidos

Uno de los mayores inconvenientes en el uso de los CPPs *in vivo* ya sea como transportadores de fármacos o bien como compuestos con actividad antimicrobiana o antiparasitaria, es su toxicidad. No es de extrañar que compuestos con propiedades penetradoras afecten a la estabilidad de las membranas celulares, provocando la lisis y la muerte celular. Es por ello, que decidimos ensayar por triplicado la actividad hemolítica *in vitro* de los γ -péptidos seleccionados a distintas concentraciones (50, 25 y 5 μ M) tras incubarlos durante 3 horas a 37 °C en una solución de hematocrito humano al 3% en PBS, detectando posteriormente la hemoglobina liberada por absorbancia a $\lambda = 570$ nm (Tabla 5. 2) (ver protocolo en el apartado 6.1.1.2 de la experimental).

A altas concentraciones (50 μ M) todos los γ -péptidos a excepción de **P 37-B**, mostraron un efecto hemolítico que afectó entre el 52 y el 65% la lisis de los eritrocitos, siendo el **P 37-C** el más dañino. Posiblemente, este efecto negativo esta correlacionado con el carácter hidrofóbico de dicho γ -péptido. No obstante, la concentración ensayada es 10 veces superior a la IC₅₀ calculada para *P. falciparum*. Por otro lado, es remarcable la baja actividad hemolítica del **P 37-B**, que solo afectó a un 1% de los eritrocitos, siendo también el compuesto que mostró más actividad antimalárica.

La actividad hemolítica de todos los compuestos decrece considerablemente con la concentración; sólo los péptidos **P 37**, **P 37-C** y **P 37-I** muestran efecto hemolítico a 25 μ M y a concentraciones cercanas a la IC₅₀ calculada para *P. falciparum* (5 μ M) ninguno de ellos provocó la lisis de los eritrocitos.

Concentración (μ M)	Lisis (%)					
	P 37	RP 37	P 37-B	P37-C	P37-H	P37-I
50	63.3 \pm 2.20	52.2 \pm 2.70	1.00 \pm 0.70	65.2 \pm 2.60	55.9 \pm 1.40	59.5 \pm 1.00
25	2.00 \pm 1.70	0.60 \pm 0.60	0.02 \pm 0.02	18.2 \pm 8.10	0.02 \pm 0.02	7.80 \pm 7.00
5	0.80 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00				

Tabla 5. 2. Activada hemolítica *in vitro* de los γ -péptidos con actividad antimalárica a distintas concentraciones, referenciando los resultados al 100% de lisis obtenido con el tratamiento de los eritrocitos con Tritón-X.

5.4 Conclusiones

Se ha diseñado y sintetizado en fase sólida una quimioteca de γ -péptidos con un esqueleto común basado en el ácido (2S,4S)-4-amino-L-prolina mediante dos estrategias ortogonales distintas utilizando los grupos protectores Fmoc/Boc/Alloc. Los rendimientos de la síntesis son mejorables y necesitan ser optimizados.

Se ha ensayado la actividad antimalárica de la quimioteca *in vitro* frente a la cepa 3D7A de *P. falciparum*. Seis de los compuestos exhibieron una IC_{50} inferior a 4 μ M. No se observaron diferencias significativas entre los valores de IC_{50} registrados a las 48 y a las 96 horas de la incubación de los compuestos, indicando que no afectan a la funcionalidad del apicoplasto del parásito.

Los γ -péptidos que mostraron más actividad frente a *P.falciparum* presentan unas características estructurales comunes; están formados por hexámeros del ácido (2S,4S)-4-amino-L-prolina, con cadenas laterales procedentes de *N*-acilaciones con tres ácidos indólicos distintos que mimetizan al aminoácido natural triptófano, alternándolos con *N*-alquilaciones originarias de una *N*-aminación reductiva con el isovaleraldehído. Creemos que las características estructurales y la relación que se establece entre las cadenas hidrofóbicas y las hidrofílicas proporcionan unas propiedades anfipáticas concretas a los compuestos que son las responsables de la actividad antimalárica.

No se ha detectado actividad hemolítica de los compuestos más activos a concentraciones cercanas a la IC_{50} (5 μ M). A una concentración cinco veces superior a esta, sólo tres de ellos afectaron levemente (>20%) a la lisis de los glóbulos rojos humanos.

El compuesto patrón a partir del cual se diseñó la quimioteca, fue ensayado *in vivo*, a distintas concentraciones (0.3, 3 y 30 mg/kg día) en modelos murinos infectados por *Py17XL* (*P. yoelii*). No se registró una actividad antimalárica suficiente para inhibir la muerte por parasitemia de los individuos tratados. No obstante, no podemos confirmar que la dosis administrada sea exacta, hecho que puede influir en los resultados.

Consideramos interesante determinar el modo de acción de estos γ -péptidos en futuros estudios así como ensayar su actividad frente a otros parásitos.

Referencias

- ¹ Moghimi, S. M.; Rajabi-Siahboom, A. R. Recent advances in cellular, sub-cellular and molecular targeting. *Adv Drug Deliv Rev*, **2000**, *41*, 129-133.
- ² Gehl, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *APS*, **2003**, *177*, 437-447.
- ³ Voinea, M.; Simionescu, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J Cell Mol Med*, **2002**, *6*, 465-474.
- ⁴ Davidson, B. L. and Breakefiel, X. O. Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, **2003**, *4*, 353-364.
- ⁵ Sanders, W. S.; Johnston, C. I.; Bridges, S. M.; Burgess, S. C.; Willeford, K. O. Prediction of cell penetrating peptides by support vector machines. *PLoS Comput Biol*, **2011**, *7*, 1-12.
- ⁶ Hansen, M.; Kilk, K.; Langel, U. Predicting cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev*, **2008**, *60*, 572-579.
- ⁷ Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Brit J Pharm*, **2009**, *157*, 195-206.
- ⁸ Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, **1988**, *55*, 1189-1193.
- ⁹ Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat *trans*-activator protein. *Cell*, **1988**, *55*, 1179-1188.
- ¹⁰ Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia Homeodomain translocates through biological membranes. *J Bio Chem*, **1994**, *269*, 10444-50.
- ¹¹ Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, **1997**, *272*, 16010-7.
- ¹² Liu, K. I.; Timmons, S. Lin, Y. Z.; Hawiger, J. Identification of a functionally important sequence in the cytoplasmic tail of integrin beta 3 by using cell-permeable peptide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**, *93*, 11819-11824.
- ¹³ Morris, M. C.; Vidal, P. ; Chaloin, L.; Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **1997**, *25* (14), 2730-2736.
- ¹⁴ Lin, Y. Z.; Yao, S, Y.; Hawiger, J. Role of the nuclear localization sequence in fibroblast growth factor-1-stimulated mitogenic pathways. *J Biol Chem*, **1996**, *271*, 5305-5308.
- ¹⁵ Pooga, M.; Hällbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell penetration by transportan, *FASEB J*, **1998**, *12*, 67-77.

- ¹⁶ Oehlke, J.; Scheller, A. Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzing, M.; Bienert, M. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Acta Biochim Biophys Sin*, **1998**, *1414*, 127-39.
- ¹⁷ Lin, Y. Z.; Yo, S.Y.; Veach, R. A.; Torgerson, T. R.; Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Bio Chem*, **1995**, *270*, 14255-14258.
- ¹⁸ Farrera-Sinfreu, J., Giralt, E., Castel, S. Albericio, F., Royo, M. Cell-penetrating *cis*- γ -amino-L-proline-derived peptides. *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 9459-9468.
- ¹⁹ Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Gräslund, A. mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Biophys J*. **2011**, ID 414729, 1-10.
- ²⁰ Soomets, U.; Lindgren, M.; Gallet, X.; Hällbrink, M.; Elmquist, A.; Balaspiri, L.; Zorko, M.; Pooga, M.; Brasseur, R.; Langel, U. Deletion analogues of transportan. *Acta Biochim Biophys Sin*, **2000**, *1467*, 165-76.
- ²¹ Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. cell internalization of the third helix of the Antennapedia Homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*, **1996**, *271*, 18188-1893.
- ²² Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 12416-12423.
- ²³ Gazit, E.; Lee, W. J.; Brey, P. T.; Shai, Y. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 10681-10692.
- ²⁴ Lundberg, P.; Langel, U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit*, **2003**, *16*, 227-233.4
- ²⁵ Mukherjee, S.; Ghosh, R. N.; Maxfield, F. R. Endocytosis. *Physiol Rev*, **1997**, *77*, 759-803.
- ²⁶ Drin, G.; Cottin, S.; Blanc, E.; Rees, A. R.; Temsamani, J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem*, **2003**, *278*, 31192-31201.
- ²⁷ Richard, J. P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C.; Verbeure, B.; Gait, M. J.; Chernomordik, L. V.; Lebleu, B. Cell-penetrating peptides: a reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, **2003**, *30*, 585-590.
- ²⁸ Lundberg, M.; Wikström, S.; Johansson, M. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther*, **2003**, *8*, 143-150.
- ²⁹ Drin, G.; Mazel, M.; Clair, P.; Mathieu, D.; Kaczorek, M.; Temsamani, J. Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity. *Eur J Biochem*, **2001**, *268*, 1304.
- ³⁰ Boman, H. G.; Nilsson, I; Rasmuson, B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature*, **1976**, *237*, 232-235.

- ³¹ Peters, B. M.; Shirliff, M. E.; Jabra-Rizk, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog*, **2010**, *6*, e1001067.
- ³² Shai, Y. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Curr Pharm Design*, **2002**, *8*, 715-25.
- ³³ Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol*, **2007**, *2*, 1-33.
- ³⁴ Stromstedt, A. A.; Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, and internal segment of LL-37. *Antimicrob Agents Chemother*, **2009**, *53*, 593-602.
- ³⁵ Zhu, W. L.; Lan, H.; Park, I. S.; Kim, J. I.; Jin, H. Z.; Hahm, K. S.; Shin, S. Y. Design and mechanism of action of a novel bacteria-selective antimicrobial peptide from the cell-penetrating peptide Pep-1. *Bio Biophys Res Commun*, **2006**, *349*, 769-74.
- ³⁶ Marr, A. K.; McGwire, B. S.; McMaster, W. R. Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiol*, **2012**, *7*, 1047-59.
- ³⁷ Farrera-Sinfreu, J.M. Noves estructures basades en aminoàcids trifuncionals: foldàmers i quimiotèques basades en derivats de prolina. *Tesis doctoral UB*, **2007**.
- ³⁸ Gao, B.; Rodriguez, M del C.; Lan-Mendoza, H.; Zhu, S. AdDLP, a bacterial defensin-like peptide, exhibits anti-*Plasmodium* activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **2009**, *387*, 393-8.
- ³⁹ Otten-Kuipers, M. A.; Franssen, F. F.; Nieuwenhuijs, N.; Overdulve, J. P.; Roelofsen, B.; Op den Kamp, J. A. Effect of tryptophan-N-formylated gramicidin on growth of *Plasmodium berghei* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**, *41*, 1778-1782.
- ⁴⁰ Trent Conroy, T.; Guo, J. T.; Hunt, N. H.; Payne, R. J. Total synthesis and antimalarial activity of symprostatin 4. *Org Lett*, **2010**, *12*, 5576-5579.
- ⁴¹ Azouzi, S.; Morandat, S.; El Kirat, K. The potent antimalarial peptide cyclosporin A induces the aggregation and permeabilization of sphingomyelin-rich membranes. *Langmuir*, **2011**, *27*, 9465-72.
- ⁴² Bell, A. Antimalarial peptides: the long and the short of it. *Curr Pharm Des*, **2011**, *17*, 2719-31.
- ⁴³ Carbajo, D. γ -Peptides base on proline derivatives: novel applications and secondary structures. *Tesis doctoral UB*, **2012**.
- ⁴⁴ Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F.; Royo, M. A new class of foldamers based on cis-gamma-amino-L-proline. *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 6048-57.
- ⁴⁵ Kaiser, E.; Colesoct, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides". *Anal Biochem*, **1970**, *34*, 595-598.

⁴⁶ Christensen, T. "A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil", *Acta Chem Scan, Series B: Org Chem and Biochem.* **1979**, 33, 760-766.

⁴⁷ Sanz, L. M. *et al.* Cyclopropyl carboxamides, a chemically novel class of antimalarial agents identified in a phenotypic screen. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**, 55, 5740-5747.

EXPERIMENTAL

1. Materiales y métodos

1.1 Disolventes y reactivos

Los disolventes y los reactivos químicos utilizados fueron obtenidos en proveedores comerciales y se utilizaron sin ningún tratamiento previo. Los más utilizados fueron:

Abreviatura	Nombre	Calidad	Casa comercial
ACN	Acetonitrilo	Multisolvente	Scharlau
AcOEt	Acetato de etilo	Síntesis	Scharlau
DCM	Diclorometano	Purísimo	Scharlau
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimida	Reactivo 99%	Fluka
DIEA	N,N-Diisopropiletilamina	Síntesis	Sigma-Aldrich
DMF	Dimetilformamida	Síntesis	Scharlau
DMSO	Dimetilsulfóxido	Síntesis 99.5%	Panreac
EDC·HCl	Clorhidrato de 1 - (3-dimetilaminopropil)-3- etilcarbodiimida	Reactivo 99%	Iris Biotech GMBH
Et ₃ N	Trietilamina	Síntesis	Panreac
HCl 4M	Ácido Clorhídrico 4 M en 1,4 dioxano	Síntesis	Sigma-Aldrich
HCOOH	Ácido fórmico	Análisis	Merck
Hexano	n-Hexano	Síntesis 95%	Panreac
HOBT·H ₂ O	1-Hidroxibenzotriazol	Reactivo 99%	Iris Biotech GMBH
MeOH	Metanol	HPLC	SDS
MeOH	Metanol	Análisis 99%	Scharlau
MgSO ₄ (s)	Sulfato de magnesio	Síntesis	Panreac
MTBE	<i>tert</i> -butil-metil-éter	Síntesis	SDS
NaCl (s)	Cloruro de sodio	Reactivo 98%	Panreac
NaHCO ₃ (s)	Bicarbonato de sodio	Reactivo 98%	Panreac
TFA	Ácido trifluoroacético	Síntesis	Fluorochem

1.2 Purificación de los compuestos

1.2.1 Cromatografía

La cromatografía *flash* en fase normal se realiza manualmente con silica (Merck, 70-230 mesh) o bien de forma automática con el equipo *Teledyne Isco module Companion*[®] con un detector *Photodiode array*. En dicho caso se utilizan columnas de gel de sílice preempaquetadas (*Silica-RediSep*[®] *columnas*) de diferentes medidas según el crudo a purificar.

1.2.2 RP-HPLC-Preparativo

El HPLC semipreparativo utilizado para la purificación de los compuestos consta de un módulo *Waters 600 Controller* integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un módulo *Waters Alliance 2767 Sample Manager* con un inyector y colector de fracciones. Detector UV-visible Dual λ *Absorbance Detector 2487* y un espectrómetro de masas *Micromass ZQ*.

Las columnas utilizadas fueron XBridge™ Prep C₁₈ (19 x 100mm, 5 μ m OBD™), XBridge™ Prep BEH130 C₁₈ (19 x 100mm, 5 μ m OBD™) y Sunfire™ Prep C₁₈ (19 x 100mm, 5 μ m OBD™) según la naturaleza de los compuestos.

Los compuestos fueron detectados por su M+1, utilizando distintos gradientes lineales a un flujo de 16 ml/min especificados en cada caso.

1.3 Caracterización de los compuestos

1.3.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF se realizó sobre placas pretratadas de Merck (sílice gel 60ACC, F254). La visualización se realiza mediante luz ultravioleta (λ = 254 nm).

1.3.2 HPLC-MS Analítico

El HPLC-MS analítico utilizado para monitorizar las reacciones y determinar la pureza de los compuestos a λ = 214 nm, consta de un cromatógrafo *Waters Alliance 2695* (integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión y un auto inyector) con un detector UV-visible multicanal *Photodiode Array Detector 2996* y un módulo *Waters 2795 Separation Module* unido a un espectrómetro de masas *Micromass ZQ*, con sonda de electro spray (ES).

Las columnas utilizadas fueron XBridge™ C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μ m) o XBrige™ BEH 130 C₁₈ (4.6 x 100 mm, 3.5 μ m) según la naturaleza de los compuestos.

La pureza de los compuestos fue determinada a λ = 214 nm utilizando distintos gradientes lineales, especificados en cada caso, a un flujo de 1ml/min.

1.3.3 Experimentos de RMN

Los espectros ^1H y ^{13}C de RMN fueron registrados a 298 K con el equipo *Varian Mercury-400 Fourier Transform spectrometer* (Unidad de RMN, servicios científicos y técnicos, Universidad de Barcelona).

Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en unidades de ppm y son relativos a la señal del disolvente deuterado empleado; (CDCl_3 (^1H RMN δ : 7.26; ^{13}C RMN δ : 77.0); DMSO-d_6 (^1H RMN δ : 2.50; ^{13}C RMN δ : 39.5); MeOD (^1H RMN δ : 3.31 y 4.84; ^{13}C RMN δ : 49.1).

La multiplicidad de las señales se describen con la siguiente nomenclatura; s (singlete), d (doblete), t (tripleto), q (cuarteto), m (multiplete), b (pico ancho).

1.3.4 Rotación óptica específica

La rotación óptica específica se midió en un polarímetro *PERKIN-ELMER 241*, empleando una lámpara de Na ($\lambda = 589$ nm) y una cubeta de 10 cm^3 . Los valores de concentración de la muestra se dan en g/ml.

1.3.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los espectros de masa se llevaron a cabo en la plataforma de proteómica del Instituto de Recerca Biomédica de Barcelona (IRB) con el equipo *MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF)* con espectrómetro *Applied Biosystems, Framingham*.

Para preparar la matriz ACH (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico); se disuelven $10.0\ \mu\text{g}$ de ACH en 1 ml de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (1:1) con un 0.1% de TFA.

El análisis de los compuestos se lleva a cabo mezclando $1.0\ \mu\text{l}$ de la disolución de la muestra a 0.5 mM con $1.0\ \mu\text{l}$ de matriz ACH. Para registrar el espectro de masa, se utiliza $1.0\ \mu\text{l}$ de la mezcla resultante que se deposita sobre la placa de análisis. El análisis se realiza utilizando el modo réflex positivo a diferentes intensidades del laser en función del compuesto a analizar.

1.3.6 Análisis de aminoácidos

Los análisis de aminoácidos fueron llevados a cabo por los servicios científicos y técnicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB). El equipo utilizado fue HPLC modelo *WATERS 600* con detector *WATERS 2487* y columna Nova-Pak Waters C_{18} (3.9×150 mm, $4\ \mu\text{m}$).

Se prepararon $500\ \mu\text{l}$ de una solución 0.1 mM de cada compuesto y 0.1 mM de ácido α -aminobutírico utilizado como patrón interno en $\text{HCl}_{(\text{ac.})}$ 6 M. Los compuestos se

hidrolizaron en un tubo kimax a 110°C durante 16h. Se evaporó el HCl a sequedad y se disolvió el crudo en 500 µl de HCl 20 mM. La solución fue filtrada con filtros de 0.45 µm. Una alícuota de cada muestra se derivatizó con 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (ACQ) según el método *AccQ-Tag de Waters*.

Mediante HPLC con detección UV ($\lambda = 254$ nm), se determinó el contenido de aminoácido presente en las muestras.

1.3.7 Cuantificación del contenido peptídico por UV

Para cuantificar el contenido peptídico de las muestras se utiliza un HPLC-analítico; *Módulo Waters Alliance 2695* equipado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un autoinyector, un detector UV-visible multicanal *Photodiode Array Detector 996* y la columna *Peptide Separation Technology XBrige™ BEH 130 C₁₈* (4.6 x 100 mm, 3.5 µm).

Una vez purificados y liofilizados, los compuestos se pesan y se disuelven en MeOH a una concentración aproximada de 5 mM. El contenido peptídico de cada producto es cuantificado por UV a $\lambda = 280$ nm empleando una recta de calibrado de los distintos ácidos indólicos utilizados en la síntesis de los γ -péptidos como patrones. Los compuestos se eluyen en condiciones ácidas (A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH (99.3:0.7, v/v)) con gradientes lineales de 5-100% de B en 11 min, a un flujo de 1ml/min.

1.4 Protocolos generales para la síntesis en fase sólida

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo de modo manual, usando jeringas de polipropeno que contienen un filtro de polietileno poroso. Se utilizó un bloque de polipropileno *Vac-Man®* para realizar todos los procesos de filtración y lavado que requiere el proceso. La agitación del soporte polimérico se realizó manualmente con varillas de teflón o bien con un agitador orbital automático. Los excesos de reactivos, disolventes y posibles subproductos que se encuentran en disolución se eliminaron por filtración al vacío. Después de cada reacción, de protección, desprotección y acoplamiento, la resina se lavó sucesivamente con DMF (5 x 1min) y DCM (5x 1 min) utilizando 10 ml de solvente por gramo de resina.

Las resinas utilizadas fueron Fmoc-Rink-Amida-MBHA (200-400 mesh, 0.56 mmoles/g) y MBHA (0.63 mmoles/g) según la estrategia de síntesis y la naturaleza de la quimioteca a sintetizar.

Todos los acoplamientos así como la eliminación de los grupos protectores fueron precedidos de un ensayo para evaluar cualitativamente la finalización de la reacción.

1.4.1 Ensayo cualitativo de ninhidrina¹ (test de Kaiser)

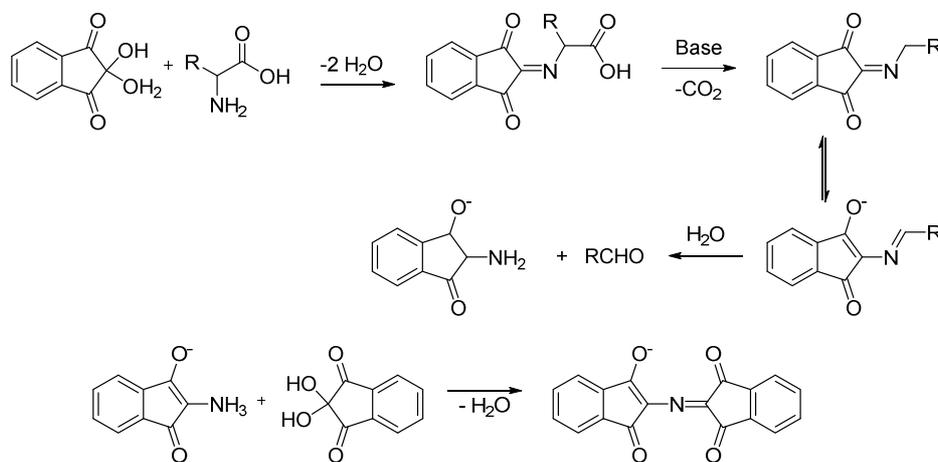
El ensayo colorimétrico de Kaiser conocido también como test de ninhidrina se utilizó para detectar aminas primarias en soportes poliméricos.

Procedimiento experimental del ensayo: después de secar la resina previamente lavada con DCM, se transfiere una alícuota de la resina (0.5 - 2.0 mg) en un tubo de cristal y se añaden 3 gotas de la disolución A y 1 gota de la disolución B. El tubo se calienta durante 3 min a 110 °C.

Disolución A: Por un lado se diluyen 40 g de fenol en EtOH absoluto (10 ml), la mezcla se calienta y se agita hasta que el fenol queda totalmente disuelto. Por otro lado, se disuelven 65 mg de KCN en H₂O (100 ml); se diluyen 2 ml de la disolución resultante en piridina recién destilada sobre ninhidrina (100 ml). Las dos disoluciones se agitan por separado durante 45 min con 4 g de resina Amberlite MB-3, se filtran y se mezclan.

Disolución B: Se disuelven 2.5 g de ninhidrina en EtOH absoluto (50 ml). Se conserva la disolución en un recipiente cerrado que lo proteja de la luz.

Una coloración amarilla de la resina y de la disolución indican la ausencia de aminas primarias en el soporte polimérico (ensayo negativo), mientras que una coloración azul de ambos indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo) (Esquema 1. 1).



Esquema 1. 1. Test de Kaiser

1.4.2 Ensayo cualitativo de cloranilo²

El ensayo colorimétrico con cloranilo nos permitió detectar aminas secundarias en un soporte polimérico.

Procedimiento experimental del ensayo: después de secar la resina previamente lavada con DCM, se transfiere una alícuota de la resina (0,5-2,0 mg) a un tubo de cristal y se le

añaden 5 gotas de una disolución saturada de cloranilo en tolueno y 20 gotas de acetona. El tubo de cristal se agita 5 min a t.a. y pasado dicho periodo se observa la coloración de la resina. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas secundarias (ensayo negativo) mientras que una coloración azulada o verdosa indica la presencia de aminas secundarias (ensayo positivo).

1.4.3 Tratamiento inicial de la resina

Acondicionamiento de la resina Fmoc-Rink-Amida-MBHA

(i) DCM (5 x 1 min); (ii) DMF (5 x 1 min); (iii) piperidina/DMF (1:4, v/v) (1 x 1 min, 2 x 15 min); (iv) DMF (5 x 1 min); (v) DCM (5 x 1 min).

Acondicionamiento de la resina MBHA

(i) DCM (5 x 1 min y 1 x 30 min); (ii) TFA/DCM (2:3, v/v) (1 x 1min y 1 x 30 min); (iii) DCM (5 x 1 min), (iv) DIEA/DCM (1:9, v/v) (3 x 3 min), (v) DCM (5 x 1 min).

1.4.4 Protocolos generales de la síntesis manual en fase sólida

Eliminación del grupo Fmoc

(i) DMF (5 x 1 min); (ii) piperidina/DMF (2:8) (1 x 1 min y 2 x 20 min); (iii) DMF (5 x 1 min); (iv) DCM (5 x 1 min).

Eliminación del grupo Boc

(i) TFA/DCM (2:3, v/v) (1 x 1min y 1 x 30 min); (ii) DCM (5 x 1 min); (iii) DIEA/DCM (1:9, v/v) (3 x 3 min), (iv) DCM (5 x 1 min).

Eliminación del grupo Alloc

(i) DCM (5 x 1 min); (ii) 2 x (Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq), PhSiH₃ (10 eq) en DCM, 20 min); (iii) DCM (3 x 10 min); (iv) DMF (5 x 1 min); (v) 0.5% dietilcarbamato en DMF (3 x 10 min); (vi) DMF (5 x 1 min); (vii) DCM (5 x 1 min).

Acilación de aminas

(i) DMF (5 x 1 min); (ii) ácido carboxílico correspondiente (5 eq), DPCDI (5 eq) y HOBt·H₂O (5 eq) en DMF, 2 h; (iii) DMF (5 x 1 min); (iv) DCM (5 x 1 min).

Alquilación de aminas

(i) DMF (5 x 1 min); (ii) aldehído correspondiente (5 eq) en DMF/AcOH (9.9:0.1, v/v), 30 min y NaBH₃CN (5 eq) en MeOH, 2 h; (iii) DMF (5 x 1 min); (iv) DCM (5 x 1 min).

Acetilación de aminas

(i) DCM (5 x 1 min); (ii) DIEA (10 eq), Ac₂O (5 eq) en DCM, 1 h, (iii) DCM (5 x 1 min).

Síntesis de hidroxamatos mediante la reacción de Mitsunobu

Se lava la resina con DCM_{anh.}, añadiendo PPh₃ (21 eq), y Boc-L-Lys(Boc)-OPMB o Boc-L-Tialisina(Boc)-OMPB (7 eq) agitando hasta que se disuelven completamente los reactivos. Se enfría la resina en la nevera a 4 °C durante 15 min bajo atmosfera de argón y se añade gota a gota DIAD (21 eq). La mezcla se deja a t.a. y con agitación orbitálica 15 h. Posteriormente se lava la resina con DCM (5 x 1 min), DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) y DCM (2 x 1 min).

Escisión de los productos de la resina Fmoc-Rink-Amida-MBHA

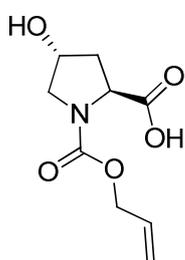
Se trata la resina con una disolución ácida de TFA/H₂O (95:5, v/v) a t.a. durante 4 h. Se filtra y se lava la resina con la misma disolución recogiendo los filtrados. Se evapora el TFA y se disuelven los compuestos en H₂O-ACN, se liofilizan y se purifican posteriormente en RP-HPLC-Preparativo.

Escisión de los productos de la resina MBHA. Acidólisis con HF anhidro

Se utiliza un sistema de teflón compuesto por una bomba de vacío y un sistema de control de presión. En un tubo de teflón provisto de un agitador se coloca la resina seca a la que se le adiciona anisol (5% v/v). Se acopla el tubo al sistema general y se enfría con N₂ líquido durante 10 min, luego se condensa sobre la resina HF_{anh} (5 ml/g de resina). Se deja reaccionar 2 h a 0 °C y se evapora el HF_{anh} al vacío. Los compuestos son precipitados en el tubo con MTBE frío, disueltos en una disolución de AcOH/H₂O (1:9, v/v), liofilizados y posteriormente purificados en RP-HPLC-Preparativo.

2. Síntesis de la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP

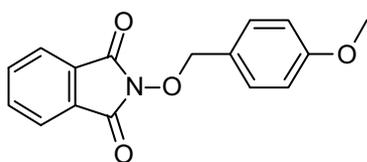
2.1 Síntesis en solución de los precursores



ácido (2S,4R)-1-((aliloxi)carbonil)-4-hidroxipirrolidina-2-carboxílico

(3). Se ajusta, con una solución de NaOH 4 M a pH a 9, una disolución de L-hidroxiprolina (10.0 g, 76.2 mmoles) en THF/H₂O (1:1, v/v) (100 ml) a 0 °C. Manteniendo siempre el pH básico de la reacción, se añade con un embudo de adicción y gota a gota cloroformiato de alilo (7.70 ml, 72.4 mmoles). Tras la adición se retira el baño H₂O/hielo y se agita la reacción

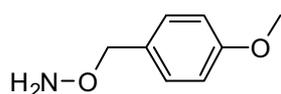
durante 1 h a t.a. Posteriormente se añade NaCl_(ac.) (30 ml). Se extrae la mezcla con AcOEt (2 x 20 ml) para eliminar posibles restos de L-hidroxiprolina. La fase acuosa se acidifica con HCl_(ac.) al 35% a pH 2 y se extrae el producto con AcOEt (3 x 20 ml). La fase orgánica se lava con una solución saturada de NaCl_(ac.) (2 x 10 ml), se seca con MgSO_{4(s)}, se filtra y se evapora a sequedad obteniendo el producto en forma de aceite transparente (12.9 g, 60.0 mmoles, rendimiento: 79%, t_R 1.16 min, pureza: 96%). **MS** (ES⁺) calculada para C₉H₁₃NO₅: (m/z) 215.07; experimental [M+H] = 215.86. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.03 - 5.77 (m, 1H), 5.41 - 5.11 (m, 2H), 4.65 - 4.41 (m, 3H), 3.70 - 3.48 (m, 2H), 2.46 - 2.09 (m, 2H).



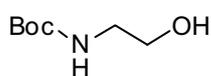
2-((4-metoxibencil)oxi)isoindolina-1,3-diona (6).

Se añade 1-(clorometil)-4-metoxibenceno (10.9 ml, 80.0 mmoles) a una solución de N-hidroxifalimida (13.1 g, 80.0 mmoles) y Et₃N (26.6 ml, 192 mmoles) en DMF (200 ml).

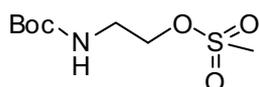
La reacción se agita durante 1 h a 90 °C. Posteriormente se añaden 250 ml de una mezcla H₂O/hielo, precipitándose un sólido que es filtrado, lavado con H₂O y secado al vacío. Se obtiene el producto como sólido blanco (17.9 g, 63.2 mmoles, rendimiento: 79%, pureza: 97%). El compuesto no se detecta por HPLC-MS-UV. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.83-7.77 (m, 2H), 7.75-7.71 (m, 2H), 7.45 (d, J = 8.70 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.71 Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 3.80 (s, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 163.5, 160.4, 134.3, 131.6, 128.8, 125.8, 123.4, 113.9, 79.4, 55.2.



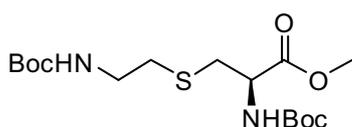
O-(4-metoxibencil)hidroxilamina (8). A una suspensión de **6** (17.0 g, 60.0 mmoles) en EtOH (300 ml) se añade *N*-metilhidrazina (3.45 ml, 65.9 mmoles). La reacción se agita a reflujo 1.5 h. Se elimina el disolvente a sequedad obteniéndose un sólido blanco que se resuspende en Et₂O, agitándolo a t.a. 30 min. Se filtra la solución recogiendo la fase orgánica y se evapora el disolvente obteniendo como producto un aceite amarillo (6.63 g, 49.9 mmoles, rendimiento: 72%, pureza determinada por RMN ¹H: 98%). El compuesto no se detecta por HPLC-MS-UV. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.30 (d, *J* = 8.65 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.67 Hz, 2H), 5.37 (bs, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.81 (s, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 159.4, 130.0, 129.3, 113.8, 77.5, 55.2.



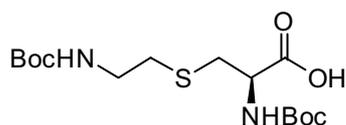
terc-butil-(2-hidroxietil)carbamato (11). A una disolución de *terc*-butil-dicarbonato (30.0 g, 138 mmoles) en DCM_{anh.} (100 ml), bajo atmosfera de nitrógeno, se le añade 2-aminoetanol (8.30 ml, 138 mmoles). La reacción se agita a 1.5 h a 0 °C. La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (ac.) (3 x 20 ml), NaCl (ac.) (2 x 10 ml), se seca con MgSO₄ (s), se filtra y se evapora a sequedad obteniendo el producto aceitoso amarillento. (22.0 g, 0.14 moles, rendimiento: 99%, *t*_R 1.60 min; pureza determinada por RMN ¹H: 99%). El compuesto no absorbe en UV. **MS** (ES⁺) calculada para C₇H₁₅NO₃: (m/z) 161.11; experimental [M+H] = 161.82. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.69 - 3.64 (m, 2H), 3.26 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 156.8, 79.6, 62.0, 43.1, 28.4.



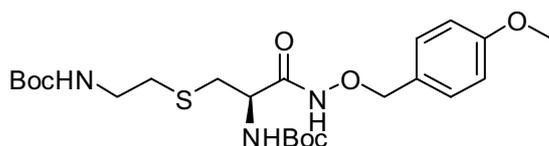
metanosulfonato de 2-((terc-butoxicarbonil)amino)etilo (14). A una disolución de **11** (22.0 g, 136 mmoles) y piridina_{anh.} (22 ml, 273 mmoles) en DCM_{anh.} (60 ml) enfriada a 0 °C con un baño H₂O/hielo y bajo atmosfera de nitrógeno, se añade gota a gota cloruro de metansulfonilo (12.8 ml, 165 mmoles). Se agita la reacción 10 min a 0 °C, posteriormente se retira el baño H₂O/hielo dejando la reacción a t.a. 40 min más. La solución se lava con una solución acuosa al 5% de HCl (2 x 10 ml) y una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 x 10 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ (s), se filtra y se evapora a sequedad obteniendo el producto como aceite amarillo (29.8 g, 0.12 moles, rendimiento: 91%, *t*_R 2.20 min, pureza determinada por RMN ¹H: 98%). El compuesto no adsorbe en UV. **MS** (ES⁺) calculada para C₈H₁₇NO₅S: (m/z) 239.08; experimental [M+H] = 239.92. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.27 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.45 (dd, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 1.43 (s, 9H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 155.8, 80.1, 69.0, 40.1, 37.5, 28.4.



***N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)etil)-*L*-cisteinato de metilo (**16**).** Se agita durante 30 min y a 0 °C una solución *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-cisteína metil éster (25.6 ml, 124 mmoles), Cs₂CO₃ (s) (48.7 g, 149 mmol) y **14** (29.8 g, 125 mmoles) en DMF (80 ml). Posteriormente se retira el baño H₂O/hielo y pasadas 4 h se elimina el exceso de Cs₂CO₃ (s) por filtración. Se elimina el disolvente al vacío, el crudo obtenido, se redissuelve en DCM y se lava con una solución saturada de NaCl (ac.) (2 x 15 ml). La fracción orgánica se seca con MgSO₄ (s), se filtra y se evapora a sequedad obteniendo un aceite amarillo como crudo. **MS** (ES⁺) calculada para C₁₆H₃₀N₂O₆S: (m/z) 378.18; experimental [M+H] = 379.24. Este compuesto es usado en la siguiente reacción sin ser purificado.

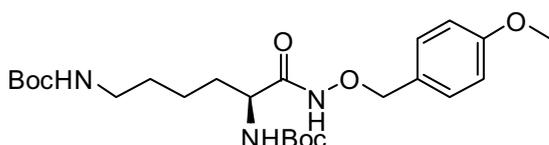


***N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)etil)-*L*-cisteína (**17**).** Al crudo obtenido **16** se le añade LiOH (s) (14.9 g, 623 mmoles) en H₂O/MeOH (1:1, v/v) (100 ml). La reacción se agita a t.a. durante 18 h. Para eliminar el exceso de LiOH (s) se filtra la solución y se acidifica posteriormente con HCl (ac.) 2 M hasta alcanzar pH 3. El producto se extrae con DCM (3 x 20 ml). Las fracciones orgánicas son lavadas con una solución saturada de NaCl (ac.) (2 x 15 ml), secadas con MgSO₄ (s), filtradas y concentradas al vacío obteniendo un aceite como producto (26.2 g, 71.9 mmoles, rendimiento en 2 etapas: 56%, t_R 2.70 min, pureza: 87%). **MS** (ES⁺) calculada para C₁₅H₂₈N₂O₆S: (m/z) 364.17; experimental [M+H] = 365.06. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.88 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.03 (td, *J* = 7.2, 4.6 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 13.3, 6.5 Hz, 2H), 2.87 (dd, *J* = 13.5, 4.6 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 13.4, 9.4 Hz, 1H), 2.57 – 2.51 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.37 (s, 9H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 172.5, 155.4, 78.2, 77.7, 53.7, 32.7, 31.4, 28.2.



BocTialis(Boc)-NH-OPMB (18**).** Se agita una mezcla de **17** (26.2 g, 71.8 mmoles), EDC·HCl (13.8 g, 71.8 mmoles) y HOBt·H₂O (11.0 g, 71.8 mmol) en DCM (120 ml) unos 20 min. Posteriormente se le añade una solución de **8** (11.0 g, 71.8 mmol) en DCM (10 ml), dejando la reacción a t.a. durante 15 h. La fase orgánica se lava con 0.1 M HCl (ac.) (2x 75 ml). Durante el primer lavado, se forma un precipitado que es eliminado por filtración. Seguidamente, la fase orgánica se lava con soluciones saturadas de NaHCO₃

(ac.) (3 x 20 ml) y NaCl (ac.) (2 x 15 ml), se seca con MgSO₄ (s), se filtra y se concentra. El producto, un sólido blanco, precipita en una mezcla de hexano/DCM (4:1, v/v) a 4 °C (26.7 g, 53.5 mmoles, rendimiento: 75%, *t_R* 3.15 min, pureza: 86%). **MS** (ES⁺) calculada para C₂₃H₃₇N₃O₇S: (m/z) 499.24; experimental [M+H] = 500.17. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.37 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.35 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.91 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.17 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.39 - 3.19 (m, 2H), 2.90 - 2.75 (m, 2H), 2.65 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.73 (s, 1H), 1.43 (s, 18H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 168.2, 160.1, 156.2, 155.5, 131.1, 127.3, 114.0, 78.0, 55.4, 51.9, 39.9, 34.4, 32.9, 28.5.



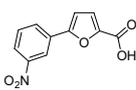
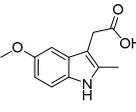
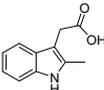
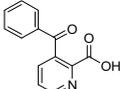
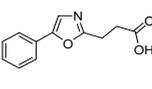
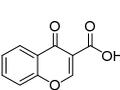
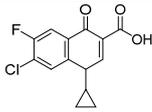
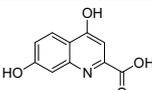
BocLys(Boc)-NH-OPMB (32). Se agita a t.a. durante 20 min una solución de **31** (5.50 g, 15.9 mmol), EDC·HCl (3.14 g, 16.4 mmoles) y HOBt·H₂O (2.43 g, 15.9 mmoles) en DCM (75 ml). A la mezcla de reacción se le añade una solución de **8** (2.44g, 15.9 mmoles) en DCM (10 ml) y se agita a t.a. durante 15 h. La fase orgánica se lava con una solución de HCl (ac.) 0.1 M (2 x 75 ml). Durante el primer lavado, se forma un precipitado que es eliminado por filtración. Seguidamente la fase orgánica se lava con una solución saturada de NaHCO₃ (ac.) y de NaCl (ac.), se seca con MgSO₄ (s), se filtra y se concentra en el rotavapor. El crudo se purifica por columna cromatográfica *flash* automatizada (ISCO; SiO₂, 120 g, sistema de elución: hexano/EtOH (4:1, v/v), λ = 230 nm, R_f = 0.45). El producto deseado se obtiene como un sólido blanco (5.43 g, 11.3 mmol, rendimiento: 71%, *t_R* 3.08 min, pureza: 99%). **MS** (ES⁺) calculada para C₂₄H₃₉N₃O₇: (m/z) 481.28; experimental: [M+H] = 482.22. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO- d₆) δ: 11.05 (bs, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.59 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.57 Hz, 2H), 6.84 (bd, *J* = 7.82 Hz, 1H), 6.74 (bt, *J* = 4.94 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.73-3.67 (m, 1H), 2.90-2.82 (m, 2H), 1.50-1.41 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.36 (s, 9H), 1.34-1.26 (m, 2H), 1.26-1.10 (m, 2H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO- d₆) δ: 168.9, 159.2, 155.4, 155.1, 130.5, 127.7, 113.5, 77.8, 77.2, 76.2, 54.9, 51.9, 31.4, 29.0, 28.1, 28.0, 22.6.

2.2 Síntesis en fase sólida de la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP

Los compuestos se sintetizan en fase sólida siguiendo la ruta sintética detallada en el apartado 2.3.3.2 de dicha tesis. Los protocolos utilizados para su síntesis se han detallado previamente en el apartado 1.4 de materiales y métodos.

2.2.1 Caracterización de la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP sintetizados en fase sólida

Grupo ROOH	Compuesto	mg producto	M calc.	Mexp. [M+H+]	¹ Pureza (%)	² Δ purif. (%B(min))	³ Tipo de unión	
							⁴ (puntuación GS) pF	HS
	M-01	3.5	571.15	574.16	84	0-17 (18')	3 (-12.9)	1 o 2 (-9.6)
	M-26	3.2	589.11	592.18	96	10-20 (10')	3 (-11.9)	1 (-10.9)
	M-02	9.3	511.22	512.17	95	0-17 (18')	3 (-12.2)	1 o 2 (-8.9)
	M-27	8.1	529.17	530.26	91	20-23 (10')	3 (-11.06)	2 (-7.9)
	M-03	1.9	445.20	446.28	53	0-17 (18')	3 (-10.8)	1 o 2 (-10.3)
	M-28	-	463.15	-	-	2-20 (10')	1 (-9.3)	2 (-8.4)
	M-04	1.6	523.11	524.23	90	0-17 (18')	3 (-11.5)	2 (-9.7)
	M-29	-	541.06	-	-	20-30 (10')	1 o 3 (-10.9)	1 o 2 (-10.6)
	M-06	3.9	510.20	511.23	99	0-17 (18')	1 o 3 (-11.2)	2 (-9.9)
	M-31	-	528.15	-	-	15-20 (10')	1 (-9.7)	2 (-9.7)
	M-07	4.0	444.21	445.21	94	0-17 (18')	3 (-11.7)	1 (-9.4)
	M-32	11.2	462.16	463.26	99	17-20 (10')	3 (-10.4)	2 (-8.4)
	M-08	1.1	547.29	548.22	90	0-17 (18')	3 (-12.7)	2 (-8.7)
	M-33	6.5	565.24	566.38	92	35-45 (10')	3 (-12.0)	2 (-9.89)
	M-09	3.4	383.16	384.09	91	Isocrático 0 (14')	1 (-9.4)	2 (-8.6)
	M-34	5.1	401.11	402.23	>99	10-30 (10')	1 (-9.3)	3 (-10.9)
	M-11	12.0	384.25	385.04	86	Isocrático 0 (14')	3 (-10.5)	4 (-8.7)
	M-36	10.1	402.20	403.29	97	0-2 (10')	1 (-9.8)	4 (-9.5)

	M-12	6.3	488.20	489.18	89	0-17 (18')	3 (-11.0)	2 (-9.1)
	M-37	8.3	506.15	507.24	88	15-25 (10')	3 (-10.5)	2 (-8.2)
	M-13	10.4	394.21	395.21	93	Isocrático 0 (14')	1 (-11.0)	3 (-8.9)
	M-38	20.1	412.16	413.20	87	15-30 (10')	3 (-10.5)	2 (-8.2)
	M-14	4.2	367.19	368.01	87	Isocrático 0 (14')	1 o 3 (-11.8)	2 (-8.2)
	M-39	12.6	385.14	386.23	85	0-10 (10')	1 o 3 (-9.8)	2 (-9.4)
	M-15	1.4	474.26	475.24	99	0-17 (18')	4 (-9.8)	2 (-10.7)
	M-40	12.7	492.21	493.29	90	15-30 (10')	3 (-10.4)	2 (-10.7)
	M-16	0.9	444.25	445.21	94	Isocrático 0 (14')	3 (-10.4)	3 (-11.6)
	M-41	11.4	462.20	463.26	88	15-30 (10')	3 (-10.1)	2 (-8.4)
	M-17	1.0	446.14	447.13	95	Isocrático 0 (14')	3 (-9.9)	1 o 2 (-9.4)
	M-42	4.9	464.09	465.18	93	5-12 (10')	1 o 3 (-9.9)	3 (-10.2)
	M-18	4.2	482.23	483.15	87	0-17 (18')	1 (-9.6)	3 (-10.5)
	M-43	8.6	500.18	491.24	93	15-30 (10')	1 (-9.7)	2 o 3 (-9.8)
	M-19	2.0	472.24	473.23	87	0-17 (18')	4 (-10.3)	4 (-8.1)
	M-44	3.9	490.19	491.24	97	10-25 (10')	1 o 3 (-11.2)	2 (-9.5)
	M-20	1.3	445.20	446.22	95	Isocrático 0 (14')	3 (-10.2)	2 (-8.7)
	M-45	-	463.15	-	-	5-30 (10')	3 (-10.5)	2 (-9.1)
	M-21	1.7	383.16	384.03	77	Isocrático 0 (14')	3 (-9.8)	1 (-11.1)
	M-46	6.5	401.11	402.16	91	6-8.5 (10')	1 (-9.9)	2 (-8.5)
	M-22	2.0	536.20	537.14	90	0-17 (18')	1 (-10.6)	1 o 2 (-10.7)
	M-47	9.0	554.15	555.20	93	15-25 (10')	1 (-12.5)	2 (-9.9)
	M-23	3.0	460.21	461.23	96	Isocrático 0 (14')	3 (-11.2)	3 (-10.5)
	M-48	3.5	478.16	479.27	93.1	0-5 (6')	3 (-9.9)	1 o 2 (-11.6)

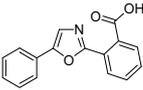
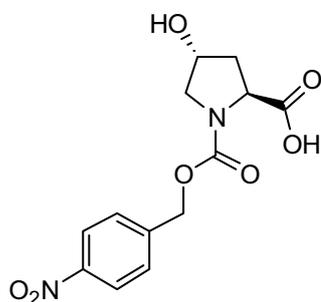
	M-24	0.5	520.24	521.31	99	0-17 (18')	4 (-9.5)	3 (-11.6)
	M-49	9.0	538.19	539.26	96	20-30 (10')	4 (-9.8)	3 (-10.5)
	M-25	4.7	413.20	414.12	92	Isocrático 0 (14')	1 (-9.6)	1 (-10.8)
	M-50	-	431.5	-	-	0-20 (10')	1 (-10.1)	1 (-8.9)

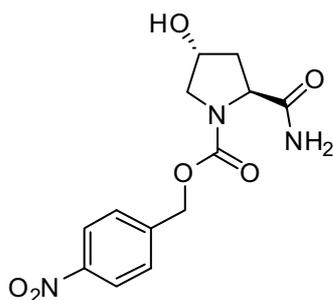
Tabla donde se resume la caracterización de los 46 compuestos sintetizados en fase sólida que forman la quimioteca de miméticos de Lisil-AMP; con **lisina** o **tialisina** como aminoácido de reconocimiento. Los compuestos marcados en **negrita** son los más activos *in vitro* y se resintetizan posteriormente en solución. ¹La pureza de los compuestos se determina a $\lambda = 214$ nm mediante RP-HPLC-MS analítico en condiciones básicas (A: H₂O:NH₄CO₃ (20 mM, pH 9); B: ACN) a 50 °C con gradientes lineales de 0-50% de B en 3.5 min a un flujo de 1ml/min. ²Gradiente utilizado para la purificación de los compuestos mediante HPLC-MS-Prep en condiciones básicas (A: H₂O:NH₄CO₃ (20 mM, pH 9); B: ACN) utilizando un flujo de 16 ml/min. ³Sitio de unión del sustrato con la enzima; por 1 = lisina; 2 = adenina; 3 = lisina-adenilato; 4 = ningún. ⁴Resultado y valores de GS del *docking* virtual.

2.3 Síntesis en solución de los miméticos de Lisil-AMP seleccionados



ácido (2S,4R)-4-hidroxi-((4-nitrobenziloxy)carbonyl)pirrolidina-2-carboxílico (20). Se disuelve la L-hidroxi-prolina (10 g, 76.2 mmoles) en NaOH 2 M (80 ml) a 0 °C y se añade gota a gota una solución cloroformiato de *p*-nitrobencilo (16.4 g, 76.2 mmoles) en 30 ml de DCM. La reacción se agita durante 1 h, posteriormente se separan las 2 fases y se lava la fase acuosa con DCM (1 x 20 ml). Se acidifica la fase acuosa

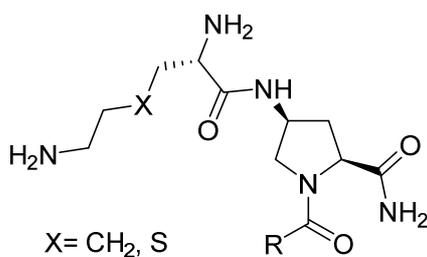
con H₂SO₄ (ac.) al 96% (~5 ml) hasta pH 2-3. La solución se enfría a 4 °C durante 14 h obteniendo un precipitado que se aísla por filtración. El se obtiene producto como sólido amarillo (13.4 g, 43.2 mmoles, rendimiento: 57%, t_R 1.73 min, pureza: > 99%). **MS** (ES+) calculada para C₁₃H₁₄N₂O₇: (m/z) 310.08; experimental [M+H] = 311.03. **¹H RMN** (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.21 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.58 (dd, $J = 13.7, 8.8$ Hz, 2H), 5.36 - 5.09 (m, 2H), 4.44 (dt, $J = 25.9, 8.1$ Hz, 2H), 3.69 - 3.48 (m, 2H), 2.39 - 2.25 (m, 1H), 2.16 - 2.03 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CD₃OD) δ : 166.7, 166.4, 146.6, 136.2, 136.1, 119.7, 119.6, 115.1, 115.0, 61.2, 60.5, 57.5, 57.3, 49.9, 49.6, 46.7, 46.3, 39.5, 30.8, 29.9.



(2S,4R)-2-carbamoyl-4-hydroxypyrrolidine-1-carboxylate de 4-nitrobenzilo (21). Una solución de **20** (11.35 g, 35.7 mmoles) en ACN_{anh.} se enfría a 0 °C con un baño H₂O/hielo y se añade EDC·HCl (8.40 g, 42.8 mmoles) y HOBT·H₂O (6.72 g, 42.8 mmoles). Se agita la reacción durante 14 h dejando que se alcance la t.a. Posteriormente se enfría de nuevo la reacción a 0 °C y se añade una solución de NH₄OH al 32%

(~10 ml). La mezcla se agita 30 min a 0 °C y 1 h a t.a. La solución se filtra para eliminar los subproductos insolubles y se concentra el filtrado. El crudo se purifica mediante cromatografía *flash* automatizada (ISCO-R_f; SiO₂, 120 g, sistema de elución: DCM/MeOH (4:1, v/v); λ= 254 nm; R_f= 0.65). Se obtiene el producto como sólido blanco como una mezcla de rotámeros (7.5 g, 24.3 mmoles, rendimiento: 66%, t_R 1.52 min, pureza: 99%). **MS** (ES+) calculada para C₁₃H₁₅N₃O₆: (m/z) 309.10; experimental [M+H] = 310.03. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO- d₆) δ: 8.21 (dd, J = 15.2, 8.7 Hz, 4H), 7.63 (t, J = 8.2 Hz, 4H), 7.48 (d, J = 42.3 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 43.3 Hz, 2H), 5.29 - 5.03 (m, 6H), 4.23 (dt, J = 42.2, 7.9 Hz, 4H), 3.46 (ddt, J = 30.7, 27.4, 7.8 Hz, 4H), 2.20 - 2.01 (m, 2H), 1.87 (tdd, J = 12.6, 7.9, 4.7 Hz, 2H). **¹³C RMN** (101 MHz DMSO- d₆) δ: 174.1, 173.6, 153.9, 153.7, 146.8, 145.0, 144.9, 128.0, 127.7, 123.5, 123.3, 68.5, 67.9, 64.8, 64.7, 58.8, 58.4, 55.4, 54.8, 39.5, 38.7.

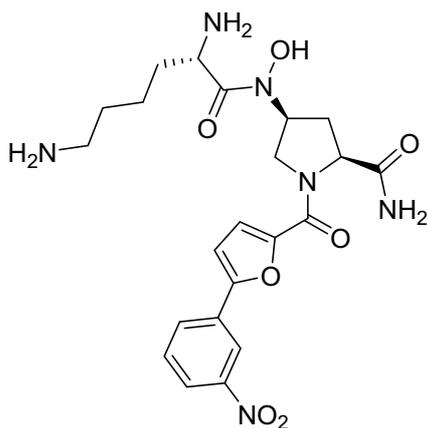
2.3.1 Procedimiento general para la obtención de los miméticos de Lisil-AMP seleccionados



Previo a la reacción se secan los productos de partida **21**, **18** y **32** en una estufa conectada al vacío a 30 °C durante 18 h.

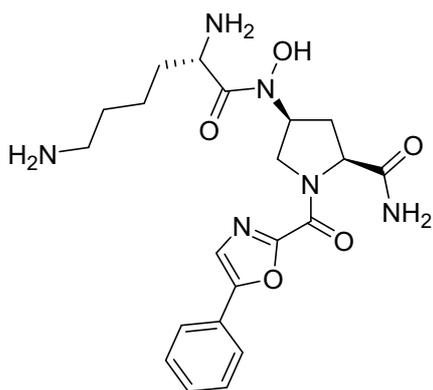
Se agita una solución de **21** (1.00 g, 3.23 mmoles), **18** (1.94 g, 3.89 mmoles) o **32** (1.87 g, 3.89 mmoles) y PPh₃ (2.55 g, 9.72 mmoles) en THF_{anh.} (15 ml) a t.a. bajo atmosfera de argón. Se añade lentamente DEAD (1.53 ml, 9.72 mmoles) dejando la mezcla reaccionar a t.a. durante 15 h bajo atmosfera de argón. Se controla la reacción por RP-HPLC-MS hasta la desaparición del producto de partida observándose la formación del producto deseado así como otros subproductos. El crudo se concentra en el rotavapor y se disuelve con Et₂O (50 ml); la mezcla resultante se enfría a 4 °C durante 16 h. Se forma un precipitado blanco que se elimina por filtración. Se evapora el Et₂O y se purifica el crudo mediante cromatografía *flash* en fase normal automatizada (ISCO-R_f; SiO₂; sistema de elución: DCM/MeOH (4:1, v/v); λ= 270 nm). Se obtiene un aceite **22** o **23**, mezcla 1:1 del producto deseado y del óxido de trifenilfosfina (subproducto de la reacción). El crudo **22** o **23**, se disuelve en

MeOH (10 ml) y se añade una punta de espátula de Pd/C al 10%. Se agita la suspensión bajo atmósfera de H₂, a t.a. durante 15 h. Se filtra la mezcla sobre Celite[®], se recoge el filtrado y se concentra al vacío. El producto resultante y el óxido de trifenilfosfina se observan por HPLC-MS. El crudo **24** es dividido en dos partes iguales mientras que el **25** es dividido en tres partes de 600 mg cada una con el fin de introducir los grupos aromáticos miméticos de la adenina. Se añade el ácido carboxílico correspondiente (1 eq), EDC·HCl (1 eq) y HOBT·H₂O (1 eq) en DCM/DMF (9:1, v/v) (15 ml). La mezcla se agita 18 h a t.a.. Posteriormente se diluye con DCM (20 ml), lavando la fase orgánica con una solución al 5% de NaHCO₃ (ac.) (2 x 15 ml), ácido cítrico (ac.) al 0.5% (15 ml) y una solución saturada de NaCl (ac.) (15 ml). Se seca la fase orgánica con MgSO₄ (s), se filtra y se evapora el disolvente. Los crudos obtenidos (**26**, **27**, **28**, **29** y **30**) se disuelven en TFA/DCM (2:3, v/v) (10 ml), se agitan a t.a. durante 18 h y se concentran a sequedad. Se observó que los productos descomponían si no se realizaba la purificación con PR-HPLC-Preparativo inmediatamente después de eliminar el TFA/DCM.



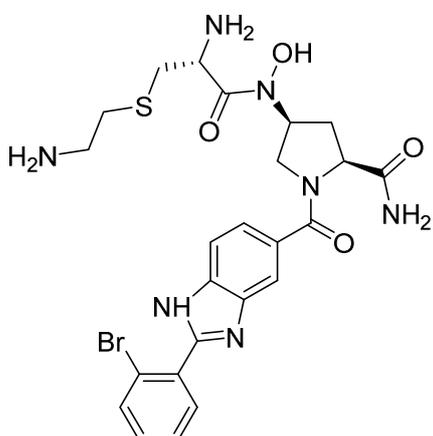
M-12. Se obtuvo el producto liofilizado, una mezcla de dos conforméres, como un sólido de color blanco (78.9 mg, 0.15 mmol, rendimiento global en 4 etapas: 10.1%, pureza: 99%). **HRMS (ES⁺)** calculada para C₂₇H₃₂N₆O₅: (m/z) 520.2434; experimental: [M+H] = 521.2508. **¹H RMN** (600 MHz, DMSO-d₆; conforméres 1) δ: 8.59 (s, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.03 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 1.53 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.72 (t, *J* = 8.04 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 3.62 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 3.64 Hz, 1H),

7.21 (s, 1H) 5.10 (d, *J* = 9.67 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 8.64 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 7.75 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 13.71, 4.57 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.50, 7.50 Hz, 2H), 2.73 - 2.59 (m, 1H), 2.47 - 2.46 (m, 1H), 2.45 - 2.38 (m, 1H), 2.18 (d, *J* = 14.04 Hz, 1H), 1.62 - 1.47 (m, 4H), 1.36 - 1.19 (m, 2H); **¹H RMN** (600 MHz, DMSO-d₆; conforméres 2) δ: 8.55 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 1.22 Hz, 1H), 8.19-8.15 (m, 1H), 7.78 (t, *J* = 8.04 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 3.62 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 3.58 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H) 5.15 (s, 1H), 5.06 - 5.02 (m, 1H), 4.29 (d, *J* = 7.75 Hz, 1H), 4.28 - 4.22 (m, 1H), 3.92 (d, *J* = 13.68 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 13.71, 4.57 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.50, 7.50 Hz, 2H), 2.71 - 2.60 (m, 1H), 2.42 (d, *J* = 14.35 Hz, 1H), 1.62 - 1.47 (m, 4H), 1.36 - 1.19 (m, 2H). **¹³C RMN** (151 MHz, DMSO-d₆) δ: 174.2, 173.0, 163.7, 158.2, 157.9, 157.6, 157.1, 156.8, 152.3, 152.2, 148.4, 148.3, 147.6, 130.8, 130.7, 130.5, 130.2, 130.0, 122.9, 122.8, 118.7, 118.6, 118.4, 118.4, 115.6, 109.8, 109.7, 75.3, 72.4, 59.6, 53.5, 53.3, 44.9, 38.4, 37.5, 33.9, 30.0, 30.0, 29.9, 26.4, 21.5.



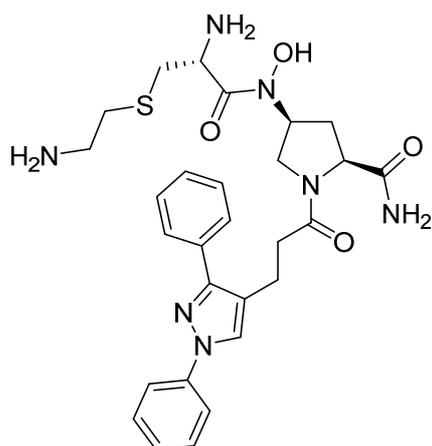
M-24. Se obtuvo el producto liofilizado, una mezcla de dos conformeros, como un sólido de color blanco (100 mg, 0.20 mmol, rendimiento global en 4 etapas: 13.7%, pureza: > 99%). **HRMS** (ES⁺) calculada para C₂₂H₂₈N₆O₇: (m/z) 488.2019; experimental: [M+H] = 489.2091. **¹H RMN** (600 MHz, DMSO- d₆; conformero 1) δ: 8.45 - 8.24 (m, 2H), 8.24 - 8.16 (m, 1H), 7.84 - 7.71 (m, 3H), 7.67 - 7.60 (m, 1H), 7.60 - 7.47 (m, 3H), 7.47 - 7.36 (m, 1H), 7.36 - 7.28 (m, 1H), 4.96 - 4.86

(m, 1H), 4.68 - 4.46 (m, 1H), 4.05 - 3.87 (m, 1H), 3.54 - 3.40 (m, 1H), 2.86 - 2.62 (m, 2H), 2.45 - 2.35 (m, 1H), 2.37 - 2.28 (m, 1H), 1.62 - 1.36 (m, 4H), 1.35 - 1.15 (m, 2H); **¹H RMN** (600 MHz, DMSO-d₆; conformero 2) δ: 8.44 - 8.24 (m, 2H), 8.15 - 8.09 (m, 1H), 7.84 - 7.70 (m, 3H), 7.67 - 7.60 (m, 1H), 7.59 - 7.47 (m, 3H), 7.47 - 7.37 (m, 1H), 7.13 - 7.06 (m, 1H), 5.08 - 5.01 (m, 1H), 4.14 - 3.99 (m, 1H), 3.79 - 3.68 (m, 1H), 3.39 - 3.23 (m, 1H), 2.86 - 2.65 (m, 2H), 2.39 - 2.27 (m, 1H), 2.27 - 2.14 (m, 1H), 1.61 - 1.37 (m, 2H), 1.36 - 1.16 (m, 2H). **¹³C RMN** (151 MHz, DMSO-d₆) δ: 174.2, 173.0; 163.7; 158.2; 157.9; 157.6; 157.1; 156.8; 152.3, 152.2, 148.4, 148.3, 147.6, 130.8, 130.7, 130.5, 130.2, 130.0, 122.9, 122.8, 118.7, 118.6, 118.4, 118.4, 115.6, 109.8, 109.7, 75.3, 72.4, 59.6, 53.5, 53.3, 44.9, 38.4, 37.5, 33.9, 30.0, 30.0, 29.9, 26.4, 21.5.

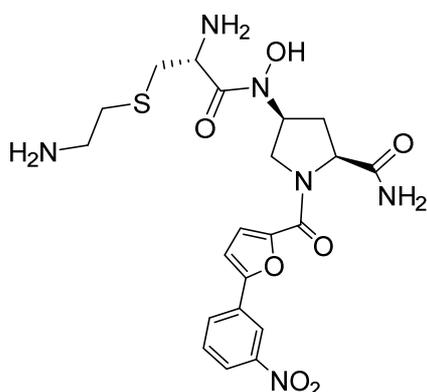


M-26. Después de liofilizar las fracciones recogidas, el producto, una mezcla de dos conformeros, se obtuvo como un sólido de color blanco (37.3 mg, 0.06 mmoles, rendimiento global en 4 etapas: 3.9%, t_R 1.00 min, pureza: > 99.5%). **HRMS** (ES⁺) calculada para C₂₄H₂₈BrN₇O₄S: (m/z) 589.1107; experimental [M+H]= 592.1155. **¹H RMN** (600 MHz, DMSO- d₆) δ: 8.41 - 8.30 (s, 1H), 7.99 - 7.87 (m, 2H), 7.87 - 7.80 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.80 - 7.74 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.71 - 7.53 (m, 2H), 7.53 - 7.42 (m, 3H), 7.40 - 7.29 (m, 1H), 7.20 -

7.10 (s, 1H), 7.10 - 7.02 (s, 1H), 5.13 - 5.00 (s, 1H), 4.99 - 4.85 (s, 1H), 4.71 - 4.54 (m, 1H), 4.40 - 4.26 (m, 1H), 4.16 - 3.96 (s, 1H), 3.00 - 2.82 (s, 2H), 2.76 - 2.63 (m, 2H), 2.62 - 2.57 (m, 2H), 2.57 - 2.53 (s, 1H), 2.33 - 2.17 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 2.20 - 2.05 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 1.31 - 1.14 (s, 1H). **¹³C RMN** (151 MHz, DMSO- d₆) δ: 173.7, 173.4, 170.0, 169.7, 165.1, 162.1, 161.9, 152.1, 151.9, 133.4, 132.3, 132.1, 131.6, 130.2, 127.9, 122.1, 121.5, 73.7, 72.8, 61.2, 58.7, 54.7, 52.5, 47.0, 39.5, 34.9, 34.6, 30.5, 29.0.



M-33. El producto liofilizado, una mezcla de dos conformeros, se obtuvo como un sólido de color blanco (51.3 mg, 0.09 mmoles, rendimiento global en 4 etapas: 4.2%, t_R 1.88 min, pureza: > 99.5%). **HRMS** (ES⁺) calculada para C₂₈H₃₅N₇O₄S: (m/z) 565.2471; experimental [M+H]⁺ = 566.2541. **¹H RMN** (400 MHz, CD₃OD; conformero 1) δ : 8.25 - 8.14 (s, 1H), 7.83 - 7.75 (m, 2H), 7.75 - 7.68 (m, 2H), 7.56 - 7.43 (m, 4H), 7.44 - 7.36 (m, 1H), 7.34 - 7.24 (m, 1H), 5.22 - 5.12 (m, 1H), 5.16 - 4.99 (m, 1H), 4.66 - 4.52 (dd, J = 8.6, 3.1 Hz, 1H), , 4.34 - 4.14 (m, 1H), 3.88 - 3.60 (dq, J = 9.4, 4.4 Hz, 3H), 3.15 - 2.95 (m, 6H), 2.89 - 2.51 (m, 4H), 2.42 - 2.31 (m, 1H), 1.99 - 1.80 (s, 1H), 1.35 - 1.17 (s, 1H); **¹H RMN** (400 MHz, CD₃OD; conformero 2) δ : 8.15 - 8.10 (s, 1H), 7.83 - 7.75 (m, 2H), 7.75 - 7.68 (m, 2H), 7.56 - 7.43 (m, 4H), 7.44 - 7.36 (m, 1H), 7.34 - 7.24 (m, 1H), 5.22 - 5.12 (m, 1H), 5.16 - 4.99 (m, 1H), 4.66 - 4.52 (dd, J = 8.6, 3.1 Hz, 1H), 4.53 - 4.41 (m, J = 5.4 Hz, 1H), 3.88 - 3.60 (dq, J = 9.4, 4.4 Hz, 3H), 3.15 - 2.95 (m, 6H), 2.89 - 2.51 (m, 4H), 2.52 - 2.44 (m, 1H), 1.99 - 1.80 (s, 1H), 1.35 - 1.17 (s, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CD₃OD) δ : 176.7, 176.6, 174.2, 174.1, 162.5, 153.0, 141.3, 134.7, 130.6, 130.6, 129.7, 129.2, 129.1, 129.1, 129.1, 128.9, 127.5, 121.6, 120.0, 120.0, 76.2, 74.8, 60.8, 60.2, 54.0, 53.8, 47.7, 40.0, 38.4, 36.2, 35.9, 35.7, 35.5, 31.2, 31.1, 20.8, 20.5.



M-37. Después de liofilizar las fracciones recogidas, el producto, una mezcla de dos conformeros, se obtuvo como un sólido de color blanco (24.4 mg, 0.05 mmoles, rendimiento global en 4 etapas: 3.0%, t_R 1.33 min, pureza: > 99.5%). **HRMS** (ES⁺) calculada para C₂₁H₂₆N₆O₇S: (m/z) 506.1584; experimental [M+H]⁺ = 507.1654. **¹H RMN** (600 MHz, DMSO- d₆; conformero 1) δ : 8.60 (s, 1H), 8.36 (s, 3H), 8.23 (dd, J = 15.6, 7.7 Hz, 2H), 7.80 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.71 - 7.35 (m, 1H), 7.35 - 7.01 (m, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.09 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.07 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 2.93 - 2.84 (m, 2H), 2.74 - 2.64 (m, 2H), 2.63 - 2.52 (m, 2H), 2.43 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 2.19 (d, J = 13.3 Hz, 1H); **¹H RMN** (600 MHz, DMSO- d₆; conformero 2) δ : 8.57 (s, 1H), 8.36 (s, 3H), 8.19 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.74 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.71 - 7.35 (m, 1H), 7.35 - 7.01 (m, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.57 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.19 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.07 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 2.93 - 2.84 (m, 2H), 2.74 - 2.64 (m, 2H), 2.63 - 2.52 (m, 2H), 2.43 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 2.19 (d, J = 13.3 Hz, 1H). **¹³C**

RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.1, 173.0, 165.2, 161.9, 157.3, 157.1, 152.3, 148.6, 147.9, 130.9, 130.3, 122.9, 118.4, 109.8, 74.5, 71.6, 59.9, 53.6, 47.0, 37.7, 34.8, 34.1, 30.8, 29.0.

2.3.2 Caracterización de los miméticos de Lisil-AMP seleccionados sintetizados en solución

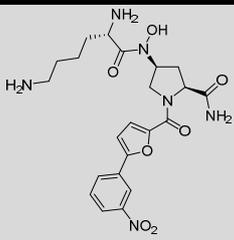
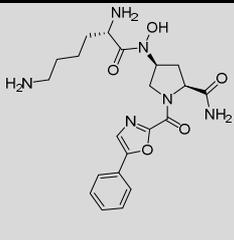
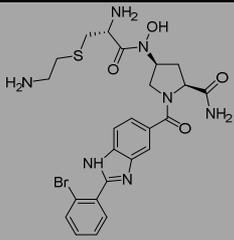
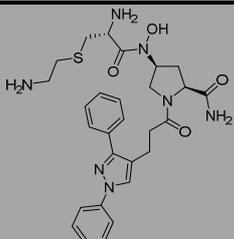
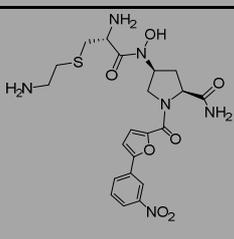
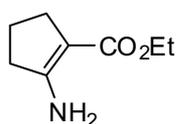
Estructura	Compuesto	mg producto	M calc.	Mexp. [M+H ⁺]	¹ Pureza (%)	² Δ purif. 1 (%B(min))	³ Δ purif. 2 (%B(min))
	M-12	78.9	520.2434	521.2508	99	0-17 (18')	-
	M-24	100.0	488.2019	489.2091	>99	0-17 (18')	-
	M-26	37.3	589.1107	592.1155	>99	10-20 (7.5')	5-40 (7.5')
	M-33	51.3	565.2471	566.2541	>99	15-30 (7.5')	20-50 (7.5')
	M-37	24.4	506.1584	507.1654	>99	15-25 (7.5')	10-50 (7.5')

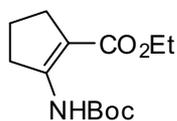
Tabla donde se resume la caracterización de los miméticos de Lisil-AMP seleccionados. ¹Pureza determinada a $\lambda = 214$ nm mediante RP-HPLC-MS analítico utilizando la columna XBridgeTM C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μ m), en condiciones ácidas (A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH (99.3:0.7, v/v)), con gradientes lineales de 5-100% de B en 4.5 min a un flujo de 1ml/min. Gradiente utilizado para la purificación de los compuestos mediante HPLC-MS-Prep en condiciones básicas ²(A: H₂O:NH₄CO₃ (20 mM, pH 9); B: ACN) o ácidas ³(A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH (99.3:0.7, v/v)) utilizando un flujo de 16 ml/min en ambos caso.

3. Síntesis de la quimioteca de ligandos múltiples

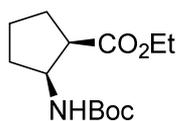
3.1 Síntesis asimétrica del ácido (1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxílico; cispentacina



2-aminociclopentenocarboxilato de etilo (34). Se disuelve 2-oxociclopentenocarboxilato de etilo (10.0 ml, 0.07 moles) en MeOH_{anh.} (70.0 ml) y se añade acetato de amonio (27.0 g, 0.35 moles). La reacción se agita a t.a en atmósfera de argón durante 18 h, monitorizando su evolución mediante HPLC-MS. Una vez finalizada la reacción se evapora el disolvente. Se disuelve el residuo con DCM, lavando la fase orgánica con una disolución saturada de NaCl_(ac.) (3 x 20 ml). La fase orgánica se seca con MgSO_{4(s)}, se filtra y se elimina el disolvente obteniendo un sólido amarillento (10.7 g, 0.07 moles, rendimiento: 99%, t_R 2.32 min, pureza: 99%). **MS** (ES⁺) calculada para C₈H₁₃NO₂: (m/z) 155.09; experimental [M+H] = 155.79. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.49 (dt, J = 15.5, 7.5 Hz, 4H), 1.81 (m, 2H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 168.2, 161.8, 95.4, 58.7, 35.2, 29.6, 20.9, 14.8.

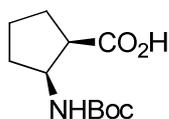


2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentenocarboxilato de etilo (35). A una disolución de **34** (10.7 g, 0.07 moles) y Et₃N (48.8 ml, 0.35 moles) se le añade Boc₂O (30.6 g, 0.14 moles). La mezcla se agita a reflujo 10 h, una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente siendo posteriormente redisoluto el residuo con DCM. Se lava con una disolución saturada de NaHCO_{3(ac.)} (3 x 20 ml) y NaCl_(ac. sat.) (3 x 20 ml). La fase orgánica se seca con MgSO_{4(s)}, se filtra y se elimina el disolvente. El crudo es purificado mediante cromatografía *flash* automatizada (ISCO-R_f; SiO₂, 120 g, sistema de elución: hexano/MTBE (4:1, v/v); λ = 270 nm; R_f = 0.80). Una vez eliminado el disolvente se obtiene el producto en forma de aceite transparente (7.20 g, 28.2 mmoles, rendimiento: 44%, t_R 4.14 min, pureza: 88%). **MS** (ES⁺) calculada para C₁₃H₂₁NO₄: (m/z) 255.15; experimental [M+H] = 255.94. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.54 (s, 1H), 4.16 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.08 - 3.02 (m, 2H), 2.54 - 2.36 (m, 2H), 1.91 - 1.72 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 167.9, 155.6, 152.1, 105.3, 81.0, 59.7, 33.7, 28.7, 28.3, 21.1, 14.5.



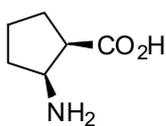
(1R,2S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ciclopentanocarboxilato de etilo (38). El complejo de Ru(Me-alilo)₂(COD) así como el ligando (*R*)-(+)-BINAP se pesan en una caja seca para evitar su deterioro al contactar con el aire.

En un tubo Slenk, bajo atmósfera de N₂, se hace reaccionar el complejo de Ru(Me-alilo)₂(COD) (150 mg, 0.43 mmoles) con el ligando (*R*)-(+)-BINAP (293 mg, 0.43 mmoles) en DCM_{seco} (10 ml). La disolución se agita a t.a durante 30 min, posteriormente, se enfría a 0 °C y se añade gota a gota HBF₄·OEt₂ (128 µl, 0.86 mmoles), observando un cambio de color amarillo-rojizo de la disolución. La mezcla se agita a 0 °C unos 30 min, posteriormente, se elimina mediante vacío, el DCM hasta sequedad. Se añaden 30 ml de MeOH_{seco} para disolver el catalizador formado y se canula sobre **35** (3.70 g, 14.5 mmoles) en un tubo dentro del el reactor donde se llevará a cabo la hidrogenación. Se purga el reactor con N₂ tres veces y tres más con H₂ hasta alcanzar una presión final de 50 bar. Se deja la reacción a t.a. con agitación. Pasadas 24 h, se añade lo más rápidamente posible catalizador recientemente preparado (Ru(Me-alilo)₂(COD): (150 mg, 0.43 mmoles); *R*)-(+)-BINAP (293 mg, 0.43 mmoles); HBF₄·OEt₂ (128 µl, 0.86 mmoles)), para aumentar la conversión del sustrato, dejando la reacción en las mismas condiciones 48 h más. Se elimina el disolvente y se purifica el crudo mediante cromatografía con gel de sílice (SiO₂, sistema de elución: hexano/MTBE (4:1, v/v), R_f=0.44). Durante la purificación un 42% del sustrato de partida es recuperado. El producto se obtiene como sólido blanco (960 mg, rendimiento: 26%, t_R 2.98 min). **MS** (ES⁺) calculada para C₁₃H₂₃NO₄: (m/z) 257.16; experimental [M+H] = 257.95. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.94 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.27 - 4.16 (m, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.97 (dd, *J* = 14.8, 7.4 Hz, 1H), 2.02 - 1.84 (m, 3H), 1.84 - 1.73 (m, 1H), 1.70 - 1.53 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 174.5, 155.4, 79.3, 60.6, 53.9, 47.0, 32.5, 28.5, 27.9, 22.4, 14.4.



ácido (1R,2S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ciclopentanocarboxílico (39). A una disolución de **38** (400 mg, 1.55 mmoles) en H₂O/THF (1:1, v/v) se le añade Ba(OH)₂·8H₂O (1.47 g, 4.65 mmoles). Se agita la reacción a 30

°C durante 10 h. Se monitoriza la reacción mediante HPLC-MS. La mezcla de reacción se pasa a través de una columna de intercambio iónico utilizando la resina Dowex 50WX4-50 lavando con H₂O. El producto se liofiliza obteniéndose un sólido blanco (310 mg, 1.35 mmoles, rendimiento: 85%, t_R 1.83 min). **MS** (ES⁺) calculada para C₁₁H₁₉NO₄: (m/z) 229.13; experimental [M+H] = 229.87. **¹H RMN** (400 MHz CDCl₃) δ: 6.85 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.23 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.29 - 3.97 (m, 1H), 3.18 - 2.88 (m, 1H), 2.13 - 1.77 (m, 4H), 1.77 - 1.53 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).



ácido (1R,2S)-2-aminociclopentanocarboxílico; cispentacina (40). A 39

(40.0 mg, 0.17 mmoles) se le añade una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano (~ 5 ml). Se agita la reacción a t.a. y se monitoriza mediante HPLC-MS hasta finalizar (~ 50 min). Se co-evapora el disolvente con 1,4-dioxano 3 veces. El crudo es solubilizado con la mínima cantidad de MeOH y se precipita el producto en Et₂O. La mezcla se centrifuga a 5 °C durante 15 min a 4500 rpm. Se obtiene el producto puro como sólido blanco (22.0 mg, 0.17 mmoles, rendimiento: 98%, t_R 0.44 min). **HRMS** (ES⁺) calculada para C₆H₁₁NO₂: (m/z) 129.0790; experimental [M+H] = 130.0866. **¹H RMN** (400 MHz, D₂O) δ: 3.88 (dd, J = 11.6, 6.3 Hz, 1H), 3.17 (dd, J = 15.0, 8.3 Hz, 1H), 2.22 - 2.11 (m, 2H), 2.03 - 1.72 (m, 4H). **¹³C RMN** (101 MHz, D₂O) δ: 176.6, 52.9, 45.6, 29.9, 27.4, 21.4. [α]_D²³ = -14.0° (c 0.01, H₂O)³.

3.2 Procedimientos generales para la síntesis de derivados del ácido (1R,2S), (1S,2S) y (1R,2R)-2-aminociclopentanocarboxílico

Para la síntesis de los compuestos de dicha quimioteca se usan L-aminoácidos con los grupos funcionales protegidos; el grupo carboxílico mediante un éster metílico (NH₂-AA-OMe); el grupo amino terminal protegido con un grupo *terc*-butoxicarbonilo (Boc-NH-AA-OH). En el caso particular del aminoácido L-Glutamina, utilizado en la síntesis de esta librería, la amida está protegida mediante el grupo tritilo (Boc-NH-Gln(Trt)-OH).

Hidrólisis del éster metílico

Se disuelve el compuesto a hidrolizar en una mezcla de H₂O/THF (1:1, v/v) y se añade Ba(OH)₂·8H₂O_(s) (2 eq), la mezcla de reacción se agita a t.a. de 1.5 h. Se monitoriza la reacción por HPLC-MS. Una vez finalizada la reacción, la solución se pasa a través de una columna de intercambio iónico utilizando la resina Dowex 50WX4-50, usando H₂O para eluir el producto. Las fracciones recogidas son liofilizadas obteniéndose el producto como un sólido.

Hidrólisis del éster etílico

Se disuelve el compuesto a hidrolizar en una mezcla de H₂O/THF (1:1) y se añade Ba(OH)₂·8H₂O_(s) (3 eq), la mezcla de reacción se agita a 30 °C durante 10 h, observando por HPLC-MS la hidrólisis del éster. Una vez finalizada la reacción, la solución se pasa a través de una columna de intercambio iónico utilizando la resina Dowex 50WX4-50, usando H₂O para eluir el producto. Las fracciones recogidas son liofilizadas obteniéndose el producto como un sólido.

Eliminación del grupo Boc

Se disuelve el compuesto en la mínima cantidad posible de una solución 4 M de HCl en 1,4-dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min, posteriormente se concentra *in vacuo* y se co-evapora dos veces con 1,4-dioxano. Se disuelve el sólido obtenido en la mínima cantidad de MeOH precipitándolo el producto mediante adición de Et₂O. La mezcla se centrifuga a 5 °C durante 15 min a 4500 rpm. Se eliminan las impurezas disueltas en la solución por decantación obteniendo el producto como un sólido.

Eliminación del grupo tritilo

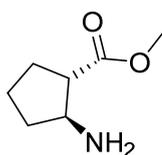
Se disuelve el compuesto en una mezcla de TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5, v/v/v) a t.a. durante 1 h. En estas condiciones todos los grupos protectores Boc también son eliminados. Una vez la reacción ha terminado se procede de la misma manera que en el apartado anterior para aislar el producto.

Reacción de acoplamiento

Las reacciones de acoplamiento entre el grupo ácido de un aminoácido y el grupo amino de otro se lleva a cabo en DCM (15-25 ml), solubilizando los compuestos con Et₃N (3 eq) e utilizando EDC·HCl (1.2 eq) y HOBt·H₂O (1.2 eq) como agentes acoplantes. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12-18 h. La fase orgánica se extrae con una solución al 5% de NaHCO₃ (ac.) (3 x 15 ml), 0.5% de ácido cítrico (ac.) (3 x 15 ml), solución saturada de NaCl (ac.) (3 x 15 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ (s), se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor obteniendo el producto deseado.

Purificación de los compuestos finales

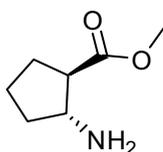
Los crudos se disuelven con H₂O/ACN (1:1, v/v) en la mínima cantidad posible. Se purifican los productos con RP-HPLC-Preparativo, utilizando la columna XBridge™ Prep C₁₈ (19 x 100 mm, 5 μm OBD™), en medio ácido (A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH (99.3:0.7, v/v)), con gradientes lineales de 7.5 min a un flujo de 16 ml/min.



(1S,2S)-2-aminociclopentanocarboxilato de metilo (44). Se disuelve el ácido (1S,2S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxílico (600 mg, 2.61 mmoles) en MeOH (20 ml). La mezcla se enfría con un baño de H₂O/hielo. Se añade gota a gota una solución de trimetilsilildiazometano

2 M en Et₂O (~5 ml) hasta que la solución cambia de color volviéndose amarilla, indicando así un exceso del reactivo. Se agita la reacción a t.a. durante 10 min. Una vez evaporado el disolvente, el se redisuelve en DCM y se filtra en sílica. Se lava con DCM eluyendo el producto con una mezcla de DCM/MeOH (9:1, v/v). Posteriormente se elimina el grupo Boc siguiendo el protocolo general previamente descrito. Se obtiene el producto como un sólido

blanco (280 mg, 1.96 mmoles, rendimiento: 75%, t_R 0.38 min). **MS** (ES^+) calculada para $C_7H_{13}NO_2$: (m/z) 143.09; experimental $[M+H] = 143.79$. **1H RMN** (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.83 (dd, $J = 15.4, 7.5$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.88 (dd, $J = 16.9, 7.7$ Hz, 1H), 2.26 - 2.12 (m, 2H), 1.93 - 1.65 (m, 4H). **^{13}C RMN** (101 MHz, CD_3OD) δ : 174.8, 55.3, 52.8, 31.9, 30.0, 24.1.



(1R,2R)-2-aminociclopentanocarboxilato de metilo (45). Se disuelve el ácido (1R,2R)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopentanocarboxílico (600 mg, 2.61 mmoles) en MeOH (20 ml). La mezcla se enfría con un baño de H_2O /hielo. Se añade gota a gota una solución de trimetilsilildiazometano

2 M en Et_2O (~5 ml) hasta que la solución cambia de color volviéndose amarilla, indicando así un exceso del reactivo. Se agita la reacción a t.a. durante 10 min. Una vez evaporado el disolvente, el crudo se redisuelve en DCM y se filtra en sílica. Se lava con DCM eluyendo el producto con una mezcla de DCM/MeOH (9:1, v/v). Posteriormente se elimina el grupo Boc siguiendo el protocolo general previamente descrito. Se obtiene el producto como un sólido blanco (300 mg, 2.10 mmoles rendimiento: 80%, t_R 0.38 min). **MS** (ES^+) calculada para $C_7H_{13}NO_2$: (m/z) 143.09; experimental $[M+H] = 143.79$. **1H RMN** (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.83 (dd, $J = 15.4, 7.5$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.88 (dd, $J = 16.9, 7.7$ Hz, 1H), 2.26 - 2.12 (m, 2H), 1.93 - 1.65 (m, 4H). **^{13}C RMN** (101 MHz, CD_3OD) δ : 174.8, 55.3, 52.8, 31.9, 30.0, 24.1.

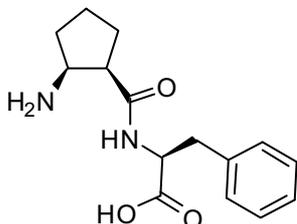
3.2.1 Caracterización de los compuestos intermedios derivados del ácido (1*R*,2*S*), (1*S*,2*S*) y (1*R*,2*R*)-2-aminociclopentanocarboxílico

Compuesto	Isomería	Estructura	mg producto	(%) R	M calc.	M exp. [M+H ⁺]	tR HPLC (min)	(%) P (λ=214 nm)
39	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)		310	85	229.13	229.87	1.83	-
41	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)		270	>99	157.11	157.97	0.92	-
42	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)		490	77	243.15	243.88	2.64	-
43	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)		515	81	243.15	243.99	2.62	-
44	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)		280	> 99	143.09	143.82	0.64	-
45	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)		300	99	143.09	143.79	0.65	-
46	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)		581	87	404.23	405.09	3.13	86
47	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)		678	89	390.22	391.07	2.90	89
48	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)		654	60	390.22	391.07	2.93	>99
49	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)		320	94	376.20	377.06	2.53	88
50	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)		520	97	376.20	377.06	2.57	88
51	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)		450	96	376.20	377.06	2.60	91
52	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)		430	92	390.22	391.07	3.05	>99
53	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)		857	84	390.22	391.07	3.00	89
54	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)		1005	98	390.22	391.07	2.97	88
55	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)		367	95	376.20	376.99	2.65	93
56	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)		134	97	376.20	377.06	2.50	90
57	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)		114	79	376.20	377.06	2.48	99
58	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)		318	99	290.16	290.99	1.45	90
59	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)		637	99	290.16	290.87	1.57	98
60	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)		656	98	290.16	290.93	1.40	98

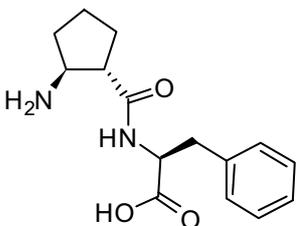
Compuesto	Isomería	Estructura	mg producto	(%) R	M calc.	M exp. [M+H ⁺]	tR HPLC (min)	(%) P ($\lambda=214$ nm)
61	(1R,2S)		247	89			3.20	88
62	(1S,2S)		344	64	503.30	504.19	3.18	87
63	(1R,2R)		348	48			3.18	84
64	(1R,2S)		204	85		490.20	2.78	87
65	(1S,2S)		113	89	489.28	490.18	2.77	91
66	(1R,2R)		104	86			2.75	90
67	(1R,2S)		355	85		761.36	3.75	96
68	(1S,2S)		580	71	760.38	761.37	3.78	84
69	(1R,2R)		953	81				91
70	(1R,2S)		200	89		747.37	3.48	94
71	(1S,2S)		354	90	746.37	747.30	3.53	92
72	(1R,2R)		419	93			3.42	90
73	(1R,2S)		156	97		504.19	3.20	80
74	(1S,2S)		277	94	503.30	504.25	3.27	80
75	(1R,2R)		225	98			3.18	78
76	(1R,2S)		129	85		490.20	2.77	70
77	(1S,2S)		218	83	489.28	490.18	2.79	80
78	(1R,2R)		183	81			2.72	92
79	(1R,2S)		134	97			2.37	94
80	(1S,2S)		291	96	518.27	519.20	2.30	75
81	(1R,2R)		275	98			2.32	89
82	(1R,2S)		120	92		505.20	2.17	70
83	(1S,2S)		243	86	504.26	505.13	2.13	84
84	(1R,2R)		241	90		505.07	2.20	72

Tabla donde se resume la caracterización de los compuestos intermedios derivados del ácido (1R,2S), (1S,2S) y (1R,2R)-2-aminociclopentanocarboxílico. La pureza de los compuestos intermedios se determina a $\lambda=214$ nm mediante RP-HPLC-MS analítico utilizando la columna XBridgeTM C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μ m), en condiciones ácidas (A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH(99.3:0.7, v/v)), con gradiente lineales de 5-100% de B en 4.5 min, a un flujo de 1ml/min.

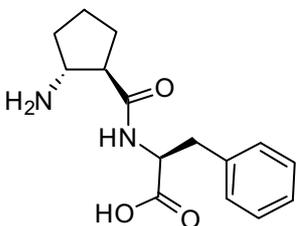
3.3 Caracterización de la quimioteca de derivados del ácido (1*R*,2*S*), (1*S*,2*S*) y (1*R*,2*R*)-2-aminociclopentanocarboxílico



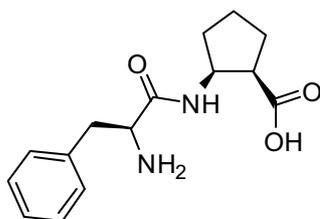
ácido (S)-2-((1*R*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxamida)-3-fenilpropanoico (M2-01). Se obtiene el producto sólido (35.6 mg, 0.13 mmoles, rendimiento final: 52%, t_R 1.73 min, pureza: >99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{20}N_2O_3$: (m/z) 276.15; experimental $[M+H] = 277.37$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ : 7.44 - 7.37 (m, 2H), 7.36 - 7.29 (m, 3H), 4.63 - 4.57 (m, 1H), 3.74 - 3.66 (m, 1H), 3.26 (dd, $J = 13.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 13.7, 9.7$ Hz, 1H), 2.91 (dd, $J = 15.2, 8.0$ Hz, 1H), 2.17 - 2.03 (m, 2H), 1.91 - 1.68 (m, 4H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 175.9, 174.4, 137.3, 129.4, 128.8, 127.2, 55.0, 53.7, 45.8, 36.9, 30.1, 27.8, 21.4.



ácido (S)-2-((1*S*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxamida)-3-fenilpropanoico (M2-02). Se obtiene el producto sólido (64.0 mg, 0.23 mmoles, rendimiento final: 65%, t_R 2.00 min, pureza: >99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{20}N_2O_3$: (m/z) 276.15; experimental $[M+H] = 276.99$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ : 7.41 - 7.35 (m, 2H), 7.34 - 7.28 (m, 3H), 3.76 (dd, $J = 14.5, 7.2$ Hz, 1H), 3.34 (dd, $J = 14.0, 4.8$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 13.9, 10.1$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 16.2, 8.5$ Hz, 1H), 2.18 - 2.05 (m, 1H), 2.04 - 1.92 (m, 1H), 1.82 - 1.60 (m, 3H), 1.38 - 1.24 (m, 1H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 176.2, 174.9, 137.1, 129.4, 128.8, 127.1, 54.6, 53.8, 49.5, 37.3, 30.6, 30.6, 23.4.



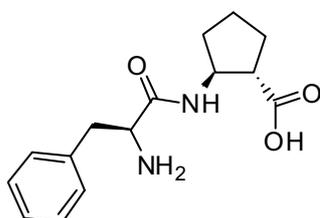
ácido (S)-2-((1*R*,2*R*)-2-aminociclopentanocarboxamida)-3-fenilpropanoico (M2-03). Se obtiene el producto sólido (45.7 mg, 0.17 mmoles, rendimiento final: 55%, t_R 1.85 min, pureza: >99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{20}N_2O_3$: (m/z) 276.15; experimental $[M+H] = 276.92$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ 7.46 - 7.38 (m, 2H), 7.37 - 7.28 (m, 3H), 4.61 (dd, $J = 9.3, 5.8$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 14.4, 6.8$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 14.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 13.9, 9.4$ Hz, 1H), 2.79 (dd, $J = 15.8, 7.7$ Hz, 1H), 2.20 - 2.05 (m, 2H), 1.86 - 1.64 (m, 4H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 175.8, 175.1, 137.2, 129.3, 128.9, 127.3, 55.1, 54.0, 49.2, 36.6, 30.6, 30.0, 23.2.



ácido

(1R,2S)-2-((S)-2-amino-3-**fenilpropanamida)ciclopentanocarboxílico (M2-04).** Seobtiene le producto sólido (19.9 mg, 0.07 mmoles, rendimiento final: 30%, t_R 1.73 min, pureza: 92%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{20}N_2O_3$: (m/z) 276.15; experimental $[M+H] = 276.92$. **1H**

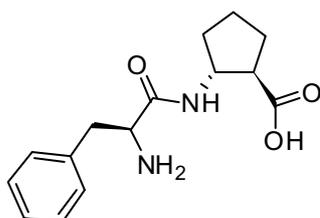
RMN (400 MHz, D_2O) δ 7.48 - 7.37 (m, 2H), 7.35 - 7.30 (m, 1H), 4.41 (dd, $J = 13.2, 6.4$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 14.8, 6.7$ Hz, 1H), 3.25 (dd, $J = 14.3, 6.0$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J = 14.2, 8.7$ Hz, 1H), 2.99 - 2.89 (m, 1H), 2.09 - 1.76 (m, 2H), 1.75 - 1.57 (m, 1H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 178.7, 168.7, 134.0, 129.5, 129.4, 129.3, 128.2, 54.6, 52.8, 48.4, 37.2, 31.3, 27.5, 21.9.



ácido

(1S,2S)-2-((S)-2-amino-3-**fenilpropanamida)ciclopentanocarboxílico (M2-05).** Seobtiene le producto sólido (56.0 mg, 0.20 mmoles, rendimiento final: 76%, t_R 1.83 min, pureza: >99%). **MS** (ES^+) calculadapara $C_{15}H_{20}N_2O_3$: (m/z) 276.15; experimental $[M+H] = 276.99$.

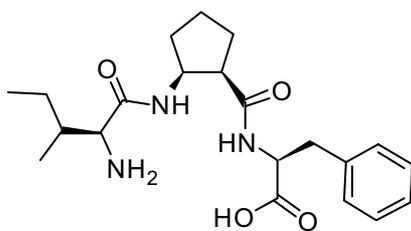
1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 7.49 - 7.35 (m, 3H), 7.33 - 7.23 (m, 2H), 4.28 (dd, $J = 13.6, 6.4$ Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 8.1, 6.6$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J = 13.7, 6.4$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 13.6, 8.4$ Hz, 1H), 2.32 - 2.23 (m, 1H), 2.05 - 1.87 (m, 2H), 1.72 - 1.53 (m, 3H), 1.51 - 1.38 (m, 1H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 182.9, 168.1, 134.0, 129.6, 129.3, 128.1, 54.7, 53.1, 49.0, 37.2, 32.4, 30.1, 23.5.



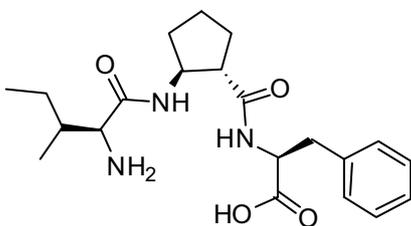
ácido

(1R,2R)-2-((S)-2-amino-3-**fenilpropanamida)ciclopentanocarboxílico (M2-06).** Seobtiene le producto sólido (46.7 mg, 0.17 mmoles, rendimiento final: 56%, t_R 1.93 min, pureza: >98%). **MS** (ES^+) calculadapara $C_{15}H_{20}N_2O_3$: (m/z) 276.15; experimental $[M+H] = 276.92$.

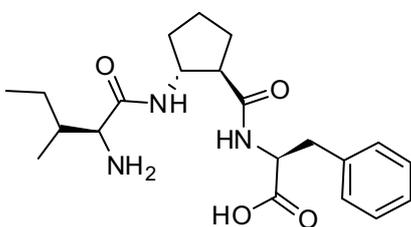
1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 7.47 - 7.36 (m, 3H), 7.32 - 7.26 (m, 2H), 4.20 (dd, $J = 15.2, 7.6$ Hz, 1H), 4.14 - 4.05 (m, 1H), 3.25 (dd, $J = 13.5, 6.1$ Hz, 1H), 3.11 (dd, $J = 13.4, 9.3$ Hz, 1H), 2.54 - 2.41 (m, 1H), 2.04 - 1.92 (m, 1H), 1.92 - 1.80 (m, 1H), 1.76 - 1.49 (m, 3H), 1.17 - 1.03 (m, 1H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 181.8, 168.2, 134.0, 129.6, 129.2, 128.1, 54.8, 51.9, 37.1, 31.9, 29.0, 22.9.



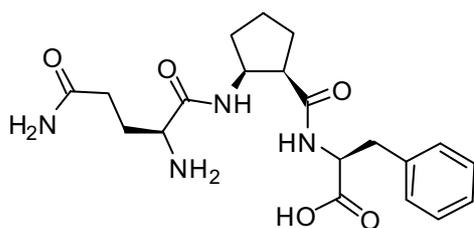
ácido **(S)-2-((1R,2S)-2-((2S,3R)-2-amino-3-metilpentanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-fenilpropanoico (M2-07)**. Se obtiene el producto sólido (69.3 mg, 0.18 mmoles, rendimiento final: 58%, t_R 2.30 min, pureza: 97%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{21}H_{31}N_3O_4$: (m/z) 389.23; experimental $[M+H] = 390.46$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ 7.44 - 7.32 (m, 3H), 7.32 - 7.26 (m, 1H), 4.44 - 4.34 (m, 1H), 3.79 - 3.73 (m, 1H), 3.13 (dd, $J = 13.8, 5.9$ Hz, 1H), 3.08 - 2.94 (m, 1H), 2.09 - 1.94 (m, 2H), 1.93 - 1.59 (m, 5H), 1.42 - 1.30 (m, 1H), 1.17 - 0.93 (m, 2H), 0.90 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 175.9, 175.2, 168.3, 136.7, 129.4, 128.9, 127.4, 57.9, 55.4, 53.6, 47.9, 36.8, 36.2, 32.2, 27.2, 24.3, 21.8, 14.0, 10.7.



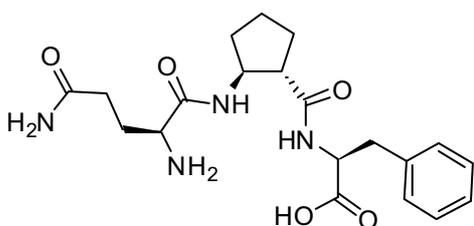
ácido **(S)-2-((1S,2S)-2-((2S,3R)-2-amino-3-metilpentanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-fenilpropanoico (M2-08)**. Se obtiene el producto sólido (53.9 mg, 0.14 mmoles, rendimiento final: 68%, t_R 2.70 min, pureza: 98%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{21}H_{31}N_3O_4$: (m/z) 389.23; experimental $[M+H] = 390.06$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ 7.39 - 7.27 (m, 3H), 7.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.60 (dd, $J = 8.4, 5.1$ Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 16.8, 8.4$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.23 (dd, $J = 13.7, 5.0$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 13.7, 8.6$ Hz, 1H), 2.62 (dd, $J = 18.0, 9.1$ Hz, 1H), 2.04 (td, $J = 12.7, 7.5$ Hz, 1H), 1.97 - 1.79 (m, 2H), 1.78 - 1.60 (m, 2H), 1.57 - 1.30 (m, 3H), 1.24 - 1.05 (m, 1H), 0.95 - 0.79 (m, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 176.1, 175.6, 168.5, 137.1, 129.6, 128.7, 127.1, 57.9, 55.1, 54.2, 51.4, 37.8, 36.4, 31.4, 29.0, 24.5, 22.6, 14.0, 10.7.



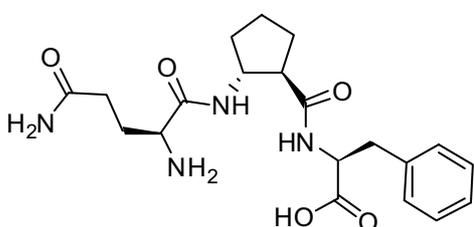
ácido **(S)-2-((1R,2R)-2-((2S,3R)-2-amino-3-metilpentanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-fenilpropanoico (M2-09)**. Se obtiene el producto sólido (47.2 mg, 0.16 mmoles, rendimiento final: 36%, t_R 2.70 min, pureza: >99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{21}H_{31}N_3O_4$: (m/z) 389.23; experimental $[M+H] = 390.06$. **1H RMN** (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.22 - 7.12 (m, 5H), 4.59 (dd, $J = 9.3, 5.2$ Hz, 1H), 4.03 (dd, $J = 13.5, 6.2$ Hz, 1H), 3.52 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.18 (dd, $J = 14.0, 5.2$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 13.9, 9.3$ Hz, 1H), 2.68 - 2.61 (m, 1H), 1.96 - 1.37 (m, 8H), 1.21 - 1.05 (m, 1H), 0.99 - 0.88 (m, 6H). **^{13}C RMN** (101 MHz, CD_3OD) δ : 176.2, 169.5, 138.6, 130.4, 129.4, 127.8, 58.9, 56.1, 55.4, 52.6, 38.5, 37.9, 33.3, 29.4, 25.5, 24.8, 15.2, 11.5.



ácido (S)-2-((1R,2S)-2-((S)-2,5-diamino-5-oxopentanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-fenilpropionico (M2-10). Se obtiene el producto sólido (32.0 mg, 0.08 mmoles, rendimiento final: 41%, t_R 1.65 min, pureza: 98%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{20}H_{28}N_4O_5$: (m/z) 404.21; experimental $[M+H] = 405.46$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ : 7.41 - 7.33 (m, 2H), 7.34 - 7.25 (m, 3H), 4.44 - 4.31 (m, 2H), 3.92 - 3.84 (m, 1H), 3.13 (dd, $J = 13.7, 4.9$ Hz, 1H), 3.01 - 2.90 (m, 2H), 2.26 - 2.16 (m, 2H), 2.09 - 1.92 (m, 2H), 1.92 - 1.75 (m, 4H), 1.74 - 1.58 (m, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 177.4, 176.9, 174.7, 168.3, 137.6, 129.4, 128.8, 127.1, 56.5, 53.6, 52.7, 48.4, 37.3, 32.3, 30.4, 26.8, 26.7, 21.9.

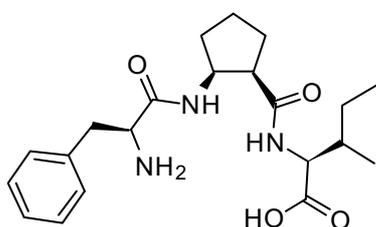


ácido (S)-2-((1S,2S)-2-((S)-2,5-diamino-5-oxopentanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-fenilpropionico (M2-11). Se obtiene el producto sólido (96.7 mg, 0.24 mmoles, rendimiento final: 60%, t_R 2.25 min, pureza: 88%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{20}H_{28}N_4O_5$: (m/z) 404.21; experimental $[M+H] = 405.07$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ : 7.40 - 7.33 (m, 2H), 7.33 - 7.23 (m, 3H), 4.62 (dd, $J = 8.8, 5.0$ Hz, 1H), 4.25 (dd, $J = 8.8, 5.2$ Hz, 1H), 3.95 - 3.88 (m, 1H), 3.25 (dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, 1H), 2.94 (dd, $J = 13.7, 9.1$ Hz, 1H), 2.62 (dd, $J = 17.6, 8.9$ Hz, 1H), 2.37 - 2.26 (m, 2H), 2.17 - 1.98 (m, 3H), 1.98 - 1.83 (m, 1H), 1.79 - 1.61 (m, 2H), 1.58 - 1.32 (m, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 176.9, 176.8, 175.9, 168.5, 137.3, 129.5, 128.7, 127.0, 55.3, 54.3, 52.8, 51.3, 37.8, 31.7, 30.1, 29.1, 26.4, 22.8.

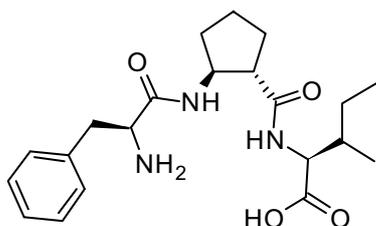


ácido (S)-2-((1R,2R)-2-((S)-2,5-diamino-5-oxopentanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-fenilpropionico (M2-12). Se obtiene el producto sólido (121.0 mg, 0.30 mmoles, rendimiento final: 56%, t_R 2.08 min, pureza: 91%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{20}H_{28}N_4O_5$: (m/z) 404.21; experimental $[M+H] = 405.07$. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ : 7.41 - 7.35 (m, 2H), 7.35 - 7.27 (m, 3H), 4.66 - 4.58 (m, 1H), 4.16 (dd, $J = 14.4, 7.2$ Hz, 1H), 3.90 - 3.83 (m, 1H), 3.23 (dd, $J = 14.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 13.8, 9.1$ Hz, 1H), 2.67 (dd, $J = 15.3, 7.6$ Hz, 1H), 2.44 - 2.34 (m, 2H), 2.13 (dd, $J = 14.4, 7.2$ Hz, 2H), 2.06 - 1.92 (m, 2H), 1.79 - 1.44 (m, 4H). **^{13}C RMN** (101 MHz, CD_3OD) δ : 176.4, 176.0,

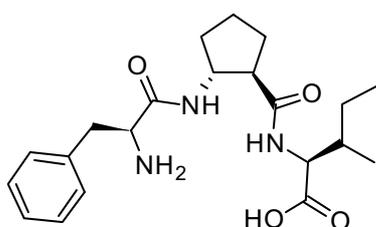
174.7, 169.8, 138.7, 130.4, 129.4, 127.7, 58.1, 55.9, 54.0, 52.8, 38.5, 33.3, 30.6, 29.7, 26.7, 24.7.



ácido **(2S,3S)-2-((1R,2S)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-metilpentanoico (M2-13)**. Se obtiene el producto sólido (46.2 mg, 0.12 mmoles, rendimiento final: 52%, t_R 2.32 min, pureza: 97%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{21}H_{31}N_3O_4$: (m/z) 389.23; experimental [M+H] = 390.50. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ : 7.50 – 7.37 (m, 3H), 7.31 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.43 (dd, J = 14.0, 7.2 Hz, 1H), 4.28 - 4.20 (m, 1H), 4.11 - 4.04 (m, 1H), 3.28 - 3.18 (m, 1H), 3.11 - 2.91 (m, 2H), 0.94 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.88 (dd, J = 14.6, 7.2 Hz, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 176.0, 175.8, 168.7, 133.8, 129.4, 129.4, 128.2, 58.1, 54.5, 53.2, 47.4, 37.5, 36.2, 31.9, 27.8, 25.5, 22.1, 15.0, 11.0.

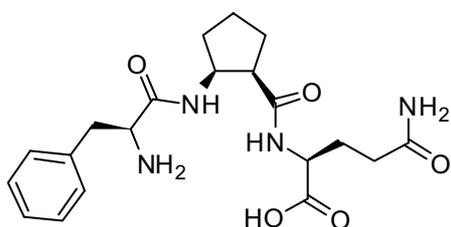


ácido **(2S,3S)-2-((1S,2S)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-metilpentanoico (M2-14)**. Se obtiene el producto sólido (83.5 mg, 0.21 mmoles, rendimiento final: 53%, t_R 2.90 min, pureza: >99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{21}H_{31}N_3O_4$: (m/z) 389.23; experimental [M+H] = 390.06. **1H RMN** (400 MHz, D_2O) δ : 7.44 - 7.36 (m, 3H), 7.24 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 4.38 - 4.26 (m, 2H), 4.16 - 4.09 (m, 1H), 3.21 (dd, J = 13.9, 6.4 Hz, 1H), 3.13 (dd, J = 13.8, 8.2 Hz, 1H), 2.45 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 2.13 - 1.94 (m, 2H), 1.95 - 1.85 (m, 1H), 1.72 - 1.61 (m, 3H), 1.57 - 1.36 (m, 2H), 1.33 - 1.13 (m, 1H), 0.95 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.93 - 0.87 (m, 1H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 176.5, 175.8, 168.4, 133.9, 129.5, 129.2, 128.1, 57.8, 54.6, 53.9, 51.0, 37.1, 37.1, 32.2, 29.8, 24.8, 23.3, 15.1, 10.7.



ácido **(2S,3S)-2-((1R,2R)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamida)ciclopentanocarboxamida)-3-metilpentanoico (M2-15)**. Se obtiene el producto sólido (53.8 mg, 0.14 mmoles, rendimiento final: 48%, t_R 2.88 min, pureza: 97%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{21}H_{31}N_3O_4$: (m/z) 389.23; experimental [M+H] = 390.06. **1H RMN** (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.33 - 7.23 (m, 3H), 7.22 - 7.18 (m, 2H), 4.27 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 13.6, 6.2 Hz, 1H), 3.94 - 3.85 (m, 1H), 3.08 (dd, J = 13.6, 7.6 Hz, 1H), 3.01 (dd, J = 13.6, 7.4 Hz, 1H), 2.68 - 2.59

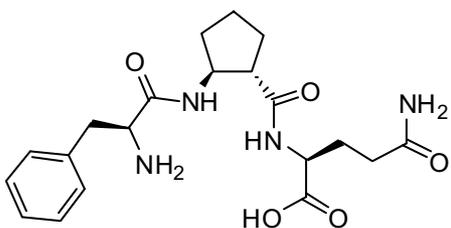
(m, 1H), 1.97 - 1.70 (m, 4H), 1.64 - 1.55 (m, 1H), 1.54 - 1.40 (m, 1H), 1.31 - 1.16 (m, 2H), 0.93 - 0.85 (m, 6H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 175.0, 174.5, 168.3, 134.5, 129.3, 128.9, 127.6, 57.6, 54.7, 54.6, 51.7, 37.6, 37.3, 32.2, 28.5, 25.1, 23.6, 15.0, 10.8.



ácido (S)-5-amino-2-((1R,2S)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamida)ciclopentanocarboxamida)-5-oxopentanoico (M2-16). Se obtiene le producto

sólido (44.0 mg, 0.11 mmoles, rendimiento final: 42%, t_R 1.98 min, pureza: 83%). **MS** (ES^+) calculada

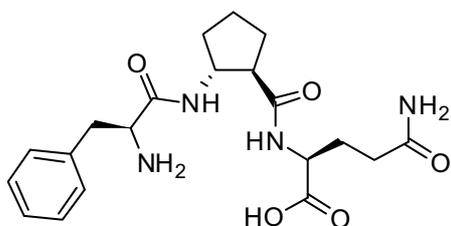
para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$: (m/z) 404.21; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 405.54$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ : 7.47 - 7.35 (m, 3H), 7.33 - 7.26 (m, 2H), 4.48 - 4.38 (m, 1H), 4.26 - 4.10 (m, 2H), 3.31 - 3.10 (m, 1H), 3.06 - 2.88 (m, 2H), 2.53 - 2.25 (m, 2H), 2.19 - 1.92 (m, 4H), 1.93 - 1.77 (m, 2H), 1.78 - 1.57 (m, 2H). Repetir. $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, D_2O) δ : 177.8, 175.6, 168.6, 133.9, 129.4, 129.3, 128.1, 54.5, 53.2, 52.6, 48.0, 47.8, 37.2, 31.7, 31.2, 30.1, 27.4, 26.3, 21.9.



ácido (S)-5-amino-2-((1S,2S)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamida)ciclopentanocarboxamida)-5-oxopentanoico (M2-17). Se obtiene le producto

sólido (8.74 mg, 0.02 mmoles, rendimiento final: 6%, t_R 2.02 min, pureza: 97%). **MS** (ES^+) calculada para

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$: (m/z) 404.21; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 405.01$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.42 - 7.26 (m, 5H), 4.41 (dd, $J = 8.2, 4.7$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 14.0, 6.7$ Hz, 1H), 4.07 - 4.00 (m, 1H), 3.21 (dd, $J = 14.0, 6.7$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J = 13.9, 8.1$ Hz, 1H), 2.65 - 2.40 (m, 1H), 2.40 - 2.26 (m, 2H), 2.25 - 2.09 (m, 1H), 2.08 - 1.93 (m, 2H), 1.92 - 1.76 (m, 2H), 1.77 - 1.51 (m, 3H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz CD_3OD) δ : 178.4, 176.0, 169.8, 136.0, 130.6, 130.0, 128.7, 56.6, 53.3, 52.6, 43.4, 33.1, 32.9, 30.7, 29.9, 25.1, 24.4.



ácido (S)-5-amino-2-((1R,2R)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamida)ciclopentanocarboxamida)-5-oxopentanoico (M2-10). Se obtiene le producto

sólido (29.4 mg, 0.07 mmoles, rendimiento final: 18%, t_R 1.98 min, pureza: 99%). **MS** (ES^+) calculada

para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$: (m/z) 404.21; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 405.01$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ : 7.47 - 7.36 (m, 3H), 7.29 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.33 (ddd, $J = 14.0, 8.9, 5.3$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 13.4, 6.0$ Hz, 1H), 4.15 - 4.07 (m, 1H), 3.26 (dd, $J = 13.5, 6.1$ Hz, 1H), 3.12 (dd, $J =$

13.3, 9.1 Hz, 1H), 2.59 (dd, $J = 15.4, 7.7$ Hz, 1H), 2.42 - 2.33 (m, 2H), 2.22 - 2.09 (m, 1H), 2.00 (td, $J = 14.8, 7.5$ Hz, 2H), 1.87 (dd, $J = 12.9, 6.4$ Hz, 1H), 1.77 - 1.56 (m, 3H), 1.25 - 1.10 (m, 1H). **^{13}C RMN** (101 MHz, D_2O) δ : 178.3, 177.3, 168.3, 134.0, 129.6, 129.3, 128.1, 54.7, 54.4, 51.2, 37.2, 32.2, 31.6, 30.4, 29.2, 26.8, 23.4.

3.3.1 Resumen de la caracterización de la quimioteca de derivados del ácido (1*R*,2*S*), (1*S*,2*S*) y (1*R*,2*R*)-2-aminociclopentanocarboxílico

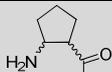
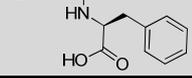
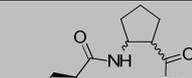
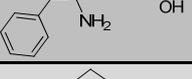
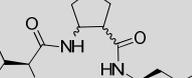
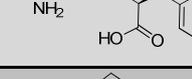
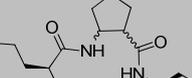
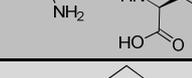
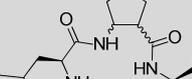
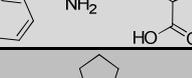
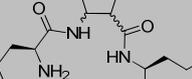
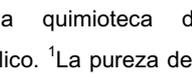
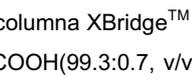
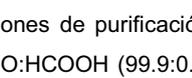
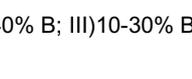
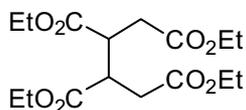
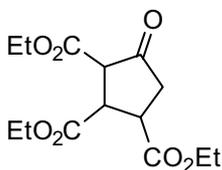
Compuesto	Estructura	mg producto	(%) R	M calc.	M exp. [M+H ⁺]	tR HPLC (min)	(%) P ¹ (λ=214 nm)	Δ purif. ²
M2-01	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) 	35.6	52		277.37	1.73	>99	IV
M2-02	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) 	64.0	65	276.15	276.99	2.00	>99	II
M2-03	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>) 	45.7	55		276.92	1.85	>99	II
M2-04	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) 	19.9	30		276.92	1.73	92	IV
M2-05	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) 	56.0	76	276.15	276.99	1.83	>99	I
M2-06	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>) 	46.7	56		276.92	1.93	98	II
M2-07	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) 	69.3	58		390.46	2.30	97	V
M2-08	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) 	53.9	68	389.23	390.06	2.70	98	V
M2-09	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>) 	47.2	36		390.06	2.88	>99	V
M2-10	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) 	32.0	41		405.46	1.65	98	III
M2-11	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) 	96.7	60	404.21	405.07	2.25	88	III
M2-12	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>) 	121	56		405.07	2.08	91	III
M2-13	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) 	46.2	52		390.50	2.32	97	V
M2-14	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) 	83.5	53	389.23	390.06	2.90	>99	V
M2-15	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>) 	53.8	48		390.06	2.88	97	V
M2-16	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) 	44.0	42		405.54	1.98	83	III
M2-17	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) 	8.74	5.5	404.21	405.01	2.02	97	I
M2-18	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>) 	29.4	18		405.01	1.98	99	I

Tabla resumen de la quimioteca de derivados del ácido (1*R*,2*S*), (1*S*,2*S*) y (1*R*,2*R*)-2-aminociclopentanocarboxílico. ¹La pureza de los compuestos finales se determina a λ= 214 nm por RP-HPLC-MS analítico utilizando la columna XBridge™ C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm), en condiciones ácidas (A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH(99.3:0.7, v/v)), a 50 °C con gradientes lineales de 0-50% de B en 3.5 min a un flujo de 1ml/min. ²Condiciones de purificación; columna XBridge™ Prep C₁₈ (19 x 100 mm, 5 μm OBD™) en condiciones ácidas (A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH(99.3:0.7, v/v)) con gradientes lineales de 7.5 min; I) 5-30% B; II) 5-40% B; III)10-30% B; IV)10-40% B V)15-40% B a un flujo de 16 ml/min.

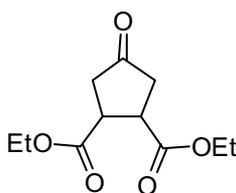
3.4 Síntesis asimétrica parcial del ácido (1*R*,2*S*)-2-amino-4-metilenciclopentanocarboxílico; icofungipen



butano-1,2,3,4-tetracarboxilato de tetraetilo (88). A una solución de ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico (20 g, 85.4 mmoles), en EtOH (120 ml) a 0 °C se le añade cloruro de tionilo (37.4 ml, 0.51 moles) gota a gota con un embudo de adición. Posteriormente se retira el baño de H₂O/hielo, calentándose la mezcla de reacción a reflujo durante 30 h. Una vez finalizada la reacción se elimina el disolvente en el rotavapor. El aceite obtenido es disuelto con DCM (75 ml) y lavado con una solución saturada de NaCl_(ac.) (3 x 20 ml) para eliminar el exceso de SOCl₂ en el medio de la reacción. La fase orgánica se seca con MgSO_{4(s)}, se filtra y se evapora a sequedad obteniéndose el producto como aceite amarillento que será utilizado en la siguiente reacción sin ser purificado (29.5 g, >99%, *t_R* 3.09 min, >99% pureza). **MS** (ES⁺) calculada para C₁₆H₂₆O₈: (m/z) 346.16; experimental [M+H] = 347.03. **¹H RMN** (400 MHz, CD₂Cl₃) δ: 4.21 - 3.94 (m, 8H), 3.31 - 3.21 (m, 2H), 2.75 (ddd, *J* = 16.8, 9.6, 2.3 Hz, 2H), 2.42 - 2.30 (m, 2H), 1.26 (dtt, *J* = 14.3, 7.1, 2.5 Hz, 12H). **¹³C RMN** (101 MHz, CD₂Cl₃) δ: 172.2, 171.5, 61.3, 60.9, 42.4, 33.4, 14.2, 14.1.

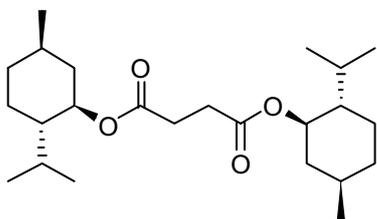


4-oxociclopentano-1,2,3-tricarboxilato de trietilo (89). A una solución de **88** (29.5 g, 85.2 mmoles) en tolueno (120 ml) se le añade Na_(s) (3.19 g, 0.14 moles). La reacción se agita a t.a. 12 h posteriormente a fin de que termine la reacción se calienta la mezcla a 80 °C durante 4 h más. En el caso de observarse Na_(s) sin reaccionar se añade EtOH. Se decanta lentamente la mezcla de la reacción sobre H₂O/hielo (100 g) acidificada con ácido acético (5 ml). Una vez disuelto todo el hielo, se extrae la fase acuosa y se lava con tolueno (2 x 15 ml). Las fracciones orgánicas se juntan y se extraen con una solución saturada de NaCl_(ac.) (2 x 20 ml). La fase orgánica se seca con MgSO_{4(s)}, se filtra y se evapora a sequedad obteniendo adquiriendo el producto en forma de aceite rojizo (21.7 g, 85%, *t_R* 2.72min). **MS** (ES⁺) calculada para C₁₄H₂₀O₇: (m/z) 300.12; experimental [M+H] = 300.92. El producto se utiliza en la siguiente reacción sin ser purificado



4-oxociclopentano-1,2-dicarboxilato de dietilo (90). Se disuelve el producto **89** (21.7g, 72.3 mmoles) en HCl (ac.) concentrado (100 ml). La reacción se agita a 100 °C durante 12 h. Posteriormente se elimina en el rotavapor el HCl restante y el H₂O formada durante la reacción obteniendo un sólido pastoso que es disuelto en EtOH (75 ml). Las sales insolubles se filtran y se eliminan de la disolución. El crudo disuelto en EtOH es acidificado con H₂SO₄ (ac.) concentrado (0.5 - 1 ml) y calentado a reflujo durante 15 h. Se elimina el disolvente en el rotavapor y se disuelve el aceite obtenido en DCM (50 ml). Se lava la fase orgánica con una solución saturada de NaHCO₃ (ac.) (2 x 20) y con NaCl (ac.) (2 x 10 ml). Se seca la fase orgánica con MgSO₄ (s), se filtra y se evapora a sequedad obteniendo un aceite marrón oscuro. El producto, una mezcla de confómeros es destilado al vacío a 178 °C obteniéndose un aceite transparente (9.90 g, 43.4 mmoles, 60%, *t_R* 2.07 y 2.18 min, >99% pureza). **MS** (ES⁺) calculada para C₁₁H₁₆O₅: (m/z) 228.10; experimental [M+H] = 228.86. **¹H RMN** (400 MHz, CD₂Cl₃) δ: 4.25 - 4.10 (m, 4H), 3.47 - 3.21 (m, 2H), 2.77 - 2.57 (m, 2H), 2.55 - 2.41 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). **¹³C RMN** (101 MHz, CD₂Cl₃) δ: 213.5, 212.8, 172.9, 172.2, 61.5, 61.3, 44.0, 43.4, 41.1, 40.6, 14.2, 14.2.

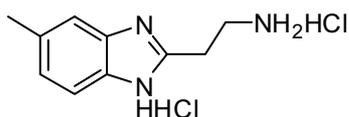
3.4.1 Síntesis de succinato de (-) dimentilo



Succinato de (-) dimentilo (95). A una solución de anhídrido succínico (15.2 g, 0.15 moles) y L-mentol (47.5 g, 0.30 moles) en tolueno anh. (120 ml), se le añade el ácido *p*-toluensulfónico monohidratado (192 mg, 1.00 mmoles). La mezcla de la reacción se agita a reflujo a 150 °C durante 24 h, recogiendo el H₂O formado durante la reacción en un aparato de Dean-Stark y dejando posteriormente que la reacción alcance la t.a. momento en el se diluye la mezcla de la reacción con TBME (100 ml). Al crudo de la reacción se le añaden 300 ml de una mezcla de H₂O, solución saturada de NaHCO₃ (ac.) y MeOH (2:2.5:1, v/v/v). La fase orgánica se extrae, se lava con una solución saturada de NaCl (ac.) (2 x 50 ml) y se seca con MgSO₄ (s). El disolvente es eliminado en el rotavapor obteniendo un sirope impuro que se disuelve en MeOH a 60 °C. La mezcla se enfría lentamente hasta -20 °C dejándola 15 h a dicha temperatura, donde precipita el producto como sólido cristalino (48.4 g, 0.12 moles, 81%, *t_R* 4.15 min, >99% pureza). **MS** (ES⁺) calculada para C₂₄H₄₂O₄: (m/z) 394.31; experimental [M+H] = 395.21. **¹H RMN** (400 MHz, CD₂Cl₃) δ: 4.70 (td, *J* = 10.9, 4.4 Hz, 2H), 2.66 - 2.52 (m, 4H), 1.98 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 1.86 (dtd, *J* = 13.9, 7.0, 2.6 Hz, 2H), 1.71 - 1.62 (m, 4H), 1.53 - 1.41 (m, 2H), 1.41 - 1.30 (m, 2H), 1.12 - 0.92 (m, 4H), 0.89 (dd, *J* = 6.8, 1.7 Hz, 14H), 0.75 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H). **¹³C RMN** (101 MHz, CD₂Cl₃) δ: 171.9, 74.6, 47.1, 41.0, 34.4, 31.5, 31.3, 29.7, 26.4, 23.6, 22.1, 20.9, 16.5.

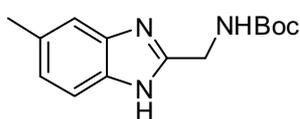
4. Síntesis de la quimioteca de derivados del benzimidazol

4.1 Síntesis de los núcleos del benzimidazol derivados de aminoácidos



dihidrocloruro de 2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)etanamina (103). A 100 ml de una solución de HCl 5.5 M se le añade 1,2-diamino-4-metilbenceno **101** (2.00 g, 16.4

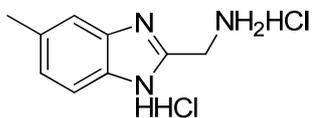
mmoles) y β -alanina **102** (3.60 g, 41.0 mmoles). La mezcla se agita a 130 °C durante 24 h. El producto precipita en forma de sal en la mezcla de reacción. Una vez filtrado, se recristaliza en EtOH obteniendo un sólido verde (2.80 g, 16.0 mmoles, rendimiento: 68.9%, t_R 0.55 min, pureza: 97%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{10}H_{13}N_3$: (m/z) 175.11; experimental $[M+H] = 176.03$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.70 - 8.42 (s, 2H), 7.69 - 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.60 - 7.53 (s, 1H), 7.41 - 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.60 - 3.53 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.53 - 3.47 (m, 2H), 2.72 - 2.09 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 149.6, 135.4, 131.2, 129.1, 126.9, 113.3, 113.1, 35.7, 24.6, 21.1.



terc-butil((5-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)carbamato (107). A una solución de 1,2-diamino-4-metilbenceno **101** (3.00 g, 24.4 mmoles) en DCM (100 ml) se le añade EDC·HCl (5.62 g,

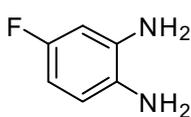
29.3 mmoles), HOBt (3.96 g, 29.3 mmoles) y ácido 2-((terc-butoxicarbonilo)amino)acético **104** (4.28 g, 24.4 mmoles). La mezcla de reacción se agita a t.a. durante 48 h. La reacción se controla por HPLC-MS. La fase orgánica se extrae con una solución al 5% de $NaHCO_3$ (ac.) (3x5 ml) y se seca con $MgSO_4$ (s). El crudo se purifica mediante cromatografía *flash* automatizada (ISCO- R_f ; SiO_2 , 120 g, sistema de elución: DCM/MeOH (4:1, v/v), $\lambda = 220$ nm, $R_f = 0.4$). Por HPLC-MS se observa producto ciclado y trazas del subproducto di-terc-butil-(((4-metil-1,2-fenileno)bis(azanediilo))bis(2-oxoetano-2,1-diilo))dicarbamato. Se obtienen 4.73 g de aceite marrón, que contiene una mezcla de los dos posibles regioisómeros formados **105** y **106**, que se disuelven en AcOH (100 ml). La reacción se agita a 65 °C durante 18 h. Se elimina el ácido en el rotavapor co-evaporándolo con 1,4-dioxano. El crudo se purifica mediante cromatografía *flash* automatizada (ISCO- R_f ; SiO_2 golden, 120 g, sistema de elución: DCM/EtOH, (9:1, v/v); $\lambda = 280$ nm, $R_f = 0.85$). El producto se obtiene como un sólido rosa pálido (2.04 g, 7.81 mmoles, rendimiento en 2 etapas: 32%, t_R 1.48 min, pureza: 99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{14}H_{19}N_3O$: (m/z) 261.15;

experimental $[M+H] = 262.04$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.47 (s, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.47 (s, 9H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 153.7, 139.1, 137.6, 133.5, 125.0, 115.5, 115.1, 80.8, 39.5, 28.7, 21.6.



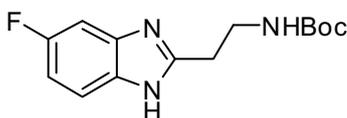
dihidrocloreto de 5-metil-1H-benzimidazol-2-il)metanamina (108) A una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano (50 ml) se le añade **107** (2.04 g, 7.80 mmoles). La solución se agita 30 min a

t.a. El producto precipita en las condiciones de reacción en forma de sal de color blanco-rosado. Después de filtrar se obtiene el producto (1.40 g, 8.69 mmoles, rendimiento: 78%, 5.90 mmoles, t_R 0.90 min, pureza: >99%). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3$: (m/z) 161.10; experimental $[M+H] = 161.99$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.76 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.6, 0.9$ Hz, 1H), 4.77 (t, $J = 1.7$ Hz, 2H), 2.56 (s, 3H); $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 145.4, 139.5, 132.8, 130.6, 130.1, 115.0, 114.8, 35.4, 21.7.



1,2-diamina 4-fluorobenceno (110). A una solución de 4-fluoro-2-nitroanilina **109** (4.00 g, 25.6 mmoles) en EtOH (50 ml) se le añade hidracina monohidratada (18.7 ml, 0.38 moles) y una solución acuosa de

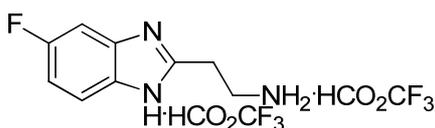
Ni-Raney (~10.0 ml). La mezcla de reacción se agita a 78 °C durante 2.5 h. La disolución se filtra sobre Celite[®]. Se evapora el EtOH en el rotavapor, obteniendo el producto (2.92 g, 23.2 mmoles, rendimiento: 90%, t_R 0.48 min, pureza: 82%). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_6\text{H}_7\text{FN}_2$: (m/z) 126.02; experimental $[M+H] = 126.94$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.76 - 6.63 (m, 1H), 6.49 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.38 - 6.28 (m, $J = 6.9$ Hz, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 157.9, 138.5, 130.8, 118.4, 105.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 19.9$ Hz, 1C), 103.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 26.0$ Hz, 1C).



tert-butil(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)etil)carbamato (114). A una solución de **110** (2.7 g, 21.4 mmoles) en DCM (100 ml) se le añade ácido 3-((*tert*-

butoxicarbonil)amino)propionico **111** (4.05 g, 21.4 mmoles), EDC·HCl (4.10 g, 21.4 mmoles), HOBT (2.89 g, 21.4 mmoles). La mezcla se agita a t.a. durante 18 h. La fase orgánica se extrae con una solución al 5% de NaHCO_3 (ac.) (3x5 ml), se seca con MgSO_4 (s), se filtra y se evapora. El producto es obtenido como aceite marrón (t_R 2.18 min, pureza: 81%). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_3$: (m/z) 297.15; experimental $[M+H] = 298.16$. Se observan trazas del subproducto di-*tert*-butilo(((4-fluoro-1,2-

fenileno)bis(azanedil))bis(3-oxopropano-3,1-diilo))dicarbamato (t_R 2.77 min, un 14% respecto al producto objetivo al analizarlo mediante HPLC-MS) **MS** (ES^+) calculada para $C_{22}H_{33}FN_4O_6$: (m/z) 468.24; experimental $[M+H] = 469.24$. El crudo que contiene una mezcla de los dos posibles regioisómeros, se disuelve en AcOH (100 ml). Se agita la reacción a 65 °C durante 18 h. Se elimina el ácido en el rotavapor, co-evaporándolo con THF. El crudo se purifica mediante cromatografía *flash* automatizada (ISCO- R_f ; SiO_2 , 120 g, sistema de elución: DCM/MeOH (4:1, v/v), $\lambda = 220$ nm, $R_f = 0.75$). El producto se obtiene como un sólido de color crudo (2.5 g, 8.86 mmoles, rendimiento en 2 etapas: 42%, t_R 1.50 min, pureza: >99%,). **MS** (ES^+) calculada para $C_{14}H_{18}FN_3O_2$: (m/z) 279.14; experimental $[M+H] = 280.07$. **1H RMN** (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.50 - 7.41 (dd, $J = 8.8, 4.7$ Hz, 1H), 7.22 - 7.16 (dd, $J = 9.1, 2.4$ Hz, 1H), 7.03 - 6.91 (td, $J = 9.4, 2.4$ Hz, 1H), 3.55 - 3.45 (m, 2H), 3.06 - 2.97 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.40 - 1.36 (s, 9H). **^{13}C RMN** (101 MHz, CD_3OD) δ : 161.9, 159.6, 116.1, 116.0, 111.3, 111.1, 101.6, 101.3, 80.2, 39.9, 30.7, 28.7.



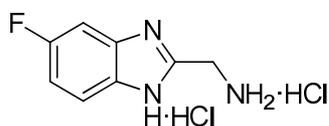
ditrifluoroacetato de 2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)etilamina (115). Se disuelve **114** en TFA/THF (4:1, v/v). La reacción se agita a t.a. durante 18 h. Se

elimina el disolvente y el ácido en el rotavapor. El producto precipita en Et_2O en forma de sal de color marrón (2.15 g, 11.95 mmoles, rendimiento: 60%, t_R 0.57 min, pureza: 96%). **MS** (ES^+) calculada para $C_9H_{10}FN_3$: (m/z) 179.09; experimental $[M+H] = 179.89$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.74 - 8.32 (s, 1H), 7.92 - 7.73 (dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, 1H), 7.70 - 7.61 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 7.44 - 7.34 (td, $J = 9.4, 2.4$ Hz, 1H), 3.58 - 3.50 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.50 - 3.41 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 160.9, 158.6, 151.7, 128.5, 115.4 (d, $J_{C-F} = 10.2$ Hz, 1C), 113.6 (d, $J_{C-F} = 26.2$ Hz, 1C), 100.6 (d, $J_{C-F} = 27.5$ Hz, 1C), 35.7, 24.8.

4.1.1 Procedimiento general para la síntesis de los núcleos de benzimidazol derivados de aminoácidos (sintetizados por el Dr. Rob Hoen)

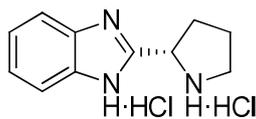
A una solución (~0.1 M) de la 1,2-diamino benceno correspondiente (1 eq), en DCM/DMF (9:1, v/v) se añade el aminoácido protegido con el grupo Boc (1eq), EDC·HCl (1 eq) y HOBt· H_2O (1 eq). La mezcla se agita a t.a. durante 14 h. La fase orgánica se extrae con una solución saturada al 5% de $NaHCO_3$ (ac.), 0.5% ácido cítrico (ac.) y por último con una solución saturada de NaCl (ac). Posteriormente se seca la fase orgánica con $MgSO_4$ (s), se filtra y se concentra el producto al rotavapor. Al analizar el crudo por HPLC-MS se observan dos picos con la misma masa que corresponden a los dos posibles regioisómeros. Se puede observar también parte del compuesto ciclado. El crudo obtenido se disuelve en AcOH (~0.05 M) y se agita a 75 °C unas 16 h. Se concentra la mezcla y se

lava dos veces con tolueno. El crudo, se disuelve en una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano y se agita a t.a. durante 2 h. El producto precipita en la mezcla de reacción, se extrae por filtración y se lava con Et₂O, obteniendo un sólido.



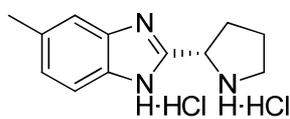
dihidrocloruro de 6-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)metanamina (116). El producto se obtuvo como sólido de color marrón (3.20 g, 13.2 mmoles, rendimiento: 83%, t_R 0.90,

pureza: 98%). **MS (ES⁺)** calculada para C₈H₁₀C₁₂FN₃: (m/z) 165.07; experimental [M+H] = 165.88. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.85 (bs, 1H), 9.03 (bs, 1H), 7.75 (dd, $J = 8.92$, 4.71 Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 9.06$, 2.43 Hz, 1H), 7.29 - 7.22 (m, 1H), 4.44 (s, 2H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 160.4 (d, $J_{C-F} = 240.5$ Hz), 149.1 (d, $J_{C-F} = 1.7$ Hz), 133.7 (d, $J_{C-F} = 13.9$ Hz), 130.0, 116.6 (d, $J_{C-F} = 10.3$ Hz), 114.4 (d, $J_{C-F} = 26.0$ Hz), 101.7 (d, $J_{C-F} = 27.4$ Hz), 35.4.



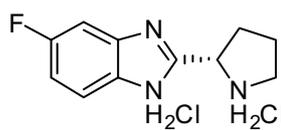
dihidrocloruro de (S)-2-(pirrolidin-2-il)-1H-benzimidazol (119). El producto se obtuvo como un sólido beige (2.58 g, 9.77 mmoles, rendimiento: 53%, t_R 0.95 min, pureza: 99%). **MS (ES⁺)** calculada

para C₁₁H₁₅C₁₂N₃: (m/z) 187.11; experimental [M+H] = 187.87. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.52 (bs, 1H), 9.76 (bs, 1H), 7.73 (dd, $J = 6.11$, 3.16 Hz, 2H), 7.40 (dd, $J = 6.11$, 3.17 Hz, 2H), 5.06 (t, $J = 7.63$ Hz, 1H), 3.49 - 3.32 (m, 2H), 2.57 - 2.47 (m, 1H), 2.37 (qd, $J = 13.07$, 8.00 Hz, 1H), 2.17 (tt, $J = 12.76$, 7.67, 5.17 Hz, 1H), 2.05 (pd, $J = 12.84$, 7.95 Hz, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 147.6, 132.0, 125.6, 114.4, 52.8, 45.6, 29.4, 23.9.



dihidrocloruro de (S)-6-metil-2-(pirrolidin-2-il)-1H-benzimidazol (120). El producto se obtuvo como un sólido de color marrón (2.89 g, 10.5 mmoles, rendimiento: 64%, t_R 1.18 min,

pureza: >99%). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₂H₁₇Cl₂N₃: (m/z) 201.13; experimental [M+H] = 201.87. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.73 (bs, 1H), 7.70 (d, $J = 8.45$ Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.36 (dd, $J = 8.46$, 1.03 Hz, 1H), 5.18 (t, $J = 8.13$ Hz, 1H), 3.52 - 3.37 (m, 2H), 2.60 - 2.53 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.29 - 2.19 (m, 1H), 2.09-1.96 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 146.9, 135.7, 131.9, 129.9, 127.3, 113.9, 113.6, 52.7, 45.5, 29.3, 23.9, 21.1.



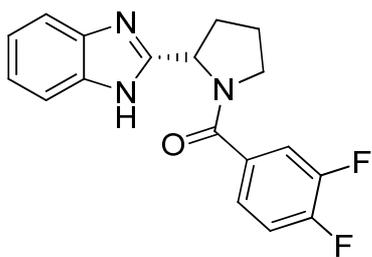
dihidrocloruro de (S)-6-fluoro-2-(pirrolidin-2-il)-1H-benzimidazol (121).

El producto se obtuvo como sólido marrón (3.42 g, 12.3 mmoles, rendimiento: 78%, t_R 1.08 min, pureza: 99%). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₁H₁₄C₁₂FN₃: (m/z) 205.10; experimental [M+H] = 205.99. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.66 (bs, 1H), 9.71 (bs, 1H), 9.26 (bs, 2H), 7.71 (dd, J = 8.90, 4.76 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 9.11, 2.44 Hz, 1H), 7.27 - 7.18 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 3.47 - 3.30 (m, 2H), 2.58-2.42 (m, 2H), 2.33 (qd, J = 13.04, 7.91 Hz, 1H), 2.20-2.09 (m, 1H), 2.08 - .99 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 159.6 (d, J_{C-F} = 240.1 Hz, 1C), 149.4, 133.9 (d, J_{C-F} = 12.3 Hz, 1C), 130.3 (d, J_{C-F} = 5.0 Hz, 1C), 116.1 (d, J_{C-F} = 10.3 Hz, 1C), 113.5 (d, J_{C-F} = 26.2 Hz, 1C), 101.0 (d, J_{C-F} = 27.1 Hz, 1C), 53.4, 45.4, 29.5, 23.8.

4.2 Procedimiento general para la síntesis de la quimioteca de derivados del benzimidazol

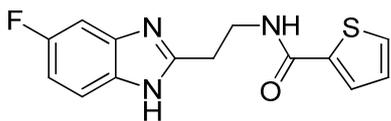
A una solución del derivado de benzimidazol correspondiente (1 eq), EDC·HCl (1 eq), HOBT (1 eq) y Et₃N (4 eq) en DCM, se le añade el ácido carboxílico correspondiente (1 eq). La reacción se agita a t.a. durante 15 h, se extrae la fase orgánica con una solución al 5% de NaHCO₃ (ac.), ácido cítrico (ac.) al 0.5% y una solución saturada de NaCl (ac.), se seca con MgSO₄ (s) y se filtra. El crudo se purifica por cromatografía *flash* automatizada (ISCO-R_f; SiO₂, 12 g, sistema de elución: DCM/MeOH (4:1, v/v), λ = 274 y 220 nm).

4.3 Caracterización de la quimioteca de derivados del benzimidazol



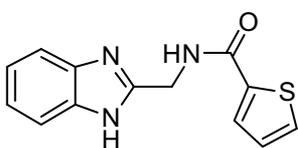
(S)-2-(1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il(3,4-difluorofenil)metanona (M2-01).

Partiendo **119** (300 mg, 1.15 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (183 mg, 1.15 mmoles) se obtiene el producto sólido (286 mg, 0.81 mmoles, rendimiento: 70%, t_R 1.18 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV = 254 nm, R_f = 0.38). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₈H₁₅F₂N₃O: (m/z) 327.33; experimental [M+H] = 328.05. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.67 - 7.49 (m, 2H), 7.43 - 7.36 (m, 1H), 7.32 - 7.26 (m, 1H), 7.24 (dd, J = 6.03, 3.20 Hz, 2H), 7.23 - 7.17 (m, 1H), 5.56 (dd, J = 7.86, 6.30 Hz, 1H), 3.61 (dd, J = 7.39, 6.01 Hz, 2H), 3.19 (tdd, J = 13.01, 8.12, 6.61 Hz, 1H), 2.48 - 2.37 (m, 1H), 2.28 (pd, J = 12.30, 6.10 Hz, 1H), 2.06 - 1.93 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 168.9, 162.5, 153.5, 152.7, 152.6, 151.1, 151.0, 150.2, 150.1, 148.6, 148.5, 132.5, 124.0, 124.0, 123.9, 123.9, 122.3, 117.4, 117.2, 117.1, 116.9, 57.8, 55.1, 50.6, 36.3, 31.2, 28.5, 25.5, 18.2.



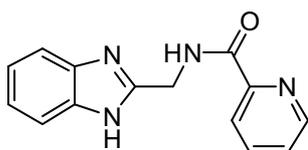
***N*-(2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)tiofeno-2-carboxamida (M2-02).** Partiendo de **115** (227 mg, 0.56 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (71.7 mg,

0.56 mmoles), se obtiene el producto como un sólido blanco (87.1 mg, 0.30 mmoles, rendimiento: 54%, t_R 1.48 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f 0.75). **MS** (ES^+) calculada para $C_{14}H_{12}FN_3OS$: (m/z) 289.33; experimental $[M+H] = 289.99$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.46 - 12.35 (m, 1H), 8.69 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 9.3, 4.1$ Hz, 2H), 7.58 - 7.19 (m, 2H), 7.17 - 7.08 (m, 1H), 7.03 - 6.89 (m, 1H), 3.68 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.07 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 161.3, 139.9, 130.7, 128.1, 127.9, 37.8, 28.9.



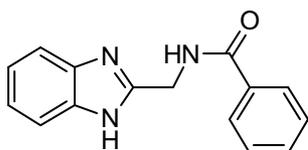
***N*-((1*H*-benzimidazol-2-yl)metil)tiofeno-2-carboxamida (M2-03).** Partiendo de **99** (100 mg, 0.45 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **22** (57.7 mg, 0.45 mmoles). El producto precipita en la mezcla de reacción. Una vez filtrado se obtiene un sólido

blanco (94.7 mg, 0.37 mmoles, rendimiento: 82%, t_R 1.33 min, pureza: 99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{13}H_{11}N_3OS$: (m/z) 257.06; experimental $[M+H] = 258.02$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.40 - 8.94 (s, 1H), 7.90 - 7.82 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.82 - 7.74 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.53 - 7.45 (dd, $J = 5.9, 3.2$ Hz, 2H), 7.20 - 7.16 (m, 1H), 7.15 - 7.11 (dd, $J = 6.0, 3.2$ Hz, 2H), 4.93 - 4.45 (s, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 161.5, 152.2, 139.5, 131.1, 128.7, 128.0, 121.5, 37.5.



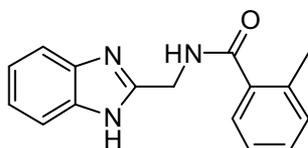
***N*-((1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)tiofeno-2-carboxamida (M2-04).** Partiendo de **99** (100 mg, 0.45 mmoles) y el ácido picolínico **123** (55.4 mg, 0.45 mmoles). El producto precipita en la fase orgánica a 4 °C durante 10 h obteniendo un sólido

blanco por filtración (51.0 mg, 0.20 mmoles, rendimiento: 45%, t_R 1.27 min, pureza: 99%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{14}H_{12}N_4O$ (m/z) 252.10; experimental $[M+H] = 253.00$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.40 - 12.07 (s, 1H), 9.44 - 9.25 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.79 - 8.59 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.13 - 8.06 (m, 1H), 8.06 - 7.99 (m, 1H), 7.71 - 7.61 (ddd, $J = 7.3, 4.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.61 - 7.39 (d, $J = 29.3$ Hz, 2H), 7.23 - 7.06 (dd, $J = 6.0, 3.0$ Hz, 2H), 4.80 - 4.70 (m, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 164.2, 152.0, 149.6, 148.5, 137.8, 126.7, 122.0, 37.5.



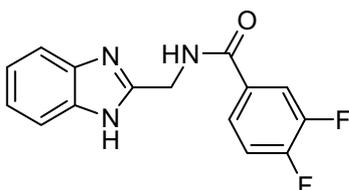
N-((1H-benzimidazol-2-il)metil)benzamida (M2-05). Partiendo de **99** (100 mg, 0.45 mmoles) y el ácido benzoico **124** (54.9 mg, 0.45 mmoles). Se obtiene un sólido blanco (79.6 mg, 0.32 mmoles, rendimiento: 70%, t_R 1.43 min, pureza: 99%). (CCF:

DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.60). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{13}N_3O$: (m/z) 251.11; experimental $[M+H] = 251.99$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.34 - 12.16 (s, 1H), 9.22 - 9.12 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.01 - 7.87 (m, 2H), 7.65 - 7.35 (m, 5H), 7.18 - 7.08 (m, 2H), 4.74 - 4.66 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 166.5, 152.4, 133.9, 131.4, 128.3, 127.4, 121.7, 121.0, 118.3, 111.2, 37.8.



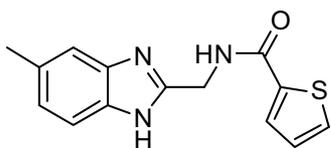
N-((1H-benzimidazol-2-il)metil)-2-metilbenzamida (M2-06).

Partiendo de **99** (100 mg, 0.45 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (61.2 mg, 0.45 mmoles). El producto precipita en la fase orgánica a 4 °C durante 10 h obteniendo por filtración un sólido blanco (82.9 mg, 0.32 mmoles, rendimiento: 69%, t_R 1.57 min, pureza: 97%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{16}H_{15}N_3O$: (m/z) 255.12; experimental $[M+H] = 266.06$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.95 - 8.72 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.54 - 7.48 (m, 3H), 7.38 - 7.31 (m, 1H), 7.29 - 7.22 (m, 2H), 7.17 - 7.11 (dd, $J = 5.9, 3.1$ Hz, 2H), 4.70 - 4.61 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.44 - 2.32 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 169.2, 152.2, 136.2, 135.7, 130.5, 129.5, 127.4, 125.4, 121.4, 37.5, 19.6.



N-((1H-benzimidazol-2-il)metil)-3,4-difluorobenzamida (M2-07). Partiendo de **99** (100 mg, 0.45 mmoles) y el ácido

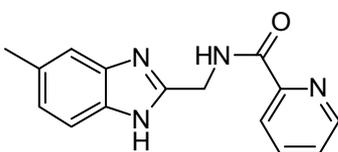
3,4-difluorobenzoico **126** (71.1 mg, 0.45 mmoles). El producto precipita en la mezcla de la reacción, una vez filtrado se obteniendo un sólido blanco (100 mg, 0.35 mmoles, rendimiento: 77%, t_R 1.62 min, pureza: >99.9%). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{11}F_2N_3O$: (m/z) 287.09; experimental $[M+H] = 288.05$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.86 - 11.80 (m, 1H), 9.47 - 9.20 (s, 1H), 8.08 - 7.94 (m, 1H), 7.91 - 7.79 (m, 1H), 7.65 - 7.53 (m, 1H), 7.53 - 7.44 (dd, $J = 5.9, 3.2$ Hz, 2H), 7.18 - 7.09 (dd, $J = 6.0, 3.2$ Hz, 2H), 4.72 - 4.65 (s, 2H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 164.4, 152.7 (d, $J_{C-F} = 13.1$ Hz, 1C), 152.1, 150.3 (d, $J_{C-F} = 12.9$ Hz, 1C), 147.9 (d, $J_{C-F} = 12.6$ Hz, 1C), 131.4 (d, $J_{C-F} = 3.7$ Hz, 1C), , 125.0 (d, $J_{C-F} = 3.2$ Hz, 1C), 124.9 (d, $J_{C-F} = 3.1$ Hz, 1C), 121.4, 117.6 (d, $J_{C-F} = 17.5$ Hz, 1C), 116.9 (d, $J_{C-F} = 18.4$ Hz, 1C), 37.9.



***N*-((5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)metil)tiofeno-2-carboxamida (M2-08).** Partiendo de **108** (145 mg, 0.62

mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (79.3 mg, 0.62 mmoles). El producto se obtiene como sólido blanco (157 mg,

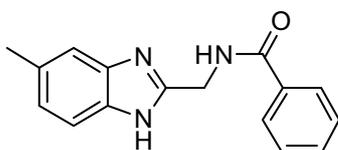
0.58 mmoles, rendimiento: 93%, t_R 1.53 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f 0.74). **MS** (ES^+) calculada para $C_{14}H_{13}N_3OS$: (m/z); 271.08; experimental $[M+H] = 271.97$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.23 - 9.14 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.88 - 7.82 (dd, $J = 3.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.83 - 7.76 (dd, $J = 5.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.42 - 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.32 - 7.25 (s, 1H), 7.22 - 7.13 (dd, $J = 5.0, 3.7$ Hz, 1H), 7.00 - 6.96 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1H), 4.67 - 4.62 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.19 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 161.4, 151.7, 139.4, 131.1, 130.9, 130.8, 130.7, 128.6, 128.0, 123.0, 37.4, 21.3.



***N*-((5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)metil)picolinamida (M2-09).** Partiendo de **108** (145 mg, 0.62 mmoles) y el ácido

picolínico **123** (76.2 mg, 0.62 mmoles). El producto se obtiene como un sólido de color amarillo (112 mg, 0.41

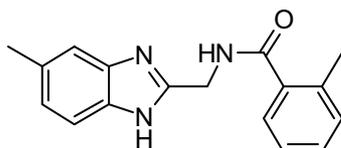
mmoles, rendimiento: 67%, t_R 1.40 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f 0.72). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{14}N_4O$: (m/z) 266.12; experimental $[M+H] = 267.00$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.59 - 9.26 (m, 1H), 8.85 - 8.55 (m, 1H), 8.14 - 8.04 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.06 - 7.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.68 - 7.57 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.47 - 7.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.37 - 7.28 (s, 1H), 7.06 - 6.98 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.96 - 4.51 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.44 - 2.30 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 164.3, 151.7, 149.5, 148.5, 137.8, 137.2, 135.8, 131.4, 126.8, 123.6, 122.0, 114.5, 114.0, 37.2, 21.2.



***N*-((5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)metil)benzamida (M2-10).** Partiendo de **108** (145 mg, 0.62 mmoles) y el ácido benzoico

124 (75.7 mg, 0.62 mmoles). El producto se obtiene como un sólido de color blanco (147 mg, 0.55 mmoles, rendimiento:

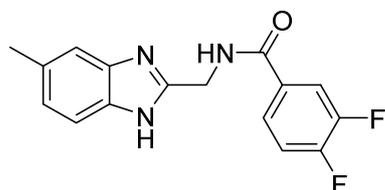
89%, t_R 1.53 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f 0.74). **MS** (ES^+) calculada para $C_{16}H_{15}N_3O$: (m/z) 265.12; experimental $[M+H] = 266.06$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.49 - 9.23 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.03 - 7.86 (m, 2H), 7.63 - 7.54 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.54 - 7.47 (m, 3H), 7.44 - 7.39 (s, 1H), 7.18 - 7.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.96 - 4.67 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.48 - 2.34 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz $DMSO-d_6$) δ : 166.8, 151.9, 135.2, 133.5, 132.9, 131.7, 128.4, 127.5, 124.8, 114.1, 113.8, 37.0, 21.2.



2-metil-N-((5-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)benzamida

(M2-11). Partiendo de **108** (145 mg, 0.62 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (84.3 mg, 0.62 mmoles). El producto se obtiene como un sólido de color blanco (83.5 mg, 0.30

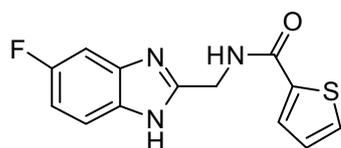
mmoles, rendimiento: 48%, t_R 1.72 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV=254 nm, R_f = 0.76). **MS** (ES^+) calculada para $C_{17}H_{17}N_3O$: (m/z) 279.14; experimental [M+H] = 280.07. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.99 - 8.83 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.57 - 7.49 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.48 - 7.40 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.40 - 7.31 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.30 - 7.21 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 7.09 - 6.97 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.76 - 4.58 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 2.44 - 2.39 (s, 3H), 2.40 - 2.34 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 169.4, 151.8, 136.0, 135.8, 131.5, 130.6, 129.7, 127.5, 125.4, 123.6, 114.5, 114.1, 109.5, 37.2, 21.2, 19.6.



3,4-difluoro-N-((5-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)benzamida (M2-12).

Partiendo de **108** (145 mg, 0.62 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (97.9 mg, 0.62 mmoles). El producto se obtiene como sólido blanco (180 mg, 0.60 mmoles, rendimiento: 96%, t_R 1.85

min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV=254 nm, R_f = 0.72). **MS** (ES^+) calculada para $C_{16}H_{13}F_2N_3O$: (m/z) 301.10; experimental [M+H] = 302.05. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.63 - 9.30 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 8.03 - 7.92 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 7.87 - 7.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.64 - 7.53 (q, J = 10.1, 9.2 Hz, 1H), 7.52 - 7.46 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.42 - 7.38 (s, 1H), 7.18 - 7.07 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.00 - 4.56 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 2.55 - 2.24 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 164.7, 152.8 (d, J_{C-F} = 12.4 Hz, 1C), 151.7, 150.4 (d, J_{C-F} = 3.8 Hz, 1C), 150.3 (d, J_{C-F} = 3.8 Hz, 1C), 147.9 (d, J_{C-F} = 12.7 Hz, 1C), 135.5, 133.8, 132.7, 131.1 (d, J_{C-F} = 4.5 Hz, 1C), 125.1 (d, J_{C-F} = 3.0 Hz, 1C), 125.0 (d, J_{C-F} = 3.4 Hz, 1C), 124.7, 117.6 (d, J_{C-F} = 17.5 Hz, 1C), 117.0 (d, J_{C-F} = 18.5 Hz, 1C), 114.0 (d, J_{C-F} = 34.8 Hz, 1C), 37.2, 21.2.

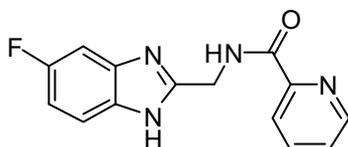


N-((5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)metil)tiofeno-2-carboxamida (M-13).

Partiendo de **116** (300 mg, 1.26 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (162 mg, 1.26 mmoles). Se obtiene el producto sólido (145 mg, 0.52

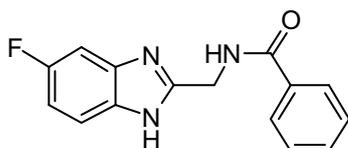
mmoles, rendimiento: 42%, t_R 1.43, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV=254 nm, R_f = 0.34). **MS** (ES^+) calculada para $C_{13}H_{10}FN_3O_2$: (m/z) 275.30; experimental [M+H] = 275.99. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.38 (bs, 1H), 9.20 (t, J = 5.73 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 3.74, 1.13 Hz, 1H), 7.79 (dd, J = 5.00, 1.10 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 8.73, 4.93 Hz, 1H),

7.29 (dd, $J = 9.52, 2.33$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 4.99, 3.74$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 5.80$ Hz, 2H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 161.3, 159.3, 157.0, 153.5, 139.2, 131.0, 128.5, 127.8, 109.4, 109.2, 37.4.



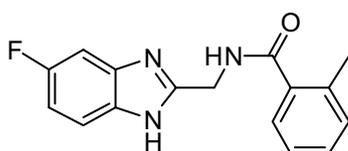
***N*-((5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)metil)picolinamida (M-**

14). Partiendo de **116** (300 mg, 1.26 mmoles) y el ácido picolínico **123** (156 mg, 1.26 mmoles) se obtiene el producto sólido (165 mg, 0.59 mmoles, rendimiento: 47%, t_R 1.35 min, pureza: 97%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.34). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{O}$: (m/z) 270.26; experimental [M+H] = 271.02. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.37 (bs, 1H), 9.38 (t, $J = 5.72$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J = 4.67$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.77$ Hz, 1H), 8.03 (dt, $J = 7.71, 1.59$ Hz, 1H), 7.64 (ddd, $J = 7.37, 4.75, 1.28$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.74, 4.93$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 9.55, 2.46$ Hz, 1H), 6.99 (ddd, $J = 9.85, 8.96, 2.52$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 6.01$ Hz, 2H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 164.1, 159.3, 157.0, 153.4, 149.4, 148.4, 137.7, 126.6, 121.9, 109.4, 109.1, 37.4.



***N*-((5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)metil)benzamida (M-**

15). Partiendo de **116** (300 mg, 1.26 mmoles) y el ácido benzoico **124** (154 mg, 1.26 mmol) se obtiene el producto sólido (156 mg, 0.58 mmol, rendimiento: 46%, t_R 1.55, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.28). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}$: (m/z) 269.27; experimental [M+H] = 270.02. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.36 (bs, 1H), 9.18 (t, $J = 5.55$ Hz, 1H), 7.97 - 7.93 (m, 2H), 7.59 - 7.53 (m, 1H), 7.53 - 7.46 (m, 3H), 7.29 (dd, $J = 9.53, 2.44$ Hz, 1H), 7.00 (ddd, $J = 9.90, 8.97, 2.52$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 5.73$ Hz, 2H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 166.4, 159.3, 157.0, 153.7, 133.7, 131.3, 128.2, 127.3, 109.4, 109.1, 37.6.

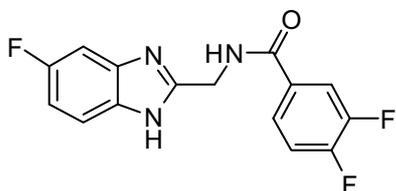


***N*-((5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)metil)-2-**

metilbenzamida (M-16). Partiendo de **116** (300 mg, 1.26 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (172 mg, 1.26 mmoles) se obtiene el producto sólido (144 mg, 0.51

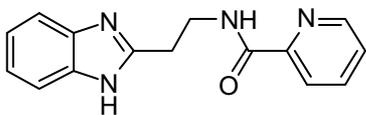
mmoles, rendimiento: 40%, t_R 1.67 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.26). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}$: (m/z) 283.30; experimental [M+H] = 284.03. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.35 (bs, 1H), 8.87 (t, $J = 5.65$ Hz, 1H), 7.54 - 7.47 (m, 2H), 7.38 - 7.29 (m, 2H), 7.28 - 7.22 (m, 2H), 7.04 - 6.97 (ddd, $J = 9.90, 8.97, 2.52$

Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 5.77$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 169.2, 159.3, 157.0, 153.5, 136.0, 135.6, 130.4, 129.4, 127.3, 125.3, 109.4, 109.1, 37.3, 19.5.



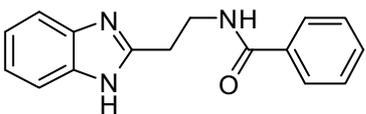
3,4-difluoro-N-((5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)metil)benzamida (M-17).

Partiendo de **116** (300 mg, 1.26 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (200 mg, 1.26 mmoles) se obtiene el producto sólido (199 mg, 0.65 mmoles, rendimiento: 52%, t_R 1.78 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV=254 nm, $R_f = 0.24$). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$: (m/z) 306.01; experimental [M+H] = 302.05. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.40 (bs, 1H), 9.30 (t, $J = 5.56$ Hz, 1H), 7.98 (ddd, $J = 11.60, 7.82, 2.12$ Hz, 1H), 7.84 (ddd, $J = 8.71, 4.24, 1.67$ Hz, 1H), 7.59 (td, $J = 10.46, 8.40$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 8.66, 4.94$ Hz, 1H), 7.29 (dd, $J = 9.49, 2.16$ Hz, 1H), 7.00 (ddd, $J = 9.91, 8.96, 2.52$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 5.69$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 164.3, 164.3, 159.4, 157.0, 153.5, 152.7, 152.5, 150.3, 150.2, 150.1, 147.9, 147.7, 131.3, 131.2, 131.2, 131.2, 124.9, 124.8, 124.8, 124.8, 117.5, 117.3, 116.8, 116.7, 109.5, 109.2, 37.8.



N-(2-(1H-benzimidazol-2-il)etil)picolinamida (M2-18).

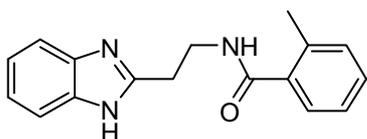
Partiendo de **99** (100 mg, 0.43 mmoles) y el ácido picolínico **123** (52.9 mg, 0.43 mmoles) se obtiene el producto sólido blanco (85.3 mg, 0.32 mmoles, rendimiento: 74%, t_R 1.25 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (4:1, v/v), UV= 254 nm, $R_f = 0.88$). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$: (m/z) 266.12; experimental [M+H] = 267.02. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.40 - 12.15 (s, 1H), 9.10 - 8.98 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.65 - 8.59 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.08 - 8.02 (m, 1H), 8.03 - 7.94 (m, 1H), 7.62 - 7.56 (m, 1H), 7.55 - 7.37 (m, 2H), 7.15 - 7.10 (dd, $J = 5.7, 2.4$ Hz, 2H), 3.85 - 3.76 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.15 - 3.08 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 163.8, 152.9, 149.9, 148.4, 137.8, 126.5, 121.8, 37.2, 28.7.



N-(2-(1H-benzimidazol-2-il)etil)benzamida (M2-19).

Partiendo de **99** (100 mg, 0.43 mmoles) y el ácido benzoico **124** (52.5 mg, 0.43 mmoles) se obtiene el producto como un sólido de color blanco 31.9 mg, 0.12 mmoles, rendimiento: 28%, t_R 1.52 min, pureza: 94%). (CCF: DCM/MeOH (4:1, v/v), UV= 254 nm, $R_f = 0.85$). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$: (m/z) 265.12; experimental [M+H] = 266.00. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.36 - 12.21 (s, 1H), 8.72 - 8.64 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.86 - 7.82 (m, 2H), 7.57 - 7.38 (m,

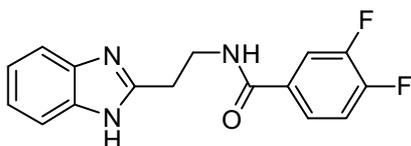
5H), 7.19 - 7.04 (dd, $J = 8.8, 3.2$ Hz, 2H), 3.76 - 3.69 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.13 - 3.06 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.3, 152.8, 143.3, 134.5, 131.1, 128.2, 127.1, 121.5, 120.8, 118.1, 110.8, 38.0, 28.8.



***N*-(2-(1*H*-benzimidazol-2-il)etil)-2-metilbenzamida (M2-**

20). Partiendo de **99** (100 mg, 0.43 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (58.5 mg, 0.43 mmoles) se obtiene el

producto como un sólido de color blanco (80.6 mg, 0.29 mmoles, rendimiento: 67%, t_R 1.52 min, pureza: 99%). (CCF: DCM/MeOH (4:1, v/v), UV= 254 nm, $R_f = 0.85$). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$: (m/z) 279.14; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 280.09$. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.28 (s, 1H), 8.39 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.24 - 7.16 (m, 2H), 7.15 - 7.06 (m, 2H), 3.69 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.08 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.27 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.1, 152.8, 143.3, 137.1, 135.1, 134.3, 130.3, 129.2, 127.0, 125.4, 121.5, 120.8, 118.1, 110.8, 37.7, 28.9, 19.3.

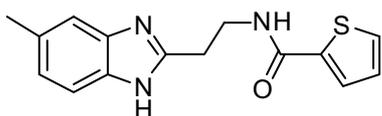


***N*-(2-(1*H*-benzimidazol-2-il)etil)-3,4-**

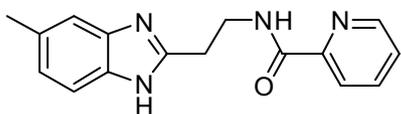
difluorobenzamida (M2-21). Partiendo de **99** (100 mg,

0.43 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (67.9 mg, 0.43 mmoles), el producto se obtiene como un

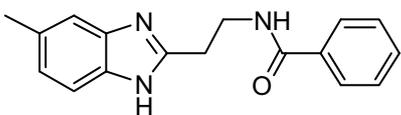
sólido de color blanco (74.4 mg, 0.25 mmoles, rendimiento: 57%, t_R 1.73 min, pureza: 99%). (CCF: DCM/MeOH (4:1, v/v), UV= 254 nm, $R_f = 0.87$). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$: (m/z) 301.10; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 301.99$. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.28 (s, 1H), 8.79 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.92 - 7.82 (m, 1H), 7.78 - 7.68 (m, 1H), 7.60 - 7.48 (m, 2H), 7.48 - 7.37 (m, 1H), 7.20 - 7.04 (m, 2H), 3.72 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.09 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2, 152.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 27.7$ Hz, 1C), 150.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 12.9$ Hz, 1C), 150.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 12.9$ Hz, 1C), 147.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 13.0$ Hz, 1C), 143.3, 134.3, 131.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.5$ Hz, 1C), 124.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.4$ Hz, 1C), 124.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.4$ Hz, 1C), 121.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 66.2$ Hz, 1C), 118.2, 117.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 17.5$ Hz, 1C), 116.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 18.3$ Hz, 1C), 110.8, 38.2, 28.7.



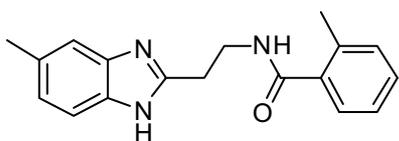
***N*-(2-(5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)tiofeno-2-carboxamida (M2-22).** Partiendo de **103** (100 mg, 0.40 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (51.2 mg, 0.40 mmoles), el producto se obtiene como un sólido de color beige (100 mg, 0.35 mmoles, rendimiento: 87%, t_R 1.58 min, pureza: 97%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.61). **MS** (ES^+) calculada para $C_{15}H_{15}N_3OS$: (m/z) 285.09; experimental $[M+H] = 286.04$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.28 - 11.99 (s, 1H), 8.81 - 8.57 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.79 - 7.69 (m, 2H), 7.40 - 7.31 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.29 - 7.22 (s, 1H), 7.15 - 7.10 (m, 1H), 6.98 - 6.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.77 - 3.59 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.08 - 3.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.42 - 2.33 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 161.2, 152.4, 140.0, 130.7, 128.0, 127.8, 122.6, 37.9, 28.9, 21.3.



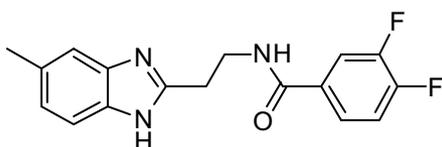
***N*-(2-(5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)picolinamida (M2-23).** Partiendo de **103** (100 mg, 0.40 mmoles) y el ácido picolínico **123** (49.2 mg, 0.40 mmoles) se obtiene el producto como un sólido de color blanco (90.0 mg, 0.32 mmoles, rendimiento: 80%, t_R 1.38 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.56). **MS** (ES^+) calculada para $C_{16}H_{16}N_4O$: (m/z) 280.13; experimental $[M+H] = 281.07$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.05 - 8.98 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.63 - 8.59 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 8.09 - 8.02 (m, 1H), 8.02 - 7.91 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.62 - 7.55 (m, 1H), 7.39 - 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.29 - 7.23 (s, 1H), 6.97 - 6.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.86 - 3.71 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.15 - 3.01 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.44 - 2.29 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 163.8, 152.5, 149.9, 148.4, 137.8, 130.3, 126.5, 122.6, 121.9, 37.3, 28.7, 21.3.



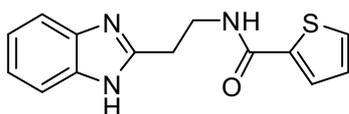
***N*-(2-(5-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)benzamida (M2-24).** Partiendo de **103** (100 mg, 0.40 mmoles) y el ácido benzoico **124** (48.8 mg, 0.40 mmoles), el producto se obtiene como sólido beige (106 mg, 0.38 mmoles, rendimiento: 94%, t_R 1.70 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.52). **MS** (ES^+) calculada para $C_{17}H_{17}N_3O$: (m/z) 279.14; experimental $[M+H] = 280.07$. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.29 - 12.01 (s, 1H), 8.77 - 8.59 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.92 - 7.74 (m, 2H), 7.55 - 7.48 (m, 1H), 7.48 - 7.42 (m, 2H), 7.38 - 7.32 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.29 - 7.23 (m, 1H), 6.96 - 6.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.77 - 3.66 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.12 - 3.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.41 - 2.34 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 166.3, 134.5, 131.1, 128.3, 127.2, 122.5, 38.0, 28.8, 21.3.



2-metil-N-(2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)etil)benzamida (M2-25). Partiendo de **103** (100 mg, 0.40 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (54.4 mg, 0.40 mmoles), el producto se obtiene como un sólido de color beige (101 mg, 0.34 mmoles, rendimiento: 86%, t_R 1.73 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.52). **MS** (ES^+) calculada para $C_{18}H_{19}N_3O$: (m/z) 293.15; experimental [M+H] = 294.14. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.37 - 11.89 (s, 1H), 8.63 - 8.17 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.33 - 7.26 (dt, J = 6.5, 2.8 Hz, 3H), 7.23 - 7.16 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 6.96 - 6.90 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.73 - 3.61 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.11 - 3.01 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.42 - 2.35 (s, 3H), 2.29 - 2.25 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 169.1, 137.2, 135.1, 130.3, 129.2, 127.0, 125.4, 37.7, 28.9, 21.3, 19.3.

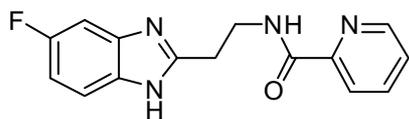


3,4-difluoro-N-(2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)etil)benzamida (M2-26). Partiendo de **103** (100 mg, 0.40 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (63.2 mg, 0.40 mmoles) se obtiene el producto como sólido blanco (101 mg, 0.32 mmoles, rendimiento: 79%, t_R 1.88 min, pureza: 97%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.60). **MS** (ES^+) calculada para $C_{17}H_{15}F_2N_3O$: (m/z) 315.12; experimental [M+H] = 316.06. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.14 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.78 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.87 (ddd, J = 11.3, 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.78 - 7.68 (m, 1H), 7.60 - 7.49 (m, 1H), 7.44 - 7.16 (m, 2H), 6.93 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.70 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.06 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H). **^{13}C RMN** (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 164.1 (d, J_{C-F} = 1.8 Hz, 1C), 152.5 (d, J_{C-F} = 12.7 Hz, 1C), 150.3 (d, J_{C-F} = 13.0 Hz, 1C), 150.0 (d, J_{C-F} = 12.7 Hz, 1C), 147.9, 147.8, 141.5, 131.9, 124.7 (d, J_{C-F} = 3.7 Hz, 1C), 124.6 (d, J_{C-F} = 3.4 Hz, 1C), 122.3, 117.5 (d, J_{C-F} = 17.5 Hz, 1C), 116.6 (d, J_{C-F} = 18.4 Hz, 1C), 110.7 (d, J_{C-F} = 3.3 Hz, 1C), 38.2, 28.7, 21.2.



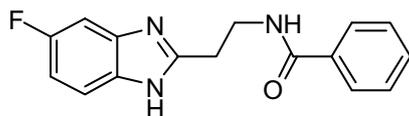
N-(2-(1H-benzimidazol-2-il)etil)tiofeno-2-carboxamida (M2-27). Partiendo de **100** (100 mg, 0.43 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (55.0 mg, 0.43 mmoles) se obtiene el producto como un sólido de color blanco (87.8 mg, 0.33 mmoles, rendimiento: 75%, t_R 1.57 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (4:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.86). **MS** (ES^+) calculada para $C_{14}H_{13}N_3OS$: (m/z) 271.08; experimental [M+H] = 271.97. **1H RMN** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.77 - 8.68 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.76 - 7.71 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 7.52 - 7.44 (dd, J = 5.6, 3.2 Hz, 2H), 7.15 - 7.07 (m, 3H), 3.73 - 3.65 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.12 - 3.05 (t,

$J = 7.3$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.2, 152.7, 139.9, 130.7, 128.1, 127.8, 121.2, 37.9, 28.9.



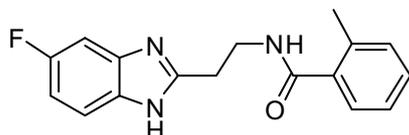
***N*-(2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)picolinamida (M2-28)**. Partiendo de **115** (227 mg, 0.56 mmoles) y el ácido picolínico **123** (68.9 mg, 0.56 mmoles), el

producto se obtiene como un sólido de color blanco (83 mg, 0.29 mmoles, rendimiento: 52%, t_R 1.37min, pureza: 99%). (CCF: DCM/EtOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.57). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}$: (m/z) 284.29; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 285.03$. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.41 (b, 1H), 9.16 - 8.90 (m, 1H), 8.72 - 8.50 (m, 1H), 8.08 - 8.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 8.01 - 7.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.70 - 7.48 (m, 1H), 7.52 - 7.13 (m, 2H), 7.06 - 6.79 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.83 - 3.75 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.21 - 2.98 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.9, 159.4, 157.1, 154.4, 149.8, 148.4, 137.8, 126.5, 121.9, 109.3, 109.1, 37.7, 37.2, 28.7, 27.9.



***N*-(2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)benzamida (M2-29)**. Partiendo de **115** (227 mg, 0.56 mmoles) y el ácido benzoico **124** (68.3 mg, 0.56 mmoles), el producto

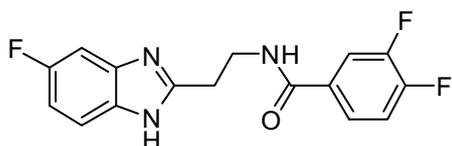
se obtiene como un sólido de color blanco (81.8 mg, 0.29 mmoles, rendimiento: 53%, t_R 1.57 min, pureza: 96%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.71). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}$: (m/z) 283.30; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 283.96$. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.41 (s, 1H), 8.67 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.88 - 7.77 (m, 2H), 7.56 - 7.38 (m, 4H), 7.28 (dd, $J = 35.2, 9.3$ Hz, 1H), 6.97 (q, $J = 9.4$ Hz, 1H), 3.71 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.08 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.3, 134.4, 131.2, 128.3, 127.2, 38.0, 28.9.



***N*-(2-(5-fluoro-1*H*-benzimidazol-2-il)etil)-2-metilbenzamida (M2-30)**. Partiendo de **115** (227 mg, 0.56 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (76.2 mg,

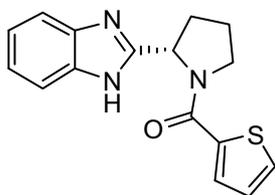
0.56 mmoles) el producto se obtiene como un sólido de color blanco (70.1 mg, 0.24 mmoles, rendimiento: 42%, t_R 1.62 min, pureza: >99 %). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.71). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}$: (m/z) 297.33; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 298.03$. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.41 (s, 1H), 8.38 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.58 - 7.37 (m, 1H), 7.36 - 7.13 (m, 5H), 7.03 - 6.91 (m, 1H), 3.68 (q, 6.9 Hz, 2H), 3.07 (t, J

= 7.1 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.1, 137.1, 135.1, 130.3, 129.2, 127.0, 125.4, 37.6, 28.9, 19.3.



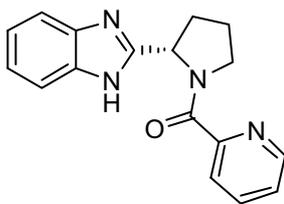
3,4-difluoro-N-(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)etil)benzamida (M2-31). Partiendo de **115** (227 mg, 0.56 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (88.5 mg, 0.56 mmoles), el producto se obtiene

como un sólido de color blanco (73.7 mg, 0.23 mmoles, rendimiento: 41%, t_R 1.83 min, pureza: 99%). (CCF: DCM/MeOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f 0.72). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$: (m/z) 319.28; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 320.01$. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.54 - 12.01 (s, 1H), 9.01 - 8.47 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.93 - 7.82 (ddd, $J = 11.6, 7.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.76 - 7.68 (m, 1H), 7.61 - 7.50 (dt, $J = 10.5, 8.4$ Hz, 1H), 7.50 - 7.41 (dd, $J = 8.0, 4.8$ Hz, 1H), 7.33 - 7.21 (m, 1H), 7.03 - 6.89 (m, 1H), 3.81 - 3.61 (m, 2H), 3.14 - 3.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 1.8$ Hz, 1C), 157.1, 155.4, 154.3, 152.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 12.6$ Hz, 1C), 150.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 13.0$ Hz, 1C), 150.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 12.8$ Hz, 1C), 147.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 13.0$ Hz, 1C), 131.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.6$ Hz, 1C), 124.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.4$ Hz, 1C), 124.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.4$ Hz, 1C), 117.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 17.6$ Hz, 1C), 116.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 18.7$ Hz, 1C), 109.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 25.2$ Hz, 1C), 38.1, 28.8.

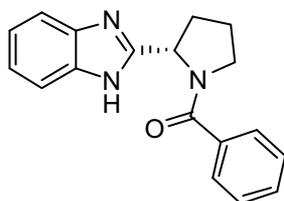


(2-(1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(tiofeno-2-il)metanona (M2-32). Partiendo de **119** (300 mg, 1.15 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (148 mg, 1.15 mmoles), se obtiene el producto sólido (271 mg, 0.89 mmoles, rendimiento: 77%, t_R 1.42 min, pureza: 99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f

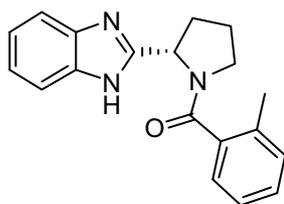
= 0.51). **MS** (ES^+) calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$: (m/z) 297.38; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 298.03$. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.56 (d, $J = 10.25$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 11.94$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 3.15$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 3.15$ Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 5.64 (dd, $J = 7.86, 3.89$ Hz, 1H), 4.04 - 3.85 (m, 1H), 3.15 (td, $J = 11.82, 5.57, 5.57$ Hz, 1H), 2.51-2.39 (m, 1H), 2.31 (ddd, $J = 15.98, 12.82, 7.98$ Hz, 1H), 2.17 (dt, $J = 12.17, 12.08, 5.85$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 163.8, 153.5, 138.3, 130.7, 130.7, 127.4, 122.5, 56.1, 49.9, 27.4, 26.0.



(2-(1*H*-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(piridin-2-il)metanona (M2-33). Partiendo de **119** (300 mg, 1.15 mmoles) y el ácido picolínico **123** (142 mg (1.15 mmoles) se obtiene el producto sólido de una mezcla de dos rotámeros (155 mg, 0.53 mmoles, rendimiento: 46%, t_R 1.32 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.32). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₇H₁₆N₄O: (m/z) 292.34; experimental [M+H] = 293.01. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃, rotámero 1) δ : 8.59 (d, J = 4.64 Hz, 1H), 7.91 - 7.77 (m, 2H), 7.64 - 7.51 (m, 2H), 7.37 (ddd, J = 6.89, 4.82, 1.75 Hz, 1H), 7.25 - 7.18 (m, 2H), 5.64 (dd, J = 7.44, 3.55 Hz, 1H), 3.97 - 3.85 (m, 2H), 3.17 - 3.05 (m, 1H), 2.39 - 2.25 (m, 2H), 2.26 - 1.99 (m, 1H); **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃, rotámero 2) δ : 8.49 (d, J = 4.15 Hz, 1H), 7.91 - 7.77 (m, 2H), 7.64 - 7.51 (m, 2H), 7.37 (ddd, J = 6.89, 4.82, 1.75 Hz, 1H), 7.25 - 7.18 (m, 2H), 5.47 (d, J = 5.87 Hz, 1H), 4.07 (td, J = 11.67, 7.98, 7.98 Hz, 1H), 3.59 - 3.51 (m, 1H), 3.01 - 2.92 (m, 1H), 2.39 - 2.25 (m, 2H), 2.26 - 1.99 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ : 168.2, 154.4, 153.8, 153.6, 153.4, 148.1, 147.1, 137.7, 136.9, 125.4, 125.1, 124.7, 123.9, 122.4, 122.3, 57.9, 55.8, 50.1, 46.4, 30.6, 27.5, 25.7, 22.1.

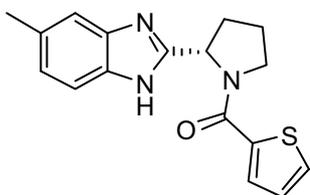


(2-(1*H*-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(fenil)metanona (M2-34). Partiendo de **119** (300 mg, 1.15 mmoles) y el ácido benzoico **124** (141 mg, 1.15 mmoles) se obtiene el producto sólido (270 mg, 0.93 mmoles, rendimiento: 80%, t_R 1.50 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.42). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₈H₁₇N₃O: (m/z) 291.35; experimental [M+H] = 292.07. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.56 (bs, 2H), 7.53 - 7.49 (m, 2H), 7.48 - 7.37 (m, 3H), 7.23 (d, J = 3.18 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 3.17 Hz, 1H), 5.59 (dd, J = 7.97, 6.18 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 7.38, 6.04 Hz, 2H), 3.16 (tdd, J = 12.99, 8.03, 6.56 Hz, 1H), 2.42 (ddd, J = 13.03, 7.36, 6.70 Hz, 1H), 2.23 (pd, J = 12.27, 6.05 Hz, 1H), 1.96 (pd, J = 12.56, 7.47 Hz, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ : 171.8, 153.7, 135.9, 130.5, 128.4, 127.1, 122.4, 54.8, 50.7, 27.7, 25.7.



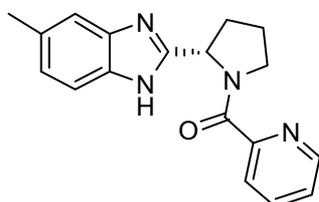
(2-(1*H*-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(o-tolil)metanona (M2-35). Partiendo de **119** (300 mg, 1.15 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (157 mg, 1.15 mmoles) se obtiene el producto sólido (300 mg, 0.98 mmoles, rendimiento: 85%, t_R 1.58 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.36). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₉H₁₉N₃O: (m/z) 305.37; experimental [M+H] = 306.07. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.58 (bs, 2H), 7.32 - 7.27 (m, 1H), 7.25 - 7.16 (m, 5H), 5.60 (dd,

$J = 7.97, 4.04$ Hz, 1H), 3.34 - 3.24 (m, 2H), 3.17 (dtd, $J = 10.58, 6.49, 4.29$ Hz, 1H), 2.42-2.20 (m, 3H), 2.25 (s, 2H), 1.98 (pd, $J = 12.71, 6.34$ Hz, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.0, 153.8, 136.4, 133.7, 130.5, 129.3, 125.9, 125.4, 122.4, 54.3, 49.4, 27.8, 25.2, 18.8.



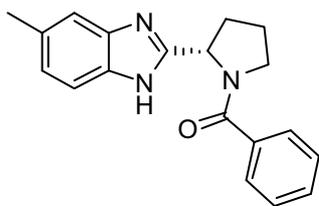
(2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(tiofen-2-il)metanona (M2-36). Partiendo de **120** (250 mg, 0.91 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (117 mg, 0.91 mmoles), se obtiene el producto sólido (185 mg, 0.59 mmoles, rendimiento: 65%, t_R 1.62 min, pureza: 99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v),

UV= 254 nm, $R_f = 0.47$). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OS}$: (m/z) 311.40; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 312.10$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.59 (d, $J = 3.79$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 4.97$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.02$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.11 (dd, $J = 4.65, 4.19$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 8.29$ Hz, 1H), 5.62 (dd, $J = 7.89, 4.32$ Hz, 1H), 3.96 (t, $J = 6.85$ Hz, 2H), 3.12 (dt, $J = 12.18, 12.13, 5.89$ Hz, 1H), 2.51 - 2.37 (m, 1H), 2.43 (s, 3H) 2.32 (ddd, $J = 15.25, 12.70, 7.98$ Hz, 1H), 2.16 (dt, $J = 12.20, 12.06, 6.03$ Hz, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 163.8, 153.1, 138.3, 132.7, 130.8, 127.5, 124.2, 109.9, 56.0, 50.0, 27.6, 26.0, 21.6.

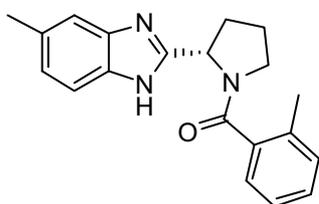


(2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(piridin-2-il)metanona (M2-37). Partiendo de **120** (250 mg, 0.91 mmoles) y el ácido picolínico **123** (113 mg, 0.91 mmoles), se obtiene el producto sólido como mezcla de dos rotámeros (146 mg, 0.47 mmol, rendimiento: 51%, t_R 1.53 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, $R_f = 0.35$). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$:

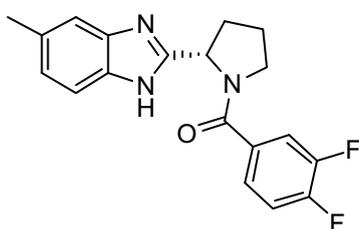
(m/z) 306.36; experimental $[\text{M}+\text{H}] = 307.14$. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , rotámero 1) δ : 8.59 (d, $J = 4.68$ Hz, 1H), 7.91-7.78 (m, 2H), 7.47 (d, $J = 8.21$ Hz, 1H), 7.40 - 7.35 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.04 (dd, $J = 8.23, 1.05$ Hz, 1H), 5.62 (dd, $J = 7.45, 3.63$ Hz, 1H), 3.95 - 3.86 (m, 2H), 3.14 - 3.02 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.38 - 2.25 (m, 2H), 2.23 - 1.99 (m, 2H); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , rotámero 2) δ : 8.48 (d, $J = 4.37$ Hz, 1H), 7.91-7.78 (m, 2H), 7.50 (d, $J = 8.16$ Hz, 1H), 7.40-7.35 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.08 (d, $J = 8.20$ Hz, 1H), 5.47 (d, $J = 5.69$ Hz, 1H), 4.11-3.99 (m, 1H), 3.55 (ddd, $J = 11.74, 8.61, 1.48$ Hz, 1H), 3.00-2.91 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.38-2.25 (m, 2H), 2.23-1.99 (m, 2H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 168.2, 153.6, 153.4, 148.2, 147.2, 137.7, 136.9, 132.4, 125.4, 125.1, 124.7, 124.0, 123.9, 123.9, 57.8, 55.7, 50.1, 46.5, 30.7, 27.6, 25.7, 21.6.



(2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(fenil)metanona (M2-38). Partiendo de **120** (250 mg, 0.91 mmoles) y el ácido benzoico **124** (112 mg, 0.91 mmoles) se obtiene el producto sólido (190 mg, 0.62 mmoles, rendimiento: 68%, t_R 1.65 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.44). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₉H₁₉N₃O: (m/z) 305.37; experimental [M+H] = 306.13. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.52 (dd, J = 7.90, 1.49 Hz, 2H), 7.49 - 7.38 (m, 4H), 7.29 (s, 1H), 7.04 (dd, J = 8.24, 0.91 Hz, 1H), 5.57 (dd, J = 7.84, 6.38 Hz, 1H), 3.66 - 3.55 (m, 2H), 3.13 (tdd, J = 13.05, 7.95, 6.66 Hz, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.46 - 2.36 (m, 1H), 2.29 - 2.17 (m, 1H), 1.95 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 171.7, 153.3, 135.9, 130.5, 128.4, 127.2, 124.0, 54.8, 50.7, 27.8, 25.7, 21.6.

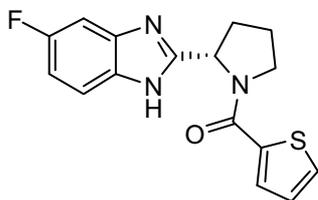


(2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(o-tolil)metanona (M2-39). Partiendo de **120** (250 mg, 0.91 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (125 mg, 0.91 mmoles), se obtiene el producto sólido (227 mg, 0.71 mmoles, rendimiento: 78%, t_R 1.75 min, pureza: >99 %). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.47). **MS (ES⁺)** calculada para C₂₀H₂₁N₃O: (m/z) 319.40; experimental [M+H] = 320.14. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.48 (d, J = 7.20 Hz, 1H), 7.33 - 7.27 (m, 2H), 7.24 - 7.19 (m, 3H), 7.05 (dd, J = 8.23, 1.54 Hz, 1H), 5.58 (dd, J = 7.99, 4.16 Hz, 1H), 3.36 - 3.24 (m, 2H), 3.20 - 3.11 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.40 - 2.22 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.97 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 172.0, 153.4, 136.4, 133.8, 130.6, 129.3, 126.0, 125.5, 124.0, 54.3, 49.5, 27.9, 25.3, 21.6, 18.8.



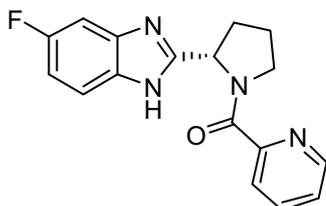
(3,4-difluorofenil)(2-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)metanona (M2-40). Partiendo de **120** (250 mg, 0.91 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (145 mg, 0.91 mmoles), se obtiene el producto sólido (169 mg, 0.50 mmoles, rendimiento: 54%, t_R 1.92 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.31). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₉H₁₇F₂N₃O: (m/z) 341.36; experimental [M+H] = 342.12. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.45 (d, J = 8.22 Hz, 1H), 7.43 - 7.37 (m, 1H), 7.34 - 7.27 (m, 2H), 7.20 (td, J = 9.71, 8.05 Hz, 1H), 7.05 (dd, J = 8.27, 1.41 Hz, 1H), 5.53 (dd, J = 7.76, 6.54 Hz, 1H), 3.70 - 3.56 (m, 2H), 3.10 (tdd, J = 13.12, 8.17, 6.65 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.47 - 2.37 (m, 1H), 2.32 - 2.22 (m, 1H), 2.05 - 1.91 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 169.3, 153.0, 152.8, 151.3,

150.4, 150.3, 148.8, 148.7, 132.7, 124.2, 124.1, 124.1, 124.0, 124.0, 117.5, 117.4, 117.2, 117.0, 55.1, 50.8, 28.0, 25.7, 21.6.



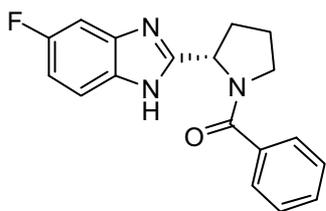
(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-yl)pirrolidin-1-il)(tiofen-2-il)metanona (M2-41). Partiendo de **121** (116 mg, 0.90 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (116 mg, 0.90 mmoles), se obtiene el producto sólido (212 mg, 0.66 mmoles, rendimiento: 73%, t_R 1.58 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v),

UV= 254 nm, R_f = 0.58). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₆H₁₄FN₃OS: (m/z) 315.37; experimental [M+H] = 316.06. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.58 (d, J = 3.65 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 5.00 Hz, 1H), 7.47 (bs, 1H), 7.22 (bd, J = 7.37 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 4.78, 4.03 Hz, 1H), 6.96 (dt, J = 9.38, 2.39 Hz, 1H), 5.61 (dd, J = 7.85, 3.92 Hz, 1H), 4.01 - 3.88 (m, 2H), 3.16 - 3.06 (m, 1H), 2.50 - 2.37 (m, 1H), 2.37 - 2.25 (m, 1H), 2.23 - 2.11 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ : 163.7, 160.5, 158.1, 154.7, 138.1, 130.8, 130.7, 127.4, 110.8, 110.5, 56.1, 49.9, 27.7, 25.9.

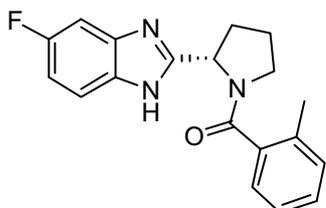


(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-yl)pirrolidin-1-il)(piridin-2-il)metanona (M2-42). Partiendo de **121** (116 mg, 0.90 mmoles) y el ácido picolínico **123** (111 mg, 0.90 mmoles), se obtiene el producto sólido como una mezcla de rotámeros (154 mg, 0.50 mmoles, rendimiento: 55%, t_R 1.45 min, pureza:

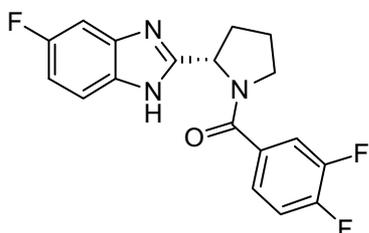
>99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.41). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₇H₁₅FN₄O: (m/z) 310.33; experimental [M+H] = 311.10. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃, rotámero 1) δ : 8.59 (d, J = 4.77 Hz, 1H), 7.85 - 7.79 (m, 2H), 7.53 - 7.42 (bm, 1H), 7.38 (ddd, J = 6.83, 4.81, 1.91 Hz, 1H), 7.25 - 7.17 (bm, 1H), 7.01 - 6.91 (m, 1H), 5.61 (dd, J = 7.53, 3.61 Hz, 1H), 3.98 - 3.85 (m, 2H), 3.59 - 3.49 (m, 1H), 3.10 - 2.99 (m, 1H), 2.38 - 2.23 (m, 2H), 2.23 - 2.00 (m, 1H); **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃, rotámero 2) δ : 8.49 (d, J = 4.50 Hz, 1H), 7.91 - 7.85 (m, 2H), 7.85 - 7.79 (m, 1H), 7.38 (ddd, J = 6.83, 4.81, 1.91 Hz, 2H), 7.01 - 6.91 (m, 1H), 5.43 (d, J = 5.72 Hz, 1H), 4.06 (td, J = 11.68, 7.99 Hz, 1H), 3.59 - 3.49 (m, 1H), 2.97 - 2.89 (m, 1H), 2.38 - 2.23 (m, 2H), 2.23 - 2.00 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ : 168.1, 166.7, 160.4, 158.1, 155.0, 153.4, 153.1, 148.1, 147.2, 137.6, 136.9, 125.3, 125.1, 124.6, 123.8, 110.6, 110.4, 58.0, 55.8, 50.1, 46.7, 31.1, 28.0, 25.6, 22.0.



(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(fenil)metanona (M2-43). Partiendo de **121** (116 mg, 0.90 mmoles) y el ácido benzoico **124** (110 mg, 0.90 mmoles), se obtiene el producto como sólido (201 mg, 0.64 mmol, rendimiento: 71%, t_R 1.67 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.46). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₈H₁₆FN₃O: (m/z) 309.34; experimental [M+H] = 310.09. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.54 - 7.50 (m, 2H), 7.49 - 7.38 (m, 4H), 7.24 - 7.14 (bm, 1H), 6.96 (ddd, J = 9.48, 8.95, 2.46 Hz, 1H), 5.56 (dd, J = 7.95, 6.24 Hz, 1H), 3.63 (d, J = 5.99 Hz, 1H), 3.61 (d, J = 5.98 Hz, 1H), 3.10 (tdd, J = 13.01, 8.18, 6.60 Hz, 1H), 2.47 - 2.37 (m, 1H), 2.23 (pd, J = 12.21, 6.04 Hz, 1H), 2.02 - 1.90 (m, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 171.6, 160.5, 158.1, 154.9, 154.9, 135.7, 130.5, 128.3, 127.1, 110.7, 110.5, 54.9, 50.7, 28.3, 25.6.

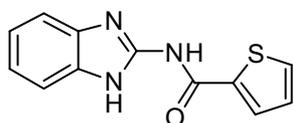


(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(o-tolil)metanona (M2-44). Partiendo de **121** (116 mg, 0.90 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (123 mg, 0.90 mmoles), se obtiene el producto sólido (237 mg, 0.73 mmol, rendimiento: 81%, t_R 1.80 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.43). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₉H₁₈FN₃O: (m/z) 323.36; experimental [M+H] = 324.10. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.59 - 7.35 (bm, 1H), 7.33 - 7.28 (m, 1H), 7.25 - 7.17 (m, 4H), 6.97 (ddd, J = 9.56, 8.87, 2.47 Hz, 1H), 5.57 (dd, J = 8.09, 4.08 Hz, 1H), 3.36 - 3.25 (m, 1H), 3.16 - 3.07 (m, 1H), 2.40 - 2.31 (m, 1H), 2.31 - 2.25 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.25 - 2.19 (m, 1H), 1.98 (pd, J = 12.67, 6.34 Hz, 1H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 171.8, 160.5, 158.1, 154.9, 136.3, 133.7, 130.6, 129.3, 125.9, 125.7, 125.4, 110.7, 110.4, 54.3, 49.4, 28.4, 26.8, 25.1, 18.8.



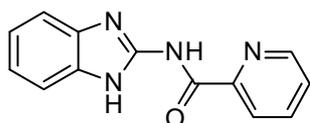
(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)pirrolidin-1-il)(3,4-difluorofenil)metanona (M2-45). Partimos de **121** (116 mg, 0.90 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (143 mg, 0.90 mmoles), se obtiene el producto sólido (265 mg, 0.75 mmol, rendimiento: 83%, t_R 1.95 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.43). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₈H₁₄F₃N₃O: (m/z) 345.32; experimental [M+H] = 346.08. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.47 - 7.36 (m, 2H), 7.33 - 7.27 (m, 1H), 7.24 - 7.13 (m, 2H), 6.94 (ddd, J = 9.53, 8.89, 2.47 Hz, 1H), 5.54 - 5.49 (m, 1H), 3.70 - 3.55 (m, 2H), 3.05 (tdd, J = 13.05, 8.15, 6.58 Hz, 1H), 2.41 (dt, J = 13.12, 7.01 Hz, 1H), 2.32 - 2.21 (m, 1H), 1.98 (pd, J = 12.58, 7.55, Hz, 1H).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 169.1, 160.5, 158.1, 154.5, 152.9, 152.8, 151.2, 151.1, 150.4, 150.2, 148.7, 148.6, 132.5, 132.4, 132.4, 124.1, 124.0, 124.0, 124.0, 117.5, 117.3, 117.1, 117.0, 110.8, 110.6, 55.2, 50.8, 28.5, 25.6.



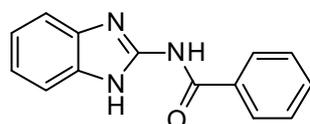
***N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)tiofeno-2-carboxamida (M2-46).**

Partiendo de **98** (250 mg, 1.88 mmoles) y el ácido tiofeno-2-carboxílico **122** (241 mg, 1.88 mmoles), se obtiene el producto como sólido (89.0 mg, 0.37 mmoles, rendimiento: 20%, t_R 1.87 min, pureza: 95%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.68). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{OS}$: (m/z) 243.05; experimental [M+H]= 244.22. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.31 (bs, 2H), 7.95 (d, J = 2.70 Hz, 1H), 7.80 (dd, J = 4.95, 1.01 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 5.91, 3.18 Hz, 2H), 7.18 (dd, J = 4.99, 3.71 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 5.92, 3.20 Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 141.4, 131.7, 130.0, 127.9, 121.7, 112.4.



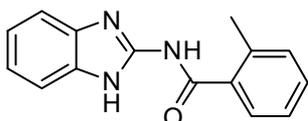
***N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)picolinamida (M2-47).**

Partiendo de **98** (250 mg, 1.88 mmoles) y el ácido picolínico **123** (232 mg, 1.88 mmoles), se obtiene el producto sólido (112 mg, 0.47 mmoles, rendimiento: 25%, t_R 1.37 min, pureza: 97%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.53). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$: (m/z) 238.09; experimental [M+H] = 238.93. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.28 (bs, 1H), 11.27 (bs, 1H), 8.78 (ddd, J = 4.71, 1.56, 0.86 Hz, 1H), 8.24 (td, J = 7.87, 1.04 Hz, 1H), 8.12 (dt, J = 7.74, 1.69 Hz, 1H), 7.74 (ddd, J = 7.54, 4.75, 1.17 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 5.92, 3.21 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 5.95, 3.19 Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 148.8, 138.2, 127.6, 122.6, 121.3.

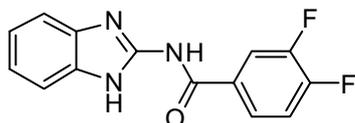


***N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)benzamida (M2-48).**

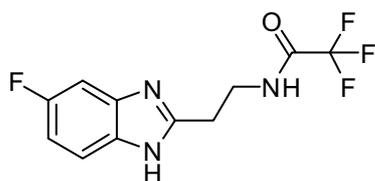
Partiendo de **98** (250 mg, 1.88 mmoles) y el ácido benzoico **124** (230 mg, 1.88 mmoles), se obtiene el producto como (221 mg, 0.93 mmoles, rendimiento: 50%, t_R 1.65 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.53). **MS (ES⁺)** calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$: (m/z) 237.09; experimental [M+H] = 237.92. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.33 (bs, 1H), 8.19 - 8.11 (m, 2H), 7.99 - 7.92 (m, 1H), 7.65 - 7.56 (m, 1H), 7.56 - 7.49 (m, 2H), 7.46 (dd, J = 5.90, 3.19 Hz, 2H), 7.14 (dd, J = 5.93, 3.19 Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 168.2, 167.2, 148.8, 134.3, 132.7, 131.8, 130.6, 129.1, 128.4, 128.2, 128.1, 121.4, 113.2.

**N-(1H-benzimidazol-2-il)-2-metilbenzamida (M2-49).**

Partiendo de **98** (250 mg, 1.88 mmoles) y el ácido 2-metilbenzoico **125** (256 mg, 1.88 mmoles), se obtiene el producto como sólido como una mezcla de dos rotámeros (334 mg, 1.33 mmoles, rendimiento: 71%, t_R 1.82 min, pureza: 98%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.73). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₅H₁₃N₃O: (m/z) 251.11; experimental [M+H] = 251.93. **¹H RMN** (400 MHz DMSO-d₆, rotámero 1) δ: 12.23 (bs, 2H), 7.61 (d, J = 6.61 Hz, 1H), 7.46 - 7.39 (m, 3H), 7.30 (dd, J = 13.90, 7.40 Hz, 2H), 7.10 (dd, J = 5.93, 3.20 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H); **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆, rotámero 2) δ: 12.23 (bs, 2H), 7.82 (d, J = 7.95 Hz, 1H), 7.46 - 7.39 (m, 3H), 7.30 (dd, J = 13.90, 7.40 Hz, 2H), 7.10 (dd, J = 5.93, 3.20 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 169.0, 147.0, 136.0, 135.0, 130.6, 130.3, 127.9, 125.5, 121.1, 19.6.

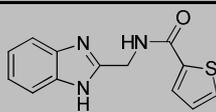
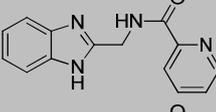
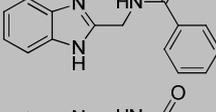
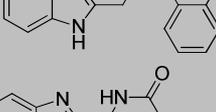
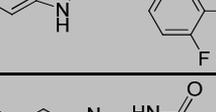
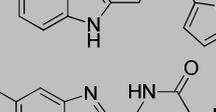
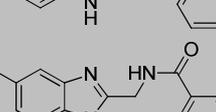
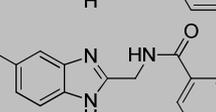
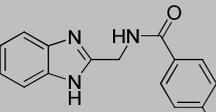
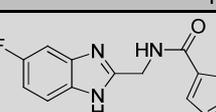
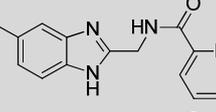
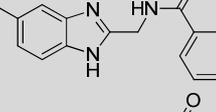
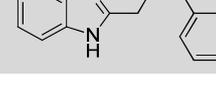
**N-(1H-benzimidazol-2-il)-3,4-difluorobenzamida (M2-50).**

Partiendo de **98** (250 mg, 1.88 mmoles) y el ácido 3,4-difluorobenzoico **126** (297 mg, 1.88 mmoles), se obtiene el producto como sólido (2.86 mg, 1.05 mmoles, rendimiento: 56%, t_R 2.18 min, pureza: >99%). (CCF: DCM/MeOH (95:5, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.63). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₄H₉F₂N₃O: (m/z) 273.07; experimental [M+H] = 273.98. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.41 (s, 1H), 8.11 (ddd, J = 11.62, 8.00, 2.05 Hz, 1H), 8.05 - 8.00 (m, 1H), 7.56 (td, J = 10.48, 8.35 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 5.92, 3.20 Hz, 2H), 7.17 (dd, J = 5.93, 3.19 Hz, 2H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 168.5, 152.8, 152.7, 150.8, 150.3, 150.2, 150.2, 150.1, 147.8, 147.7, 133.9, 133.8, 131.7, 125.7, 125.6, 125.6, 125.6, 122.0, 117.4, 117.3, 117.2, 117.1, 112.3.

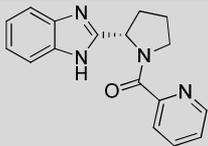
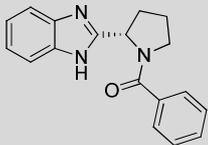
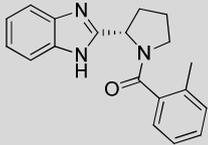
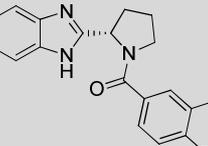
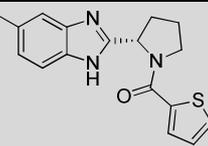
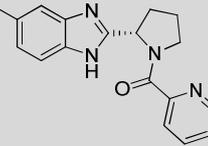
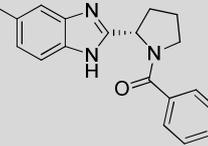
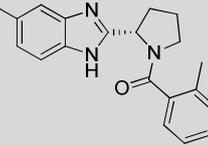
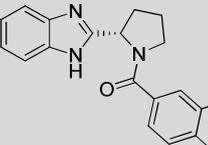
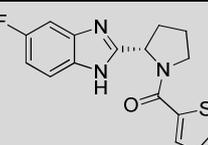
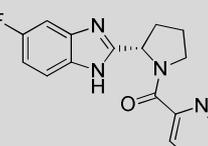
**2,2,2-trifluoro-N-(2-(5-fluoro-1H-benzimidazol-2-il)etil)acetamida (M2-51).**

En todas las reacciones que se ha utilizado el producto **115** se observa un subproducto que es aislado y purificado e incluido dentro de la librería para los ensayos biológicos. El subproducto se obtiene como un sólido de color blanco (65.2 mg, 0.24 mmoles, t_R 1.40min, pureza: 99%). (CCF: DCM/EtOH (9:1, v/v), UV= 254 nm, R_f = 0.66). **MS (ES⁺)** calculada para C₁₁H₉F₄N₃O: (m/z) 275.07; experimental [M+H] = 275.98. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.64 - 12.22 (s, 1H), 9.78 - 9.43 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 7.51 - 7.43 (dd, J = 8.7, 4.9 Hz, 1H), 7.32 - 7.26 (dd, J = 9.6, 2.4 Hz, 1H), 7.02 - 6.93 (ddd, J = 9.9, 8.9, 2.5 Hz, 1H), 3.69 - 3.60 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.08 - 3.01 (t, J = 7.3 Hz, 2H). **¹³C RMN** (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 161.0 (d, J_{C-F} = 1.9 Hz, 1C), 158.6 (d, J_{C-F} = 1.4 Hz, 1C), 151.7, 132.3, 128.5, 115.4 (d, J_{C-F} = 10.2 Hz), 113.8 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, 1C), 113.5 (d, J_{C-F} = 6.0 Hz, 1C), 100.6 (d, J_{C-F} = 27.5 Hz, 1C), 35.7, 24.8.

4.3.1 Resumen de la caracterización de la quimioteca de derivados del benzimidazol

Compuesto	Estructura	mg producto	Rend. (%)	M calc.	M exp. [M+H ⁺]	tR HPLC (min)	¹ Pureza (%) ($\lambda = 214 \text{ nm}$)
M2-03		94.7	82	257.06	258.02	1.33	99
M2-04		51.0	45	252.10	253.00	1.27	99
M2-05		79.6	70	251.11	251.99	1.43	99
M2-06		82.9	69	265.12	266.06	1.57	97
M2-07		100.0	77	287.09	288.05	1.62	>99
M2-08		157.0	93	271.08	271.97	1.53	99
M2-09		112.0	67	266.12	267.00	1.40	99
M2-10		147.2	89	265.12	266.06	1.53	>99
M2-11		83.5	48	279.14	280.07	1.72	99
M2-12		180.1	96	301.10	302.05	1.85	>99
M2-13		145	42	275.30	275.99	1.43	98
M2-14		165	49	270.26	271.02	1.35	97
M2-15		156	46	269.27	270.02	1.55	>99
M2-16		144	40	283.30	284.03	1.67	>99

M2-17		199	52	305.25	306.01	1.78	>99
M2-27		87.8	75	271.08	271.97	1.57	>99
M2-18		85.3	74	266.12	267.02	1.25	>99
M2-19		31.9	28	265.12	266.00	1.52	94
M2-20		80.6	67	279.14	280.09	1.52	99
M2-21		7.4	57	301.10	301.99	1.73	99
M2-22		100	87	285.09	286.04	1.58	97
M2-23		90	80	280.13	281.07	1.38	98
M2-24		106	94	279.14	280.07	1.70	99
M2-25		101	86	293.15	294.14	1.73	98
M2-26		101	80	315.12	316.06	1.88	97
M2-02		87.1	54	289.07	289.99	1.48	>99
M2-28		339	52	284.11	285.03	1.37	99
M2-29		84.3	53	283.11	283.96	1.57	96
M2-30		70.1	42	297.13	298.03	1.62	>99
M2-31		73.7	41	319.09	320.01	1.83	99
M2-32		271	79	297.37	298.03	1.42	98

M2-33		155	46	292.34	293.01	1.32	>99
M2-34		270	80	291.35	292.07	1.50	>99
M2-35		300	85	305.37	306.07	1,58	>99
M2-01		268	71	327.33	328.05	1.18	99
M2-36		185	65	311.40	312.10	1.62	99
M2-37		146	52	306.36	307.14	1.53	98
M2-38		190	68	305.37	306.13	1.65	99
M2-39		227	78	319.40	320.14	1.75	>99
M2-40		169	54	341.35	342.12	1.92	>99
M2-41		212	75	315.37	316.06	1.58	98
M2-42		154	55	310.33	311.10	1.45	>99

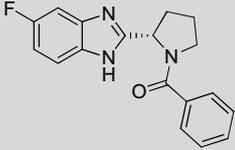
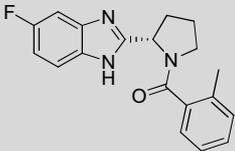
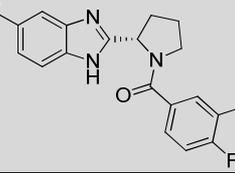
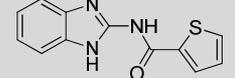
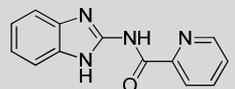
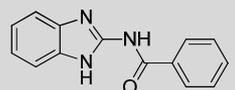
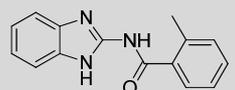
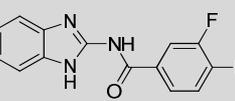
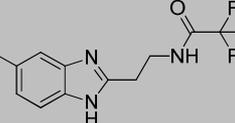
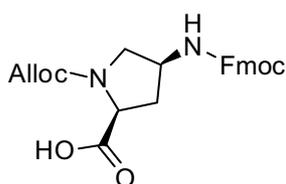
M2-43		201	72	309.34	310.09	1.67	98
M2-44		237	82	323.36	324.10	1.80	99
M2-45		265	85	345.32	346.08	1.95	98
M2-46		89	20	243.28	244.22	1.87	95
M2-47		112	25	238.24	238.93	1.37	97
M2-48		221	50	237.26	237.92	1.65	98
M2-49		334	71	251.28	251.93	1.82	98
M2-50		286	56	273.24	273.98	2.18	>99
M2-51		65.2	-	275.07	275.98	1.40	99

Tabla resumen de la caracterización de los compuestos que forman la quimioteca de derivados de benzimidazol. Los compuestos sintetizados por el Dr. Rob Hoen están marcados por un color del fondo de la figura más claro. ¹La pureza de los compuestos se determina a $\lambda = 214$ nm mediante RP-HPLC-MS analítico utilizando la columna XBridgeTM C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μ m), en condiciones ácidas (A: H₂O:HCOOH (99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH (99.3:0.7, v/v)) con un gradiente lineal de 5-100% B en 4.5 min a un flujo de 1ml/min.

5. Síntesis de la quimioteca de γ -péptidos derivados de la prolina

5.1 Síntesis del ácido (2S,4S)-4-Fmoc-amino-1-Alloc-pirrolidina-2-carboxílico

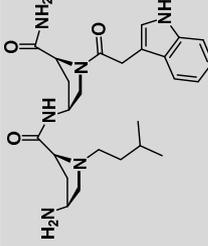
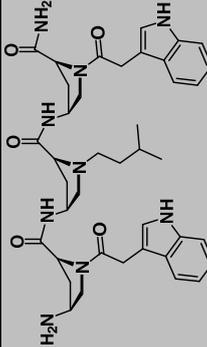
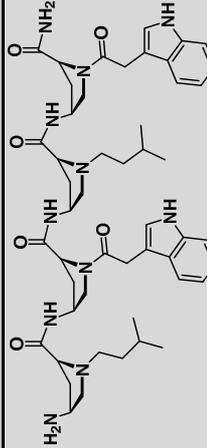


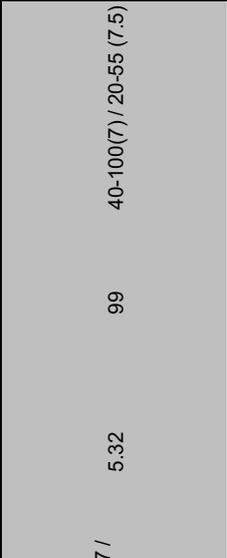
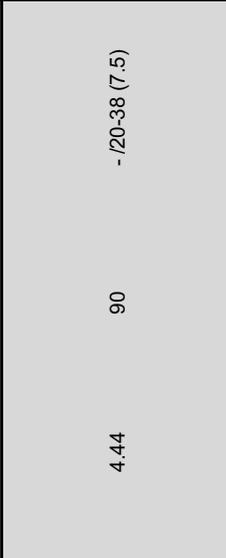
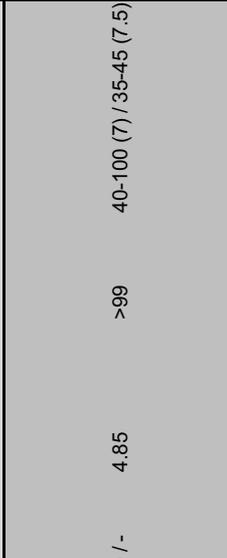
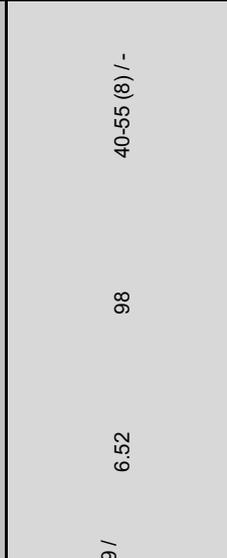
Fmoc-Amp(Alloc)-OH (129). Se disuelve el aminoácido comercial Fmoc-Amp(Boc)-OH **127** (3.00 g, 6.63 mmoles) en una solución de TFA/DCM (2:3, v/v) (50 ml) a t.a. durante 1 h hasta eliminar el grupo Boc. Se elimina el disolvente a sequedad, co-evaporando las posibles trazas restantes de TFA con 1,4-dioxano (2 x 20 ml). Seguidamente el crudo se disuelve en H₂O/1,4-dioxano (1:1, v/v) y se ajusta el pH a 9 con una solución saturada de NaHCO₃ (ac.) añadiendo cloroformiato de alilo (846 μ l, 8.00 mmoles), dejando la reacción a t.a. durante 4 h. Posteriormente se añade una solución acuosa de HCl (ac.) 1 M ajustando el pH a 4. Se extrae el producto con AcOEt (3 x 20 ml), se lavan las fracciones orgánicas con una solución saturada de NaCl (ac.), se secan con MgSO₄ (s) y después de filtrar la fase orgánica, ésta se seca en el rotavapor obteniendo un aceite espumoso. El crudo es purificado por cromatografía *flash* automatizada (ISCO-R_f; SiO₂, 120 g, DCM/DCM-MeOH-HCOOH (80:20:0.01 v/v), λ = 220 y 264 nm), (TLC: DCM/MeOH (4:1, v/v); λ = 254 nm; R_f= 0.70) obteniéndose el producto como sólido blanco (2.71 g, 94%, t_R 2.87 min, 85% pureza). **MS** (ES+) calculada para C₂₄H₂₄N₂O₆: (m/z) 436.16; experimental [M+H] = 437.18. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.74 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.54 (dd, *J* = 16.9, 6.9 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 5.99 - 5.80 (m, 1H), 5.37 - 5.21 (m, 2H), 4.68 - 4.56 (m, 2H), 4.55 - 4.45 (m, 1H), 4.34 (dd, *J* = 17.0, 8.5 Hz, 2H), 4.19 (dd, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 1H), 3.80 - 3.25 (m, 2H), 2.34 - 1.89 (m, 2H). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ : 174.6, 156.0, 143.9, 141.4, 132.1, 127.8, 127.2, 125.3, 120.1, 118.6, 67.2, 58.5, 53.5, 50.7, 47.2, 34.5.

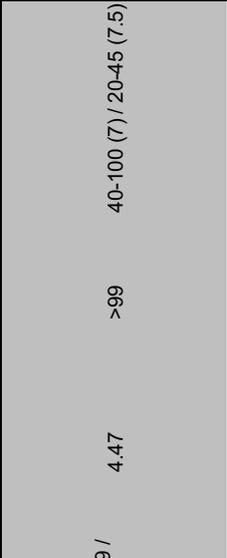
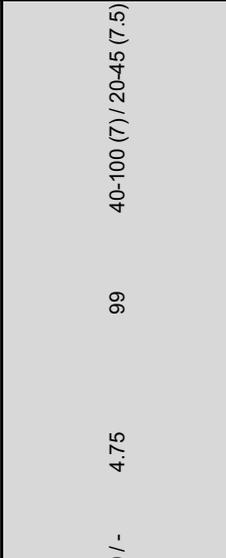
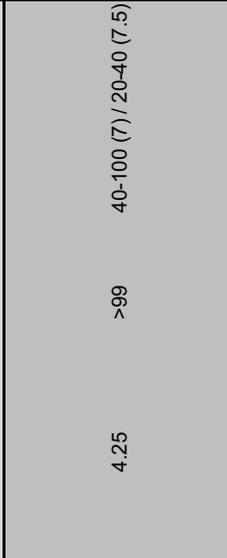
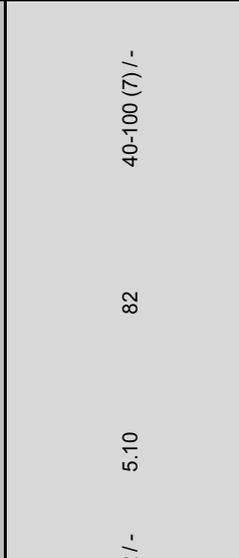
5.2 Síntesis de γ -péptidos en fase sólida

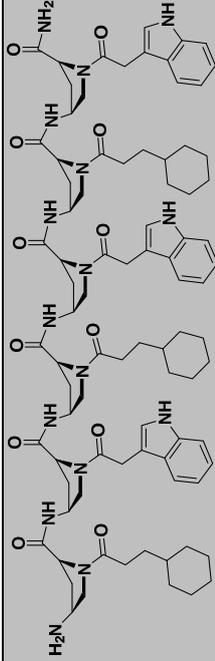
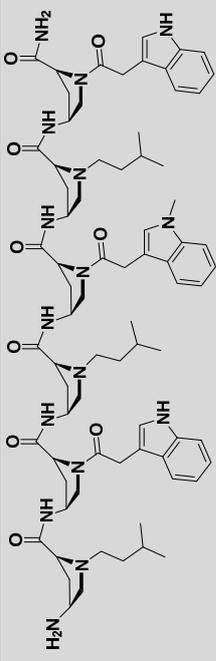
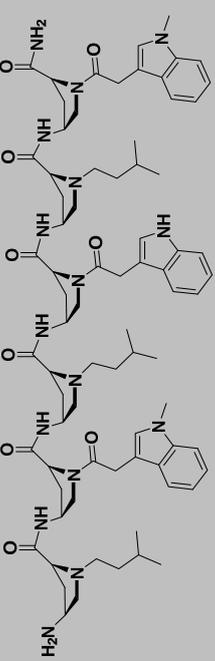
Los compuestos se sintetizan en fase sólida con una estrategia sintética basada en un esquema ortogonal con los grupos protectores fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) / *tert*-butoxycarbonilo (Boc) / alliloxicarbonilo (Alloc). Para la síntesis de los γ -péptidos de dicha quimioteca se han utilizado dos rutas sintéticas distintas, detalladas en el apartado 5.3.2 de dicha tesis. Los protocolos sintéticos utilizados en fase sólida se han detallado previamente en el apartado 1.4 de materiales y métodos.

5. 3. Caracterización de la quimioteca de γ -péptidos derivados de la prolina

Compuesto	Estructura	mg producto	M calc.	¹ M exp. [M+H ⁺] ⁺ / [M+Na ⁺] ⁺ [M+K ⁺] ⁺	² t _R HPLC (min)	³ Pureza (%) (λ = 214 nm)	⁴ Δ purif. (%ACN (min)) Básico / Ácido
P 37-2M		6.29	468.28	469.60 / - / -	4.35	98	15-70 (7) / -
P 37-3M		1.01	737.40	738.85 / 760.88 / 776.85	4.13	92	15-70 (7) / -
P 37-4M		1.27	919.54	921.07 / 943.11 / 959.0	4.58	91	40-100 (7) / -

<p>P 37-C</p> 	1.78	1412.85	1414.46 / 1436.47 / 1452.46	5.32	99	40-100(7) / 20-55 (7.5)
<p>P 37-D</p> 	2.06	1473.81	1475.43 / - / -	4.44	90	- / 20-38 (7.5)
<p>P 37-E</p> 	1.36	1412.81	1414.49 / 1436.49 / -	4.85	>99	40-100 (7) / 35-45 (7.5)
<p>P 37-F</p> 	1.24	1532.83	1534.48 / 1556.49 / 1572.48	6.52	98	40-55 (8) / -

 <p>P 37-5M</p>	<p>1.51 1188.66 1190.29 / 1212.29 / 1228.29 4.47 >99 40-100 (7) / 20-45 (7.5)</p>
 <p>P 37</p>	<p>1.73 1370.80 1372.49 / 1394.50 / - 4.75 99 40-100 (7) / 20-45 (7.5)</p>
 <p>RP 37</p>	<p>1.76 1370.80 1372.37 / - / - 4.25 >99 40-100 (7) / 20-40 (7.5)</p>
 <p>P 37-B</p>	<p>1.12 1412.85 1414.50 / 1436.52 / - 5.10 82 40-100 (7) / -</p>

 <p>P 37-G</p>	1.09	1574.88	1576.59 / 1598.56 / 1614.55	7.18	99	- /45-65 (8)
	1.94	1384.82	1386.44 / 1408.45 / -	4.97	88	- /30-40 (8)
	1.40	1398.83	1400.46 / 1422.48 / -	5.17	85	30-40 (8) / -
 <p>P 37-H</p>						
 <p>P 37-I</p>						

¹Masa experimental observada por MALDI-TOF. ^{2,3}La pureza de los γ -péptidos se determina a $\lambda=214\text{nm}$ mediante RP-HPLC-MS analítico utilizando la columna XBridge™ BEH 130 C₁₈ (4.6 x 100 mm, 3.5 μm) en condiciones ácidas (A: H₂O:HCOOH(99.9:0.1, v/v); B: ACN:HCOOH(99.3:0.7, v/v)) con gradiente lineal 5-100% B en 11 min a un flujo de 1ml/min. ⁴Gradiente utilizado para la purificación de los γ -péptidos mediante HPLC-MS-Prep utilizando la columna XBridge™ Prep BEH130 C₁₈ (19 x 100mm, 5 μm OBD™) en condiciones básicas(A: H₂O:NH₄CO₃ (20 mM, pH 9); B: ACN). Los productos con una pureza < 90% se repurificaron en condiciones ácidas (A: H₂O:TFA (99.9:0.1 v/v); B: ACN:TFA (99.9:0.1 v/v) utilizando un flujo de 16 ml/min en ambos casos. Los rendimientos de la síntesis en fase sólida no alcanzaron el 5%

6. Ensayos biológicos

6.1 Ensayos *in vitro*

6.1.1 Cultivo de eritrocitos humanos

La sangre usada en éstos ensayos fue cedida por el *Banc de Sang i Teixits (Generalitat de Catalunya, Departament de Salut)* y pertenece al grupo sanguíneo B⁺.

6.1.1.1 Lavado de eritrocitos (RBC)

Para cultivar los parásitos de *P. falciparum* así como para realizar los ensayos de hemólisis es necesario lavar la sangre no filtrada. Para evitar la degradación de los eritrocitos, mantener el cultivo de *P. falciparum* sano y el índice de invasión del parásito constante es importante utilizar sangre extraída recientemente. La sangre se almacena a 4 °C y caduca un mes después de ser extraída

Para proceder al lavado se centrifuga la sangre 10 min a 2300 rpm eliminando posteriormente por aspiración el plasma, los leucocitos y las plaquetas, reservando sólo los eritrocitos. Éstos, son resuspendidos en la solución de lavado y centrifugados nuevamente durante 10 min a 2300 rpm dos veces, la última de las cuales, se disminuye la velocidad de desaceleración del rotor para obtener dos fases perfectamente definidas. El sobrenadante es eliminado por aspiración y los eritrocitos limpios son resuspendidos con medio completo⁴ con un volumen igual al volumen del pellet obtenido. La solución adquirida de eritrocitos limpios al 50% de hematocrito, caduca a la semana de su preparación y debe almacenarse a 4 °C.

El medio completo utilizado para el cultivo *in vitro* de *P. falciparum* contiene; NaHCO₃, HEPES, gentamicina, Albumax II (*Lipid-Rich Bovine Serum Albumin*) e hipoxantina. Este medio se suplementa con L-glutamina a una concentración final 2 mM.

El medio incompleto, nombrado también solución de lavado, se obtiene filtrando bajo condiciones estériles una solución que contiene 10.4 g/l de RPMI 1640 (con L-glutamina pero no NaHCO₃) y 5.95 g/l Hepes. Se ajusta el pH de la solución a 7.4 con NaOH (ac.) 10 M.

6.1.1.2 Ensayo hemolítico con eritrocitos humanos

La solución de hematocrito al 3% obtenida según el procedimiento anterior, se lava 3 veces con una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) 1 M (5 min a 1500 rpm). El ensayo se lleva a cabo, en condiciones estériles, en una placa de 96 pocillos utilizando un volumen final de 200 µl por pocillo (198 µl de la solución de eritrocitos al 3% en PBS + 2 µl del compuesto). La actividad hemolítica de los compuestos se estudia a distintas

concentraciones y por triplicado. Utilizando como blanco 200 μl de la solución de eritrocitos al 3% en PBS; como control negativo 198 μl de la solución de eritrocitos al 3% en PBS + 2 μl del disolvente a una concentración final $< 1\%$ y como control positivo 198 μl de la solución de eritrocitos al 3% en PBS + 2 μl de Triton X-100. Después de 3 horas de incubación a 37 °C y 5% CO_2 , se traspasan las muestras en *ependorfs* y se centrifugan 5 min a la máxima velocidad. Se transfieren 150 μl del sobrenadante a una placa nueva de 96 pocillos para medir la absorbancia con espectrofotómetro de microplacas *Power Wave X* (software *KC Junior*) a $\lambda = 570 \text{ nm}$.

6.1.2 Cultivo de *Plasmodium falciparum*

El medio completo utilizado para el cultivo de *P. falciparum* se adquirió en la casa comercial Invitrogen así como la L-glutamina y el marcador fluorescente SYTO[®]11. HEPES y D-sorbito fueron obtenidos en Aldrich y RPMI 1640 en Gibco[®]. El PBS fue comprado en Life Technologies, los portaobjetos *Start Frost Blanc 45* en Deltalab y las placas estériles de 96 pocillos en Labclinics. Las capsula de petri pertenecen a la casa comercial Falcon[™] mientras que las cámaras de incubación son de Billups-Rothenberg.

6.1.2.1 Cepa de *P. falciparum*

La cepa 3D7A es la utilizada en los ensayos *in vitro* llevados a cabo. Esta cepa se caracteriza por tener un índice de invasión de eritrocitos de 7.4 en cada ciclo. Dicha cepa procede de una clonación de la línea parasitaria 3D7 que ha sido mantenida en cultivos durante años⁵.

6.1.2.2 Mantenimiento básico del cultivo de *P. falciparum*

El *P. falciparum* se cultiva siguiendo el procedimiento general descrito⁴ en 1976. El parásito se cultiva en placas manteniendo las condiciones atmosféricas de las cámaras de cultivo con concentraciones bajas de oxígeno; 92% N_2 , 5% CO_2 y 3% O_2 en incubadoras a 37 °C suplementadas con un 5% de CO_2 .

Los cultivos se mantienen con un hematocrito del 3%, sosteniendo la parasitemia por debajo del 15% de esquizontes, mediante diluciones con eritrocitos recién lavados. El medio del cultivo se substituye cada dos días, siendo necesario hacerlo a diario con cultivos altamente poblados (parasitemia $> 3\%$ de esquizontes).

6.1.2.3 Sincronización del cultivo de *P. falciparum* con sorbitol⁶

El cultivo se sincroniza mediante hemólisis con una solución al 5% de D-sorbitol en PBS, que actúa sobre los eritrocitos que contienen estadios avanzados del parásito, dejando intactos los eritrocitos sanos y aquellos infectados con trofozoítos inmaduros denominados anillos o *rings*.

Se centrifuga el cultivo 5 min a 1500 rpm y se elimina mediante aspiración el sobrenadante. Seguidamente se resuspende el pellet con la solución del 5% de D-sorbitol en PBS, utilizando un volumen siete veces superior al volumen del pellet obtenido. Después de incubar a 37 °C durante 7 min, se centrifuga 4 min a 1500 rpm. Una vez retirado el sobrenadante se lava el pellet con la solución de lavado (10 ml), se centrifuga 5 min a 1500 rpm y se resuspende el pellet en medio completo restableciendo el cultivo de nuevo.

6.1.2.4 Preparación de portaobjetos y tinción con Giemsa

Para la preparación del portaobjetos se resuspende el cultivo y se centrifugan ~ 200 µl en un *ependorf* durante 30 seg. a la máxima velocidad de la centrífuga. Se elimina el sobrenadante, y se prepara el frotis con 3 µl del pellet de eritrocitos previamente agitados. Se deja secar el portaobjetos al aire antes de fijar brevemente con MeOH, decantando el exceso, sin dejar que se seque del todo. Seguidamente se tiñe la muestra durante 10 min con una disolución recién preparada de Giemsa/*Sorenson's* (1:10). Posteriormente se lava el portaobjetos con abundante H₂O y se seca al aire.

La solución tampón *Sorenson's* se prepara disolviendo Na₂HPO₄ (3 g/l) y KH₂PO₄ (0.6 g/l) y se ajusta el pH a 7.2 con una solución de KH₂PO₄ (ac) 1 M. La solución se almacena a temperatura ambiente.

6.1.2.5 Determinación de la parasitemia del cultivo de *P. falciparum*

En el transcurso de ésta tesis se ha determinado la parasitemia del cultivo de *P. falciparum* utilizando tres técnicas distintas:

a) Análisis mediante microscopia óptica

El crecimiento del cultivo se monitorea examinando los portaobjetos con un microscopio óptico Olympus BX41[®]. Con el objetivo de 10x, se localiza un campo homogéneo que no esté ni excesivamente ni escasamente poblado. Para determinar la densidad de parásitos en esa zona, se aumenta la imagen utilizando aceite de inmersión y el objetivo 100x. Para calcular la parasitemia se contabiliza por un lado el número total de eritrocitos dentro de una celda de conteo y por otro el número de eritrocitos infectados de como mínimo seis campos distintos con características poblacionales similares. Hay que tener en cuenta el estadio en que se encuentra el parásito para el conteo de eritrocitos infectados. La parasitemia se da en tanto por ciento y se calcula utilizando la siguiente formula;

$$P(\%) = \frac{\bar{N}^{\circ} \text{eritrocitos infectados}}{3.25 \times N^{\circ} \text{eritrocitos totales}} \times 100$$

Siendo 3.25 un factor que depende del microscopio utilizado.

b) Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)⁷

Todos los ensayos para determinar la actividad de la pLDH han sido elaborados por Noelia Camacho en el laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona.

Para analizar la parasitemia presente en las muestras, se transfiere una alícuota de 20 μ l del cultivo a una placa de 96 pocillos. Se añaden 100 μ l del reactivo de *Malstat* y se incuba la placa a t.a. durante 15 min. Posteriormente se añaden simultáneamente 10 μ l de una solución acuosa de cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) (2 mg/ml) y 10 μ l de una solución acuosa de etosulfato de fenazina (PES) (0.2 mg/ml). Se incuba la placa durante 30 min protegiéndola de la luz. Posteriormente se para la reacción añadiendo 100 μ l de AcOH_(ac.) al 30%. Se cuantifica la formación de sales solubles de formazán, que está directamente relacionada con la actividad de la pLDH y la parasitemia del cultivo, mediante un espectrofotómetro de microplacas *Power Wave X* (software *KC Junior*) a $\lambda = 590$ nm.

El reactivo de *Malstat*, es una solución de lisis que contiene; Triton X-100 (2 ml/l), lactato de litio (20 g/l), APAD (110 mg/l) y solución TBS 1M (6.6 g/l), ajustando el pH a 9 con NaOH_(ac.) 1M.

La solución amortiguadora Tris (TBS) se prepara disolviendo tris(hidroximetil)aminometano (Tris-Cl) (6.05 g/l) y NaCl (8.76 g/l) en H₂O, ajustando el pH a 7.5 con HCl_(ac.) 1 M.

c) Citometría de flujo

La citometría de flujo fue llevada a cabo por los servicios científicos y técnicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB) utilizando el equipo *Beckman Coulter FC500-MPL* para la lectura de placas de 96 pocillos (200 μ l de muestra por pocillo) o bien el equipo *Epics XL* para muestras individuales (1 ml de muestra). El marcador fluorescente de ADN utilizado para la detección de los parásitos fue SYTO[®]11 a $\lambda = 508$ nm excitando las muestras a $\lambda = 488$ nm con un laser iónico estándar de argón a 15 mW.

Para analizar las muestras, se diluyen los cultivos 1/100 en PBS 1 M, añadiendo 1 μ l de una solución 5 mM de SYTO[®]11 en DMSO a t.a. analizando los resultados con el software *Summit v4.3*. Este método permite detectar selectivamente los glóbulos rojos infectados que se encuentran en el estadio de anillo o *ring* del parásito descartando aquellos con estadios más avanzados, hecho que proporciona una lectura más exacta de la parasitemia. Ésta se expresa como el número de células infectadas por cada 100 eritrocitos, utilizando como referencia la lectura del control negativo y del blanco.

6.1.2.6 Ensayo de inhibición del crecimiento del cultivo de *P. falciparum*

En condiciones estériles y después de sincronizar el cultivo, se preparan dos solución al 3% de hematocrito: solución A al 1% de parasitemia y solución B al 0.1% de parasitemia (1:10 de la solución A).

El ensayo se lleva a cabo en dos placas de 96 pocillos, una para cada solución, utilizando un volumen final de 100 μ l por pocillo (98 μ l de la solución + 2 μ l del compuesto). Se utiliza como blanco del ensayo 100 μ l de una solución al 3% de eritrocitos sanos; como control negativo 98 μ l del cultivo + 2 μ l del disolvente a una concentración final < 1% y como control positivo 98 μ l del cultivo + 2 μ l de una solución 250 mg/ml de borrelidina.

Las placas se incuban en condiciones normales durante 48 horas (placa con solución A) y 96 horas (placa con solución B). Los compuestos se analizan a distintas concentraciones y por triplicado. Se determina la parasitemia de cada muestra por duplicado.

6.1.2.7 Calculo de la IC₅₀

Se calculó la IC₅₀ de los compuestos con el software *Prism GraphPad* a través de curvas de dosis-respuesta con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición del crecimiento del *P. falciparum*.

6.1.2.8 Ensayos de aminoacilación de ARS de *P. falciparum*

Los ensayos de Lisil-aminoacilación fueron elaborados por la Dra. Eva Novoa y Noelia Camacho en el laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona, mientras que los relativos a las enzimas Tyr, Asp y Asn fueron realizados por Dra. Joëlle Rudinger-Thirion del departamento de *Architecture et Réactivité de l'ARN* en el *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg* (CNRS).

Las enzimas Asp, Tyr y Asn ARNt sintetasas de *P. falciparum* utilizadas para estos ensayos fueron clonadas, expresadas y purificadas según el protocolo habitual del laboratorio de CNRS⁸, mientras que la enzima Lisil-ARNt apicolastica de *P. falciparum* (PfKRS-2) se obtuvo por el protocolo llevado a cabo en el laboratorio de IRB⁹.

El ensayo de aminoacilación se realiza a 37 °C añadiendo una alícuota del compuesto a evaluar a las soluciones optimizadas para cada ARNt sintetasa:

- TyrRS; 50 mM Tris-HCl (ac.) (pH 8.0), 20 mM KCl (ac.), 2 mM ATP (ac.), 1 mM MgCl₂ (ac.), 10 mM DTE (ac.), 10 μ M de [¹⁴C]-tirosina y 1 μ M de Tyr-ARNt.
- AspRS; 100 mM Hepes-KOH (ac.) (pH 7.4), 3 mM MgCl₂ (ac.), 0.5 mM ATP(ac.), 15 mM KCl (ac.), 10 μ M de [¹⁴C]-aspártico y 1 μ M de Asp-ARNt.

- AsnRS; 50 mM HEPES·KOH_(ac.) (pH 7.2), 10 mM MgCl_{2(ac.)}, 2 mM ATP_(ac.), 30 mM KCl_(ac.), 10 μM de [¹⁴C]- asparagina y 1 μM de Asn-ARNt.
- LysRS; 100 mM de HEPES·KOH_(ac.) (pH 7.2), 20 mM de KCl_(ac.), 30 mM de MgCl_{2(ac.)}, 0.5 mM de DTT_(ac.), 5 mM (0.1 mg/ml en BSA) de ATP, 20 μM de [³H]-lisina (500 Ci/mol) y 5 μM de Lys-ARNt.

Para evaluar la aminoacilación se aplican alícuotas de la mezcla de la reacción (15 μl) sobre filtros *Whatmann* de 3 mm a distintos tiempos. Los filtros se lavan tres veces con ácido tricloroacético_(ac.) al 5%. La radioactividad se determina con un equipo de *liquid scintillation counting*.

Se siguió el mismo protocolo para valorar la aminoacilación de Lys-ARNt humana (HsKRS) utilizando transcripciones *in vitro* de *H. Sapiens* Lys-ARNt e añadiendo 5 μl de extractos de células humanas HEK 293T. Para la aminoacilación de la Lys-ARNt sintetasa citosólica de *P. falciparum* (PfKRS-1) se utilizaron transcripciones *in vitro* de *P. falciparum* Lys-ARNt y 5 μl de extractos del parásito.

Se evaluaron los compuestos por duplicado a distintas concentraciones, utilizando como blanco un ensayo con la enzima purificada sola es decir sin ARNt ni compuesto. Como control negativo se utilizó la enzima correspondiente y el disolvente, y como control positivo la enzima y el ARNt.

6.1.3 Cultivo de células humanas HEK 293T

Las células HEK 293T se adquirieron en el laboratorio de *Traducció genètica* del *Instituto de Recerca Biomèdica (IRB)* de Barcelona. El medio de cultivo DMEM, la solución de 0.05% de tripsina en EDTA, la solución al 0.4% de azul de tripano y el equipo *Countess Automated cell counting* fueron adquiridos en Life Technologies. Las placas de cultivo se obtuvieron en Labclinics mientras que la solución al 20% de dodecilsulfato de sodio en H₂O (SDS) se compró en Aldrich. El reactivo WST-1 para la cuantificación de la proliferación celular fue adquirido en la casa comercial Roche.

6.1.3.1 Mantenimiento del cultivo de HEK 293T

Las células HEK 293T (células renales embrionarias humanas) se cultivan en condiciones estériles, utilizando el medio comercial DMEM (con un alto contenido en glucosa y piruvato) en incubadoras suplementadas con 5% CO₂ a 37 °C.

Para despegar las células adheridas a la placa de petri, se elimina el medio por aspiración y se lavan las células con PBS 1 M. Se añaden una solución del 0.05% de tripsina en EDTA (volumen 1:5 de la capacidad de la placa), dejándolo actuar de 2 a 5 min a 37 °C.

Seguidamente se añaden 10 ml de medio y se recogen las células para ser contadas, trasplantadas y/o diluidas.

El número de células del cultivo se calcula de forma automática con el equipo *Countess Automated cell counting*. Se mezclan 10 μl del cultivo con 10 μl de una solución al 0.4% de azul de tripano. Para hacer la lectura de la muestra, se introducen 10 μl de la mezcla resultante en un portaobjetos específico para el equipo que calcula el número de células viables por ml.

6.1.3.2 Ensayo de citotoxicidad con células HEK 293T

Se incuban las células HEK 293T en condiciones normales durante 24 horas en 3 placas de 96 pocillos a una concentración de 0.5×10^5 células/ml y un volumen final de 100 μl . Posteriormente se añaden a distintas concentraciones y por triplicado los compuestos a estudiar (2 o 5 μl según el ensayo) y se incuban las células.

Se utiliza como blanco 100 μl del cultivo; como control negativo 98 o 95 μl del cultivo + 2 o 5 μl del disolvente a una concentración final < 1% y como control positivo 98 μl del cultivo + 2 μl de la solución al 20% de SDS.

Para determinar la proliferación de las células pasadas 24, 48 y 72 horas de la adición de los compuestos, se añaden 10 μl del reactivo WST-1 (dilución final 1:10 por pocillo). Una vez añadido el WST-1, se incuba la placa protegiéndola de la luz y leyendo la absorbancia de las muestras a las 2, 3 y 4 horas posteriores al tratamiento. Durante este periodo de incubación, las enzimas mitocondriales deshidrogenasa de las células viables convierten el WST-1 en sales solubles de formazán que se cuantifican mediante un espectrofotómetro de microplacas *Power Wave X* (software *KC Junior*) a $\lambda = 460 \text{ nm}$.

6.1.4 Cultivo de *Escherichia coli*

La cepa de *E. Coli* utilizada se obtuvo en Merck mientras que el medio LB (*Lennox Broth*) en Conda. La tetraciclina y la ampicilina utilizadas se obtuvieron en la casa comercial Aldrich.

6.1.4.1 Cepa de *E. Coli*

La cepa de la bacteria *E. Coli* utilizada fue NovaBlue® Gigasingles de genotipo *endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10 (Tc^R)]*.

6.1.4.2 Medio de cultivo LB (Luria Bertani) para *E. Coli*

El medio líquido utilizado para cultivar *E. Coli* se prepara disolviendo 20 g del preparado LB (*Lennox Broth*) en 1 l de H₂O destilada. El preparado LB (*Lennox Broth*) contiene 10 g de triptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura. La solución se autoclavó durante 15 min a 121 °C para esterilizarla. El medio se puede conservar a 4 °C durante una semana.

6.1.4.3 Ensayo de inhibición de la proliferación de *E. Coli*

Se cultiva en una incubadora (*Infors AG CH-4103 BOTTMINGEN*) con agitación orbitálica constante a 37 °C durante una noche *E. Coli* en el medio líquido LB con tetraciclina (1/1000 del volumen total de cultivo). Posteriormente se utiliza el espectrómetro *UV-mini 1240* (Shimadzu) para conocer la densidad de 1 ml del cultivo mediante la lectura de absorbancia a $\lambda = 600$ nm, utilizando el medio LB como blanco. Se diluye el cultivo con LB hasta obtener una densidad de 0.05 g/cm³ y se añade nuevamente la parte proporcional de tetraciclina.

El ensayo se lleva a cabo, en condiciones estériles, en una placa de 96 pocillos utilizando un volumen final de 100 μ l por pocillo (98 μ l de cultivo + 2 μ l del compuesto). Se utiliza como blanco 100 μ l del cultivo con tetraciclina; como control negativo 98 μ l del cultivo con tetraciclina + 2 μ l MeOH y como control positivo 100 μ l del cultivo sin tetraciclina + 0.1 μ l de ampicilina.

Se evalúa la actividad inhibitoria de la proliferación de *E. Coli* de los distintos compuestos, por triplicado a distintas concentraciones mediante lecturas de absorbancia a $\lambda = 600$ nm. La curva del crecimiento del cultivo se obtiene mediante los valores de absorbancia registrados cada 30 min durante 6 horas con un espectrofotómetro de microplacas *Power Wave X* (software *KC Junior*) con agitación constante a 37 °C.

6.1.4.4 Ensayos de aminoacilación con ARS de *E. coli*

Los ensayos de aminoacilación de Gln-ARNt de *E. Coli* fueron elaborados por Shirin Fatma del *Department of Chemistry* en *Wayne State University* de Detroit.

El ARNt^{Gln} se desnaturaliza a 75 °C durante 5 min antes de naturalizarlo de nuevo con una solución 8 mM de MgCl₂ (ac.) a 65 °C, dejando que la mezcla se enfríe hasta llegar a t.a. Posteriormente, se añade una alícuota del compuesto a evaluar y la solución de ARNt es incubada a 37 °C con 40 mM de Hepes·OH (pH 7.5), 4 mM de ATP, 8 mM de MgCl₂ (ac.), 200 μ M de glutamina, 50 μ Ci/mL de [³H] glutamina y 1 μ M *E. coli* GlnRS.

Una vez se inicia el ensayo, añadiéndole a la solución el compuesto a evaluar, se extraen alícuotas de la mezcla de reacción (10 μ l) a diferentes tiempos, depositándolas sobre papel de filtro saturado con ácido tricloroacético (TCA). Los filtros se lavan tres veces con una solución fría al 5% de TCA (ac.). La cantidad de pmoles de ³H-Gln-ARNt^{Gln} generada

por la enzima es determinada con un equipo de *liquid scintillation counting* detectando la radioactividad.

Se determina la actividad inhibitoria de los compuestos a distintas concentraciones y tiempos. Se utiliza como blanco del ensayo la solución + H₂O y como control negativo se evalúa la aminoacilación de la enzima sólo con el sustrato natural, es decir sin añadirle el compuesto a ensayar.

6.2 Ensayos *in vivo*

6.2.1 Evaluación de toxicidad de los compuestos con *zebrafish*¹⁰ (*Danio Reiro*)

Los ensayos de toxicidad con el modelo *zebrafish* (cepa AB), fueron realizados por Pedro Vieira y Ana Raquel Soares (*RNA Biology Laboratory, Department of Biology and Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), University of Aveiro, Portugal*) acorde con la ley Europea para la experimentación animal (2010/63/EU).

Los embriones fertilizados (250 por placa) se mantuvieron a 28 °C en condiciones estándar¹¹. Después de ser examinados con un microscopio estereoscópico, se seleccionaron aquellos que mostraban un desarrollo normal. Los embriones se distribuyeron en distintas placas de petri con 20 ml de las disoluciones acuosas de los compuestos a ensayar. Los compuestos se disolvieron previamente a una concentración madre 1 mM en MeOH o DMSO ajustando el pH a 7. Se estudiaron distintas concentraciones para cada compuesto, basándose en las IC₅₀ calculadas *in vitro* para *P. falciparum*, utilizando 2 replicados (10 embriones cada uno) en cada experimento.

Se analizaron los cambios morfológicos a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se utilizó la concentración más elevada de MeOH y DMSO utilizada para disolver las muestras como control negativo.

6.2.2. Evaluación de la actividad antimalárica de los compuestos en modelos murinos

Los ensayos *in vivo* con modelos murinos fueron realizados por Patricia Marín del departamento de bioquímica y biología molecular IV en la Universidad Complutense de Madrid.

Se utilizó la cepa de *Plasmodium yoelii* 17XL (*Py17XL*) MRA-267 facilitada por *Malaria Research and Reference Resource Center*, siendo cultivada en sangre de murinos y almacenada con nitrógeno líquido.

El ensayo se llevó a cabo con ratones hembras, de 6 a 8 semanas de edad, de la cepa BALB/cAnNHsd adquiridas en *Harlan Laboratorie* y criadas en condiciones normales de luz y temperatura en el estabulario de la Universidad Complutense de Madrid. Los roedores fueron alimentados con una dieta comercial *ad libitum*. Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo acorde con las leyes nacionales e internacionales de ética y experimentación con animales.

Para ensayar la actividad antimalárica *in vivo* se siguió el siguiente procedimiento¹²; los ratones fueron inoculados con 2×10^7 eritrocitos murinos infectados por *Py17XL*, mediante una inyección intraperitoneal. El tratamiento empieza a las dos horas de la infección, momento en que se administra la primera dosis del compuesto a experimentar. El tratamiento sigue durante los 3 días posteriores, inyectando la misma dosis cada 24 horas. Se observa la evolución de la infección a diario examinando la sangre con el método de tinción de Wright.

Los compuestos a analizar son preparados, a la dosis adecuada, en soluciones acuosas con un 7% de Tween-80 y un 3% de EtOH, inyectando H₂O al grupo control.

Referencias

- ¹ Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides". *Anal Biochem* **1970**, *34*, 595-598.
- ² Christensen, T. "A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil", *Acta Chemica Scan, Series B: Org Chem and Biochem*, **1979**, *33*, 760-766.
- ³ Konishi, M.; Nishio, M.; Saitoh, K.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. *J Antibiot*, **1989**, *42*, 1749-1755.
- ⁴ Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **1976**, *193*, 673-675.
- ⁵ Rosario, V. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*, **1981**, *212*, 1037-1038.
- ⁶ Lambros, C.; Vanderberg, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, **1979**, *65*, 418-420.
- ⁷ Makler, M. T.; Hinrichs, D. J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg*, **1993**, *48*, 205-210.
- ⁸ Bour, T; Akaddar, A.; Lorber, B.; Blais, S.; Balg, C.; Candolfi, E.; Frugier, M. Plasmodial aspartyl-tRNA synthetases and peculiarities in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, **2009**, *284*, 18893–18903.
- ⁹ Geslain, R.; Aeby, E.; Guitart, T.; Jones, T. E.; Castro de Moura, M.; Charriere, F.; Schneider, A.; Ribas de Pouplana, L.. Trypanosoma seryl-tRNA synthetase is a metazoan-like enzyme with high affinity for tRNA Sec. *J Biol Chem*, **2006**, *281*, 38217-25.
- ¹⁰ Rubinstein, A. L. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **2006**, *2*, 2.
- ¹¹ Kimmel, C. B., et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, **1995**, *203*, 253-310.
- ¹² Moneriz, C.; Marín-García, P.; Bautista, J. M.; Diez, A.; Puyet, A. Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Malaria Journal*, **2011**, *10*:103.