

NANOMATERIALES PEPTÍDICOS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS



UNIVERSITAT
JAUME·I

Alumna: Mirella Pérez Corchero
Tutora: Beatriu Escuder Gil
Departamento: Química Orgánica

AGRADECIMIENTOS

El presente Trabajo Final de Máster ha sido realizado en el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana, bajo la dirección de la Dra. Dña. Beatriu Escuder Gil a quien quiero agradecer todos los consejos y el apoyo prestados. Para mí ha sido un placer trabajar bajo su orientación y aprender día a día de sus experiencias y enseñanzas.

Asimismo quiero también agradecer a los estudiantes de doctorado por la ayuda proporcionada, siempre dispuestos a echar una mano, y por brindarme su ayuda y orientación durante la realización de este trabajo. Cabe también agradecer a los compañeros de máster por los momentos compartidos y al profesorado por transmitirnos sus conocimientos y atención con el fin de realizarnos más como personas.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y amigos que siempre me han brindado su amor y apoyo incondicional. A ellos debo en gran parte lo que soy ahora.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	Biomateriales.....	5
1.1.1.	Biomateriales peptídicos.....	6
1.1.2.	Biomateriales peptídicos en medicina	7
1.2.	Peptoides	10
1.2.1.	Farmacología de los peptoides	11
1.2.2.	Paso de los peptoides a través de la membrana celular	12
1.3.	Síntesis en fase sólida	14
1.3.1.	Soportes y anclajes.....	15
1.3.2.	Síntesis en fase sólida de peptoides	18
2.	OBJETIVOS	21
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1.	Síntesis en disolución	23
3.2.	Síntesis en fase sólida	24
4.	CONCLUSIONES	30
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
5.1.	Técnicas generales	32
5.2.	Síntesis en disolución	32
5.3.	Síntesis en fase sólida	34
6.	REFERENCIAS	39
7.	ANEXOS.....	41

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biomateriales

En sentido amplio un biomaterial sería un material diseñado para actuar con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo.

Los biomateriales están destinados a la fabricación de componentes, piezas o aparatos y sistemas médicos para su aplicación en seres vivos. Deben ser biocompatibles: se llaman bioinertes a los que tienen una influencia nula o muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean, mientras que son bioactivos los que pueden enlazarse a los tejidos óseos vivos.

Atendiendo a su origen, los biomateriales pueden ser naturales o sintéticos:

- Naturales: son materiales complejos, heterogéneos y difícilmente caracterizables y procesables. Algunos ejemplos son el colágeno purificado o las fibras proteicas (seda, lana).
- Sintéticos: Los biomateriales sintéticos pueden ser metales, cerámicas o polímeros y comúnmente se denominan materiales biomédicos, para diferenciarlos de los biomateriales de origen natural.

Atendiendo a la naturaleza del material artificial con el que se fabrica un implante, se puede establecer una clasificación en materiales cerámicos, metálicos, poliméricos o materiales compuestos.

- Los biomateriales poliméricos son ampliamente utilizados en clínica, en implantes quirúrgicos, como en membranas protectoras, en sistemas de dosificación de fármacos o en cementos óseos acrílicos.
- Los metálicos se usan cuando es imprescindible soportar carga, como ocurre en las prótesis de cadera, para las que se utilizan aleaciones de cobalto (Co) con cromo (Cr) o de titanio (Ti) con aluminio (Al) y vanadio (V); el titanio también se usa en implantes dentales.
- Las biocerámicas se emplean en la fabricación de implantes que no deban soportar cargas, como es el caso de la cirugía del oído medio, en el relleno de defectos óseos tanto en cirugía bucal como en cirugía ortopédica y en el recubrimiento de implantes dentales y articulaciones metálicas.

En el caso particular de los biomateriales poliméricos, se puede hacer una clasificación según el tiempo que deben mantener su funcionalidad cuando se aplican como implantes quirúrgicos.

- En el primer grupo se incluyen todos aquellos implantes que deben tener un carácter permanente, como son los sistemas o dispositivos utilizados para sustituir parcial o totalmente a tejidos u órganos destruidos como consecuencia de una enfermedad o trauma.
- En el segundo grupo, se incluyen los biomateriales degradables de aplicación temporal, es decir, aquellos que deben mantener una funcionalidad adecuada durante un periodo de tiempo limitado, ya que el organismo humano puede desarrollar mecanismos de curación y regeneración tisular para reparar la zona o el tejido afectado.

1.1.1. Biomateriales peptídicos

Un péptido es un polímero de aminoácidos; siendo, por tanto, una cadena de unidades básicas unidas entre sí por enlaces químicos covalentes.

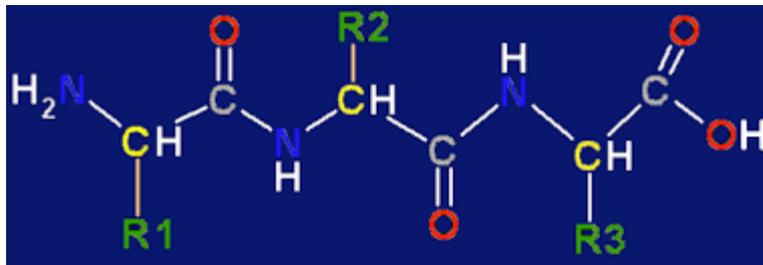


Figura 1. Estructura general de un péptido.

Los biopolímeros son macromoléculas presentes en los seres vivos. Una definición de los mismos los considera materiales poliméricos o macromoleculares sintetizados por los seres vivos; a raíz de nuevas disciplinas médicas como la ingeniería de tejidos, también se incluyen como biopolímeros materiales sintéticos con la particularidad de ser biocompatibles con los seres vivos (normalmente con el ser humano).

De entre los biopolímeros sintetizados por los seres vivos existen tres principales familias: proteínas (fibroínas, globulinas), polisacáridos (celulosa, alginatos) y ácidos nucleicos (ADN, ARN).

A continuación se describen estas y otras familias de biopolímeros:

- Ácidos nucleicos: son los portadores de la información genética heredada entre generaciones.
- Proteínas: están formadas por uniones peptídicas entre aminoácidos y tienen una función capital en los seres vivos, ya que participan en distintas funciones biológicas. Entre estas se incluyen funciones estructurales (colágeno), funciones catalíticas (enzimas) o inmunológicas (anticuerpos o inmunoglobulinas).
- Polisacáridos: son los polímeros resultantes de la condensación acetálica de monosacáridos simples. Los polisacáridos suelen tener funciones estructurales (celulosa, quitina, pectinas, alginatos) pero también funciones de reserva energética en el reino vegetal (amilosa, amilopectina, inulina) y en el reino animal (glucógeno).
- Politerpenos: los dos más conocidos son el poliisopreno (caucho natural, isómero cis-1,4-poliisopreno) y la gutapercha (caucho de propiedades mecánicas inferiores, isómero trans-1,4-poliisopreno).
- Polihidroxicanoatos: son poliésteres lineales biosintetizados por bacterias mediante la fermentación de azúcares o lípidos. Existen muchos tipos de polihidroxicanoatos pero los más conocidos son el polihidroxibutirato (PHB) y el poli-3-hidroxivalerato (PHV), así como sus copolímeros.

1.1.2. Biomateriales peptídicos en medicina

BREVE HISTORIA DE LOS BIOMATERIALES EN MEDICINA

La primera aplicación de biomateriales en medicina no se produce hasta 1860 con la introducción de las técnicas quirúrgicas asépticas. A principios de 1900 se aplican las primeras placas óseas hechas de metal con la finalidad de separar roturas o fracturas. Durante los siguientes años las aleaciones metálicas constituyen la única forma de biomateriales en uso. Sus aplicaciones se extienden desde reparaciones óseas hasta sistemas de liberación de medicamentos. No es hasta la Segunda Guerra Mundial que se produce un rápido avance en la ciencia de los polímeros, principalmente enfocado a las aplicaciones médicas. El polimetilmetacrilato (PMMA) fue uno de los primeros polímeros utilizados como material biomédico, aplicándose como material para reparar la córnea humana.

Los polímeros no únicamente reemplazaron a otros materiales en aplicaciones médicas, como la sustitución de los catéteres metálicos por polietileno, sino que abrieron el campo a otras nuevas aplicaciones antes difícilmente asequibles. Así, en 1950 se fabrica el primer corazón artificial, llevado a la práctica a finales de 1960. En la actualidad los polímeros continúan en amplio crecimiento y sus aplicaciones son cada vez mayores dentro del campo de la medicina, mejorando las propiedades de los materiales ya existentes y desarrollando nuevos polímeros par aplicaciones específicas.

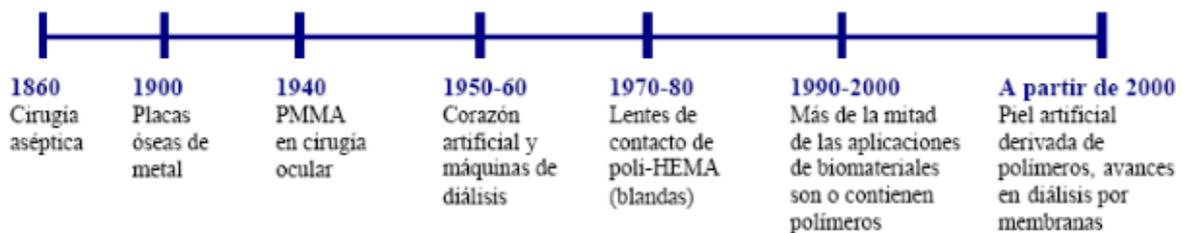


Figura 2. Secuencia histórica de los polímeros de mayor relevancia en el campo de la medicina desde su aparición.

REQUERIMIENTOS PARA POLÍMEROS BIOMÉDICOS

Al trabajar con biomateriales es necesario conocer dos aspectos fundamentales:

- el efecto del implante en el organismo
- el efecto del organismo sobre el implante.

Esto puede resumirse en los siguientes puntos:

1. El material no debe incluir componentes solubles en el sistema vivo excepto si es de forma intencionada para conseguir un fin específico (por ejemplo, en sistemas de liberación de medicamentos).
2. El sistema vivo no debe degradar el implante excepto si la degradación es intencionada y diseñada junto con el implante (por ejemplo, en suturas absorbibles).
3. Las propiedades físicas y mecánicas del polímero, deben ser las más apropiadas para ejercer la función para la que han sido elegidas (por ejemplo, un tendón sustituido debe tener un

módulo de tensión adecuado; una membrana de diálisis, la permeabilidad apropiada; una junta de cadera debe tener un bajo coeficiente de rozamiento). Las propiedades mecánicas deseadas deben mantenerse durante el tiempo de vida esperado para el implante (por ejemplo, no tiene que producirse una relajación significativa en un implante elastomérico).

4. El material debe ser biocompatible, siendo este concepto extensible al potencial cancerígeno que pueda poseer y a la interacción con el sistema inmunológico del que va a formar parte.
5. El implante debe ser esterilizable y estar libre de bacterias y endotoxinas adheridas a las paredes de las células de las bacterias.

En general, la mayor parte de los polímeros no satisfacen todas estas condiciones, de manera que los materiales polímeros utilizados en medicina deben de ser diseñados específicamente para cumplir unas determinadas funciones. Así se puede afirmar que es una labor que hay que realizar entre médico, científico y el ingeniero.

APLICACIONES BIOMÉDICAS

➤ Equipos e instrumentos quirúrgicos

Esta área está cubierta por los termoplásticos y termoestables convencionales que se pueden encontrar en diversas aplicaciones de la vida diaria. Se refiere a los materiales con los que se elaboran jeringuillas, bolsas para suero o sangre, mangueras o tubos flexibles, adhesivos, pinzas, cintas elásticas, hilos de sutura, vendas, etc. Los materiales más usados son aquellos de origen sintético y que no son biodegradables, como polietileno, polipropileno, policloruro de vinilo, polimetilmetacrilato, policarbonato.

➤ Aplicaciones permanentes dentro del organismo

Los materiales utilizados en estas aplicaciones deben ser materiales diseñados para mantener sus propiedades en largos períodos de tiempo, por lo que se necesita que sean inertes, y debido a que su aplicación es dentro del organismo, deben ser biocompatibles, atóxicos para disminuir el posible rechazo.

Las aplicaciones más importantes son las prótesis o implantes ortopédicos, elementos de fijación como cementos óseos, membranas y componentes de órganos artificiales, entre otros. Entre los materiales más utilizados se encuentran: polímeros fluorados como el teflón, poliamidas, elastómeros, siliconas, poliésteres, policarbonatos, etc.

El caso de prótesis vasculares, al ser un implante expuesto al contacto con la sangre, la propiedad fundamental requerida es que el material no provoque coagulación. Considerando este requisito, se aplican fibras de PET, espumas de poli-tetrafluoroetileno expandido, poliuretanos segmentados y silicona porosa.

Otro de los campos donde los polímeros empiezan a tener una presencia significativa son los dispositivos de fijación ósea. Una de las opciones en este campo la constituyen los cementos óseos, que son mezclas de materiales cerámicos con polímeros sintéticos rígidos como el polimetilmetacrilato.

También se han desarrollado numerosos estudios e investigaciones en el campo de implantes biodegradables que permitan solucionar las dificultades anteriores. Los polímeros o copolímeros de PLGA son los más empleados para esta aplicación, gracias principalmente a su biocompatibilidad.

➤ Aplicaciones temporales dentro del organismo

Actualmente, las suturas representan el campo de mayor éxito dentro de los materiales quirúrgicos implantables. El principal motivo es que consisten en materiales biodegradables o bioabsorbibles (principalmente polímeros biodegradables) de manera que la aplicación dentro del organismo pasa de ser permanente a ser temporal.

Entre las aplicaciones temporales dentro del organismo hay que destacar también los sistemas de liberación de fármacos. Los polímeros son esenciales para todos los nuevos sistemas de liberación desarrollados.

Finalmente, otra aplicación temporal importante es la de matrices en ingeniería de tejidos. Los polímeros, particularmente los biodegradables, se emplean en el campo de la ingeniería de tejidos como andamiajes temporales en los que las células pueden crecer y formar tejidos.

Tabla 1. Campos de la medicina donde están más extendidas las aplicaciones de biomateriales.

Oftalmología	Lentes intraoculares Lentes de contacto Implantes de retina
Cardiovascular	Injertos vasculares Válvulas de corazón Marcapasos Bolsas de sangre
Reconstrucciones	Prótesis de mama Nariz, barbilla Dientes
Ortopedia	Caderas Rodillas Hombros Juntas dedos
Otros	Catéteres Oxigenadotes Diálisis renales

El grupo de mayor uso de biomateriales lo forman los materiales polímeros sintéticos, por ejemplo:

- Poliamidas (nylon 6/6) y polipropileno se usan como material de sutura.
- El PVC se usa en tubos y bolsas para el almacenaje de sangre y productos farmacéuticos.
- PET se usa para injertos vasculares de diámetro considerable.
- PMMA es el material usado como cemento de fijación femoral, para lentes intraoculares y para prótesis de cadera.
- PTFE se usa como membranas para injertos vasculares, periodontales y como prótesis de ligamentos.
- Hidrogeles diversos están comenzando a utilizarse en aplicaciones de contacto con sangre y aplicaciones oculares, debido a la baja adsorción de proteínas que poseen y a la capacidad de lubricación.
- Poliuretanos son un ejemplo de materiales con excelente resistencia a la fatiga; se usan en bombeo en corazones artificiales.

- Los polímeros de recubrimiento (siliconas, hidrogeles, fluorocarbonos) se utilizan para muchas aplicaciones cardiovasculares.
- Los materiales bio-readsorbibles son interesantes porque se eliminan sin necesidad de una nueva cirugía. En general, son materiales que se degradan sin dar productos tóxicos para el organismo que son eliminados posteriormente. Los biopolímeros más utilizados como materiales readsorbibles son los hidroxiácidos que se degradan hasta la mitad de su masa en pocos meses.

A la vista de las estadísticas que se realizan sobre el número de fallos producidos en la implantación de materiales poliméricos sintéticos puede afirmarse que actualmente las funciones que llevan a cabo los implantes fabricados en materiales sintéticos son tan buenas como los órganos naturales a los que sustituyen.

1.2. Peptoides

Los peptoides son polímeros de glicina N-sustituídos en los que las cadenas laterales se unen al átomo de nitrógeno del esqueleto peptídico, en lugar de a los carbonos α (como están en los aminoácidos). Así, carecen del hidrógeno de amida que es responsable de muchos de los elementos de estructura secundaria en péptidos y proteínas, ya que queda impedida la unión de hidrógeno intracolumna que se encuentra en las proteínas.

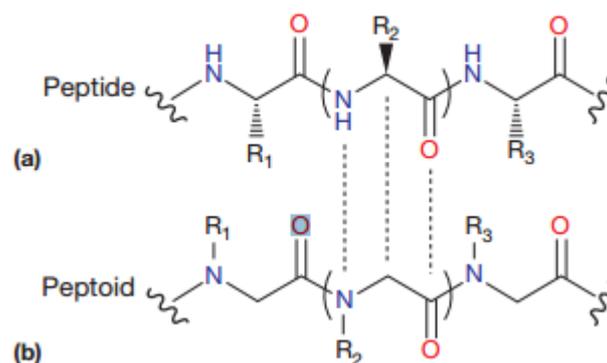


Figura 3. Comparación entre la estructura de un péptido (a) y un peptoido (b).

Los peptoides fueron inventados por primera vez por Reyna J. Simon, Paul Bartlett y Daniel V. Santi para imitar péptidos y ayudar en el descubrimiento de moléculas pequeñas resistentes a proteasas.

La sutil modificación estructural en los peptoides respecto a los péptidos mejora su resistencia a la proteólisis, y por lo tanto son ventajosos para aplicaciones terapéuticas donde la proteólisis es un problema importante. Dado que la estructura secundaria en los peptoides no implica el enlace de hidrógeno, no son desnaturizados por disolventes, temperatura o desnaturizadores químicos tales como urea.

Estos heteropolímeros de secuencias específicas están creciendo en importancia como herramientas útiles en bioquímica, liberación de fármacos y ciencia de materiales. Los avances en la química sintética han hecho posible generar estructuras, con funciones similares a las

proteínas, relativamente simples a partir de heteropolímeros sintéticos no biológicos. Muchos de estos heteropolímeros sintéticos son estables a proteasas biológicas y a ambientes extremos tales como altas temperaturas y condiciones químicas severas. Las proteínas se degradan fácilmente mediante proteasas biológicas y se desnaturalizan mediante diversos productos químicos y altas temperaturas. Por lo tanto, existe una gran oportunidad para desarrollar una nueva clase de polímeros miméticos de proteínas que sean capaces de reconocer moléculas y catalizar reacciones; con la ventaja de ser muy robustos frente al medio.

En términos de diversidad de secuencia, actualmente están disponibles más de 300 aminas primarias que se pueden incorporar en peptoides como cadenas laterales. Así, la diversidad de cadenas laterales peptoides es mucho mayor que la encontrada en proteínas.

Se ha demostrado que los peptoides de 5 monómeros de longitud adoptan conformaciones helicoidales cuando contienen cadenas laterales quirales adyacentes al nitrógeno de la cadena principal. Estas estructuras helicoidales peptoides muestran una estabilidad extrema a los desnaturalizantes químicos y la temperatura. Los peptoides también se han mostrado estables a la proteólisis, abriendo la puerta a aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y biomateriales. Se han encontrado numerosos oligómeros peptoides cortos que se unen a proteínas terapéuticamente relevantes, actuando como antagonistas, inhibidores o activadores.

1.2.1. Farmacología de los peptoides

Como se describió anteriormente, los peptoides difieren de los péptidos solamente en que las cadenas laterales peptídicas se unen al nitrógeno de la amina de la cadena principal en lugar de al carbono α . Esta estructura de los peptoides conduce a propiedades farmacológicas muy diferentes de los péptidos:

- son altamente estables frente a proteasas o peptidasas;
- carecen de un donante de enlace de hidrógeno en la cadena principal, lo que evita la agregación a la cadena principal y, por lo tanto, aumenta la biodisponibilidad;
- y, muestran mayor permeabilidad celular que los péptidos.

Para evaluar el potencial de los peptoides como agentes terapéuticos útiles, se investigó el perfil farmacocinético de peptoides pequeños. En este estudio se compararon los tripeptoides y tetrapéptidos radiomarcados, que tenían propiedades fisicoquímicas similares (peso molecular, capacidad de enlace de hidrógeno y coeficiente de reparto octanol-agua), en cuanto a sus comportamientos farmacocinéticos in vivo. Ambos compuestos mostraron espacios de adsorción similares, pero diferentes características de absorción y disposición en ratas. Su permeabilidad intestinal es comparable, probablemente por sus propiedades fisicoquímicas similares. Sin embargo, la diferencia estructural entre péptido y peptoide parece ser la razón de sus diferencias en la absorción y disposición in vivo. Como se esperaba, se observó que los tetrapéptidos se metabolizan rápidamente, pero el tripéptido es estable en el cuerpo. Los autores de este estudio concluyeron que el peptoide parecía tener ventajas sobre el péptido en términos de estabilidad metabólica, pero su baja absorción oral y excreción biliar rápida todavía presentan problemas.

Se realizó un estudio farmacológico del ligando peptoide del receptor α 1-adrenérgico. El cual demostró que el trímero peptoide es soluble y metabólicamente estable in vitro y que tiene actividad antagonista del receptor en animales. La administración intravenosa del ligando peptoide del receptor α 1-adrenérgico a perros antagonizó el aumento inducido por la epinefrina en la presión intrauretálica. Tanto en ratas como en cobayas, el ligando peptoide del receptor α 1-adrenérgico antagonizó el aumento inducido por la epinefrina en la presión arterial media de manera dependiente de la dosis.

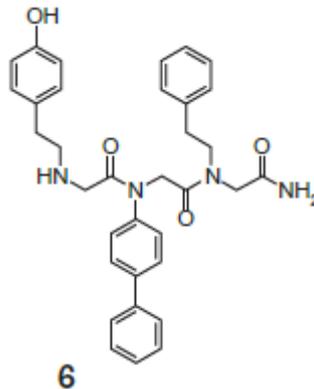


Figura 4. Ligando peptoide del receptor α 1-adrenérgico.

Otro trímero peptoide, CHIR-5585, que se descubrió como un potente inhibidor del receptor del activador del plasminógeno uroquinasa, también mostró ser un antagonista activo in vivo. La administración intranasal del peptoide a las ratas y el estudio subsiguiente de la distribución tisular demostraron la entrega significativa del peptoide en todo el sistema nervioso central y en los ganglios linfáticos cervicales profundos. Los resultados sugieren que la administración intranasal de peptoides puede proporcionar una forma de evitar la barrera hematoencefálica.

1.2.2. Paso de los peptoides a través de la membrana celular

En los últimos años, se han investigado activamente métodos para potenciar o controlar el paso selectivo de agentes terapéuticos o de diagnóstico a través de la membrana celular. Los péptidos penetrantes de células (CPPs) se han convertido en vectores ampliamente utilizados en la entrega de fármacos. Entre muchos CPPs, el VIH-tat es el CPP más popular; la secuencia responsable de la captación celular del péptido de VIH-tat consiste en una región altamente básica en los residuos de los aminoácidos 49 a 57 (RKKRRQRRR).

Utilizando las relaciones estructura-función obtenidas con CPPs, Wender y sus colaboradores diseñaron una serie de derivados peptídicos de poliguanidina. Los autores encontraron que el número de residuos de guanidina y el espacio entre las cadenas laterales afectan a la función de los peptoides que penetran en las células; así, cuanto mayor es el número de grupos guanidino y el espacio entre las cadenas laterales es más largo parece ser beneficioso para una mayor captación celular.

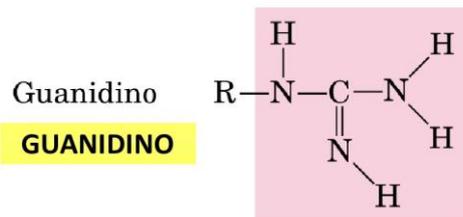


Figura 5. Grupo guanidino.

En lugar de utilizar cadenas laterales que contienen guanidina, Bradley y sus colaboradores se centraron en cadenas laterales que contenían amina y evaluaron los peptoides tipo polilisina para la captación celular. En estos estudios se observó que los peptoides catiónicos más largos muestran mayor penetración celular.

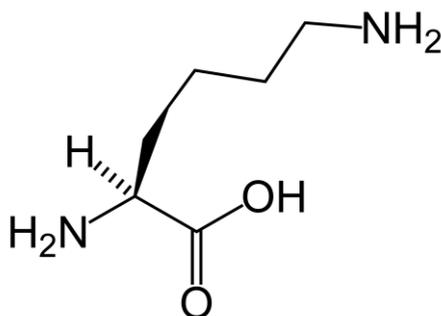


Figura 6. Lisina.

Bräse y sus compañeros compararon los dos tipos de peptoides, uno con cadenas laterales guanidino y el otro con cadenas de lisina y compararon su captación celular. En este estudio, los autores mostraron la interesante posibilidad de que la tasa de captación y la localización celular del transportador peptoide pueden ser ajustadas por simple modificación en la cadena lateral del peptoide.

El grupo Kodadek comparó la permeabilidad celular de un péptido y un peptoide, y la tendencia general mostró una permeabilidad celular superior del peptoide sobre los péptidos. Los autores razonaron que la falta de los protones de los grupos amida de la cadena principal en peptoides da lugar a una lipofilia aumentada y, por lo tanto, a mayor permeabilidad de la membrana. Los autores también compararon la permeabilidad celular relativa de péptidos lineales y cíclicos. Generalmente, se cree que los péptidos cíclicos son más permeables a las células que sus homólogos lineales debido a la rigidez conformacional. Sin embargo, los autores demostraron que los péptidos cíclicos no eran generalmente más permeables que los péptidos lineales.

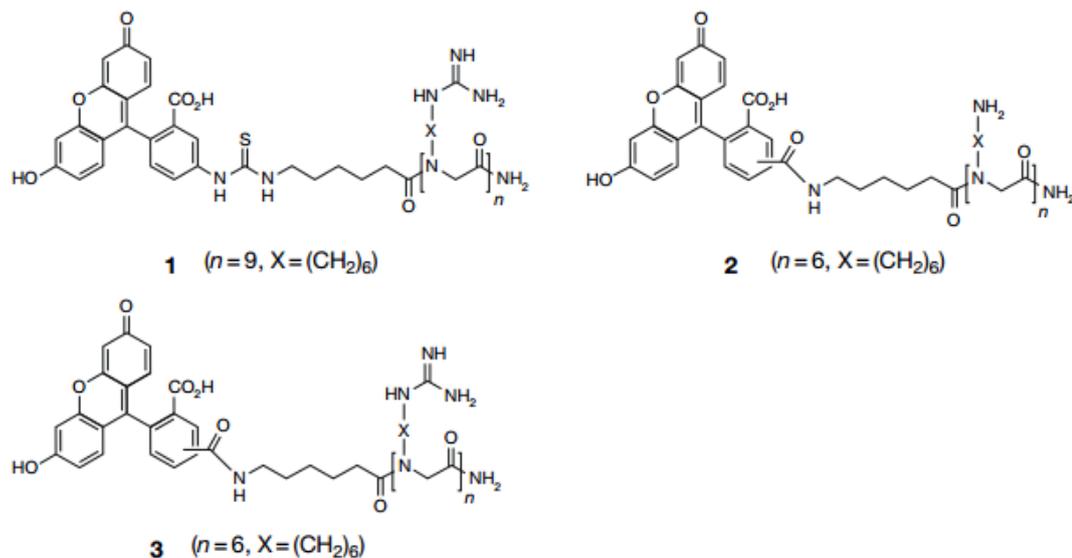


Figura 7. Peptoides con permeabilidad celular.

1.3. Síntesis en fase sólida

En el primer paso de la síntesis en fase sólida, el reactivo de partida se une mediante un anclaje a un soporte sólido polimérico y filtrable, la resina. El anclaje entre el reactivo y la resina es un enlace covalente que se mantiene durante toda la síntesis y se rompe al final como último paso. La resina es un polímero que posee un espaciador (linker) que permite establecer el enlace entre la resina y el sustrato mediante un grupo funcional.



Figura 8. Ejemplo de una resina usada en síntesis en fase sólida.

Todos los pasos de la síntesis se efectúan sobre el reactivo de partida unido al soporte sólido. La resina se hincha en un disolvente adecuado y se le añaden los reactivos y componentes necesarios para efectuar la síntesis total. Después de cada reacción, todos los productos que no estén unidos al soporte se separan del producto unido a la resina por simple lavado y filtración. Al final, el producto de reacción se aísla por ruptura del enlace con el soporte sólido y se separa por filtración.

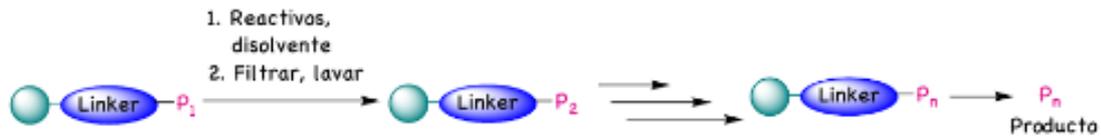


Figura 9. Representación esquemática de una síntesis en fase sólida. P1-n: intermedios sintéticos.

Las ventajas de esta metodología residen principalmente en la facilidad de purificación. Una serie de lavados con varios disolventes, capaces de hinchar la resina y disolver los reactivos y productos que se quieran separar, bastan para aislar el producto, que sigue unido a la resina, donde normalmente sería necesario una purificación por métodos cromatográficos, destilación, cristalización, etc. Además, es posible utilizar grandes excesos de reactivos para elevar el rendimiento de una reacción al máximo, sin tener que preocuparse por la separación del exceso de reactivos después de la reacción. Finalmente, la metodología es automatizable, lo que supone un ahorro de tiempo y mano de obra interesante para rutas sintéticas largas y repetitivas.

1.3.1. Soportes y anclajes

La correcta elección del soporte sólido y del tipo de enlace que une el reactivo de partida a la resina es uno de los pasos más importantes en la síntesis en fase sólida, ya que el tipo de anclaje limita las posibles reacciones que se pueden llevar a cabo sobre la resina.

Una resina o soporte polimérico ha de poseer determinadas características:

- Tener un tamaño y una forma física adecuados, que permita una rápida manipulación y filtración de los disolventes y reactivos empleados. Las más comunes suelen ser partículas de forma esférica y de tamaño entre 40 - 300µm.
- Ser químicamente inerte a los reactivos y disolventes utilizados durante el transcurso de la síntesis.
- Debe expandirse o hincharse con los disolventes usados, de manera que permita una rápida penetración de reactivos y disolventes entre las partículas del polímero; ya que, al tratarse de reacciones heterogéneas, la velocidad de reacción depende sobre todo de la velocidad de difusión del reactivo en disolución dentro y fuera de las partículas de resina.
- Tener un espaciador o linker con el extremo activado en donde se ancla el reactivo de partida. La cantidad de linker que hay en la resina viene definida por la carga, que es el número de centros de reacción por gramo de resina y suele expresarse en unidades de mmol/g.

Hay básicamente tres tipos de resinas:

1. Las resinas de poliestireno, con 1% o 2% de divinilbenceno, que permiten tener bastante más carga de grupos funcionales por gramo de resina que otras, pero tienen la desventaja de que disolventes polares próticos las hinchan mal o no las penetran del todo.

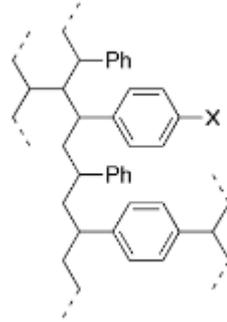


Figura 10. Estructura de la resina de poliestireno, donde X es el linker.

- Las resinas PEG, basadas en copolímeros de poliestireno y polietilenglicol, presentan un mayor grado de flexibilidad por las cadenas de PEG terminales, lo que produce un microambiente más parecido a una disolución, y se hinchan tanto en disolventes orgánicos como en agua. La desventaja que presentan estas resinas frente a las de poliestireno es que su carga es menor, son más caras y, además, presentan problemas de rotura de las cadenas de PEG si se utilizan con ellas reactivos agresivos.

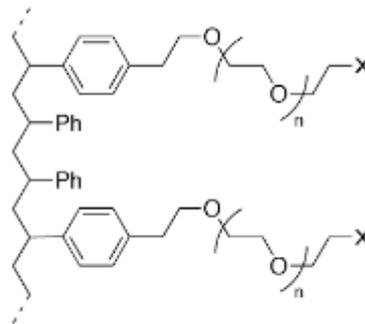


Figura 11. Estructura de la resina PEG.

- Las resinas PEGA, que son copolímeros de polietilenglicol y poli(acrilamida), tienen como característica principal la capacidad de penetración en su interior de reactivos macromoleculares y la facilidad para hincharse intensamente con muchos disolventes, incluyendo el agua. Se supone que son las que mejor simulan una reacción en disolución pero tienen limitada su aplicabilidad debido a la reactividad de sus numerosos enlaces amida.

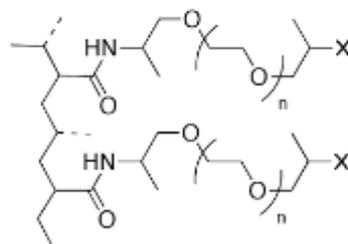


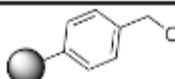
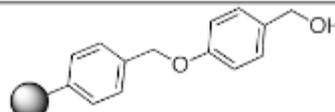
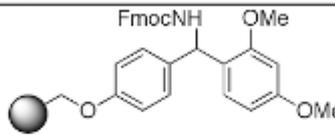
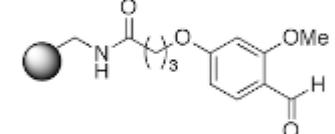
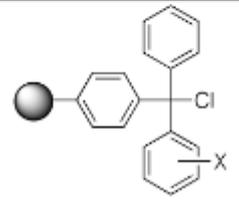
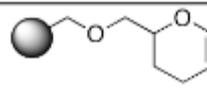
Figura 12. Estructura de la resina PEGA.

Tabla 2. Propiedades de las resinas comerciales más usadas.

Resina	Partículas de resina/g	Carga mmol/g	Hinchable en ml/g resina				
			DMF	THF	MeOH	H ₂ O	DCM
Poliestireno	200-400 mesh: 4-10x10 ⁶	0.16-3.2	3	8	2	-	7
	100-200 mesh: 0.6-2x10 ⁶	0.16-3.2	3	8	2	-	7
PEG	0.9-2.9x10 ⁶	0.23-0.30	5	6	4	4	5
PEGA	1-1.5x10 ⁵	-	11	13	13	16	13

Mientras que la variedad de soportes sólidos comerciales sigue siendo pequeña, existe un número importante de anclajes según sea la reacción que se vaya a realizar sobre el soporte sólido. Los grupos funcionales que poseen estos linkers pueden ser grupos halometilo, hidroxilo, amino, carboxilo, aldehído, tritilo, arilsililoxi y dihidropirano. Así, se pueden unir diferentes tipos de compuestos tales como ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas, tioles, halogenuros, etc.

Tabla 3. Resinas y tipos de unión al sustrato más comunes.

Nombre	Resina	Reactivos de partida
Merrifield		RCOOH ROH
Wang		RCOOH ROH
Rink amida		RCOOH
FMBP		RNH ₂ R ₂ NH
Tritilo	 X = H, Cl, OMe, Me	RNH ₂ ROH RCOOH RCONHNH ₂ RSH
DHP		ROH PhOH Purina Indol

Además, existe la posibilidad de modificar el anclaje de soportes comercialmente disponibles de forma que se obtenga el grupo funcional más conveniente para la síntesis que vaya a tener lugar.

1.3.2. Síntesis en fase sólida de peptoides

Los peptoides se sintetizan eficientemente utilizando una síntesis en fase sólida.

Originalmente se utilizaron técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida estándar para la síntesis de peptoides, usando monómeros de glicina N-sustituidos protegidos con Fmoc. Este método monomérico implica la formación de enlace amida terciaria entre la amina secundaria existente sobre la resina y el monómero de entrada, mediante la activación del grupo carboxilo en el monómero utilizando N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC). A continuación, el grupo Fmoc se desprotege con piperidina, generando una amina secundaria para el siguiente acoplamiento de amida. Esta síntesis peptídica monomérica requiere una síntesis intensiva de monómeros de glicina N-sustituidos protegidos con Fmoc.

La invención del método de síntesis en fase sólida de submonómeros para peptoides en 1992 fue un gran avance porque aumentó considerablemente la eficiencia sintética, los rendimientos de síntesis y la diversidad de cadenas laterales disponibles, al mismo tiempo que redujo drásticamente el tiempo y los costes.

En el primer paso de la síntesis en fase sólida se acila una amina secundaria sobre la resina mediante un ácido haloacético activado, tal como el ácido bromoacético con DIC. Después, el bromo es desplazado por una amina primaria. En esta reacción SN₂, se pueden añadir alrededor de 300 aminas primarias comercialmente disponibles, expandiendo la diversidad de cadenas laterales que se pueden añadir.

Además, se han sintetizado nuevos submonómeros, que se han incorporado a los peptoides. Estos incluyen N-BOC-triptamina, O-t-butil tiramina y PMC-guanidino-propilamina para imitar los aminoácidos naturales triptófano, tirosina y arginina.

Los derivados de (S)-1-feniletilamina de carboxamida, ácido carboxílico y tiol se sintetizaron para ser introducidos en una estructura helicoidal con diferentes funcionalidades químicas. También se han incorporado una variedad de grupos de conjugación quimioselectiva tales como grupos tiol, disulfuros activados, aldehído, aminooxi e hidrazina en peptoides, vía modificación de N-terminal y C-terminal o por el método del submonómero, que permite la unión eficiente entre peptoides.

Recientemente, los derivados de amina de heterociclos tales como histamina, piridina y triptamina se han incorporado con éxito en peptoides usando ácido cloroacético en la etapa de acilación. Los peptoides cíclicos, conformacionalmente restringidos, también se pueden sintetizar usando el método del submonómero, seguido de ciclación en disolución.

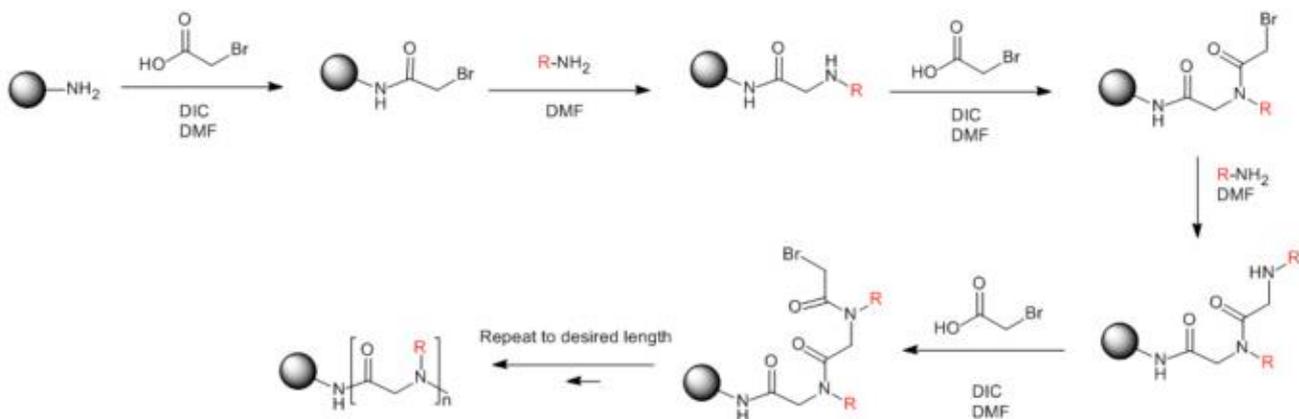


Figura 13. Esquema de síntesis en fase sólida de peptoides mediante el método del submonómero.

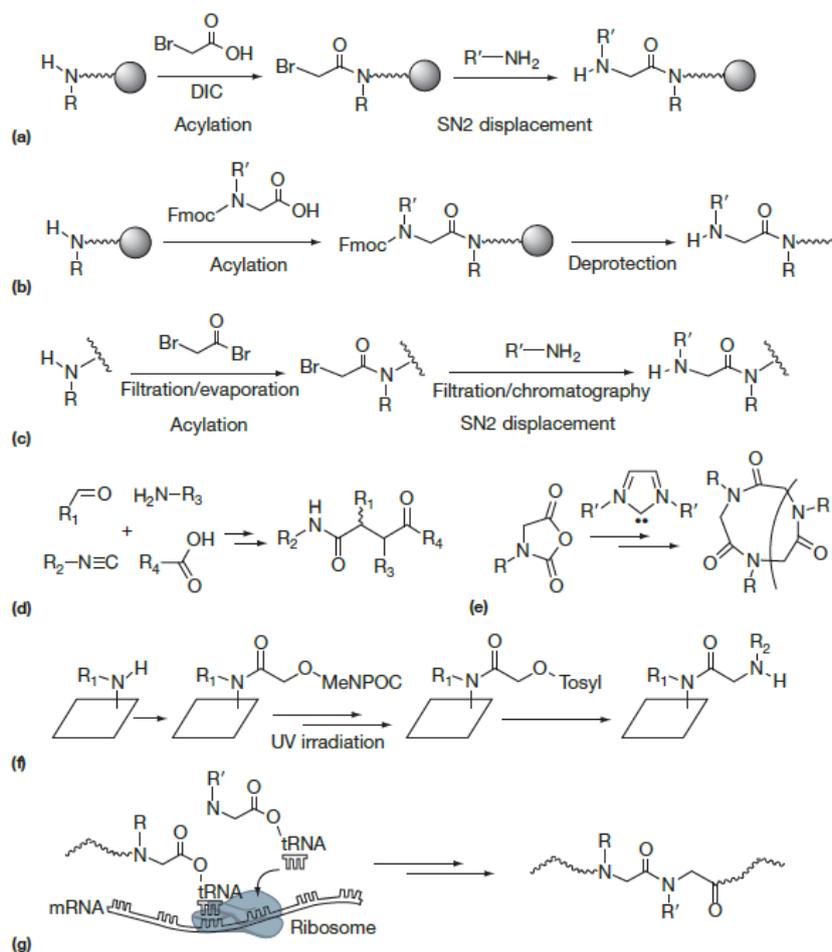


Figura 14. Métodos para la síntesis de peptoides: (a) Síntesis en fase sólida por el método del submonómero. (b) Síntesis en fase sólida por el método Fmoc. (c) Síntesis en disolución a partir de bromoacetilbromuro. (d) Síntesis en disolución mediante la Reacción de cuatro componentes de Ugi. (e) Síntesis en disolución mediante polimerización por la apertura de anillo iniciada por amina. (f) Síntesis fotolitográfica. (g) Síntesis ribosomal in vitro.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El uso de péptidos como potenciales agentes terapéuticos tiene como grandes ventajas su alta especificidad y su gran actividad. Esto implica que, en general, tienen poca toxicidad y pocos efectos secundarios y que se administran en pequeñas dosis; asimismo, no se acumulan en el organismo, ya que poseen una vida media corta. Los péptidos presentan un amplio espectro de potenciales beneficios clínicos. Actualmente hay seis amplias categorías para la aplicación terapéutica de péptidos: antibióticos/antifúngicos, antivirales, desordenes del sistema inmune, enfermedades cardiovasculares, desordenes neuronales y cáncer. Sin embargo, los péptidos se degradan mediante una gran variedad de proteasas, teniendo una vida media in vivo reducida.

Los peptoides constan de un esqueleto basado en residuos de péptidos y glicinas N-sustituidas de cadenas laterales, dando como resultado una resistencia completa a las proteasas. Como isómeros resistentes a las proteasas de los péptidos, los peptoides se están desarrollando como herramientas moleculares versátiles en bioquímica y biofísica, y se están convirtiendo en candidatos atractivos para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Los peptoides han demostrado hasta ahora bioactividad como imitadores de proteínas y como sustitutos de fármacos de moléculas pequeñas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es la síntesis de diversos peptoides, con residuos de cadenas laterales apolares y polares alternados, como alternativa a los péptidos análogos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis en disolución

El primer objetivo de este trabajo es la síntesis de un peptido con dos cadenas laterales apolares feniletilo y dos ácidos tert-butil propionato, para lo cual se sigue una ruta sintética en disolución.

La síntesis en disolución se comienza con la reacción de propilamina y ácido bromoacético, este último activado con DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), en medio de diclorometano. En la segunda reacción se introduce la primera cadena lateral apolar, haciendo reaccionar feniletilamina con el producto de la primera reacción en medio de diclorometano, de manera que por una reacción S_N2 se introduce la amina en la posición del bromo.

Se repite hasta cuatro veces estas dos reacciones, utilizando como amina en la segunda reacción S_N2 feniletilamina y tert-butil-3-aminopropionato de forma alternada para conseguir 2 cadenas laterales apolares y dos cadenas laterales ácidas.

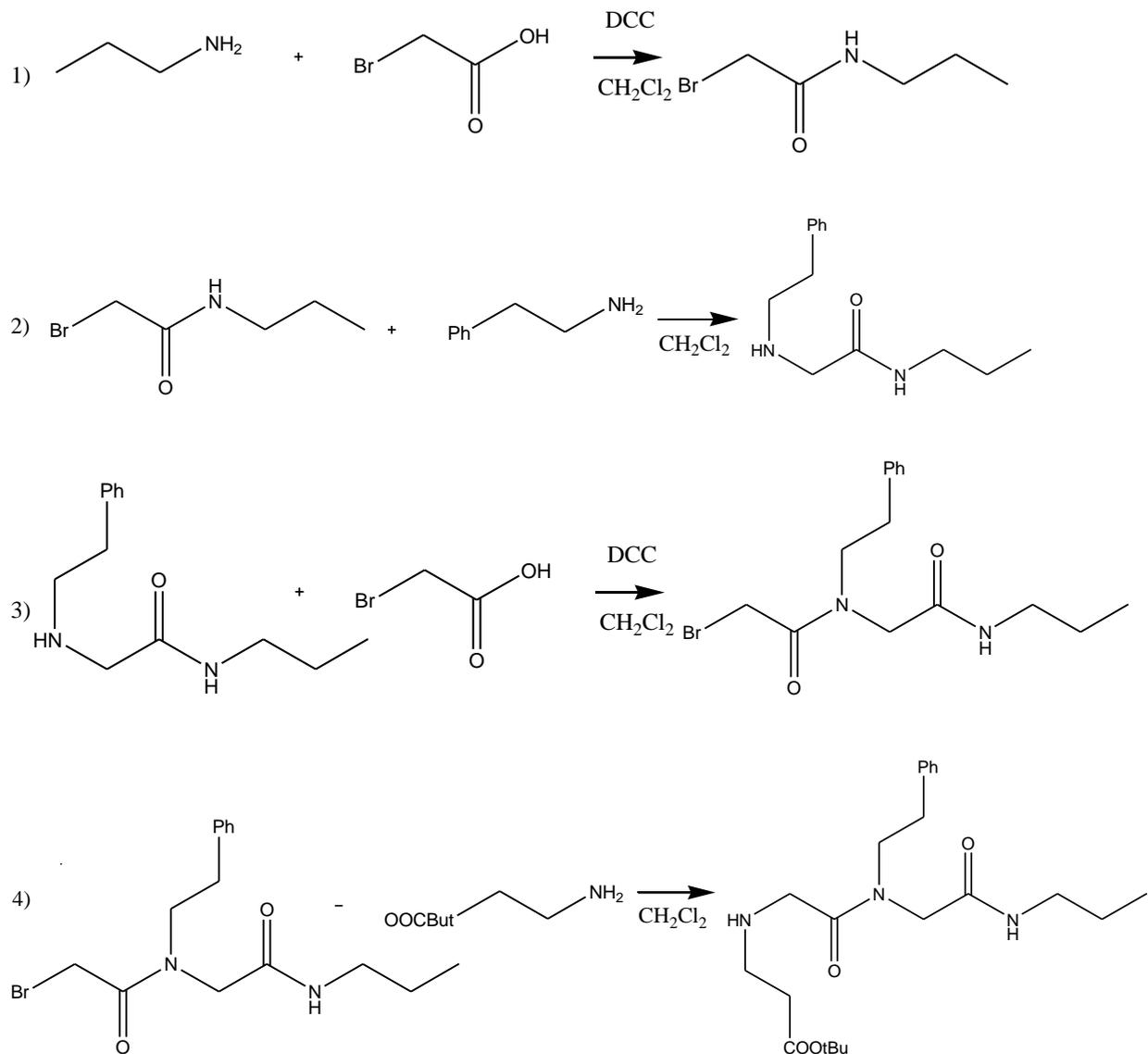


Figura 15. Ruta sintética de peptoides en disolución.

Estas cuatro reacciones se repiten de nuevo para conseguir un peptido con cuatro cadenas laterales sobre los nitrógenos de los grupos amida de la estructura principal.

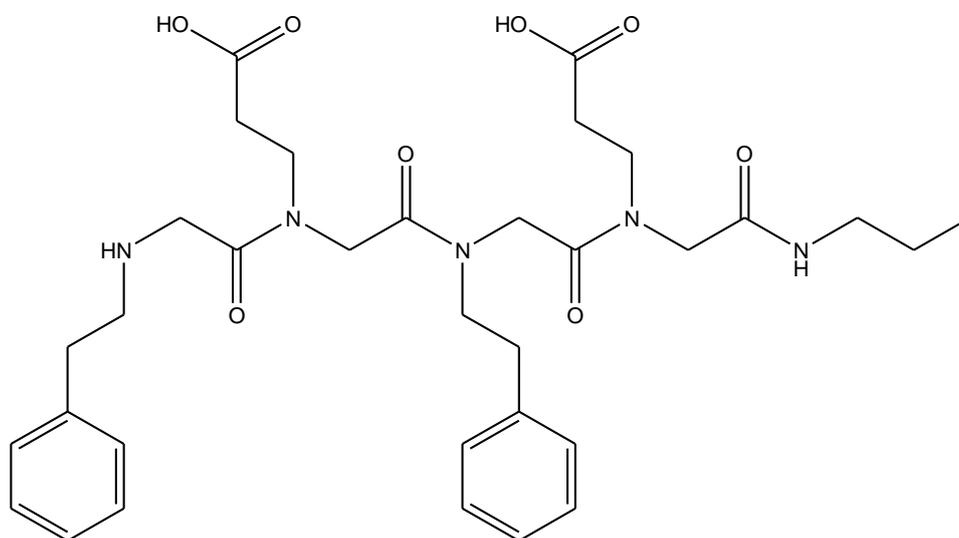


Figura 16. Estructura peptido con dos cadenas laterales apolares y dos cadenas laterales ácidas.

En el proceso experimental la primera y la segunda reacción dieron buenos rendimientos. Sin embargo, al realizar la tercera reacción, en la que se añade el ácido bromoacético activado con DCC al grupo amino del producto de la reacción 2, no se consiguió obtener el producto esperado. Así, de los dos productos obtenidos de la cromatografía de columna de la tercera reacción se han realizado RMN de hidrógeno, RMN de carbono y espectroscopía de masas y ninguno de los espectros muestra picos característicos del producto esperado para esta reacción.

3.2. Síntesis en fase sólida

Puesto que la síntesis del peptido en disolución no pudo finalizarse, debido a problemas experimentales, se optó por una ruta sintética en fase sólida.

Desde el punto de vista de la síntesis, la característica más atractiva de los peptoides es que pueden ser sintetizados a través de una ruta submonomérica. Este método consiste en una primera etapa de acilación realizada por la adición de ácido bromoacético y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y un desplazamiento nucleófilo de bromuro con una amina primaria.

Previamente a las reacciones propiamente dichas, se hincha la resina con DMF durante 1 hora; se filtra el líquido sobrenadante, y se desprotege la amina de la resina mediante lavados con piperidina.

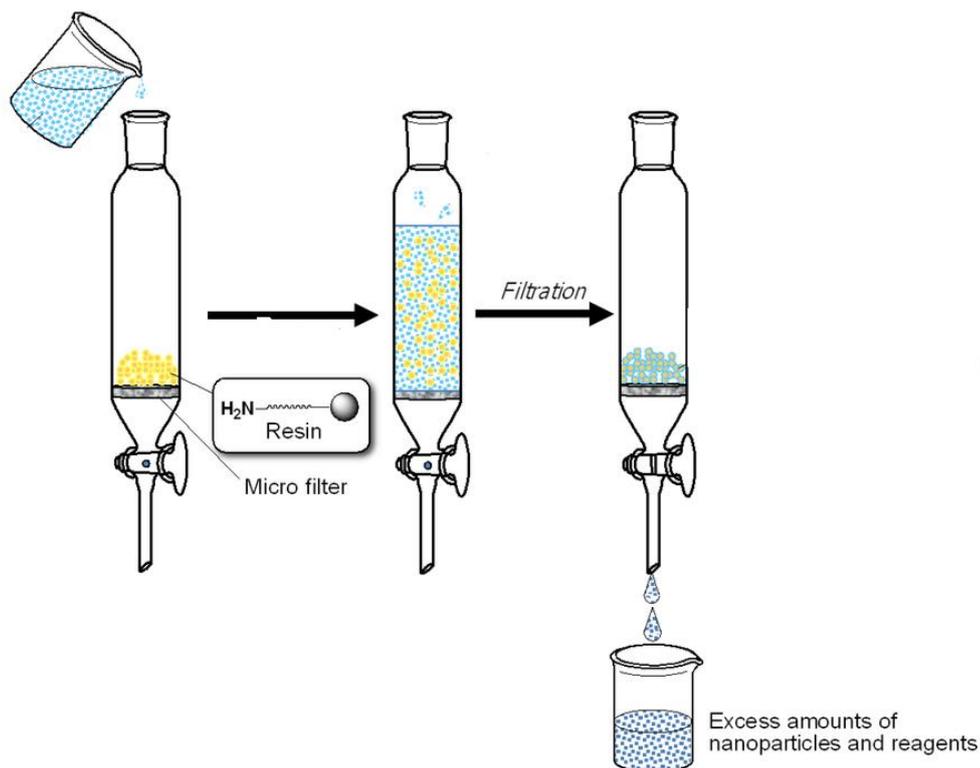


Figura 17. Esquema síntesis en fase sólida.

Se usaron aminas de diferente naturaleza para construir diversos peptoides de 4 residuos. Todos los péptoides se sintetizaron en resina Rink que permite la escisión mediada por TFA de los productos peptoides de la resina.

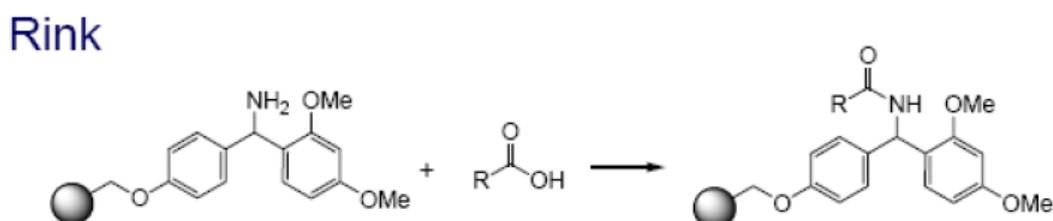


Figura 18. Primera reacción entre el grupo amina de la resina y el ácido añadido al medio de reacción.

En este trabajo, los peptoides se prepararon usando condiciones estándar (temperatura ambiente). En todos los casos, se emplearon soluciones madre de ácido bromoacético en DMF y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) en DMF a una concentración de 2 M y soluciones de aminas en DMF a una concentración de 1 M.

Como resultado, se ha desarrollado una manera rápida y eficiente de sintetizar peptoides usando la síntesis en fase sólida, siendo el tiempo de acoplamiento por residuo (incluyendo acilación y desplazamiento nucleofílico), a temperatura ambiente, de 2,5 horas aproximadamente. Por supuesto, el proceso global todavía requiere tiempo para las etapas de lavado, hinchamiento de la resina, etc.

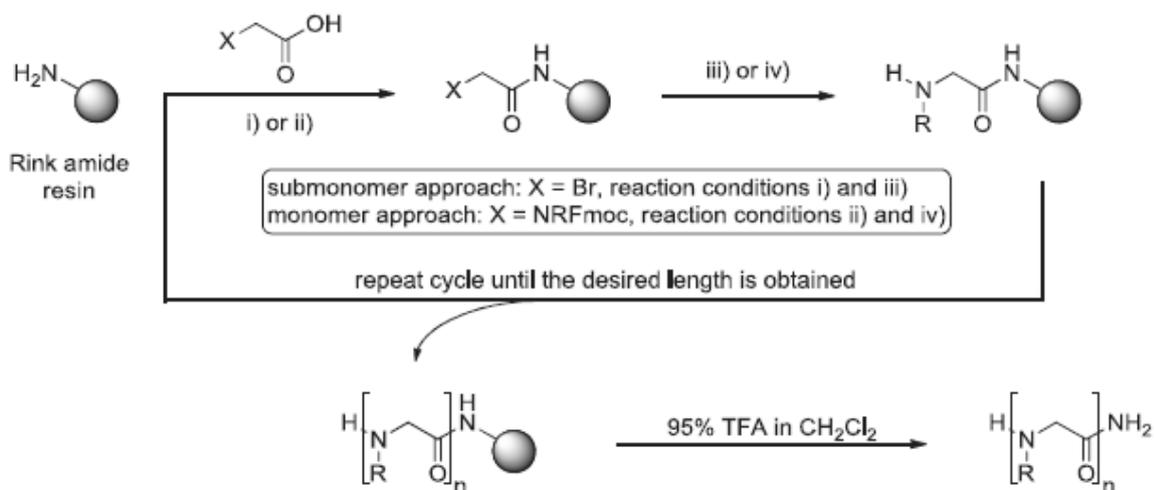


Figura 19. Esquema general de reacción para la síntesis en fase sólida de peptoides vía submonómero. Reactivos y condiciones: (i) DIC, Ácido Bromoacético, DMF, temperatura ambiente, 30 min; (iii) RNH₂, DMF, temperatura ambiente, 1 hora; (ii) RNH, DMF, temperatura ambiente, 1 h.

Con este método se sintetizaron cuatro peptoides diferentes, variando la posición de las cadenas laterales o la naturaleza de las mismas.

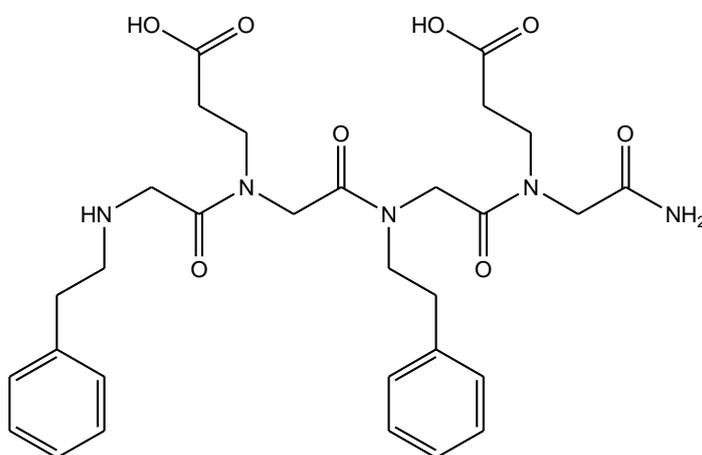


Figura 20. Peptide ácido sintetizado a partir de R₁NH₂ = tBuOOCCH₂CH₂NH₂ y R₂NH₂ = PhCH₂CH₂NH₂.

Para la síntesis de este primer peptoide, primero se realiza el montaje del material para la síntesis en fase sólida que consta de un matraz cilíndrico de boca ancha apropiada para el acople de la columna provista de llave de tres bocas y filtro; todo ello se coloca sobre un agitador orbital.

Posteriormente se introduce la resina Rink, previamente pesada, en la columna de reacción y se añade DMF para hincharla. Con el fin de desproteger el grupo amina de la resina, se añade una disolución de piperidina en DMF tras haber preparado la resina.

Después de realizar lavados con DMF se procede a añadir los reactivos para la primera reacción de la síntesis del peptóide (reacción de acilación); así, se adiciona la disolución 2M de ácido bromoacético y DIC en DMF sobre la resina en la columna de reacción.

Una vez transcurridos 30 minutos se realizan lavados con DMF para eliminar el exceso de los reactivos anteriores y, posteriormente, se añade una disolución 1M de la amina tBuOOCCH₂CH₂NH₂ (R₁NH₂) y DMF para que se produzca la reacción de desplazamiento nucleofílico.

Se deja la mezcla de reacción durante 1 hora en agitación y, una vez transcurrido este tiempo, se lava con DMF.

Llegado este punto de la ruta sintética, ya ha sido introducido el primer residuo del peptóide con cadena lateral ácida. De modo que se vuelve a poner la primera reacción de acilación, añadiendo la disolución de ácido bromoacético y DIC en DMF; procediendo como en la adición del primer residuo, se deja la mezcla de reacción durante 30 minutos y, posteriormente, se hacen lavados con DMF.

Para la adición de la segunda cadena lateral, después de los lavados, se adiciona una disolución de amina diferente a la anterior, esta disolución es de PhCH₂CH₂NH₂ (R₂NH₂) y DMF de concentración 1M. Esta mezcla de reacción se deja 1 hora para que se produzca el segundo desplazamiento nucleofílico.

Al haber realizado el proceso detallado hasta este punto se ha sintetizado la mitad del peptóide deseado; de manera que para la síntesis total del peptóide se repetirá de nuevo las 4 reacciones anteriores: 2 primeras de acilación y desplazamiento nucleofílico utilizando como disolución de amina la de tBuOOCCH₂CH₂NH₂ (R₁NH₂), y las dos siguientes de acilación y desplazamiento nucleofílico con la amina PhCH₂CH₂NH₂ (R₂NH₂).

Para finalizar la síntesis, se añade una disolución de TFA en diclorometano a la columna de reacción, la cual se deja toda la noche en agitación con la resina para romper el enlace entre el grupo amina y el resto de la resina, quedando el extremo con un grupo amida. Después de hacer lavados con metanol para recoger el producto, la disolución de metanol se congela con nitrógeno líquido y se liofiliza; de manera que el disolvente sublima y se obtiene el producto de la reacción.

Se procederá de igual manera para la síntesis de los siguientes peptóides, variando las aminas que se introducen en la columna de reacción en el paso de desplazamiento nucleofílico.

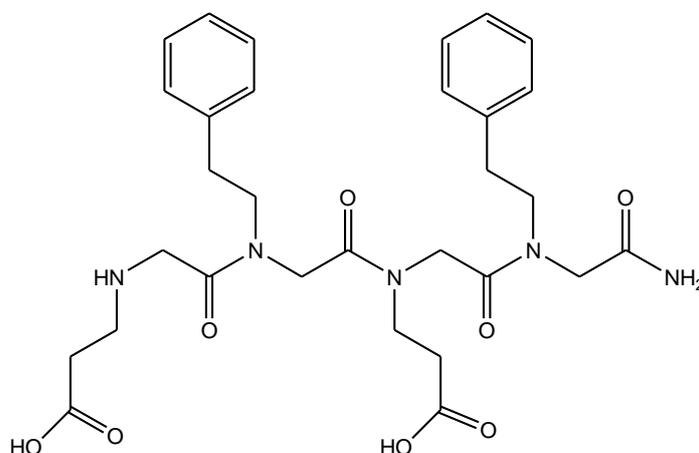


Figura 21. Peptóide ácido sintetizado a partir de R₁NH₂ = PhCH₂CH₂NH₂ y R₂NH₂ = tBuOOCCH₂CH₂NH₂.

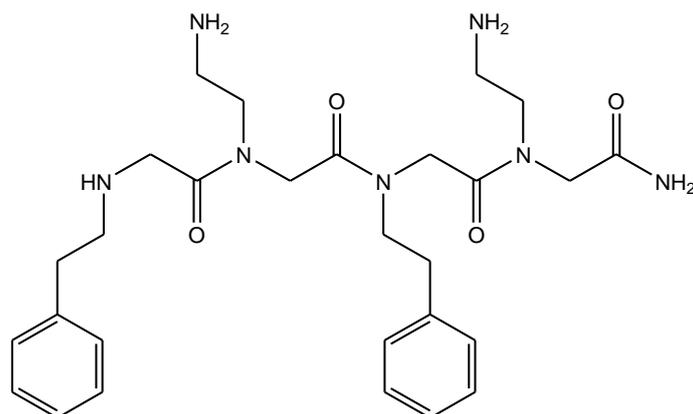


Figura 22. Peptoide básico sintetizado a partir de $R_1\text{NH}_2 = \text{BocHNCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ y $R_2\text{NH}_2 = \text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

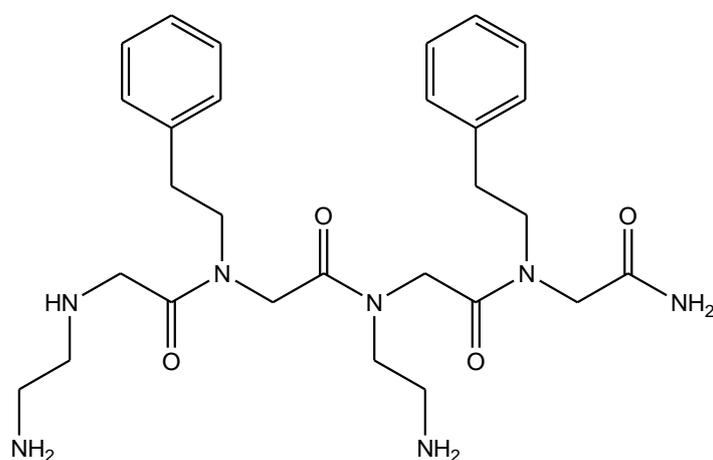


Figura 23. Peptoide básico sintetizado a partir de $R_1\text{NH}_2 = \text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ y $R_2\text{NH}_2 = \text{BocHNCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

Con el fin de purificar los productos obtenidos de las cuatro síntesis en fase sólida se pasan por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) de fase reversa.

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos, esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, como acetonitrilo y agua. Para la purificación de los peptoides se ha utilizado la columna con resina C_{18} , que posee una cadena lineal de 18 carbonos ($[\text{SiO}_2]-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$).

Al realizar la purificación de los peptoides no se observan picos de intensidad significativa en los cromatogramas obtenidos por HPLC. De manera que se decide escalar la síntesis del peptoide con $R_1\text{NH}_2 = \text{tBuOOCCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ y $R_2\text{NH}_2 = \text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ para obtener mayor cantidad de producto y realizar cromatografía de columna para su purificación.

En los espectros RMN ^1H y ^{13}C y en los espectros de masas QTOF realizados de las dos fracciones obtenidas de la purificación por columna cromatográfica del peptoide con $R_1\text{NH}_2 = \text{tBuOOCCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ y $R_2\text{NH}_2 = \text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ no se observan picos característicos de este compuesto; lo que demuestra que la reacción no ha funcionado correctamente.

4. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

Este trabajo describe un método simple de síntesis de peptoides. Además, la síntesis en fase sólida es una técnica que puede ser utilizada en cualquier laboratorio para la síntesis de peptoides, porque se utilizan materiales baratos, conocimientos básicos y técnicas directas.

Los peptoides son materiales prometedores para la investigación biomédica y la nanociencia porque son robustos y sintéticamente flexibles; sin embargo, poseen secuencias específicas. Debido a su síntesis modular, las bibliotecas de peptoides pueden sintetizarse fácilmente y examinarse para una amplia serie de actividades o propiedades.

En cuanto a la síntesis en disolución, no se ha conseguido realizar la segunda acilación de la síntesis total; esto puede deberse a que no se produzca la disolución completa de los reactivos en la mezcla de reacción o a la necesidad de aumentar ligeramente la temperatura para favorecer la reacción.

Por otra parte, se ha llevado a cabo el diseño y la síntesis en fase sólida de 4 peptoides sin haber obtenido los resultados esperados. Lo cual puede ser debido a:

- Los tiempos de reacción no han sido suficientemente largos. Este problema podría ser resuelto aumentando la temperatura de reacción hasta alrededor de 35°C para reducir el tiempo de reacción. También podría acelerarse las reacciones mediante irradiación por microondas, ya que se sabe que la irradiación por microondas acelera la velocidad de muchas reacciones químicas.
- El posible fallo de uno de los pasos de la síntesis en fase sólida, lo cual se arrastra hasta el final de la síntesis y no se consigue obtener el producto deseado.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Técnicas generales

Los espectros de RMN fueron registrados en espectrómetros Bruker de 300 y 400MHz. Los espectros se midieron en disolución de CDCl₃/TMS, en DMSO o en MeOD. Los desplazamientos químicos (δ) están indicados en ppm usando como referencia las señales residuales de los disolventes. Para el CDCl₃ se referencia el 1H a δ =7.27 ppm y el 13C a δ =77.0 ppm. En el caso del MeOD el 1H se referencia a δ =3.31 ppm y para el 13C a δ =49.0 ppm. Con respecto a las multiplicidades en el 1H-RMN se ha usado s cuando se trata de un singulete, d para doblete, t para triplete, c para cuadruplete y m para multiplete.

Los espectros de masas se midieron en un espectrómetro de masas QTOF con fuente de ionización combinada electrospray.

Para la cromatografía de capa fina se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice.

5.2. Síntesis en disolución

PRIMERA REACCIÓN DE LA RUTA SINTÉTICA

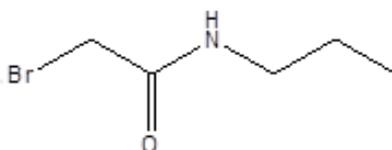


Figura 24. Producto de la primera reacción de la síntesis en disolución.

Se pesa ácido bromoacético (1.596g) en un matraz de fondo redondo y se añade 20mL de diclorometano. Se adiciona sobre el matraz de reacción en baño de hielo una emulsión de DCC (1.962g) en 30mL de diclorometano, gota a gota con un embudo de adición. Posteriormente se quita el matraz de reacción del baño de hielo y se añade una disolución de propilamina (0.589g) en 20mL de diclorometano, gota a gota con embudo de adición. Se deja reaccionar durante 3 horas en atmósfera de nitrógeno y se filtra a vacío para separar la DCU (diclohexilurea) formada como producto secundario. Después se lava con disolución de HCl 0.1M en embudo de decantación. Finalmente, se elimina el diclorometano en rotavapor.

Para purificar el producto se prepara una columna cromatográfica y se utiliza como eluyente diclorometano, aumentando la polaridad del mismo progresivamente con disoluciones de diclorometano/metanol.

RMN 1H (300MHz, DMSO): δ 8.25 (1H, s), 3.75 (2H, s), 3.00 (2H, c), 1.49 (2H, m), 0.9 (3H, t).

SEGUNDA REACCIÓN DE LA RUTA SINTÉTICA

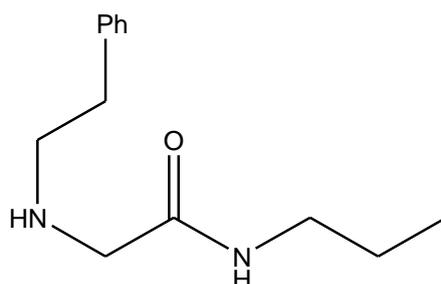


Figura 25. Producto de la segunda reacción de la síntesis en disolución.

Sobre el producto de la primera reacción (0.729g) se añade feniletilamina (0.245g) y se deja en reacción toda la noche con atmósfera de nitrógeno. Para parar la reacción se añade diclorometano al matraz de reacción y se hacen lavados con una disolución de HCl 0.1M en embudo de decantación, después se hacen lavados con una disolución saturada de bicarbonato sódico. Posteriormente se evapora el disolvente de la fase orgánica en rotavapor. Finalmente, se realiza una cromatografía de columna para purificar el producto de esta reacción; utilizándose como eluyente diclorometano, y aumentando la polaridad del eluyente progresivamente con disoluciones de diclorometano/metanol.

RMN 1H (400MHz, CDCl₃): δ 7.21 (2H, m), 7.12 (2H, m), 7.08(1H, m), 6.20 (1H, s), 3.60 (2H, s), 3.00 (2H, c), 2.75 (4H, m), 1.35 (2H, m), 0.75 (3H, m).

TERCERA REACCIÓN DE LA RUTA SINTÉTICA

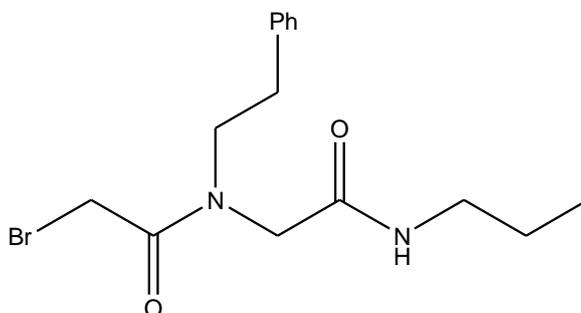


Figura 26. Producto de la tercera reacción de la síntesis en disolución.

Se pesa ácido bromoacético (0.02g) en un matraz de fondo redondo y se añade 10mL de diclorometano. Se adiciona sobre el matraz de reacción en baño de hielo una emulsión de DCC (0.0338g) en 15mL de diclorometano, gota a gota con un embudo de adición. Posteriormente se quita el matraz de reacción del baño de hielo y se añade una disolución del producto de la segunda reacción (0.033g) en 10mL de diclorometano, gota a gota con embudo de adición. Se deja reaccionar durante toda la noche en atmósfera de nitrógeno y se filtra a vacío para separar la DCU (diclohexilurea) formada como producto secundario. Después se lava con disolución de HCl 0.1M en embudo de decantación. Finalmente, se elimina el diclorometano en rotavapor.

metanol (5 x 4mL x 5 minutos). El producto bruto se liofiliza y se purifica por HPLC o por cromatografía de columna con disoluciones de diclorometano/metanol.

PEPTOIDE CON $R_1NH_2 = PhCH_2CH_2NH_2$ y $R_2NH_2 = tBuOOCCH_2CH_2NH_2$

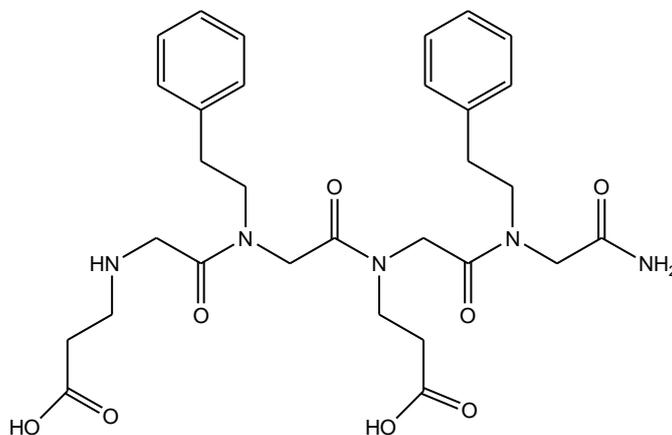


Figura 28. Peptide ácido sintetizado a partir de $R_1NH_2 = PhCH_2CH_2NH_2$ y $R_2NH_2 = tBuOOCCH_2CH_2NH_2$.

La resina de Rink amida protegida con Fmoc (0,68 mmol / g, 100 mg) se hincha en DMF (4 ml) durante 1 h. Se realizan múltiples etapas de lavado usando DMF (3 x 4 ml x 5 minutos) entre cada paso de los que se describe a continuación. La desprotección de Fmoc se completa añadiendo piperidina (20% en DMF, 4 ml, 3 x 5 min).

El primer monómero se introduce por el método del submonómero; así, se añade a la resina una solución de ácido bromoacético (95 mg, 680 μ mol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (106 μ L, 680 μ mol) en 680 μ L de DMF. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se añade una solución de feniletilamina (680 μ mol) en 680 μ L de DMF y la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se introduce el ácido bromoacético. Para conseguir esto, se disuelven el monómero (95 mg, 680 μ mol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (106 μ L, 680 μ mol) en 680 μ L de DMF y se añade a la resina. Se deja en reacción durante 30 minutos mientras se agita.

A continuación, se añade una solución de tert-butil-3-aminopropionato (680 μ mol) en 680 μ L de DMF y la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente.

La solución de reacción se filtra y se vuelven a realizar los cuatro últimos pasos para completar la síntesis del peptide.

Para finalizar la síntesis, la resina se lava a fondo con DMF. Para la escisión final del peptide de la resina se incuba con TFA (4Ml, 95% en CH_2Cl_2) a temperatura ambiente. A continuación, la resina se lava con metanol (5 x 4mL x 5 minutos). El producto bruto se liofiliza y se purifica por HPLC o por cromatografía de columna con disoluciones de diclorometano/metanol.

PEPTOIDE CON $R_1NH_2 = BocHNCH_2CH_2NH_2$ y $R_2NH_2 = PhCH_2CH_2NH_2$

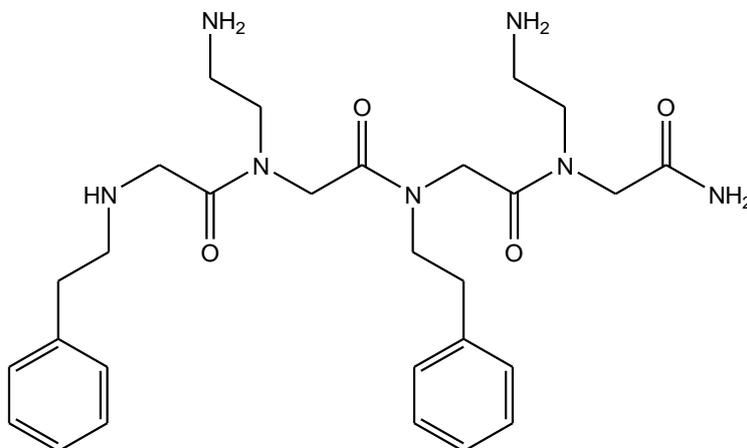


Figura 29. Peptoide ácido sintetizado a partir de $R_1NH_2 = BocHNCH_2CH_2NH_2$ y $R_2NH_2 = PhCH_2CH_2NH_2$.

La resina de Rink amida protegida con Fmoc (0,68 mmol / g, 100 mg) se hincha en DMF (4 ml) durante 1 h. Se realizan múltiples etapas de lavado usando DMF (3 x 4 ml x 5 minutos) entre cada paso de los que se describe a continuación. La desprotección de Fmoc se completa añadiendo piperidina (20% en DMF, 4 ml, 3 x 5 min).

El primer monómero se introduce por el método del submonómero; así, se añade a la resina una solución de ácido bromoacético (95 mg, 680 μ mol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (106 μ L, 680 μ mol) en 680 μ L de DMF. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se añade una solución de tert-butil-2-aminoetilcarbamato (680 μ mol) en 680 μ L de DMF y la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se introduce el ácido bromoacético. Para conseguir esto, se disuelven el monómero (95 mg, 680 μ mol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (106 μ L, 680 μ mol) en 680 μ L de DMF y se añade a la resina. Se deja en reacción durante 30 minutos mientras se agita.

A continuación, se añade una solución de feniletilamina (680 μ mol) en 680 μ L de DMF y la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente.

La solución de reacción se filtra y se vuelven a realizar los cuatro últimos pasos para completar la síntesis del peptoide.

Para finalizar la síntesis, la resina se lava a fondo con DMF. Para la escisión final del peptoide de la resina se incuba con TFA (4Ml, 95% en CH_2Cl_2) a temperatura ambiente. A continuación, la resina se lava con metanol (5 x 4mL x 5 minutos). El producto bruto se liofiliza y se purifica por HPLC.

PEPTOIDE CON $R_1NH_2 = PhCH_2CH_2NH_2$ y $R_2NH_2 = BocHNCH_2CH_2NH_2$

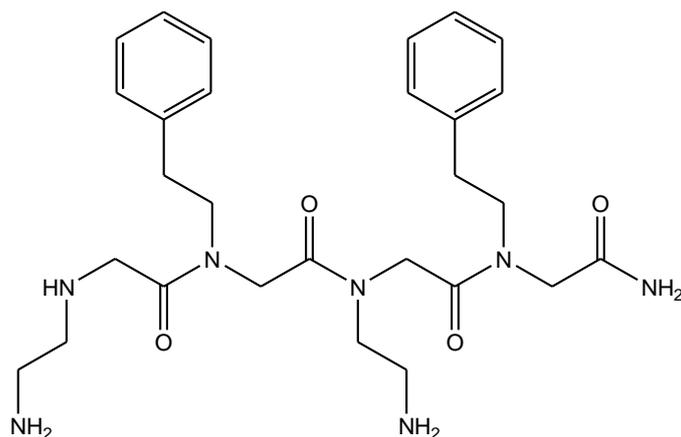


Figura 30. Peptoide ácido sintetizado a partir de $R_1NH_2 = PhCH_2CH_2NH_2$ y $R_2NH_2 = BocHNCH_2CH_2NH_2$.

La resina de Rink amida protegida con Fmoc (0,68 mmol / g, 100 mg) se hincha en DMF (4 ml) durante 1 h. Se realizan múltiples etapas de lavado usando DMF (3 x 4 ml x 5 minutos) entre cada paso de los que se describe a continuación. La desprotección de Fmoc se completa añadiendo piperidina (20% en DMF, 4 ml, 3 x 5 min).

El primer monómero se introduce por el método del submonómero; así, se añade a la resina una solución de ácido bromoacético (95 mg, 680 μ mol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (106 μ L, 680 μ mol) en 680 μ L de DMF. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se añade una solución de feniletilamina (680 μ mol) en 680 μ L de DMF y la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se introduce el ácido bromoacético. Para conseguir esto, se disuelven el monómero (95 mg, 680 μ mol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (106 μ L, 680 μ mol) en 680 μ L de DMF y se añade a la resina. Se deja en reacción durante 30 minutos mientras se agita.

A continuación, se añade una solución de tert-butil-2-aminoetilcarbamato (680 μ mol) en 680 μ L de DMF y la mezcla se agita durante 1 hora a temperatura ambiente.

La solución de reacción se filtra y se vuelven a realizar los cuatro últimos pasos para completar la síntesis del peptoide.

Para finalizar la síntesis, la resina se lava a fondo con DMF. Para la escisión final del peptoide de la resina se incuba con TFA (4MI, 95% en CH_2Cl_2) a temperatura ambiente. A continuación, la resina se lava con metanol (5 x 4mL x 5 minutos). El producto bruto se liofiliza y se purifica por HPLC.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

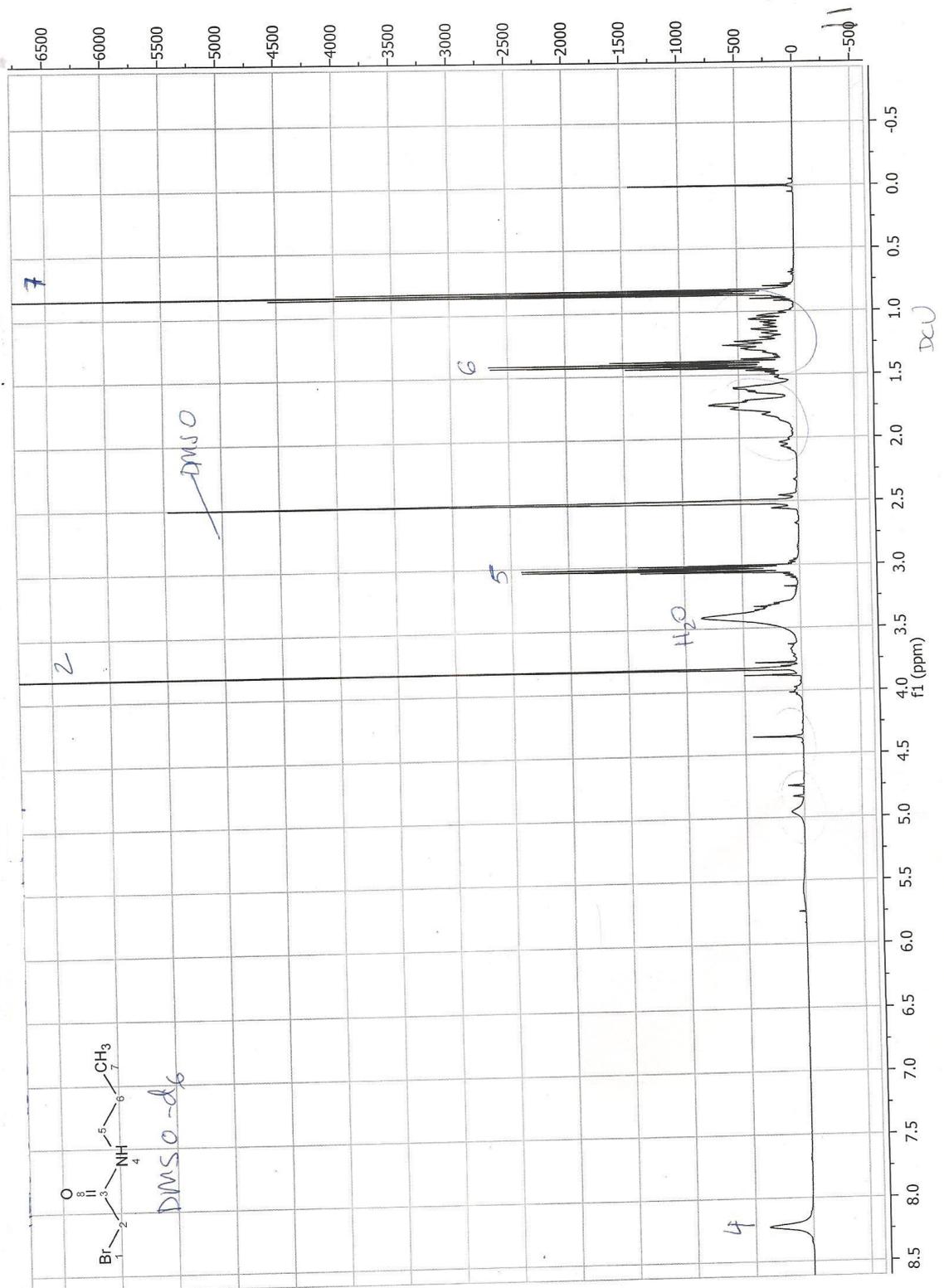
Para la realización de este trabajo se ha utilizado la siguiente bibliografía:

- D. K. Kölmel, A. Hörner, F. Röncke, M. Nieger, U. Schepers, S. Bräse (2014). Cell-penetrating peptoids: Introduction of novel cationic side chains. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 231 – 243.
- F. Albericio, H. G. Kruger (2012). *Therapeutic peptides*. *Future Medicinal Chemistry*, 4 (12), 1527 – 1531.
- *Overview of Peptoids and Peptoid Libraries*. <http://www.neuromics.com/overview-of-peptoids-and-peptoid-libraries>
- J. Seo, B. C. Lee, R. N. Zuckermann (2011). *Peptoids: Synthesis, Characterization, and Nanostructures*. P. Ducheyne, K.E. Healy, D.W. Hutmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick (eds.) *Comprehensive Biomaterials*, vol. 2, pp. 53-76 Elsevier.
- H. J. Olivos, P. G. Alluri, M. M. Reddy, D. Salony, and T. Kodadek (2002). *Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis of Peptoids*. *Organic Letters*, vol. 4, nº 23, 4057 – 4059.
- P. W. Latham (1999). *Therapeutic peptides revisited*. *Nature biotechnology*, vol. 17, 755 – 757.
- P. J. Baker, K. Numata (2013). *Polymerization of Peptide Polymers for Biomaterial Applications*. Faris Yilmaz.
- E. J. Robertson, A. Battigelli, C. Proulx, R. V. Mannige, T. K. Haxton, L. Yun, S. Whitelam, R. N. Zuckermann (2016). *Design, Synthesis, Assembly, and Engineering of Peptoid Nanosheets*. *Acc. Chem. Res.*, 49 (3), 379–389.
- *Biopolímeros*. <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/biopolimeros.htm>
- S. García (2007). *Auxiliares Quirales unidos a soportes poliméricos para la determinación de la configuración absoluta por RMN*. Universidad de Santiago de Compostela, pp. 33 – 38.
- H. Tran, S. L. Gael, M. D. Connolly, R. N. Zuckermann (2011). *Solid-phase Submonomer Synthesis of Peptoid Polymers and their Self-Assembly into Highly-Ordered Nanosheets*. *Journal of Visualized Experiments*, 57: 3373.
- R. N. Zuckermann (2010). *Commentary Peptoid Origins*. *Peptide Science*, 96 (5), 545 – 555.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

ANEXO 1. RMN 1H DEL PRODUCTO DE LA PRIMERA REACCIÓN DE LA SÍNTESIS EN DISOLUCIÓN



ANEXO 2. RMN 1H DEL PRODUCTO DE LA SEGUNDA REACCIÓN DE LA SÍNTESIS EN DISOLUCIÓN

