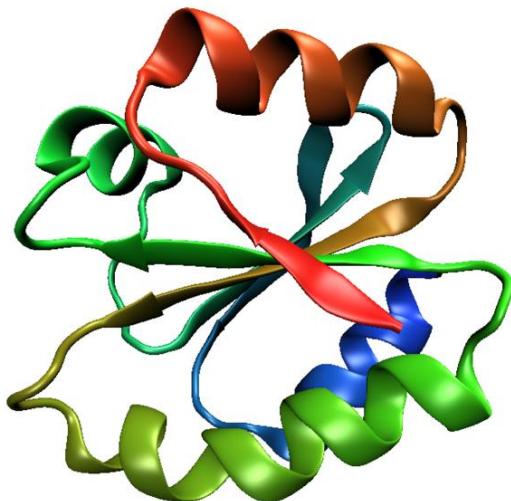


**SÍNTESIS Y ESTUDIO
ESTRUCTURAL DE NUEVOS
 γ -PÉPTIDOS CICLOBUTÁNICOS**



JUAN ANTONIO COBOS IGLESIAS

Máster en Experimentación Química
Dirigido por la Dra. Rosa M^a Ortúñoz
Universitat Autònoma de Barcelona
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bellaterra, Diciembre 2011



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE NUEVOS
 γ -PÉPTIDOS CICLOBÚTANICOS**

Memòria presentada para aspirar al título de
Máster en Experimentación Química
por la Universitat Autònoma de Barcelona,
por Juan Antonio Cobos

Dra. Rosa M^a Ortúñoz

Juan Antonio Cobos
Bellaterra, 1 de Diciembre de 2011



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departamento de Química

Rosa M^a Ortúñoz Mingarro, Catedrática de Química Orgánica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifico:

que **Juan Antonio Cobos** ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo experimental que ha conducido la redacción de:

**SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE NUEVOS
 γ -PÉPTIDOS CICLOBÚTANICOS**

Y para dejar constancia firmo el presente certificado en Bellaterra, 1 de Diciembre del 2011

Dra. Rosa M^a Ortúñoz Mingarro

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Rosa María Ortúñoz la oportunidad de entrar en este grupo, así como su ayuda para llevar a cabo la investigación aquí descrita. Quisiera agradecer sinceramente a la Dra. Ona Illa, por su inestimable ayuda y dedicación.

Dar las gracias al Dr. Pau Nolis del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, a los integrantes del Servei de Anàlisi Química, así como al Departamento de Química y muy especialmente a los miembros de Química Orgánica.

A todos mis compañeros de Laboratorio; Jordi, Eli, Raquel, Esther, Sergi, Albert, Marta, Álex, Enric, Jimena y Nydia, gracias por los buenos momentos que hemos compartido, por vuestra ayuda y apoyo. También agradecer al resto de compañeros de la unidad de Órganica y de otras unidades por haber compartido todo este tiempo.

No puedo acabar estos agradecimientos sin dar las gracias a mis amigos, porque siempre están ahí.

Finalmente, y sobretodo, dar las gracias a mis padres y al resto de mi familia, gracias por todo.

Muchas gracias!

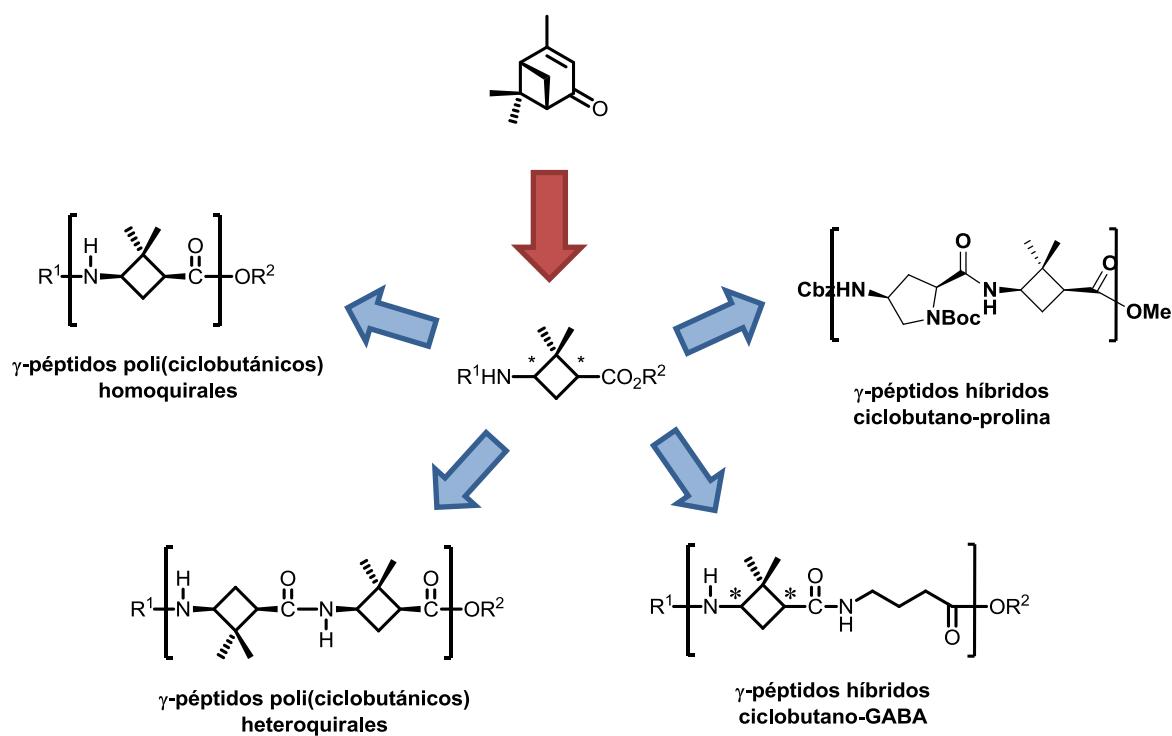
ABREVIATURAS

AACBs	Aminoácidos ciclobutánicos
Bn	Bencilo
Boc	<i>terc</i> -Butoxicarbonilo
Boc-ON	2- <i>terc</i> -butoxicarboniloximino-2-fenilacetonitrilo
Cbz	Benziloxicarbonilo
DEC	1,3-diciclohexil carbodiimida
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMS	Sulfuro de dimetilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
e.e.	Exceso enantiomérico
eq	Equivalentes
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EM	Espectrometría de masas
ESI-MS	<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>
FDPP	Pentafluorofenil difenilfosfinato
GABA	Ácido gama aminobutírico
GBP	Gabapentina
HOBt	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
IR	Infrarojo
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
Rdto	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SNC	Sistema nervioso central
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético

RESUMEN

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la síntesis y el estudio estructural de tres series diferentes de γ -péptidos conteniendo un ciclobutano como elemento constrictor del esqueleto péptidico.

También se han sintetizado una serie de γ -péptidos híbridos formados a partir de monómeros ciclobutánicos y un derivado de prolina para su potencial uso como péptidos capaces de penetrar en las células (*CPPs*).



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de los gama aminoácidos	1
1.2 Precedentes en la síntesis de gama aminoácidos	3
1.3 Restricción conformacional y quiralidad en aminoácidos y péptidos	5
1.4 Precedentes de aminoácidos y péptidos ciclobutánicos.....	6
1.4.1 γ -Aminoácidos y péptidos ciclobutánicos	7
1.4.2 Aminoácidos y péptidos ciclobutánicos en nuestro grupo de investigación.....	7
1.5 Estructura en péptidos.....	9
1.5.1 Importancia de los enlaces de hidrógeno	9
1.5.2 Estructura secundaria en péptidos	10
1.5.3 Estructura secundaria en γ -péptidos.....	10
1.6 Péptidos capaces de penetrar en las células	11
2. OBJETIVOS	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1 Síntesis de los monómeros	17
3.1.1 Monómeros ciclobutánicos	18
3.1.2 Síntesis del derivado de GABA	19
3.2 Síntesis de γ -péptidos y estudio estructural	20
3.2.1 Síntesis de los γ -péptidos constituidos por un monómeros ciclobutánicos y un derivado del GABA	20
3.2.2 Síntesis de γ -péptidos constituidos por monómeros ciclobutánicos	23

3.2.3 Estudio estructural de los γ -péptidos en solución	26
3.3 Péptidos capaces de penetrar la membrana celular “CPPs”	37
3.3.1 Síntesis	37
3.3.2 Estudio estructural y biológico	38
4. RESUMEN Y CONCLUSIONES	40
5. DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL	41
5.1. Metodología general	41
5.1.1 Espectroscopia y espectrometría	41
5.1.2 Cromatografía	42
5.1.3 Materiales generales de laboratorio.....	42
5.2 Procedimientos sintéticos y caracterización de los diferentes compuestos	43
ANEXO I	54
ANEXO II	62

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA DE LOS GAMA AMINOÁCIDOS

Los gama aminoácidos han atraído la atención de la comunidad científica, entre alguno de los motivos más importantes, por ser compuestos biológicamente activos en el sistema central nervioso (SCN) de los mamíferos.

El compuesto que hizo despertar el interés por los gama aminoácidos en el campo biológico fue el ácido γ -aminobutírico (conocido comúnmente como GABA). Aunque este producto natural ya era conocido¹ y se sabía de su existencia en plantas y bacterias, donde realiza un papel metabólico en el ciclo de Krebs, no fue hasta 1949 cuando Eugene Robert y S. Frankel² detectaron cantidades importantes de este compuesto en el sistema central nervioso de mamíferos. El primer indicio de que el GABA podría tener una función inhibitoria en el sistema nervioso de los vertebrados vino de estudios en los que se constató que la aplicación tópica de soluciones de GABA ejerce efectos inhibitorios sobre la actividad eléctrica del cerebro.³ Sin embargo, el GABA no fue aceptado como neurotransmisor hasta la década de 1960.

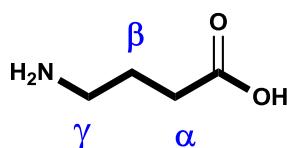


Figura 1. Ácido γ -aminobutírico (GABA)

En la actualidad, es conocido que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema central de los mamíferos. Se encuentra principalmente en el cerebro, y es un agonista de tres subtipos de receptores. La alteración de la función GABAérgica en el cerebro se asocia como el responsable del desarrollo de algunos trastornos neurológicos y psiquiátricos en los seres humanos, como la enfermedad de

¹ a) Ackermann, D. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **1910**, 69, 273. b) Ackermann, D.; Kutscher, Fr. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **1910**, 69, 265.

² Roberts, E.; Frankel, S. *J. Biol. Chem.* **1950**, 187, 55.

³ Hayashi, T., Nagai, K. *Abstr. XX Inter. Physiol. Congr. Brussels*, **1956**, 410

Huntington, el Parkinson, la epilepsia, la esquizofrenia y otros, tales como la ansiedad y el comportamiento agresivo.⁴

Sin embargo, la administración de GABA vía oral o intravenosa no es una terapia eficaz debido a su baja lipofilia, y su pobre capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB). La síntesis de los derivados de GABA más lipofílicos capaces de cruzar la barrera sangre-cerebro, y que pueda inhibir la GABA transaminasa (GABA-T), la enzima que degrada GABA, ha sido el blanco de un gran número de estudios. En consecuencia, en los últimos años se han dedicado grandes esfuerzos en la síntesis de los derivados de GABA para así modificar sus propiedades, tanto físicas como químicas, para su uso farmacológico. Hoy en día ya se pueden encontrar derivados como medicamentos:

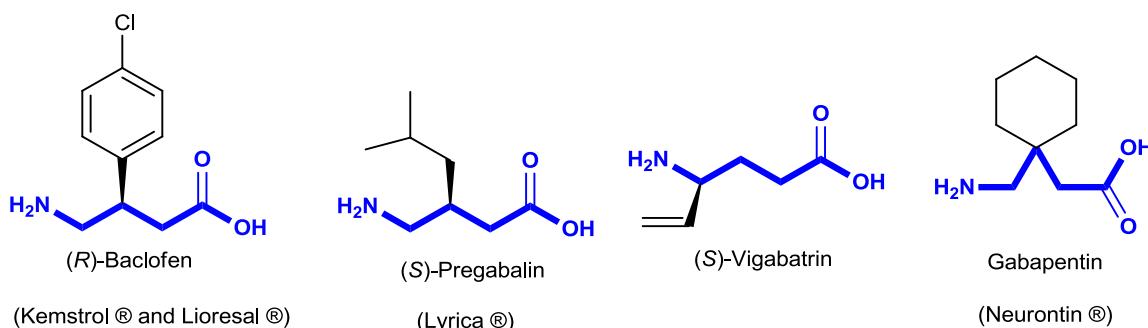


Figura 2. Análogos comerciales del GABA

Otro de los puntos es la utilización de los γ -aminoácidos, con el fin de mimetizar aminoácidos y péptidos naturales para mejorar su uso como fármacos. Los peptidomiméticos pueden ofrecer ventajas como por ejemplo la mayor estabilidad a la degradación enzimática frente a los péptidos proteicos. Además, oligómeros que contienen residuos de γ -aminoácidos pueden adoptar conformaciones específicas y pueden ser utilizados como piezas para la construcción de moléculas biomédicas activas.

Por otra parte, en los últimos años los gamma aminoácidos han sido un foco de atención por su potencial en el diseño y síntesis de α,γ - y β,γ - péptidos híbridos (oligómeros) que se pliegan en estructuras secundarias definidas. Estos péptidos se pliegan formando novedosas estructuras, algunos de ellas helicoidales. Además, recientemente se

⁴ a) Giumanini, A. G.; Chiavari, G.; Gusiani, M. M.; Rossi, P. *Synthesis*, **1980**, 743. b) Hart, B. R.; Rush, D. J.; Shea, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 460. c) Wissner, A.; Overbeek, E.; Reich, M. F.; Floyd, M. B.; Johnson, B. D.; Mamuya, N.; Rosfjord, E. C.; Discafani, C.; Shi, X.-Q.; Rabindran, S. K.; Gruber, B. C.; Ye, F.; Hallett, W. A.; Nilakantan, R.; Shen, R.; Wang, Y.-F.; Greenberger, L. M.; Tsou, H.-R. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 49.

han realizado investigaciones de gama aminoácidos lineales y cíclicos que pueden ser una promesa para el diseño de nanotubos; ejemplo de ello son segmentos de α , γ - péptidos híbridos con nuevas propiedades estructurales y cavidades internas.⁵ Estos compuestos, conocidos como nanotubos peptídicos autoensamblados (SPN), han llamado la atención recientemente, debido a sus posibles aplicaciones en biología y ciencias de materiales.

También cabe destacar la potencial utilización como nuevos biopolímeros, como es el caso del ácido gama-poliglutámico, un poliaminoácido utilizado ya en diferentes campos de la industria y con un futuro prometedor en nuevas aplicaciones.

1.2 PRECEDENTES EN LA SINTESIS DE GAMA AMINOACIDOS

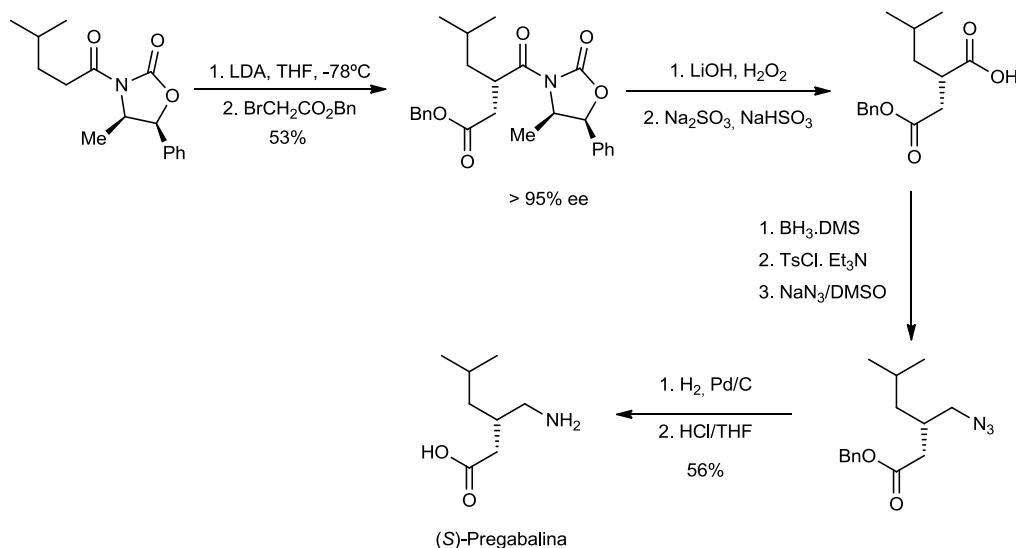
El interés por la síntesis de γ -aminoácidos ha ido creciendo desde que se conocen sus propiedades biológicas y estructurales. Hoy en día son muchos los ejemplos de síntesis de γ -aminoácidos que podemos encontrar en la literatura científica. En los últimos años se ha incrementado notablemente dado su potencial aplicación en el campo de los materiales y por ser buenos candidatos a fármacos. Sobre todo por este último motivo, se ha estudiado y publicado un número considerable de métodos para la síntesis estereoselectiva y la aplicación práctica de γ -aminoácidos quirales y derivados, demostrando claramente el interés teórico y práctico de los γ -aminoácidos.⁶

Diferentes estrategias han sido utilizadas para la síntesis estereoselectiva como el uso precursores quirales, auxiliares quirales o la resolución de mezclas racémicas. En los siguientes esquemas, a modo de ejemplo, se muestran dos estrategias diferentes para la síntesis de la (*S*)-pregabalina (análogo del GABA), que es un agonista GABAérgico comercializado como un potente anticonvulsivante.

⁵ a) Woll, M.; Lai, J.; Guzei, I.; Taylor, S.; Smith, M.; Gellman, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077. b) Amorin, M.; Brea, R; Castedo,L.; Granja, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710.

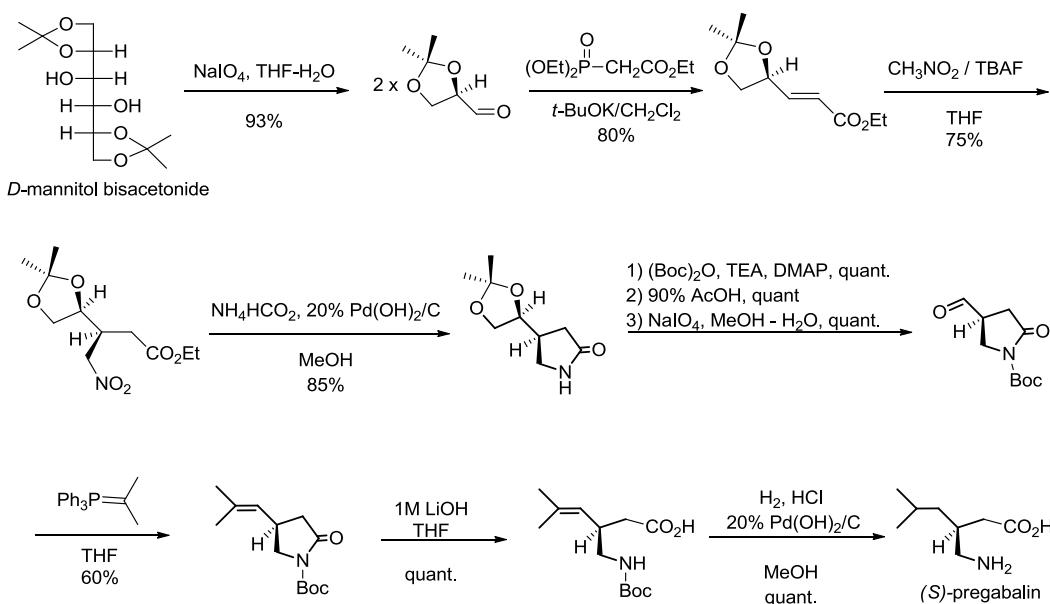
⁶ Ordóñez, M.; Cativiela, C: *Tetrahedron Asymmetry*, **2007**, *18*, 3.

En el primer esquema sintético, Yuen *et al.*⁷ realizan una síntesis estereoselectiva de enantiómero puro (*S*)-pregabalina utilizando un auxiliar quirial.



Esquema 1. Esquema sintético de Yuen *et al.* para la obtención de la (*S*)-pregabalina

En nuestro grupo de investigación, esta vía de síntesis estereoselectiva se llevó a cabo a partir de la adición 1,4-conjugada de nitrometano a un alquenoato como la etapa clave para producir un nitroéster, que posteriormente se transforma en una γ -lactama.⁸



Esquema 2. Síntesis estereoselectiva de la (*S*)-pregabalina llevada a cabo en nuestro laboratorio

⁷ Yuen, P.-W.; Kanter, G. D.; Taylor, C. P.; Vartanian, M. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 823.

⁸ Izquierdo S.; Aguilera J.; Buschmann H.; García M.; Torrens A.; Ortuño R. M. *Tetrahedron Asymmetry*, **2008**, *19*, 651.

1.3 RESTRICCIÓN CONFORMACIONAL Y QUIRALIDAD EN AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS

Los aminoácidos y péptidos de un tamaño pequeño o medio son moléculas muy flexibles que en disolución pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes e intercambiables por medio de un rápido equilibrio. Es por esta causa que la mayoría de péptidos que presentan actividad biológica no pueden ser utilizados con fines terapéuticos, ya que al presentar diferentes confórmeros pueden interaccionar con diversos receptores dando lugar a respuestas múltiples.

La posibilidad de limitar la libertad conformacional de los péptidos mediante la introducción de elementos que confieran una restricción podría potenciar una mayor selectividad y estabilidad metabólica de éstos, aumentando así las aplicaciones farmacológicas. Una forma para introducir restricciones en péptidos se basa en disminuir la flexibilidad de la cadena principal, derivada de la posibilidad de rotación existente en torno a los enlaces sencillos de cada uno de los aminoácidos que forman el péptido. Esta estrategia ha sido ampliamente explorada en las últimas décadas.

Por otro lado, la estrategia de restringir la libertad conformacional también proporciona un método muy adecuado para investigar la relación actividad-estructura y para ello es esencial determinar la estructura tridimensional que adopta el péptido en el momento de interactuar con el receptor. Este tipo de estudios permitirían un diseño racional de péptidos para un uso farmacológico.

También hay que tener en cuenta, en el diseño de nuevos aminoácidos y péptidos, el papel fundamental que juega la quiralidad de estos. Es conocido que casi todos los compuestos biológicamente activos dependen de receptores y sustratos quirales, es decir que interactúan solo con moléculas de una configuración absoluta determinada.

En los sistemas vivos frecuentemente se produce sólo una forma enantiomérica de las posibles. Un compuesto quiral biológicamente activo interacciona con su receptor de una manera quiral, y su enantiómero podría no ser reconocido por el receptor; así, no es sorprendente que los enantiómeros de un fármaco pueden interactuar de diferentes formas con el receptor, generando efectos biológicos distintos.

Vista la importancia de la quiralidad y la restricciones, los químicos sintéticos han explorado métodos que permiten obtener análogos quirales y restringidos del GABA. En la

siguiente figura se puede observar análogos, en algunos casos quirales, restringidos por la incorporación de sustituyentes voluminosos, de dobles enlaces, o anillos en su esqueleto.

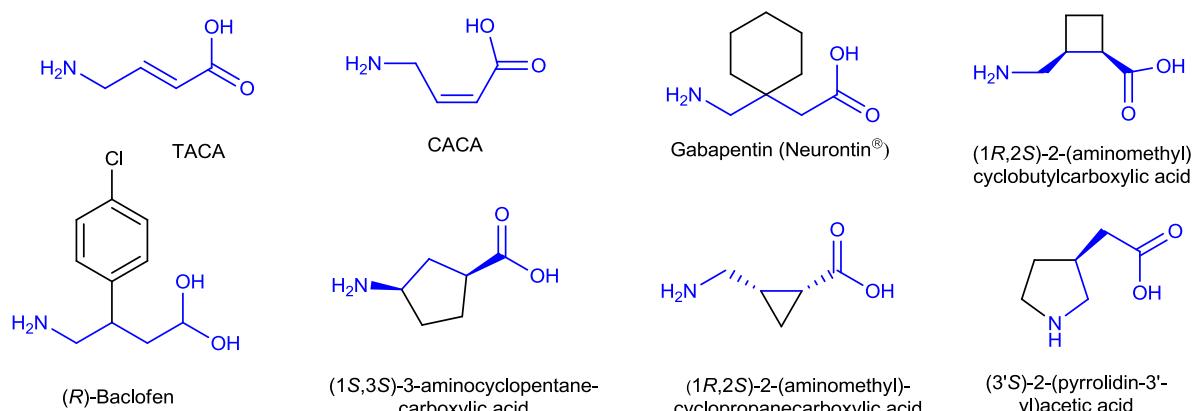


Figura 3. Análogos restringidos del GABA.

1.4 PRECEDENTES DE AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS CICLOBUTÁNICOS

Las posibilidades de limitar la libertad conformacional de los aminoácidos y péptidos son variadas. Ha sido objeto de muchos estudios y ha abierto un campo importante en el estudio estructural. Una de esas posibilidades es la restricción mediante la inclusión de anillos en la cadena principal del aminoácido. Existen precedentes en la bibliografía de síntesis de aminoácidos y péptidos que contienen anillos, pero para nuestro objeto de estudio nos centraremos en los anillos de 4 miembros.

La unidad de ciclobutano se encuentra como unidad básica de muchos compuestos naturales⁹ y sintéticos con interesantes actividades farmacológicas.¹⁰ Pero no fue hasta un pasado reciente que la estructura ciclobutánica en aminoácidos (aminoácidos ciclobutánicos, AACBs) fue investigada, debido a que no se habían detectado en fuentes naturales.¹¹ Desde entonces, otros AACBs y péptidos relacionados se han obtenido de fuentes naturales. Algunos de estos compuestos han recibido una gran atención debido a la actividad biológica que presentan: antivíricos, analgésicos, antimicrobianos, antidepresivos y neurotróficos. Es por este motivo que se han dedicado muchos esfuerzos a la obtención tanto de productos naturales como de sus análogos modificados más activos.

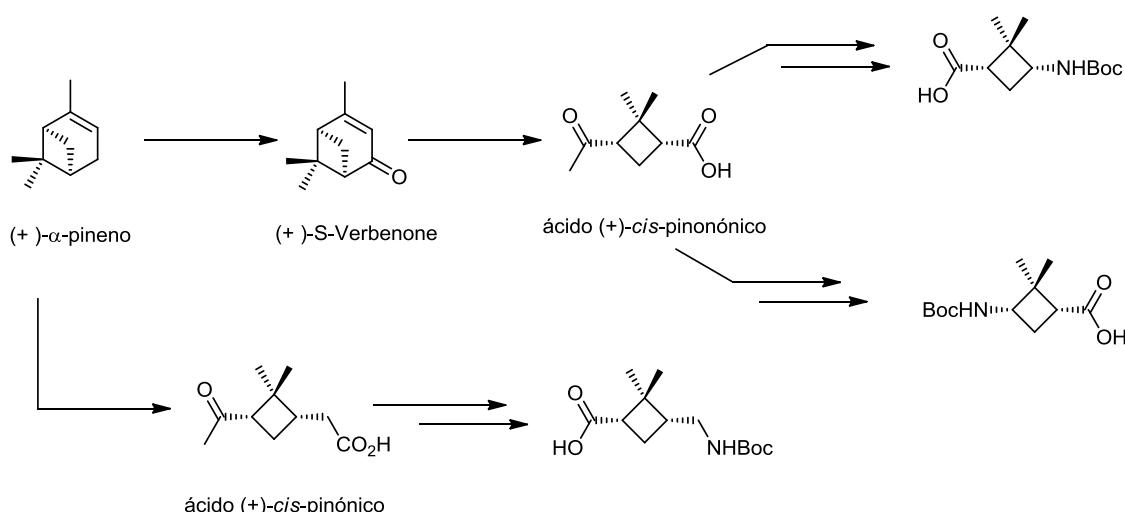
⁹ Dembitsky, V.M. *J. Nat. Med.*, **2008**, 62, 1.

¹⁰ Krohn, K.; Kirst, H., Maas, H. Eds.; *VCH: Weinheim*, **1993**, 15.

¹¹ Bell, E. A.; Qureshi, M. Y.; Pryce, R. J.; Janzen, D. H.; Lempe, K.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 1490.

1.4.1 γ -Aminoácidos y péptidos ciclobutánicos

Los precedentes para γ -aminoácidos carbocíclicos no son muy numerosos aunque existen diversos ejemplos de síntesis de γ -aminoácidos ciclopropánicos, ciclopentánicos e incluso ciclohexánicos.¹² Asimismo, los γ -aminoácidos descritos que contienen anillos de cuatro miembros son escasos,¹³ destacar la síntesis llevada a cabo por Burgess *et al.*,¹⁴ que utilizó terpenos como la (+)-verbenona y la (+)- α -pineno como precursores quirales para obtener γ -aminoácidos ciclobutánicos quirales. En el siguiente esquema se muestra la estrategia sintética:



Esquema 3. Esquema sintético de Burgess y col. para la obtención de aminoácidos ciclobutánicos a partir (+)- α -pineno

1.4.2 Aminoácidos y péptidos ciclobutánicos en nuestro grupo de investigación

En los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha interesado por la síntesis y el estudio estructural de aminoácidos y oligopéptidos no naturales que tuvieran el ciclobutano como elemento constrictor en su cadena principal, con el objetivo de mejorar sus propiedades como fármacos y nuevos materiales.

¹² a) Baxendale, I.; Ernest, M; Krahner, W-R; Ley, S. *Synlett*, **2002**, 1641 b) Kenewell, P.; Matharu, S.; Taylor, J.; Westwood, R.; Sammndr, P.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1982**, 2253.

¹³ a) Ortúñoz, R. M.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 237. b) Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortúñoz, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 302. c) Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad R.; Mor, Á.; Moglioni A. G.; Moltrasio G. Y. *Tetrahedron Asymmetry*. **2008**, 19, 2864.

¹⁴ Burgess, K.; Li, S.; Rebenspies, J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1681.

En este contexto, nuestro grupo ha sintetizado nuevos β -¹⁵ y γ -¹³ aminoácidos ciclobutánicos enantioméricamente puros. Se ha demostrado, en el caso de los β -aminoácidos y β -péptidos pequeños, que el anillo ciclobutánico es un buen inductor de estructuras secundarias definidas. Incluso se han observado β -péptidos con la capacidad de gelificar y formar fibras.

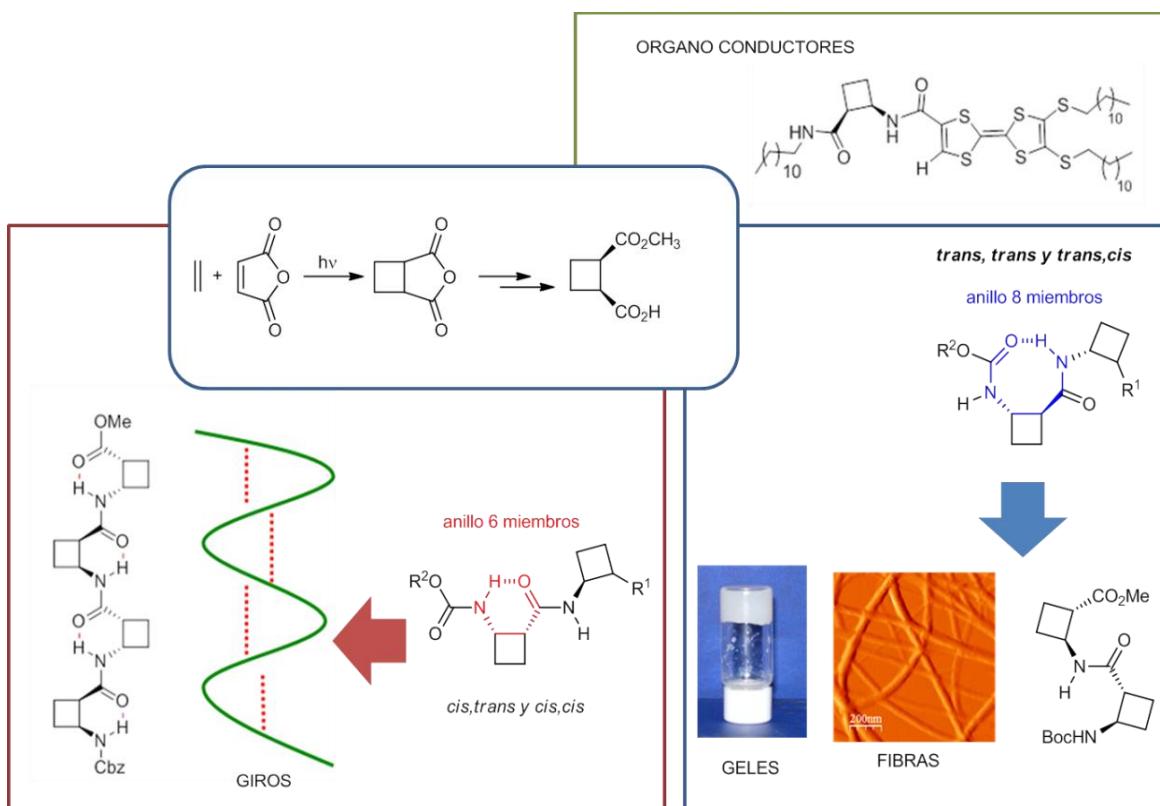


Figura 4. Estudios β -péptidos en nuestro grupo de investigación

¹⁵ a) Martín-Vilà, M.; Muray, E.; Aguado, G. P.; Álvarez- Larena, A.; Branchadell, V.; Minguillón, C.; Giralt, E.; Ortúñoz, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3569. b) Aguado, G. P.; Álvarez-Larena, A.; Illa, O.; Moglioni, A. G.; Ortúñoz, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 25. c) Moglioni, A. G.; Muray, E.; Castillo, J.; Álvarez-Larena, A.; Moltrasio, G.; Branchadell, V.; Ortúñoz, R. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2402. d) Izquierdo, S.; Kogan, M.J.; Parella, T.; Moglioni, A.G.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortúñoz, R. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5093. e) Izquierdo, S.; Rúa, F.; Sbai, Abdelouahid, Parella, T.; Álvarez-Larena, Á.; Branchadell, V.; Ortúñoz, R. M., *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7963. f) F. Rúa, F.; Boussert, S.; Diez-Pérez, I.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortúñoz, R. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3643. g) Torres, E.; Acosta-Silva, C.; Rúa, F.; Álvarez-Larena, A.; Parella, T.; Branchadell, V.; Ortúñoz, R. M. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 5669. h) Fernández, D.; Torres, E.; Avilés, F.; Ortúñoz, R. M.; Vendrell, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3824. i) Torres, E.; Gorrea, E.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Branchadell, V.; Ortúñoz, R. M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2301. j) Torres, E.; Puigmartí-Luis, J.; Pérez del Pino, A.; Ortúñoz, R. M.; Amabilino, D. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1661.

1.5 ESTRUCTURA EN PÉPTIDOS

La mayoría de las moléculas con actividad biológica puede poseer muchos grados de libertad. Sin embargo, estas moléculas sólo adoptan una conformación preferente, a pesar de todas las posibilidades existentes. Entender el por qué una molécula adopta una conformación específica implica entender el balance de fuerzas existentes entre la molécula y con su entorno.

Polímeros de α -aminoácidos tienen un esqueleto intrínsecamente flexible, sin embargo, muchas proteínas adoptan conformaciones muy compactas y que son termodinámicamente estables bajo condiciones fisiológicas. La integridad de los patrones de plegamiento de proteínas es crucial para el funcionamiento correcto de las funciones de éstas. Esto lleva al químico a preguntarse si otros tipos de polímeros también pueden hacer plegamientos y adoptar conformaciones específicas y compactas, generando "sitios activos".

El diseño de los polímeros de aminoácidos no naturales que adopten patrones de plegado específico y compacto es un reto, ya que, a pesar de décadas de estudio intensivo, los orígenes de la estabilidad de las conformaciones de las proteínas todavía no están completamente claros. Parece generalmente aceptado que la estructura terciaria de cualquier proteína en particular refleja el equilibrio alcanzado entre un gran número de interacciones débiles, sin embargo, todavía es imposible predecir con detalle los patrones de plegamiento basado simplemente en el conocimiento de la secuencia de aminoácidos.

1.5.1 Importancia de los enlaces de hidrógeno

La química supramolecular está basada en interacciones de enlace no covalentes. Este término incluye un amplio intervalo de fuerzas de atracción y repulsión. Las más importantes son los enlaces de hidrógeno, las interacciones ión-ión, las interacciones ión-dipolo, las interacciones $\pi-\pi$, las interacciones dipolo-dipolo, y las fuerzas de Van der Waals. Estas fuerzas son las responsables del ensamblado de grandes moléculas, del empaquetamiento cristalino y del reconocimiento de patrones biológicos, por mencionar algunos.

El enlace de hidrógeno juega un rol muy importante en determinar la estructura, propiedades y la actividad en un amplio intervalo en los sistemas biológicos. Se sabe que estas interacciones son las causantes de estabilizar las estructuras secundarias y terciarias

de péptidos y proteínas debido esencialmente a la posibilidad del grupo amida para formar estos.

1.5.2 Estructura secundaria en péptidos

La estructura secundaria de las proteínas es el plegamiento regular local entre residuos aminoacídicos cercanos de la cadena polipeptídica. Ésta viene definida en gran medida por su estructura primaria (la secuencia de aminoácidos). A medida que el péptido se vuelve más largo, se puede doblar y girar de varias maneras adoptando patrones definidos. Estos patrones se repiten porque son energéticamente favorables en ciertas condiciones debido a las interacciones entre los grupos químicos de los aminoácidos. El polipéptido o la proteína puede adoptar una estructura espacial ordenada y esa disposición estructural hace que los péptidos o proteínas sean funcionales, tengan actividad biológica y defina su propiedades como macromolécula. Las estructuras secundarias que aparecen con mayor frecuencia incluyen la α -hélice, la β -hoja, β -lámina y el β -giro.

1.5.3 Estructura secundaria en γ -péptidos

En estudios previos de Gellman y col.¹⁶ observaron que los γ -péptidos pequeños con gran libertad conformacional tenían tendencia a hacer enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos amida más cercanos, siendo desfavorable en los homólogos α - y β -péptidos.

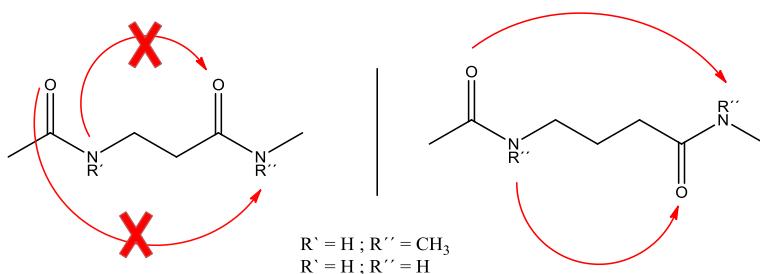


Figura 5. Formación enlaces de hidrógeno: a la izq. derivados de β -Alanina; dcha. derivados del GABA

Es importante destacar que dada la naturaleza intrínseca de los γ -péptidos, estos son más flexibles que sus homólogos α y β , y pueden plegarse en estructuras secundarias con menor número de monómeros. Otro de los efectos más relevantes de la homologación está relacionado con la estabilidad de las hélices formadas en solución, que aumenta de $\alpha < \beta < \gamma$ mientras que el número de enlaces de hidrógeno disminuye, ejerciendo mayor control el

¹⁶ Dado, G. P.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054.

esqueleto alquílico.¹⁷ Por el momento, la diversidad estructural de los γ -péptidos ha sido poco estudiada pero se espera que sea más rica que en los β -péptidos.

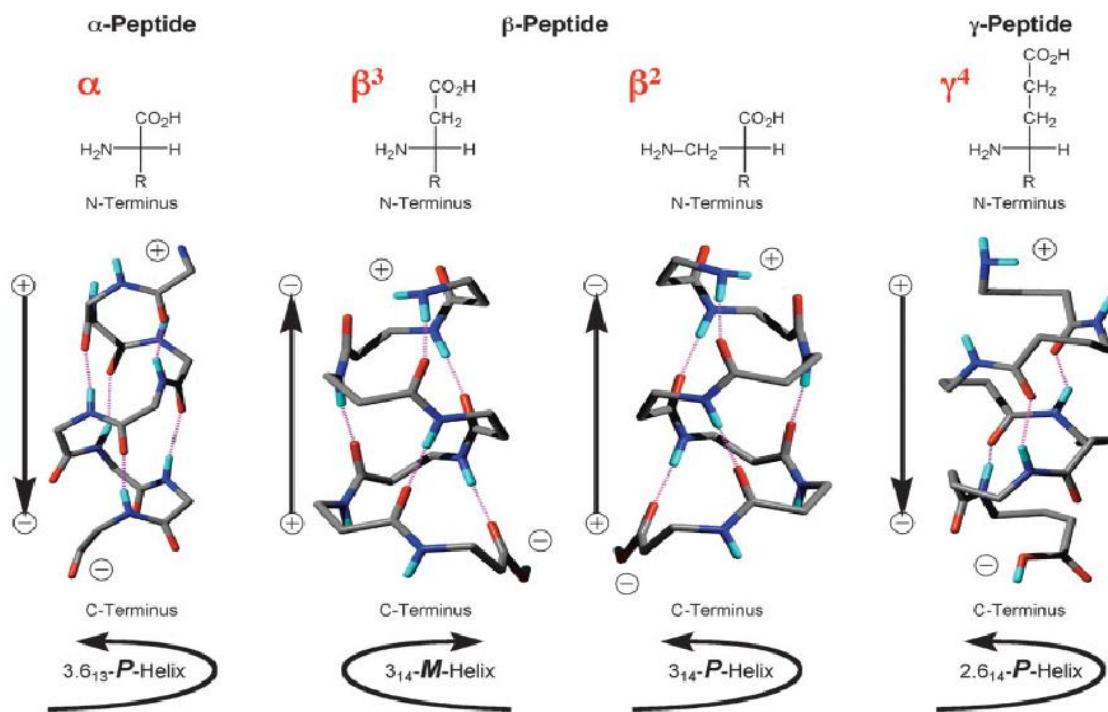


Figura 6. Comparación de las hélices más comunes por péptidos formadas α -, β -, y γ - aminoácidos

1.6 PÉPTIDOS CAPACES DE PENETRAR EN LAS CELULAS

La membrana celular es selectivamente permeable pero no hay ningún mecanismo genérico para la asimilación de compuestos. Un medicamento debe ser muy lipofílico o muy pequeño para tener alguna posibilidad de internalización celular; estas restricciones significan que el repertorio de moléculas como posibles fármacos es limitado.

El proceso de introducción de fármacos en las células ha demostrado ser siempre un gran desafío para los científicos y para la industria farmacéutica. Una plataforma universal para la entrega de agentes bioactivos en las células es un objetivo atractivo para numerosas aplicaciones.

Varias estrategias de administración de fármacos han sido propuestas, incluyendo la formulación liposomal, la microinyección y el uso de vectores virales, pero cada uno ha

¹⁷ Seebach, D.; Beck, A.; Bierbaum, D. *Chemistry & Biodiversity*, **2004**, *1*, 1111.

sido limitado por alguna motivo como procedimientos sintéticos difíciles, alta toxicidad, la baja estabilidad, o un rendimiento de entrega bajo.

Sin embargo, a finales de años 80 y principios de los 90, se descubrió una serie de secuencias cortas de péptidos con la capacidad para atravesar la membrana plasmática. Uno que recibió una gran atención fue el péptido conocido como Tat,¹⁸ el activador de la transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), por su gran capacidad de penetración. Durante el mismo período, se encontró que un fragmento derivado de la *Antennapedia Drosophila*, también llamado Penetratin,¹⁹ que tenía propiedades similares. Estos descubrimientos han sido la piedra angular de un nuevo subcampo que se centra en el uso de péptidos con la capacidad de penetrar en las células (cell-penetrating peptides, CPPs) como nuevos agentes de entrega celular.

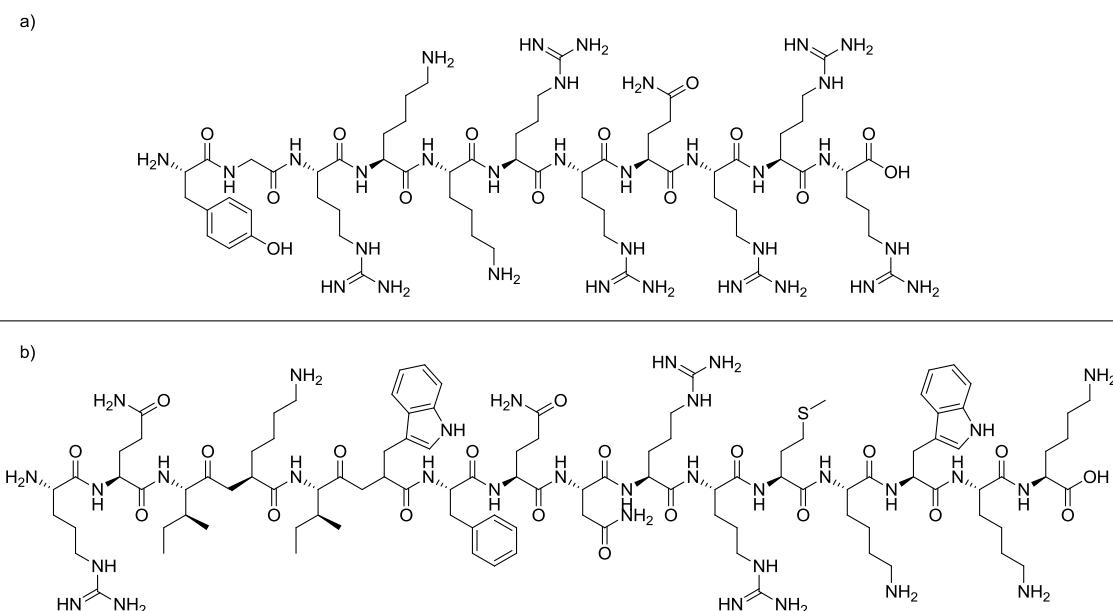


Figura 7. a) Péptido TAT b) Péptido Penetratin

Estos péptidos capaces de penetrar en las células, los CPPs, consisten en una secuencia corta de aminoácidos (< 30 residuos), generalmente péptidos catiónicos, ricos en aminoácidos tales como la lisina o arginina. Además, se ha encontrado que la hidrofobicidad juega un papel fundamental en el proceso de traslocación celular. Por lo tanto, los CPP son a menudo dotados de estas dos propiedades, a través del uso de una secuencia anfipática.

¹⁸a) Green, M.; Loewenstein, P.M. *Cell*, **1988**, 55, 1179. b). Frankel, A.D.; Pabo, C.O.; *Cell*, **1988**, 55, 1189.

¹⁹a) Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H. et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**, 88, 1864 b) Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 18188.

Los CPPs tienen la propiedad especial de llevar cargas de una amplia gama de tamaño molecular, tales como proteínas, oligonucleótidos, y incluso liposomas grandes.²⁰ Por lo que se refiere al mecanismo de penetración, no está claro, pero hay evidencias de que pueden utilizar varios mecanismos, incluyendo la translocación directa a través de la membrana plasmática y la endocitosis.

Hoy en día, se han realizado miles de estudios para la caracterización y optimización de CPPs como agentes de entrega celulares. Claramente, se ha demostrado que los CPPs son una herramienta poderosa para el transporte de materiales diversos a través de la membrana celular y han atraído el interés de una comunidad científica interdisciplinaria.

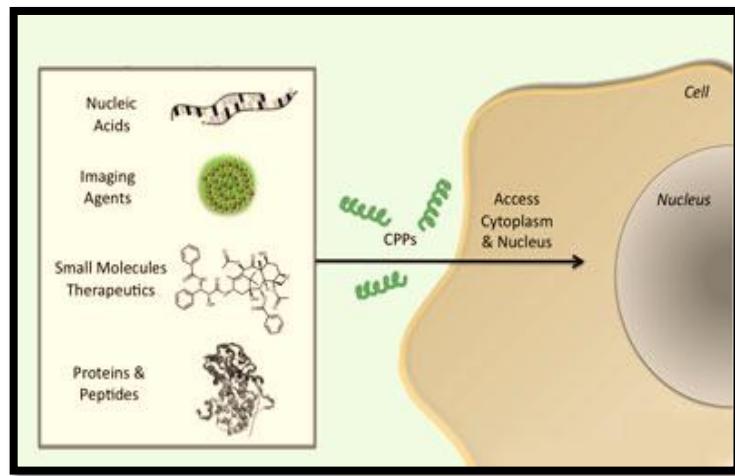


Figura 8. Cell penetrating peptides como agentes de entrega celular

²⁰ a) Torchilin, V.P., Rammohan, R., Weissig, V., Levchenko, T.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, 98, 8786. b) Torchilin, V.P.; Levchenko, T.S.; Rammohan, R.; Volodina, N.; Papahadjopoulos-Sternberg, B.; D'Souza, G.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 1972. c) Torchilin, V.P.; Levchenko, T.S. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2003**, 4, 133.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

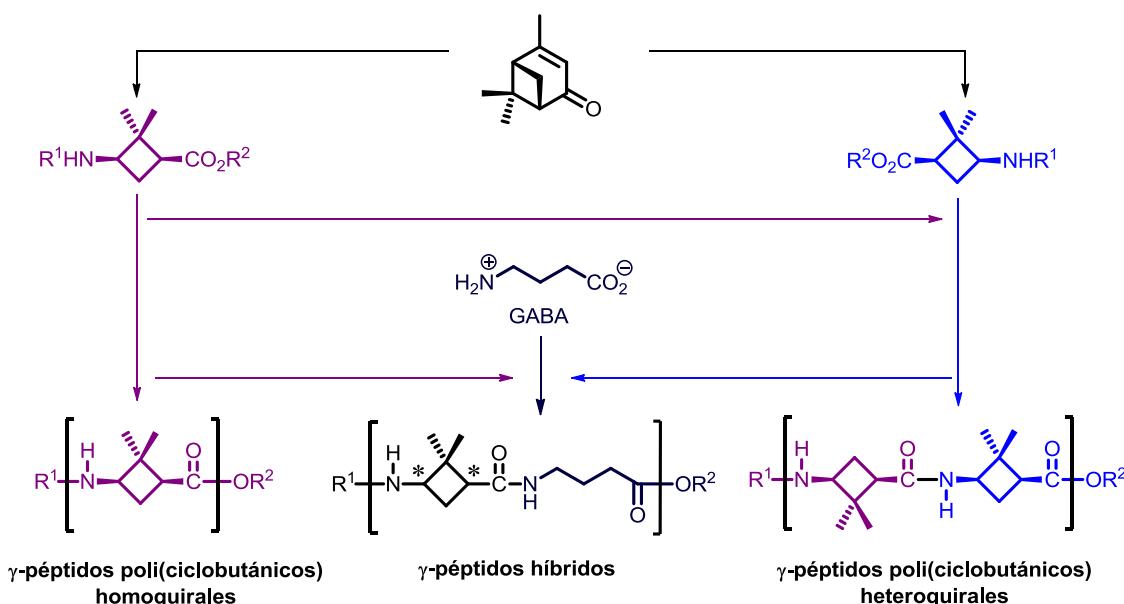
Como se ha comentado anteriormente, las propiedades de los péptidos dependen de su estructura y del tipo de plegamientos que puedan adoptar, que a su vez están determinados por los aminoácidos que lo forman, la secuencia en la que se disponen y de la geometría de éstos.

Siguiendo una de las líneas de investigación de nuestro grupo y debido a la importancia biológica y estructural de los γ -aminoácidos, se plantearon varios objetivos en el presente trabajo.

Objetivo 1. Síntesis y estudio estructural de tres series de γ -péptidos ciclobutánicos

Para tener una compresión más grande de las propiedades de los γ -péptidos, nos planteamos sintetizar tres series de γ -péptidos diferenciadas en las unidades básicas que la componen, es decir en los aminoácidos:

- Una nueva serie de γ -péptidos híbridos constituidos por un monómero ciclobutánico y un derivado del GABA
- Ampliar hasta el hexámero una serie de γ -péptidos constituidos por un monómero ciclobutánico en una única forma enantiomérica .
- Ampliar hasta el hexámero una serie de γ -péptidos constituidos por un monómero ciclobutánico alternando sus dos formas enantioméricas.



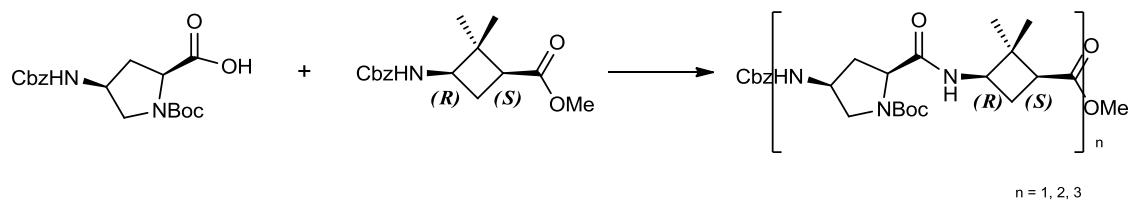
Esquema 4. Diferentes series de γ -péptidos a sintetizar

- Una vez conseguida su síntesis, se pretende realizar un estudio estructural.

Objetivo 2. Síntesis de una nueva familia péptidos de penetración celular

Debido a la importancia del uso de péptidos como nuevos agentes de penetración celular, nos planteamos sintetizar una nueva familia de γ -péptidos híbridos formados a partir de un derivado de prolina y de monómeros ciclobutánicos, con el fin de realizar un estudio estructural así como un estudio de la capacidad de estos para cruzar la membrana celular.

- Sintetizar una de las series, en concreto la serie “R,S”.



Esquema 5. Serie de γ -péptidos híbridos prolina-ciclobutano

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, nuestro grupo de investigación ha logrado con éxito varias estrategias de sintéticas estereoselectivas para la obtención de aminoácidos no naturales y péptidos incluyendo el ciclobutano como elemento constrictor del esqueleto peptídico.

Debido al interés de nuestro grupo en la síntesis y estudio de ciclobutano como un inductor de las estructuras secundarias y terciarias en la serie β -péptidos, se abordó la síntesis de γ -aminoácidos para un posterior estudio estructural siguiendo un línea de trabajo iniciado anteriormente en el grupo.

En nuestra opinión, los aminoácidos derivados de (-)-verbenona son compuestos interesantes, no sólo como análogos GABAérgicos potencialmente activos, sino también como piezas de interés en el diseño de “bloques de construcción” con propiedades especiales de plegado.

En base a los antecedentes del grupo, y para llevar a término el primero de los objetivos, en primer lugar se realizó la síntesis enantiodivergente del γ -aminoácido ciclobutánico en sus dos formas enantioméricas, partiendo (-)-verbenona como precursor quiral común, dando lugar a análogos conformacionalmente restringidos del ácido γ -aminobutírico (GABA).

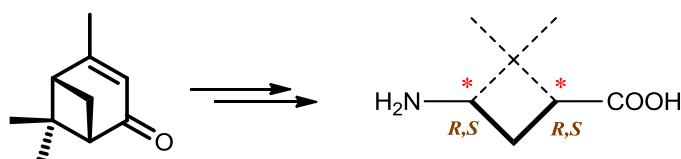


Figura 9. Análogo ciclobutánico del γ -aminobutírico

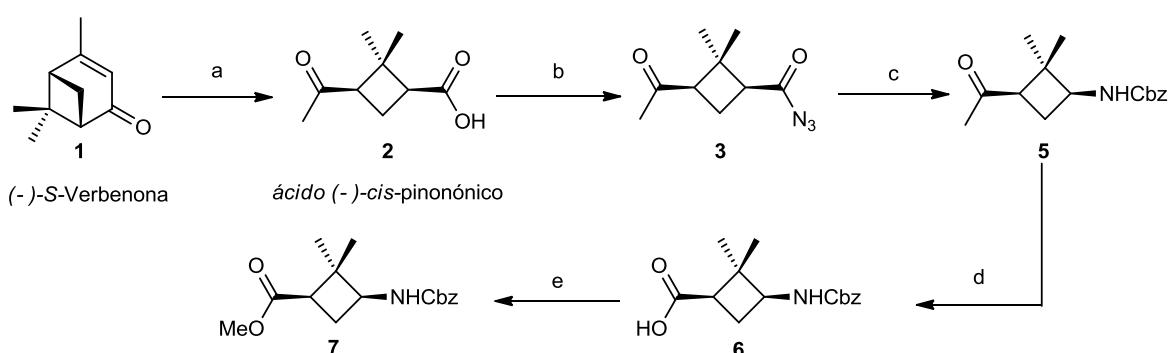
Además de la inherente restricción conformacional respecto al GABA que le otorga una posible mejora en la actividad y estabilidad metabólica para su uso terapéutico, el esqueleto ciclobutánico le confiere una hidrofobicidad mayor, posiblemente incrementando así su permeabilidad en las membranas celulares y en la barrera hematoencefálica. Al mismo tiempo, este monómero puede ser inductor de estructuras secundarias concretas en péptidos más grandes.

3.1 SÍNTESIS DE LOS MONÓMEROS

3.1.1 Monómeros ciclobutánicos

Estos dos monómeros ya se habían sintetizado previamente en nuestro grupo de investigación.²¹ Estas rutas sintéticas parten de la (-)-verbenona, terpeno comercial, en la que una rotura oxidativa del doble enlace con RuCl₃/NaIO₄ da como resultado el ácido (-)-*cis*-pinonónico, **2**, sin epimerización. Cabe destacar que los métodos clásicos descritos en la bibliografía producían la epimerización de, al menos, uno de los centros estereogénicos α -carbonílicos. Una vez obtenido el ácido (-)-*cis*-pinonónico, la síntesis de uno de los enantiómeros o del otro depende, con pequeñas diferencias, del orden en que se llevan a cabo las reacciones.

En la obtención del monómero **7**, se transforma el (-)-*cis*- pinonónico en una acilazida, **3**, y ésta se lleva a refljo de tolueno en presencia de alcohol bencílico, para obtener una amina protegida en forma de carbamato de bencilo, **5**. Posteriormente, se realiza una degradación de Lieben para transformar la metilcetona en un ácido carboxílico, **6**. Para finalizar, se protege el ácido carboxílico como éster metílico mediante una metilación, utilizando yoduro de metilo en presencia de Cs₂CO₃ como base, con un buen rendimiento. En esta última etapa sintética no se realizó una esterificación clásica (esterificación de Fisher; H₂SO₄ en metanol) debido a la posible epimerización de los centros estereogénicos. (ver Esquema 6)

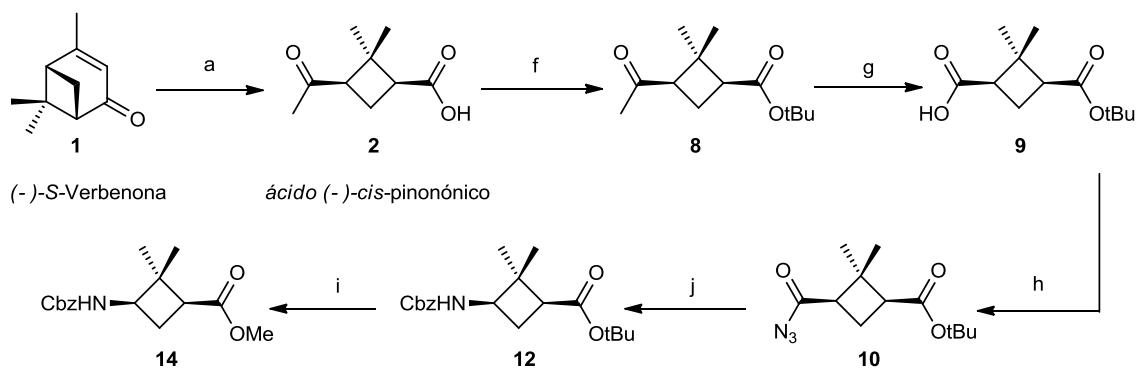


a) RuCl₃, NaIO₄ b) 1) ClCO₂Et 2) NaN₃ (dos etapas) c) 1) tolueno, Δ 2) BnOH (dos etapas) d) NaBrO e) CH₃I, Cs₂CO₃

Esquema 6. Ruta sintética para la obtención del monómero **7**

²¹ Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortúñoz, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 302

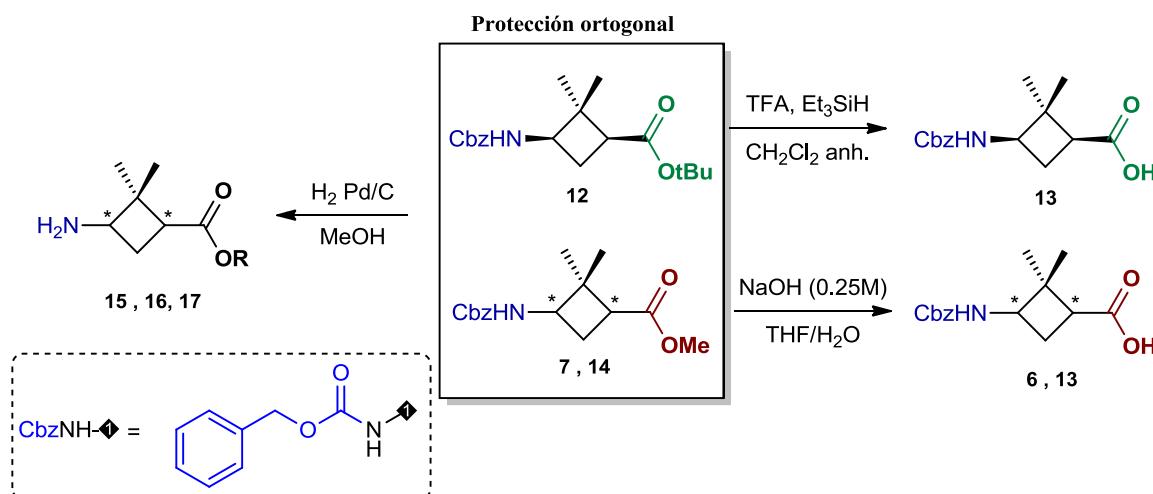
Por el contrario, para el monómero **14** la síntesis empieza con la protección del grupo ácido carboxílico del ácido (*-*)-*cis*-pinonónico, **2**, en éster *terc*-butílico para, a continuación, realizar primero la degradación oxidativa de Lieben y posteriormente transformar el nuevo grupo ácido formado en carbamato de bencilo, como en el caso anterior. Por último, también se puede proteger el grupo ácido carboxílico en forma de éster metílico con el mismo procedimiento, una vez hidrolizado el éster *terc*-butílico. (ver Esquema 7)



a) RuCl₃, NaO₄ **f**) ^tBuOH, DMAP, EDAC, TEA **g**) NaBrO **h**) 1) ClCO₂Et 2) NaN₃ (dos etapas) **j**) 1) tolueno, Δ 2) BnOH (dos etapas) **i**) 1) TFA, Et₃SiH 2) CH₃I, Cs₂CO₃ (dos etapas)

Esquema 7. Ruta sintética para la obtención del monómero **14**

Es importante indicar que estos dos monómeros presentan una protección ortogonal que nos proporciona la posibilidad de la desprotección del grupo amino sin afectar a la protección del ácido y viceversa. Este hecho nos permite poder controlar selectivamente la longitud del péptido en los futuros acoplamientos. (ver Esquema 8)



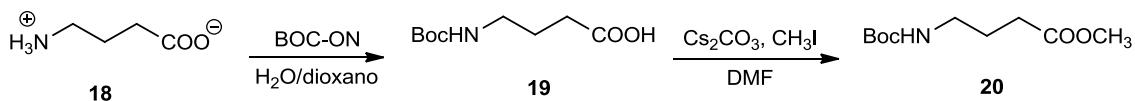
Esquema 8. Reacciones de desprotección de los monómeros ciclobutánicos

Para desproteger el carbamato de bencilo se hidrogena catalíticamente con Pd en el seno de MeOH a una presión de 5 atm durante 12 horas obteniendo la amina con rendimientos cuantitativos. Para liberar los ácidos carboxílicos se hidrolizan los ésteres: para el éster metílico realizando una saponificación clásica, y en el caso del éster *terc*-butílico hidrolizando en condiciones ácidas con trifluoroacético y trietilsilano en el seno de cloruro de metileno, con muy buenos rendimientos.

3.1.2 Síntesis del derivado de GABA

Una vez obtenido los monómeros restringidos conformacionalmente, el monómero ácido γ -aminobutírico (GABA), que es un producto comercial, se ha de proteger convenientemente para poder obtener la familia de péptidos híbridos **22**, **24**, **26** y **28**. Para obtener este monómero protegido ortogonalmente se siguió la metodología diseñada por L.-X. Zhao y col.²² El primer paso es la formación del carbamato de *terc*-butilo a partir de la amina del GABA mediante la reacción de ésta con el reactivo conocido comúnmente como BOC-ON, (2-*terc*-butoxicarboniloximino-2-fenilacetonitrilo).

Una vez protegida la amina, se realiza una metilación con MeI en presencia de Cs₂CO₃ en el seno de DMF para obtener, con un rendimiento del 80 %, el correspondiente éster metílico **20** como un aceite incoloro. De esta forma el ácido γ -aminobutírico queda protegido ortogonalmente, y posibilita ser acoplado por la amina o, si se prefiere, por el ácido terminal. (ver Esquema 9)

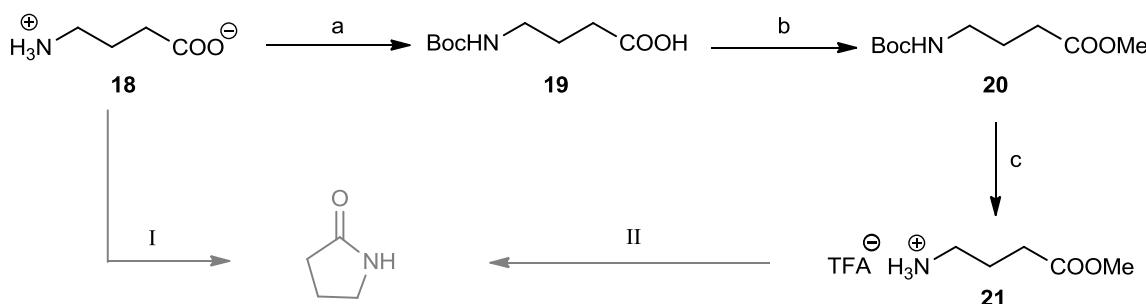


Esquema 9. Protección ortogonal del ácido γ -aminobutírico (GABA)

Se escogió la desprotección de la amina para ser acoplado con los aminoácidos ciclobutánicos, y esta se llevó a cabo con ácido trifluoroacético en presencia de trietilsilano utilizando diclorometano como disolvente. Se podría pensar entonces que la protección de la amina es una etapa sintética innecesaria, pero se constató que en la metilación del grupo

²² Zhao, L.-X.; Park, J. G.; Moon, Y.-S.; Basnet, A.; Choi, J.; Kim, E.-K.; Jeong, T. C.; Jahng, Y.; Lee, E.-S. *IL FARMACO*, **2004**, 59, 381

acido sin ser protegida la amina se obtenía la lactamización del compuesto de forma instantánea.²³ (ver Esquema 10)



a) BOC-ON, H₂O/Dioxano b) CH₃I, Cs₂CO₃, DMF c) TFA, Et₃SiH, CH₂Cl₂ I) CH₂N₂ II) Base

Esquema 10. Desprotección de la amina

3.2 SÍNTESIS DE Γ -PÉPTIDOS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL

3.2.1 Síntesis de los γ -péptidos constituidos por un monómero ciclobutánico y un derivado del GABA

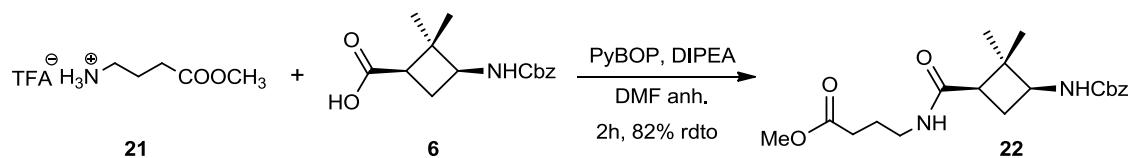
Los monómeros de GABA tienen una libertad conformacional total y, como se comentó en la introducción, en estudios realizados con péptidos donde el único residuo era el GABA, estos mostraban una tendencia a dar enlaces de hidrógeno intramoleculares entre grupos amida más cercanos. La combinación de un residuo de GABA con un análogo ciclobutánico (una de las dos formas enantioméricas) en el diseño de estos gamma péptidos, fue elegida para estudiar el efecto que estos últimos tenían en las estructuras de plegado.

Síntesis del dipéptido híbrido

Una vez desprotegidos selectivamente los dos monómeros, por un lado el monómero ciclobutánico como ácido **6** y la amina del monómero del GABA **21** por otro, se llevó a cabo la síntesis del dipéptido híbrido **22**. Para ello, el acoplamiento peptídico se realizó mediante condiciones clásicas, utilizando el PyBOP (ver mecanismo anexo II) como agente acoplante, DIPEA como base en el seno de DMF anhidra y en atmósfera de

²³ Aguilera, A. PhD Thesis. UAB, 2010.

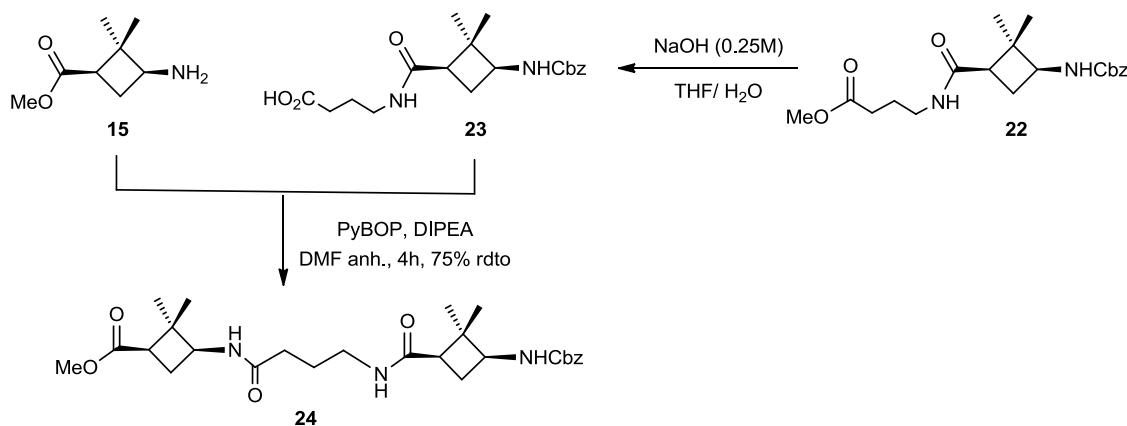
nitrógeno durante 3 horas para obtener un sólido blanco con un rendimiento del 82 %. (ver Esquema 11)



Esquema 11. Síntesis del γ -dipéptido híbrido **22**

Síntesis del tripéptido híbrido

Nos propusimos realizar a continuación la síntesis del tripéptido con dos residuos ciclobutánicos y uno de GABA como espaciador. Con ese fin, primeramente se realizó la desprotección del grupo ácido carboxílico del dipéptido **22** mediante una saponificación y la correspondiente hidrogenación sobre paladio del monómero ciclobutánico, **7**, para obtener la amina libre. Una vez obtenidos los residuos desprotegidos se utilizó la misma metodología de acoplamiento, y se obtuvo el trímero **24** con un rendimiento del 75%. (ver Esquema 12)

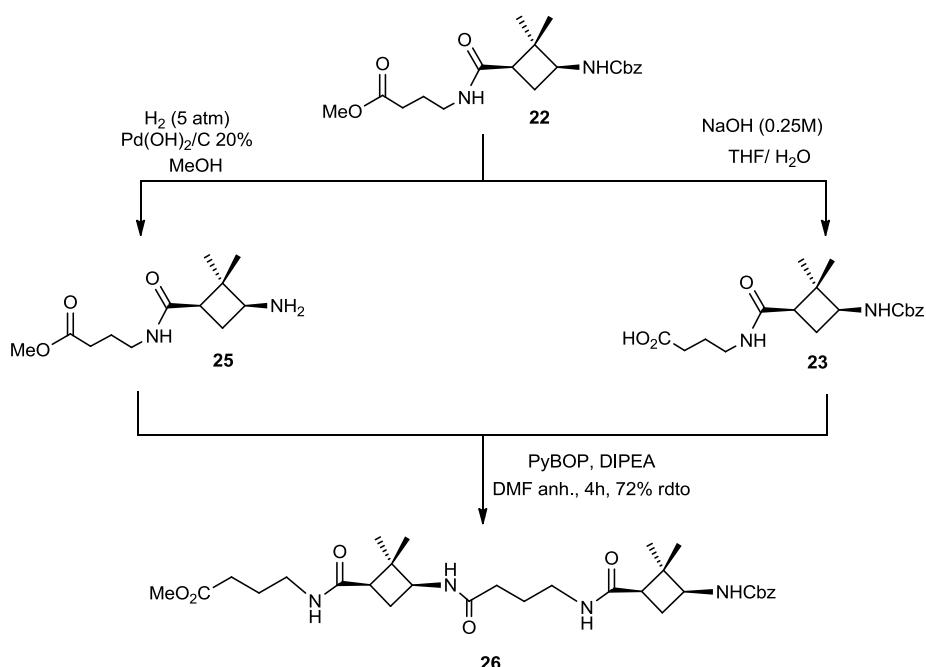


Esquema 12. Síntesis del γ -tripéptido híbrido **24**

Síntesis del tetrapéptido híbrido

Para realizar la síntesis del tetrapéptido híbrido **26** se utilizó una estrategia de síntesis convergente, que en nuestro caso resulta más eficiente. Por ese motivo se realizó el acoplamiento peptídico entre dos dipéptidos híbridos desprotegidos selectivamente. Al igual que en las síntesis anteriores, se utilizó el PyBOP, DIPEA en el seno de DMF en

condiciones anhidras a temperatura ambiente, con agitación durante 4 horas. El rendimiento obtenido fue del 72 %. (ver Esquema 13)

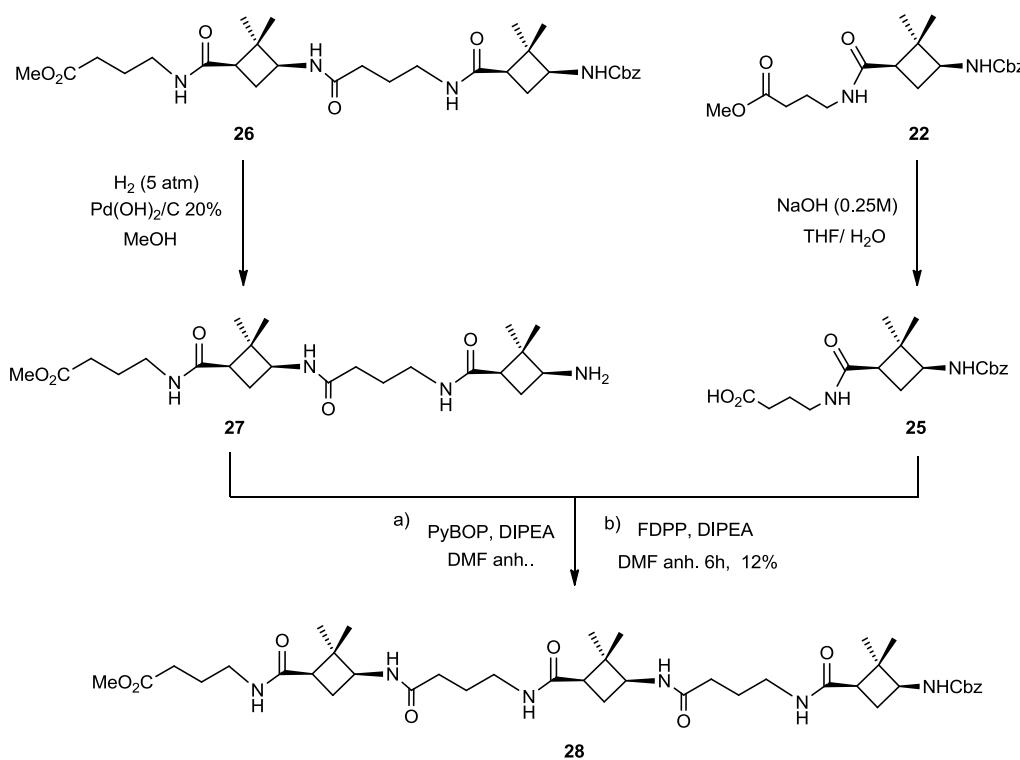


Esquema 13. Síntesis del γ -tetrapéptido híbrido **26**

Síntesis del hexapéptido híbrido

La síntesis del hexapéptido híbrido **28** se realizó por la condensación del dipéptido y del tetrapéptido de la misma familia, siguiendo así la misma estrategia de síntesis convergente. La desprotección de los péptidos se puede realizar indistintamente, pudiendo desproteger el dipéptido por el grupo éster o por el carbamato de bencilo, y análogamente en el tetrapéptido. En nuestro caso, se escogió la desprotección del grupo amino del tetrapéptido **26** y del grupo ácido carboxílico del dipéptido **22**. De mismo modo que en que los acoplamientos anteriores, se llevó a cabo la reacción con las mismas condiciones y utilizando el PyBOP como activador del ácido. Aunque la reacción evolucionó satisfactoriamente, la difícil purificación del producto obtenido, nos hizo replantear la ruta sintética. Fueron los residuos del PyBOP, en forma de hidroxibenzotriazol (HOBT) y el óxido de trifenilfosfina, los que nos supusieron muy complicada separación mediante cromatografía en columna. También se probó otras estrategias de separación, como lavados con disolvente, aunque no llegaron a ser útiles. Por este motivo se escogió el difenilfosfinato de pentafluorofenilo (FDPP) como nuevo agente de acoplamiento para realizar la síntesis (ver mecanismo anexo II). La razón de la elección de este agente fue, *a*

priori, su mayor facilidad de separación, argumentado por la experiencia de nuestro grupo en la síntesis de otros oligopéptidos de tamaño similar y estructuralmente parecidos (análogos β). No obstante, aunque la purificación fue menos difícil, el rendimiento fue 12%, y sólo se obtuvo cantidad suficiente para poder realizar una identificación por RMN ^1H y mediante espectrometría de masas de alta resolución. (ver Esquema 14)



Esquema 14. Síntesis del γ -hexapéptido híbrido **28**

3.2.2 Síntesis de γ -péptidos constituidos por monómeros ciclobutánicos

Una vez sintetizada la primera familia de γ -oligopéptidos híbridos, se realizó la síntesis de γ -oligopéptidos con residuos ciclobutánicos estructuralmente más restringidos.

Se sintetizaron dos series de γ -péptidos ciclobutánicos; una en la que todos los monómeros tienen la misma configuración absoluta y otra en la que se intercalan monómeros con configuraciones opuestas, es decir, enenatiómeros. De esta forma se pretendía observar si la quiralidad en estos oligopéptidos tiene influencia significativa en sus estructuras secundarias y terciarias.

Esta síntesis ya fue abordada por el Dr. Aguilera en su tesis doctoral, hasta alcanzar los tetrápeptidos, y en el presente trabajo se marcó como objetivo ampliar hasta los hexámeros.

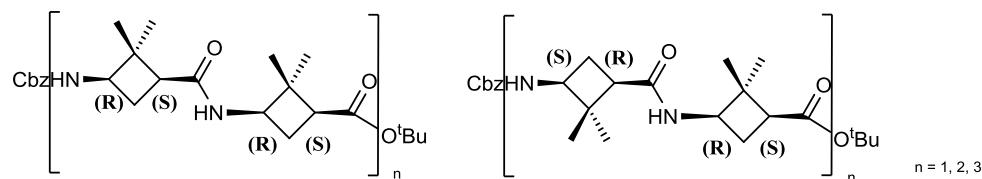
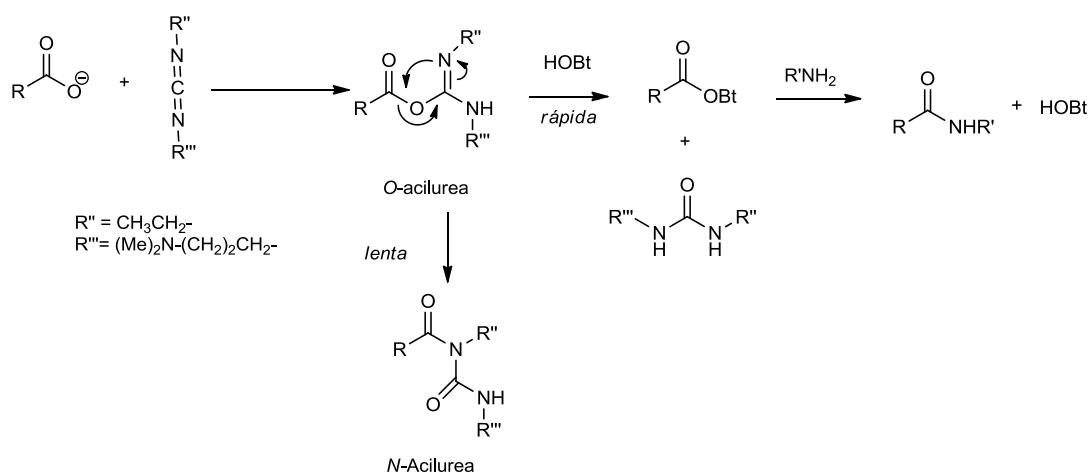


Figura 10. γ -Oligopéptidos ciclobutánicos

La síntesis siguió la misma estrategia y método que para la serie de péptidos híbrida, ya que en general había dado buenos resultados. Cabe destacar que la síntesis de estas familias, se utilizó el monómero ciclobutánico protegido con éster *terc*-butílico en el extremo C-terminal de los péptidos. Entre otros motivos, fue para poder compararlo así con sus análogos β .

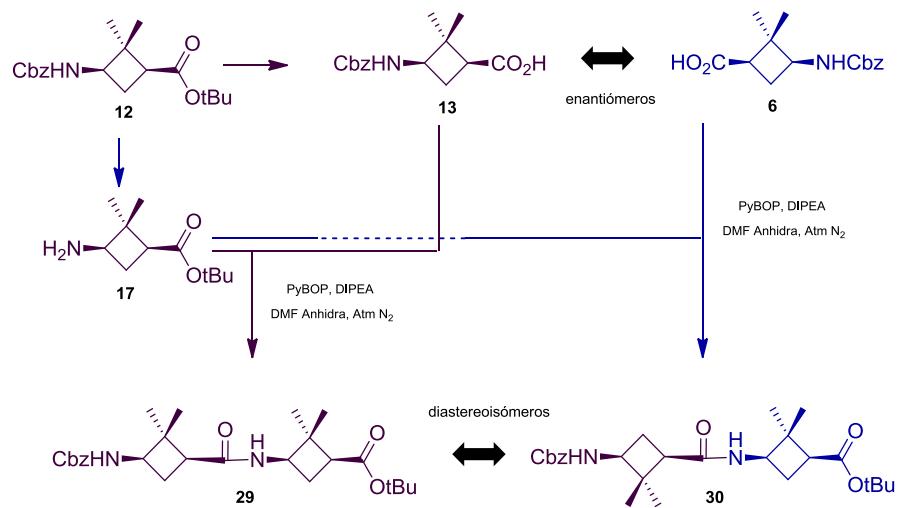
Primeramente se llevó a cabo la síntesis de los dipéptidos. La síntesis había sido descrita anteriormente utilizando HOBr (1-hidroxibenzotriazol), DEC (1-etil-3-(3'-dimetilamino)carbodiimida) y Et₃N en el seno de DMF anhidra durante 7 días a temperatura ambiente, con un rendimiento del 67 %.



Esquema 15. Mecanismo de reacción del acoplamiento utilizando carbodiimida y HOBr

En el esquema anterior, se puede ver que el uso del HOBr minimiza la formación de la inerte *N*-Acilurea, y en general es un buen método para el acoplamiento peptídico, pero en

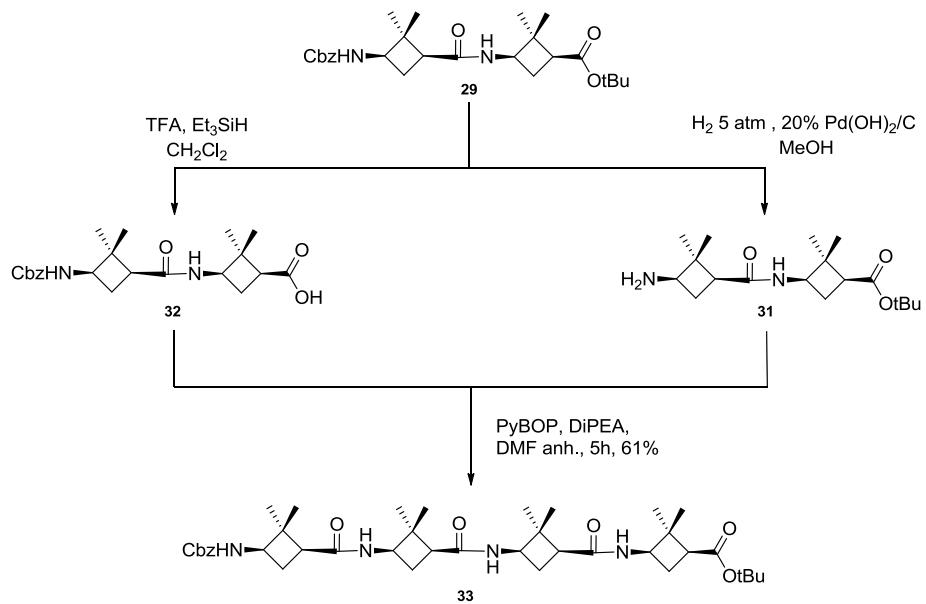
nuestro caso el tiempo de reacción era muy elevado. Por ello, para la nueva síntesis de los dipéptidos se utilizó PyBOP como activador y con las mismas condiciones que en los acoplamientos anteriores, ya que se habían obtenido buenos resultados. (ver Esquema 16)



Esquema 16. Síntesis de los γ -dipéptidos; homoquiral **29** y heteroquiral **30**

El rendimiento de estos nuevos acoplamientos durante 4 horas era superior al obtenido durante 7 días con la carbodiimida y HOBr, mejorando así la eficiencia de la reacción.

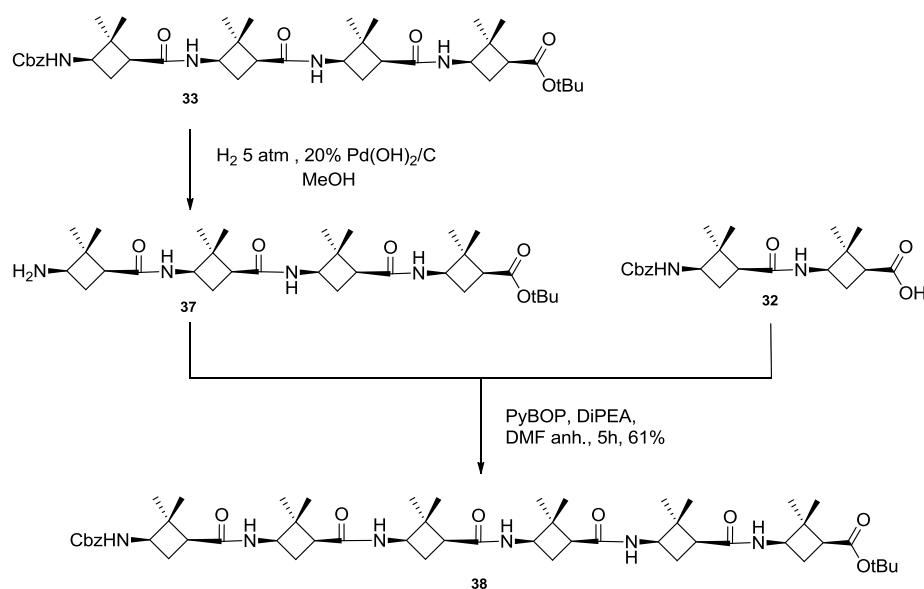
A continuación, se sintetizaron los tetrapéptidos homoquiral **33** y heteroquiral **36** de forma análoga. En el caso del homoquiral se había sintetizado anteriormente, empleando también la carbodiimida y HOBr, y al igual que en la síntesis del dipéptido el tiempo de reacción era muy elevado (siendo de 15 días para un rendimiento del mismo orden), por este motivo continuamos con el uso del PyBOP. (ver Esquema 17)



Esquema 17. Síntesis del γ -tetrapéptido ciclobutanico homoquiral **33** y análogamente para el heteroquiral **36**

Cabe destacar la diferencia de solubilidad entre los dos tetrámeros. El homoquiral era soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y se pudo caracterizar completamente, mientras el heteroquiral sólo era totalmente soluble en DMSO caliente. Esta diferencia experimental, sustenta la relevancia de la quiralidad de los monómeros que constituyen la estructura primaria, ya que se ven afectadas significativamente sus propiedades químicas.

Por último, homologamos los péptidos ciclobutánicos hasta conseguir los hexámeros. Aún con los problemas de solubilidad del tetrapéptido heteroquiral se pudo realizar la síntesis. Se probaron los dos agentes de acoplamiento que habíamos utilizado hasta el momento, el PyBOP y el FDPP. Al igual que para el hexámero híbrido, debido a la difícil purificación y los rendimientos bajos, sólo se pudieron obtener cantidades suficientes para la identificación de los hexapéptidos por RMN ^1H y por espectrometría de masas de alta resolución. La dificultad en la síntesis en solución de oligopéptidos de cierto tamaño ya era patente en nuestro grupo de investigación, entre algunos de los motivos, por la baja solubilidad o por la difícil purificación. (ver Esquema 18)



Esquema 18. Síntesis del γ -hexapéptido ciclobutanico homoquiral **38** y análogamente para el heteroquiral **40**

3.2.3 Estudio estructural de los γ -péptidos en solución

En trabajos anteriores del grupo de investigación, se han sintetizado y realizado estudios conformacionales de pequeños β -oligopéptidos, dilucidando las estructuras secundarias y terciarias que adoptaban. Los estudios indican la capacidad del ciclobutano en la

promoción de estructuras definidas sobre la base de las interacciones intramoleculares en solución, especialmente debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo (de amidas) y NH (de amidas o carbamatos) del esqueleto peptídico.

Por este motivo, en el presente trabajo, quisimos saber cómo afectaba el elemento ciclobutánico en las series sintetizadas con γ -monómeros en los patrones de plegado.

Para dilucidar la estructura secundaria nos centramos en determinar si alguno de los hidrógenos de los N-H forman enlaces de hidrógeno intermoleculares en solución, ya que básicamente son estos tipos de interacciones las que hacen que los péptidos adopten estructuras definidas y compactas.

Estudio estructural en solución de la familia de γ -péptidos híbridos

En la siguiente figura podemos ver las diferentes posibilidades de formación de enlaces de hidrógeno para el dipéptido **22**, dando lugar a anillos de diferentes eslabones. En general, se cree que los enlaces de hidrógeno de amida son más fuertes cuando el ángulo es lineal, o casi, por eso la orientación es clave para dar lugar a enlaces de hidrógeno estables. Un enlace de hidrógeno que da la formación de un anillo muy tensionado (de pocos eslabones) quedaría totalmente descartado.

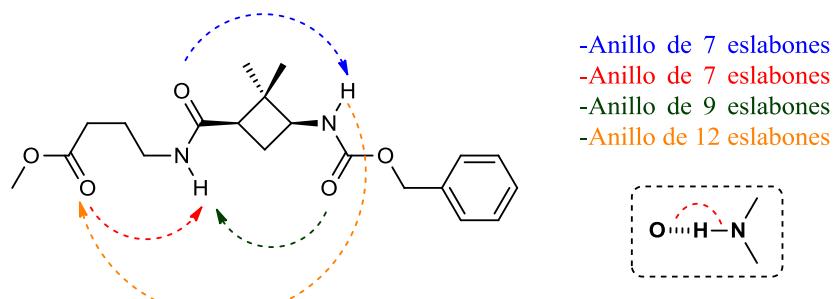


Figura 11. Posibilidades de formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares

El primer indicio para dilucidar la estructura secundaria fue el espectro de RMN ^1H a 298 K, con una concentración conocida del dipéptido **22** en cloroformo deuterado como disolvente. Es conocido que los protones de alcoholes, aminas y amidas no aparecen a un desplazamiento fijo y que este depende de varios factores como la concentración, temperatura, polaridad del disolvente. La existencia de enlaces de hidrógeno hace que estos protones aparezcan más desapantallados. Por otro lado, es posible que se formen

enlaces de hidrógeno intermoleculares con el disolvente, sin embargo, si el enlace de hidrógeno es intramolecular su desplazamiento químico apenas depende de la concentración y aparecen anormalmente desapantallados. Se estimó, en nuestro caso, que la disolución era lo bastante diluida como para que no se dieran enlaces de hidrógeno intermoleculares. En el espectro se pueden observar (ver espectro anexo I) dos singletes anchos con unos desplazamientos químicos de 5.67 y 5.20 respectivamente. Estos desplazamientos no son muy altos en relación de lo esperado, lo que parece evidenciar que no hay formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

A continuación se realizó la determinación por coeficientes de temperatura, un método valioso, que ya fue utilizado en nuestro grupo de investigación para confirmar la existencia de enlaces de hidrógeno en solución para moléculas orgánicas. El coeficiente de temperatura ($\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$), o lo que es lo mismo el gradiente de temperatura del protón, consiste en un parámetro experimental que se determina registrando el espectro de RMN ^1H del compuesto a analizar a diferentes temperaturas. Con el valor del desplazamiento químico considerado y en función de las diferentes temperaturas del registro de RMN ^1H se realiza una representación gráfica. La pendiente de la recta resultante nos da el valor del coeficiente de temperatura del protón, las unidades del cual son por definición $\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1}$.

En general, la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares hace que los protones involucrados se vean menos afectados con los cambios de temperatura que en el caso de que no lo estuvieran. De esa forma aquellos protones que presenten un valor de coeficiente de temperatura (en valor absoluto) más pequeños que $4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ indican la presencia de enlaces de hidrógeno con una muy buena predictibilidad. Por el contrario, en el caso de que sean valores más grandes indican la no formación de enlaces de hidrógeno por parte de los protones considerados.²⁴

Los valores obtenidos en la determinación por coeficientes de temperatura de los protones N-H del dipéptido **22** fueron $5.1 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ para el protón peptídico y $4.1 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ para el protón del NH de carbamato respectivamente, como se muestra en la siguiente tabla. Observando estos resultados cabría esperar que el proton N-H del carbamato pudiera

²⁴ a) Rothermund, S.; Weibhoff, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Bienert, E.; Mugge, C.; Sykes, B. D.; Sonnichsen, F. D. *J. Biomol NMR*, **1996**, 8, 93. b) Beslvisi, L.; Gennari, C.; Mielgo, A.; Porenza, D.; Scolastico, C. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 389. c) Baxter, N. J.; Williamson, M. P. *J. Biomol. NMR*, **1997**, 9, 359. c) Cierpicki, T.; Otlewski, J. *J. Biomol. NMR*, **2001**, 21, 249. d) Cierpicki, T.; Zhukov, I.; Byrd, R. A.; Otlewski, J. *J. Magn. Reson.*, **2002**, 157, 178.

estar formando enlace de hidrógeno intramolecular, ya que el valor del gradiente obtenido es inferior a $4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$.

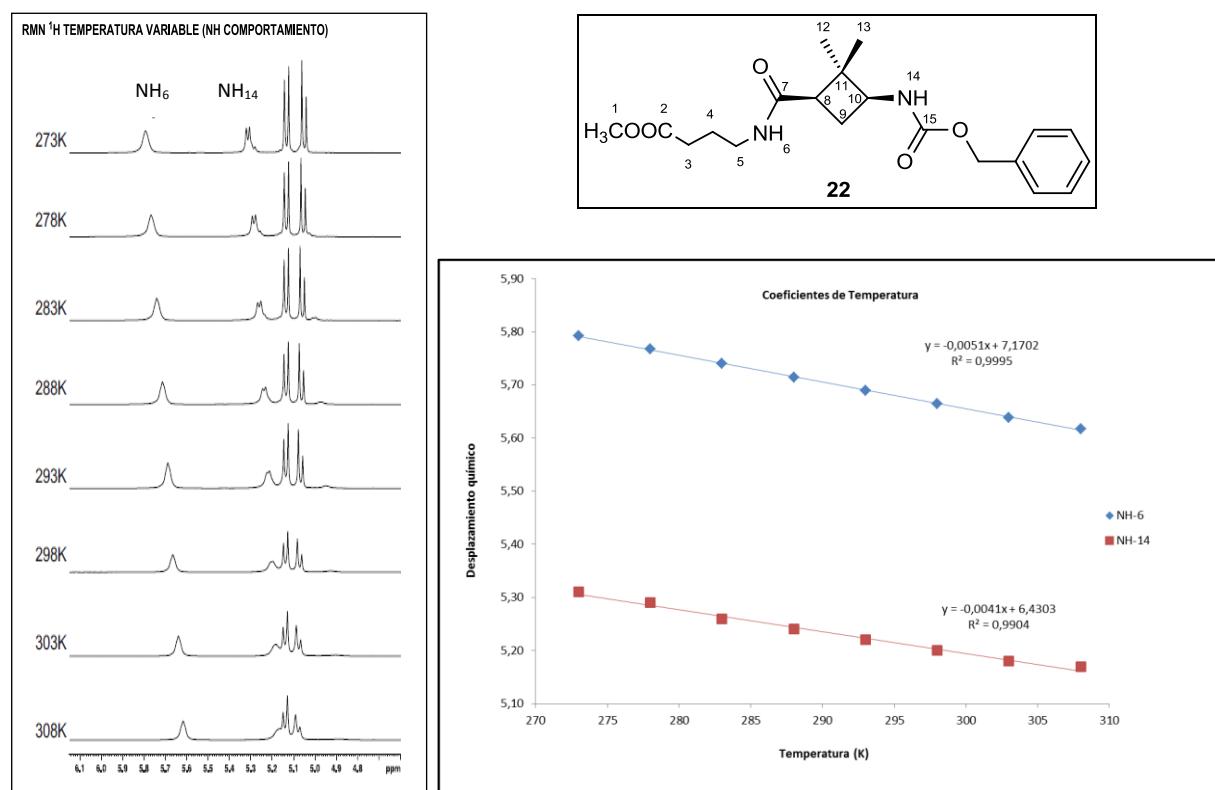


Figura 12. A la izq. espectro ^1H -RMN a diferentes temperaturas del γ -dipeptido híbrido **22**, a la dcha. representación gráfica desplazamiento químico vs temperatura

	Ecuación de la recta de regresión	R^2	$ \Delta\delta/\Delta T (\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1})$
$\delta\text{NH peptídico (NH-6)}$	$-0.0051x + 7.1702$	0.99	5.1
$\delta\text{NH carbamato (NH-14)}$	$-0.0041x + 6.4303$	0.99	4.1

Tabla 1. Resultados del coeficiente de temperaturas para el γ -dipeptido híbrido **22**

Para confirmar la posibilidad de la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular también realizamos un espectro NOESY. Una vez asignadas las señales, no podemos afirmar que el protón N-H del carbamato esté formando un enlace de hidrógeno ya que las señales observadas parecen indicar que realmente adopta una conformación espacial extendida. En el caso de que la conformación fuera compacta daría lugar a señales en el espectro de protones que estuvieran lejanos en la molécula, que no serían posibles si la molécula no estuviera plegada.

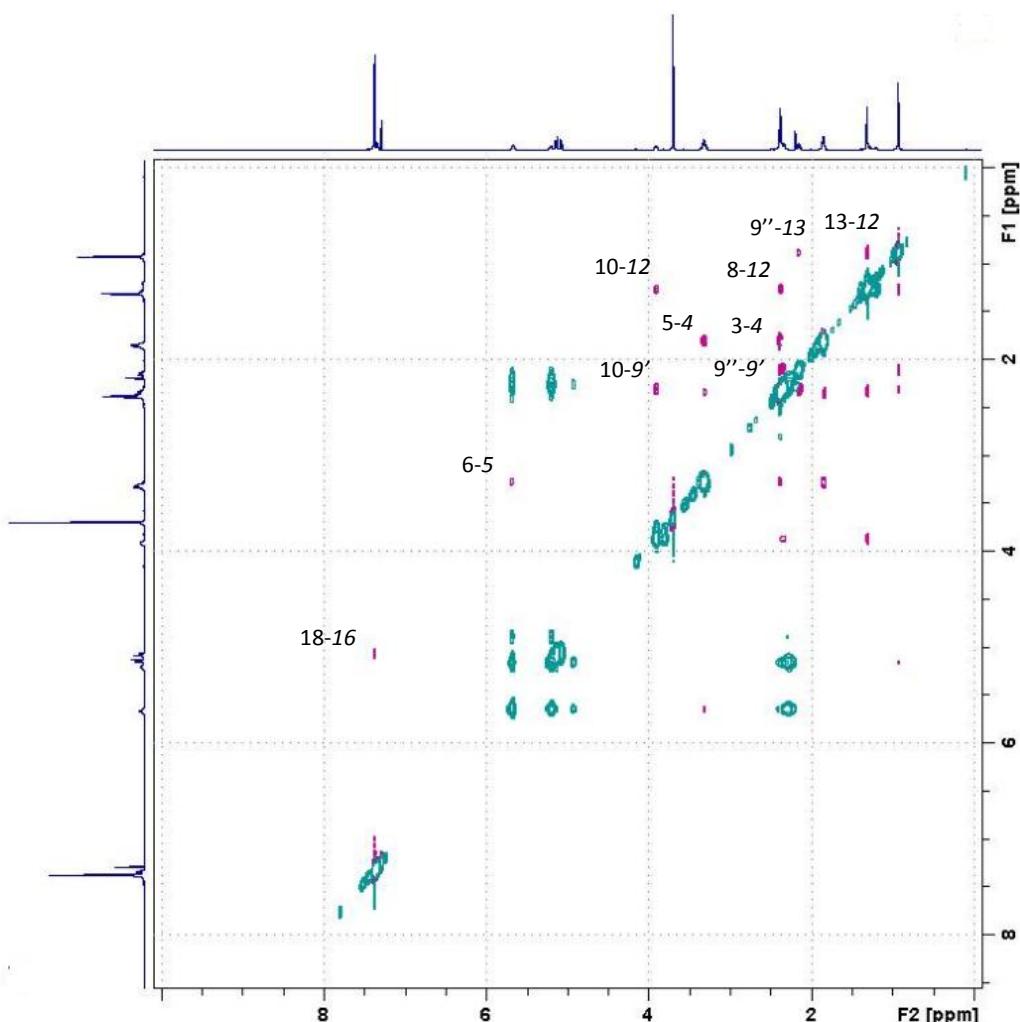


Figura 13. Espectro NOESY ^1H - ^1H NMR del γ -dipeptido híbrido **22**.

Así, podemos concluir que no hay formación de enlaces de hidrógeno, aún teniendo el valor del gradiente inferior a $4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ para uno de los protones en cuestión. Las evidencias obtenidas con el espectro NOESY se pueden considerar más contundentes, aparte del bajo desplazamiento químico que presenta ese protón en el espectro de hidrógeno a 298 K, más típico de un protón NH que no forma enlaces de hidrógeno. Además, estos resultados concuerdan con unos estudios anteriores,²² en nuestro grupo, en que un péptido muy similar también adoptaba una conformación extendida (ver Figura 14).

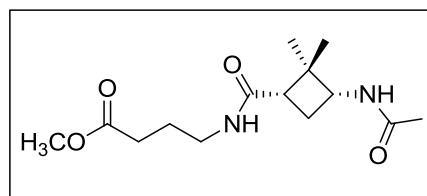


Figura 14. Dipéptido estudiado anteriormente en nuestro grupo de investigación.

Se continuó el estudio estructural con el tripéptido híbrido **24**. En el espectro de RMN ¹H a 298 K, se observa un desplazamiento químico para los protones N-H de 6.57, 6.17 y 5.3 respectivamente, aumentado así el desapantallamiento para los protones de amida respecto al dipéptido **22**. Aunque éste no es suficiente motivo para asegurar que es debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, sí se observa un cambio significativo. Para cerciorarnos mejor, realizamos los experimentos de coeficiente de temperatura para los protones N-H del tripéptido, y a partir de las representaciones gráficas se calcularon los valores de las pendientes para cada protón.

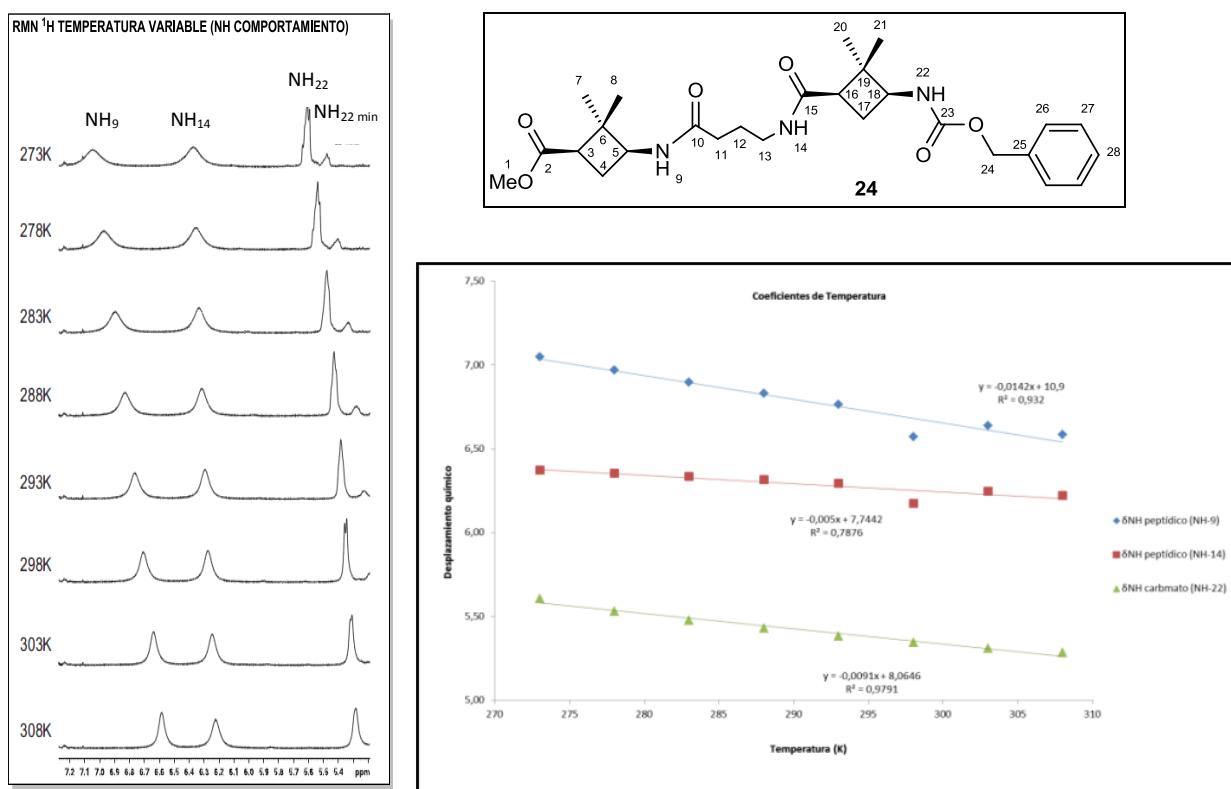


Figura 15. A la izq. espectro ¹H-RMN a diferentes temperaturas del γ-tripéptido híbrido **24**, a la dcha. representación gráfica desplazamiento químico vs temperatura

	Ecuación de la recta de regresión	R^2	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppbK ⁻¹)
δNH peptídico (NH-9)	$-0,0142x + 10,9$	0.93	14.2
δNH peptídico (NH-14)	$-0,005x + 7,7442$	0.79	5
δNH carbamato (NH-22)	$-0,0091x + 8,0646$	0.98	9.1

Tabla 2. Resultados del coeficiente de temperaturas para el γ-tripéptido híbrido **24**

Los valores obtenidos del gradiente para los protones N-H respectivos fueron inferiores en valor absoluto a $4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ en todos los casos, indicando que no hay formación de enlaces de hidrógeno para este oligopéptido. Esto se ve confirmado por el espectro NOESY de la molécula en cuestión. En él no se observa ninguna señal relevante de protones cercanos en el espacio que nos haga sospechar de una conformación más compacta.

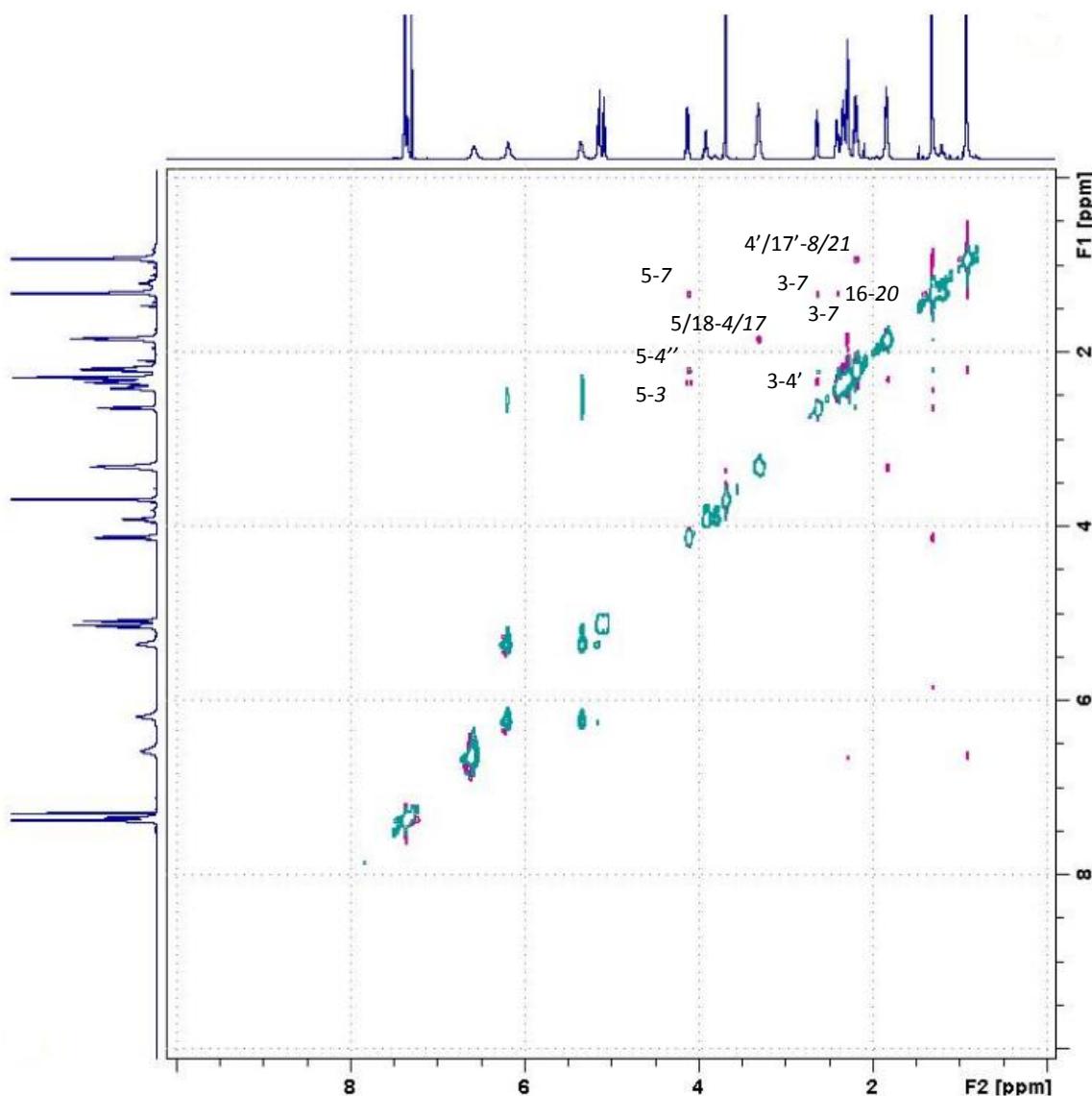


Figura 16. Espectro NOESY ^1H - ^1H NMR del γ -tripéptido híbrido **24**.

En el tetrapéptido **26** las combinaciones posibles para la formación de enlaces de hidrógeno aumentan considerablemente, no sólo por el hecho de que aumenten los grupos amida involucrados sino también porque aumenta la flexibilidad. Esto hace, en el caso que

fuerá energéticamente favorable, que el péptido pueda plegarse adoptando una conformación espacial más viable para la orientación del enlace de hidrógeno.

Al realizar el experimento de gradientes de temperatura para los protones N-H del tetrapéptido se obtuvieron dos valores inferiores a $4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$. Los valores del gradiente para esos protones fueron de 4.5 y $3.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$. El valor para protón N-H₆ está en el límite, lo que puede que no sea una gran indicio de que pueda estar formando un enlace de hidrógeno con algún grupo carboxilo de la molécula, y por otro lado el desplazamiento químico no es muy elevado. Por otro lado, el valor del protón N-H₁₄ sí que es inferior al valor de referencia pero para poder asegurar con más rigor se realizó nuevamente un espectro NOESY.

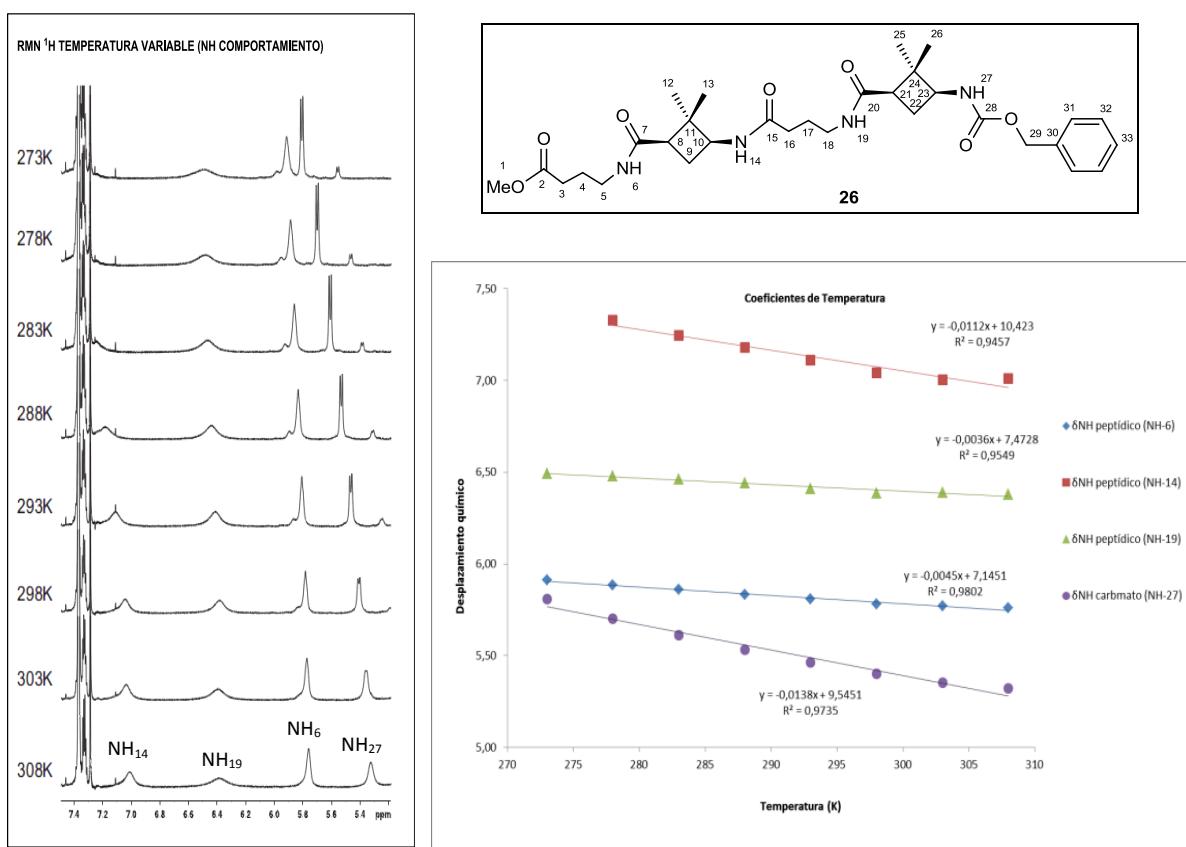


Figura 17. A la izq. espectro ¹H-RMN a diferentes temperaturas del γ -tetrapéptido híbrido **26**, a la dcha. representación gráfica desplazamiento químico vs temperatura

	Ecuación de la recta de regresión	R^2	$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppbK ⁻¹)
δ NH peptídico (NH-6)	$-0.0045x + 7.1451$	0.9802	4.5
δ NH peptídico (NH-14)	$-0.0112x + 10.423$	0.9457	11.2
δ NH peptídico (NH-19)	$-0.0036x + 7.1451$	0.9549	3.6
δ NH carbmato (NH-27)	$-0.0138x + 9.5451$	0.9735	13.8

Tabla 3. Resultados del coeficiente de temperaturas para el γ -tetrapéptido híbrido **26**

Lo observado en el espectro bidimensional NOESY parece desmentir el resultado obtenido con el experimento anterior para el protón N-H₁₄. Las señales obtenidas no dan ninguna prueba para constatar el hecho de que adopte una estructura compacta y que dicho protón forme un enlace de hidrógeno. Así, por los resultados obtenidos, y apoyándonos en la tendencia tanto del dipéptido **22** como del tripéptido **24** en adoptar una conformación extendida, se podría aseverar que este último oligopéptido tampoco tiene estructura secundaria plegada.

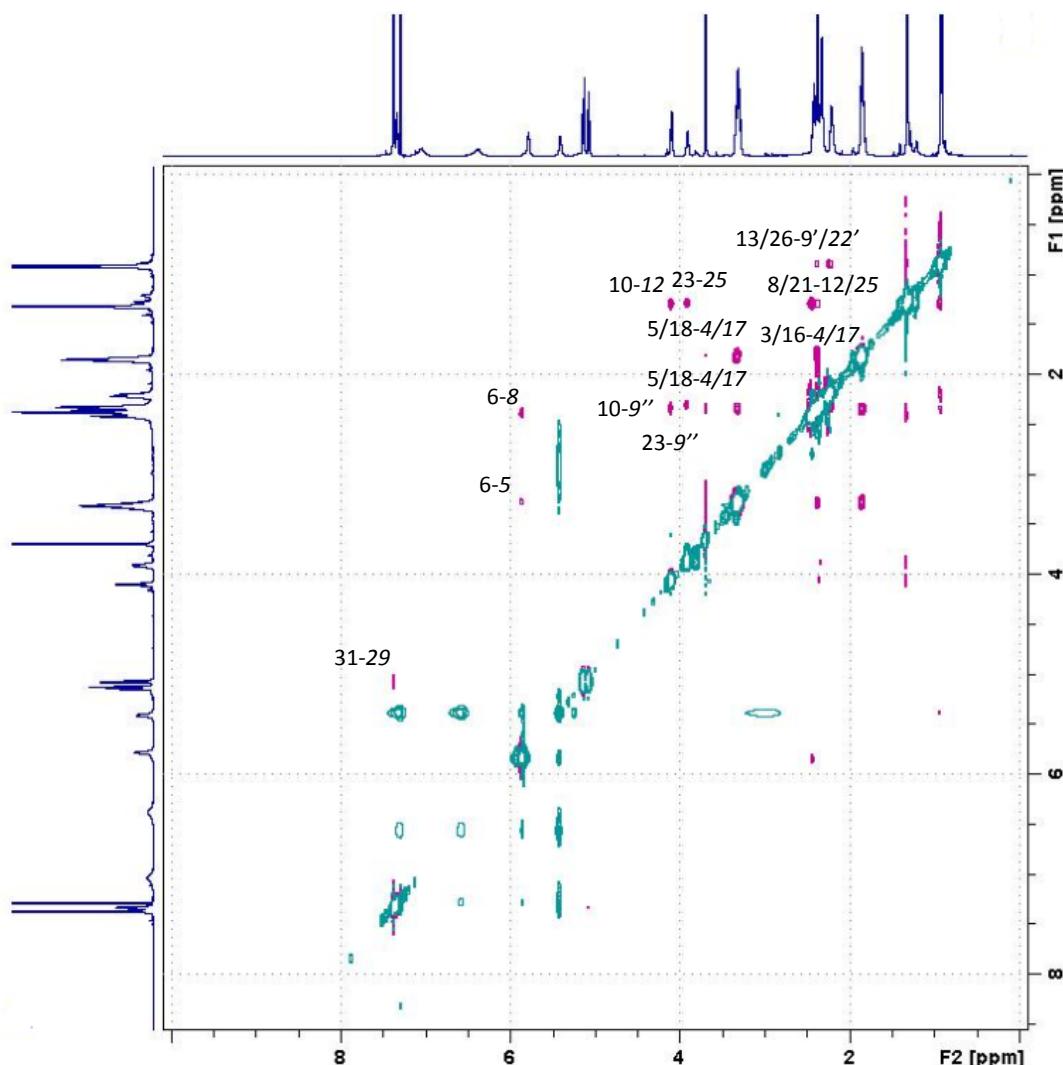


Figura 18. Espectro NOESY ¹H-¹H NMR del γ-tetrapéptido híbrido **26**.

Continuando con el estudio estructural, debido a que algunos datos son contradictorios, quisimos usar otra herramienta que sustentara lo concluido anteriormente. Para ello, se utilizó la espectroscopia de infrarrojo para dar más información de la posible formación de enlaces de hidrógeno.

En la espectroscopia en el infrarrojo se puede determinar la formación de enlaces de hidrógeno ya que la aparición de ciertas señales representa las interacciones intermoleculares e intramoleculares que corresponden a enlaces de hidrógeno en los que están implicados para ciertos grupos funcionales, como N-H de amida. Para N-H con enlaces de hidrógeno, la frecuencia está en el intervalo de 3300-3370 cm⁻¹. Los N-H, si no participan en enlaces de hidrógeno aparecen en el intervalo de 3400-3500 cm⁻¹^{14,25}. Se realizó el experimento a dos concentraciones para discernir si el enlace de hidrógeno es intramolecular o intermolecular de los péptidos **22** y **26**. Los espectros obtenidos concuerdan con lo anteriormente postulado, ya que no se ven señales de frecuencia de enlace N-H asociado en ninguno de los casos.

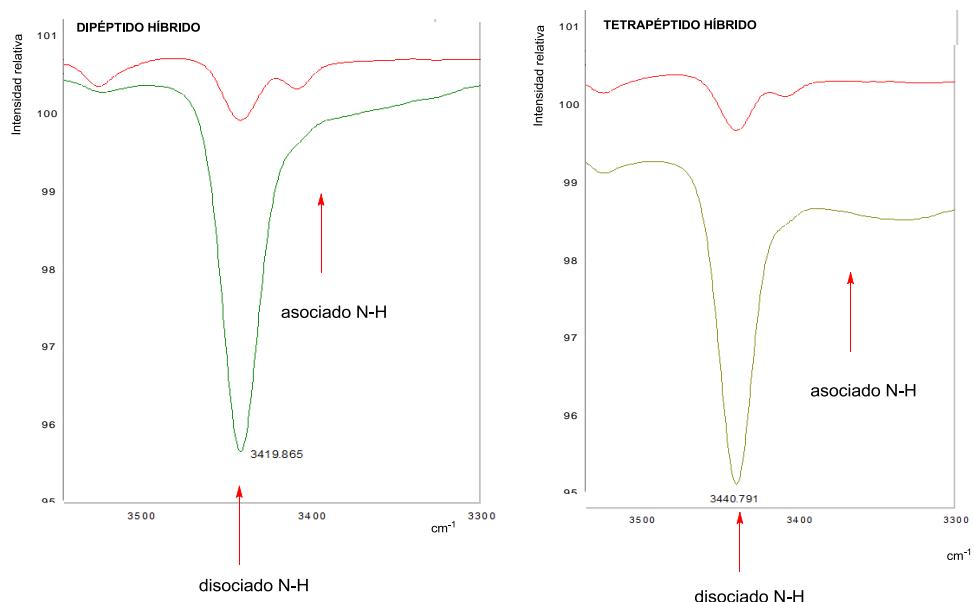


Figura 19. Región IR N-H stretch para 0.25 mM (superior) y 2.5 mM (inferior) de **22** y **26** en CH₂Cl₂ a 298 K.

El estudio del hexapéptido **28** no pudo llevarse a cabo ya que la cantidad de producto obtenido no fue suficiente en el transcurso del presente trabajo. Aunque observando el espectro de RMN ¹H parece mantener la misma tendencia de sus predecesores, a razón de que los desplazamientos químicos de los hidrógenos de amida no son muy elevados.

Resumiendo, se puede afirmar, a la vista de los resultados obtenidos, que en esta familia de γ -péptidos híbridos (al menos hasta el tetrámero) no existen interacciones de

²⁵ a) Gellman, S.; Dado, G.; Liang, G.-B; Adams, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1164. b) Dado, G.; Gellman, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4228. c) Gennari, C; Gude, M.; Potenza, D.; Piarulli, U. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1924. d) Gardner, R.; Liang, G.-B; Gellman, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1806

suficiente consideración como para que se pueda distinguir un nivel de organización superior a la estructura primaria, adoptando una conformación extendida o al azar. El ciclobutano debe jugar un papel importante al interrumpir la predisposición de realizar enlace de hidrógeno entre grupos de amida cercanos, como se vió en derivados de GABA más flexibles. Este dato es remarcable, debido a que estos oligopéptidos no tienen un alto grado de restricción, y en algunos casos tienen más residuos que le aportan más flexibilidad.

Estudio estructural en solución de la familia de γ -péptidos ciclobutánicos

En los estudios llevados a cabo anteriormente por el Dr. Aguilera,²² se determinó que los dipéptidos ciclobutánicos adoptaban conformaciones extendidas. El esqueleto peptídico de los γ -oligopéptidos ciclobutánicos **29** y **30** es muy rígido (ver esquema 11), debido a la limitación conferida por la presencia del anillo carbocíclico, sólo separados por grupos amida. En estos casos, el enlace de hidrógeno entre los grupos amida vecinos sería muy forzado debido a la rigidez intrínseca de los monómeros ciclobutánicos.

En los tetrapéptidos **33** y **36**, la tendencia de adoptar una conformación no compacta parecía continuar en base a los espectros de RMN. Cabe destacar, no obstante, que en el caso del tetrapéptido heteroquiral el espectro de RMN ^1H (DMSO-*d*6, figura IX anexo I) mostró un perfil muy diferente de los péptidos anteriores, donde todos los NH aparecen en desplazamientos superiores de 7 ppm. Este fenómeno, que está a menudo relacionado con la formación de enlaces de hidrógeno, puede estar relacionado con el DMSO, ya que es un aceptor de enlaces de hidrógeno fuertes. Por lo tanto, su insolubilidad hace que el estudio estructural del tetrapéptido en solución mediante técnicas de RMN sea inviable, porque el DMSO no es un disolvente recomendado debido a las interferencias que puede provocar. Este problema se puede resolver realizando los estudios estructurales prescindiendo de los grupos protectores y realizando el estudio estructural en medio acuoso, con el inconveniente de no poder comparar los resultados con los obtenidos en otros estudios del grupo.

La razón de elongar los péptidos a los hexámeros correspondientes era para averiguar si se podían formar enlaces de hidrógeno a larga distancia. Sin embargo, como se explicó en el parte sintética, estos hexapéptidos (**38** y **40**) no se pudieron obtener con cantidad suficiente para poder realizar el estudio estructural.

3.3 Péptidos capaces de penetrar la membrana celular “CPPs”

En colaboración con Raquel Gutiérrez del grupo de investigación, el Dr. Pau Nolis del *Servei de Ressonància Magnètica* y con el grupo de investigación de la Dra. Miriam Royo, del Parc Científic de Barcelona, se sintetizó y estudió una nueva familia de γ -péptidos híbridos formados a partir de monómeros ciclobutánicos y *cis*-4-amino-L-prolina, para realizar posteriormente un estudio estructural y analizar su uso potencial como CPPs.

3.3.1 Síntesis

Para abordar el segundo de los objetivos, sinteticé una de las dos series diastereoisoméricas de los γ -péptidos híbridos formados a partir de prolina (funcionalizada como γ -aminoácido; *cis*-4-amino-L-prolina) y del monómero ciclobutánico.

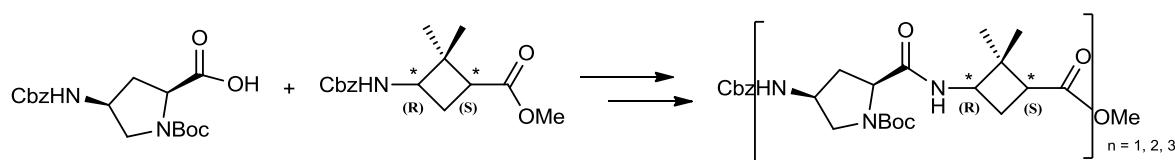
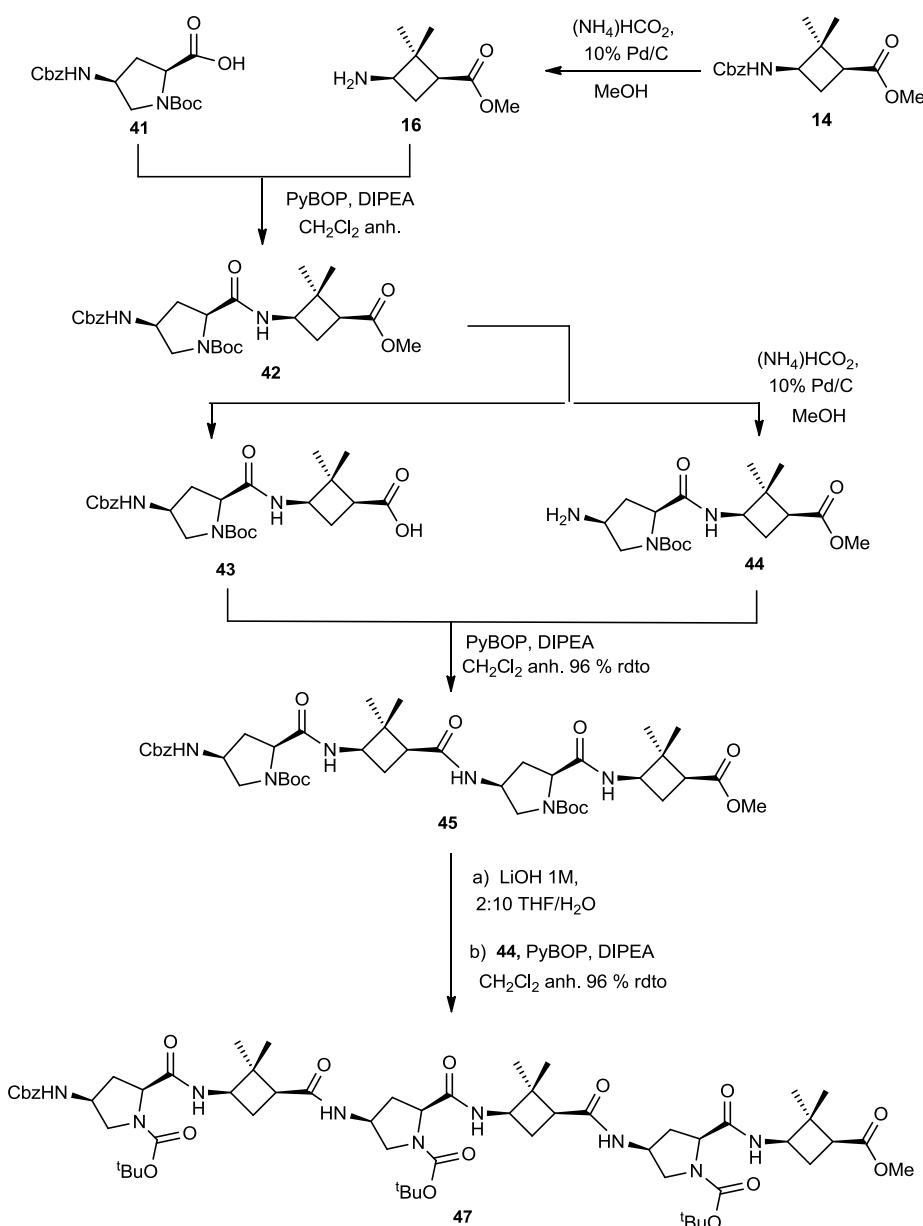


Figura 20. Serie γ -péptidos híbridos ciclobutano-prolina

Con el fin de sintetizar el hexapéptido híbrido “ciclobutano-prolina”, primeramente, se redujo con formiato de amonio en presencia de Pd/C al 10% el carbamato de bencilo del compuesto **14**, en el seno de metanol a reflujo, liberando la amina. Esta amina, **16**, se hizo reaccionar con la *cis*-4-amino-prolina parcialmente protegida **41** en condiciones clásicas y usando el PyBOP y DIPEA en diclorometano anhidro para obtener el dipéptido híbrido con un rendimiento cuantitativo, **42**. El tetramero **45** se obtuvo por el acoplamiento, y con las mismas condiciones anteriores de acoplamiento, de los dipéptidos convenientemente desprotegidos, **43** y **44**, con un rendimiento 96 %. Para la liberación del ácido se realizó una suave saponificación con LiOH 1M. Finalmente, la desprotección del grupo carboxilo del tetrapéptido **45** seguido del acoplamiento con la amina **44** dio el hexámero **47** con un 81 % de rendimiento. (Ver esquema 19)



Esquema 19. Serie γ -péptidos híbridos ciclobutano-prolina

3.3.2 Estudio estructural y biológico

El estudio estructural de estos γ -oligómeros se basó principalmente en técnicas de RMN de alta resolución, y fue a cabo por el Dr. Pau Nolis del Servicio de RMN de la Universitat Autònoma de Barcelona.²⁶

Se estudiaron las estructuras secundarias que adoptaban en solución, y se determinó que la presencia del ciclobutano en estos compuestos induce conformaciones muy

²⁶ R. Gutiérrez-Abad, D. Carbajo, P. Nolis, C. Acosta-Silva, J.A. Cobos, O. Illa, R.M. Ortúñoz *Amino Acids* **2011**, *41*, 673.

definidas adoptando estructuras compactas, debido a dos tipos diferentes de anillos formados por enlace de hidrógeno.

Además todos estos γ -péptidos tienen alta tendencia a la agregación, formando vesículas de tamaño nanométrico estables, según lo verificado por la microscopía de transmisión electrónica (TEM).

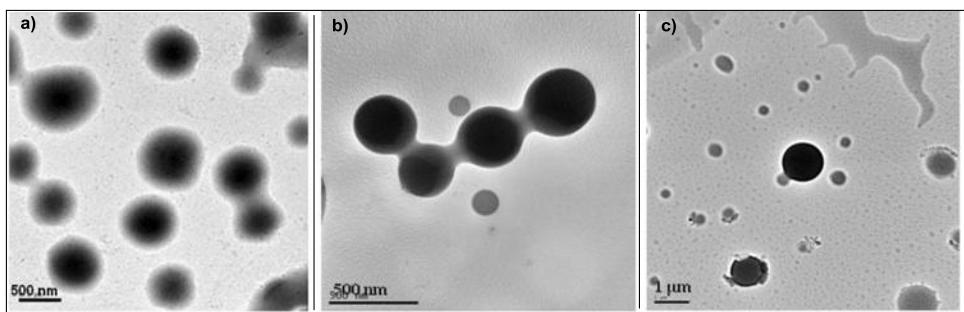


Figura 21. Imágenes de TEM de las vesículas formadas por el (a) dipéptido **42**, (b) tetrapéptido **45**, (c) hexapéptido **47**.

El estudio biológico fue llevado a cabo por el grupo de investigación de la Dr. Miriam Royo, realizando estudios *in vitro* de la capacidad de éstos péptidos de penetrar en las células. Su capacidad de penetración fue constatada aunque se observó una baja penetración respecto al péptido de referencia TAT

Actualmente, en el grupo de investigación, se está funcionalizando esta familia de péptidos (por el grupo NH-BOC de la prolina), para mejorar su capacidad de penetración.

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los principales resultados obtenidos en este trabajo han sido:

- Se ha realizado la síntesis y el estudio estructural de los γ -péptidos híbridos GABA-ciclobutano **22**, **24** y **26**. Se ha concluido que estos oligopéptidos no presentan conformaciones definidas en solución. Al contrario de lo que sucede con algunos β -péptidos similares (con ciclobutanos 1,2-disustituidos), el ciclobutano 1,3-disustituido no induce estructuras secundarias concretas en los gama péptidos estudiados. También es importante destacar que en estos γ -péptidos el ciclobutano, como elemento de rigidez, interrumpe la tendencia de formar enlaces de hidrógeno entre grupos de amida vecinos de los derivados del GABA más flexibles.
- Se ha completado la síntesis de los hexámeros **28**, **38** y **40**. Se ha optimizado alguna de las etapas sintéticas de las rutas implicadas. No obstante, en ninguno de los casos se ha podido realizar el estudio estructural, debida a la escasa cantidad obtenida.
- Se ha sintetizado una serie de γ -péptidos híbridos formados por combinación de un monómero ciclobutánico y *cis*-4-amino-L-prolina, **42**, **45** y **47**.

5. DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL

5. DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL

5.1 METODOLOGÍA GENERAL

5.1.1 Espectroscopia y espectrometría

Los *espectros de Resonancia Magnética Nuclear* (RMN) han sido registrados en el Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Equipamiento que se ha utilizado es:

- Un equipo Brucker, modelo Avance DPX-250, para los espectros de ^1H a 250 MHz, ^{13}C a 62.5 MHz.
- Un equipo Brucker, modelo DPX-360, para los espectros de ^1H a 360 MHz, ^{13}C a 90 MHz, bidimensionales y experimentos a temperatura variable.
- Un equipo Brucker, modelo AV600, para los espectros de ^1H a 600 MHz, ^{13}C a 150 MHz, bidimensionales y experimentos a temperatura variable.

Los desplazamientos químicos para cada señal se expresan ppm, utilizando como referencia:

- CDCl_3 : $\delta = 7.29$ y 77.00 ppm para ^1H y ^{13}C respectivamente
- DMSO-d_6 : $\delta = 2.50$ y 39.5 ppm para ^1H y ^{13}C respectivamente
- MeOD-d_4 : $\delta = 3.31$ y 49.0 ppm para ^1H y ^{13}C respectivamente

Las abreviaturas utilizadas para designar la multiplicidad de las señales son:

s singlete	ddd doble doble doblete
s.a. singlet ancho	t triplete
d doblete	m multiplete
dd doble doblete	a.c. absorción compleja

Los *espectros de Infrarrojo* (IR), han sido registros en un espectrofotómetro modelo Bruker Tensor 27 con ATR tipo Golden Gate con un cristal de diamante del Servicio de Análisis Química. Los valores de las señales se dan en cm^{-1} .

Los *espectros de masas de alta resolución*, han sido realizados con el equipo Bruker model SQUIRE 3000 en el Servicio Servicio de Análisis Química de la Universitat Autònoma de Barcelona; los análisis se han efectuado por la técnica de electrospray.

5.1.2 Cromatografía

La técnica de cromatografía en columna se realizado utilizando como fase estacionaria gel de sílice Baker® de la siguiente medida de partícula: 0.04-0.06 nm, 230-400 mesh.

La cromatografía en capa fina (CFF), se ha realizado sobre cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ de 0.25 mm de grosor. Los métodos utilizados para revelar las manchas han sido:

- Irradiación con lámpara de UV₂₅₄.
- Submergiendo el chromatofolio en solución acuosa básica de KMnO₄ o en una solución acida de vainillina en etanol.

5.1.3 Materiales generales de laboratorio

Las rotaciones ópticas específicas $[\alpha]_D$, se han medido a temperatura ambiente en un polarímetro *Propol Autmatishes*, modelo Dr. Kermchen, utilizando una cubeta de 0.5 cm de longitud.

Los puntos de fusión han sido determinados en un bloque Kofler de la marca Reicher y no han sido corregidos.

Las hidrogenaciones a presión han sido realizadas con un hidrogenador model Chemipress 80, diseñado por Trallero&Schlee.

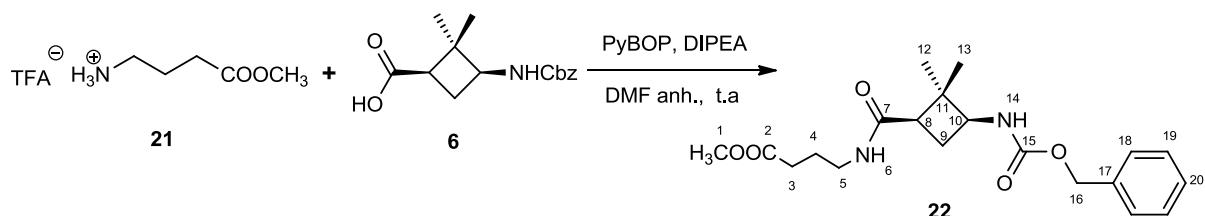
Los disolventes han sido utilizados directamente debido a su grado de calidad. En los casos requeridos han sido purificados y/o anhidrizados mediante metodologías estándar, descritas en: *Vogel's, Textbook of Practical Organic Chemistry*. Ed. Longman Scientific & Technical. UK, 1989.

Los productos **22-28, 37-40 y 42-47** son nuevos y han sido caracterizados por primera vez en este trabajo.

Los productos **1-21 y 29-37** han sido previamente descritos en Aguilera, A. PhD Thesis. UAB, 2010.

5.2 Procedimientos sintéticos y caracterización de los diferentes compuestos

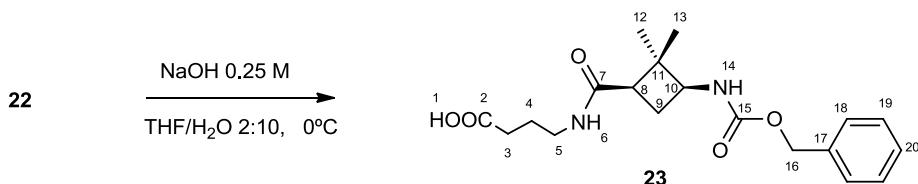
Síntesis del γ -dipéptido híbrido “GABA-ciclobutano”, 22:



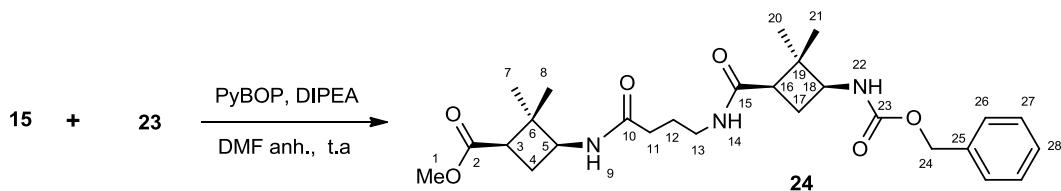
Se disuelve 0.99 g del ácido **6** (3.57 mmoles), 2 mL de DIPEA (9.71 mmoles, 3 eq.), y 2.2 g de PyBOP (11.78 mmoles) en 20 mL de DMF anhidra bajo atmósfera de nitrógeno. Se agita durante 5 minutos y, seguidamente, se añade mediante una cánula una solución de la sal **21** (4.28 mmoles, 1.2 eq) en diclorometano anhidro (10 mL). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 mL) y agua (3x10 mL). La fase orgánica es secada sobre MgSO_4 y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna (eluyente $\text{AcOEt}/\text{Hexano}$ 1:2 a 1:1) obteniéndose 1.1 g del dipéptido **22** como un sólido blanco (82% rdto).

Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **22**

- $[\alpha]_D = -21.4$ (*c* 0.56, CH_2Cl_2).
- **Punto de fusión:** 65-67 °C (éter/pentano).
- **IR (ATR $\gamma_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$):** 3284.4 (NH_{st}), 2949.8 (CH_{st}), 1733.1, 1694.2 1642.9 (CO), 1530, 6 (NH).
- **RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3):** δ 0.93 (s, 3H, H₁₃), 1.31 (s, 3H, H₁₂), 1.85 (m, 2H, H₄), 2.15 (dd, *J* = 19.7, 9.0 Hz, 1H, H_{9proS}), 2.33 (m, 1H, H_{9proR}) 2.38 (a.c, 4H, H₈, H₃), 3.33 (m, 2H, H₅), 3.70 (s, 3H, H₁), 3.91 (m, 1H, H₁₀), 5.10 (2d, *J* = 12.2 Hz, 2H, H₁₆), 5.18 (s, 1H, H₁₄) δ 5.67 (s, 1H, H₆), 7.37 (a.c, 5H, H₁₈, H₁₉, H₂₀).
- **RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3):** δ 173.9 (C₂), 171.6 (C₇), 155.9 (C₁₅), 136.5 (C₁₇), 128.5 (C₁₈, C₁₉), 128.1 (C₂₀), 66.7 (C₁₆), 51.8 (C₁, C₁₀), 45.3 (C₁₁), 44.9 (C₈), 39.1 (C₅), 31.5 (C₃), 29.2 (C₁₂), 26.3 (C₉), 24.7 (C₄), 16.8 (C₁₃).
- **Espectrometría de masas de alta resolución:** teórico para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺: 399.1890, experimental: 399.1880.

Desprotección del grupo carboxilo del γ -dipéptido híbrido “GABA-ciclobutano”, 23:*Datos espectroscópicos del compuesto 23*

- **¹H RMN** (360 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (s, 3H, H₁₃), 1.26 (s, 3H, H₁₂), 1.84 (m, 2H, H₄), 2.12 (m, 1H, H_{9proS}), 2.39 (a.c., 4H, H_{9proR}, H₈, H₃), 3.33 (m, 2H, H₅), 3.90 (m, 1H, H₁₀), 5.09 (2d, J = 12.0 Hz, 2H, H₁₆), 5.21 (s, 1H, H₁₄) 5.80 (s.a., 1H, H₆), 7.37 (a.c, 5H, H₁₈, H₁₉, H₂₀)
- **RMN ¹³C** (90 MHz, CDCl₃): δ 176.9 (C₂), 172.2 (C₇), 155.9 (C₁₅), 136.0 (C₁₇), 128.8 (C₁₈, C₁₉), 128.1 (C₂₀), 66.6 (C₁₆), 51.5 (C₁₀), 45.5 (C₁₁), 44.7 (C₈), 39.1 (C₅), 31.7 (C₃), 29.3 (C₁₂), 26.3 (C₉), 24.6 (C₄), 16.8 (C₁₃).

Síntesis del γ -tripéptido híbrido “GABA-ciclobutano”, 24:

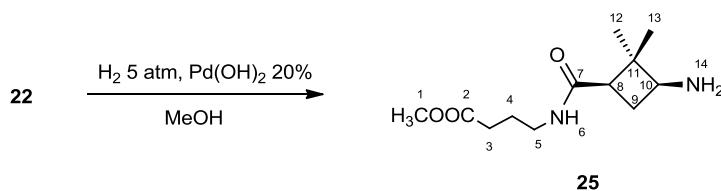
Se disuelven 190 mg del ácido **23** (0.51 mmoles), 0.27 mL de DIPEA (1.53 mmoles, 3 eq.), y 410 mg de PyBOP (0.77 mmoles, 1.5 eq) en 10 mL de DMF anhidra bajo atmósfera de nitrógeno. Se agita durante 5 minutos y, seguidamente, se añade mediante una cánula una solución 98 mg de la amina **15** (0.61 mmoles, 1.2 eq) en DMF anhidra (5 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con

una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (eluyente AcOEt/Hexano 1:2 a 1:1) obteniéndose 192 mg del tripéptido **24** como un sólido blanco (75% rdto).

*Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **24***

- $[\alpha]_D = 77.7$ (*c* 1, CH₂Cl₂).
- **Punto de fusión:** 184-186 °C (éter/pentano).
- **IR (ATR γ_{max} cm⁻¹):** 3315.65 (NH_{st}), 2956.6(CH_{st}), 1719.5, 1706.05 (CO_{carbamato}), 1655.7, 1543.5 (CO_{éster}) 1537.86, 1523.4 (NH).
- **RMN ¹H** (600 MHz, CDCl₃): δ 0.90 (s, 3H, H₈), 0.91 (s, 3H, H₂₁) 1.31 (s, 3H, H₇, H₂₀), 1.84 (m, 2H, H₁₂), 2.19 (2d, *J* = 10.63 Hz, 2H, H_{4proS} H_{17proS}), 2.28 (t, 2H, H₁₁), 2.33 (m, 2H, H_{4proR} H_{17proR}) 2.41(dd, *J* = *J'* = 8.35, Hz, 1H, H₁₆), 2.63 (m, 1H, H₃), 3.31 (s.a. 2H, H₁₃), 3.68 (s, 3H, H₁), 3.91 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₁₈), 4.12 (dd, *J* = *J'* = 8.5 Hz, 1H, H₅), 5.10 (2d, *J* = 12.2 Hz, 2H, H₂₄), 5.34 (s, 1H, H₁₄) δ 6.18 (s, 1H, H₆), 6.57 (s, 1H, H₁₄), 7.35 (a.c, 5H, H₁₈, H₁₉, H₂₀).
- **RMN ¹³C** (150 MHz, CDCl₃): δ 173.3 (C₂), 172.9 (C₁₀), 172.1 (C₁₅), 155.9 (C₂₃), 136.5 (C₂₅), 128.5 (C₂₆, C₂₇), 128.1 (C₂₈), 66.7 (C₂₄), 51.7 (C₁₈), 51.5 (C₁), 50.2 (C₅), 45.9 (C₆), 45.53(C₁₉), 44.8 (C₁₆), 43.2 (C₃), 39.2 (C₁₃), 33.5 (C₁₁), 29.2 (C₇), 28.9 (C₂₀), 26.2 (C₁₇), 25.8 (C₄), 25.47 (C₁₂), 17.3 (C₈), 16.9 (C₂₁).
- **Espectrometría de masas de alta resolución:** teórico para C₂₇H₃₉N₃O₆Na (M+Na)⁺: 524.2731 , experimental: 524.2728.

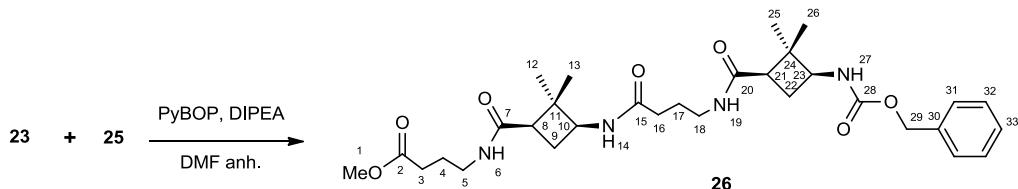
Desprotección del grupo amino γ-dipéptido híbrido “GABA-ciclobutano”, **25**:



Se disuelven 250 mg del dipéptido híbrido **22** (0.66 mmoles) en la mínima cantidad de MeOH, se añaden 100 mg de Pd(OH)₂/C al 20% en peso y se hidrogena la mezcla con ayuda de una autoclave a 5 atm de presión de H₂ durante 12 horas. Pasado este tiempo, se filtra la mezcla sobre Celite y éste se lava con MeOH (3x15 mL). La evaporación del disolvente a presión reducida permite la obtención de la amina libre **25** con un rendimiento del 97%.

Datos espectroscópicos del compuesto 25

- **¹H RMN** (250 MHz, CDCl₃): δ 0.93 (s, 3H, H₁₃), 1.26 (s, 3H, H₁₂), 1.86 (d.t, *J* = 6.98, *J'* = 7.03 Hz, 2H, H₄), 2.10 (a.c 1H, H_{9proS}), 2.39 (m, 4H, H_{9proR}, H₈, H₃), 3.15 (s. a, 1H, H₁₀), 3.32 (m, 2H, H₅), 3.69 (s, 3H, H₁), 3.89 (s.a., 1H, H₁₄) δ 5.89 (s, 1H, H₆).
- **RMN ¹³C** (62.5 MHz, CDCl₃): δ 174.6 (C₂), 172.48 (C₇), 54.3 (C₁₀), 52.1 (C₁), 46.7 (C₁₁), 45.2 (C₈), 39.4(C₅), 31.9 (C₃), 29.8 (C₁₂), 29.2 (C₉), 25.3(C₄), 16.3 (C₁₃).

Síntesis del γ-tetrapéptido híbrido “GABA-ciclobutano”, 26:

Se disuelven 230 mg del ácido **23** (0.63 mmoles), 0.32 mL de DIPEA (1.90 mmoles, 3 eq.), y 494 mg de PyBOP (0.95 mmoles, 1.5 eq) en 15 mL de DMF anhidra bajo atmósfera de nitrógeno. Se agita durante 5 minutos y, seguidamente, se añade mediante una cánula una solución 184.1 mg de la amina **25** (0.76 mmoles, 1.2 eq) en DMF anhidra (10 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (eluyente AcOEt/Hexano 1:1 a 3:1) obteniéndose 266 mg del tetrapéptido **26** como un sólido blanco (72 % rdto).

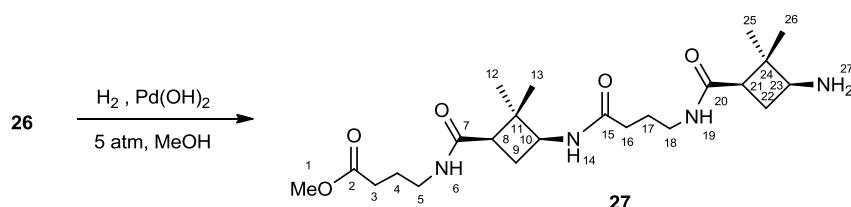
Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto 26

- [α]_D = - 76.8 (c 1, MeOH).
- **Punto de fusión:** 198-200 °C (éter).
- **IR** (ATR $\gamma_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$): 3315.16 (NH_{st}), 2956.14 (CH_{st}), 1719.51, 1706.05, 1655.72, 1645.89 (CO), 1537.86 1523.37 (NH).
- **RMN ¹H** (600 MHz, CDCl₃): δ 0.91 (s, 3H, H₁₃), 0.93 (s, 3H, H₂₆) 1.32 (s, 6H, H₁₂, H₂₅), 1.85 (m, 4H, H₄, H₁₇), 2.21 (m, 2H, H_{9proS}, H_{22proS}), 2.37 (m, 8H, H_{9proR}, H_{22proR}, H₃, H₁₆, H₈, H₂₁) 3.31 (m, 4H, H₅, H₁₈), 3.69 (s, 3H, H₁), 3.91 (dd, *J* = 8.24, 8Hz, 1H, H₂₃), 4.10 (dd, *J* = *J'* = 8.0

Hz, 1H, H₁₀), 5.10 (2dd, *J* = 39.9, 12.2 Hz, 2H, H₂₉), 5.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂₇), 5.78 (s, 1H, H₆), 6.38 (s, 1H, H₁₉), 7.04 (s, 1H, H₁₄), 7.34 (a.c, 5H, H₁₈, H₁₉, H₂₀).

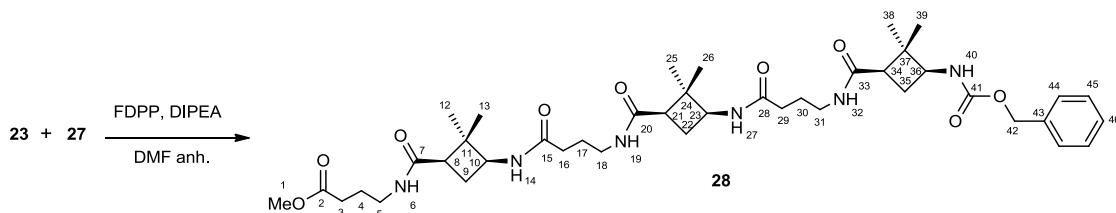
- **RMN ¹³C** (150 MHz, CDCl₃): δ 173.9 (C₂), 173.5 (C₁₅), 172.5 (C₂₀), 172.1 (C₇), 156.0 (C₂₈), 136.6 (C₃₀), 128.5 (C₃₁, C₃₂), 128.1 (C₃₃), 66.7 (C₂₉), 51.8 (C₁), 51.8 (C₂₃), 50.9 (C₁₀), 45.7 (C₂₄), 45.0 (C₈), 44.7 (C₂₁), 39.2 (C₅, C₁₈), 33.0 (C₃), 31.5 (C₁₆), 29.5 (C₁₂), 29.2 (C₂₅), 26.2 (C₂₂), 25.5 (C₉), 25.4 (C₄), 24.6 (C₇), 17.5 (C₁₃), 16.9 (C₂₆).
- **Espectrometría de masas de alta resolución:** teórico para C₃₁H₄₆N₄O₇Na (M+Na)⁺: 609.3259 , experimental: 609.3255.

Desprotección del grupo amino del γ-tetrapéptido híbrido “GABA-ciclobutano”, 27:



Se disuelven 125 mg del tetrapéptido híbrido **26** (0.21 mmoles) en la mínima cantidad de MeOH, se añaden 50 mg de Pd(OH)₂/C al 20% en peso y se hidrogena la mezcla con ayuda de una autoclave a 5 atm de presión de H₂ durante 12 horas. Pasado este tiempo, se filtra la mezcla sobre Celite y éste se lava con MeOH (3x15 mL). La evaporación del disolvente a presión reducida permite la obtención de la amina libre **27** con un rendimiento del 85%.

Síntesis del γ-hexapéptido híbrido “GABA-ciclobutano”, 28:



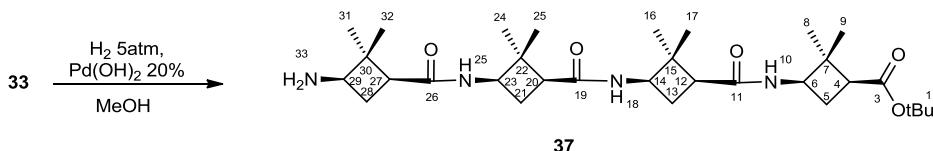
Se disuelven 36 mg del ácido **23** (0.10 mmoles, 1.1eq), 0.05 mL de DIPEA (0.27 mmoles, 3 eq.), y 38 mg de FDPP (0.10 mmoles, 1.1 eq) en 4 mL de bajo atmosfera de nitrógeno. Se agita durante 5 minutos y, seguidamente, se añade mediante una cánula una solución de 40 mg de la amina **27** (0.09 mmoles) en DMF anhidra (2 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 6 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de

bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (eluyente AcOEt/Hexano 10:1 a AcOEt/MeOH 20:1) obteniéndose 9 mg del hexapéptido **28** como un sólido blanco (12 % rdto).

Datos espectroscópicos del compuesto **28**

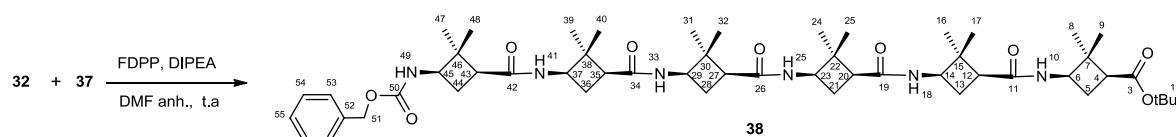
- **RMN ¹H** (360 MHz, CDCl₃): δ 0.87 (s, 3H, H₁₃) 0.90 (s, 3H, H₂₆) 0.92 (s, 3H, H₃₉) 1.32 (s, 9H, H₁₂, H₂₅, H₃₈), 1.85 (m, 6H, H₄, H₁₇, H₃₀), 2.11 (m, 3H, H_{9proS}, H_{22proS}, H_{35proS}), 2.29 (m, 3H, H_{9proR}, H_{22proR}, H_{35proR}), 2.39 (m, 9H, H₃, H₁₆, H₂₉, H₈, H₂₁, H₃₄), 3.33 (m, 6H, H₅, H₁₈, H₃₁), 3.70 (s, 3H, H₁), 3.91 (dd, J = 16.4, J' = 8.7 Hz, 1H, H₂₃), 4.10 (dd, J = 15.9, J' = 7.9 Hz, 2H, H₁₀), 5.10 (2d, J = 12.2 Hz, 2H, H₄₂), 5.10 (s, 1H, H₄₀) 5.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.03 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH), 5.20 (s.a., 1H, NH), 6.62 (d, J = 8.9 Hz, 1H, NH), 7.36 (s, 1H, H), 7.36 (a.c, 5H, H₄₄, H₄₅, H₄₆).

Desprotección del grupo amino del γ-tetrapéptido ciclobutánico “homoquiral”, **37**:



Se disuelven 130 mg del tetrapéptido homoquiral **33** (0.17 mmoles) en la mínima cantidad de MeOH, se añaden 50 mg de Pd(OH)₂/C al 20% en peso y se hidrogena la mezcla con ayuda de una autoclave a 5 atm de presión de H₂ durante 12 horas. Pasado este tiempo, se filtra la mezcla sobre Celite y éste se lava con MeOH (3x15 mL). La evaporación del disolvente a presión reducida permite la obtención de la amina libre **37** con un rendimiento del 79%.

Síntesis del γ-hexapéptido ciclobutánico “homoquiral”, **38**:



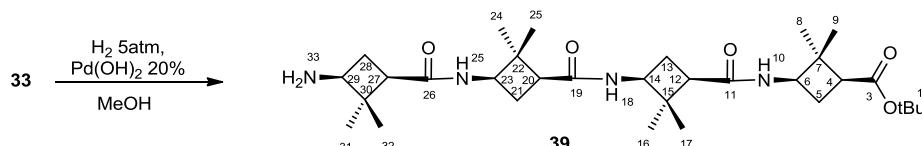
Se disuelven 36 mg del ácido **32** (0.09 mmoles, 1.1eq), 0.05 mL de DIPEA (0.24 mmoles, 3 eq.), y 35 mg de FDPP (0.09 mmoles, 1.1 eq.) en 4 mL de bajo atmosfera de

nitrógeno. Se agita durante 5 minutos y, seguidamente, se añade mediante una cánula una solución de 46 mg de la amina **37** (0.08 mmoles) en DMF anhidra (2 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 6 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (eluyente AcOEt/Hexano 10:1 a AcOEt/MeOH 20:1) obteniéndose 6 mg del hexapéptido **38** como un sólido blanco (8 % rdto).

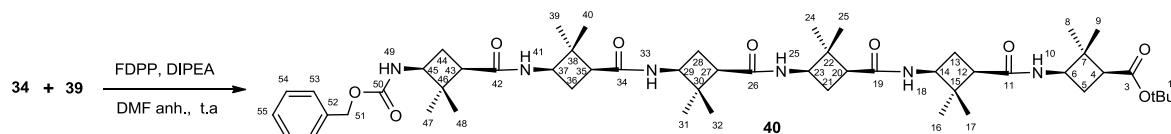
Datos espectroscópicos del compuesto 38

- **RMN ¹H** (360 MHz, CDCl₃): δ 0.87, 0.92 (2s, 18H, H₈, H₁₆, H₂₄, H₃₁, H₃₉, H₄₇), 1.27, 1.29, 1.31 (3s, 18H, H₉, H₁₇, H₂₅, H₃₂, H₄₀, H₄₈), 1.47 (s, 9H, H₁), 2.03 (a.c, 6H, H_{4proS}, H_{13proS}, H_{21proS}, H_{28proS}, H_{36proS}, H_{44proS}), 2.40 (a.c, 11H, H_{5proR}, H_{13proR}, H_{21proR}, H_{28proR}, H_{36proR}, H_{44proR}, H₁₁, H₁₉, H₂₇, H₃₅, H₄₆), 2.55 (m, 1H, H₃), 3.92 (m, 1H, H₄₅), 4.10 (m, 5H, H₃₇, H₂₉, H₂₁, H₁₃, H₅), 5.10 (2d, J = 11.8 Hz, 2H, H₅₁), 5.10 (s, 1H, NH) 5.51 (s.a, 1H, NH), 6.12 (a.c, 4H, NH), 7.37 (s, 5H, H₅₃, H₅₄, H₅₅).

Desprotección del grupo amino del γ-tetrapéptido ciclobutánico “heteroquiral”, 39:



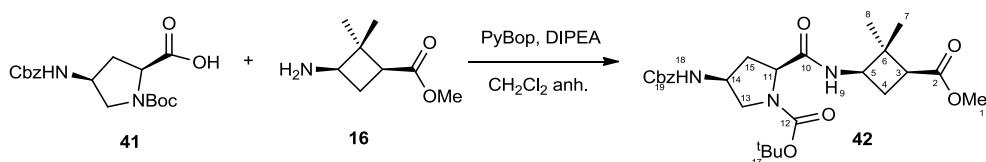
Se disuelven 102 mg del tetrapéptido heteroquiral **33** (0.14 mmoles) en la mínima cantidad de MeOH, se añaden 40 mg de Pd(OH)₂/C al 20% en peso y se hidrogena la mezcla con ayuda de una autoclave a 5 atm de presión de H₂ durante 12 horas. Pasado este tiempo, se filtra la mezcla sobre Celite y éste se lava con MeOH (3x15 mL). La evaporación del disolvente a presión reducida permite la obtención 71.1 mg de la amina libre **26** con un rendimiento del 86%.

Síntesis del γ -hexapéptido ciclobutánico “heteroquiral”, 40:

Se disuelven 47 mg del ácido **34** (0.13 mmoles, 1.1eq), 0.07 mL de DIPEA (0.36 mmoles, 3 eq.), y 51 mg de FDPP (0.09 mmoles, 1.1 eq) en 4 mL de bajo atmósfera de nitrógeno. Se agita durante 5 minutos y, seguidamente, se añade mediante una cánula una solución de 69 mg de la amina **39** (0.12 mmoles) en DMF anhidra (2 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 6 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO_4 y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (eluyente AcOEt/Hexano 10:1 a AcOEt/MeOH 20:1) obteniéndose 10 mg del hexapéptido **40** como un sólido blanco (9 % rdto).

*Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **40***

- RMN ^1H** (360 MHz, CDCl_3): δ 0.88, 0.90, 0.92 (3s, 18H, H_{16} , H_{24} , H_{31} , H_{39} , H_{47}), 1.27, 1.29, 1.33 (3s, 18H, H_9 , H_{17} , H_{25} , H_{32} , H_{40} , H_{48}), 1.46 (s, 9H, H_1), 2.03 (a.c, 6H, $\text{H}_{4\text{proS}}$, $\text{H}_{13\text{proS}}$, $\text{H}_{21\text{proS}}$, $\text{H}_{28\text{proS}}$, $\text{H}_{36\text{proS}}$, $\text{H}_{44\text{proS}}$), 2.42 (a.c, 11H, $\text{H}_{5\text{proR}}$, $\text{H}_{13\text{proR}}$, $\text{H}_{21\text{proR}}$, $\text{H}_{28\text{proR}}$, $\text{H}_{36\text{proR}}$, $\text{H}_{44\text{proR}}$, H_{11} , H_{19} , H_{27} , H_{35} , H_{46}), 2.55 (m, 1H, H_3), 3.90 (m, 1H, H_{45}), 4.13 (m, 5H, H_{37} , H_{29} , H_{21} , H_{13} , H_5), 5.10 (2d, $J = 12.1$ Hz, 2H, H_{51}), 5.10 (s, 1H, NH) 5.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 6.08 (a.c, 4H, NH), 7.37 (s, 5H, H_{53} , H_{54} , H_{55}).
- Espectrometría de masas de alta resolución:** teórico para $\text{C}_{54}\text{H}_{82}\text{N}_6\text{O}_9\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 981.6035, experimental: 981.6018.

Síntesis del γ -dipéptido híbrido “prolina-ciclobutano”, 42:

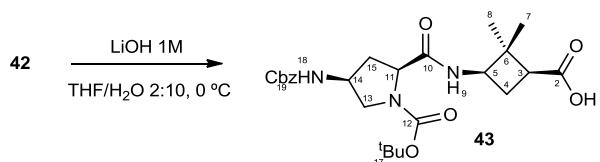
Se disuelve el ácido **41** (292 mg, 0.58 mmoles), DIPEA (0.30 ml, 1.57 mmoles), y PyBOP (420 mg, 0.78 mmoles) en 15 ml de diclorometano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó durante 5 minutos y, seguidamente, se añadió mediante una cánula una

solución de la amina **16** (92 mg, 0.58 mmoles) en diclorometano anhídrico (10 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (eluyente AcOEt/Hexano 1:1) permitiendo la obtención de 292 mg del dipéptido **42** como un sólido blanco (cuantitativo)

*Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **42***

- $[\alpha]_D = -13.8$ (*c* 0.99, CH₂Cl₂).
- **Punto de fusión:** 52-54 °C (éter).
- **IR (ATR, $\gamma_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$):** 3312 (NH_{st}), 2.956, 2.876 (CH), 1,677 (CO), 1.521 (NH), 1,393.
- **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ 0.87 (s, 3H, H₇), 1.27 (s, 3H, H₈), 1.40 (s, 9H, H₁₇), 2.12–2.21 (m, 2H, H_{4proR}, H_{15proS}), 2.25 (m, 1H, H_{4proS}), 2.40 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, H_{15proR}), 2.62 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₃), 3.47 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, H_{13proS}), 3.55 (m, 1H, H_{13proR}), 3.70 (s, 3H, H₁), 4.08 (dd, *J* = 17.8 Hz, J₀ = 8.6 Hz, 1H, H₅), 4.30 (m, 1H, H₁₄), 4.43 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₁₁), 5.10 (m, 2H, H₁₉, CH₂), 6.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H₁₈), 7.32–7.37 (m, 5H, H₁₉ Ar), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₉).
- **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ 17.0 (C₇), 26.2 (C₄), 28.3 (C₁₇), 29.0 (C₈), 31.5 (C₁₅), 43.1 (C₃), 46.3 (C₆), 50.1 (C₅), 50.7 (C₁₄), 51.4 (C₁), 55.1 (C₁₃), 59.21 (C₁₁), 66.4 (C₁₉ CH₂), 81.2 (C_{17q}), 128.0, 128.4 (C₁₉ Ar), 136.7 (C_{19q}), 156.0 (C₁₉ CO), 156.2 (C₁₆), 172.3 (C₁₀), 172.8 (C₂).
- **Espectrometría de masas de alta resolución:** teórico para C₂₆H₃₇N₃O₇Na (M+Na)⁺: 526.2524, experimental: 526.2506.

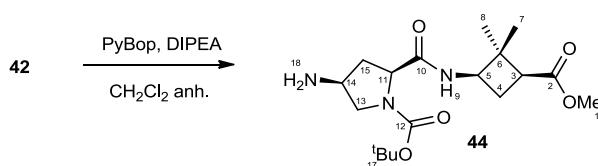
Desprotección del grupo carboxilo γ-dipéptido híbrido “prolina-ciclobutano”, **43:**



Se disuelven 95 mg del dipéptido **42** (0.19 mmol) en 11 mL de una mezcla THF/H₂O en proporción 2:9 y se enfriá la mezcla a 0° C. Seguidamente se adicionan 1 mL de una solución de LiOH 1M (1.00 mmoles, 5 eq) y se mantiene la temperatura durante

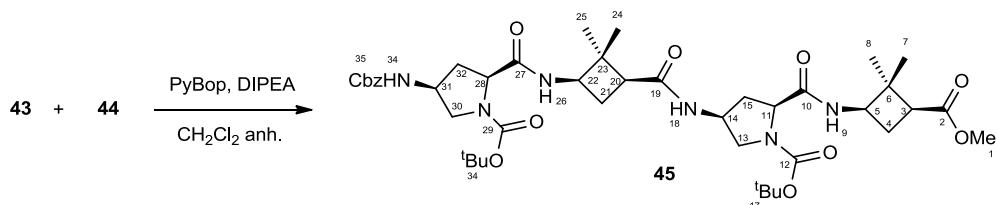
48 horas. Una vez acabada la reacción se acidifica la mezcla hasta pH= 2 con HCl al 5% y se extrae de la solución acuosa con CH₂Cl₂ (3x40 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 90 mg de un sólido blanco identificado como el ácido **243** (98% rdto).

Desprotección del grupo amino γ-dipéptido híbrido “prolina-ciclobutano”, **44**:



Se disuelve el dipéptido **42** (0.19 mmol) en 15 mL de metanol anhidro, y seguidamente se adiciona formiato de amonio (120 mg, 1.48 mmol) y 50 mg Pd/C 10%. La solución se lleva a reflujo de metanol durante 2 horas, y una vez transcurrido ese tiempo se filtra sobre Celite®. Se evapora el disolvente a presión reducida permitiendo la obtención de 65 mg de amina libre (93 % rdto).

Síntesis del γ-tetrapéptido híbrido “prolina-ciclobutano”, **45**:



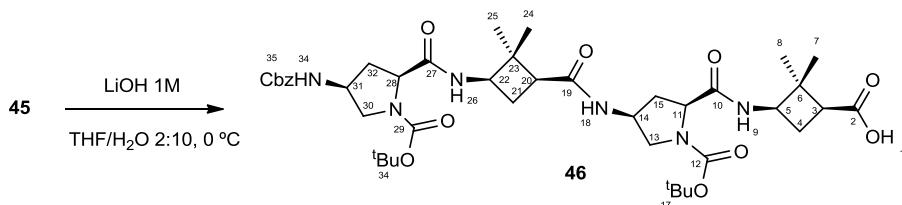
Se disuelve el ácido **43** (90 mg, 0.19 mmoles), DIPEA (0.12 ml, 1.00 mmoles), y PyBOP (161 mg, 0.29 mmoles) en 10 ml de diclorometano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó durante 5 minutos y, seguidamente, se añadió mediante una cánula una solución de la amina **44** (65 mg, 0.80 mmoles) en diclorometano anhidro (5 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante

cromatografía en columna (eluyente AcOEt 100%) permitiendo la obtención de 145 mg del tetrapéptido **45** como un sólido blanco (96% rdto).

*Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **45***

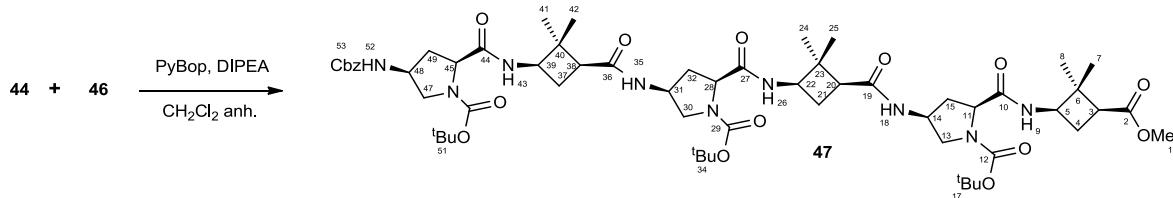
- $[\alpha]_D = -310.8$ (*c* 0.06, CH_2Cl_2).
- **Punto de fusión:** 79–81 °C (éter).
- **IR (ATR, $\gamma_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$):** 3.355(NH_{st}), 2,926, 2,854 (CH_{st}), 1.700, 1.671 (CO), 1.542 (NH), 1.459.
- **¹H NMR** (600 MHz, CDCl_3): δ 0.85, 0.86 (s, 6H, H₇, H₂₄), 1.22 (s, 3H, H₈), 1.26 (s, 3H, H₂₅), 1.45 (s, 18H, H₁₇, H₃₄), 2.10–2.35 (m, 8H, H_{4proS}, H_{4proR}, H_{15proS}, H_{15proR}, H_{21proS}, H_{21proR}, H_{32proS}, H_{32proR}), 2.48 (m, 1H, H₂₀), 2.60 (m, 1H, H₃), 3.34 (m, 1H, H_{30proS}), 3.44 (m, 1H, H_{13proR}), 3.52 (m, 1H, H_{30proR}), 3.68 (s, 3H, H₁), 4.00–4.08 (m, 2H, H₅, H₂₂), 4.30 (m, 1H, H₃₁), 4.38–4.47 (m, 3H, H₁₁, H₁₄, H₂₈), 5.09 (m, 2H, H₃₆ CH₂), 6.93 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, H₃₅), 7.30–7.36 (m, 5H, H₃₆ Ar), 7.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂₆), 7.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₉), 7.81 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H₁₈).
- **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl_3): δ 16.5 (C₂₄), 17.0 (C₇), 26.0 (C₂₁), 26.2 (C₄), 28.3 (6C, C₁₇, C₃₄), 29.0 (C₈), 29.3 (C₂₅), 31.1 (C₁₅), 31.9 (C₃₂), 43.0 (C₃), 44.3 (C₂₀), 45.8 (C₂₃), 46.2 (C₆), 49.1 (C₁₄), 50.0, 50.1 (2C, C₅, C₂₂), 50.7 (C₃₁), 51.4 (C₁), 55.2 (C₃₀), 55.5 (C₁₃), 59.2 (C₁₁), 59.3 (C₂₈), 66.4 (C₃₆ CH₂), 80.9, 81.1 (2C, C_{17q}, C_{34q}), 127.9, 128.0, 128.4 (C₃₆ Ar), 136.7 (C_{36q}), 156.1, 156.3 (3C, C₁₆, C₃₃, C₃₆ CO), 171.2 (C₁₉), 172.2 (C₂₇), 172.4 (C₁₀), 172.7 (C₂).
- **Espectrometría de masas de alta resolución:** teórico para $\text{C}_{43}\text{H}_{65}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}^+$): 863.4525, experimental: 863.4534.

Desprotección del grupo carboxilo γ-tetrapéptido híbrido “prolina-ciclobutano”, **46:**



Se disuelven 145 mg del tetrapéptido **45** (0.17 mmol) en 11 mL de una mezcla THF/H₂O en proporción 2:9 y se enfriá la mezcla a 0° C. Seguidamente se adicionan 0.85 mL de una solución de LiOH 1M (0.85 mmoles, 5 eq) y se mantiene la temperatura durante 48 horas. Una vez acabada la reacción se acidifica la mezcla hasta pH= 2 con HCl al 5% y se extrae de la solución acuosa con CH_2Cl_2 (3x40 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 140 mg de un sólido blanco identificado como el ácido **46** (98% rdto).

Síntesis del γ -hexapéptido híbrido “prolina-ciclobutánico”, 47:



Se disuelve el ácido **44** (140 mg, 0.17 mmoles), DIPEA (0.12 ml, 0.60 mmoles), y PyBOP (161 mg, 0.30 mmoles) en 10 ml de diclorometano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó durante 5 minutos y, seguidamente, se añadió mediante una cánula una solución de la amina **46** (70 mg, 0.19 mmoles) en diclorometano anhidro (5 ml). Se deja evolucionar la reacción con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3x10 ml) y agua (3x10 ml). La fase orgánica es secada sobre MgSO_4 y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (eluyente AcOEt 100%) permitiendo la obtención de 180 mg del hexapéptido **47** como un sólido blanco (81% rdto).

Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **45**

- $[\alpha]_D = 18.5$ (*c* 0.1, CH_2Cl_2).
- **Punto de fusión:** 144–166 °C ($\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$).
- **IR** (ATR, $\gamma_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$): 3,298 (NH_{st}), 2,957 (CH_{st}), 1,673 (CO), 1,520 (NH), 1,392, 1,367.
- **$^1\text{H NMR}$** (600 MHz, CDCl_3): 0.76–0.81 (m, 9H, H₇, H₂₄, H₂₄, H₄₁), 1.12–1.17 (m, 9H, H₈, H₂₅, H₄₂), 1.35–1.38 (m, 27H, H₁₇, H₃₄, H₅₁), 2.03–2.26 (m, 12H, H₄, H₁₅, H₂₁, H₃₂, H₃₈, H₄₉), 2.41–2.44 (m, 2H, H₂₀, H₃₇), 2.54 (m, 1H, H₃), 3.26–3.44 (m, 6H, H₁₃, H₃₀, H₄₇), 3.61 (s, 3H, H₁), 3.96–3.97 (m, 3H, H₅, H₂₂, H₃₉), 4.21 (m, 1H, H₄₈), 4.31 (m, 1H, H₄₅), 4.34 (m, 1H, H₂₈), 4.36–4.38 (m, 3H, H₁₁, H₁₄, H₃₁), 5.01 (m, 2H, H₅ CH₂), 6.93 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H₅₂), 7.23–7.28 (m, 5H, H₅₃ Ar), 7.56 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H₄₃), 7.60 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H₂₆), 7.66 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H₉), 7.94 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H₁₈), 8.03 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H).
- **Espectrometría de masas de alta resolución:** teórico para $\text{C}_{60}\text{H}_{91}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺: 1200.6527, experimental: 1200.6509.

ANEXOS

ANEXO I

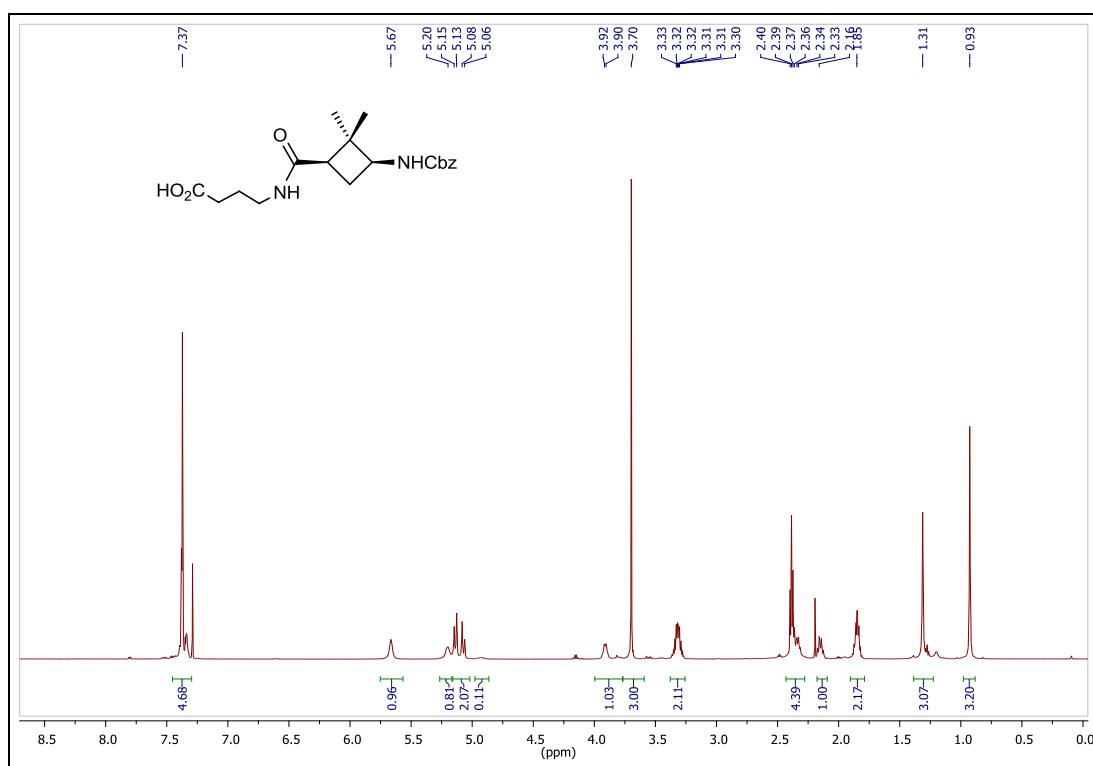


Figura 3. Espectro ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3 a 298K) del γ -dipéptido híbrido, **22**.

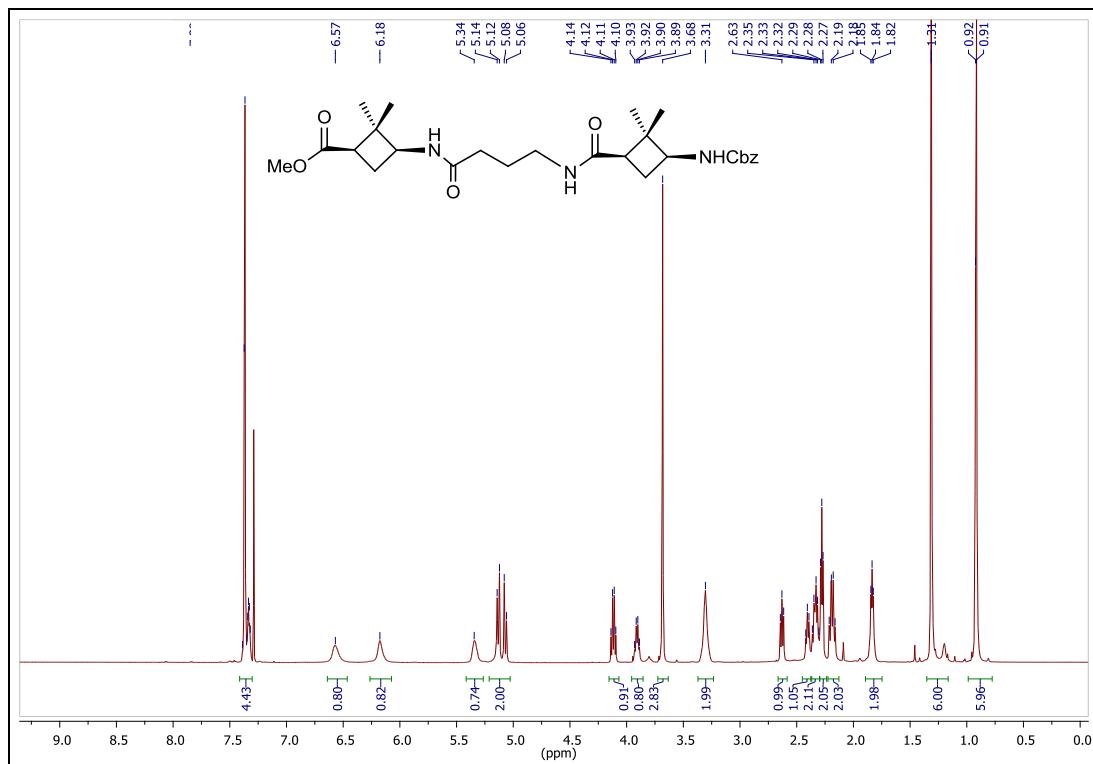


Figura II. Espectro ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3 a 298K) del γ -tripéptido híbrido, **24**.

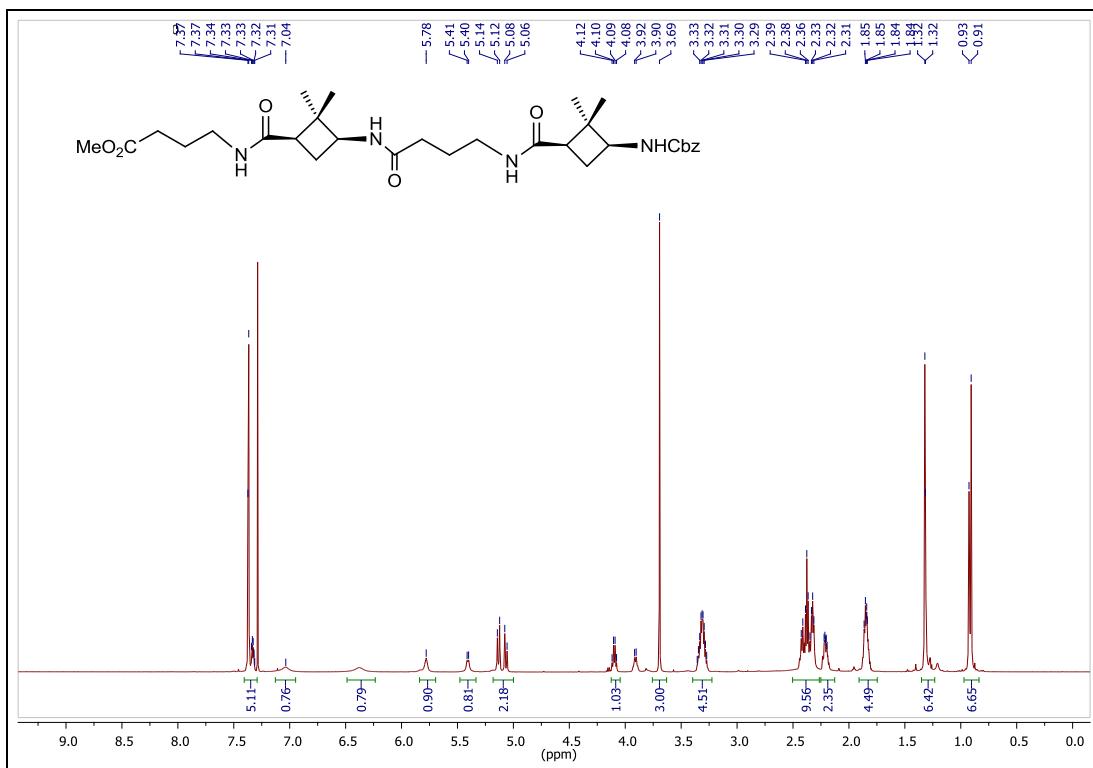


Figura 4. Espectro ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3 a 298K) del γ -tetrapéptido híbrido, 26.

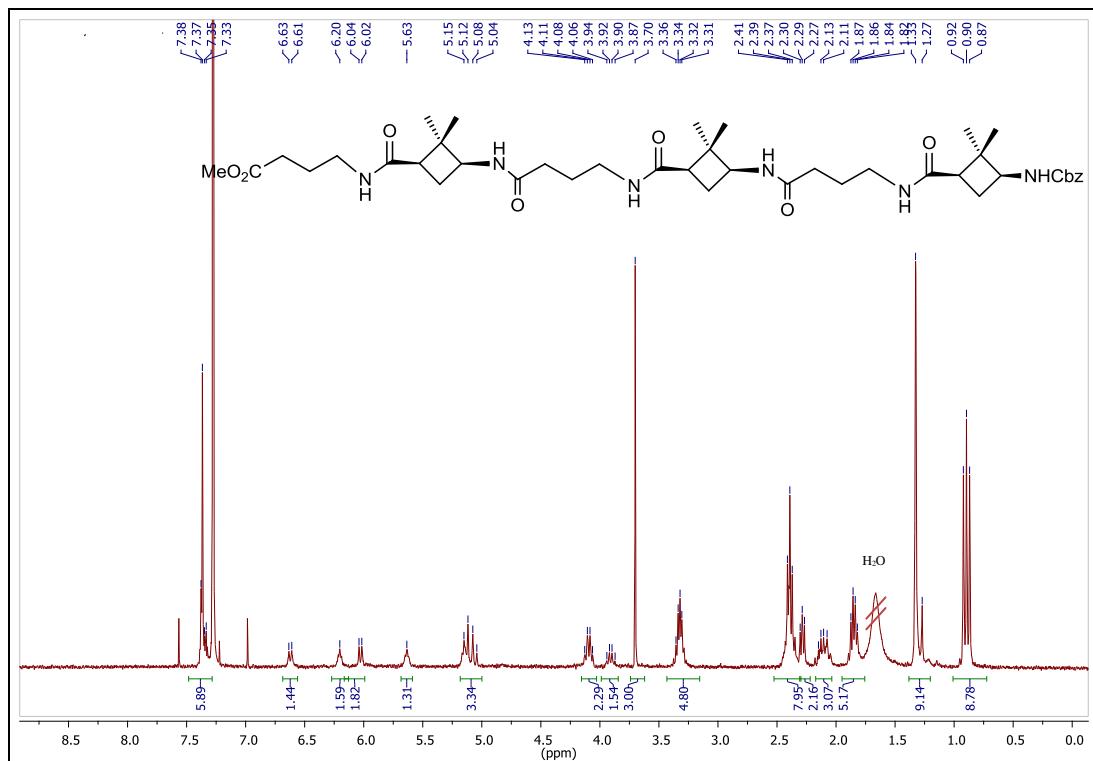


Figura IV. Espectro ^1H -RMN (360 MHz, CDCl_3 a 298K) del γ -hexapéptido híbrido, 28

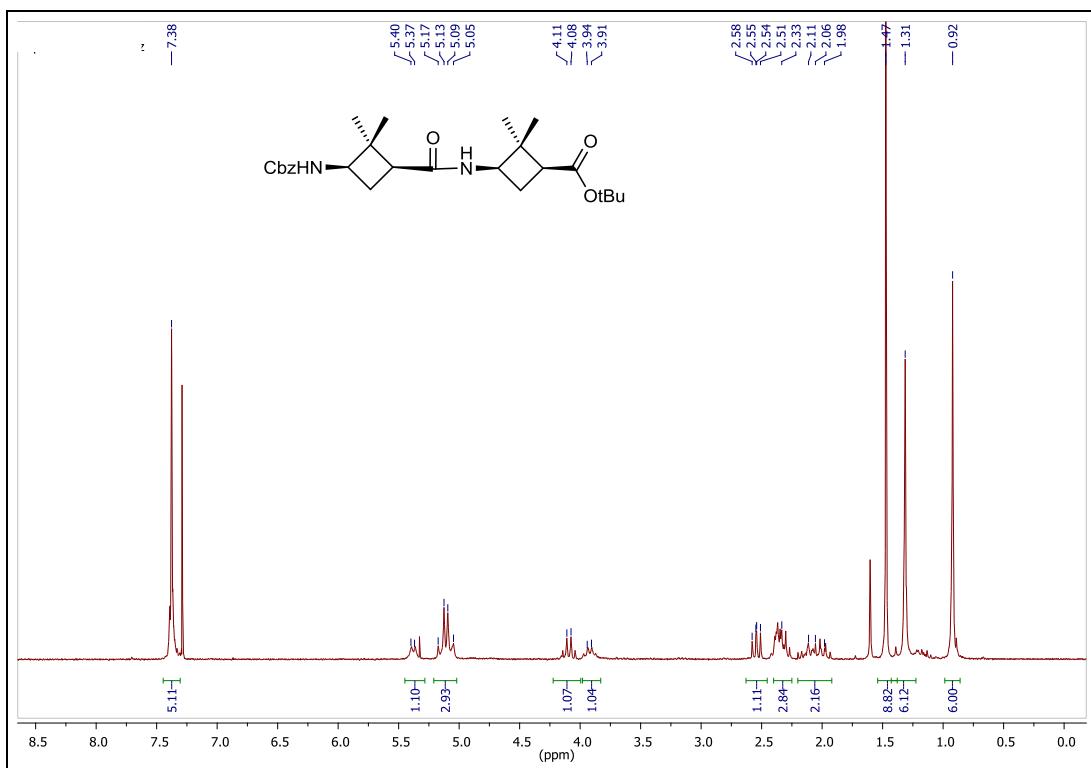
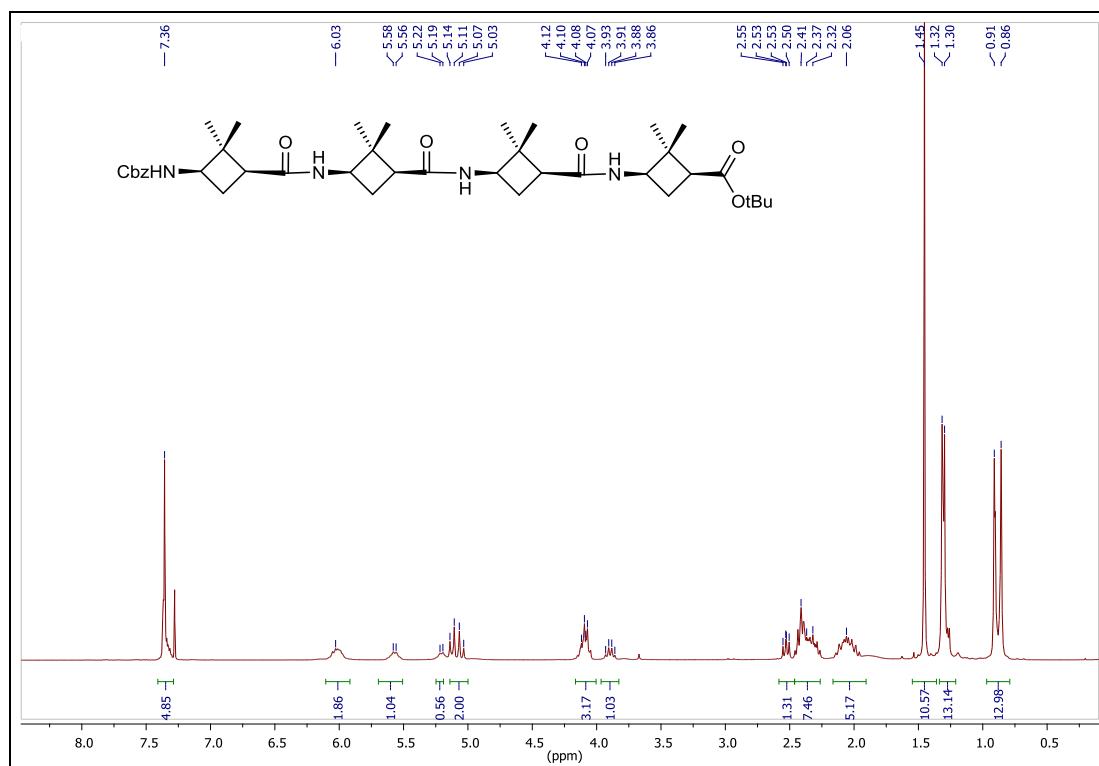


Figura 5. Espectro ¹H-RMN (360 MHz, CDCl₃ a 298K) del γ-dipéptido homoquiral, **29**.



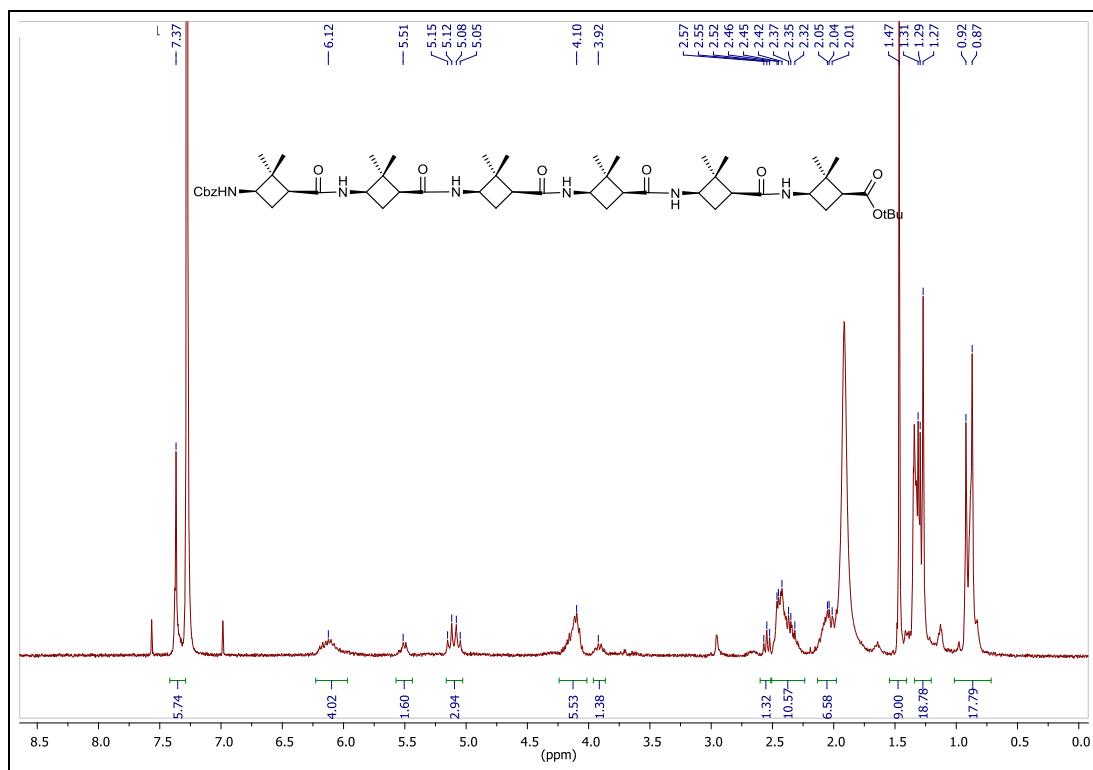


Figura 7II. Espectro ^1H -RMN (360 MHz, CDCl_3 a 298K) del γ -hexapéptido homoquiral, **38**.

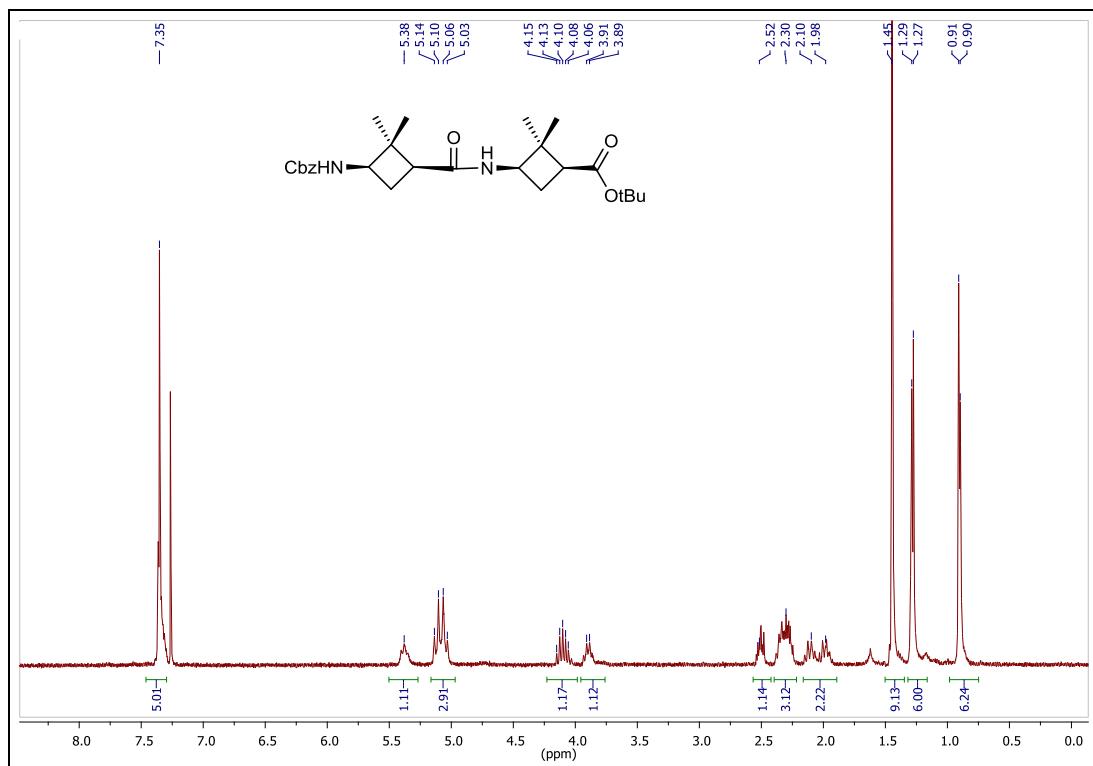


Figura 8III. Espectro ^1H -RMN (360 MHz, CDCl_3 a 298K) del γ -dipéptido heteroquiral, **30**.

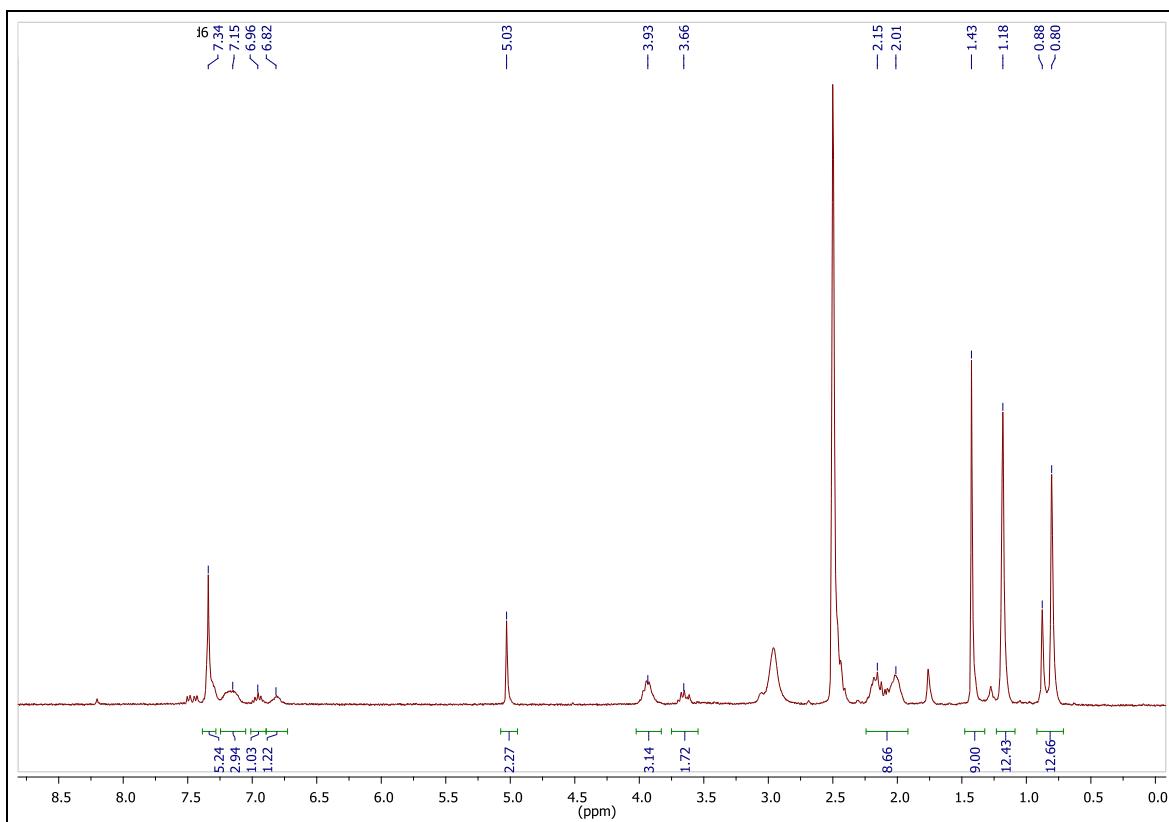


Figura IX. Espectro ^1H -RMN (360 MHz, DMSO-*d*6 a 398K) del γ -tetrapéptido heteroquiral, **36**.

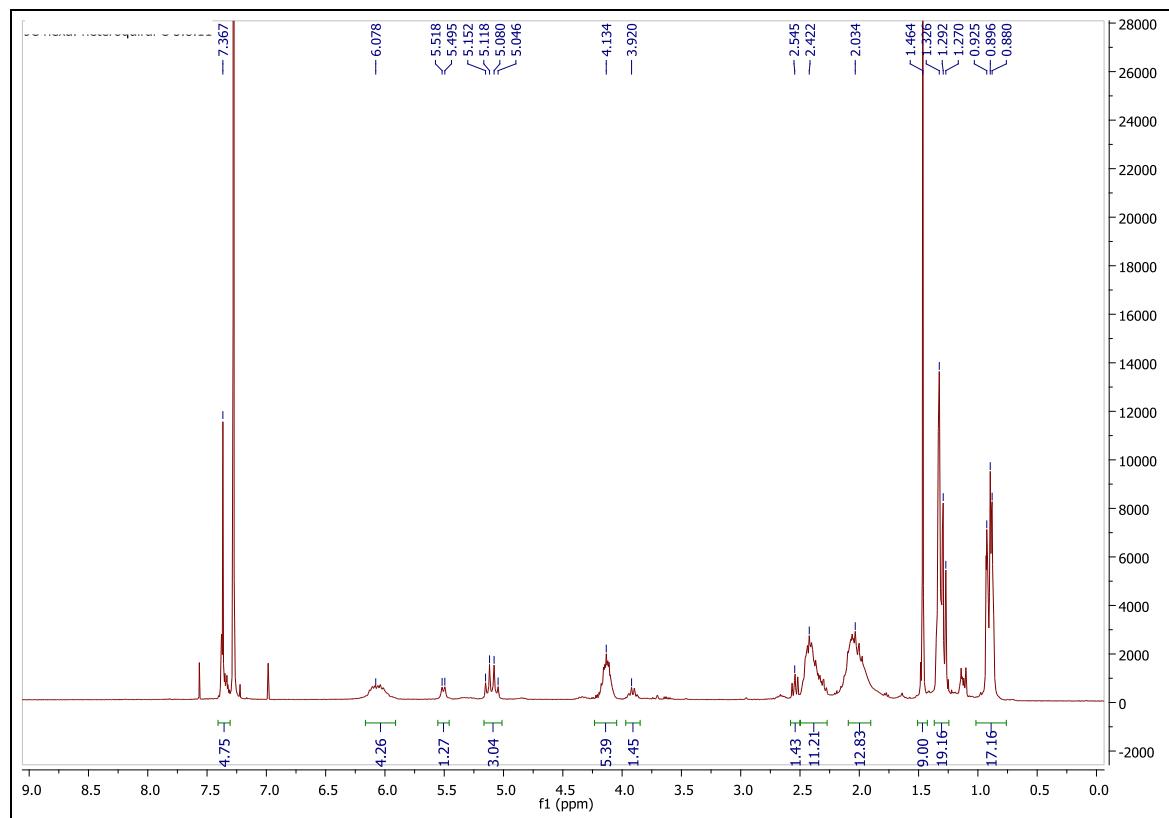


Figura X. Espectro ^1H -RMN (360 MHz, CDCl₃ a 298K) del del γ -hexapéptido heteroquiral, **40**.

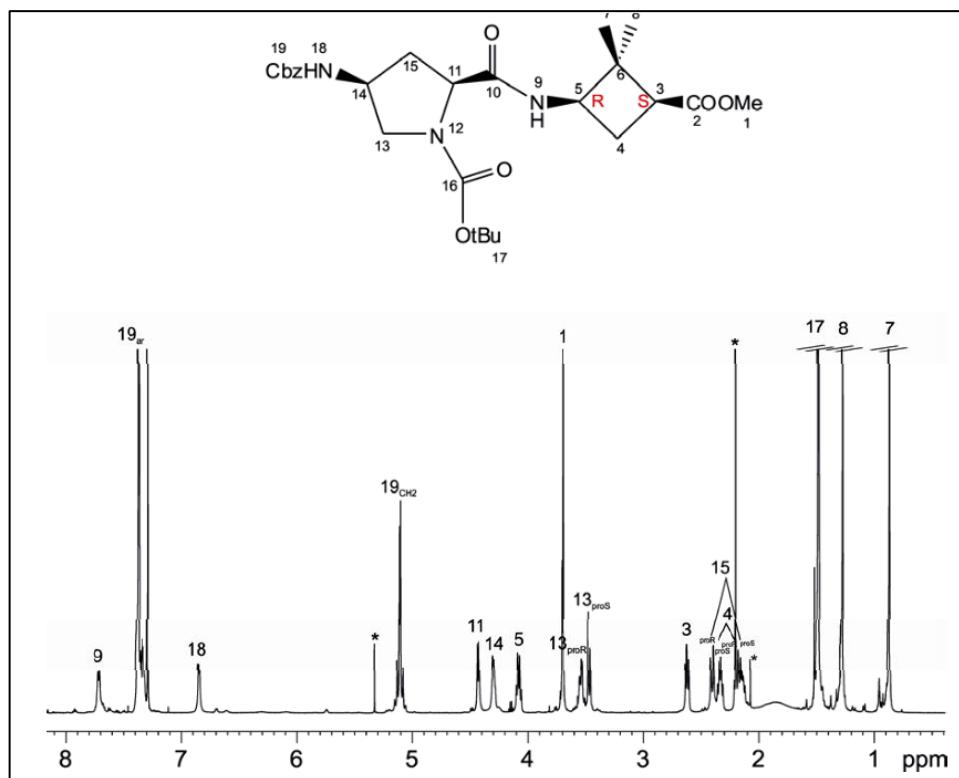


Figura XI. Espectro ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃ a 298K) del γ-dipeptido híbrido ciclobutano-prolina, **42**.

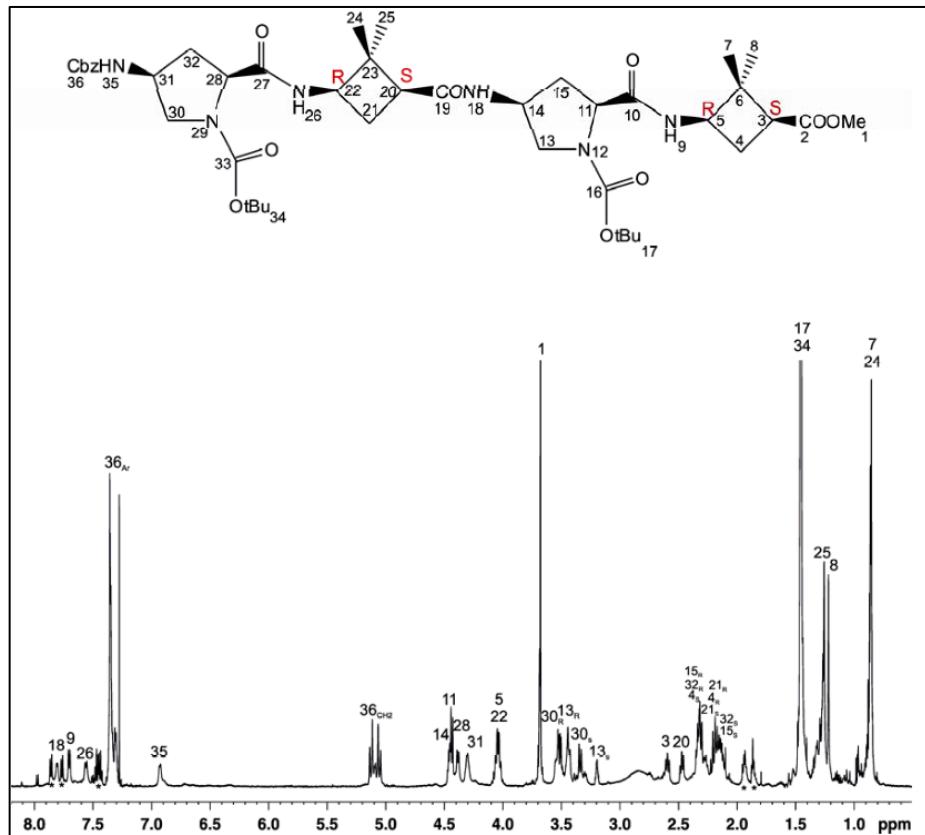


Figura XII. Espectro ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃ a 298K) del γ-tetrapéptido híbrido ciclobutano-prolina, **45**.

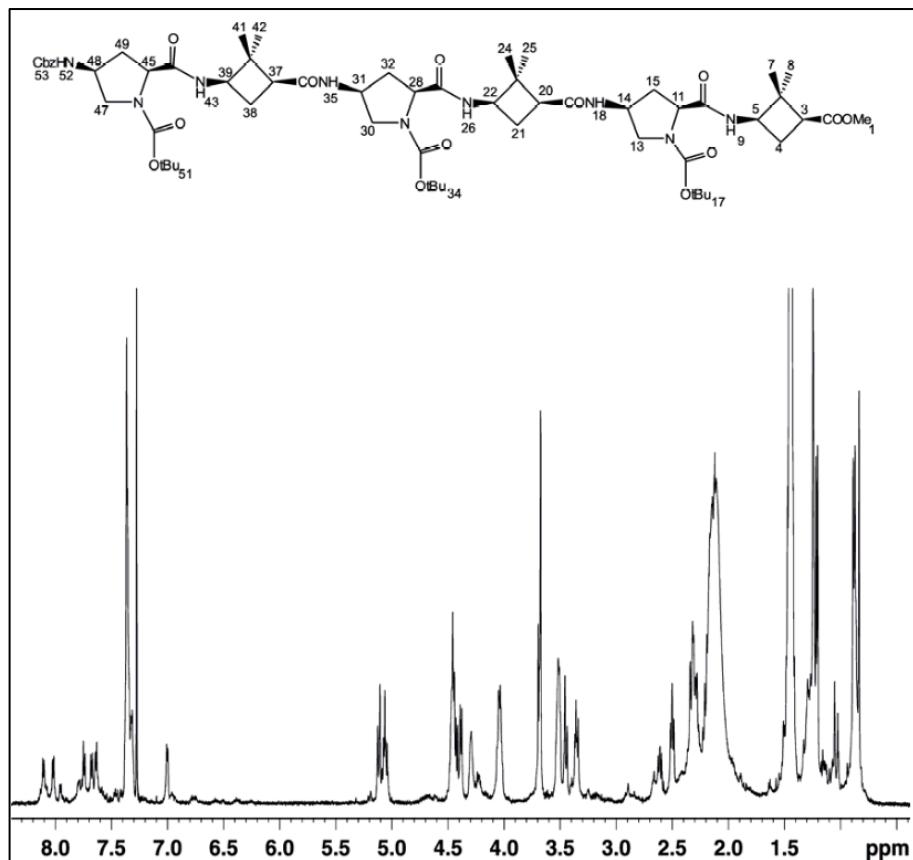
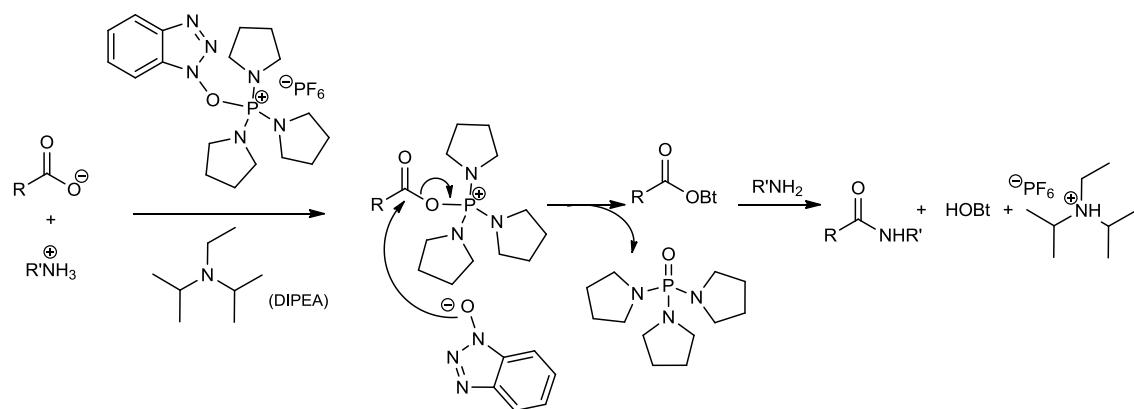
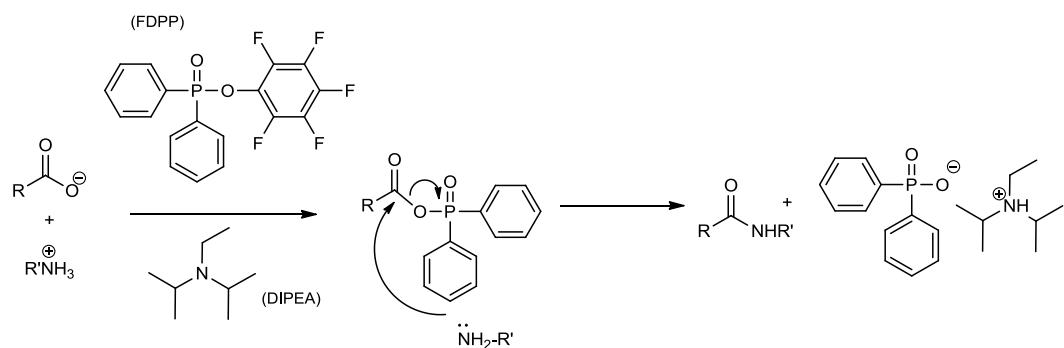


Figura XIII. Espectro ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃ a 298K) del γ-hexapéptido híbrido ciclobutano-prolina, **47**.

ANEXO II

*Esquema I.* Mecanismo de acoplamiento péptidico utilizando el PyBOP*Esquema II.* Mecanismo de acoplamiento péptidico utilizando el FDPP

