

**INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**

**LA SÍNTESIS ORGÁNICA EN LA ERA DE LOS
FÁRMACOS BIOLÓGICOS**

**DISCURSO DEL
EXCMO. SR. D. JOSÉ CARLOS MENÉNDEZ RAMOS**

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 11 DE OCTUBRE DE 2018 PARA SU
INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DE LA
EXCMA. SRA. DÑA. MARÍA DEL CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ



Madrid, 2018

ÍNDICE

Prólogo	5
Recuerdo biográfico del Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana	6
LA SÍNTESIS ORGÁNICA EN LA ERA DE LOS FÁRMACOS BIOLÓGICOS	
1. Introducción	11
2. Síntesis orgánica en la generación de nuevas moléculas candidatas a fármaco: la exploración del espacio químico	13
3. Síntesis orgánica con biomoléculas como sustratos	20
3.1. Modificación química de proteínas	20
3.2. Química <i>click</i>	22
4. Síntesis orgánica intracelular	28
4.1. Proteómica química. Aplicaciones de la síntesis <i>in vivo</i> al diagnóstico por imagen	28
4.2. Hacia el metabolismo artificial	30
5. Obtención y mejora de fármacos biológicos mediante síntesis orgánica	35
5.1. Vacunas sintéticas	35
5.1.1. Vacunas peptídicas	36
5.1.2. Vacunas glucopeptídicas	40
5.2. Síntesis química de biomoléculas naturales	42
5.4. Síntesis química de biomoléculas artificiales	48
6. Moléculas orgánicas pequeñas que llevan a cabo la función de fármacos biológicos	50
7. Observaciones finales	57
DISCURSO DE CONTESTACIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA	71

PRÓLOGO

Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,
Excelentísimas Señoras y Señores Académicos,
Señoras y señores, queridos amigos

Quisiera que mis primeras palabras sean de agradecimiento hacia los Académicos de Número de esta Real Academia por su generosa acogida. Espero poder corresponder con mi trabajo a favor de esta Corporación al honor que me hacen al admitirme en ella. En particular, quiero dejar constancia de mi profundo agradecimiento a los Académicos que tuvieron la amabilidad de avalar mi candidatura, la Excelentísima Señora doña Carmen Avendaño López y los Excelentísimos Señores don Antonio Monge Vega y don Fidel Ortega Ruiz de Apodaca.

Me gustaría agradecer especialmente a la Dra. Avendaño, compañera de trabajo durante muchos años y amiga, el entusiasmo con el que ha impulsado mi entrada en esta Real Academia y ha preparado su discurso de contestación. También quiero recordar con agradecimiento a todos los compañeros del Departamento que me ayudan en el trabajo diario y me proporcionan el ánimo necesario para perseverar en el trabajo, a menudo con su mera presencia. Gracias también a mis padres, mis mejores profesores, por enseñarme a valorar el esfuerzo y el amor por el trabajo bien hecho y a mi esposa e hijos por su comprensión con los inconvenientes que implica mi dedicación profesional. Finalmente, a todos los presentes, compañeros, familiares y amigos, quiero agradecerles vuestra compañía en este acto.

RECUERDO BIOGRÁFICO DEL EXCMO. SR. D. ROMÁN DE VICENTE JORDANA

Antes de iniciar mi discurso de ingreso propiamente dicho, es grato para mí cumplir con una de las más arraigadas tradiciones académicas, la de glosar la figura de mi antecesor en la medalla número 15, el Excelentísimo Sr. D. Román de Vicente Jordana. Aunque le conocí solo superficialmente, el estudio de su discurso de ingreso y de algunas otras de sus publicaciones, así como la de las contribuciones de varios miembros de esta Corporación a su sesión necrológica,¹ me permiten calificarle como un investigador original y apasionado por su trabajo, que contribuyó de forma entusiasta a las actividades de esta Real Academia.

Nació en Zaragoza (6 sept. 1920), el mayor de 8 hermanos. Cursó los estudios de Maestro Nacional (Zaragoza, 1940) y los de Farmacia, logrando su título de Licenciado en 1944 y el de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense en 1949, con premio extraordinario. Se colegió en Huesca en 1952 y llegó a ejercer como farmacéutico en Monzón,² pero su interés por la investigación le movió a solicitar y obtener una beca en la Universidad de Cambridge, donde pasó varios años. En este período trabajó con Kenneth Smith, uno de los padres de la virología vegetal, y con Walter John Dowson, un especialista en fitopatología del Departamento de Botánica, obteniendo un *Master of Science* por la Facultad de Biología (1957). Mencionaré también, como prueba de su inextinguible curiosidad intelectual, que en la etapa de madurez de su vida obtuvo también una Licenciatura y después, en 2004, un Doctorado en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense.

A su regreso a España desde Cambridge, inició su carrera científica en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, donde llegó a ser Profesor de Investigación y Jefe del Departamento de Bacteriología y de la Unidad de Fitobacteriología del Instituto de Microbiología Jaime Ferrán, además de ocupar cargos como el de Consejero Adjunto del CSIC y ser vocal del Consejo Técnico Asesor del Patronato "Santiago Ramón y Cajal".

Fue un investigador imaginativo, capaz de proponer nuevos conceptos y defenderlos con pasión. Fue autor de la teoría de la función citoarjé, de *cytos* (célula) y *arjé* (dirigir), un modelo funcional de los sistemas vivos que empezó a

dar a conocer aproximadamente a partir de 1955. El citoarjé sería una estructura de carácter universal capaz de dirigir toda la actividad celular, modulada en conjunción con los factores ambientales. Él propuso inicialmente que podría tratarse de una familia de nucleoproteínas responsables de las características de cada especie. Las nucleoproteínas propias de cada especie forman el arjesoma y dirigen las operaciones de síntesis de la célula. La presencia de otro organismo, simbiótico o parasítico, induce una síntesis anormal en la célula huésped, que propuso designar como arjevirus. Aunque Román de Vicente dedicó una buena parte de sus esfuerzos a explorar las implicaciones de estas ideas, trabajó también en otros campos como el cáncer, el análisis microbiológico de alimentos y los estudios medioambientales. En total, publicó alrededor de 100 artículos de investigación, divulgativos y de ensayo, así como varios libros.

Recibió múltiples reconocimientos nacionales e internacionales a su labor científica. Destacan los premios "Leonardo Torres Quevedo" (1949) y "Alonso de Herrera" (1962) en España, el Diploma de Honor, Consejo de las Ciencias, Damasco (1969) y el Prix d'Honneur (Hors-Concurs) y Medalla de Oro, Academie Internationale de Lutèce, Paris (1978). Además, fue elegido Fellow de la World Academy of Art & Science de Estocolmo (1963), Académico Correspondiente de la Sociedad Argentina de Microbiología (1966), *Membro Honorario* de la Academia Nacional de Medicina de Río de Janeiro (1967) y miembro de la World Academy of Art and Science de Washington (1994).

A pesar de estos éxitos, su vida profesional no fue siempre sencilla, probablemente a causa de lo poco convencional de sus ideas. Además de los inevitables problemas de escasez de financiación, encontró a menudo la incompreensión de sus compañeros y tuvo muchas dificultades para que se publicaran sus primeros artículos científicos. Relata estas desventuras de soslayo en su discurso de ingreso en esta Academia, en el que habla con cariño del "Dr. Gonzalo Bilbao Agejas, que tanto batalló en compañía del Dr. José García Vicente por la publicación de mis trabajos". En el mismo discurso confiesa haber luchado contra "una idea de abandono, causada por un acoso absurdo y permanente".

En cuanto a su actividad en esta Academia, entró en ella como Académico Correspondiente en 1962, propuesto por los Excelentísimos Señores Ángel Santos Ruiz, Manuel Lora Tamayo y Lorenzo Vilas López. Su discurso de ingreso tuvo por título “Acción de la temperatura en la determinación de un foco de intoxicación alimenticia en alimentos congelados”. Posteriormente, ingresó como Académico de Número tras ser propuesto por los mismos académicos que en la ocasión anterior y tomó posesión el 8-05-1986 de la medalla nº 15, vacante por fallecimiento de Ramón Turrientes y Miguel. Su discurso de toma de posesión se tituló “Reflexiones sobre la biogénesis del *ontos*, ser, y del *oncos*, tumor, en la unidad de la función citoarjé”. Fue adscrito a la Sección 5ª, entonces denominada de “Higiene y Deontología”, y hoy Sección 6ª con el nombre de “Historia, Legislación y Bioética” de la que fue Presidente entre 1993 y 1999. También le correspondió pronunciar el discurso solemne del acto protocolario de apertura de curso académico, el 18 de enero de 1990, para el que eligió el título “El grave peligro de pensar”, un elaborado ensayo literario sobre la libertad de expresión.

**LA SÍNTESIS ORGÁNICA EN LA ERA DE LOS
FÁRMACOS BIOLÓGICOS**

1. INTRODUCCIÓN

La palabra “síntesis” proviene del griego σύνθεσις, formada por σύν (junto con) y θέσις (colocación), por lo que etimológicamente síntesis significa “poner junto”, es decir, unir dos elementos para formar algo más complejo. Esta palabra se ha utilizado en el ámbito de la química desde hace unos 300 años, antes de que existieran las ideas modernas sobre la estructura química y antes incluso de la teoría atómica de Dalton.³

En lenguaje moderno, la síntesis química puede definirse como la construcción planificada de compuestos por aplicación de reacciones químicas. La síntesis, y sobre todo la rama de ésta que se centra en la obtención de compuestos orgánicos, ha experimentado un progreso espectacular,^{4,5,6,7} hasta el punto de que se ha afirmado que es ya una ciencia madura y que cualquier molécula orgánica razonablemente estable puede prepararse por los métodos sintéticos conocidos con tal de que haya un suministro ilimitado de financiación, tiempo y mano de obra. Aunque es probable que esto sea cierto, también lo es que nunca se dispondrá de cantidades ilimitadas de los recursos mencionados, por lo cual la investigación en la mejora de los métodos existentes y en el descubrimiento de otros nuevos continúa siendo una de las partes más importantes de la Química Orgánica. De hecho, puede afirmarse que, a pesar de sus éxitos, la síntesis orgánica está todavía poco avanzada en muchos aspectos cruciales por lo que estamos todavía muy lejos de disponer de métodos sintéticos ideales.^{8,9} Algunas facetas de la síntesis que serán presumiblemente la base de su crecimiento futuro son:

1. Mejora de métodos. A pesar de los progresos realizados, hay muchos tipos de transformaciones que no se pueden llevar a cabo con la metodología actual y serían de gran importancia, entre todos los campos de la ciencia, incluyendo el descubrimiento de nuevos fármacos.¹⁰
2. Química verde. La química sintética debe aspirar a causar la mínima perturbación del entorno natural, y se está poniendo cada vez mayor énfasis en el desarrollo de métodos que contribuyan a este objetivo.^{11,12}

3. Mayor eficiencia sintética. Implica el desarrollo de métodos capaces de alcanzar rápidamente diversidad y complejidad estructurales a partir de materiales de partida sencillos, normalmente mediante la generación de varios enlaces en una sola operación sintética.^{13,14}
4. Automatización de métodos sintéticos, que permita disminuir el esfuerzo manual asociado a ellos y mejorar su eficacia.^{15,16,17,18}
5. Síntesis eficiente a escala industrial de moléculas complejas, tales como productos naturales y sus análogos.¹⁹
6. Síntesis orgánica de biomoléculas.

A pesar de lo tentador que resulta para mí desarrollar el tema con mayor extensión, no voy a dedicar este discurso a la síntesis orgánica como tal, sino a su repercusión en el campo del descubrimiento de fármacos y, sobre todo, a su conexión con los fármacos biológicos. Por ello, de todos los puntos anteriores, solo tocaré brevemente el último, que guarda una estrecha relación con otras partes del discurso.

Puede considerarse que la investigación en nuevos fármacos previa a su estudio clínico consta de las tres grandes etapas que se resumen en la Figura 1.²⁰ La síntesis orgánica es crucial en las tres, y el desafío al que se enfrenta es el de desarrollar métodos que aumenten su probabilidad de éxito. Dada la enorme amplitud de este tema, me voy a centrar sobre todo en la primera etapa, es decir, la fase inicial de descubrimiento.



Figura 1. Las tres etapas del descubrimiento de fármacos en las que interviene la síntesis orgánica

2. SÍNTESIS ORGÁNICA EN LA GENERACIÓN DE NUEVAS MOLÉCULAS CANDIDATAS A FÁRMACO: LA EXPLORACIÓN DEL ESPACIO QUÍMICO

Puesto que, incluso en esta era de los fármacos biológicos, los fármacos son predominantemente moléculas orgánicas pequeñas, y en mi opinión seguirán siéndolo, voy a comentar algunos aspectos de la manera en que se generan actualmente nuevos compuestos bioactivos (*hits*) que inician una línea de optimización que quizá termine en un fármaco en el mercado.

Los fármacos conocidos actúan sobre un total de aproximadamente 500 dianas terapéuticas. Sin embargo, se ha estimado recientemente que hay unas 4.500 proteínas susceptibles de ser dianas terapéuticas,²¹ de las cuales la mayoría están desaprovechadas. Por otra parte, solamente un 4% de los programas de investigación sobre nuevos fármacos en la industria farmacéutica conducen finalmente a un fármaco en el mercado. Esta baja tasa de éxito se atribuye principalmente a dos factores: (a) la información que proporcionan los experimentos preclínicos no es trasladable a los resultados clínicos en humanos; (b) la diana seleccionada puede no ser la más adecuada para combatir la enfermedad en cuestión. Por estos motivos, es muy importante que se incremente el número de proteínas identificadas como dianas terapéuticas y que se descubran moléculas capaces de interactuar con ellas.

El desarrollo de los métodos de ensayo de alta productividad (*high-throughput screening*, HTS) ha hecho que la mayor parte de los proyectos de descubrimiento de fármacos en la industria farmacéutica se inicien por el estudio automatizado de una colección de compuestos (una quimioteca) como ligandos de una determinada diana que se considera prometedora para tratar una enfermedad. Los resultados de esta fase inicial, de la que dependen todas las posteriores, están condicionados, obviamente, por la calidad de la quimioteca investigada. En principio, es deseable que represente moléculas con la mayor diversidad estructural posible, para que sea máxima la probabilidad de que algunas de ellas se unan a dianas diversas. En otras palabras, las quimiotecas empleadas en la búsqueda de compuestos bioactivos deben ocupar una región lo más amplia posible del espacio químico.

El espacio químico se define como el conjunto de todas las moléculas que cumplen una serie de reglas estructurales establecidas previamente, y las dimensiones de dicho espacio, en lugar de las coordenadas espaciales que nos son familiares, son tres o más propiedades de dichas moléculas. Esta noción puede aplicarse a otras situaciones, pero en el campo del descubrimiento de fármacos el espacio químico relevante es el que forman las moléculas con actividad farmacológica. En la Figura 2 se representa el espacio químico, definido por tres propiedades que corresponden a los tres ejes de coordenadas, y se indican regiones en las que existen determinadas propiedades terapéuticas, así como otra en la que existe actividad por vía oral.

Las regiones del espacio químico conocidas en la actualidad corresponden a las estructuras de los productos naturales y de síntesis. Sin embargo, no existe garantía de que estas regiones, que están limitadas por los tipos de estructuras a las que permiten acceder las rutas biosintéticas y las metodologías sintéticas conocidas, sean las más adecuadas para la búsqueda de moléculas con actividad biológica. De ahí la importancia de la investigación en nuevos métodos de síntesis que permitan generar estructuras muy diferentes de las conocidas actualmente.

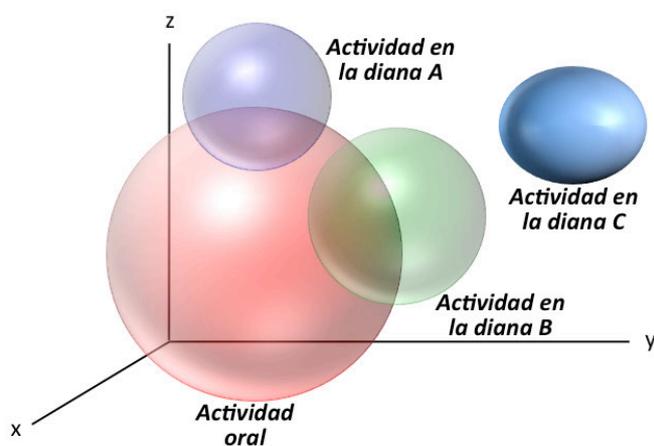


Figura 2. Representación esquemática del espacio químico

La forma tradicional de conseguir diversidad estructural consiste en introducir diferentes sustituyentes en torno a un núcleo común; esta es la metodología empleada, por ejemplo, en la Química Combinatoria. Sin embargo, esta manera de proceder conduce únicamente a la ocupación del espacio químico en torno al punto que corresponde al esqueleto no sustituido (Figura 3). Si se desea poblar el espacio químico de una manera más completa y sistemática, lo ideal sería empezar por generar una elevada diversidad de esqueletos y después una serie de análogos de cada uno de ellos (Figura 4). Esta estrategia se conoce como “síntesis orientada a la diversidad” (*diversity-oriented synthesis, DOS*)^{20,22,23} y, a pesar de su sencillez conceptual, es relativamente reciente, ya que fue propuesta por Schreiber en 2000.²⁴

Desde su introducción, este concepto ha sido ampliamente aceptado como herramienta para el estudio de procesos biológicos mediante la genómica y proteómica químicas, en las que se estudia la función celular de una proteína mediante su bloqueo con moléculas orgánicas en lugar de utilizar una alteración de los genes que codifican la proteína.^{25,26} Por tanto, la síntesis orientada a la diversidad está resultando esencial para el campo de la Química Biológica (traducción habitual, aunque incorrecta, de *Chemical Biology*), que se ocupa del estudio de los procesos biológicos utilizando como herramientas moléculas orgánicas. También se han empleado con éxito métodos basados en DOS para la identificación de compuestos cabeza de serie en el ámbito del descubrimiento de fármacos.^{27,28}

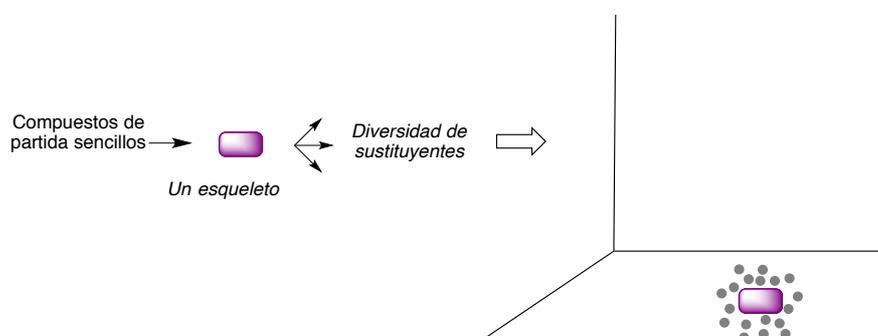


Figura 3. Ocupación del espacio químico por manipulación de un único esqueleto. Cada punto gris representa un compuesto derivado del esqueleto principal

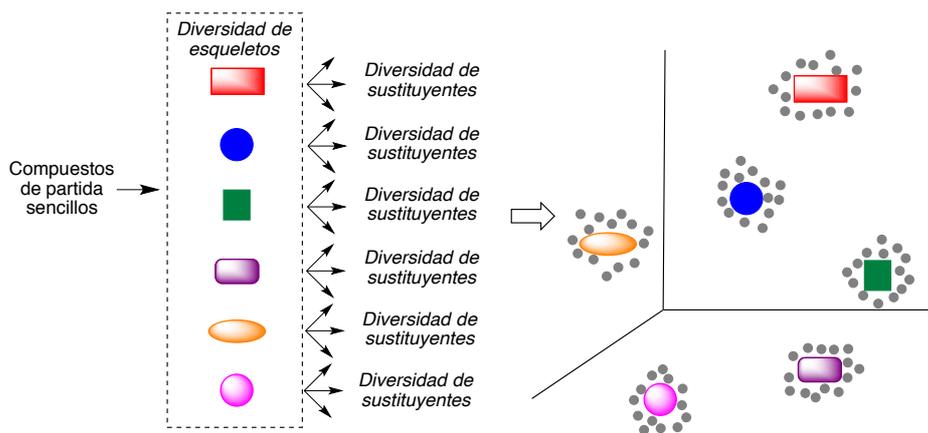


Figura 4. Ocupación del espacio químico a través de la síntesis orientada a diversidad (DOS). Cada punto gris representa un compuesto derivado de uno de los esqueletos implicados

Una de las maneras de llevar a cabo una exploración sistemática del espacio químico se representa en la Figura 5, y se conoce como estrategia de construcción-emparejamiento-acoplamiento (*build-couple-pair*).^{20, 29} La etapa de construcción implica simplemente la síntesis de los materiales de partida adecuadamente funcionalizados para poder llevar a cabo las etapas posteriores. En la fase de emparejamiento, se combinan dichos materiales, idealmente en un solo paso mediante el empleo de reacciones multicomponente, para dar lugar a un incremento inicial de complejidad. Finalmente, en la fase de acoplamiento se aprovechan los grupos funcionales presentes en los materiales de partida para llevar a cabo una reacción adicional de generación de complejidad estructural, generalmente mediante procesos de ciclación.

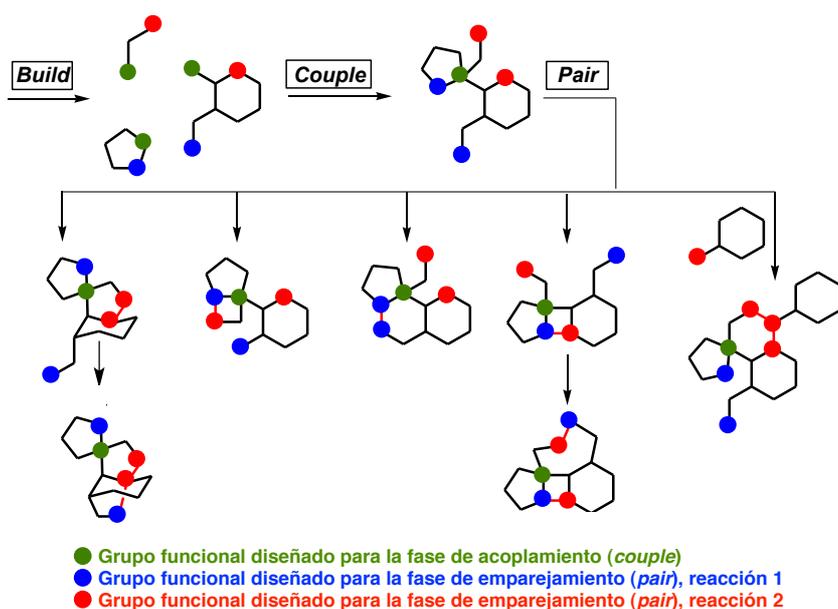


Figura 5. La estrategia construcción-acoplamiento-emparejamiento (*build-couple-pair*) para lograr diversidad estructural

No hay un método único para determinar el tamaño del espacio químico, pero a partir de algunas suposiciones de partida razonables (compuestos formados por C, H, N, S, O, un máximo de 30 átomos y cuatro ciclos) se ha estimado en 10^{63} moléculas.³⁰ Es un número inmenso, difícil de concebir. Como referencia, el *Chemical Abstracts* contiene $1,43 \times 10^8$ compuestos descritos en la bibliografía química a partir de 1800³¹ y la edad del Universo es de $4,3 \times 10^{17}$ segundos. No existe, por tanto, la posibilidad de sintetizar ni siquiera una pequeña fracción de este conjunto de compuestos. Por este motivo, es frecuente tratar de dirigir la construcción de quimiotecas DOS hacia regiones del espacio químico en las que se considere que existe una mayor probabilidad de éxito. Una posibilidad es el empleo como guía de los productos naturales, ya que se considera que han sido “optimizados” en el transcurso de la evolución para interactuar con biomoléculas. Otra posibilidad es basar el diseño de las quimiotecas en el concepto de estructura privilegiada. Se llama así a una serie de fragmentos estructurales, con frecuencia heterocíclicos, que están incluidos en compuestos que han demostrado la capacidad de unirse a

dianas farmacológicas variadas, por lo que se interpreta que dichas estructuras tienen una especial afinidad por el material biológico.³²

Para ilustrar la construcción de quimiotecas basada en estos principios, mencionaré dos ejemplos procedentes de mi grupo de investigación. En el primer caso, la quimioteca se construyó alrededor de un núcleo de tetrahidropiridina, fácilmente accesible a través de una reacción multicomponente que previamente habíamos puesto a punto a partir de materiales de partida sencillos y económicos.³³ Las transformaciones posteriores incluyeron, entre otros, procesos de deshidrogenación parcial³⁴ o completa,³⁵ reacciones de reducción diastereoselectiva,³⁶ de Povarov,³⁷ de metátesis,^{38, 39} de Diels-Alder³⁸ y de Pictet-Spengler.⁴⁰ Algunas de estas transformaciones se resumen en la Figura 6.

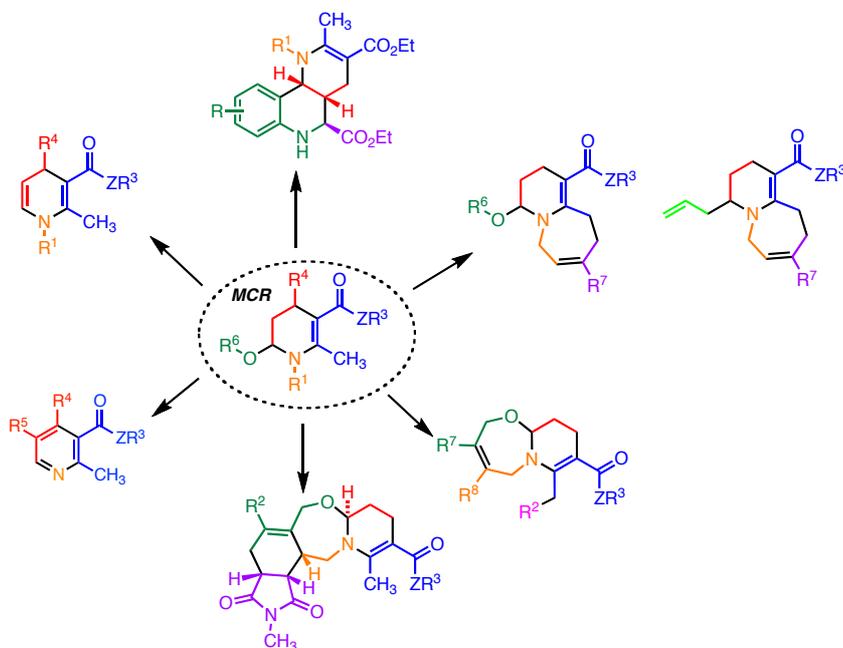


Figura 6. Ejemplos de construcción de quimiotecas orientadas a diversidad a partir de derivados de 6-alcoxi-1,4,5,6-tetrahidropiridina procedentes de una reacción multicomponente

En el segundo ejemplo, las moléculas están construidas sobre núcleos de pirrol procedentes también de una reacción multicomponente, que en este caso se llevó a cabo en condiciones mecanoquímicas.^{41,42,43} Algunos de los procesos de ciclación que se llevaron a cabo posteriormente para dar lugar a diversos esqueletos heterocíclicos⁴⁴ se resumen en la Figura 7.

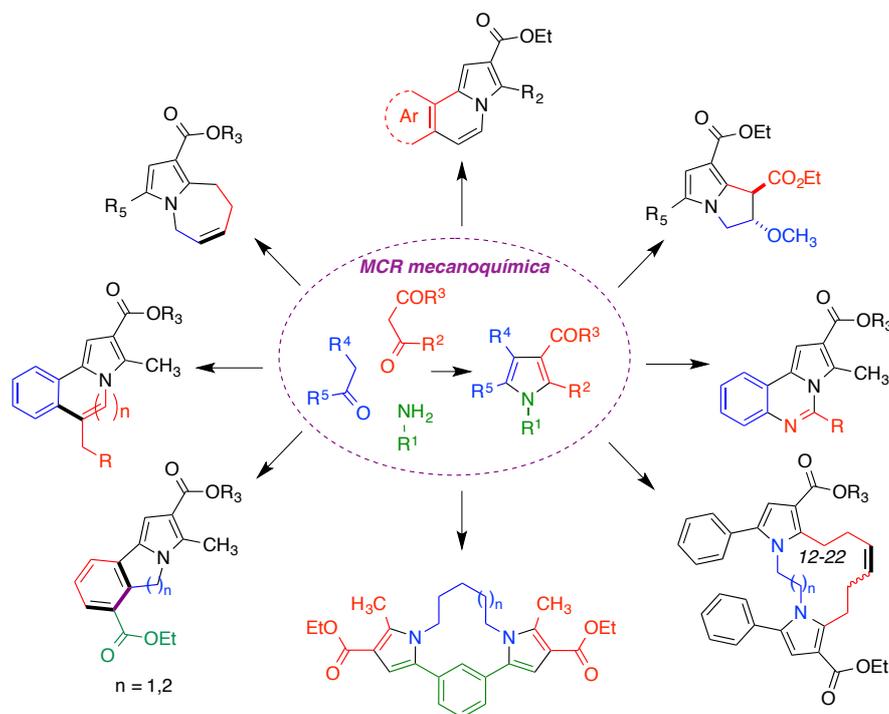


Figura 7. Ejemplos de construcción de quimiotecas orientadas a diversidad a partir de derivados de pirrol procedentes de una reacción multicomponente

3. SÍNTESIS ORGÁNICA CON BIOMOLÉCULAS COMO SUSTRATOS

Dando por sentada la relevancia de la síntesis en el descubrimiento y obtención de fármacos con estructura de moléculas orgánicas pequeñas, quisiera hablar ahora de su importancia en los fármacos biológicos, donde puede no resultar tan evidente. Dedicaré, por tanto, el resto del discurso a este aspecto del descubrimiento de fármacos.

3.1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE PROTEÍNAS

La modificación química de las cadenas laterales de determinados aminoácidos, formando éstos parte de una proteína, permite la posterior manipulación química de ésta y constituye el ejemplo más sencillo de síntesis orgánica realizada sobre una biomolécula como sustrato. Por ejemplo, la elevada nucleofilia del grupo mercapto de la cisteína permite su alquilación con derivados de maleimida a través de reacciones de adición de Michael (Figura 8).

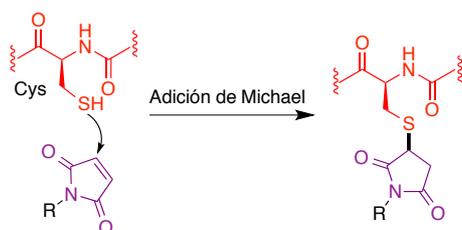


Figura 8. La adición de Michael de un residuo de cisteína contenido en una proteína a un derivado de maleimida

Esta transformación ha encontrado numerosas aplicaciones. Por un lado, es un método muy eficaz para fijar covalentemente proteínas a soportes sólidos para estudiar después su afinidad por colecciones de moléculas. Como ejemplo, se representa en la Figura 9 el método empleado por Schreiber para fijar una proteína a una lámina de vidrio, aprovechando que éste contiene grupos silanol, para posteriores estudios de Química Biológica de quimiotecas orientadas a diversidad.⁴⁵

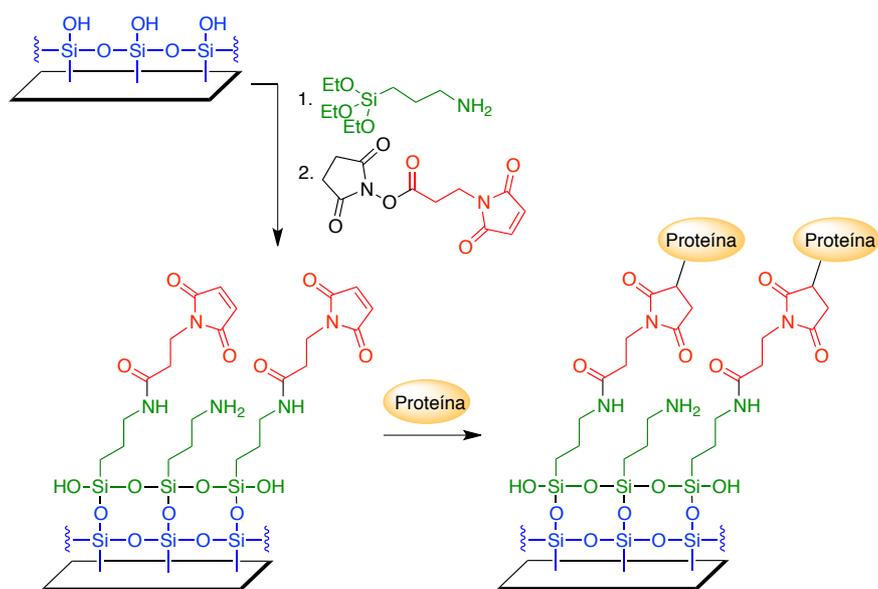


Figura 9. Fijación covalente de proteínas a soportes sólidos

Las adiciones de Michael a unidades de maleimida se han utilizado también para lograr la conjugación de fármacos de estructura polipeptídica con proteínas transportadoras. Un ejemplo es el caso de las incretinas, una familia de polipéptidos que resultan muy prometedores en el tratamiento de la diabetes⁴⁶ pero que, como es habitual en este tipo de biomoléculas, son inadecuadas como fármacos a causa de su reducida duración de acción, que se debe a su metabolismo por parte de una dipeptidasa plasmática (DPP-IV) y a su rápida eliminación por vía renal. Una manera de retrasar ambos procesos consiste en asociar el péptido a seroalbúmina, que dificulta el acceso de las peptidasas y, a causa de su gran tamaño, evita la filtración glomerular. El antidiabético experimental CJC-1131 consta de una molécula de GLP-1, la incretina natural humana, modificada por sustitución del segundo residuo de L-Ala por D-Ala, con objeto de dificultar su hidrólisis por DPP-IV, y a la que, además, se ha añadido un resto de lisina a su extremo C-terminal. El grupo amino de esta lisina se une, a través de un espaciador, a un fragmento de maleimida. Una vez en el plasma, la maleimida reacciona con residuos de cisteína de la albúmina y da lugar al sistema conjugado (Figura 10).

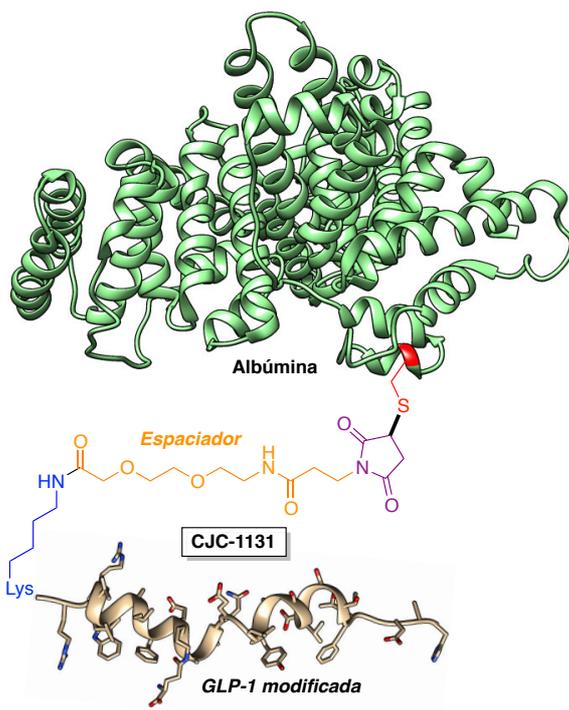


Figura 10. Producto conjugado formado *in vivo* por reacción entre el fármaco CJC-1131 y la albúmina

3.2. QUÍMICA *CLICK*

Una reacción de bioconjugación puede definirse como una reacción sintética que tiene como sustrato al menos una biomolécula, dando lugar a un enlace covalente. Las biomoléculas modificadas sintéticamente que se generan así tienen muy diversas aplicaciones, que incluyen:

1. Monitorización de procesos celulares.
2. Estudios de distribución de proteínas.
3. Estudios sobre la funcionalidad de enzimas.
4. Vectorización de fármacos hacia lugares específicos.
5. Generación de imágenes de biomarcadores.

En síntesis orgánica, la expresión “química *click*” no designa, en principio, a una reacción concreta, sino a un concepto que pretende imitar la manera en la que la naturaleza construye sus estructuras, y que busca, entre otros objetivos, lograr la compatibilidad entre la síntesis química y las moléculas biológicas. En general, la química sintética que cumpla esa condición se describe como “química bioortogonal”, en el sentido de que no interfiere las reacciones bioquímicas (es “ortogonal” a ellas).^{47,48}

El concepto de reacción *click* fue propuesto inicialmente por Sharpless. Una reacción debe reunir las siguientes condiciones para poder ser calificada como tal:⁴⁹

1. Tener lugar en una sola operación sintética.
2. Dar rendimientos muy altos
3. Dar lugar a productos de elevada estabilidad
4. Generar un mínimo número de subproductos no tóxicos.
5. Ser rápida, irreversible y transcurrir con elevado rendimiento.
6. Permitir la construcción modular de estructuras complejas.
7. Si se va a llevar a cabo en un entorno biológico, ser compatible con el agua.

La primera reacción que se consideró de forma generalizada como merecedora de ser calificada como *click* es la cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas para dar derivados de 1,2,3-triazol. Esta reacción fue descrita por primera vez por Huisgen, quien la llevó a cabo en condiciones térmicas y encontró que se formaban los dos posibles productos regioisoméricos, con estructuras de triazol 1,4- y 1,5-disustituidos.^{50,51} En el año 2002, Meldal, por un lado,⁵² y Fokin y Sharpless, por otro,⁵³ descubrieron de forma independiente una eficaz catálisis de esta cicloadición en presencia de sales de Cu(I). Esta variante de la reacción de Huisgen suele designarse de forma abreviada como CuAAC (*copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition*), y tiene la ventaja respecto a la reacción original de poder llevarse a cabo a temperatura ambiente y ser regioselectiva, ya que proporciona exclusivamente triazoles 1,4-disustituidos. Unos años después Fokin y Jia describieron un catalizador de rutenio que permite llevar a cabo una reacción análoga, que se conoce como RuAAC (*ruthenium-catalyzed azide-*

alkyne 1,3-dipolar cycloaddition) y que proporciona de forma regioselectiva triazoles 1,5-disustituídos (Figura 11).^{54,55}

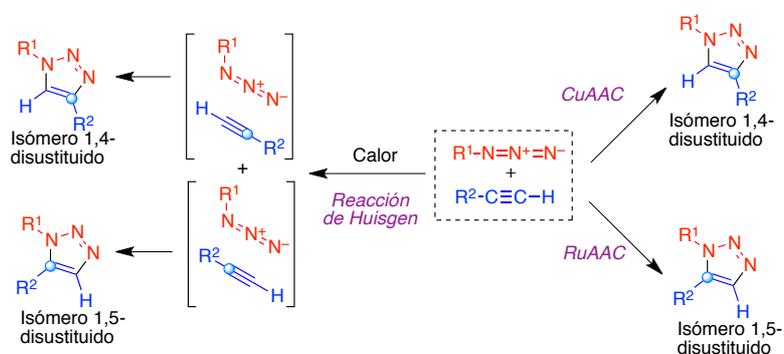


Figura 11. Variantes de la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos

La reacción CuAAC ha encontrado una gran aplicación en Química Farmacéutica y en Química Biológica, empleándose muy a menudo para lograr la unión de dos fragmentos activos en una sola molécula.^{56, 57, 58, 59, 60} Sin embargo, como regla general no puede llevarse a cabo en entornos biológicos a causa de la elevada toxicidad de las especies de Cu(I) y de su desactivación como catalizadores por coordinación con diversos grupos funcionales de las biomoléculas. Aunque recientemente se han encontrado formas de superar parcialmente esta limitación,⁶¹ estos problemas han servido de estímulo para el desarrollo de reacciones de cicloadición que no requieran catalizadores metálicos. La primera se debe al grupo de Bertozzi, y aprovecha la elevada reactividad asociada a la tensión angular de alquinos cuyo triple enlace pertenece a un carbociclo de ocho miembros, que se incrementa mediante la presencia de dos átomos de flúor, fuertemente aceptores, en la posición vecina. A partir de estos sustratos altamente reactivos, la reacción de cicloadición dipolar tiene lugar en condiciones suaves, aunque, al faltar el efecto director del catalizador de cobre, proporciona los dos regioisómeros posibles (Figura 12).⁶² Esta estrategia ha sido designada como *strain-promoted azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition* (SpAAC).

Una alternativa a los cicloalquinos son los cicloalquenos de configuración *trans*, especialmente el *trans*-cicloocteno, que está muy tensionado como consecuencia de la distorsión que induce en el anillo carbocíclico la geometría del doble enlace.

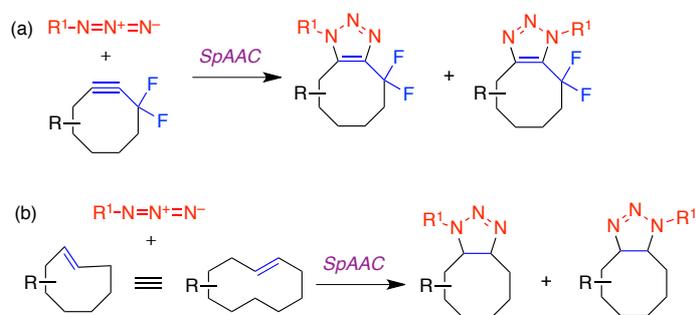


Figura 12. La estrategia SpAAC. (a) Reacción de cicloadición 1,3-dipolar con derivados de ciclooctino. (b) Reacción de cicloadición 1,3-dipolar con derivados de *trans*-ciclohexeno

Se han utilizado otras reacciones de cicloadición como base para procesos de bioconjugación. La cicloadición [4 + 2] es la clásica reacción de Diels-Alder, en la que se forma un ciclo de seis eslabones a partir de un compuesto de partida que aporta cuatro átomos al nuevo anillo y que contiene dos dobles enlaces conjugados (*dieno*) y de un segundo compuesto, del que proceden los dos átomos restantes del nuevo anillo y que contiene un doble enlace aislado (denominado *dienófilo*). Aunque existen ejemplos de su uso en reacciones de bioconjugación, tiene el inconveniente de que el aducto puede revertir a los compuestos de partida. Una manera de superar este problema es emplear como dieno un sistema de 1,2,4,5-tetrazina, ya que en ese caso el aducto inicialmente generado evoluciona rápidamente por pérdida de una molécula de nitrógeno y no tiene la opción de regenerar los compuestos de partida mediante un mecanismo de tipo retro Diels-Alder (Figura 13). La reacción de la tetrazina con alquenos se clasifica como un proceso hetero Diels-Alder de demanda electrónica inversa (iEDDA) porque en ella el dienófilo es de baja densidad electrónica.

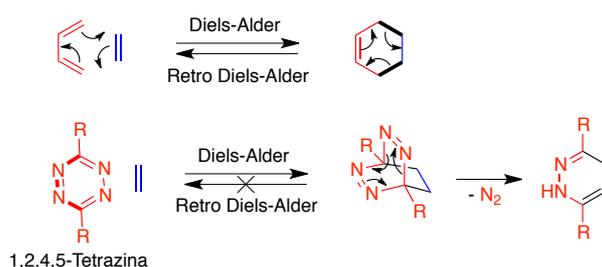


Figura 13. Reacciones de Diels-Alder convencionales y empleo de 1,2,4,5-tetrazina como heterodieno de demanda electrónica inversa

Se resume a continuación un ejemplo relativamente sencillo de aplicación de estas técnicas a la síntesis de sistemas de transporte de fármacos.

La incorporación de anticuerpos a la superficie de nanopartículas, dando lugar a inmunonanopartículas, permite incrementar la selectividad y especificidad de su distribución en comparación con las nanopartículas de actuación pasiva.⁶³ Los polímeros anfifílicos tienen la propiedad de autoensamblarse en contacto con el agua dando lugar a una nanoestructura que tiene el interior lipófilo y puede encapsular moléculas orgánicas y una corona hidrófila exterior, que queda expuesta al ambiente acuoso. Si se incorporan anillos de furano al polímero, las nanopartículas correspondientes los presentarán hacia el entorno acuoso. Schoichet demostró que la adición de anticuerpos a los que se había incorporado una unidad de maleimida daba lugar reacciones de Diels-Alder que permitían la unión covalente de ambas estructuras. Esta técnica permitió la preparación de nanopartículas asociadas covalentemente a trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido a HER-2. Esta proteína es una diana muy importante en varios tipos de tumores, especialmente de mama (Figura 14).

4. SÍNTESIS ORGÁNICA INTRACELULAR

4.1. PROTEÓMICA QUÍMICA. APLICACIONES DE LA SÍNTESIS *IN VIVO* AL DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

La proteómica química se basa en el uso de moléculas orgánicas como sondas para investigar la distribución y función de las proteínas, proporcionar información sobre las interacciones entre éstas y validar nuevas dianas farmacológicas. Esta nueva rama de la ciencia es actualmente esencial en el descubrimiento y desarrollo de fármacos.^{64,65,66,67}

La formación de imágenes basada en fluorescencia permite la visualización no invasiva de las biomoléculas para investigar sus funciones. Por este motivo, el descubrimiento de la proteína verde fluorescente, premiado con el premio Nobel de Química en 2008,⁶⁸ supuso una revolución en muchas áreas de la biología. El empleo de la química bioortogonal, cuyos principios se han resumido brevemente en el apartado anterior, ha permitido llevar a cabo estudios celulares de la interacción entre moléculas pequeñas y proteínas.⁶⁹ Como ejemplo, se resumen a continuación algunos estudios basados en el empleo de 1,2,4,5-tetrazinas en reacciones hetero Diels-Alder de demanda electrónica inversa (IEDDA).⁷⁰

En una aproximación a la localización de la diana intracelular de un fármaco, se puede introducir en un cultivo celular un análogo de dicho fármaco que se haya modificado mediante la introducción de un fragmento de *trans*-cicloocteno en una parte de la molécula que, de acuerdo con estudios de relación estructura-actividad previos, no sea esencial para la interacción con su diana. De entre las miles de proteínas presentes en la superficie o el interior de la célula y que forman el proteoma de ésta, este compuesto debe unirse selectivamente a su diana. Si a continuación se adiciona un derivado de tetrazina, dotado de fluorescencia para facilitar la monitorización del proceso, debe tener lugar una reacción hetero Diels-Alder en la que se genera una unión covalente entre el fármaco y el fragmento de tetrazina. Puesto que el fármaco, a su vez, se encuentra unido a su diana, el proceso induce la emisión fluorescente por parte de ésta (Figura 15). Este método ha permitido la

localización intracelular de la diana de un elevado número de fármacos, incluyendo el taxol,⁷¹ olaparib,⁷² foretinib⁷³ y dasatinib,⁷⁴ entre otros muchos.

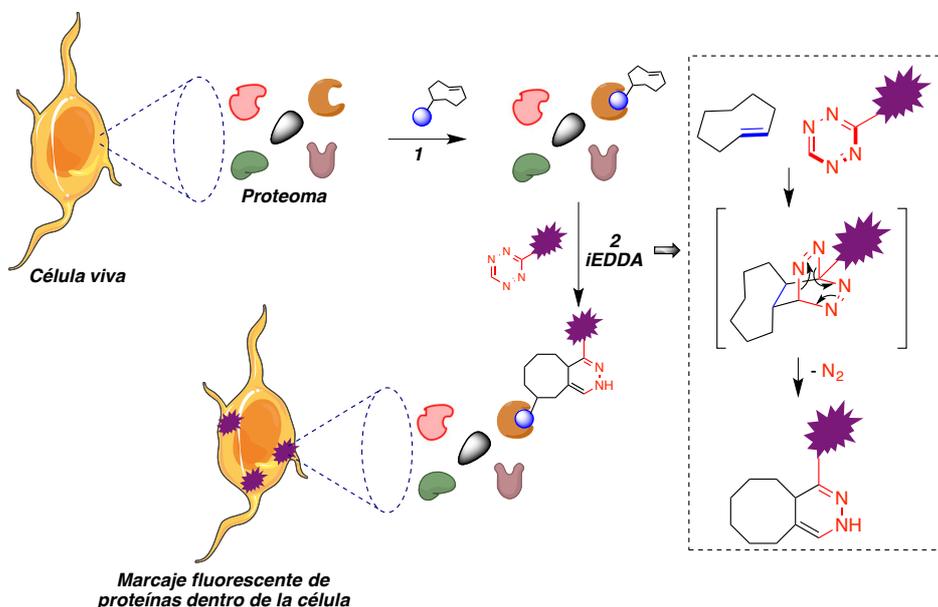


Figura 15. Localización de la diana intracelular de un fármaco basada en su marcaje covalente con derivados fluorescentes de tetrazina. Etapa 1: Unión a su diana de un fármaco, al que se ha incorporado un resto de *trans*-ciclooctenilo. Etapa 2: Marcaje fluorescente de la proteína unida al fármaco por medio de una reacción hetero Diels-Alder del fragmento de *trans*-ciclohexeno con un derivado fluorescente de 1,2,4,5-tetrazina

Esta aproximación requiere, obviamente, disponer de derivados fluorescentes de la 1,2,4,5-tetrazina que actúen como marcadores. Se ha descrito un gran número de compuestos de este tipo, muchos de los cuales son actualmente comerciales. En la Figura 16 se representan algunos ejemplos representativos, derivados de conocidas estructuras altamente fluorescentes como el BODIPY (compuesto **1**), la cumarina (HELIOS 347Me) y la rodamina (Rh-5-Tz).

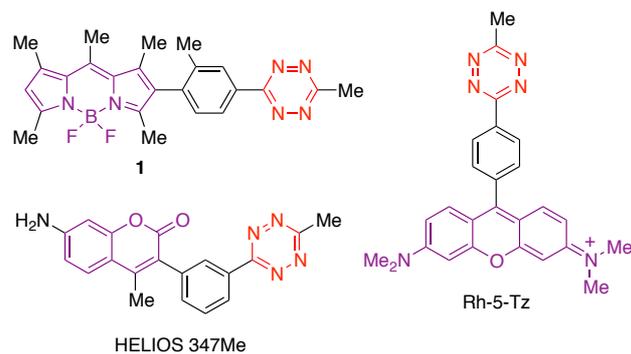


Figura 16. Algunos derivados fluorescentes de 1,2,4,5-tetrazina

Esta metodología permite también el marcaje fluorescente de proteínas para las que no se dispone de ligandos conocidos. En una primera etapa, se procede a la modificación de la proteína que se desea estudiar mediante la incorporación de un aminoácido no natural portador de un resto de *trans*-ciclooctenilo, utilizando técnicas de genética molecular. En una segunda etapa, la reacción del fragmento de *trans*-cicloocteno con un derivado fluorescente de 1,2,4,5-tetrazina conduce al marcaje covalente de la proteína (Figura 17).

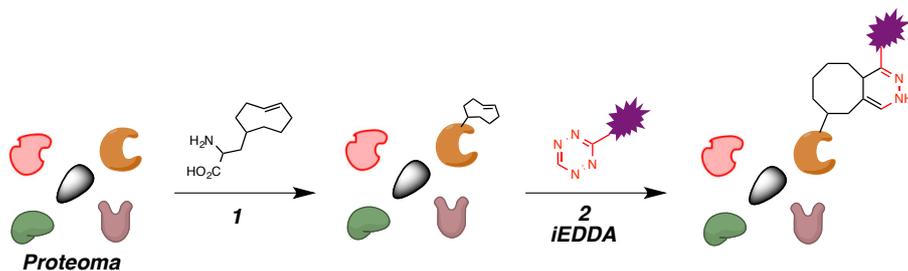


Figura 17. Marcaje fluorescente de una proteína para la que no se conocen ligandos

4.2. HACIA EL DISEÑO DE RUTAS METABÓLICAS ARTIFICIALES

El metabolismo celular es un proceso extremadamente complejo, en el que centenares de enzimas catalizan múltiples reacciones de manera orquestada. Puede especularse con la posibilidad de diseñar e implementar dentro de las células rutas metabólicas artificiales, compatibles con los naturales y

destinados a la curación de enfermedades metabólicas o, en general, a la manipulación de la actividad de las células de maneras difíciles de imaginar hoy en día.

Para poder avanzar hacia objetivo, todavía lejano, de la creación de rutas metabólicas artificiales es necesario el desarrollo de catalizadores y reacciones que permitan llevar a cabo química sintética compatible con el ambiente celular, que puede o no corresponder a reacciones presentes en la naturaleza.⁷⁵ Aunque este es un terreno casi sin explorar, es interesante destacar que ya se han logrado llevar a cabo varias clases de reacciones catalizadas por metales de transición en entornos biológicos, incluyendo el interior de células vivas.^{76, 77, 78, 79, 80} Estas reacciones son especialmente significativas debido a que, a pesar de la gran versatilidad de las enzimas como catalizadores, hay muchos tipos de transformaciones sintéticas de gran relevancia que no pueden ser logradas con las enzimas conocidas, como las indicadas en la Figura 18 (entre otras muchas). En cambio, estas reacciones son posibles en presencia de catalizadores basados en determinados metales de transición.

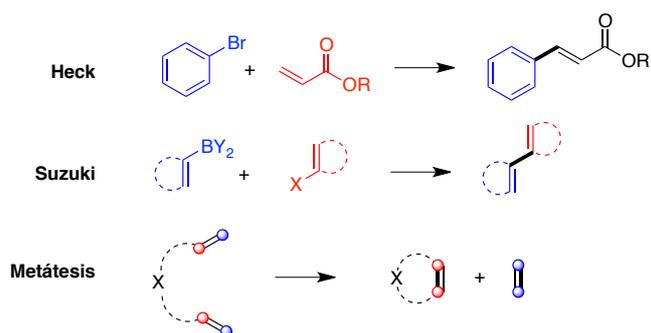


Figura 18. Algunas reacciones de formación de enlaces carbono-carbono que no son catalizadas por enzimas

El grupo del profesor Mascareñas, en la Universidad de Santiago de Compostela, es muy activo en este campo, habiendo descrito, entre otras, reacciones catalizadas por paladio localizadas en la mitocondria, orgánulo que es particularmente activo en el metabolismo oxidativo,⁸¹ y reacciones

catalizadas por oro o rutenio que pueden llevarse a cabo en paralelo en el interior de células de mamífero.⁸² Para dar una idea de las dificultades que deben superarse en el desarrollo de este tipo de química, comentaré con cierto detalle las últimas transformaciones mencionadas.

Un primer paso en el desarrollo de química compatible con entornos celulares es el de la utilización de agua como medio de reacción. Esta etapa inicial no es trivial, ya que en general los compuestos orgánicos son muy poco solubles en agua y, además, en el caso de las reacciones catalizadas por especies organometálicas, éstas no suelen ser estables al contacto con el agua. Por ello, el primer objetivo fue poner a punto un complejo de estructura $Au(I)Cl [L]$, donde L representa un ligando, que sirviera como catalizador en medio acuoso. La elección de derivados de cloruro de oro (I) se debió a que sus complejos suelen ser tolerantes al aire y la humedad, aunque tienen el inconveniente de que su reactividad suele ser baja a no ser que se adicionen sales de plata, que captan el anión cloruro y promueven la reacción. Un descubrimiento prometedor fue que, en una reacción modelo llevada a cabo en agua, la presencia de sales de plata fue innecesaria, lo que indicó que el agua puede llevar a cabo el papel de estabilización del anión cloruro. Se procedió entonces a estudiar la hidroarilación intramolecular del sustrato **1** al derivado fusionado de cumarina **3** en presencia de una serie de complejos de oro, encontrándose que la reacción, aunque lenta, procedía con buen rendimiento pero se necesitaba la presencia de un 20% de acetonitrilo por limitaciones de solubilidad del material de partida. Se investigó después la citotoxicidad de los compuestos **1** y **3** y de los catalizadores empleados frente a células HeLa, encontrándose una casi total ausencia de toxicidad para los compuestos orgánicos. De los catalizadores ensayados, **2** resultó ser también poco citotóxico y fue seleccionado para llevar a cabo los estudios posteriores. Finalmente, se demostró la aparición de la fluorescencia propia del compuesto **3** en el interior de células HeLa tratadas con el precursor **1** y el catalizador **2** (Figura 19).

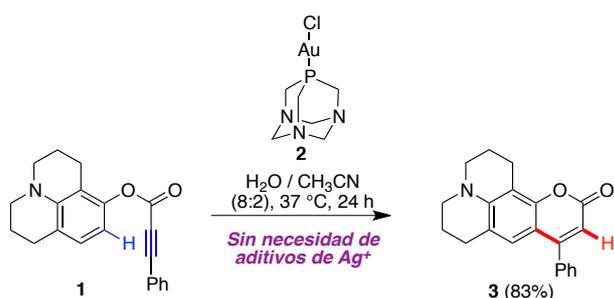


Figura 19. Reacción de hidroarilación intramolecular catalizada por Au(I) en el interior de células HeLa

Para completar el estudio, se investigó la posibilidad de llevar a cabo una segunda reacción, catalizada en este caso por rutenio, en las células en las que previamente se había llevado a cabo la reacción catalizada por oro. Para ello, se incubaron dichas células con el compuesto fluorescente **4** y un catalizador de rutenio, observándose la reacción de *O*-desalilación mostrada en la Figura 20. Es importante destacar que este experimento demostró por primera vez la posibilidad de llevar a cabo en una célula dos reacciones catalizadas por metales de transición en paralelo, sin interferencia entre ellas. En otras palabras, las reacciones no solo fueron bioortogonales (compatibles con la célula viva en la que se llevaron a cabo), sino también ortogonales entre sí. Este tipo de comportamiento es indispensable si se pretende, en el futuro, diseñar rutas metabólicas artificiales, en las que deberán coexistir numerosas especies catalíticas.

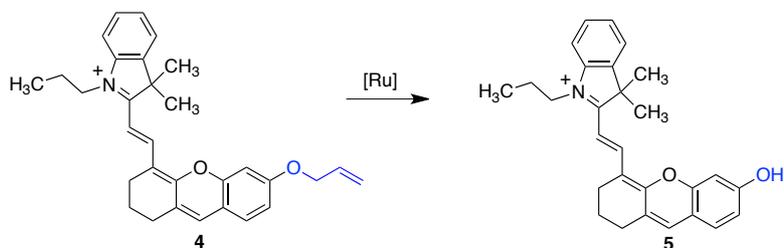


Figura 20. Reacción de *O*-desalilación catalizada por un complejo de rutenio en el interior de células HeLa previamente incubadas con los compuestos **1** y **2**

Una reacción crucial en la síntesis orgánica moderna es la metátesis, cuya importancia fue reconocida con la concesión del premio Nobel de Química de 2005. Recientemente, Ward ha descrito por primera vez una reacción de metátesis llevada a cabo en el interior de una célula.⁸³ Para proteger el delicado catalizador de rutenio necesario para llevar a cabo la reacción, se creó una enzima artificial a partir de la proteína estreptavidina, que contiene un profundo bolsillo que presenta una gran afinidad por la biotina. Sintetizaron, por otra parte, un compuesto que combina la biotina con uno de los catalizadores más empleados para promover la reacción de metátesis, una especie de rutenio conocida como catalizador de Hoveyda-Grubbs de segunda generación. Se administró este compuesto híbrido a bacterias que habían sido modificadas para expresar estreptavidina en su periplasma, lo que condujo a la formación en dicho espacio celular de una enzima artificial dotada de un centro catalítico de rutenio y capaz de catalizar reacciones de metátesis como la que se muestra en la Figura 21.

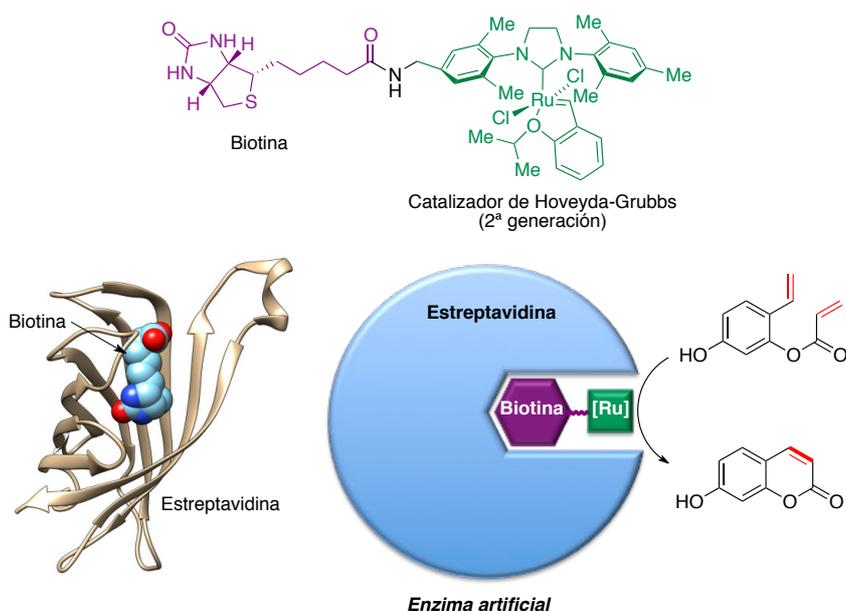


Figura 21. Reacción de metátesis catalizada dentro de una célula por una enzima artificial. Se muestra la estructura de rayos X del complejo estreptavidina-biotina, representado con Chimera 1.10 a partir de pdb 1mk5.

5. OBTENCIÓN Y MEJORA DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS MEDIANTE SÍNTESIS ORGÁNICA

Desde el punto de vista estructural, la mayor parte de los fármacos biológicos son proteínas, polisacáridos, o bien estructuras mixtas de tipo glicoproteína. Los fármacos biológicos se obtienen a partir de seres vivos utilizando tecnologías de ADN recombinante y, a diferencia de las moléculas orgánicas pequeñas, son mezclas de numerosas especies químicas. Aunque es frecuente considerar los fármacos biológicos y los de síntesis como pertenecientes a ámbitos distintos que además compiten entre sí, los avances de la síntesis orgánica están haciendo que la frontera entre ambos campos sea cada vez más borrosa. Dichos avances están permitiendo lograr la obtención de fármacos biológicos en forma de una especie química pura con un control completo de su estructura, lo que inevitablemente debe tener consecuencias sobre sus propiedades terapéuticas.

5.1. VACUNAS SINTÉTICAS

Las vacunas se han obtenido tradicionalmente a partir de bacterias o virus enteros, que han sido previamente alterados o inactivados para reducir su virulencia (Figura 22). Sin embargo, este método conduce a una considerable variabilidad entre lotes, así como a reacciones inmunológicas improductivas y

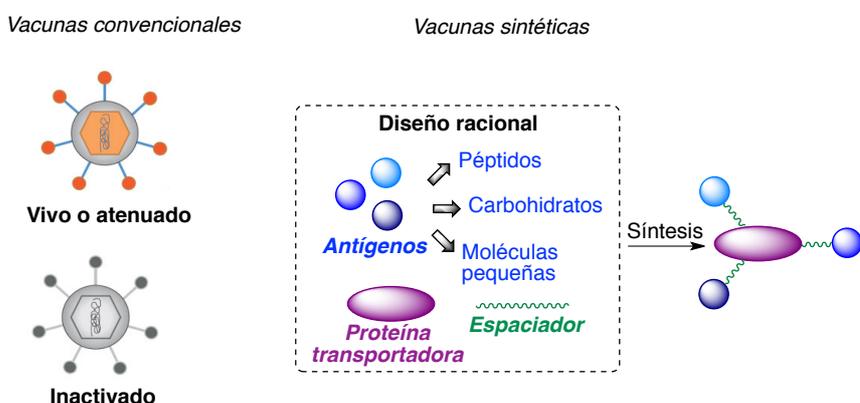


Figura 22. Diferencia esquemática entre vacunas convencionales y vacunas sintéticas.

la posibilidad de reversión del organismo a formas virulentas cuando se emplean patógenos vivos. Estos problemas se pueden evitar, en principio, utilizando vacunas sintéticas, en las que el antígeno se conjuga a una proteína transportadora, permitiendo un diseño racional del producto final.⁸⁴

5.1.1. Vacunas sintéticas peptídicas

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), introducida por Merrifield, supuso una novedad tecnológica que aceleró notablemente la investigación en química y biología de los péptidos y permitió a su creador ser galardonado con el premio Nobel de Química en 1982.^{85,86} Se basa en el anclaje del péptido en crecimiento a una resina, lo que permite emplear grandes excesos de los reactivos y llevar a cabo las etapas de purificación por simple lavado (Figura 23). De esta manera, los rendimientos de cada paso individual aumentan hasta

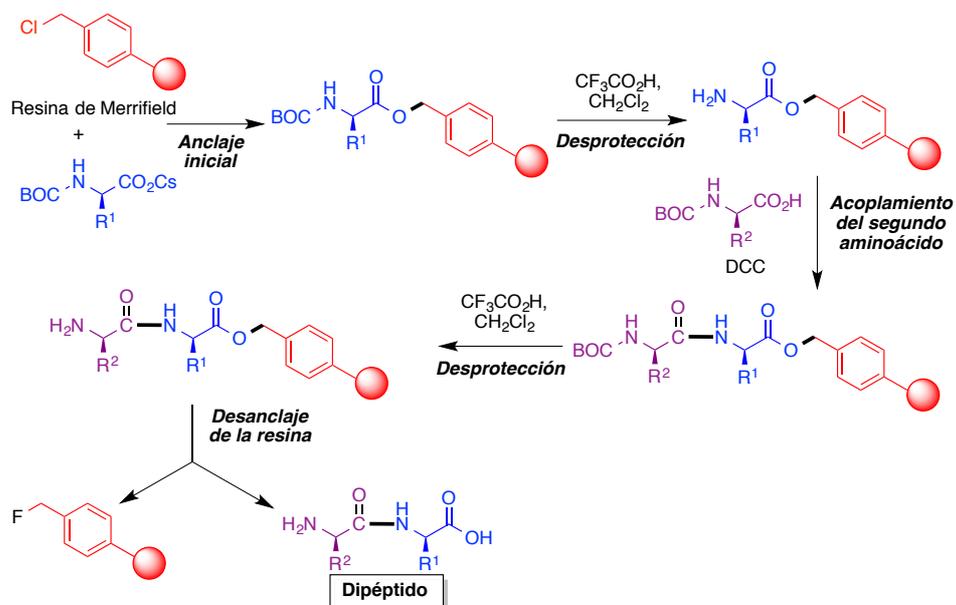


Figura 23. Un ejemplo sencillo de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), consistente en la preparación de un dipéptido utilizando el grupo *tert*-butiloxocarbonilo (BOC) como protector del grupo amino y DCC como reactivo de activación del carboxilo

niveles casi cuantitativos. Esto es crucial para poder producir péptidos de interés biológico, que suelen contener un número considerable de aminoácidos, ya que la existencia obligatoria de etapas de activación y desprotección después de añadir cada aminoácido hace que el número total de etapas de síntesis sea muy elevado.

En la figura 24 se representa esquemáticamente una vacuna peptídica típica. En este caso, la proteína transportadora es la hemocianina de la lapa californiana (*Megathura crenulata*). Esta glicoproteína, conocida generalmente como KLH, un acrónimo de su nombre en inglés (*keyhole limpet hemocyanin*), induce una potente respuesta inmunológica y se emplea a menudo como elemento de transporte de haptenos. KLH se une al resto de la vacuna mediante la reacción de un residuo de cisteína con una unidad de maleimida del fragmento espaciador, que a su vez se combina con diversos fragmentos peptídicos inmunogénicos que se unen al espaciador peptídico mediante química *click*.

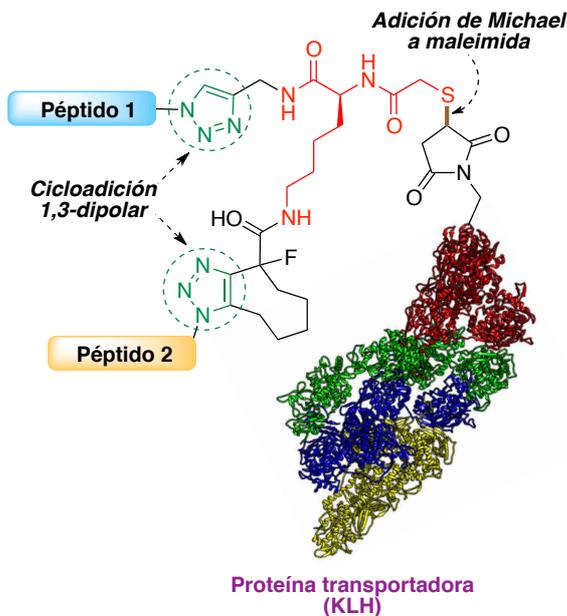


Figura 24. Estructura de una vacuna peptídica típica

Como ejemplo representativo una vacuna totalmente sintética obtenida mediante técnicas de síntesis en fase sólida, comentaré el caso de un péptido

utilizados en vacunas de este tipo han sido Lewis^y (Le^y) y fucosil GM1, entre otros. Algunas de estas vacunas han alcanzado fases avanzadas de ensayo clínico. Por ejemplo, Adagloxad simolenin (OBI-822) está en fase III para cáncer de mama.

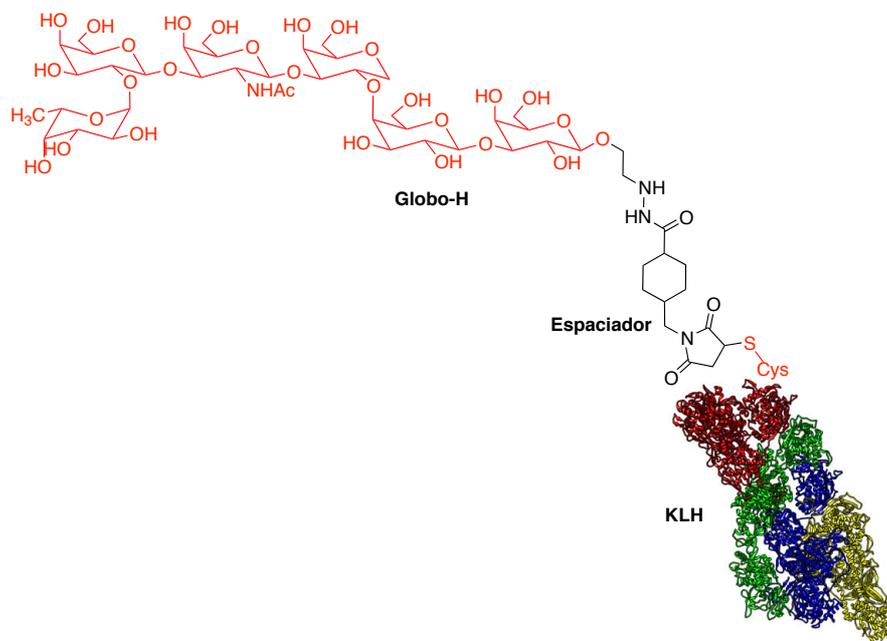


Figura 26. Estructura de una vacuna construida a partir del antígeno hexasacárido sintético Globo-H y la proteína KLH. La proteína procede de pdb 4bed y se ha representado con Chimera 1.10

Las vacunas portadoras de un único antígeno tienen el inconveniente de que responden solo a uno de los múltiples antígenos presentes en la superficie de los tumores. Aunque, en principio, este problema podría resolverse mediante la administración conjunta de varios antígenos asociados a un tumor determinado, esta aproximación tiene las desventajas de suponer la administración de una cantidad muy elevada de la proteína transportadora y de ser más compleja desde el punto de vista sintético por requerir varias etapas de conjugación oligosacárido-proteína, que son la etapa más difícil de todo el proceso. Además, a la hora de comercializar una vacuna de este tipo sería necesaria la validación de cada componente desde el punto de vista

regulatorio. Por estos motivos, se ha diseñado una segunda generación de antígenos multivalentes, que contienen varios fragmentos oligosacáridicos capaces de reconocer diversos antígenos, representándose dos ejemplos en las Figuras 27 y 28. Cabe destacar que la preparación totalmente sintética de estructuras con semejante nivel de complejidad fue posible únicamente gracias a un largo proceso previo de investigación básica sobre nuevos métodos de síntesis de oligosacáridos, que no comentaré con detalle.

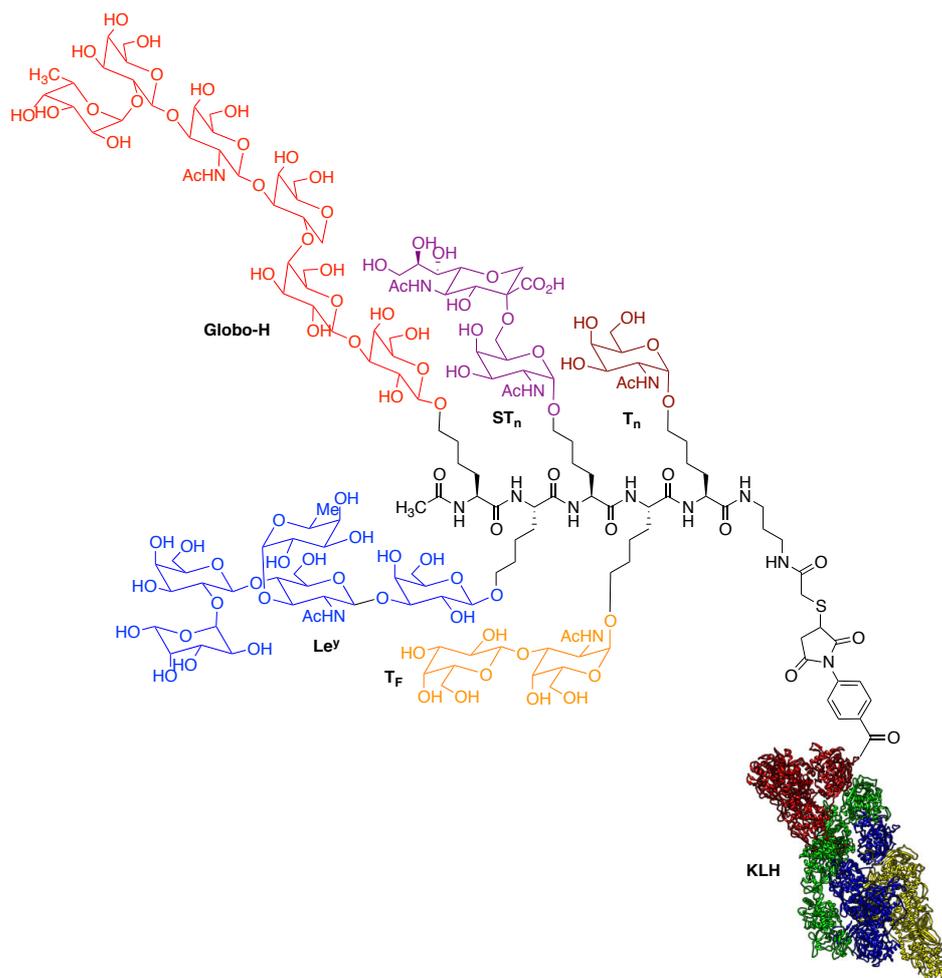


Figura 27. Estructura de una vacuna multivalente, construida a partir de varios antígenos oligosacáridicos y la proteína KLH

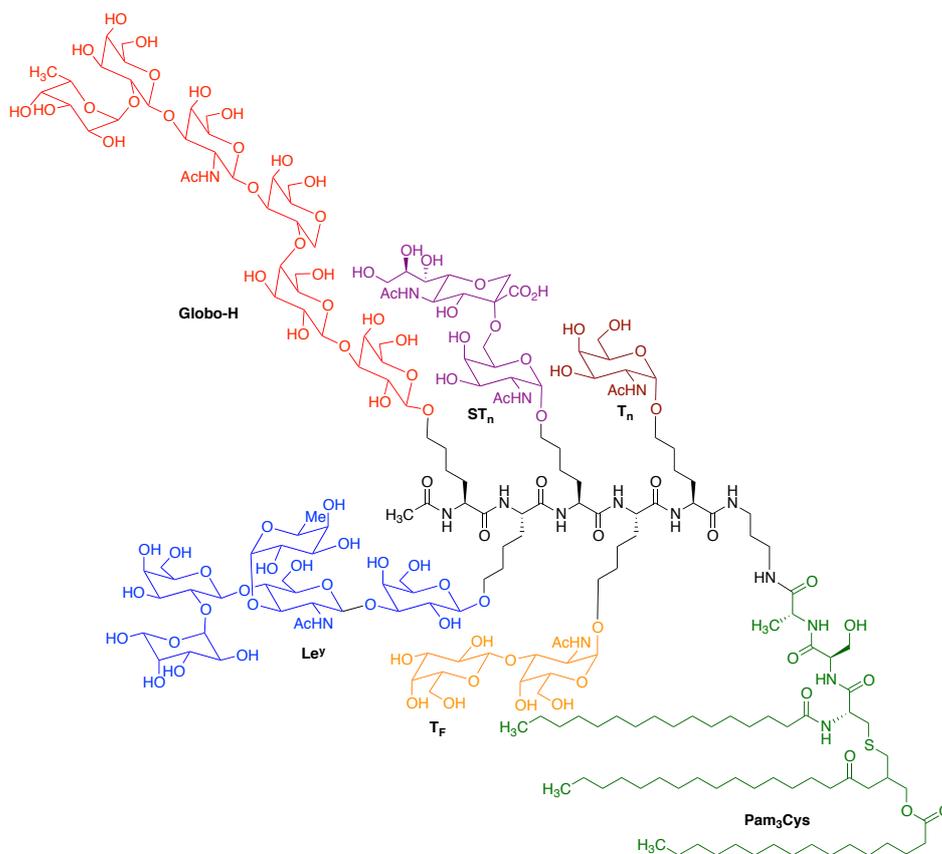


Figura 28. Estructura de una vacuna multidiana, construida a partir varios antígenos oligosacáridicos y un péptido tripalmitoilado como estructura transportadora

La preparación de vacunas basadas en oligosacáridos totalmente sintéticos se ha aplicado también al caso del síndrome de inmunodeficiencia adquirida asociada al virus VIH. Para ello, se han diseñado y sintetizado antígenos oligosacáridicos correspondientes a la glicoproteína gp120 de la superficie del virus, que se caracterizan por su alto contenido en manosa y que se unen con gran afinidad al anticuerpo humano 2G12.⁹³ En la Figura 29 se representa la unión de dicho anticuerpo a un oligosacárido de estructura $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, presente en la glicoproteína.⁹⁴

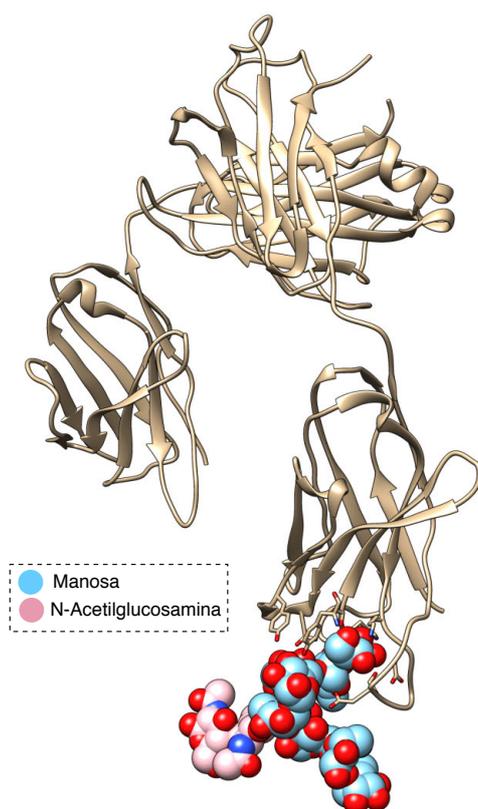


Figura 29. Unión de la fracción Fab del anticuerpo 2G12 a un oligosacárido de estructura $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Figura generada con Chimera 1.10 a partir de pdb 10p5.

5.2. SÍNTESIS QUÍMICA DE BIOMOLÉCULAS NATURALES

Un buen ejemplo de la capacidad de la química sintética de generar biomoléculas complejas es la síntesis total de la eritropoyetina (EPO), una glicoproteína de gran importancia por su papel en la regulación de la producción de eritrocitos y que supone un mercado de 10^{10} €/año. La eritropoyetina aislada de fuentes naturales presenta una elevada heterogeneidad en lo que se refiere a su patrón de glicosilación, lo que hace que las EPOs comerciales son diferentes entre sí, difiriendo en sus glicanos en función de las células utilizadas en su producción y de otros factores. Además, estos factores hace que sean mezclas de varias especies químicas.

El desarrollo de un método de síntesis puramente química de la eritropoyetina permitiría disponer de las diversas variantes de la eritropoyetina en forma de una especie química única y estudiar las propiedades de cada una de ellas. Todo ello daría lugar al establecimiento de relaciones estructura-actividad de la porción oligosacáridica, con la posibilidad de producir la especie más activa, así como preparar análogos no naturales que contribuirían, a su vez, a las relaciones estructura-actividad. La gran dificultad de esta tarea queda patente al considerar que, además de los fragmentos de oligosacárido, la eritropoyetina se compone de 166 aminoácidos. Como prueba visual de su complejidad, se muestran en la Figura 30 los fragmentos peptídicos y glucídicos de una de las glicofomas de la eritropoyetina humana.

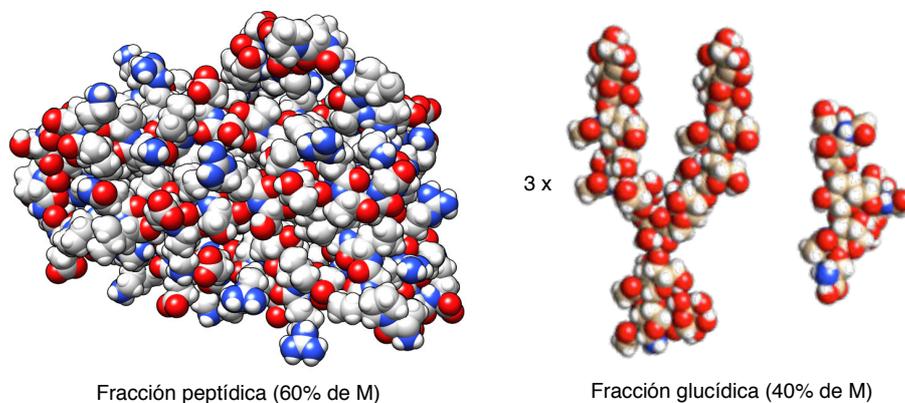


Figura 30. (a) Estructura del fragmento peptídico de la eritropoyetina, generada con Chimera 1.10 a partir de pdb 1buy. (b) Estructura de los fragmentos glicosídicos de la glicofoma 1 de la eritropoyetina humana.

La síntesis de péptidos del tamaño de la eritropoyetina no puede abordarse por las técnicas convencionales ya que, aunque la síntesis de péptidos en fase sólida fue revolucionaria en su momento y ha permitido avanzar enormemente en el estudio de estas biomoléculas, su aplicación está limitada por el enorme número de pasos de reacción implicados, teniendo en cuenta que la incorporación de cada aminoácido implica etapas de activación, acoplamiento y desprotección. Por ejemplo, la síntesis de un péptido de 16 aminoácidos supone 50 pasos de reacción, y aun admitiendo que cada uno de

ellos transcurra con un excelente rendimiento del 95%, el rendimiento global del proceso sería tan solo del 7,7% ($0,95^{50} \times 100$). Además de la longitud de la secuencia de aminoácidos, influyen otros factores. Por ejemplo, los péptidos con tendencia a la agregación (por ejemplo, los péptidos amiloides) son más difíciles de sintetizar.

El descubrimiento de una técnica sintética conocida como ligadura química nativa (*native chemical ligation*, NCL) ha ampliado espectacularmente las posibilidades de la síntesis química de péptidos (Figura 31).⁹⁵ Este método permite enlazar con gran eficacia fragmentos peptídicos no protegidos en un medio acuoso, con tal de que el extremo N-terminal de uno de ellos sea una cisteína.

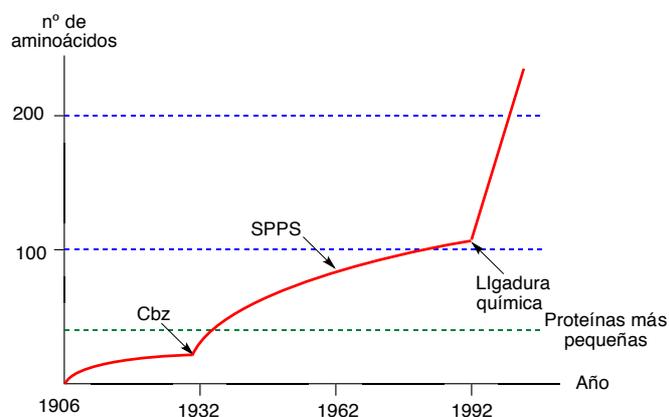


Figura 31. Evolución histórica del tamaño de los polipéptidos accesibles por síntesis (adaptada de la referencia 95)

El método de ligadura química nativa se basa en la rápida reacción del grupo mercapto de la cisteína N-terminal de uno de los fragmentos peptídicos con un grupo éster situado en el extremo C-terminal del otro péptido. La reacción es completamente regioselectiva respecto a las demás cisteínas de la secuencia aminoacídica, lo que probablemente indica la existencia de un fenómeno de asistencia por parte del grupo amino libre. Una vez enlazados los dos fragmentos peptídicos por la formación de un grupo tioéster, tiene lugar una reacción de transposición, con participación del grupo amino libre, que genera

el enlace peptídico deseado y libera el grupo mercapto de la cisteína (Figura 32).

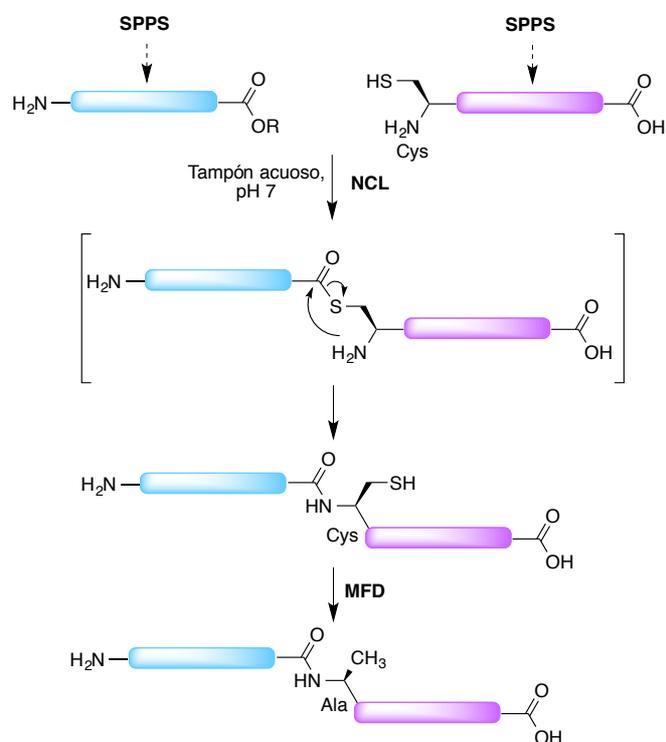


Figura 32. Fundamento del método de ligadura química nativa (NCL) acompañado de desulfuración de la cisteína (MFD)

La aplicación de esta metodología ha permitido al grupo de Samuel Danishefsky la síntesis de la eritropoyetina humana en su glicofoma 1, utilizando exclusivamente técnicas de síntesis orgánica.^{96,97} Tras obtener, por un lado, los fragmentos designados como péptido 1 a péptido 5 por química en fase sólida y los fragmentos oligosacáridos, éstos se acoplaron a los primeros con técnicas de síntesis de glucósidos (Figura 33). Después, como se representa en la Figura 34,⁹⁸ los fragmentos peptídicos glucosilados se unieron secuencialmente por técnicas de ligadura química nativa, con transformación en alanina de algunos de los residuos de cisteína implicados, que pudo hacerse selectivamente por medio del uso de grupos protectores. Finalmente, se

procedió al plegamiento de la estructura para dar lugar a eritropoyetina plenamente funcional.

Otros grupos de investigación están llevando a cabo estudios sobre la síntesis de eritropoyetina y otras glicoproteínas por métodos puramente químicos o quimioenzimáticos.^{99,100}

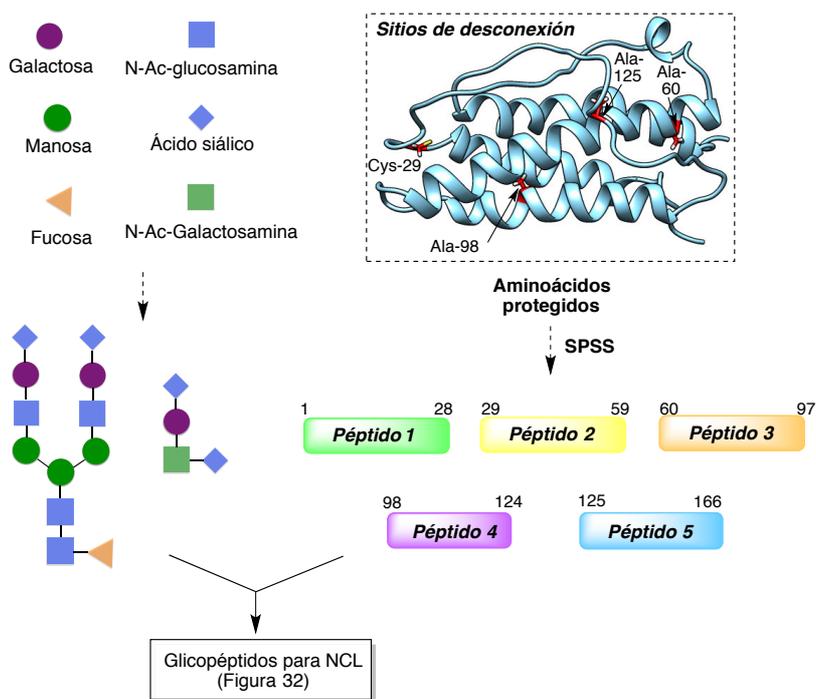


Figura 33. Etapas iniciales de la síntesis de la glicofoma 1 de la eritropoyetina

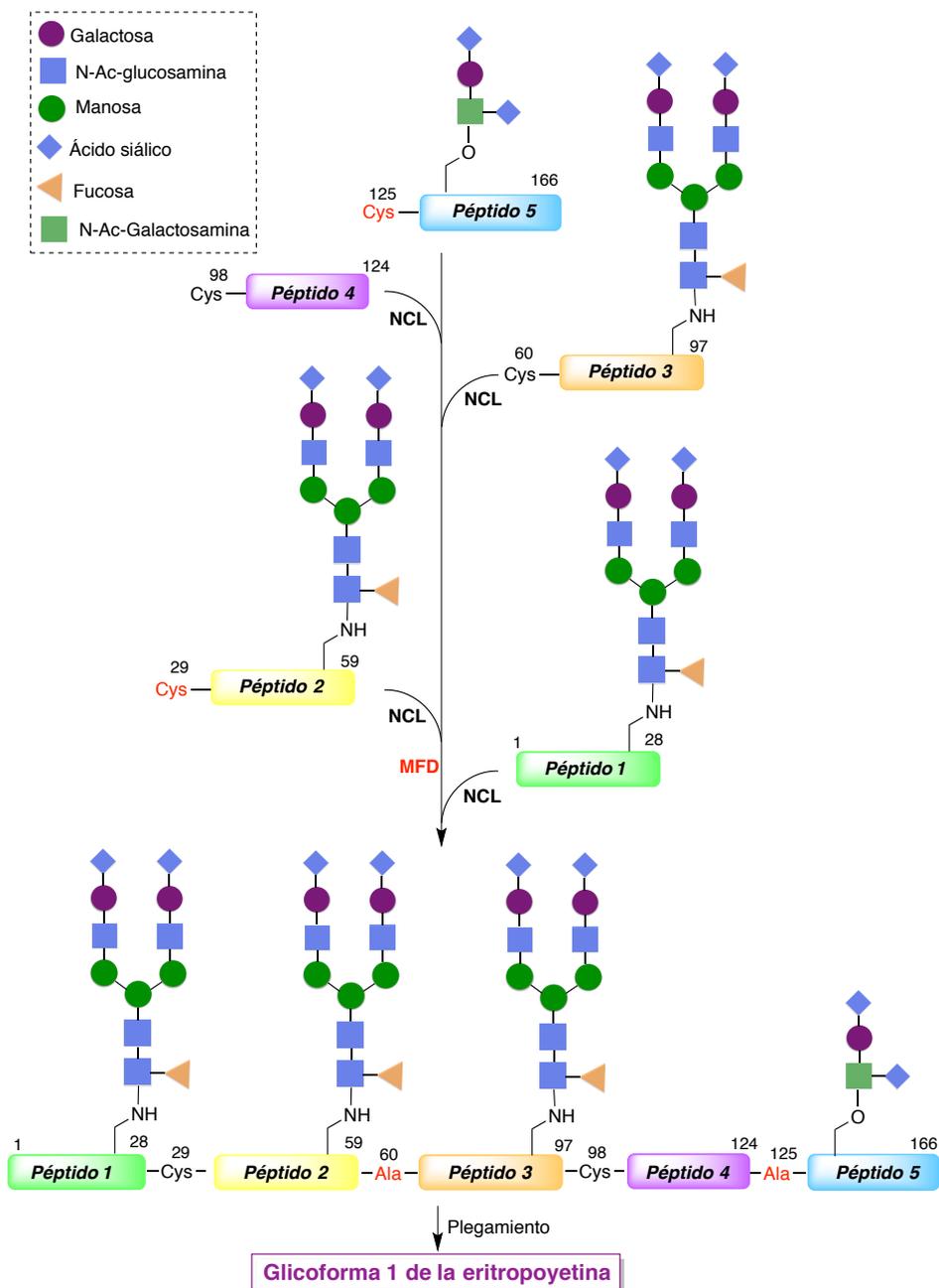


Figura 34. Representación esquemática de las etapas finales de la síntesis total de la glicoforma 1 de la eritropoyetina. Adaptada de la referencia 98

5.3. SÍNTESIS QUÍMICA DE BIOMOLÉCULAS ARTIFICIALES

La capacidad de obtener proteínas por métodos puramente sintéticos permite plantear la preparación de estructuras proteicas imposibles de aislar de la naturaleza, como por ejemplo proteínas enantiómeras de las naturales. Resulta ilustrativa la reciente obtención por síntesis total del enantiómero de la proteína Ras. En su forma natural, Ras es una GTPasa formada por 166 aminoácidos, existiendo mutaciones de Ras en un 30% de los tumores. Esta proteína forma parte de una vía de señalización crucial para la regulación de la proliferación y supervivencia celular (Figura 35).¹⁰¹

Aunque el objetivo de la inhibición directa de Ras mediante fármacos se ha perseguido durante décadas por constituir una de las máximas aspiraciones en el campo de los fármacos antitumorales, hasta la fecha no se conocen inhibidores directos de esta proteína, lo que se atribuye a su elevada afinidad

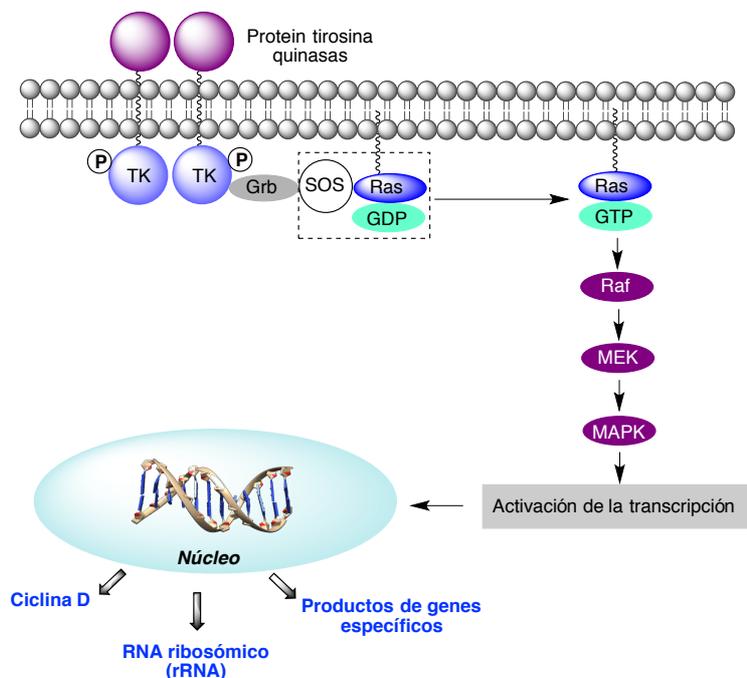


Figura 35. Representación esquemática de la vía de señalización dependiente de Ras (adaptada de la referencia 101)

por su sustrato endógeno y a la carencia de bolsillos hidrófobos a los que pueda dirigirse un inhibidor potencial. La proteína enantiómera de Ras se considera un buen sustrato en el que ensayar agentes peptidomiméticos portadores de residuos D-aminoácidos, y se espera que su disponibilidad permita el descubrimiento de fármacos capaces de inhibir Ras directamente. Dicha proteína de Ras fue sintetizada, en una forma marcada con biotina y en paralelo con la versión natural formada por L-aminoácidos marcada de la misma forma, mediante la preparación de cinco segmentos peptídicos por síntesis en fase sólida y su combinación posterior por ligadura química (Figura 36).¹⁰²

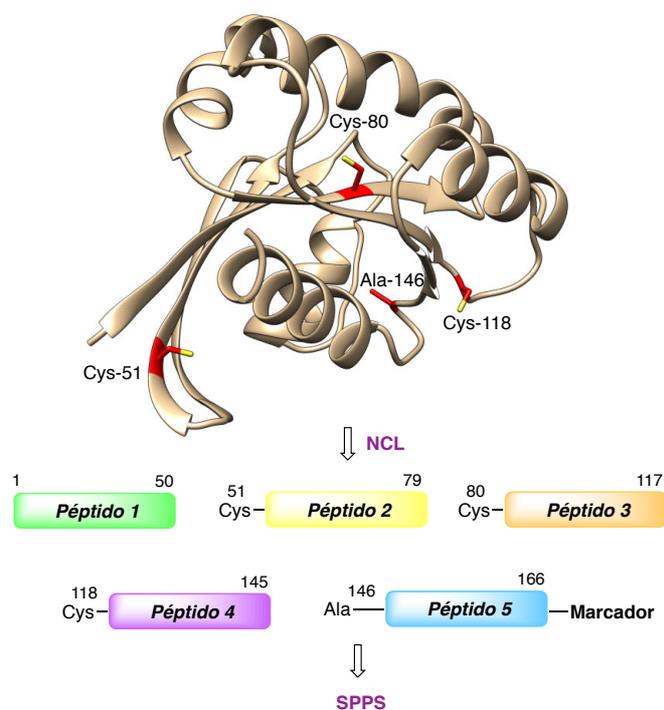


Figura 36. Resumen de la síntesis de la proteína KRas en el sentido retrosintético. La representación de la proteína se generó con Chimera 1.10 a partir de pdb 5p21.

6. MOLÉCULAS ORGÁNICAS PEQUEÑAS QUE LLEVAN A CABO LA FUNCIÓN DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS

Utilizando técnicas adecuadas, pueden conseguirse efectos terapéuticos que parecen en principio reservados a técnicas biológicas, como la terapia génica o la edición genética, mediante el uso de moléculas orgánicas pequeñas. Como ejemplo, voy a resumir brevemente la estrategia emergente conocida como PROTAC (*proteolysis-targeting chimera*), cuya finalidad es la de promover la hidrólisis de una proteína diana marcándola para su degradación por el proteasoma.¹⁰³ La destrucción de la diana presenta ventajas potenciales sobre su bloqueo, que es la aproximación tradicional, ya que de esta forma no se necesita que la diana esté permanentemente en contacto con el ligando para que exista la actividad buscada. La degradación de la proteína diana es, en la práctica, equivalente al bloqueo de la producción de la proteína actuando a nivel genético, como puede lograrse con ARN de silenciamiento (*small interfering RNA*, siRNA) o bien mediante la edición genética con la técnica CRISPR-Cas9. Debe señalarse que estas terapias biológicas presentan inconvenientes serios de toxicidad por la posibilidad de afectar a genes distintos al pretendido o por otros motivos. Así, se ha demostrado una elevada tasa de mortalidad en ratones tratados con siRNA asociada a toxicidad hepática,¹⁰⁴ lo que produjo una alta tasa de mortalidad en los ratones experimentales. Por otra parte, se ha demostrado recientemente que tratamientos de tipo CRISPR-Cas9 ocasionan daños en el ADN asociados a defectos de regulación del “guardián del genoma” p53, así como detención del ciclo celular, lo que implica riesgos evidentes de carcinogénesis asociados a esta terapia.¹⁰⁵

En la figura 37 se comparan ambos tipos de estrategias terapéuticas.

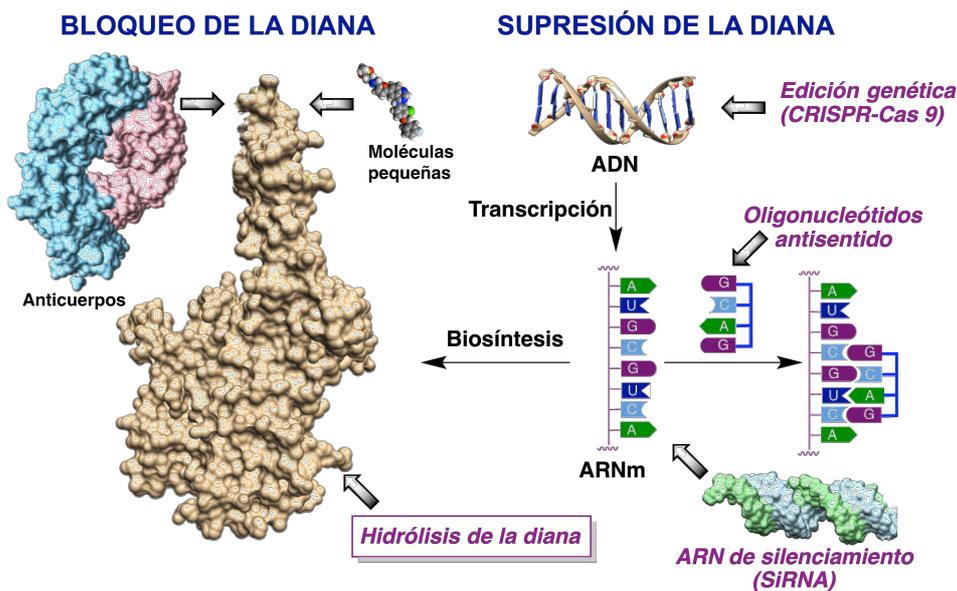


Figura 37. Comparación de las estrategias terapéuticas convencionales, basadas en el bloqueo de dianas terapéuticas, con las que se basan en su supresión.

El proteasoma es un gran complejo proteico formado por 28 subunidades proteicas agrupadas en cuatro anillos de siete unidades cada una más dos regiones reguladoras (“pestañas”) en los extremos. Su misión es la de degradar proteínas que ya no sean funcionales por haber sufrido daños, con objeto de que la célula pueda reciclar los fragmentos peptídicos resultantes.

Para que una proteína sea sustrato del proteasoma, debe ser marcada previamente por unión a unidades de ubiquitina, y los detalles de este proceso se resumen en la Figura 38. La ubiquitina necesita ser activada por una enzima llamada E1 (*ubiquitin-activating enzyme*) en una reacción dependiente de ATP. En una segunda etapa, la ubiquitina es transferida a un resto de cisteína de una segunda enzima llamada E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*). Finalmente, una ubiquitina ligasa (E3) cataliza la transferencia de la molécula de ubiquitina desde E2 hasta la proteína que va a ser sustrato del proceso de degradación. Una vez que ha sido poliubiquitinilada tras varios ciclos como el descrito, la proteína sustrato es degradada por el proteasoma. Obviamente, para el éxito

de este proceso es crucial que la proteína sustrato muestre una buena afinidad por la ligasa E3, ya que es su punto de entrada en el ciclo.

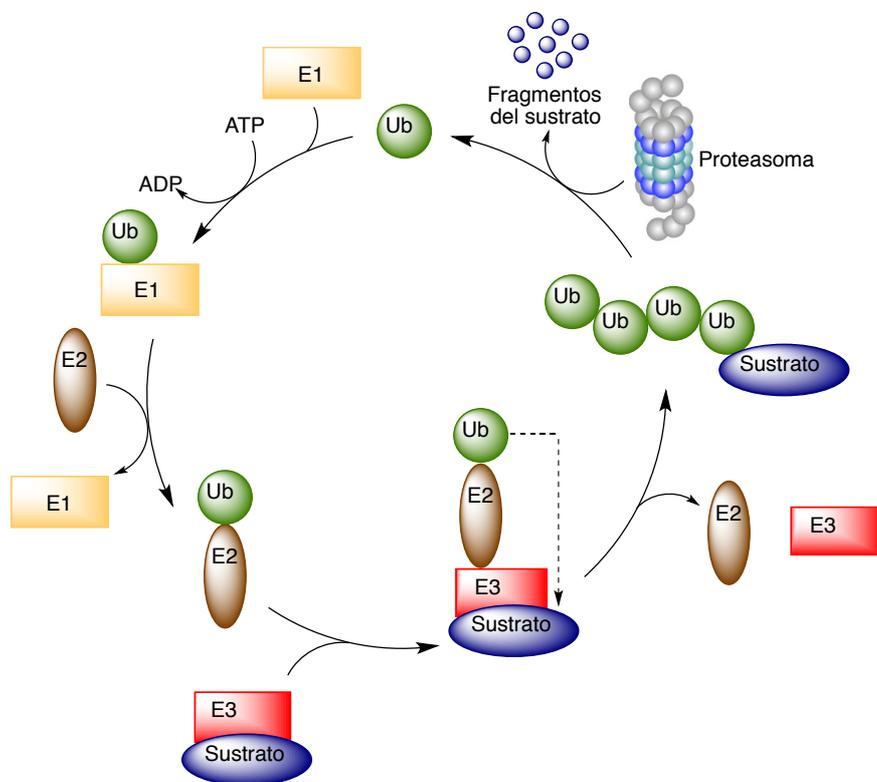


Figura 38. Degradación de una proteína por el sistema ubiquitina-proteasoma

La estrategia PROTAC se basa en lograr que la proteína que se desea eliminar con fines terapéuticos sea sustrato del proteasoma. Los fármacos de tipo PROTAC son agentes multidiana, diseñados para que presenten afinidad con la diana que se desea degradar y también con una de las proteínas E3. De esta forma, sirven de enlace entre el complejo E3-E2-ubiquitina y la proteína diana, que de esta forma puede ser ubiquitinilada y por tanto actuar como sustrato del proteasoma (Figura 39).

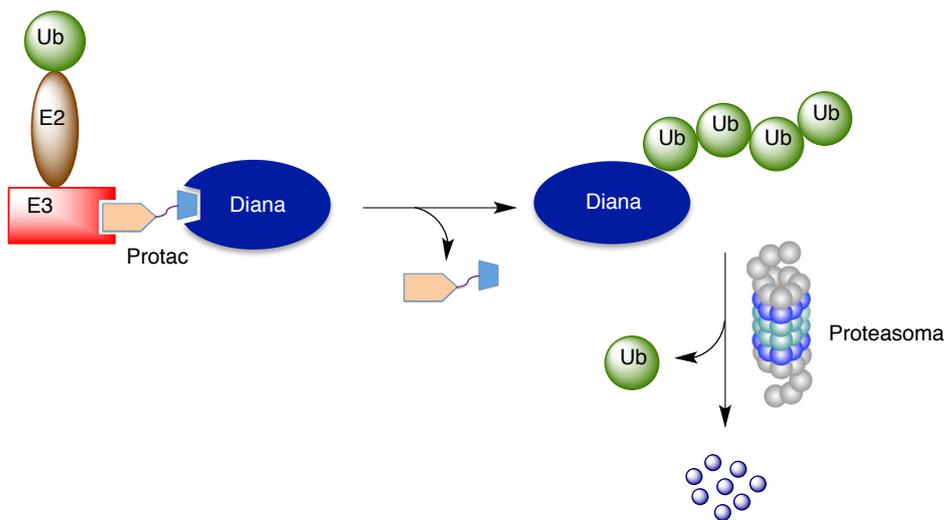


Figura 39. Resumen de la estrategia PROTAC

Se conocen más de 600 ligasas E3 humanas, algunas de las cuales son específicas de determinados tejidos, lo que permite, en principio, el desarrollo de un gran número de estructuras PROTAC. Aunque el diseño de estos compuestos se complica por la necesidad de actuar en dos dianas,¹⁰⁶ el mecanismo de acción resumido anteriormente presenta una ventaja, y es que solamente es necesario encontrar compuestos que muestren afinidad por la diana, lo que es mucho más sencillo que encontrar inhibidores. Por tanto, esta técnica podría permitir actuar terapéuticamente sobre cientos de proteínas potencialmente interesantes como dianas y de las que no se ha conseguido localizar ningún inhibidor por los métodos tradicionales. Además, también pueden ser de gran interés en investigación biológica porque debería dar acceso de una manera rápida y económica a modelos de animales o células *knockdown*.

Aunque es un campo todavía en sus inicios, se conocen ya algunos compuestos prometedores basados en la estrategia PROTAC, uno de los cuales se representa en la Figura 40 a modo de ejemplo ilustrativo. Este compuesto contiene casi íntegramente la estructura del foretinib, un inhibidor poco selectivo de quinasas. Se construyó un PROTAC a partir de esta estructura, a la

que se incorporó una cadena espaciadora unida a una molécula de talidomida, un buen ligando de la ligasa E3 conocida como cereblon (CRBN). Como cabría esperar, este compuesto tiene afinidad por un elevado número de quinasas, aunque con un patrón diferente al del foretinib. Además, el PROTAC demostró capacidad de causar la degradación de la principal diana del fármaco de partida, c-Met, también llamada HGFR (*hepatocyte growth factor receptor*). Es interesante destacar que, cuando se examinó el comportamiento frente a otras quinasas, la selectividad del proceso de degradación fue superior a la de la simple inhibición, lo que resulta muy prometedor.

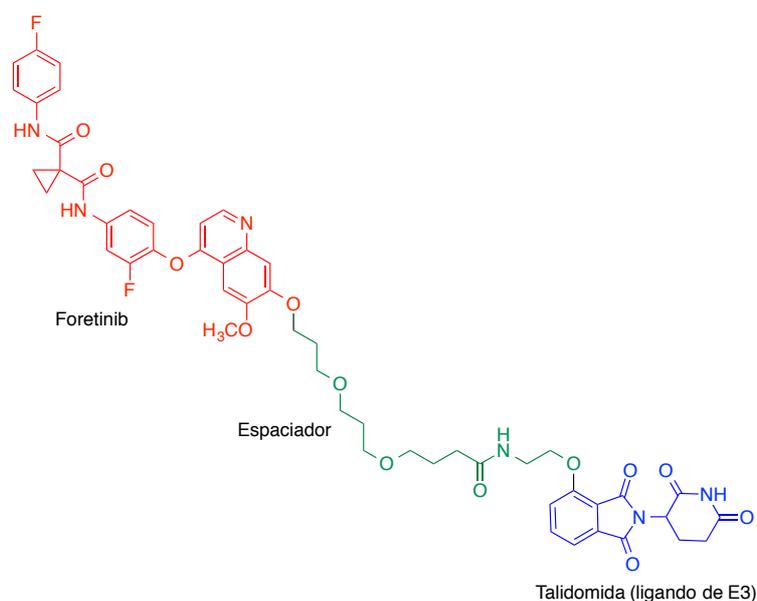


Figura 40. Un compuesto PROTAC representativo

Desde el punto de vista del diseño de fármacos, uno de los defectos de los PROTAC es que son moléculas excesivamente grandes, dada la necesidad de que contengan fragmentos capaces de unirse a dos dianas, además de un espaciador. Esto puede traer consigo una baja biodisponibilidad y otros problemas farmacocinéticos. Mencionaré, por tanto, el reciente desarrollo de profármacos que actúan como precursores de los PROTAC. Estos compuestos, que se activan gracias a una reacción *click* intracelular, han sido designados

como CLIPTAC (*click-formed proteolysis-targeting chimeras*). Se administran por separado los dos ligandos, uno de ellos portador de un anillo de *trans*-ciclohexeno y otro de una tetrazina, para que tenga lugar de forma intracelular una reacción hetero Diels-Alder que genere el PROTAC (Figura 41).

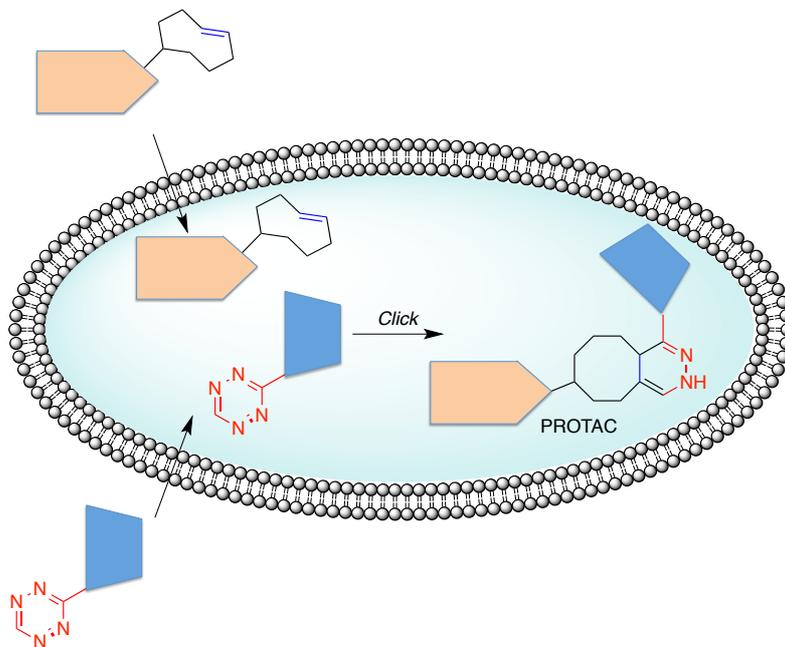


Figura 41. Fundamento de la estrategia CLIPTAC

Esta idea se ha aplicado a la degradación de oncoproteínas, como posible base de un futuro tratamiento antitumoral. Como ejemplo, se representa en la Figura 42 la estructura de un PROTAC generado *in situ* y capaz de inducir la degradación de la proteína BDR4 (*bromodomain-containing protein 4*).¹⁰⁷

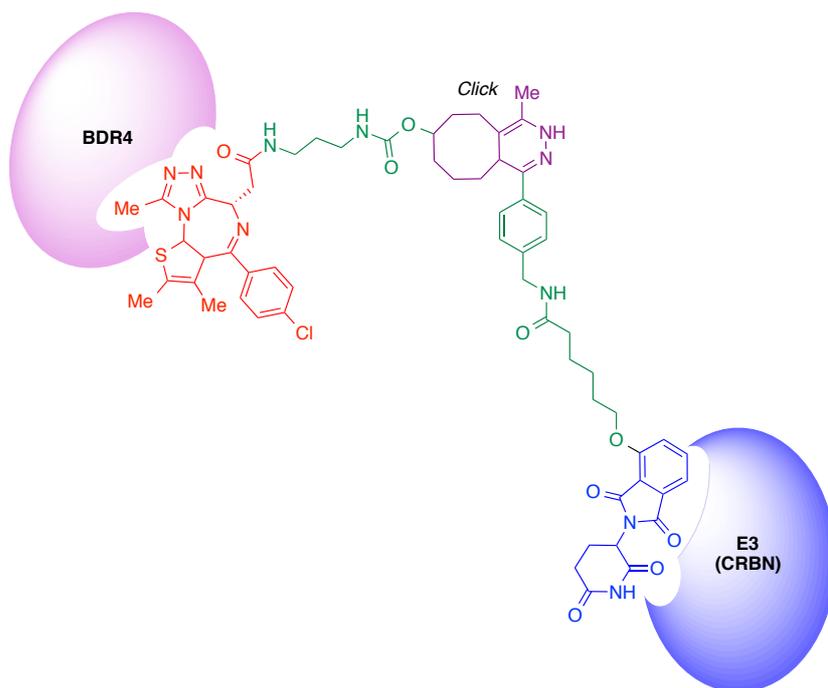


Figura 42. Estrategia CLIPTAC para la degradación de la proteína BDR4, basada en la formación intracelular de un PROTAC a través de una reacción hetero Diels-Alder

Los compuestos PROTAC están todavía en las fases iniciales de su estudio, y todavía no se ha demostrado su seguridad a largo plazo ni su tolerabilidad por pacientes humanos. La estrategia terapéutica consistente en la supresión de una diana es muy diferente de la basada en su inhibición y no se conocen todas sus implicaciones, aunque esta es una limitación que afecta no solo a PROTAC sino también a las técnicas basadas en siRNA y en edición genética por el método CRISPR-Cas9. No obstante, es una metodología sumamente innovadora en la que hay depositadas muchas esperanzas para el estudio de los sistemas biológicos y para el tratamiento de enfermedades poco accesibles al arsenal terapéutico actual.

7. OBSERVACIONES FINALES

Con esto concluye la parte científica de este discurso. Espero haberles transmitido mi pasión por las inmensas y todavía poco exploradas posibilidades de la síntesis orgánica, así como mi convencimiento de que es y será en el futuro un aspecto crucial del descubrimiento de nuevos fármacos.

La ciencia es una tarea de equipo y soy consciente de que yo no estoy aquí por mis únicos méritos y que habría logrado muy poco sin el apoyo de tantos y tantos colaboradores y amigos, nacionales y extranjeros, profesores, alumnos de máster, doctorado y postdoctorales. No puedo en este momento nombrarlos individualmente, como merecerían, pero quiero concluir dejando constancia de mi más profundo agradecimiento hacia todos ellos.

He dicho

**DISCURSO DE CONTESTACIÓN DE LA EXCMA. SRA.
DÑA. CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ**

Excmo. Sr. Presidente, Excmos. Señoras y Señores Académicos, Señoras y Señores:

Como miembro de esta Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, me cabe hoy la privilegiada tarea que representa la contestación al Discurso de Ingreso del Dr. José Carlos Menéndez Ramos como Académico de Número. Este encargo me satisface enormemente, ya que me permite resaltar ante ustedes los méritos que lo avalan y comentar brevemente la trayectoria vital y científica de un compañero en los quehaceres de la investigación y la docencia.

TRAYECTORIA VITAL

El Dr. José Carlos Menéndez nació en Madrid, el 25 de junio de 1960. Sus padres, Carlos y Mercedes, fueron compañeros de curso y, como otros miembros de su familia, eran Licenciados en Farmacia. Su padre, recientemente fallecido, fue un excelente docente que ejerció como Profesor Adjunto Interino en la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la UCM tras completar su Tesis Doctoral cuando José Carlos tenía 14 años. Era tal su devoción por la materia y por la docencia, que nos parecía posible que su hijo hubiera aprendido la estructura del benceno antes de que supiera escribir esta palabra. Una característica de nuestro protagonista de hoy es su rechazo nunca explicitado a comentar asuntos personales, lo que contrasta con su facilidad para comentar y participar en diferentes proyectos científicos con gran entusiasmo y eficacia.

Sus años de formación en el Colegio Calasancio de Madrid fueron muy bien aprovechados, y lo convirtieron en un chico de gran cultura y sensibilidad artística. Como era de esperar, en su etapa universitaria se decantó por seguir los estudios de Farmacia, obteniendo la Licenciatura y el Grado (modalidad tesina) en la Facultad de Farmacia de la UCM en los años 1982 y 1984, respectivamente, complementándolas casi simultáneamente con la Licenciatura en Química, que cursó en la UNED y culminó en 1986.

Realizó su tesis doctoral en el grupo del Profesor González Trigo bajo la inmediata dirección de la Dra. Mónica Söllhuber Kretzer, obteniendo tras su defensa en 1988 el Premio Extraordinario y el Premio Santos Ruiz de la RANF de ese mismo año. En los años 1988-1989 realizó sus estudios postdoctorales con el Profesor Steven V. Ley en el Imperial College of Science and Technology de Londres, trabajando en la síntesis total del antibiótico ionóforo routienocina. A su vuelta lo esperaba en Madrid una compañera de curso que sería su esposa y su apoyo: M^a Antonia Martín Carmona, Dra. en Farmacia y Profesora Titular de Universidad. El matrimonio tiene dos hijos: Miguel y Pilar.

ACTIVIDAD DOCENTE Y PROFESIONAL

Primero como Profesor Ayudante de Clases Prácticas y luego como Profesor Titular, el Dr. Menéndez impartió docencia teórica y práctica en las materias relacionadas con la Química Orgánica, Química Farmacéutica y Síntesis Orgánica en la licenciatura, grado y tercer ciclo de Farmacia en la UCM, siendo coordinador del Máster interuniversitario en Descubrimiento de fármacos y del programa de Doctorado interuniversitario en Química Médica en la Universidad Complutense.

Ha sido autor o coautor de más de 30 capítulos en enciclopedias, libros de texto o monografías, Profesor Visitante en la Université Paul Cezanne de Aix-Marseille III en el año 2007 y en el Instituto di Studi Avanzati de la Universidad de Bolonia en 2014. Ha colaborado también en diversos ciclos de conferencias organizados en España por los laboratorios Upjohn (1994), por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2007), la Universidad de Marsella (2007), el Central Leather Research Institute de Chennai y la Madurai Kamaraj University en India (2013), la Universidad de Bolonia (2014) y la Pharmaceutical Business School de la Fundación ESAME (2015). Además, ha trabajado activamente en la elaboración de proyectos de innovación y de nuevos materiales docentes.

Es Director desde su creación en 1995 del Centro de Asistencia a la Investigación de Microanálisis Elemental de la Universidad Complutense, ha

sido miembro del grupo de expertos en nomenclatura química de la Real Farmacopea Española, ha colaborado en la traducción al castellano de la Farmacopea Europea, en la elaboración de estudios o informes para empresas farmacéuticas o para la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, y es miembro desde 2017 del grupo de expertos del Ministerio de Sanidad encargado de la elaboración de las pruebas de acceso a las plazas de Farmacéutico Interno Residente. Desde febrero de 2017 es Catedrático de Universidad.

Ingresó como Académico Correspondiente de la RANF en el año 2004. En esta institución ha impartido conferencias, ha presentado libros y ha sido reconocido con varios premios de investigación en los años 1986, 2008 y 2014.

ACTIVIDAD INVESTIGADORA

Su intensa actividad docente y de investigación bibliográfica es inseparable de su principal activo: la actividad investigadora experimental, que se ha centrado fundamentalmente en el desarrollo de nuevas metodologías de síntesis de compuestos farmacológicamente activos, en buena parte productos naturales o análogos de los mismos. En las líneas de trabajo actuales del grupo de investigación que dirige, destaca el desarrollo de nuevas reacciones multicomponente y de reacciones dominó orientados a la síntesis de compuestos bioactivos relacionados con alcaloides, así como el descubrimiento de nuevos candidatos a fármacos mediante la metodología denominada síntesis orientada a la diversidad, como menciona en su Discurso. Entre estos candidatos encontramos antituberculosos, antileishmania y anticáncer, nuevos teranósticos y agentes multidiana diseñados racionalmente para que sean capaces de modular varias dianas terapéuticas asociadas a una enfermedad.

Esta intensa actividad investigadora se ha reflejado hasta el momento en 245 publicaciones originales y 12 patentes. Ha recibido unas 6.100 citas, con un índice h de 37. Varias publicaciones han sido seleccionadas por los editores para ilustrar la portada o contraportada del número correspondiente. Ha

dirigido o codirigido 30 tesinas o trabajos fin de grado, 35 trabajos de DEA o fin de máster y 19 Tesis Doctorales (más otras 7 en curso), habiendo tutelado también a 6 investigadores postdoctorales. Ha presentado unas 300 comunicaciones a congresos y más de 30 conferencias invitadas en distintas Universidades y centros de investigación en España y en el extranjero.

El rigor científico y la productividad del Dr. Menéndez se refleja en otras múltiples facetas. Ha sido evaluador de publicaciones para unas 90 revistas científicas internacionales, incluidas las más prestigiosas en Química Orgánica y en Química Farmacéutica, pertenece a varios consejos editoriales de revistas indexadas, y es además evaluador de proyectos de investigación para diversos organismos oficiales en España y en otros países (Francia, Italia, Rumanía, Austria, República Checa, Croacia, Portugal, Holanda, Israel, Argentina y Hong Kong).

En cuanto a la financiación de este trabajo, ha participado en casi 100 proyectos competitivos y contratos de investigación con diversas empresas químicas y farmacéuticas, siendo el Investigador principal en aproximadamente un 75% de ellos.

Los magníficos resultados que ha obtenido en su actividad investigadora solo son posibles con una gran capacidad de gestión de recursos económicos y humanos. Su relación con grupos de investigación de Francia, Italia, Reino Unido, Arabia Saudí e India, fundamentalmente, iniciada habitualmente con la estancia en el Departamento de doctorandos, postdoctorandos o profesores visitantes de dichos países, se ha ido incrementando con el tiempo a pesar de la crisis. Puedo asegurarles que no es fácil encontrar en nuestro entorno en las áreas de Química Orgánica o Química Farmacéutica una productividad tan grande y relevante.

Nuestro trabajo conjunto a lo largo de los años, continúa de alguna forma después de mi jubilación, ya que las dos primeras ediciones de nuestro libro "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs", publicadas en 2008 y en 2015 por la editorial Elsevier, se completarán con una tercera edición actualmente en marcha.

COMENTARIOS A SU DISCURSO DE INGRESO

En su discurso de ingreso, titulado "La síntesis orgánica en la era de los fármacos biológicos", el Dr. Menéndez nos ha mostrado su amplia experiencia y conocimiento. En su primera parte, ha destacado la relevancia que supone ampliar las regiones conocidas del espacio químico desarrollando nuevas metodologías sintéticas que permitan generar de forma cada vez más sofisticada y eficiente estructuras muy diferentes a las previamente conocidas, un campo al que ha aportado contribuciones interesantes.

Según el conocimiento actual, además de las diversas y complejas estructuras que nos seguirá proporcionando la naturaleza, solo a través de su síntesis previa se podrán encontrar moléculas orgánicas con actividad biológica que den lugar a fármacos novedosos o a herramientas para el estudio de las funciones celulares y de los procesos biológicos. La necesidad de sintetizar nuevas moléculas para su posterior estudio se debe a la dificultad para predecir propiedades moleculares o actividades biológicas, un asunto que fue tratado por el Dr. Arturo Mosqueira Toribio en su Discurso de Ingreso en esta Academia titulado "La teoría de los orbitales moleculares y el diseño de nuevos medicamentos" (año 1974), así como en los de apertura de los cursos 1975 y 1998. Esta es la razón por la que la síntesis orgánica ha protagonizado otros Discursos de Recepción de Académicos en esta institución. La encontramos en el del Dr. Ramón Madroñero Peláez, titulado "La variación estructural en la selección de nuevos fármacos" (año 1971), en el del Dr. Gregorio González Trigo, titulado "Las conquistas de la Síntesis Orgánica" (año 1985), o en el mío propio, titulado "Repercusión de la síntesis química en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos" (año 2000). En el Discurso de Ingreso como Académico de Honor del Dr. José Elguero Bertolini, leído el año 2009 y titulado "La farmacia y la química: un país, dos culturas", éste afirmaba que la química no alcanzará su madurez hasta que la síntesis orgánica se dirija y se aplique a compuestos cuyas propiedades se hayan predicho con anterioridad. Desgraciadamente, como afirmaba el Dr. Mosqueira, predecir con seguridad la actividad biológica de una molécula todavía no es posible.

En el resto de su Discurso, el Dr. Menéndez nos muestra como la síntesis orgánica, además de ser imprescindible para disponer de moléculas pequeñas, tiene importancia en el terreno de los fármacos biológicos y, en general, de la biología. La síntesis y manipulación de biomoléculas está permitiendo, por ejemplo, monitorizar procesos celulares, vectorizar fármacos a lugares específicos, conocer cómo se distribuyen las proteínas y cómo funcionan las enzimas, y sintetizar fármacos biológicos.

Como se ha dicho, el desarrollo de una química compatible con entornos celulares no es trivial, porque requiere utilizar el agua como medio de reacción cuando en general los compuestos orgánicos son muy poco solubles en ella, y porque muchas especies organometálicas utilizadas como catalizadores no suelen ser estables en este medio. Además, han de utilizarse “reacciones ortogonales” que no interfieran con las reacciones bioquímicas. Aunque por el momento se conocen pocas reacciones que cumplan estos requisitos, las cicloadiciones 1,3-dipolares entre azidas y alquinos y las reacciones hetero Diels-Alder de demanda electrónica inversa, se están utilizando con éxito y aplicando a diversos objetivos.

La síntesis de inmunonanopartículas sigue la estela de la de otros immunoconjugados más simples, en los que un anticuerpo monoclonal se enlaza a fármacos para lograr una distribución más específica de éstos. El conjugado Kadcyla[®], por ejemplo, aprobado en 2013 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER-2 positivo, está constituido por el potente agente antimicrotubular maitansina y el anticuerpo monoclonal trastuzumab, cuya acción antitumoral se debe a su interacción con la región extracelular del antígeno HER-2 y con los receptores Fc del sistema complementario. Análogamente, la conjugación de fragmentos de anticuerpos, como el fragmento Fab de trastuzumab, con nanopartículas que pueden encapsular moléculas, permite incrementar la selectividad y especificidad de la distribución de éstas.

El empleo de la química bioortogonal ha dado paso también a la denominada proteómica química, que representa un maridaje perfecto entre la biología y la química. En ella, las moléculas orgánicas se utilizan como sondas para localizar

las dianas intracelulares de los fármacos mediante el marcaje fluorescente de proteínas unidas a fármacos convenientemente modificados. De esta forma, se puede investigar la distribución y función de las proteínas, obtener información sobre sus interacciones, y validar nuevas dianas farmacológicas.

En la tercera parte de su Discurso, el Dr. Menéndez nos muestra con ejemplos que la síntesis orgánica no solo puede realizarse con biomoléculas, sino que los fármacos biológicos (proteínas, polisacáridos o glicoproteínas) pueden ser sintetizados por métodos químicos en vez de obtenerse a partir de seres vivos utilizando técnicas de ingeniería genética. La síntesis de oligosacáridos convenientemente conjugados, análogos a las glicoproteínas que recubren las paredes de las células tumorales o de ciertos virus, puede servir para el diseño de vacunas en las que los glicosacáridos sintetizados funcionan como antígenos. Esta química permite incorporar diferentes fragmentos de oligosacáridos para que éstos funcionen como antígenos multivalentes.

En el caso de los péptidos, la preparación de fragmentos por las ya clásicas síntesis en fase sólida, combinadas a veces con la unión de fragmentos en disolución, ha permitido la obtención a escala industrial de péptidos de un tamaño considerable, como enfuvirtida, un inhibidor del proceso de fusión de la membrana del virus VIH con la de los linfocitos TCD4, que previene la entrada en ellos del ARN viral. Enfuvirtida es un péptido formado por 36 aminoácidos que corresponden a los residuos 127-162 de la porción extracelular del segmento transmembrana gp41 de la glicoproteína de la cubierta del VIH-1.

Además de estos métodos clásicos para la síntesis de péptidos o peptidomiméticos, se están desarrollando técnicas muy eficaces, como la "ligadura química nativa", que permiten enlazar con gran eficacia en un medio acuoso fragmentos peptídicos no protegidos. Estos procedimientos se han empleado en la síntesis total de eritropoyetina humana, una glicoproteína de gran importancia por su papel en la regulación de la producción de eritrocitos que tiene un patrón de glicosilación muy heterogéneo y un fragmento peptídico compuesto por 166 aminoácidos. La síntesis puramente química o quimioenzimática de la eritropoyetina permitiría disponer de estructuras con

un único patrón de glicosilación y estudiar sus propiedades a fin de producir industrialmente la especie más activa.

En el discurso se ha comentado también, como ejemplo de síntesis de biomoléculas artificiales, la de la molécula enantiómera de la proteína Ras, una GTPasa que contiene 166 aminoácidos. Aunque Ras forma parte de una vía de señalización crucial para la regulación de la proliferación y supervivencia celular, y se encuentra mutada en muchos tumores, no se conoce hasta el momento ningún inhibidor directo debido posiblemente a su gran afinidad por su sustrato endógeno (GTP) y a que su estructura tridimensional carece de lugares adecuados para su interacción con otras moléculas. Su enantiómero tiene gran interés porque puede ser útil para descubrir peptidomiméticos capaces de inhibir directamente la proteína Ras natural.

La “intrusión” de la síntesis química en los terrenos biológicos es cada vez más atrevida e intenta manipular la actividad de las células con nuevos objetivos, como poner en funcionamiento rutas metabólicas artificiales a fin de curar ciertas enfermedades. La consecución de estos objetivos puede parecer muy lejana, pero cada vez se van conociendo más reacciones que superan las limitaciones mencionadas previamente y empiezan a utilizarse enzimas artificiales obtenidas por manipulación de proteínas.

El Dr. Menéndez se ha referido en la última parte de su discurso a una estrategia sumamente innovadora en la que hay depositadas muchas esperanzas. Conocida como PROTAC (*proteolysis-targeting chimera*) pretende promover la hidrólisis de una proteína diana marcándola con ubiquitina para su posterior degradación por el proteasoma. Aunque los fármacos actúan tradicionalmente bloqueando una o más dianas (generalmente proteínas), parece más rentable su destrucción, ya que no se requeriría que ambas entidades estuvieran permanentemente en contacto.

Actualmente, puede impedirse o limitarse la producción de una proteína específica a través del *knockdown* de genes utilizando estrategias biológicas como el ARN de silenciamiento (*small interfering RNA*, siRNA) o la edición genética con la técnica CRISPR-Cas9, pero éstas pueden afectar a genes distintos del que se pretende, por lo que tienen problemas de toxicidad y

riesgo de carcinogénesis. Los fármacos de tipo PROTAC sirven de enlace entre el complejo E3-E2-ubiquitina y la proteína diana. Son agentes multidiana, diseñados para que presenten afinidad con la diana que se desea degradar y con una ligasa de ubiquitina (E3) que sea capaz de catalizar la transferencia de la molécula de ubiquitina a la proteína que va a ser degradada. Encontrar un fármaco PROTAC parece una tarea más sencilla que encontrar un inhibidor, ya que solo se requiere que presente afinidad con esta proteína. De esta forma, podrían obtenerse fácilmente modelos de animales o células *knockdown*. Sin embargo, dado que la estrategia terapéutica consistente en la supresión de una diana es muy diferente de la basada en su inhibición, no se conocen todavía las posibles limitaciones que puede implicar el uso de fármacos PROTAC o de las técnicas basadas en siRNA o en la edición genética por el método CRISPR-Cas9.

CONSIDERACIONES FINALES

Parece que el término Química Orgánica fue propuesto por Berzelius (1779-1848) al observar que sus compuestos provenían de seres “organizados”. Berzelius opinaba que, a diferencia de los inorgánicos, estos compuestos habían adquirido una “fuerza vital” por provenir de seres vivos, y esta fuerza impedía su síntesis por las técnicas conocidas hasta el momento. Hoy sabemos que muchos compuestos estudiados en química orgánica no están presentes en los seres vivos mientras que existen numerosos compuestos inorgánicos que forman parte de importantes procesos vitales.

La posibilidad de sintetizar moléculas orgánicas se aceptó cuando el ayudante de Berzelius Friedrich Wöhler (1800-1882) que, por cierto, consideraba que la hipótesis del vitalismo era muy hermosa, sintetizó urea a partir de cloruro amónico y cianato de plata. La comunicación de su descubrimiento a Berzelius pone de manifiesto su sorpresa: “Debo decirle que soy capaz de sintetizar urea sin la necesidad de un riñón, ya sea de hombre o perro; la sal amónica del ácido cianhídrico es la urea”.

La química que ha desplegado ante nosotros el Dr. Menéndez refleja el asombroso desarrollo que han experimentado los métodos de síntesis orgánica y cómo estos avances han facilitado la casi eliminación de las barreras

que separan la química y la biología, una revolución que guarda cierta semejanza con la caída del muro de Berlín en 1989. A mi juicio, debería irse desechando la división entre fármacos biológicos o biotecnológicos y fármacos químicos o de síntesis. Sin embargo, no sería honesto por mi parte obviar que competir en el laboratorio con la química de la vida, optimizada durante siglos a través de la evolución, no es fácil. Dejando aparte el problema del precio, hay que tener en cuenta que el desarrollo de algunos de estos complejos y altamente sofisticados procesos de síntesis a escala de fabricación puede encontrarse con dificultades, aunque por otra parte con la utilización de ADN recombinante u otros métodos de ingeniería genética el proceso de purificación puede afectar significativamente a la calidad, seguridad y eficacia del medicamento.

Espero no haber abusado de su paciencia, y termino con el protocolo de despedida dirigiéndome al Dr. Menéndez Ramos:

“En este acto tomáis posesión de una plaza de Académico Numerario de la Real Academia Nacional de Farmacia, y a mí me cabe la satisfacción de daros la enhorabuena en nombre de todos sus miembros. Esta corporación tiene como objetivo trabajar de forma altruista por mejorar el bienestar personal y social a través del cultivo y la divulgación de las ciencias farmacéuticas y de las afines a la farmacia. En vuestras manos está que esta ambiciosa tarea se vea potenciada a partir de este momento con vuestra aportación.”

He dicho.

Madrid, 11 de octubre de 2018

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Ribas, B.; Lacadena, J. R.; Sentandreu, R.; González de Posada, F. Sesión Necrológica en memoria del Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana, Madrid, 25 de mayo de 2017. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* **2018**, *84*, 86-95.
- 2 <http://historiasdeboticarios.blogspot.com/2012/11/vicente-jordana-roman.html>
- 3 Cornforth, J. W. The trouble with synthesis. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 157-170.
- 4 Nicolaou, K. C.; Sorensen, E. J. *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods*. Wiley-VCH, 1996.
- 5 Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A. *Classics in Total Synthesis II: More Targets, Strategies, Methods*. Wiley-VCH, 2003.
- 6 Nicolaou, K. C.; Chen, J. S. *Classics in Total Synthesis III: Further Targets, Strategies, Methods*. Wiley-VCH, 2011.
- 7 Carreira, E. M.; Kvaerno, L. *Classics in Stereoselective Synthesis*. Wiley-VCH, 2009.
- 8 Gaich, T.; Baran, P. S. Aiming for the ideal synthesis. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4657-4673.
- 9 Wender, P. A. Toward the ideal synthesis and molecular function through synthesis-informed design. *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 433-440.
- 10 Blakemore, D. C.; Castro, L.; Churcher, I.; Rees, D. C.; Thomas, A. W.; Wilson, D. M. Wood, A. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 383-394.
- 11 Newhouse, T.; Baran, P. S.; Hoffmann, R. W. The economies of synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3010-3021.
- 12 Candeias, N. R.; Branco, L. C.; Gois, P. G. P.; Afonso, C. A. M.; Trindade, A. F. More sustainable approaches for the synthesis of N-based heterocycles. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2703-2802.
- 13 Menéndez, J. C. (Ed.) Multibond forming reactions. A new frontier in the synthesis of heterocycles. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 1919-2064.
- 14 Rodriguez, J.; Bonne, D. (Eds.) *Stereoselective multiple bond-forming transformations in organic synthesis*. Wiley, 2015.

- 15 Ley, S. V.; Fitzpatrick, D.; Ingham, R. J.; Myers, R. M. Organic synthesis: March of the machines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3449-3464.
- 16 Ley, S. V.; Fitzpatrick, D.; Myers, R. M.; Battilocchio, C.; Ingham, R. J. Machine assisted organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *5*, 10122-10136.
- 17 Fitzpatrick, D.E.; Ley, S.V. Engineering chemistry for the future of chemical synthesis. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 3087-3100.
- 18 Ley, S.V. The engineering of chemical synthesis: Humans and machines working in harmony. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5182-5183.
- 19 Michaudel, Q.; Ishihara, Y.; Baran, P. S. Academia–industry symbiosis in organic chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 712-721.
- 20 Nielsen, T. E.; Schreiber, S. L. Towards the optimal screening collection: A synthesis strategy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 48-56.
- 21 Finan, C.; Gaulton, A.; Kruger, F. A.; Lumbers, T.; Shah, T.; Engmann, J.; Galver, L.; Kelley, R.; Karlsson, A.; Santos, R.; Overington, J. P.; Hingorani, A. D.; Casas, J. P. The druggable genome and support for target identification and validation in drug development. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, artículo eaag1166.
- 22 O'Connor, C. J.; Beckmann, H. S. G.; Spring, D. R. Diversity-oriented synthesis: producing chemical tools for dissecting biology. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4444-4456.
- 23 Trabocchi, A. (Ed.) Diversity-oriented synthesis. Basics and applications in organic synthesis, drug discovery, and chemical biology. Wiley, 2013.
- 24 Schreiber., S. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science* **2000**, *287*, 1964-1969.
- 25 Galloway, W.R.J.D.; Spandl, R.J.; Bender, A.; Thomas, G.L.; Díaz-Gavilán, M.; O'Connell, K.M.G.; Spring, D.R., en Fu, H. (ed.) Chemical Genomics, capítulo 4, p. 39. Cambridge University Press, 2012.
- 26 Lenci, E.; Guarna, A.; Trabocchi, A. Diversity-oriented synthesis as a tool for chemical genetics. *Molecules* **2014**, *19*, 16506-16528.
- 27 Heidebrecht, R. W.; Mulrooney, C.; Austin, C. P.; Barker, R. H.; Beaudoin, J. A.; Cheng, K. C.-C.; Comer, E.; Dandapani, S.; Dick, J.; Duvall, J. R.; Ekland, E. H.; Fidock, D. A.; Fitzgerald, M. E.; Foley, M.; Guha, R.; Hinkson, P.; Kramer, M.; Lukens, A. K.; Masi, D.; Marcaurelle, L. A.; Su, X.-Z.; Thomas,

- C. J.; Weïwer, M.; Wiegand, R. C.; Wirth, D.; Xia, M.; Yuan, J.; Zhao, J.; Palmer, M.; Muñoz, B.; Schreiber., S. Diversity-oriented synthesis yields a novel lead for the treatment of malaria. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 112–117.
- 28 Avendaño, C. Análisis de “Diversity-oriented synthesis yields a novel lead for the treatment of malaria”. *An. Real Acad. Nac. Farm.* **2012**, *78*, 418-424.
- 29 Morton, D.; Leach, S.; Cordier, C.; Warriner, S.; Nelson, A. Synthesis of natural-product-like molecules with over eighty distinct scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 104-109.
- 30 Bohacek, R. S.; McMartin, C.; Guida, W. C. The art and practice of structure-based drug design: A molecular modeling perspective. *Med. Res. Rev.* **1999**, *1*, 3–50.
- 31 <https://www.cas.org/about/cas-content>. Consultado el 16-09-18.
- 32 Yet, L. Privileged structures in drug discovery. Medicinal chemistry and synthesis. Wiley, 2018.
- 33 Sridharan, V.; Maiti, S.; Menéndez, J. C. A very efficient cerium(IV) ammonium nitrate-catalyzed, four-component synthesis of tetrahydropyridines and its application to the concise generation of functionalized homoquinolizine frameworks. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4565-4572.
- 34 Maiti, S.; Menéndez, J. C. A mild protocol for the efficient synthesis of 5,6-unsubstituted 1,4-dihydropyridines. *Synlett* **2009**, 2249-2252.
- 35 Raja, P. V. A.; Tenti, G.; Perumal, S.; Menéndez, J. C. A heavy metal- and oxidant-free, one-pot synthesis of pyridines and fused pyridines based on a Lewis acid-catalyzed multicomponent reaction. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12270-12272.
- 36 Suryavanshi, P. A.; Sridharan, V.; Maiti, S.; Menéndez, J. C. Fully diastereoselective synthesis of polysubstituted, functionalized piperidines and decahydroquinolines based on multicomponent reactions catalyzed by cerium(IV) ammonium nitrate. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 8791–8799.
- 37 Maiti, S.; Sridharan, V.; Menéndez, J. C. Synthesis of a library of 5,6-unsubstituted 1,4-dihydropyridines based on a one-pot 4CR/elimination process and their application to the generation of structurally diverse fused nitrogen heterocycles. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 713–722.

- 38 Sridharan, V.; Maiti, S.; Menéndez, J. C. Efficient generation of highly functionalized fused oxazepine frameworks based on a CAN-catalyzed four-component tetrahydropyridine synthesis/ring closing metathesis sequence. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9365–9371.
- 39 Suryavanshi, P. A.; Sridharan, V.; Menéndez, J. C. Expedient, one-pot preparation of fused indoles via CAN-catalyzed three-component domino sequences and their transformation into polyheterocyclic compounds containing pyrrolo[1,2-*a*]azepine fragments. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 3426–3436.
- 40 Suryavanshi, P. A.; Sridharan, V.; Menéndez, J. C. A β -enaminone-initiated multicomponent domino reaction for the synthesis of indoloquinolizines and benzoquinolizines from acyclic precursors. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 13207-13215
- 41 Estévez, V.; Villacampa, M.; Menéndez, J. C. Three-component access to pyrroles promoted by the CAN-silver nitrate system under high-speed vibration milling conditions. A generalization of the Hantzsch pyrrole synthesis. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 591-593
- 42 Estévez, V.; Sridharan, V.; Sabaté, S.; Villacampa, M.; Menéndez, J. C. Three-component synthesis of pyrrole-related nitrogen heterocycles by a Hantzsch-type process: Comparison between conventional and high-speed vibration milling conditions. *Asian J. Org. Chem.* **2016**, *5*, 652–662.
- 43 Leonardi, M.; Villacampa, M.; Menéndez, J. C. Multicomponent mechanochemical synthesis. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 2042-2064.
- 44 Leonardi, M.; Villacampa, M.; Menéndez, J. C. Mild and general synthesis of pyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines and related frameworks from pyrrole precursors derived from a mechanochemical multicomponent reaction. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2570-2578.
- 45 MacBeath, G.; Koehler, A. N.; Schreiber, S. L. Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions *en masse*. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967-7968.
- 46 Menéndez, J. C.; Villacampa, M. Péptidos, lagartos y diseño de fármacos. Agentes antidiabéticos relacionados con las incretinas. *An. Real Acad. Nac. Farm.* **2013**, *79*, 580-612.
- 47 Avendaño, C. Química bioortogonal. Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía 34. Madrid, 2012.

- 48 Lang, K.; Chin, J. W. Bioorthogonal reactions for labeling proteins. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16–20
- 49 Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- 50 Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565–598.
- 51 Huisgen, R. Kinetics and mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 633–645.
- 52 Tomøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- 53 Rostovtsev, W.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I) catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- 54 Zhang, L.; Chen, X. G.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. C. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999.
- 55 Johansson, J. R.; Beke-Somfai, T.; Stålsmeden, A. S.; Kann, N.; Ruthenium-catalyzed azide alkyne cycloaddition reaction: Scope, mechanism, and applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 14726–14768.
- 56 Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- 57 Hein, J. E.; Fokin, V. V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: New reactivity of copper(I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302–1315.
- 58 Liang, L. Y.; Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933–2945.
- 59 Haldon, E.; Nicasio, M. C.; Pérez, P. J. Copper-catalysed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC): An update. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9528–9550.

- 60 Li, L.; Zhang, Z. Development and applications of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) as a bioorthogonal reaction. *Molecules* **2016**, *21*, 1393.
- 61 Li, S.; Wang, L.; Yu, F.; Zhu, Z.; Shobaki, D.; Chen, H.; Wang, M.; Wang, J.; Qin, G.; Erasquin, U.J.; Ren, L.; Wang, Y.; Cai, C. Copper-catalyzed click reaction on/in live cells. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2107-2114.
- 62 Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644-648.
- 63 Shi, M.; Wosnick, J. H.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M. S. Immuno-polymeric nanoparticles by Diels-Alder chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6126-6131.
- 64 Moellering, R. E.; Cravatt, B. F. How chemoproteomics can enable drug discovery and development. *Chem Biol.* **2012**, *19*, 11-22.
- 65 Doyle, S. K.; Pop, M. S.; Evans, H. L.; Koehler, A. N. Advances in discovering small molecules to probe protein function in a systems context. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *30*, 28-36.
- 66 Jones, L. H.; Neubert, H. Clinical chemoproteomics—Opportunities and obstacles. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, artículo eaaf7951.
- 67 Garbaccio, M. R.; Parmee, E. R. The impact of chemical probes in drug discovery: A pharmaceutical industry perspective. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 11-17.
- 68 Tsien, R. Y. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612-5626.
- 69 Cañeque, T.; Müller, S.; Rodriguez, R. Visualizing biologically active small molecules in cells using click chemistry. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *1*, 201-215.
- 70 Kang, K.; Park, J.; Kim, E. Tetrazine ligation for chemical proteomics. *Proteome Sci.* **2017**, *15*, 15.
- 71 Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. Bioorthogonal turn-on probes for imaging small molecules inside living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869-72.
- 72 Reiner, T.; Earley, S.; Turetsky, A.; Weissleder, R. Bioorthogonal small-molecule ligands for PARP1 imaging in living cells. *ChemBioChem.* **2010**, *11*, 2374-2377.

- 73 Kim, E.; Yang, K. S.; Weissleder, R. Bioorthogonal small molecule imaging agents allow single-cell imaging of MET. *PLoS One*. **2013**, *8*, e81275.
- 74 Kim, Y.-R.; Kim, Y. H.; Kim, S. W.; Lee, Y. J.; Chae, D.-E.; Kim, K. -A.; Lee, Z.-W.; Kim, N. D.; Choi, J.-S.; Choi, I. S.; Lee, K.-B. A bioorthogonal approach for imaging the binding between dasatinib and its target proteins inside living cells. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11764–11767.
- 75 Rebelein, J. G.; Ward, T. R. *In vivo* catalyzed new-to-nature reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53*, 106–114.
- 76 Yang, M.; Chen, R. P. Transition metal-mediated bioorthogonal protein chemistry in living cells. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6511–6526.
- 77 Chankeshwara, S. V.; Indrigo, E.; Bradley, M. Palladium-mediated chemistry in living cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 128–135
- 78 Vinogradova, E. V. Organometallic chemical biology: An organometallic approach to bioconjugation. *Pure. Appl. Chem.* **2017**, *89*, 1619–1641
- 79 Jbara, M.; Maity, S. K.; Brik, A. Palladium in the chemical synthesis and modification of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10644–10655.
- 80 Martínez, M.; Mascareñas, J. L. Organometallic catalysis in biological media and living settings. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *359*, 57–79.
- 81 Tomás-Gamasa, M.; Martínez-Calvo, M.; Couceiro, J. R.; Mascareñas, J. L. Transition metal catalysis in the mitochondria of living cells. *Nat. Comm.* **2016**, *7*, artículo 1253.
- 82 Vidal, C.; Tomás-Gamasa, M.; Destito, P.; López, F.; Mascareñas, J. L. Concurrent and orthogonal gold(I) and ruthenium(II) catalysis inside living cells. *Nature Comm.* **2018**, *7*, 1253.
- 83 Jeschek, M.; Reuter, R.; Heinisch, T.; Trindler, C.; Klehr, J.; Panke, S.; Ward, T. T. Directed evolution of artificial metalloenzymes for *in vivo* metathesis. *Nature* **2016**, *537*, 661–665
- 84 Jones, L. H. Recent advances in the molecular design of synthetic vaccines. *Nature Chemistry* **2015**, *7*, 952-960.
- 85 Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239-254.
- 86 Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4-27.

- 87 Liu, Y.-H.; Giunta, B.; Zhou, H.-D.; Tan, J.; Wang, Y.-J. Immunotherapy for Alzheimer disease - the challenge of adverse effects. *Nat. Rev. Neurol.* **2012**, *8*, 465-469.
- 88 Wang, C. Y.; Wang, P.-N.; Chiue, M.-J.; Finstada, C.-L.; Lin, F.; Lynn, S.; Tai, Y.-H.; Fanga, X. D.; Zhao, K.; Hung, C.-H.; Tseng, Y.; Peng, W.-J.; Wang, J.; Yu, C.-C.; Kuo, B.-S.; Frohn, P. A. UB-311, a novel UBITH[®] amyloid β peptide vaccine for mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Intervent.* **2017**, *3*, 262-272
- 89 Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Medicinal chemistry of anticancer drugs, 2^a edición, capítulo 12. Elsevier, 2015.
- 90 Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. Prospects for total synthesis: a vision for a totally synthetic vaccine targeting epithelial tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11937-11942.
- 91 Fernández-Tejada, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. Recent developments in synthetic carbohydrate-based diagnostics, vaccines, and therapeutics. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10616-10628.
- 92 Danishefsky, S. J.; Shue, Y.-K.; Chang, M. N.; Wong, C.-H. Development of Globo-H Cancer Vaccine. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 643-652.
- 93 Fernández-Tejada, A.; Baynes, B. F. Danishefsky, S. Designing synthetic vaccines for HIV. *Expert Des. Vaccin.* **2015**, *14*, 815-831.
- 94 Calarese, D. A.; Scanlan, C. N.; Zwick, M. B.; Deechongkit, S.; Mimura, Y.; Kunert, R.; Zhu, P.; Wormald, M. R.; Stanfield, R. L.; Roux, K. H.; Kelly, J. W.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Katinger, H.; Burton, D. R.; Wilson, I. A. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **2003**, *300*, 2065-2071.
- 95 Sunjic, V.; Parnham, M. Signposts to chiral drugs: Organic synthesis in action, capítulo 12. Springer Verlag, 2011.
- 96 Wang, P.; Dong, S.; Shieh, J.-H.; Peguero, E.; Hendrickson, R.; Moore, M. A. S.; Danishefsky, S. J. Erythropoietin derived by chemical synthesis. *Science* **2013**, *342*, 1357-1360.
- 97 Wilson, R. M.; Dong, S.; Wang, P.; Danishefsky, S. J. The winding pathway to erythropoietin along the chemistry-biology frontier: A success at last. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7646-7665.

- 98 Hsieh-Wilson, L. C.; Griffin, M. E. Improving biologic drugs via total chemical synthesis. *Science* **2013**, *342*, 1332-1333.
- 99 Hirano, K.; Macmillan, D.; Tezuka, K.; Tsuji, T.; Kajihara, Y. Design and synthesis of a homogeneous erythropoietin analogue with two human complex-type sialyloligosaccharides: Combined use of chemical and bacterial protein expression methods. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9557-9560.
- 100 Wang, L.-X.; Amin, M. N. Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycoproteins for deciphering functions. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 51-66.
- 101 Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Referencia 84, capítulo 10. Elsevier, 2015.
- 102 Levinson, A. M.; McGee, J. H.; Roberts, A. G.; Creech, G. S.; Wang, T.; Peterson, M. T.; Hendrickson, R. C.; Verdine, G. L.; Danishefsky, S. J. Total chemical synthesis and folding of all-L and all-D variants of oncogenic KRas(G12V). *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7632-7639.
- 103 Gu, S.; Cui, D.; Chen, X.; Xiong, X.; Zhao, Y. PROTACs: An emerging targeting technique for protein degradation in drug discovery. *BioEssays* **2018**, *40*, 1700247.
- 104 Grimm, D.; Streetz, K.; Jopling, C.; Storm, T.; Pandey, K.; Davis, C.; Marion, P.; Salazar, F.; Kay, M. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **2006**, *441*, 537-541.
- 105 Haapaniemi, E.; Botla, S.; Persson, J.; Schmierer, B.; Taipale, J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 927-930.
- 106 Bondeson, D. P.; Smith, B. E.; Burslem, G. M.; Buhimschi, A. D.; Hines, J.; Jaime-Figueroa, S.; Wang, J.; Hamman, B. D.; Ishchenko, A.; Crews, C.M. Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead. *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25*, 78-87.
- 107 Lebraud, H.; Wright, D. J.; Johnson, C.N.; Heightman, T. D. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 927-934.