



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Síntesis de inhibidores de Atg4B y desarrollo de nuevos métodos de bioconjugación basados en derivados del ácido escuárico

Ana Bilbao Girona

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

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

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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE ATG4B Y DESARROLLO DE
NUEVOS MÉTODOS DE BIOCONJUGACIÓN BASADOS EN
DERIVADOS DEL ÁCIDO ESCUÁRICO**

Memoria presentada por Ana Bilbao Girona
para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Doctoranda:

Ana Bilbao Girona

Directores

Dra. Gemma Triola Guillem

Dr. Juan B. Blanco Canosa

Tutor

Dr. Antonio Delgado Cirilo

La presente tesis doctoral ha sido llevada a cabo en el Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC), el cual pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto otorgado (CTQ2013-44334-P) y el contrato predoctoral concedido (BES-2014-070026).

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a mi directora principal Gemma Triola por darme la oportunidad de realizar el proyecto de la presente tesis, por su soporte académico, por haberme guiado a lo largo de estos años y por haber aprendido tanto. En segundo lugar, dar las gracias a la incorporación en la última etapa de Juan Bautista por la ayuda e interés invertido durante mi estancia en el IRB, en la realización de los experimentos y por presentarme el mundo de los péptidos. Asimismo, me gustaría agradecer al grupo de investigación RUBAM, en especial al Dr. Antonio Delgado, Jose Luis Abad y Gemma Fabriàs por su ayuda recibida en los seminarios de química realizados semanalmente. Del mismo modo, destacar el apoyo recibido de sus doctorandos, por haberme acogido como una más de su grupo de investigación durante el transcurso de la tesis y aunque la mayor parte ya no estén en el centro, siguen siendo un soporte desde fuera y con los cuales mantengo una gran amistad. Como no, me gustaría resaltar a mi compañera Mireia Quintana, por todo el trabajo realizado en el artículo conjunto y por haberse convertido en un apoyo incondicional durante el transcurso de estos años tanto profesionalmente como a ámbito personal. El hecho de ser pioneras en la puesta a punto de un grupo de investigación no ha sido tarea fácil, por ello me gustaría resaltar también el soporte recibido por los postdocs Marc y Jose María pertenecientes al grupo del Dr. Ángel Guerrero en cuyo laboratorio se encontraba mi lugar de trabajo. Me gustaría darles las gracias por haberme acompañado durante estos años, por haberme acogido tan bien y por el soporte recibido. En especial quería mencionar a Raquel Calderón, Ana Pou y Mireia Quintana por el apoyo recibido en aquellos momentos de frustración en los que nada sale en la poyata, al mismo tiempo que compartir las alegrías, además de todas las experiencias, viajes y risas vividas. Igualmente me gustaría dar las gracias a esos ratitos de desconexión en cada comida con los compañeros de otros grupos de investigación que al final se han convertido en esta última etapa en grandes amigos como son Mercè, Raquel, Roser, Pol y Carlos, en la cual los nervios están a flor de piel y posiblemente haya sido la etapa más complicada. Como no agradecer a mis químicas preferidas de la “terreta” Laura y Olga, las cuales han sido un apoyo incondicional tanto profesionalmente como personalmente y a pesar de realizar nuestras tesis doctorales a quilómetros de distancia (Castellón-Barcelona-Madrid), han estado más cerca que nunca con nuestras conversaciones telefónicas infinitas y nuestras quedadas comentándonos esta etapa de la vida. Finalmente, y quizás los más importantes, muchas gracias a mi familia, especialmente a mis padres, por la educación que hemos recibido tanto mi hermana como

yo y los valores transmitidos. Por soportar esas llamadas telefónicas de desesperación de los últimos meses, por el apoyo moral recibido, por estar ahí siempre que los necesito, por el viaje exprés de cambio de aires en la última etapa y por repetirme siempre aquella frase que desde que me desplazé a Barcelona me han ido recordando, en especial en estos últimos meses: ¡Ánimo que estamos contigo!

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	15
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	41
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	2
1.- Tipos de autofagia	51
2.- Mecanismos de regulación.....	53
3.- Autofagia y enfermedades.....	58
3.1.- Enfermedades neurodegenerativas	59
3.2.- Infección, inflamación e inmunidad	60
3.3.- Enfermedades metabólicas.....	60
3.4.- Envejecimiento.....	61
3.5.- Cáncer	61
4.- Moduladores químicos de autofagia	64
4.1.-Inductores de autofagia.....	66
4.2.- Inhibidores de autofagia.....	69
5.- Atg4B, diana terapéutica de la autofagia	73
5.1.- Inhibidores de Atg4B	75
OBJETIVOS	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
1.- Desarrollo de un ensayo de cribado de alto rendimiento para la detección de inhibidores de Atg4B.....	83
2.- Análisis estructural computacional.....	88
3.- Cribado Virtual de Alto Rendimiento (HTVS).....	93
4.- Cribado Biológico.....	98
5.- Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores de Atg4B	105
5.1.- Síntesis de la imina simétrica NSC43949	105
5.2.- Derivados de NSC126353	107
5.3.- Derivados de NSC116384	108
5.3.1.- Síntesis de NSC611216 y su regioisómero	110
5.3.2.- Síntesis de análogos de NSC611216.....	113
5.3.3.- Optimización de la síntesis de 7-nitrobenz[cd]indol-2-(1H).....	120
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA.....	129

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN	145
1.- Modificación de proteínas.....	147
2.- Métodos clásicos para la modificación de proteínas	148
3.- Nuevos métodos de modificación de proteínas	152
3.1.- Métodos selectivos para el marcaje de aminoácidos no naturales.....	152
3.2.- Reacciones bioortogonales con grupos funcionales no presentes en aminoácidos naturales	153
3.2.1- Química click.....	154
3.3.- Bioortogonalidad con secuencias únicas de aminoácidos.....	159
3.4.- Métodos selectivos para el marcaje de aminoácidos naturales.....	164
3.5.- Modificación del extremo C-terminal y N-terminal de proteína	167
3.5.1.- Métodos de modificación del extremo C-terminal	167
3.5.2.- Métodos de modificación del extremo N-terminal.....	170
4.- Ácido escuárico y derivados.....	178
4.1.- Estructura y propiedades del ácido escuárico	178
4.2.- Síntesis y reactividad de derivados de ácido escuárico	178
4.3.-Aplicaciones generales.....	180
4.4.- Desarrollo de un método específico de modificación de proteínas basado en escuaratos.....	183
OBJETIVOS	185
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	189
1.-Aplicaciones de los derivados del ácido escuárico.....	191
2.- Modificación específica de proteínas con diésteres del ácido escuárico	194
2.1.- Modificación de proteínas con dibutil escuarato.....	194
2.1.1- Modificación de la insulina con dibutil escuarato	194
2.1.2.- Digestión proteica de una insulina modificada.....	199
2.1.3.- Modificación de la amina N-terminal a través de una reacción de transaminación.....	201
2.1.4.- Estudio de las reactividades de α -amina y ϵ -amina a diferentes pH	203
2.1.5- Modificación de la ubiquitina con dibutil escuarato	205
2.1.6.- Modificación de proteínas en dos etapas.....	209
2.2.- Modificación de proteínas con di-3-butino escuarato (41).....	210
2.2.1.- Optimización de la reacción con péptidos	211

2.2.2.- Funcionalización de proteínas con di-3-butino escuarato (41).....	216
3.- Modificación de proteínas con mono-escuaramidas y tioésteres del ácido escuárico	223
3.1.- Modificación de proteínas con tioésteres del ácido escuárico 57, 60.....	229
CONCLUSIONES	237
BIBLIOGRAFÍA.....	241
SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	255
1.- Síntesis y caracterización de productos.....	257
1.1.- Consideraciones generales	257
1.2.- Síntesis de nuevos inhibidores de Atg4B	259
1.2.1.- Síntesis de la imina simétrica NSC43949	259
1.2.2.- Síntesis de NSC611216 y su regioisómero	260
1.2.3.- Síntesis de análogos de NSC611216	266
1.2.4.- Optimización de la síntesis de 7-nitrobenz[<i>cd</i>]indol-2-(1 <i>H</i>)	275
1.3.- Síntesis de escuaratos, mono-escuaramidas y tioésteres del ácido escuárico.....	278
1.3.1.- Síntesis de diésteres del ácido escuárico.....	278
1.3.2.- Síntesis de derivados de ácido escuárico aromáticos	278
1.3.3.- Síntesis de mono-tioescuarato 54 y sus derivados	286
2.- Síntesis de péptidos en fase sólida	292
2.1.- Consideraciones generales	292
2.2.- Test de identificación de aminas primarias	292
2.3.- Acondicionamiento de la resina.....	293
2.4.- Incorporación de aminoácidos	293
2.5.- Eliminación del grupo protector Fmoc.....	293
2.6.- Desanclaje de la resina.....	294
2.7.- Condiciones de purificación	294
2.8.- Péptidos sintetizados en fase sólida (SPPS).....	295
3.- Estudio de modificación de proteínas	300
3.1.- Proteínas	300
3.2.- Modificación específica de proteínas con diésteres del ácido escuárico.....	301
3.2.1.- Modificación de proteínas con dibutil escuarato.....	301
3.2.2.- Modificación de proteínas con di-3-butino escuarato (41).....	308

3.3.- Modificación de proteínas con mono-escuaramidas y tioésteres del ácido escuárico	316
BIBLIOGRAFÍA.....	323
RESUMEN.....	327
ANEXOS	331

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

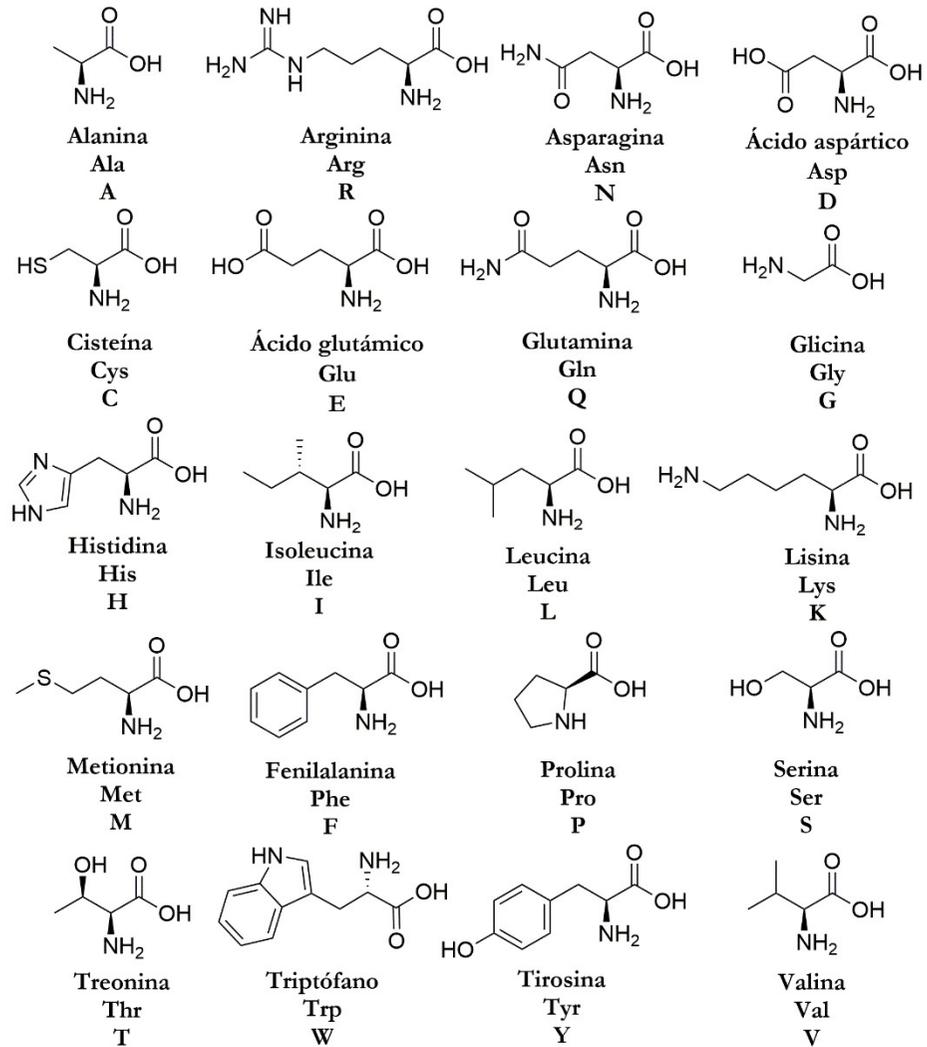
2-CTC	Resina de cloruro de 2-clorotritilo
3-MA	3- Metiladenina
ABL	Quinasa Abelson
ACN	Acetonitrilo
ADC	Conjugado anticuerpo-fármaco, "Antibody-Drug Conjugates"
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AnkX	Fosfocolina transferasa
ATG	Genes relacionados con la autofagia, "AuTophagy-related"
ATP	Adenosín trifosfato
BC	O ² -benzilcitosina
BG	O ⁶ -benzilguanina
BirA	Ligasa de la biotina
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
BSA	Albúmina de suero bovino, "Bovine Serum Albumine"
Btk	Tirosina quinasa de Bruton
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDI	Carbonildiimidazol
CMA	Autofagia mediada por chaperonas, "Chaperone-Mediated Autophagy"
COSY	Espectroscopia de correlación, "Coorelation Spectroscopy"
CQ	Cloroquina
CuAAC	Cicloadición azida-alquino catalizada por cobre, "Copper (I)-catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition"
DBCO	Dibenzociclooctino
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
DCM	Diclorometano
DECL	Biblioteca química codificada por ADN, "DNA-Encoded Chemical Libraries"
DIEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT-MM	Cloruro de 4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio
DNCB	2,4-Dinitroclorobenceno
DSP	Ditiobis(succinimidil propionato)
EBSS	Solución salina de Earle, "Earle's Balanced Salt Solution"
EDC.HCl	Hidrocloruro de etilcarbodiimida
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico, "Epidermal Growth Factor Receptor"
EM	Espectrometría de Masas
EPL	Ligación de proteínas expresadas, "Expressed Protein Ligation"
eq.	Equivalente

ESI	Ionización por electrospray, "ElectroSpray Ionization"
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
FBS	Cribado de fragmentos, "Fragment-Based Screening"
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos, "Food and Drug Administration"
FGE	Enzima generadora de formilglicina, "Formylglycine Generating Enzyme"
FIP200	Familia de quinasas de adhesión focal
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonil
Fmoc-Cl	Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonil
FRET	Transferencia de energía de resonancia Förster/fluorescencia, "Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer"
GABARAP	"GABA Receptor Associated Protein"
GFP	Proteína verde fluorescente, "Green Fluorescent Protein"
Gmb	Ácido 4-(guanidinometil)benzoico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G, "G-Protein-Coupled Receptor"
hAGT	O ⁶ -alquilguanina-DNA alquil transferasa humana
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
HCQ	Hidroxicloroquina
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano 2, "Human Epidermic Receptor 2"
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia, "High Performance Liquid Chromatography"
HTS	Cribado de alto rendimiento, "High-Throughput Screening"
HTVS	Cribado virtual de alto rendimiento, "High-Throughput Virtual Screening"
I+D	Investigación y Desarrollo
IARC	"International Agency for Research on Cancer"
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IgG	Inmunoglobina G
InsP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IR	Radiación Infrarroja
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LAMP-2A	Proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A
LBVS	Cribado virtual basado en el ligando, "Ligand-Based Virtual Screening"
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, "Liquid Chromatography–Mass Spectrometry"
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, "Liquid Chromatography tandem–Mass Spectrometry"
LDT	Química del tosilo dirigida por ligando, "Ligand-Directed Tosyl"
LplA	Ligasa del ácido lipoico

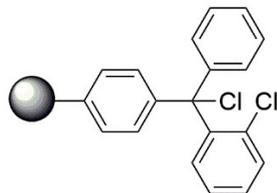
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization"
MAP1-LC3	"Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3"
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos, "Mitogen-Activated Protein Kinases"
MeOH	Metanol
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos, "Mammalian Target of Rapamycin"
<i>mw</i>	Irradiación por microondas, "MicroWave irradiation"
<i>m/ξ</i>	Relación masa-carga
NCI	Instituto Nacional del Cáncer, "National Cancer Institute"
NCL	Ligación química nativa, "Native Chemical Ligation"
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
NEt ₃	Trietilamina
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NIH	"National Institute of Health"
NTA	Ácido nitrilotriacético, "Nitrilotriacetic Acid"
PAINS	"Pan-Assay Interference Compounds"
PCR	Reacción en cadena de polimerasa, "Polymerase Chain Reaction"
PDB	"Protein Data Bank"
PDD	"Phenotypic Drug Discovery"
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Poli(etilenglicol)
PEG-1	Compuesto 42
PEG-2	Ácido 15-Azido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PLA2	Fosfolipasa A2
PLP	Piridoxal fosfato
POA	Porcentaje de actividad, "Percentage Of Activity"
POI	Proteína de interés, "Protein Of Interest"
PPtasas	Fosfopanteteinil transferasas
PtdIns3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PTS	Protein Trans-Splicing
RAR-α	Receptor α del ácido retinoico, "Retinoic Acid Receptor α"
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAR	Relación estructura-actividad, "Structure-Activity Relationship"
SBDD	Diseño de fármacos basado en la estructura, "Structure-Based Drug Discovery"
SBVS	Cribado virtual basado en estructuras, "Structure-Based Virtual Screening"
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato
SNARE	"Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein REceptor"
SNC	Sistema nervioso central

SPAAC	"Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition"
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida, "Solid Phase Peptide Synthesis"
SPS	Sistema de purificación de disolventes
SrtA	Sortasa A
TCEP.HCl	"Tris (2-Carboxyethyl) phosphine Hydrochloride"
TDD	"Targeted Drug Discovery"
TES	Trietilsilano
TFA	Ácido trifluoroacético
TGasa	Transglutaminasa
THF	Tetrahidrofurano
THPTA	"Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine"
TIC	Cromatograma total de los iones generados, "Total Ion Chromatogram"
TMSCN	Cianuro de trimetilsililo
TOF	Tiempo de vuelo, "Time Of Flight"
TR-FRET	"Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer"
UAA	Amino ácidos no naturales, "Unnatural Amino Acids"
UBLs	"UBiquitin-Like-System"
ULK	"Unc-51 Like autophagy Kinase"
UPLC	"Ultra Performance Liquid Chromatography"
UPS	Sistema ubiquitina-proteosoma, "Ubiquitin-Proteosome System"
UV	Radiación Ultravioleta
UVRAG	"UV radiation Resistance-Associated Gene product"
Vps	"Vacuolar Protein Sorting"
VS	Cribado virtual, "Virtual Screening"
YFP	Proteína fluorescente amarilla, "Yellow Fluorescent Protein"

AMINOÁCIDOS



RESINA



Cloruro de 2-clorotritilo
(2-CTC)

INTRODUCCIÓN GENERAL

Una de las características principales de los países desarrollados es la presencia de una sociedad cada vez más envejecida. De hecho, el envejecimiento, el consecuente cambio demográfico y su relación con el bienestar son unos de los desafíos prioritarios incluidos en el programa marco de investigación de la Unión Europea, Horizonte 2020. Un aumento de la longevidad y la esperanza de vida están íntimamente asociados a un incremento de los casos de demencia, enfermedades cardiovasculares y cáncer lo que conlleva importantes consecuencias socioeconómicas. En este contexto, estrategias dirigidas a entender las causas y mecanismos moleculares que regulan procesos fisiológicos y patológicos, la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de estrategias destinadas a tratar estas enfermedades son algunas de las prioridades principales de la investigación actual.

El descubrimiento de nuevos fármacos está en crisis debido al bajo número de medicamentos aprobados en relación con la gran inversión hecha en investigación y desarrollo (I+D) por las empresas farmacéuticas (Figura 1).¹ Además, el coste de un nuevo fármaco se ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas, siguiendo un porcentaje medio anual de 13% desde 1950. Por tanto, hay muchos indicios que sugieren que este modelo de negocio es insostenible y es esencial introducir cambios que permitan transformar la productividad en esta área.²

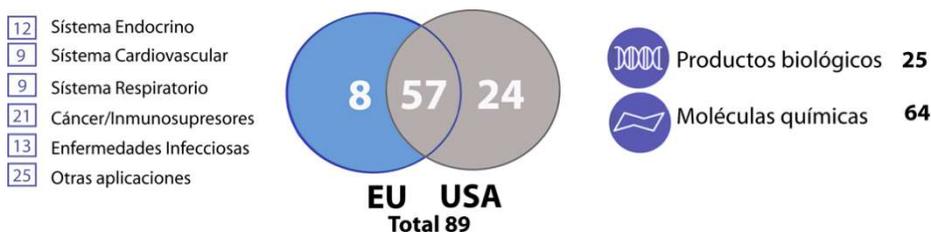


Figura 1. Medicamentos aprobados el año 2015 tanto en la Unión Europea (EU) como en Estados Unidos (USA) y sus indicaciones terapéuticas. 64 de estos compuestos eran moléculas químicas mientras 25 de ellos tenían un origen biológico. La mayoría de estos nuevos medicamentos (71.9%) fueron desarrollados por las grandes empresas farmacéuticas (Fuente: NDA, <https://www.ndareg.com/europe-vs-usa-new-drug-product-approvals-in-2015/>).

Los grandes costes y la baja productividad en I+D de las compañías farmacéuticas conllevan a la búsqueda de nuevas estrategias. Una de las aproximaciones actuales de la industria es acercarse a instituciones académicas y hospitales docentes, para beneficiarse de las innovaciones que se produzcan en estas áreas.³ Además, el incremento de nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan los procesos patológicos ha permitido la identificación de nuevos marcadores y dianas terapéuticas y el desarrollo de **medicamentos personalizados**, más eficientes y con menores efectos secundarios, como

los agentes antitumorales basados en hormonas, los inhibidores específicos de quinasas o los anticuerpos monoclonales (Figura 2).

Se conocen alrededor de 538 quinasas en el genoma humano, algunas de ellas con papeles esenciales en el inicio y progresión de ciertos cánceres. El intenso trabajo realizado en las últimas décadas ha permitido que en estos momentos existan 37 inhibidores de quinasas aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration) y más de 150 en ensayos clínicos.⁴ Entre las dianas se incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, epidermal growth factor receptor), la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) o la quinasa Abelson (ABL), entre otros. El desarrollo de un inhibidor específico de esta última quinasa supone uno de los ejemplos clásicos de cómo el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan enfermedades puede facilitar el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas. La fusión de la quinasa ABL con el gen BCR da lugar a BCR-ABL, una proteína con una actividad quinasa anormal que conlleva una excesiva proliferación y que está asociada con la leucemia mieloide crónica. El estudio cristalográfico de la proteína por rayos X facilitó el diseño de moléculas basadas en la estructura del centro activo y permitió obtener un inhibidor específico de esta quinasa (Imatinib (Gleevec®)) que causa la remisión completa en un gran porcentaje de pacientes afectados por este tipo de leucemia.⁵

Otra estrategia para superar el modelo actual de I+D se centra en el desarrollo de moléculas de tipo biológico, tanto proteínas como anticuerpos.² Ejemplos relevantes incluyen tratamientos hormonales dirigidos al receptor de estrógenos o la gran revolución que ha supuesto el desarrollo de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ejercer su función a través de diferentes mecanismos de acción. Existen anticuerpos que reconocen de manera específica células tumorales y su unión es una señal para que el sistema inmune inicie la destrucción de la célula. Este es el caso de Rituximab, dirigido al antígeno CD20 de la superficie de los linfocitos B y que se emplea para el tratamiento de linfomas de células B. Los anticuerpos monoclonales también pueden actuar bloqueando receptores necesarios para el crecimiento celular. Por ejemplo, Trastuzumab se une al factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, human epidermic receptor 2), niveles elevados del cual han sido detectados en la superficie de células tumorales de cáncer de mama y estómago.

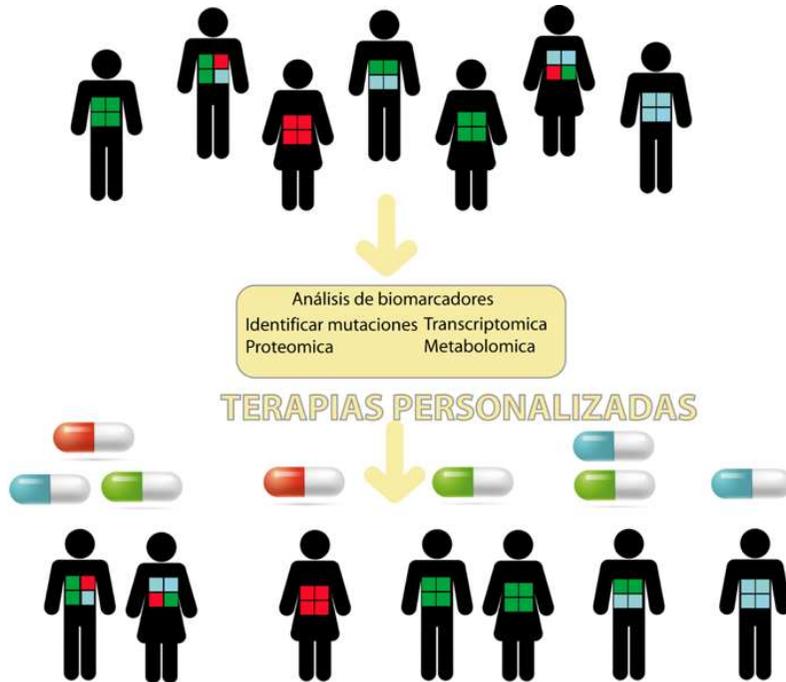


Figura 2. Mejoras en el diagnóstico permitirán el desarrollo de terapias personalizadas para el tratamiento de enfermedades (esta imagen ha sido preparada utilizando recursos de Freepik.com).

Se está trabajando también de manera intensa no sólo en la identificación de estas entidades médicas de tipo biológico, sino también en el desarrollo de métodos adecuados para su preparación y modificación. Por ejemplo, la modificación de proteínas mediante conjugación covalente con moléculas de polietilenglicol (PEG), permite aumentar su estabilidad frente proteasas, facilitar la solubilidad acuosa, reducir su inmunogenicidad y mejorar sus propiedades farmacéuticas. Esta modificación se ha utilizado con éxito en medicamentos aprobados como la insulina⁶ o el interferón α -2a o 2b para el tratamiento de la hepatitis C.⁷

Otra de las limitaciones más importantes a las que se enfrenta la industria farmacéutica es la falta de **nuevas dianas** con potencial interés terapéutico. Por ejemplo, el 20% de los programas de desarrollo de fármacos contra el cáncer de la industria farmacéutica se centra en tan solo 8 proteínas.⁸ El genoma humano incluye unas 20.000 proteínas, de las cuales se considera que alrededor de 3800 pueden estar relacionadas con enfermedades. A pesar de esto, los medicamentos aprobados en estos momentos por la FDA solo se dirigen a 667 proteínas humanas y 189 proteínas de patógenos, por lo que la identificación de nuevas dianas es un campo creciente de investigación.⁹ De manera similar, un análisis de los

medicamentos aprobados en las últimas tres décadas revela que las dianas se distribuyen por familias, siendo la más enriquecida el grupo de los receptores incluyendo los receptores acoplados a proteína G (GPCR, G-protein coupled receptor), receptores nucleares o receptores de tirosina quinasa (53%). El 22% de los medicamentos están dirigidos a enzimas y el 17% a proteínas transportadoras (Figura 3).

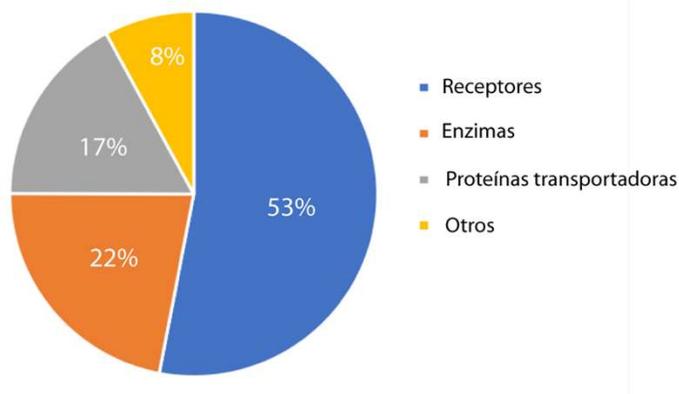


Figura 3. Principales familias de proteínas como dianas farmacológicas. Distribución de dianas proteicas humanas por familia de genes. La gran mayoría (563 medicamentos) están dirigidos a receptores acoplados a proteína G, tirosina quinasa o receptores nucleares. 234 medicamentos bloquean hidrolasas, ligasas u oxidoreductasas mientras que 181 medicamentos están dirigidos a proteínas transportadoras (canales iónicos sensibles a voltaje, transportadores activos, etc.).¹⁰

Así pues, un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares que regulan procesos celulares tendría que facilitar la identificación de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas que tras su validación pueden servir para el desarrollo de nuevos tratamientos. Esta categoría puede incluir proteínas (con actividad enzimática o no), factores de transcripción, modificaciones epigenéticas y también interacciones proteína-proteína y lípido-proteína, entre otras.

Existen dos tipos principales de ensayos, los que estudian la actividad de una diana molecular específica (Targeted Drug Discovery, TDD), y los que investigan el efecto global sobre un modelo celular o animal mediante un ensayo de tipo fenotípico (Phenotypic Drug Discovery, PDD). TDD y PDD son enfoques complementarios para el descubrimiento de fármacos, cada uno con sus fortalezas y debilidades.

En un inicio, el descubrimiento de nuevos fármacos se basó en PDD. En la década de los 80, los avances en biología molecular y genómica facilitaron la obtención y purificación de proteínas y por tanto el desarrollo de ensayos dirigidos a **dianas específicas** (TDD). Los TDD suelen ser ensayos bioquímicos, aunque también pueden ser celulares, que se basan

en el conocimiento previo de la diana molecular, ya sea por su relación establecida con una determinada enfermedad o con la intención de explorar una hipótesis de tratamiento (Figura 4A). El uso de TDD junto con el cribado de grandes librerías de compuestos, facilitado por los avances en química orgánica, ha sido el punto de partida para la identificación de muchos fármacos y es una estrategia que se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica.



Figura 4. A) Descubrimiento de fármacos a partir de TDD. B) Descubrimiento de fármacos a partir de PDD.

En contraste, los **ensayos fenotípicos** (PDD) se basan en la identificación de compuestos que en estudios celulares sean capaces de modular un fenotipo asociado a una enfermedad determinada, generalmente desconociendo su diana o mecanismo de acción (Figura 4B). Aunque la industria farmacéutica es reacia a utilizar medicamentos con mecanismo de acción desconocido, existen muchos medicamentos que han sido identificados en ensayos fenotípicos.¹¹ Una gran cantidad de fármacos aprobados por la FDA (especialmente en la década de 1970 y con anterioridad) fueron descubiertos a través de ensayos fenotípicos y fueron aprobados antes de identificar su mecanismo de acción o diana específica. Ejemplos relevantes incluyen algunos antituberculosos tales como la pirazinamida, la tiosemicarbazona o el ácido paraaminosalicílico,¹² o la aspirina (ácido acetilsalicílico), cuyo mecanismo de acción tardó casi 100 años en ser determinado.¹³ Otro ejemplo es Ezetimibe (Zetia), un inhibidor de la absorción de colesterol que obtuvo la aprobación en 2002 como medicamento para reducir el colesterol sin tener una diana específica conocida, que posteriormente se identificó como el transportador de colesterol NPC1L1.

Los ensayos fenotípicos también se utilizan como complemento de ensayos de TDD para evaluar los efectos de los compuestos sobre la viabilidad celular o en modelos celulares de la diana a estudiar. Aunque los ensayos basados en el conocimiento de la diana han sido los más utilizados durante los últimos veinte años, el desarrollo de nuevos métodos de lectura (microscopios de fluorescencia automatizados) y nuevos modelos celulares (células transfectadas de manera estable, ensayos basados en genes reporteros) ha hecho resurgir los ensayos fenotípicos tanto en academia como en la industria farmacéutica.^{14,15} Además,

el estudio de compuestos directamente en ensayos celulares permite valorar su actividad celular, asegurando su paso a través de la membrana y descartando que posibles efectos secundarios en otras dianas disminuyan el efecto global. La mayor desventaja de estos ensayos es la imposibilidad de optimizar las propiedades de los candidatos clínicos sin conocer previamente el mecanismo de acción. Además, existen aún ciertas reticencias en la industria debido a posibles problemas de seguridad o toxicidad derivados del desconocimiento del sitio de acción. Otro problema es el elevado coste y tiempo necesario para identificar las dianas correspondientes mediante estudios proteómicos basados en análisis por espectrometría de masas (EM), métodos génicos o computacionales, así como la posterior validación mediante estudios bioquímicos o biofísicos. Pero a la vez, este inconveniente se convierte en una ventaja al permitir la identificación de nuevas dianas terapéuticas que amplían el abanico de posibilidades existentes (Figura 5). En este contexto tiene un papel muy relevante la química biológica, entendida como el uso de moléculas químicas para estudiar, interrogar y perturbar procesos biológicos, permitiendo en muchos casos establecer relaciones desconocidas entre fenotipos y dianas. Por ejemplo, el desarrollo de métodos de **identificación de dianas** (**modificación de moléculas activas** con grupos bioortogonales que faciliten su inmovilización o enriquecimiento, moléculas que permitan el marcaje por fotoafinidad, etc.), han permitido grandes avances en este campo de investigación. Además, una vez identificadas las dianas, es necesario **validar** esa interacción utilizando múltiples métodos tanto bioquímicos como biofísicos. Algunos de ellos requieren el uso de proteínas recombinantes marcadas con fluoróforos o con una biotina para facilitar su detección o inmovilización en superficies o resinas. Esto no sería posible sin el desarrollo previo de métodos químicos para la **modificación de proteínas** que han permitido estudiar y caracterizar sus interacciones tanto con ligandos como con otras proteínas.

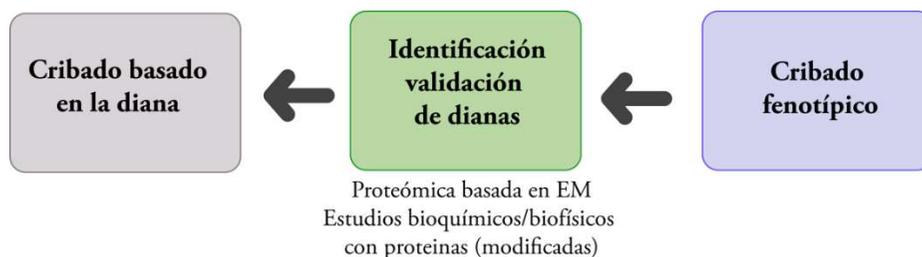


Figura 5. En los cribados basados en la diana, las moléculas son estudiadas frente una diana determinada. Suele tratarse de ensayos bioquímicos, aunque también pueden ser realizados en células. Los cribados fenotípicos miden una respuesta celular y requieren de estrategias posteriores de identificación y validación de dianas.

Otra limitación importante en el descubrimiento de fármacos es la **identificación de nuevas moléculas**. Durante los años 90, el desarrollo de métodos de producción de proteínas recombinantes y los avances en el establecimiento de ensayos de alto cribado, llevaron a la necesidad de crear grandes bibliotecas de compuestos químicos para su evaluación. Con el paso del tiempo se comprobó que el índice de éxito de estas bibliotecas moleculares o quimiotecas, hechas en muchos casos mediante técnicas de química combinatoria, era más bien bajo. La estructura plana de muchos de estos compuestos, la elevada proporción de grupos aromáticos, el bajo porcentaje de carbonos sp^3 y centros quirales parecen ser algunas de las razones de esta baja tasa de éxito.

La miniaturización de los ensayos HTS (Cribado de alto rendimiento, del inglés, “High Throughput Screening”) y el uso de robots han seguido fomentando el uso de grandes quimiotecas de compuestos (100.000-300.000). Pero las bibliotecas actuales suelen ser mucho más diversificadas, intentan explorar una gran cantidad del espacio químico, incluyen derivados de productos naturales, productos con actividad ya conocida para ayudar a determinar vías de señalización implicadas y moléculas de pequeño tamaño compuestas por estructuras privilegiadas. Este término, utilizado por primera vez por Ben Evans reconoce estructuras pequeñas, no planas, como benzodiazepinas o índoles, que de manera repetida suelen presentar actividades biológicas, que tienen grandes posibilidades para introducir sustituyentes que modifiquen su conformación tridimensional y que sirven por tanto como base para la posterior derivatización y preparación de compuestos con mayor afinidad y selectividad (Figura 6).¹⁶ Muchas de estas estructuras han sido utilizadas para la preparación de quimiotecas destinadas a la identificación de nuevos fármacos.¹⁷

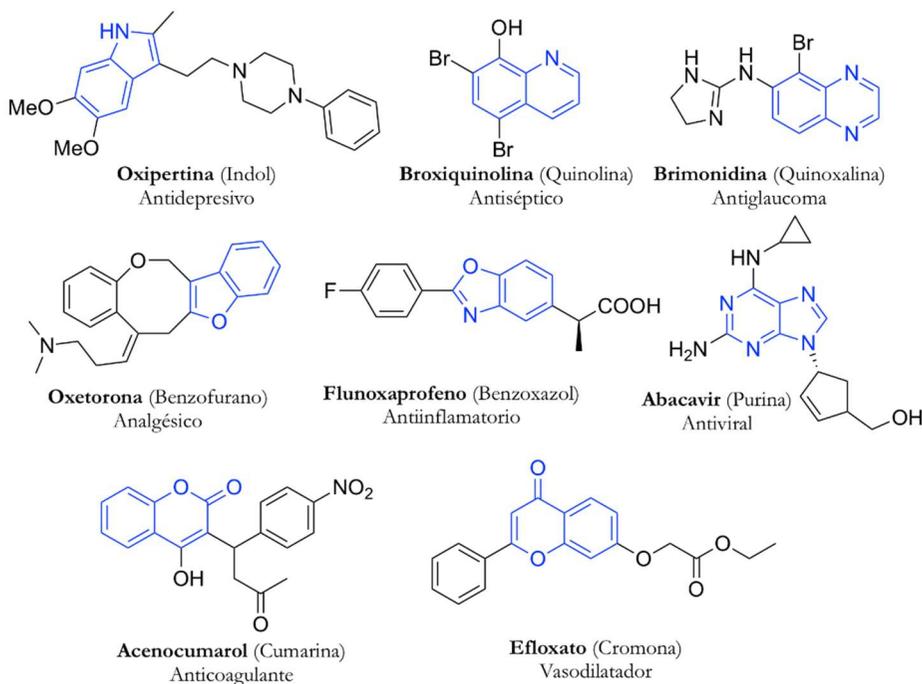


Figura 6. Ejemplos de estructuras privilegiadas presentes en los fármacos.

El contenido de algunas de las bibliotecas comerciales depende también del tipo de dianas a las que se quieran dirigir. Es lo que se conoce como cribado centrado o *focused screening*. Actualmente, muchos proveedores ofrecen quimiotecas especializadas de compuestos destinados a quinasas, GPCR, receptores nucleares, canales iónicos o dianas del sistema nervioso central (SNC). La naturaleza de estas colecciones de compuestos y los principios utilizados en el diseño de cada una, varían en función de la diana a la que se dirigen.¹⁸ Por ejemplo, las bibliotecas dirigidas a quinasas aprovechan la homología asociada con el sitio de unión a ATP (adenosín trifosfato). Los GPCRs se caracterizan por ser receptores transmembrana formados por siete dominios. Varios años de estudio de estos receptores han permitido la identificación de clases de compuestos que demuestran una marcada afinidad por estos dominios transmembranales. De manera similar, están disponibles quimiotecas de compuestos destinadas a receptores de hormonas nucleares y canales iónicos basadas en inhibidores previamente conocidos. Los compuestos de las bibliotecas que se dirigen al SNC poseen propiedades físicas comunes como por ejemplo la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. En definitiva, estas bibliotecas ofrecen mayor probabilidad de identificar compuestos activos, aunque presentan ciertos inconvenientes. El uso repetido de este tipo de librerías por diferentes instituciones puede complicar la

posible patentabilidad de los compuestos identificados y dificultar las relaciones entre estructura y actividad.

Métodos para la identificación de candidatos clínicos

Una de las consideraciones más importantes a tener en cuenta en el descubrimiento de fármacos es la elección de la estrategia a seguir para identificar compuestos activos. Algunas de las estrategias existentes son las siguientes: el cribado aleatorio de alto rendimiento (HTS),¹⁹ el diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD)²⁰, el cribado de fragmentos (FBS)²¹, la utilización de quimiotecas seleccionadas²⁰ y más recientemente, bibliotecas químicas codificadas por ADN(DECL) o presentaciones sobre fago.²² La selección de cada una de las metodologías depende de varios factores como son los costes generales, el acceso a quimiotecas o a métodos de detección adecuados, las demandas técnicas de cada ensayo o el tipo de ensayo biológico, entre otros factores. En los últimos veinte años, las tecnologías de cribado han evolucionado rápidamente. La repentina afluencia de nuevas dianas terapéuticas ha sido clave para impulsar el desarrollo de ensayos automatizados y miniaturizados para aumentar la velocidad y reducir el coste de la detección. Esta metodología se ha convertido en rutinaria en la industria farmacéutica e incluso se ha trasladado a los centros académicos.²³ La tecnología de cribado puede abarcar una gran variedad de colecciones de compuestos, desde miles de millones a cientos de ellos.

- **Cribado aleatorio o cribado de alto rendimiento (HTS, del inglés “High-Throughput Screening”).** Es la identificación de moléculas de pequeño tamaño a través de colecciones de compuestos aleatorios que pueden albergar gran cantidad de compuestos (10^5 - 10^6) o bien colecciones de menor tamaño. Las técnicas de HTS se utilizan universalmente como un método práctico en busca de nuevos puntos de partida para la identificación de compuestos biológicamente activos²⁴ y como método para comprender mejor el papel de un proceso bioquímico particular. La principal ventaja de los ensayos de tipo HTS es la capacidad de acelerar la detección primaria. Los rangos de concentración funcional de las moléculas identificadas normalmente van desde nanomolar a micromolar. Las técnicas de tipo HTS han sido esenciales en el descubrimiento de fármacos²⁵ y siguen siendo el método de elección en la industria farmacéutica. Aunque presenta varios inconvenientes como son el alto coste asociado a la robotización, el mantenimiento de las librerías y el tiempo requerido para el procesado de resultados. Últimamente, se complementan también con otro tipo de métodos como SBDD o el uso de métodos computacionales.

- **Diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD**, del inglés “Structure-Based Drug Discovery”). Se fundamenta en el diseño de compuestos activos en base al conocimiento de las estructuras tridimensionales (determinada ya sea por rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN)) de las dianas terapéuticas. Esta información permite determinar las características del sitio de unión (centro activo o alostérico) del ligando de tal manera que se pueda diseñar una estructura química que establezca una buena interacción con él. Un requisito esencial en estos estudios es la comprensión de los aspectos espaciales y energéticos que afectan a las afinidades de unión de los complejos proteína-ligando. El proceso suele iniciarse a partir de la interacción de un inhibidor o *hit* (conocido previamente o identificado durante el proceso) que es caracterizado mediante cristalización o estudios de interacción por RMN. Una vez determinadas la forma y la naturaleza química del sitio de unión y las posibles interacciones intermoleculares con el ligando, esta información permite el diseño de ligandos más potentes y selectivos (*leads*). Esta tecnología ha demostrado ser eficiente y en varios casos las tasas de éxito alcanzadas han sido significativamente mayores que utilizando ensayos de tipo HTS.^{26,27} Si a este estudio de las bases moleculares de la interacción, junto con el conocimiento de la estructura tridimensional de la diana biológica en el proceso se añaden métodos computacionales para el cribado de quimiotecas virtuales de compuestos nos encontramos ante el cribado virtual de alto rendimiento o HTVS.

- **Cribado virtual de alto rendimiento (HTVS**, del inglés “High-Throughput Virtual Screening”). El cribado virtual utiliza grandes quimiotecas de compuestos que están disponibles comercialmente. Se seleccionan computacionalmente y se estudia su interacción contra la estructura conocida de la diana de interés mediante programas de acoplamiento molecular (docking) con la finalidad de predecir la conformación preferida del ligando en el sitio de unión. Posteriormente se estudia la energía libre de unión entre la proteína y el ligando en cada postura de acoplamiento y se estima la afinidad de la unión mediante las funciones de puntuación o *scoring*. Los compuestos identificados que presentan una mayor energía de unión, y por lo tanto pueden unirse de manera más eficaz al sitio de unión, son luego estudiados experimentalmente.^{26,28,29}

Las *ventajas* de utilizar el cribado virtual basado en la estructura son las siguientes: reducción del tiempo y de los costes del proceso de selección de millones de moléculas pequeñas en comparación con HTS, ya que no hay necesidad de poseer compuestos físicamente para realizar el proceso de selección. Además, se ha estimado que los métodos experimentales poseen un porcentaje de éxito inferior a 1 por cada 10.000 compuestos sintetizados, al

estar basados fundamentalmente en técnicas de ensayo y error, mientras que la tasa de éxito del cribado virtual es de 100 a 1000 veces mayor,^{30,31} obteniendo en algunos casos moléculas activas en el rango nM. Las técnicas de HTVS han sido usadas con éxito en la identificación de inhibidores de la anhidrasa carbónica para el tratamiento del glaucoma,³² inhibidores de la proteasa del VIH, fármacos para el tratamiento de la malaria o inhibidores del receptor de dopamina D3, entre otros. El cribado virtual presenta también algunas *desventajas*, como por ejemplo que los compuestos identificados por HTS son generalmente más potentes que los compuestos identificados por VS. Además, se conoce que las moléculas de agua tienen un papel importante en el proceso de unión de muchos fármacos. Sin embargo, una práctica habitual del cribado virtual es eliminar todas las moléculas de agua de solvatación presentes en la estructura de la proteína, dificultando así el proceso de identificación. Al mismo tiempo existe una elevada complejidad en los cálculos de acoplamiento debido a la flexibilidad estructural del receptor. Estas propiedades dificultan predecir con precisión la unión de los ligandos a la proteína.

- **Cribado de fragmentos (FBS**, del inglés “Fragment-Based Screening”). Se basa en el análisis de bibliotecas de unos pocos miles de compuestos (a diferencia de las decenas de miles o incluso millones en HTS) de bajos pesos moleculares (<300-200 Da), probados a elevadas concentraciones (rango milimolar). Este método fue desarrollado por Shuker en 1996³³ y actualmente se lleva a cabo de manera rutinaria en muchas compañías farmacéuticas y laboratorios académicos como un método alternativo para identificar ligandos de proteínas.^{34,35} Hay un número de metodologías mediante las cuales se pueden analizar los fragmentos como son RMN, EM y cristalografía de rayos X.³⁶ De entre estas, destaca la técnica de RMN, ya que es ideal para la detección de ligandos de baja afinidad y es una de las más productivas identificando pequeñas moléculas que actúan de inhibidores sobre una gran variedad de dianas. Tras la identificación del fragmento activo, la idea es la obtención de compuestos de afinidad optimizada (*leads*) o mejores propiedades fisicoquímicas y ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) utilizando varias estrategias como son la síntesis de análogos, sustituciones o expansiones del fragmento inicial, la combinación con elementos de un sustrato conocido, inhibidor u otro fragmento creando así una molécula híbrida o el ensamblaje de fragmentos *in situ* que abarca áreas como la química combinatoria. El cribado de fragmentos ha facilitado por ejemplo la identificación de compuestos que bloquean la unión a ADN de la proteína E2 del virus del papiloma humano.³⁷ Además, en estos momentos más de 30 medicamentos derivados de fragmentos están incluidos en ensayos clínicos.³⁸

- **Bibliotecas químicas codificadas por ADN (DECLs**, del inglés “DNA-Encoded Chemical Libraries”). Esta tecnología emergente permite la síntesis y cribado de colecciones muy grandes (típicamente $> 10^8$) de moléculas pequeñas mediante su conjugación a fragmentos de ADN, que sirven como códigos de barras de identificación amplificables utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, “polymerase chain reaction”).²² Se trata de una técnica análoga al phage display (presentación sobre fago), en la que grandes librerías de anticuerpos o péptidos son mostrados en la superficie de fagos, permitiendo identificar moléculas que presentan gran afinidad con un ligando específico.³⁹

La tecnología DECL permite preparar y evaluar bibliotecas de colecciones de moléculas pequeñas con tamaños antes inconcebibles. Como principales inconvenientes habría que mencionar que los candidatos obtenidos tienden a ser de gran tamaño y presentan bajas eficiencias de ligando. Además, la conjugación con ADN puede enmascarar problemas potenciales de solubilidad que solo serán evidentes al sintetizar la molécula identificada. Otro desafío importante es la necesidad de ampliar el tamaño de la biblioteca mientras se preserva las características farmacocinéticas de los compuestos, así como su pureza. Para este fin, será necesario identificar y optimizar reacciones químicas compatibles con el ADN. Esta tecnología tiene un impacto cada vez mayor en el proceso de descubrimiento de medicamentos, no solo en la industria farmacéutica sino también en el mundo académico.

En este apartado se ha hecho un repaso sobre las técnicas de cribado para la identificación de compuestos activos. En la actualidad todos los métodos descritos coexisten y pueden ser complementarios. Recientemente, en un estudio publicado en la revista *Journal of Medicinal Chemistry* se describe el origen de los candidatos clínicos publicados entre 2016 y 2017. El 43% de estos candidatos surgieron a partir de compuestos ya activos, el 29% de cribados aleatorios, mientras que un 14% se obtuvieron por cribados de fragmentos. También se detectaron compuestos activos utilizando métodos de *focused screening* con quimiotecas especializadas (con una estructura química común o en base al conocimiento previo de la diana, 8%), o librerías codificadas por ADN (1%).⁴⁰

Aparte de los métodos basados en el cribado de grandes librerías de compuestos o fragmentos, existen también otras aproximaciones para la identificación de moléculas activas.

- **Reposicionamiento de compuestos activos caracterizados para otras dianas.** El reposicionamiento de medicamentos conocidos para el tratamiento de otras enfermedades es una estrategia muy atractiva para la industria farmacéutica actual, ya que al disponer de datos de su eficacia y principalmente de su toxicidad o tolerancia, permite acortar las fases de descubrimiento requiriendo así menos tiempo y coste para su lanzamiento al mercado. Además, si la estrategia de reposicionamiento funciona, permite identificar nuevas vías y dianas que podrán ser exploradas en un futuro. Existen importantes ejemplos de cómo la identificación de una diana secundaria permite el reposicionamiento de ciertos fármacos. Este es el caso del citrato de sildenafil, originalmente desarrollado como hipertensivo que fue después seleccionado para el tratamiento de la disfunción eréctil, o la talidomida, un sedante que se vio asociado con importantes problemas de malformaciones congénitas que actualmente se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple.⁴¹

- **Medicamentos “me-too” (de imitación).** Otra posibilidad de identificar compuestos activos, nuevos y patentables se basa en medicamentos que ya se encuentran en la etapa posterior del desarrollo clínico o que ya se han lanzado al mercado, son los denominados medicamentos de imitación “me-too”. Son compuestos muy similares estructuralmente a medicamentos ya conocidos que tienen un mecanismo de acción idéntico. Ejemplo de ello son los antihipertensivos derivados de Captopril (Lisinopril, Enalapril). Aproximadamente el 75% de los nuevos fármacos aprobados por la FDA son clasificados como medicamentos “me-too”, esto significa que solo el 25% presentan mejoras terapéuticas nuevas en enfermedades. Además, la mayor parte de incentivos están destinados a los fármacos “me-too”, disminuyendo así la financiación en medicamentos pioneros que son necesarios para curar otras patologías. A pesar de ello, resulta necesario el desarrollo de este tipo de medicamentos. Prueba de ello es el caso del fármaco oral hipoglucémico Troglitazona, antidiabético aprobado en 1997 por la FDA y posteriormente retirado del mercado tras informes de hepatotoxicidad inaceptable. Los medicamentos “me-too” como la Rosiglitazona⁴² y Pioglitazona⁴³ son mucho menos tóxicos y hoy en día se utilizan ampliamente en sustitución de Troglitazona. Si estos fármacos no se hubieran desarrollado, la retirada de Troglitazona hubiera provocado una brecha importante en la terapia antidiabética. Al igual ocurre con los antihistamínicos de primera generación, que presentaban efectos de corta duración y requerían múltiples dosis produciendo sedación y efectos anticolinérgicos graves. Estos efectos secundarios se redujeron considerablemente en la segunda y tercera generación de antihistamínicos.²⁰

- **Diseño de compuestos covalentes derivados de ligandos no covalentes.**

Esta estrategia aprovecha la estructura de ligandos conocidos e introduce sustituyentes que generen un enlace covalente con un residuo de cisteína o serina de la proteína diana. La reciente aprobación por parte de la FDA de fármacos covalentes basados en esta aproximación valida esta estrategia. Ejemplos relevantes incluyen Ibrutinib (2013), que reacciona con la Cys481 del sitio de unión de ATP de la tirosina quinasa de Bruton (Btk), y Osimertinib (2015), un inhibidor de EGFR que bloquea selectivamente la proteína que contiene la mutación T790M. Más recientemente, se han descrito los primeros resultados prometedores de un ensayo clínico con el fármaco AMG510. Este medicamento contiene una acrilamida que reacciona de manera específica y covalente con la Cys12 presente en una versión mutada de la proteína K-Ras (G12C) que se encuentra en el 14% de los cánceres de pulmón y el 5% de los cánceres de colon.

Un aspecto a resaltar en esta metodología es la necesidad de introducir un electrófilo que no sea reactivo con los nucleófilos más prevalentes biológicamente. Factores como la cinética de la reacción o las consideraciones estéricas y la electrónica que controlan la reacción desempeñan también un papel importante para decidir qué electrófilos son los más apropiados.⁴⁴ Algunas de las ventajas que presenta esta metodología son una mejora de la selectividad frente otras proteínas de la misma familia, un aumento de la afinidad de unión en proteínas con sitios de unión no muy profundos y además, se ha demostrado que los compuestos que actúan a través de un mecanismo de inhibición covalente presentan menos problemas de aparición de resistencias. Por el contrario, hay un cierto temor a utilizar inhibidores covalentes por su posible toxicidad, ya que establecen interacciones muy fuertes y estables provocando tiempos de permanencia prolongados y pueden tener problemas de especificidad. Aunque la experiencia previa con otros inhibidores de tipo covalente como la aspirina o la penicilina, hacen pensar que los efectos tóxicos podrían ser menores de los esperados.

Esta tesis se centra en dos temas que abordan diferentes aspectos del proceso de descubrimientos de nuevos fármacos. En primer lugar se ha trabajado en la identificación de compuestos activos frente una diana conocida, la cisteína proteasa Atg4B. La alteración de los niveles de autofagia es un problema importante asociado a enfermedades neurodegenerativas, cáncer y envejecimiento. El desarrollo de moduladores específicos de este proceso es un campo de investigación que ha atraído mucho interés en los últimos años. El primer capítulo de esta tesis se basa en el establecimiento de un ensayo de tipo HTS destinado a la identificación de inhibidores de Atg4B, una proteína involucrada en la

síntesis del marcador de autofagia LC3-II. Partiendo de las estructuras de rayos X conocidas de Atg4B en ausencia y en presencia de ligando, se realizó un HTVS para detectar potenciales inhibidores. Una vez estudiados experimentalmente, se sintetizó una pequeña librería de compuestos basados en la estructura de los más activos y su actividad fue analizada en estudios bioquímicos y celulares.

El segundo capítulo de esta tesis doctoral se centra en el desarrollo de un método para la modificación selectiva de proteínas. Los métodos de modificación selectiva de proteínas (que afectan a un residuo determinado) son de gran interés para obtener proteínas marcadas de forma homogénea (en contraposición a los métodos no selectivos que generan mezclas heterogéneas de proteínas modificadas). Las proteínas marcadas son de gran interés tanto en la industria farmacéutica (proteínas PEGiladas, generación de anticuerpos) como en investigación básica (proteínas marcadas con fluoróforos, lípidos, biotina, azúcares, etc.) para el estudio de interacciones ligando-proteína o proteína-proteína así como la validación de dianas desconocidas obtenidas a partir de ensayos fenotípicos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Pammolli, F.; Magazzini, L.; Riccaboni, M.; The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 428–438.
- (2) Munos, B. Lessons from 60 Years of Pharmaceutical Innovation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8* (12), 959–968.
- (3) Cockburn, I.; Henderson, R. Absorptive Capacity, Coauthoring Behavior, and the Organization of Research in Drug Discovery. *J. Ind. Econ.* **1998**, *46*, 157–182.
- (4) Parmar, I.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V.; Lagarón, N. O.; Bhullar, K. S.; Jha, A.; McGowan, E. M. Kinase-Targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 1–20.
- (5) Deininger, M.; Buchdunger, E.; Druker, B. J.; Dc, W. The Development of Imatinib as a Therapeutic Agent for Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2012**, *105* (7), 2640–2653.
- (6) Hinds, K. D.; Kim, S. W. Effects of PEG Conjugation on Insulin Properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (4), 505–530.
- (7) Turecek, P. L.; Bossard, M. J.; Schoetens, F.; Ivens, I. A. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105* (2), 460–475.
- (8) Superti-Furga, G.; Crews, C. M.; Cochran, J. Where Is the Future of Drug Discovery for Cancer? *Cell* **2017**, *168* (4), 564–565.
- (9) Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Donadi, R. S.; Bologa, C. G.; Karlsson, A.; Al-Lazikani, B.; Hersey, A.; Oprea, T. I.; et al. A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *16* (1), 19–34.
- (10) Rask-Andersen, M.; Almén, M. S.; Schiöth, H. B. Trends in the Exploitation of Novel Drug Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (8), 579–590.
- (11) Lee, J. A.; Berg, E. L. Neoclassic Drug Discovery: The Case for Lead Generation Using Phenotypic and Functional Approaches. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18* (10), 1143–1155.
- (12) Coll, P. Fármacos Con Actividad Frente a Mycobacterium Tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2009**, *27* (8), 474–480.
- (13) Zheng, W.; Thorne, N.; McKew, J. C. Phenotypic Screens as a Renewed Approach for Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2013**, *18* (21–22), 1067–1073.
- (14) Swinney, D. C.; Anthony, J. How Were New Medicines Discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (7), 507–519.
- (15) Swinney, D. C. The Contribution of Mechanistic Understanding to Phenotypic Screening for First-in-Class Medicines. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18* (10), 1186–1192.
- (16) Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; et al. Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31* (12), 2235–2246.
- (17) Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. Privileged Scaffolds for Library Design and Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (3), 347–361.
- (18) Harris, C. J.; Hill, R. D.; Sheppard, D. W.; Slater, M. J.; Stouten, P. F. The Design and Application of Target-Focused Compound Libraries. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2011**, *14* (6), 521–531.
- (19) Holenz, J. Lead Generation Based on Compound Collection Screening (Chapter 5). In *Lead Generation*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2016).
- (20) Jiang, Y.; Liu, Z.; Holenz, J.; Yang, H. Competitive Intelligence – Based Lead Generation and Fast Follower Approaches (Chapter 8). In *Lead Generation*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2016).
- (21) Erlanson, D. A.; Fesik, S. W.; Hubbard, R. E.; Jahnke, W.; Jhoti, H. Twenty Years on: The Impact of Fragments on Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (9), 605–619.

- (22) Franzini, R. M.; Neri, D.; Scheuermann, J. DNA-Encoded Chemical Libraries: Advancing beyond Conventional Small-Molecule Libraries. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (4), 1247–1255.
- (23) Liu, Q.; Batt, D. G.; Lippy, J. S.; Surti, N.; Tebben, A. J.; Muckelbauer, J. K.; Chen, L.; An, Y.; Chang, C.; Pokross, M.; et al. Design and Synthesis of Carbazole Carboxamides as Promising Inhibitors of Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) and Janus Kinase 2 (JAK2). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (19), 4265–4269.
- (24) MacArron, R.; Banks, M. N.; Bojanic, D.; Burns, D. J.; Cirovic, D. A.; Garyantes, T.; Green, D. V. S.; Hertzberg, R. P.; Janzen, W. P.; Paslay, J. W.; et al. Impact of High-Throughput Screening in Biomedical Research. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (3), 188–195.
- (25) Gm, N.; Cragg, D. and. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (3), 311–335.
- (26) Lavecchia, A.; Giovanni, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (23), 2839–2860.
- (27) Andricopulo, A.; Salum, L.; Abraham, D. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9* (9), 771–790.
- (28) Cheng, T.; Li, Q.; Zhou, Z.; Wang, Y.; Bryant, S. H. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: A Problem-Centric Review. *AAPS J.* **2012**, *14* (1), 133–141.
- (29) Reddy, S.; Pati, P.; Kumar, P.; Pradeep, N.; Sastry, N. Virtual Screening in Drug Discovery -- a Computational Perspective. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, *8* (4), 329–351.
- (30) Doman, T. N.; McGovern, S. L.; Witherbee, B. J.; Kasten, T. P.; Kurumbail, R.; Stallings, W. C.; Connolly, D. T.; Shoichet, B. K. Molecular Docking and High-Throughput Screening for Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase-1B. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (11), 2213–2221.
- (31) Paiva, A. M.; Vanderwall, D. E.; Blanchard, J. S.; Kozarich, J. W.; Williamson, J. M.; Kelly, T. M. Inhibitors of Dihydrodipicolinate Reductase, a Key Enzyme of the Diaminopimelate Pathway of Mycobacterium Tuberculosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1545* (1–2), 67–77.
- (32) Böhm, H.; Schneider, G. Understanding Receptor-Ligand Interactions as A Prerequisite for Virtual Screening (Chapter 10). In *Virtual Screening for Bioactive Molecules*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2000).
- (33) Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science*. **1996**, *274*, 1531–1534.
- (34) Hajduk, P. J.; Greer, J. A Decade of Fragment-Based Drug Design: Strategic Advances and Lessons Learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (3), 211–219.
- (35) Congreve, M.; Chessari, G.; Tisi, D.; Woodhead, A. J. Perspective Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (13), 3661–3680.
- (36) Erlanson, D. A.; McDowell, R. S.; O'Brien, T. Fragment-Based Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (14), 3463–3482.
- (37) Hajduk, P. J.; Dinges, J.; Miknis, G. F.; Merlock, M.; Middleton, T.; Kempf, D. J.; Egan, D. A.; Walter, K. A.; Robins, T. S.; Shuker, S. B.; et al. NMR-Based Discovery of Lead Inhibitors That Block DNA Binding of the Human Papillomavirus E2 Protein. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (20), 3144–3150.
- (38) Erlanson, D. A.; Fesik, S. W.; Hubbard, R. E.; Jahnke, W.; Jhoti, H. Twenty Years on: The Impact of Fragments on Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (9), 605–619.
- (39) Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*. **1985**, *228* (4705), 1315–1317.

- (40) Brown, D. G.; Boström, J. Where Do Recent Small Molecule Clinical Development Candidates Come From? *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9442–9468.
- (41) Ashburn, T. T.; Thor, K. B. Drug Repositioning: Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (8), 673–683.
- (42) Cantello, B. C. C.; Cawthorne, M. A.; Haigh, D.; Hindley, R. M.; Smith, S. A.; Thurlby, P. L. The Synthesis of BRL 49653 - a Novel and Potent Antihyperglycaemic Agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* (10), 1181–1184.
- (43) Gillies, P. S.; Dunn, C. J. Pioglitazone. *Drugs* **2000**, *60* (2), 333–334.
- (44) Jackson, P. A.; Widen, J. C.; Harki, D. A.; Brummond, K. M. Covalent Modifiers: A Chemical Perspective on the Reactivity of α,β -Unsaturated Carbonyls with Thiols via Hetero-Michael Addition Reactions. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (3), 839–885.

CAPÍTULO 1:

Identificación de inhibidores de Atg4B

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El término “autofagia” fue empleado por primera vez por el fisiólogo francés M. Anselmier en un breve artículo publicado en 1859. Pero no fue hasta un siglo después, en 1963, cuando el bioquímico belga Christian De Duve, durante el trabajo que le llevó al descubrimiento de los lisosomas, empleó el término autofagia desde un punto de vista mecanístico.¹ Este término, que proviene del griego y podría traducirse como autoconsumo, es un proceso celular que consiste en la degradación lisosomal de componentes citoplasmáticos desechables o potencialmente dañinos, incluyendo orgánulos obsoletos, proteínas de vida media larga, agregados de proteínas, y patógenos. Este mecanismo, junto con el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, “ubiquitin-proteosome system”), son las dos vías principales de degradación de proteínas en células eucariotas. Ambos mecanismos son complementarios pero diferentes, ya que el UPS es el responsable de degradar el 80-90% del proteoma incluyendo proteínas de vida corta, anormales o dañadas. La autofagia se produce en condiciones basales y tiene un papel crucial en el desarrollo, la diferenciación, la supervivencia y la homeostasis celular y su funcionamiento anómalo está relacionado con el envejecimiento y múltiples enfermedades como el cáncer y trastornos neurodegenerativos.²

El interés por este campo de investigación ha crecido de manera exponencial en las últimas décadas. Actualmente, una búsqueda en la base de datos PubMed proporciona 30.000 artículos científicos que contienen el término autofagia. Además, el año 2016 le fue concedido el Premio Nobel de Medicina o Fisiología al profesor Yoshinori Ohsumi por la caracterización de los mecanismos moleculares que controlan este proceso y en particular por el descubrimiento de los genes relacionados con autofagia ATG (del inglés, “AuTophagy-related”), que controlan y regulan la autofagia en levaduras.³

1.- Tipos de autofagia

Existen tres tipos principales de autofagia: la autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés “chaperone-mediated autophagy”), la microautofagia y la macroautofagia.

La autofagia mediada por chaperonas (CMA) regula la degradación de proteínas citosólicas que son seleccionadas específicamente a través de la unión de la chaperona Hsc70 a un pentapéptido presente en su secuencia (KFERQ). Tras la unión, la chaperona las dirige a la membrana lisosomal donde interactúan con la proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A, LAMP-2A. Finalmente, las proteínas son internalizadas y degradadas por las hidrolasas lisosomales (Figura 7).² Se ha demostrado que la CMA opera en una multitud de proteínas citosólicas, por lo que ejerce funciones reguladoras importantes en

diferentes estados fisiopatológicos como la regulación metabólica, la preservación de la integridad del genoma, el envejecimiento, la activación de células T, la neurodegeneración y la oncogénesis. Además, el análisis de secuencia lineal del proteoma citosólico sugiere que alrededor del 30% de sus componentes pueden ser degradados mediante CMA.

En la microautofagia, las entidades citoplasmáticas destinadas a la degradación son captadas directamente a través de la invaginación de la membrana lisosomal.

Finalmente, la macroautofagia, también conocida como autofagia, es la modalidad mejor caracterizada.⁴ Mientras que la microautofagia y la CMA no están asociadas con grandes cambios morfológicos en los compartimentos vesiculares, las respuestas macroautofágicas involucran vesículas que pueden ocupar una parte considerable del citoplasma. Durante este proceso, regulado por los genes ATG, los contenidos celulares son degradados en lisosomas o vacuolas y finalmente reciclados.

La autofagia se inicia con la formación de una doble membrana en forma de copa denominada fagóforo, la cual envuelve el material citoplasmático, proteínas y orgánulos que se desean degradar. Posteriormente, esta doble membrana se cierra dando lugar al autofagosoma, que se fusiona con el lisosoma formando el autofagolisosoma y liberando en su interior el material a degradar. Tras la degradación lisosomal, el material resultante (aminoácidos, azúcares, lípidos, etc.) se libera al citoplasma para ser reutilizado (Figura 7).

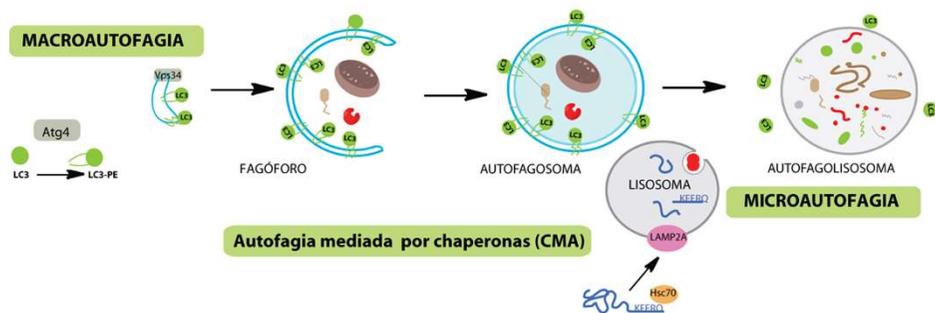


Figura 7. Diferentes tipos de autofagia. La **macroautofagia** se caracteriza por el secuestro de estructuras dirigidas a ser degradadas en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que se fusionan con el lisosoma formando autofagolisosomas y exponiendo su contenido a los enzimas hidrolíticos. Los metabolitos resultantes se transportan al citoplasma y se reutilizan para la síntesis de nuevas macromoléculas o como fuentes de energía. Durante la **autofagia mediada por la chaperona (CMA)**, las proteínas que poseen la secuencia KFERQ son reconocidas por la chaperona Hsc70, se asocian con la proteína de membrana LAMP-2A y se internalizan en el lisosoma para su degradación. **Microautofagia** es el proceso que ocurre cuando los lisosomas engullen directamente el material citosólico mediante invaginación de la membrana.

2.- Mecanismos de regulación

En condiciones fisiológicas normales la autofagia existe a un nivel basal y actúa como mecanismo de control de la calidad celular. En condiciones de estrés, como pueden ser la falta de nutrientes, infecciones por patógenos o la presencia del algún estímulo, la actividad autofágica aumenta. Existen diferentes vías de regulación para controlar la autofagia y consecuentemente numerosos puntos potenciales de modulación. La vía de regulación clásica es **la vía de señalización mTOR**, del inglés “mammalian target of rapamycin”, aunque también se han descrito otras cascadas de señalización independientes de ésta. La mayoría de los moduladores químicos que afectan a éstas últimas actúan sobre la síntesis de **inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3)** o **la vía de señalización del calcio**.

Aparte de estas vías reguladoras, implicadas también en otras funciones celulares, a principios de los años 90 el profesor Y. Oshumi caracterizó los genes ATG responsables de la maquinaria central del proceso de la autofagia. Los primeros estudios en levaduras permitieron la identificación de 15 genes involucrados en la regulación de este proceso.³ Actualmente se han descrito 41 genes ATG y la mayoría de ellos tienen también ortólogos en humanos. Este descubrimiento de gran importancia y que contribuyó a elucidar el mecanismo molecular de este proceso de reciclaje, ha facilitado el estudio del papel de la autofagia tanto en procesos fisiológicos como patológicos.^{5,6} Los genes ATG dan lugar a una serie de proteínas conocidas como Atg. Los diferentes miembros de la familia de proteínas Atg se pueden clasificar teniendo en cuenta su función específica en las diferentes etapas del proceso (Tabla 1).

Etapas de la autofagia	Proteínas implicadas
Iniciación y nucleación	Atg1/ULK1, Atg13, FIP200 ⁷ Atg6/Beclin-1-Atg14/Atg14L-Vps34-Vps15 ⁸
Formación y expansión del fagóforo	Atg9 y proteínas WIPI ⁹ Sistema de conjugación Atg8/LC3 formado por Atg3, Atg4, Atg7, Atg12, Atg5, Atg16 ¹⁰
Maduración y fusión con el lisosoma	Beclin-1-UVRAG-Vps34 ^{11,12}

Tabla 1. Proteínas implicadas en las diferentes etapas de la autofagia.

Por tanto, debido al papel crucial que tienen estas proteínas en la formación del fagóforo, el cierre del autofagosoma y su fusión con el lisosoma, se han considerado dianas interesantes para el desarrollo de inhibidores de autofagia. Hay que tener en cuenta que aunque hasta hace poco se creía que su función estaba exclusivamente involucrada en la

regulación de la autofagia, estudios recientes indican que también pueden tener también funciones celulares adicionales.^{13,116}

A continuación, se va a describir con detalle las diferentes etapas del proceso autofágico y las proteínas implicadas en cada una de ellas. El primer paso en este mecanismo es la **formación del fagóforo** que secuestra todo aquel material citosólico que va a ser degradado. Una de las vías clásicas de regulación de la autofagia en este paso inicial es la vía mTOR, una red de señalización que conecta señales extracelulares e intracelulares para adaptar el metabolismo celular a las fluctuaciones de nutrientes (Figura 8 y 9). mTOR tiene un papel crucial en la regulación de la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y la proliferación. Está formado por dos complejos: mTORC1 es responsable de la regulación de la autofagia y está generalmente asociado con la proliferación celular y la progresión del cáncer cuando está desregulado, mientras que mTORC2 participa en la reorganización del citoesqueleto de actina.

La formación del fagóforo también requiere la activación del complejo (**ULK-Atg13-FIP200**). Bajo condiciones ricas en nutrientes o en presencia de insulina, mTORC1 regula negativamente la autofagia mediante la fosforilación de Atg13 y los homólogos en mamíferos de la proteína de levaduras Atg1 (ULK1 y ULK2, del inglés “Unc-51 like autophagy activating kinase”). La fosforilación de ULK inhibe su actividad quinasa. En ausencia de nutrientes o factores de crecimiento, la fosforilación de mTOR mediada por AMPK inhibe su actividad y la consiguiente fosforilación de ULK. Al estar activa, ULK puede fosforilar Atg13 y la proteína de 200 KDa que interactúa con la familia de quinasas de adhesión focal (FIP200) lo que permite el inicio de la autofagia (Figura 8).¹⁴

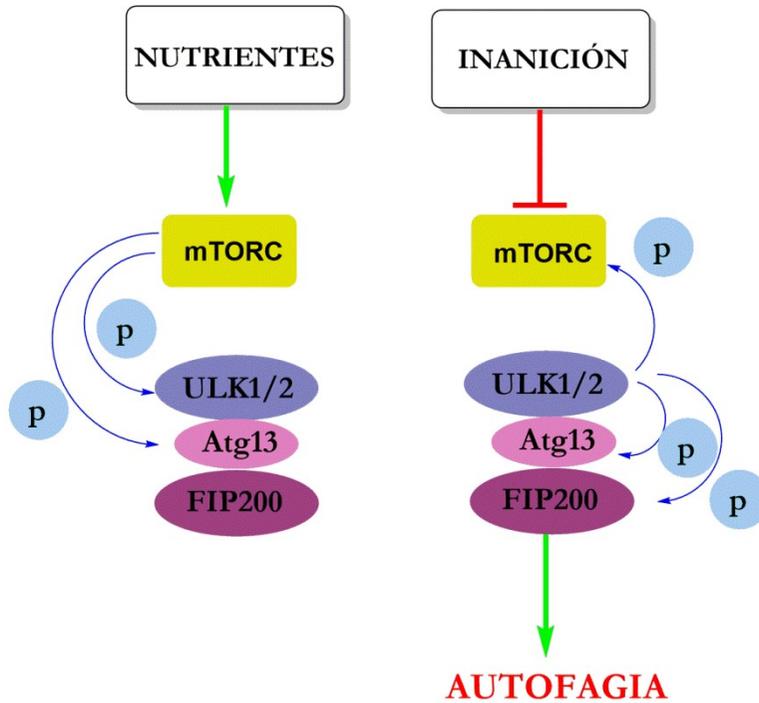


Figura 8. Los complejos **ULK-Atg13-FIP200** median la señalización de mTOR en la maquinaria autofágica. En condiciones de presencia de nutrientes mTOR está activado y fosforila las proteínas ULK y Atg13. En cambio, en ausencia de nutrientes la proteína mTOR se encuentra desactivada permitiendo así las fosforilaciones mediadas por ULK de Atg13, FIP200 que suponen el inicio del proceso autofágico.

La presencia de Atg13 facilita el reclutamiento del complejo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) formado por Atg14L, Vps34, Vps15 y beclin 1 y la consiguiente generación de fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P), que supone la señal de entrada para la formación del omegasoma, regiones de membrana altamente curvadas que se consideran el origen del fagóforo.

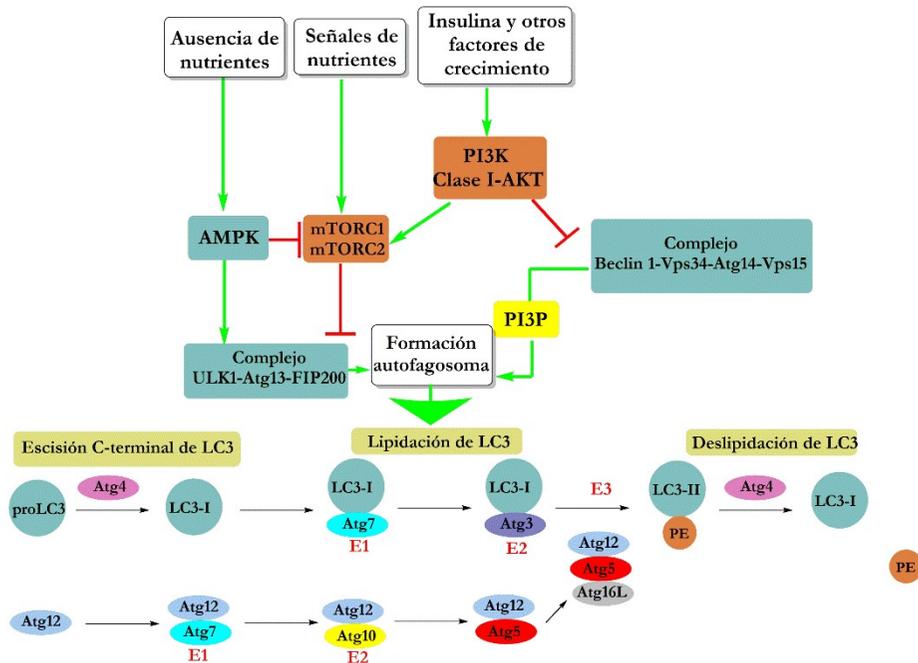


Figura 9. Superior: La presencia de nutrientes activa la vía de señalización mTOR. La fosfatidilinositol 3-quinasa de clase I (PI3K)-AKT activa mTOR en respuesta a la insulina y a señales de factores de crecimiento, actuando como reguladores negativos de autofagia. AKT también puede regular negativamente la autofagia mediante fosforilación de beclin 1. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK), regula negativamente la vía mTOR y también fosforila directamente el complejo ULK1-Atg13-FIP200, actuando como un regulador positivo de la autofagia en respuesta a inanición. En estas condiciones, mTORC1 inhibe la actividad de ULK1 y se inicia la autofagia. Este mecanismo también está regulado por el complejo de interacción beclin 1-Vps34-Atg14L. La estimulación de este complejo genera PtdIns3P, que promueve la nucleación autofagosómica de la membrana. **Inferior:** El alargamiento del autofagosoma requiere la síntesis de la proteína lipídada LC3-II mediante dos sistemas de conjugaciones tipo ubiquitina.

En la **elongación de la membrana de autofagosoma** participan tanto el complejo **ULK1-Atg13-FIP200** como **Atg14-beclin 1-PI3KC3** que movilizan dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (UBLs), del inglés “ubiquitin-like-system” que regulan la expansión del autofagosoma y su cierre (Figura 9 inferior). El primer paso consiste en la formación de un conjugado **Atg12-Atg5** que requiere de la participación de **Atg7** y **Atg10** que funcionan como ligasas de tipo E1 y E2 respectivamente. Los conjugados Atg5-Atg12 se localizan en el precursor del autofagosoma y se disocian al completar la formación del mismo. Estos conjugados interactúan de manera no covalente con **Atg16L** dando lugar a un complejo de aproximadamente 800 KDa. Por otro lado, la segunda reacción consiste en la conjugación de la proteína Atg8 (y sus homólogos en humanos las familias MAP1-LC3/GABARAP (microtubule-associated protein 1 light chain 3/GABA receptor associated protein) al lípido fosfatidiletanolamina (PE). Cogiendo como ejemplo la

proteína LC3, en primer lugar, la proLC3 es escindida en su extremo C-terminal por la cisteína proteasa Atg4, generando la proteína citosólica LC3-I. Para el proceso de lipidación son necesarias Atg7 y Atg3 que actúan como enzimas E1 y E2 respectivamente y el complejo Atg5-Atg12-Atg16L funciona como una ligasa de tipo E3 facilitando la conjugación de la proteína a PE (Figura 9 inferior). La lipidación se produce en el extremo C-terminal de la proteína y genera LC3-II que se une a la membrana del autofagosoma. Esta proteína es una de las mejor caracterizadas, y aunque su función exacta no esté completamente clara, se sabe que la ubicación de la LC3-II en la membrana del autofagosoma es necesaria para el correcto funcionamiento de todo el proceso.

La nomenclatura E1, E2 y E3 provienen de las enzimas involucradas en la ubiquitinación de proteínas. Esta modificación postraduccional sirve para dirigir las proteínas al proteasoma, donde serán degradadas y recicladas. El enzima E1 se une al extremo C-terminal de la ubiquitina mediante un enlace tioéster con un residuo de cisteína. El segundo paso se basa en transferir la ubiquitina de la proteína E1 a E2 mediante una transesterificación mediada por E2. Finalmente, el enzima E3 transfiere la ubiquitina a un residuo de lisina de proteína a degradar. La lipidación de LC3-II sigue un procedimiento similar, con la diferencia que el destino final de la proteína no es otra proteína sino un lípido.

En mamíferos existen 6 homólogos de la proteína de levaduras Atg8, divididas en dos subfamilias MAP1-LC3, o simplemente LC3A, B y C junto con GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2. Las dos subfamilias son esenciales para el proceso de autofagia, aunque parece que tienen funciones diferentes. Mientras la subfamilia LC3 estaría involucrada en la elongación de la membrana del fagóforo, la subfamilia GABARAP tendría un papel en el cierre del autofagosoma.¹⁵ Una vez cerrados, los autofagosomas se mueven por los microtúbulos hacia la región perinuclear donde se encuentran los lisosomas. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar un autofagolisosoma (Figura 7). Esta fusión está mediada por proteínas SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein REceptor) y regulada por el complejo beclin-1-UVRAG (UV radiation Resistance-Associated Gene product)-Vps34. El contenido y la membrana interna del autofagolisosoma son degradados por hidrolasas lisosomales, incluyendo lipasas y catepsinas. El material de degradación es transportado fuera del lisosoma para su reciclaje y Atg4B elimina el lípido de las LC3-II que se encuentran en la membrana externa regenerando las correspondientes LC3-I.

En definitiva, la síntesis de LC3 requiere la actividad de dos sistemas de tipo ubiquitina. El primero de ellos formado por las proteínas Atg5, Atg12 y Atg16L y el segundo sistema de conjugación involucra Atg4, Atg7, Atg3. Además, la conversión de LC3-I en LC3-II y la posterior deslipidación de LC3-II requiere la actividad de la cisteína proteasa Atg4, que por lo tanto se ha considerado un objetivo en la identificación de los inhibidores de autofagia.

3.- Autofagia y enfermedades

La autofagia actúa como un mecanismo de supervivencia bajo condiciones de estrés, manteniendo la integridad celular, la regeneración de precursores metabólicos, la eliminación de patógenos y facilitando la limpieza de proteínas u orgánulos dañados. Este proceso contribuye a la homeóstasis celular y tisular, previene enfermedades infecciosas y está involucrado en la eliminación de agregados de proteínas poliubiquitinadas que, debido a defectos en su estructura o plegamiento, se acumulan durante el estrés y el envejecimiento. Además, en los últimos años se ha comprobado que niveles elevados o deficientes de autofagia están directamente relacionados con varias enfermedades. Por estos motivos, existe un gran interés en la búsqueda de reguladores de autofagia que puedan ser potencialmente utilizados para el tratamiento de enfermedades.

Los *inductores de autofagia* están destinados generalmente al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y a la prevención del envejecimiento y, por el contrario, los *inhibidores de autofagia* están siendo estudiados para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, particularmente los que son resistentes al tratamiento.

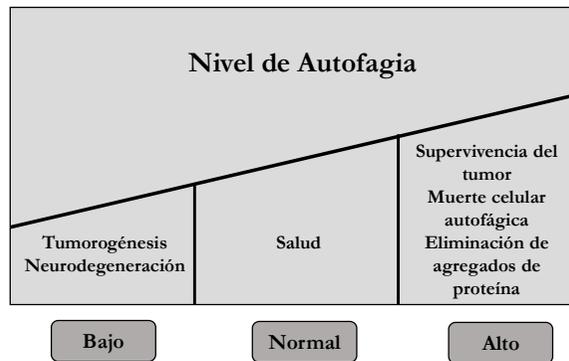


Figura 10. Efectos de los cambios en los niveles de autofagia en diferentes procesos fisiológicos y patológicos.

3.1.- Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas, como son las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la neuroinflamación,^{16,17} son trastornos genéticos o esporádicos dependientes que se manifiestan por la pérdida progresiva de la función neuronal. La característica principal de estas patologías es la acumulación de agregados de proteínas como resultado de mutaciones y mecanismos de eliminación deficientes. La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas presentan defectos en el proceso de autofagia. En algunos casos se han observado mutaciones en proteínas involucradas en autofagia como p62 (ELA) o PINK1/Parkin (Parkinson). En otros casos se observan niveles normales de autofagosomas pero cierta incapacidad de incorporar sustratos o de eliminarlos una vez dentro de los autofagolisosomas (Alzheimer).¹⁸ Mutaciones en el gen de la presenilina 1, son la causa de algunos de los casos de Alzheimer hereditario de inicio temprano, aunque corresponde a menos del 1% de los pacientes con esta enfermedad. Esta proteína es necesaria para la acidificación de los lisosomas, y por tanto, para la activación de las hidrolasas lisosomales.¹⁹ El factor de riesgo genético predominante en los casos de Alzheimer de inicio tardío es un alelo de APOE (una proteína neuronal transportadora de colesterol) que codifica para una variante de la proteína (ApoE4) la cual desestabiliza las membranas lisosomales.²⁰ Existen otros factores que contribuyen a la patogénesis de esta enfermedad como son la acumulación del péptido β -amiloide y la oxidación de lípidos y lipoproteínas que pueden dar lugar a necrosis y apoptosis de células neuronales.²¹ La gran importancia de la función lisosomal en los trastornos neurodegenerativos también es visible en los afectados por enfermedades lisosomales, ya que todos ellos presentan diferentes grados de neurodegeneración. Por lo tanto, existen las suficientes evidencias que

respaldan un papel patogénico del deterioro de la autofagia en varias enfermedades neurodegenerativas importantes. Además se ha podido comprobar que la inducción química de autofagia desempeña un papel positivo importante en etapas tempranas de estas enfermedades,²² permitiendo la eliminación de agregados de α -sinucleína en Parkinson²³ y de proteínas mutantes con extensiones ricas en poliglutamina en enfermos de Huntington.²⁴ Todos estos resultados previos proporcionan una justificación importante para estudiar los mecanismos que regulan este proceso y desarrollar nuevas terapias destinadas a modular la autofagia.

3.2.- Infección, inflamación e inmunidad

La autofagia tiene funciones importantes en la regulación de la inmunidad. Entre sus papeles destacan la eliminación directa de microorganismos, el control de la inflamación, el control de respuestas inmunes adaptativas a través de la regulación de la presentación de antígenos y la secreción de mediadores inmunes.²⁵

El control de la inflamación se realiza a través de interacciones con el sistema inmune innato, eliminando agonistas endógenos del inflamasoma o modulando la secreción de mediadores inmunes. También puede aumentar la presentación de antígenos citoplasmáticos a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y contribuir a la homeostasis de las células T. El papel de la autofagia en la detección y eliminación de patógenos contribuye a la inmunidad antibacteriana al regular la respuesta inmune inflamatoria encaminando a los microorganismos intracelulares hacia la degradación lisosomal.^{26,27} Muchos patógenos han desarrollado mecanismos de supervivencia para evadir la autofagia. *Legionella pneumophila*, patógeno intracelular que puede causar una neumonía grave en los seres humanos, utiliza la proteína RavZ para procesar las proteínas lipidadas LC3/GABARAP. RavZ hidroliza el enlace Phe(fenilalanina)-Gly(glicina)-PE del extremo C-terminal, liberando Gly-PE. La deslipidación de las proteínas y la imposibilidad de volver a ser modificadas desactiva el proceso de manera irreversible.²⁸

3.3.- Enfermedades metabólicas

La autofagia degrada y recicla una gran variedad de sustancias como proteínas, lípidos, carbohidratos, aminoácidos o ácidos grasos, todo ello para generar los metabolitos esenciales necesarios para el mantenimiento de la viabilidad celular en el corazón, músculo esquelético, tejido adiposo y células β pancreáticas. Además, este proceso es de vital importancia para la degradación de lípidos acumulados en los llamados *lipid droplets*, compartimentos intracelulares que contienen triglicéridos y ésteres de colesterol. Esta

función podría tener importantes implicaciones en enfermedades que cursan con acumulación de lípidos, como el síndrome metabólico.²⁹ La disfunción de la autofagia también se ha relacionado con enfermedades como la diabetes y la obesidad, ya que este mecanismo es necesario para el mantenimiento de la estructura, la masa y la función de las células β pancreáticas.³⁰ Dietas hipercalóricas o con elevada presencia de grasas causan un aumento de autofagia como mecanismo de defensa para evitar la apoptosis y la aparición de resistencia a la insulina. Así pues, la modulación de los niveles de autofagia podría ser una alternativa para prevenir la progresión de la diabetes, el síndrome metabólico o evitar complicaciones en personas obesas.

3.4.- Envejecimiento

La restricción calórica proporciona un aumento de la longevidad en diversos organismos tales como levaduras, gusanos, ratas y ratones³¹ y este aumento de longevidad estaría directamente relacionado con la inducción de autofagia.³² Por tanto, este proceso parece jugar un papel importante en la prevención del envejecimiento. Existen evidencias de ello en varias especies como es el caso de *Drosophila melanogaster*,³³ en el que se ha observado que la sobreexpresión de genes implicados en autofagia retarda la acumulación de neuronas dañadas. Además, en un estudio con ratones se observó un aumento de la esperanza de vida tras un tratamiento con el inhibidor de mTOR rapamicina.^{34,35} Resultados similares fueron obtenidos tras tratamientos con espermidina y resveratrol.^{36,37} Aunque su capacidad para inducir autofagia es conocida, aún existe controversia sobre si estos compuestos pueden también actuar a través de mecanismos alternativos.

3.5.- Cáncer

En el año 2030, según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés “International Agency for Research on Cancer”) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad podría ser la principal causa de muerte en el mundo con más de 20 millones de diagnósticos anuales.³⁸ En los últimos años, ha habido un progreso significativo en la comprensión de esta enfermedad incluyendo la identificación de nuevos factores de riesgo, marcadores, tratamientos y diagnósticos tempranos en ciertos tipos de cáncer, logrando avances importantes en la reducción de la mortalidad.^{39,40}

La asociación entre cáncer y autofagia es compleja, ya que este mecanismo puede desempeñar diferentes funciones en diferentes etapas de la enfermedad.⁴¹ En las etapas tempranas de la formación del tumor, la autofagia parece tener una función protectora

actuando como una vía apoptótica alternativa.⁴² Sin embargo, durante la quimioterapia y radioterapia, las células tumorales utilizan la autofagia como mecanismo de protección para prevenir la muerte celular, adquiriendo resistencia al tratamiento y facilitando su supervivencia. Este mecanismo les permite superar el estrés metabólico producido por la falta de nutrientes, factores de crecimiento y la privación de oxígeno y mantener la supervivencia de las células tumorales en dichos entornos.⁴³

De acuerdo también con estos datos, estudios preliminares han demostrado que la inhibición de la autofagia puede mejorar la eficacia antitumoral de diferentes agentes quimioterapéuticos.^{44,45} Los primeros datos *in vivo* que corroboraron esta afirmación fueron estudios realizados en un modelo de ratón que presentaba un linfoma inducido por la proteína Myc. El tratamiento de los ratones con cloroquina (CQ), que inhibe la autofagia a través del bloqueo de la función lisosomal, mejoró la activación de la proteína p53 (supresora de tumores) o el efecto de agentes alquilantes, induciendo la regresión tumoral.⁴⁶ Posteriormente, se demostró en otros modelos animales que la inhibición de la autofagia con 3-metiladenina (3-MA), CQ o hidroxicloroquina (HCQ) mejora la quimiosensibilidad y regresión del tumor y provoca la muerte de las células tumorales.^{47,48} Entre los inhibidores de autofagia más utilizados en tratamientos combinados se encuentran la CQ y la HCQ, ya que son medicamentos comúnmente utilizados para el tratamiento de la malaria o trastornos autoinmunes y cuya tolerancia y toxicidad están bien establecidas. Estos compuestos atraviesan la barrera hematoencefálica y se prefiere la administración de la HCQ debido a la elevada toxicidad retiniana observada con CQ.⁴⁹ Actualmente, se están realizando varios ensayos clínicos que se encuentran en fase I/II evaluando en varios tipos de tumores la combinación de CQ y HCQ con fármacos citotóxicos (Tabla 2). Hay que destacar también que en algunos casos, como los carcinomas hepatocelulares, se han observado efectos positivos tras la inducción, en lugar de la inhibición, de autofagia mediante tratamientos combinados con el inhibidor de mTOR Sirolimus.⁵⁰

Tipo de tumor	Fase	Combinación terapéutica	Referencia
Neoplasma sólido	I	HCQ + Sunitinib	NCT00813423
Tumor sólido	I	HCQ + Vorinostat	NCT01023737
Cáncer avanzado	I	HCQ + Sirolimus o Vorinostat	NCT01266057
Cáncer avanzado	I	HCQ + MK-2206	NCT01480154
Cáncer de mama positivo en receptor estrógeno	I	HCQ	NCT02414776
Adenocarcinoma avanzado	I/II	HCQ + Gemcitabine	NCT01506973
Carcinoma de células renales	I/II	HCQ + IL-2	NCT01550367
Cáncer colorrectal	I/II	HCQ + Vorinostat	NCT02316340
Cáncer de pulmón	I/II	HCQ + Gemcitabine/Carboplatino	NCT02722369
Cáncer de páncreas	I/II	HCQ + Gemcitabine	NCT01128296
Cáncer de mama	I/II	HCQ + Ixabepilone	NCT00765765
Cáncer de páncreas	II	HCQ + Capecitabine	NCT01494155
Cáncer de páncreas	II	HCQ + Abraxane y Gemcitabine	NCT01978184
Adenocarcinoma de páncreas metastásico	II	HCQ	NCT01273805
Cáncer de próstata	II	HCQ	NCT00726596
Adenocarcinoma de páncreas resectable	II	HCQ+ Gemcitabine, napaclitazael	NCT01978184

Tabla 2. Estudios clínicos en curso evaluando el uso de inhibidores de autofagia en el tratamiento del cáncer.^{50,57}

Debido a la acción general de la HCQ sobre la acción lisosomal, las empresas farmacéuticas interesadas buscaron alternativas a este medicamento. Pfizer y Sanofi (SAR405) desarrollaron inhibidores de la quinasa Vps34 y Millenium Pharmaceuticals inhibidores de Atg7 (más información en el apartado 4.2. Inhibidores de autofagia).⁵¹ Pero los resultados no fueron tan buenos como los esperados y hacia 2015 la industria pareció descartar esta línea de investigación.⁵² Sin embargo estudios recientes han forzado un replanteamiento de esta estrategia considerada anteriormente como fallida. Así pues, la combinación de inhibidores de autofagia con bloqueadores de la cascada de MAPK, combinación que no había sido estudiada anteriormente, han dado resultados muy esperanzadores en cánceres dependientes del oncogén Ras.^{53,54,55} La base del éxito estaría en que los tumores compensan la inhibición de proteína quinasas activadas por mitógenos MAPK (del inglés “Mitogen-Activated Protein Kinases”) con una incremento de la actividad autofágica, y por este motivo un tratamiento dual es, en estos casos particulares, de gran efectividad.

Además, parece que las células que se encuentran alrededor del tumor también utilizan el aumento de autofagia para bloquear la actividad antitumoral de las células T más próximas y escapar del efecto del sistema inmune. Por estos motivos, es muy importante utilizar los modelos adecuados de la enfermedad (pacientes vs líneas celulares) para obtener resultados globales y fiables. Todos estos nuevos resultados han dado un espaldarazo muy importante a esta estrategia terapéutica.⁵⁶

4.- Moduladores químicos de autofagia

Como resultado de la importancia de la vía de señalización de mTOR en la regulación negativa de la autofagia, la mayoría de los inductores de autofagia conocidos actúan bloqueando miembros de esta cascada de señalización. Además, también se han descrito otros inductores de autofagia que actúan disminuyendo los niveles de InsP3 o disminuyendo el contenido de calcio citosólico. En lo que se refiere a inhibidores de autofagia, tal como ya se ha comentado, los más utilizados son los que directa o indirectamente bloquean la función lisosomal. También se han descrito algunos inhibidores dirigidos a quinasas (ULK, PI3K, Vps34) o a algunas de las proteínas Atg. Hasta el día de hoy, diferentes compuestos han sido patentados y descritos en la literatura como moduladores de la autofagia con potencial actividad terapéutica.^{42,58,59} Además, se conoce que varios medicamentos aprobados por la FDA para otras indicaciones terapéuticas inducen o inhiben la autofagia, y su uso como moduladores de autofagia está también en estudio (Tabla 3).⁵⁸

Principio Activo	Indicación	Mecanismo molecular	Efecto
Temozolomide	Gliomas	Inhibición Akt/mTOR ⁶⁰	Inductor
Rapamicina (y rapalogos)	Inmunosupresor, prevención de rechazo en trasplantes	Inhibición mTOR ⁶¹	Inductor
Metformina	Diabetes de tipo 2,	Activa AMPK ⁶²	Inductor
Gefinitib	Cáncer de pulmón	Activa AMPK ⁶³	Inductor
Bortezomib	Mieloma múltiple	Activa AMPK ⁶⁴	Inductor
Fenilbutirato de sodio	Trastornos del ciclo de la urea	Activación de catepsinas D y B ⁶⁵	Inductor
Carbamazepina	Anticonvulsivo dolor neuropático	Reduce InsP3 ⁶⁶	Inductor
Verapamilo	Arritmias y presión arterial alta	Disminución de niveles de Ca ²⁺ intracitosólico ⁶⁷	Inductor
Rilmenidina	Hipertensión	Reduce los niveles de cAMP ⁶⁸	Inductor
CQ, HCQ	Malaria, trastornos autoinmunes,	Inhibe la función lisosomal ⁶⁹	Inhibidor
Pantoprazol	Úlceras estomacales	Inhibidor de bomba de protones, aumento del pH endosomal ⁷⁰	Inhibidor
Celecoxib	Artritis reumatoide, artrosis	Inhibe la función lisosomal ⁷¹	Inhibidor

Tabla 3. Varios medicamentos representativos aprobados por la FDA que también muestran actividad como moduladores de autofagia.

La autofagia es un proceso con múltiples vías involucradas y los moduladores existentes en la actualidad son poco específicos.⁷² Por estos motivos, existe una gran demanda de moduladores que sean moléculas de pequeño tamaño, específicas, potentes y que puedan ayudar a descifrar los mecanismos moleculares que regulan este proceso así como tener potencial interés terapéutico.^{59,73} En los últimos años la investigación, tanto pública como de ámbito privado, han prestado un gran interés en el desarrollo de moduladores de pequeño tamaño que induzcan o inhiban la autofagia celular. A continuación, se van a describir brevemente los moduladores de autofagia más conocidos, indicando sus dianas mayoritarias y sus posibles limitaciones.

4.1.- Inductores de autofagia

Inhibición de mTOR o mTORC1. La inhibición de la vía de mTOR, actuando directamente sobre la quinasa mTOR o sobre las quinasas posteriores como PI3K, AMPK o AKT, ha sido ampliamente explorada para la búsqueda de inductores de autofagia. La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR afecta a diversas funciones celulares, incluida la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia, por lo tanto, está interconectada con una multitud de importantes sistemas reguladores. Los compuestos más representativos de esta clase son la **Rapamicina** y sus análogos (RAD001, CCI-779, AP-23573, ABT-578) (Figura 11 y 12). La Rapamicina es un macrólido lipofílico aislado de *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe alostéricamente mTORC1.⁷⁴ Actualmente se utiliza como inmunosupresor y en la prevención de rechazo en trasplantes. Posteriormente se desarrollaron análogos sintéticos (rapalogos) con propiedades farmacocinéticas mejoradas. Como estos derivados no son capaces de bloquear el circuito de retroalimentación que involucra AKT, presentan una eficiencia clínica insuficiente. Además se ha demostrado que la Rapamicina no es un buen inductor de autofagia ya que sus efectos pueden ser muy lentos, transitorios y específicos de cada tipo celular.⁷⁵

Inhibidores duales de PI3K(I) y mTOR. La similitud en los dominios catalíticos de mTOR y PI3K ha facilitado la búsqueda de inhibidores capaces de bloquear simultáneamente los sitios de unión de ATP de ambas quinasas, evitando así la activación alternativa de AKT. Además, como la ruta PI3K/AKT tiene un papel crucial en el control del crecimiento y proliferación celular, estos inhibidores tienen también un gran interés para el tratamiento del cáncer. **PI-103** fue el primer compuesto descrito de este tipo de inhibidores duales (Figuras 11 y 12). Presenta una potente actividad antiproliferativa y es un importante inductor de autofagia.^{76,77} Posteriormente se han desarrollado derivados de este compuesto con propiedades farmacocinéticas mejoradas entre los cuales destaca **GDC-0980**⁷⁸ y **BEZ235** que se encuentra actualmente en estudios clínicos de fase II⁷⁹ (Figuras 11 y 12).

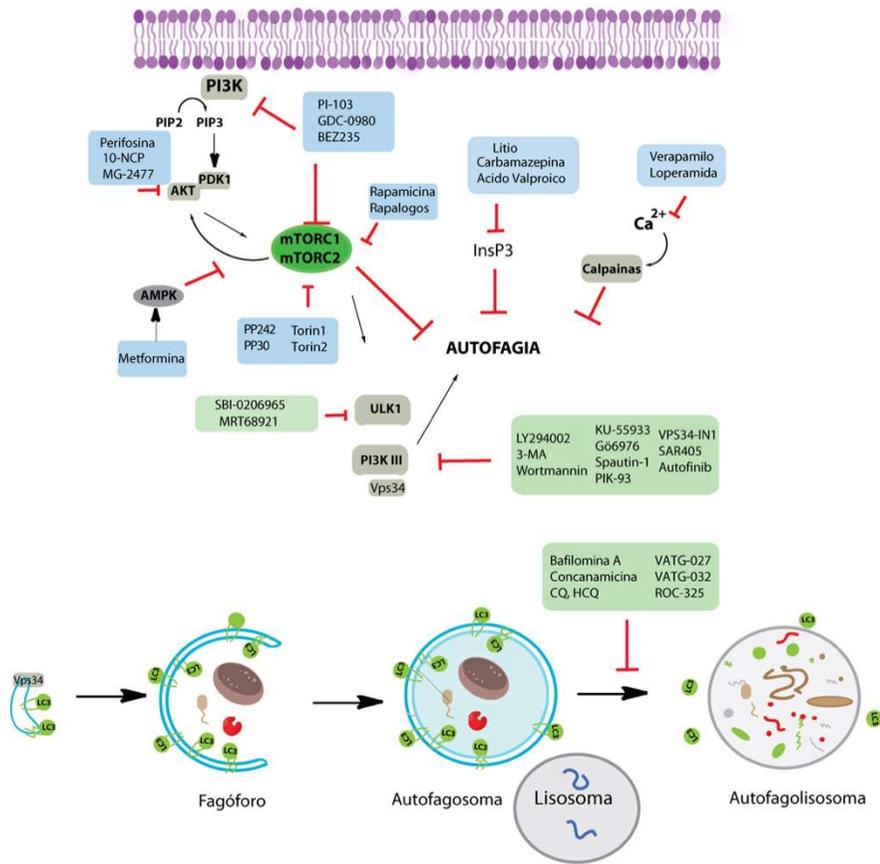


Figura 11. Algunos de los inductores (azul) e inhibidores (verde) descritos y sus dianas conocidas.

Inhibidores Pan-mTOR. La segunda generación de inhibidores mTOR son más potentes y selectivos y se dirigen al sitio de unión de ATP de ambos complejos mTORC1 y mTORC2.⁸⁰ El interés actual de estos inhibidores se centra principalmente en el tratamiento del cáncer, pero su uso como inductores de la autofagia en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas está aumentando. Sin embargo, la vía de señalización mTOR también regula otros procesos celulares y su inhibición puede causar efectos secundarios importantes en el organismo. Ejemplos de este tipo de inhibidores son **PP242** y su análogo **PP30**, **torin**⁸¹ y **torin2**, un análogo más hidrosoluble, con mayor tiempo de vida media y disponibilidad oral mejorada (Figura 11).

Inhibidores de AKT. Ejemplos de esta clase de inhibidores incluyen **perifosina** (Figura 11 y 12) aunque estudios adicionales demuestran que su efecto inhibitorio puede verse ayudado

por la degradación de los componentes principales del complejo mTOR,⁸² **MG-2477**⁸³ y por último **10-NCP**.⁸⁴

Activadores de AMPK. Los activadores de la proteína quinasa activada por Adenosina monofosfato (AMPK) inducen la autofagia bien dirigiéndose a mTORC1 o mediante fosforilación directa de ULK.⁸⁵ Ejemplos de esta clase de inductores de autofagia incluyen la **metformina** (Figura 11 y 12),⁶² fármaco para el tratamiento de la diabetes, **rottlerin**,⁸⁶ un inhibidor de la proteína quinasa C delta y **niclosamida** que actúa como protonóforo y posee un efecto selectivo hacia mTORC1.⁸⁷

Los sistemas mejor caracterizados para inducir la autofagia son aquellos que dependen de la vía de señalización de mTOR. Sin embargo, en los últimos años se está investigando su inducción a través de otras vías que no dependen de esta vía de regulación, puesto que mTOR está implicada en otros procesos celulares como son el crecimiento celular, la síntesis proteica, la biogénesis del ribosoma o el metabolismo de nutrientes. Existen también inductores que afectan vías independientes. El **litio**, el **ácido valproico** y la **carbamazepina** actúan a través de la reducción de los niveles de InsP3 mientras **verapamilo**, **loperamida**, **nimodipina**, **nitrendipino** y **amiodarona** bloquean los canales de Ca²⁺ evitando la activación de las calpaínas (Figuras 11 y 12).⁶⁷ También se han descrito inductores que actúan específicamente sobre la autofagia mediada por chaperonas. Tras observar que la señalización a través del receptor de ácido retinoico (RAR α) inhibe CMA, se planteó la síntesis de derivados del ácido *trans* retinoico para bloquear este efecto y provocar por tanto una inducción de CMA.

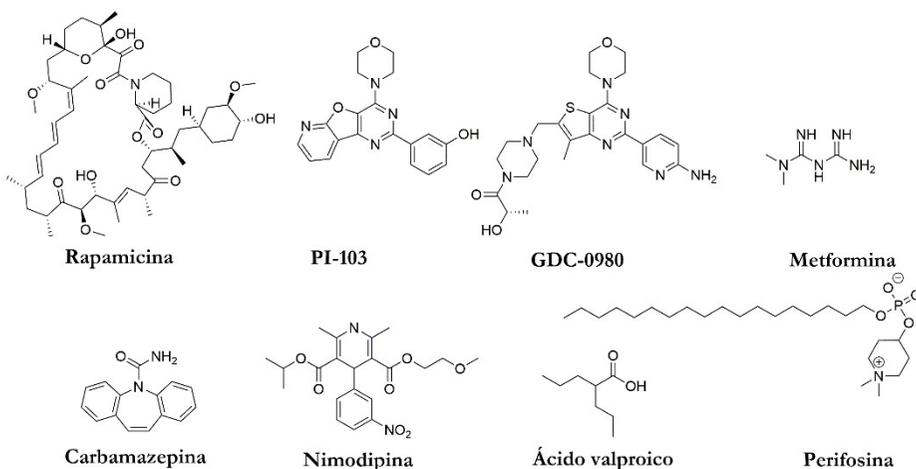


Figura 12. Inductores de autofagia que actúan inhibiendo la vía de señalización mTOR (Rapamicina, PI-103, GDC-0980, Metformina, Perifosina) y vías de señalización independientes de mTOR (Carbamazepina, Nimodipina, Ácido valproico).

4.2.- Inhibidores de autofagia

La mayoría de los inhibidores existentes actúan de manera no específica sobre la función lisosomal o en la etapa de fusión con el autofagosoma. Poco a poco, se está profundizando más en este campo y estudios recientes han permitido el diseño y la identificación de inhibidores selectivos que se dirigen a dianas proteicas determinadas.

Inhibidores de PI3K. Las quinasas PI3K son las encargadas de sintetizar PtdIns3P, imprescindible para la formación inicial del fagóforo. Por lo tanto, los inhibidores de PI3K actúan como inhibidores de autofagia. La familia PI3K está formada por tres isoformas (tipo I, II y III). Mientras las quinasas de clase I inhiben la autofagia, las de clase III inducen este proceso. De manera que los inhibidores de las quinasas de clase I son inductores de autofagia, mientras que los inhibidores de las quinasas de clase III causan la inhibición de este proceso. Ejemplos de esta clase de compuestos son **3-metiladenina (3-MA)** (Figura 11 y 13), **wortmannin** y **LY294002**⁸⁸ (Figura 11). Aunque estos compuestos han sido ampliamente utilizados en investigación básica, no tienen mucha proyección como agentes terapéuticos. La 3-MA por ejemplo se usa a elevadas concentraciones y wortmannin y LY294002 no han progresado en ensayos clínicos debido a su elevada toxicidad y a sus pobres propiedades farmacocinéticas. Además, tienen actividad contra la clase I y la clase III de PI3K, por lo que sus efectos sobre la autofagia pueden ser difíciles de interpretar,⁸⁹ y debido a la similitud entre PI3K y mTOR, también pueden inhibir la vía de señalización de mTOR dando lugar a resultados confusos o inesperados.⁹⁰

Moduladores de Vps34. En células eucariotas existe solo una PI3K de clase III, llamada Vps(vacuolar protein sorting)34 (Figura 11).⁹¹ Vps34 puede formar diferentes complejos. El complejo I contiene Vps34, Vps15, beclin 1 y Atg14L y es esencial en el inicio de la formación del fagóforo, mientras el complejo II, que incluye UVRAG en lugar de Atg14L, participa en endocitosis y en la fusión de autofagosomas con lisosomas.⁹² Por estos motivos, Vps34 es considerado una de las dianas más atractivas en estos momentos, ya que en las células que carecen de Vps34 no se observa formación de autofagosomas causada por falta de nutrientes.⁹¹ Hay que tener en cuenta que debido al papel que Vps34 juega en la regulación del tráfico endocítico, los inhibidores de esta proteína pueden tener efectos secundarios independientes de su función en el bloqueo de la autofagia. Unos de los primeros inhibidores identificados para Vps34 fueron **KU-55933** (Figura 13) y **Gö6976**.⁹³ Más tarde se describió **Spautin-1**, que inhibe las peptidasas específicas de ubiquitina USP10 y USP13 encargadas de deubiquitinar beclin 1, promoviendo así la degradación del complejo Vps34.⁹⁴ Posteriormente, la obtención de la estructura cristalina

de rayos X de la proteína ha permitido el diseño de inhibidores específicos como PIK-93,⁹⁵ **VPS34-IN1**⁹⁶ (Figura 13) o SAR405.⁹⁷ VPS34-IN1 ha demostrado permeabilidad celular y cierta selectividad para Vps34. Después del análisis de 340 quinasas y 25 quinasas lipídicas, se observó que ninguna de ellas es inhibida a concentraciones de 1 μ M, mientras la IC₅₀ observada para Vps34 es de 25 nM. Parecida potencia y selectividad fueron observadas para SAR405, que interacciona con el sitio de unión a ATP. Además, el tratamiento conjunto de SAR405 con everolimus tiene una potente actividad antiproliferativa en células tumorales renales. Más recientemente, ensayos fenotípicos han permitido la identificación de **autofinib**,⁹⁸ que representa un nuevo quimiotipo de inhibidores de Vps34 y además no presenta actividad para otras quinasas lipídicas.

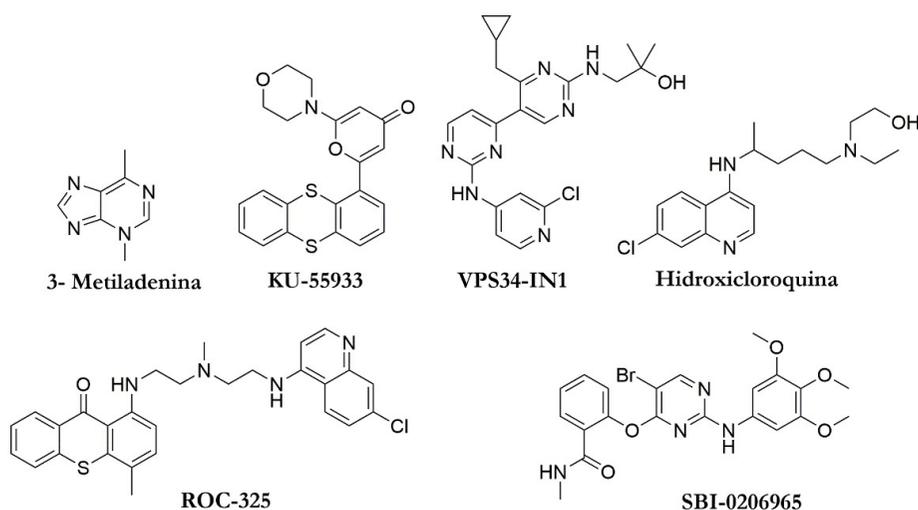


Figura 13. Estructura de algunos de los inhibidores de autofagia descritos.

Inhibidores de ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase): ULK1 desempeña un papel clave en las etapas iniciales de la autofagia y parece estar involucrado también en la regulación de la proliferación.^{99,100,101,102} Esta quinasa posee cuatro ortólogos en humanos (ULK1, ULK2, ULK3, ULK4) siendo ULK1 la más estudiada en relación a la maquinaria autofágica. Tras la falta de nutrientes o la inhibición de mTOR, ULK1 fosforila beclin-1, lo que aumenta la actividad de Atg14L presente en el complejo I de Vps34. Por todos estos motivos existe un gran interés en el desarrollo de inhibidores selectivos de esta quinasa. En el año 2015, el grupo de K.M Shokat, resolvió la estructura de ULK1 junto con la identificación de inhibidores de esta quinasa.¹⁰³ Otros inhibidores descritos incluyen **SBI0206965** (Figura 13),¹⁰⁴ y MRT68921.¹⁰⁵ En estudios combinados con cisplatino y SBI0206965 se observa un aumento de la sensibilidad al cisplatino provocado por

inhibición de autofagia. Estos resultados indican que ULK1 podría ser una diana potencial para revertir la resistencia al cisplatino en ciertos tipos de tumores. Hay que tener en cuenta que todos estos inhibidores presentan baja especificidad, inhibiendo casi el 50% de todas las quinasas estudiadas, por lo que puede ser necesario el desarrollo de nuevas moléculas más específicas.

Inhibidores de la función lisosomal. Las disfunciones lisosomales se asocian con diversas enfermedades relacionadas con la autofagia. El último paso en la autofagia es la fusión del autofagosoma con el lisosoma liberando en su interior el material a degradar por las hidrolasas lisosomales (Figura 11). El lisosoma es un orgánulo celular que participa en una secuencia de funciones biológicas, incluida la degradación de proteínas, la transducción de señales celulares y la homeostasis metabólica.¹⁰⁶ De ahí que la función lisosomal tenga un papel importante no solo en este mecanismo de reciclaje sino también para el funcionamiento global de la célula.

La característica fundamental del lisosoma es su ambiente altamente ácido ($\text{pH}=4.5\text{-}5.0$), lo que proporciona las condiciones adecuadas para que las enzimas hidrolíticas lisosomales realicen su función catalítica y digieran el contenido citosólico. El pH ácido lisosomal se genera mediante la bomba de protones $\text{H}^+/\text{-ATPasa}$ (V-ATPasa). La inhibición de esta bomba de protones provoca la neutralización del pH, bloqueando la función de los enzimas lisosomales y por tanto, bloqueando el mecanismo de autofagia.¹⁰⁷ Ejemplos de esta clase de inhibidores son los antibióticos macrólidos **Bafilomicina A**¹⁰⁸ o **Concanamicina**.

Otra manera de neutralizar el pH lisosomal es a través de agentes lisosomotrópicos lipófilos o anfífilos. Son bases débiles que pueden estar parcialmente desprotonadas a pH fisiológico siendo más fácil su penetración celular, de manera que atraviesan la membrana lisosomal y se protonan en el interior de las vesículas ácidas. Esto provoca el aumento del pH lisosomal e inhibe la actividad de los enzimas hidrolíticos, inhibiendo así indirectamente la autofagia.¹⁰⁹ Los ejemplos más destacados de esta clase de inhibidores incluyen los anteriormente mencionados CQ, HCQ (Figura 13) y propilamina. A pesar de algunos efectos secundarios, fueron los primeros inhibidores de autofagia empleados en ensayos clínicos. Actualmente CQ y HCQ, compuestos aprobados por la FDA para el tratamiento de la malaria, están siendo evaluados junto con agentes quimioterapéuticos en ensayos clínicos de fase II con el fin de explorar su efecto como coadyuvante en la terapia contra el cáncer (Tabla 2). Recientemente, se ha explorado la síntesis de una librería de 60

compuestos derivados de CQ.¹¹⁰ Tras examinar su efectos sobre la inhibición de la autofagia, **VATG-027**¹¹¹ y **VATG-032** resultaron más eficaces y potentes que la CQ. Otro agente aprobado por la FDA como compuesto antimalárico es la **mefloquina**,¹¹² que además de inactivar la función lisosomal en células de cáncer de mama, presenta una potencia mejorada in vitro respecto a la CQ. Posteriormente se desarrolló el compuesto **ROC-325** (Figura 13),¹¹³ derivado de HCQ que inhibe la autofagia en dosis más bajas, induciendo la acumulación en los autofagosomas con carga no degradada y muestra una actividad anticancerígena como agente único significativamente superior a HCQ contra una amplia gama de tumores. Esta clase de inhibidores de autofagia se consideran inhibidores no específicos puesto que cualquier inhibición de la función lisosomal puede afectar a otros procesos celulares. Por lo tanto, se debe tener un especial cuidado a la hora de emplear esta clase de agentes terapéuticos.¹¹⁴

Otras dianas están también implicadas en la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Este es el caso de la GTPasa Rab7¹¹⁵ y las proteínas de membrana asociadas a los lisosomas LAMP-1 y LAMP-2. Sin embargo, la función exacta de estas proteínas todavía es desconocida y por este motivo no se han desarrollado inhibidores específicos de estas proteínas.

En los últimos años se ha avanzado mucho en la identificación y desarrollo de compuestos que inducen o inhiben la autofagia. Existen inhibidores de autofagia ya aprobados en su uso en humanos, como por ejemplo es el caso de la CQ y la HCQ con los cuales se están haciendo ensayos clínicos en combinación con otros fármacos citotóxicos para el tratamiento de tumores. Actualmente, esta metodología de combinación sinérgica es una buena estrategia para el descubrimiento de terapias más efectivas. A pesar de estos avances, existe aún una gran demanda de modulares de autofagia que sean más potentes y específicos. Este tipo de moléculas permitirá mejorar la comprensión de cómo funcionan las cascadas de señalización y los mecanismos moleculares que controlan y regulan la autofagia. Además, la mayoría de los compuestos descritos en la actualidad presentan baja potencia y pobre farmacología. En el caso de los inhibidores de la función lisosomal se observan múltiples efectos tóxicos pleiotrópicos. El desarrollo de nuevos inhibidores permitiría encontrar dianas terapéuticas interesantes y desarrollar nuevos agentes terapéuticos específicos y por lo tanto con menores efectos secundarios

5.- Atg4B, diana terapéutica de la autofagia

Como se ha descrito en el apartado anterior, la identificación y bloqueo de dianas específicas para la autofagia es un área de investigación emergente. Hasta el momento, el interés se ha centrado en algunos miembros de la familia de PI3K (Vps34), en la quinasa ULK1 y en la inhibición de la función lisosomal. Se han puesto también muchas esperanzas en las proteínas Atg responsables de los mecanismos moleculares de la autofagia, aunque trabajos recientes sugieren su implicación en otros procesos celulares.^{13,116}

Tal como se ha mencionado anteriormente, la elongación del autofagosoma requiere la actividad de dos vías de conjugación que utiliza enzimas parecidos a los responsables de la ubiquitinación de proteínas. En primer lugar, Atg7 y Atg10 actúan respectivamente como enzima de tipo E1 y E2 para unir Atg5 a Atg12 a través de un enlace glicil-lisina. Este complejo Atg5/Atg12 actúa posteriormente como una enzima E3 y une LC3-I a una molécula de fosfatidiletanolamina. En este último paso también están involucradas Atg7 y Atg3 que actúan como enzimas de tipo E1 y E2 y la cisteína proteasa Atg4 que genera LC3-I a partir de proLC3. Todas estas proteínas han sido consideradas dianas potenciales de interés para la modulación de la autofagia (Figura 14).

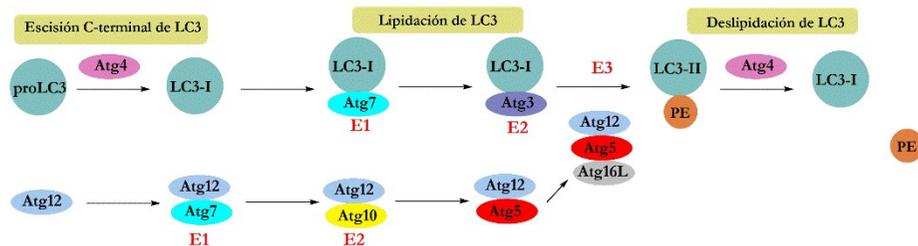


Figura 14. El alargamiento autofagosómico requiere la síntesis de la proteína lipitada LC3-II mediante dos sistemas de conjugaciones tipo ubiquitina.

Algunas aproximaciones para inhibir alguna de estas proteínas se basan en el bloqueo de interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, la actividad de Atg8 (homólogo de las subfamilias LC3/GABARAP en mamíferos) es crucial para la supervivencia de *Plasmodium falciparum*, el parásito responsable de la malaria. La inhibición mediante moléculas pequeñas de la interacción no covalente entre Atg8 y Atg3 impide la lipitación de Atg8 y disminuye la infección del parásito.¹¹⁷ Diferencias existentes entre las estructuras humanas y del parásito podrían permitir en este caso cierta especificidad.¹¹⁸ A pesar de estos resultados preliminares, el bloqueo de interacciones proteína-proteína sigue siendo un campo difícil, debido a la gran superficie que hay que bloquear mediante moléculas de pequeño tamaño. Recientemente, se ha descrito que la oxidación de Atg3 y Atg7 impide la lipitación de LC3,

sugiriendo que el desarrollo de terapias destinadas a bloquear la cisteína catalítica de estas dos proteínas puede contribuir a bloquear autofagia celular.¹¹⁹

A pesar de estos resultados preliminares destinados al bloqueo de Atg3 y Atg7, la proteína más explorada para el bloqueo de la autofagia es seguramente Atg4, la proteasa responsable de la escisión de proLC3 para formar LC3-I y de la posterior deslipidación de LC3-II, asociada a la membrana del autofagosoma, para reciclarla en forma de la proteína citosólica LC3-I.

A diferencia de las levaduras, las cuales únicamente poseen los genes ATG4 y ATG8, en mamíferos existe la presencia de cuatro genes homólogos ATG4 (ATG4A, ATG4B, ATG4C y ATG4D)¹²⁰ y siete genes ATG8 homólogos organizados en dos subfamilias (tres isoformas de LC3A/B/C, y las isoformas GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2/GATE-16).¹²¹ Parece ser que las isoformas de Atg8 presentan diferentes funciones. Así pues, mientras LC3B participa en la elongación de la membrana del fagóforo, la subfamilia GABARAP estaría más implicada en la maduración del autofagosoma.¹²² En lo que se refiere a la cisteína proteasa, Atg4B es la más activa proteolíticamente y tiene un espectro más amplio de especificidad hacia los sustratos, ya que puede escindir tanto a LC3 como a la subfamilia GABARAP. La inhibición química o genética de Atg4B conlleva a defectos importantes en la lipidación de esta familia de proteínas y en el proceso de autofagia,^{123,124} e inhibe el crecimiento del tumor en células cancerosas.^{125,126} Por ello, Atg4B puede ser considerada como una diana interesante para la identificación de moduladores específicos de autofagia.

5.1.- Inhibidores de Atg4B

En los últimos años, se han descrito una serie de inhibidores con actividad sobre Atg4B. Estos compuestos son moléculas de pequeño tamaño e incluyen entre otros **inhibidores covalentes** (haloalquilcetona basadas en la estructura del sustrato como la Z-L-fenilclorometilcetona o **FMK-9a**)^{127,128} y estructuras polifenólicas (201508)¹²⁹ o el **ácido aurintricarboxílico**¹³⁰ (Figura 15). El compuesto **NSC185058** fue identificado tras realizar un cribado virtual centrado en un sitio alostérico de Atg4B¹³¹ y un reciente estudio de reposicionamiento ha determinado la actividad inhibitoria del fármaco antifúngico **tioconazol**.¹³² Además, recientemente se han descrito otros inhibidores de Atg4B como la benzotropolona **UAMC-2526**,¹³³ la quinolina **LV-320**¹³⁴ y **S-130**¹³⁵ (Figura 15). Sin embargo, aunque existen algunos inhibidores de interesante estructura, la mayoría de estos compuestos son identificados como inhibidores promiscuos que carecen de las propiedades farmacológicas necesarias para su optimización. Por tanto, existe una necesidad de identificar nuevas estructuras capaces de inhibir esta proteasa. Este tipo de inhibidores podrían ser una herramienta muy interesante para determinar la función de Atg4B en la regulación de la autofagia, así como suponer una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades.

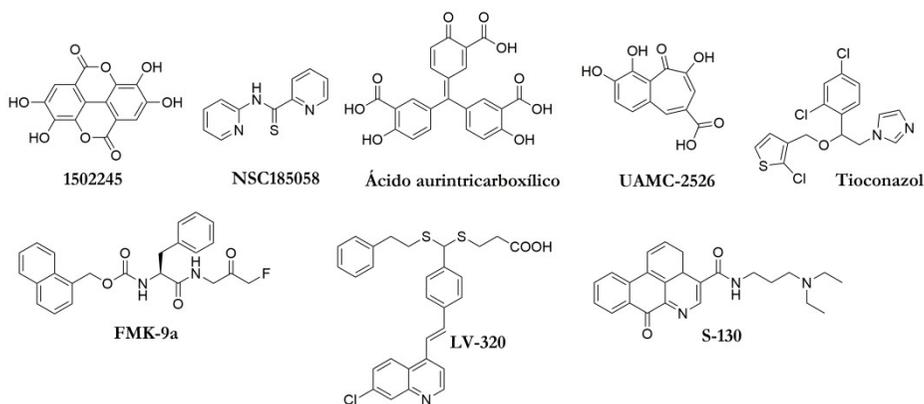


Figura 15. Estructura de los inhibidores de Atg4B conocidos en la actualidad. [Compuesto (IC_{50}) **1502245**¹²⁹ (3.0 μ M), **NSC185058**¹³¹ (51 μ M), **ácido aurintricarboxílico**¹³⁶ (1.3 μ M), **UAMC-2526**¹³³ (2.3 μ M), **FMK-9a**¹³⁷ (0.36 μ M), **LV-320**¹³⁸ (24.5 μ M), **S-130**¹³⁵ (3.24 μ M).

OBJETIVOS

El primer capítulo de esta tesis se enmarca en un proyecto global llevado a cabo en el grupo y cuyo objetivo general es la identificación de inhibidores de autofagia centrados en la cisteína proteasa Atg4B. En los últimos años se ha comprobado que niveles elevados o deficientes de autofagia están directamente relacionados con varias enfermedades y, por tanto, la modulación de este mecanismo se ha convertido en una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer. Basándonos en estas consideraciones, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Establecer un ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS) para la detección de inhibidores de Atg4B.
- El análisis estructural y computacional mediante estudios de dinámica molecular de la proteína y el establecimiento de los requisitos para actuar e interactuar con LC3.
- Realizar un cribado virtual de alto rendimiento (HTVS) empleando una biblioteca perteneciente al repositorio abierto del Instituto Nacional del Cáncer con la finalidad de identificar potenciales inhibidores de Atg4B.
- Diseño y síntesis de pequeñas bibliotecas de análogos obteniendo inhibidores potentes y selectivos basados en los compuestos activos identificados.
- Evaluación del efecto de los inhibidores de Atg4B sintetizados en cultivos de líneas celulares tumorales.

En este capítulo se mencionarán brevemente los estudios realizados para establecer un ensayo de tipo HTS, así como el análisis estructural y computacional de las proteínas LC3 y Atg4B y se explicarán con más detalle los objetivos en los que he trabajado más intensamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Desarrollo de un ensayo de cribado de alto rendimiento para la detección de inhibidores de Atg4B

El principal objetivo de este capítulo es demostrar que la modulación química de la cisteína proteasa Atg4B puede dar lugar a la inhibición selectiva de la autofagia y así servir de base para futuras intervenciones farmacológicas para el tratamiento del cáncer. Tal y como se ha comentado en la introducción, el mal funcionamiento de la autofagia contribuye a la patogénesis de una variedad de enfermedades incluyendo infecciones virales, bacterianas o parasitarias, cáncer y trastornos neurodegenerativos, entre otros. Nuestra comprensión del papel que juega la autofagia en el desarrollo de estas enfermedades está limitada por la falta de moduladores específicos y potentes.

En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para la determinación de la actividad de Atg4B. En todos los casos es necesario emplear como sustratos proteínas de longitud completa, ya que sino la proteasa no actúa de manera eficiente^{136,139,140} o presenta valores moderados de K_m .¹³⁰ Uno de los primeros métodos descritos se basaba en la cuantificación de la actividad de la cisteína proteasa mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE) utilizando como sustrato una proteína de fusión, la LC3B-glutación S-transferasa (LC3B-GST). El tanto por ciento de LC3B-GST no escindida se utiliza como una medida de actividad de Atg4B.^{139,140} Posteriormente se desarrolló un ensayo indirecto que utiliza una proteína de fusión (LC3B-PLA₂) como sustrato. Tras la escisión catalizada por Atg4B, se libera fosfolipasa A₂ (PLA₂) y su actividad, medida con un ensayo fluorogénico, se utiliza como método indirecto para determinar la actividad de Atg4B.¹⁴¹ Estos dos ensayos han permitido la identificación de inhibidores de la enzima pero tienen ciertas limitaciones. El primero de ellos no es adecuado para ensayos HTS y el segundo requiere identificar y descartar aquellos compuestos que inhiben directamente la PLA₂. Otro de los ensayos que se desarrollaron se basaba en la transferencia de energía de resonancia Förster (FRET, del inglés Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer)^{136,142} donde el sustrato LC3B es expresado como proteína de fusión (YFP-LC3B-EmGFP) presentando una proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés green fluorescent protein) en un extremo y una proteína fluorescente amarilla (YFP, yellow fluorescent protein) en el otro. Esta técnica se basa en la transferencia de energía entre cromóforos o fluoróforos. Si el espectro de emisión del donador y de excitación del aceptor se superponen se produce la transferencia de energía que permite la emisión de energía del aceptor. Así pues, si el sustrato se mantiene intacto se produce transferencia de la energía y, por lo tanto señal. En cambio, si el sustrato

es escindido se pierde la señal. En este ensayo se necesita mucho menos sustrato que en el basado en SDS-PAGE, ofrece respuestas cuantitativas dependiente del tiempo y la dosis, el uso de la proteína completa como sustrato asegura la máxima especificidad y es adecuado para el cribado de alto rendimiento. Sin embargo, se observó que presentaba una superposición significativa de los espectros de emisión del donante y del aceptor pudiendo dar lugar a falsos negativos. Finalmente, se ha descrito un ensayo basado en la tecnología FRET resuelta en el tiempo (TR-FRET, del inglés “time-resolved fluorescence resonance energy transfer”) empleando una proteína GABARAPL2/GATE-16 doblemente etiquetada. Esta técnica emplea complejos de lantánidos como fluoróforos (Eu^{3+} , Tb^{2+}), ya que debido a sus largos tiempos de emisión (de microsegundos a milisegundos), permiten una medida retardada de fluorescencia evitando así la interferencia de componentes del ensayo o de los mismos compuestos a ensayar. En este caso, el uso de LC3B tuvo que ser descartado porque no podía ser procesada de manera eficiente en las mismas condiciones que GABARAPL2/GATE-16 (Atg4B escindió el 90% de GABARAPL2 y únicamente el 10% de LC3B en el mismo tiempo de reacción).¹³⁷

Por tanto, en los últimos años se han puesto a punto diferentes protocolos experimentales para la detección de la inhibición/actividad enzimática de la cisteína proteasa Atg4B. Algunos de ellos no son aptos para cribados de alto rendimiento y otros presentan importantes limitaciones. Así pues, el primer objetivo que se planteó fue el establecimiento de un ensayo de actividad para Atg4B. Este trabajo se realizó en colaboración con otro miembro del grupo de investigación, Mireia Quintana. Tal como se muestra con detalle en su Tesis doctoral se preparó una proteína LC3B doblemente etiquetada (Figura 16).¹⁴³ En el extremo amino terminal la proteína presentaba una cola de histidinas (His_6) que codifica para seis residuos de histidina, mientras que en el extremo carboxilo terminal se incorporó una molécula de biotina. La modificación selectiva se llevó a cabo mediante la introducción de un residuo de cisteína en la leucina 123 por medio de mutagénesis dirigida, seguida de una reacción de acoplamiento con una maleimida funcionalizada. El protocolo para la síntesis y purificación de la proteína doblemente marcada puede verse en la figura 16. La identidad y pureza de la proteína modificada se evaluaron mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) y análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, del inglés “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of-Flight”).

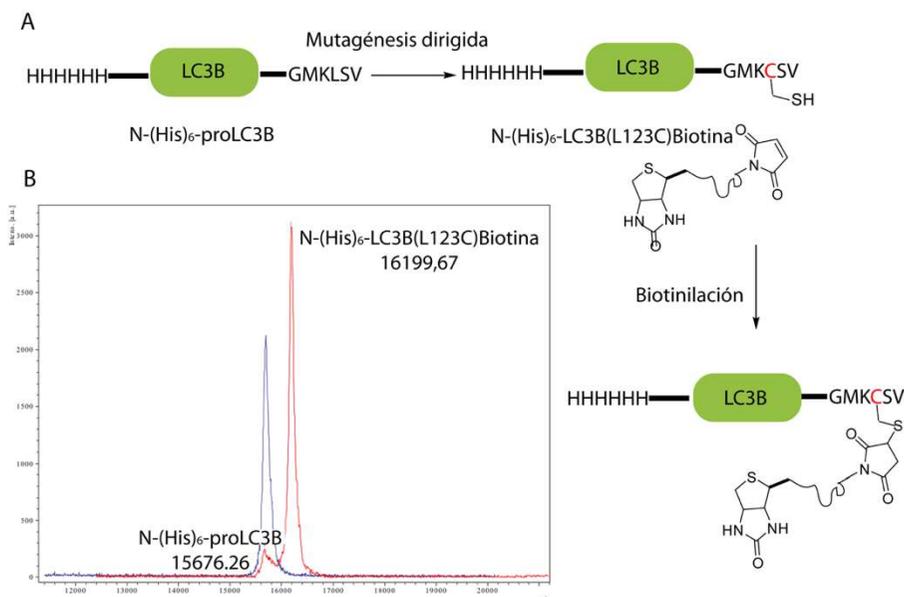


Figura 16. A) Se preparó una proteína LC3B mutada mediante introducción por mutagénesis dirigida de un residuo de cisteína en la leucina 123 (L123C). La proteína resultante se trató con una biotina que contiene un grupo maleimida para generar la proteína doblemente marcada (N-(His)₆-LC3B(L123C)Biotina). B) Determinación de la pureza e identidad de la proteína por MALDI-TOF.

En un primer momento se exploró un ensayo de tipo TR-FRET pero al no observarse señal de transferencia de la energía se utilizó el mismo sustrato para desarrollar un ensayo de cribado de alto rendimiento basado en la tecnología AlphaScreen. Esta técnica proporciona un método fácil y robusto para determinar el efecto de los compuestos en las interacciones y actividades biomoleculares. En esta metodología se emplean unas perlas dadoras y receptoras recubiertas con una capa de hidrogel que contiene grupos funcionales para su correspondiente derivatización. Cuando las moléculas interactúan biológicamente y las perlas dadoras y receptoras se encuentran a cierta proximidad, se desencadena una cascada de reacciones químicas dando lugar a una señal amplificada (Figura 17). Brevemente, después de la excitación con un láser a 680 nm, una molécula fotosensibilizadora en las perlas del donante convierte el oxígeno ambiental en oxígeno singlete. Estas moléculas, difunden y viajan hacia las perlas receptoras (a una distancia máxima de 200 nm) reaccionando con una molécula quimioluminiscente presente en las mismas y emitiendo luz a una longitud de onda entre 520-620 nm. En ausencia de una interacción específica, la distancia entre las perlas del donante y receptor es mayor, por lo que se produce una pérdida de la señal. Esta metodología se ha empleado en ensayos enzimáticos, de interacción (ligando/receptor, proteína/proteína, proteína/ADN) entre otros.

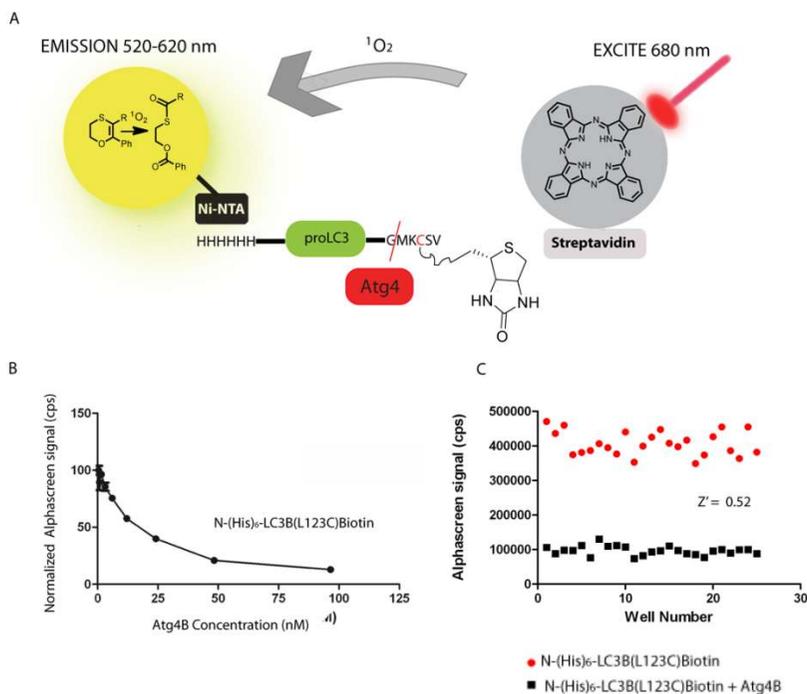


Figura 17. A) Ensayo basado en la tecnología AlphaScreen. B) Curva de valoración de N-(His)₆-LC3B(L123C) Biotina tratada con concentraciones crecientes de Atg4B. C) Representación de la variabilidad y el rango entre el control positivo (máxima señal) y el control negativo (mínima señal) que permite el cálculo del factor Z a partir de la fórmula ($Z = 1 - (3\sigma \text{ muestra} + 3\sigma \text{ control}) / |\text{media de la muestra} - \text{media del control}|$; σ desviación estándar).

Algunas de las ventajas que presenta dicha metodología son las siguientes. La técnica presenta una gran **sensibilidad** y la longitud de onda de excitación larga de 680 nm combinada con una longitud de onda de emisión corta (520-620 nm) reduce la interferencia entre ambas y genera muy poco ruido de fondo. Además, debido a la elevada concentración de moléculas fotosensibilizadoras, cada perla dadora puede generar hasta 60.000 especies de oxígeno singlete por segundo, se produce una **gran amplificación** de la señal permitiendo el uso de pequeños volúmenes y detectando interacciones a nivel femtomolar. Igualmente, es un ensayo **homogéneo**, ya que no requiere de varios pasos o lavados en su procedimiento, **miniaturizable** y **adaptable** a formatos de placas de 96, 384 y 1536 pocillos, **altamente versátil**, ofreciendo la posibilidad de analizar muchas interacciones biológicas y es capaz de detectar un **amplio rango** de interacciones con afinidades desde subnM hasta el rango μM .

Para reconocer el sustrato doblemente marcado se utilizaron perlas dadoras recubiertas de estreptavidina y perlasceptoras cubiertas de un quelato metálico de níquel y ácido nitrilotriacético (Ni^{2+} -NTA). Si la proteína sustrato está intacta, las dos perlas se

encuentran próximas en el espacio dando lugar a una señal elevada mientras que la escisión catalizada por Atg4B en la glicina 120 de la proteína marcada produciría un aumento entre la distancia de los dos marcadores causando una disminución de la señal, que podría ser evitada por la presencia de inhibidores de la cisteína proteasa (Figura 17A).

En primer lugar se comprobó que la proteína doblemente marcada era sustrato del enzima y luego se exploraron las condiciones óptimas de ensayo. La estabilidad de la señal se investigó utilizando diferentes soluciones tampón, pH, concentración de sales, contenido en DMSO y aditivos. A continuación, el siguiente parámetro a determinar fue la concentración de enzima necesaria para tener una señal de ensayo robusta utilizando concentraciones crecientes de enzima (Figura 17B). Se eligió como periodo de incubación 30 min a 37 °C porque permite adaptar en un futuro el ensayo de grandes librerías de compuestos de manera rápida y a una concentración de enzima que mostrará una señal ~3-4 veces mayor que el ruido (los ensayos que se basan en disminución de la señal requieren la utilización de concentraciones suficientemente elevadas de enzima para asegurar una buena ventana de detección).^{144,145} Con las condiciones de ensayo optimizadas (tampón Hepes 25 mM pH 8, que contiene NaCl a 150 mM, Tritón X-100, 0.1 % BSA (del inglés “Bovine Serum Albumin”), 1 % glicerol y 1mM de TCEP) se obtiene una buena estabilidad y consistencia en el ensayo con una factor Z' de 0.52 (Figura 17C). El factor Z , conocido comúnmente como Z' , es un parámetro estadístico utilizado para valorar la calidad global de un ensayo de tipo HTS. Fue desarrollado por Zhang y Oldenburg en 1999 y considera los factores que afectan tanto al rango dinámico como la variación en las determinaciones obtenidas para un grupo de controles tanto positivos como negativos.¹⁴⁶ De manera general, un valor ideal de Z' estaría cercano a 1. Valores entre 0.5-1 se consideran de elevada calidad, mientras que valores <0.5 se consideran de calidad buena o moderada. Un valor <0 indica que el ensayo no puede ser usado para HTS. Además, con la intención de validar el ensayo puesto a punto se utilizaron inhibidores conocidos como control positivo. Se observó una inhibición dosis-dependiente con la Z-L-fenilclorometilcetona con una IC_{50} of 38 μ M, validando su uso para la detección de inhibidores. El ensayo que se ha descrito en esta sección, fue el que se estableció para la búsqueda de inhibidores de Atg4B.

2.- Análisis estructural computacional

Actualmente en la literatura se encuentran descritas varias estructuras de rayos X de la enzima humana Atg4B.^{146,147,148} En general, la estructura tridimensional de la proteína se compone de un lóbulo izquierdo denominado “dominio de proteasa” y un pequeño lóbulo derecho llamado “dominio auxiliar” (Figura 18). Mientras que la estructura del dominio de proteasa coincide con la de la superfamilia de cisteína proteasas de la papaína, el dominio auxiliar contiene una estructura única con una función aún desconocida.¹⁴⁶

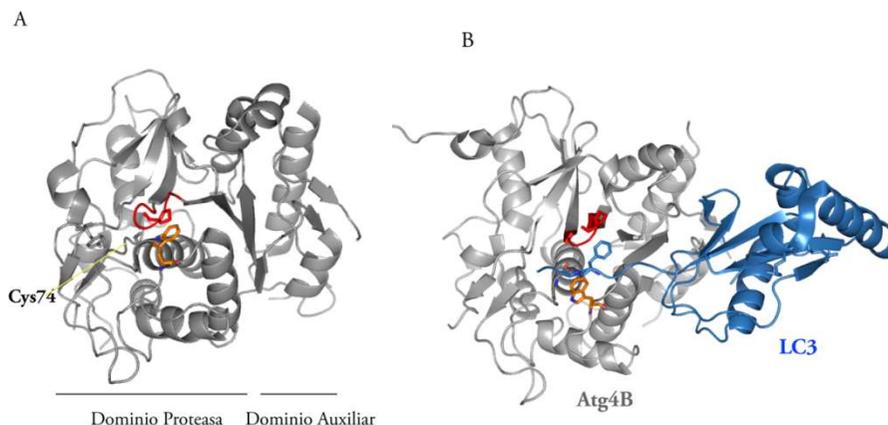
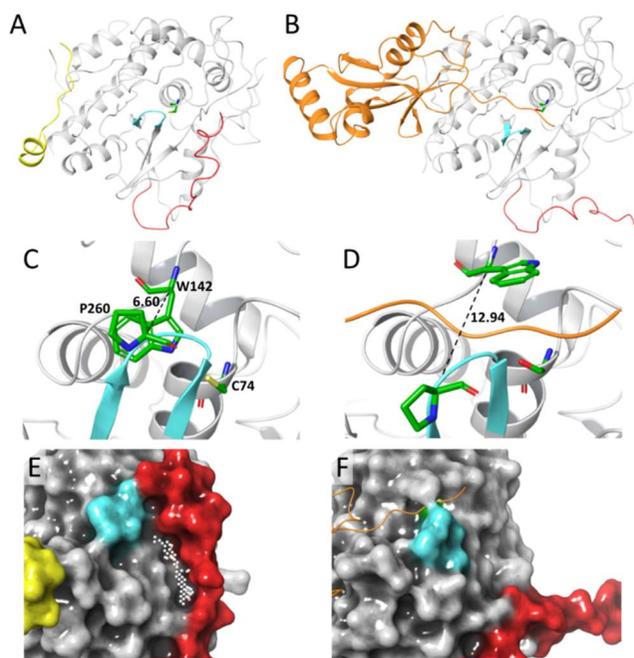


Figura 18. A) Estructura tridimensional esquemática de Atg4B (estructura cerrada). Los códigos de color son: bucle regulador, rojo y triptófano 142 (W142), naranja. El bucle regulador y W142 enmascaran la entrada al centro activo de la cisteína catalítica 74 (Cys74). La estructura se compone de un lóbulo izquierdo (dominio de proteasa) y un pequeño lóbulo derecho (dominio auxiliar). B) Complejo Atg4B-LC3 (estructura abierta). Los códigos de color son: sustrato LC3 natural, azul; fenilalanina 119 (F119) del sustrato LC3, azul. Cuando LC3 se une a la cisteína proteasa Atg4B, la cadena lateral de W142 se reemplaza por F119 de LC3. El bucle regulador y la cadena lateral de W142 experimentan un cambio conformacional formando un surco a lo largo del cual la cola de LC3 accede a la Cys74.

Las estructuras de rayos X muestran la existencia de dos poblaciones diferentes de la enzima: una forma cerrada en la cual ningún sustrato se encuentra unido al sitio activo, permaneciendo este enmascarado por un bucle regulador (residuos 258-263) junto con el residuo de triptófano 142 (Trp, W), y la forma abierta generada por la unión del sustrato LC3 al centro activo provocando un cambio conformacional. En la base de datos de proteínas (PDB, del inglés Protein Data Bank) la estructura PDB 2CY7¹⁴⁸ representa a la forma cerrada de la Atg4B y la estructura PDB 2ZZP¹⁴⁷, que representa el complejo LC3 con un mutante inactivo de Atg4 (C74S) corresponde a la forma abierta (Figura 18B). El cambio de conformación del bucle regulador que se produce tras la unión del sustrato es responsable de la especificidad de Atg4B frente a la secuencia fenilalanina (Phe, F) - glicina (Gly, G), que es distinta a la secuencia Gly-Gly presente entre los modificadores de tipo ubiquitina.¹⁴⁶ Así pues, al unirse LC3 a Atg4B la F119 reemplaza al W142 y fuerza la

abertura del bucle regulador formando una pequeña cavidad en la entrada del centro activo en la que solo cabe un residuo de glicina. La presencia de la región C-terminal no es suficiente para abrir el bucle regulador sino que es necesaria la interacción de toda la proteína LC3 con Atg4B, lo que explica las bajas afinidades observadas con sustratos peptídicos. Además, la unión de LC3 al sitio activo produce cambios conformacionales adicionales en la estructura de Atg4B. En particular, la cola N-terminal muestra un cambio en la conformación abierta respecto a la conformación cerrada. Este extremo N-terminal se encuentra ubicado a la salida del centro activo en la forma abierta, y cuando se forma el complejo con LC3 se mueve separándose del núcleo de la proteína. Además, la cola situada en el extremo C-terminal también se desplaza de su ubicación tras la formación del complejo (Figura 19A,B).¹⁴⁷

Figura 19. (A) Estructura cristalina de Atg4B libre (PDB 2CY7) y (B) complejo LC3-Atg4B C74S



(PDB 2ZZP), donde se muestra la cola N-terminal (residuos 5-26) en rojo, la cola C-terminal (355-377) en amarillo (A), el bucle regulador (258-263) en cian, el sustrato LC3 en naranja (B) y la cisteína catalítica (C74, A) o la serina introducida por mutagénesis (S74, B) con átomos de carbono verdes. (C) Vista detallada del centro activo de Atg4B en la forma cerrada, donde se muestra la distancia de los átomos C α de los residuos W142 y P260. (D) Vista detallada del centro activo del complejo LC3-Atg4B C74S. Representación superficial de Atg4B en 2CY7 (E) y 2ZZP (F) muestra la región cercana a los residuos D278 y H280, donde se resalta con esferas blancas el sitio potencial de unión al ligando presente solo en la forma cerrada. La coloración de las superficies es la misma que en las imágenes A-B.

Los siguientes apartados (análisis estructural computacional y HTVS) fueron realizados en colaboración con Jordi Bujons, IQAC-CSIC. Con la intención de obtener información acerca de la movilidad conformacional de Atg4B y determinar si la forma abierta de la proteína solamente está accesible cuando el sustrato LC3 está unido, se llevaron a cabo estudios de dinámica molecular sobre las formas abierta y cerrada de la estructura de Atg4B. Con este propósito y dado el alto número de residuos no resueltos en las estructuras cristalinas de la proteína, se obtuvo un modelo de la forma cerrada de la base de datos ModBase de los modelos comparativos de estructura proteica,¹⁵⁰ (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi>) que contiene la estructura completa de los residuos 5-377 y la denominamos “2CY7_full” ya que estaba basada en la estructura 2CY7. Además, basándonos en dicho modelo 2CY7_full y en la estructura cristalina 2ZZP, también construimos un modelo estructural de la secuencia completa Atg4B C74S entre los residuos 6-354 unidos a LC3, que llamamos “2ZZP_full”. Por tanto, estos dos modelos fueron sometidos a dinámica molecular (500 ns) en presencia de disolvente. Los resultados de las simulaciones mostraron que mientras el complejo LC3-Atg4B es mayoritariamente estable a lo largo de toda la simulación, es decir, el sustrato LC3 y el bucle regulador permanecen en su lugar, en ausencia de sustrato la estructura del Atg4B fluctúa entre dos conformaciones correspondientes a los estados cerrado y abierto de la proteína (Figura 20).

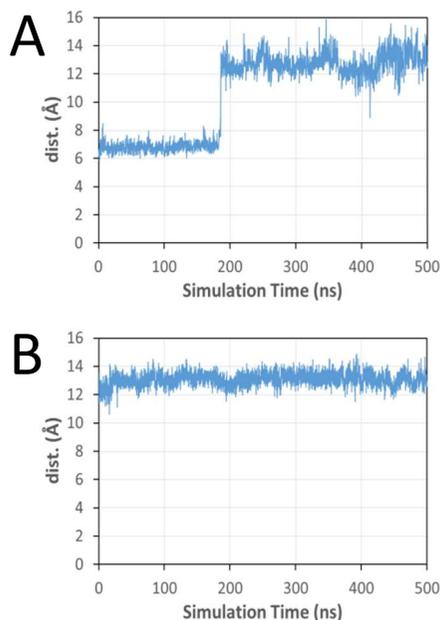


Figura 20. Resultados de las simulaciones de dinámica molecular: Dependencia en el tiempo de la distancia entre los átomos de C_{α} de los residuos W142 y P260 de Atg4B de las simulaciones de (A) 2CY7_full y (B) 2ZZP_full.

Este hecho queda claro al analizar la distancia entre los átomos de C_{α} de los residuos W142 y P260 de Atg4B, que en la forma cerrada interactúan y fijan la conformación del bucle regulador, cuya distancia entre C_{α}^{142} - C_{α}^{260} es aproximadamente de 6.6 Å, mientras en la forma abierta la distancia aumenta a aproximadamente 13 Å (Figura 19C-D). En la simulación de “2ZZP_full” esta distancia permanece esencialmente imperturbable y cercana a 13 Å durante toda la simulación, mientras que para “2CY7-full” esa distancia permanece cercana a 7 Å durante los 180 ns iniciales, pero luego aumenta a aproximadamente a 13 Å y permanece así durante el resto de la simulación. Estos resultados sugieren que no se requiere la presencia del sustrato LC3 para alcanzar la forma abierta de Atg4B, y que los ligandos potenciales podrían unirse al sitio activo de la proteasa, interfiriendo directamente con la unión del sustrato natural. También se estudió un sitio alternativo de unión situado cerca de los residuos D278 y H280 (Figura 19E-F), en la interfaz entre la cola N-terminal y el núcleo de la forma cerrada de la proteína, como diana para identificar compuestos que podrían bloquear Atg4B en su forma cerrada inactiva. Este sitio de unión ya había sido anteriormente propuesto para la identificación de inhibidores de Atg4B. De hecho, el compuesto NSC185058 mencionado en la introducción surgió después del cribado virtual de una librería de compuestos dirigida a

este sitio de unión.¹³¹ Este sitio se muestra en la figura 19E y los resultados de dinámica molecular muestran que, aunque se presenten pequeños cambios en la forma cerrada, esta región perdura durante toda la simulación (Figura 21A). Por el contrario, la unión de LC3 induce un cambio en la conformación de la cola N-terminal que elimina este sitio (Figura 21B) y no se restaura durante la simulación. Por lo tanto, se eligió la estructura Atg4B de “2ZZP_full” para identificar ligandos que podrían unirse al sitio activo, mientras que la estructura “2CY7_full” fue seleccionada para identificar ligandos que podrían dirigirse al segundo sitio alternativo.

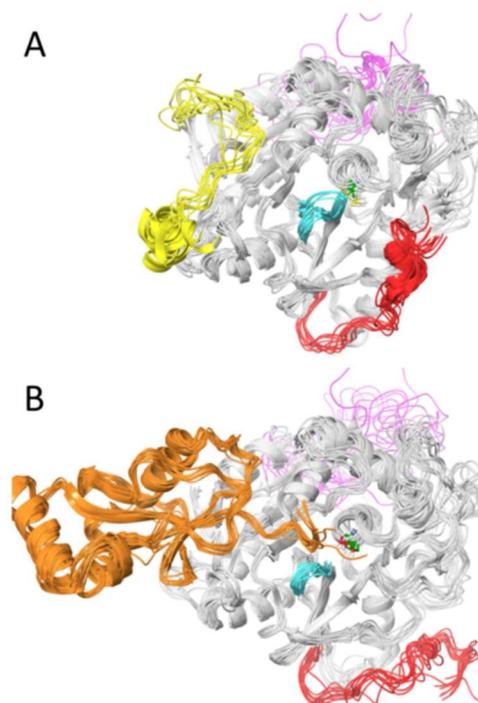


Figura 21. Instantáneas a intervalos de 50 ns de simulaciones de dinámica molecular de los sistemas (A) 2CY7_full y (B) 2ZZP_full, que muestran la cola N-terminal (residuos 5-26) en rojo, la cola C-terminal (355-377) en amarillo (A), el bucle regulador (258-263) en cian, el gran bucle sin resolución cristalográfica entre los residuos 187-217 en magenta, el sustrato LC3 en naranja (B) y la cisteína catalítica (C74, A) o la serina introducida mediante una mutación (S74, B) con átomos de C verdes.

3.- Cribado Virtual de Alto Rendimiento (HTVS)

El cribado virtual (VS) de bibliotecas de compuestos químicos es una técnica computacional utilizada en el descubrimiento de fármacos para la búsqueda de nuevos candidatos. Esta técnica identifica, a partir de una gran biblioteca de compuestos virtuales, potenciales compuestos activos con las propiedades adecuadas para unirse a una proteína diana. Es una herramienta muy útil y facilita un filtrado inicial para decidir que compuestos van a ser testados experimentalmente, lo que acelera el proceso y rebaja significativamente su coste.

Las técnicas de VS se pueden dividir en dos categorías: cribado virtual basado en estructuras (SBVS, structure-based virtual screening) y cribado virtual basado en el ligando (LBVS, ligand-based virtual screening). El SBVS requiere de la estructura tridimensional de la diana terapéutica, bien obtenida por métodos experimentales (cristalografía de rayos X o RMN) o bien a través de la construcción de modelos moleculares, y utiliza la estructura del receptor para explorar el espacio químico identificando ligandos en bases de datos de compuestos. En cambio, el LBVS se basa en el análisis y comparación de propiedades moleculares y datos de afinidad de ligandos conocidos, sin tener en cuenta la estructura de dicho receptor y asumiendo que las moléculas estructuralmente relacionadas deberían mostrar actividades biológicas similares. Ambos métodos han sido utilizados en el descubrimiento de nuevos fármacos candidatos para dianas terapéuticas.

El cribado virtual basado en el docking molecular es una de las aproximaciones más utilizadas. Existen varios programas de docking para estimar la fortaleza de la unión entre un ligando y una diana, tanto comerciales (LigandFit,¹⁵¹ Glide,¹⁵² GOLD¹⁵³) como de origen académico (Autodock Vina,¹⁵⁴ rDock,¹⁵⁵ LeDock¹⁵⁶), todos con sus ventajas y limitaciones. Estos programas proporcionan una predicción del modo de unión (binding pose) así como de su afinidad (score). La puntuación (score) de cualquier software de acoplamiento utiliza ecuaciones para calcular las interacciones de unión. Después de la suma de estas interacciones se obtienen puntuaciones para cada posición del ligando en el receptor. Estas puntuaciones varían según el campo de fuerza que utiliza el software para calcular las interacciones. En el caso de Autodock Vina, el campo de fuerza empleado es AMBER, mientras que para Glide es OPLS. La diferencia entre ambos es que los cálculos son más sofisticados en Glide, puesto que posee características avanzadas para el cálculo de la interacción π - π , la interacción π -catión y la planaridad del anillo aromático entre otras. Otra decisión importante al realizar un cribado virtual es la selección de la quimioteca virtual, que debe presentar gran diversidad estructural y cobertura del espacio químico.

Además las librerías pueden proceder de proveedores comerciales (Bioscreen®, ChemBridge®, eMolecules) o ser de origen público (ZINC, PubChem, ChemSpider, NCI Open DataBase (NCIOD), ChemBD).¹⁵⁷ Estas bases de datos pueden incluir fármacos conocidos, carbohidratos, compuestos sintéticos, de origen natural, fragmentos, etc. Su composición puede ir desde varios cientos de miles (NCIOD, WOMBAT) a varios millones (ZINC, ChemSpider). Pueden contener información de actividad biológica (WOMBAT, ChemBl) y pueden ser públicas pero formadas por compuestos de origen comercial (ZINC) o proporcionar compuestos de manera gratuita (NCIOD). Las bibliotecas comerciales presentan una mayor variabilidad en su estructura y tienen una pureza garantizada aunque a un coste más elevado, mientras que las bibliotecas públicas son en algunos casos meros catálogos de productos comerciales o repositorios de compuestos sin garantizar su pureza o identidad.

Así pues, una vez identificadas los dos modelos basados en las estructuras cristalinas para la cisteína proteasa Atg4B humana,^{146,147,148} se utilizó una técnica de SBVS aplicada a la base de datos del Instituto Nacional de Cáncer (NCI, National Cancer Institute) perteneciente al National Institute of Health (NIH) estadounidense, usando como dianas las estructuras 2CY7_full (forma cerrada) y 2ZZP_full (forma abierta). Esta base de datos contiene aproximadamente 265.000 estructuras generalmente disponibles de forma gratuita, con información sobre su estructura 3D y algunas propiedades ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción). Después de un filtrado inicial para eliminar aquellos compuestos con propiedades no deseadas, se realizó una expansión estructural para generar diferentes tautómeros, protómeros y análogos conformacionales obteniéndose 395712 estructuras que fueron estudiadas mediante HTVS dirigiéndose a las dos estructuras de Atg4B disponibles, 2CY7_full y 2ZZP_full. En cada caso se utilizaron dos softwares de acoplamiento o docking diferentes Glide^{158,159,160} y Autodock Vina, obteniéndose 4 listas de potenciales inhibidores de Atg4B: Glide VS 2CY7; Glide VS 2ZZP, Vina VS 2CY7 y Vina VS 2ZZP (Figura 22).

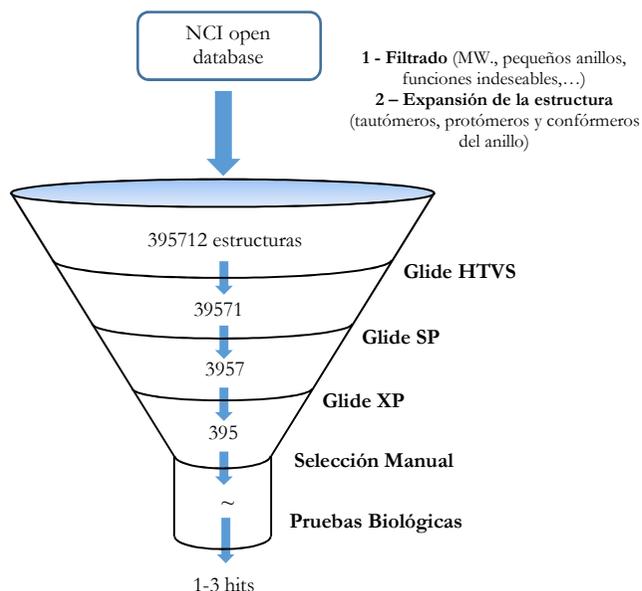


Figura 22. Embudo de selección en la identificación de los ligandos para cada una de las estructuras de Atg4B empleando el método de acoplamiento Glide.

A partir de los compuestos ordenados según la puntuación (score) obtenida en cada aproximación, se descartaron aquellos potencialmente reactivos o con propiedades indeseadas (PAINS). Se conocen como PAINS (Pan-assay interference compounds) a ese tipo de moléculas que por la presencia de grupos reactivos u otras funcionalidades indeseables pueden interferir con las técnicas de detección y dar lugar a falsos positivos en ensayos biológicos.^{161,162} Estas moléculas pueden enmascarar la señal formando agregados, interaccionando de manera inespecífica con proteínas o bien interfiriendo en el ensayo. Generalmente, en el cribado de una biblioteca académica, entre el 5 y el 12 % de sus miembros pueden ser considerados PAINS.¹⁶² Algunos de estos compuestos presentan toxicóforos (grupos nitro, anilina, hidantoína, peróxido de haluro de alquilo y carbazida) que están asociados con toxicidad celular ya sea de manera directa o por medio de activación metabólica. Pueden también incluir grupos funcionales electrofílicos como aldehídos o epóxidos, o secuestrar iones metálicos que son esenciales para la función de una proteína. En algunos casos, pueden ser compuestos fluorescentes o altamente coloreados que dan señales positivas incluso en ausencia de proteína o alterar químicamente las proteínas sin interactuar en su sitio de unión. Los PAINS abarcan más de 400 clases estructurales, pero más de la mitad de estos pertenecen a 16 categorías

fácilmente reconocibles.^{162,163} A continuación se muestran las estructuras más comunes de este tipo de compuestos de interferencia (Tabla 4).

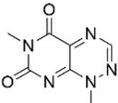
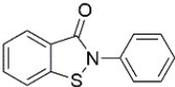
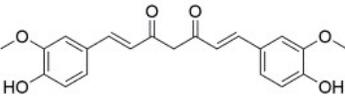
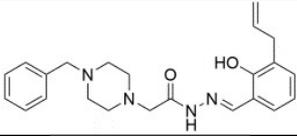
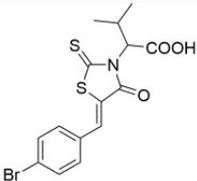
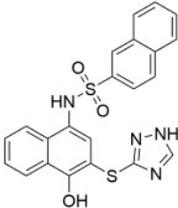
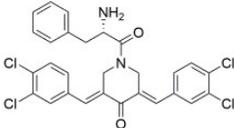
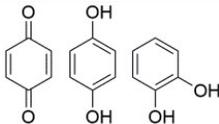
PAINS		
NOMBRE	ESTRUCTURA	MECANISMO DE ACCIÓN
Toxoflavina		<i>Ciclador redox</i> : Produce H ₂ O ₂ que puede activar o desactivar diferentes proteínas.
Isotiazolonas		<i>Modificador covalente</i> : Reacciona químicamente con proteínas de manera no específica.
Curcumina		<i>Modificador covalente y disruptor de membrana</i>
Hidroxifenil hidrazonas		<i>Modificador covalente y complejante de metales</i> : Secuestra iones metálicos
Ene-rodanina		<i>Modificador covalente y complejante de metales</i>
Fenol sulfonamidas		<i>Ciclador redox, modificador covalente y compuestos inestables</i> : Descompone en moléculas que dan señales falsas.
Enonas		<i>Modificador covalente</i>
Quinonas y catecoles		<i>Ciclador redox, modificador covalente y complejante de metales</i> .

Tabla 4. Ejemplos de compuestos de interferencia (PAINS).

La tabla 5 muestra asimismo algunas de las estructuras provenientes del cribado virtual que se descartaron debido a su probable actuación como PAINS.¹⁶⁴ Incluye ejemplos como **NSC67813** o **NSC73257** formados respectivamente por una estructura de cromona o cetona α,β -insaturada susceptibles a ataque nucleofílicos¹⁶² y **NSC706029**, con una estructura de 5-alquencilimidazolín-4-ona, es un posible aceptor de Michael. **NSC16842**, con una estructura de perilendiimida, tiene propiedades como colorantes. Además, su estructura plana hace que actúen como intercaladores de ADN y facilita su autoensamblaje mediante interacciones de tipo stacking. Las divinilcetonas y ciertos índoles como los presentes en **NSC16842** han demostrado actuar de manera inespecífica en algunos ensayos.¹⁶²

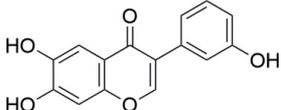
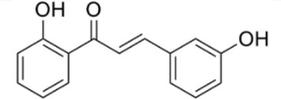
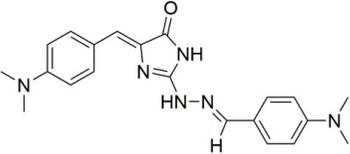
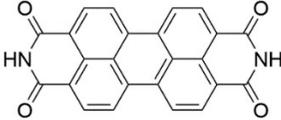
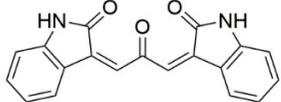
MÉTODO	COMPUESTO	ESTRUCTURA
Glide 2CY7	NSC67813 (score: -7.597)	
	NSC73257 (score: -9.192)	
Glide 2ZZP	NSC706029 (score: -10.238)	
Vina 2CY7	NSC16842 (score: -10.000)	
Vina 2ZZP	NSC174506 (score: -8.9000)	

Tabla 5. Ejemplos de compuestos descartados tras el HTVS. Incluye agentes alquilantes, aceptores de Michael o moléculas que por su estructura pueden formar agregados, pueden provocar la precipitación de la proteína (coloides) o perturbar el ensayo (compuestos con color o fluorescentes).

Así pues, una vez descartados los posibles PAINS y los compuestos que aun formando parte de la base de datos no estaban disponibles para ser distribuidos, se seleccionaron 250 moléculas (156 identificados utilizando el software Glide, 81 dirigidos a 2CY7_full y 75 a

2ZZP_full, y 94 seleccionados mediante Autodock Vina, de los cuales 41 iban dirigidos a 2CY7_full y 53 frente a 2ZZP_full), que fueron solicitados al NCI a razón de 40 compuestos/mes (<http://dtp.nci.nih.gov/RequestCompounds/>) (Tablas S1, S2, S3 y S4 de los Anexos).

4.- Cribado Biológico

Una vez obtenidos los 250 compuestos solicitados al NCI, se estudió su actividad biológica con el ensayo de tipo HTS puesto a punto previamente (Figura 17). De los candidatos seleccionados utilizando el método Glide, entre los 81 compuestos dirigidos al sitio alternativo de unión, únicamente un compuesto (**NSC43949**) mostró más del 50% de inhibición, mientras que de entre los 75 compuestos dirigidos al sitio activo de la cisteína proteasa Atg4B, 3 compuestos (**NSC83713**, **NSC126353** y **NSC116384**) disminuyeron la actividad enzimática más del 40%. Por otro lado, empleando el método Autodock Vina, de los 53 compuestos dirigidos al sitio activo de la estructura de Atg4B abierta, sólo 2 compuestos presentaron más de un 40% de inhibición (**NSC631817** y **NSC322341**) y de los 41 compuestos dirigidos a la estructura cerrada, ninguno de ellos presentó actividad (Figura 23, 24, Tabla 6 y Figura S1 y S2 de Anexos).

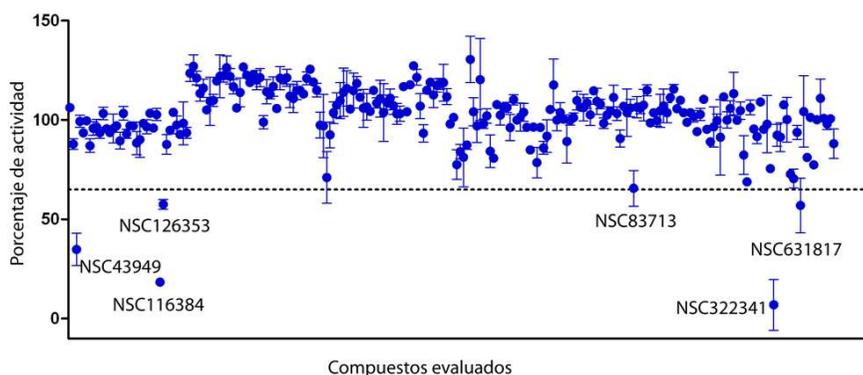


Figura 23. Representación del porcentaje de la actividad enzimática determinada en presencia de los compuestos evaluados. Cada uno de los puntos representa un compuesto evaluado en duplicado a una concentración de 200 μ M. Las moléculas seleccionadas fueron las que mostraron una inhibición superior al 40% (o una actividad enzimática de la proteína <60%)

Los índices de éxito de cribados virtuales, entendidos como la proporción de compuestos con actividad biológica entre el total de compuestos ensayados, se encuentran entre el 0.5 al 20% (en contraposición con los índices de éxitos observados en HTS de tipo aleatorio que se encuentran entre el 0.1 y el 0.5%). En este caso, se identificaron 6 moléculas activas, de un total de 250 evaluados, que mostraron una inhibición >40%, estableciéndose un índice de éxito del 2.4%. Hay que tener en cuenta que este índice de éxito sólo tiene en

cuenta las moléculas obtenidas frente las evaluadas, descartando así esas no disponibles o descartadas, por lo que no puede ser considerado un índice de éxito global del método descrito.

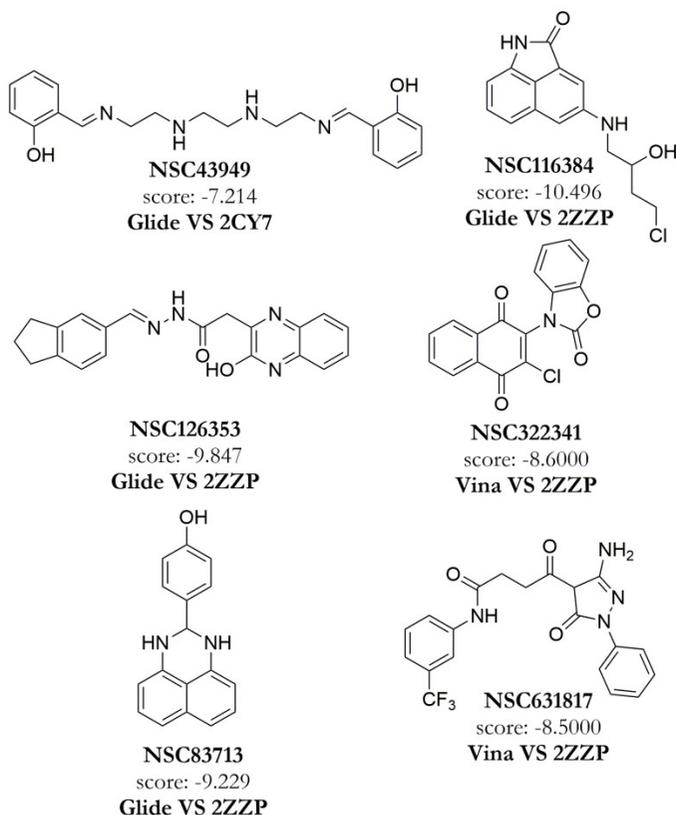


Figura 24. Estructuras de los compuestos identificados como inhibidores de Atg4B.

Método	Compuestos seleccionados	Actividad Atg4B (%)		
		<85-60	<60-40	<40
Glide VS 2CY7	81	3	-	NSC43949
Glide VS 2ZZP	75	7	NSC83713 NSC126353	NSC116384
Vina VS 2CY7	41	5	-	-
Vina VS 2ZZP	53	7	NSC631817	NSC322341

Tabla 6. Los compuestos fueron clasificados según el software utilizado y el potencial sitio de unión. Tras su evaluación como inhibidores de Atg4B en el ensayo de tipo HTS puesto a punto, se dividieron en tres categorías según la actividad enzimática observada < 40%, entre el 40 y el 60% y entre el 60 y el 85%. De los compuestos menos activos se proporciona el número de integrantes de cada categoría, mientras que en las otras filas se indica el nombre de los compuestos identificados y su estructura en la figura adjunta. El porcentaje de actividad enzimática fue determinado a una concentración de 200 μ M.

Si se estudia el modo de unión tanto de los mejores compuestos sugeridos por los métodos Glide y Vina (Figura 25), como los finalmente identificados de manera experimental (Figura 26), se observa que entre los compuestos seleccionados por el método Glide, los mejores compuestos dirigidos al centro activo de Atg4B se estabilizaban principalmente mediante interacciones hidrofóbicas e interacciones de apilamiento con el residuo W142 (Figura 25A, 26A, 26B). Este residuo se ha demostrado que es crucial para la actividad de Atg4B, ya que actúa como una pinza que mantiene en su lugar los residuos F119 y G120 del sustrato natural LC3 antes de la escisión del péptido.¹⁴⁷ Por otro lado, cabe resaltar que las características comunes de los compuestos dirigidos al segundo sitio de interacción fueron las siguientes: la presencia de al menos de un grupo catiónico (es decir, una amina protonada) que podría establecer interacciones electrostáticas con el residuo D278 de Atg4B y una estructura extendida que permitió ocupar el espacio relativamente estrecho entre la interfaz entre la cola N-terminal y el núcleo de Atg4B, interactuando así hidrofóticamente con residuos como L11, A14 y F16 (Figura 25B).

Por otro lado, el cribado virtual realizado con Autodock Vina dio lugar a resultados similares, tal como ilustran los paneles C y D de la figura 25 y figura 26, que muestran los modos de unión determinados para los compuestos con mejor “score” para los dos lugares de unión considerados. Como anteriormente, la unión de los compuestos **NSC241470**, **NSC322341** y **NSC631817** al centro activo de Atg4B está estabilizada fundamentalmente por interacciones hidrofóbicas y de apilamiento π con el residuo W142, mientras que el compuesto **NSC71204**, dirigido contra el segundo lugar de unión, presenta una estructura extendida con tres anillos de benceno, que establecen interacciones hidrofóbicas y de apilamiento con residuos tales como A14, Y276 o H280, y dos residuos de imidazolina en los extremos que pueden encontrarse protonados y establecer así interacciones electrostáticas con residuos como E17.

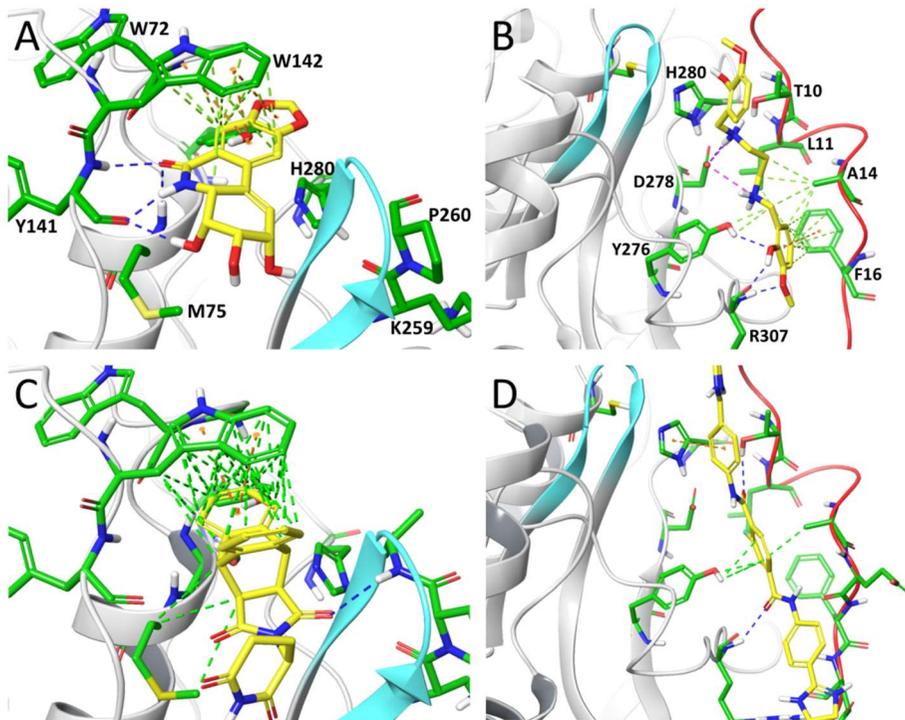


Figura 25. Modos de unión para los mejores candidatos obtenidos por HTVS con Glide (A, B) y con Autodock-Vina (C, D) frente al centro activo de Atg4B en 2ZZP_full (A: **NSC349155**, Glide score -11.65; C: **NSC241470**, Vina score -10.2) y frente al segundo lugar de unión presente en 2CY7_full (B: **NSC86286**, Glide score -10.47; D: **NSC71204**, Vina score -9.7). Los ligandos se muestran con átomos de carbono de color amarillo, los residuos de Atg4B con átomos de carbono de color verde, el bucle regulador en cian y la cola N-terminal en rojo. Las interacciones se muestran con líneas discontinuas: enlaces de hidrógeno en azul, interacciones hidrofóbicas en verde, puentes salinos en magenta, e interacciones de apilamiento π en naranja. Las estructuras de los compuestos se encuentran en el anexo adjunto.

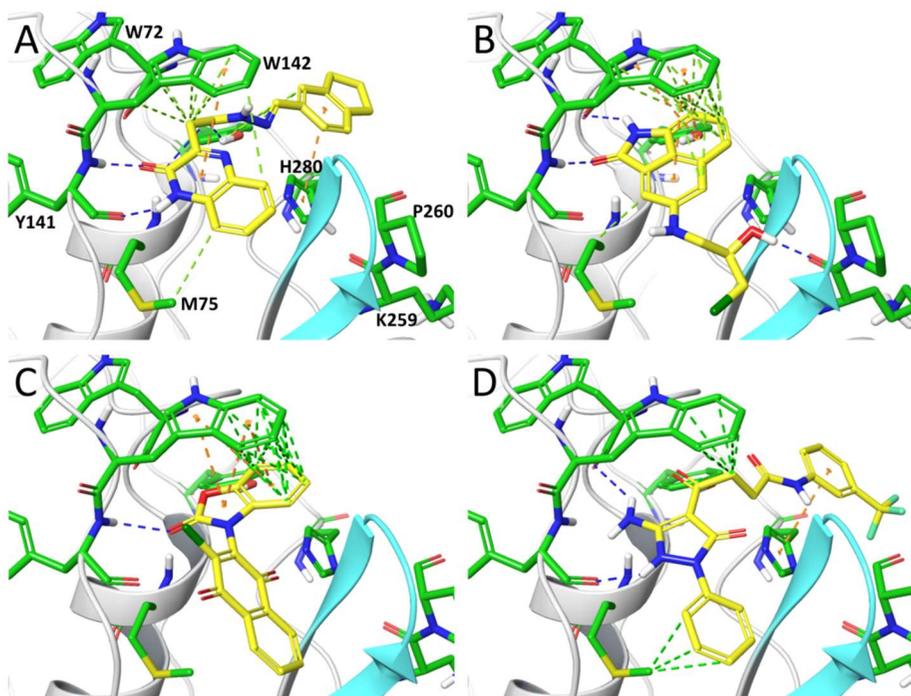


Figura 26. Modos de unión determinados con Glide (A, B) o Autodock Vina (C, D) para los compuestos (A) **NSC126353** (Glide score -9.85), (B) **NSC611216** (Glide score -10.50), (C) **NSC322341** (Vina score -8.6) y (D) **NSC631817** (Vina score -8.5) en el centro activo de Atg4B presente en la estructura 2ZZP_full. Los ligandos se muestran con átomos de carbono de color amarillo, los residuos de Atg4B con átomos de carbono de color verde, y el bucle regulador en cian. Las interacciones se muestran con líneas discontinuas: enlaces de hidrógeno en azul, interacciones hidrofóbicas en verde, e interacciones de apilamiento π en naranja.

Tras calcular la relación dosis-respuesta se estableció su concentración inhibitoria media (IC₅₀). Dichos compuestos presentaron una prometedora inhibición de Atg4B con valores de IC₅₀ comprendidos entre 86 y 300 μM. Los perfiles inhibitorios de estos compuestos con un efecto dependiente de la dosis se muestran en la figura 27.

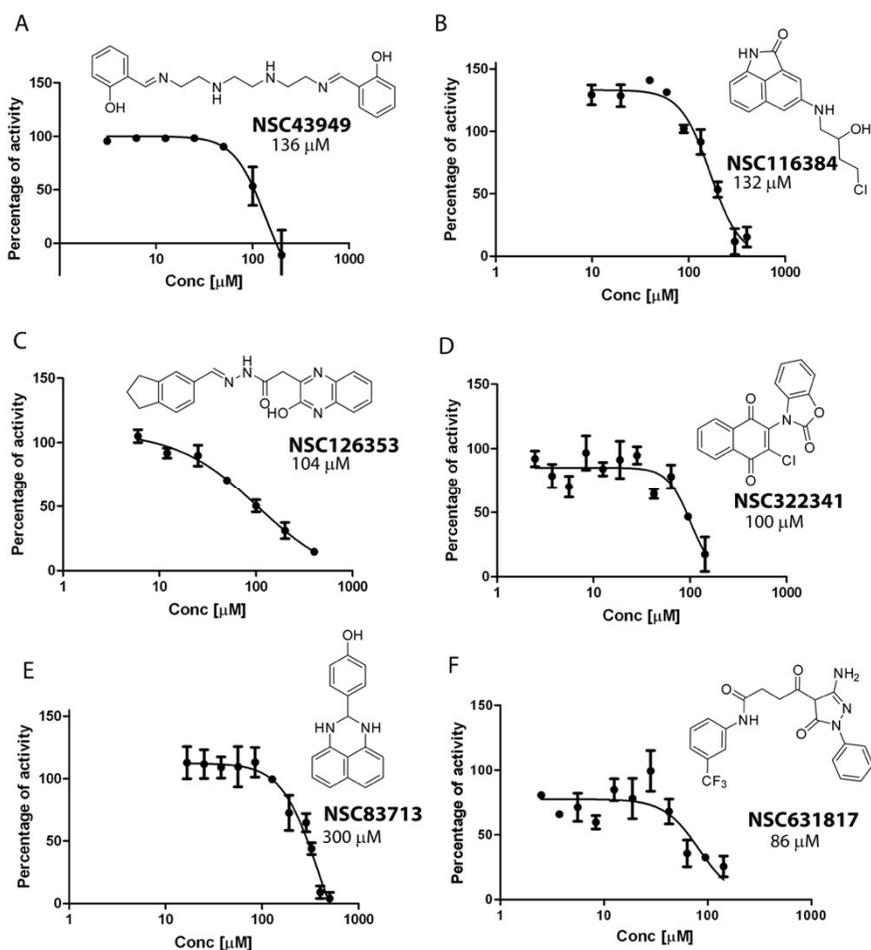


Figura 27. Curvas de concentración dosis-respuesta de la actividad de Atg4B frente a la presencia de diferentes concentraciones de NSC43949 (A), NSC116384 (B), NSC126353 (C), NSC322341 (D), NSC83713 (E) y NSC631817 (F). Los valores mostrados son medias de tres experimentos realizados por duplicado.

La identidad y pureza de las muestras obtenidas del NCI fueron analizadas mediante espectrometría de masas (EM). Significativamente, únicamente la masa del compuesto NSC126353 (Figura 28C) coincide con la calculada según la estructura proporcionada por el NCI. Ninguno de los análisis de masas obtenidos con los otros compuestos activos coincide con la estructura proporcionada. En los otros casos se producen diferencias

importantes. El ion molecular del pico principal del cromatograma de **NSC43949** (Figura 28A) difiere en 10 Da respecto a la masa calculada según la fórmula molecular. Análisis adicionales de protón a través de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$), tampoco ayudaron a esclarecer la estructura de esta muestra obtenida.

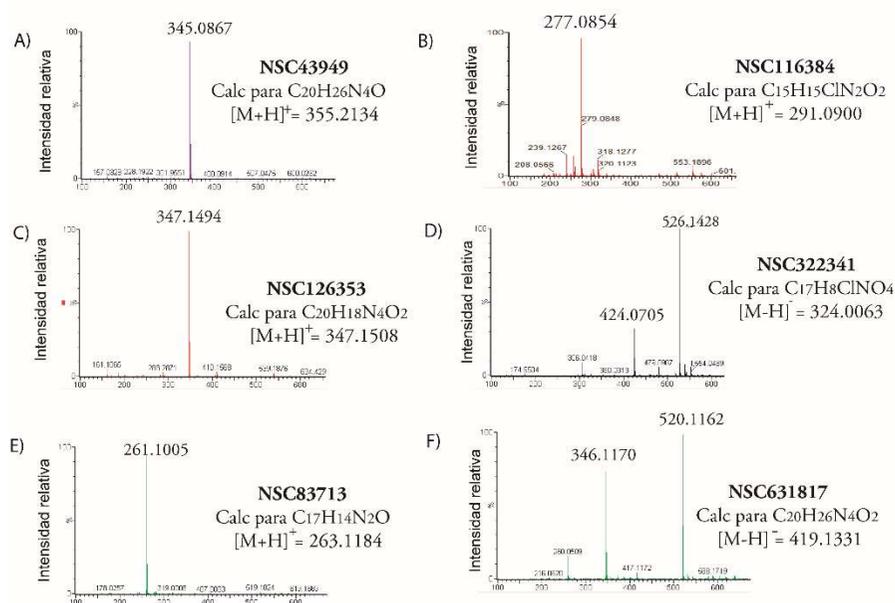


Figura 28. La pureza e identidad de los compuestos activos pertenecientes a la biblioteca NCI fueron evaluadas mediante EM. A) NSC43949, B) NSC116384, C) NSC126353, D) NSC322341, E) NSC83713, F) NSC631817.

En el caso de **NSC116384** (Figura 28B), el ion molecular correspondería a la fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$, una molécula que podría corresponder a la estructura proporcionada por el NCI con un grupo CH_2 menos. Las masas calculadas a partir de la fórmula molecular proporcionada por el NCI tampoco coincidieron con los resultados obtenidos tras el análisis de **NSC631817**, **NSC322341** o **NSC83713**. Las diferencias fueron significativas en el caso de los dos primeros mientras que en el último solo se observó una diferencia de 2 Da entre la masa calculada y la obtenida. Los análisis se hicieron en modo positivo y negativo obteniendo resultados parecidos. Además, la actividad de los compuestos se validó con un ensayo alternativo también puesto a punto en el grupo y basado en la detección por EM del pentapéptido escindido tras la acción de Atg4B (Figura 29).

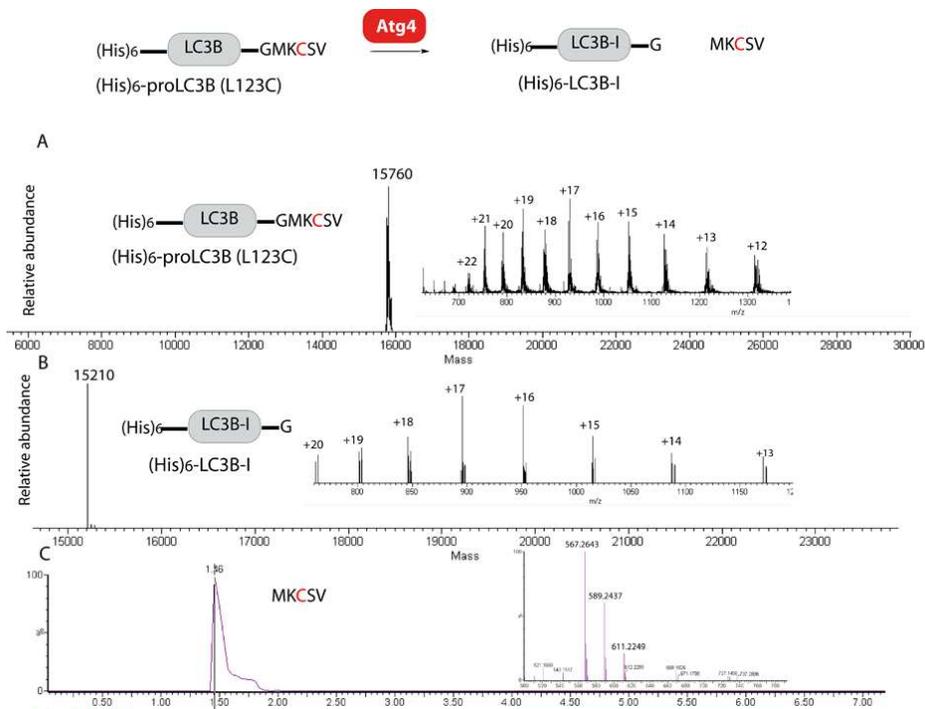


Figura 29. N-(His)₆-3C-Atg4B escinde la N-(His)₆-proLC3B(L123C) liberando el péptido C-terminal esperado (MKCSV) con una masa molecular de 567.2643 Da (Figura 29C), con la conversión simultánea de N-(His)₆-proLC3B(L123C) (masa calculada para C₇₀₂H₁₁₁₀O₂₀₁N₂₀₀S₆ [M+H]⁺: 15760 (Figura 29A) a N-(His)₆-LC3B-I (masa calculada para C₆₈₀H₁₀₇₀N₁₉₄O₁₉₅S₄ [M+H]⁺: 15210 (Figura 29B). Los insertos muestran el espectro original de masa antes de la deconvolución. C) Cromatograma del ion extraído para el pentapéptido MKCSV (*m/z*: 567.2643).

5.- Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores de Atg4B

Para confirmar la actividad inhibitoria de los compuestos identificados, así como confirmar su identidad, se obtuvieron muestras de otras fuentes o bien las moléculas fueron resintetizadas en el laboratorio. Por el momento se decidió descartar los compuestos **NSC83713**, **NSC322341**, **NSC631817** y centrar los esfuerzos en **NSC43949**, **NSC126353** y **NSC116384**.

5.1.- Síntesis de la imina simétrica NSC43949

La imina simétrica **NSC43949** fue identificada en el primer cribado realizado, aunque el posterior análisis por EM y ¹H-RMN indicaron que no se correspondía al producto solicitado. Además, otras iminas simétricas presentes en la selección de compuestos realizada mediante el método Glide con la estructura 2CY7 también estaban incluidas en el cribado y ninguna de ellas presentó ningún tipo de actividad inhibitoria (Figura 30). En

base a estos resultados lo más lógico sería pensar que se trata de un falso positivo, pero para comprobar este punto se planteó la síntesis de **NSC43949**.

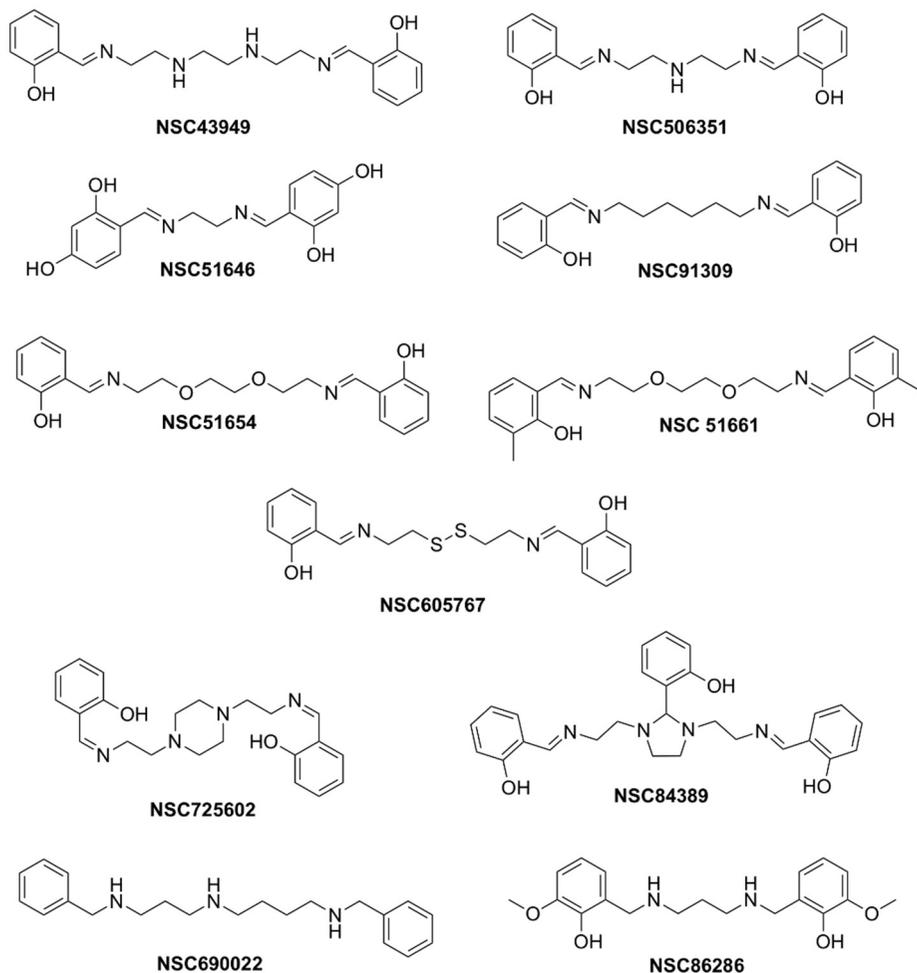


Figura 30. Iminas simétricas seleccionadas al aplicar el software Glide con la estructura 2CY7. Excepto **NSC690022** y **NSC506351**, que ya se encontraban descatalogados al iniciar este trabajo, las otras iminas fueron solicitadas al NCI y evaluadas.

Para la síntesis del compuesto **NSC43949** se disolvieron 2 equivalentes (eq.) de aldehído salicílico y 1 eq. de trietilentetramina en metanol y la mezcla resultante se calentó a reflujo hasta la completa finalización de la reacción comprobada por CCF (Cromatografía en Capa Fina). Tras enfriar, se intentó infructuosamente recristalizar la mezcla a partir de éter dietílico¹⁶⁵ y al final se obtuvo el producto deseado tras purificación por cromatografía en columna.

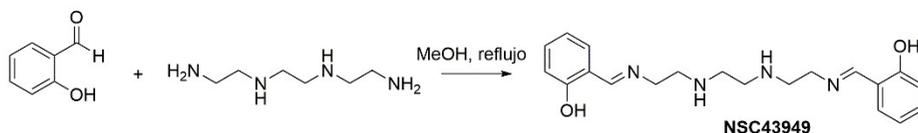
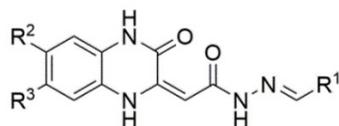


Figura 31. Síntesis de **NSC43949**.

Tras los análisis por EM y RMN, se determinó que el producto mayoritario era la bisimina simétrica esperada, aunque parcialmente contaminada con la presencia de monoiminas y la imina-aminal mixta formada debido a la presencia de 4 aminas potencialmente reactivas (que correspondería a la estructura de NSC84389, figura 30), tal como se ha descrito recientemente en la literatura.¹⁶⁶ Se estudió su actividad frente la Atg4B sin obtener inhibición destacable en ningún caso. Como se observó un 50% de inhibición de la actividad enzimática tras el estudio de la muestra inicial de **NSC43949**, se intentó elucidar su estructura. Estudios preliminares por ¹H-RMN indicaron la posible presencia de aldehído salicílico y cadenas alifáticas, aunque la masa observada no se correspondía con productos de hidrólisis parcial o total. Es por ello que en un futuro se pedirá a la biblioteca del NCI una mayor cantidad de compuesto con la finalidad de identificar el producto responsable de la actividad observada.

5.2.- Derivados de **NSC126353**

El compuesto **NSC126353**, asequible comercialmente, fue comprado y reanalizado, confirmando la actividad observada con la muestra obtenida en el NCI. La Dra. Julia Comas preparó luego una pequeña librería de derivados de **NSC126353** (Tabla 7). Desafortunadamente, ninguno de los compuestos se puede considerar como inhibidores de mayor potencia. Únicamente el compuesto **11** mostró una inhibición moderada pero con una disminución de la actividad en comparación con el compuesto **NSC126353**, por lo que fue menos potente que el compuesto original. Estos resultados sugieren que el anillo de indano es importante para la actividad.



Compuesto	R ¹	R ²	R ³	Act. (%)	IC ₅₀ (μM)
NSC126353		-	-	55	104 (87-125)
1	-	H	H	76	-
2		CN	H	N.A.	-
3		Cl	Cl	N.A.	-
4		H	H	74	-
5		H	H	71	-
6		CN	H	78	-
7		Cl	Cl	70	-
8		H	H	93	-
9		Cl	Cl	64	-
10		H	H	61	-
11		Cl	Cl	51	315 (292-337)

Tabla 7. Actividades residuales (Act. %) de Atg4B comparando con el control sin la presencia de inhibidor y valores de IC₅₀ de los compuestos más activos. Los valores de actividades residuales hacen referencia a valores medios de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Los valores de IC₅₀ se calcularon a partir del ensayo AlphaScreen y fueron validados con el ensayo basado en EM (intervalos de confianza 95%). N. A.: No activo.

5.3.- Derivados de NSC116384

Con la intención de determinar la estructura correcta de NSC116384, se realizaron estudios de elucidación estructural mediante RMN (espectro COSY (*C*ORRELATION *S*PECTROSCOPY) homonuclear 2D H/H). Como se ha descrito anteriormente, el análisis por EM sugería la presencia de un compuesto que contenía un CH₂ menos que la estructura proporcionada por el NCI. Efectivamente, esta información, juntamente con los resultados obtenidos tras los análisis por RMN (Figura 32), sugerían que la estructura de **NSC116384** se correspondería en realidad a una halohidrina como la presente en el análogo **NSC611216**, también incluido en la selección de compuestos hecha con el software Glide y con un

docking score incluso mejor (-10.496 vs -10.155) pero que no pudo ser obtenido para su estudio al encontrarse ya descatalogado de la base de datos del NCI. Como siguiente paso para confirmar su estructura se diseñó una ruta sintética para obtener el compuesto deseado.

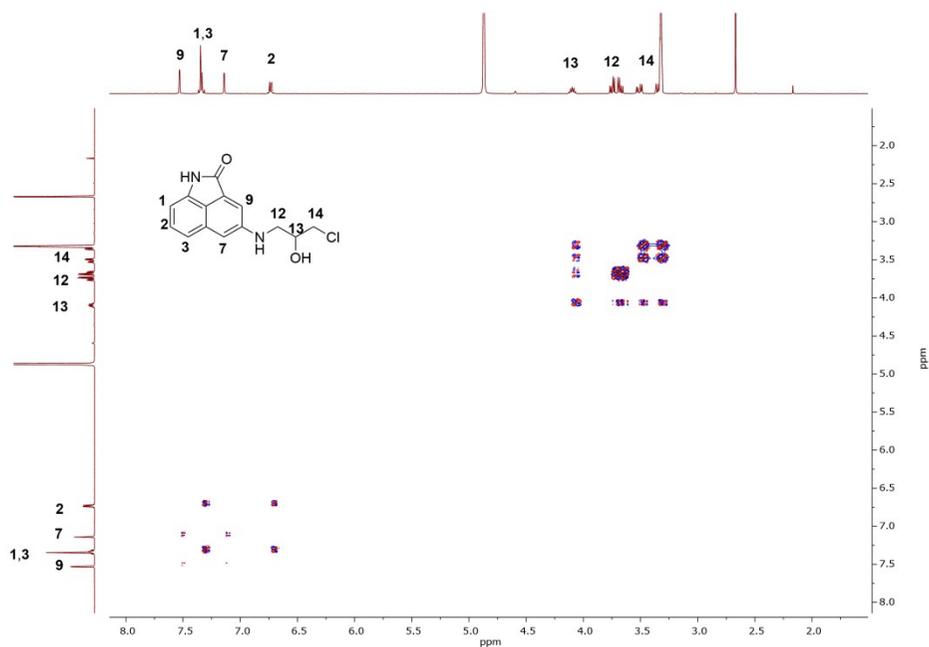


Figura 32. Espectro COSY homonuclear 2D H/H del compuesto **NSC116384**.

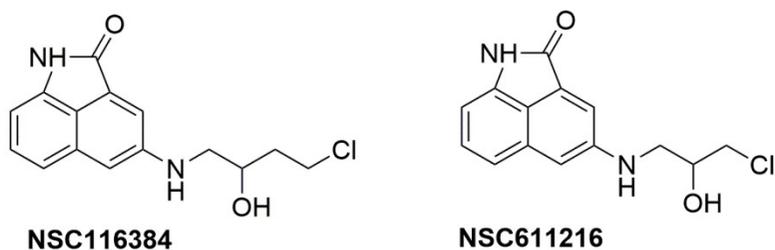
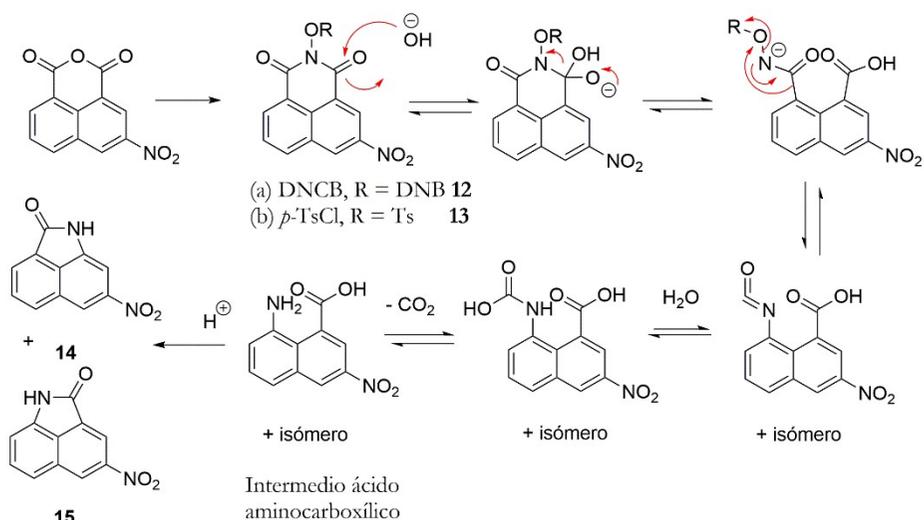


Figura 33. Tras el análisis se observó que **NSC116384** (-10.155) correspondía a la estructura proporcionada por el NCI para **NSC611216** (-10.496).

5.3.1.- Síntesis de NSC611216 y su regioisómero

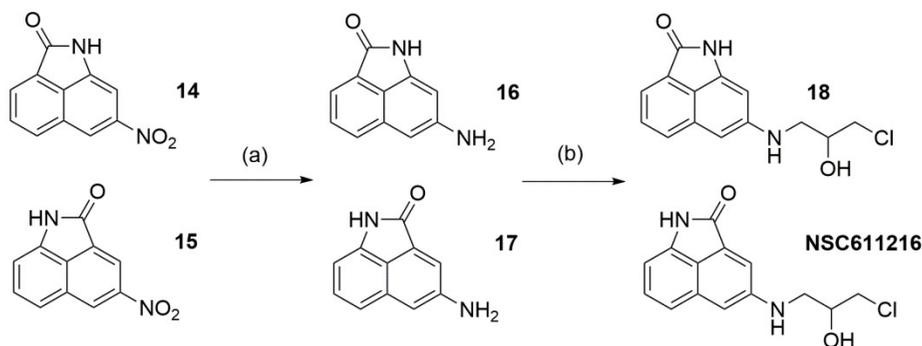
La estructura de tipo benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona ha adquirido un gran interés en los últimos años ya que los derivados 5,6-disustituídos han demostrado ser efectivos inhibidores de timidato sintasa¹⁶⁷ y los derivados de 5-sulfonamida benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona han sido descritos como inhibidores de bromodominio BET¹⁶⁸ e inhibidores fosfodiesterasa 2.¹⁶⁹ Sin embargo, los derivados de amino-benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona representan una nueva clase de inhibidores sin ninguna actividad biológica asociada.

Para obtener **NSC611216** se utilizó un método descrito para la síntesis de esqueletos de tipo benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona. Se exploraron dos grupos protectores diferentes, 2,4-dinitroclorobenceno (a) y el cloruro de *p*-toluensulfonilo (b) (Esquema 1). La primera vía de síntesis empieza con el anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico que al tratarse con clorhidrato de hidroxilamina da lugar a la correspondiente N-hidroxiftalimida con un rendimiento cuantitativo. Posteriormente, la alquilación con 2,4-dinitroclorobenceno en carbonato de sodio acuoso proporcionó el compuesto **12**.¹⁶⁷ La transposición de Lossen de imidato a la lactama se realizó en dos pasos (Esquema 1). En un primer momento, el tratamiento con una solución de hidróxido sódico en etanol dio lugar al ácido aminocarboxílico intermedio que se convirtió en la lactama deseada tras el tratamiento con agua caliente acidificada a pH 2-3. Finalmente se obtuvo una mezcla de difícil separación de 7- y 4-nitrobenz[*cd*]indol-2-(1*H*)-ona (**14** y **15**) en una relación 1:2 y con un rendimiento del 66%. En la segunda vía de síntesis, el anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico se hizo reaccionar con hidrocloreuro de hidroxilamina y cloruro de *p*-toluensulfonilo en presencia de piridina para producir el compuesto **13** que podría ser aislado fácilmente mediante recristalización y con excelentes rendimientos.¹⁶⁸ Tras este tratamiento, al igual que en el enfoque anterior, se produjo la transposición de Lossen en dos pasos. En este caso, la destilación simultánea del etanol facilitó la formación de un precipitado de fácil separación, dando lugar a los regioisómeros **14** y **15** también en una proporción 1:2 pero con un rendimiento del 97%. Así pues, el rendimiento global obtenido utilizando la primera aproximación¹⁶⁷ fue del 50%, mientras tras las optimizaciones realizadas se evitaron pasos de síntesis, extracciones con clorobenceno y se aumentó el rendimiento global al 97%.



Esquema 1. Mecanismo de la transposición de Lossen. DNCB: 2,4-dinitroclorobenceno, (2) *p*-TsCl: cloruro de *p*-toluensulfonilo. Reactivos y condiciones: (a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, acetato de sodio, H_2O , 80°C , 3 h, después Na_2CO_3 , DNCB, reflujo, 2 h; (b) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, piridina, reflujo, 1 h, después *p*-TsCl, reflujo, 2 h. El mecanismo descrito hace referencia a la síntesis del derivado **15**, mientras que el compuesto **14** se obtendría al iniciarse la reacción mediante el ataque al carbonilo 8.

Finalmente, la reducción a las correspondientes anilinas fue llevada a cabo utilizando SnCl_2 en ácido clorhídrico. Seguidamente, la alquilación de las anilinas se produjo mediante reacción con (\pm)-epiclorohidrina. La aminólisis regioselectiva de epiclorohidrina para obtener los β -amino alcoholes se ha realizado utilizando un gran número de catalizadores.¹⁷⁰ En este caso, al ser por lo general las aminas aromáticas poco nucleófilas, la apertura del anillo del epóxido fue facilitada mediante la adición de LiClO_4 ,¹⁷¹ donde el ion de litio se combina con el átomo de oxígeno del epóxido. La apertura del anillo es completamente regioselectiva debido al ataque de la anilina a la posición menos impedida de la unidad de oxirano. La reacción fue llevada a cabo a reflujo o mediada por irradiación por microondas. Finalmente, los β -amino alcoholes 4- (NSC611216) y 7-[(4-cloro-2-hidroxibutil)amino]-benzo[*a*]indol-2-[1*H*]-ona (**18**) fueron obtenidos con rendimientos moderados. De manera general se utilizaron 4 eq. de LiClO_4 y cantidades equimolares de amina y epóxido. Se evitó el uso de un exceso de amina, lo que habría tenido un impacto positivo en el rendimiento, debido a su costosa preparación (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de **NSC611216** y su regioisómero **18**. Reactivos y condiciones: (a) SnCl_2 , $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 4h; (b) (\pm)-epiclorhidrina, LiClO_4 , CH_3CN , mw, $150\text{ }^\circ\text{C}$, 150 W, 60 min.

La caracterización de NSC611216 confirmó la identidad de la muestra obtenida como **NSC116384**, así como su actividad inhibidora. Significativamente, el regioisómero minoritario **18**, mostró una mayor actividad (Tabla 8). Esta diferente potencia podría ser compatible con su modo de unión (Figura 34), ya que aunque tienen el sustituyente en diferentes posiciones de la estructura. Los resultados del Induced Fit Docking sugieren que **18** podría disponerse en el centro activo con una inversión de 180 grados en relación a **NSC611216**. Esto le permitiría mantener las interacciones principales de la estructura de benzo[*a*]indol-2(1*H*)-ona con el residuo W142 así como los puentes de hidrógeno establecidos por la amida endocíclica.

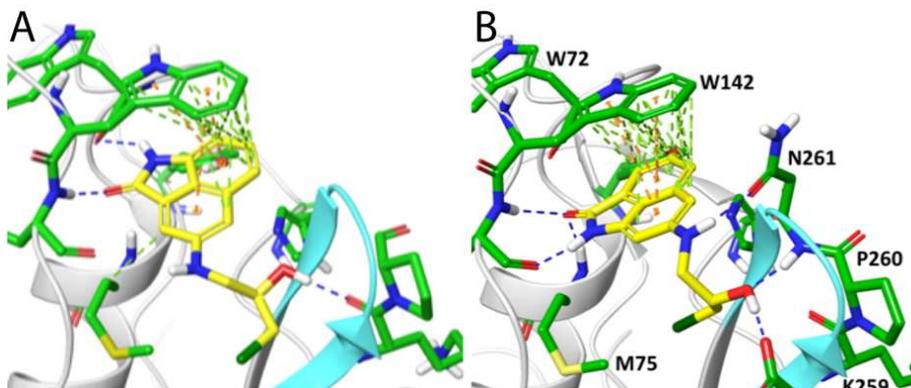
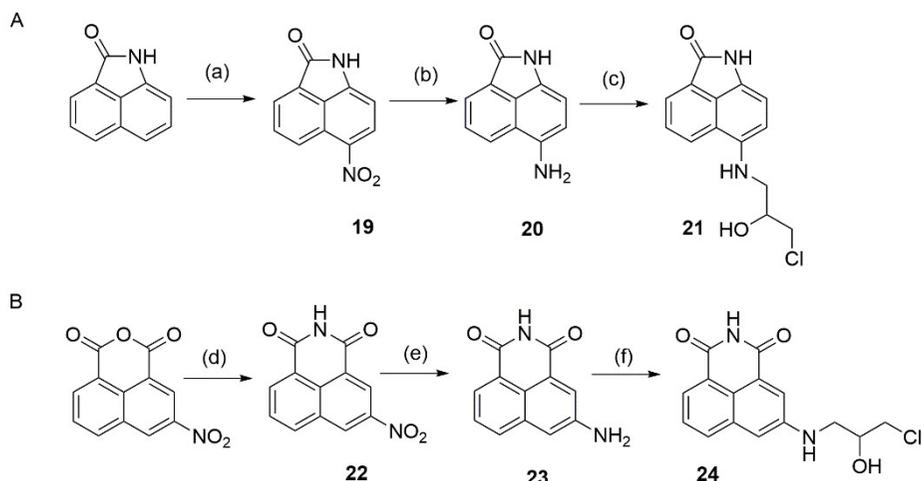


Figura 34. Mejores “poses” obtenidas mediante Induced Fit Docking de (A) **NSC611216**, (B) (*S*)-**18**. Los ligandos se muestran con los átomos de carbono en amarillo y los residuos de la proteína con los átomos de carbono en verde. El bucle regulador se muestra en azul. Las interacciones se muestran con líneas de puntos: enlaces de hidrógeno en azul, interacciones hidrofóbicas en verde y de apilamiento π en naranja. Modos de unión similares fueron observados para los enantiómeros correspondientes.

5.3.2.- Síntesis de análogos de NSC611216

Una vez obtenido **NSC611216**, se inició la síntesis de análogos con la finalidad de estudiar su actividad inhibitoria frente a la cisteína proteasa Atg4B. Para ello en primer lugar, se pensó en mantener la estructura básica benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona y cambiar la posición del grupo amina. La síntesis del derivado **21**, 6-amino-benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona empezó con la nitración del compuesto comercial benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona dando lugar al compuesto 6-nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**19**, Esquema 3).¹⁶⁷ La reducción y la posterior alquilación de la anilina dio lugar al compuesto deseado **21**. Por otro lado, se sintetizó otro análogo donde el esqueleto benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona fue reemplazado por la estructura 1,8-naftalimida. Estos compuestos tienen un gran interés como agentes antivirales y antitumorales. El Amonafide, el cual presenta actividad como agente intercalante de ADN e inhibidor de la topoisomerasa II,¹⁷² ha entrado en ensayos clínicos de fase II para el cáncer de próstata y los derivados sulfonados de 1,8-naftalimidias pueden bloquear la expresión viral en células mononucleares de sangre periférica humana infectadas por VIH mediante la inhibición de la transcriptasa inversa.¹⁷³ De manera que la síntesis del derivado de naftalimida **24** empezó con la reacción del reactivo comercial disponible, el anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico con hidróxido de amonio concentrado. A continuación, la reducción del grupo nitro a amina mediante SnCl₂ y la monoalquilación de la anilina resultante, permitió la obtención del compuesto **24** (Esquema 3). En este caso se observaron bajos rendimientos con el uso de LiClO₄. Como el bromuro de litio (LiBr) ha demostrado en algunos casos ser más eficiente que el LiClO₄,¹⁷⁴ la aminólisis de la epíclorohidrina se estudió también en presencia de LiBr, obteniéndose el producto esperado con un rendimiento bajo del 12%.



Esquema 3. A) Síntesis del derivado 6-amino-benzo [*cd*] indol-2 (1*H*)ona **21**. B) Síntesis del derivado 1,8-naftalimida **24**. Reactivos y condiciones: (a) HNO₃, 50 °C, 1,5 h; (b) SnCl₂, H₂O/HCl, 50 °C, 4 h; (c) (±)-epiclorhidrina, LiClO₄, EtOH, 80 °C, 14 h; (d) NH₄OH, H₂O, reflujo, 4 h; (e) SnCl₂, H₂O/HCl, 50 °C; (f) (±)-epiclorhidrina, LiBr, DMF, 100 °C, 14 h.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Compuesto	IC ₅₀ (μM)
	132 (99-163)		69 (55-84)
NSC611216		18	
	>300		N. A
21		24	

Tabla 8. Actividades de los compuestos **NSC611216**, **18**, **21** y **24**. Los valores de IC₅₀ fueron calculados a partir del ensayo de AlphaScreen y validados con un ensayo basado en espectroscopia de masas. Datos de al menos tres experimentos diferentes realizados por duplicado (intervalos de confianza 95%). N. A.: no activo.

Mientras el derivado de 3-nitro-1,8-anhidrido naftálico resultó inactivo, el análogo sustituido en la posición 6 (**21**) mostró una significativa pérdida de actividad que podría correlacionar con un modo de unión en que la cadena exocíclica se sitúa al otro lado de la cavidad, más expuesta al disolvente (Figura 35).

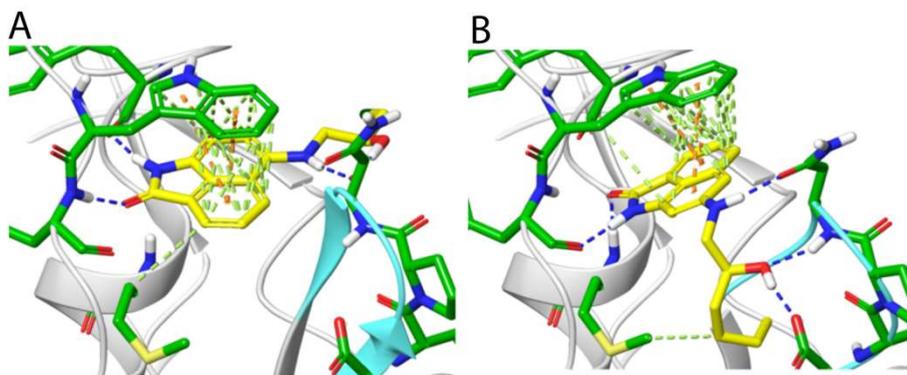
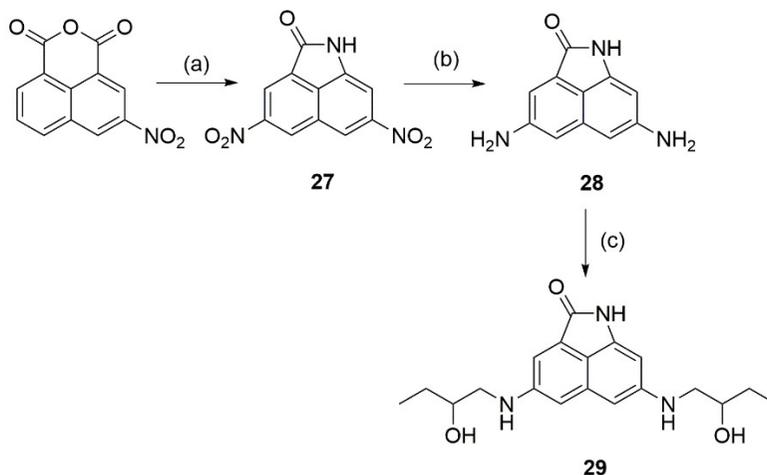


Figura 35. Mejores “poses” obtenidas mediante Induced Fit Docking de (A) (**S**)-**21** (B) (**S**)-**31**. Los ligandos se muestran con los átomos de carbono en amarillo y los residuos de la proteína con los átomos de carbono en verde. El bucle regulador se muestra en azul. Las interacciones se muestran con líneas de puntos: enlaces de hidrógeno en azul, interacciones hidrofóbicas en verde y de apilamiento π en naranja. Modos de unión similares fueron observados para los enantiómeros correspondientes.

Una vez analizados los resultados obtenidos, escogimos el compuesto **NSC611216** y su análogo **18** para llevar a cabo más modificaciones estructurales. Se mantuvo el esqueleto 4-amino y 7-aminobenzotriazol-2(1H)-ona y las modificaciones se centraron en la modificación del grupo alquilo. Se exploraron diferentes sustituyentes con la finalidad de explorar su capacidad de inhibición. Las α -clorohidrinan son agentes alquilantes moderadamente reactivos que reaccionan covalentemente con proteínas causando su inactivación. Por tanto, el siguiente paso era comprobar si este efecto era la causa de la inhibición que se observaba. Así pues, en primer lugar, se prepararon los compuestos análogos **25** y **26** donde el halógeno cloro del compuesto **18** fue reemplazado por un grupo metilo. Estos compuestos fueron preparados por aminólisis a partir de (*R,S*)-(\pm)-1,2-epoxibutano mediante calentamiento a reflujo en etanol con la presencia de LiClO_4 como catalizador, dando lugar a los correspondientes β -amino alcoholes **25** y **26** en buenos rendimientos (Tabla 9). Se observó que la presencia de un grupo metilo aumentó la inhibición y el efecto fue mayor en **26** el cual presentó mayor potencia inhibitoria que el compuesto **18**. Posteriormente, con la finalidad de explorar la relación estructura-actividad (SAR, structure-activity relationship), la estructura 4,7-diaminobenzotriazol-2(1H)-ona

se preparó mediante nitración del compuesto comercialmente disponible, el anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico,¹⁷⁵ seguida de la reacción de Lossen dando lugar a 4,7-dinitrobenzo[*a*]indol-2(1H)-ona **27**. La reducción de la correspondiente dianilina seguida mediante una doble alquilación a través de las aminas con (*R,S*)-(\pm)-1,2-epoxibutano dio lugar al compuesto **29** con rendimientos moderados, debido a la formación simultánea de especies mono y trisubstituidas. Sin embargo, la lactama 4,7-dialquilada **29** presentó una potencia intermedia, con un IC₅₀ de 68 μ M (Tabla 9).



Esquema 4. A) Síntesis del derivado disustituido **29**. Reactivos y condiciones: (a) H₂SO₄, HNO₃, 60 °C, 1.5 h; NH₂OH·HCl, piridina, reflujo, 1h; *p*-TsCl, reflujo, 2 h; NaOH en H₂O/EtOH, reflujo 1 h, HCl; (b) SnCl₂, H₂O/HCl, 50 °C, 4 h; (c) (\pm)-1,2-epoxibutano, LiClO₄, EtOH, mw, 150 °C, 150 W, 60 min.

Teniendo en cuenta que los mejores resultados se obtuvieron mediante sustitución del átomo de cloro por un metilo, el siguiente paso fue explorar el alargamiento de la cadena alquilada. Es por ello que se llevó a cabo la alquilación de la anilina con (*R,S*)-(\pm)-1,2-epoxihexano dando lugar a los regio isómeros correspondientes donde el derivado de 7-aminobenzo[*a*]indol-2-[1H]-ona **31** exhibió una IC₅₀ mejorada de 12 μ M mientras que la actividad del regioisómero 4-aminobenzo[*a*]indol-2-[1H]-ona **30**, cayó significativamente hasta 235 μ M (Tabla 9). De manera similar, se obtuvo el compuesto **32** mediante la alquilación de 4-aminobenzo[*a*]indol-2-[1H]-ona con 1,2-epoxi-5-hexeno, el cual presentó una disminución considerable de la actividad respecto el compuesto **30**. Por último, se exploró la importancia de la quiralidad en la actividad biológica de **25**. Con este objetivo en mente, se sintetizaron los β -amino alcoholes enantioméricamente puros, los cuales se prepararon a través de las aperturas de los epóxidos (*S*)-(-)-1,2-epoxibutano y (*R*)-(+)-1,2-

epoxibutano. Tras el ensayo biológico, los compuestos **33** y **34** no presentaron diferencias importantes respecto a la mezcla racémica **25**.

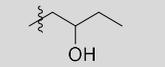
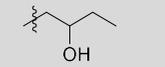
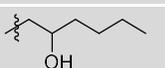
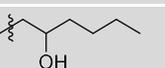
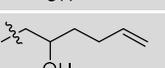
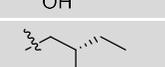
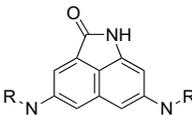
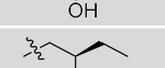
Comp.	R	IC ₅₀ (μM)	Comp.	R	IC ₅₀ (μM)
25		111 (76-161)	26		29 (15-56)
30		235 (195-284)	31		12 (6-18)
32		N. A.			
33		113 (92-138)			
34		119 (98-145)	29		68 (47-88)

Tabla 9. Actividades de los compuestos **25-34**. Los valores de IC₅₀ (μM, intervalo de confianza del 95%) fueron calculados a partir del ensayo de AlphaScreen y validado con un ensayo por EM. Datos de al menos tres experimentos diferentes realizados por duplicado. N. A.: no activo. Valores de S.D. ± 10%.

El aumento de la actividad en el compuesto **31** podría explicarse en base a su unión al sitio activo de Atg4B de manera similar al análogo **18** (Figura 34) ya que la extensión de la cadena lateral conlleva a un aumento de las interacciones hidrofóbicas de **31** con los residuos M75, P145 y A263 (Figura 35).

Atg4B tiene una elevada similaridad estructural con la papaína y sus proteasas homólogas. Una vez evaluada la concentración máxima inhibitoria de cada uno de los análogos sintetizados, se estudió si esta actividad era específica o afectaba también a otras cisteínas proteasas. Con este motivo, se estudió el efecto de varios análogos frente a la actividad de la papaína. Mientras el inhibidor no específico, *Z*-L-fenilclorometilcetona, y el control positivo (quimostatina) inhibieron la actividad de la papaína, ninguno de los análogos estudiados produjo un efecto similar (Figura 36A). Además, se estudió el efecto del compuesto **31** en estudios celulares observándose importantes cambios en el flujo autofágico (realizado por M. Quintana). Con este propósito, se indujo autofagia mediante privación de nutrientes (solución salina de Earle, EBSS por sus siglas en inglés Earle's Balanced Salt Solution) y los niveles de los marcadores de autofagia LC3-II y p62 se examinaron mediante inmunotransferencia, en el cual la proteína diana se detecta en un

gel de poliacrilamida utilizando un anticuerpo primario específico. Mientras estudios previos han indicado que la inhibición de Atg4B conlleva a una acumulación de LC3-II, p62 es un regulador de la autofagia que facilita la degradación de los agregados ubiquitinados. Además, como las diferencias de los niveles de proteína pueden ser causados tanto por modulación autofágica como por cambios en la degradación lisosomal de las proteínas, estos estudios se llevaron a cabo en presencia de inhibidores de proteasa para estimar el flujo autofágico en general.¹⁷⁶ Tal y como se muestra en la figura 36B y C, el compuesto **31** causó una acumulación de LC3-II y p62 en células privadas de nutrientes HT-29 (línea celular del adenocarcinoma humano de colon) que es más pronunciada en presencia de inhibidores de proteasas lisosomales. Por tanto, los cambios observados sugieren a una disminución del flujo autofágico y confirman la actividad celular de **31**.

La combinación de inhibidores de autofagia con agentes antitumorales ha dado prometedores resultados. Por este motivo, se estudió también el efecto del compuesto **31** en combinación con oxaliplatino en una línea celular tumoral. El oxaliplatino es un medicamento comúnmente utilizado para el tratamiento de cáncer colorrectal. Actúa como un agente intercalante de ADN inhibiendo su replicación y provocando la apoptosis. Se ha descrito que los compuestos que inhiben la autofagia aumentan la sensibilidad al oxaliplatino en condiciones normales e hipóxicas de manera sinérgica al igual que sucede con la eliminación de beclin 1.¹⁷⁷ Por tanto con esta información, se decidió investigar la actividad antitumoral del compuesto **31** en las células HT-29 en presencia y ausencia de oxaliplatino. Tal y como se muestra en la figura 36, la inhibición de la viabilidad celular por oxaliplatino mejoró notablemente en presencia de una concentración no tóxica de **31**, lo que se concluye que la inhibición de la autofagia puede resultar en un efecto anticancerígeno aditivo o sinérgico.

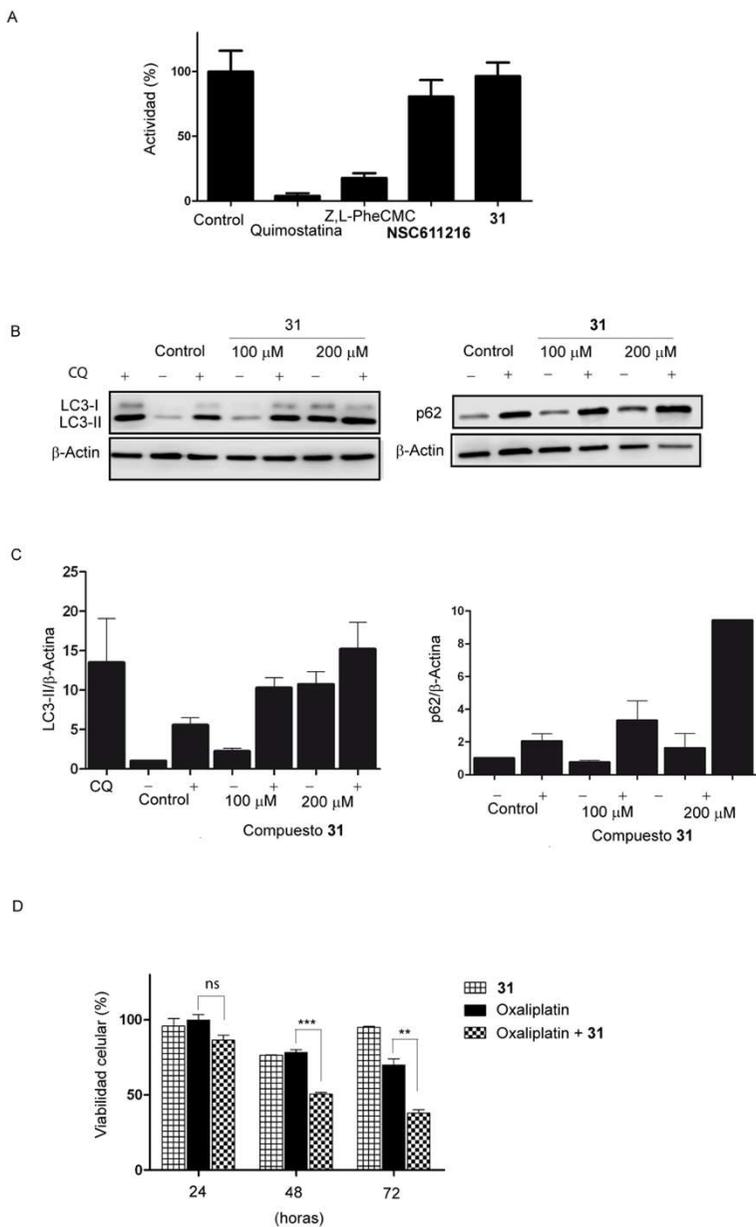
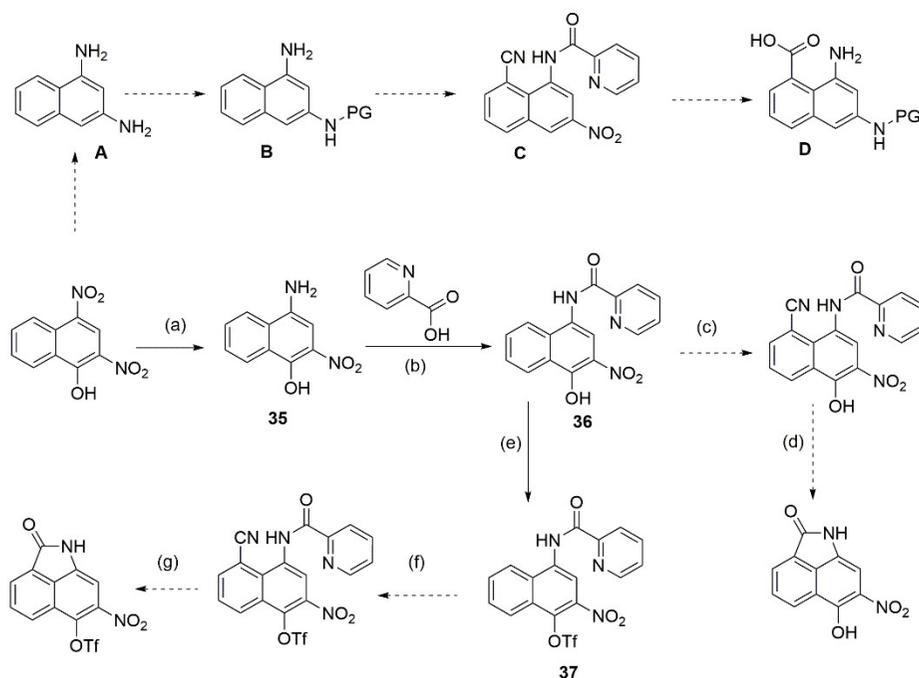


Figura 36. (A) Estudio de la inhibición de la cisteína proteasa papaína (Z-L-PheCMC: Z-L-fenilclorometilcetona); (B) Análisis de la inhibición de la autofagia en células HT-29 privadas de nutrientes, tratadas con **31** (o vehículo) y sometidas a transferencia de tipo Western para evaluar la expresión de LC3-II y p62. La actina sirvió como control de carga. Se muestran los niveles de proteínas representativas de 3 experimentos independientes. (C) El gráfico de barras muestra la expresión de LC3-II y p62 normalizada al control de carga actina; media \pm SEM; n = 3; Se usó un análisis de t Student para determinar los valores de P: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, NS: no significativo. (D) Sensibilización de las células HT-29 por **31** a los efectos no citotóxicos de oxaliplatino. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo MTT después del tratamiento con oxaliplatino (30 μ M) durante 24, 48 y 72 h en ausencia o presencia de **31** (100 μ M).

5.3.3.- Optimización de la síntesis de 7-nitrobenz[*cd*]indol-2-(1*H*)-ona

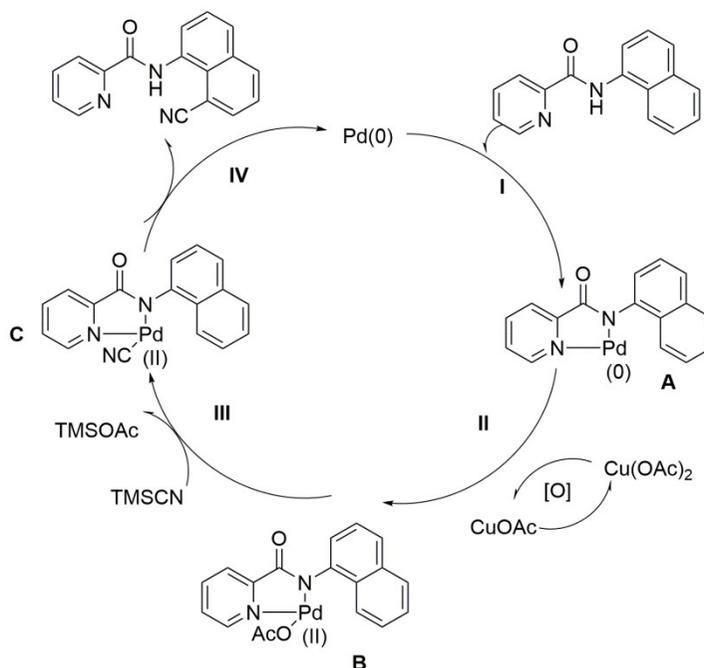
Tal y como se ha comentado anteriormente, la transposición de Lossen proporciona una mezcla de dos regioisómeros en una proporción 1:2, siendo el minoritario el que presenta una mayor actividad. Además, la separación de los compuestos 7- y 4-nitrobenz[*cd*]indol-2-(1*H*)-ona **14** y **15** resultó compleja. Se exploraron diferentes métodos de cromatografía en columna por fase directa o reversa, obteniéndose en la mayoría de los casos fracciones puras junto con mezclas de los dos regioisómeros. Así pues, se intentó optimizar una ruta para obtener únicamente el regioisómero **14**.



Esquema 5. Ruta sintética 1: a) SnCl_2 , ac. HCl, EtOH < 35 °C; b) 1) CH_2Cl_2 , Et_3N , 2) POCl_3 , 0 °C; c) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, TMSCN , DMF, 130 °C; d) y g) 1) KOH reflujo, 2) HCl diluido; e) $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, NEt_3 , CH_2Cl_2 , ac. HCl; f) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, CuBr_2 , CuCN , DMF, 130 °C.

Se planteó una estrategia sintética que partía del amarillo de Martius (2,4-dinitro-1-naftol) y que se basaba en una cianación dirigida por una picolinamida (**C**) como intermedio para formar el 8-amino-1-ácido naftoico correspondiente (**D**). En una primera aproximación se consideró la monoprotección de la diamina **A**, obtenida después de la protección del hidroxilo como triflato, yodación, y reducción con SnCl_2 . Pero los bajos rendimientos descritos descartaron esta vía.¹⁷⁸ Entonces se investigó una ruta alternativa partiendo directamente del amarillo de Martius y posponiendo la eliminación del hidroxilo al final de la ruta sintética. En primer lugar, se llevó a cabo la reducción selectiva del grupo nitro menos impedido. Utilizando 1 o 2 eq. de SnCl_2 y controlando la reacción cada hora se

observó la presencia de grandes cantidades de producto de partida y que a medida que se formaba el compuesto deseado, también se obtenía como producto secundario la correspondiente naftalen 1-3 diamina. Finalmente, la agitación con 3 eq. de SnCl_2 durante 3 h proporcionó el producto deseado **35** con un 35 % de rendimiento. Una vez obtenido el compuesto **35**, se exploró la cianación C-H catalizada por paladio. En primer lugar, se incorporó el ácido picolínico a la amina libre en medio básico mediante el reactivo acoplante POCl_3 ¹⁷⁹ obteniéndose **36** con un 70% de rendimiento. Después se exploró la cianación de naftalen-1-ilo picolinamida utilizando $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ como catalizador, TMSCN como fuente de cianuro, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ como oxidante y DMF como disolvente.¹⁸⁰ Se realizó la reacción en un vial cerrado en ausencia de oxígeno, y utilizando microondas, pero desafortunadamente, en ningún caso se pudo aislar el producto deseado.

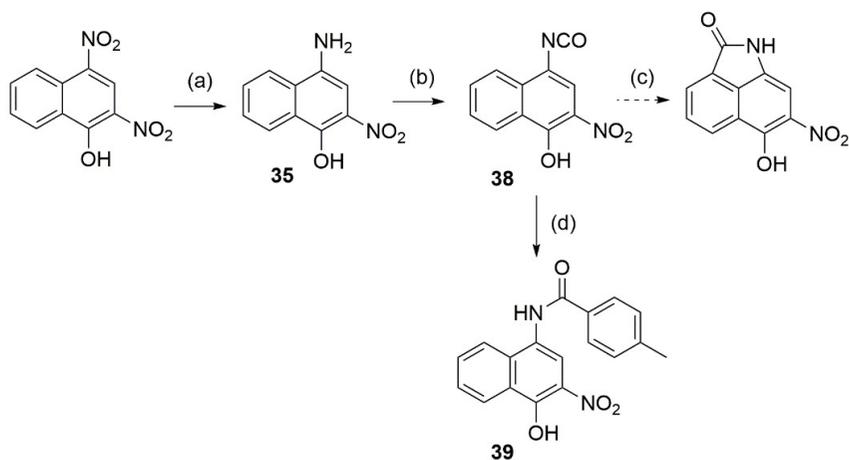


Esquema 6. Mecanismo propuesto para la reacción. El primer paso involucra la activación del enlace C-H mediada por paladio, dando lugar a una ciclopaladación para formar el intermedio **A**, que experimenta una adición oxidativa proporcionando el intermedio **B**. La transmetalación de **B** con TMSCN genera el intermedio **C** el cual finalmente a través de una eliminación reductora da lugar al producto deseado.

Para descartar que el hidroxilo presente en **36** pudiera afectar en el transcurso de la reacción, se decidió protegerlo con el anhídrido trifluorometansulfónico en presencia de trietilamina¹⁸¹ obteniéndose **37** con un rendimiento del 60%. Se estudió luego la cianación catalizada con paladio empleando diferentes catalizadores ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ y

oxidantes ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$, CuBr_2), pero en ningún caso se obtuvo el producto esperado, descartándose esta vía.

Se planteó entonces una estrategia sintética alternativa. A continuación, se investigó la conversión de la amina a isocianato y su ciclación mediante una acilación intramolecular de Friedel Crafts para formar la correspondiente lactama.¹⁸² Con esta intención, el grupo amina del compuesto **35** se hizo reaccionar con trifosgeno¹⁸³ en presencia de CH_2Cl_2 anhidro dando lugar a **38**. Dado que el grupo isocianato es muy reactivo, este compuesto no fue aislado y fue utilizado directamente en el siguiente paso de reacción. La acilación intramolecular de Friedel Crafts se realizó en presencia de AlCl_3 , empleando tolueno anhidro como disolvente y el isocianato como electrófilo.



Esquema 7. Ruta sintética 2: a) SnCl_2 , ac. HCl , EtOH < 35 °C; b) trifosgeno, DCM ; c) Friedel-Crafts, AlCl_3 d) Producto obtenido al aplicar las condiciones de (c) la reacción de Friedel-Crafts intramolecular empleando AlCl_3 y tolueno como disolvente.

Al finalizar la reacción y después de analizar el producto, se observó que el producto mayoritario obtenido correspondía a la reacción con tolueno, utilizado como disolvente. Aunque esto confirmaría la correcta formación del isocianato también evidenciaba la falta de reactividad del anillo aromático. La explicación de la formación de esta estructura podría ser que al ser el tolueno un anillo bencénico con carácter activante en *para*- por la presencia de un grupo metilo y al estar en grandes cantidades competía de manera más eficiente con el anillo de naftaleno. Es por ello, que se substituyó el disolvente utilizado, tolueno, por el empleo de otros dos disolventes en reacciones independientes. Por un lado se utilizó el *p*-clorobenceno, con un cloro en la posición *para*- y el *o*-diclorobenceno, los cuales presentan un carácter desactivante y tendrían que minimizar la formación de productos secundarios y de esta forma se evitaría la reacción del isocianato con el disolvente. Se analizaron los

productos obtenidos en ambas reacciones a través de EM y $^1\text{H-NMR}$ y sin detectarse en ningún caso el producto esperado. En estos momentos se sigue trabajando en esta ruta sintética y se pretenden explorar diferentes ácidos de Lewis (TiCl_4 , AlBr_3 , SnCl_4 , BCl_3) que han permitido sintetizar esqueletos de benz[*a*]indol-2-onas similares.¹⁶⁷

CONCLUSIONES

El resumen de las actividades descritas y las principales conclusiones del capítulo 1 de la presente tesis son las siguientes:

- Se ha puesto a punto un ensayo tipo HTS basado en la tecnología AlphaScreen que permite el estudio de la actividad de Atg4B y la identificación de inhibidores de esta enzima
- Se ha podido caracterizar la conformación y la dinámica de Atg4B y establecer los requisitos necesarios para actuar e interactuar con LC3. Los resultados sugieren que no se requiere la presencia del sustrato LC3 para alcanzar la forma abierta de Atg4B y que los ligandos potenciales podrían unirse al sitio activo de la proteasa, interfiriendo directamente con la unión del sustrato natural.
- El uso de un cribado virtual (HTVS) ha permitido identificar potenciales inhibidores de Atg4B. Se ha realizado la selección virtual de los compuestos utilizando una biblioteca abierta que pertenecen a la Base de Datos del NCIOD (265242 compuestos). El cribado virtual se ha realizado con las dos estructuras de la Atg4B disponibles, 2CY7_full y 2ZZP_full, que muestran Atg4B en forma cerrada y forma abierta respectivamente. En cada caso se han utilizado dos métodos de acoplamiento diferentes Glide y Autodock Vina, obteniéndose 4 listas de potenciales inhibidores de Atg4B: Glide VS 2CY7; Glide VS 2ZZP; Vina VS 2CY7 y Vina VS 2ZZP. Los mejores compuestos obtenidos tras la selección virtual se evaluaron y se descartaron aquellos compuestos que eran promiscuos y no específicos. Se verificó la disponibilidad, se seleccionaron 128 compuestos como posibles candidatos contra el centro activo de Atg4B y 122 compuestos contra el segundo sitio alternativo.
- Se solicitaron los 250 compuestos seleccionados al NCI y se estudió su actividad biológica con el ensayo de tipo HTS puesto a punto. De los candidatos seleccionados utilizando el método Glide, entre los 81 compuestos dirigidos al sitio alternativo de unión, únicamente un compuesto (**NSC43949**) mostró más del 50% de inhibición, mientras que de entre los 75 compuestos dirigidos al sitio activo de la cisteína proteasa Atg4B, 3 compuestos (**NSC83713**, **NSC126353** y **NSC116384**) disminuyeron la actividad enzimática más del 40%. Por otro lado, empleando el método Autodock Vina, de los 53 compuestos dirigidos al sitio activo de la estructura de Atg4B abierta, sólo 2 compuestos presentaron más de un 40% de inhibición (**NSC631817** y **NSC322341**) y de los 41 compuestos dirigidos a la estructura cerrada, ninguno de ellos presentó actividad. Estos

resultados demuestran que la aproximación utilizada es útil para la identificación de inhibidores de Atg4B.

- Tras el análisis de su pureza e identidad, los compuestos identificados se utilizaron como modelos para la síntesis de pequeñas bibliotecas de análogos, con la intención de encontrar inhibidores potentes y selectivos de Atg4B. El compuesto **NSC611216** con un esqueleto tipo benzo[*a*]indol-2(1*H*)-ona se utilizó como base para la preparación de una pequeña librería. De entre los análogos sintetizados, destacó el derivado de 7-aminobenzo[*a*]indol-2-[1*H*]-ona **31** el cual exhibió una IC₅₀ mejorada de 12 μM, un orden de magnitud inferior al compuesto inicialmente identificado.
- Se estudió el efecto del compuesto **31** en estudios celulares observándose una disminución en el flujo autofágico, detectado como una acumulación de la proteína lipidada LC3-II y el receptor p62.

En resumen, el desarrollo y la optimización de un nuevo ensayo AlphaScreen combinado con un cribado virtual de alto rendimiento basado en la estructura de una biblioteca de aproximadamente 265242 compuestos ha permitido la identificación de inhibidores de Atg4B. La optimización química del compuesto activo **NSC611216** obtenido, proporcionó información acerca de los requisitos estructurales para inhibir la cisteína proteasa Atg4B. El compuesto análogo sintetizado más potente (**31**) manifestó un buen perfil de citotoxicidad al mismo tiempo que inhibió la autofagia, en base a las medidas analizadas de los niveles de proteína LC3-II y p62. Al mismo tiempo, añadir que el efecto sinérgico de **31** combinado con oxaliplatino conllevó a un aumento de la muerte celular en la línea de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29. En general, el descubrimiento del esqueleto de tipo aminobenzo[*a*]indol-2-1(1*H*) se describe como un nuevo quimiotipo para el desarrollo de inhibidores de moléculas pequeñas de Atg4B. Los resultados obtenidos contribuirán a ampliar el abanico de posibilidades para estudiar la autofagia en células de mamíferos y a desentrañar el papel clave de Atg4B en el tratamiento del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kistakis, N. T. In praise of M. Anselmier who first used the term “Autophagy” in 1859. *Autophagy* **2017**, *13* (12), 2015–2017.
- (2) Boya, P.; Reggiori, F.; Codogno, P. Emerging Regulation and Functions of Autophagy. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15* (7), 713–720.
- (3) Tsukada, M.; Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1993**, *333* (1–2), 169–174.
- (4) Ravikumar, B.; Futter, M.; Jahreiss, L.; Korolchuk, V. I.; Lichtenberg, M.; Luo, S.; Massey, D. C. O.; Menzies, F. M.; Narayanan, U.; Renna, M.; et al. Mammalian macroautophagy at a glance. *J. Cell Sci.* **2009**, *122* (11), 1707–1711.
- (5) Harding, T. M.; Morano, K. A.; Scott, S. V.; Klionsky, D. J. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell Biol.* **1995**, *131* (3), 591–602.
- (6) Thumm, M.; Egner, R.; Koch, B.; Schlumpberger, M.; Straub, M.; Veenhuis, M.; Wolf, D. H. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1994**, *349* (2), 275–280.
- (7) Chan, E. Y. W.; Kir, S.; Tooze, S. A. SiRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (35), 25464–25474.
- (8) Furuya, N.; Yu, J.; Byfield, M.; Patingre, S.; Levine, B. The evolutionarily conserved domain of beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* **2005**, *1* (1), 46–52.
- (9) Mizushima, N. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (9), 1679–1688.
- (10) Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36* (12), 2503–2518.
- (11) Liang, C.; Feng, P.; Ku, B.; Dotan, I.; Canaani, D.; Oh, B. H.; Jung, J. U. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8* (7), 688–698.
- (12) Takahashi, Y.; Coppola, D.; Matsushita, N.; Cuaing, H. D.; Sun, M.; Sato, Y.; Liang, C.; Jung, J. U.; Cheng, J. Q.; Mulé, J. J.; et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9* (10), 1142–1151.
- (13) Subramani, S.; Malhotra, V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep.* **2013**, *14* (2), 143–151.
- (14) Jung, C. H.; Jun, C. B.; Ro, S. H.; Kim, Y.M.; Otto, N. M.; Cao, J.; Kundu, M.; Kim, D. H. ULK-Atg13-FIP200 Complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1992–2003.
- (15) Weidberg, H.; Shvets, E.; Shpilka, T.; Shimron, F.; Shinder, V.; Elazar, Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* **2010**, *29* (11), 1792–1802.
- (16) Ghavami, S.; Shojaei, S.; Yeganeh, B.; Ande, S. R.; Jangamreddy, J. R.; Mehrpour, M.; Christofferson, J.; Chaabane, W.; Moghadam, A. R.; Kashani, H. H.; et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *112*, 24–49.
- (17) Boland, B.; Yu, W. H.; Corti, O.; Mollereau B.; Henriques, A.; Bezard, E.; Pastores, G.M.; Rubinsztein, D.C.; Nixon, R.A.; Duchen, M.R.; Mallucci, G.R.; Kroemer, G. et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of aging. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17* (9), 660–688.
- (18) Nixon, R. A.; Yang, D. S. Autophagy failure in Alzheimer’s disease-locating the primary defect. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *43* (1), 38–45.
- (19) Lee, J.H.; Yu, W. H.; Kumar, A.; Lee, S.; Mohan, P. S.; Peterhoff, C. M.; Wolfe,

- D. M.; Martinez-Vicente, M.; Massey, A. C.; Sovak, G.; Uchiyama, Y.; Westaway, D.; Cuervo, A. M.; Nixon, R. A.; Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* **2010**, *141* (7), 1146–1158.
- (20) Ji, Z. S.; Müllendorff, K.; Cheng, I. H.; Miranda, R. D.; Huang, Y.; Mahley, R. W. Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid β peptide: lysosomal stability and Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (5), 2683–2692.
- (21) Nixon, R. A.; Yang, D. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2017**, *4*, 1–24.
- (22) Nixon, R. A. The Role of Autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **2013**, *19* (8), 983–997.
- (23) Moors, T. E.; Hoozemans, J. J. M.; Ingrassia, A.; Beccari, T.; Parnetti, L.; Chartier-Harlin, M. C.; Van De Berg, W. D. J. Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in parkinson’s disease. *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12* (1), 1–18.
- (24) Ravikumar, B. Aggregate-Prone Proteins with Polyglutamine and Polyalanine Expansions Are Degraded by Autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11* (9), 1107–1117.
- (25) Deretic, V.; Saitoh, T.; Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13* (10), 722–737.
- (26) Huang, J.; Brumell, J. H. Bacteria-Autophagy Interplay: A Battle for Survival. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12* (2), 101–114.
- (27) Frayling, C.; Frayling, C. Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release. *Nat Immunol.* **2011**, *12* (3), 222–230.
- (28) Choy, A.; Dancourt, J.; Mugo, B.; O’Connor, T. J.; Isberg, R. R.; Melia, T. J.; Roy, C. R. The legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science.* **2012**, *338*, 1072–1076.
- (29) Singh, R.; Kaushik, S.; Wang, Y.; Xiang, Y.; Novak, I.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Cuervo, A. M.; Czaja, M. J. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **2009**, *458* (7242), 1131–1135.
- (30) Ebato, C.; Uchida, T.; Arakawa, M.; Komatsu, M.; Ueno, T.; Komiya, K.; Azuma, K.; Hirose, T.; Tanaka, K.; Kominami, E.; et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* **2008**, *8* (4), 325–332.
- (31) Heilbronn, L. K.; Ravussin, E. Calorie restriction and aging: Review of the literature and implications for studies in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78* (3), 361–369.
- (32) Vellai, T. Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ.* **2009**, *16* (1), 94–102.
- (33) Simonsen, A.; Cumming, R. C.; Brech, A.; Isakson, P.; Schubert, D. R.; Finley, K. D. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult drosophila. *Autophagy* **2008**, *4* (2), 176–184.
- (34) Rubinsztein, D. C.; Mariño, G.; Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **2011**, *146* (5), 682–695.
- (35) Harrison, D. E.; Strong, R.; Sharp, Z. D.; Nelson, J. F.; Clinton, M.; Flurkey, K.; Nadon, N. L.; Wilkinson, J. E.; Frenkel, K.; Christy, S.; et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **2009**, *460* (7253), 392–395.
- (36) Armour, S. M.; Baur, J. A.; Hsieh, S. N.; Land-Bracha, A.; Thomas, S. M.; Sinclair, D. A. Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy. *Aging.* **2009**, *1* (6), 515–528.
- (37) Eisenberg, T.; Knauer, H.; Schauer, A.; Büttner, S.; Ruckstuhl, C.; Carmona-Gutierrez, D.; Ring, J.; Schroeder, S.; Magnes, C.; Antonacci, L.; et al. Induction

- of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11* (11), 1305–1314.
- (38) Bray, F. The Evolving Scale and Profile of Cancer Worldwide: Much Ado about Everything. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2016**, *25* (1), 3–5.
- (39) Vos T., Abajobir A.A., Abate K.H., Abbafati C., Abbas K.M., Abd-Allah F., Abdulkader R.S., Abdulle A.M., Abebo T.A., Abera S.F., Aboyans V., Abu-Raddad L.J., Ackerman I.N., Adamu A.A., Adetokunboh O.; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability- Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* **2017**, *390*, 1211–1259.
- (40) Gapstur, S. M.; Thun, M. J. Progress in the war on cancer. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **2010**, *303* (11), 1084–1085.
- (41) Mukhopadhyay, S.; Sinha, N.; Das, D. N.; Panda, P. K.; Naik, P. P.; Bhutia, S. K. Clinical relevance of autophagic therapy in cancer: Investigating the current trends, challenges, and future prospects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2016**, *53* (4), 228–252.
- (42) Rubinsztein, D. C.; Codogno, P.; Levine, B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **2012**, *11* (9), 709–730.
- (43) Hewitson, K. S.; McNeill, L. A.; Elkins, J. M.; Schofield, C. J.; Rabinowitz, J. D.; White, E. Autophagy and metabolism. *Science.* **2010**, *330* (6009), 1344–1348.
- (44) Wu, Z.; Chang, P. C.; Yang, J. C.; Chu, C. Y.; Wang, L. Y.; Chen, N. T.; Ma, A. H.; Desai, S. J.; Lo, S. H.; Evans, C. P.; et al. Autophagy blockade sensitizes prostate cancer cells towards Src family kinase inhibitors. *Genes Cancer* **2010**, *1* (1), 40–49.
- (45) Li, J.; Hou, N.; Faried, A.; Tsutsumi, S.; Kuwano, H. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46* (10), 1900–1909.
- (46) Amaravadi, R. K.; Yu, D.; Lum, J. J.; Bui, T.; Christophorou, M. A.; Evan, G. I.; Thomas-Tikhonenko, A.; Thompson, C. B. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (2), 326–336.
- (47) Yang, Z. J.; Chee, C. E.; Huang, S.; Sinicrope, F. A. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10* (9), 1533–1541.
- (48) Amaravadi, R. K.; Lippincott-Schwartz, J.; Yin, X. M.; Weiss, W. A.; Takebe, N.; Timmer, W.; DiPaola, R. S.; Lotze, M. T.; White, E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (4), 654–666.
- (49) Ruiz-Irastorza, G.; Ramos-Casals, M.; Brito-Zeron, P.; Khamashta, M. A. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: A systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69* (1), 20–28.
- (50) Marinković, M.; Šprung, M.; Buljubašić, M.; Novak, I. Autophagy modulation in cancer: current knowledge on action and therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 1–18.
- (51) Adhikari, S.; Calderwood, E., F.; Land, D., B.; Gould, A.; Harrison, S., J.; Huang, S.; MA, L. Atg7 Inhibitors and the Uses Thereof. WO 2018/089786 Cambridge, (US), 2018.
- (52) Eng, C. H.; Wang, Z.; Tkach, D.; Toral-Barza, L.; Ugwonali, S.; Liu, S.; Fitzgerald, S. L.; George, E.; Frias, E.; Cochran, N.; et al. Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (1), 182–187.
- (53) Kinsey, C. G.; Camolotto, S. A.; Boespflug, A. M.; Guillen, K. P.; Foth, M.; Truong, A.; Schuman, S. S.; Shea, J. E.; Seipp, M. T.; Yap, J. T.; et al. Protective

- Autophagy Elicited by RAF→MEK→ERK Inhibition Suggests a Treatment Strategy for RAS-Driven Cancers. *Nat. Med.* **2019**, *25* (4), 620–627.
- (54) Bryant, K. L.; Stalneck, C. A.; Zeitouni, D.; Klomp, J. E.; Peng, S.; Tikunov, A. P.; Gunda, V.; Pierobon, M.; Waters, A. M.; George, S. D.; et al. Combination of ERK and Autophagy Inhibition as a Treatment Approach for Pancreatic Cancer. *Nat. Med.* **2019**, *25* (4), 628–640.
- (55) Lee, C.-S.; Lee, L. C.; Yuan, T. L.; Chakka, S.; Fellmann, C.; Lowe, S. W.; Caplen, N. J.; McCormick, F.; Luo, J. MAP Kinase and Autophagy Pathways Cooperate to Maintain RAS Mutant Cancer Cell Survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (10), 4508–4517.
- (56) Dolgin, E. Anticancer Autophagy Inhibitors Attract ‘Resurgent’ Interest. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 408–410.
- (57) Chude, C. I.; Amaravadi, R. K. Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *23*, 2869–2879.
- (58) He, S.; Li, Q.; Jiang, X.; Lu, X.; Feng, F.; Qu, W.; Chen, Y.; Sun, H. Design of Small Molecule Autophagy Modulators: A Promising Druggable Strategy. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (11), 4656–4687.
- (59) Fleming, A.; Noda, T.; Yoshimori, T.; Rubinsztein, D. C. Chemical Modulators of Autophagy as Biological Probes and Potential Therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7* (1), 9–17.
- (60) Yan, Y.; Xu, Z.; Dai, S.; Qian, L.; Sun, L.; Gong, Z. Targeting Autophagy to Sensitive Glioma to Temozolomide Treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2016**, *35* (1), 1–14.
- (61) Liu Q, Thoreen C, Wang J, Sabatini D, G. N. MTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13* (2), 140–156.
- (62) Shi, W. Y.; Xiao, D.; Wang, L.; Dong, L. H.; Yan, Z. X.; Shen, Z. X.; Chen, S. J.; Chen, Y.; Zhao, W. L. Therapeutic Metformin/AMPK Activation Blocked Lymphoma Cell Growth via Inhibition of MTOR Pathway and Induction of Autophagy. *Cell Death Dis.* **2012**, *3* (3), e275-9.
- (63) Xu, Z.; Hang, J.; Hu, J.; Gao, B. Gefitinib, an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor, Activates Autophagy through AMPK in Human Lung Cancer Cells. *J. BUON* **2014**, *19* (2), 466–473.
- (64) Min, H.; Xu, M.; Chen, Z. R.; Zhou, J. D.; Huang, M.; Zheng, K.; Zou, X. P. Bortezomib Induces Protective Autophagy through AMP-Activated Protein Kinase Activation in Cultured Pancreatic and Colorectal Cancer Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *74* (1), 167–176.
- (65) Nogalska, A.; D’Agostino, C.; Engel, W. K.; Askanas, V. Sodium Phenylbutyrate Reverses Lysosomal Dysfunction and Decreases Amyloid-B42 in an in Vitro Model of Inclusion-Body Myositis. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *65*, 93–101.
- (66) Hidvegi, T.; Ewing, M.; Hale, P.; Dippold, C.; Beckett, C.; Kemp, C.; Maurice, N.; Mukherjee, A.; Goldbach, C.; Watkins, S.; et al. An Autophagy-Enhancing Drug Promotes Degradation of Mutant Antitrypsin Z and Reduces Hepatic Fibrosis. *Science.* **2010**, *329* (5988), 229–232.
- (67) Williams, A.; Sarkar, S.; Cuddon, P.; Ttofi, E. K.; Saiki, S.; Siddiqi, F. H.; Jahreiss, L.; Fleming, A.; Pask, D.; Goldsmith, P.; et al. Novel Targets for Huntington’s Disease in an MTOR-Independent Autophagy Pathway. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (5), 295–305.
- (68) Sarkar, S.; Floto, R. A.; Berger, Z.; Imarisio, S.; Cordenier, A.; Pasco, M.; Cook, L. J.; Rubinsztein, D. C. Lithium Induces Autophagy by Inhibiting Inositol Monophosphatase. *J. Cell Biol.* **2005**, *170* (7), 1101–1111.
- (69) Nagelkerke, A.; Bussink, J.; Geurts-Moespot, A.; Sweep, F. C. G. J.; Span, P. N. Therapeutic Targeting of Autophagy in Cancer. Part II: Pharmacological

- Modulation of Treatment-Induced Autophagy. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *31*, 99–105.
- (70) Tan, Q.; Joshua, A. M.; Saggar, J. K.; Yu, M.; Wang, M.; Kanga, N.; Zhang, J. Y.; Chen, X.; Wouters, B. G.; Tannock, I. F. Effect of Pantoprazole to Enhance Activity of Docetaxel against Human Tumour Xenografts by Inhibiting Autophagy. *Br. J. Cancer* **2015**, *112* (5), 832–840.
- (71) Lu, Y.; Liu, X. F.; Liu, T. R.; Fan, R. F.; Xu, Y. C.; Zhang, X. Z.; Liu, L. L. Celecoxib Exerts Antitumor Effects in HL-60 Acute Leukemia Cells and Inhibits Autophagy by Affecting Lysosome Function. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 1551–1557.
- (72) Triola, G. Chemical Tools for Modulating Autophagy. *Tetrahedron* **2015**, *71* (3), 387–406.
- (73) Rubinsztein, D. C., Codogno, P., Levine, B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (9), 709–730.
- (74) Choi, J.; Chen, J.; Schreiber, S. L.; Clardy, J.; Series, N.; Jul, N.; Clardy-t, J. Structure of the FKBP12-Rapamycin Complex Interacting with the Binding Domain of Human FRAP. *Science* **1996**, *273* (5272), 239–242.
- (75) Boland, B.; Kumar, A.; Lee, S.; Platt, F. M.; Wegiel, J.; Yu, W. H.; Nixon, R. A. Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer’s Disease. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (27), 6926–6937.
- (76) Fan, Q.; Cheng, C. K.; Nicolaidis, T. P.; Zachary, A.; Shokat, K. M.; Weiss, W. A. A Dual PI3K α /mTOR Inhibitor Cooperates with Blockade of EGFR in PTEN-Mutant Glioma. *Cancer Res. J.* **2008**, *67* (17), 7960–7965.
- (77) Fan, Q. W.; Cheng, C.; Hackett, C.; Feldman, M.; Houseman, B. T.; Nicolaidis, T.; Haas-Kogan, D.; James, C. D.; Oakes, S. A.; Debnath, J.; et al. Akt and Autophagy Cooperate to Promote Survival of Drug-Resistant Glioma. *Sci. Signal.* **2010**, *3* (147).
- (78) Sutherland, D. P.; Bao, L.; Berry, M.; Castanedo, G.; Chuckowree, I.; Dotson, J.; Folks, A.; Friedman, L.; Goldsmith, R.; Gunzner, J.; et al. Discovery of a Potent, Selective, and Orally Available Class I Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Kinase Inhibitor (GDC-0980) for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (21), 7579–7587.
- (79) Seront, E.; Rottey, S.; Filleul, B.; Glorieux, P.; Goeminne, J. C.; Verschaeve, V.; Vandembulcke, J. M.; Sautois, B.; Boegner, P.; Gillain, A.; et al. Phase II Study of Dual Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor BEZ235 in Patients with Locally Advanced or Metastatic Transitional Cell Carcinoma. *BJU Int.* **2016**, *118* (3), 408–415.
- (80) Benjamin, D.; Colombi, M.; Moroni, C.; Hall, M. N. Rapamycin Passes the Torch: A New Generation of mTOR Inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (11), 868–880.
- (81) Zhou, J.; Tan, S. H.; Nicolas, V.; Bauvy, C.; Yang, N. Di; Zhang, J.; Xue, Y.; Codogno, P.; Shen, H. M. Activation of Lysosomal Function in the Course of Autophagy via mTORC1 Suppression and Autophagosome-Lysosome Fusion. *Cell Res.* **2013**, *23* (4), 508–523.
- (82) Fu, L.; Kim, Y. A.; Wang, X.; Wu, X.; Yue, P.; Lonial, S.; Khuri, F. R.; Sun, S. Y. Perifosine Inhibits Mammalian Target of Rapamycin Signaling through Facilitating Degradation of Major Components in the mTOR Axis and Induces Autophagy. *Cancer Res.* **2009**, *69* (23), 8967–8976.
- (83) Viola, G.; Bortolozzi, R.; Hamel, E.; Moro, S.; Brun, P.; Castagliuolo, I.; Ferlin, M. G.; Basso, G. MG-2477, a New Tubulin Inhibitor, Induces Autophagy through Inhibition of the Akt/MTOR Pathway and Delayed Apoptosis in A549 Cells.

- Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83* (1), 16–26.
- (84) Thimmaiah, K. N.; Easton, J. B.; Germain, G. S.; Morton, C. L.; Kamath, S.; Buolamwini, J. K.; Houghton, P. J. Identification of N10-Substituted Phenoxazines as Potent and Specific Inhibitors of Akt Signaling. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (36), 31924–31935.
- (85) Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K. L. AMPK and MTOR Regulate Autophagy through Direct Phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13* (2), 132–141.
- (86) Balgi, A. D.; Fonseca, B. D.; Donohue, E.; Tsang, T. C. F.; Lajoie, P.; Proud, C. G.; Nabi, I. R.; Roberge, M. Screen for Chemical Modulators of Autophagy Reveals Novel Therapeutic Inhibitors of MTORC1 Signaling. *PLoS One* **2009**, *4* (9), 1-15.
- (87) Fonseca, B. D.; Diering, G. H.; Bidinosti, M. A.; Dalal, K.; Alain, T.; Balgi, A. D.; Forestieri, R.; Nodwell, M.; Rajadurai, C. V.; Gunaratnam, C.; et al. Structure-Activity Analysis of Niclosamide Reveals Potential Role for Cytoplasmic PH in Control of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (MTORC1) Signaling. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (21), 17530–17545.
- (88) Blommaart, E. F. C.; Krause, P.; Schellens, J. P. M.; Vreeling-Sindelarová, H.; Faculty, A. J. M.; Blommaart, E. F. C.; Krause, U.; Schellens, J. P. M.; Vreeling-Sindelarova, H.; Meijer, A. J. The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors Wortmannin and LY294002 Inhibit Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *Eur. J. Biochem* **1997**, *243*, 240–246.
- (89) Wu, Y. T.; Tan, H. L.; Shui, G.; Bauvy, C.; Huang, Q.; Wenk, M. R.; Ong, C. N.; Codogno, P.; Shen, H. M. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (14), 10850–10861.
- (90) Walker, E. H.; Pacold, M. E.; Perisic, O.; Stephens, L.; Hawkins, P. T.; Wymann, M. P.; Williams, R. L. Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Mol. Cell* **2000**, *6* (4), 909–919.
- (91) Jaber, N.; Dou, Z.; Chen, J.-S.; Catanzaro, J.; Jiang, Y.-P.; Ballou, L. M.; Selinger, E.; Ouyang, X.; Lin, R. Z.; Zhang, J.; et al. Class III PI3K Vps34 Plays an Essential Role in Autophagy and in Heart and Liver Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (6), 2003–2008.
- (92) Rostislavleva, K.; Soler, N.; Ohashi, Y.; Zhang, L.; Pardon, E.; Burke, J. E.; Masson, G. R.; Johnson, C.; Steyaert, J.; Ktistakis, N. T.; et al. Structure and Flexibility of the Endosomal Vps34 Complex Reveals the Basis of Its Function on Membranes. *Science* **2015**, *350* (6257), 1–25.
- (93) Farkas, T.; Dagaard, M.; Jäättelä, M. Identification of Small Molecule Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Autophagy. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (45), 38904–38912.
- (94) Liu, J.; Xia, H.; Kim, M.; Xu, L.; Li, Y.; Zhang, L.; Cai, Y.; Norberg, H. V.; Zhang, T.; Furuya, T.; et al. Beclin1 Controls the Levels of P53 by Regulating the Deubiquitination Activity of USP10 and USP13. *Cell* **2011**, *147* (1), 223–234.
- (95) Miller S, Tavshanjian B, Oleksy A, Perisic O, Houseman BT, Shokat KM, W. R. Shaping Development of Autophagy Inhibitors with the Structure of the Lipid Kinase Vps34R. *Autophagy* **2011**, *1638* (2010), 1638–1643.
- (96) Bago, R.; Malik, N.; Munson, M. J.; Prescott, A. R.; Davies, P.; Sommer, E.; Shpiro, N.; Ward, R.; Cross, D.; Ganley, I. G.; et al. Characterization of VPS34-IN1, a Selective Inhibitor of Vps34, Reveals That the Phosphatidylinositol 3-Phosphate-Binding SGK3 Protein Kinase Is a Downstream Target of Class III Phosphoinositide 3-Kinase. *Biochem. J.* **2014**, *463* (3), 413–427.

- (97) Pasquier, B.; El-Ahmad, Y.; Filoche-Rommé, B.; Dureuil, C.; Fassy, F.; Abecassis, P. Y.; Mathieu, M.; Bertrand, T.; Benard, T.; Barrière, C.; et al. Discovery of (2S)-8-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-Yl]-1-(3-Methyl-2-Oxobutyl)-2-(Trifluoromethyl)-3,4-Dihydro-2-H -Pyrimido[1,2- a]Pyrimidin-6-One: A Novel Potent and Selective Inhibitor of Vps34 for the Treatment of Solid Tumors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 376–400.
- (98) Robke, L.; Laraia, L.; Carnero Corrales, M. A.; Konstantinidis, G.; Muroi, M.; Richters, A.; Winzker, M.; Engbring, T.; Tomassi, S.; Watanabe, N.; et al. Phenotypic Identification of a Novel Autophagy Inhibitor Chemotype Targeting Lipid Kinase VPS34. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56* (28), 8153–8157.
- (99) Tang, J.; Deng, R.; Luo, R. Z.; Shen, G. P.; Cai, M. Y.; Du, Z. M.; Jiang, S.; Yang, M. T.; Fu, J. H.; Zhu, X. F. Low Expression of ULK1 Is Associated with Operable Breast Cancer Progression and Is an Adverse Prognostic Marker of Survival for Patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *134* (2), 549–560.
- (100) Zou, Y.; Chen, Z.; He, X.; He, X.; Wu, X.; Chen, Y.; Wu, X.; Wang, J.; Lan, P. High Expression Levels of Unc-51-like Kinase 1 as a Predictor of Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Oncol. Lett.* **2015**, *10* (3), 1583–1588.
- (101) Jung, C. H.; Seo, M.; Otto, N. M.; Kim, D. H. ULK1 Inhibits the Kinase Activity of MTORC1 and Cell Proliferation. *Autophagy* **2011**, *7* (10), 1212–1221.
- (102) Joshi, A.; Iyengar, R.; Joo, J. H.; Li-Harms, X. J.; Wright, C.; Marino, R.; Winborn, B. J.; Phillips, A.; Temirov, J.; Sciarretta, S.; et al. Nuclear ULK1 Promotes Cell Death in Response to Oxidative Stress through PARP1. *Cell Death Differ.* **2016**, *23* (2), 216–230.
- (103) Lazarus, M. B.; Novotny, C. J.; Shokat, K. M. Structure of the Human Autophagy Initiating Kinase ULK1 in Complex with Potent Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 257–261.
- (104) Tang, F.; Hu, P.; Yang, Z.; Xue, C.; Gong, J.; Sun, S.; Shi, L.; Zhang, S.; Li, Z.; Yang, C.; et al. SBI0206965, a Novel Inhibitor of Ulk1, Suppresses Non-Small Cell Lung Cancer Cell Growth by Modulating Both Autophagy and Apoptosis Pathways. *Oncol. Rep.* **2017**, *37* (6), 3449–3458.
- (105) Petherick, K. J.; Conway, O. J. L.; Mpamhanga, C.; Osborne, S. A.; Kamal, A.; Saxty, B.; Ganley, I. G. Pharmacological Inhibition of ULK1 Kinase Blocks Mammalian Target of Rapamycin (MTOR)-Dependent Autophagy. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (18), 11376–11383.
- (106) Davidson, S. M.; Vander Heiden, M. G. Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *57* (1), 481–507.
- (107) Yoshimori, T.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y.; Futai, M.; Tashiro, Y. . Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-Type H⁺-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (26), 17707–17712.
- (108) Yamamoto, A.; Tagawa, Y.; Yoshimori, T.; Moriyama, Y.; Masaki, R.; Tashiro, Y. Bafilomycin Ai Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Auto. *Cell Struct. Funct.* **1998**, *23*, 33–42.
- (109) Kaufmann, A.M.; Krise, J. P. . Lysosomal Sequestration of Amine-Containing Drugs: Analysis and Therapeutic Implications. *J Pharm Sci.* **2007**, *96* (4), 729–746.
- (110) Wang, T.; Goodall, M. L.; Gonzales, P.; Sepulveda, M.; Martin, K. R.; Gately, S.; MacKeigan, J. P. Synthesis of Improved Lysomotropic Autophagy Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 3025–3035.
- (111) Shi, T. T.; Yu, X. X.; Yan, L. J.; Xiao, H. T. Research Progress of Hydroxychloroquine and Autophagy Inhibitors on Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *79* (2), 287–294.
- (112) Sharma, N.; Thomas, S.; Golden, E. B.; Hofman, F. M.; Chen, T. C.; Petasis, N.

- A.; Schönthal, A. H.; Louie, S. G. Inhibition of Autophagy and Induction of Breast Cancer Cell Death by Mefloquine, an Antimalarial Agent. *Cancer Lett.* **2012**, *326* (2), 143–154.
- (113) Carew JS, Espitia CM, Zhao W, Han Y, Visconte V, Phillips J, N. ST. Disruption of Autophagic Degradation with ROC-325 Antagonizes Renal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Clin Cancer Res.* **2015**, *40* (4), 1291–1296.
- (114) Maes, H.; Kuchnio, A.; Peric, A.; Moens, S.; Nys, K.; DeBock, K.; Quaegebeur, A.; Schoors, S.; Georgiadou, M.; Wouters, J.; et al. Tumor Vessel Normalization by Chloroquine Independent of Autophagy. *Cancer Cell* **2014**, *26* (2), 190–206.
- (115) Gutierrez, M.G.; Munafó, D.B.; Berón, W.; Colombo, M. I. . Rab7 Is Required for the Normal Progression of the Autophagic Pathway in Mammalian Cells. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2687–2697.
- (116) Mauthe, M.; Reggiori, F. ATG Proteins: Are We Always Looking at Autophagy? *Autophagy* **2016**, *12* (12), 2502–2503.
- (117) Hain, A. U. P.; Bartee, D.; Sanders, N. G.; Miller, A. S.; Sullivan D. J.; Levitskaya, J.; Meyers, C. F.; Bosch, J. Identification of an Atg8-Atg3 Protein–Protein Interaction Inhibitor from the Medicines for Malaria Venture Malaria Box Active in Blood and Liver Stage Plasmodium Falciparum Parasites. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4521–4531.
- (118) Hain, A.U.; Weltzer, R.R.; Hammond, H.; Jayabalasingham, B.; Dinglasan, R. R.; Graham, D. R.; Colquhoun, D. R.; Coppens, I.; Bosch, J. Structural Characterization and Inhibition of the Plasmodium Atg8-Atg3 Interaction. *J. Struct. Biol.* **2012**, *180* (3), 551–562.
- (119) Frudd, K.; Burgoyne, T.; Burgoyne, J. R. Oxidation of Atg3 and Atg7 Mediates Inhibition of Autophagy. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–15.
- (120) Mariño, G.; Uría, J. A.; Puente, X. S.; Quesada, V.; Bordallo, J.; López-Otín, C. Human Autophagins, a Family of Cysteine Proteinases Potentially Implicated in Cell Degradation by Autophagy. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (6), 3671–3678.
- (121) Schaaf, M. B. E.; Keulers, T. G.; Vooijs, M. A.; Rouschop, K. M. A. LC3/GABARAP Family Proteins: Autophagy-(Un)Related Functions. *FASEB J.* **2016**, *30* (12), 3961–3978.
- (122) Weidberg, H.; Shvets, E.; Shpilka, T.; Shimron, F.; Shinder, V.; Elazar, Z. LC3 and GATE-16/GABARAP Subfamilies Are Both Essential yet Act Differently in Autophagosome Biogenesis. *EMBO J.* **2010**, *29* (11), 1792–1802.
- (123) Nakatogawa, H.; Ishii, J.; Asai, E.; Ohsumi, Y. Atg4 Recycles Inappropriately Lipidated Atg8 to Promote Autophagosome Biogenesis. *Autophagy* **2012**, *8* (2).
- (124) Yu, Z. Q.; Ni, T.; Hong, B.; Wang, H. Y.; Jiang, F. J.; Zou, S.; Chen, Y.; Zheng, X. L.; Klionsky, D. J.; Liang, Y.; et al. Dual Roles of Atg8 - PE Deconjugation by Atg4 in Autophagy. *Autophagy* **2012**, *8* (6), 883–892.
- (125) Bortnik, S.; Choutka, C.; Horlings, H. M.; Leung, S.; Baker, J. H. E.; Lebovitz, C.; Dragowska, W. H.; Go, N. E.; Bally, M. B.; Minchinton, A. I.; et al. Identification of Breast Cancer Cell Subtypes Sensitive to ATG4B Inhibition. *Oncotarget* **2016**, *7* (41), 66970–66988.
- (126) Liu, P. F.; Leung, C. M.; Chang, Y. H.; Cheng, J. S.; Chen, J. J.; Weng, C. J.; Tsai, K. W.; Hsu, C. J.; Liu, Y. C.; Hsu, P. C.; et al. ATG4B Promotes Colorectal Cancer Growth Independent of Autophagic Flux. *Autophagy* **2014**, *10* (8), 1454–1465.
- (127) Chu, J.; Fu, Y.; Xu, J.; Zheng, X.; Gu, Q.; Luo, X.; Dai, Q.; Zhang, S.; Liu, P.; Hong, L.; et al. ATG4B Inhibitor FMK-9a Induces Autophagy Independent on Its Enzyme Inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *644*, 29–36.
- (128) Xu, D.; Xu, Z.; Han, L.; Liu, C.; Zhou, Z.; Qiu, Z.; Lin, X.; Tang, G.; Shen, H.; Aebi, J.; et al. Identification of New ATG4B Inhibitors Based on a Novel High-Throughput Screening Platform. *SLAS Discov.* **2017**, *22* (4), 338–347.

- (129) Shu, C. W.; Madiraju, C.; Dayong Zhai; Welsh, K.; Diaz, P.; Sergienko, E.; Sano, R.; Reed, J. C. High-Throughput Fluorescence Assay for Small-Molecule Inhibitors of Autophagins/Atg4. *J. Biomol. Screen.* **2011**, *16* (2), 174–182.
- (130) Vezenkov, L.; Honson, N. S.; Kumar, N. S.; Bosc, D.; Kovacic, S.; Nguyen, T. G.; Pfeifer, T. A.; Young, R. N. Development of Fluorescent Peptide Substrates and Assays for the Key Autophagy-Initiating Cysteine Protease Enzyme, ATG4B. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 3237–3247.
- (131) Akin, D.; Wang, S. K.; Habibzadegah-Tari, P.; Law, B.; Ostrov, D.; Li, M.; Yin, X. M.; Kim, J. S.; Horenstein, N.; Dunn, W. A. A Novel ATG4B Antagonist Inhibits Autophagy and Has a Negative Impact on Osteosarcoma Tumors. *Autophagy* **2014**, *10* (11), 2021–2035.
- (132) Liu, P. F.; Tsai, K. L.; Hsu, C. J.; Tsai, W. L.; Cheng, J. S.; Chang, H. W.; Shiau, C. W.; Goan, Y. G.; Tseng, H. H.; Wu, C. H.; et al. Drug Repurposing Screening Identifies Tioconazole as an ATG4 Inhibitor That Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy. *Theranostics* **2018**, *8* (3), 830–845.
- (133) Cleenewerck, M.; Grootaert, M. O. J.; Gladysz, R.; Adriaenssens, Y.; Roelandt, R.; Joossens, J.; Lambeir, A. M.; De Meyer, G. R. Y.; Declercq, W.; Augustyns, K.; et al. Inhibitor Screening and Enzymatic Activity Determination for Autophagy Target Atg4B Using a Gel Electrophoresis-Based Assay. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 631–638.
- (134) Bosc, D.; Vezenkov, L.; Bortnik, S.; An, J.; Xu, J.; Choutka, C.; Hannigan, A. M.; Kovacic, S.; Loo, S.; Clark, P. G. K.; et al. A New Quinoline-Based Chemical Probe Inhibits the Autophagy-Related Cysteine Protease ATG4B. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–17.
- (135) Fu, Y.; Hong, L.; Xu, J.; Zhong, G.; Gu, Q.; Gu, Q.; Guan, Y.; Zheng, X.; Dai, Q.; Luo, X.; et al. Discovery of a Small Molecule Targeting Autophagy via ATG4B Inhibition and Cell Death of Colorectal Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Autophagy* **2019**, *15* (2), 295–311.
- (136) Nguyen, T. G.; Honson, N. S.; Arns, S.; Davis, T. L.; Dhe-Paganon, S.; Kovacic, S.; Kumar, N. S.; Pfeifer, T. A.; Young, R. N. Development of Fluorescent Substrates and Assays for the Key Autophagy-Related Cysteine Protease Enzyme, ATG4B. *Assay Drug Dev. Technol.* **2014**, *12* (3), 176–189.
- (137) Xu, D.; Xu, Z.; Han, L.; Liu, C.; Zhou, Z.; Qiu, Z.; Lin, X.; Tang, G.; Shen, H.; Aebi, J.; et al. Identification of New ATG4B Inhibitors Based on a Novel High-Throughput Screening Platform. *J. Biomol. Screen.* **2017**, *22* (4), 338–347.
- (138) Xu, J.; Bally, M.; Go, N. E.; An, J.; Kovacic, S.; Young, R. N.; Gorski, S. M.; Bosc, D.; Chen, G.; Leung, A.; et al. A New Quinoline-Based Chemical Probe Inhibits the Autophagy-Related Cysteine Protease ATG4B. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–17.
- (139) Cleenewerck, M.; Grootaert, M. O. J.; Gladysz, R.; Adriaenssens, Y.; Roelandt, R.; Joossens, J.; Lambeir, A. M.; De Meyer, G. R. Y.; Declercq, W.; Augustyns, K.; et al. Inhibitor Screening and Enzymatic Activity Determination for Autophagy Target Atg4B Using a Gel Electrophoresis-Based Assay. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 631–638.
- (140) Li, M.; Hou, Y.; Wang, J.; Chen, X.; Shao, Z. M.; Yin, X. M. Kinetics Comparisons of Mammalian Atg4 Homologues Indicate Selective Preferences toward Diverse Atg8 Substrates. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (9), 7327–7338.
- (141) Welsh, K.; Reed, J. C.; Diaz, P.; Madiraju, C.; Shu, C.-W.; Sano, R.; Zhai, D.; Sergienko, E. High-Throughput Fluorescence Assay for Small-Molecule Inhibitors of Autophagins/Atg4. *J. Biomol. Screen.* **2011**, *16* (2), 174–182.
- (142) Li, M.; Chen, X.; Ye, Q. Z.; Vogt, A.; Yin, X. M. A High-Throughput FRET-Based Assay for Determination of Atg4 Activity. *Autophagy* **2012**, *8* (3), 401–412.
- (143) Yasgar, A.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Coussens, N. P. AlphaScreen-Based Assays:

- Ultra-High-Throughput Screening for Small-Molecule Inhibitors of Challenging Enzymes and Protein-Protein Interactions Adam. *Methods Mol Biol* **2016**, *1439*, 77–98.
- (144) Wu, G.; Yuan, Y.; Hodge, C. N. Determining Appropriate Substrate Conversion for Enzymatic Assays in High-Throughput Screening. *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8* (6), 694–700.
- (145) Acker, M. G.; Auld, D. S. Considerations for the Design and Reporting of Enzyme Assays in High-Throughput Screening Applications. *Perspect. Sci.* **2014**, *1* (1–6), 56–73.
- (146) Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R.; A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4* (2), 67–73.
- (147) Ueno, T.; Tanaka, K.; Tanida, I.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Kominami, E.; Sou, Y.; Mizushima, T.; Komatsu, M.; Kumanomidou, T. The Crystal Structure of Human Atg4b, a Processing and De-Conjugating Enzyme for Autophagosome-Forming Modifiers. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 612–618.
- (148) Satoo, K.; Noda, N. N.; Kumeta, H.; Fujioka, Y.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; Inagaki, F. The Structure of Atg4B-LC3 Complex Reveals the Mechanism of LC3 Processing and Delipidation during Autophagy. *EMBO J.* **2009**, *28* (9), 1341–1350.
- (149) Inagaki, F.; Ohsumi, Y.; Suzuki, N. N.; Fujioka, Y.; Sugawara, K.; Mizushima, N. Structural Basis for the Specificity and Catalysis of Human Atg4B Responsible for Mammalian Autophagy. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (48), 40058–40065.
- (150) Pieper, U.; Datta, R. S.; Madhusudhan, M. S.; Sjolander, K.; Ferrin, T. E.; Pettersen, E. F.; Webb, B. M.; Huang, C. C.; Schneidman-Duhovny, D.; Yang, Z.; et al. ModBase, a Database of Annotated Comparative Protein Structure Models, and Associated Resources. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *39*, D465–D474.
- (151) Venkatachalam, C. M.; Jiang, X.; Oldfield, T.; Waldman, M. LigandFit: A Novel Method for the Shape-Directed Rapid Docking of Ligands to Protein Active Sites. *J. Mol. Graph. Model.* **2003**, *21* (4), 289–307.
- (152) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739–1749.
- (153) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **2002**, *267* (3), 727–748.
- (154) O. Trott; A.J.Olson. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461.
- (155) Ruiz-Carmona, S.; Alvarez-Garcia, D.; Foloppe, N.; Garmendia-Doval, A. B.; Juhos, S.; Schmidtke, P.; Barril, X.; Hubbard, R. E.; Morley, S. D. RDock: A Fast, Versatile and Open Source Program for Docking Ligands to Proteins and Nucleic Acids. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10* (4), 1–7.
- (156) Zhao, H.; Caflich, A. Discovery of ZAP70 Inhibitors by High-Throughput Docking into a Conformation of Its Kinase Domain Generated by Molecular Dynamics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (20), 5721–5726.
- (157) Lavecchia, A.; Giovanni, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (23), 2839–2860.
- (158) Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759.

- (159) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739–1749.
- (160) Repasky, M. P.; Mainz, D. T.; Greenwood, J. R.; Sanschagrin, P. C.; Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Frye, L. L. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6177–6196.
- (161) Arrowsmith CH, Audia JE, Austin C, Baell J, Bennett J, Blagg J, Bountra C, Brennan PE, Brown PJ, Bunnage ME, Buser-Doepner C, Campbell RM, Carter AJ, Cohen P, Copeland RA, Cravatt B, Dahlin JL, Dhanak D, Edwards AM, Frederiksen M19, Frye SV, Gray N, Grims, Z. W. The Promise and Peril of Chemical Probes. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 536–541.
- (162) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2719–2740.
- (163) Baell, J. B. Observations on Screening-Based Research and Some Concerning Trends in the Literature. *Future Med. Chem.* **2010**, *2* (10), 1529–1546.
- (164) Baell, J.; Walters, M. A. Chemical Con Artists Foil Drug Discovery. *Nature* **2014**, *513*, 481–483.
- (165) Mohandes, F.; Salavati-Niasari, M. Influence of Morphology on the in Vitro Bioactivity of Hydroxyapatite Nanostructures Prepared by Precipitation Method. *New J. Chem.* **2014**, *38* (9), 4501–4509.
- (166) Kovaříček, P.; Meister, A. C.; Flídrová, K.; Cabot, R.; Kovaříčková, K.; Lehn, J. M. Competition-Driven Selection in Covalent Dynamic Networks and Implementation in Organic Reactional Selectivity. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (5), 3215–3226.
- (167) Varney, M. D.; Marzoni, G. P.; Palmer, C. L.; Deal, J. G.; Webber, S.; Welsh, K. M.; Bacquet, R. J.; Bartlett, C. A.; Morse, C. A.; Booth, C. L. et al. Crystal-Structure-Based Design and Synthesis of Benz[*cd*]Indole-Containing Inhibitors of Thymidylate Synthase. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (4), 663–676.
- (168) Xue, X.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Song, M.; Xing, Y.; Xiang, Q.; Wang, Z.; Tu, Z.; Zhou, Y.; Ding, K.; et al. Discovery of Benzo[*cd*]Indol-2(1H)-ones as Potent and Specific BET Bromodomain Inhibitors: Structure-Based Virtual Screening, Optimization, and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (4), 1565–1579.
- (169) Zhang, C.; Feng, L. J.; Huang, Y.; Wu, D.; Li, Z.; Zhou, Q.; Wu, Y.; Luo, H. B. Discovery of Novel Phosphodiesterase-2A Inhibitors by Structure-Based Virtual Screening, Structural Optimization, and Bioassay. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57* (2), 355–364.
- (170) Saddique, F. A.; Zahoor, A. F.; Faiz, S.; Naqvi, S. A. R.; Usman, M.; Ahmad, M. Recent Trends in Ring Opening of Epoxides by Amines as Nucleophiles. *Synth. Commun.* **2016**, *46* (10), 831–868.
- (171) Chini, M.; Crotti, P.; Macchia, F. Metal Salts as New Catalysts for Mild and Efficient Aminolysis of Oxiranes. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (32), 4661–4664.
- (172) Hsiang, Y. H.; Jiang, J. B.; Liu, L. F. Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by Amonafide and Its Structural Analogs. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 371–376.
- (173) Rideout, D.; Schinazi, R.; Pauza, C. D.; Lovelace, K.; Chiang, L. C.; Calogeropoulou, T.; McCarthy, M.; Elder, J. H. Derivatives of 4-Amino-3,6-Disulfonato-1, 8-Naphthalimide Inhibit Reverse Transcriptase and Suppress Human and Feline Immunodeficiency Virus Expression in Cultured Cells. *J. Cell. Biochem.* **1993**, *51*, 446–457.

- (174) Chakraborti, A. K.; Rudrawar, S.; Kondaskara, A. Lithium Bromide, an Inexpensive and Efficient Catalyst for Opening of Epoxide Rings by Amines at Room Temperature under Solvent-Free Condition. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, No. 17, 3597–3600.
- (175) Girouard, S.; Houle, M. H.; Grandbois, A.; Keillor, J. W.; Michnick, S. W. Synthesis and Characterization of Dimalcimine Fluorogens Designed for Specific Labeling of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (2), 559–566.
- (176) Klionsky, D. J.; Abdelmohsen, K.; Abe, A.; Abedin, M. J.; Abeliovich, H.; Acevedo Arozena, A.; Adachi, H.; Adams, C. M.; Adams, P. D.; Adeli, K.; Adhietty, P. J.; Adler, S. G.; Agam, G.; Agarwal, R.; Aghi, M. K.; Agnello, M.; Agostinis, P.; Aguilar, P. V. A. Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (3rd Edition). *Autophagy* **2016**, *12* (1), 1–222.
- (177) Selvakumaran, M.; Amaravadi, R. K.; Vasilevska, I. A.; O'Dwyer, P. J. Autophagy Inhibition Sensitizes Colon Cancer Cells to Antiangiogenic and Cytotoxic Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (11), 2995–3007.
- (178) Twum, E. A.; Nathubhai, A.; Wood, P. J.; Lloyd, M. D.; Thompson, A. S.; Threadgill, M. D. Initial Development of a Cytotoxic Amino-Seco-CBI Warhead for Delivery by Prodrug Systems. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 3481–3489.
- (179) Chen, H.; Xu, X.; Liu, L.; Tang, G.; Zhao, Y. Phosphorus Oxochloride as an Efficient Coupling Reagent for the Synthesis of Esters, Amides and Peptides under Mild Conditions. *RSC Adv.* **2013**, *3* (37), 16247–16250.
- (180) Wang, L.; Yang, M.; Liu, X.; Song, H.; Han, L.; Chu, W.; Sun, Z. Pd-Catalyzed Direct C-H Cyanation of Picolinamides via Bidentate Chelation Assistance. *Appl. Organomet. Chem.* **2016**, *30* (8), 680–683.
- (181) Twum, E. A.; Woodman, T. J.; Wang, W.; Threadgill, M. D. Observation by NMR of Cationic Wheland-like Intermediates in the Deiodination of Protected 1-Iodonaphthalene-2,4-Diamines in Acidic Media. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (36), 6208–6214.
- (182) G. Marzolph; H. U. Blank. Verfahren Zur Durchführung von Friedel-Crafts-Reaktionen Und Friedel-Crafts-Ähnlichen Reaktionen. Patent DE3422075A1, Bayer, 1984.
- (183) Zhang, J. W.; Xu, J. H.; Cheng, D. J.; Shi, C.; Liu, X. Y.; Tan, B. Discovery and Enantiocontrol of Axially Chiral Urazoles via Organocatalytic Tyrosine Click Reaction. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–10.

CAPÍTULO 2:

Desarrollo de un método específico de modificación de proteínas

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

1.- Modificación de proteínas

La modificación química de proteínas surge como una herramienta importante en el campo de la biología química debido a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el estudio del proteoma.¹ La modificación estable de biomoléculas, también conocida como bioconjugación, combina características de la química sintética y de la biología molecular con el fin de mejorar, modular o caracterizar las propiedades de las biomoléculas.

La bioconjugación permite la unión covalente de moléculas o sondas a uno o más residuos de una proteína. Estos conjugados pueden incluir marcajes no naturales (moléculas fluorescentes, biotina, polímeros derivados de polietilenglicol (PEG)) o incluir modificaciones posttraduccionales naturales (glicosilación, acilación, metilación, fosforilación, prenilación o ubiquitinación) que desempeñan un papel fundamental en procesos celulares tales como el tráfico, la diferenciación, la migración y la señalización celular.² La modificación de proteínas puede realizarse también por métodos biológicos, como el reconocimiento por parte de enzimas de determinadas secuencias de amino ácidos. Además, mediante el uso de métodos genéticos se pueden preparar proteínas con residuos no naturales que pueden ser selectivamente modificados mediante reacciones bioortogonales.¹

Las proteínas y anticuerpos modificados han demostrado su **utilidad** en múltiples estudios biológicos, en la determinación de la función de las proteínas y su interacción con otras biomoléculas así como en el tratamiento de enfermedades.^{3,4,5,6,7} Además, como las proteínas en general son susceptibles a la degradación enzimática, los bioconjugados con PEG permiten aumentar la estabilidad de la proteína,^{8,9} presentan propiedades mejoradas y pueden llegar a servir como agentes terapéuticos más estables y eficientes. Estos métodos también tienen un papel importante en la generación de nuevos materiales más biocompatibles, aumentar la inmunogenicidad de vacunas¹⁰ o facilitar la inmovilización de proteínas sobre soportes sólidos.¹¹

Existen varios **métodos** para la modificación de proteínas, cada uno con sus ventajas y limitaciones, proporcionando un conjunto de herramientas que hasta hace 20 años se limitaba en gran medida a las reacciones con los residuos de cisteína (Cys) y lisina (Lys). Más recientemente, se han desarrollado métodos adicionales de modificación selectiva que afectan a éstos y a otros residuos de aminoácidos.¹²

Un método ideal de bioconjugación debe tener los siguientes requisitos: presentar selectividad así como tolerancia y compatibilidad con otros grupos funcionales presentes en las biomoléculas, ser compatible con el medio acuoso, proceder a pH próximo a neutro, a temperatura ambiente o 37 °C como máximo y presentar velocidades de reacción altas que permitan trabajar con concentraciones bajas de reactivos. Todas estas características garantizan que el método de modificación de proteínas sea eficiente. Sin embargo, existen aún pocos ejemplos de métodos de modificación de proteínas que cumplan todos estos requisitos de manera simultánea. Existe, por lo tanto, un gran interés en el desarrollo de nuevas metodologías para la modificación de proteínas que permitan ampliar las herramientas existentes.

De entre los 20 aminoácidos diferentes involucrados en la síntesis de proteínas, sólo un tercio de estos residuos representan objetivos químicos para los métodos de bioconjugación. Éstos son elegidos de acuerdo con la reactividad intrínseca del residuo (acidez/basicidad, electrofilia/nucleofilia, características oxidorreductoras) y su entorno (en el medio de la secuencia, extremos N-terminal o C-terminal, ubicación en una secuencia específica, accesibilidad, etc.¹³) En base a esta reactividad intrínseca de las cadenas laterales de aminoácidos, se han descrito métodos para la modificación selectiva de residuos de lisina,¹⁴ cisteína,^{15,16,17} tirosina,¹⁸ triptófano,^{19,20} glutámico,^{21,22,23} aspártico,^{24,25} o metionina.²⁶ Además de su reactividad intrínseca, las cadenas laterales de residuos que están cargados a pH neutro, como las lisinas y los ácidos glutámico y aspártico,^{24,25} se muestran a menudo en la superficie de las proteínas para ayudar a su solubilidad en agua siendo por tanto las más accesibles. A continuación se describirán brevemente los métodos de modificación de proteínas más relevantes.

2.- Métodos clásicos para la modificación de proteínas

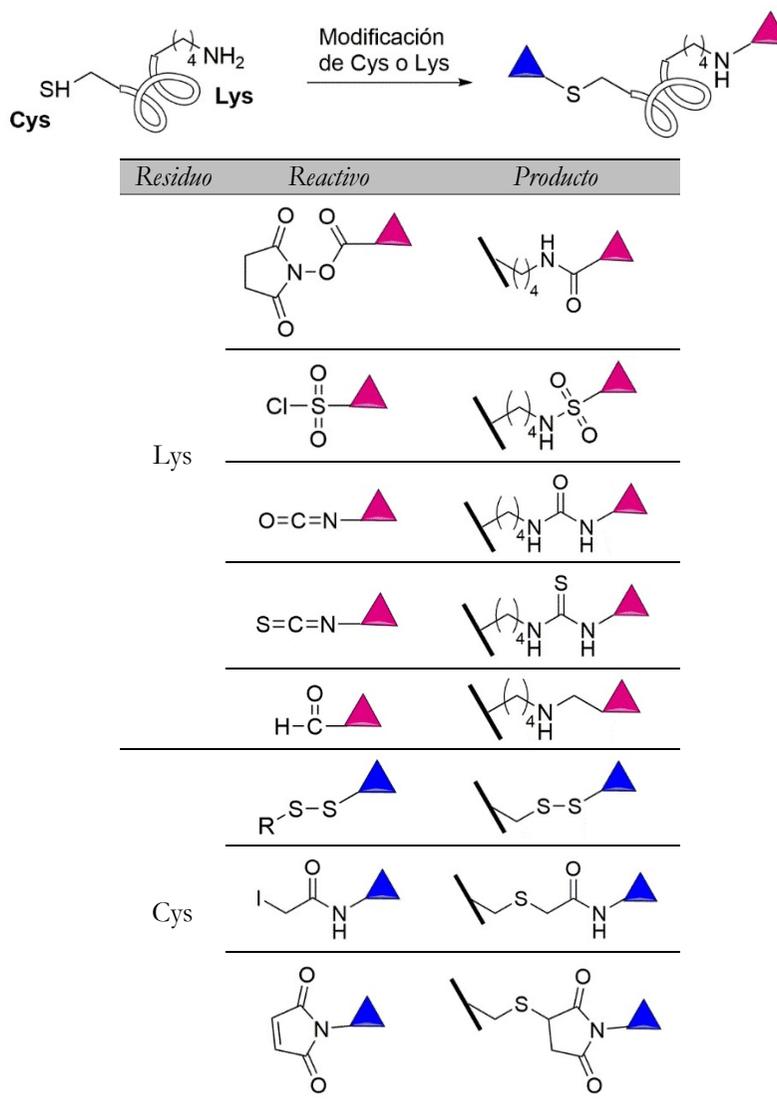
Los métodos clásicos de modificación de proteínas abarcan principalmente reacciones simples que se dirigen hacia los grupos funcionales que se encuentran en las cadenas laterales de los aminoácidos canónicos o naturales, es decir los 20 aminoácidos que forman las proteínas. Los residuos de **cisteína** y **lisina** son los más utilizados para la introducción de modificaciones debido a la elevada nucleofilia del grupo sulfhidrilo o de la amina primaria presentes en las cadenas laterales de estos residuos.^{27,28}

La reacción con residuos de **lisina** supone una modificación inespecífica y aleatoria de proteínas. Estos residuos son abundantes (5.9% de los residuos en proteínas humanas).^{29,30} Existe un gran número de métodos para modificar selectivamente aminas primarias. Estos

métodos se basan principalmente en la reacción con electrófilos e incluyen ésteres activados,^{31,32} cloruros de sulfonilo, isocianatos o isotiocianatos³³ para generar amidas, sulfonamidas, ureas o tioureas, respectivamente. Otro tipo de modificación se basa en la aminación reductora con cetonas y aldehídos (Esquema 8). Debido a su simplicidad, estos métodos han sido ampliamente utilizados, pero a causa de la abundancia, reactividad y accesibilidad de los residuos de lisina, suelen resultar en mezclas heterogéneas de productos que pueden afectar a su función. Además, aparte de marcar de manera inespecífica uno o más residuos de lisina, estos métodos pueden afectar también a otros residuos nucleofílicos como histidina, serina, treonina y tirosina.^{34,35,36}

Por otro lado, el grupo tiol o sulfhidrilo de los residuos de **cisteína** es considerado el grupo más nucleófilo a pH fisiológico y, por lo tanto, es uno de los sitios de modificación preferidos. Debido a su reactividad única y poca abundancia (se encuentra con una frecuencia del ~2 % en proteínas de mamíferos),³⁷ en combinación con sus propiedades químicas ($pK_a = 8.5-9.5$) y el ajuste del pH del medio, este residuo permite en muchos casos la modificación casi específica de proteínas frente a residuos de lisina e histidina.¹⁶ Alternativamente, hay que tener en cuenta que los residuos de cisteína tienen importantes roles dentro de las proteínas (funciones catalíticas, estabilidad estructural por formación de puentes disulfuro), por lo que su modificación puede cambiar las propiedades de la proteína. Además, los residuos de cisteína a menudo se encuentran escondidos en el interior de la proteína siendo poco accesibles para su modificación. En muchas ocasiones se pueden superar estas limitaciones y conseguir un marcaje específico mediante la introducción de nuevos residuos de cisteína localizados en la superficie de la proteína pero estas estrategias requieren de trabajos previos de ingeniería genética. El grupo sulfhidrilo de cisteínas puede modificarse mediante la formación de enlaces disulfuro,^{38,39} alquilación con derivados de yodoacetamida,^{40,41} o mediante adición de Michael a maleimidas^{42,43} o vinil sulfonas,^{44,45} tal y como se muestra en el esquema 8. Los derivados de maleimida han sido ampliamente utilizados debido a su disponibilidad comercial y a su fácil síntesis. Aunque el tioéter resultante se considera estable y reversible, estudios recientes indican que podría degradarse o que su formación podría ser reversible en presencia de tioles.⁴⁶ Asimismo, también hay métodos de modificación de proteínas mediante la introducción de un residuo de dehidroalanina que se genera a partir de una cisteína.^{47,48} Otro método más reciente es la incorporación de oxetanos⁴⁹ a través de la alquilación quimioselectiva del residuo de cisteína. En resumen, la modificación de proteínas en residuos de cisteína

presenta una elevada selectividad debido a su menor abundancia en comparación con los residuos de lisina por lo que es un método ampliamente utilizado.



Esquema 8. Reacciones de bioconjugación clásicas para la modificación de residuos de Lys y Cys. Los residuos de Lys pueden ser modificados mediante la formación de amidas, sulfonamidas, ureas, tioureas e iminas con ésteres activados por *N*-hidroxisuccinimidilo, cloruros de sulfonilo, isocianatos, tioisocianatos y aldehídos o cetonas, respectivamente. Los residuos de Cys pueden ser modificados a través de intercambio de enlaces disulfuro, alquilación con yodoacetamidas o adición de Michael con maleimidas.

Los ácidos carboxílicos presentes en las cadenas laterales de residuos de **glutámico** (Glu) y **aspártico** (Asp) han sido empleados para la bioconjugación de proteínas mediante el acoplamiento con aminas a través de carbodiimidas.²² A pesar de su baja reactividad y selectividad, las carbodiimidas solubles en agua como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) combinadas con 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) han sido utilizadas para la modificación del virus del mosaico del tabaco.⁵⁰ Recientemente, se ha desarrollado otras técnicas de modificación de ácidos carboxílicos mediante o-alquilación con diazocompuestos⁵¹ y sales de isoxazolio.²¹ La **metionina** (Met) es el único residuo capaz de reaccionar con agentes alquilantes a pH bajo, lo que le confiere cierta selectividad. Esta propiedad ha sido utilizada para el desarrollo de métodos específicos y reversibles de marcaje de residuos de metionina.⁵² Más recientemente, Chang, Toste y colaboradores han descrito el uso de oxaziridinas como oxidantes para la formación de sulfimidas. Esta reacción es específica de metioninas y compatible con condiciones neutras de pH.²⁶ Los otros aminoácidos canónicos han sido menos explotados, aunque existen métodos para la modificación de residuos de tirosina, triptófano e histidina.¹² Por ejemplo, el grupo fenol de la **tirosina** ha sido modificado mediante reacciones de sustitución electrófila aromática con sales de diazonio,^{50,53} yodo,^{54,55} o ácido nitroso.^{56,57} El anillo de imidazol de **histidinas** puede modificarse con yodo,^{58,59} epóxidos y dietilpirocarbonato (DEPC). Estos métodos de modificación han permitido la conjugación de proteínas con pequeñas sondas moleculares, como la biotina y moléculas fluorescentes o su inmovilización en superficies para generar microarrays de proteínas. Son métodos prácticos y rápidos que debido a su versatilidad se utilizan ampliamente en biología para la modificación de proteínas y anticuerpos. Su desventaja principal es la modificación inespecífica de residuos que genera poblaciones heterogéneas de proteínas diferentemente modificadas al azar. Por estos motivos existe un creciente interés en el desarrollo de métodos selectivos para la modificación de proteínas.

3.- Nuevos métodos de modificación de proteínas

La investigación realizada en el campo del desarrollo de métodos para la modificación de proteínas se ha centrado en los últimos años en el establecimiento de métodos específicos y estrategias eficientes que expandan el abanico de herramientas existentes. Estos nuevos métodos han sido desarrollados explotando tanto la reactividad de aminoácidos naturales como la introducción de aminoácidos no naturales que incorporen grupos funcionales no nativos y biocompatibles.

3.1.- Métodos selectivos para el marcaje de aminoácidos no naturales

Una de las limitaciones más importantes de la mayoría de las reacciones de bioconjugación es la carencia de especificidad para marcar selectivamente un único residuo. Dado que todas las proteínas contienen varias unidades de cada aminoácido, el marcaje selectivo de uno de ellos suele ser complicado. Se puede conseguir una modificación específica mediante mutación de los otros residuos existentes. Por ejemplo, para etiquetar químicamente una cisteína de interés evitando la modificación de otras cisteínas expuestas, resultaría necesaria la eliminación de todas las cisteínas expuestas. La mutagénesis dirigida ha permitido obtener proteínas mutantes que han sido herramientas clave para el estudio de la función de las proteínas, su estructura tridimensional y sus interacciones con otras biomoléculas o ligandos.⁶⁰ Aparte del trabajo intenso de ingeniería genética, este tipo de aproximaciones puede provocar cambios estructurales y funcionales no deseables en las proteínas. Con la finalidad de resolver este obstáculo una gran cantidad de trabajo se ha centrado en la síntesis e incorporación de aminoácidos no naturales (UAAs, por sus siglas en inglés, Unnatural Amino Acids).⁶¹

Los aminoácidos no naturales son aminoácidos no proteogénicos que se sintetizan químicamente. En contraste con los 20 aminoácidos naturales (o proteogénicos), estos aminoácidos no están codificados por el código genético universal y tienen como principal característica la presencia de grupos funcionales no nativos. En consecuencia, presentan una gran variedad de elementos estructurales que permiten la modificación de péptidos y proteínas y manipular localmente sus propiedades físicas y químicas. La incorporación de UAAs surgió en 1989 a partir de la metodología de supresión del codón ámbar.^{62,63}

Se conoce como codón de terminación a aquel codón que no determina ningún aminoácido según el código genético. El primero que se descubrió se denominó codón ámbar y está formado por UAG (uracilo, adenina, guanina) y, posteriormente, se identificaron el codón ópalo (UGA) y el codón ocre (UAA). Esta peculiaridad, la inexistencia de un codón

que no es reconocido por ninguna de las sintetetas de ARN de transferencia (ARNt) existentes permite la incorporación de los UAAs a la proteína mediante la acilación catalizada por una aminoacil ARNt sintetasa del ARNt complementario (ARNt_{CUA})⁶³ (Figura 37).

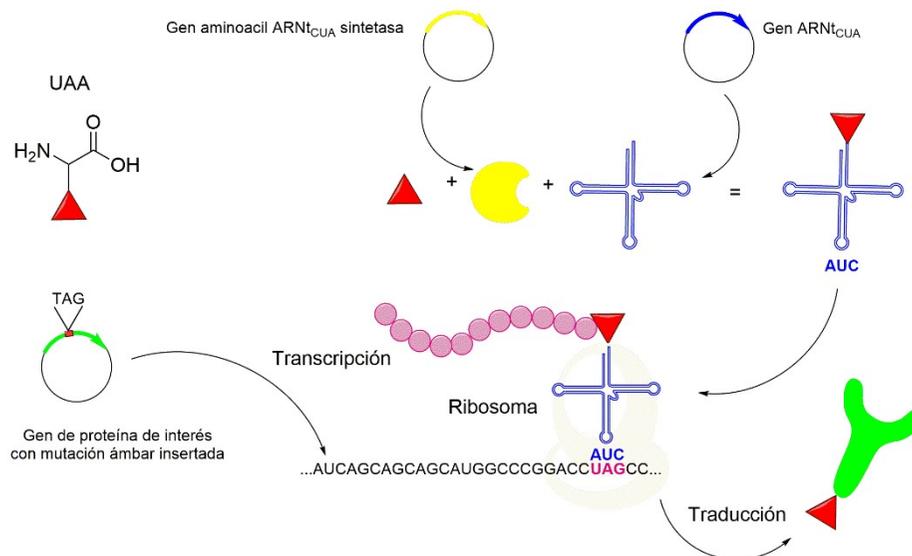


Figura 37. Incorporación de UAA a partir de la metodología de supresión del codón ámbar.

Los aminoácidos no naturales suelen presentar cadenas laterales con grupos funcionales no nativos (azidas, alquinos, átomos marcados isotópicamente, análogos estables de tirosina fosfato, fenilalaninas iodadas o grupos fotoreactivos como es el caso de las arilazidas⁶⁴) que permiten reacciones bioortogonales o de entrecruzamiento y la posterior caracterización de las proteínas por múltiples técnicas (RMN, rayos X, identificación de interacciones proteína-proteína). Existe un número significativo de reacciones de conjugación que pueden llevarse a cabo sobre aminoácidos no naturales incorporados en proteínas. Entre ellas destacan la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos, la reacción de Staudinger o la formación de iminas, entre otras. A continuación se explican algunos ejemplos de reacciones bioortogonales.

3.2.- Reacciones bioortogonales con grupos funcionales no presentes en aminoácidos naturales

En este apartado se describen algunos ejemplos de reacciones de bioconjugación en las que participan grupos funcionales no presentes en aminoácidos naturales. Este tipo de reacciones se conocen con el nombre de **química bioortogonal** porque emplea reacciones compatibles con biomoléculas o sistemas biológicos y permite la formación

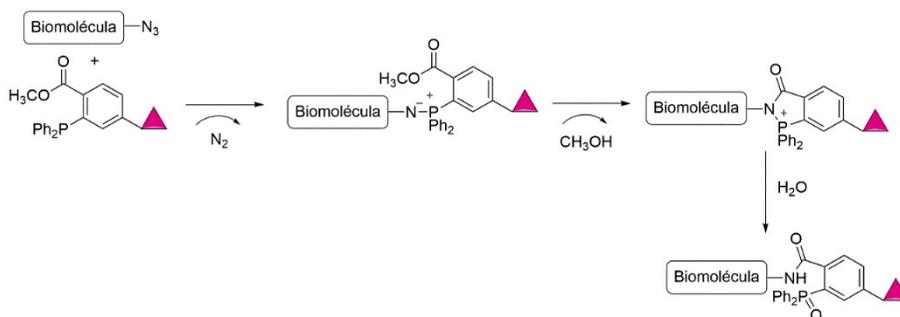
selectiva de aductos covalentes que pueden ser herramientas útiles para estudiar procesos biológicos.⁶⁵ Aunque se habían hecho algunos tímidos avances en la década de los 90,⁴ el campo de la química bioortogonal se inició en el año 2000 mediante el desarrollo por el grupo de Carolyn Bertozzi de la ligación de Staudinger para la modificación de biomoléculas,⁶⁶ aunque el término bioortogonal no se estableció hasta unos años más tarde, en 2003.⁶⁷

3.2.1- Química click

En el área de la química bioortogonal han tenido un gran papel los métodos basados en la química click. El término química “click” fue introducido por primera vez por K.B. Sharpless en 2001 y es un enfoque inspirado en la simplicidad y eficiencia de la química en la naturaleza. La naturaleza prefiere construir sus productos a partir de compuestos sencillos y unirlos mediante enlaces carbono-heteroátomo en lugar de enlaces carbono-carbono.⁶⁸ Así pues, este término engloba reacciones que intentan imitar la naturaleza, son de amplio alcance, rápidas, dan altos rendimientos, generan subproductos inofensivos y son estereoespecíficas (no necesariamente enantioselectivas).⁶⁹

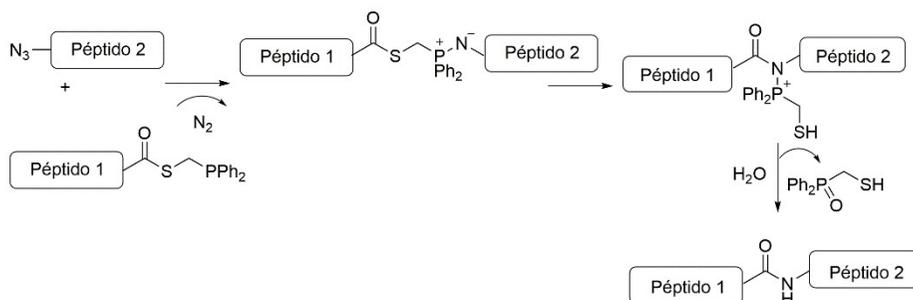
- **Ligación de Staudinger de azidas y triarilfosfinas**

Los grupos de Raines y Bertozzi de manera independiente desarrollaron un método importante para la síntesis y modificación de proteínas basado en la reacción de Staudinger desarrollada en 1919.⁷⁰ La reacción de Staudinger es un método clásico de reducción de una azida a una amina a través de la formación de un intermedio “aza-iluro” mediante tratamiento con una fosfina. En el año 2000, Bertozzi y Saxon desarrollaron un reactivo derivado de una triarilfosfina que contiene un grupo carbonilo electrofílico capaz de atrapar el intermedio aza-iluro y formar, finalmente, un enlace amida estable en medios acuosos.⁶⁶ Como consecuencia de esta modificación en la reacción de Staudinger, se empezó a denominar **ligación de Staudinger** ya que se genera una unión de manera estable entre dos moléculas (azidas y triarilfosfinas) a través de un enlace tipo amida (Esquema 9).



Esquema 9. La ligación de Staudinger entre azidas y triarilfosfinas. La triarilfosfina ataca a la biomolécula que contiene el grupo azida, liberando nitrógeno y dando lugar al compuesto aza-iluro, que ataca intramolecularmente al éster, eliminando metanol y dando lugar al compuesto bicíclico. Tras la hidrólisis, se oxida la fosfina y tiene lugar la formación de un enlace amida para dar el producto de ligación.

El grupo de Raines desarrolló un método similar en el que se utiliza un fosfinobencenotiol para unir un tioéster y el grupo azida, generando igualmente un enlace amida.⁷¹ El fosfonotiol tiene los atributos necesarios para llevar a cabo la ligación de Staudinger, pero posee una solubilidad acuosa baja y otorga un rendimiento que puede ser demasiado bajo para ciertas aplicaciones (Esquema 10).



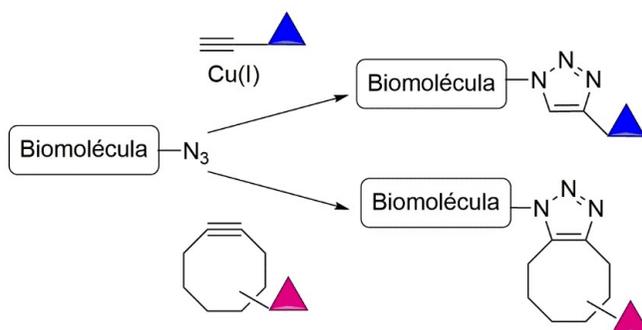
Esquema 10. Acoplamiento peptídico mediante el método de ligación de Staudinger desarrollado por el grupo de R. Raines. La fosfina unida al péptido 1 a través del C-terminal de un tioéster ataca al grupo azida unida al péptido 2 de manera análoga a la ligación de Staudinger dando lugar al compuesto iminofosforano, el cual se reorganiza. El resultado de su hidrólisis da lugar al enlace amida.

La exquisita bioortogonalidad de azidas y triarilfosfinas, las cuales no se encuentran en sistemas biológicos, así como el alto rendimiento obtenido en condiciones fisiológicas ha permitido el uso de la ligación de Staudinger para el marcaje de biomoléculas tanto in vivo como in vitro incluyendo el marcaje de proteínas de las superficie celular en modelos de ratón.^{66,72} Su mayor desventaja es la alta reactividad del intermedio “aza-iluro”, la rápida

oxidación de fosfinas en presencia de aire y la obtención como subproducto de trazas de óxido de difenilfosfina.

▪ Cicloadición de Huisgen entre azidas y alquinos

La cicloadición 1,3-dipolar [3+2] de Huisgen entre alquinos y azidas es la reacción más popular de la química click y se ha convertido en la reacción click por excelencia. Los grupos de investigación liderados por Sharpless y Meldal descubrieron que la clásica cicloadición 1,3-dipolar de azidas con alquinos terminales para formar 1,2,3-triazoles disustituidos^{69,73} se producía con buenos rendimientos a temperatura ambiente cuando era catalizada por cobre (I) (Copper (I)-catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition (CuAAC), (Esquema 11).^{74,75} Debido a su eficiencia, simplicidad y selectividad, su uso se ha generalizado en la síntesis orgánica, en la química combinatoria, química de materiales y en la química biológica.⁶⁹ El primer trabajo de CuAAC como estrategia de bioconjugación fue llevado a cabo por Finn y colaboradores.⁷⁶ El inconveniente de esta metodología es su toxicidad en sistemas vivos por la presencia del cobre (I) capaz de catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que limita su aplicabilidad.⁷⁷ En el año 2009, con el fin de mejorar la biocompatibilidad, el grupo de Bertozzi exploró otra metodología para activar alquinos sin la presencia de catálisis metálica, basada en la inclusión del alquino en un anillo de 8 miembros altamente tensionado “Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition” (SPAAC)⁷⁸ e inspirada en los trabajos iniciales de Wittig y Krebs.⁷⁹ Estas reacciones son conocidas con el nombre “reacciones click libres de cobre” y son aun ampliamente utilizadas para la modificación de biomoléculas, aunque la elevada reactividad de los ciclooctinos conlleva en algunos casos el marcaje inespecífico de residuos de cisteína y otros nucleófilos celulares (Esquema 11).



Esquema 11. Cicloadiciones 1,3-dipolares [3+2] entre azidas y alquinos para formar triazoles. Los alquinos terminales son activados por Cu(I) al someterse a la cicloadición con azidas bajo condiciones fisiológicas (superior). Los ciclooctinos reaccionan con azidas en ausencia de catalizador a través de SPAAC (inferior).

▪ Reacciones bioortogonales con alquenos

Los alquenos también han sido utilizados en cicloadiciones promovidas por luz UV⁸⁰ o por la tensión del anillo. El producto de una cicloadición de azida-alqueno es una triazolina, la cual es inestable en comparación con un triazol aromático, por lo que no es adecuado para las aplicaciones en las que se requiere un producto de ligación. Rutjes y colaboradores evitaron este problema utilizando como sustratos oxanorbornadienos que contienen olefinas deficientes en electrones como sustratos. El oxanorbornadieno se sometió a una cicloadición [3 + 2] con una azida seguida de una reacción de tipo retro Diels-Alder para eliminar furano formando un derivado de triazol (Figura 38A).⁸¹ El inconveniente que presentan estas reacciones es su baja velocidad de reacción. Otro ejemplo es la modificación quimioselectiva de alquenos por reacciones de metátesis cruzada. La metátesis de olefinas catalizada por rutenio tolera una gran variedad de grupos funcionales y se ha empleado utilizando biomoléculas como sustratos (Figura 38B).⁸² Esta reacción ha sido utilizada por el grupo de Davis que ha modificado proteínas que contienen sulfuro de alilo en residuos de cisteínas a través de metátesis cruzadas en una mezcla de *tert*-butanol/agua utilizando el catalizador de segunda generación Hoveyda-Grubbs.⁸³ Las reacciones de Diels-Alder de demanda inversa de electrón, donde un dienófilo rico en electrones reacciona con un dieno pobre en electrones, han ganado un gran interés en los últimos años debido a su rápida cinética, ortogonalidad y biocompatibilidad.⁸⁴ El primer ejemplo relevante lo describieron Fox y colaboradores⁸⁵ mediante la cicloadición [4 + 2] de transcicloocteno con dipiridiltetrazina para dar lugar al producto de ligación (Figura 38C). El equipo de Hiderbrand utilizó posteriormente norborneno y tetrazina, obteniendo una reacción de alto rendimiento, selectiva y rápida en medios acuosos (Figura 38D).⁸⁶ Lin y colaboradores desarrollaron una cicloadición 1,3-dipolar inducida por luz UV entre diariltetrazoles y alquenos simples (Figura 38E) para formar pirazolinas fluorescentes.⁸⁰ Tanto las tetrazinas como los dienófilos pueden ser incorporados en proteínas mediante métodos genéticos, enzimáticos y químicos.

Reacciones bioortogonales con alquenos

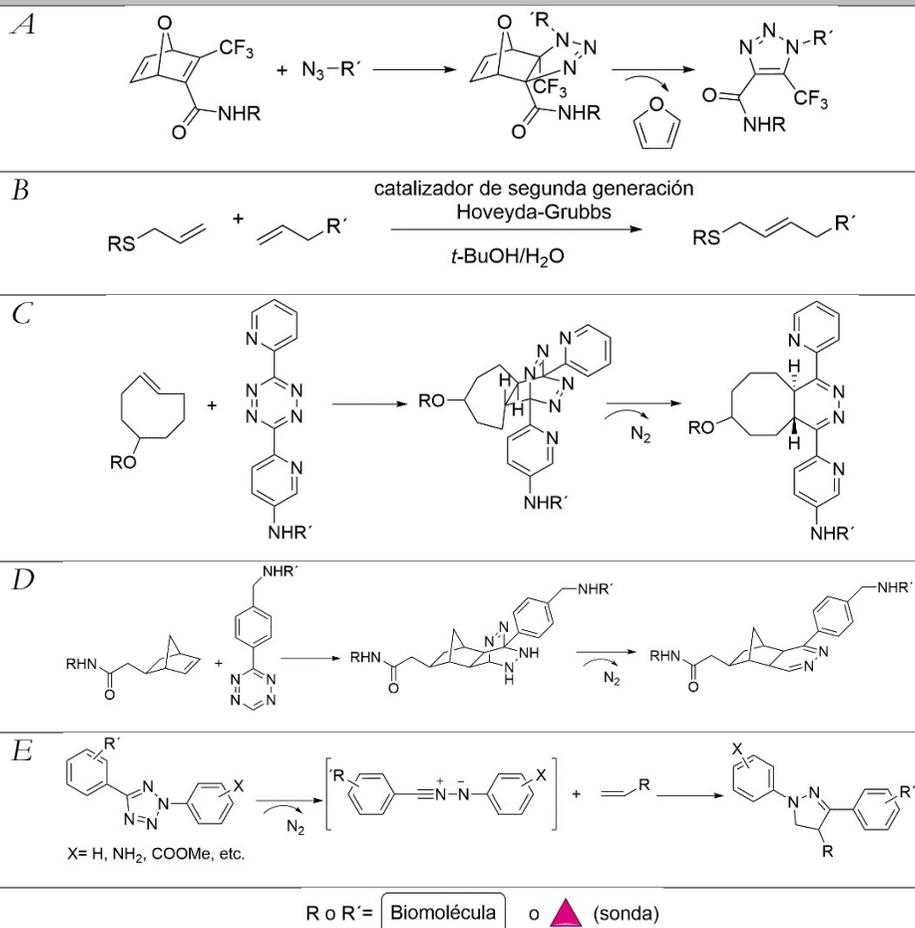


Figura 38. Reacciones bioortogonales con alquenos. A) Reacción de oxanorbornadienos y azidas para producir triazoles. B) Metátesis cruzada catalizada por rutenio de dos alquenos en agua. C) Reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrón entre dipiridiltetrazinas y *trans*-ciclooctenos. D) Reacción de Diels-Alder con demanda electrónica inversa de monoaril tetrazinas y norbornadienos. E) Cicloadición 1,3-dipolar fotoquímica entre tetrazoles y alquenos.

3.3.- Bioortogonalidad con secuencias únicas de aminoácidos

A continuación se describen los métodos basados en enzimas y el reconocimiento de determinadas secuencias de aminoácidos. Dicha metodología permite la incorporación de grupos funcionales no naturales mediante el reconocimiento enzimático de una secuencia de aminoácidos específica.

En la naturaleza existen enzimas con la capacidad de modificar proteínas de manera específica. Muchas de estas enzimas reconocen pequeñas secuencias peptídicas que pueden ser incorporadas recombinantemente a proteínas mediante técnicas de ingeniería genética.⁸⁷ El uso de estas secuencias reconocidas por enzimas permiten el marcaje rápido y selectivo de proteínas mediante la introducción de grupos funcionales bioortogonales o la incorporación de sondas. Debido a su selectividad y bioortogonalidad, en la actualidad, estos métodos están creciendo exponencialmente como técnicas para modificar selectivamente proteínas, principalmente en células vivas.⁸⁸ Por tanto, la modificación posttraduccional de proteínas catalizada por enzimas supone una nueva estrategia para el etiquetado de proteínas en un sitio específico. Estos métodos también presentan una serie de inconvenientes, como el gran tamaño de algunos de los dominios que tienen que ser incorporados por métodos genéticos a la proteína que se quiere marcar y que puede en algunos casos llegar a interferir con la función nativa de las proteínas diana. Este es el caso de la O⁶-alquilguanina-DNA alquil transferasa (hAGT) (~ 20 KDa)⁸⁹ o del HaloTag (~ 33 KDa).⁹⁰ Otra limitación de estas reacciones es que los residuos esenciales deben estar disponibles y la modificación no debe inducir la pérdida de integridad y funcionalidad estructural. A continuación se exponen brevemente los métodos enzimáticos descritos para la modificación selectiva de proteínas.

La **ligasa de la Biotina** (BirA) reconoce un péptido de alrededor de 15 aminoácidos e introduce una biotina en un residuo de lisina del mismo. También acepta como sustrato la cetobiotina permitiendo su posterior modificación con hidrazidas o hidroxilaminas (Figura 39A).⁹¹ Fue uno de los primeros métodos descritos basados en actividad enzimática pero está solo restringido al marcaje de proteínas presentes en la superficie celular y su mecanismo basado en dos pasos limita el estudio espacio-temporal de los procesos biológicos.

La **transglutaminasa** (TGasa) cataliza la reacción de transaminación entre los residuos de glutamina (Q) y lisina (K).⁹² El uso de aminos primarias permite el marcaje de proteínas que presentan secuencias de poliglutamina (polyQ). Dicho método ha sido utilizado para

la modificación de proteínas *in vitro*⁹³ y en el marcaje de proteínas celulares en sistemas vivos (Figura 39B).⁹⁴

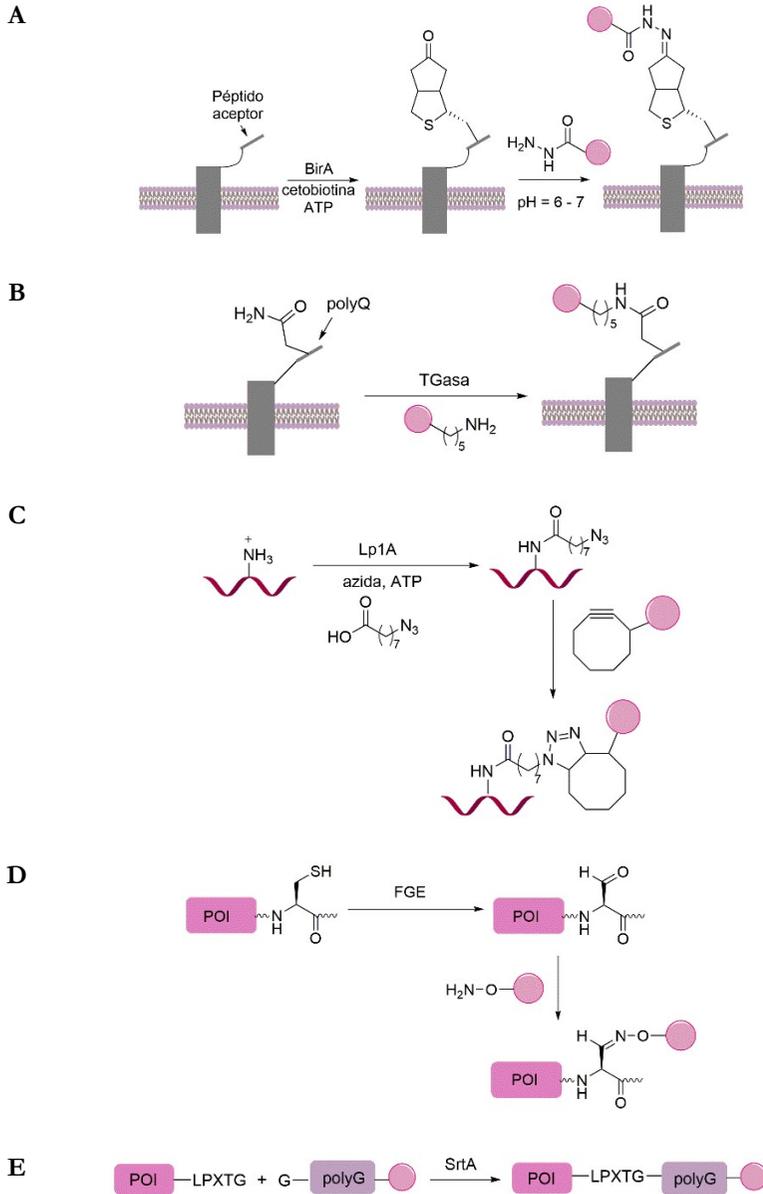
La **ligasa del ácido lipoico** (LplA) de *Escherichia coli* es la responsable de la unión del ácido lipoico a tres proteínas involucradas en el metabolismo oxidativo (E2p, E2o, y proteína-H).⁹⁵ Tras procesos de optimización se consiguió una LplA que era capaz de unir una alquil azida (en lugar de ácido lipoico) a un péptido de 22 aminoácidos (en sustitución de las proteínas sustrato). Esta metodología permite la posterior incorporación de diversas sondas de afinidad y fluorescencia a través de la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen (Figura 39C).⁹⁶

La **enzima generadora de formilglicina** (FGE) introduce un aldehído en una proteína mediante la conversión de un residuo de cisteína, incluido en la secuencia CxPxR, en un residuo de formilglicina.^{97,98,99} Originalmente la FGE era la enzima encargada de activar sulfatasas de tipo I para hidrolizar esteres de sulfato. La incorporación de esta secuencia de 5 amino ácidos en las proteínas de interés permitió su posterior marcaje tras la reacción del aldehído formado con grupos aminooxi o hidrazidas para formar los correspondientes conjugados de oximas e hidrazonas. Esta modificación enzimática permite el marcaje directo y selectivo de la proteína en el sitio de modificación y se ha aplicado en el marcaje de proteínas con fluoróforos, aunque necesita de la coexpresión de FGE juntamente con la proteína de interés (Figura 39D).^{97,100}

La **sortasa A** (SrtA) es una transpeptidasa que se encuentra en la envoltura celular de muchas bacterias gram positivas y cataliza la conjugación de proteínas a la pared celular bacteriana.¹⁰¹ Esta enzima reconoce una secuencia peptídica (LPXTG) situada cerca del extremo C-terminal de la proteína sustrato e hidroliza el enlace Thr-Gly formando un nuevo enlace amida entre el extremo carboxilo de la Thr y la α -amina de un residuo de Gly perteneciente a una secuencia de poliglicina (PolyG), resultando en la fusión de los dos polipéptidos (Figura 39E).^{101,102} Mediante dicho método enzimático se han llevado a cabo modificaciones de péptidos y proteínas con carbohidratos.^{103,104} En el año 2007 se describió la primera modificación de proteínas en células utilizando esta metodología.¹⁰⁵

Las enzimas **fosfopanteteinil transferasas** (PPtasas) son las encargadas de catalizar la incorporación de un grupo fosfopanteteína unido al coenzima A (CoA) a un residuo de serina incluido en la secuencia DSLEFIASKLA.¹⁰⁶ Mediante la conjugación previa del tiol terminal de la fosfopanteteína (producto resultante de la unión del ácido pantoténico con

la cisteamina) con diferentes tipos de sondas, se pueden llevar a cabo el marcaje de proteínas situadas en la superficie celular^{34,107} (Figura 39F).



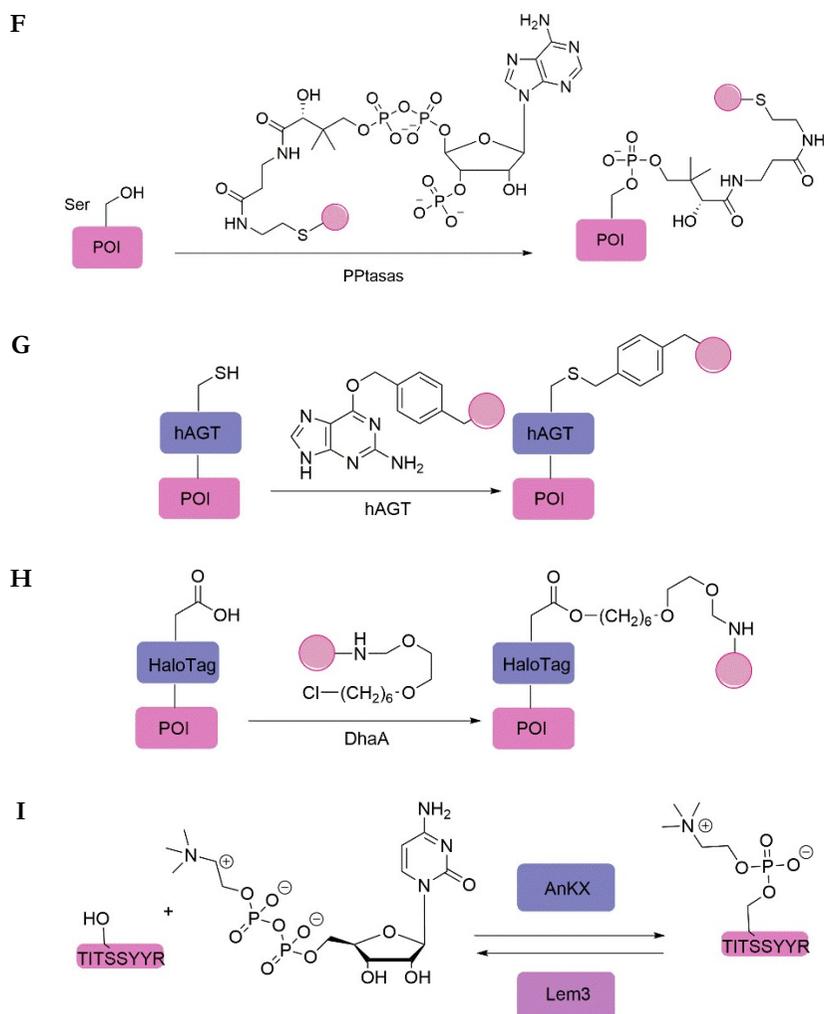


Figura 39. Reacciones enzimáticas para la modificación selectiva de proteínas. Enzimas empleadas: A) Ligasa de la Biotina (BirA), B) Transglutaminasa (TGasa), C) Ligasa del ácido lipoico (Lp1A), D) Enzima generadora de formilglucina (FGE) E) Sortasa A (SrtA), F) Fosfopanteteinil transferasas (PPtasas), G) O⁶-alquilguanina-DNA alquil transferasa (hAGT), H) Haloalcano dehalogenasa (DhaA), I) Fosfocolina transferasa (AnkX).

Otro ejemplo de modificación enzimática se lleva a cabo a través de la enzima **O⁶-alquilguanina-DNA alquil transferasa** (hAGT) también llamada SNAP-tag. Esta proteína deriva de la O⁶-metilguanina-DNA metil transferasa y mediante una estrategia de evolución dirigida se diseñó un enzima que acepta derivados de O⁶-benzilguanina (BG) como sustrato. La hAGT resultante transfiere un grupo alquilo de la O⁶-alquilguanina-DNA a un residuo de cisteína.⁸⁹ Posteriormente, se generó otro mutante de la hAGT con preferencia para sustratos derivados de la O²-benzilcitosina (BC), una aproximación

conocida como CLIP-tag. Además, las sondas químicas conjugadas con BG y BC son permeables a la membrana celular. Esta metodología presenta una serie de inconvenientes como son el gran tamaño de hAGT (207 aminoácidos), pudiendo interferir con la función nativa de las proteínas, además de que los experimentos en células de mamíferos deben realizarse en líneas celulares deficientes en AGT para evitar el marcaje de la AGT endógena (Figura 39G).

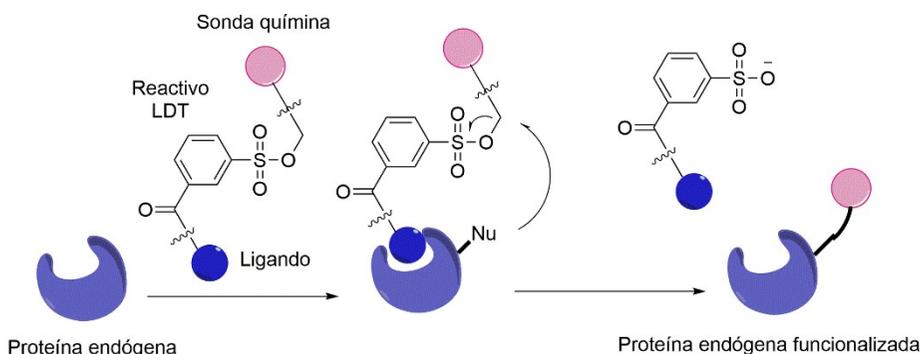
La enzima **haloalcano dehalogenasa** (DhaA) de *Rhodococcus* elimina haluros de hidrocarburos alifáticos dando lugar a alcoholes alifáticos. La modificación genética de DhaA resultó en un mutante (HT7) que en lugar de dehalogenar el haloalcano se une a él de forma covalente. Dicha metodología se conoce como HaloTag®.⁹⁰ La proteína de interés (POI, protein of interest) se fusiona con la enzima bacteriana modificada y el uso de cloroalcanos sustituidos permite el correspondiente marcaje de la proteína. Este método es aplicable en células vivas debido a la permeabilidad de los sustratos de haluros de alquilo, sin embargo el gran tamaño de la etiqueta introducida (~ 33 KDa) puede interferir con la función nativa de las proteínas diana (Figura 39H).

La **fosfocolina transferasa** (AnkX) permite la transferencia enzimática covalente de fosfocolina sobre una secuencia octapeptídica TITSSYYR específica.¹⁰⁸ Por ejemplo, la enzima bacteriana de *Legionella pneumophila* puede transferir una fosfocolina funcionalizada derivada de acetidina difosfato de colina (colina-CDP) a los extremos N y C terminales y a posiciones internas de proteínas de interés. Dicha modificación covalente puede eliminarse hidrolíticamente por la acción de la enzima de *L. pneumophila* Lem3. Este método resulta compatible con otros métodos ya existentes, ya que la secuencia de reconocimiento no contiene cisteína u otros aminoácidos reactivos (Figura 39I).

3.4.- Métodos selectivos para el marcaje de aminoácidos naturales

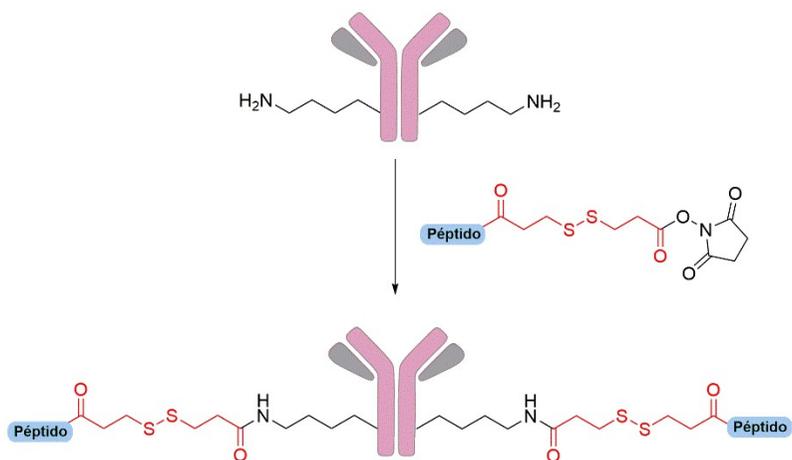
Tal como se ha descrito en los apartados anteriores, en los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias de marcaje de proteínas, la mayoría de las cuales se basan en la introducción de sondas fluorescentes o tags que permiten visualizar, rastrear, medir y perturbar las proteínas en células vivas.¹⁰⁹ Posteriormente, la codificación genética de aminoácidos no naturales y secuencias reconocidas por enzimas bacterianas permitió introducir con precisión nuevas propiedades químicas y físicas en las proteínas.¹¹⁰ Sin embargo, estas metodologías requieren la modificación genética de las proteínas de interés.

Los métodos que permiten el marcaje de proteínas en un solo residuo son de gran interés porque posibilitan la obtención de conjugados homogéneos y bien definidos y minimizan el impacto de la modificación en su estructura y función, facilitando así su estudio y aplicaciones terapéuticas. En estos momentos, la mayoría de métodos que permiten la modificación de proteínas de manera única se basan en la introducción genética de aminoácidos no naturales o secuencias peptídicas. Existen muy pocos ejemplos de métodos químicos que permiten el marcaje de un solo residuo incluyendo la modificación de residuos de lisina con cantidades subestequiométricas de ésteres de NHS²⁸ o con sulfonamidas α,β -insaturadas.^{111,112} Más recientemente, Cravatt y su grupo de investigación demostraron que los ésteres de sulfotetrafluorofenil pueden ser utilizados para identificar y modificar de manera cuantitativa residuos de lisina hiperreactivos que se encuentran en proteínas.²⁹ El grupo de Bernardes ha desarrollado un método basado en el uso de un reactivo de acrilato de sulfonilo que permite la modificación de un único residuo, siendo la lisina con el pK_a más bajo la que se ve cinéticamente favorecida a pH ligeramente básico.¹¹³ Los autores indican que la reacción es regioselectiva y quimioselectiva dando lugar a una conversión completa con solo un equivalente molar de reactivo, sin perturbar la estructura secundaria de la proteína ni alterar su función. En el año 2009, se desarrolló una nueva estrategia de modificación selectiva basada en la química del tosilo dirigida por ligando (LDT, ligand-directed tosyl).¹¹⁴ Esta técnica consiste en conectar un ligando y una sonda a través de un tosilo. En primer lugar se produce la unión entre el ligando y la proteína, después se induce un efecto de proximidad que permite la reacción de la sonda marcada con el tosilo con un aminoácido nucleofílico situado en la superficie de la proteína diana mediante una reacción tipo S_N2 , juntamente con la liberación simultánea del ligando (Esquema 12). Este método ha sido aplicado a diferentes proteínas demostrando su reactividad frente diferentes residuos incluyendo histidinas, tirosinas, cisteínas, ácidos glutámicos y aspárticos.¹¹⁵



Esquema 12. Técnica basada en LDT para marcar proteínas endógenas en células nativas vivas. Ilustración esquemática de la estrategia.

El grupo de Pentelute describió una secuencia peptídica LCYPWVY que puede fusionarse en el extremo N- o C-terminal y permite la modificación de la cisteína incluida en la secuencia con derivados de aza-dibenzociclooctino (DBCO). La presencia de los otros aminoácidos que forman la secuencia peptídica aumenta la reactividad de la reacción de hidrotiolación de alquinos (tiol-ino) 220 veces, permitiendo la modificación selectiva de esta cisteína sin afectar otras cisteínas presentes en la proteína.¹¹⁶ Finalmente, en marzo de este año 2019 se ha descrito un nuevo método de funcionalización regiodivergente mediada por péptidos de afinidad que permite la síntesis de ADC (Antibody-Drug Conjugates, conjugados anticuerpo-fármaco) a partir de anticuerpos de inmunoglobina G (IgG) nativo con una tecnología llamada AJICAP.¹¹⁷ Esta metodología consiste en la introducción de tioles funcionalizados en residuos de lisina presentes en la IgG utilizando para ello un péptido de afinidad que se une al fragmento de región cristalizable (Fc), la región de la cola de un anticuerpo que interactúa con los receptores de la superficie celular. El péptido contiene una lisina modificada con el reactivo de Lomant (DSP, Ditiobis (succinimidil propionato)) que se une covalentemente al anticuerpo tras la reacción del otro éster de N-hidroxisuccinimida con el residuo de lisina más próximo. La reducción del enlace disulfuro del DSP permite la posterior modificación del anticuerpo mediante reacción con el grupo tiol recién formado. Los ADC generados por esta nueva tecnología mostraron reconocimiento de antígenos y actividad antitumoral in vivo en estudios con ratones con xenoinjerto. Estos conjugados son cada vez más utilizados en oncología clínica, puesto que poseen la capacidad de dirigir la administración de fármacos a células cancerosas, según el reconocimiento específico de la célula y la unión de un antígeno por un anticuerpo monoclonal (mAb), proporcionando un nuevo enfoque para construir biomoléculas complejas derivadas de anticuerpos.



Esquema 13. Tecnología AJICAP para la síntesis de ADC a partir de anticuerpos de IgG. Ilustración esquemática de la estrategia. Péptido: Péptido de afinidad.

3.5.- Modificación del extremo C-terminal y N-terminal de proteínas

Dentro del campo de investigación centrado en el desarrollo de métodos para la modificación específica y única de proteínas, poseen un papel muy importante los métodos que se focalizan en los extremos N- y C-terminal de las proteínas.

3.5.1.- Métodos de modificación del extremo C-terminal

Actualmente los métodos químicos para llevar a cabo la conjugación selectiva en la posición C-terminal son escasos. El principal problema es la selectividad, ya que hasta el día de hoy no existe ningún agente capaz de activar de manera selectiva los carboxilatos terminales sin actuar sobre las cadenas laterales de glutámicos o aspárticos. Uno de los pocos ejemplos de modificación selectiva en esta posición es la ligación química nativa (Native Chemical Ligation, NCL) basada en la presencia de tioésteres en la posición C-terminal que reaccionan con un residuo de cisteína presente en la posición N-terminal de un fragmento peptídico/proteico. A partir de esta metodología, se han desarrollado técnicas tales como EPL (Expressed Protein Ligation, ligación de proteínas expresadas) y PTS (Protein Trans-Splicing) que serán desarrolladas a continuación.

- **Ligación Química Nativa (Native Chemical Ligation, NCL)**

En el año 1994, el grupo de Kent reportó la ligación peptídica entre tioésteres y residuos de cisteína dando lugar a un enlace amida “nativo”, reacción que se denominó ligación química nativa (NCL).¹¹⁸ La NCL consiste en la condensación entre un segmento peptídico/proteico, que contiene un grupo tioéster en el extremo α -carboxilo, y el tiol de un residuo de cisteína en la posición N-terminal de la segunda biomolécula dando lugar a un tioéster intermedio. Seguidamente se produce un reordenamiento (transferencia S-N acilo) donde el tioéster formado como producto inicial de la ligación experimenta una rápida transferencia intramolecular irreversible como consecuencia de la disposición geométrica favorable (que involucra la formación de un anillo de 5 miembros) del grupo α -amino de la biomolécula para formar un enlace peptídico¹¹⁸ (Figura 40A). Esta reacción se basa en la proximidad de los grupos funcionales implicados. Así pues, la transferencia S-N acilo es promovida por la orientación geométrica de la amina y el tioéster basado en los principios descritos por primera vez por Wieland y colaboradores.¹¹⁹ Este método es selectivo para el marcaje de proteínas porque consiste en la condensación covalente de estructuras peptídicas desprotegidas que contienen funcionalidades únicas, mutuamente reactivas diseñadas para reaccionar sólo entre sí y no con ninguno de los grupos funcionales existentes en los péptidos. Por lo que a través de esta modificación, es posible

la unión de dos moléculas altamente funcionalizadas sin la necesidad de grupos protectores y bajo condiciones fisiológicas.

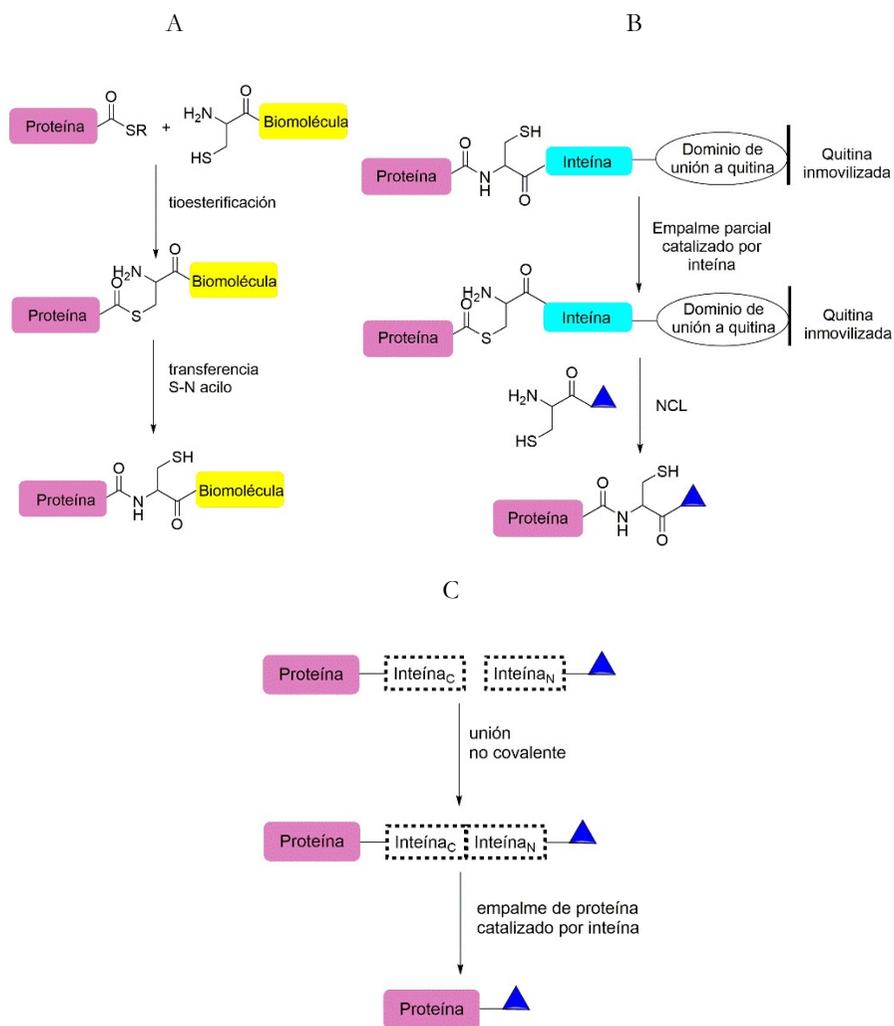


Figura 40. Ligación química nativa y técnicas basadas en NCL. A) Ligación química nativa entre una proteína que contiene un tioéster C-terminal que sufre una transtioesterificación con la cisteína N-terminal de otra biomolécula. Una transferencia *S-N* acilo da como resultado un enlace peptídico nativo. B) EPL: una proteína se expresa de forma recombinante y se fusiona con una inteína mutada y un dominio de unión a quitina para facilitar la purificación. La inteína mutada forma un tioéster, pero no sufre un intercambio *S-N* acilo, lo que permite que la proteína recombinante se escinda selectivamente de la quitina inmovilizada mediante tratamiento con una especie que contiene una cisteína N-terminal. C) PTS: una proteína se expresa de forma recombinante fusionada con una porción de una inteína dividida (IntC). La porción complementaria de la inteína (IntN) es conectada a una especie modificada. Cuando las dos inteínas se asocian de manera no covalente, se produce el empalme para dar una proteína modificada.

Este método supuso una revolución en su momento ya que permite la modificación, síntesis y semisíntesis de proteínas por métodos químicos dando lugar a proteínas de mayor tamaño que las que se pueden obtener únicamente mediante técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, solid phase peptide synthesis). Además, la NCL ha posibilitado el marcaje de proteínas facilitando así numerosos estudios de biología estructural,^{120,121,122,123} y la obtención de proteínas con modificaciones postraduccionales.¹²⁴ Técnicas como la EPL y PTS se basan en esta ligación química nativa.¹²⁵ En la técnica EPL (Figura 40B), la proteína que presenta un tioéster en el extremo C-terminal se obtiene mediante expresión de una forma recombinante fusionada a un dominio inteína y a un dominio de quitina que facilita su purificación. El grupo de Goody¹²⁶ utilizó esta metodología para introducir una hidroxilamina en la posición C-terminal, permitiendo así su posterior modificación selectiva mediante sondas modificadas con grupos aldehído y cetona.

Por otro lado, la técnica PTS (Figura 40C) consiste en una proteína (exteína) que se expresa de forma recombinante unida a un fragmento de inteína (Int_C). La porción complementaria es otra inteína (Int_N) que se expresa fusionada a otra proteína (exteína). Las dos mitades de la inteína dividida se asocian de forma no covalente y se pliegan para dar lugar a una inteína funcional. Ésta sufre una reacción de empalme de proteínas pseudointramolecular en la que las exteínas se unen entre sí y la inteína se escinde así misma. Esta técnica ha permitido la incorporación de la NCL en sistemas vivos facilitando el estudio de las interacciones entre proteína-proteína, la síntesis de péptidos cíclicos¹²⁷ y la semisíntesis de proteínas in vivo.^{128,129}

3.5.2.- Métodos de modificación del extremo N-terminal

La posición N-terminal tiene unas características únicas debido a que es la única amina primaria presente en la estructura de la proteína que posee un enlace amida adyacente en la posición α , lo que influye ligeramente en su reactividad. En consecuencia, la mayoría de las metodologías descritas explotan esta peculiaridad de la posición N-terminal para el desarrollo de métodos específicos de modificación de proteínas.

▪ Características de grupos α -amina y ϵ -amina

Los grupos amino presentes en las proteínas se pueden clasificar en dos grupos: el grupo α -amina situado en la posición N-terminal y los grupos ϵ -amina de residuos de lisinas. Estos grupos poseen pK_a aproximadamente de 6-8 y 10.5 (para α -amina y para ϵ -amina, respectivamente), por lo que la basicidad de los grupos α -amina situados en la posición N-terminal es menor que la de las aminas alifáticas debido a los efectos inductivos cercanos del grupo carbonilo (Figura 41).

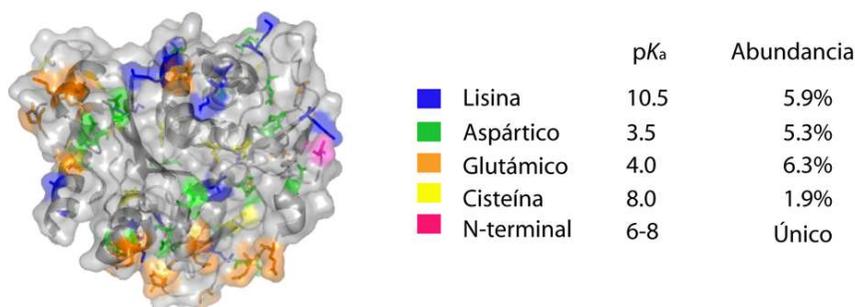


Figura 41. Representación esquemática de la abundancia promedio de los aminoácidos comúnmente utilizados para la bioconjugación, incluido los valores de pK_a correspondientes a las cadenas laterales. El valor promedio de pK_a del grupo α -amino N-terminal es sustancialmente más bajo que el de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina.

En la mayoría de los casos ambos grupos están protonados a pH fisiológico y, por lo tanto, aparecen predominantemente expuestos en la superficie de las proteínas, siendo fácilmente accesibles. Sin embargo, la protonación disminuye drásticamente su reactividad. Como consecuencia de la diferencia de pK_a , los grupos ϵ -amino de los residuos de lisinas requieren pH más elevados para ser desprotonados, por lo que se puede modular la reactividad de los grupos α -amina y ϵ -amino al ajustar diferentes valores de pH. A valores altos de pH (8.5-9.5), ambas aminas primarias estarían desprotonadas pero los grupos amino de la cadena lateral de lisina mostrarían más reactividad hacia electrófilos. A un pH cercano al neutro, los grupos α -amina situados en la posición N-terminal son los más reactivos puesto

que tienen pK_a más bajos, de manera que la amina neutra y nucleófila es la más predominante. A pH ácido, todas las aminas están protonadas y, por tanto, no son nucleófilas (Figura 42).

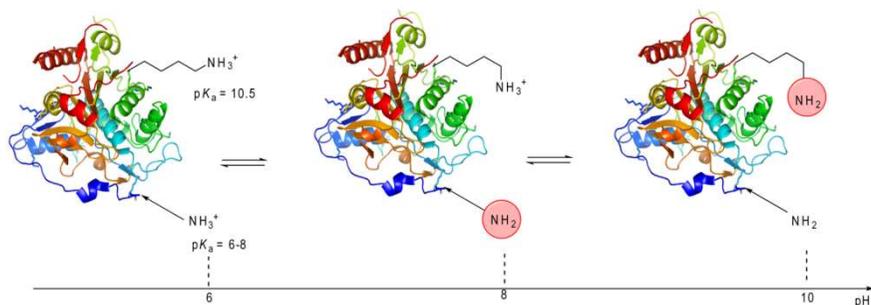


Figura 42. Desprotonación de diferentes tipos de grupos amino presentes en la estructura de la proteína (la amina más nucleófila está rodeada en rojo). Los grupos de lisina ϵ -amino son más nucleófilos, pero también más difíciles de desprotonar. En general, un pH de 8.5 a 9.5 es óptimo para modificar los residuos de lisina, mientras que un pH casi neutro favorece la modificación selectiva del extremo N-terminal.

Existen varios métodos descritos para la modificación selectiva de proteínas en el extremo N-terminal. Algunos de ellos utilizan la diferente reactividad de los α - y ϵ -aminas según el pH, como es el caso de la conversión de aminas a azidas utilizando imidazol-1-sulfanil azida,¹³¹ la acilación con cetenas,¹³² la reacción de transaminación¹³³ o la aminación reductora.¹³⁴ La acilación de la posición N-terminal utilizando un éster activado como la N-hidroxisuccinimida (NHS) ha sido ampliamente utilizado para este propósito. Sin embargo, incluso bajo condiciones de pH controladas, este método presenta baja selectividad provocando también la modificación de las cadenas laterales de los residuos de lisina. Otros métodos basan su modificación selectiva del extremo N-terminal en la presencia próxima de determinados grupos reactivos. Dentro de este grupo se incluye la NCL que permite la formación de un nuevo enlace amida debido a la presencia de una cisteína en el extremo N-terminal (las cisteínas interiores también forman el correspondiente tioéster que se hidroliza porque no disponen del grupo amino próximo responsable del ataque S/N). Existen otros métodos que dependen también de la reacción específica de residuos situados en la posición N-terminal. Por ejemplo, las cisteínas N-terminales pueden reaccionar selectivamente con 2-cianobenzotiazol (CBT) modificados (Figura 43A)¹³⁵ y los residuos de triptófano N-terminales mediante reacción de Pictet Spengler con un aldehído (Figura 43B).^{19,136} De manera similar, la oxidación selectiva de 2-amino alcoholes presentes en residuos de serina y treonina para ser

convertidos en aldehídos¹³⁷ permite su posterior modificación para dar lugar a oxazolidinas^{138,139} (Figura 43C). A continuación en el siguiente apartado se describirán brevemente algunos de estos métodos.

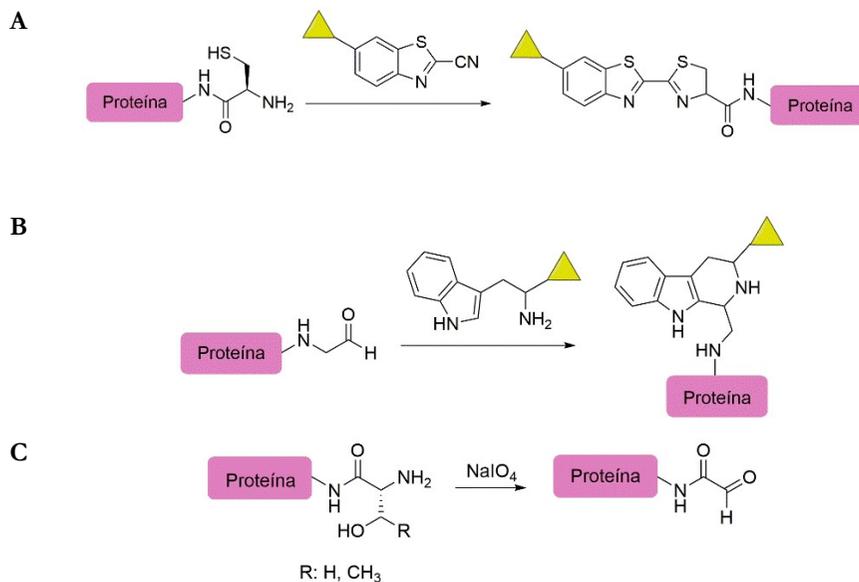


Figura 43. Métodos de modificación en la posición N-terminal. A) Reacción de Cys N-terminales con CBT modificados; B) Reacción de Pictet Spengler con aldehídos; C) Oxidación de Ser/Thr en la posición N-terminal.

▪ Transaminación

Una reacción de transaminación es una reacción reversible en la que un grupo α -amino se transfiere enzimáticamente de un α -aminoácido a un α -cetoácido, convirtiéndose el primero en α -cetoácido y el segundo en α -aminoácido.

En el contexto histórico, el grupo de Dixon comprobó que tras el éxito de la conversión del residuo terminal de serina en grupos glicilo a través de una reacción de transaminación,^{140,141,142} cualquier residuo de aminoácido podía ser transformado a su correspondiente residuo carbonílico mediante esta transformación. De manera que inspirándose en los trabajos de Metzler y Snell,¹⁴³ y el grupo de Cennamo,¹⁴⁴ Dixon y Moret desarrollaron un nuevo método de transaminación en presencia de sales de cobre (II) y a temperatura ambiente. A pesar de estos avances, no fue hasta que el grupo de Francis¹³³ reexaminó el trabajo llevado a cabo por Cennamo¹⁴⁴ sobre la transaminación de aminoácidos en presencia de piridoxal-5-fosfato (PLP, vitamina B6) a 100 °C, que esta reacción recibió más atención. Estos autores encontraron condiciones de reacción mucho

más suaves para la modificación de los residuos N-terminal de los péptidos (65 °C para que la reacción finalice en 2 h y 25 °C para lograr una conversión completa en 24 h). El mecanismo de transaminación catalizada por PLP se describe en la figura 44. La reacción entre la amina terminal y el PLP resulta en la formación de una base de Schiff (a). Posteriormente, el protón en posición α del aminoácido se transfiere a la posición 4' de la unidad de piridoxal. (b y c). Finalmente, la hidrólisis de la cetimina obtenida conduce al α -cetoácido y fosfato de piridoxamina (d). El intermedio quinoide es importante para la transformación de la base de Schiff a la cetimina y se encuentra en todas las reacciones de transaminación descritas hasta la fecha. Finalmente, la reacción del carbonilo resultante con hidroxilaminas funcionalizadas permite la introducción de sondas en el extremo N-terminal (e).

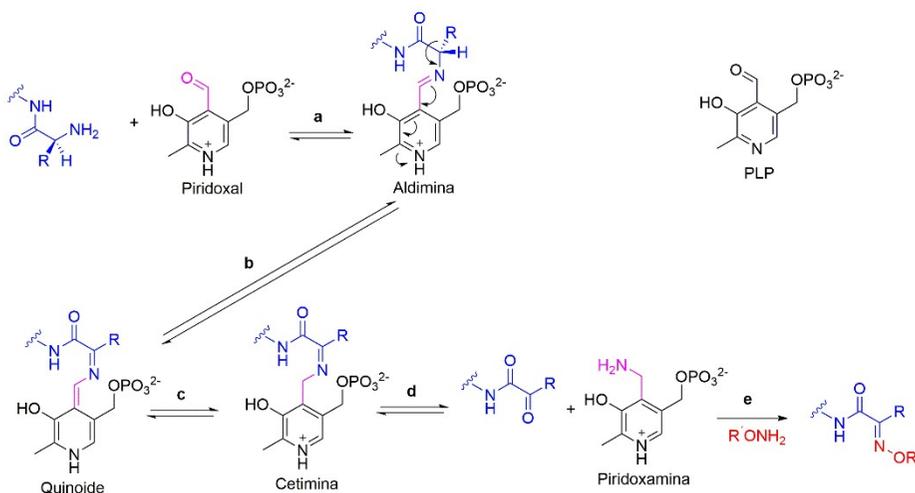
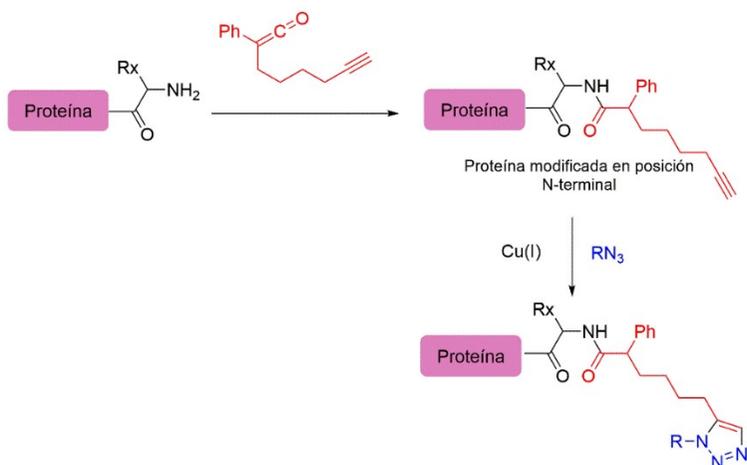


Figura 44 Estructura del PLP y mecanismo de la transaminación mediada por PLP. La ruta de reacción consiste en (a) reacción de condensación entre PLP y la amina terminal; (b y c) la tautomerización de la aldimina; (d) hidrólisis de la cetimina resultante, acompañada de descarboxilación en el caso del ácido aspártico, (e) reacción con hidroxilamina funcionalizada.

Aunque la cadena lateral no participa directamente en el mecanismo de la transaminación, se encontró un cambio significativo dependiendo del aminoácido en la posición N-terminal.¹⁴⁵ En general, la mayoría de los aminoácidos terminales proporcionan altos rendimientos de los productos de transaminación, pero los residuos (His, Trp, Lys, Pro) generan aductos estables con el PLP que no evolucionan. Otros residuos son incompatibles con la técnica debido a reacciones secundarias (Ser, y Cys proporcionan también productos de β -eliminación) y el producto de transaminación de Gln fue resistente a la formación de la oxima correspondiente.

- **Modificación de grupos α -amino N-terminales utilizando cetenas**

Este método fue desarrollado con el propósito de tener una estrategia simple y general de incorporación de una molécula funcional con elevada selectividad. En un primer momento el grupo de Che¹⁴⁶ estudió la ligación N-terminal de péptidos a través de la formación de un enlace amida empleando los sistemas “[Mn(2,6-Cl₂TPP)Cl]/alquino/H₂O₂”. Sin embargo, la oxidación de los residuos de cisteína y metionina obstaculizaban la aplicación de este protocolo en el campo de la bioconjugación. Posteriormente, los mismos autores se dieron cuenta que cetenas generadas *in situ*, eran los intermedios clave en la reactividad y, por lo tanto, su preparación previa permitiría abstenerse de la necesidad de utilizar un oxidante. Con esta finalidad, prepararon una cetena funcionalizada con un grupo alquino y estudiaron su uso para la modificación selectiva de proteínas (Esquema 14).¹³²

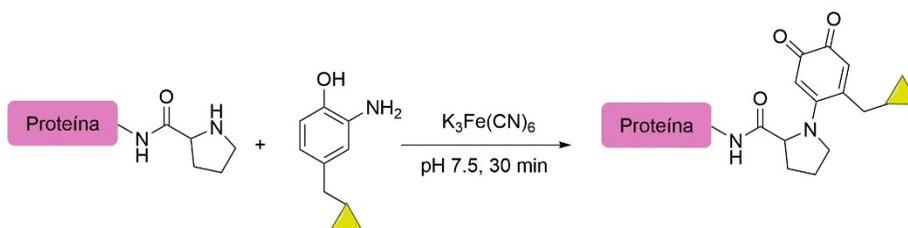


Esquema 14. Modificación selectiva de proteínas y posterior reacción click catalizada con cobre.

La cetena presentó una excelente selectividad hacia la amina terminal incluso a pH elevados. Además la presencia del alquino permitió la posterior incorporación de sondas a través de una reacción de tipo click. Por el contrario, este método también presenta varias desventajas. Los derivados de cetenas no están disponibles comercialmente y requieren por lo tanto su síntesis en varias etapas. Además, debido a su elevada reactividad hay que tener especial cuidado en su almacenamiento para evitar su degradación.

▪ Modificación de grupos N-terminal con *o*-aminofenoles

En este método de modificación, Francis y su grupo de investigación, establecen las condiciones de acoplamiento oxidativo de *o*-aminofenoles a amino ácidos en la posición N-terminal en presencia de ferricianuro de potasio.¹⁴⁷ En primer lugar la modificación ocurre en un solo paso, por lo que no se requiere la oxidación inicial de la posición N-terminal y en segundo lugar, la rápida cinética de segundo orden permite utilizar bajas concentraciones de reactivos de acoplamiento. Estudios previos con una biblioteca de péptidos con la estructura XaaADSWAG (donde Xaa correspondía a diferentes residuos en la posición N-terminal) permitieron detectar la elevada reactividad de los residuos de prolina. En cambio, estudios de modificación de proteínas utilizando esta técnica detectaron una reactividad moderada, haciendo necesario en algunos casos la introducción de un residuo de prolina en la posición N-terminal mediante técnicas de mutagénesis para aumentar la reactividad (Esquema 15).



Esquema 15. Modificación selectiva de proteínas mediante acoplamiento oxidativo con *o*-aminofenoles.

▪ Aminación reductora

Las modificaciones descritas anteriormente mediante la acilación del extremo N-terminal eliminan la carga positiva *in vivo* pudiendo modificar la función de la proteína en estudios biológicos así como su desarrollo terapéutico. La aminación reductora emplea benzaldehído en presencia de cianoborohidruro sódico permitiendo la alquilación de la amina del extremo N-terminal.¹³⁴ Fue necesario optimizar las condiciones de reacción (disolución tampón, pH) para minimizar la formación de productos doblemente modificados en el extremo N-terminal. Una vez optimizada, la reacción es eficiente (rendimientos del 80%) y altamente selectiva (>99:1) para la modificación de péptidos y proteínas en la posición N-terminal, dando lugar a aminas alquiladas que mantienen la capacidad de protonarse, aunque contiene aún pequeñas cantidades de aminas doblemente alquiladas (~16%) (Esquema 16).



Esquema 16. Modificación selectiva de proteínas mediante aminación reductora.

Entre las ventajas de este método destacan que los derivados de benzaldehído con grupos funcionales bioortogonales son comerciales, por lo que no es necesaria una síntesis de varios pasos. Además, se lleva a cabo en condiciones suaves y en el caso de la necesidad de introducir grupos funcionales bioortogonales, como el alquino y la cetona, podrían insertarse en los extremos N-terminal en un solo paso para permitir el etiquetado específico. Cuando este método se aplicó a la modificación de la insulina, se comprobó que la proteína modificada resultante de la aminación reductora era más activa que la modificada mediante un enlace amida.¹³⁴ La metodología optimizada fue aplicada a un batería de péptidos demostrando buenas conversiones en 19 de los 20 posibles residuos N-terminal. La conversión en el caso de residuos de cisteína fue de solo el 42% junto con otro 44% de formación de la tiazolidina correspondiente. La formación de tiazolidina se debe a la reacción intramolecular del tiol con el ion iminio. Esta observación se respalda en un estudio reciente llevado a cabo por el grupo de Gao donde las cisteínas N-terminales pueden reaccionar con benzaldehído en condiciones ácidas (pH=5) para formar tiazolidinas en 48 h mientras que esta reacción puede ser acelerada a pH superiores (6.1).¹⁴⁸

- **Modificación de grupos N-terminal mediante reactivos de acoplamiento basados en triazina.**

Como se ha visto en apartados anteriores, se han desarrollado varios métodos de modificación específica de N-terminal. El control del pH del medio de reacción resulta clave para la modificación específica, ya que aprovecha las diferencias de pK_a de los grupos α y ε-amino. Recientemente Kitanaka ha desarrollado una metodología¹⁴⁹ que consiste en el uso de DMT-MM (cloruro de 4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio), un potente reactivo de condensación para formar enlaces amida incluso en disolución acuosa.¹⁵⁰ La estrategia se basa en la formación del correspondiente ácido activado mediante reacción con DMT-MM y su posterior reacción con la proteína a pH 7, dando lugar a modificaciones con moderada selectividad. Este método ha sido aplicado por los autores para la introducción de sondas como el ácido 4-(guanidinometil) benzoico (Gmb) que facilitan el análisis de proteínas por espectrometría de masas.

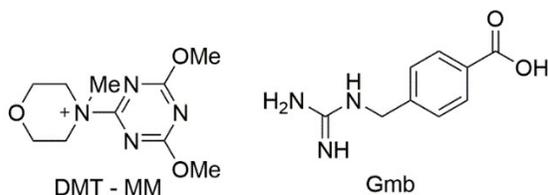


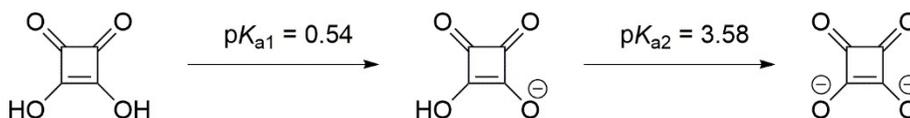
Figura 45. Estructura de cloruro de 4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio DMT-MM y el ácido 4-(guanidinometil) benzoico (Gmb) utilizados para la derivatización selectiva de proteínas en el extremo N-terminal previa a su estudio por EM.

Se han descrito las metodologías existentes para la modificación de proteínas en el extremo N-terminal. De las técnicas descritas, la aminación reductora¹³⁴ desarrollada recientemente junto con la modificación en la posición N-terminal mediante la reacción de transaminación mediada por PLP,¹³³ son probablemente los mejores procedimientos de modificación selectiva de N-terminal desarrollados hasta el momento. A pesar de esto, la mayoría de los métodos descritos tienen sus ventajas y limitaciones. Así pues, el desarrollo de métodos alternativos y complementarios de modificación de proteínas que actúen de manera selectiva sobre el extremo N-terminal sigue siendo un tema de gran interés. En el segundo capítulo de esta tesis se ha trabajado en el desarrollo de un nuevo método para la modificación selectiva de proteínas mediante el uso de estructuras derivadas del ácido escuárico.

4.- Ácido escuárico y derivados

4.1.- Estructura y propiedades del ácido escuárico

El ácido escuárico es un ácido fuerte con valores de pK_a comparables con los del ácido sulfúrico. El correspondiente dianión se caracteriza por tener valores de acidez inusualmente elevados.



Esquema 17. Ácido escuárico y los correspondientes pK_a del dianión ($pK_{a1} = 0.54$; $pK_{a2} = 3.58$).

La facilidad de la formación del dianión se debe a que se produce un aumento de la **aromaticidad** en relación a la especie protonada (en concordancia con la regla de Hückel $4n+2$; $n=0$).

4.2.- Síntesis y reactividad de derivados de ácido escuárico

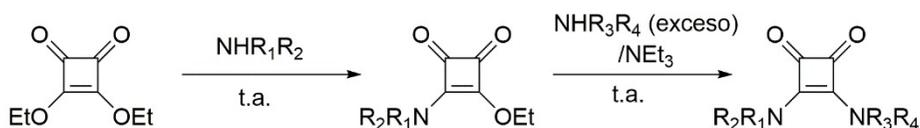
La reactividad del ácido escuárico es más compleja que la de un ácido dicarboxílico “convencional”, por lo que diversas estructuras derivadas del ácido escuárico presentan un gran interés.¹⁵¹ Dado que el ácido escuárico es insoluble en la mayor parte de disolventes orgánicos y tras el descubrimiento de varias vías sintéticas, se empezó a prestar un gran interés por los derivados de ésteres alquílicos del ácido escuárico. Los ésteres alquílicos del ácido escuárico normalmente se sintetizan por condensación del ácido libre con su respectivo alcohol o mediante alcoholisis del dicloruro de ácido escuárico.¹⁵² Por otro lado, la amidación sucesiva de los ésteres del ácido escuárico da lugar a las escuaramidas. Esta reacción es una vía importante para la síntesis de bisamidas asimétricas con aplicaciones que van desde la preparación de antibióticos hasta la obtención de organocatalizadores.¹⁵³

La primera reacción para la obtención de **ésteres de ácido escuárico** fue llevada a cabo por Cohen.¹⁵⁴ La acción del diazometano en el ácido escuárico y posterior reacción de la sal de plata con yoduro de metilo, dio lugar al éster dimetílico del ácido escuárico. Compuestos con cadenas alquílicas de mayor longitud pueden ser preparados mediante transesterificación o a través de la reacción del ácido escuárico con un exceso del alcohol correspondiente.¹⁵¹ Las **escuaramidas** se obtienen a partir de reacciones de derivados de escuaratos con un exceso de aminas alifáticas primarias o secundarias bajo condiciones

suaves y con elevados rendimientos permitiendo la obtención tanto de escuaramidas simétricas como asimétricas.

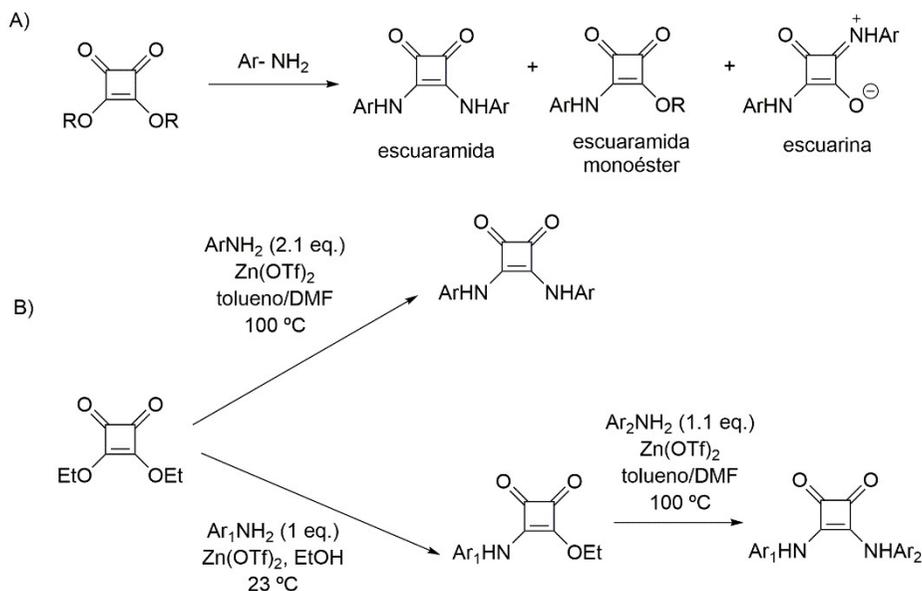
La síntesis de **escuaramidas simétricas** fue descrita también por primera vez en 1966 por el grupo de Cohen¹⁵⁴ a partir del dimetil escuarato en condiciones suficientemente básicas. En un solo paso de reacción, con un exceso de la amina correspondiente o bien añadiendo NEt_3 como base, se obtienen escuaramidas simétricas con elevados rendimientos.

La síntesis de **escuaramidas asimétricas** fue descrita por primera vez en 1991 por Tietze y colaboradores y se preparan a partir de amidación secuencial de ésteres de ácido escuárico.¹⁵⁵ Ambas reacciones proceden a temperatura ambiente pero la segunda reacción requiere de condiciones más básicas (un exceso de amina o el uso de NEt_3) permitiendo la formación secuencial de la mono-amida y la bis-amida deseadas (Esquema 18)



Esquema 18. Síntesis de escuaramidas asimétricas a partir del dietil escuarato.

La baja reactividad de la mono-escuaramida comparado con el diéster de partida puede ser explicada por el aumento de la estabilización debido a la aromaticidad. Este incremento de la aromaticidad se ha visto corroborado mediante cálculos teóricos.¹⁵⁶ Más recientemente, en el año 2010, Taylor y su grupo de investigación¹⁵⁷ describieron otro método el cual ha sido ampliamente utilizado en la preparación de escuaramidas simétricas y asimétricas. En primer lugar, las escuaramidas simétricas pueden ser preparadas utilizando como disolvente tolueno/DMF en presencia de un ácido de Lewis como catalizador ($(\text{Zn}(\text{OTf})_2)$) (Esquema 19B), evitando así la formación de subproductos (isómeros de escuarina y monoésteres de escuaramida, Esquema 19A). A través de una simple modificación de este método, los mismos autores describieron la síntesis de escuaramidas asimétricas (Esquema 19B).¹⁵⁷



Esquema 19. A) Formación de escuarinas y monoésteres de escuaramidas como subproductos en la síntesis de N,N' -Diarilescuaramidas. B) Síntesis de N,N' -Diarilescuaramida simétricas (superior) y asimétricas (inferior) en presencia del catalizador $Zn(OTf)_2$.

4.3.-Aplicaciones generales

A lo largo de los años han surgido numerosas aplicaciones debido a las inusuales propiedades físico químicas de los derivados de escuaramida. Solo en los últimos 5 años se han publicado más de 700 artículos con la palabra clave escuaramida. Por tanto, las escuaramidas y sus derivados representan un importante grupo de estructuras que actualmente se están aplicando con éxito en diversos campos de la química orgánica e inorgánica, y cada vez adquieren mayor interés en el campo de la química médica.

Muchos procesos biológicos se basan en el **reconocimiento molecular** entre un sustrato y su correspondiente enzima, por lo que son importantes las interacciones aniónicas y catiónicas entre ambos. En este campo las escuaramidas surgen como alternativa al uso de ureas y tioureas.¹⁵⁸ Presentan unas características mejoradas, como su comportamiento dual, ya que se comportan como aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno. Además presentan rigidez estructural y una mayor distancia de enlace entre los dos grupos N-H (en la N,N' -dimetiltiourea es 2.13 Å y en la N,N' -dimetilescuaramida es 2.72 Å). Además, las propiedades de estas estructuras como receptores aniónicos sintéticos, ya que forman fuertes interacciones con especies cargadas negativamente, conllevó a que fueran utilizadas como potentes **organocatalizadores bifuncionales** en síntesis asimétrica (Figura 46).^{153,158,159,160} Al mismo tiempo, debido a su gran afinidad aniónica, especialmente hacia

aniones cloruro, los derivados de escuaramidas también surgen como alternativa a las tio(ureas) en el campo del desarrollo de **transportadores aniónicos transmembranas** (Figura 46)¹⁶¹ con potenciales actividades bioactivas.¹⁶² Por ejemplo, el uso de un derivado de escuaramida capaz de aumentar el transporte de aniones cloruro en el lisosoma provoca la inhibición de autofagia y la inducción de apoptosis.¹⁶³ Asimismo, se ha observado que algunos derivados de escuaramida presentan también actividad como **agentes antiparasitarios** para el tratamiento de la malaria o la enfermedad de Chagas,^{164,165,166} como **inhibidores de quinasas**^{167,168} o tienen **efectos antiproliferativos** en células tumorales (Figura 46).¹⁶⁹ Por último, cabe destacar la inclusión de escuaramidas en productos bioactivos como **bioisómeros** de ácidos carboxílicos,¹⁷⁰ aminoácidos,¹⁷¹ ureas,¹⁷² guanidinas¹⁷³ o fosfatos.^{174,175}

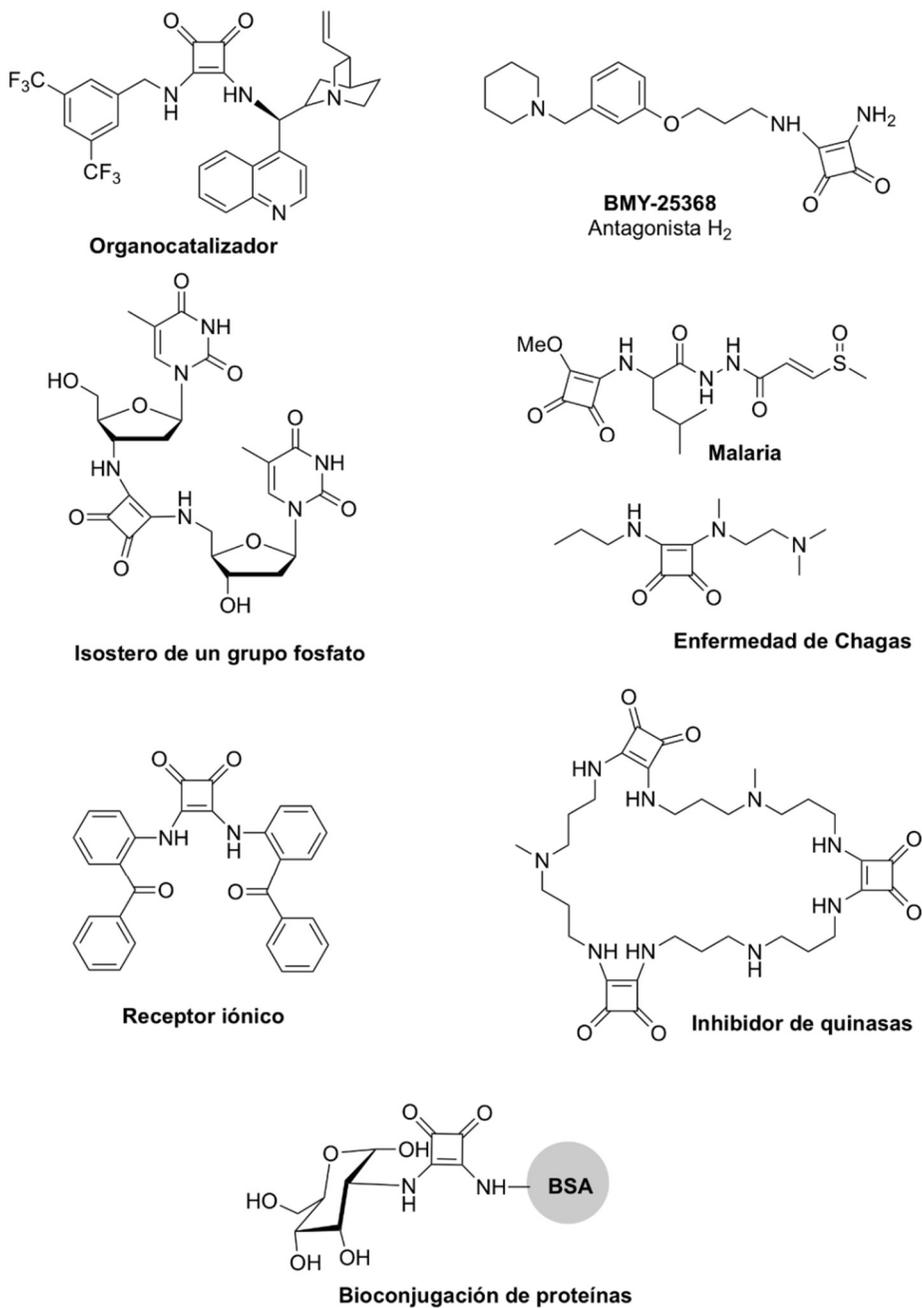


Figura 46. Algunos ejemplos de aplicaciones generales de derivados de escuaramida: organocatalizadores bifuncionales, potente antagonista del receptor de histamina H₂, bioisómeros (fosfatos), agentes antiparasitarios (tratamiento de la malaria o enfermedad de Chagas), receptores iónicos, inhibidores de quinasas y en el desarrollo de métodos para la bioconjugación de proteínas.

Aparte de su uso como organocatalizadores y en aplicaciones de química médica, las escuaramidas también han sido utilizadas para el desarrollo de métodos para la **conjugación de carbohidratos, proteínas y anticuerpos**.^{176,155,177} La menor reactividad de las mono-escuaramidas formadas a partir de reacción de diésteres del ácido escuárico permite su preparación y, en condiciones más básicas, su posterior conjugación con biomoléculas. El primer ejemplo de esta aplicación fue descrito por Tietze y colaboradores que utilizaron el dietil éster del ácido escuárico para acoplar la *p*-aminofenilo 2-acetamido-2-desoxi-3-*O*- β -D-galactopiranosilo- β -D-galactopiranosido (gal- β 1,3-galNAc) a la albúmina sérica bovina o BSA. La modificación se produjo en dos pasos independientes y consecutivos. Primeramente tiene lugar la reacción de gal- β 1,3-galNAc con el diéster del ácido escuárico. Después, la monoamida formada es conjugada a pH 9 con los residuos de lisina de la BSA.¹⁷⁸ La posterior cuantificación permitió determinar aproximadamente 15 unidades de oligosacáridos por molécula de BSA. La glicoproteína obtenida fue entonces empleada en la detección de receptores específicos de antígenos T en diferentes líneas celulares tumorales. Este tipo de acoplamiento tiene un gran interés debido a que estos conjugados pueden ser utilizados para atacar células de manera selectiva,^{179,180} para la generación de vacunas sintéticas útiles para el tratamiento de enfermedades infecciosas y el cáncer¹⁸⁰ y para la detección de lectinas.¹⁸¹ Desde entonces se ha utilizado esta metodología para la preparación de varios bioconjugados que serán explicados con más detalle en el apartado de Resultados y Discusión.

4.4.- Desarrollo de un método específico de modificación de proteínas basado en escuaratos

Aunque en los últimos años se han descrito varios métodos de modificación específica de proteínas, existe aún un gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias y métodos que complementen y superen las limitaciones de los existentes y amplíen el abanico de herramientas disponibles.

Como se ha comentado en apartados anteriores, el uso de derivados de escuaramidas para la bioconjugación de proteínas con oligosacáridos o moléculas orgánicas permite modular las propiedades de las biomoléculas con métodos suaves y de gran versatilidad. Además, las proteínas y péptidos modificados resultantes son herramientas esenciales para el estudio de procesos biológicos, para la caracterización de la actividad de proteínas y para el tratamiento de enfermedades. Todos los ejemplos descritos hasta el momento se basan en la modificación no selectiva de residuos de lisina a pH básico o en la modificación de cisteínas situadas en el extremo N-terminal, aunque esta modificación solo ha sido

estudiada en péptidos de pequeño tamaño. Debido al creciente interés para el desarrollo de métodos selectivos de modificación de proteínas que actúen sobre residuos específicos, este capítulo 2 se centra en el desarrollo de un método específico de modificación de proteínas mediante el uso de estructuras derivadas del ácido escuárico.

OBJETIVOS

El segundo capítulo de la presente tesis se desarrolla en el ámbito de la modificación química de las proteínas como una herramienta importante en el campo de la biología química. En esta técnica de bioconjugación se combinan características de la química sintética y de la biología molecular. Aunque en los últimos años se han descrito varios métodos de modificación de proteínas, existe un gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias y métodos complementarios que superen las limitaciones de los existentes. En este contexto, se ha planteado el siguiente objetivo general:

- Desarrollar un método específico de modificación de proteínas en condiciones suaves y biocompatibles mediante el uso de estructuras derivadas del ácido escuárico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.-Aplicaciones de los derivados del ácido escuárico

La posibilidad de formar enlaces de hidrógeno y el carácter aromático del anillo en combinación con la rigidez estructural de los escuaratos y escuaramidas ha facilitado que estos compuestos sean estudiados como ligandos quirales en catálisis asimétrica,^{153,159,189} como isómeros de ácidos carboxílicos,¹⁷⁰ aminoácidos¹⁷¹ y fosfatos¹⁷⁴ y como moléculas biológicamente activas.¹⁶⁹ Además, las escuaramidas pueden sintetizarse a partir de ésteres del ácido escuárico mediante condiciones suaves y en disoluciones acuosas, lo que las convierte en estructuras idóneas para la bioconjugación y la química supramolecular. Como se ha explicado en la introducción de este capítulo, los diésteres del ácido escuárico reaccionan de manera muy rápida para formar mono-escuaramidas, mientras que la posterior modificación de esta mono-escuaramida para formar una bis-escuaramida requiere de condiciones más drásticas. La diferencia en la reactividad entre las estructuras mono/bimodificadas ha permitido el uso de ésteres del ácido escuárico para la modificación selectiva de proteínas.¹⁸⁵ Esta técnica ha sido utilizada para la preparación de glicoproteínas y en menor medida para la modificación de péptidos y proteínas (PEGilación, inmovilización sobre superficies).¹⁸² Las modificaciones se producen a valores de pH ~ 9 y presentan una elevada selectividad para residuos de lisina. Este método tiene una serie de ventajas como es una mayor estabilidad frente a la hidrólisis, comparado con los ésteres activados de N-hidroxisuccinimida (NHS), y tolerancia ante la presencia de alcoholes, argininas e histidinas. Presenta también ciertas desventajas. Así pues, su elevada reactividad junto con la abundancia de los residuos de lisina causa una proporción alta de marcajes por proteína. Esta propiedad puede ser interesante, por ejemplo, en la creación de conjugados para la obtención de vacunas en los que es preferible la unión de múltiples antígenos por proteína. En cambio, esta multiplicidad puede ser contraproducente en otros casos como el marcaje de proteínas con sondas fluorescentes en las que un exceso de marcaje puede producir una disminución del rendimiento cuántico de los conjugados. De manera similar, la modificación de residuos al azar puede dar lugar a mezclas heterogéneas de proteínas y modificar sus propiedades y actividades. Así pues, el desarrollo de métodos selectivos de modificación de proteínas es un campo de investigación que en los últimos años ha despertado un creciente interés.

La selectividad de dialquil escuaratos para la modificación de proteínas ha sido objeto de estudio y presenta ciertas controversias. Aunque los resultados previos anteriormente descritos han demostrado su uso para la modificación proteica actuando de manera selectiva sobre residuos de lisinas a $\text{pH} \sim 9$ (Figura 47A). Otros estudios preliminares realizados con el éster metílico del dihidrocloruro de lisina (H-Lys-OMe) sugirieron que mediante la modulación del pH se podría conseguir cierta selectividad para los grupos α -amino vs ϵ -amino.¹⁸⁵ Además, en condiciones neutras ($\text{pH} = 7$) se detectó la reacción quimioselectiva de escuaratos con el grupo α -amino de residuos de cisteína situados en el extremo N-terminal. La reacción parece proceder probablemente a través de una transferencia intramolecular S - N de acilo ya que no se observó reacción con el β -mercaptoetanol y sí con la β -mercaptoetilamina (Figura 47B).¹⁸⁶ Los autores justifican que esta reacción quimioselectiva tiene lugar en un disolvente acuoso cuando el pK_a del grupo tiol disminuye por la presencia de un grupo amino próximo. Posteriormente, los mismos autores estudiaron el uso de escuaratos presentes en monocapas autoensambladas (SAM, del inglés self-assembled monolayers) para la inmovilización de péptidos que contienen residuos de cisteína. Así pues, mientras en condiciones ligeramente ácidas ($\text{pH}=5.5$) se produce la inmovilización selectiva de péptidos que contienen cisteínas en la posición N-terminal, a pH superiores (7.5), también pueden ser inmovilizados los péptidos que contienen residuos internos de cisteína, incluso si tiene el extremo N-terminal acetilado (Figura 47C).¹⁸⁷ Posteriormente se demostró la rápida modificación de péptidos con escuaratos cíclicos a pH neutro.¹⁸⁸ La reacción se produce tanto con residuos de lisina como de cisteína, sin especificar si es posible modular una reacción selectiva para un residuo concreto (Figura 47D).

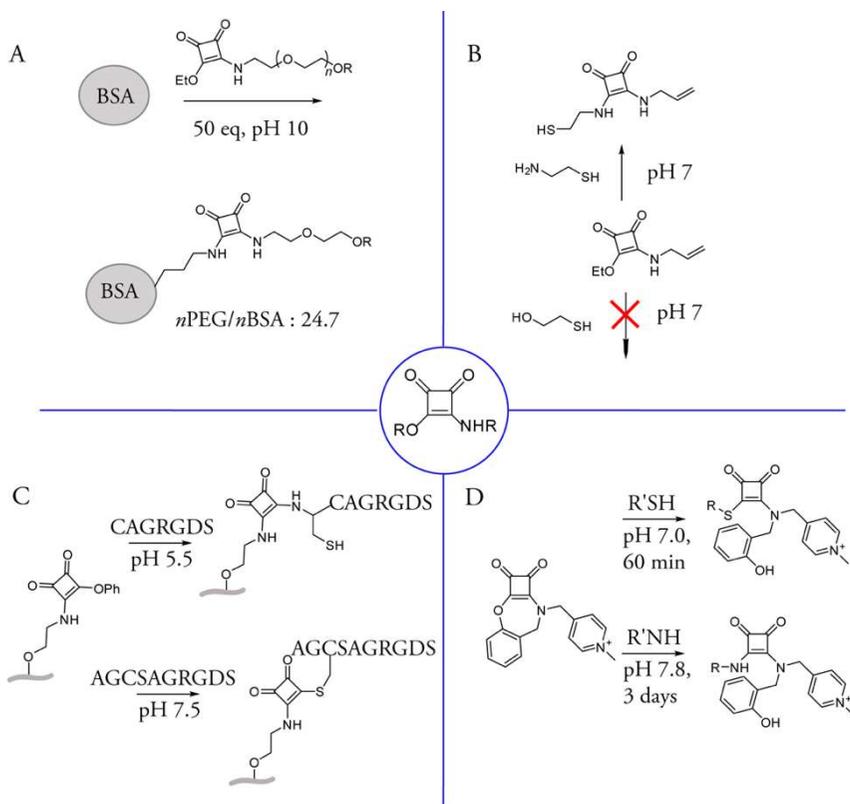


Figura 47. Estudios previos han explorado la modificación de proteínas con escuaramidaz con diversos resultados. A pH elevados se produce la modificación mediante reacción con residuos de lisina (A). A pH inferiores (pH 7) solo se observa reacción con tioles que estén en β de un grupo amino (B). Algunos trabajos observan reacción específica con cisteínas N-terminales a pH 5.5 y reacción con cisteínas internas a pH 7.5 (C). A pH neutro la reacción se produce con escuaratos cíclicos tanto con residuos de lisina como de cisteína (D).

Con el objetivo de explorar métodos alternativos que permitan modificar de manera selectiva proteínas, se decidió explorar el uso de dialquil escuaratos y, más concretamente, el dibutil escuarato (3,4-dibutoxiciclobut-3-eno-1,2-diona). En base a la información y resultados previos, se consideró que estas estructuras poseen un gran potencial para conseguir un marcaje selectivo de proteínas dependiente del pH, teniendo como potenciales sitios de reacción los residuos de cisteína y el extremo N-terminal.

El extremo N-terminal de las proteínas tiene unas características únicas que permiten su modificación específica. No solo se encuentra más expuesto al medio y, por lo tanto, más accesible a interactuar con reactivos,¹⁹⁰ sino que su diferente valor de pK_a (6-8) puede ser empleado para modificar esta posición utilizando reacciones químicas

dependientes de pH. Ejemplos de estrategias que utilizan esta diferente reactividad han sido mencionados en la introducción de este capítulo e incluyen la conversión de aminas a azidas utilizando imidazol-1-sulfonyl azida,¹³¹ la acilación con cetenas¹³² y la aminación reductiva,¹³⁴ entre otros métodos. Así pues, mediante control del pH y la presencia de agentes reductores que eviten la oxidación y consiguiente bloqueo de los tioatos, se planteó el desarrollo y la caracterización de un método para la modificación específica de proteínas basado en el uso de derivados del ácido escuárico.

2.- Modificación específica de proteínas con diésteres del ácido escuárico

2.1.- Modificación de proteínas con dibutil escuarato

2.1.1- Modificación de la insulina con dibutil escuarato

Como primera aproximación se estudió la reacción del dibutil escuarato con la insulina, una proteína pequeña de peso molecular 5807.65 Da formada por dos cadenas unidas por tres puentes de disulfuro (Figura 48), y que debido a su tamaño puede ser fácilmente analizada por espectrometría de masas (EM).

La espectrometría de masas permite la identificación de compuestos presentes en una muestra a través de su ionización que permite generar moléculas cargadas (m/z). Así pues, el espectro de masas es un gráfico de intensidad donde se representa la abundancia relativa de los distintos iones en función de su relación m/z . Este término se obtiene dividiendo la masa atómica o molecular de un ion por el número de cargas z que tiene el ion ($m/z = [m + z(H^+)]^{z+}/z$), donde H^+ corresponde a la masa de un protón = 1.008 Da). En modo positivo, el número de especies cargadas depende del número de residuos básicos que pueden ser protonados. Teniendo en cuenta que el rango de masas en el que trabaja el equipo que utilizamos es de 50 - 1500 Da, para obtener la masa de grandes moléculas es necesario realizar la deconvolución de los espectros de masas obtenidos. Este proceso se basa en la identificación de los iones con múltiples cargas que correspondan a un mismo peso molecular. Estos análisis se llevaron a cabo con el software libre, MagTran que utiliza el algoritmo Zscore para la detección de los picos del espectro, asignar distribuciones de estados de carga a los picos identificados y en base a esto determinar una masa molecular para la proteína.¹⁹¹

La insulina está formada por 51 aminoácidos distribuidos en dos cadenas, A y B, que contienen 21 y 30 aminoácidos, respectivamente. Posee 6 residuos de cisteína que están

formando 3 enlaces disulfuro, dos de ellos unen las dos cadenas mientras otro es un puente disulfuro intramolecular que se encuentra en la cadena A. La insulina también presenta un residuo de lisina (cadena B) y dos extremos N-terminales (Gly y Phe) (Figura 48).



Figura 48. La insulina está formada por dos cadenas A (azul) y B (rosa) unidas mediante tres enlaces disulfuro.

Como primera aproximación se estudió la posible reacción de los residuos de cisteína con dibutil escuarato (40). Con este fin, se hizo un tratamiento previo con un agente reductor (la fosfina hidrosoluble tris (2-carboxietil) (TCEP)) para reducir los enlaces disulfuro y dejar libres los grupos sulfhidrilos. La reducción completa, entendida como la desaparición del producto de partida y la aparición de dos nuevos compuestos correspondientes a las cadenas A y B se comprobó mediante cromatografía líquida acoplada a EM, obteniéndose así dos especies con las siguientes masas moleculares 2383 (calcd. para $C_{99}H_{155}N_{25}O_{35}S_4$, $[M+H]^+ = 2384.01$) y 3429 (calcd. para $C_{158}H_{234}N_{40}O_{42}S_2$, $[M+H]^+ = 3428.69$) correspondientes a la cadena A y cadena B respectivamente (Figura 48A y B).

Tras la incubación con TCEP durante una hora, se añadió el dibutil escuarato manteniendo la reacción 3 h bajo agitación a temperatura ambiente en disolución tampón fosfato 0.1 M a pH 6.5. Mientras 10 eq. resultaron insuficientes, con 20 eq. se obtuvo la completa modificación de la proteína. El tratamiento con dibutil escuarato realizado con la insulina reducida, resultó en la formación de dos nuevas especies correspondientes a las modificaciones de la cadena A y de la cadena B con una unidad de dibutil escuarato en cada una de ellas $[M+H]^+ = 2535$ y $[M+H]^+ = 3582$ (Figura 49C). Aunque se ha descrito que el ácido escuárico puede ser reducido a ciclobutanooctol mediante tratamiento con TCEP, en ningún caso se observó la conversión de los diésteres de escuarato en otro producto.¹⁹²

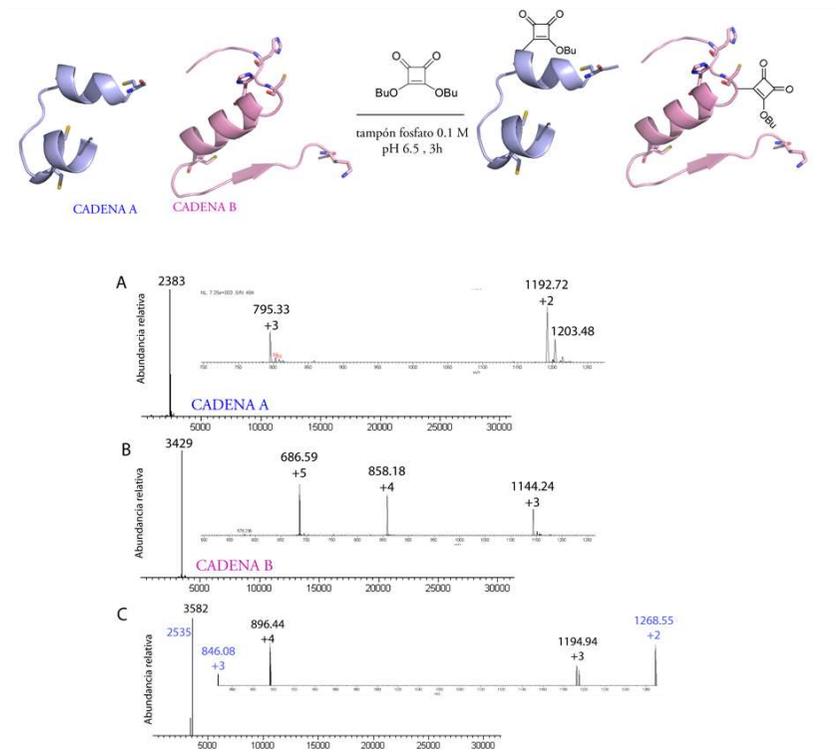


Figura 49. La insulina tratada previamente con TCEP (A y B) reaccionó con dibutil escuarato resultando en la formación de dos nuevas especies que corresponden a la incorporación de una unidad de dibutil escuarato en cada una de las cadenas (C). Los iones moleculares corresponden a la cadena A modificada 2535 (calcd. para $C_{107}H_{163}N_{25}O_{38}S_4$, $[M+H]^+ = 2535.05$) y la cadena B modificada 3582 (calcd. para $C_{166}H_{242}N_{40}O_{45}S_2$, $[M+H]^+ = 3580.74$). Los espectros de masas originales antes de ser deconvolucionados pueden verse insertados.

Teniendo en cuenta la secuencia de la insulina y las condiciones de la reacción, existen diferentes puntos potenciales de reacción como son los grupos amino de la cadena lateral de lisinas, los grupos sulfhidrilos de la cadena lateral de cisteínas, el anillo de imidazol de residuos de histidinas¹⁹³ o el grupo α -amino del extremo N-terminal. La reactividad de las cadenas laterales de estos aminoácidos depende en gran medida de las condiciones del medio. Así pues, cuando el pH es inferior al pK_a , los grupos se encuentran protonados, y si el pH es superior al pK_a , el grupo ionizable estará desprotonado y por tanto potencialmente nucleófilo.

Los valores de pK_a de las cadenas laterales de los aminoácidos, si estuvieran completamente expuestos al disolvente sin verse afectados por la presencia de fuerzas electrostáticas, se conocen como valores de pK_a intrínseco (pK_{int}) y serían los siguientes: Cys (pK_a 8.5-9.5), His (pK_a 6-7), Lys, (grupo ϵ -amino pK_a 10.5) y posición N-terminal (grupo α -amino $pK_a=6$ -

8).¹⁹⁴ Conociendo estos valores y el valor de pH del medio se puede calcular la proporción exacta de cada población que viene determinada por la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Por ejemplo, en condiciones fisiológicas (pH = 7.4), el grupo sulfhidrilo, que posee un pK_a alrededor de 8.4, presenta aproximadamente el 10% de los grupos sulfhidrilos desprotonados, por lo tanto cargados negativamente y nucleófilos y esta proporción disminuye al 1% a pH 6.5. A este valor de pH también encontraríamos un 25% de anillos de imidazol desprotonados y entre un 10-50% de la posición α -amino terminal desprotonada mientras que el efecto sobre las cadenas laterales de los residuos de lisina sería residual. Pero además estos valores de pK_a pueden verse afectados por efectos de proximidad que se producen en proteínas. Un estudio reciente analizando 541 valores de pK_a descritos experimentalmente para 78 proteínas indica que estos valores pueden variar de manera muy amplia situándose en los siguientes rangos: His (2.4 a 9.2), Cys (2.5 a 11.1), Lys (5.7 a 12.1) y el grupo α -amino terminal (6.8 a 9.1).¹⁹⁴

Con el fin de investigar los puntos potenciales de reacción, se procedió a estudiar la modificación de la proteína con dibutil escuarato tras el bloqueo de los residuos de cisteína. Para ello, se realizaron dos experimentos diferentes. En primer lugar, se bloquearon las cisteínas con *N*-etilmaleimida (NEM). Las cisteínas reaccionan de manera específica con electrófilos como maleimidias en un rango de pH de 6.5 a 7.5.¹⁹⁵ Como primera aproximación se utilizaron 10, 20 y 50 eq. de NEM respecto a la concentración de proteína, pero no fue hasta la adición de 100 eq. de NEM cuando tanto los tioles de la cadena A como de la cadena B reaccionaron de manera completa, como se comprobó mediante análisis por EM (Sección Experimental, Figura 77). El análisis posterior de la reacción con dibutil escuarato indicó que aunque se produjera un bloqueo total de los residuos de cisteína, se podía seguir observando un incremento de masa que correspondía a la adición de una unidad de dibutil escuarato. Las especies que se identificaron tras este experimento correspondían a la cadena A con los cuatro residuos de tiol bloqueados por reacción con NEM $[M+H]^+ = 2883.4$ (calcd. para $C_{123}H_{183}N_{29}O_{43}S_4$ $[M+H]^+ = 2883.20$) y la cadena B con las dos cisteínas bloqueadas e incorporación de una unidad de dibutil escuarato $[M+H]^+ = 3831.6$ (calcd. para $C_{178}H_{255}N_{42}O_{49}S_2$, $[M+H]^+ = 3830.83$ (Sección Experimental, Figura 78). Como estudio complementario, se caracterizó la modificación

de la proteína oxidada, con las cadenas A y B unidas mediante 3 puentes disulfuro, y consiguientemente con los grupos sulfhidrilos bloqueados. Con esta finalidad se incubaron 20 eq. de dibutil escuarato con la proteína en una disolución tampón de fosfato 0.1 M a pH 6.5. Tras 3 h de reacción a temperatura ambiente, se analizó la muestra por EM observando la desaparición de la insulina de partida y la aparición de una nueva especie que corresponde a la conjugación de la insulina con una y en menor medida dos unidades de escuarato (Figura 50B).

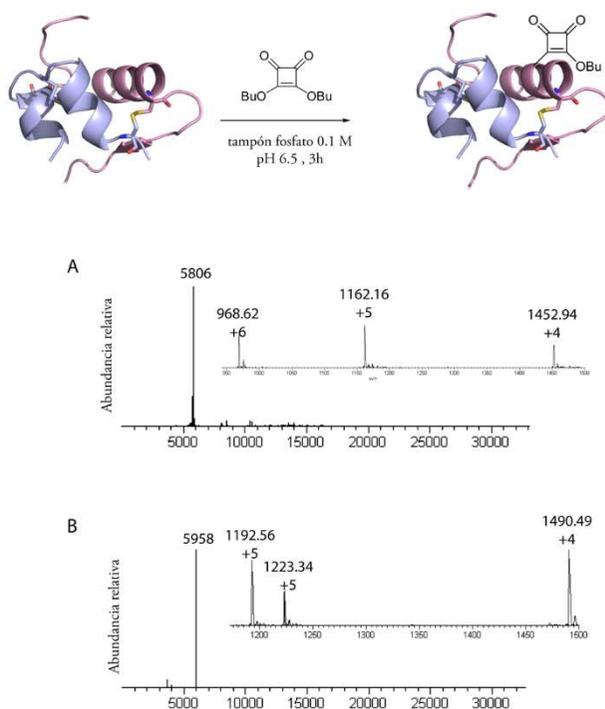


Figura 50. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando el ion molecular correspondiente. A) Insulina y B) Especie obtenida tras la incubación de insulina con 20 eq. de dibutil escuarato a pH 6.5. Los espectros de masas originales antes de su deconvolución pueden verse insertados. La insulina doblemente modificada no es visible en el espectro deconvolucionado debido a que la presencia de una sola especie $[M+5H]^{5+}$ no es suficiente para que el software MagTran pueda analizarla.

Estos resultados indican que en las condiciones de reacción utilizadas se produce la modificación de la proteína. Aunque no se puede descartar la modificación de residuos de cisteína en las muestras previamente reducidas mediante tratamiento con TCEP, los estudios posteriores realizados con insulina oxidada y con la proteína reducida y tratada con NEM indican al menos la participación de otros grupos funcionales adicionales.

2.1.2.- Digestión proteica de una insulina modificada

Para estudiar con más detalle el sitio de modificación, se procedió a la digestión de la proteína mediante la incubación con diferentes proteasas (tripsina, quimotripsina y endoproteinasa Glu-C). La tripsina es una serina proteasa que escinde los péptidos en el extremo carboxi o posición C-terminal de los aminoácidos lisina y arginina. Por otro lado, la quimotripsina cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en C-terminal de los residuos de tirosina, fenilalanina, triptófano y leucina. Ambas proteasas resultaron en hidrólisis parciales o dieron lugar a péptidos demasiado largos sin proporcionar la suficiente información. Por estos motivos, se recurrió a una tercera serina proteasa, la endoproteinasa Glu-C aislada de *Staphylococcus aureus* V8 y cuya especificidad depende del pH y la disolución tamponada utilizada. Así pues, a pH 4 y en acetato amónico actúa de manera específica sobre residuos de ácido glutámico mientras que en bicarbonato amónico (pH 7.8) actúa además sobre residuos de ácido aspártico, aunque con menos actividad.

En la **tabla 10** se pueden observar los resultados de los experimentos realizados y en la figura adjunta se indican los fragmentos esperados para cada cadena. En la primera columna, se describe la reacción que se ha llevado a cabo en la que se indica el orden de adición. La segunda columna presenta la secuencia de aminoácidos de los fragmentos peptídicos esperados tras la digestión, junto con su fórmula molecular y la masa calculada para cada uno de ellos. Finalmente, en la última columna se puede ver el ion molecular encontrado por EM. Los fragmentos peptídicos encontrados resultantes de la digestión de la insulina reducida suponen una cobertura del 100% de la secuencia, siendo la cobertura el número de péptidos obtenidos tras la digestión frente al número de péptidos teóricos que se pueden obtener. La Figura 79 de la Sección Experimental muestra los cromatogramas correspondientes.



Reacción	Fragmentos esperados	Fórmula molecular	Masa calculada [M+H] ⁺ / [M+2H] ²⁺	Masa encontrada [M+H] ⁺ / [M+2H] ²⁺
Insulina + TCEP + endoGlu-C	GIVE	C ₁₈ H ₃₂ N ₄ O ₇	417.24	417.23
	QCCTSICSLSYQLE	C ₆₁ H ₉₉ N ₁₅ O ₂₂ S ₃	1490.63	1490.66
	NYCN	C ₂₀ H ₂₈ N ₆ O ₈ S	513.18	513.18
	FVNQHLCGSHLVE	C ₆₅ H ₉₉ N ₁₉ O ₁₉ S	1482.72	1482.76
	ALYLVCGE	C ₃₉ H ₆₂ N ₈ O ₁₂ S	867.43	867.44
	RGFFYTPKT	C ₅₄ H ₇₇ N ₁₃ O ₁₃	1116.58	1116.62
Insulina + TCEP + dibutil escuarato + endoGlu-C	(X)GIVE	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₁₀	569.28	569.28
	(X)QCCTSICSLSYQLE	C ₆₉ H ₁₀₇ N ₁₅ O ₂₅ S ₃	821.84	-
	(X)NYCN	C ₂₈ H ₃₆ N ₆ O ₁₁ S	665.22	-
	(X)FVNQHLCGSHLVE	C ₇₃ H ₁₀₇ N ₁₉ O ₂₂ S	817.88	817.86
	(X)ALYLVCGE	C ₄₇ H ₇₀ N ₈ O ₁₅ S	1019.47	-
	(X)RGFFYTPKT	C ₆₂ H ₈₅ N ₁₃ O ₁₆	1268.63	-

Tabla 10. Resultados de la digestión con endoproteínasa Glu-C (endoGlu-C) de la insulina sola o tratada con dibutil escuarato y el posterior análisis de los fragmentos peptídicos resultantes mediante EM. La figura muestra la cadena A (azul) y la cadena B (rosa), su secuencia peptídica y los fragmentos esperados tras la digestión con la endoproteínasa Glu-C. La tabla indica los resultados de la digestión proteica. En cada apartado se muestran en primer lugar los fragmentos peptídicos derivados de la digestión de la cadena A, seguidos de los fragmentos esperados de la digestión de la cadena B. La modificación con dibutil escuarato se indica como (X).

La digestión y posterior análisis de los fragmentos peptídicos obtenidos tras el tratamiento de la insulina reducida con dibutil escuarato indican la modificación del tetrapéptido GIVE (cadena A) y del fragmento FVNQHLCGSHLVE (cadena B) mientras que los otros fragmentos se mantienen inalterados. Este último péptido contiene varios lugares de reacción, puesto que presenta una cisteína y dos histidinas, mientras que el otro fragmento está formado básicamente por aminoácidos alifáticos. Estos resultados sugieren que la modificación sucede de forma selectiva en la α -amina del extremo N-terminal, el único residuo común en los dos péptidos identificados. Para confirmar esta hipótesis, era necesario realizar estudios adicionales. Estos resultados también indican que tanto los residuos de Cys como el residuo de Lys o His presente en la cadena B permanecen inalterados tras el tratamiento con dibutil escuarato.

2.1.3.- Modificación de la amina N-terminal a través de una reacción de transaminación

Para confirmar una posible modificación de la α -amina del extremo N-terminal, se decidió bloquearla utilizando la reacción de transaminación desarrollada por Francis y su grupo de investigación, que modifica de manera selectiva este grupo α -amino.¹³³ En una transaminación, se produce la desaminación de un aminoácido para formar un cetoácido. Las transaminaciones enzimáticas requieren piridoxal-5'-fosfato (PLP) como coenzima, formando una base de Schiff entre el grupo aldehído y una amina primaria (Figura 44). En base a esta transformación enzimática, desarrollaron la modificación selectiva del extremo N-terminal mediada por PLP, para dar lugar a cetonas y aldehídos que pueden reaccionar posteriormente con oximas. Esta reacción es altamente específica para el extremo N-terminal, probablemente debido al pK_a del protón α de este residuo, en relación al protón ϵ de los residuos de lisina.

Así pues, se trató la insulina con PLP durante 2 h a 37 °C o 16 h a temperatura ambiente. El posterior análisis por EM reveló que en ambos ensayos se obtenían dos especies, una de las cuales mostraba un ion molecular que correspondía a la proteína formando un enlace imina con PLP y la otra especie presentaba una masa parecida a la inicial que podría ser la insulina no modificada o el correspondiente producto de transaminación (Sección Experimental, Figura 80 y 81, la diferencia entre la masa molecular de proteína nativa y el producto de transaminación es de solo 1 Da y entra dentro del error experimental). La insulina posee dos extremos N-terminales, por lo que no se puede descartar que coexistan diferentes especies debido a la diferente reactividad que muestran los diferentes aminoácidos.¹⁴⁵ Se llevó luego a cabo la reacción de la proteína modificada con dibutil

escurato durante 3 h a temperatura ambiente y a pH 6.5. Tras el análisis por EM, se obtienen las mismas especies detectadas anteriormente y en ningún caso se detecta modificación adicional de la insulina con dibutil escurato. Estos resultados sugieren que la modificación observada con dibutil escurato se produce de manera específica en el extremo N-terminal ya que un tratamiento previo con PLP impide la modificación posterior con dibutil escurato (Figura 51).

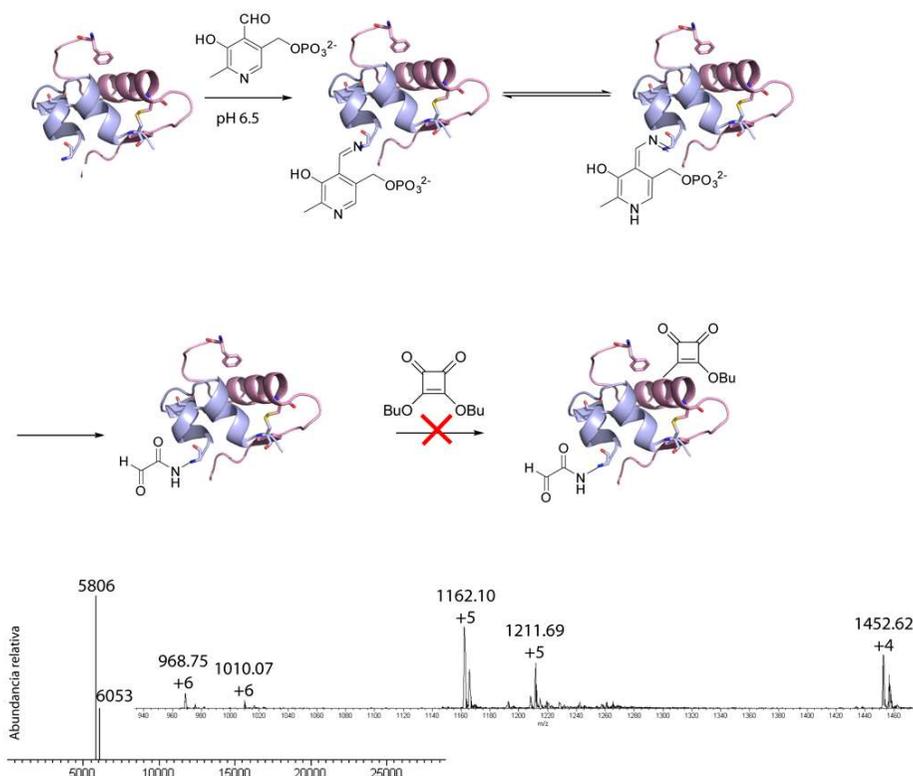


Figura 51. Reacción de modificación de la posición N-terminal de la insulina mediante transaminación y posterior reacción con dibutil escurato. Los iones moleculares de las especies obtenidas son 6053, que corresponde al aducto con PLP (calcd. para $C_{265}H_{389}N_{66}O_{82}S_6P$ $[M+NH_3]^+ = 6054.71$) y 5806 que corresponde al producto de transaminación (calcd. para $C_{257}H_{380}N_{64}O_{78}S_6$ $[M+H]^+ = 5806.61$). El espectro de masas original antes de su deconvolución puede verse insertado. El espectro de masas obtenido tras la incubación con el dibutil escurato también coincide con el mostrado, indicando la ausencia de reacción.

2.1.4.- Estudio de las reactividades de α -amina y ϵ -amina a diferentes pH

La reactividad de las cadenas laterales de los aminoácidos depende del pH del medio. A los valores de pH que se trabaja (pH=6.5), se esperaría una reacción mayoritaria de los grupos α -amina debido a su pK_a (6-8). A partir de valores de pH mayores pueden también reaccionar otros residuos como cisteína o lisina. Con la intención de determinar las condiciones óptimas de reacción que permitieran una elevada conversión minimizando la formación de productos secundarios, se llevó a cabo un estudio de reactividad de la insulina a diferentes valores de pH (5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5).

		Modificaciones				
		Insulina	(x1)	(x2)	(x3)	(x1) + entrecruz.
		Masa calculada para $[M+5H]^{5+}$				
		1162.33	1192.74	1223.35	1253.76	1208.94
pH	Conv.	Ratio				
5.5	44%	1	1	-	-	-
6.5	>99%	-	1.6	1	-	-
7.5	>99%	-	-	8	4	1
8.5	>99%	-	-	-	2.5	1
9.5	>99%	-	-	-	1.9	1

Tabla 11. Resultados del estudio de modificación de la proteína insulina tratada con dibutil escuarato a diferentes condiciones de pH. Análisis realizado por EM.

En la **tabla 11** se observan los resultados obtenidos. Como ya se ha indicado anteriormente, la insulina contiene dos grupos α -amino, un residuo de lisina, dos histidinas y seis cisteínas que en su forma oxidada no se encuentran disponibles. Los resultados se analizaron por EM, analizando en cada espectro el ion correspondiente a la m/z $[M+5H]^{5+}$ calculada para cada una de las posibles modificaciones. La intensidad del pico depende de la concentración de la especie en la mezcla. Este método de cuantificación ha sido previamente utilizado y se basa en la observación de que la ionización en proteínas depende de la superficie externa de la proteína y no se ve influenciada por pequeñas modificaciones como las estudiadas aquí.¹⁹⁶ Teniendo en cuenta esta información, se calcularon los porcentajes de conversión en base a la intensidad relativa de los picos detectados. El análisis de los resultados muestra que mientras a pH 5.5 aún se puede observar la presencia de la proteína sin modificar, a pH 6.5, después de 3 h a temperatura ambiente, desaparece la proteína nativa y se detectan especies mono y doblemente modificadas. A pH 7.5, se empiezan a detectar especies que contienen tres unidades de escuarato así como una nueva especie que correspondería a la presencia de un escuarato y otro que habría dado lugar al entrecruzamiento de la proteína mediante el ataque de dos grupos nucleófilos diferentes.

A pH más elevados solo se detectan estas dos poblaciones en diferentes proporciones. Estos resultados confirmaron que el pH óptimo de la reacción con insulina para favorecer la modificación del grupo α -amino era de 6.5.

Posteriormente, para confirmar el sitio de modificación, las reacciones anteriores fueron sometidas a digestión con endoproteínasa Glu-C. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente **tabla 12** y muestran la cantidad relativa de péptido no modificado en relación al modificado en cada reacción realizada a un valor de pH diferente.

Péptidos	Masa calcd. [M+H] ⁺ /[M+2H] ²⁺	Ratio péptido no modificado vs péptido modificado				
		pH				
		5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
GIVE	417.23	9.3	3	0.06	-	-
(X)GIVE	569.28	1	1	1	1	1
RGFFYTPKT	1116.58	1	1	-	-	-
(X)RGFFYTPKT	1268.63	-	-	-	-	-
ALYLVCGE NYCN	1377.58	1	1	1	1	1
(X)ALYLVCGE NYCN	1529.63	-	-	-	0.04	-
FVNQHLCGSHLVE QCCTSICSLYQLE	1041.12	-	-	-	-	-
(X)FVNQHLCGSHLVE QCCTSICSLYQLE	1041.12	-	-	-	-	-

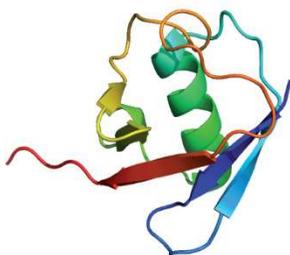
Tabla 12. Resultados de la digestión empleando endoproteínasa Glu-C de la insulina tratada con dibutil escuarato a diferentes pH y el posterior análisis de los fragmentos peptídicos resultantes mediante EM. La modificación con dibutil escuarato se indica como **(X)**.

El análisis de estos resultados corrobora los resultados obtenidos en la digestión proteica del apartado (2.1.2) en donde se observa la modificación de la proteína en la cadena A, a través del tetrapéptido GIVE. El porcentaje de modificación aumenta significativamente con el pH y a partir de pH 7.5 ya casi solo se detecta péptido modificado. En este caso no es posible detectar la modificación del péptido N-terminal de la cadena B. Al realizar la digestión con la insulina oxidada, los péptidos resultantes son fragmentos de gran tamaño y complejidad por la presencia de diferentes puentes disulfuro. Así pues, el extremo N-terminal de la cadena B FVNQHLCGSHLVE se encuentra unido a un fragmento de la cadena A QCCTSICSLYQLE, dificultando su identificación. En cambio, sí que es posible detectar el fragmento de la cadena A (NYCN) unido a la cadena B (ALYLVCGE) aunque

no se observa ninguna modificación. No se observa tampoco modificación del péptido RGFFYTPKT, aunque a pH 7.5 deja de detectarse el péptido no modificado, lo que podría sugerir una posible modificación del residuo de lisina (K) resultando en un péptido de difícil identificación por EM. Los resultados de los estudios realizados hasta el momento indican que el método optimizado es capaz de modificar de manera selectiva el extremo N-terminal de proteínas mediante la incubación durante 3 h con 20 eq. de dibutil escuarato a temperatura ambiente y en disolución acuosa. Estas condiciones suponen una ventaja sobre los métodos previamente descritos que requieren tiempos más largos de reacción. Por ejemplo la modificación mediante aminación reductora descrita por el grupo de H.C. Chou requiere entre 6-48 h de reacción.¹³⁴

2.1.5- Modificación de la ubiquitina con dibutil escuarato

Una vez puesto a punto el método y teniendo en cuenta las limitaciones de la insulina (una proteína de pequeño tamaño, con dos cadenas unidas por puentes disulfuro y con un solo residuo de lisina) se decidió explorar la aplicabilidad del método utilizando otras proteínas. En primer lugar, se empleó la ubiquitina (*Bos taurus*) formada por 76 aminoácidos y que contiene una metionina N-terminal y 7 lisinas internas potencialmente reactivas.



MQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKGIQEKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDG
RTLSDYNIQKESTLHLVLRGG

Figura 52. Estructura y secuencia de aminoácidos de la ubiquitina de *Bos taurus*.

Con la finalidad de estudiar la reactividad de los residuos de lisina, se exploraron diferentes condiciones de reacción (pH 5.5-6.5 y 10 o 20 eq. de dibutil escuarato).

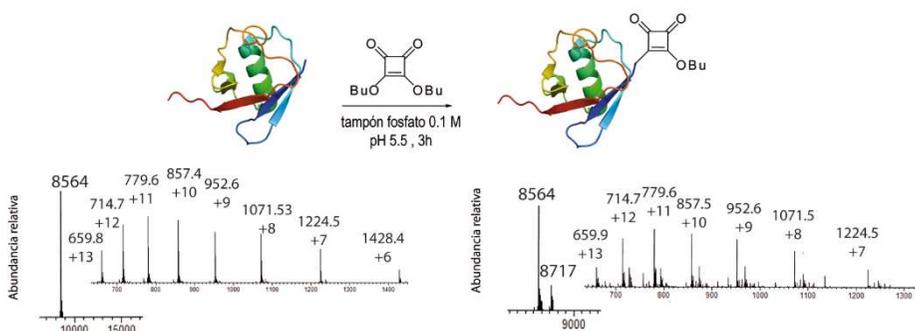


Figura 53. Intensidades relativas de los picos (m/z) detectadas y analizadas con el software MagTran. Las especies obtenidas tras la reacción de 10 eq. de dibutil escuarato a la ubiquitina y a pH 5.5, presentan los siguientes iones moleculares: 8564, que corresponde a la proteína sin reaccionar (calcd. para $C_{378}H_{629}N_{105}O_{118}S [M+H]^+$ = 8565.64) y 8717 que corresponde a la incorporación de una unidad de dibutil escuarato en la proteína (calcd. para $C_{386}H_{636}N_{105}O_{121}S [M+H]^+$ = 8715.68).

Analizando los resultados, se observó mayoritariamente una única modificación con una unidad de dibutil escuarato (Figura 53), sin embargo, utilizando 20 eq. ya se empezaba a detectar una proteína doblemente modificada (Tabla 13). Conforme aumenta el pH de la reacción (pH=6) y utilizando el mismo número de eq. en reacciones independientes (10 y 20) se observa que aumenta la proporción de la segunda incorporación de dibutil escuarato. Igualmente elevando el pH del medio de reacción a 6.5 y utilizando 20 eq. de dibutil escuarato se observa un incremento de la segunda incorporación. Los porcentajes de modificación se determinaron en base a la intensidad relativa de los picos. Al igual que ocurre con la insulina, la ionización de la ubiquitina depende de la superficie total y no se ve influenciada por pequeñas modificaciones que se produzcan en la proteína, lo que permite calcular el porcentaje de especies según la intensidad relativa de sus picos.

		Modificaciones		
		(x1)	(x2)	
		Masa calculada [M+H] ⁺		
		8565.64	8715.68	8897.68
pH	eq.	*	Conversión (%)	
5.5	10	75	25	0
5.5	20	61	28	11
6	10	59	34	7
6	20	45	33	22
6.5	20	40	37	23

Tabla 13. Resultados del estudio de modificación de la ubiquitina tratada con diferente número de eq. de dibutil escuarato y a diferentes pH. Cuantificación de la proteína modificada a partir de las intensidades relativas de cada pico tras realizar la deconvolución del espectro sin procesar. Ubiquitina [M+H]⁺ = 8565.64 calcd. para C₃₇₈H₆₂₉N₁₀₅O₁₁₈S, ubiquitina modificada con una unidad de dibutil escuarato [M+H]⁺ = 8715.68, calcd. para C₃₈₆H₆₃₆N₁₀₅O₁₂₁S y ubiquitina doblemente modificada [M+H]⁺ = 8897.68 calcd. para C₃₉₄H₆₄₃N₁₀₅O₁₂₄S₂. (*: % de proteína nativa no modificada).

Con el objetivo de averiguar con qué residuos nucleófilos reacciona el dibutil escuarato, se procedió a digerir la proteína marcada con 20 eq. de dibutil escuarato a pH 5.5 mediante tratamiento con la endoproteinasa Glu-C. Se identificaron casi todos los fragmentos peptídicos esperados con una cobertura de la secuencia del 86% (66 aminoácidos identificados de 76 aminoácidos totales). En la figura 52 se muestra en negrita el péptido no identificado: **NVKGKIQEK**.

Reacción	Fragmentos esperados	Fórmula Molecular	Masa calculada [M+H] ⁺ / [M+2H] ²⁺	Masa encontrada [M+H] ⁺ / * [M+2H] ²⁺
Ubiquitina + endoGlu-C	MQIFVKTLTGKTTITLE	C ₈₃ H ₁₄₃ N ₁₉ O ₂₄ S ₁	912.52	912.51
	VEPSDTIE	C ₃₇ H ₆₀ N ₈ O ₁₇	889.41	889.41
	GIPPDQQLIFAGKQLE	C ₈₆ H ₁₄₀ N ₂₄ O ₂₅	955.52	955.52
	DGRTLSDYNIQKE	C ₆₄ H ₁₀₃ N ₁₉ O ₂₅	769.87	769.86
	STLHLVLRIRGG	C ₅₈ H ₁₀₄ N ₂₀ O ₁₅	661.40	661.40
Ubiquitina dibutil escuarato + endoGlu-C	(X)MQIFVKTLTGKTTITLE	C ₉₁ H ₁₅₁ N ₁₉ O ₂₄ S ₁	988.04	988.03
	(X)VEPSDTIE	C ₄₅ H ₆₈ N ₈ O ₂₀	1041.46	-
	(X)GIPPDQQLIFAGKQLE	C ₉₄ H ₁₄₈ N ₂₄ O ₂₈	1031.55	1031.55
	(X)DGRTLSDYNIQKE	C ₇₂ H ₁₁₁ N ₁₉ O ₂₈	845.90	-
	(X)STLHLVLRIRGG	C ₆₆ H ₁₁₂ N ₂₀ O ₁₈	737.43	-

Tabla 14. Resultados de la digestión de la ubiquitina con endoproteinasa Glu-C y el posterior análisis de los fragmentos peptídicos resultantes mediante EM. La modificación con dibutil escuarato se indica como (X).

Una vez identificados los fragmentos peptídicos de la ubiquitina nativa y modificada tras la digestión con la Glu-C, se procedió a la digestión proteica de reacciones llevadas a cabo a diferentes valores de pH (5.5, 6, 6.5) con 20 eq. de dibutil escuarato.

Péptidos	pH		
	5.5	6	6.5
	Porcentaje de péptidos modificados vs no modificados		
(X)/MQIFVKTLTGKTTITLE	43	52	65
(X)/VEPSDTIE	-	-	-
(X)/GIPPDQQLIFAGKQLE	6	14	20
(X)/DGRTLSDYNIQKE	-	-	-
(X)STLHLVLRGG	-	-	-

Tabla 15. Abundancia relativa (%) de los péptidos modificados en relación a los no modificados identificados tras la digestión con endoproteínasa Glu-C de la ubiquitina previamente tratada con 20 eq. de dibutil escuarato en las condiciones mostradas.

El porcentaje relativo de modificación se obtuvo comparando la intensidad (áreas) de los péptidos modificados en relación a la cantidad identificada de péptidos no modificados. El análisis de los resultados obtenidos indica que aproximadamente el 43% del péptido N-terminal (MQIFVKTLTGKTTITLE) se encuentra modificado a pH 5.5. Este porcentaje aumenta hasta 52% (pH 6) y 65% (pH 6.5). Aunque existen otros dos fragmentos que contienen residuos de lisina, GIPPDQQLIFAGKQLE y DGRTLSDYNIQKE, solo se detecta modificación del primero en una pequeña proporción que aumenta al incrementar el pH de la reacción. Hay que tener en cuenta que esta cuantificación relativa no es muy exacta ya que el efecto de la modificación en péptidos de pequeño tamaño es mayor que en proteínas, especialmente si se produce cambios en grupos ionizables, pero permite tener una idea de que péptidos se modifican de manera preferente, confirmando así cierta selectividad por el extremo N-terminal. Es remarcable que, a diferencia de los estudios previos con la insulina, en este caso fue necesario trabajar a valores de pH 5.5 para conseguir una mayor selectividad. En este punto, cabe destacar que según análisis recientes hechos por RMN, la metionina presente en el extremo N-terminal de la ubiquitina tiene un pK_a de 9.14, uno de los valores pK_a más altos descritos para este grupo α -amino. Esto podría explicar la baja selectividad observada a pH 6.5 debido a la competición de los grupos ϵ -amino de determinadas cadenas laterales de lisina.¹⁹⁷ Para confirmar el sitio de identificación tanto en el péptido GIPPDQQLIFAGKQLE como en el péptido N-

terminal (MQIFVKTLTGKTTLE), que contiene aparte de la α -amina, dos lisinas potencialmente reactivas, se realizarán en un futuro estudios de MS/MS sobre ubiquitina tratada y digerida con endoproteinasa Glu-C utilizando tanto 10 como 20 eq. de reactivo. Es de esperar que estos análisis MS/MS permitan identificar el sitio exacto de modificación en cada péptido.

2.1.6.- Modificación de proteínas en dos etapas

Las proteínas pueden ser modificadas con azúcares, lípidos, polímeros sintéticos o fluoróforos con la intención de mejorar sus propiedades, añadir propiedades extras o facilitar el estudio de su función e interacciones con otras biomoléculas. Al observar que la modificación de la insulina y la ubiquitina tenía lugar preferentemente a través del extremo N-terminal de la proteína, se consideró que la proteína modificada podría servir para una posible incorporación en un segundo paso de fluoróforos o sondas a través de condiciones suaves de reacción en disolución acuosa. Esta aproximación presentaría una serie de ventajas. Tanto el primer como el segundo paso de modificación se llevaría a cabo utilizando reactivos comerciales, por lo que se evita la síntesis previa de derivados de ácido escuárico. Debido a la baja reactividad de la mono-escuaramida en comparación con el diéster de partida, esta segunda reacción precisa de condiciones más básicas (pH 8-9).¹⁵⁵ Al modular el pH en cada paso se puede también modular la reactividad de los diversos grupos nucleófilos, aumentando así la selectividad de la reacción. Asimismo, las condiciones de conjugación en ambos pasos son biocompatibles, puesto que se llevan a cabo en medio acuoso y a temperatura ambiente. Esta metodología presenta también la versatilidad de permitir preparar varios derivados a partir de una misma proteína modificada.

Como una primera aproximación, se llevó a cabo la modificación de la insulina en una disolución acuosa tamponada a pH 6.5, incubándola con 20 eq. de dibutil escuarato durante 3 h. Como el segundo paso de reacción requiere de condiciones más drásticas, se realizó un intercambio de disolución tampón, pasando de un pH 6.5 a pH 8, utilizando filtros de centrifugación Amicon® con un peso molecular de corte (molecular weight cut off, MWCO) de 5 KDa. Una vez concentrada y diluida en la nueva disolución tampón, la proteína convenientemente modificada se trató durante 16 h con 100 eq. de diferentes aminas comerciales incluyendo la fluoresceinamina, galactosamina, bencilamina y 1-hexadecilamina.

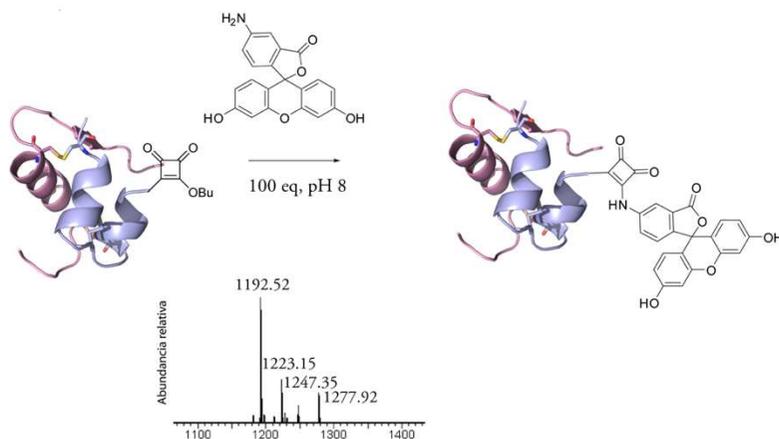


Figura 54. Modificación de la proteína en dos etapas. La insulina modificada con dibutil escuarato reacciona en un segundo paso con fluoresceinamina. Debido a la presencia de mezclas complejas de picos el algoritmo de MagTran no pudo en este caso realizar la deconvolución del espectro, por lo que se muestra el espectro de la reacción indicando los iones moleculares $[M+5H]^{5+}$ de la insulina modificada con una (1192.52) o dos (1223.15) unidades de dibutil escuarato y la insulina posteriormente modificada con una (1247.35) o dos (1277.92) unidades de fluoresceína.

Los porcentajes de conversión se determinaron en base a la intensidad relativa de los picos. Así pues, mientras se pudo observar la reacción completa con hexadecilamina, en el caso de la bencilamina se obtuvo un 50% de conversión, que se redujo a 21% e inferior al 5% para la fluoresceinamina y la galactosamina respectivamente (Sección Experimental). Ensayos control realizados en ausencia de dibutil escuarato, demostraron que la reacción únicamente tiene lugar si la proteína ha sido previamente modificada mediante dibutil escuarato.

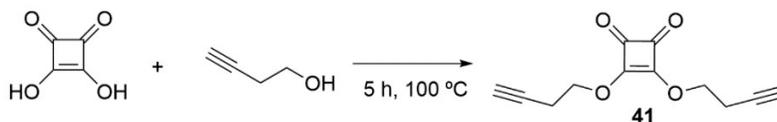
2.2.- Modificación de proteínas con di-3-butino escuarato (41)

Los estudios previos realizados indican que es posible modificar de manera selectiva y rápida una proteína tratándola con dialquil escuaratos a temperatura ambiente y pH 6.5. Además, en un segundo paso de reacción se puede tratar esta proteína modificada con nucleófilos para conseguir el marcaje de proteínas con fluoróforos o sondas. Tal y como se ha visto, este segundo paso requiere de tiempos largos de reacción y proporciona en algunos casos bajos porcentajes de conversión. Debido a estas razones se planteó el uso de un dialquil escuarato funcionalizado con grupos alquinos que debido a su estructura permitiría el segundo paso de bioconjugación a través de una cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen, una reacción de tipo click que destaca por su eficiencia, simplicidad y

selectividad.^{74,198} Desde su descubrimiento, la reacción de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC) se ha utilizado en una gran variedad de campos, desde la síntesis de moléculas y quimiotecas, la modificación e inmovilización de proteínas, la inmovilización de biomoléculas en superficies, etc. La rapidez, la selectividad y eficiencia de esta reacción la convierten en una candidata perfecta para la conjugación de biomoléculas. Esta estrategia permitiría superar las limitaciones provocadas por la reducida reactividad de mono-escuaramidas.

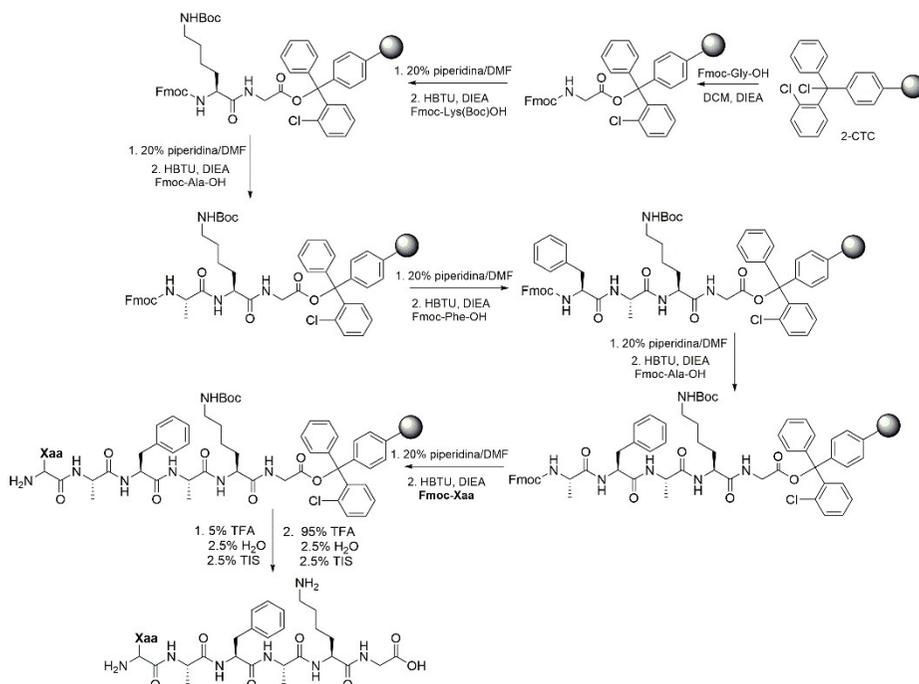
2.2.1.- Optimización de la reacción con péptidos

En un primer momento se intentó preparar el di-3-butino escuarato (**41**) a partir del dibutil escuarato utilizando alcohol propargílico como disolvente, pero tras algunos intentos infructuosos el compuesto **41** se sintetizó a partir del ácido escuárico y el alcohol propargílico mediante condensación a reflujo durante 5 h, obteniéndose el compuesto deseado con un 83% de rendimiento (Esquema 20).



Esquema 20. Síntesis de **41**.

Una vez sintetizado el compuesto **41**, se estudió su reactividad con diferentes péptidos. La identidad del aminoácido presente en el extremo N-terminal puede tener un papel en la eficiencia del método estudiado. Es por ello que para investigar la aplicabilidad de esta aproximación, se sintetizó una librería de diez péptidos que presentaban diferentes aminoácidos en la posición amino terminal y de estructura general H₂N-**Xaa**AFKGG-COOH, donde **Xaa** puede corresponder a Tyr, Lys, Asp, Arg, Ser, Met, Pro, Ala, Gly o Val (Esquema 21). Además, estos péptidos presentaban un residuo de lisina para estudiar la competición entre la α -amina del extremo N-terminal y la ϵ -amina de la cadena lateral de la lisina y un residuo de fenilalanina para facilitar su digestión con quimotripsina. Los péptidos fueron sintetizados en fase sólida utilizando una resina de tipo 2-clorotritilo y condiciones estándares de síntesis de péptidos. El tratamiento de la resina con bajas concentraciones de TFA liberó los péptidos sintetizados que se obtuvieron con excelentes rendimientos y elevada pureza tras purificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en modo preparativo.



Esquema 21. Síntesis en fase sólida de los péptidos H₂N- **Xaa**/AFAFKG-COOH utilizados para el estudio de la reactividad de **41** siendo **Xaa** (Tyr, Lys, Asp, Arg, Ser, Met, Pro, Ala, Gly o Val).

Cada uno de los péptidos sintetizados se disolvieron en una disolución tampón (1 mM) a pH =6.5 y se le añadieron 2 eq. de di-3-butino escuarato **41** (2 mM). La desaparición del péptido de partida y la formación de una única especie, correspondiente al péptido modificado, se analizó mediante HPLC tomando alícuotas de la reacción a intervalos de 30 min durante 4 h. (Figura 55).

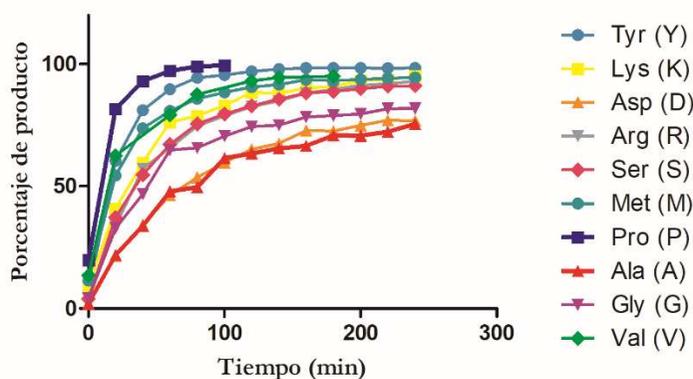


Figura 55. Cinéticas de las reacciones de los péptidos H₂N- XaaAFAKG-COOH con el compuesto **41**. Las reacciones se llevaron a cabo a una concentración final de 1 mM de péptido y 2 mM de **41** a pH 6.5 y fueron analizadas por LC-MS.

Secuencia	Conversión(%) ^a	Selectividad ^b
YAFAKG	97.1	>99:1
KAFAKG	88.45	>99:1
DAFAKG	65.18	>99:1
RAFAKG	82.61	>99:1
SAFAKG	82.9	>99:1
MAFAKG	90.68	>99:1
PAFAKG	100	>99:1
AAFAKG	63.44	N. C.
GAFAKG	74.45	>99:1
VAFAKG	93.16	N. C.

Tabla 16. ^a Tanto por ciento de conversión a los 120 min de reacción. ^b Selectividad calculada a partir de análisis MS/MS. N. C. No cuantificable.

En este estudio se observó que **41** reaccionaba más rápidamente con la secuencia peptídica que contenía el aminoácido terminal prolina. Concretamente, a los 40 min se observaba una formación de producto superior al 90%. Los otros aminoácidos más reactivos fueron tirosina (~98%) y metionina (~80%). Se desconoce la razón de la rápida modificación del péptido observado cuando el residuo N-terminal es Pro. *A priori* la Pro presenta una amina secundaria y el pK_a más elevado de todos los aminoácidos estudiados (10.47) por lo que si acaso se hubiera esperado un efecto contrario. Una elevada reactividad de péptidos que contienen Pro en el extremo N-terminal también fue observada por Francis y colaboradores al utilizar un acoplamiento oxidativo de *o*-aminofenoles catalizado por

ferrocianuro potásico para la modificación de proteínas, pero los autores no explican la razón de este aumento de la reactividad. Serán necesarios estudios adicionales con amino ácidos para determinar la razón de esta elevada cinética de reacción.¹⁴⁷

La metionina posee especial importancia puesto que las proteínas expresadas en procariotas contienen siempre un residuo de metionina en el extremo N-terminal. Aunque en algunos casos este residuo puede ser posteriormente eliminado por la metionina aminopeptidasa (esta enzima actúa de manera general si el segundo aminoácido es de tamaño pequeño (Gly, Ala, Ser, Cys, Pro, Val)). Met es un amino ácido muy frecuente en la posición N-terminal, lo que amplía la aplicabilidad del método. Los péptidos que reaccionan más lentamente presentan residuos de alanina y ácido aspártico y a los 30 min de reacción presentan aproximadamente un porcentaje de formación de producto de alrededor de 34% en ambos casos. A pesar de ello, al cabo de 120 min de reacción con sólo 2 eq. de **41**, todos los péptidos estudiados presentan conversiones superiores al 75% (Tabla 16).

Una vez determinada la cinética de reacción para cada péptido se analizaron los péptidos modificados mediante estudios de MS/MS para determinar la selectividad N-terminal vs el grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina (Figura 56 y tabla 16).

Hay tres tipos diferentes de enlaces en un péptido, los que se encuentran entre CH-CO, CO-NH y NH-CH. Al romperse cada uno de estos enlaces se producen dos fragmentos, por lo que existen 6 tipos de fragmentos diferentes: los fragmentos N-terminales **a**, **b**, y **c** y los fragmentos C-terminales **x**, **y** y **z** (Figura 56). Los fragmentos más frecuentes son los derivados de los enlaces CO-NH, por lo que los fragmentos de tipo **b** y **y** son generalmente los más predominantes. Los estudios MS/MS de los péptidos modificados por MALDI-TOF/MS permitieron detectar de manera muy clara algunos de los fragmentos **b**, **y** y **a** correspondientes al péptido modificado en el extremo N-terminal, mientras que no se observó ningún fragmento que pudiera derivar del péptido modificado en la lisina interna. Así pues, se observó en la mayoría de los casos una selectividad completa para el grupo α -amina del extremo N-terminal, sin detectarse trazas de modificación en el residuo de lisina. Solo para los péptidos con residuos de Ala o Val en el extremo N-terminal se detectaron trazas del fragmento **y4** del péptido modificado en el residuo de Lys (Sección Experimental, Figura 83). Una cuantificación exacta de las dos poblaciones no es posible en estos momentos debido a la diferente ionización de cada fragmento. En el futuro se realizarán estudios de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

(LC-MS/MS) que permitan separar y analizar los dos péptidos por separado y por lo tanto establecer la selectividad N-terminal *vs* lisina en los péptidos que presentan trazas de fragmentos correspondientes a la modificación en el residuo de Lys.

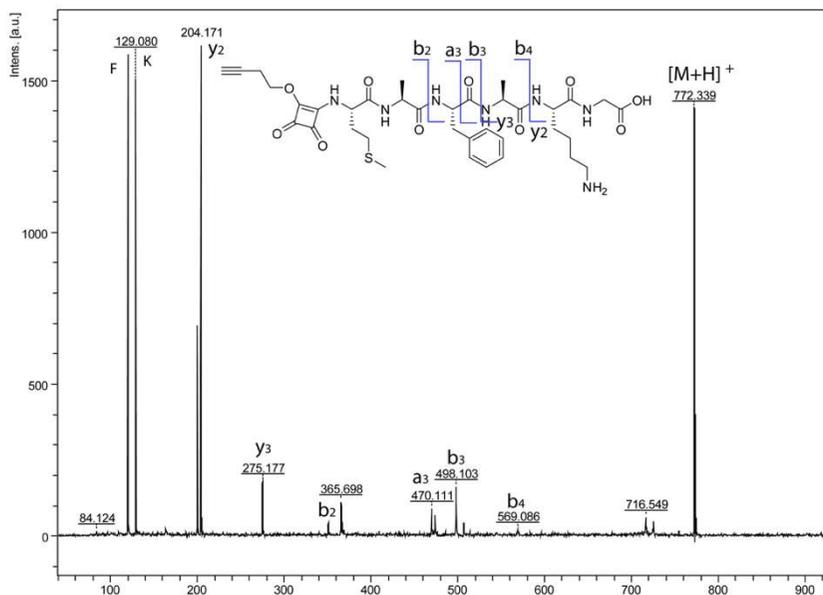
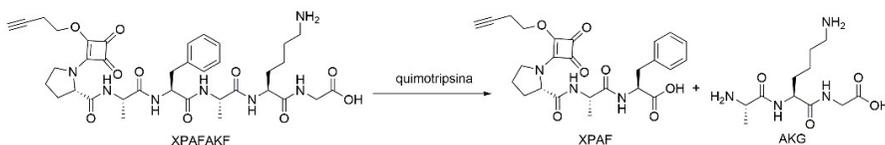


Figura 56. Ejemplo representativo del análisis MS/MS realizado tras el tratamiento del péptido MAFKAG con **41**. Los espectros de los análisis MS/MS realizados con los otros péptidos se encuentran en el apartado de Sección Experimental. El espectro muestra el péptido antes de la fragmentación (parent peptide, $[M+H]^+$), los fragmentos de tipo **a** y **b**, generados a partir del extremo N-terminal y los fragmentos de tipo **y**, generados a partir del extremo C-terminal.

Además, el péptido modificado PAFKAG fue posteriormente digerido con quimotripsina dando lugar a dos fragmentos PAF y AKG. En el análisis de la muestra digerida por EM se pudo detectar el péptido XPAF modificado y el péptido AKG sin modificar, sin detectar en ningún caso trazas del péptido AKG modificado con **41** (Sección Experimental).



Esquema 22. Digestión del péptido modificado PAFKAG con quimotripsina.

Estos estudios indican que es posible la modificación de péptidos con **41** con buenos rendimientos (Tabla 16) y una excelente selectividad N-terminal.

2.2.2.- Funcionalización de proteínas con di-3-butino escuarato (41)

Con la finalidad de demostrar la aplicabilidad del compuesto **41** en la modificación de proteínas, el siguiente paso fue examinar su reactividad con diferentes proteínas. En primer lugar se escogió como modelo sencillo de reacción la insulina. Para ello, se incubó esta proteína (0.12 mM) con 5 eq. de **41** en una disolución tampón de fosfato 0.1 M a pH 6.5 durante 3 h. Pasado este tiempo, se analizó la muestra por EM, observándose la desaparición de la proteína de partida y la aparición de un producto mayoritario correspondiente a la insulina conjugada con una o dos unidades de **41** (Figura 57).

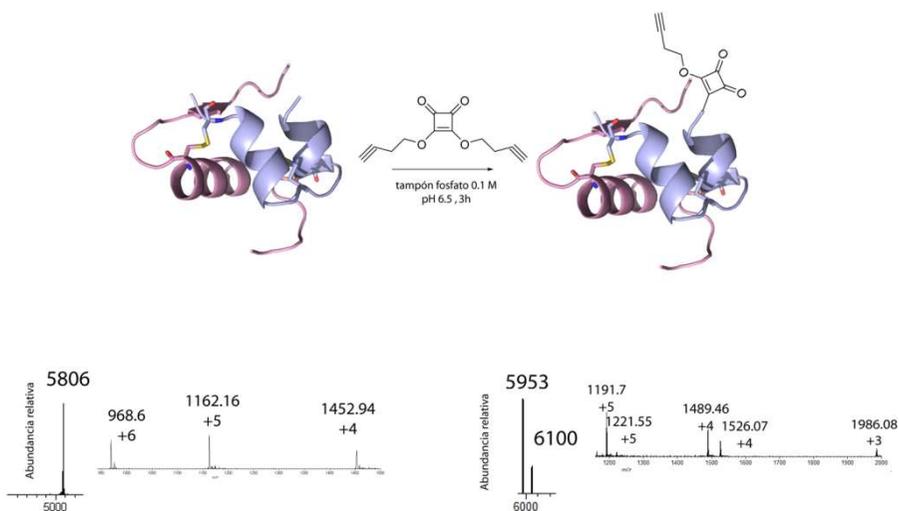


Figura 57. Reacción de modificación de la insulina con 5 eq. de **41** a pH 6.5. El espectro muestra los correspondientes iones moleculares $[M+H]^+ = 5953$, (calcd. para $C_{265}H_{387}N_{65}O_{80}S_6$, $[M+H]^+ = 5953.66$) y $[M+H]^+ = 6100$ (calcd. para $C_{273}H_{392}N_{65}O_{83}S_6$, $[M+H]^+ = 6102.69$) correspondientes a la incorporación de una y dos unidades de **41**, respectivamente. Los espectros originales antes de su deconvolución pueden verse insertados.

Una vez obtenida la insulina conjugada a **41**, se pasó a estudiar si los grupos funcionales bioortogonales introducidos podían ser modificados con otras moléculas. Así pues, tras eliminar el exceso de **41** mediante centrifugación en un filtro de exclusión molecular (MWCO 5 KDa), la proteína resultante se trató con dos azidas funcionalizadas, una que presenta un linker de tipo PEG y otra unida a un fluoróforo.

La incorporación de grupos PEG, también conocida como PEGilación, le confiere a la proteína ciertas propiedades de interés, puesto que este polímero ha sido aprobado por la FDA (del inglés “Food and Drug Administration”), no es tóxico, ni inmunogénico y es altamente soluble en agua. Los conjugados PEG-proteína presentan varias ventajas como

son la residencia prolongada en el cuerpo, una degradación reducida por las enzimas metabólicas y una reducción o eliminación de la inmunogenicidad de la proteína, facilitando el uso de péptidos y proteínas como agentes terapéuticos.¹⁸³ Para conseguir la PEGilación de la insulina, se trató la proteína modificada con el ácido 15-Azido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (PEG-2) en una disolución tamponada a pH 6.5. La reacción se llevó a cabo en presencia de 20 eq. de la azida correspondiente, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y el ligando THPTA con la finalidad de mantener al Cu (I) en su estado de oxidación (I). Como agente reductor se utilizó el ácido ascórbico. Después de una 1 h de reacción, se analizaron los resultados por EM, observando la completa PEGilación de la insulina de partida obteniendo las especies con iones moleculares 6244.9 y 6683.4, las cuales corresponden a la insulina modificada con una y dos unidades PEG-2 (Figura 58).

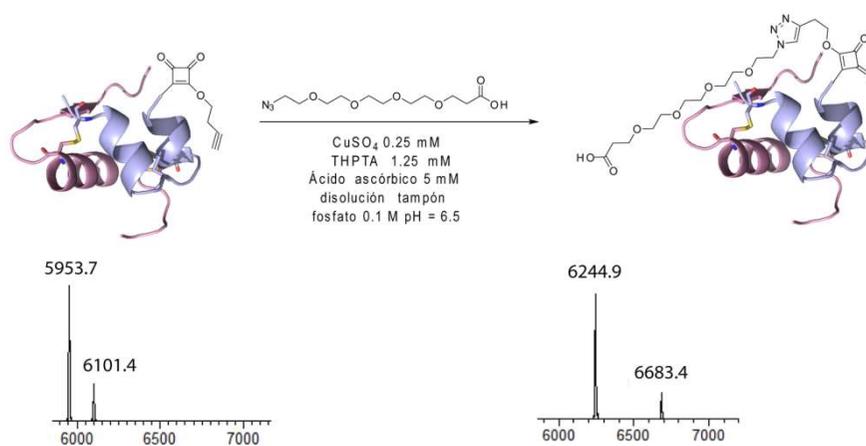


Figura 58. Cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por cobre (CuAAC) entre un alquino terminal presente en la insulina modificada con **41** y la azida presente en el ácido 15-Azido-4, 7, 10, 13-tetraoxapentadecanoico. Las especies observadas antes de la modificación corresponden a la insulina modificada con una (5953.7) o dos (6101.4) unidades de **41** (calcd. para $\text{C}_{265}\text{H}_{387}\text{N}_{65}\text{O}_{80}\text{S}_6$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 5953.66$) y calcd. para $\text{C}_{273}\text{H}_{392}\text{N}_{65}\text{O}_{83}\text{S}_6$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 6102.69$). Después de la reacción click se observa la formación de dos productos que presentan los iones moleculares correspondientes a la presencia de uno (6244.9) o dos (6683.4) PEG-2 (calcd. para $\text{C}_{276}\text{H}_{408}\text{N}_{68}\text{O}_{86}\text{S}_6$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 6247.81$ y calcd. para $\text{C}_{295}\text{H}_{433}\text{N}_{71}\text{O}_{95}\text{S}_6$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 6686.97$) unidades de PEG- N_3 .

El marcaje de proteínas con sondas fluorescentes permite el estudio de su actividad e interacciones con otras proteínas. Así pues, en un siguiente paso se estudió la bioconjugación de la insulina con una cianina funcionalizada con un grupo azida ($\text{Cy}3\text{-N}_3$), fluoróforo que emite a 566 nm y es soluble en agua. La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones anteriormente descritas y en presencia de 20 eq. de $\text{Cy}3\text{-N}_3$. Tras 1 h de reacción, se analizaron los resultados por EM y se observó la modificación de

escurato con el fluoróforo, observándose la existencia de dos poblaciones, una mono-modificada y otra doblemente modificada (Figura 59).

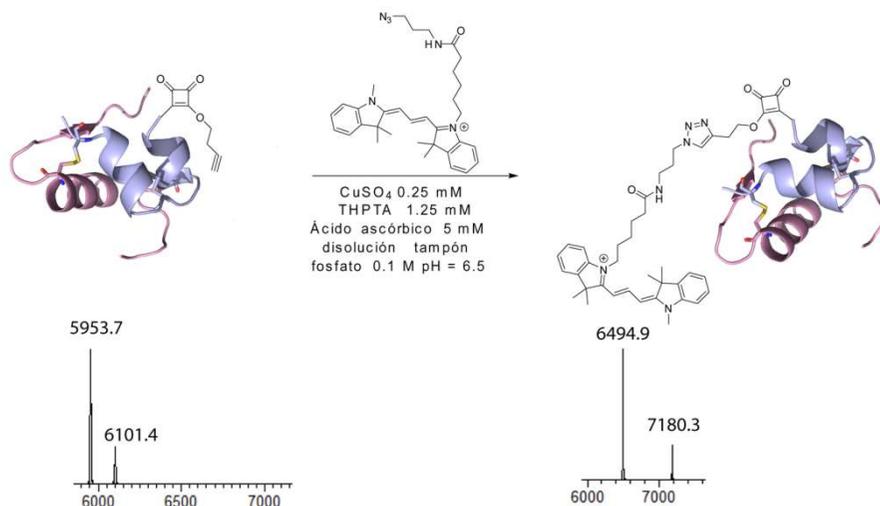


Figura 59. Cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por cobre (CuAAC) entre un alquino terminal presente en la insulina modificada con **41** y la azida presente en Cy3-N₃. Las especies observadas antes de la modificación corresponden a la insulina conjugada con una (5953.7) o dos (6101.4) unidades de **41** (calcd. para C₂₆₅H₃₈₇N₆₅O₈₀S₆, [M+H]⁺ = 5953.66) y calcd. para C₂₇₃H₃₉₂N₆₅O₈₃S₆, [M+H]⁺ = 6102.69). Después de la reacción click se observa la formación de dos productos que presentan los iones moleculares correspondientes a la presencia de una (6294.9) o dos (7180.3) unidades de Cy3-N₃ (calcd. para C₂₉₈H₄₃₀N₇₁O₈₁S₆, [M+H]⁺ = 6296.02) calcd. para C₃₃₉H₄₇₈N₇₇O₈₅S₆, [M+H]⁺ = 7184.39).

En un siguiente ejemplo, se exploró también la modificación de la ubiquitina con **41**. Con este fin, la proteína fue tratada con 5 eq. de **41** durante 140 min en una disolución tampón de fosfato 0.1 M a pH=6.5. El posterior análisis mediante EM indicó la presencia de ubiquitina nativa 8562.1 así como una nueva especie correspondiente a la adición de una unidad de **41** (8709.6) con una conversión del 28% (Figura 60). Tiempos más largos de reacción (200 min) resultó en la aparición de especies derivadas de la doble adición sin desaparecer en ningún caso la proteína de partida observándose un 30% de conversión para la mono-modificación y un 3% para la doble modificación (Sección Experimental, Figura 84). Por este motivo, se escogieron como condiciones óptimas de reacción el uso de 5 eq. de di-3-butino escurato a pH 6.5 y 140 min de reacción consiguiendo así la formación de una única especie modificada.

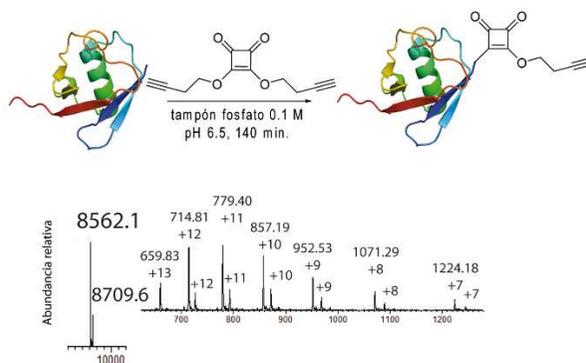


Figura 60. Modificación de la ubiquitina con 5 eq. de **41** a pH 6.5 y a 140 min. Los iones moleculares obtenidos tras la deconvolución del espectro de masas corresponden a $[M+H]^+ = 8562.1$, (calcd. para $C_{378}H_{629}N_{105}O_{118}S$, $[M+H]^+ = 8565.64$) y $[M+H]^+ = 8709.6$, (calcd. para $C_{386}H_{633}N_{105}O_{121}S$, $[M+H]^+ = 8711.65$) que corresponden a la proteína nativa y a la modificada con una unidad **41**. Los espectros originales antes de la deconvolución pueden verse insertados. Pequeñas diferencias en el ion molecular obtenido se producen debido al uso de diferentes equipos.

La proteína marcada se utilizó posteriormente para la bioconjugación con diferentes moléculas. Así pues, se trató la proteína con 20 eq. de (PEG-2) en una disolución tampón de fosfato 0.1 M a pH 6.5 en presencia de $CuSO_4 \cdot H_2O$, THPTA y ácido ascórbico. Tras 1 h de reacción a temperatura ambiente, mediante EM se observó la completa PEGilación de la proteína modificada (Figura 61). De manera similar, el tratamiento de la ubiquitina modificada con $Cy3-N_3$ permitió obtener una ubiquitina marcada con este fluoróforo (Figura 62).

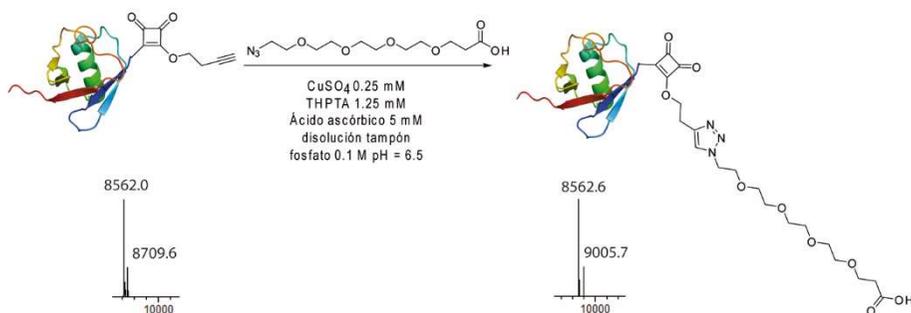


Figura 61. Cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por cobre (CuAAC) entre un alquino terminal presente en la ubiquitina modificada con **41** y la azida presente en PEG-2. Las especies previas a la modificación corresponden a la ubiquitina nativa y a la conjugada con **41**. Después de la reacción click se observan dos productos que presentan los iones moleculares correspondientes a la ubiquitina no modificada y a la conjugada con una unidad PEG-2, 8562.6 y 9005.7 (calcd. para $C_{397}H_{654}N_{108}O_{127}S$, $[M+H]^+ = 9004.80$).

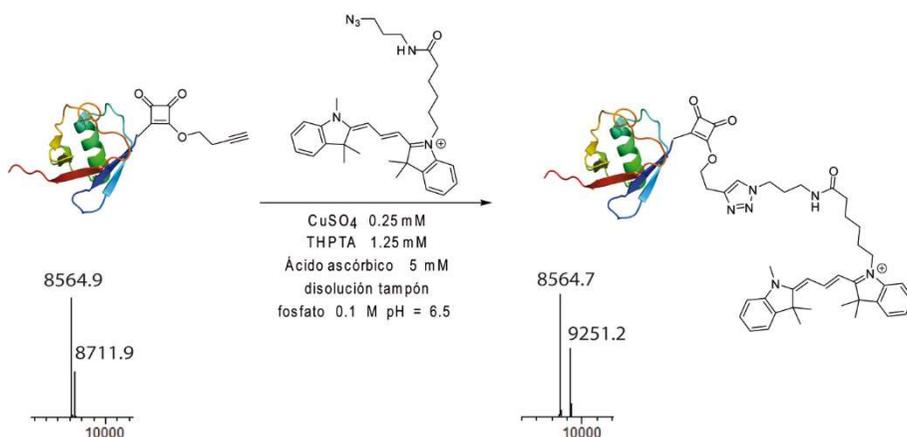


Figura 62. Cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por cobre (CuAAC) entre un alquino terminal presente en la ubiquitina modificada con **41** y la azida presente en Cy3-N₃. Después de la reacción click se observan dos productos que presentan los iones moleculares correspondientes a la ubiquitina no modificada y la conjugada con una unidad Cy3-N₃, (9251.2, calcd. para C₄₁₉H₆₇₆N₁₁₁O₁₂₂S, [M+H]⁺ = 9253.00).

En un estudio preliminar de su aplicabilidad, la insulina y la ubiquitina modificadas con Cy3 fueron estudiadas mediante gel de poliacrilamida y detectadas con azul de Coomassie (Figura 63A) o un escáner de fluorescencia (Figura 63B). En cada gel se cargaron 1 o 2 microgramos de proteína nativa y modificada. Debido a un error de dilución, la cantidad cargada de proteína modificada fue bastante inferior a la esperada. Aun así, aunque la señal de proteína modificada en el gel teñido con el azul de Coomassie es débil, solo las bandas que contienen proteínas marcadas son visibles en el gel analizado mediante el escáner de fluorescencia.

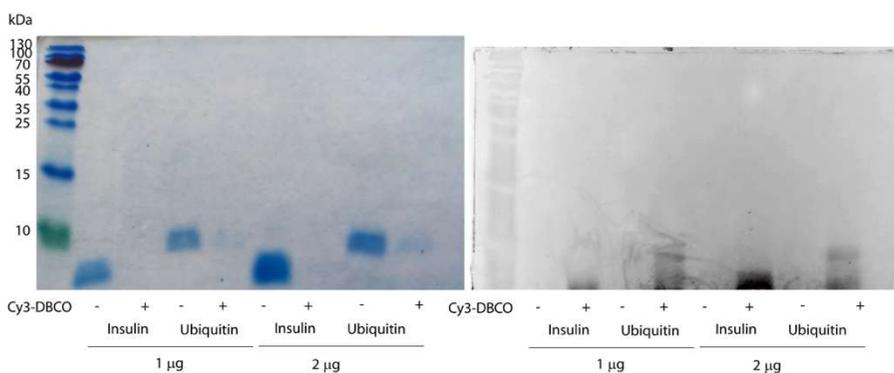
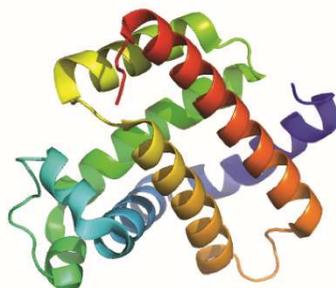


Figura 63. A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie B) Gel de poliacrilamida analizado con un escáner de fluorescencia.

El método desarrollado se aplicó también a la mioglobina, una proteína de 153 aminoácidos que contiene una glicina N-terminal y 19 lisinas internas (Figura 64).



```
GLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMK  
ASEDLKKHGTIVVLTALGGILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISDAIIHVLH  
SKHPGDFGADAQGAMTKALELFRNDIAAKYKELGFQG
```

Figura 64. Estructura y secuencia de la mioglobina de *Equus caballus*.

En primer lugar, se investigó la modificación de la mioglobina tratándola con 5 eq. de **41** en una disolución tampón de fosfato a pH 6.5. La reacción se siguió mediante EM analizando alícuotas a diferentes tiempos de reacción. Después de 60 min de reacción, se detectó la formación de dos especies correspondientes a la adición de una (34%) y dos unidades (6%) de **41** (Figura 65). Tras el análisis a los 150 min, se determinó un 41% de conversión respecto a la mono-modificación y un 18% en cuanto a la segunda incorporación. Finalmente, analizando la reacción a las 20 h, la primera incorporación se mantuvo intacta con un 42% de conversión, mientras que aumentó la conversión de la segunda incorporación con un 30%, identificándose una tercera especie correspondiente a la proteína modificada con tres unidades de **41**. Así pues, largos tiempos de reacción no aumentan la proporción de proteína mono-modificada sino que resultan en la formación de especies conjugadas a varias unidades de **41**, aunque es posible la formación mayoritaria de especies mono-modificadas mediante un control del tiempo de reacción.

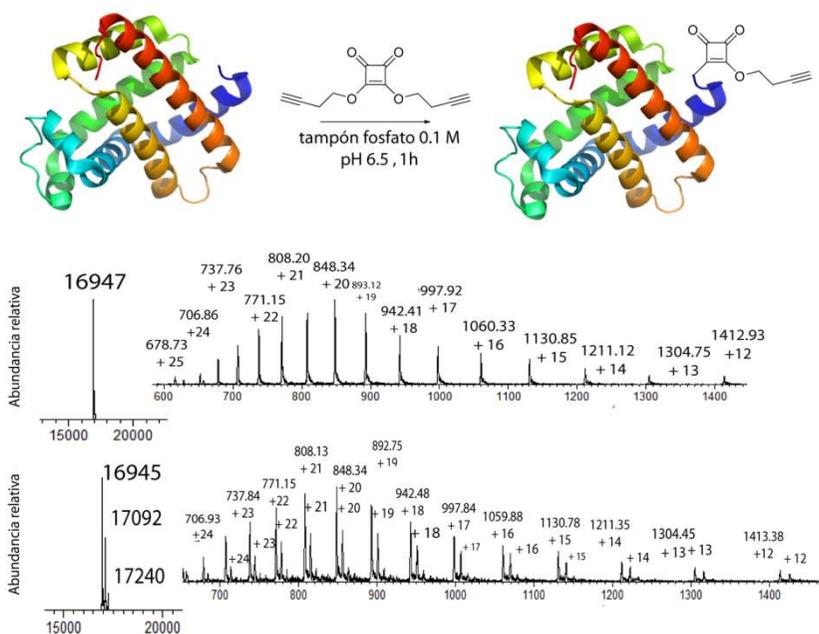


Figura 65. Modificación de la mioglobina con 5 eq de **41** a pH 6.5 durante 60 min. Los iones moleculares obtenidos tras la deconvolución del espectro de masas corresponden a $[M+H]^+ = 16945$ (calcd. para $C_{769}H_{1212}N_{210}O_{218}S_2$, $[M+H]^+ = 16952.00$), $[M+H]^+ = 17092$ (calcd. para $C_{777}H_{1216}N_{210}O_{221}S_2$, $[M+H]^+ = 17098.01$) y $[M+H]^+ = 17240$ (calcd. para $C_{785}H_{1220}N_{210}O_{224}S_2$, $[M+H]^+ = 17246.03$) que corresponden a la proteína nativa y a la modificada con una y dos unidades de **41**.

Así pues, parece que los diéster del escuarato **dibutil escuarato** y **41** permiten una rápida modificación de péptidos y proteínas. Se ha comprobado que la modificación se produce de manera específica en el extremo N-terminal mediante estudios de transaminación, digestión mediante la endoproteinasa Glu-C y estudios de fragmentación MS/MS (Sección Experimental, Figura 83). En cambio, su uso con proteínas de mayor tamaño, como la ubiquitina o la mioglobina, con una elevada presencia de lisinas internas complica la modificación selectiva del extremo N-terminal, aun utilizando pequeñas cantidades de reactivo (5 eq) aunque esta selectividad puede ser modulada mediante un control del tiempo de reacción. Como aproximación complementaria nos planteamos la búsqueda de un derivado de ácido escuarico que presente menor reactividad y estudiar su aplicabilidad en la modificación de proteínas.

3.- Modificación de proteínas con mono-escuaramidas y tioésteres del ácido escuárico

Hasta el momento se habían investigado dos diésteres del ácido escuárico (**dibutil escuarato** y **41**) como herramienta para la modificación selectiva de péptidos y proteínas. Como se ha explicado anteriormente, los ésteres del ácido escuárico tienen una serie de ventajas una de las cuales es la elevada reactividad frente nucleófilos que permite una rápida formación de mono-escuaramidas. Esta elevada reactividad parece también estar asociada con la modificación del compuesto con lisinas internas requiriendo tiempos cortos de reacción para conseguir la modificación selectiva. Por este motivo se exploró el uso de mono-escuaramidas y tioésteres del ácido escuárico como método alternativo y complementario de modificación selectiva de proteínas.

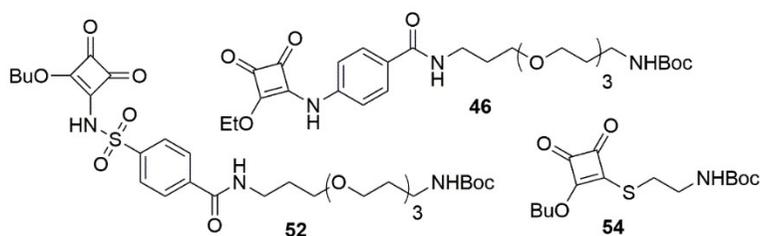
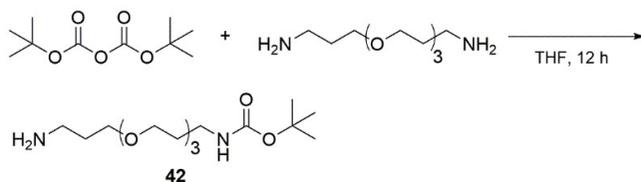


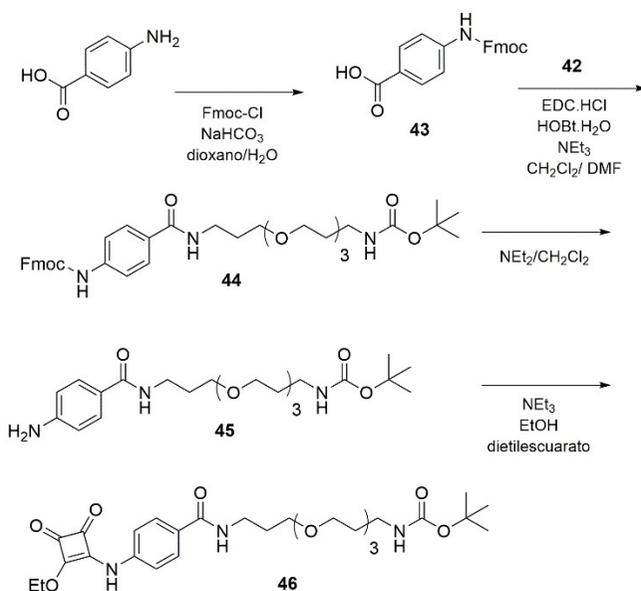
Figura 66. Estructura de derivados del ácido escuárico sintetizados (escuaramidas **46**, **52** y el mono tioéster del ácido escuárico **54**).

Se diseñaron en primer lugar la mono-escuaramida **46** y la sulfonamida **52**, derivados que contenían sustituyentes aromáticos para hacer el sistema más electrófilo y, por tanto, incrementar la reactividad en el segundo paso de reacción con la proteína. La síntesis de estos dos compuestos se inició con la mono protección de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (PEG) con el dicarbonato de di-*tert*-butilo (Esquema 23). La mono protección se consiguió mediante la adición lenta a 0 °C de una disolución que contenía el dicarbonato de di-*tert*-butilo en THF al PEG disuelto en el mismo disolvente. Se dejó agitando la reacción a temperatura ambiente durante 12 h lo que dio lugar al compuesto deseado (PEG-1) que se obtuvo con un 78% de rendimiento tras su aislamiento mediante cromatografía en columna.



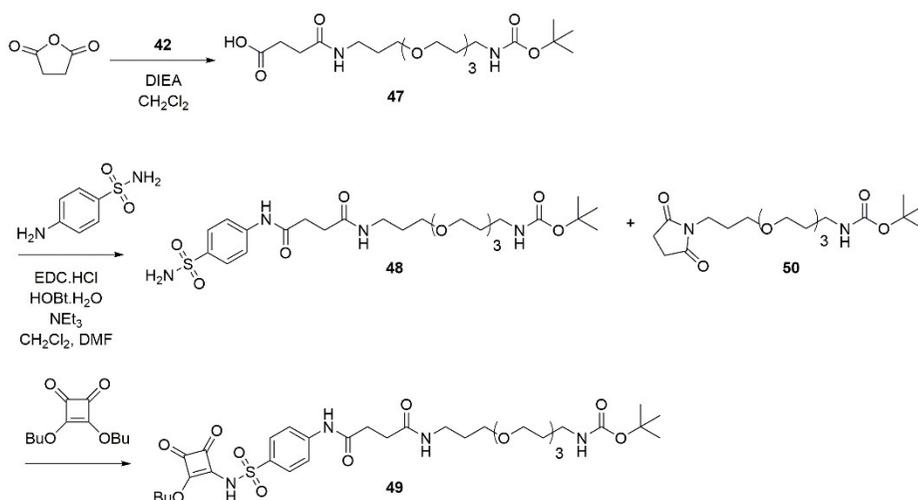
Esquema 23. Síntesis de **42** (PEG-1).

El siguiente paso fue el acoplamiento del grupo amina con el ácido aromático utilizando 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agentes de acoplamiento y NEt_3 /DBU como base. Por último, se incorporaron los escuaratos para dar lugar a las escuaramida **46** (Esquema 24) o sulfonamida **52** (Esquema 26) correspondientes.



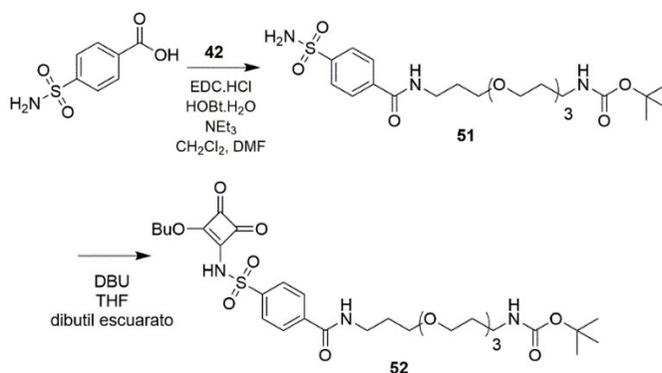
Esquema 24. Síntesis de la escuaramida **46**.

En este punto habría que resaltar que en la síntesis de la sulfonamida **52** se presentaron una serie de complicaciones. En un primer momento se diseñó la sulfonamida **49** (Esquema 25) que contenía un linker de mayor longitud. La síntesis de **49** se inició con la reacción de **42** y anhídrido succínico, obteniéndose así el ácido **47** que fue posteriormente activado con EDC y HOBT para reaccionar con la sulfanilamida comercial. Aunque se pudieron aislar pequeñas cantidades de **48**, en la mayoría de los casos se detectó una gran proporción de la succinimida **50** debido a la ciclación intramolecular del ácido terminal. Este cierre del anillo se produce debido a la alta estabilidad de la succinimida (los anillos de 5 miembros son muy estables). Esa estabilidad produce el ataque interno del ácido a la amina secundaria formando la succinimida correspondiente. Es por ello que se intentó evitar la formación de este producto aumentando la concentración de la misma. Dado que el producto de ciclación no se pudo minimizar o evitar, esta ruta se descartó y se decidió sintetizar el compuesto **52**.



Esquema 25. Síntesis de la sulfonamida **49**

En vista de estos resultados, se sintetizó la sulfonamida **52** tras reacción directa de sulfanilamida con **42** y posterior reacción con dibutil escarato en THF en presencia de DBU como base (Esquema 26).



Esquema 26. Síntesis de la sulfonamida **52**.

Se diseñó también el tioéster del ácido escuárico **54** (Esquema 27). Los alquil o aril tioésteres del ácido escuárico pueden presentar propiedades conformacionales y/o estereoelectrónicas diferentes en comparación con los análogos que contienen nitrógeno o carbono en parte debido a la mayor longitud de los enlaces C-S y S-escuarato.¹⁹⁹ Además el grupo RS-escuarato ha demostrado gran estabilidad a la hidrólisis y al ataque de nucleófilos. Así pues, el enlace CH₃S-Sq resiste dos días a 100 °C en una solución al 13% HCl, mientras en estas mismas condiciones el grupo CH₃O-Sq se hidroliza fácilmente para proporcionar ácido escuárico.²⁰⁰ De manera similar, en la reacción de 3-etoxi-4-alquiltiociclobutenediona con dimetilamina se produce el desplazamiento del grupo etoxi sin modificación del grupo alquiltio (Figura 67A).²⁰¹

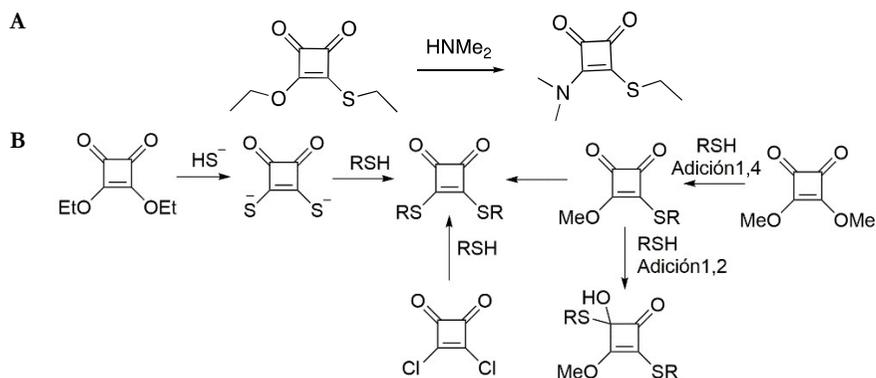
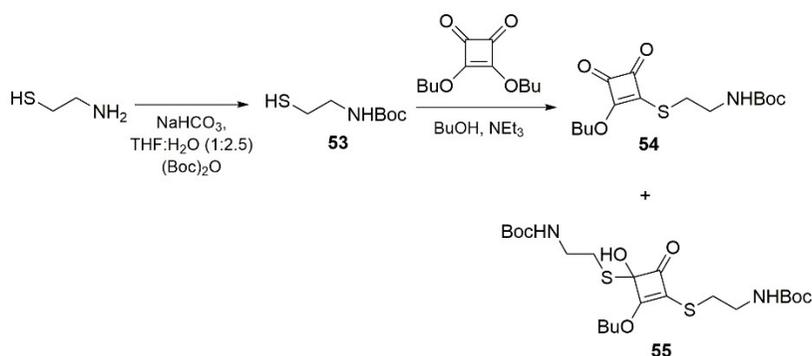


Figura 67. A) Estabilidad del grupo RS-escuarato al ataque de nucleófilos; B) Diferentes métodos descritos para sintetizar tioésteres del ácido escuárico mono y disustituidos.

Varios métodos han sido descritos para la síntesis de alquil o aril tioésteres del ácido escuárico 1,2-disustituidos, como es el caso de la cicloadición [2+2] de metiltioqueteno,²⁰⁰ la adición de sulfuro de hidrógeno a dietil escuarato seguido de S-alquilación,²⁰¹ la adición-

sustitución de alquil tioles con 3,4-diclorociclobutenodiona²⁰² y la adición-sustitución de tioles con dimetil escuarato.²⁰³ Los métodos para la obtención de derivados mono-sustituídos son más limitados. El método clásico se basa en una reacción de adición-sustitución de dibutil escuarato con un tiol terminal, pero es susceptible a la formación de productos secundarios debido a dobles adiciones de tipo 1,2 o 1,4 (Figura 67B). El grupo de investigación de Ohfuné presentó un nuevo método para la obtención de derivados mono-sustituídos consistente en la preparación previa de un *tert*-butil-metilescuarato que al ser estéricamente voluminoso, evita la sustitución del grupo *tert*-butoxi. Este precursor permite obtener mono-derivados con buenos rendimientos, pero el *tert*-butil-metilescuarato de partida se obtiene solo con un 39% de rendimiento.¹⁹⁹ Además, la gran estabilidad del grupo *tert*-butoxi podría complicar en este caso la posterior modificación de la proteínas. Por todas estas razones, los análogos alquil o aril tioésteres del ácido escuárico diseñados fueron sintetizados mediante reacción de adición-sustitución de dibutil escuarato con el tiol correspondiente.



Esquema 27. Esquema de síntesis del mono-tioéster del ácido escuárico **54**.

La síntesis empieza con la protección de la cisteamina con dicarbonato de di-*tert*-butilo. A continuación, el compuesto **53** obtenido, se disolvió en butanol y en condiciones básicas se hizo reaccionar con el dibutil escuarato, obteniendo así el producto esperado **54** con un rendimiento del 37%. Se obtuvieron también mezclas de doble adición 1,2 sobre el carbonilo (**55**, Sección Experimental) que pudieron ser separadas por cromatografía en columna. La formación del hidroxitioacetal **55** ha sido descrita anteriormente para la reacción de ésteres del ácido escuárico con tioles en base a una reacción 1,2 sobre el carbonilo junto con una adición 1,4 sobre el carbonilo de la misma cetona α,β insaturada.²⁰³

Una vez obtenidas las escuaramidas **46** y **52** y el tioéster del ácido escuárico **54**, se pasó a estudiar su reactividad utilizando la insulina como proteína modelo. Para ello, se incubó la insulina con 20 eq. de la escuaramida aromática **46**, la sulfonamida **52** y el mono-tioescuarato **54**. Al cabo de 3 h a temperatura ambiente, se observó la formación de producto modificado con un rendimiento del 10% en el caso de la escuaramida aromática **46** (Sección Experimental, Figura 85). En cambio, al cabo de 3 h de incubación con **54**, se pudo observar la completa modificación de la insulina. No se observó ningún tipo de modificación con **52** ni con la insulina ni con la mioglobina (Figura 68).

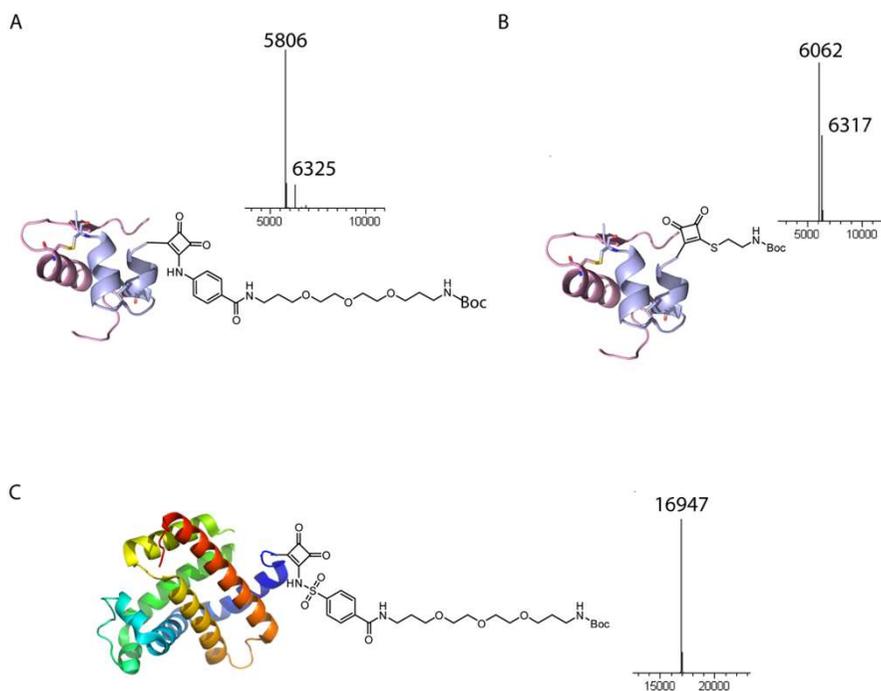


Figura 68. A) Modificación de la insulina con el compuesto **46**. Los iones moleculares obtenidos tras la deconvolución del espectro de masas corresponden a $[M+H]^+ = 5806$ y 6325 , que corresponden a la proteína sin reaccionar y a la incorporación de una unidad de **46** (calcd. para $C_{257}H_{383}N_{64}O_{78}S_6$, $[M+H]^+ = 5807.61$, calcd. para $C_{283}H_{420}N_{68}O_{85}S_6$, $[M+H]^+ = 6325.91$) B) La modificación de la insulina con **54** proporciona dos especies $[M+H]^+ = 6062$ y 6317 , que corresponden a la modificación de la proteína con una o dos unidades de **54** (calcd. para $C_{268}H_{396}N_{66}O_{81}S_7$, $[M+H]^+ = 6061.71$, calcd. para $C_{279}H_{409}N_{67}O_{85}S_8$, $[M+H]^+ = 6316.76$). C) Reacción de modificación de la mioglobina con **52** a pH 6.5. El espectro de masas tras la deconvolución solo muestra proteína sin modificar.

De manera análoga a la caracterización realizada anteriormente con el dibutil escuarato, se estudió la modificación de la insulina reducida con **54**, observándose la modificación preferente de la cadena B. Además, el bloqueo anterior o posterior al tratamiento con **54** de los grupos sulfhidrilos mediante tratamiento con NEM, descartó una reacción con las

cadena lateral de las cisteínas. En ambos casos, se observa la completa modificación de los 6 residuos de cisteína así como la modificación adicional de la cadena B con **54** (Sección Experimental, Figura 86).

3.1.- Modificación de proteínas con tioésteres del ácido escuárico **57**, **60**

Dada la actividad y el interés del mono-tioescuarato **54**, se sintetizaron dos derivados adicionales: el análogo biotilado **57** y el compuesto **60** que presenta una azida para su posterior modificación mediante reacciones bioortogonales.

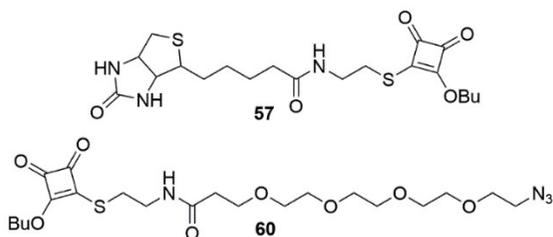
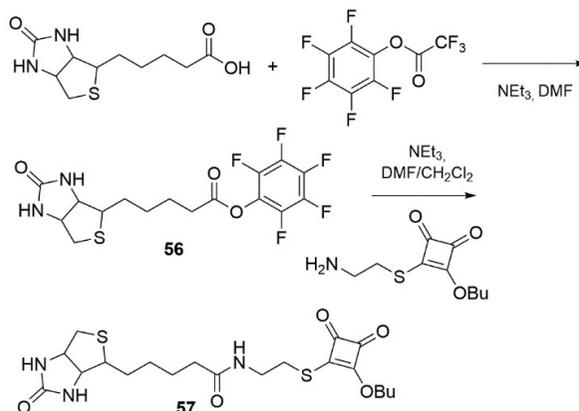


Figura 69. Derivados del mono-tioescuarato **54** sintetizados (**57**, **60**).

En primer lugar se preparó el análogo biotilado **57**. La biotina es una molécula importante en aplicaciones de biología molecular debido a su alta afinidad por la estreptavidina y la avidina. Esta unión presenta una elevada estabilidad hacia valores extremos de calor, pH y proteólisis, lo que permite la captura de moléculas biotiladas en una amplia variedad de entornos. Además esta interacción es fuerte, no covalente y reversible, facilitando su posterior liberación.²⁰⁴ La biotinilación de proteínas se utiliza en ensayos de movilidad, purificación y adhesión a superficies sólidas al mismo tiempo que se emplea para etiquetar moléculas diana con estreptavidina, y para el estudio de modificaciones posttraduccionales como la ubiquitinación.²⁰⁵

La síntesis de **57** comenzó con la activación del ácido de la biotina en forma de éster de pentafluorofenilo. La reacción se llevó a cabo en DMF utilizando NEt₃ como base y a temperatura ambiente, obteniéndose el compuesto deseado con un rendimiento del 61% (Esquema 28). A continuación, el éster activado de la biotina se hizo reaccionar en medio básico con el compuesto **54** desprotegido y a temperatura ambiente dando lugar al compuesto biotilado **57** que se purificó mediante cromatografía en columna (34%). Este bajo rendimiento puede ser ocasionado debido a la presencia de ácido trifluoroacético (TFA) residual de difícil eliminación presente en el compuesto **54** desprotegido. En este

caso se debería haber añadido mayor cantidad de base (NEt_3) para neutralizar el TFA. Muestra de ello es la recuperación de parte de la biotina activada **56**.



Esquema 28. Esquema de síntesis del compuesto **57**.

Cuando se incubaron 20 eq. del mono-tioescuarato **57** con la insulina, se observó por espectrometría de masas un incremento de masa correspondiente a la incorporación de una unidad de **57** 6187.7, (calcd. para $\text{C}_{273}\text{H}_{400}\text{N}_{68}\text{O}_{81}\text{S}_8$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 6184.71$), comprobándose que la modificación de la proteína se puede llevar a cabo con análogos biotilados de los derivados de mono-tioescuaratos (Sección Experimental, Figura 87). Se exploró también el uso de **57** para la modificación de ubiquitina (Sección Experimental, Figura 88) y mioglobina (Figura 70) con conversiones del 45% y 21% respectivamente.

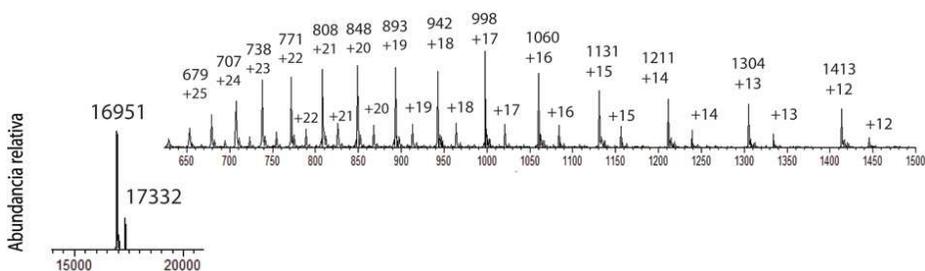
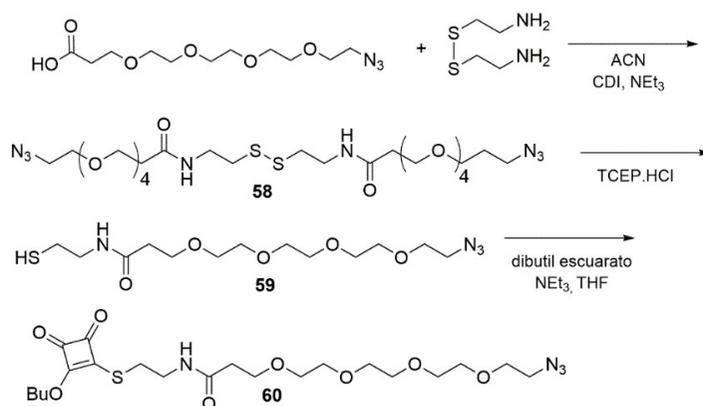


Figura 70. Modificación de la mioglobina con 20 eq de **57** a pH 6.5 durante 3 h a 37 °C. Los iones moleculares obtenidos tras la deconvolución del espectro de masas corresponden a $[\text{M}+\text{H}]^+ = 16951$ (calcd. para $\text{C}_{769}\text{H}_{1212}\text{N}_{210}\text{O}_{218}\text{S}_2$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 16952.00$) y $[\text{M}+\text{H}]^+ = 17332$ (calcd. para $\text{C}_{785}\text{H}_{1231}\text{N}_{213}\text{O}_{222}\text{S}_4$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 17330.07$).

La síntesis del compuesto **60** se llevó a cabo a partir de la reacción de acoplamiento entre la cisteamina oxidada y PEG-2 en medio básico a temperatura ambiente durante 4 h (Esquema 29). El progreso de la reacción se analizó mediante LC-MS, observándose la completa desaparición del ácido de partida y la presencia del compuesto **58** con una masa molecular 699.24 (calcd. para $C_{26}H_{50}N_8O_{10}S_2$, $[M+H]^+ = 699.32$), el cual se empleó en la siguiente reacción sin ser purificado. La reducción del disulfuro **58** resultante mediante tratamiento con TCEP proporcionó **59**, con una masa molecular de 351.18 (calcd. para $C_{13}H_{26}N_4O_5S$ $[M+H]^+ = 351.17$). Este compuesto se purificó en columna mediante cromatografía en fase reversa. Posteriormente, se llevó a cabo la incorporación de dibutil escuarato a temperatura ambiente y, tras el análisis por EM tras 21 h de reacción, se observó una proporción de compuestos 46:26:28 (**59:58:60**), lo cual indica que durante el transcurso de la reacción se forma de nuevo el compuesto oxidado **58**. Al observar la presencia de reactivo de partida **59**, se añadió mayor cantidad de dibutil escuarato y transcurridas 21 h adicionales, se observó la ausencia de **59** y la proporción de la mezcla de compuestos cambió 35:65 (**58:60**). Finalmente, el compuesto esperado **60** se purificó en columna mediante cromatografía de fase reversa obteniendo un 58% de rendimiento.



Esquema 29. Esquema de síntesis del compuesto **60**. CDI: 1,1'-carbonildiimidazol.

Una vez sintetizado se exploró la reactividad del tioéster del ácido escuárico **60**. El interés de esta sonda radica en la presencia de la azida terminal ya que permitiría la funcionalización de las proteínas mediante un segundo paso de reacción con alquinos convenientemente modificados.

Los estudios preliminares se realizaron con 5 y 20 eq. de **60** empleando como proteína la insulina en una disolución tampón de fosfato 0.1 M a pH 6.5, pero se observó que la

modificación avanzaba muy lentamente. Tras una optimización de las condiciones de reacción se observó que el uso de 60 eq. a pH 7 permitía obtener la casi completa modificación de la proteína al cabo de 140 min. Tras el análisis por EM se detectaron dos especies que corresponden a la incorporación de una y dos unidades de compuesto **60** con una relación 2.5:1 (Sección Experimental, Figura 89).

La insulina modificada fue posteriormente conjugada a sondas mediante reacciones bioortogonales. En los anteriores apartados se utilizó la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre (CuAAC). Sin embargo, en el caso de querer aplicar esta metodología en sistemas vivos o biomoléculas, los catalizadores de cobre limitan la utilidad de este proceso²⁰⁶ por la generación de especies reactivas de oxígenos y nitrógeno y por la toxicidad asociada a Cu (I).²⁰⁷ Es por ello, que se decidió explorar el uso de cicloalquinos tensionados, como el dibenzociclooctino (DBCO), que reaccionan con azidas sin necesidad de catálisis metálica mediante SPAAC. Con esta finalidad se añadieron 2 eq. de DBCO-biotina. Después de 1 h de reacción a temperatura ambiente, los resultados fueron analizados por EM observándose la presencia de dos especies, la insulina mono-modificada con una unidad de DBCO-biotina y la doblemente modificada (Figura 71).

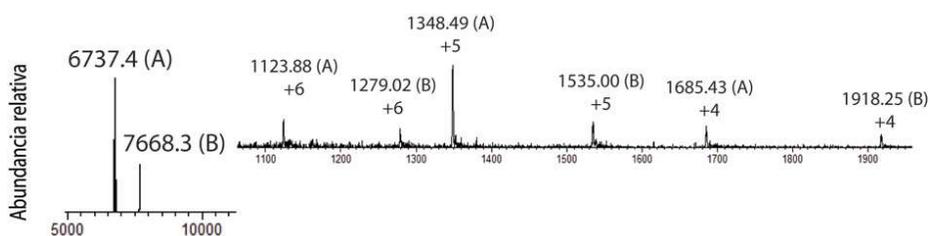


Figura 71. Estados individuales de carga detectados e ion molecular obtenido tras la deconvolución del espectro. La insulina modificada reaccionó con DBCO-biotina resultando en la formación de dos especies que corresponden a la conjugación de la insulina modificada con una ($[M+H]^+ = 6737.4$) o dos ($[M+H]^+ = 7668.3$) unidades de DBCO-biotina (calcd. para $C_{302}H_{435}N_{75}O_{87}S_8$, $[M+H]^+ = 6234.98$ calcd. para $C_{347}H_{488}N_{81}O_{97}S_{10}$, $[M+H]^+ = 7665.31$) El espectro de masas original antes de la deconvolución puede verse insertado.

El mismo procedimiento se aplicó a la ubiquitina, obteniendo la proteína mono-modificada a las 2 h de reacción con un porcentaje de conversión del 37% y trazas de una segunda modificación. Tiempos más largos resultaron en la aparición de productos secundarios observándose a las 4 h un 38% de producto mono-modificado junto con un 8% de proteína doblemente marcada y a las 7 h un 40% de producto mono-modificado junto con un 9% de producto doblemente marcado. (Sección Experimental, Figura 90). La

ubiquitina modificada fue posteriormente tratada con 5 eq. de DBCO-biotina en una disolución tampón de fosfato a pH 7. El análisis de los resultados demostró que tras 1 h ya se observaba la completa biotinilación de la ubiquitina previamente modificada (Figura 72).

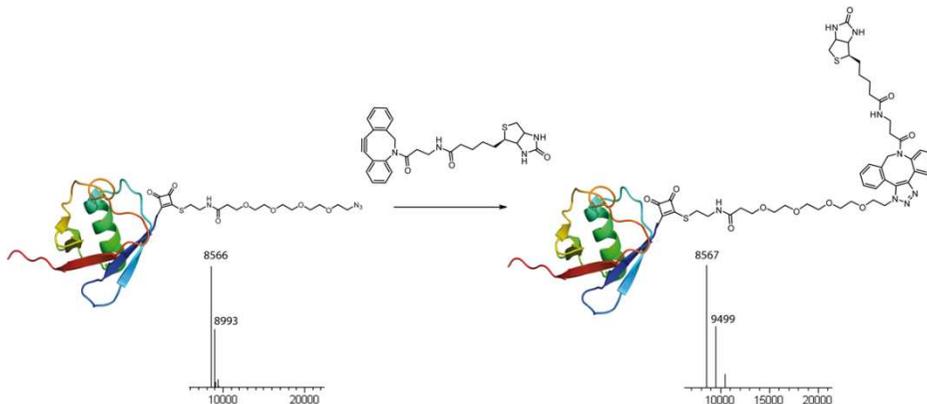


Figura 72. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre la azida y el cicloocteno funcionalizado permite la biotinilación de la ubiquitina de manera específica. El espectro deconvolucionado muestra las especies presentes tras la modificación de la proteína con **60** (ubiquitina $[M+H]^+ = 8566$ (calcd. para $C_{378}H_{629}N_{105}O_{118}S$, $[M+H]^+ = 8565.64$) y con una modificación $[M+H]^+ = 8993$ (calcd. para $C_{395}H_{653}N_{109}O_{125}S_2$, $[M+H]^+ = 8993.77$)). Tras la reacción con DBCO-biotina se detecta la conjugación de la proteína previamente modificada ($[M+H]^+ = 9499$ (calcd. para $C_{423}H_{681}N_{113}O_{128}S_3$, $[M+H]^+ = 9493.96$)).

La modificación de **60** se estudió también con la mioglobina. El tratamiento de la proteína con 60 eq. de **60** durante 80 min permitió obtener la proteína con una sola modificación y un 46% de rendimiento, a pesar del gran número de residuos de lisina en la proteína. A tiempos más largos (2 h 25 min) se observa la proteína modificada (47%) y la formación de una especie doblemente modificada con un rendimiento del 22% (Figura 73). La desaparición completa de la proteína nativa sucede al cabo de 7 h 30 min, observándose en estas condiciones la aparición de una tercera población que presenta tres modificaciones con un 16% de rendimiento (Sección Experimental, Figura 91).

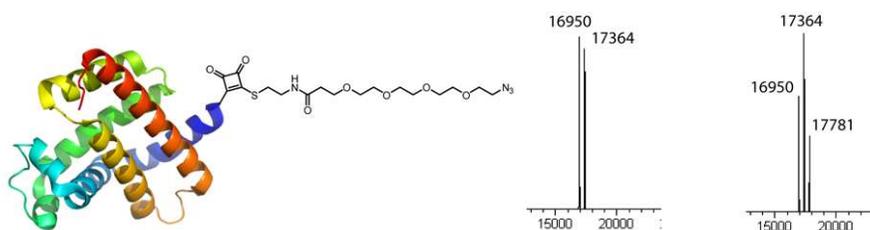


Figura 73. Reacción de modificación de la mioglobina con **60**. El espectro deconvolucionado muestra la proteína nativa $[M+H]^+ = 16950$, calcd. para $C_{769}H_{1212}N_{210}O_{128}S_2$ $[M+H]^+ = 16952$) y la modificada con una unidad de **60** (80 min, 46%, $[M+H]^+ = 17364$, calcd. para $C_{786}H_{1236}N_{214}O_{225}S_3$ $[M+H]^+ = 17380.14$). El espectro deconvolucionado (2 h 25 min) muestra la formación de una segunda especie doblemente modificada ($[M+H]^+ = 17781$, calcd. para $C_{803}H_{1260}N_{218}O_{232}S_4$ $[M+H]^+ = 17809.28$).

Así pues, los tioésteres desarrollados **57** y **60** permiten una fácil modificación de las proteínas presentando una elevada selectividad para la formación de especies mono modificadas. Además, permiten su posterior modificación mediante reacciones de tipo click con por ejemplo DBCO-biotina. En futuros estudios se va a confirmar que la especificidad mostrada por los tioésteres descritos es también selectiva para el extremo N-terminal. Estudios previos realizados con el tioescuarato simple **54** e insulina así lo indican. Además se van a realizar estudios de reactividad de los tres tipos de derivados estudiados: el dibutil escuarato, el di-3-butino escuarato (**41**) y los tioésteres **57** y **60** con péptidos de pequeño tamaño, análogos a los descritos para **41** (Figura 55 y Tabla 16) para comparar su cinética de reacción y selectividad frente a la presencia de lisinas internas.

Las proteínas modificadas son herramientas esenciales para estudiar la función de proteínas, preparar conjugados terapéuticos o construir nuevos materiales. Este tipo de bioconjugados necesitan ser preparados mediante reacciones quimioselectivas y bioortogonales. Los métodos más comúnmente usados se basan en la reactividad de las cadenas laterales de lisina y cisteína, aunque suele resultar en mezclas heterogéneas de proteínas marcadas. Otras aproximaciones se basan en la introducción de amino ácidos no naturales y su posterior modificación con reacciones bioortogonales o en la introducción de secuencias peptídicas que son reconocidas por enzimas. Aunque son métodos muy selectivos y compatibles con células vivas, requieren de compleja ingeniería genética para introducir los aminoácidos no naturales o las secuencias sustrato. Estos últimos años está creciendo el interés por desarrollar métodos específicos que actúen sobre el residuo α -amina del extremo N-terminal.

Algunos métodos previos requieren largos tiempos de reacción, elevados excesos de reactivos o requieren varios pasos para la modificación final de las proteínas. Por ejemplo, la acilación con ésteres activados de N-hidroxisuccinimida (NHS) proporciona mezclas heterogéneas debido a la fácil modificación de hidroxilos y lisinas internas.²⁰⁹ El acoplamiento oxidativo de *o*-aminofenoles al extremo N-terminal es una reacción rápida y eficiente cuando el residuo N-terminal es una prolina pero moderada en los otros casos. Además, el método no es compatible con la presencia de cisteínas no protegidas.¹⁴⁷ Otros métodos como la transaminación requieren dos pasos y no puede ser aplicado a proteínas que contienen residuos de His, Lys, Trp, Pro o Gln.¹⁴⁵ El uso de cetenas proporciona una selectividad elevada para el extremo N-terminal, aunque moderada si se trata de los residuos de Lys, Cys, Arg o His y requiere de largos tiempos de reacción¹³² al igual que la técnica basada en la aminación reductora.¹³⁴

En este capítulo se ha explorado el uso de derivados del ácido escuárico para la modificación de proteínas, con selectividad en el extremo N-terminal. En concreto se ha explorado el uso de dibutil escuarato y el di-3-butinil escuarato (**41**). Mientras el primero permite la modificación de la proteína en dos pasos utilizando reactivos comerciales, el segundo permite la modificación posterior mediante reacciones de tipo click. Además, su elevada reactividad, probablemente debido una mejor solubilidad en el tampón de reacción, permite la modificación de péptidos y proteínas de manera rápida aunque esto puede afectar en algunos casos a la selectividad observada. En una segunda parte, se han explorado tioésteres del ácido escuárico como nuevas herramientas para la modificación de proteínas. Los compuestos diseñados y sintetizados **54**, **57**, **60** presentan una menor reactividad, comparado con el éster del ácido escuárico **41**, lo que permite modular y controlar la formación de proteínas mono-modificadas. Serán necesarios estudios adicionales para determinar y comparar la reactividad de los compuestos utilizados en este capítulo. Además, serán requeridos estudios de digestión y análisis MS/MS de proteínas modificadas para confirmar que tanto **54** como **60** muestran una preferencia para el grupo N-terminal parecida a la mostrada por los diésteres **dibutil escuarato** y di-3-butinil escuarato **41**.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del capítulo 2 de la presente tesis son las siguientes:

- Como primera aproximación, se ha estudiado la modificación de proteínas empleando los diésteres del ácido escuárico **dibutil escuarato** y di-3-butin escuarato (**41**), los cuales permiten una rápida modificación de péptidos y proteínas. Mientras el primero permite la modificación de la proteína en dos pasos utilizando reactivos comerciales, el segundo permite la modificación posterior mediante reacciones de tipo click. Se ha comprobado que la modificación se produce de manera mayoritaria en el extremo N-terminal mediante estudios de transaminación, digestión a través de la endoproteínasa Glu-C y estudios de fragmentación MS/MS. En proteínas de mayor tamaño que la insulina, como la ubiquitina o mioglobina con elevada presencia de lisinas internas, la selectividad disminuye. Por este motivo se exploraron tioésteres del ácido escuárico como alternativa al uso de diésteres del ácido escuárico para la modificación selectiva de proteínas.
- Los nuevos tioésteres sintetizados **54**, **57**, **60** presentan una menor reactividad comparada con los diésteres del ácido escuárico, lo cual permite modular y controlar la formación de proteínas mono-modificadas. De entre estos compuestos destaca el tioéster del ácido escuárico **60**. Su interés radica en la presencia de la azida terminal ya que permite la funcionalización de las proteínas mediante un segundo paso de reacción con alquinos convenientemente modificados.

Así, pues en este segundo capítulo se ha explorado el uso de ésteres y tioésteres del ácido escuárico para la modificación selectiva de proteínas en condiciones suaves (en disolución acuosa y a temperatura ambiente) empleando tiempos de reacción cortos y dos simples pasos de bioconjugación. El primer paso consiste en la incorporación a la proteína de tioésteres del ácido escuárico de síntesis sencilla y el segundo permite la posterior modificación mediante una reacción de tipo click incorporando nuevas funcionalidades con la intención de mejorar o conceder propiedades nuevas o facilitar el estudio de su función e interacciones. Este nuevo método permite la modificación específica y completa de proteínas de manera mayoritaria en el extremo N-terminal. Algunos métodos de modificación de proteína descritos en la literatura requieren largos tiempos de reacción, elevados excesos de reactivos, varios pasos para la modificación final de las proteínas y modificación inespecífica de varios residuos de lisina. Por tanto este nuevo método de modificación de proteínas complementa y supera algunas de las limitaciones de los

métodos existentes por lo que amplía el abanico de herramientas disponibles en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Stephanopoulos, N.; Francis, M. B. Choosing an Effective Protein Bioconjugation Strategy. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7* (12), 876–884.
- (2) Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (45), 7342–7372.
- (3) Zalipsky, S. Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6* (2), 150–165.
- (4) Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science*. **1998**, *281* (5374), 269–272.
- (5) Rao, J.; Dragulescu-Andrasi, A.; Yao, H. Fluorescence Imaging in Vivo: Recent Advances. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18* (1), 17–25.
- (6) Krall, N.; Da Cruz, F. P.; Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. Site-Selective Protein-Modification Chemistry for Basic Biology and Drug Development. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (2), 103–113.
- (7) Cravatt, B. F.; Wright, A. T.; Kozarich, J. W. Activity-Based Protein Profiling: From Enzyme Chemistry to Proteomic Chemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77* (1), 383–414.
- (8) Bell, S. J.; Fam, C. M.; Chlipala, E. A.; Carlson, S. J.; Lee, J. I.; Rosendahl, M. S.; Doherty, D. H.; Cox, G. N. Enhanced Circulating Half-Life and Antitumor Activity of a Site-Specific Pegylated Interferon- α Protein Therapeutic. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (1), 299–305.
- (9) Baker, D. P.; Lin, E. Y.; Lin, K.; Pellegrini, M.; Petter, R. C.; Chen, L. L.; Arduini, R. M.; Brickelmaier, M.; Wen, D.; Hess, D. M.; et al. N-Terminally PEGylated Human Interferon- β -1a with Improved Pharmacokinetic Properties and in Vivo Efficacy in a Melanoma Angiogenesis Model. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (1), 179–188.
- (10) Adamo, R.; Nilo, A.; Castagner, B.; Boutureira, O.; Berti, F.; Bernardes, G. J. L. Synthetically Defined Glycoprotein Vaccines: Current Status and Future Directions. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (8), 2995–3008.
- (11) Camarero, J. A. Recent Developments in the Site-Specific Immobilization of Proteins onto Solid Supports. *Biopolymers* **2008**, *90* (3), 450–458.
- (12) Koniev, O.; Wagner, A. Developments and Recent Advancements in the Field of Endogenous Amino Acid Selective Bond Forming Reactions for Bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (15), 5495–5551.
- (13) Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (5), 2174–2195.
- (14) Matos, M. J.; Oliveira, B. L.; Martínez-Sáez, N.; Guerreiro, A.; Cal, P. M. S. D.; Bertoldo, J.; Maneiro, M.; Perkins, E.; Howard, J.; Deery, M. J.; et al. Chemo- and Regioselective Lysine Modification on Native Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (11), 4004–4017.
- (15) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology. *Chem. Asian J.* **2009**, *4* (5), 630–640.
- (16) Crankshaw, M. W.; Grant, G. A. Modification of Cysteine. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **1996**, *15* (1), 1–18.
- (17) Wright, E. J.; Sosna, M.; Bloodworth, S.; Kilburn, J. D.; Bartlett, P. N. Design of Maleimide-Functionalised Electrodes for Covalent Attachment of Proteins through Free Surface Cysteine Groups. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (19), 5550–5554.
- (18) Tilley, S. D.; Francis, M. B. Tyrosine-Selective Protein Alkylation Using π -Allylpalladium Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (4), 1080–1081.
- (19) Li, X.; Zhang, L.; Hall, S. E.; Tam, J. P. A New Ligation Method for N-Terminal

- Tryptophan-Containing Peptides Using the Pictet-Spengler Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (21), 4069–4073.
- (20) Antos, J. M.; Francis, M. B. Selective Tryptophan Modification with Rhodium Carbenoids in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (33), 10256–10257.
- (21) Martín-Gago, P.; Fansa, E. K.; Winzker, M.; Murarka, S.; Janning, P.; Schultz-Fademrecht, C.; Baumann, M.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. Covalent Protein Labeling at Glutamic Acids. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (5), 589–597.e5.
- (22) Hoare, D. G.; Koshland, D. E. A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (10), 2447–2453.
- (23) Hua, J.; Li, Z.; Xia, W.; Yang, N.; Gong, J.; Zhang, J.; Qiao, C. Preparation and Properties of EDC/NHS Mediated Crosslinking Poly (Gamma-Glutamic Acid)/Epsilon-Polylysine Hydrogels. *Mater. Sci. Eng.* **2016**, *61*, 879–892.
- (24) Yamada, H.; Imoto, T.; Fujita, K.; Okazaki, K.; Motomura, M. Selective Modification of Aspartic Acid-101 in Lysozyme by Carbodiimide Reaction. *Biochemistry* **1981**, *20* (17), 4836–4842.
- (25) Totaro, K. A.; Liao, X.; Bhattacharya, K.; Finneman, J. I.; Sperry, J. B.; Massa, M. A.; Thorn, J.; Ho, S. V.; Pentelute, B. L. Systematic Investigation of EDC/SNHS-Mediated Bioconjugation Reactions for Carboxylated Peptide Substrates. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (4), 994–1004.
- (26) Wells, J. A.; Jia, S.; Lee, P. S.; Lin, S.; Yang, X.; Chang, C. J.; Hornsby, M.; Weeks, A. M.; Nichiporuk, R. V.; Iavarone, A. T.; et al. Redox-Based Reagents for Chemoselective Methionine Bioconjugation. *Science*. **2017**, *355* (6325), 597–602.
- (27) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology. *Chem. - Asian J.* **2009**, *4* (5), 630–640.
- (28) Chen, X.; Muthoosamy, K.; Pfisterer, A.; Neumann, B.; Weil, T. Site-Selective Lysine Modification of Native Proteins and Peptides via Kinetically Controlled Labeling. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (3), 500–508.
- (29) Hacker, S. M.; Backus, K. M.; Lazear, M. R.; Forli, S.; Correia, B. E.; Cravatt, B. F. Global Profiling of Lysine Reactivity and Ligandability in the Human Proteome. *Nat. Chem.* **2017**, *9* (12), 1181–1190.
- (30) Tekaia, F.; Yeramian, E.; Dujon, B. Amino Acid Composition of Genomes, Lifestyles of Organisms, and Evolutionary Trends: A Global Picture with Correspondence Analysis. *Gene* **2002**, *297* (1–2), 51–60.
- (31) Kalkhof, S.; Sinz, A. Chances and Pitfalls of Chemical Cross-Linking with Amine-Reactive N-Hydroxysuccinimide Esters. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392* (1–2), 1–8.
- (32) Coleman, J. P.; Buckingham, D. A. N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (19), 3039–3040.
- (33) Kollipara, L.; Zahedi, R. P. Protein Carbamylation: In Vivo Modification or in Vitro Artefact? *Proteomics* **2013**, *13* (6), 941–944.
- (34) Yin, J.; Liu, F.; Li, X.; Walsh, C. T. Labeling Proteins with Small Molecules by Site-Specific Posttranslational Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (25), 7754–7755.
- (35) Glazer, A. N. Specific Chemical Modification of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *39* (1), 101–130.
- (36) Katritzky, A. R.; Narindoshvili, T. Fluorescent Amino Acids: Advances in Protein-Extrinsic Fluorophores. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (4), 627–634.
- (37) Miseta, A.; Csutora, P. Relationship between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17* (8), 1232–1239.

- (38) Gunnoo, S. B.; Madder, A. Chemical Protein Modification through Cysteine. *ChemBioChem* **2016**, *17* (7), 529–553.
- (39) Bernardes, G. J. L.; Casi, G.; Trüssel, S.; Hartmann, I.; Schwager, K.; Scheuermann, J.; Neri, D. A Traceless Vascular-Targeting Antibody-Drug Conjugate for Cancer Therapy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51* (4), 941–944.
- (40) Goddard, D. R.; Michaelis, L. Derivatives of Keratin. *J. Biol. Chem.* **1935**, *112* (1), 361–371.
- (41) Abo, M.; Li, C.; Weerapana, E. Isotopically-Labeled Iodoacetamide-Alkyne Probes for Quantitative Cysteine-Reactivity Profiling. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (3), 743–749.
- (42) Moore, J. E.; Ward, W. H. Cross-Linking of Bovine Plasma Albumin and Wool Keratin. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (11), 2414–2418.
- (43) Betting, D. J.; Kafi, K.; Abdollahi-Fard, A.; Hurvitz, S. A.; Timmerman, J. M. Sulfhydryl-Based Tumor Antigen-Carrier Protein Conjugates Stimulate Superior Antitumor Immunity against B Cell Lymphomas. *J. Immunol.* **2014**, *181* (6), 4131–4140.
- (44) Masri, M. S.; Friedman, M. Protein Reactions with Methyl and Ethyl Vinyl Sulfones. *J. Protein Chem.* **1988**, *7* (1), 49–54.
- (45) Hemelaar, J.; Borodovsky, A.; Kessler, B. M.; Reverter, D.; Cook, J.; Kolli, N.; Gan-erdene, T.; Wilkinson, K. D.; Gill, G.; Lima, C. D.; et al. Specific and Covalent Targeting of Conjugating and Deconjugating Enzymes of Ubiquitin-Like Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24* (1), 84–95.
- (46) Shen, B. Q.; Xu, K.; Liu, L.; Raab, H.; Bhakta, S.; Kenrick, M.; Parsons-Reponte, K. L.; Tien, J.; Yu, S. F.; Mai, E.; et al. Conjugation Site Modulates the in Vivo Stability and Therapeutic Activity of Antibody-Drug Conjugates. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30* (2), 184–189.
- (47) Holmes, T. J.; Lawton, R. G. Cysteine Modification and Cleavage of Proteins with 2-Methyl-N1-Benzenesulfonyl-N4-Bromoacetylquinonediimide. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (6), 1984–1986.
- (48) Chalker, J. M.; Gunnoo, S. B.; Boutureira, O.; Gerstberger, S. C.; Fernández-González, M.; Bernardes, G. J. L.; Griffin, L.; Hailu, H.; Schofield, C. J.; Davis, B. G. Methods for Converting Cysteine to Dehydroalanine on Peptides and Proteins. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (9), 1666–1676.
- (49) Boutureira, O.; Martínez-Sáez, N.; Brindle, K. M.; Neves, A. A.; Corzana, F.; Bernardes, G. J. L. Site-Selective Modification of Proteins with Oxetanes. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (27), 6483–6489.
- (50) Schlick, T. L.; Ding, Z.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B. Dual-Surface Modification of the Tobacco Mosaic Virus. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3718–3723.
- (51) Mix, K. A.; Raines, R. T. Optimized Diazo Scaffold for Protein Esterification. *Org. Lett.* **2015**, *17* (10), 2358–2361.
- (52) Kramer, J. R.; Deming, T. J. Reversible Chemoselective Tagging and Functionalization of Methionine Containing Peptides. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (45), 5144–5146.
- (53) Pauly, H. Zur Kenntnis Der Diazoreaktion Des Eiweißes. *Z. Physiol. Chem.* **1915**, *94*, 284–290.
- (54) Glazer, A.; Sanger, F. The Iodination of Chymotrypsinogen. *Biochem. J.* **1964**, *90* (1), 92–98.
- (55) Allan, C.; Kosar, M.; Burr, C. V.; Mackay, C. L.; Duncan, R. R.; Hulme, A. N. A Catch-and-Release Approach to Selective Modification of Accessible Tyrosine Residues. *ChemBioChem* **2018**, *19* (23), 2443–2447.
- (56) Sokolovsky, M.; Riordan, J. F.; Vallee, B. L. Tetranitromethane. A Reagent for the Nitration of Tyrosyl Residues in Proteins. *Biochemistry* **1966**, *5* (11), 3582–3589.

- (57) Radi, R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Its Functional Effects. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *46* (2), 550–559.
- (58) Wolff, J.; Covelli, I. Factors in the Iodination of Histidine in Proteins. *Eur. J. Biochem.* **1969**, *9* (3), 371–377.
- (59) Chen, J.; Cui, W.; Giblin, D.; Gross, M. L. New Protein Footprinting: Fast Photochemical Iodination Combined with Top-down and Bottom-up Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (8), 1306–1318.
- (60) Knowles. Tinkering with Enzymes: What Are We Learning? *Science* . **1987**, *236* (4806), 1252–1258.
- (61) Lang, K.; Chin, J. W. Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (9), 4764–4806.
- (62) Noren, C. J.; Anthony-cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G.; April, I. A General Method for Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. *Science.* **1989**, *244*, 182–188.
- (63) Suich, D. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Schultz, P. G.; Noren, C. J.; Griffith, M. C. Site-Specific Mutagenesis with Unnatural Amino Acids. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *14* (10), 400–403.
- (64) Chin, J. W.; Santoro, S. W.; Martin, A. B.; King, D. S.; Wang, L.; Schultz, P. G. Addition of P-Azido-L-Phenylalanine to the Genetic Code of Escherichia Coli. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (31), 9026–9027.
- (65) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998.
- (66) Saxon E. ; Bertozzi C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science.* **2000**, *287* (5460), 2007–2010.
- (67) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. A Metabolic Labeling Approach toward Proteomic Analysis of Mucin-Type O-Linked Glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (25), 14846–14851.
- (68) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. The Growing Applications of Click Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (8), 1249–1262.
- (69) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (70) Staudinger, H.; Meyer, J. Ueber Neue Organische Phosphorverbindungen II. Phosphazine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2* (1), 619–635.
- (71) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Org. Lett.* **2000**, *2* (13), 1939–1941.
- (72) Prescher, J.A.; Dube, D.H.; Bertozzi, C. R. Chemical Remodelling of Cell Surfaces in Living Animals. *Nature* **2004**, *430* (7002), 873–877.
- (73) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, *2* (10), 565–598.
- (74) Rostovtsev, V. V; Green, L. G.; Fokin, V. V; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (75) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.
- (76) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192–3193.
- (77) Wolbers, F.; ter Braak, P.; Le Gac, S.; Lutge, R.; Andersson, H.; Vermes, I.; van den Berg, A. Viability Study of HL60 Cells in Contact with Commonly Used Microchip Materials. *Electrophoresis* **2006**, *27* (24), 5073–5080.

- (78) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (79) Adolf, W.; Krebs, A. Zur Existenz Niedergliedriger Cycloalkine. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (12), 3260–3275.
- (80) Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Madden, M. M.; Lin, Q. A Photoinducible 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction for Rapid, Selective Modification of Tetrazole-Containing Proteins. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47* (15), 2832–2835.
- (81) Van Berkel, S. S.; Dirks, A. J.; Debets, M. F.; Van Delft, F. L.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M.; Rutjes, F. P. J. T. Metal-Free Triazole Formation as a Tool for Bioconjugation. *ChemBioChem* **2007**, *8* (13), 1504–1508.
- (82) Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. Inhibition of Cell Adhesion to Fibronectin by Oligopeptide-Substituted Polynorbornenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (7), 1275–1279.
- (83) Davis, B. G.; Lin, Y. a; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernardes, G. J. L. Allyl Sulfides Are Privileged Substrates in Aqueous Cross-Metathesis: Application to Site-Selective Protein Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (30), 9642–9643.
- (84) Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. Inverse Electron Demand Diels-Alder Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4895–4950.
- (85) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
- (86) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. a. Tetrazine-Based Cycloadditions : Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2297–2299.
- (87) Foley, T. L.; Burkart, M. D. Site-Specific Protein Modification: Advances and Applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11* (1), 12–19.
- (88) Chen, I.; Ting, A. Y. Site-Specific Labeling of Proteins with Small Molecules in Live Cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 35–40.
- (89) Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. A General Method for the Covalent Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (1), 86–89.
- (90) Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; et al. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (6), 373–382.
- (91) Chen, I.; Howarth, M.; Lin, W.; Ting, A. Y. Site-Specific Labeling of Cell Surface Proteins with Biophysical Probes Using Biotin Ligase. *Nat. Methods* **2005**, *2* (2), 99–104.
- (92) Griffin, M.; Casadio, R.; Bergamini, C. M. Transglutaminases: Nature's Biological Glues. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 377–396.
- (93) Sato, H.; Ikeda, M.; Suzuki, K.; Hirayama, K. Site-Specific Modification of Interleukin-2 by the Combined Use of Genetic Engineering Techniques and Transglutaminase. *Biochemistry* **1996**, *35* (40), 13072–13080.
- (94) Lin, C. W.; Ting, A. Y. Transglutaminase-Catalyzed Site-Specific Conjugation of Small-Molecule Probes to Proteins in Vitro and on the Surface of Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (14), 4542–4543.
- (95) Morris, T. W.; Reed, K. E.; Cronan, J. E. Lipoic Acid Metabolism in Escherichia Coli: The LplA and LipB Genes Define Redundant Pathways for Ligation of Lipoyl Groups to Apoprotein. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (1), 1–10.
- (96) Fernández-Suárez, M.; Baruah, H.; Martínez-Hernández, L.; Xie, K. T.; Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R.; Ting, A. Y. Redirecting Lipoic Acid Ligase for Cell Surface

- Protein Labeling with Small-Molecule Probes. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (12), 1483–1487.
- (97) Carrico, I. S.; Carlson, B. L.; Bertozzi, C. R. Introducing Genetically Encoded Aldehydes into Proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (6), 321–322.
- (98) Dierks, T.; Schmidt, B.; Borissenko, L. V.; Peng, J.; Preusser, A.; Mariappan, M.; Von Figura, K. Multiple Sulfatase Deficiency Is Caused by Mutations in the Gene Encoding the Human α -Formylglycine Generating Enzyme. *Cell* **2003**, *113* (4), 435–444.
- (99) Carlson, B. L.; Ballister, E. R.; Skordalakes, E.; King, D. S.; Breidenbach, M. A.; Gilmore, S. A.; Berger, J. M.; Bertozzi, C. R. Function and Structure of a Prokaryotic Formylglycine-Generating Enzyme. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (29), 20117–20125.
- (100) Rush, J. S.; Bertozzi, C. R. New Aldehyde Tag Sequences Identified by Screening Formylglycine Generating Enzymes in Vitro and in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12240–12241.
- (101) Mazmanian, S. K.; Liu, G.; Ton-That, H.; Schneewind, O. Staphylococcus Aureus Sortase, an Enzyme That Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. *Science*. **1999**, *285* (5428), 760–763.
- (102) Perry, A. M.; Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Schneewind, O. Anchoring of Surface Proteins to the Cell Wall of Staphylococcus Aureus. III. Lipid II Is an in Vivo Peptidoglycan Substrate for Sortase-Catalyzed Surface Protein Anchoring. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (18), 16241–16248.
- (103) Samantaray, S.; Marathe, U.; Dasgupta, S.; Nandicoori, V. K.; Roy, R. P. Peptide-Sugar Ligation Catalyzed by Transpeptidase Sortase: A Facile Approach to Neoglycoconjugate Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (7), 2132–2133.
- (104) Mao, H.; Hart, S. A.; Schink, A.; Pollok, B. A. Sortase-Mediated Protein Ligation: A New Method for Protein Engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (9), 2670–2671.
- (105) Popp, M. W.; Antos, J. M.; Grotenbreg, G. M.; Spooner, E.; Ploegh, H. L. Sortagging: A Versatile Method for Protein Labeling. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (11), 707–708.
- (106) Lambalot, R. H.; Gehring, A. M.; Flugel, R. S.; Zuber, P.; LaCelle, M.; Marahiel, M. A.; Reid, R.; Khosla, C.; Walsh, C. T. A New Enzyme Superfamily - The Phosphopantetheinyl Transferases. *Chem. Biol.* **1996**, *3* (11), 923–936.
- (107) George, N.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, N.; Johnsson, K. Specific Labeling of Cell Surface Proteins with Chemically Diverse Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8896–8897.
- (108) Heller, K.; Ochtrop, P.; Albers, M. F.; Zauner, F. B.; Itzen, A.; Hedberg, C. Covalent Protein Labeling by Enzymatic Phosphocholination. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54* (35), 10327–10330.
- (109) Marks, K. M.; Nolan, G. P. Chemical Labeling Strategies for Cell Biology. *Nat. Methods* **2006**, *3* (8), 591–596.
- (110) Takimoto, J. K.; Baiga, T. J.; Wang, L.; Lee, K.-F.; Wang, W.; Slesinger, P. A.; Louie, G. V.; Noel, J. P. Genetically Encoding Unnatural Amino Acids for Cellular and Neuronal Studies. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10* (8), 1063–1072.
- (111) Asano, S.; Patterson, J. T.; Gaj, T.; Barbas, C. F. Site-Selective Labeling of a Lysine Residue in Human Serum Albumin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (44), 11783–11786.
- (112) Patterson, J. T.; Wilson, H. D.; Asano, S.; Nilchan, N.; Fuller, R. P.; Roush, W. R.; Rader, C.; Barbas, C. F. Human Serum Albumin Domain i Fusion Protein for Antibody Conjugation. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (10), 2271–2275.
- (113) Matos, M. J.; Oliveira, B. L.; Martínez-Sáez, N.; Guerreiro, A.; Cal, P. M. S. D.;

- Bertoldo, J.; Maneiro, M.; Perkins, E.; Howard, J.; Deery, M. J.; et al. Chemo- and Regioselective Lysine Modification on Native Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (11), 4004–4017.
- (114) Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. Ligand-Directed Tosyl Chemistry for Protein Labeling in Vivo. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (5), 341–343.
- (115) Tsukiji, S.; Hamachi, I. Ligand-Directed Tosyl Chemistry for in Situ Native Protein Labeling and Engineering in Living Systems: From Basic Properties to Applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 136–143.
- (116) Zhang, C.; Dai, P.; Vinogradov, A. A.; Gates, Z. P.; Pentelute, B. L. Site-Selective Cysteine–Cyclooctyne Conjugation. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57* (22), 6459–6463.
- (117) Yamada, K.; Shikida, N.; Shimbo, K.; Ito, Y.; Khedri, Z.; Matsuda, Y.; Mendelsohn, B. A. AJICAP: Affinity Peptide Mediated Regiodivergent Functionalization of Native Antibodies. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 5592–5597.
- (118) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*. **1994**, *266* (5186), 776–779.
- (119) Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H. U.; Lau, H. Über Peptidsynthesen. 8. Mitteilung Bildung von S-haltigen Peptiden Durch Intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583* (1), 129–149.
- (120) Camarero, J.; Shekhtman, A.; Campbell, E.; Chlenov, M.; Gruber, T. M.; Bryant, D.; Darst, S.; Cowburn, D.; Muir, T. W. Autoregulation of a Bacterial Sigma Factor Explored by Using Segmental Isotopic Labeling and NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8536–8541.
- (121) Otomo, T.; Ito, N.; Kyogoku, Y.; Yamazaki, T. NMR Observation of Selected Segments in a Larger Protein: Central- Segment Isotope Labeling through Intein-Mediated Ligation. *Biochemistry* **1999**, *38* (49), 16040–16044.
- (122) Luk, L. Y. P.; Ruiz-Pernía, J. J.; Adesina, A. S.; Loveridge, E. J.; Tuñón, I.; Moliner, V.; Allemann, R. K. Chemical Ligation and Isotope Labeling to Locate Dynamic Effects during Catalysis by Dihydrofolate Reductase. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54* (31), 9016–9020.
- (123) Muona, M.; Aranko, A. S.; Raulinaitis, V.; Iwai, H. Segmental Isotopic Labeling of Multi-Domain and Fusion Proteins by Protein Trans-Splicing in Vivo and in Vitro. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (3), 574–587.
- (124) Jin, K.; Li, X. Advances in Native Chemical Ligation-Desulfurization: A Powerful Strategy for Peptide and Protein Synthesis. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 17397–17404.
- (125) Muralidharan, V.; Muir, T. W. Protein Ligation: An Enabling Technology for the Biophysical Analysis of Proteins. *Nat. Methods* **2006**, *3* (6), 429–438.
- (126) Yi, L.; Sun, H.; Itzen, A.; Triola, G.; Waldmann, H.; Goody, R. S.; Wu, Y. W. One-Pot Dual-Labeling of a Protein by Two Chemoselective Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50* (36), 8287–8290.
- (127) Topilina, N. I.; Mills, K. V. Recent Advances in in Vivo Applications of Intein-Mediated Protein Splicing. *Mob. DNA* **2014**, *5* (1), 1–14.
- (128) Ando, T.; Tsukiji, S.; Tanaka, T.; Nagamune, T. Construction of a Small-Molecule-Integrated Semisynthetic Split Intein for in Vivo Protein Ligation. *Chem. Commun.* **2007**, No. 47, 4995–4997.
- (129) Giriat, I.; Muir, T. W. Protein Semi-Synthesis in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (24), 7180–7181.
- (130) Rosen, C. B.; Francis, M. B. Targeting the N Terminus for Site-Selective Protein Modification. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (7), 697–705.
- (131) Ye, H.; Liu, R.; Li, D.; Liu, Y.; Yuan, H.; Guo, W.; Zhou, L.; Cao, X.; Tian, H.;

- Shen, J.; et al. A Safe and Facile Route to Imidazole-1-Sulfonyl Azide as a Diazotransfer Reagent. *Org. Lett.* **2013**, *15* (1), 18–21.
- (132) Chan, A. O.-Y.; Ho, C.-M.; Chong, H.-C.; Leung, Y.-C.; Huang, J.-S.; Wong, M.-K.; Che, C.-M. Modification of N-Terminal α -Amino Groups of Peptides and Proteins Using Ketenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (5), 2589–2598.
- (133) Gilmore, J. M.; Scheck, R. A.; Esser-Kahn, A. P.; Joshi, N. S.; Francis, M. B. N-Terminal Protein Modification through a Biomimetic Transamination Reaction. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45* (32), 5307–5311.
- (134) Chen, D.; Disotuar, M. M.; Xiong, X.; Wang, Y.; Chou, D. H. C. Selective N-Terminal Functionalization of Native Peptides and Proteins. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (4), 2717–2722.
- (135) Xie, H.; Zhan, K.; Kim, Y.-P.; Ren, H.; Rao, J.; Xia, Z.; Xiao, F. A Biocompatible Condensation Reaction for the Labeling of Terminal Cysteine Residues on Proteins. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48* (51), 9658–9662.
- (136) Sasaki, T.; Kodama, K.; Suzuki, H.; Fukuzawa, S.; Tachibana, K. N-Terminal Labeling of Proteins by the Pictet-Spengler Reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (16), 4550–4553.
- (137) Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Site-Directed Conjugation of Nonpeptide Groups to Peptides and Proteins Via Periodate Oxidation of a 2-Amino Alcohol. Application to Modification at N-Terminal Serine. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3* (2), 138–146.
- (138) Kang, W.; Wang, W.; Zhi, X.; Zhang, B.; Wei, P.; Xu, H. A Simple Oxazolidine Linker for Solid-Phase Synthesis of Peptide Aldehydes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (2), 1187–1188.
- (139) Chelius, D.; Shaler, T. A. Capture of peptides with N-terminal Serine and Threonine: A sequence-specific chemical method for peptide mixture simplification. *Bioconjugate Chem.*, . **2003**, *14* (1), 205–211.
- (140) Dixon, H. B. F.; Weitkamp, L. R. Conversion of the N-Terminal Serine Residue of Corticotrophin into Glycine. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 462–468.
- (141) Dixon, H. B. F. Removal of the N-Terminal Residue of a Protein After Transamination. *Biochem. J.* **1965**, *94* (2), 463–469.
- (142) Dixon, H. B. F. Transamination of Peptides. *Biochem. J.* **1964**, *92*, 661–666.
- (143) Metzler, D. E.; Snell, E. E.; Snell, E. E. Some Transamination Reactions Involving Vitamin B6. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (4), 979–983.
- (144) Cennamo, C.; Carafoli, B.; Bonetti, E. P. Non-Enzymatic Transamination Between Peptides and Pyridoxal. Isolation of the 2,4-Dinitrophenylhydrazones of Some Ketopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (14), 3523–3527.
- (145) Scheck, R. A.; Dedeo, M. T.; Iavarone, A. T.; Francis, M. B. Optimization of a Biomimetic Transamination Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (35), 11762–11770.
- (146) Chan, W. K.; Ho, C. M.; Wong, M. K.; Che, C. M. Oxidative Amide Synthesis and N-Terminal α -Amino Group Ligation of Peptides in Aqueous Medium. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (46), 14796–14797.
- (147) Obermeyer, A. C.; Jarman, J. B.; Francis, M. B. N-Terminal Modification of Proteins with o-Aminophenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (27), 9572–9579.
- (148) Bandyopadhyay, A.; Cambray, S.; Gao, J. Fast and Selective Labeling of N-Terminal Cysteines at Neutral PH: Via Thiazolidino Boronate Formation. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (7), 4589–4593.
- (149) Kitanaka, A.; Juichi, H.; Nihashi, Y.; Miyashita, M.; Miyagawa, H. A Facile Method for Preferential Modification of the N-Terminal Amino Group of Peptides Using Triazine-Based Coupling Reagents. *Mass Spectrom.* **2017**, *6* (1), A0059–A0059.
- (150) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Morita, J.; Tani, S.; Terao, K. 4-(4,6-Dimethoxy-

- 1,3,5-Triazin-2-Yl)-4-Methyl-Morpholinium Chloride: An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13159–13170.
- (151) Schmidt, A. H. Reaktionen von Quadratsäure Und Quadratsäure-Derivaten. *Synthesis (Stuttg)*. **1980**, 961–994.
- (152) Maahs, G.; Hegenberg, P. Synthesen Und Derivate Der Quadratsäure. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1966**, *78* (20), 927–931.
- (153) Chauhan, P.; Mahajan, S.; Kaya, U.; Hack, D.; Enders, D. Bifunctional Amine-Squaramides: Powerful Hydrogen-Bonding Organocatalysts for Asymmetric Domino/Cascade Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (2–3), 253–281.
- (154) Cohen, S.; Cohen, S. G. Preparation and Reactions of Derivatives of Squaric Acid. Alkoxy-, Hydroxy-, and Aminocyclobutenediones. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (7), 1533–1536.
- (155) Tietze, L. F.; Arlt, M.; Beller, M.; Gl üsenkamp, K. -H.; Jähde, E.; Rajewsky, M. F. Anticancer Agents, 15. Squaric Acid Diethyl Ester: A New Coupling Reagent for the Formation of Drug Biopolymer Conjugates. Synthesis of Squaric Acid Ester Amides and Diamides. *Chem. Ber.* **1991**, *124* (5), 1215–1221.
- (156) Quiñonero, D.; Frontera, A.; Ballester, P.; Deyà, P. M. A Theoretical Study of Aromaticity in Squaramide and Oxocarbons. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (12), 2001–2005.
- (157) Rostami, A.; Colin, A.; Li, X. Y.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S. N, N' -Diarylsquaramides: General, High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (12), 3983–3992.
- (158) Alemán, J.; Parra, A.; Jiang, H.; Jørgensen, K. A. Squaramides: Bridging from Molecular Recognition to Bifunctional Organocatalysis. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17* (25), 6890–6899.
- (159) Kaya, U.; Chauhan, P.; Mahajan, S.; Deckers, K.; Valkonen, A.; Rissanen, K.; Enders, D. Squaramide-Catalyzed Asymmetric Aza-Friedel–Crafts/N,O-Acetalization Domino Reactions Between 2-Naphthols and Pyrazolinone Ketimines. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56* (48), 15358–15362.
- (160) Sigman, M. S.; Jacobsen, E. N. Schiff Base Catalysts for the Asymmetric Strecker Reaction Identified and Optimized from Parallel Synthetic Libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (19), 4901–4902.
- (161) Bao, X.; Wu, X.; Berry, S. N.; Howe, E. N. W.; Chang, Y. T.; Gale, P. A. Fluorescent Squaramides as Anion Receptors and Transmembrane Anion Transporters. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (11), 1363–1366.
- (162) Busschaert, N.; Kirby, I. L.; Young, S.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Light, M. E.; Gale, P. A. Squaramides as Potent Transmembrane Anion Transporters. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51* (18), 4426–4430.
- (163) Busschaert, N.; Park, S.H.; Baek, K.H.; Marques, I.; Félix, V. et al. A Synthetic Ion Transporter That Disrupts Autophagy and Induces Apoptosis by Perturbing Cellular Chloride Concentrations. *Biomaterials* **2016**, *62* (7), 147–154.
- (164) Olmo, F.; Rotger, C.; Ramírez-Macias, I.; Martínez, L.; Marín, C.; Carreras, L.; Urbanová, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaur, G.; Sampedro, A.; et al. Synthesis and Biological Evaluation of N, N'-Squaramides with High in Vivo Efficacy and Low Toxicity: Toward a Low-Cost Drug against Chagas Disease. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (3), 987–999.
- (165) Glória, P. M. C.; Gut, J.; Goncalves, L. M.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Santos, M. M. M. Aza Vinyl Sulfones: Synthesis and Evaluation as Antiplasmodial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (24), 7635–7642.
- (166) Gonçalves, L. M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Kumar, S. P.; Ribeiro, C. J. A.; Santos, M. M. M.; Moreira, R. Squaric Acid/4-Aminoquinoline Conjugates: Novel Potent

- Antiplasmodial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 365–372.
- (167) Villalonga, P.; Fernández de Mattos, S.; Ramis, G.; Obrador-Hevia, A.; Sampredo, A.; Rotger, C.; Costa, A. Cyclosquaramides as Kinase Inhibitors with Anticancer Activity. *ChemMedChem* **2012**, *7* (8), 1472–1480.
- (168) Zhang, Q.; Xia, Z.; Mitten, M. J.; Lasko, L. M.; Klinghofer, V.; Bouska, J.; Johnson, E. F.; Penning, T. D.; Luo, Y.; Giranda, V. L.; et al. Hit to Lead Optimization of a Novel Class of Squarate-Containing Polo-like Kinases Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (24), 7615–7622.
- (169) Quintana, M.; Alegre-Requena, J. V.; Marqués-López, E.; Herrera, R. P.; Triola, G. Squaramides with Cytotoxic Activity against Human Gastric Carcinoma Cells HGC-27: Synthesis and Mechanism of Action. *MedChemComm* **2016**, *7* (3), 550–561.
- (170) Soll, R. M.; Kinney, W. A.; Primeau, J.; Garrick, L.; McCaully, R. J.; Colatsky, T.; Oshiro, G.; Park, C. H.; Hartupee, D.; White, V.; et al. 3-Hydroxy-3-Cyclobutene-1,2-Dione: Application of Novel Carboxylic Acid Bioisostere to an in-Vivo Active Non-Tetrazole Angiotensin-II Antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3* (4), 757–760.
- (171) Baudy, R. B.; Butera, J. A.; Abou-Gharbia, M. A.; Chen, H.; Harrison, B.; Jain, U.; Magolda, R.; Sze, J. Y.; Brandt, M. R.; Cummons, T. A.; et al. Prodrugs of Perzinfotel with Improved Oral Bioavailability. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (3), 771–778.
- (172) Urbahns, K.; Härter, M.; Albers, M.; Schmidt, D.; Stelte-Ludwig, B.; Brüggemeier, U.; Vaupel, A.; Keldenich, J.; Lustig, K.; Tsujishita, H.; et al. Biphenyls as Potent Vitronectin Receptor Antagonists. Part 3: Squaric Acid Amides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (22), 6151–6154.
- (173) Butera, J. A.; Antane, M. M.; Antane, S. A.; Argentieri, T. M.; Freeden, C.; Graceffa, R. F.; Hirth, B. H.; Jenkins, D.; Lennox, J. R.; Matelan, E.; et al. Design and SAR of Novel Potassium Channel Openers Targeted for Urge Urinary Incontinence. 1. N-Cyanoguanidine Bioisosteres Possessing in Vive Bladder Selectivity. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (6), 1187–1202.
- (174) Saha, A.; Panda, S.; Paul, S.; Manna, D. Phosphate Bioisostere Containing Amphiphiles: A Novel Class of Squaramide-Based Lipids. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (60), 9438–9441.
- (175) Seio, K.; Miyashita, T.; Sato, K.; Sekine, M. Synthesis and Properties of New Nucleotide Analogues Possessing Squaramide Moieties as New Phosphate Isosters. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, No. 24, 5163–5170.
- (176) Xu, P.; Trinh, M. N.; Kováč, P. Conjugation of Carbohydrates to Proteins Using Di(Triethylene Glycol Monomethyl Ether) Squaric Acid Ester Revisited. *Carbohydr. Res.* **2018**, *456*, 24–29.
- (177) Wurm, F.; Steinbach, T.; Klok, H. A. One-Pot Squaric Acid Diester Mediated Aqueous Protein Conjugation. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (71), 7815–7817.
- (178) Tietze, L. F.; Schröter, C.; Gabius, S.; Brinck, U.; Goerlach-Graw, A.; Gabius, H. J. Conjugation of P-Aminophenyl Glycosides with Squaric Acid Diester to a Carrier Protein and the Use of Neoglycoprotein in the Histochemical Detection of Lectins. *Bioconjugate Chem* **1991**, *2* (3), 148–153.
- (179) Gamblin, D. P.; Scanlan, E. M.; Davis, B. G. Glycoprotein Synthesis: An Update. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (1), 131–163.
- (180) Lee, Y. C.; Lee, R. T.; *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications*, Academic Press: San Diego, 1994.
- (181) Kevin L. Bicker, Jing Sun, Morgan Harrell, Yu Zhang, Maria M. Pena, P. R. T. and J. J. L. Synthetic Lectin Arrays for the Detection and Discrimination of Cancer Associated Glycans and Cell Lines. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1147.

- (182) Wurm, F. R.; Klok, H. A. Be Squared: Expanding the Horizon of Squaric Acid-Mediated Conjugations. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (21), 8220–8236.
- (183) Veronese, F. M.; Pasut, G. PEGylation, Successful Approach to Drug Delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (21), 1451–1458.
- (184) Caliceti, P.; Veronese, F. M. Pharmacokinetic and Biodistribution Properties of Poly(Ethylene glycol)–protein Conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1261–1277.
- (185) Dingels, C.; Wurm, F.; Wagner, M.; Klok, H. A.; Frey, H. Squaric Acid Mediated Chemoselective PEGylation of Proteins: Reactivity of Single-Step-Activated α -Amino Poly(Ethylene Glycol)s. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18* (52), 16828–16835.
- (186) Sejwal, P.; Han, Y.; Shah, A.; Luk, Y. Y. Water-Driven Chemoselective Reaction of Squarate Derivatives with Amino Acids and Peptides. *Org. Lett.* **2007**, *9* (23), 4897–4900.
- (187) Sejwal, P.; Narasimhan, S. K.; Prashar, D.; Bandyopadhyay, D.; Luk, Y. Y. Selective Immobilization of Peptides Exclusively via N-Terminus Cysteines by Water-Driven Reactions on Surfaces. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (17), 6843–6846.
- (188) Cui, D.; Prashar, D.; Sejwal, P.; Luk, Y. Y. Water-Driven Ligations Using Cyclic Amino Squarates: A Class of Useful SN1-like Reactions. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (4), 1348–1350.
- (189) Roy, T. K.; Parhi, B.; Ghorai, P. Cinchonamine Squaramide Catalyzed Asymmetric Aza-Michael Reaction: Dihydroisoquinolines and Tetrahydropyridines. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57* (30), 9397–9401.
- (190) Jacob, E.; Unger, R. A Tale of Two Tails: Why Are Terminal Residues of Proteins Exposed? *Bioinformatics* **2007**, *23* (2), 225–230.
- (191) Zhang, Z.; Marshall, A. G. A Universal Algorithm for Fast and Automated Charge State Deconvolution of Electrospray Mass-to-Charge Ratio Spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9* (3), 225–233.
- (192) Lai, W.; Tang, D.; Fu, L.; Que, X.; Zhuang, J.; Chen, G. A Squaric Acid-Stimulated Electrocatalytic Reaction for Sensing Biomolecules with Cycling Signal Amplification. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (42), 4761–4763.
- (193) Uchida, K.; Stadtman, E. R. Modification of Histidine Residues in Proteins by Reaction with 4-Hydroxynonenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 4544–4548.
- (194) Pace, C. N.; Grimsley, G. R.; Scholtz, J. M. Protein Ionizable Groups: PK Values and Their Contribution to Protein Stability and Solubility. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (20), 13285–13289.
- (195) Robinson, L.; Fontaine, S. D.; Ashley, G. W.; Reid, R.; Santi, D. V. Long-Term Stabilization of Maleimide–Thiol Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *26* (1), 145–152.
- (196) Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. Olefin Cross-Metathesis on Proteins: Investigation of Allylic Chalcogen Effects and Guiding Principles in Metathesis Partner Selection. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (47), 16805–16811.
- (197) Oregioni, A.; Stieglitz, B.; Kelly, G.; Rittinger, K.; Frenkiel, T. Determination of the PKa of the N-Terminal Amino Group of Ubiquitin by NMR. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–8.
- (198) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (199) Shinada, T.; Yamasaki, A.; Kaniwa, Y.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y. Thiol Addition to T-Butyl Methyl Squarate. Efficient Synthesis of Novel Sulfur-Linked Squaryl Group-Containing Glutamate Analogs. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (30), 4354–4357.

- (200) Belluš, D. Synthesis and Reactivity of Compounds with Cyclobutane Ring(s). 10. Syntheses of Squaric Acid, Its Monoorthoesters, and Related Derivatives via [2 + 2] Cycloadditions of Tetraalkoxyethylenes with Heterosubstituted Ketenes. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (8), 1208–1211.
- (201) Eggerding, D.; West, R. Synthesis of the Monothiosquarate and 1,2-Dithiosquarate Ions and Their Derivatives. *J. Org. Chem.* **1976**, *41* (24), 3904–3909.
- (202) Coucouvanis, D.; Hollander, F. J.; West, R.; Eggerding, D. Synthesis of 1,2-Dithiosquarate Salts and X-Ray Crystal Structure of Potassium Bis(Dithiosquarato)Nickelate(II). *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (9), 3006–3008.
- (203) Kraus, J.-L. Sur La Reactivite Du Squarate de Dimethyle Vis-a-Vis de Thiols. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (16), 1765–1768.
- (204) DeChancie, J.; Houk, K. N. The Origins of Femtomolar Protein-Ligand Binding: Hydrogen-Bond Cooperativity and Desolvation Energetics in the Biotin-(Strept)Avidin Binding Site. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (17), 5419–5429.
- (205) Mayor, U.; Martinez-Chantar, M. L.; Lee, S. Y.; Migotti, R.; Mansfield, B.; Ramirez, J.; Sutherland, J. D.; Dittmar, G.; Lectez, B.; Beraza, N. Ubiquitin Profiling in Liver Using a Transgenic Mouse with Biotinylated Ubiquitin. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (6), 3016–3026.
- (206) Li, S.; Wang, L.; Yu, F.; Zhu, Z.; Shobaki, D.; Chen, H.; Wang, M.; Wang, J.; Qin, G.; Erasquin, U. J.; et al. Copper-Catalyzed Click Reaction on/in Live Cells. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (3), 2107–2114.
- (207) Gaetke, L. M.; Chow, C. K. Copper Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidant Nutrients. *Toxicology* **2003**, *189* (1–2), 147–163.
- (208) Abello, N.; Kerstjens, H. A. M.; Postma, D. S.; Bischoff, R. Selective Acylation of Primary Amines in Peptides and Proteins. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (12), 4770–4776.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

1.- Síntesis y caracterización de productos

1.1.- Consideraciones generales

Todos los productos químicos utilizados proceden de las casas comerciales Sigma Aldrich, TCI Europe, Fluka, Alfa Aesar, Merck Chemicals y Acros Organics. Los disolventes empleados proceden de Carlo Erba y Panreac. Los disolventes anhidros se obtuvieron mediante purificación través de una columna de alúmina activada en un sistema de purificación de disolventes (SPS). Para los análisis mediante HPLC y UPLC-TOF se utilizaron disolventes de grado HPLC. La proteasa empleada en la digestión de las proteínas procede de la casa comercial Sigma Aldrich: endoproteinasa Glu-C procedente de *Staphylococcus aureus* V8. La quimotripsina empleada en la digestión peptídica procede de la casa comercial Sigma Aldrich: α -Quimotripsina del páncreas bovino.

Las reacciones de síntesis de los compuestos fueron monitorizadas mediante análisis por cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizaron láminas de aluminio recubiertas con ALUGRAM® SIL G / UV254 (0.2 mm de espesor, Macherey-Nagel). Como agente de visualización se empleó luz ultravioleta (UV) a $\lambda=254$ nm o las siguientes disoluciones de revelado:

Disolución de ácido fosfomolibdico. Se disuelven 100 mL de la disolución preparada de ácido fosfomolibdico al 20 % (20 g /100 mL en etanol) en 100 mL de etanol.

Disolución de ninhidrina. Se disuelven 0.2 g de ninhidrina en 100 mL de etanol absoluto.

La **cromatografía** en columna *flash* se llevó a cabo con los disolventes indicados en la sección experimental (apartados 1.2, 1.3) utilizando como fase estacionaria gel de sílice “flash-grade” de 60 Å (37-70 μ m). Las separaciones se llevaron a cabo manualmente utilizando columnas de vidrio de diferentes tamaños o bien empleando Isolera Biotage Prime con el cartucho y gradiente de disolvente indicados en el procedimiento experimental (apartados 1.2, 1.3, 1.4).

Los espectros de **RMN** fueron registrados a temperatura ambiente en un equipo Varian Mercury 400 utilizando como disolventes CDCl_3 , CD_3OD y $\text{DMSO}-d_6$. La calibración se realizó tomando como referencia el pico del disolvente correspondiente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) en relación con la señal del disolvente y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertzios (Hz). Las multiplicidades observadas en la asignación de señales aparecen en el texto de la siguiente manera: s (singulete), d (doblete), dd (doble doblete), ddd (doblete de dobletes de dobletes),

t (tripleto), td (triple doblete), tap (tripleto aparente), q (cuartete), m (multiplete), br (señal amplia), tap (tripleto aparente).

Las reacciones con **irradiación de microondas** se llevaron a cabo en un reactor CEM Discover Focused™. El instrumento consiste en un sistema de suministro continuo de energía de microondas enfocada con una potencia de salida seleccionable por el operador de 0 a 300 W. Las reacciones se realizaron en recipientes de vidrio de 10 ml sellados con septum. La temperatura del contenido del recipiente se controló utilizando un sensor de infrarrojo (IR) y la temperatura indicada corresponde a la temperatura máxima alcanzada durante cada experimento. El contenido de los recipientes se agita por medio de una placa magnética giratoria ubicada debajo de la cavidad del microondas y una barra de agitación magnética recubierta de teflón en el recipiente. El tiempo especificado corresponde al tiempo total de irradiación. El enfriamiento eficiente se logra por medio de aire presurizado durante todo el experimento. Los perfiles de temperatura, presión y potencia se monitorizaron utilizando el software disponible comercialmente proporcionado por el fabricante del microondas.

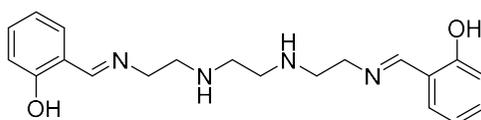
Las reacciones de los compuestos derivados de ácido escuárico con los diferentes péptidos fueron monitorizadas mediante **HPLC**. Se utilizó un equipo Waters 2695 acoplado a un detector de fotodiodos utilizando una columna de fase reversa C18 (Bridge C18 3.5 μm , 4.6x100 mm columna). La detección por UV se realizó a 220 nm y el gradiente empleado fue de acetonitrilo (ACN) (0.036% de ácido trifluoroacético TFA) en H₂O (0.045% TFA) en 8 min desde 5% a 70% a un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección de muestra fue de 5 μL .

Las reacciones de los compuestos derivados de ácido escuárico con las diferentes proteínas fueron monitorizadas mediante **UPLC-TOF** y **HPLC-MS**. Los análisis de espectrometría de masas se registraron en el equipo UPLC Acquity acoplado a un espectrómetro de masas con un detector de tiempo de vuelo Premier LCT (Waters) utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI). Los datos fueron adquiridos en ESI positivo. Las muestras, con un volumen de inyección de 10 μL , se analizaron en una columna C18 (Acquity UPLC® BEH C18 1.7 μm , 2.1 x 100 mm columna) donde la fase móvil utilizada es una mezcla de ACN (0.076 % de ácido fórmico)/H₂O (0.076 % de ácido fórmico) en un gradiente de 5 a 100% de ACN en agua durante 8 min. Las relaciones m/z se muestran en unidades de masa atómica.

La adquisición de espectros de los péptidos modificados para determinar la selectividad N-terminal vs el grupo ε-amino, se realizó mediante un espectrómetro de masas **MALDI-TOF/TOF** (AutoFLEX III, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con un láser de N₂ pulsado (337 nm) en modo reflector positivo con un voltaje de aceleración de 19 kV. Los espectros fueron adquiridos como la suma de 200 disparos con una frecuencia de 200 Hz y el rango de masa utilizado para el análisis fue de 600-2500 Da. La matriz (10 mg/mL ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en ACN/H₂O 2:1 0.1%TFA) se mezcló con la muestra (μM) en proporción 1:1, a continuación se depositó 1 μL de la mezcla en la placa y se dejó secar.

1.2.- Síntesis de nuevos inhibidores de Atg4B

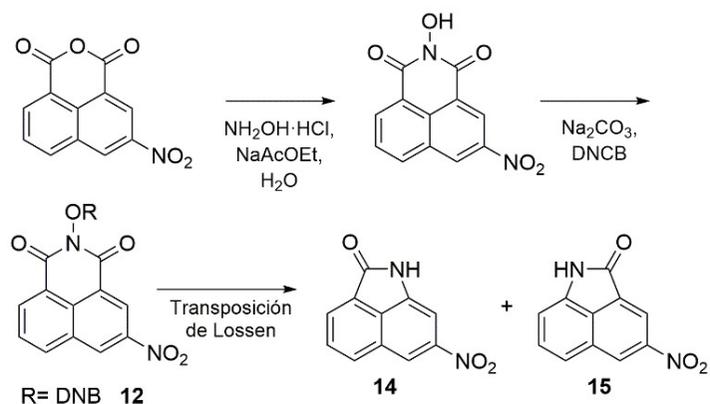
1.2.1.- Síntesis de la imina simétrica NSC43949



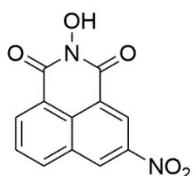
2,2'-((1E,11E)-2,5,8,11-tetraazadodeca-1,11-dieno-1,12-diilo)difenol (NSC43949). En la síntesis de este compuesto, los reactivos comerciales aldehído salicílico (436.3 μL, 4.09 mmol) y trietilentetramina (306.1 μL, 2.05 mmol) se disolvieron en 5 mL de metanol. Después del calentamiento a reflujo (70 °C) durante 3 h, se eliminó el disolvente mediante presión reducida y se adicionó CH₂Cl₂ (x3) con la finalidad de extraer las fases orgánicas y secarlas sobre Na₂SO₄ anhidro. Finalmente, el disolvente se evaporó a presión reducida y se obtuvo el compuesto como un sólido amarillo (286.4 mg, 0.8 mmol, 40 %). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 8.22 (s, 2H), 7.59-6.68 (m, 8H), 3.41 (d, J=4 Hz, 4H), 2.95 (m, 4H), 2.65 (m, 4H). **HRMS: (m/z) calcd.** para C₂₀H₂₆N₄O₂: 355.2134 [M+H]⁺, encontrada 355.2166 [M+H]⁺. Imina-aminal: **¹H RMN** (Se han encontrado picos importantes: imina [8.22 (s, 2H)], aromáticos [7.59-6.68 (m, 12H)], 3.57 (m, 4H). **HRMS: (m/z) calcd.** para C₂₇H₃₀N₄O₃: 459.2396 [M+H]⁺, encontrada 459.2426 [M+H]⁺.

1.2.2- Síntesis de NSC611216 y su regioisómero

▪ Vía de síntesis 1



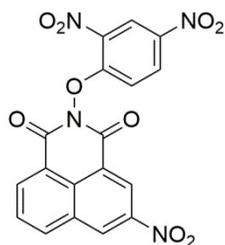
Esquema 30. Esquema de síntesis de los compuestos **14** y **15** mediante la vía de síntesis 1.



2-hidroxi-5-nitro-1H-benzo[de]isoquinolina-1,3(2H)-diona.

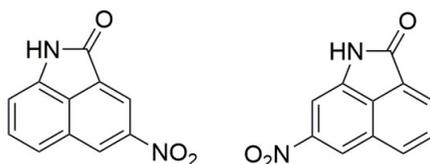
Dicha síntesis se inició a partir del anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico disponible comercialmente. Se preparó una disolución del anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico (1 g, 4.11 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (342.9 mg, 4.93 mmol) y acetato de sodio (404.4 mg, 4.93 mmol) en 15 mL de agua destilada. La mezcla de reacción se calentó con agitación a 80 °C durante 3 h. El producto se aisló por filtración y se lavó con agua. El crudo sólido de color marrón pálido resultante se utilizó en la siguiente reacción sin ninguna manipulación adicional (1.0 g, 3.89 mmol, 95%). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.98 (s, 1H), 9.50 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 8.97 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 8.79 (d, $J=8$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.07 (t, $J=7.2$ Hz, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160.1, 159.6, 145.7, 136.4, 133.9, 130.8, 129.8, 129.2, 128.3, 124.2, 122.8, 122.7. HRMS: (m/z) calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_5$: 257.0198 [M-H] $^-$, encontrada 257.0211 [M-H] $^-$.

2-(2,6-dinitrofenoxi)-5-nitro-1H-benzo[de]isoquinolina-1,3(2H)-diona (**12**). Una



disolución de la diona anterior (700 mg, 2.71 mmol), Na_2CO_3 (151.6 mg, 1.43 mmol) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (645.6 mg, 3.19 mmol) en 40 mL de agua destilada, se calentó a reflujo. La disolución de color anaranjada adquirió con el transcurso del tiempo una tonalidad marrón pálido. Tras 2 h, el material de partida se consumió (según se verificó mediante CCF) y el matraz

se dejó enfriar por debajo de 50 °C y se filtró. El material resultante se lavó con H₂O y se redisolvió en metanol calentando durante 2 h a reflujo para eliminar el exceso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno. Posteriormente, se dejó enfriar, el precipitado se filtró en placa filtrante lavando con metanol frío y se secó para obtener un producto de color marrón rojizo (930 mg, 2.19 mmol, 81%).⁴ **¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 9.60 (s, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.98 (dd, *J*=12.3, 2.5 Hz, 2H), 8.89 (d, *J*=8 Hz, 1H), 8.74 (dd, *J*=7.4, 1.1 Hz, 1H), 8.63 (m, 1H), 8.44 (dd, *J*=9.3, 2.7 Hz, 1H), 8.16-8.10 (m, 2H). **¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 159.2, 158.8, 155.0, 145.8, 142.9, 137.3, 136.7, 134.5, 130.7, 130.5, 129.8, 129.6, 129.3, 124.6, 123.3, 123.1, 122.1, 116.6. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₈H₈N₄O₉: 423.0213 [M-H]⁻, encontrada 423.0250 [M-H]⁻.



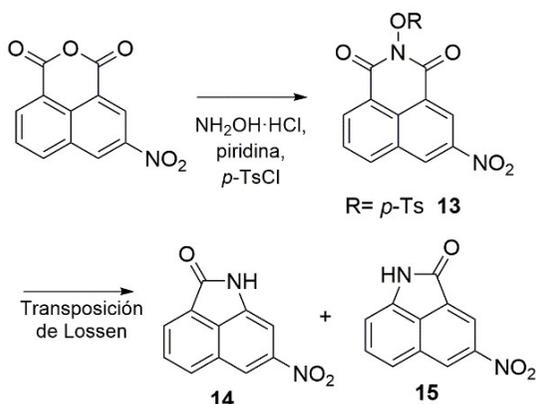
4-Nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona y 7-Nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**14**, **15**).

Se añadió NaOH (75.5 mg, 1.89 mmol) a una disolución de 4 mL de agua destilada y 10 mL de EtOH (H₂O:EtOH, 2:5)⁵ y seguidamente se adicionó **12** (200 mg, 0.47 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Tras este tiempo, aproximadamente el 50% del disolvente se evaporó. Posteriormente se añadió agua destilada (6 mL) a la disolución restante. La mezcla de reacción se filtró y el precipitado se desechó. Al filtrado se añadió una disolución de HCl 1N con la finalidad de ajustar el pH a 2-3 y posteriormente dicha mezcla se calentó a 70 °C durante 2 h. A continuación, se extrajo directamente el filtrado con clorobenceno (x3)⁵. Posteriormente, las fases orgánicas se juntaron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó bajo presión reducida dando lugar a un sólido anaranjado (66.8 mg, 0.31 mmol, 66%) como una mezcla de regioisómeros 4-Nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**15**) y 7-Nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**14**) en una proporción 2:1 respectivamente determinado por RMN.

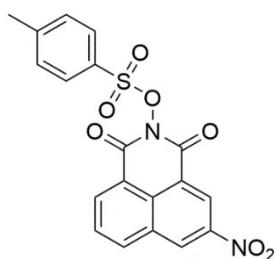
Rendimiento global: (0.95 x 0.81 x 0.66) x 100 = 50.8%

Con la finalidad de incrementar el rendimiento total de esta síntesis, se exploró otro procedimiento experimental.

▪ **Vía de síntesis 2**

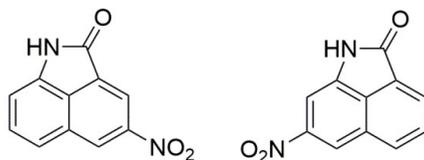


Esquema 31. Esquema de síntesis de los compuestos **14** y **15** mediante la vía de síntesis 2.



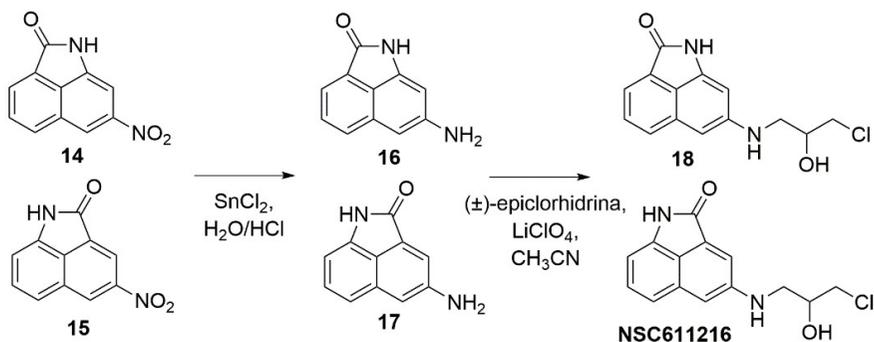
p-toluensulfonato de 5-nitro-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-2(3*H*)-ilo (**13**).

El reactivo comercial anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico (500 mg, 2.06 mmol) y el clorhidrato de hidroxilamina (142.9 mg, 2.06 mmol) se disolvieron en 7 mL de piridina. La mezcla de reacción resultante se calentó a reflujo durante 1 h. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y entonces se añadió el cloruro de *p*-toluensulfonilo (784 mg, 4.11 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h adicionales, y tras este tiempo, se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo (50 mL) y se agitó hasta la aparición de un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó con agua fría y con NaHCO₃ saturado para dar lugar al compuesto deseado como un sólido amarillento con un rendimiento cuantitativo (830 mg, 2.06 mmol, 100%).
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.30 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.81 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 8.52 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 8.0 (m, 3H), 7.44 (m, 2H), 2.52 (s, 3H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 159.0, 158.4, 147.0, 146.5, 136.9, 135.7, 133.7, 132.0, 131.5, 130.2, 130.1, 129.6, 129.5, 125.4, 124.1, 122.9, 22.1. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₉H₁₂N₂O₇S [M+H]⁺: 413.0443, encontrada 413.0409.

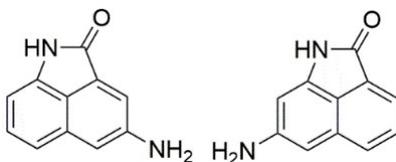


4-nitrobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (15) y 7-nitrobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (14). El compuesto **13** (778 mg, 1,89 mmol) se disolvió en etanol (5 mL) y H₂O (4 mL) y se añadió una disolución acuosa de hidróxido de sodio (2.7 M, 3 mL) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 1 h mientras se destilaba etanol. Cuando el análisis por capa fina mostró la finalización de la reacción, la mezcla se enfrió y se añadió gota a gota ácido clorhídrico concentrado hasta que se formó un precipitado amarillo. Tras enfriar a temperatura ambiente, el precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua, dando lugar a una mezcla de 4- y 7-nitrobenzo [cd] indol-2 (1H) -ona (390 mg, 1.82 mmol, 97%) en una proporción 2:1 determinado por RMN. **4-Nitrobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (15).** ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.14 (s, 1H), 9.21 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 8.59 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 7.86 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J*=8.5, 7.2 Hz, 1H), 7.19 (d, *J*=7.1 Hz, 1H); **7-Nitrobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (14).** ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.14 (s, 1H), 8.73 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 8.48 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 8.24 (d, *J*=7.0 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J*=8, 7.5 Hz, 1H), 7.58 (d, *J*=1.6 Hz, 1H). **HRMS: (*m/z*) calcd.** para C₁₁H₆N₂O₃ [M-H]: 213.0300, encontrada 213.0344.

Rendimiento global: $(1 \times 0.97) \times 100 = 97\%$

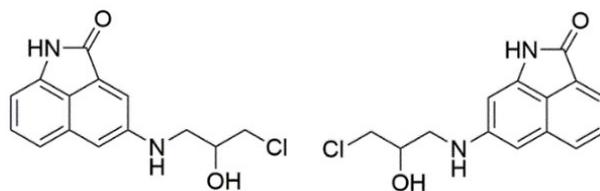


Esquema 32. Esquema de síntesis de los compuestos **18** y **NSC611216**.



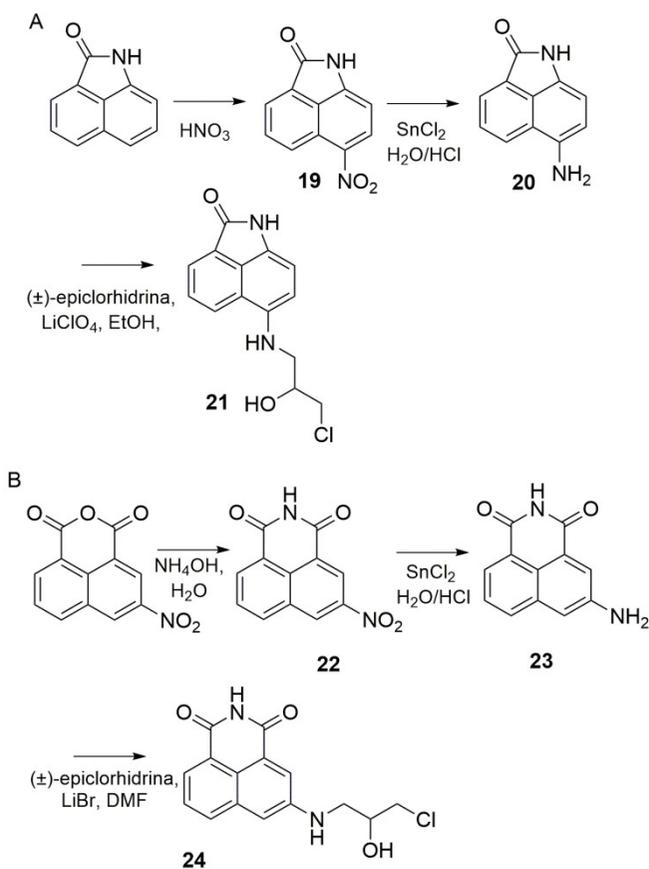
4-aminobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (17) y 7-aminobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (16).

Inicialmente el SnCl₂ (2.6 g, 13.89 mmol) se disolvió en HCl (37%, 14 mL) y H₂O (5 mL). A esta disolución, se añadió lentamente una mezcla de 4-nitrobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (15) y 7-nitrobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (14) (700 mg, 3.27 mmol). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 4 h y la reacción se siguió mediante cromatografía en capa fina. Posteriormente, se enfrió la mezcla a 0 °C y la reacción se basificó mediante la adición de una disolución acuosa de NaOH 6 M. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a presión reducida para proporcionar una mezcla 2:1 de 4- y 7-aminobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (540 mg) que se separó por cromatografía en fase normal (Isolera Biotage, Cartucho SNAP KP-Sil 25 g, eluyente CH₂Cl₂/MeOH (de 98:2 a 97:3), dando lugar al compuesto **17** puro (103.6 mg, 0.56 mmol) y **16** (56.2 mg, 0.31 mmol), junto con una mezcla de ambos (369.1 mg, 2.00 mmol) con un rendimiento total del 88%. **4-aminobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (17)**. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.50 (d, J=1.6 Hz, 1H), 7.31 (m, 2H), 7.23 (d, J=1.5 Hz, 1H), 6.73 (dd, J=6.0, 1.4 Hz, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 172.3, 151.0, 138.7, 132.1, 130.0, 128.9, 121.0, 120.0, 115.9, 113.3, 104.7. HRMS: (m/z) calcd. para C₁₁H₈N₂O [M+H]⁺: 185.0715, encontrada 185.0702; **7-aminobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (16)**. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.75 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.67 (d, J=6.8 Hz, 1H), 7.57 (dd, J=8.1, 7.1 Hz, 1H), 6.65 (d, J=1.4 Hz, 1H), 6.62 (d, J=1.4 Hz, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 173.0, 150.7, 139.7, 132.5, 129.9, 129.7, 127.5, 122.5, 120.2, 101.8, 100.1. HRMS: (m/z) calcd. para C₁₁H₈N₂O [M+H]⁺ : 185.0715, encontrada 185.0712.

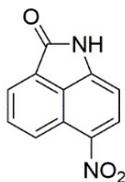


4-((3-cloro-2-hidroxiopropil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (NSC611216) y 7-((3-cloro-2-hidroxiopropil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**18**). A una disolución de LiClO₄ (101.7 mg, 0.96 mmol) y (±) epiclorohidrina (22.1 mg, 0.24 mmol) en ACN (2 mL), se añadió una mezcla de anilinas **16** y **17** (44 mg, 0.24 mmol) y se agitó bajo irradiación de microondas durante 60 min (150 °C, 150 PSI, 150W). La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, dando lugar al crudo de reacción el cual se purificó en columna cromatográfica utilizando una proporción de disolventes CH₂Cl₂/MeOH (de 99:0 + 1% NEt₃ a 95:5 + 1% NEt₃) obteniéndose así el compuesto NSC611216 (18 mg, 28%) y **18** (10 mg, 15%). NSC611216: ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.53 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 7.39-7.30 (m, 2H), 7.14 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J*=5.3, 2.2 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.77-3.64 (dq, *J*=11.2 Hz, 3.2 Hz, 2H), 3.51 (dd, *J*=7.6 Hz, 5.2 Hz, 1H), 3.33 (m, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 175.5, 151.6, 138.7, 132.3, 130.1, 129.0, 120.7, 120.1, 115.4, 109.3, 104.5, 70.8, 48.3, 48.1. HRMS: (*m/z*) calcd. para C₁₄H₁₃ClN₂O₂ [M+H]⁺: 277.0587, encontrada 277.0280; **18**: ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.38 (d, *J*=1.0 Hz, 1H), 7.31 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 6.96 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J*=5.9, 1.7 Hz, 2H), 4.59 (br s, 1H), 4.31(m, 1H), 3.80-3.64 (m, 2H), 3.51 (dd, *J*=13.4, 5.2 Hz, 1H), 3.35 (m, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 172.3, 151.6, 138.7, 132.3, 130.1, 128.9, 120.6, 120.1, 115.4, 109.3, 104.5, 78.8, 48.1, 47.9. HRMS: (*m/z*) calcd. para C₁₄H₁₃ClN₂O₂ [M+H]⁺: 277.0744, encontrada 277.0765.

1.2.3- Síntesis de análogos de NSC611216

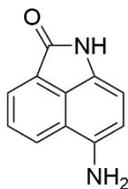


Esquema 33. Esquema de síntesis de los compuestos 21 (A) y 24 (B).

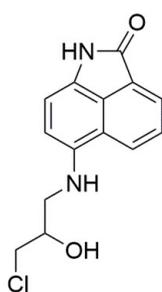


6-nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (19). Sobre una disolución de benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (500 mg, 3 mmol) en 5 mL de ácido acético glacial, se añadió gota a gota una disolución de ácido nítrico al 70% (171 μ L, 3.84 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 1.5 h y luego se enfrió a temperatura ambiente. La suspensión verdosa resultante se filtró, se lavó con ácido acético acuoso al 50% y se secó. El sólido obtenido se disolvió en 7 mL de MeOH y se calentó a reflujo durante 4 h (la mezcla resultante adquirió una tonalidad naranja) y posteriormente se enfrió a 0 °C. Finalmente, la mezcla se filtró, se lavó con MeOH frío y se secó a presión reducida para proporcionar un material crudo de color naranja (700 mg) el cual se utilizó en la siguiente reacción sin ninguna purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm): 9.07 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 8.62 (d, *J*=8.1

Hz, 1H), 8.18 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.98 (dd, $J=8.6, 7.0$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J=8.0$ Hz, 1H);
HRMS: (m/z) calcd. para $C_{11}H_6N_2O_3$ [M-H]⁻: 213.0300 encontrada 213.0341.



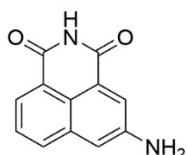
6-aminobenzo[cd]indol-2(1H)-ona (20). El crudo **19** (171 mg, 0.8 mmol) se añadió lentamente a una disolución de $SnCl_2$ (645 mg, 3.40 mmol) en HCl (37%, 4 mL) y agua (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 4 h. Posteriormente se enfrió a 0 °C y se basificó hasta pH 10 mediante la adición de una solución acuosa de NaOH 6M. Seguidamente el material crudo se filtró a través de celite, se extrajo con acetato de etilo (x3), las fases orgánicas se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporó el disolvente en el rotavapor obteniéndose el compuesto deseado (147 mg, 0.978 mmol, 100%). **¹H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 10.87 (br s, 1H), 8.32 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J=8.3, 7.0$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J=7.5$ Hz, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 168.6, 137.2, 131.5, 129.4, 127.1, 125.9, 124.8, 123.4, 123.3, 122.2, 105.9; **HRMS:** (m/z) calcd. para $C_{11}H_8N_2O$ [M+H]⁺: 185.0715, encontrada 185.0689.



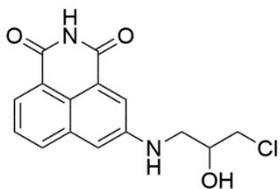
6-((3-cloro-2-hidroxiopropil)amino)benzo[cd]indol-2(1H)-ona (21). La anilina **20** (40 mg, 0.22 mmol) se adicionó a una disolución que contenía $LiClO_4$ (76.7 mg, 0.72 mmol) y (\pm)-epiclorohidrina (20 mg, 0.22 mmol) en etanol (2 mL). La mezcla resultante se calentó a 80 °C durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se añadió otro eq. de (\pm)-epiclorhidrina y la reacción se calentó durante 24 h adicionales. Finalmente, se añadió agua (2 mL) y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas se lavaron con salmuera y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo resultante se purificó mediante columna cromatográfica ($CH_2Cl_2/MeOH$, con un gradiente desde 0% a 10% de metanol) dando lugar al compuesto **21** (12.6 mg, 0.045 mmol, 21%) junto con material de partida sin reaccionar (22.4 mg, 0.122 mmol, 54%). **¹H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 8.33 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J=8.2, 7.0$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.51-3.99 (m, 4H), 3.36 (s, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 171.5, 165.0, 128.31, 128.1, 127.5, 125.3, 123.3, 110.4, 105.7, 105.0, 70.5, 49.3, 48.2, 37.0. **HRMS:** (m/z) calcd. para $C_{14}H_{13}ClN_2O_2$ [M+H]⁺: 277.0744, encontrada 277.0737.



5-nitro-1H-benzo[de]isoquinolina-1,3(2H)-diona (22). A una disolución de anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico disponible comercialmente (560 mg, 2.30 mmol) en H₂O (10 mL) se añadió hidróxido de amonio (448 μ L) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 h. Posteriormente, la mezcla se enfrió a 0 °C y el precipitado obtenido se recogió por filtración y se lavó con agua fría y etanol. El sólido se secó al vacío para dar el producto esperado que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional (486.7 mg, 2.01 mmol, 87%). **¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm):** 12.03 (br s, 1H), 9.43 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 8.87 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.74 (d, *J*=8,3 Hz, 1H), 8.60 (dd, *J*=7.2, 1.1 Hz, 1H), 8.02 (t, *J*=7,5 Hz, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm):** 163.5, 162.9, 145.8, 136.3, 133.1, 131.1, 130.8, 129.7, 129.1, 124.5, 123.0, 122.2. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₂H₆N₂O₄ [M-H]⁻: 241.0249, encontrada 241.0219.



5-Amino-1H-benzo[de]isoquinolina-1,3(2H)-diona (23). El compuesto **22** (300 mg, 1.24 mmol) se añadió lentamente como un sólido a una disolución de SnCl₂ (998 mg, 5.26 mmol) en HCl (37%, 12 mL) y agua (5 mL). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C hasta completar la reacción. Tras enfriar la mezcla a 0 °C, la reacción se basificó hasta pH 10 añadiendo una disolución de NaOH 6M. La amina deseada se extrajo con acetato de etilo (x3). Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄) y se concentraron a vacío para proporcionar el compuesto **23** (283 mg, 100%). **¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 11.53 (br s, 1H), 8.0 (d, *J*=7.7 Hz, 2H), 7.89 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.58 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.26 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H). **¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 164.5, 164.3, 147.7, 133.8, 131.5, 126.8, 124.7, 123.1, 122.2, 121.8, 121.0, 111.7. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₂H₈N₂O₂ [M + H]⁺: 213.0664, encontrada 213.0647.

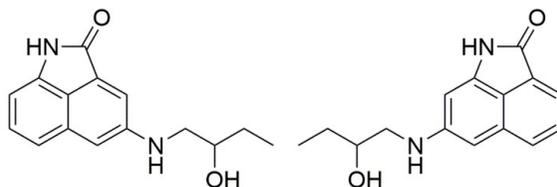


5-((3-cloro-2-hidroxipropil)amino)-1H-benzo[de]isoquinolina-1,3(2H)-diona (24). Se preparó una disolución de (\pm)-epiclorhidrina (36.8 μ L, 0.47 mmol) en DMF (1 mL) a la cual se añadió LiBr (5% mol, 0.0235 mmol) y a continuación la anilina **23** (100 mg, 0.47 mmol). La mezcla se calentó a 100 °C durante la noche. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas

combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío para dar un producto crudo, el cual se purificó por columna cromatográfica (Isolera Biotage, SNAP Cartucho KP-C18-HS 12 g, utilizando como eluyentes agua + 0.1% HCOOH/ACN + 0.1% HCOOH (con una proporción 90:10 a 80:20) para proporcionar el compuesto deseado (16 mg, 0,057 mmol, 12%). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8.20 (dd, J=7.1, 0.8 Hz, 1H), 8.04 (d, J=2.3 Hz, 1H), 7.99 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.60 (t, J=7.5 Hz, 1H), 7.37 (d, J=2.2 Hz, 1H), 4.45-4.37 (m, 1H), 4.26-4.15 (m, 2H), 3.72-3.57 (ddd, J=30.6, 11.3, 4.2 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 166.4, 166.2, 148.9, 135.3, 133.1, 128.0, 127.7, 124.1, 123.4, 123.3, 123.1, 114.7, 70.3, 48.5, 44.6. HRMS: (m/z) calcd. para C₁₅H₁₃ClN₂O₃ [M+H]⁺: 305.0693, encontrada 305.0613.

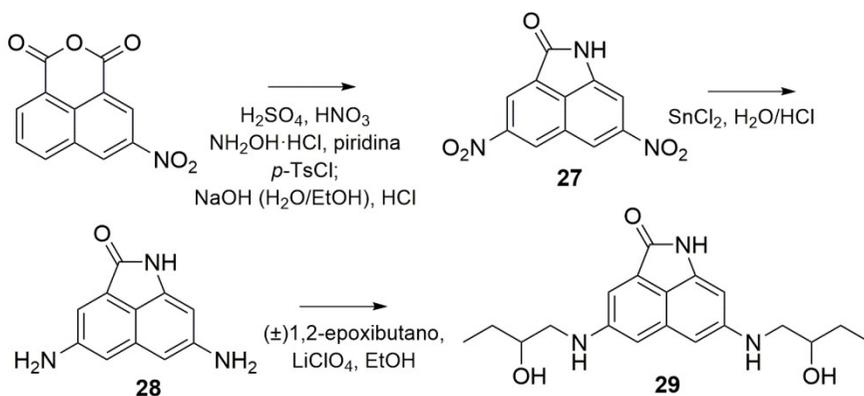
Procedimiento general para la síntesis de derivados de aminobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona.

Inicialmente se preparó una disolución de LiClO₄ (4 eq.) y el correspondiente epóxido (1.5 eq.) en EtOH y dicha disolución se adicionó a una mezcla 2:1 de 4 y 7 aminobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**17** y **16**, 1 eq.). La mezcla resultante se calentó a 80 °C durante 16 h. Posteriormente el disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por columna cromatográfica con una mezcla de disolventes CH₂Cl₂/MeOH como eluyentes. Alternativamente, la mezcla de reacción se calentó bajo radiación de microondas durante 60 min (150 °C, 150 PSI, 150 W). Posteriormente, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron bajo presión reducida dando lugar a un producto crudo, el cual fue purificado mediante columna cromatográfica.



4-((2-hidroxibutil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**25**) y 7-((2-hidroxibutil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**26**). Se aplicó el procedimiento general a 40 mg (0.22 mmol) de una mezcla 2:1 de 4- y 7-aminobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona y (*R,S*)-(±)-1,2-epoxibutano dando lugar a 29 mg de **25** (0.113 mmol, 52%), 8.4 mg de **26** (0.033 mmol, 15%) junto con 10.6 mg (0.061 mmol, 28%) de la mezcla de anilinas sin

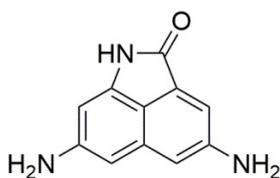
reaccionar. (25) $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.50 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.07 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 6.71 (dd, $J=5, 2.5$ Hz, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.32 (dd, $J=13.5, 4.3$ Hz), 3.14 (dd, $J=13, 7.3$ Hz), 1.70 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.04 (t, $J=7.5$ Hz, 3H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 172.4, 151.8, 138.6, 132.3, 130.0, 128.8, 120.5, 120.1, 115.4, 109.2, 104.4, 72.3, 51.0, 29.0, 10.4. HRMS: (m/z) calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 257.1290$, encontrada 257.1306. (26) $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.78 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J=8.1, 7.1$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.15 (dd, $J=12.8, 7.1$ Hz, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.05 (t, $J=7.4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 173.1, 151.5, 139.5, 132.9, 130.0, 129.7, 129.6, 127.4, 119.6, 101.6, 95.5, 72.2, 50.8, 29.1, 10.4. HRMS: (m/z) calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 257.1290$, encontrada 257.1292.



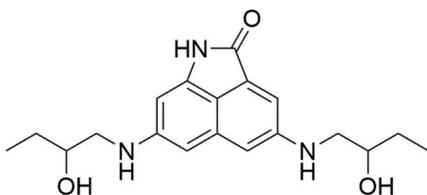
Esquema 34. Esquema de síntesis del compuesto 29.

4,7-dinitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (27). El reactivo comercial anhídrido 3-nitro-1,8-naftálico (1.2 g, 4.9 mmol) se disolvió en un matraz que contenía ácido sulfúrico (4 mL, 73.3 mmol). La mezcla resultante se enfrió a 5 °C en un baño de hielo y se adicionó ácido nítrico gota a gota (905 μL , 21.7 mmol). Posteriormente, la mezcla de reacción se agitó durante 90 min a 60 °C y se diluyó mediante la adición de agua, se neutralizó con una disolución acuosa de NaHCO_3 y se extrajo con diclorometano (x3). Las fases orgánicas se reunieron, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron bajo presión reducida para dar lugar al anhídrido 3,6-dinitro-1,8-naftálico (673 mg, 2.3 mmol, 47%).⁷ $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 9.76 (d, $J=2.1$ Hz, 2H), 9.24 (d, $J=2.1$ Hz, 2H).

Dicho compuesto, el anhídrido 3,6-dinitro-1,8-naftálico (1.3 g, 4.51 mmol) y el clorhidrato de hidroxilamina (313 mg, 4.51 mmol) se disolvieron en piridina (13 mL). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 1 h y se bajó la temperatura posteriormente a 80 °C. Posteriormente, se adicionó a la reacción cloruro de *p*-toluenosulfonilo (1.7 g, 9 mmol) y se calentó a reflujo durante 2 h adicionales. Seguidamente, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo (50 mL) y se agitó. El precipitado de color marrón se filtró y se lavó con agua fría y una disolución saturada de NaHCO₃ dando lugar al compuesto 5,8-dinitro-1,3-dioxo-1H-benzo [*de*] isoquinolin-2 (3H)-il *p*-toluenosulfonato (1.5 g, 3.40 mmol, 84%). El compuesto resultante se disolvió en etanol (6 mL) y H₂O (5 mL) y seguidamente se adicionó una disolución acuosa de hidróxido de sodio (2.7 M, 4 mL) a temperatura ambiente. La reacción se calentó a reflujo durante 3 h mientras se destilaba etanol y cuando se completó la reacción, la mezcla se enfrió, se añadió una disolución de ácido clorhídrico (37%) gota a gota y se formó un precipitado. Dicho precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua dando lugar al compuesto 4,7-dinitrobenzo[*cd*]indol-2(1H)-ona (700 mg, 2.70 mmol, 77%) el cual se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional. **¹H RMN (400 MHz, acetona-*d*₆) δ (ppm):** 10.41 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.85 (s, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, acetona-*d*₆) δ (ppm):** 166.8, 150.9, 150.6, 140.2, 130.7, 130.2, 128.9, 127.2, 121.5, 119.0, 103.1. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₁H₅N₃O₅ [M-H]⁻: 258.0151, encontrada 258.0194.

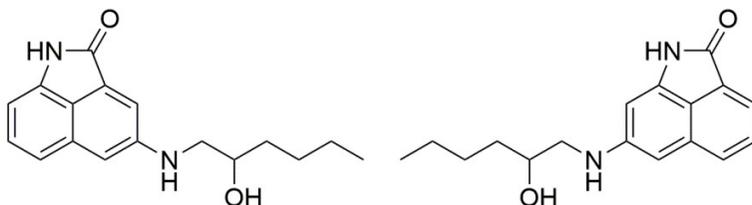


4,7-diaminobenzo[*cd*]indol-2(1H)-ona (28). Se preparó una disolución de SnCl₂ (1.6 g, 8.81 mmol) en HCl (37%, 16 mL) y agua (6 mL). El compuesto **27** (537 mg, 2.07 mmol) se añadió lentamente a esta disolución en agitación y se calentó a 50 °C durante 4 h hasta la completa finalización de la reacción. Tras enfriar la mezcla a 0 °C, la reacción se basificó hasta pH 10 mediante la adición de una disolución de NaOH 6M. Posteriormente, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron bajo presión reducida dando lugar al compuesto esperado (**28**) (142 mg, 0.71 mmol, 34%). **¹H RMN (400 MHz, acetona-*d*₆) δ (ppm):** 9.25 (br s, 1H), 7.08 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 6.86 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 6.32 (d, *J*=1.4 Hz, 1H), 6.31 (d, *J*=1.3 Hz, 1H), 2.89 (br s, 4H). **¹³C RMN (101 MHz, acetona-*d*₆) δ (ppm):** 170.8, 151.0, 150.7, 133.5, 128.7, 116.9, 112.6, 109.5, 109.4, 97.7, 97.1. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₁H₉N₃O [M+H]⁺: 200.0824, encontrada 200.0819.



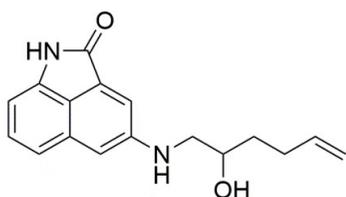
**4,7-bis((2-
hidroxibutil)amino)benzo[*cd*]indol-
2(1*H*)-ona (29).** El compuesto **29** se preparó
siguiendo el procedimiento general de
alquilación de las aminas: 50 mg (0.25 mmol)

del compuesto **28** se disolvieron en EtOH y se agitaron con (*R,S*)-(\pm)-1,2-epoxibutano en presencia de LiClO₄ bajo irradiación de microondas durante 60 min. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se eliminó el disolvente en el rotavapor, dando lugar al compuesto crudo el cual se purificó mediante columna cromatográfica utilizando una mezcla de disolventes CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ [98/2/1 a 96/4/1] para proporcionar el compuesto deseado **29** con un rendimiento de 29% (25 mg, 0.073 mmol), junto con material de partida sin reaccionar (9.2 mg, 0.05 mmol, 18%) y productos secundarios como el compuesto monoalquilado (7.58 mg, 0.028 mmol) y trialquilado (10.72 mg, 0.026 mmol). **¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm):** 7.11 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 6.84 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 6.29 (m, 1H), 3.77 (ddd, *J*=12.3, 4.6, 3.1 Hz, 2H), 3.32 (br s, 1H), 3.31-3.08 (m, 4H), 1.74-1.40 (m, 4H), 1.04 (t, *J*=7.5 Hz, 6H). **¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm):** 173.4, 152.2, 151.6, 139.2, 133.8, 128.3, 116.3, 109.6, 108.3, 98.3, 72.4, 72.3, 51.2, 50.9, 29.1, 29.0, 10.4. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₉H₂₅N₃O₃ [M+H]⁺: 344.1974, encontrada 344.1964.



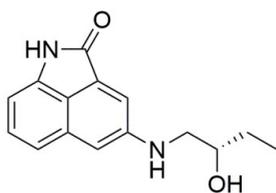
4-((2-hidroxihexil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (30) y **7-((2-
hidroxihexil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (31).** Se aplicó el procedimiento general a 168 mg (0.91 mmol) de una mezcla 2:1 de 4- y 7-aminobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona y el reactivo comercial (*R,S*)-(\pm)-1,2-epoxibutano dando lugar a 52.8 mg de **(30)** (0.19 mmol, 20%), 20.9 mg de **(31)** (0.07 mmol, 14%) junto con 33 mg (0.18 mmol, 20%) de material de partida sin reaccionar. **(30) ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm):** 7.50 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 7.31 (m, 2H), 7.07 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 6.71 (dd, *J*=5.1, 2.4 Hz, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.17 (dd, *J*=12.9, 7.4 Hz, 1H), 1.63 (m, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.39 (m, 2H), 0.95 (t, *J*=7.1 Hz, 3H). **¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm):** 172.4, 151.9, 138.6, 132.3, 130.0, 128.8, 120.5, 120.1, 115.4, 109.2, 104.4, 70.9, 51.4, 36.0, 29.0, 23.8, 14.4.

HRMS: (m/z) calcd. for $C_{17}H_{20}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 285.1603, encontrada 285.1608; **(31) 1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 7.78 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J=8.3, 7.7$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J=1.2$ Hz, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 3.15 (dd, $J=12.9, 7.4$ Hz, 1H), 1.55 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.30 (m, 2H), 0.96 (t, 7.2 Hz, 3H). **^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 173.1, 151.5, 139.5, 132.9, 130.0, 129.7, 127.4, 122.9, 119.6, 101.6, 95.5, 70.8, 51.2, 36.0, 29.0, 23.9, 14.4. **HRMS:** (m/z) calcd. para $C_{17}H_{20}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 285.1603, encontrada 285.1592.



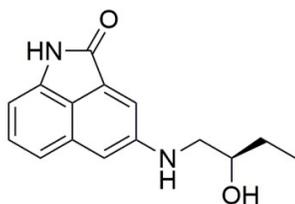
4-((2-hidroxihex-5-en-1-ilo)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (32). El procedimiento general mediante irradiación de microondas se aplicó a 4-aminobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (23 mg, 0.13 mmol) y 1,2-epoxi-5-hexeno. El

producto crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando una mezcla de disolventes $CH_2Cl_2/MeOH$ (99:1) proporcionando el compuesto **32** (30 mg, 0.106 mmol, 85%) junto con material de partida sin reaccionar (4 mg, 0.021 mmol, 17%). **1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 7.48 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 7.30 (m, 2H), 7.06 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 6.69 (dd, $J=5.2, 2.3$ Hz, 1H), 5.85 (m, 1H), 5.04 (dq, $J=17.2, 1.7$ Hz, 1H), 4.94 (ddd, $J=10.2, 2.2, 1.1$ Hz, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.17 (dd, $J=13.0, 7.3$ Hz, 1H), 2.27 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.59 (m, 1H). **^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 172.4, 151.9, 139.6, 138.7, 132.3, 130.0, 128.9, 120.5, 120.1, 115.4, 115.2, 109.2, 104.4, 70.2, 51.4, 35.5, 31.0. **HRMS:** (m/z) calcd. para $C_{17}H_{18}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 283.1447, encontrada 283.1455.



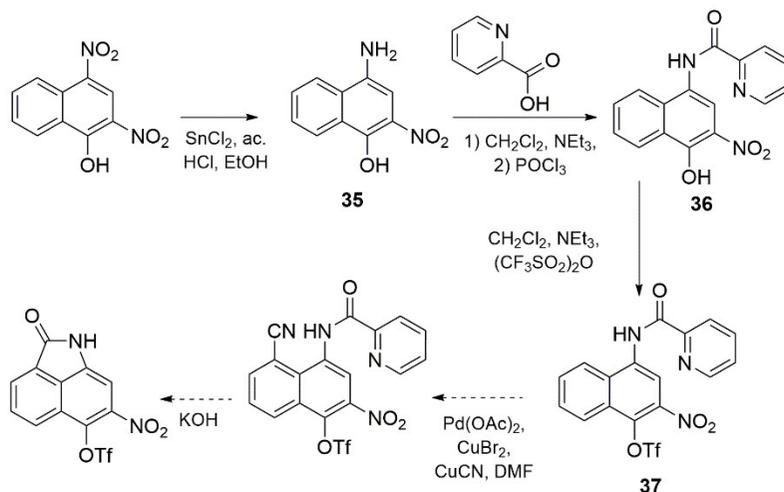
(*S*)-4-((2-hidroxibutil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (33). El compuesto **33** se preparó bajo irradiación de microondas aplicando el procedimiento general a 100 mg (0.54 mmol) de una mezcla 2:1 de 4- y 7-aminobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ($CH_2Cl_2/MeOH$ (99:1)), obteniéndose 48.5 mg de **33** (0.18 mmol, 33%) y 62.6 mg (0.25 mmol, 47%) de una mezcla de anilinas de partida sin reaccionar. **1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 7.50 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.07 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 6.71 (dd, $J=4.9, 2.3$ Hz, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.17 (dd, $J=12.9, 7.4$ Hz, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.04 (t, $J=7.5$ Hz, 3H). **^{13}C RMN**

(101 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 172.4, 151.9, 138.6, 132.3, 130.0, 128.3, 120.5, 120.1, 115.4, 109.2, 104.4, 72.3, 51.0, 29.8, 10.4. HRMS: (m/z) calcd. para C₁₅H₁₆N₂O₂ [M+H]⁺: 257.1290, encontrada 257.1271.

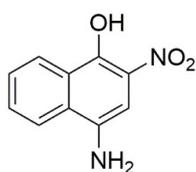


(R)-4-((2-hidroxibutil)amino)benzo[*cd*]indol-2(1H)-ona (34). El compuesto **36** se preparó utilizando el procedimiento general bajo irradiación de microondas partiendo de 100 mg (0.54 mmol) de una mezcla 2:1 de 4- y 7-aminobenzo[*cd*]indol-2(1H)-ona. El producto crudo se purificó mediante columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH (98:2)), obteniéndose 48.3 mg de **34** (0.19 mmol, 35%) junto con 44.9 mg (0.24 mmol, 44%) de material de partida sin reaccionar. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.48 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 7.29 (m, 2H), 7.05 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 6.69 (dd, $J=4.7, 2.8$ Hz, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.15 (dd, $J=12.9, 7.4$ Hz 1H), 1.67 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.03 (t, $J=7.5$ Hz, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 172.3, 151.8, 138.6, 132.2, 130.0, 128.8, 120.5, 120.1, 115.4, 109.2, 104.4, 72.3, 51.0, 29.0, 10.4. HRMS: (m/z) calcd. para C₁₅H₁₆N₂O₂ [M+H]⁺: 257.1290, encontrada 257.1286.

1.2.4- Optimización de la síntesis de 7-nitrobenz[*cd*]indol-2-(1*H*)-ona



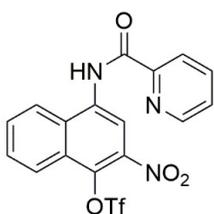
Esquema 35. Esquema de optimización de la síntesis de 7-nitrobenz[*cd*]indol-2-(1*H*)-ona (Ruta sintética 1)



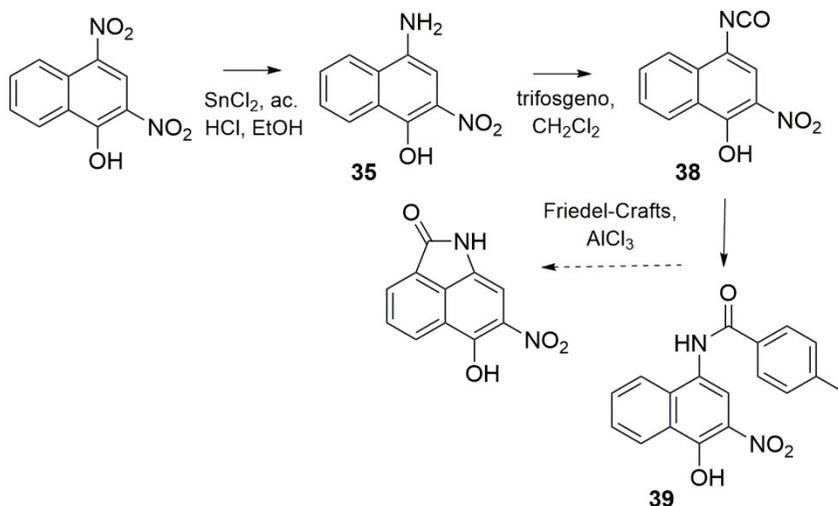
4-amino-2-nitro-naftalen-1-ol (35). El reactivo comercial 2,4-dinitro-1-naftol o amarillo de Martius (3 g, 12.81 mmol) se disolvió en HCl (9 M, 12 mL) y etanol (6 mL) y sobre esta disolución se añadió gota a gota (no superando la temperatura de 35 °C) una disolución preparada previamente que contenía SnCl₂ (7.28 g, 38.40 mmol) en 12 mL de etanol. La reacción de reducción se controló mediante CCF y se dejó agitando durante 3 h evitando así la formación de gran cantidad de subproducto consistente en la doble reducción de los grupos nitro. Tras enfriar la mezcla a 0 °C, la reacción se basificó hasta pH 10 mediante la adición de una disolución de NaOH 6M. Posteriormente, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (x3). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron bajo presión reducida dando lugar al crudo que fue posteriormente purificado por cromatografía en columna utilizando como disolvente CH₂Cl₂. Se obtuvo el compuesto esperado de color rosa pálido (1 g, 4.90 mmol, 38%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 8.30 (dd, *J*=7.9, 1.3 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J*=7.6, 1.9 Hz, 1H), 7.68 (td, *J*=7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.60 (td, *J*=7.5, 1.3 Hz 1H), 6.11 (s, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 150.2, 135.3, 131.0, 129.7, 127.3, 126.1, 125.8, 121.6, 110.2, 100.7. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₀H₇N₂O₃ [M+H]⁺: 205.0613, encontrada 205.0631.



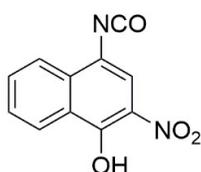
N-(4-hidroxi-3-nitronaftalen-1-il) picolinamida (36). A una disolución que contiene el compuesto **35** (148 mg, 0.72 mmol), ácido picolínico (107.2 mg, 0.87 mmol) y NEt₃ (202.33 µL) en un baño de hielo, se adicionó lentamente POCl₃ (207 µL) durante 30 min. Posteriormente, se dejó agitando la reacción bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se obtuvo un compuesto crudo de color anaranjado intenso el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando una mezcla de disolventes CH₂Cl₂/MeOH (99:1) proporcionando el compuesto **36** (150 mg, 0.49 mmol, 67%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 12.15 (br s, 1H), 10.47 (br s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.69 (ddd, *J*=4.8, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.56 (ddd, *J*=8.4, 1.4, 0.7 Hz, 1H), 8.31 (dt, *J*=7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.99 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.95 (td, *J*=7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.80 (ddd, *J*=8.4, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.66 (ddd, *J*=8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.54 (ddd, *J*=7.6, 4.8, 1.2 Hz, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 162.6, 153.1, 149.5, 148.3, 138.0, 131.8, 131.6, 127.7, 127.4, 127.0, 126.0, 125.5, 125.4, 122.7, 121.3, 112.1. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₆H₁₁N₃O₄ [M+H]⁺: 310.0820 encontrada 310.0760.



Trifluorometanosulfonato de 2-nitro-4-(picolinamido) naftalen-1-ilo (37). A una disolución de **36** (113.5 mg, 0.37 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro y NEt₃ (133 µL) bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente anhídrido trifluorometansulfónico (78 µL, 0.48 mmol) y la mezcla se agitó a 20 °C durante 5 h. Transcurrido este tiempo, se añadió una disolución acuosa de HCl (0.5 M, 0.3 mL) y la mezcla de reacción se dejó agitando durante 30 min. Seguidamente la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂ (x3). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se eliminó el disolvente en el rotavapor, dando lugar al compuesto crudo el cual se purificó mediante columna cromatográfica utilizando como disolvente CH₂Cl₂. Se obtuvo el compuesto deseado **37** (96 mg, 0.22 mmol, 60%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 11.07 (br s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.72 (ddd, *J*=4.8, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 8.32 (dt, *J*=8.6, 1.1 Hz, 1H), 8.19 (m, 1H), 7.98 (td, *J*=7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.59 (ddd, *J*=7.6, 4.8, 1.2 Hz, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 162.4, 148.9, 148.5, 139.4, 138.3, 133.9, 133.5, 130.6, 129.6, 128.2, 127.5, 124.1, 122.9, 121.0, 120.2, 117.0, 113.8, 111.3. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₇H₁₀F₃N₃O₆S [M+H]⁺: 442.0321 encontrada 442.0337.



Esquema 36. Esquema de optimización de la síntesis de 7-nitrobenz[*a*]indol-2-(1*H*) (Ruta sintética 2).

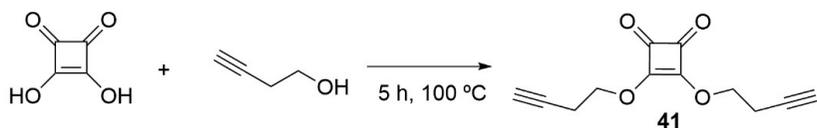


4-isocianato-2-nitro-naftalen-1-ol (38). Una disolución de **37** (225 mg, 1.10 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro se añadió lentamente sobre una disolución previamente preparada de trifosgeno (163.61 mg, 0.55 mmol) en el mismo disolvente bajo atmósfera de nitrógeno. Tras 4 h de reacción, el material de partida se consumió

tal y como se verificó a través de CCF, y el producto crudo obtenido al ser tan reactivo se empleó en la siguiente reacción sin ninguna manipulación. **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 12.14 (br s, 1H), 8.57 (dd, *J*=8.4, 1.3 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.86-7.82 (m, 2H), 7.72 (ddd, *J* =8.3, 7.0, 1.1 Hz, 1H).. **HRMS: (*m/z*)** calcd. para C₁₁H₆N₂O₄ [M-H]: 229.0249 encontrada 229.0376..

1.3.- Síntesis de escuratos, mono-escuramidas y tioésteres del ácido escuárico.

1.3.1- Síntesis de diésteres del ácido escuárico

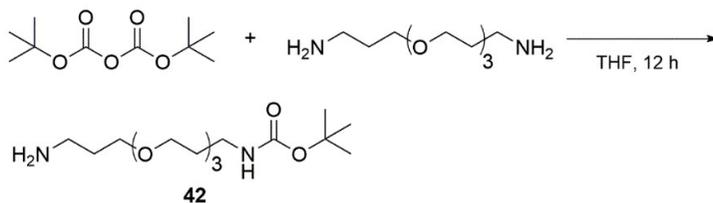


Esquema 37. Esquema de síntesis del compuesto 41.

di-3-butino escurato (41). En un matraz de fondo redondo de dos bocas equipado con un condensador de reflujo se añadió el ácido escuárico (500 mg, 4.38 mmol) disuelto en alcohol propargílico (5 mL, 66.13 mmol). La reacción se agitó a 100 °C durante 5 h. El residuo resultante se purificó isocráticamente mediante cromatografía en columna utilizando CH₂Cl₂ como eluyente, obteniendo así el producto esperado (794 mg, 3.62 mmol, 83%) como un aceite amarillo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 4.74 (t, J=6.5 Hz, 4H), 2.69 (ddd, J=7.3, 6.2, 2.7 Hz, 2H), 2.04 (td, J=2.7, 0.7 Hz, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃): 188.7, 183.6, 78.4, 71.5, 71.3, 20.3. HRMS (m/z): calcd. para C₁₂H₁₀O₄: 219.0657 [M+H]⁺, encontrada 219.0639 [M+H]⁺.

1.3.2- Síntesis de derivados de ácido escuárico aromáticos

▪ Síntesis de 42 (PEG-1)

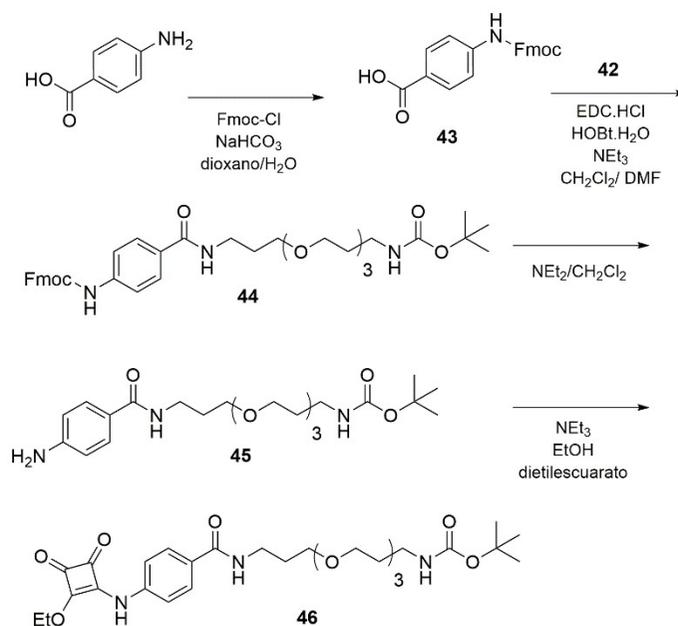


Esquema 38. Esquema de síntesis del compuesto 42.

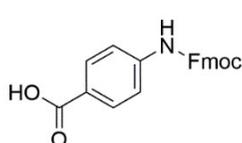
La síntesis de **42** comenzó con la monoprotección de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (PEG) con el dicarbonato de di-*tert*-butilo (anhídrido de Boc, Boc₂O). Sobre una disolución de PEG (10 g, 45.39 mmol) en THF anhidro (50 mL) a 0 °C, se adicionó lentamente una disolución que contenía Boc₂O (2.48 g, 11.36 mmol) en el mismo disolvente (50 mL). Tras 30 min la disolución adquirió una tonalidad blanquecina. La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente, el

disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un sólido blanquecino. A continuación, se añadió acetato de etilo (50 mL) y la disolución fue filtrada a vacío. Se recogió el filtrado, se eliminó el disolvente y se purificó el aceite amarillo resultante mediante cromatografía en gel de sílice con una mezcla de EtOAc/MeOH/NH₄OH (90:10:3) lo que permitió aislar el producto deseado (2.85 g, 78%) cuyos datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁹ **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ = 5.11 (br s, 1H), 3.70-3.48 (m, 12H), 3.21 (q, *J*=6.3 Hz, 2H), 2.80 (t, *J*=6.7 Hz, 2H), 2.03 (br s, 2H), 1.84-1.64 (m, 4H), 1.42 (s, 9H). **HRMS (*m/z*):** calcd. para C₁₅H₃₂N₂O₅: 321.2390 [M+H]⁺, encontrado 321.2290 [M+H]⁺.

▪ **Síntesis de escuaramida aromática 46**

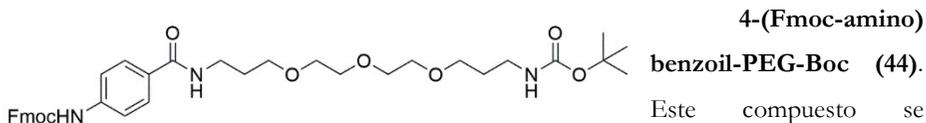


Esquema 39. Esquema de síntesis del compuesto 46.

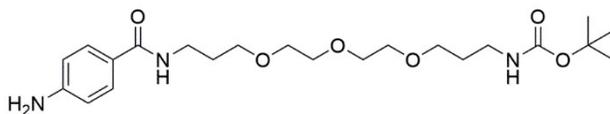


ácido 4-(Fmoc-amino) benzoico (43). En un matraz de fondo redondo se añadieron ácido 4-aminobenzoico (1 g, 7.29 mmol) y NaHCO₃ (1.5 g, 14.59 mmol) en 10 mL de agua, seguido de la adición de 10 mL de dioxano a 0 °C. A esta mezcla, se adicionó gota a gota una mezcla de cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato (Fmoc-Cl, 1.89 g, 7.30 mmol) en 10 mL de dioxano, se agitó durante 1 h a 0 °C y, posteriormente, durante la noche a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se añadieron 100 mL de agua fría

y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). El extracto orgánico se desechó y la fase acuosa se ajustó a pH = 3 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL) y, finalmente, con salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar un sólido blanco (1.21 g, 3.38 mmol, 46%) cuyos datos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹⁰ **¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 9.92 (br s, 1H), 7.77 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.71 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.61 (d, *J*=7.4 Hz, 2H), 7.48 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.40 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 7.29 (t, *J*=7.4 Hz, 2H), 7.21 (ddd, *J*=7.8, 7.4, 0.9 Hz, 2H), 4.39 (d, *J*=6.5 Hz, 2H), 4.18 (t, *J*=6.5 Hz, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 167.1, 153.4, 143.8, 143.3, 140.9, 130.5, 127.8, 127.3, 125.2, 124.5, 120.3, 117.6, 65.9, 46.7. **HRMS (*m/z*):** calcd. para C₂₂H₁₇NO₄: 358.1079 [M+H]⁺, encontrada 358.1012 [M+H]⁺.



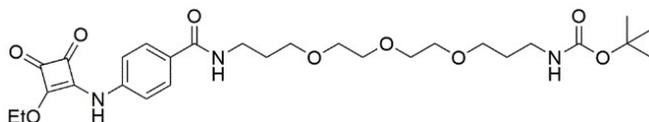
preparó por tratamiento del ácido **43** (618 mg, 1.72 mmol) con el PEG-1 (**42**) (551 mg, 1.72 mmol) en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt.H₂O) (278 mg, 2.06 mmol), EDC.HCl (330 mg, 2.06 mmol) y NEt₃ (2.06 mmol) en CH₂Cl₂/DMF seca (20:1) bajo atmósfera de argón. La reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el disolvente fue eliminado a presión reducida y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). La fase orgánica recogida se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando mezclas de CH₂Cl₂/MeOH como eluyente (100:0 a 97:3) para proporcionar el producto esperado en forma de un sólido blanco (683.4 mg, 1.03 mmol, 60%). También pudo aislarse un aceite blanquecino, eluido con una mezcla 97:3 CH₂Cl₂/MeOH (170 mg, 0.39 mmol, 15%), que correspondía al producto sin el grupo protector Fmoc. **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7.77 (d, *J*=7.5 Hz, 4H), 7.62 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.48 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 7.40 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.30 (ddd, *J*=8.2, 7.5, 1.1 Hz, 2H), 7.16 (br s, 1H), 4.95 (br s, 1H), 4.52 (d, *J*=6.7 Hz, 2H), 4.25 (t, *J*=6.7 Hz, 1H), 3.68-3.52 (m, 10H), 3.44 (m, 4H), 3.17 (q, *J*=6.4 Hz, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), *J*=6.3 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃):** δ = 166.8, 156.2, 153.4, 143.8, 141.4, 141.0, 129.5, 128.2, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1, 118.1, 79.2, 71.0, 70.54, 70.53, 70.4, 70.2, 69.5, 67.1, 47.2, 39.2, 38.6, 29.8, 28.9, 28.6. **HRMS (*m/z*):** calcd. para C₃₇H₄₇N₃O₈: 662.3441 [M+H]⁺, encontrada 662.3520 [M+H]⁺.



4-aminobenzoil-PEG-

Boc (45). El compuesto **44**

(417 mg, 0.63 mmol) se disolvió en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{NH}$ (4 mL:4 mL) (1:1) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y posteriormente se concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó en columna cromatográfica eluyendo con una proporción de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 96:4) obteniéndose el producto esperado en forma de aceite amarillo (252 mg, 0.57 mmol, 91%). **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3):** $\delta=7.61$ (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.91 (br s, 1H), 6.63 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 4.98 (br s, 1H), 4.02 (br s, 2H), 3.73-3.41 (m, 14H), 3.18 (q, $J=6.3$ Hz, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.42 (s, 9H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3):** $\delta=153.2$, 143.6, 141.3, 128.7, 127.8, 127.1, 124.9, 120.0, 70.9, 70.8, 70.6, 70.5, 70.4, 70.2, 47.2, 39.0, 29.8, 28.6. **HRMS (m/z):** calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$: 440.2761 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 440.2728 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Escuararomida

aromática (46). En

primer lugar, se preparó

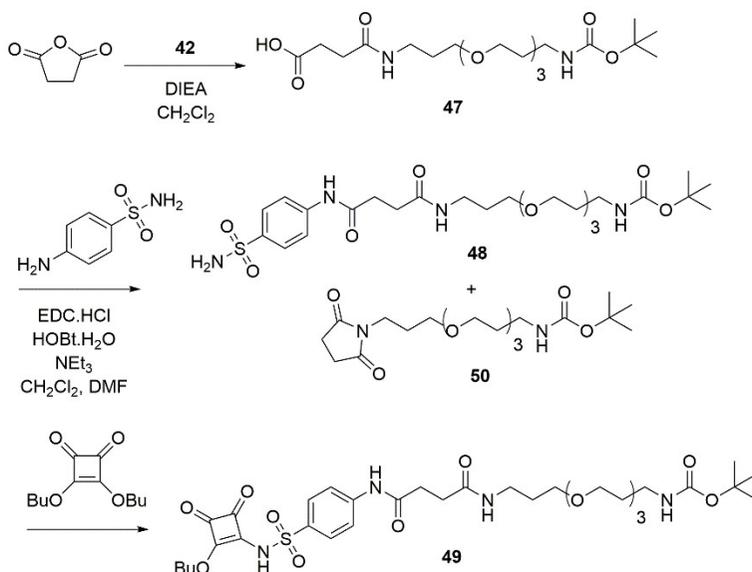
dietil escuarato de la siguiente manera. Sobre una disolución de dibutil escuarato (0.95 mL, 4.42 mmol) en etanol (5 mL), se adicionó trietilamina (NEt_3) (1.23 mL, 8.84 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el disolvente se eliminó a presión reducida dando lugar a un aceite anaranjado correspondiente al dietil escuarato deseado con un rendimiento cuantitativo (749.5 mg, 4.40 mmol) y fue utilizado directamente en la siguiente reacción. **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3):** $\delta=4.73$ (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD) δ (ppm):** 189.3, 184.2, 70.6, 15.6. **HRMS (m/z):** calcd. para $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4$: 171.0657 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 171.0626 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Los datos analíticos coinciden con los que se han publicado para este compuesto en la literatura.⁸

Para la preparación de **46**, se disolvió **45** (250 mg, 0.57 mmol) en EtOH anhidro (4 mL), se le añadió NEt_3 (1.13 mmol) y a continuación dietil escuarato (97 mg, 0.57 mmol). La reacción se calentó a 70 °C y se agitó durante 18 h. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía con un gradiente de una mezcla de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 96:4) para proporcionar

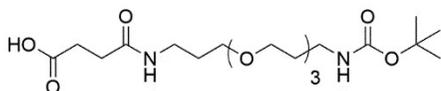
el compuesto esperado (240 mg, 0.73 mmol, 75%) como un sólido amarillo. **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ= 9.17 (br s, 1H), 7.81 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.43 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.29 (br s, 1H), 4.95 (br s, 1H), 4.85 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.67–3.53 (m, 10H), 3.48 (dd, J=5.9, 3.6 Hz, 2H), 3.44 (t, J=6 Hz, 2H), 3.16 (q, J=6.3 Hz, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.48 (t, J=7.1 Hz, 3H), 1.41 (s, 9H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃):** δ= 184.5, 178.7, 166.7, 156.3, 140.3, 130.5, 128.5, 119.0, 79.1, 70.7, 70.5, 70.3, 70.1, 69.4, 39.1, 38.4, 29.7, 28.9, 28.5, 15.9. **HRMS (m/z):** calcd. para C₂₈H₄₁N₃O₉: 564.2921 [M+H]⁺, encontrada 564.2979 [M+H]⁺.

▪ **Síntesis de sulfonamida aromática 52**

Vía 1:



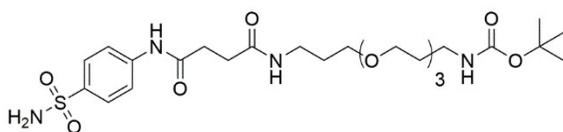
Esquema 40. Esquema de síntesis del compuesto 49.



Ácido N-Boc-PEG-succínico (47).

A una disolución de **42** (500 mg, 1.56 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (15 mL) se adicionó diisopropiletilamina (DIEA) (526.68 mg, 4.08 mmol) y anhídrido succínico (176.56 mg, 1.76 mmol) a temperatura ambiente durante 16 h. La fase acuosa se extrajo con HCl 1M (x3) y la fase orgánica recogida se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida proporcionando **47** como un aceite amarillo (432.2 mg, 1.03 mmol, 66%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ = 6.91 (br s, 1H), 6.53 (br s, 1H), 4.97 (br s, 1H), 3.63

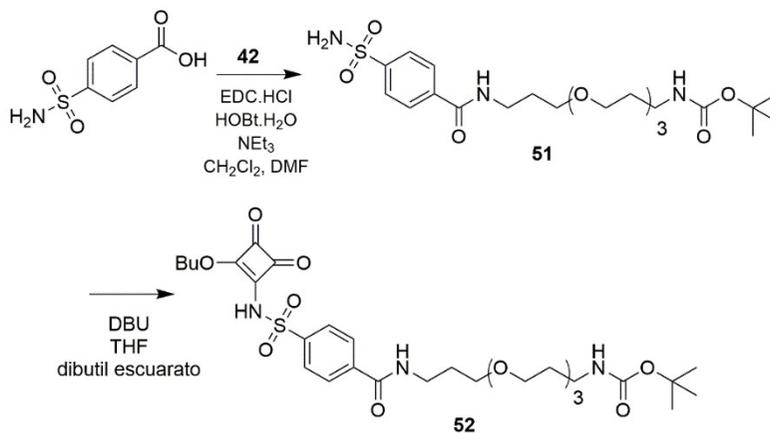
(m, 10H), 3.53 (t, $J=6.1$ Hz, 2H), 3.40 (q, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.21 (m, 2H), 2.66 (m, 2H), 2.51 (m, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): $\delta=175.2, 172.5, 156.3, 79.1, 70.5, 70.1, 69.5, 53.8, 38.4, 38.2, 31.0, 30.1, 29.7, 28.7$. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$: 333.2026 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 333.2095 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



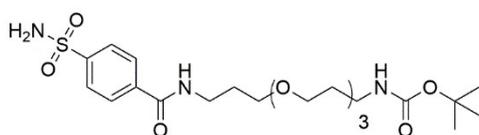
N-Boc-PEG-sulfanilamida

(48). Para la síntesis de este compuesto se llevó a cabo el procedimiento de amidación descrito anteriormente. Así pues, el **48** se preparó mediante la activación del ácido **47** (200 mg, 0.47 mmol) en presencia de $\text{HOBT}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (77.13 mg, 0.57 mmol), $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (109.40 mg, 0.57 mmol) y NEt_3 (79.5 μL , 0.57 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL) y DMF (3 mL) y, a continuación, se añadió la sulfanilamida comercial (81.90 mg, 0.47 mmol) bajo atmósfera de argón. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía empleando una mezcla de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 95:5). El producto esperado **48** se obtuvo como un sólido amarillo (88 mg, 0.15 mmol, 32%). Además, se aisló un derivado de succinimida (**50**) como un aceite amarillo junto a la sulfanilamida de partida en una proporción (1:3) (27.6 mg, 25%). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): $\delta=7.79$ (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.57-7.32 (m, 4H), 6.62 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 3.61-3.47 (m, 8H), 3.43 (td, $J=6.2, 4.3$ Hz, 4H), 3.18 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.04 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.53 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.40 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 1.73-1.58 (m, 4H), 1.35 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): $\delta=174.7, 174.0, 158.3, 153.3, 142.4, 131.2, 129.4, 128.9, 128.2, 127.2, 118.4, 114.4, 111.4, 79.8, 71.4, 71.1, 69.8, 54.8, 52.2, 38.7, 37.8, 31.4, 30.7, 30.2, 30.1, 28.8$. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$: 575.2751 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 575.2731 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Alquil succinimida (**50**). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): $\delta=3.70$ -3.45 (m, 14H), 3.17 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.72 (s, 4H), 1.86 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.48 (s, 9H). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): $\delta=180.1, 164.8, 79.8, 71.5, 71.4, 71.2, 71.1, 70.0, 69.8, 38.7, 37.3, 37.0, 30.8, 29.1, 28.8, 28.6$. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7$: 403.2444 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 403.2407 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$: 303.1920 $[\text{M}-\text{Boc}]^+$, encontrada 303.1996 $[\text{M}-\text{Boc}]^+$.

Vía 2:

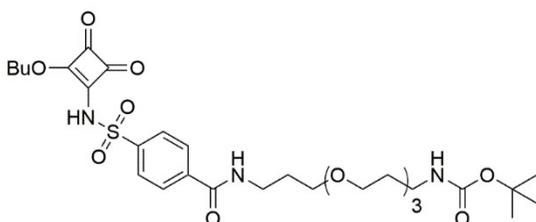


Esquema 41. Esquema de síntesis del compuesto 52.



N-Boc-PEG-sulfanilamida (51). Una disolución de ácido 4-sulfamoilbenzoico (251.32 mg, 1.25 mmol), EDC.HCl (287.34 mg, 1.50 mmol), HOBT.H₂O

(202.53 mg, 1.50 mmol), NEt₃ (152 mg, 1.50 mmol) y **42** (400 mg, 1.25 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) y DMF (3 mL) anhidros se agitaron en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 16 h. Seguidamente, se eliminó el disolvente formando un azeótropo con tolueno. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía utilizando una mezcla de disolventes CH₂Cl₂/MeOH (100:0 a 97:3) como eluyentes para proporcionar el compuesto (426.6 mg, 0.85 mmol, 68%) en forma de un sólido espumoso. **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ=7.90–7.76 (m, 4H), 7.67 (br s, 1H), 6.12 (br s, 2H), 5.02 (br s, 1H), 3.64–3.31 (m, 14H), 3.10 (q, J=6.5 Hz, 2H), 1.89 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.37 (s, 9H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃):** δ= 166.3, 156.3, 145.2, 138.0, 127.8, 126.3, 79.2, 70.3, 70.24, 70.16, 70.1, 70.0, 69.3, 38.8, 38.2, 29.6, 28.7, 28.4. **HRMS (m/z):** calcd. para C₂₂H₃₇N₃O₈S: 504.2380 [M+H]⁺, encontrada 504.2312 [M+H]⁺.

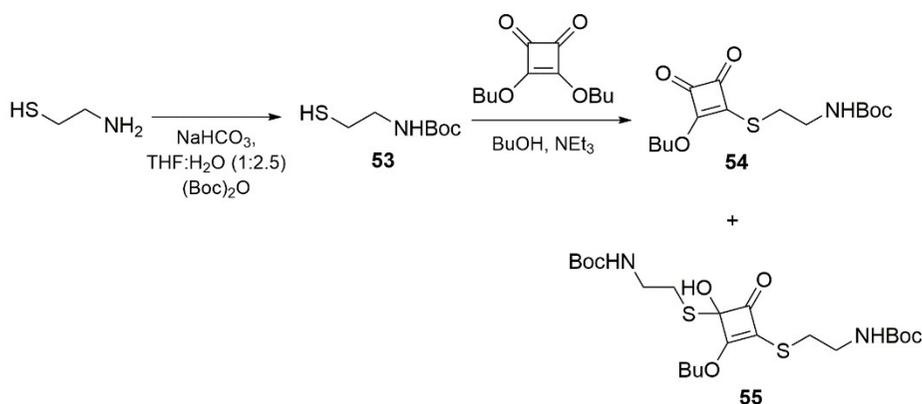


Escuaramida (52) A una disolución del compuesto **51** (180 mg, 0.36 mmol) en THF (2 mL), se añadió DBU (54.41 mg, 0.36 mmol) y a continuación se adicionó dibutil

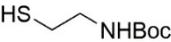
escuarato (242.6 μ L, 1.07 mmol). La reacción se calentó a reflujo (66 °C) durante 16 h. Posteriormente, se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía utilizando como eluyentes una mezcla de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) a (93:7) dando lugar al compuesto **52** (129.7 mg, 0.20 mmol, 55%) en forma de aceite marrón y se recuperó parte de la sulfanilamida de partida (38.6 mg, 0.08 mmol) y dibutil escuarato (163.7 mg). **^1H RMN (400 MHz, CD_3OD):** δ = 8.08 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.99 (d, J =8.5 Hz, 2H), 4.69 (t, J =6.5 Hz, 2H), 3.73–3.49 (m, 14H), 3.17 (t, J =6.8 Hz, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.45 (m, 11H), 0.98 (t, J =7.4 Hz, 3H). **^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD):** δ = 195.7, 189.4, 185.7, 180.7, 168.6, 158.3, 147.5, 138.5, 128.6, 128.1, 79.7, 73.9, 71.4, 71.2, 71.1, 70.1, 69.8, 68.9, 39.3, 38.6, 33.1, 30.8, 28.8, 27.4, 19.5, 14.0. **HRMS (m/z):** calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{S}$: 656.2853 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 656.2866 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

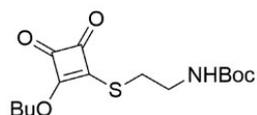
1.3.3- Síntesis de mono-tioescuarato **54** y sus derivados

▪ Síntesis de mono-tioescuarato **54**



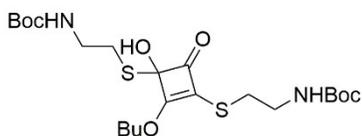
Esquema 42. Esquema de síntesis del compuesto **54**.

 **2-(Boc-amino) etanotiol (**53**)**. Una disolución que contenía una mezcla de cisteamina (500 mg, 6.48 mmol), Boc₂O (1.41 g, 6.48 mmol) y NaHCO₃ (1.63 g, 19.44 mmol) en THF (9 mL) y H₂O (22.5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La disolución adquirió una tonalidad blanquecina a los pocos minutos. Posteriormente, se añadió gota a gota en baño de hielo una disolución de HCl 1M a la mezcla de reacción para ajustar el pH a 3. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (x 3) y, posteriormente, las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla de eluyentes hexano/acetato de etilo (100:0 a 95:5) para proporcionar el producto en forma de un aceite incoloro (726.8 mg, 4.10 mmol, 63%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ= 4.93 (br s, 1H), 3.30 (q, *J*=5.9 Hz, 2H), 2.64 (q, *J*=6.5 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.34 (t, *J*=8.5 Hz, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃):** δ= 155.8, 79.3, 43.6, 28.4, 25.0. **HRMS (*m/z*):** calcd. para C₇H₁₅NO₂S: 178.0902 [M+H]⁺, encontrada 178.0956 [M+H]⁺.



Mono-tioescuarato (54**)**. Sobre una disolución del compuesto **53** (600 mg, 3.38 mmol) en 1-butanol (10 mL) se adicionó NEt₃ (471 μL, 3.38 mmol) y se dejó la mezcla reaccionando a temperatura ambiente durante varios minutos. Posteriormente, se añadió dibutil escuarato

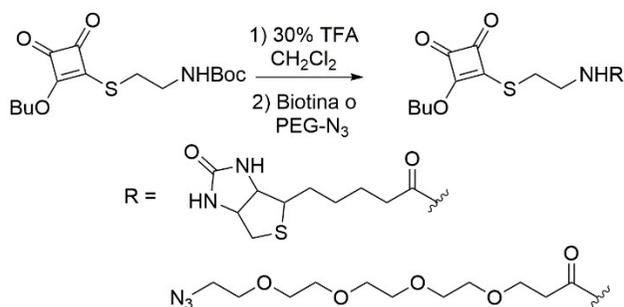
(765.89 mg, 3.38 mmol). La reacción permaneció en agitación a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida dando lugar al crudo que posteriormente se purificó mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano/acetato de etilo (100:0 a 80:20) permitiendo aislar el compuesto esperado **54** (403.4 mg, 1.22 mmol, 37%) como un sólido blanco. Adicionalmente, se forma un subproducto como resultado de la doble adición del compuesto (55%) y se recuperó parte del dibutil escuarato (9%). La formación de **55** se puede explicar como resultado de una adición 1,4 sobre el carbonilo de una cetona α - β insaturada seguida de una adición de tipo 1,2 sobre el carbonilo, conduciendo a un derivado hidroxitiioacetal obtenido.¹² (**54**): **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)**: δ = 4.93 (br s, 1H), 4.73 (t, J =6.4 Hz, 2H), 3.49 (m, 4H), 1.80 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 0.97 (t, J =7.4 Hz, 3H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃)**: δ = 192.8, 191.5, 187.4, 177.1, 155.8, 79.8, 75.0, 41.6, 31.9, 30.6, 28.4, 18.5, 13.6. **HRMS (m/z)**: calcd. para C₁₅H₂₃NO₅S: 330.1375 [M+H]⁺, calcd. para C₁₀H₁₅NO₃S: 230.0851 [M-Boc]⁺, encontrada 230.0892 [M-Boc]⁺.



(55) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.39 (br s, 1H), 5.21 (br s, 2H), 4.23 (t, J =6.7 Hz, 2H), 3.35 (q, J =6.3 Hz, 2H), 3.16 (q, J =6.2 Hz, 2H), 3.04 (t, J =6.4 Hz, 2H), 2.80 (t, J =6.2 Hz, 2H), 1.76-1.57 (m, 2H), 1.37 (s, 20H), 0.97 (t, J =7.4 Hz, 3H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃)**: δ = 181.4, 164.3, 155.7, 124.1, 79.7, 79.3, 66.1, 41.0, 39.9, 35.3, 33.6, 30.3, 28.4, 28.3, 19.0, 13.6. **HRMS (m/z)**: calcd. para C₂₂H₃₈N₂O₇S₂: 507.2199 [M+H]⁺, calcd. para C₁₃H₂₂N₂O₅S₂: 351.1048 [M-Boc-OBu]⁺, encontrada 350.9122 [M-Boc-OBu]⁺.

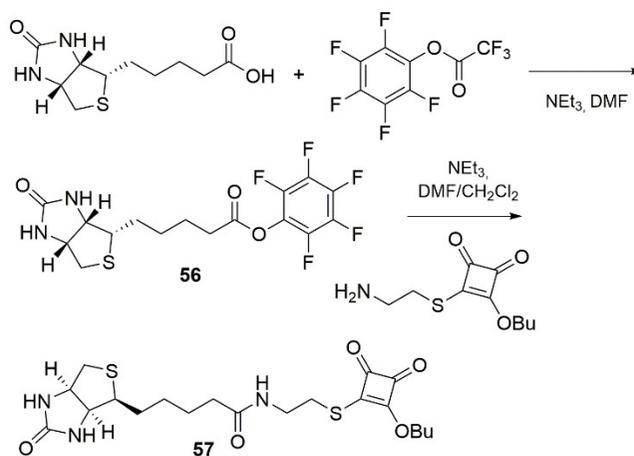
▪ **Síntesis de derivados del mono-tioescuarato 54**

Dada la actividad y el interés del mono-tioescuarato **54**, se sintetizaron dos derivados: el análogo biotilado **57**, donde la biotina es una molécula de gran interés en aplicaciones de biología molecular debido a su alta afinidad por la estreptavidina y la avidina; y el compuesto **60** que presenta una azida para su posterior modificación mediante química de tipo click. Estos derivados contienen el compuesto **54** anterior en el que la amina se desprotegió en condiciones ácidas y se acopló con diferentes ácidos.

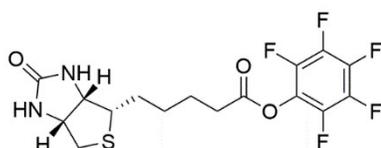


Esquema 43. Esquema de síntesis de derivados del mono-tioescuarato **54**.

Esquema de la síntesis del compuesto 57

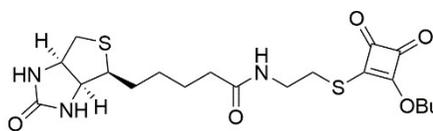


Esquema 44. Esquema de síntesis del mono-tioescuarato **57**.



Pentafluorofenil éster de la Biotina (56).

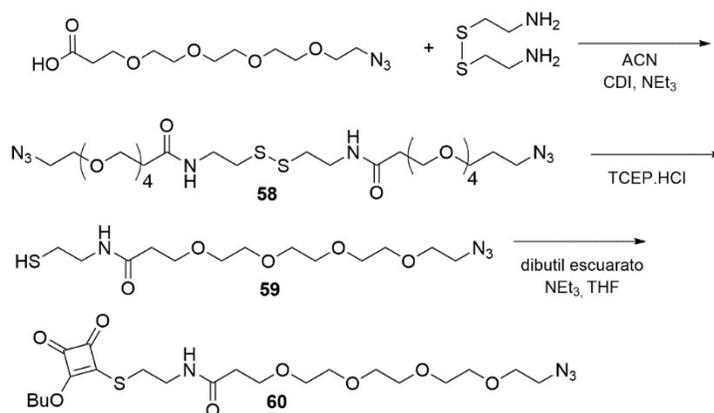
A una disolución de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (361.11 mg, 1.29 mmol) en DMF (5 mL) se añadió NEt_3 (1.84 mmol) a 0 °C. A continuación, se adicionó biotina (300 mg, 1.23 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h 30 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 mL de éter y el sólido blanco que precipitó se filtró, se lavó con éter (10 mL) y se secó proporcionando el pentafluorofenilester de la biotina (306.8 mg, 0.75 mmol, 61%). La identidad del producto fue confirmada por HRMS. **HRMS (m/z):** calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 411.0802 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 411.0756 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Mono-tioescuarato (57).

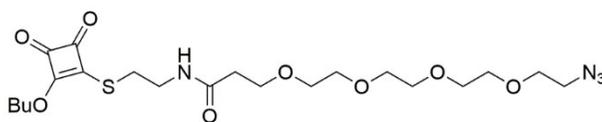
El éster activado de la biotina (140.12 mg, 0.34 mmol) reaccionó con la amina procedente de la desprotección de **54** (78.35 mg, 0.34 mmol) en presencia de NEt_3 (0.51 mmol) en una mezcla de disolventes DMF/ CH_2Cl_2 (4 mL, 1:1) bajo agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Después de comprobar mediante CCF la desaparición del producto de partida, se añadió acetato de etilo (x3) al crudo de la reacción, se lavó con agua y salmuera y la fase orgánica se secó con MgSO_4 . Posteriormente, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía utilizando como eluyente una mezcla de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 94:6) obteniéndose así el producto deseado como un sólido blanco (52.5 mg, 0.12 mmol, 34%) y se recupera parte del reactivo de partida **56** (25 mg). **^1H RMN (400 MHz, CD_3OD):** δ = 4.72 (dt, $J=18.1, 6.5$ Hz, 2H), 4.51 (ddd, $J=7.6, 5.3, 1$ Hz, 1H), 4.32 (m, 1H), 3.78 (t, $J=6.2$ Hz, 1H), 3.60 (t, $J=6.2$ Hz, 1H), 3.21 (m, 1H), 3.14 (q, $J=6.3$ Hz, 1H), 2.96 (dd, $J=5.2, 12.9$ Hz, 1H), 2.72 (d, $J=12.7$ Hz, 1H), 2.63 (m, 1H), 1.88–1.26 (m, 12H), 1.01 (m, 3H). **^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD):** 200.1, 199.9, 175.1, 169.2, 166.1, 74.6, 63.4, 61.6, 57.0, 56.9, 45.0, 44.5, 41.0, 33.2, 30.8, 30.3, 29.4, 26.7, 19.7, 14.03. **HRMS (m/z):** calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_2$: 456.1627 $[\text{M}+\text{H}]^+$, encontrada 456.1600 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Esquema de la síntesis del mono-tioescuarato **60**



Esquema 45. Esquema de síntesis del mono-tioescuarato **60**.

Mercapto-PEG-2 (59). A una disolución de ácido 15-azido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (PEG-2) (253.7 mg, 0.87 mmol) en 5 mL de ACN anhidro se añadió 1,1-carbonildiimidazol (CDI) (141.22 mg, 0.87 mmol) y se dejó agitando durante 30 min. Posteriormente se adicionó la cisteamina (48.99, 0.44 mmol) y NEt₃ (121 µL, 0.87 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Transcurrido este tiempo, se analizó el progreso de la reacción mediante UPLC-TOF, observándose la desaparición del ácido de partida y la presencia del compuesto deseado **58**. A continuación, se añadió *in situ* la fosfina TCEP.HCl (374.42 mg, 1.31 mmol) y la reacción se dejó agitando a temperatura ambiente. Tras 1 h de reacción se observó la formación del producto esperado mediante LC-MS. Este compuesto se purificó mediante cromatografía en fase reversa (Isolera Biotage, Cartucho SNAP KP-C18-HS 12 g, eluyente H₂O + 0.1% TFA/ACN + 0.1% TFA (de 100:0 a 45:55), permitiendo aislar **59** (61.7 mg, 0.18 mmol, 40%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ = 6.97 (br s, 1H), 3.73 (t, J=5.6 Hz, 2H), 3.69–3.62 (m, 14H), 3.40 (m, 4H), 2.66 (dt, J=8.2, 6.5 Hz, 2H), 2.49 (t, J=5.6 Hz, 2H), 1.45 (t, J=8.5 Hz, 1H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃):** δ = 172.1, 70.82, 70.78, 70.7, 70.6, 70.43, 70.41, 70.2, 67.4, 50.8, 42.5, 37.0, 24.6. **HRMS (m/z):** calcd. para C₁₃H₂₆N₄O₅S: 351.1702 [M+H]⁺, encontrada 351.1070 [M+H]⁺.



Mono-tioescuarato (60).

En un matraz de fondo redondo de 10 mL bajo atmósfera de argón se añadió **59** (48.95 mg, 0.14 mmol) y dibutil escuarato (63.26 mg, 0.28 mmol) disueltos en THF anhidro (1.5 mL). A continuación, se adicionó NEt₃ (19.5 µL, 0.14 mmol) y se dejó la reacción agitando a temperatura ambiente y con una corriente de Ar a través de la disolución con la finalidad de que no se oxidaran los residuos de tiol y diera lugar a enlaces disulfuro. Después de 21 h se observó una proporción de mezcla de compuestos 46:26:28 (**59:58:60**), por lo que se decidió añadir mayor cantidad de dibutil escuarato (94.89 mg, 0.42 mmol). Transcurridas 21 h adicionales, mediante análisis por UPLC-TOF se observó la ausencia de **59** y la proporción de la mezcla de compuestos 35:65 (**58:60**). Posteriormente, se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en fase reversa (Isolera Biotage, Cartucho SNAP KP-C18-HS 12 g, eluyente H₂O + 0.1% TFA / ACN + 0.1% TFA (de 100:0 a 50:50), dando lugar al compuesto **60** (41 mg, 0.08 mmol, 58%). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** 4.72 (m, 2H), 3.83 (br s, 1H), 3.77 (t, *J*=6.1 Hz, 2H), 3.71-3.57 (m, 16H), 3.39 (t, *J*=5.1, 2H), 3.13 (t, *J*=6.1 Hz, 2H), 2.84 (t, *J*=6.1 Hz, 2H), 1.93 (br s, 1H), 1.78 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 1.44 (q, *J*=7.5 Hz, 2H), 0.97 (t, *J*=7.4 Hz, 3H). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃):** 183.7, 177.9, 177.3, 172.9, 160.1, 147.0, 70.8, 70.75, 70.7, 70.68, 70.6, 70.2, 66.8, 50.8, 44.5, 44.2, 32.2, 29.7, 18.7, 13.8. **HRMS (*m/z*):** calcd. para C₂₁H₃₄N₄O₈S: 503.2176 [M+H]⁺, encontrada 503.2343 [M+H]⁺.

2.- Síntesis de péptidos en fase sólida

2.1.- Consideraciones generales

Los diferentes péptidos fueron preparados en fase sólida. La síntesis en fase sólida (SPPS) se llevó a cabo manualmente utilizando jeringas de polipropileno que contienen un filtro de polietileno poroso. Todos los disolventes y reactivos solubles fueron eliminados por succión a través de una bomba de vacío. Durante los acoplamientos y las desprotecciones se llevaron a cabo lavados con DMF (x3) y DCM (x3) utilizando 5 mL de disolvente/g resina por cada lavado. Todas las reacciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Durante los acoplamientos, las jeringas fueron agitadas en agitadores orbitales.

2.2.- Test de identificación de aminas primarias

Para determinar la presencia o la ausencia de grupos amino libres durante los acoplamientos se empleó el test cualitativo de ninhidrina, desarrollado por Kaiser. Para realizar el ensayo se coge una pequeña muestra de peptidil-resina seca (1-2 mg) y se coloca en un tubo de vidrio. Se añaden 3 gotas de disolución A y 3 gotas de disolución B. A continuación, se calienta a 100 °C durante 3 min. Pasado este tiempo se enfría y se observa la coloración que ha tomado la disolución. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias (test negativo), lo que indica que al menos el 99% de los puntos funcionales han sido bloqueados. Por el contrario, una coloración azul oscura (test positivo) indica la presencia de aminas primarias, por lo que el acoplamiento no es completo. Las disoluciones se prepararon tal y como se detalla a continuación:

Disolución A: Se preparó una disolución en caliente de fenol (40 g) en etanol absoluto (10 mL). Por otro lado, se añadieron 2 mL de una disolución 10 mM de cianuro de potasio (65 mg de KCN en 100 mL de H₂O) sobre 100 mL de piridina. A ambas mezclas se les añadió 4 g de resina Amberlite MB-3 y se agitaron durante 45 min. Seguidamente se filtraron y se mezclaron las dos disoluciones.

Disolución B: Se preparó una disolución de ninhidrina (2.5 g) en etanol (50 mL). El reactivo de ninhidrina es sensible a la luz, por ello la disolución B se almacena en un frasco protegido de la luz.

2.3.- Acondicionamiento de la resina

La resina empleada para SPPS contiene un soporte de poliestireno funcionalizado con un conector 2-clorotritilcloruro (2-CTC) lábil en medio ácido. La funcionalización inicial fue de 1.59 mmol/g resina. Se emplearon 2 g de resina que equivalen a 3.18 mmol.

El acondicionamiento de la resina se realizó mediante lavados con DMF (5 x 1 min) con el fin de eliminar las trazas de ácido clorhídrico, ya que la resina es extremadamente lábil y con DCM (5 x 1 min) con el objetivo de hinchar la resina antes de la incorporación del aminoácido siguiente.

2.4.- Incorporación de aminoácidos

En primer lugar, se incorporó el aminoácido C-terminal (Fmoc-Gly-OH) mediante la adición de 0.5 mmol (6.36 eq.) en 3 mL de DCM y 500 µL de DIEA.

La incorporación de los siguientes aminoácidos a la resina de 2-CTC se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

Tratamiento		Condiciones
1	Lavados	DMF (3 x 1 min), DCM (3 x 1 min)
2	Desprotección	Piperidina/DMF (1:5) (5 min)
3	Lavados	DMF (3 x 1 min), DCM (3 x 1 min)
4	Acoplamiento	Aminoácido (1mmol)/HBTU en DMF (0.5M)/ DIEA (1.5 eq.)
5	Lavados	DMF (3 x 1 min), DCM (3 x 1 min)
6	Test colorimétrico	Test de Kaiser

Todos los acoplamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C) durante 30 min en agitadores orbitales. El test de Kaiser se utiliza para comprobar si el acoplamiento se ha efectuado correctamente. Si el test es positivo (acoplamiento incompleto), se vuelve a realizar el procedimiento desde el paso 4. Si el test es negativo, (acoplamiento completo), se continúa el procedimiento con la eliminación del grupo Fmoc, incorporándose el siguiente aminoácido y así sucesivamente.

2.5.- Eliminación del grupo protector Fmoc

El grupo protector de las aminas primarias Fmoc se elimina mediante una disolución de piperidina al 20% en DMF (v:v) durante 5 min. Después del tratamiento de desprotección, la resina se lava con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) con la finalidad de eliminar la piperidina sobrante. Para confirmar que el Fmoc ha sido eliminado se lleva a cabo el Test de Kaiser (color azul).

2.6.- Desanclaje de la resina

El desanclaje del péptido de la resina 2-CTC se llevó a cabo mediante una disolución de 2.5% H₂O, 2.5% TIS (tiisopropilsilano) y 95% TFA. Posteriormente se eliminó el TFA bajo presión reducida, se añadió una mezcla de ACN/H₂O y la disolución resultante se liofilizó.

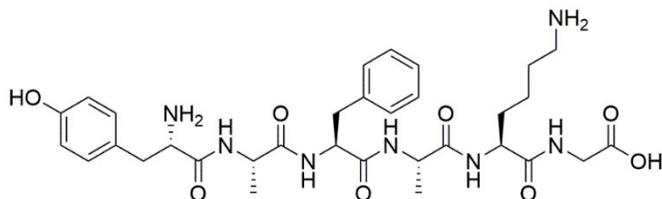
2.7.- Condiciones de purificación

La purificación de los diferentes péptidos se llevó a cabo en un equipo de HPLC preparativo (Waters 2545) conectado a un detector de doble absorbancia (Waters 2489) empleando como columna Jupiter Proteo 90Å (10 µm, 100x21.2 mm) con un flujo de 16 mL/min. Las fases móviles empleadas fueron H₂O/ACN conteniendo 0.1% y 0.05% TFA, respectivamente. Las inyecciones fueron monitorizadas a 220 y 280nm.

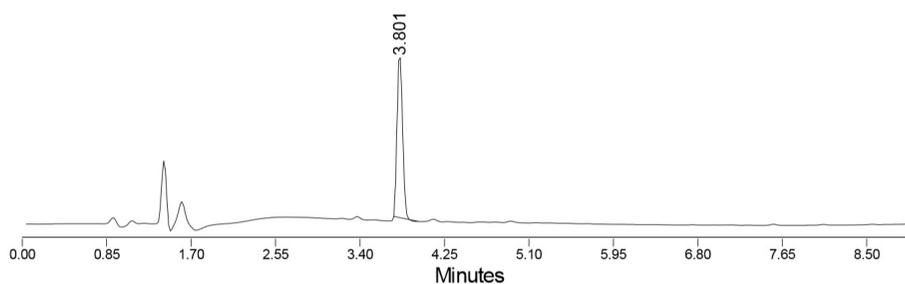
2.8.- Péptidos sintetizados en fase sólida (SPPS)

A continuación, se muestran los cromatogramas de HPLC de los crudos de síntesis de los diversos péptidos sintetizados así como el resultado del análisis por LC-MS.

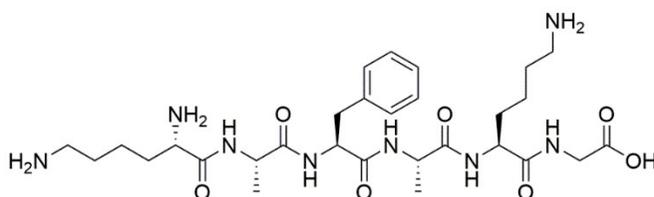
-H₂N-YAFAKG-COOH



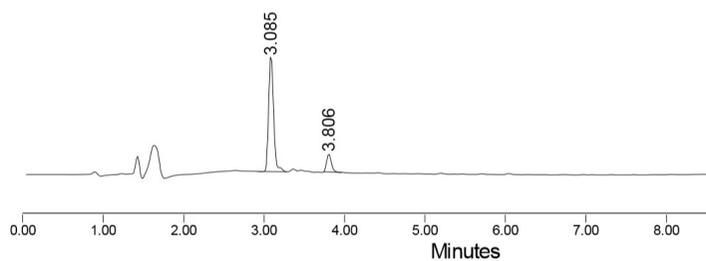
LC-MS (ESI): calcd. para C₃₂H₄₅N₇O₈: 656.34 [M+H]⁺, encontrada 656.10 [M+H]⁺.



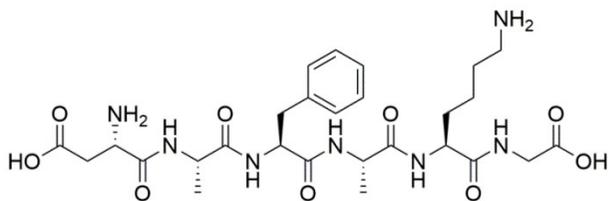
-H₂N-KAFAKG-COOH



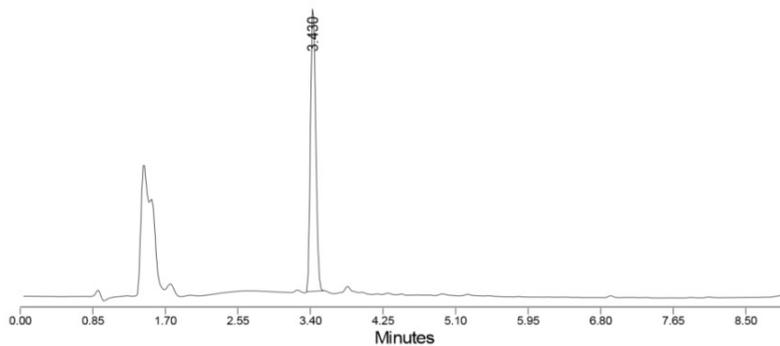
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₉H₄₈N₈O₇: 621.37 [M+H]⁺, encontrada 621.42 [M+H]⁺.



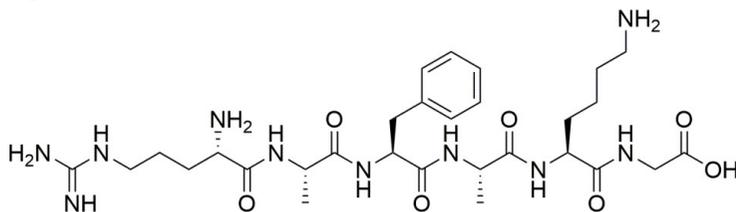
-H₂N-DAFAKG-COOH



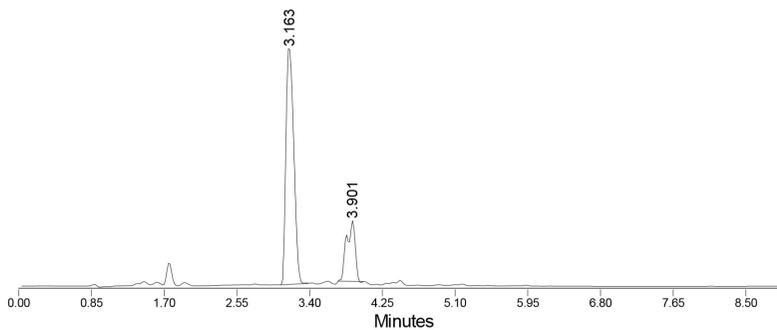
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₇H₄₁N₇O₉: 608.30 [M+H]⁺, encontrada 608.07 [M+H]⁺.



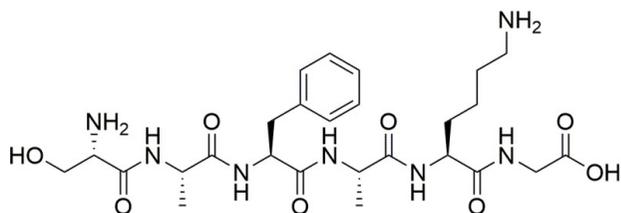
-H₂N-RAFAKG-COOH



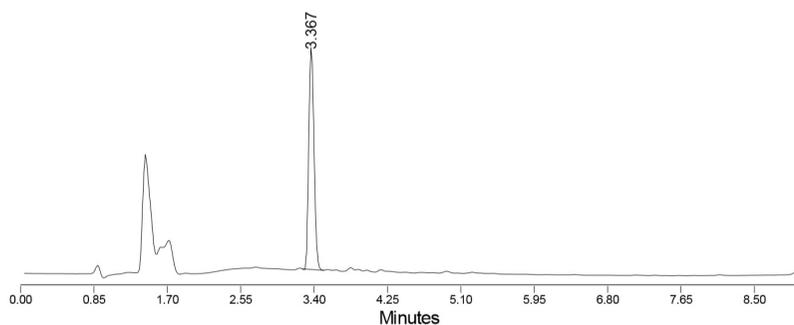
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₉H₄₈N₁₀O₇: 649.38 [M+H]⁺, encontrada 649.17 [M+H]⁺.



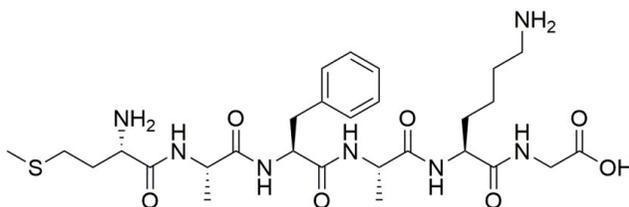
-H₂N-SAFK₂G-COOH



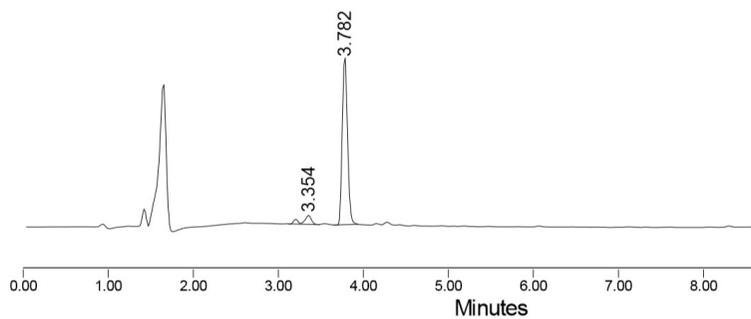
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₆H₄₁N₇O₈: 580.31 [M+H]⁺, encontrada 580.14 [M+H]⁺.



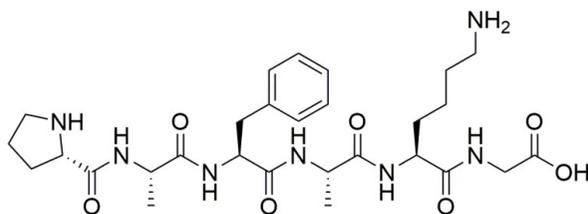
H₂N-MAFAK₂G-COOH



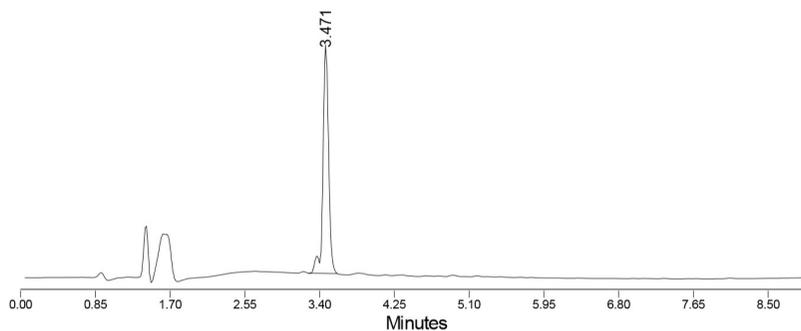
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₈H₄₅N₇O₇S: 624.32 [M+H]⁺, encontrada 624.11 [M+H]⁺.



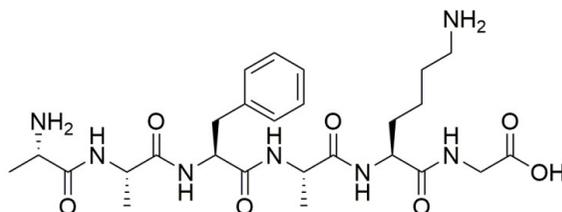
-H₂N-PAFAKG-COOH



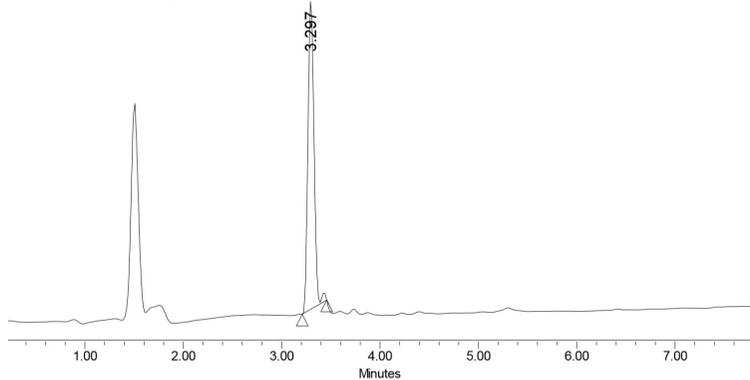
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₈H₄₃N₇O₇: 590.33 [M+H]⁺, encontrada 590.08 [M+H]⁺.



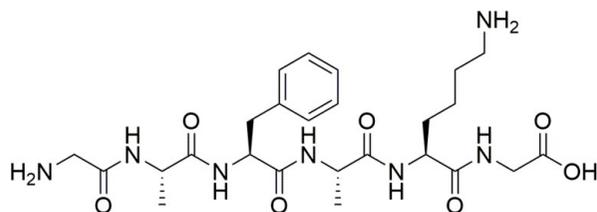
-H₂N-AAFAKG-COOH



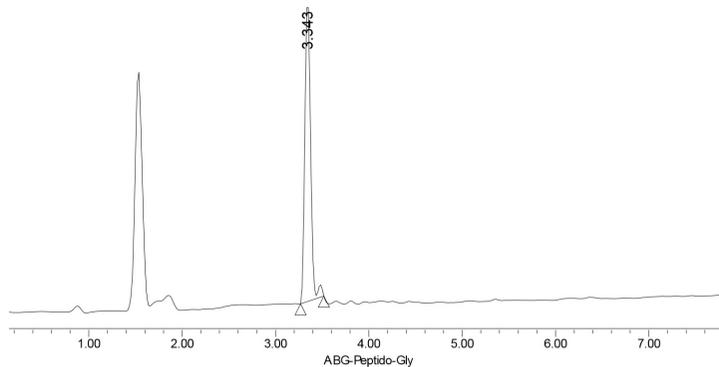
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₆H₄₁N₇O₇: 564.31 [M+H]⁺, encontrada 564.29 [M+H]⁺.



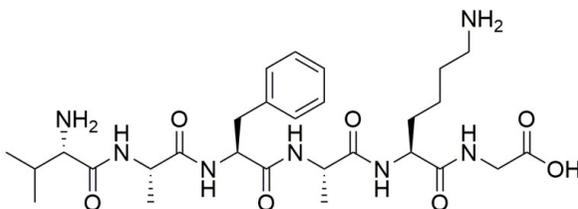
-H₂N-GAFAKG-COOH



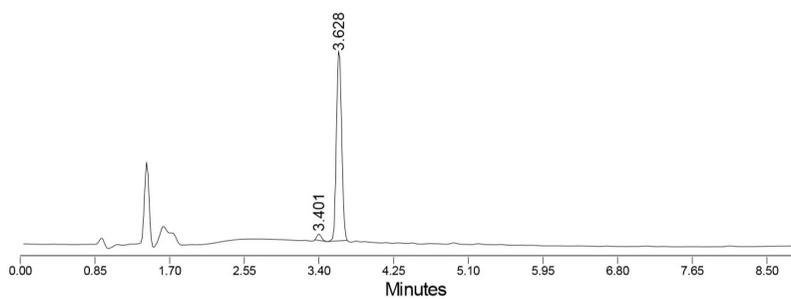
LC-MS (ESI): calcd. para C₂₅H₃₉N₇O₇: 550.30 [M+H]⁺, encontrada 550.17 [M+H]⁺.



-H₂N-VAFAKG-COOH



LC-MS (ESI): calcd. para C₂₈H₄₅N₇O₇: 592.35 [M+H]⁺, encontrada 592.46 [M+H]⁺.



3.- Estudio de modificación de proteínas

3.1.- Proteínas

Las proteínas utilizadas en el estudio de modificación fueron las siguientes:

Insulina: la insulina utilizada fue insulina humana recombinante. Se preparó una disolución de concentración 0.86 mM: se disolvieron 5 mg en 1 mL de una disolución acuosa que contenía HCl (5 mM).

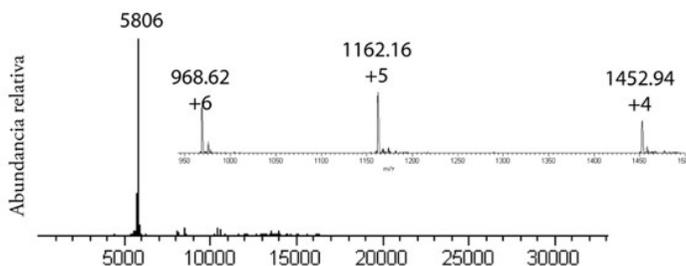


Figura 74. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando el ion molecular correspondiente. LC-MS (ESI): calcd. para $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$: 5807.65 $[M+H]^+$, encontrada 5806 $[M+H]^+$. El espectro de masas original antes de su deconvolución puede verse insertado.

Ubiquitina: la ubiquitina empleada procedía de eritrocitos bovinos. Se preparó una disolución de concentración 0.1 mM disolviendo 1 mg en 1 mL de H_2O milli Q.

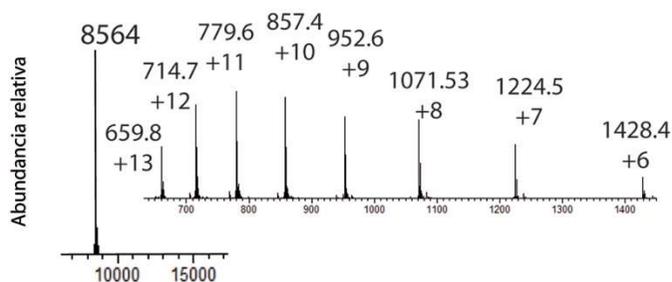


Figura 75. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando el ion molecular correspondiente. LC-MS (ESI): calcd. para $C_{378}H_{629}N_{105}O_{118}S$: 8564.64 $[M+H]^+$, encontrada 8564 $[M+H]^+$. El espectro de masas original antes de su deconvolución puede verse insertado.

Mioglobina: la mioglobina utilizada en los experimentos procedía del músculo esquelético equino (pureza del 95-100%). Se preparó una disolución de concentración 0.5 mM disolviendo 4.24 mg en 500 μL de H_2O milli Q.

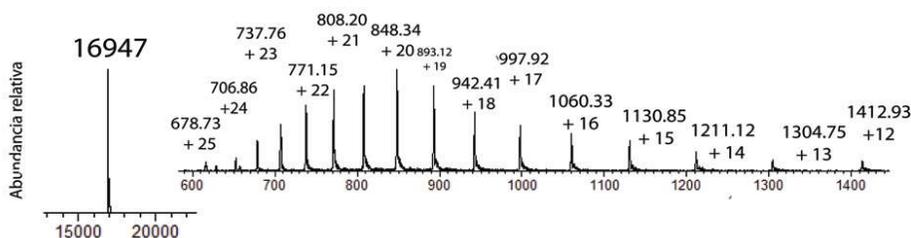


Figura 76. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando el ion molecular correspondiente. LC-MS (ESI): calcd. para $C_{769}H_{1212}N_{210}O_{218}S_2$: 16949.99 $[M+H]^+$, encontrada 16947 $[M+H]^+$. El espectro de masas original antes de su deconvolución puede verse insertado.

3.2.- Modificación específica de proteínas con diésteres del ácido escuárico

3.2.1.- Modificación de proteínas con dibutil escuarato

- **Modificación de la insulina con dibutil escuarato**

Disoluciones empleadas: Insulina 0.86 mM en DMSO, dibutil escuarato 8 mM en DMSO, TCEP.HCl 0.5 M en H_2O milli Q, NEM 20 mM en H_2O milli Q.

Se preparó una disolución de insulina 0.063 mM en 200 μL totales a partir del stock inicial, en una disolución tamponada de fosfato 0.1 M (pH=6.5). A continuación se adicionaron 2 μL de TCEP.HCl (0.5 M) a la disolución para reducir los puentes de disulfuro y se dejó agitando durante 1 h. Posteriormente, se adicionaron 20 eq. de dibutil escuarato para proporcionar una concentración final de compuesto de 1.27 mM. La reacción se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente. Los resultados fueron analizados utilizando espectrometría de masas (UPLC-TOF). La deconvolución de los espectros mediante el software MagTran, que utiliza el algoritmo Zscore, permitió determinar la masa del ion molecular tras deconvolución del espectro no procesado (Resultados y discusión, Figura 49).

Con la intención de investigar los puntos potenciales de reacción, se procedió a estudiar la modificación de la proteína con dibutil escuarato tras el bloqueo de los residuos de cisteína. Para ello, se bloquearon las cisteínas con *N*-etilmaleimida (NEM). En este ensayo, en un eppendorf de 1.5 mL se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 μL totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5). A continuación, se añadieron 2 μL de TCEP.HCl (0.5 M) y se dejó agitando durante 1 h con el objetivo de reducir los puentes de disulfuro y dejar los tioles libres. Tras la reducción de los puentes de disulfuro, se añadieron 100 eq. de una disolución de NEM

(20 mM) en la reacción y se agitó durante 3 h a temperatura ambiente (Figura 77). Finalmente, se añadieron 20 eq. de dibutil escuarato y se dejó la reacción agitando durante 3 h a temperatura ambiente (Figura 78).

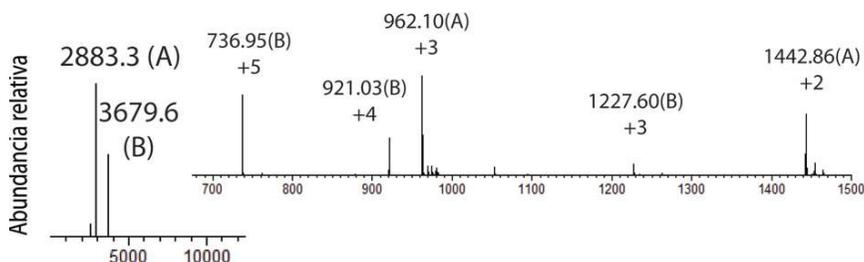


Figura 77. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando el ion molecular correspondiente. La insulina tratada con TCEP y NEM previamente a la modificación con dibutil escuarato, resultó en la formación de dos nuevas especies 2883.3 (calcd. para $C_{123}H_{183}N_{29}O_{43}S_4$, $[M+H]^+ = 2883.20$) y 3679.6 (calcd. para $C_{170}H_{248}N_{42}O_{46}S_2$, $[M+H]^+ = 3678.79$) correspondientes a la cadena A con los cuatro residuos de tiol bloqueados por NEM y a la cadena B con los 2 residuos de cisteína alquilados por NEM.

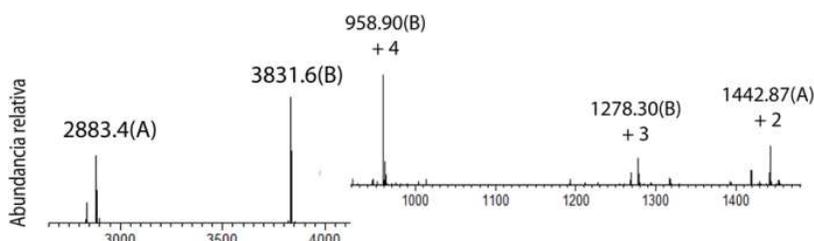


Figura 78. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando el ion molecular correspondiente. La insulina tratada previamente con TCEP y NEM reaccionó con dibutil escuarato resultando en la formación de las especies que corresponden a la cadena A con los cuatro residuos de tiol bloqueados por NEM con la masa molecular 2883.4 ($C_{123}H_{183}N_{29}O_{43}S_4$, $[M+H]^+ = 2883.20$) y a la cadena B con los dos residuos de tiol inmovilizados con dos unidades de NEM e incorporación de una unidad de dibutil escuarato 3831.6 ($C_{178}H_{255}N_{42}O_{49}S_2$, $[M+H]^+ = 3830.83$).

Como estudio complementario, se caracterizó la modificación de la proteína oxidada. Para ello se preparó una disolución de insulina 0.063 mM en fosfato 0.1 M (pH =6.5) sobre la cual se adicionaron 20 eq. de dibutil escuarato del stock de 8 mM obteniéndose así una concentración final de compuesto de 1.27 mM en un volumen total de 200 μ L. La reacción se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente (Resultados y discusión, Figura 50).

- **Digestión proteica de una insulina modificada**

Disoluciones empleadas: endoproteinasa Glu-C 0.5 mM en H₂O milli Q.

Protocolo para la digestión: se añadieron 850 µL de acetona fría a 4 °C sobre la proteína modificada o sin modificar, se mezcló y se centrifugó a 5000 g durante 10 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet que contenía la proteína. A continuación, se añadieron 50 µL de disolución tamponada (100 mM Tris HCl, pH=7.8). Finalmente, se adicionaron 7.34 µL de proteasa (relación peptidasa:proteína 1:20) y se incubó a 37 °C durante 16 h.

Digestión de la reacción de modificación con dibutil escuarato: Se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 µL totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH = 6.5). A continuación, se adicionaron 2 µL de una disolución de TCEP.HCl 0.5 M a la proteína para reducir los puentes de disulfuro y se dejó agitando durante 1 h. Posteriormente, se añadieron 20 eq. de compuesto. La reacción se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente para llevar a cabo la modificación de la proteína. Finalizada la reacción, se realizó el protocolo de digestión añadiendo 7.34 µL de proteasa y se dejó incubando a 37 °C durante 16 h. Los resultados de los fragmentos peptídicos obtenidos se analizaron mediante EM en base a la intensidad relativa (área) de cada pico correspondiente a cada uno de los fragmentos.

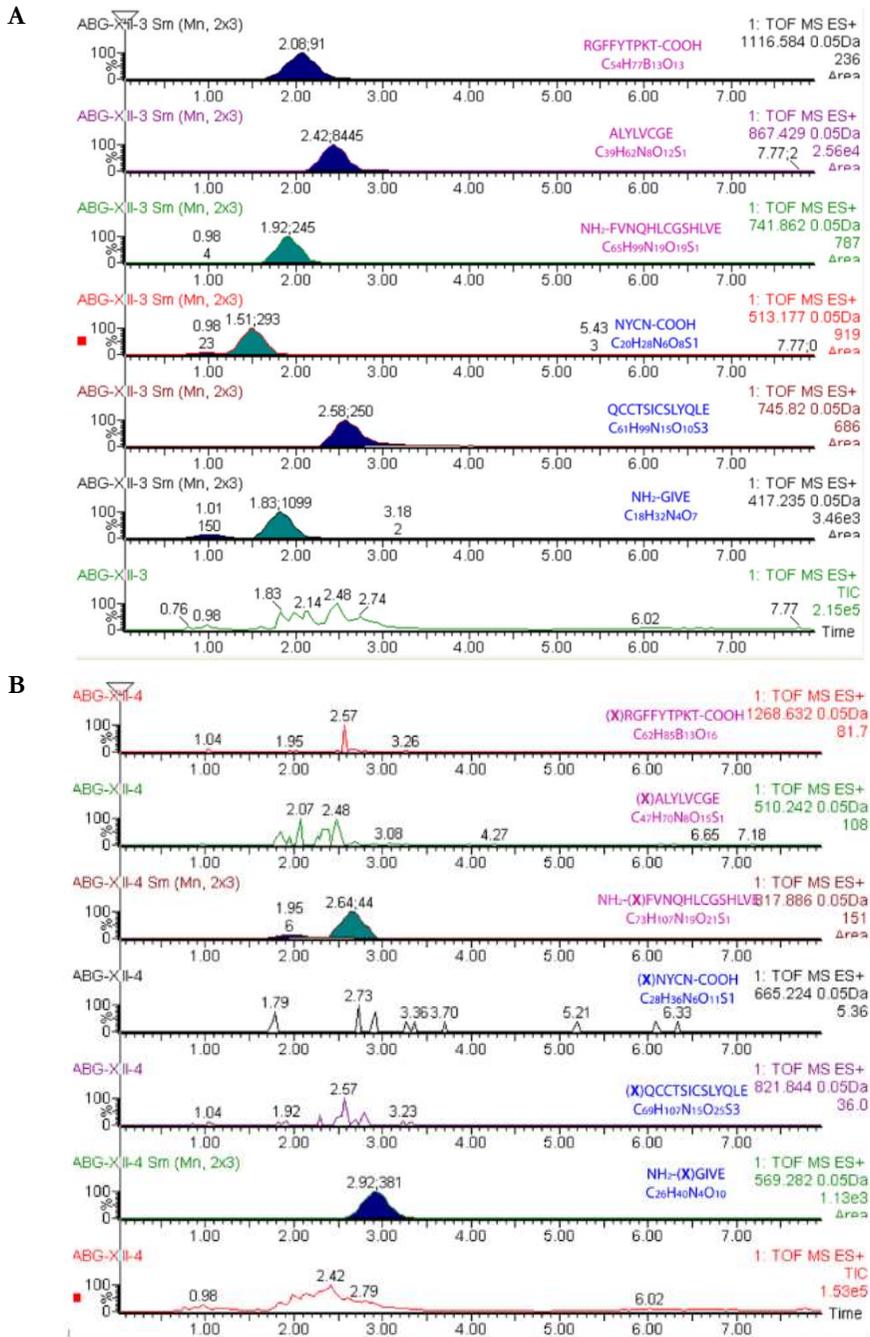


Figura 79. Cromatogramas de iones extraídos (Extracted ion chromatograms EIC) correspondiente a cada uno de los péptidos esperados tras la digestión de A) Proteína nativa, no modificada y B) Proteína tratada con dibutil escurato. Insertados se puede ver la secuencia del péptido esperado así como su fórmula molecular en estado nativo (A) o conteniendo una modificación con dibutil escurato (B).

- **Modificación de la amina N-terminal a través de una reacción de transaminación**

Disoluciones empleadas: piridoxal fosfato (PLP) 20 mM en disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH 6.5), dibutil escuarato (30 mM) en DMSO.

A una disolución de insulina 0.063 mM en 200 μ L de disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH 6.5), se añadieron 200 μ L de disolución stock de PLP. La mezcla se dejó reaccionando durante 2 h a 37 $^{\circ}$ C (Figura 80).

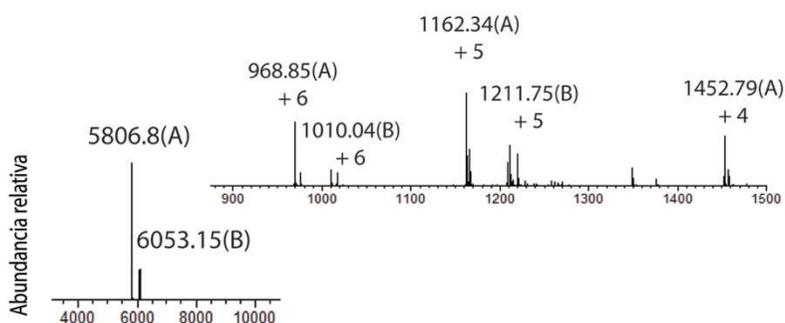


Figura 80. Reacción de modificación de la posición N-terminal de la insulina mediante transaminación durante 2 h a 37 $^{\circ}$ C. Los iones moleculares de las especies obtenidas son 6053.15, que corresponde al aducto con PLP (calcd. para $C_{265}H_{389}N_{66}O_{82}S_6P [M+NH_3]^+ = 6054.71$) y 5806.8 que corresponde al producto de transaminación (calcd. para $C_{257}H_{380}N_{64}O_{78}S_6 [M+H]^+ = 5805.61$). El espectro de masas original antes de su deconvolución puede verse insertado.

A una disolución de insulina 0.063 mM en 200 μ L de disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH 6.5) se añadieron 200 μ L de disolución stock de PLP. La mezcla se dejó reaccionando durante 16 h a temperatura ambiente (Figura 81).

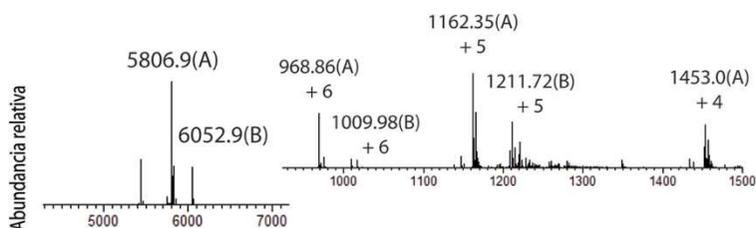


Figura 81. Reacción de modificación de la posición N-terminal de la insulina mediante transaminación durante 16 h a temperatura ambiente. Los iones moleculares de las especies obtenidas son 6052.9, que corresponde al aducto con PLP (calcd. para $C_{265}H_{389}N_{66}O_{82}S_6P [M+NH_3]^+ = 6054.71$) y 5807 que corresponde al producto de transaminación (calcd. para $C_{257}H_{380}N_{64}O_{78}S_6 [M+H]^+ = 5805.61$). El espectro de masas original antes de su deconvolución puede verse insertado.

A una disolución de insulina 0.063 mM en 200 μ L de disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH 6.5), se añadieron 200 μ L de disolución stock de PLP. La mezcla se dejó reaccionando durante 2 h a 37°C. Posteriormente se adicionaron 20 eq. de dibutil escuarato de una disolución de 30 mM en DMSO y la reacción se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 3 h (Resultados y discusión, Figura 51).

▪ Estudio de las reactividades de α -amina y ϵ -amina a diferentes pH

En primer lugar, se prepararon disoluciones tampón de fosfato 0.1 M a pH diferentes (5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5).

Modificación de la insulina con dibutil escuarato

Se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 μ L totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M) al pH correspondiente. A continuación, se adicionaron 20 eq. de dibutil escuarato. La reacción se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente para llevar a cabo la modificación de la proteína. Posteriormente cada una de las reacciones se sometieron al protocolo de digestión empleando endoproteinasa Glu-C.

Modificación de la ubiquitina con dibutil escuarato

Posteriormente, se preparó una disolución de ubiquitina de concentración 0.037 mM en 200 μ L totales a partir del stock inicial, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M) al pH correspondiente (5.5-6.5). A continuación, se adicionaron 10 y 20 eq. de dibutil escuarato de forma independiente, y cada una de las reacciones se dejaron agitando durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación se procedió a digerir la proteína marcada (pH 5.5 y 20 eq. de dibutil escuarato) con la endoproteinasa Glu-C siguiendo el protocolo de digestión mencionado anteriormente.

▪ Modificación de la proteína en dos etapas

Disoluciones empleadas: bencilamina (500 mM), 1-hexadecilamina (500 mM), galactosamina (500 mM), fluoresceinamina (500 mM) en DMF.

Sobre una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5), se añadieron 20 eq. de dibutil escuarato de un stock a 30 mM. Se dejó la reacción agitando durante 3 h a temperatura ambiente y, una vez transcurrido este tiempo, se filtró mediante exclusión molecular el exceso de compuesto utilizando

filtros de tipo Amicon® (5 KDa). Una vez eliminado el exceso de dibutil escuarato, se traspasó la proteína modificada a un eppendorf, el cual contenía 200 µL de una disolución tamponada a pH=8, y se añadió la amina correspondiente (100 eq.) con la cual se quería llevar a cabo la segunda modificación. Se dejó agitando la reacción a temperatura ambiente durante 16 h.

Filtros: Amicon R Ultra-0.5 30K (centrifugal filter devices) Merck Millipore Ltd.

En estas reacciones de modificación de la insulina en dos etapas, se observa la masa molecular 5958.59 tanto en la modificación con fluoresceinamina y bencilamina, correspondiente al primer paso de modificación de la incorporación de una unidad de dibutil escuarato (calcd. para $C_{265}H_{391}N_{65}O_{80}S_6$, $[M+H]^+ = 5959.70$). En el caso de la incorporación de la fluoresceinamina se observa la masa molecular 6232.76, correspondiente a la proteína doblemente modificada tras el segundo paso de incorporación de una unidad de fluoresceinamina (calcd. para $C_{281}H_{394}N_{66}O_{84}S_6$, $[M+H]^+ = 6230.70$). Con el tratamiento de bencilamina se obtuvo la masa molecular 1199.50, correspondiente a la modificación en dos etapas (calcd. para $C_{268}H_{390}N_{66}O_{79}S_6$ $[M+H]^{5+} = 1199.35$). En ambos casos el segundo paso de modificación es incompleto. Por último, la modificación de la insulina con hexadecilamina fue completa (sin la presencia de la insulina mono-modificada por dibutil escuarato) dando lugar a la masa molecular 1226.33 ($C_{277}H_{416}N_{66}O_{79}S_6$, $[M+H]^{5+} = 1126.39$), que hace referencia a la incorporación de una unidad de hexadecilamina tras el segundo paso de reacción.

Ensayo control: Se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 µL totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=8). A continuación, se añadieron 100 eq. de cada una de las aminas en tres reacciones independientes y se dejaron reaccionando a temperatura ambiente durante 3 h. No se observó reacción.

3.2.2.- Modificación de proteínas con di-3-butino escurato (41)

- Optimización de la reacción con péptidos

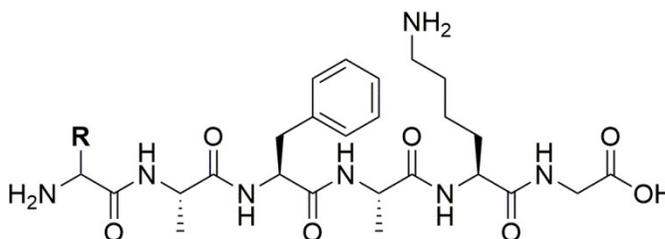


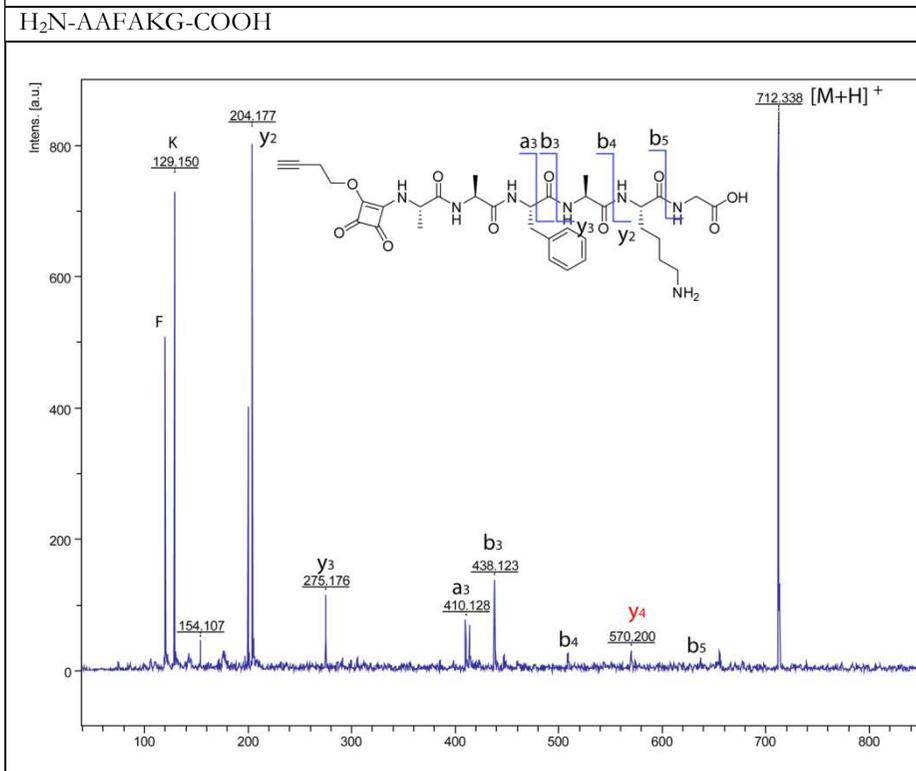
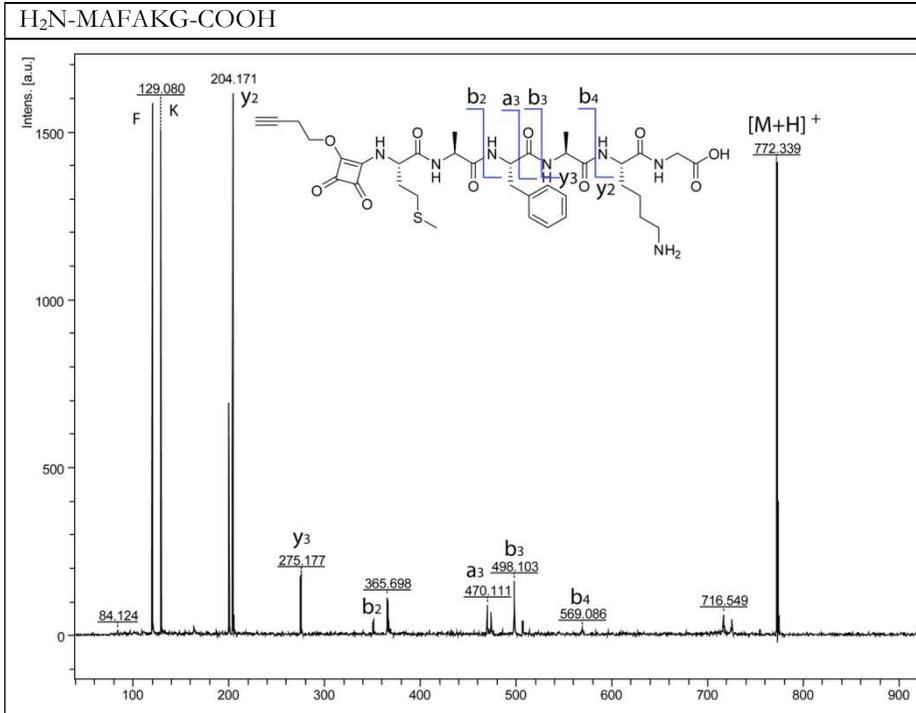
Figura 82. Estructura de los péptidos H₂N- XaaAFAKG-COOH utilizados para el estudio de la reactividad de **41** siendo Xaa (Ala, Gly, Val, Asn, Asp, Arg, Ser, Tyr, Pro o Cys).R: cadena lateral.

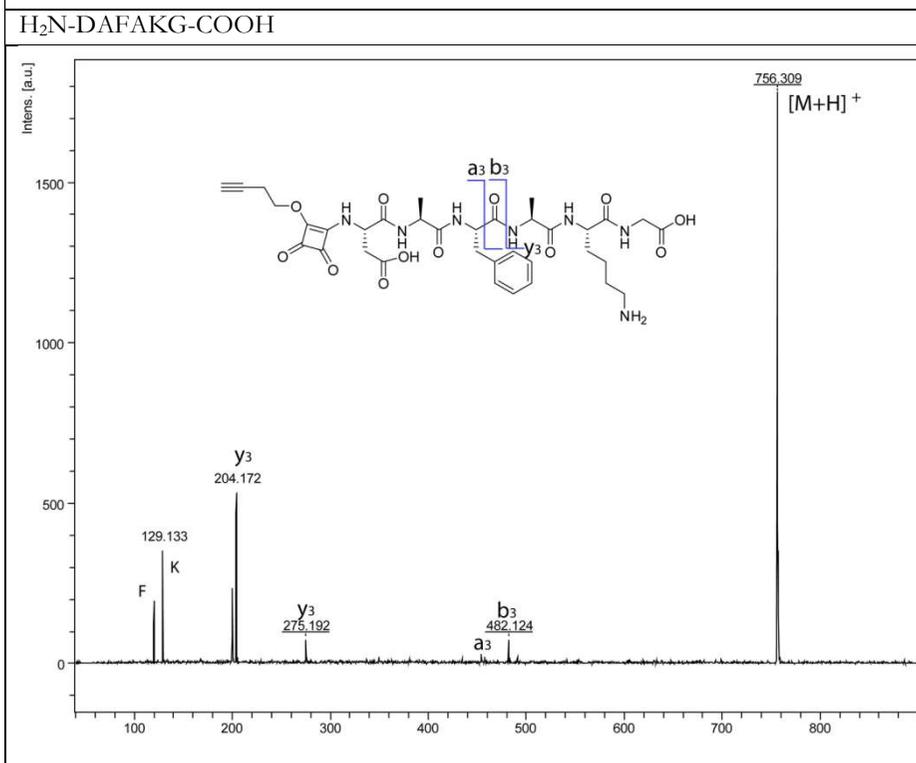
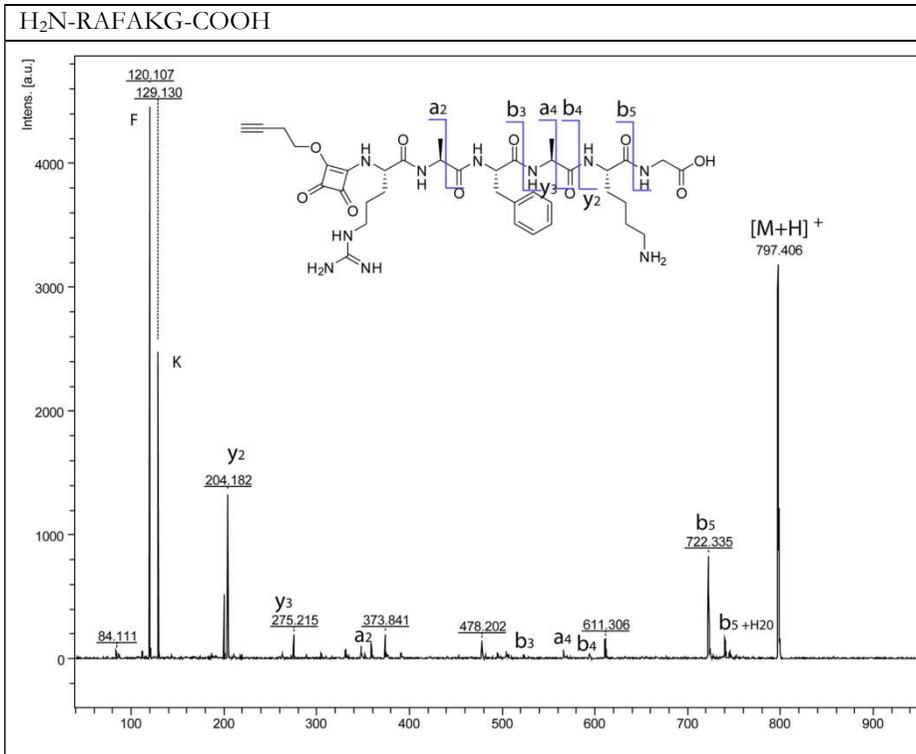
Preparación disoluciones: Se prepararon disoluciones de los péptidos sintetizados a una concentración 8 mM en H₂O milli Q y del compuesto **41** a una concentración 100 mM en DMSO.

El estudio de las reacciones se realizó a intervalos de 30 min, desde t = 0 hasta t = 240 min. Las diversas reacciones se prepararon en un eppendorf de 1.5 mL en un volumen total de 250 μ L. Para ello, se disolvieron los diferentes péptidos en una disolución tampón de fosfato (0.1 M, pH=6.5) a una concentración final de 1 mM. Posteriormente, se añadieron 5 μ L de **41** (100 mM), obteniéndose así una concentración final de compuesto de 2 mM.

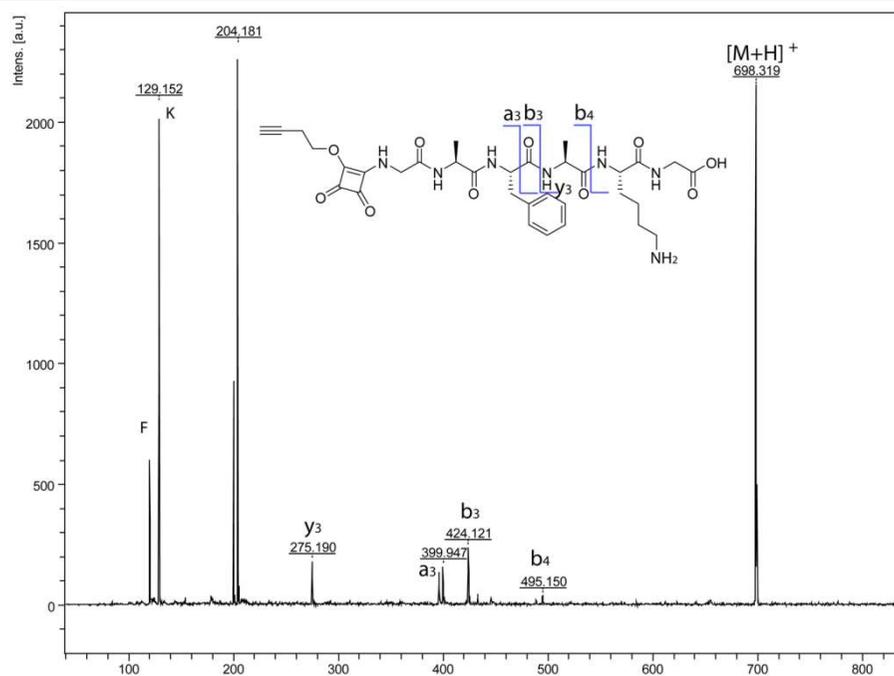
Espectros de los análisis MS/MS de los péptidos modificados obtenidos mediante MALDI-TOF/TOF.

Con la finalidad de determinar la selectividad N-terminal vs el grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina, se analizaron los péptidos modificados mediante estudios de MS/MS.

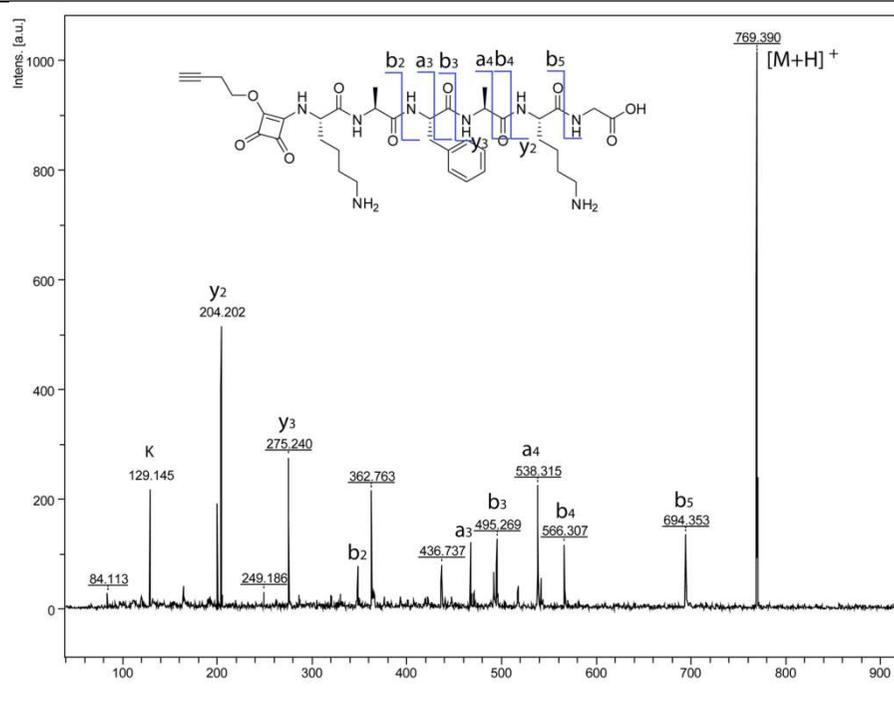




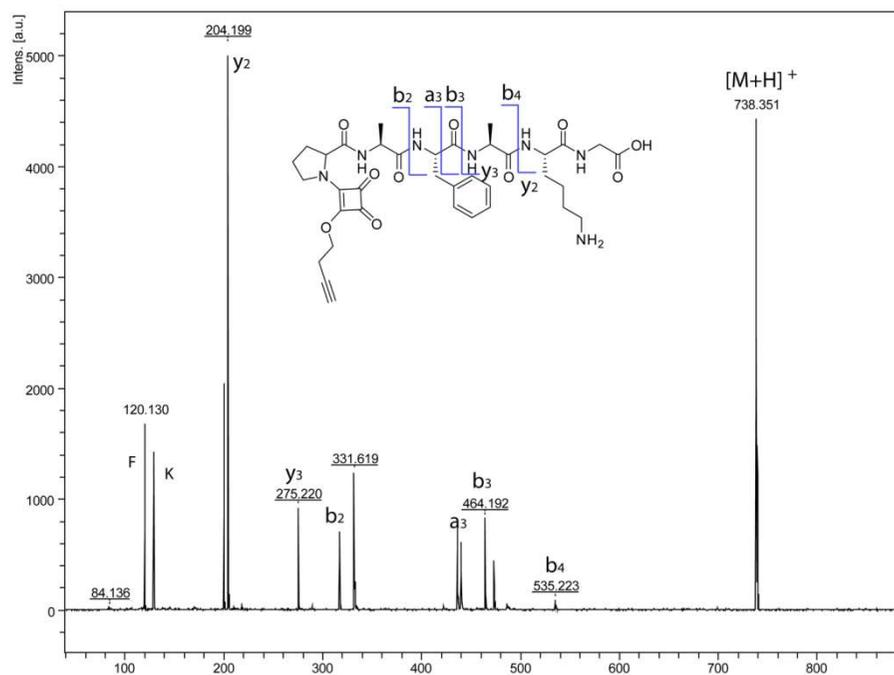
H₂N-GAFAKG-COOH



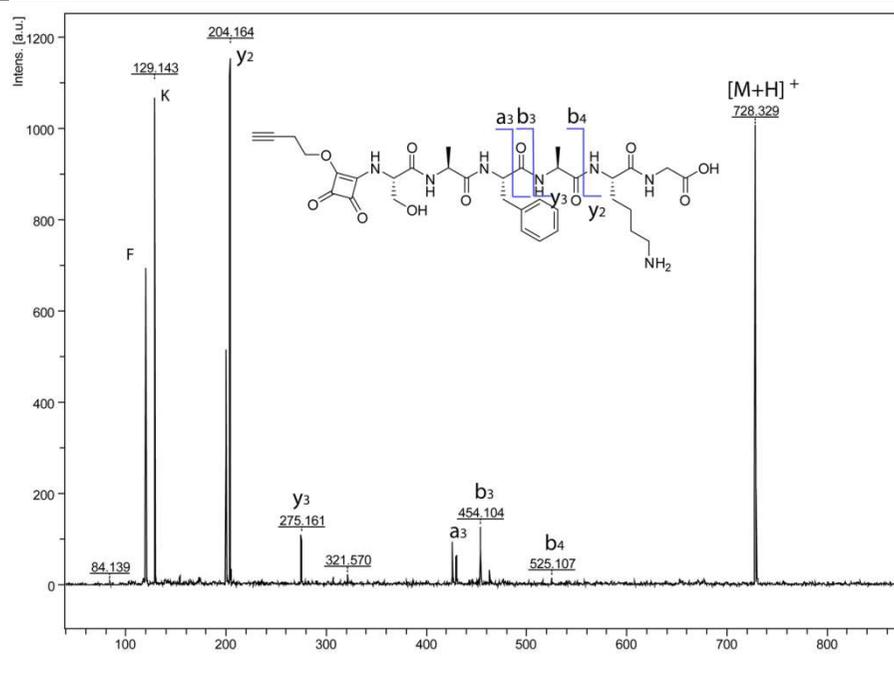
H₂N-KAFAKG-COOH



H₂N-PAFAKG-COOH



H₂N-SAFAKG-COOH



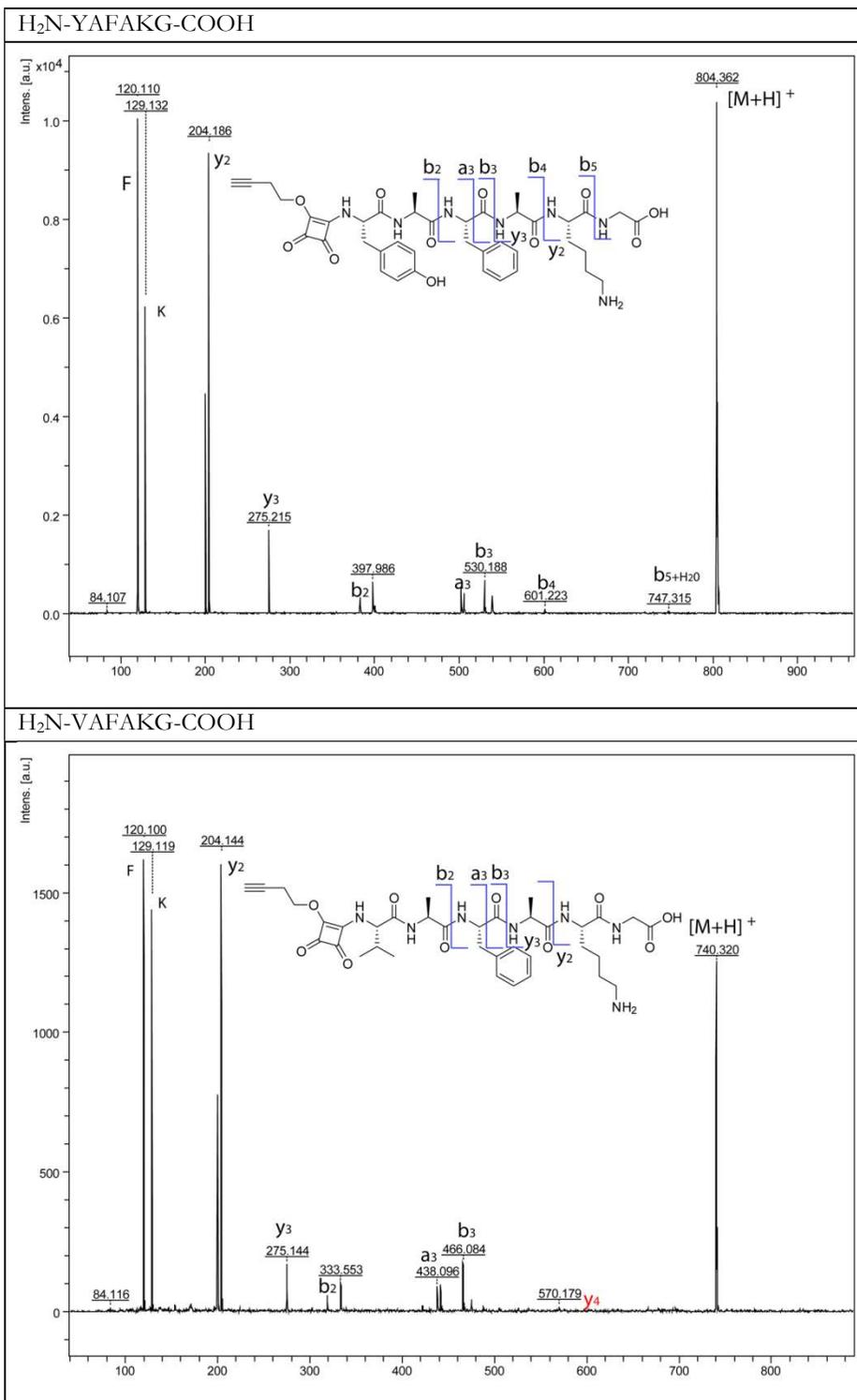


Figura 83. Espectros resultantes de los estudios MS/MS de los péptidos modificados por MALDI-TOF/TOF. Fragmentos N-terminales a, b. Fragmentos C-terminales y.

▪ **Confirmación del sitio de modificación. Digestión peptídica**

Se preparó una disolución del péptido PAFAKG de concentración 1 mM en 250 μ L totales a partir del stock 8 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5). Posteriormente, se añadieron 5 μ L de una disolución 100 mM de **41**, obteniéndose así una concentración final de compuesto de 2 mM. Tras 1 h de reacción, se eliminó el exceso de **41** mediante filtración (filtros Amicon®). Posteriormente, el péptido modificado obtenido se purificó mediante HPLC en fase reversa. Mediante análisis por EM se observó la masa molecular 738.16 correspondiente a la incorporación de una unidad de **41** (calcd. para $C_{33}H_{43}N_7O_{10}$, $[M+H]^+ = 738.35$).

Una vez obtenido el producto final purificado, se llevó a cabo la digestión con quimotripsina. Para ello se disolvió el compuesto purificado en 50 μ L de una disolución tampón 100 mM Tris, 2 mM $CaCl_2$, pH=8.0. A continuación, se añadieron 6.12 μ L de quimotripsina de una disolución 1 mg/mL (relación quimotripsina:péptido 1:60). Se dejó incubando a 30 °C durante 16 h. Mediante análisis por EM se observaron las masas moleculares 482.19 y 275.16, correspondientes a la muestra digerida de PAFAKG modificada mediante **41**, **41PAF** (calcd. para $C_{25}H_{27}N_3O_7$, $[M+H]^+ = 482.19$) y **AKG** (calcd. para $C_{11}H_{22}N_4O_4$, $[M+H]^+ = 275.17$).

▪ **Funcionalización de proteínas con di-3-butino escuarato 41**

A continuación se examinó la reacción del diéster del ácido escuarico **41** con las diferentes proteínas (insulina, ubiquitina y mioglobina) y el posterior tratamiento con azidas funcionalizadas.

INSULINA

Reactividad del compuesto 41 con la insulina

Se preparó una disolución de insulina 0.12 mM en 332 μ L de una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5). Posteriormente se añadieron 12 μ L de una disolución 20 mM de **41**, obteniéndose así una concentración final de compuesto de 0.6 mM, (5 eq. de compuesto añadido). Los resultados fueron analizados mediante espectrometría de masas después de 3 h a temperatura ambiente (Resultados y discusión, Figura 57).

Reacción de cicloadición azida-alquino

Una vez obtenida la proteína modificada, se eliminó el exceso de **41** mediante filtración y la proteína resultante se trató con azidas funcionalizadas.

Disoluciones empleadas: $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50 mM), PEG-1 (100 Mm), THPTA (50 mM), ácido ascórbico (50 mM), Cy3-N_3 (100 mM).

En primer lugar, se desgasificaron todas las disoluciones acuosas mediante burbujeo de nitrógeno. Se escogieron 200 μL para llevar a cabo la reacción de bioconjugación. Seguidamente, se adicionaron 20 eq. de azida (PEG-1) respecto a la proteína modificada. A continuación, se añadió 1 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dando lugar a una concentración final de 0.25 mM. Posteriormente, se adicionaron 5 μL (1.25 mM) del ligando quelante THPTA. Finalmente, se añadieron 20 μL de ácido ascórbico de la disolución stock. Después de 1 h de reacción, se analizaron los resultados mediante EM (Resultados y discusión, Figura 58).

El siguiente ejemplo fue el estudio de bioconjugación de la insulina con una cianina funcionalizada con un grupo azida (Cy3-N_3). Al igual que en la reacción de bioconjugación anterior, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero en este caso se añadieron 20 eq. de Cy3-N_3 . Después de 1 h de reacción, se analizaron los resultados mediante EM (Resultados y discusión, Figura 59).

UBIQUITINA

Reactividad del compuesto **41** con la ubiquitina

Se preparó una disolución de ubiquitina 0.037 mM en 253 μL de una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, $\text{pH}=6.5$). Posteriormente se añadieron 3.7 μL de una disolución 20 mM de compuesto **41**, obteniéndose así una concentración final de compuesto de 0.185 mM. La reacción se dejó agitando y los resultados fueron analizados transcurridos los 140 min y 200 min. Los resultados fueron analizados mediante EM.

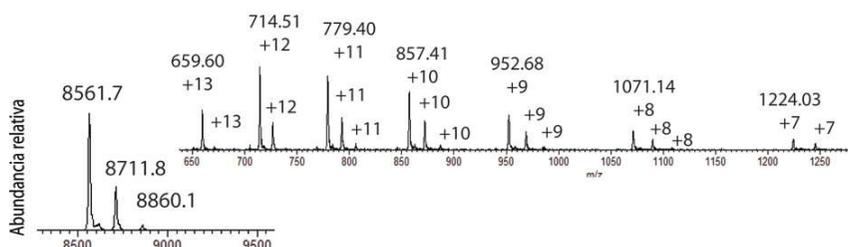


Figura 84. Modificación de la ubiquitina con 5 eq. de **41** a pH 6.5 y a 200 min. Los iones moleculares obtenidos tras la deconvolución del espectro de masas corresponden a $[\text{M}+\text{H}]^+ = 8561.7$, calcd. para $\text{C}_{378}\text{H}_{629}\text{N}_{105}\text{O}_{118}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 8565.64$; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 8711.8$, calcd. para $\text{C}_{386}\text{H}_{633}\text{N}_{105}\text{O}_{121}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 8711.65$ y $[\text{M}+\text{H}]^+ = 8860.1$, calcd. para $\text{C}_{394}\text{H}_{638}\text{N}_{105}\text{O}_{124}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 8860.67$, que corresponden a la proteína nativa y a la modificación con una unidad de **41** y con dos unidades de **41**, respectivamente.

Reacción de cicloadición azida-alquino

Al igual que se llevó a cabo en el caso de la insulina, se empleó la proteína marcada en estudios de bioconjugación con diferentes azidas funcionalizadas.

En un eppendorf de 1.5 mL se añadió la proteína modificada (0.037 mM) en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5, 200 μ L), 20 eq. de una disolución acuosa 20 mM de PEG-1, 1 μ L de una disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en H_2O (50 mM), 5 μ L de ligando quelante THPTA y 20 μ L de ácido ascórbico. Después de 1 h de reacción a temperatura ambiente, se analizaron los resultados mediante EM (Resultados y discusión, Figura 61). Del mismo modo, se trató la ubiquitina modificada con 20 eq. de Cy3- N_3 . Los resultados fueron analizados mediante EM (Resultados y discusión, Figura 62).

Las proteínas marcadas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 16.5% que fue separado por electroforesis a 120 mV/90 min. El gel fue analizado mediante un escáner de fluorescencia y posteriormente teñido con Azul de Coomassie (Resultados y discusión, Figura 63).

MIOGLOBINA

Reactividad del compuesto 41 con la mioglobina

En un eppendorf de 1.5 mL se preparó una disolución de mioglobina 0.1 mM a partir del stock 0.5 mM en 38.75 μ L de una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5). Posteriormente, se añadieron 5 eq de **41**, obteniéndose así una concentración final de compuesto de 0.5 mM. La reacción se siguió por EM analizando alícuotas a diferentes tiempos de reacción (60 min (Resultados y discusión, Figura 65), 150 min y 20 h).

3.3.- Modificación de proteínas con mono-escuaramidas y tioésteres del ácido escuárico

Disoluciones empleadas: **46** (8 mM), **52** (8 mM), **54** 8 (mM) en DMSO.

▪ Reactividad de las escuaramidas 46, 52 y el tioéster 54

Se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 μ L totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH= 6.5). Por otro lado, se preparó una disolución de **46** de concentración 8 mM en DMSO y se adicionaron 20 eq. de compuesto. La reacción se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente (Figura 85).

Se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 μ L totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5). Por otro lado, se preparó una disolución de **52** de concentración 8 mM en DMSO y se adicionaron 20 eq. de compuesto. La reacción se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente. (Resultados y discusión, Figura 68).

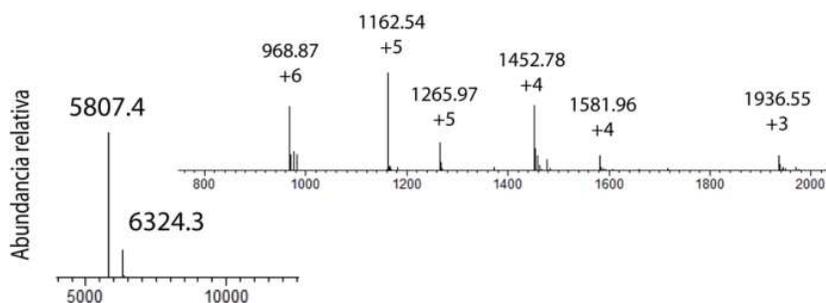


Figura 85. Reacción de modificación de la insulina con 20 eq. de **46** a pH 6.5. El espectro muestra los correspondientes iones moleculares $[M+H]^+ = 5807.4$, (calcd. para $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ $[M+H]^+ = 5807.65$) y $[M+H]^+ = 6324.3$ (calcd. para $C_{283}H_{420}N_{68}O_{85}S_6$ $[M+H]^+ = 6325.91$) correspondientes a la proteína nativa y a la incorporación de una unidad de **46**, respectivamente. Los espectros originales antes de su deconvolución pueden verse insertados.

De manera análoga a la caracterización realizada anteriormente con el dibutil escuarato, se llevó a cabo la modificación de la insulina con **54**. Se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 μ L totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH = 6.5). A continuación, se adicionaron 2 μ L de una disolución de TCEP.HCl 0.5 M a la disolución para reducir los puentes de disulfuro y se dejó agitando durante 1 h. Después de la reducción de los puentes de disulfuro, se añadieron 100 eq. de NEM en la reacción y se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 20 eq. de **54** y la reacción se agitó durante 3 h adicionales (Figura 86).

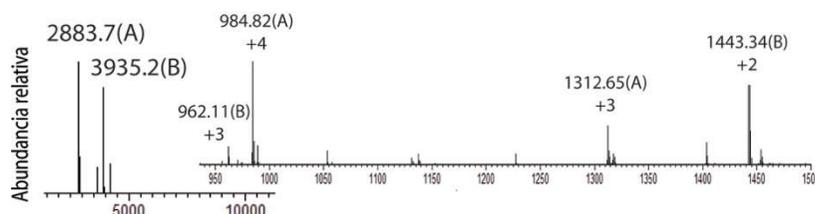


Figura 86. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando los iones moleculares correspondientes. La insulina tratada previamente con TCEP.HCl y NEM reaccionó con **54** resultando en la formación de las especies que corresponden a la cadena A con los cuatro residuos de tiol bloqueados por NEM con la masa molecular 2883.7 (calcd. para $C_{123}H_{183}N_{29}O_{43}S_4$, $[M+H]^+ = 2883.20$) y a la cadena B con los dos residuos de tiol inmovilizados con dos unidades de

NEM e incorporación de una unidad de **54** 3935.2 (calcd. para $C_{181}H_{259}N_{43}O_{50}S_3$, $[M+H]^+ = 3932.83$).

▪ **Reactividad con derivados del mono-tioescuarato **54** (**57** y **60**)**

Disoluciones empleadas: **57** (8 mM), **60** (100 mM) en DMSO.

Reactividad del compuesto **57 con la insulina, ubiquitina y mioglobina**

Se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM en 200 μ L totales a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5). Por otro lado se preparó una disolución de compuesto biotinilado **57** de concentración 8 mM en DMSO y se adicionaron 20 eq. obteniéndose así una concentración final de compuesto de 1.27 mM. La reacción se dejó agitando durante 16 h a temperatura ambiente (Figura 87).

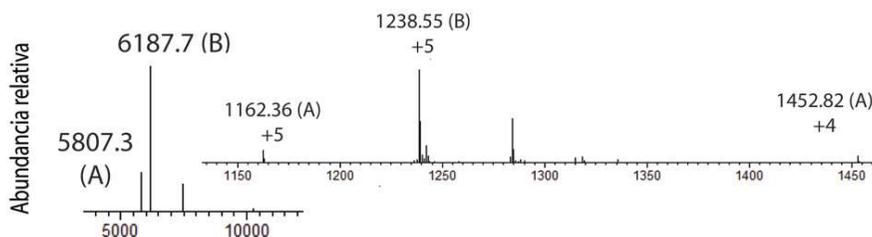


Figura 87. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando los iones moleculares correspondientes. La insulina reaccionó con 20 eq. de **57** resultando en la formación de la especie que corresponden a la insulina modificada con una unidad de **57** con la masa molecular 6187.7 (calcd. para $C_{273}H_{400}N_{68}O_{81}S_8$, $[M+H]^+ = 6184.71$).

Posteriormente, se estudió la reacción de modificación con la ubiquitina y la mioglobina. En primer lugar, se preparó una disolución en 108.26 μ L de fosfato 0.1 M (pH=6.5) de ubiquitina de concentración 0.037 mM a partir de la disolución stock inicial y se adicionaron 20 eq. de compuesto **57**. La reacción se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente (Figura 88).

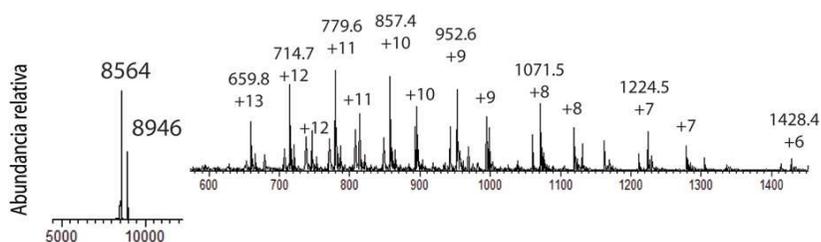


Figura 88. Estados de carga detectados y espectro deconvolucionado obtenido mostrando los iones moleculares correspondientes. La ubiquitina reaccionó con 20 eq. de **57** resultando en la formación de la especie que corresponde a la ubiquitina modificada con una unidad de **57** con la masa molecular 8946 (calcd. para $C_{394}H_{648}N_{108}O_{122}S_3$, $[M+H]^+=8945.72$).

En una segunda reacción, se preparó una disolución de mioglobina 0.06 mM a partir del stock 0.5 mM en 142.98 μ L de una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=6.5). A continuación, se adicionaron 20 eq. de **57** y la reacción se dejó agitando durante 3 h a 37 °C (Resultados y discusión, Figura 70).

Reactividad del compuesto 60 con la insulina

En un eppendorf de 1.5 mL, se preparó una disolución de insulina de concentración 0.063 mM a partir del stock 0.86 mM, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=7). Por otro lado, se preparó una disolución de **60** de concentración 100 mM en DMSO y se adicionaron 60 eq. de compuesto en 100 μ L totales. La reacción se dejó agitando durante 140 min a temperatura ambiente (Figura 89). Las especies obtenidas corresponden a las masas moleculares 6236 (calcd. para $C_{274}H_{407}N_{69}O_{84}S_7$, $[M+H]^+ = 6234.79$) y 1333.86 (calcd. para $C_{291}H_{431}N_{73}O_{91}S_8$, $[M+5H]^{5+} = 1333.79$) pertenecientes a la incorporación de una y dos unidades de compuesto **60** respectivamente en una relación 2.5:1. El análisis de la reacción se siguió por EM a los 140, 240 y 420 min.

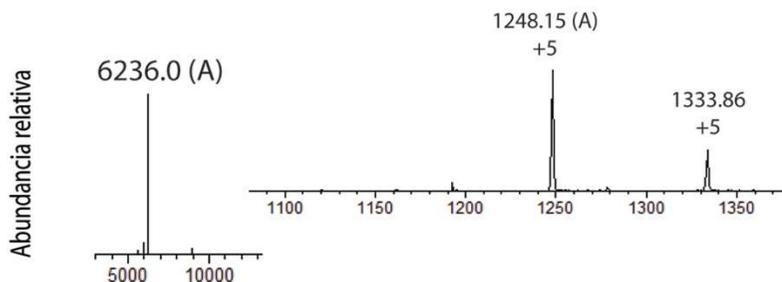


Figura 89. Estados de carga detectados e ion molecular calculado en base a la presencia de los iones $[M+5H]^{5+}$. La insulina reaccionó con 60 eq. de **60** resultando en la formación de las especies que corresponden a la insulina modificada con una unidad y dos unidades de **60** con las masas moleculares 6236.0 (calcd. para $C_{274}H_{407}N_{69}O_{84}S_7$, $[M+H]^+=6234.79$) y 1333.86 (calcd. para $C_{291}H_{431}N_{73}O_{91}S_8$, $[M+5H]^{5+} = 1333.79$).

Reacción click de cicloadición de azida-ciclooctino

En un eppendorf de 1.5 mL se preparó una disolución de la proteína modificada con el compuesto **60** en tampón de fosfato (0.1 M, pH=7, 25 μ L) y 2 eq. de una disolución acuosa 10 mM de dibenzociclooctino biotina (DBCO-Biotin). Después de 1 h de reacción a temperatura ambiente, se analizaron los resultados mediante EM (Resultados y discusión, Figura 71).

Reactividad del compuesto **60** con la ubiquitina

En un eppendorf de 1.5 mL, se preparó una disolución de ubiquitina de concentración 0.037 mM a partir del stock inicial, en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=7). A continuación, se adicionaron 60 eq. de **60**. La reacción se dejó agitando durante 2, 4 y 7 h y los resultados fueron analizados mediante EM (Figura 90).

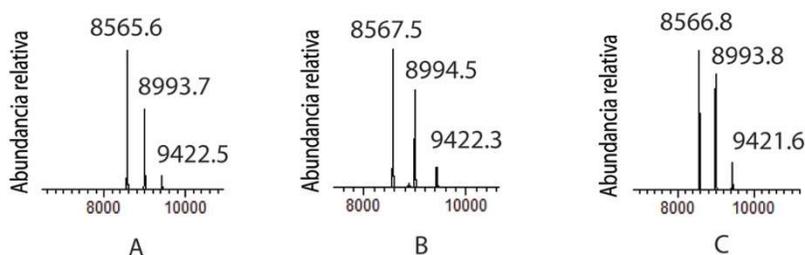


Figura 90. Espectros deconvolucionados. La insulina modificada reaccionó con 60 eq. de **60** resultando después de 2 h (A), 4 h (B) y 7 h (C) en la formación de las especies que corresponden a la reacción de modificación de una (calcd. para $C_{395}H_{653}N_{109}O_{125}S_2$, $[M+H]^+=8993.77$) y dos unidades de **60** (calcd. para $C_{412}H_{677}N_{113}O_{132}S_3$, $[M+H]^+=9421.91$).

Reacción de cicloadición de azida-ciclooctino

Se añadió la proteína modificada (0.037 mM) en una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=7, 25 μ L) y 5 eq. de una disolución acuosa 10 mM de DBCO-Biotina. La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se analizaron los resultados mediante EM (Resultados y discusión, Figura 72).

Reactividad del compuesto 60 con la mioglobina

En un eppendorf de 1.5 mL se preparó una disolución de mioglobina 0.06 mM a partir del stock inicial en 168.8 μ L de una disolución tamponada de fosfato (0.1 M, pH=7). Posteriormente se añadieron 60 eq. de 60. La reacción se siguió por EM y se tomaron muestras a diversos tiempos (Figura 91).

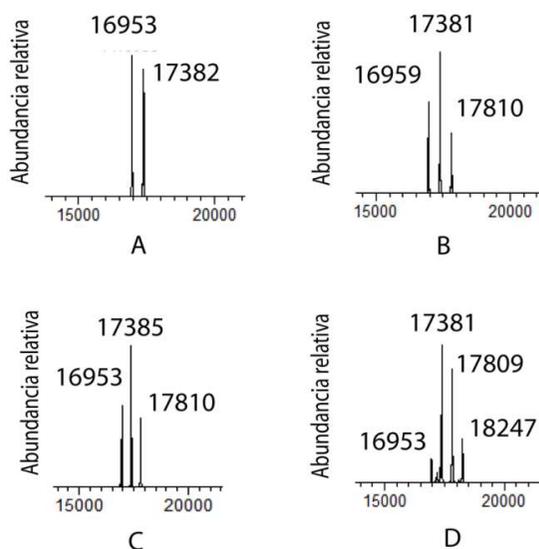


Figura 91. Reacción de modificación de la mioglobina con el compuesto 60 en muestras tomadas a los 80 min (A), 2 h 25 min (B), 3 h (C) y 7 h 30 min (D). Especies correspondientes a la proteína sin reaccionar (calcd. para $C_{769}H_{1212}N_{210}O_{128}S_2$, $[M+H]^+ = 16952.00$), a una incorporación (calcd. para $C_{786}H_{1236}N_{214}O_{225}S_3$, $[M+H]^+ = 17380.14$), dos incorporaciones (calcd. para $C_{803}H_{1260}N_{218}O_{232}S_4$, $[M+H]^+ = 17809.28$) y a tres incorporaciones (calcd. para $C_{820}H_{1283}N_{218}O_{232}S_4$, $[M+H]^+ = 18234.40$) de compuesto 60.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mohandes, F.; Salavati-Niasari, M. Influence of Morphology on the in Vitro Bioactivity of Hydroxyapatite Nanostructures Prepared by Precipitation Method. *New J. Chem.* **2014**, *38* (9), 4501–4509.
- (2) Thirunarayanan, G. Synthesis, IR and NMR Spectral Correlations in Some Symmetrical Diimines. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, **2014**, *28* (1), 73–79.
- (3) Heo, J. M.; Kong, S.; Park, D.-S.; Choi, J.; Ko, Y.; Jo, S.; Hwang, J. Y.; Kim, H.-Y.; Cechetto, J.; Park, E.; et al. Synthesis and Evaluation of Hexahydropyrimidines and Diamines as Novel Hepatitis C Virus Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 315–325.
- (4) Marzoni, G.; Varney, M. D. An Improved Large-Scale Synthesis of Benz [cd] indol-2 (1H)-one and 5-methylbenz [cd] indol-2 (1H) -one. *Org. Process Res. Dev.* **1997**, *1* (1), 81–84.
- (5) Michael D. Varney, Gifford P. Marzoni, Cindy L. Palmer, Judith G. Deal, Stephanie Webber, Katherine M. Welsh, Russell J. Bacquet, Charlotte A. Bartlett, C. A. M. Crystal-Structure-Based Design and Synthesis of Benz[cd]indole-Containing Inhibitors of Thymidylate Synthase. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (4), 663–676.
- (6) Xue, X.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Song, M.; Xing, Y.; Xiang, Q.; Wang, Z.; Tu, Z.; Zhou, Y.; Ding, K.; et al. Discovery of Benzo[cd]Indol-2(1H)-ones as Potent and Specific BET Bromodomain Inhibitors: Structure-Based Virtual Screening, Optimization, and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (4), 1565–1579.
- (7) Girouard, S.; Houle, M. H.; Grandbois, A.; Keillor, J. W.; Michnick, S. W. Synthesis and Characterization of Dimaleimide Fluorogens Designed for Specific Labeling of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (2), 559–566.
- (8) Mejuch, T.; Garivet, G.; Hofer, W.; Kaiser, N.; Fansa, E. K.; Ehrh, C.; Koch, O.; Baumann, M.; Ziegler, S.; Wittinghofer, A.; et al. Small-Molecule Inhibition of the UNC119–Cargo Interaction. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56* (22), 6181–6186.
- (9) Chaturvedi, P. K.; Park, J.-S.; Kim, Y.-W.; Jalde, S. S.; Lee, J. H.; Chauhan, A. K. Synthesis of Novel Chlorin E6-Curcumin Conjugates as Photosensitizers for Photodynamic Therapy against Pancreatic Carcinoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *147*, 66–76.
- (10) Van Der Plas, S. E.; Gea, A.; Figaroli, S.; De Clercq, P. J.; Madder, A. Synthesis of a Tripodal Scaffold for Solid Phase Synthesis of Artificial Receptors. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, No. 9, 1582–1588.
- (11) Hori, Y.; Norinobu, T.; Sato, M.; Arita, K.; Shirakawa, M.; Kikuchi, K. Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (33), 12360–12365.
- (12) Kraus, J.L. Sur La Reactivite Du Squarate de Dimethyle vis-a-vis de thiols. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (16), 1765–1768.

RESUMEN

El modelo de negocio de I+D de las compañías farmacéuticas está en crisis desde hace décadas debido a los grandes costes y a la baja productividad. En consecuencia, la identificación de nuevos biomarcadores y el desarrollo de nuevas estrategias para detectar y tratar trastornos patológicos es un campo de investigación emergente. Estos enfoques pueden ayudar a comprender mejor el mecanismo de progresión de la enfermedad, así como la identificación de nuevas dianas para la intervención terapéutica. La presente tesis trata dos temas que abordan diferentes aspectos del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. En primer lugar se ha trabajado en la identificación de compuestos activos frente a una diana conocida de tipo biológico y en segundo lugar se ha estudiado el desarrollo de métodos adecuados para la modificación de este tipo de moléculas consideradas como dianas farmacéuticas.

La autofagia es un proceso celular que consiste en la degradación lisosomal de componentes citoplasmáticos desechables o potencialmente dañinos. Este proceso regula la degradación lisosomal y el reciclado de orgánulos obsoletos, de proteínas de una vida media larga, de agregados de proteínas y de patógenos. Se produce en condiciones basales y tiene un papel crucial en el desarrollo celular, la diferenciación, la supervivencia y la homeostasis y su funcionamiento anómalo está relacionado con el envejecimiento y múltiples enfermedades como el cáncer y trastornos neurodegenerativos. En condiciones fisiológicas normales, la autofagia se produce a un nivel basal, mientras que en condiciones de estrés, como pueden ser la falta de nutrientes o la presencia del algún estímulo, la actividad autofágica aumenta. En los últimos años se ha comprobado que niveles elevados o deficientes de autofagia están directamente relacionados con varias enfermedades y la modulación de este mecanismo se ha convertido en una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer. Existen diferentes vías de regulación para controlar la autofagia y consecuentemente numerosos puntos potenciales de modulación. Una de las proteínas más exploradas para el bloqueo de la autofagia es Atg4B, cisteína proteasa que tiene un papel fundamental en este mecanismo y prescindir genéticamente de Atg4B inhibe el crecimiento del tumor en células cancerosas. Es por ello que el objetivo general del primer capítulo es la identificación selectiva de inhibidores de autofagia mediante la modulación química de Atg4B y así servir de base para futuras intervenciones farmacológicas. Inicialmente se llevó a cabo un cribado virtual utilizando una quimioteca virtual del National Cancer Institute, se descartaron aquellas estructuras conocidas como altamente reactivas y se solicitaron 250 compuestos para estudiar su actividad utilizando un ensayo de cribado de alto rendimiento basado en la tecnología Alpha Screen puesto a

punto en el grupo. Se procedió a la síntesis de los compuestos activos identificados para confirmar su identidad y actividad, y se prepararon análogos con la intención de explorar la relación estructura-actividad y obtener moléculas de mayor potencia y características farmacológicas mejoradas. Una vez sintetizados, se estudió su actividad como inhibidores de Atg4B y la actividad celular de los compuestos más potentes. Así pues los derivados de 7-aminobenzo[*a*]indol-2(1*H*)-ona presentaron actividades prometedoras como inhibidores de Atg4B destacando especialmente el compuesto **31** que inhibe la autofagia celular y sensibiliza a las células cancerosas al oxiplatino.

Por otro lado, la modificación química de las proteínas es una herramienta importante en el campo de la biología química para el estudio de procesos biológicos, para la caracterización de la actividad de proteínas y para el tratamiento de enfermedades. Esta técnica de bioconjugación combina características de la química sintética y de la biología molecular. Aunque en los últimos años se han descrito varios métodos de modificación específica de proteínas, existe un gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias y métodos complementarios que superen las limitaciones de los existentes. En este contexto, el objetivo principal del segundo capítulo es el desarrollo de un método específico de modificación de proteínas mediante el uso de estructuras derivadas del ácido escuárico. Se sintetizó una pequeña biblioteca de diésteres, mono-escuaramidas y tioésteres del ácido escuárico. Inicialmente se escogió la insulina como proteína modelo puesto que era fácilmente analizable mediante análisis de masas, y posteriormente se extendió a proteínas de mayor tamaño, ubiquitina y mioglobina. Se emplearon varios procedimientos para el estudio del sitio de modificación como son el empleo de agentes alquilantes, diferentes condiciones de pH, la digestión proteica mediante la endoproteinasa Glu-C, estudios de transaminación y de fragmentación MS/MS, entre otros. Todo ello conllevó al desarrollo de un nuevo método aplicable a proteínas en su estado nativo para su modificación selectiva a través del alquil tioescuarato **60** presentando menos reactividad pero más selectividad frente a los diésteres de ácido escuárico previamente explorados.

ANEXOS

Los anexos de la presente tesis doctoral se encuentran en el USB adjunto. El material que se encuentra incluido es el siguiente:

- **Docking**
 - Compuestos pertenecientes a la base de datos NCI Open Database seleccionados por HTVS empleando los programas de acoplamiento Glide y Autodock Vina para cada una de las estructuras de Atg4B.
 - Figuras representando el proceso de cribado virtual utilizado (embudos de selección/docking funnels) para ambas estructuras de Atg4B empleando ambos métodos de acoplamiento.
 - Resultados del Induced Fit Docking.

- **Espectros de RMN**
 - Capítulo 1 (12-39)
 - Capítulo 2 (40-60)

- **PDF de la tesis doctoral**