

# Preparació de blocs quirals per a nous agents de penetració cel·lular *Preparation of building blocks for new cell-penetrating agents*

Víctor Maestre,<sup>1</sup> Ona Illa,<sup>1</sup> Miriam Royo<sup>2</sup> i Rosa M. Ortuño<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Ciències. Departament de Química

<sup>2</sup> Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)

**Resum:** Les membranes plasmàtiques protegeixen la cèl·lula d'invasions exògenes, fet que dificulta l'arribada de certs fàrmacs a les seves dianes terapèutiques intracel·lulars. En els últims anys, s'han desenvolupat diferents pèptids sintètics per internalitzar diferents molècules bioactives.

Aquest article tracta de la síntesi en fase sòlida de dos pèptids tetradecamèrics híbrids mitjançant l'estratègia Fmoc/Boc. Aquests pèptids estan constituïts per un  $\gamma$ -aminoàcid ciclobutànic i un residu de *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina funcionalitzat, enllaçats alternadament. Alguns d'aquests pèptids han donat bons resultats d'internalització en cèl·lules HeLa i en el paràsit leishmània, i es preveu realitzar un estudi en profunditat de les seves propietats de penetració.

**Paraules clau:** Pèptids de penetració cel·lular, internalització cel·lular, aminoàcid ciclobutànic, *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina, síntesi en fase sòlida, leishmània.

**Abstract:** Plasma membranes protect the cell from exogenous invasions and this may impede the arrival of some drugs to their intracellular therapeutic target. In recent years, various synthetic cell-penetrating peptides have been developed which permit the internalization of different bioactive molecules.

This paper deals with the solid-phase synthesis of two hybrid tetradecameric peptides using the Fmoc/Boc strategy. These peptides consist of a  $\gamma$ -cyclobutane amino acid that is alternately linked with a functionalized residue of *trans*- $\gamma$ -amino-L-proline. Some of these peptides have provided good results in internalizing HeLa cells and Leishmania parasites, and their internalization properties will continue to be studied.

**Keywords:** Cell-penetrating peptides, cellular internalization, cyclobutane amino acid, *trans*- $\gamma$ -amino-L-proline, solid-phase synthesis, Leishmania.

## Introducció

Les membranes plasmàtiques tenen un paper molt important com a barreres bioquímiques efectives en la resistència envers la invasió exògena [1]. Generalment, estan formades per una bicapa lipídica que conté múltiples lípids químicament diferents, presents en diverses quantitats i proporcions [2]. Per als fàrmacs basats en molècules petites, travessar aquesta membrana pot implicar un procés cel·lular natural com la difusió directa a través de la bicapa lipídica. No obstant, hi ha molècules de pes molecular més gran, hidrofòbiques, hidròfiles o carregades que necessiten ajuda per ser transportades a l'interior de la cèl·lula [3].

En les últimes dècades, s'han desenvolupat diversos pèptids sintètics de penetració cel·lular (CPP, de l'anglès *cell penetrating*

*ing peptides*) que han contribuït significativament a l'avenç científic en aquesta àrea.

### *Pèptids de penetració cel·lular (CPP)*

Generalment, els CPP són pèptids curts carregats positivament i constituïts per residus bàsics que consten d'entre cinc i trenta aminoàcids. Aquests pèptids presenten una baixa citotoxicitat i són capaços de realitzar la transducció de membrana a baixes concentracions, tant *in vivo* com *in vitro*, sense provocar danys importants a la membrana [4]. A més, es poden modificar fàcilment durant el seu disseny, fet que els converteix en un dels sistemes de lliurament cel·lular més interessants per ser estudiats en aplicacions farmacològiques.

D'altra banda, els CPP es poden unir de forma covalent o no covalent a un ampli ventall de molècules de càrrega, com altres pèptids, proteïnes, àcids nucleics, oligonucleòtids, liposomes, plasmidis, fàrmacs o altres nanopartícules [5], la qual cosa en fa possible el transport i l'alliberació a l'interior de la cèl·lula.

Correspondència: Ona Illa Soler  
Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Ciències. Departament de Química  
08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès  
Tel.: +34 935 814 884  
A/e: [ona.illa@uab.cat](mailto:ona.illa@uab.cat)

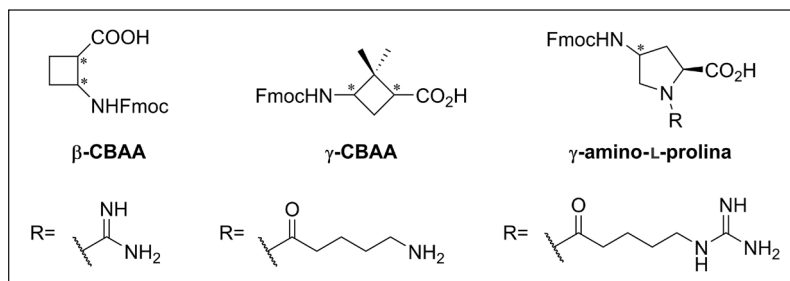


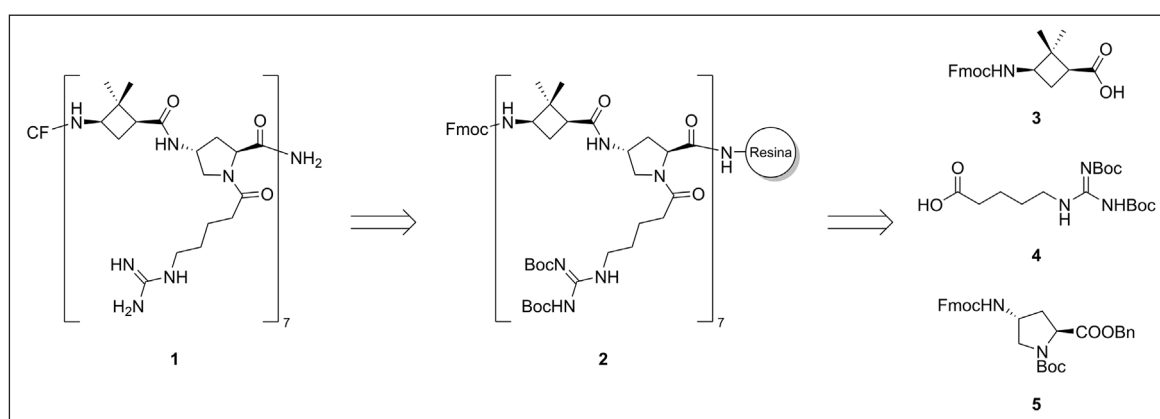
FIGURA 1. Monòmers utilitzats en CPP sintetitzats en el grup de recerca SERO. Elaboració pròpia.

Per disposar d'un CPP amb una bona internalització cel·lular cal una combinació òptima d'hidrofobicitat/hidrofilia i tenir presents funcionalitzacions que augmentin la capacitat d'interacció amb la membrana plasmàtica. En aquest sentit, els CPP rics en derivats de prolina presenten una bona solubilitat en aigua i poden ser substituïts en la posició  $N^\alpha$  de l'anell de pirrolidina amb el fi de modular les seves propietats hidrofòbiques o hidrofíliques. Per la seva banda, els CPP rics en arginina i grups guanidini presenten una bona internalització gràcies al fet que es troben protonats a pH fisiològics i poden interaccionar amb grups aniónics de la superfície cel·lular.

### Estudis precedents

En els darrers anys, el grup de recerca Síntesi, Estructura i Reactivitat Química (SERO), del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), ha desenvolupat diversos CPP híbrids basats en una combinació alternada de diferents  $\beta$ -aminoàcids ciclobutànics (CBAA) o  $\gamma$ -CBAA, respectivament, amb residus de *cis*- o *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina, entre d'altres (vegeu la figura 1). En un primer moment,

aquests pèptids van ser sintetitzats en forma d'hexapèptids i es va estudiar la influència de la configuració absoluta dels aminoàcids ciclobutànics, així com la influència dels substituents en la posició  $N^\alpha$ , la  $\gamma$ -aminoprolina en l'estructura del pèptid i en la seva capacitat d'internalització en cèl·lules HeLa [6-8]. Més recentment, s'han preparat pèptids de més llargada, fins a tetradecapèptids, que han estat estudiats com a agents de penetració cel·lular amb cèl·lules HeLa i amb leishmanies, i que han mostrat un comportament notable no només en la transducció cel·lular, sinó com a agents leishmanicides. A aquests pèptids s'hi ha conjugat una molècula d'un fluoròfor, la carboxifluoresceïna (CF), així com el fàrmac doxorubicina (Dox), un agent antiparasitari contra leishmania i que també és utilitzat en la teràpia contra el càncer [9, 10]. En aquests estudis es va confirmar que els CPP basats en  $\gamma$ -CBAA proporcionen millors resultats en termes d'internalització que els basats en  $\beta$ -CBAA. Cal destacar també que la presència d'aminoàcids no naturals i amb restriccions conformacionals en els CPP (com és el cas de l'ús dels aminoàcids ciclobutànics que es presenten en aquest treball) s'ha descrit com un aspecte positiu per assolir millors nivells de resistència a la proteòlisi i menys toxicitat [11].



ESQUEMA 1. Proposta retrosintètica per a l'obtenció dels pèptids híbrids  $\gamma$ -CBAA/ $\gamma$ -amino-L-prolina. Elaboració pròpia.

Actualment, hi ha pocs exemples de CPP que puguin ser internalitzats pel paràsit leishmània, la qual cosa fa que aquest camp de recerca sigui d'interès [12]. L'objectiu d'aquest treball ha estat sintetitzar pèptids híbrids  $\gamma$ -CBAA/ $\gamma$ -amino-L-prolina se sintetitzen en fase sòlida utilitzant l'estratègia Fmoc/Boc, va ser necessari protegir adequadament l'extrem N-terminal del  $\gamma$ -CBAA 3 amb el grup fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc), el qual presenta una alta estabilitat en presència d'agents àcids però pot ser eliminat fàcilment en certes condicions bàsiques.

## Resultats i discussió

### Síntesi del monòmer $\gamma$ -CBAA 3

Tenint en compte que els pèptids híbrids  $\gamma$ -CBAA/ $\gamma$ -amino-L-prolina se sintetitzen en fase sòlida utilitzant l'estratègia Fmoc/Boc, va ser necessari protegir adequadament l'extrem N-terminal del  $\gamma$ -CBAA 3 amb el grup fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc), el qual presenta una alta estabilitat en presència d'agents àcids però pot ser eliminat fàcilment en certes condicions bàsiques.

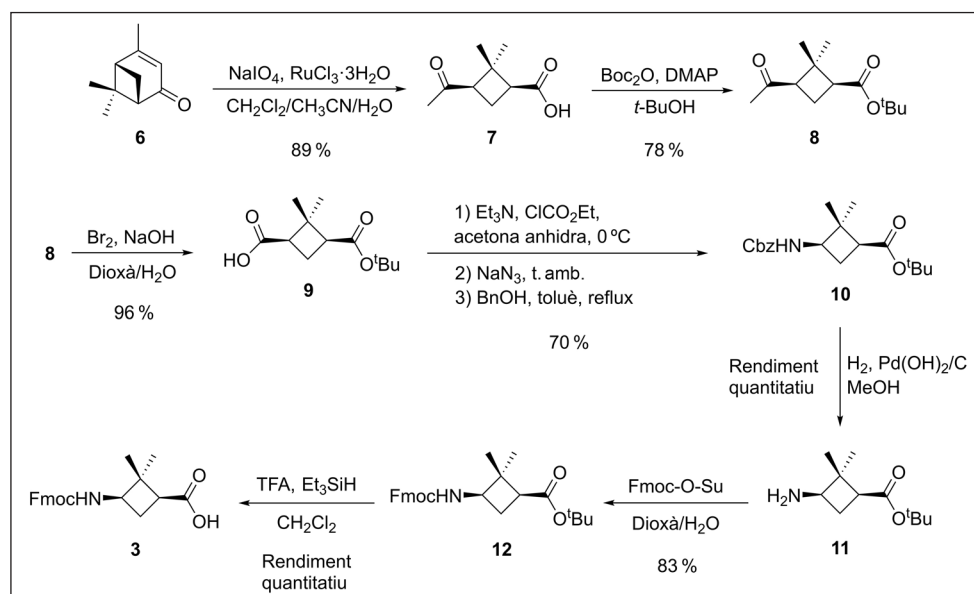
El nostre grup de recerca (SERQ) ha descrit una seqüència de set passos per a la preparació del  $\gamma$ -CBAA 3 [7]. La ruta sintètica es mostra a l'esquema 2.

Partint de la (-)-verbenona 6, comercialment disponible, l'anell de sis membres s'obre mitjançant un trencament oxidatiu del doble enllaç C=C, que, gràcies a una posterior descarboxilació  $\alpha$ -carbonílica, esdevé l'àcid carboxílic 7. Aleshores, es realitza una protecció de l'àcid carboxílic que dona el

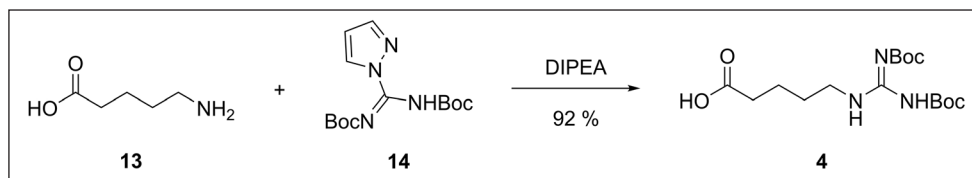
respectiu èster *tert*-butílic 8. Posteriorment, es realitza una transformació de la metilcetona en el corresponent àcid carboxílic mitjançant una reacció de l'haloform (o Lieben) i s'obté l'hemièster 9. A continuació, es realitza una transposició de Curtius per tal de transformar el grup carboxil, a través d'un isocianat, en una amina protegida per un grup benziloxicarbonil (Cbz). La transformació anterior és el pas clau per a la síntesi del monòmer 3, no només perquè el seu rendiment és lleugerament més baix que la resta d'etapes sinó perquè permetrà la posterior protecció del grup amina en forma de Fmoc, necessària per a l'estratègia utilitzada en la síntesi en fase sòlida. Una vegada s'ha obtingut el carbamat 10, protegit ortogonalment, es realitza una hidrogenació catalítica del carbamat de benzil que dona com a resultat l'amina lliure 11, la qual es protegeix amb el grup protector Fmoc. Finalment, es procedeix a l'eliminació selectiva de l'èster *tert*-butílic per obtenir el  $\gamma$ -CBAA 3.

### Síntesi de la cadena lateral 4

Tal com s'explica a la introducció, la presència d'un grup guanidini en les cadenes laterals del pèptid afavoreix el procés d'internalització cel·lular. Per tal d'introduir el grup guanidini a l'aminoàcid 13 s'utilitza l'agent guanidilant 14 i així es porta a terme una reacció que té lloc per mitjà d'un mecanisme d'addició-eliminació en presència de *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA) com a base (vegeu l'esquema 3).



ESQUEMA 2. Ruta sintètica per a la preparació del monòmer 3 a partir de la (-)-verbenona 6. Elaboració pròpia.



ESQUEMA 3. Síntesi de la cadena lateral 4. Elaboració pròpia.

L'agent guanidilant 14 es troba protegit amb dos grups *tert*-butoxicarbonil (Boc) com a grups protectors permanents, necessaris per a l'estratègia utilitzada en la posterior síntesi en fase sòlida dels pèptids.

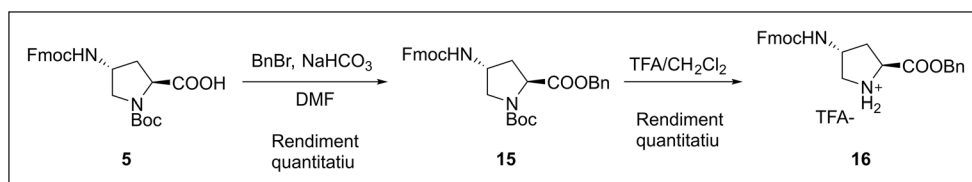
### Síntesi de la *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina modificada 18

La síntesi de la *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina modificada 18 es porta a terme seguint una seqüència sintètica de quatre etapes, representades als esquemes 4 i 5. El primer pas necessari en aquesta síntesi és la protecció del grup carboxil del derivat de  $\gamma$ -amino-L-prolina 5, per posteriorment poder realitzar una reacció d'acoblament entre la sal d'amoni 16 i la cadena lateral 4. En el cas que no es realitzés aquesta protecció podria haver-hi problemes de competitivitat entre l'amina i el carboxilat del derivat de prolina en l'atac nucleòfil sobre el grup carboxil, activat amb un agent d'acoblament, de la cadena lateral 4. Degut a la presència de grups Fmoc i Boc a l'aminoàcid 5, el grup protector escollit per protegir l'àcid carboxílic és

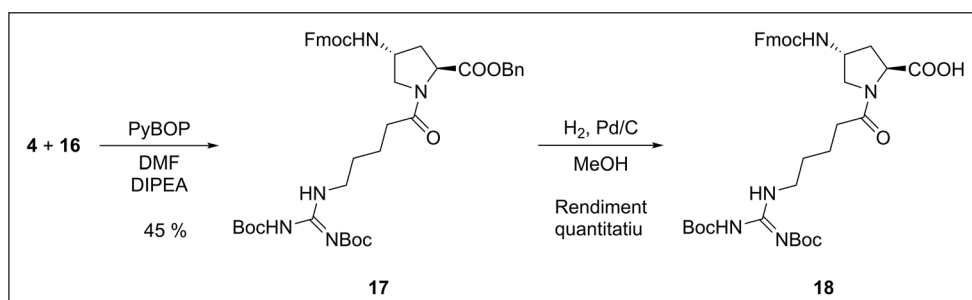
l'èster benzílic, ja que aquest és ortogonal respecte als altres dos grups protectors mencionats, és a dir, presenta condicions de desprotecció diferents de les dels altres. Seguidament, es realitza una desprotecció de la posició  $N^{\alpha}$  de l'anell de pirrolidina en condicions àcides i s'obté la sal d'amoni 16.

A continuació, es prepara l'aminoàcid 17 per mitjà de l'acoblament de la cadena lateral 4 amb la sal d'amoni 16 (vegeu l'esquema 5).

Per portar a terme aquesta reacció, la cadena lateral 4 es mescla prèviament amb DIPEA i amb hexafluorofosfat de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfoni (PyBOP) per tal d'activar l'àcid carboxílic, que, una vegada activat, s'afegeix sobre una solució de la sal d'amoni 16. Després de purificar 17 per mitjà d'una columna cromatogràfica de gel de sílice, el rendiment mitjà obtingut per aquesta reacció és d'un 45%, un valor més baix que el de les altres etapes d'aquesta síntesi. El fet que es recuperi una quantitat significativa de la cadena lateral 4 i de la sal d'amoni 16 després de la cromatografia en columna, significa que aquest baix rendiment podria ser



ESQUEMA 4. Etapes 1 i 2 de la ruta sintètica per a la preparació de la sal d'amoni 16. Elaboració pròpia.



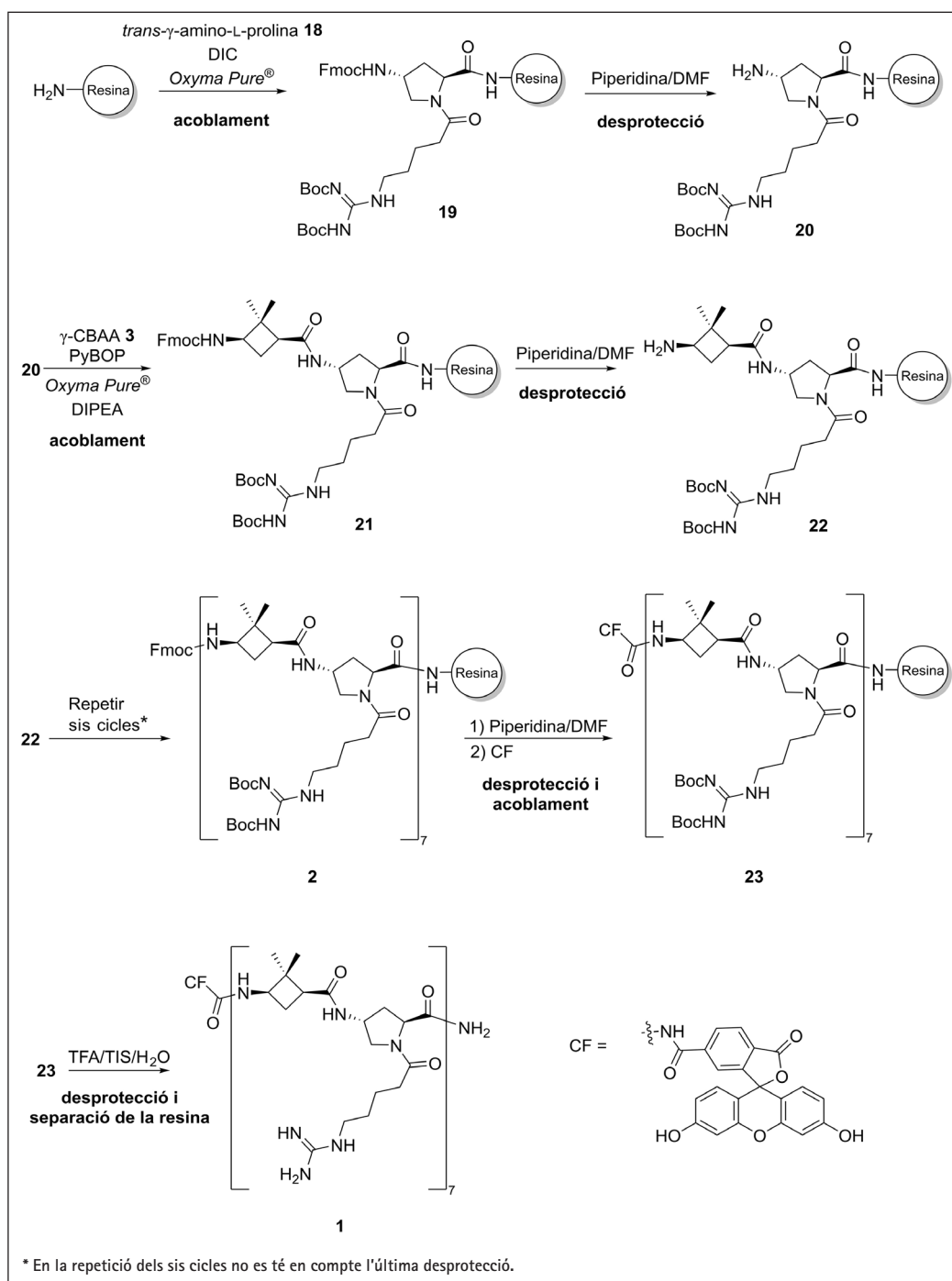
ESQUEMA 5. Etapes 3 i 4 de la ruta sintètica per a la preparació de l'aminoàcid 18. Elaboració pròpia.

degut a una baixa conversió i no a altres reaccions secundàries que poguessin haver tingut lloc.

Finalment, una vegada obtingut l'aminoàcid **17** es realitza una hidrogenació a una pressió d'un bar utilitzant Pd/C catalític per tal de desprotegir l'èster benzilic i s'obté la *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina **18** (vegeu l'esquema 5).

### Síntesi en fase sòlida dels pèptids (SFS)

Com s'ha esmentat anteriorment, els pèptids híbrids  $\gamma$ -CBAA/ $\gamma$ -amino-L-prolina **1** i **2** (vegeu l'esquema 2) se sintetitzen utilitzant tècniques de síntesi en fase sòlida mitjançant l'estratègia Fmoc/Boc. El procediment per a la preparació dels pèptids desitjats es mostra a l'esquema 6.



ESQUEMA 6. Procediment general seguit en SFS. Elaboració pròpia.

El primer pas de la síntesi en fase sòlida consisteix en l'acoblament dels grups amino de la resina seleccionada amb el grup carboxil de la *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina modificada **18**. Inicialment, la síntesi peptídica es va portar a terme utilitzant 500 mg de resina H-Rink amide ChemMatrix® considerant una funcionalització de 0,3 mmol/g de grups amino lliures. El primer acoblament de la síntesi es va realitzar utilitzant un equivalent de la *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina modificada **18**, un equivalent de PyBOP com a agent d'acoblament, un equivalent de 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetat d'etil (Oxyma Pure®) com a additiu i dos equivalents de DIPEA com a base. Després de realitzar el primer acoblament, el test de ninhidrina [13] va revelar que la major part dels grups amino de la resina no havien estat funcionalitzats per aminoàcids (denotat per un color blau molt intens). En aquest sentit, es va realitzar un reacoblament utilitzant les mateixes condicions i proporcions que en el primer acoblament, però el test de ninhidrina va continuar revelant una baixa funcionalització d'aminoàcids.

En conseqüència, es va augmentar la relació d'aminoàcid per grup amino de la resina i es va substituir el PyBOP per un altre agent d'acoblament, en aquest cas una carbodiimida. Seguint aquesta idea, es van fer servir 360 mg de la resina anterior considerant una funcionalització de 0,5 mmol/g i el primer acoblament es va realitzar utilitzant *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) com a agent d'acoblament i Oxyma Pure® com a additiu. Aquesta vegada, una vegada eliminat el Fmoc de l'extrem N-terminal, el test de ninhidrina va demostrar un alt percentatge de funcionalització de la resina amb l'aminoàcid **18** afegit.

Una vegada la  $\gamma$ -amino-L-prolina modificada **18** està ancorada a la resina, es continua amb l'elongació del pèptid per mitjà de l'acoblament del  $\gamma$ -CBAA *N*-protegit 3 utilitzant PyBOP com a agent d'acoblament, Oxyma Pure® com a additiu i DIPEA com a base. Aquest procés es repeteix diverses vegades, intercalant els monòmers **3** i **18** per allargar la cadena peptí-

dica fins a assolir la longitud de catorze unitats (tetradecàmer). Per assegurar el correcte acoblament dels aminoàcids, cada cinc acoblaments es realitza una miniruptura del pèptid de la resina. Per fer-ho, es pren una petita quantitat de resina i es tracta amb àcid trifluoroacètic (TFA), triisopropilsilà (TIS) i aigua per tal de separar el pèptid de la resina i desprotegir tots els grups protectors de la cadena lateral. Aquestes mostres s'analitzen per cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS, de l'anglès *high performance liquid chromatography - mass spectrometry*).

Un cop sintetitzat adequadament el tetradecàmer, la resina es divideix en dues parts per tal de fer seguir a cada part una ruta diferent. Una part de la resina amb la cadena peptídica ancorada **2** es va retirar amb l'objectiu d'acoblar-hi, en un futur, diferents marcadors i fàrmacs per continuar l'estudi biològic que s'està portant a terme en el grup de recerca. La resina restant va ser utilitzada per incorporar la 5(6)-carboxifluoresceïna (CF) a l'extrem N-terminal del pèptid. Aquesta s'acobla abans de separar el pèptid de la resina utilitzant PyBOP com a agent d'acoblament, Oxyma Pure® com a additiu i DIPEA com a base. Després de realitzar l'acoblament de la CF, es va observar una coloració vermellosa del medi de reacció. Aquesta coloració és resultat de la formació de dímers de carboxifluoresceïna (vegeu la figura 2). Anteriors estudis han demostrat que l'hidroxil fenòlic de la carboxifluoresceïna pot ser acilat degut a l'autoactivació del grup carboxil de la CF, que dona lloc a la formació *in situ* d'un èster fenòlic [14]. A més, els èsters fenòlics, en particular els èsters fenòlics amb grups electroattractants, són ben coneguts pel fet de ser hidrolitzats per nucleòfils i medi bàsic. D'acord amb aquesta idea, es va portar a terme un tractament amb piperidina en *N,N*-dimetilformamida (DMF) (4:6, v/v) que va permetre eliminar fàcilment aquests productes secundaris i obtenir-ne el pèptid marcat amb CF. L'eliminació de l'èster fenòlic va poder ser observada d'acord amb la desaparició del color vermellós del medi de reacció.

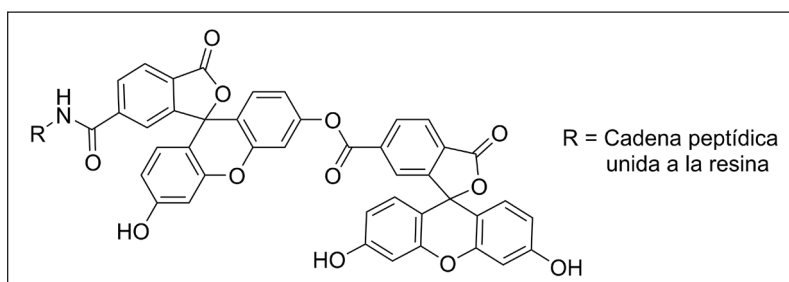


FIGURA 2. Dímer de carboxifluoresceïna. Elaboració pròpia.

Finalment, la separació del pèptid de la resina es va portar a terme per mitjà d'una hidròlisi àcida utilitzant una mescla de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O, metodologia amb la qual les proteccions dels grups guanidini amb carbamats de *tert*-butil també són eliminades.

## Part experimental

### Preparació del $\gamma$ -CBAA 3

La preparació del  $\gamma$ -CBAA 3 es porta a terme seguint la seqüència sintètica descrita pel nostre grup de recerca [7].

### Preparació de la cadena lateral 4

#### Síntesi de l'àcid 5-(3-(*tert*-butoxicarbonil)guanidino)pentanoic 4

Es dissol l'àcid 5-aminopentanoic 13 (0,60 g, 5,1 mmol) en 60 mL d'una mescla CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:5, v/v). S'afegeix DIPEA (2,6 mL, 14 mmol) i es refreda la solució a 0 °C. A continuació, s'addiciona *N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonil)-1H-pirazol-1-carboxamidina 14 (1,75 g, 5,64 mmol) i la mescla de reacció s'agita a temperatura ambient durant 16 h. S'evapora el dissolvent a pressió reduïda, el cru es dissol en acetat d'etil (30 mL) i aigua (10 mL) i s'ajusta a pH 2-3 utilitzant HCl 1 M. Es realitzen rentats amb salmorra (2 × 10 mL), la fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre i el dissolvent s'evapora a pressió reduïda. S'obté la cadena lateral 4 (1,70 g, 4,73 mmol, 92 % de rendiment) com un sòlid blanc. <sup>1</sup>H-RMN (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11,27 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 3,41 (m, 2H), 2,37 (m, 2H), 1,68 (m, 4H), 1,47 (s, 18H) ppm.

### Preparació de la *trans*- $\gamma$ -amino-*L*-prolina modificada 18

#### Síntesi de (2*S*,4*R*)-4-((9*H*-fluoren-9-*il*)metoxicarbonilamino)pirrolidina-1,2-di-carboxilat de 2-benzil 1-(*tert*-butil) 15

S'afegeix bromur de benzil (150  $\mu$ L, 1,26 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (0,118 g, 1,40 mmol) a una solució agitada de l'àcid (2*S*,4*R*)-4-((9*H*-fluoren-9-*il*)metoxicarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxilic 5 (0,50 g, 1,1 mmol) en

DMF (12 mL). La mescla de reacció s'agita a temperatura ambient durant 48 h. Es realitzen extraccions amb acetat d'etil (4 × 20 mL) i rentats de la fase orgànica amb salmorra (2 × 15 mL). S'asseca el conjunt de fases orgàniques amb MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. Es liofililitza el producte per tal d'eliminar la màxima quantitat de DMF possible. S'obté l'aminoàcid 15 com un sòlid blanc de forma quantitativa sense necessitat d'etapa de purificació. <sup>1</sup>H-RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,04 (s, 1H), 7,78 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,59 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,37 (m, 9H), 5,18 (m, 2H), 4,84 (m, 1H), 4,46 (m, 2H), 4,27 (m, 2H), 3,77 (m, 1H), 3,39 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 1,42 (m, 9H) ppm.

#### Síntesi de trifluoroacetat de (2*S*,4*R*)-4-((9*H*-fluoren-9-*il*)metoxicarbonilamino)-2-benziloxycarbonilpirrolidina-1-*i* 16

A una solució agitada de l'aminoàcid 15 (0,66 g, 1,2 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,3 mL) s'afegeix àcid trifluoroacètic (3,3 mL). S'agita la reacció a temperatura ambient durant 1 h. Es realitzen coevaporacions amb 2 × 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i 3 × 10 mL de Et<sub>2</sub>O per eliminar el dissolvent i l'excés de volàtils. La sal d'amoni 16 (0,660 g, 1,19 mmol, rendiment quantitatiu) s'obté com un sòlid blanc sense necessitat d'etapa de purificació. <sup>1</sup>H-RMN (360 MHz, MeOD):  $\delta$  7,99 (s, 1H), 7,80 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H), 7,64 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H), 7,36 (m, 9H), 5,33 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,29 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,55 (m, 3H), 4,23 (m, 2H), 3,56 (m, 1H), 3,36 (m, 1H), 2,38 (m, 2H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (90 MHz, MeOD):  $\delta$  168,1, 163,5, 143,8, 141,3, 134,9, 128,5, 128,4, 128,3, 127,4, 126,8, 124,6, 119,6, 117,7, 68,3, 66,2, 58,5, 50,3, 49,9, 47,9, 47,0, 33,6 ppm.

#### Síntesi de (2*S*,4*R*)-4-((9*H*-fluoren-9-*il*)metoxicarbonilamino)-1-(5-(2,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidino)pentanoil)pirrolidina-2-carboxilat de benzil 17

S'afegeix PyBOP (1,11 mmol) i DIPEA (4,44 mmol) a una solució agitada de la cadena lateral 4 (0,400 g, 1,11 mmol) en DMF anhidra (3 mL), prèviament purgada amb nitrogen. Es manté en agitació a temperatura ambient durant 30 minuts per tal d'activar l'àcid. Una vegada l'àcid ha sigut activat correctament, s'afegeix sobre una solució de la sal d'amoni 16 (0,615 g, 1,11 mmol) en DMF anhidra (5 mL), prèviament purgada amb nitrogen. La mescla de reacció s'agita a temperatura ambient durant 16 h. Es realitzen extraccions amb acetat d'etil (25 mL) i aigua (25 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. Es



purifica el producte per cromatografia en columna utilitzant com a eluent una mescla d'acetat d'etil / hexà 3:1. S'obté l'aminoàcid **17** (0,395 g, 0,504 mmol, 45% de rendiment) com un sòlid blanc amb un RF = 0,55 (AcOEt/hexà 3:1).

<sup>1</sup>H-RMN (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11,51 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,78 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,36 (m, 11H), 5,23 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,13 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,97 (s, 1H), 4,53 (m, 4H), 4,20 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 3,91 (s, 1H), 3,43 (m, 3H), 2,37 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,50 (s, 18H) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171,5, 163,6, 156,2, 155,8, 153,3, 143,7, 141,3, 135,5, 128,6, 128,4, 128,2, 127,8, 127,1, 125,0, 120,1, 83,1, 79,3, 67,1, 66,7, 57,4, 52,5, 50,5, 47,2, 40,5, 34,8, 33,8, 28,6, 28,3, 28,1, 21,7 ppm. IR (ATR): 2 968, 1 719, 1 637, 1 326, 1 252, 1 132, 740 cm<sup>-1</sup>.

#### *Síntesi de l'àcid (2S,4R)-4-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbo- nilamino)-1-(5-(2,3-bis(tert-butoxicarbonil)guanidino) pentanoil)pirrolidin-2-carboxílic 18*

S'afegeix Pd/C al 10% en pes (0,20 g) a una solució agitada de l'aminoàcid **17** (0,50 g, 0,64 mmol) en metanol (60 mL), purgada prèviament amb un corrent de nitrogen. Es purga la mescla de reacció resultant amb nitrogen. Es bombollegen dos globus plens d'hidrogen a l'interior de la solució. Tot seguit, s'afegeix un globus ple d'hidrogen per mantenir la pressió d'hidrogen constant. La reacció s'agita a temperatura ambient durant 2 h. El cru de reacció es filtra amb Celite® i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obté la *trans*-γ-amino-L-prolina **18** (0,41 g, 0,59 mmol, rendiment quantitatiu) en forma de cristalls groguencs sense cap etapa de purificació.

<sup>1</sup>H-RMN (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11,50 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,76 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,57 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,38 (m, 4H), 4,41 (m, 4H), 3,90 (m, 1H), 3,37 (m, 3H), 2,28 (m, 4H), 1,62 (m, 4H), 1,49 (s, 18H) ppm. IR (ATR): 3 319, 2 973, 1 719, 1 615, 1 366, 1 327, 1 227, 1 132, 740 cm<sup>-1</sup>.

#### *Síntesi en fase sòlida dels pèptids (SFS)*

Tots els pèptids han estat sintetitzats de forma manual, utilitzant xeringues de polipropilè que contenen un filtre de polietilè porós. Les reaccions s'han dut a terme a temperatura ambient i amb agitació manual amb una vareta de tefló.

L'eliminació dels excessos de reactius, dissolvents i possibles subproductes s'ha realitzat per mitjà de filtració al buit.

S'ha utilitzat la resina H-Rink amide ChemMatrix® amb una funcionalització de 0,5 mmol/g, prèviament condicionada amb rentats successius amb diclorometà (DCM) i *N,N*-dimetilformamida (DMF). La síntesi dels pèptids s'ha efectuat mitjançant l'estratègia Fmoc/Boc. De la quantitat total sintetitzada, s'han utilitzat 1,87 g de la *trans*-γ-amino-L-prolina **18** i 1,38 g del γ-CBAA **3** per portar a terme la síntesi en fase sòlida. El protocol general per a la síntesi es mostra en la taula 1, on s'indiquen la funció del tractament, les proporcions emprades, el nombre de cicles i el temps en minuts de cada cicle.

Cada cinc aminoàcids acoblats, es va realitzar una miniruptura del pèptid de la resina per seguir el progrés de la síntesi. Per fer-ho, es va prendre una petita quantitat de resina i es va tractar amb TFA, TIS i H<sub>2</sub>O (9,5:2,5:2,5, v/v) per tal de separar el pèptid de la resina i desprotegir tots els grups protectors de la cadena lateral. Una vegada tractat, el pèptid es va caracteritzar amb HPLC-MS.

#### *Acoblament amb la 5(6)-carboxifluoresceïna (CF)*

Una vegada obtingut el tetradecàmer desitjat, la resina es va dividir en dues parts. La primera part (240 mg) va quedar protegida en forma de Fmoc i amb els 120 mg restants es va continuar amb la incorporació de la CF en el grup amino de l'extrem N-terminal, tal com s'indica a la taula 2.

A continuació, es purifica el pèptid i es caracteritza completament, i es comprova que les dades coincideixen amb les descrites prèviament per al mateix compost [9].

## Conclusions

En aquest article s'ha estudiat i desenvolupat la metodologia per a la síntesi en fase sòlida dels pèptids híbrids γ-CBAA/γ-amino-L-prolina **1** i **2**. Per portar a terme la síntesi d'aquests pèptids va ser prèviament necessària la preparació del γ-aminoàcid ciclobutànic **8**, així com de la *trans*-γ-amino-L-prolina modificada **18**, que es va portar a terme a partir de l'acoblament de la cadena lateral **4** amb la γ-amino-L-prolina comercialment assequible corresponent.

La síntesi de la cadena lateral **4** es va realitzar per mitjà d'una guanidilació de l'àcid 5-aminopentanoic **13**. D'altra banda, la



**TAULA 1.** Protocol general per a la síntesi en fase sòlida dels pèptids  $\gamma$ -CBAA/ $\gamma$ -amino-L-prolina mitjançant l'estratègia Fmoc/Boc. Elaboració pròpia.

Etapa	Reactius/Dissolvents	Funció	Cicles	t/cicle (min)
1	DMF	Rentat	5	1
2	DCM	Rentat	5	1
3	DMF	Rentat	5	1
4	<i>trans</i> - $\gamma$ -amino-L-prolina 18/DIC/ Oxyma Pure® en DMF (2:3:3)	Acoblament	1	180
5	DMF	Rentat	5	1
6	DCM	Rentat	5	1
7	Test de ninhidrina (-)*	Test d'acoblament	1	3
8	DMF	Rentat	5	1
9	Piperidina/DMF (2:8, v/v)	Desprotecció	5	10
10	DMF	Rentat	5	1
11	DCM	Rentat	5	1
12	Test de ninhidrina (+)	Test d'acoblament	1	3
13	DMF	Rentat	5	1
14	$\gamma$ -CBAA 3 / Oxyma Pure®/ PyBOP/DIPEA (2,5:2,5:2,5:5) en DMF/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	Acoblament	1	120
15	DMF	Rentat	5	1
16	DCM	Rentat	5	1
17	Test de ninhidrina (-)	Test d'acoblament	1	3
18	DMF	Rentat	5	1
19	Piperidina/DMF (2:8, v/v)	Desprotecció	5	10
20	DMF	Rentat	5	1
21	DCM	Rentat	5	1
22	Test de ninhidrina (+)	Test d'acoblament	1	3

\* En el cas d'obtenir un test de ninhidrina positiu, s'acila la resina amb una solució de Ac<sub>2</sub>O/DIPEA (5:10) en DMF.

**TAULA 2.** Protocol general per a la incorporació de la CF. Elaboració pròpia.

Etapa	Reactius/Dissolvents	Funció	Cicles	t/cicle (min)
1	DMF	Rentat	5	1
2	DCM	Rentat	5	1
3	DMF	Rentat	5	1
4	CF/ Oxyma Pure®/ PyBOP/DIPEA (3:3:3:6) en DMF	Acoblament	1	120
5	DMF	Rentat	5	1
6	DCM	Rentat	5	1
7	Test de ninhidrina (-)	Test d'acoblament	1	3
8	Piperidina/DMF (4:6, v/v)	Trencament de l'èster fenòlic	5	10
9	TFA/TIS/H <sub>2</sub> O (95:2,5:2,5)	Desprotecció / Separació de la resina	1	120
10	DCM	Rentat	5	1

*trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina modificada **18** es va preparar a partir d'una ruta sintètica de quatre etapes des de l'aminoàcid comercialment disponible **5**. Malgrat que alguna de les etapes d'aquesta síntesi va donar un rendiment mitjà millorable que podria portar a futurs estudis per augmentar-lo, es va aconseguir sintetitzar una quantitat de **18** suficient per realitzar la posterior síntesi dels pèptids. La *trans*- $\gamma$ -amino-L-prolina modificada **18**, així com els seus intermedis de reacció van ser caracteritzats per les tècniques de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN i IR.

Respecte a la síntesi en fase sòlida dels tetradecàmers **1** i **2**, després de realitzar diferents estudis dels agents d'acoblament més adequats i d'augmentar la relació d'aminoàcid per grup amino lliure de la resina, va ser possible obtenir els pèptids desitjats amb èxit, així com aïllar-los per fer-ne un ús posterior en estudis biològics.

## Referències

- [1] KANG, Z.; DING, G.; MENG, Z.; MENG, Q. «The rational design of cell-penetrating peptides for application in delivery systems». *Peptides* [en línia], 121 (2019), article 170149. <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170149>>.
- [2] HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. «Understanding the diversity of membrane lipid composition». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* [en línia], 19 (2018), p. 281-296. <<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>>.
- [3] WANG, F.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, W.; GUO, S.; JIN, F. «Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery». *J. Control. Release* [en línia], 174 (2014), p. 126-136. <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.11.020>>.
- [4] XU, J.; KHAN, A. R.; FU, M.; WANG, R.; JI, J.; ZHAI, G. «Cell-penetrating peptide: A means of breaking through the physiological barriers of different tissues and organs». *J. Control. Release* [en línia], 309 (2019), p. 106-124. <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.020>>.
- [5] DERAKHSHANKHAH, H.; JAFARI, S. «Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications». *Biomed. Pharmacother.* [en línia], 108 (2018), p. 1090-1096. <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.097>>.
- [6] GUTIÉRREZ-ABAD, R.; CARBAJO, D.; NOLIS, P.; ACOSTA-SILVA, C.; COBOS, J. A.; ILLA, O.; ROYO, M.; ORTUÑO, R. M. «Synthesis and structural study of highly constrained hybrid cyclobutane-proline  $\gamma,\gamma$ -peptides». *Amino Acids* [en línia], 41 (2011), p. 673-686. <<https://doi.org/10.1007/s00726-011-0912-4>>.
- [7] GORREA, E.; CARBAJO, D.; GUTIÉRREZ-ABAD, R.; ILLA, O.; BRANCHADELL, V.; ROYO, M.; ORTUÑO, R. M. «Searching for new cell-penetrating agents: Hybrid cyclobutane-proline  $\gamma,\gamma$ -peptides». *Org. Biomol. Chem.* [en línia], 10 (20) (2012), p. 4050-4057. <<https://doi.org/10.1039/C2OB25220A>>.
- [8] ILLA, O.; OLIVARES, J. A.; NOLIS, P.; ORTUÑO, R. M. «The relevance of the relative configuration in the folding of hybrid peptides containing  $\beta$ -cyclobutane amino acids and  $\gamma$ -amino-L-proline residues». *Tetrahedron* [en línia], 73 (44) (2017), p. 6286-6295. <<https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.09.011>>.
- [9] ILLA, O.; OLIVARES, J. A.; GAZTELUMENDI, N.; MARTÍNEZ-CASTRO, L.; OSPINA, J.; ABENGOZAR, M. Á.; SCIORTINO, G.; MARÉCHAL, J. D.; NOGUÉS, C.; ROYO, M.; RIVAS, L.; ORTUÑO, R. M. «Chiral cyclobutane-containing cell-penetrating peptides as selective vectors for anti-*Leishmania* drug delivery systems». *Int. J. Mol. Sci.* [en línia], 21 (20) (2020), article 7502. <<https://doi.org/10.3390/ijms21207502>>.
- [10] ILLA, O.; OSPINA, J.; SÁNCHEZ-APARICIO, J.-E.; PULIDO, X.; ABENGOZAR, M. Á.; GAZTELUMENDI, N.; CARBAJO, D.; NOGUÉS, C.; RIVAS, L.; MARÉCHAL, J.-D.; ROYO, M.; ORTUÑO, R. M. «Hybrid cyclobutane/proline-containing peptidomimetics: The conformational constraint influences their cell-penetration ability». *Int. J. Mol. Sci.* [en línia], 22 (10) (2021), article 5092. <<https://doi.org/10.3390/ijms22105092>>.
- [11] FOMINAYA, J.; BRAVO, J.; REBOLLO, A. «Strategies to stabilize cell penetrating peptides for *in vivo* applications». *Ther. Del.* [en línia], 6 (10) (2015), p. 1171-1194. <<https://doi.org/10.4155/tde.15.51>>.
- [12] ZAHEDIFARD, F.; LEE, H.; NO, J. H.; SALIMI, M.; SEYED, N.; ASOODEH, A.; RAFATI, S. «Comparative study of different forms of Jellein antimicrobial peptide on *Leishmania* parasite». *Exp. Parasitol.* [en línia], 209 (2020), article 107823. <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107823>>.
- [13] KENDALL, P. A. «Use of the ninhydrin reaction for quantitative estimation of amino groups in insoluble specimens». *Nature* [en línia], 197 (1963), p. 1305-1306. <<https://doi.org/10.1038/1971305a0>>.
- [14] FISCHER, R.; MADER, O.; JUNG, G.; BROCK, R. «Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis». *Bioconjugate Chem.* [en línia], 14 (3) (2003), p. 653-660. <<https://doi.org/10.1021/bc025658b>>.



V. Maestre



O. Illa



M. Royo



R. M. Ortuño

**Víctor Maestre** es va graduar en química per la Universitat Autònoma de Barcelona l'any 2020. Va guanyar el Premi de la Societat Catalana de Química pel treball de final de grau *Preparació de blocs quirals per a nous agents de penetració cel·lular*, realitzat pel grup de recerca Síntesi, Estructura i Reactivitat Química (SERQ). Va ser guardonat amb una beca del Programa Màster+ UB per cursar el Màster en Química Orgànica a la Universitat de Barcelona (UB). Actualment treballa com a ajudant investigador a la Fundació Bosch i Gimpera i és professor associat del Departament de Química Inorgànica i Orgànica a la Facultat de Química de la UB.

**Ona Illa** es va llicenciar en química per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), on va obtenir el doctorat en química l'any 2005. Actualment és professora agregada de la UAB i el seu àmbit de recerca és el disseny i la síntesi de noves molècules funcionals per a aplicacions biològiques i en l'àrea dels materials.

**Miriam Royo** és llicenciada en química per la Universitat de Barcelona (UB), on va obtenir el doctorat en química l'any 1994. Va realitzar una estada postdoctoral (1994-1996) al Beth Israel Deaconess Medical Center - Harvard Medical School de Boston, als Estats Units. El 1997 va tornar a la UB com a investigadora postdoctoral (1997-2001). El 2002 es va incorporar al Parc Científic de Barcelona, on va ser cap de la Unitat de Química Combinatòria fins al 2018. Actualment és investigadora científica a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), on lidera el grup de Sistemes Multivalents per Nanomedicina (MS4N) i el seu àmbit de recerca és la nanomedicina i la química biològica.

**Rosa M. Ortuño** és catedràtica de la Universitat Autònoma de Barcelona des del 1993, emèrita des del 2021, i va ser directora del Departament de Química d'aquesta universitat del 2013 al 2019. Ha liderat projectes sobre la síntesi, l'estudi supra-molecular i les aplicacions de nous surfactants, organogels i derivats peptídics. També ha col·laborat amb empreses del sector farmacèutic.