

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

El diseño de inhibidores de la toxicidad de la proteína A β durante la presente tesis se basa en la aceptación de la hipótesis amiloide sobre la enfermedad de Alzheimer. Se asume, por tanto, que son las formas fibrilares de A β las causantes del desarrollo de la enfermedad y, por consiguiente, las moléculas diseñadas y sintetizadas en este trabajo están orientadas a reducir la formación de fibras amiloides de A β , disminuyendo así su toxicidad.

Existen numerosos trabajos que describen la secuencia 17-21 de la proteína A β (Leu-Val-Phe-Phe-Ala) como centro de nucleación⁸⁹: la mutagénesis dirigida planteada por Wood y colaboradores⁹⁰, o los experimentos del grupo de Maggio⁹¹ muestran cómo las modificaciones introducidas en esta parte de la secuencia conducen a una disminución, o incluso desaparición, de la capacidad de formación de fibras amiloides. Este hecho hace que la secuencia 17-21 sea considerada una diana a la que dirigir los potenciales inhibidores de la agregación.

3.1 Antecedentes de inhibidores de A β

Varios autores apuntaban, antes del inicio de la presente tesis, a la posibilidad de utilizar moléculas capaces de inhibir la agregación de A β como una vía terapéutica para la enfermedad de Alzheimer⁹².

En 1994 ya se había establecido la capacidad del colorante histopatológico Rojo Congo (CR, ver Figura 31) para reducir la toxicidad de las fibras amiloides tanto de β (1-40), como β (1-42) y de amilina (1-37)⁹³, estudiándose su posible utilización terapéutica. Curiosamente, y en contra de lo esperado según la hipótesis amiloide, la capacidad de

⁸⁹ Hilbich, C.; Kisters-Woike, B.; Reed, R.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 149-163.

⁹⁰ Wood, S. J.; Wetzel, R.; Martin, J. D.; Hurler, M. R. *Biochemistry* **1995**, *34*, 724-730.

⁹¹ Esler, W. P.; Stimson, E. R.; Ghilardi, J. R.; Lu, Y.; Felix, A.; Vinters, H. V.; Mantyh, P. W.; Lee, J. P.; Maggio, J. E. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13914-13921.

⁹² Iversen, L. L.; Mortishire-Smith, R. J.; Pollack, S. J.; Searman, M. S. *Biochem. J.* **1995**, *311*, 1-16.

⁹³ Lorenzo, A.; Yankner, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 12243-12247.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

disminución de la toxicidad en el caso de $\beta(1-42)$ y de la amilina no está acompañada por una disminución de la formación de fibras amiloides, sino que parece estar más relacionada con el recubrimiento de éstas por moléculas de CR. Los estudios con $\beta(1-40)$ mostraron que, en este caso, el CR es capaz de actuar mediante dos mecanismos diferentes: además de recubrir las fibras amiloides reduciendo su toxicidad, también inhibe la formación de dichas fibras.

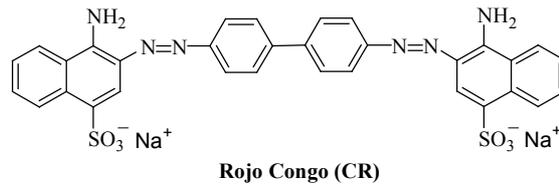


Figura 31. Estructura molecular del colorante diazoico Rojo Congo, uno de los inhibidores no peptídicos de la toxicidad de la proteína A β .

3.1.1 Antecedentes de inhibidores peptídicos de A β

En 1994 Snyder y colaboradores⁹⁴ observaron que el péptido $\beta(1-40)$ es capaz de retardar la cinética de agregación de $\beta(1-42)$ de una forma dependiente de la concentración, mientras que el sembrado de $\beta(1-40)$ con fibras preformadas de $\beta(1-42)$ produce un incremento de la velocidad de agregación del primero. Este comportamiento implica que existe una interacción entre ambas secuencias, la cual es capaz de modular el proceso de agregación de la proteína A β y plantea un posible punto de partida para el diseño y síntesis de inhibidores de carácter peptídico.

Cribbs y colaboradores⁹⁵ presentaron una observación interesante sobre la capacidad de reconocimiento de la proteína A β . Sintetizaron las secuencias amiloides $\beta(1-42)$ y $\beta(25-35)$ con aminoácidos D y vieron que sus propiedades fisico-químicas son prácticamente idénticas que las mostradas por las secuencias originales (igual capacidad de sedimentación, espectros de dicroísmo circular que guardan una relación de imagen especular con los obtenidos para la secuencia constituida con aminoácidos L $^{\diamond}$, fibras de iguales características y co-elución en sistemas cromatográficos de alta resolución). Además de ser físicamente comparables las secuencias D con las L, también se observa

⁹⁴ Snyder, S. W.; Lador, U. S.; Wade, W. S.; Barrett, L. W.; Matayoshi E. D.; Huffaker, H. J.; Krafft, G. A.; Holzman, T. F. *Biophys. J.* **1994**, 67, 1216-1228.

⁹⁵ Cribbs, D. H.; Pike, C. J.; Weinstein, S. L.; Velazquez, P.; Cotman, C. W. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 7431-7436.

$^{\diamond}$ Los espectros de dicroísmo circular obtenidos guardan una relación de imagen especular debido a la relación de enantiómeros entre ambos péptidos.

que provocan la misma respuesta tóxica en cultivos neuronales. Estos resultados parecen indicar que el mecanismo de acción citotóxica de la proteína A β no es estereoespecífico.

3.1.1.1 Inhibidores diseñados por Tjernberg y colaboradores

Tras la aparición de los primeros trabajos basados en la aproximación amiloide, empezaron a publicarse artículos describiendo ejemplos de inhibidores peptídicos con capacidad de reconocimiento de la proteína A β . Tjernberg y colaboradores describieron en 1996⁹⁶ el uso del barrido posicional de la proteína nativa para identificar los fragmentos de A β que permiten el reconocimiento y unión de dos cadenas, demostrando así de forma directa la capacidad de reconocimiento que presenta la secuencia β (16-20) (Lys-Leu-Val-Phe-Phe) por la proteína nativa y corroborando además las observaciones obtenidas por Hilbich⁸⁹, Wood⁹⁰ y Maggio⁹¹. En el mismo trabajo Tjernberg y colaboradores demostraron la capacidad de un péptido derivado de la molécula A β , el Ac-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NH₂, para prevenir la formación de fibras amiloides *in vitro*.

El bajo número de cargas de la molécula Ac-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NH₂ (sólo presenta un grupo protonable), además de su carácter hidrofóbico, la hacen poco soluble en medios acuosos. Por este motivo Tjernberg y colaboradores⁹⁷ escogieron la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-OH (con el C-terminal en forma de ácido carboxílico) como sustituto. Esta secuencia, más hidrofílica, fue utilizada, tras verificar que mostraba un comportamiento equivalente a β (1-40), en los experimentos de reconocimiento molecular, como “sonda” para encontrar secuencias de A β con capacidad de unión al centro de nucleación. Este experimento parece indicar que la secuencia (16-20) es una de las responsables del reconocimiento y unión de unidades de A β .

La ventaja de utilizar el péptido Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-OH para realizar el escrutinio o *screening* de varias quimiotecas de pentapéptidos de D-aminoácidos, es que ofrece resultados comparables a los obtenidos con β (1-40), pero simplifica el ensayo, además de resultar más asequible (es más soluble y económico que A β). La criba de la primera quimioteca de D-aminoácidos dio como resultado los tres mejores residuos en

⁹⁶ Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Neurochem.* **1996**, *67*, 294-301.

⁹⁷ Tjernberg, L. O.; Lilliehöök, C.; Callaway, D. J. E.; Näslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12601-12605.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

cada posición. A partir de las posibles combinaciones de éstos, Tjernberg y colaboradores sintetizaron una segunda quimioteca y determinaron que los aminoácidos más importantes para el reconocimiento y unión son el segundo y el tercero (la secuencia con mayor capacidad de interacción es xf/xx).

Al verificar la capacidad inhibidora de dos de las mejores moléculas con capacidad de reconocimiento del centro de nucleación, observaron que la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala presenta una mayor capacidad de inhibición de formación de fibras amiloides que los péptidos constituidos con D-aminoácidos. Además, la secuencia con aminoácidos D, D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe, no fue capaz de unirse a A β , lo que interpretaron como una prueba de la estereoselectividad de la interacción.

Tras el primer artículo presentado por Tjernberg y colaboradores, y en un breve periodo de tiempo, aparecieron en la bibliografía dos trabajos que, basándose en la capacidad de unión de la secuencia hidrofóbica central, sintetizaron y ensayaron varios péptidos con capacidad inhibidora de la fibrilgénesis de A β . Tanto el grupo de Soto⁹⁸ como el de Murphy⁹⁹ utilizaron de nuevo la idea del reconocimiento de la secuencia nativa y diseñaron dos tipos de inhibidores diferentes.

Simultáneamente, apareció también un trabajo¹⁰⁰ que demuestra la importancia de la secuencia Phe-Phe de la región central en el reconocimiento de la proteína A β . Un octapéptido basado en el centro de nucleación y en el cual se sustituyeron las dos fenilalaninas por dos treoninas, dio lugar a Gln-Lys-Leu-Val-Thr-Thr-Ala-Glu, otro buen inhibidor peptídico de la fibrilgénesis de A β .

3.1.1.2 Inhibidores diseñados por Soto y colaboradores

Partiendo de la secuencia β (15-25), Soto y colaboradores⁹⁸ sustituyeron algunos residuos por prolina para reducir su tendencia a formar estructuras de tipo β . Este aminoácido, además de impedir la disposición de la cadena en forma de lámina β (restringe los ángulos de torsión permitidos), evita la formación de los puentes de

⁹⁸ Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 226, 672-680.

⁹⁹ Ghanta, J.; Shen, C.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 29525-29528.

¹⁰⁰ Hughes, S. R.; Goyal, S.; Sun, J. E.; Gonzalez-DeWhitt, P.; Fortes, M.; Riedel, N. G.; Sahasrabudhe, S. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 2065-2070.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

hidrógeno intermoleculares requeridos en la trama de láminas β . Con estas premisas diseñaron y sintetizaron el péptido que denominan iA β 1 (Tabla 3), el cual vieron que era capaz de reducir la formación de fibras de A β , según cuantificaron mediante el ensayo de la tioflavina T (ThT, ver apartado 6.3 para más detalles sobre este ensayo), además de desensamblar fibras amiloides preformadas.

Péptido	Secuencia
β (15-25)	Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly
iA β 1 ⁹⁸	Arg-Asp- Leu-Pro-Phe-Phe-Pro -Val-Pro-Ile-Asp
iA β 5 ⁹⁸	Leu-Pro-Phe-Phe -Asp
H1 ⁹⁹	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Gly-Gly- Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly
H2 ⁹⁹	Gly- Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly -Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys

Tabla 3. Resumen de las secuencias más destacadas ensayadas por el grupo de Soto⁹⁸ y por el grupo de Murphy⁹⁹. En negrita se resaltan los aminoácidos conservados de la secuencia nativa.

Un inconveniente que presenta esta molécula es su tamaño relativamente elevado. Al aumentar el tamaño de la molécula, el transporte del péptido a través de la barrera hematoencefálica se ve dificultado, incrementando también el riesgo de tener una respuesta inmune. Por ello, Soto y colaboradores desarrollaron iA β 5, una molécula de inferior tamaño que iA β 1 y con una actividad similar^{98,101}. Más recientemente han conseguido mejorar la farmacocinética de iA β 5 protegiendo los extremos N- y C-terminal mediante acetilación y amidación respectivamente^{102,103}.

En las diferentes etapas de optimización que han llevado a cabo Soto y colaboradores, pudieron observar que la sustitución de los aminoácidos L por aminoácidos D conlleva, además de un aumento de la biodisponibilidad, una reducción parcial de la actividad¹⁰⁴. La actividad mostrada por el péptido con D-aminoácidos podría sugerir que la interacción inhibidor-A β se produce debido a las características hidrofóbicas y/o de cargas de las cadenas laterales, y no por un reconocimiento específico de la secuencia peptídica.

¹⁰¹ Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castaño, E. M.; Frangione, B. *Nature Med.* **1998**, *4*, 822-826.

¹⁰² Adessi, C.; Soto, C. *Drug Dev. Res.* **2002**, *56*, 184-193.

¹⁰³ Adessi, C.; Permanne, B.; Saborio, G.; Frosard, M. J.; Fraga, S.; Soto, C. *Neurobiol. Aging*, **2002**, *23*, S270.

¹⁰⁴ Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Kumar, A.; Frangione, B.; Soto, C. *J. Neurobiol.* **1999**, *39*, 371-382.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

Este último resultado, por tanto, entra en contradicción con las observaciones descritas por Tjernberg y colaboradores para la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala.

3.1.1.3 Inhibidores diseñados por Murphy y colaboradores

En el trabajo de Murphy y colaboradores⁹⁹ se plantea una forma alternativa de alterar la estructura β . Partiendo de un fragmento de la secuencia nativa con capacidad de reconocimiento de A β (la secuencia β (15-25)), le unieron un fragmento de polilisinas, obteniendo así lo que denominaron *híbrido*.

La función del fragmento de polilisinas es interferir con la estructura amiloide y lo escogieron por su elevada hidrofiliidad. Sorprendentemente, la introducción del elemento disruptor antes de la secuencia β (15-25) dio lugar a la obtención de una molécula, H1 (Tabla 3), que forma agregados no amiloides, pero si la secuencia de polilisinas se sitúa en el extremo C-terminal (molécula H2) el péptido no agrega y además es capaz de interferir en la fibrilogénesis, reduciendo la toxicidad de β (1-39) en células PC12.

Posteriormente, Murphy y colaboradores han continuado desarrollando la idea de unir un elemento con capacidad disruptora a otro con capacidad de reconocimiento, optimizando la molécula H2 en dos etapas. En un primer trabajo¹⁰⁵ consiguieron reducir el fragmento β (15-25) hasta el β (16-20), obteniendo un híbrido aún más potente que el original.

El uso de un fragmento de polilisinas como elemento disruptor puede resultar sorprendente si tenemos en cuenta que es conocida la capacidad de la polilisina para dar lugar a fibras amiloides¹⁰⁶. La segunda optimización de H2 realizada por el grupo de Murphy¹⁰⁷ estudió la influencia de este elemento disruptor. Verificaron que podían obtener el mismo efecto utilizando cadenas de poliglutámico, mientras que el uso de un fragmento de poliserinas^{*} dio como resultado un péptido sin actividad. Esto parece indicar que el

¹⁰⁵ Pallitto, M. M.; Ghanta, J.; Heinzelman, P.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *Biochemistry* **1999**, *38*, 3570-3578.

¹⁰⁶ Klunk, W. E.; Pettegrew, J. W.; Abraham, D. J. *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 1273-1281.

¹⁰⁷ Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7882-7889.

* Las poliserinas, al igual que las polilisinas, también forman estructuras de lámina β , pero al contrario que éstas no unen CR.

factor más importante en la cadena disruptora es la presencia de cargas. Por otro lado, establecieron la longitud mínima de la cadena disruptora en tres lisinas.

Un punto importante de esta aproximación es que, al igual que los resultados obtenidos con el colorante CR y al contrario que lo observado por Soto, la disminución de toxicidad en presencia de estos inhibidores peptídicos no va acompañada de una reducción de la formación de fibras. La mezcla $\beta(1-40)$ + Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys evoluciona rápidamente para rendir estructuras amiloides, las cuales presentan una estructura ligeramente diferente a la obtenida con A β . Además, este tipo de moléculas resultaron ser efectivas incluso a relaciones inhibidor:A β inferiores a 1:100. Basándose en esto, Murphy y colaboradores propusieron un mecanismo de acción que implica que las fibras amiloides no son las especies nocivas, sino que son los oligómeros intermedios las especies tóxicas. Resultados recientes muestran que las especies oligoméricas resultan 10 veces más tóxicas que las fibras amiloides, y hasta 40 veces más que las especies no agregadas¹⁰⁸, lo que podría confirmar la hipótesis de Murphy.

Los resultados más recientes de Murphy y colaboradores¹⁰⁹ utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR \star) podrían explicar los diferentes mecanismos de inhibición de la toxicidad observados. En este trabajo, además de estudiar la interacción de A β con diversos derivados de la secuencia Lys-Leu-Val-Phe-Phe, también ensayaron varias moléculas descritas previamente como inhibidores de la toxicidad de A β .

El uso de SPR les permitió confirmar los resultados obtenidos previamente. También comprobaron que el CR, un buen inhibidor de la toxicidad de A β , también presenta una elevada afinidad por A β . Sorprendentemente, la molécula descrita por Soto y colaboradores, Leu-Pro-Phe-Phe-Asp⁹⁸, no demostró ningún tipo de afinidad por A β en este ensayo y tampoco lo hicieron compuestos tales como la rifampicina o la melatonina (ver apartado 3.1.2). El hecho de que algunos inhibidores de A β presenten gran afinidad por la proteína y otros no, parece confirmar la idea de la existencia de múltiples mecanismos de acción.

¹⁰⁸ Stine, W. B.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612-11622.

¹⁰⁹ Cairo, C. W.; Strzelec, A.; Murphy, R. M.; Kiessling, L. L. *Biochemistry* **2002**, *41*, 8620-8629.

\star La resonancia de plasmón superficial permite determinar qué moléculas presentan una constante de afinidad elevada frente a la proteína A β , y por tanto podría utilizarse para identificar nuevos inhibidores.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

El trabajo presentado por el grupo de Bohrmann¹¹⁴ muestra varias moléculas con capacidad inhibidora de la toxicidad de A β , muchas de las cuales son análogas a capturadores de radicales libres de origen vegetal. Los resultados de Bohrmann apuntan a que el mecanismo de actuación de su molécula más activa implica el “secuestro” de A β en forma de una estructura intermedia, que él define como láminas poliméricas de A β . Por otro lado, el compuesto obtenido por Reixach y colaboradores¹¹² parece actuar inhibiendo la formación de estructuras β , lo que se corresponde con las observaciones hechas para la melatonina por Pappolla¹¹¹. Ambos mecanismos de acción no se corresponden con el propuesto por Murphy y colaboradores¹⁰⁷, pero recuerdan a la inhibición de fibras amiloides que tiene lugar en presencia del inhibidor de Soto y colaboradores⁹⁸.

¹¹⁴ Bohrmann, B.; Adrian, M.; Dubochet, J.; Kuner, P.; Müller, F.; Huber, W.; Nordstedt, C.; Döbeli, H. J. *Struct. Biol.* **2000**, *130*, 232-246.

3.2 Diseño de inhibidores

Al iniciar esta tesis se planteó como objetivo la obtención de inhibidores peptídicos de la toxicidad de A β . El diseño de estas moléculas se llevó a cabo considerando dos factores fundamentales. Desde un principio se tuvo en cuenta la necesidad de encontrar una molécula con afinidad por A β para favorecer la interacción A β -inhibidor, por lo que nos basamos en los resultados publicados hasta aquel momento sobre péptidos derivados de la secuencia central de la proteína A β (los inhibidores descritos por los grupos de Tjernberg, Soto y Murphy, apartado 3.1.1). Además, se decidió introducir N-metilaminoácidos como elemento disruptor de la formación de láminas β .

Con estos dos elementos se pretendía que las nuevas moléculas, por un lado, conservasen la capacidad de unión a A β y, por el otro, fuesen capaces de bloquear el crecimiento de la estructura fibrilar de A β , al impedir la formación de los correspondientes enlaces de hidrógeno propios de la estructura de lámina β .

3.2.1 Elección de una secuencia base

La secuencia β (16-21) fue escogida por hallarse involucrada en la hipotética formación del centro de nucleación. De hecho ya existían precedentes en la bibliografía de que dicho fragmento, con la substitución de la Gln¹⁶ por Lys en el extremo N-terminal, interacciona con A β y altera la estructura fibrilar de los agregados⁹⁷. Además, esta substitución favorece la solubilidad en agua de la molécula, motivo por el cual se tomó la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala como punto de partida para el diseño de nuestros nuevos inhibidores.

Con el fin de reforzar el carácter polar del extremo N-terminal de la molécula se decidió dejar dicho extremo libre. Además, y para incrementar el carácter hidrofóbico del extremo C-terminal, la carga negativa que este presenta a pH fisiológico fue eliminada, sintetizándose los péptidos en forma de carboxamida. Así se llegó al péptido básico, Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂, el cual, como muestra la distribución de cargas de la Figura

34, presenta un elevado carácter anfipático, además ser un polication, lo que podría facilitar su transporte a través de la barrera hematoencefálica¹¹⁵.



Figura 34. Distribución de cargas en la molécula Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂ a pH fisiológico (en gris se indican los residuos neutros).

3.2.2 Elección de un elemento disruptor de la lámina β

Los N-metilaminoácidos, al igual que las prolinas utilizadas por Soto y colaboradores⁹⁸, pueden actuar como elementos disruptores de láminas β al prevenir la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares. El hecho de introducir un grupo metilo, en lugar de un hidrógeno en el N-amida del enlace peptídico, confiere a la secuencia final una mayor resistencia a proteasas, además de alterar la formación de puentes de hidrógeno y, por tanto, interferir en la formación de láminas β , como han observado recientemente Meredith y colaboradores¹¹⁶.

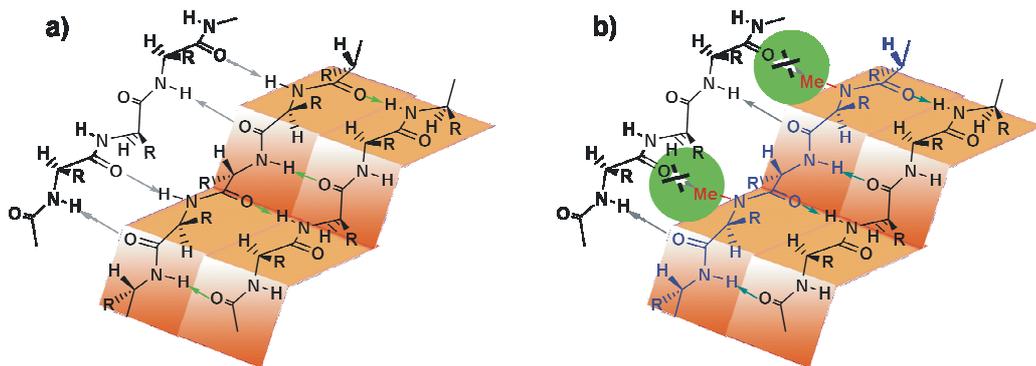


Figura 35. a) Interacción de una molécula que se acerca a la superficie de una lámina β en crecimiento. La figura b) muestra lo que sucede cuando la última cadena de la lámina β en crecimiento es un N-metilpeptido: la siguiente cadena no puede incorporarse ya que la formación de puentes de hidrógeno se encuentra bloqueada por los grupos metilo.

La hipótesis de trabajo sobre la forma de actuar de los N-metilaminoácidos interfiriendo en la formación de láminas β entre cadenas se muestra esquemáticamente en la Figura 35. Por un lado la secuencia escogida es capaz de reconocer la secuencia central de la proteína A β nativa y unirse a ella, como si se tratase de la cadena original. Una vez incorporada esta cadena de inhibidor a la lámina β , los grupos metilo que posee quedan orientados hacia el exterior, dificultando así la aproximación de otra molécula de A β e impidiendo el crecimiento de la estructura β .

¹¹⁵ Prokai, L. *Prog. Drug Res.* **1998**, *51*, 97-131.

¹¹⁶ Gordon, D. J.; Sciarretta, K. L.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237-8245.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

Otra de las particularidades de esta aproximación se muestra también en la Figura 35. Al utilizar aminoácidos con grupos N-metilo en posiciones alternadas conseguimos reforzar el efecto de repulsión a las nuevas cadenas que intenten incorporarse, ya que aumentamos el número de N-H amida que no pueden formar puentes de hidrógeno para estabilizar la estructura β .

3.2.3 Diseño de la primera serie de N-metilpéptidos

Teniendo en cuenta estos dos elementos básicos, la estructura con capacidad de reconocimiento y el elemento disruptor de la estructura β , se diseñó la primera serie de inhibidores, la cual se muestra en la Tabla 4. Esta serie de moléculas se clasificó en tres grupos diferentes: inhibidores mono-, di- y trimetilados.

Se decidió sintetizar además dos péptidos, sin N-metilaminoácidos, cuya capacidad inhibidora se encuentra descrita en la bibliografía. Esto nos permitirá validar la eficacia del ensayo utilizado para la criba de inhibidores, además de permitir comparar los resultados de nuestras moléculas con el de otras, cuya capacidad inhibidora de A β se encuentra descrita. Por un lado se escogió la secuencia en la que se basan los inhibidores diseñados en la presente tesis, Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂⁹⁷, y por otro el péptido descrito por Soto y colaboradores, LPFFD¹⁰¹.

n° N-metilos	Secuencia peptídica	Péptido
1	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NMeAla-NH ₂	1
	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-NMePhe-Ala-NH ₂	2
	Lys-Lys-Leu-Val-NMePhe-Phe-Ala-NH ₂	3
	Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-Phe-Ala-NH ₂	4
	Lys-Lys-NMeLeu-Val-Phe-Phe-Ala-NH ₂	5
2	Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-NMePhe-Ala-NH ₂	6
	Lys-Lys-NMeLeu-Val-NMePhe-Phe-Ala-NH ₂	7
	Lys-Lys-Leu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH ₂	8
3	Lys-Lys-NMeLeu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH ₂	9
0	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH ₂	10
	Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-OH	11

Tabla 4. Secuencia de los péptidos sintetizados en la primera serie de inhibidores.

3.2.4 Evaluación de algunos de péptidos de la primera serie

El diseño de las moléculas descritas en el apartado anterior se hizo pensando en la capacidad de éstas para inhibir la formación de fibras amiloides de la proteína A β , por lo que el cribado de éstas debería realizarse cuantificando la capacidad que presentan para evitar la formación de fibras amiloides. Sin embargo, como han podido comprobar otros investigadores^{93,99}, es posible obviar compuestos bioactivos con este tipo de *screening*, sobretodo si se trabaja con la secuencia más amiloidogénica, $\beta(1-42)$. Debido a ello y a los problemas encontrados en la cuantificación del contenido amiloide de las preparaciones ensayadas (apartado 6), se decidió evaluar la bondad de los inhibidores midiendo su capacidad para reducir la toxicidad de A β .

Además, el mecanismo mediante el que A β conduce a la muerte neuronal no ha sido determinado aún de forma precisa y hay muchas contradicciones en los resultados obtenidos por diferentes grupos (apartado 3.1). No existe acuerdo en la bibliografía sobre si son las fibras amiloides, las especies oligoméricas de menor tamaño o bien el proceso de agregación en sí el causante de la apoptosis^{117,118,119}, por lo que un ensayo que mide la capacidad de inhibir la formación de fibras amiloides puede obviar compuestos bioactivos.

Como modelo biológico para ensayar la toxicidad de A β y de A β combinado con inhibidores se escogió la línea celular PC12, midiendo su tasa de supervivencia celular, tal y como se detalla en el apartado 4.1.1. La acción de los inhibidores sobre la capacidad de formación de fibras de la proteína A β se evaluó de forma cualitativa utilizando microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos se muestran y discuten en el apartado 4.2.

En una primera etapa, se ensayaron en el IIBB (Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC), bajo la dirección del Dr. Serratosa y el Dr. Tusell, todos los monometilpéptidos (**1** a **5**), el dimetilpéptido **7**, y los dos péptidos control: **10** y **11** (ver Tabla 4). Entre las moléculas diseñadas por nosotros, únicamente los N-metilpéptidos **2** y **3** presentaron una actividad protectora frente a la acción de A β , no detectándose ningún efecto destacable en el caso del dimetilpéptido ensayado.

¹¹⁷ Varadarajan, S.; Yatin, S.; Aksenova, M.; Butterfield, D. A. J. *Struct. Biol.* **2000**, *130*, 184-208.

¹¹⁸ Wolfe, M. S. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 859-865.

¹¹⁹ Howlett, D. R.; Jennings, K. H.; Lee, D. C.; Clark, M. S. G.; Brown, F.; Wetzell, R.; Wood, S. J.; Camilleri, P.; Roberts, G. W. *Neurodegeneration*, **1995**, *4*, 23-32.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

Los péptidos control, **10** y **11**, se comportaron de forma muy diferente. Mientras que el comportamiento que mostró **11**+A β en el ensayo biológico fue prácticamente igual al del control de A β , **10**+A β mostró una tasa de supervivencia superior a la del control y similar a la mostrada por **2**+A β . Este resultado, contradictorio con la bibliografía⁹⁸, podría estar relacionado con la incapacidad que mostró **11** para prevenir la formación de fibras de A β en las condiciones de trabajo utilizadas en esta tesis (apartado 4.2).

Con estos resultados biológicos, y sin haber evaluado la actividad de los restantes péptidos que componen la primera serie de inhibidores, se decidió preparar dos nuevas series de compuestos, coherentes con los resultados de actividad biológica de los que se disponía en ese momento.

3.2.5 Optimización de los N-metilinhibidores

El mayor inconveniente que presenta cualquier fármaco basado en secuencias peptídicas es la baja biodisponibilidad que presentan: los péptidos y proteínas son degradados rápidamente en el organismo por proteasas endógenas, haciendo que el tiempo de vida medio del compuesto sea muy corto. La presencia de N-metilaminoácidos hace aumentar este tiempo pero, como demuestran las pruebas de proteólisis realizadas (apartado 5.4), aun así, los péptidos son degradados en un tiempo breve. Esto se da incluso en las condiciones, relativamente suaves, de los ensayos celulares, en los que se utilizan sueros inactivados (apartado 8.4.1).

Debido a reducida biodisponibilidad que presentan en general los péptidos, nos planteamos, antes de iniciar los ensayos biológicos, la necesidad de utilizar aminoácidos D en una segunda serie de péptidos. Esta estrategia permite obtener péptidos con una mayor resistencia a proteasas¹¹⁵, pero los resultados contradictorios descritos en la bibliografía sobre la estereoespecificidad de la interacción inhibidor-A β ^{97,104}, hicieron que se decidiera no utilizar aminoácidos D en la primera serie de péptidos.

3.2.5.1 Segunda serie de inhibidores: utilización de aminoácidos D

Si, igual que sucede con otros péptidos¹⁰⁴, la interacción entre nuestros inhibidores y A β no es estereoespecífica, los péptidos **12** y **14** (derivados de las secuencias de **2** y **3**

pero constituidos con aminoácidos D, ver Tabla 5) deberían presentar una actividad biológica equiparable a la observada con aminoácidos L. Con el fin de verificar el tipo de interacción (estereoespecífica o no) que muestran nuestros inhibidores, se decidió sintetizar una segunda serie. En la Tabla 5 se indican los péptidos que la constituyen.

Péptido	Secuencia peptídica	Péptido original
12	D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-Phe-D-NMePhe-D-Ala-NH ₂	2
13	D-Lys-D-Lys-D-NMeLeu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Ala-NH ₂	5
14	D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-NMePhe--D-Phe-D-Ala-NH ₂	3
15	D-Lys-D-Lys-D-NMeLeu-D-Val-D-NMePhe-D-Phe-D-Ala-NH ₂	7

Tabla 5. Secuencias de los péptidos que constituyen la segunda serie de inhibidores (aproximación *enantio*).

La Tabla 5 incluye, además de los péptidos **12** y **14**, un derivado de **5** (el péptido **13**) para poder comparar el efecto de la sustitución de aminoácidos D por L en un compuesto sin actividad biológica. Se sintetizó también **15**, un dimetilpéptido con D-aminoácidos, ya que aunque **7** (péptido en el que está basado y el único péptido dimetilado ensayado hasta ese momento) no presenta una actividad biológica significativa, **3** (uno de los análogos monometilados de **7**) sí que muestra una respuesta considerable.

3.2.5.2 Tercera serie de inhibidores: aproximación *retro-enantio*

Por otro lado, si tenemos en cuenta los resultados publicados sobre la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala y sus derivados constituidos con aminoácidos D⁹⁷, parece lógico pensar que la interacción entre nuestros N-metilpéptidos y A β también debería ser estereoselectiva y, en tal caso, los péptidos de la Tabla 5 no deberían presentar actividad biológica.

Si se asume, tal como indican los datos estructurales de rayos X, que la disposición adoptada por las cadenas peptídicas corresponde a una estructura β (ya sea paralela o antiparalela), tenemos que las cadenas involucradas en el reconocimiento entre A β y el inhibidor pueden orientarse de diversas maneras. Fijándonos en una de estas orientaciones, por ejemplo la antiparalela (ver a) Figura 36), se puede ver cómo todas las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la interacción (simbolizadas por redondas en este caso) se orientan detrás del plano definido por las moléculas. Si en lugar de tener dos cadenas con L-aminoácidos, utilizamos una cadena con L-aminoácidos y otra

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

con D-aminoácidos (ver b) Figura 36) no es posible conseguir la misma disposición relativa de las cadenas laterales (las disposiciones posibles dejan las cadenas al lado contrario del plano definido por los puentes de hidrógeno o bien en un orden diferente). Es decir, al cambiar una de las cadenas de aminoácidos L por aminoácidos D, se pierden las interacciones estabilizantes entre cadenas laterales que se obtienen al unir dos secuencias con aminoácidos L.

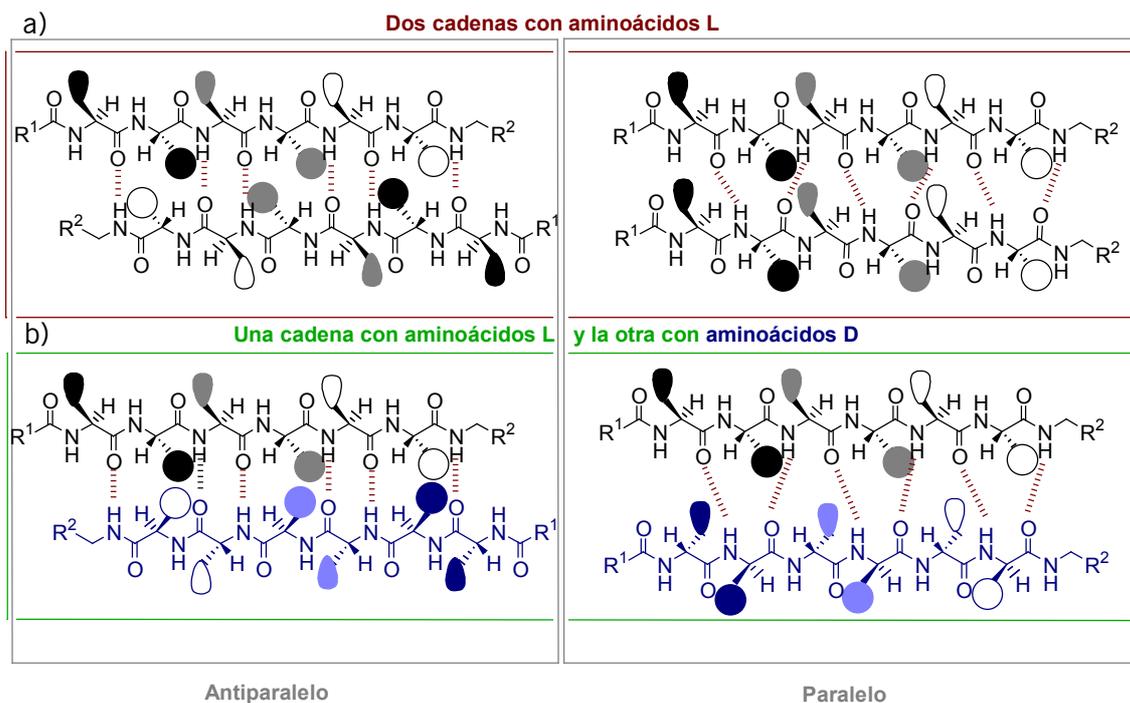


Figura 36. Disposición relativa de las diferentes cadenas laterales si dos péptidos en conformación β se aproximan de forma antiparalela (izquierda) o paralela (derecha) a) si ambos péptidos están constituidos con aminoácidos L y b) cuando una de las cadenas (azul) está constituida íntegramente por aminoácidos D.

Este tipo de reconocimiento molecular entre dos cadenas β permite explicar la pérdida de interacción descrita al cambiar la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe por su forma *enantió*, D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe⁹⁷. La existencia de una interacción de este tipo no excluye, no obstante, la posibilidad de obtener un derivado de la secuencia β (16-21) con aminoácidos D que conserve, al menos en parte, la capacidad de interacción con la secuencia nativa.

Si tenemos una cadena de péptido extendida, como sucede en una estructura β , podemos conseguir mantener la topología de las cadenas laterales y parte de los puentes de hidrógeno que la estabilizan utilizando la aproximación sintética denominada *retro-enantió*. Esta aproximación consiste en, además de utilizar aminoácidos D, invertir también el orden de los aminoácidos respecto a la secuencia peptídica original. Con

ambos cambios se consigue mantener la topología de las cadenas laterales a costa de sacrificar el tipo de estructura β que se forma. La Figura 37 muestra cómo la unión antiparalela entre dos péptidos L orienta las cadenas laterales que interactúan detrás, igual que sucede con una estructura β paralela entre la secuencia con L-aminoácidos y la secuencia con D-aminoácidos en orden inverso. Lo mismo sucede si nos fijamos en la estructura β paralela de dos péptidos L y la estructura antiparalela del péptido L y la secuencia *retro-enantio*.

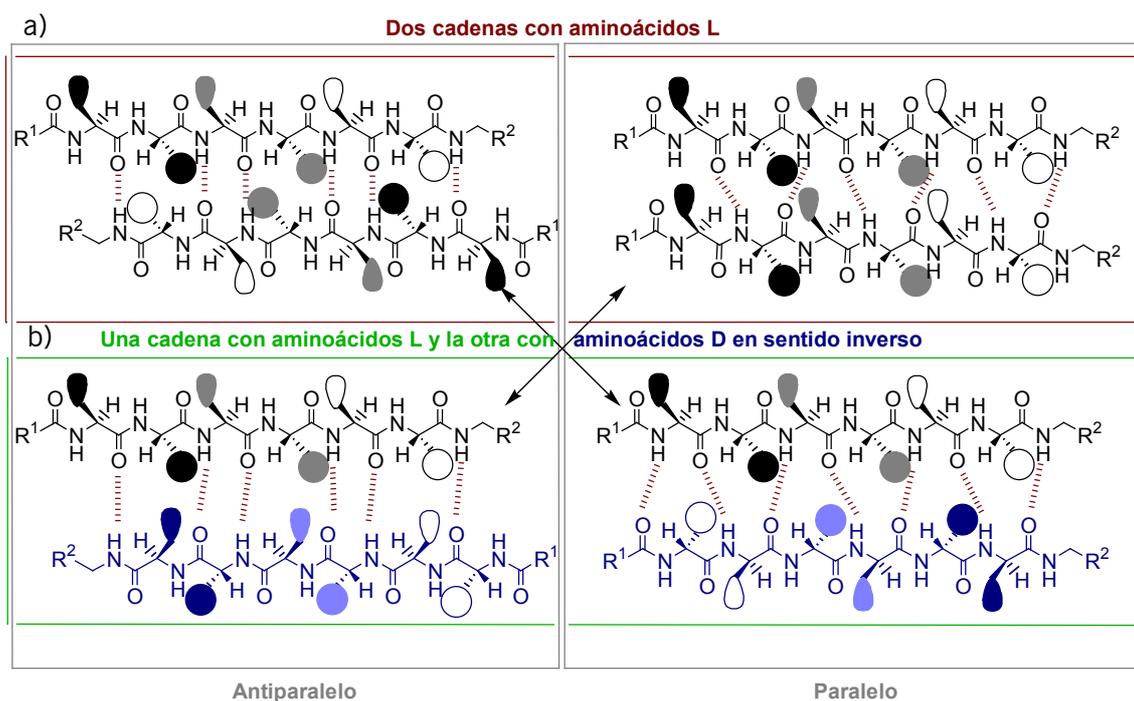


Figura 37. a) muestra el reconocimiento que se puede dar entre dos cadenas constituidas con aminoácidos L, bien sea mediante una aproximación antiparalela (izquierda) o bien paralela (derecha). En b) se muestra el resultado de combinar una cadena de aminoácidos L con su correspondiente secuencia *retro-enantio* (azul). Las flechas relacionan las estructuras que ofrecen una topología de cadenas laterales equivalente, pero estructura β diferente.

Para poder comparar los resultados obtenidos entre la segunda serie de inhibidores (aproximación *enantio*) (Tabla 5) y la tercera serie de inhibidores (aproximación *retro-enantio*), se escogieron las mismas secuencias básicas. De esta forma se obtuvieron los péptidos que se muestran en la Tabla 6.

Además de los derivados de los péptidos mostrados en Tabla 5, en la Tabla 6 se añadieron dos derivados más, **16** y **21**. Por un lado se incluyó **16**, la secuencia *retro* de **2**. Con ella se completa todas las variaciones posibles de **2** (sin cambiar la secuencia de aminoácidos). Por otro lado, el péptido **21** deriva directamente de **10**, la secuencia básica

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

sin grupos N-metilo (**10** presentó una respuesta equiparable a la de **2** en el ensayo biológico).

Péptido	Secuencia peptídica	Péptido original
16	Ala-NMePhe-Phe-Val-Leu-Lys-Lys-NH ₂	
17	D-Ala-D-NMePhe-D-Phe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH ₂	2
18	D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-NMeLeu-D-Lys-D-Lys-NH ₂	5
19	D-Ala-D-Phe-D-NMePhe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH ₂	3
20	D-Ala-D-Phe-D-NMePhe-D-Val-D-NMeLeu-D-Lys-D-Lys-NH ₂	7
21	D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH ₂	10

Tabla 6. Secuencias de los péptidos que constituyen la tercera serie de inhibidores (aproximación *retro-enantio*).

Los péptidos **2** y **10** mostraron los valores de actividad biológica más elevados durante los ensayos en el IIBB. Por este motivo, y aunque **10** no es uno de los péptidos que hemos diseñado nosotros, se decidió sintetizar también su derivado *retro-enantio*. Incluir el péptido **21** en esta tercera serie podría ayudar a esclarecer la función que desempeñan los grupos metilo en la inhibición de la toxicidad de la proteína A β .

3.3 Inhibidores peptídicos aparecidos recientemente en la bibliografía

La enfermedad de Alzheimer, en la que se centra el estudio de esta tesis, es un tema muy relevante, tanto desde un punto de vista de ciencia básica como aplicada, debido al elevado impacto social y económico que presenta esta enfermedad. Por este motivo, no es de extrañar que la aparición de nuevos inhibidores de la proteína A β haya continuado durante el desarrollo de este trabajo experimental^{120,121}. A pesar de ello, sólo un número reducido de grupos de investigación en todo el mundo se centran en el uso de péptidos como inhibidores de A β y de éstos, sólo dos han publicado, muy recientemente, trabajos en los que se describe el uso de N-metilpéptidos con dicho fin.

3.3.1 Inhibidores diseñados por el grupo de Doig

El trabajo presentado por Doig y colaboradores en el 2000¹²² se centra en la utilización de un derivado sintético de la proteína A β , $\beta(25-35)$, como modelo. Escogieron este péptido debido a que es el fragmento más pequeño de A β capaz de rendir fibras amiloides, manteniendo además la toxicidad de la proteína nativa¹²³. Los inhibidores diseñados por Doig y colaboradores son derivados monometilados de $\beta(25-35)$, los cuales se evaluaron midiendo su capacidad para reducir la toxicidad de $\beta(25-35)$ en células PC12. Además correlacionaron estos resultados con el contenido en fibras amiloides de la mezcla $\beta(25-35)$ -inhibidor.

La comparación de los análisis estructurales de cada una de las moléculas que ensayaron les llevó a determinar que no existe una relación entre la estructura secundaria del inhibidor (determinada mediante dicroísmo circular) y su capacidad de actuar reduciendo la toxicidad de A β o modificando la estructura amiloide. Además, y como resultado de este estudio, Doig y colaboradores encontraron que la sustitución de la Gly³³ por NMeGly da lugar a un buen inhibidor monometilado, capaz tanto de reducir la toxicidad de $\beta(25-35)$ como de prevenir la formación de fibras.

¹²⁰ Heal, J., R.; Roberts, G. W.; Christie, G.; Miller, A. D. *ChemBiochem* **2002**, 3, 86-92.

¹²¹ Findeis, M. A.; Musso, G. M.; Arico-Muendel, C. C.; Benjamín, H. W.; Hundal, A. M.; Lee, J. Chin, J.; Kelley, M.; Wakefield, J.; Hayward, N. J.; Molineaux, S. M. *Biochemistry* **1999**, 38, 6791-6800.

¹²² Hughes, E.; Burke, R. M.; Doig, A. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, 33, 25109-25115.

¹²³ Forloni, G.; Lucca, E.; Angeretti, N.; Torre, P. D.; Salmona, M. *J. Neurochem.* **1997**, 69, 2048-2054.

3.3.2 Inhibidores diseñados por el grupo de Meredith

Los péptidos propuestos por el grupo de Meredith¹¹⁶ utilizan la secuencia β (16-22) como unidad de reconocimiento e introducen N-metilaminoácidos de forma alternada para impedir el crecimiento de laminas β , dando así lugar a inhibidores muy similares a los mostrados en la presente tesis (el péptido base en este caso es NH₂-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂).

No obstante, Meredith y colaboradores únicamente presentaron resultados estructurales que demuestran la capacidad de sus péptidos para inhibir la agregación de A β . Ninguno de los trabajos publicados^{116,124} ofrece datos sobre la actividad biológica de los compuestos descritos. Además, consideraron que el efecto disruptor de una secuencia polimetilada en posiciones alternas es mayor que el de una secuencia monometilada, por lo que Meredith y colaboradores omitieron la síntesis y evaluación de este tipo de compuestos, refiriendo sus resultados sólo a la secuencia original sin N-metilaminoácidos.

En ambos trabajos se muestra la eficacia de péptidos di-¹²⁴ y trimetilados¹¹⁶ en posiciones alternas para inhibir la formación de fibras amiloides de β (1-40), aunque los valores de concentración efectiva 50 (EC₅₀) presentados son sólo ligeramente superiores a los que presentan para la secuencia sin N-metilaminoácidos (entre 4 y 10 equivalentes).

Un de resultado interesante es que la utilización de un péptido basado en la secuencia β (16-22), pero con N-metilaminoácidos consecutivos, presenta una capacidad inhibidora muy baja, lo que demuestra la importancia que tiene la disposición alterna de los grupos metilo.

Además, observaron que un derivado N-metilado del centro de nucleación de otra proteína amiloidogénica, la proteína priónica humana (PrP), no presenta capacidad para inhibir A β , lo que fue interpretado como una prueba de la especificidad que existe en el proceso de reconocimiento de la secuencia β (16-22)¹¹⁶. Posteriormente, comprobaron que el reconocimiento no es totalmente específico, ya que una secuencia aleatoria constituida a partir de la secuencia β (16-20) con dos N-metilaminoácidos alternos, presenta una

¹²⁴ Gordon, D. J.; Tappe, R.; Meredith, S. C. J. *Pept. Res.* **2002**, *60*, 37-55.

actividad similar a la secuencia en la que se basó y ligeramente superior a la mostrada por β (16-20).

Los estudios estructurales que realizaron con péptidos trimetilados indican una disposición β , en contrapartida a la conformación principalmente *al azar* (desestructurada) que presenta la molécula sin metilar. Además, el uso de ultracentrifugación analítica parece indicar que los péptidos trimetilados se encuentran en forma monomérica.

Un trabajo más reciente presentado por Meredith y Gordon¹²⁵ ofrece una aproximación diferente al introducir enlaces éster como elemento disruptor de la formación de puentes de hidrógeno. El uso de enlaces éster es una modificación más conservadora que la utilización de N-metilaminoácidos, e igualmente rinde moléculas con capacidad para prevenir la formación de agregados amiloides.

El inconveniente que presenta esta aproximación es la elevada labilidad que presentan los peptoides con enlaces éster a la acción de proteasas (los enlaces éster son más lábiles que los enlaces amida). Por ello, este tipo de molécula carece de interés desde el punto de vista de su aplicación *in vivo*.

Este último trabajo muestra, además, la capacidad, tanto de los inhibidores con enlace éster como de aquellos con N-metilaminoácidos, para asociarse a estructuras micelares de β (1-40), estabilizándolas e impidiendo su transformación en fibras, lo que podría explicar el mecanismo de acción de estos péptidos.

3.3.3 Comparación de nuestros inhibidores respecto a los aparecidos recientemente en la bibliografía

El primer resultado destacable es que, tanto en el trabajo de Meredith como en el nuestro, la secuencia básica (sin metilar) presenta una actividad inhibidora similar a la encontrada para los mejores N-metilpéptidos de cada estudio.

Queda por responder la pregunta de si β (25-35) (el péptido en el que se basan Doig y colaboradores para diseñar sus inhibidores), al igual que sucede con β (1-40)⁹⁴, es capaz

¹²⁵ Gordon, D. J.; Meredith, S. C. *Neurobiol. Aging*, **2002**, 23, S201.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

de interferir en la agregación de la proteína $\beta(1-42)$ y, en caso afirmativo, si implica un cambio en la toxicidad de la mezcla resultante.

Al comparar nuestros resultados y los obtenidos por Meredith y colaboradores se observan discrepancias en el número óptimo de metilos en cada caso. Nuestros resultados muestran que la molécula con mayor actividad es un compuesto monometilado, sin obtener una respuesta destacable al utilizar compuestos di- y trimetilados, pero Meredith describe que todos los compuestos di- y trimetilados que ensaya presentan una actividad elevada, la cual se ve poco afectada por la naturaleza de la secuencia utilizada, siempre que ésta sea similar a la nativa.

Las preguntas que esto plantea son varias. ¿Cuál de los dos resultados es el correcto? ¿Por qué esta diferencia? Además de la complejidad que implican los experimentos con proteínas amiloides, la diferencia puede deberse a distintos factores, o a una suma de todos ellos.

Por un lado, existen dos diferencias importantes en las secuencias peptídicas utilizadas en cada laboratorio: la proteína A β con la que se han realizado los experimentos ($\beta(1-42)$ es más amiloidogénica que $\beta(1-40)$, por lo que el proceso de fibrillogénesis no es igual) y la secuencia en la que se basan los inhibidores (nosotros partimos de una molécula anfipática, con una región positiva y otra hidrofóbica, mientras que los inhibidores de Meredith se basan en una región central hidrofóbica, con una carga positiva en un extremo y otra negativa en el extremo opuesto).

Además, ambos ensayos se basan en planteamientos diferentes. Nuestro experimento encuentra péptidos con capacidad para disminuir la toxicidad de A β , mientras que Meredith ensaya la capacidad de sus productos para impedir la agregación, utilizando entre 20 y 30 equivalentes para ver una inhibición total de la formación de fibras y sin llevar a cabo experimentos de toxicidad. Es posible que la inhibición de la agregación dé lugar, en algunos casos, a intermedios con igual o mayor capacidad neurotóxica que los

obtenidos por la proteína A β sola¹⁰² (resultados recientes muestran que las asociaciones oligoméricas resultan más tóxicas incluso que la forma fibrilar de A β ^{108,126}).

La comparación de nuestro trabajo con el de Meredith es compleja, ya que no hay suficientes vínculos entre ellos. Aun así, a partir de los resultados obtenidos por Meredith y por nosotros mismos, podemos concluir que, aunque los N-metilpéptidos estudiados en ambos casos presentan propiedades inhibitoras de la agregación/toxicidad de A β , éstas son equiparables a la obtenida con la misma secuencia sin N-metilaminoácidos.

¹²⁶ Walsh, D. M.; Klubin, I.; Fadeeva, J. V.; Rowan, M. J. Selkoe, D. J. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 552-557.

3.4 Síntesis de inhibidores

La síntesis de los inhibidores diseñados en el apartado 3.2 se realizó en fase sólida, utilizando la estrategia Fmoc/^tBu. La construcción de la secuencia se llevó a cabo sobre resina *p*-metilbenzihidrilaminapoliestireno (*p*-MBHA), por lo que fue necesario funcionalizar la resina con el espaciador bifuncional (*handle*) Fmoc-AM para obtener los péptidos en forma de carboxamida (Figura 38). Debido tanto al potencial riesgo de estructuración de la secuencia durante la elongación de la cadena, como a los problemas detectados durante los primeros intentos de síntesis, se decidió reducir la funcionalización inicial de la resina de 0,70 mmol/g a 0,1-0,3 mmol/g.

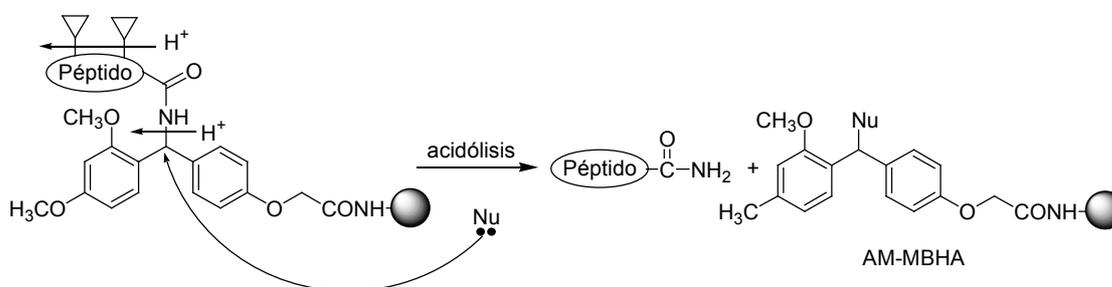


Figura 38. Escisión de un péptido unido al *handle* AM y anclado sobre resina mediante acidólisis en presencia de un captador de carbocationes (Nu). De esta forma se obtiene el péptido libre en forma de carboxamida.

3.4.1 Incorporación de un aminoácido sobre N-metilaminoácidos

Al llevar a cabo la síntesis de los primeros derivados se observó la elevada dificultad que entraña la incorporación de un Fmoc-aminoácido (Fmoc-AA) sobre un N-metilaminoácido (NMeAA): al contrario de lo que sucede normalmente al incorporar un Fmoc-AA sobre prolina, no fue posible, en el caso de los N-metilaminoácidos, conseguir rendimientos aceptables utilizando carbodiimidas como agentes activantes. Por este motivo, se decidió mejorar el rendimiento de los acoplamiento sobre NMeAA, probando para ello PyAOP y HATU¹²⁷ como agentes activantes. En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos al acoplar un Fmoc-aminoácido sobre un N-metilaminoácido.

¹²⁷ Angell, Y. M.; Thomas, T. L.; Flentke, G. R.; Rich, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7279-7280.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

Mezcla de acoplamiento	Rdto [♦] 1 ^{er} acoplamiento	Rdto [♦] 2 ^o acoplamiento	Rdto [♦] 3 ^{er} acoplamiento
Fmoc-AA/DIP/HOBt (4:4:4)	~10%	~15-20%	
Fmoc-AA/HATU/DIEA (3,8:8:4)	~50-60%	~80-100%	
Fmoc-AA/PyAOP/DIEA (5:10:5)	~50-60%	~65-100%	≥ 95%
Fmoc-AA/DIP (3:6) ^{♦♦}		> 90%	

Tabla 7. Rendimientos correspondientes al acoplamiento de un Fmoc-aminoácido sobre un N-metilaminoácido para diferentes mezclas de reacción (ver apartado 8.3.1.1.3).

Los resultados obtenidos utilizando HATU (hexafluorofosfato de *N*-óxido *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]piridin-1-il-metilen]-*N*-metilmetanamino) y PyAOP (hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-*N*-oxi-tria(pirrolidino)fosfonio) son comparables entre sí, como se muestra en la Tabla 7 (ver el mecanismo de reacción en la Figura 39), pero se escogió este segundo agente de acoplamiento ya que los tiempos de reacción necesarios son inferiores (2 h utilizando PyAOP, frente a 6-12h con HATU) y además no existe el riesgo de guanidilación asociado a las sales de uronio¹²⁸ (en realidad, aunque se denominan por motivos históricos sales de uronio, son sales de guanandinio, ver Figura 40).

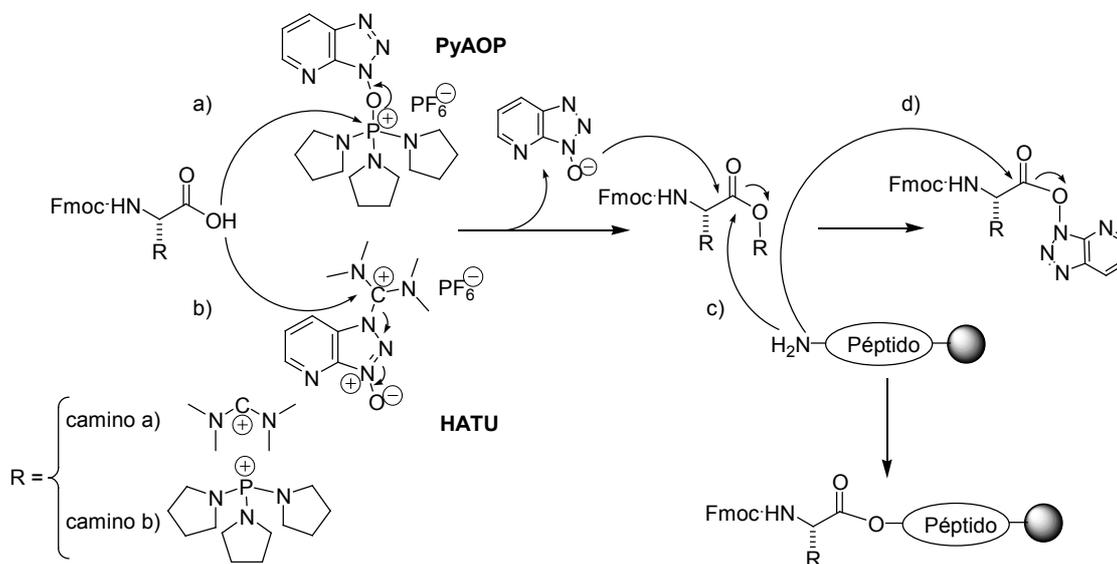


Figura 39. Mecanismo de formación de un enlace peptídico utilizando como agente de acoplamiento a) PyAOP ó b) HATU. La acilación del grupo amino puede darse mediante c) o d).

[♦] Rendimientos calculados a partir del análisis de aminoácidos (ver apartado 8.1.3.4). Se muestra el intervalo de rendimientos obtenido en varios experimentos. Los reacoplamientos siempre se llevaron a cabo con el 50% de los reactivos utilizados en el primer acoplamiento.

^{♦♦} La preincubación de 6 eq de Fmoc-AA con 3 eq de DIP da lugar a la formación del anhídrido simétrico, el cual actúa como especie activa en la reacción de acoplamiento.

¹²⁸ Albericio, F.; Lloyd-Williams, P.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Ed. CRC Press LLC, Florida **1997**.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

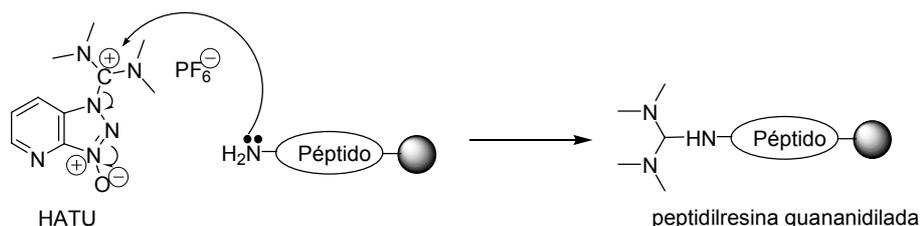


Figura 40. Reacción de guanidilación entre la peptidilresina y HATU.

En pruebas posteriores se pudo observar que la utilización de anhídridos simétricos¹²⁹ preformados permite incorporar un Fmoc-AA sobre un N-MeAA con una eficacia equiparable a la observada con las sales de fosfonio. Por este motivo, los péptidos del **13** al **21** fueron sintetizados utilizando este protocolo.

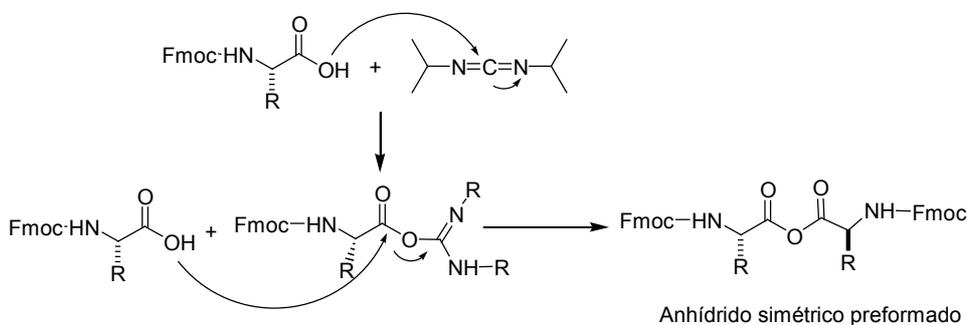


Figura 41. Obtención del anhídrido simétrico preformado en presencia de DIP.

3.4.2 Seguimiento de la reacción de acoplamiento sobre N-MeAA

El control cualitativo de la reacción de acilación de una amina primaria libre en fase sólida se lleva a cabo mediante el ensayo de Kaiser (apartado 8.1.3.1), el cual nos indica que el acoplamiento se ha completado, al menos en un 99,0-99,5% (dependiendo de la funcionalización de la resina).

El problema es que el ensayo de Kaiser no es efectivo cuando se realizan acoplamientos sobre aminas secundarias libres, como es la prolina. En este caso el acoplamiento se controla tradicionalmente utilizando el ensayo del cloranilo cualitativo (apartado 8.1.3.2). El inconveniente de este ensayo es su baja sensibilidad, lo que da lugar a falsos negativos. Por este motivo, la monitorización de la incorporación sobre N-metilaminoácidos se realizó utilizando el ensayo del *p*-nitrofenilester del rojo disperso I

¹²⁹ Ko, S. Y.; Wegner, R. M. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *80*, 695-705.

(apartado 8.1.3.3). Este ensayo resulta mucho más sensible que el cloranilo¹³⁰, permitiendo seguir de forma adecuada el acoplamiento sobre N-metilaminoácidos, como se verificó al contrastar los resultados obtenidos mediante este ensayo con análisis de aminoácidos de la peptidilresina y/o cromatografía líquida de alta resolución del crudo peptídico.

3.4.3 N-metilaminoácidos en el extremo C-terminal

La caracterización de péptidos con N-metilaminoácidos en el extremo C-terminal resulta especialmente problemática. Se observó mediante HPLC la aparición de picos múltiples al sintetizar péptidos terminados en NMe-Ala. Esta multiplicidad de señales sólo se manifiesta tras la incorporación del cuarto aminoácido, como puede determinarse mediante la escisión de peptidiresina antes y después de dicho acoplamiento (en la Figura 42 se muestra un ejemplo obtenido durante la síntesis de los péptidos **8** y **9**).

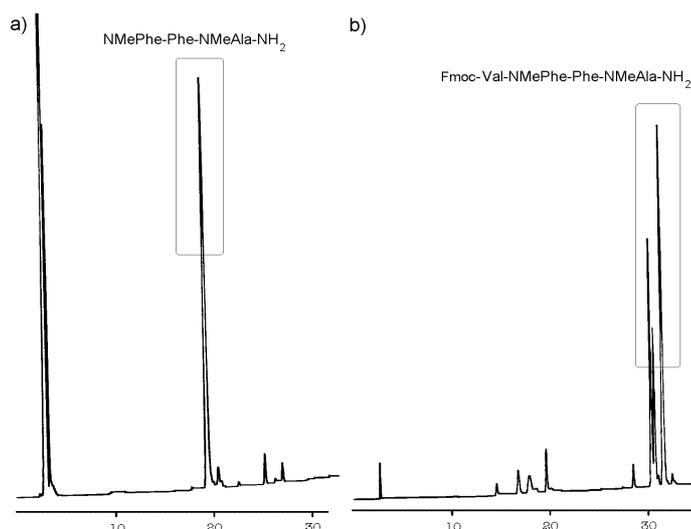


Figura 42. Cromatogramas de HPLC de la secuencia NMePhe-Phe-NMeAla-NH₂ a) antes y b) después de incorporar Fmoc-Val (apartado 8.3.1.5). Los recuadros indican las señales que se corresponden, por MALDI, con la masa deseada. El registro del cromatograma b) a 301 nm muestra únicamente las tres señales correspondientes al producto Fmoc-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH₂. El análisis por MALDI de ambos crudos muestra sólo una única señal, correspondiente a la masa de los productos esperados en cada caso. Elución en una columna Nucleosil C₁₈ utilizando un gradiente lineal de 0% de B hasta 100% de B en 30 min. (A = H₂O con 0,045% TFA, B = ACN con un 0,036% TFA). Detección a 220 nm.

El uso de HPLC-MS permitió caracterizar el péptido **1**, Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NMeAla-NH₂, y establecer que las tres señales que aparecen en el cromatograma del crudo (Figura 43) corresponden a **1**.

¹³⁰ Madre, A.; Farsi, N.; Hosten, N.G.C.; De Muynck, H.; De Clercq, P.J.; Barry, J.; Davis, A.P. *Eur. J. Org. Chem.* 1999, 385, 1-7.

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

La observación de este comportamiento cromatográfico anómalo hizo que se decidiera investigar la posibilidad de un equilibrio conformacional. Para determinar la existencia de dicho equilibrio se utilizaron dos aproximaciones, las cuales se describen a continuación.

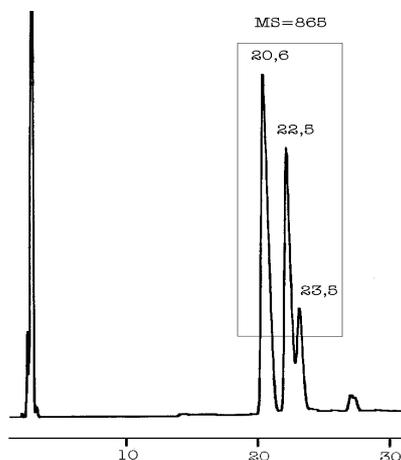


Figura 43. Cromatograma de **1** (péptido terminado en NMeAla). Elución en una columna C₁₈ utilizando un gradiente lineal de 15% de B \rightarrow 40% de B en 30 min. (A = H₂O con 0,045% TFA, B = ACN con un 0,036% TFA). Detección a 220 nm.

3.4.3.1 Cromatografía líquida a alta temperatura

La existencia de equilibrios conformacionales lentos, como el que presentan las helices de poliprolina¹³¹, o la presencia de oligómeros¹³², puede llevar a la aparición de múltiples picos en el análisis cromatográfico a pesar de encontrarnos frente a una sustancia químicamente pura.

Para lograr la coalescencia de señales correspondientes a conformeros se puede aumentar la temperatura del sistema cromatográfico. De esta forma aumenta la velocidad de interconversión de las especies presentes en el equilibrio, pudiéndose llegar a la coalescencia de las señales cromatográficas si el equilibrio se vuelve suficientemente rápido (invisible en la escala de tiempo de la cromatografía líquida de alta resolución).

En nuestro caso, y como se muestra en la Figura 44, no pudo conseguirse la coalescencia total de las tres señales que contenían el producto deseado (se determinó mediante el uso de MS), aunque sí que se observa el ensanchamiento de los picos y la desaparición de una de las señales al eluir a una temperatura de 60°C.

¹³¹ Crespo, L.; Sanclimens, G.; Montaner, B.; Perez-Tomás, R.; Royo, M.; Pons, M.; Albericio, F.; Giralt, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8876-8883.

¹³² Murphy, R. M.; Pallitto, M. M. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 109-122.

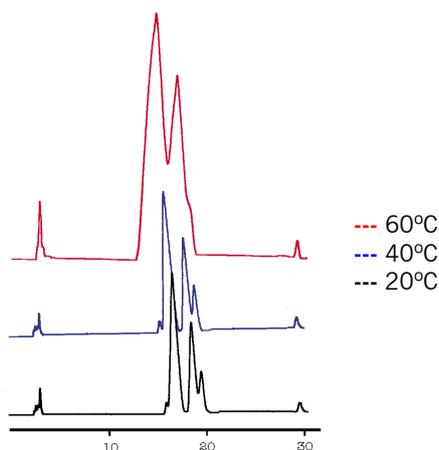


Figura 44. Cromatograma de **1** a diferentes temperaturas (20, 40 y 60°C). Elución en una columna C₄ utilizando un gradiente lineal de 15% de B hasta 40% de B en 30 min. (A = H₂O con 0,045% TFA, B = ACN con un 0,036% TFA). Detección a 220 nm.

3.4.3.2 Condiciones de escisión peptidilresina: TFA/H₂O 95:5

El resultado no satisfactorio obtenido con la cromatografía líquida a alta temperatura no implica que no nos encontremos frente a un equilibrio. Puede ser que la temperatura utilizada no sea suficientemente elevada o bien que la interconversión requiera algún tipo de catálisis.

Basándonos en esta última hipótesis, se investigó la posible existencia de un equilibrio conformacional durante la escisión de la peptidilresina (en presencia de TFA/agua 95:5). Para ello se procedió a purificar uno de los posibles conformeros (ver apartado 8.3.1.2) y se disolvió durante 2 h en TFA/H₂O 3:1 y TFA 100% para comparar el comportamiento según el contenido de ácido. El análisis cromatográfico posterior, como se muestra en la Figura 45, permitió en este caso la observación de interconversión parcial entre las dos especies mayoritarias, aunque no se pudo determinar la aparición de la señal minoritaria (23,5 min).

La ausencia, en la Figura 45, de la señal minoritaria a 23,5 min que se observa en el crudo (Figura 44) no es sorprendente. La purificación del compuesto que eluye a 23,5 min y posterior tratamiento durante 3 h con TFA/H₂O 1:1 o 3 h con H₂O, da lugar a cromatogramas que presentan únicamente las señales a 20,6 y 22,5 min, lo que podría indicar que la señal a 23,5 min corresponde a una especie poco estable.

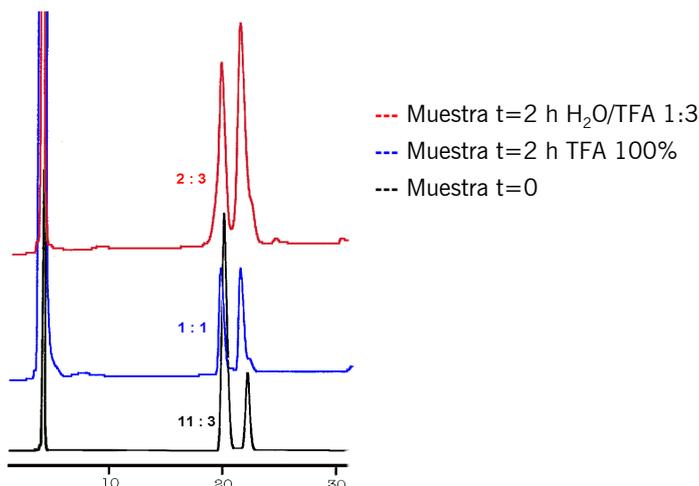


Figura 45. Cromatograma de **1** purificado parcialmente (apartado **8.3.1.2**) y reinyectado tras su disolución en agua (negro) o bien tras permanecer 2 h en H₂O/TFA 1:3 (rojo) o TFA 100% (azul). Los números indican la relación de áreas entre el primer y segundo pico. Elución en una columna C₄ utilizando un gradiente lineal de 15% de B hasta 40% de B en 30 min. (A = H₂O con 0,045% TFA, B = ACN con un 0,036% TFA). Detección a 220 nm.

3.4.3.3 Equilibrio conformacional

La naturaleza del enlace amida podría ser la causa de un equilibrio conformacional en los péptidos con un N-metilaminoácido en el C-terminal* (la Pro, un N-alquilaminoácido, es el aminoácido que habitualmente precede a los escasos enlaces *cis* presentes en las proteínas naturales¹³⁴, Figura 46).

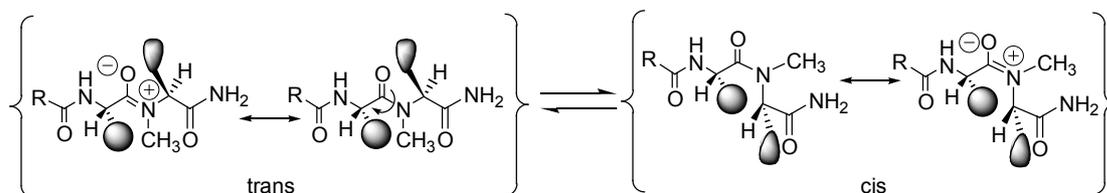


Figura 46. Equilibrio de rotación del enlace amida entre la forma *trans* (la más habitual en enlaces peptídicos) y la forma *cis* en un péptido con un N-metilaminoácido en el C-terminal. La prolina, otro alquilaminoácido, se puede encontrar en proteínas naturales adoptando ambas conformaciones.

Normalmente el carácter de doble enlace del enlace peptídico es de un 40%¹³⁴. La presencia de un grupo metilo sobre el nitrógeno del enlace amida tiene dos efectos diferentes. Por un lado, estabiliza por efecto inductivo la carga positiva que aparece sobre el nitrógeno en la forma resonante que deslocaliza el doble enlace del carbonilo, lo que incrementa el carácter de doble enlace. Por otro lado, se produce un aumento de los

* Durante el desarrollo de esta tesis, Meritxell Teixidor observó también el mismo comportamiento en péptidos terminados en diversos N-metilaminoácidos diferentes de NMeA, constatando que es una característica intrínseca a este tipo de secuencias peptídicas.

¹³⁴ Voet, D.; Voet, J. G. *Bioquímica*, Ed. Ediciones Omega S.A., Barcelona **1992**.

impedimentos estéricos debido a la presencia de dicho metilo: al rotar el enlace amida en presencia de este grupo, las interacciones entre las cadenas laterales son mayores que en presencia de un hidrógeno.

Ambos factores hacen que la energía de rotación del enlace amida del N-metilaminoácido aumente respecto a la energía observada para un aminoácido no N-alquilado, ralentizando la velocidad de interconversión de forma equivalente a la observada en el caso de tener una Pro (el equilibrio de interconversión entre la forma *cis* y la forma *trans* es muy lento a pH neutro¹³⁵, como muestran los estudios de interconversión entre la estructura de poliprolina I, en la que todos los enlaces son *cis*, y la estructura de poliprolina II, con todos los enlaces *trans*¹³¹). Además, este equilibrio rotacional puede explicar la catálisis ácida observada.

Los péptidos con N-metilaminoácidos en el interior de la secuencia no mostraron señales múltiples. Esto puede justificarse debido al aumento en los impedimentos estéricos que conlleva la presencia de un aminoácido en el extremo C-terminal.

¹³⁵ Freeman, W. H. *Structure and Mechanism in Protein Science. A guide to enzyme catalysis and protein folding*, 4th Ed. W. H. Freeman and Company, USA **2002**.

