

**“SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS  
ANÁLOGOS A PRODUCTOS  
NATURALES COMO POTENCIALES  
ANTIPARASITARIOS”**

CATHERINE FAGUNDEZ

Montevideo

2018



# “SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS ANÁLOGOS A PRODUCTOS NATURALES COMO POTENCIALES ANTIPARASITARIOS”

Trabajo presentado por la Q.F. Catherine Fagundez para aspirar al título de doctorado.

Directora: Dra. Gloria Serra

Co-Director: Dr. Diver Sellanes.

Tribunal: Dr. Williams Porcal, Dra. Margarita Brovetto, Dr. Rafael Guido.

Laboratorio de Química Farmacéutica

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química, Udelar

Abril, 2018





*“Limitar nuestra atención a cuestiones terrestres sería limitar el espíritu humano. El mayor enemigo del conocimiento no es la ignorancia, sino la ilusión del conocimiento”*

***Stephen Hawking***



# AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos institucionales:

A Facultad de Química, CSIC, PEDECIBA, ANII, Embajada Británica y UDEPI (Unidad de Propiedad Intelectual)

A mi tutora Gloria, por todo lo que me ha enseñado en este tiempo, desde los conocimientos en química, en el laboratorio, en la persistencia que es necesaria para investigar, a no bajar los brazos cuando no te salen las cosas y buscarle la vuelta para que marchen, por mostrarme las cosas positivas cuando no se ven a simple vista. Por ser un ejemplo de dedicación, compromiso y entusiasmo por lo que se quiere.

A Diver por haberme introducido en toda la fase sólida, por aparecerse siempre con las breaking news de fase sólida y hacer que cosas complicadas parezcan fáciles.

A Danilo por transmitirme una partecita de los kilos que sabe de cromatografía con la mayor paciencia del mundo y permitirme conocer un poco más de la docencia con lo que he aprendido mucho. No me puedo olvidar de agradecer los chistes cuando el tema central de conversación es la depilación.

A Eduardo por llenarnos de sabiduría y ayudarnos con los problemas cuando no le veíamos la vuelta, y caer con siempre con algún chiste pese a su intensa agenda diaria. A Graciela y Laurita por ayudarme muchas veces con química, por los chistes en el laboratorio, y por enseñarme muchas cosas mostrando siempre entusiasmo en lo que hacen.

A Miriam Royo, Steve Ley, Ernesto Mata y Carina Delpiccolo por haberme recibido en su laboratorio durante las pasantías, permitiendo adquirir conocimientos importantes en el área en el que cada uno es especialista y que fueron de gran utilidad para este trabajo. A toda la gente que me ha recibido de manera super amable en las pasantías que he hecho, con las que compartí momentos muy lindos y grandes aprendizajes, un regalo de trabajo.

A Andrea Medeiros y Marcelo Comini del Instituto Pasteur, Vanessa Yarley, Lindsay Stewart y Simon Croft de LSHTM, Anna Caroline Aguiar y Rafael Guido del Instituto de Física de Sao Paulo, a Medicines for Malaria Venture, por todos los ensayos biológicos.

A Horacio, Vero, Guille y Caro por los RMN, a Alejandra Rodriguez y su grupo por los HRMS y a Madelón Portela del grupo de UByPA por los MALDI-TOF.

A la compañeros de orgánica, que siempre están para dar una mano, por ser un grupo hermoso de gente que solo suma!

De la gente del lab, podría ocupar muchas hojas y quedarme corta. Pero quiero agradecer a todos y cada uno de los que ha llegado hace poco o ha pasado corto tiempo por acá, porque

lo han hecho valer, Anderson “Silva”, Lucía, Leo, Pablosss, Maria, Valentina, Nati, Diego, Franco, Ramiro...

A Vero porque resultó ser una excelente amiga! de estas que están en todo, que buscan lo mejor por el otro, que te dan lo que tienen para comer aunque no tenga otra banana y no le puedas salir a comprar una galletita.

A Chelo que pese a que no le puedes contar chusmerios porque hace que se enteré el Papa, sabe escuchar y dar muy buenos consejos, un ejemplo de cómo hay que llegar a los... entrenando todos los días como un botija de 20, entusiasmándome a querer correr todas las carreras.

A Carlitos y Jaime que me han apoyado siempre, dando para adelante todo el tiempo y mostrando que la noche tiene su templo! A Stella por compartir todos esos dilemas que nos hacían pensar en las disyuntivas de la vida y por compartir tantos ratos en el lab.

A Martín y Laura que han sido los mejores compañeros para despedir los sucesivos años, incluyendo bajadasss!!! Muy buenos ejemplos de que ser buen químico y el consumo de altas cantidades de cerveza es compatible.

A Ceci y Guille que me han enseñado pila con la montaña de conocimiento que cargan, además de ser los grandes tutores en el laboratorio (junto con Carlitos). Por ser excelentes personas siempre, por aportar el mejor humor al laboratorio y buscarle una solución a cada problema que aparecía.

A Valerie y Chiara, que ya no están trabajando por acá, pero por suerte donde he encontrado a dos amigas que me han acompañado y soportado en momentos complicados, dando para adelante con la mejor, y con las que hemos compartido riquísimas meriendas y alguna salida en la que siempre fueron mi moderador.

A la chiquis del Yale, con las que hemos compartido momentos como en los que más he reído, las prácticas para distendernos y divertirnos. Gracias por ser un grupo hermoso! A Vani por toda esa fuerza que tiene, que contagia a cualquiera y estar cuando se la necesita y cuando no. A mis amigas de la vida Ceci y Fabi, que puedo decir... gracias por estar siempre, escucharme y compartir conmigo todos sus temas, y demás cosas que las hacen especiales, por ser las personas hermosas que son.

Tratando de resumir los agradecimientos a mi familia... Quiero agradecer a mis abuelos, que han sido un gran soporte y de los mejores educadores que existe. Me enseñaron que pese a lo dura que puede ser la vida en muchos momentos, todos tenemos fuerza para salir adelante y dar amor en forma interminable.

A los “agregados” de la familia (cuñados), que por hacer felices a mis hermanos, me hacen feliz también. A Ceci, donde encontré una amiga loquita y fiestera que ha estado para todo, que me hizo madrina de Felipito, el solcito nuevo de la familia, que nos llena de felicidad y sonrisas con cada diablura que está aprendiendo a hacer.

A mis tíos Vero y Pablito que han sido un gran apoyo en todos los momentos, desde muy chiquita hasta el día de hoy, dando siempre una sonrisa o un aporte bibliográfico para cuando la situación lo requería.

A Julio, que me ha acompañado estos últimos años siendo un soporte sólido cuando me quería caer. Ha sabido hacerme la mujer más feliz dándome muchísimo cariño, acompañándome en cada cosa que he emprendido, por pequeña que sea, por tener la respuestas a “casi” todas mis preguntas y aguantarme la cabeza en este último tramo, que admito que le tengo que dar el premio a la paciencia.

A mis padres, a los que les debo gran parte de lo que soy, lo que tengo y lo que voy a lograr. Me han dado los valores, me han enseñado a luchar por lo que quiero, y que con esfuerzo y dedicación puedo al menos acercarme a lo que quiero, por lo que gran parte de este trabajo se los debo a ellos. Me han dado cada día su amor incondicional, sacando de donde no hay para verme mejor. Han sabido ser los mejores padres que podría pedir.

A los seres más importantes de mi vida, mis hermanos/as, que han sido los mejores mosqueteros/as, soportándonos entre todos los temas de cada uno, y siempre dispuestos a todo, aunque tengan que cruzarse Montevideo bajo lluvia. Gracias por las veladas de truco, de fiestas, de caipiriñas, de desastres bajo lluvia, de maquillaje y peluquería, de juegos, de películas, de charlas filosóficas en la que podían expresar todo su conocimiento, “porque el que sabe, sabe” así como sabemos que “uma pedra e uma pedra”. Han sido todos y cada uno, un ejemplo de superación y esfuerzo que me deja muy orgullosa, poniendo a relucir el excelente trabajo que hicieron nuestros padres.



## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.2 ANTECEDENTES	4
1.2.1 Tripanosomiasis Africana.	4
1.2.1.1. Enfermedad del sueño africana	6
1.2.1.2. La tripanosomiasis animal	9
1.2.2 Paludismo	10
1.2.3. Ciclopéptidos como potenciales antiparasitarios	15
1.3 OBJETIVOS	19
1.3.1. Objetivo General	19
1.3.2. Objetivos específicos	19

## **CAPÍTULO 2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPFS)**

1.4 INTRODUCCIÓN	
2.1.1. Introducción y Antecedentes	23
2.1.2 Soportes poliméricos	27
2.1.2.1 Resina Hidrofóbica	28
2.1.2.2 Resina Hidrofilica	29
2.1.3 Conectores	31
2.1.3.1 Conectores de escisión electrofílica	32
2.1.3.2 Conectores de escisión nucleofílica	32
2.1.3.3 Conectores fotosensibles	33
2.1.3.4 Conectores de escisión asistida por metal	33
2.1.3.5 Conectores de escisión en condiciones reductoras	33
2.1.3.6 Conectores de escisión en condiciones oxidantes	34
2.1.3.7 Conectores de cicloadición y liberación basada en cicloreversión	34

2.1.4 Métodos de análisis en fase sólida	35
2.1.4.1 Determinación del grado de carga	35
2.1.4.2 Métodos de seguimiento de la reacción en la partícula	36
2.1.4.3 Métodos de seguimiento de la reacción por escisión del producto	39
2.1.5 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida	40
2.1.5.1 Agentes acoplantes	42
2.1.5.2 Estrategias en SPPS	48
2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	55
2.2.1 Síntesis de Péptidos en Resina 2-CTC	55
2.2.1.1 Anclando el grupo carboxilo del primer AA	55
2.2.1.2 Anclando por la cadena lateral del primer AA.	59
2.2.2 Síntesis de Péptidos en Resina de Wang	61
2.3 CONCLUSIONES	67
2.4 PARTE EXPERIMENTAL	69

## **CAPÍTULO 3. MACROCICLACIÓN EN SOLUCIÓN Y EN FASE SÓLIDA.**

3.1 INTRODUCCION	89
3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
3.2.1 Obtención de macrociclos combinando SPFS y macrociclación en solución.	97
3.2.2 Obtención de macrociclos en fase sólida.	101
3.2.3 Comparación de metodologías de macrociclación: solución vs fase sólida.	104
3.3 CONCLUSIONES	109
3.4 PARTE EXPERIMENTAL	111

## **CAPÍTULO 4: SÍNTESIS DE DERIVADOS DE CICLOPÉPTIDOS**

4.1 INTRODUCCION	167
4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
4.2.1 Preparación de derivados conteniendo grupos funcionales desprotegidos	173
4.2.2 Preparación de bicíclo conteniendo puentes disulfuros	174
4.2.3. Preparación de bicíclo conteniendo tioéteres.	180
4.2.4 Estudios de reacciones de ciclodeshidratación en fase sólida.	181

4.2.4.1. Formación de tiazolinas en resina de Wang	181
4.2.4.2. Formación de oxazolinas y oxazoles en resina de Wang	183
3.3 CONCLUSIONES	187
3.4 PARTE EXPERIMENTAL	189

## **CAPÍTULO 5: ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS**

5.1 INTRODUCCION	201
5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	209
5.2.1. Determinación de Log P	209
5.2.2. Determinación de Solubilidad y Estabilidad	213
5.2.3. Solvatación de compuestos prometedores.	217
5.2.4. Determinación de Permeabilidad trans-membrana PAMPA.	220
5.2.5. Determinación de confórmeros en diferentes solventes.	225
5.3 CONCLUSIONES	229
5.4 PARTE EXPERIMENTAL	231

## **CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS, REA Y PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.**

6.1 INTRODUCCION	237
6.1.1. Tripanosomiasis Africana Humana	237
6.1.2. Paludismo	239
6.1.3. Citotoxicidad	241
6.1.4. Farmacocinética	241
6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	243
6.2.1. Evaluación in vitro contra <i>Tripanosoma brucei brucei</i> y citotoxicidad.	243
6.2.2. Evaluación in vitro contra <i>Plasmodium falciparum</i> K1, 3D7 y citotoxicidad.	253
6.2.3. Evaluación in vitro contra <i>Plasmodium falciparum</i> en sus 3 estadíos y velocidad de muerte para el compuesto 35.	266
6.2.4. Evaluación in vivo contra <i>Plasmodium berghei</i> NK65 para los compuestos 37, 42 y 48.	269

6.2.5. Evaluación in vivo de comportamiento farmacocinético en plasma para compuesto 37.	271
6.3 CONCLUSIONES	273
6.4 PARTE EXPERIMENTAL	275

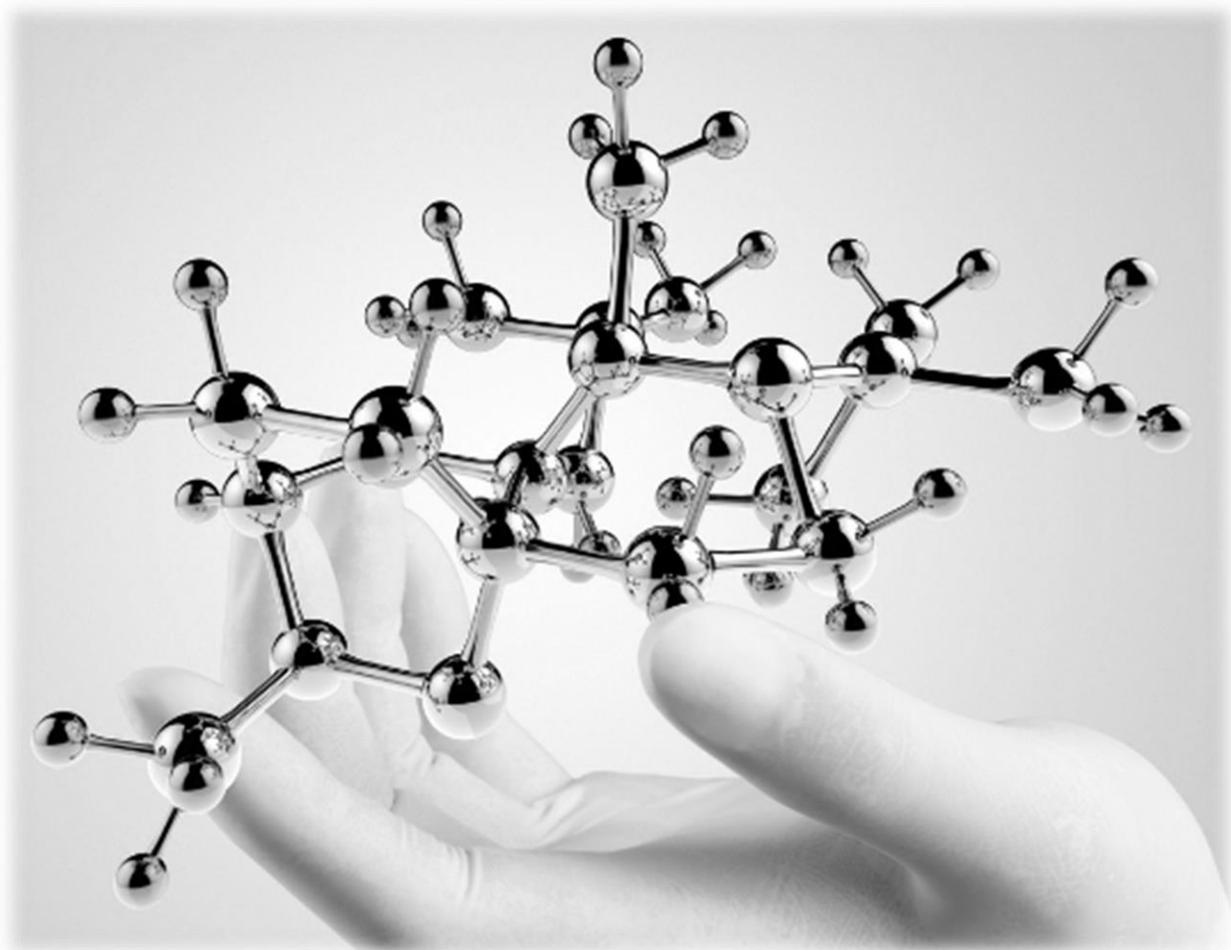
## **CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

7.1 CONCLUSIONES	285
7.2 PERSPECTIVAS	288

## **ANEXO**

Abreviaturas

Trabajos publicados.



# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES**



## 1.1. INTRODUCCIÓN

La presencia de dolencias desde el comienzo de la vida, hizo que a lo largo de los años, civilización tras civilización, se fueran buscando métodos diversos, según los conocimientos y recursos que se poseían, para combatir estos males. Con el tiempo, estos también se fueron utilizando para diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir enfermedades. Desde las civilizaciones más antiguas, se ha buscado la cura de enfermedades en diversas fuentes naturales: hierbas, frutas, cortezas de árboles, raíces, etc. ya que eran accesibles al ser humano. El enfoque clásico para descubrir medicamentos en la naturaleza implica el aislamiento de compuestos puros de plantas, hongos o bacterias. Después, en el laboratorio se seleccionan y optimizan las sustancias prometedoras, se evalúa su seguridad en animales y solo si ésta queda garantizada, se inician los ensayos con humanos.

Con el paso del tiempo el incremento del conocimiento humano y la tecnología, hizo posible tener acceso a otras fuentes de tratamiento y desarrollar nuevos fármacos. Este avance llevó al nacimiento de la química medicinal moderna, con la que se introdujo el concepto de diseño racional de fármacos por el químico Emil Fischer (1852-1919) y el médico Paul Ehrlich (1854-1915). Ellos estudiaron los mecanismos moleculares para explicar las interacciones entre determinadas sustancias y las estructuras biológicas del organismo y la importancia de conocer acerca de los efectos tóxicos y benéficos de los fármacos, dando así lugar a la introducción de los estudios de relación estructura-actividad (REA), fundamentales para el desarrollo racional de fármacos.<sup>1</sup>

Los productos naturales juegan un rol tan importante en el desarrollo de nuevos fármacos que en el período de 1981-2010 alrededor del 70% de los fármacos que ingresaron al mercado fueron productos naturales, derivados o inspirados en éstos.<sup>2</sup> Por tal motivo, actualmente muchos grupos de síntesis orgánica trabajan en la obtención de cantidades adecuadas de productos naturales o sus derivados con actividad biológica para poder realizar los ensayos “*in vitro*”, “*in vivo*” y toxicológicos, ya que estos requieren cantidades apreciables de muestra muy difíciles de obtener de fuentes naturales.

---

<sup>1</sup> Folkers, G.; Kubinyi, H. *Investigación y Ciencia* **1997**, 254.

<sup>2</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311.

## 1.2. ANTECEDENTES

Las enfermedades parasitarias tropicales, como la Tripanosomiasis Africana humana (HAT) y el Paludismo afectan a casi 300 millones de personas cada año, siendo ambas enfermedades endémicas en la región subsahariana de África. Además presentan varias carencias en cuanto a tratamiento y prevención, lo hace que sean un problema sanitario actual real, por lo que surge la necesidad de encontrar soluciones, como puede ser el desarrollo de nuevos compuestos para su terapia, uno de los objetivos de la Química Farmacéutica.

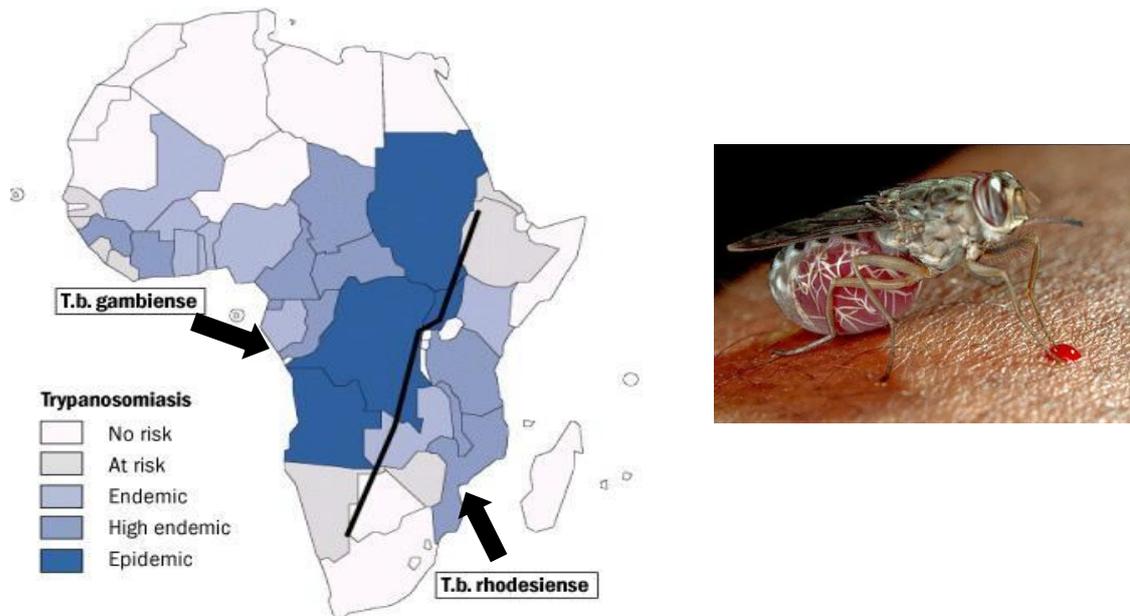
### 1.2.1 Tripanosomiasis Africana

La tripanosomiasis africana, también llamada enfermedad del sueño, es una parasitosis causada por protozoos pertenecientes al género *Trypanosoma* que puede afectar tanto al ser humano como a animales y son transmitidos por la picadura de la mosca tse-tsé (del género *Glossina*) infectada al picar a otras personas o animales que albergan parásitos patógenos. Esta enfermedad hace parte de lo que se llaman “enfermedades desatendidas”, que son un conjunto de enfermedades infecciosas, muchas de las cuales parasitarias, que afectan principalmente a las poblaciones más vulnerables.

Las personas que están más expuestas a la mosca tsé-tsé, y por consiguiente a contraer la enfermedad, son los habitantes de zonas rurales, en general de poblaciones con niveles socioeconómicos bajos, que se dedican a la agricultura, la pesca, la ganadería o la caza en el África subsahariana, donde habita éste insecto, Figura 1.1. Una de las estrategias de control de esta enfermedad es tratar de erradicar el vector, con fumigaciones aéreas y directas de las zonas afectadas, además del uso de trampas con cebo impregnadas de piretroides o técnicas de insectos estériles.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Kabayo, J. *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 473.



**Figura 1.1.** Mapa de la distribución de la Tripanosomiasis africana según la subespecie de parásito causante,<sup>4</sup> e imagen del vector Mosca Tsetsé.

Las subespecies *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Trypanosoma brucei gambiense*, son las mayores causantes de la tripanosomiasis africana humana, teniendo un desenlace fatal si no se trata. Por otro lado, esta afección sobre el ganado bovino, conocida como Nagana, es causada principalmente por el *Trypanosoma brucei brucei*, que aunque no es patógeno para los seres humanos, produce una enfermedad altamente incapacitante para los animales afectados. En 2002, esta enfermedad estuvo entre las tres enfermedades de mayor impacto socioeconómico en África junto con la Malaria y la Esquistosomiasis. Actualmente hay unos 65 millones de personas en situación de riesgo en los 36 países africanos comprometidos. Gracias a las iniciativas sostenidas de control de la enfermedad, el número de nuevos casos disminuyó. En 2009, por primera vez en 50 años, el número de casos notificados se redujo a menos de 10000, y en 2015 se produjeron 2804 casos registrados.<sup>5</sup> La tripanosomiasis bovina repercute fuertemente en la economía y el estado nutricional de las comunidades rurales damnificadas.

<sup>4</sup> <http://www.shakariconnection.com/trypanosomiasis-in-africa.html>

<sup>5</sup> a) Simarro, P. P.; Cecchi, G.; Franco, J. R.; Paone, M.; Diarra, A.; Ruiz-Postigo, J. A.; Fèvre, E. M.; Mattioli, R. C.; Jannin, J. G. *PLoS Negl Trop Dis.* **2012**, *6*, 1859. b) World Health Organization Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Technical Report Series no. 975 (2012). ISBN 978 92 4 120975 5. [http://www.who.int/tdr/publications/research\\_priorities/en/index.html](http://www.who.int/tdr/publications/research_priorities/en/index.html). c) Report of

### 1.2.1.1. Enfermedad del sueño africana



La enfermedad adopta dos formas, en función del parásito causante:

***Trypanosoma brucei gambiense***: se encuentra en 24 países de África occidental y central. Esta forma representa en la actualidad más del 97% de los casos notificados para la enfermedad del sueño y causa una infección crónica. Una persona puede estar infectada por meses o incluso años sin presentar manifestaciones clínicas importantes. Cuando los síntomas aparecen, es frecuente que la enfermedad ya esté muy avanzada, en la etapa de afección del sistema nervioso central.

***Trypanosoma brucei rhodesiense***: se encuentra en 13 países de África oriental y del sur. Hoy en día esta forma representa menos del 3% de los casos notificados y causa una infección aguda. Los primeros signos y síntomas se observan a las pocas semanas o a los pocos meses después de la infección. La enfermedad evoluciona rápidamente y afecta al sistema nervioso central.

El parásito además de transmitirse por la picadura de una mosca tsé-tsé infectada, la cual es la principal vía de transmisión, también puede hacerlo por pinchazos accidentales con agujas contaminadas, por contacto sexual, infección vertical transplacentaria o por transmisión mecánica por intermedio de otros insectos hematófagos.

---

the second WHO stakeholders meeting on gambiense human African trypanosomiasis elimination, Geneva, 21-23 March 2016. [http://www.who.int/trypanosomiasis\\_african/resources/9789241511520/en/](http://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/9789241511520/en/).

En la primera etapa, los tripanosomas se multiplican en los tejidos subcutáneos, la sangre y la linfa; lo que se conoce como fase hemolinfática y se caracteriza por episodios de fiebre, cefaleas, dolores articulares y prurito. En la segunda etapa, los parásitos atraviesan la barrera hematoencefálica e infectan el sistema nervioso central. Esta última, se conoce como la fase neurológica o meningoencefálica, en la cual comienza el desarrollo sintomatológico como cambios de comportamiento, confusión, trastornos sensoriales y falta de coordinación. Los trastornos del ciclo del sueño, que le dan el nombre a la enfermedad, es una característica importante de la segunda etapa. Si no se trata, la enfermedad se considera mortal, si bien se han notificado casos de portadores sanos.<sup>6</sup>

El diagnóstico y tratamiento de ésta enfermedad son complejos y exigen la intervención de personal especializado, implicando punciones, recolección de fluidos corporales, exploración física en busca de signos clínicos, y el tratamiento se realiza con inyectables y terapias multidosis. El diagnóstico temprano permite evitar tratamientos complicados y peligrosos.

La quimioterapia actual en humanos para esta enfermedad no es eficaz debido: a un número limitado de medicamentos útiles que presentan escasa especificidad, una vía de administración no deseada, aparición de resistencia a los fármacos, efectos secundarios y toxicidad elevada.<sup>7</sup> Ésta depende de la etapa en la que se encuentre, tal que los medicamentos utilizados en la primera etapa tienen poca toxicidad y se administran más fácilmente que los que usan en la segunda etapa, por lo tanto, cuanto antes se identifica la enfermedad, mayores son las probabilidades de curación. Por otro lado, para el éxito del tratamiento en la segunda etapa es necesario que el fármaco atraviese la barrera hematoencefálica para llegar al parásito.

Hay cinco medicamentos registrados para el tratamiento de esta enfermedad, que proceden de donaciones efectuadas de los fabricantes por medio de una alianza público-privada de la ONU con Sanofi (pentamidina, melarsoprol y eflornitina) y Bayer AG (suramina y nifurtimox) y luego se distribuyen gratuitamente a los países en los que la enfermedad es endémica.

---

<sup>6</sup> a) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/es/>. b) <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/107-tripanosomiasis-africana-epidemiologia-y-situacion-mundial>.

<sup>7</sup> Matovu, E.; Seebeck, T.; Enyaru, J. C.K.; Kaminsky R. *Microbes Infect* **2001**, 3, 763.

**Pentamidina:** fue descubierta en 1940; se usa para el tratamiento en la primera etapa de la infección por *T. b. gambiense*. A pesar de que causa efectos indeseables de cierta consideración, en general es bien tolerada por los pacientes.

**Suramina:** fue descubierta en 1920; se usa para el tratamiento en la primera etapa de la infección por *T. b. rhodesiense*. Provoca ciertos efectos indeseables en las vías urinarias, así como reacciones alérgicas.

**Melarsoprol:** fue descubierto en 1949; se usa en el tratamiento de las dos formas de la infección (*gambiense* y *rhodesiense*). Es un derivado del arsénico y produce muchos efectos colaterales indeseables; el peor es la encefalopatía reactiva (síndrome encefalopático), que puede ser mortal (entre 1-5%). Se ha observado un aumento de la resistencia a este medicamento en varios focos, particularmente en África central.

**Eflornitina:** es una molécula menos tóxica que el melarsoprol y obtuvo el registro en 1990. Solo es eficaz contra *T. b. gambiense*. El régimen de tratamiento es complejo y difícil de aplicar.

En 2009, se introdujo un tratamiento mediante la combinación de **nifurtimox** y **eflornitina**, que simplifica la administración de eflornitina, al reducir la duración del tratamiento y el número de perfusiones intravenosas; pero desafortunadamente, no se han realizado estudios para su administración contra *T. b. rhodesiense*. El nifurtimox tiene registro para el tratamiento de la tripanosomiasis americana, pero no para la tripanosomiasis africana humana, pero se han realizado ensayos clínicos de esta terapia que dieron buenos resultados, por lo que se incluyó en la "Lista de medicamentos esenciales de la OMS", y actualmente se recomienda como tratamiento de primera línea contra la forma *gambiense*.

Considerando las deficiencias presentadas en el tratamiento, la OMS clasifica a la Enfermedad del sueño, como "no manejables que exigen tratamiento específico".

### 1.2.1.2. La tripanosomiasis animal



Las especies *T. congolense*, *T. vivax* y *T. brucei* son patógenos para los animales y causan la tripanosomiasis animal en especies silvestres y domesticadas, siendo más agresiva la enfermedad en estos últimos. Esta enfermedad en el ganado recibe el nombre de *N'gana* o *Nagana* en la tierra Zulú, que quiere decir impotente/inútil.<sup>8</sup> La Nagana afecta animales individuales, rebaños y al desarrollo socioeconómico de las zonas rurales afectadas. Los animales pueden hospedar los parásitos que son patógenos para el ser humano, especialmente *T.b. rhodesiense*, pero también *T.b. gambiense* por lo tanto, los animales domésticos y salvajes son un reservorio importante.

Esta enfermedad puede presentarse en forma aguda, pero las infecciones crónicas son más comunes. La interacción huésped-parásito produce patología extensa y anemia severa.<sup>9</sup> Los animales afectados clínicamente se vuelven débiles e improductivos siendo a menudo fatal y, a nivel del rebaño, su impacto es amplio. Todos los aspectos de la producción están deprimidos: la fecundidad está deteriorada, los rendimientos de leche, el crecimiento y la producción de trabajo se reducen.<sup>10</sup>

---

<sup>8</sup> Steverding, D. *Parasite Vector* **2008**, 1, 3.

<sup>9</sup> Naessens, J. *Int. J. Parasitol.* **2006**, 36, 521.

<sup>10</sup> Connor, R. J. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **1994**, 61, 379.

### 1.2.2 Paludismo



La Malaria (o Paludismo), enfermedad mortal causada por parásitos del género *Plasmodium*, es transmitida a los humanos por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* infectado. El *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, para los cuales los humanos son los anfitriones mamíferos exclusivos, son las especies más comunes y responsables de la mayor carga de salud pública, aunque esta enfermedad también puede ser causada por las especies *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. El *P. falciparum* está asociado con la malaria grave y complicaciones en el embarazo. Es el mayor causante de las muertes relacionadas con malaria y produce el 99 % de los casos de la enfermedad.<sup>11</sup> Por otro lado el *P. vivax* es el parásito predominante en las Américas, representando el 64% de los casos, es el principal causante de Malaria en zonas templadas, puede sobrevivir en regiones climáticamente desfavorables y permanecer latente en forma hipnozoica en hígado por muchos años.

En 2016, casi la mitad de la población mundial corría el riesgo de padecer el paludismo, dentro del cual el 61% pertenece al África subsahariana. Según las últimas estimaciones publicadas en 2017, se estima que hubo 216 millones de casos de paludismo

---

<sup>11</sup> Phillips, M.; Burrows, J.; Manyando, C.; Van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, C.; Wells, T. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, 3, 1.

en todo el mundo, que ocasionaron la muerte de unas 445 000 personas. Estos datos pueden compararse con los de 2010 en el que hubo 237 millones de casos y con los de 2015, en el que los casos fueron 211 millones.<sup>12</sup> El 90% de esos casos y el 91% de las muertes por esta enfermedad, se registraron en África. Entre 2010 y 2016, la incidencia de la enfermedad se ha reducido en un 18% a nivel mundial.

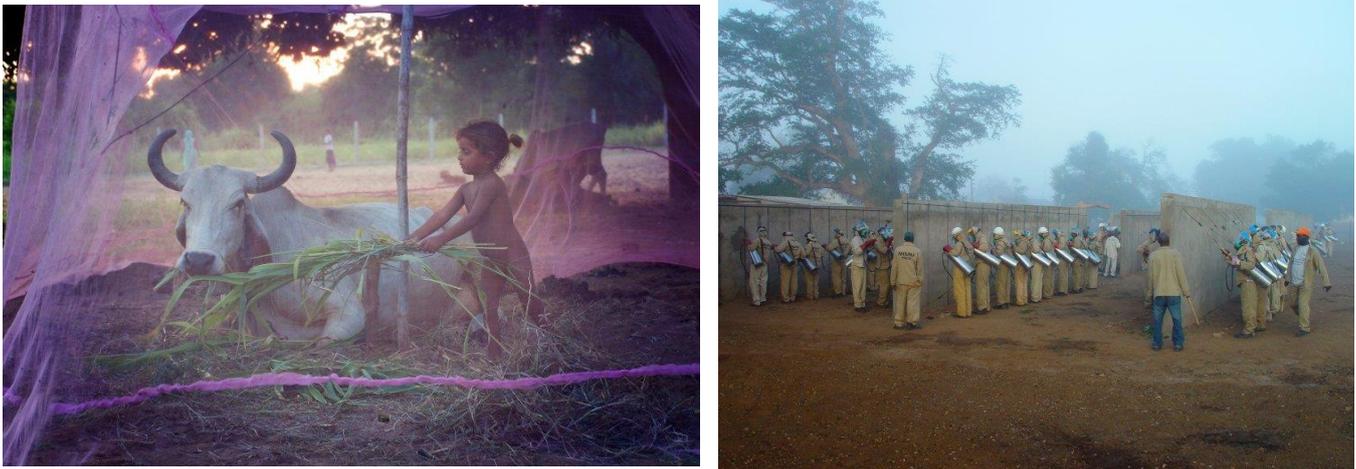


**Figura 1.2.** Distribución de *P. falciparum* y *P. vivax*, y países endémicos en 2000 y 2015.<sup>5</sup>

Tanto para la Malaria, como para otras enfermedades parasitarias transmitidas por un vector (como la Tripanosomiasis), una de las estrategias para su erradicación o disminución del número de casos, es el control del transmisor. Para esto se han utilizado tanto fumigaciones con el insecticida DDT (diclorodifeniltricloroetano), como mosquiteros impregnados con el mismo. Las fumigaciones se realizaban tanto a nivel doméstico como en zonas donde se podría desarrollar el mosquito. El gran problema que se encontró es que los mosquitos repoblaron gradualmente las áreas tratadas con DDT porque desarrollaron resistencia al insecticida, y el uso del mismo se redujo debido a sus costos y aumento de las preocupaciones ambientales. De cualquier manera ha servido para la reducción de estos insectos. Se están buscando otras alternativas con éste fin dentro de los cuales se ha probado ivermectina, pero aún se está en período de prueba. Los mosquiteros

<sup>12</sup> World Health Organization. Paludismo. <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/es/>

impregnados con al menos dos insecticidas, para disminuir la generación de resistencia, sin embargo, han dado buenos resultados. Actualmente se están distribuyendo en forma gratuita en los países más afectados por esta enfermedad y de menores recursos, pero igualmente existen muchos hogares en el continente africano que no han tenido acceso a ellos.



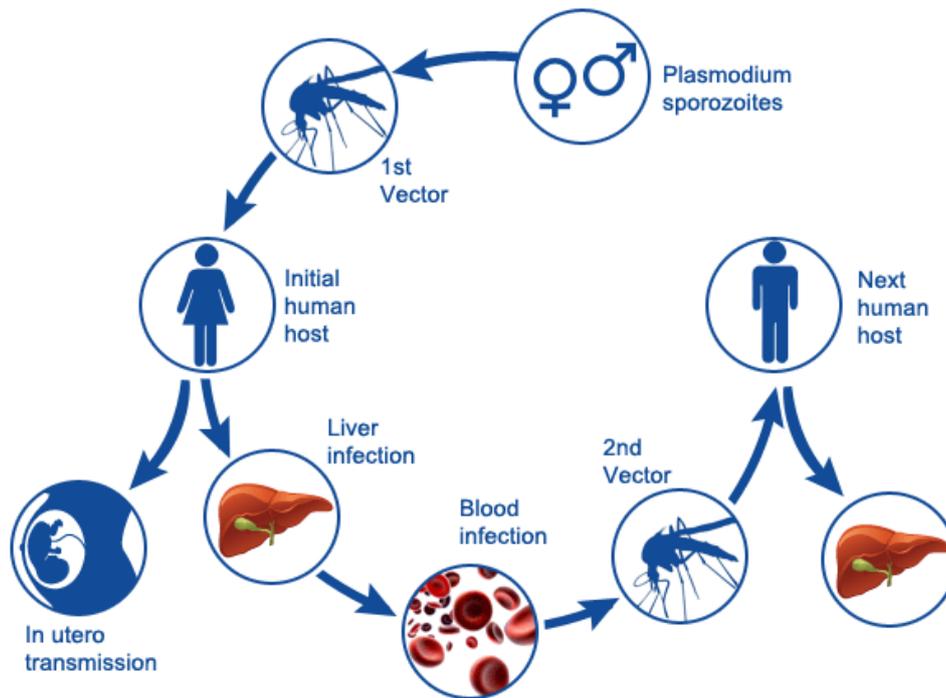
**Figura 1.3.** A la izquierda, uso de mosquiteros impregnados con DDT (MIT), y a la derecha, practica de fumigaciones sobre estos mosquiteros.

La gravedad de la malaria, depende de la especie de *Plasmodium* causante y de características del propio huésped, incluido su nivel de inmunidad, que está vinculada en parte a la exposición previa al parásito.<sup>13</sup> En poblaciones que tienen exposición repetida a estos parásitos (zonas de transmisión), se puede desarrollar una inmunidad protectora parcial, principalmente para *P. vivax*. Las personas que no presentan esta inmunización, son más propensas a padecer Malaria severa si son infectadas con alguno de los agentes causantes de la misma.

El desenlace de la enfermedad, se da una vez que el parásito ha llegado a la fase eritrocítica, donde la infección causa los síntomas, ya que los glóbulos rojos son el sitio de mayor replicación del parásito. El parásito ingresa al huésped en forma de esporozoítos, luego se aloja en el hígado, donde se replica para liberar parte de estas células al torrente sanguíneo en una forma asexual que genera la afección (fase eritrocítica) y parte en forma de gametos para continuar su ciclo infeccioso. Figura 1.4. El tiempo que demora el parásito en llegar a la fase eritrocítica, depende de cual sea la especie transmitida, variando

<sup>13</sup> a) Wassmer, S. C.; Taylor, T. E.; Rathod, P. K.; Mishra, S. K.; Mohanty, S.; Arevalo-Herrera, M.; Duraisingh, M. T.; Smith, J.D. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, 93, 42. B) Wassmer, S. C.; Grau, G. E. *Int. J. Parasitol.* **2017**, 47, 145.

entre 5 y 16 días. Los síntomas son muy variados y comunes para otras enfermedades como fiebre, escalofríos, sudoración y dolor de cabeza, pudiendo agravarse con el paso de los días sin tratamiento llevando a la muerte. Estos síntomas se dan en ciclos repetitivos de entre dos y tres días.



**Figura 1.4.** Ciclo de transmisión del *Plasmodium spp.*<sup>14</sup>

La Malaria es prevenible y debe tratarse si el parásito ha ingresado, para lograr la eliminación rápida y completa del parásito de la sangre del paciente, evitando así la afección grave. Pero además, desde la perspectiva de salud pública, el tratamiento se administra también para reducir la transmisión de la infección a otras personas mediante la reducción del reservorio infeccioso y prevenir el surgimiento y la propagación de la resistencia a los medicamentos antipalúdicos. Para la malaria, la resistencia a los fármacos es un problema importante ya que la mayor parte de las cepas actualmente infectantes son resistentes a cloroquina y recientemente se ha detectado resistencia, en algunas regiones del sudeste asiático y de Africa, a la artemisinina, el fármaco más importante en la terapia de esta enfermedad.<sup>15</sup>

<sup>14</sup> <http://www.jenner.ac.uk/about-malaria>

<sup>15</sup> (a) Wells, T.N.; Alonso, P.L.; Gutteridge, W.E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 879-891. (b) Rueda, L.; Castellote, I.; Castro-Pichel, J.; Chaparro, M. J.; de la Rosa, J. C.; Garcia-Perez, A.; Gordo, M.; Jimenez-Diaz, M. B.;

Actualmente, la mayor parte de los tratamientos, se basan en terapias combinadas con artemisinina (TCA) o sus derivados (recomendado por la OMS), con el fin de que se pueda atacar al parásito por diferentes mecanismos en forma conjunta, tratando de evitar o evadir los mecanismos de resistencia. Los medicamentos que se están utilizando en general son activos contra la forma eritrocítica del *Plasmodium*, en la fase sintomática de la enfermedad. La primaquina, es activa además contra las formas hepáticas, por lo cual se utiliza una dosis baja y única a fin de reducir la transmisión de la infección. Los medicamentos utilizados varían según el caso y la complicación de la enfermedad siendo: cloroquina, atovacuona-proguanil (Malarone ®), artemeter-lumefantrina (Coartem ®), mefloquina (Lariam ®), quinina, doxiciclina (en combinación con la quinina), clindamicina (en combinación con la quinina), artesunato.<sup>16</sup> Por lo general, para Malaria causada por *P. falciparum*, se utiliza TCA, mientras que para la causada por *P. vivax* la cloroquina es de elección o TCA si la cepa es resistente al anterior. Para casos complejos de la enfermedad, se debe tratar con artesunato por 24hs y luego 3 días de TCA.<sup>17</sup>

El gran número de personas en riesgo, la resistencia del parásito a los quimioterápicos y del vector a los piretroides compromete seriamente el control de esta enfermedad. La malaria es prevenible y tratable, y la historia muestra que puede ser eliminada, ya que así fue en la mayor parte de Europa occidental a mediados de la década de 1930 y en los Estados Unidos en 1951. Por tal motivo, la OMS en conjunto con diversas fundaciones y laboratorios están invirtiendo en desarrollar nuevas herramientas y estrategias que se centren no solo en los mosquitos transmisores sino también en el parásito, que puede sobrevivir en los humanos por más de 10 años. Es así que la financiación total del control y la eliminación del paludismo alcanzó en 2016 una cifra estimada de US\$ 2700 millones, incentivando la investigación en esta área.

---

Kessler, A.; Macdonald, S. J. F.; Martinez, M. S.; Sanz, L. M.; Gambo, F. J.; Fernandez, E. *Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 840.

<sup>16</sup> a) <http://www.paludismo.org/tratamiento/>. b) World Health Organization. Paludismo: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/es/>.

<sup>17</sup> Guidelines for the treatment of malaria. Third edition: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>

### 1.2.3. Ciclopéptidos como potenciales antiparasitarios

Con miles de millones de personas en riesgo de contraer estas enfermedades y con la quimioterapia actual insuficiente, hay una necesidad urgente de descubrir nuevos fármacos antipalúdicos y anti-tripanosómicos. Por tales motivos, es de suma importancia la investigación en esta área.

Los productos naturales extraídos de distintos organismos vivos, son excelentes modelos para el desarrollo de potenciales antiparasitarios. Su diversidad estructural es una fuente de inspiración para el descubrimiento de fármacos y la preparación de análogos sintéticamente más accesibles y estables.<sup>18</sup> Estos organismos producen metabolitos secundarios para su protección o realización de diversas funciones y consecuentemente despiertan interés como posibles candidatos a fármacos. En particular, los productos naturales macrocíclicos aislados de cianobacterias marinas o terrestres son una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos con estructuras muy particulares y atractivas. Las cianobacterias son organismos unicelulares, pertenecientes a un filo del dominio Bacteria que comprende las bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica.

En los últimos años se han aislado de cianobacterias, compuestos llamados ciclamidas, como la Hapalociclamida,<sup>19</sup> las Aeruciclamidas, Figura 1.4, que han demostrado poseer propiedades biológicas interesantes.<sup>20</sup> Comúnmente estos compuestos son hexa u octapéptidos cíclicos alternando aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (Ser, Thr, Cys). Las cadenas laterales de estos aminoácidos polares, pueden ciclar para formar oxazoles, tiazoles o sus derivados reducidos (oxazolininas o tiazolininas), que están unidos por diferentes restos aminoácídicos entre sí: L-Gly, L-Ala, L-Ile, D-allo-Ile, L-Met, L-Phe, L-Val. La Aeruciclamida B,<sup>21</sup> muestra actividad antiplasmodium selectiva, con  $CE_{50} = 0.7 \mu\text{M}$  (*P. falciparum* K1 cepa resistente a la cloroquina). El metabolito predicho de *M. aeruginosa* PCC 7806,<sup>22</sup> muestra también una potente y selectiva actividad antimalárica de  $CE_{50} = 0.18$

---

<sup>18</sup> (a) D.J. Newman, G.M. Cragg. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311. (b) Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., Saludes, J. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 69.

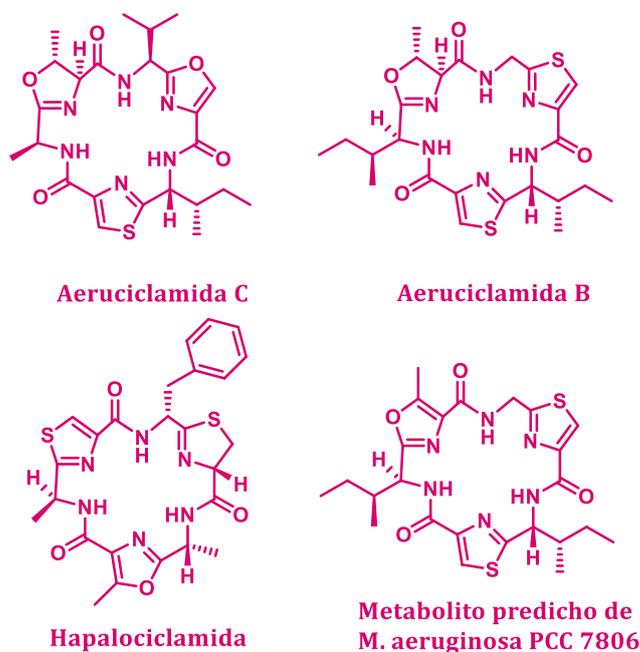
<sup>19</sup> Koodkaew, I.; Matsuyama, S.; Sunohara, Y.; Matsumoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 977.

<sup>20</sup> (a) Gademann, K.; Kobylinska, J. *Chem. Rec.*, **2009**, *9*, 187-198. (b) Kaur, K.; Jain, M.; Kaur, T.; Jain, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3229.

<sup>21</sup> Portmann, C.; Blom, J. F.; Kaiser, M.; Brun, R.; Jüttner, F.; Gademann, K. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1891.

<sup>22</sup> Ziemert, N.; Ishida, K.; Quillardet, P.; Bouchier, C.; Hertweck, C.; Tandeau de Marsac, N.; Dittmann, E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 1791.

$\mu\text{M}$  (*P. falciparum* K1).<sup>23</sup> Por otro lado la Aeruciclamida C es el más activo de este grupo contra *T. b. rhodesiense*,  $\text{CE}_{50} = 9.2 \mu\text{M}$ .



**Figura 1.4.** Estructura de Ciclamidas con actividad antitripanosómica y antimalárica.

Varios ciclopéptidos no azólicos muestran también actividad antiparasitaria. La Mahafaciclina B y Chevalerina A (Figura 1.5), heptapéptidos cíclicos aislados a partir del látex de la especie *Jatropha*, mostraron  $\text{CE}_{50} = 2.2$  y  $8.9 \mu\text{M}$ , respectivamente, frente a *P. falciparum*.<sup>24</sup> Se ha descrito también actividad inhibitoria selectiva de ciertos ciclohexapéptidos, como el *cyclo* [-Trp-Phe-D-Pro-Phe-Phe-Lys(Z)-] con un  $\text{CI}_{50}$  de  $3 \mu\text{M}$ , frente a la triosa-fosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*.<sup>25</sup> Además, dentro del grupo de las Malforminas, que son ciclopentapéptidos conteniendo puentes disulfuros aislados a partir del hongo *Aspergillus niger*,<sup>26</sup> recientemente se ha descrito que la Mafomina C,

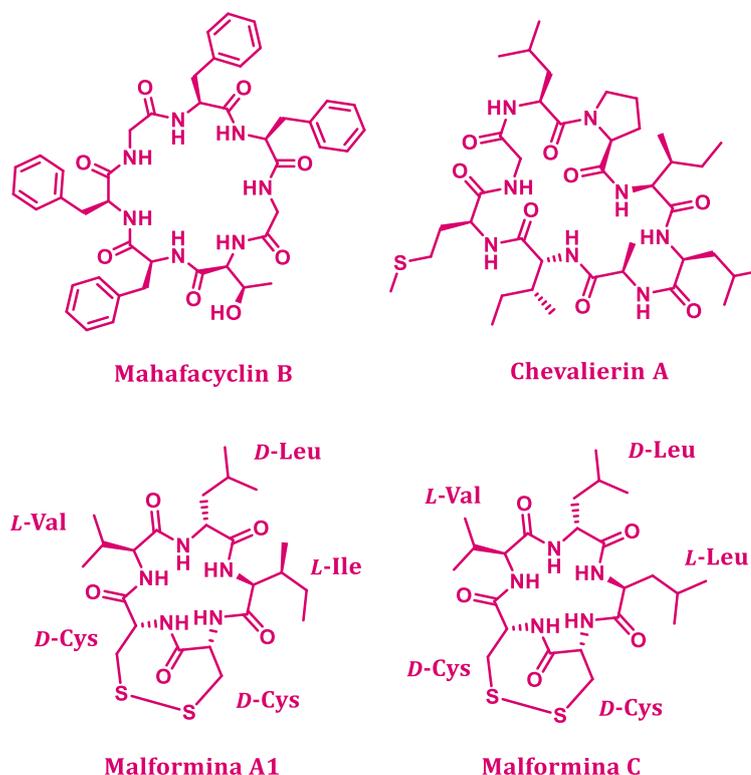
<sup>23</sup> Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Stewart, L.; Yardley, V.; Croft, S.; Serra, G. Synthesis of a *Microcystis aeruginosa* predicted metabolite with antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22.

<sup>24</sup> (a) Baraguey, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2098-2103. b) Baraguey, C.; Auvin-Guette, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J. L.; Bodo, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 3033.

<sup>25</sup> a) Kuntz, D. A.; Osowski, R.; Schudok, M.; Wierenga, R.; Muller, K.; Kessler, H.; Opperdoes, F. R. *Eur. J. Biochem.* 1992, 207,441 -447. b) Callens, M.; Van Roy, J.; Zeelen, J. Ph.; borchert, T. V.; Nalis, D.; Wierenga, R.; Opperdoes, F. R. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993, 195, 667.

<sup>26</sup> a) Curtis, R. W. *Science* **1958**, 128, 661. b) Curtis, R. W. *Plant Physiol.* **1958**, 33, 17.

presenta actividad antimalárica y antitripanosómica de  $CI_{50}=70$  y 1.6 ng/ml, respectivamente.<sup>27</sup> Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Estructura de ciclopéptidos con actividad antitripanosómica y antimalárica.

Los ciclopéptidos, han demostrado poseer propiedades adecuadas como candidatos para el descubrimiento de fármacos, ya que por lo general presentan características estructurales que favorecen conformaciones bioactivas, selectividad hacia los receptores y buena estabilidad metabólica, además de un mayor carácter hidrofóbico, permitiéndole una mejor permeación por las membranas comparándolos con sus análogos lineales.<sup>28</sup>

Desde hace algunos años, nuestro grupo viene desarrollando un programa general de síntesis y evaluación biológica de heterociclos análogos a productos naturales marinos o

<sup>27</sup> Kojima, Y.; Sunazuka, T.; Nagai, K.; Julfakyan, K.; Fukuda, T.; Tomoda, H.; Omura, S. *J. Antibiot.*, **2008**, *61*, 297.

<sup>28</sup> (a) Driggers, E.; Hale, S.; Lee, J.; Terret, N. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, *7*, 608. (b) Davies, J. S. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471. (c) Skropeta, D.; Jolliffe, A. K.; Turner, P. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8804. (d) Wipf P. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115.

derivados de cianobacterias.<sup>29</sup> Recientemente nuestro grupo ha obtenido resultados muy prometedores en la síntesis y evaluación biológica contra *Plasmodium falciparum* K1 y *Trypanosoma brucei brucei* de compuestos macrocíclicos análogos a las Aeruciclamidas.<sup>30</sup> Del mismo modo, se han obtenido actividades del orden nanomolar contra *P. falciparum* y del orden micromolar contra *T. b. brucei*, para ciclohexapéptidos no azólicos, sintetizados como parte del trabajo de Tesis de Doctorado de la Q.F. Stella Peña (Directoras de Tesis: Dra. Gloria Serra y Dra. Laura Scarone).<sup>31</sup>

---

<sup>29</sup> a) Sellanes, D. Tesis de Doctoral, UDELAR, Uruguay, 2009. b) Scarone, L. Tesis Doctoral, UDELAR, Uruguay, 2008. c) Incerti, M. Tesis doctoral, UDELAR, Uruguay, 2006. d) Sellanes, D. Tesis de Maestría, UDELAR, Uruguay, 2004. e) Mahler, S. G. Tesis doctoral, UDELAR, Uruguay, 2002. f) Serra, G. L. Tesis doctoral, UDELAR, Uruguay, 1998.

<sup>30</sup> a) Peña, S.; Scarone, L.; Medeiros, A.; Manta, E.; Comini, M.; Serra, G. *MedChemComm* **2012**, 3, 1443. (b) Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Stewart, L.; Yardley, V.; Croft, S.; Serra, G. *Bioorg.Med.Chem. Lett.* **2012**, 22, 4994.

<sup>31</sup> Peña, S.; Fagundez, C.; Medeiros, A.; Comini, M.; Scarone, L.; Sellanes, D.; Manta, E.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Stewart, L.; Yardley, V.; Serra, G. *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 1309.

## 1.3. OBJETIVOS

Basados en los antecedentes anteriormente descritos, definimos para este trabajo los siguientes objetivos:

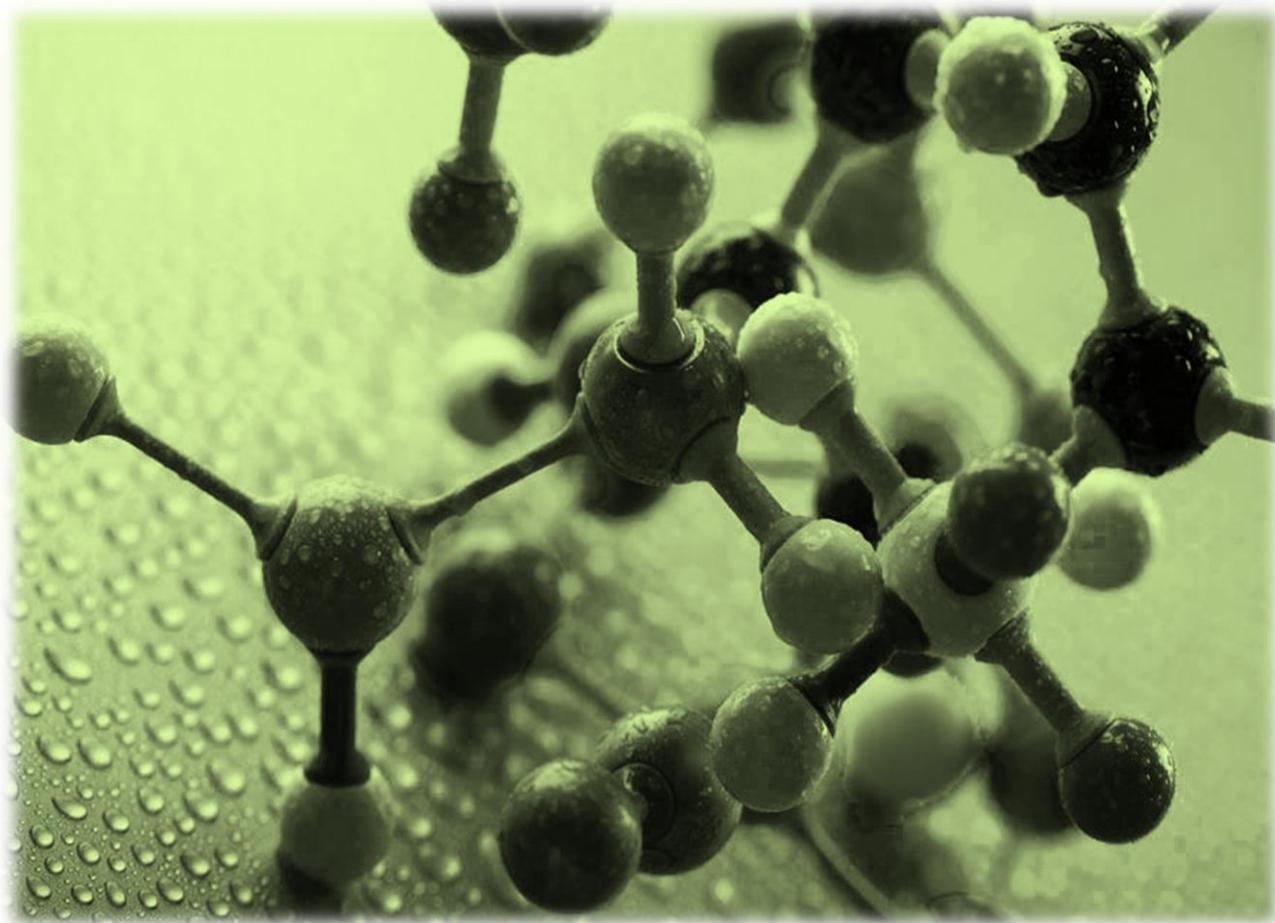
### 1.3.1. Objetivo General

El objetivo general es realizar el estudio de metodologías que permitan obtener ciclopéptidos con distinto tamaño de anillo, variando también los aminoácidos constituyentes, y precursores sintéticos de ciclámidas. Para los compuestos obtenidos, se realizarán los estudios de sus potenciales actividades: antitripanosómica contra *Trypanosoma brucei brucei*, antimalárica contra *Plasmodium falciparum* y citotóxicas.

### 1.3.2. Objetivos específicos

1. Síntesis de pentapéptidos y hexapéptidos en fase sólida precursores de ciclopéptidos de interés.
2. Obtención de ciclopéptidos utilizando metodologías de macrociclación en solución y en fase sólida.
3. Síntesis de derivados de ciclopéptidos.
4. Estudios de metodologías para la síntesis en fase sólida, de heterociclos constituyentes de ciclámidas.
5. Estudio de propiedades fisicoquímicas de los ciclopéptidos sintetizados.
6. Estudio de actividades biológicas contra *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei brucei* y citotoxicidad contra macrófagos murinos y/o células HepG2. Estudios de REA. Basándonos en estos resultados, se realizarán modificaciones estructurales preparando nuevos ciclopéptidos con el fin de acercarnos a un mejor candidato.





## **CAPÍTULO 2**

### **SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA**



## 2.1 INTRODUCCIÓN

### 2.1.1 Introducción y Antecedentes

Es bien conocido el rol importantísimo de la fase sólida en la síntesis de péptidos. R. Merrifield en 1963 comenzó a estudiar dicha metodología y demostró la gran utilidad de la misma en su trabajo titulado “Síntesis peptídica en fase sólida”. En el mismo, Merrifield, premio Nobel en Química en 1984 por este trabajo, reporta la síntesis de un nonapéptido, la Bradiquinina, en tan solo 27 horas.<sup>1</sup> Este método fue conocido a partir de ese momento como síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) y hoy en día es la manera más habitual y sencilla de obtener péptidos.

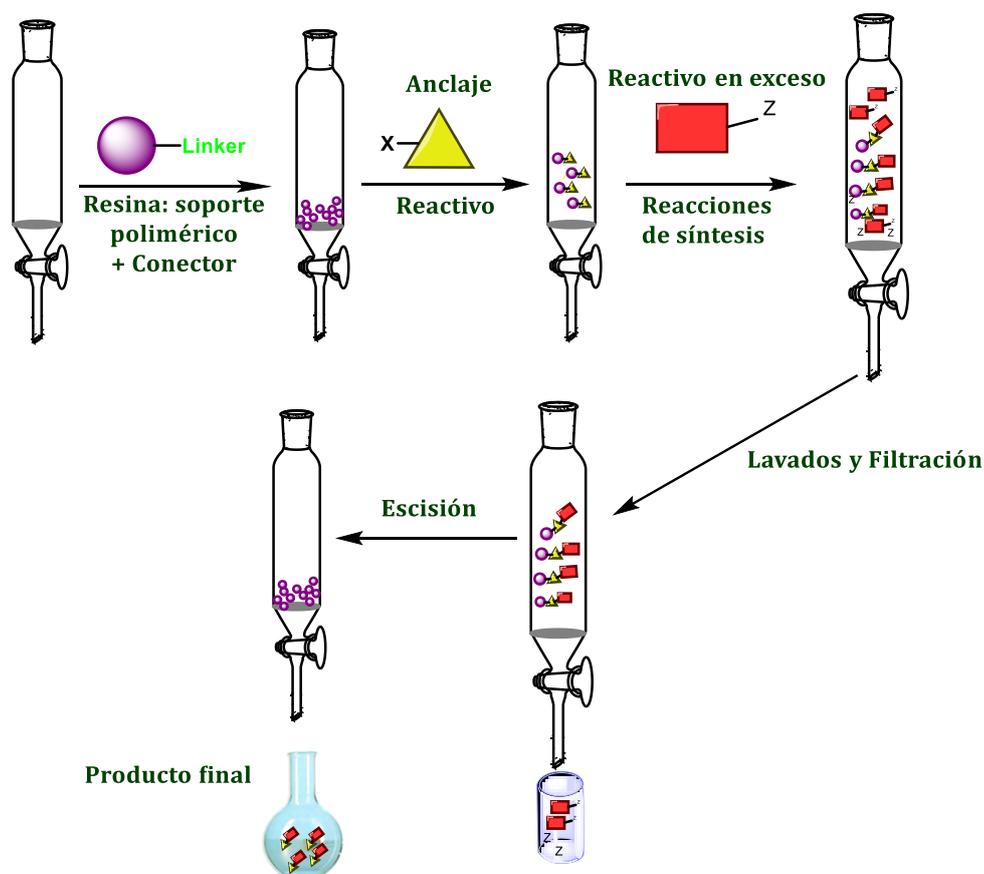
Este método se basa en la unión del reactivo a un soporte polimérico, insoluble en el solvente de reacción, sobre el que permanece anclado durante todo el proceso de síntesis. Luego de cada reacción es posible eliminar el exceso de reactivos, por procesos de filtración y lavado, los cuales son rápidos y sencillos, quedando el compuesto de interés unido a la resina, siendo ésta una de las grandes ventajas del método respecto a la síntesis realizada en solución (Esquema 2.1). Una de las características más sobresalientes, es que facilita la purificación, que es la etapa que demanda mayor tiempo y trabajo en síntesis orgánica.

---

<sup>1</sup>(a) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149,. (b) Merrifield, R. B. *Science* **1986**, *232*, 341.

El proceso general de síntesis en fase sólida, se puede dividir en tres pasos:

- 1) Anclaje inicial:** el reactivo inicial se hace reaccionar con el ligante presente en el soporte sólido, teniendo protegidos aquellos grupos que no se desea que reaccionen. Luego de realizada la unión, se desprotegen selectivamente los grupos que deben reaccionar posteriormente.
- 2) Reacciones de síntesis del producto deseado:** El reactivo inmovilizado, se hace reaccionar con otros para generar el producto deseado, en tantos pasos como sea necesario. En todos los casos, el exceso de reactivos utilizado, se elimina por filtración y lavado de la resina con los solventes compatibles, mientras que el producto deseado queda retenido en el soporte polimérico.
- 3) Escisión de la resina:** una vez que se completa la secuencia de reacciones, es necesario liberar el compuesto de interés del soporte sólido, lo cual se realiza utilizando distintas condiciones de reacción de acuerdo a la resina en cuestión. De esta forma el compuesto sintetizado pasa a la solución.



**Esquema 2.1.** Esquema básico del método de síntesis en fase sólida.

### Ventajas de la síntesis en fase sólida

Esta metodología de síntesis presenta varias ventajas si es comparada con la síntesis convencional en solución:

- 1) Una etapa de síntesis puede estar completa en tan solo tres pasos: adición de los reactivos, filtración de los mismos y lavado de la resina. Además, se elimina el proceso de purificación de la síntesis en múltiples etapas, siendo eventualmente necesaria la purificación del producto final de la síntesis. Esto es de suma importancia en los casos de reacciones en las que los reactivos y productos tienen características fisicoquímicas similares que dificultan su separación.
- 2) Las reacciones por lo general se completan debido al agregado de un exceso de reactivos. Luego de culminada la reacción, este exceso es eliminado por filtración evitando, además, la interferencia de los mismos en etapas posteriores, lo que trae como consecuencia la obtención de mejores rendimientos. Por otro lado, esta metodología permite la utilización de solventes de alto punto de ebullición, ya que estos también se pueden eliminar por filtración, por lo que solventes tales como Dimetilformamida y Dimetilsulfóxido son de uso común.
- 3) Debido a que, en fase sólida, uno de los reactivos siempre se encuentra soportado en los sitios activos de la resina y estos a su vez se encuentran distanciados uno del otro, se crea un ambiente de “pseudodilución”, favoreciéndose así, las reacciones intramoleculares en lugar de las intermoleculares. Esto, puede ser una ventaja o una desventaja, dependiendo de la finalidad de la reacción. Un aspecto positivo por lo tanto es que el uso de fase sólida evita el homoacoplamiento indeseado.
- 4) Es fácilmente automatizable debido a la simplicidad en el manejo de las resinas y a que se repiten las mismas reacciones: desprotección y acoplamiento. Considerando las etapas de purificación y de extracción líquido-líquido de la síntesis en solución, la síntesis en fase sólida es más amigable con el medio ambiente debido a que se disminuye el volumen de desechos al reducir la cantidad de sílica gel y de solventes que se utilizan, aunque estos últimos no son depreciables. Además, las sustancias tóxicas se pueden manejar de forma más segura, por permanecer unidas al soporte sólido hasta el final de la síntesis.

Pese a estas ventajas, no es una metodología muy económica, debido al costo de las resinas y reactivos, el exceso de reactivos que se utilizan, y uso de solventes HPLC tanto como medio de reacción, como para el lavado de la resina, entre otros.

Por lo tanto, para que sea posible realizar una reacción de síntesis orgánica en fase sólida es necesario contar, por un lado, con un material polimérico entrecruzado, insoluble e inerte a las condiciones de reacción, que posea un agente conector o “linker” que una el sustrato al soporte sólido. El anclaje del producto de interés al polímero, permite una separación selectiva al final de la síntesis. Por último, es necesaria una estrategia de protección-desprotección selectiva de los grupos reactivos (principio de ortogonalidad). Basándonos en estos requerimientos, pasaremos a describir cada uno.

### 2.1.2 Soportes poliméricos.

El soporte sólido, está compuesto de un material polimérico entrecruzado (resina) que permite la separación sólido-líquido por medio de filtración. Este soporte, debe poseer estabilidad mecánica y química a las condiciones a las que será sometido, para evitar la destrucción de las partículas de resina, lo que podría causar obstrucción de los filtros o pérdida del material polimérico.<sup>2</sup>

Existen diferentes materiales útiles como soportes sólidos para la síntesis orgánica en fase sólida compatibles con distintos tipos de solventes, de reactivos y de condiciones, por lo que es importante la elección correcta del material a utilizar. El material más utilizado para formar las partículas de resina es el poliestireno entrecruzado con divinilbenceno, con variaciones químicas que determinan las propiedades fisicoquímicas de la misma, la cual puede ser hidrofóbica o hidrofílica. El entrecruzamiento con divinilbenceno que poseen estas resinas, es por lo general de entre 1 y 2%, lo que permite un buen “hinchamiento” (expansión de la red polimérica por penetración de solvente a los huecos de la misma, con aumento del volumen de partícula, Figura 2.1) y una aceptable estabilidad mecánica de las partículas, ya que un entrecruzamiento menor produce partículas demasiado frágiles. Este tipo de soportes, no se debe utilizar a temperaturas mayores a los 120°C, debido a que sufren ablandamiento y pueden experimentar reacciones no deseadas.

Las resinas deben “hincharse” con los disolventes, siendo este hecho clave para el buen desarrollo de la síntesis. Se podría decir, entonces, que la síntesis se lleva a cabo en fase gel, siendo imprescindible la expansión del polímero para que pueda darse la penetración de los reactivos a los sitios activos de la resina. Figura 2.1. Esta capacidad de expansión difiere entre los diferentes tipos de resina y depende del disolvente en el que se la suspenda.<sup>3</sup>

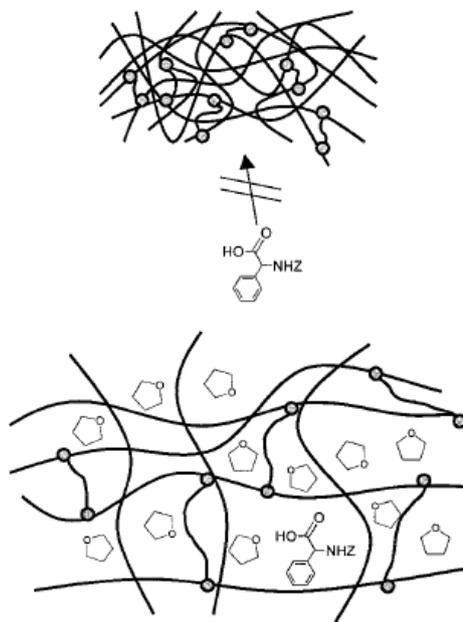
Existen otros tipos de resinas, que poseen una mayor capacidad de hinchado que las anteriormente mencionadas, que están formadas por cadenas de poliestireno entrecruzado con 1,4-bis(divinilfenoxi)butano, que le confiere mayor flexibilidad, permitiendo su compatibilidad con un mayor número de solventes, mejorando su solvatación. Estas

---

<sup>2</sup> Garcia, F.; Albericio, F. *Chim. Oggi-Chem. Today* **2008**, 26, 29.

<sup>3</sup> Vaino; A. R.; Janda, K. D. *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 579.

resinas reciben el nombre de Janda Jel y pueden utilizarse en una gran variedad de reacciones.<sup>4</sup>



**Figura 2.1.** Representación del polímero penetrado por solvente.

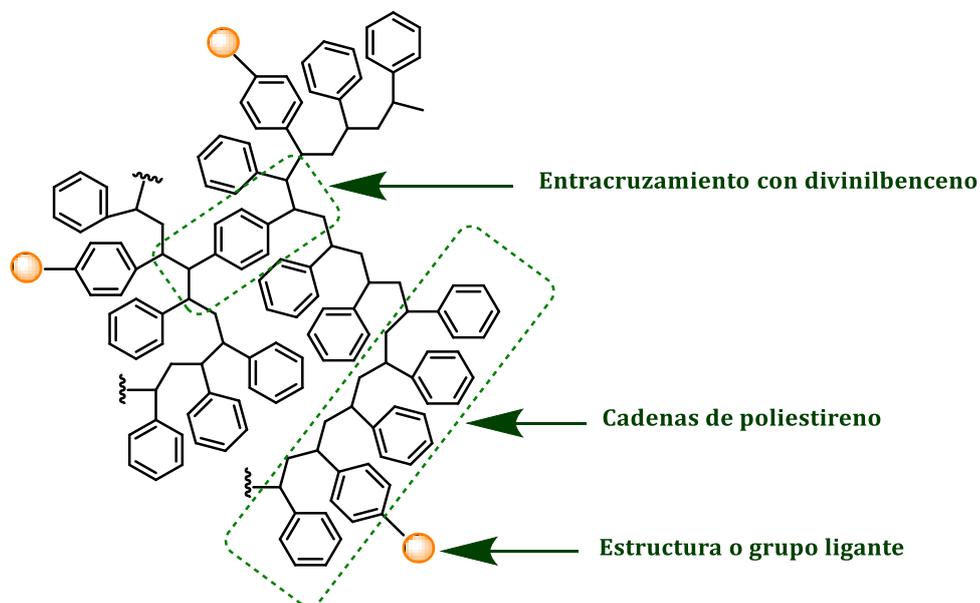
### 2.1.2.1 Resina Hidrofóbica.

La característica de este tipo de resinas es que se hinchan apropiadamente en solventes apolares, aumentando de 3 a 8 veces el tamaño de sus granos y su hinchamiento es pobre en solventes próticos polares tales como alcoholes y agua.

Generalmente, estas resinas son granos de entre 90 y 300  $\mu\text{m}$ , un tamaño suficiente para que un gran número de sitios de reacción se encuentren en un solo grano (alrededor de cientos de picomoles). Estos sitios activos se deben a que, a ciertos intervalos de los núcleos aromáticos de poliestireno poseen un grupo con la funcionalidad de unión al sustrato de reacción (conector). Entonces, la cantidad de sitios activos por gramo de resina, determina la carga de la resina, teniendo una mayor carga cuanto mayor cantidad de sitios activos posea cada grano. Lo más común, es una carga de alrededor de 1 mmol/g, obteniéndose comercialmente una gran diversidad de grupos funcionales entre las que encontramos la resina de Merrifield (resina clorometil), 2-Clorotritilo (2-CTC), resina de Wang, Rink, Oxima, entre otras. Estas resinas toleran un gran rango de condiciones de reacción, como bases y ácidos fuertes, agentes oxidantes o reductores, etc. Pero existen

<sup>4</sup> Toy, P. H. ; Janda, K. D. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 40, 6328.

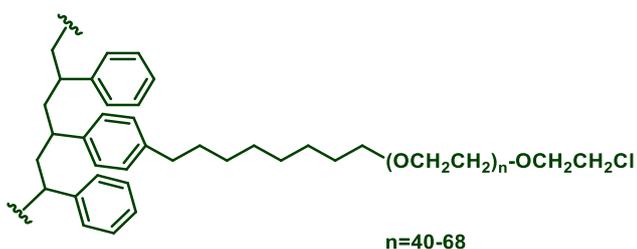
algunos agentes oxidantes fuertes, que a altas temperaturas pueden producir degradación de la resina.



**Figura 2.2.** Estructura de la resina de poliestireno entrecruzada con divinilbenceno.

### 2.1.2.2 Resina Hidrofílica

Estas resinas están compuestas de un polímero de poliestireno entrecruzado, como las hidrofóbicas, pero contienen cadenas hidrofílicas de polietilenglicol (PEG) unidas, produciendo una resina híbrida que permite el uso de solventes hidrofílicos y próticos, como metanol, agua, acetonitrilo, dimetilformamida, etc.<sup>5</sup>



**Figura 2.3.** Estructura de la resina de poliestireno sustituida con PEG.

Una de las ventajas que le otorgan estas largas cadenas conteniendo grupos funcionales éteres, es la amplia flexibilidad y movilidad, lo que crea un microambiente como el de una solución real típica de éteres o tetrahidrofurano, incrementando la

<sup>5</sup> Kates, S. A.; McGuinness, B.F. ; Blackburn, C.; Griffin, G. W.; Solè, N. A.; Albericio F. *Biopolymers* **1998**, *47*, 365.

compatibilidad con un mayor número de reacciones comunes en química orgánica. Además, es importante destacar, que la determinación de la estructura en el grano, así como el monitoreo se puede realizar por técnicas espectroscópicas fácilmente.

Por otro lado, también el largo de este tipo de cadenas, acarrea una disminución de la carga, para evitar una posible interacción entre las mismas. Por lo tanto éstas, poseen una carga no mayor a 0.4 mmol/g, salvo las de alta carga (Argopor), en las que su carga es no mayor de 0.6 mmol/g, pero son de difícil manejo.

Se pueden adquirir estas resinas con una gran variedad de grupos funcionales, teniendo un costo bastante superior a las resinas hidrofóbicas, pero se utilizan muchas veces donde el monitoreo de la reacción por técnicas espectroscópicas es necesario o cuando son necesarios solventes próticos polares en la reacción.

También podemos encontrar otras resinas hidrofílicas, disponibles comercialmente, como las de acrilamida sustituida con cadenas PEG, llamadas PEGA, que son muy buenas para reacciones en medio acuoso, pero su reactividad está determinada por la susceptibilidad de los enlaces amidas presentes.

### 2.1.3 Conectores

Los conectores son grupos inmovilizados al soporte polimérico, que conectan de forma reversible al material de partida con este soporte sólido.<sup>6</sup> Para elegir que conector debemos utilizar, considerando los tres grandes pasos de esta metodología sintética, se debe procurar: i) que la reacción de anclaje entre el material de partida y éste grupo sea fácil y prácticamente cuantitativa; ii) que ésta unión pueda soportar las condiciones de reacción necesarias para el procedimiento a realizar y iii) que el procedimiento de escisión de la resina sea también sencillo, cuantitativo y permita la obtención del compuesto deseado. Se clasifica a los conectores en: (i) enlazadores integrales, en los que parte del núcleo de soporte sólido forma una parte o la totalidad del enlazador y (ii) enlazadores no-integrales en los que este grupo está unido al núcleo de resina.

La mayor parte de los conectores utilizados en síntesis de fase sólida, son los no integrales, ya que tanto la sustitución como la carga de la resina son más controladas de esta forma. La mayoría de los métodos de escisión usan reactivos en exceso para asegurar que esta reacción sea completa, por lo que también es deseable, que los reactivos sean volátiles para que el exceso se elimine por evaporación o por liofilización.

Los conectores se pueden clasificar también, según el método de escisión, pero puede suceder que algunas clases se superpongan:

1. Conectores de escisión electrofílica,
2. Conectores de escisión nucleofílica,
3. Conectores fotosensibles,
4. Conectores de escisión asistida por metal,
5. Conectores de escisión en condiciones reductoras,
6. Conectores de escisión en condiciones oxidantes,
7. Conectores de cicloadición y liberación basada en cicloreversión

---

<sup>6</sup> (a) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091. (b) Eggenweiler, H.; *Drug Discov. Today* **1998**, *3*, 552. (c) James, L W. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855.

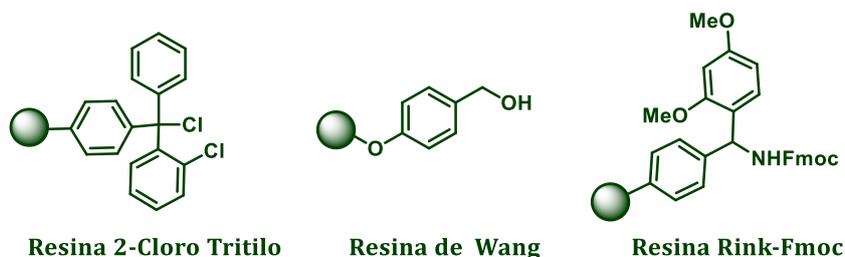
### 2.1.3.1 Conectores de escisión electrofílica

La escisión electrofílica puede realizarse a través del uso de protones o halógenos, formando estos finalmente parte del producto final, por lo que el uso de protones es el principalmente elegido.

La fuerza del ácido requerido para inducir la escisión del sustrato unido al conector está relacionada con los sustituyentes donores de electrones en el sistema aromático que estabilizará el catión unido a la resina formado en la escisión. Cuanto más estable sea este catión, la unión entre el reactivo y el conector será más lábil al ácido. Los ácidos más utilizados son TFA o HF diluídos a distintas concentraciones, lo que determina la fuerza del mismo. Estos ácidos tienen la característica de que son volátiles y a altas concentraciones son muy fuertes.

Este tipo de conectores, son ampliamente utilizados en síntesis peptídica en fase sólida (SPFS), dentro de los cuales se encuentran las resinas Merrifield, PAM, Wang, Rink, Tritilo, etc; variando con cada una, la fuerza del ácido necesario para la escisión del producto de la misma.

Los enlazadores basados en enlaces éster, también pueden escindirse mediante ataque nucleofílico, (ejemplo NaOMe para dar el éster metílico), lo cual se puede evitar utilizando enlazadores congestionados estéricamente.

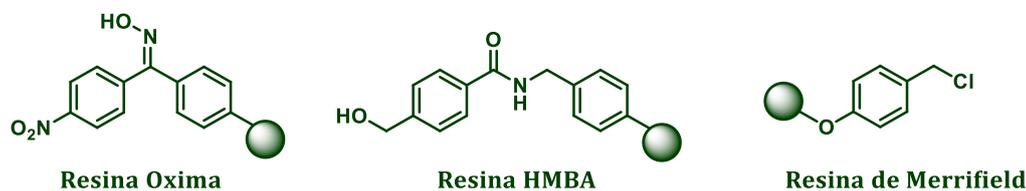


**Figura 2.4.** Conectores comunes de escisión electrofílica.

### 2.1.3.2 Conectores de escisión nucleofílica

El tipo más común de esta categoría implica la adición nucleofílica sobre el grupo funcional involucrado en la unión al conector (generalmente un éster), con posterior eliminación; mientras que el tipo menos común involucra reacciones catalizadas por bases, como la eliminación o la ciclación. La escisión se puede realizar con una solución de NaOH, NaOMe o mediante una amina no impedida tal como metilamina, con lo que se obtiene

siempre el producto con el nucleófilo incorporado a la molécula así, si fuera un grupo éster el que está unido a la resina, obtendríamos, la sal del ácido carboxílico, el éster metílico o la amida respectivamente.



**Figura 2.5.** Conectores comunes de escisión nucleofílica.

### 2.1.3.3 Conectores fotosensibles

La fotólisis es un método de escisión suave que es ortogonal a las condiciones de reacciones ácidas y básicas y que tiene lugar en condiciones neutras. El producto se puede liberar directamente en una solución acuosa neutra adecuada para la detección inmediata. Los grupos protectores fotoescindibles se han usado ampliamente en química de carbohidratos, síntesis de nucleótidos y péptidos. Su aplicación y generalización hacia síntesis no oligoméricas ha estado limitada por el hecho de que muchos compuestos orgánicos pequeños absorben la luz o son sensibles a la irradiación necesaria para romper el enlazador. La luz utilizada solo debe ser absorbida por el grupo de enlace a la resina y no debe afectar a otros grupos si es posible. El principal problema que se ha visto en este tipo de enlazadores, es cómo lograr buenos rendimientos para la escisión.

### 2.1.3.4 Conectores de escisión asistida por metal

La escisión para este tipo de conectores se basa en, la activación de olefinas por metales de transición o en la activación/polarización de enlaces carbono-heteroátomo con ácidos de Lewis, en condiciones suaves de escisión. El principal inconveniente en este caso, es que son métodos invasivos y provocan contaminación del producto final por especies metálicas, incluso cuando se usan en cantidades catalíticas.

### 2.1.3.5 Conectores de escisión en condiciones reductoras

Actualmente existen cuatro tipos de escisión reductora: a) hidrogenación catalítica, b) reducción de disulfuro, c) desulfuración y d) ataque nucleofílico por hidruro o radicales de hidrógeno. Dentro de estos, el único método de reducción que está demostrando ser

bastante general es el que utiliza hidruros. Sin embargo, presenta problemas relacionados con los bajos rendimientos obtenidos y el “work-up” necesario después de este proceso.

#### **2.1.3.6 Conectores de escisión en condiciones oxidantes**

Existen dos tipos de conectores dentro de este grupo, aquellos que son introducidos como parte del sustrato al soporte polimérico, pero que contienen un grupo sensible a la oxidación (ozonólisis de alqueno, oxidación de un enlazador a base de azufre o selenio) o usando las propiedades de los conectores existentes. Esta estrategia no es compatible con la presencia de grupos sensibles en la molécula que pueda ser modificado por la utilización de agentes oxidantes como CAN, DDQ o m-CPBA.

#### **2.1.3.7 Conectores de escisión por cicloadición y liberación basada en cicloreversión**

Esta metodología es posible, cuando en el enlace que se debe formar para obtener el ciclo, está involucrado uno de los átomos que permite la unión de la molécula al soporte sólido, entonces es posible lograr la ciclación y la escisión en el mismo paso. Esto, está bien representado por el ataque de un nucleófilo, tal como una amina, sobre un derivado de éster para liberar una lactama. Las velocidades de ciclación dependen de las cadenas laterales presentes en el ciclo que se está formando y, por lo tanto, varían de un compuesto a otro. Esto puede conducir a rendimientos variables. Utilizando la escisión cíclica, solo las moléculas que contienen el nucleófilo experimentarán escisión, por lo tanto, incluso si el paso de introducción del nucleófilo no fue bueno, se obtendrá principalmente el producto deseado en la escisión. Este método da como resultado una alta pureza, pero a costa de rendimientos potencialmente reducidos.

### 2.1.4 Métodos de análisis en fase sólida

Uno de los problemas más significativos en la síntesis en fase sólida, es el seguimiento de la reacción, ya que uno de los componentes se encuentra unido al soporte sólido, por lo general el reactivo limitante, y esto hace que no puedan controlarse por los métodos tradicionales utilizados en fase homogénea, como es la cromatografía en capa fina (TLC). Por lo tanto se debieron buscar alternativas a este problema.<sup>7</sup>

#### 2.1.4.1 Determinación del grado de carga

Uno de los problemas encontrado al trabajar en esta química es la determinación de la carga de la resina al inmovilizar un compuesto sobre la misma, o sea, determinar qué porcentaje de los sitios activos han reaccionado.

##### ✓ **Cuantificación del Fmoc.**

Este método es muy utilizado cuando es posible, debido a la efectividad del mismo, así como por su simplicidad. Para realizarlo, el compuesto unido a la resina debe poseer este grupo como protector.

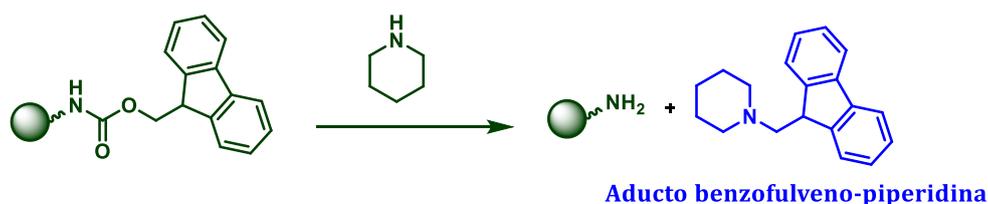
Se basa en la absorptividad que posee el aducto Benzofulveno-piperidina, formado por la reacción entre la piperidina y el grupo protector Fmoc, que lleva a la desprotección del grupo funcional en el que se encontraba el mismo, permitiendo que este quede libre para reaccionar. Durante dicho proceso, el aducto antes mencionado, pasa a la solución.<sup>8</sup> De esta manera, una vez completa la reacción de acoplamiento del reactivo protegido con Fmoc a la resina, se toma una alícuota de la misma desprotegiéndose el Fmoc con un volumen exactamente conocido de una solución de piperidina y se determina la absorbancia a 300 nm. Se calcula luego la concentración de Fmoc incorporada y así el rendimiento del acoplamiento.

Este método se utiliza tanto para saber cuánto efectivamente se cargó en la resina, como para evaluar el rendimiento de un paso intermedio de reacción.

---

<sup>7</sup> Mata, E.; Furlán, R. "Metodologías Relacionadas con la Generación de Diversidad Molecular", *Química Combinatoria*, Fondo de Cultura Económica, México, **2012**, 137.

<sup>8</sup> Hancock, W.S.; Battersby, J. E. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260.



**Esquema 2.2.** Reacción de formación del Aducto Benzofulveno-piperidina.

✓ **Determinación del cloruro residual.**

Este método solo puede utilizarse en resinas para las cuales el grupo saliente que tiene la resina es un Cl, ya que se determina la cantidad de Cl que queda unido a la resina, o sea, los sitios activos que quedaron sin reaccionar. Este método es conocido como Volhard modificado. Tiene la desventaja de que es un método destructivo y se requiere mucha muestra, por lo que solo se utiliza en casos especiales.

✓ **Otras opciones.**

Como los ensayos antes mostrados no son universales, muchas veces no pueden ser aplicados. Un ensayo universal, pero que sin duda es más engorroso, es la determinación de los rendimientos intermedios por gravimetría. Este método se basa en la determinación de la masa ganada por la resina luego de cada paso de reacción. Esto debe tener en cuenta, el peso molecular de la estructura que ganó la resina y el grado de carga inicial de la resina. Para realizarse, se debe secar y pesar la resina exactamente antes y después de cada reacción. Pero una limitante de este método, si la masa incorporada es muy pequeña, es que la diferencia de peso será baja y se necesitará mucha resina para disminuir el margen de error de la medida.

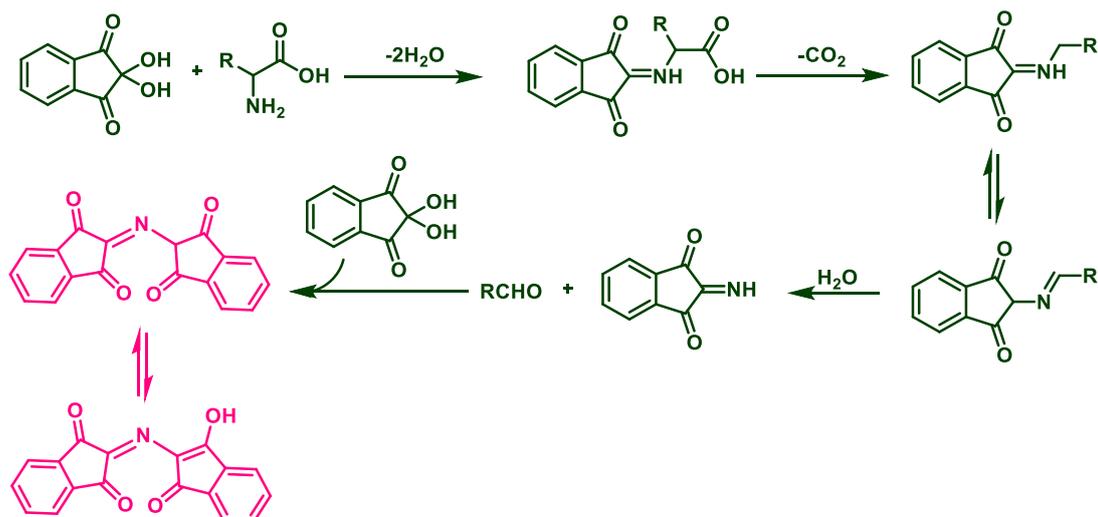
#### 2.1.4.2 Métodos de seguimiento de la reacción en la partícula

En la síntesis en fase sólida en varios pasos, generalmente se determina la estructura del producto de síntesis al final de la misma, ya que, durante el resto del tiempo, se mantiene unido al soporte sólido, lo cual sería una de las desventajas de la metodología. Se podría determinar la estructura si se escindiera una alícuota de la resina al final de cada uno de los pasos, pero de esta forma, disminuirán los rendimientos y el trabajo se hace lento y tedioso. Por lo tanto, el seguimiento de la reacción por los métodos convencionales, se hace complicado. Buscando una forma de tener más información en los pasos

intermedios, pero sin tener que recurrir a los métodos tradicionales, se implementaron métodos colorimétricos y espectroscópicos para su análisis.

✓ **Métodos colorimétricos.**

El test de Kaiser,<sup>9</sup> o test de Ninhidrina, que es utilizado para detectar la presencia de grupos amino libres. Se utiliza para determinar si la reacción sobre un grupo amino se completó o no.



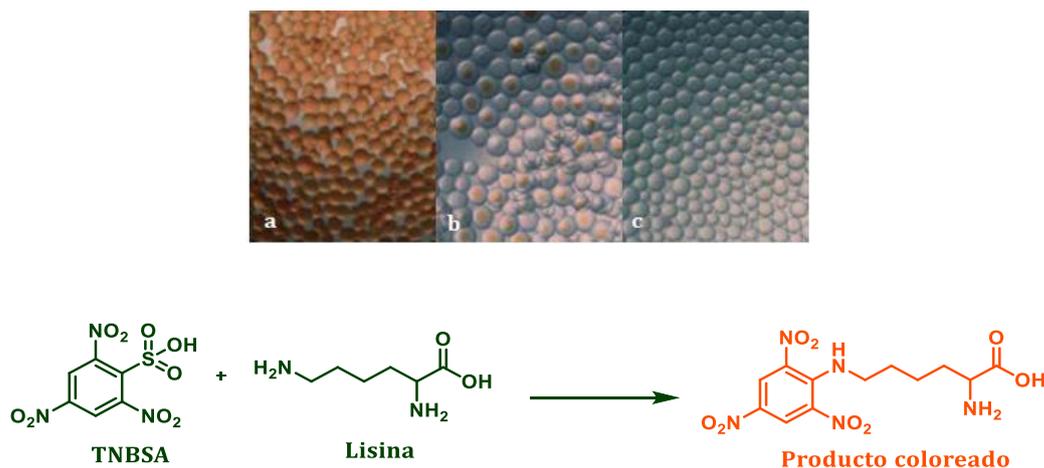
**Esquema 2.3.** Reacción de formación del complejo coloreado entre Ninhidrina y un amino libre.

En la práctica, se trata de tomar una alícuota pequeña de la resina, y luego agregarle unas gotas de la solución de Kaiser (Ninhidrina, fenol y KCN), dejándolo actuar durante 5 minutos a 100°C. Si una vez transcurrido este tiempo, los granos permanecen amarillos, el test es negativo. Para que el test sea positivo debe virar a un color violeta.

Además de éste, existen otros ensayos para determinar la presencia de aminos libres con otras características, como ser mayor número de sustituyentes, como el test de TNBS (ácido trinitrobenzensulfónico), Cloranilo o azul de bromofenol entre otros, Figura 2.10.<sup>10</sup>

<sup>9</sup> Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.

<sup>10</sup> *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Global Marketing, Bachem Group, **2016**.



**Esquema 2.4.** Reacción de formación del complejo coloreado con TNBS. a) Test positivo, b) acoplamiento incompleto, c) Test negativo (acoplamiento completo).

#### ✓ **Espectroscopia Infrarroja.**

Este método es ampliamente usado en el análisis de la muestra aún unida a la resina. Es simple y no requiere más que un espectrofotómetro de IR convencional.

Para llevar a cabo esta metodología es necesario pesar aproximadamente 3 mg de la resina y 100 mg de KBr, formar la pastilla de manera habitual con muestras sólidas y hacer la medición. Se utiliza muy frecuentemente para detectar aparición o desaparición de señales que tienen corrimientos característicos y pronunciados en el espectro IR, como ser alquinos, nitrilos, sulfóxidos, sulfonas, aldehídos, cetonas, cloruros de ácido, amidas, esterres, lactamas, lactonas y todo tipo de compuesto carbonílico. Un ejemplo de un caso ampliamente aplicado, es la incorporación de un ácido carboxílico a la resina de Wang, así como la desaparición del grupo hidroxilo de la misma.

#### ✓ **<sup>13</sup>C-RMN en fase gel para monitoreo de reacciones en fase sólida.**

La espectroscopía de RMN, es una de las herramientas más utilizadas por los químicos orgánicos para la determinación estructural de los compuestos con los que se trabaja. Cuando se tiene al producto unido a un soporte polimérico, es posible realizar este análisis mediante la formación de un gel con algún solvente deuterado que sea capaz de hinchar la resina.<sup>11</sup>

Para el caso de los protones, es una herramienta no muy útil debido a que las señales se ensanchan demasiado y no es posible diferenciar correctamente cada pico. Sin embargo, esta técnica es muy útil cuando se utiliza <sup>13</sup>C-RMN broadband (con desacoplamiento de

<sup>11</sup> Giralt, E.; Rizo, J.; Pedroso, E. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 4141.

banda ancha) por la menor complejidad que presenta éste experimento frente al  $^1\text{H}$ -RMN. Además, las señales correspondientes a los carbonos, por lo general varían muy poco con el entorno, en cambio las de protón se ven más afectadas. Una gran ventaja de este método es que puede llevarse a cabo con un equipo convencional de RMN. La preparación de la muestra se realiza con unos 50 a 80 mg de resina provenientes de la reacción a analizar que deben colocarse en un tubo de RMN, posteriormente se agrega el solvente deuterado lentamente, mientras se hincha y forma un gel. Para que pueda realizarse el análisis es necesario una buena cantidad de resina, ya que el producto anclado a la misma se encuentra en una concentración bastante pequeña, por este motivo también este estudio requiere un tiempo tal vez un poco mayor que el convencional, de todas formas esta resina es completamente recuperable. El espectro obtenido permite identificar señales del compuesto unido a la resina, siempre y cuando no se superpongan con las de la matriz polimérica.

#### ✓ Métodos espectroscópicos no convencionales

Dentro de estos podemos nombrar al RMN de giro del ángulo mágico (RMN-MAS),<sup>12</sup> espectrometría de masas MALDI-TOF con escisión sobre la placa de muestras,<sup>13</sup> o variantes de IR como la Microespectroscopia FT-IR (espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier),<sup>14</sup> o la espectroscopia infrarroja foto acústica (PAS-FTIR).<sup>15</sup>

#### 2.1.4.3 Métodos de seguimiento de la reacción por escisión del producto

Este método de seguimiento de la reacción es poco atractivo, ya que implica la escisión del producto de reacción de una pequeña alícuota de la resina, por lo que habrá disminución de los rendimientos y el trabajo se vuelve lento y tedioso.

De esta forma, el seguimiento de la reacción se puede realizar por los métodos convencionales. Por lo tanto, se puede utilizar métodos cromatográficos como ser cromatografía en capa fina (TLC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el detector deseado. También se pueden utilizar otros métodos siempre teniendo en cuenta la sensibilidad del mismo. En este trabajo, el seguimiento de las reacciones, se realizaron de esta forma utilizando un HPLC con detector UV.

---

<sup>12</sup> Wehler, T.; Westman, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4771.

<sup>13</sup> Xiao, X.; Nova, M. P., *Combinatorial Chemistry Synthesis and Application*, S.R Wilson y A. W. Czarnik (eds.), John Wiley & Sons, Nueva York, **1997**, 134.

<sup>14</sup> Yan, B. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 621.

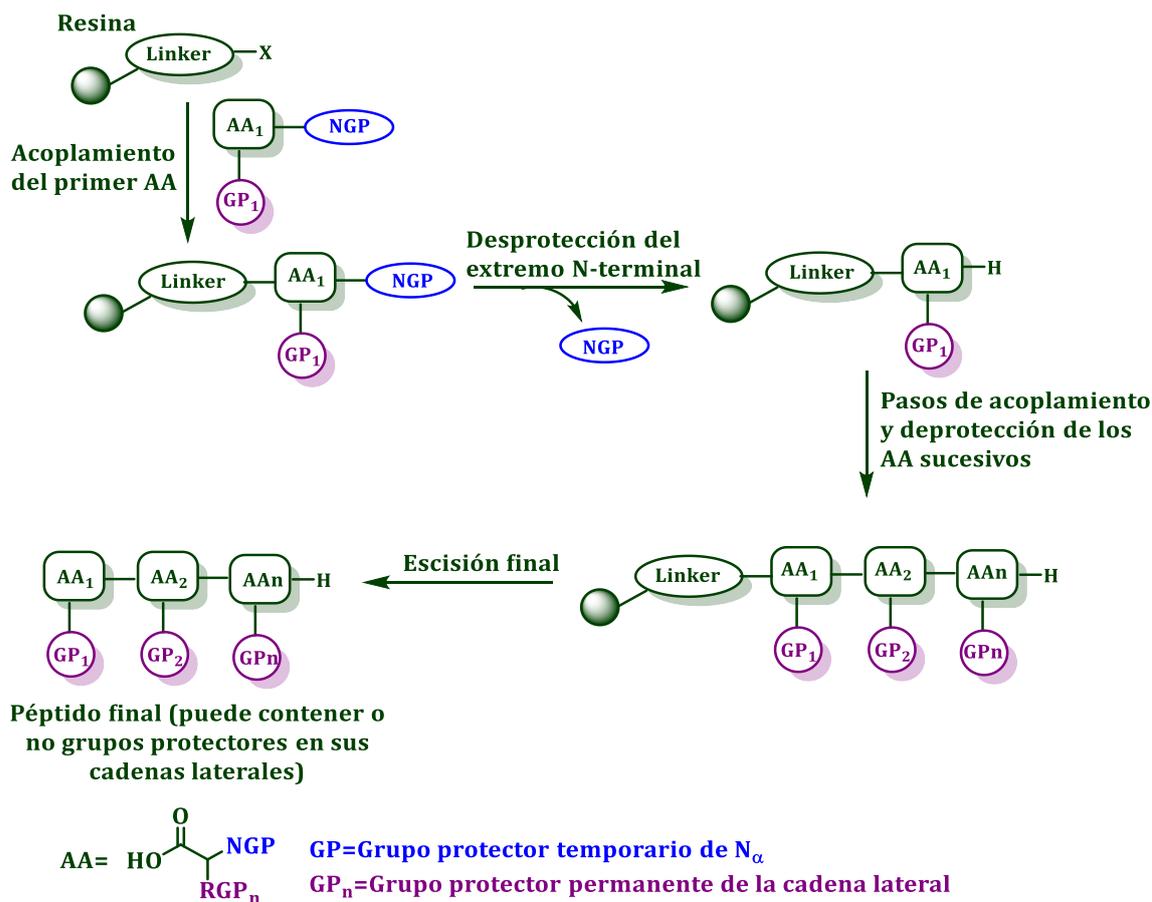
<sup>15</sup> Gosselin, E.; Di Renzo, M.; Ellis, T. H.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7980.

### 2.1.5 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida

La síntesis peptídica, se basa en la formación de enlaces amida, a partir de un grupo  $\alpha$ -carboxilo y un grupo  $\alpha$ -amino de diferentes aminoácidos, mediante reacciones de condensación. Una característica que podemos encontrar en los aminoácidos, es la presencia de más de un grupo funcional que podría reaccionar durante este proceso, por lo cual es importante el uso de grupos protectores apropiados para prevenir la formación de enlaces no deseados y reacciones secundarias. Además de lo antes mencionado, hay que tener en cuenta que se deberán utilizar reactivos que promuevan la formación del enlace amida.

Por lo antedicho, para realizar la síntesis de un péptido, se necesita a los aminoácidos involucrados, con sus grupos funcionales no reactantes protegidos, alguna forma de activar al ácido carboxílico (agentes acoplantes) y un medio de reacción.

La síntesis peptídica en solución, fue ampliamente utilizada y estudiada por nuestro grupo, pero en este trabajo nos enfocaremos en la síntesis peptídica sobre un soporte sólido.

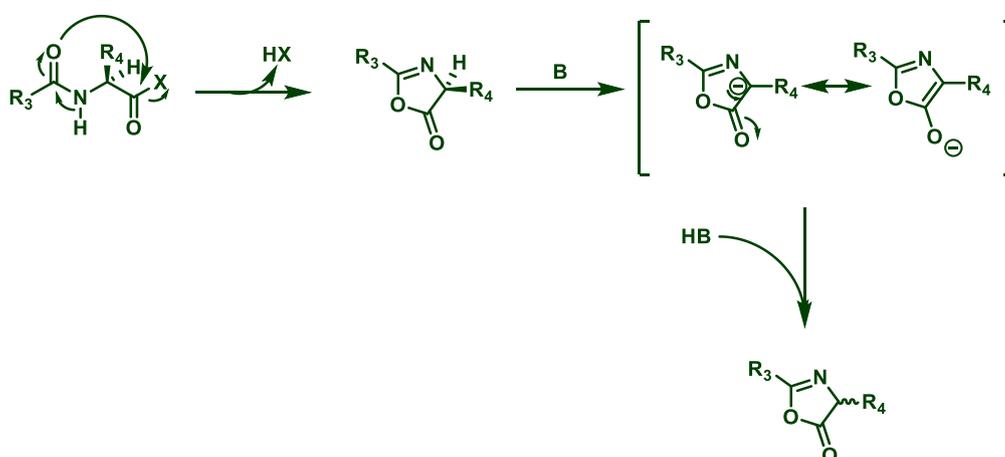


Esquema 2.5. Esquema de síntesis peptídica en fase sólida.

El primer paso para esta síntesis es el acoplamiento del primer aminoácido (AA), por su extremo C-terminal al conector de la resina, para lo que, deben estar protegidos su grupo N-terminal y el grupo funcional de su cadena lateral. Es importante resaltar, que estos grupos protectores, sobre el grupo amino del AA y sobre el grupo funcional de la cadena lateral del mismo, deben poder escindirse en condiciones diferentes (concepto de grupos protectores ortogonales). Luego con el fin de alargar la cadena por la formación de enlaces peptídicos, se desprotege el extremo N, y se acopla el siguiente AA con el mismo sistema de protección ortogonal planteado para el primer AA, utilizando un agente acoplante para que esta reacción se dé rápidamente. Mediante ciclos sucesivos de desprotección y acoplamiento de un nuevo AA, se continúa con el crecimiento de la cadena hasta obtener la secuencia deseada. Una vez que se llega al compuesto deseado soportado en la resina, se pasa a la escisión del péptido de la misma, en condiciones que dependen del conector elegido. Esquema 2.5.

La activación del ácido carboxílico, se puede realizar de diversas maneras, por formación de haluros de acilo, de anhídridos, de ésteres, de azidas, etc.<sup>16</sup>

Debido al exceso de reactivos utilizado en la síntesis en fase sólida, las reacciones de acoplamiento son generalmente más rápidas que en solución, lo que minimiza la probabilidad de racemización, de todas maneras, siempre debe tenerse en cuenta este problema, especialmente para los aminoácidos que son propensos a esto, como la cisteína o la histidina.<sup>17</sup> Uno de los mecanismos principales por los que se produce la racemización, es vía formación de oxazolona, por la presencia de una base en el medio de reacción, según el esquema 2.6.



**Esquema 2.6.** Racemización vía formación de Oxazolona.

### 2.1.5.1 Agentes acoplantes

#### Carbodiimidias

Este grupo de agentes acoplantes, con la aparición de la DCC,<sup>18</sup> fue de los primeros en ser utilizados, siendo hoy de amplio uso tanto en síntesis en fase sólida como en solución. La carbodiimida reacciona con el ácido carboxílico para formar la O-acilisourea que puede reaccionar directamente con la amina para dar la amida deseada y el subproducto urea.

En esta reacción se puede dar la formación de un subproducto no reactivo, la N-acilurea, lo cual lleva a una disminución en el rendimiento, Esquema 2.7. Para evitar la formación de la N-acilurea, se suele adicionar otro nucleófilo que reaccione en forma

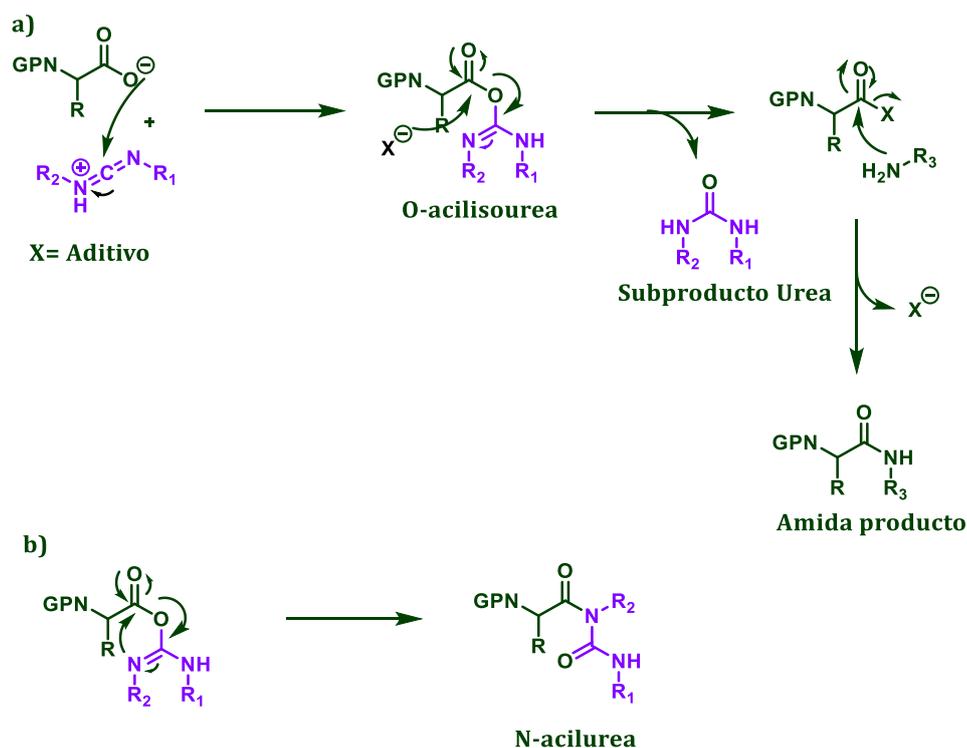
<sup>16</sup> Montalbetti, C. A.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827.

<sup>17</sup> Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M.A; El-Faham, A. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97.

<sup>18</sup> Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067.

rápida con la *O*-acilisourea. Estos agentes se conocen como aditivos y suelen usarse 4-DMAP, HOBT y análogos.

La preactivación en la que el ácido es colocado en presencia de la carbodiimida y el aditivo, antes de entrar en contacto con la amina, en la mayoría de las veces permite mejores resultados.



**Esquema 2.7.** a) Mecanismo de formación de enlace amina, con una carbodiimida como agente acoplante. b) Mecanismo de formación del producto no deseado, *N*-acilurea.

Entre las carbodiimidas disponibles comercialmente, la más utilizada para la síntesis peptídica en fase sólida, es DIC, ya que al reaccionar, la urea generada es soluble en DCM, DMF, MeOH y THF, solventes comúnmente usados para esta metodología. Otras ureas pueden no ser solubles en estos solventes (ejemplo: DCU) o son solubles mayormente en solventes acuosos (ejemplo: EDCU), Figura 2.6. Además, en algunos casos, se utiliza una base, pero en la mayoría de los casos no es necesario; esto es uno de los factores que disminuye el riesgo de racemización vía oxazolona, Esquema 2.6.

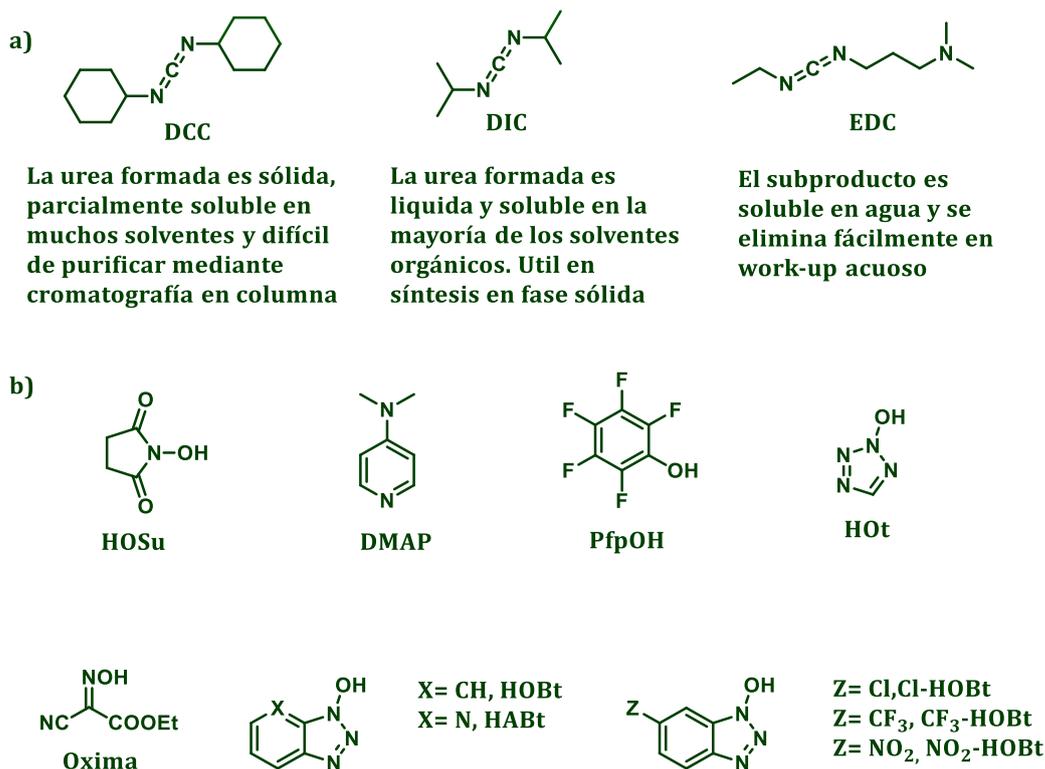
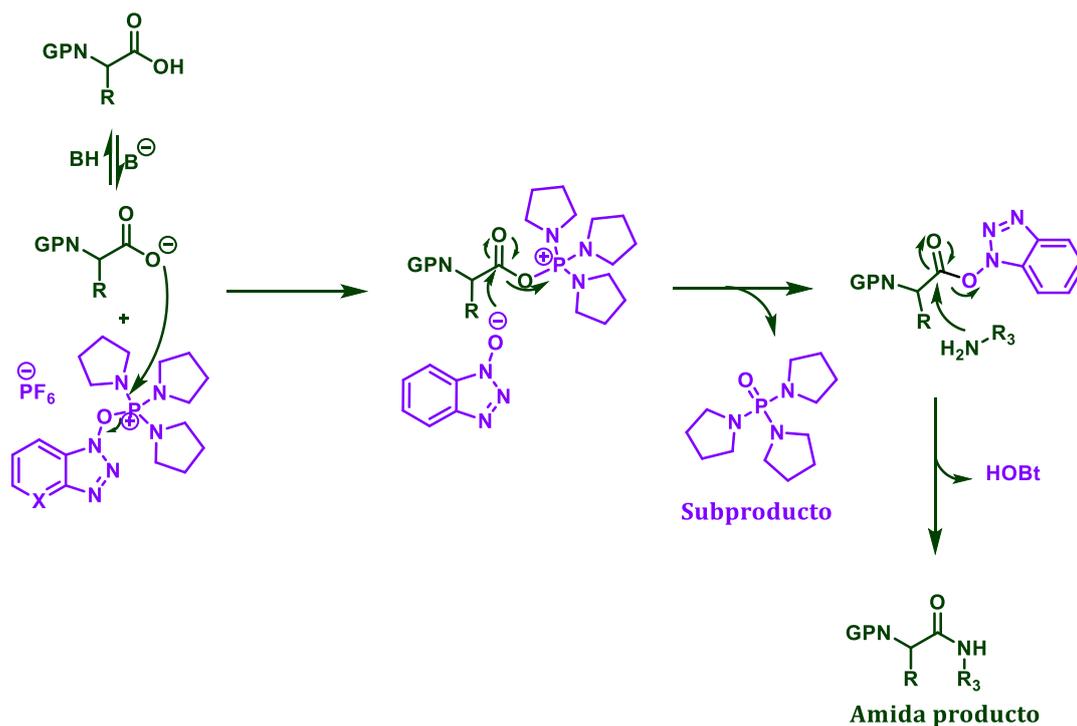


Figura 2.6. a) Carbodiimidas más comunes. b) Aditivos.

### Sales de Fosfonio.

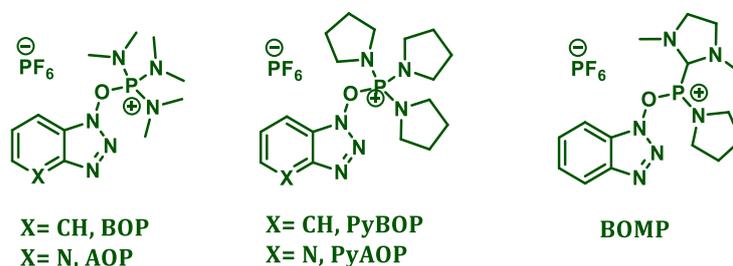
Estos reactivos fueron descritos por primera vez en el 1969 como reactivos acoplantes,<sup>19</sup> siendo los primeros de la clase las sales “onio” basadas en HOBt. A estas se las conoce como agentes de un solo paso, ya que en la misma molécula está presente el activante y el aditivo, lo cual representa una clara ventaja frente al uso de DIC/HOBt. Para el uso de éstas, a diferencia de las carbodiimidas, es necesaria la presencia de una base, con bajo carácter nucleofílico (DIPEA, NMM, TMP, TEA, etc), para desprotonar el ácido correspondiente. Pero además de esto, para que se dé la reacción de acoplamiento, deben estar presentes el ácido, la amina y la sal de fosfonio correspondiente. La fuerza motora de esta reacción es la formación de la fosfoamida como producto secundario en este caso. Esquema 2.8.

<sup>19</sup> Gawne, G.; Kenner, G.W. ; Sheppard, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5670.



**Esquema 2.8.** Mecanismo de formación de enlace amina, con PyBOP como agente acoplante.

Como en el caso de los agentes acoplantes mencionados anteriormente, el producto secundario formado, puede limitar el uso de uno u otro de estos reactivos, ya que por ejemplo, la reacción usando BOP ((benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato), genera hexametilfosforotriamida, que es toxica y carcinogénica, por lo que se prefiere evitar su uso, sustituyéndolo por PyBOP, ya que su fosfoamida no posee esas características. Figura 2.7.



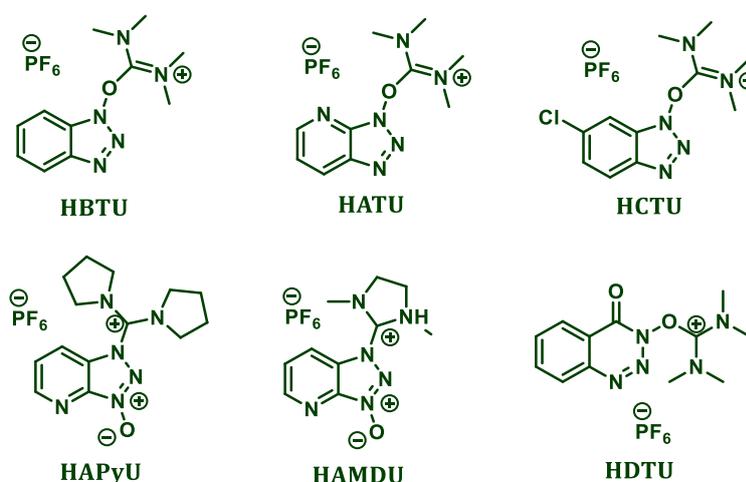
**Figura 2.7.** Sales de fosfonio más comunes

Estos reactivos son capaces de promover un rápido acoplamiento y reducir la racemización, principalmente en el acoplamiento con aminas primarias sin mucho impedimento estérico.

### Sales de Uronio/Guanidinio

Estos agentes acoplantes actúan por un mecanismo similar a las sales de fosfonio, la diferencia es que contienen como contra-ión al uronio, por lo que el primer ataque nucleofílico del ácido carboxílico es sobre un C en lugar de un P, manteniendo el resto del mecanismo de activación y acoplamiento. También en este caso la fuerza motora es la formación de la urea.<sup>20</sup>

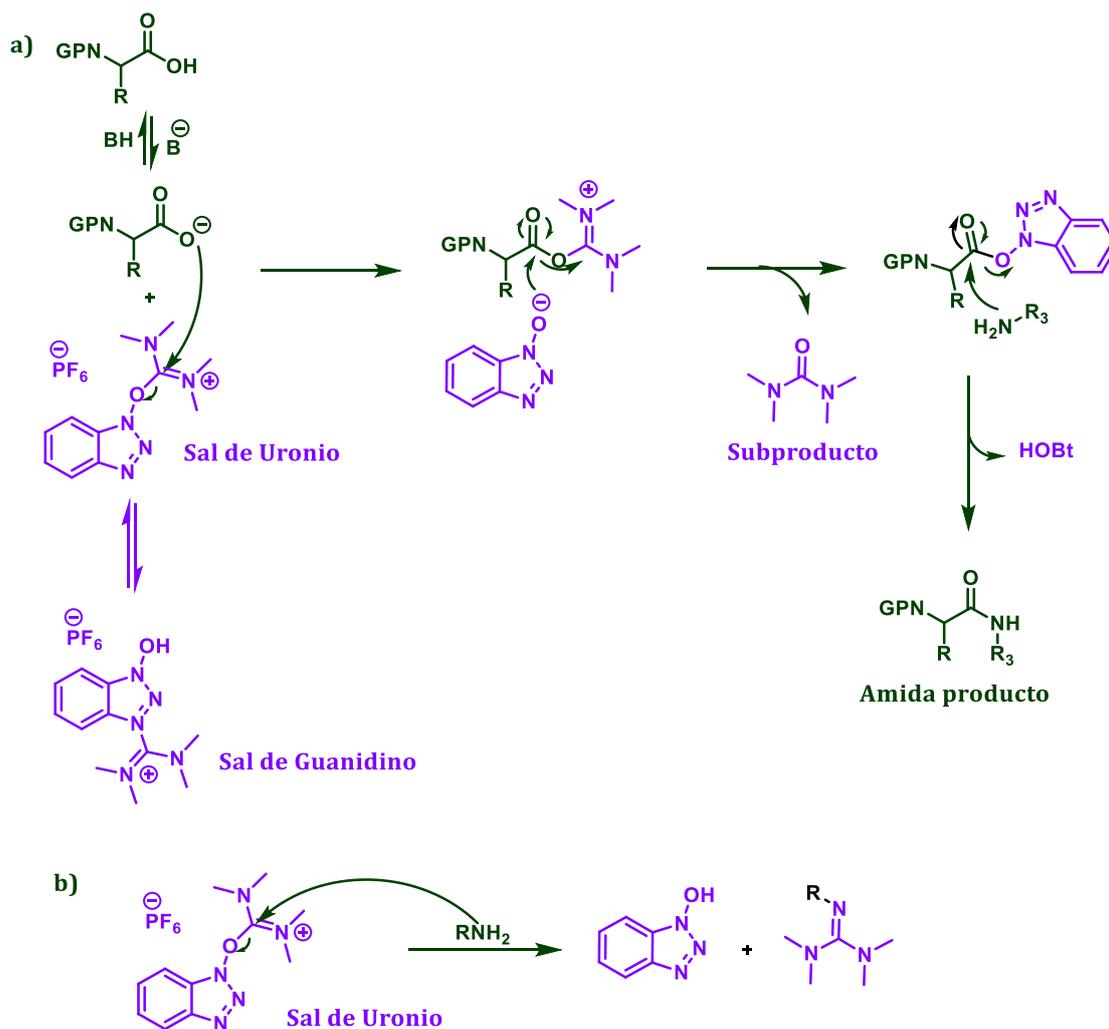
De entre las sales de uronio, aquellas basadas en HOAt son mejores activantes, por lo que se lo prefiere para realizar acoplamientos difíciles como ser con aminas secundarias como aminoácidos N-metilados. Estos generan mejores grupos salientes permitiendo una mayor rapidez y acoplamientos más efectivos. Al reducir los tiempos, también se reduce la posibilidad de racemización.



**Figura 2.8.** Sales de uronio más comunes.

Estos reactivos además pueden reaccionar tanto en su forma uronio como guanidino, las cuales se encuentran en equilibrio en solución, Esquema 2.9. Además, el uso de HXTU, trae la posibilidad de que se genere una guanidina por la reacción de la amina presente en el medio de reacción con el HBTU, pero esta reacción se ve disminuida si se agrega además HOBT.

<sup>20</sup> Carpino, L.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*,441.



**Esquema 2.9.** a) Mecanismo de formación de enlace amina con sal de uronio como agente acoplante. b) Formación del posible producto secundario guanidina con el uso de HBTU.

### 2.1.5.2 Estrategias en SPPS

Principalmente se utilizan dos estrategias sintéticas para péptidos conocidas como Fmoc o Boc en las que no solo difieren los grupos protectores presentes sobre las funcionalidades de cada aminoácido, sino también las condiciones de escisión de la resina, debiendo ser ambas ortogonales entre sí.<sup>21</sup> El concepto de ortogonalidad implica que ante la presencia de múltiples grupos protectores, un conjunto de estos pueda retirarse sin afectar los otros, o sea, que se escinden en diferentes condiciones.<sup>22</sup>

#### Estrategia Boc/Bn.

Esta estrategia fue introducida por Merrifield en 1976,<sup>23</sup> para la síntesis peptídica en fase sólida, en la que pudo establecer una metodología que se basa en el uso de aminoácidos que presentan su grupo N-terminal protegidos por un grupo Boc, el cual se escinde en condiciones acidas tales como 25-50% TFA/DCM, Trimetilsilil cloruro 1M, HCl 4M en Dioxano, etc, mientras que las cadenas laterales de estos, deben ser protegidos con grupos que sean ortogonales al Boc o que se escindan en condiciones acidas más fuertes (pseudortogonalidad), por lo que se utilizan Bn y análogos. Esquema 2.10.

Para el uso de esta estrategia, es necesario que la unión del ácido a la resina pueda resistir estas condiciones para la desprotección del Boc, por lo que las resinas que pueden utilizarse son principalmente aquellas de escisión electrofílica con TFA o HF concentrado. Esto genera que el grupo amino se encuentre cargado positivamente, limitando la agregación de las cadenas peptídicas sintetizadas.

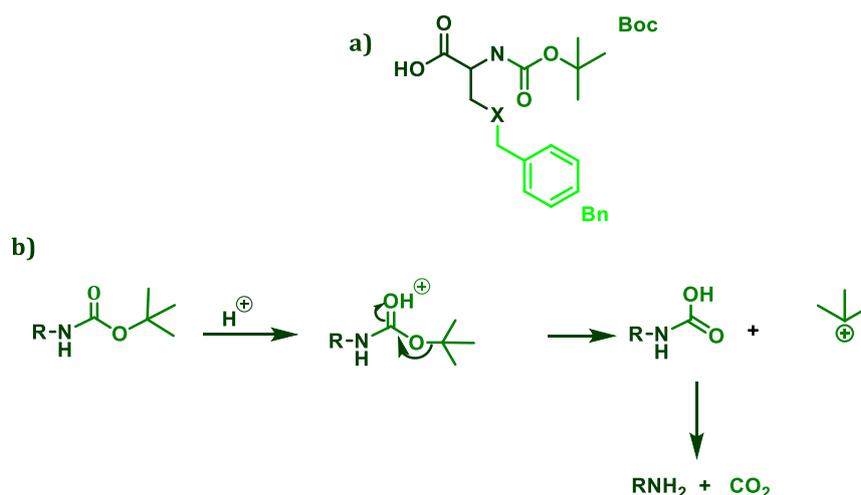
Las condiciones ácidas extremas, deben ser soportadas por la resina, por todo el material necesario para la síntesis y por el mismo péptido. Por lo que, esta estrategia es utilizada cuando se trata de péptidos sensibles a condiciones básicas o para síntesis complejas o con altas probabilidades de agregación.

---

<sup>21</sup> A. Llobet, I.; Alvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2457.

<sup>22</sup> Merrifield, R. B.; Barany, G.; Cosand, W. L.; Engelhard, M.; Mojssov, S.; *Pept. Proc. Am. Pept. Symp.* **1977**, *5*, 488.

<sup>23</sup> a) Mitchell, R.; Erickson, B.; Ryabtsev, M.; Hodges, R. S.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7357. b) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5463.



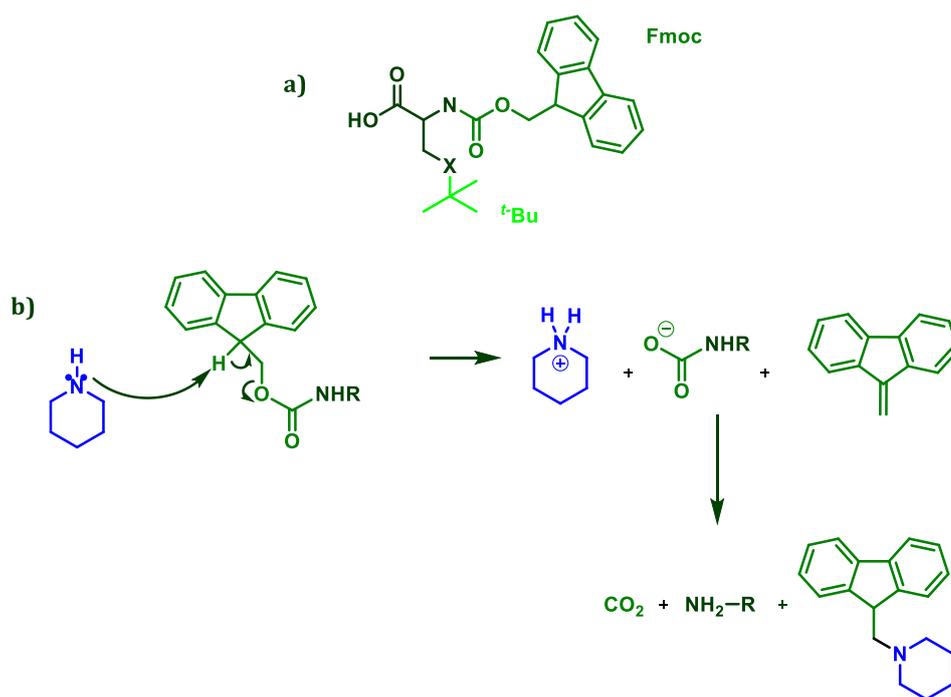
**Esquema 2.10.** a) Aminoácido tipo utilizado para la estrategia sintética Boc/Bn. b) Mecanismo de escisión ácida del Boc.

### Estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu

Debido a las condiciones extremas utilizadas en el caso anterior, era necesario el desarrollo de una estrategia más suave, para lo cual se desarrolló la síntesis peptídica basada en la protección del extremo N-terminal con un grupo Fmoc, el cual se escinde en condiciones básicas.<sup>24</sup> Para la escisión del mismo, por lo general se utiliza 20-50% de Piperidina/DMF (Esquema 2.11), que en pocos minutos permite una desprotección total del grupo amino. Es fundamental que éste proceso sea efectivo, ya que la baja eficiencia en la desprotección dará como resultado una disminución del rendimiento y en la calidad del péptido, incrementando las impurezas relacionadas en el crudo final. Cuando las secuencias peptídicas son largas, el tratamiento con Piperidina comienza a perder efectividad, haciéndose necesarias mayores concentraciones de ésta o mayores tiempos de tratamiento. En los casos en los que es problemática esta desprotección, ha tenido éxito una solución de DBU, la cual tienen un carácter básico más fuerte y permite una escisión más rápida, lo que trae aparejado una menor probabilidad de racemización de AA propensos a la misma como la Cisteína. Se recomienda utilizar la solución de DBU con un 2% de piperidina, para que esta pueda atrapar el dibenzofulveno generado, para evitar la alquilación por éste de los aminos que quedaron expuestos.<sup>25</sup>

<sup>24</sup> White, P. D.; Chan, W. C. "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A practical approach", Oxford University, **2004**, 9.

<sup>25</sup> a) Wade, J.; Bedford, J.; Sheppard, R.; Tregear, G. *Peptide Res.* **1991**, *4*, 194. b) Kates, S.; Nuria, A.; Solé, M.; Beyermann, M.; Barany, G.; Albericio, F. *Peptide Res.* **1996**, *9*, 106.



**Esquema 2.11.** a) Aminoácido tipo utilizado para la estrategia sintética Fmoc/<sup>t</sup>Bu. b) Mecanismo de escisión del Fmoc con piperidina.

También se pueden utilizar morfolina en DMF (1:1) o 2% HOBT, 2% hexametilénimina y 25% N-metilpirrolidina en DMSO/NMP (1:1).<sup>26</sup> La adición de una pequeña cantidad de HOBT en el caso enunciado, se debe a que reduce la formación de aspartimida en las secuencias propensas a que se dé esta reacción secundaria.

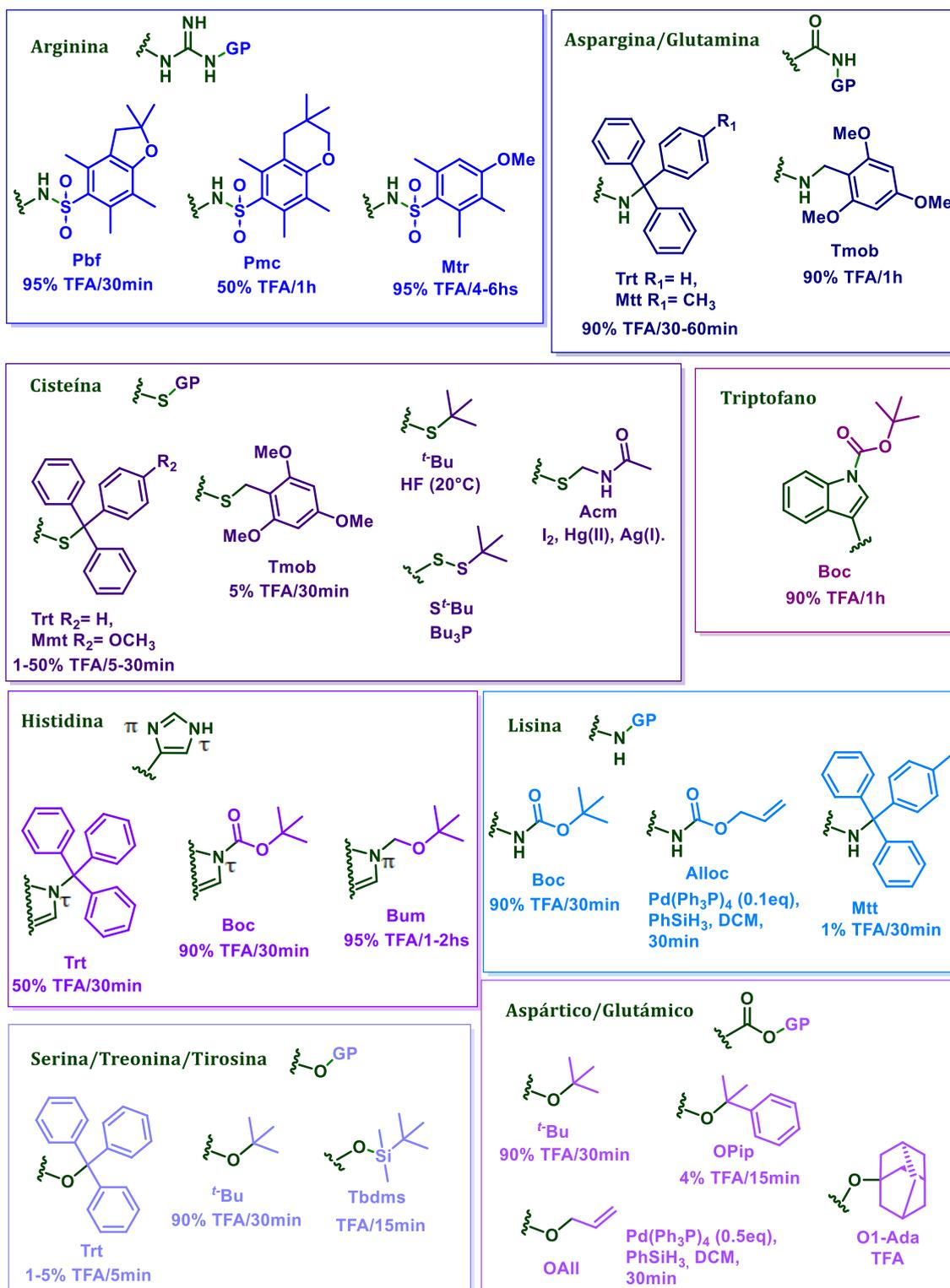
Debido a que la amina desprotegida no tiene carga por estar en un medio básico, las posibilidades de agregación de las cadenas peptídicas son mayores que en el caso de la estrategia antes citada, por lo que esto puede ser un problema, principalmente para cadenas largas.

En esta estrategia, se utilizan grupos de protección ortogonales para las cadenas laterales, los cuales se escinden en condiciones ácidas por lo general, como ser <sup>t</sup>Bu, Trt, Pbf, etc. Pueden utilizarse también grupos que se escindan en otras condiciones, como ser los grupos tipo alilo (All), para el cual se utiliza Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> como agente de desprotección, Figura 2.9.<sup>27</sup> Muchas veces, es necesario que la mezcla para la desprotección de las cadenas laterales de los AA, además de contener el agente de desprotección, contenga un “agente

<sup>26</sup> A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2459.

<sup>27</sup> P. D White; W. C. Chan; “*Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A practical approach*”, Oxford University, **2004**, 20.

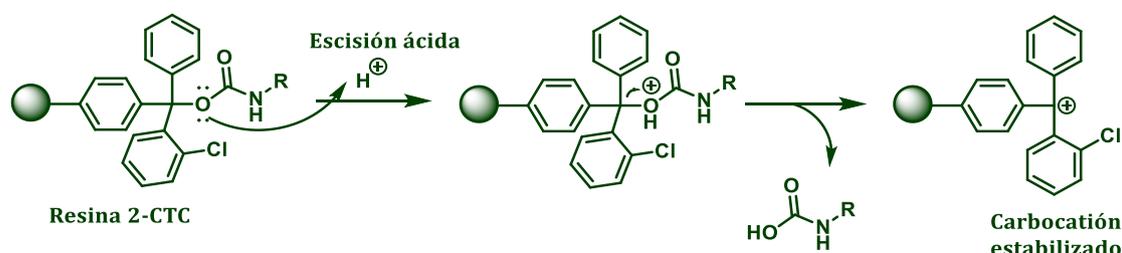
secuestrante” o “scavenger”, que reaccione con el residuo del grupo protector, evitando que vuelva a reaccionar con algún grupo funcional libre del péptido desprotegido (ej. TIS). La alquilación por carbocationes generados en la escisión acidolítica es la reacción secundaria más común.<sup>10</sup>



**Figura 2.9.** Grupos protectores de grupos funcionales de aminoácidos utilizados en la estrategia sintética Fmoc/<sup>t</sup>-Bu.

En cuanto a la resina utilizada para aplicar esta estrategia, la misma debe poder resistir las condiciones básicas de desprotección del extremo N-terminal, por lo que se

eligen por lo general, resinas de escisión electrofílica. Como ser la resina 2-Clorotritilo (2-CTC), resina de Wang, PAM, Rink, etc. Figura 2.5. Dentro de este grupo hay resinas de diferente labilidad a las condiciones ácidas, en función de la estabilidad del carbocación formado en esas condiciones. Figura 2.22.



**Esquema 2.12.** Mecanismo de escisión ácida para la resina 2-CTC y formación del carbocación residual.

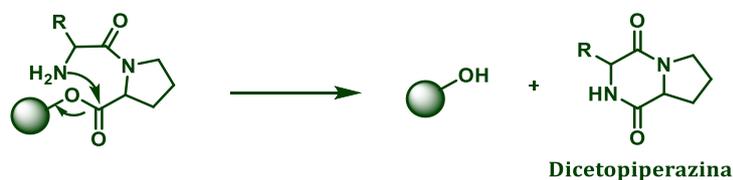
Para la elección de la resina en la síntesis peptídica, debe tenerse en cuenta cuales son los aminoácidos que se utilizarán, ya que si estos presentan grupos protectores, hay que considerar si se desea mantenerlos o no, ya que como se mencionó, la mayoría se escinden en condiciones ácidas.

El acoplamiento del primer aminoácido, se puede dar por una sustitución nucleofílica  $S_N2$ , con el uso solamente de una base (Resina 2-CTC o Br-Wang), siendo el carboxilato el nucleófilo, o puede ser necesario el uso de un agente acoplante, para que el C del ácido carboxílico actúe como electrófilo (Resina de Wang o SASRIN). En función del rendimiento y velocidad de esta reacción, se puede obtener una carga completa de la resina, ocupando el primer aminoácido la mayoría de los sitios activos de esta, pero de todas formas, todos los sitios que no reaccionaron, deben bloquearse para evitar la obtención de secuencias truncadas que impurificarán el producto final, proceso que va a depender del conector.

Cuando se comienza la síntesis peptídica en fase sólida, se pueden producir algunas reacciones no deseadas que se pueden evitar o disminuir eligiendo bien el conector y la secuencia peptídica. Cuando el primer o segundo aminoácido acoplado es Prolina o un N-alquil-aminoácido, luego de la desprotección del dipéptido se puede dar la formación de una dicetopiperazina, (Esquema 2.13). Esto provoca la pérdida de producto o la formación de nuevos sitios de unión, disminuyendo los rendimientos de la síntesis.<sup>28</sup> Para evitar esto, se puede acortar el tiempo en el que quede libre este grupo amino o utilizar resina con

<sup>28</sup> Fischer, P.M.J. *Pept. Sci.* **2003**, 9, 9.

conectores voluminosos, como la resina 2-CTC. Pero para conectores voluminosos, hay que tener en cuenta también, que esto puede afectar el rendimiento del primer acoplamiento, si el aminoácido para acoplar es también muy voluminoso o posee grupos protectores con esta característica.



**Esquema 2.13.** Mecanismo de formación de la diketopiperazina.

Una vez culminada la síntesis del péptido deseado y escindido éste de la resina, se obtiene un crudo que puede contener el péptido objetivo e impurezas como péptidos truncados, de péptidos desprotegidos con desprotección incompleta, péptidos modificados, agentes secuestrantes y subproductos derivados de los grupos protectores escindidos. La pureza del péptido diana se determina mediante HPLC-UV analítico en fase reversa, utilizando una  $\lambda = 210\text{-}220$  nm, ya que es donde se encuentran los máximos de absorción para el enlace amida y otros cromóforos. La cuantificación se realiza como porcentaje de área, ya que corresponde al área del pico principal en relación con el área total de todos los picos, es decir, todo el material que se absorbe a esta longitud de onda. El agua y las sales residuales no se detectan en el espectro UV, por lo que estos no se podrían cuantificar por éste método si fuera necesario. Por lo tanto, la pureza HPLC-UV (%) corresponde al porcentaje del péptido buscado en relación con la cantidad total de material que absorbe a 210-220 nm.<sup>29</sup>

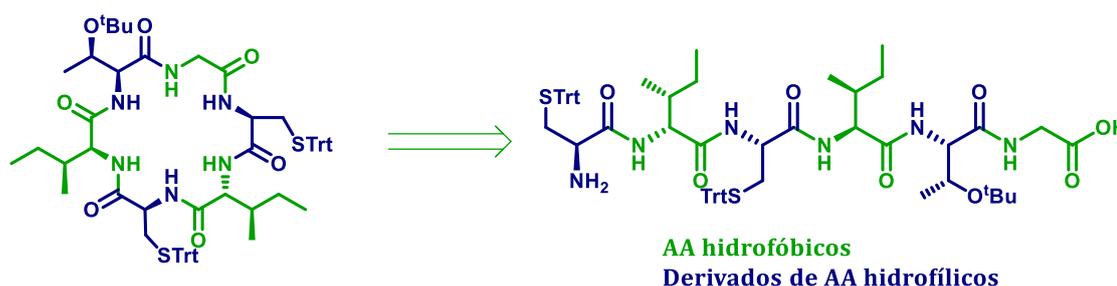
También, dentro de los parámetros utilizados para determinar pureza y rendimiento, es importante definir rendimiento total del crudo y el rendimiento específico del péptido. Rendimiento total del crudo, se calcula como el porcentaje del crudo total obtenido en relación al máximo teórico alcanzable. Mientras que el rendimiento específico de péptido, se calcula como la relación entre el peso obtenido en mg y el peso teórico también en mg, multiplicado por la pureza (% del área) del pico principal.<sup>30</sup>

<sup>29</sup> *A brief introduction to synthesis, design, and handling of peptides*, Global Marketing, Bachem Group, 2016.

<sup>30</sup> Luna, O.; Gomez, J.; Cárdenas, C.; Albericio, F.; Marshall, S.; Guzmán, F.; *Molecules* **2016**, *21*, 1542.

## 2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para la elección de las diferentes secuencias peptídicas que componen los macrociclos finales, nos enfocamos en seguir el lineamiento de investigación que se venía realizando previamente en el grupo.<sup>31</sup> En este marco, basándonos en la estructura que presenta el ciclopéptido A (Esquema 2.14), en el que se intercalan AA hidrofóbicos y derivados de AA hidrofílicos, pensamos en comenzar los estudios sintéticos siguiendo esta idea, e ir variando la composición aminoacídica, según como fueran variando los resultados de actividades biológicas (capítulo 6). En este trabajo, para la síntesis peptídica, se utilizó la estrategia sintética Fmoc/*t*-Bu, y según el objetivo final de la síntesis, se utilizaron dos resinas, la 2-CTC y la resina de Wang. Estas difieren entre otras características en la concentración de la solución ácida que permite la escisión del péptido de la misma.



**Esquema 2.14.** Ciclopéptido A, base para la síntesis de las secuencias peptídicas sintetizadas en este trabajo.

### 2.2.1 Síntesis de Péptidos en Resina 2-CTC

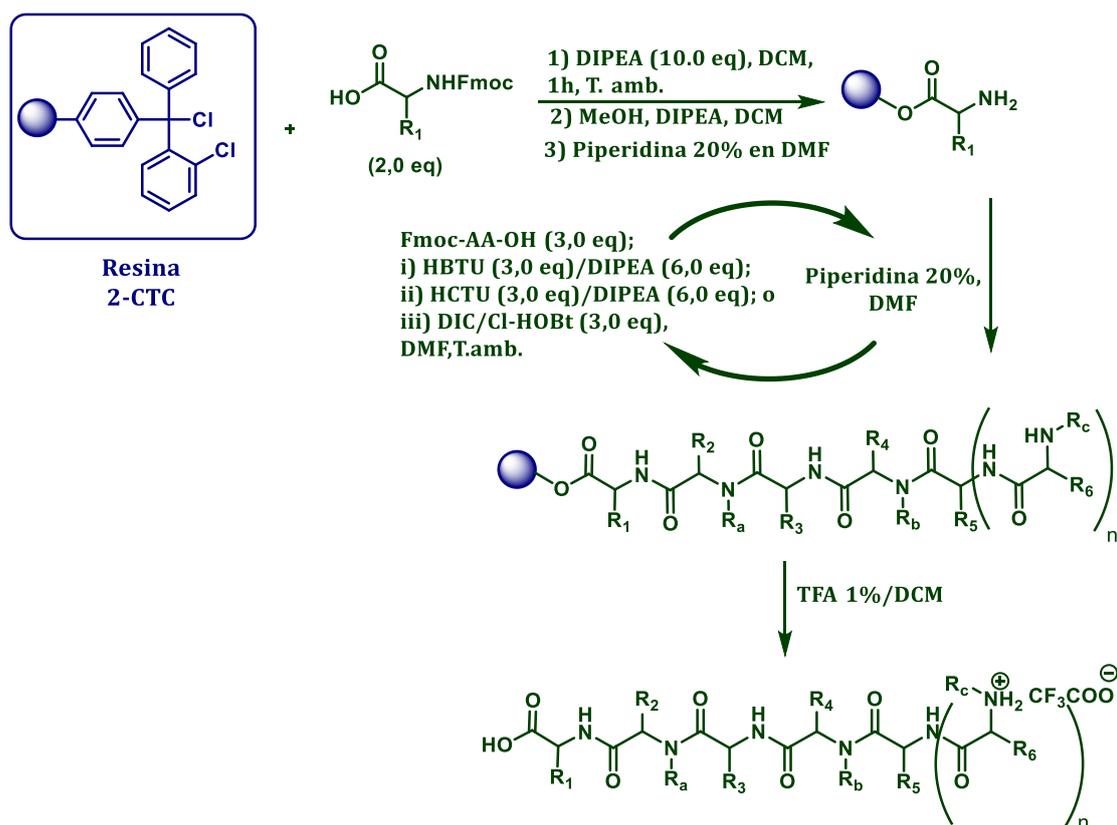
#### 2.2.1.1 Anclando el grupo carboxilo del primer AA

Con el fin de sintetizar secuencias peptídicas para la formación de macrociclos, conteniendo aminoácidos hidrofílicos y que mantengan sus grupos protectores al escindir el péptido de la resina, se planteó en primer lugar utilizar la resina 2-CTC. En ésta, la escisión final se realiza con una solución al 1% de TFA en DCM, lo que permite mantener

<sup>31</sup> Peña, S.; Fagundez, C.; Medeiros, A.; Comini, M.; Scarone, L.; Sellanes, D.; Manta, E.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Stewart, L.; Yardley, V.; Serra, G. *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 1309.

todos los grupos protectores. La resina utilizada es de carga media (1.1-1.4 mmol/g) y debido a que los péptidos objetivo son de un máximo de 6 AA se trató de utilizar la totalidad de estos sitios activos. Esta es una resina que además de económica, permite un acoplamiento del primer AA casi cuantitativo y de forma rápida por una  $S_N2$ , solamente con el agregado de un exceso de DIPEA (10 eq) para formación del carboxilato del ácido del extremo C-terminal. De cualquier manera, los posibles sitios que quedaron sin reaccionar deben ser bloqueados, para lo que luego de 1h en presencia del primer AA, se agrega MeOH al medio de reacción sustituyendo el Cl de la resina por el  $-OCH_3$ . La carga efectiva de la resina se determinó por cuantificación del Fmoc.

Se realizó la síntesis de los diferentes péptidos utilizando una metodología general, variándose los aminoácidos que forman parte de cada uno y el agente acoplante seleccionado según cada caso. Esquema 2.15. Para el acoplamiento de la mayor parte de los Fmoc-AA-OH se utilizó HBTU/DIPEA. Pero en el caso de acoplamientos de AA  $\beta$ -sustituido o de un acoplamiento luego de un N-metil-AA, se utilizó HCTU/DIPEA en la mayor parte de los casos con preactivación, ya que estos acoplamientos son más dificultosos, pero no fue necesario el reacoplamiento. Por otro lado, para aminoácidos con alto riesgo de racemización, como es el caso de Fmoc-Cys(Trt)-OH, se utilizó DIC/Cl-HOBt, cuyas condiciones neutras disminuyen éste riesgo. Cada acoplamiento se mantuvo durante 90 min, una vez culminado ese tiempo, se filtró la mezcla y se lavó la resina con DCM, DMF y MeOH, siempre dejando la resina hinchada con DCM o DMF para el siguiente paso de reacción. El avance de la reacción de acoplamiento se realizó escindiendo una alícuota muy pequeña del péptido de la resina y determinando la aparición del producto y desaparición del reactivo por HPLC-UV en fase reversa. Una vez terminada la síntesis del producto, se escindió de la resina en las condiciones antes mencionadas.



**Esquema 2.15.** Secuencia sintética de péptidos en resina 2-CTC.

La mayoría de las secuencias peptídicas tienen Glicina como extremo *C*-terminal básicamente por dos motivos: i) por un lado estos péptidos fueron pensados para realizar una macrociclación posterior, por lo que, se evitaría la potencial racemización en el  $C\alpha$  de este extremo de la cadena; ii) por otro lado, al ser este AA el de menor tamaño, podrá acceder con mas facilidad a los sitios activos de la resina que contiene un conector voluminoso, permitiendo un anclaje mas rápido y completo.

Como se puede ver en la tabla 2.1, los péptidos **14**, **15** y **16** que contienen NHMe-Gly en el extremo *N*-terminal, tienen algunas particularidades, que no contemplan los conceptos anteriores. El residuo *N*-terminal al encontrarse metilado podría disminuir el rendimiento del acoplamiento en la ciclación y el AA *C*-terminal es ópticamente activo con lo que habría riesgo de racemización durante la macrociclación. El motivo que nos llevó a seleccionar de todos modos esta secuencia de aminoácidos, es que en un primer intento de obtención de estos compuestos, se observó una pérdida sustancial en la masa del producto al comenzar acoplar el tercer AA, cuando el primer o segundo AA introducido en la secuencia sintética era NHMe-Gly. Esto, según lo descrito en la sección 2.1.5.2 del presente capítulo, podría

ser debido a la formación de la dicetopiperazina, que se genera con la escisión del péptido de la resina. Para solucionar éste problema, se buscaron dos alternativas, una fue no colocar NHMe-Gly como primer o segundo AA en los casos que fuera posible, o tratar de realizar en un menor tiempo los pasos de desprotección y lavado de la resina luego de acoplado el segundo AA.

En cuanto a la reacción de acoplamiento que involucre el grupo amino de NMe-Gly, se probó en un principio utilizando HBTU como agente acoplante, pero en estos casos fue necesario un reacoplamiento. Por este motivo, se comenzó a utilizar HCTU con el cual se completa la reacción en un solo tratamiento de 1.5 hs.

Entrada	Péptido	Rend <sup>a</sup> (%)	Pur. <sup>b</sup> (%)
1	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (1)	91	90
2	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly-OH (2)	94	80
3	NH <sub>2</sub> -L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Ile-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Ile-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (3)	84	85
4	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (4)	87	93
5	NH <sub>2</sub> -L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly-OH (5)	81	89
6	NH <sub>2</sub> -L-Val-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-OH (6)	98	94
7	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (7)	80	92
8	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly-OH (8)	87	93
9	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (9)	94	84
10	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu( <sup>γ</sup> <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (10)	93	88
11	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu( <sup>γ</sup> <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (11)	86	95
12	NH <sub>2</sub> -L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu( <sup>γ</sup> <sup>t</sup> Bu)-L-Met-Gly-OH (12)	79	100
13	NH <sub>2</sub> -L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Ile-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Phe-L-Glu( <sup>γ</sup> <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (13)	93	100
14	NHMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-OH (14)	82	92
15	NHMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-OH (15)	87	82
16	NHMe-Gly-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-OH (16)	90	91
17	NH <sub>2</sub> -L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-OH (17)	89	91
18	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (18)	95	97
19	NH <sub>2</sub> -L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH (19)	84	96
20	NHMe-Gly-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-OH (20)	67	82

(a) Rendimientos basados en la carga teorica de la resina. (b) Pureza UV determinada por HPLC.

**Tabla 2.1.** Rendimientos y purezas de los péptidos obtenidos utilizando la resina 2-CTC.

Por esta metodología se lograron sintetizar 17 hexapéptidos y 3 pentapéptidos con rendimientos entre 67-98% (con respecto a la carga inicial de la resina) y las purezas que se muestran en la tabla 2.1. Como es posible observar en dicha tabla, los péptidos se obtuvieron con muy buenos rendimientos y purezas, en cortos tiempos, considerando los 13 pasos de reacción involucrados en la misma para hexapéptidos.

### 2.2.1.2 Anclando por la cadena lateral del primer AA.

Con el fin de estudiar luego una metodología rápida de macrociclación en fase sólida, se sintetizaron péptidos en la resina 2-CTC utilizando la misma estrategia sintética, pero anclando el primer AA por su cadena lateral.

Para comenzar esta síntesis, fue necesario estudiar las condiciones de acoplamiento del primer aminoácido a la resina, ya que el mismo debe anclarse por un grupo nucleofílico de su cadena lateral. Para realizar esto, en bibliografía,<sup>32</sup> podemos encontrar estrategias de anclaje para una serie de funcionalidades de cadena lateral de aminoácidos, necesitándose al menos tres dimensiones ortogonales de grupos protectores para construir el péptido.

Teniendo en cuenta esto, se seleccionaron Fmoc-Ser-OAll y Fmoc-Glu- $\alpha$ OAll que poseen diferentes grupos en sus cadenas laterales. El grupo All se escinde con Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>, condiciones compatibles con la unión a la resina y los demás grupos protectores de esta estrategia. Con estos AA se ensayaron las condiciones de acoplamiento, como se muestra en la tabla 2.2, comprobándose que el anclaje por el ácido carboxílico de Glu presenta un rendimiento notablemente mejor que el mostrado para el acoplamiento de un grupo OH de Ser.

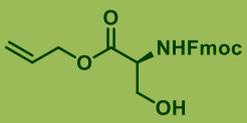
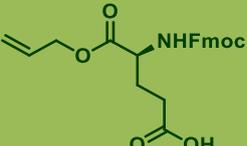
Las mejores condiciones de acoplamiento para ambos AA, son utilizando 10 equivalentes de DIPEA como base. Pero mientras que para el ácido Glutámico es suficiente con un tratamiento de 2hs en estas condiciones para lograr un 92% de anclaje, para la Serina se llega al 51% con dos tratamientos de 2hs. Otro aspecto a destacar en cuanto al

---

<sup>32</sup> a) Isied, S.; Kuehn, C. G.; Lyon, J. M.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2632. b) Rovero, P.; Quartara, L.; Fabbri, G. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2639-2642. c) Trzeciak, A.; Bannwarth, W. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4557. d) Kates, S. A.; Solé, N.A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549. e) Alsina, J.; Chiva, C.; Ortiz, M.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 883. f) Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633. g) García, O.; Nicolás, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5319. h) Cabrele, C.; Langer, M.; Beck-Sickinger, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4353.

acoplamiento de la Ser, es que se debe tener en cuenta que se hace necesaria una mayor cantidad de MeOH para realizar el bloqueo de la resina, ya que en las condiciones de la entrada 3 de la tabla 2.2, cuando se acopló el segundo AA, se observó por HPLC-UV residuos de este último, indicando que ingresó en los sitios que quedaron sin bloquear.

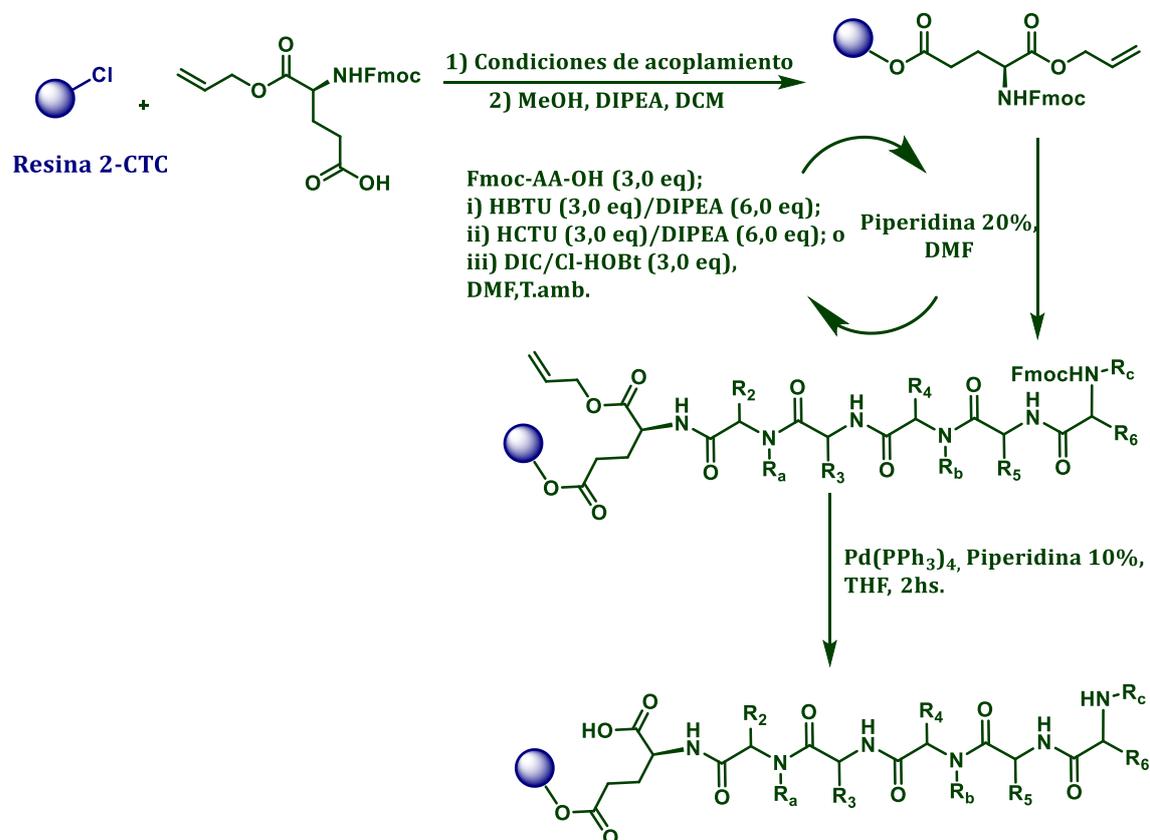
Por este motivo y dado nuestro interés en sintetizar derivados conteniendo un grupo COOH libre, se decidió utilizar Fmoc-Glu- $\alpha$ OAll para la síntesis de nuevos péptidos aplicando la metodología de acoplamiento descrita anteriormente Esquema 2.16.

Aminoácido	Entrada	Condiciones	Resultado
	1	1) AA (2,0 eq), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (7,0 eq), DCM, 8 h. 2) MeOH (0,8 ml por g de resina)	No hubo anclaje
	2	1) AA (1,3 eq), DIPEA (3,0 eq), DMAP, DCM /DMF, 16h. 2) MeOH (0,8 ml por g de resina)	No hubo anclaje
	3	1) AA (2,5 eq), DIPEA (5,0 eq), DMAP, DCM /DMF, 16h. 2) MeOH (0,8 ml por g de resina)	Anclaje del 51% Bloqueo con MeOH incompleto.
	4	1) AA (2,5 eq), DIPEA (10,0 eq), DMAP, DCM /DMF, 2x2hs. 2) MeOH (1,6 ml por g de resina)	Anclaje del 51%
	5	1) AA (2,0 eq), DIPEA (10,0 eq), DMF, 2hs. 2) MeOH (0,8 ml por g de resina)	Anclaje del 92%

**Tabla 2.2.** Condiciones ensayadas de acoplamiento a la resina 2-CTC de diferentes aminoácidos por su cadena lateral.

Por esta metodología se sintetizaron siete péptidos, realizando el seguimiento de la reacción de cada acoplamiento por escisión de una alícuota de la resina y comprobando la aparición del producto y desaparición del reactivo por HPLC-UV. La desprotección de ambos extremos del péptido soportado en la resina, se realizaron en un solo paso, utilizando Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> para la escisión del All y Piperidina para la del Fmoc en una concentración menor a la usual (debido a que se deja reaccionar por más tiempo). Este paso se realiza en THF para una mejor solubilización del reactivo con Paladio. Para que dicho reactivo se pueda lavar de la resina una vez finalizada la desprotección, se debe utilizar Dietilditiocarbamato de sodio que formará un complejo con el Pd, permitiendo su eliminación. El producto final no fue escindido debido a que se trata de un intermediario

para la macrociclación final en la resina. Las secuencias sintetizadas por esta metodología se muestran en el siguiente capítulo.



**Esquema 2.16.** Síntesis de péptidos anclando el primer AA por el grupo  $\gamma$  de Glu

### 2.2.2 Síntesis de Péptidos en Resina de Wang

Debido a la alta labilidad de la resina 2-CTC a las condiciones ácidas y con el objetivo de realizar derivatizaciones de los péptidos en las que pueda generarse un medio levemente ácido, se estudió la síntesis peptídica en una resina capaz de soportar esas condiciones. Para esto se eligió la resina de Wang, donde la escisión se realiza con una solución de concentración de TFA mayor al 10%, dependiendo de la estructura anclada, siendo usual para compuestos peptídicos alrededor de 90-95% de TFA durante 1-2 horas.<sup>33</sup> Una característica de esta elevada concentración de ácido para la escisión final, es que si el péptido posee grupos protectores de escisión ácida, los perderá en este paso. Tuvimos la

<sup>33</sup> P. D White; W. C. Chan; "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A practical approach", Oxford University, 2004, 17.

oportunidad de ganar experiencia con el uso de esta resina, al realizar una pasantía, en la Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fé, Argentina, a cargo de la Dra. Carina Delpiccolo y el Dr. Ernesto Mata integrándonos a un proyecto de su grupo.<sup>34</sup>

Luego, en nuestro laboratorio, fue fundamental una instancia de optimización de la síntesis de péptidos en resina de Wang. Para esto en primer lugar, se optimizaron las condiciones de acoplamiento del primer aminoácido al soporte sólido, realizando pruebas con diferentes agentes acoplantes, utilizando distintos tiempos, bases, etc, como se muestra en el Esquema 2.17. Se utilizó Fmoc-Cys(Trt)-OH para esta prueba, porque es el AA que podría generar mas complicaciones en este paso. Todas las pruebas se realizaron en pequeñas porciones de resina (aproximadamente 50 mg). Para determinar el % de anclaje, se realizó la escisión del AA de la resina, con una solución 95% de TFA en DCM, midiendo el peso del producto liberado de la misma con respecto a su carga teórica.

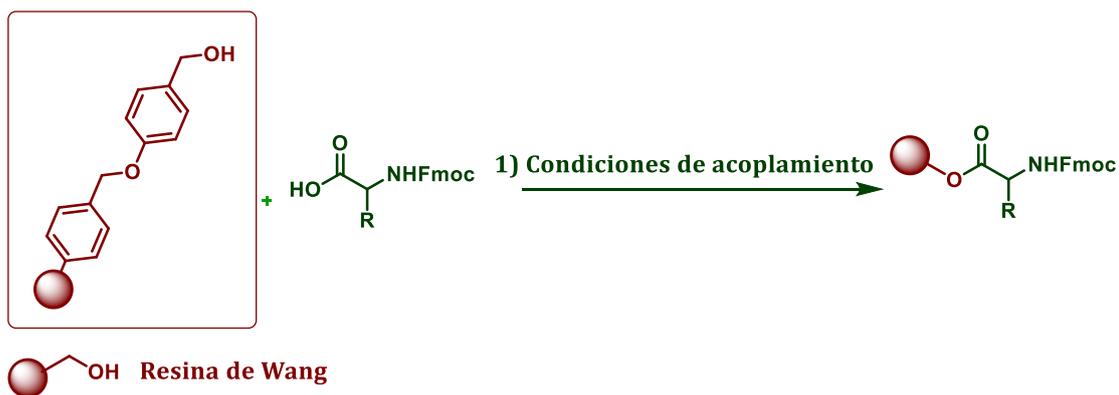
Analizando los resultados obtenidos, se pudo determinar que la mejores condiciones de acoplamiento son las de las metodologías E, F y G, con porcentajes de anclaje mayores al 85%.

Entonces, considerando que los AA con los que se trabajará para anclar en la resina son en su gran mayoría quirales, se decidió utilizar DIC como agente acoplante, ya que éste no requiere la presencia de una base, que podría producir la racemización de los mismos, aunque esto no asegura que no suceda. Por esta razón se descarta la metodología E. Entre las metodologías F y G, no se han evidenciado diferencias significativas en los resultados obtenidos.

Se ha realizado la síntesis de péptidos de diversa longitud, utilizando las condiciones G de anclaje en resina de Wang, Esquema 2.18. Al igual que para la resina 2-CTC, el seguimiento de la reacción de cada acoplamiento se realiza sobre el producto escindido de una alícuota de la resina comprobando la aparición del producto y desaparición del reactivo por HPLC-UV. En este caso, se tuvo en cuenta que para los AA que poseen grupos protectores en sus cadenas laterales, el compuesto presente en la solución analizada, sería el producto desprotegido.

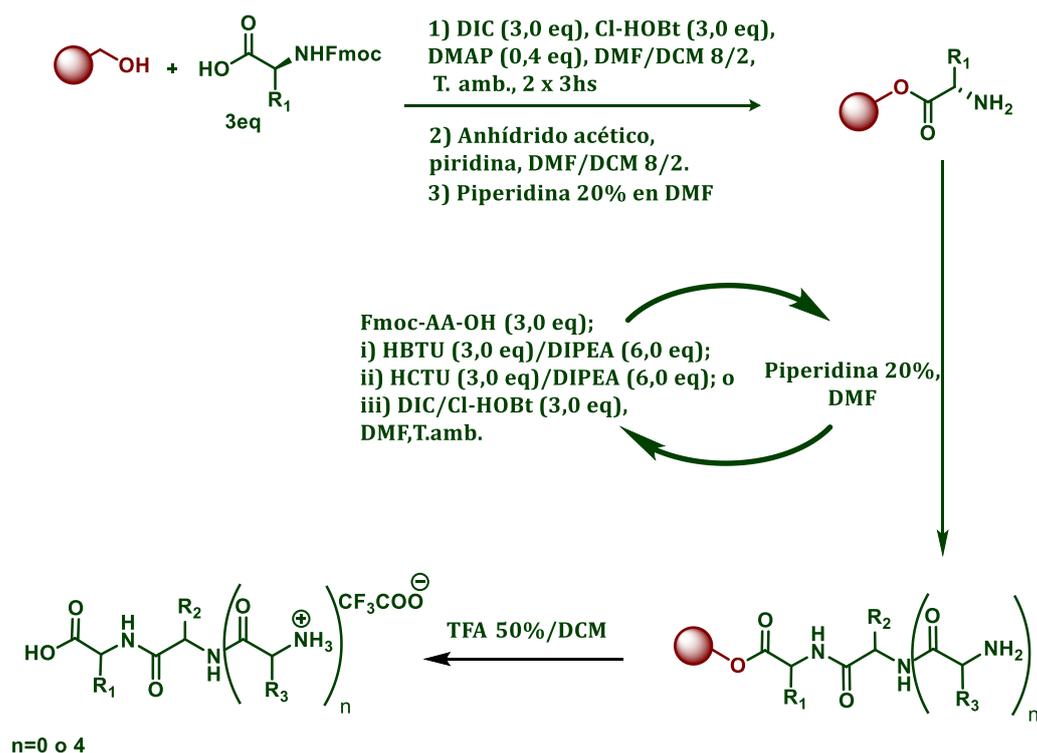
---

<sup>34</sup> C. Traficante; C. Fagundez; G. Serra, E. Mata, C. Delpiccolo; *ACS Combinatorial Science*; **2016**, *18*, 225.



Metodología	Agente acoplante	Base	Tiempo de reacción	Aditivo	Catalizador	% de anclaje
A (2 eq AA)	HCTU (2.2 eq)	Imidazol (3 eq)	12 hs	Cl-HOBt (2.2eq)	-	76
B (2 eq AA)	HBTU (2.2 eq)	Imidazol (3 eq)	12 hs	Cl-HOBt (2.2eq)	-	82
C (2 eq AA)	HATU (2.2 eq)	Imidazol (3 eq)	12 hs	Cl-HOBt (2.2eq)	-	83
D (2 eq AA)	PyBOP (2.2 eq)	Imidazol (3 eq)	12 hs	Cl-HOBt (2.2eq)	-	46
E (5 eq AA)	HATU (5 eq)	DIPEA (10 eq)	4 hs	-	-	87
F (3 eq AA)	DIC (3 eq)	-	3 hs	Cl-HOBt (3eq)	DMAP (0.1eq)	91
G (4 eq AA)	DIC (3 eq)	-	2 x 3 hs	Cl-HOBt (3eq)	DMAP (0.4 eq)	98
H (4 eq AA)	DIC (3 eq)	-	2 x 3 hs	-	DMAP (0.4 eq)	78
I (2 eq AA)	HCTU (2.2 eq)	DIPEA (3 eq)	12 hs	Cl-HOBt (2.2eq)	-	39

**Esquema 2.17.** Optimización de condiciones de acoplamiento del primer aminoácido en resina de Wang.



**Esquema 2.18.** Síntesis de péptidos en resina de Wang.

Utilizando esta metodología se lograron sintetizar dos hexapéptidos y algunos dipéptidos que se mantuvieron unidos a la resina para realizar el estudio de reacciones de derivatización (ver Capítulo 4).

Debido a las condiciones fuertemente ácidas necesarias para escindir el péptido de esta resina, el compuesto obtenido pierde los grupos protectores de las cadenas laterales de los residuos aminoácidos, quedando los mismos como impureza en el crudo obtenido luego de la escisión. Estos péptidos se presentan en el Figura 2.10. Sus estructuras fueron determinadas por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN y experimentos bidimensionales (HSQC y COSY) del crudo procedente de la escisión de una alícuota de resina. En estos experimentos, se pudo identificar las señales características de los compuestos deseados, tales como las de H pertenecientes a  $\text{C}\alpha$  y  $\text{C}\beta$  de los residuos aminoácidos, así como también las correspondientes a estos C. Estos productos se mantuvieron unidos a la misma para realizar estudios de derivatizaciones posteriores, por lo que el rendimiento y la pureza no fueron determinados.

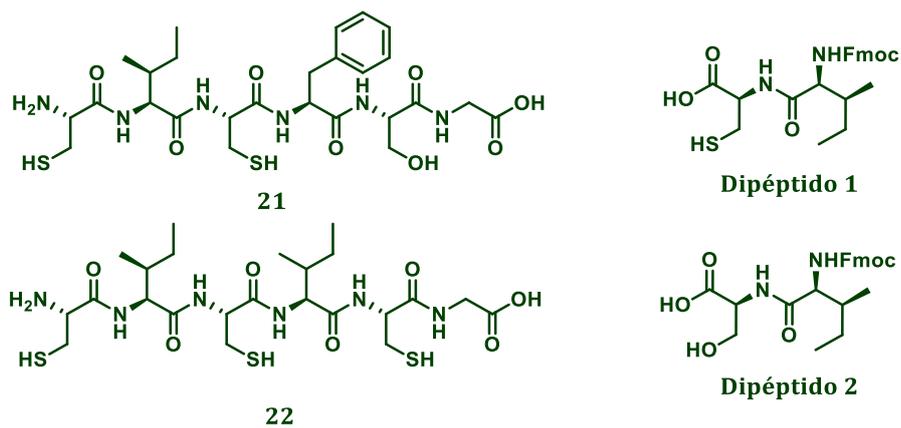


Figura 2.10. Péptidos obtenidos en Resina de Wang.



## 2.3 CONCLUSIONES

Por la metodología de síntesis utilizando la resina 2-CTC, acoplado el primer AA por su extremo C-terminal, se lograron optimizar las condiciones de reacción y de esta manera obtener 20 péptidos con excelentes rendimientos y purezas UV superiores al 80%. Estos procedimientos se realizaron en tiempos cortos, considerando los 13 pasos de reacción involucrados en las mismas (para el caso de los hexapéptidos). Es así que luego de haber encontrado las condiciones adecuadas para cada secuencia peptídica, un hexapéptido puede ser preparado en dos días de trabajo.

Con el uso de esta metodología, también se optimizó la síntesis de péptidos conteniendo NHMe-Gly, logrando acoplamientos completos en un solo paso sobre los NMe de los mismos y encontrando secuencias adecuadas de manera de evitar la pérdida de masa causada por la formación de dicetopiperacinas .

Para la síntesis peptídica en esta misma resina, pero acoplado el primer AA por su cadena lateral, se encontraron condiciones efectivas de anclaje para el Fmoc-Glu- $\alpha$ OAll obteniéndose buenos resultados con la síntesis de los hexapéptidos preparados.

Utilizando la resina de Wang, se lograron establecer buenas condiciones de acoplamiento del primer AA y sintetizar los péptidos deseados.



## 2.4 PARTE EXPERIMENTAL

Todos los solventes utilizados durante la síntesis, fueron de calidad HPLC.

Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$  NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químicos se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

El seguimiento de todas las reacciones se realizaron por HPLC analítico en un equipo Shimadzu (LC-10AT Pump) equipado con una columna Waters  $\mu$ Bondapak<sup>TM</sup> C18 (150 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m) y un detector SPD20A Prominence UV/Vis.

### 2.4.1 Procedimiento general para síntesis de péptidos en resina 2-CTC anclando por el grupo C-terminal.

La síntesis se realizó en una jeringa de plástico equipada con filtros de teflón unidos a un colector, para permitir eliminación de reactivos y disolventes. Se hinchó la resina 2-CTC (1.2-1,43 mmol/g, 100-300 mesh) en DCM (3 x 30 seg). Se agregó a la misma, una solución del primer aminoácido protegido (Fmoc-AA-OH, 2,0 eq) en DCM o DMF y DIPEA (3,0 eq), se agitó suavemente durante 10 min, a continuación, se añadió 7,0 eq más de DIPEA y se continuó agitando durante 45 min. Con el fin de bloquear los grupos funcionales de la resina sin reaccionar, se añadió MeOH (0,8 mL / g de resina) y a continuación, la mezcla se agitó durante 10 min. La resina se filtró y después se lavó con DCM (x3) y DMF (x3). El extremo N-terminal se desprotegió utilizando una solución 20% de piperidina en DMF (2 x 5 min y 1 x 10 min). Posteriormente, se lavó la resina con DMF (x3). Una solución de Fmoc-AA-OH (3 eq.) y DIPEA (6 eq) en DMF, se añadió a la resina, seguido por una solución de HBTU (2,9 eq). En los casos particulares especificados (preactivación), en lugar de HBTU se agregó HCTU (2,9 eq) en DMF sobre la solución del AA. Para el caso de Fmoc-Cys(Trt)-OH, se adicionó una solución del aminoácido (3eq) y DIC/Cl-HOBt (2.9 eq de cada uno) sobre la resina. La mezcla se agitó durante 90 min. Después de completarse el acoplamiento, la resina se lavó con DMF (x 3) y DCM (x3). Ciclos de desprotección y acoplamiento se repitieron con los aminoácidos apropiados para proporcionar el compuesto deseado. El péptido se escindió de la resina mediante tratamiento con 1% TFA en DCM durante 2-3 minutos a temperatura ambiente, seguido por una filtración y

recolección del filtrado en MeOH. El tratamiento se repitió tres veces y después la resina se lavó con DCM y MeOH (x5). Se evaporaron los disolventes a vacío para obtener el péptido crudo.

Nota: Los crudos de los péptidos sintetizados por esta metodología se utilizaron como reactivos para la posterior macrociclación, por lo que no fueron purificados. Las caracterizaciones completas se realizaron para los macrociclos finales y se presentan en el Capítulo 3.

### 2.4.2 Procedimiento de determinación de la carga de la resina 2-CTC con el primer AA.

Se tomó una alícuota de 10 mg de resina seca cargada con el primer Fmoc-AA-OH y se la colocó en una jeringa de plástico equipada con filtros de teflón. Se hinchó la resina 2-CTC en DCM (3 × 30 seg), y luego se lavó con DMF (x 3). El extremo N-terminal se desprotegió utilizando una solución al 20% de piperidina en DMF (2 × 5 min y 1 × 10 min) y posteriormente se lavó la resina con DMF (x3), recogiendo todas estas soluciones en un matraz aforado de 100 mL. El matraz se llevó a volumen con DMF. Se determinó la absorbancia de esta solución en un espectrofotómetro UV, utilizando como blanco DMF (calidad HPLC). Aplicando la fórmula siguiente, se determinó la cantidad de AA cargado a la resina. Esta metodología fue utilizada para determinar la carga sobre la resina 2-CTC con todos los distintos AA anclados a la misma.

$$f \text{ (mmol/g)} = \frac{A_{300} \times V \text{ (mL)} \times 1000}{\epsilon_{300} \times l \times m \text{ (mg)}}$$

f= carga de la resina

A<sub>300</sub>= Absorbancia a 300nm

V= Volumen del matraz aforado

ε<sub>300</sub>= absortividad de Benzofulveno-piperidina a 300 nm

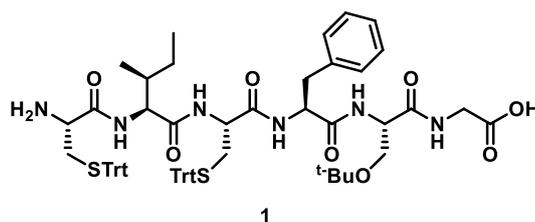
l= longitud del camino optico (ancho de celda)

m=masa de resina pesada.

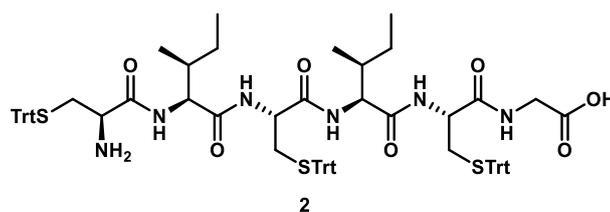
**Fmoc-Gly-Resina 2-CTC:** Fmoc-Gly-OH se acopló a la resina 2-CTC según el procedimiento 2.4.1. Luego se determinó la carga de la misma por el procedimiento 2.4.2. Se calculó una carga de 1.44 mmol/g. (100%)

**Fmoc-Cys(Trt)-Resina 2-CTC:** Fmoc-Cys(Trt)-OH se acopló a la resina 2-CTC según el procedimiento 2.4.1. Luego se determinó la carga de la misma por el procedimiento 2.4.2. Se calculó una carga de 1.34 mmol/g. (93%).

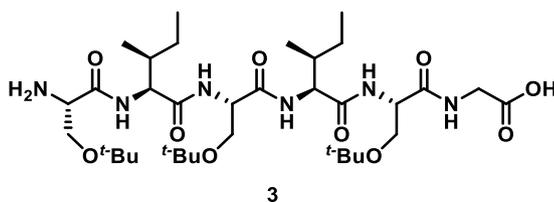
**Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Resina 2-CTC:** Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH se acopló a la resina 2-CTC según el procedimiento 2.4.1. Luego se determinó la carga de la misma por el procedimiento 2.4.2. Se calculó una carga de 1.38 mmol/g. (96%).



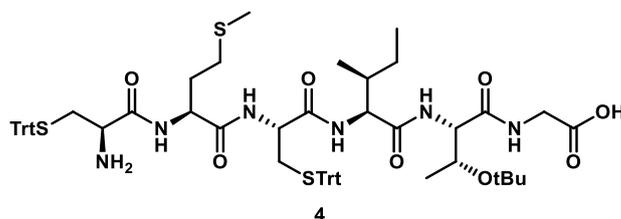
**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH (1):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para los acoplamientos de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 350 mg (rendimiento 91%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (90%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,1% de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub> = 13,97 min).



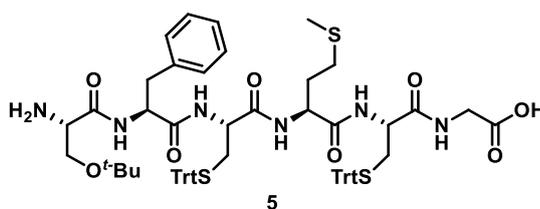
**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly-OH (2):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 410 mg (rendimiento 94%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (80%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% acetonitrilo in H<sub>2</sub>O/ 0.1% TFA durante 20 min; flujo = 1.5 mL/min; t<sub>R</sub> = 14.52 min).



**NH<sub>2</sub>-L-Ser(*t*-Bu)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH (3):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Ser(*t*-Bu)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 310 mg (rendimiento 84%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (85%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,1% de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub> = 13,15 min).

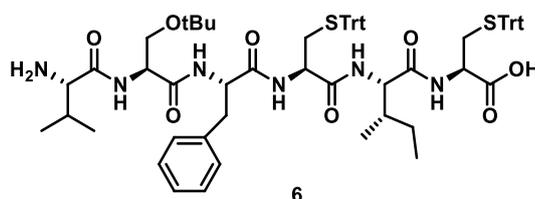


**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(*t*-Bu)-Gly-OH (4):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(*t*-Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para los acoplamientos de Fmoc-Ile-OH y Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 480 mg (rendimiento 87%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (93%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,1% de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub> = 13,97 min).

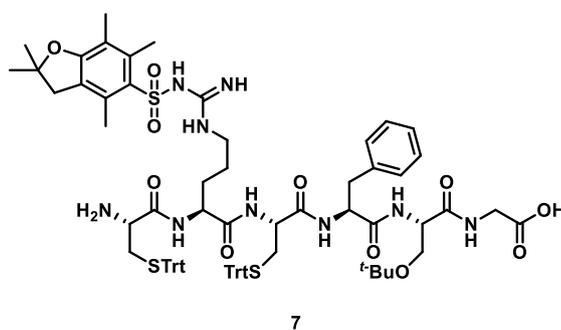


**NH<sub>2</sub>-L-Ser(*t*-Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly-OH (5):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Ser(*t*-Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly-OH se obtuvo

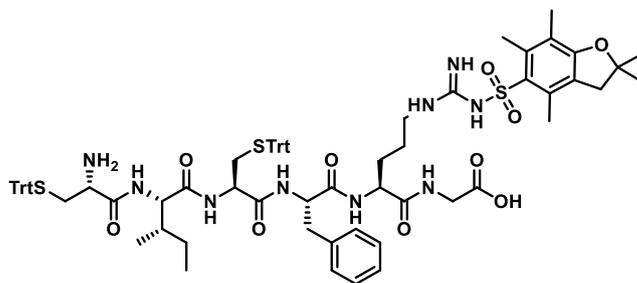
siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Se obtuvieron 254 mg (rendimiento 81%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (89%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,1% de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 13.00 min).



**NH<sub>2</sub>-L-Val-L-Ser(*t*-Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-OH (6):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Val-L-Ser(*t*-Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para los acoplamientos de Fmoc-Ile-OH y Fmoc-Val-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 277 mg (rendimiento 98%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (94%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,1% de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 13,42 min).

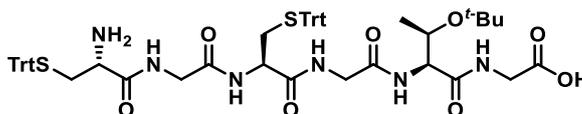


**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH (7):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Se obtuvieron 314 mg (rendimiento 80%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (92%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,1% de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 12.22 min).



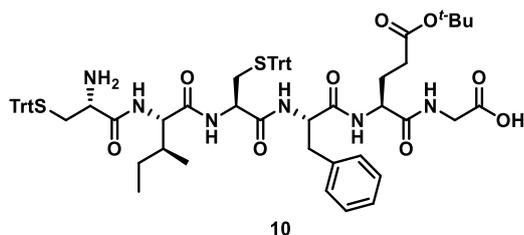
8

**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly-OH (8):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 535 mg (rendimiento 87%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (93%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/min; t<sub>R</sub> = 11.78 min).

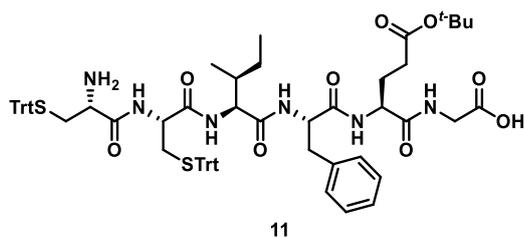


9

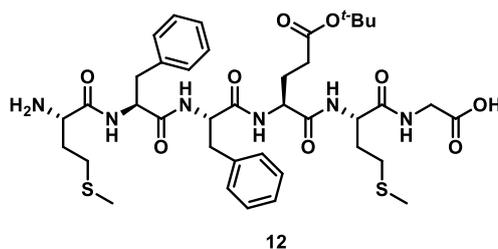
**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH (9):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 195 mg (rendimiento 94%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (85%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/min; t<sub>R</sub> = 4.89 min).



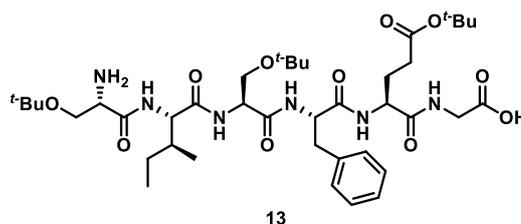
**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH (10):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 537 mg (rendimiento 93%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (88%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/min; t<sub>R</sub> = 9.64 min).



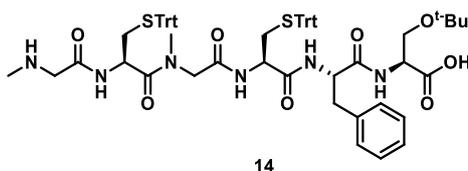
**H<sub>2</sub>N-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH (11):** La sal de trifluoroacetato de H<sub>2</sub>N-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 377 mg (rendimiento 86%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (95%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/min; t<sub>R</sub> = 6.81 min).



**NH<sub>2</sub>-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-L-Met-Gly-OH (12):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-L-Met-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Se obtuvieron 232 mg (rendimiento 79%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (100%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/min; t<sub>R</sub> = 8.85 min).

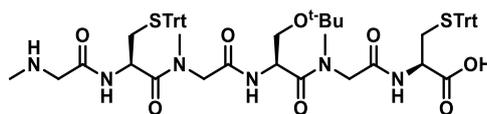


**NH<sub>2</sub>-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH (13):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para los acoplamiento de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvo 269 mg (rendimiento 93%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (98%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/min; t<sub>R</sub> = 3.30 min).



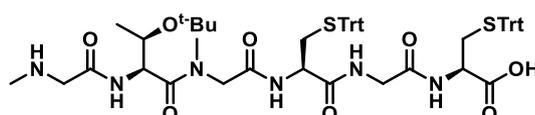
**NHMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH (14):** La sal de trifluoroacetato de NHMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH se

obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento entre NHMe-Gly y Fmoc-Cys(Trt)-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 450 mg (rendimiento 82%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (92%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 9.51 min).



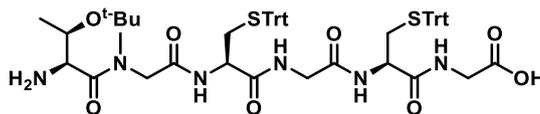
15

**NHMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-OH (15):** La sal de trifluoroacetato de NHMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento entre NHMe-Gly y Fmoc-Cys(Trt)-OH y entre NHMe-Gly y Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 733 mg (rendimiento 87%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (82%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 9.13 min).



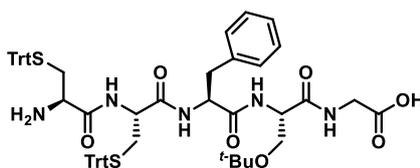
16

**NHMe-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-OH (16):** La sal de trifluoroacetato de NHMe-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 502 mg (rendimiento 90%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (91%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 9.24 min).



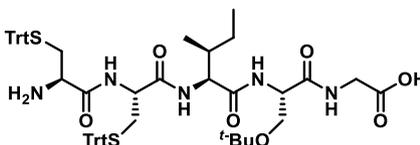
17

**NH<sub>2</sub>-L-Thr(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-OH (17):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Thr(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 750 mg (rendimiento 89%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (91%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/min;  $t_R$  = 9.05 min).



18

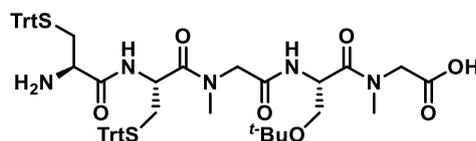
**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH (18):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH se utilizó HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 510 mg (rendimiento 95%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (97%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/min;  $t_R$  = 11.46 min).



19

**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH (19):** La sal de trifluoroacetato de NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Para el acoplamiento de Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH se utilizó

HCTU/DIPEA. Se obtuvieron 244 mg (rendimiento 84%) del hexapéptido como un sólido blanco. La pureza (96%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 11.12 min).



20

**NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-OH (20):** La sal de trifluoroacetato de NHMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general 2.4.1 para la resina 2-CTC. Se obtuvieron 240 mg (rendimiento 67%) del hexapéptido como un sólido blanco. Para el acoplamiento entre NHMe-Gly y Fmoc-Cys(Trt)-OH y entre NHMe-Gly y Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH se utilizó HCTU/DIPEA. La pureza (82%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 mL/ min; t<sub>R</sub>= 9.18 min).

### 2.4.3 Procedimiento general para síntesis de péptidos en resina 2-CTC anclando por la cadena lateral del Fmoc-Glu-αOAll.

La síntesis se realizó en una jeringa de plástico equipada con filtros de teflón unidos a un colector, para permitir eliminación de reactivos y disolventes. Se hinchó la resina 2-clorotritilo (1,20 mmol/g, 100-300 mesh) en DCM (3 × 30 seg) y luego se lavó la misma con DMF y DCM (3 × 30 seg). Se agregó a la misma, una solución de Fmoc-Glu-αOAll, (2,0 eq) en DCM y DIPEA (3,0 eq), se agitó suavemente durante 10 min. A continuación, se añadió 7,0 eq más de DIPEA y se continuó agitando durante 45 min. Con el fin de bloquear los grupos funcionales de la resina sin reaccionar, se le añadió MeOH (0,8 mL / g de resina) y a continuación, la mezcla se agitó durante 10 min. La resina se filtró, y después se lavó con DCM (x3) y DMF (x3). El extremo N-terminal se desprotegió utilizando 20% de piperidina en DMF (2 × 5 min y 1 × 10 min). Posteriormente, se lavó la resina con DMF (x3). Una solución de Fmoc-AA-OH (3 eq.) y DIPEA (6 eq) en DMF, se añadió a la resina, seguido por una solución de HBTU (2,9 eq). En los casos particulares especificados (preactivación), se

agregó HCTU (2,9 eq) en DMF sobre la solución del AA. Para el caso de Fmoc-Cys(Trt)-OH, se adicionó una solución del aminoácido (3eq) y DIC/Cl-HOBt (2.9 eq de cada uno) sobre la resina. La mezcla se agitó durante 90 min. Después de completarse el acoplamiento, la resina se lavó con DMF (x 3) y DCM (x3). Ciclos de desprotección y acoplamiento se repitieron con los aminoácidos apropiados para proporcionar el compuesto deseado. El péptido terminado, se desprotegió en ambos extremos con  $[Pd(PPh_3)_4]$  (0.5eq) en una solución de Piperidina 10% en THF por 3 horas. Luego de terminado se filtró y lavó la resina con DCM (x3) y DMF (x3). Luego se agita la resina con una solución de Dietilditiocarbamato de sodio (5% m/v) y DIPEA (5%) en DMF, durante 30 minutos. Se filtró y lavó la resina con DCM y MeOH, obteniéndose el péptido deseado soportado en la resina.

Nota: Los péptidos sintetizados por esta metodología no se escindieron de la resina, por lo que no tienen caracterización en este capítulo, la información de los mismos se presenta en el Capítulo 3.

**Fmoc-Glu- $\alpha$ OAll-Resina 2-CTC:** Fmoc-Glu- $\alpha$ OAll se acopló a la resina 2-CTC según el procedimiento 2.4.3. Luego se determinó la carga de la misma por el procedimiento 2.4.2. Se calculó una carga de 1.32 mmol/g. (92%).

#### 2.4.4 Procedimiento general para síntesis de péptidos en resina de Wang.

La síntesis se realizó en una jeringa de plástico equipada con filtros de teflón unidos a un colector, para permitir la eliminación de reactivos y disolventes. Se hinchó la resina de Wang (1,14 mmol/g, 100-200 mesh) en DCM (3 x 30 seg). Se agregó a la misma, una solución del primer aminoácido protegido (Fmoc-AA-OH, 3,0 eq) en DCM /DMF. A continuación, se añadió una solución de Cl-HOBt (3,0 eq), DIC (3 eq) y DMAP (0,4 eq), y se mantuvo con agitación durante 2 hs. La resina se filtró y luego se lavó con DCM (x3) y DMF (x3), y se volvió a realizar este procedimiento. Con el fin de bloquear los grupos funcionales de la resina sin reaccionar, se le agregó anhídrido acético (3eq) y Piridina (6 eq). Esta mezcla se agitó durante 1 h, la resina se filtró y después se lavó con DCM (x3) y DMF (x3). El extremo N-terminal se desprotegió utilizando 20% de piperidina en DMF (2 x 5 min y 1 x 10 min). Posteriormente, se lavó la resina con DMF (x3) y se añadió a la resina una solución de Fmoc-AA-OH (3 eq.) y DIPEA (6 eq.) en DMF, seguido por una solución de

HBTU o HCTU (2,9 eq) en DMF. La mezcla se agitó durante 90 min. Después que se completó el acoplamiento, la resina se lavó con DMF (x 3). Ciclos de desprotección y acoplamiento se repitieron con los aminoácidos apropiados para proporcionar el compuesto deseado. El péptido se escindió de la resina mediante tratamiento con 50% TFA en DCM durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido por filtración y recolección del filtrado. El tratamiento se repitió tres veces y después la resina se lavó con DCM y MeOH extensamente, recogiendo estos lavados. Se evaporaron los disolventes a vacío para obtener el péptido crudo.

Nota: Los péptidos obtenidos por esta metodología, son crudos que poseen tanto el péptido desprotegido como los grupos protectores, los cuales no se purificaron, por lo que los datos de caracterización no se informan.

#### **2.4.5 Procedimiento de determinación de la carga de la resina de Wang con el primer AA.**

La resina, cargada (aproximadamente 50 mg) con el primer Fmoc-AA-OH en una jeringa de plástico equipada con filtros de teflón, se hinchó en DCM (3 × 30 seg). El péptido se escindió de la resina mediante tratamiento con 90% TFA en DCM durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido por filtración y recolección del filtrado. Se evaporaron los disolventes a vacío. Se midió la masa del AA obtenido y aplicando la formula siguiente se determinó la carga de la resina.

$$f \text{ (mmol/g)} = \frac{m_{AA} \text{ (mg)} \times 1000}{m_R \text{ (mg)} \times PM_{AA} \text{ (g/mol)}}$$

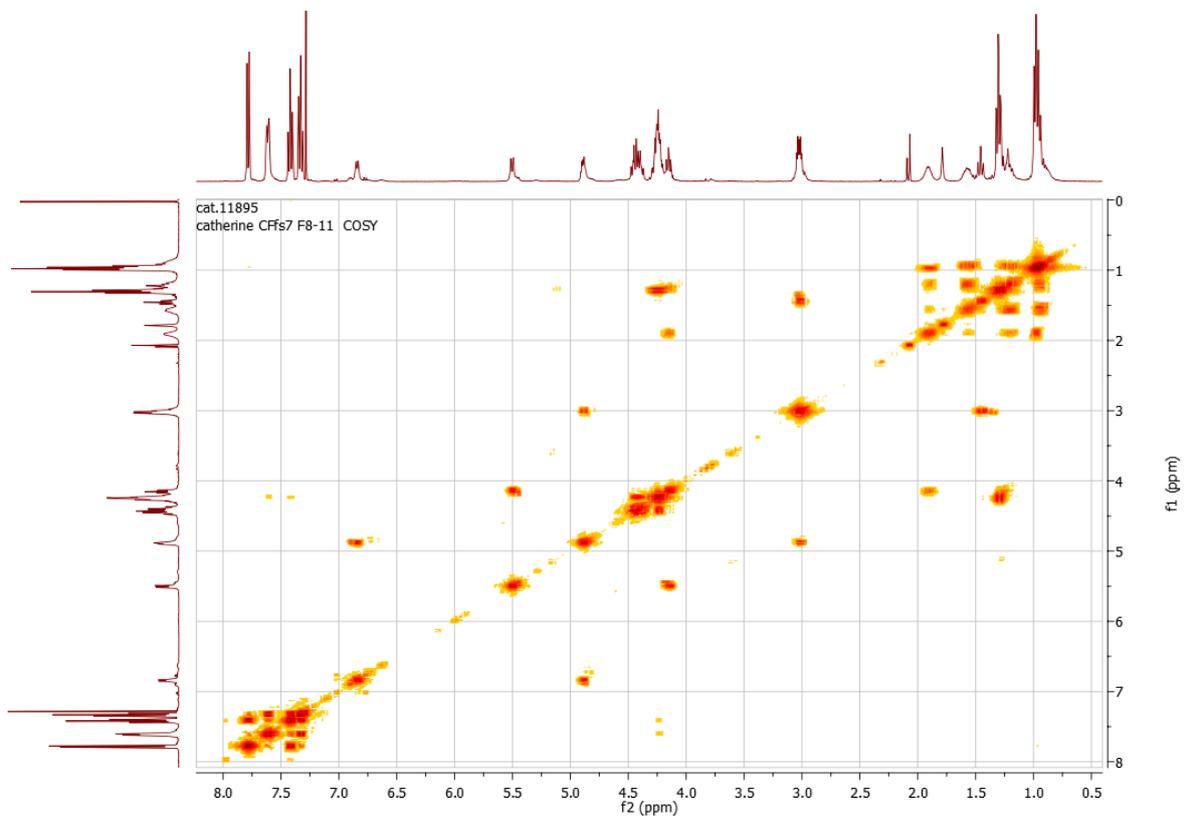
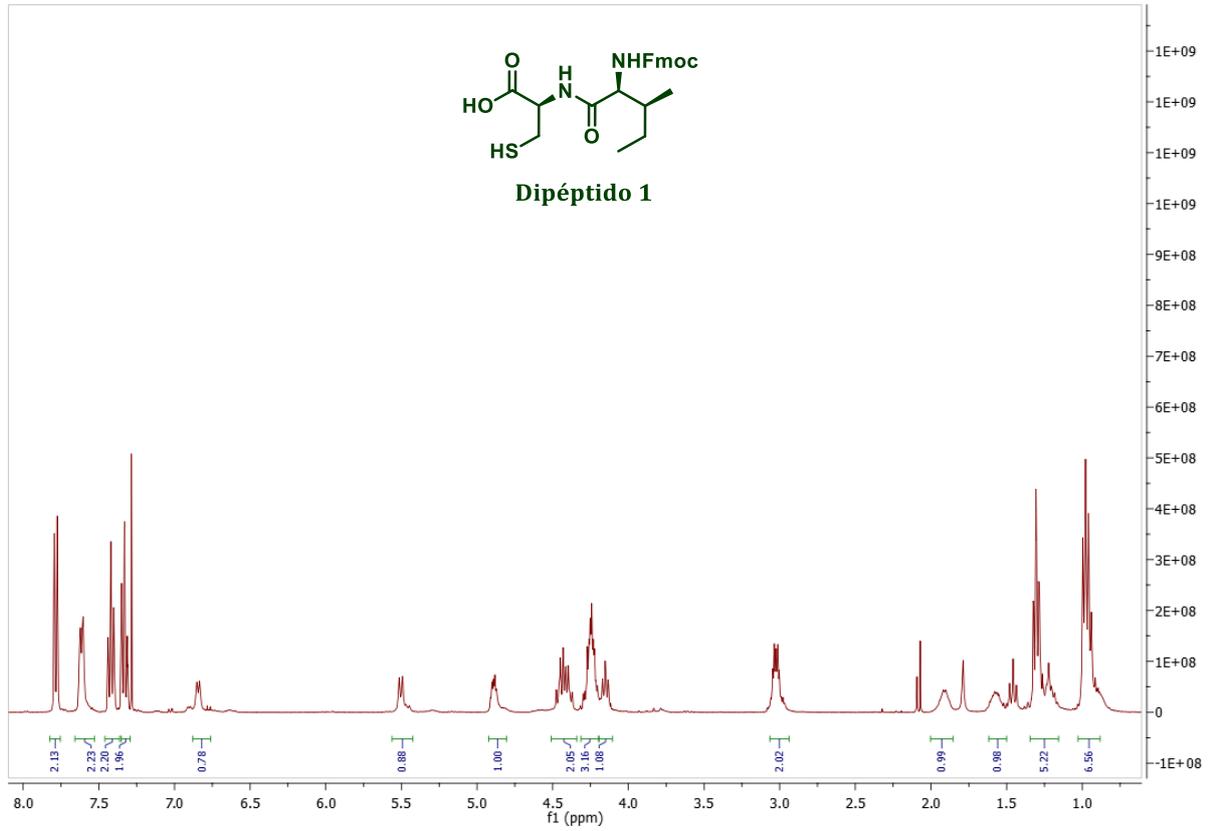
f= carga de la resina

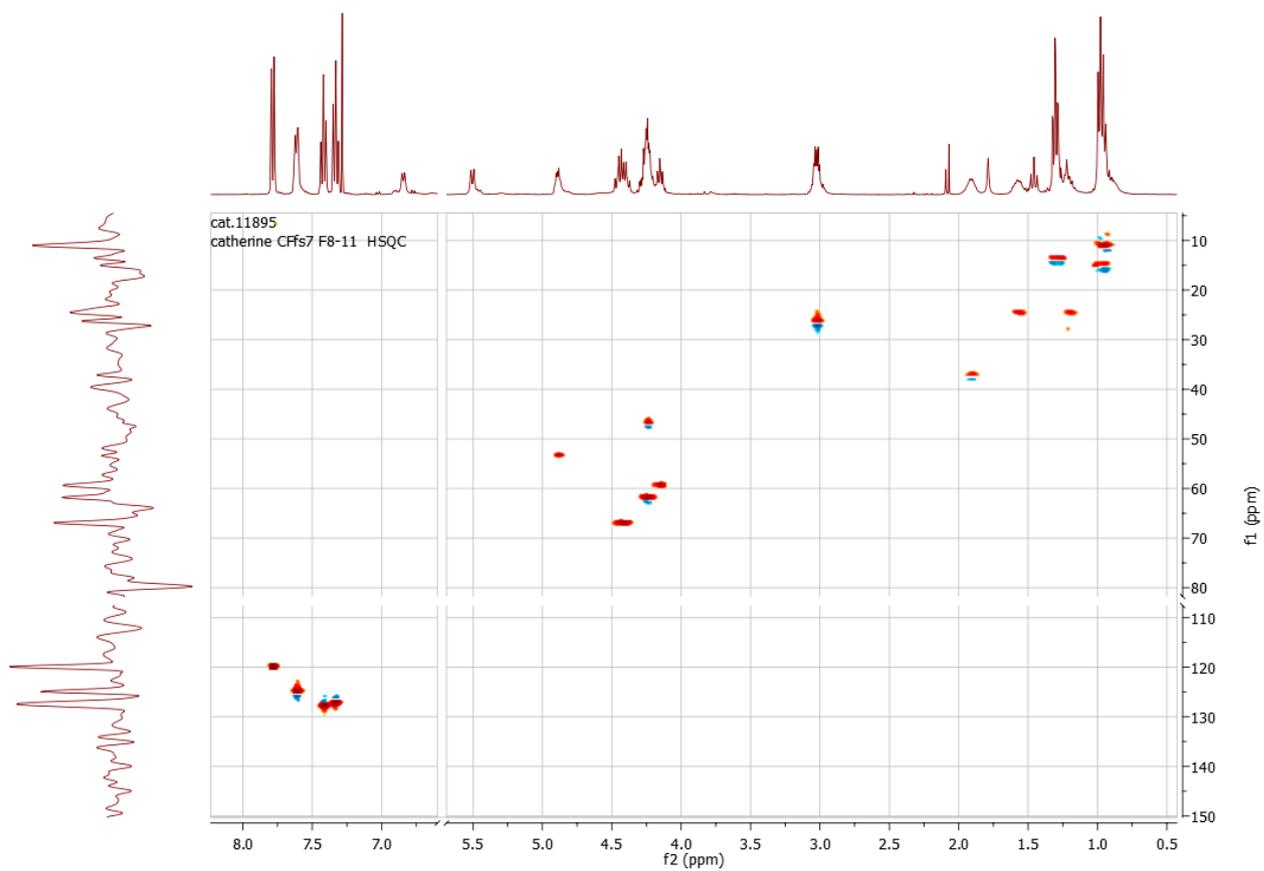
$m_{AA}$ = masa del AA escindido

$m_R$ = masa de resina utilizada

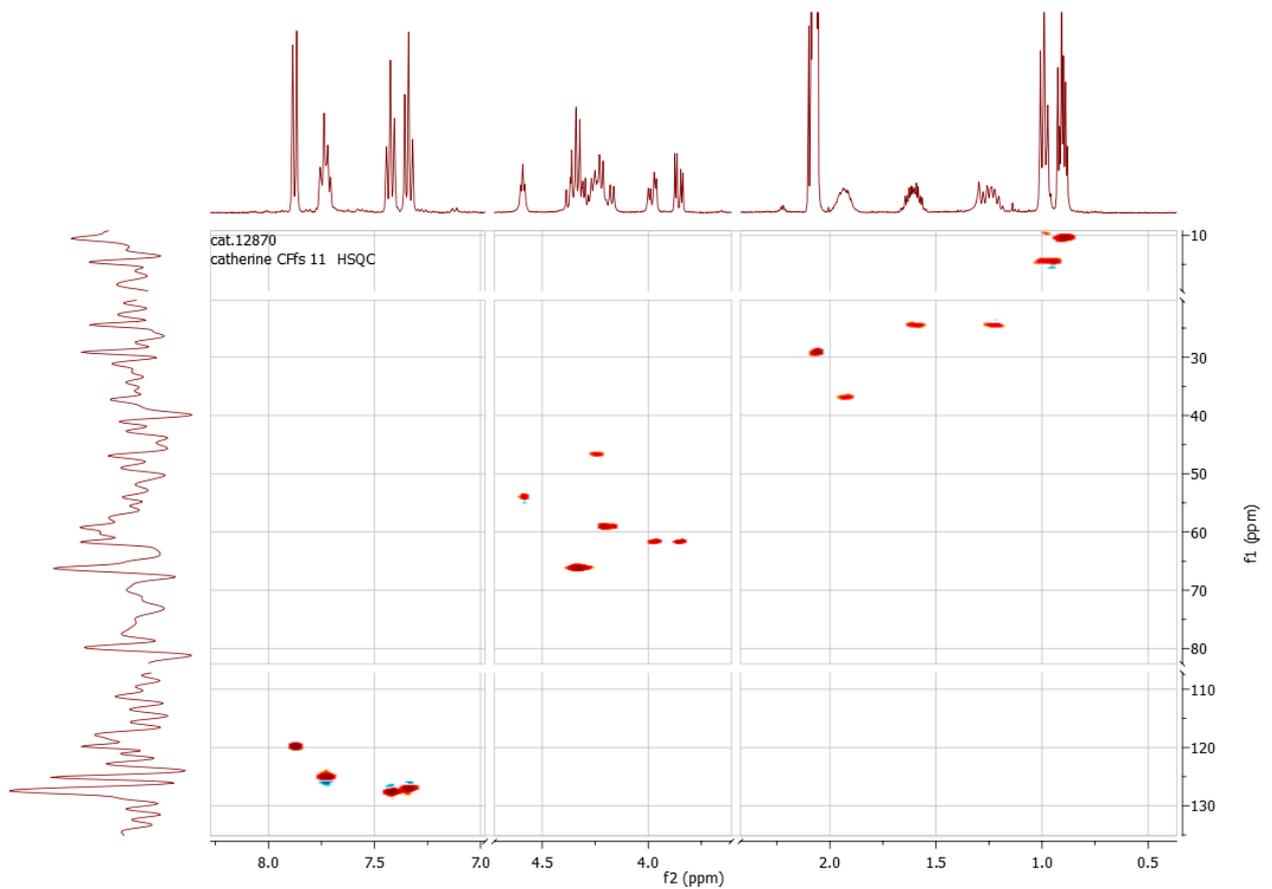
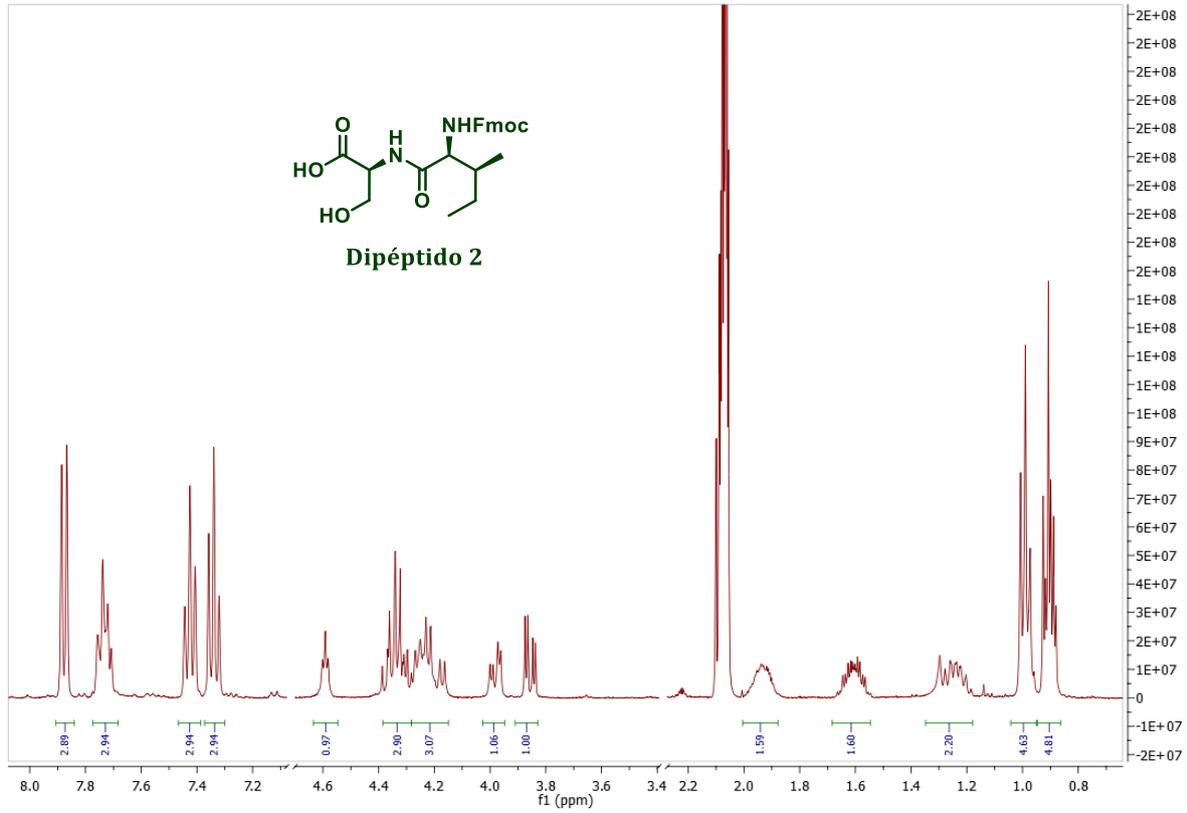
$PM_{AA}$ = Peso molecular del AA escindido

Dipéptido 1

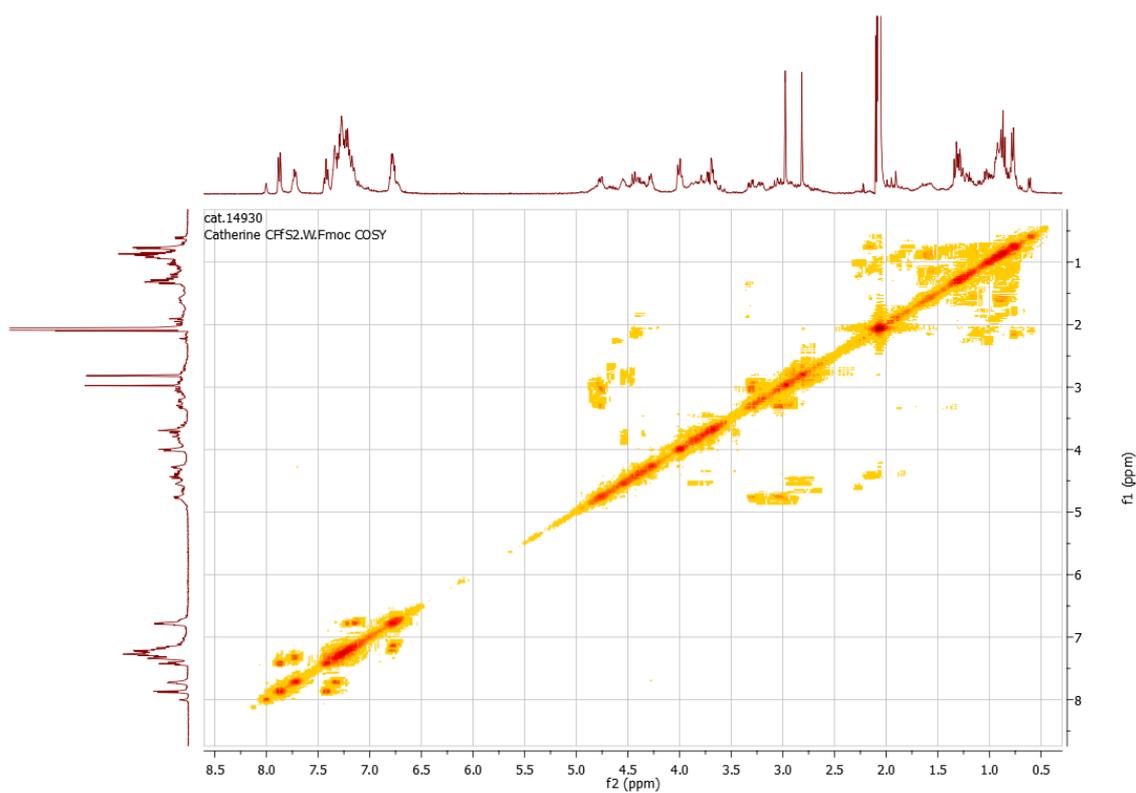
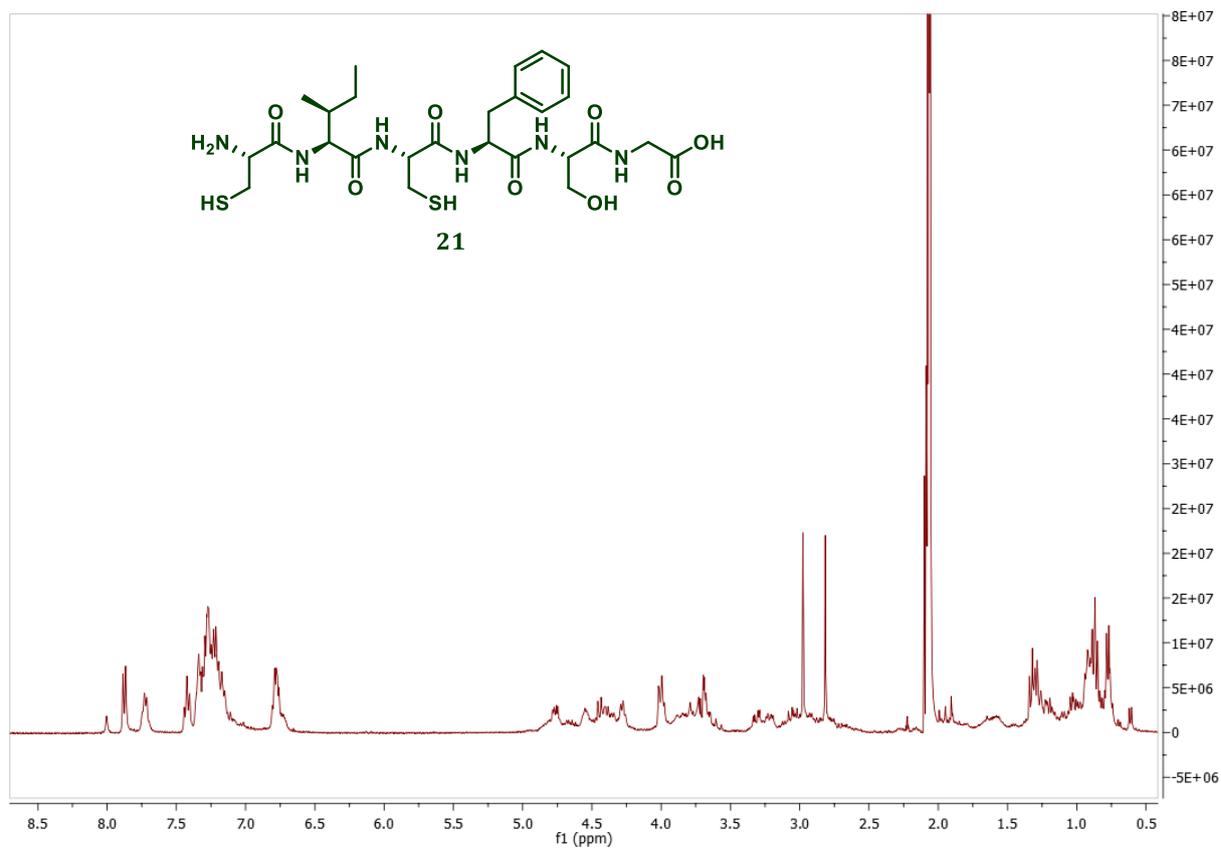


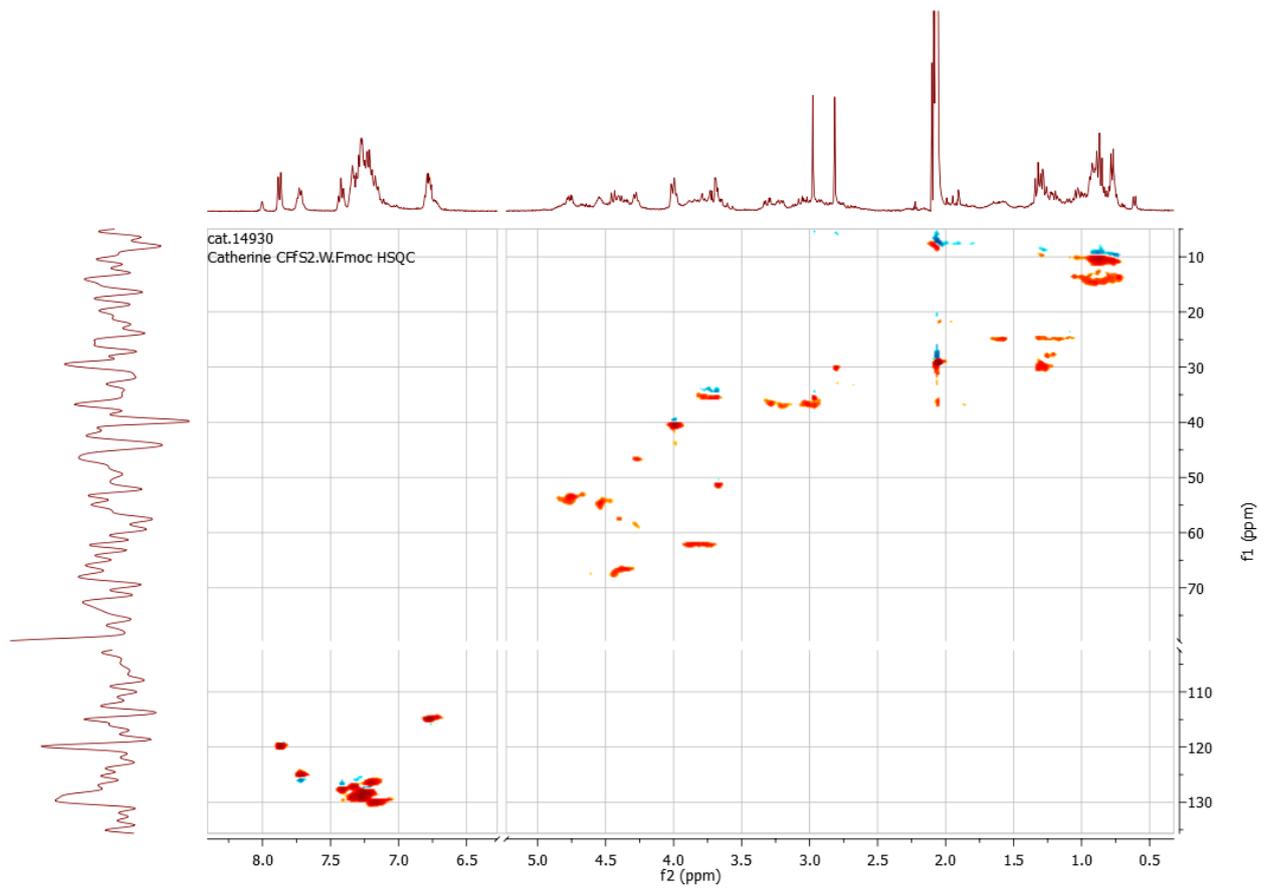


Dipéptido 2



Crudo de NH<sub>2</sub>-L-Cys-L-Ile-L-Cys-L-Phe-L-Ser-Gly-OH (21)







## **CAPÍTULO 3**

### **MACROCICLACIÓN EN SOLUCIÓN Y EN FASE SÓLIDA.**



## 3.1 INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento en 1942 de la Gramacidina S,<sup>1</sup> macrociclo peptídico utilizado como antibiótico durante la Segunda Guerra Mundial, se comenzó la búsqueda de una gran variedad de ciclopeptidos con diversas actividades biológicas, que pudieran resultar buenos candidatos para el descubrimiento de fármacos. En la naturaleza podemos encontrar macrociclos de hasta más de 50 átomos, pero los más comunes son aquellos de entre 14 y 18.<sup>2</sup> El espectro de actividades biológicas de estos compuestos incluyen, actividad antimicrobiana, antiviral, citotóxica, antiinflamatoria, inmunosupresora, insecticida, antifúngica y antiparasitaria.

Usualmente tienen características estructurales que promueven conformaciones bioactivas, selectividad hacia los receptores y buena estabilidad metabólica. Además, el aumento de la hidrofobicidad, permite una mejor permeación de la membrana en comparación con su precursor lineal.<sup>3</sup>

Dentro de estos podemos nombrar a la mahafaciclina B y la chevalierina A, péptidos cíclicos aislados del látex de *Jatropha* que mostraron  $CE_{50} = 2.2$  y  $8.9 \mu M$ , respectivamente contra *P. falciparum*.<sup>4</sup> También se ha descrito actividad inhibidora selectiva de ciertos ciclohexapéptidos, tales como *Ciclo*[Trp-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Lys(Z)-] con una  $CI_{50} = 3.0 \mu M$  para la Triosa Fosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei*.<sup>5</sup> El Cyanopeptolin 1020 aislado de una cianobacteria *Microcystis*, es un inhibidor de tripsina muy potente ( $CI_{50} = 670 pM$ ) y

---

<sup>1</sup> Gause, G.; Brazhnikova, M. G. *Nature*, **1944**, *154*, 703.

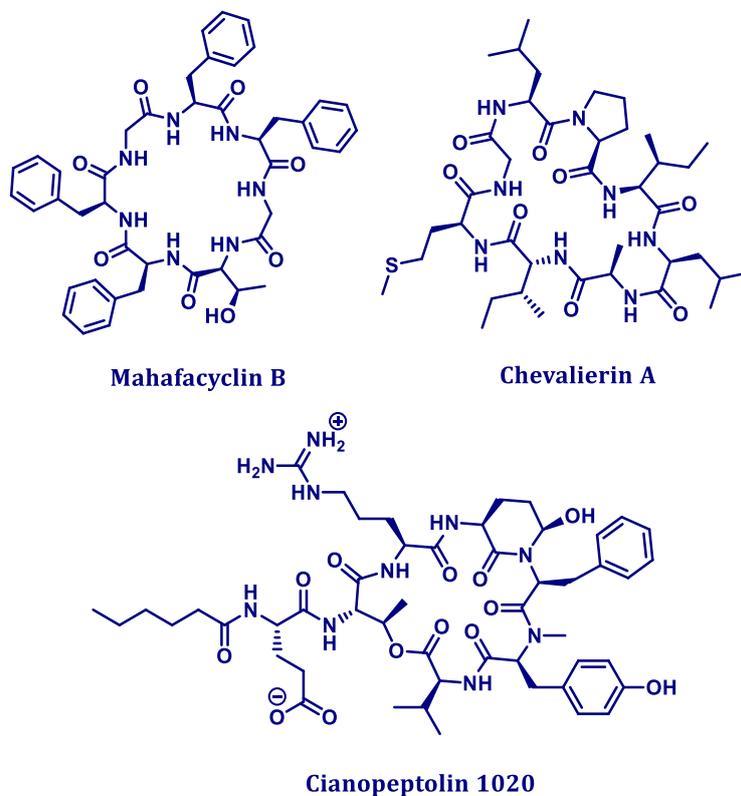
<sup>2</sup> Frank, A. T.; Farina, N. S.; Sawwan, N.; Wauchope, O. R.; Qi, M.; Brzostowska, E. M.; Chan, W.; Grasso, F. W.; Haberfield, P.; Greer, A. *Mol. Diversity* **2005**, *11*, 115.

<sup>3</sup> a) Giordanetto, F.; Kihlberg J. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 278. b) Mallinson, J.; Collins, I. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 140. c) Peña, S.; Scarone, L.; Serra, G. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 355. d) Driggers, E.; Hale, S.; Lee, J.; Terret, N. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, *7*, 608. e) Davies, J. S. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471. f) Skropeta, D.; Jolliffe, A. K.; Turner, P. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8804. g) Wipf, P. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115.

<sup>4</sup> a) Baraguey, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *1*, 2098. b) Baraguey, C.; Auvin-Guette, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J. L.; Bodo, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1998**, *1*, 3033.

<sup>5</sup> a) Kuntz, D. A.; Osowski, R.; Schudok, M.; Wierenga, R.; Muller, K.; Kessler, H.; Opperdoes, F. R. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 441-447. b) Callens, M.; Van Roy, J.; Zeelen, J. Ph.; Borchert, T. V.; Nalis, D.; Wierenga, R.; Opperdoes, F. R. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1993**, *195*, 667.

mostró valores nanomolares bajos, contra la Calicreína humana (4.5 nM) y el factor XIa (3.9 nM), Figura 3.1.<sup>6</sup>



**Figura 3.1.** Ciclopéptidos con actividad biológica.

Por las razones anteriores, el desarrollo de una metodología rápida y eficiente para preparar estos ciclopéptidos, de grandes tamaños y varios centros quirales, es de gran importancia en síntesis orgánica y química medicinal. Ya se ha mencionado el importante rol de la fase sólida para la síntesis de péptidos lineales,<sup>7</sup> entre los que cabe destacar la estrategia Fmoc/SPFS (Síntesis de péptidos en fase sólida). Como consecuencia, la SPFS y luego macro ciclación en solución o en la misma resina son las estrategias más populares descritas en la literatura para preparar ciclopéptidos. Sin embargo, es muy poco frecuente encontrar comparaciones para la eficiencia de ciclación de ambas estrategias. Sewald y colaboradores,<sup>8</sup> describen la síntesis de ciclopentapéptidos y ciclohexapéptidos con rendimientos para la macro ciclación en solución del 9-36% y para la ciclación en resina de

<sup>6</sup> Gademann, K.; Portmann, C.; Blom, J.; Zeder, M.; Jüttne, F. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 980.

<sup>7</sup> a) Merrifield, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149. b) Merrifield, R. *Science* **1986**, *232*, 341. c) Albericio, F.; Zompra, A.; Galanis, A.; Werbitzky, O. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 361.

<sup>8</sup> Malesevic, M.; Strijowski, U.; Bachle, D.; Sewald, N. *J. Biotech.* **2004**, *112*, 73.

1-22%. Por otro lado, Jeong y colaboradores informaron sobre la macro ciclación en solución de un pentapéptido con un rendimiento del 7% y la lactamización en resina de un hexapéptido con un rendimiento del 35%.<sup>9</sup> Sin embargo, ambos procedimientos no se aplicaron para la preparación de ciclopéptidos con el mismo tamaño y secuencia.

Es conocido que la macro ciclación en solución, por ser una reacción intramolecular, se realiza mejor en condiciones de alta dilución (1-10 mM), ya que esto permite reducir las reacciones intermoleculares no deseadas tales como la polimerización. De forma similar, si la molécula peptídica está anclada a un soporte polimérico, se genera un fenómeno de pseudodilución, por lo tanto, podría darse únicamente la macro ciclación ya que se favorecen las reacciones intracadena para cada molécula ligada a la resina, minimizando las interacciones intermoleculares, siempre que las cadenas no sean muy extensas y la resina no esté altamente cargada.<sup>10</sup>

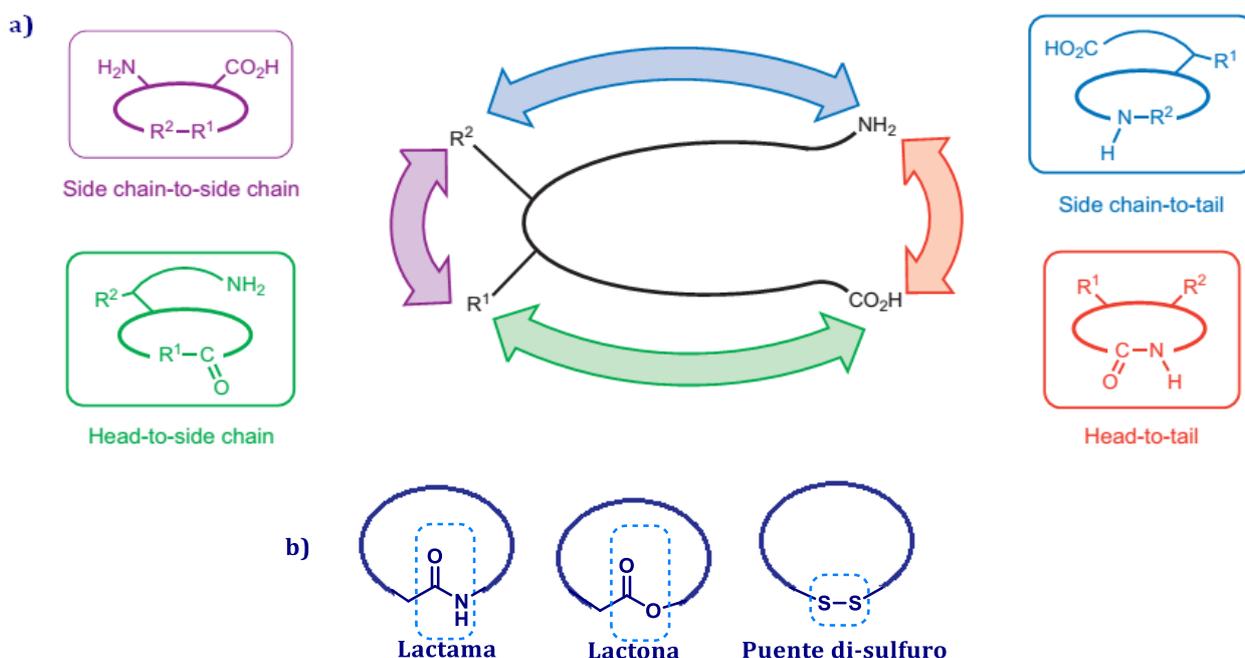
Por otro lado la ciclación peptídica se puede dar básicamente de cuatro formas; cabeza-cola (entre el N-terminal y C-terminal), cabeza-cadena lateral, cadena lateral-cola y cadena lateral-cadena lateral, por formación de una lactama, lactona o puente di-sulfuro. Figura 3.2.

El largo de la cadena peptídica, es uno de los factores más importantes para el éxito de la macro ciclación, siendo sencilla la síntesis de ciclopéptidos conteniendo siete o más AA. De cualquier forma, la obtención de ciclos de menor tamaño, ha sido ampliamente estudiada, pudiéndose encontrar síntesis con buenos rendimientos en bibliografía, pero por lo general estas reacciones son lentas y de bajos rendimientos.

---

<sup>9</sup> Kim, J.; Hong, I-K.; Kim, H-J.; Jeong, H-J.; Choi, M-J; Yoon, C-N.; Jeong, J-H. *Arch. Pharm. Res.* **2002**, *25*, 801.

<sup>10</sup> a) Scott, L. T.; Rebek, J.; Ovsyanko, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 626. b) Mazur, S.; Jayalekshmy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 677.



**Figura 3.2.** a) Vías posibles para la obtención de ciclopéptidos<sup>11</sup>. b) enlaces formados para la ciclación con AA naturales.

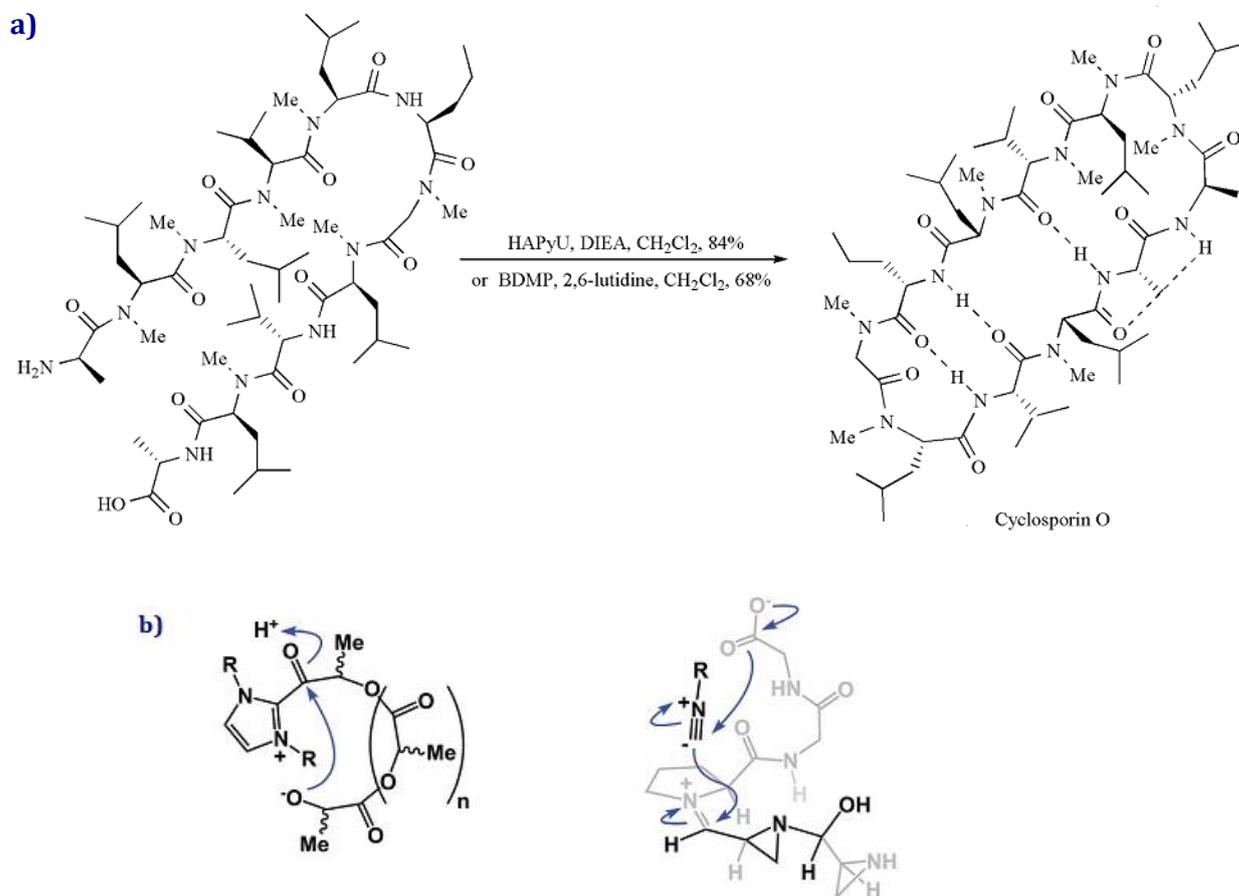
El éxito de la macro ciclación se basa en la capacidad del precursor lineal para preorganizar la conformación de sus extremos reactivos para el cierre del anillo, lo cual genera una alta molaridad efectiva y produce menos subproductos por reacciones intermoleculares. Basándonos en esto, se destacan dos tipos de estrategias para mejorar la efectividad de estas reacciones, una es por medio de elementos estructurales que determinen con mayor facilidad la conformación efectiva (modificaciones en la cadena peptídica), y la otra es por el uso de agentes externos que permitan adquirir la conformación de reacción (elementos que no forman parte de la estructura peptídica).<sup>11</sup>

### Modificaciones estructurales

Las modificaciones estructurales, son elementos que forman parte de la estructura del péptido y que pueden favorecer la macro ciclación permitiendo acomodar el ángulo de los extremos que formarán el enlace con una baja tensión. Por ejemplo, para cadenas polipeptídicas de 6 o más AA, esta reacción está favorecida por la formación de enlaces de hidrógeno intrapéptido, que permiten el acercamiento de los extremos reactantes con un

<sup>11</sup> White, C.; Yudin, A. K. *Nat. Chem.* **2011**, 3, 509.

motivo de hoja plegada  $\beta$ , reduciendo así la energía libre de la misma. Esto no sucedería para péptidos menores.<sup>12</sup> Esquema 3.1-a.



**Esquema 3.1.** a) Macro ciclación para formación de la Ciclosporina O, favorecida por la formación de enlaces de H intramoleculares.<sup>13</sup>b) Acercamiento de los extremos de cadenas peptídicas por formación de pares iónicos.<sup>14</sup>

Para secuencias lineales cortas, Daidone y Smith demostraron que las interacciones entre pares de iones eran efectivas para favorecer la macro ciclación. Esto es debido a que dichas interacciones, son inversamente proporcionales al cuadrado de la distancia entre las cargas en solventes con baja constante dieléctrica, pudiendo así mantener los extremos de

<sup>12</sup> a) Li, P.; Xu, C. J.; *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2951. b) Daidone, L.; Neuweiler, H.; Doose, S.; Sauer, M.; Smith, J.C. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, 6, 276.

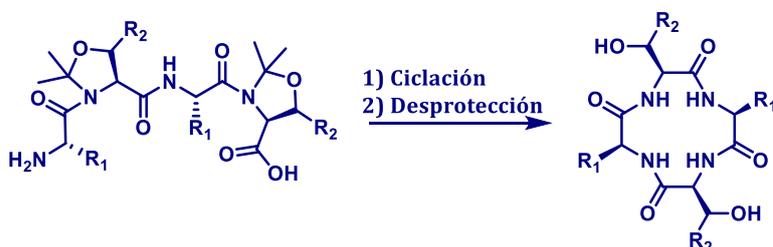
<sup>13</sup> Li, P.; Roller, P.; Xu, C. J. *Current Org. Chem.* **2002**, 6, 411.

<sup>14</sup> Yudin, A. K.; *Chem. Sci.* **2015**, 6, 30.

la cadena en contacto por atracción electrostática en péptidos zwitteriónicos.<sup>15</sup> Esquema 3.1-b.

Para poder acercar los extremos de péptidos de 6 o menos AA, otra opción es introducir un inductor de giro que genere un enlace *cis*-amida en el medio de la cadena peptídica, como por ejemplo una Prolina. Los péptidos lineales que contienen una unidad de di-prolina heteroquiral son excelentes para ciclación debido a la fuerte inducción giro. Otra estrategia que se ha utilizado, es la introducción de heterociclos, que pueden ser reversibles si no se desea que formen parte de la estructura final del ciclo, lo que se conoce como pseudoprolinas.<sup>16</sup> Esquema 3.2. Los aminoácidos *N*-metilados pueden tener este mismo efecto, al inducir el establecimiento de enlaces *cis*-amida, aunque pueden encontrarse tanto en esta forma como en su conformación *trans*.<sup>17</sup>

Las ciclaciones de péptidos que están completamente constituidos por AA de la misma configuración, son por lo general dificultosas. La incorporación de AA de configuración inversa en los extremos de la secuencia peptídica, es otro de los factores estructurales que favorecen la ciclación.



Esquema 3.2. Macro ciclación utilizando Pseudoprolinas reversibles. <sup>13</sup>

### Adyuvantes conformacionales externos.

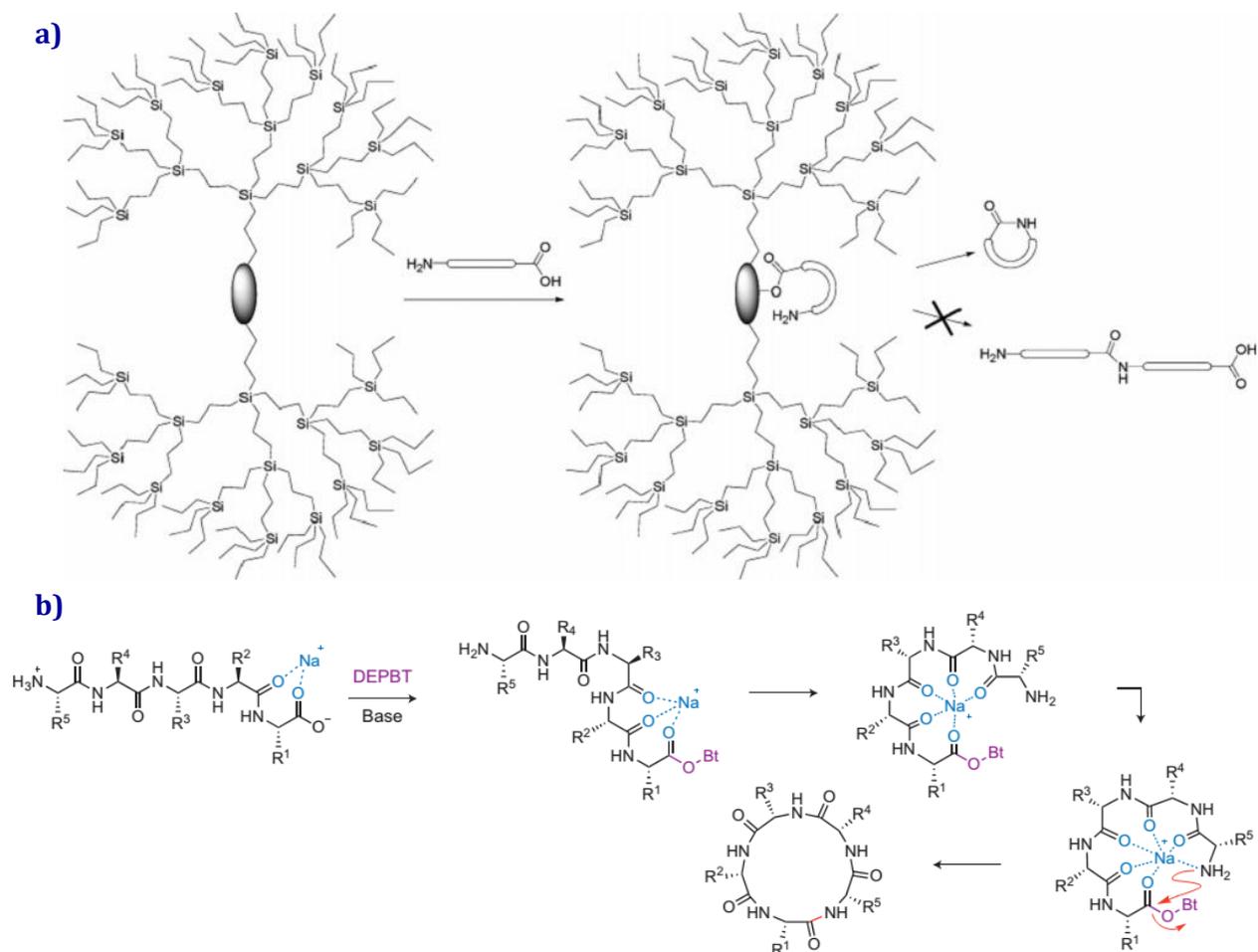
Existe una variedad de este tipo de elementos, que actúan acercando a los extremos a enlazarse, por diferentes mecanismos. Estos son utilizados muchas veces, cuando la estructura peptídica no favorece la ciclación y no es posible introducir cambios estructurales en la misma.

<sup>15</sup> Schmuck, C.; Rehm, T.; Gröhn, F.; Klein, K.; Reinhold, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1430.

<sup>16</sup> a) Rückle, T.; De Lavallaz, P.; Keller, M.; Dumy, P.; Mutter, M. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11281. b) Skropeta, D.; A. Jolliff, K.; Turner, P.; *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8804. c) Fairweather, K.; Sayyadi, N.; Luck, I. J.; Clegg, J. K.; Jolliff, K. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3136.

<sup>17</sup> Takeuchi, Y.; Marshall, G.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 15164.

Entre estos, podemos nombrar a moléculas capaces de generar un sitio de aislamiento, en el que ingresa el péptido, puede girar y luego ciclarse, disminuyendo así la probabilidad de oligomerización. Son un ejemplo de estos las carbodiimidas dendriméricas de carbosilano.<sup>18</sup>



**Esquema 3.3.** a) Macro ciclación utilizando carbodiimidas dendriméricas de carbosilano.<sup>15</sup> b) Macro ciclación utilizando cationes metálicos.<sup>10</sup>

Otra estrategia es el uso de cationes metálicos como centros de coordinación, debido a que la estructura peptídica es rica en N, O y en algunos casos S, átomos con gran carácter coordinante. Esto hace que el péptido lineal envuelva el ion acercando así los extremos que se desea que reaccionen. El ion utilizado, es muy dependiente del tamaño del ciclo que se desea formar, siendo necesario iones más grandes cuantos más átomos tenga el ciclo. Esto

<sup>18</sup> Amore, A.; Van Heerbeek, R.; Zeep, N.; Van Esch, J.; Reek, J. N. H.; Hiemstra, H.; Van Maarseveen, J. H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1851.

permite además, aumentar la solubilidad del ciclo o el péptido, si éste presenta estos problemas en solventes polares.<sup>19</sup> Esquema 3.3.

Otras metodologías de macro ciclación involucran el uso de otros grupos que permiten el aumento de la velocidad de ciclación, por un incremento en la reactividad de los mismos.

En este trabajo nos enfocamos en la síntesis de macrociclos peptídicos de 5 y 6 miembros, basándonos en principio, en intercalar aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, ya que en trabajos previos, se han obtenido actividades biológicas del orden submicromolar para macrociclos de ese tipo. Posteriormente, basados en los resultados de actividad biológica que se obtuvieron como parte de esta Tesis y en los estudios de REA (Relación estructura-actividad), se fueron rediseñando nuevos ciclopéptidos, modificando las secuencias peptídicas.

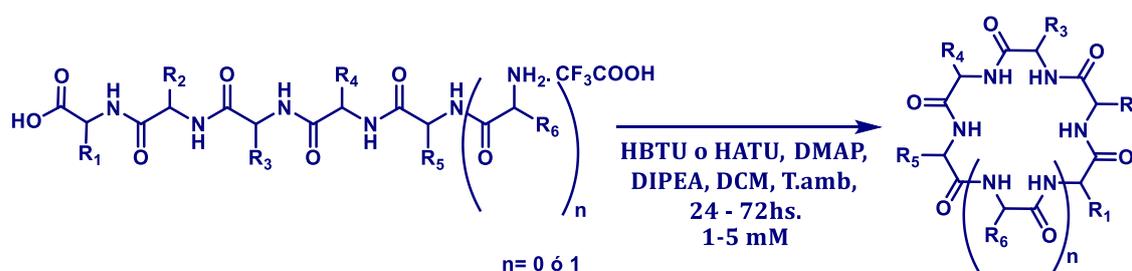
---

<sup>19</sup> a) Seebach, D.; Thler, A.; Beck, A. K.; *Helv. Chim. Acta.* **1989**, *72*, 857. b) Ye, Y.-H.; Gao, X.-M.; Liu, M.; Tang, Y.-C.; Tian, G.-L. *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 571. c) Zhang, L.; Tam, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4375.

## 3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.2.1 Obtención de macrociclos combinando SPFS y macro ciclación en solución.

A partir de los péptidos obtenidos por SPFS, anclando el primer AA por su extremo C-terminal en la resina 2-CTC (Procedimiento 2.4.1), se realizó la macro ciclación en solución. Esta reacción se realizó en DCM como solvente, con HBTU o HATU como agentes acoplantes, según muestra el esquema 3.4. Como se comentó anteriormente, esta reacción debe realizarse en alta dilución para favorecer la reacción intramolecular y el tiempo de reacción requerido fue entre 24 y 72 horas dependiendo de la secuencia peptídica. Los menores tiempos de reacción se dieron para la ciclación de pentapéptidos.



**Esquema 3.4.** Macro ciclación en solución.

Para realizar la síntesis de la mayoría de los péptidos, se seleccionó Gly como extremo C-terminal, de manera de evitar la formación de diastereómeros durante la activación del ácido carboxílico para el cierre del anillo. Esto es debido a que el agente acoplante utilizado durante la macro ciclación, es una sal de uronio la cual hace necesario el uso de base que puede traer aparejado dicho problema, (capítulo 2). En algunos casos, este AA fue sustituido por otro, ya sea porque se presentaron problemas durante la síntesis del péptido respectivo o porque la secuencia peptídica no contenía Gly.

El agente acoplante utilizado en un principio fue HBTU, ya que era un reactivo con el que el grupo tenía amplia experiencia y con el cual se habían obtenido buenos resultados. Más tarde, se decidió probar otros agentes acoplantes descritos como más efectivos tales como HATU. El macrociclo **31** se sintetizó con ambos agentes acoplantes obteniendo para la reacción con HBTU un 46% de rendimiento y un 59% cuando se utilizó HATU. A partir de

ese momento, se decidió utilizar este último en las ciclaciones de los péptidos conteniendo NMe-Gly.

Entrada	Ciclo	R. de macroc. (%)	R. total <sup>a</sup> (%)
1	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (23)</i>	72 <sup>b</sup>	66
2	<i>Ciclo -L-Cys(Trt)-L-Ile L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly (24)</i>	66 <sup>b</sup>	62
3	<i>Ciclo -L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (25)</i>	54 <sup>b</sup>	45
4	<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly (26)</i>	38 <sup>b</sup>	31
5	<i>Ciclo-L-Val-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt) (27)</i>	43 <sup>b</sup>	42
6	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (28)</i>	27 <sup>b</sup>	22
7	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly (29)</i>	26 <sup>b</sup>	23
8	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (30)</i>	34 <sup>b</sup>	32
9	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (31)</i>	59 <sup>c</sup>	55
10	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (32)</i>	59 <sup>b</sup>	50
11	<i>Ciclo-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-L-Met-Gly (33)</i>	80 <sup>b</sup>	63
12	<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (34)</i>	34 <sup>b</sup>	31
13	<i>Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu) (35)</i>	57 <sup>c</sup>	47
14	<i>Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt) (36)</i>	74 <sup>c</sup>	64
15	<i>Ciclo-NMe-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt) (37)</i>	42 <sup>c</sup>	38
16	<i>Ciclo-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly (38)</i>	77 <sup>c</sup>	69
17	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (39)</i>	54 <sup>b</sup>	51
18	<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (40)</i>	69 <sup>b</sup>	58
19	<i>Ciclo-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt) (41)</i>	57 <sup>c</sup>	47

a. Rendimientos basados en la carga teórica de la resina. b. Se utilizó HBTU como agente acoplante. c. Se utilizó HATU como agente acoplante.

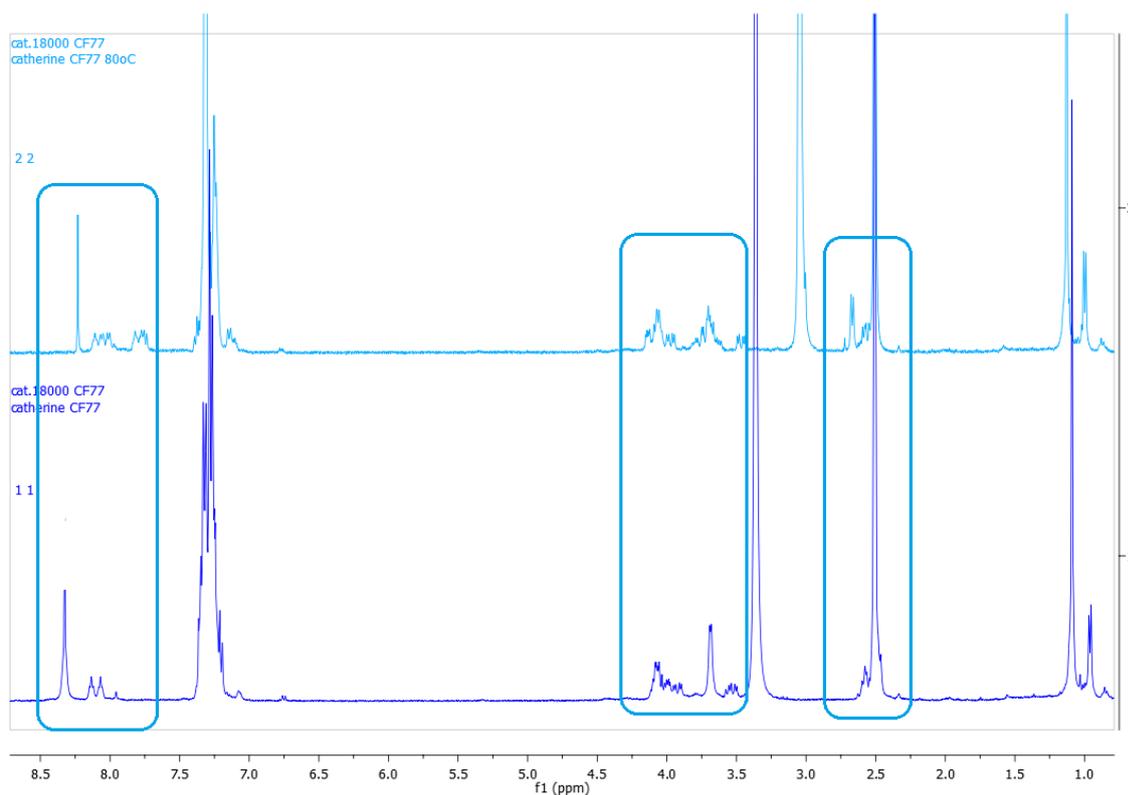
**Tabla 3.1.** Rendimientos de la reacción de macro ciclación en solución de péptidos obtenidos utilizando la resina 2-CTC y rendimientos totales de obtención de dichos macrociclos.

Como se puede ver en la tabla 3.1, los rendimientos de las macro ciclaciones partiendo del crudo del péptido, son de moderados a buenos, entre 26 y 80%. Es de destacar, que todas las secuencias contienen L-AA, es decir, no se utilizó nunca un D-AA como inductor de giro, tampoco se utilizó inductores externos de giro; sin embargo, se lograron rendimientos muy buenos en muchos casos. Para las secuencias que contienen inductores de giro estructurales como NMe-Gly, los rendimientos fueron de buenos a muy buenos. Se

debe tener en cuenta en algunos casos, que el acoplamiento para el cierre del ciclo debe realizarse entre una amina secundaria y un carboxilo estéricamente impedido (compuestos **35**, **36**, **37** y **41**). El compuesto **38**, que contiene una única NMe-Gly en el medio de su secuencia y su extremo N-terminal es una amina primaria, fue el que se obtuvo con el mejor rendimiento de esta serie de ciclopéptidos (77%). Estas reacciones se siguieron mediante análisis de HPLC-UV para determinar el progreso de la reacción.

De acuerdo con el análisis de los cromatogramas y los espectros de RMN de los compuestos formados a partir de un carboxilo de Cys o Ser, no se detectó racemización durante su preparación. Con respecto al tiempo de reacción, los compuestos **31**, **39** y **40** fueron preparados en un día y con muy buenos rendimientos. Por el contrario, los compuestos **28**, **29**, **30** y **34** se obtuvieron después de tres días con un rendimiento bajo. Estos rendimientos de macrociclación en la síntesis de los compuestos **28** y **29** podrían explicarse por la presencia de un Arg(Pbf) en la secuencia peptídica que no favorecería este proceso, probablemente debido a un importante efecto estérico de los grupos protectores (Pbf), sumado a los Tritilos voluminosos que protegen los tioles de las Cisteínas. El mejor resultado para la macrociclación se obtuvo para el ciclohexapéptido **33** que presenta cinco AA hidrofóbicos y Glu(<sup>t</sup>Bu) como único residuo hidrofílico. En cuanto a los ciclopéptidos conteniendo NMe-AA, el tiempo de reacción fue de 24 hs para la obtención de los compuestos **36**, **37** y **41**, de 48 hs para el compuesto **35** y en 72 hs para el **36**. Esto podría indicar que los péptidos que contienen mayor número de NMe-AA, tienden a reaccionar con mayor rapidez, pero esto no tiene relación con el rendimiento final de esta reacción.

Una característica que presentan estos compuestos, es la complejidad en sus espectros de <sup>1</sup>H-NMR, debido al gran tamaño y al número de protones de diferente naturaleza que poseen. Sumado a esto, varios de estos compuestos presentan conformeros en solución, lo que dificulta aun más su caracterización. Esto se puede evidenciar en los espectros de RMN realizados a diferentes temperaturas. En la Figura 3.3 se muestra el espectro en DMSO-d<sub>6</sub> a temperatura ambiente y a 80°C del compuesto **30**, en el que se puede comparar el corrimiento y agrupación de las señales de los H asignables a NH y a los C $\alpha$  de los residuos aminoacídicos.



**Figura 3.3.** Comparación de espectros  $^1\text{H-NMR}$  a diferentes temperaturas del compuesto **30**.

A pesar de que con el uso de esta metodología se logró obtener un buen número de ciclopéptidos, con buenos rendimientos, la misma tiene como desventaja que, dependiendo de la secuencia aminoacídica, puede ser una reacción bastante lenta y con posibilidad a racemizar, a pesar de que en nuestro caso, no hemos observado indicios de éste último. Además, la purificación de estos compuestos por cromatografía de columna en fase normal, se hace larga y dificultosa, ya que son compuestos que quedan muy retenidos a la sílica a pesar de su alta lipofilia aparente.

Un punto a destacar también, es que por la metodología descrita anteriormente se pueden obtener macrociclos totalmente protegidos en todos los residuos aminoacídicos y con secuencias peptídicas muy diversas. Los rendimientos totales, Tabla 3.1, se refieren a todo el proceso: SPFS y macro ciclación en solución. Desde el acoplamiento del primer AA a la resina, serían 14 pasos de reacción para los ciclohexapéptidos y 12 para ciclopentapéptidos, seguido de una purificación final larga y tediosa por lo general. Considerando esto, podría justificarse rendimientos como el más bajo obtenido (22%), sin embargo, se supera ampliamente ese valor en la mayoría de los casos.

### 3.2.2 Obtención de macrociclos en fase sólida.

Debido al largo tiempo que requiere la macrociclación en solución y las dificultades que se han observado para la purificación de muchos macrociclos obtenidos, nos embarcamos en la búsqueda de una metodología que permita reducir estos problemas. Pensando en esto, decidimos estudiar la lactamización cabeza-cola, con el péptido anclado a la resina a través de la cadena lateral de un aminoácido trifuncional. Hasta la fecha, se han diseñado estrategias de anclaje para una serie de funcionalidades de cadena lateral de aminoácidos, pero en todos los casos, es necesaria la triortogonalidad de la estrategia para sintetizar el péptido lineal.<sup>20</sup> Una vez que se completa la reacción de ciclación, se puede obtener el producto con buena pureza lavando la resina luego de terminada la reacción. Se ha informado sobre el uso de varias resinas para este fin, tales como resina Wang<sup>21</sup>, resina Rink amida<sup>22</sup>, resina Br-Wang<sup>23</sup> o resina 2-CTC (Cloruro de 2-clorotritilo).<sup>24</sup>

En el capítulo 2, se presentó la puesta a punto del anclaje del primer AA por su cadena lateral y la síntesis del péptido lineal anclado a la resina 2-CTC, con lo que una vez terminado, se procedió al estudio de la metodología de macrociclación. Para esto, se realizó la reacción de macrociclación en resina, utilizando DIC/Cl-HOBt como agente acoplante para obtener siete ciclopéptidos, Esquema 3.5. Resolvimos utilizar DIC/Cl-HOBT, de forma de evitar el uso de bases que podrían promover la racemización del C $\alpha$  durante la ciclación. El progreso de la reacción se realizó escindiendo una alícuota del compuesto de la resina y analizando la misma por HPLC-UV. Las macrociclaciones se completaron durante la noche para todos los ciclopéptidos con lo que se obtuvieron los macrociclos deseados con rendimientos del 63 al 99%, y purezas UV del 48 al 83%, Tabla 3.2. Los resultados de pureza que se informan, son de los crudos obtenidos.

---

<sup>20</sup> a) Isied, S.; Kuehn, C. G.; Lyon, J. M.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2632. b) Rovero, P.; Quartara, L.; Fabbri, G. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2639. c) Trzeciak, A.; Bannwarth, W. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4557. d) Kates, S. A.; Solé, N.A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549. e) Alsina, J.; Chiva, C.; Ortiz, M.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 883. f) Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633. g) García, O.; Nicolás, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5319. h) Cabrele, C.; Langer, M.; Beck-Sickinger, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4353. i) Fernando, A.; Kates, S.; Solé, N.; Johnson, C.; Hudson, D.; Barany, G. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549.

<sup>21</sup> a) Myer, J. P.; Yan, L. Z.; Edwards, P.; Flora, D. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 923. b) Wang, P.; Miranda, L.P. *Int. J. Pept. Res. Therap.* **2005**, *11*, 117.

<sup>22</sup> Wang, P.; Miranda, L.P. *Int. J. Pept. Res. Therap.* **2005**, *11*, 117.

<sup>23</sup> Wong, C.; Ficht, S.; Payne, R.; Guy, R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3620.

<sup>24</sup> a) Schutkowski, M.; Bernhardt, A.; Drewello, M. *J. Peptide Res.* **1997**, *50*, 143. b) Rizzi, L.; Cendic, K.; Vaiana, N.; Romeo, S. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2808.

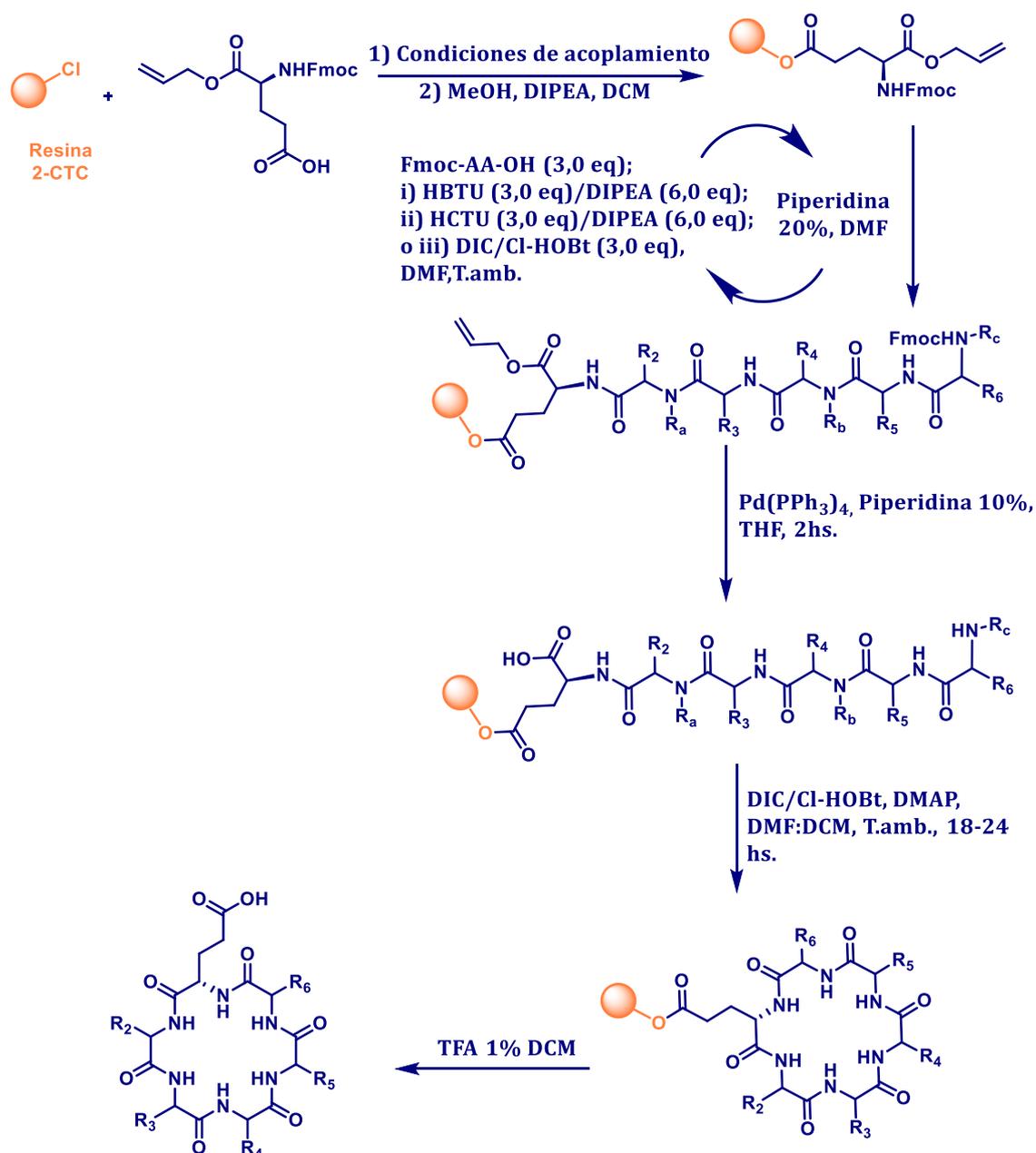
Entrada	Macro ciclo	R. <sup>a</sup> (%)	Pur. (%)	Tiempo (h)
1	<i>Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu (42)</i>	68	81	16
2	<i>Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu (43)</i>	98	76	16
3	<i>Ciclo-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu (44)</i>	63	78	16
4	<i>Ciclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu (45)</i>	99	83	16
5	<i>Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu (46)</i>	81	54	20
6	<i>Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu (47)</i>	92	48	20
7	<i>Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu (48)</i>	84	84	20

a. Rendimiento basado en la carga de la resina.

**Tabla 3.2.** Rendimientos, purezas y tiempos de la reacción de macro ciclación en fase sólida.

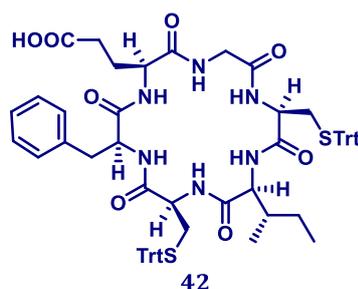
Contrariamente a nuestras expectativas, ya que esperábamos los mejores resultados para la obtención de **42**, **43** y **44** cuyos precursores contienen Gly en sus extremos N-terminal, el mejor rendimiento de macro ciclación fue para el compuesto **45**, que involucra el acoplamiento entre el grupo amino de Met y el carboxilo de Glu resultando ser un proceso muy eficiente, con un rendimiento del 99% y una pureza del 83%.

Para el caso de los compuestos conteniendo NMe-AA (**46**, **47** y **48**) los rendimientos de síntesis son buenos a pesar de que se trata de un acoplamiento dificultoso, ya que debe reaccionar una amina secundaria, impedida, con el carboxilo del Glu. Estos ciclopéptidos presentaron el inconveniente de que durante la evaporación de la mezcla de solventes con los que se toma el crudo final, dentro de los cuales se utilizó MeOH, el carboxilo del residuo de ácido Glutámico se metiló formando un éster metílico. Por este motivo el crudo final de reacción posee una pureza inferior a las demás reacciones, siendo esto un dato a tomar en cuenta para las posteriores síntesis de ciclopéptidos por éste método. Además, para estos últimos, no se puede asegurar que no haya ocurrido racemización del centro quiral del extremo C-terminal, ya que el cromatograma luego de la última reacción, muestra un pico, con bajo porcentaje de área, con  $t_R$  similar al del macro ciclo buscado. Esto también podría deberse a la presencia de confórmeros que puedan observarse por HPLC, por lo que se necesitaría realizar nuevos estudios de manera de concluir al respecto.



**Esquema 3.5.** Síntesis de macrociclos en fase sólida.

Para determinar si el rendimiento de macro ciclación en resina puede mejorarse, se ensayaron diferentes reactivos de acoplamiento, HATU/DIPEA y HBTU/DIPEA en DMF: DCM (8:2) para obtener el compuesto **42**, Tabla 3.3, Figura 3.4. De acuerdo con los resultados, no hay una diferencia significativa entre el uso de HBTU o DIC/Cl-HOBt como agentes acoplantes. En el caso de HATU/DIPEA, el rendimiento fue más alto pero el crudo se obtuvo con menor pureza.



**Figura 3.4.** Estructura del compuesto 42.

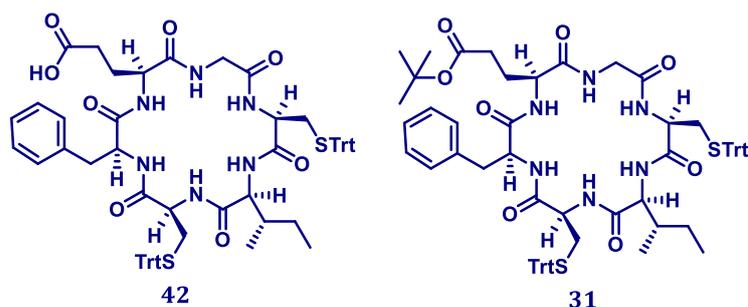
Entrada	Condiciones	Resultado <sup>a</sup>
1	DIC/Cl-HOBt (4 eq), DMF:DCM (8:2), T. amb., 24hs.	Crudo: 68% de recuperación de masa Pureza: 81%
2	HATU(3 eq), DIPEA (6 eq), DMF:DCM (8:2), T. amb., 24hs.	Crudo: 100% de recuperación de masa Pureza: 59%
3	HBTU(3 eq), DIPEA (6 eq), DMF:DCM (8:2), T. amb., 24hs.	Crudo: 88% de recuperación de masa Pureza: 80%

a. Rendimiento basado en la carga de la resina.

**Tabla 3.3.** Macro ciclo análogo a **31** sintetizado por macro ciclación en Fase Sólida y condiciones ensayadas para su obtención.

### 3.2.3 Comparación de metodologías de macro ciclación: solución vs fase sólida.

Con el fin de obtener información acerca de la eficiencia de los dos procesos utilizados para la síntesis de ciclopéptidos: i) SPFS y macro ciclación en solución y ii) SPFS y macro ciclación en la resina, se utilizaron dos agentes acoplantes, HATU y HBTU para obtener **42** y **31** que presentan la misma secuencia (Figura 3.5 y Tabla 3.4). Con el uso de HATU, la diferencia de ambos procedimientos no es significativa. Sin embargo, cuando se utilizó HBTU, la macro ciclación en fase sólida resultó con un mejor rendimiento. Como se ha introducido anteriormente, estos agentes acoplantes, hacen necesario el uso de una base, que además permite solubilizar los péptidos en el medio de reacción (DCM). Uno de los principales motivos por los que no se estudió la macro ciclación en solución para la obtención de **31** utilizando DIC/Cl-HOBt, es que al no ser necesario el agregado de una base, no se solubiliza el péptido precursor, lo que no permitiría que reaccionara.



**Figura 3.5.** Estructura de compuestos **42** y **31**.

Agente acoplante	Resultado para compuesto <b>42</b> <sup>a</sup>	Resultado para compuesto <b>31</b> <sup>b</sup>
HATU	Crudo: 100% de recuperación de masa Pureza: 59% Rendimiento específico <sup>c</sup> : 59%	Rendimiento péptido: 93% Rendimiento macro ciclación: 59% Rendimiento total: 55%
HBTU	Crudo: 88% de recuperación de masa Pureza: 80% Rendimiento específico <sup>c</sup> : 70%	Rendimiento péptido: 93% Rendimiento macro ciclación: 46% Rendimiento total: 43%

- a. Macro ciclación en fase sólida. Rendimiento basado en la carga de la resina.  
 b. Macro ciclación en solución.  
 c. Rendimiento específico definido en capítulo 2.<sup>25</sup>

**Tabla 3.4.** Comparación de ambas metodologías para la síntesis de macrociclos.

Por otro lado, continuando con la comparación entre ambas metodologías, se analizaron los resultados obtenidos para la síntesis de ciclopéptidos con las mismas secuencias difiriendo solamente en la presencia o no de un grupo protector (<sup>t</sup>Bu) en el carboxilo y del residuo de Glu, Figura 3.6. Como se muestra en la Tabla 3.5, la eficiencia de la macro ciclación en fase sólida es mayor que para la macro ciclación en solución, para cada uno de los compuestos sintetizados. Además, se puede observar, que los rendimientos de estas reacciones son muy dependientes de las secuencias aminoacídicas, ya que los mejores resultados son para los compuestos con la misma secuencia **33** y **45** y los peores para la de los compuestos **34** y **44**.

<sup>25</sup> Luna, O.; Gomez, J.; Cárdenas, C.; Albericio, F.; Marshall, S.; Guzmán, F.; *Molecules* **2016**, *21*, 1542.

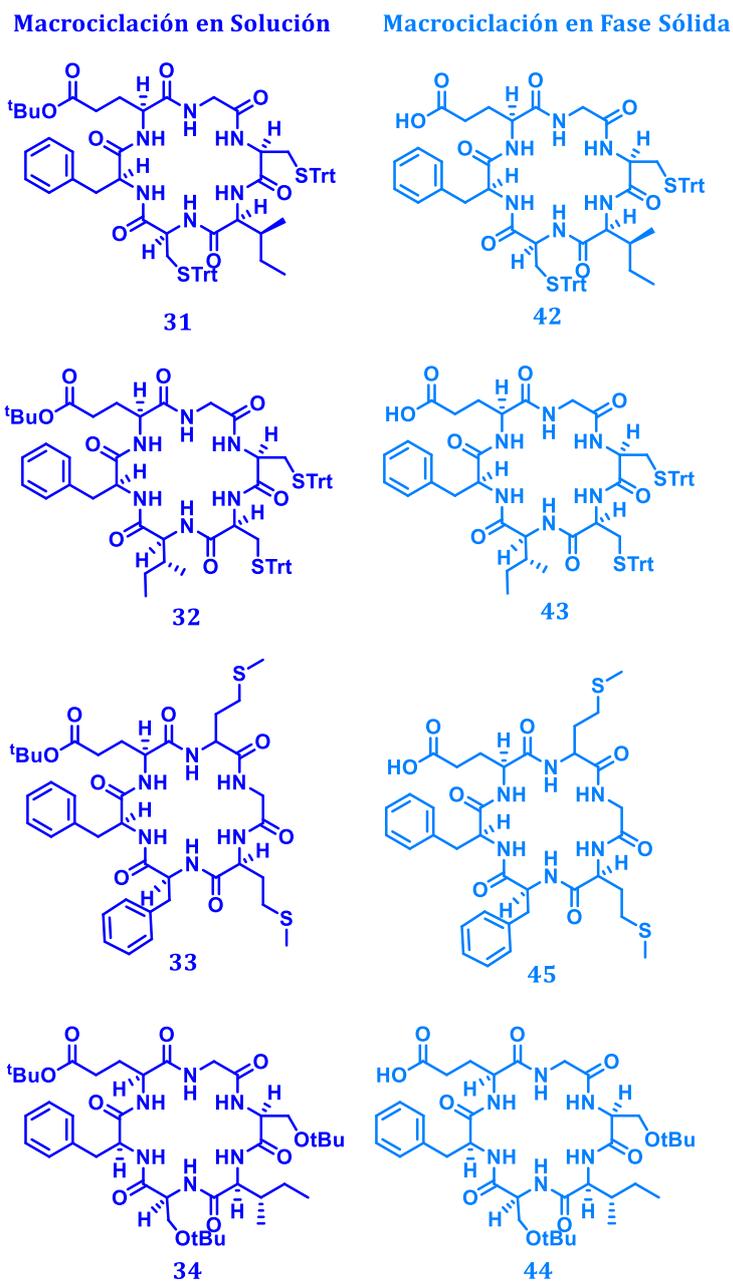


Figura 3.6. Macro ciclación sintetizados por diferentes metodologías.

Entrada	Macro ciclación en fase sólida (Rendimiento x Pureza = Rendimiento específico <sup>25</sup> ) <sup>a</sup>	Macro ciclación en solución (Rendimiento x Pureza = Rendimiento específico <sup>25</sup> ) <sup>b</sup>
1	(43) 63 x 76 = 46	(32) 50 x 83 = 42
2	(45) 80 x 83 = 66	(33) 63 x 93 = 59
3	(44) 46 x 78 = 36	(34) 31 x 93 = 29
4	(42) 51 x 81 = 41	(31) 55 <sup>c</sup> x 83 = 46

- a. Macro ciclación en fase sólida. Rendimiento basado en la carga de la resina.
- b. Macro ciclación en solución. Rendimientos de la síntesis total, basados en la carga teórica de la resina.
- c. Se utilizó HATU como agente acoplante.

Tabla 3.5 Comparación de ambas metodologías para la síntesis de macro ciclación.

Por otro lado, la macro ciclación en fase sólida en términos de tiempo y facilidad es una metodología más ventajosa. De todas formas, se destaca que ambas metodologías dan resultados muy buenos por lo que se podrá seleccionar la que mejor se ajuste para la secuencia peptídica y las protecciones deseadas.

Dado que se debe contar con muestras de purezas cercanas al 95% para los ensayos de actividad biológica, se hizo necesario purificar los macrociclos obtenidos que no cumplieran con esa condición. Estos compuestos, como se puede apreciar, presentan un carácter anfifílico importante, lo que los hace más difíciles aún de purificar por cromatografía en fase normal. Por lo tanto, se utilizó un sistema de purificación por HPLC-UV, con una columna semi-preparativa C18, que permite la separación de pocos miligramos.



### 3.3 CONCLUSIONES

Utilizando la metodología de macro ciclación en solución, se logró obtener 16 ciclohexapéptidos y 3 ciclopentapéptidos, con rendimientos de moderados a muy buenos teniendo en cuenta el tipo de reacciones involucradas, y considerando que en la mayoría de los casos (salvo para los casos en que NMe-Gly está presente en la secuencia), no se realizaron modificaciones estructurales que favorecieran la ciclación ni se utilizaron inductores externos de giro.

Los rendimientos en las macro ciclaciones para las estructuras que contienen NMe-AA (inductores de giro), son muy buenos, mayores al 42%, considerando que cuatro de ellos implican un acoplamiento dificultoso en el que interviene una amina secundaria. El compuesto **38**, que contiene una única NMe-Gly en el medio de su secuencia y su extremo N-terminal es una amina primaria, fue el que se obtuvo con el mejor rendimiento de esta serie de ciclopéptidos (77%).

Utilizando la metodología de macro ciclación en fase sólida, se logró sintetizar 7 ciclohexapéptidos con rendimientos totales de síntesis muy buenos, con buenas purezas salvo en dos casos en los que se obtuvo el éster metílico derivado. Comparando nuestros resultados para la ciclación de péptidos en resina, con los obtenidos por otros autores, nuestro procedimiento tiene una alta eficiencia de ciclación.<sup>8,9</sup> Los ciclopéptidos obtenidos mediante esta metodología, presentan un grupo carboxilo libre en uno de los residuos aminoacídicos que es un punto excelente para marcar o para proporcionarles las propiedades requeridas para su posible uso como fármacos.

Con los resultados obtenidos, podemos decir que ambas metodologías dan resultados muy buenos por lo que se podrá seleccionar la que mejor se ajuste para la secuencia peptídica y las protecciones deseadas. Si se desea un proceso que pueda llevarse a cabo en poco tiempo, claramente la mejor opción es la síntesis total del macrociclo en fase sólida.



## 3.4 PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando placas de sílica gel sobre plástico de 0.20 mm de espesor (Macherey-Nagel, Polygram®, silG/UV 254 nm) y revelado con lámpara UV a 254 nm, vapores de yodo, spray de ninhidrina o fosfomolibdico.

Diclorometano seco se obtuvo de  $\text{CaH}_2$ .<sup>26</sup> Todas las reacciones en solución fueron llevadas a cabo en sistemas secos y bajo atmósfera de nitrógeno. Los solventes utilizados en fase sólida, son de calidad HPLC.

La cromatografía en columna se realizaron utilizando Sílica gel 60 (J.T. Baker, 40  $\mu\text{m}$  diámetro promedio de partícula).

Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químico se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa micro QTOF-G (Bruker Daltonics) mediante ionización de electrospray y LTQ-FT Ultra (NanoESI) (Thermo Scientific).

Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu 8101A en film sobre pastillas de NaCl.

Las medidas de punto de fusión fueron realizadas en Fischer-Johns de Fischer Scientific Comp.

El ángulo de rotación óptica fue medido en un polarímetro Kruss Optronic GmbH P8000 con una celda de 0.5 mL.

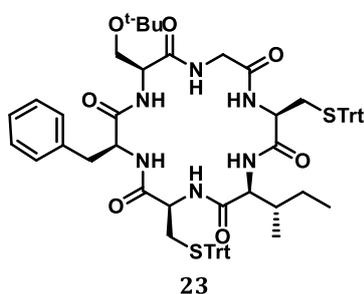
El seguimiento de todas las reacciones se realizaron por HPLC analítico Shimadzu (LC-10AT Pump) equipado con una columna Waters  $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$  C18 (150 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) y un detector SPD20A Prominence UV/Vis. La purificación por HPLC semi-preparativo se realizó con el mismo equipo equipado con una columna Phenomenex Luna<sup>R</sup> C18 (250 x 10 mm, 5 $\mu\text{m}$ ).

---

<sup>26</sup> Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3<sup>th</sup> Ed. Pergamon Press, Oxford, 1988.

### 3.4.1 Procedimiento general para la macro ciclación en solución.

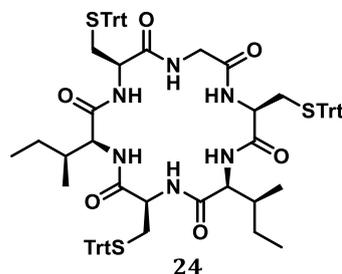
A una solución/suspensión del péptido en DCM seco (1-10 mM), se le agregó DIPEA (3 eq.), seguido de HBTU o HATU (1.5 eq.) y 4-DMAP (catalítico) y se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 1-3 días. El disolvente se evaporó a vacío. El crudo de reacción, se suspendió en AcOEt, se lavó con HCl 5% y luego con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> en agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. El producto se purificó por cromatografía flash para obtener el macrociclo.



**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (23):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 1 día), a partir de la sal de trifluoroacetato del NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly-OH (300 mg, 0,23 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (193 mg, 0,168 mmol) con un rendimiento del 72%.

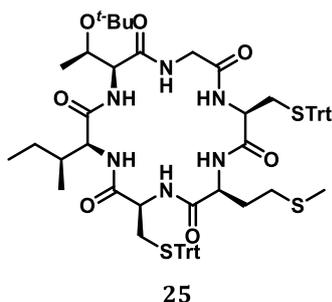
Sólido blanco (72%). R<sub>f</sub> = 0.4 (EtOAc:EP, 3:1). m.p. = 123-129. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -25.9 (c 1.35, MeOH). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 0.87 (t, J=6.7 Hz, 3H), 0.88 (d, J=6.7 Hz, 3H), 1.07 (m, 1H), 1.11 (s, 9H), 1.48 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.59 (m, 1H), 2.70 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 3.01 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.87 (t, J=7.2 Hz, 1H), 4.04 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 6.79 (d, J=5.4 Hz, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.09-7.18 (m, 6H), 7.18-7.25 (m, 7H), 7.25-7.34 (m, 14H), 7.35-7.40 (m, 6H), 7.40-7.46 (m, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ(ppm): 11.1, 15.7, 25.2, 27.4 (3C), 32.3, 32.5, 35.6, 36.5, 38.6, 43.6, 53.4, 54.1, 54.7, 56.1, 60.3, 67.3 (2C), 74.0, 126.9 (2C), 127.0 (3C), 127.3 (2C), 127.9 (2C), 128.0 (3C), 128.1 (8C), 128.3, 128.7 (2C), 129.4 (2C), 129.5 (5C), 129.5 (5C), 144.2 (3C), 144.3 (3C), 146.9, 170.1, 170.2, 170.6, 170.7, 171.3 (2C). **IR** λ (cm<sup>-1</sup>)

1034, 1157, 1236, 1265, 1365,1531, 1645, 2931, 2970, 3059, 3296. **HRMS**  $m/z$  calc. for  $C_{68}H_{74}N_6O_7S_2$   $[[M+Na]^+]$  1173,4958, found 1173.4912.



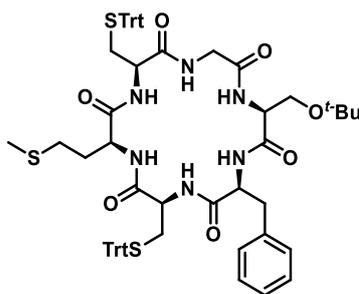
**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly (24):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del  $NH_2$ -L-Cys(Trt)-L-Ile L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly-OH (330 mg, 0,23 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (192 mg, 0,145 mmol) con un rendimiento del 66%.

Sólido blanco (66%). **Rf**= 0.5 (EtOAc). **m.p.**= 144-149.  $[\alpha]_D^{25}$ = -58.4 ( $c$  0.5, MeOH).  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  (ppm): 0.83-0.89 (m, 9H), 0.91 (d,  $J$ =6.8 Hz, 3H), 0.99-1.20 (m, 2H), 1.39-1.60 (m, 2H), 1.90-2.10 (m, 2H), 2.52-2.65 (m, 2H), 2.65-2.79 (m, 4H), 3.21-3.30 (m, 1H), 3.51-3.63 (m, 1H), 3.69-3.83 (m, 2H), 3.89-4.03 (m, 3H), 6.78 (d,  $J$ =6.3 Hz, 1H), 6.85-6.96 (m, 1H), 7.01 (d,  $J$ =7.5 Hz, 1H), 7.04-7.16 (m, 2H), 7.18-7.25 (m, 10H), 7.25-7.33 (m, 18H), 7.38-7.46 (m, 18H).  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$ (ppm):10.8, 11.4, 15.7, 15.9, 24.7, 25.1, 31.9 (2C), 34.9, 35.4, 36.5, 43.9, 53.3, 53.5, 54.0, 59.1, 59.6, 67.0, 67.2(2C), 126.9 (3C), 126.9 (3C), 127.0 (3C), 127.9 (2C), 128.0 (8C), 128.1 (4C), 128.2 (4C), 129.4 (6C), 129.5 (6C), 129.6 (6C), 144.1 (3C), 144.3 (3C), 144.5 (3C), 165.3, 170.6, 170.8, 170.9, 171.0, 171.4. **IR**  $\lambda$ ( $cm^{-1}$ ) 1033, 1082, 1265, 1445, 1526, 1651, 2931, 2965, 3059, 3385, 3400. **HRMS**  $m/z$  calc. for  $C_{80}H_{82}N_6O_6S_3$   $[[M+Na]^+]$  1341,5456, found 1341.5231.



**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(*t*-Bu)-Gly (25):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(*t*-Bu)-Gly-OH (340 mg, 0.265 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (165 mg, 0.144 mmol) con un rendimiento del 54%.

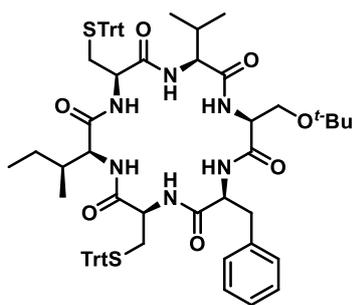
Sólido blanco (54%). R<sub>f</sub> = 0.5 (EtOAc:EP, 3:1). m.p. = 123-133. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -28.0 (c 1.35, MeOH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.85-0.95 (m, 6H), 1.02 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.05-1.19 (m, 1H), 1.23 (s, 9H), 1.39-1.51 (m, 1H), 1.75-1.86 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.89-1.99 (m, 1H), 1.89-2.09 (m, 2H), 2.14-2.24 (m, 1H), 2.48-2.63 (m, 3H), 2.63-2.72 (m, 1H), 2.96-3.06 (m, 1H), 3.17-3.26 (m, 1H), 3.39-3.49 (m, 1H), 3.53-3.71 (m, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.02-4.13 (m, 2H), 4.20-4.27 (m, 1H), 4.46-4.55 (m, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.69-6.78 (m, 1H), 6.78-6.88 (m, 1H), 7.20-7.27 (m, 7H), 7.27-7.35 (m, 14H), 7.40 (m, 11H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 11.3, 14.2, 15.4, 15.8, 19.2, 21.0, 22.6, 25.3, 28.3, 29.9, 30.4, 32.2, 32.3, 35.6, 44.1, 53.1, 53.7, 55.2, 58.7, 60.5, 67.3, 67.4, 75.0, 127.0 (6C), 128.1 (12C), 129.5 (12C), 144.2 (3C), 144.3 (3C), 165.7, 169.7, 170.3, 171.1, 171.5, 172.0. IR λ (cm<sup>-1</sup>) 1082, 1148, 1192, 1236, 1234, 1383, 1445, 1512, 1647, 2931, 2970, 3059, 3287. HRMS *m/z* calc. for C<sub>65</sub>H<sub>76</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>3</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 1171.4836, found 1171.4790.



26

**Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly (26):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido NH<sub>2</sub>-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly-OH (140 mg, 0.107 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (25 mg, 0,021 mmol) con un rendimiento del 38%.

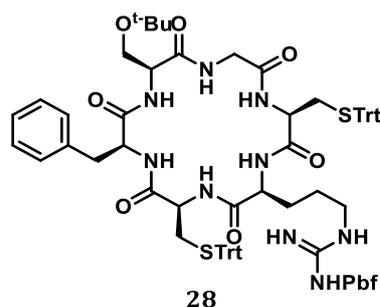
Sólido amarillo (38%). **R<sub>f</sub>**= 0.3 (EtOAc:EP, 3:1). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 1.11 (s, 9H), 1.99 (s, 3H), 2.01 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.79 (m, 1H), 2.82 (m, 2H), 3.06 (dd, *J*= 9.5,13.9 Hz 1H), 3.24 (dd, *J*= 6.2, 13.9 Hz 1H), 3.44 (m, 1H), 3.58 (d, *J*=15.4 Hz 1H), 3.61(m, 1H), 3.72 (m, 1H), 4.04 (d, *J*=15.4 Hz 1H), 4.20 (t, *J*=7.2 Hz 1H), 4.25 (m, 1H), 4.3 (dd, *J*= 4.6, 9.1 Hz 1H), 4.66 (dd, *J*=6.2, 9.5 Hz, 1H), 7.21-7.29 (m, 10H), 7.29-7.36 (m, 13H), 7.37-7.43 (m, 12H), 7.67 (m, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.93 (m, 1H), 8.01 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ(ppm): 14.2, 22.7, 27.4 (3C), 30.8, 32.5, 32.5, 37.1, 43.3, 51.7, 53.3 (2C), 54.0, 54.8, 60.6, 67.2, 67.3, 74.8, 124.5, 126.9 (6C), 127.3 (2C), 127.9 (2C), 128.0 (6C), 128.1 (6C), 129.6 (12C), 136.1, 144.3 (3C), 144.4 (3C), 169.7, 171.0 (2C), 171.1 (2C), 171.6.



27

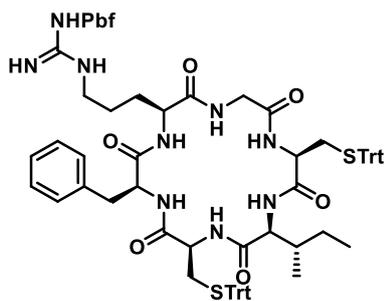
**Ciclo-L-Val-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt) (27):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido NH<sub>2</sub>-L-Val-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-OH (300 mg, 0.226 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (115 mg, 0.096 mmol) con un rendimiento del 43%.

Sólido amarillo (43%). R<sub>f</sub>= 0.6 (EtOAc:CHCl<sub>3</sub>, 3:1). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 0.86 (m, 6H), 0.93 (d, *J*=7.2 Hz, 6H), 1.10 (m, 1H), 1.11 (s, 9H), 1.56 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.72 (m, 1H), 2.84 (m, 3H), 3.13 (m, 1H), 3.18 (m, 1H), 3.55 (d, *J*=5.7 Hz, 2H), 3.66 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.91 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 4.02 (t, *J*=5.7 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J*=5.1, 8.7 Hz, 1H), 4.47 (dd, *J*=7.3 Hz, 1H), 7.17-7.37 (m, 25H), 7.37-7.45 (m, 13H), 7.87 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 8.03 (d, *J*=6.8 Hz, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ(ppm):10.7, 15.3, 18.2, 18.9, 24.9, 26.7 (3C), 28.6, 31.7, 32.8, 35.4, 36.4, 53.7, 54.4, 55.0, 55.1, 60.3, 60.4, 62.0, 66.6, 67.0, 81.1, 125.3, 126.7 (2C), 126.8 (2C), 126.9 (2C), 127.5 (2C), 128.0 (12C), 128.4 (2C), 129.4 (6C), 129.5 (6C), 137.5, 144.6 (3C), 144.7 (3C), 165.2, 170.6, 170.7, 171.2, 171.6, 171.8. **HRMS** *m/z* calc. for C<sub>71</sub>H<sub>80</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 1215.5422, found 1215.2886.



**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (28):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido  $\text{NH}_2\text{-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser}(\text{}^t\text{Bu})\text{-Gly-OH}$  (300 mg, 0.190 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (74 mg, 0.051 mmol) con un rendimiento del 27%.

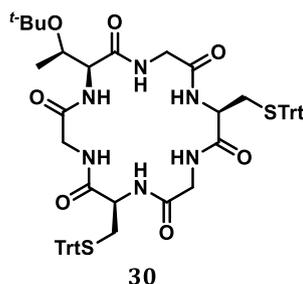
Sólido Amarillo (22%).  $R_f = 0.3$  (EtOAc:EP, 3:1).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -1.4$  ( $c$  2.00, DCM).  **$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )**  $\delta$  (ppm): 1.16 (s, 9H), 1.45 (s, 6H), 1.45-1.67 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 2.37-2.61 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.95-3.04 (m, 1H), 2.99 (s, 2H), 3.07-3.28 (m, 3H), 3.28-3.37 (m, 1H), 3.47-3.58 (m, 2H), 3.62-3.71 (m, 2H), 3.83-3.94 (m, 1H), 3.94-3.99 (m, 1H), 4.02-4.13 (m, 2H), 4.36-4.46 (m, 1H), 4.59-4.68 (m, 1H), 6.53-6.52 (m, 1H), 7.03-7.49 (m, 43H).  **$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )**  $\delta$  (ppm): 11.7, 17.4, 18.7, 24.1, 25.4, 26.8 (3C), 27.9 (2C), 32.6, 33.9, 36.9, 39.7, 40.7, 42.8, 51.3, 52.9, 53.4, 53.6, 54.1, 61.1, 66.8 (2C), 73.3, 86.0, 116.6, 126.4 (3C), 126.7, 126.8 (3C), 127.5 (2C), 128.0 (14C), 128.4, 128.6, 129.5 (12C), 132.0, 134.7, 144.6 (6C), 147.9, 152.9, 158.1, 165.2, 169.1, 170.0, 171.4, 171.2, 173.6. **HRMS**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{81}\text{H}_{91}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}_3$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 1468.5943, found 1468.6544.



29

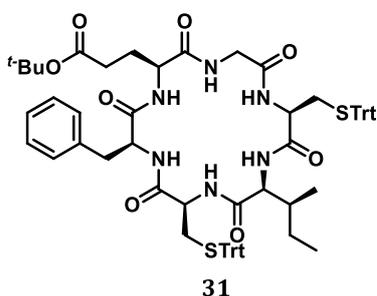
**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly (29):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido  $\text{NH}_2\text{-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly-OH}$  (100 mg, 0.065 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (24 mg, 0.017 mmol) con un rendimiento del 26%.

Sólido amarillo (26%).  $R_f = 0.3$  (EtOAc:EP, 4:1).  $[\alpha]_D^{25} = -4.1$  ( $c$  1.46, DCM).  **$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 0.73-1.00 (m, 6H), 1.28-1.68 (m, 4H), 1.46 (s, 6H), 1.77-2.09 (m, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.36-2.70 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.94-3.26 (m, 3H), 2.95 (s, 2H), 3.27-3.39 (m, 1H), 3.41-3.56 (m, 2H), 3.62-3.76 (m, 1H), 3.86-4.06 (m, 2H), 4.28-4.53 (m, 2H), 6.18-6.31 (m, 2H), 7.03-7.49 (m, 42H).  **$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ (ppm): 10.6, 12.5, 15.1, 18.0, 18.5, 24.3, 25.4, 26.1, 28.6 (2C), 29.7, 31.3, 32.0, 32.4, 36.5, 40.7, 41.0, 43.3, 51.0, 53.6, 54.6, 56.3, 58.3, 66.2 (2C), 86.9, 113.2, 123.4, 126.9, 127.3 (2C), 127.9 (6C), 128.1 (12C), 128.3 (2C), 129.5 (12C), 130.1, 136.4, 138.3, 146.9 (6C), 153.5, 158.8, 169.0, 170.4, 171.0, 171.6, 172.1, 173.2. **HRMS**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{80}\text{H}_{89}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}_3$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 1438.5843, found 1438.7155.



**Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(*t*-Bu)-Gly (30):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(*t*-Bu)-Gly-OH (500 mg, 0.43 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (134 mg, 0.132 mmol) con un rendimiento del 34%.

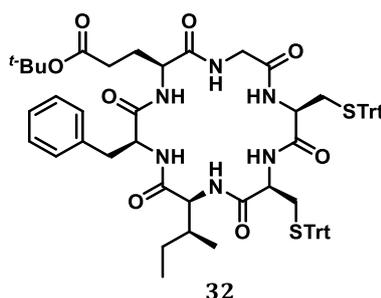
Sólido blanco (34%). R<sub>f</sub>= 0.3 (EtOAc:EP, 3:1). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>= -25.6 (*c* 1.25, MeOH). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)** δ (ppm): 0.96 (d, *J*=6.2 Hz, 3H), 1.09 (s, 9H), 2.44-2.63 (m, 4H), 3.52 (dd, *J*=6.1, 16.2 Hz, 1H), 3.65-3.72 (m, 4H), 3.92 (dd, *J*=6.1, 16.2 Hz, 1H), 3.96-4.13 (m, 4H), 7.16-7.41 (m, 31H), 8.07 (t, *J*=5.4 Hz, 1H), 8.13 (t, *J*=5.3 Hz, 1H), 8.28-8.36 (m, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO)** δ(ppm): 19.6, 28.4 (3C), 32.1, 33.2, 42.7, 42.8, 43.1, 52.6, 52.7, 58.4, 66.4, 66.5, 66.6, 74.2, 127.3 (2C), 128.0 (2C), 128.2 (2C), 128.5 (12C), 129.5 (12C), 144.7 (6C), 169.0, 169.1, 169.4, 170.1, 170.5 (2C). **HRMS** *m/z* calc. for C<sub>58</sub>H<sub>62</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 1041.4013, found 1041.0489.



**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(γ-*t*-Bu)-Gly (31):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HATU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(γ-*t*-Bu)-Gly-OH (150 mg, 0.124

mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (88 mg, 0.074 mmol) con un rendimiento del 59%.

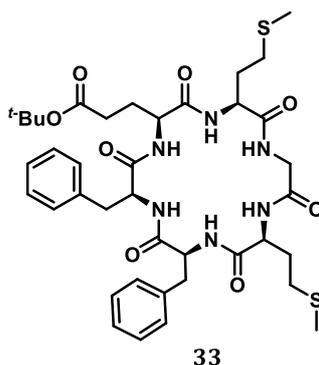
Sólido blanco (59%).  $R_f = 0.3$  (EtOAc:EP, 3:1).  $[\alpha]_D^{25} = -52.5$  ( $c$  0.25, DCM).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.81-0.92 (m, 6H), 1.00-1.14 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.41-1.52 (m, 1H), 1.79-2.03 (m, 2H), 2.11-2.25 (m, 3H), 2.45 (dd,  $J = 5.4, 12.8$  Hz, 1H), 2.56 (dd,  $J = 5.0, 13.2$  Hz, 1H), 2.69-2.82 (m, 2H), 2.97-3.12 (m, 2H), 3.14-3.29 (m, 2H), 3.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.00-4.12 (m, 2H), 4.22 (m, 1H), 4.27-4.36 (m, 1H), 6.43-6.54 (m, 1H), 6.68-6.79 (m, 1H), 6.89-7.00 (m, 1H), 7.08-7.48 (m, 38H).  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.2, 15.5, 25.0, 25.4, 28.2 (3C), 31.7, 31.9, 32.5, 36.1, 36.5, 43.9, 52.9, 53.5, 54.3, 56.3, 58.3, 67.4, 67.5, 80.6, 127.0 (6C), 128.0, 128.1 (6C), 128.2 (6C), 128.8 (2C), 129.2 (2C), 129.5 (12C), 136.9, 144.2 (6C), 170.0, 170.1, 170.4, 171.3, 171.4, 172.3, 172.4. HRMS  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{70}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 1215.5058, found 1215.5062.



**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ -Bu)-Gly (32):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 2 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido  $\text{NH}_2$ -Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ -Bu)-Gly-OH (350 mg, 0.260 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (182 mg, 0.152 mmol) con un rendimiento del 59%.

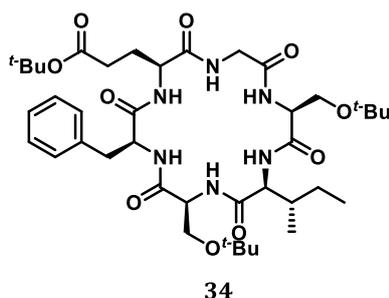
Sólido blanco (59%).  $t_R = 13.25$  min (gradiente lineal: 50 to 100% acetonitrilo en  $\text{H}_2\text{O}/0.003\text{M TFA}$  por 20 min).  $[\alpha]_D^{25} = -7.10$  ( $c$  1.18, MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.64-0.74 (m, 7H), 0.78-0.93 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.85-2.01 (m, 2H), 2.12-2.31 (m, 4H), 2.53-2.66 (m, 2H), 2.82 (t,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 2.87-2.98 (m, 1H), 3.00-3.08 (m, 1H), 3.08-3.19 (m, 1H), 3.21-3.41 (m, 1H), 3.46-3.59 (m, 1H), 3.74-3.91 (m, 3H), 4.35-4.46 (m, 1H), 4.47-4.56 (m, 1H), 6.26-6.38 (m, 1H), 6.82-6.94 (m, 1H), 6.97-7.15 (m, 2H), 7.15-7.53 (m,

37H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 11.4, 15.8, 24.1, 25.2, 28.1 (3C), 30.7, 31.8, 32.13, 35.1, 36.5, 43.3, 52.2, 54.0, 54.2 (2C), 60.8, 67.3, 67.4, 80.7, 126.8, 126.9 (3C), 127.0 (3C), 128.1 (6C), 128.2 (6C), 128.5 (2C), 129.4 (6C), 129.5 (2C), 129.6 (6C), 136.9, 144.1 (3C), 144.3 (3C), 170.6, 170.8, 171.4, 171.5 (2C), 171.9, 172.4. HRMS  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{70}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 1215.5064, found 1215.3950.



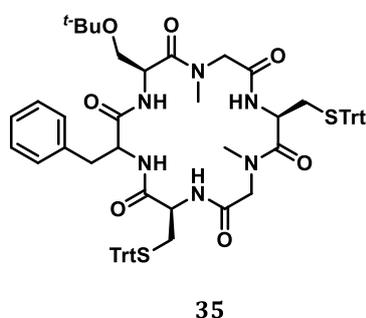
**Ciclo-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ -Bu)-L-Met-Gly (33):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente (5 mM de dilución, 2 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido  $\text{NH}_2$ -L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ -Bu)-L-Met-Gly-OH (200 mg, 0.215 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (137 mg, 0.171 mmol) con un rendimiento del 80%.

Sólido blanco (80%).  $t_R = 5.64$  min (gradiente lineal: 50 to 100% acetonitrilo en  $\text{H}_2\text{O}/0.003\text{M}$  TFA por 20 min).  $[\alpha]_D^{25} = -21.8$  ( $c$  1.55, MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  (ppm): 1.45 (s, 9H), 1.76-1.89 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.11-2.41 (m, 8H), 2.48-2.68 (m, 2H), 3.01-3.31 (m, 4H), 3.73-3.84 (m, 1H), 3.97-4.10 (m, 1H), 4.15-4.31 (m, 2H), 4.39-4.66 (m, 3H), 7.11-7.41 (m, 14H), 8.02-8.49 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ (ppm): 14.2, 14.3, 25.7, 27.4 (3C), 30.1, 30.5, 31.5, 36.5, 36.6, 42.9, 52.7, 53.9, 54.9 (2C), 56.3, 80.0, 126.4, 126.6, 128.2 (2C), 128.4 (2C), 129.3 (2C), 129.4 (2C), 137.6, 137.8, 170.8, 170.9, 171.7, 171.9, 172.0, 172.1, 173.0. HRMS  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$  ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ ) 837.3082, found 837.2639. ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 821.3342, found 821.2675.



**Ciclo-L-Ser(*t*-Bu)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-L-Phe-L-Glu( $\gamma$ *t*-Bu)-Gly (34):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del aminoácido NH<sub>2</sub>-L-Ser(*t*-Bu)-L-Ile-L-Ser(*t*-Bu)-L-Phe-L-Glu( $\gamma$ *t*-Bu)-Gly-OH (300 mg, 0.320 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (86 mg, 0.109 mmol) con un rendimiento del 34%.

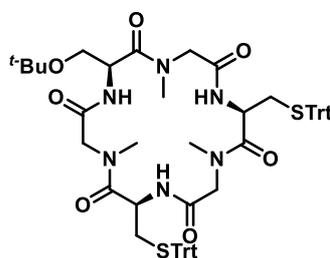
Sólido blanco (34%).  $t_R$  = 7.79 min (gradiente lineal: 50 to 100% acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/0.003M TFA por 20 min).  $[\alpha]_D^{25} = +17.42$  ( $c$  0.93, MeOH). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)**  $\delta$  (ppm): 0.83-0.95 (m, 6H), 1.13-1.17 (m, 1H), 1.15 (s, 9H), 1.20 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 1.53-1.61 (m, 1H), 1.93-2.03 (m, 3H), 2.24-2.33 (m, 2H), 3.20-3.32 (m, 2H), 3.47-3.74 (m, 6H), 4.23-4.31 (m, 2H), 4.32-4.38 (m, 1H), 4.40-4.47 (m, 1H), 4.48-4.57 (m, 1H), 7.20-7.40 (m, 7H), 7.43-7.50 (m, 1H), 7.73 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 7.89 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 8.02-8.06 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)**  $\delta$ (ppm): 10.6, 14.9, 24.6, 25.9, 26.7 (6C), 27.4 (3C), 31.5, 36.3 (2C), 43.0, 52.9, 54.9, 56.15, 57.8 (2C), 60.8 (2C), 73.4, 74.0, 78.3, 126.7, 128.5 (2C), 129.2 (2C), 137.1, 170.3, 170.8, 170.9, 171.7 (3C), 171.8. **HRMS**  $m/z$  calc. for C<sub>40</sub>H<sub>64</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 811.4582, found 811.3882.



**Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu) (35):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HATU como

agente acoplante (5 mM de dilución, 2 días), a partir de la sal de trifluoroacetato de *NHMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH* (450 mg, 0.358 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (231mg, 0.21 mmol) con un rendimiento del 57%.

Sólido blanco (57%). **Rf**= 0.4 (AcOEt).  $[\alpha]_D^{25} = -24.3$  ( $c$  2.40, DCM). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)**  $\delta$  (ppm): 1.06 (s, 9H), 2.47-2.60 (m, 3H), 2.86-3.02 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.07-3.23 (m, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.39-3.50 (m, 2H), 3.65 (dd,  $J=5.0, 9.3$  Hz, 1H), 4.07-4.15 (m, 1H), 4.16-4.24 (m, 1H), 4.30 (d,  $J= 14.4$  Hz, 1H), 4.50 (dd,  $J= 8.1$ Hz, 1H), 4.62-4.70 (m, 1H), 4.90 (d,  $J= 16.7$  Hz, 1H), 7.11-7.47 (m, 35H), 7.53 (d,  $J= 4.9$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J= 9.1$  Hz, 1H), 7.76 (d,  $J= 8.2$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J= 9.0$  Hz, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)**  $\delta$ (ppm): 26.8 (3C), 32.8, 32.9, 35.6, 36.4, 38.4, 47.44, 51.2, 52.8, 53.3, 53.4, 53.6, 61.8, 66.5, 66.7, 72.7, 126.3, 126.8 (3C), 126.8 (3C), 128.0 (12C), 128.2 (2C), 129.4 (2C), 129.5 (6C), 129.6 (6C), 137.7, 144.6 (3C), 144.9 (3C), 167.3, 168.8, 169.6, 169.9, 171.0, 171.5. **HRMS**  $m/z$  calc. para C<sub>66</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 1146.4640, found 1146.4666.

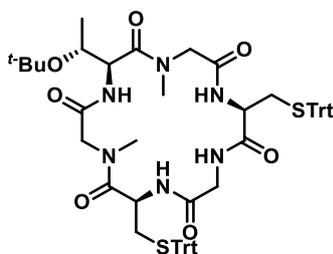


36

**Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt) (36):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HATU como agente acoplante (5 mM de dilución, 1 día), a partir de la sal de trifluoroacetato NH<sub>2</sub>-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-OH (550 mg, 0.430 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (334 mg, 0.319 mmol) con un rendimiento del 74%.

Sólido blanco (74%). **Rf**= 0.5 (AcOEt).  $[\alpha]_D^{25} = +74.0$  ( $c$  0.99, DCM). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm): 1.14 (s, 9H), 2.46-2.60 (m, 1H), 2.64-2.73 (m, 1H), 2.75-3.07 (m, 10H), 3.11-3.29 (m, 4H), 3.33-3.47 (m, 1H), 3.51-3.72 (m, 1H), 4.41-4.60 (m, 3H), 4.65-4.81 (m, 2H), 4.83-4.94 (m, 1H), 7.02-7.59 (m, 33H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ (ppm): 27.3 (3C)

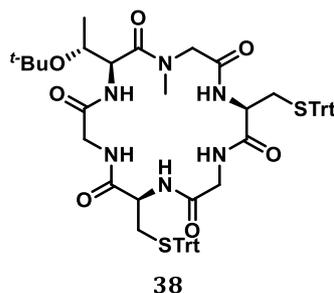
34.2, 37.0, 38.6 (3C), 48.6 (2C), 50.0, 53.4 (2C), 53.9, 63.0, 67.1 (2C), 73.8, 126.9 (6C), 128.0 (12C), 129.7 (12C), 144.4 (6C), 167.4, 167.5, 167.7, 170.5 (2C), 170.8. **HRMS**  $m/z$  calc. para  $C_{60}H_{66}N_6O_7S_2$  ( $[M+Na]^+$ ) 1069.4325, found 1069.4327.



37

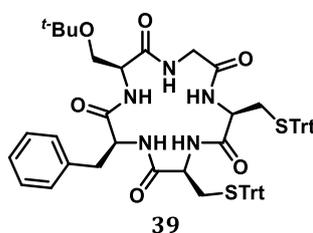
**Ciclo-NMe-Gly-L-Thr(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt) (37):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HATU como agente acoplante (5 mM de dilución, 1 día), a partir de la sal de trifluoroacetato  $NH_2$ -NMe-Gly-L-Thr(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-OH (350 mg, 0,270 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (120mg, 0,115 mmol) con un rendimiento del 42%.

Sólido blanco (42%).  $R_f = 0.5$  (AcOEt).  $[\alpha]_D^{25} = +85.9$  ( $c$  1.43, DCM).  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )**  $\delta$  (ppm): 1.13 (s, 9H), 1.21 (d,  $J=5.8$ , Hz, 3H), 2.58-2.70 (m, 1H), 2.65-2.72 (m, 4H), 2.95 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.60-3.73 (m, 2H), 3.76-3.85 (m, 1H), 3.97-4.04 (m, 1H), 4.14-4.23 (m, 2H), 4.38-4.48 (m, 2H), 4.54-4.62 (m, 2H), 7.24-7.45 (m, 30H), 7.52-7.58 (m, 1H), 7.63-7.68 (m, 1H), 7.90-7.95 (m, 1H), 7.96-8.02 (m, 1H).  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )**  $\delta$ (ppm): 20.3, 27.2 (3C), 31.6, 32.8, 37.9 (2C), 42.4, 51.0, 52.1, 52.3, 53.5, 56.6, 65.9, 66.9, 67.2, 74.2, 127.0 (3C), 127.1 (3C), 128.1 (12C), 129.4 (6C), 129.5 (6C), 144.3 (6C), 165.1, 170.2, 170.5, 171.5, 171.7, 172.0. **HRMS**  $m/z$  calc. para  $C_{60}H_{66}N_6O_7S_2$  ( $[M+Na]^+$ ) 1069.4306, found 1069.4327.



**Ciclo-L-Thr(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly (38):** La reacción de macrociclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HATU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato NH<sub>2</sub>-L-Thr(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-OH (660 mg, 0,566 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (451mg, 0,436 mmol) con un rendimiento del 77%.

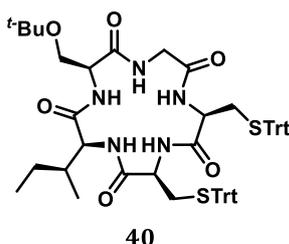
Sólido blanco (77%). R<sub>f</sub>= 0.5 (AcOEt). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>= +20.5 (*c* 1.9, DCM). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ (ppm): 0.99 (d, *J*=6.3, Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 2.47-2.56 (m, 1H), 2.65-2.72 (m, 1H), 2.76-2.84 (m, 1H), 3.07-3.15 (m, 1H), 3.19-3.26 (m, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.46-3.55 (m, 1H), 3.57-3.66 (m, 1H), 3.71-3.74 (m, 1H), 3.91-4.03 (m, 2H), 4.04-4.17 (m, 2H), 4.35-4.43 (m, 1H), 4.67 (t, *J*=5.4 Hz, 1H), 6.09-6.17 (m, 1H), 6.18-6.26 (m, 1H), 6.67-6.76 (m, 1H), 7.08-7.16 (m, 1H), 7.19-7.37 (m, 21H), 7.38-7.50 (m, 12H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ(ppm): 18.5, 28.2 (3C), 31.8, 32.8, 39.2, 43.0, 43.1, 52.2, 53.3, 54.1, 54.7, 67.4 (2C), 67.7, 75.1, 127.0 (6C), 128.1 (12C), 129.5 (12C), 144.3 (3C), 144.4 (3C), 168.7, 168.9, 169.4, 170.4, 170.5, 170.8. HRMS *m/z* calc. para C<sub>59</sub>H<sub>64</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 1055.4170, found 1055.4148.



**Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu)-Gly (39):** La reacción de macrociclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 1 días), a partir de la sal de trifluoroacetato NH<sub>2</sub>-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-

Phe-*L*-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH (400 mg, 0.350 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (187 mg, 0.188 mmol) con un rendimiento del 54%.

Sólido blanco (54%). *R*<sub>f</sub>= 0.5 (AcOEt).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -13.1$  (*c* 2.40, DCM). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 1.19 (s, 9H), 2.41-2.70 (m, 4H), 3.02-3.16 (m, 2H), 3.20-3.32 (m, 2H), 3.58-3.70 (m, 2H), 4.08 (dd, *J*=7.6, 15.5 Hz, 1H), 4.12-4.20 (m, 2H), 4.28 (dd, *J*=6.5, 13.6 Hz, 1H), 6.59 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 6.79-6.89 (m, 1H), 7.09-7.31 (m, 24H), 7.32-7.44 (m, 13H), 7.60-7.70 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ(ppm): 27.6 (3C), 31.5, 32.8, 37.3, 43.8, 52.7, 54.2, 55.6, 56.5, 60.5, 67.2 (2C), 73.6, 126.9 (6C), 127.0, 128.1 (12C), 128.6 (2C), 129.3 (2C), 129.5 (12C), 136.4, 144.2 (6C), 170.2, 170.9, 171.0, 171.2, 171.5. **HRMS** *m/z* calc. for C<sub>62</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 1060.4112, found 1060.4180.

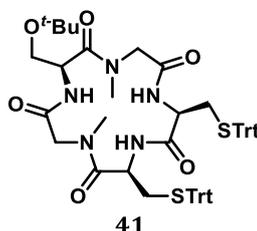


**Ciclo-*L*-Cys(Trt)-*L*-Cys(Trt)-*L*-Ile-*L*-Ser(*t*-Bu)-Gly (40):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 1 días), a partir de la sal de trifluoroacetato H<sub>2</sub>N-*L*-Cys(Trt)-*L*-Cys(Trt)-*L*-Ile-*L*-Ser(*t*-Bu)-Gly-OH (171 mg, 0,153 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (106 mg, 0.106 mmol) con un rendimiento del 69%.

Sólido blanco (69%). *R*<sub>f</sub>= 0.5 (AcOEt).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -13.7$  (*c* 1.70, DCM). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 0.80 (t, *J*=7.3 Hz, 3H), 0.93 (d, *J*=6.9 Hz, 3H), 1.00-1.11 (m, 1H), 1.19 (s, 9H), 1.45-1.55 (m, 1H), 1.92-2.03 (m, 1H), 2.43-2.57 (m, 2H), 2.60-2.72 (m, 2H), 3.28-3.37 (m, 1H), 3.55-3.66 (m, 2H), 3.67-3.74 (m, 1H), 3.90 (t, *J*=7.3 Hz, 1H), 3.93-4.00 (m, 1H), 4.09-4.19 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 6.57-6.67 (m, 1H), 6.85-6.95 (m, 1H), 7.16-7.33 (m, 21H), 7.37-7.51 (m, 12H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ(ppm): 11.1, 15.6, 24.7, 27.5 (3C), 32.0, 32.2, 46.3, 53.1, 54.4, 55.6, 56.6, 60.3 (2C), 67.2, 67.3, 73.5, 126.9 (3C), 126.9 (3C), 128.1 (6C),

128.1 (6C), 129.4 (6C), 129.5 (6C), 144.1 (3C), 144.1 (3C), 170.0, 170.8, 171.3, 171.4, 172.0.

**HRMS**  $m/z$  calc. for  $C_{59}H_{65}N_5O_6S_2$  ( $[M]^+$ ) 1003.4376, found 1003.7641.

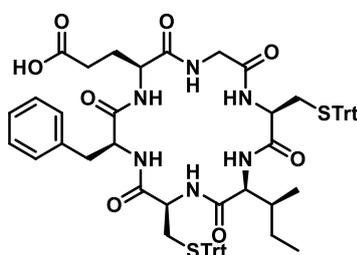


**Ciclo-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt) (41):** La reacción de macro ciclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general utilizando HATU como agente acoplante (5 mM de dilución, 1 días), a partir de la sal de trifluoroacetato NHMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-OH (240 mg, 0,218 mmol). La purificación se realizó por cromatografía con sílica flash, y se obtuvo el macrociclo deseado (125mg, 0,128 mmol) con un rendimiento del 59%.

Sólido blanco (59%).  $R_f = 0.5$  (AcOEt).  $[\alpha]_D^{25} = -12.3$  ( $c$  1.66, DCM).  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )**  $\delta$  (ppm): 1.14 (s, 9H), 2.18-2.27 (m, 1H), 2.49 (dd,  $J=4.0, 12.5$  Hz, 1H), 2.65-2.82 (m, 5H), 2.94 (d,  $J=13.6$  Hz, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.38-3.50 (m, 3H), 4.15-4.26 (m, 2H), 4.63-4.72 (m, 1H), 4.82 (d,  $J=13.6$  Hz, 1H), 4.91-4.94 (m, 1H), 7.06 (d,  $J=9.9$  Hz, 1H), 7.17-7.35 (m, 18H), 7.35-7.43 (m, 12H), 7.54 (d,  $J=9.2$  Hz, 1H), 7.64 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H).  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )**  $\delta$  (ppm): 26.6 (3C), 33.3, 33.8, 35.2, 38.2, 49.1, 49.5, 52.8, 53.3, 53.9, 62.4, 66.6 (2C), 78.4, 126.6 (3C), 126.8 (3C), 127.9 (6C), 128.0 (6C), 129.5 (6C), 129.6 (6C), 144.6 (3C), 145.1 (3C), 168.6, 168.9, 169.6, 169.8, 169.9, 173.0. **HRMS**  $m/z$  calc. para  $C_{57}H_{61}N_5O_6S_2$  ( $[M+Na]^+$ ) 998.3964, found 998.3955.

### 3.4.2 Procedimiento general para la macro ciclación en fase sólida.

A la resina con el péptido anclado, se le agregó una solución de DIC (4.0 eq), Cl-HOBt (4.0 eq), 4-DMAP (catalítico) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Esta mezcla se dejó agitando durante 16-20 horas. Finalizada la macro ciclación, se filtró y lavó la resina con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (x3) y DMF (x3), repetidamente. El péptido se escindió de la resina mediante tratamiento con 1% TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 2-3 minutos a temperatura ambiente, seguido por una filtración y recolección del filtrado en MeOH. El tratamiento se repitió tres veces y después la resina se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (x5) y MeOH (x5). Se evaporaron los disolventes a vacío para obtener el macrociclo crudo.

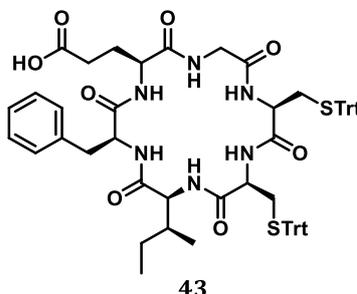


42

**Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu (42):** El *Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu* se obtuvo siguiendo el procedimiento general de de macro ciclación en fase sólida para la resina 2-CTC durante 16 horas. Se obtuvieron 139 mg (rendimiento 68%) del macrociclo como un sólido amarillo. La pureza UV (81%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min; t<sub>R</sub> = 10.13 min).

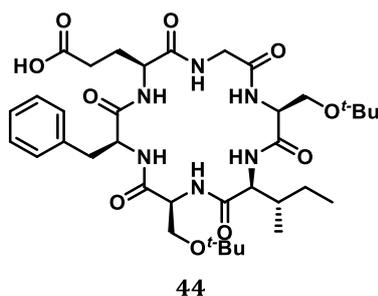
Sólido Amarillo (68%). t<sub>R</sub> = 10.13 min (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/ 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min). **[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>** = -34.6 (c 0.56, MeOH). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)** δ (ppm): 0.61-0.73 (m, 3H), 0.77 (d, J=6.6 Hz, 3H), 0.88-1.00 (m, 1H), 1.30-1.40 (m, 1H), 1.58-1.70 (m, 1H), 1.71-1.87 (m, 1H), 1.92-2.05 (m, 1H), 2.11-2.25 (m, 2H), 2.26-2.42 (m, 3H), 2.46-2.55 (m, 1H), 2.87-3.00 (m, 1H), 3.10-3.22 (m, 1H), 3.34-3.45 (m, 1H), 3.82-3.93 (m, 1H), 3.96-4.30 (m, 5H), 7.13-7.37 (m, 35H), 7.44 (d, J=6.7 Hz, 1H), 7.82-7.91 (m, 1H), 7.93-8.00 (m, 1H), 8.09-8.18 (m, 1H), 8.19-8.31 (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO)** δ(ppm): 11.6, 15.8, 24.5, 27.0, 30.3, 33.7, 36.2, 36.3, 36.7, 43.7, 52.1, 52.7, 53.7, 56.2, 57.7, 66.6, 66.7, 126.6, 127.2 (3C), 127.3 (3C), 128.0 (2C), 128.2 (2C), 128.5

(12C), 129.5 (12C), 138.9, 144.7 (6C), 169.3, 169.5, 169.6, 170.9, 171.0, 171.4, 174.5. **HRMS**  $m/z$  calc. for  $C_{66}H_{68}N_6O_8S_2$   $[[M+K]^+]$  1175.4177, found 1175.3783.



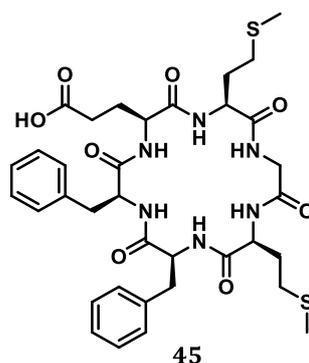
**Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu (43):** El *Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu* se obtuvo siguiendo el procedimiento general de macro ciclación en fase sólida para la resina 2-CTC durante 16 horas. Se obtuvieron 121 mg (rendimiento 98%) del macrociclo como un sólido amarillo. La pureza UV (76%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en  $H_2O$  / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min;  $t_R$  = 10.42 min).

Sólido amarillo (98%).  $t_R$  = 10.42 min (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en  $H_2O$  / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min).  $[\alpha]_D^{25} = -25.2$  (c 1.03, MeOH).  **$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)**  $\delta$  (ppm): 0.55-0.77 (m, 6H), 0.82-0.90 (m, 1H), 1.05-1.15 (m, 1H), 1.82-1.96 (m, 1H), 2.13-2.26 (m, 2H), 2.28-2.48 (m, 3H), 2.65-2.85 (m, 2H), 2.88-3.07 (m, 2H), 3.50-3.61 (m, 1H), 3.65-3.82 (m, 2H), 4.05-4.35 (m, 2H), 4.35-4.46 (m, 1H), 4.51-4.65 (m, 2H), 6.90-7.41 (m, 35H), 7.42-7.53 (m, 1H), 7.92-8.30 (m, 4H), 8.31-8.57 (m, 1H) 12.09 (sb, 1H).  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO)**  $\delta$ (ppm): 11.4, 15.5, 24.3, 28.0, 30.4, 31.2, 34.7 (2C), 36.3, 44.3, 51.6, 51.7, 52.0, 52.3, 56.1, 66.2 (2C), 127.2 (6C), 127.5, 128.4 (2C), 128.5 (12C), 128.7 (2C), 129.5 (12C), 138.1, 144.7 (6C), 168.7, 169.1, 169.7, 171.1, 171.1, 171.4, 174.45. **HRMS**  $m/z$  calc. for  $C_{66}H_{68}N_6O_8S_2$   $[[M+Na]^+]$  1171.4836, found 1171.4790.



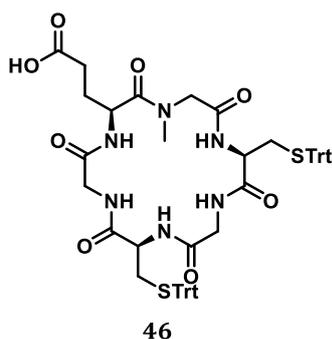
**Ciclo-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu (44):** El *Cyclo-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu* se obtuvo siguiendo el procedimiento general de macro ciclación en fase sólida para la resina 2-CTC durante 16 horas. Se obtuvieron 57 mg (rendimiento 63%) del macrociclo como un sólido amarillo. La pureza UV (74%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min; t<sub>R</sub> = 7.31 min).

Sólido amarillo (63%). t<sub>R</sub> = 7.31 min (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -24.3 (c 1.38, MeOH). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)** δ (ppm): 0.84 (t, J=7.4 Hz, 3H), 0.90 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.07 (s, 18H), 1.34-1.52 (m, 2H), 1.62- 1.72 (m, 2H), 1.75-1.86 (m, 1H), 2.78-2.90 (m, 2H), 2.96-3.05 (m, 1H), 3.10-3.14 (m, 1H), 3.15-3.19 (m, 1H), 3.28-3.45 (m, 4H), 3.50-3.62 (m, 2H), 4.16-4.24 (m, 1H), 4.25-4.37 (m, 2H), 4.49-4.56 (m, 1H), 4.56-4.63 (m, 1H), 7.12-7.30 (m, 5H), 7.80-8.11 (m, 4H), 8.18-8.29 (m, 1H), 8.47 (d, J=7.9 Hz, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO)** δ(ppm): 11.5, 15.8, 24.5, 25.6, 27.6 (6C), 31.3, 34.0, 36.7, 42.3, 51.7, 52.2, 53.3, 53.8, 55.7, 62.0 (2C), 75.1 (2C), 127.2, 128.5 (2C), 130.6 (2C), 137.4, 169.8, 169.7, 170.0, 170.9, 173.0, 173.7, 177.8. **HRMS** m/z calc. for C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 1171.4836, found 1171.4790.



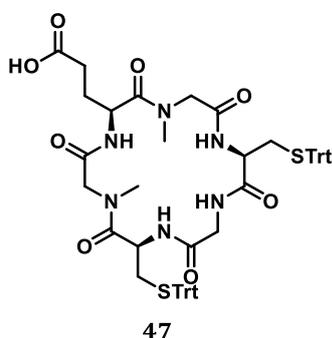
**Ciclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu (45):** El *Cyclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu* se obtuvo siguiendo el procedimiento general de macro ciclación en fase sólida para la resina 2-CTC durante 16 horas. Se obtuvieron 91 mg (rendimiento 99%) del macrociclo como un sólido amarillo. La pureza UV (83%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min; t<sub>R</sub> = 6.79 min).

Sólido amarillo (99%). t<sub>R</sub> = 6.79 min (gradiente lineal: 8 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/0,003M de TFA durante 20 min; flujo = 1,5 ml / min). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)** δ (ppm): 1.62 (m, 4H), 1.96 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.05-2.14 (m, 3H), 2.15-2.30 (m, 3H), 2.34-2.56 (m, 2H), 2.87-3.00 (m, 2H), 3.10-3.19 (m, 2H), 3.56-3.60 (m, 1H), 3.66-3.71 (m, 1H), 3.74-3.82 (m, 1H), 3.91-4.00 (m, 1H), 4.05-4.14 (m, 1H), 4.15-4.23 (m, 1H), 4.28-4.40 (m, 1H), 7.06-7.32 (m, 10H), 8.07-8.16 (m, 2H), 8.16-8.22 (m, 1H), 8.24-8.44 (m, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO)** δ(ppm): 15.0 (2C), 28.7, 29.0, 29.4, 29.9, 30.2, 30.3, 38.4, 38.5, 42.2, 51.7 51.8, 53.3, 53.5, 55.7, 123.6 (2C), 127.7, 128.5, 128.5, 128.6, 129.4, 129.7, 130.7, 130.8 136.5 (2C), 166.8, 166.9, 169.2, 171.1, 171.4, 171.6, 173.2. **HRMS** m/z calc. for C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 765.2716. found 765.2101.



**Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu (46):** El *Cyclo*-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu se obtuvo siguiendo el procedimiento general de macro ciclación en fase sólida para la resina 2-CTC durante 20 horas. Se obtuvieron 195 mg (rendimiento 81%) del macrociclo como un sólido amarillo. La pureza UV (54%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O / 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 ml / min; t<sub>R</sub> = 10.65 min).

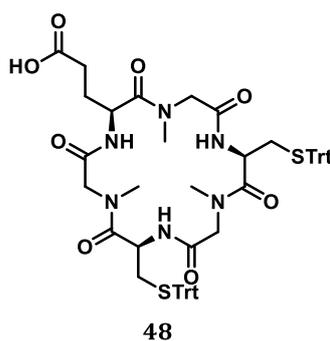
Sólido amarillo (81%). t<sub>R</sub> = 10.65 min (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/ 0,003M de TFA durante 50 min; flujo = 1,5 ml / min). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ (ppm): 1.77-1.93 (m, 2H), 2.28-2.43 (m, 2H), 2.61-2.79 (m, 4H), 3.30 (s, 3H), 3.51-3.68 (m, 2H), 3.79-3.96 (m, 3H), 3.96 -4.10 (m, 1H), 4.18-4.34 (m, 1H), 4.35-4.45 (m, 1H), 4.81-4.90 (m, 1H), 7.15-7.51 (m, 35H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ(ppm): 21.9, 28.6, 32.0, 33.2, 37.1, 42.1, 42.2, 48.7, 50.3, 52.6, 53.6, 66.6, 66.7, 126.8 (6C), 128.0 (12C), 129.5 (12C), 144.7 (6C), 168.5, 169.5 (2C), 169.7, 169.8, 169.9, 173.4. (ESI-MS) m/z calc. for C<sub>56</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> ([M]<sup>-</sup>) 1003.35. found 1003.04.



**Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu (47):** El *Cyclo*-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu se obtuvo siguiendo el procedimiento general de macro ciclación en fase sólida para la resina 2-CTC durante 20 horas. Se obtuvieron 206 mg

(rendimiento 92%) del macrociclo como un sólido amarillo. La pureza UV (48%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/ 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 ml / min; t<sub>R</sub> = 11.02 min).

Sólido amarillo (92%). t<sub>R</sub> = 11.02 min (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/ 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 ml / min). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ (ppm): 1.76-1.94 (m, 2H), 2.24-2.45 (m, 2H), 2.53-2.75 (m, 3H), 2.77-2.90 (m, 1H), 2.96 (s, 3H), 3.12-3.22 (m, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.64-3.77 (m, 2H), 3.84-3.95 (m, 1H), 3.99-4.14 (m, 1H), 4.19-4.28 (m, 1H), 4.31-4.42 (m, 1H), 4.68-4.79 (m, 1H), 4.89-5.02 (m, 1H), 7.06-7.50 (m, 34H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ(ppm): 26.9, 28.8, 32.7, 33.0, 36.3, 37.5, 42.1, 48.4, 51.4, 52.1, 52.7, 53.5, 66.6, 66.8, 126.8 (6C), 128.0 (12C), 129.5 (12C), 144.8 (6C), 167.6, 168.4, 168.7, 170.11, 171.6, 171.6, 173.3. **(ESI-MS)** m/z calc. for C<sub>57</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> ([M]<sup>-</sup>) 1017.37 found 1017.56

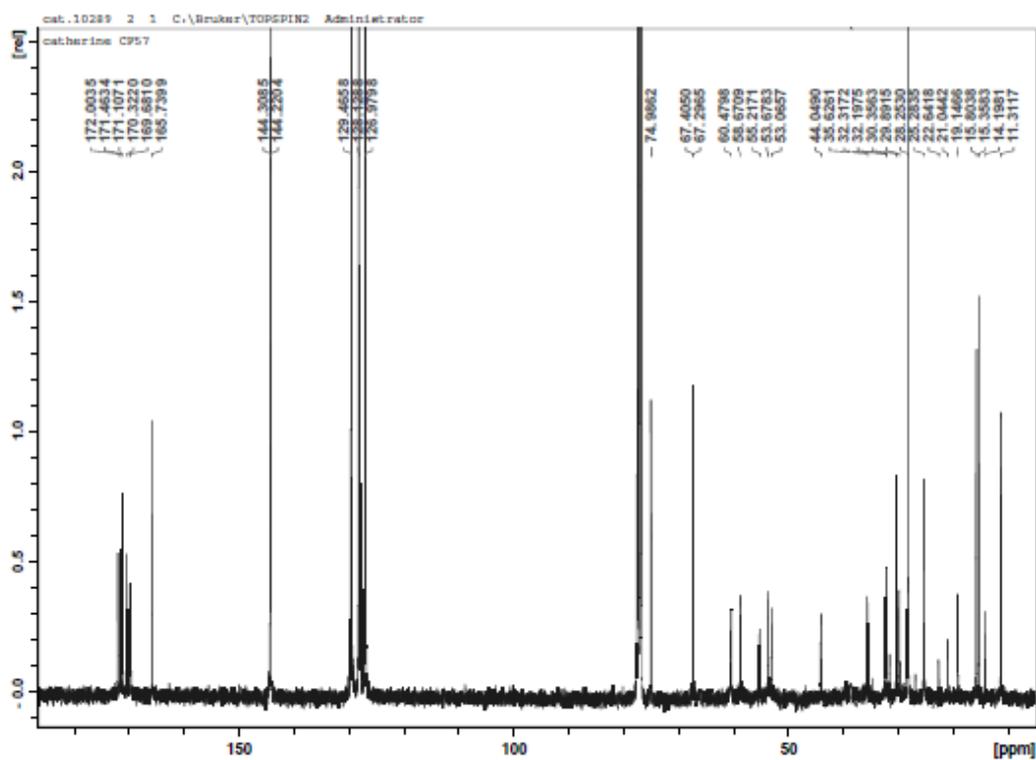
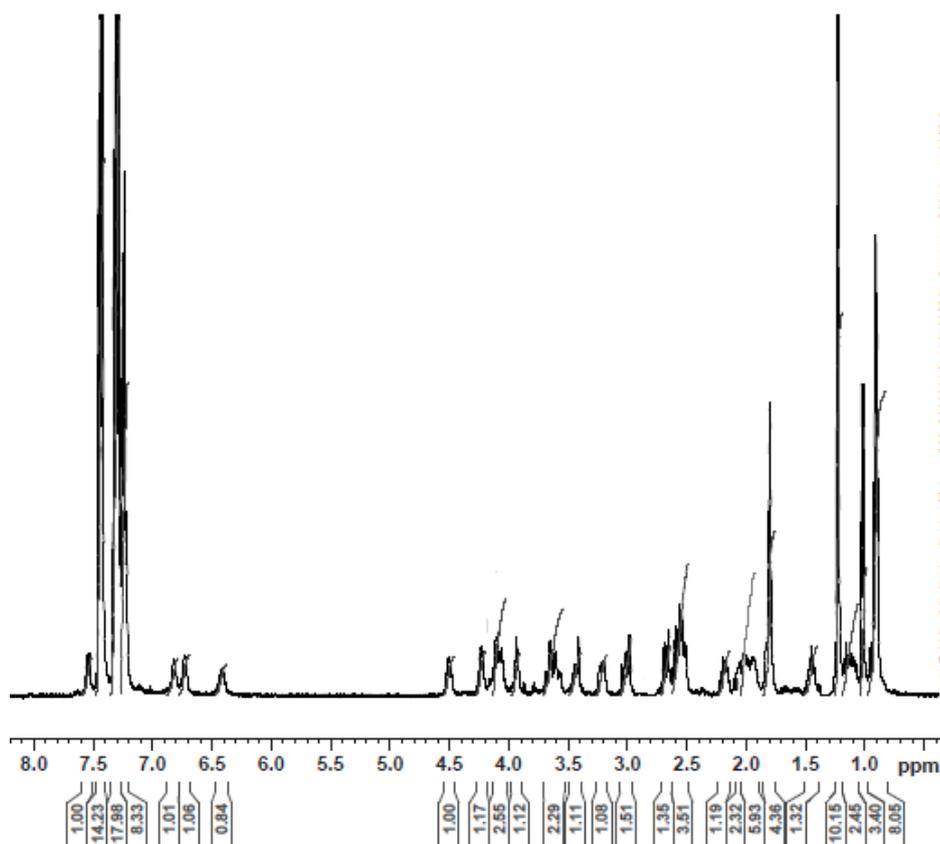


**Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu (48):** El *Cyclo*-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu se obtuvo siguiendo el procedimiento general de macro ciclación en fase sólida para la resina 2-CTC durante 20 horas. Se obtuvo 412 mg (rendimiento 84%) del macrociclo como un sólido amarillo. La pureza UV (84%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 ml / min; t<sub>R</sub> = 9.40 min).

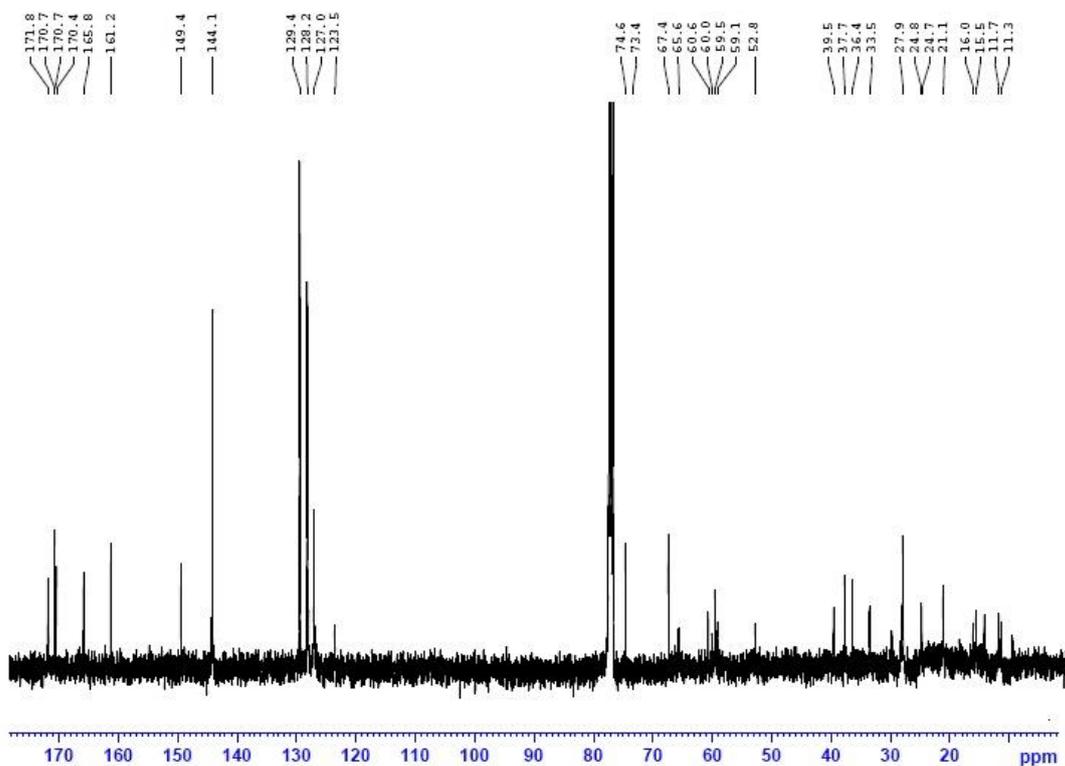
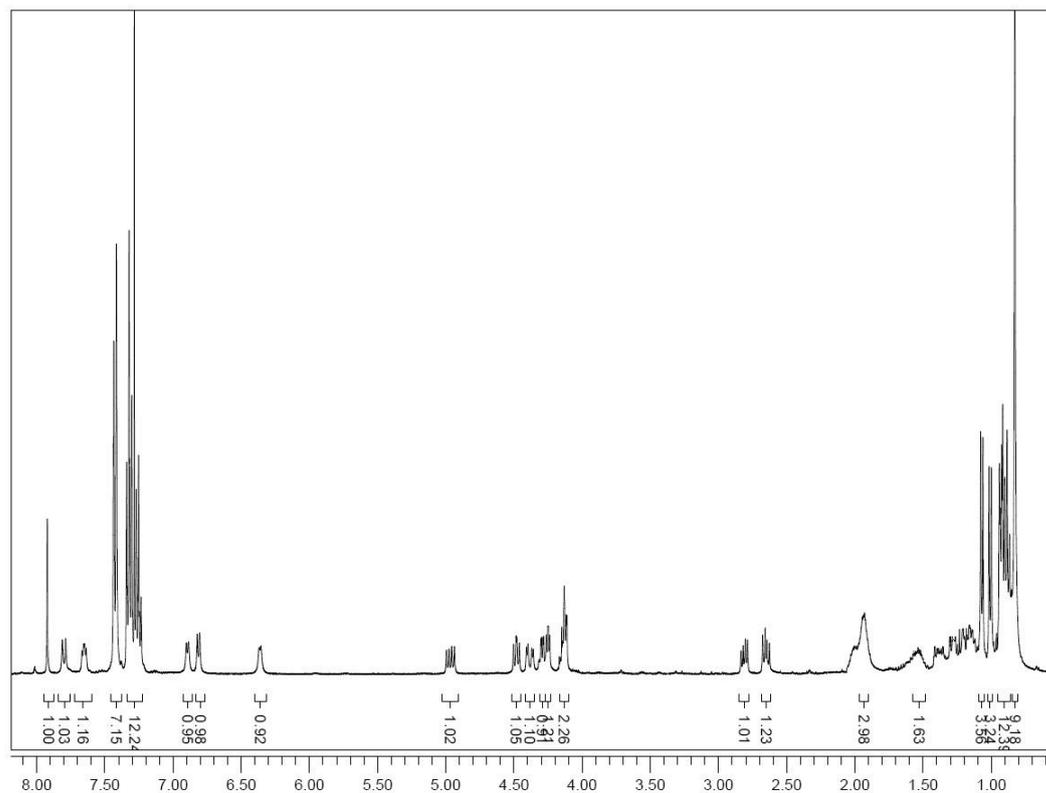
Sólido amarillo (84%). t<sub>R</sub> = 9.40 min (gradiente lineal: 50 a 100% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O/ 0,003M de TFA durante 10 min; flujo = 1,5 ml / min). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)** δ (ppm): 2.31-2.39 (m, 2H), 2.39-2.41 (m, 2H), 2.54-2.74 (m, 4H), 2.82-2.91 (m, 9H), 3.29-3.54 (m, 2H), 3.75-3.88 (m, 1H), 4.17-4.32 (m, 1H), 4.36-4.52 (m, 2H), 4.64-4.86 (m, 3H), 4.86-5.06 (m, 1H), 7.18-7.47 (m, 33H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO)** δ(ppm): 22.7, 29.5, 35.0 (2C),

38.1, 47.4, 48.4 48.5, 51.3, 51.7 (2C), 66.2, 66.5, 127.1, 128.0, 128.2, 129.6, 144.7, 145.0, 169.9, 170.0 (2C), 170.6, 171.0, 172.0, 174.4. **HRMS**  $m/z$  calc. for  $C_{58}H_{60}N_6O_8S_2$  ( $[M+Na]^+$ ) 1055.38. found 1055.26; ( $[M+H]^+$ ) 1033.27. found 1033.28

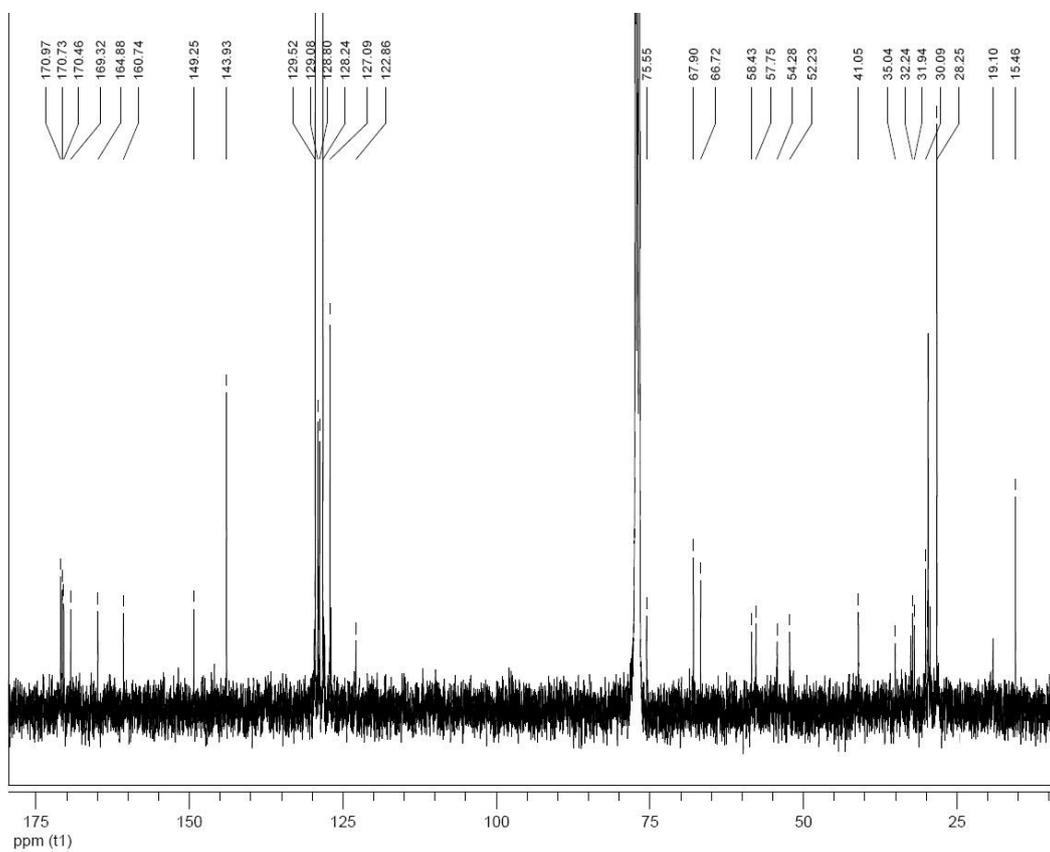
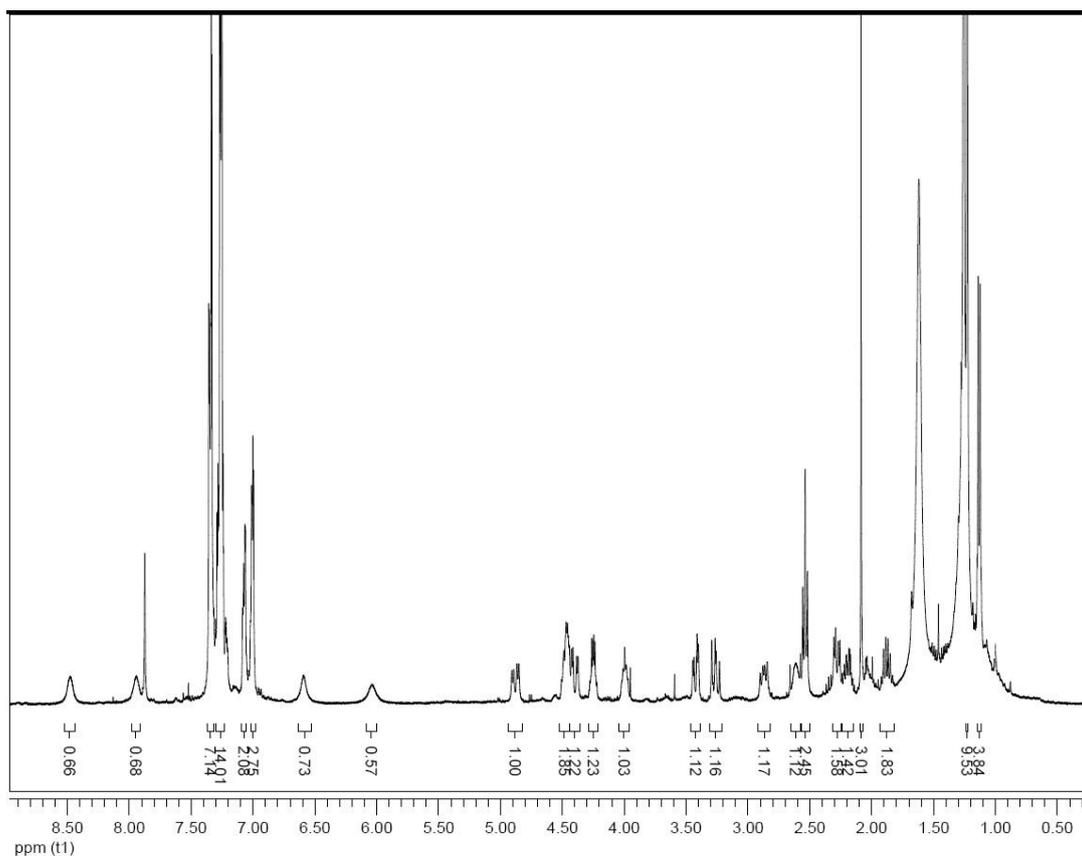
*Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (23)*



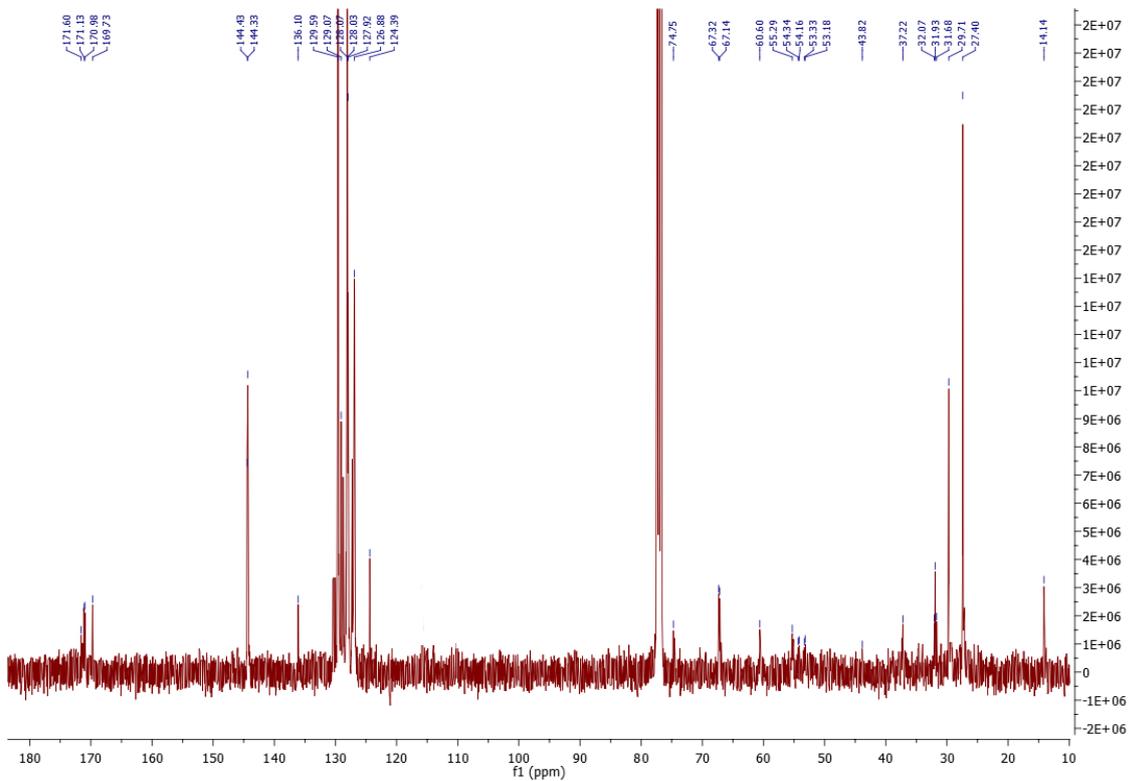
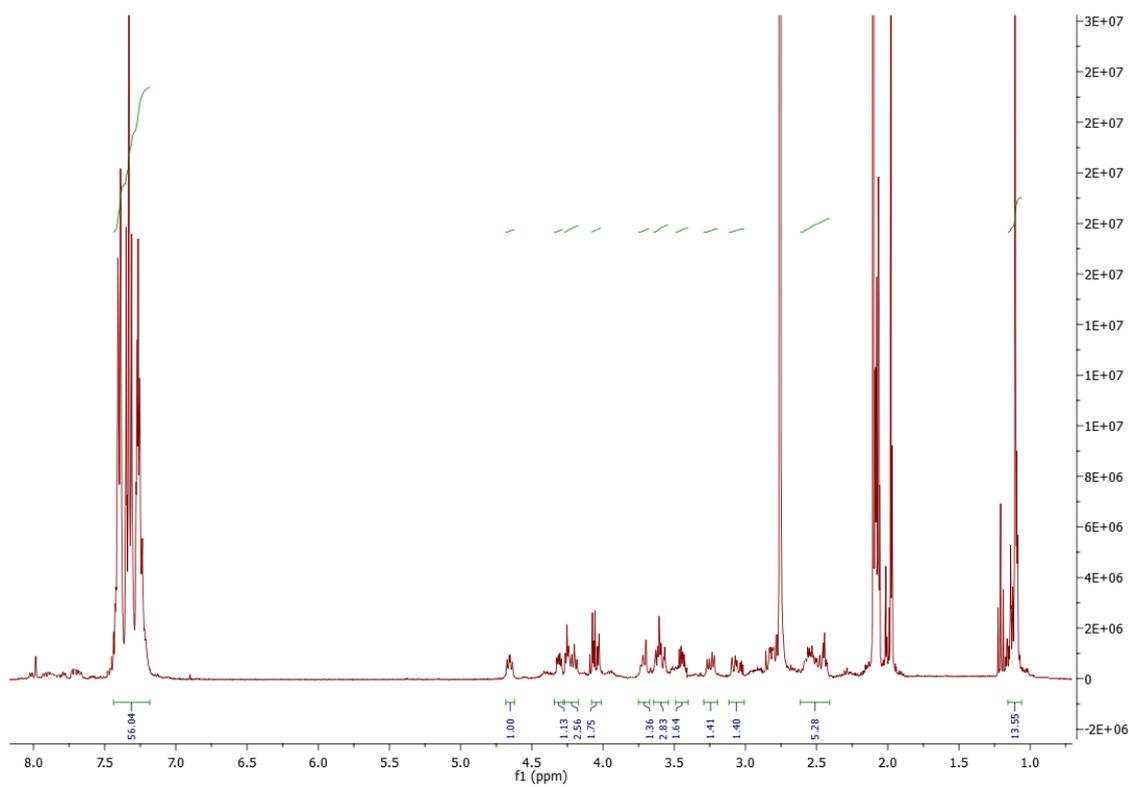
**Cyclo -L-Cys(Trt)-L-Ile L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly (24)**



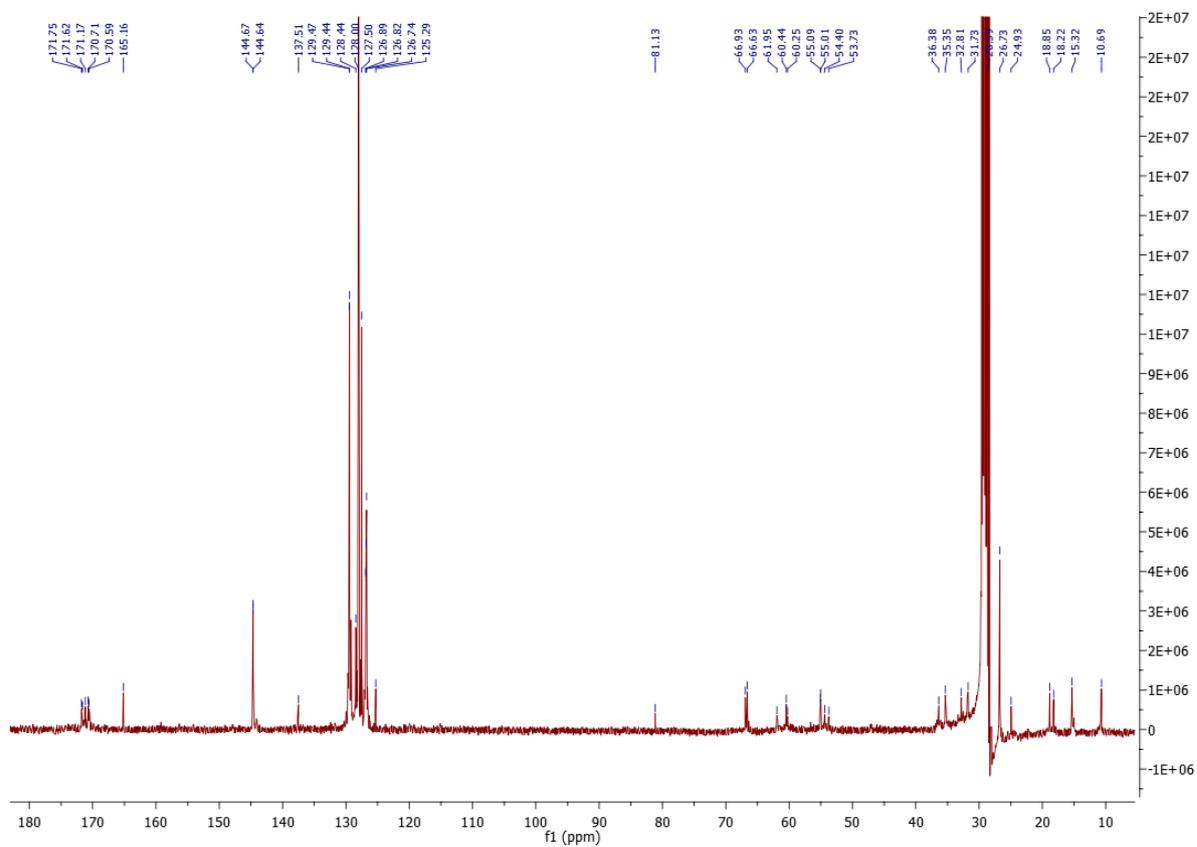
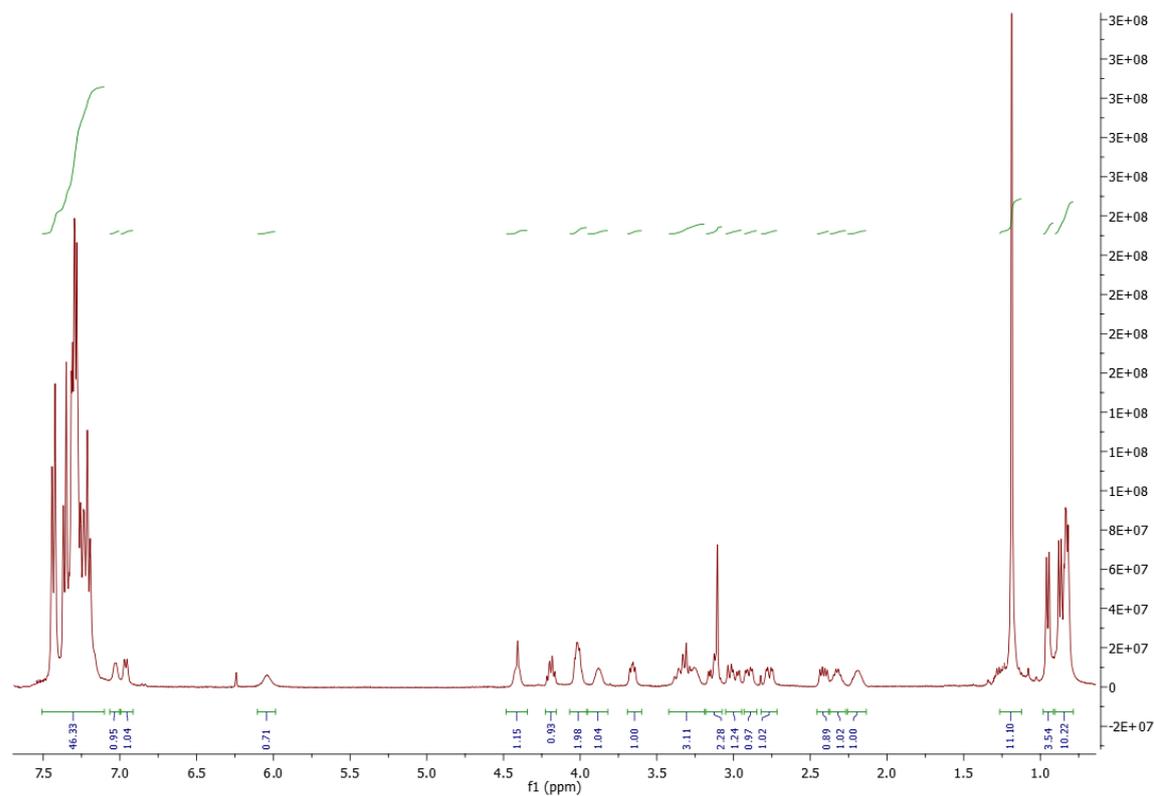
*Cyclo* -L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(*t*-Bu)-Gly (25)



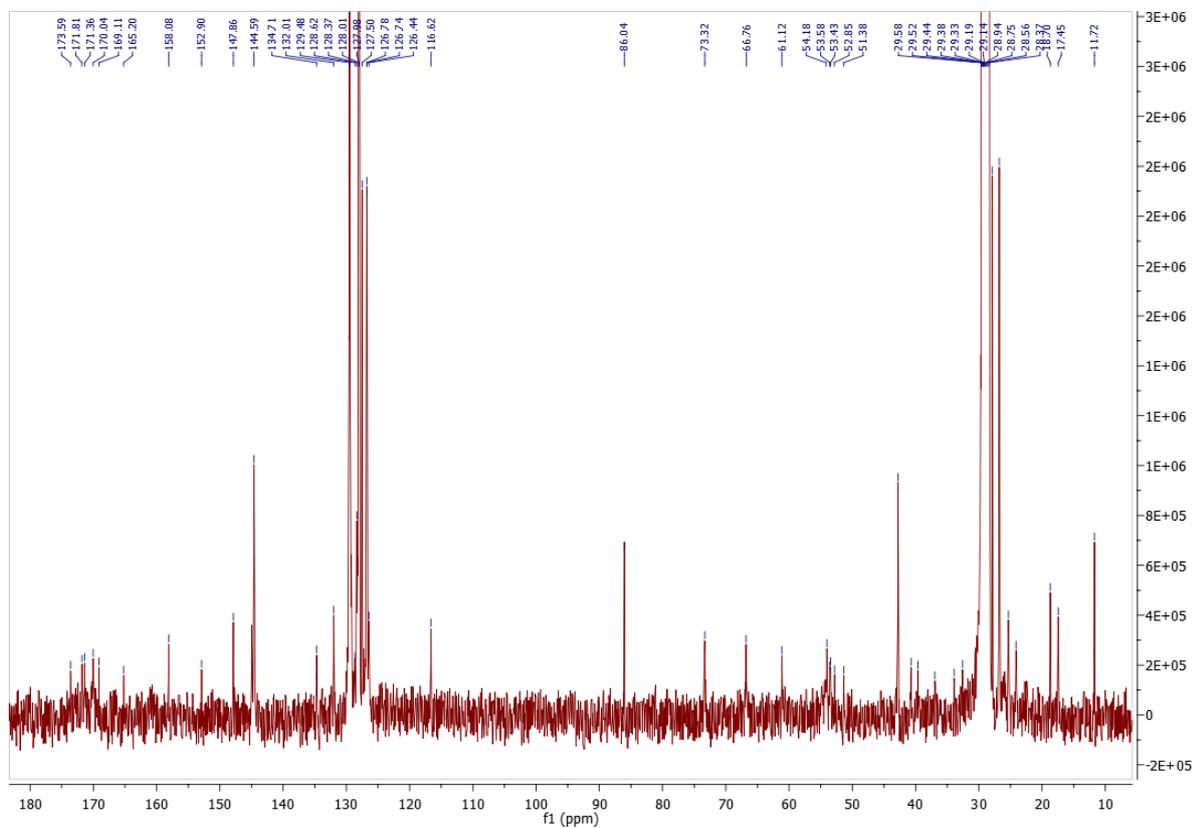
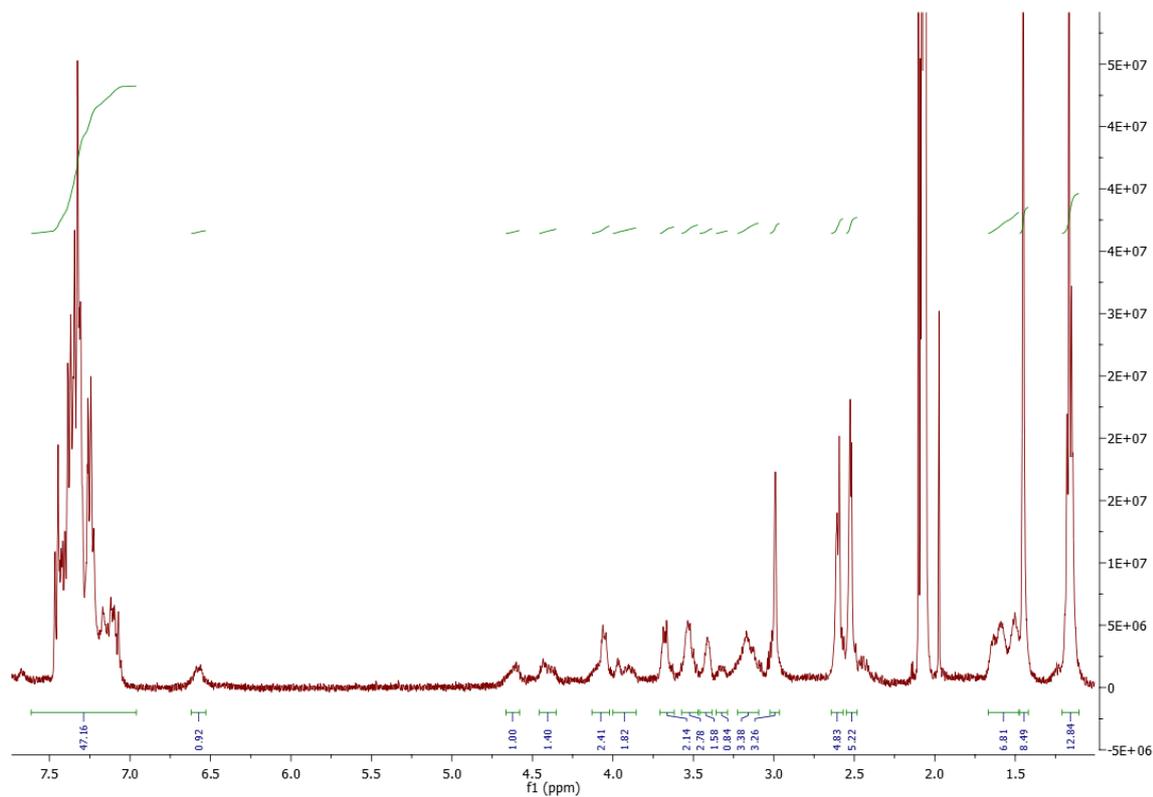
**Cyclo-L-Ser(*t*-Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly (26)**



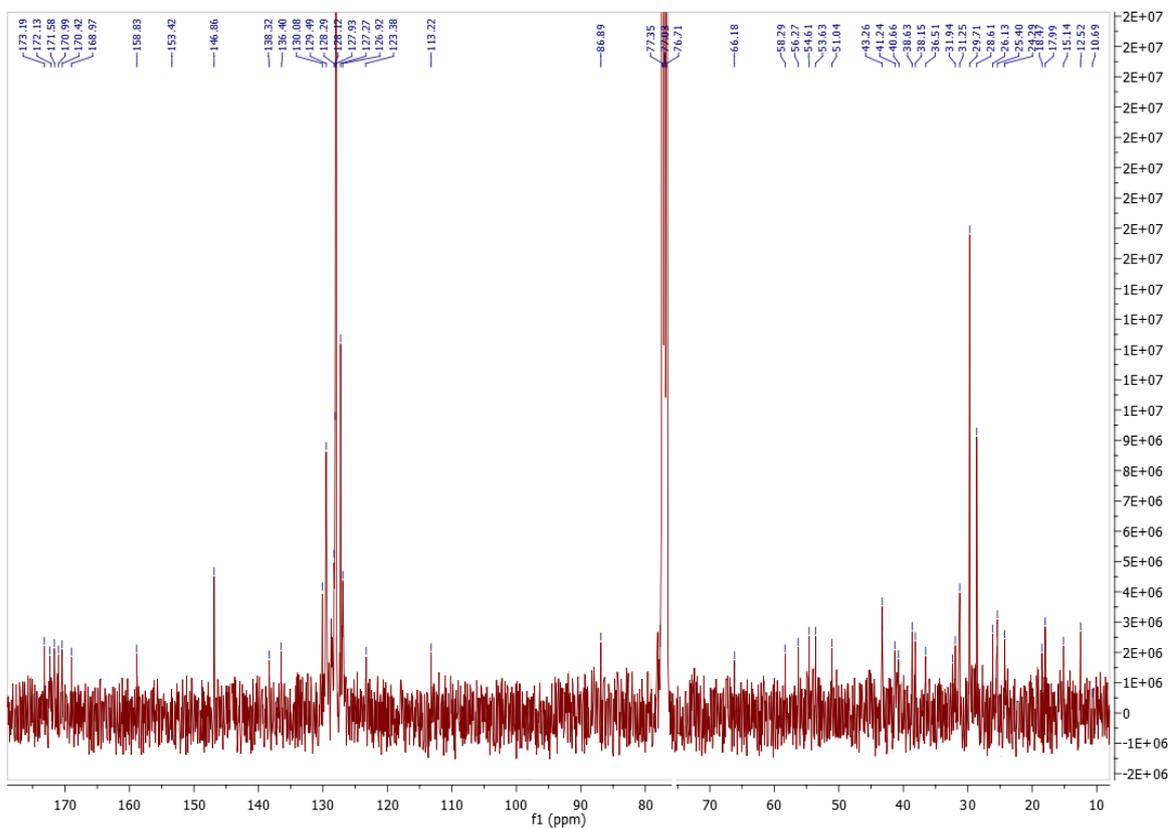
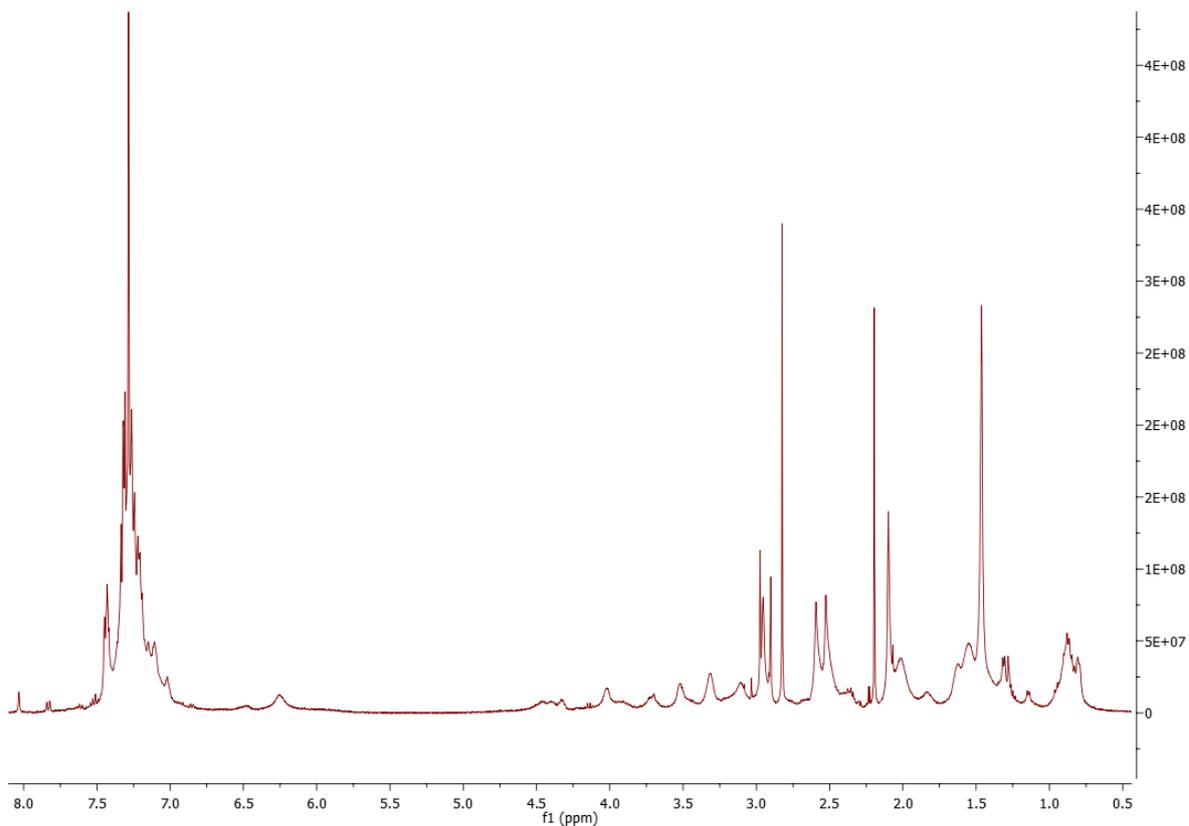
*Cyclo-L-Val-L-Ser(t-Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt) (27)*

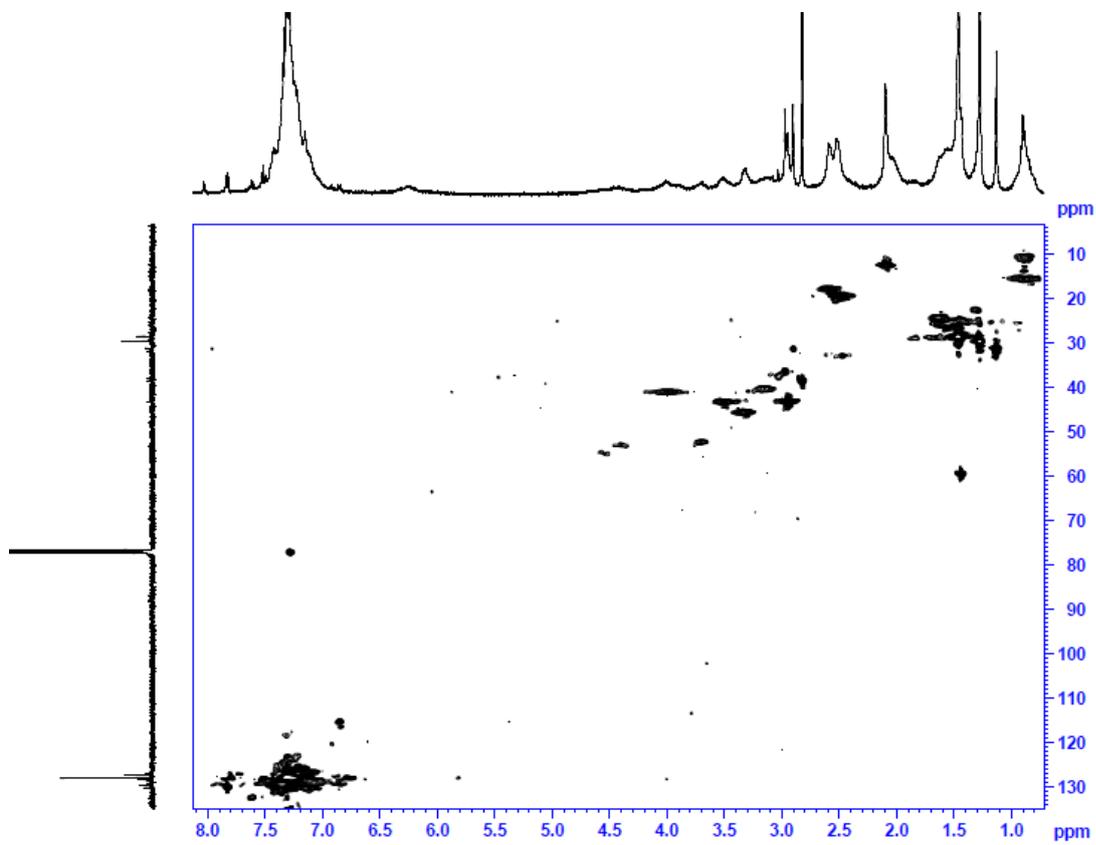
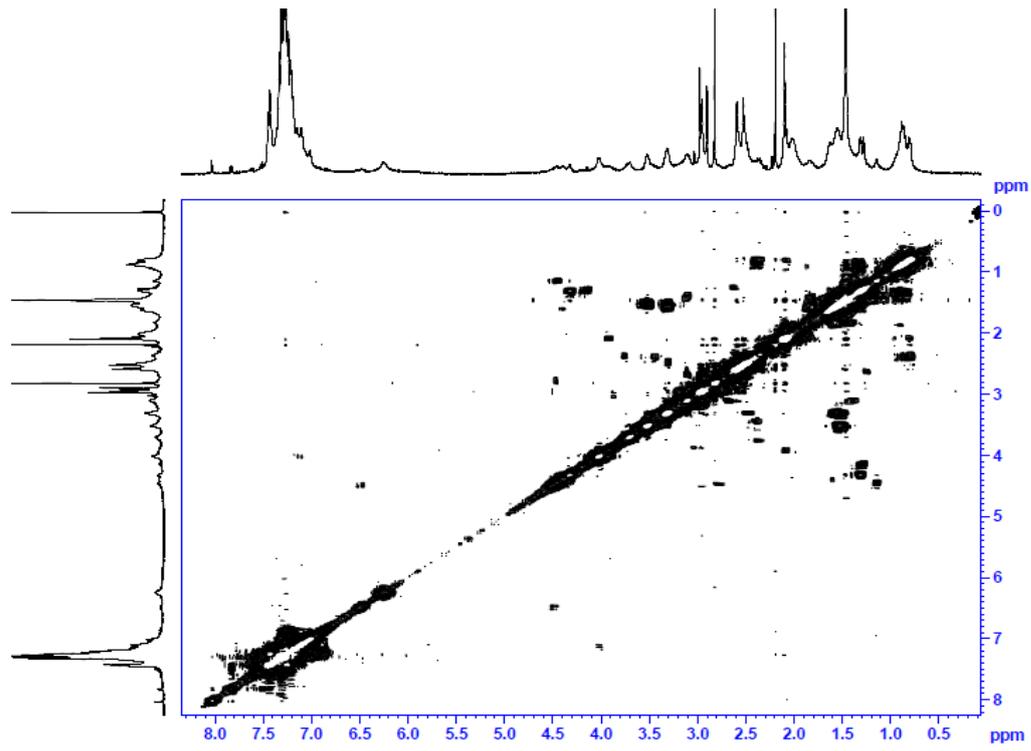


*Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (28)*

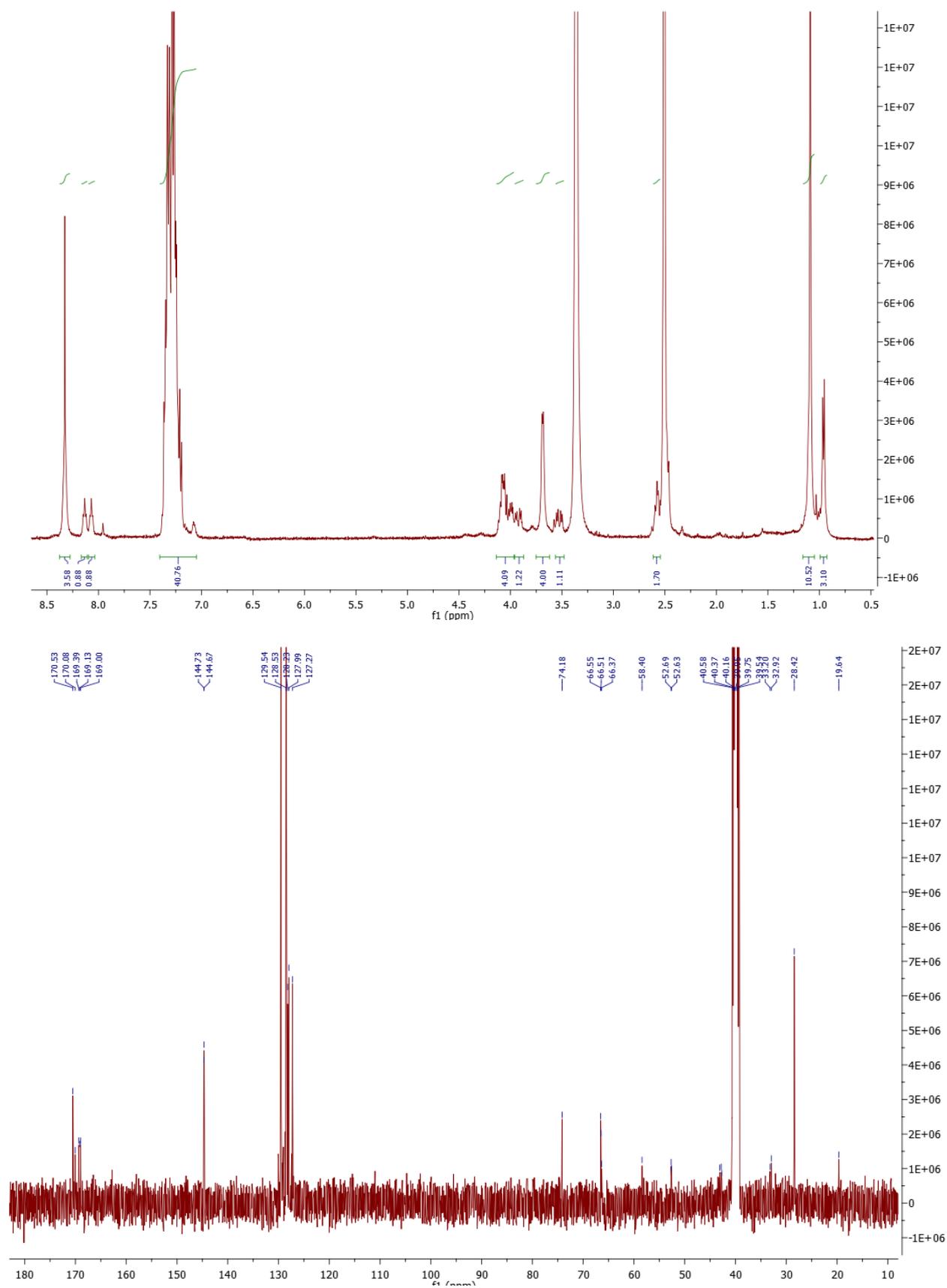


*Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly (29)*

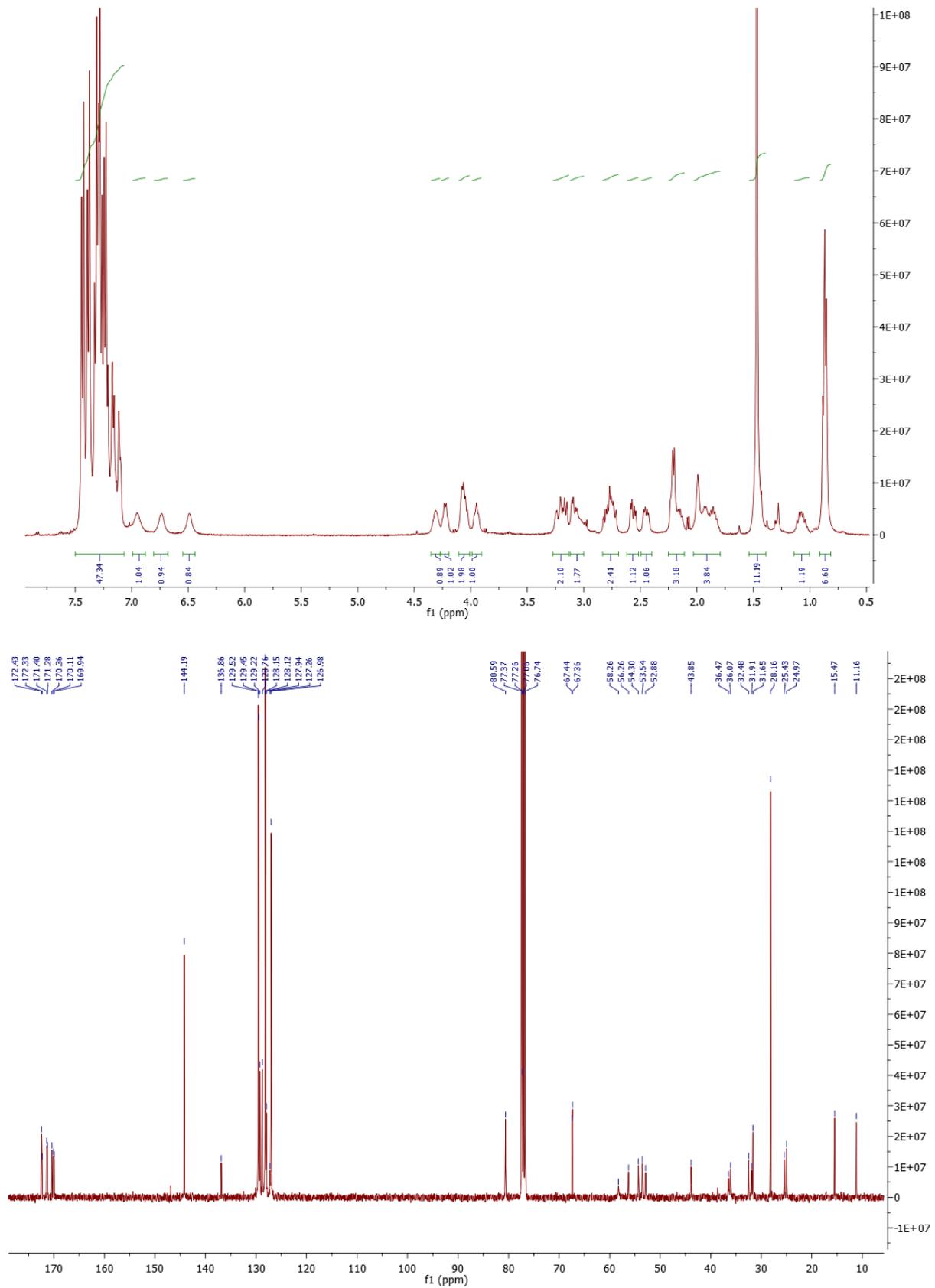




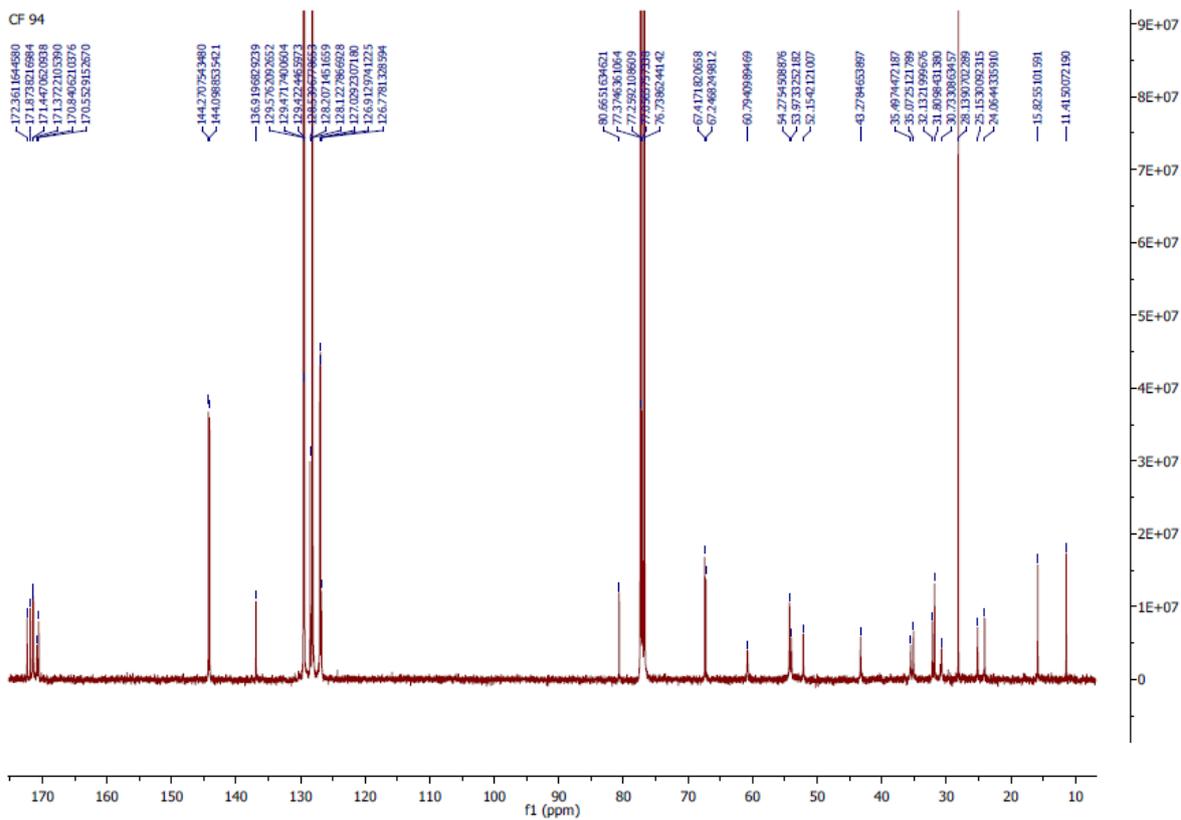
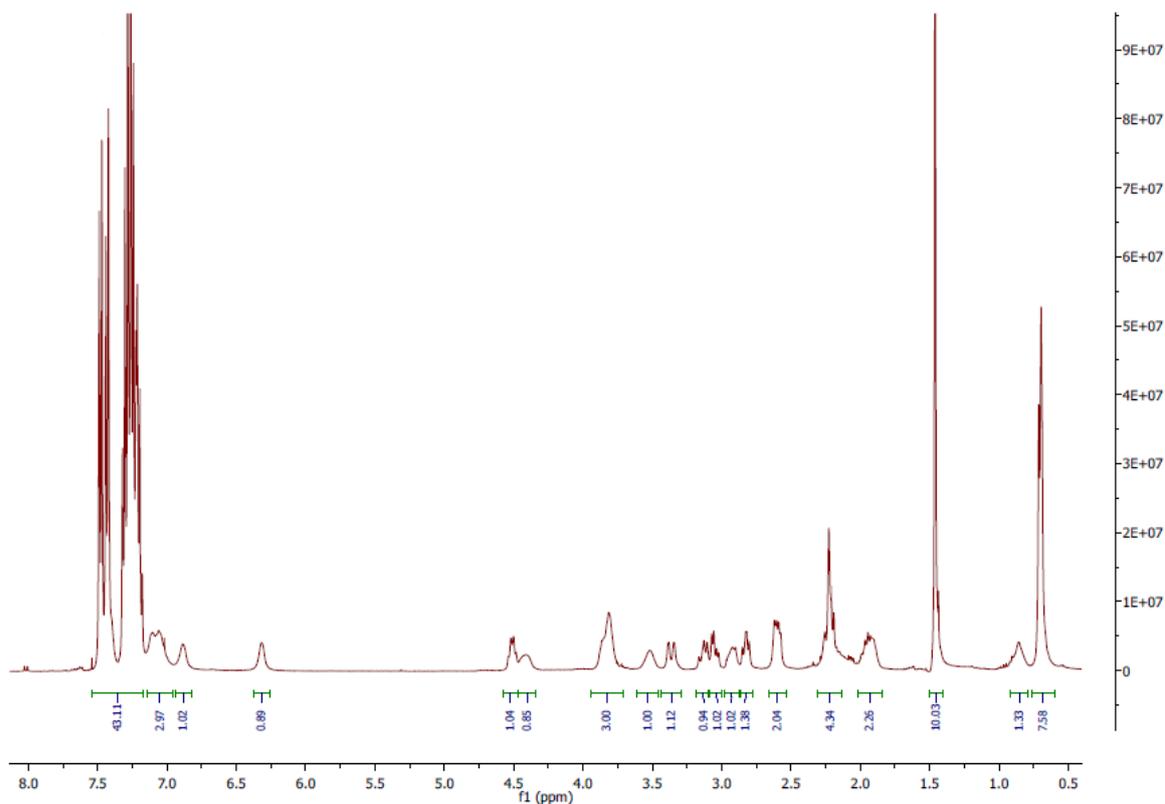
**Cyclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (30)**



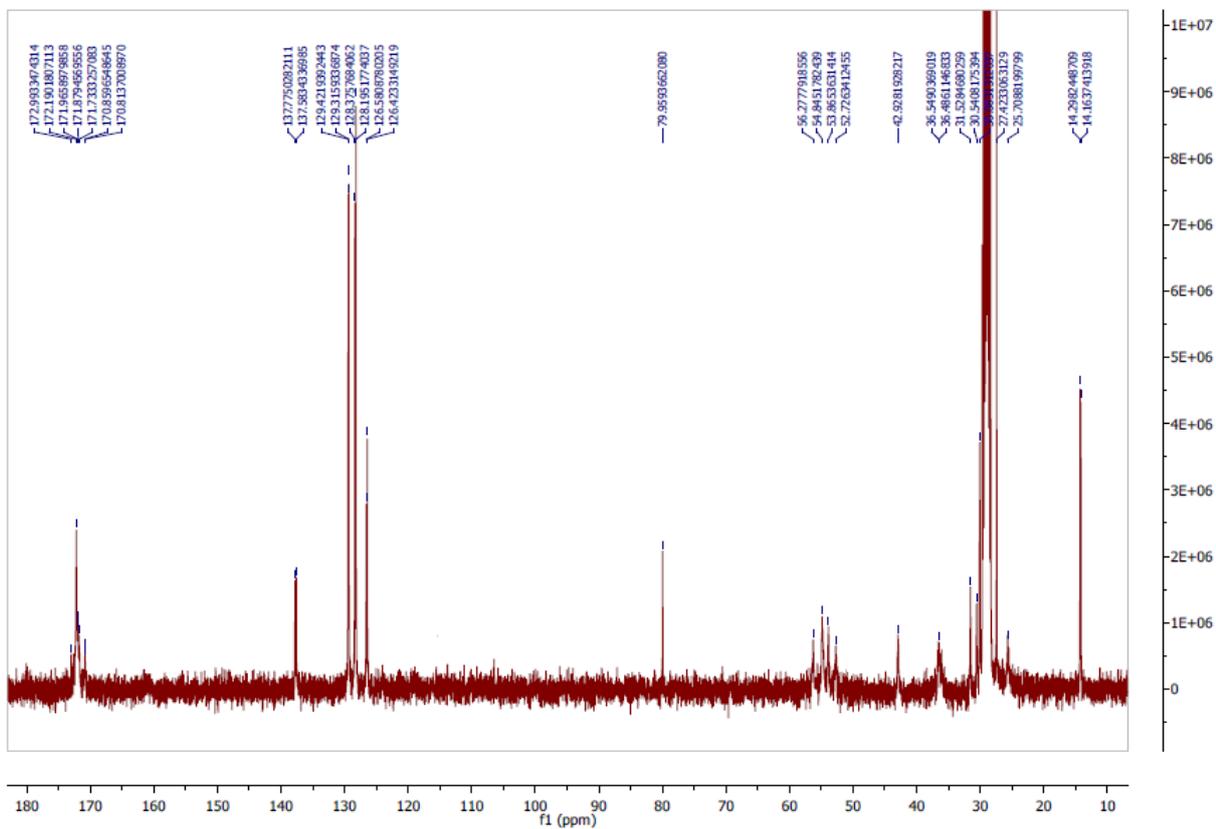
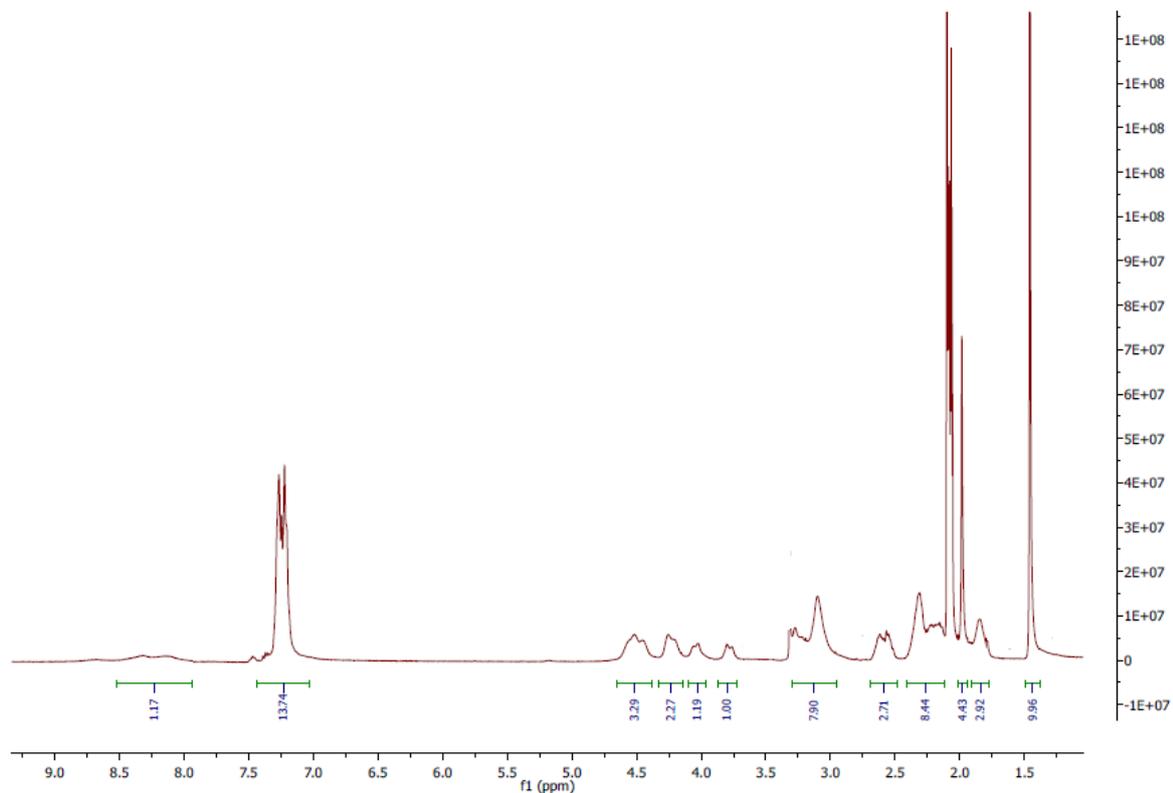
*Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ -Bu)-Gly (31)*



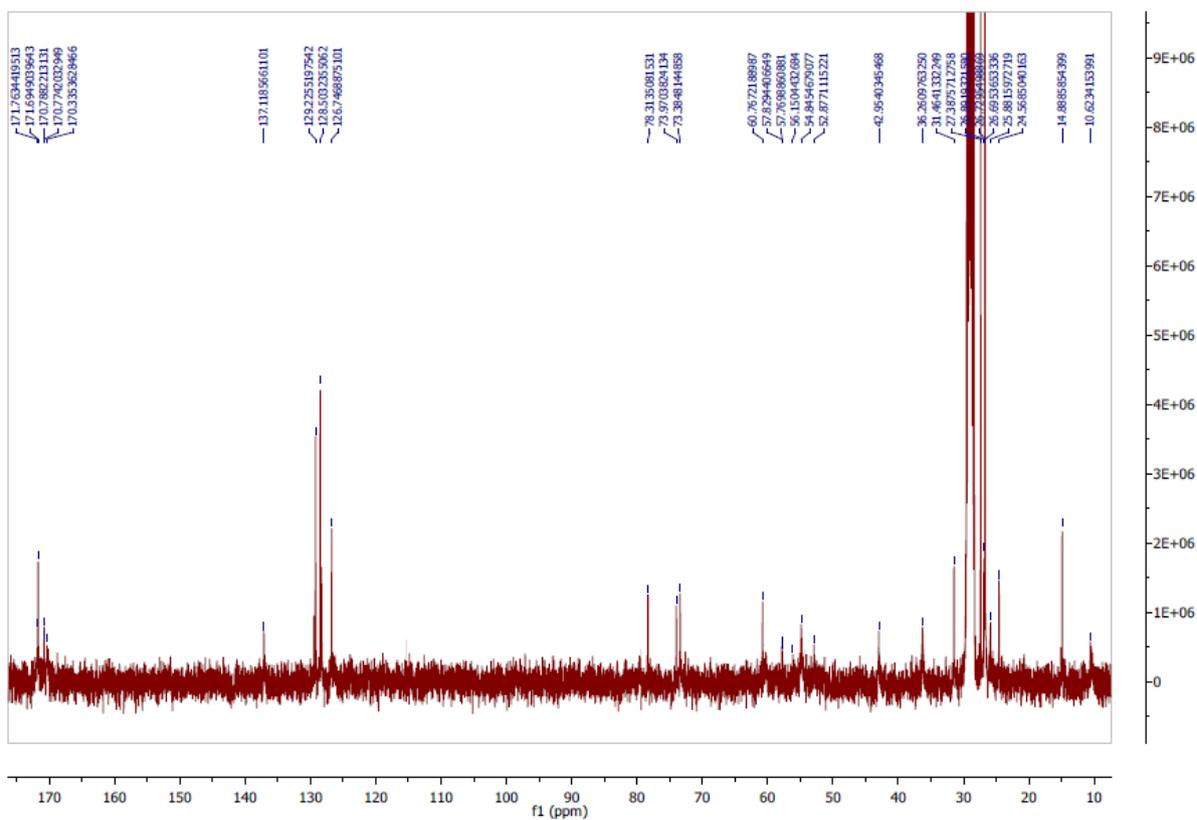
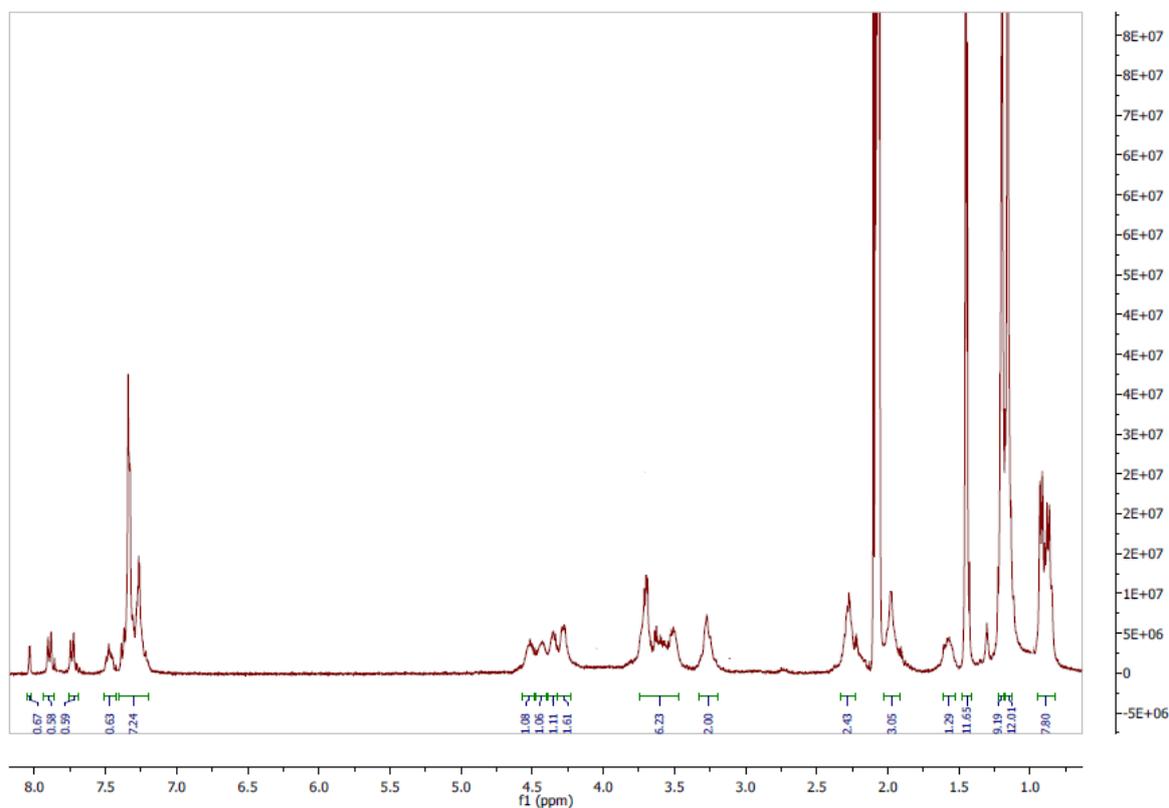
**Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ Bu)-Gly (32)**



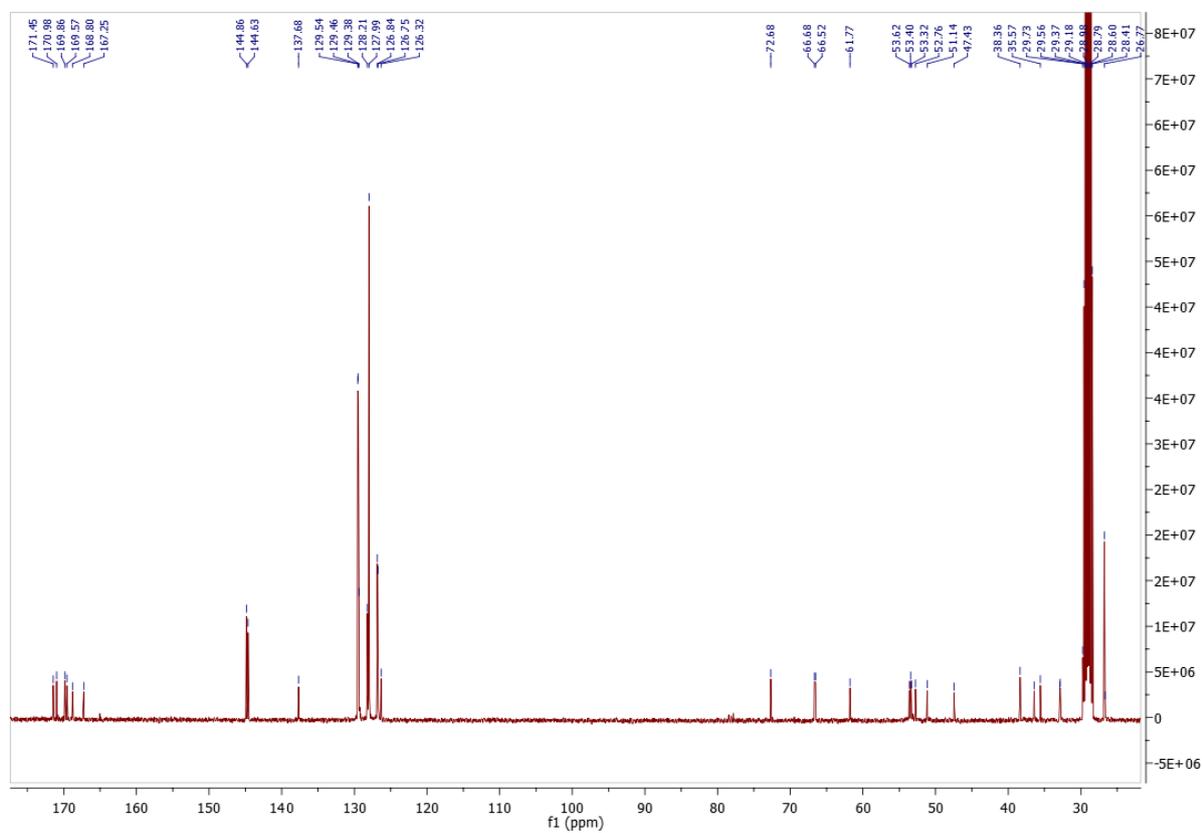
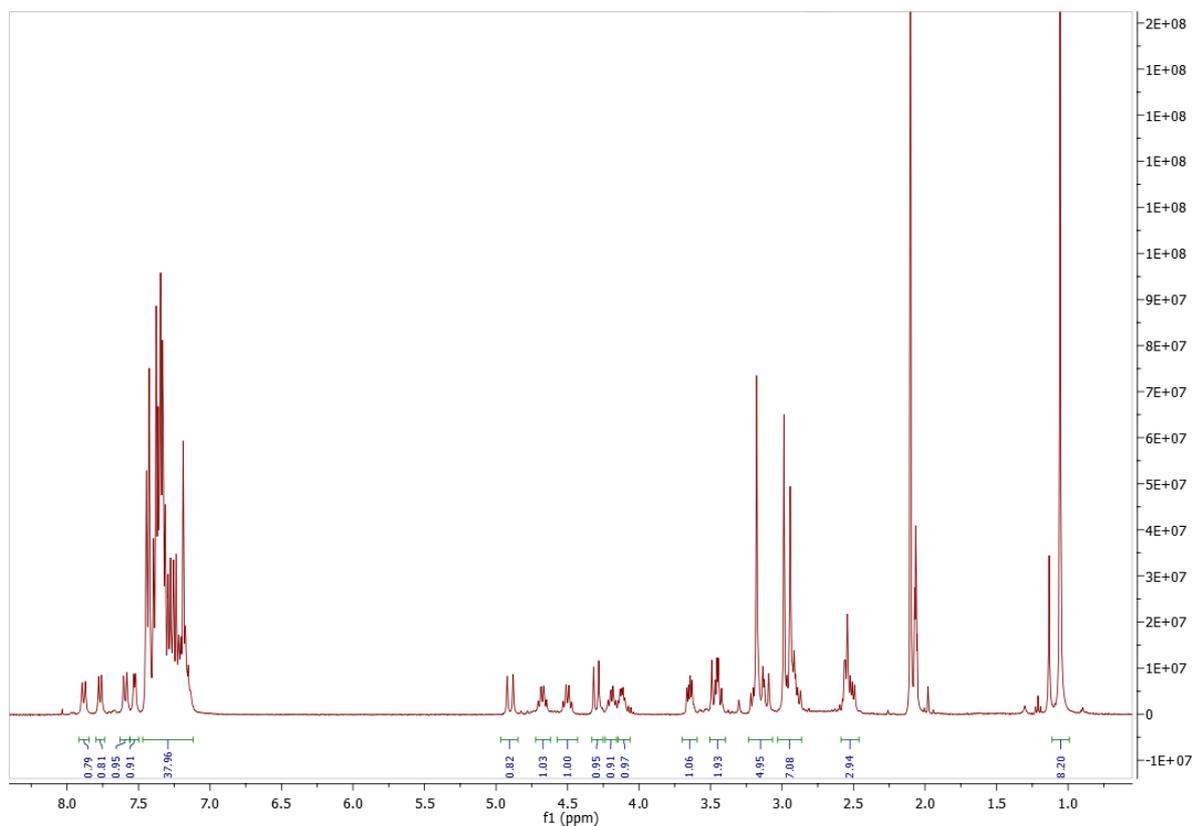
*Cyclo-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ Bu)-L-Met-Gly (33)*



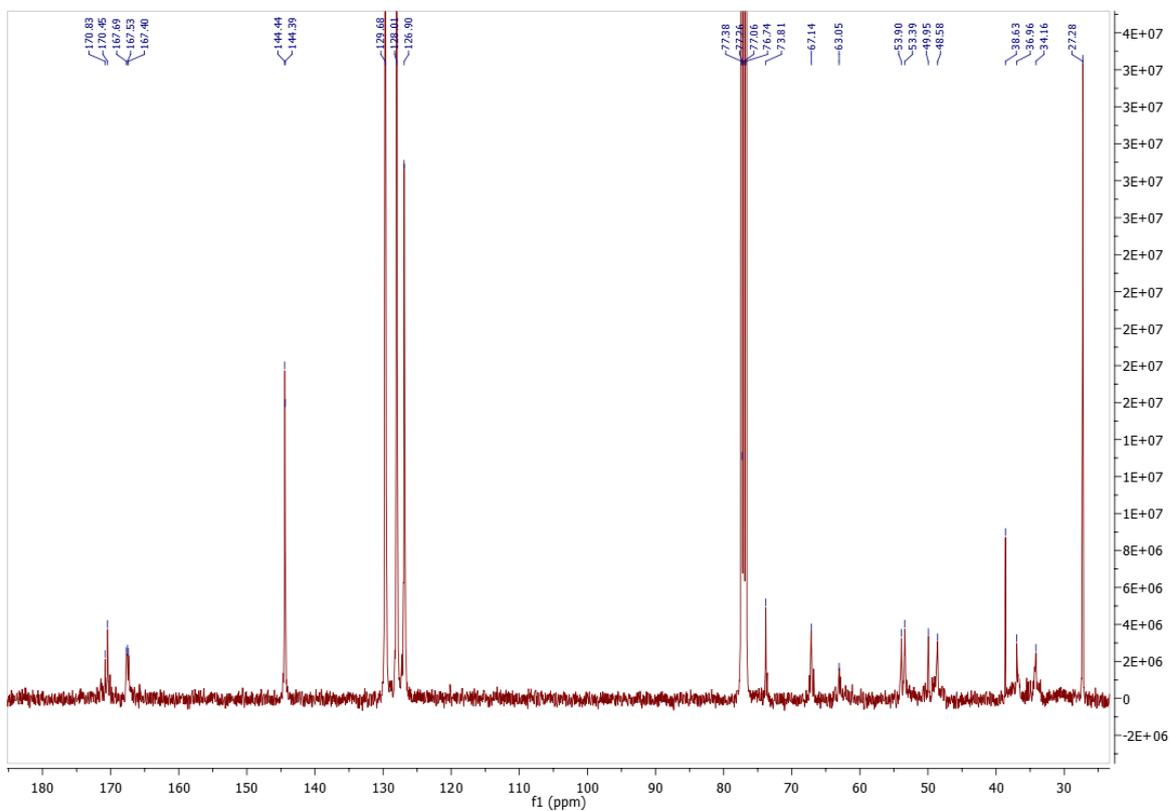
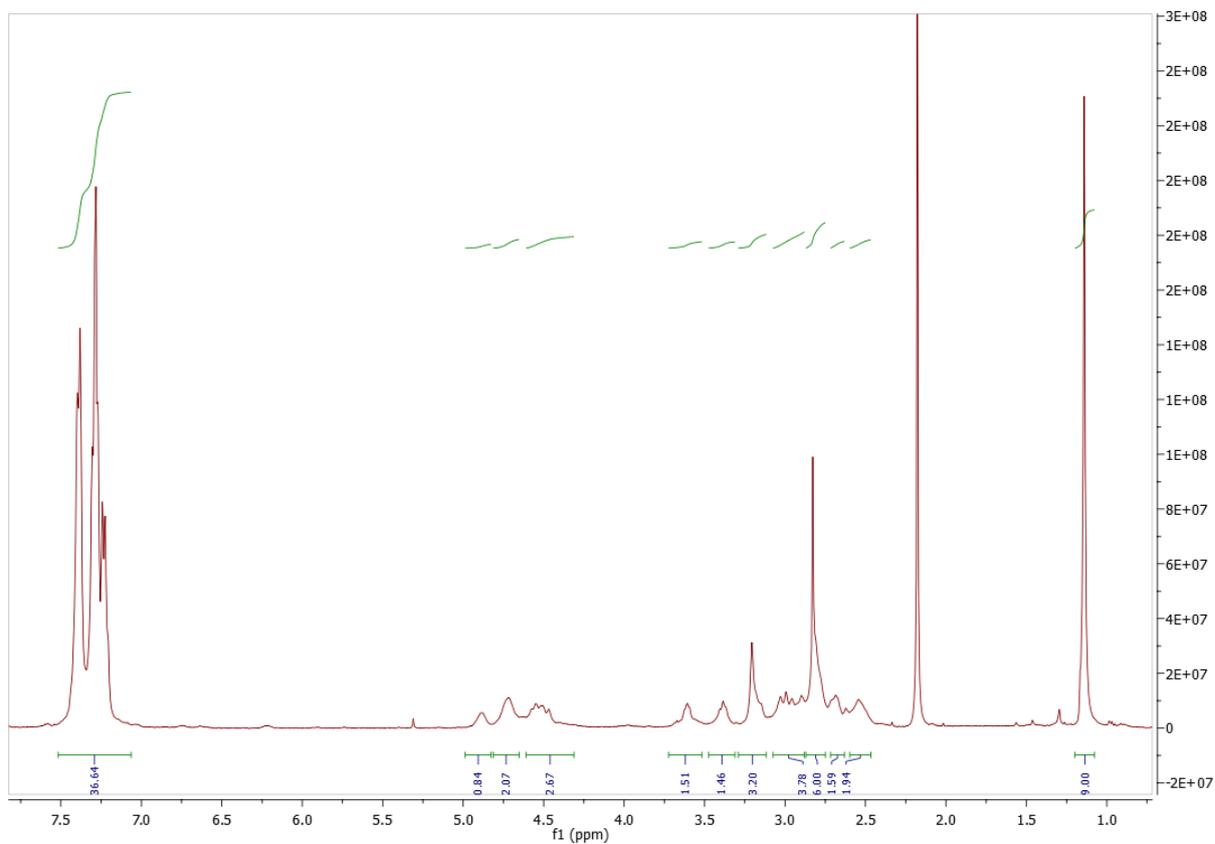
*Cyclo-L-Ser(t-Bu)-L-Ile-L-Ser(t-Bu)-L-Phe-L-Glu( $\gamma^t$ -Bu)-Gly (34)*



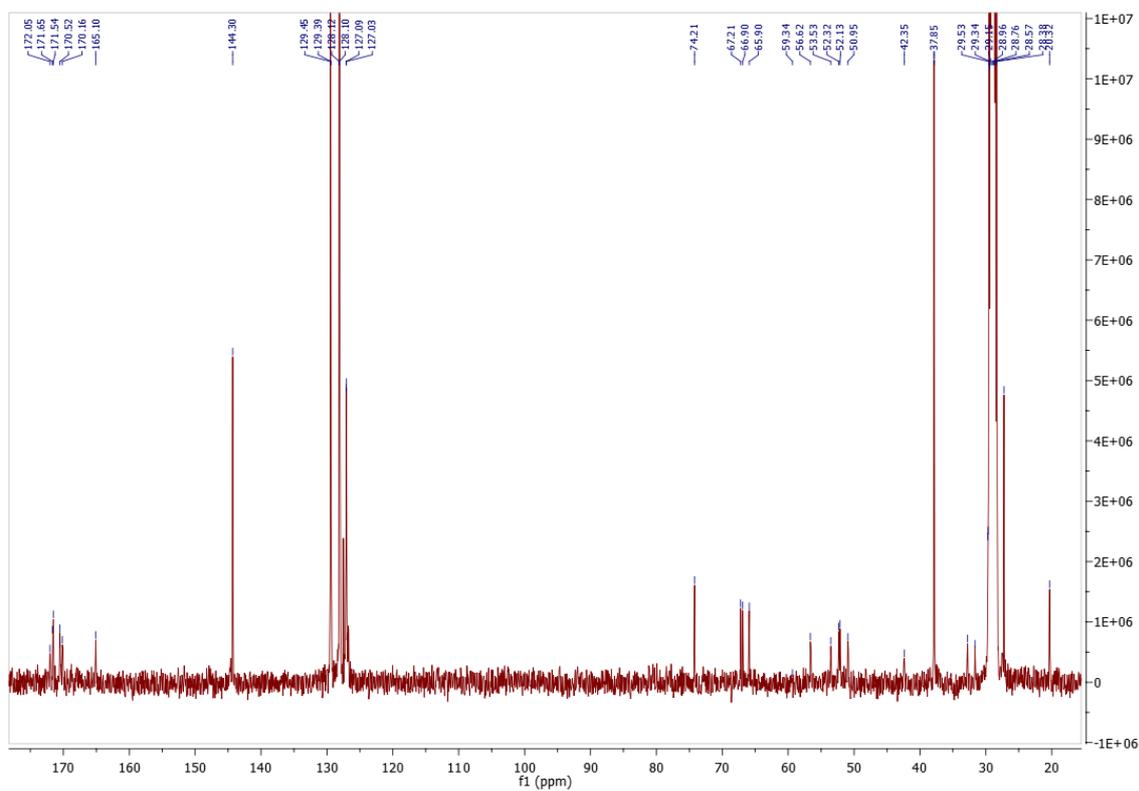
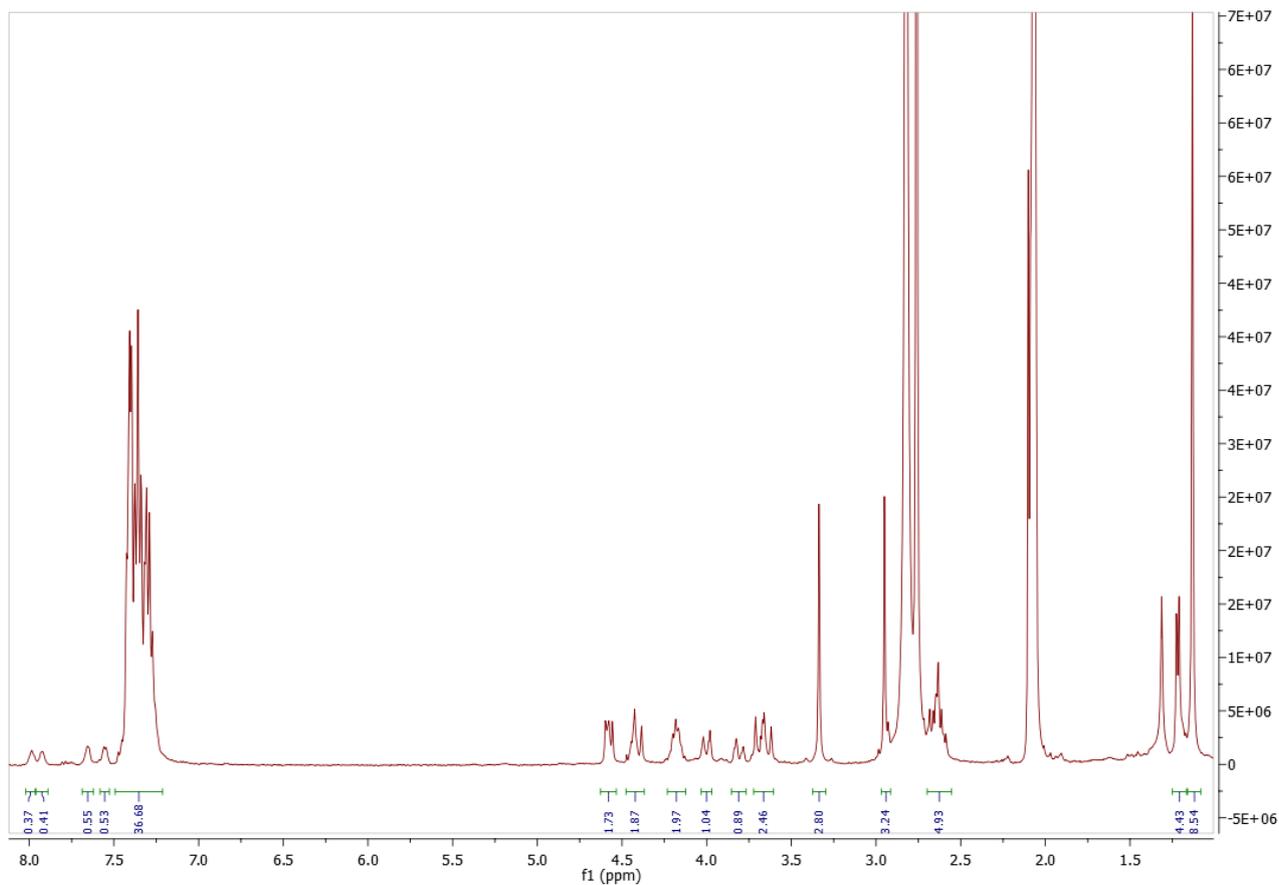
**Cyclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu) (35)**



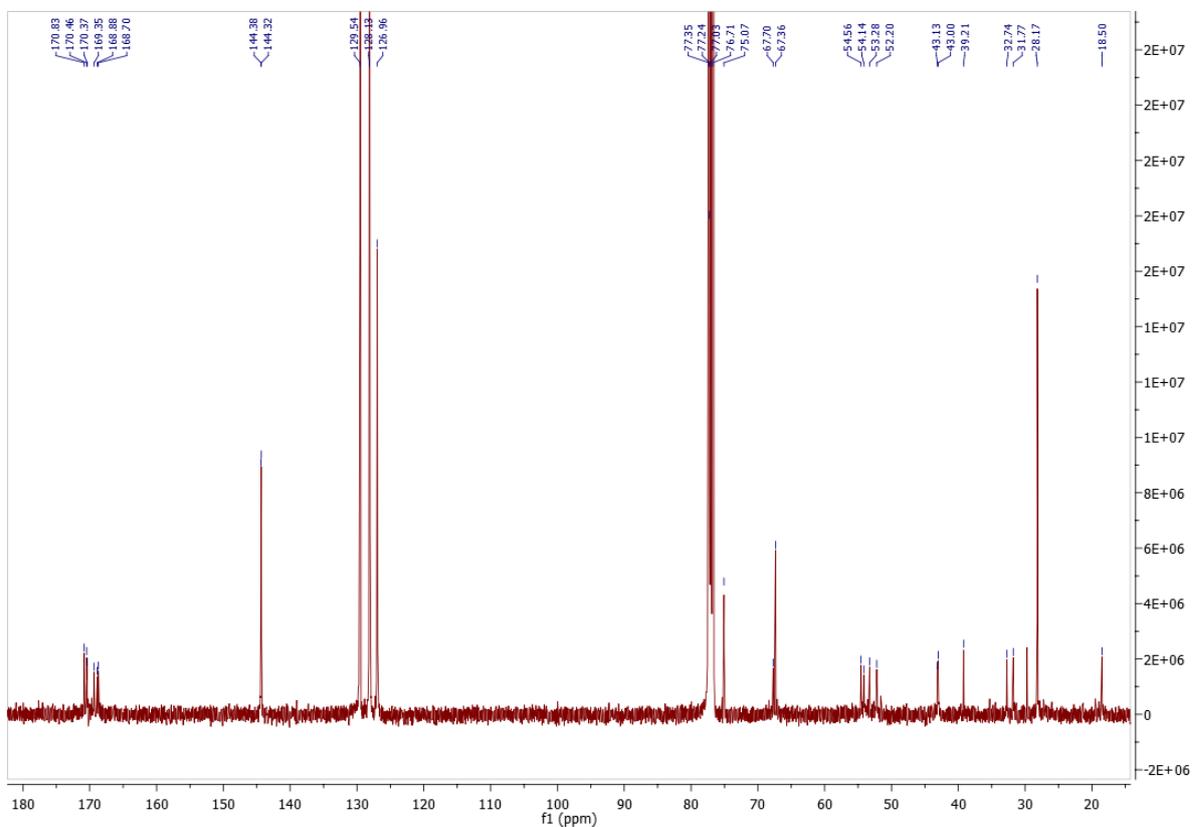
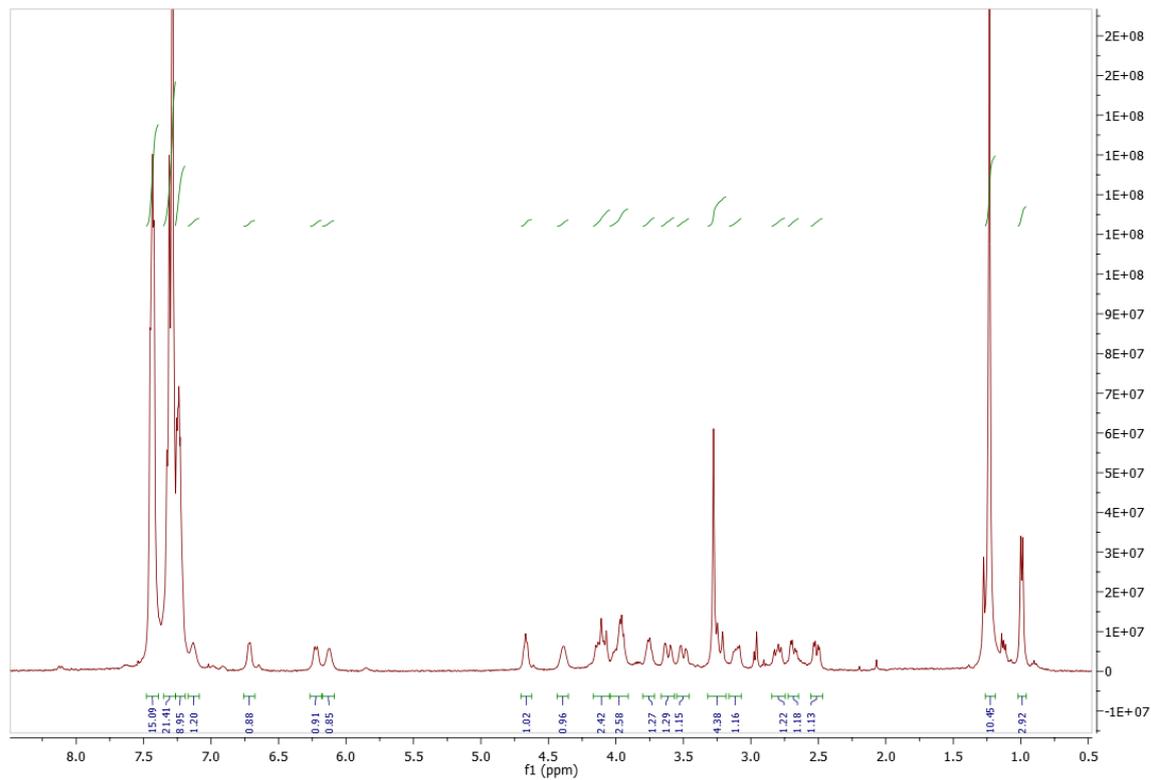
**Cyclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt) (36)**



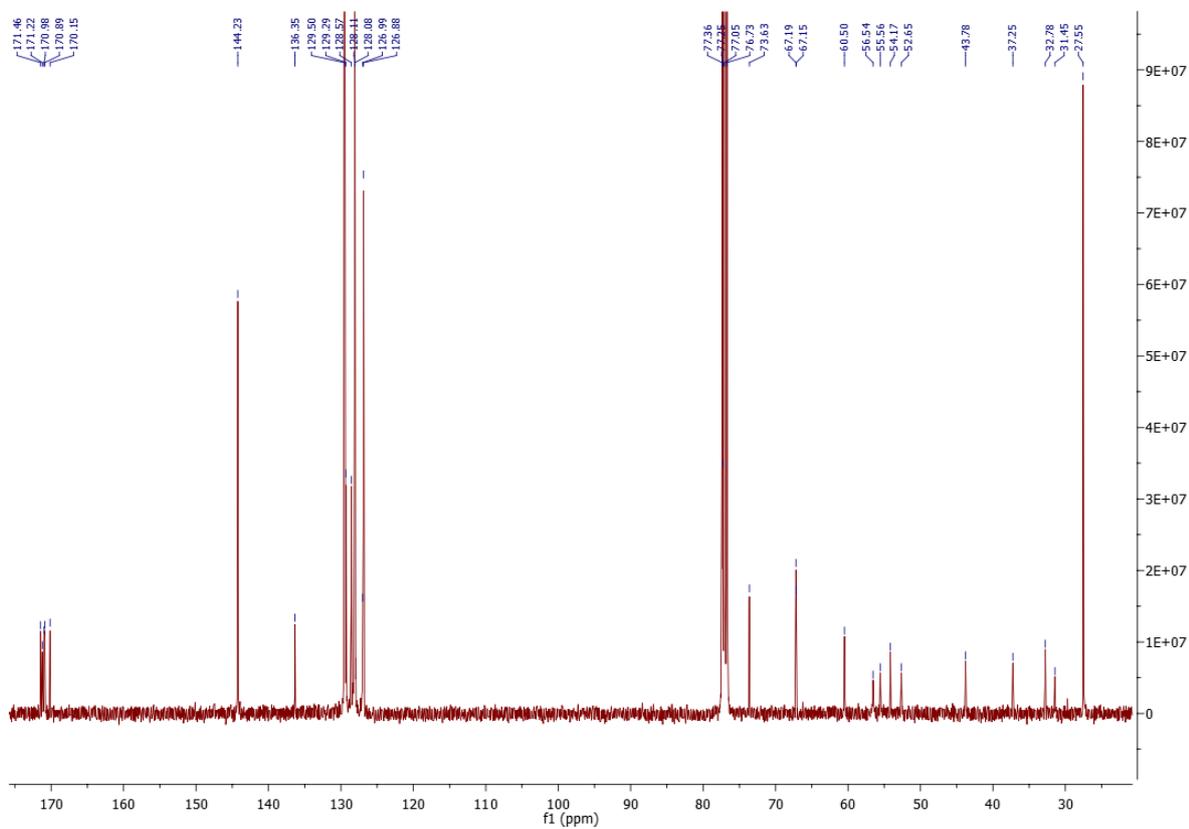
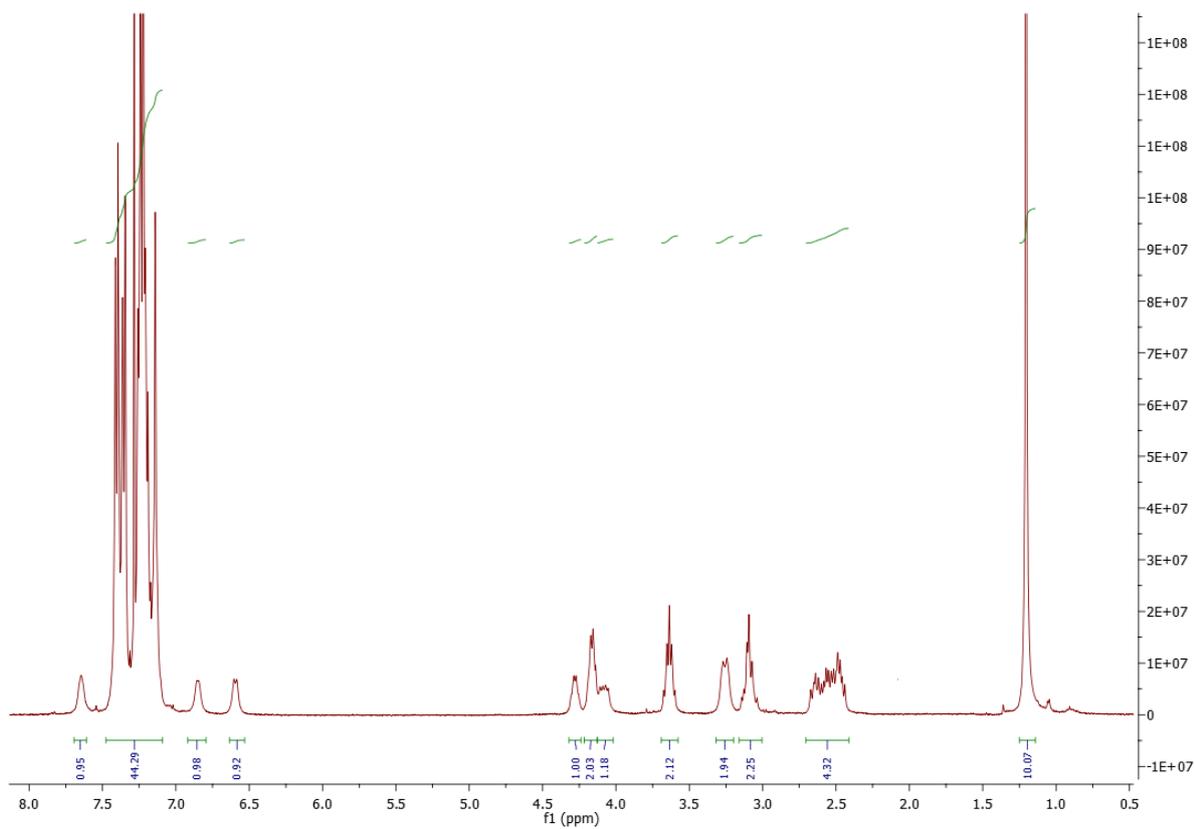
**Cyclo-NMe-Gly-L-Thr(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt) (37)**



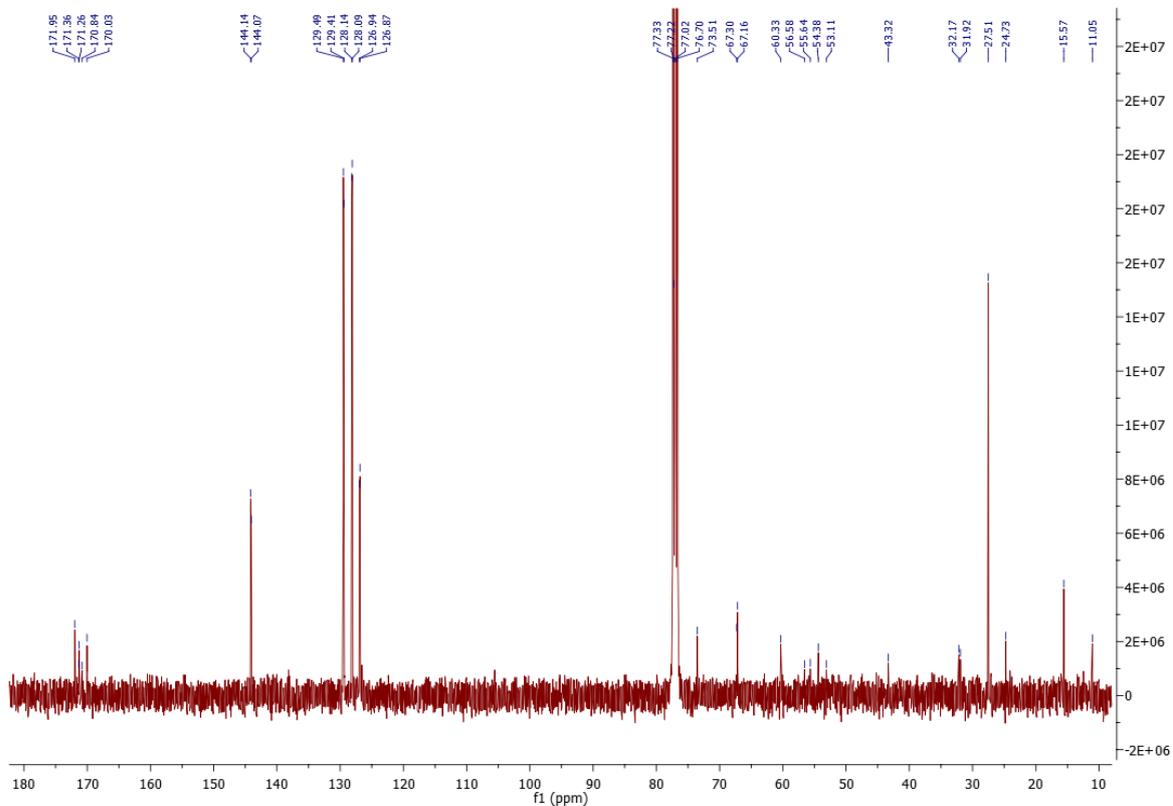
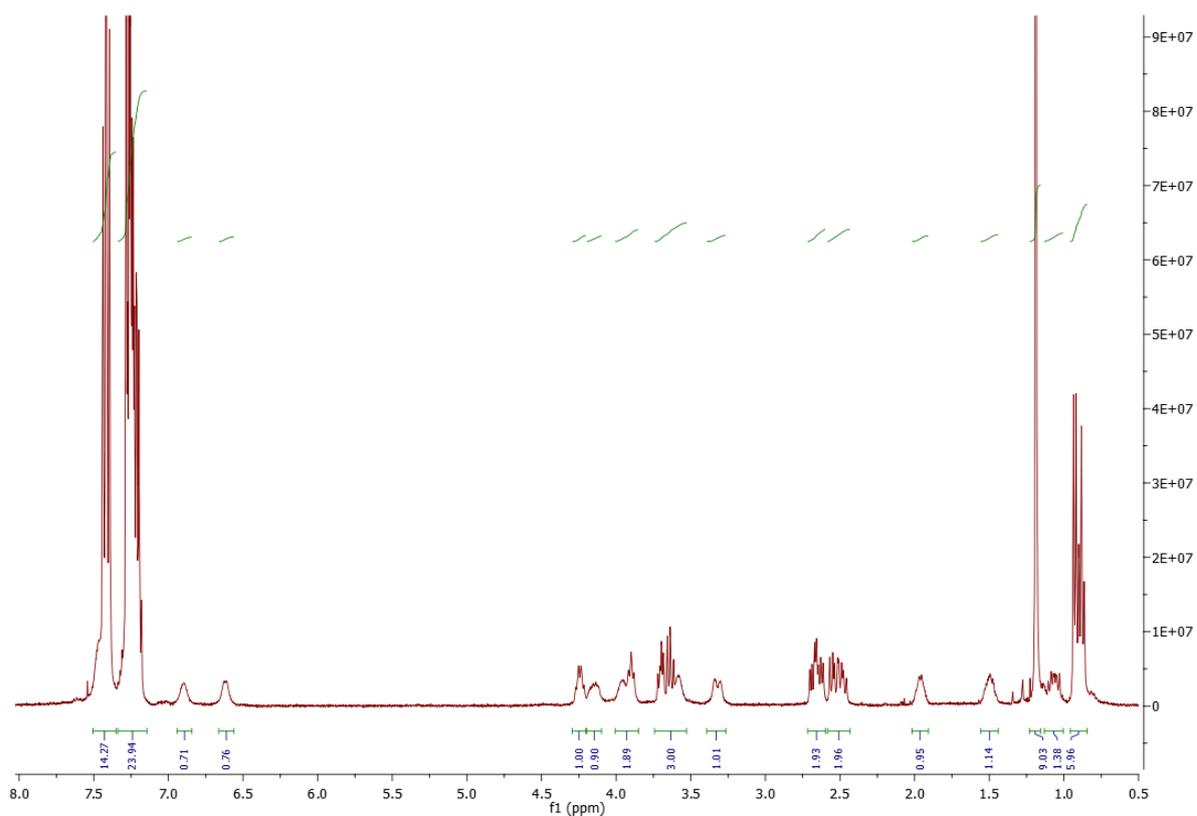
**Cyclo-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly (38)**



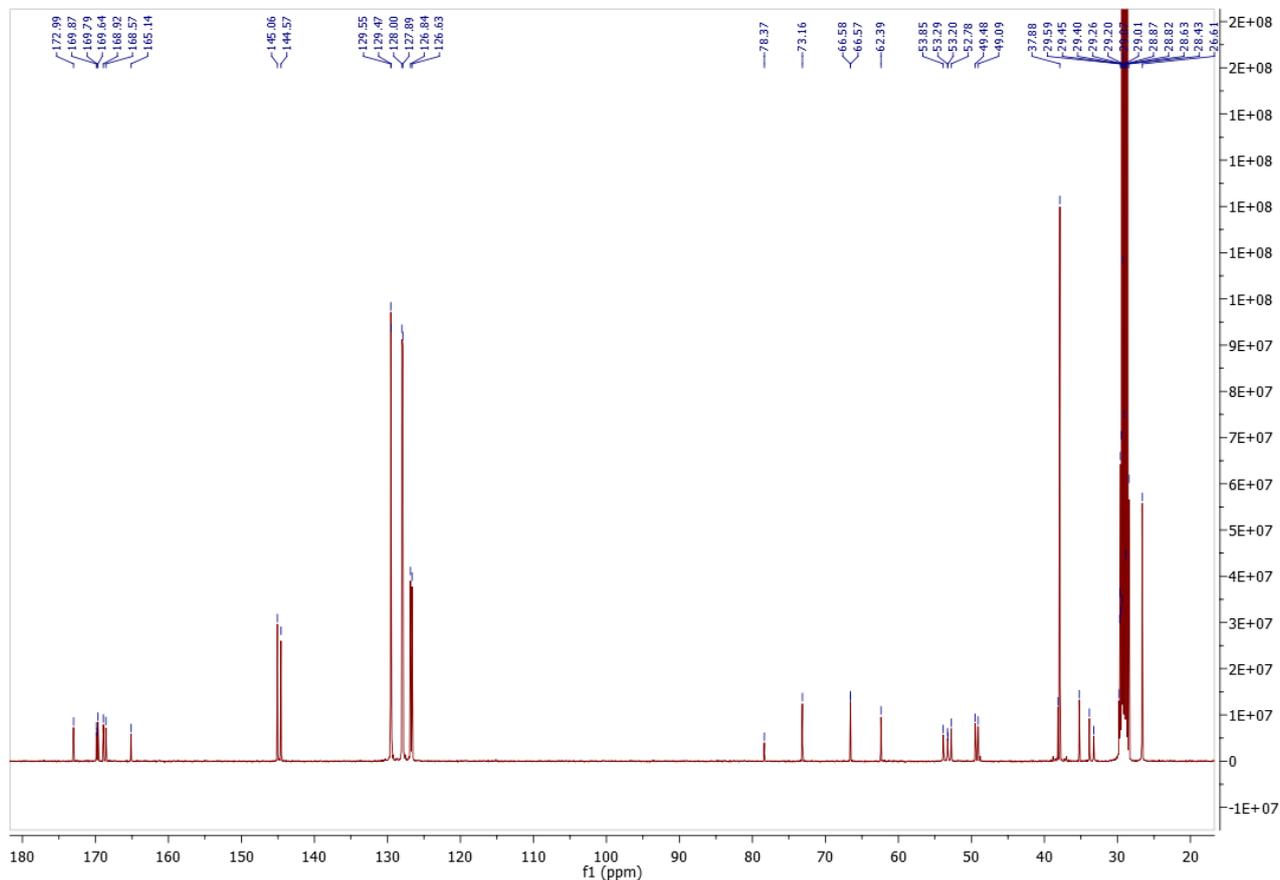
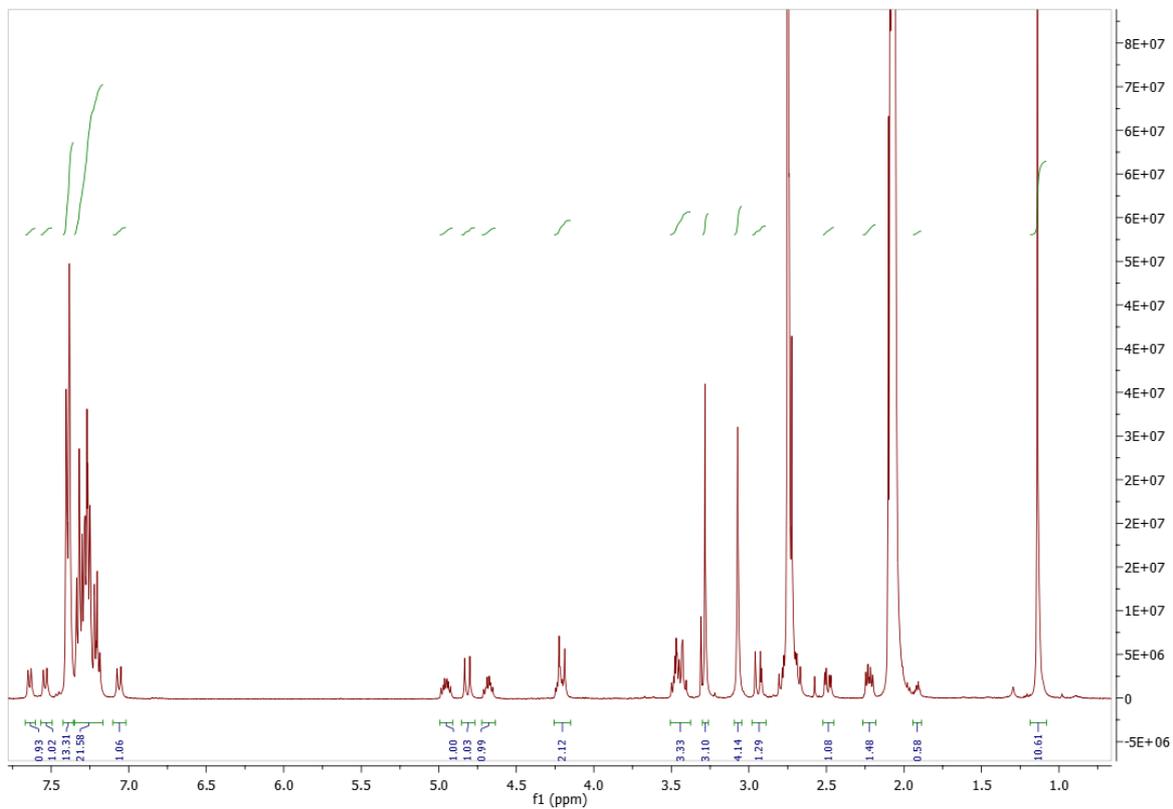
*Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(t-Bu)-Gly (39)*



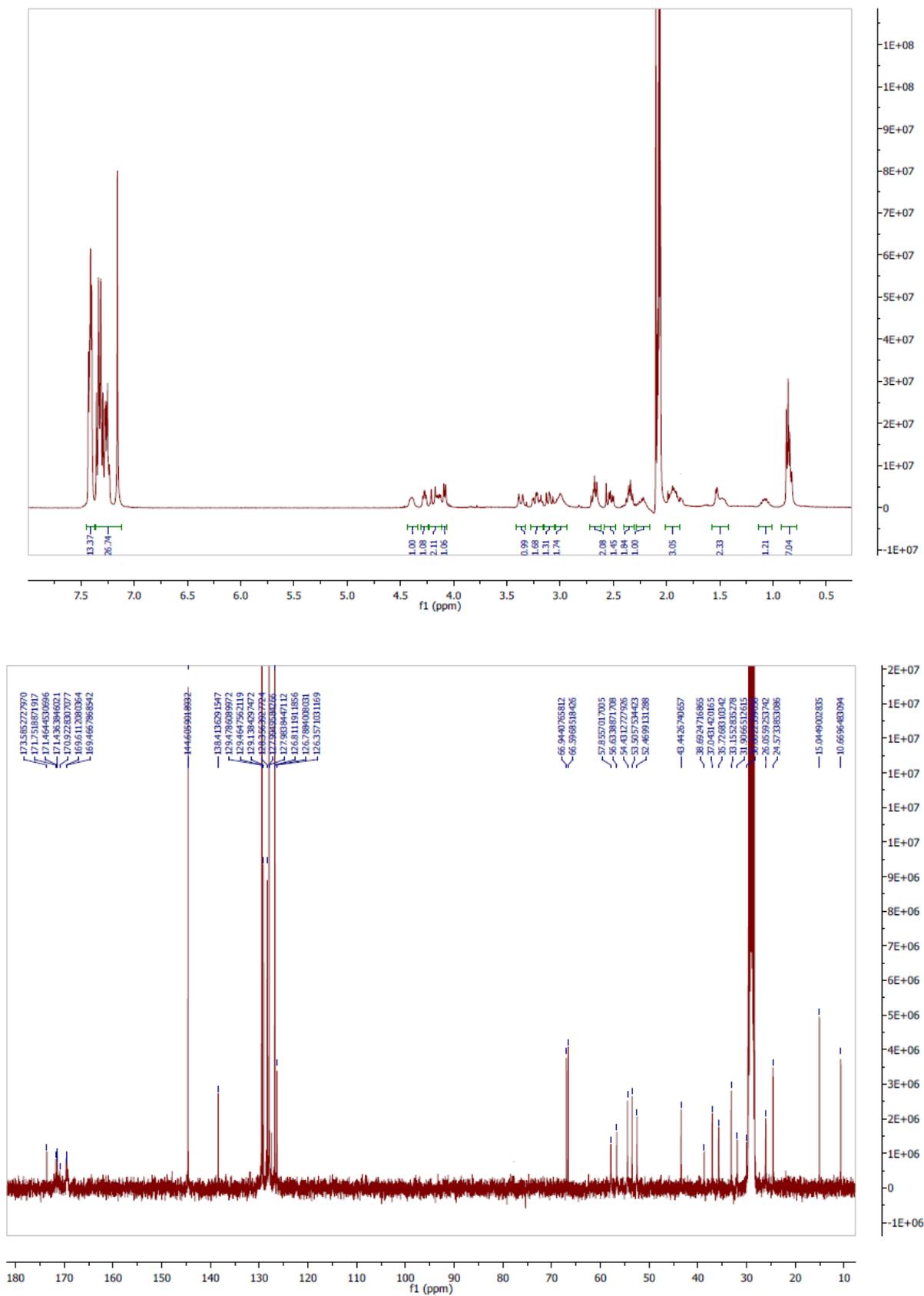
*Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser(t-Bu)-Gly (40)*



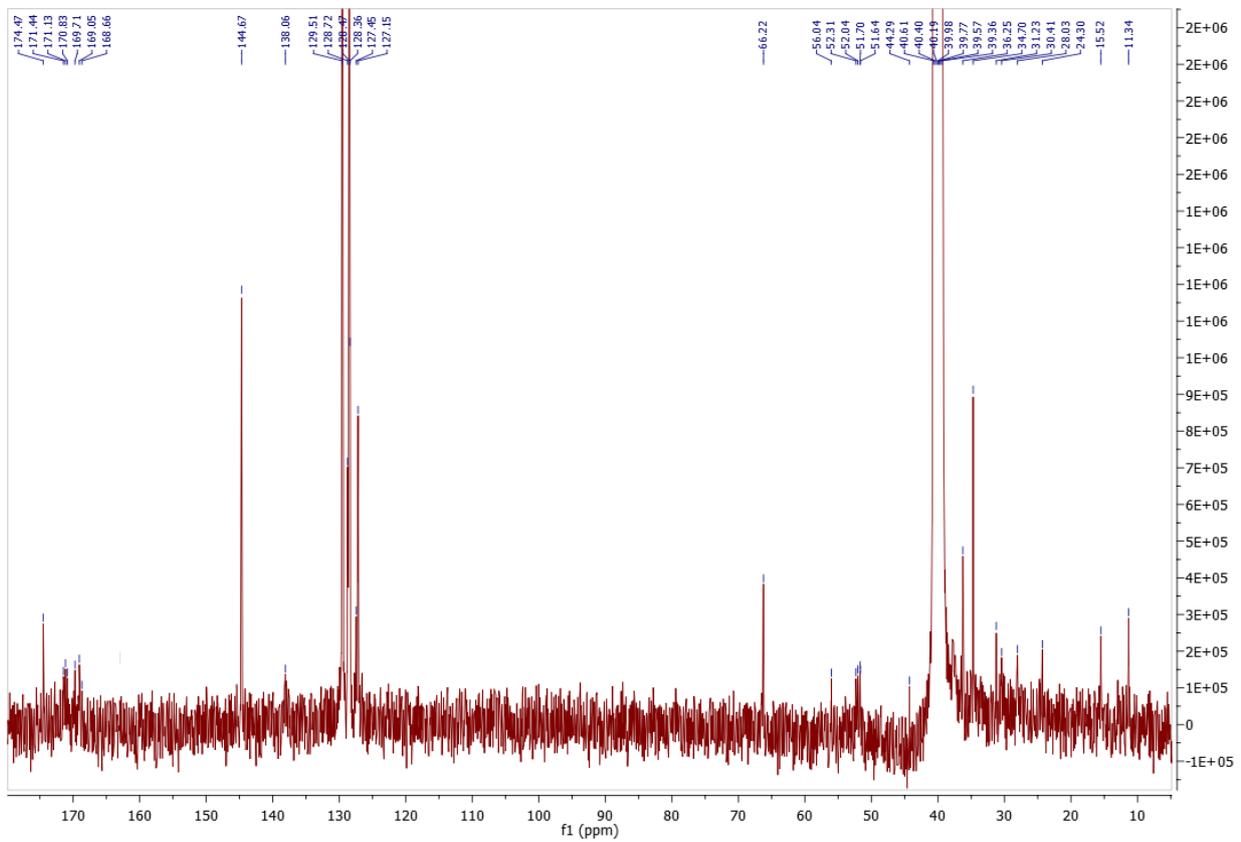
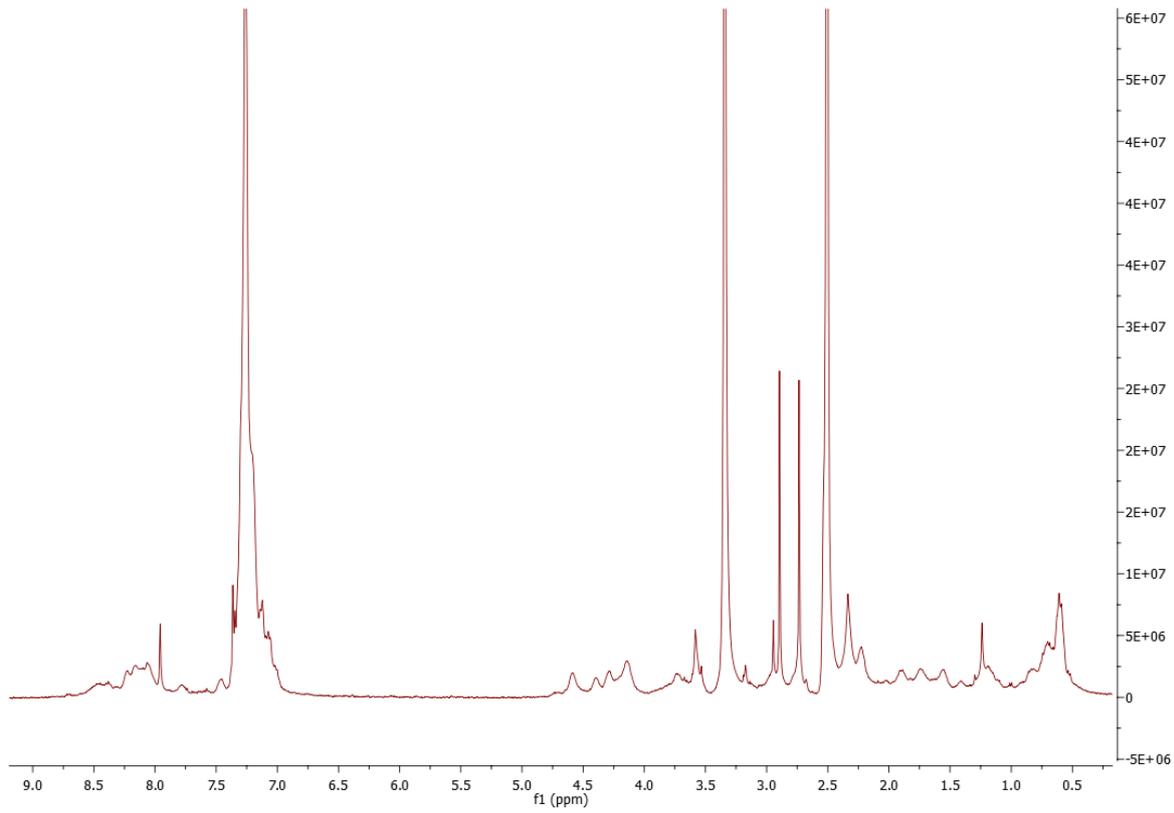
**Cyclo-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt) (41)**

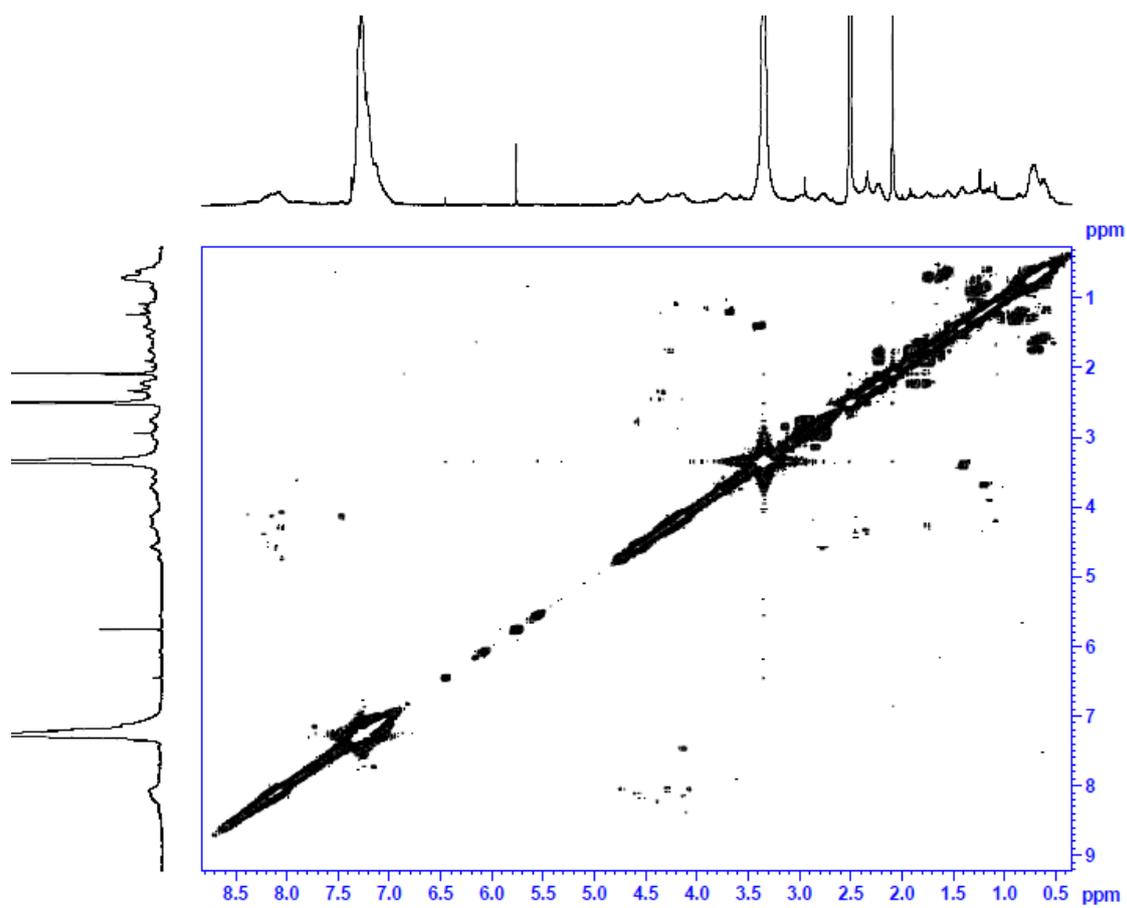


**Cyclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu (42)**

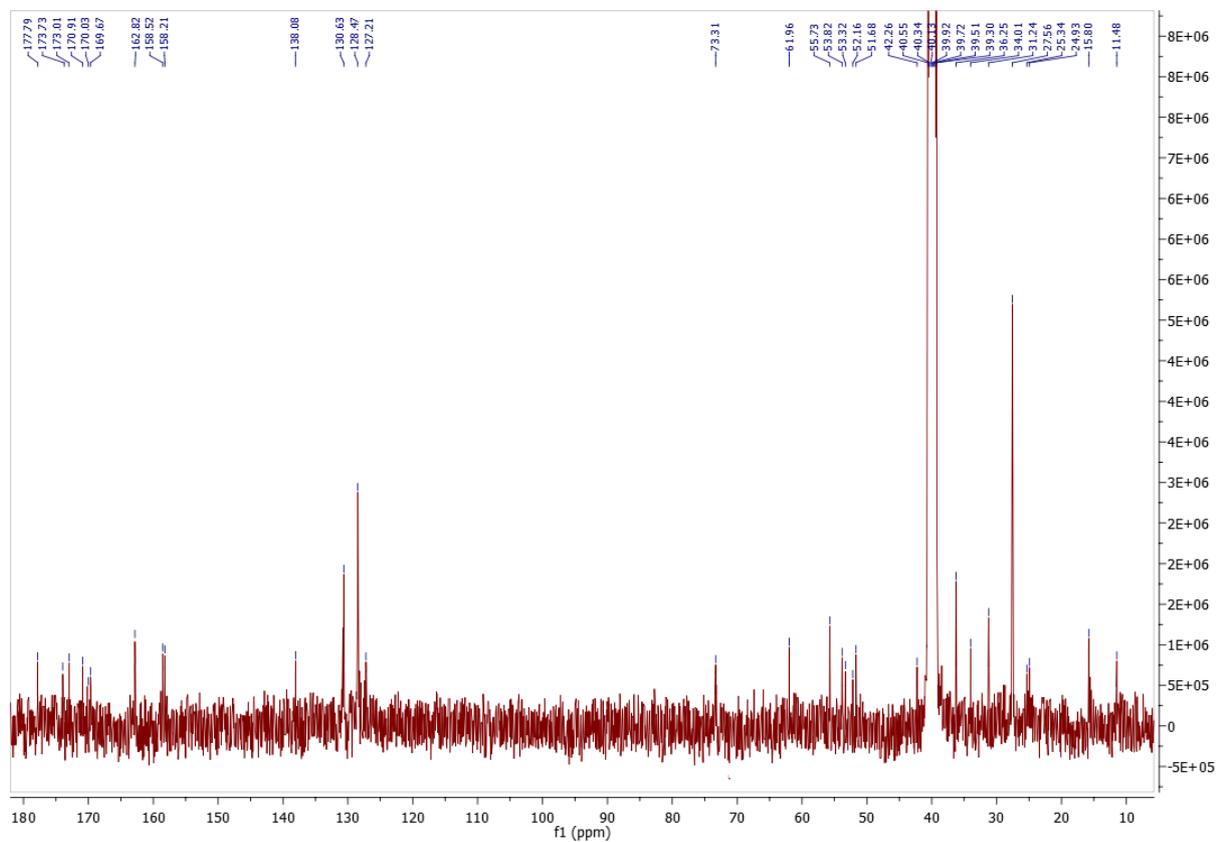
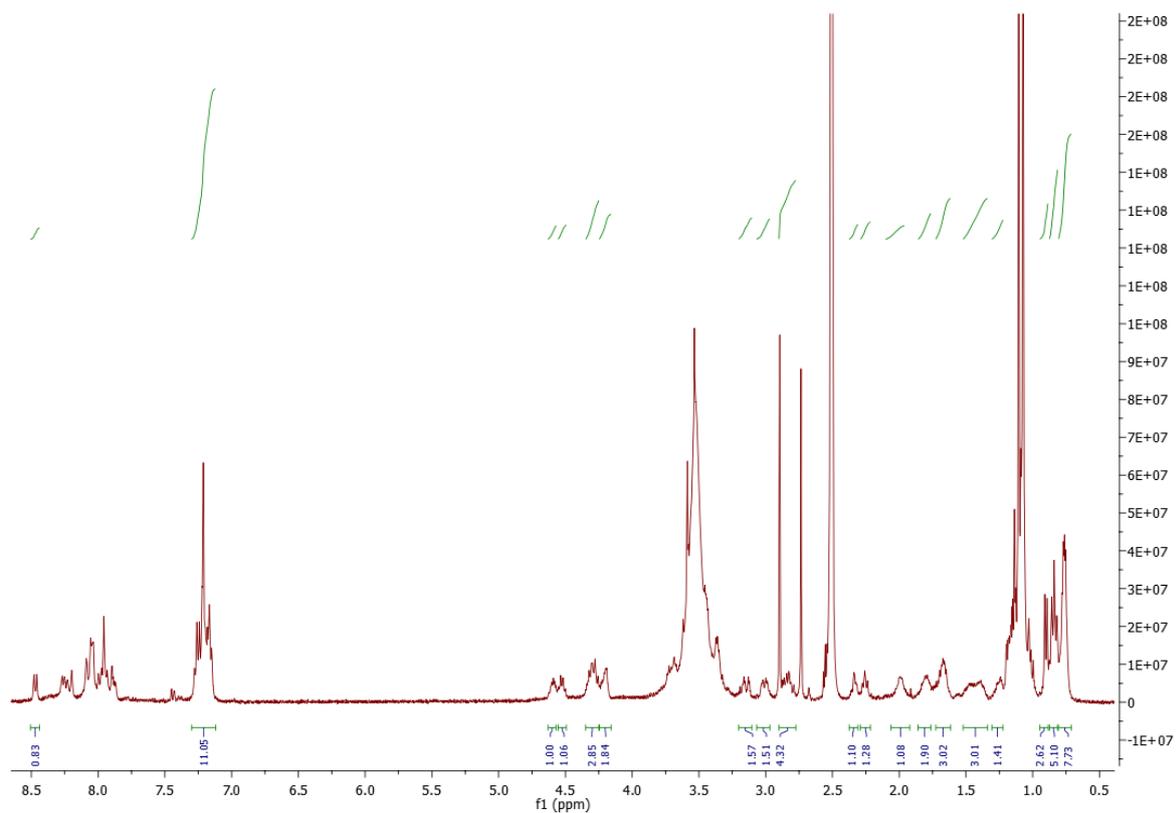


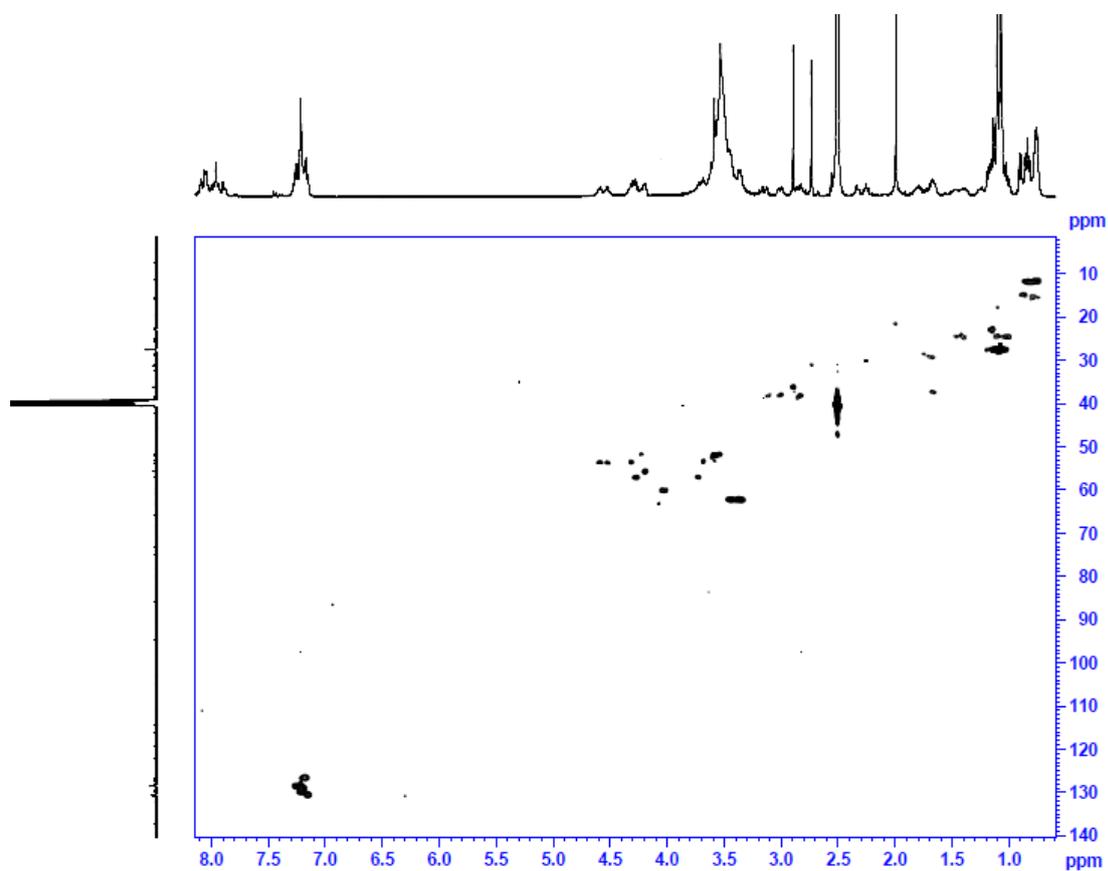
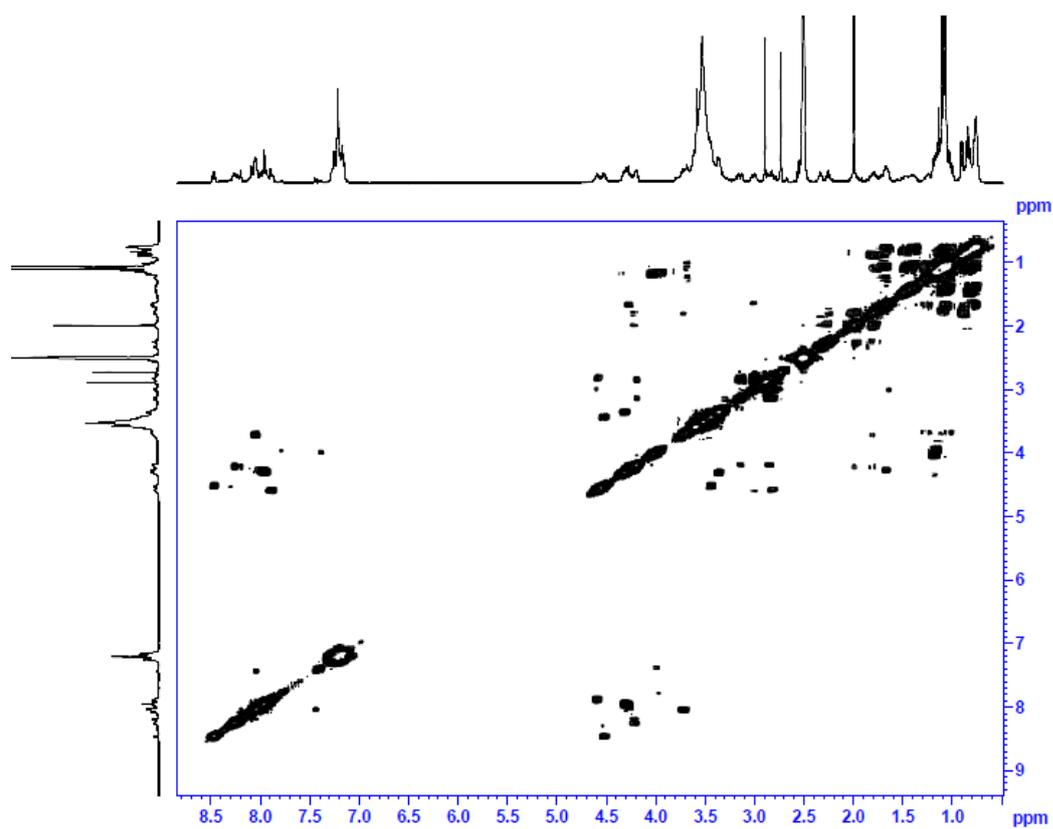
*Cyclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu (43)*



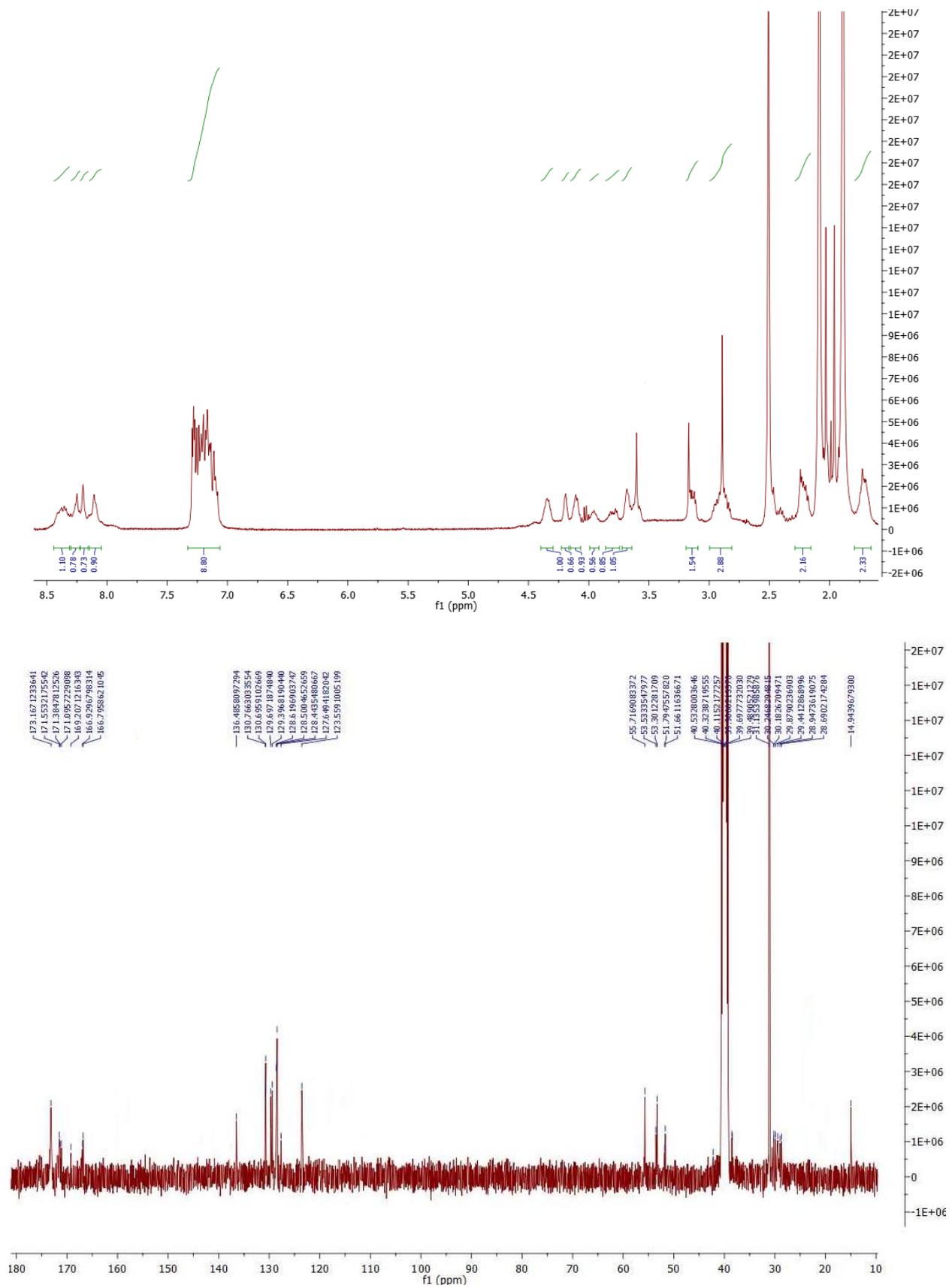


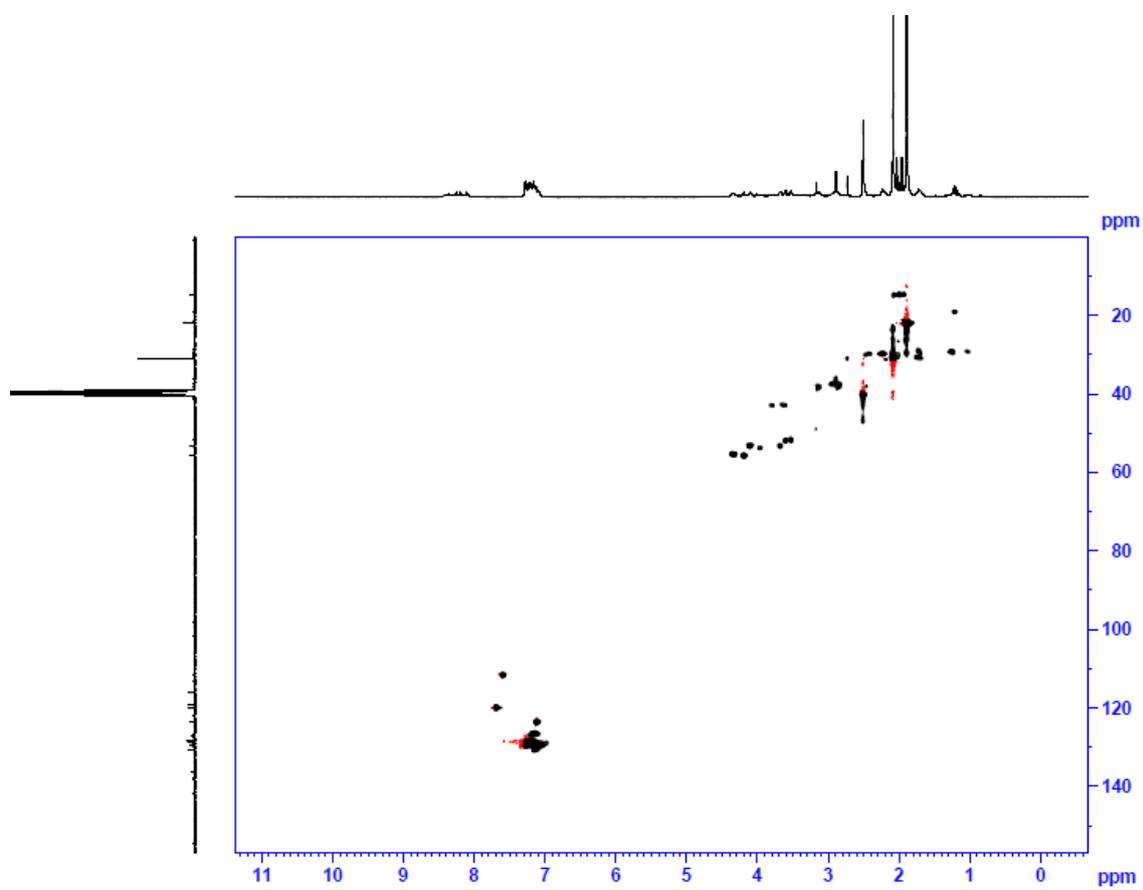
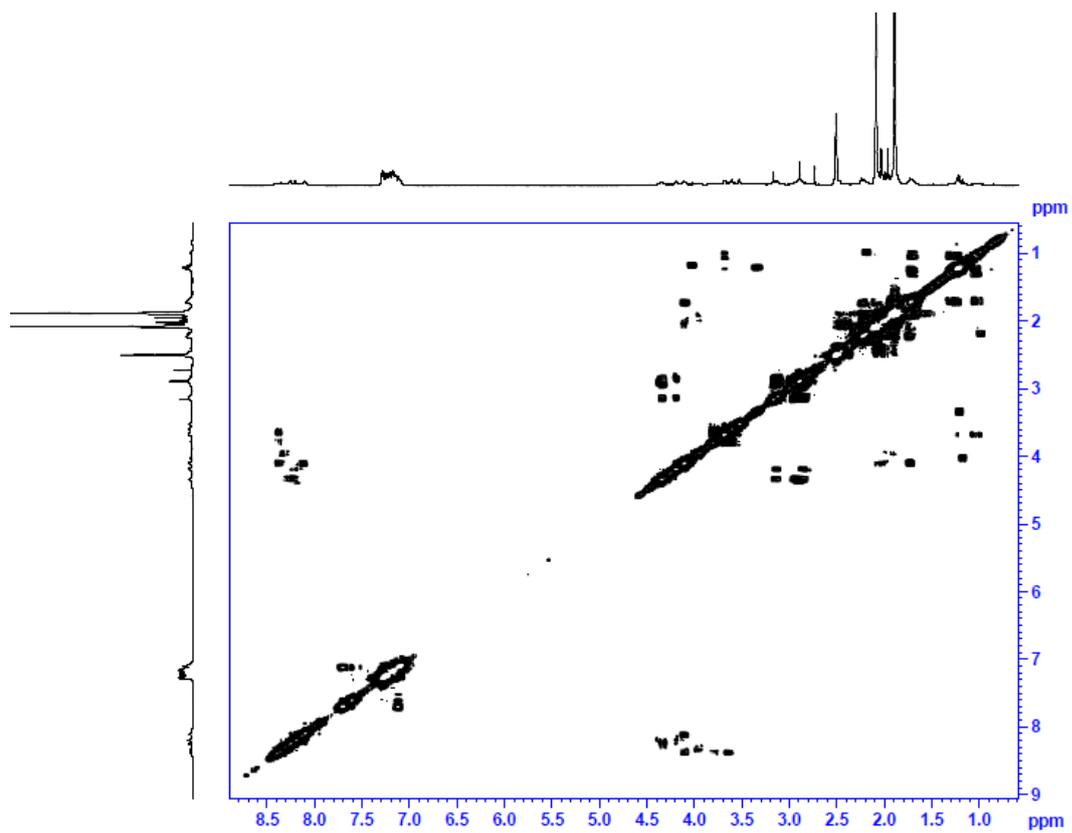
**Cyclo-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu (44)**



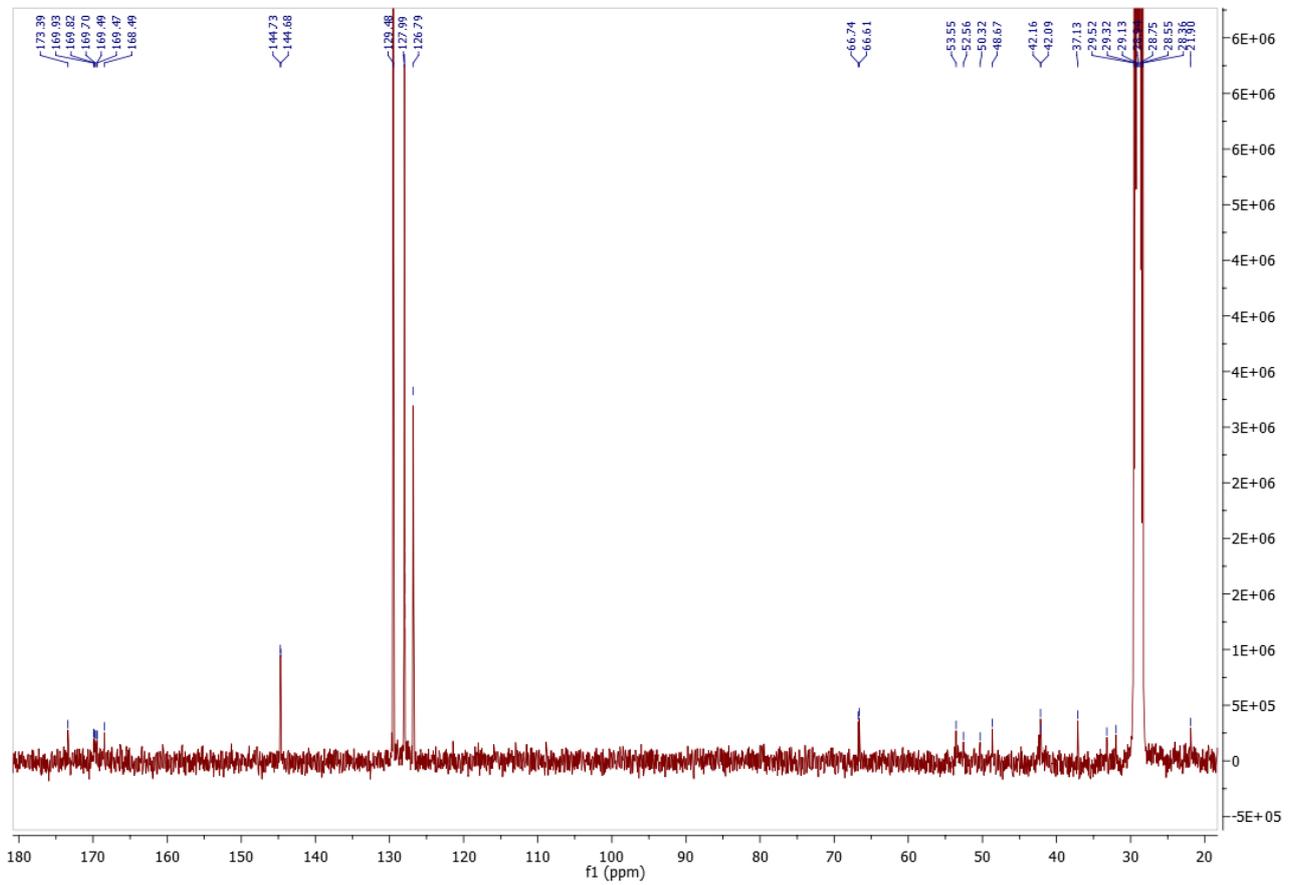
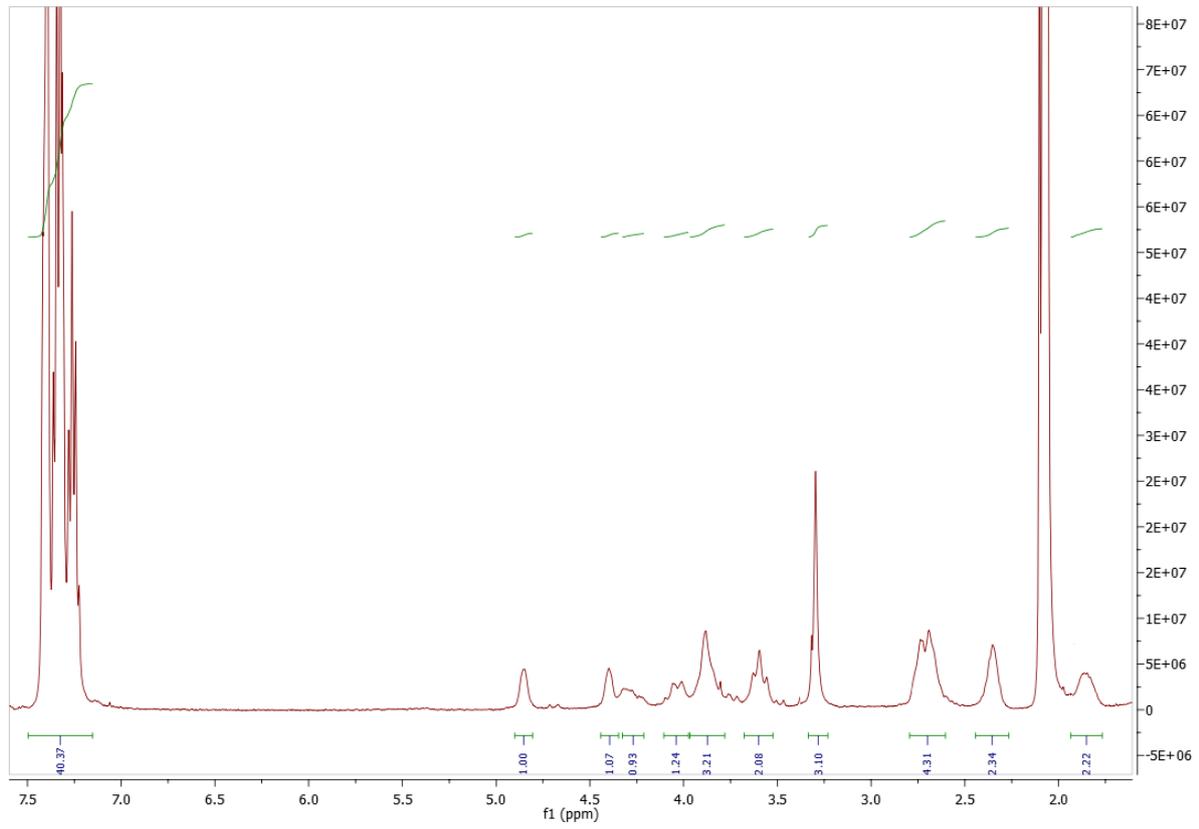


*Cyclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu (45)*

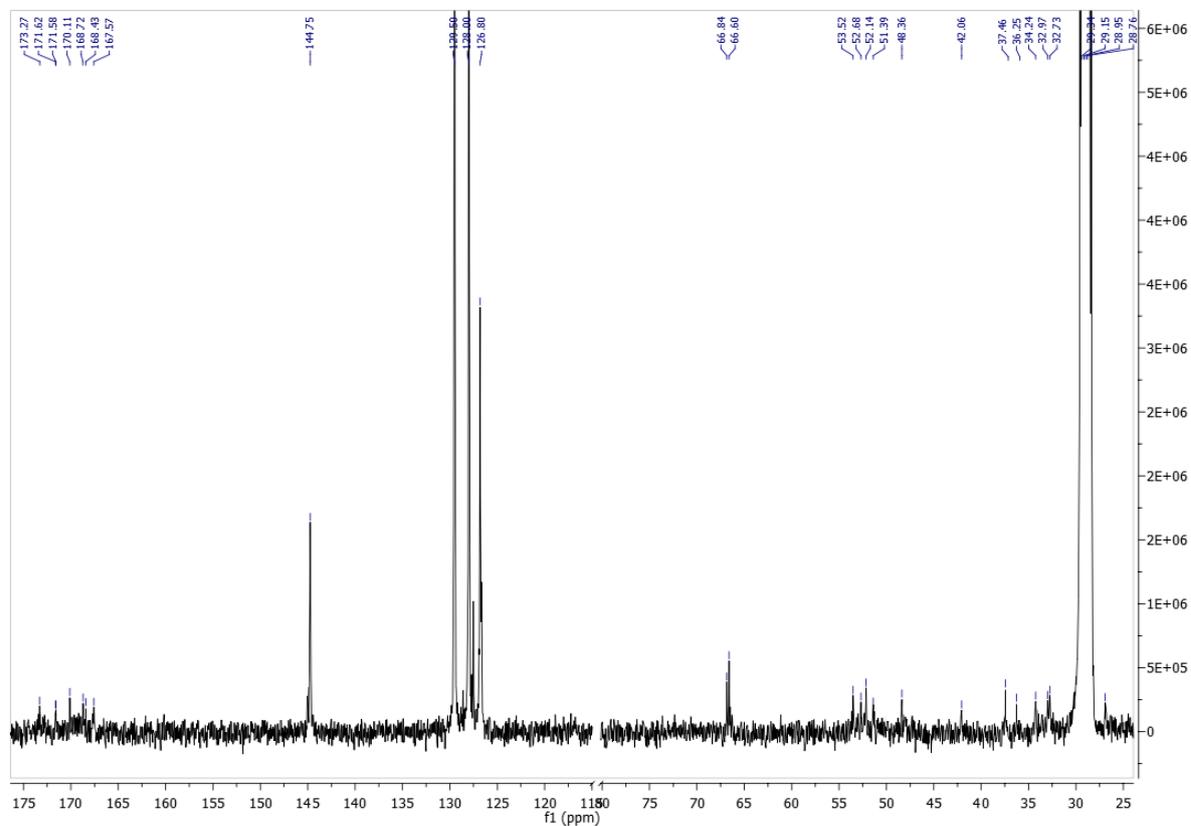
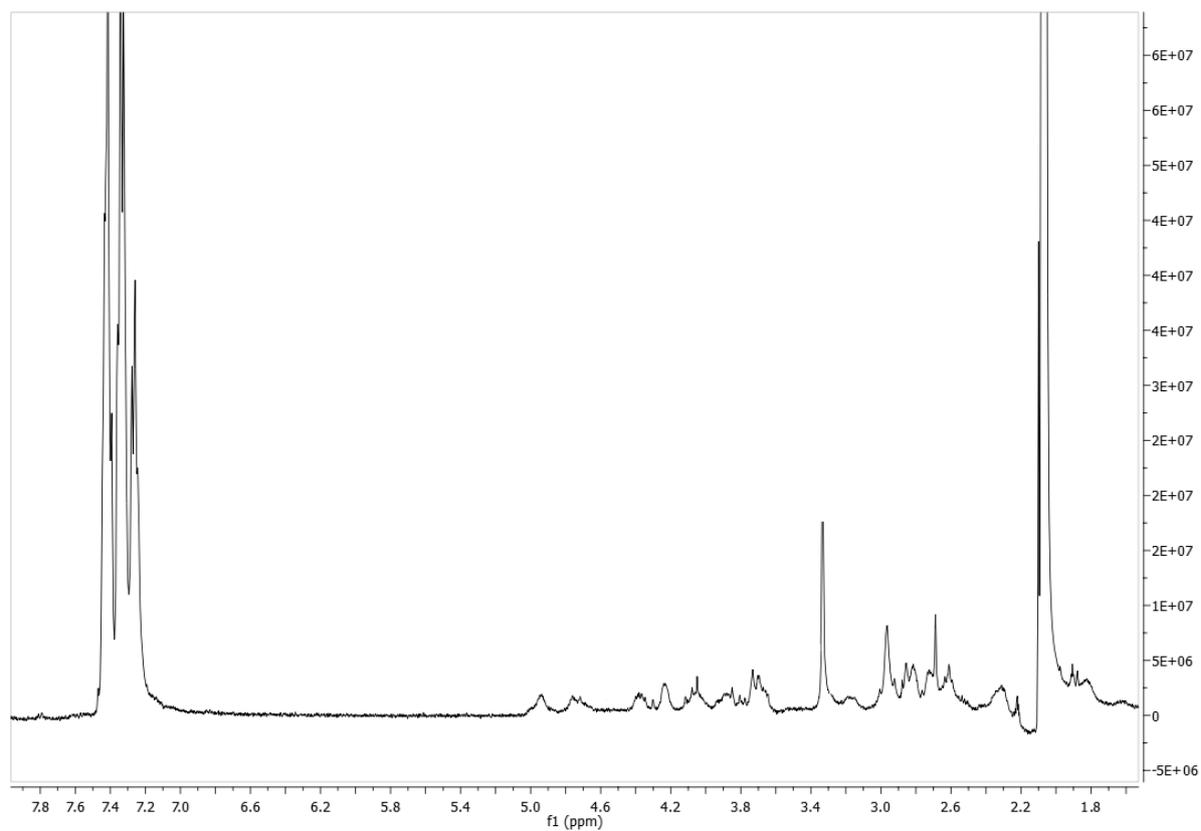




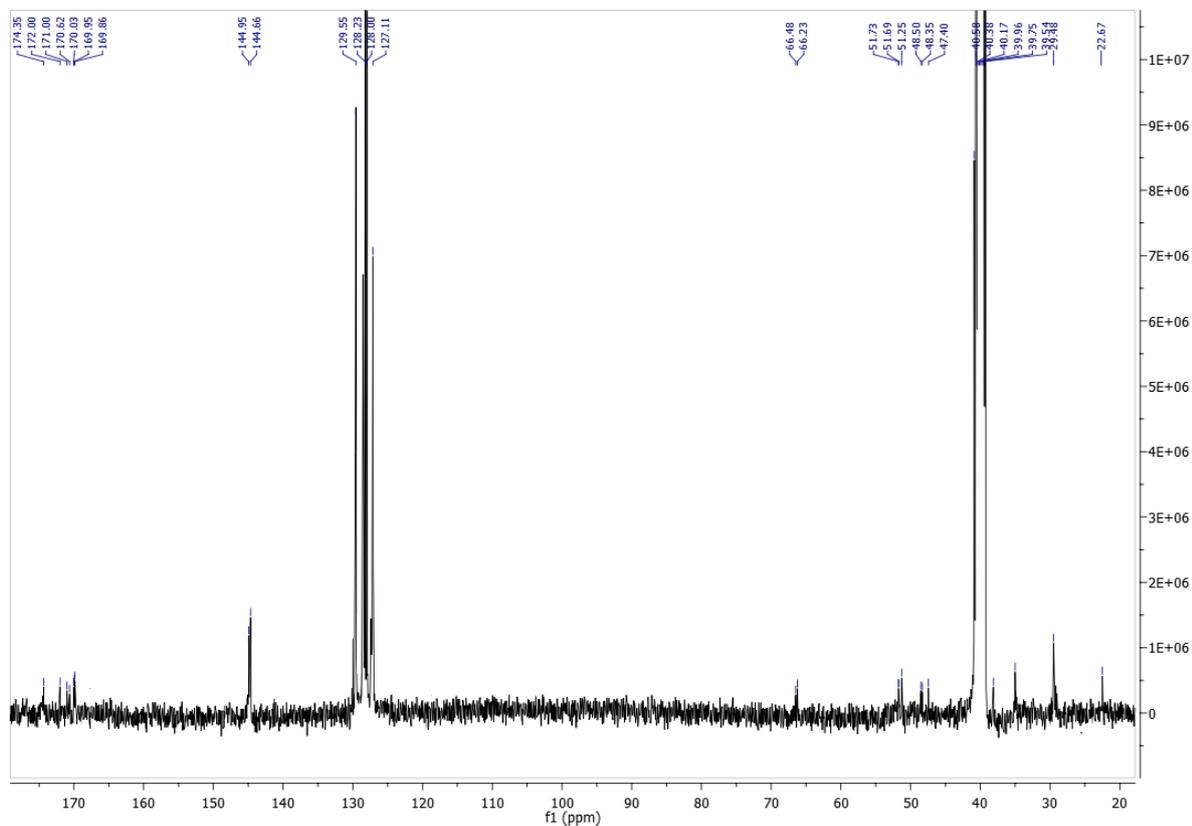
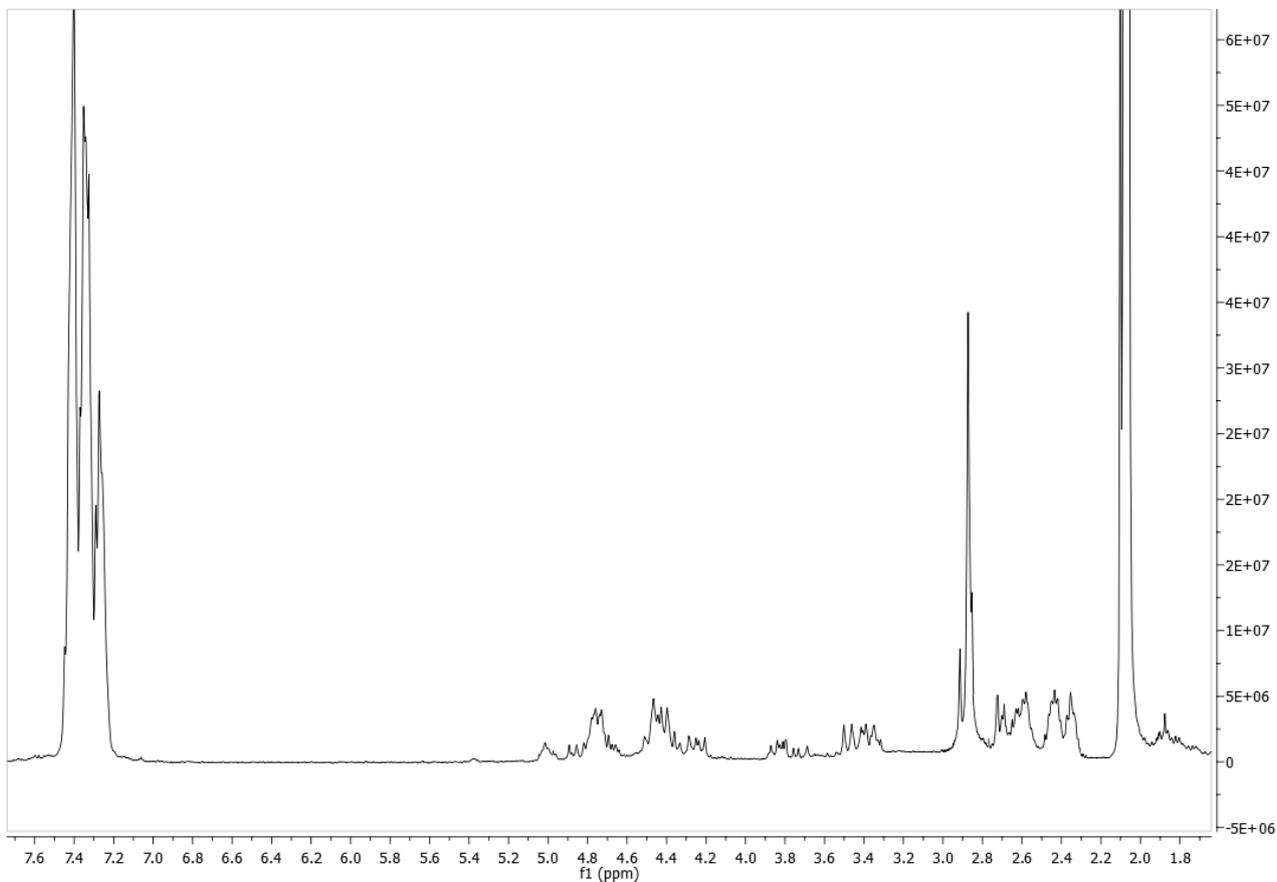
**Cyclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu (46)**



**Cyclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu (47)**



**Cyclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu (48)**





## **CAPÍTULO 4**

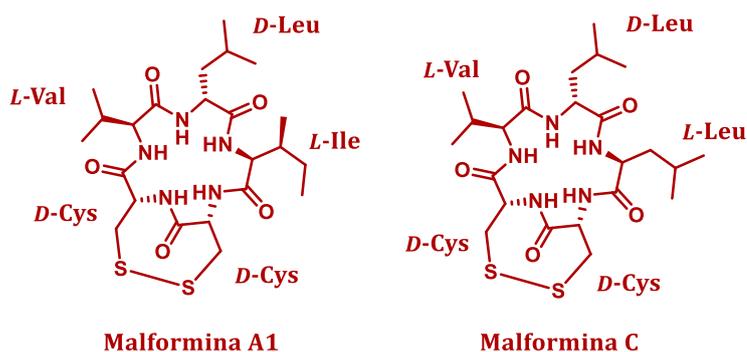
### **SÍNTESIS DE DERIVADOS DE CICLOPÉPTIDOS**



## 4.1 INTRODUCCIÓN

La naturaleza es capaz de proporcionar una gran diversidad de estructuras ciclopéptidicas, de variados niveles de complejidad sintética, que además poseen un amplio rango de actividades biológicas como ya se comentó en el capítulo 3. Este tipo de compuestos de origen natural, pueden presentar diferentes funcionalidades en las cadenas laterales de sus aminoácidos, encontrándose estos en su forma libre o formando ciclos como en el caso de las ciclámidas, compuestos con puentes disulfuro (S-S), etc.

Como ejemplo de ciclopéptidos conteniendo puentes disulfuros, destacamos a las Malforminas, que son un grupo de ciclopentapéptidos aislados en 1958 a partir del hongo *Aspergillus niger*.<sup>1</sup> Estos compuestos inducen curvaturas en raíz y malformaciones en plantas (a lo que deben su nombre), pero además poseen actividad antibacteriana contra Gram-positivas y Gram-negativas, actividad fibrinolítica y actividad inhibidora en la mitosis celular.<sup>2</sup> Además, recientemente se ha descrito que la Mafomina C, presenta actividad antimalárica y antitripanosómica de CE<sub>50</sub>=70 y 1.6 ng/ml, respectivamente.<sup>3</sup> Estos compuestos tienen la particularidad de presentar un enlace di-sulfuro formado a partir de dos tioles de D-Cisteínas. Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Estructura de Malformina A1 y Malformina C.

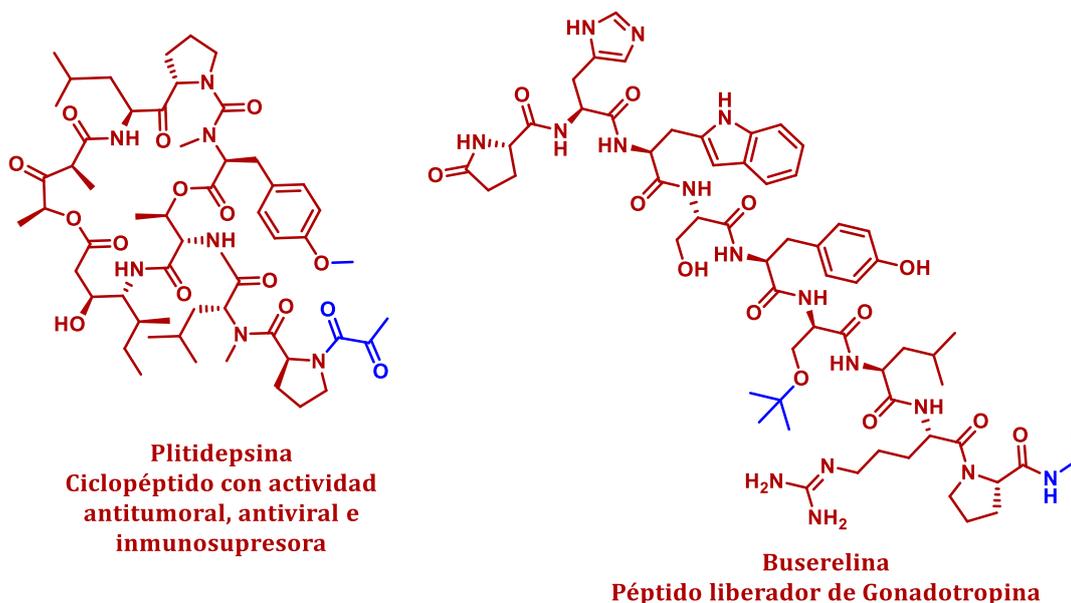
Por otro lado, en muchos fármacos de uso comercial se han mantenido algunos grupos protectores pequeños, dando buenos resultados, tanto para incrementar la

<sup>1</sup> a) Curtis, R. W. *Science* **1958**, *128*, 661. b) Curtis, R. W. *Plant Physiol.* **1958**, *33*, 17.

<sup>2</sup> Suda, S.; Curtis R. W. *Appl. Microbiol.* **1966**, *14*, 475. b) Koizumi, Y.; Hasumi K. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 78.

<sup>3</sup> Kojima, Y.; Sunazuka, T.; Nagai, K.; Julfakyan, K.; Fukuda, T.; Tomoda, H.; Omura, S. *J. Antibiot.*, **2008**, *61*, 297.

permeabilidad del compuesto como para disminuir su posible degradación enzimática, aumentando así su tiempo de permanencia en el organismo, Figura 4.2.<sup>4</sup> Los puentes disulfuros, aunque no son grupos protectores en sí mismos, pueden evitar degradaciones enzimáticas y le confieren distintas propiedades fisicoquímicas que podrían ser adecuadas para el desarrollo de un potencial fármaco.



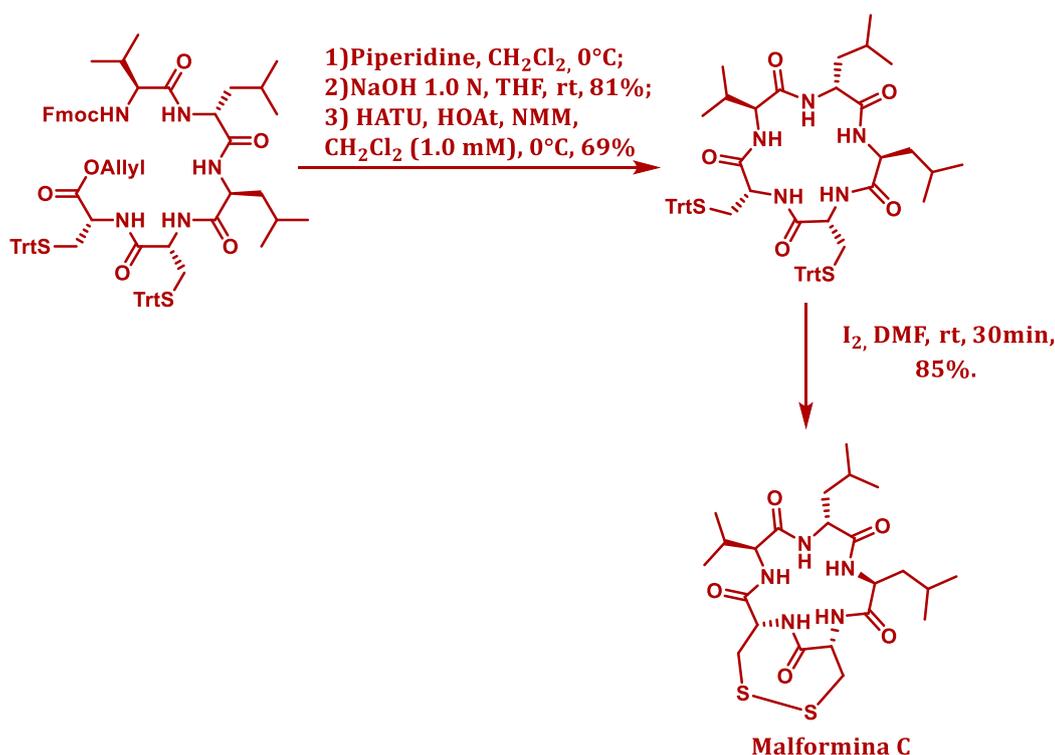
- Grupos protectores residuales

**Figura 4.2.** Fármacos peptídicos que mantienen grupos protectores pequeños.

Como ejemplo de síntesis de ciclopeptidos naturales conteniendo puentes disulfuro, destacamos la que ha sido reportada por Omura y colaboradores para la síntesis total en solución de la Malformina C, en cuyas etapas finales se realiza la macrociclación del pentapéptido seguida de la formación del puente di-sulfuro con rendimientos del 69% y de 85% respectivamente. Esquema 4.1. En esta síntesis, se utiliza I<sub>2</sub>/DMF, para realizar tanto la desprotección de los tioles de las Cisteínas como la oxidación de estos grupos. Este grupo posteriormente publicó la síntesis total en fase sólida para este compuesto, con el fin de reducir los tiempos, pero el rendimiento total se redujo a la mitad.<sup>5</sup>

<sup>4</sup> Jiménez, J. C.; Giralt, E.; Albericio, F.; *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, **2004**, 10.

<sup>5</sup> Kojima, Y.; Sunazuka, T.; Nagai, K.; Hirose, T.; Namatame, M.; Ishiyama, Aki.; Otoguro, K.; Omura, S.; *J. Antibiot.* **2002**, 62, 681.



**Esquema 4.1** Pasos finales para la síntesis de Malformina C presentado en el trabajo de Omura y colaboradores.<sup>3</sup>

Además del uso de I<sub>2</sub> como agente oxidante,<sup>6</sup> la formación de enlaces di-sulfuro ha sido ampliamente estudiada tanto en solución como en fase sólida. Para que tenga lugar esta reacción, es necesario un medio oxidante que puede ser dado por el uso de NCS,<sup>7</sup> NH<sub>3</sub>/MeOH, Buffer pH=8,<sup>8</sup> DMSO/H<sub>2</sub>O, etc. Aunque se ha visto que estos enlaces se pueden formar con mucha facilidad, incluso solo con la exposición al O<sub>2</sub> atmosférico, la reacción es muy dependiente de la estructura del compuesto, por lo que muchas veces se vuelve dificultosa. Se debe tener en cuenta además, para el uso de cualquiera de estos reactivos oxidantes en fase sólida, su compatibilidad con el conector y la unión al soporte sólido del compuesto a ser oxidado.

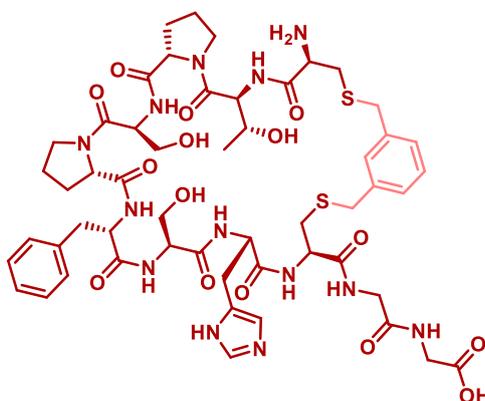
Por otro lado, además de este tipo de biclos que contienen puentes S-S, decidimos trabajar también con biclos donde los tioles de dos Cys se alquilen formando tioéteres. De esta manera se lograría tener otro tipo de estructuras más flexibles ya que el tamaño del nuevo ciclo formado dependerá de la cadena alquílica que una a los -S-. Esto fue inspirado

<sup>6</sup> Hartmann, A.; Eisler, H.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber P.; Rittel, W.; Kamber, K. *Helv. Chim. Acta*, **1980**, 63, 899.

<sup>7</sup> Postma, T. M.; Albericio, F. *Org. Lett.* **2013**, 15, 616.

<sup>8</sup> Benítez, M.; Tulla-Puche, J.; Paradís-Bas, M.; Werbitzky, O.; Giraud, M.; Albericio, F. *Pept. Sci.*, **2010**, 96, 69.

en los trabajos realizados en síntesis de macrociclos peptídicos conteniendo puentes disulfuro, como el TCP-1,<sup>9</sup> durante la pasantía realizada en el Parc Cientific de Barcelona, a cargo de la Dra. Miriam Royo Uno de los compuestos que se sintetizó en la misma fue el análogo B de TCP-1, de la figura 4.3.



Análogo B a TCP-1

Figura 4.3. Análogo B a TCP-1

En los últimos años se han aislado de cianobacterias, compuestos llamados ciclamidas, ejemplos de derivados de ciclopéptidos de menor peso molecular como la Hapalociclamida,<sup>10</sup> las Aeruciclamidas, y las Microciclamidas,<sup>11</sup> (Figura 4.4), que han demostrado poseer propiedades biológicas interesantes.<sup>12</sup> Gademann y colaboradores han aislado las aeruciclamidas A, B, C y D de las cianobacterias *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.<sup>13</sup> La Aeruciclamida B, muestra una actividad antiplasmodium interesante, con  $CE_{50} = 0.7 \mu M$  (*P. falciparum* K1 cepa resistente a la cloroquina). El metabolito predicho de *M. aeruginosa* PCC 7806,<sup>14</sup> muestra también una potente y selectiva actividad antimalárica de  $CE_{50} = 0.18 \mu M$  (*P.falciparum* K1).<sup>15</sup> Por otro lado la Aeruciclamida C es el más activo de este grupo contra *T. b. rhodesiense*,  $CE_{50} = 9.2 \mu M$ . Además, las aeruciclamidas y su análogo han mostrado una gran selectividad para estos parásitos, siendo no tóxicas frente a una

<sup>9</sup> Li, Z.; Ka Kei Wu, W.; Siu Man, S.; Yu, L.; Tao Li, H.; Ching Man Wong, C.; Chun Wu, Y.; Zhang, L.; Xiang Ren, S.; Gang Sun, X.; Ming Chan, K.; Hin Cho, C. *J. Control. Release.* **2010**, *148*, 292.

<sup>10</sup> Koodkaew, I.; Matsuyama, S.; Sunohara, Y.; Matsumoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 977.

<sup>11</sup> a) Portmann, C., Blom, J. F., Kaiser, M., Brun, R., Jüttner, F., Gademann, K. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1891. b) Raveh, A.; Moshe, S.; Evron, Z.; Flescher, E.; Carmeli, S. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2705.

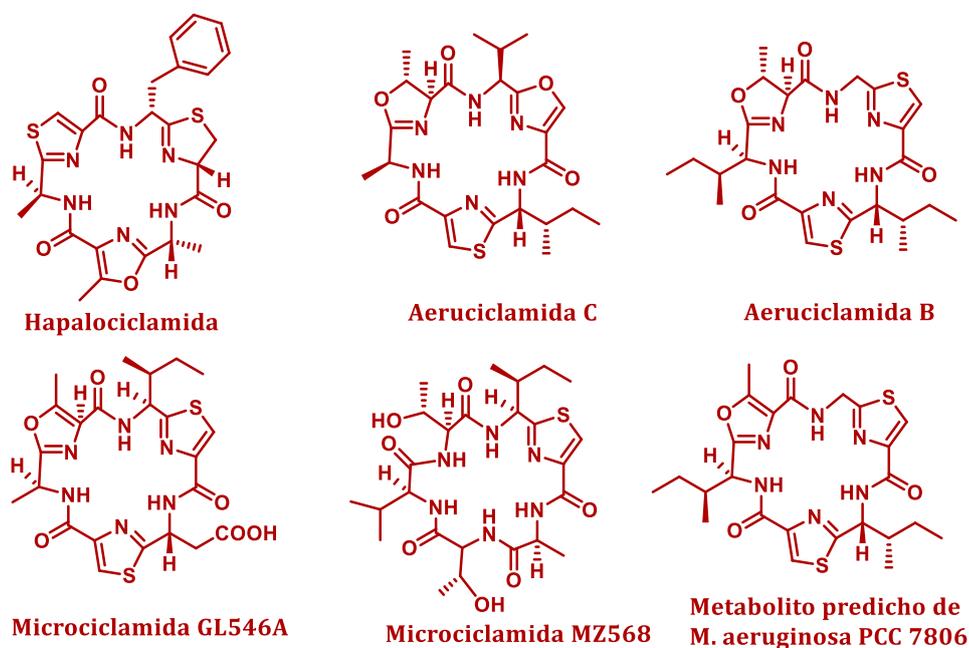
<sup>12</sup> a) Gademann, K.; Kobylinska, J. *Chem. Rec.*, **2009**, *9*, 187-198. b) Kaur, K.; Jain, M.; Kaur, T.; Jain, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3229.

<sup>13</sup> Portmann, C.; Blom, J. F.; Kaiser, M.; Brun, R.; Jüttner, F.; Gademann, K. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1891.

<sup>14</sup> Ziemert, N.; Ishida, K.; Quillardet, P.; Bouchier, C.; Hertweck, C.; Tandeau de Marsac, N.; Dittmann, E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 1791.

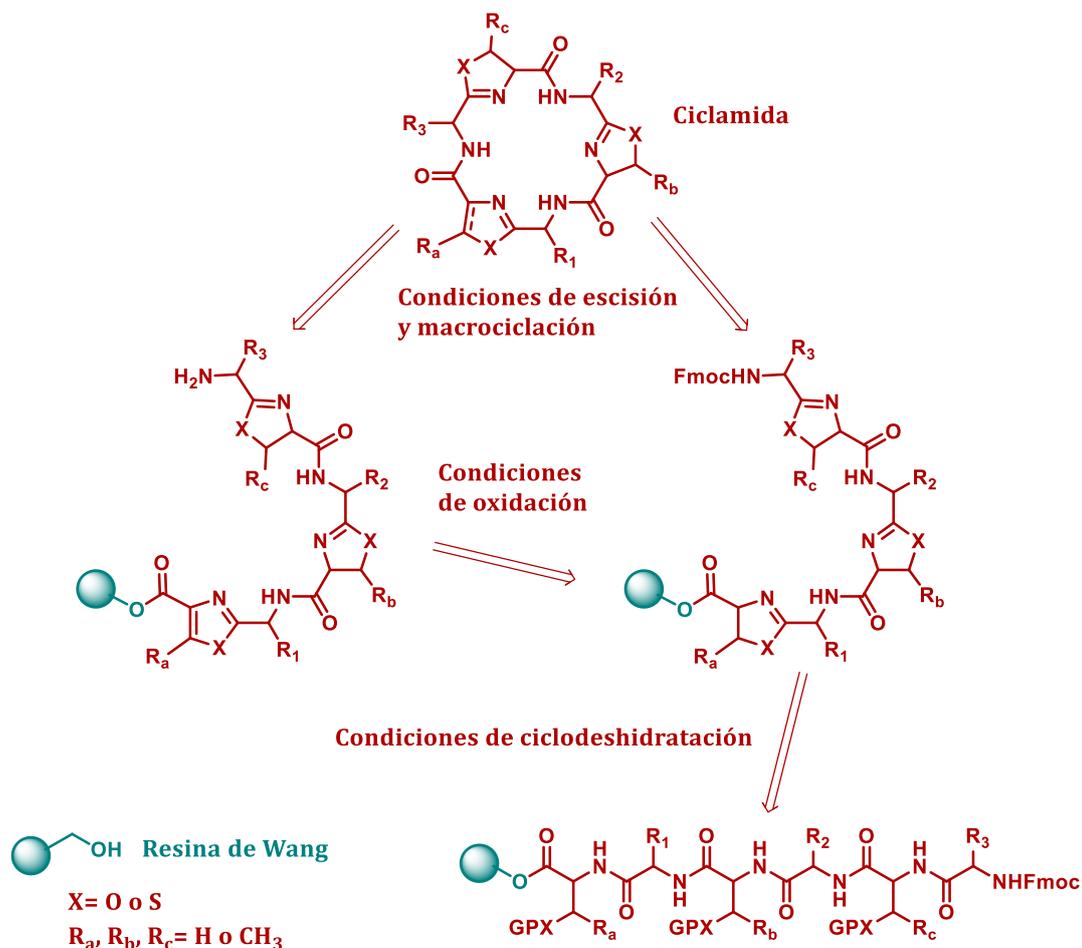
<sup>15</sup> Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Stewart, L.; Yardley, V.; Croft, S.; Serra, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*.

línea celular de mioblastos L6 de rata y macrófagos murinos. Nuestro grupo de trabajo, posee amplia experiencia en la síntesis de heterociclos en solución, por lo que nos propusimos en esta instancia el estudio de metodologías sintéticas que puedan utilizarse en fase sólida.



**Figura 4.4.** Estructura de ciclámidas biológicamente activas.

Existen diversas rutas sintéticas para la obtención de ciclámidas, pero en el presente trabajo, nos propusimos realizar la síntesis peptídica en fase sólida, y en la misma resina poder realizar las ciclodeshidrataciones, tratando de realizar la síntesis sin pasos de purificación y en menores tiempos. Esquema 4.2. Pero para poder embarcarnos en esto, es necesario como primer paso, el estudio de las metodologías de ciclodeshidratación en fase sólida.



**Esquema 4.2.** Esquema retrosintético para la obtención de Ciclamidas.

Con estos antecedentes y debido a que los macrociclos sintetizados hasta el momento en este trabajo poseen grupos protectores de gran tamaño, decidimos preparar algunos derivados de los mismos. Presentaremos aquí:

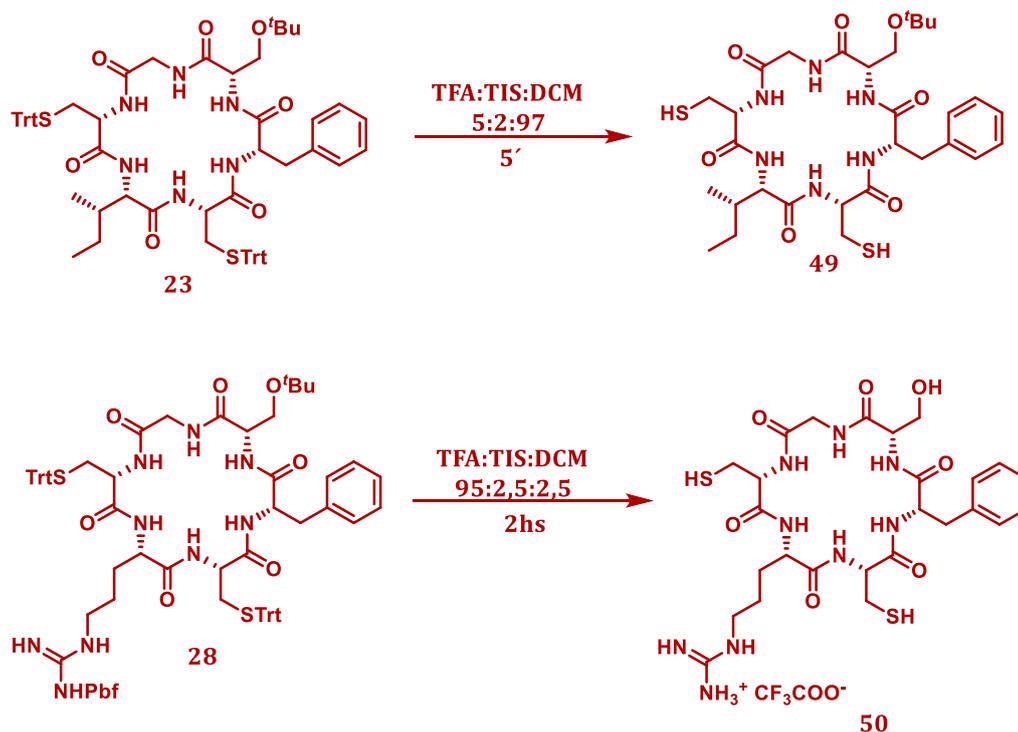
- 4.2.1 Preparación de derivados conteniendo grupos funcionales desprotegidos
- 4.2.2 Preparación de biclos conteniendo puentes disulfuros
- 4.2.3 Preparación de biclos conteniendo tioéteres.
- 4.2.4 Estudios de reacciones de ciclodeshidratación en fase sólida.

## 4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2.1 Preparación de derivados conteniendo grupos funcionales desprotegidos

Las primeras derivatizaciones que se realizaron, fueron la desprotección de las cadenas laterales de dos macrociclos sintetizados anteriormente. La idea de liberar los grupos polares de las cadenas laterales de estos compuestos, se basó en que las solubilidades en agua de los primeros, es muy limitada o nula, lo cual podría ser incompatible con su potencial función farmacológica. Para esto, se eligieron los compuestos **23** y **28**, escindiendo parte o todos los grupos protectores que presenta, dependiendo de las condiciones utilizadas. Esquema 4.3.

Como todos los grupos protectores presentes en estos ciclopéptidos, son ácido lábiles, se utilizó una solución de TFA para escindirlos. Se debe tener en cuenta, que estos grupos protectores, tienen distinta estabilidad a dichas condiciones, como se describe en el capítulo 2. Para la ruptura del enlace S-Trt es suficiente con un tratamiento de 5 minutos con una solución 5% de TFA, pero para la escisión del *t*-Bu sobre el hidroxilo, es necesario al menos un 10% de este ácido en tan corto tiempo de exposición. Esto permitiría realizar una desprotección selectiva de cada grupo. El compuesto **50** contiene todos los grupos de las cadenas laterales desprotegidos, debido a que se deseaba estudiar la incidencia en la actividad biológica del grupo guanidinio libre. Como la concentración de TFA necesaria para la escisión del Pbf es superior a la que necesitan los demás grupos protectores de la molécula, se obtuvo un compuesto completamente desprotegido. Una vez terminada la desprotección de ambos, el TFA se evapora, se agrega agua y se extraen los grupos protectores con DCM, quedándonos con el producto deseado en la fase acuosa. Posteriormente el agua es removida por evaporación a vacío.



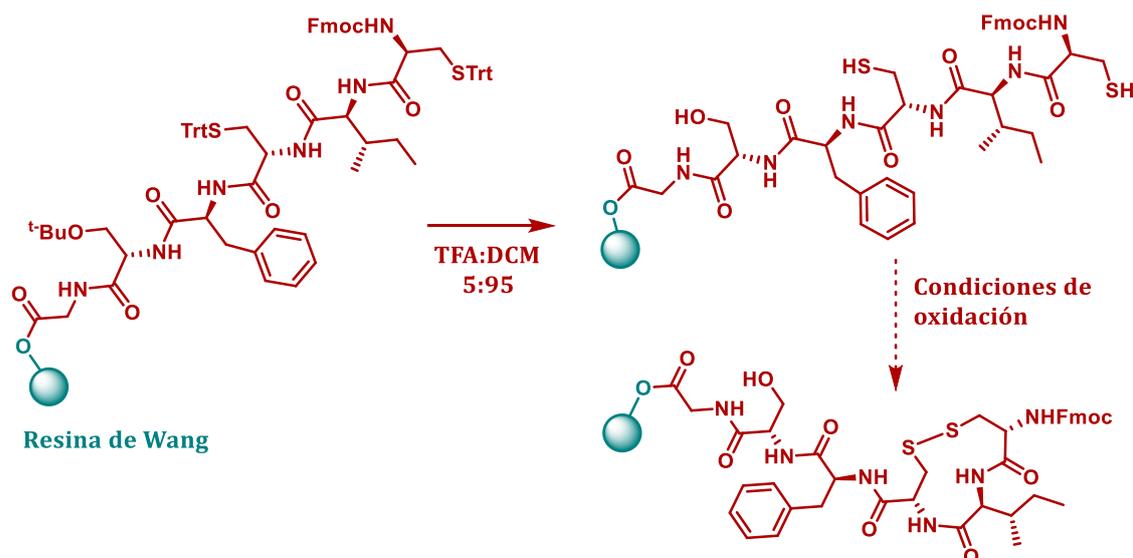
**Esquema 4.3.** Desprotección parcial o total de los grupos potencialmente reactivos de las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos.

#### 4.2.2 Preparación de biclos conteniendo puentes disulfuros

Posteriormente, nos embarcamos en sintetizar macrociclos peptídicos conteniendo un puente disulfuro en su estructura. Para este fin, se realizó un trabajo que demandó mucho tiempo de investigación, estudiando tanto oxidaciones en fase sólida como en solución.

##### Estudios en Fase Sólida

Se comenzó ensayando una metodología de formación del enlace disulfuro en fase sólida, entre los tioles de dos Cisteínas, tomando como modelo el péptido precursor del macrociclo **23**. Se realizó primero la síntesis de este hexapéptido en una resina de Wang para que fuera posible desproteger los tioles sin que tuviera lugar la escisión del péptido anclado a la resina. Una vez libres los grupos SH, se procedió a estudiar diferentes condiciones de oxidación. Esquema 4.4, Tabla 4.1.



**Esquema 4.4.** Síntesis de puentes disulfuro en un hexapéptido soportado en resina de Wang.

Entrada	Condiciones de reacción	Resultado
1	Buffer: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /guanidina 2 mM, pH=7. 75% Buffer, 20% DMF, DMSO 5%.	No se obtuvo el producto oxidado.
2	N-Cloro Succinimida (NCS) (2 eq), DMF	Se descompuso la muestra
3	I <sub>2</sub> /DCM	No se logró aislar el producto

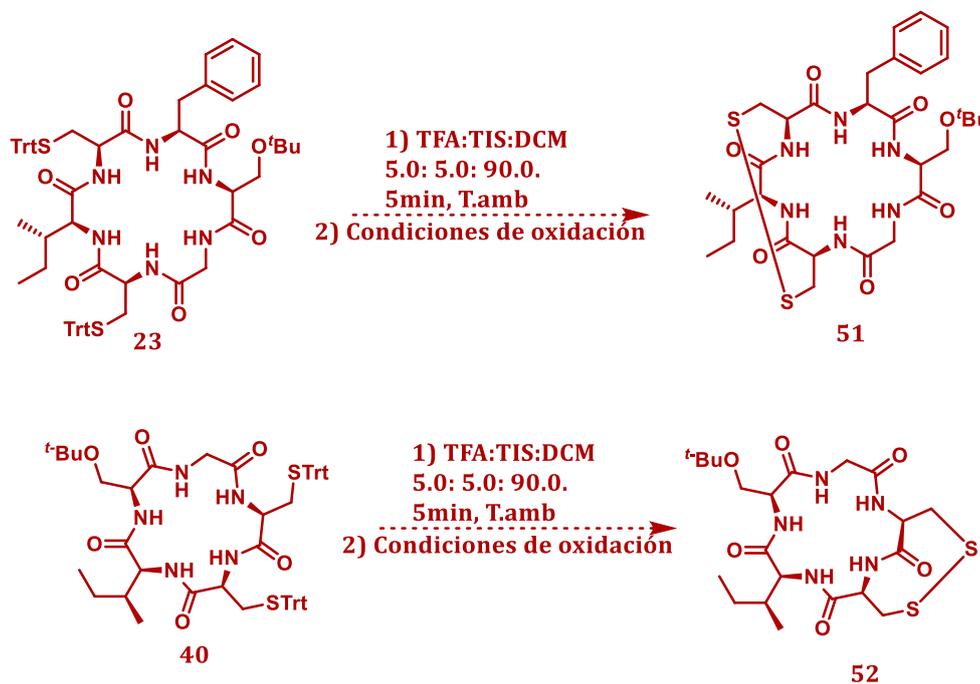
**Tabla 4.1.** Condiciones de oxidación ensayadas en hexapéptido soportado en resina de Wang.

Debido a los malos y poco concluyentes resultados, se probó realizar las mismas reacciones sobre un sustrato más pequeño, el tripéptido *L*-Cys-*L*-Ile-*L*-Cys con el fin de disminuir los factores que puedan afectar la formación del enlace S-S, pero lamentablemente se obtuvieron resultados similares.

### Estudios en Solución

Dado el poco éxito obtenido en fase sólida, se comenzó el estudio de este proceso de oxidación en solución, realizando las diferentes pruebas sobre el macrociclo ya formado. Esquema 4.5. Para esto, a partir de los compuestos **23** y **40**, se probaron las condiciones ya utilizadas, con el fin de evaluar si la distancia que presentan las cisteínas entre sí influye en

la formación del enlace di-sulfuro. Lamentablemente, en ninguno de los casos se obtuvieron buenos resultados. Tabla 4.2.



**Esquema 4.5.** Síntesis de puentes di-sulfuro en ciclopéptidos en solución.

Entrada	Condiciones de reacción	Resultado para 23 y 40
1	Buffer: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /guanidina, 2 mM, pH=7. 75% Buffer, 20% DMF, DMSO 5%. 10 mM	Se obtuvo el reactivo
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / MeOH	No se obtuvo el producto
3	I <sub>2</sub> /DCM	No se logró aislar el producto

**Tabla 4.2.** Condiciones de oxidación ensayadas sobre ciclopéptidos en solución.

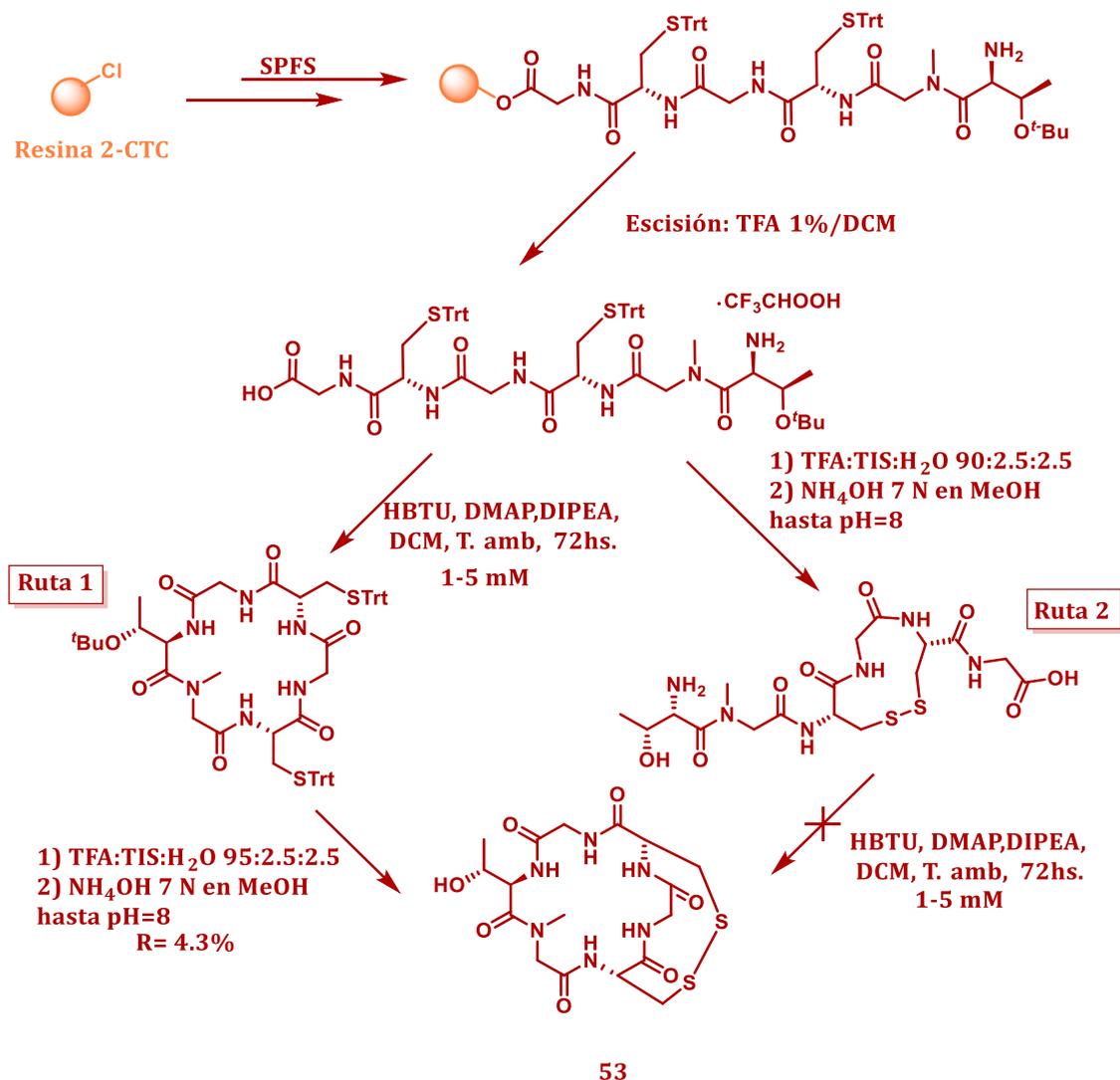
Es necesario resaltar algunos de los aspectos que limitaron el desarrollo de esta metodología y que podrían explicar los resultados poco concluyentes obtenidos. En primer lugar, el seguimiento de todas las reacciones en fase sólida, se ha realizado por HPLC, equipado con un detector UV, y si bien, el enlace amida tiene un máximo de absorción cercano a 220 nm, la absorptividad que presentan los compuestos es baja, por lo que se necesitan concentraciones altas para su detección. Por este motivo se hizo difícil el seguimiento de estas reacciones una vez que los reactivos perdieron los grupos Trt. Otro de los aspectos, es que la determinación por RMN de una muestra compleja como estas, se

vuelve muy difícil. La desprotección de los tioles y la formación del puente disulfuro, se puede comprobar por el desplazamiento de los C $\beta$  pertenecientes a las Cys en el  $^{13}\text{C}$ -RMN, pero en los crudos de reacción, estas señales a veces no se logran visualizar con claridad.

El último de los problemas que debemos considerar, es la dificultad en la purificación. Estos compuestos en cromatografía de fase normal, quedan muy retenidos en la columna, lo que hace muy complicada su purificación por este método y, en fase reversa acoplada a un detector UV, no es posible verlos a las concentraciones de trabajo.

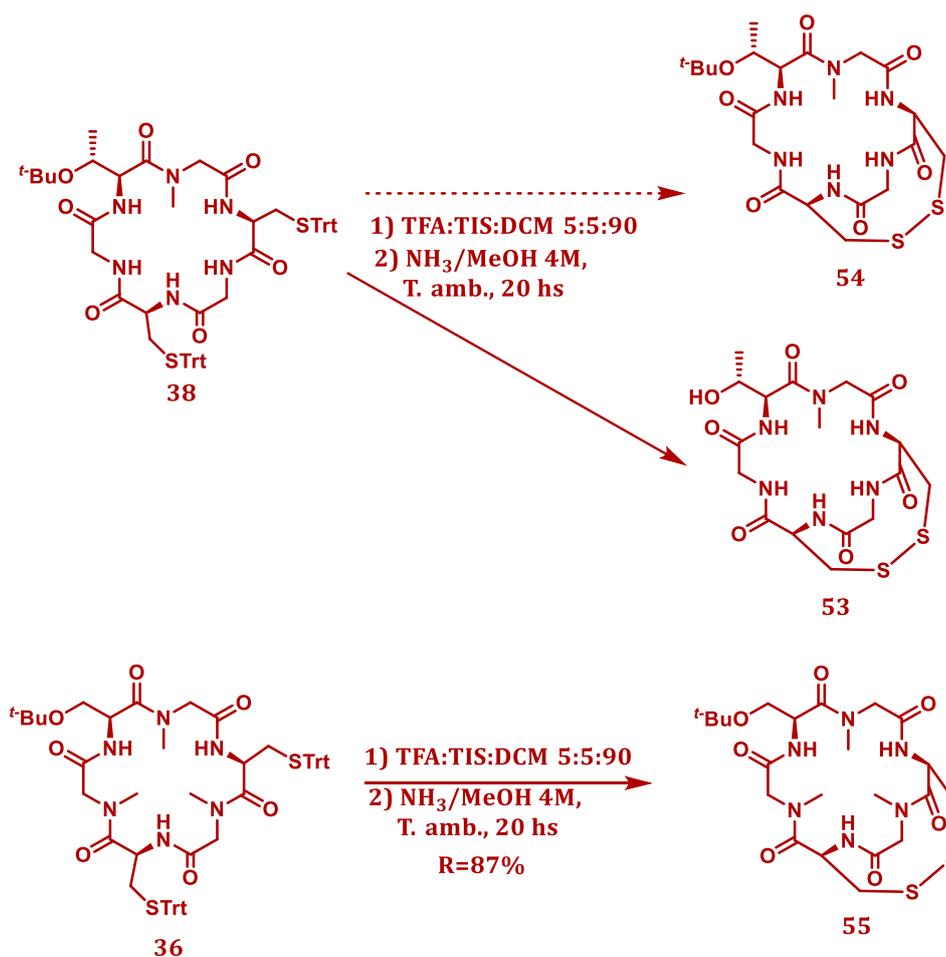
Para el estudio de esta reacción, consideramos fundamental contar con un espectrofotómetro de masas como detector, por este motivo y dada la amplia experiencia del grupo de Barcelona, se realizó una pasantía en el Parc Científic. En esta instancia se estudiaron dos rutas sintéticas para la obtención del compuesto **53**, partiendo en los dos casos del hexapéptido **17** sintetizado sobre una resina 2-CTC. Una vez escindido de la resina, por un lado se macrocicló y luego se procedió a su oxidación (ruta 1) y por el otro se desprotegeron sus tioles y luego se intentó formar el macrociclo **53** (ruta 2). Por esta última, se observó la formación del puente disulfuro, pero no la macrociclación posterior. Esquema 4.6. Sin embargo, utilizando la ruta 1, fue posible obtener el biciclo deseado aunque, el rendimiento sin optimizar de las 2 reacciones involucradas fue de un 4.3%, purificando solamente el producto final. Uno de los principales problemas en esta reacción, fue la muy mala solubilidad del crudo, que hizo muy larga y tediosa la purificación.

La determinación estructural de los compuestos obtenidos se realizó por HPLC-MS. Luego, el producto **53** se purificó por HPLC-MS preparativo, con una columna C18 (100 mm x 19 mm x 5 $\mu\text{m}$ ) XSelect CSM<sup>TM</sup> con un gradiente de 5 a 16% de MeCN en Agua, de 0-8 minutos.



**Esquema 4.6.** Rutas para la síntesis de macrociclo hexapeptídido con puente di-sulfuro.

Una vez establecida una metodología efectiva para la formación de estos enlaces en este tipo de compuestos macrocíclicos, pese al bajo rendimiento total, se trató de realizar esta reacción a partir del mismo compuesto para dar lugar a un producto que mantenga el grupo protector sobre el residuo de Treonina (54) y también partiendo del compuesto 36, Esquema 4.7. Observando el HRMS para la reacción de formación del compuesto 54, se encontró un producto cuya estructura correspondería al del 53 (sin el *t*-Bu) y otro que podría corresponder a un dímero de dos ciclos unidos por puentes disulfuro. Figura 4.5. Sin embargo utilizando las mismas condiciones de reacción sobre 36, se obtuvo el compuesto 55 deseado.



**Esquema 4.7.** Síntesis de los compuestos **54** y **55** manteniendo el grupo *t*-Bu sobre el grupo OH presente.

Para ambos productos, debido a que se parte del macrociclo puro, la única impureza que puede estar presente al final de la reacción, son restos de Trt hidrofóbicos. Como el producto oxidado es bastante hidrofílico, el crudo de reacción se lavó varias veces con hexano, lo que permitió retirar las impurezas del medio. Se determinó la formación de estos compuestos por HRMS.

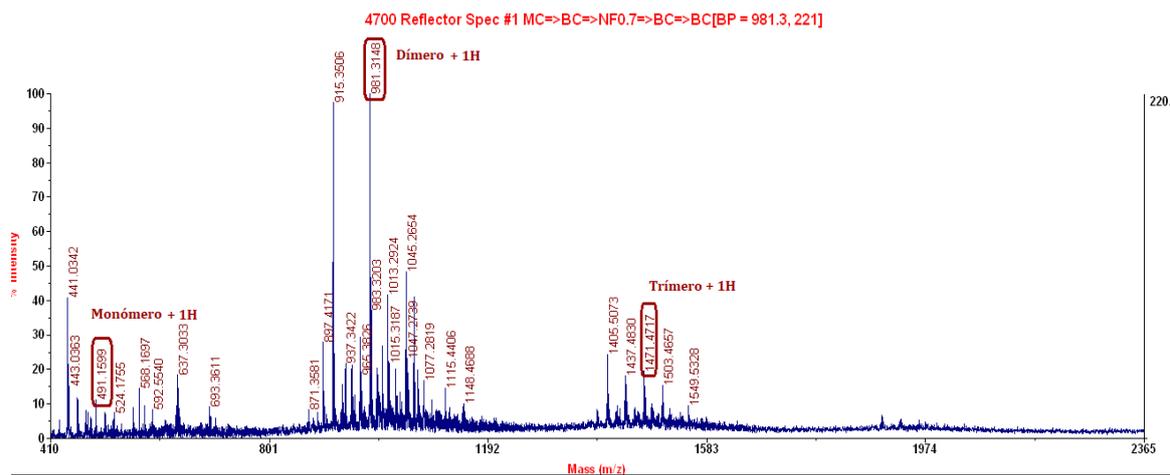
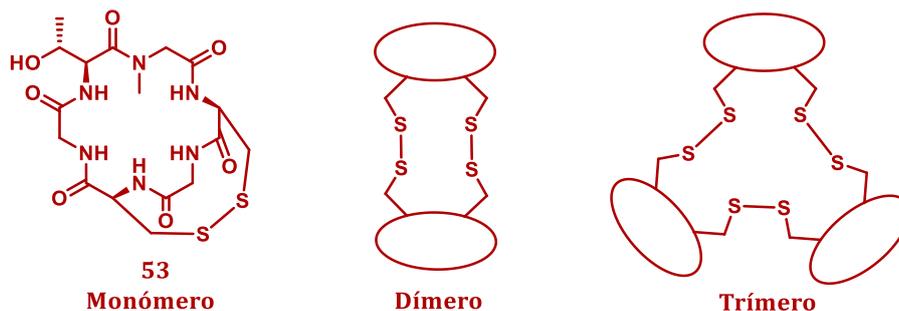


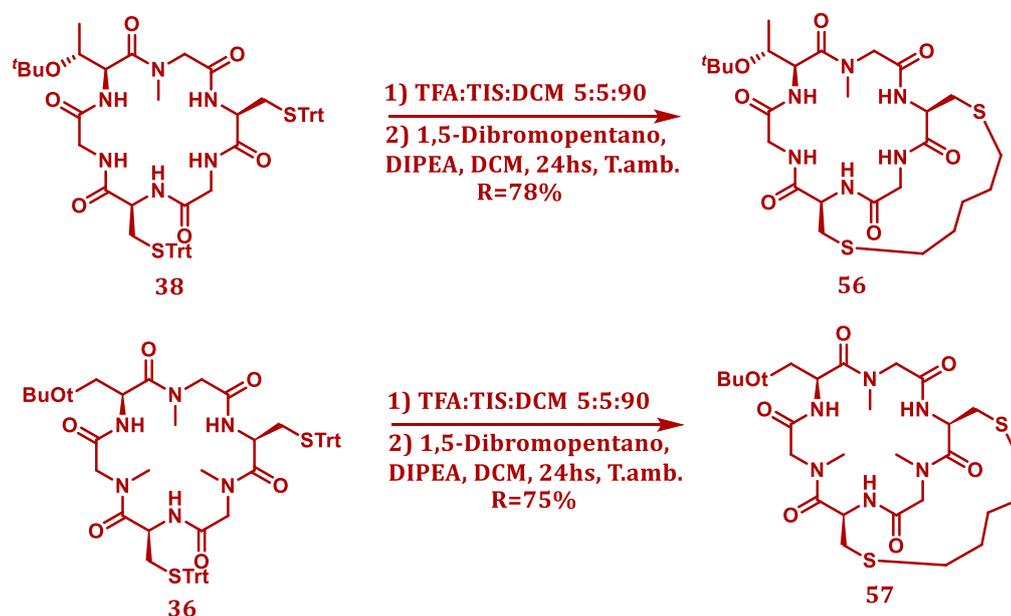
Figura 4.5. Espectro de masas de crudo para obtención de 54.

### 4.2.3. Preparación de biclos conteniendo tioéteres.

Considerando la labilidad de los enlaces disulfuro en medios biológicos, se pensó en preparar otros derivados que puedan mantener la rigidez que presentan los biclos. Estos compuestos además cumplirían con el objetivo de presentar un peso molecular menor que los macrociclos que contienen grupos protectores voluminosos.

Para esto, se formó un enlace tioéter entre los grupos tioles desprotegidos y una cadena alquílica utilizando 1,5-dibromopentano. Se desprotegieron los macrociclos en condiciones selectivas, dejando sus grupos -SH libres, y con el posterior agregado de una base se acopló la cadena alquílica mediante una sustitución nucleofílica en condiciones diluidas (5 mM) durante 20hs, Esquema 4.8. Para ambos casos la base presente en el medio de reacción se eliminó por una extracción en medio ácido. Las fases orgánicas, una vez concentradas, se purificaron con una pequeña porción de sílica (percolado) eliminando

grupos protectores y reactivos del medio. También en estos casos se determinó su formación por HRMS.



**Esquema 4.8.** Síntesis de los derivados **56** y **57** manteniendo el grupo  $t\text{Bu}$  sobre el grupo OH presente.

#### 4.2.4 Estudios de reacciones de ciclodeshidratación en fase sólida.

##### 4.2.4.1. Formación de tiazolinas en resina de Wang

Partiendo del dipéptido Fmoc-*L*-Ile-*L*-Cys(Trt) soportado en la resina de Wang, sintetizado según se indicó en el capítulo 2, se estudió la formación de tiazolinas mediante el uso de la metodología de Kelly,<sup>16</sup> que utiliza  $\text{Ph}_3\text{PO}/\text{Tf}_2\text{O}$  como agentes ciclodeshidratantes. Esta metodología, fue utilizada previamente por nosotros en solución, con reactivos similares obteniéndose buenos resultados. Uno de los principales motivos de interés para el estudio de esta reacción en fase sólida, es el hecho de que tiene como producto de desecho  $\text{Ph}_3\text{PO}$ , el cual es muy difícil de separar de nuestros productos de interés por columna cromatográfica en fase normal.

Esta reacción se realiza sobre el tiol del residuo de Cisteína protegido con Trt, ya que durante el transcurso de la misma, se produce la liberación del grupo protector con formación de un aducto con el ácido trifílico del medio. Es importante para el éxito de la

<sup>16</sup> a) You, S.; Razavi, H.; Kelly, J. W. *Angew Chem*, **2003**, 42, 83. b) Fagundez, C.; Serra, G. *Heterocyclic Lett.* **2013**, 3, 415.

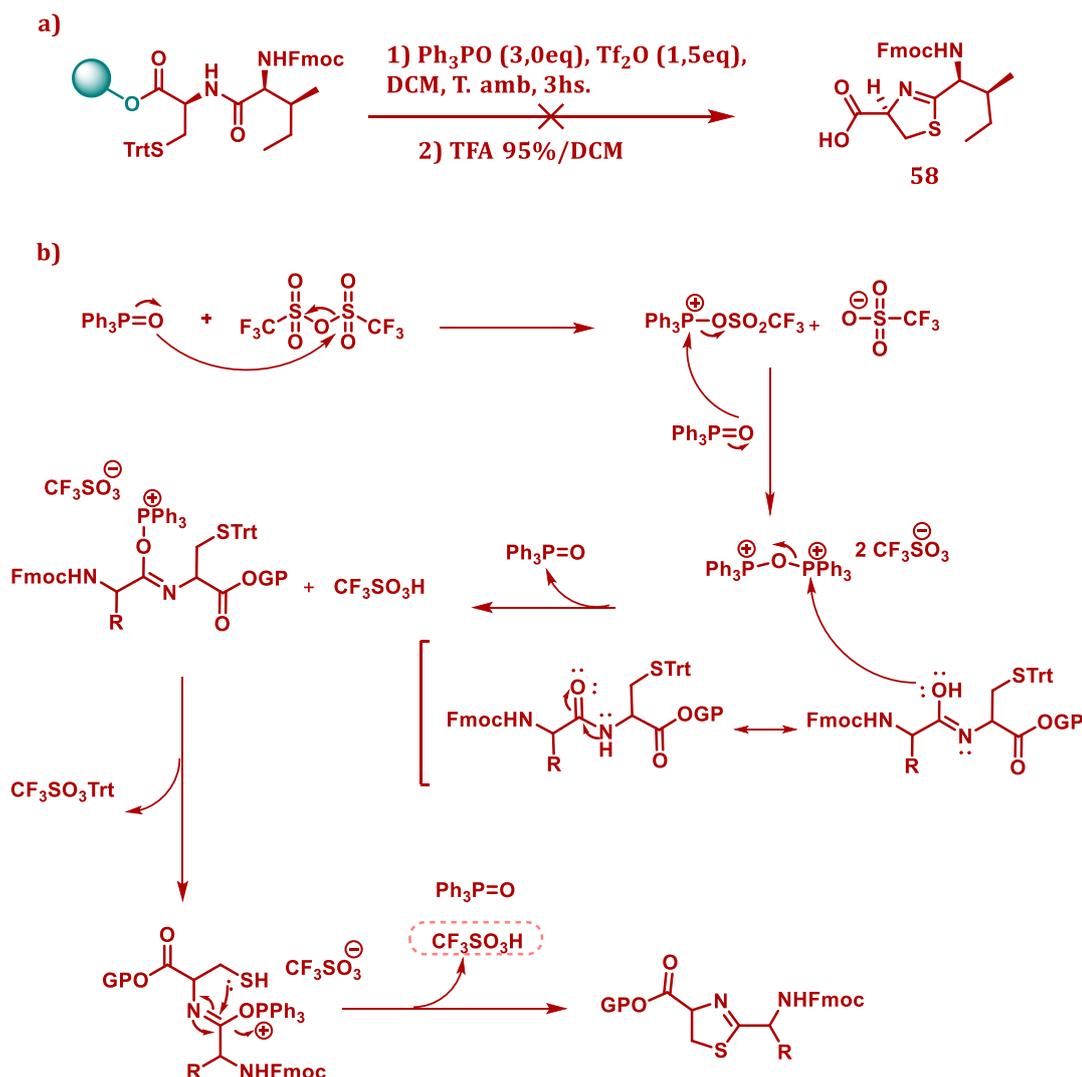
misma, la pre-activación del reactivo ciclodeshidratante, como muestra el mecanismo en el Esquema 4.9.

En este estudio, se fueron variando condiciones de reacción. En primer lugar se utilizaron, sistemas abiertos al aire, después en atmósfera inerte y por último cambiando el orden de agregado de reactivos. En todos los casos se observó que el producto anclado a la resina, era escindido durante este proceso, por lo que esta metodología no resultó adecuada para el fin deseado.

Simultáneamente, se sintetizó el hexapéptido  $\text{NH}_2\text{-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-OH}$ , con el fin de realizar luego tres ciclodeshidrataciones simultáneas en fase sólida tal como fue publicado por Kessler.<sup>17</sup> Las condiciones de Kessler, eran las mismas a las que utilizamos previamente para el dipéptido, por lo que, dado los resultados negativos obtenidos, no se realizó la reacción para este sustrato.

---

<sup>17</sup> Biron, E.; Chatterjee, J.; Kessler, H. *Org. Lett.* **2006**, 8, 2417.

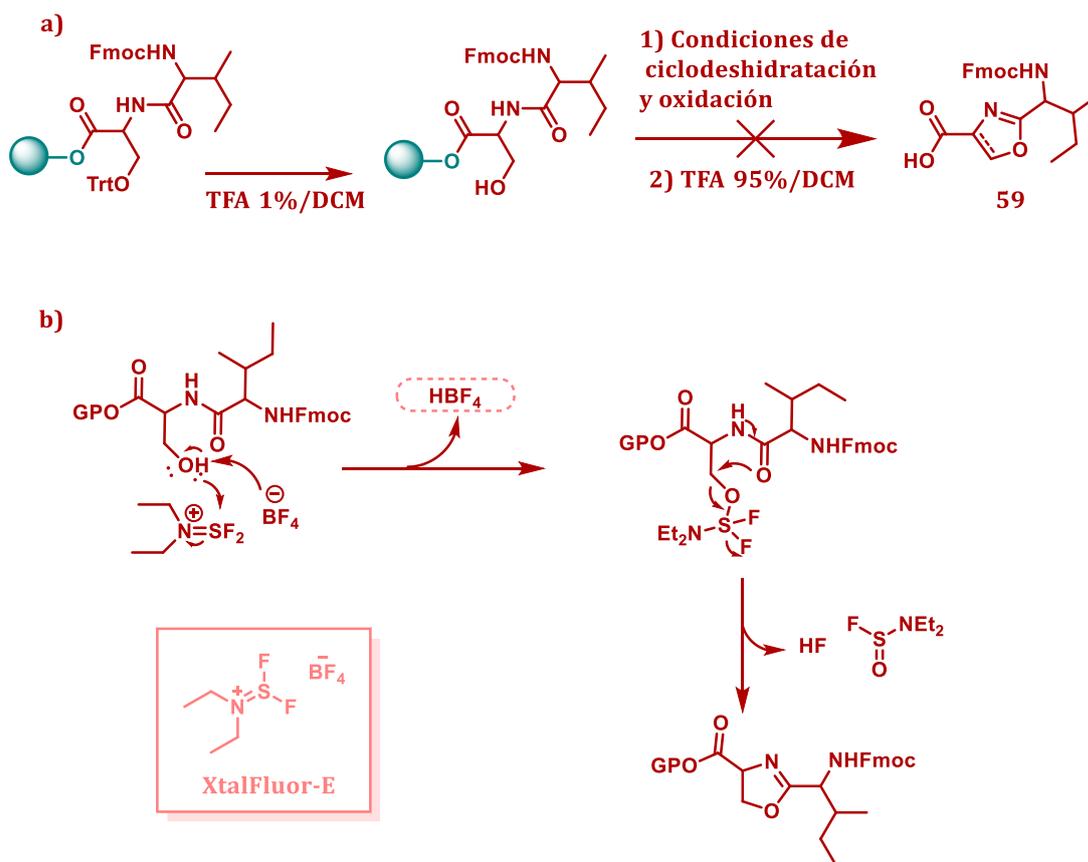


**Esquema 4.9.** a) Reacción de ciclodeshidratación utilizando  $\text{Ph}_3\text{PO}/\text{Tf}_2\text{O}$ , para formación de una tiazolina. b) Mecanismo propuesto para la reacción anterior.

#### 4.2.4.2. Formación de oxazolinas y oxazoles en resina de Wang

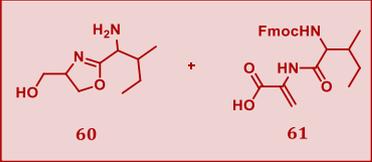
Por otro lado, se sintetizó el dipéptido  $\text{NH}_2$ -L-Ile-L-Ser(Trt)-OH manteniéndolo unido a la resina de Wang, sobre el cual se estudió la metodología de ciclodeshidratación utilizando XTalFluor-E, un agente fluorante que en las condiciones de reacción podría permitir la formación de oxazolinas a partir de  $\beta$ -hidroxiamidas, lo cual ya ha sido reportado en solución.<sup>18</sup> Esquema 4.10, Tabla 4.3.

<sup>18</sup> Beaulieu, F.; Beauregard, L.; Courchesne, G.; Couturier, M.; LaFlamme, F.; L'Herreux, A.; *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5050.



**Esquema 4.10.** a) Reacción de ciclodeshidratación utilizando XtalFluor-E, para formación de una oxazolina. b) Mecanismo propuesto para la reacción anterior.

Para que se dé esta reacción, es necesario solo el agente fluorante y el dipéptido como reactivos. Pero durante el progreso de la misma, se libera ácido fluorobórico, y siendo la resina utilizada, del tipo ácido lábil, se pensó agregarle una base al medio de reacción para neutralizar el medio y evitar la posible escisión de la resina. Esquema 4.10. En ninguna de estas condiciones de reacción (entradas 1 y 2 de la tabla 4.3), se observó la formación del producto deseado ni pérdida de masa, y cuando se agrega la base se observa la formación de un producto secundario de eliminación (**61**), por lo que se decidió continuar con pruebas sin el agregado de base. El cambio que se realizó en las reacciones subsiguientes fue disminuir la concentración de XTalFluor-E en el medio, para disminuir también la concentración del HBF $_4$  formado.

Entrada	Condiciones de ciclodeshidratación	Condiciones de oxidación	Resultado
1	XtalFluor-E (2,0 eq, 200 mM), DCM, atm de N <sub>2</sub> , T. amb, 3hs.	-	No se formó oxazolina. Se recupera el reactivo.
2	XtalFluor-E (2,0 eq, 200 mM), DIPEA (2,0 eq), DCM, atm de N <sub>2</sub> , T. amb, 1h.	-	No se formó oxazolina. Se recupera el reactivo y producto de eliminación <b>61</b>
3	XtalFluor-E (2,0 eq, 90 mM), DCM, atm de N <sub>2</sub> , T. amb, 1h.	-	No se formó oxazolina. Se recupera el reactivo.
4	XtalFluor-E (3,0 eq, 90 mM), DCM, atm de N <sub>2</sub> , T. amb, 45min	-	No se formó oxazolina. Se recupera el reactivo.
5	XtalFluor-E (2,0 eq, 90 mM), DCM, atm de N <sub>2</sub> , T. amb, 45min.	DBU (2,6 eq) , BrCCl <sub>3</sub> (2,2 eq), DCM, 24h, T. amb.	No se forma el oxazol, no se observa formación de ciclos.
6	XtalFluor-E (3,0 eq, 90 mM), DCM, atm de N <sub>2</sub> , T. amb, 45min.	DBU(5,5 eq), BrCCl <sub>3</sub> (5,0 eq), DCM, 24h, T. amb.	No se forma el oxazol 

**Tabla 4.3.** Condiciones ensayadas para la formación de oxazolinas y oxazoles en resina de Wang.

Como no se obtuvieron resultados positivos en los primeros intentos, tomando en cuenta la poca estabilidad a condiciones ácidas presentada generalmente por las oxazolinas, se pensó que el problema podría ser la degradación del producto en la etapa de escisión de la resina. Por este motivo, se probó realizar la oxidación inmediatamente después del lavado de la resina de las condiciones de ciclodeshidratación, ya que los respectivos oxazoles podrían resistir mejor las condiciones ácidas. En este caso, tampoco se obtuvieron los resultados deseados, con ninguna de las condiciones analizadas, aunque se pudieron observar algunos productos secundarios que no son útiles para el objetivo final del trabajo. Pero, si se observó la formación de un heterociclo (**60**) y el producto de eliminación (**61**), ambos sin el grupo protector del extremo N-terminal Fmoc. El grupo Fmoc, se escinde en presencia de DBU como base, como se comentó en el capítulo 2, además ésta base permitiría la formación de **61**. En estas condiciones de reacción, no se

observó escisión del péptido de la resina, como se había dado para la metodología de formación de tiazolinas estudiada.

## 4.3 CONCLUSIONES

Se sintetizaron macrociclos peptídicos sin grupos protectores voluminosos, algunos de ellos son estructuras bicíclicas, conteniendo enlaces di-sulfuro y con derivatizaciones alquílicas sobre los tioles residuales de las Cisteínas. Los rendimientos obtenidos fueron de moderados a bajos, típicos de los que se describen en bibliografía cuando se realizan reacciones sobre compuestos rígidos.

Contar con el instrumental necesario para la determinación estructural de estos compuestos, es fundamental dado que en caso contrario se hace muy dificultosa su identificación. Este último escenario fue el principal problema encontrado en el estudio de estas metodologías en nuestro laboratorio.

A partir de péptidos soportados en la resina de Wang, se estudiaron reacciones de ciclodeshidratación, tanto para la síntesis de tiazolinas como oxazolinas/oxazoles. Para la obtención de tiazolinas utilizando  $\text{Ph}_3\text{PO}/\text{Tf}_2\text{O}$ , el péptido se escindió de la resina, por lo que estas condiciones de reacción no son adecuadas para utilizar con esta resina, pese a lo reportado por Kessler y colaboradores. Por otro lado, para la obtención de oxazolinas y oxazoles, no se logró obtener el producto deseado, aunque la unión del péptido a la resina soportó, al menos parcialmente, las condiciones de reacción, aislando productos secundarios.



## 4.4 PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando placas de sílica gel sobre plástico de 0.20 mm de espesor (Macherey-Nagel, Polygram®, silG/UV 254 nm) y revelado con lámpara UV a 254 nm, vapores de yodo, spray de ninhidrina o fosfomolibdico.

Diclorometano seco se obtuvo de CaH<sub>2</sub>.<sup>19</sup> Los solventes utilizados en fase sólida, son de calidad HPLC.

La cromatografía en columna se realizaron utilizando Sílica gel 60 (J.T. Baker, 40 μm diámetro promedio de partícula).

Los espectros de RMN (<sup>1</sup>H NMR y <sup>13</sup>C NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químico se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa micro QTOF-G (Bruker Daltonics) mediante ionización de electrospray y LTQ-FT Ultra (NanoESI) (Thermo Scientific).

HPLC analítico Shimadzu (LC-10AT Pump) equipado con una columna Waters μBondapak™ C18 (150 x 4.6 mm, 5μm) y un detector SPD20A Prominence UV/Vis. La purificación en por HPLC semi-preparativo se realizó con el mismo equipo equipado con un columna Phenomenex Luna<sup>R</sup> C18 (250 x 10 mm, 5μm). En el Parc Científico de Barcelona se purificó por HPLC-MS preparativo, con una columna C18 (100mm x 19mmx 5μm) XSelect CSM™ con un gradiente de 5 a 16% de MeCN en Agua, de 0-8minutos.

### 4.4.1 Procedimiento general para la desprotección de S-Trt.

A una alícuota del compuesto de interés, se adicionó una solución TFA:TIS:DCM (5:5:90). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación hasta que la solución virara de color amarillo a incoloro. Luego se agregó MeOH y se evaporó la mezcla a vacío.

---

<sup>19</sup> Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3<sup>th</sup> Ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.

#### **4.4.2 Procedimiento general para la escisión de todos los grupos protectores ácido lábil.**

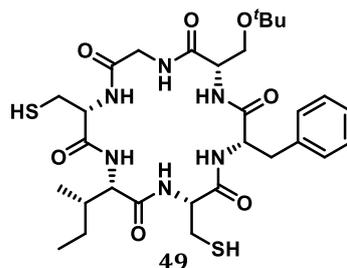
A una alícuota del compuesto de interés, se adicionó una solución TFA:TIS:DCM o H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación hasta desaparición del reactivo por TLC. Luego se evaporaron los solventes a vacío.

#### **4.4.3 Procedimiento general para la macrociclación en solución.**

A una solución/suspensión del péptido en DCM seco (1-10 mM), se le agregó DIPEA (3 eq.), seguido de HBTU o HATU (1.5 eq.) y 4-DMAP (catalítico). Se mantuvo la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 1-3 días. El disolvente se evaporó a vacío. El crudo de reacción, se suspendió en AcOEt, se lavó con HCl 5% y luego con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> en agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío.

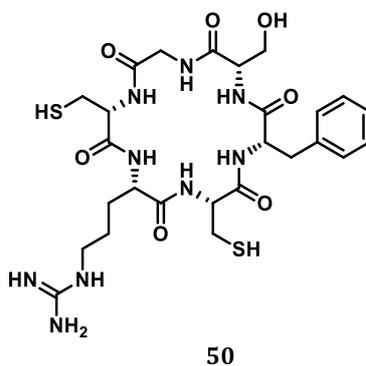
#### **4.4.4 Procedimiento general para la síntesis de puentes disulfuro.**

A una alícuota del compuesto de interés, se adicionó una solución NH<sub>3</sub>/MeOH 7N, controlando que en el transcurso de la reacción mantenga el pH=8 y que la concentración de la solución sea al menos 5 mM. Se dejó reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 20 hs. Luego se evaporaron los solventes a vacío.



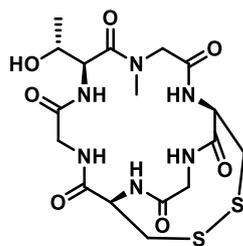
**Ciclo-L-Cys-L-Ile-L-Cys-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu)-Gly (49):** A partir del *Ciclo-L-Cys*(Trt)-*L-Ile-L-Cys*(Trt)-*L-Phe-L-Ser*(*t*-Bu)-Gly (80 mg, 0.069 mmol), la reacción de desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general 4.4.1. Al crudo obtenido se le realizó un percolado para retirar el Trt presente en el medio y se obtuvo el macrociclo deseado (22 mg, 0.033 mmol) con un rendimiento crudo del 48%.

Sólido blanco (48%). **HRMS**  $m/z$  calc. para  $C_{30}H_{46}N_6O_7S_2$  ( $[M+Na]^+$ ) 689.2767, found 689.2602.



**Ciclo-L-Cys-L-Arg-L-Cys-L-Phe-L-Ser-Gly (50):** A partir del *Ciclo-L-Cys*(Trt)-*L-Arg*(Pbf)-*L-Cys*(Trt)-*L-Phe-L-Ser*(*t*-Bu)-Gly (15 mg, 0.010 mmol). La reacción de desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general 4.4.2 utilizando DCM. El crudo se retomó en HCl 5% y se lavó con DCM, quedándonos con la solución acuosa. Esta última se evaporó a vacío y se obtuvo el macrociclo deseado (5 mg, 0.0076 mmol) con un rendimiento crudo del 77%.

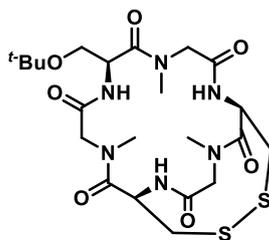
Sólido blanco (77%). **HRMS**  $m/z$  calc. para  $C_{26}H_{39}N_9O_7S_2$



53

**Disulfuro cíclico (3→5) de *Ciclo-[L-Thr-NMe-Gly-L-Cys-Gly-L-Cys-Gly]* (53):** La reacción de macrociclación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general 4.4.3 utilizando HBTU como agente acoplante (5 mM de dilución, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato  $\text{NH}_2\text{-L-Thr}(t\text{-Bu})\text{-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-OH}$  (170 mg, 0,163 mmol). La reacción de desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general 4.4.2 utilizando  $\text{H}_2\text{O}$  a partir del *Ciclo-L-Thr}(t\text{-Bu})\text{-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly}. El crudo obtenido se retomó en una solución de  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$  7N, siguiendo el procedimiento general para la formación de puentes disulfuro 4.4.4. La purificación se realizó por HPLC-MS preparativo. Se obtuvo el macrociclo deseado (3.2 mg, 0.0065 mmol) con un rendimiento del 4%.*

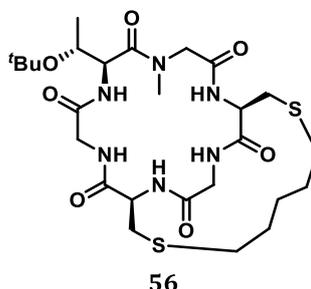
Sólido amarillo (4%). **HRMS**  $m/z$  calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 491.1304, found 491.1599.



55

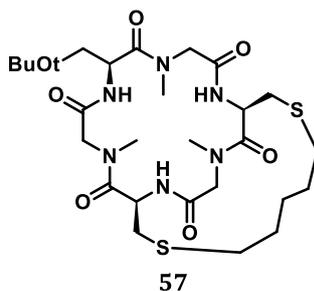
**Disulfuro cíclico (2→6) de *Ciclo-[NMe-Gly-L-Cys-NMe-Gly-L-Ser}(t\text{-Bu})\text{-NMe-Gly-L-Cys]-* (55):** La reacción de desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general 4.4.1 a partir del *Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser}(t\text{-Bu})\text{-NMe-Gly-L-Cys(Trt)} (60 mg, 0.057 mmol). El crudo obtenido se retomó en una solución de  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$  7N, siguiendo el procedimiento general para la formación de puentes disulfuro 4.4.4. El crudo obtenido se lavó exhaustivamente con hexano. Se obtuvo el macrociclo deseado (28 mg, 0.050 mmol) con un rendimiento crudo del 87%.*

Sólido blanco (87%). **HRMS**  $m/z$  calc. para  $C_{22}H_{36}N_6O_7S_2$  ( $[M+Na]^+$ ) 583.1979, found 583.1976.



**(1R,7S,13R)-7-((R)-1-(tert-butoxy)ethyl)-5-methyl-15,21-dithia-2,5,8,11,24,27-hexaazabicyclo[11.9.5]heptacosane-3,6,9,12,23,26-hexaone (56)**: La reacción de desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general 4.4.1 a partir del *Ciclo-L-Thr*(*t*-Bu)-NMe-Gly-*L*-Cys(Trt)-Gly-*L*-Cys(Trt)-Gly (75 mg, 0.073 mmol). El crudo obtenido se retomó en 20 mL de DCM. Luego se agregó DIPEA (26  $\mu$ L, 0.150 mmol) y 1,5-dibromopentano (15  $\mu$ L, 0.11 mmol). Esta mezcla se dejó con agitación a temperatura ambiente por 20 hs. Luego se evaporó el solvente a presión reducida. El crudo de reacción, se suspendió en DCM, se lavó con HCl 5%, se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se concentró a vacío. Con el crudo obtenido se realizó un percolado para retirar los Trt. Se obtuvo el compuesto deseado (35 mg, 0.057 mmol) con un rendimiento del 78%.

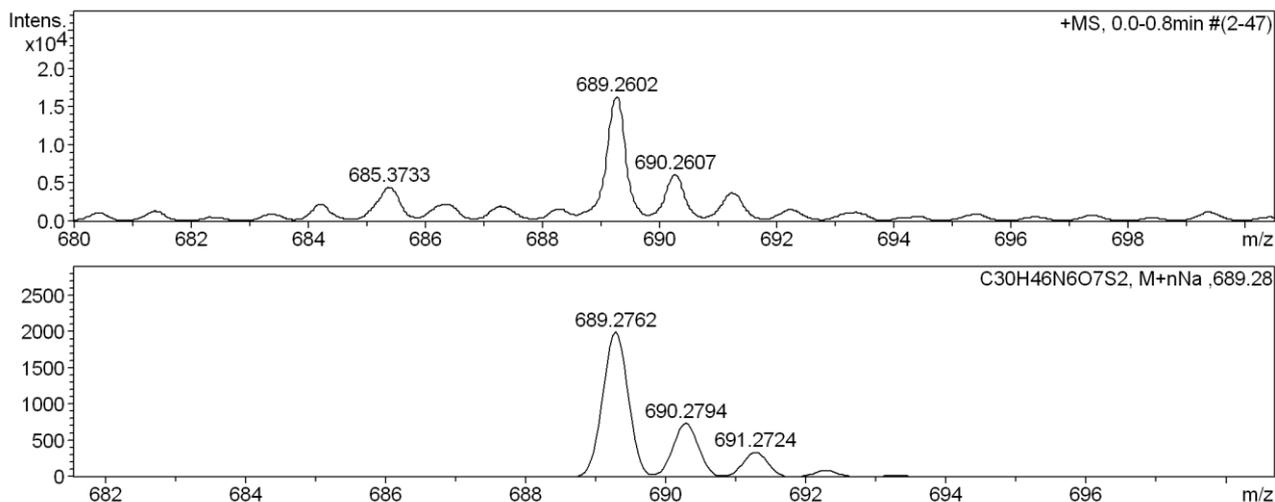
Sólido blanco (78%). **HRMS**  $m/z$  calc. para  $C_{26}H_{44}N_6O_7S_2$  ( $[M+Na]^+$ ) 639.2605, found 639.2609.



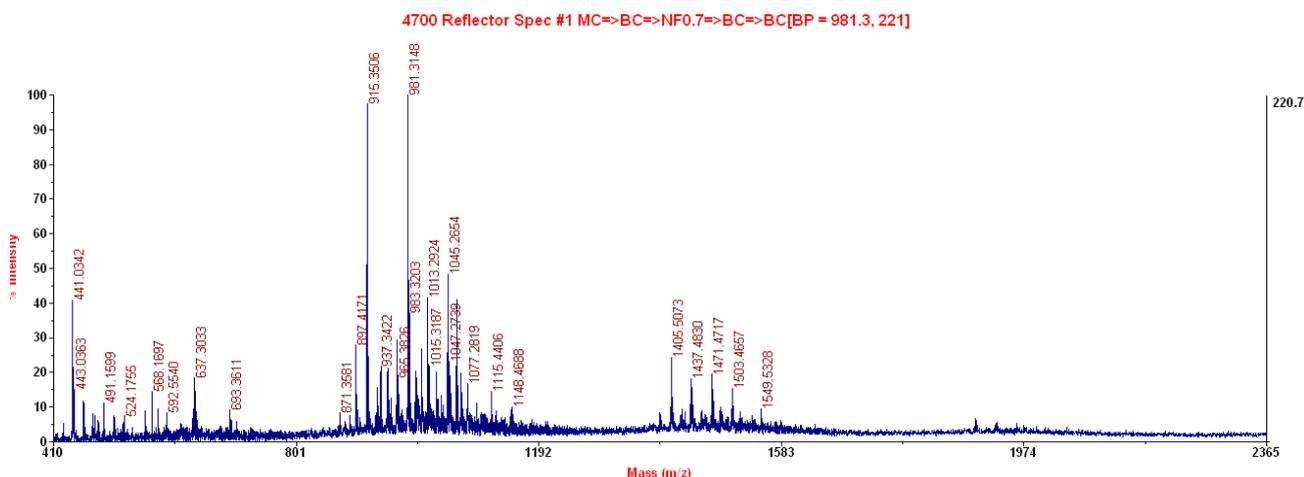
**(1R,7S,13R)-7-(tert-butoxymethyl)-5,11,24-trimethyl-15,21-dithia-2,5,8,11,24,27-hexaazabicyclo[11.9.5]heptacosane-3,6,9,12,23,26-hexaone (57):** La reacción de desprotección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general 4.4.1 a partir del *Ciclo-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)* (40 mg, 0.038 mmol). El crudo obtenido se retomó en 10 mL de DCM. Luego se agregó DIPEA (20  $\mu$ L, 0.114 mmol) y 1,5-dibromopentano (8  $\mu$ L, 0.057 mmol). Esta mezcla se dejó con agitación a temperatura ambiente por 20 hs. Luego se evaporó el solvente a presión reducida. El crudo de reacción, se suspendió en DCM, se lavó con HCl 5%, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. Con el crudo obtenido se realizó un percolado para retirar los Trt. Se obtuvo el compuesto deseado (18 mg, 0.029 mmol) con un rendimiento del 75%.

Sólido blanco (75%). **HRMS**  $m/z$  calc. para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 631.2942, found 631.2945.

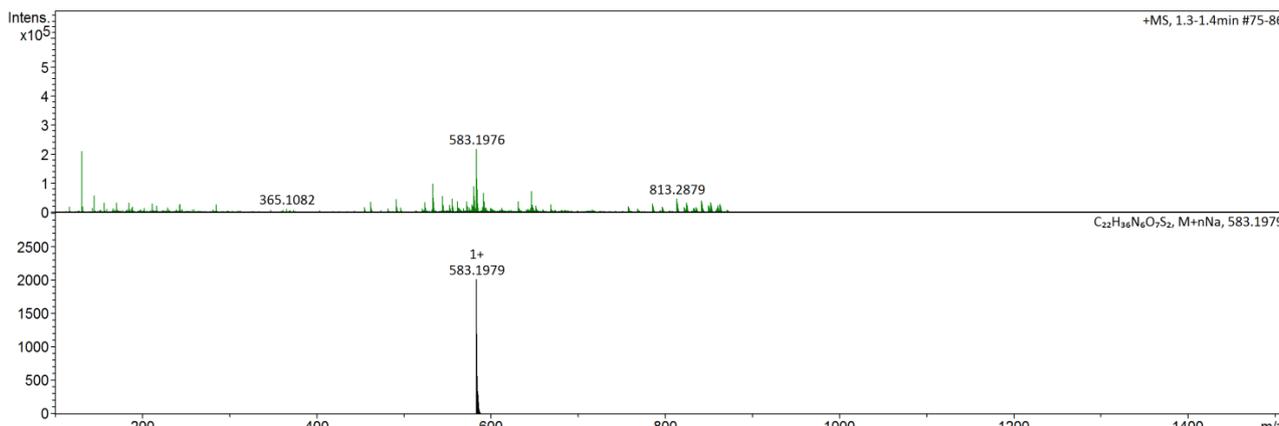
**Cyclo-L-Cys-L-Ile-L-Cys-L-Phe-L-Ser(*t*-Bu)-Gly (49):**



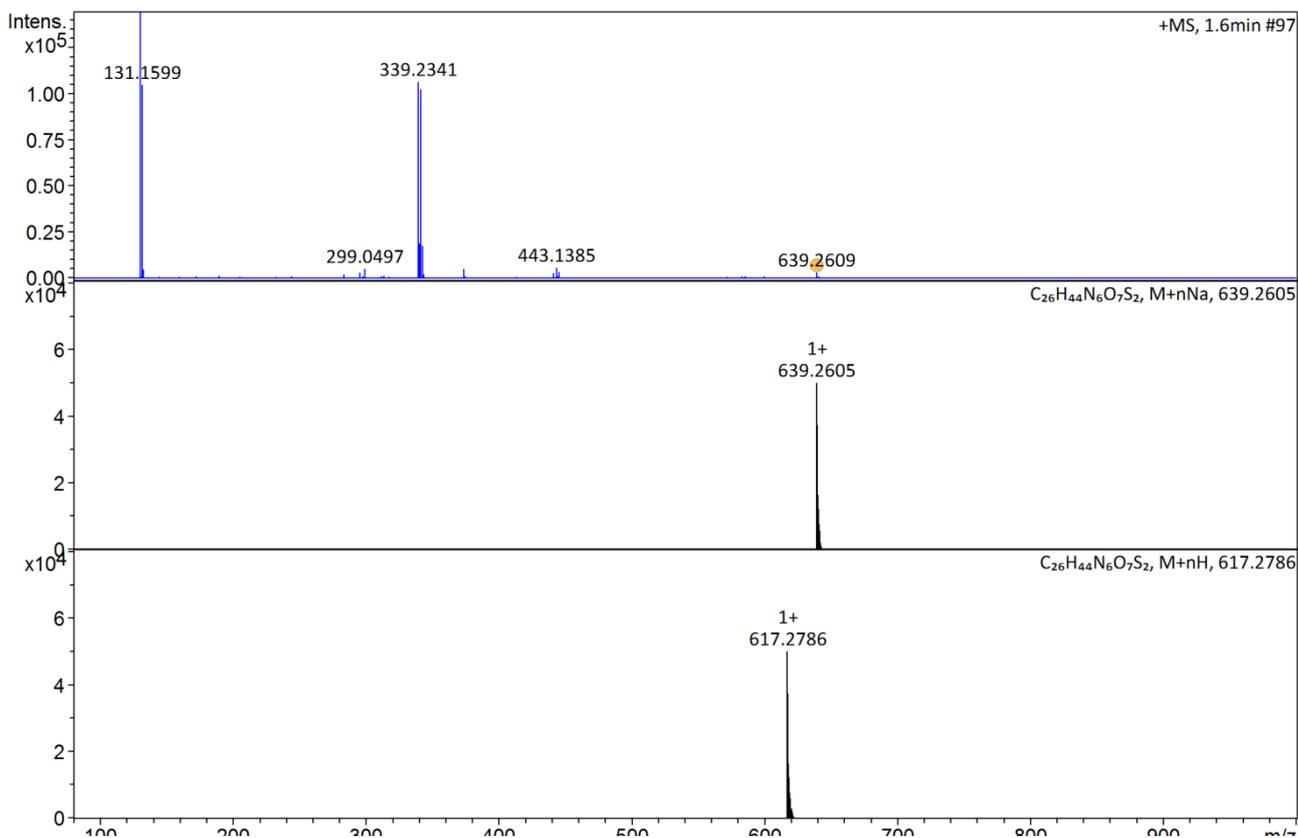
**Disulfuro cíclico (3→5) de *Ciclo*-[L-Thr-NMe-Gly-L-Cys-Gly-L-Cys-Gly] (53)**



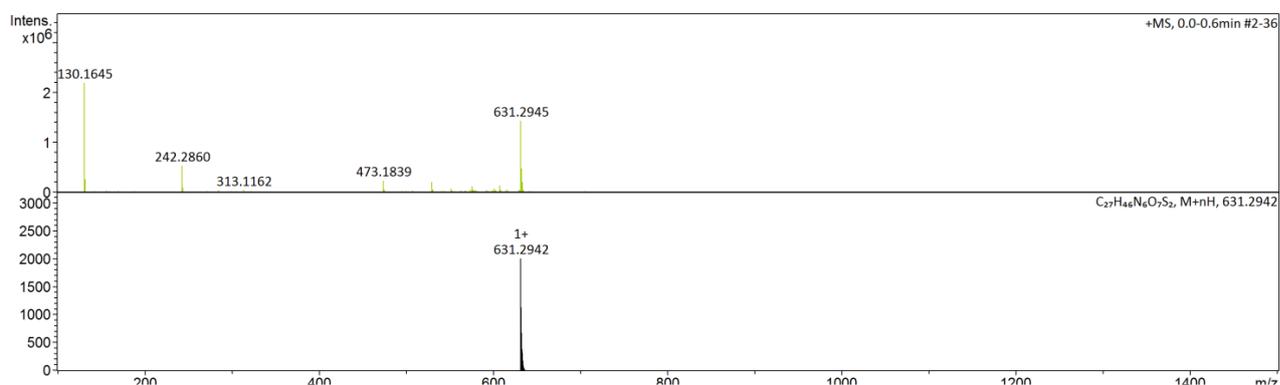
**Cyclo-[NMe-Gly-L-Cys-NMe-Gly-L-Ser(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys]-cyclic(2-6)-disulfide (55):**



**(1R,7S,13R)-7-((R)-1-(tert-butoxy)ethyl)-5-methyl-15,21-dithia-2,5,8,11,24,27-hexaazabicyclo[11.9.5]heptacosane-3,6,9,12,23,26-hexaone (56):**



**(1R,7S,13R)-7-(tert-butoxymethyl)-5,11,24-trimethyl-15,21-dithia-2,5,8,11,24,27-hexaazabicyclo[11.9.5]heptacosane-3,6,9,12,23,26-hexaone (57):**







# **CAPÍTULO 5**

## **ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS**



## 5.1. INTRODUCCIÓN

Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tienen un rol fundamental, cuando se piensa en ellos como posibles fármacos. Un compuesto biológicamente activo, tiene un blanco de acción sobre el que actúa modificando su función, para que de esta forma pueda causar el efecto farmacológico deseado. Pero, para que el compuesto pueda actuar, debe poder llegar a este sitio, por lo que se requieren determinadas características estructurales, que le infieren las propiedades fisicoquímicas necesarias.

Existen diferentes mecanismos por los cuales un compuesto puede ingresar al torrente sanguíneo, desde el cual pasa a distribuirse a todo el organismo, pero uno de los más importantes, principalmente para moléculas de gran tamaño, es la difusión pasiva a través de la membrana plasmática. Se han identificado varias propiedades moleculares que influyen en este proceso como son los coeficientes de partición y distribución en octanol/agua ( $\log P$  y  $\log D$ ), constante de ionización ( $pK_a$ ), potencial de enlace de hidrógeno y tamaño molecular.<sup>1</sup> La lipofilia ( $\log P$ ) y solubilidad, son las principales propiedades responsables de determinar el camino que va a recorrer el compuesto en el organismo. En este punto, comienza a existir un compromiso entre estas dos propiedades, ya que el compuesto debe ser lo suficientemente hidrofílico como para disolverse en agua (el 70% del organismo es agua) y lo suficientemente lipófilo como para poder difundir por la membrana celular.

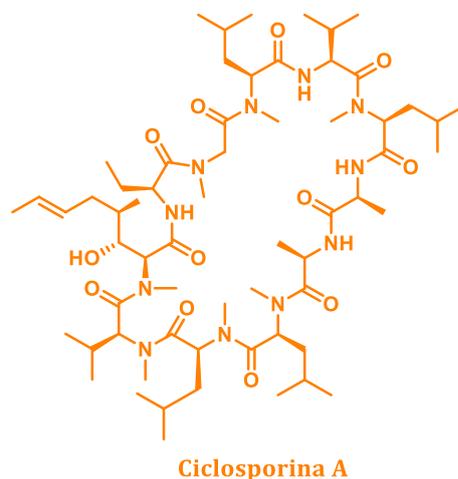
Los péptidos y peptidomiméticos a menudo tienen pesos moleculares que superan los 500 Da y poseen una capacidad de formar enlaces de H mayor de lo que se ha considerado deseable para un fármaco de administración por vía oral. Por este y otros motivos, la mayoría de estos compuestos con fin terapéutico se administran por vía parenteral. La baja biodisponibilidad oral se puede atribuir a dos problemas principales: la

---

<sup>1</sup> Wohnsland, F.; Faller, B. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 923.

mala capacidad del péptido para cruzar la pared intestinal y la vida media plasmática corta por la degradación oxidativa, proteolítica y eliminación renal.<sup>2</sup>

La lactamización de péptidos para la obtención de sus derivados cíclicos, hace que sean más resistentes a la degradación proteolítica<sup>3</sup> y además se eliminen las cargas de sus extremos incrementando así su lipofilia,<sup>4</sup> lo que aumentaría el tiempo de permanencia en el organismo. Sus conformaciones restringidas pueden proporcionar una mayor afinidad por los sitios de acción, ya sea un receptor, una enzima, etc. al disminuir la pérdida de entropía tras la unión a los mismos. Sin embargo, el aumento de la lipofilia muchas veces conduce a un mayor riesgo de desgaste del fármaco debido a una menor especificidad por el objetivo, un aumento de la unión a proteínas plasmáticas, un mayor volumen de distribución, una mayor toxicidad, un  $t_{1/2}$  elevado y una menor solubilidad acuosa.



**Figura 5.1.** Estructura de Ciclosporina A.

Los ciclopéptidos, por un lado poseen la característica de tener un esqueleto central con capacidad de formar una gran cantidad de puentes de H, y por otro tienen el carácter apolar de sus cadenas laterales. Pero es relevante destacar que pese a ser estructuras con cierta rigidez, pueden adoptar conformaciones diferentes según el medio en el que se encuentren, pudiendo establecer enlaces de H internos o con el medio que los rodea.<sup>5</sup> Un ejemplo de esto es el undecapéptido cíclico Ciclosporina A, Figura 5.1, un fármaco de

<sup>2</sup> Rand, A. R.; Leung, S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, B.; Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1282.

<sup>3</sup> March, D. R.; Abbenante, G.; Bergman, D. A.; Brinkworth, R. I.; Wickramasinghe, W.; Begun, J.; Martin, J. L.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3375.

<sup>4</sup> Burton, P. S.; Conradi, R. A.; Ho, N. F. H.; Hilgers, A. R.; Borchardt, R. T. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1336.

<sup>5</sup> Rezai, T.; Yu, B.; Millhauser, G. L.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *J. Am. Chem. Soc. Comm.* **2006**, *128*, 2510.

administración oral que se une a la proteína citoplasmática Ciclofilina. Este macrociclo que presenta en su cadena principal N-metilos, posee un alto peso molecular e ingresa a la célula por difusión pasiva. Se ha visto que en cloroformo adopta una conformación en la que todos los NH de las amidas se encuentran formando enlaces de hidrógeno intramoleculares. Sin embargo, en agua, adopta conformaciones múltiples en las que la mayoría de sus grupos NH se direccionan interaccionando con el solvente.<sup>6</sup>

Debido a su gran tamaño, la funcionalidad compleja y la flexibilidad conformacional, puede ser muy difícil predecir el comportamiento de los péptidos cíclicos con respecto a la permeabilidad celular, la solubilidad y otras propiedades fisicoquímicas.

La solubilidad se define como la cantidad de soluto necesaria para formar una solución saturada en una cantidad dada de disolvente. La misma depende del área superficial del sólido que se disuelve y la solubilidad propiamente dicha del producto. La determinación de la solubilidad se puede realizar de diversas maneras, esta dependerá en gran parte de cuan soluble sea, la naturaleza del compuesto y el medio en el que se desea determinar.

Poder conocer la solubilidad en agua de potenciales fármacos es de suma importancia, para determinar que es necesario para su formulación, si podría administrarse por vía oral o en solución acuosa, o si es necesario el agregado de algún adyuvante de solvatación. La concentración de fármaco en solución es la fuerza motriz de la transferencia por la membrana del fármaco (concepto de ósmosis). Un gran número de fármacos tiene una solubilidad acuosa muy baja, principalmente debido a una muy alta lipofilia y además debido a la falta de centros ionizables. Estos medicamentos se absorben de forma errática e incompleta debido a esta incapacidad para disolverse en el tracto gastrointestinal después de la administración oral.<sup>7</sup> La incorporación de un centro ionizable, puede traer una serie de beneficios, incluida la solubilidad en agua. Este problema también se puede solucionar en algunos casos por medio de la formulación, como puede ser por el uso de ciclodextrinas como encapsulante del fármaco lipofílico.<sup>8</sup>

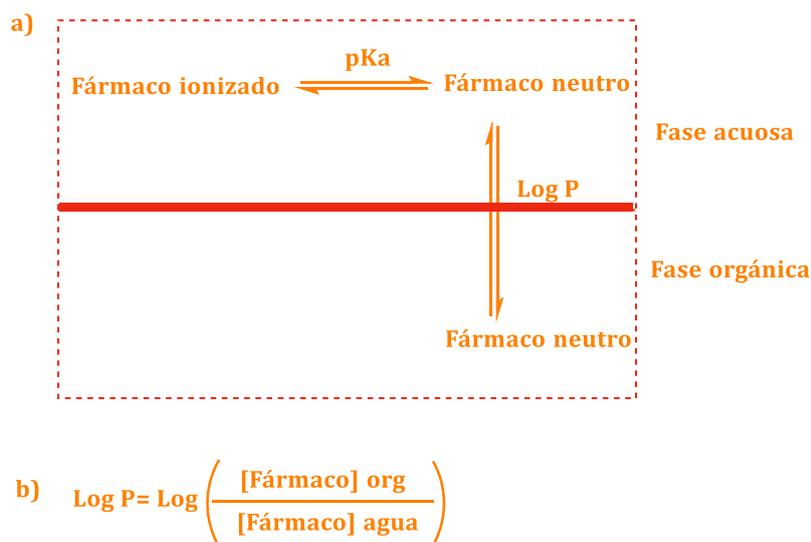
---

<sup>6</sup> a) Ko, S. Y.; Dalvit, C. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 380. b) Augustijns, P. F.; Brown, S. C.; Willard, D. H.; Consler, T. G.; Annaert, P. P.; Hendren, R. W.; Bradshaw, T. P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7621.

<sup>7</sup> Smith, D. A.; Waterbeemd, H. V.; Walker, D. K. *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*, **2001**, *3*, 37.

<sup>8</sup> De lima, F.; Cavalcante, G.; Araújo, F.; Fantini, L.; Araújo, L.; Rolim, P. *Rev. Bras. Farm.* **2008**, *89*, 220.

Por otro lado, la lipofilia o Log P, es uno de los parámetros más importantes para determinar la biodisponibilidad de un fármaco. Este concepto fue introducido por Hansch y Fujita en 1964 donde sugirieron el uso del valor logarítmico del coeficiente de partición octanol/agua (log P) para modelar el comportamiento de partición biológica de moléculas neutras de fármacos.<sup>9</sup> El núcleo hidrofóbico interno de una membrana se puede modelar mediante el uso de un solvente apolar, mientras que el compartimento acuoso se puede imitar usando un buffer acuoso o agua. Este sistema bifásico se puede utilizar para estudiar la preferencia relativa de un compuesto por la fase acuosa (hidrófila) u orgánica (hidrófoba, lipófila). Entonces, la relación de concentraciones del compuesto neutro en equilibrio entre las fases orgánica y acuosa define este parámetro, Esquema 5.1. Por lo tanto, el coeficiente de partición describe la lipofilia intrínseca de la colección de grupos funcionales y esqueleto de carbono, que se combinan para formar la estructura del compuesto, en ausencia de disociación o ionización.<sup>10</sup> Existen varios métodos para la determinación de este parámetro,<sup>11</sup> pero el más utilizado en la actualidad es por HPLC, aunque cada uno es aplicable para rangos restringidos de valores de Log P.



**Esquema 5.1.** a) Representación de reparto de un fármaco entre una fase acuosa y orgánica. b) Fórmula para cálculo de Log P.

<sup>9</sup> a) Hansch, C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616. b) Leo, A. J.; Hansch, C.; Elkins, D. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 525.

<sup>10</sup> Smith, D. A.; Waterbeemd, H. V.; Walker, D. K. *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*, **2001**, *1*, 2.

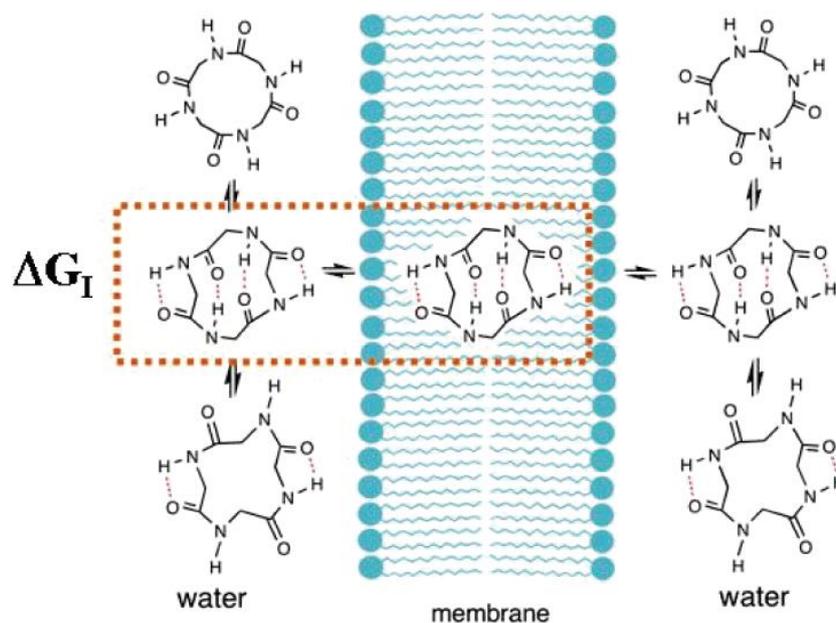
<sup>11</sup> Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H.; Pilska, V.; Testa, B.; Van de Waterbeemd, H. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Vol. 4, Lipophilicity in Drug Action and Toxicology **1996**.

La determinación del Log P por HPLC es un método rápido, aplicable para una amplia gama de compuestos y de valores de este parámetro (variando las condiciones del ensayo). Pero, dado que se debe realizar una regresión lineal con compuestos de Log P conocidos, es necesario conocer alguna característica del analito de antemano, que sirva para predecir si el método elegido es adecuado.

Estos dos parámetros, solubilidad y lipofilia, serán los que puedan dar las primeras aproximaciones acerca de la biodisponibilidad esperada de un potencial fármaco. Como se mencionó anteriormente, muchos compuestos, como los ciclopéptidos, son capaces de adoptar diferentes conformaciones según el disolvente en el que se encuentren. Así, en medios con constante dieléctrica altas tales como el agua, se presenta mayormente el conformero altamente dieléctrico en el que las amidas polares apuntan hacia el solvente, mientras que en ambientes de bajo valor de esta constante, el péptido cambia de conformación formando enlaces de H intramoleculares al internalizar sus amidas polares (conformero dieléctrico bajo). Con esta última conformación, el péptido puede atravesar una membrana artificial. Esta característica de los ciclopéptidos que les permite adoptar distintas conformaciones se la conoce como “camaleónica”.<sup>12</sup> Figura 5.2.

---

<sup>12</sup> a) Rezai, T.; Bock, J. E.; Zhou, M. V.; Kalyanaraman, C.; Lokey, R. S.; Jacobson, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14073. b) Rand, A. C.; Leung, S. S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, C. L.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1282. c) White, T. R.; Renzelman, C. M.; Rand, A. C.; Rezai, T.; McEwen, C. M.; Gelev, V. M.; Turner, R. A.; Linington, R. G.; Leung, S. S. F.; Kalgutkar, A. S.; Bauman, J. N.; Zhang, Y.; Liras, S.; Price, D. A.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 810.



**Figura 5.2.** Conformaciones adoptadas por ciclopéptidos en diferentes medios.<sup>4</sup>

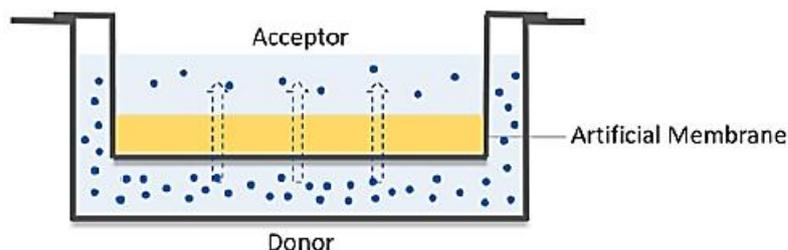
Dada las propiedades mostradas por los ciclopéptidos, se los ha catalogado como los ejemplos típicos de compuestos “más allá de la regla de 5” (“beyond-Rule of 5”: bRo5) refiriéndose a la “regla de 5 de Lipinski”. Una variedad de factores afectan la permeabilidad de la membrana en péptidos cíclicos como ser: el tipo de cadenas laterales, la N-metilación,  $\beta$ -ramificación, etc.

En los trabajos de Lockey y Jacobson, también se demostró que los derivados N-metilados son más permeables que sus equivalentes no N-metilados debido al menor costo de desolvatación. Se han relacionado la solubilidad, Log P y permeabilidad de diversos compuestos, describiéndose que el incremento en la permeabilidad y Log P van en sentido inverso a la solubilidad acuosa. Thansandote y colaboradores, hacen una extensa comparación entre estos tres parámetros para ciclopéptidos con diferente número de AA N-metilados, demostrando que el incremento en el número de estos AA en la estructura, incrementa la permeabilidad de estos compuestos.<sup>13</sup>

Es frecuente encontrar en la literatura, en los últimos años, el ensayo PAMPA (por sus siglas en inglés: Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) con el que se pueden relacionar las propiedades fisicoquímicas anteriormente mencionadas. Este ensayo, ha sido muy utilizado por la industria farmacéutica como un ensayo “high throughput” para

<sup>13</sup> Thansandote, P.; Harris, R. M.; Dexter, H. L.; Simpson, G. L.; Pal, S.; Upton, R. J.; Valko, K.; *Bioor.Med. Chem* **2015**, *23*, 322.

predecir la absorción oral. En PAMPA, se mide la difusión de un compuesto desde un compartimento donante hacia uno receptor a través de una membrana artificial impregnada con lípidos, imitando las características de la membrana celular. Esta membrana artificial, debe ser atravesada por los compuestos de interés y los resultados se correlacionan bien con la difusión pasiva para células vivas.<sup>14</sup> Figura 5.3.



**Figura 5.3.** Representación de compartimentos utilizados para PAMPA.<sup>15</sup>

En el presente capítulo presentaremos el estudio de las propiedades fisicoquímicas anteriormente mencionadas, con el fin de intentar predecir el comportamiento de los ciclopéptidos sintetizados con respecto a su ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción).

<sup>14</sup> Bermejo, M.; Avdeef, A.; Ruiz, A.; Nalda, R.; Ruell, J. A.; Tsinman, O.; Gonzalez, I.; Fernandez, C.; Sanchez, G.; Garrigues, T. M.; Merino, V. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 429.

<sup>15</sup> Parallel Artificial Membrane Permeability Assay - Creative Bioarray, <http://www.addthis.com/bookmark.php?v=300&pubid=xa-5184e2be4186e26e>



## 5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.2.1. Determinación de Log P

Para realizar este estudio se eligió utilizar un método por HPLC fase reversa, lo que implica determinar el reparto que experimenta el compuesto entre la fase móvil (polar) y la fase estacionaria (apolar). Este ensayo tiene la ventaja de ser rápido y sencillo de realizar, por lo que se puede aplicar a una gran cantidad de compuestos en tiempos relativamente cortos. Este método consiste en determinar los  $t_R$  (tiempo de retención) de los analitos, luego este valor se interpola en una curva de calibración con estándares de Log P conocido para los que fueron previamente determinados sus  $t_R$  en las condiciones del ensayo. Por este motivo, es importante contar con estándares que puedan cubrir el rango de Log P de los compuestos a estudiar.

El ensayo se realizó siguiendo la guía “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (117): Partition coefficient (n-octanol/water) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method”. Si bien en principio se trata de un reparto octanol/agua, se han estudiado diferentes condiciones que permiten tener un buen acercamiento al valor de Log P, que pueden adecuarse mejor a diferentes clases de compuestos. En esta guía, se establecen condiciones y límites en solventes, flujos, columnas, temperaturas, etc., para los que puede ser aplicado este método, teniendo en cuenta el rango de valores de este parámetro que se puede manejar. También presenta una lista de compuestos que pueden ser utilizados como estándares, ya que este método se basa en interpolar el valor del  $t_R$ .

Como la mayor parte de los ciclopéptidos que estudiaremos son bastante hidrofóbicos, necesitábamos condiciones y estándares que nos permitieran medir valores altos de Log P. Por este motivo se llegó a las siguientes condiciones para el método:

- ✓ Columna: Zorbax XDB-C8, 5 $\mu$ m, 4.6 x 250 mm.
- ✓ Fase móvil: H<sub>2</sub>O:MeCN (25:75).
- ✓ Flujo: 1mL/min.
- ✓  $\lambda$ = 220nm y 254nm.

- ✓ Estándares: Uracilo ( $t_0$ ), Nitrobenceno (Log P=1.9), Bromobenceno (Log P=3.0), Naftaleno (Log P=3.6), Bencilbenzoato (Log P=4.0), y Enantato de Testosterona (Log P=8.3).

Estas condiciones son útiles para la determinación de Log P de compuestos que no contengan grupos ionizables libres. Para aquellos ciclopéptidos que contienen un grupo carboxilo, en estas condiciones dicho grupo estará en su forma aniónica mayormente, por lo que se determinará su valor de Log D (distribución de todas las formas del compuesto: ionizadas y no-ionizadas). Para determinar el Log P de estos últimos, se utilizó una mezcla MeCN:Agua con TFA ajustando a pH=2.0, para que los compuestos se mantengan en su forma neutra.

En primer lugar, se construyó la curva de calibración con los estándares elegidos, para luego obtener la ecuación de regresión lineal para el cálculo del Log P. Tabla 5.1, Figura 5.4.

ESTANDAR	$t_R$	k	log k	log P
Uracilo	2,4755	0		
Nitrobenceno	3.8545	0,557	-0,2641	1,9
Bromobenceno	5,3755	1,1714	0,0687	3
Naftaleno	5,6575	1,2854	0,1090	3,6
Bencilbenzoato	5,9245	1,3933	0,1440	4
Enantato de Testosterona	27,3805	10,0606	1,0026	8,3

**Tabla 5.1.** Tiempos de retención determinada para los estándares utilizados.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$$\text{Log P} = 3.0482 + 5.2011 \text{ Log k}$$

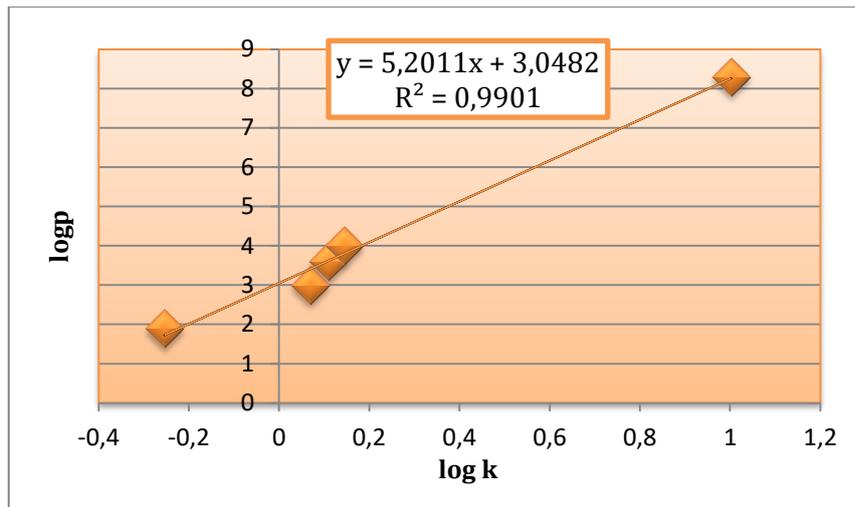
**k=** Factor de capacidad.

**$t_R$ =** Tiempo de retención

**$t_0$ =** Tiempo muerto ( $t_R$  del Uracilo)

**Log k=** Log del factor de capacidad

**Log P=** Log del coeficiente de partición



**Figura 5.4.** Gráfico Log P vs Log k.

Se determinaron los tiempos de retención de los diferentes compuestos problemas, para así, interpolar el valor de Log P en la ecuación de regresión lineal obtenida con los valores de los estándares.

Compuesto	PM	Nº NH	Log P <sub>calc</sub> <sup>a</sup>	Log P <sub>exp</sub>
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (23)</i>	1151.51	6	10.41	8.77
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly (24)</i>	1319.77	6	14.72	ND
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (25)</i>	1149.56	6	9.82	7.07
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly (26)</i>	1169.55	6	9.73	5.94
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Val-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe (27)</i>	1193.59	6	11.87	4.02
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (28)</i>	1446.87	6	11.83	7.85
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly (29)</i>	1416.85	6	12.51	9.57
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (30)</i>	1019.30	6	6.70	5.59
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (31)</i>	1192.52	6	10.61	8.99
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (32)</i>	1192.52	6	10.61	9.54
<i>Ciclo-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-L-Met-Gly (33)</i>	798.34	6	1.67	1.17
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (34)</i>	788.98	6	1.35	3.78
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (35)</i>	1123.45	4	8.96	7.96
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (36)</i>	1047.36	3	6.96	6.33
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (37)</i>	1047.36	4	7.15	5.95
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (38)</i>	1033.33	5	6.93	5.83
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (39)</i>	1038.35	5	9.62	7.68
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (40)</i>	1003.44	5	9.29	8.59
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (41)</i>	976.28	3	7.84	7.66
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu-Gly (42)</i>	1037.44	6	9.41 <sup>b</sup>	5.87 <sup>c</sup>
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu-Gly (43)</i>	1136.45	6	9.41 <sup>b</sup>	6.03 <sup>c</sup>
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu-Gly (44)</i>	732.88	6	0.15 <sup>b</sup>	ND
<i>Ciclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu (45)</i>	742.92	6	0.47 <sup>b</sup>	6.19 <sup>c</sup>
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu-NMe-Gly (46)</i>	1004.36	5	5.51 <sup>b</sup>	3.02 <sup>c</sup>
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (47)</i>	1018.38	4	5.73 <sup>b</sup>	3.49 <sup>c</sup>
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (48)</i>	1033.29	3	5.95 <sup>b</sup>	3.87 <sup>c</sup>

a) Log P calculado por <https://chemicalize.com/#/calculation> b) Log P de compuestos ácidos calculados para pH=1,7.  
 c) Log P determinado a pH=2,0. ND: No determinado

**Tabla 5.2.** Log P calculado y medido para los compuestos sintetizados.

Compuestos	PM	N° NH	Log D calc <sup>a</sup>	Log D exp <sup>c</sup>
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu-Gly (42)</i>	1037.44	6	6.20 <sup>b</sup>	3.58
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu-Gly (43)</i>	1136.45	6	6.20 <sup>b</sup>	6.79
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu-Gly (44)</i>	732.88	6	-3.06 <sup>b</sup>	2.18
<i>Ciclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu (45)</i>	742.92	6	-2.70 <sup>b</sup>	2.68
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu-NMe-Gly (46)</i>	1004.36	5	2.32 <sup>b</sup>	3.10
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (47)</i>	1018.38	4	2.59 <sup>b</sup>	3.69
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (48)</i>	1033.29	3	2.81 <sup>b</sup>	3.92

a) Log D calculado por <https://chemicalize.com/#/calculation> b) Log D de compuestos ácidos calculados para pH=7.0. c) Log D determinado a pH=7,0.

**Tabla 5.3.** Log D calculado y medido para los compuestos sintetizados.

Como se puede ver en las tablas, la mayoría de los coeficientes de partición/distribución a pH=7, son bastante elevados, comparado con lo que se considera deseable para un potencial fármaco. Se podría decir, sin embargo, que aquellos con un valor menor a 6 en este parámetro, son prometedores. Con el fin de tener una aproximación al valor experimental para los compuestos **23**, **29**, **31**, **32** y **40**, se debe tener en cuenta que, dado que presentan valores mayores a 8.3 (Log P para el Enantato de Testosterona), fue necesario realizar una extrapolación en la curva. Para poder obtener un valor más exacto, sería necesario contar con un estándar con un Log P mayor.

### 5.2.2. Determinación de Solubilidad y Estabilidad

La solubilidad en agua, como se mencionó previamente, es fundamental para los compuestos candidatos a fármacos, ya que tanto para administración como solución inyectable o por vía oral, es necesario que sea soluble en los medios involucrados para que pueda ingresar y distribuirse en el organismo. Además como en el lumen del tracto gastrointestinal el pH se encuentra entre 1 a 8, poder conocer la solubilidad entre estos valores es un dato interesante para predecir donde se realizará el proceso de absorción.

Una vez disuelto el compuesto de interés debe ser estable para que pueda absorberse y/o distribuirse, por este motivo, además de la solubilidad se determinó la estabilidad por 2 horas a pH=1.0 y pH=7.4 a 37°C.

En esta sección se presentan los resultados de dos ensayos que fueron realizados utilizando la misma metodología: el de solubilidad en PBS (buffer fosfato salino) y en solución de HCl a pH=1.0. Además se presenta el estudio de estabilidad en las dos soluciones mencionadas anteriormente. Esto se realizó según el trabajo de Thansandote y colaboradores.<sup>13</sup>

Para los ensayos de solubilidad y estabilidad a ambos pH se partió de una solución 10 mM del compuesto en DMSO, y se prepararon para cada pH, las soluciones acuosas por duplicado al 5% en el disolvente orgánico, dejándolo equilibrar con agitación. Por lo tanto, la máxima concentración posible que puede alcanzarse, en el caso de que los compuestos sean totalmente solubles, es 500 µM. Para los ciclopéptidos que contienen Glu con su ácido carboxílico libre, se utilizaron soluciones 20 mM en DMSO y se prepararon soluciones acuosas al 5% en este disolvente. Por lo que, en este caso, la máxima concentración posible sería 1000 µM. Una vez transcurridas las dos horas, se filtraron las soluciones y se determinó la concentración alcanzada por HPLC-UV fase reversa, comparando contra un estándar del compuesto correspondiente de concentración similar disuelto en DMSO. Previamente se realizó una curva de calibración, para comprobar si en el rango de concentraciones utilizado la relación entre la Absorbancia y concentración del analito es lineal. Además, para analizar la estabilidad a pH=1 con el tiempo, se tomaron alícuotas cada 15 minutos. Tabla 5.4.

Se calculó la concentración a partir del área del pico para el producto a determinar, comprándolo con el área obtenida para el pico del estándar (el mismo producto en una solución en DMSO de concentración conocida).

$$[\text{Producto}] = \frac{A_P \times [\text{Estándar}]}{A_E}$$

**[Producto]= Concentración del producto**  
**[Estándar]= Concentración del Estándar**  
**AP= Área del pico para producto.**  
**AE= Área del pico para estándar**

Compuesto	Solubilidad a pH=7.4(μM)	Solubilidad a pH=1.0 (μM)
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (23)</i>	0.0	0.44 ± 0.04
<i>Ciclo -L-Cys(Trt)-L-Ile L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly (24)</i>	ND	ND
<i>Ciclo -L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (25)</i>	ND	ND
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly (26)</i>	ND	ND
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Val-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe (27)</i>	28.3 ± 10.8	16.5 ± 10.5
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (28)</i>	0.0	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly (29)</i>	0.0	27.5 ± 5.9
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (30)</i>	42.6 ± 9.3	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly (31)</i>	0.39 ± 0.16	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly (32)</i>	0.15 ± 0.05	28.0 ± 8.0
<i>Ciclo-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-L-Met-Gly (33)</i>	13.3 ± 1.9	16.2 ± 3.8
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu(γ<sup>t</sup>Bu)-Gly (34)</i>	0.37 ± 0.04	4.90 ± 1.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (35)</i>	0.0	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (36)</i>	0.14 ± 0.00	0.74 ± 0.11
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (37)</i>	0.38 ± 0.25	5.39 ± 3.56
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (38)</i>	0.94 ± 0.84	1.17 ± 0.68
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (39)</i>	0.0	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (40)</i>	0.0	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (41)</i>	0.0	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu-Gly (42)</i>	520.0 ± 7.0	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu-Gly (43)</i>	460.0 ± 6.0	0.0
<i>Ciclo -L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu-Gly (44)</i>	ND	ND
<i>Ciclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu (45)</i>	607.5 ± 34.5	0.0
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu-NMe-Gly (46)</i>	ND	ND
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (47)</i>	ND	ND
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (48)</i>	436.5 ± 12.5	27.50 ± 3.5

a) Estos valores corresponden a una primera determinación, pero se están reevaluando los datos en este momento. ND: No determinado

**Tabla 5.4.** Solubilidades experimentales a pH=1.0 y pH=7.4 para los compuestos sintetizados

Se evaluó la estabilidad, observando la aparición de picos adicionales o con  $t_R$  disimiles a los presentes en el cromatograma del patrón correspondiente. En algunos casos, se estudió el precipitado remanente del ensayo de solubilidad, disolviendo en MeCN y analizándolo por HPLC. En ningún caso se encontraron picos adicionales o con  $t_R$  diferentes respecto al correspondiente patrón, lo que indicaría, entre otras cosas, que no hubo desprotección de las cadenas laterales en las muestras analizadas. Esto podría indicar que son estables en ambas condiciones de pH durante las dos horas del ensayo.

En cuanto a sus solubilidades, como puede verse en la Tabla 5.4, los ciclopentapéptidos (**39**, **40** y **41**) son insolubles en las dos condiciones. Los compuestos sin grupos ionizables presentan solubilidades menores a 43  $\mu\text{M}$  a ambos pH. Aquellos macrociclos con NMe-Gly y que no contienen Glu con su ácido carboxílico libre, no son solubles a pH=7,4, pero algunos presentan cierta solubilidad a pH=1.0 siendo el más soluble en estas condiciones el compuesto **37** que presenta dos NMe-AA. Considerando los compuestos que no contienen Glu, el compuesto **30**, que podría presentar mayor libertad conformacional debido a que tres de sus AA son Gly, es el que presenta mayor solubilidad en PBS. Los compuestos **31** y **32**, poseen iguales AA, pero hay un cambio en el orden de uno de ellos, invirtiendo Cys(Trt) e Ile, en este caso en PBS no se presenta una diferencia significativa, pero en HCl, hay un incremento cuando las Cys(Trt) se encuentran consecutivas (**32**).

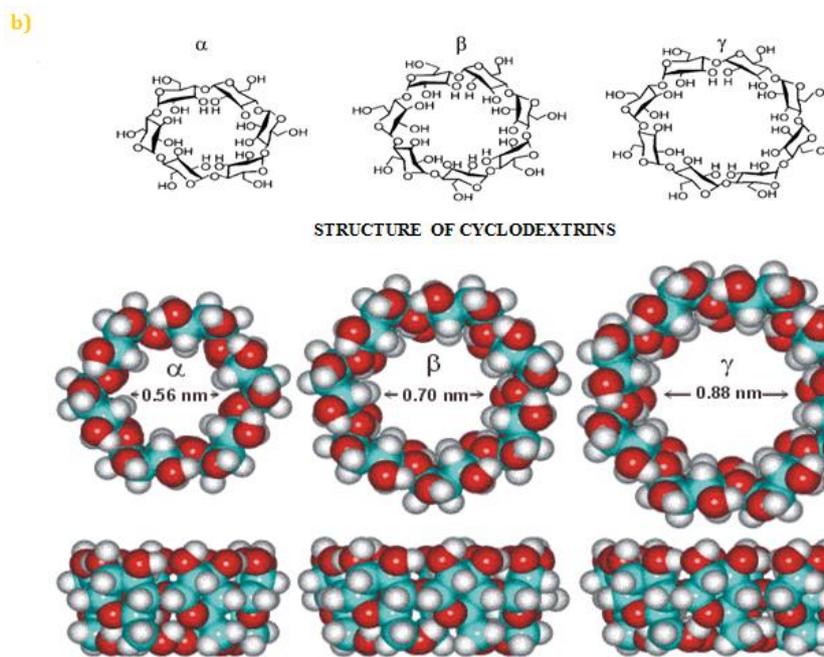
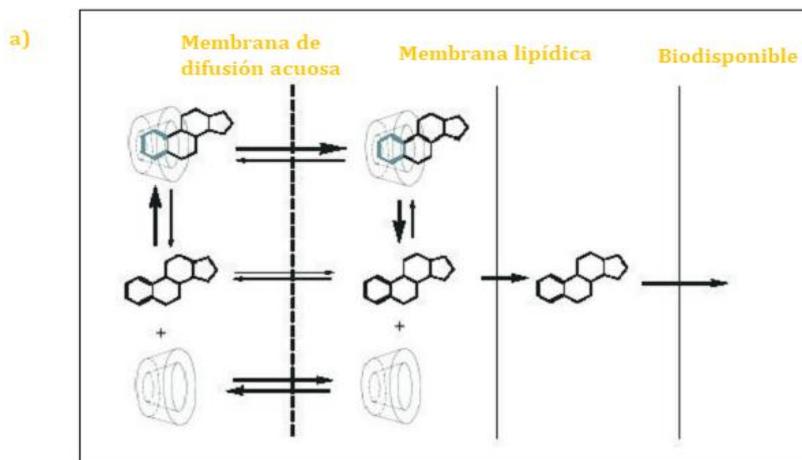
Por otro lado, para los macrociclos que contienen el COOH del residuo de Glu libre, a pH=1,0 son insolubles. En estas condiciones se encuentran en su forma neutra, por lo que se esperarían características similares a los compuestos previamente discutidos. Sin embargo, cuando estos son ionizados (a pH=7,4), la solubilidad es muy superior.

### 5.2.3. Solvatación de compuestos prometedores.

En esta instancia el objetivo fue encontrar alguna forma de solubilizar el compuesto **37**, que ha mostrado la mejor actividad biológica como se verá en el capítulo 6, y que presenta una solubilidad baja a los pH ensayados. Con la idea de no introducirle un cambio estructural que pueda modificar su actividad biológica, nos embarcamos en tratar de buscar algún adyuvante de solvatación. Para eso, son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica las ciclodextrinas como encapsulantes de compuestos insolubles en agua, transportándolo hasta la membrana y liberándolo para que pueda ingresar a la misma. Figura 5.5. Estas poseen amplia solubilidad acuosa ya que son polímeros de azúcares que disponen sus grupos OH hacia el exterior, manteniendo una cavidad hidrofóbica que permite transportar compuestos con esta misma característica. Para esto se necesita poder encontrar la ciclodextrina adecuada, lo cual depende en gran medida del tamaño de su cavidad y el volumen que presenta el compuesto a introducir. Este tamaño, está dado por el número de unidades de D-Glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4); las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas tienen 6, 7 y 8 unidades respectivamente.

De estas tres, la  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD), es la más económica, por lo que fue con la que se comenzaron los estudios de solubilidad, pero como se puede ver en la Tabla 5.5, no se obtuvieron buenos resultados. Además, las  $\beta$ -CD, son las que presentan menor solubilidad acuosa, lo que podría contribuir a éste resultado.

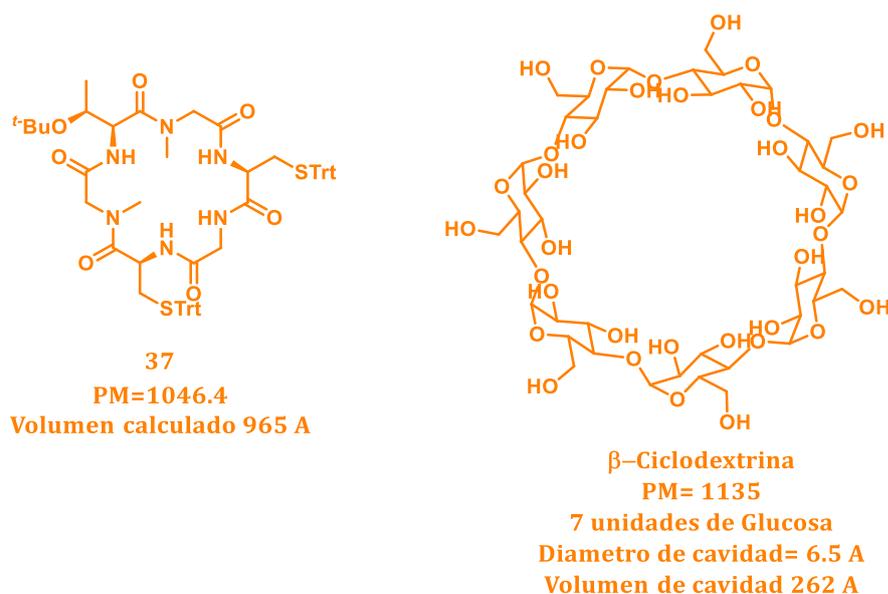
Posteriormente, se podría probar solubilizar este compuesto con una ciclodextrina de mayor tamaño como la  $\gamma$ , ya que probablemente el problema con las pruebas anteriores sea que el tamaño de la cavidad no era suficiente para estos ciclopeptidos ya que son muy voluminosos.



**Figura 5.5.** a) Representación de liberación del fármaco del complejo con ciclodextrinas para que permee la membrana celular.<sup>16</sup> b) Ciclodextrinas más comunes con dimensiones de sus cavidades.<sup>17</sup>

<sup>16</sup> De lima, F.; Cavalcante, G.; Araújo, F.; Fantini, L.; Araújo, L.; Rolim, P. *Rev. Bras. Farm.* **2008**, *89*, 220.

<sup>17</sup> <https://www.pharmatutor.org/articles/review-beta-cyclodextrin-inclusion-complex-morden-approach-drug-delivery>.



**Figura 5.6.** Estructuras de compuesto **37** y β-CD.<sup>18</sup>

Entrada	Cantidad de 37	Cantidad de β-CD	Condiciones	Solubilidad
1	0.0096 mmol	0.0192 mmol	Se agregó 3 mL de H <sub>2</sub> O destilada 100°C, de a poco formando una pasta	19.4 μM
2	1.1 x 10 <sup>-4</sup> mmol	0.063 mmol	Se agregó 3 mL de H <sub>2</sub> O destilada 100°C, de a poco formando una pasta	20.5 μM
3	4.14 mM en EtOH	No se agrega	Se realiza una solución 30% en EtOH con la solución de 37 en agua a 80°C.	No hay solubilización
4	4.14 mM en EtOH	Solución saturada en H <sub>2</sub> O	Se agregó una solución saturada de β-CD en agua a 80°C de a poco.	No hay solubilización
5	6.7 x 10 <sup>-3</sup> mmol	Solución saturada en H <sub>2</sub> O	Se agregó una solución saturada de β-CD en agua a 80°C de a poco.	7.4 μM

**Tabla 5.5.** Estudios de solubilización del compuesto **37** con β-CD.

Pese a que el volumen calculado para el compuesto **37**, es casi 4 veces mayor que el volumen de la cavidad de la β-CD, se ha reportado que los complejos con estos azúcares no

<sup>18</sup> Volumen calculado del compuesto 37, se extrajo de cálculos teóricos de <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>

necesariamente deben ser de inclusión, sino que pueden encontrarse recubriendo una zona de molécula o su totalidad, con varias unidades de ciclodextrinas.<sup>16</sup>

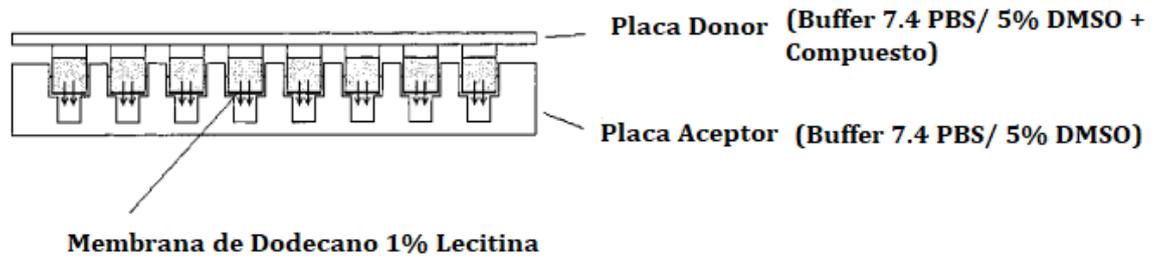
#### 5.2.4. Determinación de Permeabilidad trans-membrana PAMPA.

Este ensayo como se comentó en la sección 5.1, permite determinar la capacidad que tienen los distintos compuestos de permear una membrana artificial. Por lo tanto, para diseñar este ensayo hay que tener en cuenta, qué tipo de membrana celular deberían ser capaces de permear los compuestos de interés y que características tienen los medios a ambos lados de la misma. Si se quisiera que fueran capaces de atravesar, por ejemplo la barrera hematoencefálica, la membrana utilizada debería poseer las características de esta.<sup>19</sup> Dado que las membranas que deberían permear los ciclopéptidos preparados por nosotros como potenciales antiparasitarios, son las típicas y los pH a ambos lados de las mismas se encuentran alrededor de 7, el experimento se diseñó manteniendo a ambos lados de la membrana un buffer pH=7.4 y se utilizó una membrana compuesta de dodecano con 1% de Lecitina como emulsificante, basándonos en el procedimiento de Lockey Lab Protocols.<sup>20</sup> Se necesitan en principio tres estándares de distintos valores de permeabilidad, por lo que, se utilizaron Carbamazepina (alta permeabilidad), Propanolol (permeabilidad media) y Progesterona (permeabilidad relativamente baja). El ensayo se realizó por triplicado con soluciones 20  $\mu\text{M}$ , al 5% de DMSO en buffer PBS, para cada compuesto. Se utilizaron placas de 96 pocillos, un esquema de las mismas se muestra en la Figura 5.7. Una vez transcurrido el tiempo de transferencia (20hs), se determinan las concentraciones en cada pocillo (aceptor y donar) por HPLC-UV fase reversa para cada compuesto.

---

<sup>19</sup> Pérez, D.; Pistozzi, M.; Palomo, V.; Redondo, M.; Fortugno, C.; Gil, C.; Felix, G.; Martinez, A.; Bertucci, C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45*, 677.

<sup>20</sup> <http://lokeylab.wikidot.com/wiki:pampa-assay>



**Figura 5.7.** Esquema de placa a utilizar en PAMPA.

Una vez obtenidos los resultados de absorbancia en los cromatogramas de cada compuesto, se calcularon los valores de  $P_e$  (permeabilidad). Para determinar éste valor se calculó en primer lugar  $C$  (constante del ensayo) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Pe = (-C \times \ln(1 - \frac{[analito]_a}{[analito]_{eq}}))$$

$[analito]_a$ : concentración del analito en el aceptor

$[analito]_{eq}$ : concentración del analito en equilibrio (analito disuelto, no adherido o retenido en membrana ni precipitado en la solución)

$$C = \frac{V_d \times V_a}{(V_d + V_a) \times M_{sa} \times T_s} = \frac{(180 \times 180) \mu L^2}{(180 + 180) \mu L \times 240 \text{ mm}^2 \times 72000 \text{ s}} = 5.24 \times 10^{-6} \mu L/\text{mm}^2 \cdot \text{s}$$

$V_d$  = Volumen Donor = 180  $\mu L$

$V_a$  = Volumen Aceptor = 180  $\mu L$

$T_s$  = Tiempo de ensayo en segundos = 72000 s

$M_{sa}$  = Superficie activa de mambrana = 240  $\text{mm}^2$

C = Constante del ensayo.

$$[analito]_{eq} = \frac{m_{anal_{aceptor}} + m_{anal_{donor}}}{V_a + V_d}$$

$$m_{anal_{aceptor}} = [analito]_a \times V_a$$

$$m_{anal_{donor}} = [analito]_d \times V_d$$

$[analito]_a$ : se determina por la  $I_a$

$[analito]_d$ : se determina por la  $I_d$

$I_a$  = Intensidad en Aceptor

$I_d$  = Intensidad en donador

$$[analito]_{eq} = \frac{I_a \times V_a + I_d \times V_d}{V_d + V_a} = \frac{180 (I_a + I_d)}{360} = \frac{I_a + I_d}{2} \quad \text{sustituyendo en la ecuación de Pe}$$

$$Pe = (-C \times \ln(1 - \frac{2 \times I_a}{I_a + I_d}))$$

Cuando  $I_a$  tiene un valor similar a  $I_d$  se descartan los datos

Generalmente, los compuestos con Pe menor a  $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  se clasifican como de baja permeabilidad y los que tienen Pe mayor a  $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  se clasifican como de alta permeabilidad. Sin embargo, se encuentran publicaciones de investigadores especializados en el área donde se informan compuestos con Pe de 1-6, describiéndolos como de permeabilidad adecuada.<sup>21</sup>

<sup>21</sup> Boehm, M.; Beaumont, K.; Jones, R. M.; Kalgutkar, A.S.; Zhang, L.; Atkinson, K.; Bai, G.; Brown, J. A.; Eng, H.; Goetz, G.H.; Holder, B. R. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 9653..

Compuesto	Pe (x10 <sup>-6</sup> )
Carbamazepina	15.19
Propanolol	14.65
Progesterona	4.93
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (23)</i>	1.31
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (25)</i>	0.50
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly (26)</i>	0.41
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Val-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe (27)</i>	-a
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (28)</i>	0.74
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Gly (30)</i>	2.63
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (31)</i>	0.50
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (32)</i>	0.28
<i>Ciclo-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-L-Met-Gly (33)</i>	1.16
<i>Ciclo-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-L-Phe-L-Glu(<math>\gamma^t</math>Bu)-Gly (34)</i>	4.29
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (35)</i>	0.19
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (36)</i>	0.26
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (37)</i>	1.00
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (38)</i>	0.63
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (39)</i>	3.54
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Gly (40)</i>	0.48
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Ser(<sup>t</sup>Bu)-NMe-Gly (41)</i>	1.98
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu-Gly (42)</i>	-a
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu-Gly (43)</i>	-a
<i>Ciclo-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu (45)</i>	-a
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-L-Glu-NMe-Gly (46)</i>	-a
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (47)</i>	-a
<i>Ciclo-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-NMe-Gly-L-Glu-NMe-Gly (48)</i>	0.15

a) No fueron permeable, no se observa producto en el aceptor

**Tabla 5.6.** Permeabilidad PAMPA experimental para algunos ciclopéptidos sintetizados.

La permeabilidad está relacionada en gran parte con la solubilidad, ya que si el compuesto no se solubiliza en el medio, tampoco podrá atravesar la membrana pertinente. También está relacionada con la lipofilia, ya que cuanto mayor es esta característica, más rápido será su ingreso a la membrana artificial, pero a su vez, si el Log P es muy alto, el compuesto tampoco podrá salir de la misma, quedando retenido.

Entre los ciclopéptidos que presentan mayor solubilidad a pH=7.4 (**27**, **30** y **33**), los que muestran mejores valores de permeabilidad son los compuestos **30** y **33**. De estos dos, el compuesto **30** presenta un valor de Log P bastante alto, por lo que se podría esperar este valor de Pe. Los compuestos **31** y **32**, que tienen como diferencia el cambio de la posición entre Cys(Trt) y Ile, presentan permeabilidades semejantes.

Considerando los ciclohexapéptidos neutros que contienen NMe-Gly, el compuesto **37** es el que presenta mayor permeabilidad de esta serie (compuestos **35-38**), sin embargo, sus Log P son similares. En este caso, sería útil realizar un estudio de la conformación de este compuesto en solventes con distinta constante dieléctrica, por ejemplo cloroformo y DMSO, de manera de evaluar si es posible que **37** tenga un comportamiento camaleónico como el que se muestra en la Figura 5.2 que permitiría el pasaje a uno y otro medio a través de la membrana artificial más fácilmente.

Como puede verse en la tabla, los compuestos que presentan un ácido carboxílico libre, no permearon la membrana, salvo el compuesto **48**, que presenta un valor muy bajo de Pe. Estos compuestos, como se ve en la sección 5.2.2, poseen muy buena solubilidad en buffer PBS pH=7.4/5% DMSO, pero en estas condiciones se encuentran en forma ionizada. Por este motivo, es esperable que la permeabilidad en las condiciones ensayadas sea baja o nula. El compuesto **48** probablemente es el que presenta la mejor permeabilidad, debido a que tiene un mayor número de NMe-AA, con lo que podrá formar un menor número de enlaces de H con el solvente lo que le permitiría permear la membrana.

Los ciclopentapéptidos **39** y **41**, presentan valores un poco inesperados ya que mostraron una solubilidad nula, en buffer pH = 7.4; sin embargo sus valores de lipofilia son altos. Este último parámetro seguramente es el que determina que presenten valores de Pe mayor a 1, por lo que serían considerados compuestos permeables.

El compuesto que presentó el mayor valor de permeabilidad, no presenta grupos tritilos, siendo el menos voluminoso (**34**). Además, presenta un Log P medio y una solubilidad baja. En este caso al igual que para **37**, podría estudiarse la posibilidad de comportamiento camaleónico por presentar un menor volumen, lo que le permitiría tener una mayor flexibilidad conformacional aumentando así la permeabilidad.

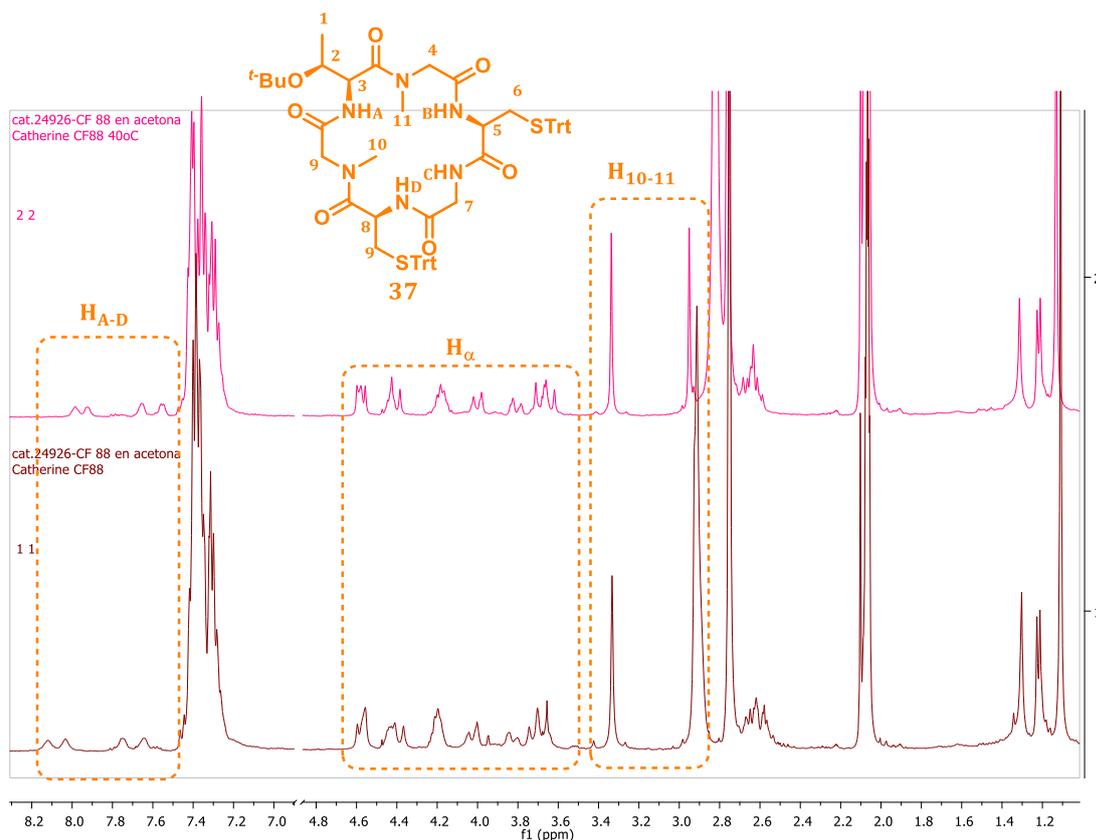
### 5.2.5. Determinación de confórmeros en diferentes solventes.

Como ya se mencionó en la introducción del presente capítulo, los ciclopéptidos, son capaces de adoptar diferentes conformaciones según el disolvente en el que se encuentren. Por lo que, se probó disolver uno de estos, el compuesto **37**, en tres disolventes con características de polaridad y formación de puentes de H diferentes. Se seleccionaron cloroformo, DMSO y acetona deuterados para hacer los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, y en este último disolvente se realizaron a diferentes temperaturas.

En los dos  $^1\text{H}$ -RMN en acetona a diferentes temperaturas, Figura 5.8, se puede ver que las señales correspondientes a los  $\text{H}_\alpha$  (3.5-5.0 ppm) se definen mejor en el espectro a 40°C. También para las señales correspondientes a los H de NH (7.5-8.5 ppm), se ve un desplazamiento a campos mayores cuando se incrementa la temperatura del solvente. A ésta temperatura se puede observar la presencia de un solo confórmero y una mayor definición de las señales. En el espectro a temperatura ambiente, se ven dos señales superpuestas a  $\delta=2.9$  ppm de integración 3 y otra pequeña a  $\delta=3.3$  de integración mayor a 9 que corresponderían a los H metílicos, perteneciente a las NMe-Gly. Cuando la temperatura se eleva a 40 °C, se ven dos singuletes a  $\delta=2.9$  y 3.4 ppm de integración 3H cada una, asignables cada uno a un Me de las NMe-Gly. Es conocido que la resonancia de los H pertenecientes a N-metilo del confórmero *cis* (syn al carbonilo) de amidas, aparece a campos más altos en relación al *trans* debido al efecto de blindaje del grupo carbonilo.<sup>22</sup> En el caso de versicotide C,<sup>23</sup> los autores asignan uno de los N-metilo como *cis* con una  $\delta = 2.91$  ppm y otro como *trans* con una  $\delta = 3.35$  ppm para las señales de estos protones metílicos. Por lo anterior, podríamos suponer que en el caso del espectro realizado a temperatura ambiente de **37**, uno de los NMe se encontraba tanto en *cis* como en *trans*. A 40°C, ese Me pasaría a conformación *cis* ( $\delta = 2.91$  ppm) exclusivamente.

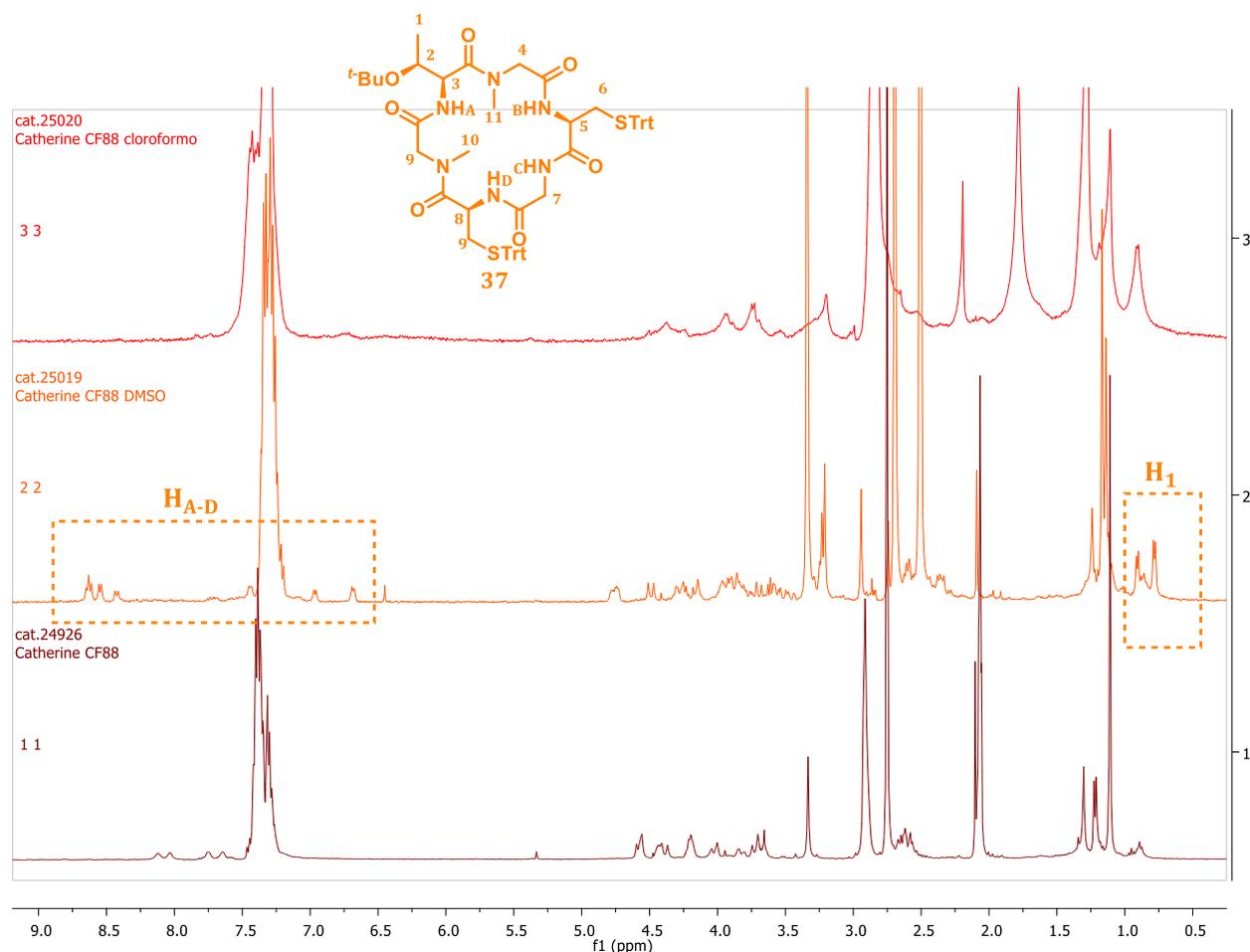
<sup>22</sup> a) Dorman, D. E.; Bovey, F. A. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1719. b) Ramiro, Q. L.; Juan, F. C. V.; Adolfo, C. Q.; Cristina, R. P.; Reyes, T. G.; Ricardo, G. F.; Noemi, W. *Molecules* **2002**, *7*, 662.

<sup>23</sup> Peng, J.; Gao, H.; Zhang, X.; Wang, S.; Wu, C.; Gu, Q.; Guo, P.; Zhu, T.; Li, D. *J Nat Prod.* **2014**, *77*, 2218.



**Figura 5.8.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **37** a  $40^\circ\text{C}$  y temperatura ambiente.

Además de este experimento, se realizó el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **37**, en  $\text{DMSO-d}_6$ , y  $\text{CDCl}_3$  para compararlo con el espectro obtenido en  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , Figura 5.9. En el experimento en  $\text{DMSO-d}_6$ , se observa un gran número de señales, mayores a las esperadas para este compuesto, para prácticamente todos los H, incluyendo las de  $\text{H}_1$ , donde se pueden ver dos señales diferenciadas. Al compararla con el experimento en  $\text{CDCl}_3$  y  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , se observa que además del desplazamiento en algunas señales, en este último disolvente se ven con mayor definición, utilizando siempre la misma concentración para los tres casos.



**Figura 5.9.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **37** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  y  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  a temperatura ambiente.

Es de destacar el amplio rango de desplazamientos en DMSO (6.6 a 8.6 aprox.) para las señales asignables a los NH de las amidas de **37**, comparándolo con el rango en  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  (entre 7.5 y 8.2 ppm). Esto nos permitiría pensar, que algunos de los H en DMSO se encontrarían formando puentes de H con el solvente, lo que determina un corrimiento de estas señales a campos menores, mientras que los H internalizados tendrían sus señales desplazadas a campos mayores.



## 5.3. CONCLUSIONES

Los Log P experimentales para la mayor parte de los compuestos, son similares a los respectivos valores calculados o al menos siguen la misma tendencia, lo cual determina una buena correlación para el método utilizado. Además, la determinación, arrojó valores por lo general bastante altos, lo que está de acuerdo con la alta lipofilia de los ciclopéptidos que mantienen los grupos protectores.

Los ciclopéptidos neutros, presentaron solubilidades muy bajas entre 0-28  $\mu\text{M}$  a  $\text{pH}=1.0$  y entre 0-43  $\mu\text{M}$  a  $\text{pH}=7.4$ . Por otro lado, los ciclopéptidos que presentan un grupo ionizable libre (Ácido carboxílico), presentaron buenas solubilidades a  $\text{pH}=7.4$ , mientras que a  $\text{pH}=1.0$  no se solubilizaron en el rango de 2 horas, salvo el compuesto **48** que presentó una solubilidad de 27.5  $\mu\text{M}$  en esas condiciones. Todos los compuestos que fueron solubilizados resultaron estables en ambas condiciones por 2hs.

Con respecto a la solubilización del compuesto **37** en  $\beta$ -CD, si bien se pudo lograr un incremento de la misma con respecto al ensayo sin este adyuvante, aún resulta insuficiente para nuestros fines. Sería importante, posteriormente realizar estudios con una CD de mayor tamaño.

Cinco de los ciclopéptidos estudiados, presentan valores de  $P_e$  mayores a 1, lo que podría indicar que probablemente estos compuestos puedan permear membranas. Este comportamiento se adjudicaría más bien a una flexibilidad conformacional que a sus Log P y/o solubilidad.

Al realizar espectros para el compuesto **37** con diferentes disolventes deuterados y a diferentes temperaturas, se pudo confirmar la presencia de confórmeros en diferentes condiciones, esto podría determinar un menor costo de desolvatación acuosa para permear la membrana celular.



## 5.4. PARTE EXPERIMENTAL

Todos los solventes utilizados, para los ensayos y para la cromatografía son calidad HPLC. Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químico se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

Las determinaciones de solubilidad, estabilidad y Log P se realizaron en un HPLC analítico Shimadzu (LC-10AT Pump) equipado con un detector SPD20A Prominence UV/Vis. Para la determinación de solubilidad y estabilidad, se utilizó una columna Phenomenex Luna<sup>R</sup> SV 100A C18 (150 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ). La determinación de Log P se realizó utilizando una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ). La detrmnación de las concentraciones para PAMPA, se realizaron en un HPLC analítico Agilent Infinity 1260 equipado con un detector UV/Vis DAD, con una columna Phenomenex Luna<sup>R</sup> SV 100A C18 (150 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ).

### 5.4.1. Determinación de Solubilidad y Estabilidad.

**Solubilidad y Estabilidad a pH=7.4:** Se tomaron 5µL de una solución 10mM en DMSO del compuesto a analizar, diluyendo hasta 100 µL con solución de buffer fosfato salino pH=7.4 (0.1 M). Esta solución se dejó equilibrar a 37°C, con agitación (100 rpm) por 2 hs.

La solución resultante, se filtró y se determinó su concentración por HPLC con detector UV a  $\lambda=220$  nm, utilizando un estándar externo del producto.

**Solubilidad y Estabilidad a pH=1.0:** Se tomaron 5µL de una solución 10 mM en DMSO del compuesto a analizar, diluyendo hasta 100 µL con solución de ácido clorhídrico pH=1.0 (0.1 M). Esta solución se dejó equilibrar a 37°C, con agitación (100 rpm) por 2 hs.

La solución resultante, se filtró y se determinó su concentración por HPLC con detector UV a  $\lambda=220$  nm, utilizando un estándar externo del producto.

Se determinaron las áreas para los picos de la solución del ensayo y para el pico del estándar para cada producto problema, corriendo cada muestra en un sistema de H<sub>2</sub>O:MeCN, 0.003M TFA (con composición dependiente del compuesto a analizar) en una columna Phenomenex C18 Luna SV 100A, 5µm, 4.6 x 150 mm, con un flujo de 1.5 mL/min, determinando la absorbancia a 220 y 280 nm.

**Estabilidad:** La determinación de la estabilidad se realizó buscando ausencia de picos en el cromatograma de la solución filtrada diferentes a los del producto de interés, tomando muestras a los 15, 30, 60 y 120 minutos.

### 5.4.2. Determinación de Log P.

La determinación de Log P, se realizó basándonos en la Guía OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (117): Partition coefficient (n-octanol/water) Hight Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method, para determinación del coeficiente de partición por HPLC.

Se determinaron los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los diferentes compuestos problema, corriendo cada muestra en un sistema isocrático H<sub>2</sub>O:MeCN (25:75), en una columna Zorbax XDB-C8, 5µm, 4.6 x 25 mm, con un flujo de 1mL/min, determinando la absorbancia

a 220 y 254 nm, para así, interpolar este valor en la ecuación de regresión lineal obtenida con los valores de los estándares.

#### **5.4.3. Determinación de permeabilidad trans-membrana PAMPA.**

Se realizó el ensayo siguiendo el protocolo general de PAMPA de Lokey Lab Protocols.

**Soluciones 20  $\mu\text{M}$ / 5% DMSO en buffer PBS:** Se tomó 50  $\mu\text{L}$  de una solución 400  $\mu\text{M}$  de cada compuesto y se agregó 950  $\mu\text{L}$  de buffer PBS.

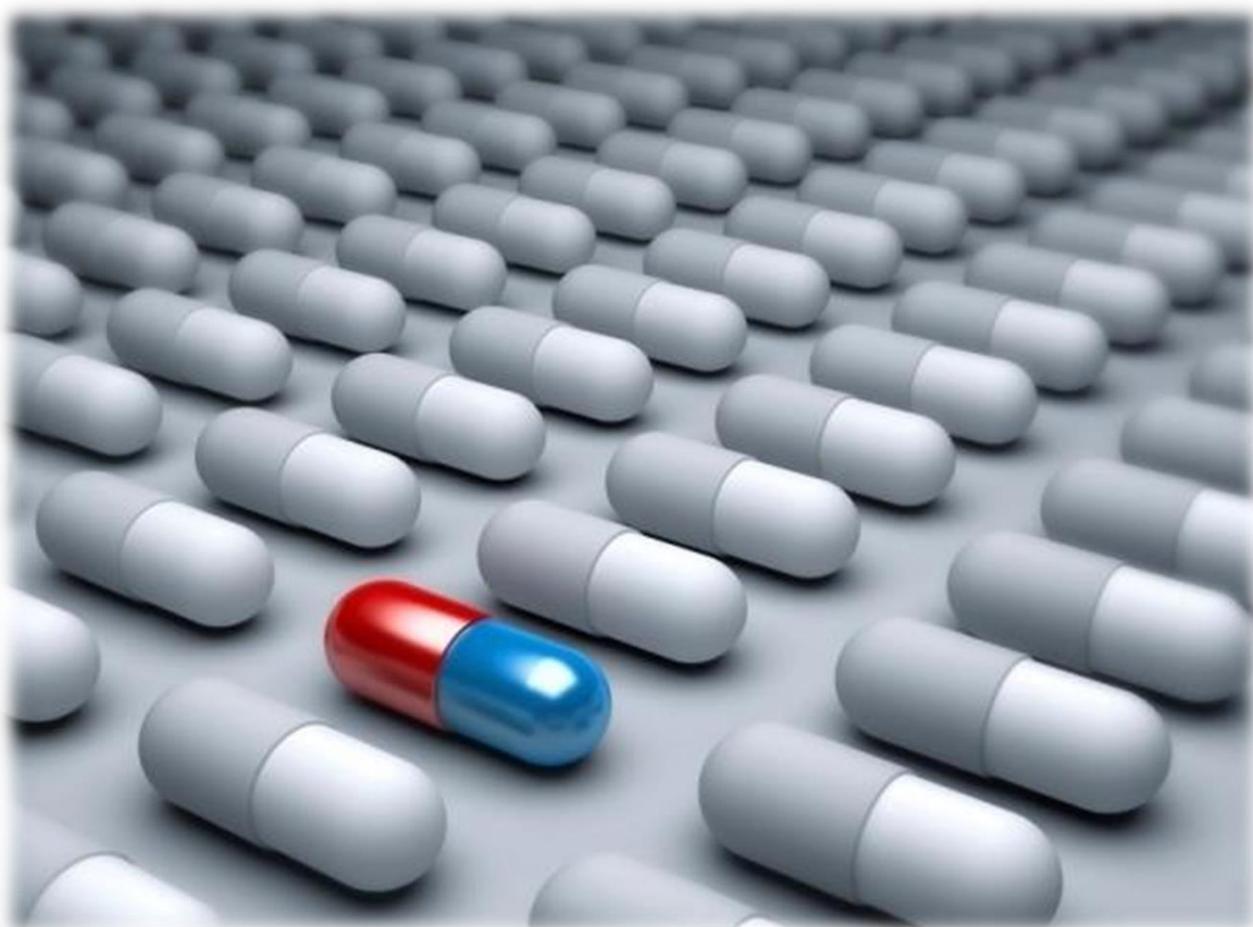
**Placa Donor (Placa D):** Sobre los pocillos a utilizar de esta placa, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de Lecitina al 1% en Dodecano, con cuidado en no tocar la membrana del fondo de esta placa. Esto se dejó humectar durante 10 minutos. Una vez transcurridos los 10 minutos, se carga la placa D con 180  $\mu\text{L}$  de las soluciones 20  $\mu\text{M}$  de cada compuesto por triplicado, incluyendo un blanco de una solución 5% DMSO en PBS y las soluciones de los estándares.

**Placa Aceptor (placa A):** Sobre los pocillos a utilizar de esta placa, se agregaron 180  $\mu\text{L}$  de una solución de DMSO al 5% en PBS (pH=7.4, 1 M) utilizando una pipeta multicanal. Una vez completa se cubre para evitar la evaporación.

Luego se colocó la placa D sobre la Placa A, cuidando que no queden burbujas entra ambas, y se cubrió para evitar evaporación. Se colocaron en un shaker con agitación a 100 rpm por 20 hs.

Una vez transcurrido ese tiempo, se separaron ambas placas, y se cubrió la que no estuviera en uso. La solución de cada pocillo se tomó con una jeringa y se filtró pasándola a un vial para inyectarla luego al HPLC. Para la placa D, se debe tener cuidado de no tocar con la punta de la jeringa la membrana.





## **CAPÍTULO 6**

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES  
BIOLÓGICAS, REA Y PROPIEDADES  
FARMACOCINÉTICAS**



## 6.1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de nuevos fármacos para enfermedades que tienen carencias en el tratamiento existente, como son la Paludismo y la Tripanosomiasis Africana, es de suma importancia, como se comentó en el capítulo 1. En Química Farmacéutica, la identificación de compuestos activos y la optimización de su actividad biológica así como disminución de su toxicidad, son etapas fundamentales en la búsqueda de nuevos fármacos. Para poder conocer estos aspectos, es necesario realizar ensayos *in vitro* con blancos moleculares aislados de las células o con la propia célula. Posteriormente, los compuestos activos se someten a varias evaluaciones experimentales que implican ensayos en líneas celulares, en animales y pruebas clínicas en humanos.<sup>1</sup>

Para llevar adelante esas etapas, es fundamental conocer los parásitos causantes de estas enfermedades y características de su ciclo celular y de transmisión.

### 6.1.1 Tripanosomiasis Africana Humana

La Tripanosomiasis africana humana es causada por los parásitos *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.g.*) y *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b.r.*). Su ciclo comienza cuando una mosca tsé-tsé infectada (género *Glossina*), durante la ingestión de sangre del hospedador mamífero, inyecta trypomastigotes metacíclicos en el tejido de la piel del huésped, (1) Figura 6.1. Los parásitos entran al sistema linfático y pasan al torrente sanguíneo del huésped, donde se transforman en trypomastigotes (2) y son transportados a otros sitios del cuerpo (linfa, líquido cefalorraquídeo, etc.) replicándose por fisión binaria (3). Por otro lado, la mosca tsé-tsé se infecta con trypomastigotes al ingerir la sangre contaminada (4), y en su intestino medio, los parásitos se transforman en trypomastigotes procíclicos, multiplicándose también por fisión binaria (6), luego dejan el intestino y se transforman en epimastigotes (7). Estos últimos, alcanzan las glándulas salivales de la mosca y continúan multiplicándose de la misma manera (8). El ciclo toma

---

<sup>1</sup> Saldívar, F.; Prieto, F.; Medina, J. *Educación Química* **2017**, 28, 51.

aproximadamente tres semanas. Los humanos son el reservorio principal para *Trypanosoma brucei gambiense*, pero esta especie también se puede encontrar en animales. Los animales silvestres son el reservorio principal de *T. b. rhodesiense*.<sup>2</sup> Si bien el *Trypanosoma brucei brucei* no infecta al hombre, es un modelo de estudio “*in vitro*” e “*in vivo*” validado para la búsqueda de compuestos contra la enfermedad del sueño.

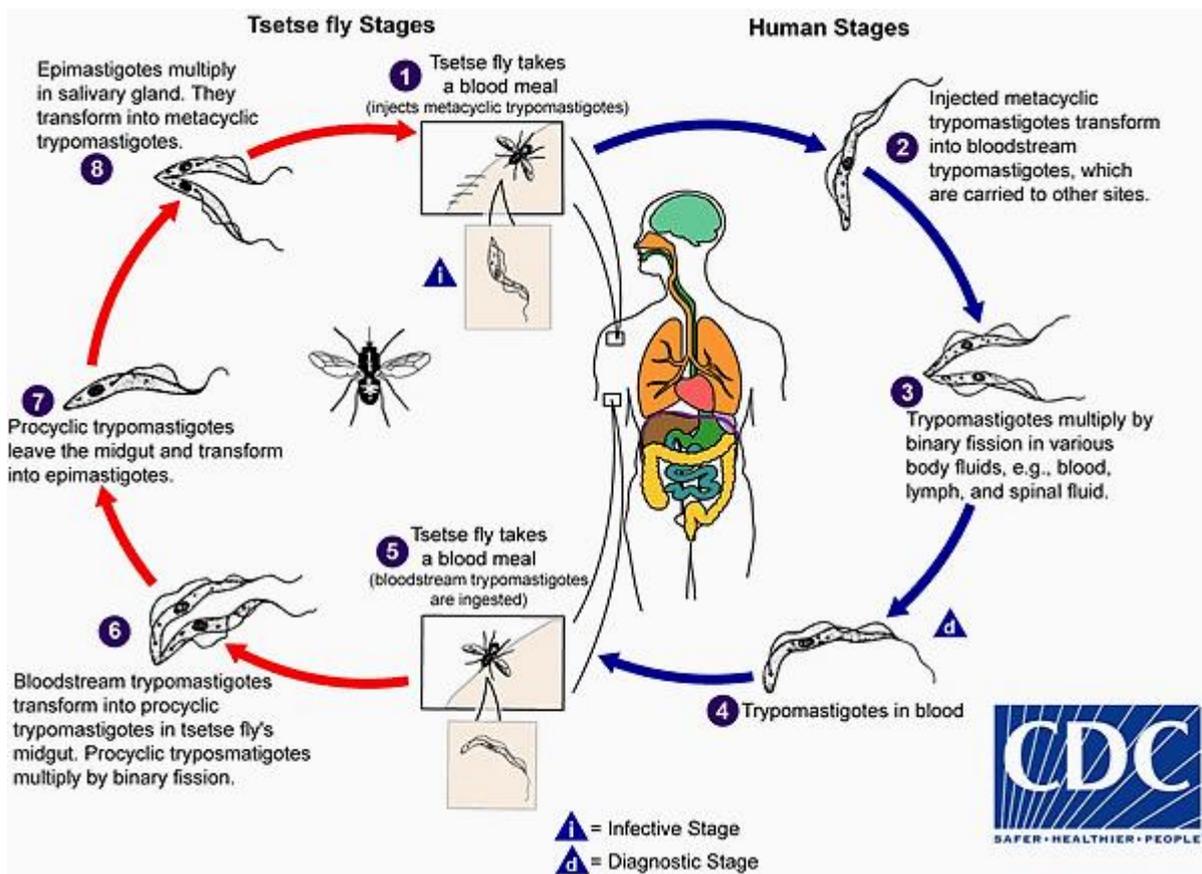


Figura 6.1. Ciclo de vida de *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*.<sup>2</sup>

Dependiendo de la etapa de la enfermedad en la que se encuentre en el humano (1-4 de la Figura 6.1), será el tipo de tratamiento que se administre. Los medicamentos que se usan en la primera etapa tienen poca toxicidad y se administran más fácilmente que los utilizados en la segunda etapa. El éxito del tratamiento en ésta última, depende de que el medicamento atraviese la barrera hematoencefálica para llegar al parásito. Los medicamentos que se usan son tóxicos y complicados de administrar. La OMS recomienda en total cinco medicamentos para su tratamiento (Capítulo 1). Cuanto antes se identifique la enfermedad, mayores son las probabilidades de curación. La evaluación

<sup>2</sup> <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>

de los resultados del tratamiento requiere un seguimiento del paciente durante 24 meses e implica el análisis en laboratorio de líquidos corporales, incluido el líquido cefalorraquídeo obtenido mediante punción lumbar, dado que los parásitos pueden permanecer viables durante largos períodos de tiempo y provocar la enfermedad meses después del tratamiento.

### 6.1.2. Paludismo

Esta enfermedad es causada por parásitos del género *Plasmodium*, diferenciado en las especies *Plasmodium falciparum* (*P.f.*), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*. El parásito tiene un ciclo de vida complejo que involucra el desarrollo de la fase sexual en el mosquito vector hembra del género *Anopheles*; y la fase asexual que ocurre en el humano, inicialmente en el hígado y luego en sangre periférica, Figura 6.2. Cuando los mosquitos se alimentan con sangre, inoculan al hospedador humano los esporozoítos, que son la forma infecciosa y móvil de *Plasmodium spp.* Estos infectan a los hepatocitos, dentro de los cuales maduran a esquizontes. Un solo esquizonte, al romperse puede generar decenas de miles de merozoítos (la etapa resulta de múltiples fisiones asexuales, lo que se conoce como esquizogonia exo-eritrocítica), que se liberan en el torrente sanguíneo donde entran en los glóbulos rojos para replicarse (esquizogonia eritrocitaria), infectando así a estos últimos. En el ciclo eritrocítico, los trofozoítos (forma intra-eritrocítica) maduran a esquizontes, lo que hace que los merozoítos se liberen. Algunos parásitos se pueden diferenciar hacia el estadio sexual (gametocitos) saliendo del ciclo eritrocítico. Los estadios parasitarios sanguíneos son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El inicio de los síntomas clínicos generalmente ocurre de 7 a 10 días después de la picadura del mosquito. *P. vivax* y *P. ovale*, además tienen formas llamadas hipnozoítos (forma latente), que pueden liberarse desde el hígado años después de la infección inicial, conduciendo a una recaída si no se trata adecuadamente.

Los gametocitos, machos (microgametocitos) y hembra (macrogametocitos), son ingeridos por el mosquito *Anopheles* mientras se alimentan de la sangre. La multiplicación de los parásitos en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico. En el estómago del mosquito, los microgametos penetran el macrogameto generando cigotos, que se vuelven móviles y alargados (ooquinetos) invadiendo la pared del

estómago del mosquito donde se desarrollan en oocistos. Los oocistos crecen, se rompen y liberan a los esporozoítos, que encuentran su camino a través de las glándulas salivales del mosquito. La inoculación de los esporozoítos en un nuevo hospedador humano perpetúa el ciclo biológico de la malaria.<sup>3</sup>

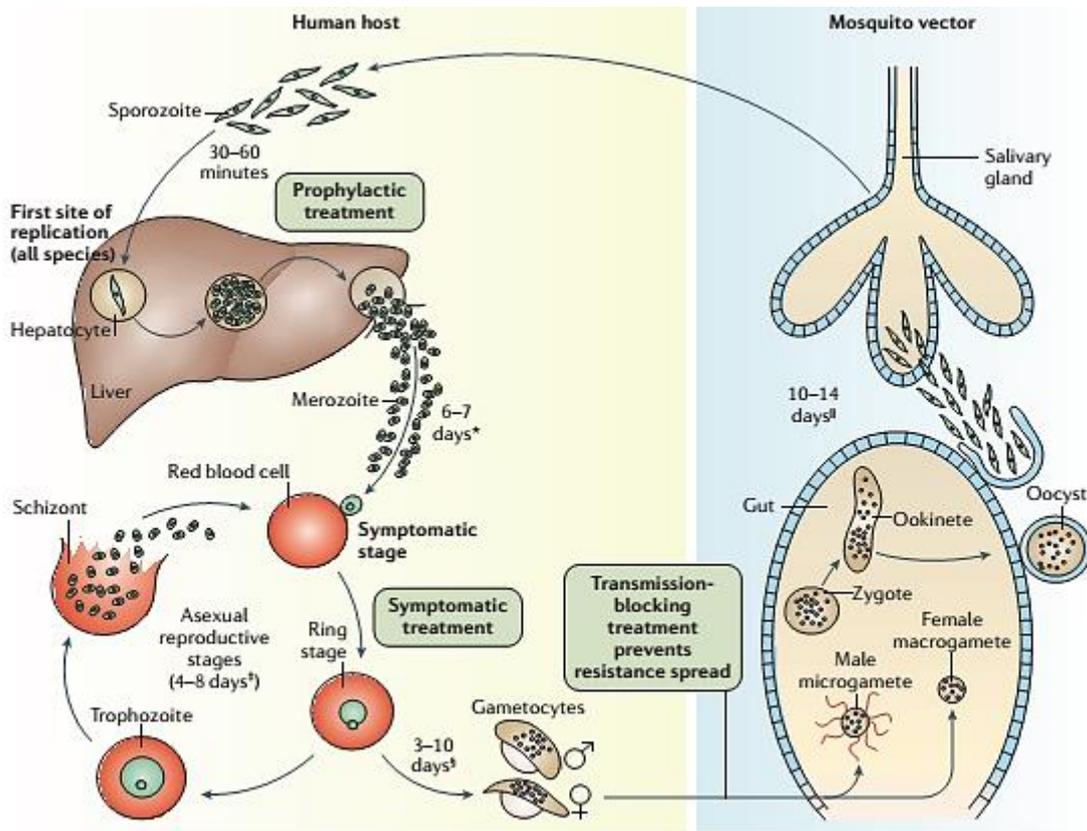


Figura 6.2. Ciclo de vida del *Plasmodium*.<sup>3</sup>

Como se puede ver en la figura 6.2, hay tres etapas del ciclo en las que podemos enfocarnos para la búsqueda de un nuevo fármaco:

1. La transmisión, en la que el compuesto debe ser capaz de matar a los gametocitos.
2. Fase hepática, etapa de profilaxis, ya que el compuesto debe ser activo contra los esporozoítos, que son la forma de ingreso del parásito al ser humano.
3. Fase eritrocítica, en la cual comienza la sintomatología de la enfermedad y donde por lo general se recurre al tratamiento.

<sup>3</sup> a) Phillips, M.; Burrows, J.; Manyando, C.; Van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, C.; Wells, T. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 1.

b) [http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/HTML/Frames/M-R/Malaria/body\\_Malaria\\_page1#Top](http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/HTML/Frames/M-R/Malaria/body_Malaria_page1#Top)

### 6.1.3. Citotoxicidad

Es deseable que un compuesto activo contra los parásitos causantes de la enfermedad que se quiere tratar, presente una baja toxicidad para las células del huésped. Es decir, se buscan compuestos que tengan alta selectividad hacia el parásito. Por tal motivo es fundamental, realizar en forma paralela estudios de citotoxicidad. Para esta determinación, se utilizaron dos líneas celulares distintas debido a que los ensayos fueron realizados por dos grupos. Algunas de las determinaciones fueron realizadas por la Dra. Andrea Medeiros sobre las células de macrófagos murinos J774 en el Instituto Pasteur de Montevideo, en el grupo de Biología Redox de Tripanosomátidos a cargo del Dr. Marcelo Comini. Otros ensayos se realizaron sobre células HepG2 (línea celular de cáncer de hígado humano), en el Instituto de Física de San Carlos, en la Universidad de San Pablo a cargo del Dr. Rafael Guido, realizados por la Dra. Anna Caroline Aguiar.

### 6.1.4. Farmacocinética

La vía de administración para los fármacos, depende principalmente de su capacidad de ingresar al torrente sanguíneo, para que una vez allí pueda ser distribuido en el organismo hasta su sitio de acción. Por lo que, si el compuesto de interés es capaz de absorberse en el tracto gastrointestinal e ingresar al plasma, el mismo puede ser administrado por vía oral. La administración oral, es la preferida en la mayor parte de los medicamentos, principalmente multidosis, ya que es la más cómoda, no necesita personal capacitado para su administración, es la más económica, produce efecto tanto local como sistémico y produce poco rechazo por parte del paciente. Una vez que el compuesto se encuentra en la circulación, es importante también conocer en que concentración está disponible para ejercer su acción y poder fijar una dosis, así como su  $t_{1/2}$  (tiempo de vida media de eliminación, que es el tiempo necesario para eliminar el 50 % del fármaco del organismo)<sup>4</sup> para poder determinar la frecuencia de cada dosis.

Por estos motivos, la determinación del comportamiento farmacocinético de un compuesto candidato a fármaco es de suma importancia. Estas determinaciones se realizaron en ratones machos albinos suizos en Sai Life Science Limited, International Biotech Park, Phase II Hinjewadi, India.

---

<sup>4</sup> Glosario de términos farmacológicos, <http://glosario.sld.cu/terminos-farmacologicos/2011/05/03/>

En el este capítulo, presentaremos los datos obtenidos en la evaluación biológica *in vitro* de los compuestos sintetizados, contra *Plasmodium falciparum* en su fase eritrocítica con las líneas celulares K1<sup>5</sup> y 3D7,<sup>6</sup> contra gametocitos y contra la forma en fase hepática del ciclo.<sup>7</sup> También, se presentarán los estudios de velocidad de muerte en el estadio intraeritrocítico. Finalmente, se describirán los resultados de las evaluaciones *in vivo* de tres compuestos que fueron seleccionados teniendo en cuenta sus actividades contra *P. falciparum* en fase eritrocítica y sus propiedades fisicoquímicas.<sup>5</sup>

Por otro lado, se evaluaron las actividades *in vitro* contra *Trypanosoma brucei brucei* de la línea Grx-roGFP2.<sup>8</sup> También se presentarán los estudios de citotoxicidad en macrófagos murinos J774<sup>7</sup> y células HepG2,<sup>5</sup> de los compuestos que exhibieron actividades prometedoras contra alguno de los parásitos, de manera de determinar el índice de selectividad (SI).

Por último, se determinaron las características farmacocinéticas del compuesto 37 en ratones machos suizos albinos, determinando parámetros como  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  y  $t_{1/2}$ , entre otros.<sup>9</sup>

---

<sup>5</sup> Dra. Vanessa Yardley, Dra. Lindsay Steward, *Faculty of Infectious and Tropical Diseases, LSHTM*, Londres, Reino Unido.

<sup>6</sup> Dra. Anna Caroline Aguiar, Dr. Rafael Guido, *Center of Research and Innovation on Biodiversity and Drugs*, Instituto de Física de San Carlos, Universidad de San Pablo.

<sup>7</sup> Compuestos seleccionados en convenio con Medicines for Malaria Venture. Los ensayos se realizaron en diferentes laboratorios en convenio con ésta Fundación.

<sup>8</sup> Dra. Andrea Medeiros, Dr. Marcelo Comini, *Biologia Redox de Tripanosomátidos*, Instituto Pasteur Montevideo.

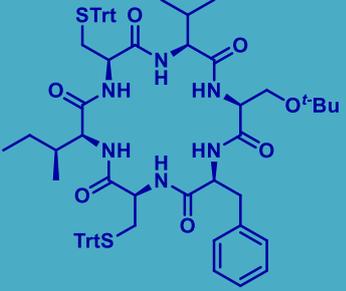
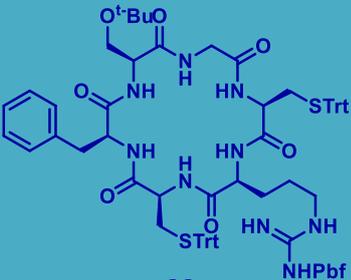
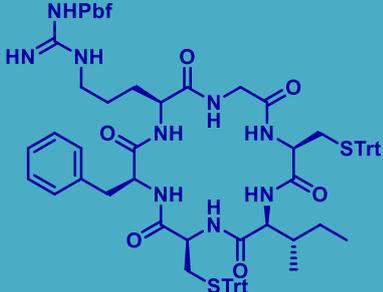
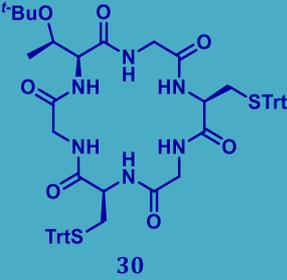
<sup>9</sup> A cargo del M. Pharm. Aslam Burhan, Director del estudio en Sai Life Science Limited, International Biotech Park, Phase II Hinjewadi, India.

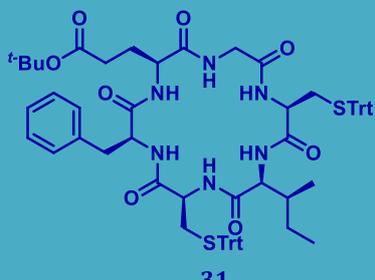
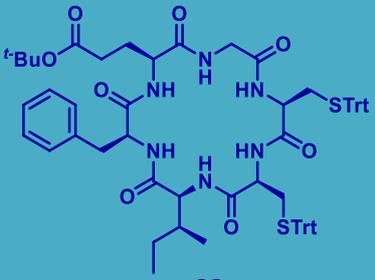
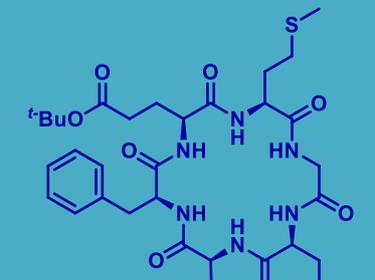
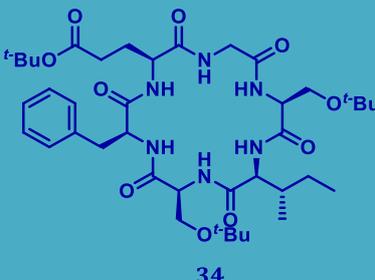
## 6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

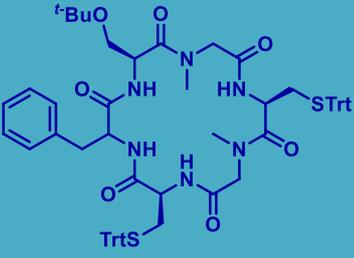
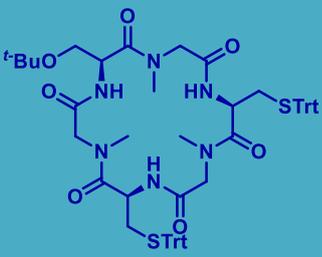
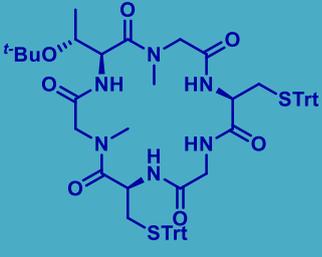
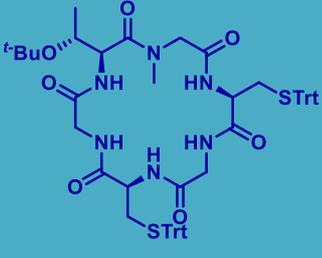
### 6.2.1 Evaluación *in vitro* contra *Trypanosoma brucei brucei* y citotoxicidad

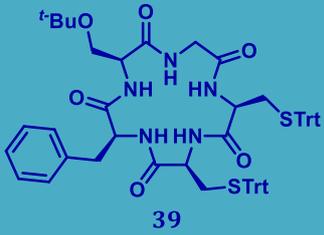
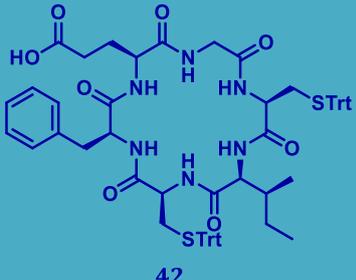
En la presente sección se muestran los resultados para la evaluación *in vitro* contra *T. b. brucei* y citotoxicidad en macrófagos murinos (línea celular J774) o células HepG2. Tabla 6.1.

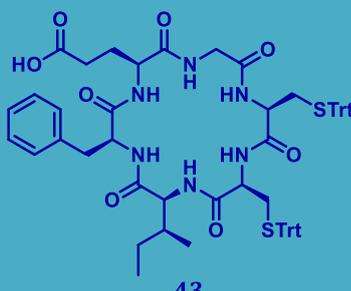
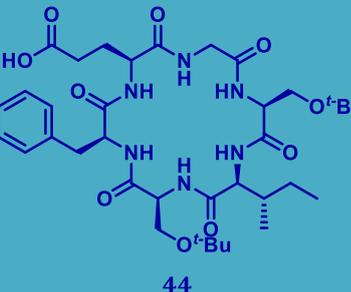
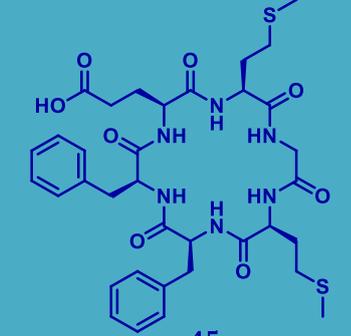
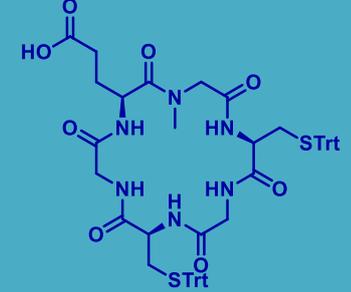
Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> T (IS)
<p>23</p>	7.3 ± 0.2	202 <sup>b</sup> ± 2	28 <sup>d</sup>
<p>24</p>	> 25	ND	-
<p>25</p>	2.1 ± 0.1	199 <sup>b</sup> ± 3	95 <sup>d</sup>
<p>26</p>	1.9 ± 0.2	> 100 <sup>b</sup>	> 53 <sup>d</sup>

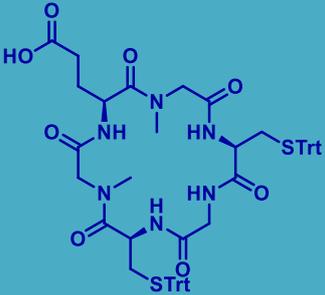
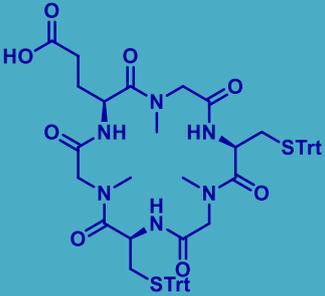
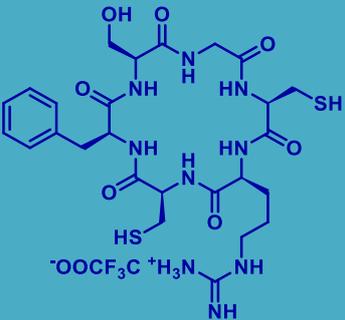
Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> T (IS)
 <p>27</p>	6.0 ± 0.8	> 100 <sup>b</sup>	> 17 <sup>d</sup>
 <p>28</p>	25	ND	-
 <p>29</p>	> 5	ND	-
 <p>30</p>	2.3 ± 0.2	>250 <sup>c</sup>	109 <sup>e</sup>

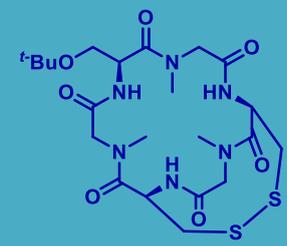
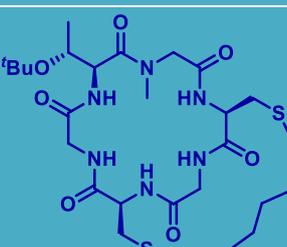
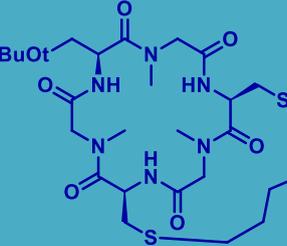
Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> T (IS)
 <p>31</p>	> 5	ND	-
 <p>32</p>	<5	ND	-
 <p>33</p>	>5	ND	-
 <p>34</p>	>5	ND	-

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> T (IS)
 <p>35</p>	1.6 ± 0.2	>250 <sup>c</sup>	> 156 <sup>e</sup>
 <p>36</p>	0.39 ± 0.04	> 100 <sup>b</sup> >250 <sup>c</sup>	> 256 <sup>d</sup> > 641 <sup>e</sup>
 <p>37</p>	0.32 ± 0.01	> 100 <sup>b</sup> >250 <sup>c</sup>	> 312 <sup>d</sup> > 781 <sup>e</sup>
 <p>38</p>	0.46 ± 0.01	> 100 <sup>b</sup> >250 <sup>c</sup>	> 217 <sup>d</sup> > 543 <sup>e</sup>

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> T (IS)
 <p>39</p>	1.1 ± 0.2	ND	-
 <p>40</p>	25 ± 0.2	>100 <sup>b</sup>	>4 <sup>d</sup>
 <p>41</p>	> 5	ND	-
 <p>42</p>	> 5	>250 <sup>c</sup>	-

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> T (IS)
 <p>43</p>	> 5	ND	-
 <p>44</p>	> 5	ND	-
 <p>45</p>	> 5	ND	-
 <p>46</p>	>5	ND	-

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> T (IS)
 <p>47</p>	<5	ND	-
 <p>48</p>	> 5	>250 <sup>c</sup>	-
 <p>49</p>	> 25	ND	-
 <p>50</p>	> 25	ND	-

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> (T) <sup>a</sup> (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> M/CE <sub>50</sub> T (IS)
 <p>55</p>	> 5	ND	-
 <p>56</p>	> 5	ND	-
 <p>57</p>	> 5	ND	-

a) Control: Azul de Metileno: CE<sub>50</sub> = 400 nM y Nifurtimox: CE<sub>50</sub> = 13 μM; b) Evaluación realizada con macrófagos murinos J774, control: Nifurtimox: CE<sub>50</sub> = 170 μM. c) CE<sub>50</sub> Macrófago/ CE<sub>50</sub> *P.f.* K1. d) Evaluación realizada con Células HepG2, control: 100% viabilidad. e) CE<sub>50</sub> HepG2/ CE<sub>50</sub> *P.f.* 3D7.

**Tabla 6.1.** Tabla de actividades biológicas contra *T. b. brucei*, macrófagos murinos J774 e índices de selectividad (IS) de los macrociclos sintetizados.

Observando los resultados obtenidos, debemos resaltar que todos aquellos compuestos que presentan en sus estructura Glu tanto con su ácido carboxílico libre (compuestos **42-48**) como protegido (compuestos **33** y **34**), no son activos frente a este parásito (CE<sub>50</sub>> 5 μM), salvo los compuestos **32** y **47** que tiene un CE<sub>50</sub> inferior a 5 μM, pero no se ha determinado aún el valor exacto. Esto claramente no se debe a una falta de solubilidad, ya que aquellos que presentan el COOH libre tienen muy buenos valores para este parámetro (capítulo 5).

Comparando los resultados para los compuestos **23**, **28**, **49** y **50** respectivamente, se observa que la pérdida de los grupos protectores, produce una reducción de la actividad anti-tripanosómica.

En cuanto a cambios en la composición aminoacídica, los compuestos **23** y **27** difieren en el cambio de una Gly (**23**) por una Val (**27**). Los resultados en sus actividades contra este parásito no difieren de forma significativa, lo que indicaría que la incorporación de un AA más voluminoso no afecta en este sentido. Sobre la estructura del compuesto **23**, la introducción de una Arg(Pbf) en lugar de la Ile entre las dos Cys(Trt) en el compuesto **28**, o en lugar de la Ser(<sup>t</sup>Bu) para el compuesto **29**, vienen acompañada de una pérdida de actividad antitripanosómica. El cambio de Ser(<sup>t</sup>Bu) por Glu(<sup>t</sup>Bu) (compuesto **31**), trae también aparejado la pérdida de actividad, sin embargo, la sustitución de la Ser(<sup>t</sup>Bu) en **26** por una Thr(<sup>t</sup>Bu) en **25**, permite mantenerla. La sustitución en **23** de una Ile por Met para obtener **26**, produce un incremento en casi 4 veces la actividad. Entre los compuestos **23** y **24**, hay dos variaciones que llevan a que éste último no sea activo, una es el cambio de la Ser(<sup>t</sup>Bu) por Cys(Trt) y el otro es el de Phe por Ile. Estos últimos resultados podrían sugerir que la presencia de Ser(<sup>t</sup>Bu) o Thr(<sup>t</sup>Bu) en esa posición son fundamentales para mantener valores micromolares de CE<sub>50</sub>.

La pérdida de Ile entre ambas Cys(Trt) del compuesto **23**, ciclopentapéptido **39**, produce un incremento en 7 veces la actividad. Sin embargo el ciclopentapéptido **41** pierde la actividad comparándolo con el ciclohexapéptido **36** que posee una NMe-Gly más que **41**. Por lo anterior, la influencia en la actividad anti-tripanosomal del tamaño del ciclo dependería de la secuencia de AA implicada.

Las mayores actividades antitripanosómicas fueron para los compuestos **36**, **37** y **38**, ciclohexapéptidos que contienen al menos una NMe-Gly. Estos compuestos tienen la característica de poseer tres Gly o NMe-Gly intercaladas con Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu) o Cys(Trt). Estos ciclohexapéptidos muestran el mismo orden de actividad; sin embargo el análogo que no contiene ninguna NMe-AA (**30**), muestra un descenso de actividad en un orden de magnitud, lo que sugiere que la introducción de NMe-Gly, es muy significativo para mejorar la capacidad antiparasitaria de este tipo de compuestos.

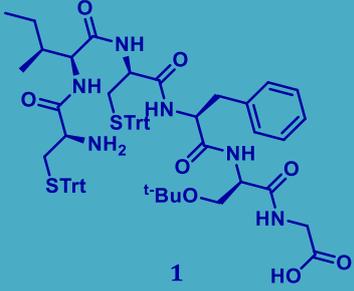
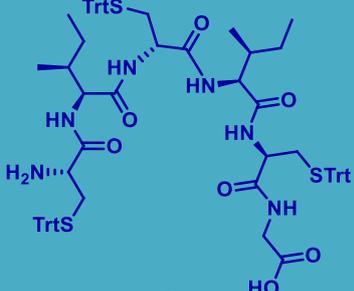
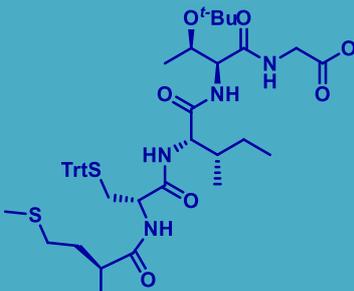
Además, aquellos compuestos que poseen tanto puentes di-sulfuro (**53** y **55**) como cadenas alquílicas formando un triciclo (**56** y **57**), perdieron su actividad con respecto a

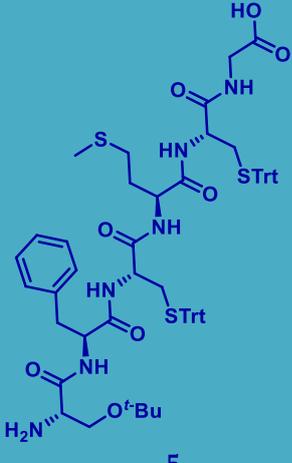
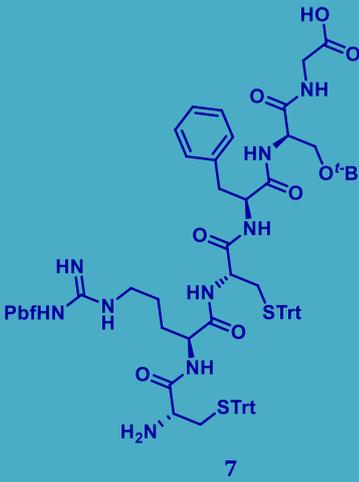
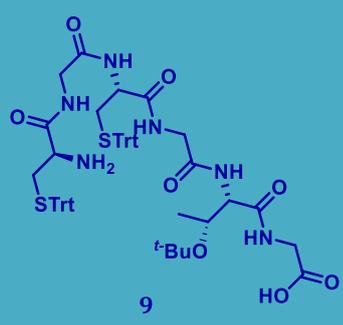
sus precursores **36** y **38**, respectivamente. Es de destacar, que los índices de selectividad (IS), para los compuestos que mostraron actividad del orden micromolar, en general son adecuados. Para los compuestos con actividad sub-micromolar **36**, **37** y **38**, IS es mayor a 200, lo que indicaría una muy buena selectividad hacia el *T. b. b.*

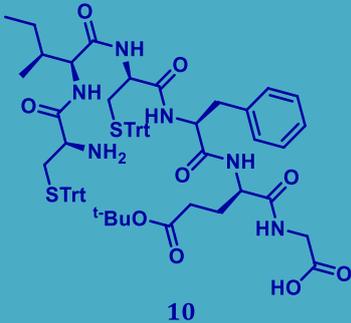
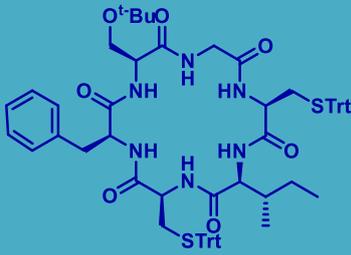
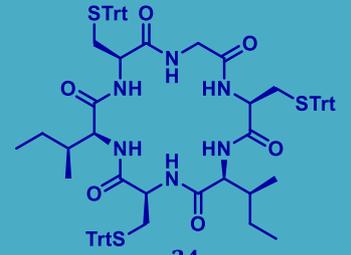
Por lo tanto, se podría decir que mantener el intercalado de AA hidrofóbicos (sin grupos funcionales en sus cadenas laterales) y de derivados de AA hidrofílicos, manteniendo dos Cys y una Ser o Thr, con sus grupos protectores Trt y *t*-Bu respectivamente produciría un incremento de la actividad. El intercambio entre los diferentes AA hidrofóbicos, siempre que estos no sean NMe-AA, mantuvo relativamente dentro del mismo orden de magnitud las actividades, por lo que no tiene gran influencia. Por el contrario, la presencia de NMe-Gly produjo un incremento importante en la actividad.

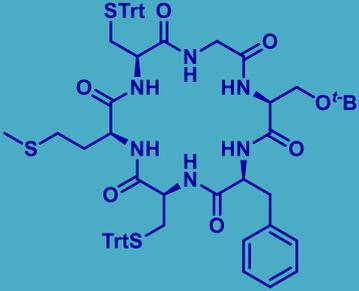
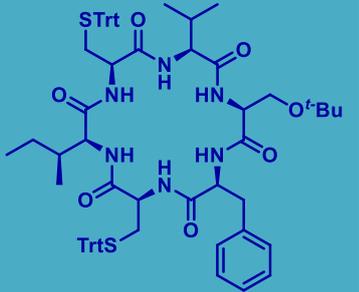
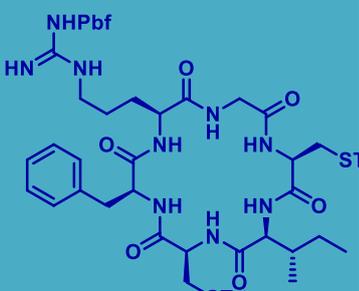
6.2.2 Evaluación *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* K1, 3D7 y citotoxicidad

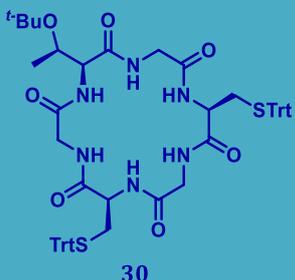
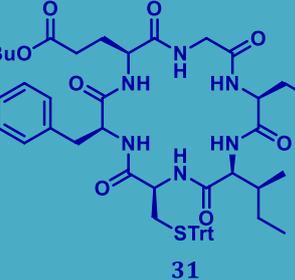
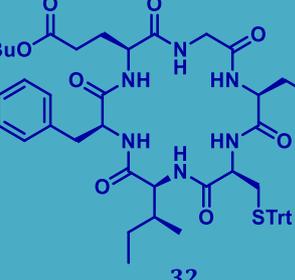
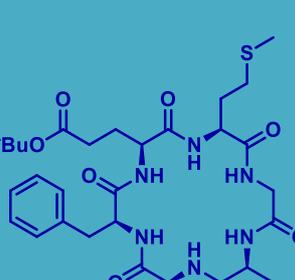
En la presente sección se muestran los resultados para la evaluación *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* en su fase eritrocítica para las cepas K1 (resistente a Cloroquina) y 3D7 (sensible a Cloroquina) y citotoxicidad en macrófagos murinos (línea celular J774) o células HepG2. Tabla 6.2.

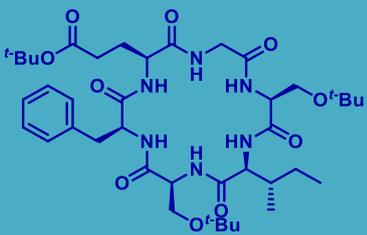
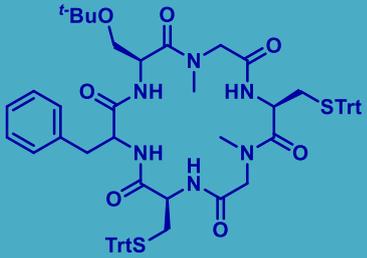
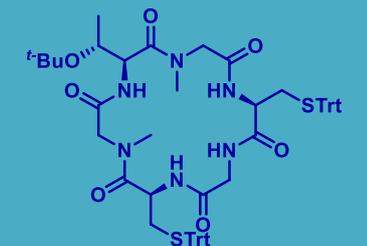
Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>1</p>	ND	0.46 ± 0.01	>100	>216
 <p>2</p>	ND	2.9 ± 0.6	>100	>34.5
 <p>4</p>	ND	0.43 ± 0.05	>100	>233

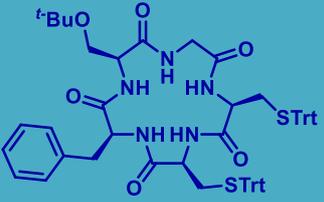
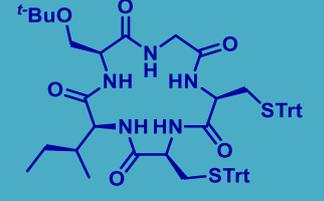
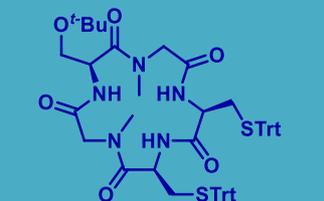
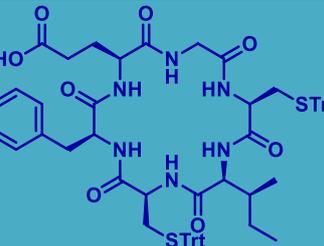
Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>5</p>	ND	>10	ND	-
 <p>7</p>	ND	>10	ND	-
 <p>9</p>	ND	0.38 ± 0.02	>100	>260

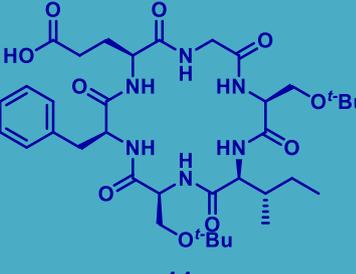
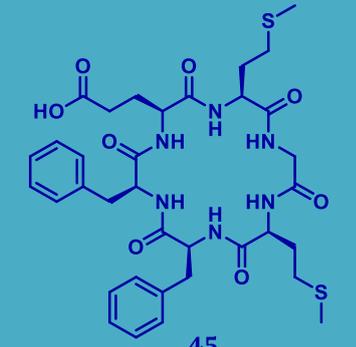
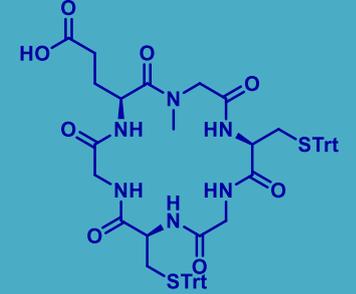
Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>10</p>	ND	0.7 ± 0.1	>100	>154
 <p>23</p>	0.19 ± 0.02	ND	202 <sup>c</sup>	1063 <sup>d</sup>
 <p>24</p>	1.2 ± 0.3	ND	>200 <sup>c</sup>	>172 <sup>d</sup>
 <p>25</p>	0.8 ± 0.2	ND	199 <sup>c</sup>	258 <sup>d</sup>

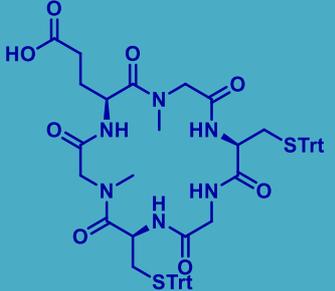
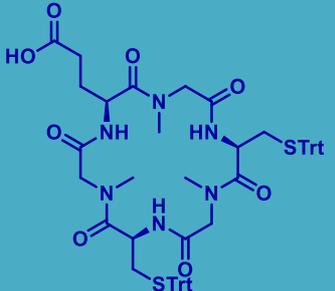
Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>26</p>	0.68	ND	>100 <sup>c</sup>	>147 <sup>d</sup>
 <p>27</p>	6.50	ND	>100 <sup>c</sup>	>15 <sup>d</sup>
 <p>28</p>	16.75	ND	ND	-
 <p>29</p>	43.07	ND	ND	-

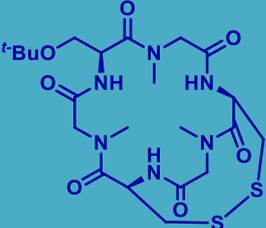
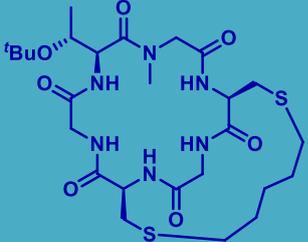
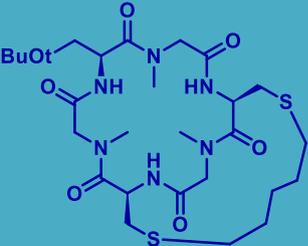
Compuesto	CE <sub>50</sub> P.f. K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> P.f. 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>30</p>	0.028	47 x 10 <sup>-3</sup> ± 0.003	>250 <sup>e</sup>	>5319 <sup>f</sup>
 <p>31</p>	0.42	ND	ND	-
 <p>32</p>	ND	>10	ND	-
 <p>33</p>	ND	4.63	ND	-

Compuesto	CE <sub>50</sub> P.f. K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> P.f. 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>34</p>	ND	3.78	ND	-
 <p>35</p>	9.0 x 10 <sup>-3</sup>	1.8 x 10 <sup>-3</sup> ± 0.0001	>100 <sup>c</sup> >250 <sup>e</sup>	>11111 <sup>d</sup> >1.4 x 10 <sup>5</sup> f
 <p>36</p>	1.3 x 10 <sup>-4</sup>	1.4 x 10 <sup>-3</sup> ± 0.0006	>100 <sup>c</sup> >250 <sup>e</sup>	> 7.7 x 10 <sup>5</sup> d >1.8 x 10 <sup>5</sup> f
 <p>37</p>	7.6 x 10 <sup>-6</sup>	0.25 x 10 <sup>-3</sup> ± 0.00002	>100 <sup>c</sup> >250 <sup>e</sup>	> 1.3 x 10 <sup>7</sup> d >1.0 x 10 <sup>6</sup> f

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>38</p>	8.0 x 10 <sup>-3</sup>	3.8 x 10 <sup>-3</sup> ± 0.0001	>100 <sup>c</sup> >250 <sup>e</sup>	> 12500 <sup>d</sup> >6.6 x 10 <sup>5</sup> <sup>f</sup>
 <p>39</p>	8.37	ND	ND	-
 <p>40</p>	0.73	ND	>100 <sup>c</sup>	>137 <sup>d</sup>
 <p>41</p>	0.15	ND	ND	-
 <p>42</p>	0.47	40 x 10 <sup>-3</sup> ± 0.001	>250 <sup>e</sup>	>6250 <sup>f</sup>

Compuesto	CE <sub>50</sub> P.f. K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> P.f. 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>43</p>	0.42	ND	ND	-
 <p>44</p>	>50	ND	ND	-
 <p>45</p>	>50	ND	ND	-
 <p>46</p>	ND	5.4 ± 0.1	>100 <sup>e</sup>	>19 <sup>f</sup>

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> P.f. (SI)
 <p>47</p>	ND	0.21 ± 0.01	>100 <sup>e</sup>	>477 <sup>f</sup>
 <p>48</p>	2.0 x 10 <sup>-4</sup>	0.012 ± 0.001	>250 <sup>e</sup>	>20833 <sup>f</sup>
 <p>49</p>	>50	ND	ND	-
 <p>50</p>	>50	ND	ND	-

Compuesto	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> K1 <sup>a</sup> (K1) (μM)	CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> 3D7 <sup>b</sup> (3D7) (μM)	Citotoxicidad CE <sub>50</sub> (C) (μM)	CE <sub>50</sub> C/CE <sub>50</sub> <i>P.f.</i> (SI)
 53	0.97	ND	ND	-
 55	3.5	ND	ND	-
 56	13.4	ND	ND	-
 57	1.55	ND	ND	-

a) Control: Cloroquina: CE<sub>50</sub> = 0.47 μM, Artemisinina: CE<sub>50</sub> = 0.02 μM, y Artesunato: CE<sub>50</sub> = 0.003 μM. b) Control: Pirimetamina: CE<sub>50</sub> = 0.031 μM y Artesunato: CE<sub>50</sub> = 0.005 μM. c) Evaluación realizada con macrófagos murinos J774, control: Nifurtimox: CE<sub>50</sub> = 170 μM. d) CE<sub>50</sub> Macrófago/ CE<sub>50</sub> *P.f.* K1. e) Evaluación realizada con Células HepG2, control: 100% viabilidad. f) CE<sub>50</sub> HepG2/ CE<sub>50</sub> *P.f.* 3D7.

**Tabla 6.2.** Tabla de actividades biológicas contra *P. falciparum* líneas celulares K1 y 3D7, citotoxicidades para macrófagos murinos J774 y células HepG2, e índices de selectividad (IS) de los macrociclos sintetizados.

Como se puede observar en la Tabla 6.2, la mayor parte de los compuestos presentaron actividades del orden  $\mu\text{M}$  o sub- $\mu\text{M}$  contra las dos cepas de *P. f.* ensayadas.

Los péptidos precursores **1**, **2**, **4** y **10**, mostraron actividades del mismo orden que sus respectivos derivados macrocíclicos **23**, **24**, **25** y **31**. El péptido **9** presenta una actividad 14 veces menor que su derivado cíclico **30** y en el caso del par de compuestos **5** y **26**, el péptido abierto no mostró actividad, mientras que el macrociclo presentó  $\text{CE}_{50}=0,68 \mu\text{M}$ . Hay que tener en cuenta, de todas formas, que los ensayos se realizaron sobre cepas distintas, los péptidos sobre *P. f.* 3D7 y los macrociclos sobre *P. f.* K1. Por lo tanto, basándonos en estos resultados, se podría decir que en algunos casos las actividades antimaláricas para los macrociclos serían mayores que las correspondientes a sus respectivos péptidos abiertos, pero en forma general, dichas actividades, serían muy dependientes de la secuencia aminoacídica del compuesto.

En cuanto a la composición aminoacídica de cada macrociclo, tomando nuevamente el compuesto **23** como punto de partida, la actividad contra *P.f.* se reduce en 34 veces al cambiar su Gly por una Val (compuesto **27**). También la introducción de la Arg(Pbf) sustituyendo tanto un AA hidrofílico protegido (Ser(*t*-Bu) para el compuesto **29**) como por un AA hidrofóbico (Ile para el compuesto **28**), trae la pérdida de actividad. La sustitución de una Ile por Met para **26**, causó la disminución en 3 veces la actividad, con un valor similar al mostrado por el compuesto **25**, el cual difiere de **26** en la sustitución de una Ser(*t*-Bu) por una Thr(*t*-Bu). El compuesto **24** se diferencia de **23** en dos AA, Ser(*t*-Bu) por Cys(Trt) y Phe por Ile, esto hace que se reduzca a la mitad la actividad.

Otro cambio realizado fue la introducción de Glu(*t*-Bu) (**31**) en lugar de Ser(*t*-Bu) de **21**, manteniendo el orden de actividad con una disminución a la mitad en el  $\text{CE}_{50}$ . Los demás compuestos conteniendo Glu(*t*-Bu), (**32-34**), no mostraron buenas actividades ( $\text{CE}_{50}>3,5 \mu\text{M}$ ). Si comparamos las actividades mostradas para los análogos a estos compuestos con el COOH libre, se observó que el par **31** y **42** mantienen la actividad ( $\text{CE}_{50}=0,42$  y  $0,47 \mu\text{M}$  respectivamente). La presencia del grupo protector en el compuesto **32** hace que éste pierda la actividad en comparación con la del compuesto **43**. Dentro de esta serie de compuestos, se puede ver que el cambio en el orden de los AA, variación introducida en el compuesto **32** al colocar las 2 Cys(Trt) contiguas y por ende dos AA hidrofóbicos quedan también consecutivos, disminuye la actividad. La sustitución de

Cys(Trt) por Ser(*t*-Bu), disminuyó significativamente el CE<sub>50</sub>, comparando tanto para el par **31** y **34**, como **42** y **44**. Otro dato importante, es que cuando en la secuencia aminoacídica se mantiene solamente uno de los AA hidrofílicos, tanto protegido como libre, la actividad antimalárica disminuye significativamente, como se ve para los compuestos **33** y **45**.

Al igual que lo observado para la actividad contra *T. b. b.*, la ausencia de los grupos protectores en las cadenas laterales para los compuestos **49** y **50**, hace que pierdan completamente la actividad antimalárica, pese a que el precursor de éste último compuesto (**28**), presentó un valor bajo para este estudio.

El compuesto **39**, ciclopentapéptido que difiere de **23** en que no contiene Ile entre ambas Cys(Trt), perdió actividad respecto a éste último, mientras que para **40** en el que se cambió una Phe por una Ile, la CE<sub>50</sub> es casi 4 veces menor que para **23**.

Resultados previos de nuestro grupo para un ciclohexapéptido con tres NMe-AA con excelente actividad antimalárica,<sup>10</sup> y la presencia de fármacos peptídicos en el mercado con características fisicoquímicas adecuadas presentando este tipo de AA (ejemplo ciclosporina administrada por vía oral), nos llevó a introducirlos sustituyendo a los aminoácidos hidrofóbicos (que contienen cadenas alquílicas como radical). Por lo tanto se sintetizaron los compuestos **35-38** y **41**. En **35** se mantuvieron algunos aminoácidos de la secuencia de **23**, cambiando dos de sus AA por NMe-Gly. Este cambio hizo que aumentara casi dos órdenes la actividad contra *P.f.* con respecto a **23**. Los ciclopéptidos **37** y **38** que presentan una NMe-Gly y dos Gly y dos NMe-Gly y una Gly respectivamente, mostraron un incremento sustancial en la actividad. Para determinar la influencia de Gly y NMe-Gly en la estructura del ciclo, se sintetizó **30**, el cual mostró CE<sub>50</sub>= 28 nM. Comparando las actividades de **30** (sin NMe-Gly), **38** (una NMe-Gly) y **37** (dos NMe-Gly), el valor más alto es para **37**, del orden picomolar para la línea K1 CE<sub>50</sub>=7.6 pM y 0.25 nM para 3D7. El análogo **36** conteniendo Ser(*t*-Bu) y tres NMe-Gly presenta actividad antimalárica del orden nanomolar similar a **38**. El ciclopentapéptido **41**, que contiene dos NMe-Gly presenta una actividad muy inferior a los compuestos **36-38**, pero mayor a la de los otros ciclopentapéptidos (**39** y **40**).

---

<sup>10</sup> Tesis Doctoral Dra. Stella Peña, "Síntesis de fragmentos claves y estructuras análogas a Aeruciclámidas como potenciales quimioterápicos". Mayo de 2015.

En cuanto a los análogos de los ciclohexapéptidos conteniendo NMe-Gly, pero que contienen un Glu desprotegido en lugar de Ser(*t*-Bu) o Thr(*t*-Bu) (compuestos **46-48**), se observaron actividades mucho menores para los compuestos **46** y **47**, con respecto a sus análogos **38** y **37** respectivamente. Sin embargo, el análogo a **36**, el compuesto **48** tiene valores de CE<sub>50</sub> similares con una actividad nanomolar. El mejor valor de actividad mostrado para el compuesto **48**, con respecto a sus análogos con una y dos NMe-Gly (**46** y **47**), podría ser por un incremento en la lipofilia del primero, la cual se vio disminuida tras la introducción del COOH en los tres compuestos.

Por último, los bicíclos con puentes di-sulfuros (**53** y **55**) y con tioeteres (**56** y **57**) presentan actividad antimalárica menor con respecto a la de sus precursores.

Es de destacar, que todos los compuestos con actividades del orden sub- $\mu$ M, presentaron índices de selectividad muy altos (mayores a 150), siendo para **37** (el compuesto más activo contra *P.f.*) mayor a  $1.0 \times 10^6$ .

Resumiendo, se podría decir que la actividad antimalárica de los ciclopéptidos es muy dependiente de la composición aminoacídica y del tamaño del ciclo, siendo los ciclohexapeptídicos mejores candidatos. Además, es importante que los ciclopéptidos presenten secuencias que alternen aminoácidos hidrofóbicos con aminoácidos conteniendo grupos funcionales en sus cadenas laterales pero mayoritariamente protegidos. Además, parece fundamental la presencia de dos Cys(Trt) y un tercer AA que puede ser Ser(*t*-Bu), Thr(*t*-Bu), Glu(*t*-Bu) o Glu. La presencia de NMe-Gly entre los AA hidrofóbicos, mejora ampliamente la actividades. Se podría decir que para los macrociclos que contienen  $\beta$ -alcoholes protegidos con *t*-Bu, el número óptimo de NMe-Gly es de dos,<sup>11</sup> (**37**), mientras que cuando contienen Glu es de 3 NMe-Gly (**48**).

---

<sup>11</sup> El análogo a **37** conteniendo tres NMe-Gly fue obtenido y evaluado contr *P.f.*K1 en los trabajos de Tesis de Doctorado de Stella Peña mostrando una EC<sub>60</sub> mayor.

### 6.2.3 Evaluación *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* en sus 3 estadios y velocidad de muerte para el compuesto 35.

Estos ensayos fueron realizados por diferentes laboratorios a través de un convenio con Medicines for Malaria Venture (MMV). Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales problemas en el tratamiento de la malaria actualmente, es que existen cepas de *Plasmodium* que han adquirido resistencia a la artemisinina y sus derivados, por este motivo la urgencia de encontrar nuevas terapias para esta enfermedad. Se buscan compuestos que puedan actuar sobre el parásito en más de un estadio o que actúen por un mecanismo diferente por el que actúa la artemisinina y sus derivados. Por lo tanto, poder determinar si los compuestos son activos en las demás formas parasitarias es de suma importancia.

Últimamente ha tomado relevancia la actividad en gametos, dado que esto permitiría controlar la transmisión del mismo, o la actividad en el estadio hepático, ya que permitiría controlar la infección en las primeras etapas de la enfermedad, pudiendo utilizarse como profiláctico. Es destacable, que en estas fases parasitarias la principal medicación utilizada es la primaquina, la cual es muy tóxica.<sup>12</sup> La actividad contra la forma eritrocítica permite el tratamiento de la enfermedad diagnosticada y en desarrollo.

<i>P. falciparum</i> 3D7 CE <sub>50</sub> (nM) /IS	Inhibición de estadio en hígado <sup>13</sup> CE <sub>50</sub> (μM)	Inhibición de gametocitos <sup>14</sup>
1,8 ± 0,1/ 149	0,3347	> 1μM

**Tabla 6.3.** Actividades biológicas del compuesto 35 contra *P.f.* en sus tres estadios.

Como se puede ver en la tabla 6.3, además de la muy buena actividad contra *P.f.* en su fase eritrocítica (CE<sub>50</sub> para 3D7), el compuesto **35** mostró CE<sub>50</sub> sub-μM contra el parásito en su fase hepática (*Plasmodium berghei*), pero no fue activo en gametocitos (*Plasmodium*

<sup>12</sup> Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias - Segunda edición://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.5.12.html.

<sup>13</sup> A cargo de Dra. Elizabeth Winzeler, School of Medicine, Dept. Pediatrics, Pharmacology & Drug Discovery, University of California San Diego, USA

<sup>14</sup> A cargo de Dr. Michael Delves, Imperial College London, Life Sciences, London, UK.

*falciparum* NF54) tanto masculino como femenino. Estos resultados indican que el compuesto **35**, no podría utilizarse como agente bloqueante de la transmisión por eliminación de gametos, pero si podría ser útil como fármaco profiláctico y para el tratamiento de la enfermedad.

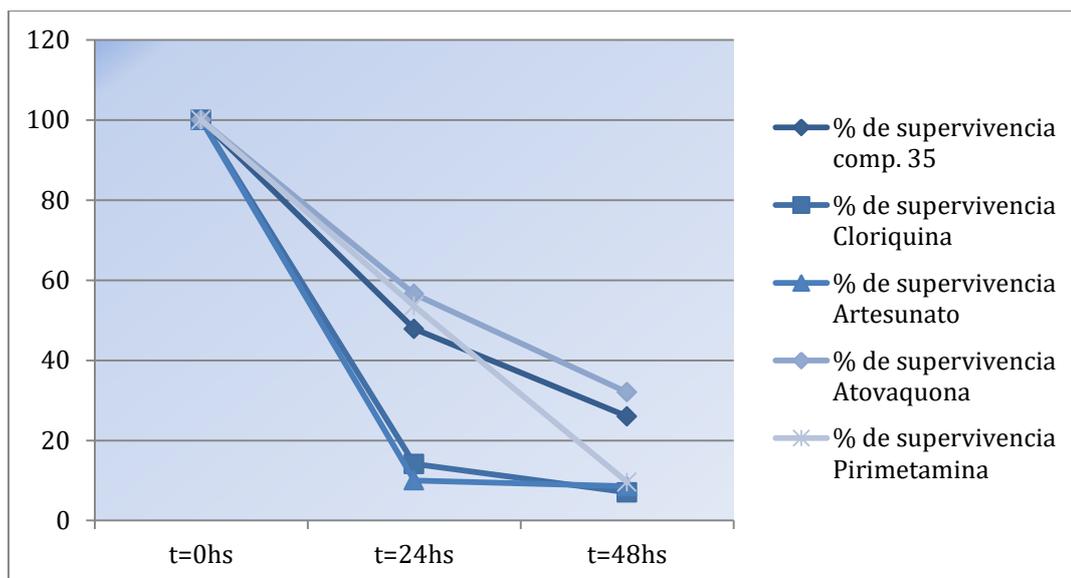
Por otro lado, el ensayo de velocidad de muerte, puede contribuir con la elucidación del tipo de mecanismo por el que pueden estar actuando en este proceso,<sup>15</sup> o también sería un dato relevante en el momento de buscar la forma de administración adecuada (intervalos de tiempos y dosis). Este ensayo también se realizó sobre la cepa 3D7 de la forma eritrocítica del parásito, determinando el % de supervivencia con el transcurso de las horas (0, 24 y 48 hs).<sup>16</sup> Cada compuesto es renovado (lavando los parásitos y agregando medio de cultivo y compuesto nuevamente) después de las primeras 24 hs de tratamiento.

Compuesto	Tiempo de tratamiento				
	0hs	24hs		48hs	
	% supervivencia	% supervivencia	Desviación estándar	% supervivencia	Desviación estándar
<b>35</b>	100	47.83	5.88	26.01	6.02
<b>Artesunato</b>	100	10.01	2.09	8.56	1.23
<b>Cloroquina</b>	100	14.13	4.84	7.04	3.07
<b>Atovacuona</b>	100	56.55	4.36	32.02	6.40
<b>Pirimetamina</b>	100	53.52	1.36	9.59	2.62

**Tabla 6.4.** Velocidad de muerte para *P.f.* 3D7, % de Supervivencia según tiempo de incubación.

<sup>15</sup> Sanz, L. M, ; Crespo, B.; De-Cózar, C.; Ding, X. C.; Llergo, J. L; Brrows, J.; García-Bustos, J; Gamo, F.-J. *PLoS One.* **2012**; 7(2): e30949.

<sup>16</sup> A cargo de Dra. Laura Sanz, Diseases of the Developing World, Tres Cantos Medicines Development Campus, GlaxoSmithKline, España.



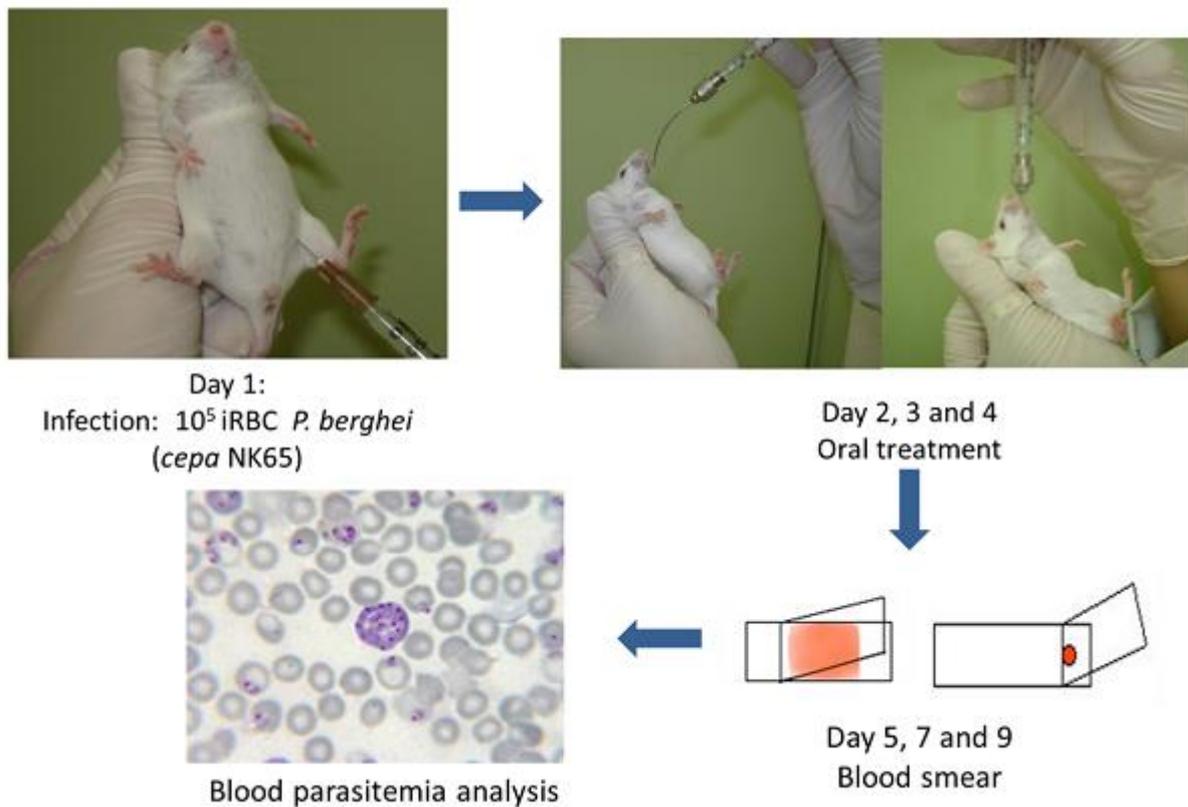
**Figura 6.3.** Gráfico de velocidad de muerte para *P.f.* 3D7, % de Supervivencia vs Tiempo de incubación.

Como se puede ver en la Tabla 6.4 y Figura 6.3, la velocidad con la que el compuesto mata al parásito es comparable con la mostrada por un agente de muerte lento (Atovaquona). Tanto la cloroquina como el artesunato son fármacos de velocidad de acción rápida. En el trabajo publicado por el equipo que realizó el ensayo,<sup>11</sup> atovaquona integra el grupo de compuestos que interfieren de alguna manera con las funciones mitocondriales. Específicamente dentro de dicho grupo los mecanismos descritos son: inhibidores de la dihidroorotato deshidrogenasa de *P. falciparum* una enzima esencial para la biosíntesis de pirimidinas; o en el caso de atovaquona: inhibición del complejo citocromo bc1, que interfiere con la biosíntesis de pirimidinas.

### 6.2.4 Evaluación *in vivo* contra *Plasmodium berghei* NK65 para los compuestos 37, 42 y 48.

Estos ensayos fueron realizados por el grupo del Instituto de Física de San Carlos, USP.<sup>6</sup>

El *Plasmodium berghei*, es uno de los causantes de malaria en algunos roedores. Para este ensayo, se utilizaron ratones suizos adultos que se inocularon con el parásito por vía parenteral, para el estudio por triplicado para cada compuesto (día 1). Los días 2, 3 y 4 se trataron los ratones vía oral con soluciones de los compuestos 37, 42, 48, cloroquina (control positivo) y vehículo (control negativo) en DMSO al 3% en RPMI (medio a base de bicarbonato en agua).<sup>17</sup> Luego los días 5, 7 y 9 se tomaron muestras de su cola para determinar la parasitemia. Tabla 6.4.



**Figura 6.4.** Esquema de ensayo *in vivo* contra *Plasmodium berghei* NK65 en ratones.<sup>5</sup>

<sup>17</sup> <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/R0883?lang=en&region=UY>.

Compuesto 50mg/Kg	Parasitemia (% de reducción)			Días de supervivencia
	Día 5	Día 7	Día 9	
37	0.9 ± 0.7 (70 ± 24 %)	1.7 ± 0.3 (46 ± 10 %)	6 ± 1 (33 ± 10 %)	25 ± 7
42	3.2 ± 0.9 (0 %)	-	-	6 ± 1
48	1.1 ± 0.2 (66 ± 5 %)	1.6 ± 0.2 (46 ± 6 %)	4.8 ± 0.5 (50 ± 4 %)	23 ± 4
Cloroquina	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	> 30
S/tratamiento	3.2 ± 0.5	3.1 ± 0.4	9 ± 2	23 ± 6

**Tabla 6.4.** Actividad antimalárica en ratones inoculados con *P.b.*, tratados durante 3 días consecutivos.

Los compuestos **48** y **37** fueron activos contra parásitos de *P. berghei* reduciendo la parasitemia en 66 ± 5% y 70 ± 24 % respectivamente, al día 5 después de la infección. La reducción de la parasitemia se comprobó hasta el día 9, Tabla 6.4. El compuesto **42** fue inactivo al día 5, por lo que no se continuó con la determinación en los días siguientes. Además, para éste último compuesto los ratones murieron al día 6, antes que para el control negativo (sin tratamiento). Los resultados para los compuestos **37** y **48**, no solo son positivos por la disminución de la parasitemia, sino que también demuestra que tras la administración vía oral, ambos compuestos serían biodisponibles.

### 6.2.5 Evaluación *in vivo* de comportamiento farmacocinético en plasma para compuesto 37.

Estos ensayos fueron realizados por el grupo de Sai Life Sciences Limited de India.

El objetivo de este estudio fue investigar la farmacocinética en plasma de **37** en ratones macho albinos suizos después de una sola administración oral. Se utilizaron nueve animales en este estudio utilizando una dosis oral de 50 mg/Kg administrada en forma de solución de **37** en DMSO al 3% y medio RPMI. Las muestras de plasma una vez tratadas, se analizaron por LC-MS/MS (LLOQ = 4.9 nM). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon utilizando la herramienta de análisis no compartimental de Phoenix WinNonlin® (Versión 7.0) y se resumen a continuación:

Compuesto	Ruta	Dosis (mg/Kg)	$t_{max}$ (hs)	$C_{max}$ (ng/mL)	$AUC_{last}$ (hr*ng/mL)	$AUC_{inf}$ (hr*ng/mL)	$t_{1/2}^a$ (hr)
37	Oral	50	2.00	61.13	314.79	390.71	4.93

a) El cálculo de  $t_{1/2}$ , 4, 6, 8 and 12 hs se tomaron puntos con  $r^2=0.7325$ .

**Tabla 6.5.** Parámetros farmacocinéticos en plasma para **37** después de una administración en dosis única oral a ratones machos suizos albinos.

Las concentraciones en plasma fueron cuantificables hasta 12 horas con  $t_{max}$  a las 2 hs.

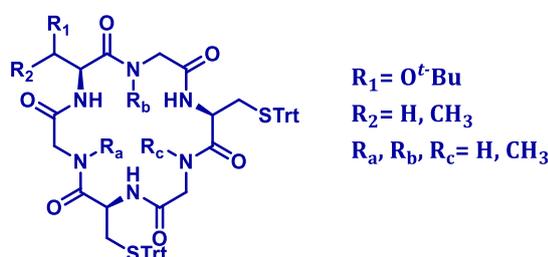
Según los resultados que se muestran en la Tabla 6.5, se puede ver que el compuesto **37** esta biodisponible por vía oral. Además, la concentración en plasma durante las 12 hs posteriores a la administración (mayor a 4.9 nM) es superior a la necesaria para causar la muerte del 90% de los parásitos *in vitro* contra la cepa K1 ( $CE_{90} = 1$  nM)<sup>18</sup>. Otro dato interesante, es que el  $t_{1/2}$  es 4.93 hs, lo cual determina que el compuesto tiene un tiempo de permanencia adecuado en el organismo. Uno de los requerimientos de MMV (Medicines for Malaria Venture) para los nuevos candidatos a fármacos contra ésta enfermedad es que tengan idelamente un  $t_{1/2}$  mayor a 4 hs.. Considerando que la velocidad de muerte para este tipo de compuestos, es lenta, es de suma importancia el tiempo de permanencia en el organismo mostrado.

<sup>18</sup> Estudio realizado en London School of Hygiene and Tropical Medicines



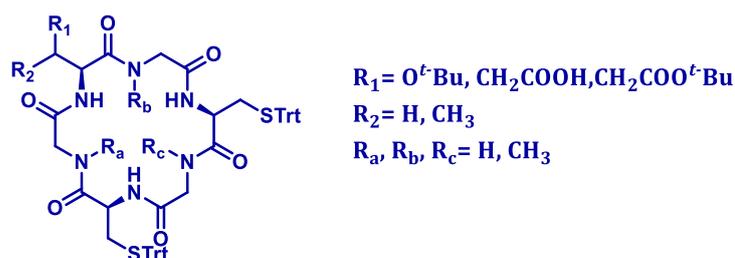
## 6.3. CONCLUSIONES

En cuanto a los resultados de actividad contra *Trypanosoma brucei brucei*, se puede concluir que los ciclopéptidos que alternan AA hidrofóbicos e hidrofílicos, manteniendo dos Cys(Trt) y una Ser(<sup>t</sup>Bu) o Thr(<sup>t</sup>Bu), presentan las mejores actividades. La presencia de NMe-AA en las posiciones de AA hidrofóbicos hace que la actividad contra este parásito se incremente, siendo estos compuestos prometedores en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la Tripanosomiasis africana. El mejor resultado observado fue para el compuesto **37**, el cual contiene dos de estos AA en su estructura.



**Figura 6.5.** Estructura tipo propuesta para mayor actividad contra *Trypanosoma brucei brucei*.

La actividad antimalárica de los ciclopéptidos es muy dependiente de la composición aminoacídica y del número de estos, siendo los ciclohexapéptidos mejores candidatos. Los mejores resultados son para los compuestos que alternan AA hidrofóbicos y derivados de AA hidrofílicos. Además, es fundamental la presencia de 2 Cys(Trt) y un tercer AA que puede ser Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu), Glu(<sup>t</sup>Bu) o Glu. La presencia de NMe-Gly entre los AA hidrofóbicos (sin cadenas laterales con grupos funcionales), mejora sustancialmente las actividad. Se podría decir que para los macrociclos que contienen alcoholes protegidos con <sup>t</sup>Bu, el número óptimo de NMe-Gly es de dos (**37**), mientras que cuando contienen Glu es de 3 NMe-Gly (**48**).



**Figura 6.6.** Estructura tipo propuesta para mayor actividad contra *Plasmodium falciparum*.

Además, ninguno de los compuestos resultó citotóxico contra macrófagos murinos J774 o células HepG2. Todos los compuestos con actividades antiparasitarias prometedoras, presentaron índices de selectividad muy buenos.

El compuesto **37**, resultó ser el más activo contra *T. b. brucei* ( $\text{CE}_{50} = 0.32 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ) y contra *P. falciparum* ( $\text{CE}_{50} = 7.6 \text{ pM}$  para K1 y  $0.25 \text{ nM}$  para 3D7), presentando además índices de selectividad muy buenos ( $\text{IS} > 312, 1.3 \times 10^7$  y  $1.0 \times 10^6$ , respectivamente).

El compuesto **35**, mostró buena actividad contra *Plasmodium* tanto en su fase eritrocítica (*P.f.* 3D7) como hepática (*P.b.*), pero no es activo contra gametos. Además tendría el comportamiento de un agente de muerte lenta, según los datos obtenidos en el ensayo de velocidad de muerte. Estos resultados indicarían que éste compuesto, no podría utilizarse para eliminar los gametos en el huésped y de esta manera bloquear la transmisión, pero si podría ser útil como fármaco profiláctico para eliminar el parásito en las etapas tempranas de la enfermedad, lo cual ayudaría además a disminuir el número de casos.

Los compuestos **37** y **48**, mostraron una importante reducción de la parasitemia *in vivo* para *Plasmodium berghei* NK65, por lo que fueron activos *in vivo* vía oral. Estos son resultados muy prometedores que nos alientan a continuar próximamente con nuevos estudios.

El compuesto **37**, mostró un buen perfil farmacocinético, encontrándose biodisponible con una  $\text{C}_{\text{max}}$  a las 2 hs, con un  $t_{1/2}$  superior a 4 (4.93 hs) cumpliendo así este requisito propuesto por MMV para candidatos a fármacos contra la Malaria, y además presenta una concentración plasmática superior al valor de  $\text{CE}_{90}$  para este compuesto contra *P.f.* K1 durante al menos 12 hs.

## 6.4 PARTE EXPERIMENTAL

### 6.4.1 Procedimiento para la evaluación *in vitro* contra *Trypanosoma brucei brucei* y citotoxicidad.

#### **Estudio de citotoxicidad contra la forma infectiva de *T. brucei*:**

Línea celular: *Trypanosoma brucei brucei* forma sanguínea cepa 449 (línea GrxroGFP2) inducida con tetraciclina 24 hs previo al tratamiento con compuestos.

Medio de cultivo: HMI-9 + 10% FCS y antibióticos (Pen-Strep, Phleomycin)

Los compuestos fueron disueltos en DMSO a una concentración de 10 mM. A partir de estas soluciones madres se preparó una dilución en PBS para obtener una concentración final de 2,5 mM.

Experimento: Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron resuspendidos en medio fresco y sembrados por triplicado en placa de 96 pocillos a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml x pocillo. Los compuestos fueron agregados inmediatamente a concentraciones finales de 25 y 5  $\mu$ M. Se incluyeron como controles parásitos no tratados con compuestos y parásitos agregados de DMSO a concentración final de 0,025%. Las placas fueron incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en estufa humidificada. Después de 24 horas se tomaron 100  $\mu$ L y se le agregó 100  $\mu$ L de PBS Glucosa 1% y un volumen apropiado de CountBright™ como estándar interno de conteo de forma de tener 10 perlas/uL. La mezcla homogeneizada se analizó usando un citómetro de flujo CyAn™ ADP (Dako). Se analizaron aprox. 500 eventos de perlas y se procesó usando el software Summit (Dako). Se expresa el resultado como porcentaje de citotoxicidad celular con respecto al control sin compuesto.

#### **Estimación de CE<sub>50</sub> a las 24hs pos-tratamiento:**

Línea celular: *Trypanosoma brucei brucei* forma sanguínea cepa 449.

Medio de cultivo: HMI-9 + 10% FCS y antibióticos (Pen-Strep, Phleomycin).

Compuestos: A partir las soluciones madres de los compuestos, disueltos en DMSO a una concentración de 10 mM, se prepararon diluciones en PBS para obtener concentraciones finales de 2,0, 0,5, 0,2 y 0,02 mM.

Experimento: Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron resuspendidos en medio fresco y sembrados por duplicado en placa de 24 pocillos a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml x pocillo. Los compuestos fueron agregados inmediatamente a concentraciones finales en un rango de 10 a 0,09  $\mu$ M. Se incluyeron como controles parásitos no tratados con compuestos y parásitos agregados de DMSO a concentraciones finales de 0,1 % (v/v). Las placas fueron incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en estufa humidificada. Los recuentos celulares se llevaron a cabo por duplicado a las 24 hs, empleando cámara de Neubauer y microscopio óptico. Se expresa el resultado como porcentaje de crecimiento celular con respecto al control sin compuesto en función de la concentración de compuesto y se calcula el CE<sub>50</sub> correspondiente.

#### 6.4.2. Estudio de citotoxicidad sobre macrófagos murinos:

Línea celular: J 774.

Medio de cultivo: DMEM glutamax+ 10% FCS y antibióticos (Pen-Strep).

Compuestos: A partir de las soluciones madres de los compuestos, disueltos en DMSO a una concentración de 10 mM, se prepararon diluciones en medio para obtener concentraciones finales de 100, 20, 2, 0,2 y 0,002  $\mu$ M.

Experimento: Las células fueron resuspendidas en medio fresco y sembradas por duplicado en placa de 96 pocillos a una densidad celular de  $1,2 \times 10^4$  células x pocillo. Los compuestos fueron agregados luego de 24 hs a las concentraciones finales del punto anterior. A las 24 hs se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces los pocillos. Las placas fueron incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en estufa humidificada. Los recuentos celulares se llevaron a cabo por duplicado a las 24 hs, empleando reactivo WST-1. Se incluyeron como controles células no tratadas con compuestos y agregados de DMSO a concentraciones finales de 1 %, así como controles sin células. Luego de 3 hs se midió la absorbancia a 450 y 630 nm en lector de placas EL800 (Biotek). La absorbancia corregida se determina como  $A_i^{c450} = A_i^{450} - A_i^{630nm} - A_{blank}^{450nm}$ . Se expresa el resultado como porcentaje de crecimiento celular con

respecto al control sin compuesto en función de la concentración de compuesto y se calcula el CE<sub>50</sub> correspondiente

#### 6.4.3 Procedimiento para la evaluación *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* y citotoxicidad contra células HepG2.

##### *P. falciparum* K1<sup>19</sup>

Cultivos de parásitos. Se utilizó la cepa K1 de *P. falciparum* procedente de Tailandia que es resistente a la cloroquina y la pirimetamina, pero sensible a la mefloquina. Los cultivos son naturalmente asincrónicos y se mantienen en fase continua de crecimiento logarítmico en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de eritrocitos A+ humanos lavados, HEPES 25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 32 mM y AlbuMAXII (albúmina sérica bovina rica en lípidos) (GIBCO, Grand Island, NY) (CM). Todos los cultivos y ensayos se realizan a 37 ° C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>, con un balance de N<sub>2</sub>.

Ensayos de sensibilidad a los compuestos. Las soluciones stock se preparan en 100% de DMSO (dimetilsulfóxido) a 20 mM. El compuesto se diluye adicionalmente a la concentración apropiada usando medio RPMI1640 completo suplementado con 15 mM de hipoxantina fría y AlbuMAXII. Los ensayos se realizan en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos, cada placa contiene 100 µl de cultivo de parásitos (parasitemia al 0,5%, hematocrito al 2,5%). Cada producto se analiza por triplicado y el crecimiento del parásito se compara con el control y los pocillos del blanco (eritrocitos no infectados). Después de 24 h de incubación a 37 ° C, se añaden 3.7 Bq de [3H] hipoxantina a cada pocillo. Los cultivos se incuban durante otras 24 h antes de que se cosechen en esteras filtrantes de fibra de vidrio. La radioactividad se cuenta usando un contador de centelleo Wallac Microbeta 1450. Los resultados se registran como recuentos por minuto (CPM) por pocillo en cada concentración de producto, control y pocillos blanco. El porcentaje de inhibición se calcula a partir de la comparación con los pocillos blanco y de control, y los valores de CE<sub>50</sub> se calculan usando Prism™.

Ensayo. El compuesto se diluye tres veces a 12 concentraciones diferentes con una concentración de partida apropiada. La CI<sub>50</sub> se determina mediante un análisis sigmoideal

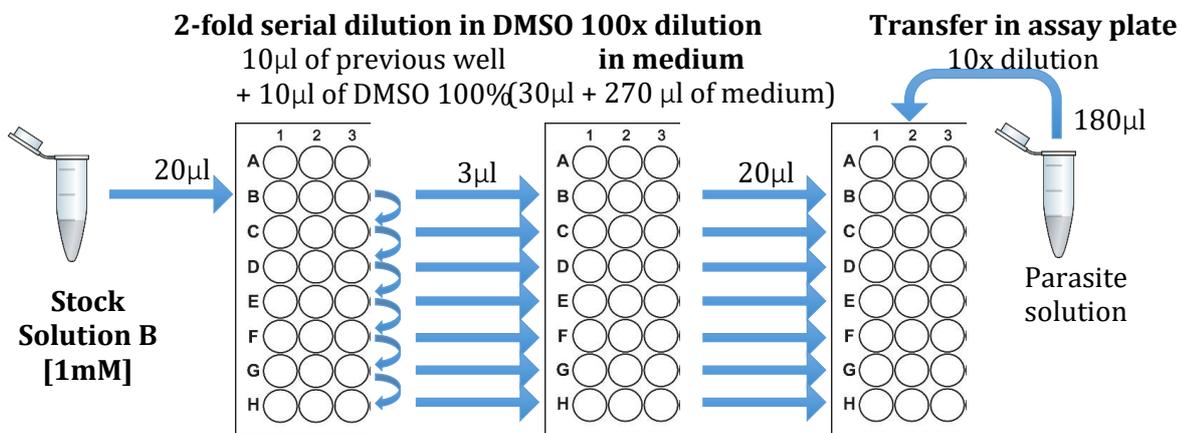
---

<sup>19</sup> Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes D. E.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710.

de respuesta a la dosis utilizando Prism™. Para cada ensayo, se determina el valor de IC<sub>50</sub> para el parásito frente a la conocida cloroquina y artesunato antipalúdicos, más otros compuestos estándar apropiados para el ensayo.

***P. falciparum* 3D7**

Este ensayo utiliza el colorante de ácidos nucleicos SYBR Green I. Se prepararon dos soluciones madre de los compuestos: solución A (dilución de la muestra en polvo) a 20 mM, y solución B a 1 mM (preparada por dilución de la solución A). A continuación, los compuestos se diluyeron 100 veces (concentración del compuesto = 10 µM), luego, se transfirió el volumen adecuado de solución del producto en la placa de ensayo SYBR GREEN (concentración final = 10 – 0.15 µM) ( ver Figura) . si los compuestos muestran una actividad mayor, la concentración inicial se reduce para determinar los valores de CI50. condiciones del ensayo: hematocrito al 2%, parasitemia inicial 0,5% y artesunato y piremetamina como control positivo. El valor de IC<sub>50</sub> de cada compuesto se evaluó en al menos dos experimentos independientes. Las muestras se distribuyeron en la placa y en una línea se colocan los controles de eritrocitos infectados y no infectados. Se mide la fluorescencia de las muestras en los distintos pozos.



**6.4.4 Ensayos *in vivo* contra *P. berghei*<sup>20</sup>**

Se usó un ensayo de supresión del crecimiento parasitario de *P. berghei*, cepa NK65 (originalmente recibida de la New York University Medical School) que infectó ratones como se describió previamente (Peters et al., 1965).

<sup>20</sup> Peters, W. *Exp. Parasitol.* **1965**, 17, 80.

Brevemente, se inocularon ratones adultos exogámicos suizos ( $20 \pm 2$  g) con  $1 \times 10^5$  glóbulos rojos infectados con *P. berghei*, por vía intraperitoneal. Los ratones infectados se mantuvieron juntos durante al menos 2 h y luego divididos aleatoriamente en grupos de 3 animales por jaula, que posteriormente se trataron con 50 mg / kg de cada compuesto diluido en DMSO al 3% (v / v) en RPMI administrado diariamente por sonda oral durante tres días consecutivos.

Se usaron grupos de control en paralelo, uno tratado con CQ (20 mg / kg) y otro con el vehículo. Se prepararon frotis de las colas del ratón los días 5, 7 y 9 después de la infección y luego se fijaron con metanol, se tiñe con Giemsa y se examina microscópicamente. Se evaluó la parasitemia y el porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito calculada en relación con el grupo de control no tratado (considerado 100% crecimiento) usando la siguiente ecuación:  $[(C - T) / C] \times 100$ ; donde C es la parasitemia en el grupo control y T es la parasitemia en el grupo tratado.

#### 6.4.5 Ensayo de citotoxicidad contra células HepG2

Se utilizó el ensayo del colorante tetrazolium MTT para evaluar la citotoxicidad de los compuestos activos. Brevemente, se distribuyeron las células HepG2 en una placa de 96 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^4$  células por pocillo y se incubaron durante 24 horas para la adhesión. La solución madre A, del ensayo de *P. falciparum* 3D7, se transfirió a esta placa en el volumen adecuado para concentraciones finales de 100 - 1.5  $\mu$ M. El ensayo MTT fue realizado comparando con el control negativo (10% de viabilidad) después de 24 horas de incubación y se determinaron los valores de MLC50 para los compuestos.

#### 6.4.6 Procedimiento para la evaluación *in vivo* de comportamiento farmacocinético en plasma para compuesto 37.

El estudio se realizó en Sai Life Sciences Limited, Pune, India, de acuerdo con el Plan de Estudio SAIDMPK / PK-18-03-122.

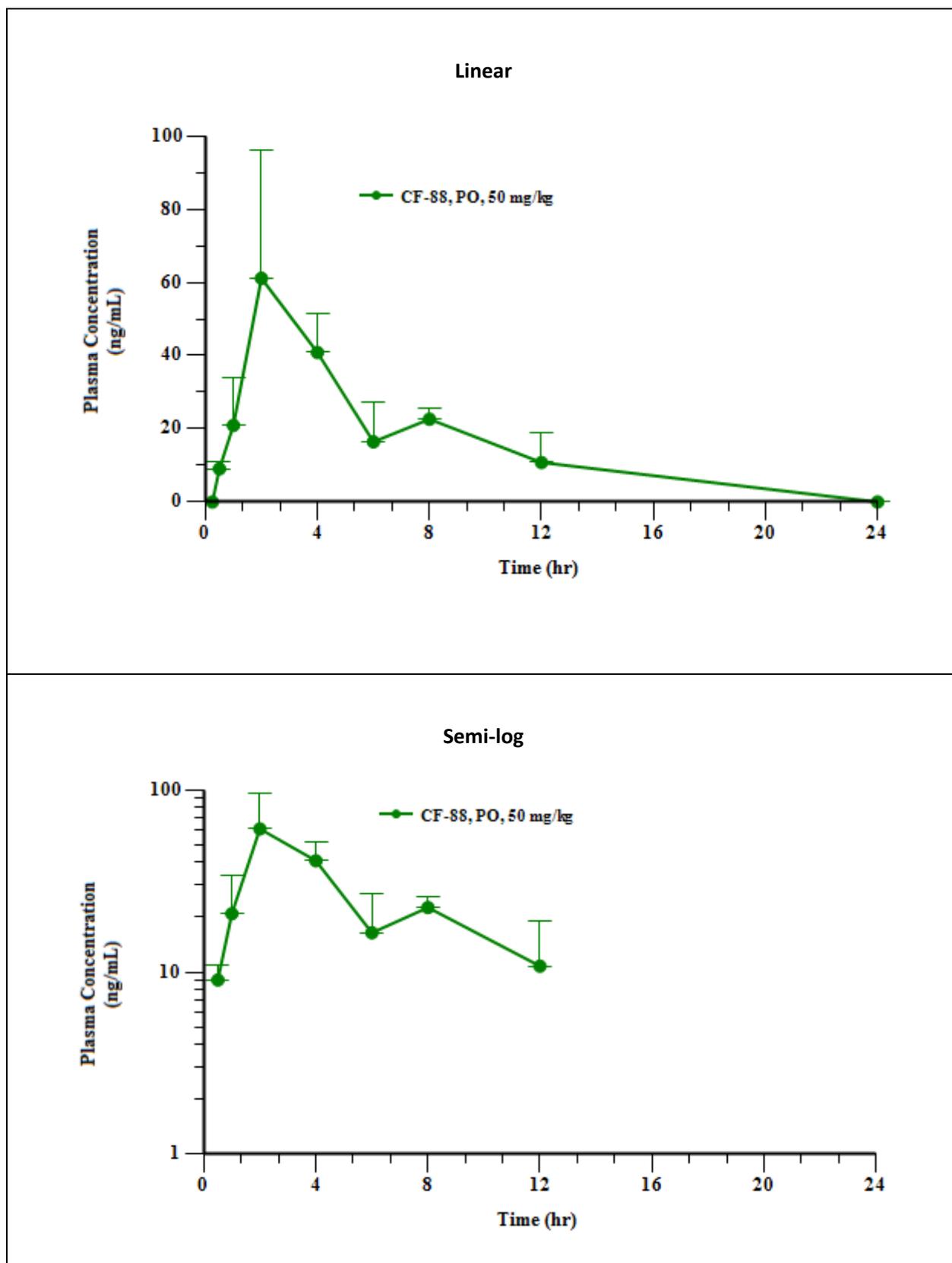
Este estudio se realizó con la aprobación del Comité Institucional de Ética Animal (AICE) de acuerdo con los requisitos del Comité para el Propósito del Control y la

Supervisión de Experimentos en Animales (CPCSEA), India. El estudio no se realizó según las regulaciones GLP y no fue auditado por QA; sin embargo, toda la documentación apropiada se mantiene en el archivo del estudio. El grupo de estudio verificó la precisión de las fases del estudio, los datos generados y el informe.

Se utilizaron ratones macho Albino machos sanos (8-12 semanas de edad) que pesaban entre 25 y 35 g de NIB, India. Tres ratones fueron alojados en cada jaula. La temperatura y la humedad se mantuvieron a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  y 30-70%, respectivamente, y la iluminación se controló para dar una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se registró la temperatura y la humedad mediante un sistema de registrador de datos auto-controlado. A todos los animales se les proporcionó una dieta de laboratorio para roedores durante todo el período de estudio, excepto 2 horas antes de la dosificación y 2 horas después de la dosis en ayunas (Envigo Research private Ltd, Hyderabad).

Se pesó con precisión 19,93 mg de **37** para la dosificación y se añadió 0,112 ml de DMSO y se agitó en vórtice. Se añadió 3,617 ml de medio RPMI y se agitó en vórtice. La formulación final se sometió a agitación durante 2 minutos para obtener una formulación finamente suspendida. Después se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  para el análisis. Se encontró que las formulaciones estaban dentro de los criterios de aceptación (los criterios internos de aceptación son  $\pm 20\%$  del valor nominal).

Nueve ratones macho albinos suizos se utilizaron en este estudio como Grupo. Se administró una formulación en solución de **37** en DMSO al 3% y medio RPMI por vía oral a 50 mg/kg. El volumen de dosificación administrado fue de 10 ml/kg. Las muestras de sangre se recogieron del conjunto de tres ratones en cada punto de tiempo sobre un tubo de microcentrífuga marcado que contenía solución de  $\text{K}_2\text{EDTA}$  como anticoagulante a 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. Las muestras de plasma se separaron por centrifugación de sangre completa y se almacenaron por debajo de  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$  hasta el bioanálisis. Todas las muestras se procesaron para el análisis por precipitación de proteínas usando acetonitrilo y se analizaron con un método de LC-MS/MS apto para el propósito (LLOQ = 5,16 ng/ml). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon utilizando la herramienta de análisis no compartimental de Phoenix WinNonlin® (Versión 7.0).



Perfil medio de concentración-tiempo en plasma de CF-88 después de una administración única de dosis oral en ratones macho albinos suizos (Dosis: 50 mg/kg)





# **CAPÍTULO 7**

## **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**



## 7.1.CONCLUSIONES

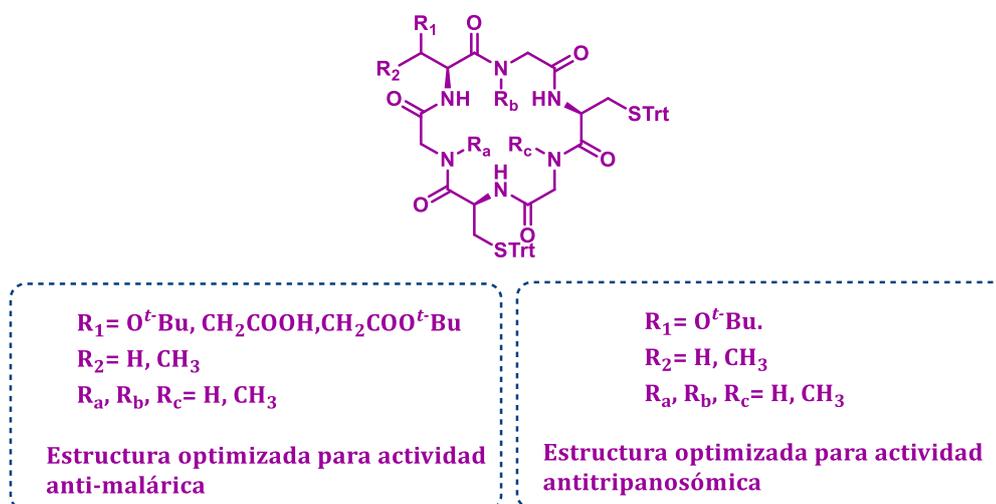
Las conclusiones específicas para cada objetivo, se fueron presentando con detalle en el capítulo correspondiente. En esta sección se presentarán las conclusiones generales del trabajo para aspirar al título de doctorado.

A grandes razgos, en este trabajo se ha realizado el estudio de metodologías sintéticas tanto en solución como en fase sólida, para la obtención de péptidos, ciclopéptidos y derivados, y precursores de ciclámidas. De esta forma se logró obtener un número importante de ciclopéptidos de diferentes tamaños y composición, así como derivados de los mismos. Se establecieron métodos de análisis y se realizó elucidación estructural y estudios de propiedades fisicoquímicas para los compuestos obtenidos, estableciendo algunos métodos adecuados para este fin. Por último, se analizaron los datos obtenidos en las evaluaciones biológicas de los compuestos sintetizados, que arrojaron resultados muy prometedores para varios de ellos.

Algunos de los resultados de síntesis con mejores rendimientos, se observaron en la síntesis de los compuestos que presentaron mejores actividades *in vitro* contra *T. brucei brucei* y *P. falciparum*. Estos contienen al menos una NMe-Gly, siendo esto un excelente punto de partida para un posible proceso de escalado posterior, considerando una producción a gran escala como fármaco.

Los resultados del estudio de propiedades fisicoquímicas, indican que este es un campo de amplio estudio, que sumado a los resultados de actividades biológicas *in vitro*, generan las directrices de la búsqueda del candidato a fármaco con una mejor actividad y adecuadas características fisicoquímicas. Es así que compuestos dentro de los más activos, presentaron cierta permeación en el ensayo de PAMPA, pese a las bajas solubilidades. Debido a la necesidad de buscar un incremento en la solubilidad acuosa de este tipo de compuestos, se introdujo un ácido glutámico libre a la secuencia, viendo que esto genera un gran incremento en ese parámetro, manteniendo una buena lipofilia. Como contrapartida, esto trajo aparejado una disminución en la permeación aunque algunos mostraron buenas actividades anti-maláricas. Esta ganancia en hidrofilia, se comienza a contrarrestar con la introducción de forma creciente de NMe-Gly, lo que se ve reflejado en la mayor actividad que presentó el compuesto **48**, frente a los que contienen un número menor de estos AA.

Se llegó a una posible estructura necesaria y optimizada para ciclohexapéptidos con potente actividad antitripanosómica y anti-malárica *in vitro*. Figura 7.1.



**Figura 7.1.** Estructura tipo de ciclohexapéptidos propuesta para mayor actividad contra *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei brucei* *in vitro*.

La presencia de NMe-Gly en la secuencia peptídica trae un incremento en las actividades biológicas, tanto contra *T. b. brucei* como contra *P. falciparum*. Para la actividad antitripanosómica, no se ve dependencia en cuanto al número de estos en la molécula, pero para la actividad antipalúdica esto es relevante.

Ninguno de los compuestos con actividad significativa *in vitro* mostró ser citotóxico, exhibiendo excelentes índices de selectividad hacia los parásitos. Esto es determinante para el propósito con el que han sido sintetizados.

El compuesto **37**, resultó ser el más activo *in vitro* tanto para *T. b. brucei* ( $CE_{50} = 0.32 \pm 0.01 \mu M$ ) como para *P. falciparum* ( $CE_{50} = 7.6 \text{ pM}$  para K1 y  $0.25 \pm 0.02 \text{ nM}$  para 3D7), presentando además índices de selectividad excelentes ( $IS > 312, 1.3 \times 10^7$  y  $1.0 \times 10^6$ , respectivamente). El compuesto **35**, mostró buena actividad *in vitro* contra *Plasmodium* tanto en su fase eritrocítica (*P. f.* 3D7) como hepática (*P. b.*), pero no fue activo en gametos. Además tendría el comportamiento de un agente de muerte lenta, según los datos obtenidos en el ensayo de velocidad de muerte. Estos resultados indicarían que éste compuesto, no podría utilizarse como agente bloqueante de la transmisión pero si podría disminuirla, así también podría ser útil como fármaco profiláctico y para el tratamiento de la enfermedad.

Los compuestos **37** y **48**, mostraron una importante reducción de la parasitemia de *Plasmodium berghei* NK65 en ratones, por lo que se podría decir que son activos *in vivo*. Esto indica, que son biodisponibles vía oral, lo cual se confirmó con estudios farmacocinéticos para el primero de esos compuestos donde también se observó que tiene un tiempo de vida media adecuado para que pueda mantenerse un tratamiento razonable multidosis, debido a que la velocidad con la que matan los parásitos este tipo de compuestos es lenta.

Por otra parte, realizando estudios de RMN con el ciclopéptido **37**, se comprobó la presencia de distintas conformaciones según sea el disolvente en el que se encuentra, lo que nos permitiría predecir un comportamiento “camaleónico” que facilitaría la permeación a través de membranas.

Se realizaron ciertos ensayos de formulación con  $\beta$ -CD, para los que se vio un aumento en la solubilidad de **37**, pero sin alcanzar un buen valor. Este es un resultado prometedor para continuar con estudios de éste tipo con el fin de incrementar la biodisponibilidad de estos compuestos.

Finalmente podemos concluir, que los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis son muy prometedores para el posible uso de este tipo de compuestos como fármacos antimaláricos o antitripanosómicos.

## 7.2 PERSPECTIVAS

Basándonos en los resultados obtenidos, consideramos que se debería proseguir con las etapas de optimización de líderes en el desarrollo de potenciales fármacos. Por esta razón, se plantea como trabajos posteriores la síntesis de ciclopéptidos análogos a los más activos (conteniendo NMe-AA), con un grupo funcional que permita incrementar su solubilidad acuosa y permeación de la membrana, así como su vida media ( $t_{1/2}$ ). En definitiva, estudiar que modificaciones harían que los compuestos presenten mejores perfiles farmacocinéticos. Dado que la máxima ambición de MMV es realizar tratamientos completos con una dosis única que aseguren la conformidad de los pacientes, la optimización anterior es de suma importancia.

Debido a la excelente actividad *in vitro* presentada por el compuesto **37**, la capacidad de ser activo *in vivo* y un perfil farmacocinético adecuado, nos planteamos completar los estudios preclínicos para éste compuesto. Para ello, también será necesario continuar estudiando una formulación adecuada, como puede ser el uso de una  $\gamma$ -CD, ya que esto podría reducir los esfuerzos hacia la síntesis de un compuesto con mejor ADME.

Dado que el mecanismo de acción de uno de los ciclopéptidos, el compuesto **35**, está siendo estudiado por el consorcio MalDA (Malaria Drug Accelerator) integrado por MMV, como perspectiva futura, luego de conocer el sitio de acción posible, nos planteamos la realización de estudios teóricos.

Por último, planteamos realizar un escalado de los compuestos más prometedores, para poder enfocarnos en los estudios biológicos posteriores.

Por otro lado, se plantea realizar ensayos *in vivo* contra *T. b. brucei* y los demás estudios pertinentes en caso de resultados positivos.

**ANEXO**



## ABREVIATURAS

$^{13}\text{C}$ -RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono

$^1\text{H}$ -RMN: Resonancia magnética nuclear de protón

2-CTC: Cloruro de 2-clorotritilo

AA: Aminoácido

AcOEt: Acetato de etilo

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Boc: t-butoxicarbonil

Cbz: Benciloxycarbonil

$^{\circ}\text{C}$ : Grado Celcius

C8: Columna de fase reversa con fase de octasilano

C18: Columna de fase reversa con fase de octadecilsilano

CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva 50

CE<sub>90</sub>: Concentración efectiva 90

Cl-HOBt: 6-Cloro-1-hidroxibenzotriazol

Cys: Cisteína

COSY: Correlation Spectroscopy

d: Doblete

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0] undeca-7-eno

DCM: Diclorometano

dd: Doble doblete

ddd: Doble doble doblete

DIC: *N,N'*-Diisopropil carbodiimida

DIPEA: Diisopropiletilmins

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMF: *N,N'*-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EP: Éter de petróleo

Fmoc: Fluorenilmetiloxycarbonil

g: Gramo

Gly: Glicina

Glu: Ácido Glutámico

GP: grupo protector

HBTU: Hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilamonio

HCTU: N-óxido de N-[(1H-6-cloro-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanaminio hexafluorofosfato

HATU: N-óxido de N-[(Dimetilamino)-1H-1,2,3-triazol-[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio hexafluorofosfato

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HRMS: High resolution mass spectroscopy

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation

Hz: Hertz

Ile: Isoleucina

IR: Infrarrojo

J: Constante de acoplamiento

L: Litro

LC: Cromatografía líquida

m: multiplete

M: Molar

MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo.

MeCN: Acetonitrilo

MeOH: Metanol

Met: Metionina

mg: miligramo

MHz: Mega Hertz  
μM: micromolar  
mL: mililitro  
mM: milimolar  
mmol: milimol  
MMV: Medicines for Malaria Venture  
ND: No determinado  
NMM: *N*-metil morfolina  
OMS: Organización mundial de la salud  
Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonyl  
ppm: Partes por millón  
Ph<sub>3</sub>PO: Oxido de trifenilfosfina  
Phe: Fenilalanina  
RMN: Resonancia magnetica nuclear  
s: Singulete  
Ser: Serina  
SPFS: Síntesis peptídica en fase sólida  
t: Triplete  
T.amb.: Temperatura ambiente  
*t*-Bu: tert-butilo  
TEA: Trietilamina  
TFA: Ácido trifluoroacético  
THF: Tetrahidrofurano  
Thr: Treonina  
Tf<sub>2</sub>O: Anhídrido trifluoroacetico  
TLC: Cromatografía líquida en capa fina  
TNBS (ácido trinitrobencensulfónico)  
TMP: 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine

TMS: Tetrametilsilano

Trt: Tritilo

UV: Ultravioleta

Val: Valina

## CONCISE ARTICLE



Cite this: *Med. Chem. Commun.*, 2014, 5, 1309

Received 24th March 2014  
Accepted 15th May 2014

DOI: 10.1039/c4md00135d

www.rsc.org/medchemcomm

## Synthesis of cyclohexapeptides as antimalarial and anti-trypanosomal agents†

S. Peña,<sup>a</sup> C. Fagundez,<sup>a</sup> A. Medeiros,<sup>b,c</sup> M. Comini,<sup>b</sup> L. Scarone,<sup>a</sup> D. Sellanes,<sup>a</sup> E. Manta,<sup>a</sup> J. Tulla-Puche,<sup>d,e</sup> F. Albericio,<sup>d,e,f,g</sup> L. Stewart,<sup>h</sup> V. Yardley<sup>h</sup> and G. Serra<sup>\*a</sup>

Cyclohexapeptide analogs of natural products were obtained in very good yields by a combination of solid-phase peptide synthesis, for the linear peptide, and solution cyclization. The activities against *Plasmodium falciparum* K1, *Trypanosoma brucei brucei* and murine macrophages (cell line J774) of these novel compounds and azolic macrocycles, previously reported by us, were evaluated. Seven macrocycles showed submicromolar activities against *Plasmodium falciparum* K1 and a high selectivity (SI > 125) for the parasite. In addition, two compounds displayed one digit micromolar EC<sub>50</sub> against *T. brucei brucei* and satisfactory selectivity (SI 82 and 95). Preliminary structure–activity relationships are presented.

### Introduction

Parasitic tropical diseases such as Human African Trypanosomiasis (HAT) and malaria affect almost 300 million people every year.

Malaria is a life-threatening illness caused by *Plasmodium* parasites that are transmitted to humans through the bite of an infected female Anopheles mosquito. *P. falciparum* is the most deadly of the four species that cause malaria.

According to the World Health Organization 2012 report, approximately 3.3 billion people were at risk of malaria in 2011, principally in the sub-Saharan region.<sup>1</sup> Indeed, this region of Africa is also endemic to HAT or sleeping sickness, which is caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei gambiense*. Both subspecies are transmitted by the bite of an infected tsetse fly (*Glossina* genus) and have a fatal outcome if left untreated. The current statistics in Africa's endemic

countries report about 60 million people at risk with ~10 000 new cases per year.<sup>2</sup> Moreover, and though not pathogenic to humans, the closely related subspecies *T. brucei brucei* produces a highly disabling disease in cattle, known as Nagana, which impacts heavily on the economy and the nutritional status of the rural communities is affected.<sup>3</sup>

Present-day chemotherapy for these diseases is not effective due to a limited number of useful drugs, poor efficacy, undesirable route of administration, emergence of drug resistance, side effects and unacceptable toxicity.<sup>4</sup> In the case of malaria, drug resistance is a major problem, since recently artemisinin resistance has been detected in the south-east Asia.<sup>1,5</sup>

With billions of people at risk and the unsuccessful current chemotherapy, there is an urgent need for discovering safe and effective antimalarial and anti-trypanosomal drugs. For these reasons, over the last decade, several research groups have been involved in the isolation, design and synthesis of antiparasitic compounds.<sup>6</sup>

Natural products are excellent models for the development of potential antiparasitic chemotherapy. The structural diversity is a source of inspiration for drug discovery and the preparation of analogs as simplified, synthetically more accessible and stable models are broadly described in the literature. According to Newman and Cragg's revision, approximately 71% of new approved drugs from 1981 to 2010 were derived or inspired from natural products.<sup>7</sup>

Several azolic cyclopeptides displaying anti-plasmodial or anti-trypanosomal activity were identified over the last few years.<sup>8</sup> Gerwick and co-workers have isolated antimalarial venturamides A (1) and B (2) from the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp., which show IC<sub>50</sub> = 8.2 μM and 5.2 μM against the *P. falciparum* W2 chloroquine-resistant strain, respectively, and mild cytotoxicity to mammalian Vero cells (IC<sub>50</sub> = 86 and 56 μM, respectively), Fig. 1.<sup>9</sup> Gademann and co-workers have

<sup>a</sup>Cátedra de Química Farmacéutica, (DQO), Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, CP 11800, Uruguay. E-mail: gserra@fq.edu.uy; Fax: +598 29241906; Tel: +598 29290290

<sup>b</sup>Group Redox Biology of Trypanosomes, Institut Pasteur de Montevideo, Matajojo 2020, CP 11400, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral. Flores 2125, CP 11800, Montevideo, Uruguay

<sup>d</sup>Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Baldiri Reixac 10, 08028-Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Barcelona Science Park, Baldiri Reixac 10, 08028-Barcelona, Spain

<sup>f</sup>Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, 08028-Barcelona, Spain

<sup>g</sup>School of Chemistry & Physics, University of KwaZulu-Natal, 4001-Durban, South Africa

<sup>h</sup>Faculty of Infectious & Tropical Disease, LSHTM, Keppel Street, London, WC1E 7HT, UK

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4md00135d

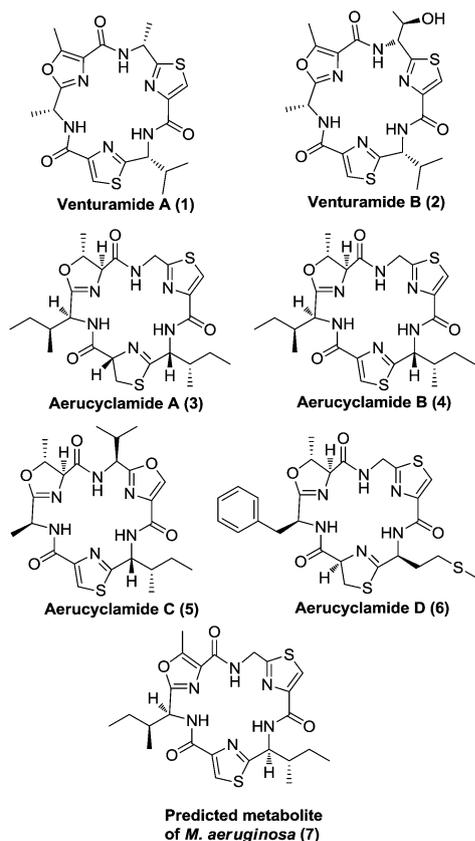


Fig. 1 Examples of natural azole cyclohexapeptides with antimalarial or/and antitrypanosomal activities.

isolated aerucyclamides A (3), B (4), C (5) and D (6) from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.<sup>10</sup> Aerucyclamide B (4) and its predicted metabolite (7)<sup>11</sup> show promising antiplasmodial activity towards the *P. falciparum* K1 chloroquine-resistant strain with  $IC_{50}$ s of 0.7  $\mu$ M and 0.18  $\mu$ M, respectively.<sup>10,12</sup> Aerucyclamide C (5) is the most active of the aerucyclamides against *T. b. rhodesiense* ( $IC_{50}$  = 9.2  $\mu$ M). In addition, aerucyclamides display a large selectivity for the parasites over a cell line of L6 rat myoblast and the analog (7) shows 555-fold selectivity for *P. falciparum* than against the murine macrophages.<sup>10,12</sup>

Interestingly, several non azolic-cyclohexapeptides displayed antiparasitic activity. Mahafacyclin B (8) and chevalierin A (9),

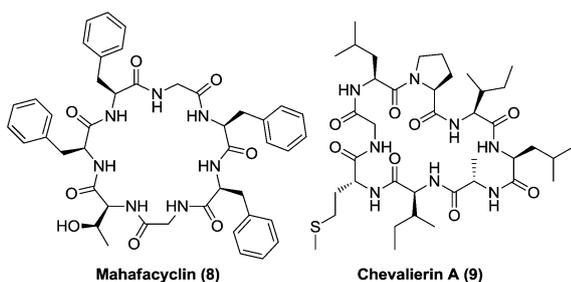


Fig. 2 Non-azolic cyclohexapeptides with antimalarial activity.

Fig. 2, cyclic peptides isolated from the latex of *Jatropha* species, showed  $IC_{50}$  = 2.2 and 8.9  $\mu$ M, respectively, against *P. falciparum*.<sup>13</sup> Cyclopeptides possess a number of desirable properties that make them promising candidates for the discovery of novel drug molecules. In general, they present structural features to favor bioactive conformations, selectivity to the receptors and metabolic stability. In addition, the absence of C- and N-terminal ionizable groups and the internal hydrogen bonded conformations allow them to cross membranes.<sup>14</sup>

As part of a search for compounds with antimalarial or anti-trypanosomal activity, recently we reported the syntheses of aerucyclamide B<sup>15</sup> and azolic analogs.<sup>12,16</sup> Based on the relevant biological activities shown by aerucyclamides,<sup>10</sup> their oxa(thia)zole analogs,<sup>12,16</sup> and several natural cyclopeptides,<sup>13</sup> we embarked on the synthesis of new cyclohexapeptide analogs. These compounds, containing cysteine or threonine/serine amino acids, which are biomimetic precursors of thiazoline/thiazole or oxazoline/oxazole, respectively,<sup>17</sup> were prepared and evaluated to study the influence of the azole rings and of the open precursors on biological activity. The thiol or hydroxyl groups of Cys or Thr/Ser, respectively, of these macrocycles remained protected in order to maintain the number of ionizable and polar groups present in the azolic analogs and to avoid undesired reactions.

In this work, seven novel macrocycles were obtained from hexapeptides prepared by solid phase peptide synthesis (SPPS) methodology. These compounds and seven other macrocycles previously obtained by us, the predicted metabolite of *M. aeruginosa* (7),<sup>12</sup> the precursor of aerucyclamide B (10),<sup>15</sup> the fluorinated derivative (11),<sup>15</sup> synthetic aerucyclamide B,<sup>15</sup> and the aerucyclamides analogs (12–14),<sup>16</sup> Fig. 3, were evaluated against *Plasmodium falciparum* K1, *Trypanosoma brucei brucei* and murine macrophages (cell line J774).

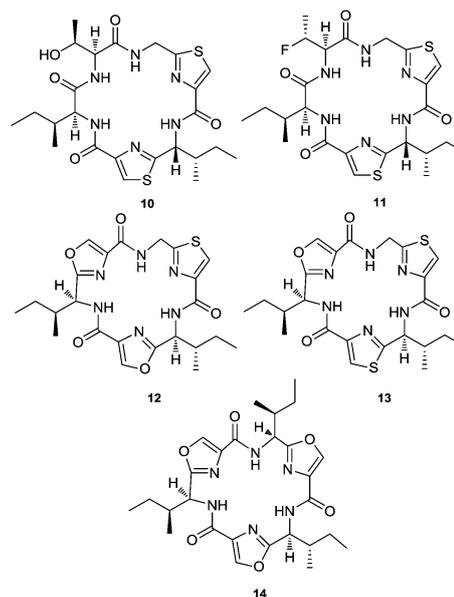


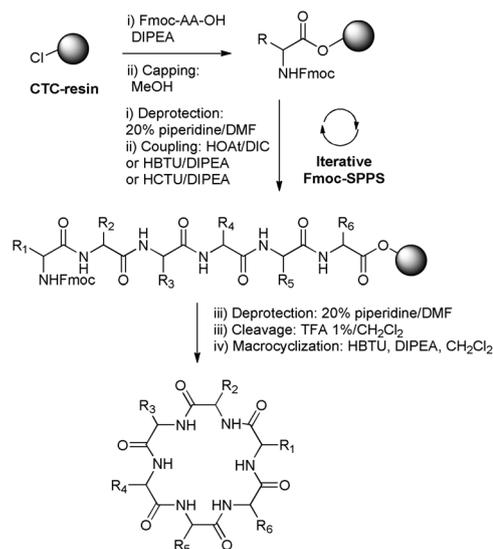
Fig. 3 Azolic cyclohexapeptides previously synthesized.

## Results and discussion

For the preparation of the macrocycles **15–21** (Fig. 4), we followed the general procedure shown in Scheme 1. SPPS was used to accelerate access to the desired linear hexapeptide precursors. The linear sequence was build-up on a 2-chlorotrityl chloride-resin (CTC-resin) which allowed the cleavage of the peptide under very mild acidic conditions in the presence of other acid-labile protecting groups and minimized the formation of diketopiperazines due to the large volume of the chlorotrityl groups.<sup>18</sup>

The first coupling between the resin and Fmoc-AA-OH was performed with an excess of *N,N'*-diisopropylethylamine (DIPEA) and the unreacted reactive sites were capped with MeOH.

The hexapeptide precursors of compounds **15** and **16** were obtained through activation with *N,N'*-diisopropyl carbodiimide (DIC) and 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) in dimethylformamide (DMF). In the case of the hexapeptide precursors of compounds **17–19** the growing chain was enabled using *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluoro-phosphate *N*-oxide (HBTU) and DIPEA in DMF. The amide bond formation between the peptide



Scheme 1 General procedure of the SPPS Fmoc-strategy and macrocyclization.

sequence and Fmoc-L-Cys(Trt)-OH was carried on with *N*-[(1*H*-6-chloro-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluoro-phosphate *N*-oxide (HCTU) and DIPEA since HCTU is more reactive and effective than HBTU.<sup>20</sup> Iterative Fmoc-strategy SPPS was followed in order to reach the target sequence in each hexapeptide. After the final Fmoc-deprotection with 20% piperidine in DMF, the desired hexapeptide was cleaved from the resin with 1% TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Under these conditions, the *tert*-butyl and trityl groups remained intact.<sup>21</sup>

For the synthesis of the hexapeptide precursors of compounds **20** and **21**, Fmoc-protected thiazole (Fmoc-Thz-OH) **22** was obtained from Boc-Gly-OH using Hantzsch's methodology<sup>22</sup> and then the *N*<sup>z</sup>-Boc group was removed and replaced by *N*<sup>z</sup>-Fmoc (Scheme 2).<sup>23</sup> The attachment of Fmoc-Thz-OH to the CTC-resin was conducted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> using DIPEA to furnish resin bound. Fmoc-Thz was incorporated directly into the Fmoc-strategy SPPS and the desired sequence was subsequently assembled as previously described.

Once the hexapeptides were obtained in suitable purity, macrocyclization was performed under high dilution conditions (1–5 mM) by activation with HBTU affording the desired compounds in rather good yields (40–83%).

Despite the fact that hexapeptide precursors of **17**, **18** and **19** are composed of all *L*-amino acids, relative good yields in the macrolactam formation were obtained (Table 1).<sup>24</sup> In these cases the selection of the cyclization point could facilitate the

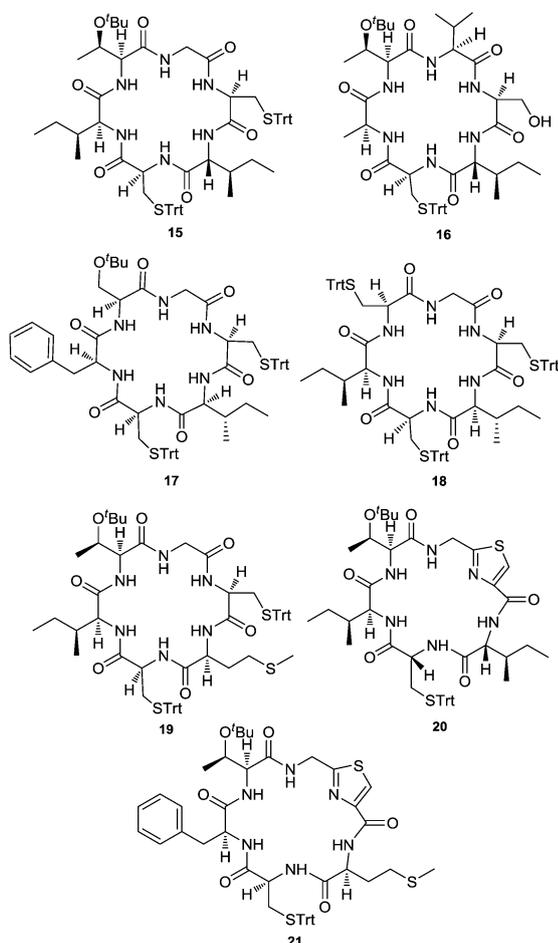
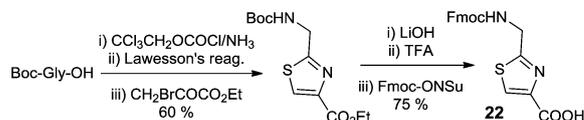


Fig. 4 Cyclohexapeptides synthesized in this work.



Scheme 2 Synthesis of Fmoc-protected thiazole **22**.

Table 1 Synthesis and yield (%) of the macrocyclic analogs

Entry	Hexapeptide precursor	Compound	Y (%)
1	H <sub>2</sub> N-Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-OH	15	59
2	H <sub>2</sub> N-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ala-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-L-Val-L-Ser-OH	16	55
3	H <sub>2</sub> N-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	17	48
4	H <sub>2</sub> N-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly-OH	18	66
5	H <sub>2</sub> N-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	19	54
6	H <sub>2</sub> N-D-Ile-D-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-Gly-Thz-OH	20	83
7	H <sub>2</sub> N-L-Met-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-Gly-Thz-OH	21	40

reaction since in the open intermediates the carboxylic acid group is derived from Gly and consequently gave the synthesis advantages of non-epimerization and non-steric hindrance.<sup>25</sup> Product **20** was obtained in very good yield (83%) since the presence of the turn-inducing thiazole constraint favors the reaction.<sup>26</sup> Compound **21** was obtained from a hexapeptide precursor with Met at the NH-termini point in moderate yield (40%).

The novel synthesized macrocycles **15–21** and compounds **7, 10–14** were evaluated *in vitro* as antimalarial and anti-trypanosomal agents. The antimalarial activities were determined against the chloroquine-resistant K1 strain of *P. falciparum* by using the [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation method reported by Desjardins *et al.*<sup>27</sup> The anti-trypanosomal activities were evaluated against the infective form of

*T. b. brucei*, the etiologic agent of Nagana disease in cattle, which is a suitable laboratory model of the subspecies *rhodesiense* that cause HAT. The selectivity of compounds was evaluated against murine macrophages (cell line J774) and calculated for each parasite. The results are summarized in Table 2.

The most active compounds against the resistant strain *P. falciparum* K1, showing EC<sub>50</sub> lower than 0.2 μM, are macrocycles **7, 10, 17** and **20**. In addition, they were not toxic to murine macrophages showing selectivity indices higher than 500, (entries 1, 2, 9 and 12, Table 2). Compounds **7, 10, 17, 20** and **21** are more potent against *P. falciparum* K1 than the most active aerucyclamides (**4**, EC<sub>50</sub> = 0.7 μM),<sup>10</sup> but they are less potent than the antimalarials artemisinin and artesunate, EC<sub>50</sub> = 0.02 and 0.003 μM, respectively.

Comparing the EC<sub>50</sub> of the compounds containing three heterocycles, first it is noteworthy that removal of the methyl group of the oxazole in **7** impacts negatively on the biological activity by decreasing 3-fold the potency towards *P. falciparum* and increasing at least 2-fold the cytotoxicity against macrophages of compound **13** (compare entries 1 and 5). In addition, the substitution of one of the thiazole rings of compound **13** by its isostere oxazole (compound **12**) has a negative effect on the antiplasmodium activity, decreasing it almost six times. In contrast, the activity is enhanced five times if the Gly-thiazole moiety of **12** is changed by an L-Ile-Oxazole (compound **14**, see entries 4 and 6).

By comparison of the EC<sub>50</sub>s of compounds **7** and **10** (entries 1 and 2), it could be concluded that the presence of the 5-methyloxazole ring and L-Ile instead of L-*allo*-Thr and D-*allo*-Ile, respectively, has the same effect on the antiplasmodium activity. In contrast, synthetic aerucyclamide B containing an oxazoline is ten times less active than the β-hydroxyamide **10**

Table 2 Biological activities of macrocycles. Values represent the mean ± SD (n = 2)

Entry	Compound	EC <sub>50</sub> (μM)				
		<i>P. falciparum</i> K1 <sup>a</sup> (μM)	Infective <i>T. b. brucei</i> <sup>b</sup>	Murine macrophage <sup>c</sup>	Selectivity index 1 <sup>d</sup>	Selectivity index 2 <sup>e</sup>
1	<b>7</b>	0.18 ± 0.02 <sup>12</sup>	>25	>100	>556	>4
2	<b>10</b>	0.18 ± 0.01	14.5 ± 1.2	>100	>588	>7
3	<b>11</b>	24.8 <sup>f</sup>	>25	ND	ND	ND
4	<b>12</b>	3.7 ± 0.1	>25 <sup>16</sup>	ND	ND	ND
5	<b>13</b>	0.6 ± 0.2	11.4 ± 0.2 <sup>16</sup>	48.8 ± 0.1	79	4
6	<b>14</b>	0.80 ± 0.02	>25 <sup>16</sup>	>100	>125	>4
7	<b>15</b>	1.97 ± 0.08	1.06 ± 0.01	87.4 ± 3.8	44	82
8	<b>16</b>	1.00 ± 0.02	23.8 ± 1.5	>100	>100	>4
9	<b>17</b>	0.19 ± 0.02	7.3 ± 0.2	202 <sup>g</sup>	1063	28
10	<b>18</b>	1.2 ± 0.3	>25	>200	>172	>4
11	<b>19</b>	0.8 ± 0.2	2.1 ± 0.1	199 <sup>h</sup>	258	95
12	<b>20</b>	0.19 ± 0.03	3.0 ± 0.1	>100	>526	>33
13	<b>21</b>	0.41 ± 0.02	2.8 ± 0.2	>100	>244	>36
14	Synthetic aerucyclamide B	1.84 ± 0.3	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Control: chloroquine: EC<sub>50</sub> = 0.47 μM, artemisinin: EC<sub>50</sub> = 0.02 μM, and artesunate: EC<sub>50</sub> = 0.003 μM. <sup>b</sup> Control: methylene blue: EC<sub>50</sub> = 400 nM (ref. 28) and nifurtimox: EC<sub>50</sub> = 13 μM. <sup>c</sup> Nifurtimox: EC<sub>50</sub> = 170 μM. <sup>d</sup> EC<sub>50</sub> macrophage/EC<sub>50</sub> plasmodium. <sup>e</sup> EC<sub>50</sub> macrophage/EC<sub>50</sub> trypanosomes, SI nifurtimox = 13. ND: not determined. <sup>f</sup> Estimated value. <sup>g</sup> Estimated value from 49 ± 4% of growth inhibition at 200 μM. <sup>h</sup> Estimated value from 52 ± 4% of growth inhibition at 200 μM.

(entries 2 and 14). These results suggest that more flexible cyclohexapeptides containing at least two azoles, such as **10**, could display good antimalarial properties as well as the triazoles ones. Notably, the substitution of the alcohol group present in **10** by fluorine (compound **11**) decreased by almost 140 times the parasitocidal activity (entries 2 and 3).

One of the most active compounds evaluated in this work, cyclopeptide **20** differing from **15** in the presence of Gly-Thz residue instead of its precursor Gly-L-Cys(Trt) and in the configuration of one Cys(Trt) residue, is ten times more active than **15** against *P. falciparum* K1 (entries 7 and 12, Table 2). It is noteworthy that only one of the non-azolic cyclopeptides (**17**) showed  $EC_{50}$  lower than  $0.2 \mu\text{M}$  as the most active macrocycles containing heterocycles (**7**, **10** and **20**). Notably, the substitution of the residue L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu) in **17** by L-Ile-L-Cys(Trt) present in **18** decreased the antiplasmodium activity six times (entries 9 and 10). Similarly, compound **19** differing from **15** in the presence of L-Met instead of D-Ile is at least two times more active than compound **15**.

The most potent compounds against *T. b. brucei* ( $EC_{50} \leq 3 \mu\text{M}$ ) are macrocycles **15**, **19**, **20** and **21** (Table 2). They are less active than methylene blue ( $EC_{50}$  against *T. b. brucei* =  $0.4 \mu\text{M}$ ) but more potent and selective than nifurtimox ( $EC_{50} = 13 \mu\text{M}$ , SI = 13). Compounds **15** and **19** are the most active ( $EC_{50}$  1.06 and  $2.1 \mu\text{M}$ , respectively) and selective (SI 82 and 95, respectively) derivatives against trypanosoma. The higher  $EC_{50}$  values against *T. b. brucei* were obtained for the macrocycles containing two or three azole heterocycles (**7**, **10**, **11**, **12**, **13** and **14**). A remarkable effect is observed by substitution of L-Thr(<sup>t</sup>Bu) and D-Ile by L-Cys(Trt) and L-Ile respectively (see entries 7 and 10); compound **18** resulted in being more than 25 times less active than **15**. Interestingly, all cyclohexapeptides containing two or three azoles, with the exception of compound **11**, displayed a marked species-specificity towards killing *P. falciparum* (an average  $EC_{50}$  of  $1.09 \mu\text{M}$  for compounds **7**, **10**, **12**, **13** and **14**) rather than *T. b. brucei* (an average  $EC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ). Importantly, cyclohexapeptides with only one thiazole (compounds **20** and **21**) exhibited satisfactory mutual anti-parasitic activities and selectivity indices.

## Conclusions

In summary, seven novel macrocycles were obtained in very good yield combining solid phase and solution phase procedures. Several of the compounds evaluated in this work show increased antimalarial and anti-trypanosomal activities compared to their natural products analogs, although they are less active than artemisinin and artesunate.

With respect to the evaluation against *P. falciparum* K1, we can conclude that: (a) a thiazole instead of L-Cys in the macrocycle increases the potency; (b) replacement of 5-methyloxazole by its corresponding  $\beta$ -hydroxyamide does not affect bioactivity; (c) the more flexible non-azolic macrocycles (compounds **15**, **16**, **18** and **19**) are less potent than the azolic ones; (d) the chemical nature of the aminoacidic residues seems to be critical for the activity of non azolic-cyclohexapeptides; L-Met and the

dipeptide L-Phe-L-Ser(<sup>t</sup>Bu) increase the potency of this compound class.

The evaluation of the anti-trypanosomal activity revealed that the presence of two or three heterocycles in the macrocycles impairs the biological activity. The most active compound is a non-azolic-cyclohexapeptide (**15**) showing 82-fold selectivity for the parasite than against murine macrophages. Cyclohexapeptides containing only one thiazole (**20** and **21**) showed satisfactory cytotoxic profiles against both protozoan parasites. Compounds with this property are highly required for multi-disease intervention in multi-endemic areas as it is the case of malaria and HAT in Africa.

Considering that these cyclohexapeptides are a new class of compounds that have demonstrated anti-plasmodial and/or anti-trypanosomal activities, the data reported here provide a valuable basis for further optimization.

## Experimental section

### Chemistry

**SPPS general procedure.** The synthesis was done using a plastic syringe equipped with Teflon filters attached to a vacuum manifold to enable rapid removal of reagents and solvents. The 2-chlorotriylchloride resin (loading =  $1.0 \text{ mmol g}^{-1}$ ; 100 mg) was washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $5 \times 30 \text{ s}$ ), DMF ( $5 \times 30 \text{ s}$ ) and then with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $5 \times 30 \text{ s}$ ). A solution of Fmoc-AA-OH ( $1 \text{ mmol g}^{-1}$  of resin) in minimal  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and DIPEA (7 eq.) was gently shaken for 1 h, then an extra 3 eq. of DIPEA was added and shaking was continued for 5 min. MeOH ( $0.08 \text{ mL g}^{-1}$  of resin) was then added in order to cap unreacted functional groups on the resin; the mixture was then shaken for 20–30 min. The resin was filtered, and washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and DMF ( $5 \times 30 \text{ s}$  each). The N-terminus was deprotected using 20% piperidine in DMF ( $2 \times 5 \text{ min}$  and  $1 \times 10 \text{ min}$ ). The resin was then washed with DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and DMF ( $5 \times 30 \text{ s}$  each). Fmoc-AA-OH (3 eq.) was pre-activated by vigorous shaking for 4 min in the presence of DIC (3 eq.) and HOAt (3 eq.) in minimal DMF, and then poured onto the resin and the resulting mixture was gently shaken for 1–2 h. After the coupling was completed, the resin was washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and DMF ( $5 \times 30 \text{ s}$  each). Deprotection and coupling cycles were repeated with the suitable amino acids to obtain the desired compound.

The peptide was cleaved from the resin by treatment with 1% TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  for 2–3 minutes at room temperature followed by filtration and collection of the filtrate in water. The treatment was repeated 4–5 times. Solvents were removed *in vacuo* and the crude peptide was washed twice with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , cooled with  $\text{N}_2$  liquid and lyophilized to render the desired hexapeptide.

**General procedure for macrocyclization.** Macrocyclization reactions were performed under diluted conditions (1–5 mM) using HBTU (2 eq.), DIPEA (3 eq.), and 4-DMAP (catalytic) in dried  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  at room temperature for 3–5 days. Then the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude was redissolved in EtOAc, washed with HCl 5% and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$ , dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography to obtain the macrocycle.

*Cyclo-[Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr<sup>t</sup>(Bu)]* (**15**). The trifluoroacetate salt of H<sub>2</sub>N-Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr<sup>t</sup>(Bu)-OH was obtained following the general SPPS procedure. Lyophilization yielded 1.25 g (98% yield) of the hexapeptide as a white solid. The purity (89%) was determined by HPLC (linear gradient: 70 to 100% acetonitrile (0.036% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.045% TFA) over 8 min; flow rate = 1.0 mL min<sup>-1</sup>; t<sub>R</sub> = 5.08 min). mp: 159–160 °C. α<sub>D</sub> = -8.25 (c 0.667, MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (1 : 1)). HRMS calculated for C<sub>66</sub>H<sub>81</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> ([M + H]<sup>+</sup>) 1149.5557, observed 1149.55652.

Macrocyclization reaction was performed following the general procedure (dilution 5 mM, 3 days), starting from the trifluoroacetate salt of the amino acid H<sub>2</sub>N-Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr<sup>t</sup>(Bu)-OH (100 mg, 0.079 mmol). By further purification using flash chromatography, the desired macrocycle was obtained (53 mg, 0.046 mmol) in 59% yield.

White solid, mp: decompose above 210 °C, R<sub>f</sub> = 0.3 (AcOEt : EP, 3 : 2), α<sub>D</sub> = +10.7 (c 0.9, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0.76 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.88–0.96 (m, 9H), 1.07 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.11–1.15 (m, 1H), 1.21 (s, 9H), 1.23–1.26 (m, 1H), 1.45–1.55 (m, 2H), 1.62–1.67 (m, 1H), 2.19–2.27 (m, 1H), 2.37 (dd, J<sub>1</sub> = 12.6 Hz, J<sub>2</sub> = 4.4 Hz, 1H), 2.40 (dd, J<sub>1</sub> = 13.1 Hz, J<sub>2</sub> = 5.4 Hz, 1H), 3.07 (dd, J<sub>1</sub> = 12.5 Hz, J<sub>2</sub> = 5.8 Hz, 1H), 3.12 (dd, J<sub>1</sub> = 13.3 Hz, J<sub>2</sub> = 9.7 Hz, 1H), 3.34 (dd, J<sub>1</sub> = 17.0 Hz, J<sub>2</sub> = 2.6 Hz, 1H), 3.49 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 3.67 (ddd, J<sub>1</sub> = 3.5 Hz, J<sub>2</sub> = 5.8 Hz, J<sub>3</sub> = 9.1 Hz, 1H), 4.05–4.17 (m, 4H), 4.61 (dd, J<sub>1</sub> = 17.6 Hz, J<sub>2</sub> = 9.9 Hz, 1H), 5.83 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 6.25 (dd, J<sub>1</sub> = 2.7 Hz, J<sub>2</sub> = 9.6 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.01 Hz, 1H), 7.18–7.34 (m, 19H), 7.39–7.44 (m, 12H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 10.3, 10.7, 15.5, 16.0, 18.4, 24.7, 25.5, 28.3 (3C), 28.9, 31.2, 32.4, 35.4, 42.5, 51.7, 53.2, 56.8, 60.3, 61.9, 65.5, 66.9, 67.2, 74.9, 126.8 (3C), 127.1 (3C), 128.0 (6C), 128.2 (6C), 129.4 (6C), 129.6 (6C), 144.2 (2C), 144.6 (2C), 146.9 (2C), 169.1, 169.9, 172.1, 172.8, 173.3, 173.4. IR ν(cm<sup>-1</sup>) 1381, 1543, 1640, 2854, 2927, 2966, 3059, 3286, 3402. HRMS calculated for C<sub>66</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ([M + Na]<sup>+</sup>) 1153.5271, observed 1153.5226.

*Fmoc-Gly-Thz-COOH* (**22**). Compound NH-Boc-Gly-Thz-COOH (7.09 mmol, 1.83 g) (obtained as we reported previously)<sup>13,16</sup> was treated with TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 1, v/v, 52 mL) for 1 h and then concentrated under reduced pressure. The trifluoroacetate salt was dissolved in dioxane-H<sub>2</sub>O (3 : 2, 130 mL) and then NaHCO<sub>3</sub> (1.2 eq.) was added followed by Fmoc-OSu (2.0 eq.) in dioxane (40 mL) and stirred for 16 h. The dioxane was removed under reduced pressure, 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> (10% aq.) was added until pH 3 and then the mixture was extracted in CHCl<sub>3</sub>-i-PrOH (3 : 1). The organic layer was washed with brine and dried with MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure, affording the title compound as a white solid (1.99 g, 74%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm 4.23 (t, J = 6.73 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 6.79 Hz, 2H), 4.45 (d, J = 5.94 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 7.36 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.39 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 7.42 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 7.49 Hz, 2H), 8.34–8.24 (m, 2H).

*Cyclo-[Gly-Thz-L-D-Ile-D-Cys-L-Ile-L-Thr<sup>t</sup>(Bu)]* (**20**). The trifluoroacetate salt of H<sub>2</sub>N-D-Ile-D-Cys-L-Ile-L-Thr<sup>t</sup>(Bu)-Gly-Thz-OH was obtained following the general SPPS procedure.

Lyophilization yielded 470 mg (95% yield) of the hexapeptide as a white solid. The purity (100%) was determined by HPLC (linear gradient: 50 to 100% acetonitrile (0.036% TFA) in H<sub>2</sub>O (0.045% TFA) over 8 min; flow rate = 1.0 mL min<sup>-1</sup>; t<sub>R</sub> = 3.69 min). Mp 189–191 °C. α<sub>D</sub> = +9.29 (c 0.53, DMSO). HRMS calculated for C<sub>47</sub>H<sub>63</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ([M + H]<sup>+</sup>) 887.41956, observed 887.41942. Macrocyclization reaction was performed following the general procedure (dilution 1 mM, 5 days), starting from the trifluoroacetate salt of the amino acid H<sub>2</sub>N-D-Ile-D-Cys-L-Ile-L-Thr<sup>t</sup>(Bu)-Gly-Thz-OH (50 mg, 0.05 mmol). By further purification using flash chromatography, the desired macrocycle was obtained (36 mg, 0.041 mmol) in 83% yield.

White solid, mp: 136–137 °C, R<sub>f</sub> = 0.5 (AcOEt : EP, 4 : 1). α<sub>D</sub> = +34.8 (c 1.27, MeOH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.84 (s, 9H), 0.85–0.93 (m, 12H), 0.99 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.22–1.29 (m, 2H), 1.39–1.45 (m, 2H), 1.86–1.94 (m, 1H), 1.95–2.01 (m, 1H), 2.65 (dd, J<sub>1</sub> = 12.5 Hz, J<sub>2</sub> = 7.3 Hz, 1H), 2.81 (dd, J<sub>1</sub> = 12.6 Hz, J<sub>2</sub> = 6.3 Hz, 1H), 4.08–4.15 (m, 2H), 4.25 (dd, J<sub>1</sub> = 4.5 Hz, J<sub>2</sub> = 5.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, J<sub>1</sub> = 2.1 Hz, J<sub>2</sub> = 6.3 Hz, 1H), 4.37 (dd, J<sub>1</sub> = 4.5 Hz, J<sub>2</sub> = 15.4 Hz, 1H), 4.48 (dd, J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, J<sub>2</sub> = 9.6 Hz, 1H), 4.97 (dd, J<sub>1</sub> = 7.8 Hz, J<sub>2</sub> = 15.4 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.21–7.33 (m, 9H), 7.39–7.42 (m, 6H), 7.63 (dd, J<sub>1</sub> = 4.7 Hz, J<sub>2</sub> = 7.7 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 11.3, 11.7, 15.5, 15.9, 21.1, 24.6, 24.8, 27.9 (3C), 33.5, 36.4, 37.7, 39.5, 52.8, 59.1, 59.5, 65.6, 67.4, 74.6, 79.2, 123.5, 127.0 (3C), 128.2 (6C), 129.4 (6C), 144.1 (3C), 149.4, 161.2, 165.8, 170.4, 170.6, 170.7, 171.2. IR film ν(cm<sup>-1</sup>) 1080, 1188, 1267, 1356, 1449, 1491, 1499, 1640, 2876, 2930, 3057, 3309, 3325, 3337. HRMS calculated for C<sub>47</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ([M + Na]<sup>+</sup>) 891.3913, observed 891.3925.

## Biology

### *In vitro* antimalarial activity

*Parasite cultures.* The K1 strain of *P. falciparum* originating from Thailand that is resistant to chloroquine and pyrimethamine but sensitive to mefloquine was used. The cultures are naturally asynchronous (65–75% ring stage) and are maintained in continuous log phase growth in RPMI1640 medium supplemented with 5% washed human A+ erythrocytes, 25 mM HEPES, 32 nM NaHCO<sub>3</sub>, and AlbumaxII (lipid-rich bovine serum albumin) (GIBCO, Grand Island, NY) (CM). All cultures and assays are conducted at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>, with a balance of N<sub>2</sub>.

*Drug sensitivity assays.* Stock drug solutions are prepared in 100% DMSO (dimethylsulfoxide) at 20 mM. The compound is further diluted to the appropriate concentration using complete medium RPMI1640 supplemented with 15 nM cold hypoxanthine and AlbumaxII. Assays are performed in sterile 96-well microtitre plates, each plate contains 100 μL of parasite culture (0.5% parasitemia, 2.5% hematocrit). Each drug is tested in triplicate and parasite growth is compared to control and blank (uninfected erythrocytes) wells. After 24 h of incubation at 37 °C, 3.7 Bq of [<sup>3</sup>H]hypoxanthine is added to each well. Cultures are incubated for a further 24 h before they are harvested onto glass-fiber filter mats. The radioactivity is counted using a Wallac Microbeta 1450 scintillation counter. The results are

recorded as counts per minute (CPM) per well at each drug concentration, control and blank wells. The percentage inhibition is calculated from comparison of blank and control wells, and EC<sub>50</sub> values are calculated using Prism™.

**Screen.** The K1 line is used. The compound is diluted three-fold over 12 different concentrations with an appropriate starting concentration. The IC<sub>50</sub> is determined by a sigmoidal dose–response analysis using Prism™. For each assay, the IC<sub>50</sub> value for the parasite line is determined against the known anti-malarials chloroquine and artesunate, plus other standard compounds appropriate for the assay.

#### **In vitro anti-trypanosomal activity**

**Materials.** Chemical reagents were purchased from Sigma or ROCHE. Medium and consumables for cell culture were purchased from Invitrogen and Greiner, respectively.

**Parasites.** The infective form of *T. brucei brucei* strain 427, cell line 449 (encoding one copy of the tet-repressor protein: Pleo<sup>R</sup>) and cell line Grx1-roGFP<sub>2</sub> (encoding a redox sensitive biosensor; Sardi and Comini, unpublished) was aerobically cultivated in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in HMI-9 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 10 U mL<sup>-1</sup> penicillin, and 10 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin. Cell line 449 was also supplemented with 0.2 µg mL<sup>-1</sup> phleomycin and Grx1-roGFP<sub>2</sub> with 0.2 µg mL<sup>-1</sup> phleomycin, 5 µg mL<sup>-1</sup> hygromycin and induced with 1 µg mL<sup>-1</sup> tetracycline.

#### **Cytotoxicity against murine macrophages**

**Murine macrophages.** The J774 mouse macrophage cell line was cultivated in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37 °C in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) FCS, 10 U mL<sup>-1</sup> penicillin and 10 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin.

**Cytotoxicity assays.** Stock solutions (10 mM) of the test compounds were prepared using dimethylsulfoxide (DMSO) as the solvent and then diluted in culture medium to obtain the specific experimental concentrations (5 and 25 µM for screening and between 0.025 and 25 µM and 0.1 and 100 µM for the determination of EC<sub>50</sub> against parasites and macrophages, respectively). Controls included the compound vehicle (DMSO) at final concentrations up to 0.25% (v/v) and culture medium (growth control). Each condition was tested in duplicate or triplicates. The cytotoxic effect of the compounds towards trypanosomes and macrophages was evaluated by cell counting with a Neubauer chamber or flow cytometry and by colorimetric assay of cell viability with a tetrazolium salt (WST-1 reagent), respectively. If required, the drug concentration range was adjusted to allow a more accurate determination of the EC<sub>50</sub> value. The methodological procedure is essential as described previously.<sup>16</sup>

**Data evaluation.** Living parasites were counted in both hemichambers with a light microscope. The cell density in the case of flow cytometry was calculated using the following formula: cell per mL =  $A/B \times C/D$ , where *A* = number of cell events, *B* = number of bead events, *C* = assigned bead count of the lot (beads/5 µL) and *D* = volume of the sample (250 µL).

For each compound concentration, cytotoxicity was calculated according to the following equation: cytotoxicity (%) = (experimental value – DMSO control)/(growth control – DMSO control) × 100. For assays involving trypanosomes and murine

macrophages, the input value is the mean (*n* = 2) of the cell densities and corrected absorbance at 450 nm (*A*<sub>i</sub><sup>450</sup>), respectively. The data were plotted as percentage cytotoxicity versus drug concentration. EC<sub>50</sub> values were obtained from dose–response curves fitted to a sigmoidal equation (Boltzmann model) or extrapolated from non-linear fitting plots.

## Acknowledgements

This work was supported by Grants from ANII (FCE2720 and FCE 6919), CSIC Grupos (Universidad de la República), PEDECIBA (Uruguay), CICYT (CTQ2012-30930), and the Generalitat de Catalunya (2009SGR 1024) (Spain). The authors acknowledge a PhD fellowship from ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) (Stella Peña) and an internship supported by ANII and PEDECIBA. MAC acknowledges the support of ANII (grant Innova Uruguay, agreement DCI-ALA/2007/19.040 between Uruguay and the European Commission and grant FMV 2617).

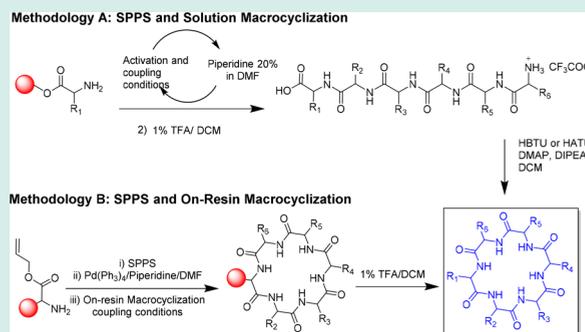
## Notes and references

- 1 World Malaria Report, Geneva, World Health Organization, 2012, [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html).
- 2 World Health Organization, *Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis*, Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Technical Report Series no. 975, 2012, ISBN 978 92 4 120975 5, [http://www.who.int/tdr/publications/research\\_priorities/en/index.html](http://www.who.int/tdr/publications/research_priorities/en/index.html).
- 3 A. Cavalli and M. L. Bolognesi, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 7339–7359.
- 4 C. J. Bacchi, *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2009, 195040; A. H. Fairlamb, *Trends Parasitol.*, 2003, **19**, 488–494.
- 5 T. N. C. Wells, P. L. Alonso and W. E. Gutteridge, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2009, **8**, 879–891; C. Amaratunga, S. Sreng, S. Suon, E. S. Phelps, K. Stepniewska, P. Lim, C. Zhou, S. Mao, J. M. Anderson, N. Lindegardh, H. Jiang, J. Song, X. Su, N. J. White, A. M. Dondorp, T. J. C. Anderson, M. P. Fay, J. Mu, S. Duong and R. M. Fairhurst, *Lancet Infect. Dis.*, 2012, **12**, 851–858.
- 6 K. Kaur, M. Jain, T. Kaur and R. Jain, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 3229–3256; E. L. Flannery, A. K. Chatterjee and E. a. Winzeler, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, **11**, 849–862; S. Dandapani, E. Comer, J. R. Duvall and B. Munoz, *Future Med. Chem.*, 2012, **4**, 2279–2294; D. Steverding and K. M. Tyler, *Expert Opin. Invest. Drugs*, 2005, **14**, 939–955.
- 7 D. J. Newman and G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 2012, **75**, 311–335.
- 8 K. Gademann and J. Kobylinska, *Chem. Rec.*, 2009, **9**, 187–198.
- 9 R. G. Linington, J. Gonzalez, L.-D. Ureña, L. I. Romero, E. Ortega-Barría and W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, 397–401.
- 10 C. Portmann, J. F. Blom, K. Gademann and F. Jüttner, *J. Nat. Prod.*, 2008, **71**, 1193–1196; C. Portmann, J. F. Blom,

- M. Kaiser, R. Brun, F. Jüttner and K. Gademann, *J. Nat. Prod.*, 2008, **71**, 1891–1896.
- 11 N. Ziemert, K. Ishida, P. Quillardet, C. Bouchier, C. Hertweck, N. T. de Marsac and E. Dittmann, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 1791–1797.
- 12 S. Peña, L. Scarone, E. Manta, L. Stewart, V. Yardley, S. Croft and G. Serra, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 4994–4997.
- 13 C. Baraguey, A. Blond, F. Cavelier, J.-L. Pousset, B. Bodo and C. Auvin-Guette, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 2098–2103; C. Baraguey, C. Auvin-guette, A. Blond, F. Cavelier, F. Lezenven, J. Pousset and B. Bodo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1998, 3033–3040.
- 14 E. M. Driggers, S. P. Hale, J. Lee and N. K. Terrett, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008, **7**, 608–624; J. S. Davies, *J. Pept. Sci.*, 2003, **9**, 471–501.
- 15 S. Peña, L. Scarone, E. Manta and G. Serra, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 2806–2808.
- 16 S. Peña, L. Scarone, A. Medeiros, E. Manta, M. Comini and G. Serra, *MedChemComm*, 2012, **3**, 1443–1448.
- 17 R. S. Roy, a. M. Gehring, J. C. Milne, P. J. Belshaw and C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.*, 1999, **16**, 249–263.
- 18 K. Barlos, D. Gatos and W. Schafer, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, **30**, 590–593.
- 19 A. López-Macià, J. C. Jiménez, M. Royo, E. Giralt and F. Albericio, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 11398–11401.
- 20 C. A. Hood, G. Fuentes, H. Patel, K. Page, M. Menakuru and J. A. E. H. Park, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 97–101; O. Marder and F. Albericio, *Chim. Oggi*, 2004, **35**, 6–11.
- 21 A. Isidro-Llobet, M. Alvarez and F. Albericio, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 2455–2504.
- 22 A. Hantzsch, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1888, **249**, 54–65.
- 23 R. E. Thompson, K. Jolliffe and R. J. Payne, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 680–683.
- 24 The presence of D-amino acids in the sequence uses to favour the cyclization reaction.
- 25 C. J. White and A. K. Yudin, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 509–524.
- 26 N. Sayyadi, D. Skropeta and K. A. Jolliffe, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 5497–5499; R. Black, V. Dungan, R. Li, P. Young and K. Jolliffe, *Synlett*, 2010, **4**, 551–554; R. E. Thompson, K. A. Jolliffe and R. J. Payne, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 680–683; D. Skropeta, K. A. Jolliffe and P. Turner, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 8804–8809.
- 27 R. E. Desjardins, C. J. Canfield, D. E. Haynes and J. D. Chulay, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1979, **16**, 710–718.
- 28 K. Buchholz, M. A. Comini, D. Wissenbach, R. H. Schirmer, R. L. Krauth-Siegel and S. Gromer, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2008, **160**, 65–69.

1 **Synthesis of Cyclic Peptides as Potential Anti-Malarials**2 Catherine Fagundez, Diver Sellanes, and Gloria Serra\*<sup>1</sup>3 Cátedra de Química Farmacéutica, (DQO), Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, CP 11800,  
4 Montevideo, Uruguay5 **S** Supporting Information

6 **ABSTRACT:** The results from the synthesis of peptides by Fmoc/  
7 SPPS on a 2-CTC resin and then lactamization in solution or solid  
8 phase for the preparation of cyclopeptides are presented. Both  
9 procedures allow the synthesis of the desired compounds in good to  
10 very good yield and with high cyclization efficiency for on-resin  
11 macrocyclization. In addition, the activities of the corresponding  
12 cyclopeptides against the chloroquine-resistant K1 strain of  
13 *Plasmodium falciparum* were evaluated. Cyclo-Cys(Trt)-Gly-Thr-  
14 (Bu)-Gly-Cys(Trt)-Gly showed potent *in vitro* and selective activity  
15 against this parasite,  $EC_{50} = 28$  nM.

16 **KEYWORDS:** cyclopeptides, solid phase peptide synthesis, macrocyclization, malaria17 **INTRODUCTION**

18 Cyclic peptides have demonstrated advantageous properties as  
19 candidates for drug discovery. They usually have structural  
20 characteristics promoting bioactive conformations, often show  
21 high selectivity in binding to target receptors, and exhibit good  
22 metabolic stability. In addition, increased hydrophobicity  
23 associated with the removal of polar N- and C-termini allows  
24 better membrane permeation compared with linear analogs.<sup>1</sup>  
25 Natural cyclic peptides have proved to have a wide spectrum of  
26 biological activities, including antimicrobial, antiviral, cytotoxic,  
27 anti-inflammatory, immunosuppressive, insecticidal, and anti-  
28 fungal effects.

29 Among examples of antiparasitic compounds are the cyclic  
30 heptapeptides mahafacyclin B and chevalierin A, isolated from  
31 the latex of *Jatropha*, which showed  $IC_{50} = 2.2$  and  $8.9$   $\mu$ M,  
32 respectively, against *P. falciparum*.<sup>2</sup> Selective inhibitory activity  
33 of certain cyclohexapeptides has also been reported, such as  
34 cyclo-[Trp-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Lys(Z)-] with an  $IC_{50} = 3$   $\mu$ M  
35 against triose phosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*.<sup>3</sup>

36 As part of a search for compounds with antimalarial activity,  
37 we have previously reported the synthesis and biological  
38 evaluation of analogs of the antiparasitics aerucyclamide B (1),  
39 C (2), and D (3),<sup>4</sup> Figure 1. We obtained non-azolic-  
40 cyclohexapeptides containing cysteine or threonine/serine  
41 amino acids, which are biomimetic precursors of thiazoline/  
42 thiazole or oxazoline/oxazole, respectively, such as compounds  
43 4 and 5 (Figure 1).<sup>5</sup> These present interesting antiplasmodial  
44 activity ( $EC_{50} = 0.19 \pm 0.02$   $\mu$ M and  $0.8 \pm 0.2$   $\mu$ M,  
45 respectively) and were not toxic to murine macrophages  
46 showing excellent selectivity indices. These activities are on the  
47 same order of magnitude as that of aerucyclamides,<sup>4</sup> showing  
48 that cyclic hexapeptides composed by alternating amino acids  
49 with alcohol or thiol groups in the lateral chain and

hydrophobic amino acids are potential antiparasitic com- 50  
pounds. We describe here the improvement of synthetic 51  
methods for this type of compounds, and an exploration of 52  
structure–activity relationships that led to candidates with 53  
increased potency *in vitro*. 54

Cyclic peptides are most commonly made by Fmoc-based 55  
solid phase peptide synthesis (SPPS),<sup>6</sup> followed by macro- 56  
cyclization either on-resin or in solution. However, extensive 57  
comparisons between the cyclization efficiencies of solution vs 58  
on-resin macrolactamization are not frequently reported. One 59  
example was described for cyclopentapeptides and cyclo- 60  
hexapeptides by Sewald et al.,<sup>7</sup> using a dual syringe pump 61  
method for solution cyclization. They obtained better yields for 62  
the solution-phase method, 9–36%, than for on-resin 63  
cyclization, 1–22%. In contrast, Jeong and co-workers, reported 64  
solution macrocyclization of a pentapeptide in 7% yield and on- 65  
resin lactamization of a hexapeptide in 35% yield.<sup>8</sup> However, 66  
both procedures were not applied for the preparation of 67  
cyclopeptides with the same size and sequence. 68

It is well-known that high dilution in solution (1–10 mM) 69  
and moderate density of loading on resins (the latter to 70  
enhance the “pseudo-dilution” provided by attachment to a 71  
support<sup>9</sup>) promote macrolactamization relative to unwanted 72  
intermolecular reactions such as polymerization. Due to long 73  
reaction times and difficulties in purification inherent in the 74  
solution-phase method,<sup>5,10</sup> we embarked on a search for 75  
methods to reduce these problems. We chose to take advantage 76  
of an on-resin head-to-tail lactamization design in which the 77  
peptide is anchored to the resin through a side chain of a 78

Received: October 22, 2017

Revised: February 3, 2018

Published: February 15, 2018

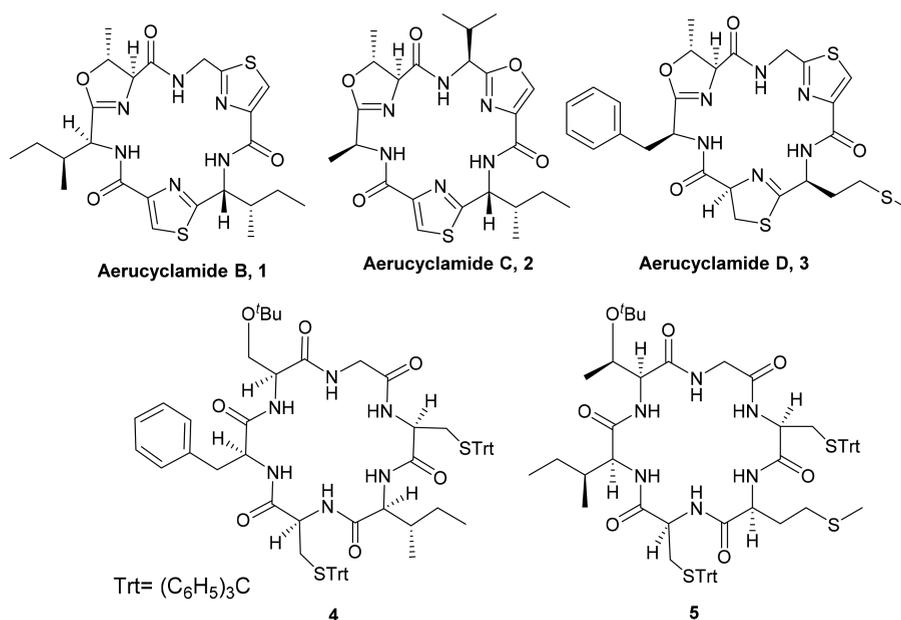
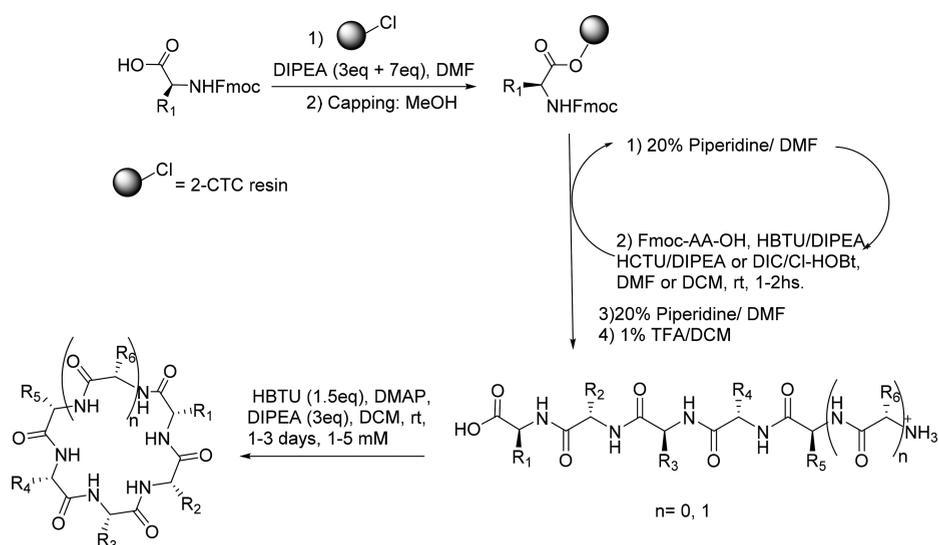


Figure 1. Aerucyclamides and analogs with antiplasmodial activity.

### Scheme 1. General Procedure (A): Fmoc Strategy SPPS and Solution Phase Macrocyclization



79 trifunctional amino acid. At least three dimensions of  
80 orthogonality are necessary to construct the linear peptide,<sup>11</sup>  
81 allowing for subsequent cyclization, washing, and release of the  
82 pure product by cleavage of the resin connection. Various  
83 supports have been employed for this purpose, including  
84 Wang,<sup>12</sup> Rink amide,<sup>13</sup> Br-Wang,<sup>14</sup> and 2-CTC (2-chlorotrityl  
85 chloride) resins.<sup>15</sup>

86 In the present work, we have compared solution- and solid-  
87 phase ring-closing reactions following linear SPPS on a 2-CTC  
88 resin, chosen in the hope that the steric nature of the 2-CTC  
89 linkage would help to minimize racemization during the on-  
90 resin macrocyclization process.<sup>16</sup> Sequences were chosen based  
91 on structures 4 and 5, which are composed by alternating  
92 amino acids with alcohol or thiol groups in the lateral chain and  
93 hydrophobic amino acids. In addition, Ser, Thr, or Cys and  
94 hydrophobic amino acids were changed by Glu or Arg and  
95 more hydrophilic ones, respectively. Moreover, two cyclo-  
96 pentapeptides were prepared to study the influence of the

cyclopeptide size and those substitutions in the activity against 97  
the chloroquine-resistant K1 strain of *Plasmodium falciparum*. 98

## RESULTS AND DISCUSSION

99  
100 In the following discussion, method A refers to the synthesis of  
101 the peptide sequence on the resin, followed by cleavage and  
102 macrocyclization in solution, whereas method B refers to  
103 synthesis and macrocyclization both performed on-resin.

104 General procedure A is shown in Scheme 1. The 2-CTC  
105 resin was employed to minimize the formation of diketopiper-  
106 azines due to the large size of the chlorotrityl group,<sup>17</sup> and the  
107 very mild acidic cleavage conditions allowed several other acid-  
108 labile protecting groups to be used in the peptide synthesis.  
109 Unreacted reactive sites after the first amino acid attachment  
110 were capped with MeOH,<sup>18</sup> followed by standard SPPS using  
111 HCTU or HBTU and DIPEA in most cases. A combination of  
112 DIC and Cl-HOBT was used when the next amino acid was  
113 Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, because this coupling agent does not

114 require the addition of a base, so as to decrease the possibility  
 115 of racemization, a common problem when amide bonds are  
 116 formed from a Cys carboxyl.<sup>19</sup>  
 117 Following resin cleavage, solution macrocyclization was  
 118 performed at 1–5 mM concentration by activation with  
 119 HBTU or HATU, using DIPEA in DCM, whereby the desired  
 120 compounds were obtained in moderate to good yields (26–  
 121 80%; Table 1). The ring size and the amino acids involved are

Table 1. Synthesis of Macrocycles by Methodology A

peptide precursor	product	time (days)	macrocycliz. yield <sup>d</sup> /purity <sup>d</sup> (%)	overall yield <sup>e</sup> (%)
H-L-Cys(Trt)-Gly-L-Thr( <sup>t</sup> Bu)-Gly-L-Cys(Trt)-Gly-OH	6	3	34 <sup>a</sup> /98	32
H-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-L-Cys(Trt)-Gly-OH	7	3	38 <sup>a</sup> /85	31
H-L-Val-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-OH	8	3	43 <sup>a</sup> /82	42
H-L-Cys(Trt)-L-Arg(Pbf)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	9	3	27 <sup>a</sup> /80	22
H-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Arg(Pbf)-Gly-OH	10	3	26 <sup>a</sup> /93	23
H-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	11	1	46 <sup>a</sup> /89–59 <sup>b</sup> /85	43 <sup>a</sup> /55 <sup>b</sup>
H-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	12	2	59 <sup>a</sup> /83	51
H-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Ile-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Phe-L-Glu( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	13	3	34 <sup>a</sup> /93	32
H-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu( <sup>t</sup> Bu)-L-Met-Gly-OH	14	2	80 <sup>a</sup> /93	63
H-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	15	1	54 <sup>a</sup> /94	51
H-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Gly-OH	16	1	69 <sup>a</sup> /96	58

<sup>a</sup>HBTU was used as a coupling reagent for macrocyclization. <sup>b</sup>HATU was used as a coupling reagent for macrocyclization. <sup>c</sup>For the purified final compounds. <sup>d</sup>Determined by HPLC analysis. <sup>e</sup>Yields for the linear peptides were based on the determination of the resin loading.

122 the most important factors governing the success of the head-  
 123 to-tail peptide macrocyclization. It has been reported that  
 124 cyclization of peptides with less than seven amino acids is  
 125 troublesome; the E-geometry of the peptide bond prevents the  
 126 peptides from adopting the ring-like conformation conducive to  
 127 cyclization.<sup>20</sup> Even though, small cyclic peptides containing a  $\beta$ -  
 128 turn such as a proline, a D-amino acid, a thiazole, or oxazole  
 129 ring etc. can be prepared in good yields. If the peptide does not  
 130 contain a turn induction, the cyclization is very dependent on  
 131 its sequence. To minimize racemization, and thereby the  
 132 formation of diastereomers, during ring closure,<sup>21</sup> we started  
 133 most peptide sequences with glycine at the C-terminus, which  
 134 minimizes steric hindrance during the macrocyclization process.  
 135 Eleven cyclic peptides were synthesized using method A in  
 136 23 to 63% overall yield (Figure 2). In some compounds, Ser or  
 137 Thr present in 4 or 5 were substituted by Glu or Arg (10–14),  
 138 and hydrophobic amino acids were substituted by others such  
 139 as Gly, Phe, Met, or Arg (6–9), in order to obtain more soluble  
 140 compounds in several cases and to study the influence of those  
 141 substitutions in the bioactivities. In addition, as we were  
 142 interested in evaluating if the ring size affects the antimalarial  
 143 activity, two cyclic pentapeptides were prepared. The processes  
 144 were monitored by HPLC analyses to determine the reaction  
 145 progress. No racemization was observed, including for  
 146 compound 8,<sup>22</sup> formed from a peptide with Cys at the carboxyl

end. The best macrocyclization yield (80%) was obtained for  
 the single cyclohexapeptide, which presents only one hydro-  
 philic amino acid (Glu) and five hydrophobic residues (14).  
 Lower macrocyclization yields and longer reaction times were  
 associated with the presence of Arg(Pbf) in the peptide  
 sequence (compounds 9 and 10), perhaps because of steric  
 hindrance of the macrocyclic process.<sup>23</sup>

Using methodology B, Scheme 2, first Fmoc-L-Glu-OAll was  
 loaded onto 2-CTC resin with an excess of DIPEA, and then a  
 capping step with MeOH was realized. The peptide elongation  
 for the synthesis of the linear peptides was according to the  
 Fmoc SPPS protocol used in methodology A. Lim and co-  
 workers reported the use of allyl-based terminal protecting  
 groups prior to macrocyclization in their solid-phase total  
 synthesis of coibamide A.<sup>16</sup> In contrast, we decided to use the  
 readily available, Fmoc-protected amino acids at the N-termini  
 and perform the removal of the allyl ester using [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] in  
 a solution of 10% piperidine in THF,<sup>24</sup> which allows the  
 preparation of the desired peptide with the free carboxylic  
 group at the C-terminus and the unprotected amino group at  
 the N-terminus.

Then, on-resin macrocyclization was realized using DIC/Cl-  
 HOBt to obtain four cyclopeptides (17–20), Figure 3. The  
 macrocyclizations were completed overnight for the four  
 cyclopeptides. In addition, no racemization was detected by  
 analysis of the HPLC chromatograms and the NMR spectra of  
 the crude;<sup>23</sup> consequently the desired macrocycles were  
 obtained in yields from 63 to 99% and purities from 72 to  
 83%, Table 2. Further purification rendered the isolated  
 macrocycles in yields from 46 to 80% and purities from 93  
 to 95%, Table 3. Contrary to our expectations, the best  
 macrocyclization yield was not for the synthesis of 17, 18, or  
 19, and their precursors present an N-terminal Gly with the  
 advantage of nonsteric hindrance. In the other hand, coupling  
 between the amino group of Met and the carboxyl of Glu, to  
 obtain 20, was a very efficient process, as its crude was obtained  
 in 99% yield and 83% purity. It is worth it to note that  
 compounds obtained by methodology B present a free  
 carboxylic acid, which allows the synthesis of new derivatives,  
 with different physicochemical properties for their possible use  
 as drug candidates.

In order to determine if on-resin macrocyclization yield can  
 be improved by the use of different coupling reagents, HATU/  
 DIPEA and HBTU/DIPEA in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8:2), overnight,  
 were tested to obtain compound 17, Figure 3. By the use of  
 HATU, 17 was obtained in 100% yield but in lower purity  
 (59%). In the other hand, using HBTU, it was obtained in 70%  
 yield and 80% purity showing that there is no significant  
 difference with the use of DIC/Cl-HOBt.

Compounds 11, 12, 13, and 14, which were obtained by  
 solution macrocyclization, differ from 17, 18, 19, and 20,  
 respectively, by the presence of a <sup>t</sup>Bu protecting group in the  $\gamma$   
 carboxylic of Glu. In order to compare both procedures, A and  
 B, yield and purity for the purified macrocycles are taken into  
 account, Table 3. For the last three sequences (compounds 12  
 and 18, 13 and 19, and 14 and 20), methodology B resulted in  
 a more efficient process than methodology A. In the case of 11,  
 it was obtained in a higher yield but in poorer purity than 17.

Moreover, it is worth it to note that 17, 18, 19, and 20 were  
 obtained by draining and washing the resin in acceptable purity  
 (see Table 2). The highest yield of each methodology A and B  
 is for compounds 14 and 20, respectively, which present the  
 same sequence. In the same manner, the lowest yield for 209

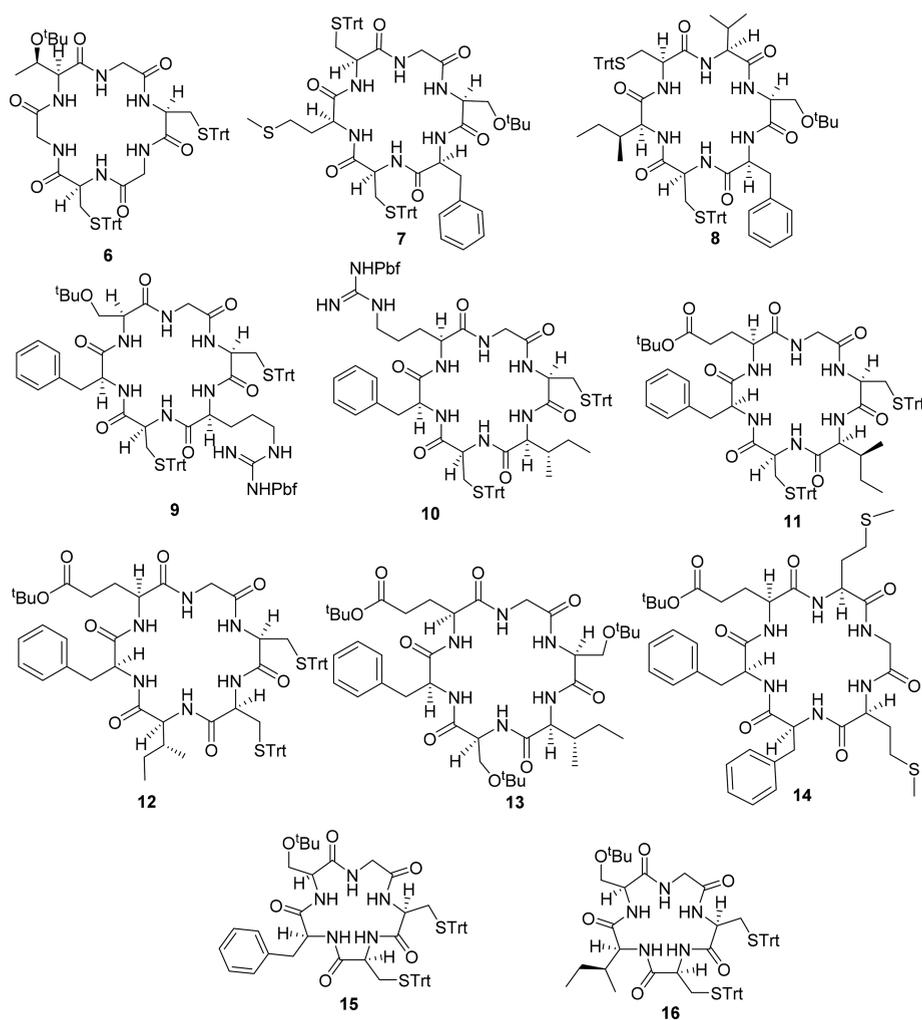
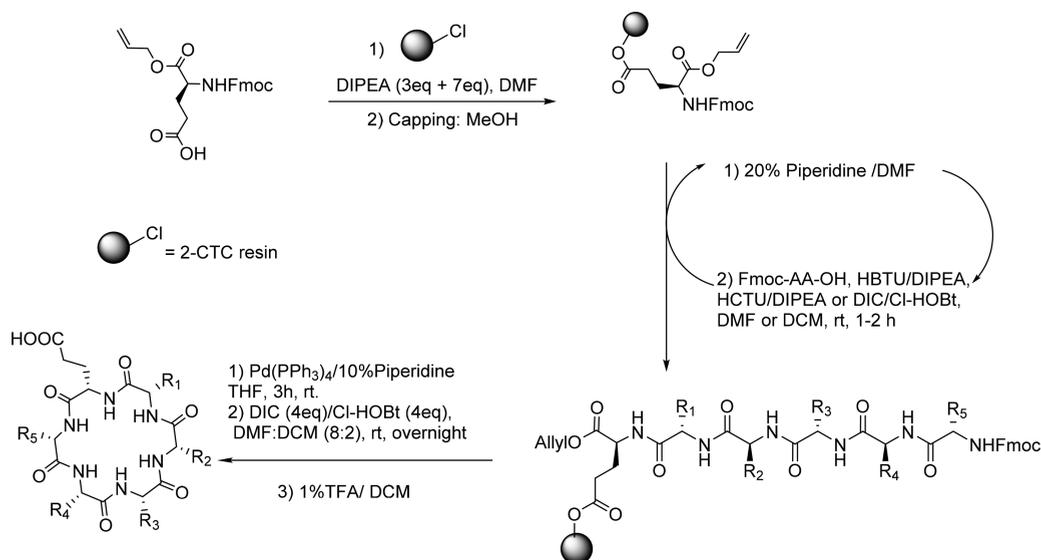


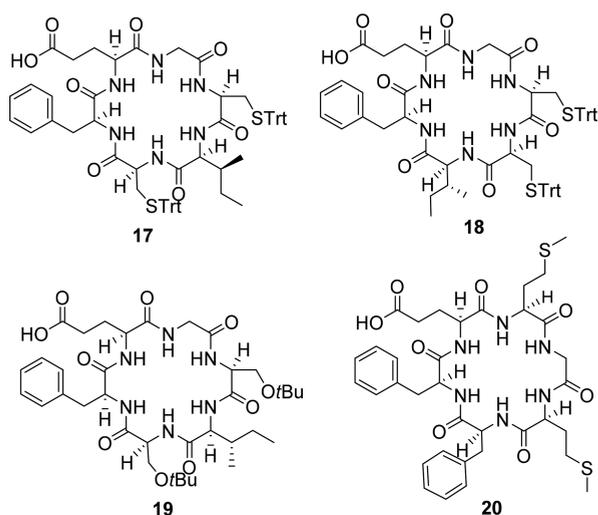
Figure 2. Cyclopeptides synthesized in this work by methodology A.

Scheme 2. General Procedure (B): Fmoc Strategy SPPS and on Resin Macrocyclization



210 methodology A and B is for 13 and 19, respectively. The above  
 211 results are in agreement with previous reports indicating that  
 212 the yield of the cyclization step is strongly sequence  
 213 dependent.<sup>24</sup>

214 The novel synthesized and purified macrocycles were  
 215 evaluated *in vitro* as antimalarial agents. The antiplasmodium  
 216 activities were determined against the chloroquine-resistant K1  
 217 strain of *P. falciparum* by using the [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine



**Figure 3.** Cyclohexapeptides synthesized in this work by methodology B.

**Table 2.** Synthesis of Macrocycles by Methodology B Using DIC/Cl-HOBt

peptide precursor	product	crude yield <sup>a</sup> / purity <sup>b</sup> (%)	isolated macrocycle yield <sup>a</sup> / purity <sup>b</sup> (%)	time (h)
H-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu-OH	17	68/81	51/95	16
H-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Phe-L-Glu-OH	18	98/72	63/95	16
H-Gly-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Ile-L-Ser( <sup>t</sup> Bu)-L-Phe-L-Glu-OH	19	63/78	46/93	16
H-L-Met-Gly-L-Met-L-Phe-L-Phe-L-Glu-OH	20	99/83	80/95	16

<sup>a</sup>Yield based on the determination of resin loading. <sup>b</sup>Determined by HPLC analysis.

**Table 3.** Comparison between Methodology A and B

macrocycle methodology A	yield/ purity	macrocycle methodology B	yield/ purity
11	59 <sup>a</sup> /85	17	51/95
12	59/83	18	63/95
13	34/93	19	46/93
14	80/93	20	80/95

<sup>a</sup>HATU was used as coupling reagent for macrocyclization.

**Table 4.** Antiplasmodium Activities of Macrocycles

compound	EC <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i> K1 ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	compound	EC <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i> K1 ( $\mu$ M) <sup>a</sup>
6	0.028 $\pm$ 0.006	14	4.6 $\pm$ 0.8
7	0.68 $\pm$ 0.04	15	8.4 $\pm$ 0.7
8	6.50 $\pm$ 0.05	16	0.73 $\pm$ 0.06
9	16.8 $\pm$ 0.9	17	0.47 $\pm$ 0.04
10	43.1 $\pm$ 0.8	18	0.42 $\pm$ 0.05
11	0.42 $\pm$ 0.03	19	>50
12	>10	20	>50
13	3.8 $\pm$ 0.6		

<sup>a</sup>Control: chloroquine, EC<sub>50</sub> = 0.47  $\mu$ M. Artemisinin: EC<sub>50</sub> = 0.02  $\mu$ M. Artesunate: EC<sub>50</sub> = 0.003  $\mu$ M. **nt: not tested.**

compound. The other macrocycles containing Glu resulted in being inactive against *P. falciparum*. The substitution of the two Cys(Trt)'s in 17 by Ser(<sup>t</sup>Bu) in 19 impacts negatively in the biological activity by decreasing 100-folds the potency toward *P. falciparum*. The substitution of Ile or Ser(<sup>t</sup>Bu) in 4 by Arg (Pbf) in 9 or 10, respectively, decreases the activity. The removal of Ile in cyclohexapeptide 4 to obtain cyclopentapeptide 16 decreases the activity by almost 4-fold (EC<sub>50</sub> = 0.19 and 0.73  $\mu$ M, respectively). Macrocycle 6, which presents two Gly's instead of Ile or Phe present in 4, is the most active compound reported by our group against *P. falciparum* K1, EC<sub>50</sub> = 28 nM. This evaluation was repeated two times in order to confirm it. Moreover, it was not toxic against HepG2 cells (EC<sub>50</sub> > 250  $\mu$ M), showing a selectivity index (SI) against the parasite >8900. Even though it is less active than artesunate, EC<sub>50</sub> = 3 nM, it is worthy to note that its activity is on the same order of magnitude as artemisinin, EC<sub>50</sub> = 20 nM.

## CONCLUSIONS

Taking into account the results for both procedures, we can conclude that methodology B, on resin macrocyclization, is the most convenient as large quantities of the desired compounds can be obtained in higher yield and acceptable purity. Comparing our results for on-resin peptide cyclization, with those obtained by other authors, our procedure has high cyclization efficiency.<sup>8,9,24,26</sup> The cyclopeptides obtained by this methodology present a free carboxyl group in the side chain of one of the amino acids, which is an excellent point to mark or to provide them the required properties for their possible use as drug candidates.

The two methodologies allow working with the same protecting groups, as the same strategy was used. However, methodology A allows the obtaining of more diverse cyclic peptides as the anchoring to the resin is performed by the C-terminal carboxyl group, and contrary to method B, it is not necessary to have amino acids containing a lateral chain with carboxyl group in their sequence. As a consequence, the selection of procedure A or B depends on the desired cyclopeptides. If methodology B can be used, cyclopeptides possessing very diverse physicochemical properties could be obtained quickly and in good yields, facilitating the approach to the best candidate with desirable biological activity.

Six of the obtained compounds showed submicromolar activity against *P. falciparum* K1. Two of them containing a free carboxylic group from Glu, 17 and 18, allow the preparation of derivatives or more soluble salts. The obtained cyclic pentapeptides are less active than cyclic hexapeptides. In addition, we have prepared a very active and selective 278

incorporation method reported by Desjardins et al.,<sup>25</sup> the results are shown in Table 4.

As compounds 6, 7, 11, 16, 17, and 18 showed submicromolar EC<sub>50</sub> as the previously reported compounds 4 and 5,<sup>5</sup> cytotoxicity evaluation against HepG2 cells was performed. The compounds were not toxic, showing EC<sub>50</sub> > 250  $\mu$ M. The substitution of the Ser(<sup>t</sup>Bu) in 4, by a Glu(<sup>t</sup>Bu) or Glu in 11 and 17, respectively, has little effect on the bioactivity. By comparison of the EC<sub>50</sub> for compound 11 and 17, it could be concluded that the <sup>t</sup>Bu ester and the free carboxylic acid in Glu have the same effect in the antiplasmodium activity for this amino acids sequence. In contrast, 18, which differs from 12 by the presence of a Glu instead of a Glu(<sup>t</sup>Bu), respectively, resulted in a more active

279 compound, **6**,  $EC_{50} = 28$  nM, and concluded that substitutions  
280 of the larger hydrophobic amino acids Phe, Met, and Ile,  
281 present in **4** and **5** by Gly maintaining one Thr and two Cys,  
282 have a great impact on the biological activities. New  
283 compounds presenting this structural requirement will be  
284 prepared for additional evaluations and will be reported in due  
285 course. As compound **6** is active on the nanomolar scale, it  
286 would be selected as a candidate for further investigations on  
287 mechanisms of action.

## 288 ■ EXPERIMENTAL PROCEDURES

289 Optical rotation was measured using a Kruss Optronic GmbH  
290 P8000 polarimeter with a 0.5 mL cell. IR spectra were recorded  
291 on a Shimadzu FTIR 8101A spectrophotometer.  $^1\text{H}$  NMR and  
292  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on Bruker Advance DPX-400.  
293 Chemical shifts are related to TMS as an internal standard.  
294 High resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a  
295 micro Q-TOF (ESI; Bruker Daltonics) and LTQ-FT Ultra  
296 (NanoESI; Thermo Scientific). Flash column chromatography  
297 was carried out with silica gel 60 (J.T. Baker, 40  $\mu\text{m}$  average  
298 particle diameter). All solution phase reactions and chromatographic  
299 separations were monitored by TLC, conducted on  
300 0.25 mm silica gel plastic sheets (Macherey/Nagel, Poly-  
301 gram\_SIL G/UV 254). TLC plates were analyzed under 254  
302 nm UV light, iodine vapor, p-hydroxybenzaldehyde spray, or  
303 ninhydrine spray. Yields are reported for chromatographically  
304 and spectroscopically ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) pure compounds.

305 Analytical HPLC was performed on a Shimadzu (LC-10AT  
306 Pump) equipped with a Waters  $\mu\text{Bondapak C18}$  column (150  
307  $\times$  3.9 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) and a SPD20A Prominence UV/vis  
308 detector.

309 All solvents were purified according to literature proce-  
310 dures.<sup>27</sup> All reactions were carried out in dry, freshly distilled  
311 solvents under anhydrous conditions unless otherwise stated.

312 **SPPS General Procedure for Elongation of the**  
313 **Peptide Chain.** The synthesis was done in a plastic syringe  
314 equipped with Teflon filters. The 2-chlorotriyl chloride resin  
315 (100–300 mesh, 1.20 mmol/g) was swelled in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  30  
316 s). A solution of the first protected amino acid (Fmoc-AA-OH  
317 2.0 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and DIPEA (3.0 equiv) was gently shaken  
318 for 10 min. Then, an extra 7.0 equiv of DIPEA was added, and  
319 shaking was continued for 45 min. MeOH (0.8 mL/g of resin)  
320 was then added in order to cap unreacted functional groups on  
321 the resin; the mixture was then shaken for 10 min. The resin  
322 was filtered and then washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\times 3$ ), DMF ( $\times 3$ ),  
323 and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\times 3$ ). The N-terminus was deprotected using 20%  
324 piperidine in DMF (2  $\times$  5 min and 1  $\times$  10 min). The resin was  
325 then washed with DMF ( $\times 3$ ),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\times 3$ ), and DMF ( $\times 3$ ). A  
326 solution of Fmoc-AA-OH (3.0 equiv) and DIPEA (6 equiv) in  
327 DMF was added to the resin, followed by a solution of HBTU  
328 or HCTU (2.9 equiv) in DMF; or, if the amino acid is Fmoc-  
329 Cys(Trt)-OH, a solution of Fmoc-AA-OH (3.0 equiv), DIC  
330 (2.9 equiv), and Cl-HOBt (2.9 equiv) in DMF was added to  
331 the resin. The mixture was stirred for 90 min. After the  
332 coupling was completed, the resin was washed with DMF ( $\times 3$ )  
333 and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\times 3$ ). Deprotection and coupling cycles were  
334 repeated with the appropriate amino acids to provide the  
335 desired compound. The peptide was cleaved from the resin by  
336 treatment with 1% TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  for 2–3 min at room  
337 temperature followed by filtration and collection of the filtrate  
338 in MeOH. The treatment was repeated three times and then  
339 the resin washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\times 5$ ). Solvents were removed *in vacuo*  
340 to obtain the crude peptide.

**General Procedure for Macrocyclization in Solution** 341  
**Phase.** A macrocyclization reaction was performed in diluted 342  
conditions (1–5 mM) using HBTU or HATU (1.5 equiv), 343  
DIPEA (3 equiv), and 4-DMAP (catalytic) in dried  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  at 344  
room temperature over 1–3 days. The reaction mixture was 345  
washed with HCl 5% and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$ , dried 346  
over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude was 347  
purified by flash chromatography to obtain the macrocycle. 348

**Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu( $\gamma$ - $^t\text{Bu}$ )-Gly** 349  
(**11**). The trifluoroacetate salt of  $\text{H}_2\text{N-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-}$  350  
 $\text{Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu( $\gamma$ - $^t\text{Bu}$ )-Gly-OH}$  was obtained following 351  
the general SPPS procedure, yielding 537 mg (93% yield) as a 352  
white solid. The purity (88%) was determined by HPLC (linear 353  
gradient: 8 to 100% acetonitrile in  $\text{H}_2\text{O}/0.003$  M TFA over 20 354  
min; flow rate = 1.5 mL/min;  $t_{\text{R}} = 9.64$  min). 355

The macrocyclization reaction was performed following the 356  
general procedure (dilution 5 mM, 1 day), starting from the 357  
trifluoroacetate salt of the amino acid  $\text{H}_2\text{N-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-}$  358  
 $\text{Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu( $\gamma$ - $^t\text{Bu}$ )-Gly-OH}$  (150 mg, 0.124 mmol). 359  
Further purification by flash chromatography rendered the 360  
desired macrocycle (88 mg, 0.074 mmol) in 59% yield and 85% 361  
purity. 362

**Cyclo-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu( $\gamma$ - $^t\text{Bu}$ )-Gly** (**11**). 363  
White solid (55% overall yield).  $R_f = 0.3$  (EtOAc/PE, 3:1). 364  
 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -52.5$  ( $c$  0.25, DCM).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 365  
 $\delta$  (ppm) 0.81–0.92 (m, 6H), 1.00–1.14 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 366  
1.41–1.52 (m, 1H), 1.79–2.03 (m, 2H), 2.11–2.25 (m, 3H), 367  
2.45 (dd,  $J = 5.4, 12.8$  Hz, 1H), 2.56 (dd,  $J = 5.0, 13.2$  Hz, 1H), 368  
2.69–2.82 (m, 2H), 2.97–3.12 (m, 2H), 3.14–3.29 (m, 2H), 369  
3.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.00–4.12 (m, 2H), 4.22 (m, 1H), 370  
4.27–4.36 (m, 1H), 6.43–6.54 (m, 1H), 6.68–6.79 (m, 1H), 371  
6.89–7.00 (m, 1H), 7.08–7.48 (m, 38H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 372  
MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 11.2, 15.5, 25.0, 25.4, 28.2 (3C), 31.7, 373  
31.9, 32.5, 36.1, 36.5, 43.9, 52.9, 53.5, 54.3, 56.3, 58.3, 67.4, 374  
67.5, 80.6, 127.0 (6C), 128.0, 128.1 (6C), 128.2 (6C), 128.8 375  
(2C), 129.2 (2C), 129.5 (12C), 136.9, 144.2 (6C), 170.0, 376  
170.1, 170.4, 171.3, 171.4, 172.3, 172.4. HRMS  $m/z$  calcd for 377  
 $\text{C}_{70}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$  ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ): 1215.5058. Found: 1215.5062. 378

**General Procedure for on-Resin Macrocyclization.** The 379  
macrocyclization reaction was performed on-resin using DIC 380  
(4.0 equiv), Cl-HOBt (4.0 equiv), and 4-DMAP (catalytic) in 381  
dried DMF/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8:2) at room temperature overnight. 382  
After the macrocyclization was completed, the resin was filtered 383  
and then washed with DMF ( $\times 3$ ) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\times 3$ ). The 384  
macrocycle was cleaved from the resin by treatment with 1% 385  
TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  for 2–3 min at room temperature followed by 386  
filtration and collection of the filtrate in MeOH. The treatment 387  
was repeated three times and then the resin washed with 388  
 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\times 5$ ). Solvents were removed *in vacuo* to obtain the 389  
crude macrocycle. 390

**Cyclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu** (**17**). 391  
The cyclopeptide was obtained following the general SPPS 392  
and on-resin macrocyclization procedures, yielding 139 mg 393  
(68% yield) of the crude macrocycle as a yellow solid. The 394  
purity (81%) was determined by HPLC (linear gradient: 8 to 395  
100% acetonitrile in  $\text{H}_2\text{O}/0.003$  M TFA over 20 min; flow rate 396  
= 1.5 mL/min;  $t_{\text{R}} = 10.13$  min). Further purification by flash 397  
chromatography rendered the desired macrocycle (104 mg) in 398  
51% yield and 95% purity. 399

**Cyclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Phe-L-Glu** (**17**). Yellow 400  
solid,  $t_{\text{R}} = 10.13$  min (linear gradient: 8 to 100% acetonitrile in 401  
 $\text{H}_2\text{O}/0.003$  M TFA over 20 min).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -34.6$  ( $c$  0.56, 402  
MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  (ppm) 0.79– 403

404 0.91 (m, 6H), 1.01–1.13 (m, 1H), 1.42–1.56 (m, 2H), 1.88–  
405 2.00 (m, 3H), 2.17–2.28 (m, 1H), 2.30–2.38 (m, 2H), 2.49–  
406 2.59 (m, 1H), 2.62–2.72 (m, 2H), 2.94–3.04 (m, 2H), 3.05–  
407 3.15 (m, 1H), 3.16–3.27 (m, 1H), 3.37 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H),  
408 4.08 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.11–4.16 (m, 1H), 4.19 (d,  $J = 15.1$   
409 Hz, 1H), 4.25–4.39 (m, 1H), 4.36–4.43 (m, 1H), 7.12–7.45  
410 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  (ppm) 10.7,  
411 15.1, 24.6, 26.1, 30.0, 31.9, 33.2, 35.7, 37.0, 38.7, 43.4, 52.5,  
412 53.5, 54.4, 56.6, 57.9, 66.6, 66.9, 126.4, 126.8 (6C), 128.0  
413 (12C), 128.4 (2C), 129.1 (2C), 129.5 (12C), 138.4, 144.6  
414 (6C), 169.5, 169.6, 170.9, 171.4, 174.5, 171.8, 173.6. HRMS  $m/z$   
415  $z$  calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$  ( $[\text{M} + \text{K}]^+$ ): 1175.4177. Found:  
416 1175.3783.

## 417 ■ ASSOCIATED CONTENT

### 418 ● Supporting Information

419 The Supporting Information is available free of charge on the  
420 ACS Publications website at DOI: [10.1021/acscombsci.7b00154](https://doi.org/10.1021/acscombsci.7b00154).

422 General methods, synthetic procedures, antiplasmodium  
423 assay, characterization data ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and  
424 HRMS), and HPLC chromatograms for the obtained  
425 macrocycles (PDF)

## 426 ■ AUTHOR INFORMATION

### 427 Corresponding Author

428 \*E-mail: [gserra@fq.edu.uy](mailto:gserra@fq.edu.uy).

### 429 ORCID

430 Gloria Serra: [0000-0002-5474-6524](https://orcid.org/0000-0002-5474-6524)

### 431 Notes

432 The authors declare no competing financial interest.

## 433 ■ ACKNOWLEDGMENTS

434 This work was supported by Grants from British Embassy in  
435 Uruguay, CSIC Grupos 983 (Universidad de la República) and  
436 PEDECIBA (Uruguay). The authors acknowledge the collab-  
437 oration of Dr. Vanessa Yardley and Lindsay Stewart from  
438 London School of Hygiene and Tropical Medicines for  
439 performing the biological evaluations, a Ph.D. fellowship from  
440 ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación; to  
441 C.F.), and an internship supported by PEDECIBA

## 442 ■ REFERENCES

443 (1) (a) Giordanetto, F.; Kihlberg, J. Macrocytic drugs and clinical  
444 candidates: what can medicinal chemists learn from their properties? *J.*  
445 *Med. Chem.* **2014**, *57*, 278. (b) Mallinson, J.; Collins, I. Macrocytic  
446 new drug discovery. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1409. (c) Peña, S.;  
447 Scarone, L.; Serra, G. Macrocytic as potential therapeutic agents in  
448 neglected diseases. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 355. (d) Driggers, E.;  
449 Hale, S.; Lee, J.; Terrett, N. The exploration of macrocytic for drug  
450 discovery-an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discovery*  
451 **2008**, *7*, 608. (e) Davies, J. S. The cyclization of peptides and  
452 depsipeptides. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471. (f) Skropeta, D.; Jolliffe, A. K.;  
453 Turner, P. Pseudoprolines as removable turn inducers: tools for the  
454 cyclization of small peptides. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8804. (g) Wipf, P.  
455 Synthetic studies of biologically active marine cyclopeptides. *Chem.*  
456 *Rev.* **1995**, *95*, 2115.  
457 (2) (a) Baraguey, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.;  
458 Auvin-Guette, C. Isolation, structure and synthesis of mahafacyclin B, a  
459 cyclic heptapeptide from the latex of *Jatropha mahafalensis*. *J. Chem.*  
460 *Soc., Perkin Trans.* **2001**, *1*, 2098. (b) Baraguey, C.; Auvin-Guette, C.;  
461 Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J. L.; Bodo, B. Isolation,  
462 structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from

the latex of *Jatropha chevalieri*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, *1*,  
3033.  
(3) (a) Kuntz, D. A.; Osowski, R.; Schudok, M.; Wierenga, R.;  
Muller, K.; Kessler, H.; Opperdoes, F. R. Inhibition of triosephosphate  
isomerase from *Trypanosoma brucei* with cyclic hexapeptides. *Eur. J.*  
*Biochem.* **1992**, *207*, 441. (b) Callens, M.; Van Roy, J.; Zeelen, J. Ph.;  
Borchert, T. V.; Nalis, D.; Wierenga, R.; Opperdoes, F. R. Selective  
interaction of glycosomal enzymes from *Trypanosoma brucei* with  
hydrophobic cyclic hexapeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*  
**1993**, *195*, 667.  
(4) (a) Portmann, C.; Blom, J. F.; Gademann, K.; Jüttner, F.  
Aerucyclamides A and B: isolation and synthesis of toxic ribosomal  
heterocyclic peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*  
PCC 7806. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1193. (b) Portmann, C.; Blom, J. F.;  
Kaiser, M.; Brun, R.; Jüttner, F.; Gademann, K. Isolation of  
aerucyclamides C and D and structure revision of microcyclamide  
7806A: heterocyclic ribosomal peptides from *Microcystis aeruginosa*  
PCC 7806 and their antiparasite evaluation. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*,  
1891.  
(5) Peña, S.; Fagundez, C.; Medeiros, A.; Comini, M.; Scarone, L.;  
Sellanes, D.; Manta, E.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Stewart, L.;  
Yardley, V.; Serra, G. Synthesis of cyclohexapeptides as antimalarial  
and anti-trypanosomal agents. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1309.  
(6) (a) Merrifield, R. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis  
of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149. (b) Merrifield, R.  
Solid Phase Synthesis. *Science* **1986**, *232*, 341. (c) Albericio, F.;  
Zompra, A.; Galanis, A.; Werbitzky, O. Manufacturing peptides as  
active pharmaceutical ingredients. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 361.  
(7) Malesevic, M.; Strijowski, U.; Bachle, D.; Sewald, N. An improved  
method for the solution cyclization of peptides under pseudo-high  
dilution conditions. *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73.  
(8) Kim, J.; Hong, I.-K.; Kim, H.-J.; Jeong, H.-J.; Choi, M.-J.; Yoon,  
C.-N.; Jeong, J.-H. Efficient macrocyclization for cyclicpeptide using  
solid-phase reaction. *Arch. Pharmacol. Res.* **2002**, *25*, 801.  
(9) (a) Scott, L. T.; Rebek, J.; Ovsyanko, L.; Sims, C. L. Organic  
chemistry on the solid phase. Site-site interactions on functionalized  
polystyrene. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 625. (b) Mazur, S.;  
Jayalekshmy, P. Chemistry of polymer-bound o-benzyne. Frequency  
of encounter between substituents on crosslinked polystyrenes. *J. Am.*  
*Chem. Soc.* **1979**, *101*, 677.  
(10) (a) Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Stewart, L.; Yardley, V.;  
Croft, S.; Serra, G. Synthesis of a *Microcystis aeruginosa* predicted  
metabolite with antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*,  
4994. (b) Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Serra, G. First Total  
Synthesis of Aerucyclamide B. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2806.  
(c) Peña, S.; Scarone, L.; Medeiros, A.; Manta, E.; Comini, M.; Serra,  
G. Synthesis of precursors and macrocycle analogs of aerucyclamides  
as anti-trypanosomal agents. *MedChemComm* **2012**, *3*, 1443.  
(11) (a) Isied, S.; Kuehn, C. G.; Lyon, J. M.; Merrifield, R. B. Specific  
peptide sequences for metal ion coordination. I. Solid-phase synthesis  
of cyclo-(Gly-His) $_3$ . *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2632. (b) Rovero, P.;  
Quartara, L.; Fabbri, G. Synthesis of cyclic-peptides on solid support.  
*Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2639. (c) Trzeciak, A.; Bannwarth, W.  
Synthesis of 'head-to-tail' cyclized peptides on solid support by Fmoc  
chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4557. (d) Kates, S. A.; Solé, N.  
A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. A novel,  
convenient, three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase  
synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549.  
(e) Alsina, J.; Chiva, C.; Ortiz, M.; Rabanal, F.; Giral, E.; Albericio,  
F. Active carbonate resins for solid phase synthesis through the  
anchoring of a hydroxyl function. Synthesis of cyclic and alcohol  
peptides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 883. (f) Alsina, J.; Rabanal, F.;  
Giral, E.; Albericio, F. Solid-phase synthesis of "Head-to-Tail" cyclic  
peptides via lysine side-chain anchoring. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*,  
9633. (g) García, O.; Nicolás, E.; Albericio, F. Solid-phase synthesis: A  
linker for side-chain anchoring of arginine. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*,  
5319. (h) Cabrele, C.; Langer, M.; Beck-Sicking, A. Amino acid side  
chain attachment approach and its application to the synthesis of  
tyrosine-containing cyclic peptides. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4353.

- 532 (12) (a) Mayer, J. P.; Yan, L. Z.; Edwards, P.; Flora, D. Synthesis of  
533 cyclic peptides through hydroxyl side-chain anchoring. *Tetrahedron*  
534 *Lett.* **2004**, *45*, 923.
- 535 (13) Wang, P.; Miranda, L. P. Fmoc-Protein synthesis: preparation of  
536 peptide thioesters using a side-chain anchoring strategy. *Int. J. Pept.*  
537 *Res. Ther.* **2005**, *11*, 117.
- 538 (14) Wong, C.; Ficht, S.; Payne, R.; Guy, R. Solid-phase synthesis of  
539 peptide and glycopeptide thioesters through side-chain-anchoring  
540 strategies. *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 3620.
- 541 (15) (a) Schutkowski, M.; Bernhardt, A.; Drewello, M. The solid-  
542 phase synthesis of side-chain-phosphorylated peptide-4-nitroanilides. *J.*  
543 *Pept. Res.* **1997**, *50*, 143. (b) Rizzi, L.; Cendic, K.; Vaiana, N.; Romeo,  
544 S. Alcohols immobilization onto 2-chlorotriylchloride resin under  
545 microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2808.
- 546 (16) Sable, G. A.; Park, J.; Kim, H.; Lim, S.-J.; Jang, S.; Lim, D. Solid-  
547 phase total synthesis of the proposed structure of coibamide A and its  
548 derivative: highly methylated cyclic depsipeptides. *Eur. J. Org. Chem.*  
549 **2015**, *2015*, 7043.
- 550 (17) Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W. Synthesis of prothymosin a  
551 (ProTo)—a protein consisting of 109 amino acid residues. *Angew.*  
552 *Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 590.
- 553 (18) López-Maciá, A.; Jiménez, J. C.; Royo, M.; Giral, E.; Albericio,  
554 F. Synthesis and structure determination of kahalalide F (1,2). *J. Am.*  
555 *Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11398.
- 556 (19) (a) Hood, A. C.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.;  
557 Park, J. H. Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis with  
558 HCTU. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 97. (b) Marder, O.; Albericio, F.  
559 Industrial application of coupling reagents in peptides. *Chim. Oggi*  
560 **2003**, *21*, 6. (c) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical*  
561 *Approach* (Chan, W. C., White, P. D., Eds.), p 9, Oxford University  
562 Press, 2004.
- 563 (20) (a) Schmidt, U.; Langner, J. Cyclotetrapeptides and cyclo-  
564 pentapeptides: occurrence and synthesis. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 67.  
565 (b) White, C.; Yudin, A. Contemporary strategies for peptide  
566 macrocyclization. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509.
- 567 (21) Humphrey, J.; Chamberlin, A. Chemical synthesis of natural  
568 product peptides: coupling methods for the incorporation of  
569 noncoded amino acids into peptides. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243.
- 570 (22) See [Supporting Information](#).
- 571 (23) Thakkar, A.; Trinh, T. B.; Pei, D. Global analysis of peptide  
572 cyclization efficiency. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15*, 120.
- 573 (24) Rand, A. C.; Leung, S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.;  
574 Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M.; Farley, K. A.; Khunte, B.;  
575 Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M.  
576 P.; Lokey, R. S. Optimizing PK properties of cyclic peptides: the effect  
577 of side chain substitutions on permeability and clearance. *MedChem-*  
578 *Comm* **2012**, *3*, 1282.
- 579 (25) (a) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, D. E.; Chulay, J. D.  
580 Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a  
581 semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.*  
582 **1979**, *16*, 710. (b) See [Supporting Information](#).
- 583 (26) Sable, G. A.; Park, J.; Lim, S. J.; Lim, D. Solid-phase total  
584 synthesis of amide analogues of coibamide a: azacoibamide a and O-  
585 desmethyl azacoibamide A. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2016**, *37*, 330.
- 586 (27) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory*  
587 *Chemicals*, 3rd ed., Pergamon Press, Oxford, 1988.