

## Síntesis de tetrapéptido-metilado-indólico con posible actividad biológica

Castañón Alonso Sandra Luz<sup>1\*</sup>, Quintana Zavala Delia<sup>2</sup>, Hernández Ochoa Beatriz<sup>1</sup>, Carrillo Sánchez José Adrián<sup>1</sup>, Rocha Ramírez Luz María<sup>3</sup>, San Martín Martínez Eduardo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Inmunoquímica, Unidad de Investigación en Inmunología Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Calle Dr. Márquez N° 162, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México C.P. 06720, México

<sup>2</sup>Laboratorio de Química Orgánica, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Legaria, Instituto Politécnico Nacional, Legaria No. 694, C.P. 11500, CDMX.

<sup>3</sup>Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Calle Dr. Márquez N° 162, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México C.P. 06720, México.

<sup>4</sup>Laboratorio de Biomateriales, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Legaria, Instituto Politécnico Nacional, Legaria No. 694, C.P. 11500, CDMX.

\*Autor para correspondencia: sandracastason@yahoo.com.mx

ORCID : 0000-0003-4874-5151

### Recibido:

14/mayo/2023

### Aceptado:

20/septiembre/2023

### Palabras clave:

Indol,  
tetrapéptido metilado,  
actividad antitumoral

### Keywords:

Indole,  
methylated tetrapeptide,  
antitumor activity

### RESUMEN

Se realizó la síntesis de un tetrapéptido lineal metilado unido a un heterociclo de tipo indol, fue purificado por cromatografía en placa preparativa e identificado por HPLC-masas (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas). La secuencia del tetrapéptido lineal es: D-Phe-Arg (Me)-Trp-Lys, se llevó a cabo mediante la técnica de síntesis en fase sólida (SPS) a través de la metodología de Merrifield, utilizando aminoácidos protegidos con N<sup>α</sup>-Fmoc. El proceso de metilación se hizo bajo las condiciones de Mitsunobu. Por otra parte, se obtuvo un compuesto heterocíclico del tipo indol, que ya ha sido sintetizado anteriormente por los autores. Se presenta un breve estudio biológico para medir su actividad anticancerígena frente a la línea celular de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™).

### ABSTRACT

The synthesis of a methylated linear tetrapeptide linked to an indole-type heterocycle was carried out, it was purified by preparative plate chromatography and identified by HPLC-mass (Liquid chromatography-mass spectrometry). The sequence of the linear tetrapeptide is: D-Phe-Arg (Me)-Trp-Lys, it was carried out using the solid phase synthesis (SPS) technique through the Merrifield methodology, using amino acids protected with N<sup>α</sup>-Fmoc. The methylation process was done under Mitsunobu conditions. On the other hand, a heterocyclic compound of the indole type was obtained, which has already been previously synthesized by the authors. A brief biological study is presented to measure its anticancer activity against the mammary adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™).

## Introducción

El cáncer es considerado es considerado como la enfermedad más compleja que la humanidad debe enfrentar. Se han descrito más de 200 formas de cáncer y cada tipo se puede caracterizar por diferentes perfiles moleculares que requieren estrategias terapéuticas únicas (Tomczak et al., 2015). Existen muchos tipos de cáncer. El cáncer se puede desarrollar en cualquier parte del cuerpo y se denomina según la parte del cuerpo corporal en el que se origina. Por ejemplo, el cáncer de seno que se origina en el seno sigue siendo cáncer de seno incluso tras haberse propagado (metástasis) a otras partes del cuerpo (página web: American Cancer Society, 2020).

El cáncer es una enfermedad que hoy en día parece ser la causa más importante de muerte. Sin embargo, en las últimas décadas se han logrado avances significativos en términos de la comprensión y el tratamiento de esta enfermedad. Dependiendo del diagnóstico, el origen y el estado del cáncer existen varias opciones predominantes, incluyendo la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Además, pueden reprimir el sistema inmunológico y las células cancerosas, con frecuencia desarrollan resistencia a muchos fármacos contra el cáncer que reduce en gran medida su utilidad terapéutica. Otros efectos secundarios comunes incluyen fatiga, tendencia a sangrar fácilmente, malestar gastrointestinal, pérdida rápida de peso, en algunos casos el aumento de peso y pérdida temporal del cabello.

Debido a la constante necesidad de mejorar o encontrar nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer y especialmente aquellos que son capaces de evadir la resistencia a los medicamentos y otros efectos secundarios significativos, los péptidos se han convertido en uno de los nuevos objetivos de investigación.

Los péptidos se encuentran entre las moléculas bioactivas más versátiles por ejemplo muchas hormonas peptídicas y péptidos cortos análogos que ejercen su acción mediante la unión a los receptores de membrana (Nielsen, 2004). Los péptidos y sus derivados pueden presentar un amplio espectro de actividades biológicas tales como antimicrobianos (Leader et al., 2008), antiviral y actividades anticancerígenas (Hancock & Scott, 2000).

Los péptidos y las proteínas constituyen los elementos de control de un buen número de procesos biológicos muy significativos (Semenov et al., 1998).

Tras asociarse con sus receptores, estos neurotransmisores, neuromoduladores u hormonas influyen en la comunicación intercelular y controlan una serie de funciones vitales como son el metabolismo, la defensa inmune, la digestión, la respiración, la sensibilidad al dolor, la reproducción, el comportamiento y el nivel de electrolitos en la sangre. Por todo ello, este tipo de compuestos poseen un interés farmacológico altamente elevado (Ismail & Hatori, 2011).

El aislamiento de péptidos bioactivos, seguido de su caracterización y síntesis a mayor escala, ha permitido emplear dichos compuestos para ensayos clínicos y farmacológicos (Krieger., 1983), los cuales han dado lugar a nuevos métodos terapéuticos para el tratamiento de una amplia serie de enfermedades.

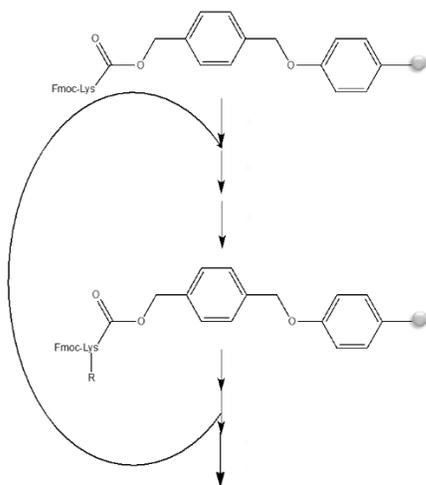
En cuanto a los péptidos metilados: Hay varias razones para el creciente interés en los últimos años en el estudio de péptidos con un alto contenido de *N*-metil aminoácidos. Los péptidos que contienen estos aminoácidos presentan una estabilidad metabólica mejorada y una hidrofobicidad mejorada, lo que puede aumentar su biodisponibilidad, amplificando así su potencial terapéutico. Desde un punto de vista conformacional, estos péptidos tienen menos enlaces de hidrógeno y menos tendencia a exhibir conformaciones *trans*, lo que debería afectar sus estructuras secundarias y terciarias, lo que los hace interesantes para los estudios de relación de actividad estructural (SAR) (Teixidó et al., 2005). Una de las técnicas sugeridas para mejorar la estabilidad enzimática de los péptidos es la *N*-metilación, existe un método simplificado que permite la *N*-metilación múltiple rápida y eficiente de péptidos sobre un soporte sólido (Biron et al., 2008).

Los péptidos que contienen *N*<sup>α</sup>-metil aminoácidos presentan interesantes perfiles terapéuticos y son cada vez más reconocidas como terapias potencialmente útiles. Una preparación eficiente y práctica de *N*<sup>α</sup>-metil-*N*<sup>α</sup>-(*o*-nitrobenzenosulfonil)- $\alpha$ -aminoácidos ya ha sido descrita. El procedimiento descrito permite la preparación de *N*<sup>α</sup>-metil aminoácidos en un período de tiempo más corto y una síntesis rápida de péptidos *N*-metilados usando síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc (Biron & Kessler., 2005).

Se pueden contemplar a los aminoácidos Trp, Lys, Phe y Arg en la secuencia de un péptido de cualquier debido a que esta secuencia ya ha sido aplicada en otros estudios como agente antitumoral y con algunos aminoácidos metilados (Offerman et al., 2017; Mackinnon et al., 1999; Grieco et al., 2006; Mayorov, 2008).

En este trabajo de investigación, se reportan los resultados que se obtuvieron sobre la síntesis del derivado **III** a través de la Síntesis en Fase Sólida (SPPS), que contiene un núcleo de indol y un tetrapéptido *N*-metilado unido al indol, con posible actividad biológica. El derivado **III** se evaluó mediante un ensayo de citotoxicidad MTT.

Se presenta a continuación el esquema 1, es de la síntesis que se llevó a cabo 20% piperidina en NMP; 3 eq. HOBt/HBTU/Fmoc-aa, 6eq. DIPEA; 95% TFA, 2.5% H<sub>2</sub>O, 2.5% trietilsilano.



**Esquema 1.** Síntesis en Fase Sólida (SPPS).

## Metodología

### Materiales e Instrumentación

Los reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich y se usaron tal como se recibieron. Los equipos utilizados en la caracterización, evaluación biológica e identificación del compuesto fueron: Un lector de microplacas (Elisa LabSystem, Multiskan Go Plate Reader, ThermoScientific), (cromatógrafo HPLC 1200, DAD, Agilent Technologies), transformada de Fourier (FTIR), utilizando el equipo Cary 630 (Agilent Technologies, EEUU). Los análisis se llevaron a cabo empleando una celda de reflectancia total atenuada (ATR).

### Síntesis

#### Síntesis de tetrapéptido-metilado-indólico

La síntesis de este compuesto se inició con la preparación del tetrapéptido metilado (**I**) con la secuencia: D-Phe-Arg(Me)-Trp-Lys, como se describe a continuación, (Mayorov, 2006).

Se utilizaron 0.5 g de la resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamida-norleucilo-MBHA) y una jeringa de polipropileno y se dejó hinchar la resina con 5 mL de *N*-metilpirrolidona (NMP) por 30 minutos.

El grupo protector Fmoc del grupo amino, fue removido con una mezcla de 20 % piperidina en NMP (1 x 8 min y 1 x 12 min). La resina fue lavada con NMP (5 x 2 min x 4 mL) y diclorometano (DCM) (5 x 2min x 4 mL). Se hizo la prueba de Kaiser y la de Cloranilo, estas pruebas salieron positivas (+) para aminas primarias, lo cual nos indica que hubo una desprotección.

Una vez desprotegida la resina, se inició el acoplamiento del primer aminoácido, usando el éster pre activado, esto se hizo con 6 eq del aminoácido Fmoc-Lys (Alloc)-OH, 6 eq del agente acoplante *o*-(benzotriazol-1il)-*N,N,N,N*-tetrametilurano tetrafluoroborato (TBTU) y 12 eq de la base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) utilizando como disolvente NMP. La mezcla de acoplamiento fue transferida a la jeringa con la resina, se dejó reaccionar por 10 horas en atmósfera de nitrógeno gas (N<sub>2</sub>). Después de este tiempo, la resina se lavó con NMP (5 x 2 min x 4 mL) y DCM (5 x 2 min x 4 mL). Se hizo la prueba de Kaiser y la de cloranilo, salieron negativas (-) para aminas primarias, lo cual nos indica que hubo acoplamiento. El grupo protector Fmoc del aminoácido, fue removido con una mezcla de 20 % piperidina en NMP (1 x 10 min, 1 x 15 min). La resina se lavó con NMP (5 x 2min x 4 mL) y DCM (5 x 2min x 4 mL). Se hizo la prueba de Kaiser y la prueba de cloranilo, salieron positivas (+) para amina primaria, lo cual nos indica que hubo desprotección.

El segundo aminoácido se acopló de igual manera, usando 6 eq del aminoácido Fmoc-Trp (BOC)-OH, 6 eq del agente acoplante TBTU y 12 eq de la base DIPEA en NMP por 12 h.

El tercer aminoácido fue acoplado, usando 6 eq del aminoácido Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 6 eq del agente acoplante TBTU y 12 eq de base DIPEA en NMP, Se dejó reaccionar por 11 h.

Metilación por la técnica de Mitsunobu. Se protegió el grupo amino de la arginina, con 5 eq de cloruro de 2-nitrobenzenesulfonilo (O-NBS-Cl) y 10 eq de colidina (2,4,6-trimetil piridina) en NMP y todo se adicionó en frío hacia la resina, se dejó burbujear con N<sub>2</sub> por un período de 20 minutos, después se lavó con NMP (5 x 2min x 4 mL) y DCM (5 x 2min x 4 mL). Se hizo la prueba de Kaiser y cloranilo, salieron negativas (-) para aminas primarias, con esto nos aseguramos de que se ha logrado la protección.

Posteriormente se adicionaron 5 eq de trifetilfosfina (PPh<sub>3</sub>) y fue disuelto en 1 mL de THF seco y anhidro, se agregaron 10 eq de metanol (MeOH), se agitó por 1 minuto. Por otra parte, se adicionaron 5 eq de la base azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) en 1 mL de THF anhidro, se dejó reaccionar por 12 min en atmósfera inerte.

La resina se lavó con NMP y DCM. Se hizo la prueba de Kaiser y cloranilo, salieron negativas (-) para aminas secundarias, lo cual nos indica que hubo metilación. Para la desprotección del NBS, el enlace de la resina unida al péptido *N*<sup>α</sup>-metil-*N*<sup>α</sup>-o-NBS-péptido, fue tratada con 5 eq de 2-mercaptoetanol y 2.5 eq del catalizador 1,8-diazobicyclo[5,4,0]undeca-7-eno (DBU) en 1 mL de NMP por 5 min. El procedimiento de desprotección fue repetido una vez más. La resina se lavó con NMP y DCM. Se hizo la prueba de Kaiser y cloranilo, salieron positivas (+) para amina secundaria, lo cual nos indica que hubo desprotección.

El cuarto aminoácido fue acoplado, usando 6 eq del aminoácido Fmoc-D-Phe-OH, 6 eq del agente acoplante HATU y 12 eq de la base DIEA en NMP. Se dejó reaccionar por 12 h.

#### Síntesis del compuesto: ácido (*E*)-2-[4-(3-(1*H*-indol-3-*il*)-3-oxoprop-1-en-1-*il*)fenoxi]acético

Se preparó el ácido {4-[(*E*)-3-(1*H*-indol-3-*il*)-3-oxoprop-1-en-1-*il*]fenoxi} acético de acuerdo con el procedimiento descrito en la referencia (Ismail & Hatori 2011).

Se preparó el núcleo indólico, el cual se obtuvo a partir del ácido fenoxiacético, el cual fue obtenido por la condensación aldólica en condiciones básicas entre (0.47 g, 0.03 mol) del 3-acetilindol y (0.5 g, 0.03 mol) de ácido 4-formilfenoxiacético, ambos fueron disueltos en 10 mL de benceno seco, fueron agregados 300 μL de ácido acético y 100 μL de piperidina, la solución fue calentada a reflujo por 24 h. Se evaporó el disolvente y el producto obtenido fue lavado con 5 mL de éter etílico 2 veces y 2 mL de HCl 2 N dos veces, se secó y se recristalizó de benceno, obteniéndose unos cristales de color crema con un rendimiento del 81 %. Punto de fusión: 242-243 °C. FT-IR (KBr),  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3016, 2985, 2843, 1714, 1682, 1657, 1598, 1570, 1511, 1423, 1401, 1372, 1250. RMN <sup>1</sup>H (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 4.82 (s, 2H), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.76 Hz), 7.15-7.21 (m, 3H), 7.45 (d, 1H, *J* = 7.12 Hz), 7.86 (d, 1H, *J* = 15.52 Hz), 8.15 (d, 1H, *J* = 15.54 Hz), 8.29 (d, 2H, *J* = 8.76 Hz), 8.33 (d, 1H, *J* = 6.98 Hz), 9.87 (d, 1H, *J* = 5.88 Hz), 11.89 (s, 1H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 64.50, 112.09, 114.77, 117.72, 121.68, 121.73, 122.56, 122.95, 125.87, 128.29, 129.94, 134.37, 136.78, 139.14, 159.07, 169.72, 183.67.

#### Acoplamiento del tetrapéptido con el heterociclo indólico

El péptido fue humedecido e hinchado con 5 mL de NMP por 30 minutos. En seguida se realizó una desprotección con la finalidad de remover el grupo Fmoc del grupo amino que corresponde al último aminoácido acoplado (D-Phe) fue removido con una mezcla de 20% piperidina en NMP (1 x 10 min, 1 x 15 min). La resina se lavó con NMP (5 x 2min x 4 mL) y DCM (5 x 2min x 4 mL). Se hizo la prueba de Kaiser y la prueba de cloranilo, salieron positivas (+) para amina primaria, lo cual nos indica que hubo desprotección.

Por otra parte, se pesaron 8 eq del compuesto de indol, 8 eq de TBTU, 8 eq de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 16 eq de la base de DIPEA en NMP y se dejó acoplado por 1 hora, después de este tiempo se vertió esta mezcla de reactivos al péptido desprotegido que estaba contenido en la resina, se colocó en atmósfera inerte a T= ambiente, se llevó a pH cercano a 8 con: *N*-metilmorfolina (NMM) y se dejó agitando la mezcla de reacción por 60 horas aproximadamente, obteniéndose el producto final. (Figura 1)

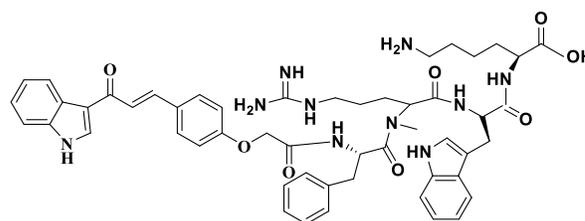


Figura 1. Estructura del compuesto final: Tetrapéptido metil-indol.

#### Separación de resina e hidrólisis del péptido

La resina fue separada del péptido agregando 5 mL de ácido trifluoroacético (TFA)/trietilsilano/agua (95:2.5:2.5, v/v/v) por un período de 3 h, y el péptido crudo se re-precipitó en éter frío, dando un precipitado beige. La suspensión resultante fue centrifugada por 30 min at 2000 rpm, y el líquido sobrante fue decantado, el péptido crudo fue lavado nuevamente con éter frío y centrifugado, se repitió una vez más el procedimiento anterior y se secó bajo vacío. El péptido se disolvió en CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 90:10, se pasó a una jeringa, se hizo pasar por un filtro de 45 μm y se transfirió a un tubo Falcón. Finalmente, el péptido se congeló a -80 °C y fue liofilizado.

#### Purificación

El compuesto obtenido se purificó a través de la técnica de placas preparativas de cromatografía en capa fina (TLC), se eluyeron varias placas y se usaron diferentes fases para su elución (Al-Obeidi, 1989; Mayorov, 2008 y

2006) , de las cuales, la más conveniente fue la fase MeOH/NH<sub>3</sub> 95:5. FT-IR (KBr),  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3282, 3199, 2985, 2935, 2843, 1714, 1682, 1656, 1598, 1570, 1537, 1511, 1458, 1440, 1423, 1401, 1339, 1372, 1250, 1164, 1094, 936, 854, 779, 742, 653. (Figura 4).

Por último, el compuesto final obtenido, se analizó por HPLC acoplado a masas.

### Estudio biológico

Se hicieron las pruebas in vitro con las líneas celulares de mama por la técnica colorimétrica MTT, la morfología celular por microscopía óptica.

Cultivo celular: Las líneas celulares de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), fueron cultivadas en placas de 96 pozos a una confluencia de 7,000 células por pozo con un volumen total de 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h, para permitir la adhesión de las células a la superficie de la placa. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y se aplicaron los tratamientos en un nuevo medio de cultivo.

### Ensayos de citotoxicidad in vitro

Se probó la citotoxicidad de los péptidos en la línea celular MDA-MB-231, para ello, se retiró el medio de cultivo de los pocillos que contenían células adherentes y se adicionaron 100  $\mu$ L de medio fresco que contienen los péptidos en concentraciones de 15, 30, 45 y 60  $\mu$ g/mL. Los péptidos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), para obtener concentraciones de DMSO menores al 0.2 % v/v en el cultivo celular. Se emplearon tres controles a) control negativo, células sin tratamiento; b) control positivo, células tratadas con taxol 0.25  $\mu$ g/mL; y c) placebo, células con DMSO al 0.2 % v/v. Los tratamientos se mantuvieron en incubación durante 24 y 72 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, los resultados fueron evaluados mediante el ensayo MTT.

### Ensayo MTT

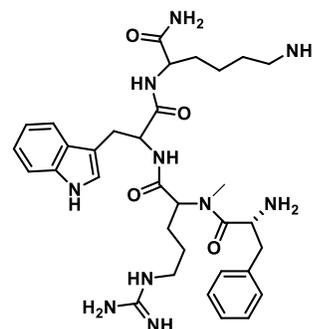
Una vez que se concluyeron los tratamientos, se adicionaron a cada pozo 0.1 mg del reactivo MTT y se incubaron las placas durante 2 h a 37 °C en oscuridad con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de completar el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 100  $\mu$ L de DMSO.

Las muestras fueron analizadas por espectroscopia en un lector de ELISA a 570 nm. Los diferentes tratamientos fueron comparados contra el control negativo, a partir de éste, se calculó el porcentaje de viabilidad celular.

## Resultados y discusión

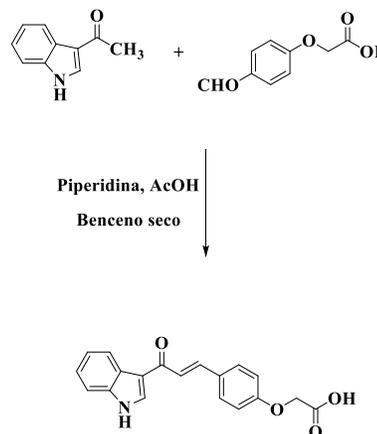
### Síntesis Química

Nuestra estrategia de síntesis para obtener el tetrapéptido-metilado-indólico (III) comenzó con la síntesis del tetrapéptido lineal metilado donde la secuencia del tetrapéptido lineal es: D-Phe-Arg(Me)-Trp-Lys, con agentes acoplantes diferentes a los que ya han sido utilizados comúnmente, razón por la cual fue necesario estandarizar otra metodología para la síntesis del péptido obtenido. La secuencia del tetrapéptido lineal es: D-Phe-Arg(Me)-Trp-Lys. Figura 2. Estructura del tetrapéptido metilado: D-Phe-Arg(Me)-Trp-Lys. La preparación del péptido lineal metilado se llevó a cabo mediante la técnica de síntesis en fase sólida (SPS) a través de la metodología de Merrifield, utilizando aminoácidos protegidos con N<sup>α</sup>-Fmoc. El proceso de metilación se hizo bajo las condiciones de Mitsunobu (Mayorov et al., 2006; Grieco et al., 2006).



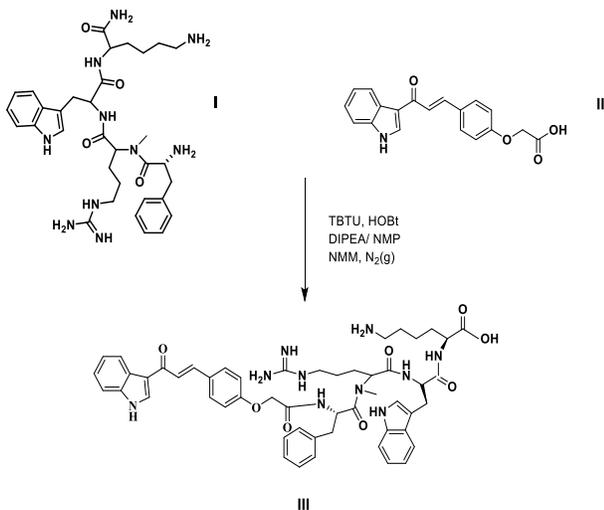
**Figura 2.** Estructura del tetrapéptido metilado: D-Phe-Arg(Me)-Trp-Lys.

Por otra parte, se obtuvo un compuesto heterocíclico quelante bifuncional del tipo indol, este derivado de indol **II** ya ha sido previamente publicado y descrito por (Ismail & Hatori; 2011), para ser coordinado al tetrapéptido metilado obtenido. Figura 3.



**Figura 3.** Síntesis del derivado de indol **II**.

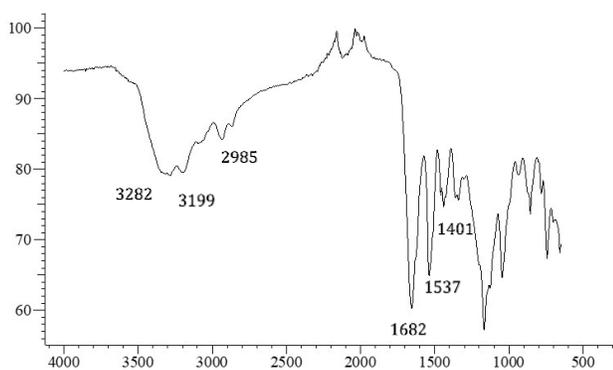
El compuesto final **III**, se obtuvo a través de la síntesis en fase sólida (SPS) en donde el tetrapéptido metilado **I** y el núcleo indólico **II** fueron unidos a través de la formación de una amida con la cantidad de equivalentes y agentes acoplantes ajustados a la molécula obtenida mostrada en el Esquema 2.



**Esquema 2.** Síntesis de 2,2'-[4-[[4-[[{(1E)-3-(1H-indol-3-il)-3-oxoprop-1-en-1-ilo]fenoxi}acetamido]fenil]etil]fenil]azanedil]di(etano-2,1-diil)dipropionato (**III**).

### Espectroscopia de FT-IR del tetrapéptido metilado-indol **III**

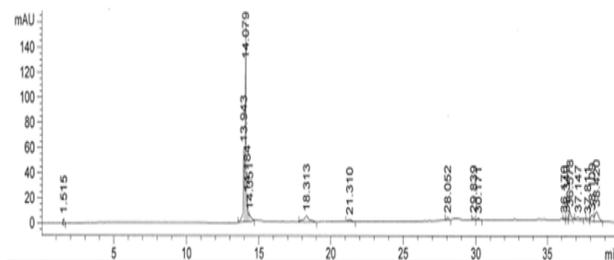
Se presenta el espectro de FT-IR del compuesto final en donde se muestra la aparición del nuevo enlace peptídico (amida) del metilo del aminoácido metilado, la presencia del heterociclo indólico y el tetrapéptido. (Figura 4)



**Figura 4.** FT-IR del tetrapéptido metilado-Indol **III**.

### Cromatografía de HPLC del tetrapéptido metilado-indol **III**

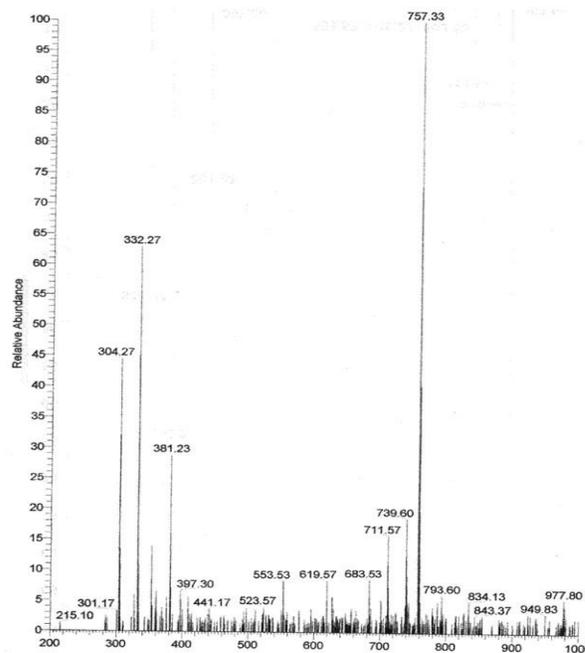
En el cromatograma de HPLC podemos observar un compuesto mayoritario proveniente del compuesto final y que fue aislado y purificado. (Figura 5).



**Figura 5.** Cromatograma de HPLC del tetrapéptido metilado-indol **III**.

### Espectroscopia de masas del tetrapéptido metilado-indol **III**

Finalmente, como caracterización espectroscópica se caracterizó por espectrometría de masas acoplado a HPLC y se aprecia un ión molecular en 984 g/mol y un pico base de 757 g/mol. (Figura 6)



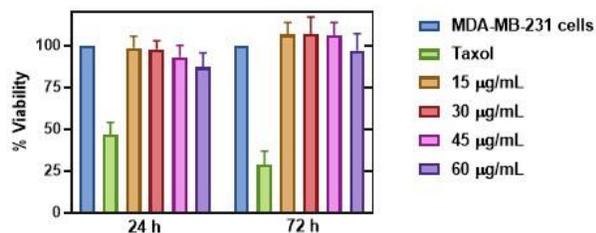
**Figura 6.** Espectro de masas del tetrapéptido metilado-Indol **III**.

### Efecto citotóxico del péptido sobre células de adenocarcinoma de mama humano

La actividad antitumoral del péptido se evaluó in vitro en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), sin embargo, la concentración más alta que se evaluó fue de 60 µg/mL, y se encontró que la viabilidad de las células disminuyó 15 % luego de 24 horas de tratamiento.

El Taxol fue probado a una concentración de 250 µg/mL y mostró una disminución en la viabilidad de 50 % a las 24 h, con esta primera evaluación encontramos que el péptido tiene efecto sobre células de cáncer de mama, sin

embargo, es importante repetir la prueba con una mayor concentración del péptido. Figura 7.



**Figura 7.** Ensayo de citotoxicidad biológica del tetrapéptido metilado-indol III a 24 h 72 h.

## Conclusiones

Fue necesario establecer y estandarizar una nueva metodología para la obtención de nuestro péptido, en cuanto a la síntesis del compuesto heterocíclico de indol que fue acoplado al péptido lineal ya ha sido sintetizado anteriormente por nosotros y por otros autores y ha dado actividad biológica.

La síntesis y evaluación *in vitro* de péptidos metilados anclados a heterociclos, en este caso del tipo indólico, con actividad antitumoral, permitirá el desarrollo de nuevos compuestos aplicados en estudios de cáncer de mama, entre otros.

Se logró la apertura de nuevas líneas de investigación encaminadas al desarrollo y perfeccionamiento de esta familia de péptidos.

Se propuso hacer un ensayo de citotoxicidad con una baja concentración del compuesto; frente a la línea celular de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). Los resultados obtenidos de actividad fueron bajos por parte del péptido obtenido, aproximadamente del 10%, considerando que la concentración tomada del compuesto fue muy baja y que presente un poco de actividad nos motiva a que se sintetice más compuesto para probarlo nuevamente con esta y otras líneas celulares.

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo a CONAHcyT por la beca otorgada para la estancia de posdoctorado otorgada con Referencia: CVU No.162415 y al proyecto de FONDOS FEDERALES-México (Grant HIM-2022-051 FF) por el apoyo financiero.

## Referencias

American Cancer Society. (20 de noviembre de 2020) Qué es el cáncer? <https://www.cancer.org/es/cancer/entendimiento-del-cancer/que-es-el-cancer.html>

Al-Obeidi, F., Castrucci, A. M. D. L., Hadley, M. E., & Hruby, V. J. (1989). Potent and prolonged-acting cyclic lactam analogs of  $\alpha$ -melanotropin: design based on molecular dynamics. *J. Med. Chem.*, 32(12), 2555-2561. <https://doi.org/10.1021/jm00132a010>

Biron, E., Chatterjee, J., Ovadia, O., Langenegger, D., Brueggen, J., Hoyer, D., Kessler, H. (2008). Improving oral bioavailability of peptides by multiple N-methylation: somatostatin analogues. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 47(14), 2595-2599. <https://doi.org/10.1002/anie.200705797>

Biron, E., & Kessler, H. (2005). Convenient synthesis of N-methylamino acids compatible with Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, 70(13), 5183-5189. <https://doi.org/10.1021/jo050477z>

Grieco, P., Cai, M., Mayorov, A. V., Trivedi, D., & Hruby, V. J. (2006). Structure-activity studies of new melanocortin peptides containing an aromatic amino acid at the N-terminal position. *Peptides*, 27(2), 472-481. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.032>

Hancock, R. E., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS*, 97(16), 8856-8861. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8856>

Ismail, N.S. M.; Hatori, M. (2011). Molecular Modeling based approach, Synthesis and *in vitro* assay to new indole inhibitors of hepatitis C NS3/4A Serine protease. *Bioorg. Med. Chem*, 19, 374-383. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.11.017>.

Krieger, D. T. (1983). Brain peptides: what, where, and why?. *Sci*, 222(4627), 975-985. DOI: 10.1126/science.6139875

Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov*, 7(1), 21-39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>

MacKinnon, A. C., Armstrong, R. A., Waters, C. M., Cummings, J., Smyth, J. F., Haslett, C., & Sethi, T. (1999). [Arg6, D-Trp7, 9, NmePhe8]-substance P (6-11) activates JNK and induces apoptosis in small cell lung cancer cells via an oxidant-dependent mechanism. *BJC*, 80(7), 1026-1034. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690458>

Mayorov, A. V., Cai, M., Palmer, E. S., Dedek, M. M., Cain, J. P., Van Scoy, A. R., Hruby, V. J. (2008). Structure-activity relationships of cyclic lactam analogues of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) targeting the human melanocortin-3 receptor. *J. Med. Chem.*, 51(2), 187-195. <https://doi.org/10.1021/jm070461w>

Mayorov, A. V., Han, S. Y., Cai, M., Hammer, M. R., Trivedi, D., & Hruby, V. J. (2006). Effects of Macrocyclic Size and Rigidity on Melanocortin Receptor-1 and-5 Selectivity in Cyclic Lactam  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone Analogs. *Chem. Biol. Drug Des*, 67(5), 329-335.

<https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2006.00383.x>

Nielsen, P. E. (Ed.). (2004). Pseudo-peptides in drug discovery. John Wiley & Sons.

<http://web.stanford.edu/group/barronlab/PubPdfs/2004/barronpubother04.pdf>

Offerman, S. C., Kadirvel, M., Abusara, O. H., Bryant, J. L., Telfer, B. A., Brown, G., Aojula, H. S. (2017). N-tert-Prenylation of the indole ring improves the cytotoxicity of a short antagonist G analogue against small cell lung cancer. *Medchemcomm*, 8(3), 551-558. DOI: 10.1039/C6MD00691D

Semenov, A., Olson, J. E., & Rosenthal, P. J. (1998). Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42(9), 2254-2258. DOI: 10.1128/aac.42.9.2254

Teixidó, M., Albericio, F., & Giralt, E. (2005). Solid-phase synthesis and characterization of N-methyl-rich peptides. *Int. J. Pept. Res.*, 65(2), 153-166.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00213.x>

Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). Review The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 2015(1), 68-77.

DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2014.47136>