
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“DISEÑO DE PÉPTIDOS MEDIANTE INTELIGENCIA ARTIFICIAL
Y SU SÍNTESIS QUÍMICA EN SOLUCIÓN”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

p. de Q. F. B. Rubén Omar Torres Ochoa

ASESORES:

D. en C. Luis Chacón García

D. en C. Judit Araceli Aviña Verduzco

Morelia, Michoacán, México

Enero de 2008

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Diseño Molecular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la muy grata y valiosa asesoría del D. en C. Luis Chacón García y de la D. en C. Judit Araceli Aviña Verduzco.

Se agradece el apoyo otorgado por CONACyT al proyecto **47907 (“Síntesis de inhibidores potenciales de la topoisomerasa”)** y por el apoyo que otorgó la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana al proyecto **2.21 (“Síntesis de derivados de fluoroquinolonas”)**, con los cuales se pudo realizar este trabajo.

Parte de este trabajo se presentó en la 3ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica llevada a cabo los días 15 y 16 de Marzo del 2007 en la ciudad de Pachuca, Hidalgo y en la XVI Verano de la Investigación Científica “Delfín” desarrollado el 23 y 24 de Agosto del 2007 en Nuevo Vallarta, Nayarit.

ÍNDICE

	Página
Índice de Figuras, Gráficas y Tablas	III
Lista de abreviaturas	V
Resumen	1
Antecedentes	2
Diseño molecular asistido por ordenador	3
QSAR	7
Validación de modelos	12
Descriptores moleculares	12
Aplicaciones de estudios QSAR	14
Termodinámica de las interacciones no covalentes entre el DNA y otra molécula	17
Aminoácidos, péptidos y proteínas	19
Propiedades de los péptidos	22
β-aminoácidos: Papel que guardan dentro de la síntesis orgánica	23
Síntesis química de péptidos	27
Evaluación de la actividad de moléculas reconocedoras de surco	31
Hipótesis	36
Objetivos	37
General	37
Particular	37
Análisis QSAR y diseño	38

Selección de la serie de exploración	38
Optimización geométrica	40
Cálculo de descriptores fisicoquímicos a las moléculas que conforman la serie	40
Obtención de los modelos empleando algoritmos genéticos	40
Selección, análisis estadístico y validación de un modelo adecuado	42
Diseño de moléculas con probable actividad como reconocedores del DNA y empleo del modelo seleccionado para el cálculo de la actividad de dichas moléculas	44
Resultados y discusión	46
Síntesis	50
Conclusiones	60
Parte experimental	61
Bibliografía	77

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

	Página
Figuras	
1. Metodología QSAR	11
2. Molécula intercaladora (bromuro de etidio) y su inserción entre los pares de bases de una secuencia de DNA	15
3. Molécula reconocedora del B-DNA (clorambucil) y su inserción en el surco menor	17
4. Posibilidades que se podrían presentar en un diagrama termodinámico de la interacción reconocedor de surco (RS) con el DNA	18
5. Estructura de un α -aminoácido	20
6. Estereoquímica de los aminoácidos presentes en la naturaleza	21
7. Ejemplos de péptidos con actividad biológica	22
8. Conjugación del par de electrones del nitrógeno con el grupo carbonílico dentro de un enlace peptídico	22
9. Estructura de un β -aminoácido	24
10. Acoplamiento de dos α -aminoácidos	27
11. Protección del grupo amino mediante la formación de uretanos	28
12. Protección del grupo carboxilo mediante la formación de ésteres	28
13. Activación del grupo carboxilo previo ataque nucleofílico del grupo amino de otra molécula	29
14. Formación de un enlace peptídico empleando DCC y un alcohol	29
15. Panorama general de la desnaturalización y renaturalización del DNA	32
16. Serie de exploración	39

17.Representación esquemática del descriptor D_{CL}	41
18.Reacción general de protección de los α -aminoácidos	50
19.Reacción de acoplamiento entre 2 aminoácidos	51
20.Reacción general de <i>O</i> -desprotección de los α,α -dipéptidos	52
21.Reacción general de <i>N</i> -desprotección de los α,α -dipéptidos	53
22.Reacciones realizadas para la obtención del β,α -dipéptido	55

Tablas

Tabla 1	30
Tabla 2	43
Tabla 3	44
Tabla 4	46
Tabla 5	47
Tabla 6	48
Tabla 7	51
Tabla 8	52
Tabla 9	53
Tabla 10	54
Tabla 11	56
Tabla 12	56
Tabla 13	57
Tabla 14	58
Tabla 15	59

Gráficas

1. Secuencia que se sigue en la desnaturalización del DNA	32
2. Representación de la temperatura de fusión del DNA (T_m)	34
3. Dependencia de T_m con el contenido en G-C del DNA	34

LISTA DE ABREVIATURAS

A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nanómetros
AcOEt	Acetato de etilo
Ag ₂ O	Óxido de plata
A-T	Adenina-Timina
BOC	Dicarbonato de diterbutilo
Bzl	Bencilo
Cbz	Carboxibenzoilo
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CH ₂ N ₂	
C-G	Citosina-Guanina
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Ec.	Ecuación
EtOH	Etanol
Fen	Fenilalanina
Fig.	Figura

Fmoc-OSuc	<i>N</i> -(9-fluorenilmetoxicarbonil-oxi) succinimida
ΔG	Variación de energía libre de Gibbs
g	gramos
Gp	Grupo protector
ΔH	Variación de entalpía
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂	Hidrógeno gaseoso
H ₂ O	Agua
<i>i</i> -BBCl	Cloroformiato de isobutilo
LiOH.H ₂ O	Hidróxido de litio monohidratado
M	Molar
MeOH	Metanol
ml	mililitros
mmol	milimoles
N	Normal
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloruro de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sódio
N. R.	No reaccionó
pb	Pares de bases
Pd/C	Paladio sobre carbono

Ph	Fenilo
pH	Potencial hidrógeno
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
% r	Por ciento de rendimiento
ΔS	Variación de entropía
SOCl_2	Cloruro de tionilo
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
$\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico monohidratado
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Un área sumamente interesante dentro del modelado molecular es el diseño de nuevos compuestos. Los métodos QSAR han demostrado que las relaciones entre la estructura molecular y la actividad biológica de los compuestos se pueden cuantificar matemáticamente a partir de parámetros estructurales simples (descriptores).

En una parte del presente trabajo se realiza un análisis QSAR de varias moléculas reconocedoras de surco que presentan actividad contra parásitos y como inhibidores del crecimiento de células neoplásicas. Los descriptores elegidos en el modelo matemático se relacionan al reconocimiento topológico del DNA y a las distancias que se deben de guardar determinados átomos clave dentro de la molécula para que su interacción con la diana (DNA) sea la óptima. El tipo de moléculas elegidas para el análisis QSAR y posterior síntesis fueron péptidos. En base a que estos exhiben un amplio rango de propiedades biológicas y químicas, su estudio en los últimos tiempos ha tenido mucho auge en las muy diversas áreas de la investigación. Se logró en el trabajo diseñar por computadora varios dipéptidos con determinadas cadenas unidas en el extremo carboxilo, predecir su actividad mediante el uso del modelo establecido y sintetizar β,α - y α,α -dipéptidos que son las bases estructurales de los dipéptidos diseñados.

Al final pudimos comprobar que se prefiere una depuración de muchos compuestos seleccionados antes de la realización de su síntesis.

———— ANTECEDENTES ————

Desde tiempos antiguos las personas del mundo empleaban un rango muy amplio de productos naturales que ellos usaban para propósitos medicinales; eran tanto obtenidos de fuentes animal, vegetal y mineral. Con el paso del tiempo se sobreexplotó el empleo de muchas sustancias tanto para lograr efectos medicinales como para ser usados con otros propósitos, y no fue hasta los siglos XVIII y XIX cuando los practicantes de esta área tuvieron comunicación entre sí y comenzaron a conocer farmacopeas de diversos sitios para saber y también ellos dar a conocer que sustancias resultaban ser inefectivas o muy tóxicas, trayendo consigo un uso más racional de las mismas.

Con el aislamiento de las primeras sustancias puras a principios del siglo XVIII a partir de plantas, se vio que solo algunas demostraban ser agentes terapéuticos satisfactorios. La búsqueda por encontrar agentes terapéuticos menos tóxicos que los basados en fuentes naturales dio lugar a la introducción de sustancias sintéticas como drogas a fines del siglo XIX y su uso se extendió prácticamente sin límites en el siglo XX.

Inicialmente, los primeros fármacos sintéticos desarrollados se basaron alrededor de productos naturales aislados de plantas y animales, pero como el conocimiento se fue incrementando, un rango amplio de sustancias sintéticas fueron desarrolladas como drogas.¹

El trabajo de la Química Médica está centrado alrededor del descubrimiento de nuevos compuestos líderes con propiedades médicas específicas, esto incluyendo el desarrollo de análogos más efectivos y seguros. La fase de descubrimiento se estima que dura aproximadamente 42,6 meses (3,55 años) como promedio en aquellos países con una amplia infraestructura investigativa. En países con un nivel menor de desarrollo esta fase alcanza aproximadamente de 5 a 6 años. La fase de desarrollo comprende la de los estudios clínicos y la del registro farmacéutico, y se estima que duren entre 68.6 meses y 30.3 meses respectivamente. Todo este largo proceso, desde su obtención hasta su registro comprende un total de 11.8 años de investigación, con un costo promedio de 231 millones de dólares por cada nuevo medicamento que salga al mercado. Actualmente se estima que por cada 10 000 compuestos sintetizados, solo uno es conveniente para uso médico. El desafío de la Química Médica actual no está en cómo sintetizar nuevos compuestos, sino en que compuestos deben sintetizarse.^{1, 2}

Diseño molecular asistido por ordenador

Durante los últimos 15 años se han incorporado a los laboratorios de investigación de las principales industrias farmacéuticas una serie de técnicas computacionales que permiten racionalizar el diseño de nuevos medicamentos; estas técnicas, reciben la denominación general de *diseño de fármacos asistido por ordenador* y también *modelaje molecular*, y se han extendido gracias al desarrollo de la computación y a la creación de software

que nos permiten simular las propiedades de los fármacos y su interacción con las macromoléculas blanco presentes en las células de los organismos vivos. Los crecientes costos asociados a la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, la limitación en los años de protección de las patentes del producto y la necesidad de obtener fármacos más innovadores, selectivos y con menores efectos secundarios; han sido también factores importantes para el desarrollo de las técnicas englobadas en el diseño molecular asistido por ordenador.

El sueño del químico medicinal es diseñar fármacos que tengan una actividad farmacológica específica. En las empresas farmacéuticas se sintetizan miles de compuestos y para cada uno de ellos se evalúan sus parámetros de actividad farmacológica. El proceso de descubrimiento de nuevos fármacos se ha originado en muchos casos en la capacidad de los equipos de síntesis química para proveer una gran cantidad de nuevas moléculas para el análisis de su actividad farmacológica.

El diseño molecular asistido por ordenador se sitúa al comienzo de la tarea investigadora de un nuevo fármaco. Su objetivo fundamental es la *predicción de la actividad biológica de nuevas moléculas*. El diseño de los denominados *compuestos cabeza de serie* requiere el análisis de una gran cantidad de información interdisciplinaria (Química, Biología, Farmacológica clínica).

Los métodos utilizados para diseñar nuevos fármacos pueden dividirse en dos grandes grupos:

1. Cuando no se conocen los detalles estructurales de la interacción fármaco-receptor, las nuevas moléculas se pueden diseñar comparando en el espacio tridimensional las propiedades geométricas, electrónicas y fisicoquímicas de otras moléculas que actúan sobre el receptor estudiado.
2. Cuando se conocen experimentalmente los detalles estructurales de la interacción entre uno o varios fármacos y el receptor, pueden diseñarse nuevas moléculas basadas en dichas estructuras fármaco-receptor.

En el caso de que no se conoce la estructura de la interacción fármaco-receptor pueden seguirse varias metodologías:

- Relaciones estructura-actividad. Son técnicas estadísticas que hacen posible la optimización de un compuesto líder y pueden abarcar desde una relación simplemente cualitativa (qué sustituciones en un núcleo común de varias moléculas favorecen la actividad), a una predicción cuantitativa de la actividad (una ecuación que indique qué sustituciones en la molécula tendrán una mayor importancia para mejorar la actividad, QSAR).

- Obtención de farmacóforos. Cuando varios laboratorios trabajan en un mismo campo terapéutico, es frecuente que se desarrollen nuevas moléculas activas con una gran similitud estructural. Sin embargo, es también posible que diversas aproximaciones químicas generen moléculas activas y selectivas para un mismo receptor, y que aparentemente no presenten una similitud estructural en la representación química bidimensional. Las técnicas computacionales de identificación de farmacóforos permiten establecer cuáles son las funciones químicas importantes para una interacción favorable fármaco-receptor y cuál es la distribución espacial de dichas funciones químicas.
- Búsqueda en bases de datos de estructuras químicas tridimensionales. Si es posible obtener un farmacóforo que explique la actividad farmacológica selectiva de una serie de moléculas estructuralmente diversas, es posible utilizarlo para buscar en una base de datos que contenga estructuras químicas tridimensionales (experimentales o calculadas teóricamente). Si en la búsqueda se introduce cierta flexibilidad conformacional, se pueden obtener nuevos compuestos cabeza de serie que presenten una estructura química diferente a la de los compuestos desarrollados previamente. La ventaja de este método es que las moléculas extraídas de la base de datos ya han sido sintetizadas previamente o bien son adquiridas

comercialmente, por lo que puede evaluarse su actividad farmacológica rápidamente.

Pero si ya es conocida la estructura de la interacción fármaco-receptor, es posible utilizar todas las técnicas computacionales de diseño molecular resumidas en el apartado anterior. Sin embargo, la información estructural experimental de una macromolécula, obtenida generalmente por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear, nos ofrece una imagen detallada del volumen y las características químicas y electrostáticas del centro activo de dicha enzima o receptor. Se han desarrollado una serie de técnicas computacionales para aprovechar esta información estructural en 3D en el diseño de fármacos y permiten un análisis geométrico, energético y electrostático de las interacciones ligando-receptor, y predecir la actividad de nuevas moléculas incorporadas al centro activo (Docking) por su mayor o menor estabilidad energética del complejo con la macromolécula.³

En el presente trabajo el diseño molecular se realizó mediante relaciones de estructura-actividad (QSAR), es por esto que se desglosará más a fondo a continuación.

QSAR

Es posible relacionar variaciones estructurales en una serie de moléculas con variaciones en la actividad de forma cuantitativa, a través de las

llamadas ecuaciones de relaciones estructura-actividad o QSAR. Ésta idea fue formulada por Richet a finales del siglo XIX, y queda establecida en la Ec. (1):

$$\Delta\Phi = f(\Delta C) \quad \text{Ec. (1)}$$

Siendo C la estructura química y Φ la medida de la actividad.⁴

No fue hasta 1964 cuando aparecieron las primeras aportaciones QSAR que se aplicaron con éxito al diseño de nuevas moléculas, dos métodos fueron desarrollados en paralelo que abordaban el tema desde planteamientos teóricos diferentes:

- Free y Wilson publicaron una técnica basada en considerar las aportaciones que hacen a la actividad de un compuesto (C) sus distintos sustituyentes químicos (X_i) localizados en posiciones j de la estructura μ (Ec. 2):

$$\log 1/C = \Sigma (X_{ij}) + \mu \quad \text{Ec. (2)}$$

Aunque inicialmente el método fue pensado para construir moléculas *de novo*, a partir de la adición de los distintos fragmentos, únicamente se llegó a aplicar en estudios de relaciones estructura-actividad de series congenéricas.

- Hansch y Fujita pusieron a punto el modelo paramétrico (modelo de Hansch o extratermodinámico) en el que se correlaciona la actividad biológica de series de productos con sus propiedades fisicoquímicas. El modelo puede describirse según la Ec. (3) y supone que la energía libre de unión ligando-receptor se puede aproximar mediante una combinación lineal de contribuciones lipofílica, electrónica y estérica:

$$\Delta G = \Delta G_{lipo} + \Delta G_{el} + \Delta G_{est} \quad \text{Ec. (3)}$$

La metodología QSAR (Fig. 1) sigue, independientemente del modelo que se utilice como punto de partida en todos los casos, la existencia de un prototipo cabeza de serie. Cuando se cuenta con este, es preciso diseñar una serie de exploración (compuestos por un núcleo común y sustituyentes o fragmentos variables), constituida por un conjunto de productos análogos del prototipo, que permitan el establecimiento de las primeras relaciones estructura-actividad. Dichos sustituyentes variables han de ser identificados por descriptores, que serán utilizados como variables independientes (X_i) en el modelo. Por otra parte, los valores de actividad biológica se utilizan como variable dependiente (C) en el modelo.

Una vez establecidos ambos conjuntos de valores X_i y C , se utilizan técnicas de regresión múltiple para obtener un modelo que ha de ser analizado en su actividad estadística para evaluar su capacidad de predicción y

frecuentemente es utilizado para calcular la actividad de miembros de la familia de productos analizada.

La fase de optimización implica que una vez obtenido un modelo de buena calidad, es posible calcular los productos con actividad óptima dentro de la familia estudiada, que habrán sido obtenidos con un mínimo de esfuerzo experimental. Por su puesto, esto no se consigue al primer intento, de hecho, el proceso de optimización de un prototipo es un proceso cíclico, en el que la serie de exploración inicial produce un modelo de baja calidad, que es refinado por el diseño y la síntesis de series complementarias, hasta obtener un modelo de calidad suficiente para ser utilizado en el diseño de productos óptimos.⁵

El campo de los métodos QSAR se encuentra bien establecido. Se ha demostrado que la actividad biológica de un conjunto de compuestos que actúan vía el mismo mecanismo de acción puede ser modelado matemáticamente a partir de parámetros estructurales simples.

De ahí que en la última década, estos modelos han encontrado un auge como una alternativa viable para estimar un sin fin de propiedades químicas y de actividades biológicas. Tienen algunas ventajas sobre métodos tradicionales como puede ser su rapidez y simplicidad. Sin embargo, la metodología clásica de este tipo de métodos tiene limitaciones, como la imposibilidad de distinguir estereoisómeros, o la imposibilidad de encontrar modelos lineales

cuando la base estructural tiene una variación considerable (conjuntos heterogéneos).⁷

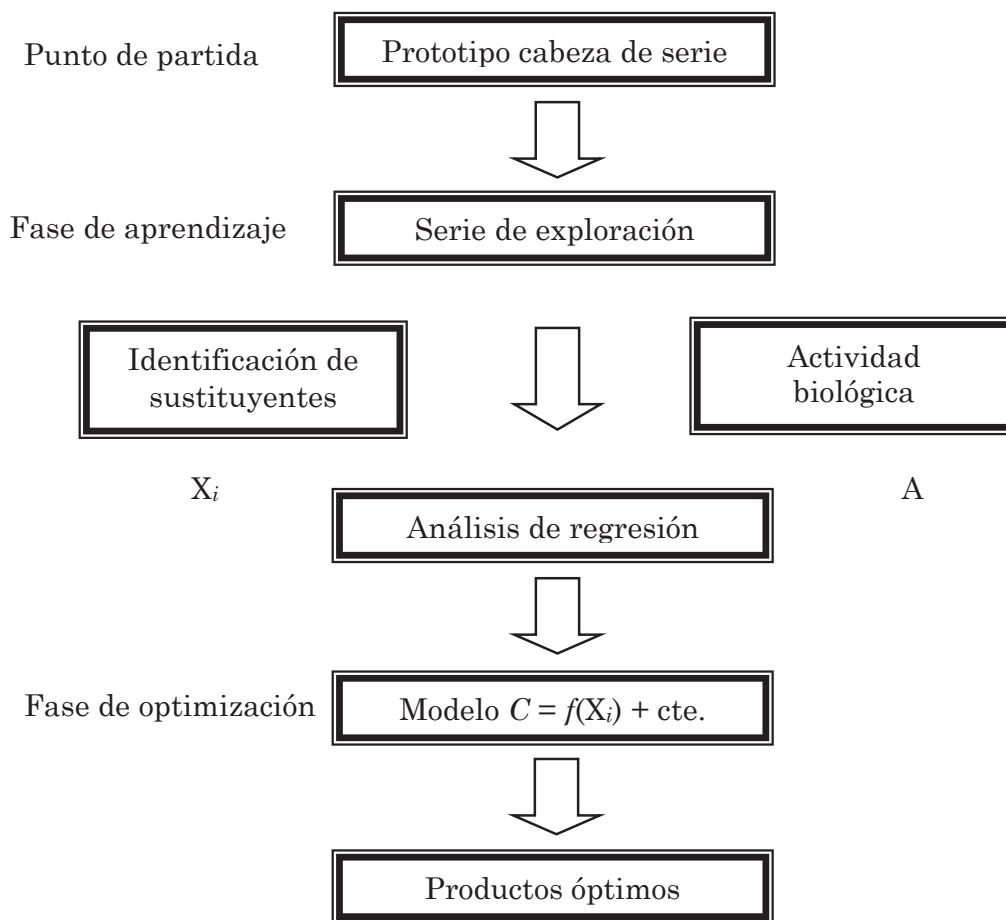


Figura 1. Metodología QSAR.

Cuando las relaciones QSAR hacen uso de descriptores fisicoquímicos que depende de la estructura tridimensional de la molécula, entonces se habla de 3D-QSAR.⁴

Validación de modelos

El resultado final de un análisis QSAR será un modelo matemático. Para estar completamente seguros de que el modelo obtenido no resulta de un ordenamiento al azar de los datos es conveniente verificar la calidad del mismo. El método de regresión lineal múltiple proporciona los valores para los coeficientes que hacen que la función matemática propuesta explique al máximo como varían las actividades. Independientemente de esto siempre quedará una varianza no explicada por el modelo (los residuales), que corresponden a los errores en las medidas de los datos de actividad y a posibles efectos no incluidos en él (parámetros no considerados).

Descriptores moleculares

Un descriptor molecular es el resultado final de una lógica y de un procedimiento matemático que transforma la información química codificada dentro de una representación de una molécula o el resultado de un cierto experimento estandarizado en un número útil.

Las características de las moléculas no dependen solamente de las características de los átomos componentes sino también de sus conexiones mutuas. La molécula (pensada como un objeto verdadero) contiene implícita toda la información química, pero solamente una parte de esta información se puede extraer por medidas experimentales. Los descriptores moleculares

son números capaces de extraer pedazos pequeños de información química de la molécula.

En las últimas décadas, varias investigaciones científicas se centraron en estudiar cómo tomar y convertir los descriptores moleculares usados para establecer relaciones cuantitativas entre estructuras y propiedades, actividades biológicas y otras propiedades experimentales. La evidencia del interés de la comunidad científica en los descriptores moleculares es proporcionada por el número enorme de descriptores propuestos hasta hoy: más de 2000 de los descriptores son actualmente definidos y medidos por computadoras usando software como herramienta.⁶

Ejemplo de lo anterior fue que en el 2001 Chacón y Martínez⁷ dieron a conocer un nuevo descriptor (D_{CL}), relacionado con el reconocimiento topológico entre el DNA y moléculas reconocedoras de surco. Modelaron, sintetizaron y probaron una serie de moléculas con un núcleo común pero con diferente longitud. La idea que propusieron es lógica y justificada experimentalmente, nos dicen que para que moléculas reconocedoras interaccionen de manera óptima con el DNA deben poseer una longitud y acomodo espacial específico, el aumento de manera indiscriminada de la longitud de la cadena conlleva a un decremento en la actividad prefiriendo interactuar entre ella misma (intramolecular) que con su diana (intermolecular).

Aplicaciones de estudios QSAR

Gran parte de las investigaciones en la actualidad están enfocadas al descubrimiento y síntesis de nuevos compuestos contra enfermedades que constituyen graves problemas de salud pública, por ejemplo el cáncer. Este se presenta al haber un crecimiento incontrolado de células y ha sido una de las enfermedades con las que el hombre ha lidiado desde tiempos ancestrales. En la actualidad, existe un gran número de fármacos para paliar este problema y muchos más que se encuentran en desarrollo; este campo de estudio es muy amplio, ya que se buscan nuevas moléculas capaces de ser selectivas al actuar evitando efectos colaterales indeseables, disminuir su toxicidad (efectos secundarios) y tratar de eliminar por completo la resistencia múltiple a fármacos por parte de las células cancerosas.

Moléculas pequeñas que se unen al DNA han probado que pueden ser efectivas como agentes anticancerosos, antibióticos y antivirales. El DNA es el blanco farmacológico de muchas drogas que son usadas en la clínica o en ensayos clínicos avanzados. Desde la mitad de la década de los 50's del siglo pasado, la correlación entre la unión de moléculas con el DNA y manifestación de alguna actividad biológica fue establecida.⁸ Cabe recalcar que otro blanco molecular muy empleado son las proteínas pero en este trabajo no se abordará este tema.

Según se reporta en la literatura, de los grupos de moléculas más importantes que presentan actividad citotóxica son aquellos que *interaccionan de manera reversible con el DNA* mediante la formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas sin la formación de enlaces covalentes; así lo hacen los *agentes intercaladores* y los *reconocedores del surco menor*.

Un intercalador es una molécula que se inserta por sí misma entre los pares de bases de la hélice del DNA (Fig. 2). Esta inserción permite que la hélice parcialmente se desenrolle en el sitio donde se encuentra la molécula intercaladora, inhibiendo así la replicación y la transcripción; esto conlleva a la muerte celular. Por ejemplo, el bromuro de etidio, que es utilizado para detectar la posición del DNA en geles electroforesis, es un poderoso agente intercalante con efectos mutagénicos.

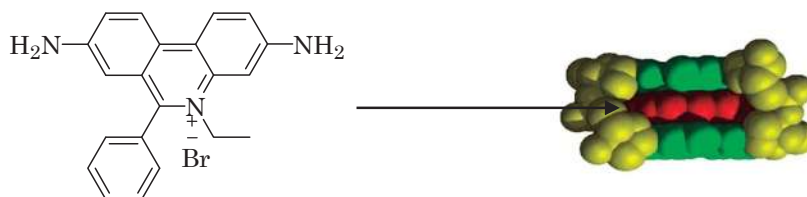


Figura 2. Molécula intercaladora (bromuro de etidio) y se inserción entre los pares de bases de una secuencia de DNA.

La estructura química de un agente intercalador puede poseer secciones de anillos aromáticos fusionados planos o anillos heteroaromáticos también planos que puedan entrar entre los pares de bases del DNA. Se mantienen insertados a través de la formación de puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.¹

Ahora bien, una molécula puede llegar, reconocer y establecerse de manera no covalente en el surco menor del B-DNA formando un complejo. Este tipo de moléculas son conocidas como reconocedoras del surco menor del B-DNA (Fig. 3). Dichas moléculas exhiben actividad antiparasitaria, antiviral y antibacteriana; y además algunos de estos muestran también actividad antitumoral, por lo tanto, pueden considerarse para aplicaciones terapéuticas contra el cáncer.⁹ El origen de un reconocedor puede ser natural, sintético o semisintético y algunas características comunes que presentan son:

- Se unen preferentemente en secuencias A-T.
- Poseen anillos aromáticos en su estructura.
- Poseen enlaces que les permitan adoptar una estructura curva al unirse al DNA (helicoididad).
- Poseen átomos donadores de puentes de hidrógeno.

- Pueden llegar a poseer cargas positivas (extremos).

Un ejemplo de este tipo de moléculas es el clorambucil, es un reconocedor del surco menor que puede inhibir la enzima telomerasa presente en más del 90% de las células cancerosas pero que está ausente en las células sanas.¹⁰

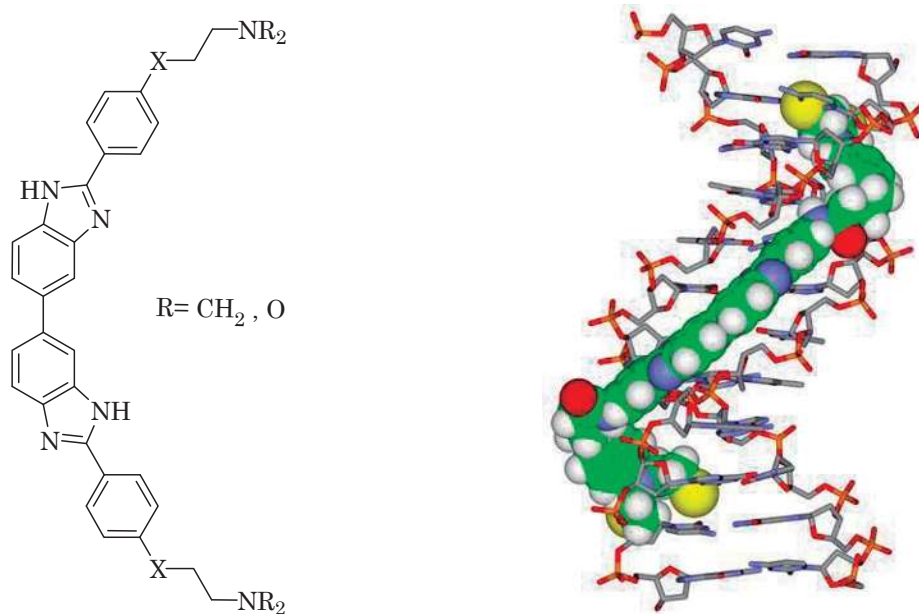


Figura 3. Molécula reconocedora del B-DNA (clorambucil) y su inserción en el surco menor.

Termodinámica de las interacciones no covalentes entre el DNA y otra molécula

Desde el punto de vista termodinámico las interacciones no covalentes entre el DNA y otras moléculas afines a él (reconocedor de surco), puede llevar a

tres tipos de panoramas (Fig. 4); primero donde el ΔG del proceso global resulta ser positivo y desfavorecido; segundo cuando el ΔG equivale a cero convirtiéndose el proceso en reversible y por consiguiente permanece en equilibrio; y por último cuando el ΔG es negativo, con esto se posee la mínima energía posible, se favorece el proceso y se vuelve espontáneo.

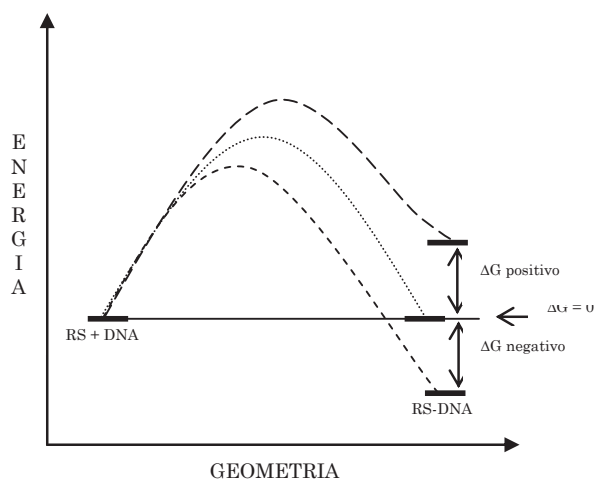


Figura 4. Posibilidades que se podrían presentar en un diagrama termodinámico de la interacción reconocedor de surco (RS) con el DNA.

Cabe recordar que ΔG dependerá de los cambios de entalpía (ΔH), presentada en forma de interacciones intermoleculares; y de entropía (ΔS), que nos habla de los grados de libertad o número de conformaciones moleculares (Ec. 4).¹¹

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

Infinidad de moléculas interaccionan y se pueden anclar en el DNA para llevar a cabo diferentes procesos, principalmente proteínas; es por lo tanto, lógico pensar que péptidos cortos que posean una determinada secuencia sean capaces de reconocer regiones en el surco menor del biopolímero y lleguen a actuar como agentes terapéuticos impidiendo procesos como el de replicación.

El actual e incesante estudio de los péptidos como agentes terapéuticos, justificado por la variedad de actividades biológicas que pueden presentar y también a la falta de información del papel que pueden jugar como reconocedores de surco, en el presente trabajo retomamos el descriptor D_{CL} reportado por Chacón y Martínez para ver la qué utilidad puede tener en el diseño de varios dipéptidos con posible actividad como reconocedores. Se utilizó ΔT_m como parámetro de la actividad (muy común reconocedores de surco) de las moléculas sintetizadas y de las que conforman la serie de exploración. Antes de presentar y discutir los resultados obtenidos, es importante destacar aspectos generales y de síntesis de péptidos, así como también de sus bloques de construcción: los aminoácidos.

Aminoácidos, péptidos y proteínas

Las proteínas son sustancias macromoleculares que existen en todas las células vivas. Son los componentes estructurales más importantes en los tejidos animales, también catalizan reacciones (enzimas), transportan oxígeno, actúan como hormonas para regular procesos en el organismo,

entre otras funciones. Cualquiera que sea su función, todas las proteínas son similares en cuanto a su estructura química, pues están compuestas por los mismos bloques de construcción, que reciben el nombre de aminoácidos.

Los aminoácidos son ácidos carboxílicos que poseen un grupo amino, y en base al lugar donde poseen este último grupo respecto al carbonilo puede haber α y β -aminoácidos principalmente, y son los de tipo α quienes las células utilizan para sintetizar las proteínas (Fig. 5).

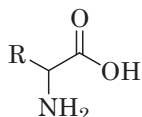


Figura 5. Estructura de un α -aminoácido.

Los α -aminoácidos difieren unos de otros en el tipo de sustituyente que poseen y son 20 los que se encuentran en la mayor parte de las proteínas. Comparten una propiedad estructural importante: con la excepción de la glicina (cuyas moléculas son aquirales), casi todos los aminoácidos naturales poseen la configuración *L* en el carbono α , es decir, poseen la misma configuración que el *L*-gliceraldehído (Fig. 6). Algunos *D*-aminoácidos se han obtenido de la pared celular bacteriana y por hidrólisis de algunos antibióticos.¹²

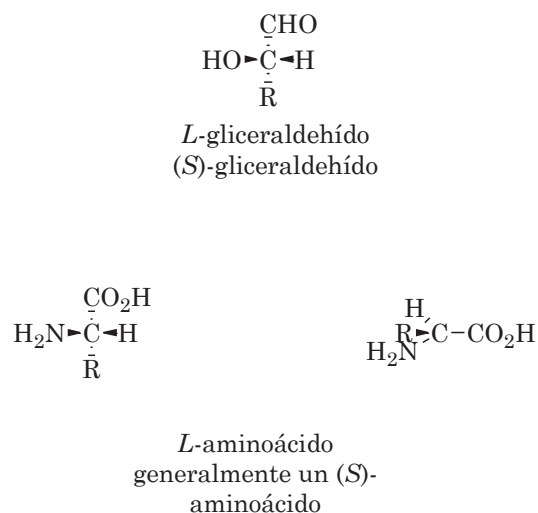


Figura 6. Estereoquímica de los aminoácidos presentes en las proteínas.

Bajo ciertas condiciones, el grupo amino de una molécula y el grupo carboxilo de una segunda pueden reaccionar, uniendo los dos aminoácidos por un enlace amida. Este enlace es mejor conocido como enlace peptídico y el producto de la formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos se llama dipéptido. La cadena peptídica puede alargarse para incorporar tres aminoácidos en un tripéptido, cuatro en un tetrapéptido, y así sucesivamente. Los polipéptidos contienen muchas unidades de aminoácidos. Las proteínas son polipéptidos naturales que contienen más de 50 unidades de aminoácidos.¹³

Los péptidos exhiben un amplio rango de propiedades biológicas, pueden actuar como antibióticos, hormonas, aditivos alimentarios, venenos o eliminadores del dolor (Fig. 7). Esto es primariamente por que el estudio de

sus propiedades médicas ha venido a ser una de las más activas áreas de la investigación actual.¹²

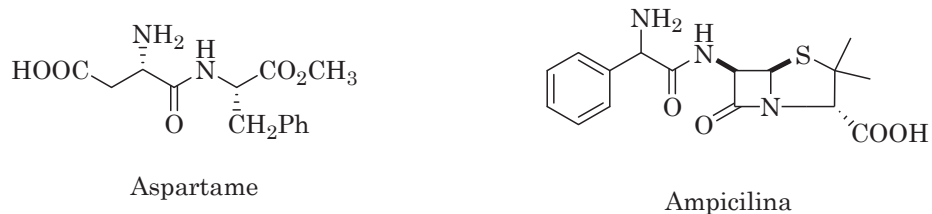


Figura 7. Ejemplos de péptidos con actividad biológica.

Propiedades de los péptidos

Aunque los péptidos están compuestos de aminoácidos, no muestran las mismas propiedades del grupo amino ni del ácido carboxílico de dichos aminoácidos. De hecho, las propiedades del grupo amida están gobernadas por la conjugación del par de electrones del nitrógeno con el grupo carbonílico (Fig. 8).



Figura 8. Conjugación del par de electrones del nitrógeno con el grupo carbonílico dentro de un enlace peptídico.

La estabilización por resonancia del grupo amida trae consigo tres consecuencias:

1. El enlace peptídico es químicamente poco reactivo. El átomo de nitrógeno no es básico ni nucleofílico, debido a que el par de electrones está deslocalizado en el grupo carbonílico. Contrariamente, el grupo carbonilo puede ser atacado por nucleófilos, pero son necesarias condiciones extremadamente fuertes debido a que el grupo carbonilo es estabilizado por interacción con el par de electrones del nitrógeno.
2. El grupo amida puede actuar ocasionalmente como nucleófilo, en el que el oxígeno (con carga parcial negativa) es un átomo más nucleofílico que el nitrógeno.
3. El grupo amida es plano. El par de electrones del nitrógeno interactúan con el enlace π del grupo carbonilo; en consecuencia los orbitales p del nitrógeno, el carbono y el oxígeno se encuentren en el mismo plano, condición necesaria para que la conjugación se lleve a cabo. La planaridad del enlace amida es importante para definir la conformación de los péptidos en su estructura secundaria.¹⁴

β -aminoácidos: Papel que guardan dentro de la síntesis orgánica

Los β -aminoácidos como ya se dijo anteriormente son moléculas que poseen el grupo amino en la posición β respecto al grupo carbonilo (Fig. 9) y aunque

son menos abundantes que sus análogos α , también están presentes en péptidos, en varios productos naturales, y en forma libre presentan efectos farmacológicos interesantes; además, se pueden ciclar para dar β -lactamas que son compuestos biológicamente activos de interés (penicilinas y cefalosporinas).

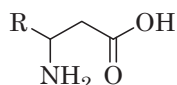
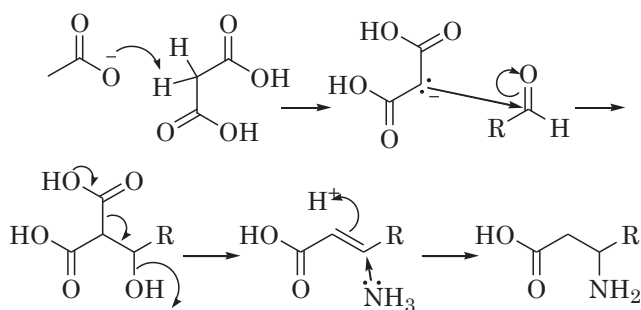


Figura 9. Estructura de un β -aminoácido.

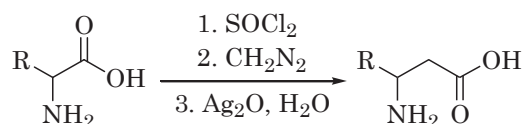
Aunque a fines de los años ochenta se conocían varios procedimientos para la síntesis de β -aminoácidos racémicos, no existía un método eficiente para la obtención de compuestos enantioméricamente puros. Así, apenas once artículos aparecen en la literatura entre 1980 y 1990, donde se reportan rutas para la preparación enantioselectiva de β -aminoácidos. En contraste, más de 350 reportes fueron publicados entre 1991 y 2001.¹⁵

A continuación se describen algunos ejemplos de síntesis de este tipo de aminoácidos:

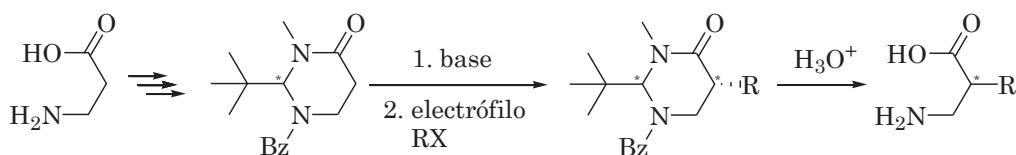
1. Ácidos cinámicos obtenidos mediante la síntesis de Knoevenagel¹⁶ en presencia de amonio pueden generar β -aminoácidos:



2. Derivados N-ftaloil de los α -aminoácidos pueden ser convertidos en sus correspondientes β -aminoácidos mediante la reacción de Arndt-Eistert.¹⁷



3. Juaristi y col.¹⁵ describieron una metodología para la síntesis de β -aminoácidos α -sustituídos a partir de la β -alanina (aminoácido barato y aquiral). Esta se pudo convertir en una pirimidinona, que a su vez reaccionó con varios electrófilos de manera altamente estereoselectiva. Posteriormente, la hidrólisis de los derivados conduce a los β -aminoácidos:



Teniendo métodos sintéticos para la obtención de β -aminoácidos, estos pueden ser empleados en la síntesis de péptidos; ya sea preparando péptidos que posean solamente monómeros β o en combinación con monómeros α . Al respecto con esto, un gran interés surgió en los 80's por la síntesis de β -péptidos al observar que cuando se sustituyen residuos de α -aminoácidos por β -aminoácidos dentro de las cadenas α -peptídicas, el grupo metilénico "extra" del β -aminoácido, le confiere nuevas propiedades al péptido modificado.

Ejemplo de lo anterior es la facilidad que tienen los β -péptidos de formar estructuras secundarias helicoidales aún en péptidos de cadena muy corta (6 o 7 residuos), contrariamente a sus análogos los α -péptidos, que necesitan de 15 o más residuos de aminoácidos para poder estabilizar la estructura. También es importante resaltar la diferencia de estabilidades que presentan los α -péptidos naturales y los β -péptidos a la degradación enzimática, debido a las insuficientes interacciones entre los β -péptidos y las enzimas α -peptídicas.

Tanto la estabilidad enzimática como la variedad de estructuras secundarias que presentan los β -péptidos son indicadores que estos compuestos pueden ser empleados en Química Médica imitando o mejorando las propiedades de los péptidos naturales.¹⁴

Síntesis química de péptidos

La síntesis de péptidos ha mantenido un gran interés en la síntesis orgánica, esto para desarrollar nuevos métodos de preparación enantioselectivos; en vista de que muchas moléculas de origen peptídico presentan alguna actividad biológica y es una herramienta esencial en la Química Médica.

La síntesis de un dipéptido a partir de determinados aminoácidos involucra la formación de un enlace peptídico.¹⁸ Es necesario proteger todos los grupos funcionales, excepto los que participaran en la formación del enlace peptídico (Fig. 10). Después, estos grupos protectores deberán ser removidos sin ruptura del nuevo enlace formado (peptídico).

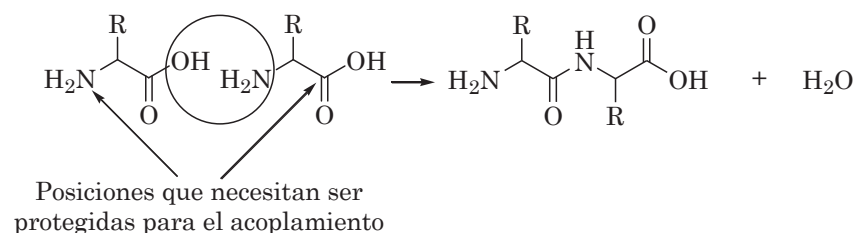
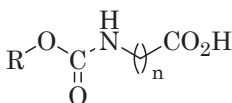


Figura 10. Acoplamiento de dos α -aminoácidos.

La protección del grupo amino no es muy sencilla, grupos como *N*-acetilo y *N*-bencilo no son útiles por que las condiciones necesarias para efectuar la desprotección nos llevaría al rompimiento del enlace peptídico. Además, la presencia de estos grupos durante las fases del acoplamiento peptídico es

probable que favorezca la racemización. Se prefieren grupos protectores que formen *C*-alcoxiámidas o uretanos (Fig. 11), ya que estos pueden ser removidos por métodos suaves como la hidrogenólisis y exposición a ácidos o bases a temperatura ambiente.



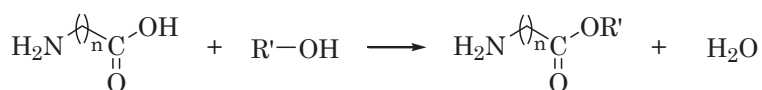
C-alcoxiámidas o uretanos

R = Bencil, *t*-butil, 9-fluorenilmetoxicarbonil

n = 1, 2, 3, etc.

Figura 11. Protección del grupo amino mediante la formación de uretanos.

La protección de grupos carboxilos generalmente se hace mediante la formación de ésteres (Fig. 12).



n = 1, 2, 3, etc.

Figura 12. Protección del grupo carboxilo mediante la formación de ésteres.

La reacción de condensación entre los aminoácidos ya protegidos es usualmente iniciada con la activación del grupo carboxilo seguida del posterior ataque del grupo amino de la otra molécula, esto conlleva el

acoplamiento entre los dos fragmentos para así formar el enlace peptídico (Fig. 13).

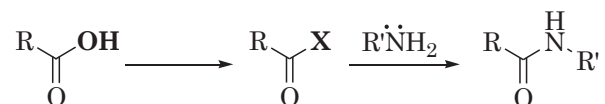


Figura 13. Activación del grupo carboxilo previo ataque nucleofílico del grupo amino de otra molécula.

Un método que se puede utilizar para activar el grupo carboxilo y que consta de tres fases es donde primeramente un derivado carbodiimídico como la DCC se acopla a nuestra molécula, enseguida, el ataque nucleofílico de un alcohol lleva a la formación de un éster activado, quien es susceptible al atacado de un grupo amino (Fig. 14).

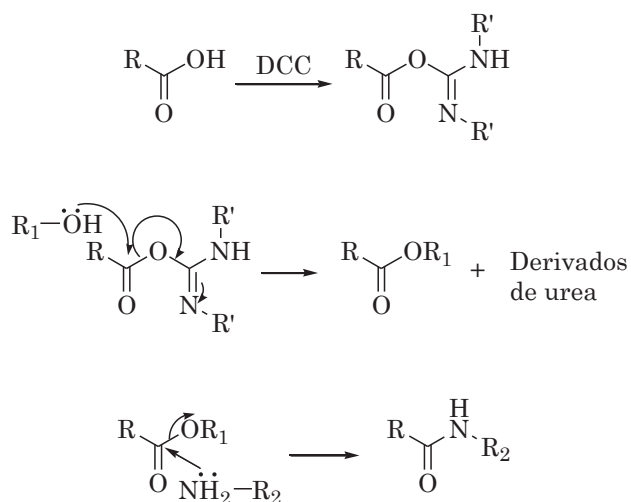



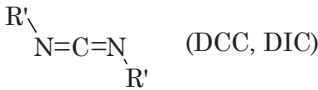
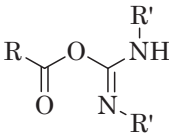
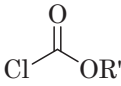
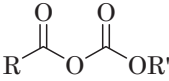
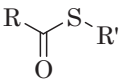
Figura 14. Formación de un enlace peptídico empleando DCC y un alcohol.

Los alcoholes aromáticos como el *p*-nitrofenol y pentafluorofenol son de los más empleados para formar este tipo de ésteres activados. También se pueden utilizar derivados de benzotriazol o derivados de pirrolidonas.¹⁴

Una vez obtenido el dipéptido, es importante recalcar que todo aminoácido que se desee agregar al grupo *N*-terminal será previamente protegido en su grupo amino, mientras que la molécula que se desee insertar en el *C*-terminal se tratará con anticipación para bloquear su grupo carboxilo.

En la Tabla 1 se muestran grupos activantes utilizados en la síntesis de péptidos.

Tabla 1. Grupos activantes más empleados y estructura de la molécula activada que sólo espera el ataque del grupo amino para formar el enlace peptídico.

Agente activante	Molécula activada
SOCl ₂ (Cloruro de tionilo)	
 (DCC, DIC) DCC, R' = dicitclohexil DIC, R' = di- <i>i</i> -propil	
 Cloroformiatos de alquilo R' =etil, <i>i</i> -butil, <i>t</i> -butil	
R'-SH Tioles	

Evaluación de la actividad de moléculas reconocedoras de surco

La estructura helicoidal del DNA se mantiene gracias a interacciones no covalentes. Por un lado, el apilamiento entre las bases adyacentes de una misma hebra favorece interacciones hidrofóbicas entre éstas, y por otro lado, cada base está unida a su pareja mediante puentes de hidrógeno. La energía libre de las interacciones no covalentes que mantienen la estructura helicoidal del DNA no es muy superior a la energía de los movimientos térmicos a temperatura ambiente, por lo que es posible desestabilizar la estructura tridimensional del DNA mediante un simple aumento de la temperatura.

Cuando se calienta un DNA de doble hebra (forma nativa) se rompen las fuerzas de unión entre las dos hebras y acaban por separarse. Por tanto, el DNA desnaturalizado es de una sola hebra. La transición entre el estado nativo y el desnaturalizado se conoce como *desnaturalización*. En determinadas condiciones, una disolución de DNA monocatenario (desnaturalizado), puede volver a formar el DNA nativo (de doble hebra). Este proceso recibe el nombre de *renaturalización* del DNA (Fig. 15).

La forma más corriente de desnaturalizar el DNA es por calentamiento, otro agente desnaturalizante es el pH elevado porque cambia la carga de algunos grupos que forman parte de los puentes de hidrógeno. En agua destilada (con una fuerza iónica muy reducida) se produce la separación de las hebras. Este fenómeno se debe a que en agua muy pura, la fuerte repulsión entre las

cargas negativas de los grupos fosfato no es contrarrestada por los correspondientes contraiones (Na^+ , Mg^{2+}).

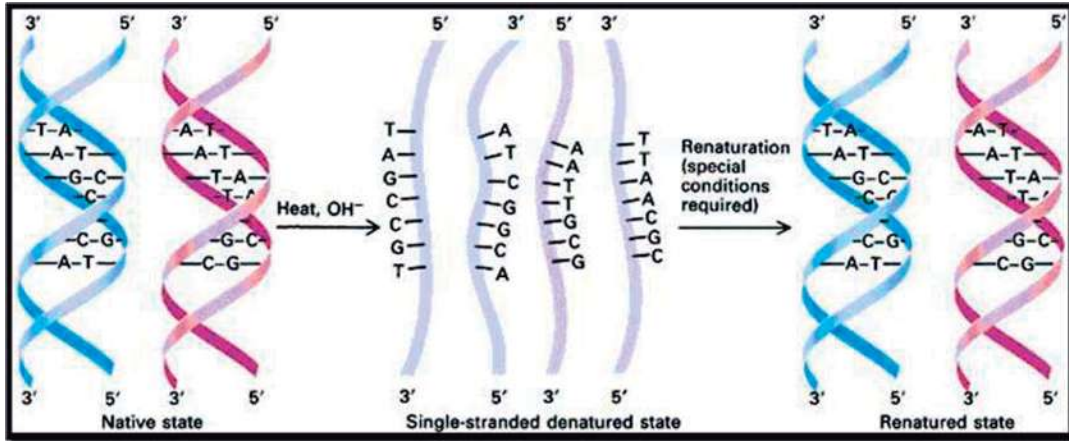
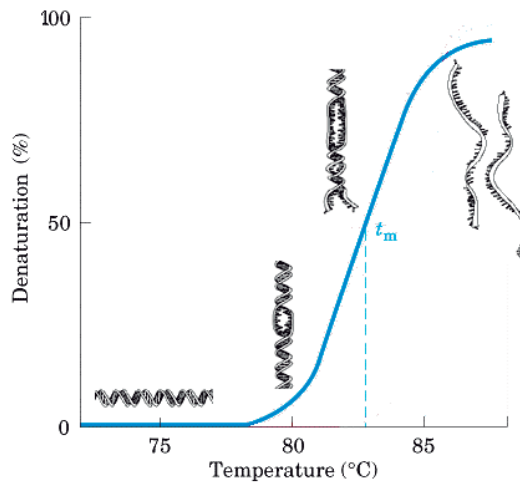


Figura 15. Panorama general de la desnaturalización y renaturalización del DNA.

La Gráfica 1 representa la medida de A_{260} en función de la temperatura, y se llama curva de fusión del DNA.

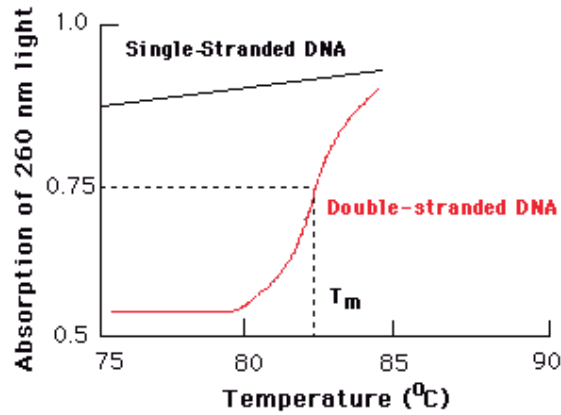


Gráfica 1. Secuencia que se sigue en la desnaturalización del DNA.

Esta curva presenta las siguientes características:

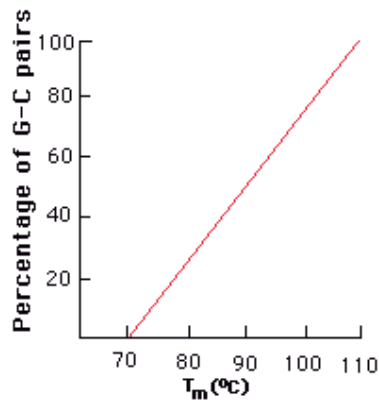
1. La A_{260} permanece constante hasta temperaturas bien por encima de las fisiológicas. En este intervalo, la molécula está en forma de doble hebra.
2. El aumento de A_{260} tiene lugar en un estrecho rango de temperaturas (6-8 °C). La A_{260} empieza a aumentar cuando comienzan a romperse las uniones entre las bases en varios segmentos de la molécula. El número de pares de pb que se rompen aumenta con la temperatura, y con ella la A_{260} . Al final del tramo ascendente, las dos hebras se mantienen juntas por unos cuantos pb.
3. La A_{260} máxima es aproximadamente hasta un 30% mayor que el valor inicial, y corresponde al estado en que las dos hebras están completamente separadas.

Un parámetro muy útil para caracterizar la evolución de la fusión es la temperatura a la que el aumento de la A_{260} ha llegado a la mitad de su camino. Esta temperatura se llama temperatura de fusión y se representa por el término T_m (Gráfica 2).



Gráfica 2. Representación de la temperatura de fusión del DNA (T_m).

Se ha comprobado que la T_m aumenta con el contenido de G-C (Gráfica 3). Como este par de bases está unido por tres puentes de hidrógeno (a diferencia del par A-T que sólo presenta 2) se requiere una temperatura más alta para desnaturalizarlo.¹⁹



Gráfica 3. Dependencia de T_m con el contenido en G-C del DNA.

También se sabe que si existen ligandos unidos al DNA, T_m puede aumentar, ya que estas moléculas actúan como “broches” que impiden la

separación de las hebras requiriendo una mayor cantidad de energía para lograrlo; y cuanto más aumente T_m , es más fuerte la unión ligando-diana.

ΔT_m es el parámetro que en realidad nos indicará la actividad de reconocedores de surco (afinidad al DNA), y se calcula según la Ec. (5).

$$\Delta T_m = T_{m_2} - T_{m_1} \quad (5)$$

Donde T_{m_2} es la temperatura de desnaturalización cuando existe algún ligando unido al DNA y T_{m_1} es la temperatura de desnaturalización cuando el DNA no posee ningún ligando.

ΔT_m ha mostrado ser un parámetro adecuado para evaluar experimentalmente la estabilidad extra que el ligando transmite al oligonucleótido una vez acomplexado. La transición hélice-ovillo es altamente dependiente de la entropía y es detectada por el incremento abrupto de absorción de luz UV por el DNA (20-30% más). Mientras más alta sea la diferencia, será más la intensidad de unión del ligando con la diana.²⁰

HIPÓTESIS

El descriptor molecular D_{CL} puede ser empleado para realizar un análisis QSAR de diferentes péptidos y se puede encontrar dentro de los mejores modelos matemáticos obtenidos del análisis; siendo con esto, una característica muy importante a considerar para el diseño de moléculas con probable actividad biológica.

Con la elección de un modelo idóneo se pueden diseñar diversidad de moléculas con probable actividad.

El éxito de la síntesis de diferentes dipéptidos en solución dependerá en gran medida de los aminoácidos seleccionados para realizar la síntesis, del agente activante a emplear y de los grupos con los que se protegen los centros reactivos que no participarán en la formación del enlace peptídico.

OBJETIVOS

GENERAL

Elaborar un análisis cuantitativo estructura-actividad (QSAR) de moléculas reconocedoras de surco utilizando técnicas de inteligencia artificial, utilizar el modelo obtenido para predecir la actividad de moléculas peptídicas y realizar la síntesis química de la estructura base de dichas moléculas.

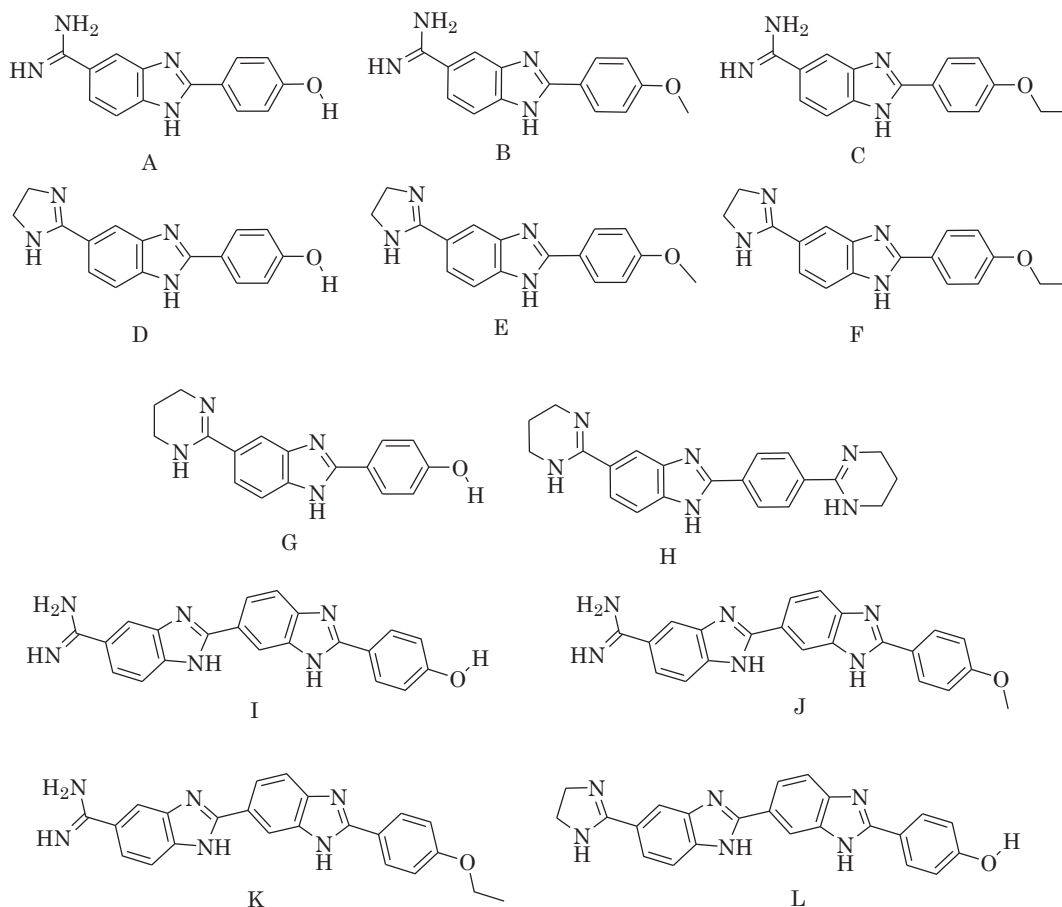
PARTICULARES

1. Obtener un modelo matemático estadísticamente adecuado que posea el descriptor molecular D_{CL} a partir de una serie de exploración conformada por moléculas reconocedoras de surco.
2. Diseño y determinación teórica de la actividad que puedan llegar a tener 3 dipéptidos con cadenas incorporadas en su extremo carboxilo.
3. Síntesis química en solución de 2 α,α -dipéptidos y 1 β,α -dipéptido que son las bases estructurales de los 3 dipéptidos diseños con el modelo.
4. Introducir al β,α -dipéptido 3 cadenas diferentes en su extremo carboxilo.

ANÁLISIS QSAR Y DISEÑO

1. Selección de la serie de exploración

Se desarrolló un análisis QSAR a una serie de exploración conformada por 27 moléculas reconocedoras de surco²⁰ (algunas muy variadas en su estructura con respecto a otras, Fig. 16), seleccionándolas de un total de 53. El patrón de selección fue que sólo 27 además del valor de la actividad calculada con el modelo que propone de Oliveira y col. se daba a conocer el valor de su actividad experimental en la misma referencia.



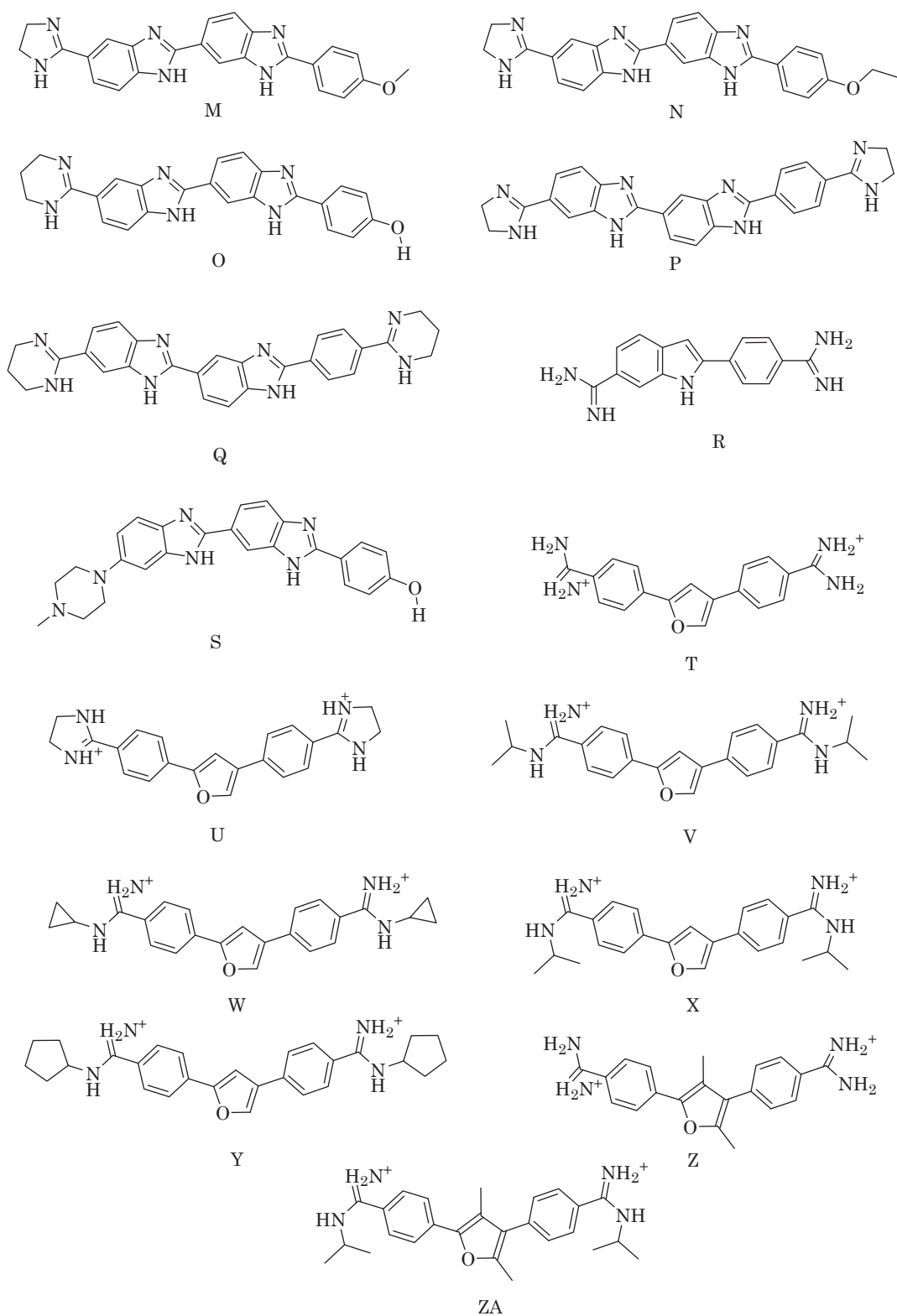


Figura 16. Serie de exploración.

2. Optimización geométrica

Teniendo seleccionada la serie de exploración, se elaboraron las estructuras de las moléculas de la serie con el software HiperChem²¹. Una vez elaboradas, las moléculas son optimizadas geoméricamente con cálculos semiempíricos AM1.

3. Cálculo de descriptores fisicoquímicos a las moléculas que conforman la serie

El cálculo de descriptores se realizó empleando el software DRAGON²², siendo alrededor de 1660 descriptores agrupados en diferentes bloques, dentro de los cuales destacan: constitucionales, topológicos, indicadores de conectividad, geométricos, de carga, propiedades moleculares, entre otros.

4. Obtención de los modelos empleando algoritmos genéticos

Los modelos matemáticos fueron obtenidos por algoritmos genéticos mediante el software ModyDigs²³. Como se quería evaluar la importancia del descriptor D_{CL} ; y este no se encuentra dentro de los muchos parámetros que maneja el programa DRAGON, se calculó aparte y se añadió a los demás descriptores antes de comenzar a realizar los algoritmos genéticos.

El descriptor D_{CL} está relacionado con reconocimiento topológico entre el DNA y moléculas reconocedoras. Es obtenido a partir de la longitud de la

molécula geoméricamente optimizada, teniendo en cuenta que una longitud específica se requiere para un reconocimiento óptimo de la doble hélice.

La distancia dentro de la molécula entre los grupos extremos (NH₂-NH₂), dividido por 4.202 o 3.4/cos 36, debería ser en principio el número de huecos (o pares de bases más uno) que la unión cruzada reconozca (Fig. 17). Por lo tanto, si el número entero más cercano a este valor es restado al cociente de la división anterior, la diferencia que resulta será la separación del reconocimiento relativo el cual es óptimo cuando es cero o el peor cuando es 0.5. Esto se puede ser apreciado en la Ec. (6).

$$D_{CL} = |(Distancia\ entre\ NH_2-NH_2/4.202) - N| \quad (6)$$

donde N es el número entero más cercano.⁷

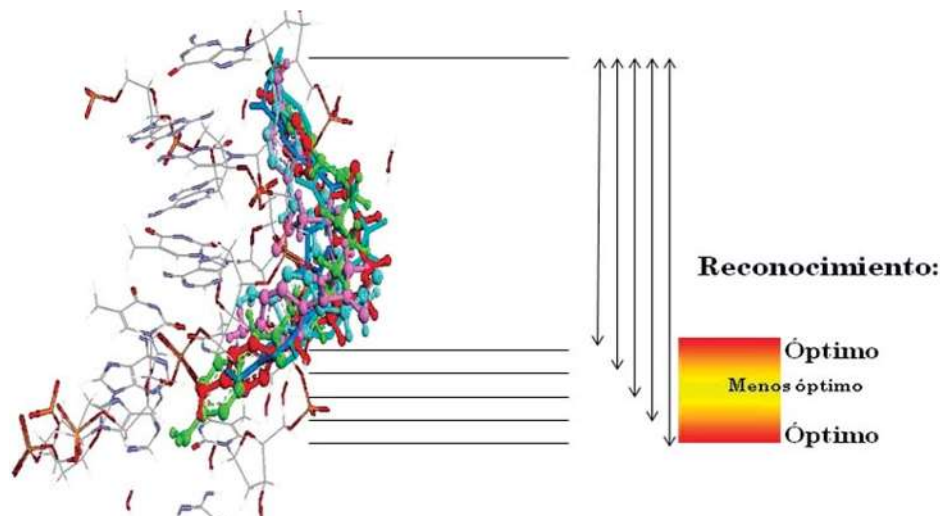


Figura 17. Representación esquemática del D_{CL}.

5. Selección, análisis estadístico y validación de un modelo adecuado

Una vez descartados cientos de descriptores se procedió a seleccionar los 50 mejores modelos y de estos se realizó la búsqueda intencionada de modelos que poseían D_{CL} . Se encontró el modelo representado en la Ec. (7), llamó nuestra atención debido a su tamaño (posee solo 2 descriptores) y valores estadísticos aceptables (en la Tabla 2 se muestran cada una de las moléculas que conforman la serie de exploración, valores correspondientes a cada descriptor, actividad experimental, actividad calculada de cada compuesto de la serie de exploración y su diferencia).

$$\log(\Delta Tm) = -0.77 D_{CL} + 30.02 \times 10^{-4} G(N..N) + 1.093, \quad (7)$$

$$n = 27, \quad r^2 = 0.85, \quad F = 68.98, \quad s = 0.107$$

Donde:

$G(N..N)$ es un descriptor geométrico que deriva de la estructura tridimensional que posee la molécula. N y N en referencia a cualquier otro heteroátomo, es un descriptor molecular simple calculado por la suma de las distancias geométricas entre todos los pares de un tipo de átomo específico.

El cálculo de la matriz de correlación de los integrantes del modelo nos muestra la inexistencia de relación entre ambos descriptores como lo muestra la Tabla 3.

Tabla 2. Valores correspondientes a cada descriptor, actividad experimental, actividad calculada por el modelo de cada compuesto de la serie de exploración y la diferencia entre ambas actividades.

ID	DESCRIPTORES		ACTIVIDAD (ΔTm)		
	D _{CL}	G(N..N)	Experimental	Calculada	Residuo
A	0.488	24.316	0.845	0.79	0.055
B	0.406	24.273	0.792	0.853	0.061
C	0.499	24.317	0.69	0.781	0.091
D	0.476	24.437	0.748	0.799	0.051
E	0.467	24.514	0.875	0.807	0.068
F	0.462	24.571	0.845	0.811	0.034
G	0.462	24.118	0.845	0.809	0.036
H	0.088	105.089	1.233	1.341	0.108
I	0.009	95.084	1.362	1.371	0.008
J	0.141	95.192	1.362	1.27	0.092
K	0.0088	95.169	1.362	1.372	0.01
L	0.026	95.612	1.378	1.36	0.018
M	0.018	95.454	1.387	1.366	0.021
N	0.067	95.604	1.412	1.328	0.084
O	0.153	94.905	1.405	1.26	0.145
P	0.426	250.12	1.479	1.515	0.036
Q	0.464	248.159	1.487	1.48	0.007
R	0.239	78.287	1.233	1.144	0.089
S	0.071	98.504	1.253	1.334	0.081
T	0.349	59.421	0.959	1.003	0.044

U	0.326	59.678	0.857	1.021	0.164
V	0.358	59.322	1.037	0.995	0.042
W	0.475	59.06	1.037	0.904	0.133
X	0.498	58.745	0.968	0.885	0.083
Y	0.381	59.085	1.113	0.977	0.156
Z	0.353	59.719	0.813	1.0006	0.1876
ZA	0.388	59.311	0.732	0.972	0.24

Tabla 3. Matriz de correlación de los descriptores involucrados en el modelo.

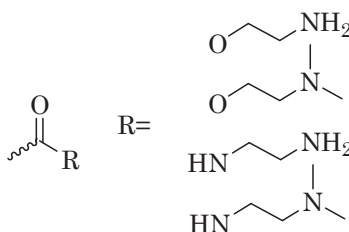
	D_{CL}	G(N..N)
D_{CL}	1	
G(N..N)	-0.243	1

6. Diseño de moléculas con probable actividad como reconocedores del DNA y empleo del modelo seleccionado para el cálculo de la actividad de dichas moléculas

Para diseñar los dipéptidos fueron seleccionados los siguientes aminoácidos en base a su diversidad estructural: *L*-Triptófano (*L*-Trp), *L*-Fenilalanina (*L*-Fen), *L*-Ácido glutámico (*L*-Glu), *D,L*-Alanina (*D,L*-Ala) y *D,L*-β-Fenilalanina (*D,L*-β-Fen). La estereoquímica no se consideró un factor importante en la selección de los aminoácidos, ya que estos fueron los que se

encontraron disponibles en el laboratorio al momento de comenzar las síntesis.

Se diseñaron 3 dipéptidos para ser evaluados con el modelo seleccionado: *L*-Trp-*L*-Phe-OH, *D,L*-Ala-*L*-Phe-OH y *D,L*-β-Fen-*L*-Glu-OH. Como el descriptor D_{CL} mide distancia entre los grupos aminos más alejados dentro de la molécula, se decidió incorporar en el extremo carboxilo de los péptidos lo siguiente:



Las cadenas seleccionadas fueron las que se encontraron en el laboratorio al momento de comenzar el trabajo de laboratorio. Se eligieron cadenas que poseen aminos primarios y terciarios para ver si las sustituciones podrían jugar un papel importante en términos de la actividad. Ya establecidos los parámetros de diseño, se procedió a la construcción de las estructuras en HyperChem y se optimizaron geoméricamente con cálculos semiempíricos AM1. Una vez optimizadas las estructuras se calculó la distancia entre los grupos aminos (en Å) en el mismo programa y se realizó el cálculo del descriptor D_{CL} . Posteriormente se sometieron al cálculo del descriptor $G(N..N)$ con el software DRAGON y ya con los datos recabados se procedió a realizar el cálculo de la actividad.

— RESULTADOS Y DISCUSIÓN —

1. Dipéptido *L*-Trp-*L*-Phe:

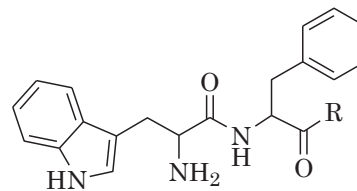


Tabla 4. Valor de los descriptores y actividad calculada para el péptido base 1 con cada una de las cadenas insertadas en el grupo carboxilo terminal.

R=	D _{CL}	G(N..N)	Actividad (ΔT_m)
	0.25	40.289	1.021
	0.268	37.864	0.868
	0.438	57.224	1.058
	0.310	56.893	1.025

2. *D,L*-Ala-*L*-Phe:

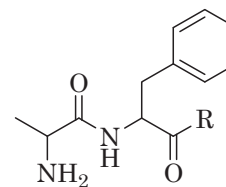
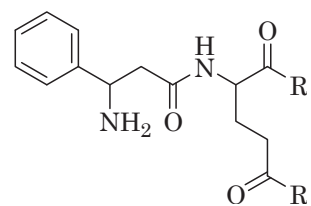


Tabla 5. Valor de los descriptores y actividad calculada para el péptido base 2 con cada una de las cadenas insertadas en el grupo carboxilo terminal.

R=	D _{CL}	G(N..N)	Actividad (ΔT_m)
	0.074	17.964	1.09
	0.034	17.938	1.12
	0.329	33.654	0.893
	0.040	30.036	1.152



3. *D,L*-β-Fen-*L*-Glu:

Tabla 6. Valor de los descriptores y actividad calculada para el péptido base 3 con cada una de las cadenas insertadas en el grupo carboxilo terminal.

R=	D _{CL}	G(N..N)	Actividad (ΔTm)
	0.112	52.334	1.164
	0.175	52.982	1.117
	0.253	111.45	1.232
	0.307	110.77	1.189

En base a los resultados, se puede inferir que el péptido 3 es el que exhibe una mayor actividad y que el descriptor G(N..N) es el responsable de la actividad. Esto conlleva a afirmar que se prefieren moléculas de longitud

considerable, que permitan la adopción de un mayor número de conformaciones para el establecimiento de una mejor interacción con el DNA.

En cuanto a la presencia o no de grupos metilo en el *N*-terminal de la cadena incorporada los resultados muestran para el péptido 1 y 3 la existencia de dichos grupos tiende a reducir la actividad, esto nos lleva a pensar que es debido al impedimento estérico que se genera. Se observó este fenómeno de manera no proporcional. Para el péptido 2, esto resultó ser lo contrario. Se acentuó más la actividad de las moléculas con la alquilación de del grupo amino.

El párrafo anterior demuestra que la actividad no va a estar en base sólo de la alquilación o no del grupo amino, si no de toda la estructura molecular. Por ejemplo, el péptido 1 y 2 que se diferencian solo en el aminoácido *N*-terminal, se ve que la voluminosidad del biciclo indólico viene a influir en la actividad negativamente.

Cabe recalcar que aunque ninguna de las moléculas propuestas sobrepasa a la molécula más activa que conforma la serie de exploración, estas mostraron tener una actividad considerable y más si se toma en cuenta que se parte de estructuras “inofensivas” como lo son los aminoácidos.

SÍNTESIS

La síntesis de estructuras peptídicas siempre ha sido un reto para la síntesis orgánica de innovación, ya que el punto de partida son aminoácidos los cuales presentan en muchos casos más de un centro reactivo. Sin embargo, las herramientas sintéticas dan la pauta para encontrar tácticas precisas que favorecerán la formación del producto buscado, evitando así la formación de subproductos.

La síntesis de los 3 dipéptidos fue una tarea difícil y a menudo extenuante; como en toda experimentación de síntesis, es ineludible hacer uso de diferentes grupos protectores para determinar cual es el mejor compañero del camino sintético a recorrer para llegar al producto esperado. En algunos casos fue necesario probar diferentes grupos protectores tanto para grupos aminos como para grupos carboxilos y por consiguiente diferentes medios de desprotección fueron empleados. Comenzaré describiendo la síntesis de los α,α -dipéptidos, comenzando por la reacción general de protección (Fig. 18) y las condiciones necesarias para llevarse a cabo (Tabla 7).

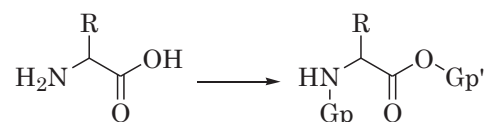
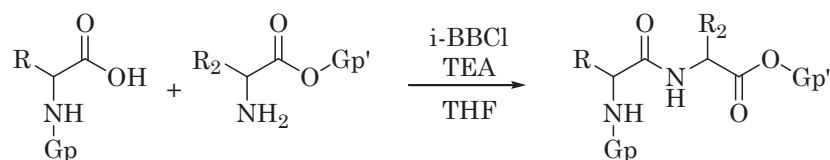


Figura 18. Reacción general de protección de los α -aminoácidos.

Tabla 7. Condiciones necesarias para realizar las protecciones.

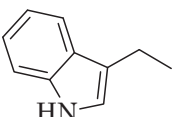
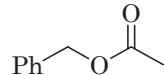
R	Condiciones	Gp	Gp'
CH ₃	Cloroformiato de bencilo, NaOH 1 N		H
	Cloroformiato de bencilo, NaOH 1 N		H
	SOCl ₂ , MeOH	H	CH ₃

Ya protegidos los aminoácidos, la reacción de acoplamiento entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo del otro (Fig. 19) fue posible gracias al uso del agente activante cloroformiato de *i*-butilo que procede con la formación de un anhídrido mixto y el posterior ataque nucleofílico hacia el grupo carbonilo del péptido *N*-protegido por parte del grupo amino libre del aminoácido enlazante, dando como resultado el enlace peptídico. Fue utilizado THF como disolvente y TEA como agente basificante.

**Figura 19.** Reacción de acoplamiento entre 2 aminoácidos.

Los rendimientos de reacción para las 2 reacciones de acoplamiento se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Rendimiento de las reacciones para la síntesis de α,α -dipéptidos.

R	R ₂	Gp	Gp'	% r
CH ₃				95.33
	Ph-CH ₂ -CH ₃		CH ₃	68

Ambas síntesis resultaron ser muy limpias en cuanto a la formación de subproductos, los dipéptidos fueron el producto mayoritario, se purificaron fácilmente por cromatografía en columna. La combinación de los grupos protectores, condiciones suaves para la eliminación de estos y la secuencia de los aminoácidos en la molécula final contribuyó al éxito de las reacciones.

La reacción general de la desprotección del grupo carboxilo de los α,α -dipéptidos se basó en una hidrólisis alcalina (Fig. 20), el medio de reacción fue una mezcla de THF:H₂O:MeOH (25:3:0.1). Las condiciones de reacción y rendimientos se indican en la Tabla 9.

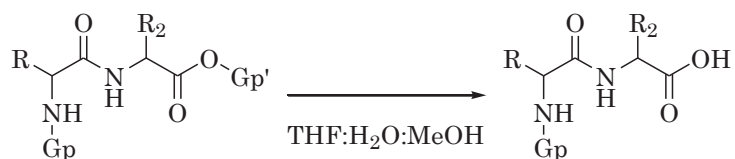
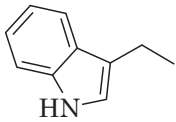
**Figura 20.** Reacción general de *O*-desprotección de los α,α -dipéptidos.

Tabla 9. Condiciones para la *O*-desprotección del grupo carboxilo y rendimientos de reacción.

R	R ₂	Gp'	Condiciones	% r
CH ₃				88
	Ph-CH ₂ -CH ₂	CH ₃	LiOH 2 M	80

La reacción de desprotección del grupo amino de los α,α -dipéptidos (Fig. 21) está fundamentada en una hidrogenólisis a temperatura ambiente y presión atmosférica. Las condiciones para realizar y los rendimientos obtenidos se dan a conocer en la Tabla 10.

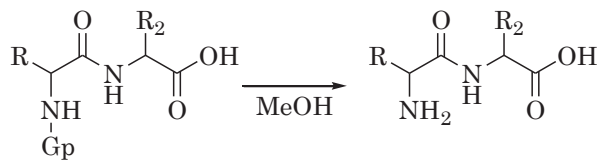
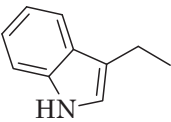
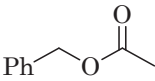


Figura 21. Reacción general de *N*-desprotección de los α,α -dipéptidos.

Tabla 10. Condiciones para la *N*-desprotección del grupo amino y rendimientos de reacción.

R	R ₂	Gp	Condiciones	% r
CH ₃				89
	Ph		H ₂ , Pd/C (10% en peso)	80

Con este último paso se dio por terminada la síntesis de ambos α,α -dipéptidos.

Para sintetizar el β,α -dipéptido se realizaron determinadas reacciones (Fig. 22) bajo condiciones descritas en las Tablas 11, 12 y 13.

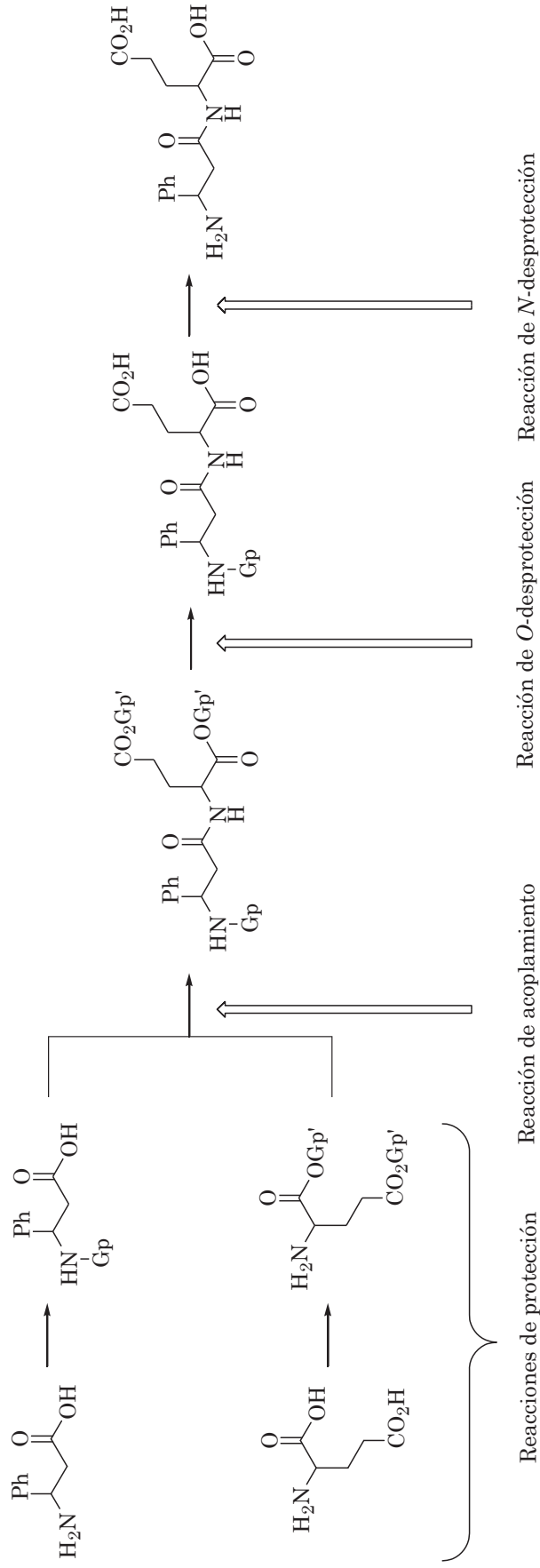


Figura 22. Reacciones realizadas para la obtención del β, α-dipéptido.

Tabla 11. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos de las protecciones de los grupos funcionales que no participan en la formación del enlace peptídico.

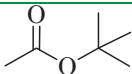
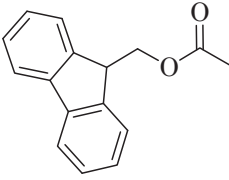

Gp (amino)	Gp' (ácido)	Condiciones	% r
	-	BOC, DMF, TEA	94
	-	Fmoc-OSuc, Dioxano, Na ₂ CO ₃	95
.	CH ₃	SOCl ₂ , MeOH	97
.	Ph 	BnOH, TsOH, microondas (40% de potencia)	75

Tabla 12. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos del acoplamiento de los aminoácidos.

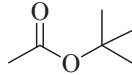

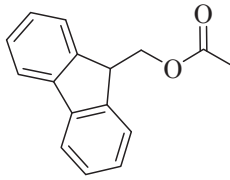
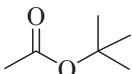
Gp	Gp'	Condiciones	% r
	CH ₃		N. R.
	Ph 		62.4
	CH ₃	<i>i</i> -BBCl, TEA, THF	N. R.

Tabla 13. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos de las desprotecciones.

Tipo de desprotección	Gp	Gp'	Condiciones	% r
O-	-	Ph	H ₂ , Pd/C (10% en peso), MeOH	85
N-		-	TFA, CH ₂ Cl ₂ , 0 ° C	

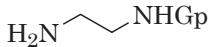
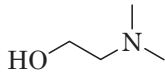
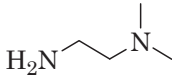
La única forma en que se obtuvo el β,α -dipéptido fue empleando los grupos bencílicos como protectores de los grupos carboxilo y al BOC como protector del grupo amino. Se cree que los grupos bencilo aumentan la solubilidad del aminoácido en el THF, ya que con los grupos metilo no se lograba solubilizar.

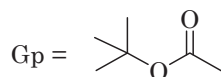
Uno de los objetivos trazados en el proyecto fue incorporar mínimo 3 diferentes cadenas al β,α -dipéptido en los extremos carboxilo. Para lograrlo se realizaron varias reacciones, las cuales no tuvieron el éxito esperado y por consiguiente no se cumplió este objetivo.

A continuación se describe lo realizado:

1. Incorporación de las cadenas al dipéptido BOC-β-Fen-α-Glu-OH y posterior *N*-desprotección (Tabla 14).

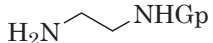
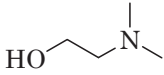
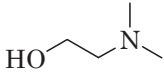
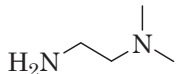
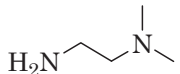
Tabla 14. Condiciones de reacción para la incorporación de las cadenas laterales al dipéptido BOC-β-Fen-α-Glu-OH.

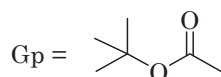
Cadena lateral	Condiciones	Producto
	<i>i</i> -BBCl, TEA, THF	Inestable
	DCC, DMAP, CH ₂ Cl ₂	N. R.
	<i>i</i> -BBCl, TEA, THF	N. R.
	DCC, DMAP, CH ₂ Cl ₂	N. R.
	<i>i</i> -BBCl, TEA, THF	N. R.
	DCC, DMAP, CH ₂ Cl ₂	N. R.



2. Protegiendo los grupos carboxílicos del *L*-α-Glu con las cadenas a incorporar para después acoplar con la *D,L*-β-Fen *N*-protegida (Tabla 15).

Tabla 15. Condiciones de reacción para la incorporación de las cadenas laterales al *L*- α -Glu.

Cadena lateral	Condiciones	Producto
	<i>i</i> -BBCl, TEA, THF	Inestable
	SOCl ₂	N. R.
	<i>i</i> -BBCl, TEA, THF	Inestable
	SOCl ₂	N. R.
	<i>i</i> -BBCl, TEA, THF	Inestable



La incorporación de estas cadenas a la estructura base que es el β,α -dipéptido o al *L*- α -Glu para *O*-protegerlo hace que nuestra molécula se comporta de manera extraña ya que el producto se descomponía rápida y fácilmente, no permitiéndonos con esto continuar con las reacciones sucesivas y como se mencionó arriba, a esto se atribuye el no cumplimiento de este objetivo planteado.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un modelo matemáticamente adecuado que posee el descriptor D_{CL} .
2. Se determinó la actividad teórica de algunos dipéptidos.
3. Se logró la síntesis química en solución de la base estructural de los dipéptidos.
4. Distancias determinadas entre grupos aceptores y donadores de puentes de hidrógeno en una molécula favorecen la interacción entre esta y la diana.
5. Se prefiere diseñar, predecir la actividad y seleccionar las nuevas moléculas con ayuda de métodos QSAR antes de realizar su síntesis en el laboratorio.

———— PARTE EXPERIMENTAL ————

Consideraciones generales

El material de vidrio, barras de agitación y demás, empleado en el desarrollo de las reacciones se lavó escrupulosamente antes de utilizarse, se enjuagó con acetona y se secó en la estufa a 85 ° C.

La purificación de los crudos de reacción se llevó a cabo por cromatografía en columna utilizando sílica gel 70-230 Mesh y como sistema eluyente el indicado en cada caso. El monitoreo de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina sobre cromatofolios Merck, empleando como fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄ y como reveladores se empleo radiación UV y vapores de yodo. Los puntos de fusión fueron determinados por el método de Fisher en un equipo marca EVEL Mod. 1237 utilizando cubreobjetos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H RMN) y de carbono (¹³C RMN) se realizaron en equipos Varian 200 y Mercury 400. Los disolventes deuterados empleados en la obtención de los espectros fueron: agua (D₂O), cloroformo (CDCl₃), y metanol (CD₃OD) con tetrametil silano como referencia interna.

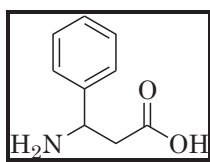
Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón a partir de la referencia interna (TMS). Las constantes de acoplamiento (J) se obtienen en Hertz. Para indicar la multiplicidad de las señales en ¹H se

utilizan las abreviaturas: **a**, ancha, **s**, simple; **d**, doble; **dd**, doble de dobles; **t**, triple; **c**, cuádruple; y **m**, múltiple.

Síntesis de *D,L*-β-Fenilalanina. En un matraz balón provisto de agitación magnética y 25 ml de EtOH se añadieron 2 g de ácido malónico (19.21 mmol), 1.95 ml de benzaldehído (19.21 mmol) y 2.96 g de acetato de amonio (38.42 mmol). Se llevó a reflujo durante 6 horas y al término de este tiempo se filtra a vacío enjuagándose con más EtOH. Se obtuvieron 1.903 g de un sólido blanco (60% de rendimiento) con punto de fusión de 202 ° C.

¹H RMN (D₂O, 400 MHz) δ 2.67 (dd, J = 6.59 y 16.11 Hz, 1H, CH₂), 2.76 (dd, J = 8.05 y 16.11 Hz, 1H, CH₂), 4.49 (dd, J = 6.77 y 7.87 Hz, 1H, CH), 7.28-7.36 (m, 5H).

¹³C RMN (D₂O, 100 MHz) δ 40.67 (CH₂), 52.88 (CH), 127.05 y 129.39 (C aromáticos), 136.22 (C ipso), 177.42 (CO).

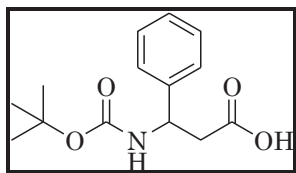


Protección del grupo amino de la *D,L*-β-Fenilalanina con BOC. En un matraz bola provisto de agitación magnética se colocaron 1.5 g de β-Fen (9.08 mmol), 15 ml de DMF y 1.9 ml de TEA (13.62 mmol). Se llevó a agitación, mientras que en un vaso de precipitados pequeño se disolvieron

2.17 g de BOC (9.98 mmol) en el menor volumen posible de DMF. Esta mezcla se añadió con ayuda de una jeringa al matraz que posee la β -Fen y se deja en agitación durante toda la noche. Se ajustó el pH a 3 empleando una solución de HCl 1 M. Se extrajo con AcOEt, se colectó la fase orgánica y se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y concentró a presión reducida en el rotavapor. Se obtuvieron 2.26 g de cristales blancos brillantes (94% de rendimiento) con un punto de fusión de 123 ° C.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.4 (s, 9H, 3CH₃), 2.88 (s a, 2H, CH₂), 5.08 (s a, 1H, CH), 5.3 (s, 1H, NH), 7.22-7.33 (m, 5H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 28.72 (CH₃), 42.29 (CH₂CO), 52.85 (CH), 80.24 (C), 1267.37, 128.26 y 129.48 (C aromáticos), 143.76 (C ipso), 157.51 (CONH), 174.36 (CO).

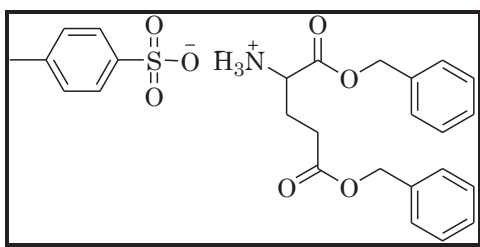


Síntesis del *p*-toluensulfonato del éster dibencílico del *L*- α -ácido glutámico. En vial se pesaron 1.8 g de *L*- α -ácido glutámico (12.23 mmol), se le adicionaron 2.56 g de TsOH.H₂O (13.45 mmol) y finalmente añadí 3 ml de alcohol bencílico. Se expuso a radiación en un microondas al 40% de su potencia por 60 segundos, al término de ese lapso se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente porciones de 10 ml

de hexano cuantas veces sea suficiente para eliminar el alcohol sobrante y otros subproductos indeseables. El producto cristaliza al añadir AcOEt, se filtró a vacío y se lavó con más AcOEt. Al final se obtuvieron 4.57 g de un sólido blanco (75% de rendimiento) que funde a 225 ° C.

¹H RMN (CD₃OD, 200 MHz) δ 2.09-2.26 (m, 2H, CH₂), 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.42-2.64 (m, 2H, CH₂), 4.02, 4.14 (2dd, J = 6.59 Hz, 1H, CH), , 7.19 (d, J = 8.06 Hz, 2H, 2CH's), 7.32-7.4 (m, 10H), 7.7 (d, J = 8.064 Hz, 2H, 2CH's).

¹³C RMN (CD₃OD, 50 MHz) δ 21.31 (CH₃), 26.55 (CH₂CO), 30.4 (CH₂CH), 53.17 (CH), 67.57 y 69.15 (CH₂-Ph), 125.44, 127.95, 127.98, 128.05, 128.21, 128.4 y 128.45 (C aromáticos), 135.01, 135.92, 137.54 y 145.7 (C ipso), 170.54 y 171.48 (CO₂).



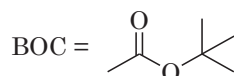
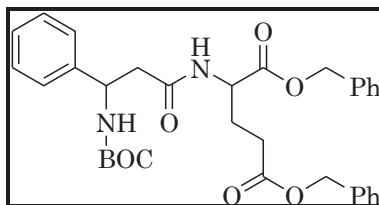
Síntesis del dipéptido BOC-β-Fen-α-Glu-(OBzl)₂. En un matraz balón provisto de agitación se colocaron 14 ml de THF, 1.4 g de *p*-toluensulfonato del éster dibencílico del *L*-α-ácido glutámico (2.8 mmol) y 0.88 ml de TEA (6.37 mmol); se puso a agitar durante 3 horas. En otro matraz redondo y también con agitación se adicionaron 12.7 ml de THF y 0.67 g de *D,L*-β-Fen

N protegida con BOC (2.55 mmol), se llevó a 0 ° C antes de la adición lenta de 0.36 ml de cloroformiato de isobutilo (2.8 mmol) disuelto en 3 ml de THF mediante un embudo de adición. Se dejó en agitación 20 minutos; al término de ese lapso, se le adicionó la solución que posee el *p*-toluensulfonato del éster dibencílico del *L*- α -ácido glutámico a través del mismo embudo de adición de manera muy lenta (este se enfrió 20 minutos antes de la adición en el refrigerador). Al finalizar, se dejó reaccionar toda la noche. La reacción se terminó primeramente filtrando por embudo poroso, eliminando el disolvente en el rotavapor, lavando con H₂O destilada y extrayendo con AcOEt, se secó la fase acuosa con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. Finalmente se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla 7:3 de hexano:AcOEt como eluyente, obteniéndose 1 g de un sólido blanco (62.4% de rendimiento) con punto de fusión de 118-120 ° C.

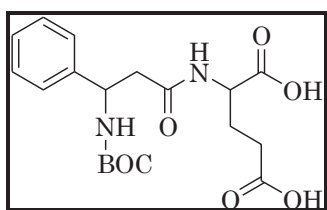
¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.38 (s, 9H, 3CH₃), 1.77-2.27 (m, 4H, 2CH₂), 2.65 (d a, J = 5.86 Hz, 2H, CH₂), 4.5-4.59 (m, 1H, CH), 4.94-5.11 (m, 5H, 2CH₂, CH), 7.1-7.4 (m, 13H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 27.01 (CH₂CO₂Bzl), 28.28 (CH₃), 29.7 (CH₂CH₂), 42.5 (CH₂CONH), 51.5 (CHPh), 51.84 (CHCO₂Bzl), 66.45 y 67.3 (CH₂Ph), 79.54 (C), 125.88, 126.09, 127.27, 127.41, 128.26, 128.28, 128.52, 128.56 y 128.59 (C aromáticos), 135,

135.66 y 141.39 (C ipso), 155.31 (OCONH), 170.25 y 171.4 (CO₂), 172.47 (CONH).



O-desprotección del dipéptido BOC-β-Fen-α-Glu-(OBzl)₂. En un matraz balón con agitación magnética se colocaron 1 g del dipéptido BOC-β-Fen-α-Glu-(OBzl)₂ (1.74 mmol), 10% en peso con respecto al dipéptido de Pd/C (0.1 g) y aproximadamente 10 ml de MeOH. Se creó atmósfera de H₂ y se dejó reaccionar 3 horas. Al finalizar ese lapso se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. Se obtuvieron 0.58 g de un sólido blanco (85% de rendimiento) que posee un punto de fusión de 160-162 ° C.

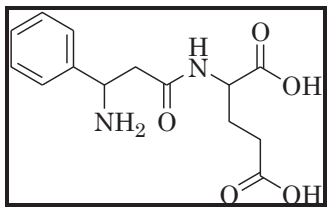


N-desprotección del dipéptido BOC-β-Fen-α-Glu-OH. En un matraz redondo provisto de agitación se colocaron 0.5 g de dipéptido BOC-β-Fen-α-Glu-OH (1.27 mmol), se suspendieron en aproximadamente 10 ml de

CH₂Cl₂, se llevó a agitación y a una temperatura de 0 ° C se le adicionaron 0.39 ml de TFA (5.07 mmol). Permaneció en agitación a esa temperatura durante 2 horas y al término de ese lapso se llevó a refrigeración (temperatura menor a 4 ° C) y permaneció ahí hasta el siguiente día. Se eliminó el disolvente y se realizaron lavados con más CH₂Cl₂ para eliminar el exceso de TFA. Finalmente se obtuvieron g de un sólido blanco (% de rendimiento) que posee un punto de fusión de ° C.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.79-1.94 (m, 1H, CH₂), 2.12 (m, 2H, CH₂), 2.24-2.32 (m, 1H, CH₂), 2.88-3.03 (m, 2H, CH₂), 4.33-4.41 (m, 1H, CH), 4.69 (dd, J = 8.33 y 15.28 Hz, 1H, CH), 7.39-7.48 (m, 5H).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz) δ 28 (CH₂CO₂H), 31.3 (CH₂CH₂), 40.1 (CH₂CONH), 53.61 (CHPh), 53.89 (CHCO₂H), 128.08, 128.3 y 130.38 (C aromáticos), 137.5 (C ipso), 173.04 (CONH), 171.59 y 176.55 (CO₂H).

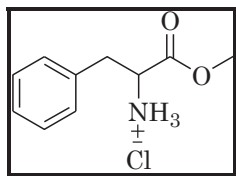


Síntesis del clorhidrato del éster metílico de la L-α-Fenilalanina. Se colocaron en un matraz balón provisto de agitación 2 g de L-α-Fen (12.1

mmol) y aproximadamente 15 ml de MeOH. Se llevó a baño de hielo y se puso a agitar. Con ayuda de una jeringa de cristal se le añadieron 1.06 ml de SOCl₂ (14.52 mmol) gota a gota y se dejó reaccionar toda la noche. Se evaporó el exceso de MeOH en el rotavapor, se eliminó el sobrante de SOCl₂ con lavados de CH₂Cl₂. Se obtuvo 2.44 g de cristales blancos alargados (94% de rendimiento) con punto de fusión de 130 ° C.

¹H RMN (D₂O, 200 MHz) δ 3.09 (dd, J = 7.51 y 14.48 Hz, 1H, CH₂), 3.23 (dd, J = 5.86 y 14.29 Hz, 1H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.31 (dd, J = 6.32 y 7.33, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

¹³C RMN (D₂O, 50 MHz) δ 35.72 (CH₂), 53.72 (CH₃), 54.25 (CH), 128.27, 1298.44 y 129.53 (C aromáticos), 133.87 (C ipso), 170.2 (CO₂).

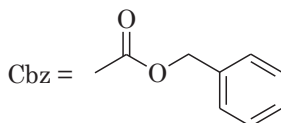
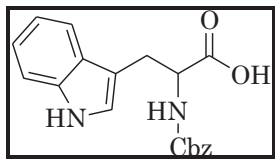


Protección del grupo amino del *L*-α-Triptófano con Cbz. Se pesaron 1.5 g de *L*-α-Triptófano (7.34 mmol) y se depositaron en un matraz bola con agitación magnética, se disolvieron en 25 ml de NaOH 1 N. Se le adicionó 1.08 ml de cloroformiato de bencilo (7.71 mmol) y se dejó reaccionar toda la noche. Se lavó con éter etílico en una ocasión y la fase acuosa se llevó a pH de 4, se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el

rotavapor. Se obtuvieron 2.24 g de un sólido ámbar (90.4% de rendimiento) con punto de fusión de 115-117 ° C.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.13 (dd, J = 8.05 y 14.64 Hz, 1H, CH₂), 3.33 (dd, J = 4.94 y 14.46 Hz, 1H, CH₂), 4.47-4.51 (m, 1H, CH), 6.98 (t a, J = 7.14 Hz, 1H, NCHC), 7.03-7.33 (m, 9H), 7.55 (d, J = 7.87 Hz, 1H, NH aromático), 10.28 (s a, 1H, OH).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 28.58 (CH₂CH), 56.33 (CH), 67.5 (CH₂OCO), 111.02, 112.22, 119.25, 119.79, 122.33, 124.45, 128.69, 128.89 y 129.42 (C aromáticos), 138.19 (C ipso), 154.75 (CONH), 175.19 (CO₂H).



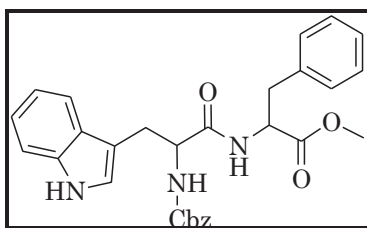
Síntesis del dipéptido Cbz- α -Trp- α -Phe-OMe. En un matraz balón provisto de agitación se colocaron 16.2 ml de THF, 0.7 g del clorhidrato del éster metílico de la *L*- α -Fen (3.25 mmol) y 1 ml de TEA (7.4 mmol); se puso a agitar durante 3 horas. En otro matraz redondo y también con agitación se adicionaron 14.7 ml de THF y 1 g de *L*- α -Trp *N* protegido con Cbz (2.95

mmol), se llevó a 0 ° C antes de la adición lenta de 0.43 ml de cloroformiato de isobutilo (3.25 mmol) disuelto en 3 ml de THF mediante un embudo de adición. Se dejó en agitación por 20 minutos; al término de ese lapso, se le adicionó la solución que posee el clorhidrato del éster metílico de la *L*- α -Fen, (este se enfrió 20 minutos antes de la adición en el refrigerador) a través de un embudo de adición de manera lenta. Al finalizar la adición, se dejó reaccionar toda la noche. La reacción se terminó primeramente filtrando por embudo poroso, eliminando el disolvente en el rotavapor, lavando con H₂O destilada dos ocasiones y extrayendo con AcOEt, se secó la fase acuosa con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. Finalmente se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla 7:3 de hexano:AcOEt como eluyente, obteniéndose 1.005 g de cristales pequeños en forma de agujas color amarillo claro (68% de rendimiento) con punto de fusión de 126 ° C.

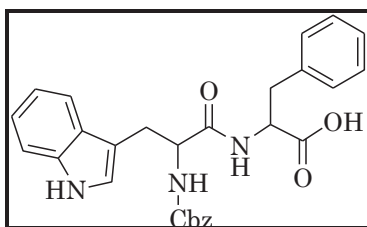
¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.93 (m, 2H, CH₂), 3.11 (dd, J = 7.68 y 14.64 Hz, 1H, CH₂), 3.32 (dd, J = 4.2 y 14.09 Hz, 1H, CH₂), 3.61 (s, 3H, CH₃), 4.5 (d, J = 5.67 Hz, 1H, CH), 4.71 (c, J = 5.85 Hz, 1H, CH), 5.1 (s, 2H, CH₂), 5.48 (d, J = 7.14 Hz, 1H, NH), 6.15 (d, J = 7.13 Hz, 1H, NH), 6.78-8.09 (m, 15H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 28.42 (CH₂), 37.73 (CH₂Ph), 52.22 (CH₃), 53.22 (CHCO₂), 55.34 (CHCONH), 66.97

(CH₂OCO), 110.3, 111.18, 118.81, 119.83, 122.29, 123.405, 126.98, 128.03, 128.15, 128.45, 128.51 y 129.06 (C aromáticos), 136.46 y 136.16 (C ipso), 155.98 (CO₂CH₂), 170.79 (CO₂CH₃), 171.25 (CONH).



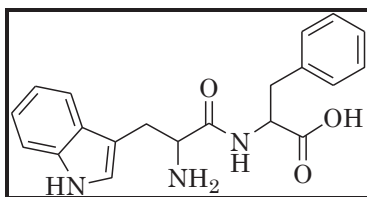
O-desprotección del dipéptido Cbz- α -Trp- α -Phe-OMe. En un matraz redondo provisto de agitación se colocaron 1 g del dipéptido Cbz- α -Trp- α -Phe-OMe (2 mmol) y se disolvieron en 28.1 ml de la mezcla THF:H₂O:MeOH (25:3:0.1). Posteriormente se le adicionaron 3 ml de una solución 2 M de LiOH.H₂O (6 mmol) y se dejó reaccionando bajo una fuerte agitación durante 3 horas. Al final de ese lapso, la mezcla de reacción se llevó a un pH de 3 y se extrae con AcOEt, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 0.82 g de un aceite amarillo (85% de rendimiento).



N-desprotección del dipéptido Cbz- α -Trp- α -Phe-OH. En un matraz redondo provisto de agitación se colocaron 0.5 g del dipéptido Cbz- α -Trp- α -Phe-OH (1 mmol), 10% en peso con respecto al dipéptido de Pd/C (0.05 g) y aproximadamente 8 ml de MeOH. Se creó atmósfera de H₂ y se dejó reaccionar por 3 horas. Al finalizar ese lapso se filtró y se eliminó el disolvente a vacío, así se obtuvieron 0.29 g de un sólido amorfo color café (80% de rendimiento) que posee un punto de fusión de 135 ° C

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ 3.04 (dd, J = 8.97 y 14.09 Hz, 1H, CH₂), 3.18 (dd, J = 8.87 y 15.09 Hz, 1H, CH₂), 3.25 (dd, J = 5.12 y 14.09 Hz, 1H, CH₂), 3.43 (dd, J = 5.21 y 15.1 Hz, 2H, CH₂), 4.16 (dd, J = 5.4 y 8.32 Hz, 1H, CH), 4.68 (dd, J = 5.12 y 8.6 Hz, 1H, CH), 7.03-7.69 (m, 11H).

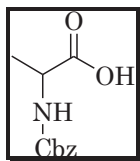
¹³C RMN (CD₃OD 100 MHz) δ 28.68 (CH₂), 38.11 (CH₂Ph), 54.65 (CHCO₂H), 55.52 (CHCONH), 107.66, 112.57, 119.13, 120.23, 122.8, 125.87, 127.84, 128.26, 129.49 y 130.22 (C aromáticos), 138.16 (C ipso), 170.1 (CONH), 174 (CO₂H).



Protección del grupo amino de la *D,L*- α -Alanina con Cbz. Se pesaron 1 g de *D,L*- α -Alanina (11.1 mmol) y se depositaron en un matraz bola con agitación magnética, se disolvieron en 25 ml de NaOH 1 N. Se puso a agitar fuertemente, posteriormente se le adicionó 1.64 ml de cloroformiato de bencilo (11.65 mmol) y se dejó reaccionar toda la noche. Se lavó con éter etílico y la fase acuosa se llevó a pH de 4, se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 1.38 g de cristales en forma de aguja alargados (55.5% de rendimiento) con punto de fusión de 77-79 ° C.

¹H RMN (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.46 (d, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 4.41 (t, J = 7.14 Hz, 1H, CH), 5.12 (s, 2H, CH₂), 5.35 (d, J = 6.59, 1H, NH), 5.05-5.36 (m, 5H).

¹³C RMN (CDCl₃, 50 MHz) δ 18.35 (CH₃), 49.42 (CH), 67.1 (CH₂), 128.11, 128.25 y 128.53 (C aromáticos), 136.03 (C ipso), 155.81 (CONH), 177.07 (CO).

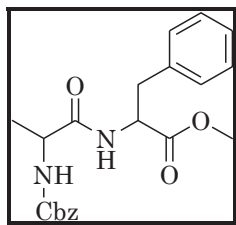


Síntesis del dipéptido Cbz- α -Ala- α -Phe-OMe. En un matraz balón provisto de agitación se colocaron 23 ml de THF, 1 g del clorhidrato del éster metílico de la *L*- α -Fen (4.65 mmol) y 1.47 ml de TEA (10.57 mmol); se puso a

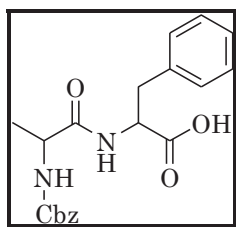
agitar durante 3 horas. En otro matraz redondo y también con agitación se adicionaron 21.14 ml de THF y 0.94 g de *D,L*- α -Ala *N* protegido con Cbz (4.22 mmol), se llevó a 0 ° C antes de la adición lenta de 0.58 ml de cloroformiato de isobutilo (4.43 mmol) disuelto en 3 ml de THF mediante un embudo de adición. Se dejó en agitación durante 20 minutos; al término de ese lapso, se le adicionó la solución que posee el clorhidrato del éster metílico de la *L*- α -Fen (previamente enfriada en el refrigerador durante 20 minutos) a través del mismo embudo de adición de manera lenta. Al finalizar la adición, se dejó reaccionar toda la noche. La reacción se terminó primeramente filtrando por embudo poroso, eliminando el disolvente en el rotavapor, lavando con H₂O destilada dos ocasiones y extrayendo con AcOEt, se secó la fase acuosa con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla 7:3 hexano:AcOEt y así se obtuvieron 1.54 g de cristales pequeños en forma de aguja (95.33% de rendimiento) con punto de fusión de 72 ° C.

¹H RMN (CDCl₃, MHz) δ

¹³C RMN (CDCl₃, MHz) δ



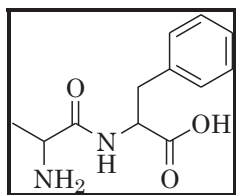
O-desprotección del dipéptido Cbz- α -Ala- α -Phe-OMe. En un matraz redondo provisto de agitación se colocaron 0.8 g del dipéptido Cbz- α -Ala- α -Phe-OMe (2.08 mmol) y se disolvieron en 28.1 ml de la mezcla THF:H₂O:MeOH (25:3:0.1). Posteriormente se le adicionaron 3.12 ml de una solución 2 M de LiOH.H₂O (6.24 mmol) y se dejó reaccionando bajo una fuerte agitación durante 3 horas. Al final de ese lapso, la mezcla de reacción se llevó a un pH de 3 y se extrae con AcOEt, la fase orgánica se socó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 0.67 g de un aceite amarillo (88% de rendimiento).



N-desprotección del dipéptido Cbz- α -Ala- α -Phe-OH. En un matraz redondo provisto de agitación se colocaron 0.6 g del dipéptido Cbz- α -Ala- α -Phe-OH (1.62 mmol), 10% en peso con respecto al dipéptido de Pd/C (0.06 g) y aproximadamente 8 ml de MeOH. Se creó atmósfera de H₂ y se dejó reaccionar por 3 horas. Al finalizar ese lapso se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. Se obtuvieron 0.34 g de un sólido blanco (89% de rendimiento) que posee un punto de fusión de 134 ° C. Se obtuvieron dos diastereómeros según los datos de ¹H RMN.

^1H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.2 (d, J = 6.77 Hz, 3H, CH₃), 1.44 (d, J = 6.95 Hz, 3H, CH₃), 2.88 (dd, J = 9.61 y 13.82 Hz, 1H, CH₂), 2.99 (dd, J = 8.42 y 13.91 Hz, 1H, CH₂), 3.21 (dd, J = 4.75 y 13.73 Hz, 1H, CH₂), 3.29 (dd, J = 3.93 y 13.45 Hz, 1H, CH₂), 3.88 (d, J = 6.59 Hz, 2H, 2CH's), 4.48 (dd, J = 4.94 y 8.23 Hz, 1H, CH), 4.55 (dd, J = 4.39 y 9.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.33 (m, 5H).

^{13}C RMN (CD₃OD, 100 MHz) δ 17.7 (CH₃), 39.24 (CH₂), 57.06 (CHCH₃), 57.61 (CHCH₂), 127.45, 129.21 y 130.41 (C aromáticos), 139.45 (C ipso), 170.57 (CONH), 177.62 (CO).



BIBLIOGRAFÍA

1. Thomas, G.; *Medicinal Chemistry An Introduction*; Wiley: England, **2004**.
2. Escalona, J. C.; Carrasco, R.; Padrón, J. A.; *Introducción al diseño de fármacos*, Folleto para la docencia de la asignatura de Farmacia, Universidad de Oriente.
3. Elguero, J.; Pérez, G.; *Bases de datos en Farmacología y Terapéutica*, Fundación Dr. Antonio Esteve: España, **1996**.
4. Gutiérrez de Terán Castellón, H.; *Tesis doctoral*, Universitat Pompeu Fabra: Barcelona, **2004**.
5. Pastor, M.; Álvarez-Builla, J.; *Técnicas QSAR en Diseño de Fármacos*, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid.
6. Todeschini, R.; Consonni, V.; *Handbook of molecular descriptors*, Wiley-VSH, **2000**.
7. Chacón-García, L.; Martínez, R.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2001**, 36, 731-736.
8. Gibson, D.; *The Pharmacogenomics Journal*, **2002**, 2, 275-276.
9. Wemmer, D., E.; Dervan, P., B.; *Current Biology in Structural Biology*, **1997**, 7, 355-361.
10. www.ch.qub.ac.uk/staff/mann/index.html
11. Mathews, C., K.; van Holde, K., E.; Ahern, K., G.; *Bioquímica*, Pearson Educación: Madrid, **2002**.
- 12.; *An introduction to peptide chemistry*,

13. Carey, *Química Orgánica*,
14. Aviña Verduzco, J.; *Tesis doctoral*, CINVESTAV: México, D. F., **2004**.
15. Artículo juaristi
16. Rodionow, W. M.; Postovskaja, E. A.; Artículo de la síntesis de beta-a.
a.,
17. ARTICULO BETA AMINOACIDS
18. Barrett, G. C.; Elmore, D. T.; *Amino Acids and Peptides*, Cambridge University Press: England, **1998**.
19. www.vi.cl/foro/index.php?showtopic=690&st=80
20. de Oliveira, A. M.; Custódio, F. B.; Donnici, C. L.; Montanari, C. A.;
European Journal of Medical Chemistry, **2003**, 38, 141-155.
21. Software *Hiper Chem 6.03 for Windows*; HiperCube Inc., **2000**.
22. Software *Dragón Versión 5.3 profesional para Windows*; Talete srl:
Italy, **2003-2005**.
23. Software *MobyDigs Versión 1.0 profesional para Windows*, Talete srl:
Italy, **2004-2005**.