



Programa de Doctorado en Química Médica

**Estrategias en el tratamiento de la enfermedad  
renal crónica:**

**Nuevos moduladores de PTP1B e ILK**

Tesis doctoral presentada por

**Javier García Marín**

Directores: Dr. Juan José Vaquero López

Dr. Ramón Alajarín Ferrández

Alcalá de Henares, 2020

## AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, y tras varias semanas de confinamiento toca escribir una de las partes que más me ha costado y a la que más vueltas he dado de toda esta tesis. No han sido pocas las personas que de algún modo u otro han pasado por mi vida y me han acompañado en el periplo de esta tesis. Si bien espero no dejarme a nadie, estoy seguro de que cada vez que vuelva a leer estas líneas se me ocurriría alguien más, así que a todo aquel que se me haya olvidado incluir, ¡¡ muchas gracias!!

Esta tesis ha podido llegar a buen término gracias al apoyo financiero de distintos organismos, es por ello por lo que agradezco al Instituto de Salud Carlos III y más en concreto a la RED DE INVESTIGACIÓN RENAL (REDinREN) por el contrato de personal investigador con el que comencé mi andadura en la Universidad de Alcalá (UAH). Del mismo modo, quiero agradecer a la UAH la concesión de un contrato de Formación del Personal Investigador (FPI-UAH) en el año 2016 y posteriormente, al Ministerio de Educación Cultura y Deporte por la concesión de una ayuda FPU (FPU16/01647) con la que he podido terminar la Tesis. Así mismo, también agradezco al Ministerio de Ciencia e Innovación los proyectos de investigación que han permitido llevar a cabo todo el trabajo experimental, así como los concedidos por la Universidad de Alcalá, la Comunidad de Madrid y el Instituto de Salud Carlos III. Del mismo modo, agradezco a la RSEQ y a la SEQT todas las ayudas concedidas para asistencia a congresos y a la SEQT el Premio de Jóvenes Investigadores que me otorgaron en 2019. También agradezco a la empresa BioSolvelt su premio por el Scientific Challenge, el cual fue el germen del segundo capítulo de esta memoria y a la Real Academia Nacional de Farmacia el Premio Otimes-Farmapraxis concedido en 2019.

En primer lugar, doy las gracias al profesor Juan José Vaquero, “Juanjo”, por permitirme realizar la tesis en su grupo de investigación. Además, le agradezco todo el apoyo que me ha brindado estos años en todas las decisiones que he tomado y el haber estado dispuesto a echarme una mano siempre que la he necesitado con total cercanía.

También agradezco al Dr. Ramón Alajarín por su cotutela, o lo que es más difícil, que es llevar mi día a día. Le agradezco profundamente y de corazón todo el esfuerzo que me ha dedicado y su ayuda para preparar manuscritos, premios, congresos y haber sabido llevarme durante casi 5 años. No es fácil tratar con alguien que cada día aparece con ideas nuevas, ganas de hacer más cosas y seguir ese ritmo con tanta dedicación, profesionalidad (ya sea química, enzimología o computacional) y crítica, “yo tengo mis dudas”.

Quiero agradecer a los doctores Diego y Manuel Rodríguez Puyol, directores del grupo de Investigación traslacional de las enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento y la enfermedad renal de la UAH por todos los experimentos realizados en colaboración, por abrirme las puertas de su laboratorio y todo el asesoramiento durante la tesis. Especialmente quiero dar las gracias a Mercedes Griera por su buen hacer y gran capacidad de trabajo y estar siempre dispuesta a echarme una mano y enviarme resultados rápidamente y con una sonrisa.

Del mismo modo, quiero agradecer al profesor Adrian J. Mulholland por aceptarme en su grupo de investigación para llevar a cabo mi estancia predoctoral y a la doctora Kara E. Ranaghan por su supervisión.

También quiero agradecer a otras personas que han contribuido al trabajo experimental de esta Tesis, como la Dra. Laura Lagartera por los estudios de SPR y la Dra. Beatriz de Pascual Teresa por los de modelado molecular.

Agradezco a los doctores Gonzalo García y Elena Nieto, los “postdocs” cuando llegué a Alcalá, y que me ayudaron a dar los primeros pasos. Aunque se fueron al poco tiempo, gracias a ellos pude hacerme con ese laboratorio tan grande sin que se me viniese encima a mí solo.

Quiero dar las gracias a todos mis “niños”, más bien “niñas” y “becarias” de TFM, especialmente a las dos primeras. A Andrea por llegar cuando aún no me había hecho a estar tan sólo en el laboratorio y por todos los buenos momentos que pasamos tomando cañas y poniendo reacciones con *tert*-butil-litio procurando no inmolarnos e intentar sintetizar alguna carbolina en el intento. Especialmente quiero dar las gracias a Sandra, también por romper mi soledad en el labo y todos los desayunos, cafés, tintos, compras y risas que hemos tenido juntos durante su TFM y después. ¡Y luego llegó Alejandra (“poca broma”)! (acompañada de tres personas más) y en ese momento el “Laboratorio de la Soledad” pasó a llamarse el “Laboratorio del Amor”, “Laboratorio de los Péptidos” o “Laboratorio de la Desdicha”! Gracias también a Miriam que, aunque llegó en mi última etapa en la universidad, también he podido compartir buenos momentos con ella. Junto a ellas también quiero agradecer al resto de miembros temporales del “Laboratorio del Amor”: Lucía, Silvia, Tomás y Alejandra II por los buenos momentos pasados tanto dentro como fuera de la universidad. Por último, no quiero olvidarme de Adela, que durante los años de técnico que estuvo con nosotros también me hizo compañía cuando no había nadie más en el labo y tanto me ayudó preparando disoluciones, resintetizando compuestos y haciendo alguna que otra columna.

Gracias a Sara nucleasa, la “putilla” o “traidora original”, por ser mi primera amiga en Alcalá, y acompañarme al café cuando nadie tomaba café, por todas nuestras discusiones científicas, risas, viajes (con y sin Hildegart) y teatros juntos.

Gracias especialmente a Javi, “El traidor” por su amistad durante todos estos años desde que nos conocimos, risas, viajes, cafés, y ayuda durante mi estancia en Alcalá. Sigue pendiente la excursión al monte y hablar de los derechos de autor de tu memoria. También dar las gracias a Marina que junto a Javi y Sara amenizó mi estancia en Alcalá y compartió nuestros “Viernes de Cañas” y “reuniones de grupo” los miércoles en el 100 Montaditos.

Muchas gracias a mis dos compañeros de laboratorio (“sátrapas todos”) los últimos años. A Álvaro que tiene el listón de traición más bajo y siempre me ha apoyado y a Fran/“Flan”/“Frankie” por aceptar que nunca iba a llamarle Fran y por todos los momentos compartidos. A los dos ¡¡muchísimas gracias!!

También quiero dar las gracias a todos mis “compañeros de abajo”. A los antiguos: Raúl, Katerina, Sara Gutiérrez, Elena, Pedro, Alberto y especialmente Marisol (y por ende a Sebastian). Y también a los “nuevos”: Ana, Esther, Isa, Jaime, Julia y Clara. Gracias por todos los momentos compartidos.

Gracias también a las nucleasas de segunda generación: Patri y Julia por todos los momentos compartidos y vividos juntos. Esperemos que siga habiendo más a pesar de la “traición”.

Muchísimas gracias a todos los profesores del Departamento y miembros de mi grupo de investigación por haber estado ahí y dedicar una sonrisa o un consejo cuando fuese necesario. Especialmente gracias a Carolina por todas las facilidades que me ha dado.

Muchísimas gracias a Gloria Barcala, la secretaria del departamento, por su rápida y eficaz gestión de todos mis asuntos y por dejarme usar su cafetera de vez en cuando =).

Gracias a nuestros técnicos de laboratorio, a Desi especialmente por haberme echado una mano siempre con las bombas y los aparatos del laboratorio y a Eugenia por estar siempre ahí y resolverme rápidamente cualquier problema.

Agradezco también al CAI de la UAH y al Centro de Química Aplicada y Biotecnología de la UAH todos los servicios prestados.

Gracias a mis “compañeros de inglés” analíticos: Águeda y Roberto. Especialmente Águeda por tu amistad estos años, compartiendo todas nuestras penurias y dramas junto alguna que otra



risa y cerveza. Poca gente es tan positiva y resolutiva frente a las adversidades y da ánimos como tú.

Gracias a mis dos “bristoleñas” favoritas: Olatz y Yoli. Sin vosotras mi estancia en Bristol hubiese sido mucho más aburrida y deprimente, muchas gracias por todas las risas, pelis, excursiones y vivencias que hemos tenido.

Desde pequeñito siempre decía las palabras: “de mayor quiero ser científico”. Es por esto por lo que agradezco a todos los profesores que he tenido y que siempre me han animado a continuar con esta vocación. Especialmente, quiero agradecer a las profesoras M<sup>a</sup> Dolores Prieto y Ana Sánchez Pina de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense por permitirme meterme en sus laboratorios en primero de carrera y mostrarme “de qué iba todo esto”. Junto a ellas a las profesoras M<sup>a</sup> José Hernáiz-Dégano, Pilar Hoyos y al resto de miembros del Grupo de Biotransformaciones de la UCM por los dos años que pasé en sus laboratorios introduciéndome en la investigación. Del mismo modo, quiero agradecer a las profesoras Mónica Söllhuber y Mercedes Villacampa que despertaron mi interés y fascinación por la asignatura de Química Farmacéutica y que me motivó a elegir esta disciplina para el futuro desarrollo de mi carrera investigadora.

Gracias a Rosa Álvarez, mi tutora durante mi estancia en el CNIO por enseñarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio de química orgánica, que “es mejor cristalizar que columnar” y por preocuparse por mi futuro en el mundillo una vez acabase allí. Agradezco a la Dra. Marta Gutiérrez su tutela y cercanía durante todo mi “TFM” y permitirme conocer cómo se trabaja en el CSIC y embarcarme en un proyecto multidisciplinar usando química, docking, y SPR. También a la Dra. Mercedes Martín por las tardes que pasamos en el “zulo” mientras me enseñaba a “dockear” miles de diseños.

Gracias a todos mis amigos y amigas fuera de Alcalá por entender cuando les decía: “al final no llego”, “llegaré tarde” o “perdona tengo que acabar unas cosillas”. Especialmente, gracias a Iziar y su ayuda con las cartas a Mulholland, a Almudena por haber estado siempre ahí o a Alejandro por haberme ayudado a desconectar y echarme una mano con la ortografía.

Finalmente tengo que dar las gracias a toda mi familia por el enorme apoyo que me han dado estos años. A papá y a mamá por aguantar mi difícil humor cuando llegaba a las mil de la noche a casa y me ponía delante del ordenador a seguir trabajando, a mi hermano, a mis tíos y a mis primos. Especialmente a mi abuelo “Vantito” que estoy seguro de que le habría encantado y se sentiría enormemente orgulloso de poder ver esta tesis y como me hago doctor.

A todos vosotros y a los demás,

Muchas gracias





# 1. ÍNDICE

---

2.	Glosario de siglas y abreviaturas.....	1
3.	Summary .....	6
4.	Inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B .....	9
4.1	Introducción .....	10
4.1.1	Aspectos generales de la diabetes <i>mellitus</i> .....	11
4.1.2	Tratamiento de la diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 .....	14
4.1.3	La proteína tirosina fosfatasa 1B.....	16
4.1.4	Antecedentes: Inhibidores de la PTP1B .....	25
4.2	Antecedentes y objetivos.....	34
4.4	Discusión de resultados.....	37
4.4.1	Síntesis y estudio de los inhibidores cabeza de serie.....	38
4.4.2	Síntesis de derivados en las posiciones C-4 y N-5 .....	41
4.4.3	Síntesis de azoloquinoxalinas.....	44
4.4.4	Actividad biológica .....	52
4.4.5	Estudios de docking.....	66
4.5	Research stay at the University of Bristol .....	74
4.6	Conclusiones.....	89
4.7	Experimental procedures .....	92
4.7.1	Chemistry .....	93
4.7.2	Biology.....	112
4.7.3	Computational methods .....	115
5.	Moduladores de la quinasa ligada a integrinas.....	120
5.1	Introducción .....	121
5.1.1	La matriz extracelular y las adhesiones focales .....	122
5.1.2	La quinasa ligada a integrinas .....	124
5.1.3	La ILK como potencial diana terapéutica. ....	130

5.2	Antecedentes y objetivos.....	136
5.3	Discusión de resultados.....	139
5.3.1	Estudio <i>in silico</i> de la interfaz de dimerización de la ILK con $\alpha$ -parvina.....	140
5.3.2	Tripéptidos epitópicos de la $\alpha$ -parvina .....	147
5.3.3	Heptapéptidos moduladores de la ILK.....	169
5.4	Conclusiones.....	192
5.5	Experimental procedures .....	194
5.5.1	Chemistry .....	195
5.5.2	Surface plasmon resonance experiments.....	224
5.5.3	Biology.....	224
5.5.4	Computational methods .....	226
6.	General conclusions .....	230

## 2. GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

---

Durante la redacción de la presente tesis se han empleado las abreviaturas y acrónimos recomendados por la *American Chemical Society* para el área de química orgánica, revisadas en las revistas *Journal of Organic Chemistry* y *Journal of Medicinal Chemistry*. Aquellos términos sin traducción en castellano se han empleado en inglés y se encuentran en cursivas. Para aquellas abreviaturas y siglas en la que la traducción tampoco haya sido posible, ésta proviene de su escritura en lengua inglesa.

Así mismo, se han empleado los términos y definiciones recomendados por el glosario publicado por la IUPAC para el área de química médica.<sup>1</sup>

Para nombrar los aminoácidos se ha utilizado el sistema de código de una letra y de tres letras recomendado por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica de la IUPAC.<sup>2</sup> Todos los aminoácidos pertenecen a la serie natural L. El extremo del péptido con grupo amino libre (o no) se denomina *N*-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina *C*-terminal. La representación gráfica de los mismos, así como su nomenclatura, comienza por el residuo *N*-terminal, seguido de los aminoácidos en orden hasta finalizar en el residuo *C*-terminal.

Con el fin de simplificar el proceso de publicación de los resultados en revistas internacionales se ha hecho uso de la puntuación inglesa en la numeración, empleándose este sistema en la parte experimental de la memoria de la tesis doctoral. Las cifras decimales se encuentran indicadas con puntos en lugar de comas, hecho aceptado por la Real Academia Española en su *Ortografía de la Lengua española* (2010).

---

<sup>1</sup> Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. *Pure and Applied Chemistry* **1998**, 1129.

<sup>2</sup> IUPAC *European Journal of Biochemistry* **1984**, 1, 9-37.

## Abreviaturas

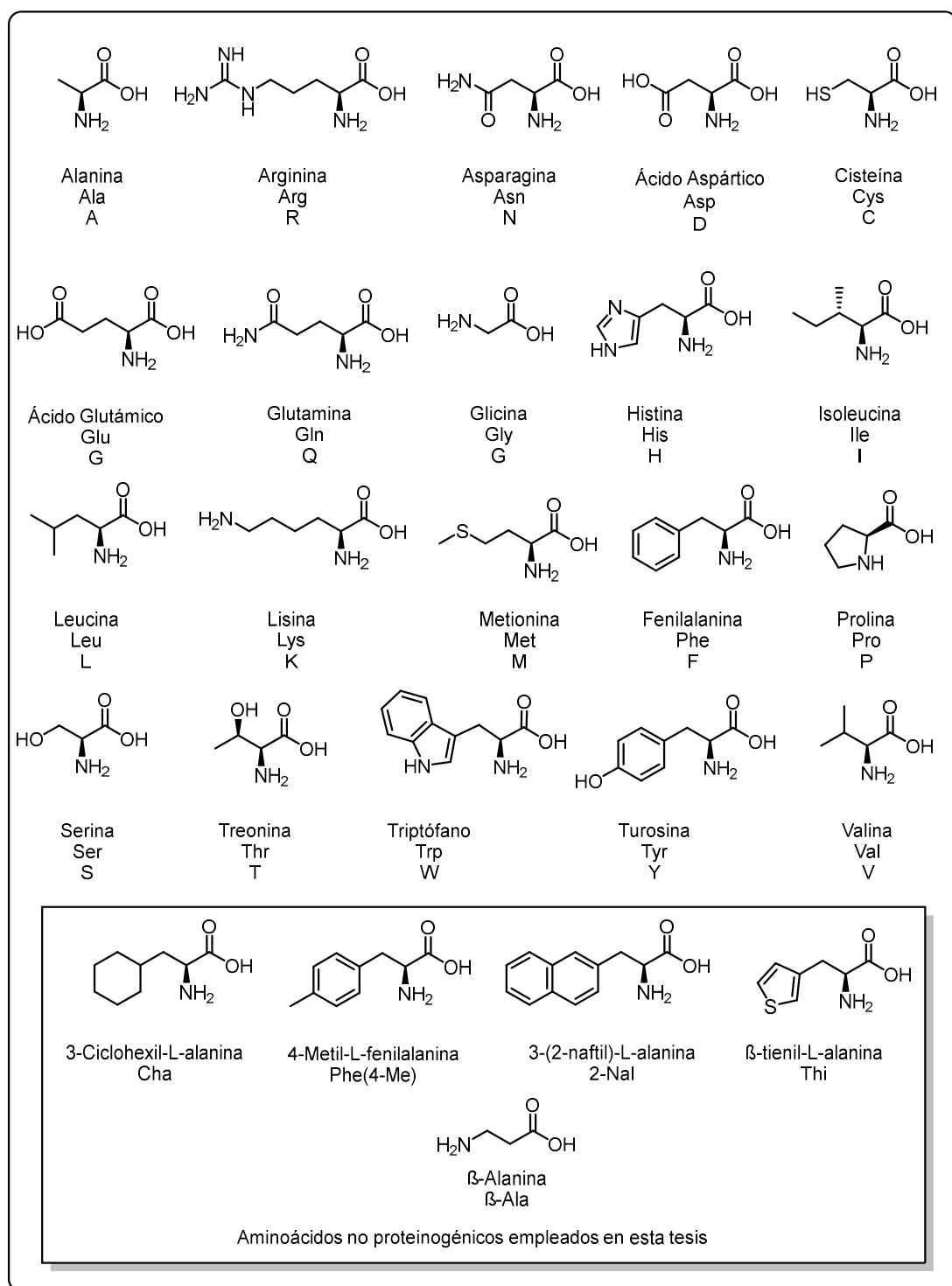
<sup>13</sup> C-NMR	Resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C ( <i><sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance</i> )
aa	Aminoácido ( <i>Amino acid</i> )
Å	Angström
Ac	Acetilo ( <i>Acetyl</i> )
AcOH	Ácido acético ( <i>Acetic acid</i> )
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
Akt	Proteína quinasa B ( <i>Protein kinase B</i> )
AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
Aq	Acuosa ( <i>aqueous</i> )
ARN	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero ( <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
ATP	Trifosfato de adenosina ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
Bn	Bencilo ( <i>Benzyl</i> )
Bu	Butilo ( <i>Butyl</i> )
CKD	<i>Cronic Kidney Disease</i>
clogP	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua calculado
CMH	Células Mesangiales Humanas ( <i>Human mesangial cells, HMC</i> )
δ	Desplazamiento químico, en ppm ( <i>Chemical shift, in ppm</i> )
DCM	Diclorometano ( <i>Dichloromethane</i> )
DE	Desviación estándar
DIC	Diisopropilcarbodiimida ( <i>N,N'-Diisopropylcarbodiimide</i> )
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina ( <i>N,N'-Diisopropylethylamine</i> )
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida ( <i>N,N-Dimethylformamide</i> )
DMSO	Dimetil sulfóxido ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
DPP-IV	Dipeptidil peptidasa 4 o adenosina desaminasa proteína acompañante 2
Dr/Dra	Doctor/a
DTT	Ditiotreitol ( <i>1,4-dithiothreitol</i> )
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (latín); y colaboradores ( <i>and coworkers</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EtOH	Etanol ( <i>Ethanol</i> )
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina ( <i>Triethylamine</i> )
Equiv	Equivalente(s)
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ESI	Ionización por Electrospray ( <i>Epectrospray Ionization</i> )
EtOAc	Acetato de etilo ( <i>Ethyl Acetate</i> )
FEP	Free energy perturbation
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonilo ( <i>Fluorenylmethyloxycarbonyl</i> )
gHSQC	<i>Gradient Heteronuclear Single Bond Correlation</i>
gHMBC	<i>Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
GSK	Glucógeno sintasa quinasa 3β ( <i>Glycogen synthase kinase 3β</i> )
h	Horas ( <i>Hours</i> )
HATU	<i>1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxide hexafluorophosphate</i>
Hex	Hexano ( <i>Hexane</i> )
HCTU	<i>2-(6-Chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate</i>



HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol ( <i>1-Hydroxy-7-azabenzotriazole</i> )
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución ( <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> )
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1 ( <i>Glucagon-like peptide 1</i> )
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50, ( <i>Inhibitory Concentration 50</i> )
ILK	Quinasa ligada a integrinas ( <i>Integrin Linked Kinase</i> )
KILK	Dominio quinasa de ILK ( <i>ILK kinase domain</i> )
IS	Índice de Selectividad ( <i>Selectivity index</i> )
J	Julios
μL	Microlitro ( <i>Microlitre</i> )
μM	Micromolar
IRS	Sustrato del Receptor de Insulina ( <i>Insuline Receptor Substrate</i> )
kDa	KiloDalton
m	Multiplete ( <i>Multiplet</i> )
M	Molaridad ( <i>Molarity</i> )
MD	Dinámica molecular ( <i>Molecular Dynamics</i> )
Me	Metilo ( <i>Methyl</i> )
mg	Miligramos ( <i>Miligrams</i> )
MHz	Megahercios ( <i>Megahertz</i> )
min	Minutos ( <i>Minutes</i> )
mL	Mililitros ( <i>Mililitres</i> )
mM	Milimolar ( <i>Millimolar</i> )
MM	Mecánica Molecular ( <i>Molecular Mechanics</i> )
mmol	Milimoles ( <i>Millimole</i> )
M.p.	Punto de fusión ( <i>Melting point</i> )
MSTS	Mesitilenosulfonato
MW	Microondas ( <i>Microwave irradiation</i> )
nM	Nanomolar
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<i>p</i> -	Sustituyente en posición <i>para</i> ( <i>para substituent</i> )
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (también para los archivos depositados con este formato)
P.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo ( <i>Phenyl</i> )
PINCH	<i>Particularly interesting new cysteine-histidine-rich protein</i>
pNPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenol ( <i>p-Nitrophenylphosphate</i> )
ppm	Partes por millón ( <i>Parts-per-million</i> )
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B ( <i>Protein Tyrosine Phosphatase 1B</i> )
QM	Mecánica cuántica ( <i>Quantum Mechanics</i> )
REDinREN	RED de INVESTIGACIÓN RENAL ( <i>Kidney Research Network</i> )
rpm	Revoluciones por minuto ( <i>revolution per minute</i> )
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root-Mean-Square Fluctuation</i>
rt	Temperatura ambiente ( <i>Room temperature</i> )
Rto	Rendimiento ( <i>Yield</i> )
SGLT-2	Cotransportador 2 de sodio-glucosa
SHP-2	<i>Src Homology Region 2 Domain-containing Phosphatase-2</i>
S <sub>E</sub> Ar	Sustitución electrofílica aromática ( <i>Electrophilic aromatic substitution</i> )
S <sub>N</sub> Ar	Sustitución nucleofílica aromática ( <i>Nucleophilic aromatic substitution</i> )
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida ( <i>Solid-Phase Peptide Synthesis</i> )
SPR	Resonancia de plasmón de superficie ( <i>Surface Plasmon Resonance</i> )
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
tBu	Terc-Butilo ( <i>tert-butyl</i> )

TCPTP	Proteína tirosina fosfatasa de linfocitos T ( <i>T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase</i> )
TFA	Ácido trifluoroacético ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )
THF	Tetrahidrofurano ( <i>Tetrahydrofuran</i> )
TI	Thermodynamic Integration
TIPS	Triisopropilsilano ( <i>Triisopropylsilane</i> )
Trt	Tritilo ( <i>Trityl</i> )
UV	Ultravioleta-visible ( <i>Ultraviolet-visible</i> )

## Aminoácidos



### 3. SUMMARY

---

The research group joined in 2011 to one of the NETWORKS (RETICS) promoted by the Spanish Instituto de Salud Carlos III, REDinREN. The role of our research group in this network is to contribute to the search for new compounds that could be of interest for new and relevant targets involved in the development and progression of Chronic Kidney Disease (CKD).

The present thesis has been focused on the application of medicinal and biological chemistry approaches for the treatment of CKD. This is one of the most important contributors to morbidity and mortality of non-transmissible diseases.<sup>3</sup> This term collects several disorders affecting kidney structure and function, generally glomerular filtration rate  $60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  or albuminuria  $\geq 30 \text{ mg per 24 hours}$ ) for more than 3 months.<sup>4</sup> In the late stages, it produces the kidney failure or end-stage renal disease, which requires renal replacement therapy. During 2017, the global prevalence of CKD was 9.1% which is about 700 million cases, and since 1990, its prevalence has increased by 29.3%, especially in elderly population of developed countries. Furthermore, it remains among the growing causes of mortality which made CKD the 13th leading cause of death in 2013.<sup>5</sup> Moreover, it supposes a big burden for current health care systems. As an example, those patients treated through renal replacement therapy consume more than the 5% of health care budgets. Nowadays the origin of CKD is unknown, but the main causes are: diabetes *mellitus* type II (44%), followed by hypertension (28%) and other non-related and idiopathic causes. Despite of this scenario, there is no pharmacological treatment for this disease. Only canagliflozin (an SGLT2 inhibitor) of Janssen laboratories has entered in Phase II Clinical Trials to reduce the risk of end-stage kidney disease in an attempt of drug-repurposing. Then, in this context this thesis has followed different approaches to get new outcomes for the treatment or the study of this disease.

Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) has been claimed as a promising target for diabetes *mellitus* type II, and its inhibition may be the best approach for the treatment of CKD. Despite the wide variety of PTP1B inhibitors described in the literature, just only allosteric inhibitors have reached clinical trials. In our research group, the scaffold pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline was identified as inhibitor of PTP1B in a collaboration with Servier Laboratories. In this context, during the first chapter, different positions of this scaffold were explored in order to improve

---

<sup>3</sup> Webster, A. C.; Nagler, E. V.; Morton, R. L.; Masson, P. *The Lancet* **2017**, *10075*, 1238-1252.

<sup>4</sup> Chen, T. K.; Knicely, D. H.; Grams, M. E. *JAMA* **2019**, *13*, 1294-1304.

<sup>5</sup> Cockwell, P.; Fisher, L. *The Lancet* **2020**, *10225*, 662-664.

the potency and/or physicochemical properties. Then, *in vitro* activity was determined for new and previously prepared compounds in order to identify the most interesting ones. Moreover, computational methods have been employed to explain the behaviour and/or activity observed for the different series of compounds.

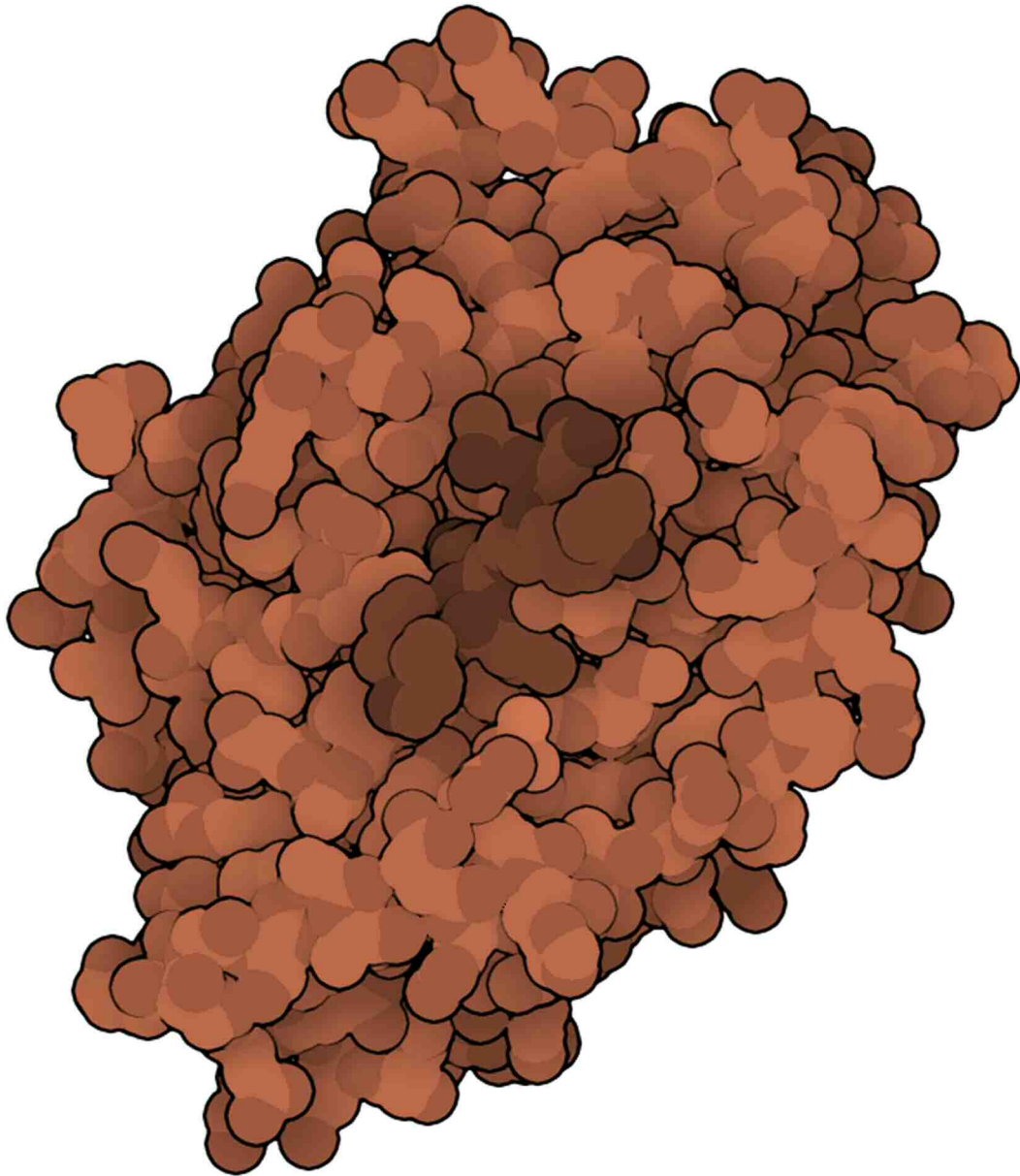
During the pre-doctoral research stay at the University of Bristol, computational approaches, mainly molecular dynamics and Water Swap free energy methods, were also tested on selected compounds with the aim of shedding some light onto the experimentally observed results.

Regarding the second chapter of this work, the novel target ILK was explored. This is a protein which in recent years has been tightly related to chronic kidney disease and kidney function in several studies. ILK regulates processes such as renal fibrosis, kidney development or immune response in kidney. In the last decade this enzyme was proposed as a new cancer target, however its role in kidney disease remains unclear. An approach non-explored before was carried out to design new molecules based on its protein-protein interaction with  $\alpha$ -parvin. Following an *in silico* proposal, different series of peptides were synthesized and tested in different experiments in order to obtain new tools for the study of this protein.



## 4. INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B

---



## 4.1 INTRODUCCIÓN

---





#### 4.1.1 Aspectos generales de la diabetes *mellitus*

En el último siglo, los avances en la calidad de vida y los sistemas de salud han conducido a un incremento de la esperanza de vida, especialmente en los países más desarrollados. No obstante, esta transformación ha traído consigo la aparición y aumento en la prevalencia de enfermedades metabólicas tales como la diabetes *mellitus*.

La “diabetes *mellitus*” (DM) es una patología que engloba aquellas alteraciones metabólicas, independientemente de su etiología, que cursan con una hiperglucemia crónica y trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas. Éste es el resultado de un defecto en los sistemas de producción/liberación de insulina o de una falta de eficacia de la misma en el organismo.

La DM es una enfermedad de carácter crónico que afecta a un elevado número de personas en el mundo y cuyas principales complicaciones vienen derivadas de los altos niveles de glucosa a los que se expone el cuerpo durante largos períodos de tiempo.

Atendiendo a las bases fisiopatológicas de la enfermedad, ésta se clasifica en tres tipos principales:<sup>6</sup>

1. Diabetes *mellitus* tipo I o insulino-dependiente: Es aquella que afecta a la población joven la cual no produce suficiente insulina y en consecuencia requieren de su administración externa.
2. Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) o insulino-independiente: Está caracterizada por una producción insuficiente de insulina o su falta de eficacia. Se trata de la variedad más frecuente y que afecta principalmente a personas en la de edad adulta.
3. Diabetes Gestacional: Se caracteriza por una hiperglucemia iniciada durante el embarazo.

Aunque existen algunas variedades menos prevalentes (diabetes neonatal o diabetes tipo MODY), la DM2 es sin duda la más importante de todas, ya que afecta a un 90% de los individuos diagnosticados con esta enfermedad.

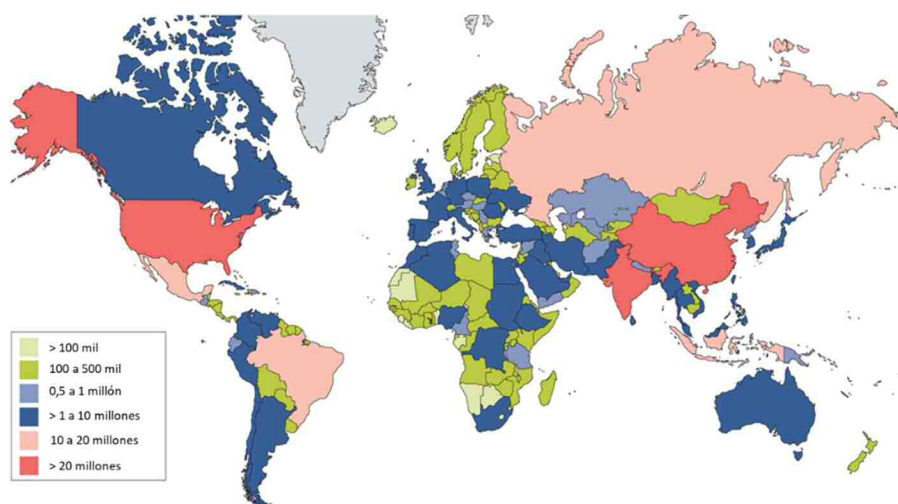
La DM2 está directamente asociada con el desarrollo de comorbilidades y complicaciones crónicas y agudas. Mientras que las complicaciones agudas incluyen la hiperglucemia o la cetoacidosis metabólica, entre otras, son las complicaciones crónicas las responsables de la mayor morbimortalidad asociada a este síndrome. Así pues, es común que los afectados por la

---

<sup>6</sup> Artola-Menéndez, S. *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad* 2012, 1-108.

DM2 desarrollen complicaciones microvasculares incluyendo la retinopatía diabética, neuropatía y nefropatía diabética (la cual conduce al desarrollo de enfermedad renal crónica) o glomerulonefritis intersticial. Por otro lado, las complicaciones macrovasculares, más severas a largo plazo incluyen la cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, síndrome metabólico o hipertensión arterial.<sup>7</sup>

Las cifras de afectados por la DM2 aumentan cada año y, realmente, son alarmantes, especialmente en los países desarrollados, donde ha aumentado significativamente en las últimas décadas (Figura 1). El *Informe mundial sobre la diabetes*, publicado por la OMS en 2016 cifra en más de 422 millones de adultos afectados por diabetes en 2014 en comparación a los 108 millones de 1980.<sup>8</sup> Estas alarmantes cifras muestran la tendencia al aumento de esta patología en lo que llevamos del siglo. Los resultados de la primera fase del estudio Di@bet.es mostraron cómo en España un 13.8% de la población se encuentra afectada por la DM2, de la cual, más de la mitad desconocía esta situación.<sup>9</sup>



**Figura 1.** Estimación del número total de adultos con DM2. Figura adaptada de Zheng, Y. et al. (2017).<sup>10</sup>

A pesar de que el origen de la DM2 no se conoce con exactitud, los avances epidemiológicos de las últimas décadas han permitido identificar los factores de riesgo más relevantes para su aparición. Los determinantes de la DM2 son el resultado de una conjunción de factores

<sup>7</sup> Alberti, K. G. M. M.; Zimmet, P. Z. *Diabetic Medicine* **1998**, *7*, 539-553.

<sup>8</sup> World Health Organization, author, issuing body *Global report on diabetes / World Health Organization*; 2016.

<sup>9</sup> Soriguer, F.; Goday, A.; Bosch-Comas, A.; Bordiú, E.; Calle-Pascual, A.; Carmena, R.; Casamitjana, R.; Castaño, L.; Castell, C.; Catalá, M.; Delgado, E.; Franch, J.; Gaztambide, S.; Gibés, J.; Gomis, R.; Gutiérrez, G.; López-Alba, A.; Martínez-Larrad, M. T.; Menéndez, E.; Mora-Peces, I.; Ortega, E.; Pascual-Manich, G.; Rojo-Martínez, G.; Serrano-Rios, M.; Valdés, S.; Vázquez, J. A.; Vendrell, J. *Diabetologia* **2012**, *1*, 88-93.

genéticos, epigenéticos y ambientales, y aunque cada individuo presenta distinta predisposición al desarrollo de la enfermedad, el estilo de vida ha demostrado ser uno de los más importantes.<sup>10</sup> El sobrepeso es sin duda el mayor factor de riesgo para el desarrollo de DM2, sin embargo, a éste se le unen otros como el síndrome metabólico, un estilo de vida sedentario o la ingesta de alcohol y tabaco. Existen también, otros factores menos modificables y donde la intervención terapéutica directa no es posible como la etnia, la edad, o el historial familiar previo de DM2.<sup>11</sup>

---

<sup>10</sup> Zheng, Y.; Ley, S. H.; Hu, F. B. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *2*, 88-98.

<sup>11</sup> Serrano Ríos, M., ed *Type 2 diabetes mellitus*; Elsevier: Barcelona [etc.] (sp), 2015.

### 4.1.2 Tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo 2

En la actualidad, el tratamiento de la DM2 supone distintas intervenciones con el fin de mantener los niveles de glucemia tan próximos como sea posible a los de aquellos individuos no diabéticos. Por un lado, la intervención primaria engloba aquellas medidas como una dieta saludable y el ejercicio físico, las cuales son además factores preventivos. La intervención secundaria comprende aquellas medidas que buscan normalizar los niveles de glucosa sanguínea a través de tratamientos farmacológicos.

Los fármacos clásicos comercializados en España para el tratamiento de la DM2 tienen como objetivo aumentar los niveles de insulina plasmáticos y/o aumentar la sensibilidad a la misma en los tejidos periféricos del organismo (Tabla 1). Sin embargo, en los últimos años se han unido a este grupo otros agentes terapéuticos como los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas o del cotransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2) que buscan disminuir los niveles de los carbohidratos más simples y monosacáridos.<sup>12</sup>

Si bien el arsenal terapéutico disponible en la actualidad es amplio, todos estos fármacos cuentan con importantes efectos adversos que eventualmente limitan su aplicación en el paciente. A modo de ejemplo, las meglitinidas y sulfonilureas se asocian con ganancia de peso y con episodios de hipoglucemia, mientras que los inhibidores de DPP-4 pueden causar reacciones alérgicas y la metformina puede producir diarrea y distensión abdominal.<sup>13</sup>

Del mismo modo, las terapias clásicas siguen sin solventar algunos de los problemas asociados a la DM2 como son la reducción de la sensibilidad a la glucosa en células  $\beta$ -pancreáticas, la pérdida de estas o la pérdida de eficacia de la insulina entre otros.<sup>14</sup>

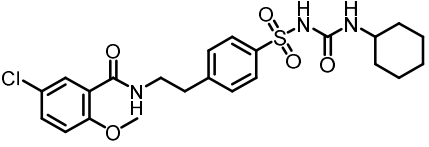
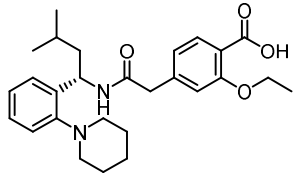
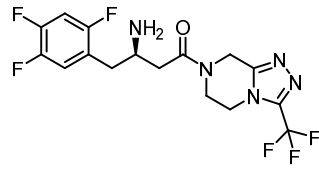
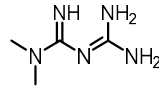
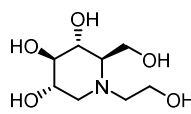
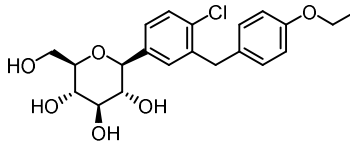
---

<sup>12</sup> Gomez-Peralta, F.; Escalada San Martín, Francisco Javier; Menéndez Torre, E.; Mata Cases, M.; Ferrer García, J. C.; Ezkurra Loiola, P.; Ávila Lachica, L.; Fornos Pérez, J. A.; Artola Menéndez, S.; Álvarez-Guisasola, F.; Rica Echevarría, I.; Girbés Borrás, J. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición* **2018**, *10*, 611-624.

<sup>13</sup> Serrano Ríos, M., ed *Type 2 diabetes mellitus*; Elsevier: Barcelona [etc.] (sp), 2015.

<sup>14</sup> Verspohl, E. J. *Pharmacol Rev* **2012**, *2*, 188-237.

**Tabla 1.** Grupos terapéuticos aprobados actualmente en España para el tratamiento de la DM2.

Grupo terapéutico	Diana farmacológica	Estructura
<b>Secretagogos</b>		
Sulfonilureas	Receptor de sulfonilureas	<p style="text-align: center;">Glibenclamida</p> 
Meglitinidas	Canal K-ATP	<p style="text-align: center;">Repaglinida</p> 
Análogos y miméticos del péptido similar al glucagón-1 (GPL-1)	Receptor GLP-1	<p style="text-align: center;">Exenatida</p> <p style="text-align: center;">H<sub>2</sub>N-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub></p>
Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-IV (gliptinas)	Dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV)	<p style="text-align: center;">Sitagliptina</p> 
<b>Sensibilizadores a la insulina</b>		
Biguanidas (metformina)	Desconocida	
<b>Otros</b>		
Insulina	Receptor de insulina	
Inhibidores de α-glicosidasas	α-Glicosidasas	<p style="text-align: center;">Miglitol</p> 
Inhibidores de SGLT2	SGLT2	<p style="text-align: center;">Dapaglifozina</p> 

Es por esta razón que la búsqueda de nuevos antidiabéticos orales continúa siendo un campo de investigación amplio y muy actual, tanto en la industria farmacéutica como en los grupos académicos.

### 4.1.3 La proteína tirosina fosfatasa 1B

La fosforilación reversible de los residuos de tirosina presentes en las proteínas constituye uno de los mecanismos más ubicuos e importantes de señalización celular y de regulación de la expresión génica en eucariotas.<sup>15</sup> Además, el control del equilibrio entre los mecanismos de fosforilación catalizados por proteínas quinasas y desfosforilación catalizados por proteínas fosfatasa es el responsable del correcto funcionamiento de numerosos procesos celulares. La alteración y aberraciones en este balance conducen a estados patológicos como el desarrollo de neoplasias, alteraciones durante la embriogénesis o deficiencias inmunitarias. No obstante, la capacidad de modular este balance selectivamente también supone una fuente de enorme potencial para el desarrollo de nuevos fármacos.

En los últimos 30 años las proteínas quinasas han constituido una diana sumamente atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos. Prueba de ello es el gran número de moléculas aprobadas y actualmente comercializadas que tienen como diana farmacológica alguna proteína quinasa.<sup>16</sup> En contraste, existen menos resultados de investigación acerca de las proteínas tirosina fosfatasa. Esto se debe en parte a su potencial menor *druggability* y a la dificultad de conseguir fármacos selectivos, ya que el genoma humano codifica más de 600 quinasas y sólo 125 fosfatasa.<sup>17</sup> A pesar de ello, en los últimos años se ha empezado a explotar el potencial terapéutico de esta nueva clase de diana. Concretamente, la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B ha emergido como la diana terapéutica fosfatasa más importante y prometedora.

---

<sup>15</sup> Fahs, S.; Lujan, P.; Köhn, M. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2944-2961.

<sup>16</sup> Ferguson, F. M.; Gray, N. S. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2018**, *5*, 353-377.

<sup>17</sup> Hale, A. J.; ter Steege, E.; den Hertog, J. *Dev. Biol.* **2017**, *2*, 283-292.

#### 4.1.3.1 Estructura y funcionamiento

La Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B) o Proteína Tirosina Fosfatasa No-Receptora tipo 1 fue la primera fosfatasa en ser aislada de manera homogénea a partir de placenta humana por Tonks y colaboradores en 1988, 10 años después de la primera proteína quinasa.<sup>18</sup> Ésta es una proteína de 37 kDa constituida principalmente por un dominio catalítico, sin embargo, *in vivo* la enzima presenta 453 aminoácidos, un peso molecular de 50 kDa y dos dominios, uno catalítico y otro de regulación. En su extremo C-terminal, la PTP1B cuenta con una cola de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos de tal forma que esta extensión del segmento regulador permite su anclaje a membranas celulares, especialmente en la cara citosólica del retículo endoplásmico.<sup>19</sup>

El dominio catalítico y más conservado entre otras fosfatasas es el que comprende los aminoácidos 30 a 278, mientras que los siguientes 122 aminoácidos previos al extremo C-terminal son predominantemente de naturaleza hidrofílica y contienen posiciones de fosforilación de serinas y treoninas que permiten la regulación de la actividad enzimática de la proteína. En la actualidad, para estudios bioquímicos y biofísicos *in vitro* se utiliza una PTP1B recombinante truncada o “corta” y catalíticamente activa constituida por los aminoácidos 1 a 321.<sup>20</sup>

Es el dominio catalítico de la PTP1B el encargado de la desfosforilación de los residuos de fosfotirosina del receptor de insulina y de otros sustratos relacionados. Este dominio se encuentra organizado en 8  $\alpha$ -hélices y 12 láminas  $\beta$ . Además, al igual que el resto de los miembros de la superfamilia de fosfatasas, la PTP1B presenta una secuencia altamente conservada en el motivo His-Cys-X-Ala-Gly-X-X-Arg-Ser/Thr-Gly. Esta secuencia donde se encuentra la Cys215 y la Arg221, que juegan un papel fundamental en la catálisis enzimática, recibe el nombre de bucle P. A este motivo se le une la secuencia catalítica Trp-Pro-Asp, también conocida como bucle WPD (Trp179-Pro180-Asp181) y altamente conservada tanto en eucariotas como procariontes la cual se encarga de funcionar a modo de puerta de la garganta catalítica.<sup>21</sup> Muy próximo a estos dos bucles se encuentra una secuencia que comprende los residuos 259 a 263 donde se encuentra el residuo de Gln262 encargado de coordinar una molécula de agua durante el ciclo catalítico y que recibe el nombre de bucle Q. Los aminoácidos Tyr45, Arg46 y

---

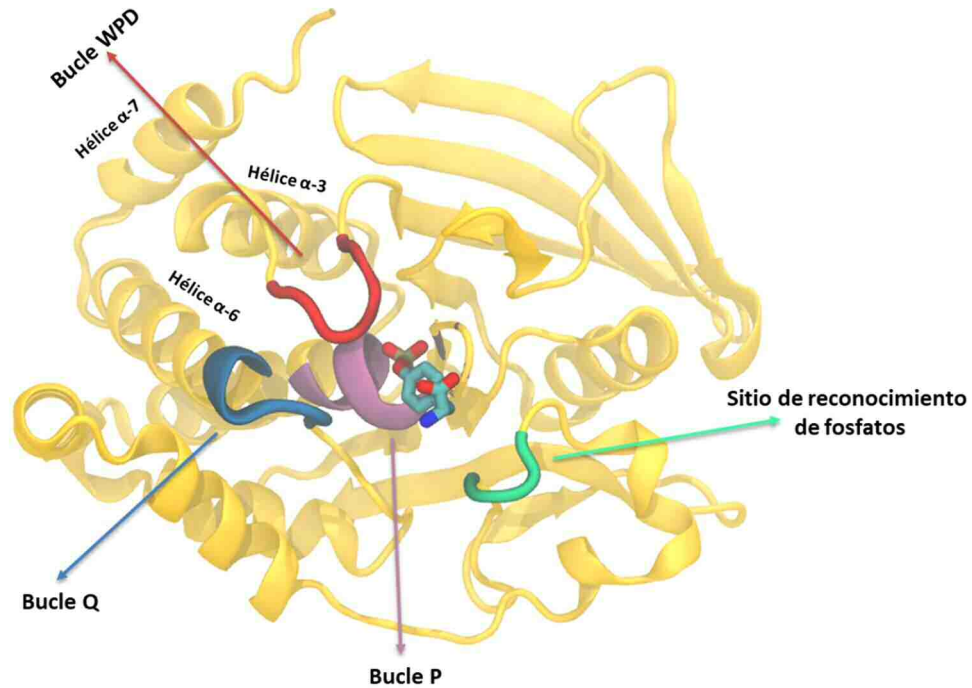
<sup>18</sup> Tonks, N. K.; Diltz, C. D.; Fischer, E. H. *J. Biol. Chem.* **1988**, *14*, 6722-6730.

<sup>19</sup> Barford, D.; Flint, A. J.; Tonks, N. K. *Science* **1994**, *5152*, 1397-1404.

<sup>20</sup> Keedy, D. A.; Hill, Z. B.; Biel, J. T.; Kang, E.; Rettenmaier, T. J.; Brandão-Neto, J.; Pearce, N. M.; von Delft, F.; Wells, J. A.; Fraser, J. S. *eLife* **2018**.

<sup>21</sup> Li, S.; Zhang, J.; Lu, S.; Huang, W.; Geng, L.; Shen, Q.; Zhang, J. *PLoS one* **2014**, *5*, e97668.

Asp47 forman parte del bucle o segmento de reconocimiento del grupo fosfotirosina y son encargados de orientar este grupo de forma adecuada en la cavidad catalítica.



**Figura 2.** Estructura tridimensional de la PTP1B (PDB:1PTY) representada en forma de "cartoons" en complejo con una molécula de fosfotirosina en "sticks".

Estudios cristalográficos posteriores a la determinación de la primera estructura cristalina de la PTP1B demostraron que existía un segundo sitio de reconocimiento de fosfatos, catalíticamente inactivo, pero que establece suficientes interacciones como para unir residuos de fosfotirosina y que durante mucho tiempo supuso un punto clave para el diseño de inhibidores de la PTP1B más potentes.<sup>22</sup>

El mecanismo catalítico de las fosfatasas dependientes de cisteína, como la PTP1B, tiene lugar a través de un mecanismo de tipo *ping-pong* en dos etapas que se sustenta en la relativamente buena nucleofilia del grupo tiol del residuo de Cys215 (Figura 2).<sup>23</sup> Este mecanismo tiene como paso clave la formación de un intermedio de tipo éster fosfato de tiol en el transcurso del ciclo catalítico. Durante la primera etapa tiene lugar el ataque nucleofílico de la Cys215 del bucle P sobre el éster fosfato del sustrato que es estabilizado por coordinación con la Arg221. Al mismo tiempo, el bucle WPD pasa a una conformación "cerrada" de tal modo que el resto Asp181 se

<sup>22</sup> Puius, Y. A.; Zhao, Y.; Sullivan, M.; Lawrence, D. S.; Almo, S. C.; Zhang, Z. *PNAS* **1997**, *25*, 13420-13425.

<sup>23</sup> Brandão, T. A. S.; Hengge, A. C.; Johnson, S. J. *J. Biol. Chem.* **2010**, *21*, 15874-15883.



mueve aproximadamente 9 Å de su posición inicial y es capaz de donar el protón necesario para que se libere la peptidil-tirosina como grupo saliente. En la segunda etapa, tiene lugar el ataque de una molécula de agua sobre el complejo de Michaelis. Esta molécula es activada por el Asp181 que actúa a modo de base y favorece la hidrólisis del aducto, liberando fosfato al medio y regenerando el sitio activo de la enzima. Existen numerosos estudios que sugieren que el esqueleto peptídico de todos los bucles implicados en la catálisis juega también un papel importante coordinando los sustratos y la molécula de agua durante el proceso catalítico.<sup>24</sup>

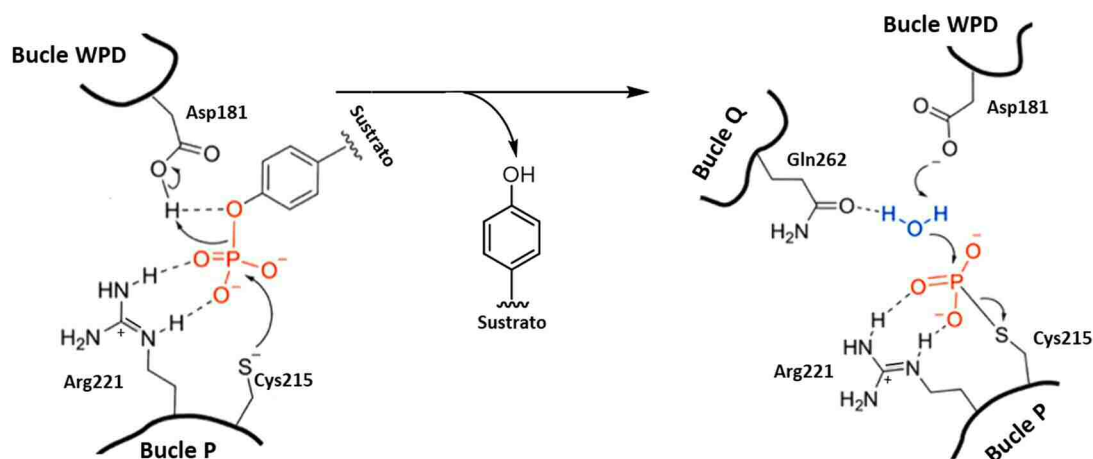


Figura 3. Esquema simplificado del mecanismo catalítico en dos etapas de PTP1B.

A parte de todas estas regiones altamente conservadas que participan en el proceso catalítico, se han descrito más zonas de unión de inhibidores a la PTP1B rodeando el centro activo. Si bien estos sitios carecen de actividad enzimática *per se*, juegan un papel muy importante en el diseño de fármacos selectivos dirigidos a esta diana.

El primer sitio corresponde al centro activo (sitio A), mientras que el segundo sitio de reconocimiento de fosfatos o sitio B lo constituyen los residuos Arg24, Cys32, Phe52, Met258 y Arg254. Existe un sitio C que se encuentra mucho más expuesto al disolvente y bastante plano donde los residuos claves son Lys41 y Arg47.<sup>25</sup> Finalmente se puede encontrar un sitio D que carece de relevancia biológica pero que ha sido explorado con éxito en el diseño de inhibidores más potentes pues se trata de un pequeño bolsillo hundido en la superficie de la PTP1B y lo constituyen los residuos Tyr46, Glu115, Lys120, Asp181 y Ser216.<sup>26</sup>

<sup>24</sup> Kolmodin, K.; Åqvist, J. *FEBS Letters* **2001**, *2*, 208-213.

<sup>25</sup> Li, X.; Wang, L.; Shi, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *16*, 3343-3352

<sup>26</sup> Ala, P. J.; Gonnevillie, L.; Hillman, M.; Becker-Pasha, M.; Yue, E. W.; Douty, B.; Wayland, B.; Polam, P.; Crawley, M. L.; McLaughlin, E.; Sparks, R. B.; Glass, B.; Takvorian, A.; Combs, A. P.; Burn, T. C.; Hollis, G. F.; Wynn, R. *J. Biol. Chem.* **2006**, *49*, 38013-38021.

La actividad enzimática de la mayoría de las enzimas se encuentra finamente regulada en el organismo a través de mediadores endógenos capaces de unirse a sitios alostéricos. Estas zonas, alejadas del centro activo de la enzima, son capaces de desencadenar un cambio conformacional en la proteína, de tal modo que se modula la afinidad por el sustrato endógeno.

En el año 2004, Wiesmann y colaboradores describieron los primeros moduladores alostéricos de la PTP1B.<sup>27</sup> Los estudios cristalográficos permitieron identificar una cavidad comprendida entre las hélices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -6 y  $\alpha$ -7 que se encuentra situada aproximadamente a 20 Å del centro activo. Este sitio no existe como tal en la proteína, sino que se forma cuando una molécula es capaz de desplazar el residuo Trp291 de la hélice  $\alpha$ -7 de tal modo que las hélices  $\alpha$ -3 y  $\alpha$ -6 se mueven y dejan en su interior una cavidad altamente hidrófoba. Este cambio conformacional trae consigo una desestructuración parcial de la hélice  $\alpha$ -7 y una perturbación estructural que se transmite a través del esqueleto proteico hasta el bucle-WPD.<sup>28</sup> Como resultado, este bucle queda fijo en su conformación abierta, de tal modo que no puede tener lugar el ciclo catalítico de la enzima.

Diez años después, el grupo de Tonks describió una nueva familia de inhibidores alostéricos capaces de unirse al segmento C-terminal de la PTP1B de 401 aminoácidos.<sup>29</sup> Si bien no fueron capaces de obtener una estructura tridimensional que explique de forma precisa el modo de unión de estos nuevos inhibidores alostéricos, experimentos de <sup>1</sup>H-RMN y mutagénesis dirigida permitieron dilucidar el sitio de unión aproximado. Éste se encontraría en el segmento desordenado C-terminal de la PTP1B y próximo a la hélice  $\alpha$ -7. Además, este sitio alostérico tendría capacidad de unir hasta dos moléculas de inhibidor a diferencia del descrito por Wiesmann.

Finalmente, un estudio realizado en 2018 mediante técnicas de cribado por cristalografía de rayos X describe hasta 11 nuevos sitios de unión de fragmentos *drug-like* a la PTP1B, pudiendo constituir sitios potencialmente alostéricos.<sup>30</sup>

---

<sup>27</sup> Wiesmann, C.; Barr, K. J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D. A.; Shen, W.; Fahr, B. J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randall, M.; McDowell, R. S.; Hansen, S. K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *8*, 730-737.

<sup>28</sup> Li, S.; Zhang, J.; Lu, S.; Huang, W.; Geng, L.; Shen, Q.; Zhang, J. *PLoS one* **2014**, *5*, e97668.

<sup>29</sup> Krishnan, N.; Koveal, D.; Miller, D. H.; Xue, B.; Akshinthala, S. D.; Kragelj, J.; Jensen, M. R.; Gauss, C.; Page, R.; Blackledge, M.; Muthuswamy, S. K.; Peti, W.; Tonks, N. K. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 558.

<sup>30</sup> Keedy, D. A.; Hill, Z. B.; Biel, J. T.; Kang, E.; Rettenmaier, T. J.; Brandão-Neto, J.; Pearce, N. M.; von Delft, F.; Wells, J. A.; Fraser, J. S. *eLife* **2018**.

#### 4.1.3.2 Función biológica de la PTP1B

Desde su descubrimiento hasta nuestros días, la PTP1B ha sido objeto de numerosos estudios que persiguen comprender su papel en los procesos fisiológicos del cuerpo humano. Se ha descrito que esta enzima es capaz de interactuar con más de 30 fosfoproteínas distintas desfosforilándolas sola o cooperativamente con otras biomoléculas.<sup>31</sup> Algunos de los sustratos más relevantes y que por tanto determinan su función biológica son el receptor de insulina (IR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermic Growth Factor Receptor, EGFR), el receptor de leptina o la proteína PERK (double-stranded RNA-activated Protein kinase-like ER Kinase).<sup>32</sup> En cualquier caso, la acción de la PTP1B sobre la gran variedad de sustratos que regula viene coordinada por el alto número de modificaciones post-translacionales que han sido descritas incluyendo: oxidación, nitrosilación y sulfuración de su centro activo, sumoilación, fosforilación y proteólisis.<sup>33</sup>

##### 4.1.3.2.1 Papel en el metabolismo

La insulina es la hormona humana cuyo papel principal es la regulación de los niveles de glucosa sanguíneos. La transducción de la señalización de la insulina comienza tras su unión al receptor, lo que provoca una autofosforilación cruzada de sus cadenas intracitoplasmáticas en los residuos de tirosina. Tras esto, tiene lugar el reclutamiento y fosforilación del Sustrato del Receptor de Insulina de tipo 1 (IRS1), seguido de la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (PKB o Akt) (Figura 4). La cascada de señalización intracelular desencadena finalmente la expresión de ciertos genes entre los que se incluye el gen que codifica al transportador de glucosa GLUT4, el cual es sintetizado y traslocado a la superficie celular.<sup>34</sup>

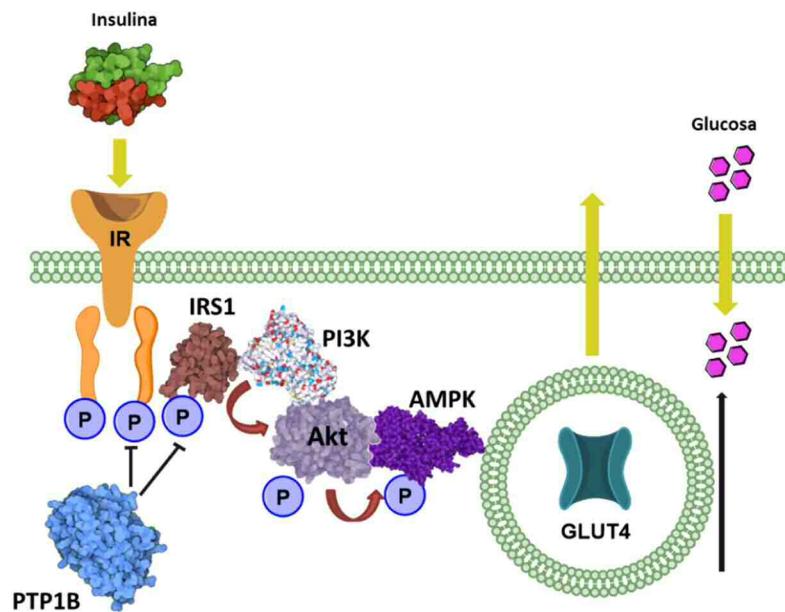
---

<sup>31</sup> Feldhammer, M.; Uetani, N.; Miranda-Saavedra, D.; Tremblay, M. L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *5*, 430-445.

<sup>32</sup> Krishnan, N.; Fu, C.; Pappin, D. J.; Tonks, N. K. *Sci. Signal.* **2011**, *203*, ra86.

<sup>33</sup> Anonymous *Protein Tyrosine Phosphatase Control of Metabolism*; Springer-Verlag: New York, 2013.

<sup>34</sup> De Meyts, P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In *Endotext*; Feingold, K. R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J. M., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., McLachlan, R., Morley, J. E., New, M., Perreault, L., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., Trencce, D. L., Vinik, A. and Wilson, D. P., Eds.; MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA), 2000.



**Figura 4.** Esquema simplificado de la ruta de señalización intracelular del receptor de insulina.

Los primeros estudios tras el descubrimiento de la proteína relacionaron a la PTP1B con la desfosforilación del receptor de insulina y de sustratos relacionados como el Sustrato del Receptor de Insulina de tipo 1 (IRS1).<sup>35</sup> Si bien las primeras evidencias procedían de resultados *in vitro*,<sup>36</sup> poco tiempo después se demostró que los ratones *knock-out* heterocigóticos para el gen que codifica la PTP1B mostraban mejor tolerancia a la glucosa bajo condiciones de dieta rica en grasa. Del mismo modo, este modelo murino presentaba resistencia al aumento de peso y conservaba la sensibilidad a la insulina del fenotipo silvestre.<sup>37</sup> Este hecho se confirmó al comprobarse, a nivel molecular, que estos animales presentaban un mayor grado de fosforilación del IRS en hígado y músculo liso tras la administración de insulina. Es a raíz de este descubrimiento cuando empieza a investigarse y generarse un gran número de inhibidores de la PTP1B, validándola como diana terapéutica para el tratamiento de la DM2.

Al mismo tiempo que se descubrió el potencial de inhibición de la PTP1B para mejorar la sensibilidad a la insulina, se empezó a investigar su relación con la obesidad. También existe, una estrecha relación entre la DM2 y la obesidad puesto que el aumento del tejido adiposo desencadena un estado de inflamación y de resistencia a la insulina.<sup>38</sup> Además, la mayoría de los

<sup>35</sup> Goldstein, B. J.; Bittner-Kowalczyk, A.; White, M. F.; Harbeck, M. J. *Biol. Chem.* **2000**, *6*, 4283-4289.

<sup>36</sup> Khandelwal, R. L.; Pugazhenth, S. *Mol. Cell. Biochem.* **1995**, *1-2*, 87-94.

<sup>37</sup> Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A. L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-Hagen, J.; Chan, C. C.; Ramachandran, C.; Gresser, M. J.; Tremblay, M. L.; Kennedy, B. P. *Science* **1999**, *5407*, 1544-1548.

<sup>38</sup> Deng, T.; Lyon, C. J.; Bergin, S.; Caligiuri, M. A.; Hsueh, W. A. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2016**, *1*, 421-449.

individuos afectados por la DM2 sufren de sobrepeso. Dado que los ratones carentes del gen que codifica la PTP1B (PTPN1) mostraban resistencia a la ganancia de peso tras la ingesta de una dieta rica en grasa se decidió profundizar en las bases moleculares de este efecto. Así fue cómo se descubrió que la PTP1B interviene en la vía de señalización del receptor de leptina. Ésta es una hormona que regula la ingesta de calorías controlando principalmente la sensación de hambre, entre otros procesos metabólicos. De este modo, se comprobó cómo la PTP1B es capaz de desfosforilar el segundo mensajero JAK2 que actúa sobre la proteína Transductora de la Señal y de Activación de la Transcripción 3 (STAT3) de la vía de señalización del receptor de leptina.<sup>39</sup> Poco tiempo después se descubrió cómo la PTP1B cerebral era la mayor responsable de los efectos sobre la ganancia de peso.<sup>40</sup>

#### 4.1.3.2.2 Papel en cáncer

Otro de los grandes fenómenos con los que la PTP1B ha sido relacionada son las neoplasias. En la última década han aparecido numerosos estudios que ponen de manifiesto la relación existente entre la sobreexpresión de la PTP1B y distintos tipos de neoplasias, sin embargo, su papel varía dependiendo del tipo de tumor. Se han detectado niveles elevados de sobreexpresión de la PTP1B y del ARN mensajero de PTPN1 en individuos con cáncer colorrectal, además estos pacientes están asociados a un fenotipo mucho más agresivo y de peor pronóstico.<sup>41</sup> También, se ha comprobado que la inhibición de la PTP1B mediante ARNs pequeños de interferencia es capaz de detener la proliferación y revertir parcialmente la progresión del cáncer pancreático *in vivo* donde la PTP1B actúa a modo de oncogén.<sup>42</sup> Numerosos estudios han demostrado cómo la PTP1B también es un oncogén en el tumor de ovarios o del cáncer de mama.<sup>43</sup>

Estos son sólo algunos ejemplos de las evidencias encontradas con la PTP1B y distintos tipos de cáncer. No obstante, esta enzima también se ha relacionado con el cáncer de esófago, el carcinoma pulmonar no microcítico, el de cérvix o el cáncer de próstata.<sup>44</sup> A pesar de ello, el papel de la PTP1B en cáncer no está del todo esclarecido y genera cierta controversia porque,

---

<sup>39</sup> Myers, M. P.; Andersen, J. N.; Cheng, A.; Tremblay, M. L.; Horvath, C. M.; Parisien, J.; Salmeen, A.; Barford, D.; Tonks, N. K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *51*, 47771-47774.

<sup>40</sup> Gorgun, C. Z.; Hotamisligil, G. S.; Kahn, B. B.; Delibegovic, M.; Bence, K. K.; Xue, B.; Neel, B. G. *Nature Med.* **2006**, *8*, 917-924.

<sup>41</sup> Hoekstra, E.; Das, A. M.; Swets, M.; Cao, W.; Woude, C. Janneke van der; Bruno, M. J.; Peppelenbosch, M. P.; Kuppen, P. J. K.; Hagen, Timo L. M. ten; Fuhler, G. M. *Oncotarget* **2016**, *16*, 21922-21938.

<sup>42</sup> Xu, Q.; Wu, N.; Li, X.; Guo, C.; Li, C.; Jiang, B.; Wang, H.; Shi, D. *Cell. Death. Dis.* **2019**, *12*, 874.

<sup>43</sup> Yu, M.; Liu, Z.; Liu, Y.; Zhou, X.; Sun, F.; Liu, Y.; Li, L.; Hua, S.; Zhao, Y.; Gao, H.; Zhu, Z.; Na, M.; Zhang, Q.; Yang, R.; Zhang, J.; Yao, Y.; Chen, X. *FEBS J.* **2019**, *6*, 1136-1153.

<sup>44</sup> Wang, J.; Wang, J.; Liu, B.; Chen, X.; Chen, X.; Su, L.; Su, L.; Wu, P.; Wu, P.; Wu, J.; Wu, J.; Zhu, Z.; Zhu, Z. *Med. Oncol.* **2012**, *2*, 948-956.

dependiendo del tipo de cáncer estudiado, se ha comprobado como la PTP1B puede actuar de forma condicional como supresor de tumores o como oncogén.<sup>45</sup>

#### 4.1.3.2.3 Papel en inflamación e inmunidad

La producción de citoquinas proinflamatorias por parte del tejido adiposo es una de las principales respuestas del cuerpo humano ante un estado de obesidad. Así pues, la acción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) o las interleuquinas 1 y 6, ha sido directamente relacionada con la acción de la PTP1B.<sup>46</sup> No sólo eso, sino que se ha demostrado que una de las vías de señalización inflamatorias más importantes, como es la del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-  $\kappa$ B), está directamente regulada por la PTP1B, la cual promueve la activación de macrófagos en modelos de esteatosis alcohólica.<sup>47</sup>

Muchos de los efectos observados con respecto a la inmunidad son debidos a que la PTP1B actúa sobre sustratos como JAK2, STAT5 o la proteína tirosina quinasa no receptora tipo 2.<sup>48</sup> La fibrosis es uno de los procesos finales de la respuesta inflamatoria que tiene como objetivo sustituir el tejido dañado por tejido nuevo a base de colágeno. Utilizando modelos murinos carentes del gen PTPN1, el grupo de Valverde y colaboradores han demostrado que se produce un efecto protector frente a la fibrosis dependiente de oxidasas.<sup>49</sup>

Además, la localización celular de la PTP1B, en la cara citosólica del retículo endoplásmico, ha dado lugar en que en los últimos años se empiece a estudiar el papel que juega ésta en el fenómeno de estrés del retículo endoplásmico. Dado que su alteración conduce a un proceso anómalo en la síntesis y plegamiento de algunas proteínas, existen investigaciones que demuestran como la inhibición o silenciamiento de la PTP1B disminuye el estrés reticular y además aminora la disfunción endotelial, la inflamación vascular y las complicaciones cardíacas.<sup>50</sup>

<sup>45</sup> Bollu, L. R.; Mazumdar, A.; Savage, M. I.; Brown, P. H. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *9*, 2136-2142.

<sup>46</sup> Feldhammer, M.; Uetani, N.; Miranda-Saavedra, D.; Tremblay, M. L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *5*, 430-445.

<sup>47</sup> Yang, L.; Sun, Y.; Liu, Y.; Yin, N.; Bu, F.; Yu, H.; Du, X.; Li, J.; Huang, C. *Toxicol. Lett.* **2019**, 11-21.

<sup>48</sup> Través, P. G.; Pardo, V.; Pimentel-Santillana, M.; González-Rodríguez, Á.; Mojena, M.; Rico, D.; Montenegro, Y.; Calés, C.; Martín-Sanz, P.; Valverde, A. M.; Boscá, L. *Cell. Death. Dis.* **2014**, *3*, e1125.

<sup>49</sup> García-Ruiz, I. G.; Ruiz, N. B.; Rada, P.; Pardo, V.; Ruiz, L.; Blas-García, A.; Valdecantos, M. P.; Sanz, M. G.; Solís Herruzo, J. A.; Valverde, Á M. *Redox Biol.* **2019**, 214-225.

<sup>50</sup> Abdelsalam, S. S.; Korashy, H. M.; Zeidan, A.; Agouni, A. *Biomolecules* **2019**, *7*, 286-291.

#### 4.1.4 Antecedentes: Inhibidores de la PTP1B

Desde su descubrimiento hasta nuestros días, el campo de búsqueda de inhibidores de la PTP1B ha sido muy activo y prolífico respecto al número y tipo de moléculas desarrolladas. Entre los inhibidores de la PTP1B se pueden encontrar desde moléculas inorgánicas simples como el anión vanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ),<sup>51</sup> un inhibidor inespecífico de fosfatasa cuyo mecanismo de acción se sustenta en mimetizar el grupo fosfato en el estado de transición de la enzima, hasta pequeños micro-ARNs antisentido capaces de silenciar el gen que codifica la PTP1B, algunos de los cuales alcanzaron ensayos clínicos de fase II.<sup>52</sup>

A pesar de que la exploración de nuevos inhibidores es muy activa, no lo es tanto su paso a ensayos clínicos ya que muy pocas moléculas han conseguido rebasar la barrera del desarrollo preclínico. Esto se debe, en parte, a las limitaciones que presentan la mayoría de los inhibidores, sobre todo los de primera generación, dirigidos al centro activo de la enzima. Éstos son moléculas que compiten con el sustrato endógeno por su unión al centro activo de la proteína y normalmente portan grupos cargados negativamente a pH fisiológico, los cuales limitan su absorción y permeabilidad a través de membranas. Por otro lado, la otra gran dificultad a afrontar en el desarrollo de inhibidores de la PTP1B es la de conseguir moléculas selectivas. El centro activo de las fosfatasa se encuentra altamente conservado entre los miembros de la familia. Como ejemplo, la proteína tirosina fosfatasa de linfocitos T (TCPTP) comparte un 74% de identidad con la PTP1B y sólo en el centro activo un 94%. Sin embargo, la inhibición de la TCPTP está asociada con importantes e indeseables efectos adversos.<sup>53</sup>

A continuación, se revisarán algunos de los ejemplos más representativos de inhibidores de la PTP1B seleccionados en base a la importancia de su descubrimiento y para ilustrar la grandísima diversidad estructural.

##### 4.1.4.1 Inhibidores dirigidos al centro activo

Los primeros inhibidores de la PTP1B en desarrollarse fueron moléculas pensadas para mimetizar los restos de fosfotirosina del receptor de insulina. Para este fin, es necesario sustituir los grupos fosfatos por otro agrupamiento no hidrolizable como el difluorometilfosfonato (DFMP). Este grupo ha sido usado con mucho éxito como bioisómero del correspondiente grupo

---

<sup>51</sup> Kim, J.; Cho, H.; Ryu, S.; Choi, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *1*, 72-80.

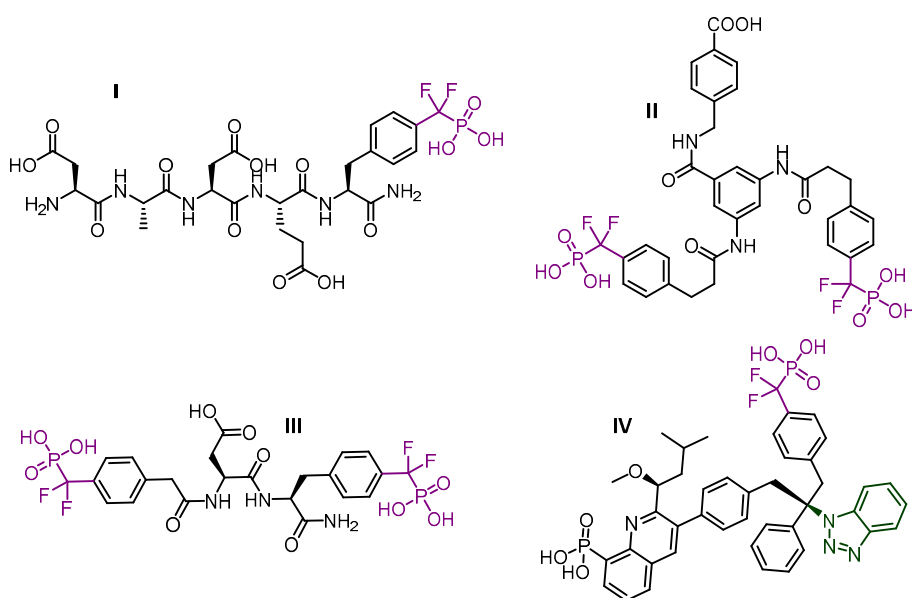
<sup>52</sup> Bradley A. Zinker; Cristina M. Rondinone; James M. Trevillyan; Rebecca J. Gum; Jill E. Clampit; Jeffrey F. Waring; Nancy Xie; Denise Wilcox; Peer Jacobson; Leigh Frost; Paul E. Kroeger; Regina M. Reilly; Sandra Koterski; Terry J. Oopenorth; Roger G. Ulrich; Seth Crosby; Madeline Butler; Susan F. Murray; Robert A. McKay; Sanjay Bhanot; Brett P. Monia; Michael R. Jirousek *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *17*, 11357-11362.

<sup>53</sup> Barr, A. J. *Future Med. Chem.* **2010**, *10*, 1563-1576.

fosfato en el desarrollo de inhibidores de fosfatasa, especialmente en el caso de la PTP1B.<sup>54</sup> Estos derivados demostraron ser hasta 1,000 veces más afines por la proteína que el correspondiente derivado no fluorado.

Los primeros inhibidores, como el compuesto I, fueron de naturaleza peptídica y obtenidos a partir de quimiotecas combinatorias, buscando análogos del sustrato con el grupo DFMP.<sup>55</sup> Si bien este tipo de sustratos demostraron ser poco selectivos, el agrupamiento DFMP puede contribuir a la unión a la diana a través de enlaces de tipo halógeno o enlaces de hidrógeno y además disminuyen la constante de ionización del grupo metilfosfonato ( $pK_{a2} = 5.2$ ) en comparación al fosfato ( $pK_{a2} = 6.22$ ), dificultando su hidrólisis.<sup>56</sup> De este modo, se postula que el fragmento de *p*-fosfometilfenilalanina puede funcionar como bioisómero de las unidades de fosfotirosina.

Con el paso del tiempo, este tipo de estructuras derivaron en inhibidores más selectivos capaces de interactuar con el sitio B adyacente al centro activo, y dieron nombre a una nueva clase de inhibidores conocidos como bidentados por su unión bivalente. Así, aparecen, derivados como la sonda molecular II que incorpora dos unidades miméticas de fosfotirosina gracias al grupo DFMP, y que aparte de presentar un valor de  $IC_{50} = 0.93 \mu M$ , demostró ser selectivo frente a otros tres tipos de fosfatasa.<sup>57</sup>



**Figura 5.** Inhibidores portadores del grupo DFMP.

<sup>54</sup> Combs, A. P. *J. Med. Chem.* **2010**, *6*, 2333-2344.

<sup>55</sup> Burke, T. R.; Kole, H. K.; Roller, P. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *1*, 129-134.

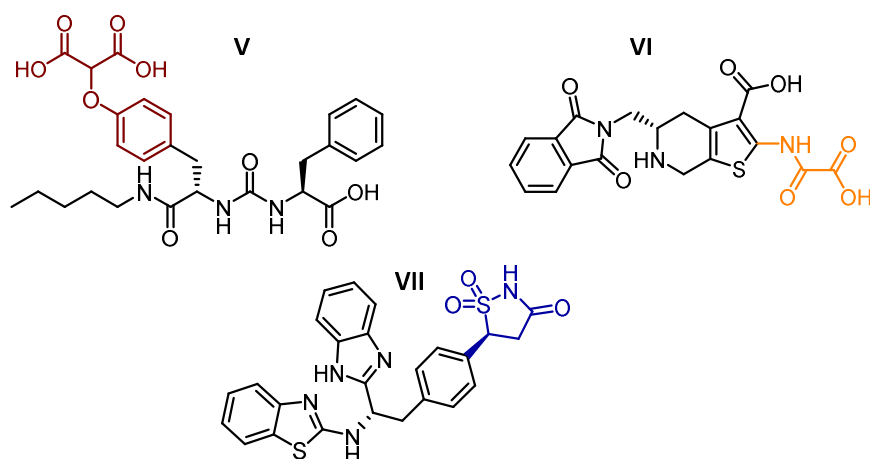
<sup>56</sup> Elliott, T. S.; Slowey, A.; Ye, Y.; Conway, S. J. *MedChemComm* **2012**, *7*, 735-751.

<sup>57</sup> Taing, M.; Keng, Y. F.; Shen, K.; Wu, L.; Lawrence, D. S.; Zhang, Z. Y. *Biochemistry* **1999**, *12*, 3793-3803.



En un intento por combinar la estrategia de diseño de peptidomiméticos que portasen el bioisómero DFMP de fosfotirosina, el grupo de Zhang desarrolló péptidos bidentados como **III** los cuales son los compuestos más potentes de esta familia. No obstante, la resolución de la estructura cristalina reveló que este tipo de compuestos se unían al sitio catalítico A y al sitio cercano C, consiguiendo una selectividad 10 veces superior sobre la PTP1B ( $K_i = 2.4 \text{ nM}$ ) que sobre la TCPTP ( $K_i = 26 \text{ nM}$ ).<sup>58</sup> La búsqueda de compuestos con menor carácter peptídico dio lugar a la preparación de una familia de análogos de benzotriazol representada por el compuesto **IV** de Merck Frost. Éste demostró tener muy buena potencia ( $IC_{50} = 5 \text{ nM}$ ) y un nuevo modo de unión que permite explorar el sitio B a través de uno de los grupos fosfonato mientras que el benzotriazol interacciona en el sitio C (PDB: 1Q6T).<sup>59</sup>

La búsqueda de bioisómeros alternativos al DFMP con mejor permeabilidad, dio lugar a la identificación de los derivados del ácido 2-(carboximetoxi)benzoico. El primero se descubrió en 1998 y fue incorporado en compuestos de naturaleza peptidomimética.<sup>60</sup> En el año 2001 investigadores de Pharmacia Corp. publicaron el compuesto **V** el cual presentaba 10 veces más selectividad sobre la PTP1B ( $K_i = 3.4 \text{ } \mu\text{M}$ ) que sobre las fosfatasa LAR y SHP-2.<sup>61</sup> La estructura cristalina (PDB: 1G7F) reveló que este compuesto también presentaba un modo de unión a los sitios A y C, de forma que sirvió para la optimización de nuevos derivados con mayor potencia pero menor selectividad.



**Figura 6.** Inhibidores portadores de restos miméticos de fosfotirosina.

<sup>58</sup> Shen, K.; Keng, Y.; Wu, L.; Guo, X.; Lawrence, D. S.; Zhang, Z. *J. Biol. Chem.* **2001**, *50*, 47311-47319.

<sup>59</sup> Scapin, G.; Patel, S. B.; Becker, J. W.; Wang, Q.; Despoints, C.; Waddleton, D.; Skorey, K.; Cromlish, W.; Bayly, C.; Therien, M.; Gauthier, J. Y.; Li, C. S.; Lau, C. K.; Ramachandran, C.; Kennedy, B. P.; Asante-Appiah, E. *Biochemistry* **2003**, *39*, 11451-11459.

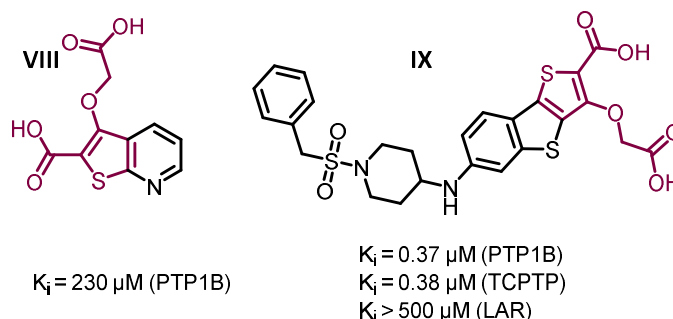
<sup>60</sup> Burke, T. R.; Yao, Z.; Zhao, H.; Milne, G. W. A.; Wu, L.; Zhang, Z.; Voigt, J. H. *Tetrahedron* **1998**, *34*, 9981-9994.

<sup>61</sup> Bleasdale, J. E.; Ogg, D.; Palazuk, B. J.; Jacob, C. S.; Swanson, M. L.; Wang, X.; Thompson, D. P.; Conradi, R. A.; Mathews, W. R.; Laborde, A. L.; Stuchly, C. W.; Heijbel, A.; Bergdahl, K.; Bannow, C. A.; Smith, C. W.; Svensson, C.; Liljebri, C.; Schostarez, H. J.; May, P. D.; Stevens, F. C.; Larsen, S. D. *Biochemistry* **2001**, *19*, 5642-5654.

Otro mimético de los restos fosfotirosina son los derivados de la *N*-(2-tienil) monoamida del ácido oxálico.<sup>62</sup> Éstos muestran una inhibición pH dependiente y máxima a pH ácido. Así, el compuesto **VI** interactúa en los sitios A y C, y, además, demostró ser selectivo frente a TCPTP y potente en la PTP1B ( $K_i = 70$  nM).<sup>63</sup>

En el año 2005, investigadores de Incyte identificaron una familia de (*S*)-isotiazolidinonas que se comportaban como bioisómeros de fosfotirosina. Estos inhibidores presentan la ventaja de ser bastante más permeables en comparación con los derivados de ácido oxálico descritos previamente. El compuesto **VII** mostró unirse al sitio A y al sitio C con buena potencia ( $IC_{50} = 120$  nM).

Las investigaciones posteriores se enmarcaron en la búsqueda de nuevos inhibidores dirigidos al centro activo, aunque no mimetizasen todas las interacciones del resto de fosfotirosina. Así, se descubrió una familia de compuestos derivados del ácido 2-tiofenocarboxílico de naturaleza monocíclica, bicíclica e incluso tricíclica.<sup>64</sup> La estructura cristalina del compuesto **VIII** reveló que se unía a los sitios A y B. De este modo, se llevó a cabo un programa de química médica por parte de Wyeth Research que permitió llegar a candidatos optimizados como **IX** y que resultaron selectivos frente a otras fosfatasa.



**Figura 7.** Inhibidores basados en ácidos tienocarboxílicos.

Los inhibidores dirigidos al centro activo contienen en su estructura, en su gran mayoría, un alto número de funcionalidades polares las cuales mejoran su potencia, pero comprometen sus propiedades fisicoquímicas de cara al ADME. Por este motivo, ninguno de estas moléculas

<sup>62</sup> Andersen, H. S.; Iversen, L. F.; Jeppesen, C. B.; Branner, S.; Norris, K.; Rasmussen, H. B.; Møller, K. B.; Møller, N. P. *H. J. Biol. Chem.* **2000**, *10*, 7101-7108.

<sup>63</sup> Johnson, T. O.; Ermolieff, J.; Jirousek, M. R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *9*, 696-709.

<sup>64</sup> Moretto, A. F.; Kirincich, S. J.; Xu, W. X.; Smith, M. J.; Wan, Z. -; Wilson, D. P.; Follows, B. C.; Binnun, E.; Joseph-McCarthy, D.; Foreman, K.; Erbe, D. V.; Zhang, Y. L.; Tam, S. K.; Tam, S. Y.; Lee, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *7*, 2162-2177.

alcanzó los ensayos clínicos. En consecuencia, en los años siguientes fueron apareciendo nuevos inhibidores con un carácter mucho más lipófilo que pudiesen solventar estos problemas.

En 2012, Roche identificó, a través de una campaña de cribado de alto rendimiento, diaminoquinazolinas con actividad inhibitoria de la PTP1B. Un programa de optimización de estos sustratos dio lugar a diaminas como **X**, las cuales presentan buena potencia ( $IC_{50} = 0.48 \mu M$ ) y parámetros farmacocinéticos. Sin embargo, a pesar de ser muy selectivo para la PTP1B en comparación a un panel amplio de fosfatasa, este compuesto no mostró selectividad frente a la TCPTP. Además, este derivado presentó un modo de unión nuevo pues se unía en la región del bucle WPD sin interactuar con los sitios de reconocimiento de fosfatos. En el año 2014 y haciendo usos de estrategias de *scaffold hopping* y modelado por farmacóforo, se identificó el compuesto **XI** el cual presentaba unos resultados bastante interesantes en cuanto a la prueba de captación de glucosa.<sup>65</sup> Otro ejemplo para ilustrar la diversidad estructural alcanzada en el desarrollo de inhibidores de PTP1B lo representan los dímeros de indolina, como el compuesto **XII** ( $IC_{50} = 2.06 \mu M$ ). Estos derivados patentados en 2015 demostraron presentar un buen perfil inhibitorio de la PTP1B.<sup>66</sup>

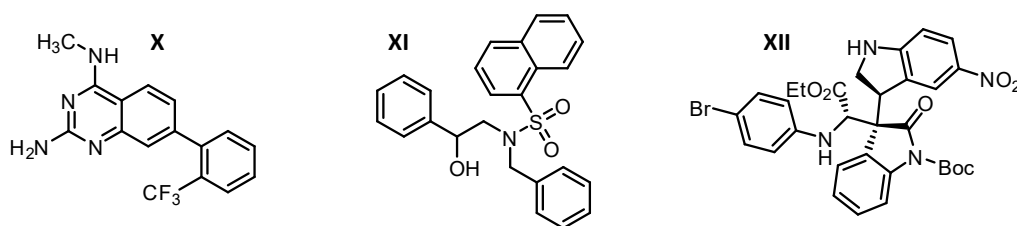


Figura 8. Otros inhibidores sin grupos ácidos.

#### 4.1.4.2 Inhibidores no competitivos y dirigidos a sitios alostéricos

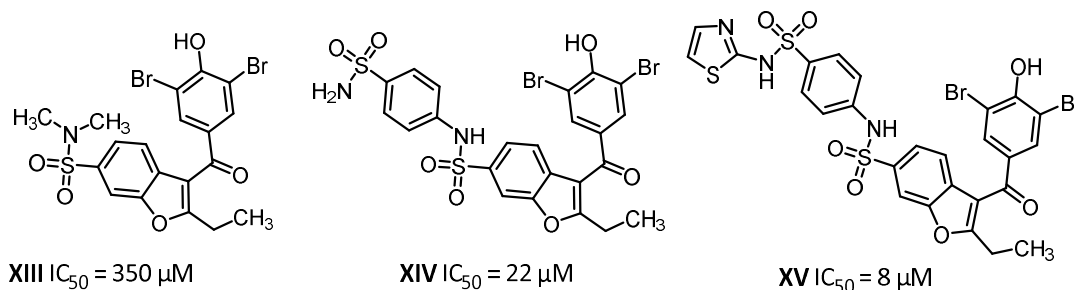
Los numerosos intentos orientados en desarrollar inhibidores dirigidos al centro activo de la PTP1B no han dado lugar a resultados muy fructíferos debido a los inconvenientes ya mencionados, de tal modo que ninguno de éstos ha llegado a ensayos clínicos. Sin embargo, los inhibidores alostéricos presentan un mayor potencial para su desarrollo hasta fármacos.

En el año 2004, Wiesmann y colaboradores describieron una familia de benzbromaronas capaces de unirse a un sitio alostérico de la PTP1B, no descrito anteriormente y situado

<sup>65</sup> Balaramnavar, V. M.; Srivastava, R.; Rahuja, N.; Gupta, S.; Rawat, A. K.; Varshney, S.; Chandasana, H.; Chhonker, Y. S.; Doharey, P. K.; Kumar, S.; Gautam, S.; Srivastava, S. P.; Bhatta, R. S.; Saxena, J. K.; Gaikwad, A. N.; Srivastava, A. K.; Saxena, A. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 578-594.

<sup>66</sup> Hussain, H.; Green, I. R.; Abbas, G.; Adekenov, S. M.; Hussain, W.; Ali, I. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2019**, 9, 689-702.

aproximadamente a unos 20 Å del centro activo.<sup>67</sup> Estas moléculas presentan las primeras diferencias significativas con respecto a otros inhibidores previamente descritos, especialmente por presentar un mayor carácter lipófilo.



**Figura 9.** Benzobromaronas descritas por Wiesmann y colaboradores en 2004.

Estas moléculas se identificaron en una campaña de cribado de alto rendimiento que tenía como objetivo la búsqueda de inhibidores de la PTP1B sin grupos miméticos de fosfotirosina. Así, primero se identificó el inhibidor **XIII** y su posterior optimización condujo a los compuestos **XIV** y **XV**, mucho más activos y, en el caso de **XIV**, altamente selectivo frente a las fosfatasas LAR ( $IC_{50} > 500 \mu\text{M}$ ) y TCPTP ( $IC_{50} = 129 \mu\text{M}$ ). Los estudios de cinética revelaron que **XIV** inhibía la PTP1B de forma no competitiva, reduciendo la velocidad máxima de producción de producto de hidrólisis sin alterar apenas la afinidad de la enzima. Los mismos autores realizaron estudios cristalográficos que revelaron cómo esta familia de moléculas se acomodaba entre las hélices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -6 y  $\alpha$ -7. Los estudios fenotípicos demostraron que los inhibidores, a pesar de tener una  $IC_{50}$  menor a la de inhibidores dirigidos al centro activo, presentaban *in vivo* una potencia comparable o superior, probablemente debida a su mayor permeabilidad.

Desafortunadamente, a pesar de que su descubrimiento supuso un punto de inflexión para el desarrollo de inhibidores de la PTP1B, estos derivados no alcanzaron etapas de desarrollo clínico.

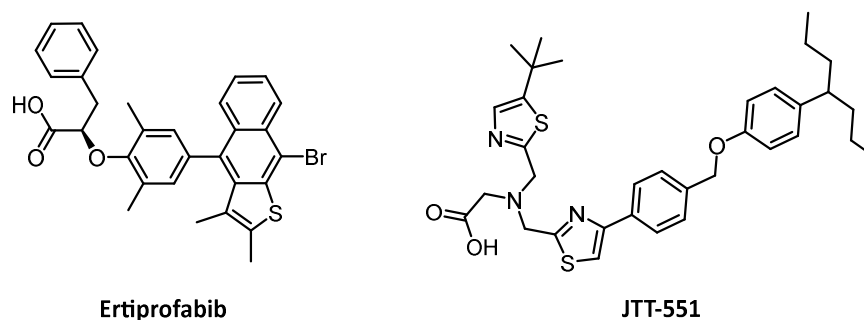
En el año 2003, la empresa Wyeth puso en marcha ensayos clínicos de fase I para la evaluación de seguridad de la molécula PTP112, conocida como ertiprotafib ( $IC_{50} = 20 \mu\text{M}$ ).<sup>68</sup> Este compuesto, también altamente lipófilo demostró ser un inhibidor no competitivo de la PTP1B capaz de inhibir por un mecanismo tiempo-dependiente. Además, demostró actuar también como agonista del receptor  $\gamma$  activado por proliferación de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ), lo cual

<sup>67</sup> Wiesmann, C.; Barr, K. J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D. A.; Shen, W.; Fahr, B. J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randall, M.; McDowell, R. S.; Hansen, S. K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *8*, 730-737.

<sup>68</sup> Erbe, D. V.; Wang, S.; Zhang, Y.; Harding, K.; Kung, L.; Tam, M.; Stolz, L.; Xing, Y.; Furey, S.; Qadri, A.; Klamann, L. D.; Tobin, J. F. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *1*, 69-77.

contribuía a su eficacia *in vivo*.<sup>69</sup> A pesar de todo, el ertiprofajib no prosperó en ensayos clínicos debido a su falta de eficacia y a la aparición de algunos efectos adversos relacionados con la dosis administrada.

Otro inhibidor no competitivo de la PTP1B que alcanzó los ensayos clínicos fue el candidato JTT-551. Descrito en el año 2014, JTT-551 ( $IC_{50} = 0.22 \mu M$ ) demostró mejorar el metabolismo de glucosa y presentar efectos antiobesidad, alcanzando los ensayos clínicos de fase I.<sup>70</sup>



**Figura 10.** Inhibidores no competitivos de la PTP1B.

En el año 2014, el grupo de Tonks describió un aminoesterol, el MSI-1426C ( $IC_{50} = 0.6 \mu M$ ) como inhibidor no competitivo y reversible de la PTP1B.<sup>71</sup> Este derivado de escualeno es capaz de unirse a un sitio alostérico de la PTP1B nuevo y distinto al de las benzbromaronas de Wiesmann. Además de presentar un buen perfil biológico para el tratamiento de la diabetes, MSI-1426C demostró ser especialmente activo en revertir modelos de cáncer de mama al modular la vía de señalización de HER2. Poco tiempo después, esta molécula entró en ensayos clínicos de fase I y II bajo el nombre de trodusquemina para evaluar su eficacia en pacientes obesos con DM2 y en pacientes con cáncer metastásico de mama HER2 positivo (ClinicalTrials.gov: NCT02524951). A pesar de ello, se trata de una molécula cargada lo que limita las indicaciones en las que puede ser aplicada terapéuticamente y aprobada. Por ello, el mismo grupo de Tonks describió a finales de 2018 un derivado más potente, el DPM-1001 ( $IC_{50} = 0.1 \mu M$ ) que pretende llevar a ensayos clínicos.<sup>72</sup>

<sup>69</sup> Zhang, Z.; Lee, S. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *2*, 223-233.

<sup>70</sup> Ito, M.; Fukuda, S.; Sakata, S.; Morinaga, H.; Ohta, T. *J. Diabetes. Res.* **2014**.

<sup>71</sup> Krishnan, N.; Koveal, D.; Miller, D. H.; Xue, B.; Akshinthala, S. D.; Kragelj, J.; Jensen, M. R.; Gauss, C.; Page, R.; Blackledge, M.; Muthuswamy, S. K.; Peti, W.; Tonks, N. K. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *7*, 558-566.

<sup>72</sup> Krishnan, N.; Konidaris, K. F.; Gasser, G.; Tonks, N. K. *J. Biol. Chem.* **2018**, *5*, 1517-1525.

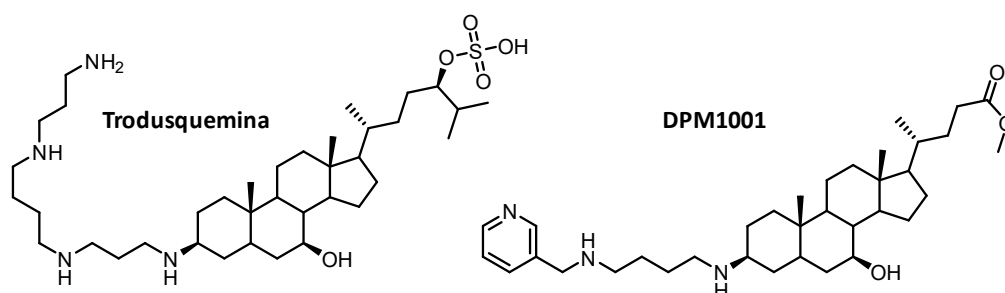


Figura 11. Inhibidores alostéricos derivados de escualeno.

#### 4.1.4.3 Productos naturales

Si bien el campo de la química sintética ha dado lugar a abundantes y muy variadas familias de inhibidores de la PTP1B, también se han descrito un gran número de productos naturales con esta actividad. Una de las familias con mayor representación son los terpenos. El hueafuranoide A es un diterpeno, aislado mediante fraccionamiento dirigido de distintas especies de líquenes antárticos, con un valor de  $IC_{50}$  moderado de  $13.9 \mu\text{M}$  y con una cinética de inhibición no competitiva.<sup>73</sup> Muchos flavonoides han sido relacionados con la inhibición de la PTP1B como el erythaddison II un flavonoide isoprenilado con una  $IC_{50}$  de  $17.4 \mu\text{M}$ .<sup>74</sup> En 2019 se describió un aducto Diels-Alder con naturaleza de chalcona isoprenilada aislado de la morera (*Morus alba*), que poseía capacidad inhibitoria de la PTP1B y un buen perfil biológico cuando se evaluó en líneas celulares HepG2.<sup>75</sup> También, existen derivados de bromofenol como **BDB** ( $IC_{50} = 1.7 \mu\text{M}$ ) que fue aislado del alga roja *Rhodomela confervoides*, y se utilizó como cabeza de serie para el posterior desarrollo de derivados más potentes.<sup>76</sup>

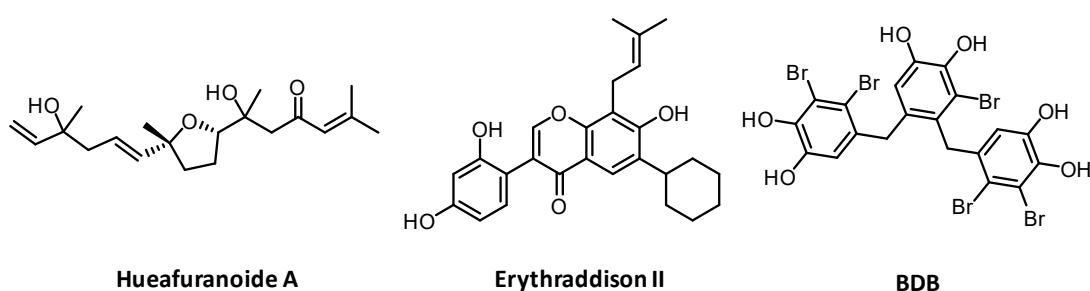


Figura 12. Productos naturales inhibidores de la PTP1B.

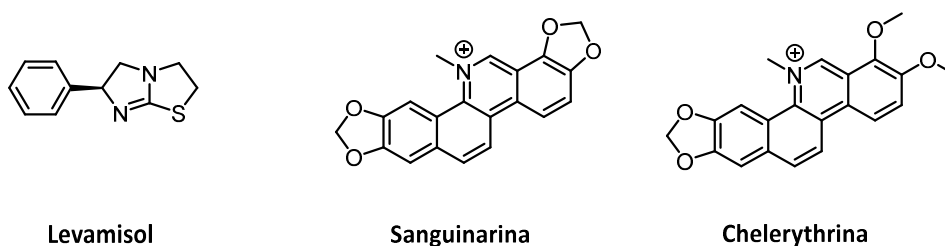
<sup>73</sup> Cui, Y.; Yim, J. H.; Lee, D.; Kim, Y.; Oh, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *24*, 7393-7396.

<sup>74</sup> Combs, A. P. *J. Med. Chem.* **2010**, *6*, 2333-2344.

<sup>75</sup> Su, C.; Tao, X.; Yin, Z.; Zhang, X.; Tian, J.; Chen, R.; Liu, J.; Li, L.; Ye, F.; Zhang, P.; Zhang, D.; Dai, J. *Org. Lett.* **2019**, *23*, 9463-9467.

<sup>76</sup> Shi, D.; Guo, S.; Jiang, B.; Guo, C.; Wang, T.; Zhang, L.; Li, J. *Mar Drugs* **2013**, *2*, 350-362.

En el grupo de los alcaloides se encuentran menos ejemplos de moléculas inhibitoras de la PTP1B. Sin embargo, hay que mencionar la chelerythrina por su mecanismo de acción a nivel molecular. Este alcaloide se aisló por primera vez de la celidonia mayor o *Chelidonium majus spp* y se trata de un derivado catiónico de benzofenantridina. En un estudio realizado por Krishnan se describe que el anticuerpo monoclonal csFv45 es capaz de unirse a la forma oxidada de la PTP1B cuya Cys215 se encuentra en forma de ácido sulfénico o sulfenamida cíclica inactiva catalíticamente.<sup>77</sup> Gracias a este anticuerpo, se desarrolló un método de muestreo para identificar moléculas capaces de estabilizar la forma oxidada de la PTP1B. De este modo, se identificaron dos hits (*hits*) de entre 1280 compuestos, el levamisol y la sanguinarina. Tras comprobar que la actividad de la sanguinarina es mayor a la del levamisol, se buscaron análogos potentes *in vivo* y se comprobó, que la chelerythrina es capaz de potenciar significativamente la señal de la insulina en estudios celulares, así como aumentar la tasa de metabolismo en modelos de ratón alimentados con dieta rica en grasas.<sup>78</sup>



**Figura 13.** Inhibidores de la PTP1B por estabilización de su forma oxidada.

<sup>77</sup> Salmeen, A.; Andersen, J. N.; Myers, M. P.; Meng, T.; Hinks, J. A.; Tonks, N. K.; Barford, D. *Nature* **2003**, *6941*, 769-773.

<sup>78</sup> Krishnan, N.; Bonham, C. A.; Rus, I. A.; Shrestha, O. K.; Gauss, C. M.; Haque, A.; Tocilj, A.; Joshua-Tor, L.; Tonks, N. K. *Nat. Commun.* **2018**, *1*, 1-17.

## 4.2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---





Dado el interés que la PTP1B suscitó en la industria farmacéutica y la academia, especialmente al comienzo de la década pasada, nuestro grupo de investigación llevó a cabo una campaña de cribado biológico, en colaboración con el laboratorio Servier, de una pequeña quimioteca de compuestos de naturaleza heterocíclica propiedad de nuestro grupo. Como resultado de ello, se identificó un nuevo *hit* con estructura de sal de pirazinoquinoxalino capaz de inhibir la PTP1B *in vitro* (Figura 14). Con el fin de encontrar análogos más potentes de este compuesto y estudiar las relaciones estructura actividad, el grupo de investigación exploró la síntesis química para optimizar esta estructura. Además, se diseñó una simplificación estructural para encontrar los requisitos mínimos responsables de su actividad biológica. De este modo, durante la Tesis Doctoral de la Dra. Patricia Sánchez Alonso, se preparó una familia de derivados más sencillos con estructura de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas que presentaron actividad inhibitoria de la PTP1B.<sup>79</sup>

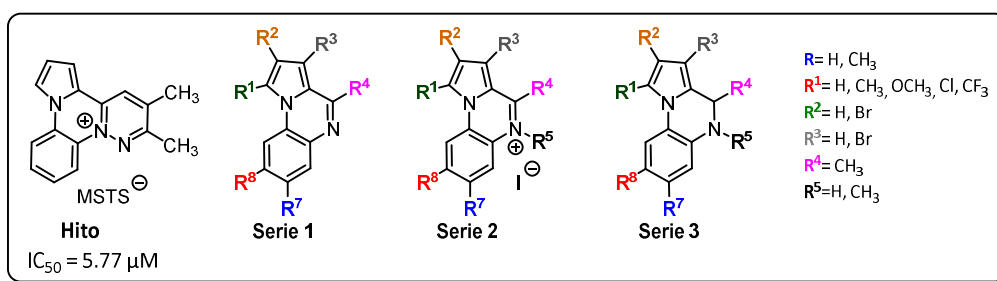


Figura 14. Primeros inhibidores de la PTP1B preparados por el grupo de investigación.

Se determinó el porcentaje de inhibición de la PTP1B por los compuestos sintetizados y la  $IC_{50}$  de algunos de los mejores inhibidores utilizando el método colorimétrico del verde malaquita e IRS5 como sustrato (Tabla 2). De este modo se estableció que los compuestos más activos eran **1a** y **3a**.

Tabla 2. Actividad de los mejores compuestos sintetizados previamente en el grupo.

Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	Inh (% , 1 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>1a</b>	-	H	CH <sub>3</sub>	-	H	H	47.15	1.02
<b>1k</b>	Br	H	CH <sub>3</sub>	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	50.00	1.81
<b>1p</b>	H	Br	CH <sub>3</sub>	-	H	Cl	47.00	1.73
<b>2a</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	45.78	1.34
<b>3a</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H	55.57	0.89
<b>3f</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	53.35	1.23

<sup>79</sup> Sánchez Alonso, P. Dianas implicadas en la enfermedad renal: síntesis y evaluación de nuevos inhibidores de PTP-1B y FABP, Universidad de Alcalá, 2014.

---

Así pues, continuando con los estudios previos en esta familia de inhibidores, en esta Tesis Doctoral, se plantearon los objetivos siguientes:

- La síntesis y el estudio cinético de los compuestos **1a** y **3a** para determinar el mecanismo de inhibición.
- La exploración de las posiciones **R<sup>4</sup>** y **R<sup>5</sup>** con el fin de comprobar su impacto sobre la actividad de los compuestos, una vez seleccionado el cabeza de serie.
- La síntesis de análogos con mejor cLogP siguiendo una estrategia de *scaffold hopping* sobre el anillo de pirrol.
- La determinación de la actividad de los compuestos a través del ensayo más accesible del fosfato de *p*-nitrofenol, dadas las dificultades inherentes al uso de IRS5 como sustrato y al método del verde malaquita relacionadas con la dificultad del ensayo y su coste.
- Un estudio *in silico* del comportamiento de las mejores moléculas y propuesta de un modo de unión que permitiera explicar las relaciones estructura-actividad.
- Caracterización biológica *in cellulo* de los compuestos con mejor perfil.

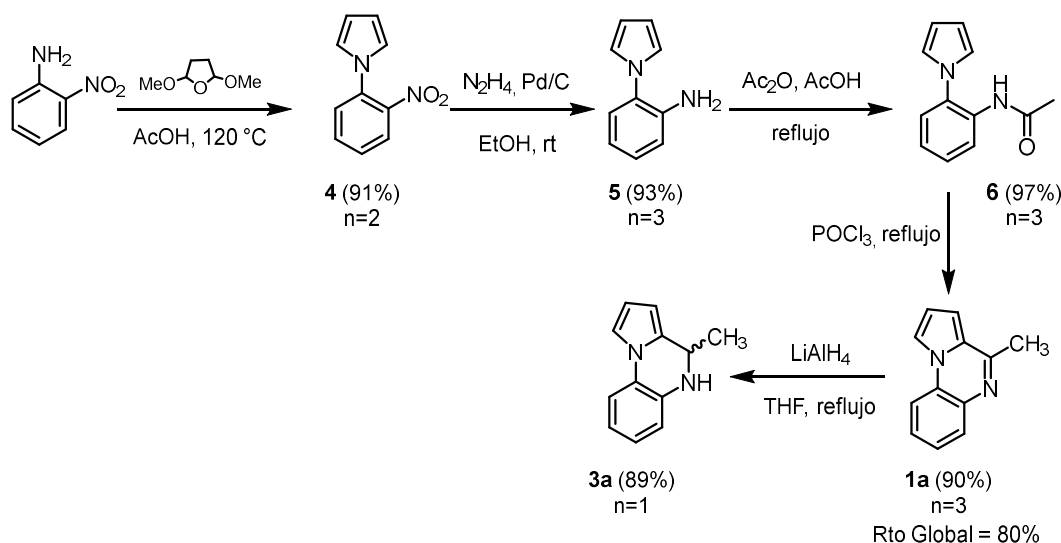
#### 4.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---



#### 4.4.1 Síntesis y estudio de los inhibidores cabeza de serie

Para la síntesis del derivado **1a**, se siguió una ruta sintética puesta a punto por la Dra. Sánchez Alonso en su tesis doctoral. Ésta emplea materiales de partida sencillos y de gran accesibilidad, siguiendo la metodología descrita por Cheeseman y colaboradores a partir de 1*H*-(2-nitrofenil)pirroles.<sup>80</sup> La síntesis comienza con la reacción de Clauson-Kaas sobre la 2-nitrofenilamina, haciéndola reaccionar con 2,5-dimetoxitetrahidrofurano en ácido acético, tal y como se recoge en el Esquema 1. El pirrol **4** así obtenido se reduce en presencia de Pd-C empleando hidrazina como donador de hidrógeno, y obteniéndose la amina **5** con buen rendimiento. A continuación, la preparación del derivado *N*-acetilado tiene lugar por tratamiento de la amina **5** con una mezcla 1:1 de ácido y anhídrido acético para dar la acetanilida **6**. Finalmente, la pirroloquinoxalina **1a** se obtiene mediante una ciclación en condiciones de Bischler-Napieralski al hacer reaccionar **6** con oxiclórico de fósforo. De este modo, en 4 etapas, se obtuvo el cabeza de serie **1a** con un rendimiento global de un 80% través de una síntesis fácilmente escalable y reproducible.



**Esquema 1.** Ruta sintética de la 4-metil-pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina (**1a**) y el dihidro derivado **3a**.

La obtención del derivado **3a** se llevó a cabo empleando las condiciones de reducción de **1a** descritas por Sánchez Alonso en su Tesis Doctoral, que permitieron preparar el racemato **3a** con buen rendimiento.

<sup>80</sup> Cheeseman, G. W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 242-247.

Con el objetivo de caracterizar biológicamente **3a**, inicialmente se decidió llevar a cabo la resolución del racémico mediante separación de diastereómeros con el fin de poder identificar el eutómero.

El tratamiento de **3a** con ácido D-tartárico en condiciones descritas en la literatura (acetona, 50 °C) para sistemas de quinolina dio lugar a la recuperación del producto oxidado **1a**.<sup>81</sup> A la vista de estos resultados, se planteó el estudio de la estabilidad de **3a** con el fin evaluar su potencial interés para el posterior desarrollo. Para ello, se monitorizó la cinética de oxidación del compuesto **3a** mediante la técnica de <sup>1</sup>H-RMN (Figura 15) en: acetona deuterada (0.7 M) y condiciones potencialmente oxidantes (atmósfera de aire, temperatura ambiente y sin protección frente a la luz). Para ello, se midió a lo largo del tiempo la relación de las intensidades de las integrales del doblete correspondiente al grupo metilo de **3a** y del singlete del grupo metilo de **1a**.

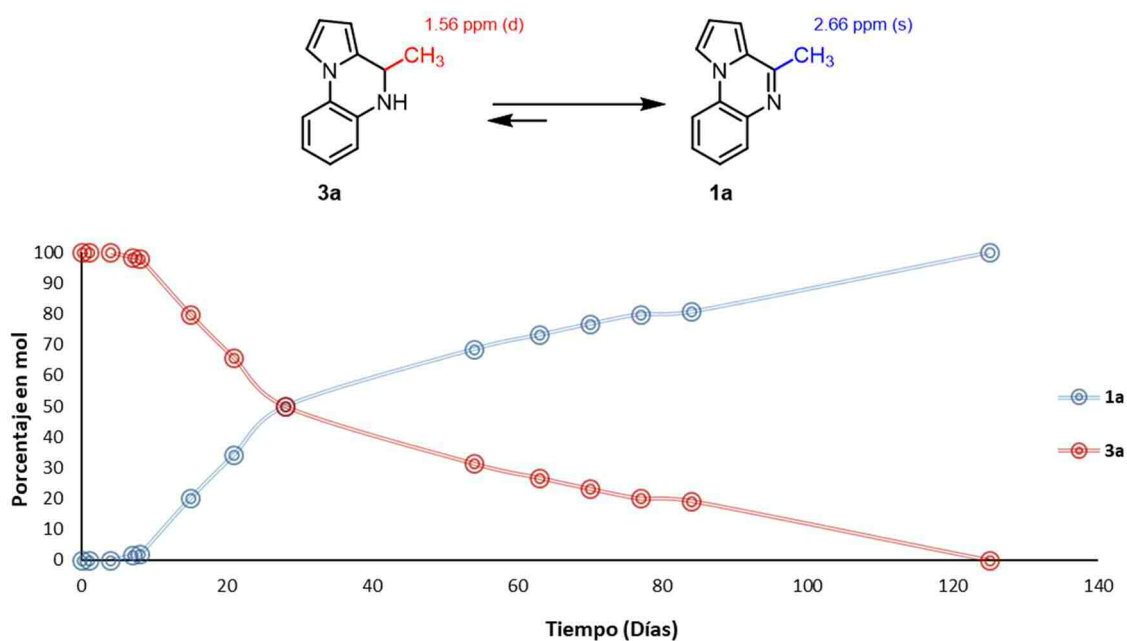
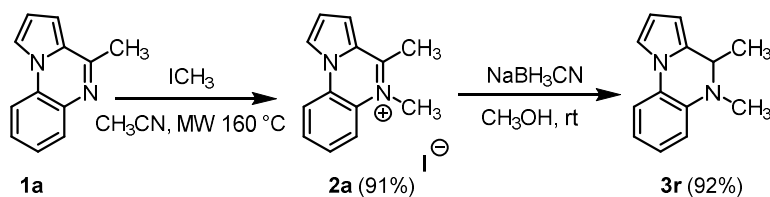


Figura 15. Estudio de estabilidad del compuesto **3a** mediante <sup>1</sup>H-RMN.

<sup>81</sup> Zhou, Y.; Jiang, G.; Tang, J. *Heterocycles* **2010**, *1*, 887.

Como se puede observar en la Figura 15, **3a** comenzó a oxidarse apreciablemente al cabo de una semana, detectándose un 3% de la forma oxidada **1a**. A partir de este momento, la velocidad de oxidación del compuesto aumentó drásticamente, y después de un mes, aproximadamente se alcanzó la proporción 1:1. La oxidación continuó hasta que al cabo de 125 días sólo se pudo observar la especie **1a**. Si bien el diseño de este experimento está sujeto a sesgos como el control de la temperatura del laboratorio, especialmente durante el período estival, sirvió para corroborar la baja estabilidad de **3a** frente a la oxidación y descartar los 4,5-dihidro derivados **3** en los estudios posteriores.

En base a estos resultados, se propuso sintetizar el derivado *N*-metilado de **3i** con el fin de evitar la oxidación del anillo de dihidroquinoxalina. Para ello, se decidió partir de la correspondiente sal **2a** preparada a partir de **1a**. Para su síntesis, **1a** se hace reaccionar con exceso (10 equiv) de yoduro de metilo en acetonitrilo bajo irradiación de microondas. Tras obtener la sal con buen rendimiento, esta se redujo fácilmente con cianoborohidruro de sodio, obteniéndose el derivado deseado **3r** (Esquema 2).



**Esquema 2** Síntesis del derivado **3r**.

Una vez preparado este derivado se decidió medir su actividad a través de la prueba de verde malaquita utilizando un kit comercial (Enzo Life Sciences®). Los ensayos se realizaron en el laboratorio del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá. Junto a **3r** se volvió a ensayar el derivado **1a**, recientemente preparado obteniéndose unos valores de  $\text{IC}_{50}$  de 0.34 y 0.33  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A pesar de la estabilidad superior del nuevo derivado **3r**, su actividad *in vitro* no mejoró significativamente la de **1a**. Por este hecho y dado que la síntesis de una familia de derivados de **3r** alargaría las etapas sintéticas y conduciría a mezclas racémicas se optó por proseguir la investigación seleccionando como cabeza de serie el compuesto **1a**.

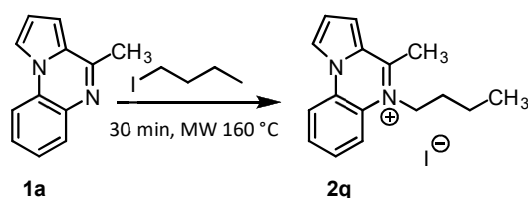
#### 4.4.2 Síntesis de derivados en las posiciones C-4 y N-5

Durante el trabajo experimental precedente a esta Tesis Doctoral se exploró la posición N-5 del esqueleto de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina y como resultado se obtuvo una familia de sales metiladas en el átomo N-5. Con el fin de explorar el efecto del sustituyente en N-5 sobre la actividad inhibitoria, se planteó la alquilación de **1a** con haluros de bencilo y butilo.

Inicialmente, se utilizaron las condiciones de la reacción de metilación previamente ensayadas en microondas. El empleo de bromuro de bencilo como agente alquilante no tuvo como resultado la obtención del producto deseado, sino la recuperación del producto de partida en su totalidad. También, se realizaron distintas pruebas adicionando ioduro de potasio en cantidades catalíticas para favorecer el intercambio de halógeno, así como incrementando los tiempos de reacción, sin resultados positivos. Del mismo modo, se realizaron pruebas aumentando la temperatura y se observó cómo a partir de 170 °C, el producto comenzaba a calcinarse en el vial de microondas.

Cuando se realizó el mismo experimento empleando ioduro de butilo como agente alquilante, se pudo aislar **2q** con un rendimiento del 17%. En base a estos resultados se intentó llevar a cabo un proceso de mejora del rendimiento de la reacción ensayando las condiciones que se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Ensayos de optimización de la alquilación de **1a** en microondas.

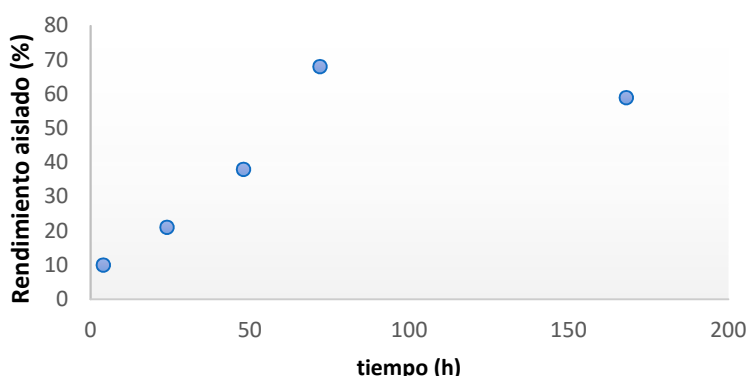


Ensayo <sup>a</sup>	1a (M)	Disolvente	2q (Rto, %) <sup>a,b</sup>
1	0.18	CH <sub>3</sub> CN	17
2 <sup>c</sup>	0.18	CH <sub>3</sub> CN	19
3	0.27	CH <sub>3</sub> CN	17
4	0.55	CH <sub>3</sub> CN	20
5	0.55	Ioduro de <i>n</i> -butilo	7
6	0.18	Acetona	15
7	0.18	Tolueno	10
8	0.18	CH <sub>3</sub> CN/Tolueno	16

<sup>a</sup> Las reacciones se realizaron con 0.55 mmol de **1a** y 5.5 mmol de BuI, excepto en el ensayo 5. <sup>b</sup> Rendimiento de producto aislado. <sup>c</sup> Tiempo de reacción, 3h.

Tal y como se puede observar en la Tabla 3, el aumento del tiempo de reacción no condujo a un aumento significativo en la obtención de **2q** (ensayos 1 y 2). Resultados análogos se observaron cuando la concentración de **1a** se aumentó 1, 3 y 5 veces con el fin de acelerar la cinética de reacción (ensayos 3 y 4, respectivamente). En estas condiciones, además se pudo observar que la mezcla de reacción comenzaba a calcinarse. El disolvente tampoco influyó significativamente en el proceso, no obstante, el acetonitrilo fue el disolvente que mejor resultados brindó, probablemente por su mayor momento dipolar (3.92 D). El bajo rendimiento obtenido al emplear ioduro de *n*-butilo como reactivo y disolvente (ensayo 5) puede deberse su menor momento dipolar (2.1 D). Este efecto también se observó para la acetona (2.91 D, ensayo D) y tolueno (0.36 D, ensayo 7). Dado que en todos los experimentos el rendimiento de la reacción no superó el 20%, se exploró la reacción en un tubo sellado.

Inicialmente fueron necesarios unos pocos ensayos para determinar la temperatura adecuada de la reacción (110 °C), puesto que la alta temperatura a la que se llevaba a cabo y la baja solubilidad de **1a** en el medio de reacción conducía fácilmente a su calcinación.



**Figura 16.** Evolución de la reacción de alquilación de **1a** con ioduro de *n*-butilo a 110 °C en tubo sellado.

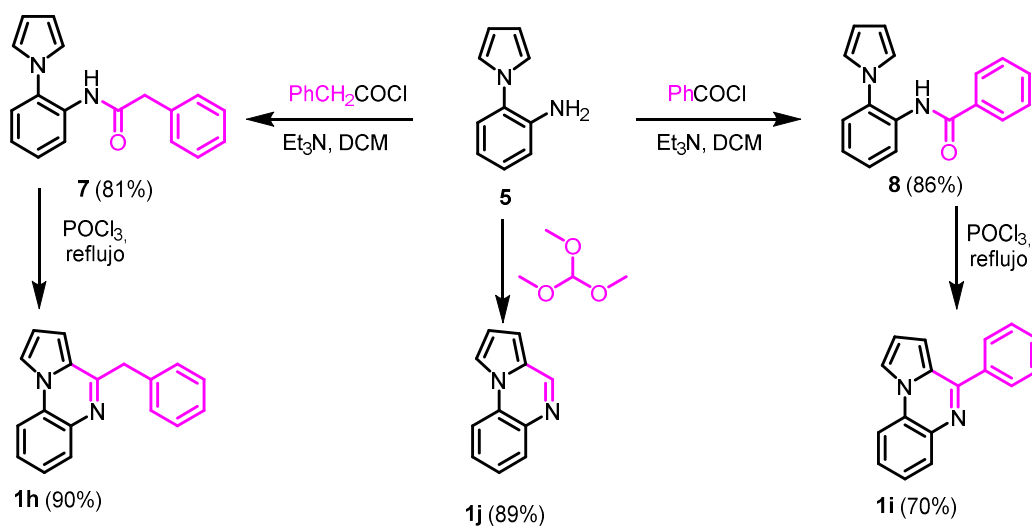
Al cabo de 4 h de reacción se aisló solamente un 10% de **2q**, pudiendo recuperarse casi en su totalidad el producto de partida **1a** (Figura 16). En base a estos resultados se decidió estudiar la evolución de la reacción a lo largo del tiempo, calentando a 110 °C, utilizando el ioduro de *n*-butilo como disolvente, y una concentración 0.4 M de **1a**. Si bien, el rendimiento aumentaba conforme aumentaba el tiempo de reacción, el rendimiento máximo (67%) se alcanzó al cabo de 72 h. Pasados 7 días, la mezcla de reacción mostraba subproductos no identificables y calcinación del producto de partida. No obstante, este nuevo método presentaba la ventaja adicional de proporcionar **2q** como un precipitado en el medio de reacción, pudiendo separarse del producto inicial fácilmente por filtración y purificación mediante trituración con éter frío.



Estas condiciones también fueron ensayadas para la alquilación con bromuro de bencilo sin resultados positivos. Debido a la dificultad de llevar a cabo la *N*-alquilación con sustituyentes distintos del grupo metilo y butilo, se optó por proseguir la investigación seleccionando como cabeza de serie el compuesto **1a**.

Con el fin de indagar en el impacto que el grupo metilo de la posición **R**<sup>4</sup> en **1a** tiene sobre la actividad, se planteó la preparación de los análogos sin sustituyente en esta posición y la introducción de restos aromáticos y lipófilos capaces de establecer interacciones de apilamiento- $\pi$  y Van der Waals.

Para la preparación de estos derivados se plantearon rutas sintéticas divergentes que utilizarasen como intermedio común la anilina **5** (Esquema 3).



**Esquema 3.** Esquema sintético de los derivados **1h-j**.

Para llevar a cabo la síntesis de los derivados de bencilo y fenilo, la anilina **5** se hizo reaccionar con el correspondiente cloruro de acilo a 0 °C, dejándose evolucionar la reacción hasta alcanzar la temperatura ambiente. De este modo, se tuvo acceso a las correspondientes anilidas derivadas **7** y **8**, respectivamente, con buenos rendimientos. Las pirroloquinoxalinas finales se obtuvieron por tratamiento de éstas con oxiclورو de fósforo de manera análoga al protocolo empleado para la obtención de **1a**. De este modo se pudieron preparar los compuestos **1h** y **1i** con buenos rendimientos.

Por otro lado, la obtención de **1j**, se llevó a cabo a través de una reacción *one-pot* lo que supone la generación *in situ* de una formanilida y su posterior ciclación. De este modo, el tratamiento de **5** con ortoformiato de trimetilo en presencia de  $\text{AcOH}$  en cantidades catalíticas, dio lugar a la formación de **1j** con muy buen rendimiento.

### 4.4.3 Síntesis de azoloquinoxalinas

Durante el transcurso de la presente investigación también se planteó la posibilidad de la preparación de derivados que sustituyesen el anillo de pirrol por otros azoles. Esta idea surge de la necesidad de conseguir nuevos derivados con mejores propiedades fisicoquímicas como solubilidad y, al mismo tiempo, obtener análogos más potentes. Para el diseño de esta nueva generación de derivados se optó por seguir una estrategia de *scaffold hopping* sobre el anillo de pirrol.

Las estrategias de *scaffold hopping* han sido ampliamente utilizadas en el descubrimiento de fármacos desde comienzos del siglo<sup>82</sup> Estas estrategias, se basan en la búsqueda, guiada computacionalmente, de compuestos activos que contienen estructuras base distintas. Normalmente se recurre a ellas con el fin de explorar el espacio químico, y con ello la propiedad intelectual de un determinado quimiotipo. No obstante, estas estrategias también se han relacionado con aproximaciones para el diseño de nuevas moléculas con mejores propiedades ADME tales como solubilidad, estabilidad química y metabólica, etc.<sup>83</sup>

En aplicación de esta estrategia, se diseñó la sustitución del anillo de pirrol con azoles monocíclicos de hasta 4 nitrógenos con el fin de generar una nueva familia de análogos. Estos derivados, de mantener o mejorar la actividad, presentarían la ventaja de una mayor solubilidad, acorde a los cLogP calculados (se utilizó el software ChemDraw®).

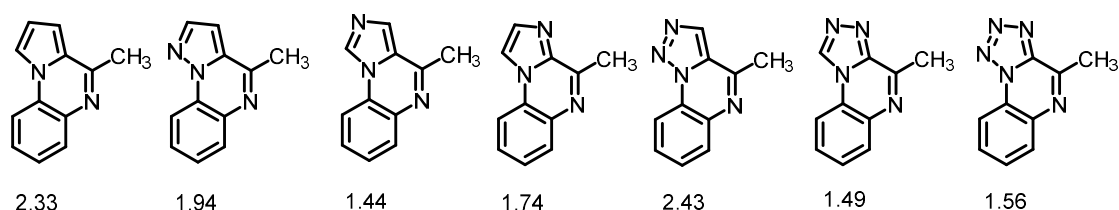


Figura 17. Derivados de azoloquinoxalina y sus valores de cLogP.

Tal y como se recoge en la Figura 17, en general, se puede observar cómo la incorporación de nitrógenos al anillo de pirrol conduce a valores menores de cLogP en comparación al compuesto líder **1a**. Además, si mantuviesen la actividad biológica, estos derivados serían bioisómeros más solubles y adecuados para utilizar como potenciales fármacos inhibidores de la PTP1B. También, la presencia de un mayor número de nitrógenos en el anillo de azol podría contribuir a que se

<sup>82</sup> Sun, H.; Tawa, G.; Wallqvist, A. *Drug Discov. Today*. **2012**, *7*, 310-324.

<sup>83</sup> Hu, Y.; Stumpfe, D.; Bajorath, J. *J. Med. Chem.* **2017**, *4*, 1238-1246.

estableciesen nuevas interacciones intermoleculares de naturaleza de enlace de hidrógeno y, por otro lado, podría implicar el bloqueo de posiciones potencialmente reactivas y susceptibles de metabolismo oxidativo.

En base a su accesibilidad sintética, se tomó la decisión de seleccionar un único azol y una única fusión con el anillo de quinoxalina por cada familia de azol (diazoles, triazoles y tetrazol), manteniendo en todos los casos la fusión a través de un átomo de nitrógeno (*N*-10) y un átomo de carbono (*C*-3a). Así se abordó la síntesis de un ejemplo de cada azol (2-4 nitrógenos): imidazo[1,2-*a*]quinoxalina, 1,2,4-triazolo[4,3-*a*]quinoxalina y tetrazolo[5,1-*a*]quinoxalina.

Inicialmente, se optó por abordar la síntesis de estos compuestos a partir de la misma estrategia sintética reflejada en el Esquema 1, ya optimizada para el caso del pirrol. Si bien todos los pasos serían análogos, primero sería necesario la preparación de los nitroazoles de partida mediante una metodología distinta a la reacción de Clauson-Kaas.

La mayoría de las estrategias descritas en la literatura para la síntesis de derivados de *N*-(*o*-nitrofenil)azoles implican la reacción de un haluro de *o*-nitroarilo con el correspondiente azol en presencia de un metal, generalmente Cu, y bajo condiciones de reacción de moderadas a drásticas.<sup>84,85,86</sup> Sin embargo, en nuestro caso se planteó una síntesis sin metales que además permitiese usar temperaturas más suaves y un fácil aislamiento del producto final.

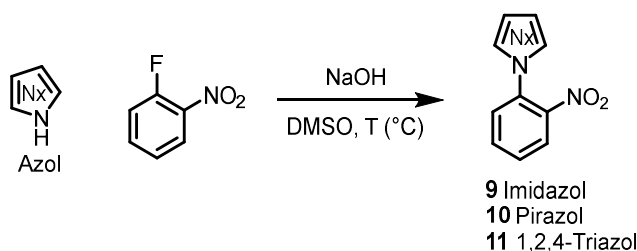
Para ello, se hizo reaccionar el 1-flúor-2-nitrobenceno con diferentes azoles en DMSO empleando como base NaOH.

---

<sup>84</sup> Yang, Q.; Wang, Y.; Zhang, B.; Zhang, M. *Chin. J. Chem.* **2012**, *10*, 2389-2393.

<sup>85</sup> Maity, T.; Saha, D.; Koner, S. *ChemCatChem* **2014**, *8*, 2373-2383.

<sup>86</sup> Zhou, L.; Yin, M.; Jiang, X.; Huang, Q.; Lang, W. *New J. Chem.* **2016**, *2*, 1454-1459.

**Tabla 4.** Reacciones de sustitución nucleófila aromática para la síntesis de *N*-(-*o*-nitrofenil)azoles.

Entrada	Azol	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Compuesto	Rendimiento (%) <sup>a</sup>
1	Imidazol	25	2	<b>9</b>	99
2	Pirazol	25	5	<b>10</b>	97
3	Pirazol	60	2	<b>10</b>	99
4	1,2,4-Triazol	25	17	<b>11</b>	90
5	1,2,4-Triazol	60	5	<b>11</b>	99
6	Tetrazol	25	72	<b>12</b>	-

<sup>a</sup> Rendimiento de producto aislado

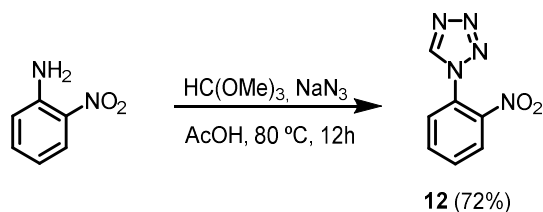
Tal y como se puede observar en la Tabla 4, las reacciones transcurrieron con excelente rendimiento. El mayor número de átomos de nitrógeno en el azol se asocia a su menor reactividad,<sup>87</sup> como consecuencia de la densidad electrónica menor por átomo de nitrógeno en el correspondiente anión azolato. No obstante, este hecho fue fácilmente solventado aumentando la temperatura con el fin de disminuir el tiempo de reacción. Además, una vez finalizada la reacción, el producto fue aislado fácilmente mediante la adición de agua fría a la mezcla de reacción para favorecer la precipitación del producto final. Curiosamente, este método no fue adecuado para llevar a cabo la sustitución nucleófila aromática sobre el anillo de 1-flúor-2-nitrobenceno con el tetrazol. Durante el transcurso de la reacción se observó una mezcla compleja de compuestos y descomposición del tetrazol. A la vista de estos resultados, se optó por preparar el derivado según el protocolo descrito por He.<sup>88</sup> Este método consiste en la preparación del anillo de tetrazol a partir de una anilina.

Cuando se intentó reproducir el protocolo partiendo de la *o*-nitroanilina, únicamente se consiguió un 48% de rendimiento de producto **12** (Esquema 4). Dados estos resultados se intentó aumentar el tiempo de reacción observándose descomposición en la mezcla de reacción transcurridas 24 h. Aumentando el número de equivalentes de azida sódica (2 equiv) y

<sup>87</sup> Saha, B.; Sharma, S.; Sawant, D.; Kundu, B. *Tetrahedron* **2008**, *37*, 8676-8684.

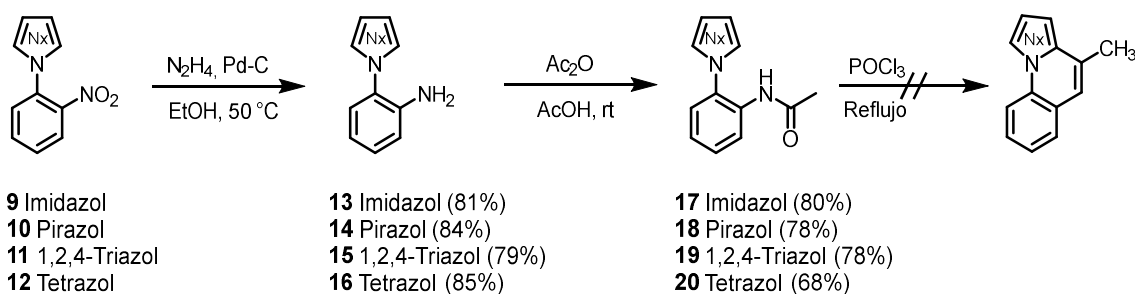
<sup>88</sup> He, Z.; Bae, M.; Wu, J.; Jamison, T. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *52*, 14451-14455.

monitorizando la reacción hasta la aparición de productos de descomposición se consiguió alcanzar un 72% de rendimiento de **12** aislado.



**Esquema 4.** Síntesis de 1-H-(2-nitrofenil)-tetrazol.

Una vez obtenidos los compuestos **9-12**, éstos se redujeron empleando Pd-C e hidrazina como fuente de hidrógeno bajo atmósfera inerte (Esquema 5). A pesar de que la reacción realizada a temperatura ambiente transcurría en tiempos bastante largos de hasta 72 h, calentando la mezcla a 50 °C se consiguieron reducir los tiempos hasta 24 horas con buenos rendimientos.



**Esquema 5.** Reacciones de reducción y acetilación de azoloderivados intermedios.

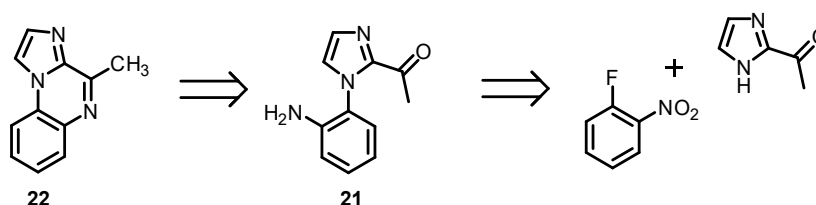
Las aminas así obtenidas fueron seguidamente acetiladas, sin embargo, en esta ocasión se optó por emplear unas condiciones de reacción más suaves para los derivados **13-16**. Se hicieron reaccionar con 1.3 equivalentes de anhídrido acético en ácido acético como disolvente, a temperatura ambiente. Se prepararon así las acetanilidas **17-20** con buenos rendimientos. Además, el proceso de purificación fue sencillo, requiriendo únicamente una simple extracción, sin necesidad de columna cromatográfica.

Finalmente, las acetanilidas **17-20** se hicieron reaccionar con oxiclورو de fósforo a reflujo para provocar la ciclación a los compuestos finales. Desafortunadamente, en ningún caso se obtuvo la correspondiente azoloquinolina. También, los experimentos realizados aumentando los tiempos de reacción, adicionando ácidos de Lewis como FeCl<sub>3</sub>, o utilizando microondas, resultaron negativos. La menor nucleofilia y reactividad del anillo de azol a medida que aumenta su número de nitrógenos se asume como la causa que explicaría el fracaso de la ciclación a través de la reacción de sustitución electrófila en el azol.

A la vista de estos resultados, se replanteó la estrategia y se tomó la decisión de sintetizar los análogos de imidazol, 1,2,4-triazol y tetrazol como representativos del esqueleto de azoloquinoxalina de 2, 3 y 4 átomos de nitrógeno con los mejores valores de cLogP. Para ello se siguieron rutas sintéticas distintas, intentando emplear productos de partida que fueran de fácil acceso.

#### 4.4.3.1 Síntesis de 4-metilimidazo[1,2-*a*]quinoxalina (**22**)

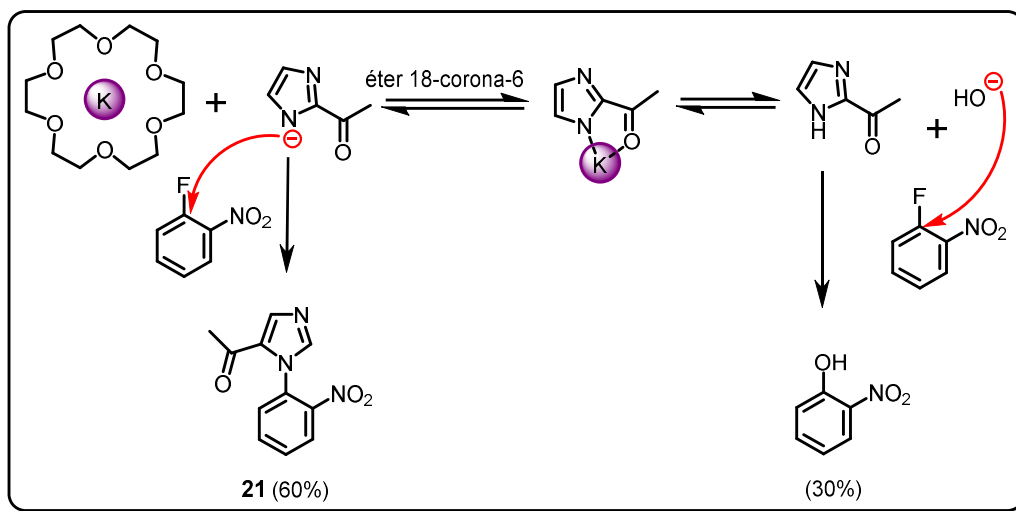
Para la síntesis se planteó el siguiente esquema retrosintético, el cual permitía la síntesis del producto deseado a partir de la condensación intramolecular del intermedio **21** (Esquema 6).



*Esquema 6. Esquema retrosintético para 22.*

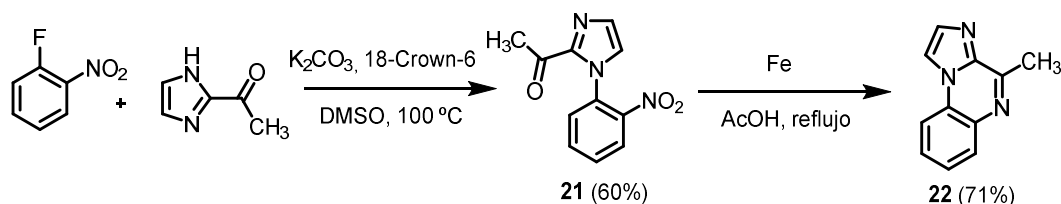
Siguiendo este planteamiento se hizo reaccionar el 2-acetilimidazol con el 1-flúoro-2-nitrobenzene en las condiciones utilizadas previamente para la síntesis de **9-11**. Sin embargo, transcurridas 24 h de reacción no se observó la formación del producto final. El empleo de otras bases como KOH o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tampoco condujo a los resultados deseados. Cuando se aumentó la temperatura de reacción hasta los 100 °C, se pudo aislar 2-nitrofenol con un 30% de rendimiento como subproducto no deseado junto a los productos de partida. La formación de este subproducto se explica por la baja nucleofilia del anión 2-acetilimidazolato, que, además, se estabiliza formando un quelato con el catión metálico (Esquema 7). Así, el anión hidróxido, más nucleófilo, competiría con el anión imidazolato para dar el 2-nitrofenol.

Como alternativa se recurrió a añadir un exceso de éter 18-corona-6 con respecto a la base con el fin de complejar los cationes potasio, aumentar la nucleofilia del anión imidazolato y favorecer así la reacción. Bajo estas condiciones, se consiguió sintetizar el compuesto **21** con buen rendimiento.



**Esquema 7.** Evolución de la reacción del anión 2-acetilimidazolato.

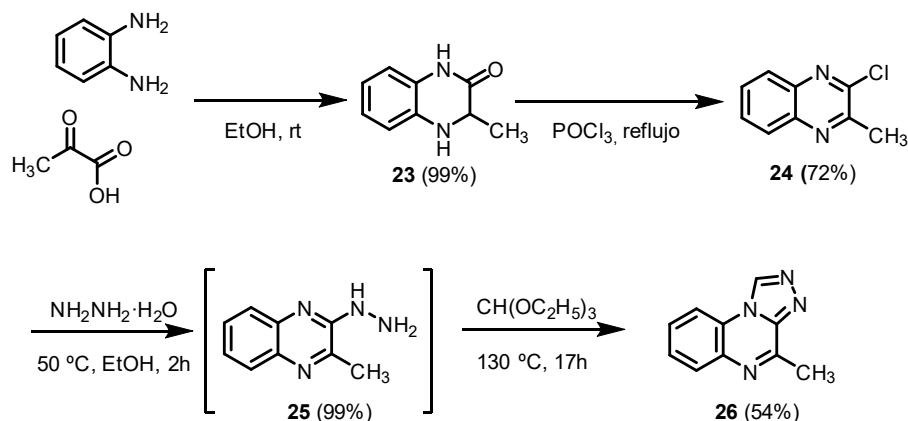
Para la obtención de **22** se tomó la decisión de reducir el grupo nitro de **21** utilizando unas condiciones más drásticas mediante el empleo de hierro en polvo como agente reductor y ácido acético como disolvente de reacción, a reflujo y en atmósfera inerte. En estas condiciones se pretendía generar la correspondiente anilina y llevar a cabo su ciclación *in situ*. Esta reacción estaría favorecida por la presencia del ácido acético y los cationes  $\text{Fe}^{3+}$ , que podrían actuar como ácido de Lewis coordinándose al grupo carbonilo del acetilimidazol aumentando así la electrofilia del mismo. La ciclación se consiguió calentando la mezcla de reacción durante 3 h, obteniéndose un 71% del compuesto **22** sin necesidad de aislar la amina intermedia.



**Esquema 8.** Ruta sintética de **22**.

#### 4.4.3.2 Síntesis de 4-metil-[1,2,4]-triazolo[4,3-*a*]quinoxalina (26)

Para la síntesis del derivado de triazol se siguió la ruta sintética descrita por Wagle (Esquema 9).<sup>89</sup> La primera reacción consistió en la condensación de la *o*-fenilendiamina con el ácido pirúvico para formar la quinoxalina **23** con rendimiento cuantitativo. El posterior tratamiento de esta con oxiclorigo de fósforo condujo a la cloroquinoxalina **24** con buen rendimiento.



Esquema 9. Ruta sintética para 26.

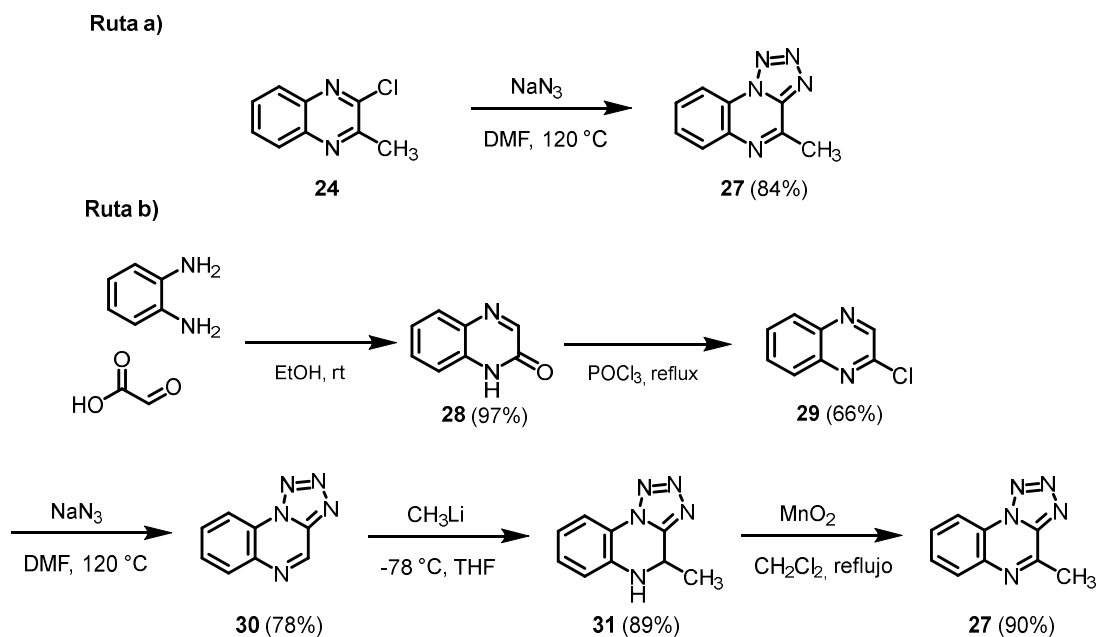
A continuación, se procedió a la síntesis del hidrazino derivado **25** mediante tratamiento de **24** con hidrazina en etanol. A pesar de que el producto **25** podía ser aislado y purificado mediante cromatografía, en nuestro caso se decidió continuar con el crudo de reacción por poseer una pureza adecuada para llevar a cabo la última reacción. La ciclación del intermedio **25** se logró por tratamiento de este en una disolución de ortoformiato de trietilo, a reflujo, durante toda la noche. De este modo se tuvo acceso a la triazoloquinoxalina **26** con un 38% de rendimiento global mediante una ruta sintética que sólo requería purificación cromatográfica en el último paso.

#### 4.4.3.3 Síntesis de tetrazolo[5,1-*a*]quinoxalina (27)

Para llevar a cabo la síntesis del derivado de tetrazol **27**, se plantearon dos posibles rutas siguiendo el planteamiento descrito previamente en el Esquema 8. Por un lado, se accedió fácilmente a **27** a partir del intermedio **24** haciéndolo reaccionar con azida sódica en DMF y calentando durante 24 h, obteniéndose el producto final **27** con muy buen rendimiento (Esquema 10, Ruta a).

<sup>89</sup> Wagle, S.; Adhikari, A. V.; Kumari, N. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *3*, 1135-1143.





**Esquema 10.** Esquemas sintéticos para la obtención de derivados de tetrazol.

La segunda ruta se planteó de forma análoga a la ruta utilizada para **24** con el fin de poder obtener otros compuestos (Esquema 10, ruta b). En esta ocasión, se hizo reaccionar el ácido glioxílico con la *o*-fenilendiamina para obtener la quinoxalin-2-ona (**28**). La cloración posterior se llevó a cabo fácilmente por tratamiento con oxiclورو de fósforo dando lugar a la formación de **29**. Finalmente, este derivado se cicló por tratamiento con azida sódica en DMF durante 24 h, para dar **30** con buen rendimiento.

Por otra parte, cuando **30** se trató con una disolución de metil litio en tetrahydrofurano a 0 °C, se pudo obtener fácilmente el dihidro derivado **31** con muy buen rendimiento (89%). Éste resultó ser estable frente a la oxidación ambiental a diferencia de su análogo **3a**. A continuación, **31** se oxidó fácilmente con óxido de manganeso a reflujo, obteniéndose **27** con un 90% de rendimiento. Si bien la primera ruta permitió el acceso a **27** con un rendimiento global del 60%, superior al de la segunda ruta (37%). Ésta última, también dio acceso a los productos intermedios **30** y **31** sin necesidad de incluir purificaciones cromatográficas adicionales, por lo que supone una alternativa interesante a la hora de generar cierta diversidad estructural para este esqueleto.

#### 4.4.4 Actividad biológica

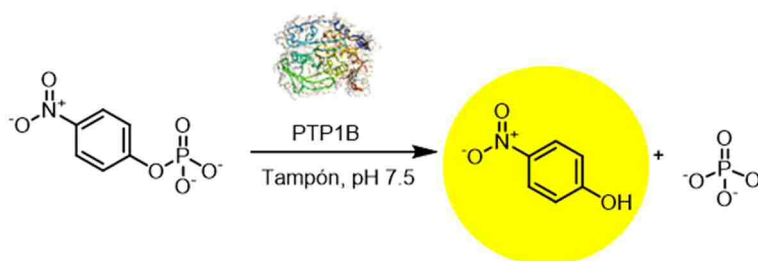
##### 4.4.4.1 Actividad inhibitoria *in vitro* de las familias de azoloquinoxalinas

Una vez se completó la síntesis de las azoloquinoxalinas, se procedió a la evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* de las mismas, así como de los derivados de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina sintetizados previamente en nuestro grupo.

Los primeros ensayos consistieron en la evaluación del porcentaje de inhibición a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  de inhibidor utilizando como sustrato enzimático un péptido (IRS5) con secuencia correspondiente a los aminoácidos 1142-1153 del receptor de la insulina. Este péptido presenta fosforilada la tirosina de la posición 1146 y es sobre la cual actúa la PTP1B. El ensayo, de naturaleza colorimétrica se basa en medir la concentración del anión fosfato liberado durante la hidrólisis por la formación de un complejo de color verde oscuro (ensayo del verde malaquita).

Los resultados de este primer ensayo mostraron que los compuestos evaluados mostraban porcentajes de inhibición comprendidos entre el 22% y el 53%, confirmándose así la actividad de estos análogos como inhibidores de la PTP1B.

Para determinar la potencia de los inhibidores se decidió medir los valores de  $\text{IC}_{50}$ . Sin embargo, en este caso se optó por cambiar el método colorimétrico del verde malaquita por el método del fosfato de *p*-nitrofenol. Se trata de un ensayo colorimétrico que mide la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm correspondiente al producto de hidrólisis, el *p*-nitrofenol, que se libera al medio durante la reacción enzimática (Figura 18).



**Figura 18.** Esquema representativo del fundamento del ensayo del fosfato de *p*-nitrofenol.

Este es un ensayo menos sensible ya que la PTP1B presenta menor afinidad por el sustrato y por tanto lo hace más susceptible a variaciones en la concentración de sustrato del medio.<sup>90</sup> No obstante, esta prueba se ajustaba más a nuestras necesidades, dado que permite llevar a cabo mediciones en continuo a diferencia de las mediciones en punto final inherentes al método del verde malaquita. Además, el sustrato, es mucho más barato y el procedimiento experimental es más sencillo y, por lo tanto, está sujeto a menos error.

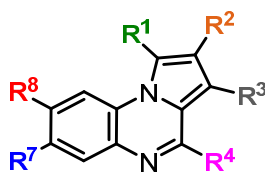
Junto a la actividad frente a la PTP1B, también se evaluó el grado de inhibición frente a la enzima TCPTP. Este hecho es importante, ya que la selectividad de los inhibidores frente a otras fosfatasa como la TCPTP es vital, puesto que su inhibición es la responsable de los numerosos efectos adversos y del fracaso de desarrollo clínico de inhibidores de esta enzima.<sup>91</sup>

---

<sup>90</sup> Lubben, T.; Clampit, J.; Stashko, M.; Trevillyan, J.; Jirousek, M. R. *Curr. Protoc. Pharmacology*. **2001**, *1*, 3.8.1-3.8.18.

<sup>91</sup> Li, X.; Wang, L.; Shi, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *16*, 3343-3352.

Tabla 5. Datos de actividad biológica in vitro de la familia de pirrolo[1,2-a]quinoxalinas



Comp.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	IC <sub>50</sub> ± DE (μM)		IS <sup>a</sup>
							PTP1B	TC-PTP	
<b>1a</b>	H	H	H	Me	H	H	1.00 ± 0.01	3.95 ± 1.81	3.95
<b>1b</b>	H	H	H	Me	Me	Me	> 10	Nd	Nd
<b>1c</b>	H	H	H	Me	Me	H	> 10	Nd	Nd
<b>1d</b>	H	H	H	Me	Cl	Cl	0.57 ± 0.22	> 25	> 43.86
<b>1e</b>	H	H	H	Me	CF <sub>3</sub>	H	> 10	Nd	Nd
<b>1f</b>	H	H	H	Me	OCH <sub>3</sub>	H	> 10	Nd	Nd
<b>1g</b>	H	H	H	Me	H	Cl	0.60 ± 0.11	> 25	> 41.67
<b>1h</b>	H	H	H	Bn	H	H	0.24 ± 0.01	0.96 ± 0.21	4.00
<b>1i</b>	H	H	H	Ph	H	H	0.62 ± 0.08	0.45 ± 0.40	0.72
<b>1j</b>	H	H	H	H	H	H	0.88 ± 0.43	1.79 ± 1.01	2.03
<b>1k</b>	Br	H	H	Me	Me	Me	Ns	Ns	Ns
<b>1l</b>	H	H	Br	Me	Me	Me	4.20 ± 0.98	1.99 ± 1.48	0.47
<b>1m</b>	Br	Br	H	Me	Me	Me	Ns	Ns	Ns
<b>1n</b>	Br	H	H	Me	H	Cl	1.82 ± 0.94	7.95 ± 3.02	4.37
<b>1o</b>	H	H	Br	Me	H	Cl	4.69 ± 0.43	Nd	Nd

<sup>a</sup> Índice de selectividad, IS = IC<sub>50</sub>PTP1B/IC<sub>50</sub>TCPTP; Nd: no determinado; Ns: no soluble.

Tal y como se puede observar en la Tabla 5, los mejores inhibidores de PTP1B (**1d**, **1g** y **1h**) presentaron valores de IC<sub>50</sub> ligeramente por debajo del rango micromolar, siendo **1h** el más potente de la serie.

En relación con las principales relaciones estructura-actividad, se pudo concluir que la existencia de grupos metilo en las posiciones **R**<sup>7</sup> y **R**<sup>8</sup> parece tener un efecto negativo sobre la actividad, disminuyendo la potencia en términos de IC<sub>50</sub>. Respecto a las sustituciones en la posición **R**<sup>4</sup>, no se observaron cambios significativos en la actividad con respecto al grupo metilo, salvo para el derivado con un grupo bencilo (**1h**). Éste demostró tener una potencia de casi un orden de magnitud superior al derivado de referencia **1a**. A pesar de que no se encontraron diferencias muy significativas respecto al resto de derivados, si se pudo concluir que la presencia de grupos trifluórometilo y metoxilo da lugar a un efecto negativo sobre la actividad.

Para aquellos inhibidores más potentes también se determinó la IC<sub>50</sub> frente a la proteína TCPTP. En general, la mayoría de los derivados mostraron una selectividad aceptable y dentro del rango de los compuestos descritos en la literatura. Únicamente los derivados **1i** y **1l** presentaron mayor afinidad por la TCPTP que por PTP1B. Las sustituciones en la posición **R**<sup>4</sup> del esqueleto de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina no parecieron afectar de forma significativa a la selectividad de los compuestos, mientras que la presencia de un átomo de bromo en **R**<sup>1</sup> afecta de forma negativa a la selectividad.

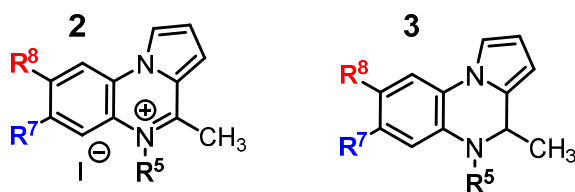
Un resultado bastante interesante en términos de selectividad fue el que presentaron los compuestos portadores de cloro en las posiciones **R**<sup>7</sup> y/o **R**<sup>8</sup>. Estos análogos mostraron un alto grado de selectividad hacia la PTP1B frente a la TCPTP, con índices de selectividad superiores a 40. Además, ambos derivados presentaban unos valores por debajo del rango micromolar. En base a estos resultados parece que la presencia de átomos de cloro en estas posiciones del esqueleto de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina estaría contribuyendo de forma significativa a la mejora de la selectividad. Una posible explicación para justificar esta mayor selectividad de los compuestos **1d** y **1g** *in vitro* podría ser que la presencia de los átomos de cloro estuviera contribuyendo a la generación de interacciones intermoleculares menos comunes, pero no por ello menos importantes como el enlace de halógeno, interacciones tipo Dunitz, o interacciones halógeno-sistema π.<sup>92</sup>

---

<sup>92</sup> Kuhn, B.; Gilberg, E.; Taylor, R.; Cole, J.; Korb, O. J. *Med. Chem.* **2019**, *22*, 10441-10455.

Al igual que con la serie **1**, los análogos de las series **2** y **3** fueron inicialmente evaluados mediante un cribado rápido a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  frente a una PTP1B recombinante humana mediante la prueba de verde malaquita. Los resultados fueron similares, obteniéndose porcentajes de inhibición comprendidos entre el 22% y el 56% de inhibición. Para aquellos candidatos que presentaban porcentajes cercanos o superiores al 50% se determinó la  $\text{IC}_{50}$  mediante la prueba del fosfato de *p*-nitrofenol.

**Tabla 6.** Datos de actividad inhibitoria in vitro para los compuestos de la serie **2** y **3** frente a la PTP1B



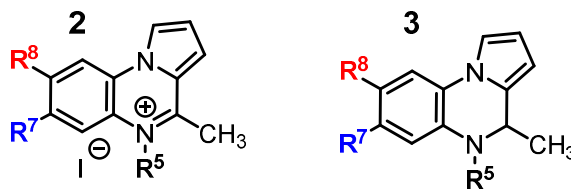
R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	<b>2</b>	R <sup>5</sup>	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) $\pm$ DE	<b>3</b>	R <sup>5</sup>	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) $\pm$ DE
H	H	<b>a</b>	Me	0.32 $\pm$ 0.01	<b>a</b>	H	0.41 $\pm$ 0.18
Me	Me	<b>b</b>	Me	Nd	<b>b</b>	H	Nd
Me	H	<b>c</b>	Me	> 10	<b>b</b>	H	Nd
Cl	Cl	-	Me	-	<b>d</b>	H	0.95 $\pm$ 0.52
CF <sub>3</sub>	H	<b>e</b>	Me	0.58 $\pm$ 0.05	<b>e</b>	H	Nd
OCH <sub>3</sub>	H	<b>f</b>	Me	> 10	<b>f</b>	H	1.39 $\pm$ 0.38
H	Cl	<b>g</b>	Me	0.83 $\pm$ 0.26	<b>g</b>	H	0.45 $\pm$ 0.25
H	H	<b>q</b>	Bu	1.91 $\pm$ 0.57	-	-	-
H	H	-	-	-	<b>r</b>	Me	0.51 $\pm$ 0.05

Nd: no determinado; Ns: no soluble.

Cabe destacar que, para un número significativo de los compuestos evaluados, los rangos de valores de  $\text{IC}_{50}$  encontrados son del orden de micromolar bajo y submicromolar. En la serie **2**, destacó la sal **2a**, la cual presentó un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 0.32  $\mu\text{M}$  y es más soluble que su correspondiente análogo **1a**. Al igual que ocurría en la serie **1**, aquellos compuestos de la serie **2** y **3** con metoxilo como sustituyente sufren una notable pérdida de su capacidad inhibitoria (compuestos **2f** y **3f**). Por otro lado, el cambio del grupo metilo por un grupo butilo en la posición R<sup>5</sup> (compuesto **2q**) tampoco tuvo un efecto beneficioso sobre la actividad.

Una vez establecido el perfil inhibitorio de ambas series de compuestos frente a la PTP1B, se pasó a estudiar su selectividad frente a la TCPTP recombinante humana.

**Tabla 7.** Datos de selectividad de los compuestos de las series 2 y 3.



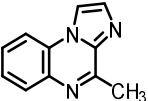
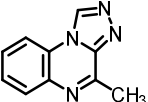
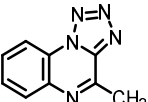
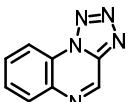
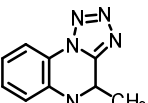
Compuesto	R <sup>5</sup> , R <sup>7</sup> , R <sup>8</sup>			IC <sub>50</sub> ± DE (μM)		IS <sup>a</sup>
	R <sup>5</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	PTP1B	TC-PTP	
<b>2e</b>	CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	H	0.58 ± 0.05	0.41 ± 0.13	0.71
<b>2g</b>	CH <sub>3</sub>	H	Cl	0.83 ± 0.26	> 5	> 6.02
<b>3d</b>	H	Cl	Cl	0.95 ± 0.52	> 5	> 5.26
<b>3g</b>	H	H	Cl	0.45 ± 0.25	> 5	> 11.1
<b>3r</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	0.51 ± 0.05	0.50 ± 0.01	0.98

<sup>a</sup> Índice de selectividad, IS = IC<sub>50</sub>PTP1B/IC<sub>50</sub>TCPTP.

Tal y como se puede observar en la Tabla 7, se identificaron dos derivados con selectividad por ambas fosfatasas. El compuesto **2e**, que presenta un grupo trifluórometilo en posición **R<sup>7</sup>**, y el dihidro derivado **3r** con un grupo metilo unido al átomo de nitrógeno N-5. Por otro lado, en estas series se volvió a observar el efecto que ejercen los átomos de cloro en posiciones **R<sup>7</sup>** y/o **R<sup>8</sup>** sobre la selectividad, llegando a alcanzar valores superiores a 5, especialmente para el compuesto **3g**. Estos resultados confirman la relevancia del cloro como sustituyente en las posiciones **R<sup>7</sup>** y **R<sup>8</sup>** del sistema de pirroloquinoxalina a efectos del diseño y obtención de moléculas selectivas frente a la fosfatasa altamente homóloga TCPTP.

Finalmente, se determinó la actividad inhibitoria *in vitro* frente a la PTP1B de los derivados de azoloquinoxalina utilizando el ensayo del fosfato de *p*-nitrofenol.

**Tabla 8.** Datos de actividad in vitro de inhibición de PTP1B de la serie de azoloquinoxalinas.

Compuesto	Estructura	IC <sub>50</sub> (μM) ± DE
22		0.42 ± 0.05
26		0.59 ± 0.22
27		1.24 ± 0.61
30		0.25 ± 0.09
31		1.70 ± 0.43

Como muestran los valores de IC<sub>50</sub> determinados para esta familia de compuestos, en general, se puede constatar un leve aumento de la actividad inhibitoria. Los derivados de imidazo- y triazoloquinoxalina **22** y **26**, respectivamente, resultaron más potentes que el análogo **1a**, aunque esta tendencia no se mantuvo con el derivado **27**. Así pues, aunque las diferencias de potencia son pequeñas, el anillo de imidazol sería el más adecuado para esta región. El compuesto **30** resultó ser 5 veces más potente que su análogo metilado **27**, el cual, presenta una actividad similar a la determinada para el dihidroderivado **31**. Estos datos mostrarían que la combinación de un anillo de tetrazol y un grupo metilo en **R<sup>4</sup>** en la estructura de azoloquinoxalina disminuirían la potencia inhibitoria frente a la PTP1B.



#### 4.4.4.2 Estudios de viabilidad celular

Dado los buenos resultados obtenidos en los ensayos de actividad inhibitoria *in vitro*, y con el fin de poder confirmar el potencial valor terapéutico de los compuestos más potentes, se decidió llevar a cabo estudios de toxicidad de todos los compuestos sintetizados hasta el momento. Para ello, se llevaron a cabo pruebas de viabilidad celular empleando el ensayo del MTT junto a la línea celular HepG2. La toxicidad de los compuestos se evaluó utilizando una concentración de inhibidor muy alta (50  $\mu$ M) y comparando con un tampón a modo de control y con el vehículo (DMSO). Cabe señalar que en estos ensayos no se encontraron problemas de solubilidad con los compuestos puesto que la cantidad de DMSO empleada para solubilizarlos fue mayor, dado que tiene menor impacto sobre la viabilidad celular que en los ensayos *in vitro*.

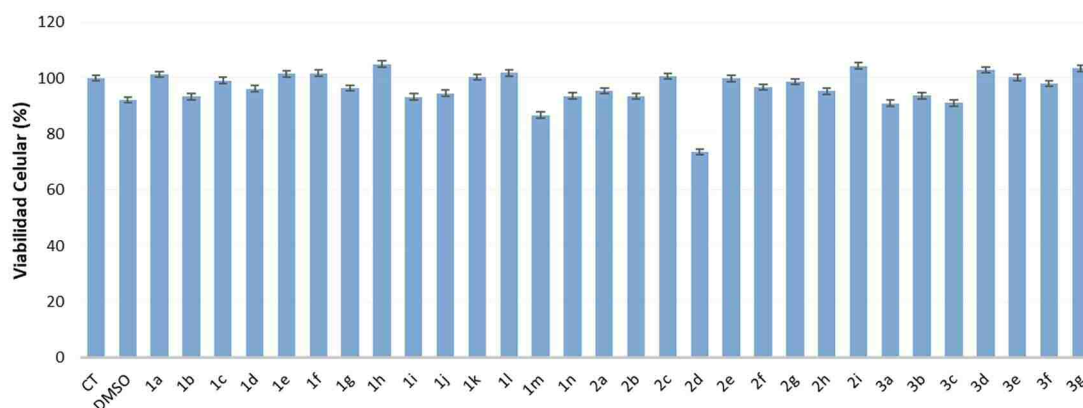
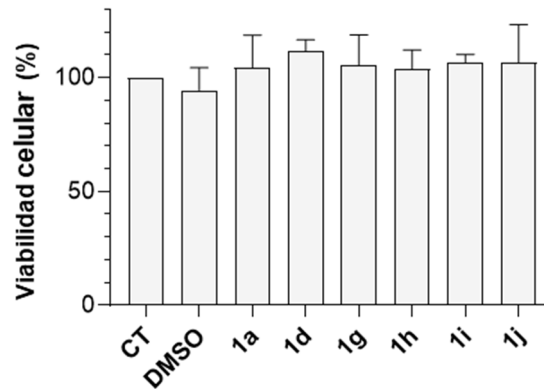


Figura 19. Resultados de viabilidad celular en la línea HepG2.

En este primer cribado de viabilidad celular se testaron los compuestos pertenecientes a las series **1**, **2** y **3** por estar disponibles en el momento de su evaluación. Los resultados recogidos en la Figura 19, ilustran cómo los compuestos ensayados presentaron una toxicidad baja. La mayoría de ellos consiguieron viabilidades similares a las del control y por encima del vehículo de DMSO. Los valores de viabilidad para esta línea celular se encuentran en su mayoría por encima del 85% a excepción de la sal de quinoxalino **2d** que produce una viabilidad celular alrededor de 70%, siendo por ello levemente más tóxico que el resto de los miembros de la familia. A pesar de que la serie de azoles no se evaluó, dada la similitud estructural es de esperar también para estos compuestos valores semejantes y por tanto baja toxicidad de los mismos.

Una vez obtenidos estos resultados y previo a la evaluación de los efectos de los compuestos a nivel celular, se optó por realizar otro experimento de viabilidad celular. Para este segundo ensayo se utilizó otra línea celular distinta a la HepG2, la línea C2C12. Esta línea celular, procedente de mioblastos de células de músculo esquelético de ratón, es fácilmente diferenciable a miocitos y se seleccionó por ser más sensible a los experimentos de captación de

glucosa que se realizaron posteriormente. Dado que el trabajo con esta línea celular es menos rutinario y experimentalmente más complejo, únicamente se seleccionaron algunos de los derivados de la serie **1** para estudiar su comportamiento en esta línea celular.



**Figura 20.** Resultados de viabilidad celular en la línea C2C12 expresado como histogramas  $\pm$  error. CT: Control.

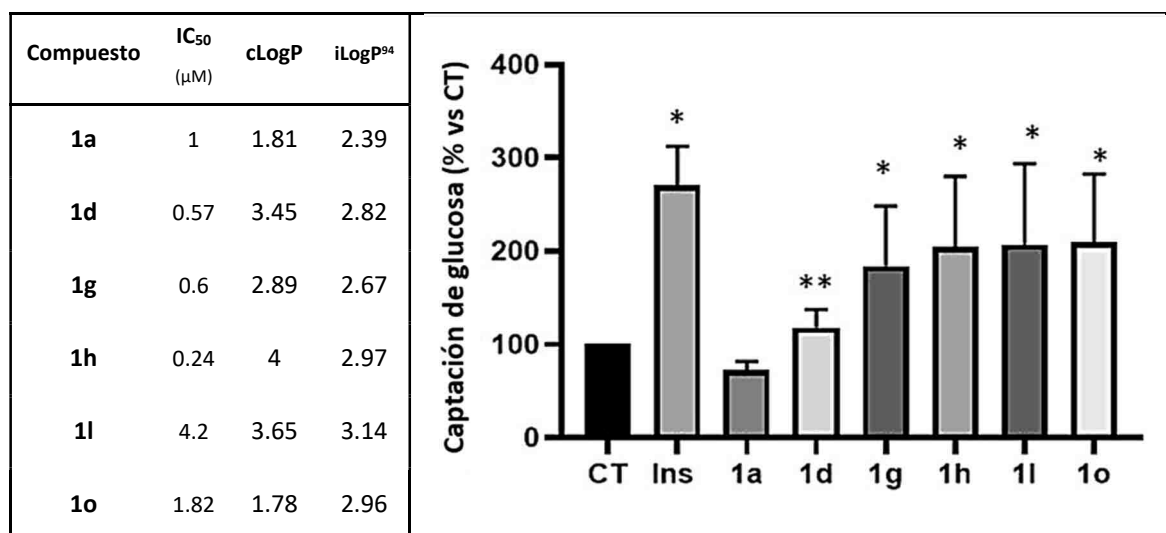
Al igual que ocurre con la línea HepG2, los compuestos seleccionados no mostraron toxicidad frente a la línea celular de mioblastos. De hecho, para los compuestos **1d**, **1i** y **1j** los resultados de viabilidad celular fueron incluso mejores que para la línea celular ensayada previamente. Este conjunto de resultados avaló realizar un estudio más exhaustivo de eficacia y mecanismo de acción de los compuestos.

#### 4.4.4.3 Evaluación de la captación de glucosa

La unión de la insulina a su receptor da lugar a la activación de numerosas cascadas de señalización intracelular que, en última instancia, tienen entre otros efectos, la expresión y traslocación de los transportadores de glucosa de la familia GLUT en las células de los tejidos de los mamíferos.<sup>93</sup> La expresión de las distintas isoformas de este transportador trae consigo un aumento en la captación de glucosa por parte de la célula y, por tanto, del tejido donde se integra. Al actuar como regulador negativo de la vía de señalización de la insulina, es de esperar que la inhibición de la PTP1B traiga consigo un aumento en la expresión de estas proteínas y, por tanto, de la captación celular de glucosa. Así pues, se tomó la decisión de medir la captación de glucosa promovida por estos inhibidores en modelos celulares con el fin de demostrar su eficacia en un ensayo fenotípico. Estos ensayos se realizaron empleando la línea celular C2C12

<sup>93</sup> Taheripak, G.; Bakhtiyari, S.; Rajabibazl, M.; Pasalar, P.; Meshkani, R. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 1435-1446.

por tratarse de miocitos, un tipo celular con alta demanda de captación de glucosa para llevar a cabo las funciones propias del tejido de músculo esquelético.



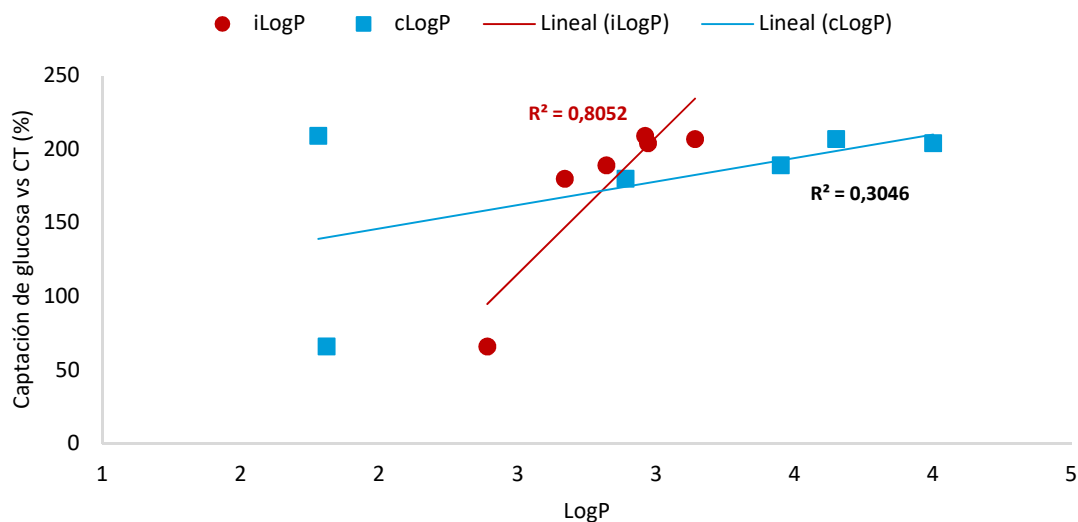
**Figura 21.** Resultados de la captación de glucosa de los inhibidores de la serie **1** sobre células C2C12. CT: Control; Ins: Insulina. \*  $p < 0.05$  vs CT, \*\*  $p < 0.005$  vs el resto de los grupos.

En la primera serie de experimentos, se evaluaron compuestos correspondientes a la serie **1** a una concentración de 2  $\mu$ M. Como se puede observar en la Figura 21, el compuesto cabeza de serie **1a**, no mostró efectos a nivel de captación de glucosa en los ensayos fenotípicos. A pesar de ello, se encontraron otros resultados más interesantes con otros inhibidores. Mientras que el derivado **1d** fue capaz de aumentar la captación de glucosa levemente, **1g** fue capaz de aumentar la captación de glucosa un 85% con respecto al control. Además, los inhibidores **1h**, **1l** y **1o** fueron capaces de doblar la captación de glucosa respecto al control y sin la presencia de insulina.

La baja correlación que se observa entre los resultados de la actividad de captación de glucosa a nivel celular con los resultados de actividad inhibitoria de PTP1B *in vitro*, puede explicarse en base a la lipofilia de los compuestos. Los compuestos más lipófilos mostraron mayor actividad en el ensayo de captación de glucosa en comparación con **1a**. Este hecho podría estar

<sup>94</sup> Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. J. *Chem. Inf. Model.* **2014**, *12*, 3284-3301.

relacionado con la permeabilidad de estos a través de las membranas biológicas, con el fin de llegar a la biofase donde se encuentra la diana.

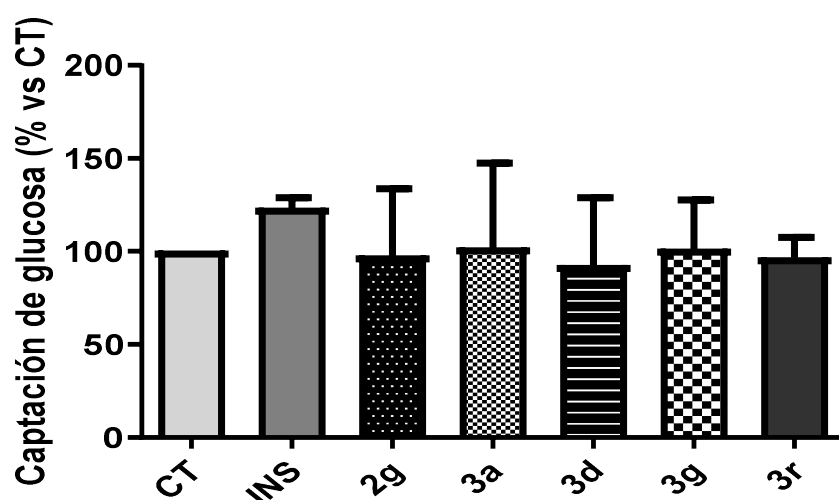
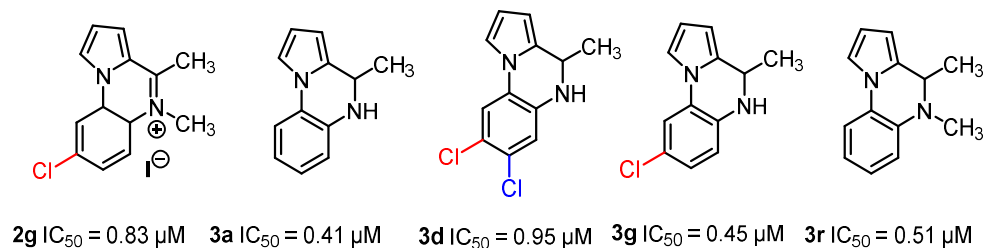


**Figura 22.** Correlación entre los valores calculados de LogP y la captación de glucosa para los compuestos de la serie 1

Además, el estudio detenido de los valores de LogP calculados con el método estándar por fragmentos de Chemdraw® y el método desarrollado más recientemente de iLogP permitió encontrar correlaciones. Como se puede observar en la Figura 22, mientras que los valores de cLogP no correlacionan bien con la capacidad de captación de glucosa de la serie de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas ( $R^2 = 0.3046$ ), en el caso del iLogP esta correlación es mucho mejor ( $R^2 = 0.8052$ ). De este modo, se podría establecer un modelo sencillo de QSAR que relacionase la capacidad de captación de glucosa del esqueleto de pirroloquinoxalina con su valor de iLogP calculado:

$$\% \text{ Captación de glucosa} = 184i\text{LogP} - 350$$

A continuación, también se evaluó la eficacia de las series **2** y **3** de compuestos sintetizados. Teniendo en cuenta que los compuestos de la serie **1** mostraron un comportamiento *in cellulo* no del todo acorde con su perfil *in vitro*, los compuestos se seleccionaron teniendo en cuenta también la diversidad estructural.



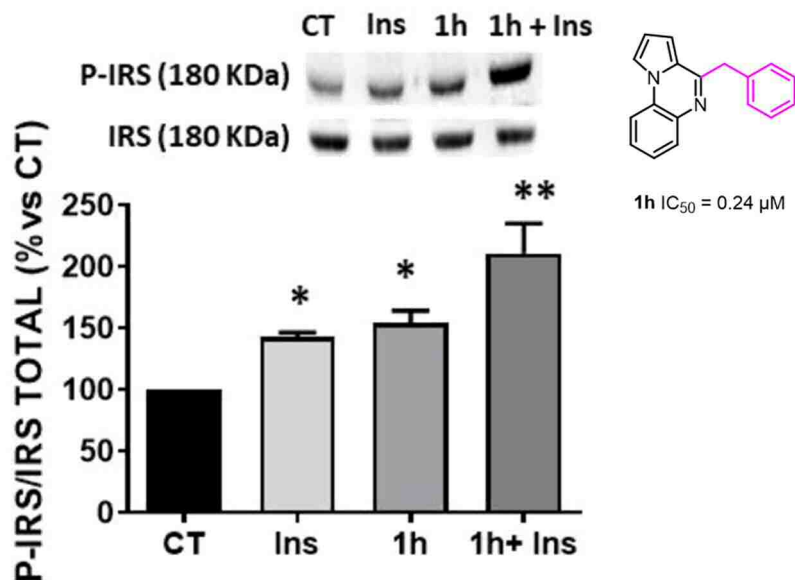
**Figura 23.** Resultados del ensayo de captación de glucosa de inhibidores de las series **2** y **3** sobre células C2C12 expresados como histogramas  $\pm$  error de tres repeticiones. CT: Control; Ins: Insulina.

En esta batería de experimentos, los compuestos no mostraron aumento de la captación de glucosa. Únicamente los derivados **3a** y **3g** parecieron aumentar la captación aproximadamente un 5% por encima del control. No obstante, cuando se estudiaron los resultados más detenidamente se observó que la insulina no ejerció un efecto lo suficientemente alto y significativo, y, por consiguiente, la línea celular no era completamente funcional. Además, teniendo en cuenta la desviación de todas las medidas, los resultados parecerían indicar que la captación de glucosa podía ser mayor de lo observada. En el momento de redacción de la presente Tesis se está repitiendo el estudio de los compuestos seleccionados.

#### 4.4.4.4 Estudio del mecanismo de acción

La principal conclusión obtenida de los experimentos de captación de la glucosa es que los compuestos sintetizados son eficaces en modelos fenotípicos *in vivo*. Establecer el mecanismo de acción de un potencial candidato a fármaco a nivel molecular es uno de los pasos claves en el proceso de descubrimiento de fármacos. Aunque se estima que aproximadamente un 18% de los fármacos aprobados carecen de un mecanismo de acción definido y en un 7% se desconoce,<sup>95</sup> establecer el mecanismo de acción de las moléculas supone una fuente valiosa de información antes de entrar en etapas clínicas, aumentando las posibilidades de éxito en las etapas de su desarrollo.<sup>96</sup>

La unión de la insulina a su receptor desencadena la fosforilación cruzada de las cadenas intracitoplasmáticas de éste. A continuación, se produce el reclutamiento de distintas proteínas adaptadoras y proteína quinasas que conducen a la fosforilación de todas las proteínas y sustratos implicados en la ruta de señalización de la insulina (Figura 4). Así, con el fin de poder corroborar el mecanismo de acción se midió el grado de fosforilación de distintas proteínas sobre las cuales actúa directamente PTP1B.



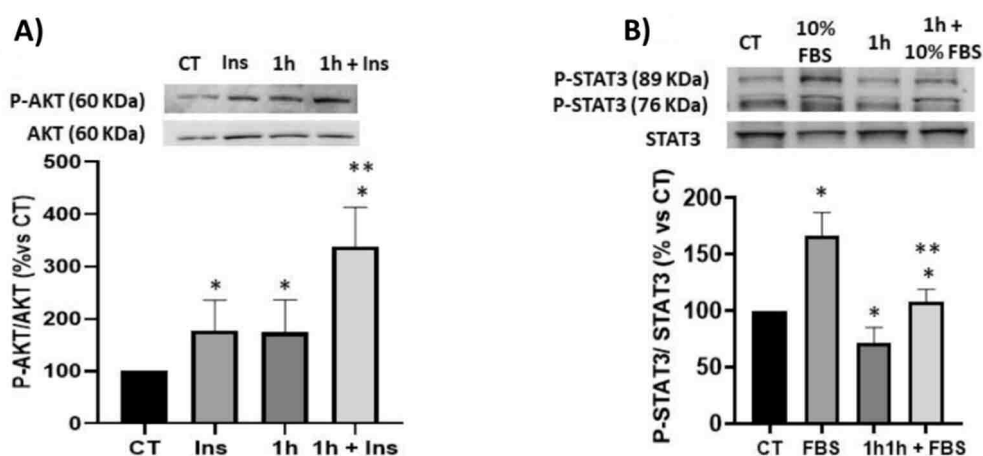
**Figura 24.** Efecto de 1h sobre la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS). Western blot para IRS y fosfo-IRS (P-IRS). Las ratios del análisis densitométrico se muestran debajo del Western blot. Los valores se expresan como porcentaje respecto al control y la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. CT: Control; Ins: Insulina. \*  $p < 0.05$  vs CT, \*\*  $p < 0.005$  vs el resto de los grupos.

<sup>95</sup> Gregori-Puigjané, E.; Setola, V.; Hert, J.; Crews, B. A.; Irwin, J. J.; Lounkine, E.; Marnett, L.; Roth, B. L.; Shoichet, B. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *28*, 11178-11183.

<sup>96</sup> *Nat. Med.* **2010**, *4*, 347.

Para llevar a cabo estos ensayos se seleccionó el candidato **1h** por ser uno de los inhibidores que mejor perfil presentó tanto en los ensayos *in vitro* como fenotípicos *in vivo*. Inicialmente se intentó medir el grado de fosforilación del receptor de insulina (IR), pero dadas las dificultades en el desarrollo y revelado de los *Western blots* se optó por evaluar el IRS-1. Tal y como se observa en la Figura 24, **1h** fue capaz de aumentar el grado de fosforilación del sustrato en torno a un 50% con respecto a las condiciones basales sin insulina. En presencia de esta hormona, que correspondería a una situación fisiológica, la recaptación de glucosa se ve aumentada hasta 3 veces con respecto al control, poniendo de manifiesto el potente efecto de **1h**.

Finalmente, también se decidió evaluar la fosforilación de Akt, enzima implicada en la ruta de señalización del receptor de la insulina, así como de STAT3 una proteína implicada en la ruta de señalización de las Janus quinasas activadas por el receptor de leptina.



**Figura 25.** Efecto de **1h** sobre la fosforilación de: A) Akt y B) STAT3. Western blot para proteínas totales y proteínas fosforiladas. Las ratios del análisis densitométrico se muestran debajo del Western blot. Los valores se expresan como porcentaje respecto al control y la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. CT: Control; Ins: Insulina, FBS: Suero Fetal Bovino. \*  $p < 0.05$  vs CT, \*\*  $p < 0.005$  vs el resto de los grupos.

Tal y como se observa en la Figura 25, el inhibidor **1h** mostró tener un efecto muy pronunciado sobre el grado de fosforilación de Akt. Respecto al control, **1h** fue capaz de aumentar la fosforilación a los mismos niveles que la insulina, mientras que cuando se incubaron las células tanto con **1h** como con insulina el efecto se duplicaba respecto a las condiciones basales. Estos resultados junto a los del sustrato del receptor de insulina y de captación de glucosa confirman el mecanismo de acción de esta familia de moléculas sobre la vía de señalización de la insulina. Por otro lado, también se midió la fosforilación de la proteína STAT3, sin embargo, en esta ocasión el inhibidor no pareció exhibir ningún efecto modulador sobre la proteína y, por tanto, sobre su vía de señalización.

#### 4.4.5 Estudios de docking

Una vez caracterizado el perfil biológico de todos los compuestos sintetizados, se planteó la posibilidad de llevar a cabo un estudio de modelado molecular encaminado a poder racionalizar parte de los resultados obtenidos, así como proponer un posible modo de unión de los compuestos a PTP1B.

En primera instancia, y con el fin de poder proponer los modos de unión, se intentaron llevar a cabo experimentos de cinética enzimática con los compuestos **1a**, **1g** y **1h** con el objetivo de poder establecer su comportamiento a nivel de modo de inhibición. Desafortunadamente, y en parte debida a la baja solubilidad y problemas de agregación a concentraciones altas de los compuestos en las condiciones del ensayo, cuando se obtuvieron y procesaron los correspondientes diagramas de Lineweaver-Burk no se consiguieron resultados concluyentes. A pesar de todo, se pudo comprobar que **1a** parecía exhibir un comportamiento propio de un inhibidor de tipo mixto.

Teniendo en cuenta esta tendencia se decidió empezar modelando los compuestos más activos en el sitio activo de PTP1B y en su bolsillo alostérico con el fin de comprobar cuál era su patrón de comportamiento en los estudios de *docking*.

Para llevar a cabo estas simulaciones se utilizaron dos estructuras cristalinas distintas. Por un lado, y para el modelado en el centro activo de la enzima se empleó el PDB: 2NTA el cual muestra un inhibidor de naturaleza tiazolidindiona unido al centro activo. Para llevar a cabo el modelado en el sitio alostérico, se recurrió a técnicas de modelado por homología con el fin de reconstruir el sitio alostérico de la PTP1B con el inhibidor **XIV** (Figura 9) unido en su interior. Este paso fue necesario puesto que experimentalmente está comprobado que la unión en esta zona de la PTP1B da lugar a una pérdida parcial de la estructura secundaria de la hélice  $\alpha$ -7 y, por tanto, produce su desestabilización.<sup>97</sup> Hasta el momento, las estructuras depositadas en el PDB para los complejos PTP1B/inhibidor alostérico carecen de la zona C-terminal, especialmente la parte de la hélice  $\alpha$ -7. Esta no se encuentra completamente resuelta debido a la alta movilidad que presenta y que hace imposible su correcto modelado y asignación una vez resueltos los cristales por difracción de rayos X.

---

<sup>97</sup> Baskaran, S. K.; Goswami, N.; Selvaraj, S.; Muthusamy, V. S.; Lakshmi, B. S. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *8*, 2004-2012.



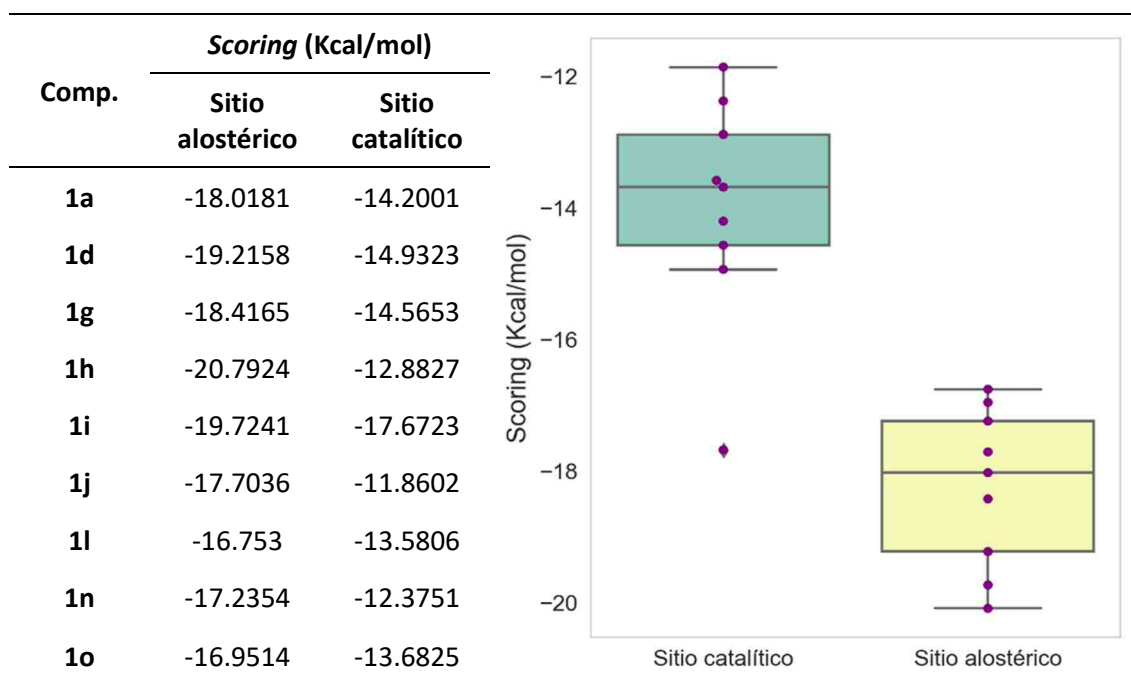
Una vez obtenido el modelo de homología mediante la herramienta Modeller, éste fue validado y optimizado utilizando los servidores *What If* y *Molprobit*, comprobando su validez visualmente y a través de los mapas de Ramachandran.

Las proteínas se protonaron a un pH de 7.2, considerándose la Cys215 del centro activo en su forma ionizada y la Arg221 protonada.

Estos experimentos de docking se realizaron con el programa FlexX. Inicialmente, y con el fin de validar el protocolo utilizado, para el inhibidor del sitio activo (2NTA) y del sitio alostérico (1T49) se llevaron a cabo los experimentos de *docking* en sus correspondientes cristales. De este modo, se comprobó que el método desarrollado era capaz de reproducir las poses y principales interacciones de los inhibidores en sus correspondientes cristales. Se obtuvieron valores de RMSD de 0.587 Å y 0.981 Å para el inhibidor del centro activo y del sitio alostérico, respectivamente, considerándose aceptables valores por debajo de 2 Å para la validación de los protocolos de *docking* de ligandos extraídos de sus respectivos cristales.<sup>98</sup>

Una vez validado el método, se hizo el *docking* de los compuestos más activos de la serie **1** tanto en el sitio activo como en el sitio alostérico con el fin de comprobar posibles diferencias de los compuestos por uno u otro sitio.

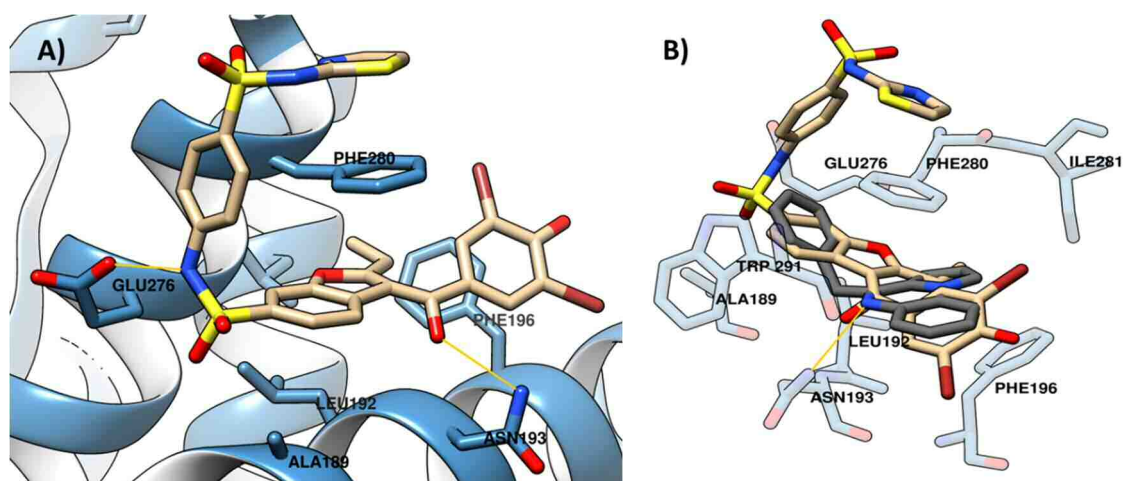
**Tabla 9.** Resultados de los estudios de docking y distribución de los valores de scoring obtenidos por los compuestos en forma de diagrama de cajas y bigotes.



<sup>98</sup> Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. Molecular Docking. In *Molecular Modeling of Proteins*; Kukol, A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2008; pp 365-382.

Tal y como se puede observar en los resultados obtenidos en la Tabla 9, se pudieron observar diferencias muy notables en cuanto al valor de puntuación o *scoring* de los compuestos después del *docking*. Todos los inhibidores simulados mostraron mayor afinidad en el sitio alostérico de la PTP1B que en el centro activo de la enzima. Atendiendo a la distribución de valores, se puede observar que para el sitio alostérico, la media de energía de interacción está en torno a las -18 kcal/mol y para la cavidad catalítica, se encuentra en torno a -13 kcal/mol, siendo una diferencia bastante notable. Además, cuando se pasó a inspeccionar visualmente las poses obtenidas, se pudo comprobar que no existía ningún patrón de interacción para los compuestos en el centro activo a pesar de su similitud estructural. Del mismo modo, no se observaron modos de unión tan plausibles como los encontrados en el sitio alostérico, presentando cada compuesto una pose distinta en el centro activo. Estas soluciones exponían a las moléculas, de carácter eminentemente hidrofóbico, a sitios cargados y polares, sin que en la mayoría de los casos se observen enlaces de hidrógeno u otras interacciones que pudiesen explicar el modo de unión.

En base a estos resultados, se decidió modelar los compuestos de la serie **1** en el bolsillo alostérico con el fin de proponer un modo de unión. Este bolsillo se encuentra en el interior flanqueado por las hélices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -6 y  $\alpha$ -7 de la PTP1B y se trata de una cavidad mucho más lipófila en comparación al centro activo.



**Figura 26.** A) Representación del inhibidor **XV** en el bolsillo alostérico y sus principales interacciones (PDB: 1T49). B) Superposición del *docking* de **1h** en el modelo de homología con la estructura de **XV**.

Los derivados de benzobromarona descritos por Wiesmann se alojan en este sitio donde abundan las interacciones hidrofóbicas de Van der Waals con las cadenas laterales de los residuos Ala189, Leu192, Leu232, Ala273 o Ile 281. A estos contactos se le unen interacciones de naturaleza apilamiento- $\pi$  entre el ligando y residuos de fenilalanina. De este modo, el esqueleto de

benzofurano de los inhibidores **XIII**, **XIV** y **XV** establece un apilamiento- $\pi$  paralelo con el residuo Phe280 mientras que el resto de dibromofenol lo hace con la Phe196. Además, los compuestos **XIV** y **XV** son capaces de establecer una interacción de naturaleza apilamiento- $\pi$  en forma de T con la Phe280 y el anillo del fragmento de sulfanilamida. El inhibidor más potente, **XV**, interacciona con otro apilamiento- $\pi$  paralelo a través del resto de tiazol con la Phe280. En el caso de la estructura cristalina de **XIII** (PDB:1T48) existe un pequeño segmento de la hélice terminal  $\alpha$ -7 resuelto y se puede observar cómo el residuo de Trp291, desplazado por el inhibidor, también es capaz de establecer interacciones hidrofóbicas y de naturaleza apilamiento- $\pi$ . Además, de todas estas interacciones de naturaleza hidrófoba se establecen dos enlaces de hidrógeno, uno mediado por el residuo Asn193 y el grupo carbonilo de las benzbromaronas, y otro entre el resto de Glu276 y el grupo -NH de las sulfonamidas.

Las poses obtenidas del *docking* de las pirrolo[1,2-*a*]quinoxalinas tratan de reproducir alguna de las interacciones de estas benzbromaronas dentro del bolsillo alostérico. El nitrógeno de la posición N-5 de todos los compuestos se posiciona hacia la Asn193 con el fin de establecer un enlace de hidrógeno análogo al del carbonilo de las benzbromaronas. Además, el apilamiento- $\pi$  paralelo con la Phe280 lo establece el anillo de pirrol o el de pirazina en la mayoría de los casos. Como se puede comprobar en la superposición del inhibidor cristalizado **XV** y **1h** el anillo de benceno de la quinoxalina se sitúa en el lugar ocupado por el anillo de bromofenol mientras que el grupo fenilo termina de ocupar el espacio donde se posiciona el esqueleto de benzofurano (Figura 25 B).

Para el resto de los compuestos de la serie **1** el patrón de interacción encontrado resultó muy similar. Los derivados con cloro en las posiciones **R**<sup>7</sup> y **R**<sup>8</sup> orientaban los sustituyentes hacia la Phe196, lugar que ocupa el anillo de dibromofenol de **XV** en las estructuras cristalinas. Por otro lado, aquellos derivados con átomos de bromo en el anillo de pirrol curiosamente orientan el bromo hacia el exterior de la cavidad tal y como ocurre con **1l**.

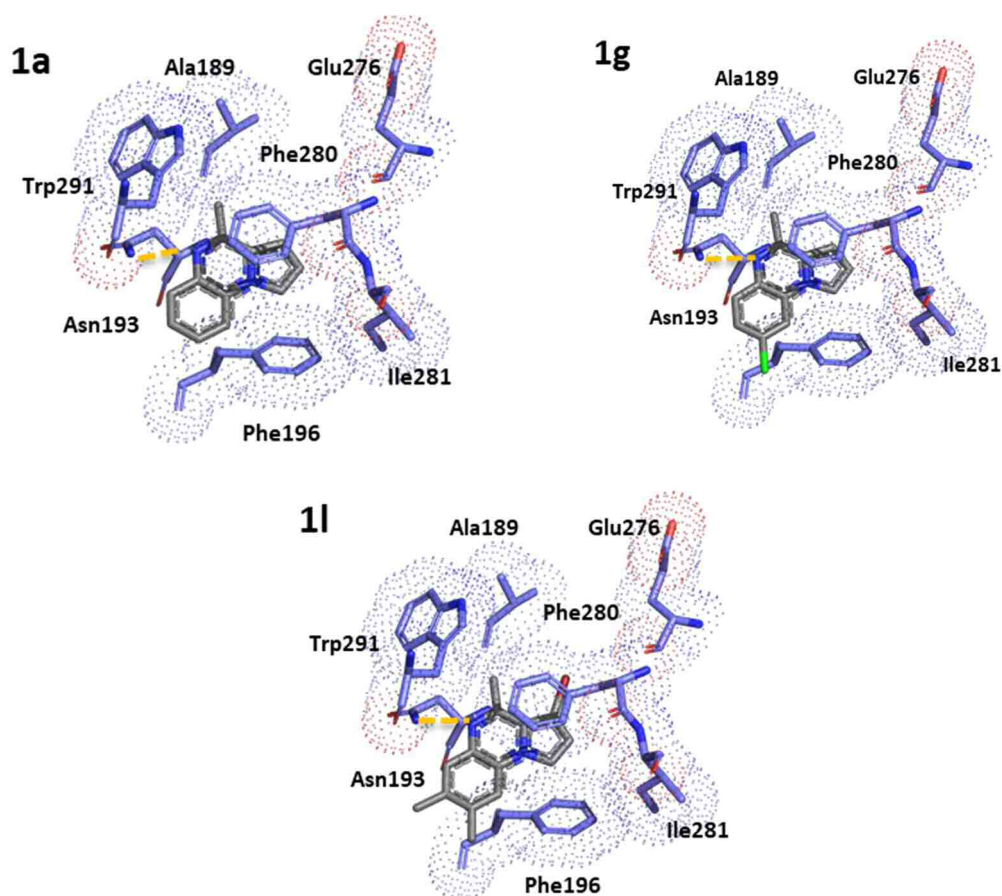


Figura 27. Docking de los compuestos más activos de la serie 1.

A continuación, se procedió a estudiar el posible modo de unión de los derivados de las series **2** y **3**. Tal y como era de esperar, en los compuestos de ambas series se pierde el enlace de hidrógeno mediado por el nitrógeno *N*-5 y la Asp193. Este hecho se debe a que, en la serie **2**, el átomo de nitrógeno *N*-5 se encuentra alquilado y, en la serie **3**, en forma de -NH, y por tanto pierde su naturaleza de aceptor de enlace de hidrógeno.

Tal y como se puede observar en la Figura 28, el análogo **2a** experimenta una rotación de 180 ° en su pose respecto a **1a**. De este modo, el compuesto **2a** orienta el grupo metilo unido al nitrógeno catiónico hacia el interior del bolsillo hidrofóbico, y en el mismo lugar que los derivados de benzbromarona **XIII**, **XIV**, **XV**, orientan el grupo etilo del anillo de benzofurano. Por otro lado, esta pose, es la más frecuente dentro de la serie **2** y supone un desplazamiento de los anillos aromáticos de los compuestos con respecto a su posición en el *docking* de la serie **1**. Por ello, las interacciones por apilamiento- $\pi$  con la Phe280 pasan a establecerse a través del anillo

de benceno de las pirroloquinoxalinas y de forma desplazada con el anillo de quinoxalina. El anillo de pirrol y el metilo de la posición 4 pasan a ocupar la cavidad delimitada por la Phe196.

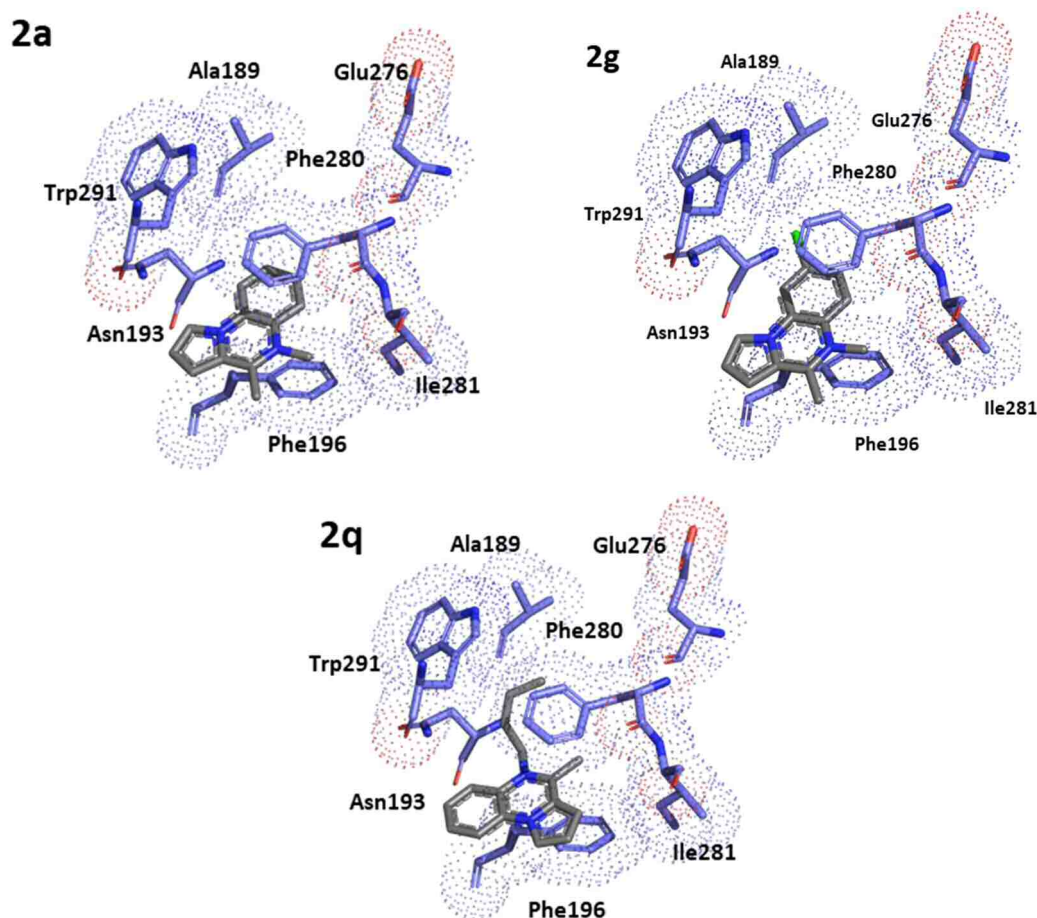


Figura 28. Docking de compuestos de la serie 2

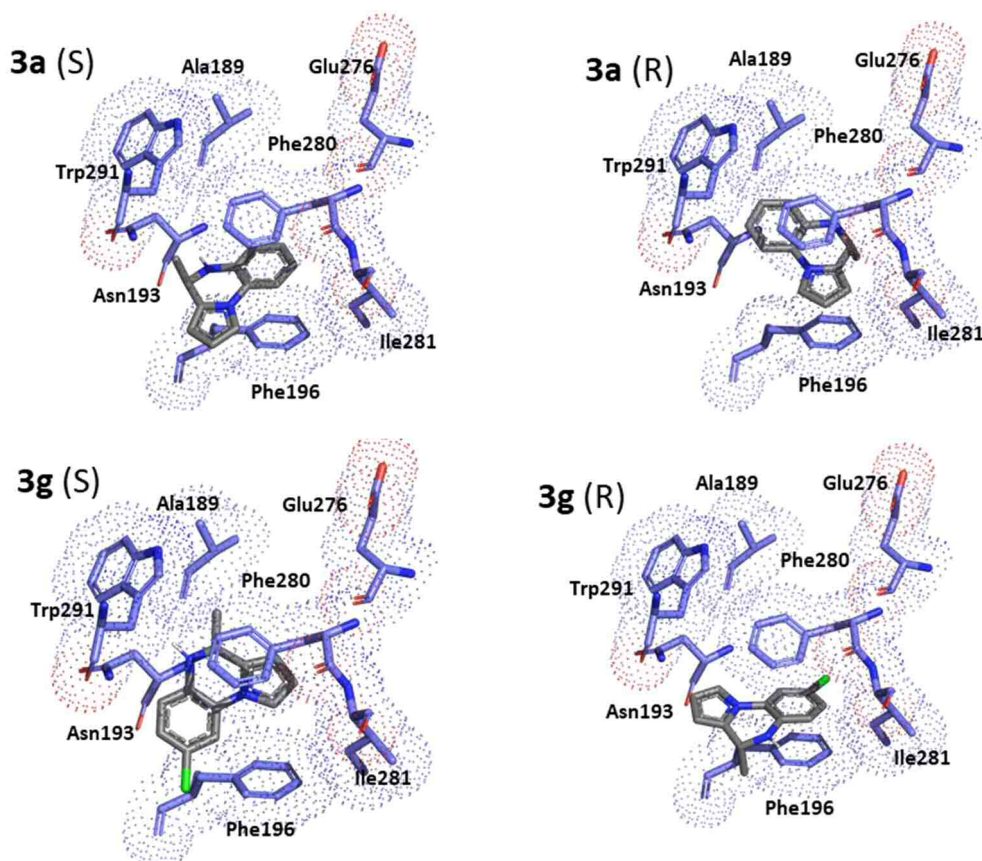
Si bien este patrón se cumplió para todos los compuestos estudiados por *docking*, **2q** presentó una pose distinta. En este caso el nitrógeno *N*-5 se encuentra sustituido con un grupo butilo en lugar de metilo, de tal modo que ocupa un mayor volumen y presenta alta movilidad. Como resultado la pose de este compuesto se vió notablemente desplazada del respecto al resto de miembros de la serie **2**. En este caso la cadena alquílica intenta posicionarse en el interior de la cavidad hidrofóbica de tal manera que desplaza el esqueleto aromático. Como resultado, solo se establece una interacción de apilamiento- $\pi$  parcialmente desplazado entre el anillo de quinoxalina y la Phe196. Esta pose podría explicar la menor actividad de **2q** con respecto al resto de miembros de la serie. Además, **2q** presentó una puntuación o *scoring* mayor (-14.5035 kcal/mol) en comparación al derivado **2a** (-16.1754 kcal/mol).

Con respecto a los compuestos de la serie **3**, para los estudios de *docking* se consideraron los enantiómeros de cada uno de ellos. En general, la orientación del grupo metilo en cada uno de los enantiómeros condiciona la pose del compuesto. De este modo los derivados **3a** y **3d** (no



mostrado) compartían la misma pose para cada uno de sus enantiómeros (Figura 29). En el caso de **3a**, las interacciones de apilamiento- $\pi$  se establecen, por un lado, entre el anillo de benceno y la Phe280 de forma parcialmente desplazada y, por otro lado, entre el anillo de pirrol y la Phe196 en el caso de le enantiómero de configuración absoluta *R*. Si bien, en ambos casos, parece más plausible el modo de interacción de los enantiómeros *R* por tener más interacciones y porque los enantiómeros *S* se encuentran parcialmente más desplazados hacia el exterior de la cavidad.

Los derivados clorados **3d** (no mostrado) y **3g** presentan el mismo patrón de interacciones. En el caso del enantiómero (*S*)-**3g**, el átomo de cloro se orienta hacia la Phe196 de manera similar a como ocurre con sus respectivos análogos de la serie **1** (Figura 29). El apilamiento- $\pi$  tiene lugar entre la Phe280 y el anillo de pirrol. Por otro lado, el enantiómero (*R*)-**3g** cambia la orientación del átomo de cloro dirigiéndolo hacia la zona colindante al residuo de Glu276 de la cavidad hidrofóbica. En este caso, la Phe280 interactúa con el anillo de benceno de **3d** (no mostrado) y **3g**.



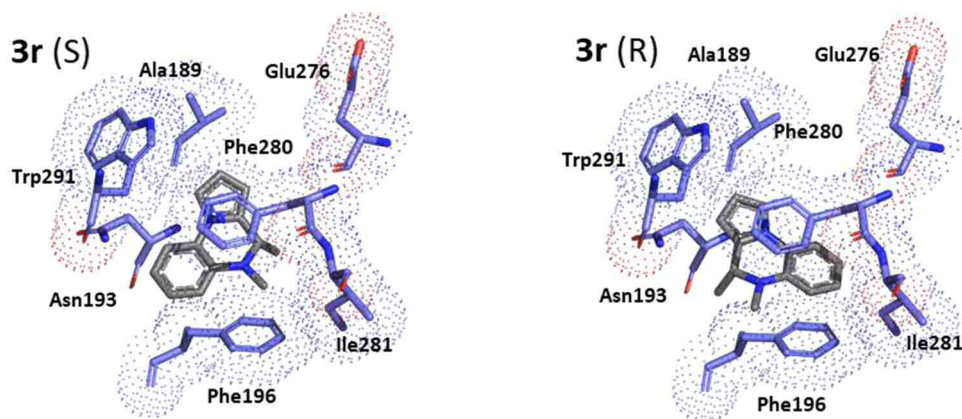


Figura 29. Docking de compuestos de la serie 3.

Finalmente, las poses encontradas para los enantiómeros de **3r** fueron diferentes a las descritas anteriormente para el resto de los análogos. Ambos enantiómeros se sitúan más internamente en la cavidad hidrófoba que sus respectivos análogos de la serie **3**. De este modo, el enantiómero (*S*)-**3r** es capaz de establecer interacciones de apilamiento- $\pi$  desplazadas con los residuos Phe196 y Phe280 gracias al anillo de pirrol y benceno respectivamente. En este caso el metilo del nitrógeno *N*-5 queda orientado hacia el interior de la cavidad hidrofóbica de forma análoga al grupo etilo de las benzbromaronas **XIII**, **XIV** y **XV**. Por otro lado, el enantiómero (*R*)-**3r** establece una interacción análoga entre la Phe196 y el anillo de benceno, pero, en este caso, la orientación del anillo de pirrol favorece la interacción de apilamiento- $\pi$  en forma de T con el anillo de indol del triptófano.

## 4.5 RESEARCH STAY AT THE UNIVERSITY OF BRISTOL

---





During summer 2018, I spent a three-month stay funded by the University of Alcalá through a mobility grant as a visiting researcher at Prof. Adrian. J. Mulholland Group in the Centre of Computational Chemistry at the University of Bristol, United Kingdom. The aim of this stay was to get a better understanding with current methods for computational modelling of enzyme-ligand systems.

Prof. Mulholland's group has focused its research on the study of biochemical reactions mediated by enzymes from the computational point of view.<sup>99</sup> To reach these aims, since all chemical reactions involve the cleavage and forming of new bonds, this research group is specialized in the use of mixed quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) methods. In this framework, those atoms involved in the catalytic cycle are described by quantum mechanics level of theory while the rest of the enzyme is treated by classical molecular mechanic approaches.

Moreover, in last years, their research has been also extended to the field of drug design and computational pharmacology. They have developed several methods to predict cytochrome P450 metabolism,<sup>100</sup> or to detect  $\beta$ -lactamase resistant antibiotics,<sup>101</sup> as well as virtual reality docking and molecular dynamics.<sup>102</sup>

During my internship, I worked modelling in PTP1B the series of azoloquinolines described in this chapter. Moreover, in the last month, my work entailed the unravelling of the basis that could explain the selective binding of some pirroloquinolines to PTP1B by comparison with its closest homologue, TCPTP. For this aim, conventional all-atoms molecular dynamics methods were used. Also, a new software developed in Mulholland's group (WaterSwap) was tested to calculate absolute and/or relative binding free energy.<sup>103</sup>

---

<sup>99</sup> Mulholland, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *9*, 2328.

<sup>100</sup> Oláh, J.; Mulholland, A. J.; Harvey, J. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *15*, 6050-6055.

<sup>101</sup> Hirvonen, V. H. A.; Hammond, K.; Chudyk, E. I.; Limb, M. A. L.; Spencer, J.; Mulholland, A. J.; van der Kamp, Marc W. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *8*, 3365-3369.

<sup>102</sup> O'Connor, M.; Deeks, H. M.; Dawn, E.; Metatla, O.; Roudaut, A.; Sutton, M.; Thomas, L. M.; Glowacki, B. R.; Sage, R.; Tew, P.; Wonnacott, M.; Bates, P.; Mulholland, A. J.; Glowacki, D. R. *Sci. Adv.* **2018**, *6*, eaat2731.

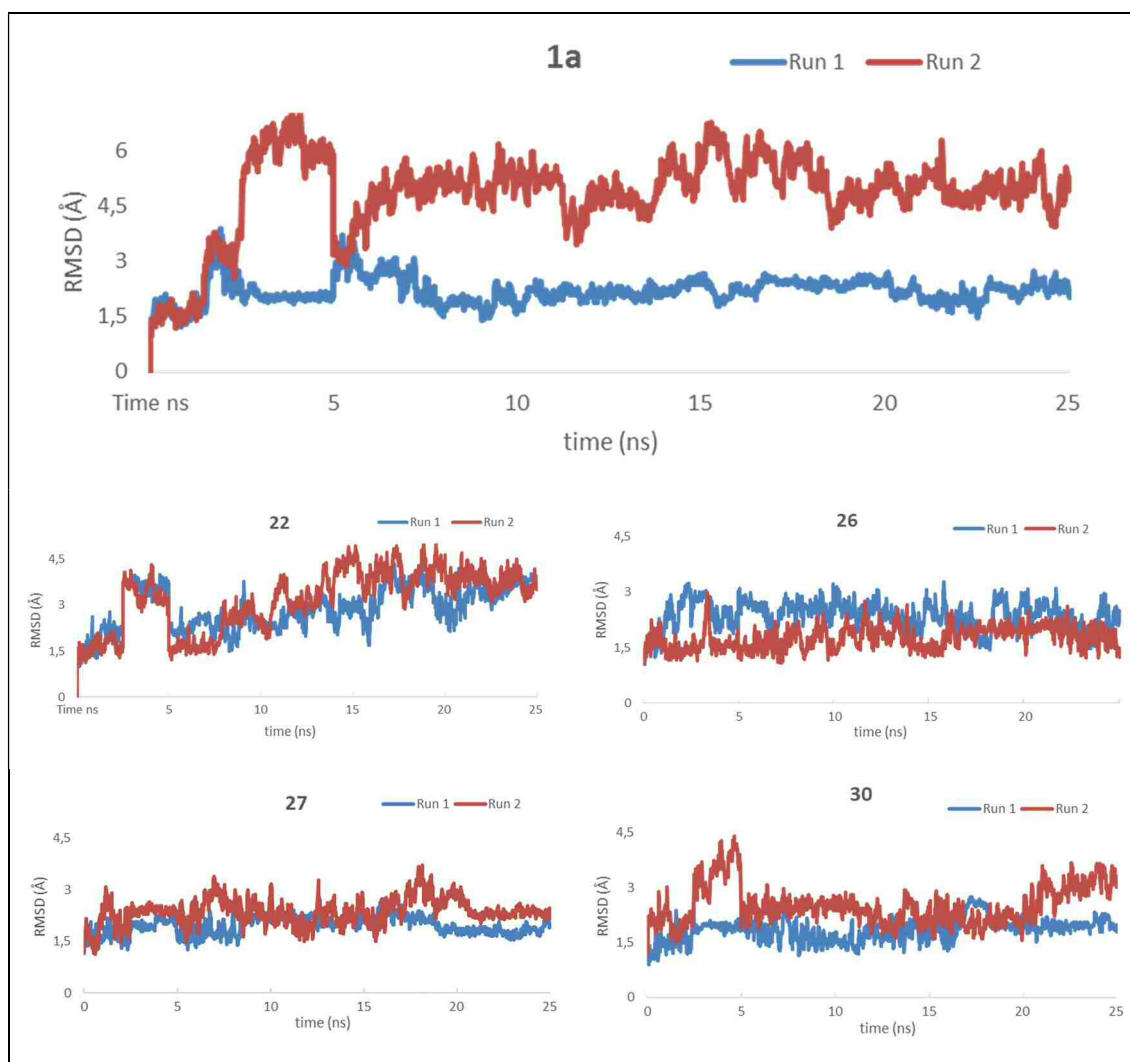
<sup>103</sup> Woods, C. J.; Malaisree, M.; Michel, J.; Long, B.; McIntosh-Smith, S.; Mulholland, A. J. *Faraday. Discuss.* **2014**, 477-499

#### 4.5.1.1 Azoloquinoxalines modelling

For this study, the set of azolo quinoxalines previously described in this chapter was used. All of them present the same core of quinoxaline, but they differ in the five-membered ring including imidazole, 1,2-4-triazole and tetrazole rings. Due to its similarity to the family of pyrrolo-[1,2- $\alpha$ ]-quinoxalines previously described in this chapter, azoloquinoxalines were considered as allosteric inhibitors of PTP1B. So, these molecules were docked by means of AutoDock 4.2 and Autodock Vina in the site flanked by the three alpha helices (3, 6 and 7).

All ligands accommodate nicely onto the binding site due to their high hydrophobicity and flat shape. Therefore, ligands **22**, **26**, **27** and **30** shared the same binding mode than **1a** inside the allosteric cavity. All ligands were stabilized by parallel  $\pi$ -stacking interactions established with Phe280 and T-shaped  $\pi$ -stacking with Phe196. Furthermore, Trp191, Leu192 and Ile281 contribute with hydrophobic interactions while Asn193 acts as hydrogen bond donor with the nitrogen atom *N*-5 in the quinoxaline core. This general picture shows the importance of hydrophobic interactions into this pocket for the design of new ligands. On the other hand, for **31** both enantiomers were studied, but only (*S*)-**31** presented a feasible binding mode inside the cavity. This binding mode was very similar to that described for its analogues, but none hydrogen bond was found between Asn193 and the nitrogen atom *N*-5.

Since derivatives **22**, **26**, **27** and **30** were designed from the scaffold hopping of the pyrrole ring in **1a**, only these molecules were considered for further studies to compare results. In order to gain a better understanding on the behaviour of these compounds, molecular dynamic experiments were carried out. Two replicas of 25 ns production, of molecular dynamics were performed without restrains for each molecule to study its evolution along the simulation time. These simulations were carried out with the Amber14 package in the Blue Crystal Phase 3 Supercomputer at the University of Bristol.

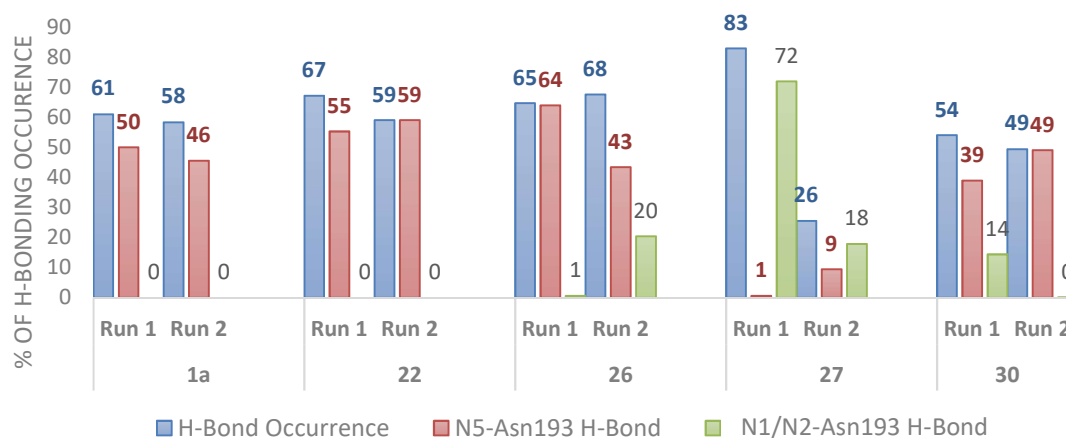


**Figure 30.** Time evolution of the RMSD (Å) of C $\alpha$  atoms of two replicas for ligand-bound systems simulations.

To check the structural stability of our systems, RMSD of protein  $\alpha$ -carbons was monitored for all simulations. As can be deduced from Figure 30, systems were stable during the simulation time, except the second replica for ligand **1a**. In addition, during molecular dynamics simulations, ligands remained reasonably stable inside the allosteric pocket. However, in the second replica for **1a**, it was observed how the molecule fled from the allosteric site, while in the other one remained inside this site.

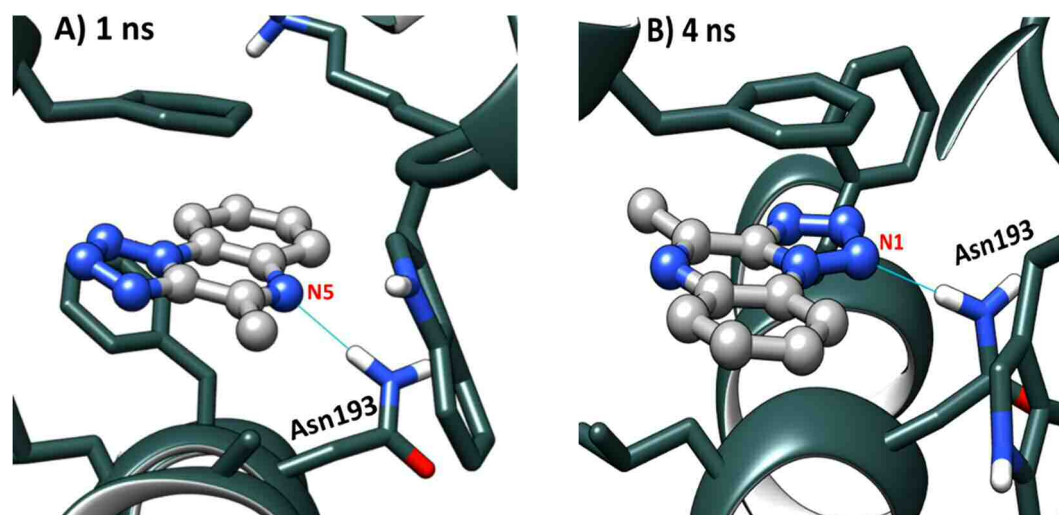
To understand ligand behaviour inside the pocket, hydrogen bond patterns, and  $\pi$ -stacking interactions were studied. While the hydrogen bond between Asn193 and nitrogen atom N-5 in the quinoxaline core is not maintained during the whole simulation (with occurrences varying from 38 to 59%), parallel  $\pi$ -stacking with Phe280 is well maintained as well as a displaced stacking with Trp291 and T-shaped stacking with Phe196. This network of aromatic and

hydrophobic interactions allowed small movements of ligands inside the tunnel during the simulation in order to be accommodated.



**Figure 31.** Hydrogen bond occurrences for ligand-protein systems.

Interestingly, in one of the replicas for **27** there was a complete change in the binding mode to get a new pose hydrogen bonding to the tetrazole ring. This new bond is well maintained from 3 ns until the end of the simulation, then suggesting the stability of the new pose for ligand **27** into the pocket (Figure 31 and 32). For this new binding mode methyl group is placed toward the inner of the hydrophobic cavity in a similar way as previously described for benzbromarone derivatives identified by Wiesmann. In contrast, no important changes in the binding mode were observed during the simulation of its closest analogue, **30**, suggesting the important role that methyl group at C-4 plays in the new orientation inside the pocket. In addition,  $\alpha 7$  helix presents a high mobility and this allows ligands to flip around its own axis to establish hydrogen bonds between the nitrogen atoms present in the azole ring and Asn193. In fact, **27** and **30** showed fluctuations allowing the eventual orientation of the azole ring to form a hydrogen bond mediated by nitrogen atom N-1, while **26** presented a similar pattern for N-2. Considering all previous data, these events suggest the possibility of different binding modes inside the pocket for the azoloquinoxaline scaffolds and they highlight the importance of  $\pi$ -stacking interactions rather than hydrogen bonds for this type of molecules comparing with active site inhibitors.



**Figure 32.** Representative snapshot taken from molecular dynamics simulation of **27** to illustrate the change in the binding mode.

To try explaining the allosteric behaviour of the complexes, our attention was focused in the study of certain secondary structure elements. It has been reported that  $\alpha$ -7 helix plays a crucial role in PTP1B, stability and WPD conformation.<sup>104 105,106</sup> In fact, when an allosteric inhibitor binds to this region it takes place the partially uncoiling of  $\alpha$ -7 helix and the blockage of WPD-loop in its open non-active conformation.<sup>107</sup> In this context, the flexibility of all complexes and apo structure was first evaluated by means of RMSF calculations.

RMSF values of C-terminal residues for all simulations were above 2 Å, as expected comparing with B-factors of templates crystal structures of PTP1B and other phosphatases.<sup>108</sup> RMSF values higher than those for the remainder of protein were also observed for residues 110-121. Since the allosteric pocket is located at this C-terminal region of the protein, the high residue mobility allows the accommodation of ligands inside the pocket. This may be considered as an opportunity for drug design. Overall, no significant differences could be observed between the apo form of PTP1B and protein-ligand complexes, then suggesting stability of the protein during the whole simulation due to the lack of changes triggered by the secondary structure during the simulation (Figure 33). Regarding to the WPD region, it presented a low flexibility, likely due to its stabilization in the open form mediated by the inhibitors.

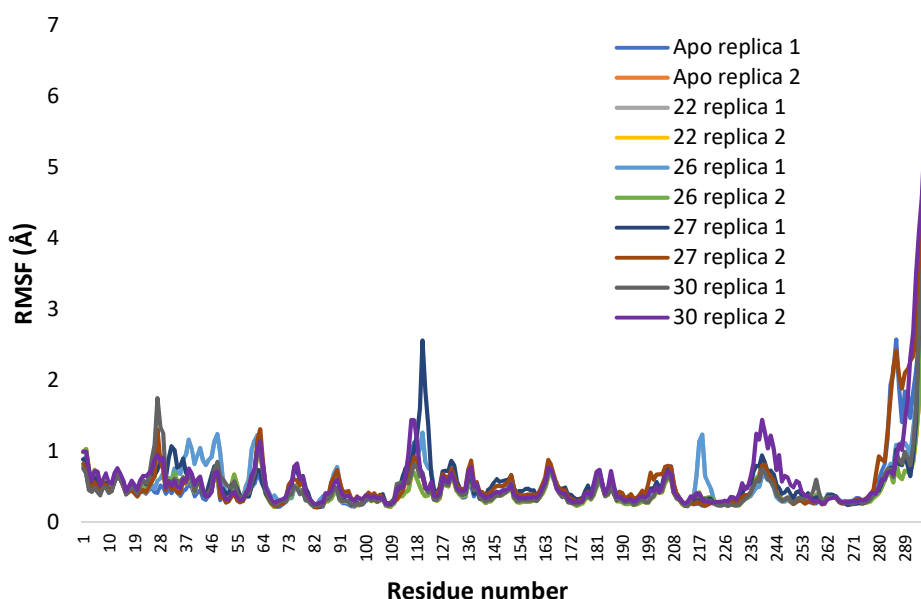
<sup>104</sup> Olmez, E. O.; Alakent, B. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2011**, *5*, 675-693.

<sup>105</sup> Olmez, E. O.; Alakent, B. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, *5*, 675-693

<sup>106</sup> Cui, W.; Cheng, Y.; Geng, L.; Liang, D.; Hou, T.; Ji, M. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *5*, 1157-1167.

<sup>107</sup> Wiesmann, C.; Barr, K. J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D. A.; Shen, W.; Fahr, B. J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randall, M.; McDowell, R. S.; Hansen, S. K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *8*, 730-737.

<sup>108</sup> Ge, Y.; van der Kamp, M.; Malaisree, M.; Liu, D.; Liu, Y.; Mulholland, A. J. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2017**, *11*, 995-1007.



**Figure 33.** Per residue average Ca RMSF for protein-ligand complexes and apo PTP1B.

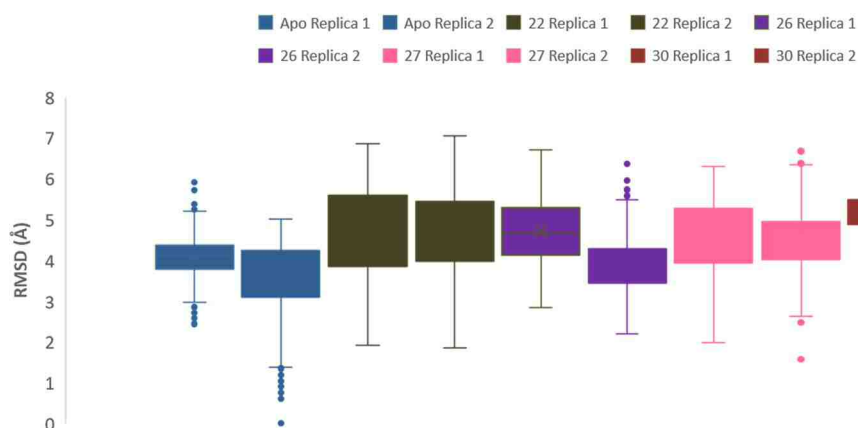
A more detailed study of the RMSD of the WPD loop revealed that the apo forms presented higher values comparing to those bound to ligand-protein complexes. This tendency was checked in all simulations except for ligand **30**. However, values are overall in agreement with a lower mobile loop and then, with a stabilized open conformation, as it was described previously for allosteric inhibitors.<sup>109</sup>

**Table 10.** RMSD (Å) values for WPD-loop residues.

		Replica	RMSD WPD loop ± (SD)
	Apo	Run 1	<b>1.54 ± 0.24</b>
		Run 2	<b>1.98 ± 0.5</b>
	22	Run 1	1.31 ± 0.23
		Run 2	1.42 ± 0.22
	26	Run 1	1.59 ± 0.31
		Run 2	1.36 ± 0.27
	27	Run 1	1.42 ± 0.26
		Run 2	1.36 ± 0.19
	30	Run 1	<b>1.6 ± 0.25</b>
		Run 2	<b>1.73 0.26</b>

<sup>109</sup> Kamerlin, S. C. L.; Rucker, R.; Boresch, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *4*, 1011-1016.

Finally, to confirm the structural behaviour observed in terms of flexibility and WPD-loop mobility, RMSD was measured for the backbone atoms of  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -6 and  $\alpha$ -7 helices.

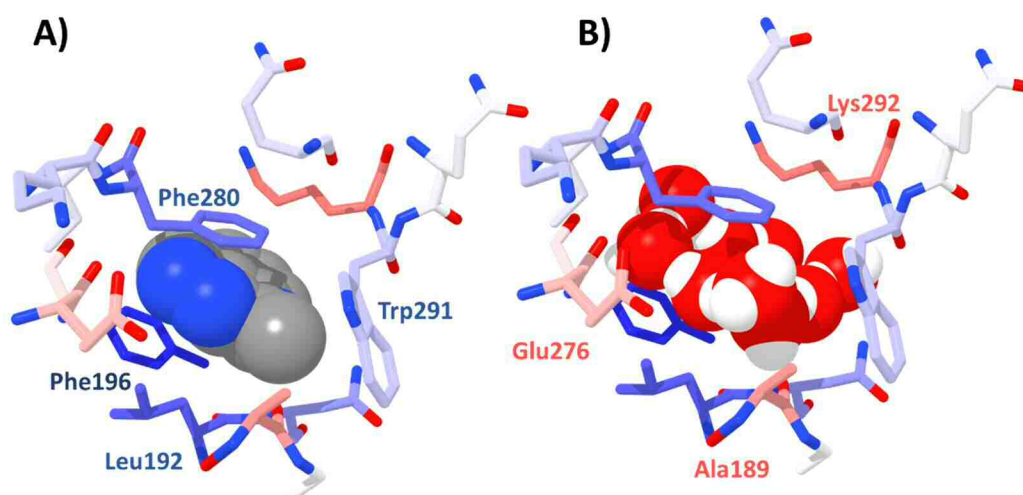


**Figure 34.** Box-and-whisker plot of apo protein and complexes with **22**, **26**, **27** and **30** displaying the distribution of RMSD of  $\alpha$ -7 helix into quartiles. The line inside each box represent the mean for the 100 calculated values whereas the vertical whiskers indicate the variability outside the upper and lower quartiles. Points outside those whiskers were considered outliers.

In general, the mean RMSD values throughout the MD simulation for  $\alpha$ -3 and  $\alpha$ -6 helices were quite similar to those observed in the apo structure. No significant differences were found, except for the  $\alpha$ -7 helix. In this case, higher RMSD values were found for all holo systems compared to apo protein. While apo proteins exhibited a mean RMSD value  $\sim 4$  Å, the same analysis showed a higher mean RMSD for protein-ligand complex  $\sim 4.8$  Å. This picture illustrates how ligand binding leads to a destabilization of  $\alpha$ -7 helix, which can be detected through RMSD analysis. This increment was also detected in terms of SD, which was higher once again for ligand-bound systems. All in all, these results are in good agreement with the poorly structured C-termini in crystal structures solved with allosteric inhibitors (PDBs: 1T49, 1T4J or 6B8Z).

Free energy calculations are very valuable tools during hit-to-lead optimization and drug discovery process. Prediction of absolute free energy may guide the design and optimization of drug-like molecules to putative drugs.<sup>110</sup> To calculate free energy for our ligands and rationalize these results, Waterswap reaction coordinates were used.

Waterswap is a novel methodology which allows to calculate absolute binding free energy between a protein and a ligand based in an explicit solvent water model. The main difference between this approach and other cutting-edge methods, such as alchemical free calculations, or free energy perturbations relies on the introduction of water molecules into the cavity left behind as result of ligand decoupling. Moreover, WaterSwap runs a Monte Carlo simulation on the whole system to estimate the conformational changes and evaluate binding free energy along the trajectory. Additional insights can be obtained from the WaterSwap calculations as the binding free energy can be decomposed in per-residue contributions (Figure 35).



**Figure 35.** The coordinates of the **26** and swapped water cluster are shown. The residues are coloured by their total components of the Waterswap free energy. Red sticks correspond to those residues which stabilise the water cluster, and blue values indicate stabilisation of the ligand.

Waterswap results show a similar profile for all the ligands ranging from -13 to -17 kcal/mol, which are in good agreement with experimental IC<sub>50</sub> values. The best result (-17.31 Kcal/mol) corresponds to **1a** which may be accounted due to higher hydrophobicity compared to the rest of analogues. The four azolo-quinoxalines presented a similar absolute free energy values which confirms their similar behaviour in enzymatic assays and makes them an interesting bioisosteric replacement according to the desired physicochemical characteristics. According to the

<sup>110</sup> Amaro, R. E.; Mulholland, A. J. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *4*, 0148.



calculated ligand efficiency index based on Waterswap free energy, compounds **1a** and **30** would be the more interesting, followed by **26** and **27**, for further optimization.

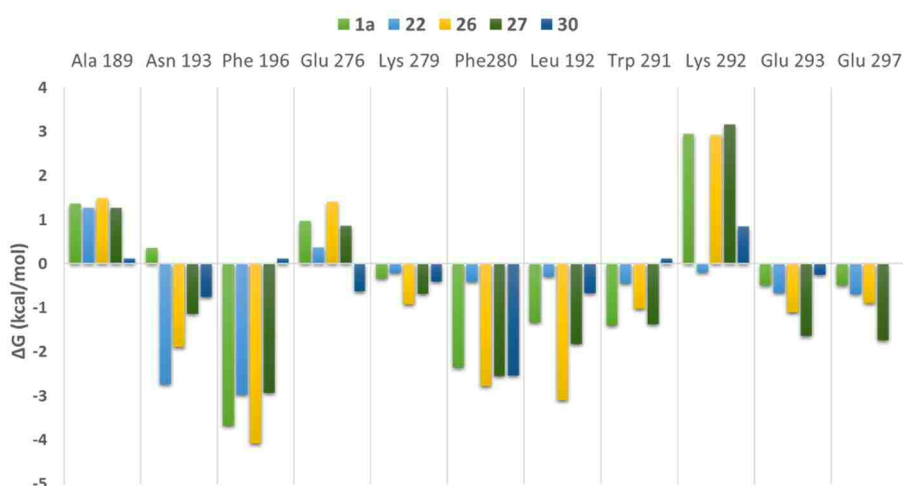
**Table 11.** Waterswap results.

Ligand	$\Delta G$ Bennets (Kcal/mol)	$\Delta G$ FEP (Kcal/mol)	$\Delta G$ TI (Kcal/mol)	$\Delta G$ Average (Kcal/mol)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	LE*
<b>1a</b>	17.12	16.73	17.31	-17.05	1	1.21
<b>22</b>	14.72	13.85	12.43	-13.67	0.42	0.97
<b>26</b>	15.9	15.43	15.01	-15.45	0.65	1.1
<b>27</b>	15.7	15.39	15.02	-15.37	1.2	1.1
<b>30</b>	15.78	16.505	15.31	-15.87	0.25	1.22

\*LE: Ligand efficiency index.  $\Delta G$ /Heavy Atoms

The Waterswap protocol allows also a better understanding of the interaction energy profile through its Chimera plugin, so it could be used to explain the basis of the interaction and to describe requirements for the design of new inhibitors. As can be observed in the Figure 36 ligands are stabilized by its large hydrophobic contact with the neighbouring residues Phe291, Phe280, Phe196 and Leu192. On the other hand, charged residues like Glu276 and Lys 292 stabilise the water cluster. Moreover, when structures are observed in detail, they show that the water cluster forms hydrogen bonds with As193 and with the backbone of Ala189.

To gain more insight into the differences between complexes, binding free energy was decomposed in per-residue components. Results could be visualized and analysed with the Chimera Plugin. As can be observed in the Figure 36, the most important residue for the stabilization is Phe196 followed by Phe280, which is in good agreement with previous studies and with our MD studies.



**Figure 36.** Time-averaged decomposition of the Waterswap binding free energy into selected per-residue components. Positive values indicate residues which stabilize the complex with the water cluster, while negative indicate stabilization of the protein-ligand complex.

Further stabilization is also provided by Leu192 and Trp291, surprisingly Ala189 presented a positive value. This may be explained because polar nitrogen atoms of all ligands were pointing to methyl group of Ala189 during the simulation. For charged residues like Glu276 and Lys292, there is also a negative effect to ligand binding. This is not surprising as they are partially in contact with hydrophobic portions of the ligands. Nonetheless, the effects of Lys292 should be consider carefully, as this residue is placed in one of the most mobiles part of the  $\alpha$ -7 helix, and its behaviour is difficult to model. Interestingly, As193 does not contribute to interaction energy as much as can be expected from a hydrogen bond. This highlights the importance of hydrophobic interactions for this binding site rather than polar and electrostatic ones as we previously hypothesized.

#### 4.5.1.2 Selectivity modelling

One of the main bottlenecks for the development of PTP1B drugs is the lack of selectivity when compared to other phosphatases, especially TCPTP. This enzyme shares more than 71% of sequence identity with PTP1B.<sup>111</sup> Its inhibition leads to undesirable side-effects such as anomalous haematopoiesis, moreover, TCPTP-deficient mice died after 5 weeks old.<sup>112</sup> Then, the design of selective PTP1B inhibitors is a crucial task for its clinical progress.

Previously, it was observed that compounds **1d** and **1g** presented a high selectivity index for PTP1B/TCPTP inhibition. Hence, we decided to gain further insight into this behaviour by means of molecular dynamics and free energy calculations in order to explain selectivity differences between these compounds.

First, it was necessary to model the whole TCPTP, as its crystal structure (PDB:1LK8) lacks the  $\alpha$ -6 helix and to  $\alpha$ -7 loop, and the terminal  $\alpha$ -7 helix as well. To this aim we followed the procedure described by Shinde.<sup>113</sup> Compounds **1a** and **1g** were docked into the allosteric site located, obtaining the same pose for both compounds complexed to PTP1B. Then, those were the starting geometries for the molecular modelling studies (see section 3.4.5).

Both systems were simulated for 25 ns, and two replicas were performed for each system. Simulation with an apo-TCPTP was carried out in order to confirm the stability of the homology model.

The first difference observed, is related to the volume of the allosteric cavity. In the case of TCPTP this volume is 343.616 Å<sup>3</sup>, bigger than compared to 227.468 Å<sup>3</sup> for PTP1B as calculated by CASTp 3.0.<sup>114</sup> This is partially explained by the substitution of residues Phe280<sub>PTP1B</sub> by a Cys278<sub>TCPTP</sub> and Ile192<sub>PTP1B</sub> by Val193<sub>TCPTP</sub>. This could be crucial because of the lack of an aryl ring in the residue avoids  $\pi$ -stacking interactions with ligands.

Apo systems exhibited a similar behaviour during MD simulations, maintaining its stability in terms of RMSDs and the same pattern for RMSFs. In contrast, the ligand-bound complexes presented a different scenario. As expected, **1a** remained into the allosteric cavity after 25 ns of simulation in both replicas. However, a different picture was observed for **1g**, which in both replicas, is released from the allosteric site after  $\sim$  4 ns of simulation. This is well illustrated

<sup>111</sup> Shinde, R. N.; Kumar, G. S.; Eqbal, S.; Sobhia, M. E. *PLoS one* **2018**, *6*, e0199020.

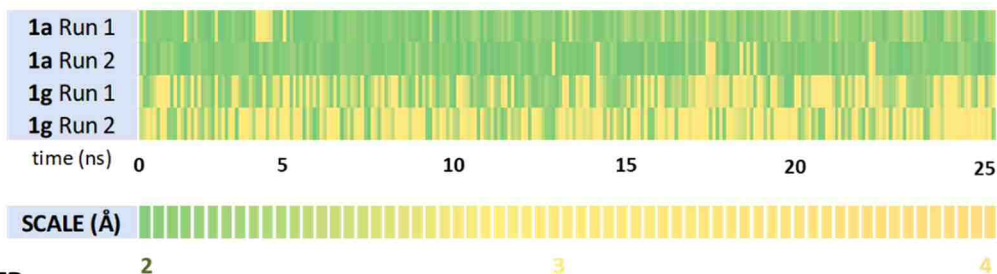
<sup>112</sup> You-Ten, K. E.; Muise, E. S.; Itié, A.; Michalyszyn, E.; Wagner, J.; Jothy, S.; Lapp, W. S.; Tremblay, M. L. *J. Exp. Med.* **1997**, *5*, 683-693.

<sup>113</sup> Shinde, R. N.; Kumar, G. S.; Eqbal, S.; Sobhia, M. E. *PLoS one* **2018**, *6*, e0199020.

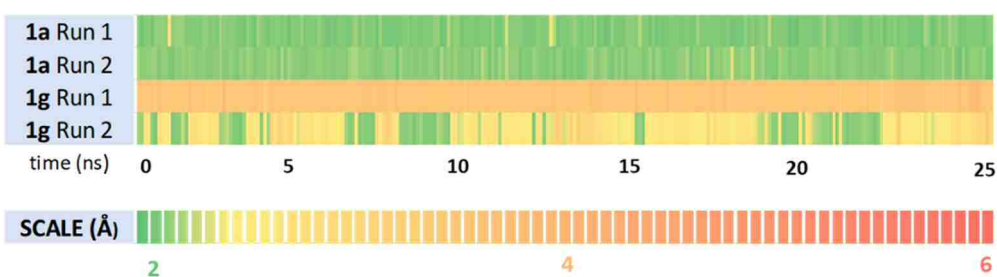
<sup>114</sup> Tian, W.; Chen, C.; Lei, X.; Zhao, J.; Liang, J. *Nucleic. Acids. Res.* **2018**, *W1*, W363-W367.

when distances between Phe280/Cys278 and ligand centre of mass distances were measured across de MD simulation (Figure 39).

### A) PTP1B



### B) TCPTP



**Figure 37** The time dependent distance analysis of **1a** and **1g** centre of masses and A) Phe280<sub>PTP1B</sub>, B) Cys278<sub>TCPTP</sub>. Distances are measured in Angstrom (Å) and time is shown along the x-axis.

Despite of **1a** presented fluctuations inside the tunnel, it remained bound to TCPTP all the simulation time (distance  $\sim 2$  Å). However, as mentioned above, **1g** escaped from the allosteric site in both replicas with distances above 3 Å. This event could be in part explained by the pushing effect that chlorine atoms produce over the  $\alpha$ -7 helix. The lack of Phe280 increase the mobility of ligands inside the cavity due to the lack of  $\pi$ -stacking interactions, then destabilizing the binding site.

Waterswap simulations were also carried out for the complexes. The free energy values calculated through Bennets, FEP and TI methods only differ by  $\leq 1$  kcal/mol, indicating good convergence of the calculations.

As shown in Table 12, Waterswap predicted a better affinity for **1g** towards TCPTP rather than for **1a**, with a difference of 3 kcal/mol. Despite these values are not in agreement with  $IC_{50}$  data experimentally measured, the general preference of the ligands towards PTP1B instead of TCPTP was well predicted in terms of  $\Delta G$ . A detailed study on the energetic per-residue contribution revealed that Phe280 contributed to absolute binding free energy with 3.2 kcal/mol for both ligands. However, in the case of TCPTP, Cys278, only contribute with 0.1 kcal/mol. This was the greatest difference, as the rest of residues presented similar contributions in both enzymes. This fact also highlights the role that Phe280 plays in PTP1B in terms of affinity and selectivity.

**Table 12.** Binding free energies of the selected inhibitor-bound complexes from Waterswap calculations.

	<b>1a</b>		<b>1g</b>	
	<b>PTP1B</b>	<b>TCPTP</b>	<b>PTP 1B</b>	<b>TCPTP</b>
<b>Bennetts</b> (Kcal/mol)	17.12	9.973	16.69	13.51
<b>FEP</b> (Kcal/mol)	16.739	11.61	16.42	13.69
<b>TI</b> (Kcal/mol)	17.31	11.16	15.96	14
<b>Quadrature</b> (Kcal/mol)	17.32	10.03	16.01	13.72
<b>Average <math>\Delta G</math></b> (Kcal/mol)	-17.1223	-10.6933	-16.27	-13.73
<b><math>IC_{50}</math></b> ( $\mu M$ )	1	3.95	0.6	25

### 4.5.1.3 Conclusions

In summary, classical MD have showed the potential of the azoloquinoxaline scaffold as tight allosteric inhibitors of PTP1B. During simulations, minor changes in the binding mode were observed for the ligands except the tetrazolo derivatives which showed a brand-new binding mode different from the starting position. The binding of these molecules to the allosteric site is further stabilized by hydrophobic contacts rather than by hydrogen bonds or polar contacts. It is noteworthy that aromatic residues Phe196 and Phe280 play a critical role in the stabilization of the complex with  $\pi$ -stacking interactions as also illustrated by Waterswap calculations. Free energy profiles, calculated by Waterswap, provide a good and consistent result with the *in vitro* activity data, showing the predictive potential of this method. In addition, a molecular-detailed view of Waterswap results have allowed to identify the key residues for this interaction in an easy and accessible way, and their classification. Thus, we show a new opportunity for the design of inhibitors targeting the allosteric site of PTP1B which should bear hydrophobic and aromatic rings in order to interact with these residues identified as critical hotspot for the ligand binding. Moreover, MD has shown that **1g** is not stable in the TCPTP complex, and Waterswap calculations have proven to be a valuable tool to identify the key points of selectivity for these ligands.

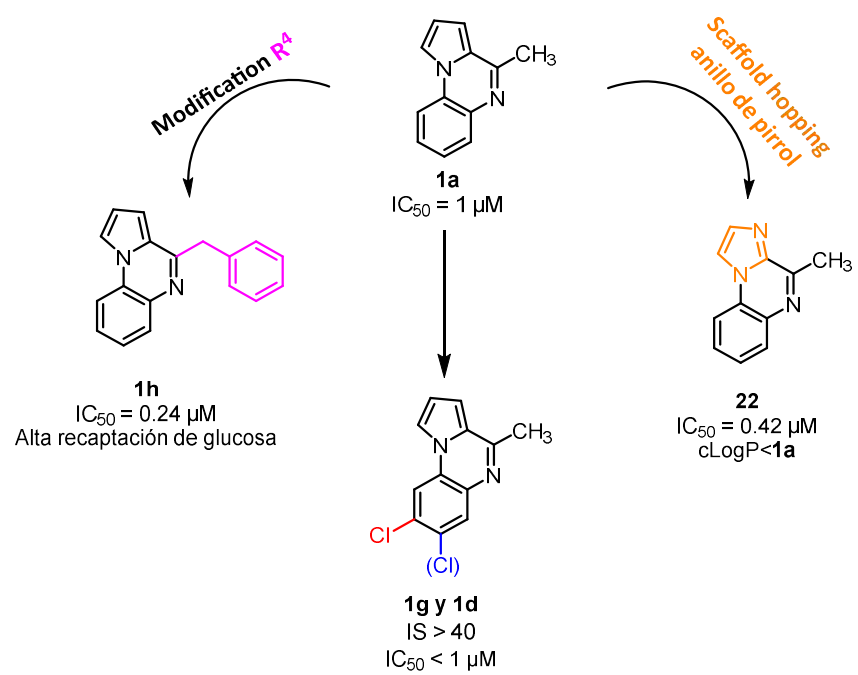
## 4.6 CONCLUSIONES

---



- Durante el presente capítulo se ha ampliado una familia de compuestos basada en el sistema de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina a través de la modificación de la sustitución en la posición R<sup>4</sup>. Como resultado de los estudios sintéticos llevados a cabo, se han puesto a punto rutas sintéticas que han permitido la obtención de los derivados deseados con buenos rendimientos y, de forma fácil y escalable.
- Se ha comprobado cómo el sistema de 4,5-dihidropirrolo[1,2-*a*]quinoxalina no es apto para su potencial desarrollo como sonda química o fármaco debido a su baja estabilidad en atmósfera de aire.
- Se ha comprobado cómo, en general, el sistema de pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina, sus 4,5-dihidro derivados y los análogos *N*-metilados presentan capacidad inhibitoria de PTP1B *in vitro*, a concentraciones por debajo del rango micromolar.
- Algunos de los compuestos ensayados presentaron una alta capacidad para inducir la captación de glucosa, llegando a niveles similares a los producidos por la propia insulina. Además, al no presentar toxicidad, serían candidatos de interés para estudios complementarios de la fase preclínica. También, se ha podido correlacionar el parámetro de *i*LogP con la capacidad de captación de glucosa de este esqueleto por lo que se dispone de un modelo sencillo para poder predecir el comportamiento de moléculas análogas.
- El compuesto **1h**, uno de los más potentes, se ha utilizado para establecer el mecanismo de acción a través de los ensayos de medida de la fosforilación de las proteínas IRS1 y Akt. Este compuesto se considera como un candidato prometedor para su desarrollo en procesos de optimización de propiedades ADME y toxicidad.
- Los estudios computacionales han permitido sustentar la hipótesis de un modo de unión en la cavidad alostérica de PTP1B. Además, los resultados de *docking* han permitido proponer modos de unión en los que se ha puesto de manifiesto cómo estas moléculas establecen principalmente interacciones hidrofóbicas y de apilamiento- $\pi$ , más que interacciones polares tales como enlaces de hidrógeno.
- Se han sintetizado análogos de **1a** mediante la estrategia de *scaffold hopping* del anillo de pirrol, preparándose isómeros de este anillo, capaces de mantener las interacciones de apilamiento- $\pi$  con la diana. Éstos presentan mejor solubilidad en términos de *c*LogP. Además, su actividad *in vitro* confirma su utilidad como bioisómeros para la inhibición de PTP1B.





**Figura 38.** Resumen de la diversidad sobre el núcleo de 4-metil-pirrolo[1,2-a]quinoxalina (**1a**).

## 4.7 EXPERIMENTAL PROCEDURES

---



## 4.7.1 Chemistry

### 4.7.1.1 General information

All reagents were acquired from the following commercial sources and used without further purifications: Merck, ACROS, Novabiochem and Fluorochem. Solvents were purchased from Scharlab and EtOAc, Hexane and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were distilled prior its utilization. Dry solvents were dried by a MBRAUN MB-SPS-800 device. For those reactions which were performed under inert atmosphere argon or nitrogen was used with oven-dried glassware with magnetic stirring and dry solvents.

Reactions were followed by Thin Layer Chromatography (TLC) on Merck Kieselgel 60 F254 0.25 mm precoated aluminium plates. TLC plates were visualised using UV light ( $\lambda = 254$  nm or 365 nm) and/or staining with Ninhydrin (1 M, EtOH), 1% aq. KMnO<sub>4</sub> or Phosphomolybdic Acid (0.05 M, EtOH). Purification was carried out by normal-phase silica gel flash chromatography, gel grade 60 (70-230 mesh, Merck).

Microwave reactions were conducted through a *Biotage*<sup>®</sup> *Initiator* 2.5 reactor at 2.45 GHz with appropriate vials and caps.

Melting points were determined using open capillary tubes with a *Gallenkamp*<sup>®</sup> Melting Point apparatus (uncorrected).

High-resolution analysis (HRMS) were performed on an Agilent 6210 time of flight LC/MS using electrospray (ESI) as ion source and a mobile phase of ACN/H<sub>2</sub>O 75:25 with 0.1% TFA as additive. The HPLC column (50 mm × 4.6 mm) contained a C18 stationary phase with a particle size of 3.5  $\mu$ m. Data are expressed as mass units (z/e).

Analytical HPLC was performed at the Centro de Química Aplicada y Biotecnología of the University with the supervision of Dr. Leonor Nozal under the following the conditions:

Analytic Column	KROMPHASE C18 (250 mm x 4.5 mm x 5 $\mu$ m)		
Elution Mode	Elution Gradient		
	t (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	20	0	100
	21	0	100
	22	90	10
Mobile Phase	A: 0.1% TFA in H <sub>2</sub> O and B: 0.1% TFA in MeOH		
Flow rate	1 mL/min		
Injection Volume	200 $\mu$ L		
Column temperature	50 $^{\circ}$ C		
Detection	UV 254 nm		

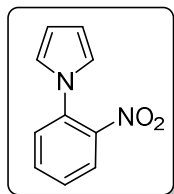
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded on a either a Varian Mercury VX-300, Varian Unity 300 or Varian Unity 500 MHz spectrometer at room spectrometer in the deuterated solvent stated. Chemical shifts ( $\delta$ ) are quoted in parts per million (ppm) and using the residual non-deuterated solvent signal as an internal reference ( $\delta_{\text{H}} = 7.24$  ppm and  $\delta_{\text{C}} = 77.0$  ppm for CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{H}} = 4.87$  ppm and  $\delta_{\text{C}} = 79.0$  ppm for CD<sub>3</sub>OD). Multiplicities are denoted as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), apparent (ap) and multiplets as (m). The abbreviation br denotes a broad resonance peak. Coupling constants (*J*) were recorded as Hert (Hz).

High-resolution analysis (HRMS) were performed on an Agilent 6210 time of flight LC/MS using electrospray (ESI) as ion source and mobile phase of ACN/H<sub>2</sub>O 75:25 with 0.1% TFA as additive.

#### 4.7.1.2 Synthesis of 1-(2-nitrophenyl)azoles

##### 4.7.1.2.1 By Clauson-Kaas reaction

###### 4.7.1.2.1.1 1-(2-Nitrophenyl)-1H-pyrrole (4)



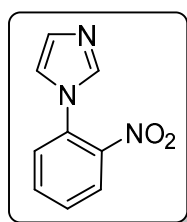
2-Nitroaniline (1.38 g, 10 mmol) and 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (1.33 mL, 10 mmol) in glacial acetic acid (25 mL) were heated at 80 °C for 30 min. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. Then, saturated aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mL) was added, the aqueous layer was extracted with EtOAc (60 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2 x 20 mL). After drying (MgSO<sub>4</sub>), the solvent was evaporated, and the residue was filtered through pad of silica gel and eluted EtOAc/hexane, 1:4 to yield **4** (1.8 g, 99%) as a red oil. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>115</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.85 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H, Ar-H6), 7.60 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, Ar-H4), 7.48-7.43 (m, 2H, Ar-H3 and Ar-H5), 6.78 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-Hα), 6.29 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-Hβ).

##### 4.7.1.2.2 By nucleophilic aromatic substitution (S<sub>N</sub>Ar). General procedure A

To a stirred solution of the corresponding azole (1.77 mmol), and NaOH (1.1 equiv), in anhydrous DMSO (2 mL), 1-fluoro-2-nitrobenzene (1 equiv) was added dropwise. The solution was stirred vigorously for the appropriate time until consumption of starting material (monitored by TLC). After cooling, H<sub>2</sub>O was added (7 mL) and the resulting crystalline solid was filtered off and dried under vacuum, affording the final product.

###### 4.7.1.2.2.1 1-H-1-(2-Nitrophenyl)imidazole (9)

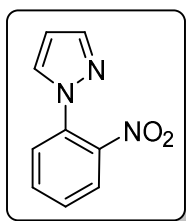


As described in general procedure **A**, imidazole (120 mg, 1.77 mmol), NaOH (78 mg, 1.94 mmol) and 1-fluoro-2-nitrobenzene (250 mg, 1.77 mmol) afforded **9** as yellow solid (320 mg, 99%) after 2 h. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>116</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.00 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, Ar-H6), 7.74 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, Ar-H4), 7.65 (s, 1H, HetAr-H2), 7.61 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, Ar-H5), 7.47 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, Ar-H3), 7.22 (s, 1H, HetAr-H5), 7.08 (s, 1H, HetAr-H5).

<sup>115</sup> Budke, B.; Tueckmantel, W.; Miles, K.; Kozikowski, A. P.; Connell, P. P. *ChemMedChem* **2019**, *10*, 1031-1040.

<sup>116</sup> Moarbess, G.; Deleuze-Masquefa, C.; Bonnard, V.; Gayraud-Paniagua, S.; Vidal, J.; Bressolle, F.; Pinguet, F.; Bonnet, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *13*, 6601-6610.

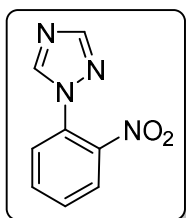


#### 4.7.1.2.2.2 1-(2-Nitrophenyl)-1H-pyridazole (10)

As described in general procedure **A** pyridazole (120 mg, 1.77 mmol), NaOH (78 mg, 1.94 mmol) and 1-fluoro-2-nitrobenzene (250 mg, 1.77 mmol) afforded **10** as pale yellow solid (319 mg, 99%) after 3 h. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>117</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  7.87 (dd,  $J$  = 8.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-H6), 7.75 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H, HetAr-H3), 7.72 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, HetAr-H5), 7.69 – 7.64 (m, 1H, Ar-H5), 7.59 (dd,  $J$  = 7.9, 1.2 Hz, 1H, Ar-H3), 7.56 – 7.48 (m, 1H, Ar-H4), 6.50 (t,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, HetAr-H4).

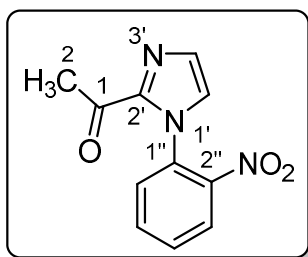
#### 4.7.1.2.2.3 1-(2-Nitrophenyl)-1H-1,2,4-triazole (11)



As described in general procedure **A**, pyridazole (127 mg, 1.77 mmol), NaOH (78 mg, 1.94 mmol) and 1-fluoro-2-nitrobenzene (250 mg, 1.77 mmol) afforded **11** as pale yellow solid (300 mg, 91%) after 5h. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>118</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.41 (s, 1H, HetAr-H5), 8.12 (s, 1H, HetAr-H3 Triazole), 8.03 (dd,  $J$  = 8.0, 1.2 Hz, 1H, Ar-H6), 7.77 (td,  $J$  = 7.6, 1.3 Hz, 1H, Ar-H4), 7.67 (td,  $J$  = 7.7, 1.2 Hz, 1H, Ar-H5), 7.59 (dd,  $J$  = 7.8, 1.2 Hz, 1H, Ar-H3).

#### 4.7.1.2.3 2-Acetyl-1-*H*-1-(2-nitrophenyl)imidazole (21)



To an oven-dried Schlenk with a stir bar 2-Acetyl-1*H*-imidazole (100 mg, 0.9 mmol, 1 equiv), anhydrous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (139 mg, 0.99 mmol, 1.1 equiv), and 18-Crown-6 (523 mg, 1.98 mmol, 2.2 equiv) were added. Then, the air was evacuated under vacuum and the Schlenk was purged with argon. Anhydrous DMSO (5.5 mL/mol) was added, followed by 1-fluoro-2-nitrobenzene (139 mg, 0.99 mmol, 1 equiv). The resulting mixture was heated to 100 °C and stirred for 3 h. Then the reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with H<sub>2</sub>O (27 mL/mmol) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was removed under vacuum, and the product was purified by flash column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetone 9:1). The product **21** was obtained as a yellowish solid (126 mg, 0.54 mmol, 60%).

<sup>117</sup> Yang, H.; Xi, C.; Miao, Z.; Chen, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *18*, 3353-3360.

<sup>118</sup> Subramanian, P.; Kaliappan, K. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *27*, 5986-5997.

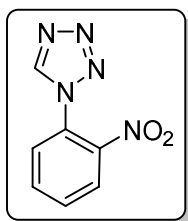
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.19 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H6), 7.73 (td, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H, Ar-5), 7.65 (td, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-H4), 7.38 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar-H3), 7.35 (s, *J* = 1.2 Hz, 1H, HetAr-H5), 7.15 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, HetAr-H5), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 204.17 (CO), 149.54 (HetAr-C2), 138.30 (Ar-C2), 134.44 (ArC), 133.02 (ArC), 133.00 (ArC), 130.89 (Ar-C1), 130.47 (ArC), 129.55 (Ar-C1'), 126.49 (C-Ar5''), 126.04 (Ar-C4''), 27.31 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 232.0717. Found [M+H]<sup>+</sup>: 232.0718.

**M. p.:** 156-157 °C.

#### 4.7.1.2.4 1-*H*-1-(2-Nitrophenyl)-1*H*-tetrazole (**12**)



To a suspension of NaN<sub>3</sub> (0.94 g, 14.48 mmol, 2 equiv) in a solution of 2-nitroaniline (1.00 g, 7.24 mmol, 1.0 equiv) in trimethyl orthoformate (4.75 mL, 43.44 mmol, 6.0 equiv) was added AcOH (1.09 mL/mmol) dropwise. The mixture was stirred for 12 h at 80 °C. Then, the solution was evaporated under reduced pressure till dryness. Saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (0.7 mL/mmol) was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x15 mL). The organic layer was washed with saturated NH<sub>4</sub>Cl aqueous solution, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated till dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1 :1) to afford **12** a yellowish solid (1.01 g, 72%). Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>119</sup>

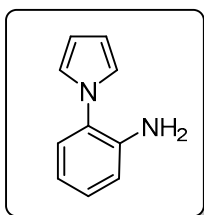
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.01 (s, 1 H, HetAr-H5), 8.23 (dd, *J* = 8, *J* = 1.5 Hz, 1 H, Ar-H6), 7.89 (dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1 H, Ar-H4), 7.83 (dt, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1 H, Ar-H5), 7.63 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1 H, Ar-H3).

#### 4.7.1.3 Synthesis of *o*-azolylanilines. General procedure B

The corresponding *N*-(2-nitrophenyl)azole **1** (4.7 – 7.88 mmol, 1 equiv) was dissolved in ethanol (4.44 mL/mmol) and Pd/C-10% (0.05 equiv) was added. Then, hydrazine monohydrate (5 equiv) was added and the mixture was stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere during 24 h at 50 °C. Then, the reaction mixture was filtered through Celite© and washed with ethanol (3 x 25 mL). The solvents were evaporated, and the oily residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5) to furnish the final products as colourless oils.

<sup>119</sup> Saha, B.; Sharma, S.; Sawant, D.; Kundu, B. *Tetrahedron* **2008**, *37*, 8676-8684.

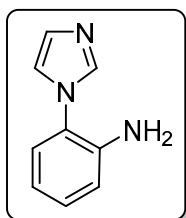
#### 4.7.1.3.1 2-(1*H*-Pyrrol-1-yl)aniline (**5**)



Following general procedure **B** and starting from **4** (0.895 g, 4.7 mmol), **5** (0.662 g, 99%) was obtained. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>120</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.15 (td, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, Ar-H4), 7.08 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.3 Hz, Ar-H3), 6.89 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, Ar-H6), 6.83 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-Hα), 6.75 (td, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, Ar-H5), 6.03 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-Hβ), 3.55 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>).

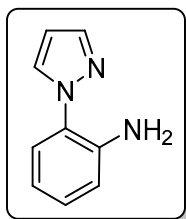
#### 4.7.1.3.2 2-(1*H*-Imidazol-1-yl)aniline (**13**)



Following general procedure **B** and starting from **9** (1g, 5.28 mmol), **13** (680 mg, 81%) was obtained. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>121</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.68 (s, 1H, HetAr-H2), 7.29 (s, 2H, Ar-H3 and HetAr-H5), 7.19 – 7.07 (m, 2H, Ar-H5 and HetAr-H4), 6.91 – 6.77 (m, 2H, Ar-H6 and Ar-H4), 3.72 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>).

#### 4.7.1.3.3 2-(1*H*-Pyrazol-1-yl)aniline (**14**)



Following general procedure **B** and starting from **10** (1g, 5.28 mmol), **14** (700 mg, 84%) was obtained. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>122</sup>

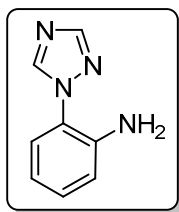
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.75 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, HetAr-H3 or H5), 7.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, HetAr-H3 or H5), 7.27 – 7.09 (m, 2H, Ar-H3 and Ar-H5), 6.87 – 6.72 (m, 2H, Ar-H4 and Ar-H6), 6.44 (dd, *J* = 3.0, 1.1 Hz, 1H, HetAr-H4), 4.24 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>).

<sup>120</sup> Guillon, J.; Dallemagne, P.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Manechez, D.; Kervran, A.; Rault, S. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *4*, 293-308

<sup>121</sup> Xie, C.; Zhang, Z.; Li, D.; Gong, J.; Han, X.; Liu, X.; Ma, C. *J. Org. Chem.* **2017**, *7*, 3491-3499.

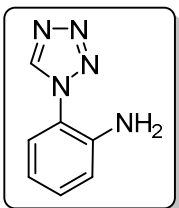
<sup>122</sup> Shen, Y.; Cindy Lee, W.; Gutierrez, D. A.; Li, J. *J. Org. Chem.* **2017**, *21*, 11620-11625.



**4.7.1.3.4 2-(1H-1,2,4-Triazol-1-yl)aniline (15)**

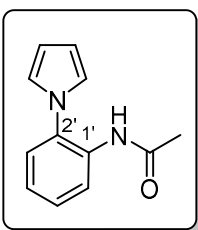
Following general procedure **B** and starting from **11** (1.5 g, 7.88 mmol), **15** (997 mg, 79%) was obtained. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>123</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.37 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, HetAr-H5), 8.16 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, HetAr-H3), 7.41 – 7.07 (m, 2H, Ar-H3 and H5), 6.97 – 6.65 (m, 2H, Ar-H4 and H6), 4.55 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>).

**4.7.1.3.5 2-(1H-Tetrazol-1-yl)aniline (16)**

Following general procedure **B** and starting from **12** (1 g, 5.23 mmol), **16** (716 mg, 85%) was obtained. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>124</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.91 (s, 1H, HetAr-H5), 7.37 – 7.16 (m, 2H, Ar-H3 and Ar-H5), 6.97 – 6.65 (m, 2H, Ar-H4 and H6), 4.35 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>).

**4.7.1.4 Synthesis of N-(2-azolyphenyl)amides.****4.7.1.4.1 N-(2-(1H-Pyrrol-1-yl)phenyl)acetamide (6)**

A solution of **5** (0.5 g, 3.1 mmol) in a mixture 1:1 of AcOH:Ac<sub>2</sub>O (4 ml/mmol) was refluxed for 30 min. Then, the mixture was cooled, and the solvent was removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/hexane, 1:3) to afford **6** (617 mg, 99%) as cream coloured solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>125</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.33 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar-H6), 7.34 (td, 1H, *J* = 8.1, 7.2 Hz, 1.6 Hz, Ar-H5), 7.25 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.7 Hz, Ar-H3), 7.11 (td, 1H, *J* = 7.6, 7.2 Hz, Ar-H4), 6.96 (br s, 1H, NH), 6.77 (t, 2H, *J* = 2.1 Hz, HetAr-Hα), 6.38 (t, 2H, *J* = 2.1 Hz, HetAr-Hβ), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**M. p.:** 75-77 °C (*Lit*<sup>126</sup>: 73.5-74.5°C).

<sup>123</sup> Subramanian, P.; Kaliappan, K. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 27, 5986-5997.

<sup>124</sup> Saha, B.; Sharma, S.; Sawant, D.; Kundu, B. *Tetrahedron* **2008**, 37, 8676-8684.

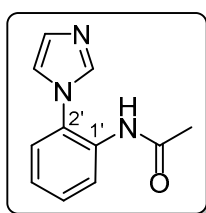
<sup>125</sup> Cheeseman, G. W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 242-247.

<sup>126</sup> Cheeseman, G. W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 242-247.

#### 4.7.1.5 General procedure C

To a stirred solution of the corresponding azolo-1-acetanilide (0.3 – 0.63 mmol, 1 equiv) in AcOH (1.58 mL/mmol), Ac<sub>2</sub>O (1.3 equiv) was added dropwise at room temperature. The solution was stirred for 35 min at room temperature. Then, the reaction mixture was poured onto an ice/satd. NaHCO<sub>3</sub> bath (61 mL/mmol). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL) and then, the organic phase was washed with brine (2x10mL) and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Following, the solvent was removed under reduced pressure affording the final product.

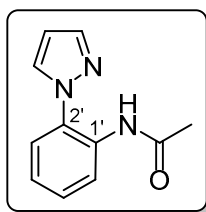
##### 4.7.1.5.1 *N*-(2-(1*H*-imidazol-1-yl)phenyl)acetamide (**17**)



Following general procedure C and using **13** (100 mg, 0.632 mmol), **17** (101 mg, 80%) was obtained as a white crystalline solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>127</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H6), 7.66 (s, 1H, HetAr-H2), 7.60 (s, 1H, NH), 7.53 – 7.39 (m, 1H, Ar-H4), 7.28 – 7.18 (m, 3H, ArH), 7.11 (s, 1H, HetArH), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

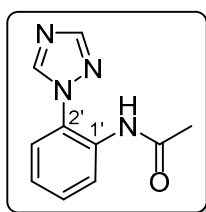
##### 4.7.1.5.2 *N*-(2-(1*H*-pyrazolo-1-yl)phenyl)acetamide (**18**)



Following general procedure C and using **14** (50 mg, 0.316 mmol), **18** (50 mg, 78%) was obtained as a yellow oil. Spectroscopic data agree with those reported in the literature<sup>128</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.26 (s, 1H, NH), 8.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H6), 7.80 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, HetAr-H3 and H5), 7.38 – 7.25 (m, 2H, Ar-H3 and Ar-H4), 7.14 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, Ar-H5), 6.49 (ap t, *J* = 2.2 Hz, 1H, HetAr-H4), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

##### 4.7.1.5.3 *N*-(2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (**19**)



Following general procedure C and using **15** (50 mg, 0.316 mmol), **19** (50 mg, 78%) was obtained as a yellow crystalline solid.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.41 (s, 1H, NH), 8.44 (s, 1H, HetAr-H5), 8.42 (d, 1H, Ar-H6, partially overlapped with HetAr-H5), 8.21 (s, 1H, HetAr-H3),

<sup>127</sup> Tang, B.; Guo, S.; Zhang, M.; Li, J. *Synthesis* **2008**, *11*, 1707-1716.

<sup>128</sup> Kianmehr, E.; Amiri Lomedasht, Y.; Faghieh, N.; Khan, K. M. *JOC* **2016**, *14*, 6087-6092.

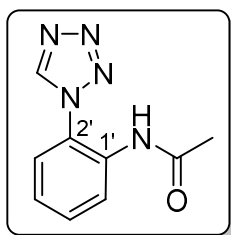
7.47 – 7.42 (m, 1H, Ar-H4), 7.34 (dd,  $J = 8.0, 1.4$  Hz, 1H, Ar-H3), 7.20 (td,  $J = 7.8, 1.3$  Hz, 1H, Ar-H5), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171.06 (CO), 155.44 (HetAr-C3), 146.29 (HetAr-C5), 134.28 (Ar-C1), 132.39 (Ar-C5), 128.48 (Ar-C2), 127.01 (Ar-C4), 126.22 (Ar-C6), 125.52 (Ar-C3), 27.55 (CH<sub>3</sub>).

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 203.0927. Found [M+H]<sup>+</sup>: 203.0933.

M. p.: 145-147°C.

#### 4.7.1.5.4 N-(2-(1H-Tetrazol-1-yl)phenyl)acetamide (20)



As described in general procedure E, **16** (50 mg, 0.31 mmol) AcOH (43 mg, 0.41 mmol) stirred for 45 min gave **20** as a yellow solid (37mg, 68%).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.91 (s, 1H, HetAr-H5), 8.41 (s, 1H, NH), 8.27 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, Ar-H6), 7.58 (td,  $J = 8.6, 1.8$  Hz, 1H, Ar-H4), 7.46 – 7.28 (m, 2H, Ar-H5 and H3), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  168.97 (CO), 142.98 (HetAr-C5), 131.89 (Ar-C1), 131.49 (2C, Ar-C2, Ar-C6), 125.70 (Ar-C3), 125.61 (Ar-C5), 124.23 (Ar-C5), 24.64 (CH<sub>3</sub>).

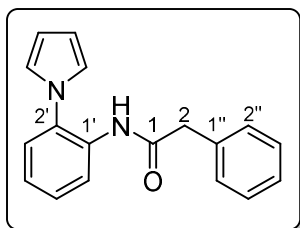
HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculated for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 204.0880. Found [M+H]<sup>+</sup>: 204.0880.

M. p.: 161-162°C.

#### 4.7.1.6 2.1.5.3. General Procedure D

A stirred solution of **6** (0.632 mmol, 1 equiv) and triethylamine (70 mg, 0.695 mmol, 1.1 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11 mL/mmol) was cooled in an ice bath. Acyl chloride (0.695 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, the organic phase was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), and next, washed with satd. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 x 5 mL) and brine (2 x 5 mL), dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure to give the crude product. Purification by flash chromatography on silica gel (hexane/EtOAc 4:1) afforded the final product.

#### 4.7.1.6.1 *N*-(2-(1*H*-Pyrrol-1-yl)phenyl)-2-phenylacetamide (**7**)



As described in general procedure **D**, **7** (155 mg, 81 %) was obtained as a white solid.

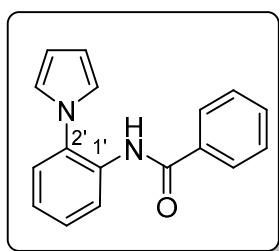
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.39 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H6'), 7.36-7.31 (m, 1H Ar-H5'), 7.28-7.24 (m, 3H, ArH), 7.18 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, Ar-H3'), 7.12-7.08 (m, 3H, ArH), 7.09 (br s, 1H, NH), 6.48 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-H $\alpha$ ), 6.19 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-H $\beta$ ), 3.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 169.05 (CO), 133.81 (Ar-C2'), 133.61 (Ar-C1'), 129.42 (2 Ar-C2'' and 6''), 129.41 (2 Ar-C3'' and 5''), 128.82 (ArC), 127.69 (ArC), 127.01 (ArC), 124.25 (ArC), 121.40 (Ar-C1''), 121.65 (2C, HetAr-C $\alpha$ ), 121.12 (ArC), 110.48 (2C, HetAr-C $\beta$ ), 45.34 (CH<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI-TOF<sup>+</sup>)** *m/z* calculated for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 277.1335. Found [M+H]<sup>+</sup>: 277.1329.

**M. p.:** 150-152 °C.

#### 4.7.1.6.2 *N*-(2-(1*H*-Pyrrol-1-yl)phenyl)benzamide (**7**)



Following general procedure **D**, **8** (142 mg, 86 %) was obtained as a white solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>129</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H6'), 7.42 (br s, 1H, NH), 7.34 – 7.20 (m, 3H, ArH), 7.20 – 7.03 (m, 6H, ArH), 7.07 – 6.94 (m, 3H, ArH), 6.96 – 6.77 (m, 2H, ArH), 6.50 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-H $\alpha$ ), 6.10 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, HetAr-H $\beta$ ).

### 4.7.1.7 Synthesis of azoloquinoxalines

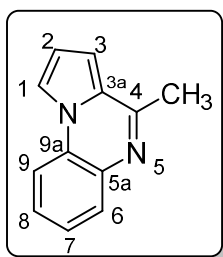
#### 4.7.1.7.1 Pyrrolo[1,2- $\alpha$ ]quinoxalines. General Procedure E

A mixture of the corresponding acetanilide and POCl<sub>3</sub> (5 mL/mmol) was heated at reflux temperature during 1 h. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and evaporated to dryness. Iced water (20 mL/mmol) was added on the resulting residue and the pH was adjusted to 7–8 with 5% NaHCO<sub>3</sub>. Next, the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL/mmol) and the organic extracts were pooled and dried (MgSO<sub>4</sub>). Following, the desiccant

<sup>129</sup> Guillon, J.; Dallemagne, P.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Manechez, D.; Kervran, A.; Rault, S. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *4*, 293-308.

was filtered off and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was chromatographed on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ , 9:1) to afford the final product.

#### 4.7.1.7.1.1 4-Methylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline (1a)



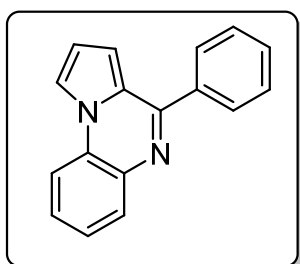
As described in general procedure **E**, **6** (1.5 g, 7.5 mmol) afforded **3a** (1.26 g, 92%) as a cream coloured solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>130</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.92 – 7.89 (m, 2H, H1 and H6), 7.82 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H9), 7.53 – 7.36 (m, 2H, H7 and H8), 6.93 – 6.77 (m, 2H, H2 and H3), 2.73 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  145.7 (C4), 135.55 (C5a), 129.91 (C6), 128.5 (C9a), 127.5 (C8), 125.1 (C3a), 123.87 (C7), 114.09 (C1), 113.36 (C9), 113.7 (C2), 106.88 (C3), 21.22 ( $\text{CH}_3$ ).

M. p.: 139-141 °C (*Lit*<sup>131</sup>: 133-138 °C).

#### 4.7.1.7.1.2 4-Phenylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline (1i)

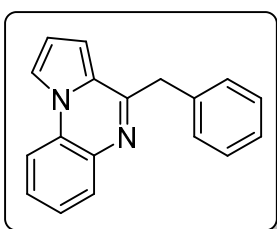


As described in general procedure **E**, **8** (78 mg, 0.33 mmol), afforded **1i** (63 mg, 70%) as a white solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>132</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.07 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H6), 8.04 – 7.97 (m, 2H, ArH), 7.87 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H9), 7.63 – 7.38 (m, 5H, ArH), 7.01 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H, H2), 6.96 – 6.81 (m, 1H, Ar-H3).

M. p.: 85-87°C (*Lit*<sup>133</sup>: 87-89 °C).

#### 4.7.1.7.1.3 4-Benzylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline (1h)



As described in general procedure **B**, **7** (36 mg, 0.13 mmol), afforded **1h** (29 mg, 90%) as a white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.99 (dd,  $J$  = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H6), 7.88 (dd,  $J$  = 2.7, 1.2 Hz, 1H, H1), 7.82 (dd,  $J$  = 8.1, 1.4 Hz, 1H, H9), 7.50 (m, 1H, H), 7.46 – 7.41 (m, 3H, ArH), 7.31 – 7.25 (m, 2H, ArH), 7.23 – 7.17 (m, 1H, ArH), 6.86 (dd,  $J$  = 3.9, 0.9 Hz, 1H, H2), 6.80 (dd,  $J$  = 4.3, 2.7 Hz, 1H, H3), 4.38 (s, 3H,  $\text{CH}_2$ ).

<sup>130</sup> Liu, G.; Zhou, Y.; Lin, D.; Wang, J.; Zhang, L.; Jiang, H.; Liu, H. *ACS Comb. Sci.* **2011**, *3*, 209-213.

<sup>131</sup> Cheeseman, G. W. *H. J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 242-247.

<sup>132</sup> Liu, X.; Liu, T.; Meng, W.; Du, H. *Org. Lett.* **2018**, *18*, 5653-5656.

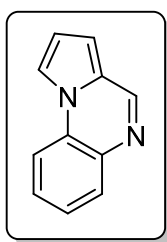
<sup>133</sup> You, W.; Rotili, D.; Li, T.; Kambach, C.; Meleshin, M.; Schutkowski, M.; Chua, K. F.; Mai, A.; Steegborn, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *4*, 1007-1011.

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  155.44 (C4), 138.17 (C5a), 129.85 (C6), 128.99 (Ar-C2' and C6'), 128.65 (C3' and C5'), 127.49 (C8), 127.37 (C4'), 126.72 (C9a), 125.99 (C3a), 125.27 (C7), 114.44 (C9), 113.89 (C1), 113.76 (C2), 107.30 (C3), 42.72 (CH<sub>2</sub>). C1' not observed in <sup>13</sup>C-RMN.

**HRMS (ESI-TOF<sup>+</sup>)** *m/z* calculated for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 259.1242. Found [M+H]<sup>+</sup>: 259.1238.

**M. p.:** 90-93 °C.

#### 4.7.1.7.1.4 Pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline (**1j**)



To a stirred solution of **6** (50 mg, 0.312 mmol, 1 equiv) in trimethyl orthoformate (500  $\mu$ L, 4.56 mmol, 14 equiv), few drops of AcOH were added and the solution was stirred at reflux temperature for 1.5 h. Next, the reaction was quenched with water (9 mL/mmol). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL), the organic phase was washed with brine (2 x 5 mL), and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a brown solid. The solid was dissolved in CH<sub>3</sub>OH and H<sub>2</sub>O was added until precipitation of **1j** as a cream coloured solid (42 mg, 89%). Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>134</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.81 (s, 1H, H4), 8.00 – 7.91 (m, 2H, H6 and H1), 7.87 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H, H9), 7.57 – 7.49 (m, 1H, H8), 7.45 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H7), 6.93 – 6.85 (m, 2H, H2 and H3).

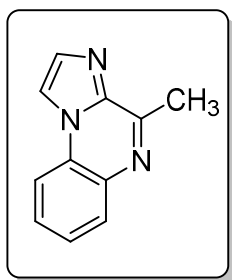
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  144.7 (C4), 135.55 (C5a), 129.99 (C9), 128.0 (C7), 127.7 (C9a), 127.5 (C6a), 125.1 (C3a), 124.88 (C8), 114.11 (C1), 113.79 (C6), 113.7 (C2), 107.21 (C3).

**M. p.:** 131-132 °C (*Lit.*: 131-132 °C).

#### 4.7.1.7.1.5 Synthesis of 4-methylimidazo[1,2-*a*]quinoxaline (**22**)

To a solution of **21** (55 mg, 0.23 mmol, 1 equiv) in AcOH (13 mL/mmol), Fe powder (52 mg, 0.92 mmol, 4 equiv) was added. Then, the system was purged with argon and the reaction mixture refluxed for 3 h until the reaction finished by TLC monitoring. Next, the reaction mixture was cooled to room temperature and the solution was neutralized using satd. NaHCO<sub>3</sub> (21 mL/mmol). The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL) and the organic extracts were pooled and dried (MgSO<sub>4</sub>). The desiccant was filtered off and the solvent was removed

<sup>134</sup> Li, J.; Zhang, J.; Yang, H.; Gao, Z.; Jiang, G. *J. Org. Chem.* **2017**, *1*, 765-769.



under reduced pressure to give a residue that was chromatographed on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9.5:0.5) as eluent to afford **22** (30 mg, 71%).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.09 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H1), 8.03 (td, *J* = 5.4, 1.3 Hz, 1H, H2), 7.85 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H6), 7.76 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H9), 7.64 – 7.53 (m, 2H, H7 and H8), 2.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

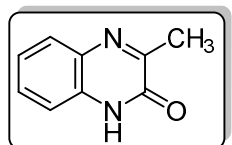
<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 146.37 (C4)\*, 139.4 (C3a), 135.7 (C5a)\*, 129.61 (C6), 128.63 (C8), 127.03 (C9a)\*, 126.81 (C7), 114.69 (C9), 112.73 (C1), 29.74 (CH<sub>3</sub>). \*Carbon not observed in <sup>13</sup>C-NMR, assigned by gHBMC.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculated for C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 184.0869. Found [M+H]<sup>+</sup>: 184.0867.

M. p.: 81-83 °C.

#### 4.7.1.7.2 Synthesis of 4-methyl[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinoxaline

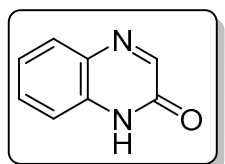
##### 4.7.1.7.2.1 3-Methylquinoxalin-2(1*H*)-one (**23**)



To a suspension of *o*-phenylenediamine (1 g, 9.24 mmol, 1 equiv) in H<sub>2</sub>O (61 ml/mmol), pyruvic acid (1.65 g, 18.48 mmol, 2 equiv) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 30 min and next, the precipitate was filtered off, washed with cold water and recrystallized from water yielding the **23** as a white solid. (1.4 g, 99%). Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>135</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.59 (s, 1H, NH), 7.81 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, Ar-H5), 7.49 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1, Ar-H7), 7.37 (dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, Ar-H8), 7.31 (m, 1H, Ar-H6), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

##### 4.7.1.7.2.2 1-*H*-Quinoxalin-2-one (**28**)



A solution of *o*-phenylenediamine (2.75 g 25 mmol, 1 equiv) and glyoxylic acid (2.2 g, 25 mmol, 1 equiv, 50% wt in water) is refluxed for 2 h. The resulting precipitate is filtered and washed with cold methanol and dried in vacuum to give **28** (3.55 mmol, 97%) as a white solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>136</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.79 (s, 1H, -NH), 8.41 (s, 1H, H3), 7.79 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, H5), 7.51 (td, 1H, H7), 7.42 – 7.25 (m, 2H, H6 and H8), 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

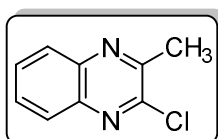
<sup>135</sup> Noolvi, M. N.; Patel, H. M.; Bhardwaj, V.; Chauhan, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *6*, 2327-2346.

<sup>136</sup> Fischer, G.; Isomäki-Krondahl, M.; Göttker-Schnetmann, I.; Daltrozzo, E.; Zumbusch, A. *Chem. : Eur. J.* **2009**, *19*, 4857-4864.

#### 4.7.1.7.3 Synthesis of chloroquinoxalines. General procedure F

A suspension of the corresponding quinoxalinone in  $\text{POCl}_3$  (1.17 ml/mmol) was refluxed at 120 °C for 5h. Next, the resulting mixture was cooled at room temperature and then poured into a DMF-ice bath. The solid was filtered off, washed with DMF and recrystallized from DMF yielding the final product.

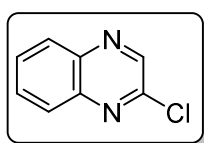
##### 4.7.1.7.3.1 2-Chloro-3-methylquinoxaline (24)



Following general procedure F, **23** (940 mg, 5.89 mmol) gave **24** (786 mg, 72%) as a colourless crystalline solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>137</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.93 – 7.78 (m, 2H, H5 and H8), 7.66 – 7.54 (m, 2H, H6 and H7), 2.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

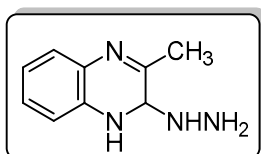
##### 4.7.1.7.3.2 2-Chloroquinoxaline (29)



Following general procedure F, **28** (1g, 6.84 mmol) gave **29** (750 mg, 66%) as a colourless crystalline solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>138</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.75 (s, 1H, H3), 8.07 (td,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, 1H, H6), 8.01 (m, H7), 7.81 – 7.69 (m, 2H, H5 and H8).

##### 4.7.1.7.3.3 2-Hydrazino-3-methylquinoxaline (25)



Compound **24** (170 mg, 0.957 mmol) and hydrazine monohydrate (238 mg, 4.75 mmol) were dissolved in EtOH (5.5 mL/mmol). The reaction mixture was stirred at 50 °C until the starting material could not be detected by TLC (6 h). Then, the solvent was eliminated under reduced pressure and the residue thus obtained was purified by silica gel column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ , 9:1) to give **25** as a red solid (164 mg, 99%). Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>139</sup>

<sup>137</sup> Noolvi, M. N.; Patel, H. M.; Bhardwaj, V.; Chauhan, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *6*, 2327-2346.

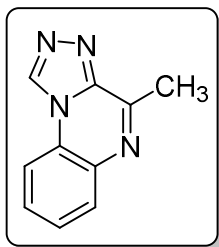
<sup>138</sup> Fischer, G.; Isomäki-Kron Dahl, M.; Göttker-Schnetmann, I.; Daltrozzo, E.; Zumbusch, A. *Chem. : Eur. J.* **2009**, *19*, 4857-4864.

<sup>139</sup> Wagle, S.; Adhikari, A. V.; Kumari, N. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *3*, 1135-1143.



**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H5), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H8), 7.57 (td, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, H7), 7.43 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H6), 6.97 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.14 (s, 1H, NH), 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### 4.7.1.7.3.4 4-Methyl-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinoxaline (26)



**25** (110 mg, 0.559 mmol) was dissolved in triethyl orthoformate (7 mL/mmol). The reaction mixture was stirred at 130 °C overnight and then, cooled at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue thus obtained was purified by silica gel column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) to give **26** an orange solid (55 mg, 54%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.28 (s, 1H, H1), 8.09 (dd, *J* = 7.1, 2.4 Hz, 1H, Ar-H6), 7.97 – 7.85 (dd, *J* = 7.2, 2.2 Hz, 1H, H9), 7.75 – 7.60 (m, 2H, H7 and H8), 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 148.31 (C4), 145.86 (C3a), 139.26 (C1), 131.58 (C5a), 130.32 (C7), 130.25 (C8), 129.17 (C6), 128.17 (C9a), 115.29 (C9), 21.42 (CH<sub>3</sub>).

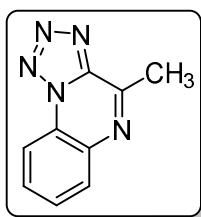
**HRMS (ESI-TOF) *m/z*** calculated for C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 185.0822. Found [M+H]<sup>+</sup>: 185.0821.

**M. p.:** 129 - 131 °C.

#### 4.7.1.7.4 Synthesis of tetrazolo[1,5-*a*]quinoxalines: General procedure G

To a suspension of the corresponding cloroquinoxaline (1 equiv) in DMF (1.85 ml/mmol) was added sodium azide (2 equiv). The reaction was purged with argon and the flask was heated at 120 °C for 24 hours. After cooling, at room temperature, the mixture was poured into an ice/water (61 mL/mmol) bath, the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 ml) and washed with water (3 x 10 mL), followed by brine (10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography over silica gel (EtOAc/hexane, 1:1) to afford the desired product.

##### 4.7.1.7.4.1 4-Methyltetrazolo[1,5-*a*]quinoxaline (27)



**A)** Following general procedure **G** and using **24** (406 mg, 2.27 mmol), **27** (360 mg, 84%) was obtained as a crystalline orange solid.

**B)** To a solution of **31** (50 mg, 0.267 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11 mL/mmol), activated MnO<sub>2</sub> (116 mg, 1.535 mmol) was added. The suspension was stirred for 2.5 h. After this time, the reaction mixture was filtered through

a pad of Celite® and the solvent was eliminated under reduced pressure to afford **27** as an amorphous yellowish solid (44 mg, 90%).

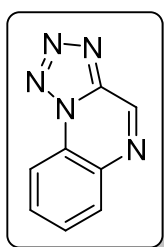
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.55 (dd, *J* = 6.3, 3.2 Hz, 1H, H6), 8.18 (dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 1H, H9), 7.92 – 7.68 (m, 2H, H7 and H8), 3.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 151.27 (C4), 145.87 (C3a), 136.37 (C5a), 132.25 (C6), 130.52 (C9a), 130.00 (C8), 129.88 (C7), 116.48 (C9), 22.26 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 186.1975. Found [M+H]<sup>+</sup>: 186.1971.

**M. p.:** 146 - 148 °C.

#### 4.7.1.7.4.2 Tetrazolo[1,5-σ]quinoxaline (**30**)



Following the general procedure **G** from **29** (300 mg, 1.62 mmol), **30** (50 mg, 78%) was obtained as an orange solid. Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>140</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.58 (s, 1H, H4), 8.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H6), 8.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H9), 8.01 – 7.78 (m, 2H, H7 and H8).

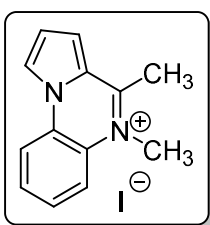
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 142.11 (C4), 140.54 (C3a), 135.53 (C5a), 131.42 (C6), 130.67 (C9a), 129.53 (C8), 124.85 (C7), 117.12 (C9).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 185.0545. Found [M+H]<sup>+</sup>: 185.0547.

**M. p.:** 126-128 °C.

#### 4.7.1.7.5 Synthesis of pyrrolo[1,2-σ]quinoxalinium iodides

##### 4.7.1.7.5.1 4,5-Dimethylpyrrolo[1,2-σ]quinoxalin-5-ium iodide (**2a**)



To a solution of **1a** (0.1 g, 0.55 mmol, 1 equiv) in CH<sub>3</sub>CN (18.2 mL/mmol), CH<sub>3</sub>I (780 mg, 5.5 mmol, 10 equiv) was added. The solution is heated under microwave irradiation during 20 min at 160 °C. After the reaction was cooled down, cold diethyl ether is added to enhance precipitation of the final product. The solid is collected by filtration and washed with cold diethyl ether (2 x 5 mL) to give **2a** as a yellowish solid (0.155 g, 91%).

<sup>140</sup> Chattopadhyay, B.; Vera, C. I. R.; Chuprakov, S.; Gevorgyan, V. *Org. Lett.* **2010**, *9*, 2166-2169.

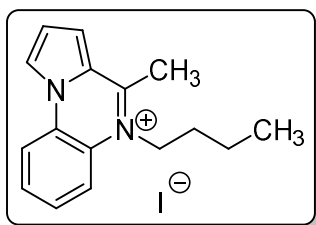
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H1), 8.50 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.4 Hz, H6), 8.29 (dd, 1H, *J* = 8.8, 1.2 Hz, H9), 8.03 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz, H2), 7.93 (td, 1H, *J* = 7.2, 1.2 Hz, H7), 7.81 (td, 1H, *J* = 8.5, 1.4 Hz, H8), 7.33 (dd, 1H, *J* = 4.4, 2.6 Hz, H3), 4.31 (s, 3H, N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 3.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155.01 (C4), 136.1 (C5a), 129.55 (C6), 129.1 (C8), 127.27 (C9a), 126.64 (C3a), 124.22 (C7), 119.83 (C1), 119.76 (Ar-C9), 117.8 (C2), 115.89 (C3), 37.45 (NCH<sub>3</sub>), 18.32 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup>: 197.1073. Found [M]<sup>+</sup>: 190.1070.

**M. p.:** 266-268 °C.

#### 4.7.1.7.5.2 5-Butyl-4-methylpyrrolo[1,2-*a*]quinoxalin-5-ium iodide (2q)



Compound **1a** (100 mg, 0.548 mmol, 1 equiv) was suspended in 1-iodobutane (3.46 mL/mmol) and sealed in a microwave vial. The suspension was heated during 72 h at 110 °C. After this, the reaction mixture was cooled and the precipitate was filtered off and washed with cold diethyl ether affording **2q** as a green solid

(125 mg, 68%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 8.93 (dd, *J* = 2.6, 1.1 Hz, 1H, H1), 8.51 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, H6), 8.26 (dd, *J* = 8.6, 0.7 Hz, 1H, H9), 8.04 (dd, *J* = 4.5, 1.1 Hz, 1H, H2), 7.92 (td, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.83 (td, *J* = 8.7, 1.4 Hz, 1H, H7), 7.37 (dd, *J* = 4.5, 2.6 Hz, 1H, H8), 4.86 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>, overlapped with solvent), 3.22 (m, 1.5 H, -CH<sub>3</sub>, partially exchanged with deuterium), 2.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

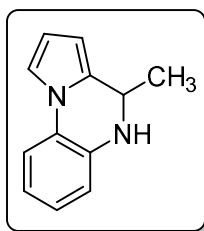
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 155.67 (C4), 141.45 (C5a), 131.23 (C6), 128.97 (C8), 128.48 (C9a), 127.68 (C3a), 126.25 (C3a), 125.98 (C7), 121.61 (C1), 121.09 (C9), 119.94 (C2), 117.86 (C3), 51.01 (NCH<sub>2</sub>), 31.48 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.84 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.01 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup>: 239.1543. Found [M]<sup>+</sup>: 239.1549.

**M. p.:** 192-194 °C.

#### 4.7.1.7.6 Synthesis of 4,5-dihydroazoloquinolines

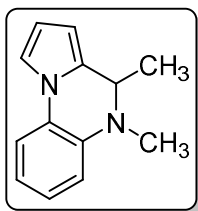
##### 4.7.1.7.6.1 4-Methyl-4,5-dihydropyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline (**3a**)



LiAlH<sub>4</sub> (42 mg, 1.1 mmol, 2 equiv) was added over a solution of **1a** (100 mg, 0.55 mmol, 1 equiv) in anhydrous THF (8 mL/mmol) and the mixture was refluxed overnight. Next, after cooling to room temperature, reaction was quenched with H<sub>2</sub>O (4.2 mL/mmol) and EtOAc (8.5 mL/mmol). The organic layer was washed with brine (3 x 10.4 mL/mmol), dried with anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. Residue was chromatographed on silica gel (EtOAc/hexane, 1:2) to furnish **3a** as a yellow oil (90 mg, 89%). Spectroscopic data agree with those reported in the literature.<sup>141</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.29 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 7.17 – 7.12 (m, 1H, ArHet-H1), 6.96 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6.82 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 6.74 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 6.31 (ap t, *J* = 3.1 Hz, 1H, ArHet-H2), 6.02 – 5.95 (m, 1H, ArHet-H3), 4.55 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH), 3.82 (br s, 1H, NH), 1.56 (dd, *J* = 6.4, 1.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

##### 4.7.1.7.6.2 4,5-Dimethyl-4,5-dihydropyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline (**3r**)



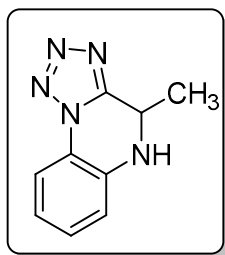
To a solution of **2a** (45 mg, 0.237 mmol, 1 equiv) in CH<sub>3</sub>OH (12 mL/mmol) NaBH<sub>3</sub>CN (16 mg, 0.353 mmol, 1.5 equiv) was added and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. Next, solvent was removed under reduced pressure to give a residue that was chromatographed on silica gel (EtOAc/hexane, 5:1) to furnish the **3r** as a colourless oil (42 mg, 92%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.33 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 7.15 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 7.12 – 7.03 (m, 1H, H<sub>7</sub>), 6.84 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 6.39 – 6.28 (ap t, *J* = 3.3, 2.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 5.97 (dd, *J* = 3.3, 1.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 2.96 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.27 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 136.62 (C<sub>9a</sub>), 131.17 (C<sub>3a</sub>), 126.20 (C<sub>5a</sub>), 124.99 (C<sub>7</sub>), 118.17 (C<sub>8</sub>), 114.27 (C<sub>9</sub>), 113.68 (C<sub>6</sub>), 113.51 (C<sub>1</sub>), 110.09 (C<sub>2</sub>), 102.82 (C<sub>3</sub>), 54.25 (CH), 36.48 (NCH<sub>3</sub>), 17.56 (CHCH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 199.1224. Found [M+H]<sup>+</sup>: 199.1225.

<sup>141</sup> Liu, X.; Liu, T.; Meng, W.; Du, H. *Org. Lett.* **2018**, *18*, 5653-5656.

**4.7.1.7.6.3 4-Methyl-4,5-dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-a]quinoxaline (31)**

To a solution of **30** (50 mg, 0.292 mmol, 1 equiv) in THF anhydrous (4.5 mL/mmol), methyllithium (1.6 M in hexane, 9.6 mg, 0.438 mmol) was added at -78 °C under argon. After 30 min, reaction was quenched with satd. NH<sub>4</sub>Cl (34 mL/mmol). The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 7 mL) and washed with water (3 x 10 mL), followed by brine (2 x 10 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated to give **31** (54 mg, 94%) as an orange solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.93 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H9), 7.25 (td, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H7), 6.93 (td, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H, H8), 6.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 5.18 (qd, *J* = 6.5, 3.0 Hz, 1H, CH), 4.23 (s, 1H, NH), 1.75 (dd, *J* = 6.5, 3.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 150.50 (C3a), 135.20 (C9a), 129.96 (C8), 120.23 (5a), 120.19 (C7), 119.70 (C8), 117.18 (C9), 115.28 (C6), 46.50 (CH), 20.63 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI-TOF) *m/z*** calculated for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 188.0931. Found [M+H]<sup>+</sup>: 188.0932.

**M. p.:** 119-121 °C.

## 4.7.2 Biology

### 4.7.2.1 PTP1B inhibitory screening

These experiments were performed by Mercedes Grier Merino at the Department Biology of Systems under the supervision of Dr. Diego Rodríguez Puyol.

Inhibition assays were performed using a commercial kit ("PTP1B Tyrosine Phosphatase Drug Discovery Kit", BML-AK822 Enzo Life Sciences®). This kit performs a colorimetric test that measures the phosphatase activity of purified PTP1B, based on the malachite green assay. This assay measures the inorganic phosphate released into the aqueous solution that complexes with malachite green molybdate. The absorbance of the complex at 620 nm is proportional to the concentration of free phosphate. The inhibitor was dissolved in reagent-grade dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO) for assay. The assay kit contained recombinant PTP1B and the phosphopeptide substrate (IRS5). The enzyme has an estimated  $K_m$  of 85  $\mu\text{M}$  for the substrate which is used to measure PTP1B activity. PTP1B was prepared for all assays to allow for a final amount of 2.5 ng/well and IRS5 was prepared to have a final assay concentration of 75  $\mu\text{M}$ . Briefly, 35  $\mu\text{L}$  of assay buffer was added to each well and incubated for 15 minutes at 37 °C. Inhibitors or DMSO (10  $\mu\text{L}$ ) as baseline control (final concentration 1  $\mu\text{M}$ ) were added to each well followed by 5  $\mu\text{L}$  of PTP1B (2.5 ng per well) solution. Reactions were initiated by adding 50  $\mu\text{L}$  of IRS5 (final concentration 75  $\mu\text{M}$ ) and the plate was incubated for 30 minutes at 37 °C. Reactions were then terminated by adding 25  $\mu\text{L}$  of the provided phosphate detection reagent and wells were agitated gently to mix. Colour was allowed to develop for 25–30 minutes and absorbance was read at 620 nm using a spectrophotometer.

### 4.7.2.2 *In vitro* activity by *p*-nitrophenylphosphate (pNPP)

Recombinant 433 amino acids PTP1B was purchased from Enzo Life Sciences® and TCPTP from Merck-Sigma Aldrich. All inhibitors were dissolved in 25  $\mu\text{L}$  of DMSO for storage. Starting from this stock different dilution were prepared to perform the assays. Inhibition was measured as hydrolysis of pNPP (400 mM) at 37 °C and pH 7.5 in a 96-well plate with 100  $\mu\text{L}$ /well.

Buffered solution consisted of Tris-HCl (25 mM, pH 7.5),  $\beta$ -mercaptoethanol (2 mM), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM), and DTT (dithiothreitol, 1 mM). Increasing concentrations (0, 0.04, 0.2, 1, 5, 10 and 25  $\mu\text{M}$ ) of compounds were used to determinate the  $\text{IC}_{50}$ . For compounds less soluble, the upper limit of concentrations was lowered.

In each experiment, the hydrolysis of pNPP was measured as an increment in absorbance at 405 nm by adding substrate solution (50  $\mu$ L) to a solution consisting of inhibitor (45  $\mu$ L) and enzyme (5  $\mu$ L; 60 ng/mL). The non-enzymatic hydrolysis of pNPP was corrected by measuring the increase in absorbance at 405 nm obtained in the absence of enzyme. According to the absorbance values, the inhibition rate against PTP1B enzyme was calculated. Each data point was measured by duplicate and experiments were performed by duplicate. Data thus obtained were fitted with GraphPad® (SPCC Inc., Chicago, IL) to obtain IC<sub>50</sub> values using the standard model equation  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / [1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{50})}]$ .

#### 4.7.2.3 MTT assay

These experiments were performed Mercedes Griera Merino at the Department of Biology of Systems under the supervision of Dr. Diego Rodríguez Puyol.

1. **HepG2 cell line.** HepG2 cells were seeded in 24-well plate and were treated for 24 h with the selected compounds. Then DMEM (Eagle's minimal essential medium, ThermoFisher®) was supplemented with MTT (0.5 mg/mL final concentration) and the myotubes were incubated at 37 °C. After 4 h, DMSO was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer.
2. **C2C12 cell line.** Cells were seeded in 24-well, differentiated to myotubes and subsequently treated with compounds (50  $\mu$ M) for 24 h. Cytotoxicity of PTP inhibitors was determined by the MTT assay. For the MTT assay, cells were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (50  $\mu$ L of 5 mg/mL in PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) for 4 h at 37 °C in CO<sub>2</sub> incubator. The medium was removed, and the purple formazan crystals formed were then dissolved by adding 500  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) and mixed effectively by pipetting up and down. Spectrophotometric absorbance of the purple blue formazan dye was measured using Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) at 570 nm. Optical density of each sample was compared with control.

#### 4.7.2.4 Cell differentiation and treatment

These experiments were performed by Mercedes Griera Merino at the Department of Biology of Systems under the supervision of Dr. Diego Rodríguez Puyol.

Mouse skeletal muscle cell lines, C2C12 myoblasts (from ATCC CRL-1772TM) were routinely maintained in DMEM, supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), 1000 UI/mL penicillin, 1000 UI/mL streptomycin and 2 mM L-Glutamine at 37 °C in humidified air

containing 5% CO<sub>2</sub>. Differentiation was induced by switching the growth medium to DMEM supplemented with 2% Horse Serum (HS) (differentiation medium). The differentiation medium was changed every 48 h.

#### **4.7.2.5 Glucose uptake**

These experiments were performed by Mercedes Griera Merino at the Department of Biology of Systems under the supervision of Dr. Diego Rodríguez Puyol.

To determine glucose uptake, C2C12 cells were seeded in 24-well plate. Differentiated C2C12 cells were cultured in fresh DMEM for 2 h, and then treated with DMSO (1% final concentration, 90 min), insulin (10 nM final concentration, 30 min) or compounds (2 µM final concentration, 90 min) at 37 °C. After incubation, the cells were washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) and added fresh glucose-free DMEM containing 100 µM 2NBDG (2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose) for 30 min. Then, cells were washed three times with ice-cold PBS to remove excess fluorescence in the wells, and fluorescence was measured using a microplate reader at excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. Background was subtracted from all values. The cells were then lysed, the protein content was determined in each experiment with a BCA protein assay kit. For each experiment, at least two assays of each condition were performed, and each experiment was repeated at least three times.

#### **4.7.2.6 *In vivo* phosphorylation of PTP1B substrates.**

These experiments were performed by Mercedes Griera Merino at the Department of Biology of Systems under the supervision of Dr. Diego Rodríguez Puyol.

This was analysed by western blot. Antibodies were purchased from Cell Signaling Technology Inc. In brief, cell lysates were subjected to 5 or 12% SDS-PAGE. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane and the membranes were then blocked for 1h at room temperature with 3% BSA in Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween 20. Immunostaining to detect each protein was achieved with O/N incubation with a 1:1000 dilution of anti-phosphospecific anti-IRS, anti-AKT or anti-STAT3 antibodies. Membranes were also blotted with anti-total anti-IRS, anti-AKT or anti-STAT3 antibodies. Specificity total or phosphoproteins were visualized after subsequent incubation with a 1:5.000 dilution of anti-mouse or rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase and a SuperSignal Chemiluminescence detection procedure and imaged using an ImageQuant LAS 500



chemiluminescent detection chamber (General Electric Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Densitometry was determined using ImageJ software (NIH). Three independent experiments were performed for each condition.

### 4.7.3 Computational methods

#### 4.7.3.1 Homology modelling

For the construction of a full PTP1B suitable for our docking studies, homology modelling techniques were needed to model the missing  $\alpha 7$  helix, partially unsolved in the crystal structures (PDB: 1T48) or completely missing (1T49 and 1T4J). To this aim, Modeller software<sup>142</sup> was used through its Graphic User Interface in Chimera.<sup>143</sup> As template 1T48 3D structure was selected and aligned to PTP1B Uniprot sequence (Access code: P18031). Structure 1T48 presents an allosteric ligand which was selected as a constrain to model the missing residues of the  $\alpha 7$  helix surrounding it. Best model thus obtained based on its DOPE score<sup>144</sup> (-0.9) was refined and evaluated by the external web servers: *What if* (<https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html.html>) and *Swiss-Model*. Hydrogens and protonation state of all residues in the final model were generated using the H++ server.<sup>145</sup>

#### 4.7.3.2 Ligand preparation

2D representation for all ligands were obtained with ChemDraw<sup>®</sup> or MarvinSketch<sup>®</sup> software. Protonation states as well as tautomers were investigated using MarvinSketch<sup>®</sup> at physiological pH. After this, structures were exported in mol2 format and the 3D structure was built by means of Spartan<sup>®</sup>. After a rough minimization of all ligands with Spartan<sup>®</sup>, Avogadro<sup>®</sup> was used to full minimize structures with the MMFF94S forcefield and the steepest descent algorithm until dE < 0.05 kJ/mol.

#### 4.7.3.3 Docking studies with AutoDock and AutoDock Vina

For docking studies with AutoDock 4.2<sup>146</sup> and AutoDock Vina 1.12,<sup>147</sup> AutoDockTools were used to prepare both ligands and receptors. AutoDock combines different searching algorithm

---

<sup>142</sup> Šali, A.; Blundell, T. L. *J. Mol. Biol.* **1993**, *3*, 779-815.

<sup>143</sup> Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *13*, 1605-1612.

<sup>144</sup> Shen, M.; Sali, A. *Protein Sci.* **2006**, *11*, 2507-2524.

<sup>145</sup> Gordon, J. C.; Myers, J. B.; Folta, T.; Shoja, V.; Heath, L. S.; Onufriev, A. *Nucleic Acids Res* **2005**, *suppl\_2*, W368-W371.

<sup>146</sup> Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785-2791.

<sup>147</sup> Oleg Trott; Arthur J Olson *J. Comput. Chem.* **2010**, *2*, 455.

(Genetic, Monte Carlo, Simulated annealing, etc) and a semi-empirical (forcefield-based) scoring function (which includes a solvation and entropy term). On the other hand, AutoDock Vina uses an iterated local search global optimizer search algorithm and an empirical-knowledge based scoring function.<sup>148</sup>

Ligands were imported in mol2 format to AutoDockTools, where nonpolar hydrogen atoms were merged, Gasteiger–Marsili atomic charges were added and atom types were assigned, while the rest of parameters were set as default. Final files were saved as pdbqt files.

For the receptor, the PDB file was imported in AutoDockTools and non-polar hydrogen atoms merged, followed by Kollman charges and atom type assignation. The final file with the protein was saved as pdbqt file. Then, the same grid box coordinates and size for all ligands were used in the same protein. Box size chosen was set as default, and a three-dimensional grid was defined (40 x 40 x 40 Å) centered on Phe280 to define the allosteric site for docking calculations.

Atomic grid maps were generated using AutoGrid (only needed for AutoDock 4.2), choosing all possible atom types based in our ligands. Rest of parameters were set as default and Grid Parameter File (GPF) was generated prior performing AutoGrid calculations for atom-specific affinity maps.

For docking with AutoDock 4.2, Lamarckian Genetic algorithm was chosen for conformational ligand sampling. Number of genetic algorithm runs were set to 100 and the rest of parameters were maintained as default. For AutoDock Vina, number of poses generated was set to 10 and exhaustiveness was set to 25. Same grid coordinates were used for both programs. Finally, AutoDock results were clustered with a minimum tolerance of 0.5 and 2.0 Å.

Pose selection was based not only into the free energy (scoring) of all compounds but also in the visual inspection of plausible and coherent binding modes.

#### 4.7.3.4 Docking studies with FlexX

FlexX uses an automated hybrid approach for ligand sampling which is based upon an incremental ligand construction algorithm<sup>149</sup> and an empirical scoring function.<sup>150</sup> For its use, both ligand and receptor were submitted to LeadIt® where files were prepared, and the binding site was defined as a zone of 11 Å surrounding Phe280. Ligands were imported in mol2 format

<sup>148</sup> Pérez-Regidor, L.; Zariouh, M.; Ortega, L.; Martín-Santamaría, S. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *9*, 1508.

<sup>149</sup> Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **1996**, *3*, 470-489.

<sup>150</sup> Böhm, H. J. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *3*, 243-256.

and protonation state was set to pH 7.2 and the rest of parameters was set as default. Docking results were visualized using LeadIt® and PoseView®. For those which was required, HYDE free energy was calculated upon docking results using the best selected pose.

#### 4.7.3.5 Molecular dynamics

PDB files were prepared with pdb4amber module implemented in AmberTools 17<sup>151</sup> prior calculations, in order to assign correct residue and chain names.

Ligands were parameterized using GAFF2<sup>152</sup> forcefield and AM1-BCC charges by means of Antechamber module, while protein was described with AMBER force field ff14SB.<sup>153</sup> Complexes were immersed in a cubic TIP3P<sup>154</sup> water box extended 10 Å from the solute. Afterwards, counterions were added to neutralize the systems. The cut-off for the short-range nonbonded interactions was set to 10 Å and the Particle-mesh Ewald Method (PME)<sup>155</sup> was applied for long-range electrostatic interactions in combination with periodic boundary conditions. All bonds containing hydrogen were constrained using the SHAKE algorithm.<sup>156</sup>

In order to remove steric clashes in the starting 3D structure, energy minimization was performed in several steps: hydrogen atom positions were relaxed in 500 steps, then the positions of water molecules were relaxed under a restrain of  $k = 200 \text{ kcal mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$  for all solute atoms for 1000 steps. Afterwards, the energy of the whole system was minimized with a position restraint of  $k = 5 \text{ kcal mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$  on the position of all C $\alpha$  atoms (1000 steps). Finally, all energy atoms were minimized using 300 cycles of conjugate gradients and a restrain of  $k = 100 \text{ kcal mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$ .

After minimization, solvated complexes were heated by Langevin dynamics (with a collision frequency of  $1.0 \text{ ps}^{-1}$ ) to 300 K for 20 ps with a time step of 2 fs and a restraint of  $k = 5 \text{ kcal mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$  on C $\alpha$  atoms using the NVT ensemble (constant temperature and volume). Secondly, 200 ps simulation in the NPT ensemble (constant temperature and pressure) at 300 K and a pressure of 1 bar was carried out, maintaining the mild restraint on C $\alpha$  atoms. Thereafter, the whole system was equilibrated by 100 ps of NPT molecular dynamics simulation without restraints.

<sup>151</sup> Case, D. A.; Cheatham III, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz Jr., K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2005**, *16*, 1668-1688.

<sup>152</sup> Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *9*, 1157-1174.

<sup>153</sup> Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *8*, 3696-3713.

<sup>154</sup> Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *2*, 926-935.

<sup>155</sup> Shao, X.; Mi, W.; Xu, Q.; Wang, Y.; Ma, Y. *J. Chem. Phys.* **1993**, *18*, 184110.

<sup>156</sup> Ryckaert, J.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Phys.* **1977**, *3*, 327-341.

Molecular dynamics production was performed using the PMED.CUDA module, as implemented in AMBER16 in the High Performing Computer (HPC) BlueCrystal Phase 3 at the University of Bristol using NVIDIA K20 as GPUs. Simulations of **BB2** complexes were performed with OpenMM 7.1<sup>157</sup> using a Monte Carlo barostat for pressure control or NAMD 2.1<sup>158</sup> with the Nosé-Hoover Langevin piston pressure control through their CUDA implementations on a Windows 10 workstation equipped with a GPU NVIDIA GeForce GTX 650 Ti BOOST.

#### 4.7.3.6 WaterSwap Calculations

The WaterSwap free energy perturbation method, implemented in Sire<sup>159</sup> package, was used to calculate absolute binding free energy. WaterSwap uses an explicit water model to fill the cavity left behind due to ligand decoupling reaction. Moreover, it takes into account flexibility of the system by using a Monte Carlo sampling method for protein motion and trajectory generation. The reaction coordinates were the exchange of ligand for a water cluster with the same volume inside the binding site over of 16  $\lambda$  values by means of replica-exchange thermodynamic integration. Then, the free energy perturbation (FEP), thermodynamic integration (TI) and Bennet accepted ratio (BAR) algorithms were applied to calculate binding free energy. The agreement value within 1 kcal/mol between these algorithms is regarded reasonable.

For this simulation, an equilibrated structure from molecular dynamics simulations was used as starting point. AMBER topology and coordinates files were selected, and the calculations were performed in a 16 cores node of HPC Blue Crystal Phase 3 or in an Ubuntu AMD-6300 Six-Core Workstation.

#### 4.7.3.7 Molecular dynamics analysis

For the visualization of the molecular dynamics VMD<sup>160</sup> and Chimera software were used. Analysis of RMSDs, RMSFs, distances and contacts were performed using Python software package MDTraj<sup>161</sup> with Jupyter Notebooks. Hydrogen bonds were analyzed with the VMD plugin as well as secondary structure. Finally, graphics were generated using Excell or Python Matplotlib library.

---

<sup>157</sup> Eastman, P.; Swails, J.; Chodera, J. D.; McGibbon, R. T.; Zhao, Y.; Beauchamp, K. A.; Wang, L.; Simonett, A. C.; Harrigan, M. P.; Stern, C. D.; Wiewiora, R. P.; Brooks, B. R.; Pande, V. S. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *7*, e1005659.

<sup>158</sup> Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. *J. Comput. Chem.* **2005**, *16*, 1781-1802.

<sup>159</sup> Woods, C.; Malaisree, M.; Hannongbua, S.; Mulholland, A. *J. Chem. Phys.* **2011**, *5*, 054114-13.

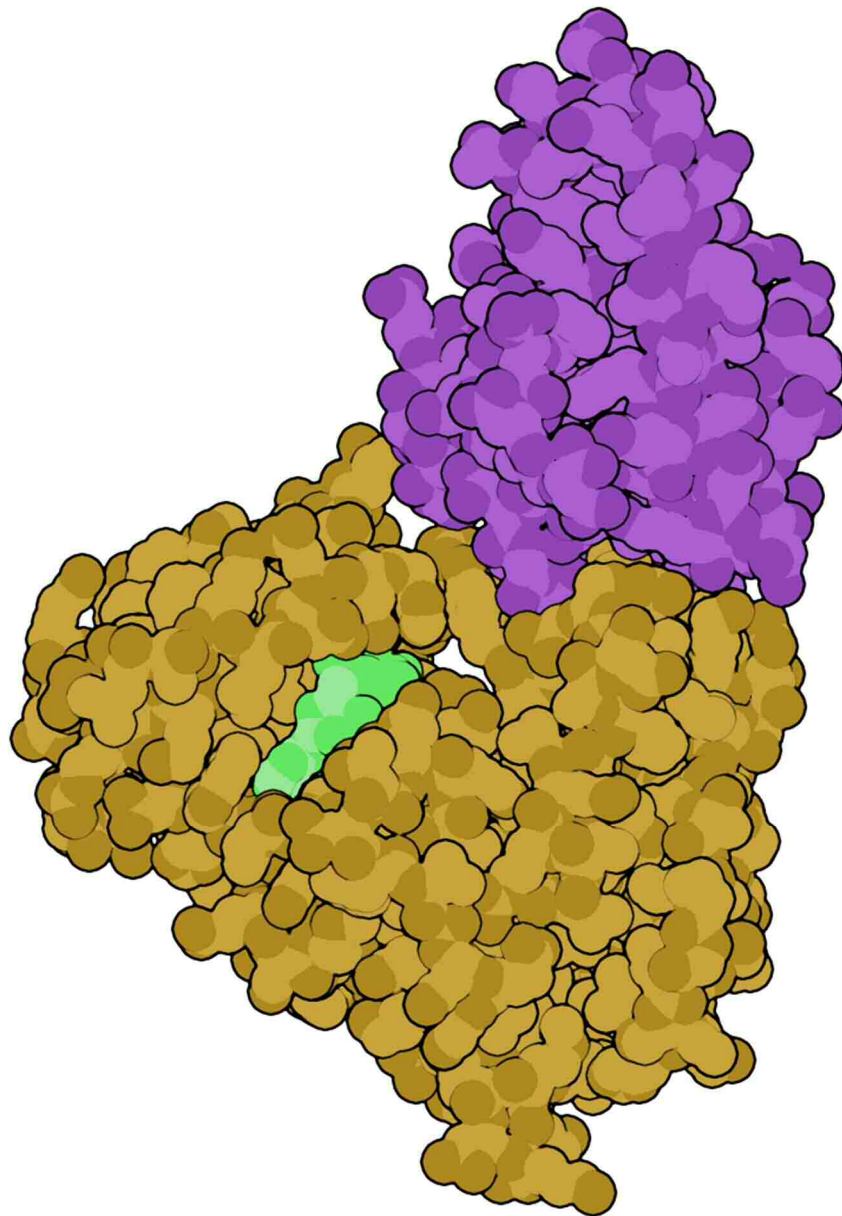
<sup>160</sup> Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, *1*, 33-38.

<sup>161</sup> McGibbon, R.; Beauchamp, K.; Harrigan, M.; Klein, C.; Swails, J.; Hernández, C.; Schwantes, C.; Wang, L.; Lane, T.; Pande, V. *Biophys. J.* **2015**, *8*, 1528-1532.



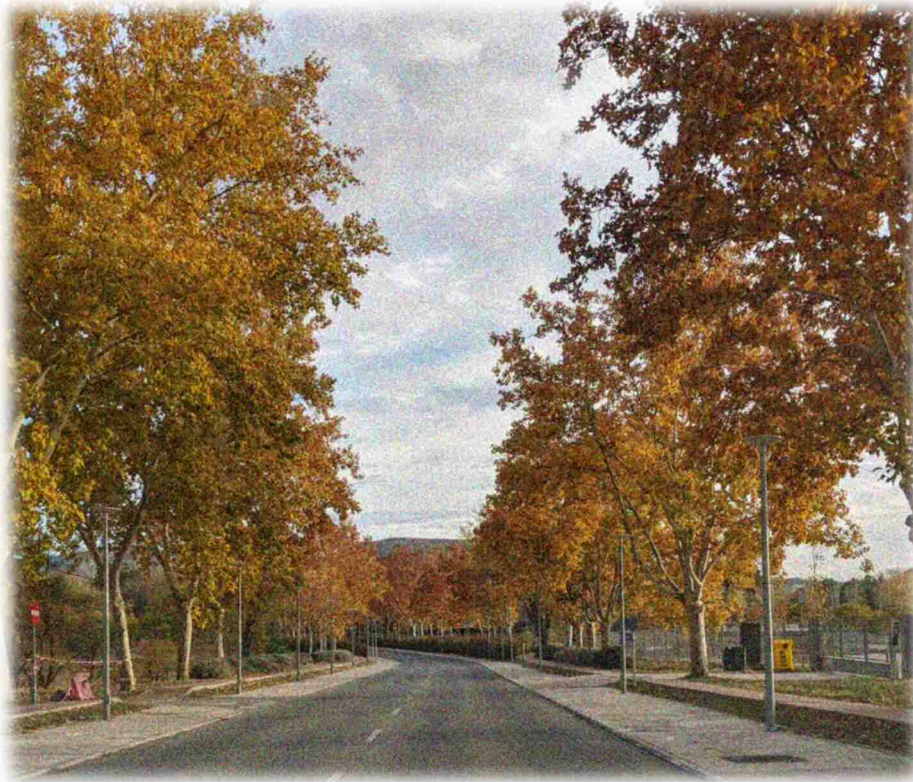
## 5. MODULADORES DE LA QUINASA LIGADA A INTEGRINAS

---



## 5.1 INTRODUCCIÓN

---



### 5.1.1 La matriz extracelular y las adhesiones focales

De entre todos los elementos no celulares de mayor importancia en el organismo humano, la matriz extracelular es uno de los más relevantes. Bajo esta denominación se engloban el conjunto de componentes localizados en el estroma celular, constituido por agua, distintas proteínas como el colágeno, fibrina o elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y otras biomoléculas de diversa naturaleza (Figura 39). Aunque durante mucho tiempo se pensó que la matriz extracelular solo jugaba un papel estructural de andamiaje entre células, a mediados del siglo XIX este hecho comenzó a cambiar.<sup>162</sup> Así pues, se ha reconocido que la matriz extracelular interviene de forma decisiva en procesos como el crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia celular, homeostasis y morfogénesis de los tejidos.<sup>163</sup>

La matriz extracelular, se trata pues, de un sistema altamente dinámico sometido a cambios tanto físicos como bioquímicos en su composición y su estructura. Su remodelación juega un papel decisivo en procesos como la cicatrización, el envejecimiento tisular o el desarrollo e invasividad de distintos tumores.<sup>164</sup> Además, es capaz de iniciar reacciones de señalización intracelular de forma *outside-in* gracias a receptores específicos en las células que son capaces de detectar cambios químicos en el medio de la matriz debidos a neurotransmisores, hormonas y citoquinas o estímulos mecánicos.

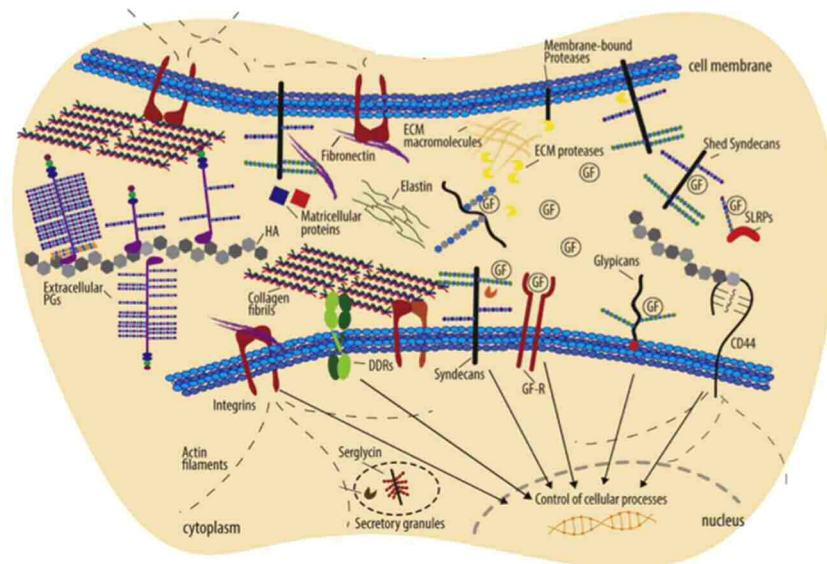


Figura 39. Matriz extracelular. Figura adaptada de Theocharis et al (2016).<sup>163</sup>

<sup>162</sup> Burridge, K. *FEBS J.* **2017**, *20*, 3355-3361.

<sup>163</sup> Theocharis, A. D.; Skandalis, S. S.; Gialeli, C.; Karamanos, N. K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *4*-27.

<sup>164</sup> Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M. *J. Cell. Sci.* **2010**, *Pt 24*, 4195-4200.



De este modo, para que tengan lugar todos aquellos fenómenos dinámicos en los que está implicada la matriz extracelular, tiene que existir una comunicación entre la misma y los distintos tipos celulares conectados a ella. Esta conexión está mediada por una gran variedad de receptores y moléculas entre las que se encuentran las integrinas, sindecanos o las cadherinas entre otras. Sin embargo, las más relevantes y cuyo interés ha ido aumentando en los últimos años por su papel biológico son las integrinas.

Las integrinas son una familia de proteínas transmembrana de naturaleza heterodimérica ( $\alpha/\beta$ ) que actúan como conectores de la matriz extracelular y el citoesqueleto celular. La unión de los ligandos extracelulares a las integrinas desencadena su activación por medio de cambios conformacionales en el dominio extracelular. Como consecuencia de esta señal *outside-in*, la cola intracelular de la integrina se despliega y tiene lugar un proceso de reclutamiento de distintas proteínas entre las que se encuentran la quinasa de adhesión focal o la quinasa ligada a integrinas.<sup>165</sup> Posteriormente, tiene lugar la adhesión de más proteínas a este complejo como la paxilina o la talina, entre otras, constituyendo lo que se conoce como complejo de adhesión focal, de pequeño tamaño y tiempo de vida corto.<sup>166</sup> La unión de este entramado a otras proteínas adaptadoras y a los filamentos de actina del citoesqueleto celular da lugar a que se formen las que se conocen como adhesiones focales, complejos mucho más estables y observables al microscopio. Estos agregados, altamente heterogéneos, varían en su morfología, tamaño, componentes o en los tipos celulares donde se forman. No obstante, la adhesión focal es el tipo de adhesión celular más estable y que se encuentra en células con gran potencial adherente como los fibroblastos.<sup>167</sup>

Se distinguen, en general, dos tipos de proteínas atendiendo a su función bioquímica como posibles constituyentes de las adhesiones focales. Por un lado, están las proteínas con actividad catalítica *per se* incluyendo la quinasa de adhesión focal (FAK), la ILK, la quinasa Src, fosfatasa como PTEN o PTP1B y proteasas como calpaínas.<sup>168</sup> Finalmente, se pueden encontrar las proteínas adaptadoras las cuales únicamente median la interacción con otras biomoléculas como PINCH, paxilina, migfilinas o kindilinas.<sup>169</sup> A pesar de todo el conocimiento referente a este

---

<sup>165</sup> Parsons, J. T.; Horwitz, A. R.; Schwartz, M. A. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2010**, *9*, 633-643.

<sup>166</sup> Calderwood, D. A.; Campbell, I. D.; Critchley, D. R. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *8*, 503-517.

<sup>167</sup> Schiller, H. B.; Fässler, R. *EMBO Rep.* **2013**, *6*, 509-519.

<sup>168</sup> Burdisso, J. E.; Gonzalez, A.; Arregui, C. O. *J. Cell. Sci.* **2013**, *Pt 8*, 1820-1831.

<sup>169</sup> Wu, C. *Cell. Adh. Migr.* **2007**, *1*, 13-18.

macroensamblaje proteico, no se descarta que en un futuro se descubran nuevos componentes del complejo de adhesión focal que permitan explicar sus funciones.

Una vez ensamblado, este complejo es el encargado de reforzar y dinamizar la conexión entre las integrinas y los filamentos de actina, activando distintas cascadas de señalización intracelular incluyendo las MAP quinasas, Akt, las quinasas Rho o distintas GTPasas.

### 5.1.2 La quinasa ligada a integrinas

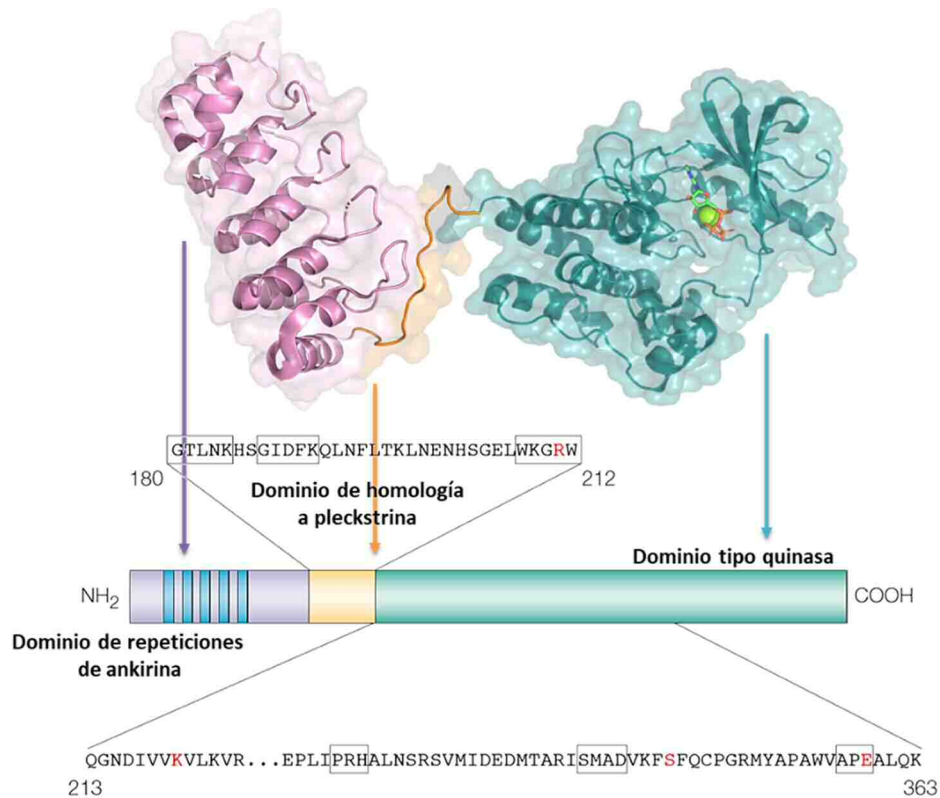
Uno de los principales transductores de la señalización de las integrinas hacia el citoesqueleto celular es la quinasa ligada a integrinas (*Integrin Linked Kinase*, ILK). Esta proteína fue identificada y aislada en el año 1996 por el grupo de Dedhar como un sistema proteico capaz de interactuar con la subunidad  $\beta 1$  de integrinas.<sup>170</sup> Se trata de una proteína de 59 kDa evolutivamente muy conservada y constituida por 452 aminoácidos divididos en tres dominios bien diferenciados.

En el extremo *N*-terminal se encuentra el dominio de repeticiones de ankirina. Aunque inicialmente se pensó que este dominio lo constituían 4 repeticiones de ankirina (cada una con dos  $\alpha$ -hélices antiparalelas separadas por un bucle), la estructura cristalina de este dominio junto a LIM1 mostró que lo constituyen 5 repeticiones diferentes.<sup>171</sup> Le sigue el dominio central, o dominio putativo de homología a pleckstrina, constituido por los aminoácidos 180 a 212 y con capacidad de unión a fosfatidilinositol-3-fosfato y finalmente el dominio *C*-terminal o dominio tipo quinasa (KILK) tal y como se muestra en la Figura 40.

---

<sup>170</sup> Hannigan, G. E.; Leung-Hagesteijn, C.; Fitz-Gibbon, L.; Coppolino, M. G.; Radeva, G.; Filmus, J.; Bell, J. C.; Dedhar, S. *Nature* **1996**, *6560*, 91-96.

<sup>171</sup> Ghatak, S.; Morgner, J.; Wickstrom, S. A. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *4*, 995-1001.



**Figura 40.** Representación de la estructura tridimensional de ILK (reconstrucción a partir de datos depositados en PDB: 3KMW y 4H18) y su secuencia. Figura adaptada de Hannigan, G. et al (2005).<sup>173</sup>

En su descubrimiento, ILK fue considerada una proteína quinasa con capacidad de fosforilar residuos de treonina y serina de las proteínas implicadas en sus vías de señalización. De hecho, varios han sido los sustratos putativos o no, descritos como dianas de fosforilación de la ILK, incluyendo GSK-3 $\beta$ , Akt o las kindilinas.<sup>172</sup> No obstante, este hecho ha estado siempre sujeto a una enorme controversia entre los grupos de investigación, dadas las características del centro activo de la proteína que la convierten en una pseudoquinasa.

Son tres los motivos característicos y canónicos de las quinasas (HRD, DFG y APE) presentes en el bucle de activación, sin embargo, únicamente el motivo APE se encuentra plenamente conservado en la ILK.<sup>173</sup> En el caso de esta proteína, el motivo DFG se encuentra sustituido por DVK. Como consecuencia, las cadenas laterales del mismo se orientan de forma muy distinta a las de otras quinasas como PKA y tiene como resultado que el bucle donde se encuentra este adopta siempre en una conformación “cerrada” o “catalíticamente activa” independientemente de que tenga unido ATP o no.<sup>174</sup> A este cambio se le une la falta del motivo conservado rico en

<sup>172</sup> Grashoff, C.; Thievensen, I.; Lorenz, K.; Ussar, S.; Fassler, R. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *5*, 565-571.

<sup>173</sup> Hannigan, G.; Troussard, A. A.; Dedhar, S. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, *1*, 51-63.

<sup>174</sup> Fukuda, K.; Gupta, S.; Chen, K.; Wu, C.; Qin, J. *Mol. Cell.* **2009**, *5*, 819-830.

glicinas (GXGXXG) que permite una amplia flexibilidad del bucle P. Este último hecho la diferencia además de otras quinasas atípicas que, a pesar de los cambios en las secuencias canónicas, conservan el motivo rico en glicinas. Como resultado, la molécula de ATP presenta un modo de unión distinto en el centro activo de la ILK en comparación a otras quinasas más comunes como PKA. En el caso de ILK, los fosfatos de las posiciones  $\beta$  y  $\gamma$  de la molécula de ATP se encuentran desplazados por la presencia de la Lys341 del motivo DVK, alejándolo del bucle catalítico. En el trabajo realizado por Fukuda en el año 2009, los autores son capaces de cristalizar el dominio catalítico de la ILK con una molécula de ATP sin hidrolizar unida en el centro activo (PBD: 3KMW y 3UMU), lo cual supuso una prueba más de su falta de actividad quinasa.

A pesar de estas evidencias, en su descubrimiento ILK se asoció a una actividad quinasa cuando era purificada en eucariotas, hecho que se apoyó con trabajos posteriores que demostraban su capacidad de fosforilación de importantes sustratos como GSK3 $\beta$  y Akt.<sup>175</sup> Además, el doble mutante S343D y K220M de ILK demostró ser incapaz de unir ATP y de fosforilar todos los sustratos relacionados.<sup>176</sup> En la actualidad, aunque parece bastante claro la naturaleza pseudoquinasa de la ILK y la falta de actividad catalítica, sigue habiendo trabajos que apoyan su actividad catalítica.<sup>177, 178</sup>

Desde su descubrimiento hasta nuestros días, se ha reconocido el papel crucial que ILK juega en el organismo humano. Esta proteína es un componente decisivo y altamente conservado en las adhesiones focales, controlando su ensamblaje y la conexión entre las integrinas y la actina.<sup>179</sup> Sin embargo, si se parte de la asunción de su naturaleza pseudoquinasa y por consiguiente su falta de actividad catalítica, surge la cuestión de cómo es capaz esta proteína de transducir las señales mediadas por las integrinas.

Esta pregunta, si bien es objeto de estudio y debate en la actualidad, es en parte explicada por el hecho de que *in vivo*, la ILK se encuentra formando siempre un complejo heterotrimérico altamente estable y funcional. De este modo, la ILK se une a través de sus dominios de ankirina al dominio LIM1 de la proteína particularmente interesante en cisteína-histidinas, PINCH.<sup>180</sup> Por otro lado, a través de su dominio tipo quinasa (KILK), la ILK interacciona con el segundo dominio

<sup>175</sup> Delcommenne, M.; Tan, C.; Gray, V.; Rue, L.; Woodgett, J.; Dedhar, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *19*, 11211-11216.

<sup>176</sup> Lynch, D. K.; Ellis, C. A.; Edwards, P. A.; Hiles, I. D. *Oncogene* **1999**, *56*, 8024-8032.

<sup>177</sup> Huang, H. L.; Wu, H. Y.; Chu, P. C.; Lai, I. L.; Huang, P. H.; Kulp, S. K.; Pan, S. L.; Teng, C. M.; Chen, C. S. *Oncogenesis* **2017**, *7*, e359.

<sup>178</sup> Ning, Z.; Zhu, X.; Jiang, Y.; Gao, A.; Zou, S.; Gu, C.; He, C.; Chen, Y.; Ding, W. Q.; Zhou, J. J. *Cancer*. **2020**, *2*, 324-333.

<sup>179</sup> Wickstrom, S. A.; Lange, A.; Montanez, E.; Fassler, R. *EMBO J.* **2010**, *2*, 281-291.

<sup>180</sup> Chiswell, B. P.; Zhang, R.; Murphy, J. W.; Boggon, T. J.; Calderwood, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *52*, 20677.

de homología a calponina (CH2) de las proteínas parvinas tal y como demostró Fukuda en su trabajo del 2009. Este complejo proteico recibe el nombre de IPP (*ILK-PINCH-Parvin*) y su formación parece tener lugar previa unión a las adhesiones focales.<sup>181</sup> La estabilidad de este complejo es tal, que la pérdida de alguno de sus componentes conduce directamente a la degradación del resto, generalmente vía proteasoma.<sup>182</sup> De este modo el complejo IPP es esencial para la formación de las adhesiones focales y sirve como anclaje de integrinas transductoras de la señal iniciada por factores de crecimiento, encaminada a controlar la adhesión, el crecimiento y la migración celular.<sup>183</sup>

Se han descrito hasta dos isoformas de PINCH (PINCH1 y PINCH2) capaces de interactuar con ILK junto a tres isoformas distintas de parvina:  $\alpha$ -parvina o actopaxina,  $\beta$ -parvina o affixina y  $\gamma$ -parvina.<sup>184</sup> Si bien todas las isoformas se expresan de forma bastante ubicua en los tejidos del organismo su importancia es bastante diferente. En modelos murinos, la ablación de PINCH-2 no conduce a cambios en el fenotipo, sin embargo, la pérdida de PINCH-1 conduce a anomalías epiteliales y desanclaje del endotelio.<sup>185</sup> Algo similar ocurre con las parvinas, de tal modo que mientras la falta de las isoformas  $\beta$  o  $\gamma$  no conduce a fenotipos obvios observables, la ablación de la isoforma  $\alpha$  produce la muerte del ratón.<sup>186</sup>

Una vez constituido, el complejo IPP es capaz de unir los filamentos de actina a través de PINCH y parvina, pero además recluta otras proteínas para formar parte de la adhesión focal. Se ha descrito como PINCH es capaz de reclutar a la proteína adaptadora Nck-2 o la timosina  $\beta$ -4, mientras que parvina une la paxilina y filamentos de actina.<sup>187</sup>

---

<sup>181</sup> Zhang, Y.; Chen, K.; Tu, Y.; Velyvis, A.; Yang, Y.; Qin, J.; Wu, C. *J. Cell. Sci.* **2002**, Pt 24, 4777-4786.

<sup>182</sup> Fukuda, T.; Chen, K.; Shi, X.; Wu, C. *J. Biol. Chem.* **2003**, 51, 51324-51333.

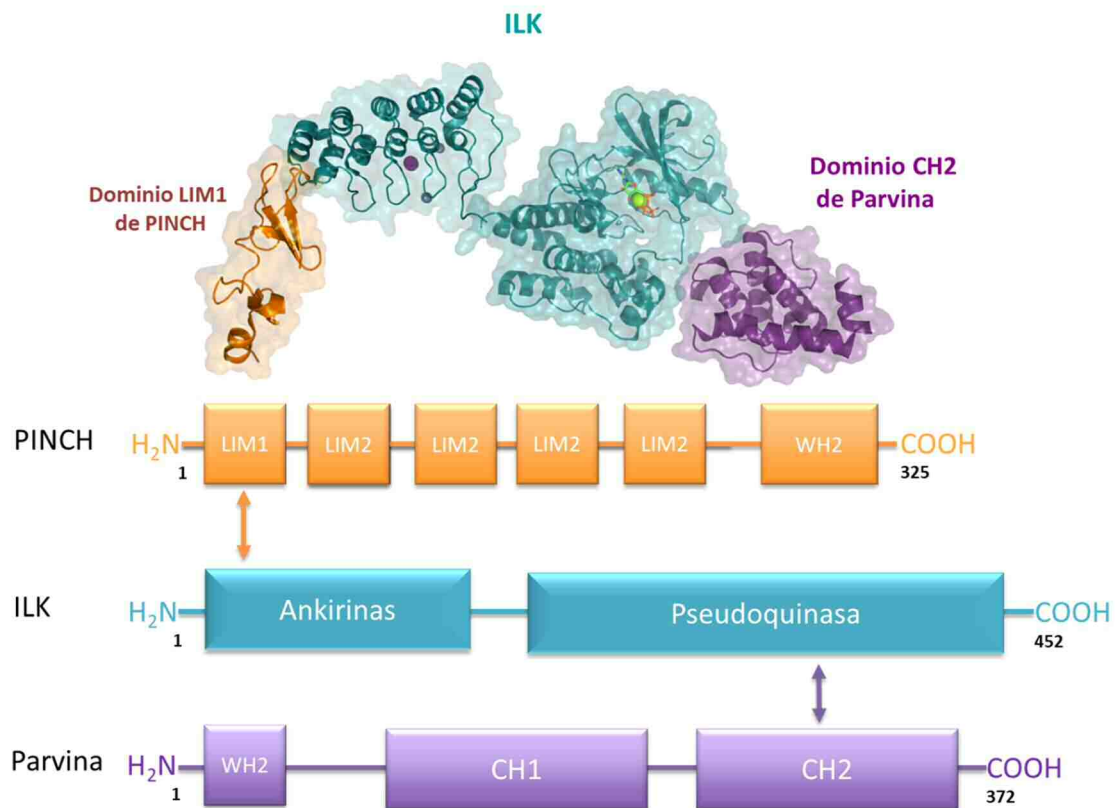
<sup>183</sup> Stiegler, A. L.; Grant, T. D.; Luft, J. R.; Calderwood, D. A.; Snell, E. H.; Boggon, T. J. *PLOS ONE* **2013**, 1, e55591.

<sup>184</sup> Hannigan, G.; Troussard, A. A.; Dedhar, S. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, 1, 51-63.

<sup>185</sup> Liang, X.; Zhou, Q.; Li, X.; Sun, Y.; Lu, M.; Dalton, N.; Ross, J., Jr; Chen, J. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 8, 3056-3062.

<sup>186</sup> Montanez, E.; Wickström, S., A.; Altstätter, J.; Chu, H.; Fässler, R. *EMBO J.* **2009**, 20, 3132-3144.

<sup>187</sup> Grashoff, C.; Thievessen, I.; Lorenz, K.; Ussar, S.; Fassler, R. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, 5, 565-571.



**Figura 41.** Esquema representativo del modo de interacción de las proteínas PINCH-ILK-Parvina dentro del complejo IPP.

Dentro del propio complejo ternario, se ha postulado que las parvinas puedan ejercer algún tipo de efecto sobre la ILK. Dedhar sostuvo que  $\alpha$ -parvina inhibe ILK, especialmente su “actividad quinasa”,<sup>188</sup> hecho que contrasta con el estudio previo de 2009 de Fukuda que prueba cómo la unión de  $\alpha$ -parvina no parece afectar a la estructura tridimensional del kILK. Además, la molécula de ATP del centro pseudoactivo no parece influir tampoco en la afinidad de este dominio por el dominio CH2 de  $\alpha$ -parvina.<sup>189</sup> Sorprendentemente la mutación K220M dentro del bolsillo de ATP conduce a la disrupción en la unión entre ILK y  $\alpha$ -parvina y con ello a la muerte del ratón a las pocas semanas de vida por agenesia renal.<sup>190</sup>

Los estudios más recientes han confirmado que la ILK no tiene capacidad por sí sola de unir los filamentos de actina en las adhesiones focales. Son las proteínas PINCH y parvina del complejo IPP las que, a través de unos dominios recientemente identificados como WH2, son capaces de unir la F-actina a través de sus monómeros de G-actina. De este modo, las dos proteínas

<sup>188</sup> Hannigan, G. E.; McDonald, P. C.; Walsh, M. P.; Dedhar, S. *Oncogene* **2011**, *43*, 4375-4385.

<sup>189</sup> Fukuda, K.; Gupta, S.; Chen, K.; Wu, C.; Qin, J. *Mol. Cell.* **2009**, *5*, 819-830.

<sup>190</sup> Lange, A.; Wickstrom, S. A.; Jakobson, M.; Zent, R.; Sainio, K.; Fassler, R. *Nature* **2009**, *7266*, 1002-1006.

adaptadoras se colocan en forma de “*sándwich*” alrededor de la ILK para favorecer la unión de los filamentos de actina cada una por separado a través de sus dominios WH2 en forma de abrazadera.<sup>191</sup> En este mismo estudio se preparó el mutante L220W el cual coloca en el bolsillo de ATP un resto de triptóano que ejerce impedimento estérico para que no pueda unirse la molécula. Si bien, este mutante (PDB: 6MIB) no une ATP, su interacción con  $\alpha$ -parvina es la misma, en términos de estructura tridimensional, a la observada previamente (PDB: 3KMW y 3REP). Curiosamente, este mutante tampoco es capaz de unirse al ión  $Mg^{2+}$ , demostrando, que el papel quelante del ATP sobre el ión es mayor que el que ejerce el residuo de Asp229 del centro pseudoactivo para unirlo a la proteína en su forma silvestre. Sin embargo, y en contra de lo esperado, este mutante demostró *in vitro* ser incapaz de formar los agregados de actina y, por otro lado, *in cellulo* fue capaz de aumentar el estrés fibrilar y disminuir el número de adhesiones focales.

Todos estos datos constatan cómo, a pesar de que existe mucho conocimiento acerca de esta proteína, especialmente estructural, todavía quedan muchos aspectos que investigar sobre su papel y funcionamiento a nivel biológico en el organismo.

---

<sup>191</sup> Vaynberg, J.; Fukuda, K.; Lu, F.; Bialkowska, K.; Chen, Y.; Plow, E. F.; Qin, J. *Nat. Commun.* **2018**, *1*, 4465.

### 5.1.3 La ILK como potencial diana terapéutica.

A pesar de que el papel bioquímico de la ILK sigue sin ser bien comprendido en términos mecanísticos y estructurales, no lo son tanto sus funciones a nivel fisiológico o fisiopatológico. Para entender los efectos mediados por la ILK muchos autores diferencian su “actividad quinasa” de su función estructural o de ensamblaje.

#### 5.1.3.1 ILK en cáncer

Se encuentra bien documentado que la pérdida de la expresión de la ILK en el ratón conduce letalidad durante la fase embrionaria, similar a la que tiene lugar cuando se suprime la integrina  $\beta 1$ .<sup>192</sup> Esto demuestra que la ILK es una proteína constitutiva, ampliamente extendida en los tejidos y cuyo papel para la supervivencia celular y, por tanto, su modulación es crítica. Por otro lado, la activación constitutiva por su propia función fisiológica en los diferentes tejidos o la sobreexpresión anómala de la ILK se ha asociado con fenómenos de supresión de la anoikis y la apoptosis.<sup>193</sup> Este hecho relaciona directamente ILK con los procesos tumorales y metastásicos.

Se ha descrito que, en general, la ILK se encuentra sobreexpresada y/o sobreactivada en distintos tipos de cánceres promoviendo la progresión oncogénica, siendo su regulación incluso más importante. Existen diversas evidencias en las que se asocia la ILK al grado de supervivencia y agresividad tumoral (capacidad oncogénica) con la regulación *in vivo* de esta proteína por diversas dianas pro-oncogénicas.<sup>194</sup>

La sobreexpresión de la ILK o su activación constitutiva conduce directamente a la estimulación del ciclo celular, mientras que su inhibición, en líneas cancerosas, tiene como resultado la inhibición de la expresión de la ciclina D1 y, por tanto, una parada del ciclo celular en el punto de control G1-S.<sup>195</sup>

Así pues, un aumento en la actividad de la ILK, ya sea por expresión o activación, produce la transformación de distintos tipos de líneas celulares oncogénicas, así como la formación de tumores en modelos murinos, generalmente por supresión de la apoptosis. En estos casos se ha

---

<sup>192</sup> Sakai, T.; Li, S.; Docheva, D.; Grashoff, C.; Sakai, K.; Kostka, G.; Braun, A.; Pfeifer, A.; Yurchenco, P. D.; Fassler, R. *Genes Dev.* **2003**, *7*, 926-940.

<sup>193</sup> Attwell, S.; Roskelley, C.; Dedhar, S. *Oncogene* **2000**, *33*, 3811-3815.

<sup>194</sup> Zheng, C. C.; Hu, H. F.; Hong, P.; Zhang, Q. H.; Xu, W. W.; He, Q. Y.; Li, B. *Am. J. Cancer. Res.* **2019**, *1*, 186-197.

<sup>195</sup> Radeva, G.; Petrocilli, T.; Behrend, E.; Leung-Hagesteijn, C.; Filmus, J.; Slingerland, J.; Dedhar, S. *J. Biol. Chem.* **1997**, *21*, 13937-13944.



comprobado que los fenómenos están asociados a un aumento de la fosforilación de Akt, GSK-3 $\beta$  y las MAP quinasa, tal y como se ha observado en los cánceres de próstata y colorectal.<sup>196</sup>

La relación de la ILK con cáncer no sólo se circunscribe a su capacidad de aumento de la supervivencia celular sino también a su mediación en el aumento de angiogénesis. El factor VEGF es una de las principales proteínas proangiogénicas del organismo, y se encuentra regulado por ILK a través de la inducción de la subunidad  $\alpha$  del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 $\alpha$ ). Se ha demostrado que la sobreexpresión de ILK en melanomas cursa con el aumento de VEGF vía NF- $\kappa$ B.<sup>197</sup>

La función de la ILK también se ha encontrado alterada en otros tipos de cánceres, como el de pulmón, mama o pancreático, contribuyendo a un aumento de la supervivencia, migración celular o invasividad. Adicionalmente, los niveles de ILK se encuentran aumentados en distintos tipos de cánceres donde, además, suponen un indicador de pronóstico del mismo como es en el cáncer de mama, próstata, osteosarcoma, pancreático o gástrico.<sup>198</sup>

Junto al papel que ILK juega directamente en algunos tipos de cáncer se ha demostrado cómo los modelos *knockdown* de ILK son más sensibles a la acción de los inhibidores de EGFR. Además, en los últimos años se especula acerca del papel que juega ILK en la resistencia a quimioterapia en neoplasias como el adenocarcinoma, donde aumenta la resistencia a gemcitabina.<sup>199</sup>

No sólo ILK se ha relacionado con cáncer, también los componentes del complejo IPP. PINCH-1 puede proteger a las células tumorales de la apoptosis regulando la vía de señalización Erk-Bim.<sup>200</sup> Algo similar ocurre con la  $\alpha$ -parvina, que se ha demostrado que promueve el cáncer de mama aumentando su progresión y malignidad.<sup>201</sup>

Dado el relevante papel que la ILK juega en cáncer y su aceptación como diana terapéutica para su tratamiento, desde comienzos de siglo muchos han sido los intentos de búsqueda de nuevas moléculas capaces de inhibir ILK. Existen patentes que describen supuestos moduladores de ILK de distinta naturaleza como “moléculas pequeñas” (US8153641B2), anticuerpos (EP1448191A1) y ARN antisentido (EP0870033B1). Aunque la búsqueda continúa en activo en la actualidad,

---

<sup>196</sup> Durbin, A. D.; Hannigan, G. E.; Malkin, D. *Cell Cycle* **2009**, *24*, 4060-4066.

<sup>197</sup> Cooper, S. J.; Zou, H.; LeGrand, S. N.; Marlow, L. A.; Roemeling, C. A. v.; Radisky, D. C.; Wu, K. J.; Hempel, N.; Margulis, V.; Tun, H. W.; Blobe, G. C.; Wood, C. G.; Copland, J. A. *Oncogene* **2010**, *20*, 2905-2915.

<sup>198</sup> Zheng, C. C.; Hu, H. F.; Hong, P.; Zhang, Q. H.; Xu, W. W.; He, Q. Y.; Li, B. *Am. J. Cancer. Res.* **2019**, *1*, 186-197.

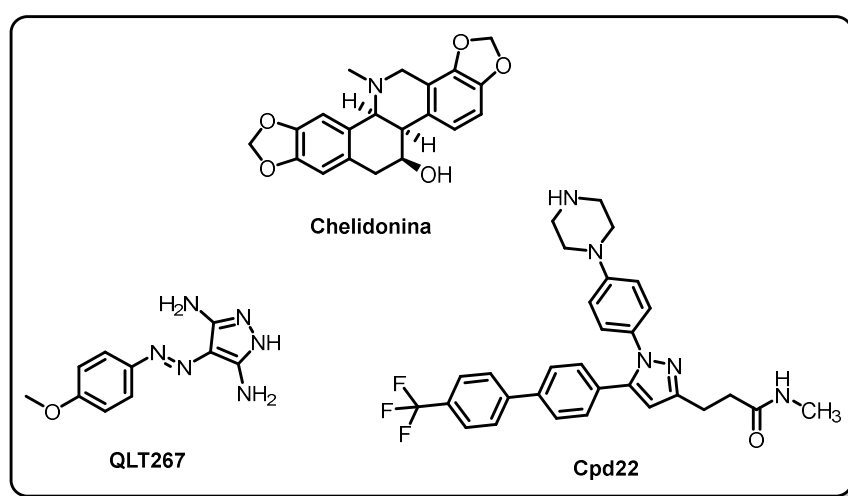
<sup>199</sup> Duxbury, M. S.; Ito, H.; Benoit, E.; Waseem, T.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *9*, 3433-3438.

<sup>200</sup> Chen, K.; Tu, Y.; Zhang, Y.; Blair, H. C.; Zhang, L.; Wu, C. *J. Biol. Chem.* **2008**, *5*, 2508-2517.

<sup>201</sup> Sun, Y.; Ding, Y.; Guo, C.; Liu, C.; Ma, P.; Ma, S.; Wang, Z.; Liu, J.; Qian, T.; Ma, L.; Deng, Y.; Wu, C. *Oncogene* **2019**, *24*, 4856-4874.

únicamente dos “moléculas pequeñas” de síntesis han sido descritas y caracterizadas como inhibidores de ILK: QLT267 y Cpd22.

Además, se ha identificado el producto natural chelidonina con capacidad para inhibir indirectamente a la ILK (Figura 42). Se trata de un alcaloide de benzofenantridina aislado de extractos de *Chelidonium majus* que presentaban propiedades antiproliferativas. Se ha descrito que la chelidonina es capaz de alterar el citoesqueleto y disminuir el crecimiento celular descontrolado. Además, parece ser capaz de inhibir la formación del complejo IPP dependiente de activación por colágeno tipo 1, reduciendo la invasividad y capacidad migratoria en células tumorales.<sup>202</sup>



**Figura 42.** Estructura de los inhibidores descritos de ILK.

El compuesto QLT267 fue identificado en una campaña de cribado de alto rendimiento en búsqueda de nuevos agentes antitumorales.<sup>203</sup> Los hitos así identificados demostraron inhibir la supervivencia de células cancerosas, su crecimiento e invasión e incluso inducir apoptosis en modelos *in vitro*. Sin embargo, QLT267 únicamente era capaz de retrasar el crecimiento y desarrollo tumoral. No obstante, la administración conjunta de éste y el antitumoral docitaxel produce una disminución de la ratio de supervivencia tumoral, así como del tamaño del tumor *in vivo*, disminuyendo los niveles de Akt fosforilada en líneas celulares de cáncer de mama.<sup>202</sup>

El descubrimiento del inhibidor Cpd22 tuvo lugar durante una campaña de desarrollo de distintos inhibidores de quinasas. Tras estudios de *docking* en el centro activo de ILK y evaluación

<sup>202</sup> Kim, O.; Hwangbo, C.; Kim, J.; Li, D. H.; Min, B. S.; Lee, J. H. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *2*, 2161-2168.

<sup>203</sup> Kalra, J.; Warburton, C.; Fang, K.; Edwards, L.; Daynard, T.; Waterhouse, D.; Dragowska, W.; Sutherland, B. W.; Dedhar, S.; Gelmon, K.; Bally, M. *Breast. Cancer. Res.* **2009**, *3*, R25.

de su afinidad, los autores optimizaron una serie de derivados de *N*-arilpirrol con el fin de aumentar interacciones polares con el esqueleto proteico de ILK.<sup>204</sup> De este modo, se generó una quimioteca que se ensayó frente a ILK mediante ensayos de *Western blot* midiendo el efecto de los agentes a nivel de fosforilación de la Ser473 de Akt. El compuesto Cpd22 resultó inhibir el crecimiento tumoral (IC<sub>50</sub> = 1–2.5 μM), su progresión en modelos celulares y murinos y, además, ser biodisponible oralmente. Además, esta molécula ha sido empleada posteriormente en numerosos estudios como inhibidor de ILK.<sup>205</sup>

A pesar del descubrimiento de estos inhibidores, la falta de estructuras cristalinas o ensayos biofísicos que corroboren la inhibición directa de ILK por parte de ambas moléculas complican su uso como base para el desarrollo de fármacos basado en estructura.

Finalmente, también se ha descrito como algunos ARNm antisentido son capaces de inhibir ILK y el progreso y/o formación tumoral, sin embargo, no se han intentado llevar a terapia antitumoral.<sup>1</sup>

### 5.1.3.2 ILK en la enfermedad renal

En los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de ILK, y su implicación en la fisiología del riñón y las patologías asociadas ya que parece jugar un papel fundamental en aquellas patologías crónicas que afectan al ser humano. En diversos estudios se ha ido demostrando que ILK participa de forma crucial en la génesis y progresión de la fibrosis renal,<sup>206,207</sup> manifestación última del deterioro del riñón con la edad y del desarrollo de la enfermedad renal crónica. Además, se ha demostrado que esta fibrosis está mediada, en gran parte, por la acción quinasa de ILK sobre las vías de señalización de Akt y GSK-3β en las células, demostrándose cómo el inhibidor QLT267 es capaz de revertir el deterioro renal en modelos murinos de enfermedad renal por obstrucción uretral unilateral.<sup>208</sup>

Si bien existen muchas evidencias del rol que la ILK desempeña en el desarrollo de fibrosis renal, también se pueden encontrar trabajos que muestran una relación más indirecta entre ILK y las afecciones del riñón, pero no por ello menos importante. Prueba de ello es que los niveles de

---

<sup>204</sup> Lee, S.; Hsu, E.; Chou, C.; Chuang, H.; Bai, L.; Kulp, S. K.; Chen, C. *J. Med. Chem.* **2011**, *18*, 6364-6374.

<sup>205</sup> Shen, Y.; Goncharov, D. A.; Avolio, T.; Ray, A.; Okorie, E.; DeLisser, H.; Mora, A. L.; Vanderpool, R.; Kudryashova, T. V.; Goncharova, E. A. *Pulm. Circ.* **2020**, *1*, 2045894019898593, de la Puente, P.; Weisberg, E.; Muz, B.; Nonami, A.; Luderer, M.; Stone, R. M.; Melo, J. V.; Griffin, J. D.; Azab, A. K. *Leuk. Res.* **2015**.

<sup>206</sup> Li, Y.; Yang, J.; Dai, C.; Wu, C.; Liu, Y. *J. Clin. Invest.* **2003**, *4*, 503-516.

<sup>207</sup> Li, M.; Zhou, H.; Di, J.; Yang, M.; Jia, F. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *1*, 289-296.

<sup>208</sup> Li, Y.; Tan, X.; Dai, C.; Stolz, D. B.; Wang, D.; Liu, Y. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *9*, 1907-1918.

ILK se ven alterados en aquellos pacientes que sufren nefropatía diabética.<sup>209</sup> Además, estudios experimentales en modelos murinos y celulares confirman cómo ILK es un regulador crítico en la inflamación renal mediada por la angiotensina II a través de la vía de señalización proinflamatoria NF- $\kappa$ B.<sup>210</sup>

Una de las posibles causas de la enfermedad renal crónica son los quistes en el riñón, también conocidos como poliquistosis renal o enfermedad renal poliquística. En este trastorno se produce una activación persistente de la proliferación celular y de la matriz extracelular que conduce a la fibrosis y formación de acúmulos de éstos, conocidos como quistes. Estos procesos están mediados por la proteína periostinina la cual actúa a través del eje de señalización celular de ILK.<sup>211, 212</sup>

Así pues, las primeras hipótesis apuntan a que la inhibición de la actividad quinasa de ILK podría ser beneficiosa para disminuir la fibrosis asociada al desarrollo de enfermedad renal crónica. No obstante, su función como proteína ensambladora y su papel en la enfermedad renal ha sido menos estudiado y su estudio podría suponer también una vía de aplicación terapéutica.

### 5.1.3.3 ILK y su relación con otras patologías

Si bien el papel de ILK, en cáncer se encuentra bien establecido, su importancia y relación con otro tipo de patologías está siendo objeto de estudio en la actualidad. Así, el origen de la DM2 o del síndrome metabólico han sido relacionados con ILK ya que se postula como un posible modulador de la pérdida de sensibilidad a la insulina.<sup>213</sup> Del mismo modo, se ha señalado cómo su expresión puede resultar un valor predictivo de alta importancia durante etapas iniciales de desarrollo de resistencia a la insulina, contribuyendo a la patogénesis de trastornos metabólicos en ratón.<sup>214</sup>

También se conoce la relación de ILK con el sistema cardíaco. Los ratones *knockdown* para el gen de ILK manifiestan cardiomiopatía por dilatación del corazón y, además, acaban

<sup>209</sup> Guo, L.; Sanders, P. W.; Woods, A.; Wu, C. *Am. J. Pathol.* **2001**, *5*, 1735-1742.

<sup>210</sup> Alique, M.; Civantos, E.; Sanchez-Lopez, E.; Lavoz, C.; Rayego-Mateos, S.; Rodrigues-Diez, R.; Garcia-Redondo, A. B.; Egido, J.; Ortiz, A.; Rodriguez-Puyol, D.; Rodriguez-Puyol, M.; Ruiz-Ortega, M. *Clin. Sci. (Lond)* **2014**, *1*, 19-31.

<sup>211</sup> Raman, A.; Reif, G. A.; Dai, Y.; Khanna, A.; Li, X.; Astleford, L.; Parnell, S. C.; Calvet, J. P.; Wallace, D. P. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *9*, 2708-2719.

<sup>212</sup> Raman, A.; Parnell, S. C.; Zhang, Y.; Reif, G. A.; Dai, Y.; Khanna, A.; Daniel, E.; White, C.; Vivian, J. L.; Wallace, D. P. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *6*, F1695-F1707.

<sup>213</sup> Tang, X.; Guilherme, A.; Chakladar, A.; Powelka, A. M.; Konda, S.; Virbasius, J. V.; Nicoloso, S. M. C.; Straubhaar, J.; Czech, M. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *7*, 2087-2092.

<sup>214</sup> Hatem-Vaquero, M.; Griera, M.; Garcia-Ayuso, D.; Campillo, S.; Bohorquez, L.; Calleros, L.; Rodriguez-Puyol, D.; Rodriguez-Puyol, M.; de Frutos, S. *Cell. Physiol. Biochem.* **2020**, *1*, 71-87.

desarrollando fallo cardíaco espontáneo.<sup>215</sup> Prueba del efecto beneficioso que la ILK puede ejercer sobre el corazón son las investigaciones que han demostrado que su activación previene de arritmias originadas por los fenómenos de isquemia/perfusión. Este hecho, podría destacar el papel de ILK como posible diana terapéutica para prevenir las arritmias ventriculares originadas de esta manera.<sup>216</sup> Además, también se ha destacado el papel crucial que juega la ILK en arritmias hereditarias como algunas cardiomiopatías, donde el gen se encuentra mutado.<sup>217</sup> Finalmente, se ha comprobado como una activación importante de la ILK puede ser beneficiosa para la remodelación cardíaca, como demuestra el estudio de Zhang y colaboradores en el que trasplantan células madre con sobreexpresión de la ILK para mejorar la función cardíaca en modelos de rata con infarto agudo de miocardio.<sup>218</sup>

Estudios recientes ponen de manifiesto la importancia de la ILK en el sistema nervioso central donde juega un papel decisivo en el desarrollo de ciertas estructuras como el hipocampo.<sup>219</sup> Los mismos autores, en 2018, presentaron un trabajo en el que demuestran como la activación de la ILK y de la vía Akt y GSK-3 $\beta$  conduce a un aumento del hipocampo en modelos animales mejorando la memoria.<sup>220</sup>

---

<sup>215</sup> White, D. E.; Coutu, P.; Shi, Y. F.; Tardif, J. C.; Nattel, S.; St Arnaud, R.; Dedhar, S.; Muller, W. J. *Genes Dev.* **2006**, *17*, 2355-2360.

<sup>216</sup> Zhou, P.; Yang, X.; Yang, D.; Jiang, X.; Wang, W. E.; Yue, R.; Fang, Y. J. *Cardiovasc. Transl. Res.* **2020**.

<sup>217</sup> Brodehl, A.; Rezazadeh, S.; Williams, T.; Munsie, N. M.; Liedtke, D.; Oh, T.; Ferrier, R.; Shen, Y.; Jones, S. J. M.; Stiegler, A. L.; Boggon, T. J.; Duff, H. J.; Friedman, J. M.; Gibson, W. T.; FORGE Canada Consortium; Childs, S. J.; Gerull, B. *Transl. Res.* **2019**, 15-29.

<sup>218</sup> Zhang, F.; Guo, F. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *2*, 746-750.

<sup>219</sup> Xu, X. F.; Li, T.; Wang, D. D.; Chen, B.; Wang, Y.; Chen, Z. Y. *Sci. Rep.* **2015**, 11456.

<sup>220</sup> Xu, X. F.; Wang, Y. C.; Zong, L.; Chen, Z. Y.; Li, Y. *Brain Res.* **2018**, 65-77.

## 5.2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---



Dentro del contexto de la participación de nuestro grupo de investigación en la RETIC denominada Red de Investigación Renal (REDinREN) del Instituto de Salud Carlos III, uno de los objetivos generales de la red es la búsqueda de tratamientos para prevenir, diagnosticar o curar la enfermedad renal.

En la actualidad no existe ninguna diana terapéutica validada para esta enfermedad, no obstante, el gran número de trabajos que relacionan ILK con este trastorno motivó la apertura en el grupo de una nueva línea de investigación en colaboración con el grupo liderado por el Dr. Diego Rodríguez Puyol (Hospital Príncipe de Asturias). Este grupo tiene tras sí una dilatada experiencia en el estudio del papel que juega la ILK en la enfermedad renal crónica y en trastornos relacionados.<sup>221, 222</sup> Así pues, uniendo la experiencia de ambos grupos se abordó la modulación de ILK, tanto *in vitro* como *in vivo*, con el objetivo de explorar la potencialidad de nuevos moduladores en el desarrollo de fármacos.

En el campo de la química médica, el desarrollo de inhibidores de quinasa es un proceso complejo ya que los candidatos obtenidos a menudo se encuentran en un espacio químico de propiedad intelectual más reducido, suelen presentar una alta potencia *in vitro* (IC<sub>50</sub> cercanas al orden de pico molar) y deben tener una alta selectividad frente a un gran panel de quinasa a fin de evitar los posibles efectos adversos y toxicidad.<sup>223</sup>

Por otro lado, la controvertida actividad quinasa de la ILK, junto a la falta de datos estructurales del modo de unión de las moléculas inhibitoras descritas, dificulta la tarea de desarrollo de nuevos inhibidores basado en estructura, tal y como se ha comentado previamente. Además, las moléculas dirigidas al centro pseudoactivo no tendrían por qué afectar a la supuesta actividad quinasa de la ILK o su función de andamiaje, desaconsejando el desarrollo de fármacos como otros autores han postulado previamente.<sup>224</sup>

No obstante, queda patente que las funciones de la ILK *in vivo* están totalmente condicionadas a su unión a la PINCH y la parvina y formación del complejo funcional IPP. Por esta razón, se planteó la posibilidad de intentar modular la ILK basándose en alguna de sus interacciones proteína-proteína. Este tipo de interacciones, enormemente abundantes en el cuerpo humano,

---

<sup>221</sup> de Frutos, S.; Luengo, A.; Garcia-Jerez, A.; Hatem-Vaquero, M.; Griera, M.; O'Valle, F.; Rodriguez-Puyol, M.; Rodriguez-Puyol, D.; Calleros, L. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *6*, 1284-1297.

<sup>222</sup> Hatem-Vaquero, M.; Griera, M.; Giermakowska, W.; Luengo, A.; Calleros, L.; Gonzalez Bosc, L. V.; Rodriguez-Puyol, D.; Rodriguez-Puyol, M.; De Frutos, S. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2017**, *9*, 922-935.

<sup>223</sup> Ferguson, F. M.; Gray, N. S. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2018**, *5*, 353-377.

<sup>224</sup> Qin, J.; Wu, C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *5*, 607-613.

representan una fuente novedosa de nuevas dianas terapéuticas para el descubrimiento de fármacos, altamente potentes y más selectivos.<sup>225, 226</sup>

Para llevar a cabo este estudio se seleccionó la interacción entre la ILK y la  $\alpha$ -parvina ya que la de PINCH se encuentra mejor caracterizada, así como sus funciones, mientras que la de  $\alpha$ -parvina plantea más cuestiones desde el punto de vista funcional y bioquímico. Por otro lado, la topología de esta interacción es más sencilla de abordar dado que tiene lugar entre los dominios globulares de las dos proteínas, mientras que la de PINCH es entre sus dominios de tipo dedo de zinc y las repeticiones de ankirina de la ILK. Además, la  $\alpha$ -parvina parece jugar un papel relevante en el riñón, donde se ha visto que su delección provoca también agenesia renal.<sup>227</sup> Por otro lado, el desarrollo de herramientas capaces de modular la ILK a través de esta interacción podrían servir para arrojar luz sobre las todavía controvertidas funciones que ejerce la  $\alpha$ -parvina sobre ILK, como la supuesta inhibición de la actividad quinasa.<sup>228</sup>

De este modo, se plantearon como objetivos específicos de este capítulo:

1. Estudio *in silico* de la interfaz de dimerización entre la ILK y la  $\alpha$ -parvina con el fin de encontrar *hot spots* y bolsillos.
2. Diseño y síntesis de tripéptidos miméticos del *hot spot*.
3. Diseño y síntesis de péptidos más largos basados en la  $\alpha$ -parvina para modular la ILK.
4. Evaluación de su capacidad de unión a la ILK y/o modulación de esta en ensayos *in vitro* y fenotípicos.
5. Preparación de sondas fluorescentes de la ILK y/o corroborar la capacidad de penetración de los péptidos más largos.
6. Estudio del mecanismo de acción de estas moléculas sobre la vía de señalización de la ILK.

---

<sup>225</sup> Aeluri, M.; Chakamuri, S.; Dasari, B.; Guduru, S. K.; Jimmidi, R.; Jogula, S.; Arya, P. *Chem. Rev.* **2014**, *9*, 4640-4694.

<sup>226</sup> Arkin, M. R.; Wells, J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *4*, 301-317.

<sup>227</sup> Montanez, E.; Wickström, S.,A.; Altstätter, J.; Chu, H.; Fässler, R. *EMBO J.* **2009**, *20*, 3132-3144.

<sup>228</sup> Maydan, M.; McDonald, P. C.; Sanghera, J.; Yan, J.; Rallis, C.; Pinchin, S.; Hannigan, G. E.; Foster, L. J.; Ish-Horowicz, D.; Walsh, M. P.; Dedhar, S. *PLoS One* **2010**, *8*, e12356.



### 5.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---



### 5.3.1 Estudio *in silico* de la interfaz de dimerización de la ILK con $\alpha$ -parvina

Para el estudio de la superficie de interacción entre la ILK y la parvina se tomó como modelo la estructura con código 3KMW depositada en la base de datos Protein Data Bank. En el momento de inicio del presente trabajo, únicamente se encontraban depositados en el PDB éste archivo de kILK unido a la  $\alpha$ -parvina y el cristal 3KMU con kILK unido a la  $\alpha$ -parvina y en este caso con el  $Mn^{2+}$  en lugar de  $Mg^{2+}$  y las cisteínas sustituidas por selenocisteínas.

El cristal 3KMW contiene el dominio quinasa de la ILK unido al dominio CH2 de la  $\alpha$ -parvina junto a una molécula de ATP y un catión  $Mg^{2+}$  en su centro pseudoactivo. Si bien, ninguna de las dos proteínas está completa, representan un modelo suficiente para la búsqueda de *hot spots* en la interfaz de dimerización.

En la actualidad, se encuentra aceptado que la energía libre de unión entre dos proteínas no se encuentra distribuida uniformemente a lo largo de toda la superficie de interacción. Así pues, se suele hablar de pequeñas zonas o segmentos de la proteína, conocidas como “puntos calientes” o “hot spots”, que contribuyen de una forma más significativa a esta interacción.<sup>229</sup> Generalmente, éstos se encuentran en el interior de largas superficies de interacción y relativamente planas topológicamente, a diferencia de los más convencionales bolsillos de unión de moléculas pequeñas o fármacos. Además, los *hot spots* suelen encontrarse en regiones hidrófobas inmersas en la interfaz de dimerización por lo que contribuyen a la unión principalmente a través de interacciones de Van der Waals. También es conocido que muchos de estos *hot spots* los constituyen residuos muy conservados evolutivamente.<sup>230</sup> La caracterización de estos *hot spots* supone una etapa clave a la hora de llevar a cabo el diseño basado en la estructura, ya que permite identificar epítomos peptídicos que puedan servir como punto de partida para el diseño de inhibidores o estabilizadores de las interacciones proteína-proteína.<sup>231</sup>

Inicialmente, para la búsqueda de *hot spots* sobre la superficie del dominio kILK se utilizó el algoritmo implementado en el programa FTMap. Este método realiza, sobre la superficie de la proteína el *docking* de 16 sondas orgánicas de distinta naturaleza tales como benceno, fenol o

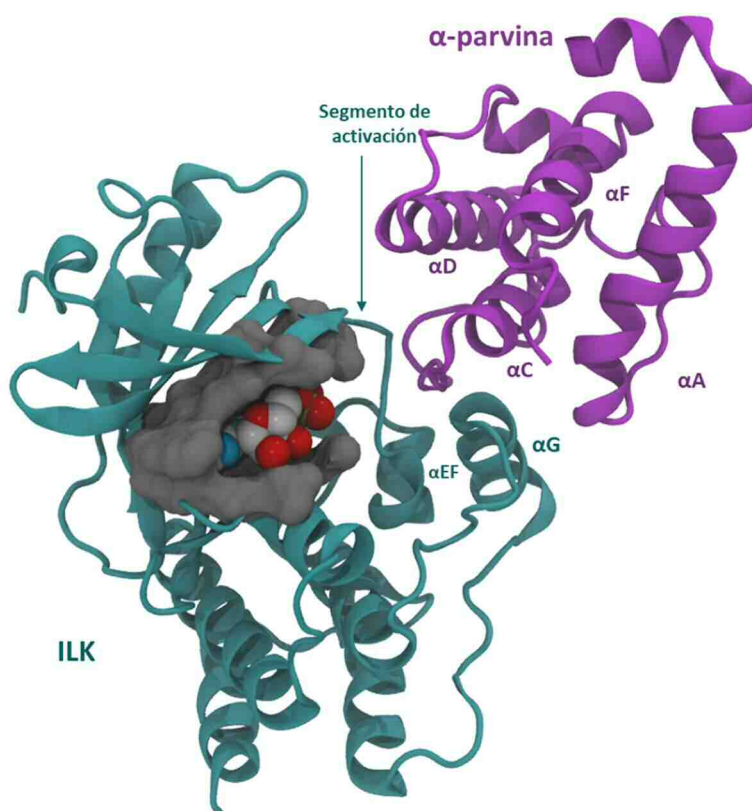
<sup>229</sup> Scott, D. E.; Bayly, A. R.; Abell, C.; Skidmore, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *8*, 533-550.

<sup>230</sup> Geppert, T.; Hoy, B.; Wessler, S.; Schneider, G. *Chemistry & Biology* **2011**, *3*, 344-353.

<sup>231</sup> Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *31*, 8896-8927.

dietil éter, entre otras. A continuación, las poses resultantes son minimizadas energéticamente empleando el campo de fuerzas CHARMM y finalmente aquellas zonas donde coinciden un mayor número de resultados pasan a formar los sitios consenso.<sup>232</sup> Aquellos sitios con mayor número de sondas diferentes son los que pasan a ser clasificados como *hot spots*. Esta metodología se encuentra bien validada y ha demostrado ser capaz de identificar numerosos *hot spots* coincidiendo con los resultados experimentales.<sup>233,234</sup>

La interacción entre kILK y el dominio CH2 de  $\alpha$ -parvina no corresponde a las interacciones más convencionales entre sistemas de interacción proteína-proteína. En lugar de tener lugar en una superficie continua entre ambas proteínas, se establece entre zonas concretas de las hélices  $\alpha$ EF y  $\alpha$ G, así como del segmento de activación del lóbulo C-terminal de kILK. Con respecto a la  $\alpha$ -parvina, las hélices  $\alpha$ A,  $\alpha$ C y  $\alpha$ F del dominio CH2 son las que entran en contacto con kILK (Figura 43).



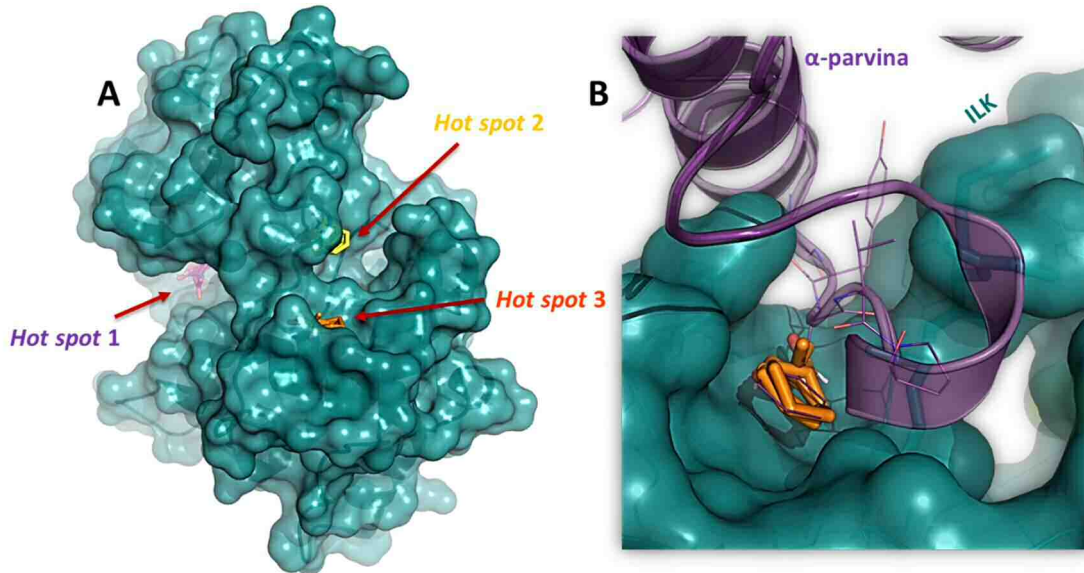
**Figura 43.** Complejo ILK- $\alpha$ -parvina con ATP y magnesio (PDB:3KMW).

<sup>232</sup> Kozakov, D.; Grove, L. E.; Hall, D. R.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Luo, L.; Xia, B.; Beglov, D.; Vajda, S. *Nature Protocols* **2015**, *5*, 733-755.

<sup>233</sup> Zhong, M.; Lynch, A.; Muellers, S. N.; Jehle, S.; Luo, L.; Hall, D. R.; Iwase, R.; Carolan, J. P.; Egbert, M.; Wakefield, A.; Streu, K.; Harvey, C. M.; Ortet, P. C.; Kozakov, D.; Vajda, S.; Allen, K. N.; Whitty, A. *Biochemistry* **2020**, *4*, 563-581.

<sup>234</sup> Gee, C. T.; Arntson, K. E.; Koleski, E. J.; Staebell, R. L.; Pomerantz, W. C. K. *ChemBiochem* **2018**, *9*, 963-969.

Para los estudios con kILK se empleó únicamente el dominio kILK sin la molécula de ATP, ni el cofactor de magnesio unidos. Los resultados de este primer análisis permitieron identificar distintas zonas en la superficie de kILK como potenciales *hot spots* (Figura 44 A).



**Figura 44.** A) *Hot spots* identificados en kILK por el servidor FTMap. B) Ampliación de la zona donde se localiza el hot spot 3 (sondas naranjas) superpuesto con la estructura de  $\alpha$ -parvina (los residuos se identifican como líneas moradas).

El *hot spot* más importante (*hot spot 1*, Figura 44 A) identificado mediante este método se localiza en el interior del bolsillo de ATP de la proteína. Este resultado era previsible, ya que se trata de la cavidad donde se aloja el ligando endógeno (ATP) y el cofactor metálico implicado en el reconocimiento. Por este hecho, el mayor número de sondas y de sitios consenso se encontraron localizados en esta región. El segundo *hot spot* en importancia (*hot spot 2*, Figura 44 A) se encuentra ubicado en la zona anterior del bolsillo del ATP con el que se encuentra directamente conectado a través del segmento de activación. Esta zona no superpone con la región de interacción con  $\alpha$ -parvina por lo que fue descartada para estudios posteriores. Por otro lado, el tercer *hot spot* más importante en el ranking proporcionado por el servidor FTMap, (*hot spot 3*, Figura 44 A) se localiza en una zona donde la superficie de  $\alpha$ -parvina entra en contacto directo con kILK (Figura 44 B).

El tercer *hot spot* se localiza en un canal hidrófobo de kILK que está constituido por el espacio que dejan entre sí las hélices  $\alpha$ EF y  $\alpha$ G, localizadas en el lóbulo C o lóbulo menor del dominio quinasa. El análisis detallado del porcentaje de interacciones no enlazantes y enlaces de

hidrógeno que establecen las moléculas sonda del *hot spot* en esta región, permite identificar aquellos residuos de kILK con mayor importancia (Tabla 13).

Los residuos Met350, Tyr351 y Ala352 situados en la hélice  $\alpha$ G de kILK destacan en términos de interacciones no enlazantes totales. Estos aminoácidos forman entre sí un bolsillo hidrofóbico, con forma de hendidura, en medio de la superficie de kILK donde la  $\alpha$ -parvina interacciona a través del bucle que conecta las hélices  $\alpha$ C y  $\alpha$ D del dominio CH2. Por otro lado, según las interacciones por enlace de hidrógeno destacan como residuos importantes de ILK la Arg349, Tyr351 y Ala352 que también presentan un buen perfil de interacción no enlazante.

**Tabla 13.** Porcentaje y tipo de interacciones obtenidos del estudio de *hot spot* mediante FTMap.

Identificador de residuo	% Interacciones no enlazantes	% Interacciones por enlace de hidrógeno
Pro347	0.36	0
Gly348	0.26	0.15
<b>Arg349</b>	0.88	<b>3.13</b>
<b>Met350</b>	<b>5.33</b>	0.21
<b>Tyr351</b>	<b>2.89</b>	<b>7.41</b>
<b>Ala352</b>	<b>3.66</b>	<b>10.02</b>
Pro353	0.8	0.4

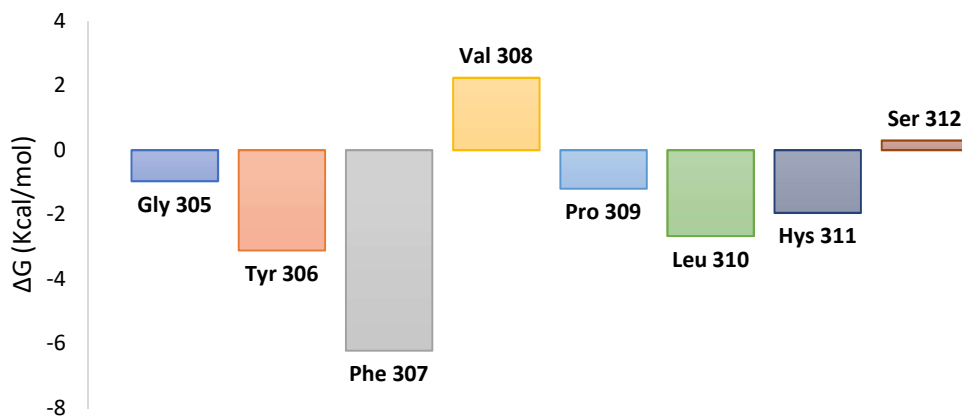
Además del porcentaje de interacciones calculadas por FTMap, se puede estudiar el tipo de sondas *dockeadas* en el *hot spot*, las cuales corresponden a benceno, bencilo, fenol, ciclohexano, butano y formamida. Éstas revelan la posible naturaleza de las interacciones con el *hot spot*, las cuales corresponden esencialmente a contactos hidrofóbicos. Sorprendentemente, la disposición de las sondas mostró un enorme grado de similitud con la disposición que adopta la cadena lateral del residuo de Phe307 del bucle de  $\alpha$ -parvina cuando se superpone con la estructura de esta proteína (Figura 44B).

Como resultado de este análisis, se pudo identificar una región de kILK con potencial para ser un *hot spot* de unión a  $\alpha$ -parvina. Por otro lado, el estudio del *hot spot* superpuesto a la estructura de  $\alpha$ -parvina llamó nuestra atención acerca de la importancia que puede jugar el residuo Phe307. Por este hecho, se decidió estudiar la contribución energética de los residuos del segmento de

la  $\alpha$ -parvina dispuesto en el *hot spot* y las zonas colindantes. Para ello, se utilizó un método novedoso en el estudio de las IPP que consistió en el cálculo de energía libre total y descompuesta por residuos a través de la función de *scoring* HYDE.

Este algoritmo, está basado en una descripción rápida y consistente de los enlaces de hidrógeno y de las energías de deshidratación entre sistemas proteína-ligando. La mayor ventaja que ofrece este método, frente a otros más convencionales y tradicionales basados en dinámica molecular, es su rapidez (unos pocos segundos) y que además permite una visualización de los resultados rápida e intuitiva en forma de esquema de colores.<sup>235</sup> Para este estudio se seleccionó el segmento octapeptídico de la  $\alpha$ -parvina que comprende desde Gly305 hasta Ser312 por encontrarse directamente en contacto con la superficie de kILK a través del *hot spot*.

Se distinguen dos grupos de aminoácidos atendiendo al grado de contribución a la energía libre de unión (Figura 45). Por un lado, están los residuos Gly305, Tyr306 y Phe307 que ocupan la zona del *hot spot* 3 y hasta su salida de la cavidad comprendida entre las hélices  $\alpha$ EF y  $\alpha$ G. Estos residuos presentan el mayor porcentaje de contribución energética (76% del total, -10.28 Kcal/mol). Por otro lado, están los residuos a partir de Val308 cuya contribución a la energía libre de unión es menor y que se extienden hacia la zona del segmento de activación y fuera de la superficie de kILK.

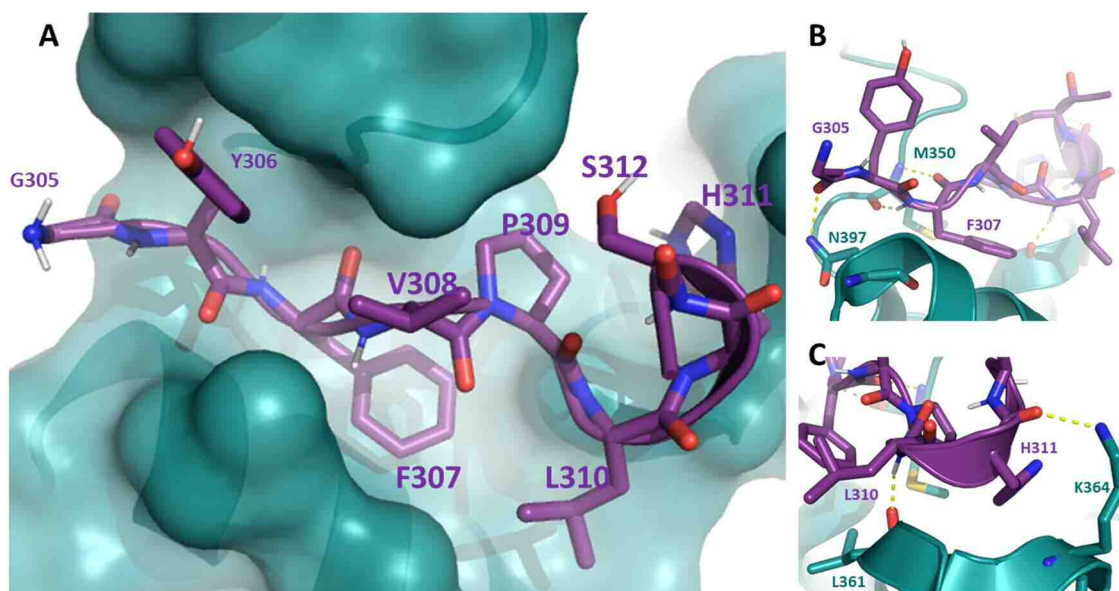


**Figura 45.** Contribución por residuo a la energía de unión del segmento GYFVPLHS de  $\alpha$ -parvina a kILK.

<sup>235</sup> Schneider, N.; Lange, G.; Hindle, S.; Klein, R.; Rarey, M. J. *Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *1*, 15-29.

El análisis energético a través de la función HYDE revela, además, que el residuo más importante es, de nuevo, Phe307 (-6.21 kcal/mol), seguido de Tyr306 y Leu310 (-3.11 y -2.6 kcal/mol, respectivamente).

La observación detenida de la estructura tridimensional del complejo cristalizado permite destacar la importancia de Phe307 en términos energéticos: dona y acepta dos enlaces de hidrógeno complementariamente con Met350 (kILK) y el grupo fenilo se coloca en el interior del nicho hidrofóbico del *hot spot* 3 (Figura 46 A). Por otro lado, Gly305 sale del canal y establece un enlace de hidrógeno a través de su grupo carbonilo con Asn397 de kILK (Figura 46 B). El resto de las interacciones establecidas por la cadena de  $\alpha$ -parvina son de carácter hidrofóbico. Además, el grupo carbonilo de la His311 acepta enlace de hidrógeno del grupo  $\text{NH}_3^+$  de la cadena lateral de Lys364 (kILK) y Leu310 dona enlace de hidrógeno a Leu361 (kILK) (Figura 46 3C).



**Figura 46.** Superficie de Interacción entre el bucle CH2 de la  $\alpha$ -parvina y el surco entre las hélices  $\alpha$ EF y  $\alpha$ G de la kILK

En base a estos resultados, se planteó la hipótesis de que Met350, Tyr351 y Ala352 en la ILK constituyen un *hot spot* en forma de bolsillo pequeño donde la interacción con la  $\alpha$ -parvina es especialmente favorable energéticamente. Del mismo modo, la interacción proteína-proteína estaría especialmente estabilizada por Phe307, Tyr306 y Gly305 del bucle de interacción de  $\alpha$ -parvina. Así pues, se diseñó un modelo de epítipo de  $\alpha$ -parvina capaz de unirse a ILK y modular así la actividad de la proteína *in vivo*.

Para alcanzar este objetivo, se simplificó el bucle de interacción de la  $\alpha$ -parvina reduciéndolo al tripéptido Tyr-Phe-Val que está localizado en el *hot spot* identificado por FTMap. Además, todos

los residuos del tripéptido presentan un valor de superficie accesible de disolvente (SAD) en el complejo mucho menor que en su estado monomérico (Tabla 14). Esto es propio de residuos localizados en *hot spots* que quedan socavados en la superficie hidrofóbica una vez formado el complejo IPP.

Para apoyar esta hipótesis se decidió tomar una tercera aproximación a la detección de *hot spot*, esta vez basada en el algoritmo implementado en el programa *Hot-Point*. Este modelo empírico, se basa en el cálculo de la superficie accesible al disolvente (SASA) de cada residuo, ya que se ha demostrado que los *hot spots*, al estar socavados en la superficie de interacción, suelen presentar altos valores de SASA en su estado monomérico y muy baja formando el complejo.<sup>236</sup>

**Tabla 14.** Resultados obtenidos por el servidor *Hot-Point* para la detección de *hot spots*. SAD: Superficie accesible al disolvente ponderada y relativa al complejo y/o al monómero. PCPR: Potencial de Contacto entre Pares de Residuos.

<b>Residuo</b>	<b>SAD Complejo</b>	<b>SAD Monómero</b>	<b>PCPR</b>	<b>Predicción de Hot spot</b>
<i>Gly 305</i>	36.74	89.36	14.69	No
<i>Tyr306</i>	1.7	39.86	17.31	No
<i>Phe307</i>	0	75.41	35.04	Si
<i>Val308</i>	0.15	7.24	35.20	Si
<i>Pro309</i>	5.81	40.39	4.12	No

Tal y como se recoge en la Tabla 14, el residuo de Phe307 es detectado como *hot spot* acorde a sus valores de superficie accesible al disolvente, y junto a este también la Val308, especialmente por su valor de contacto entre pares de residuos.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se planteó la hipótesis de que los residuos Tyr306, Phe307 y Val308 de  $\alpha$ -parvina fuesen los más importantes para la interacción con ILK en la región localizada como *hot spot* por FTMap. Estos aminoácidos constituirían un epítipo de interacción donde el residuo más importante, dado el consenso de todas las aproximaciones utilizadas, sería la Phe307.

<sup>236</sup> Tuncbag, N.; Keskin, O.; Gursoy, A. *Nucleic Acids Res.* **2010**, W402-W406.



### 5.3.2 Tripéptidos epitópicos de la $\alpha$ -parvina

En primer lugar, se decidió proponer un modelo minimalista de molécula capaz de interactuar con KILK basándonos en una propuesta de epítipo que lo constituirían el grupo de aminoácidos que más contribuyen a la energía libre de unión (Figura 47). Para ello se optó por sintetizar el tripéptido Tyr-Phe-Val. Además, se decidió mimetizar el efecto de la Gly305 por un grupo acetilo para conservar el enlace de hidrógeno del residuo por parte del grupo carbonilo y al mismo tiempo aumentar la estabilidad del péptido por la protección del extremo *N*-terminal.

Con respecto al extremo *C*-terminal, se planteó su síntesis tanto con el grupo carboxilo libre (**32**) como en forma de éster metílico (**33**). Este diseño, se debe a que se buscaba favorecer, en el caso de **33**, la interacción en el bolsillo hidrofóbico y permeabilidad celular. De este modo, se puede mantener la naturaleza más lipófila del extremo *C*-terminal, mimetizando en parte la naturaleza del enlace amida en lugar de dejar el grupo ácido carboxílico libre, que dentro del bolsillo hidrofóbico podría desestabilizar considerablemente la unión.

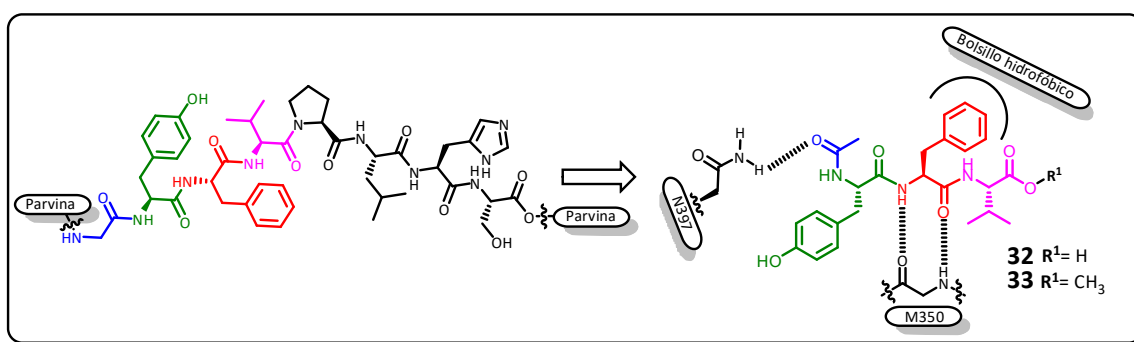


Figura 47. Esquema de la hipótesis y propuesta de epítipo sintético de la  $\alpha$ -parvina (**32** y **33**).

#### 5.3.2.1 Síntesis de los tripéptidos modelo **32** y **33**

Para llevar a cabo la síntesis de estos tripéptidos modelo, se recurrió a la metodología de síntesis en fase sólida empleando la estrategia de protección ortogonal Fmoc/*t*Bu. El soporte polimérico de elección para el desarrollo de esta síntesis fue la resina cloruro de 2-clorotritilo [(2-Cl-Trt-Cl)], dada su alta versatilidad en el control del tipo de péptido desanclado (ácidos carboxílicos, ésteres, cadenas laterales protegidas).<sup>237</sup>

Desde su introducción por Robert B. Merrifield en 1963,<sup>238</sup> la síntesis en fase sólida se ha convertido en un método de elección y habitual para obtener de forma sencilla péptidos a

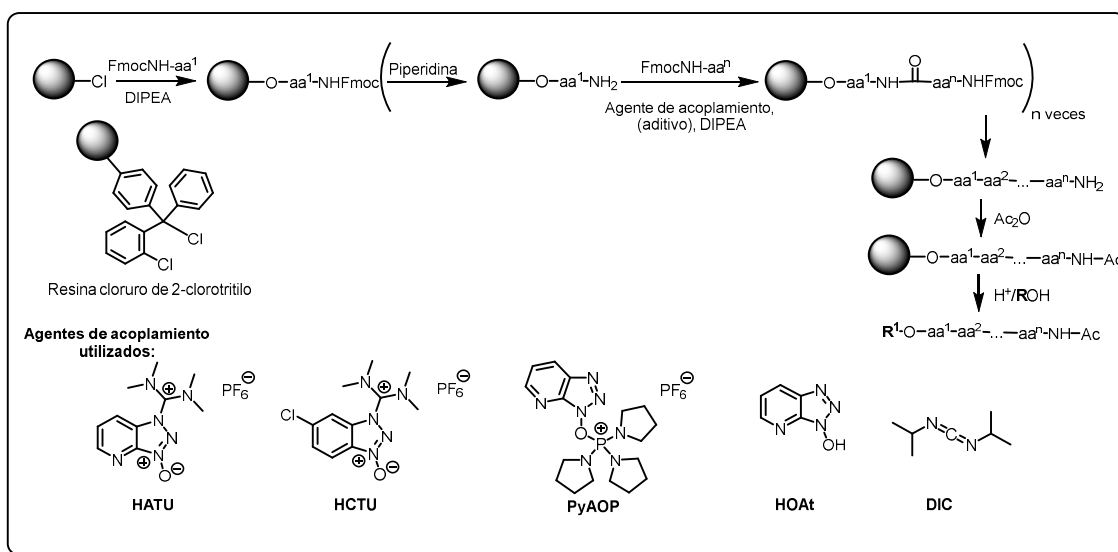
<sup>237</sup> Chan, W.; White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; OUP Oxford: 2000.

<sup>238</sup> Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *14*, 2149-2154.

pequeña y mediana escala en el laboratorio.<sup>239</sup> En general, este método se basa en elongar la cadena peptídica uniendo un primer aminoácido (extremo C-terminal) al soporte insoluble (resina) a través de un enlace de tipo éster o amida. A continuación, se van incorporando el resto de los aminoácidos de forma secuencial.

La síntesis y purificación de los péptidos se llevó a cabo de forma manual o semiautomática en varias etapas:

- 1) Anclaje del aminoácido C-terminal como carboxilato de DIPEA.
- 2) Desprotección del grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF.
- 3) Elongación de la cadena. Los pasos 1) y 2) se repiten hasta alcanzar la longitud de la cadena.
- 4) Desprotección del grupo Fmoc N-terminal.
- 5) Acetilación del extremo N-terminal.
- 6) Desanclaje y desprotección simultánea de grupos protectores del péptido en condiciones ácidas.
- 7) Purificación mediante HPLC semipreparativo (en caso de ser necesario).



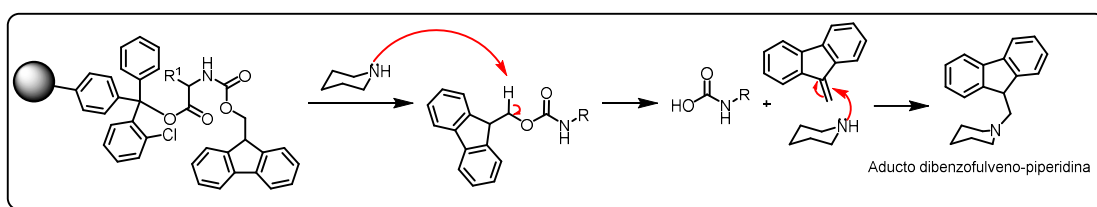
**Figura 48.** Protocolo general empleado en la síntesis en fase sólida y agentes de acoplamiento utilizados en el desarrollo de la presente tesis.

Para la síntesis de **32** se procedió a llevar a cabo la carga del primer aminoácido empleando 1.5 equivalentes de Fmoc-Val y 3 equivalentes de DIPEA durante 1.5 h a temperatura ambiente y empleando agitación orbital. Transcurrido este tiempo, se procedió al bloqueo de los grupos clorotritilo de la resina que no reaccionaron mediante tratamiento con metanol durante 30 min.

<sup>239</sup> Hoekstra, W. J. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 6, 715-719.

Este paso es fundamental puesto que busca desactivar los grupos clorotritilo que no hayan unido el aminoácido a través de su extremo C-terminal, así como sustituir el átomo de cloro del carbono cuaternario de la resina por un grupo metoxilo, inerte químicamente durante el resto de la síntesis.

Para cuantificar el rendimiento de este primer paso, clave durante el resto de la ruta, se debe determinar el grado de funcionalización de la resina con moléculas de Fmoc-aa a través de la cuantificación experimental de la sustitución de la resina. Para ello, se determina la cantidad de grupos Fmoc que se liberan del aminoácido al tratarlo con el cóctel de desprotección de piperidina al 20%. De este modo, se mide la absorbancia mediante espectroscopía UV-Visible del aducto dibenzofulveno-piperidina que se forma al eliminar el grupo Fmoc.



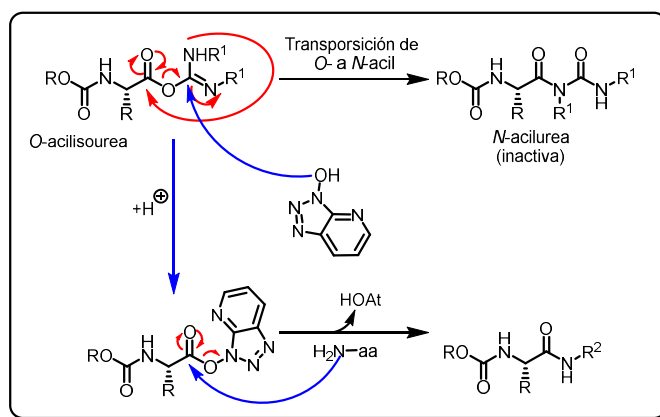
**Figura 49.** Reacción de formación del aducto de dibenzofulveno durante la desprotección.

De este modo, con este protocolo se determinó que la carga de la Fmoc-Val a la resina fue cuantitativa. Previa elongación, se desprotegió el grupo Fmoc utilizando una solución de piperidina al 20% en DMF durante 30 min. Tras comprobar la presencia de aminas libres, a través del test de Kaiser, se procedió a elongar la cadena peptídica.<sup>240</sup> Para esta reacción se emplearon 3 equivalentes de Fmoc-aa y se usó como agente de acoplamiento una mezcla de la carbodiimida DIC y como aditivo HOAt durante 3 horas a temperatura ambiente. Si bien, el uso de DIC podría bastar para llevar a cabo el acoplamiento peptídico, se ha demostrado que las carbodiimidas pueden inducir la formación de *N*-acilureas, inactivas frente a otros acoplamientos, como consecuencia de una transposición de la *O*-acilisourea formada durante la etapa de activación (Figura 50). Estas *O*-acil isoureas son además susceptibles de enolizarse y racemizar por formación de oxazolonas. Como la reacción de acilación es especialmente rápida en DMF, se emplean aditivos como HOAt capaces de evitarla, los cuales reaccionan con el intermedio de *O*-acil isourea, disminuyendo su reactividad y formando el éster activado de benzotriazol.<sup>241</sup> Esta

<sup>240</sup> Palomo, J. M. *RSC Adv.* **2014**, *62*, 32658-32672.

<sup>241</sup> Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *10*, 4397-4398.

especie minimiza las racemizaciones y, además, acelera la reacción de formación del enlace amida (Figura 50).



**Figura 50.** Formación de N-acilurea y activación por HOAt.

La reacción de acoplamiento con la mezcla DIC/HOAt se completó en 3 horas a temperatura ambiente, siguiéndose mediante el test de Kaiser. Una vez formado el tripéptido en la resina, se procedió a desproteger el extremo N-terminal con la mezcla de piperidina al 20% y, a continuación, se llevó a cabo la acetilación del extremo utilizando una mezcla DCM/Ac<sub>2</sub>O 1:1 durante 30 min.

Finalmente, para llevar a cabo el desanclaje del péptido y la desprotección simultánea de las cadenas laterales de **32** se empleó el cóctel estándar de desanclaje por hidrólisis-desprotección (TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TIPS/H<sub>2</sub>O). Tras 3 h de tratamiento y posterior eliminación del cóctel mediante evaporación del disolvente a presión reducida, se obtuvo **32** con un 89% de rendimiento y excelente pureza (100%).

Como se comentó previamente, también se marcó el objetivo de preparar **33**, el éster metílico de **32**, ya que hipotéticamente este sería más compatible con el bolsillo de unión. Normalmente, este proceso requeriría del desanclaje del péptido manteniendo las cadenas laterales protegidas y posterior esterificación en disolución seguida de la desprotección de las cadenas laterales. Sin embargo, y con el fin de poder aplicar la ruta sintética al diseño de una pequeña quimioteca de forma rápida y eficaz, se optó por utilizar el procedimiento descrito por Turner.<sup>242</sup>

En este trabajo, se desarrolla una metodología que, bajo condiciones ácidas suaves, es capaz de desanclar, desproteger y esterificar en una sola etapa sintética los péptidos unidos a las resinas

<sup>242</sup> Turner, R. A.; Weber, R. J.; Lokey, R. S. *Org. Lett.* **2010**, *8*, 1852-1855.

de tipo Wang y (2-Cl-Trt)Cl. Sin embargo, cuando se aplicó este protocolo de desanclaje por transesterificación-desprotección en una etapa, no se obtuvieron los resultados deseados (entrada 1, Tabla 15). El empleo de una disolución metanólica de HCl 3M sólo condujo a un 4% de rendimiento de **33** (entrada 1, Tabla 15) y las condiciones de desanclaje tuvieron que ser optimizadas.

**Tabla 15.** Optimización del desanclaje por transesterificación-desprotección del péptido **33**.

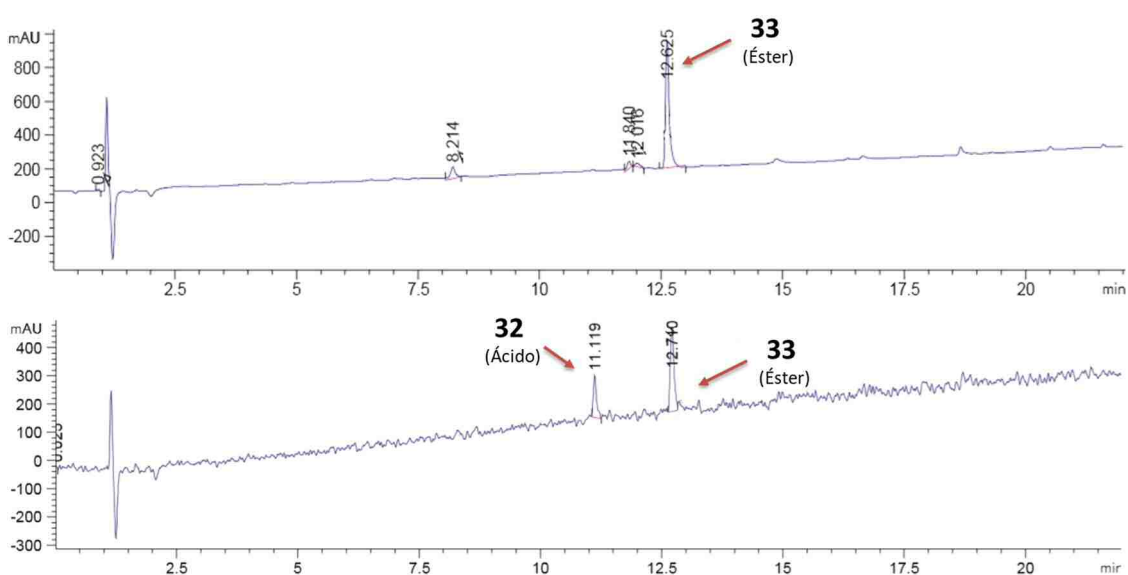
Entrada	Cóctel de desanclaje	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Pureza (%)
1	HCl 3M (MeOH)	5	4	90
2	HCl 6M (MeOH)	5	5	-
3	HCl 9M (MeOH)	5	7	-
4	HCl 9M (MeOH)	4	3	-
5	HCl 9M (MeOH)	3	2	85
6	TFA/MeOH/TIPS (90:10:5)	4	10	>90
7	HCl en Dioxano 4M y 10 eq CH <sub>3</sub> OH	5	24	45
8	HCl en Dioxano 4M/ MeOH /TIPS (95:5:5)	5	87	86

El tratamiento con mezclas de mayor acidez (entradas 2-5), preparadas *in situ* a partir de metanol anhidro y cloruro de acetilo, o el empleo de TFA como disolvente en presencia de metanol y TIPS (entrada 6) no mejoró de forma significativa los resultados. Las mezclas a base de metanol utilizan un disolvente muy polar que provocan un hinchamiento deficiente de la resina lipófila, produciendo rendimientos bajos debidos a la oclusión de los péptidos en el interior de la matriz polimérica. En consecuencia, se intentó cambiar el metanol por un disolvente más apolar, en el que la resina pudiese hincharse de forma más apropiada. Se eligió el dioxano ya que presenta un coeficiente de hinchamiento alto (5-6 mL/g dependiendo del grado de entrecruzamiento), comparado con el del metanol (1.6 mL/g).<sup>243</sup> Además, la disolución ácida se puede adquirir a la casa comercial Acros Organics en forma de disolución de HCl 4N, evitando así su preparación. Inicialmente se utilizaron únicamente 10 equivalentes de metanol (entrada 7, Tabla 15) con el fin de facilitar la reacción, no obstante, se obtuvo un rendimiento bajo. Aumentando la proporción de metanol en volumen, se encontraron unas condiciones de

<sup>243</sup> Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *49*, 8951-8954.

desanclaje-desprotección-esterificación eficientes que permitieron aislar el producto final con buen rendimiento (87%) y una pureza adecuada (entrada 8, Tabla 15).

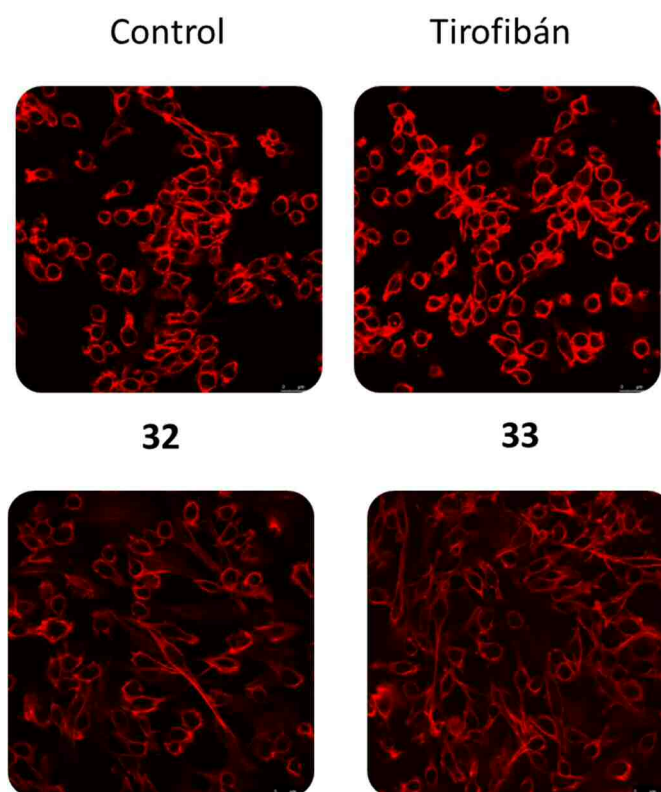
Es importante destacar, que este procedimiento es muy sensible a la humedad que contiene la disolución de HCl 4N, por lo que hay que extremar el cuidado en su manipulación. Los rendimientos y pureza disminuyeron conforme se repitió la reacción con la misma botella de dioxano. Así mismo, también se pudo comprobar que, con el paso del tiempo, y probablemente debido a la presencia de agua, el rendimiento de transesterificación disminuía, pudiéndose encontrar en el producto final el péptido no esterificado (Figura 51).



**Figura 51.** Cromatogramas de HPLC-masas representativos de la reacción con la mezcla HCl en Dioxano 4M/ MeOH /TIPS. Arriba: Reacción con la mezcla recién preparada y la botella recién abierta. Abajo: La misma reacción repetida al cabo de tres semanas.

### 5.3.2.2 Estudios preliminares de los compuestos modelo

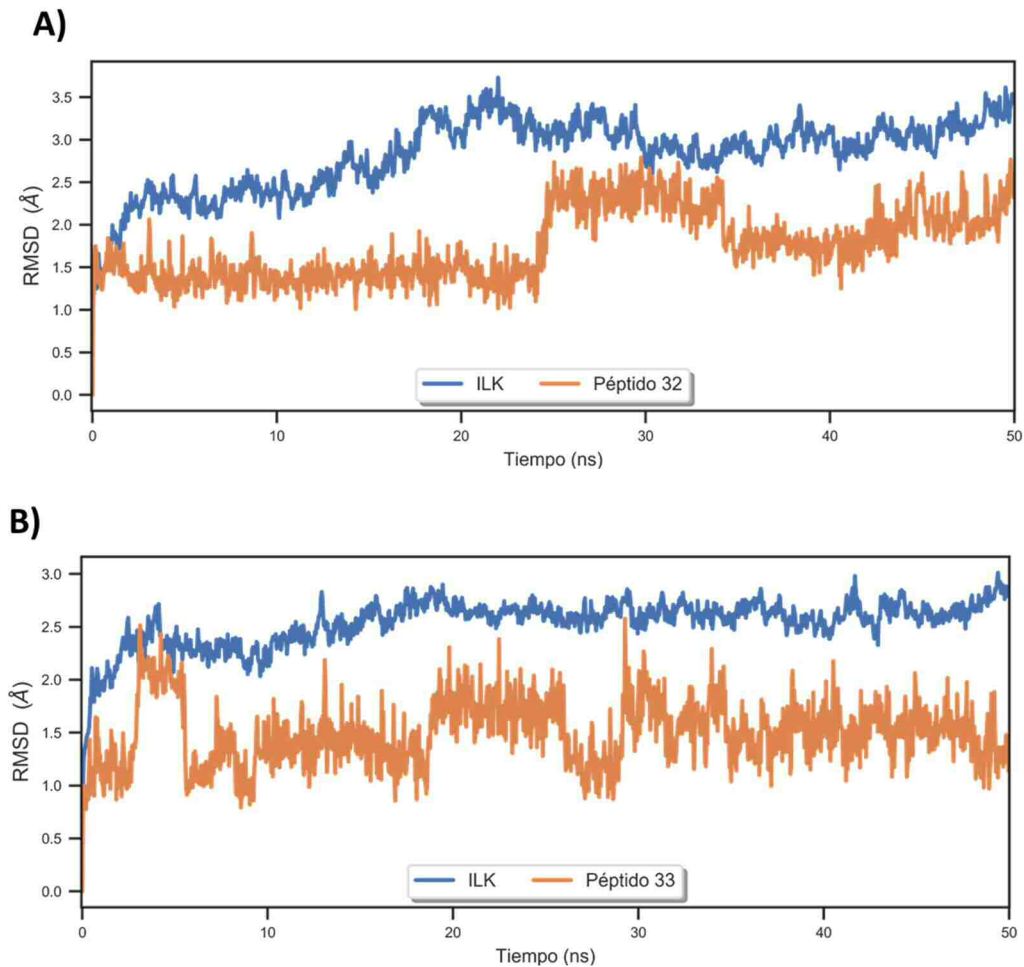
Una vez obtenidos ambos péptidos **32** y **33** se decidió evaluar su potencial funcionamiento en células mesangiales humanas (CMH) a través de una prueba sencilla. El ensayo consistió en medir posibles aumentos o disminuciones en el grado de polimerización de actina, ya que este fenómeno se encuentra estrechamente relacionada con la actividad de ILK. En estos ensayos se empleó como control positivo el fármaco tirofiban. Esta molécula está aprobada para su uso como anticoagulante, sin embargo, el grupo de investigación del Dr. Rodríguez Puyol ha comprobado que tiene capacidad de activación de integrinas. Así pues, la activación de las integrinas trae consigo una activación de la función de andamiaje y ensamblado de ILK que promueve la polimerización de actina del esqueleto celular.



*Figura 52. Fotografías de microscopía confocal mostrando el efecto de los compuestos sobre la polimerización de actina después de 24 horas de tratamiento.*

El tratamiento de las células con los compuestos o tirofibán y posteriormente con un anticuerpo anti-actina fluorescente permite visualizar los filamentos de actina mediante microscopía confocal (Figura 52). Aquellas células tratadas con tirofibán como control positivo dieron lugar a un aumento en la replicación celular y aumento del citoesqueleto de actina, tal y como se observa en la Figura 52. Cuando se pasó a estudiar el efecto del compuesto **32**, si bien se pudieron observar alteraciones en la morfología de algunas células, estos cambios no fueron significativos. Además, tampoco se observó un aumento significativo de la replicación celular. No obstante, y sorprendentemente, el compuesto **33** exhibió efectos muy similares a los del tirofibán en los ensayos celulares.

Con el fin de intentar explicar estos resultados se decidió hacer una dinámica molecular de los péptidos **32** y **33** en el bolsillo putativo de unión a KILK.



**Figura 53.** Gráfica de la variación de RMSD de los átomos del esqueleto de kILK y de los péptidos **32** y **33** a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular. A) Complejo kILK-**32** y B) Complejo kILK-**33**.

Los complejos se simularon a lo largo de 50 ns en presencia explícita de disolvente, utilizando el campo de fuerzas CHARMM.<sup>244</sup> Tal y como se muestra en la Figura 53-A, el complejo kILK-**32** se estabiliza aproximadamente al cabo de 20 ns de simulación con un valor de RMSD del esqueleto proteico de 3 Å. Estos valores están de acuerdo con otras simulaciones de dinámica molecular que se han realizado utilizando únicamente el dominio quinasa de ILK.<sup>245, 246</sup> Además, en esta simulación, a partir de los 25 ns el RMSD del péptido se incrementa hasta los 2.5 Å, momento en el cual la molécula comienza a abandonar el bolsillo, distorsionándose su modo de unión en el extremo C-terminal que comienza a exponerse al disolvente. En comparación, el complejo

<sup>244</sup> Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B.,L.; Grubmüller, H.; MacKerell, A. D. *Nat. Methods* **2017**, *1*, 71-73.

<sup>245</sup> Gulzar, M.; Ali, S.; Khan, F. I.; Khan, P.; Taneja, P.; Hassan, M. I. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *16*, 4327-4337

<sup>246</sup> Syed, S. B.; Khan, F. I.; Khan, S. H.; Srivastava, S.; Hasan, G. M.; Lobb, K. A.; Islam, A.; Hassan, M. I.; Ahmad, F. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 1252-1263.



kILK-**33** se estabilizó al cabo de aproximadamente 20 ns de simulación con un valor de RMSD medio cercano a los 2.5 Å respecto a las coordenadas iniciales, mostrando mayor estabilidad. Si bien, durante el transcurso de esta simulación, se pudo observar que **33** presentaba cierta movilidad dentro del bolsillo (RMSD medio de 1 -1.5 Å), en todo momento permanece en la cavidad, y los dos principales enlaces de hidrógeno de la Phe307 se mantienen con la Met350 de kILK. Esto podría, en parte, ayudar a explicar el efecto observado *in cellulo*.

En base a estos resultados, se decidió continuar con la síntesis de la serie de tripéptidos preparando todos los derivados en forma de ésteres metílicos.

### 5.3.2.3 Síntesis de análogos de **33**

Con el fin de explorar posibles relaciones estructura-actividad se planteó la síntesis de nuevos derivados. Para ello se decidió llevar a cabo un escaneo posicional de Ala en las posiciones del tripéptido. Esta estrategia, empleada por primera vez en 1989 por Cunningham y Wells, permite identificar aquellos residuos más importantes de cara a la interacción proteína-proteína sustituyéndolos por un residuo de alanina.<sup>247</sup>

Para llevar a cabo el diseño de otros análogos se estudiaron las propiedades estructurales y energéticas del sitio de unión mediante mapas de afinidad. Esta aproximación prospectiva se puede emplear para el diseño y síntesis de los nuevos análogos.<sup>248, 249</sup> Utilizando el programa AutoGrid,<sup>250</sup> se identificaron los mapas de afinidad tridimensionales entre la proteína y sondas de naturaleza lipófila ("C"), donadora de enlace de hidrógeno ("HD"), y aceptora de 2 enlaces de hidrógeno ("OA").

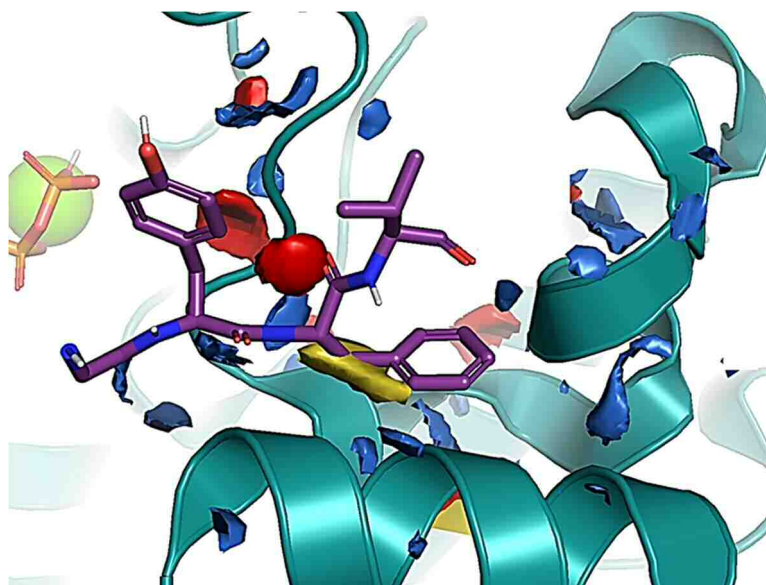
---

<sup>247</sup> Cunningham, B. C.; Wells, J. A. *Science* **1989**, *4908*, 1081-1085.

<sup>248</sup> Schaller, D.; Šribar, D.; Noonan, T.; Deng, L.; Nguyen, T. N.; Pach, S.; Machalz, D.; Bermudez, M.; Wolber, G. *WIREs. Comput. Mol. Sci* **2020**, e1468.

<sup>249</sup> Ballante, F.; Ragno, R. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *6*, 1674-1685.

<sup>250</sup> Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785-2791.



**Figura 54.** Tetrapéptido GYFV de  $\alpha$ -parvina (sticks violetas) unido a kILK y superpuesto con las mallas tridimensionales que corresponden a las zonas encontradas mediante las sondas de AutoGrid a un valor de isocontorno de -0.8. Sonda C en amarillo, sonda HD en azul y sonda OA en rojo.

Tras la visualización de los mapas de afinidad, se planteó la posibilidad de introducir en la posición del residuo de Phe otros aminoácidos con restos lipófilos que pudiesen ocupar el máximo volumen posible de la cavidad hidrofóbica del *hot spot* como ciclohexilo, 4-tolilo, 2-naftilo o un isómero del benceno como es el tiofeno.

Por otro lado, dado que en las inmediaciones del residuo de Val se encuentra un punto de donador de enlace de hidrógeno (Figura 54) y la valina queda fuera del bolsillo exponiéndose al disolvente, se planteó la posibilidad de incorporar en esta posición un residuo de Ser.

Para llevar a cabo la síntesis de los distintos análogos se planteó realizar su preparación en microondas.<sup>251, 252</sup> Aunque la síntesis de péptidos en fase sólida en un reactor de microondas ya ha sido desarrollada, la misma requiere de una puesta a punto de la reacción de acoplamiento cuando no se utilizan los sistemas comerciales convencionales calibrados para tal fin. En este caso, se buscaron las condiciones más adecuadas para llevar a cabo las reacciones de acoplamiento, durante la elongación, con un reactor Biotage Initiator 2.5 y como modelo de tripéptido se seleccionó el compuesto **32**.

Aunque se ha descrito que las temperaturas altas mejoran el acoplamiento de aminoácidos muy impedidos, el uso de temperaturas más suaves suele ser más adecuado para evitar reacciones

<sup>251</sup> Grieco, P. *ChemInform* **2005**, 43.

<sup>252</sup> Pedersen, S.; Tofteng, A. P.; Malik, L.; Jensen, K. J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 5, 1826-1844.

secundarias, principalmente de formilación y/o epimerización. Durante el transcurso de estas pruebas fue necesario cambiar el agente de acoplamiento DIC/HOAt por HCTU, ya que los proveedores dejaron de proporcionar HOAt sólido, por los riesgos que conlleva su transporte. Inicialmente se llevó a cabo el acoplamiento Phe-Val a una temperatura de 70 °C durante 15 min (entrada 1, Tabla 16) con resultados positivos.

**Tabla 16.** Pruebas de optimización del acoplamiento Phe-Val en microondas.

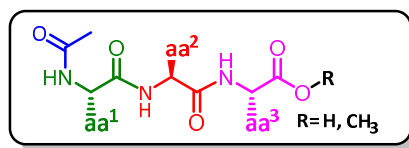
Entrada	T (°C)	Tiempo (min)	RPM	Pre-Agitación (min)	Kaiser <sup>1</sup>
1	70	15	600	-	-
2	70	10	600	-	-
3	65	5	600	5	+/-
4	65	15	540	5	+/-
5	65	15	420	5	+/-
6	65	25	420	5	-

<sup>1</sup> + Presencia de aminas primarias libres, - No se detecta presencia de aminas primarias libres, +/- Alta conversión, pero aún se detectan aminas primarias libres.

La reacción también finalizó en 10 min (entrada 2), no obstante, en estas pruebas se pudo observar que el soporte polimérico quedaba pulverizado como resultado de la agitación magnética, disminuyendo notablemente su grado de hinchamiento. Este hecho puede comprometer la elongación de la cadena peptídica en etapas posteriores y en consecuencia disminuir los rendimientos. Por esta razón, se decidió buscar condiciones de reacción más suaves para los acoplamientos.

Disminuyendo 5 grados la temperatura, la velocidad de agitación y alargando el tiempo de reacción (entradas 3-6), se alcanzaron unas condiciones en las que la resina mantenía su grado de hinchamiento. Además, se elevó el tiempo de pre-agitado con el fin de homogeneizar la suspensión antes de que comenzase el calentamiento y fuese más regular a lo largo de todas las perlas de resina. Con estas nuevas condiciones (entrada 6), se consiguió completar el acoplamiento Phe-Val, en un único ciclo, al igual que el siguiente acoplamiento Tyr-Phe. De este modo, por radiación de microondas, se obtuvo **32** con muy buen rendimiento (89%) y un 93% de pureza.

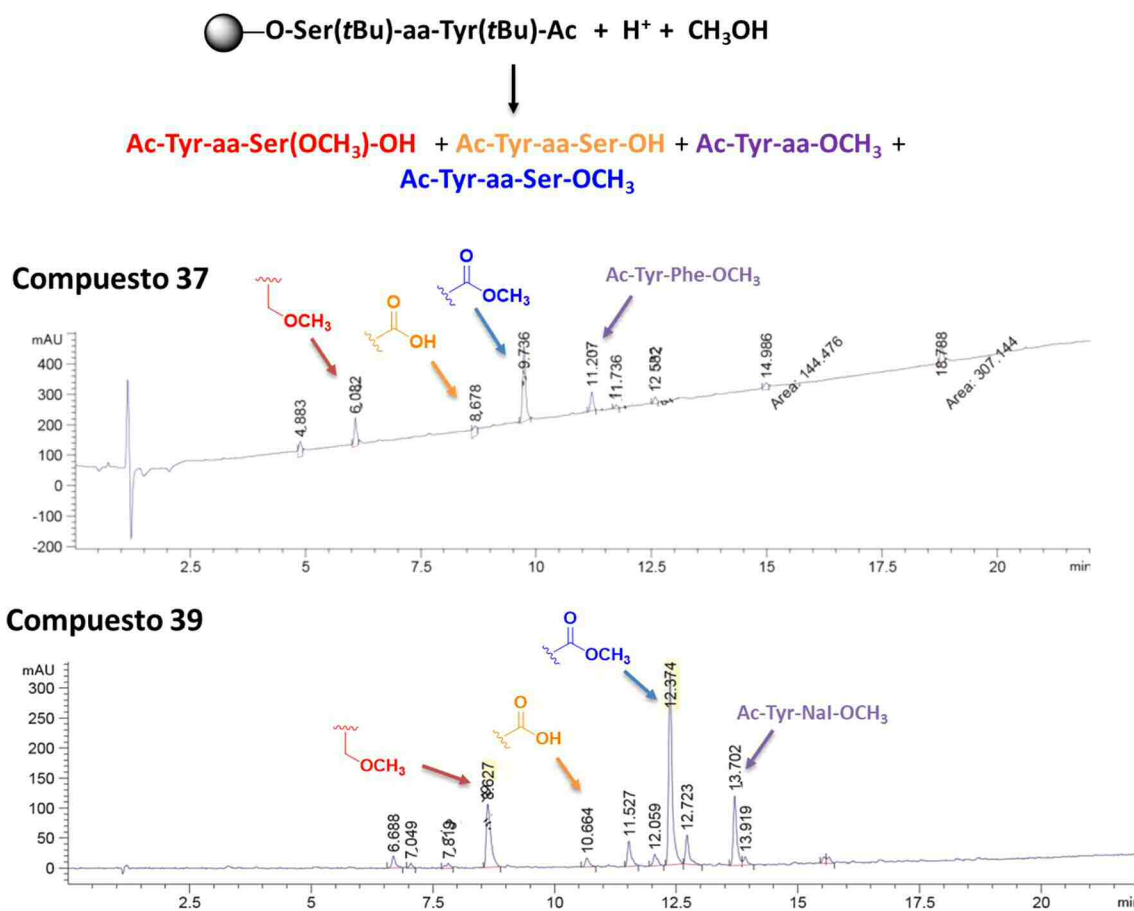
Una vez encontradas las condiciones óptimas para llevar a cabo los acoplamientos de elongación de la cadena, éstas se aplicaron a la preparación de una pequeña “peptoteca” (Tabla 17).

**Tabla 17.** Péptidos **32-42** sintetizados, rendimiento y pureza del crudo.

Entrada	Comp.	aa <sup>1</sup>	aa <sup>2</sup>	aa <sup>3</sup>	R	Agente de acoplamiento	Rendimiento (%)	Pureza (%)
1	<b>32</b>	Tyr	Phe	Val	OH	HCTU	89	93
2	<b>33</b>	Tyr	Phe	Val	CH <sub>3</sub>	HCTU	87	91
3	<b>34</b>	Ala	Phe	Val	CH <sub>3</sub>	HCTU	46	52
4	<b>35</b>	Tyr	Ala	Val	CH <sub>3</sub>	HCTU	77	70
5	<b>36</b>	Tyr	Phe	Ala	CH <sub>3</sub>	HCTU	82	34
6	<b>37</b>	Tyr	Phe	Ser	CH <sub>3</sub>	HCTU	68	32
7	<b>38</b>	Tyr	2-Nal	Val	CH <sub>3</sub>	HCTU	46	80
8	<b>39</b>	Tyr	2-Nal	Ser	CH <sub>3</sub>	HCTU	62	28
9	<b>40</b>	Tyr	Phe(4-Me)	Val	CH <sub>3</sub>	HATU	66	100
10	<b>41</b>	Tyr	Thi	Val	CH <sub>3</sub>	HATU	79	67
11	<b>42</b>	Tyr	Cha	Val	CH <sub>3</sub>	HATU	88	65

La carga de todos los péptidos se realizó de forma manual, así como la desprotección del grupo Fmoc de los mismos. Inicialmente, se repitió la síntesis de **33** para terminar de validar esta metodología, obteniéndose resultados comparables en términos de rendimiento y pureza a los alcanzados en la síntesis manual (entrada 2). A continuación, se sintetizaron los análogos del escaneo posicional de alanina (entradas 3-5). En este caso, aunque los rendimientos fueron de moderados a buenos, la pureza disminuyó. Esto se debe al hecho comentado previamente sobre la sensibilidad del método de desanclaje por transesterificación-desprotección hacia el contenido de agua en la disolución de HCl 4M en dioxano. Además, las casas comerciales a las que se les pudo adquirir la Fmoc-Ala en ese momento la proporcionaron con una pureza menor (90%) en comparación al resto de monómeros comerciales (~ 95%).

Los peores rendimientos y purzas corresponden a los derivados **37** y **39** portadores de Ser en la posición 3 (entradas 6 y 8).



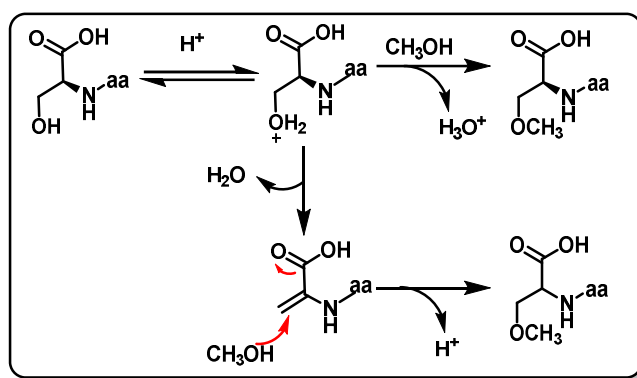
**Figura 55.** Cromatogramas HPLC-masas del crudo de los productos **37** y **39**.

Para estos compuestos, los cromatogramas de HPLC-masas de los crudos de la reacción de desanclaje por transesterificación-desprotección recientemente obtenidos revelaron la presencia de dos picos con la misma masa nominal y separados aproximadamente 4 min de tiempo de retención (Figura 55, rojo y azul), y un pico minoritario entre ambos correspondiente al péptido ácido carboxílico (Figura 55, naranja). Además, a mayor tiempo de retención, se observan los picos correspondientes a Ac-Tyr-Phe-OMe y Ac-Tyr-(2-Nal)-OMe (**37** y **39**, en violeta). La SPPS acelerada por microondas sobre la resina 2-Cl-Tr es susceptible de ruptura  $S_N1$  por hidrólisis térmica parcial del enlace péptido-resina, causando rendimientos globales más bajos que la síntesis a temperatura ambiente.<sup>253</sup> Durante el acoplamiento del segundo aminoácido, la escisión del enlace Ser(tBu)-O-resina deja la resina funcionalizada con cationes 2-clorotritilo que reaccionan con el anión carboxilato del Fmoc-aa entrante. Terminado el acoplamiento, en la resina quedan anclados un dipéptido y un aminoácido que, después del

<sup>253</sup> Echaliier, C.; Al-Halifa, S.; Kreiter, A.; Enjalbal, C.; Sanchez, P.; Ronga, L.; Puget, K.; Verdié, P.; Amblard, M.; Martinez, J.; Subra, G. *Amino Acids* **2013**, *6*, 1395-1403

tercer acoplamiento, generarán respectivamente los tri- y dipéptidos observados en los crudos de reacción. Esto justifica la formación de los subproductos acil tripéptido ácido carboxílico (rojo y naranja) y acil dipéptidos (violeta).

El estudio de los cromatogramas de iones de los picos de igual masa permitió identificar los picos de menor tiempo de retención (Figura 56, rojo) como subproductos no esperados de metoxilación del residuo de serina, y el pico que eluye unos 4 min después (Figura 56, azul) como el producto de la reacción. Por un lado, se forma el éster metílico deseado y, por otro lado, se produce la metilación del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina. Esta última reacción podría tener lugar a través de una sustitución nucleófila o por adición de Michael sobre el producto de deshidratación de la serina (Figura 56), no detectado por HPLC-MS. En el segundo caso sería esperable la epimerización del C $\alpha$  de la serina y, por lo tanto, la observación de dos picos de péptidos epímeros con tiempos de retención muy próximos. Sin embargo, no se pudieron observar las masas de los epímeros, bien porque los picos no se resuelven o porque existe una inducción asimétrica total del resto de la cadena peptídica. En consecuencia, es bastante probable que la reacción transcurra vía sustitución nucleófila y que no ocurran procesos de racemización del C $\alpha$  de la serina, como el indicado en la Figura 56 o vía formación de oxazolona y posterior hidrólisis.<sup>254</sup>



**Figura 56.** Posibles rutas de reacción para la formación del éster metílico de serina durante el desanclaje de **37** y **39**

Durante la síntesis de péptidos análogos a **33** también se observó que los acoplamientos Nal-Val y Thi-Val no se completaron en un único ciclo, siendo necesario repetirlo. Además, el acoplamiento de la Fmoc-Tyr realizado a continuación, tampoco se finalizó en un único ciclo,

<sup>254</sup> Echaliier, C.; Al-Halifa, S.; Kreiter, A.; Enjalbal, C.; Sanchez, P.; Ronga, L.; Puget, K.; Verdié, P.; Amblard, M.; Martinez, J.; Subra, G. *Amino Acids* **2013**, *6*, 1395-1403.

teniendo que repetirse. Este hecho puede deberse al mayor volumen de los grupos 2-naftilo y 2-tienilo de los aminoácidos Nal y Thi respectivamente, que al presentar libre giro dificultan su acoplamiento e incorporación a la cadena peptídica. Se decidió realizar otro experimento control haciendo la síntesis del péptido **38** de forma manual. Tal y como se esperaba, tras un acoplamiento de 3 horas a temperatura ambiente, no se completaron los acoplamientos Nal-Val ni el acoplamiento Tyr-Nal, haciéndose necesaria su repetición. Del mismo modo, se comprobó que, si estos acoplamientos se dejaban en agitación toda la noche sí se completaban las reacciones de forma manual.

Finalmente, el compuesto **40** se obtuvo con buen rendimiento y una pureza excelente (entrada 9) mientras que en el caso de **42** fue necesaria su purificación por HPLC preparativo.

#### 5.3.2.4 Estudios de actividad

Una vez obtenidos todos los péptidos, y purificados aquellos que presentasen purzas por debajo del 90%, se decidió pasar a su estudio en modelos celulares en CMH. Dado que su naturaleza es principalmente lipófila y su peso molecular está por debajo de 500 g/mol se asumió que podrían absorberse por la célula ya sea por difusión pasiva o mediante algún sistema de transporte activo o difusión facilitada.<sup>255</sup> Estos experimentos se llevaron a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá bajo la supervisión de los doctores Diego Rodríguez Puyol, Manuel Rodríguez Puyol y Sergio de Frutos.

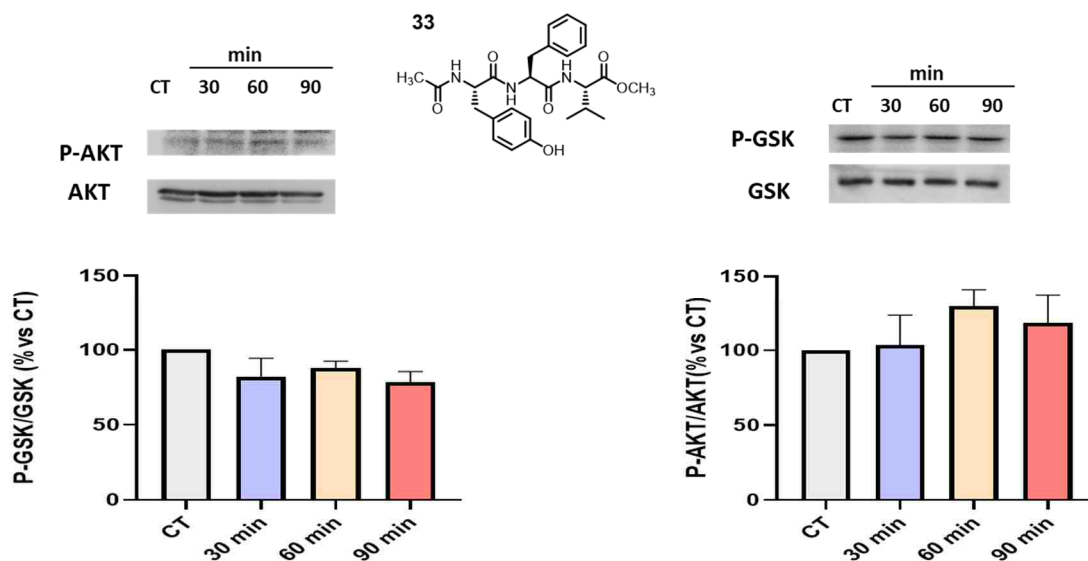
Se seleccionó una línea de células mesangiales humanas (CMH) para disponer de un modelo lo más cercano posible al del riñón. Dado que, como se ha comentado en la introducción, hoy en día se acepta que la ILK exhibe al menos una actividad quinasa (directa o indirecta) y una función de andamiaje o ensamblaje, inicialmente se decidieron evaluar ambos efectos en los modelos celulares.

En primer lugar, se hicieron medidas mediante *Western blot* de los niveles de fosforilación de las proteínas GSK-3 $\beta$  y Akt, ya que es conocido que la ILK es capaz de producir la fosforilación de sus residuos Ser9 y Ser473 respectivamente. Para todos los estudios se partió de una concentración de 50  $\mu$ M del péptido correspondiente y del control positivo (tirofibán) en el medio. Además, se intentaron medir estas fosforilaciones a tiempos cortos (30 min) y largos (60 y 90 min).

---

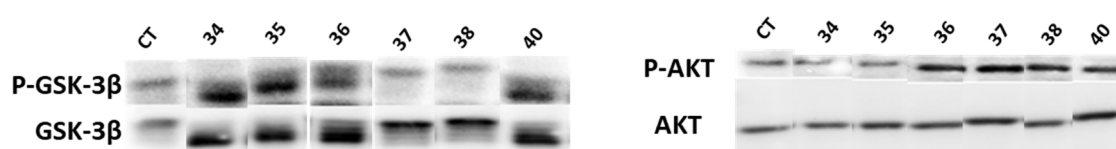
<sup>255</sup> Diller, D. J.; Swanson, J.; Bayden, A. S.; Jarosinski, M.; Audie, J. *Future Med. Chem.* **2015**, *16*, 2173-2193.





**Figura 57.** Resultados de los ensayos de fosforilación de **33** (50 μM) sobre CMH. Se muestra un Western blot representativo para Akt (izquierda) y GSK-3β (derecha) junto con el análisis densitométrico ± error de 3 repeticiones. CT: Control.

En la Figura 57, se recogen los resultados observados para el compuesto líder **33**. Tal y como se observa, los efectos fueron diferentes en GSK-3β y Akt. Mientras que en GSK-3β el efecto a los 30 min, relacionado con los eventos de fosforilaciones rápidas iniciadoras de vías de señalización intracelular, se corresponde con un efecto inhibitorio, ocurre lo contrario con Akt. En este segundo caso, el compuesto **33** exhibió un efecto levemente activador, aunque no significativo. Además, es importante notar que estos efectos no se mantuvieron a tiempos más largos (60 y 90 min). De estos resultados se pudo concluir que estas moléculas no parecían tener un efecto sobre la actividad quinasa relacionada con ILK. Los ensayos de Western blot del resto de compuestos mostraron, en general, la misma tendencia (Figura 58).

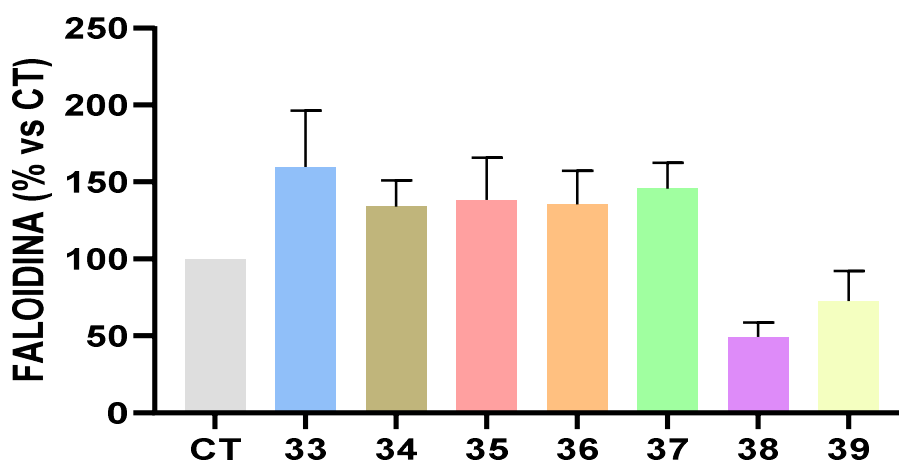


**Figura 58.** Western blot representativos de compuestos seleccionados que mostraron algún tipo de efecto en los ensayos en CMH al cabo de 30 min.

En los ensayos de fosforilación con el resto de los compuestos no se observó una respuesta clara y significativa para ninguno de ellos, pudiendo mostrar efectos distintos en la fosforilación de cada una de las proteínas. De estos resultados se concluyó que la mayoría de los compuestos a

pesar de producir algún tipo de señalización celular no eran capaces de afectar la capacidad quinasa de ILK.

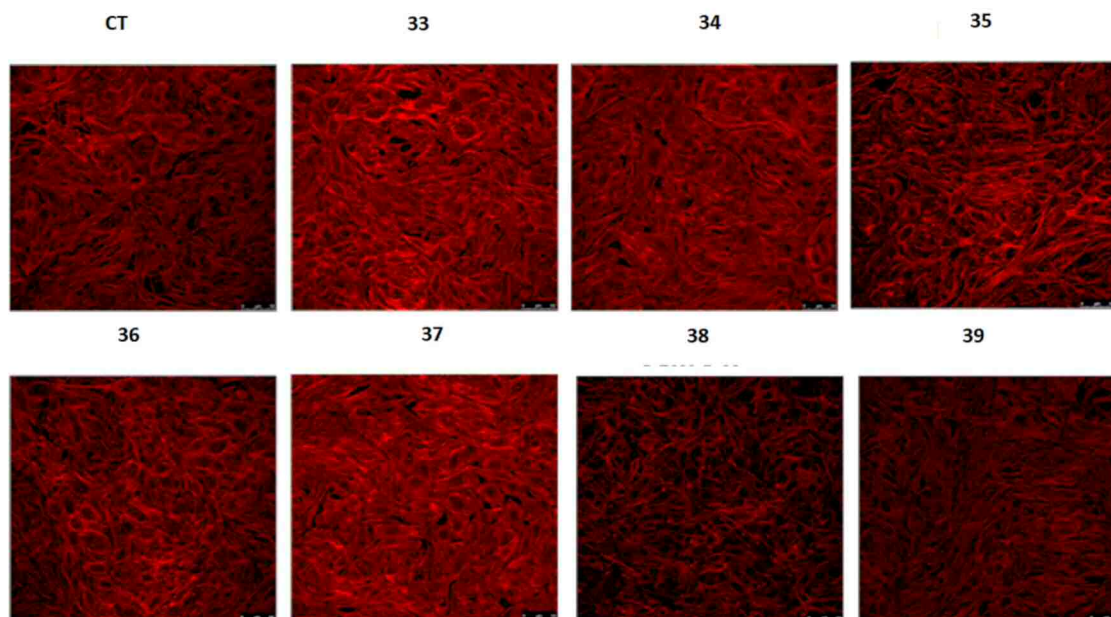
En segundo lugar, se decidió medir el efecto de los compuestos sobre la polimerización de actina en el interior celular al cabo de una hora. Las células se estimularon a una concentración 50  $\mu\text{M}$  de cada uno de los péptidos y a continuación se fijaron y se tiñeron con el marcador Faloidina-FITC. De este modo, se pudo evaluar la integridad de los filamentos de actina por microscopía confocal y fluorescencia y, por otro lado, cuantificar el aumento o disminución de esta mediante análisis densitométrico (Figura 59).



**Figura 59.** Análisis densitométrico de los experimentos de polimerización de actina de compuestos seleccionados (50  $\mu\text{M}$ ) sobre CMH expresados como media de seis experimentos independientes  $\pm$  error. CT: Control.

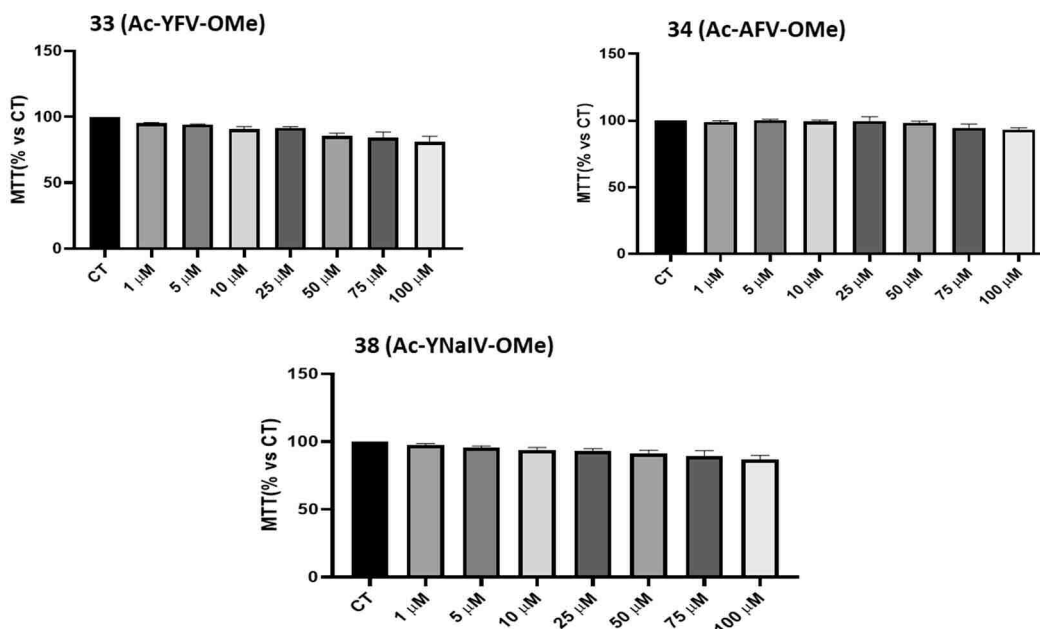
Los resultados del análisis densitométrico de los compuestos permite agruparlo en dos grupos: por un lado, aquellos que potencian la polimerización de la actina y, por otro lado, aquellos que la disminuyen. Los derivados procedentes del escaneo de alanina (**34-36**) mostraron el mismo efecto positivo sobre la actina, de tal modo que el cambio de alanina en cualquiera de las tres posiciones no pareció afectar a las propiedades del compuesto en estos ensayos. Los derivados **33** y **37** exhibieron el mismo efecto activante, siendo el de **33** (Ac-YFV-OMe) el más potente dentro del grupo con un 50% de aumento de polimerización respecto al control.

El segundo grupo de compuestos lo forman los derivados portadores del resto de 2-naftilo **38** (Ac-Y(2-Nal)S-OMe) y **39** (Ac-Y(2-Nal)V-OMe) que disminuyen los niveles de polimerización de actina respecto al control. De acuerdo con el diseño planteado, estos deberían unirse más fuertemente al sitio de unión del *hot spot*, sin embargo, mostraron un perfil completamente distinto al del resto de análogos en términos de actividad (Figura 60).



**Figura 60.** Imágenes representativas del efecto de los péptidos (50  $\mu$ M) sobre la polimerización de actina en CMH. CT: Control.

En base a estos resultados y para llevar a cabo más pruebas, se seleccionaron los péptidos **33** y **34** que presentaban capacidad activante y el péptido **38** que presentaba propiedades inhibitorias. A continuación, se analizó la viabilidad celular de la línea CMH con los péptidos seleccionados a distintas concentraciones (Figura 61).



**Figura 61.** Resultados del ensayo de viabilidad celular en CMH al cabo de 24h y distintas concentraciones de los compuestos **33**, **34** y **38** representados como media de 3 experimentos  $\pm$  error. CT: Control.

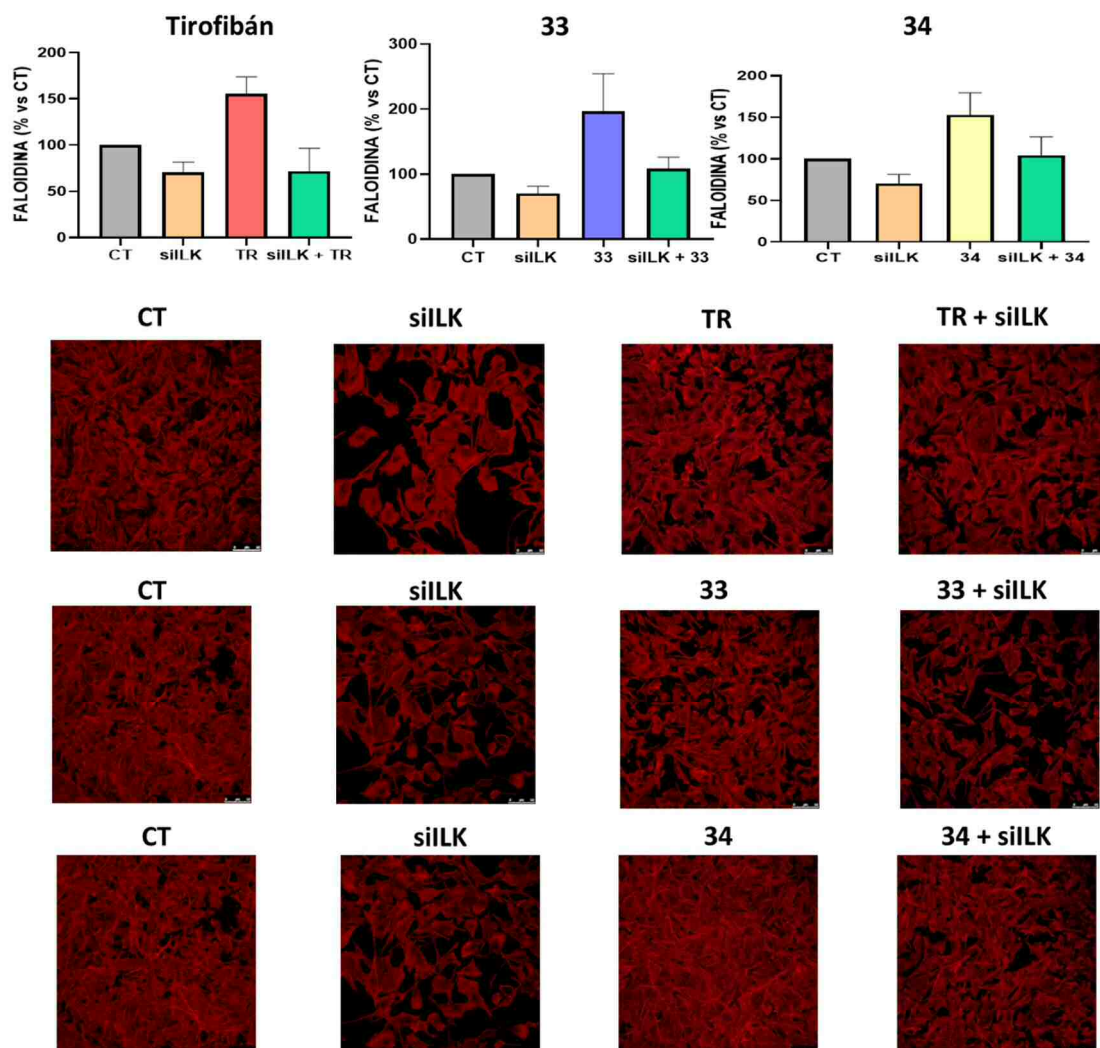
Estos ensayos revelaron que los péptidos no mostraban toxicidad significativa en las condiciones ensayadas y tampoco comprometían la viabilidad celular, ni siquiera a concentraciones altas.

Se encuentra descrito que el uso de los inhibidores Cpd22 y QLT267 se asocia a una disminución de la proliferación y crecimiento celular en líneas tumorales por disminución en la fosforilación de Akt y GSK-3 $\beta$ .<sup>256</sup> En consecuencia, la falta de acción quinasa sobre estos sustratos, como se ha comentado previamente, junto al hecho de su baja toxicidad apoyan una posible modulación únicamente de la función de ensamblaje de ILK.

Finalmente, y dado el comportamiento que presentaban estos compuestos, se decidió llevar a cabo un experimento más complejo para poder ayudar a entender su mecanismo de acción. Con estos nuevos ensayos se pretendía silenciar el gen que codifica ILK y disminuir su contenido intracelular con el fin de corroborar si la acción de estos péptidos desaparece. De este modo, se puede confirmar si la acción de los compuestos depende de la presencia de ILK. Para ello, se emplearon ARNs de interferencia específicos del gen de ILK disponibles comercialmente. Una vez silenciado el gen, se incubaron las células 1 hora con los compuestos a una concentración de 50  $\mu$ M y se midieron los efectos a nivel de polimerización de actina por microscopía confocal y la tinción Faloidina-FITC. Para estos experimentos se seleccionaron los compuestos **33** y **34** que promovían la polimerización de actina, por tratarse de un efecto muy característico de ILK y novedoso.

---

<sup>256</sup> Chen, J.; Bell, J.; Lau, B. T.; Whittaker, T.; Stapleton, D.; Ji, H. P. *Oncogenesis* **2019**, 5, 33-z.

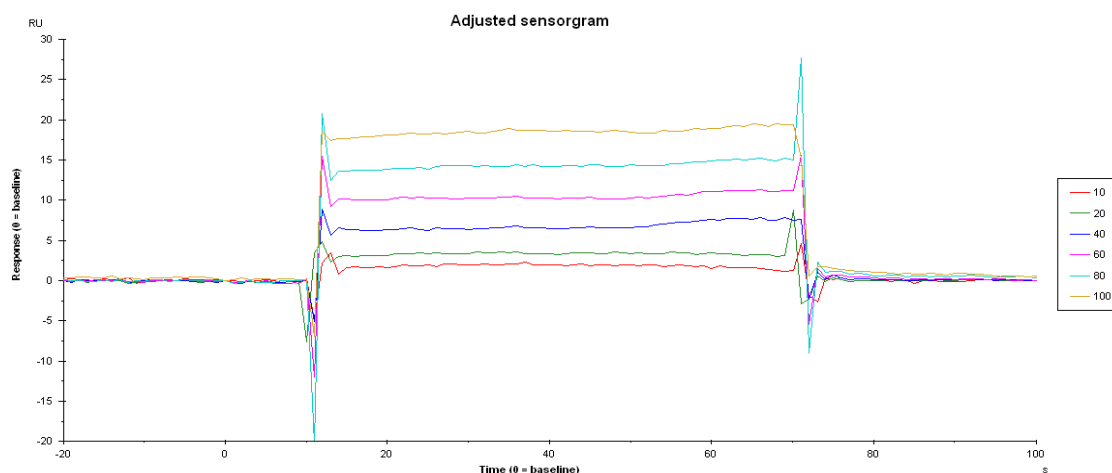


**Figura 62.** Análisis densitométrico de los experimentos de polimerización de actina de compuestos **33** y **34** ( $50 \mu\text{M}$ ) expresados como media de tres experimentos independientes  $\pm$  error. Abajo fotografías representativas de los tratamientos al cabo de 1h. CT: Control, siILK: ILK silenciada, TR: Tirofibán.

Para estos ensayos se empleó como control positivo el fármaco tirofibán por inducir la polimerización de actina debido a la activación de integrinas en esta línea celular en las condiciones ensayadas. Tal y como se puede observar en la Figura 63, se concluyó que el efecto de estos compuestos es dependiente del contenido celular de la ILK. El ARN de interferencia es capaz de inducir una disminución del contenido de actina y la proliferación celular tal y como se puede observar en las imágenes. En contraste, los compuestos ensayados **33** y **34** son capaces de aumentar notoriamente la polimerización de actina.

Cuando las células silenciadas se exponen al compuesto (Figura 63, columna derecha), se produce el aumento de la polimerización respecto de las células silenciadas (segunda columna) hasta niveles similares a los del control. Además, este aumento es significativamente inferior en comparación con el aumento que el compuesto produce en las células no silenciadas (tercera columna) hasta a niveles similares a los del control.

Finalmente, durante el transcurso de esta investigación se abrió la posibilidad de hacer experimentos de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) en el Instituto de Química Médica de Madrid. La mayoría de los compuestos fueron evaluados para su unión frente a una ILK recombinante. No obstante, ninguno de estos compuestos consiguió dar señal a la concentración ensayada de 100  $\mu\text{M}$  a excepción del derivado **38** (Ac-Y(2-NaI)V-OMe). Éste mostró indicios de unión a la ILK, sin embargo, dada su cinética de unión-disociación rápida y relativamente baja afinidad, no se pudo determinar la constante de afinidad ( $K_D$ ). A pesar de ello, sus propiedades en todos los ensayos realizados lo convierten en un hito para su posterior optimización hacia un compuesto más potente.

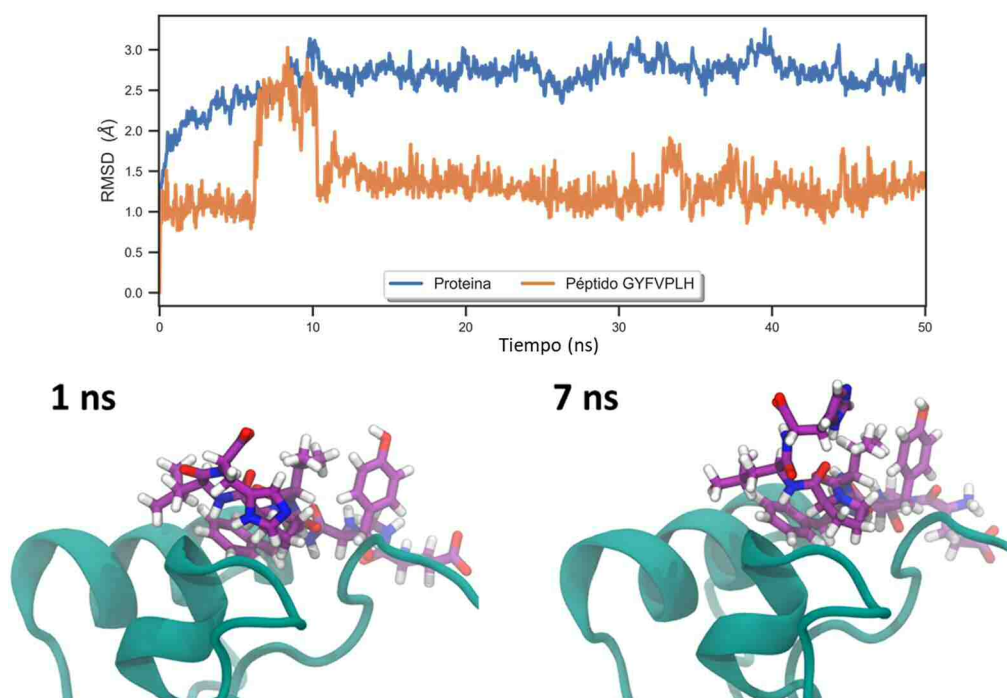


**Figura 63.** Sensograma del compuesto **38** a distintas concentraciones ( $\mu\text{M}$ , en el recuadro) donde se muestra que no se llega a alcanzar una curva de saturación.

### 5.3.3 Heptapéptidos moduladores de la ILK

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in cellulo* con los modelos epitópicos del *hot spot* de  $\alpha$ -parvina, se planteó la posibilidad de hacer un estudio algo más exhaustivo de la interacción proteína-proteína. Para este nuevo objetivo se propuso hallar un segmento peptídico del dominio CH2 de la  $\alpha$ -parvina capaz de interactuar con ILK *in vitro*. De este modo, se podría generar un modelo a partir del cual desarrollar posteriormente peptidomiméticos u otro tipo de herramientas químicas con utilidad para el estudio del sistema ILK-parvina y/o con posibles aplicaciones terapéuticas.

Para ello se partió del diseño generado *in silico* en el cual se estudió la energía de interacción de la  $\alpha$ -parvina con kILK (sección 2.2.1). Este modelo, abarca los aminoácidos comprendidos desde la Gly305 (*N*-terminal) hasta la Phe313 de  $\alpha$ -parvina (*C*-terminal). Teniendo en cuenta que, el residuo Phe313 no contribuye energéticamente por encontrarse prácticamente fuera del canal, y que la Ser312 contribuye negativamente (aunque de manera leve) a la energía de unión (+ 0.2 kcal/mol), se decidió trabajar con un heptapéptido que comprendiese los aminoácidos Gly305 hasta His311 del bucle de interacción de  $\alpha$ -parvina. Una vez seleccionado el heptapéptido, primero se realizó una simulación de dinámica molecular del mismo (GYFVPLH) unido a kILK a partir de su estructura cristalina (Figura 64).



**Figura 64.** Gráfica de la variación de RMSD de los átomos del esqueleto de kILK y del péptido GYFVPLH a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular. Abajo se muestran fotografías representativas de la simulación, tomadas a distintos tiempos que ilustran el movimiento del residuo de His311.

Tal y como se observa en el gráfico de RMSD de la dinámica molecular, el sistema se estabilizó al cabo de aproximadamente 10 ns de simulación con un valor medio de RMSD de 2.5 Å para el esqueleto peptídico. Respecto al péptido, éste permaneció firmemente unido al sitio de unión de kILK, tal y como muestra su RMSD a lo largo de la simulación. Únicamente se observaron cambios al cabo de 6 ns, comprobándose que la His311 mueve su cadena lateral exponiendo el anillo de imidazol al disolvente. Sin embargo, al cabo de 10 ns ésta vuelve a orientarse hacia el segmento de activación, en su posición inicial.

Dado que estos resultados soportan la unión firme del heptapéptido a kILK, se decidió preparar tanto el péptido modelo, como llevar a cabo un escaneo de alanina, además de truncarlo para establecer los requisitos mínimos de actividad.

### 5.3.3.1 Síntesis de heptapéptidos

En primer lugar, se decidió preparar de forma manual el péptido GYFVPLH **43** por tratarse de un péptido más largo que los anteriormente sintetizados y por contener en su secuencia los aminoácidos histidina y prolina que pueden resultar problemáticos durante la síntesis en fase sólida.<sup>257</sup>

A pesar del mayor tamaño del péptido, aunque todavía corto, se decidió seguir utilizando la resina (2-Cl-Trt)-Cl con un grado de sustitución relativamente alto, ligeramente por encima de 1 mmol/g. Para llevar a cabo la síntesis de **43** se utilizó como agente de acoplamiento HCTU ya que se trata de uno de los agentes de acoplamiento más eficientes y utilizados para síntesis de péptidos en fase sólida.<sup>258, 259</sup>

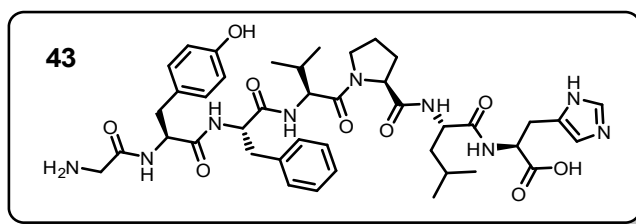


Figura 65. Péptido **43**.

El primer paso, fue llevar a cabo la carga de la resina con Fmoc-His(Boc), no obstante, el rendimiento de carga fue muy por debajo de lo esperado (36%). En vista de estos resultados se

<sup>257</sup> Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. J. *Pept. Sci.* **2016**, *1*, 4-27.

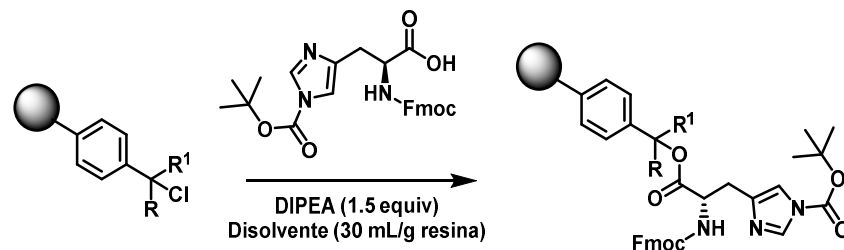
<sup>258</sup> Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. H. *J. Pept. Sci.* **2008**, *1*, 97-101.

<sup>259</sup> Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. *ChemInform* **2003**, 32.



intentó buscar unas condiciones que aumentasen la carga de este primer aminoácido al soporte polimérico (Tabla 18).

**Tabla 18.** Reacciones de optimización de anclaje de Fmoc-His(Boc) a la resina (2-Cl-Trt)-Cl.

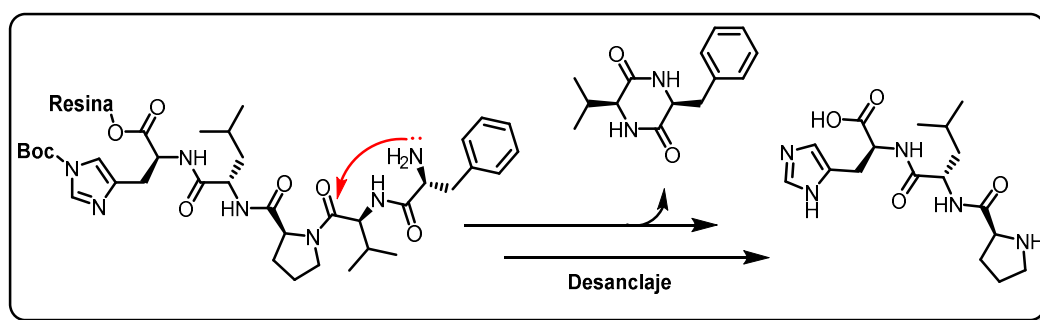


Entrada	Disolvente	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Rto de carga (%)
1	DMF	1.5	25	36
2	DMF	3	25	42
3	DCM	1.5	25	5
4	DMF, 10% DMSO	1.5	25	47
5	DMF, 10% DMSO	3	25	50
6	DMF, 10% DMSO	3	50	62
7	DMF, 10% DMSO	12	50	92

En primer lugar, se optó por doblar el tiempo de carga (entrada 2) sin resultados fructuosos. Además, se observó que el monómero Fmoc-His(Boc) presenta una velocidad de disolución muy baja, lo cual complica su reacción y anclaje a la resina. El uso de DCM como disolvente menos polar tampoco mejoró la carga ya que el monómero no se llegó a disolver. En vista de estos resultados, se probó adicionar un 10% (v/v) de DMSO en la mezcla de reacción con el fin de favorecer la disolución del monómero (entradas 5-7). Si bien, la adición de DMSO mejoró el rendimiento de la carga, este seguía siendo bajo a pesar de que el monómero se solubilizaba mejor. Aumentando la temperatura a 50 °C en un horno con agitación y dejando la mezcla de reacción toda la noche se alcanzó un 92% de carga final.

Una vez optimizado el paso de carga de la histidina a la resina, se preparó manualmente **43**, siguiendo el avance de la síntesis de forma cualitativa a través del test de Kaiser. Finalizada la síntesis y desanclado el producto, únicamente se obtuvo un 15% de la masa teórica. Además, el análisis mediante HPLC-masas del producto obtenido no mostró la presencia de **43**. En su lugar, se detectaron hasta 4 subproductos no deseados distintos, de los cuales, el mayoritario presentaba una masa nominal de 365.20 g/mol, que corresponde al tripéptido His-Leu-Pro. Este

producto se formaría debido a la ciclación intramolecular del pentapéptido en desarrollo Phe-Val-Pro-Leu-His una vez eliminado el grupo Fmoc de la fenilalanina del extremo *N*-terminal.



**Figura 66.** Reacción de formación del tripéptido His-Leu-Pro.

El grupo amino libre del residuo de Phe atacaría al carbonilo del enlace amida Leu-Pro, produciendo la salida de la correspondiente 2,5-dicetopiperazina-3,6-disustituida. Esta reacción está favorecida por la conformación que fuerza la prolina, probablemente a través de una hélice  $3_{10}$ , al inducir un giro en la cadena peptídica. También, la conformación del dipéptido Leu-His(Boc) podría favorecer la formación de la dicetopiperazina. En vista de estos problemas, se decidió monitorizar la reacción de formación del péptido por HPLC-masas en cada uno de los pasos hidrolizando una pequeña muestra de la resina previa desprotección del grupo Fmoc. Desgraciadamente, el análisis por HPLC-MS correspondiente al primero y segundo acoplamiento (Leu-His y Pro-Leu-His) ya mostró una gran mezcla de productos además del péptido en formación.

A la vista de todos estos problemas, se decidió cambiar el monómero inicial de Fmoc-His(Boc) por Fmoc-His(Trt) por tratarse de un producto más convencional, estar disponible comercialmente y ofrecer mejor solubilidad.

Empleando Fmoc-His(Trt) como monómero, se consiguió una carga inicial cuantitativa y se solventaron todos los problemas de solubilidad, pudiendo anclarse este aminoácido con las condiciones estándar durante 1.5 h a temperatura ambiente. Empleando 3 equivalentes de HCTU en ciclos de 3 h de acoplamiento y realizando el desanclaje con el cóctel para la liberación de ácidos carboxílicos (TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O), se obtuvo el péptido **43** con un 46% de rendimiento y una excelente pureza (100%). En esta ocasión, no se observó el péptido truncado His-Leu-Pro, demostrando que la histidina protegida con un grupo Boc, favorecía, de algún modo, el proceso intramolecular de escisión del péptido.

Una vez encontradas las condiciones óptimas, se pasó a sintetizar el péptido GYFVPLH (**43**) y todos los análogos correspondientes al scan de alanina, utilizando un sistema de síntesis semiautomática que permitiese llevar a cabo las reacciones en paralelo por medio un sintetizador QUEST 210 (Argonaut®, Figura 67).



*Figura 67. Dispositivo de síntesis en paralelo QUEST 210 de Argonaut®.*

Inicialmente fue necesario ajustar un poco las condiciones de reacción ya que el sistema de agitación con el que cuenta el dispositivo no es tan eficaz como el utilizado durante la síntesis manual. De este modo, fue necesario aumentar los tiempos de acoplamiento a 4 h y el de desprotección de la resina a 45 min, mientras que el tiempo de carga no fue necesario modificarlo. Los resultados de la síntesis en paralelo de los derivados del scan de alanina se recogen en la Figura 68.

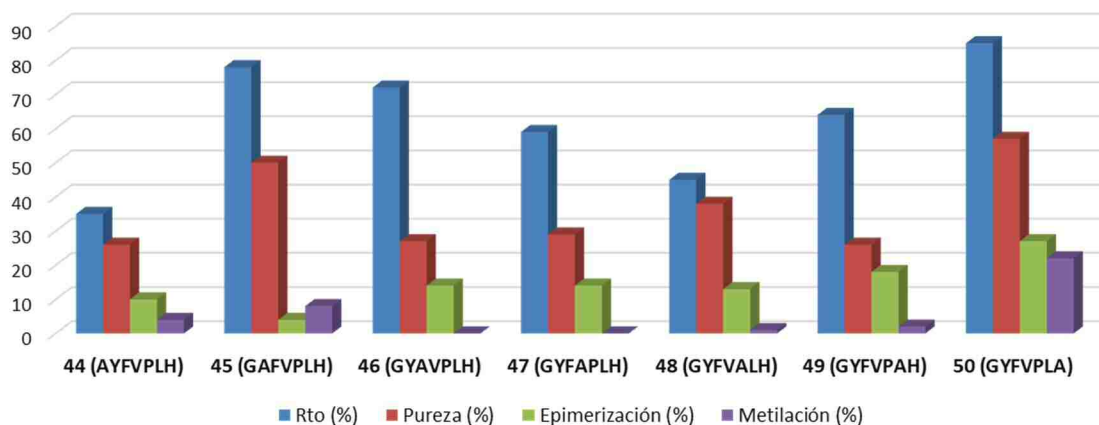


Figura 68. Resultados de la síntesis en paralelo utilizando el QUEST 210 (Argonaut®).

Tal y como se puede observar en la Figura 68, los resultados obtenidos empleando este método no fueron satisfactorios. Los crudos de cada uno de los compuestos, recién desanclados mostraban purezas bajas para los productos finales. Además, se detectó que en alguno de los productos preparados ocurrían reacciones de epimerización. Éstas se detectaron en el cromatograma UV-visible y de iones donde, junto al pico correspondiente al producto, aparecía otro muy solapado con exactamente el mismo cromatograma de iones (Figura 69).

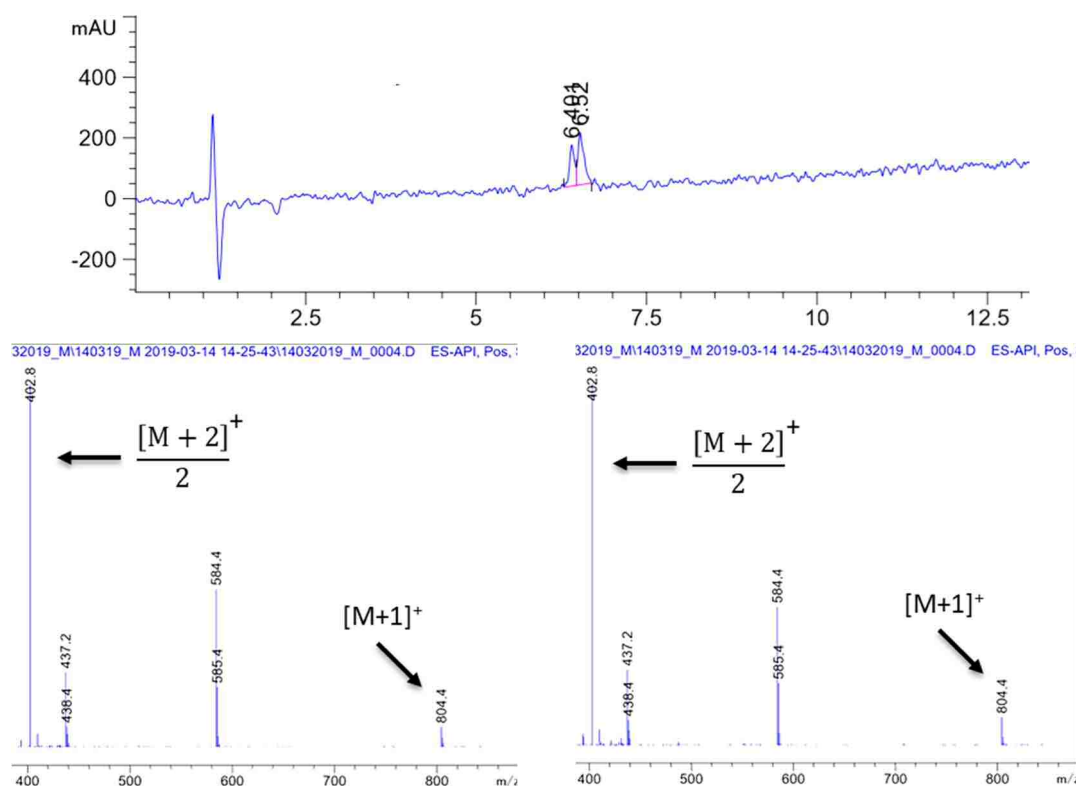
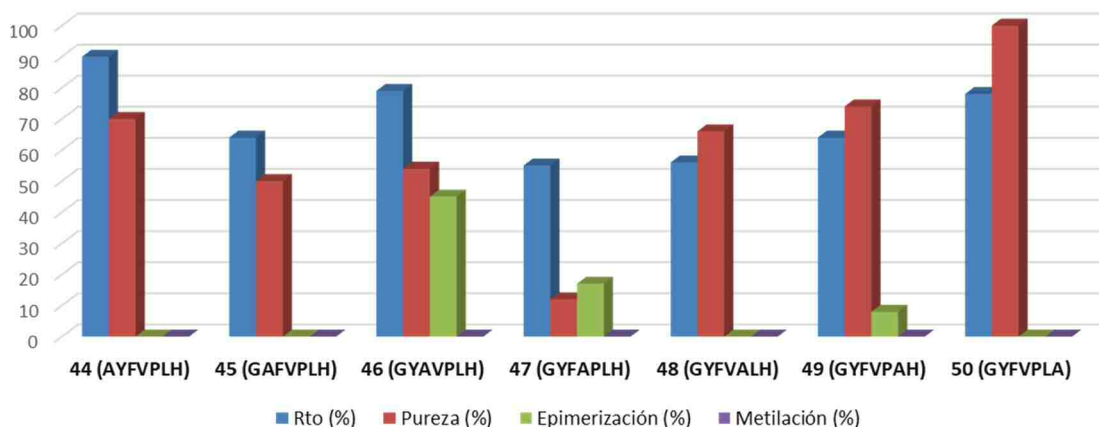


Figura 69. Cromatograma de HPLC (arriba) y ampliación del espectro de iones (abajo) correspondiente a los picos izquierdo y derecho, respectivamente, en el cromatograma del crudo del compuesto 47 sintetizado semiautomáticamente con el sintetizador Argonaut®.

Si bien los valores de epimerización observados fueron elevados (4-27%) para algunos derivados, esto se debe al hecho de que el método de HPLC no es capaz de resolver los picos completamente y al aparecer solapados el área del pico correspondiente al epímero se encuentra muy aumentada.

Por otro lado, para **44**, **45**, **48**, **49** y **50** se detectaron los productos de transesterificación en forma de ésteres metílicos. Esto se debe a que posteriormente se comprobó que, durante los lavados de la resina, el dispositivo no drenaba bien el metanol, dejando restos en los reactores. De este modo, al mezclarse los restos de metanol con el ácido trifluoroacético del cóctel de desanclaje se producía la transesterificación de algunos de los compuestos.

Con el fin de intentar solventar este problema se tomó la decisión de sintetizar los péptidos manualmente y, además, sustituir el HCTU por HATU. Este agente de acoplamiento minimiza las posibles reacciones de epimerización, ya que es más reactivo que el HCTU y favorece la formación del enlace amida antes de que tengan lugar las posibles reacciones de racemización por enolización o formación de oxazolonas.<sup>260, 261</sup>



**Figura 70.** Resultados de la síntesis manual de los derivados **44-50**.

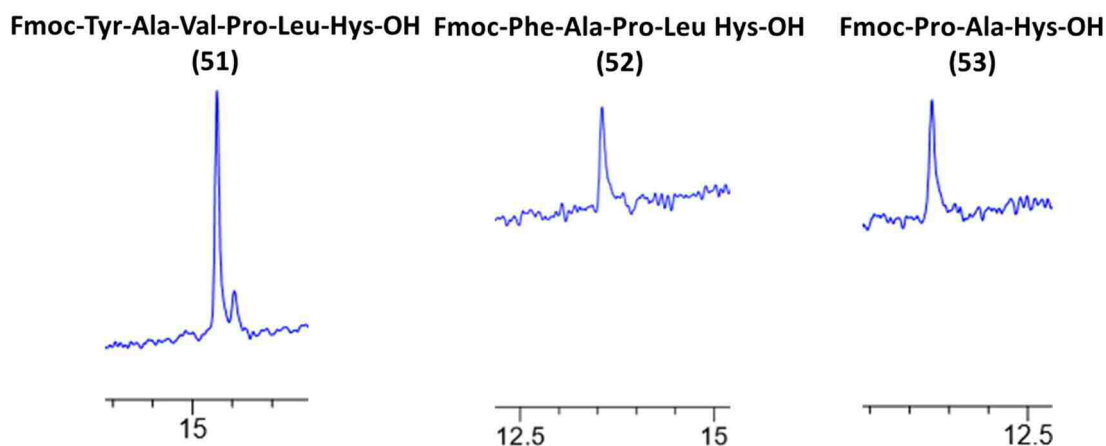
El cambio en la metodología sintética proporcionó mejores resultados tal y como se puede observar en la Figura 70. Tras realizar el análisis HPLC-MS de todos los productos no se detectaron productos de transesterificación, confirmando que su aparición se debe al uso del dispositivo Argonaut®. Las epimerizaciones también disminuyeron de forma notable,

<sup>260</sup> Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F. J. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2, 201-203.

<sup>261</sup> Albericio, F.; El-Faham, A. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 7, 760-772.

desapareciendo para los productos **44**, **45**, **48** y **50**. Además, se mejoraron las purezas de casi todos los productos, llegando a obtenerse **50** con elevada pureza.

Para los productos **46**, **47** y **49** se siguió detectando epimerización en el análisis HPLC-MS. Esta podría deberse a la racemización del aminoácido activado ya sea por parte de la propia base del medio o por el nitrógeno  $\pi$  de la histidina. Esta enolización, podría tener lugar porque la reacción de acoplamiento del nuevo aminoácido a la cadena peptídica no es lo suficientemente rápida, lo que a su vez podría deberse a la conformación que adopta el péptido en la matriz polimérica que dificulta la reacción de acoplamiento. A la vista de que experimentalmente el cambio de HCTU por HATU (mucho más reactivo) redujo la epimerización de los compuestos, se decidió emplear PyAOP para el acoplamiento de la Fmoc-Ala de las posiciones  $n = 3$ ,  $n = 4$  y  $n = 6$  del péptido. El PyAOP ha demostrado ser tanto o incluso más reactivo que el HATU, especialmente para secuencias con aminoácidos impedidos, secuencias cortas difíciles y sistemas cíclicos.<sup>262</sup> Además, también se decidió acoplar el aminoácido siguiente a la Ala con PyAOP ya que la epimerización podría ocurrir también en este segundo acoplamiento. Estas reacciones se siguieron por análisis mediante HPLC-MS, hidrolizando una pequeña cantidad de resina después de los acoplamientos para confirmar que no se observaba la formación de epímeros (Figura 71).



**Figura 71.** Extracto de los cromatogramas UV-visible de péptidos intermedios en la síntesis de **46**, **47** y **49**.

El uso de este nuevo agente de acoplamiento resultó en la desaparición de los posibles epímeros tanto en el cromatograma de UV-visible como en el de iones. De este modo, se consiguió obtener los compuestos finales con buenos rendimientos y, además una pureza elevada.

<sup>262</sup> Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *27*, 4853-4856.

**Tabla 19.** Rendimiento y pureza de los péptidos 46, 46 y 49.

Compuesto	Secuencia	Rendimiento (%)	Pureza (%)
46	GYAVPLH	46	100
47	GYFAPLH	52	100
49	GYFVPAH	64	100

Finalmente, también se prepararon los péptidos truncados que abarcan desde el extremo C-terminal hasta el residuo de Val, de forma manual y empleando como agente de acoplamiento HATU. Estos nuevos derivados se obtuvieron sin mayores complicaciones y, además, con muy buena pureza.

**Tabla 20.** Rendimiento y pureza de los péptidos truncados 54, 55 y 56.

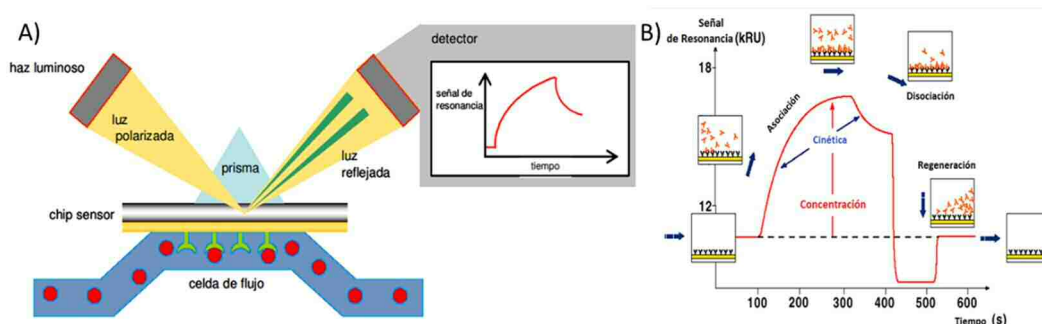
Compuesto	Secuencia	Rendimiento (%)	Pureza (%)
54	GYFVPL	40	94
55	GYFVP	45	100
56	GYFV	37	100

### 5.3.3.2 Estudios biofísicos *in vitro*

Para llevar a cabo una evaluación de la afinidad de los distintos péptidos, se recurrió a la técnica biofísica de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Por otro lado, también se hizo el cálculo de la energía libre ( $\Delta G$ ) *in silico* empleando la función HYDE, para todos los péptidos, con el fin de ver si se podía correlacionar los resultados computacionales y los obtenidos en los ensayos de actividad e *in vitro*.

Los biosensores de SPR permiten realizar medidas de afinidad y cinética entre dos moléculas (o biomoléculas) en tiempo real y con una alta sensibilidad sin necesidad de ningún tipo de marcaje enzimático, fluorescente o radioactivo y utilizan cantidades de proteína muy inferiores a las necesarias para realizar análisis similares por microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC). La resonancia de plasmón de superficie es un fenómeno óptico que permite la detección de cambios en el índice de refracción en las proximidades de la interfase entre un metal y un medio

dieléctrico donde se encuentra el analito.<sup>263</sup> Estos cambios, que son dependientes de las variaciones en la masa cuando tiene lugar la interacción, darán lugar a una variación en el ángulo de resonancia. La representación de la respuesta (en unidades de resonancia, RU) frente al tiempo da lugar a lo que se denomina sensograma, el cual proporciona información sobre la capacidad de interacción de las moléculas ensayadas con la proteína inmovilizada (Figura 72).<sup>264</sup>



**Figura 72.** A) Esquema de funcionamiento de un biosensor de SPR. B) Modelo de un sensograma.

Estos ensayos los llevó a cabo la Dra. Laura Lagartea del Instituto de Química Médica (CSIC Madrid), empleando una ILK humana recombinante (Radox). Debido a dificultades en la purificación de los péptidos mediante HPLC preparativo, algunos fueron adquiridos (Caslo) para llevar a cabo los ensayos iniciales de SPR. Para llevar a cabo estas medidas, la proteína se inmovilizó en el chip y a continuación se fluyeron los distintos compuestos utilizando como blanco el tampón. En el primer cribado se evaluaron todos los compuestos a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ , a excepción de **48** que no se solubilizó inicialmente en el tampón y se tuvo que solubilizar en DMSO. Los resultados de este primer cribado se muestran en la Figura 73.

<sup>263</sup> Cooper, M. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 7, 515-528.

<sup>264</sup> Prabowo, B. A.; Purwidyantri, A.; Liu, K. *Biosensors* **2018**, 3, 80.



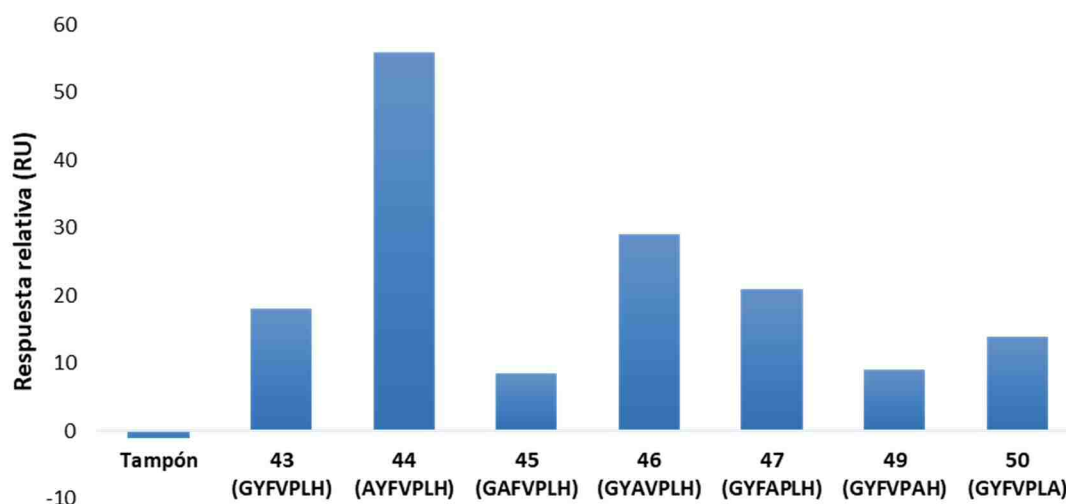
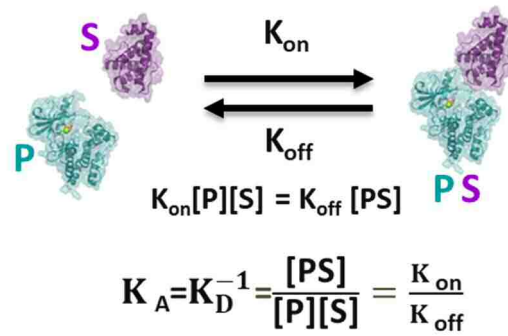


Figura 73. Resultados del cribado de los compuestos en SPR.

En este primer ensayo se pudo comprobar que el péptido modelo **43** fue capaz de unirse a la ILK *in vitro* durante los ensayos de SPR. Además, se identificaron tres derivados con mejor señal (**44**, **46** y **47**). Por otro lado, cuando se ensayó el compuesto **48** se comprobó que éste daba mayor señal (RU) por SPR que el inhibidor Cpd22 y que el péptido de referencia **43**. Así, el escaneo de alanina permitió establecer como críticas para la interacción con la ILK las posiciones  $n = 2$  (**45**),  $n = 6$  (**49**) y  $n = 7$  (**50**), correspondientes a los residuos de Tyr, Leu e His cuya sustitución por Ala conduce a la pérdida de afinidad por parte de los compuestos (Figura 73).

Para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de las medidas de SPR se decidió determinar los parámetros cinéticos de la unión, los cuales se pueden determinar a partir de las constantes cinéticas (ajuste cinético) o a partir de la respuesta en el equilibrio (ajuste por afinidad). El ajuste cinético se realiza tras sustraer la respuesta de fondo al fluir el analito y se pudo llevar a cabo en la mayoría de los péptidos por ajustarse a un modo de interacción uno-uno o Langmuir. No obstante, en determinadas situaciones los datos del ajuste cinético pueden estar sometidos a un gran error ya que los procesos de asociación y disociación son muy rápidos. En esta última situación se recurre al ajuste por afinidad que se lleva a cabo cuando se ha alcanzado el estado estacionario de la interacción. El modelo de Langmuir define el proceso de unión entre el analito y el ligando mediante las constantes de asociación ( $K_{on}$ ) y disociación ( $K_{off}$ ). Cuando se alcanza el equilibrio, las velocidades de asociación y disociación se igualan y permiten calcular las constantes de asociación ( $K_A$ ) y disociación ( $K_D$ ) (Figura 74).



**Figura 74.** Modelo de interacción 1:1 entre una proteína (P) y un posible sustrato (S).

De este modo, se intentaron determinar los parámetros de afinidad de los péptidos más interesantes por ajuste cinético, y de aquellos de los que fuese posible también por ajuste de afinidad. Además, se hicieron experimentos de afinidad con la  $\alpha$ -parvina para comprobar que la ILK inmovilizada mantenía el plegamiento activo para su reconocimiento. Así mismo, se hicieron ensayos de competición entre la  $\alpha$ -parvina y los péptidos para valorar si estos pueden, de alguna forma, alterar la afinidad de la PPI. Además, se probó a utilizar el inhibidor Cpd22 como control positivo para estos experimentos (Tabla 21).

**Tabla 21.** Resultados de SPR y de cálculo de energía libre con la función HYDE.

Compuesto	Secuencia	$\Delta G_{HYDE}$ (Kcal/mol)	$K_D$ ( $\mu M$ )	$K_{on}$ ( $M s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )
Cpd22	-	-	59000	-	-
<b>43</b>	GYFVPLH	-11.23	9990	-	-
<b>44</b>	AYFVPLH	-14.1	69	-	-
<b>45</b>	GAFVPLH	-11.95	ND	-	-
<b>46</b>	GYAVPLH	-10.03	$2.06^3$	-	-
<b>47</b>	GYFAPLH	-13.8	8.76	-	-
<b>48</b>	GYFVALH	-11.7	$370^a$	9.647	3.615
<b>49</b>	GYFVPAH	-9.56	ND	-	-
<b>50</b>	GYFVPLA	-10.03	ND	-	-
<b>54</b>	GYFVPL	-12.18	1200	-	-
<b>55</b>	GYFVP	-10.27	ND	-	-
<b>56</b>	GYFV	-8.84	ND	-	-
$\alpha$ -parvina	-	-	0.88	-	-

<sup>a</sup> Constante determinada a través del método de ajuste cinético. ND: No determinada.

Del estudio más exhaustivo de los péptidos por SPR se determinó una constante de afinidad para el péptido modelo **43** de 9.99 mM que se tomó como referencia. Además, los experimentos de SPR permitieron demostrar que el compuesto Cpd22 interacciona de forma directa con ILK con una constante de afinidad de 59 mM.

Los péptidos **49** y **50** que no dieron una señal significativa en SPR presentaban una disminución de  $\Delta G$  calculada con respecto a **43**, -9.56 y -10.03 Kcal/mol respectivamente frente a -11.23 kcal/mol, aunque esta tendencia no se cumplió para **45** cuyo valor (-11.95 kcal/mol) aumenta ligeramente respecto al péptido de referencia **43**.

Entre los derivados del scan se encontraron dos péptidos, **46** y **47**, con una afinidad muy superior al Cpd22 y al péptido **43** que, presentan constantes de afinidad del orden micromolar. En este caso si se correlacionó el aumento de afinidad de **47** ( $K_D = 8.76 \mu M$ ) con el valor de  $\Delta G$  para el compuesto (-13.8 kcal/mol). Sorprendentemente, el compuesto **46** ( $K_D = 2.06 \mu M$ ), cuya

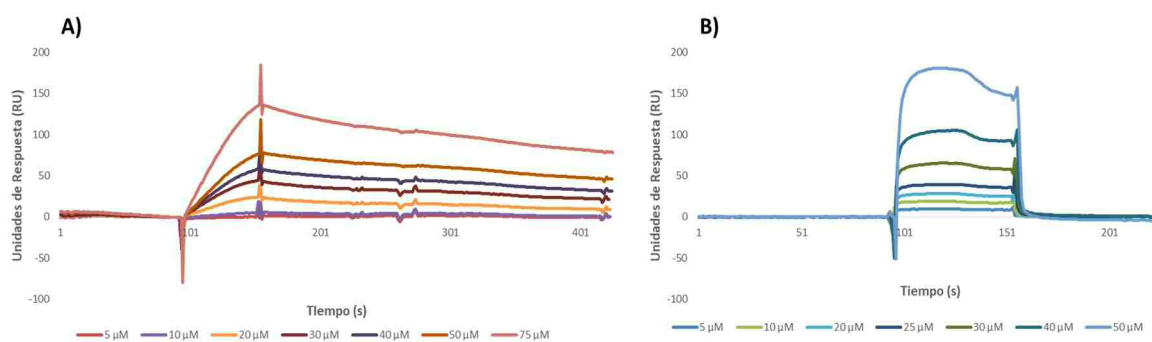
predicción de energía libre de unión era peor (-10.03 kcal/mol), fue el compuesto que presentó mayor afinidad.

Si bien, los valores de  $K_D$  no alcanzan el rango nanomolar con el que es capaz de unirse la  $\alpha$ -parvina, para los compuestos más potentes, son unos valores realmente bajos para un sistema sencillo como es un heptapéptido.

Con respecto a los péptidos truncados, se pudo comprobar que la delección del residuo  $n = 7$  (His) conduce a una mejora en la afinidad de **51** respecto a **43** de casi 9 veces ( $K_D = 0.12$  M), lo cual está de acuerdo con su valor de energía libre calculado (-12.18 Kcal/mol). Por otro lado, cuando se truncó la leucina de la posición  $n = 6$  (**52**) se perdió la unión a ILK, hecho que también se ve reflejado en el valor calculado de energía libre que cae hasta -10.2 Kcal/mol respecto a **51**.

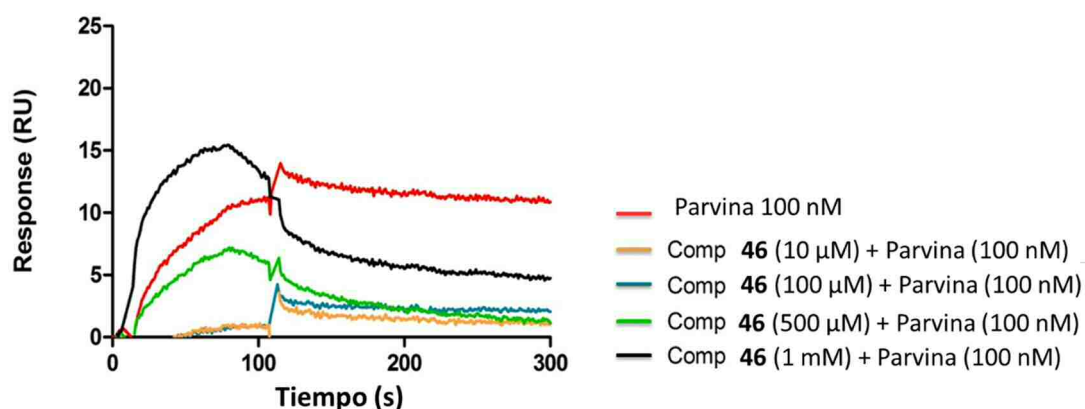
Del estudio de los sensogramas también se detectó que los péptidos **44** y **48**, pese a no ser de los más potentes presentaban una cinética de asociación lenta y una velocidad de disociación todavía más lenta, especialmente **48** (Figura 75). Este hecho podría tener mucha relevancia desde el punto de vista biológico, ya que el tiempo de residencia del péptido en el sitio de unión es mayor y puede ser interesante para el marcaje de la proteína o conseguir un mayor efecto.

En general, se pudo comprobar que las tendencias observadas en el modelo computacional de  $\Delta G$  calculada con la función HYDE se cumplían con todos los péptidos salvo **45** y **46**, y aunque no permite hacer estimaciones cuantitativas, si permite una predicción cualitativa del comportamiento de los péptidos.



**Figura 75.** Comparación de sensogramas de los compuestos A) **48** (cinética de disociación lenta) y B) Cpd22 (cinética de disociación rápida).

Finalmente, y dado los resultados tan prometedores que se obtuvieron de los ensayos de SPR, se optó por intentar realizar un experimento de competición entre el péptido más potente **46** y la  $\alpha$ -parvina.



**Figura 76.** Sensograma del ensayo de competición entre  $\alpha$ -parvina y el péptido **46**.

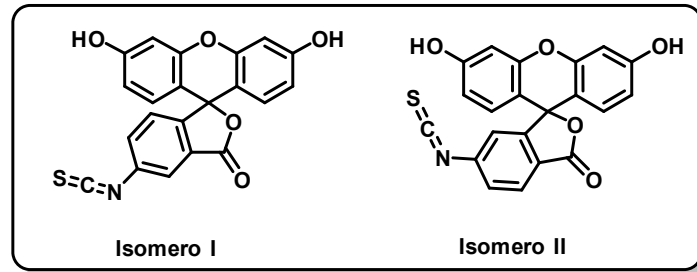
Los resultados de este ensayo mostraron que **46** no era capaz de inhibir completamente la unión de la  $\alpha$ -parvina a la ILK, debido a la altísima afinidad que la  $\alpha$ -parvina ( $K_D = 88$  nM) tiene por la ILK. No obstante, se pudo comprobar que **46** era capaz de modular la interacción ILK-  $\alpha$ -parvina y disminuirla, ya sea por unión al sitio ortostérico o por algún tipo de modulación alostérica de la ILK. De este modo, se pudo concluir que el compuesto no es capaz de disrumpir totalmente la interacción proteína-proteína pero sí es capaz de modularla.

### 5.3.3.3 Síntesis y evaluación de derivados fluorescentes

Dado que los resultados obtenidos con la serie de heptapéptidos fueron bastante prometedores, se planteó la posibilidad de ensayarlos a nivel celular para comprobar si exhibían alguna actividad en un modelo más complejo. Los péptidos, sin embargo, no son fácilmente absorbidos por la célula cuando se presentan un gran tamaño a no ser que induzcan algún tipo de transporte activo como endocitosis o puedan ser reconocidos por algún tipo de transportador específico.

Por esta razón, se tomó la decisión de hacer un marcaje fluorescente de los péptidos para monitorizar su posible presencia en el interior celular. Además, dado que se consiguieron algunos candidatos con una alta afinidad por la ILK o con parámetros cinéticos lentos interesantes, estos podrían servir como sondas fluorescentes de localización o marcaje celular.

Para llevar a cabo la síntesis de las sondas fluorescentes se seleccionó como cromóforo la fluoresceína, por ser una de las más empleadas en este tipo de ensayos y encontrarse comercialmente en forma de isotiocianato de fluoresceína (FITC), muy reactivo y de fácil conjugación.



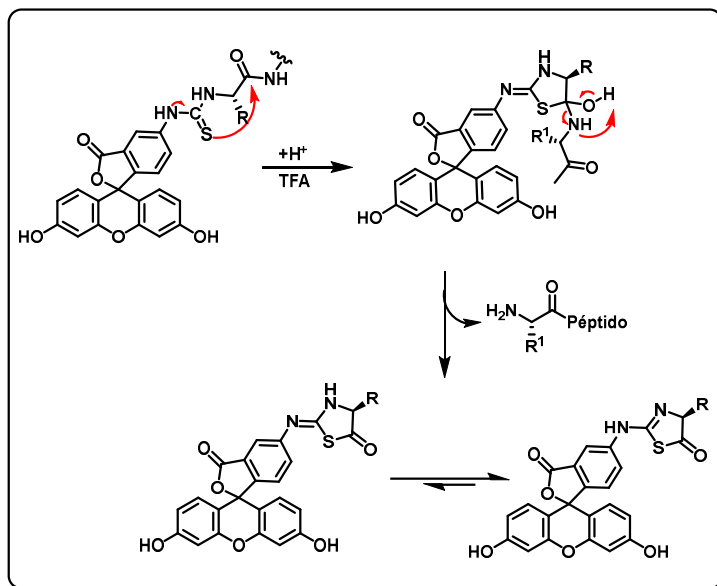
**Figura 77.** Isómeros comerciales de FITC.

En agua, su máximo de absorción corresponde a los 494 nm (azul), mientras que el máximo de emisión se encuentra a 518 nm (verde), que es la longitud de onda que se detecta en los ensayos de microscopía confocal.<sup>265</sup> Gracias al grupo isotiocianato, este marcador es fácilmente conjugable con aquellas moléculas portadoras de restos amino libres y se ha utilizado con éxito en el marcaje de proteínas, lípidos o anticuerpos entre otros.<sup>266</sup> Para su uso en el marcaje de péptidos sintetizados en fase sólida mediante la estrategia Fmoc/tBu es necesario introducir en la cadena peptídica un espaciador. Esto se hace porque durante el desanclaje en condiciones

<sup>265</sup> Johnson, M. *Materials and Methods* **2020**.

<sup>266</sup> Kempf, A.; Tews, B.; Arzt, M. E.; Weinmann, O.; Obermair, F. J.; Pernet, V.; Zagrebelsky, M.; Delekate, A.; Iobbi, C.; Zemmar, A.; Ristic, Z.; Gullo, M.; Spies, P.; Dodd, D.; Gyax, D.; Korte, M.; Schwab, M. E. *PLoS Biol.* **2014**, *1*, e1001763.

ácidas puede tener lugar la ciclación por parte del átomo de azufre del grupo tiourea hacia el aminoácido precedente en la cadena peptídica, liberando una tihidantoína unida al fluoróforo y un péptido con un aminoácido menos.<sup>267</sup>

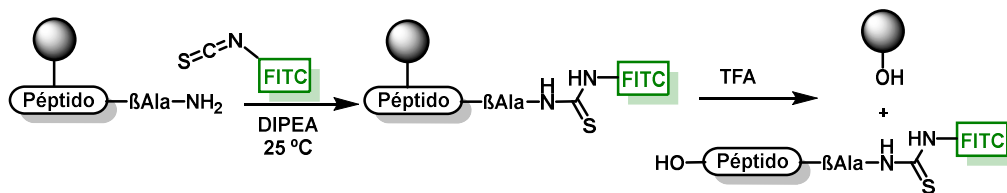


**Figura 78.** Mecanismo propuesto para la formación del aducto de tihidantoína durante el desanclaje de péptidos marcados con FITC.

Se propuso conjugar el compuesto **46** con el fluoróforo por ser el más potente en los ensayos de SPR y, también, los compuestos **44** y **48** por presentar las cinéticas de disociación más lentas, lo que los convertiría potencialmente en excelentes sondas fluorescentes para el marcaje de la ILK. Como espaciador de la cadena se seleccionó el aminoácido  $\beta$ -Ala, ya que al presentar un carbono adicional al de la posición en alfa del aminoácido imposibilita la formación de una hidantoína durante la hidrólisis. A continuación, se pasó a sintetizar la cadena peptídica de forma manual y en condiciones estándar empleando los agentes de acoplamiento HATU y PyAOP según el tipo de secuencia y en base a los resultados anteriormente descritos. Una vez se preparó la cadena peptídica en la resina se incorporó el monómero de Fmoc- $\beta$ Ala-OH. Tras la desprotección del grupo Fmoc, se pudo observar al realizar el test de Kaiser que las perlas y el sobrenadante adquirirían un color negro en lugar de azul, no obstante, fue indicativo de la presencia de aminas libres. Seguidamente se pasó a hacer las pruebas de acoplamiento de FITC, protegiendo todas ellas del contacto directo con la luz.

<sup>267</sup> Jullian, M.; Hernandez, A.; Maurras, A.; Puget, K.; Amblard, M.; Martinez, J.; Subra, G. *Tetrahedron Letters* **2009**, 3, 260-263.

**Tabla 22.** Resultados de las pruebas de conjugación y desanclaje de péptidos conjugados con FITC.



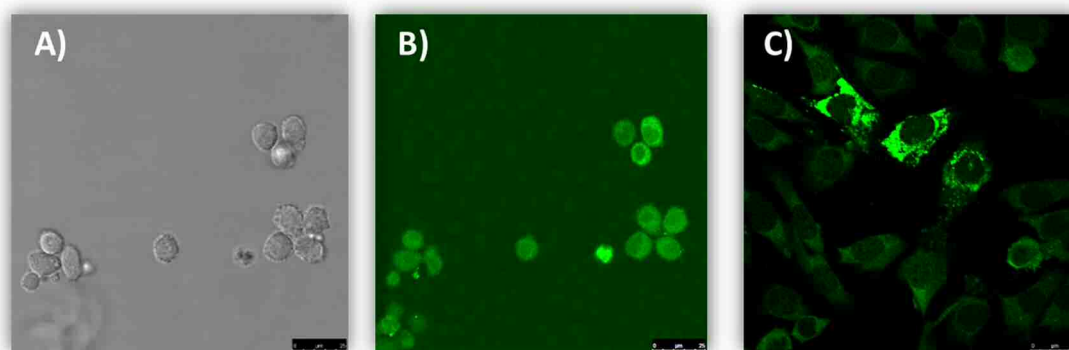
Entrada	Compuesto	Secuencia	FITC (equiv)	DIPEA (equiv)	Tiempo (h)	Rto (%)	Pureza (%)
1	<b>57</b>	GYFVALH	1.2	1.2	2	-	-
2	<b>57</b>	GYFVALH	2	2.2	3	trazas	--
3	<b>57</b>	GYFVALH	2	2.2	15	90	96
4	<b>58</b>	AYFVPLH	2	2.2	15	89	100
5	<b>59</b>	GYAVPLH	2	2.2	15	81	83

En un primer intento y empleando 1.2 equivalentes de DIPEA y de FITC durante 2 h de reacción, el seguimiento de la reacción a través del test de Kaiser reveló que no había tenido lugar reacción alguna, hecho que se confirmó por análisis HPLC-MS. Aumentando el tiempo de reacción a 3 horas se consiguió detectar trazas del compuesto final por lo que se optó por dejar la reacción toda la noche a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se observó un cambio de color en la resina a naranja intenso y, además, el test de Kaiser dio negativo por lo que se desancló el péptido a continuación. De este modo, y con un excelente rendimiento y pureza se pudo aislar el compuesto final **57**. En el análisis mediante HPLC-MS del compuesto se pudo comprobar que existían trazas del compuesto sin desproteger el grupo *tert*-butilo de la Tyr por lo que se decidió aumentar el tiempo de desanclaje en el resto de los derivados hasta 4 h. La presencia de este compuesto puede explicarse porque durante la elongación de la cadena peptídica se pudo observar una disminución en el grado de hinchamiento de la resina. Este hecho compromete la reactividad de los péptidos al quedar atrapados en la matriz polimérica. Utilizando el mismo protocolo de conjugación de FITC (entradas 4 y 5, Tabla 22) que se aplicó para **57** y ampliando el tiempo de desanclaje hasta las 4 h, pudieron obtenerse los productos **58** y **59**. Si bien **58** se obtuvo con una excelente pureza, no ocurrió lo mismo con **56**. En este caso, se detectaron una vez más productos de desprotección incompleta de grupos *tert*-butilo (8%) y una pequeña cantidad de péptido no conjugado (5%).



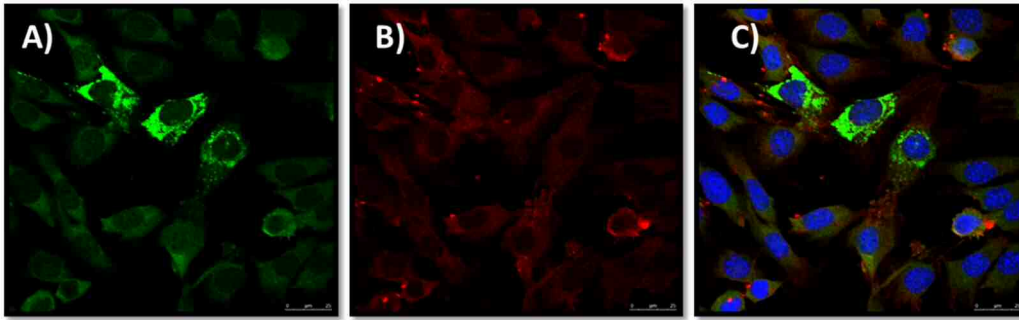
### 5.3.3.3.1 Estudios de internalización celular

Una vez preparados los conjugados, se procedió a hacer los ensayos de internalización sobre la línea CMH. Estos ensayos se hicieron en la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá bajo la supervisión del Dr. Diego Rodríguez Puyol. Inicialmente, se utilizó una concentración de 50  $\mu\text{M}$  para ensayar los compuestos, aunque se comprobó que **57** mostraba cierta toxicidad al cabo de 1 h por lo que se decidió bajar su concentración a 25  $\mu\text{M}$ .



**Figura 79.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal del ensayo de internalización celular con **57** (25  $\mu\text{M}$ ) al cabo de 30 min. A) y B) corresponden a un mismo cuadrante de la preparación mientras que C) corresponde a otra zona ampliada para observar su distribución celular.

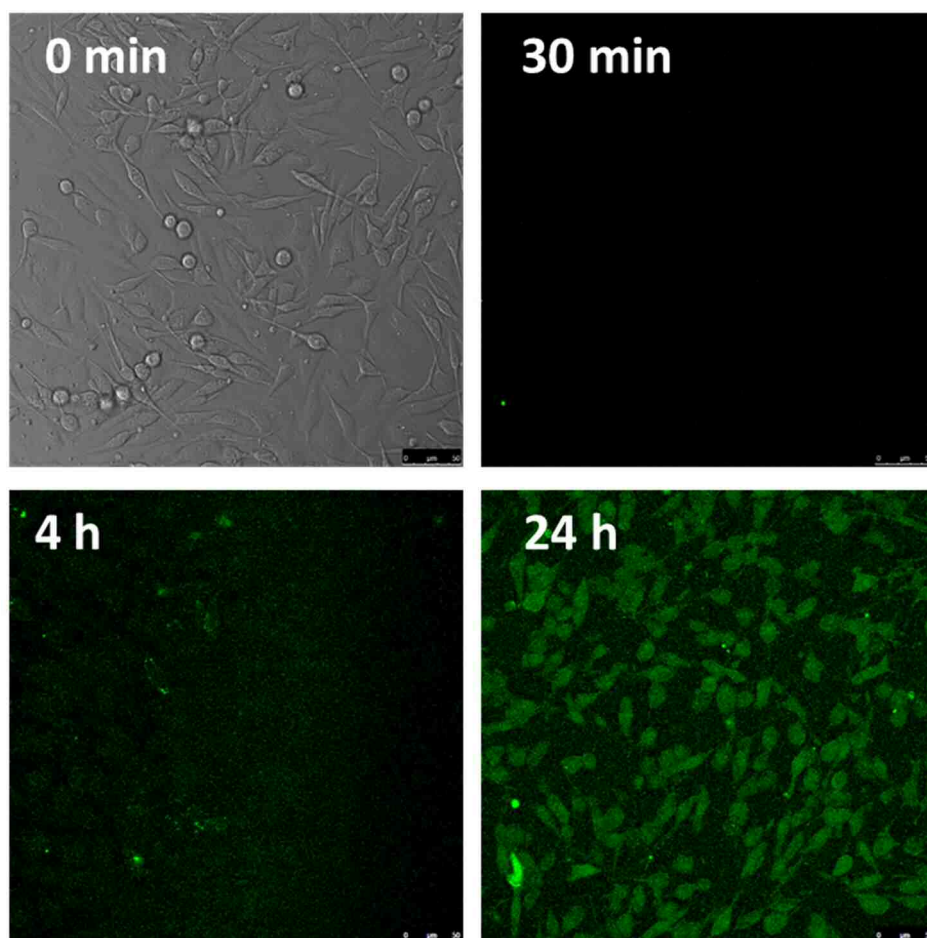
Al cabo de 30 minutos de exposición con **57**, se pudo observar que el péptido se había internalizado en la célula, distribuyéndose en el citoplasma celular. Con este experimento se confirma que el péptido tenía capacidad de entrar a la célula sin necesidad de algún tipo de permeabilización. Además, experimentos preliminares de co-localización celular empleando un anticuerpo monoclonal fluorescente de la ILK permitieron comprobar que el péptido tenía tendencia a marcar aquellas zonas donde se encontrase la ILK. Actualmente se están llevando a cabo más ensayos, supervisados por el Dr. Rodríguez Puyol, para corroborar este comportamiento (Figura 80).



**Figura 80.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal del ensayo de co-localización celular de ILK. A) Células marcadas con el péptido **57**, B) Células del mismo campo marcadas con un anticuerpo anti-ILK, C) Superposición de ambas imágenes.

También se ensayaron los compuestos **58** y **59**, y estos mostraron un comportamiento diferente. Al cabo de 30 y 60 min, no se detectó fluorescencia con ninguno de los dos péptidos a 25  $\mu$ M por lo que se decidió doblar la concentración, aun así, se consiguieron resultados infructuosos. En vista de estos resultados, se optó por incubar las células con los péptidos durante 24 h y, transcurrido este tiempo si se pudo observar una ligera de fluorescencia.

Se planteó la posibilidad de que estos dos conjugados se internalizasen de forma más lenta en la célula y que, en consecuencia, fuesen degradados en el medio extracelular por la acción de proteasas de membrana inespecíficas. Por esta razón se planteó un experimento incorporando hormona adrenocorticotropa comercial (Synacthen®) en el medio de cultivo por tratarse de un péptido por el que las proteasas de las células renales presentan gran afinidad. De este modo se evitaría, al menos, parcialmente, la hidrólisis y degradación de la sonda fluorescente en el medio extracelular.



**Figura 81.** Imágenes de microscopía confocal del ensayo de internalización celular del compuesto **59**.

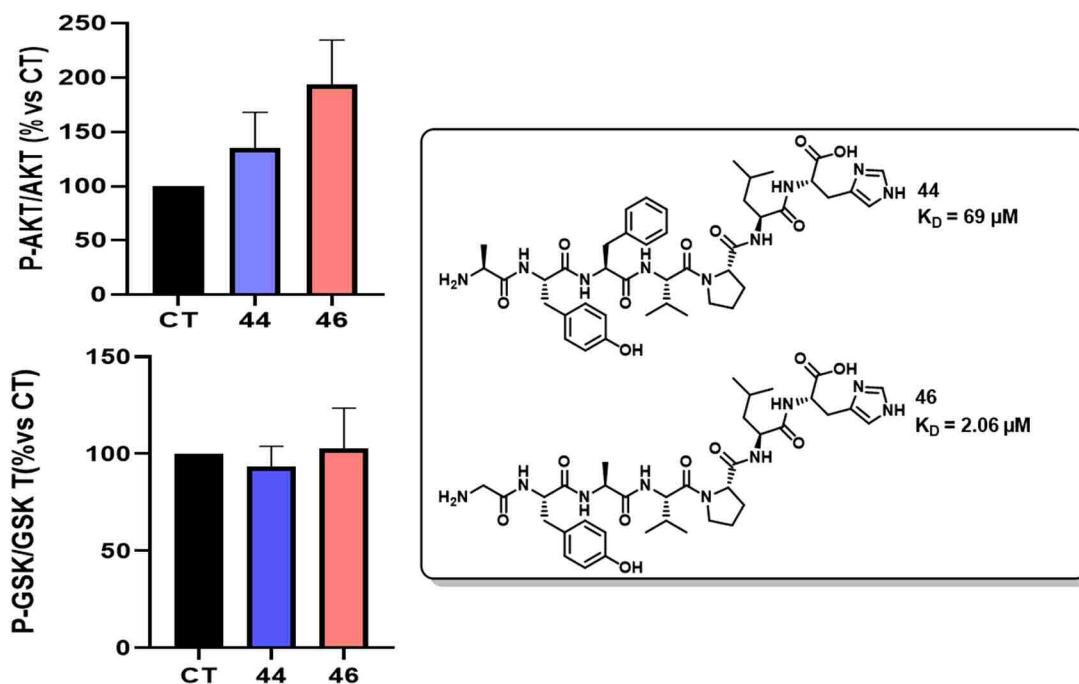
Tal y como se recoge en la Figura 81, se pudo comprobar que el compuesto **59** podía ser internalizado por la célula después de 24 h, con resultados análogos para **58**. De este modo, se confirmó que la internalización de **58** y **59** es mucho más lenta que la de **57**. Estos resultados demuestran no sólo la cinética de internalización lenta, sino que la absorción de estos heptapéptidos por la célula es muy dependiente de su secuencia. Por otro lado, también se observó que esta internalización dependía en gran medida del estado en el que se encontrasen las células. Así, se comprobó que aquellas líneas celulares con un mayor número de pases o “más viejas” internalizaban mucho peor estos dos derivados, hecho que también parece avalar su transporte de forma activa por parte de la célula.

#### 5.3.3.4 Estudios de actividad

Dado que los resultados con las sondas fluorescentes parecieron indicar que los péptidos eran capaces de entrar al interior celular, se decidió probar en ensayos fenotípicos al igual que se hizo con los de la serie de tripéptidos. Estos ensayos se realizaron con el compuesto **46** por ser el más

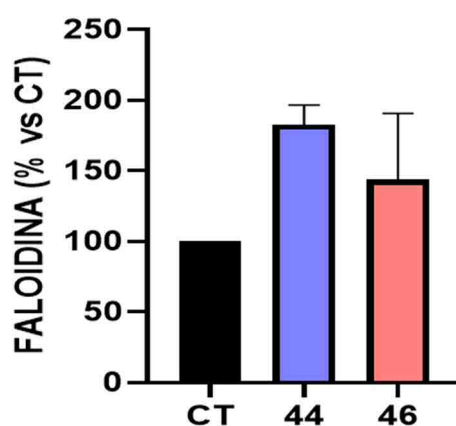
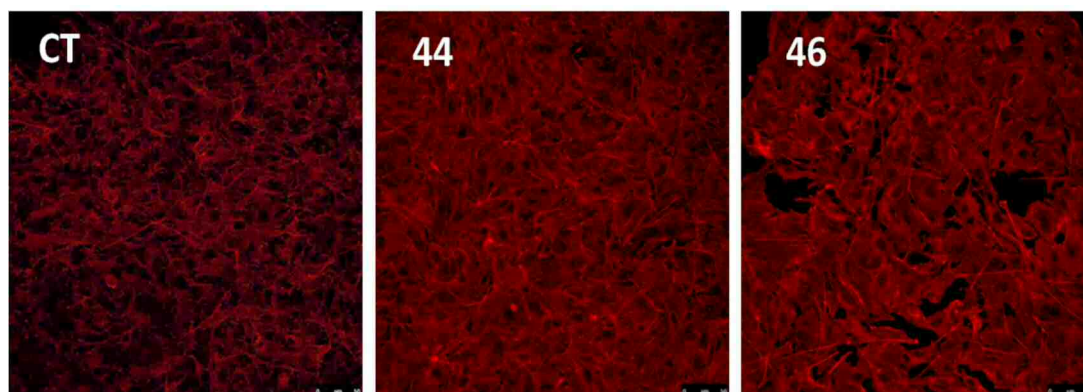
afín por la ILK en los ensayos de SPR y con el compuesto **44** por presentar una cinética de asociación/disociación lenta y una constante de afinidad superior a la de **48** por ILK.

Inicialmente se optó por medir la capacidad quinasa de la ILK sobre Akt y GSK-3 $\beta$  al cabo de 1 hora de tratamiento con los péptidos dado que, probablemente, al igual que sus análogos fluorescentes, podrían entrar lentamente en la célula.



**Figura 82.** Resultados de los ensayos de fosforilación de **44** y **46** (25  $\mu\text{M}$ ) sobre CMH al cabo de 1 h. Se muestra el análisis densitométrico  $\pm$  error para Akt (arriba) y GSK-3 $\beta$  (abajo) junto con el análisis densitométrico  $\pm$  error de 4 repeticiones.

Estos primeros ensayos revelaron que, a pesar de observarse aumentos en la fosforilación de Akt, GSK-3 $\beta$  permanecía sin cambios significativos, de tal modo que se concluyó que estos compuestos no alteraban la función quinasa de la ILK que controla la fosforilación de ambas proteínas. A continuación, se pasaron a hacer los ensayos de actividad faloidina para comprobar si **44** y **46** eran capaces de modular la polimerización de actina a nivel celular.



**Figura 83.** Resultados del efecto de los péptidos (25  $\mu$ M) en la polimerización de actina de CMH al cabo de 4 repeticiones. Arriba se muestra una fotografía representativa de la microscopía confocal y abajo el análisis densitométrico  $\pm$  error para los compuestos **44** y **46**.

Este análisis permitió comprobar cómo ambos compuestos eran capaces de inducir un aumento en el grado de polimerización de la actina, presumiblemente por su acción sobre la ILK. Además, el compuesto **44** mostró un efecto todavía más acusado que **46** a pesar de presentar una menor constante de afinidad tras el estudio de SPR. El compuesto **44** fue capaz de prácticamente duplicar la polimerización de actina respecto al control. Además, ambos compuestos presentaron un efecto, en líneas generales, superior al de los tripéptidos.

## 5.4 CONCLUSIONES

---

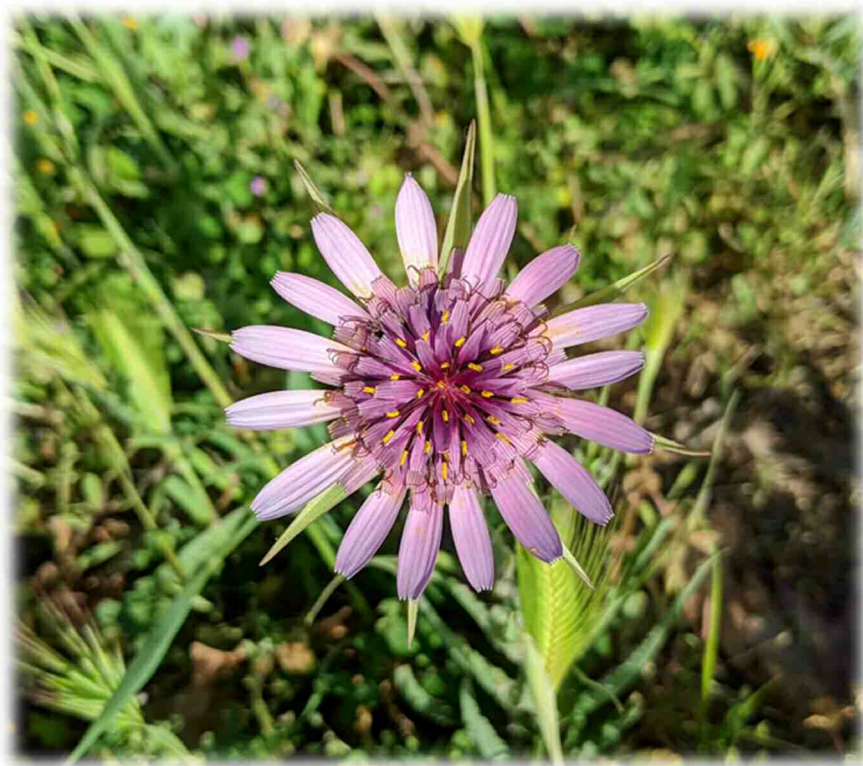


- En el presente capítulo se ha llevado a cabo un estudio de la interfaz de dimerización entre la ILK y la  $\alpha$ -parvina mediante inspección visual y distintas herramientas computacionales que nos han permitido proponer un *hot spot* para esta interacción y un fragmento peptídico mínimo para modular la ILK.
- En base a estos modelos se han diseñado dos familias de péptidos como modelos simples de  $\alpha$ -parvina para modular ILK.
- Se ha sintetizado una primera familia de tripéptidos, que son capaces de modular la actividad de ensamblaje de la ILK, tanto por activación como por inactivación, sin afectar a su actividad quinasa.
- El péptido **38**, además, ha mostrado tener capacidad inhibitoria de esta actividad y unión directa a la ILK, lo cual ha supuesto identificarle como un primer *hit* para el desarrollo de nuevos compuestos con mejor perfil.
- Se ha sintetizado una familia de heptapéptidos basados en  $\alpha$ -parvina cuyo escaneo de alanina ha permitido identificar las posiciones esenciales y, además, obtener un análogo de alta afinidad **46** y otro de cinética de asociación-disociación muy lenta **48**.
- Se han preparado los conjugados fluorescentes **57-59** que, además de ser absorbidos por la célula, han demostrado que su internalización es dependiente de secuencia.
- Los péptidos **44** y **46** actúan sobre la ILK, promoviendo la polimerización de actina de forma muy potente y en base a los resultados de los estudios con **46**, probablemente modulando su interacción con la  $\alpha$ -parvina.



## 5.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES

---





### 5.5.1 Chemistry




All reagents were acquired from the following commercial sources and used without further purifications: Merck, ACROS, Novabiochem, Fluorochem and Alfa Aesar. Solvents were purchased from Scharlab and EtOAc, Hexane and DCM were distilled prior to use. Dry solvents were dried by a MBRAUN MB-SPS-800 device. For those reactions which were carried out under an inert atmosphere, argon or nitrogen were used with oven-dried glassware with magnetic stirring and dry solvents.

#### Kaiser Test

The Kaiser or ninhydrin test for the detection of primary amines was carried out by taking a small amount of dried resin in a small glass tube. To the dried resin were added 2 drops of 5% (w/v) ninhydrin in ethanol, 2 drops of 80% (w/v) phenol in ethanol, and 2 drops of 20  $\mu$ M potassium cyanide (KCN) in pyridine (0.01M). The tube was then heated for a few seconds at  $\sim 120$  °C. The test is used routinely to monitor the presence of free amine after deprotection (dark blue color, positive) and the completeness of the amino acid coupling step (yellow color, negative test).

#### Chloranil Test

The Chloranil test for secondary amine was conducted by taking a small amount of dried resin in a small glass tube. Four drops of 2% p-chloranil (w/v) in toluene were added to the dried resin and next, 10 drops of acetone. The tube was then agitated for few seconds at room temperature. No coloration develops in the beads supporting an Fmoc-protected *peptide*, while dark green coloration was observed after Fmoc removal.

Positive Kaiser Test	Negative Kaiser Test	Positive Chloranil Test
		

### 5.5.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### 5.5.1.1.1 HPLC coupled to High resolution mass spectrometry

<b>Column:</b> Luna C18	
<b>Column temperature</b>	50 °C
<b>Phases</b>	A= Formic acid 0.1% (v/v) B= CH <sub>3</sub> CN with formic acid 0.1% (v/v)
<b>Flow rate</b>	0.4 mL/min
<b>Gradient</b>	10-100% phase B in 20 min and 100%B in 5 min
<b>Injection volume</b>	2 µL
HPLC Dionex UltiMate 3000 device from Thermo Scientific® (equipped with: degasser, binary pump, automatic injector, column oven, UV-VIS diode array detector) coupled to an ORBITRAP Q-EXACTIVE spectrometer with ESI source.	

#### 5.5.1.1.2 Routine HPLC

<b>Column:</b> Luna C18	
<b>Column temperature</b>	50 °C
<b>Phases</b>	A= Formic acid 0.1% (v/v) B= CH <sub>3</sub> CN with formic acid 0.1% (v/v)
<b>Flow rate</b>	1 mL/min
<b>Gradient</b>	10-100% B in 20 min
<b>Injection volume</b>	2 µL
HPLC 1200 Infinity de Agilent Technologies® (equipped with: a degasser, quaternary pump, automatic injector, column oven, UV-VIS diode array detector) coupled to a quadrupole spectrometer with ESI source.	

### 5.5.1.1.3 Semipreparative HPLC

<b>Column:</b> KROMAPHASE C18	
<b>Column temperature</b>	Room temperature
<b>Phases</b>	A= Formic acid 0.1% (v/v) B= CH <sub>3</sub> OH with formic acid 0.1% (v/v)
<b>Flow rate</b>	20 mL/min
<b>Gradient</b>	10-100% B in 20 min
<b>Injection volume</b>	10 mL
HPLC dynamax VARIAN (equipped with two binary pumps, manual injector, UV-VIS detector)	

### 5.5.1.2 General Methods for Solid Phase Peptide Synthesis

All peptides were synthesized using standard Fmoc-based solid phase peptide synthesis (SPPS) procedures on 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 - 1.27 mmol/g) and using commercially available Fmoc-protected amino acids. The synthesis was performed in a 5 mL plastic syringe provided with caps and frit (25  $\mu$ m pore size, Multi Syn Tech GmbH). Reactors were shaken using IKA RW 20 digital mixer at 73 rpm and set horizontally or in a Heidolph Reax 2 overhead shaker. Polypropylene reactors were filtered using a VacMaster multiport vacuum manifold coupled to a water-jet pump.

#### 5.5.1.2.1 Resin Swelling

2-Chlorotrityl chloride resin (100 mg) was placed in a clean, dry plastic syringe with DCM (30 mL/g) and capped. The reactor was shaken with DCM (20 mL/g) for 5 min and then, DCM was removed with the vacuum manifold.

#### 5.5.1.2.2 Initial Resin Loading

Fmoc-aa-OH (1.5 equiv) was dissolved in dry DMF (30 mL/g of resin) and DIPEA (3 equiv) was added. The final solution was mixed with 2-chlorotrityl chloride resin (100 mg). The suspension was shaken for 1.5 h at room temperature. After this, the reaction was quenched with MeOH (0.8 mL/g of resin) and shaken for further 30 min. Then, the mixture was filtered off and subsequently washed with DMF, MeOH, DCM (30 mL/g, 3 x 3 min).

#### 5.5.1.2.3 Fmoc Removal

The Fmoc-aa-resin or Fmoc-peptide-resin (100 mg) of was treated with 20% piperidine in DMF (3 mL) and stirred in a rotational shaker for 30 min at room temperature. Then, the mixture was filtered off and subsequently washed with DMF, MeOH, DCM (30 mL/g, 3 x 3 min). After this, a Kaiser test was done to determine the completion of the reaction (blue, positive).

#### 5.5.1.2.4 Loading Test

Resin loading was verified by measuring the absorbance of the piperidine-dibenzofulvene adduct formed after Fmoc removal of the first supported amino acid. A 100  $\mu$ L aliquot of the Fmoc-cleavage cocktail was taken prior reactor filtration. This was diluted into 10 mL of DCM and then, the absorbance of the mixture at 301 nm was measured by using a UV-Vis spectrophotometer to estimate the level of Fmoc removal, which correlates to the yield of the

anchoring step and to the loading of the new resin. The first residue attachment was estimated from the following equation:

$$\text{Abs}_{301} = \frac{\epsilon}{7800} \times 3000$$

Where Abs is the absorbance at 301 nm, 7800 is the extinction coefficient ( $\epsilon$ ) of the piperidine-divenzofluorene adduct and 3000 is a diluting factor.

#### 5.5.1.2.5 General Resin Elongation (Standard Fmoc/tBu SPPS)

Fmoc-aa-OH (3 equiv) was dissolved in dry DMF (30 mL/g of resin) then, the corresponding coupling agent (3 equiv) and DIPEA (6.5 equiv) were added and the solution stirred for a few seconds. The final solution was mixed with preswelled NH<sub>2</sub>-aa-O-resin or NH<sub>2</sub>-peptide-O-resin in a rotational shaker for 3 h at room temperature.

When reaction was carried out in a Biotage® *Initiator* 2.5 reactor, temperature was set to 65 °C and the stirring velocity to 420 rpm. Mixture was stirred for 25 min with 5 min of pre-stirring.

Then, the mixture was filtered off and subsequently washed with DMF, MeOH, DCM (30 mL/g, 3 x 3 min). Then, a Kaiser test was performed to determine the completion of the reaction (yellow, negative).

#### 5.5.1.2.6 N-Terminus acetylation

Peptide-NH<sub>2</sub> resin was mixed with DCM/acetic anhydride solution (1:1, 30 mL/g of resin) and shaken for 30 min at room temperature. Then, the mixture was filtered off and subsequently washed with DMF, MeOH, DCM (30 mL/g, 3 x 3 min). After this, a Kaiser test was done to determine the completion of the reaction (yellow, negative).

#### 5.5.1.2.7 Resin cleavage and lateral chain deprotection

- A) *N*-acetyl-peptide resin was mixed with a TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O 9:0.5:0.5 solution (3 mL, 30 mL/g of resin) and shaken for 3 h at room temperature. Subsequently, the mixture was filtered, solvents were removed under vacuum and the residue was precipitated in cold ether and sonicated to afford a white solid that was sonicated, centrifuged and washed twice with diethyl ether to yield the final product.
- B) *N*-acetyl-peptide resin was mixed with 4M HCl in 1,4-dioxane/TIPS/MeOH solution 9:0.5:0.5 (30 mL/g of resin) and shaken for 5 h at room temperature. Subsequently, the

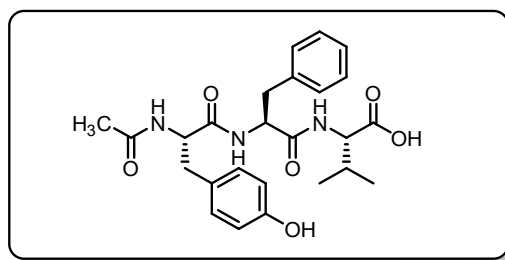
mixture was filtered, solvents were removed under vacuum and the residue was precipitated in diethyl ether to afford a white solid that was sonicated, centrifuged and washed twice with diethyl ether to yield final product.

#### 5.5.1.2.8 Conjugation with FITC

Fluorescein isothiocyanate (FITC) (2 equiv) was dissolved in DMF (30 mL/g of resin) and DIPEA (2 equiv) was added. The solution was added to the reactor with NH<sub>2</sub>-peptide resin and stirred overnight protected from light. Then, the mixture was filtered off and subsequently washed with DMF, MeOH, DCM (30 mL/g, 3 x 3 min).

#### 5.5.1.3 Peptide synthesis

##### 5.5.1.3.1 Ac-Tyr-Phe-Val-OH (**32**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.47 mmol/g), DIC/HOAt or HCTU as coupling agent, and using the general cleavage procedure **A**, **32** was obtained as a white solid (61 mg, 89%) without further purification. Under microwave irradiation the product (59 mg, 86%) was obtained with 90% purity.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.27 – 7.12 (m, 5H, ArH Phe), 6.96 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and Ar-H6 Tyr), 6.63 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and Ar-H5 Tyr), 4.68 (dd,  $J$  = 8.5, 5.7 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe), 4.49 (dd,  $J$  = 9.0, 5.5 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.29 – 4.22 (m, 1H, H $\alpha$  Val), 3.12 (dd,  $J$  = 13.9, 5.5 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 2.95 – 2.86 (m, 2H, CH<sub>2a</sub> Tyr and CH<sub>2b</sub> Phe) 2.66 (dd,  $J$  = 14.1, 9.1 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.12 (m, 1H, CH Val), 1.86 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 0.94 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Val).

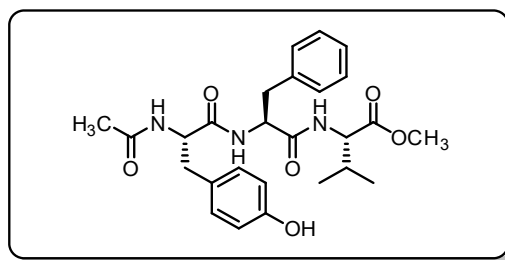
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  174.36 (CO), 173.46 (CO), 173.29 (CO), 173.05 (CO), 157.20 (Ar-C4 Tyr), 138.18 (Ar-C1 Phe), 131.17 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.45 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.37 (Ar-C2 and C6 Phe), 127.70 (Ar-C4 Phe), 126.07 (Ar-C1 Tyr), 116.15 (Ar-C3 and C5 Tyr), 59.08 (C $\alpha$  Val), 56.19 (C $\alpha$  Tyr), 55.64 (C $\alpha$  Phe), 38.86 (CH<sub>2</sub> Phe), 37.91 (CH<sub>2</sub> Tyr), 31.85 (CH Val), 22.40 (CH<sub>3</sub> Ac), 19.56 (CH<sub>3</sub> Val), 18.44 (CH<sub>3</sub> Val).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $C_{25}H_{31}N_3O_6$   $[M+H]^+$ : 470.2223. Found  $[M+H]^+$ : 470.2219.

**M. p.:** 98-99 °C.

**Purity** (214 nm): 100%,  $t_r$  = 11.46 min.

### 5.5.1.3.2 Ac-Tyr-Phe-Val-OCH<sub>3</sub> (**33**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with DIC/HOAt or HCTU as coupling reagent and using the general cleavage procedure **B**, **33** was obtained as a white solid (41 mg, 80%; 45 mg 87% under microwave irradiation). The final product was purified by semipreparative HPLC (3 mg, 6%).

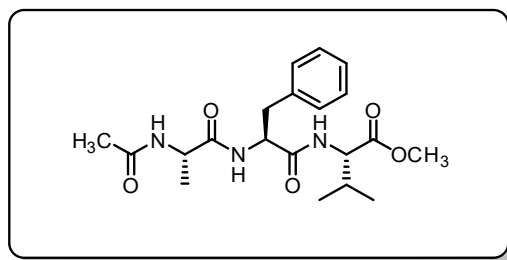
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.33 – 7.15 (m, 5H, ArH Phe), 7.01 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.68 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.66 (dd,  $J$  = 8.3, 6.1 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe), 4.53 (dd,  $J$  = 8.9, 5.6 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.30 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Val), 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.13 (dd,  $J$  = 13.8, 6.1 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 2.95 – 2.86 (m, 2H, CH<sub>2a</sub> Tyr + CH<sub>2b</sub> Phe), 2.66 (dd,  $J$  = 14.1, 8.9 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.18 – 2.05 (m, 1H, CH Val), 1.88 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 0.95 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.93 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  173.44 (CO), 173.29 (CO), 173.16 (CO), 173.06 (CO), 157.25 (Ar-C4 Tyr), 138.13 (Ar-C1 Phe), 131.18 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.46 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.39 (Ar-C2 and C6 Phe), 128.99 (Ar-C1 Tyr), 127.72 (Ar-C4 Phe), 116.17 (Ar-3 and C5 Tyr), 59.31 (C $\alpha$  Val), 56.22 (C $\alpha$  Tyr), 55.64 (C $\alpha$  Phe), 52.47 (OCH<sub>3</sub> Val), 38.90 (CH<sub>2</sub> Phe), 37.90 (CH<sub>2</sub> Tyr), 31.93 (CH Val), 22.39 (CH<sub>3</sub> Ac), 19.42 (CH<sub>3</sub> Val), 18.64 (CH<sub>3</sub> Val).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $C_{26}H_{34}N_3O_6$   $[M+H]^+$ : 484.2442. Found  $[M+H]^+$ : 484.2447.

**M. p.:** 75-77 °C.

**Purity** (214 nm): 97.5%,  $t_r$  = 12.714 min.

5.5.1.3.3 Ac-Ala-Phe-Val-OCH<sub>3</sub> (**34**)

As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HCTU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B** under microwave irradiation, **34** was obtained as a white solid (23 mg, 46% crude yield). The product was purified by semipreparative HPLC (5 mg, 10%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.34 – 7.09 (m, 5H, ArH Phe), 4.68 (dd,  $J$  = 8.3, 6.1 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe), 4.30 (m, 2H, H $\alpha$  Val and Ala), 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 3.16 (dd,  $J$  = 13.9, 6.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Phe), 2.96 (dd,  $J$  = 13.9, 8.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Phe), 2.13 (dd,  $J$  = 13.3, 6.8 Hz, 2H, CH Val), 1.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac), 1.25 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 0.94 (dd,  $J$  = 6.8, 3.5 Hz, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Val).

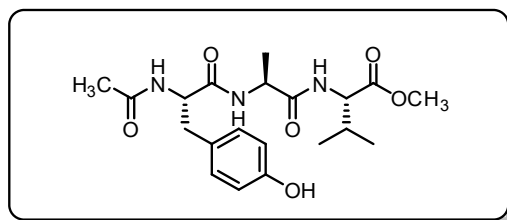
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  174.84 (CO), 173.45 (CO), 173.17 (CO), 172.86 (CO), 138.17 (Ar-C4 Phe), 130.43 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.39 (Ar-C2 and C6 Phe), 127.72 (Ar-C1 Phe), 59.33 (C $\alpha$  Val), 55.58 (C $\alpha$  Phe), 52.46 (C $\alpha$  Ala), 50.44 (OCH<sub>3</sub>), 38.61 (CH<sub>2</sub> Tyr), 31.90 (CH Val), 22.38 (CH<sub>3</sub> Ac), 19.41 (CH<sub>3</sub> Val), 18.59 (CH<sub>3</sub> Val), 17.72 (CH<sub>3</sub> Ala).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 391.2172. Found [M+H]<sup>+</sup>: 391.218.

**M. p.:** 86-88 °C.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 11.961 min.



5.5.1.3.4 Ac-Tyr-Ala-Val-OCH<sub>3</sub> (**35**)

As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HCTU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B** under microwave irradiation, **35** was obtained as a white solid (31 mg, 77% crude yield). The product was purified by semi-preparative HPLC (2.5 mg, 6%).

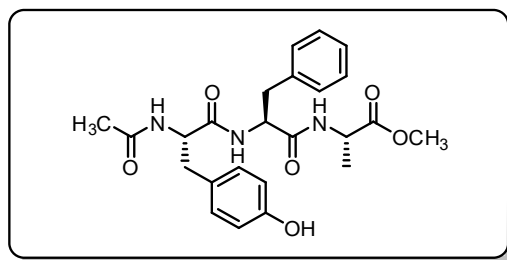
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.56 (dd, *J* = 9.2, 5.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H $\alpha$  Ala), 4.12 (ddd, *J* = 17.7, 11.4, 5.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Val), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.05 (dd, *J* = 14.1, 5.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Tyr), 2.78 (dd, *J* = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Tyr), 2.16 (qd, *J* = 12.9, 6.9 Hz, 1H, CH Val), 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac), 1.36 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.01 – 0.96 (m, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 174.91 (CO), 173.60 (CO), 173.43 (CO), 173.20 (CO), 157.28 (Ar-C4 Tyr), 131.25 (Ar-C4 and C6 Tyr), 129.03 (Ar-C1 Tyr), 116.16 (Ar-C3 and C5 Tyr), 59.24 (C $\alpha$  Val), 56.22 (C $\alpha$  Tyr), 52.46 (C $\alpha$  Ala), 50.14 (OCH<sub>3</sub>), 38.08 (CH<sub>2</sub> Tyr), 30.75 (CH Val), 22.37 (CH<sub>3</sub> Ac), 19.47 (CH<sub>3</sub> Val), 18.55 (CH<sub>3</sub> Val), 18.05 (CH<sub>3</sub> Ala).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 408.2129. Found [M+H]<sup>+</sup>: 408.2128.

**M. p.:** 84-86 °C.

**Purity** (214 nm): 100 %, *t<sub>r</sub>* = 9.599 min.

5.5.1.3.5 Ac-Tyr-Phe-Ala-OCH<sub>3</sub> (**36**)

As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HCTU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B** under microwave irradiation, **36** was obtained as a white solid (33 mg, 82%, crude yield). The product was purified by semipreparative HPLC (2.5 mg, 6%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.34 – 7.16 (m, 5H, ArH Phe), 7.00 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, Ar-H2 an H6 Tyr), 6.68 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.62 (dd,  $J$  = 8.5, 5.6 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe), 4.49 (dd,  $J$  = 8.8, 6.0 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.39 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Ala), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.17 (dd,  $J$  = 13.9, 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 2.97 – 2.86 (m, 2H, CH<sub>2b</sub> Phe and CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.71 (dd,  $J$  = 14.0, 8.8 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 1.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac), 1.39 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Ala).

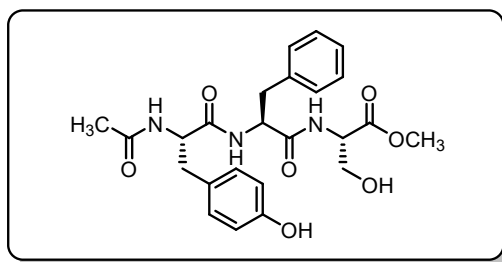
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  174.30 (CO), 173.43 (CO), 173.15 (CO), 172.86 (CO), 157.28 (Ar-C4 Tyr), 138.23 (Ar-C1 Phe), 131.17 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.50 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.38 (Ar-C2 and C6 Phe), 128.98 (Ar-C1 Tyr), 127.70 (Ar-C4 Phe), 116.17 (Ar-C3 and C5 Tyr), 56.42 (C $\alpha$  Tyr), 55.48 (C $\alpha$  Phe), 52.75 (C $\alpha$  Ala), 49.49 (OCH<sub>3</sub> overlapped with CH<sub>3</sub>OH), 39.15 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.13 (CH<sub>2</sub> Tyr), 22.39 (CH<sub>3</sub> Ac), 17.42 (CH<sub>3</sub> Ala).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 456.2129. Found [M+H]<sup>+</sup>: 456.2098.

**M. p.:** 83-85 °C.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 10.742 min.

5.5.1.3.6 Ac-Tyr-Phe-Ser-OCH<sub>3</sub> (**37**)

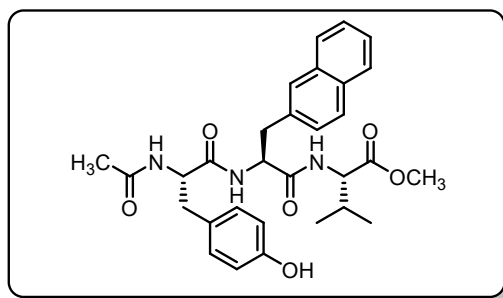


As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.33 mmol/g), with HCTU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B** under microwave irradiation, **37** was obtained as a white solid (31 mg, 68%, crude yield). The product was purified by semipreparative HPLC (0.9 mg, 2%).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 472.2078. Found [M+H]<sup>+</sup>: 472.2082.

**M. p.:** 83-85 °C.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 9.71 min.

5.5.1.3.7 Ac-Tyr-2-Nal-Val-OCH<sub>3</sub> (**38**)

As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B**, under microwave irradiation (repeating Fmoc-Nal-OH and Fmoc-Tyr-OH coupling after the first cycle), **38** was obtained as a white solid (23 mg, 46%, crude yield). The product was purified by semipreparative HPLC (4 mg, 6%).

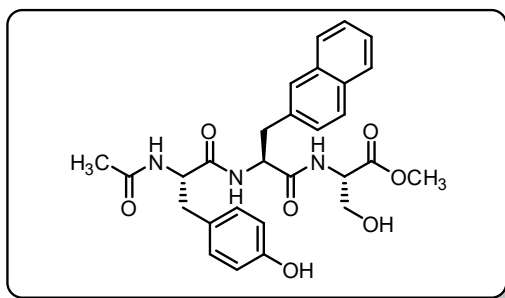
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.82 – 7.77 (m, 3H, ArH Nal), 7.68 (s, 1H, Ar-H1 Nal), 7.48 – 7.41 (m, 2H, ArH Nal), 7.39 (dd,  $J$  = 8.4, 1.8 Hz, 1H, ArH Nal), 6.98 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, Ar-2 and H6 Tyr), 6.66 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, Ar-H3 and H5), 4.81 (dd,  $J$  = 11.6, 9.9 Hz, 1H, H $\alpha$  Nal), 4.53 (dd,  $J$  = 8.8, 5.7 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.29 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Val), 3.51 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.28 (dd,  $J$  = 13.8, 6.4 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Nal), 3.10 (dd,  $J$  = 13.8, 8.1 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Nal), 2.94 (dd,  $J$  = 14.1, 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.69 (dd,  $J$  = 14.1, 8.8 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.09 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, CH Val), 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac), 0.96 – 0.90 (m, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  173.41 (CO), 173.35 (CO), 173.15 (CO), 173.06 (CO), 157.23 (Ar-C4 Tyr), 137.29 (ArC Nal), 134.96 (ArC Nal), 131.18 (Ar-C5 and C8 Nal), 130.34 (Ar-C6 and C7 Nal), 130.02 (Ar-C2 and C6 Tyr), 128.99 (Ar-C1 Nal), 128.01 (Ar-C1 Tyr), 116.16 (Ar-C3 and C5 Tyr), 59.30 (C $\alpha$  Val), 56.24 (C $\alpha$  Nal), 55.71 (C $\alpha$  Tyr), 52.45 (OCH<sub>3</sub>), 38.49 (CH<sub>2</sub> Nal), 37.88 (CH<sub>2</sub> Tyr), 31.93 (CH Val), 22.38 (CH<sub>3</sub> Ac), 19.42 (CH<sub>3</sub> Val), 18.64 (CH<sub>3</sub> Val). (Three ArC of Nal were not observed in <sup>13</sup>C-NMR).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 534.2599. Found [M+H]<sup>+</sup>: 534.2608.

**M. p.:** 90-92 °C.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 14.595 min.

5.5.1.3.8 Ac-Tyr-Nal-Ser-OCH<sub>3</sub> (**39**)

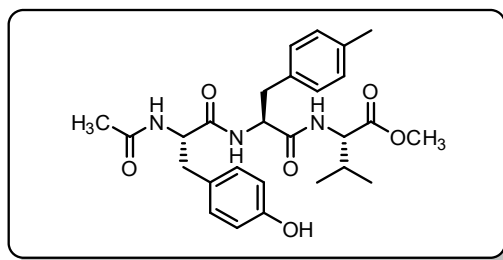
As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B**, under microwave irradiation **39** was obtained as a white solid (31 mg, 62%, crude yield). The product was purified by semipreparative HPLC (1.1 mg, 2%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.83 – 7.79 (m, 3H, Ar-H4, H5 and H8 Nal), 7.71 (d,  $J$  = 0.6 Hz, 1H, Ar-H1 Nal), 7.48 – 7.40 (m, 3H, ArH Nal), 6.94 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.64 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.79 (dd,  $J$  = 12.0, 4.5 Hz, 1H, H $_{\alpha}$  Nal), 4.46 (a t,  $J$  = 4.5 Hz, 1H, H $_{\alpha}$  Ser), 4.46 (dd,  $J$  = 9.1, 5.7 Hz, 1H, H $_{\alpha}$  Tyr), 3.90 (dd,  $J$  = 11.4, 4.8 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Ser), 3.81 (dd,  $J$  = 11.4, 4.2 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Ser), 3.64 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.37 (dd,  $J$  = 13.9, 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Nal, partially overlapped with H<sub>2</sub>O), 3.12 (dd,  $J$  = 13.9, 8.7 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Nal), 2.88 (dd,  $J$  = 14.1, 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.67 (dd,  $J$  = 14.1, 9.1 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr) 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  173.64 (CO), 173.15 (CO), 171.89 (CO), 170.77 (CO), 157.21 (Ar-C4 Tyr), 136.78 (ArC Nal), 133.95 (ArC Nal), 131.09 (Ar-C2 and C6 Tyr), 129.21 (Ar-C1 Tyr), 129.10 (ArC Nal), 129.02 (ArC Nal), 128.95 (ArC Nal), 128.75 (ArC Nal), 128.68 (ArC Nal), 128.59 (ArC Nal), 126.98 (ArC Nal), 126.59 (ArC Nal), 116.15 (Ar-C3 and C5 Tyr), 62.86 (CH<sub>2</sub>OH Ser), 56.53 (CH $_{\alpha}$  Ser), 56.26 (CH $_{\alpha}$  Tyr), 55.66 (CH $_{\alpha}$  Nal), 52.75 (OCH<sub>3</sub>), 38.93 (CH<sub>2</sub> Phe), 37.77 (CH<sub>2</sub> Tyr), 22.25 (CH<sub>3</sub> Ac).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 522.2235. Found [M+H]<sup>+</sup>: 522.2241.

**Purity** (214 nm): 94 %,  $t_r$  = 12.426 min.

5.5.1.3.9 Ac-Tyr-(4-Me)Phe-Val-OCH<sub>3</sub> (40)

As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.47 mmol/g), with HCTU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B**, under microwave irradiation **40** was obtained as a white solid (33 mg, 66%, crude yield).

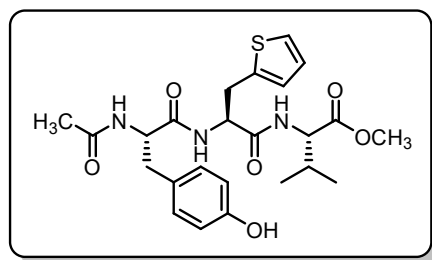
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.09 (q, 4H, Ar-H (4-Me)Phe), 7.00 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.67 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5), 4.81 – 4.63 (m, 1H, H $\alpha$  (4-Me)Phe), 4.52 (dd,  $J$  = 8.9, 5.7 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.33 – 4.25 (m, 1H, H $\alpha$  Val), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.07 (dd,  $J$  = 13.8, 6.1 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> (4-Me)Phe), 2.96 (dd,  $J$  = 14.1, 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.88 (dd,  $J$  = 13.8, 8.2 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> (4-Me)Phe), 2.70 (dd,  $J$  = 14.0, 8.9 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (4-Me)Phe), 2.10 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 1.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac), 0.95 (m, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  173.41 (CO), 173.35 (CO), 173.15 (CO), 173.06 (CO), 157.10 (Ar-C4 Tyr), 137.29 (Ar-C1 (4-Me)Phe), 134.96 (Ar-C4 (4-Me)Phe), 131.18 (Ar-C2 and C6 (4-Me)Phe), 130.34 (Ar-C3 and C5 (4-Me)Phe), 130.02 (Ar-C2 and C6 Tyr), 128.99 (Ar-C1 Tyr), 116.16 (Ar-C3 and C5 Tyr), 59.30 (C $\alpha$  (4-Me)Phe), 56.24 (C $\alpha$  Tyr), 55.71 (C $\alpha$  Val), 52.45 (OCH<sub>3</sub>), 38.49 (CH<sub>2</sub> (4-Me)Phe), 37.88 (CH<sub>2</sub> Tyr), 31.93 (CH Val), 22.38 (CH<sub>3</sub> Ac), 21.11 (CH<sub>3</sub> (4-Me)Phe), 19.42 (CH<sub>3</sub> Val), 18.64 (CH<sub>3</sub> Val).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 498.2599. Found [M+H]<sup>+</sup>: 498.2591.

**M. p.:** 88-90 °C.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 13.795 min.

5.5.1.3.10 Ac-Tyr-Thi-Val-OCH<sub>3</sub> (**41**)

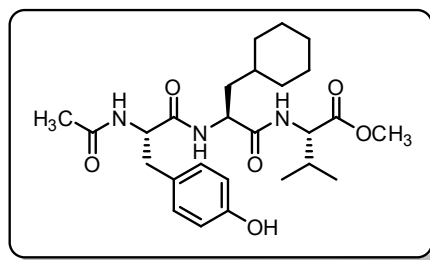
As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.47 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B**, under microwave irradiation (repeating Fmoc-Thi-OH coupling after the first cycle), **41** was obtained as a white solid (39 mg, 79%, crude yield). The product was purified by semipreparative HPLC (0.9 mg, 5%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.22 (d, 1H, Ar-H5 Thi), 7.02 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.92 - 6.89 (m, 2H, Ar-H3 and H4 Thi), 6.68 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.66 (dd,  $J = 7.6$ , 5.8 Hz, 1H, H $\alpha$  Thi), 4.53 (dd,  $J = 8.3$ , 5.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.30 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H, H $\alpha$  Val), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 3.22 - 3.19 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Thi), 2.99 (dd,  $J = 14.0$ , 4.8 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.73 (dd,  $J = 13.9$ , 8.9 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.14 - 2.10 (m, 1H, CH Val), 1.89 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 0.95 (d,  $J = 2.2$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.93 (d,  $J = 2.2$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  173.13 (CO), 172.92 (CO), 173.75 (CO), 173.06 (CO), 157.72 (Ar-C4 Tyr), 139.64 (Ar-C2 Thi), 131.15 (Ar-C2 and C6 Tyr), 128.93 (Ar-C1 Tyr), 127.80 (Ar-C3 Thi), 127.68 (Ar-C4 Thi), 125.36 (Ar-C5 Thi), 116.17 (Ar-C3 and C5 Tyr), 59.32 (C $\alpha$  Val), 56.33 (C $\alpha$  Tyr), 55.65 (C $\alpha$  Thi), 52.53 (OCH<sub>3</sub>), 37.86 (CH<sub>2</sub> Tyr), 32.85 (CH<sub>2</sub> Thi), 31.85 (CH Val), 23.12 (CH<sub>3</sub> Ac), 19.74 (CH<sub>3</sub> Val), 18.60 (CH<sub>3</sub> Val).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 490.2006. Found [M+H]<sup>+</sup>: 490.2011.

**Purity** (214 nm): 67 %,  $t_r = 12.182$  min.

5.5.1.3.11 Ac-Tyr-Cha-Val-OCH<sub>3</sub> (**42**)

As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **B**, under microwave irradiation **42** was obtained as a white solid (43 mg, 88% crude yield). The product was purified by semipreparative HPLC (2 mg, 5%) affording a cream coloured wax.

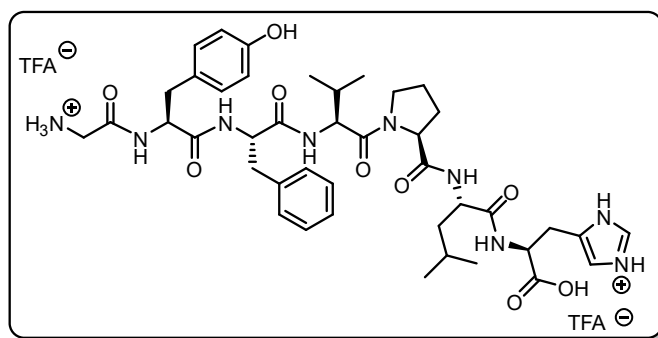
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 7.03 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.56 (m, dd, *J* = 12.0, 4.5 Hz, 1H, H<sub>α</sub>, Tyr), 4.54 – 4.46 (m, 1H, H<sub>α</sub>, Val), 4.30 (dd, *J* = 5.9, 2.5 Hz, 1H, H<sub>α</sub>, Cha), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.04 (dd, *J* = 14.0, 5.5 Hz, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.75 (dd, *J* = 14.0, 8.9 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub>, Tyr), 2.21 – 2.06 (m, 1H, CH Val), 1.72 (dd, *J* = 30.3, 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, Cha), 1.66 – 1.48 (m, 6H, CH<sub>2</sub> axial Cha), 1.39 – 1.12 (m, 5H, CH<sub>2</sub> Equatorial Cha), 0.99 – 0.91 (m, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 174.71 (CO), 174.50 (CO), 173.57 (CO), 173.37 (CO), 157.24 (Ar-C4 Tyr), 131.23 (Ar-C2 and C6 Tyr), 128.99 (Ar-C1 Tyr), 116.16 (Ar-C3 and C5 Tyr), 59.22 (C<sub>α</sub> Cha), 56.13 (C<sub>α</sub> Tyr), 42.48 (C<sub>α</sub> Val), 52.32 (OCH<sub>3</sub>), 38.01 (CH<sub>2</sub> Tyr), 35.17 (CH<sub>2</sub> Cha), 33.64 (CH<sub>2</sub> 2' and 6' Cha), 31.82 (CH Val), 27.56 (CH 1' Cha), 27.36 (CH<sub>2</sub> 3 and 5' Cha), 27.24 (CH<sub>2</sub> 4' Cha), 22.37 (CH<sub>3</sub> Ac), 19.59 (CH<sub>3</sub> Val), 18.65 (CH<sub>3</sub> Val).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 490.2912. Found [M+H]<sup>+</sup>: 490.2905.

**Purity** (214 nm): 72 %, *t<sub>r</sub>* = 11.362 min.



5.5.1.3.12 H<sub>2</sub>N-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (43)

As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.33 mmol/g), with HCTU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **43** was obtained as a white solid (23 mg, 46%).

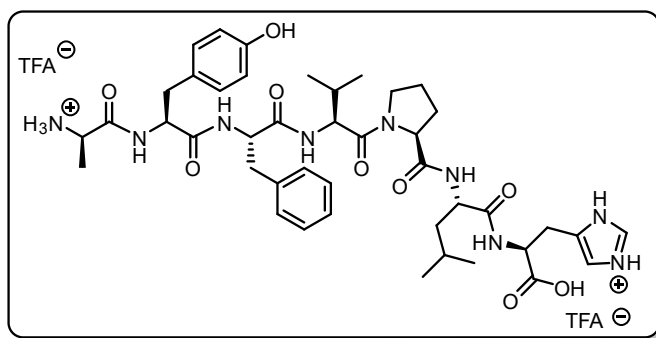
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  8.72 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.35 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.29 – 7.17 (m, 5H, ArH Phe), 7.03 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.68 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.72 (dd,  $J$  = 7.7, 5.0 Hz, 1H, H $\alpha$  His), 4.61 (ap t,  $J$  = 14.1, 7.0 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe), 4.60 (dd,  $J$  = 9.2, 5.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.41 (m, 2H, H $\alpha$  Pro and Val), 4.26 (dd,  $J$  = 9.6, 5.6 Hz, 1H, H $\alpha$  Leu), 3.78 (m, 1H, CH<sub>2a</sub> $\delta$  Pro), 3.70 – 3.66 (m, 1H, CH<sub>2b</sub> $\delta$  Pro overlapped with CH<sub>2a</sub>), 3.63 (dd,  $J$  = 16.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 3.32 – 3.29 (m, 1H, CH<sub>2a</sub> His, overlapped with solvent), 3.16 (dd,  $J$  = 15.3, 7.7 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> His), 3.10 (dd,  $J$  = 14.4, 8.0 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 3.02 (dd,  $J$  = 14.1, 5.2 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.94 (dd,  $J$  = 13.8, 8.0 Hz, 1H CH<sub>2b</sub> Phe), 2.74 (dd,  $J$  = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.20 (dd,  $J$  = 12.1, 7.8 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> $\beta$  Pro), 2.10 – 2.00 (m, 2H, CH Val and CH<sub>2b</sub> $\beta$  Pro overlapped), 2.00 – 1.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\gamma$  Pro), 1.75 (dd,  $J$  = 13.5, 7.4 Hz, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Leu), 1.00 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.97 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Leu), 0.93 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  174.63 (CO), 174.41 (CO), 173.35 (CO), 173.12 (CO), 172.81 (CO), 172.60 (CO), 172.10 (CO), 167.00 (CO TFA), 157.41 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Phe), 134.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.42 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.39 (Ar-C2 and C6 Phe), 128.63 (Ar-C1 Tyr), 127.81 (Ar-C4 Phe), 118.53 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 and C5 Tyr), 61.31 (C $\alpha$  Pro), 57.84 (C $\alpha$  Val), 56.34 (C $\alpha$  Tyr), 55.76 (C $\alpha$  Phe), 53.76 (C $\alpha$  Leu), 53.09 (C $\alpha$  His), 48.76 (CH<sub>2</sub> $\delta$  Pro), 41.53 (C $\alpha$  Gly), 41.35 (CH<sub>2</sub> Leu), 38.83 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.27 (CH<sub>2</sub> Tyr), 32.01 (CH Val), 30.56 (CH<sub>2</sub> $\beta$  Pro), 28.02 (CH<sub>2</sub> His), 25.98 (CH<sub>2</sub> $\gamma$  Pro), 25.76 (CH Leu), 23.39 (CH<sub>3</sub> Leu), 22.05 (CH<sub>3</sub> Leu), 19.70 (CH<sub>3</sub> Val), 19.01 (CH<sub>3</sub> Val).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $C_{42}H_{58}N_9O_9$   $[M+H]^+$ : 832.4352. Found  $[M+H]^+$ : 832.4336.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 7.285 min.

#### 5.5.1.3.13 $H_2N$ -Ala-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (**44**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.27 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **44** was obtained as a white solid (66 mg, 90%).

**$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ):**  $\delta$  8.71 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.35 (s, 1H, Ar-H5 His), 7.28 – 7.20 (m, 5H, ArH Phe), 7.06 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.69 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.70 (dd,  $J$  = 7.7, 5.0 Hz, 1H,  $H_\alpha$  His), 4.61 (ap t,  $J$  = 14.1, 7.0 Hz, 1H,  $H_\alpha$  Phe), 4.59 (dd,  $J$  = 9.2, 5.5 Hz, 1H,  $H_\alpha$  Tyr), 4.42 (m, 2H,  $H_\alpha$  Pro and Val), 4.27 (dd,  $J$  = 9.6, 5.5 Hz, 1H,  $H_\alpha$  Leu), 3.84 – 3.79 (m, 1H,  $CH_2\delta$  Pro overlapped with q, 1H,  $J$  = 14.2, 7.1 Hz, CH Ala), 3.68 – 3.64 (m, 1H,  $CH_2\delta$  Pro), 3.32 – 3.29 (m, 1H,  $CH_{2a}$  His, overlapped with solvent), 3.16 (dd,  $J$  = 15.3, 7.8 Hz, 1H,  $CH_{2b}$  His), 3.10 (dd,  $J$  = 13.9, 6.3 Hz, 1H,  $CH_{2a}$  Phe), 3.03 (dd,  $J$  = 14.0, 5.4 Hz, 1H,  $CH_{2a}$  Tyr), 2.94 (dd,  $J$  = 13.8, 7.8 Hz, 1H  $CH_{2b}$  Phe), 2.79 (dd,  $J$  = 14.1, 9.2 Hz, 1H,  $CH_{2b}$  Tyr), 2.24 - 2.18 (m, 1H,  $CH_{2a\beta}$  Pro), 2.10 – 1.99 (m, 2H, CH Val and  $CH_{2b\beta}$  Pro overlapped), 1.98 – 1.91 (m, 2H,  $CH_2\gamma$  Pro), 1.81 – 1.73 (m, CH Leu), 1.68 – 1.54 (m, 2H,  $CH_2$  Leu), 1.43 (d,  $J$  = 7.1 Hz,  $CH_3$  Ala), 1.00 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H,  $CH_3$  Val), 0.97 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 6H,  $CH_3$  Leu and  $CH_3$  Val), 0.93 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H,  $CH_3$  Leu).

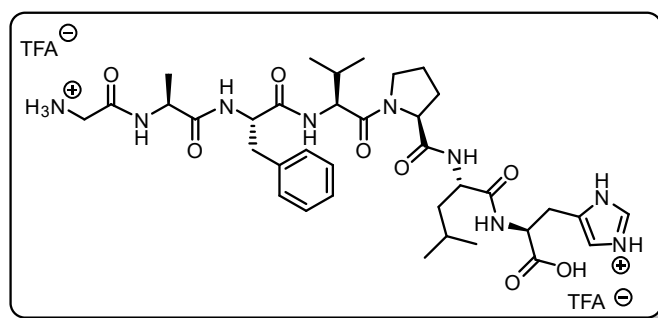
**$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ):** 174.63 (CO), 174.41 (CO), 173.35 (CO), 173.12 (CO), 172.81 (CO), 172.60 (CO), 172.10 (CO), 167.00 (CO TFA), 156.11 (Ar-C4 Tyr)\*, 138.63 (Ar-C1 Phe), 134.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 and C6 Tyr), 131.38 (Ar-C3 and C5 Phe), 130.39 (Ar-C1 Tyr), 129.35 (Ar-C2 and C6 Phe), 127.61 (Ar-C4 Phe)\*, 118.08 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 and C5 Tyr), 61.26 ( $C_\alpha$  Pro), 57.20 ( $C_\alpha$  Val), 56.43 ( $C_\alpha$  Tyr), 55.66 ( $C_\alpha$  Phe), 53.76 ( $C_\alpha$  Leu), 53.09 ( $C_\alpha$  His), 50.03 ( $C_\alpha$  Ala), 49.63 ( $CH_2\delta$  Pro), 41.35 ( $CH_2$  Leu), 38.83 ( $CH_2$  Phe), 38.27 ( $CH_2$  Tyr), 32.01

(CH Val), 30.56 (CH<sub>2</sub>β Pro), 28.22 (CH<sub>2</sub> His), 25.98 (CH<sub>2</sub>γ Pro), 25.76 (CH Leu), 23.39 (CH<sub>3</sub> Leu), 22.05 (CH<sub>3</sub> Leu), 19.70 (CH<sub>3</sub> Val), 19.01 (CH<sub>3</sub> Val), 17.69 (CH<sub>3</sub> Ala). \*Carbon not observed in <sup>13</sup>C-NMR, assigned by gHMBC and gHSQC when possible.

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>43</sub>H<sub>59</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 846.4509. Found [M+H]<sup>+</sup>: 846.4513 and [M+2/2]<sup>+</sup>: 423.7305.

**Purity** (214 nm): 70 %, *t<sub>r</sub>* = 7.207 min.

#### 5.5.1.3.14 H<sub>2</sub>N-Gly-Ala-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (45)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.33 mmol/g), with HATU as coupling agent and using general cleavage procedure **A**, **45** was obtained as a white solid (54 mg, 64%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 8.42 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.30 – 7.22 (m, 6H, 5 x ArH Phe and Ar-H5 His), 4.68 (dd, *J* = 7.9, 6.5 Hz, 1H, H<sub>α</sub> His), 4.61 (ap t, *J* = 14.1, 7.0 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Phe), 4.44 – 4.42 (m, 2H, H<sub>α</sub> Pro and H<sub>α</sub> Val), 4.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Ala), 4.26 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Leu), 3.78 - 3.75 (m, 1H, CH<sub>2a</sub>δ Pro), 3.69 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 3.67 - 3.65 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>δ Pro), 3.28-3.24 (m, 1H, CH<sub>2a</sub> His), 3.16 (dd, *J* = 6.7, 3.0 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> His), 3.10 (dd, *J* = 14.3, 8.1 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 2.96 (dd, *J* = 13.8, 8.0 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Phe), 2.24 – 2.18 (m, 1H, CH<sub>2a</sub>β Pro), 2.07 – 2.02 (m, 2H, CH Val and CH<sub>2b</sub>β Pro), 1.97 – 1.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>γ Pro), 1.81 – 1.71 (m, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Leu), 1.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Leu), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Leu).

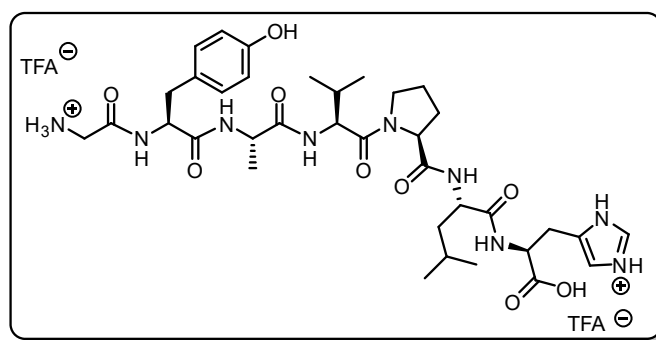
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 174.63 (CO), 174.41 (CO), 173.35 (CO), 173.12 (CO), 172.81 (CO), 172.60 (CO), 172.10 (CO), 167.00 (TFA), 136.38 (Ar-C1 Phe), 133.80 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 130.23 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.98 (Ar-C2 and C6 Phe), 126.39 (Ar-C4 Phe), 118.53 (Ar-C4 His), 60.27\* (C<sub>α</sub> Pro), 56.62\* (C<sub>α</sub> Val), 52.83 (C<sub>α</sub> Phe), 52.46\* (C<sub>α</sub> Leu), 53.09 (C<sub>α</sub> His), 49.13 (C<sub>α</sub> Ala), 47.63 (CH<sub>2</sub> δ Pro), 40.04 (C<sub>α</sub> Gly), 40.14 (CH<sub>2</sub> Leu), 37.15 (CH<sub>2</sub> Phe), 30.72 (CH Val), 29.19

(CH<sub>2</sub>β Pro), 27.15 (CH<sub>2</sub> His), 24.58 (CH<sub>2</sub>γ Pro), 24.41 (CH Leu), 21.93 (CH<sub>3</sub> Val), 20.57 (CH<sub>3</sub> Leu), 18.18 (CH<sub>3</sub> Val), 17.48 (CH<sub>3</sub> Leu), 16.72 (CH<sub>3</sub> Ala). \*Carbon not observed in <sup>13</sup>C-NMR, assigned by gHMBC and gHSQC when possible.

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>36</sub>H<sub>54</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 740.409. Found [M+H]<sup>+</sup>: 740.4065.

**Purity** (214 nm): 50 %, *t<sub>r</sub>* = 6.718 min.

#### 5.5.1.3.15 H<sub>2</sub>N-Gly-Tyr-Ala-Val-Pro-Leu-His-OH (46)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent. Couplings for and after Fmoc-Ala were performed with PyAOP. Using the general cleavage procedure **A**, **46** was obtained as a white solid (23 mg, 46%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 8.72 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.35 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and 5 Tyr), 4.69 (dd, *J* = 7.7, 5.0 Hz, 1H, H<sub>α</sub> His), 4.64 (ap t, *J* = 9.6, 5.0 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Tyr), 4.45 – 4.38 (m, 2H, H<sub>α</sub> Pro and Val), 4.40 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Ala), 4.27 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Leu), 3.90 (m, 1H, CH<sub>2a</sub>δ Pro), 3.72 – 3.69 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>δ Pro overlapped with CH<sub>2a</sub> Gly), 3.63 (dd, *J* = 16.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 3.32-3.29 (dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> His, overlapped with solvent), 3.17 (dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> His), 3.11 (dd, *J* = 14.4, 8.0 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.79 (dd, *J* = 14.2, 9.6 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.21 (m, 1H, CH<sub>2a</sub>β Pro), 2.10 – 2.04 (m, 2H, CH Val, CH<sub>2b</sub>β Pro overlapped), 2.00 – 1.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>γ Pro), 1.75 (m, 1H, CH Leu), 1.66 – 1.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Leu), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 1.01 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

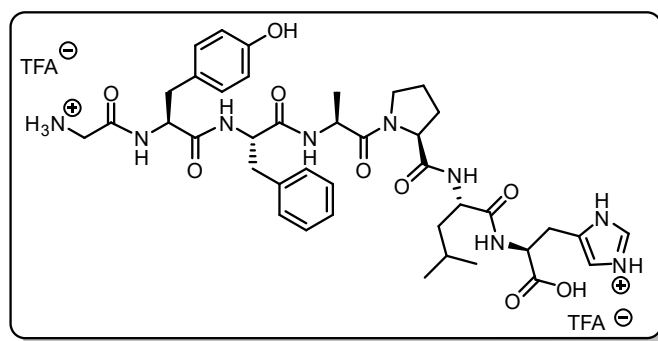
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 172.45 (CO), 172.06 (CO), 171.20 (CO), 165.69 (CO TFA), 156.00 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Tyr), 134.23 (Ar-C2 His), 129.93 (Ar-C5 His), 129.97 (Ar-C2 and C6 Tyr), 118.53 (Ar-C4 His), 114.86 (Ar-C3 and C5 Tyr), 60.93\* (C<sub>α</sub> Pro), 57.84 (C<sub>α</sub> Val), 54.94 (C<sub>α</sub> Tyr),

52.29 (C $\alpha$  Leu), 51.95 (C $\alpha$  His), 48.88 (CH $\alpha$  Ala), 48.79 (CH $_2\delta$  Pro), 40.12 (CH $_2$  Leu), 39.56 (C $\alpha$  Gly), 38.83 (CH $_2$  Phe), 38.27 (CH $_2$  Tyr), 30.47 (CH $_2\beta$  Pro), 29.10 (CH Val), 26.71 (CH $_2\gamma$  Pro), 24.32 (CH Leu), 23.39 (CH $_3$  Leu), 22.05 (CH $_3$  Leu), 19.70 (CH $_3$  Val), 19.01 (CH $_3$  Val), 16.48 (CH $_3$  Ala). \*Carbon not observed in  $^{13}\text{C}$ -NMR, assigned by gHMBC and gHSQC when possible. Four CO were not observed in  $^{13}\text{C}$ -NMR experiments.

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C $_{36}$ H $_{54}$ N $_9$ O $_9$  [M+H] $^+$ : 756.4039, [M+2/2] $^+$ : 378.7056. Found [M+H] $^+$ : 756.4071 and [M+2/2] $^+$ : 378.7083.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 5.327 min.

#### 5.5.1.3.16 H $_2$ N-Gly-Tyr-Phe-Ala-Pro-Leu-His-OH (**47**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent. Couplings for and after Fmoc-Ala were performed with PyAOP. Using the general cleavage procedure **A**, **47** was obtained as a white solid (29 mg, 52%).

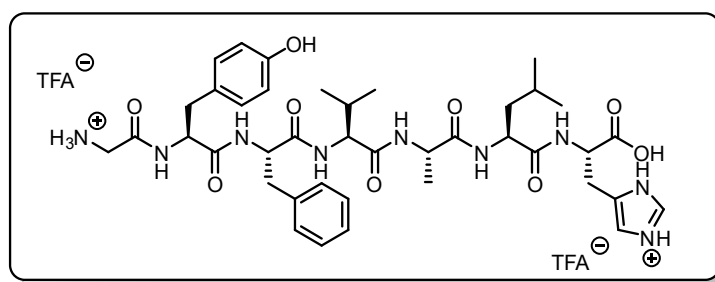
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, CD $_3$ OD):**  $\delta$  8.75 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.34 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.27 – 7.18 (m, 5H, ArH Phe), 7.02 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.68 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.70 (dd,  $J$  = 7.9, 5.1 Hz, 1H, H $\alpha$  His), 4.64 – 4.60 (m, 2H, H $\alpha$  Phe and Ala overlapped), 4.56 (dd,  $J$  = 9.0, 5.7 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.42 (dd,  $J$  = 8.2, 4.4 Hz, 1H, H $\alpha$  Pro), 4.28 (dd,  $J$  = 9.7, 5.5 Hz, 1H, H $\alpha$  Leu), 3.70 – 3.66 (m, 2H, CH $_2\delta$  Pro overlapped with CH $_{2a}$  Gly), 3.63 (dd,  $J$  = 16.1 Hz, 2H, CH $_2$  Gly), 3.32 3.30 (m, 1H, CH $_{2a}$  His, overlapped with solvent), 3.18 – 3.12 (m, 1H, CH $_{2b}$  His overlapped with 1H, CH $_{2a}$  Phe), 2.97 (dd,  $J$  = 14.1, 5.7 Hz, 1H, CH $_{2a}$  Tyr), 2.91 (dd,  $J$  = 13.9, 8.7 Hz, 1H CH $_{2b}$  Phe), 2.73 (dd,  $J$  = 14.1, 9.0 Hz, 1H, CH $_{2b}$  Tyr), 2.20 (m, 1H, CH $_{2a\beta}$  Pro), 2.07 – 1.94 (m, 1H, CH $_{2b\beta}$  Pro overlapped with 2H, CH $_{2\gamma}$  Pro), 1.72 (m, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH $_2$  Leu), 1.35 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, CH $_3$  Ala), 0.98 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, CH $_3$  Leu), 0.93 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, CH $_3$  Leu).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  167.14 (CO TFA), 157.41 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Phe), 134.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His)\*, 131.12 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.42 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.40 (Ar-C2 and C6 Phe), 128.63 (Ar-C1 Tyr), 127.81 (Ar-C4 Phe)\*, 118.86 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 and C5 Tyr), 61.31 ( $\text{C}\alpha$  Pro), 56.35 ( $\text{C}\alpha$  Tyr), 55.96 ( $\text{C}\alpha$  Phe), 53.41 ( $\text{C}\alpha$  Leu), 53.09 ( $\text{C}\alpha$  His), 48.75 ( $\text{CH}_2\delta$  Pro)\*, 47.31 ( $\text{C}\alpha$  Ala)\*, 41.53 ( $\text{C}\alpha$  Gly), 40.63 ( $\text{CH}_2$  Leu), 38.83 ( $\text{CH}_2$  Phe), 38.27 ( $\text{CH}_2$  Tyr), 32.01 (CH Val), 30.56 ( $\text{CH}_2\beta$  Pro), 28.71 ( $\text{CH}_2$  His)\*, 25.98 ( $\text{CH}_2\gamma$  Pro), 25.76 (CH Leu), 23.39 ( $\text{CH}_3$  Leu), 21.63 ( $\text{CH}_3$  Leu), 16.48 ( $\text{CH}_3$  Ala). \*Carbon not observed in  $^{13}\text{C-NMR}$ , assigned by gHMBC and gHSQC when possible. Backbone carbonyls not observed in  $^{13}\text{C-NMR}$ .

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_9\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 804.4039. Found  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 804.4045 and  $[\text{M}+2/2]^+$ : 402.7057.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 6.408 min.

#### 5.5.1.3.17 $\text{H}_2\text{N-Gly-Tyr-Phe-Val-Ala-Leu-His-OH}$ (**48**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.33 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **48** was obtained as a white solid (35 mg, 56%).

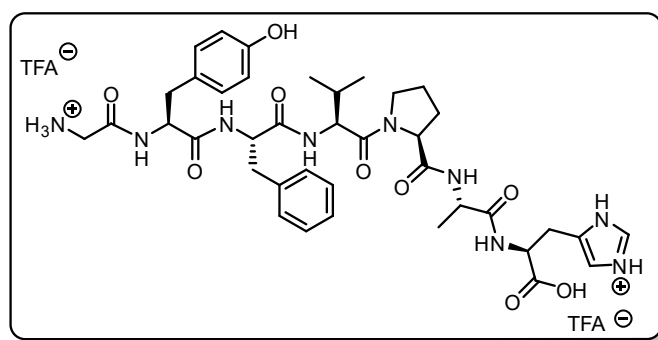
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  8.74 (s, 1H, Ar-H3 His), 7.35 (s, 1H, Ar-H5 His), 7.31 – 7.20 (m, 5H, ArH Phe), 7.03 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.69 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.73 – 4.66 (m, 2H,  $\text{H}\alpha$  Phe and His overlapped), 4.62 (dd,  $J$  = 9.3, 5.2 Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$  Tyr), 4.35 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$  Ala), 4.30 (dd,  $J$  = 9.5, 5.7 Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$  Leu), 4.14 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$  Ala), 3.55 (dd,  $J$  = 16.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  Gly), 3.29 (m, 1H,  $\text{CH}_{2a}$  His, overlapped with solvent), 3.20 – 3.09 (m, 2H,  $\text{CH}_{2a}$  Phe &  $\text{CH}_{2b}$  His, overlapped), 3.03 (dd,  $J$  = 14.2, 5.2 Hz, 1H,  $\text{CH}_{2a}$  Tyr), 2.95 (dd,  $J$  = 13.9, 8.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_{2b}$  Phe), 2.73 (dd,  $J$  = 14.1, 5.3 Hz, 1H,  $\text{CH}_{2b}$  Tyr), 2.11 – 1.97 (m, 1H, CH Val), 1.72 (m, 1H, CH Leu), 1.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , Leu), 1.38 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  Ala), 0.97 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 9H, 2 x  $\text{CH}_3$  Leu and  $\text{CH}_3$  Val), 0.92 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  174.91 (CO), 174.48 (CO), 174.08 (CO), 173.58 (CO), 173.48 (CO), 173.25 (CO), 172.95 (CO), 166.99 (CO TFA), 157.41 (Ar-C4 Tyr), 138.19 (Ar-C1 Phe), 134.79 (Ar-C2 His), 131.42 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.38 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.44 (Ar-C2 and C6 Phe), 128.63 (Ar-C1 Tyr), 127.79 (Ar-C4 Phe), 118.53 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 and C5 Tyr), 60.12 (C $\alpha$  Val), 56.27 (C $\alpha$  Tyr), 56.03 (C $\alpha$  Phe), 53.56 (C $\alpha$  Leu), 53.26 (C $\alpha$  His), 50.31 (C $\alpha$  Ala), 41.59 (CH<sub>2</sub> Leu), 41.34 (C $\alpha$  Gly), 38.74 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.26 (CH<sub>2</sub> Tyr), 32.19 (CH Val), 28.20 (CH<sub>2</sub> His), 25.77 (CH Leu), 23.40 (CH<sub>3</sub> Leu), 21.97 (CH<sub>3</sub> Leu), 19.76 (CH<sub>3</sub> Val), 18.96 (CH<sub>3</sub> Val), 17.94 (CH<sub>3</sub> Ala).

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 806.4196. Found [M+H]<sup>+</sup>: 806.7195 and [M+2/2]<sup>+</sup>: 403.7135.

**Purity** (214 nm): 66 %, *t<sub>r</sub>* = 6.997 min.

#### 5.5.1.3.18 H<sub>2</sub>N-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Ala-His-OH (49)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **49** was obtained as a white solid (43 mg, 64%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  8.71 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.37 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.31 – 7.17 (m, 5H, ArH Phe), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.71 – 4.65 (m, 2H, H $\alpha$  Phe and His), 4.60 (dd, *J* = 9.2, 5.3 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.41 (m, 2H, H $\alpha$  Pro and Val overlapped), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H $\alpha$  Ala), 3.82-3.78 (m, 1H, CH<sub>2a</sub> $\delta$  Pro), 3.70 – 3.65 (m, 1H, CH<sub>2b</sub> $\delta$  Pro overlapped with CH<sub>2a</sub> Gly), 3.62 (dd, *J* = 16.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 3.32-3.29 (m, 1H, CH<sub>2a</sub> His, overlapped with solvent), 3.17 (dd, *J* = 15.3, 7.1 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> His), 3.10 (dd, *J* = 13.7, 7.5 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 3.02 (dd, *J* = 14.1, 5.2 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.94 (dd, *J* = 14.1, 9.3 Hz, 1H CH<sub>2b</sub> Phe), 2.74 (dd, *J* = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.22 (dd, *J* = 16.9, 9.9 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> $\beta$

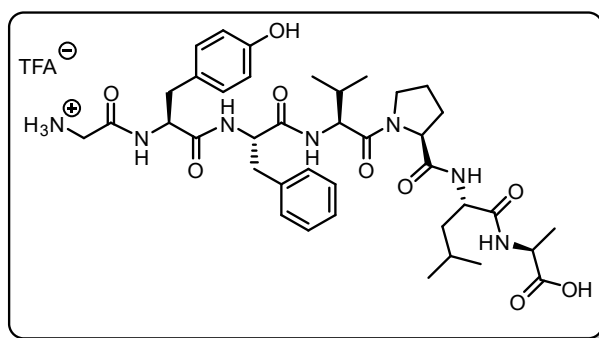
Pro), 2.10 – 2.01 (m, 3H, CH Val, CH<sub>2b</sub>β and CH<sub>2a</sub>γ Pro overlapped), 2.00 – 1.87 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>γ Pro), 1.39 (d, *J* = 7.2, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 162.23 (CO TFA), 157.21 (Ar-C4 Tyr), 138.12 (Ar-C1 Tyr), 136.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 and C6 Phe), 130.42 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.79 (Ar-C4 Phe), 128.99 (Ar-C1 Phe), 127.95 (Ar-C3 and C5 Tyr), 118.51 (Ar-C4 His), 114.73 (Ar-C2 and C6 Tyr), 61.41 (Cα Pro), 57.64 (Cα Val), 56.34 (Cα Tyr), 55.71 (Cα Phe), 54.22 (Cα Leu), 53.09 (Cα His), 50.23 (Cα Ala), 47.96 (CH<sub>2</sub>δ Pro), 41.95 (Cα Gly), 39.91 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.29 (CH<sub>2</sub> Tyr), 32.01 (CH Val), 28.32 (CH<sub>2</sub> His)\*, 30.54 (CH<sub>2</sub>β Pro), 25.94 (CH<sub>2</sub>γ Pro), 19.70 (CH<sub>3</sub> Val), 19.01 (CH<sub>3</sub> Val), 14.29 (CH<sub>3</sub> Ala). \*Carbon not observed in <sup>13</sup>C-NMR, assigned by gHMBC and gHSQC when possible. Carbonyls and CH<sub>2</sub> His were not observed in <sup>13</sup>C-NMR experiments.

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>39</sub>H<sub>52</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 790.3883. Found [M+H]<sup>+</sup>: 790.3875.

**Purity** (214 nm): 100 %, *t<sub>r</sub>* = 5.203 min.

#### 5.5.1.3.19 H<sub>2</sub>N-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-Ala-OH (50)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **50** was obtained as a white solid (66 mg, 78%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 7.27 – 7.21 (m, 5H, ArH Phe), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.65 (ap t, *J* = 14.1, 7.0 Hz, 1H, Hα Phe), 4.60 (dd, *J* = 9.2, 5.3 Hz, 1H, Hα Tyr), 4.43 (m, 2H, CHα Pro and Val), 4.36 (m, 2H, Hα Leu and Hα Ala, overlapped), 3.77 (m, 1H, CH<sub>2a</sub>δ Pro), 3.70 – 3.65 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>δ Pro overlapped with CH<sub>2a</sub> Gly), 3.60 (dd, *J* = 16.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 3.11 (dd, *J* = 14.4, 8.0 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 3.02 (dd, *J* = 14.1, 5.2 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.94 (dd, *J* = 13.8, 8.0 Hz, 1H CH<sub>2b</sub> Phe), 2.74 (dd, *J* = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.20 (dd, *J* = 12.1, 7.8 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub>β Pro), 2.08 – 2.00 (m, 3H, CH Val, CH<sub>2b</sub>β Pro and CH<sub>2a</sub>γ Pro overlapped), 1.96 – 1.93 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>γ Pro), 1.75 (dd, *J* = 13.5, 7.4 Hz, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53



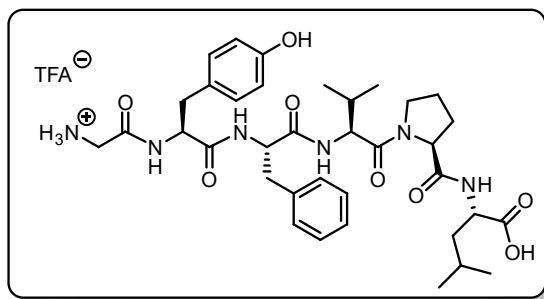
(m, 2H, CH<sub>2</sub> Leu), 1.41 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> Leu), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 174.30 (CO), 174.14 (CO), 173.12 (CO), 172.80 (CO), 172.03 (CO), 167.00 (CO TFA), 157.42 (Ar-C4 Tyr), 138.13 (Ar-C1 Tyr), 131.23 (Ar-C2 and C6 Phe), 130.42 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.39 (Ar-C4 Phe), 128.64 (Ar-C1 Phe), 127.80 (Ar-C3 and 5 Tyr), 116.26 (Ar-C2 and C6 Tyr), 61.40 (Cα Pro), 57.76 (Cα Val), 56.38 (Cα Tyr), 55.84 (Cα Phe), 53.19 (Cα Leu), 50.11 (Cα Ala)\*, 48.76 (CH<sub>2</sub>δ Pro), 41.99 (Cα Gly), 41.38 (CH<sub>2</sub> Leu), 38.81 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.24 (CH<sub>2</sub> Tyr), 31.99 (CH Val), 30.54 (CH<sub>2</sub>β Pro), 25.95 (CH<sub>2</sub>γ Pro), 25.70 (CH Leu), 23.39 (CH<sub>3</sub> Leu), 22.05 (CH<sub>3</sub> Leu), 19.78 (CH<sub>3</sub> Val), 18.87 (CH<sub>3</sub> Val), 17.92 (CH<sub>3</sub> Ala). \*Carbon not observed in <sup>13</sup>C-NMR, assigned by gHMBC and gHSQC when possible. Two CO were not observed in <sup>13</sup>C-RMN experiments.

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>39</sub>H<sub>57</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 766.4134, [M+2/2]<sup>+</sup>: 383.7087. Found [M+H]<sup>+</sup>: 766.4105 and [M+2/2]<sup>+</sup>: 383.709.

**Purity** (214 nm): 100 %, *t<sub>r</sub>* = 9.483 min.

#### 5.5.1.3.20 H<sub>2</sub>N-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-OH (54)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.33 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **54** was obtained as a white solid (28 mg, 40%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 7.31 – 7.14 (m, 5H, ArH Phe), 7.00 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.71 (dd, *J* = 8.7, 4.7 Hz, 1H, Hα Phe), 4.65 (m, 1H, Hα Tyr), 4.50 – 4.40 (m, 3H, Hα Pro, Hα Val and Hα Leu), 4.26 (dd, *J* = 9.6, 5.6 Hz, 1H, Hα Leu), 3.72 – 3.55 (m, 3H, CH<sub>2a</sub>δ Pro overlapped with CH<sub>2</sub> Gly) 3.58 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>δ Pro), 3.12 (dd, *J* = 14.4, 8.0 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 2.98 (dd, *J* = 13.7, 6.4 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.87 – 2.81 (m, 2H CH<sub>2b</sub> Phe and CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.20 (dd, *J* = 12.1, 7.0 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub>β Pro), 2.10 – 2.00 (m, 2H, CH Val, CH<sub>2b</sub>β Pro

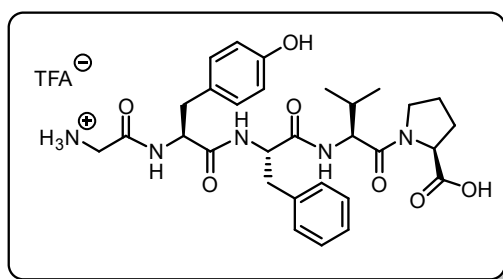
overlapped), 2.00 – 1.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>γ Pro), 1.85 – 1.74 (m, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Leu), 1.11 – 0.93 (m, 12H, 2 x CH<sub>3</sub> Val and 2 x CH<sub>3</sub> Leu).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 175.90 (CO), 174.20 (CO), 172.92 (CO), 172.87 (CO), 172.00 (CO), 167.08 (CO TFA), 157.19 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Phe), 131.43 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.26 (Ar-C2 and C6 Phe), 130.26 (Ar-C3 and C5 Phe), 128.73 (Ar-C1 Tyr), 127.85 (Ar-C4 Phe), 116.14 (Ar-C3 and C5 Tyr), 61.22 (Cα Pro), 57.59 (Cα Val), 56.06 (Cα Tyr), 56.03 (Cα Phe), 52.12 (Cα Leu), 49.29 (CH<sub>2</sub>δ Pro overlapped with solvent), 41.79 (Cα Gly), 41.41 (CH<sub>2</sub> Leu), 39.06 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.17 (CH<sub>2</sub> Tyr), 32.07 (CH Val), 30.37 (CH<sub>2</sub>β Pro), 25.85 (CH<sub>2</sub>γ Pro), 25.81 (CH Leu), 23.39 (CH<sub>3</sub> Leu), 21.96 (CH<sub>3</sub> Leu), 19.77 (CH<sub>3</sub> Val), 18.90 (CH<sub>3</sub> Val). One CO was not observed in <sup>13</sup>C-RMN experiments.

**HRMS (ESI-TOF)** *m/z* calculated for C<sub>36</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 696.3763. Found [M+H]<sup>+</sup>: 696.3775.

**Purity** (214 nm): 94 %, *t<sub>r</sub>* = 10.243 min.

#### 5.5.1.3.21 H<sub>2</sub>N-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-OH (**55**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.33 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **55** was obtained as a white solid (31 mg, 45%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 7.19 – 7.08 (m, 5H, ArH Phe), 6.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.76 (m, 1H, Hα Phe), 4.66 (ap t, *J* = 7.8, 5.2 Hz, 1H, Hα Tyr), 4.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Hα Val), 4.31 (dd, *J* = 7.9, 3.9 Hz, 1H, Hα Pro), 3.80-3.63 (m, 4H, CH<sub>2</sub> Gly and CH<sub>2</sub>δ Pro overlapped), 3.09 (m, 2H, CH<sub>2a</sub> Phe and CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.92 (m, 1H, CH<sub>2b</sub> Phe), 2.73 (dd, *J* = 13.7, 8.5 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.24 (m, 1H, CH<sub>2a</sub> β Pro), 2.02 (m, 4H, CH<sub>2a</sub>β, CH<sub>2</sub>γ Pro and CH Ala overlapped), 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.98 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val).

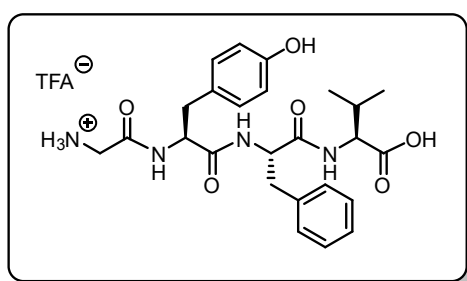
**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 174.63 (CO), 174.41 (CO), 173.35 (CO), 173.12 (CO), 172.81 (CO), 172.60 (CO), 172.10 (CO), 167.00 (CO TFA), 157.41 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Phe), 134.77 (Ar-

C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.42 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.39 (Ar-C2 and C6 Phe), 128.63 (Ar-C1 Tyr), 127.81 (Ar-C4 Phe), 118.53 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 and C5 Tyr), 61.31 (C $\alpha$  Pro), 57.84 (C $\alpha$  Val), 56.34 (C $\alpha$  Tyr), 55.76 (C $\alpha$  Phe), 53.76 (C $\alpha$  Leu), 53.09 (C $\alpha$  His), 48.76 (CH<sub>2</sub>  $\delta$  Pro), 41.53 (C $\alpha$  Gly), 41.35 (CH<sub>2</sub> Leu), 38.83 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.27 (CH<sub>2</sub> Tyr), 32.01 (CH Val), 30.56 (CH<sub>2</sub> $\beta$  Pro), 25.98 (CH<sub>2</sub> $\gamma$  Pro), 25.76 (CH Leu), 23.39 (CH<sub>3</sub> Leu), 22.05 (CH<sub>3</sub> Leu), 19.70 (CH<sub>3</sub> Val), 19.01 (CH<sub>3</sub> Val).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 582.2922. Found [M+H]<sup>+</sup>: 582.2913.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 7.583 min.

#### 5.5.1.3.22 H<sub>2</sub>N-Gly-Tyr-Phe-Val-OH (**56**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.47 mmol/g), with HATU as coupling agent and using the general cleavage procedure **A**, **56** was obtained as a white solid (37 mg, 75%).

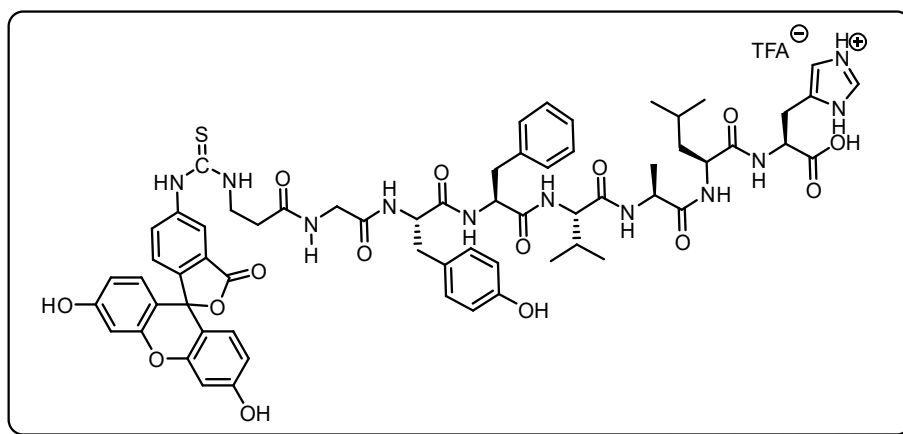
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  7.27 – 7.20 (m, 5H, ArH Phe), 7.01 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, Ar-H2 and H6 Tyr), 6.67 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, Ar-H3 and H5 Tyr), 4.74 (dd,  $J$  = 12.8, 6.8 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe), 4.61 (dd,  $J$  = 9.1, 5.1 Hz, 1H, H $\alpha$  Tyr), 4.32 – 4.29 (m, 1H, H $\alpha$  Val), 3.59 (dd,  $J$  = 15.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Gly) 3.16 (dd,  $J$  = 13.9, 5.5 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Phe), 3.01 (dd,  $J$  = 14.2, 4.9 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub> Tyr), 2.93 (dd,  $J$  = 13.9, 8.6 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Phe), 2.71 (dd,  $J$  = 14.0, 9.4 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub> Tyr), 2.20 - 2.13 (m, 1H, CH Val), 0.99 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 6H, 2xCH<sub>3</sub> Val).

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  174.37 (CO), 173.33 (CO), 173.10 (CO), 166.96 (CO TFA), 157.38 (Ar-C4 Tyr), 138.17 (Ar-C1 Phe), 131.22 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.45 (Ar-C2 and C6 Phe), 129.39 (ArC3 and C5 Phe), 128.67 (Ar-C1 Tyr), 127.75 (Ar-C1 Phe), 116.23 (Ar-C3 and C5 Tyr), 59.14 (CH $\alpha$  Val), 56.33 (CH $\alpha$  Tyr), 55.69 (CH $\alpha$  Phe), 41.36 (CH<sub>2</sub> Gly), 39.00 (CH<sub>2</sub> Phe), 38.27 (CH<sub>2</sub> Tyr), 31.85 (CH Val), 19.56 (CH<sub>3</sub> Val), 18.44 (CH<sub>3</sub> Val). \*One carbonyl was not observed in <sup>13</sup>C-NMR experiments.

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $C_{25}H_{33}N_6O_4$   $[M+H]^+$ : 485.2387. Found  $[M+H]^+$ : 485.2395

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 6.933 min.

#### 5.5.1.3.23 FITC- $\beta$ Ala-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (57)

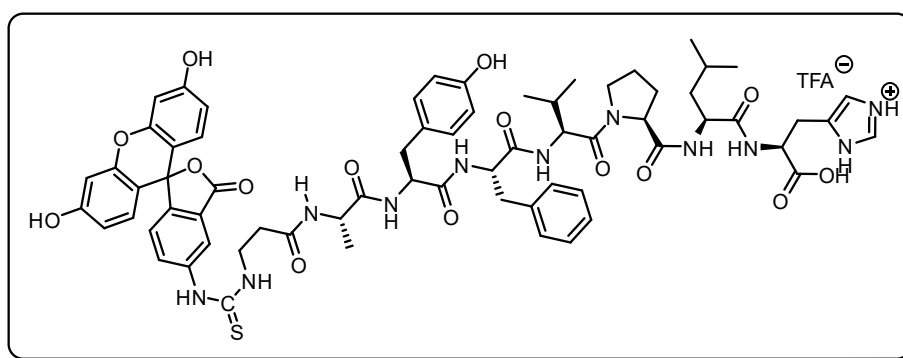


As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.55 mmol/g), with HATU as coupling agent. After removal of Fmoc group from the terminal  $\beta$ -Ala, FITC was coupled following the general procedure. Then, using the general cleavage procedure **A**, **57** was obtained as an orange solid (90 mg, 89%).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $C_{64}H_{72}N_{11}O_{15}S$   $[M+H]^+$ : 1266.4925. Found  $[M+H]^+$ : 1266.4922 and  $[M+2/2]^+$ : 633.7498.

**Purity** (214 nm): 96 %,  $t_r$  = 12.05 min.

#### 5.5.1.3.24 FITC- $\beta$ Ala-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (58)



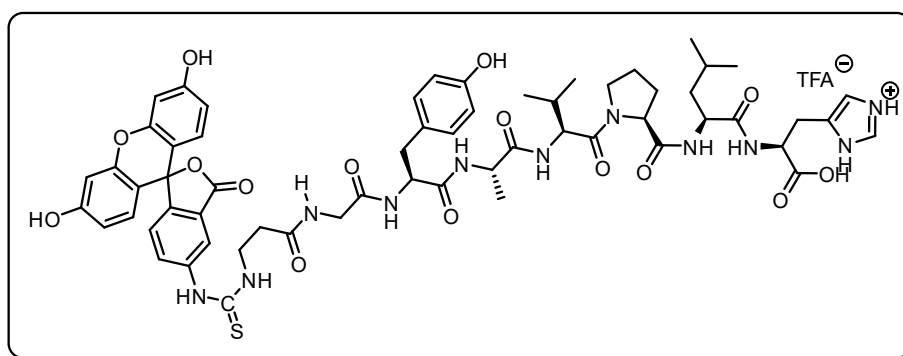
As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.47 mmol/g), with HATU as coupling agent. After removal of Fmoc group from the terminal  $\beta$ -

Ala, FITC was coupled following the general procedure. Then, using the general cleavage procedure **A**, **58** was obtained as an orange solid (90 mg, 89%).

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $C_{60}H_{70}N_{11}O_{15}S$   $[M+2H/2]^+$ : 608.74204. Found  $[M+2H/2]^+$ : 608.7412.

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 12.420 min.

#### 5.5.1.3.25 FITC- $\beta$ Ala-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (**59**)



As described in the general peptide synthesis method, starting from 2-chlorotrityl chloride resin (1.47 mmol/g), with HATU as coupling agent. Couplings for Fmoc-Ala and next one for Fmoc-Tyr were performed with PyAOP. After removal of Fmoc group from the terminal  $\beta$ -Ala, FITC was coupled following the general procedure. Then, using the general cleavage procedure **A**, **59** was obtained as an orange solid (88 mg, 81%). After purification by HPLC, final product was obtained as an orange solid (4 mg, 4%)

**HRMS (ESI-TOF)**  $m/z$  calculated for  $C_{67}H_{76}N_{11}O_{15}S$   $[M+H]^+$ : 1306.5237. Found  $[M+H]^+$ : 1306.5238

**Purity** (214 nm): 100 %,  $t_r$  = 10.033 min.

## 5.5.2 Surface plasmon resonance experiments

These experiments were performed at the Instituto de Química Médica of the Spanish National Research Council (CSIC) by Dra Laura Lagartera. SPR experiments were performed with a Biacore X-100 apparatus (Biacore, GE Healthcare Life Sciences) at room temperature using a running buffer (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> with 20 mM EDTA and 2% of DMSO). Recombinant ILK (59.92 kDa) were purchased to Randox Life Sciences. The protein was immobilized on a CM5 sensor chip (Biacore, GE) following a standard amine coupling method.<sup>268</sup>

Affinity measurements were made by a series of different concentrations injected onto the sensor chip at a 90 µL/min flow rate for 1 min, followed by a 1 min dissociation period. After dissociation, an extra wash was done over the flow cells with 50% DMSO. No regeneration was needed. Sensograms data were double-referenced and solvent-corrected using the BIAevaluation X-100 software (Biacore, GE Healthcare Life Sciences).

## 5.5.3 Biology

### 5.5.3.1 Cell culture

Human mesangial cells (HMC) were obtained and cultured according to previously described procedures.<sup>269</sup> All cells were treated with the appropriate inhibitor concentration or vehicle (CT) during the estimated time.

### 5.5.3.2 Protein extraction and immunoblot analysis

Cells were homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 0.1% sodium deoxycholate; protease and phosphatase inhibitors Complete and PhoSTOP from Roche, Basel, Switzerland). Protein concentrations were determined by DC-Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to 0.2µm-PVDF or 0.4 µm-nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After blocking, membranes were incubated with antibodies against ILK, GSK3β, P-GSK3β(ser9), P-AKT, AKT (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), and actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After secondary antibody incubation (Merck-Millipore, Billerica, MA, USA or Dako, Glostrup, Denmark), the immunoblots were developed (ECL, Thermo Fisher Scientific

<sup>268</sup> Johnsson, B.; Löfås, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* **1991**, *2*, 268-277.

<sup>269</sup> Iglesias-de la Cruz, M. Carmen; Ruiz-Torres, P.; Alcamí, J.; Díez-Marqués, L.; Ortega-Velázquez, R.; Chen, S.; Rodríguez-Puyol, M.; Ziyadeh, F. N.; Rodríguez-Puyol, D. *Kidney Int.* **2001**, *1*, 87-95.

Waltham, MA, USA) and imaged using an Image Quant LAS 500 chemiluminescent detection chamber (General Electric Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Densitometry was determined using Image J software (NIH).<sup>270</sup>

### 5.5.3.3 F-actin quantification assay

HMC monolayers grown in microscope cover glasses were treated with the appropriate concentration of all compounds for 30 min, 1h or 24h. At the end of incubation, HMC were washed twice with PBS, and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Fixed coverslips were permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 5 min before being washed three times with PBS. Cells were treated for 1h at RT with an F-actin specific stain, AlexaFluor 488 Phalloidin (1:40, 25 µl of Phalloidin in 1 ml PBS), HMC were washed twice with PBS. Cells were incubated for 1 hr at RT with the secondary antibody (Alexa Red). Subsequently, cells were washed again, and mounting medium ProLong® Gold Antifade reagent (Invitrogen) was added. Samples were analyzed using LEICATCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany) to detect the fluorescence of Phalloidin.

### 5.5.3.4 ILK silencing

To decrease ILK content in CMH cells specific interference RNAs were used (siRNA). Prior transfection, HMC were cultured until a confluence of 70-80%. The following day, cells were transfected using lipofectamine as a diluted in OptiMEM® (ThermoFischer) without any antibiotic and after 5 min the dilution was mixed with the specific siRNA at 100 nM. After 20 min, transfection mixture was added dropwise, and cells were incubated 18 h. As negative control, a mixture of non-specific siRNAs were used. Cells were reversed of silencing after 48 h.

### 5.5.3.5 Internalization studies

HMC cells were incubated with compounds for different times (30 min, 1 h, 4 h, 24 h) at 25 µM. Then, cells were washed twice with PBS buffer. Fluorescence was measured with a Leica TSC-SP5 microscope.

---

<sup>270</sup> Cano-Penalver, J. L.; Griera, M.; Serrano, I.; Rodriguez-Puyol, D.; Dedhar, S.; de Frutos, S.; Rodriguez-Puyol, M. *FASEB J.* **2014**, *8*, 3645-3659.

### 5.5.3.6 Statistics

Unless otherwise stated, data are means  $\pm$  SE of a variable number of experiments, detailed in the figure legends. All statistics were analyzed with an unpaired Student's *t*-test for two groups or one-way ANOVA for more using GraphPad Prism version 6.00 for Macintosh (San Diego, CA). In some datasets, multiple-comparison post-tests were performed. *P* values  $< 0.05$  were considered statistically significant (\**P*  $< 0.05$ . \*\**P*  $< 0.01$ ).

## 5.5.4 Computational methods

### 5.5.4.1 Protein preparation

During the development of the present research only two structures with ILK and parvin proteins were deposited in the Protein Data Bank (PDB: 3KMW and 3KMU). For this work 3KMW was selected as it contains the kinase domain of ILK (271 aminoacids) bound to CH2 parvin domain. This structure also contains an ATP molecule into the pseudoactive site, and Mg<sup>2+</sup> ion bound. All residues were maintained, and hydrogens were added using ProteinFixer at pH 7.2. Then for FTMAP calculations, chain B (parvin), and ATP were deleted manually using PyMol and the final coordinates of ILK were saved in \*.pdb format.

### 5.5.4.2 Hotspot calculations

For the *in silico* identification of hotspot three different approaches were used. First, ILK kinase domain was subjected to FTMap server (<http://fmap.bu.edu/>) in pdb format. Results were retrieved in PyMol session format and analysed.<sup>271</sup> FTMap algorithm docks small organic probe molecules with different size, shape, and polarity on the surface of the protein submitted. Then, it finds the most favourable positions for each probe type, clusters them, and ranks the clusters based on its energy. Those regions that bind several different probe clusters are selected consensus clusters or consensus sites and they represent putative binding hot spots.

On the other hand, HotPoint method was also used for the hotspot identification.<sup>272</sup> This approach determines computationally hotspots based on pair potentials and solvent

---

<sup>271</sup> Kozakov, D.; Grove, L. E.; Hall, D. R.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Luo, L.; Xia, B.; Beglov, D.; Vajda, S. *Nature Protocols* **2015**, *5*, 733-755.

<sup>272</sup> Tuncbag, N.; Keskin, O.; Gursoy, A. *Nucleic Acids Res.* **2010**, W402-W406.



accessibility of interface residues.<sup>273</sup> The accession code 3KMW was introduced into the server and then, results were analysed by means of post-scripts retrieved from web.

#### 5.5.4.3 Affinity grid maps

PDB file of kILK domain was converted into the pdbqt format by using AutoDock Tools, adding Kollman charges and torsions to all aminoacids. Then, non-polar hydrogens were merged, and grid box was centred in the  $\alpha$ -parvin pocket ( $X = 1.529$ ,  $Y = -15.131$ ,  $Z = 16.402$ ) and size was set to 40x40x40. Finally, atom types were selected manually to H, HD and OA prior AutoGrid Calculations.<sup>274</sup>

#### 5.5.4.4 Free energy (HYDE) calculation

These calculations were done in the suite LeadIt from BiosolveIT<sup>®</sup>, the prepared PDB of ILK was exported and preparation was carried out at pH= 7.2. Then, a mol2 file with the segment Gly305 to Phe313 extracted from  $\alpha$ -parvin (PDB 3KM) was exported as ligand for calculation. Ala mutations were done in this peptide using the mutagenesis tool implemented in PyMol. By-residue decomposition energy was extracted from the final file manually.

#### 5.5.4.5 Molecular dynamics

PDB files were upload to CHARMM-GUI and prepared for molecular dynamics simulations.<sup>275</sup> Using the *Solution Builder* module, protein, ATP, and Mg<sup>2+</sup> ion names were changed to those used in CHARMM36m forcefield and psf topology files were generated.<sup>276</sup> Then, the system was immersed in a rectangular water box of TIP3P water molecules extended 10 Å from protein solute. Afterwards, 3 Na<sup>+</sup> ions were added to neutralize the system. Archives containing PDB coordinates, topology and forcefield parameters were downloaded together with production scripts. The MD protocol included an energy minimization with conjugate gradients for 2000 cycles and equilibration at 298 °C in the NVT ensemble for 1 ns applying positional harmonic restrains over protein atoms ( $k = 100 \text{ kcal mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$ ). After this, MD production was performed without any restrain using NAMD 2.1<sup>277</sup> in a GPU NVIDIA for 50 ns with the Nosé-Hoover

---

<sup>273</sup> Tuncbag, N.; Gursoy, A.; Keskin, O. *Bioinformatics* **2009**, *12*, 1513-1520.

<sup>274</sup> Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785-2791.

<sup>275</sup> Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. *J. Comput. Chem.* **2008**, *11*, 1859-1865.

<sup>276</sup> Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B.,L.; Grubmüller, H.; Mackerell, A. D. *Nature Methods* **2017**, *1*, 71-73.

<sup>277</sup> Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. *J. Comput. Chem.* **2005**, *16*, 1781-1802.

Langevin piston pressure control through their CUDA implementations on a Windows 10 workstation equipped with a GPU NVIDIA GeForce GTX 650 Ti BOOST.

#### 5.5.4.6 Molecular dynamics analysis

For the visualization of the molecular dynamics VMD<sup>278</sup> and Chimera software were used. Analysis of RMSDs, RMSFs, distances and contacts were performed using Python software package MDTraj<sup>279</sup> with Jupyter Notebooks. Hydrogen bonds were analyzed with the VMD plugin as well as secondary structure. Finally, graphics were generated using Excel or Python Matplotlib library.

---

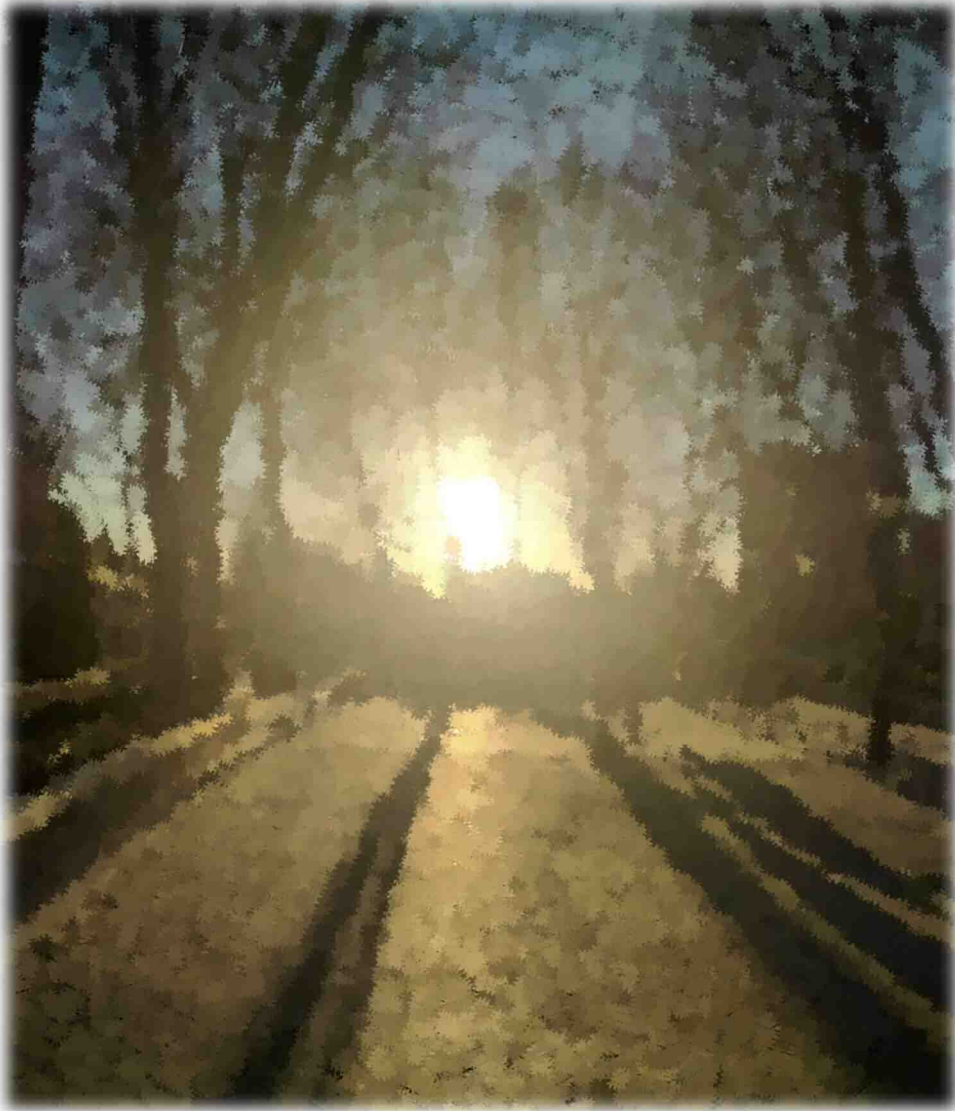
<sup>278</sup> Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, *1*, 33-38.

<sup>279</sup> McGibbon, R.; Beauchamp, K.; Harrigan, M.; Klein, C.; Swails, J.; Hernández, C.; Schwantes, C.; Wang, L.; Lane, T.; Pande, V. *Biophys. J.* **2015**, *8*, 1528-1532.



## 6. GENERAL CONCLUSIONS

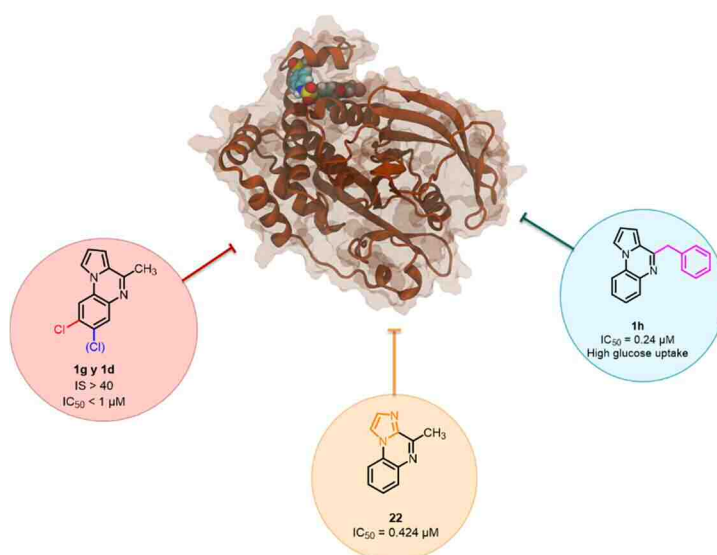
---



During the present thesis two different approaches have been followed in order to get new insights into the treatment and study of chronic kidney disease.

In the first chapter, new PTP1B inhibitors have been explored. Since PTP1B is considered as a key regulator in the insulin signalling pathway and a target for Diabetes Mellitus Type II, its inhibition can contribute to avoid the development of chronic kidney disease. The main conclusions that could be drawn are:

- A new family of pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline have been synthesized, yielding compound **1h** which exhibited a great glucose uptake performance and also an PTP1B inhibitor mechanism of action in phenotypic assays.
- The incorporation of chlorine atoms in positions **R<sup>7</sup>** and **R<sup>8</sup>** of the pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline scaffold increase its selectivity against the closest homologue TCPTP preventing possible off-target side-effects.
- Scaffold-hopping of the pyrrole ring can afford active compounds with better physicochemical properties.
- The combination of computational methods such as molecular dynamics and Water Swap calculations are valuable tools for the development of new PTP1B inhibitors targeting the allosteric site.



**Figure 84.** Graphical summary, Chapter 1.

The second chapter of this thesis has been focused on the study of ILK. Recently, this protein has been explored as a potential target for chronic kidney disease because it plays a key role in

several related process including renal fibrosis, kidney development and homeostasis. ILK protein always acts bound to its *in vivo* partner  $\alpha$ -parvin, so our attention was focused in the study of this protein-protein interaction in order to design and prepare new tools for biological studies and future therapeutic validation of ILK. The following conclusions can be drawn from the studies carried out and the results obtained:

- The computational studies carried out have allowed *hot spot* detection and the proposal of a hot spot for the ILK and  $\alpha$ -parvin interaction.
- Based in this model a family of tripeptides were prepared and evaluated against ILK. These compounds are capable to modulate only the assembly function of ILK but no its controversial kinase activity, providing a valuable tools for its study in cellular models.
- A new hit, tripeptide **38**, able to increase actin polymerization was also identified and may be a promising compound for further analogues development.
- A set of heptapeptides were also synthesized and tested against ILK in biophysics assays allowing the identification of key residues for the interaction.
- These heptapeptides form conjugates with fluorescein and these conjugates are able to penetrate cells, but its behaviour is influenced by its sequence.
- Actin polymerization can be increased by using peptide **44** or **46** which showed very high activity *in cellulo* experiments.
- This set of heptapeptides provide a valuable tool for the design of peptidomimetics and, eventually, for the design of small molecules to modulate ILK based in its interaction with  $\alpha$ -parvin.

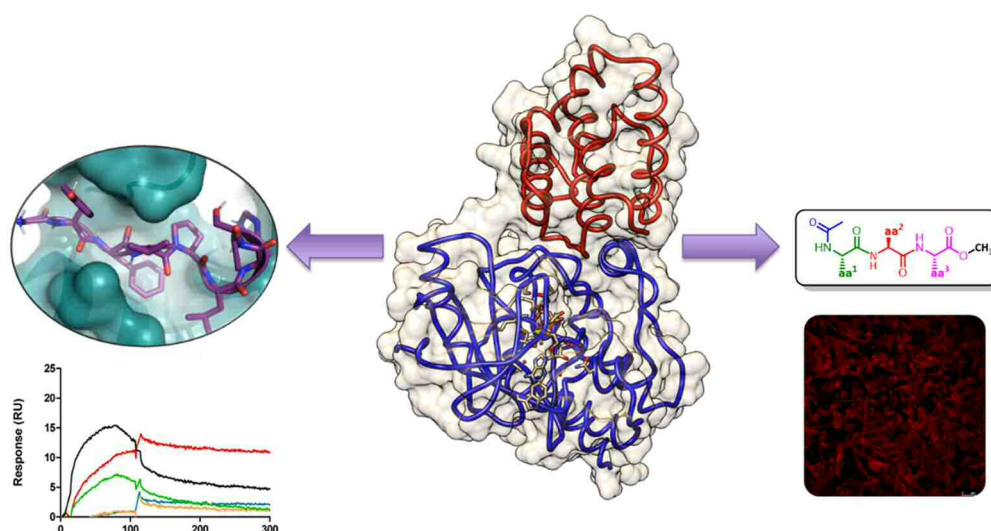


Figure 85. Graphical summary, Chapter 2.

