

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

**ALFA, GAMMA-NANOTUBOS PEPTÍDICOS:  
DISEÑO Y SÍNTESIS**

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Química  
por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta  
**César Reiriz Armental**  
Santiago de Compostela, Abril 2011

**ISBN 978-84-9887-757-1 (Edición digital PDF)**

D. JUAN RAMÓN GRANJA GUILLÁN, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

CERTIFICA:

Que la memoria adjunta titulada “Alfa, Gamma-Nanotubos Peptídicos: Diseño y Síntesis”, que, para optar al grado de Doctor en Química, presenta D. César Reiriz Armental, ha sido realizada bajo mi dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de esta universidad.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizo su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Santiago de Compostela, a 4 de abril de 2011.

Fdo. Juan R. Granja Guillán



## **Agradecimientos:**

Con el paso del tiempo una persona va acumulando vivencias, y en el desarrollo de una tesis se comparten muchas cosas, y con muchas personas, sin las cuales los hechos vividos no serían los mismos, puede que fuesen mejores pero también podrían ser peores, aunque seguro que serían diferentes. En mi caso durante los últimos cinco años he compartido experiencias con un montón de personas a las que le debo mi gratitud y reconocimiento.

En primer lugar me gustaría dar las gracias al director de esta tesis doctoral, el prof. Juan R. Granja, tengo muchas cosas que agradecerle, ya que sin su confianza, su orientación, sus enseñanzas, y su constante apoyo esta tesis no habría visto la luz.

A los profesores José María Valpuesta y Ramón Eritja, ya que en momentos difíciles nos ofrecieron ayuda, su tiempo y sus laboratorios para que este trabajo siguiese hacia delante. Al profesor Harry L. Anderson de la Universidad de Oxford me dio la oportunidad de trabajar para en su grupo, muchas gracias. El prof. Mark van Raaij, y a los doctores Antonio L. Llamas y Bruno Acuña por sus consejos a la hora de trabajar en la obtención de cristales y su manipulación.

Por supuesto debo recordar a las personas que compartieron su tiempo conmigo en las mesas y vitrinas del laboratorio. En estos años han pasado por el laboratorio muchas personas, y todas, en menor o mayor medida me han influenciado. Debo recordar a los compañeros de mi grupo: Manuel Amorín, Roberto, Rebeca, Jorge, Noel, Arcadio, Lionel, Jordi, Nuria. Y por supuesto también agradecer la compañía y consejos de los miembros de nuestros grupos vecinos, empezando por sus directores: Luis Castedo, Concepción Gonzalez Bello y José Luis Mascareñas, y siguiendo por los miembros de sus grupos: Cristina Sánchez, Verónica, Antia, Sonia, Bea Blanco, Fernando, Ceci, Beatriz Trillo, Lucia, Isaac, Mateo, Cristina Penas, Adrian,... También me acuerdo de nuestros eternos vecinos: Iago, Alejandro y Diego, con los que pase muchísimo tiempo, y momentos que nunca olvidaré. Si me olvido de alguien, lo cual es casi seguro, espero que me perdonen y que sepan que fueron importantes.

Por supuesto merecen una mención especial Eugenio y Elena. Ellos me sufrieron y aguantaron durante todos estos años, su ayuda fue tan importante para mí que no

sabría por donde empezar, simplemente decir que los recordaré siempre, y les estaré muy agradecidos por ser como son.

En estos momentos no sólo me acuerdo de mis compañeros de laboratorio, sino de todas las personas que me ayudaron tanto en el trabajo como fuera de el. En este punto merecen una mención especial Paco “Tomás”, Iván y Bello, su amistad y sus bromas hacían posible olvidarse de los malos momentos, y hacer que estos años fuesen mejores de lo que serían sin haberlos conocido. También le agradezco a mis amigos de Corrubedo su compañía, y ser la mejor vía de escape para olvidar el laboratorio y volver a el con fuerzas renovadas.

Agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la financiación para desarrollar esta tesis doctoral a través de una beca FPU. También agradecer a las entidades financiadoras el dinero aportado para abarcar los diversos proyectos realizados en esta tesis doctoral: MICINN: SAF2007-61015, CTQ2010-15725; CONSOLIDER INGENIO 2010 (CSD2007-00006); y a la Xunta de Galicia: PGIDIT08CSA047209PR y GRC2006/132.

Por último los más importantes, dar las gracias a mis hermanos y a mis padres, ellos fueron los que siempre me motivaron para exigirme más.

*A mi madre y a mi padre*



<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN: .....</b>	<b>11</b>
Nanotubos de carbono y buckminsterfullerenos: .....	14
Nanopartículas:.....	16
Quantum dots:.....	17
SAM (Self-Assembled Monolayers):.....	17
Estructuras tubulares: .....	18
Formación de nanoestructuras a partir de biomoléculas:.....	20
Nanotubos peptídicos a partir de péptidos lineales:.....	21
Nanotubos peptídicos partiendo de péptidos cíclicos: .....	22
<i>D,L</i> - $\alpha$ -Ciclopéptidos:.....	23
$\beta$ -Ciclopéptidos: .....	26
$\delta$ -Ciclopéptidos: .....	28
$\alpha,\epsilon$ -Ciclopéptidos: .....	28
$\alpha,\gamma$ -Ciclopéptidos: .....	29
Diseño:.....	30
Proceso de homodimerización:.....	33
Proceso de heterodimerización:.....	35
Aplicaciones: .....	36
1. Antibacterianos.....	36
2. Canales Iónicos.....	37

3. Biosensores.....	39
4. Biomateriales. ....	40
5. Materiales Fotosensibles.....	41
6. Sistemas Electrónicos.....	42
7. Sistemas Fotosintéticos .....	44
<b>OBJETIVOS: .....</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
Nuevos $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos basados en $\alpha$ -aminoácidos $\alpha,\alpha$ -disustituidos. ....	55
Compuestos formados por el <i>cis</i> - $\gamma$ -ciclopent-2-enocarboxílico y el ácido 2-amino-2-metil-propanoico. ....	59
Compuestos formados por el <i>cis</i> - $\gamma$ -ciclohexanocarboxílico y el ácido 1-aminociclopropanocarboxílico. ....	73
Diseño, síntesis y estudio de $\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos. ....	85
$\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: agrupaciones de nanotubos.....	87
Diseño de los ciclopéptidos:.....	88
Síntesis de los ciclopéptidos: .....	92
Formación de nanotubos, cristalizaciones:.....	96
Caracterización de los cristales:.....	102
$\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: nanotubos individuales. ....	115
Diseño:.....	117
Síntesis:.....	120
Ciclohexapéptidos.....	122
Ciclooctapéptidos.....	126

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL: .....</b>	<b>137</b>
Descripción general, instrumentos y materiales:.....	139
Síntesis en fase sólida, procedimiento general: .....	141
Nuevos $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos basados en $\alpha$ -aminoácidos $\alpha,\alpha$ disustituidos:.....	145
Síntesis del ácido cis-4-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopent-2-enecarboxílico (cis-Boc- $\gamma$ -Ace-OH) y del ácido cis-3-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopentanecarboxílico (cis-Boc- $\gamma$ -Acp-OH).....	145
Síntesis del c-[(L-Ace-Aib) <sub>3</sub> ]-.....	148
Síntesis del ácido cis-3-amino-N-t-butiloxycarbonilciclohexanocarboxílico (cis-Boc- $\gamma$ -Ach-OH):.....	152
Síntesis del c-[(L-Ach-Ac <sub>3</sub> C) <sub>3</sub> ]-.....	154
$\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: agrupaciones de nanotubos.....	155
$\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: nanotubos individuales. ....	160
Microscopía de fuerza atómica (AFM):.....	165
Microscopía de transmisión de electrones (TEM):.....	167
Microscopía de efecto túnel (STM):.....	168
<b>ANEXOS: .....</b>	<b>171</b>
ANEXO I: Pruebas de cristalización.....	173



## **Abreviaturas**



---

$\delta$	Desplazamiento químico (ppm)
Aa	Aminoácido
Ac3c	Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico
Aca	Ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico
$\gamma$ -Ace	Ácido <i>cis</i> -4-aminociclopent-2-enocarboxílico
$\gamma$ -Ach	Ácido <i>cis</i> -3-aminociclohexanocarboxílico
ACN	Acetonitrilo
$\gamma$ -Acp	Ácido <i>cis</i> -3-aminociclopentanocarboxílico
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
$\gamma$ -Ahf	Ácido 4-amino-3-hidroxitetrahidrofuran-2-carboxílico
Aib	Ácido 2-amino-2-metilpropanoico
Ala	Alanina
All	Alilo
Arg	Arginina
$\beta^3$ -HAla	$\beta$ -Homoalanina
Boc	Tert-butoxicarbonilo
(Boc) <sub>2</sub> O	Anhídrido de tert-butoxicarbonilo
c	Cuadruplete
°C	Grados Celsius
Ccf	Cromatografía en capa fina
CP	Ciclopéptido
Cys	Cisteína
d	Doblete
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformiamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC·HCl	Hidrocloruro de la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

## Abreviaturas

---

ee	Exceso enantiomérico
EM	Espectrometría de masas
eq	Equivalentes
ESI	Espectrometría de masas de electrospray
FAB	Espectrometría de masas de bombardeo con átomos rápidos
Fm	9-fluorenilmetil éster
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonilo
FmOH	9-fluorenilmetanol
FT-IR	Espectrometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier
GABA	Ácido 4-aminobutírico
Glu	Ácido glutámico
Gln	Glutamina
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HEPES	Ácido N-2-Hidroxiethylpiperacín-N'-2-etanosulfónico
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
His	Histidina
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía Líquida de alta Resolución
IE	Impacto electrónico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	Grados Kelvin
K <sub>a</sub>	Constante de asociación
Leu	Leucina
m	Multiplete
MALDI-TOF	Espectroscopía de masas de ionización mediante desorción por láser asistida mediante matriz
Me	Metilo

---

MHz	Megahercio
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
MS	Espectrometría de Masas
m/z	Relación masa carga
Mtt	4-metiltritilo
MWNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiples
NDI	1,4,5,8-naftalenotretetracarodiimida
NMM	4-N-metilmorfolina
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PCBA	Ácido [6,6]-fenil-C61-butanoico
PCBM	Éster [6,6]-fenil-C61-butanoato de metilo
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
PyAOP	Hexafluorofosfato de fosfonio de 7-azabenzotriazol-1- iloxitris (pirrolidino)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
r.p.m.	Revoluciones por minuto
s	Singlete
SAM	Surface Assembled Monolayer
STM	Microscopía de Efecto Túnel
SWNT	Nanotubos de carbono de pared sencilla
t	Triplete
TBTU	Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3- tetrametiluronio
<sup>t</sup> Bu	Tert-butilo
TEM	Microscopía de Transmisión Electrónica
TES	Trietilsilano
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol

## Abreviaturas

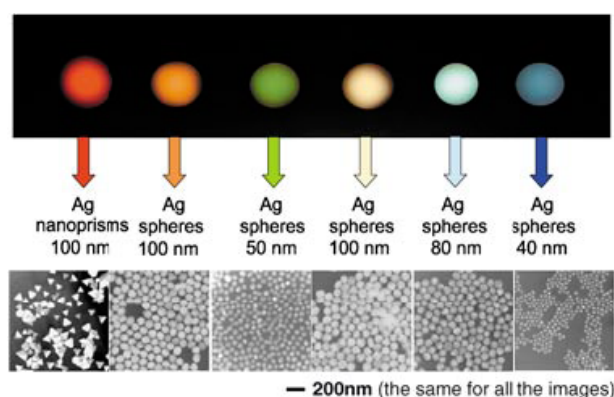
---

THF	Tetrahidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
TMS	Tetrametilsilano
TNBS	Ácido 2,4,6-Trinitrobenceno sulfónico
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina

## **Introducción:**



La “nanociencia” es la rama de la ciencia que se encarga del estudio de los objetos a escala nanométrica, es decir, aquellos cuyos tamaños se encuentran entre 1 y 100 nm. A grandes rasgos se puede decir que uno de los grandes retos de la nanotecnología es la preparación de nuevos materiales funcionales cuyas dimensiones y estructuras estén controlados a nivel molecular o atómico. El objetivo es estudiar cuales son las consecuencias de la miniaturización, un ejemplo clásico es el caso de los metales nobles, cuyas propiedades ópticas, eléctricas y mecánicas se modifican dependiendo de la forma y el tamaño de la partícula, siempre y cuando posea dimensiones menores de 100 nm (figura 1).<sup>1</sup> Debido a la situación en la que se encuentra esta nueva área del conocimiento es necesario desarrollar nuevas estrategias sintéticas para la preparación de estos materiales. Uno de los métodos tradicionalmente usado es la degradación física a partir de objetos de mayores dimensión, el cual es conocido como “método sintético descendente” o “top-down”. Sin embargo, a medida que se pretende alcanzar estructuras de tamaños cada vez menores se encuentran limitaciones cada vez mayores para llevarlo a cabo mediante métodos físicos.



**Figura 1:** Ilustración que muestra como varían las propiedades de los metales nobles con la miniaturización.<sup>1</sup> Copyright 2005 Wiley.

Es por ello que a lo largo de estos últimos años se ha intensificado la búsqueda de métodos alternativos basados en procesos químicos. En estos métodos donde se puede ir desde átomos o moléculas hasta estructuras más complejas, se conocen como “métodos sintéticos ascendentes” o “bottom-up”. Uno de los métodos más importantes es el autoensamblaje molecular, proceso por el cual dos o más componentes se organizan y asocian, de forma autónoma, para dar lugar a superestructuras de forma

<sup>1</sup> Mirkin, C. A. *Small* **2005**, 1, 14-16.

espontánea. El autoensamblaje molecular puede ser de dos clases: dinámico o estático.<sup>2</sup> En el primer caso la interacción responsable de la organización de la estructura tiene lugar disipando energía, como por ejemplo: sistemas solares, y reacciones de difusión.<sup>3</sup> En el segundo caso el sistema está en equilibrio global o local, y no se disipa energía, en este caso la organización de la estructura puede requerir el aporte de energía, como es el caso de los cristales líquidos,<sup>4</sup> y cristales moleculares.<sup>5</sup>

Con los avances que se han realizado en estos últimos años se ha podido abordar el objetivo final de la nanotecnología, que no es otro que usar las nuevas estrategias sintéticas para la obtención de novedosos materiales con nuevas propiedades, que permitan el desarrollo de sistemas y máquinas funcionales capaces de mejorar las condiciones de vida del ser humano.

En la química tradicional los únicos materiales que poseían dimensiones nanométricas eran los polímeros, coloides, y micelas, los cuales se caracterizaban por una baja complejidad estructural. Actualmente existen una amplísima variedad de estructuras, tanto en sus dimensiones y formas como por sus propiedades. El futuro de estos materiales pasa por su obtención a un precio asequible, de tal forma que permita aplicarlos en objetos que a su vez puedan ser vendidos a un coste razonable para los usuarios. A continuación describiremos algunos de los materiales más estudiados hoy en día para llevar a cabo el objetivo mencionado.

### **Nanotubos de carbono y buckminsterfullerenos:**

Los nanotubos de carbono fueron descubiertos por Iijima en el año 1991.<sup>6</sup> Una forma sencilla de definir un nanotubo de carbono es considerarlos como una o varias laminas de grafito plegadas sobre si mismas dando forma de tubo (figura 2). Existen varios tipos de nanotubos de carbono: de pared simple (SWNTs) o de pared múltiple

---

<sup>2</sup> Whitehouse, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, 295, 2418-2421.

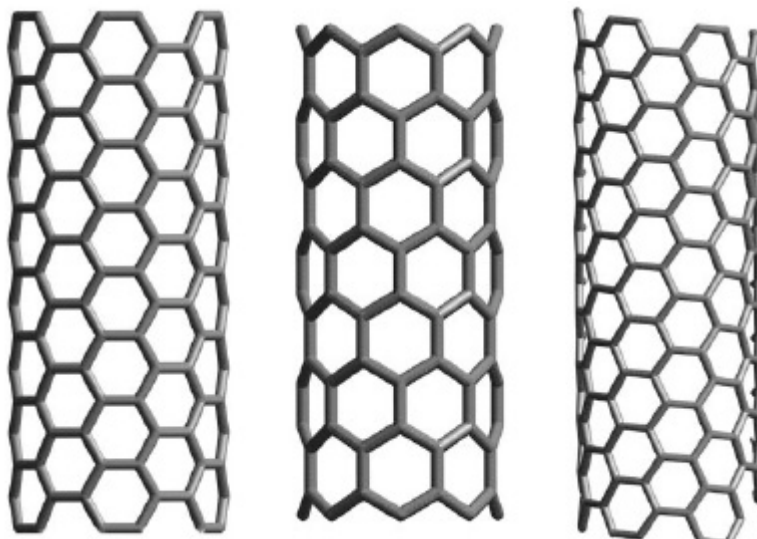
<sup>3</sup> Jakubith, S.; Rotermund, H. H.; Engel, W.; von Oertzen, A.; Ertl, G. *Phys. Rev. Lett.* **1990**, 65, 3013-3016.

<sup>4</sup> Loudet, J. C.; Barois, P.; Poulin, P. *Nature* **2000**, 407, 611-613.

<sup>5</sup> Isaacs, L.; Chin, D. N.; Bowden, N.; Xia, Y.; Whitesides, G. M. in *Supramolecular Materials and Technologies*, John Wiley & Sons Ltd., New York, **1999**, 1-46.

<sup>6</sup> Iijima S. *Nature* **1991**, 354, 56-58.

(MWNTs), en los que hay varios nanotubos concéntricos encapsulados uno dentro de otro a modo de cebollas o matriuskas. Hoy en día es uno de los materiales más usados y estudiados tanto por sus maravillosas propiedades mecánicas como electromagnéticas, ya que pueden comportarse como conductores metálicos o como semiconductores, dependiendo de la dirección del plegamiento de la lamina de grafito que forma el nanotubo.<sup>7</sup>



**Figura 2: Representación de 3 nanotubos diferentes según la dirección que adopta la lamina de grafito.**

Los buckminsterfullerenos<sup>8</sup> o fullerenos son la 3ª forma alotrópica del carbono tras el diamante y el grafito.<sup>9</sup> Los átomos se ordenan de tal forma que dan lugar a moléculas redondas o elipsoides dependiendo del número de carbonos que formen la molécula. Existen varios tipos de fullerenos, pero el más común e importante es el C60, esta molécula está constituida por 60 átomos de carbono que se disponen

<sup>7</sup> Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. *Science* **2002**, 297, 787-792.

<sup>8</sup> Los buckminsterfullerenos deben su nombre al famoso arquitecto Richard Buckminster Fuller, quien diseñó las cúpulas geodésicas. La más famosa se construyó para la Expo Mundial de Montreal celebrada en el año 1967, esta cúpula aún se conserva como museo dedicado al agua y el medioambiente.

<sup>9</sup> Mokeyev, M. V.; Griбанov, A. V.; Sazanov, Yu. N.; Goikhman, M. Y.; Fedorova, G. N. *Russian Journal of Applied Chemistry*, **2005**, 78, 1145-1148.

formando 20 hexágonos y 15 pentágonos, distribuidos de tal forma que ningún pentágono comparten un borde, como sucede en un balón clásico de fútbol.<sup>10</sup>

Estas estructuras son objeto de un gran número de estudios por diversos grupos de investigación de todo el mundo debido a sus propiedades electrónicas y estructurales.<sup>11</sup>

### **Nanopartículas:**

Las nanopartículas son pequeños fragmentos de materia, más o menos esféricos, con una radio que varía entre 2-100 nm.<sup>12</sup> En principio las nanopartículas pueden ser de diversos materiales, metálicas: Au, Ag, etc. o materiales semiconductores: CdSe o ZnS, que son los más estudiados. Las nanopartículas son interesantes, debido a que dependiendo de su tamaño o diámetro estas presentan diferentes propiedades de absorción-emisión de electrones, agregación, niveles energéticos, solubilidad e interacciones con los sistemas biológicos.

Las nanopartículas, normalmente, se usan como una suspensión en algún disolvente, es decir, tenemos 2 fases: una es un sólido en suspensión, las nanopartículas, y la segunda es un disolvente líquido. Este sólido no se separa mediante precipitación debido a que las nanopartículas son demasiado pequeñas, y a que están recubiertas de diferentes grupos para prevenir su agregación.

Los métodos más comunes para la obtención de las nanopartículas son mediante degradación física de materiales de mayor tamaño. El primer método fue desarrollado en 1951 por Turkevich et. al.,<sup>13</sup> el método consiste en reducir el tetraclorato de oro (III) con citrato sódico, de esta forma se obtienen nanopartículas de entre 10-20 nm, suelen ser de color púrpura pero a veces son rojo oscuro. Otro método es tratar el  $[\text{AuCl}_4]^-$  con borhidruro sódico en presencia de bromuro de tetraoctilamonio, el solubilizador de la nanopartículas. Estos métodos también se pueden usar con otros metales con Ag ( $\text{AgNO}_3$ ), Pd ( $\text{H}_2[\text{PdCl}_4]$ ) y Pt ( $\text{H}_2[\text{PtCl}_6]$ ).<sup>14</sup>

---

<sup>10</sup> Martin N.; Sánchez L.; Illescas B.; Pérez I. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2527-2547.

<sup>11</sup> Giacalone, F.; Martín, N. *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4220-4248.

<sup>12</sup> Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, Chichester, **2009**.

<sup>13</sup> J. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday. Soc.* **1951**, 11, 55-75.

<sup>14</sup> Li, H.; Jo, J. K.; Zhang, L. D.; Ha, C-S.; Suh, H.; Kim, I. *Langmuir* **2010**, 26, 18442-18453.

### Quantum dots:

Los quantum dots son nanopartículas que contienen sólo unos cientos de átomos de un material semiconductor, como por ejemplo: CdS, CdSe o ZnS que son capaces de aceptar un par de electrones, los cuales quedan confinados en una “caja” de 3 dimensiones.<sup>12,15</sup> Lo más común es que sean pequeñas partículas fluorescentes de un material semiconductor cubierto de algún compuesto que prevenga la hidrólisis o la agregación, como por ejemplo: seleniuro de cadmio cubierto de óxido de zinc.

Son materiales muy importantes ya que no pierden color con el tiempo ni con la exposición a la luz (photobleaching), el segundo motivo es su fácil manufacturación en un amplio rango de tamaños y gama de colores, debido a estas propiedades se están usando en ordenadores y otros equipos electrónicos. Pero su aplicación a nivel biológico, igual que las nanopartículas, está encontrando complicaciones por la baja solubilidad de estos compuestos así como a su alta toxicidad.<sup>16,17</sup>

### SAM (Self-Assembled Monolayers):

Las SAMs<sup>18</sup> consisten en uno o varios tipos de moléculas surfactantes organizados sobre una superficie.<sup>19,20</sup> Estos materiales tienen un amplio uso en aplicaciones que requieren la modificación de las propiedades de las superficies metálicas, entre las cuales se pueden destacar, sensores, reconocimiento de moléculas, nanomateriales, modificación de superficies para biocompatibilización, y control de la propiedades superficiales como: corrosión, fricción, mojado y adhesión.<sup>21</sup> Estas

---

<sup>12</sup> Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, Chichester, **2009**.

<sup>15</sup> Whitesides, G. M.; Love, J. C. *Scientific American* **2001**, 39-47.

<sup>16</sup> Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547-1562.

<sup>17</sup> Barth, J. V.; Costantini, G.; Kern, K. *Nature* **2005**, 437, 671-679.

<sup>18</sup> El uso del termino SAMs, acrónimos inglés de “surface assembled monolayers”, esta muy afianzado en el vocabulario científico español por lo que se decidió no traducirlo.

<sup>19</sup> Huo, Q. D.; Margolese, D. I.; Ciesla, U.; Feng, P. Y.; Gier, T. E.; Sierger, P.; Leon, R.; Petroff, P. M.; Schuth, F.; Stucky, G. D. *Nature* **1994**, 368, 317-320.

<sup>20</sup> Calhoun, M. F.; Sanchez, J.; Olaya, D.; Gershenson, M. E.; Podzorov, V. *Nature Materials* **2008**, 7, 84-9.

<sup>21</sup> Schwartz, D. K. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, 52, 107-137.

superficies también se usan para ayudar a la organización de otras moléculas, en lo que se denomina “nanopatrones” (termino inglés: nanopattern).<sup>22</sup> De esta forma se puede controlar la forma y el tamaño de los materiales que se desean depositar sobre una superficie, del mismo modo se pueden preparar biosensores que tengan afinidad por células, proteínas o moléculas.<sup>23</sup>

### **Estructuras tubulares:**

Hasta el momento se resumió brevemente diferentes materiales de gran relevancia en el campo de la nanociencia, pero también se pueden clasificar según su forma o estructura, encontrándose una amplia gama de posibilidades: redes,<sup>24</sup> esferas,<sup>25</sup> capsulas,<sup>26</sup> laminas,<sup>20</sup> en este abanico de estructuras han demostrado una gran relevancia aquellas que presentan forma tubular, denominados nanotubos.<sup>27,28</sup> Los nanotubos poseen ciertas características que los hacen especialmente atractivos sobre otro tipo de diseños, como por ejemplo: poseen un volumen en su interior en el cual pueden penetrar moléculas o biomoléculas de diferentes tamaños, esto los hace especialmente atractivos para el transporte de fármacos. Otra característica importante es que la cavidad interior es diferente a la externa, se trata de un mundo unidimensional en el que se cree que las propiedades de las moléculas situadas en el interior son diferentes, es muy posible que muchas de las propiedades posean características cuánticas.<sup>29</sup> Finalmente los nanotubos tienen una entrada y una salida, lo cual permite el paso reversible de una molécula, sea gas, líquido, o sólido. Esto los

---

<sup>22</sup> Garcia, R.; Martinez, R. V.; Martinez, J. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 29–38.

<sup>23</sup> Smith, R. K.; Lewis, P. A.; Weiss, P. S. *Progress in Surface Science* **2004**, 75, 1–68.

<sup>24</sup> Lehn, J. M. *Science* **2002**, 295, 2400-2403.

<sup>25</sup> Martín, M.; Sánchez, L.; Illescas, B.; Pérez, I. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2527-2547.

<sup>26</sup> Rebek, J. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106, 10423-10424.

<sup>20</sup> Calhoun, M. F.; Sanchez, J.; Olaya, D.; Gershenson, M. E.; Podzorov, V. *Nature Materials* **2008**, 7, 84-9.

<sup>27</sup> Martin, C. R.; Kohli, P. *Nature Reviews* **2003**, 2, 29-37.

<sup>28</sup> Langley, P. J.; Hulliger, J. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, 28, 279-291.

<sup>29</sup> Amdursky, N.; Molotskii, M.; Gazit, E.; Rosenman, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15632-15636.

hace muy interesantes para el diseño de nanoreactores (selectividad dependiente del tamaño), catálisis heterogénea, síntesis, sensores químicos o almacén de materiales.<sup>28</sup>

Desde el descubrimiento de los nanotubos de carbono de Iijima se han desarrollado diferentes diseños para la obtención de estructuras tubulares (figura 3).<sup>30,31</sup> Uno de estos métodos se basa en el empleo de una lamina de 2 dimensiones, que se puede enrollar sobre si misma, uno de los ejemplos más característicos son los nanotubos lipídicos.<sup>32</sup> Un segundo método consiste en el empleo de largas moléculas lineales que se pliegan sobre si mismas formando hélices, por ejemplo la gramicidina A, que forma conductos transmembranales. La Gramicidina A es un péptido que contiene 18 residuos en los que se alternan aminoácidos de configuración *D* y *L*, los cuales se pliegan formando una hélice  $\delta$ , la estructura dimérica deja un orificio central lo suficientemente grande para permitir el paso de iones alcalinos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), de tal forma que se rompe el equilibrio iónico de la célula.<sup>33</sup> Un tercer método desarrollado se basa en el agrupamiento de subunidades moleculares rígidas, que a modo de listones forman una superestructura con forma de barril molecular.<sup>34</sup> La última estrategia consiste en el apilamiento de moléculas con forma de discos, con un interior hueco, o fragmentos de discos que se unen para dar lugar a materiales porosos, el ejemplo más conocido es el del virus del mosaico del tabaco (TMV: tabacco mosaic virus),<sup>35,36,37</sup> el cual está constituido por 2130 subunidades proteicas formada cada una por 158 aminoácidos, estas se agrupan entorno a una molécula de ARN, de 6400 residuos, que es la que actúa como guía de todo el proceso, formando una estructura cilíndrica de

---

<sup>30</sup> Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988-1011.

<sup>31</sup> Brea, R. J.; Reiriz, C.; Granja, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1448-1456.

<sup>32</sup> Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401-1443.

<sup>33</sup> Roux, B. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 366-375.

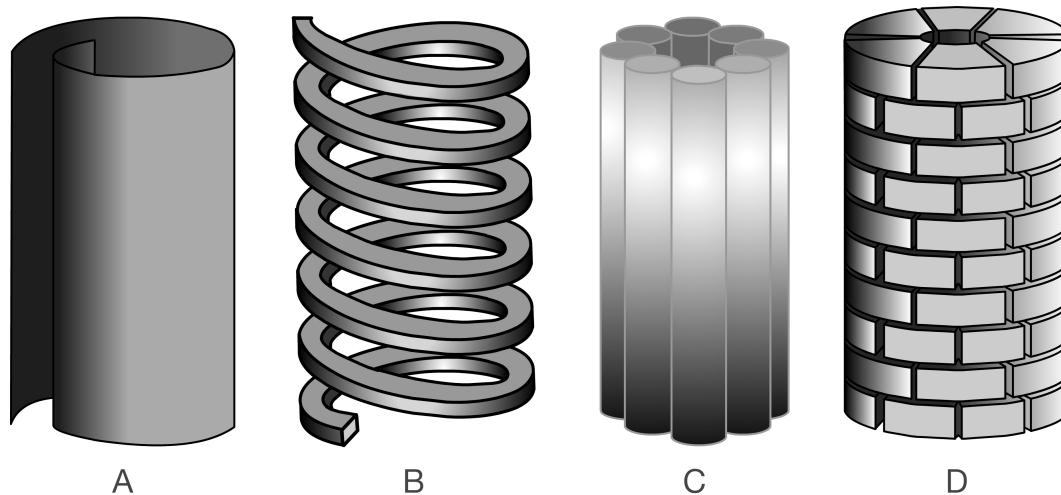
<sup>34</sup> Sakai, N.; Mareda, J.; Matile, S. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 79-87.

<sup>35</sup> Champness, J. N.; Bloomer, A. C.; Bricogne, G.; Butler, P. J. G.; Klug, A. *Nature* **1976**, *259*, 20-24.

<sup>36</sup> Bloomer, A. C.; Champness, J. N.; Bricogne, G.; Staden, R.; Klug, A. *Nature* **1978**, *276*, 362-368.

<sup>37</sup> Namba, K.; Pattanayek, R.; Stubbs, G. *J. Mol. Biol.* **1989**, *208*, 307-325.

más de 250 nm de longitud. El reconocimiento molecular juega un papel muy importante en el autoensamblaje, ya que la selección de las subunidades y su adecuada orientación es lo que guía la formación de la superestructura.



**Figura 3: Representación de las estrategias comúnmente usadas para la formación de estructuras tubulares:** A) Lámina de dos dimensiones plegada sobre si misma; B) Molécula lineal que se pliega formando hélices que poseen un canal interior; C) Listones agrupados en forma de barriles; D) Fragmentos de discos que se unen dejando un canal en el interior.

### **Formación de nanoestructuras a partir de biomoléculas:**

En la naturaleza, la célula es la encargada de fabricar nanomateriales biológicos en unas condiciones de presión y temperatura muy suaves. Biomoléculas, como péptidos y proteínas, sufren procesos de autoensamblaje molecular tanto *in Vivo* como *in Vitro*, dando lugar a estructuras de escala nanométrica, todo ello bajo condiciones ambientales. Mediante el autoensamblaje molecular los péptidos dan lugar a diversas estructuras como nanohilos, nanotubos o nanopartículas.<sup>38</sup> Usando estos procesos de autoensamblaje y de reconocimiento molecular, la bionanotecnología puede dar lugar al desarrollo de diversos dispositivos con propiedades mejoradas respecto a otros materiales, exceptuando tal vez sus propiedades electrónicas.

La formación de nanotubos mediante el autoensamblaje de péptidos puede clasificarse de forma sencilla en dos clases, según la unidad básica sean: péptidos lineales o péptidos cíclicos.

---

<sup>38</sup> Gao, X. Y.; Matsui, H. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2037-2050.

### Nanotubos peptídicos a partir de péptidos lineales:

Se conoce que la agregación de péptidos esta relacionada con un amplio número de enfermedades neurológicas. La perdida de solubilidad de muchos péptidos mediante autoensamblaje, para dar lugar a  $\beta$ -amiloides u otros agregados tipo ovillos neurofibrilares, es el origen de enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson.<sup>39,40</sup> Los estudios de estas enfermedades se usan para prevenir la formación de estos agregados moleculares basados en hojas plegadas  $\beta$ . El conocimiento de las bases estructurales, y los factores termodinámicos y cinéticos que gobiernan la formación de estos agregados moleculares permitirá en un futuro, no sólo ayudar a la detección temprana de estas enfermedades, sino también a su prevención, y lo que es más importante a la cura. Este conocimiento también se ha usado en el desarrollo de nuevas estructuras supramoleculares dirigidas a la preparación de nuevos materiales.

Una clase de nanotubos peptídicos son los basados en la organización de pequeños péptidos aromáticos. Con los estudios estructurales llevados a cabo con pequeños péptidos derivados de aquellos que forman proteínas  $\beta$ -amiloides, se pudo determinar que el dipéptido de difenilalanina es fundamental en la formación de estas estructuras, encontrándose adicionalmente que en condiciones adecuadas dan lugar a estructuras tubulares. Estos nanotubos son extraordinariamente rígidos, y se forman espontáneamente al pasar de una disolución orgánica a una acuosa, o simplemente mediante calentamiento a elevadas temperaturas y posteriormente dejando enfriar la disolución.<sup>41</sup> Recientemente se han podido preparar nanotubos, de forma eficiente, mediante deposición de vapor.<sup>42</sup>

El empleo de residuos polares y apolares en la síntesis de polipéptidos, así como el orden en la secuencia peptídica parece determinar la longitud y dimensiones del nanotubo.<sup>43</sup> Así se estableció que la formación de estas estructuras está determinada por la secuencia peptídica. Recientemente y como consecuencia de los estudios

---

<sup>39</sup> Harper, J. D.; Lansbury, P. T. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 385-407.

<sup>40</sup> Sipe, J. D.; Cohen, A. S. *J. Struct. Biol.* **2000**, 130, 88-98.

<sup>41</sup> Gazit, E. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1263-1269.

<sup>42</sup> Shklovsky, J.; Beker, P.; Amdursky, N.; Gazit, E.; Rosenman, G. *Materials Science & Engineering B*, **2010**, 169, 62-66.

<sup>43</sup> Wang, W. X.; Hecht, M. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 2760-2765.

estructurales llevados a cabo, se han diseñado péptidos capaces de dar lugar a agregados moleculares con forma tubular. En general, se puede decir que la base de este proceso se basa en que cada unidad básica contiene un final “adherentes” que le permite unirse selectivamente con su complementario, se diseñaron y sintetizaron nanotubos con diferentes formas: rectos, flexibles, y en forma de “T”.

También se usan moléculas anfifílicas que pueden autoensamblarse siguiendo el modelo del virus del mosaico del tabaco. Un ejemplo son los compuestos desarrollados por el Prof. Percec y colaboradores, moléculas anfipáticas que poseen una cadena polar en un extremo y tres cadenas alquílicas en el lado opuesto. Estas moléculas se agrupan situando los grupos hidrofílicos hacia el interior y los hidrofóbicos hacia el exterior, formando una columna que deja un canal interno.<sup>44,45</sup>

Otra alternativa estudiada es la tendencia de los péptidos formados por glicinas para formar hélices alfa, desarrollándose compuestos capaces de formar nanotubos dependiendo del pH.<sup>46,47,48</sup> Por ejemplo, el bis(*N*- $\alpha$ -amida-glicilglicina)-1,7-heptanodicarboxilato da lugar a nanotubos en dimetilsulfóxido a pH 5. Se han estudiado casos en los que la modificación superficial de estos nanotubos permite fijar, mediante enlaces no covalentes, moléculas metálicas (Au) o identificar biomoléculas.<sup>49,50,51,52</sup>

### **Nanotubos peptídicos partiendo de péptidos cíclicos:**

Hasta el momento se describió la importancia de la nanociencia y de la nanotecnología, así como las diferentes áreas hacia las que está enfocada, los diversos

---

<sup>44</sup> Percec, V.; Johansson, G.; Ungar, G.; Zhou, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9855-9866.

<sup>45</sup> Percec, V.; Ahn, C-H.; Bera, T. K.; Ungar, G.; Yearley, D. J. P. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1070-1083.

<sup>46</sup> Kogiso, M.; Masuda, M.; Shimizu, T. *Supramol. Chem.* **1998**, *9*, 183-189.

<sup>47</sup> Matsui, H.; Gologan, B. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3383-3386.

<sup>48</sup> Shimizu, T.; Kogiso, M.; Masuda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6209-6210.

<sup>49</sup> Banerjee, I. A.; Yu, L.; Matsui, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9542-9543.

<sup>50</sup> Douberly, G. J.; Pan, S.; Walters, D.; Matsui, H. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 7612-7618.

<sup>51</sup> Djalali, R.; Chen, Y.-F.; Matsui, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13660-13661.

<sup>52</sup> Matsui, H.; MacCuspie, R. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 671-675.

materiales que están siendo investigados, y las distintas estrategias para producirlos. A partir de este punto la discusión se centrará sobre el tema que más nos interesa, el estudio de los nanotubos peptídicos a partir de ciclopéptidos capaces de autoensamblarse.

### ***D,L*- $\alpha$ -Ciclopéptidos:**

En el año 1974, De Santis y colaboradores plantearon mediante estudios teóricos, y partiendo del conocimiento de la estructura de la Gramicidina D, la posibilidad de formar nanotubos mediante un proceso de autoensamblaje molecular, en el que participaban ciclopéptidos formados por un número par de  $\alpha$ -aminoácidos de estereoquímica *D* y *L* alternada.<sup>53</sup> Estos péptidos podían adoptar una conformación plana, de tal forma que los enlaces de amida quedaban en disposición perpendicular al plano del anillo peptídico. De esta manera el carbonilo de un péptido participaría en un enlace de hidrógeno con un NH de la molécula vecina de forma similar a una hoja plegada  $\beta$ , produciéndose así el sucesivo apilamiento de unidades cíclicas y dando lugar a la formación de un nanotubo. Es importante resaltar que en este diseño las cadenas laterales de los ciclopéptidos tienen disposición ecuatorial, es decir, están orientadas al exterior de la estructura resultante, lo que en un principio permitiría modificar las propiedades externas del nanotubo según la secuencia peptídica usada.

Los primeros estudios realizados para demostrar las propuestas de De Santis fueron realizadas por el Prof. Lorenzi y colaboradores,<sup>54</sup> en el año 1989 presentó los estudios de rayos X de los ciclohexapéptidos: *c*-[(*D*-Phe-*L*-Phe)<sub>3</sub>-] y *c*-[(*D*-Val-*L*-Val)<sub>3</sub>-], en ellos no se observa la asociación entre las diferentes subunidades peptídicas, sino que los ciclopéptidos estaban formando enlaces de hidrógeno con varias moléculas de disolvente. De todas formas se podía observar que estos péptidos adoptaban la conformación plana propuesta inicialmente.<sup>55</sup>

En el año 1993, en el grupo de investigación del Prof. Ghadiri obtuvieron los primeros nanotubos peptídicos mediante el autoensamblaje molecular de *D,L*- $\alpha$ -

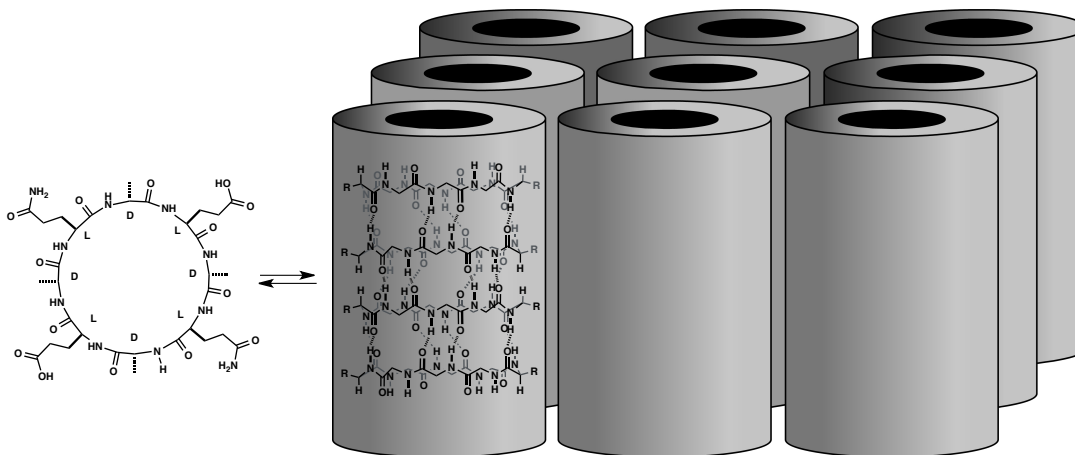
---

<sup>53</sup> De Santis, P.; Morosetti, S.; Rizzo, R. *Macromolecules* **1974**, *7*, 52-58.

<sup>54</sup> Tomasic, L.; Lorenzi, G. P. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1012-1016.

<sup>55</sup> Pavone, V.; Benedetti, E.; Blasio, B. D.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Lorenzi, G. P. *Biopolymers* **1989**, *28*, 215-223.

ciclopéptidos (figura 4).<sup>56</sup> El ciclopéptido seleccionado fue el  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)<sub>2</sub>]-, el cual gracias a las glutaminas presenta una buena solubilidad en medios acuosos básicos, así mediante un lento cambio de pH se reduce su solubilidad, de esta forma se obtuvieron microcristales que fueron estudiados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de electrones y espectroscopía FT-IR.



**Figura 4:** Estructura del  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)<sub>2</sub>]-, precursor de los primeros nanotubos peptídicos. Representación del modelo del nanotubo y los correspondientes materiales porosos.

Los cristales estaban formados por haces de nanotubos dispuestos paralelamente, con una longitud entre 10-30  $\mu\text{m}$ , y un diámetro entre 100-500 nm. La celdilla unidad tenía las siguientes dimensiones:  $a = 9.5 \text{ \AA}$ ,  $b = c = 15.1 \text{ \AA}$ , en ella estaban incluidas 2 unidades peptídicas, es decir que cada ciclopéptido ocupa  $4.73 \text{ \AA}$  en el eje  $a$ . La celdilla unidad calculada por difracción de electrones es de  $4.73 \text{ \AA}$  y  $14.92 \text{ \AA}$ , pero cuando se calculan los diagramas de difracción, por cada dos niveles se elimina uno debido a la pseudosimetría del dímero. El análisis de IR demostró que los ciclopéptidos se apilan formando estructuras de lamina  $\beta$  antiparalela. El estudio del  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)<sub>3</sub>]- permitió demostrar que se puede controlar el diámetro del nanotubo simplemente variando el número de aminoácidos que forman el ciclopéptido, esta es una de las grandes ventajas que posee esta estrategia, algo que no es fácil de controlar en los otros métodos usados para la obtención de nanotubos, por ejemplo en los nanotubos de carbono se trabaja con mezclas de diferentes grosores, y el separar estos según sus diámetros es un proceso caro y difícil. Muchas de las propiedades propuestas

<sup>56</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, 366, 324-327.

para los nanotubos: transporte, encapsulación, catálisis, almacenaje, etc. depende directamente del diámetro de los mismos.

En trabajos posteriores se profundizó en el estudio de esta familia de nanotubos peptídicos, en esos ensayos se evaluó la efectividad del empaquetamiento de los nanotubos al aumentar la superficie hidrofóbica del tubo, así como disminuir la cantidad de grupos aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Para llevar a cabo este objetivo los aminoácidos hidrofóbicos seleccionados fueron alaninas, valinas, leucinas y fenilalaninas, mientras los residuos polares que permiten modular la solubilidad del ciclopéptido fueron glutaminas. Los ciclopéptidos estudiados,  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Ala)<sub>4</sub>],  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Leu)<sub>4</sub>],  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Phe)<sub>4</sub>],  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Val)<sub>4</sub>], también formaban agujas microcristalinas mediante un proceso de ensamblaje inducido por el cambio de pH. Los péptidos eran solubles en pH ácido (disolución de ácido trifluoroacético) donde los grupos amida se encuentran protonados, y se autoensamblaban cuando se basificaba lentamente, aumentando los efectos hidrofóbicos al añadirse agua. Los microcristales, que nuevamente resultaron ser demasiado pequeños para su caracterización mediante difracción de rayos X, fueron caracterizados mediante TEM y FT-IR, demostrando que la formación de los nanotubos tenía lugar, y que las interacciones de los grupos isobutilo eran las más adecuadas para el autoensamblaje.

Como se ha visto, el estudio de los *D,L*- $\alpha$ -nanotubos se ha llevado a cabo mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), difracción de electrones, y espectroscopía FT-IR, a día de hoy ninguna de estas estructuras ha podido caracterizarse a nivel atómico mediante difracción de rayos X, ni tampoco se han realizado estudios de los factores energéticos que dan lugar a la formación de los nanotubos. Con la finalidad de entender mejor los procesos que dan lugar al autoensamblaje, se diseñaron sistemas en los que sólo es posible la formación de estructuras constituidas por dos ciclopéptidos, impidiendo la formación de nanotubos, de esta forma se reducen las complicaciones derivadas del apilamiento múltiple como, por ejemplo, la baja solubilidad que presentan estas estructuras supramoleculares. Para llevar a cabo esta idea, era necesario eliminar los grupos dadores de los enlaces de hidrógeno de una de las caras del ciclopéptido, lo cual se podía conseguir mediante la alquilación selectiva de los grupos amida de los residuos con la misma quiralidad.

Basándose en esta idea, Lorenzi y colaboradores presentaron la primera estructura de rayos X de un dímero de ciclohexapéptidos,  $c\text{-}[(D\text{-Leu-L-MeN-Leu})_3\text{-}]$ .<sup>57,58</sup> Casi simultáneamente el grupo del Prof. Ghadiri realizó un estudio con octapéptidos que posteriormente amplió a diferentes ciclopéptidos, que incluyeron ciclo tetra-, hexa-, octa-, deca-, dodeca-péptidos. De estos estudios se deduce que los ciclos formados por ocho residuos eran los más favorables para que se produzca el autoensamblaje molecular, los ciclotetrapéptido no daban lugar a dímeros debido a la incapacidad de estos de adoptar la conformación plana requerida para que este proceso tenga lugar, mientras decameros y dodecameros eran demasiado flexibles dando lugar a plegamientos que impedían la dimerización a través de la conformación plana.<sup>59,60</sup> En estas estructuras se confirmó que los ciclopéptidos se agrupan con una constante de asociación que puede llegar a ser  $2540 \text{ M}^{-1}$  en cloroformo, para el caso del  $c\text{-}[(L\text{-Phe-D-MeN-Ala})_4\text{-}]$ . También se realizaron estudios termodinámicos, demostrando que el autoensamblaje molecular es un proceso fundamentalmente entálpico, en el que cada enlace de hidrógeno aporta, únicamente, entre  $0.5$  y  $0.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . Adicionalmente, estudios realizados con dos péptidos enantioméricos demostraban que la hoja plegada antiparalela (homodímeros) era más estable que la paralela (dímero formado por dos péptidos enantioméricos).

### **$\beta$ -Ciclopéptidos:**

Los aminoácidos no naturales son capaces de resistir la degradación enzimática mejor que los  $\alpha$ -Aa, por este motivo los nanotubos que poseen residuos no naturales en su secuencia son especialmente atractivos dentro de este campo de investigación. En el año 1997, el Prof. Seebach y colaboradores diseñaron y sintetizaron el primer

---

<sup>57</sup> Saviano, M.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Di Blasio, B.; Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. *J. Incl. Phenom.* **1994**, *18*, 27-36.

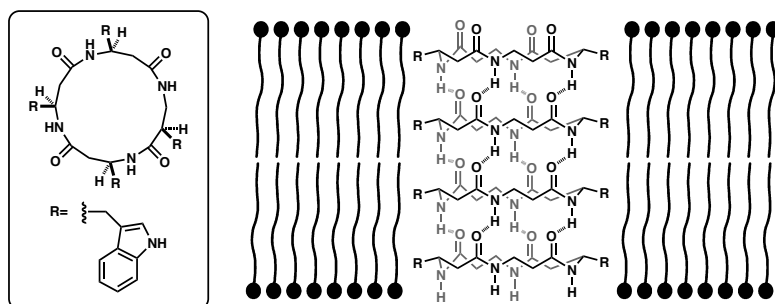
<sup>58</sup> Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1520-1526.

<sup>59</sup> Ghadiri M. R.; Kobayashi K.; Granja J. R.; Chadha R. K.; McRee D. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.

<sup>60</sup> Clark T. D.; Buriak J. M.; Kobayashi K.; Isler M. P.; Ghadiri M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.

ciclopéptido compuestos únicamente por  $\beta$ -aminoácidos,<sup>61</sup> demostrando mediante modelos moleculares y difracción de rayos X en estado sólido que ciclotetrapéptidos formados por  $\beta^3$ -aminoácidos quirales pueden adoptar una conformación plana, en la cual los grupos amida están orientados perpendicularmente al plano del anillo, lo que permite que se apilen de forma similar a los anteriormente comentados *D,L*- $\alpha$ -ciclopéptidos. Estudios sobre el ciclopéptido, *c*-[( $\beta^3$ -Hala)<sub>4</sub>],<sup>62</sup> demostraron que estos compuestos se apilan dando lugar a nanotubos con un diámetro interno de 2.6 Å, en la que la interacción responsable de la formación de nanotubos es una hoja plegada  $\beta$ .

Posteriormente en el grupo del Prof. Ghadiri se realizaron estudios con esta familia de ciclopéptidos, enfocándolos fundamentalmente a sus aplicaciones como modelos de canales iónicos en membranas lipídicas (figura 5).<sup>63,64</sup> Más recientemente Kimura y colaboradores han ampliado este diseño a péptidos que poseen unidades derivadas de azúcares dentro del esqueleto peptídico, lo que permite modificar las propiedades externas del nanotubo y la interacción con otras moléculas como lectinas.<sup>65,66</sup>



**Figura 5:** Estructura de un  $\beta$ -ciclopéptido ( $\beta$ -CPs) y representación de un canal transmembranoso formado por  $\beta$ -nanotubos.

<sup>61</sup> Seebach, D.; Mathews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173-182.

<sup>62</sup> En esta memoria se adoptó la nomenclatura de Seebach, en la cual el  $\beta^3$ -Hala se corresponde con el  $\alpha$ -insustituido- $\beta$ -metil-aminoácido.

<sup>63</sup> Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.

<sup>64</sup> Ishihara, Y.; Kimura, S. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 110-114.

<sup>65</sup> Fujimura, F.; Horikawa, Y.; Morita, T.; Sugiyama, J.; Kimura, S. *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 611-616.

<sup>66</sup> Fujimura, F.; Hirata, T.; Morita, T.; Kimura, S. *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 2394-2400.

### $\delta$ -Ciclopéptidos:

Existen otros ejemplos de nanotubos que incorporan aminoácidos no naturales en los anillos peptídicos que los forman. En el grupo de investigación de Dory, desarrollaron una familia de tripéptidos capaces de autoensamblarse para dar lugar a nanotubos (figura 6). Estos péptidos están compuestos por  $\delta$ -aminoácidos- $\alpha,\beta$ -insaturados, en todos los casos el grupo vinilo presenta configuración *trans*, adoptando la configuración plana necesaria para que el autoensamblaje tenga lugar. Todos los grupos carbonilo están orientados en la misma dirección, es decir, que el agregado molecular esta formada por ciclopéptidos que interactúan mediante una lamina  $\beta$  paralela, esta disposición hace que el momento dipolar de estas moléculas se transfiera a nivel microscópico dando lugar a cristales que presentan anisotropía.<sup>67,68,69</sup>

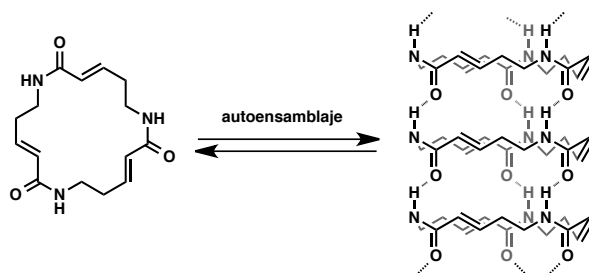


Figura 6: Representación del autoensamblaje molecular para un  $\delta$ -ciclopéptido.

### $\alpha,\epsilon$ -Ciclopéptidos:

Una vez más, el grupo de Ghadiri dio un paso más en el estudio de los nanotubos basados en el autoensamblaje de ciclopéptidos, diseñando y preparando un nuevo péptido que incorporaba dentro del esqueleto peptídico el 1,2,3-triazol- $\epsilon$ -aminoácido (figura 7), el cual se preparaba mediante una reacción de cicloadición alquino/azida. La estructura tubular permite modificar su superficie exterior debido a la presencia de las cadenas laterales de los  $\alpha$ -aminoácidos, mientras que la incorporación del heterociclo al esqueleto peptídico modifica las propiedades físicas del interior del anillo.<sup>70</sup> Sin

<sup>67</sup> Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 4635-4638.

<sup>68</sup> Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, R.; Gauthier, D.; Zhao, Y.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 349-353.

<sup>69</sup> Bélanger, D.; Tong, X.; Soumaré, S.; Dory, L. Y.; Zhao, Y. *Chemistry* **2009**, *15*, 4428-4436.

<sup>70</sup> Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9372-9376.

embargo la estabilidad del nanotubo depende de las moléculas de disolvente que median en la formación de enlaces de hidrógeno entre las unidades ciclopeptídicas.

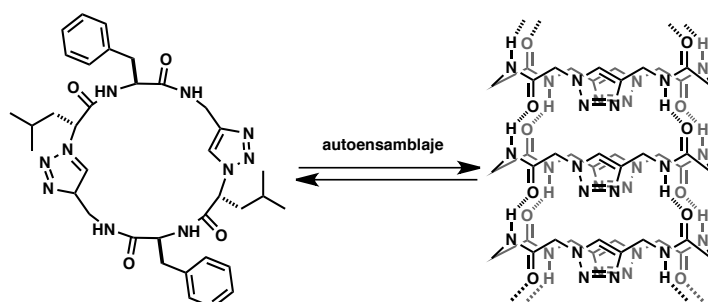


Figura 7: Representación del autoensamblaje molecular para un  $\alpha,\epsilon$ -ciclopeptido.

### $\alpha,\gamma$ -Ciclopeptidos:

Nuestro grupo de investigación diseñó y sintetizó ciclopeptidos capaces de apilarse formando nanotubos, en los que se alternaban  $\alpha$ -aminoácidos y ácidos *cis*-3-aminocicloalcanocarboxílicos ( $\gamma$ -Aca).<sup>71,72,73,74,75,76</sup> Los primeros estudios llevados a cabo se realizaron con modelos diméricos sencillos, debido a la dificultad que entraña el estudio y caracterización de agregados de mayor tamaño. Además estos modelos sencillos, en los que los péptidos se unen entre ellos mediante interacciones similares a las que están presentes en el nanotubo, permiten obtener información termodinámica del proceso de autoensamblaje.

Una de las mayores ventajas de este diseño es la presencia de los grupos metileno dirigidos al interior del nanotubo, lo cual hace que este tenga carácter hidrofóbico, al contrario que los estudiados hasta el momento que poseían carácter hidrofílico, ya que el interior del nanotubo está decorado por los grupos carbonílicos del esqueleto peptídico. Además, ninguno de estos nanotubos permiten modificar las propiedades internas del nanotubo, ya que las modificaciones de los  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ -aminoácidos en alguna de sus posiciones da lugar a ciclopeptidos que no pueden apilarse para formar

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

<sup>73</sup> Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4681-4684.

<sup>74</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chemistry* **2005**, 11, 6543-6551.

<sup>75</sup> Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Heterocycles*, **2006**, 67, 575-583.

<sup>76</sup> Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269.

nanotubos, mientras que las cadenas laterales quedan proyectadas al exterior, en el caso de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos la adecuada modificación del metileno  $\beta$  permitiría modificar las propiedades internas del nanotubo.

**Diseño:**

Todos los ciclopéptidos precursores de nanotubos cumplen el requisito de ser planos. La planaridad es una característica fundamental para que estos compuestos se apilen unos sobre otros formando las estructuras tubulares deseadas. Este requisito es más difícil de cumplir a medida que se usan aminoácidos con un mayor número de átomos entre el grupo carbonilo y el amino, en el caso de los  $\gamma$ -aminoácidos esto puede ser un problema, por ejemplo: el ácido 4-aminobutírico (GABA), es el  $\gamma$ -aminoácido más sencillo que existe, pero es complicado que un ciclopéptido que alterne residuos GABA con  $\alpha$ -aminoácidos adquiera la conformación plana necesaria para que se produzca el autoensamblaje molecular. Con objeto de reducir la libertad conformacional y facilitar así la predisposición a adoptar la conformación plana, se pensó que la mejor solución era usar  $\gamma$ -aminoácidos con esqueleto cíclicos, 3-aminocicloalcanocarboxílicos ( $\gamma$ -Aca), cuyos isómeros *cis* deberían ser lo suficientemente rígidos y preorganizados para facilitar que los ciclopéptidos adopten una conformación plana.

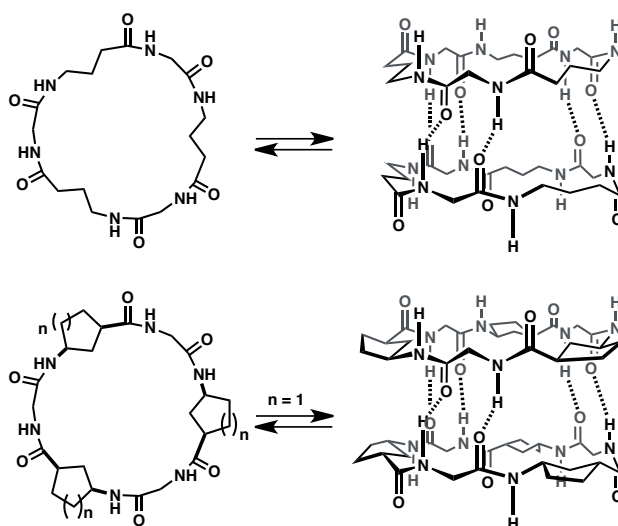
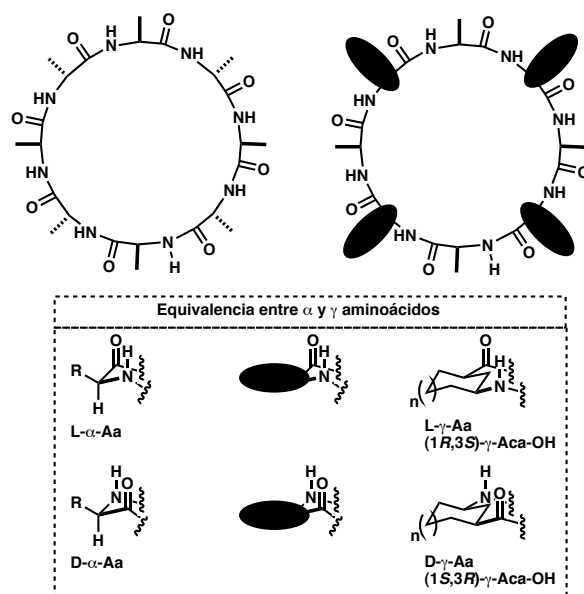


Figura 8: Esquema del autoensamblaje para los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos. El primer caso alterna  $\alpha$ -aminoácidos con GABAs, el cual es poco probable que tenga lugar. En el segundo caso, la rigidez que aporta el  $\gamma$ -aminoácido cíclico debería ayudar a que este proceso tenga lugar.

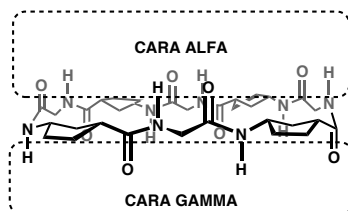
A la hora de escoger los  $\gamma$ -aminoácidos correctos para realizar la síntesis, debemos tener en cuenta cual de los posibles isómeros es el que permitirá que la molécula adopte conformación plana. En el caso de los  $D,L$ - $\alpha$ -ciclopéptidos es indispensable que los aminoácidos tengan estereoquímica alternada, para los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos se debe encontrar la equivalencia a esta situación. Si se observa como se dispone un  $\alpha$ -aminoácido cuando esta formando parte de un nanotubo, se percibe que el carbonilo y el NH del grupo amido quedan orientados perpendicularmente al plano del anillo, y que las cadenas laterales están en disposición ecuatorial, es decir, orientadas al exterior del anillo. La situación equivalente para un  $\gamma$ -aminoácido sería que los cicloalcanos quedasen orientados paralelamente al plano del anillo del ciclopéptido, de forma que el carbono  $\beta$  quede orientado hacia el interior del ciclopéptido, mientras que el resto del esqueleto se orienta hacia el exterior. Los grupos CO y NH permanecen perpendiculares al plano del anillo y en disposición *cis* (figura 9).



**Figura 9:** Equivalencia entre los  $\alpha$ -aminoácidos y los ácidos  $\gamma$ -aminocicloalcanocarboxílicos para la formación de ciclopéptidos capaces de autoensamblarse y para dar lugar a nanotubos.

Los ciclopéptidos que contienen residuos  $L$ -aminocicloalcanocarboxílicos ( $L$ - o  $(1R,3S)$ - $\gamma$ -Aca) y de  $D$ - $\alpha$ -aminoácidos, o sus enantiómeros, pueden adoptar la conformación plana con los grupos carbonilo y amino orientados perpendicularmente al plano del anillo, mientras las cadenas laterales de los residuos  $\alpha$  están dispuestas hacia el exterior de su estructura (figura 9). Esta conformación es adecuada para

favorecer interacciones del tipo lamina  $\beta$  entre distintas unidades ciclopeptídicas. En el caso de alternar  $\alpha$  y  $\gamma$ -aminoácidos, cuando los ciclopéptidos adquieren conformación plana, los grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno de los residuos  $\alpha$  y  $\gamma$  quedan orientados en caras opuestas, por tanto, tienen dos caras diferentes, la alfa en la que están presentes los grupos carbonilo (C=O) y amina (N-H) de los  $\alpha$ -Aa, mientras que la cara gamma es aquella en la que están los grupos C=O y N-H de los  $\gamma$ -aminoácidos (figura 10). La diferente separación que existe entre los grupos NH y CO en la cara  $\alpha$  y  $\gamma$  debe dar lugar a que los carbonilos de los  $\alpha$ -Aa forman enlaces de hidrógeno con los N-H de los residuos alfa del siguiente ciclopéptido, interacción  $\alpha$ - $\alpha$ . La interacción  $\gamma$ - $\gamma$  es aquella en la que los enlaces de hidrógeno se forman entre los grupos NH y carbonilo de los  $\gamma$ -aminoácidos (figura 11). En este diseño los metilenos en posición  $\beta$  de cada cicloalcano quedan orientados hacia el interior del ciclopéptido, la sustitución del hidrógeno beta, en *trans* al carbonilo y al amino del  $\gamma$ -aminoácido, modificaría las propiedades internas del nanotubo. Esto sólo es posible en esta familia de ciclopéptidos, ya que con los otros CPs la funcionalización de los residuos impediría que el autoensamblaje molecular tuviese lugar.



**Figura 10:** Representación de un  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptido en la cual podemos observar como los carbonilos y los NH de los  $\alpha$ -Aa están dirigidos hacia la cara alfa, mientras los residuos gamma están orientados hacia la cara opuesta.

Para estudiar el comportamiento termodinámico del proceso es necesario impedir el apilamiento indefinido de estos anillos, bloqueando una de las caras mediante la sustitución de los protones de la amida por grupos alquilo (metílicos), con lo cual el ciclopéptido sólo podrá interactuar a través de la otra cara. De esta forma, si se utilizan  $\alpha$ -aminoácidos N-metilados se podrá estudiar las interacciones entre las caras  $\gamma$ , mientras que la utilización de  $\gamma$ -Aa N-metilados permite estudiar las interacciones entre las caras  $\alpha$  (figura 11).

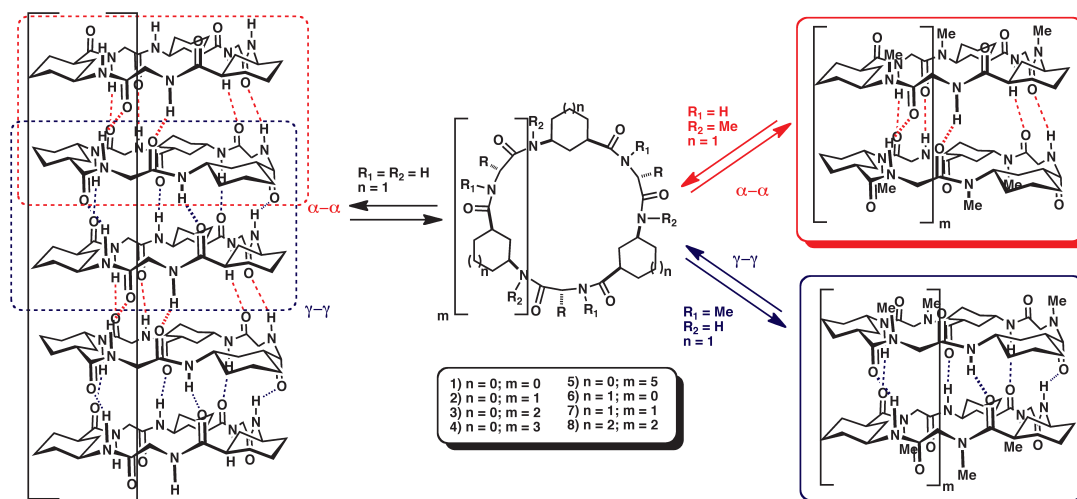


Figura 11: Diseño del autoensamblaje molecular de los  $c\text{-}[(D\text{-}\alpha\text{-Aa-L-}\gamma\text{-Aca})_m\text{-}]$  para formar nanotubos y dímeros. Se puede observar las dos posibles interacciones: la interacción  $\alpha\text{-}\alpha$  de color rojo, mientras que la interacción  $\gamma\text{-}\gamma$  está representada en color azul.

#### Proceso de homodimerización:

Los primeros ciclohexapéptidos N-metilados preparados contenían el ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico ( $\gamma\text{-Ach}$ ). Para estudiar la interacción  $\gamma\text{-}\gamma$  se empleó N-metil- $\alpha$ -alanina, obteniéndose un CP que presentaba una constante de asociación ( $K_a$ ) de  $230\text{ M}^{-1}$  en  $\text{CHCl}_3$ , demostrando que el principal factor del autoensamblaje era la entalpía con una contribución de  $2.20\text{ KJ mol}^{-1}$  por enlace de hidrógeno. También se estudió la interacción  $\alpha\text{-}\alpha$ , para la que se usó un CP en el que se alternaban fenilalaninas con N-metil- $\gamma\text{-Ach}$ , y que poseía una  $K_a > 10^5\text{ M}^{-1}$  en  $\text{CHCl}_3$ . La estructura cristalina de dicho ciclopéptido,  $c\text{-}[(D\text{-Phe-L-}\gamma\text{-MeN-Ach})_3\text{-}]$ , fue analizada mediante difracción de rayos X, demostrando que esta familia de CPs puede autoensamblarse dando lugar a tubos mediante la formación de laminas  $\beta$ -antiparalelas.<sup>71</sup> Una molécula de cloroformo ocupaba la cavidad interna del dímero, confirmando el carácter hidrofóbico en el interior de estos nanotubos. Adicionalmente, otros cristales obtenidos en otros medios de cristalización muestran moléculas desordenadas de agua en el interior de su cavidad, lo que sugiere que las propiedades de la cavidad tiene carácter anfipático más que hidrofóbico.

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

Posteriormente, se realizaron estudios sobre la influencia del diámetro del ciclo en la eficacia del autoensamblaje molecular. Para ello se prepararon ciclopéptidos de ocho residuos, observándose que la constante de asociación en cloroformo, a 273 K, para la interacción  $\gamma$ - $\gamma$  es de  $340 \text{ M}^{-1}$ , y superiores a  $10^5 \text{ M}^{-1}$  para los péptidos que interaccionan a través de sus  $\alpha$ -aminoácidos.<sup>74</sup> Estudios similares con ciclopéptidos de 24 miembros, tetrapéptidos, demostraron que la rigidez que tienen estos anillos impide el proceso de autoensamblaje, mediante la interacción  $\gamma$ - $\gamma$ , mientras que los ciclopéptidos formados por  $\gamma$ -aminoácidos N-metilados (interacción  $\alpha$ - $\alpha$ ) posee una  $K_a$  de  $15 \text{ M}^{-1}$  (en  $\text{CHCl}_3$ ).<sup>73</sup>

Los estudios realizados por nuestro grupo no se restringieron a ciclopéptidos constituidos por el  $\gamma$ -Aa de seis miembros ( $\gamma$ -Ach), también se amplió al ácido *cis*-3-aminociclopentanocarboxílico ( $\gamma$ -Acp).<sup>72</sup> Utilizando este aminoácido se sintetizaron ciclopéptidos de 4, 6, 8, 10 y 12 residuos, en los que alternaban  $\gamma$ -N-metil-Acp y  $\alpha$ -aminoácidos, todos ellos demostraron tener una constante de asociación con valores superiores a  $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$  en cloroformo, salvo el caso del compuesto de 4 residuos, cuya  $K_a$  es  $47 \text{ M}^{-1}$ . Estos datos se obtuvieron mediante RMN, rayos X, FT-IR y espectrometría de masas.<sup>76</sup>

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se dio un paso más en el desarrollo de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos, sintetizándose un nuevo  $\gamma$ -aminoácido, el ácido 4-amino-3-hidroxitetrahidrofuran-2-carboxílico ( $\gamma$ -Ahf), partiendo de un reactivo barato la *D*-Xilosa. Usando este compuesto se sintetizó un ciclotetrapéptido, *c*-[*D*-Leu- $\gamma$ -Ahf-*D*-Tyr(Me)-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Acp-], capaz de autoensamblarse para dar lugar a la formación de dímeros cuyo lumen está decorado con los grupos hidroxilo del  $\gamma$ -Ahf. Es importante resaltar la constante de asociación de este ciclotetrapéptido es superior a los estudiados con anterioridad ( $K_a = 1.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), esto es debido a la participación de los

---

<sup>74</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chemistry* **2005**, *11*, 6543-6551.

<sup>73</sup> Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4681-4684.

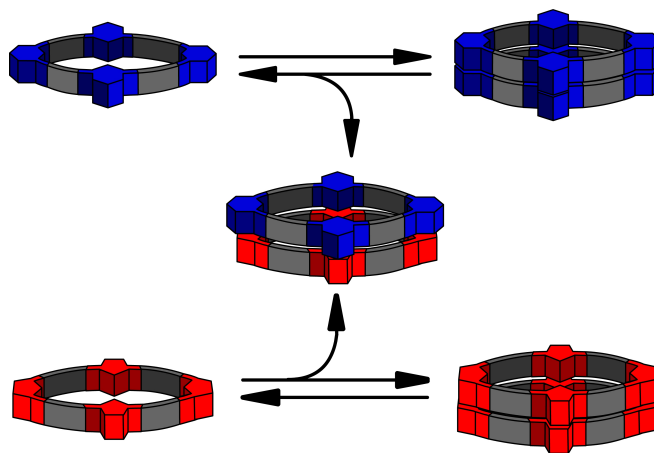
<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

<sup>76</sup> Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, *31*, 3267-3269.

grupos hidroxilo en la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, favoreciendo de esta forma el proceso de autoensamblaje molecular.<sup>77</sup>

**Proceso de heterodimerización:**

Una de las características más importantes que presentan esta familia de ciclopeptidos es su capacidad para formar heterodímeros.<sup>72</sup> Cuando se mezclan disoluciones de hexapéptidos capaces de autoensamblarse, basados en el  $\gamma$ -Acp, con otra disolución de ciclopeptidos que contienen  $\gamma$ -Ach, se produce la formación de una nueva especie preferente que se caracterizó como el heterodímero (figura 12). Mediante estudios de  $^1\text{H}$ -RMN se estimó que la especie heterodimérica es 30 veces más estable que los correspondientes homodímeros. Posteriores estudios exhaustivos demostraron que la formación del heterodímero es independiente de las cadenas laterales de los  $\alpha$ -aminoácidos que componen los ciclopeptidos, y que la fuerza impulsora de esta asociación es la interacción entre los esqueletos peptídicos de los ciclopeptidos. La confirmación definitiva llegó mediante estudios de difracción de rayos X, en la que se muestran dos péptidos interactuando mediante una lamina  $\beta$  antiparalela.



**Figura 12:** Sistemas supramoleculares heterodiméricos basados en la combinación de  $\alpha,\gamma$ -CPs formados  $\gamma$ -Acp y el  $\gamma$ -Ach.

<sup>77</sup> Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Bio. Chem.* **2009**, *7*, 4358-4361.

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

También los ciclooctapéptidos formados por  $\gamma$ -Ach y  $\gamma$ -Acp muestran propiedades similares, con la consiguiente formación mayoritaria del heterodímero, independientemente de los  $\alpha$ -aminoácidos empleados en la formación de los ciclopéptidos.<sup>78</sup>

### Aplicaciones:

Se han desarrollado un amplio número de aplicaciones para las diferentes familias de CPs, a continuación se describirán brevemente las más reseñables.

#### 1. Antibacterianos.

La proliferación de bacterias resistentes a los antibióticos ha relanzado nuevamente el interés por el desarrollo de fármacos con nuevos mecanismos de acción.<sup>79,80</sup> Los estudios realizados con *D,L*- $\alpha$ -CPs anfipáticos mostraban que eran capaces de organizarse sobre las membranas, formando poros transmembranosos o depositándose paralelamente sobre la bicapa fosfolipídica, de esta manera modifican las propiedades de permeabilidad a iones y pequeñas moléculas polares. Así, ciclohexa- y ciclooctapéptidos anfifílicos pueden autoensamblarse sobre las membranas celulares dando lugar a nanotubos que se orientan formando un ángulo de 20° con el plano de la bicapa lipídica, en un proceso que se denomina “mecanismo tipo alfombra” (figura 13). En este proceso, la cara hidrofóbica del nanotubo interacciona con la superficie interna de la membrana (zona lipídica), mientras que la parte hidrofílica del tubo queda expuesta a los componentes más polares del exterior de la célula.<sup>81,82</sup> De esta forma se consigue distorsionar el balance iónico de la célula provocando la muerte celular.

---

<sup>78</sup> Brea, R. J.; Perez-Alvite, M. J.; Panciera, M.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Asian. J.* **2011**, *6*, 110-121.

<sup>79</sup> Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Paged, C. *Nat. Drug. Discovered.* **2002**, *1*, 895-910

<sup>80</sup> Número especial resistencia a los antibióticos, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 391-774.

<sup>81</sup> Fernandez-Lopez, S.; Hui-Sun, K.; Choi, E. C.; Delgada, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehi, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. W.; Ghadiri, R. M. *Nature* **2001**, *412*, 452-455.

<sup>82</sup> Fletcher, J. T.; Finlay, J. A.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4008-4013.

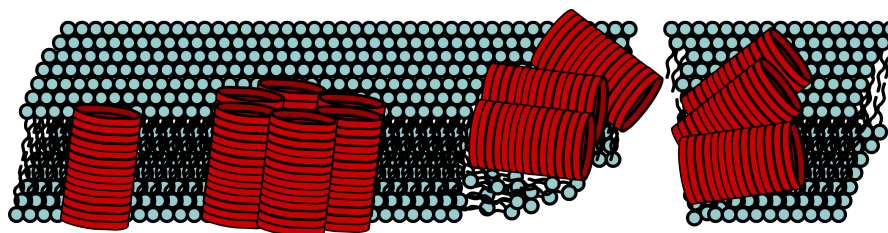


Figura 13: Representación de los posibles mecanismos de acción de los nanotubos peptídicos antimicrobianos, formación de canales y/o poros, mediante la asociación de varios nanotubos, lo que conlleva la destrucción de la membrana mediante el “mecanismos tipo alfombra.”

Es importante resaltar que los ciclopéptidos pueden ser diseñados para actuar selectivamente frente a bacterias y no sobre las células de mamíferos. Estos ciclopéptidos demostraron ser activos frente a bacterias Gram-positivo y Gram-negativo, tanto *in Vivo* como *in Vitro*, incluida *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina (MRSA).<sup>83</sup> También se desarrollaron glicopéptidos que demostraron ser activos frente a bacterias Gram-positivo, cuya ventaja es que presentan una menor toxicidad manteniendo su potencial antibacteriano.<sup>84</sup>

Ghadiri y colaboradores demostraron que el autoensamblaje de ciclopéptidos sobre las membranas puede interferir en el mecanismo de endocitosis de los virus.<sup>85</sup> Con estos estudios podemos afirmar que el autoensamblaje de *D,L*- $\alpha$ -ciclopéptidos puede ser una gran herramienta para la lucha contra un amplio rango de bacterias y virus.

## 2. Canales Iónicos.

En la naturaleza existen poros y canales transmembranosos que son vitales para las funciones biológicas de las células, estos canales pueden estar formados por proteínas o péptidos con un exterior hidrofóbico y un interior hidrofílico.<sup>86</sup> En el año

<sup>83</sup> Dartois, V.; Sánchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Dubbelde, C.; Dunn, C.; Granja, J. G.; Gritzen, C.; Weinberger, D.; Ghadiri, M. R.; Parr, T. R. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **2005**, 49, 3302-3310.

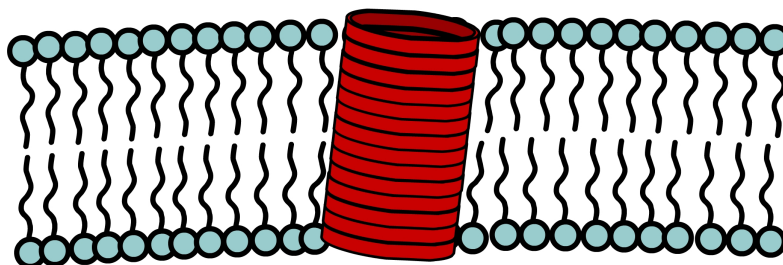
<sup>84</sup> Motiei, L.; Rahimpour, S.; Thayer, D. A.; Wong, C. H.; Ghadiri M. R. *Chem. Commun.* **2009**, 25, 3693-3695.

<sup>85</sup> Horne, W. S.; Wiethoff, C. M.; Cui, C.; Wilcoxon, K. M.; Amorin, M.; Ghadiri, M. R.; Nemerow, G. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5145-5153.

<sup>86</sup> Bailey, H. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 94-103.

1994, Ghadiri y colaboradores propusieron la formación de canales iónicos mediante el autoensamblaje de péptidos cíclicos. Los estudios realizados con el ciclopéptido  $c\text{-}[(L\text{-Trp-}D\text{-Leu})_3\text{-}L\text{-Gln-}D\text{-Leu-}]$  demostraban que se insertaba en las bicapas lipídicas, y era capaz de formar conductos transmembranosos que transportaban más de  $10^7$  iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  por segundo, similar o superior a la gramicidina A y anfotericina B.<sup>87</sup> Estudios de FT-IR polarizada demostraron que los ciclopéptidos hidrofóbicos se ensamblan en la membrana con su eje central inclinado  $7^\circ$  con respecto a la bicapa lipídica (figura 14).<sup>88</sup>

De estos estudios se deduce que la orientación del nanotubo en la membrana depende de la secuencia de los ciclopéptidos, en la que ciclopéptidos hidrofóbicos forman nanotubos transmembranosos (disposición perpendicular a la membrana) mientras que los anfipáticos se orientan paralelamente a las bicapas lipídicas.<sup>88</sup>



**Figura 14:** Formación de conductos transmembranosos por el autoensamblaje de ciclopéptidos en una bicapa lipídica.

Los canales formados por ciclopéptidos son capaces de discriminar las moléculas que transportan dependiendo de su diámetro interno. Los estudios realizados mostraron que el poro del canal debía ser mayor de  $9 \text{ \AA}$  si se quiere transportar moléculas como la glucosa. Este requisito lo cumplían los ciclodecapéptidos, como el  $c\text{-}[(\text{Trp-}D\text{-Leu})_4\text{-Gln-}D\text{-Leu-}]$ , cuyo diámetro interno es  $10 \text{ \AA}$ , y que mostraba una gran eficiencia en el transporte de glucosa y del ácido glutámico, así como de fármacos antitumorales.<sup>89,90,91</sup> Los  $\beta$ -ciclopéptidos también se estudiaron como moléculas precursoras de canales iónicos, formando poros en las membranas lipídicas, y transportando  $\text{K}^+$  a una velocidad comparable a la de los  $D,L\text{-}\alpha$ -ciclooctapéptidos ( $1.9 \times$

<sup>87</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, 369, 301-304.

<sup>88</sup> Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4417-4424.

<sup>89</sup> Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10785-10786.

<sup>90</sup> Sánchez-Quesada, J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2503-2506.

<sup>91</sup> Liu, H.; Chen, J.; Shen, Q.; Fu, W.; Wu, W. *Molecular Pharmaceutics*, **2010**, 7, 1985-1994.

$10^7$  iones  $\text{seg}^{-1}$ ).<sup>92</sup> Estos descubrimientos sugieren que este tipo de compuestos podrían ser utilizados como sensores biológicos o en el transporte de fármacos.

Estudios computacionales publicados recientemente sugieren que ciclopeptidos compuestos por un número par de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -aminoácidos alternados pueden encapsular, atrapar e incluso transportar pequeñas moléculas a través de las membranas celulares.<sup>93,94,95,96</sup>

### 3. Biosensores.

La  $\alpha$ -hemolisina es una proteína de membrana formada por siete subunidades idénticas que se organizan formando un barril  $\beta$  con un poro de 14 Å, por el que pueden pasar iones o moléculas pequeñas.<sup>97</sup> El uso de moléculas que se unen en el lumen de la hemolisina como, por ejemplo, las ciclodextrinas, o los  $D,L$ - $\alpha$ -ciclopeptidos, pueden modificar sus propiedades de conductancia o selectividad del canal.<sup>98,99</sup> Estas propiedades transportadoras permitieron desarrollar sistemas de secuenciación de una única cadena de nucleótidos, determinado el cambio de conductividad de los canales cuando una molécula atraviesa su poro.<sup>100,101</sup>

---

<sup>92</sup> Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.

<sup>93</sup> García-Fandiño, R.; Granja, J. R.; D'Abramo, M.; Orozco, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15678-15686.

<sup>94</sup> Cheng, J.; Zhu, J.; Liu, B. *Chemical Physics* **2007**, *333*, 105-111.

<sup>95</sup> Praveena, G.; Kolandaive, P. *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 1147-1157.

<sup>96</sup> Praveena, G.; Kolandaive, P. *J. Mol. Struct: Theochem.* **2009**, *900*, 96-102.

<sup>97</sup> Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E. *Science* **1996**, *274*, 1859-1866.

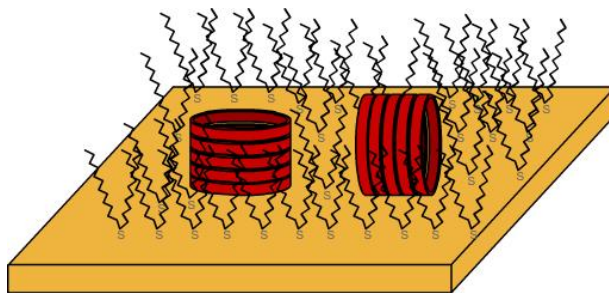
<sup>98</sup> Gu, L. Q.; Serra, M. D.; Vincent, J. B.; Vigh, G.; Cheley, S.; Braha, O.; Bayley, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 3959-3964.

<sup>99</sup> Sánchez-Quesada, J.; Bayley, H.; Ghadiri, M. R.; Braha, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11757-11767.

<sup>100</sup> Ashkenasy, N.; Sánchez-Quesada, J.; Bayley, H.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1401-1404.

<sup>101</sup> Chu, J.; González-López, M.; Cockroft, S. L.; Amorin, M.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 10106-10109.

Ghadiri y colaboradores han desarrollado sensores de iones basados en la capacidad de los *D,L*- $\alpha$ -ciclopéptidos para formar nanotubos sobre superficies de oro cubiertas de organosurfactantes, es decir, sobre SAMs (figura 15). Dependiendo del diámetro del ciclo se pueden detectar y excluir unos complejos de otros, como por ejemplo el  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  del  $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$ .<sup>102</sup>



**Figura 15:** Esquema de un biosensor por la inclusión de nanotubos en organosurfactantes sobre superficies de oro, SAMs.

#### 4. Biomateriales.

La biomineralización es un proceso mediante el cual se pueden disminuir las limitaciones que presentan los péptidos a la hora de aplicarlos en el desarrollo de maquinas o aparatos moleculares.<sup>38</sup> En el grupo del Prof. Ghadiri usaron nanotubos basados en el apilamiento de *D,L*- $\alpha$ -ciclopéptidos como plantilla para formar nanocluster metálicos sobre su superficie. Los grupos carboxilato del *c*- $[(L\text{-Gln-}D\text{-Ala-}L\text{-Gln-}D\text{-Ala})_2]$  sirvieron de moldes para formar arrays de óxido de cobre (I), a temperatura ambiente.<sup>103</sup>

El grupo de Biesalki desarrolló una nueva técnica para sintetizar nuevos materiales partiendo de *D,L*- $\alpha$ -CPs (figura 16).<sup>104,105</sup> Las cadenas laterales del CP contienen un iniciador de polímeros, una vez que los ciclopéptidos se autoensamblaban para dar lugar a nanotubos, este iniciador quedaba expuesto en la superficie externa, el proceso de polimerización tenía lugar cuando el nanotubo estaba en presencia de la N-

<sup>102</sup> Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 11306–11312.

<sup>38</sup> Gao, X. Y.; Matsui, H. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2037-2050.

<sup>103</sup> Hartgerink, J. D.; Clark, T. D.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1367-1372.

<sup>104</sup> Couet, J.; Jeyaprakash, J. D.; Samuel, S.; Kopyshchev, A.; Santer, S.; Biesalski, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297-3301.

<sup>105</sup> Gokhale, G.; Couet, J.; Biesalki, M. *Phys. Status. Solidi A*, **2010**, *207*, 878-883.

isopropilpropenamida, de forma que los CPs evolucionaban a material porosos muy difíciles de preparar mediante otros métodos.

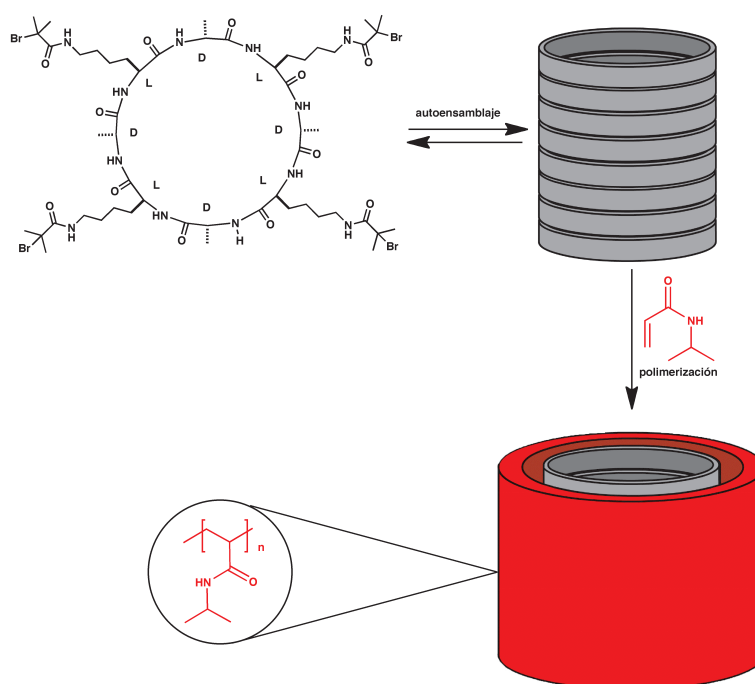


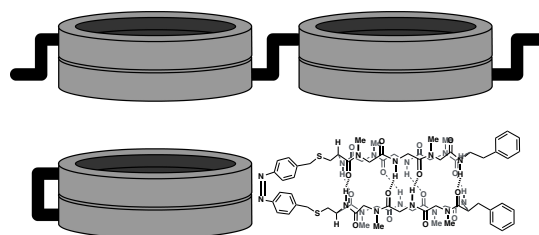
Figura 16: Esquema sintético de un híbrido polímero-nanotubo peptídico.

## 5. Materiales Fotosensibles.

El poder controlar el autoensamblaje molecular es el principal problema a la hora de desarrollar nuevos materiales funcionales. El control del ensamblaje mediante señales externas, como por ejemplo la luz, es uno de los objetivos que se proponen múltiples grupos de investigación, con el fin de desarrollar sistemas supramoleculares fotosensibles. Nuevamente, el grupo del profesor Ghadiri propuso el uso de nuevos sistemas ciclopeptídicos, donde la isomerización *E/Z* de grupos azobenceno controle la formación de enlaces de hidrógeno intra- o intermoleculares, controlando la ordenación de los ciclopeptidos en disolución y sobre diferentes superficies, todo ello a presión y temperatura constantes (figura 17).<sup>106,107</sup>

<sup>106</sup> Vollmer, M.; Clark, T.; Steinem, C.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1598-1601.

<sup>107</sup> Steinem, C.; Janshoff, A.; Vollmer, M.; Ghadiri, M. R. *Langmuir*, **1999**, *15*, 3956-3964.



**Figura 17:** Diferentes conformaciones que puede adquirir un material fotosensible basado en grupos diazobenceno.

## 6. Sistemas Electrónicos.

Los hilos moleculares, o nanohilos fabricados mediante el autoensamblaje molecular tienen una gran importancia por su posible aplicación en el campo de la nanoelectrónica.<sup>108,109</sup> Los nanotubos de carbono han resaltado por sus extraordinarias propiedades eléctricas, pudiendo actuar como semiconductores o conductores dependiendo de la dirección de la capa de carbono grafito plegada. Los nanotubos peptídicos, por su diámetro y longitud, son buenos candidatos para este objetivo, diversos autores han tratado de estudiar las propiedades conductivas de los nanotubos peptídicos, pero el elevado gap homo/lumo, mayor de 4 eV, parece indicar que es necesario disponer de grupos periféricos unidos al nanotubo que faciliten la transferencia de electrones. Por este motivo, el grupo de Ghadiri preparó *D,L*- $\alpha$ -CPs unidos, a través de sus cadenas laterales, a la diimida del 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico (NDI), y estudiaron la posibilidad de que los enlaces de hidrógeno que participan en el autoensamblaje molecular orienten los grupos aromáticos para que la transferencia electrónica sea posible (figura 18).<sup>110</sup>

<sup>108</sup> Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401-1444.

<sup>109</sup> Feldman, A.; Steigerwald, M.; Guo, X.; Nuckolls, C. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1731-1741.

<sup>110</sup> Horne, W. S.; Ashkenasy, N.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1137-1144.

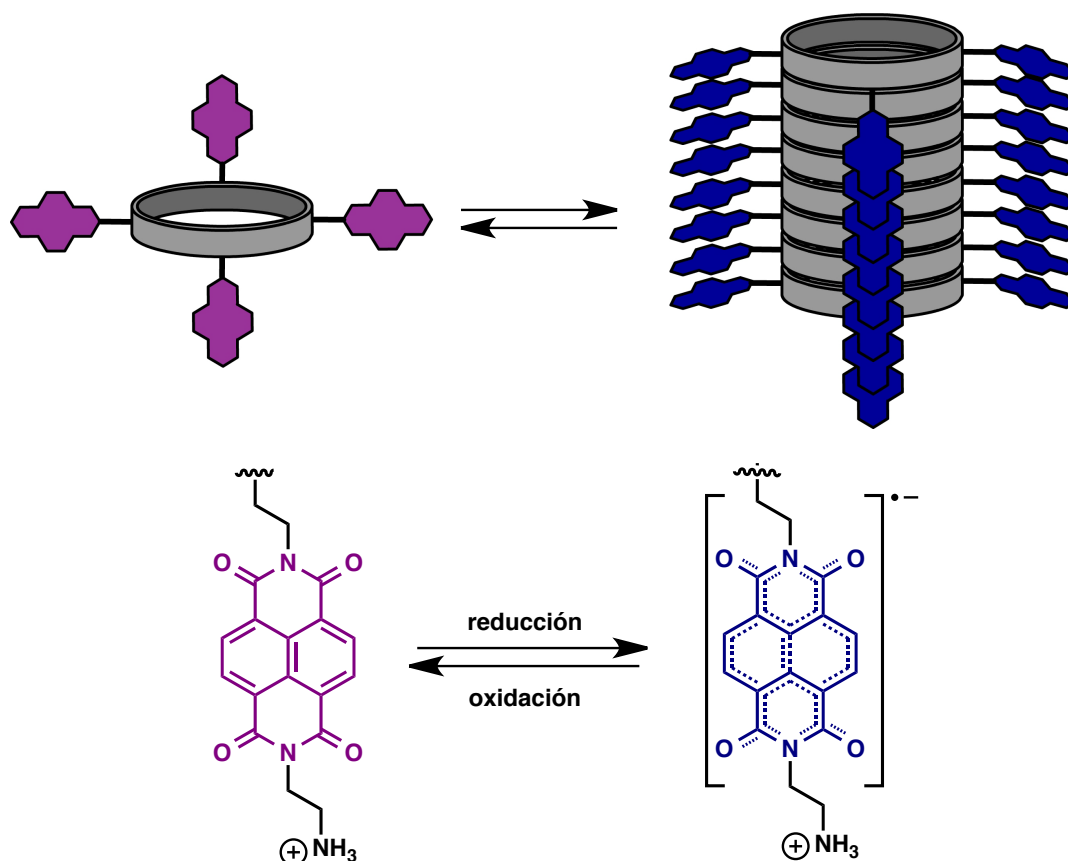


Figura 18: Hilos moleculares basados en el apilamiento de CPs favorecidos por reacciones redox.

Además también estudiaron la posibilidad de que la reducción y la oxidación de los grupos NDI puedan influir en la formación de los nanohilos, demostrando que la deslocalización electrónica, al reducir los NDI, activa el proceso de autoensamblaje obteniéndose nanotubos de 2-3 nm de diámetro y una gran longitud.<sup>111</sup>

El grupo de investigación al que pertenezco ha desarrollado un novedoso sistema multicomponente basándose en la capacidad de heterodimerización de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos. Las propiedades del grupo fluorescente pireno para dar lugar a excímeros, así como procesos de transformación energética (FRET) con un grupo espectroscópicamente adecuado, como es el dapoxilo, hace que estos sistemas formados por el conjugado pireno-dapoxilo sean especialmente atractivos para el desarrollo de sensores basados en procesos de homo- y heterodimerización.<sup>112</sup>

<sup>111</sup> Ashkenasy, N.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. *Small* **2006**, 2, 99-102.

<sup>112</sup> Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1653-1657.

Resultados similares han sido reportados usando el conjugado pireno-perileno, y utilizando ciclooctapéptidos en lugar de los análogos de seis miembros.<sup>78</sup>

El desarrollo de estos sistemas, de múltiples especies y equilibrios, puede tener una gran repercusión en el avance y comprensión de la química de sistemas, que recientemente ha experimentado un gran auge por sus aplicaciones en campos tan diversos como las ciencias de la computación y sociología.<sup>113,114</sup>

### 7. Sistemas Fotosintéticos

Uno de los mayores retos de los nanomateriales es poder igualar la transferencia de electrones que plantas y bacterias logran en el proceso de fotosíntesis, y utilizar dichos materiales en el proceso de generación de energía.<sup>115,116</sup> A lo largo de estos últimos años diversos grupos de investigación han desarrollado sistemas artificiales simples, en los que apropiados grupos dador-aceptor, adecuadamente ordenados, son capaces de realizar un proceso de transferencia electrónica iniciado por la luz, de forma similar a los sistemas naturales.<sup>117,118</sup>

Nuestro grupo de investigación, en colaboración con los grupos del Prof. Nazario Martín (Universidad Complutense) y del Prof. D. Guldi (Universidad de Erlanger-Nürnberg), realizó una importante contribución al sintetizar y estudiar las propiedades físico-químicas de un sistema heterodimérico formado por  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos, modificando uno con un aceptor de electrones, un fullereno, y el otro con un grupo dador de electrones, un tetratiofulvaleno (figura 19). Demostrando que la fotoexcitación de este híbrido da lugar a la separación de cargas y a la transferencia

---

<sup>78</sup> Brea, R. J.; Perez-Alvite, M. J.; Panciera, M.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Asian. J.* **2011**, 6, 110-121.

<sup>113</sup> Nitschke, J. R. *Nature* **2009**, 462, 736-738

<sup>114</sup> Ludlow, R. F.; Otto, S. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 101-108

<sup>115</sup> Pullerits, T.; Sundström, V. *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 381-389

<sup>116</sup> Brixner, T.; Stenger, J.; Vaswani, H. M.; Cho, M.; Blankenship, R. E.; Fleming, G. R.; *Nature* **2005**, 434, 625-628.

<sup>117</sup> Cravino, A.; Sariciftci, N. S. *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, 1931-1943.

<sup>118</sup> Giacalone, F.; Martín, N. *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4220-4248.

electrónica desde el grupo fulvaleno al C60, y que las especies radicales intermedias tengan tiempo de vida superiores a 1  $\mu$ S.<sup>119</sup>

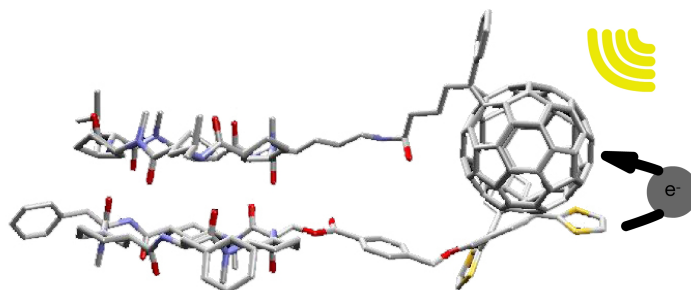


Figura 19: Sistemas supramoleculares dador-aceptor basados en el autoensamblaje heterodimérico de  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos.

<sup>119</sup> Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Herranz, M. A.; Sánchez, L.; Martín, N.; Seitz, W.; Guldi, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 5291-5294.



**Objetivos:**



Como hemos visto en el capítulo anterior se han realizado grandes avances en el campo de la nanotecnología. Para el caso particular de los nanotubos peptídicos se han desarrollado una amplia familia de ciclopéptidos capaces de autoensamblarse para dar lugar a nanotubos, los cuales tienen un amplio número de aplicaciones. Especialmente atractivo parecen los ciclopéptidos compuestos por  $\gamma$ -aminoácidos cíclicos, ya que permiten la funcionalización de la cavidad interna del nanotubo. Por ese motivo creemos que es de especial importancia seguir profundizando en este campo.

Nuestro grupo de investigación viene trabajando en estos últimos años en el diseño, síntesis y caracterización de nuevos sistemas autoensamblables basados en  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos. Como se ha indicado en la introducción, en el momento en que se empezó este trabajo sólo se habían realizado diversos estudios con modelos diméricos, usando aminoácidos N-metilados, debido a que presentan una mayor solubilidad, y menor complejidad que los nanotubos.

En este trabajo de tesis doctoral se decidió abordar varios objetivos.

El primero de estos era la búsqueda de **nuevas formas para la obtención de dímeros sin la necesidad de usar aminoácidos N-metilados**, con el propósito de ampliar la variedad estructural de esta familia de supramoléculas. Los estudios realizados anteriormente con dímeros habían demostrado que los grupos N-metilo no actuaban únicamente como meros bloqueantes del proceso de autoensamblaje molecular impidiendo la formación de nanotubos, sino que tenían una gran influencia en el proceso ensamblaje. Además, los ciclopéptidos N-metilados ya se emplearon como tapas moleculares de canales iónicos, por su capacidad para modificar la conductividad de los nanotubos transmembranosos.<sup>120</sup> Demostrándose que los ciclopéptidos situados en los extremos de los nanotubos confieren propiedades diferenciadoras a los tubos, ya que modifican las condiciones en la entrada y/o la salida del tubo. Por lo tanto, la preparación de este tipo de tapas es un objetivo especialmente perseguido por nuestro y otros grupos de investigación.

---

<sup>120</sup> Sanchez-Quesada, J.; Isler, M. P.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10004-10005.

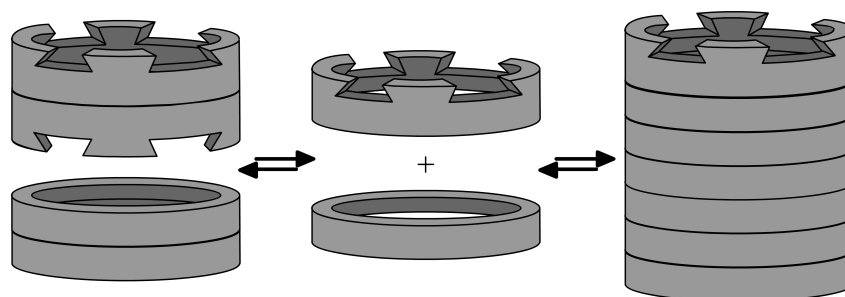


Figura 20: Representación que muestra cómo el uso de ciclopéptidos capados pueden impedir el crecimiento del nanotubo.

Un segundo objetivo perseguía la obtención y caracterización de nanotubos peptídicos derivados de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos (figura 21). En la introducción se ha mencionado una gran variedad de ciclopéptidos capaces de dar lugar a nanotubos peptídicos mediante el autoensamblaje molecular controlado, sin embargo, para la familia de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos sólo se habían realizado estudios con modelos diméricos sencillos, es decir, no se demostró la formación de nanotubos. Debido a las múltiples aplicaciones propuestas para dichos materiales, consideramos de gran importancia demostrar la capacidad de formar tubos de mayores dimensiones.

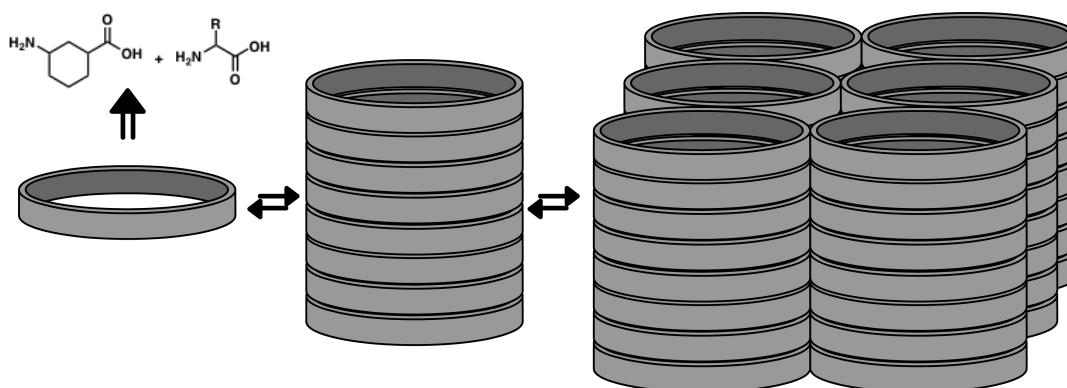


Figura 21: Los ciclopéptidos formados por  $\alpha$ -Aa y  $\gamma$ -Aca pueden dar lugar a la obtención de nanotubos y materiales porosos, tal y como se representa en esta figura, siendo este uno de los objetivos de este trabajo.

En el grupo de investigación ya se había estudiado la formación de nanotubos durante la tesis doctoral del Dr. Amorin, utilizando diseños similares a los desarrollados con los  $D,L$ - $\alpha$ -CPs. A pesar de que se habían obtenido microcristales con características similares a los nanotubos peptídicos, no se había podido demostrar de forma satisfactoria su estructura tubular, debido a la fragilidad que presentaban los cristales, destruyéndose durante los experimentos de difracción de electrones en la

cryo-microscopía electrónica.<sup>121</sup> Es por ello que para llevar a cabo este objetivo se decidió seguir diferentes estrategias con el objeto de que alguna de ellas permitiera demostrar la existencia de las estructuras tubulares. Una de estas estrategias se centró en obtener cristales de tamaño adecuado para poder caracterizarlos mediante difracción de rayos X, y obtener una caracterización a nivel atómico de los nanotubos. Por otro lado, se desarrollaron ciclopéptidos que podían autoensamblarse para dar lugar a unidades discretas de nanotubos, los cuales podían ser estudiados mediante diferentes técnicas de microscopía: AFM, STM, TEM. Así como la funcionalización de estos últimos con el fin de demostrar que estos compuestos podrían usarse en diferentes campos de la nanotecnología.

---

<sup>121</sup> Amorín, M. *Diseño, síntesis y estudio de  $\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos*, Universidad de Santiago de Compostela, **2005**.



## **Discusión y resultados.**



### Nuevos $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos basados en $\alpha$ -aminoácidos $\alpha,\alpha$ -disustituidos.

Como se ha expuesto en la introducción de esta memoria, los nanotubos peptídicos formados mediante el autoensamblaje de ciclopeptidos tienen un amplio número de aplicaciones en el campo de la nanotecnología y biotecnología. Una de las propiedades más importantes es la capacidad que poseen los ciclopeptidos hidrofóbicos para formar tubos transmembranosos,<sup>87</sup> cuya selectividad en el transporte de moléculas es dependiente del tamaño de las moléculas, y del diámetro interno nanotubo.<sup>90</sup>

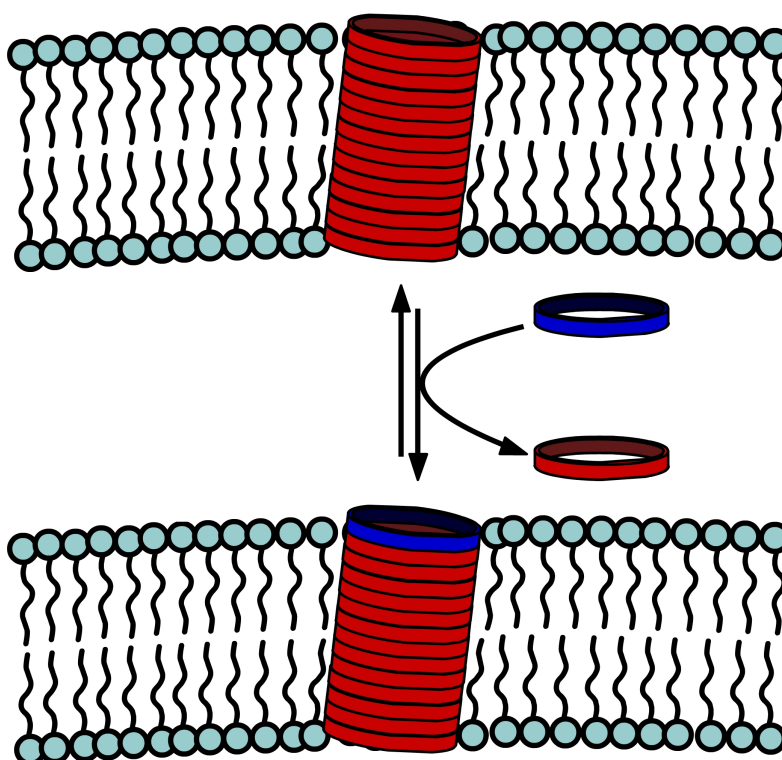


Figura 22: Modelos de nanotubos peptídicos de membrana en la que se resalta el uso de diferentes ciclopeptidos, como tapas moleculares, ya que modifican las propiedades de los canales formados por los ciclopeptidos en las bicapas lipídicas.

Otra propiedad que hay que resaltar es la posibilidad de utilizar péptidos N-alkilados, los cuales mediante la adecuada selección de su secuencia peptídica se autoensamblan sólo en los extremos del nanotubo, debido a que se favorecen las interacciones sus cadenas laterales del péptido con los grupos fosfolipídicos que

<sup>87</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, 369, 301-304.

<sup>90</sup> Sánchez-Quesada, J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2503-2506.

componen la membrana. Estos nanotubos, con CPs-N-alkilados en sus extremos, pueden modificar la conductancia y alterar las propiedades de los canales (figura 23).<sup>120</sup>

Los estudios realizados en nuestro grupo de investigación han mostrado el efecto que tiene sobre la constante de asociación de los CPs la presencia o ausencia de sustituyentes metílicos en el nitrógeno amídico. De hecho, pensamos que una de las razones de la menor  $K_a$  en la dimerización a través de las caras  $\gamma$ , frente a la de las caras  $\alpha$ , se debe a la repulsión entre el grupo N-metilo y el carbonilo de los  $\alpha$ -aminoácidos (repulsiones tipo 1,3-diaxial; figura 23). Esta repulsión no está presente en el caso de los  $\gamma$ -aminoácidos, ya que hay un mayor número de átomos separando los grupos carbonilo y N-metilo. Una evidencia de este efecto se observó con los  $3\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos,  $c-[(L-\gamma\text{-Ach-D-Aa-L-Aa-D-Aa})_2-]$  que se muestra en la figura 23, en la que simplemente mediante la eliminación de uno de estos grupos en uno de los  $\alpha$ -aminoácido varía extraordinariamente la constante de asociación, pasando del orden de  $10^1 \text{ M}^{-1}$  para el derivado tetrametilado ( $R_1=\text{Me}$ ) a más de  $10^5 \text{ M}^{-1}$  para el derivado dimetilado ( $R_1=\text{H}$ ). Adicionalmente, se pudo determinar que estos grupos N-metilo también tienen un extraordinario efecto en la conformación adoptada por el CP, haciendo que en algunos casos el péptido se pliegue en dobles giros en lugar de adoptar la conformación plana formadora de nanotubos.<sup>122</sup> Los estudios realizados permiten atribuir este comportamiento a las repulsiones estéricas entre el N-Me y el C=O, que se liberan como consecuencia de este giro. De hecho es conocido que los aminoácidos N-metilados son propensos a formar giros  $\beta$  y  $\gamma$ .<sup>123,124</sup> Adicionalmente los grupos amidas disustituidos tienen una menor diferencia entre los conformeros *cis* y *trans*, en torno a 2.1 KJ/mol frente a los 10.9 KJ/mol para los aminoácidos convencionales. De tal forma que los péptidos N-metilados pueden presentar un mayor número de isómeros conformacionales.<sup>125,126,127</sup>

---

<sup>120</sup> Sanchez-Quesada, J.; Isler, M. P.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10004-10005.

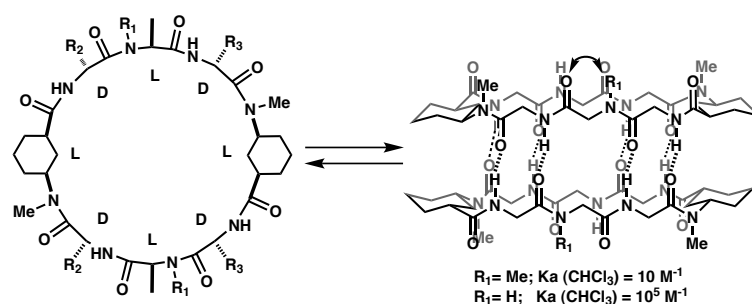
<sup>122</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chemistry* **2008**, *14*, 2100-2111.

<sup>123</sup> Chatterjee, J.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331-1342.

<sup>124</sup> Takeuchi, Y.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5363-5372

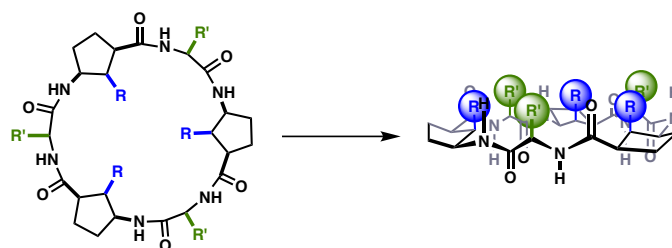
<sup>125</sup> Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 253-260.

<sup>126</sup> Manavalan, P.; Momany F. A. *Biopolymers*, **1980**, *19*, 1943-1973.



**Figura 23:** Representación esquemática de los  $3\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos y su correspondiente dímero. Se omitieron las cadenas laterales de los  $\alpha$ -Aa para facilitar su visualización.

Este importante efecto sobre la estructura del CP nos llevo a abordar otros métodos para bloquear el crecimiento del nanotubo. Atendiendo a la conformación plana que debería adoptar el ciclopéptido para autoensamblarse (figura 24), se puede observar que grupos situados en el carbono  $\beta$  del  $\gamma$ -Aa (R), o la proyección en axial de uno de los sustituyentes del  $\alpha$ -aminoácido (R'), deberían tener un efecto similar a los grupos alquilo situados sobre el nitrógeno de la amina, impidiendo el autoensamblaje a través de la cara  $\gamma$ , sin tener ningún efecto sobre las características estructurales de los enlaces peptídicos anteriormente mencionados, de forma que el ciclopéptido sea plano y que sean capaces de autoensamblarse mediante la formación de laminas  $\beta$ . La dificultad sintética que supone la síntesis de  $\alpha$ -Aa sustituidos en la posición  $\beta$  nos llevó a evaluar la utilización de  $\alpha,\alpha$ -disustituidos.



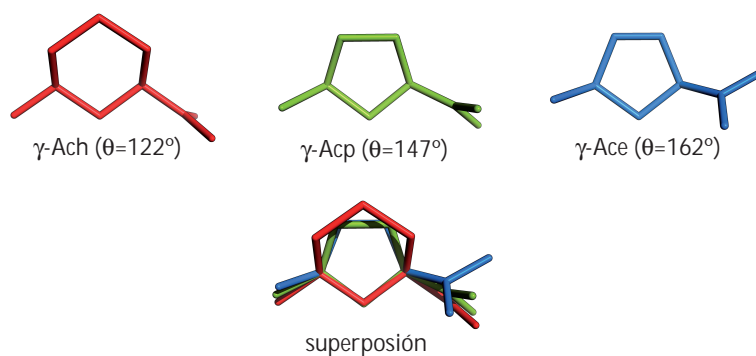
**Figura 24:** Representación de un ciclohexapéptido en configuración plana, en la que se resaltan aquellos grupos que debido a su orientación pseudo-axial podrían impedir el crecimiento del nanotubo sin necesidad de usar aminoácidos N-metilados. En azul, sustituyentes en el carbono  $\beta$  del  $\gamma$ -aminoácido. En verde la representación de los sustituyentes de los  $\alpha$ -aminoácidos si quedase en disposición axial.

<sup>127</sup> Fusetani, N.; Matsunaga, S. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1793-1806.



### Compuestos formados por el *cis*- $\gamma$ -ciclopent-2-enocarboxílico y el ácido 2-amino-2-metil-propanoico.

Debido a lo anteriormente expuesto sería de gran relevancia ampliar estos estudios a las nuevas familias de CPs. En nuestro grupo de investigación se desarrollaron  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos *N*-metilados capaces de autoensamblarse para dar lugar a dímeros. Esto se llevó a cabo mediante la sustitución de los H de los grupos amidas de una de las caras por sustituyentes alquílicos (metilos), de forma que el CP no puede formar enlaces de hidrógeno por dicha cara. En este estudio se usaron 2  $\gamma$ -aminoácidos diferentes, con excelentes resultados: el *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico ( $\gamma$ -Ach) y el *cis*-3-aminociclopentanocarboxílico ( $\gamma$ -Acp).<sup>71,72</sup> Los estudios realizados con el  $\gamma$ -Acp y el  $\gamma$ -Ach demostraban que, los CPs compuestos por el  $\gamma$ -aminoácido ciclopentílico tienen una mejor predisposición a formar dímeros con elevadas  $K_a$ , y en un mayor rango de tamaño de los CPs, que van desde cuatro a doce residuos, mientras que derivados de  $\gamma$ -Ach se restringen a hexámeros y octámeros. Esto es debido a que el ángulo formado entre los grupos carbonilo y el amino del ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico es menor que en el caso del anillo de 5 miembros (figura 25).



**Figura 25:** Minimización computacional en la que se muestran las estructuras de 3  $\gamma$ -aminoácidos:  $\gamma$ -Ach,  $\gamma$ -Acp,  $\gamma$ -Ace. Por último una superposición de los tres en la que se puede observar que el ángulo  $\theta$  es diferente para cada aminoácido.

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

Debido al buen resultado que se obtuvo con estos compuestos se decidió ampliar la variedad de  $\gamma$ -aminoácidos, para ello pensamos utilizar el derivado ciclopentenílico, el ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico ( $\gamma$ -Ace), con un doble objetivo.

El primer objetivo era poder preparar ciclopéptidos con un mayor número de residuos, que mantengan la predisposición a adoptar la conformación plana, y de esa forma obtener nanotubos con un canal interior de mayores dimensiones.

El segundo objetivo es el “ahorro químico”, hoy en día la química sintética busca disponer de un mayor número de compuestos en el menor número posible de etapas, y que mediante una única síntesis, divergente en las últimas etapas, permita disponer de una amplia variedad de análogos (figura 26).<sup>128,129</sup> El  $\gamma$ -Ace, cuya síntesis a partir de la lactama de Vince es sencilla, permitiría acceder a una amplia variedad de  $\gamma$ -aminoácidos mediante la funcionalización del doble enlace. Además el ángulo  $\theta$  ( $\approx 162^\circ$ ), que se encuentra definido por el grupo amino y el carbonilo, es mayor que para el caso del  $\gamma$ -Acp ( $\approx 147^\circ$ ) y el  $\gamma$ -Ach ( $\approx 122^\circ$ ), lo que nos hace preveer que se puedan sintetizar CPs autoensamblables de mayores dimensiones.<sup>76</sup>

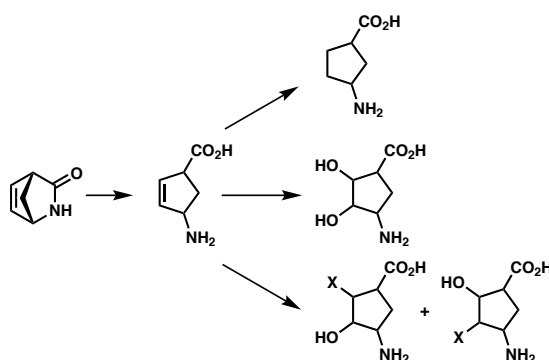


Figura 26:  $\gamma$ -aminoácidos que se podría obtener a partir de la derivatización del  $\gamma$ -Ace.

Como se comentó anteriormente, una posible solución a los problemas derivados de la utilización de N-metil- $\alpha$ -aminoácidos podría ser el uso de  $\alpha$ -aminoácidos que tengan un grupo dispuesto en orientación pseudoaxial, de forma que el impedimento estérico causado por ese grupo alquílico impida la aproximación, y por lo tanto, la interacción mediante enlaces de hidrógeno con otra unidad ciclopeptídica, impidiendo la formación del nanotubo (figura 27). En los estudios realizados con residuos  $\alpha,\alpha$ -

<sup>128</sup> Lowe, G. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 309-317.

<sup>129</sup> Ganm, B. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 463-472.

disustituidos en fóldameros demostraban una cierta preferencia a inducir la formación de hélices  $\alpha$  en lugar de laminas  $\beta$ .<sup>130</sup> Cabe destacar que el uso de residuos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos en el caso de los *D,L*- $\alpha$ -CPs no da lugar a la formación de dímeros.<sup>131</sup> De todas formas, pensamos que la menor flexibilidad de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos podría paliar las deficiencias conformacionales introducidas por los aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, y las múltiples aplicaciones que podían surgir con esta aproximación nos motivaron a realizar estos estudios.

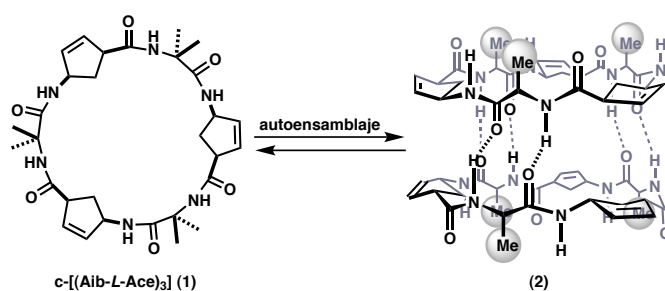


Figura 27: Estructura del *c*-[(Aib-*L*- $\gamma$ -Ace)<sub>3</sub>] y el modelo del dímero correspondiente.

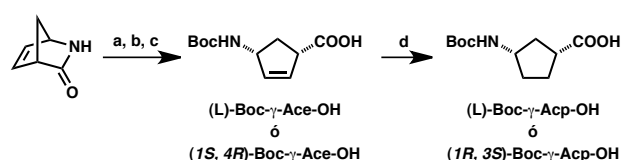
La síntesis del ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico se llevó a cabo a partir de la lactama de Vince (2-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona), el primer paso consistió en la hidrólisis ácida con una disolución al 10% de HCl durante 24 h. El grupo amino del aminoácido resultante se protegió mediante el tratamiento de la sal obtenida con el anhídrido del di-*tert*-butiloxicarbonato en presencia de base, para obtener la mezcla racémica del ácido deseado, el ( $\pm$ ) Boc- $\gamma$ -Ace-OH, el cual se purificó mediante cristalización de CHCl<sub>3</sub>:hexano (1:1) (figura 28). La resolución del ácido ( $\pm$ ) Boc- $\gamma$ -Ace-OH se realizó mediante sucesivas cocrystalizaciones de este en presencia de medio equivalente de la (*R*)-1-fenil-1-etilamina. La obtención del derivado de Ace con un exceso enantiomérico adecuado para la síntesis del péptido, e.e.>95% ( $[\alpha]_D = -46.1$  ( $c=1.0$ , MeOH)), se consiguió mediante la repetición de esta cristalización, al menos 3 veces. En las sucesivas cristalizaciones la cantidad de la amina se va aumentando paulatinamente, hasta emplear 1 equivalente, mientras que la proporción de hexano se

<sup>130</sup> Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, M.; Valle, G.; Cavicchioni, G.; Précigoux, G.; Aubry, A.; Kamphuis, J. *Biopolymers* **1993**, 33, 1061-1072.

<sup>131</sup> Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8949–8962.

va disminuyendo, hasta que en la última este no se utiliza. A partir del enantiómero (*R*)-1-fenil-1-etilamina se obtiene el isómero (*1S,4R*), al que por similitud con los *L*- $\alpha$ -aminoácidos usados en los ciclopéptidos formadores de nanotubos se denominará a partir de ahora como isómero *L*. Es importante aclarar que las aguas madres de la cristalización son ricas en el enantiómero contrario al cristalizado, de forma que tras lavarlas con HCl (10%) y concentrarlas, el residuo se cristaliza en presencia de la (*S*)-1-fenil-1-etilamina para obtener el enantiómero (*1R,4S*) ó *D*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH, de forma similar al otro enantiómero.

La hidrogenación catalítica heterogénea del ácido *L*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH en presencia de Pd/C permitió obtener el ácido *L*-Boc- $\gamma$ -Acp-OH con rendimiento cuantitativo, este es un nuevo método para la obtención de este aminoácido, mejorando los tiempos de síntesis empleados en la ruta anteriormente empleada en nuestro grupo de investigación.<sup>72</sup>



**Figura 28:** Síntesis del (*L*)-Boc- $\gamma$ -Ace-OH y del (*L*)-Boc- $\gamma$ -Acp-OH: a) HCl (10%); b) (BocO)<sub>2</sub>O, DIEA, H<sub>2</sub>O/dioxano, 100%; c) (*R*)-1-fenil-1-etilamina, CHCl<sub>3</sub>/hexano; d) H<sub>2</sub>(g), Pd/C, EtOH, 99%.

Para que la síntesis de un ciclopéptido sea sintéticamente útil es necesario que los aminoácidos tengan un exceso enantiomérico adecuado, superior al 95%. El cálculo del exceso enantiomérico del ácido *cis*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH se realizó mediante el test de Marfey,<sup>132</sup> mucho más preciso que la rotación óptica empleada para seguir el proceso de resolución, demostrando que tras 3 cristalizaciones se obtiene el aminoácido de interés con un exceso enantiomérico superior al 97%, (figura 29) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -46.1 (c=1.0, MeOH).

Es importante comentar que esta síntesis se puede realizar a escala de multigramo de forma reproducible, mejorando los rendimientos y reduciendo de forma considerable el tiempo necesario en anteriores rutas sintéticas.<sup>72</sup>

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

<sup>132</sup> Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.

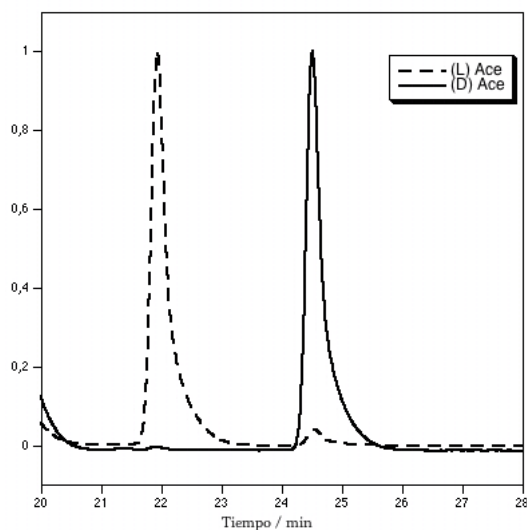
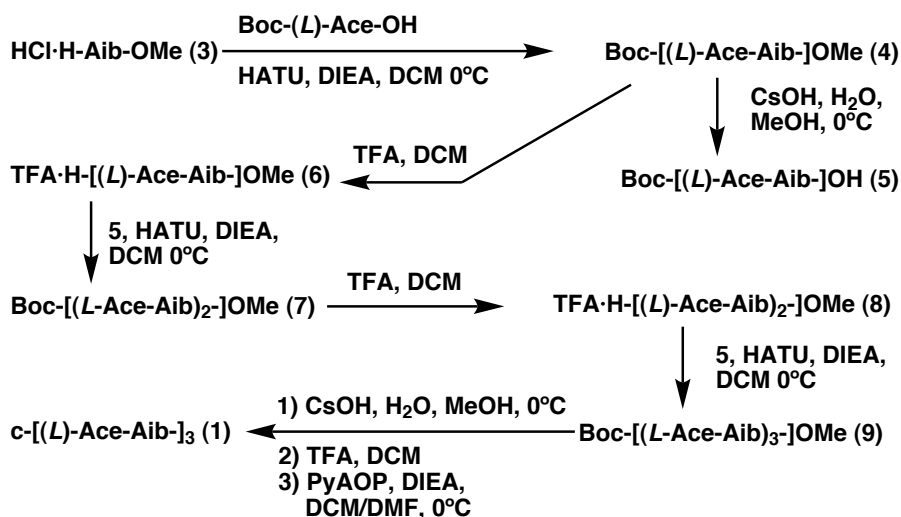


Figura 29: Cromatogramas obtenidos en el Test de Marfey para el (*D*)-Boc- $\gamma$ -Ace-OH (línea continua) y el (*L*)-Boc- $\gamma$ -Ace-OH (línea discontinua) correspondientes a excesos enantioméricos superiores al 98%.

La síntesis del ciclopeptido se realizó en disolución siguiendo los pasos mostrados en el esquema 1. El ácido 2-amino-2-metilpropanoico (Aib) se disolvió y se transformó en el éster metílico por tratamiento con cloruro de tionilo en metanol. El acoplamiento a 0 °C del hidrocloreuro Cl·H-Aib-OMe resultante con el Boc-(*L*)- $\gamma$ -Ace-OH, usando HATU como agente activante, y en presencia de base (DIEA) dio lugar al dipéptido Boc-(*L*)- $\gamma$ -Ace-Aib-OMe con buenos rendimientos (97%).



Esquema 1: Estrategia sintética seguida para la obtención del *c*-[(*L*)-Ace-Aib-]<sub>3</sub> (1)

Cuando se realizó el acoplamiento a temperatura ambiente, o usando como activantes otros agentes de acoplamiento menos reactivos que el HATU se observaba la formación de una mezcla de isómeros, la cual representaba una gran dificultad para poder purificarlo. La aparición de la mezcla de isómeros se puede justificar teniendo en cuenta el mecanismo de activación de las sales de uronio, que aparece reflejado en la figura 30.<sup>133</sup> Cuando la preactivación del ácido tiene lugar, se produce una gran disminución del pKa del protón en  $\alpha$ , que además está flanqueado por una olefina, por consiguiente las ligeras condiciones básicas necesarias para que el acoplamiento tenga lugar son suficientes para arrancar dicho protón. La posterior protonación tiene lugar por cualquiera de ambas caras (formación de isómeros *cis* y *trans*) pero además puede ocurrir en la posición 3, generando el compuesto  $\alpha, \beta$ -insaturado.

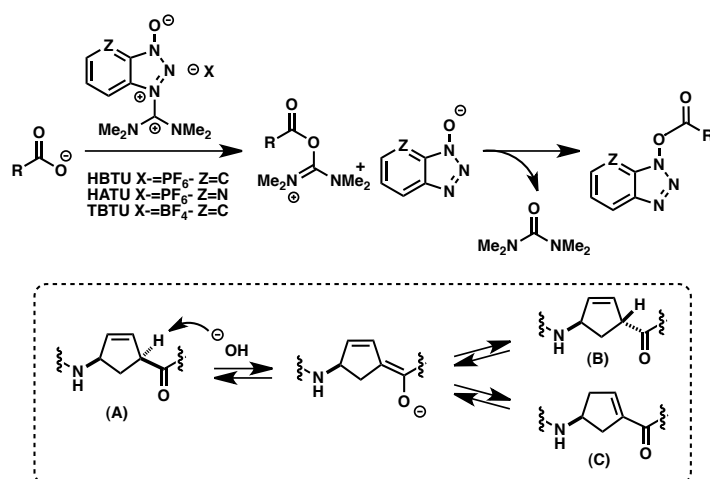


Figura 30: Mecanismo de activación de las sales de uronio. Y mecanismo propuesto para la isomerización del *cis*- $\gamma$ -Ace en condiciones básicas.

La siguiente etapa era la desprotección del éster metílico utilizando las hidrólisis básicas con hidróxido de litio, que son las más usadas. Sin embargo, cuando se realizó la hidrólisis del éster con LiOH también se observó la aparición de epímeros y el derivado en el cual el doble enlace había isomerizado a la posición  $\alpha, \beta$ . Para solucionar este nuevo problema se cambió la base a CsOH, se llevaron a cabo las hidrólisis a temperaturas más bajas (0°C) y tiempos de reacción más cortos. Bajo estas condiciones se reduce la aparición de epímeros, y se obtiene el producto deseado con buenos rendimiento (78%), recuperándose parte del producto de partida (el

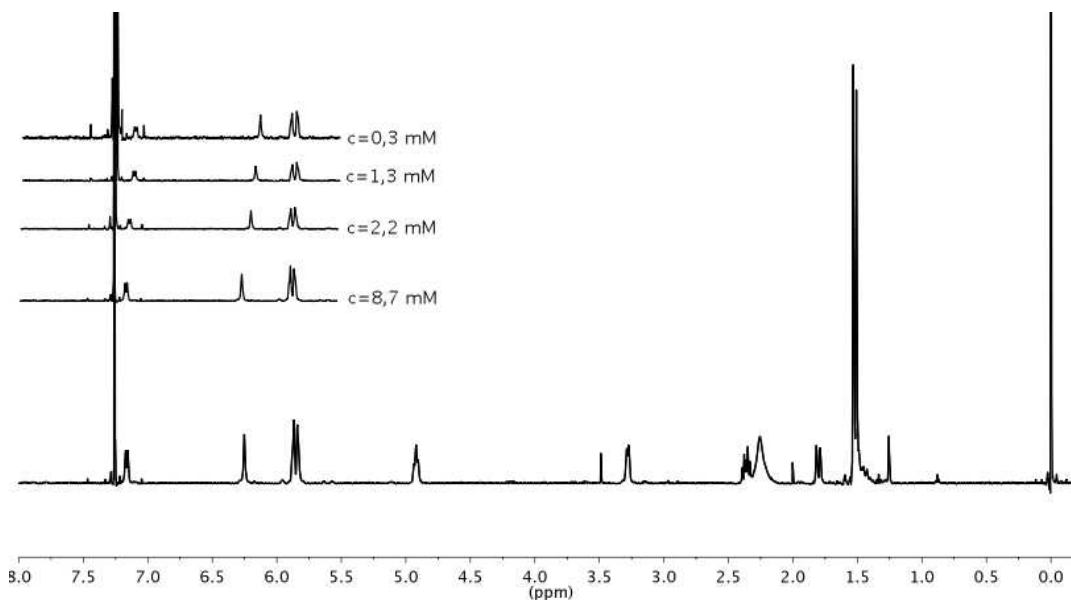
<sup>133</sup> Albericio, F.; Carpino, L. A. *Methods in Enzymology* **1997**, 289, 104-126.

rendimiento del proceso es del 90% sobre la sustancia de partida recuperada). Por otro lado, el dipéptido Boc-(*L*)- $\gamma$ -Ace-Aib-OMe se trató con ácido trifluoroacético (TFA), y este se acopló con el dipéptido cuyo extremo C terminal está desprotegido (**5**) para obtener el tetrapéptido Boc-[(*L*)- $\gamma$ -Ace-Aib]<sub>2</sub>-OMe (**7**). El tratamiento con TFA del tetrapéptido (**7**) y acoplamiento con el dipéptido (**5**) dio lugar al hexapéptido lineal, Boc-[(*L*)- $\gamma$ -Ace-Aib]<sub>3</sub>-OMe (**9**). La doble desprotección del hexapéptido (**9**), primero con CsOH y después con TFA, seguido del tratamiento con TBTU y DIEA condujo al ciclopéptido deseado (**1**), con un rendimiento del 35%, el CP **1** se purificó mediante HPLC en fase reversa, usando como eluyente H<sub>2</sub>O:ACN (0.1% TFA). Las pequeñas proporciones de epímeros e isómeros que se obtienen en las distintas etapas de desprotección se van eliminando fácilmente en las etapas de purificación. También se estudiaron otros grupos protectores, por ejemplo, 9-fluorenilmetil éster (Fm), que permite disminuir la epimerización del  $\gamma$ -Ace ya que para su eliminación se usan bases muy suaves (piperidina o DBU).<sup>134</sup> Sin embargo la baja solubilidad de los productos resultantes, que sólo son solubles en disolventes muy polares (DMSO, DMF), hacía disminuir drásticamente los rendimientos de la síntesis del compuesto **1**.

Los estudios de resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN) que se realizaron al ciclopéptido **1**, tanto en disolventes polares como apolares, mostraron un espectro sencillo con señales muy bien definidas, indicando que se trata de una especie con elevada simetría (C<sub>3</sub>) lo que hace pensar que el CP adopta una conformación plana en disolventes apolares (CHCl<sub>3</sub>). Esto también se confirmó por las constantes de acoplamiento entre el NH y el H $\gamma$ ,  $J_{\text{NH,H}\gamma}$  = 7.2 Hz, sugiriendo una disposición *anti*. Una vez verificada la primera condición para que el autoensamblaje tenga lugar, la planaridad, se decidió demostrar si este proceso se producía. Para observar si los CPs están formando enlaces de hidrógeno entre diferentes subunidades (figura 27), así como para poder calcular las variables termodinámicas de este proceso, se realizaron varios experimentos de <sup>1</sup>H-RMN, variando las temperaturas desde 233K a 303K, a intervalos de 10K, y a diferentes concentraciones que van desde 8.7 mM a 0.071 mM (figura 31). En estos estudios se observa que la señal correspondiente al NH del Aib (que aparece como singlete), que es el responsable de la formación del dímero

<sup>134</sup> Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.

mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre las 2 unidades peptídicas, varía entre 6.6 y 6.1 ppm. La señal del NH del  $\gamma$ -Ace, que aparece como doblete a 7.2 ppm, permanece casi inalterada a lo largo de los diferentes experimentos. Esto es un claro indicio del autoensamblaje molecular del ciclopeptido para dar lugar al dímero.



**Figura 31:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del CP  $c\text{-}[(L)\text{-Ace-Aib-}]_3$  (1) en  $\text{CDCl}_3$ . La región del espectro entre 5.5 y 8.0 ppm se representó a diferentes concentraciones para mostrar el desplazamiento de la señal correspondiente a NH del Aib.

El cálculo de las variables termodinámicas se llevó a cabo utilizando una ecuación de correlación no lineal,<sup>135</sup> que relaciona los desplazamientos de los NH con la constante de asociación de un proceso en equilibrio entre monómero y dímero:

$$\delta_{obs} = \delta_{dim} + (\delta_{mon} - \delta_{dim}) \frac{[-1 + \sqrt{(1 + 8K_a C)}]}{(4K_a C)}$$

En donde C corresponde a la concentración del péptido, mientras que  $K_a$ ,  $\delta_{mon}$ ,  $\delta_{dim}$  son valores calculados a partir de los datos observados  $\delta_{obs}$ , que se corresponden con los desplazamientos químicos medidos en los distintos experimentos de RMN a una concentración dada. Para las condiciones estudiadas se calculó el valor de la  $K_a$  a diferentes temperaturas. La correlación entre el log  $K_a$  con el inverso de la temperatura (conocido como representación de Van't Hoff) permitió obtener una

<sup>135</sup> LaPlanche, L. A.; Thompson, H. B.; Rogers M.T. *J. Phys. Chem.* **1965**, 69, 1482–1488.

recta a partir de la cual se relaciona la  $\Delta H$  con la pendiente y la  $\Delta S$  con la coordenada en el origen. Para el ciclopéptido, *c*-[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>-], se obtiene una  $K_a = 63 \text{ M}^{-1}$  (CHCl<sub>3</sub>, 298K). Los valores termodinámicos de este proceso son  $\Delta H^\circ_{298} = -24.0 \text{ KJmol}^{-1}$  y  $\Delta S^\circ_{298} = -46.2 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ . Esto implica que el proceso de autoensamblaje está dirigido entálpicamente, debido a la formación de 6 enlaces de hidrógeno, aunque entrópicamente desfavorable, tal como cabría de esperar para el paso de monómero a dímero ya que implica un aumento del orden.<sup>136,137</sup> La contribución energética por cada enlace de hidrógeno es únicamente de 1.7 KJ por enlace, valor ligeramente inferior a los obtenidos para otros CPs, lo cual indica que existen algunas limitaciones estructurales que impiden obtener enlaces de hidrógeno más fuertes.

Por tanto, se demostró que los CPs constituidos por el  $\gamma$ -Ace son capaces de autoensamblarse formando dímeros, y que el 2-amino-2-metilpropanoico bloquea el crecimiento de los nanotubos. La baja constante de asociación encontrada nos llevó a estudiar otros ciclopéptidos con el objeto de esclarecer si estas limitaciones se debían a la presencia del  $\gamma$ -Ace. Cuando se comparan estos resultados con otros péptidos de similares características, por ejemplo: *c*-[(*L*-<sup>Me</sup>N-Acp-*D*-Leu)<sub>3</sub>-] que también forma 6 enlaces de hidrógeno entre  $\alpha$ -Aa similares a los que tenemos en el *c*-[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>-], dimeriza con constantes de asociación de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (CHCl<sub>3</sub>), se observa una gran diferencia.<sup>72</sup> Por ello pensamos que una comparación con el CP, *c*-[(*L*-Acp-Aib)<sub>3</sub>-], sería más realista ya que si se elimina la diferencia del  $\gamma$ -Aa, la única diferencia se podría atribuir al  $\alpha$ -Aa, Leu frente a Aib. Este péptido se podría preparar fácilmente a partir del *c*-[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>-], anteriormente preparado. De esta forma, la reducción catalítica heterogénea del *c*-[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>-], usando como catalizador Pd/C (10%) en una disolución de etanol dio lugar al derivado saturado de forma cuantitativa.

---

<sup>136</sup> Searle, M. S.; Westwell, M.S.; Williams, D.H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1995**, 141.

<sup>137</sup> Dunitz, J. D. *Chem. Biol.* **1995**, 2, 709–712.

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

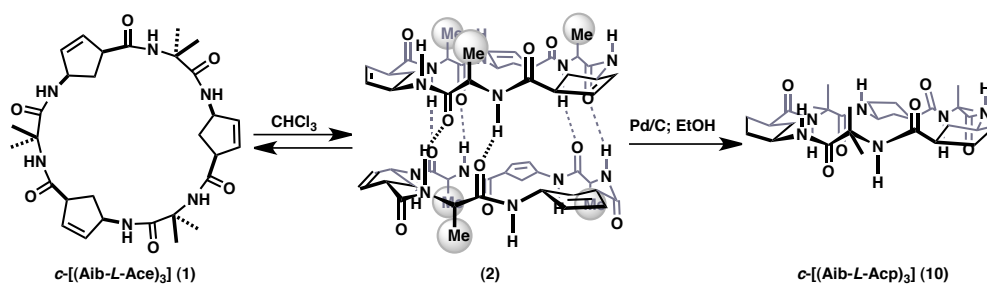


Figura 32: Hidrogenación catalítica heterogénea del CP 1 para obtener el CP 10.

El  $^1\text{H}$ -RMN, del CP resultante, de modo similar al anterior, es un espectro muy sencillo (figura 33), con señales correspondientes a sólo 2 Aa, lo que implica que sigue manteniendo un eje de simetría  $C_3$ . Lo más llamativo, además de la esperada desaparición de la señal del doble enlace a 5.85 ppm, es el desplazamiento del NH del  $\alpha$ -Aa a campo alto, apareciendo ahora a 5.88 ppm (frente a los 6.43 ppm del CP 1), y el desplazamiento a campo bajo de la señal del  $\gamma$ -Aa a 7.62 ppm (frente a 7.18 del CP 1). Es importante destacar que el desplazamiento químico ( $\delta$ ) de estas señales es independiente de la concentración del CP.

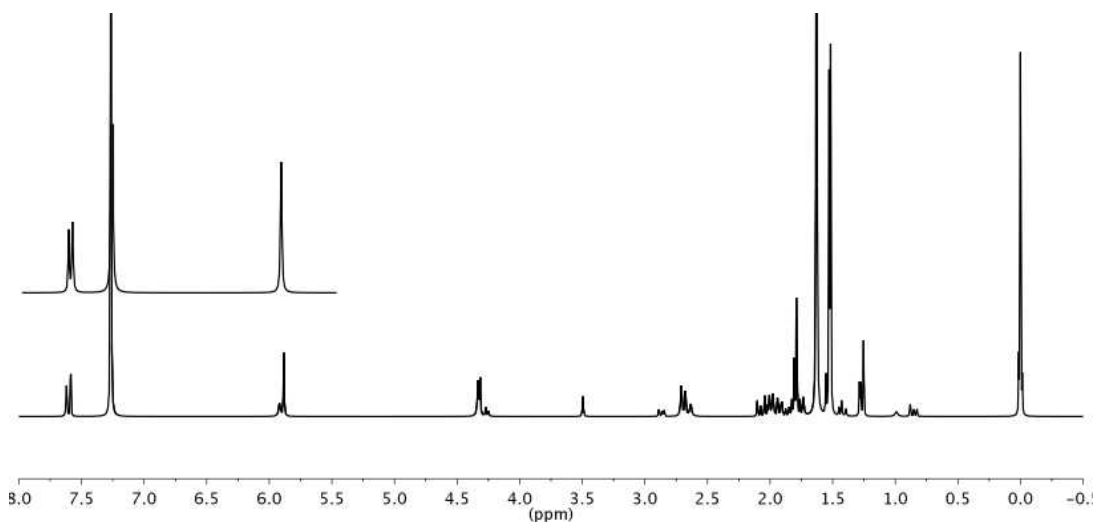
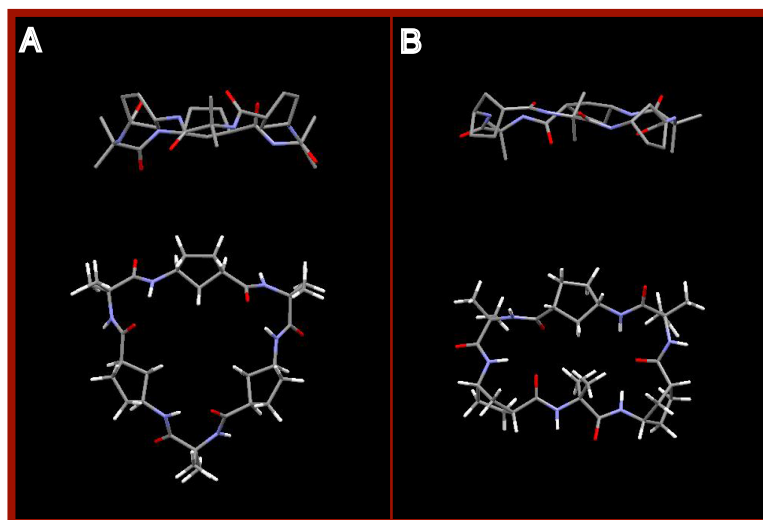


Figura 33: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del CP  $c\text{-}[(\text{L-Acp-Aib})_3\text{-}]$  (10) en  $\text{CDCl}_3$ . La región del espectro entre 5.5 y 8.0 ppm se representó a dos concentraciones diferentes, para mostrar que la señal correspondiente a NH del Aib no es dependiente de la misma.

El desplazamiento de la señal de los NH del  $\alpha$ -Aa a campo tan alto hace suponer que estos NH no están involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno. Por otro lado, el desplazamiento de la señal del NH del  $\gamma$ -Aa a campo bajo (7.62 ppm) si es característico de un enlace de hidrógeno (en teoría esta es la cara que debería quedar

expuesta al disolvente en el caso de que se formen dímeros, y no participaría en enlaces de hidrógeno intermoleculares). Esto nos hace pensar en un posible plegamiento involucrando a los protones amídicos del  $\gamma$ -Acp. En un principio propusimos dos estructuras alternativas, una basada en la formación de enlaces de hidrógeno entre el carbonilo y el NH de dos  $\gamma$ -Aa contiguos, mientras la otra sería la formación de enlaces de hidrógeno entre el carbonilo y el NH del mismo  $\gamma$ -Acp. En ambos casos se observaría que uno de los grupos metilo saldría de la orientación axial para disminuir las repulsiones estéricas con el carbonilo del  $\gamma$ -Acp.



**Figura 34:** Posibles plegamientos que justifican que el  $c$ -[(*L*-Acp-Aib)<sub>3</sub>-] no de lugar al proceso de autoensamblaje molecular.

Hasta el momento no hemos podido esclarecer experimentalmente cual es la estructura correcta, la Dr. Rebeca García-Fandiño, recientemente incorporada nuestro grupo de investigación, realizó estudios teóricos con el fin de ayudarnos a discernir cual es. Estos experimentos se realizaron de la siguiente manera: Las coordenadas atómicas para los correspondientes ciclopéptidos se obtuvieron a partir de las estructuras de RX del dímeros que se forma con el ciclopéptido  $c$ -[(*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-].<sup>71</sup> A partir de esta estructura, se eliminaron los grupos metilo de los nitrógenos, y las cadenas laterales del  $\alpha$ -aminoácido se sustituyeron por dos grupos metileno. Se construyeron dos dímeros diferentes, el formado por la interacción mediante enlaces de hidrógeno entre los  $\alpha$ -Aa (interacción  $\alpha$ - $\alpha$ ), y el análogo en donde

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

son los  $\gamma$ -aminoácidos los que forman enlaces de hidrógeno (interacción  $\gamma$ - $\gamma$ ). Asimismo, también se consideró la estructura de un sólo monómero constituyente de dichos dímeros. Con estas tres estructuras se llevaron a cabo cálculos DFT (Density Functional Theory), utilizando el funcional de correlación de intercambio híbrido B3LYP, que combina el funcional de tres parámetros de Becke con el funcional de correlación de Lee, Yang, y Parr.<sup>138,139,140</sup> En primer lugar se realizaron minimizaciones completas de geometría de cada una de las tres estructuras (sin restricciones en dicha geometría) empleando la base estándar 6-31G (d).<sup>141</sup> A continuación, las geometrías optimizadas se usaron para llevar a cabo cálculos de energía puntuales (Single Point) con una base que agrega funciones de polarización y funciones difusas, 6-31+G(d,p).<sup>141</sup>

Con los estudios realizados, a este nivel de teoría, se confirmó que en caso de formarse un dímero, este sería a través de la interacción  $\alpha$ - $\alpha$ , que es más estable que a través de las caras  $\gamma$ , exactamente 28.6 Kcalmol<sup>-1</sup>. También se realizaron estudios con los monómeros, con objeto verificar que conformación adoptaría un ciclopéptido que no sufriese el proceso de autoensamblaje molecular (figura 34). Se observaba que la primera estructura era más estable, en ella se forman enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los carbonilos y los grupo amino de los  $\gamma$ -aminoácidos contiguos, la distancia de estos enlaces es de 1.88 Å. Es importante resaltar que a este nivel de estudio teóricos, la formación de un dímero a través de una interacción  $\alpha$ - $\alpha$ , es 10.7 Kcalmol<sup>-1</sup> más estable que tener dos monómeros por separado, a pesar de lo observado experimentalmente.

Debido a los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación en la formación de heterodímeros con ciclopéptidos que contienen  $\gamma$ -Acp y  $\gamma$ -Ach.<sup>72</sup> Se

---

<sup>138</sup> Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1992**, 96, 2155-2161.

<sup>139</sup> Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5653.

<sup>140</sup> Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785-789.

<sup>141</sup> Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. v. R.; Pople, J. A. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, 1st ed.; Wiley: New York, 1986

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

decidió ampliar estos estudios a los CPs compuestos por  $\gamma$ -Ace, se realizaron estudios de RMN usando el ciclopéptido **1**, *c*-[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>], y el *c*-[(*D*-Phe-*L*- $\gamma$ -MeN-Ach)<sub>3</sub>] (**11**), con el objeto de estudiar la posible formación de nuevos heterodímeros (figura 35). Sobre una disolución del ciclopéptido **1** en CDCl<sub>3</sub>, se realizaron adiciones del CP **11**, hasta 3 eq, en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN no se observó ninguna señal que no se correspondiese a los espectros de los ciclopéptidos por separado, como sucede con otros  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos. Por consiguiente se concluyó que no se produce la formación de estructuras heterodiméricas cuando se usan CPs formados por  $\gamma$ -Ace y  $\alpha,\alpha$ -aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos.

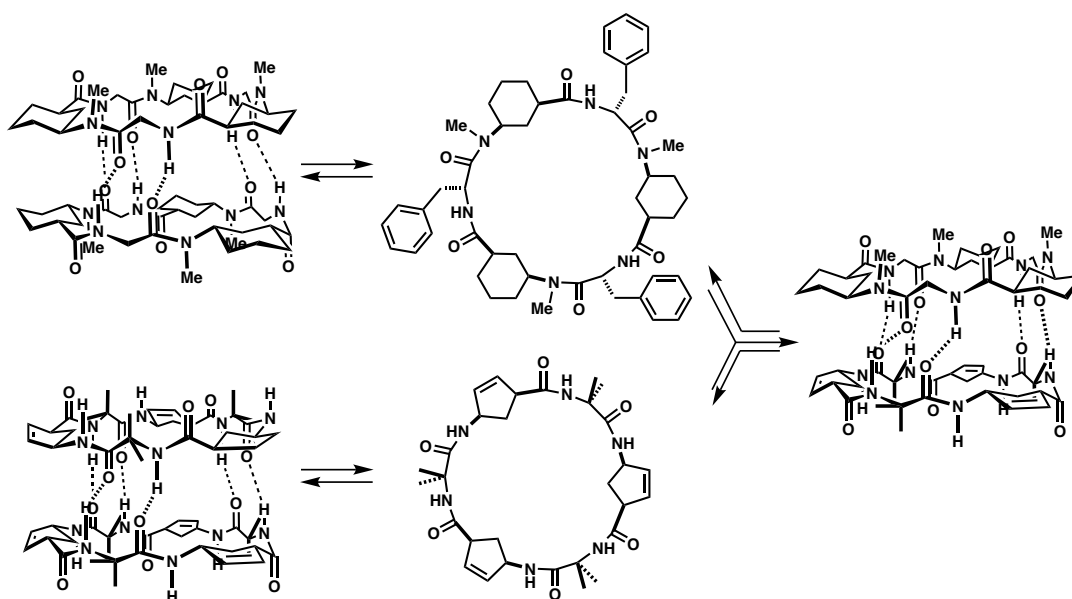


Figura 35: Esquema del proceso de autoensamblaje molecular para la posible formación del heterodímero entre los ciclopéptidos: *c*-[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>], y el *c*-[(*D*-Phe-*L*- $\gamma$ -MeN-Ach)<sub>3</sub>].

En conclusión, se ha demostrado que los ciclopéptidos que alternan  $\alpha$  aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos y el ácido *cis*-4-amino-ciclopent-2-enocarboxílico ( $\gamma$ -Ace) dan lugar a estructuras diméricas mediante la formación de una lamina  $\beta$  antiparalela, favoreciendo la interacción entre unidades mediante enlaces de hidrógeno. Los grupos metilo orientados en disposición axial de los  $\alpha$  aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos demostraron ser capaces de bloquear una de las caras del CP, impidiendo así la agregación de estos para dar lugar a nanotubos. Este tipo de compuestos representan una nueva clase de tapas moleculares, que podrían ser usados en la formación de canales iónicos modificando las propiedades de transporte,

conductividad y sensibilidad. De todas formas las fuertes interacciones repulsivas entre el grupo metilo en disposición axial, responsable del bloqueo del crecimiento del tubo, con el carbonilo del  $\gamma$ -Ace dificulta que adopte una conformación plana y por ello las constantes de asociación son moderadas.

### **Compuestos formados por el *cis*- $\gamma$ -ciclohexanocarboxílico y el ácido 1-aminociclopropanocarboxílico.**

Como consecuencia de los resultados obtenidos con el péptido compuesto por el  $\gamma$ -Ace y el Aib, y gracias a una colaboración con el Prof. Carlos Cativiela, se decidió ampliar el estudio de los ciclopéptidos formados por  $\alpha$ -aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos. Para llevar a cabo este proyecto se decidió usar residuos diferentes a los usados con anterioridad, como  $\gamma$ -aminoácido se usó el ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico ( $\gamma$ -Ach), el cual presenta varias ventajas frente al  $\gamma$ -Ace y el  $\gamma$ -Acp. En primer lugar el uso de aminoácidos saturados como el  $\gamma$ -Ach reduce la dificultades sintéticas presentadas por el  $\gamma$ -Ace, otra ventaja es que el ciclohexano, debido a que tiende a adoptar la conformación silla con los dos sustituyentes en ecuatorial, favorece la planaridad del ciclopéptido y por tanto el autoensamblaje de los ciclopéptidos. Este comportamiento conformacional debería dificultar que el compuesto se pliegue como sucede en el caso del CP **10**, *c*-[(*L*-Acp-Aib)<sub>3</sub>-], anteriormente estudiado. Como  $\alpha$ -aminoácido en lugar de usar el Aib, se decidió usar el ácido 1-aminociclopropanocarboxílico ( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>C).<sup>142,143</sup> Este aminoácido de la familia del Aib, y sus derivados se han estudiado, ampliamente, en la formación de hélices  $\alpha$  y giros  $\beta$ .<sup>144</sup> La presencia del grupo ciclopropílico debería actuar de formar similar a los grupos metílicos del Aib, aunque debido a la unión de estos dos sustituyentes mediante un enlace C-C, hace suponer que ambos sustituyentes no se dispongan en las orientaciones pseudoaxial y ecuatorial de los metilos del Aib. No obstante esperábamos que el CP siguiese adoptando la conformación plana, y a su vez siga protegiendo una de las caras del ciclopéptido de la interacción con otras unidades peptídicas, impidiendo la formación del nanotubo. También esperamos que usando este aminoácido, junto con el  $\gamma$ -aminoácido descrito, obtuviésemos ciclopéptidos capaces de autoensamblarse mediante laminas  $\beta$ ,

---

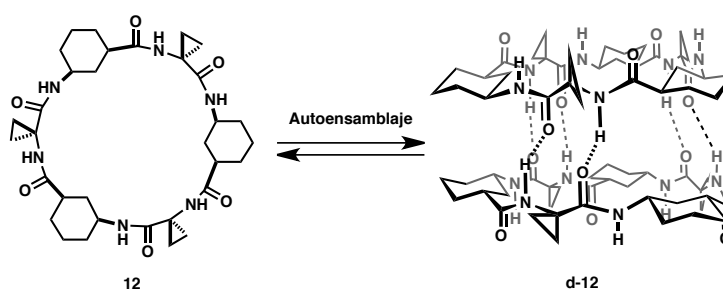
<sup>142</sup> El ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (Ac<sub>3</sub>C) fué proporcionado por el grupo del Prof. Carlos Cativiela, del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Zaragoza-CSIC.

<sup>143</sup> Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 645-732.

<sup>144</sup> Royo, S.; De Borggraeve, W. M.; Peggion, C.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Toniolo, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2036-2037.

formándose dímeros y no dando lugar a agregados supramoleculares de mayores dimensiones.

Para la realización de este proyecto se decidió preparar el ciclopéptido de seis residuos:  $c\text{-}[(L\text{-Ach-Ac}_3\text{c})_3\text{-}]$  (**12**). Teniendo en cuenta los problemas sintéticos del péptido con el Aib, se decidió realizar la síntesis en fase sólida. El péptido lineal se preparó mediante síntesis en fase sólida, usando una estrategia Fmoc y la resina 2-clorotritilo como soporte sólido. Para los acoplamientos utilizamos HBTU como agente activante, empleando 2.5 eq.  $\gamma$ -Aa y 3 eq. para los  $\alpha$ -Aa, con tiempos de acoplamiento de 30 min.<sup>145</sup> Después de realizar la ruptura con una mezcla de ácido trifluoroacético, diclorometano, agua y triisopropilsilano (90:5:2.5:2.5), se realizó la ciclación, para la que se empleó una disolución de dimetilformamida en presencia de HBTU y DIEA. La purificación del CP se llevó a cabo mediante HPLC en fase reversa, usando como eluyente  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  (0.1%TFA).



**Figura 36:** Estructura del  $c\text{-}[(L\text{-Ach-Ac}_3\text{c})_3\text{-}]$  (**12**) y del correspondiente dímero, si el proceso de autoensamblaje molecular tiene lugar.

Una vez purificado el ciclopéptido, este resultó poco soluble tanto en disolventes apolares (cloroformo, diclorometano, etc.) así como en muchos disolventes polares (agua, metanol, etc). La falta de solubilidad en disolventes apolares, en los cuales se esperaba que los CPs pudiesen autoensamblarse, nos llevó a estudiar mezcla de disolventes, encontrando que es soluble en una mezcla de  $\text{DMSO}:\text{CHCl}_3$  (4:1), condiciones bajo las que se llevó a cabo los estudios de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 37). Lo primero que se observa es que el espectro es muy sencillo, donde sólo hay 2 señales características de los NH: a 8.3 ppm el NH del  $\text{Ac}_3\text{c}$  y a 7.0 ppm la señal correspondiente al NH del  $\gamma$ -Ach, la constante de acoplamiento es 8.3 Hz,

<sup>145</sup> *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*, Oxford University press, Oxford, **2000**.

característico para una conformación *anti* o *trans*. Estos datos indican que el ciclopéptido adopta una conformación plana y tiene un eje de simetría C<sub>3</sub>, de ahí la sencillez del espectro. Las señales de los grupos amida se encuentran muy desapantallados, sobre todo el singlete del N-H correspondiente al Ac<sub>3</sub>C, a un desplazamiento similar a los NH que se encuentran formando enlaces de hidrógeno en los dímeros anteriormente estudiados en nuestro grupo de investigación.<sup>71</sup> Además, aquellos que deberían intervenir en la dimerización aparecen desplazados a campo bajo, sin embargo este apantallamiento se podría deber al efecto del disolvente, DMSO. En contraposición, el H $\gamma$  del Ach aparece a 3.65 ppm, desplazamiento que no se corresponde para las hojas plegadas  $\beta$  observadas anteriormente con ciclopéptidos N-metilados (tabla 2). Esta incongruencia nos llevó a realizar estudios adicionales.

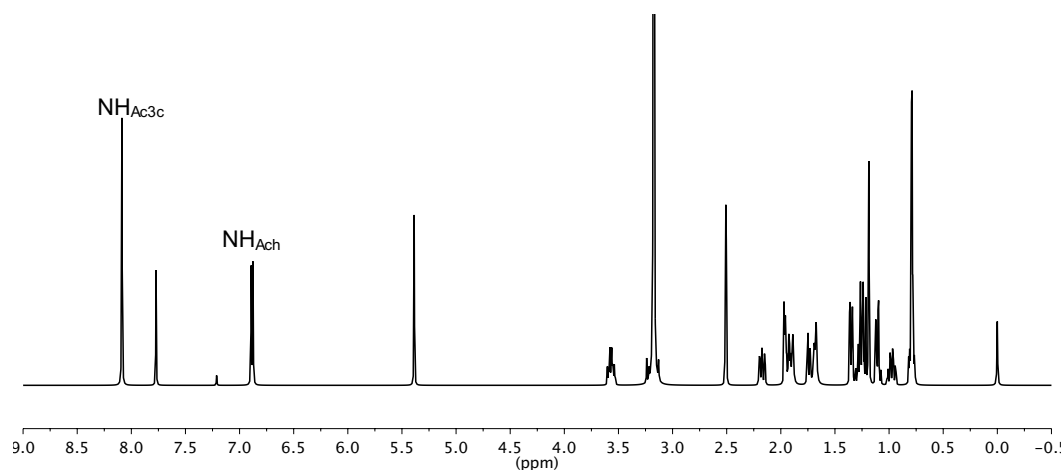


Figura 37: Se muestra el <sup>1</sup>H-RMN del *c*-[(*L*-Ach-Ac<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>-] (12).

Para comprobar que el proceso de autoensamblaje molecular tenía lugar y no se debía a interacciones con el disolvente, se realizaron estudios de <sup>1</sup>H-RMN a diferentes concentraciones y temperaturas, entre 303K y 243K en intervalos de 10 °C, con concentraciones que van desde 22 mM a 2 mM. En la tabla 1 aparecen indicados los desplazamientos químicos del N-H.

Se observó que las señales correspondientes a los grupos amida, tanto el correspondiente al  $\alpha$ -Aa como las señales del  $\gamma$ -Aa, no sufrían desplazamientos significativos con la concentración. Esto puede deberse a que los dímeros tengan una

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

constante de asociación muy alta,  $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ , o que el proceso de autoensamblaje no tiene lugar. Al realizar una representación de los desplazamientos químicos de los NH frente a la concentración y la temperatura no se obtuvo una gráfica con las características de los procesos de autoensamblaje. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos para aquellos ciclopéptidos que si experimentan el proceso de autoensamblaje molecular.

Concentración (mM)		<b>303 K</b>	<b>283 K</b>	<b>273 K</b>	<b>263 K</b>	<b>253 K</b>	<b>243 K</b>
<b>22</b>	<b>NH<sub>Ac3c</sub></b>	7.97	8.07	8.13	8.18	8.23	8.28
	<b>NH<sub>Ach</sub></b>	6.94	6.98	7.00	7.02	7.03	7.04
<b>12</b>	<b>NH<sub>Ac3c</sub></b>	8.00	8.10	8.15	8.20	8.25	8.30
	<b>NH<sub>Ach</sub></b>	6.91	6.95	6.97	6.99	7.00	7.02
<b>7</b>	<b>NH<sub>Ac3c</sub></b>	8.00	8.10	8.15	8.20	8.26	8.31
	<b>NH<sub>Ach</sub></b>	6.91	6.95	6.96	6.98	7.00	7.01
<b>4</b>	<b>NH<sub>Ac3c</sub></b>	8.01	8.12	8.17	8.22	8.26	8.29
	<b>NH<sub>Ach</sub></b>	6.90	6.94	6.96	6.98	7.00	7.01
<b>2</b>	<b>NH<sub>Ac3c</sub></b>	8.01	8.11	8.16	8.21	8.26	8.31
	<b>NH<sub>Ach</sub></b>	6.90	6.94	6.96	6.98	7.00	7.02

Tabla 1: Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de las señales correspondientes a los NH del residuo Ac<sub>3c</sub> para el CP 12.

Una explicación para que la formación del dímero no tenga lugar es la elevada polaridad del disolvente, que el 20% de DMSO sea una proporción demasiado elevada para que el dímero se forme, si este tiene una constante de asociación débil. Para dar respuesta a estas cuestiones se decidió comparar el ciclo  $c-[(L\text{-Ach-Ac}_3\text{c})_3\text{-}]$  (**12**) con dos ciclohexapéptidos *N*-metilados:  $c-[(L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ach-D-Phe})_3\text{-}]$  (**13**) cuya constante de asociación es  $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$  (CDCl<sub>3</sub>), y el  $c-[(L\text{-Ach-D-}^{\text{Me}}\text{N-Ala})_3\text{-}]$  (**14**) cuya interacción es débil,  $K_a = 230 \text{ M}^{-1}$  (CDCl<sub>3</sub>).<sup>71</sup> Al realizar <sup>1</sup>H-RMN de los CPs **13** y **14** en una solución de CDCl<sub>3</sub>:DMSO-*d*<sup>6</sup> (80:20), se observó que los espectros eran muy similares a los realizados en CDCl<sub>3</sub>, los desplazamientos químicos más significativos aparecen reflejados en la tabla 2. El uso del dimetilsulfóxido no parece haber modificado los

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

desplazamientos químicos de las señales que intervienen en el proceso de dimerización. Lo más llamativo es que las señales de los NHs del CP **12** están desplazadas a campo alto con respecto a sus equivalentes en los compuestos **13** y **14**.

Ciclopéptido:	NH( $\alpha$ -Aa)	NH(Ach)	H $\alpha$ ( $\alpha$ -Aa)	H $\gamma$ (Ach)
<i>c</i> -[(L-Ach-Ac <sub>3</sub> C) <sub>3</sub> -]	7.97	6.94	-	3.58
<i>c</i> -[(L- <sup>Me</sup> N-Ach-D-Phe) <sub>3</sub> -]	8.60	-	5.23	4.48
<i>c</i> -[(L-Ach-D- <sup>Me</sup> N-Ala) <sub>3</sub> -]	-	7.36	5.15	3.65

**Tabla 2:** Se muestran las señales más características para el proceso de autoensamblaje de los ciclopéptidos *c*-[(L-Ach-Ac<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>-] (**12**), *c*-[(L-<sup>Me</sup>N-Ach-D-Phe)<sub>3</sub>-] (**13**) interacción  $\alpha$ - $\alpha$ , y *c*-[(L-Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>3</sub>-] (**14**) interacción  $\gamma$ - $\gamma$ .

Una estrategia usada para demostrar si la formación de enlaces de hidrógeno son intra- o intermolecular, es estudiar la dependencia de las señales de la amida con respecto a la temperatura, si  $\Delta\delta/\Delta T$  es inferior a 5 ppb/K significa que es un enlace de hidrógeno intramolecular, en nuestro caso significaría que pueden estar participando en la formación de dímeros.<sup>146,147,148</sup> Se realizaron <sup>1</sup>H-RMN de los CPs **12**, **13** y **14** a diferentes temperaturas, de 25°C a -30°C, y se calculó  $\Delta\delta/\Delta T$  (tabla 3), obteniéndose que la variación del NH<sub>Phe</sub> para el CP **13** es 3.27 ppb/K, es decir que debe estar formando enlaces de hidrógeno con otro ciclopéptido. Mientras que para el caso del CP **14**,  $\Delta\delta(\text{NH}_{\text{Ach}})/\Delta T$  es 7.27 ppb/K, lo que indicaría que los protones de la amida no están interaccionando con otro ciclopéptido, sino que interactúan con las moléculas de disolvente, tal y como se esperaba que se comportase un ciclopéptido que tiene una pequeña constante de dimerización en cloroformo, y suponemos que en una mezcla más polar, 20% DMSO-d<sup>6</sup> en CDCl<sub>3</sub>, debe estar como monómero. Para el caso del ciclopéptido *c*-[(L-Ach-Ac<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>-] (**12**), se calculó la dependencia de las señales del NH<sub>Ach</sub> y del NH<sub>Ac<sub>3</sub>C</sub> entre 30°C y -30°C, a diferentes concentraciones que van desde 21.5 mM a 1.9 mM. Se obtuvieron resultados sorprendentes, la señal a 7.97 ppm que corresponde

<sup>146</sup> Kulp, J. L.; Clark, T. D. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11867-11877.

<sup>147</sup> Ranganathan, D.; Haridas, V.; Kurur, S.; Nagaraj, R.; Bikshapathy, E.; Kunwar, A. C.; Sarma, A. V.; Vairamani, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 365-374.

<sup>148</sup> Ranganathan, D.; Haridas, V.; Nagaraj, R.; Karle, I. L. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4415-4422.

al NH del ácido 1-aminociclopropilencarboxílico ( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>c), y por tanto debería participar en la formación de enlaces de hidrógeno con otra unidad de ciclopéptido, en el caso de la formación de dímeros, tiene una relación  $\Delta\delta/\Delta T$  entre 5.2 ppb·K<sup>-1</sup> a 5.0 ppb·K<sup>-1</sup>, es decir, se encuentra en el límite de interacción con el disolvente. Mientras que la señal que se encuentra a 6.9 ppm, que no participa en el autoensamblaje molecular, tiene un valor de 2.0-1.7 ppb·K<sup>-1</sup>, y por consiguiente no está interaccionando con el disolvente. Este resultado implica que estos NH parecen no estar involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno ni con el disolvente ni con otros ciclopéptidos. Esta falta de interacción no resulta fácil de explicar, tal vez exista un plegamiento que oriente a los NH a una zona en la que el disolvente no puede acceder fácilmente .

Ciclopéptido:		303 K	298 K	273	243K	$\Delta\delta/\Delta T$
c-[(L-Ach-Ac <sub>3</sub> c) <sub>3</sub> -]	$\alpha$ -Aa	7.97	-	8.13	8.28	5.2
	$\gamma$ -Aa	6.94	-	6.97	7.02	2.0
c-[(L- <sup>Me</sup> N-Ach-D-Phe) <sub>3</sub> -]		-	8.59	8.67	8.77	3.8
c-[(L-Ach-D- <sup>Me</sup> N-Ala) <sub>3</sub> -]		-	7.36	7.55	7.77	7.3

**Tabla 3: Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de las señales correspondientes a los NHs, y la dependencia del desplazamiento químico frente a la temperatura ( $\Delta\delta/\Delta T$ ).**

Debido a que las estrategias de caracterización anteriormente empleadas no ofrecieron conclusiones definitivas, se decidió emplear una técnica nueva para nuestro grupo de investigación, pero ampliamente usada en estudios de química supramolecular, experimentos de RMN de difusión (DOSY).<sup>149</sup> La difusión de una molécula en un disolvente es dependiente del tamaño de la misma, siguiendo este principio se esperaba que las difusiones correspondientes a un ciclopéptido que forma dímeros fuesen diferentes de uno que no se autoensambla, ya que la diferencia de pesos moleculares sería el doble. Esta técnica también tiene limitaciones, la primera es que la ecuación de Stokes Einstein esta diseñada para moléculas esféricas,<sup>150</sup> en nuestro

<sup>149</sup> Macchioni, A.; Ciancaleoni, G.; Zuccaccia, C.; Zuccaccia, D. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 479–489.

<sup>150</sup> Edward, J. T. *J. Chem. Educ.*, **1970**, 47, 261-270.

caso los ciclopéptidos son cilindros con un orificio en el centro, como un donuts, esto puede hacer que la difusión de la molécula varíe según como se encuentre orientada con respecto al gradiente de difusión, aún así esperamos que este problema pueda ser solventado. El segundo escollo con el que nos enfrentamos es que los disolvente cuyo punto de ebullición son bajos, como el  $\text{CDCl}_3$ , son muy dependientes de la temperatura, produciéndose corrientes de convección, esto dificulta la realización del experimento, sin embargo este problema puede ser solventado usando experimentos de doble eco estimulado para la medida de coeficientes de difusión por RMN, en inglés, DSTE (Double-STimulated-Echo).<sup>151,152</sup>

El primer paso a realizar es concretar cuales son las constantes de difusión ( $Dt$ ) para un ciclopéptido que forme dímeros, y otro que no los forme. Se decidió estudiar los siguientes compuestos:  $c\text{-}[(L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ach-D-Phe})_3\text{-}]$  (**13**), y el  $c\text{-}[(L\text{-Ach-D-}^{\text{Me}}\text{N-Ala})_3\text{-}]$  (**14**). Como ya hemos comentado el CP **13** forma dímeros con  $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}(\text{CHCl}_3)$ , mientras que el CP **14** forma dímeros con una baja constante de interacción en cloroformo, pero en nuestro caso el disolvente en el que se realizaron los estudios era  $\text{CHCl}_3\text{:DMSO-d}^6(4:1)$ , por lo cual debería estar totalmente disociado. Una vez conocidas  $Dt$  para los dos ciclopéptidos, se compararon con la  $Dt$  del ciclopéptido  $c\text{-}[(L\text{-Ach-Ac}_3\text{C})_3\text{-}]$  (**12**).

Se realizaron los experimentos DSTE en 64 pasos, con tiempos entre gradientes de 200 ms (milisegundos) para los 3 ciclopéptidos. Lamentablemente se encontró que las difusiones para los CP **13** y el CP **14** son muy similares,  $Dt = 3.2 \cdot 10^{-10} \text{ m/s}^2$ . Y no se puede distinguir cuando un CP se encuentra como monómero o como dímero, por lo menos para los casos estudiados.

Con el objetivo de esclarecer el comportamiento de este compuesto, se decidió realizar estudios teóricos, cálculos DFT, y dinámica molecular, la Dr. Rebeca García-Fandiño recientemente incorporada fue la encargada de realizar dichos estudios.

Para la realización de estos cálculos el primer paso que se dio fue el cálculo de las coordenadas atómicas de los ciclopéptidos a estudiar, estos se obtuvieron a partir de las

---

<sup>151</sup> Jerschow, A.; Muller, N. *J. Magn. Reson.*, **1997**, 125, 372–375.

<sup>152</sup> Khrapitchev, A. A.; Callaghan, P. T. *J. Magn. Reson.*, **2001**, 152, 259-268.

estructuras de RX del ciclopeptido  $c\text{-}[(D\text{-Phe}\text{-}L\text{-}^{\text{Me}}\text{N}\text{-}\gamma\text{-Ach})_3\text{-}]$ .<sup>71</sup> A partir de esta estructura, se eliminaron los grupos metilo de los nitrógenos, y las cadenas laterales del aminoácido alfa se sustituyeron por grupos ciclopropilo. Se construyeron dos dímeros diferentes, el formado por la interacción mediante enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos alfa (interacción  $\alpha\text{-}\alpha$ ), y el análogo en donde son los aminoácidos gamma los que forman enlaces de hidrógeno (interacción  $\gamma\text{-}\gamma$ ). Asimismo, también se calculó la estructura monomérica del ciclopeptido.

Con estas tres estructuras se llevaron a cabo cálculos DFT (Density Functional Theory), utilizando el funcional de correlación de intercambio híbrido B3LYP, que combina el funcional de tres parámetros de Becke con el funcional de correlación de Lee, Yang, y Parr.<sup>138,139,140</sup> En primer lugar se realizaron minimizaciones completas de geometría de cada una de las tres estructuras (sin restricciones en dicha geometría) empleando la base estándar 6-31G (d). A continuación, las geometrías optimizadas se usaron para llevar a cabo cálculos de energía puntuales (Single Point) con una base que agrega funciones de polarización y funciones difusas, 6-31+G(d,p).<sup>140</sup>

Asimismo, las estructuras optimizadas se utilizaron en simulaciones de dinámica molecular, mediante el programa GROMACS 4.0.<sup>153</sup> Los parámetros empleados para el ciclopeptido corresponden al campo de fuerzas de GAFF,<sup>154,155</sup> fácilmente combinable con el campo de fuerzas de AMBER99,<sup>156</sup> utilizando las cargas correspondientes a cada átomo obtenidas a partir de los cálculos B3LYP/6-31+G(d,p). Cada una de las estructuras se solvató usando una caja de agua, de cloroformo, o bien una caja de

---

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

<sup>138</sup> Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 2155-2161.

<sup>139</sup> Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5653.

<sup>140</sup> Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.

<sup>153</sup> Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435-447.

<sup>154</sup> Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Mol. Graphics Modell.* **2006**, *25*, 247-260.

<sup>155</sup> Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.

<sup>156</sup> Wang, J.; Cieplak, C.; Kollman, P. A. *J. Comp. Chem.* **2000**, *21*, 1049-1074.

cloroformo/DMSO (20%). El agua se simuló empleando el modelo (SPC/E),<sup>157</sup> mientras para el cloroformo y el DMSO se empleó el modelo de Kollman.<sup>158,159</sup>

Los sistemas así preparados se minimizaron y equilibraron, a continuación se simularon en condiciones de equilibrio durante 10-20 ns (time step=2 fs). La presión se mantuvo constante a 1 bar utilizando el barostato de Parrinello-Rahman en condiciones isotópicas.<sup>160</sup> La temperatura también fue constante a 300 K, conservada mediante el termostato de Berendsen.<sup>161</sup> El algoritmo de LINCS<sup>162</sup> se empleó para eliminar las vibraciones de enlaces. El método PME (Particle Mesh Ewald),<sup>163</sup> acoplado al uso de condiciones periódicas (PBC), se utilizó para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance, usando una distancia límite (*cutoff*) de 1.0 nm y un espacio de red (*grid spacing*) de 0.12 nm. Las interacciones de van der Waals se calcularon usando condiciones periódicas acopladas a un *cutoff* esférico de 1.0 nm.

Los análisis de las simulaciones se llevaron a cabo empleando herramientas implementadas en GROMACS 4.0. Para la visualización de estructuras empleamos los programas MOLDEN<sup>164</sup> y VMD (Visual Molecular Dynamics).<sup>165</sup> Todos los cálculos DFT realizados se llevaron a cabo mediante el paquete de Gaussian 03,<sup>166</sup> en el centro

---

<sup>157</sup> Joung, I. S.; Cheatham, T. E. *J Phys Chem B* **2008**, *112*, 9020-9041.

<sup>158</sup> Fox, T.; Kollman, P. J. *Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8070-8079.

<sup>159</sup> Cieplak, P.; Caldwell, J.; Kollman, P. J. *Comput. Chem.* **2001**, *22*, 1048-1057.

<sup>160</sup> Parrinello, M.; Rahman, A. *J Appl Phys* **1981**, *52*, 7182-7190.

<sup>161</sup> Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.

<sup>162</sup> Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463-1472.

<sup>163</sup> Essman, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577-8594.

<sup>164</sup> Schaftenaar, G.; Noordik, J. H., *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **2000**, *14*, 123-134.

<sup>165</sup> Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J Mol. Graphics*, **1996**, *14*, 33-38.

<sup>166</sup> Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.;

de supercomputación CESGA (Centro de Supercomputación de Galicia). Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron en el BSC (Barcelona Supercomputing Center).

Cuando se analizaron los resultados obtenidos en estos experimentos DFT y de dinámica molecular se obtuvieron datos muy interesantes. En primer lugar se procederá a estudiar los resultados obtenidos mediante cálculos DFT. Los primeros resultados mostraron que en las tres posibilidades (dímero  $\alpha$ - $\alpha$ ; dímero  $\gamma$ - $\gamma$ ; monómero) se pueden formar enlaces de hidrógeno, tanto intermoleculares como intramoleculares. Cuando se compara la estabilidad energética de unos frente a otros, se observa que el dímero formado a través de la interacción alfa es 40.5 Kcal mol<sup>-1</sup> más estable que el formado a través de la interacción gamma, y 37.3 Kcal mol<sup>-1</sup> más estable que los dos ciclopéptidos como monómeros. Este resultado concuerda con las suposiciones previas que nos movieron a realizar este proyecto, aunque hay que tener en cuenta que estos resultados no tienen en cuenta el efecto del disolvente.

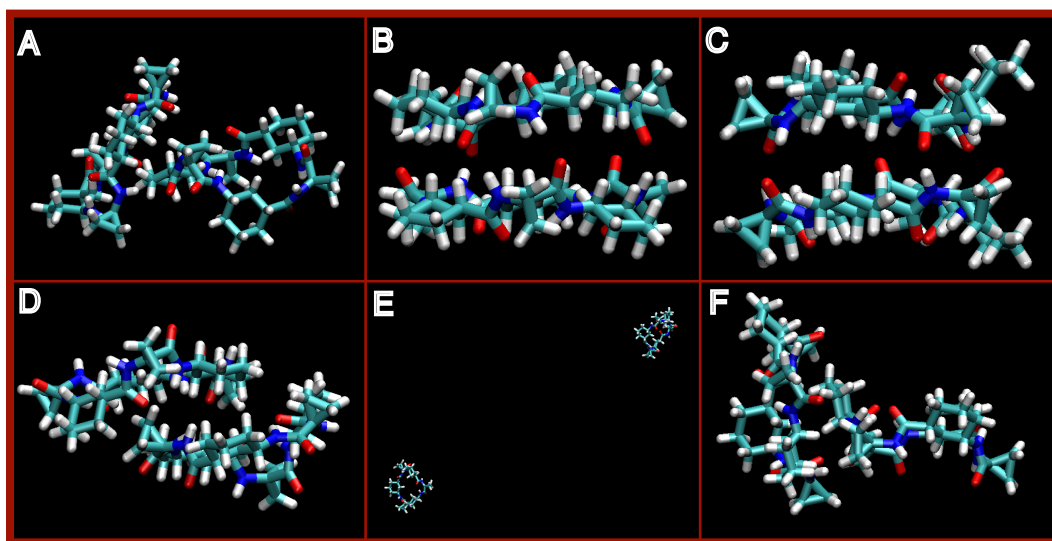
Para solventar este problema se realizaron estudios de dinámica molecular, en los que se puede observar como se comporta el ciclopéptido en diferentes disolventes a lo largo del tiempo. Los disolventes seleccionados fueron, agua, cloroformo y 20% DMSO en cloroformo, ya que fueron las condiciones en las que se realizaron los estudios de RMN.

Los resultados de dinámica molecular en agua mostraron que los dímeros formados por el *c*-[(L-Ach-Ac<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>-] no son estables en agua, a los 10 ns los CPs no forman enlaces de hidrógeno intermoleculares entre ellos, tanto en la interacción  $\alpha$ - $\alpha$  como en la  $\gamma$ - $\gamma$  (figuras 38 A y 38 D), la estructura dimérica no es lo suficientemente

---

Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, revision E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, **2004**.

estable como para poder competir con los enlaces de hidrógenos que se establecen con el agua, entre 20 y 28 por cada péptido.



**Figura 38:** Representación de los resultados de dinámica molecular para el *c*-[(*L*-Ach-Ac<sub>3</sub>c)<sub>3</sub>]. La interacción  $\alpha$ - $\alpha$  se representa en las imágenes A, B y C, en los disolventes: agua, cloroformo y 20%DMSO cloroformo respectivamente. Las figuras D, E y F se corresponden con los resultados de la interacción  $\gamma$ - $\gamma$ , en agua, cloroformo y DMSO:CHCl<sub>3</sub> (4:1), respectivamente.

Cuando se realizaron los estudios de dinámica molecular en cloroformo se observó que únicamente el dímero que se establece a través de la interacción  $\alpha$ - $\alpha$  es estable (figura 38 B), cuando los CPs interactúan a través de su cara gamma la estructura dimérica no es estable (figura 38 E). Por el momento, todos estos resultados concuerdan con las predicciones iniciales hechas por nuestro grupo de investigación antes de empezar el proyecto. Sin embargo, los problemas de solubilidad de este compuesto nos hizo trabajar con una mezcla de disolventes que no se esperaba en un principio. Cuando se analizaron los resultados de los estudios de dinámica molecular en los que se introdujo como disolvente un 20% de DMSO en ClCl<sub>3</sub>, se obtienen conclusiones interesantes. El dímero formado a través de la formación de enlaces de hidrógeno por la cara gamma no es estable (figura 36 F), sin embargo, cuando este se forma por medio de la interacción  $\alpha$ - $\alpha$  si lo es, incluso cuando la dinámica es más larga, 20 ns (figura 38 C). Es importante resaltar, que a pesar de ser estable este no mantiene la conformación totalmente plana, como en el caso donde no hay DMSO. Estos resultados también se confirmaron cuando se analizaron las gráficas de RMSD (Root Mean Square Deviation) y RMSF (Root Mean Square Fluctuation).

Se puede concluir que los ciclohexapéptidos compuestos por  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>c y  $\gamma$ -Ach pueden dar lugar a la formación de dímeros a través de sus caras  $\alpha$ . Sin embargo, la falta de un rayos X que nos muestre la estructura del dímero, nos impide corroborar inequívocamente que es lo que sucede.

## Diseño, síntesis y estudio de $\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos.

Como se ha comentado en la introducción, existe una amplia gama de ciclopeptidos capaces de autoensamblarse para dar lugar a nanotubos, estos péptidos pueden ser compuestos por una gran variedad de aminoácidos.<sup>31</sup> Algunas de las aplicaciones desarrolladas para los nanotubos peptídicos ya han sido presentadas en esta memoria (véase introducción Pág. 28). En nuestro grupo de investigación, se diseñaron, sintetizaron y estudiaron  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos capaces de autoensamblarse formando estructuras diméricas.<sup>31</sup> En este capítulo nos centraremos en el estudio de nuevos ciclopeptidos capaces de autoensamblarse para dar lugar a la formación de agregados supramoleculares, con el objeto de demostrar la existencia de los  $\alpha,\gamma$ -nanotubos. Para presentar estos estudios se decidió dividirlo en dos secciones diferentes, cada una de ellas estará enfocada a discutir la posibilidad de caracterizar nuevos  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos y su capacidad para dar lugar a nanotubos.

- i. Caracterización de nanotubos en estado sólido:** La caracterización de estos agregados de nanotubos en el estado sólido implica diseñar ciclopeptidos capaces de formar cristales, en los que el crecimiento no tenga lugar sólo en la dirección del nanotubo sino en las tres direcciones del espacio. En ese caso se podría obtener cristales con la calidad suficiente para su resolución mediante difracción de rayos-X, tarea que hasta la fecha ha resultado infructuosa para la mayor parte de los nanotubos peptídicos. Para ello es muy importante el diseño del CP y del correspondiente nanotubo, de tal forma que se permita un buen empaquetamiento, estableciendo interacciones favorables entre ellos. Sin embargo, esto no es una tarea sencilla, de todas formas en caso de no tener el tamaño suficiente se podría caracterizar mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM), tal y como se llevó a cabo con los D,L- $\alpha$ -nanotubos.<sup>56</sup> La estrategia la formación de nanotubos mediante un

---

<sup>31</sup> Brea, R. J.; Reiriz, C.; Granja, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1448-1456.

<sup>56</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, 366, 324-327.

cambio de pH, así como su caracterización mediante TEM fueron los métodos que mejores resultados dieron en el estudio y desarrollo de los *D,L- $\alpha$* -nanotubos, por ese motivo se decidió usar esta estrategia en un intento de caracterizar los  *$\alpha,\gamma$* -nanotubos.

**ii. Nanotubos individuales:** Tanto en las agrupaciones de nanotubos como los estudios en disolución, las interacciones de las cadenas laterales entre diferentes nanotubos pueden jugar un papel muy importante a la hora de producirse el proceso de autoensamblaje molecular. Con el objeto de evitar estas interacciones se decidió estudiar el comportamiento de los nanotubos individuales, evitando la formación de agregados mediante interacciones a través de las cadenas laterales, y de esa manera poder obtener información exacta acerca de las características de un único  *$\alpha,\gamma$* -nanotubo: diámetro, longitud. Para la realización de este objetivo se decidió usar diferentes técnicas, que a su vez pueden ser complementarias: microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía de transmisión de electrones (TEM), microscopía de efecto túnel (STM).

### **$\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: agrupaciones de nanotubos.**

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral era demostrar la formación de los  $\alpha,\gamma$ -nanotubos mediante el autoensamblaje molecular de los correspondientes ciclopeptidos. Posiblemente, la mejor forma de caracterizar una molécula, o sus agregados moleculares, sea mediante la difracción de rayos X de un monocristal. Los nanotubos peptídicos están diseñados para crecer en una dirección del espacio, por lo que no siempre se empaquetan formando cristales con la calidad suficiente para su caracterización mediante difracción de rayos X, de echo, a día de hoy no hay datos de resolución atómica de un *D,L*- $\alpha$ -nanotubo. El Prof. Ghadiri y colaboradores lograron caracterizar dichos compuestos mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM), difracción de electrones y FT-IR, con los datos obtenidos propusieron un modelo en el cual los *D,L*- $\alpha$ -ciclopeptidos se apilaban unos encima de otros mediante la formación de una lamina  $\beta$ -antiparalela.<sup>56,167,168</sup> Si pudieron caracterizarse mediante difracción de rayos X aquellos compuestos que mediante el bloqueo selectivo de una de las caras del ciclopeptido formaban estructuras diméricas, en este caso el autoensamblaje molecular también tiene lugar mediante la formación de laminas  $\beta$ -antiparalela.<sup>59,60</sup>

El Dr. Manuel Amorín, durante su tesis doctoral, comenzó los estudios sobre la capacidad de autoensamblaje de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos para dar lugar a la formación de

---

<sup>56</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

<sup>167</sup> Khazanovich, N.; Granja, J. R.; McRee, D. E.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011-6012.

<sup>168</sup> Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

<sup>59</sup> Ghadiri M. R.; Kobayashi K.; Granja J. R.; Chadha R. K.; McRee D. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.

<sup>60</sup> Clark T. D.; Buriak J. M.; Kobayashi K.; Isler M. P.; Ghadiri M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.

nanotubos.<sup>121</sup> Con el objeto de demostrar que esto era posible, se sintetizaron los ciclos:  $c-[(L\text{-Gln-}D\text{-}\gamma\text{-Ach})_3^-]$  y  $c-[(L\text{-Gln-}D\text{-}\gamma\text{-Ach})_4^-]$ , estos compuestos formaban cristales en forma de aguja, los cuales no pudieron ser caracterizados mediante cristalografía de rayos X, ni difracción de electrones, aparentemente los cristales se descomponían cuando se intentaba obtener la difracción de electrones.<sup>121</sup> Debido a la dificultad que representa el trabajar con este tipo de compuestos, el Prof. Granja decidió aplazar el estudio de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos formadores de nanotubos, y centrarse en la obtención de información estructural básica a partir de los derivados N-metilados. El objetivo era caracterizar estrictamente el proceso de autoensamblaje molecular de estos compuestos, recopilando información: estructural, termodinámica y cinéticas de dicho proceso. Se esperaba que la información obtenida mediante esos modelos permitiera, posteriormente, aplicarlo a los nanotubos. Con estos estudios demostraron que el autoensamblaje molecular para la obtención de dímeros es un proceso entálpicamente favorable y que la interacción entre subunidades tiene lugar mediante la formación de una lamina  $\beta$ -antiparalela.<sup>71,72</sup>

El objetivo de esta sección era obtener cristales con la calidad suficiente para su caracterización mediante difracción de rayos X, y en su defecto por microscopía electrónica, de forma que podamos obtener una resolución a nivel atómico.

### ***Diseño de los ciclopéptidos:***

A la hora de realizar este proyecto, hay que tener en cuenta un amplio número de factores que pueden influir en la obtención de cristales. Cuando se trabaja con macromoléculas, resulta casi imposible abarcar todas las posibilidades que se presentan a la hora de diseñar un compuesto, que se desea empaquete perfectamente en las tres dimensiones, para su resolución mediante difracción de rayos X. De todas formas se intentó limitar el número de posibilidades para poder llevar a cabo este objetivo.

---

<sup>121</sup> Amorín, M. *Diseño, síntesis y estudio de  $\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos*, Universidad de Santiago de Compostela, **2005**.

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

### Diámetro del ciclopéptido:

El primer factor a tener en cuenta, es el número de residuos que forman el  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptido. Se han estudiado péptidos compuestos por diferente número de aminoácidos: 4, 6, 8, 10 y 12.<sup>76</sup> Los anillos formados por cuatro aminoácidos son demasiado rígidos, este hecho hace que los procesos de autoensamblaje, cuando se producen, sean menos eficientes que para sus homólogos con un mayor número de residuos. A mayores, el canal interno es demasiado pequeño para desarrollar futuras posibles aplicaciones.<sup>75</sup> Los ciclodeca- y ciclododecapéptidos son anillos muy grandes, por lo que la flexibilidad que presenta el esqueleto peptídico de estos compuestos puede favorecer que se plieguen. Además, el empaquetamiento de los nanotubos dejaría huecos entre ellos que deberían ser ocupados por moléculas de disolvente, esto es especialmente complicado para el caso de los decapeptidos, debido a su simetría C5 que resulta apropiada para superficies esféricas pero no planas.<sup>169</sup> A pesar de que los ciclos:  $c-[(D\text{-Leu-}L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach})_5]$ ,  $c-[(D\text{-Leu-}L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Acp})_5]$ , y el  $c-[(D\text{-Phe-}L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Acp})_6]$  adoptaban conformaciones planas en disolventes apolares, y se autoensamblaban formando los correspondientes dímeros, estos nunca se han caracterizado mediante difracción de rayos X. Una posible explicación es el amplio diámetro interno que tienen estos anillos, en el que pueden dar cabida a un gran número de moléculas de disolvente que dificultan el ordenamiento y la obtención de un cristal de gran calidad. Las moléculas compuestas por seis y ocho residuos se estudiaron ampliamente, estas poseen propiedades muy interesantes, y en cloroformo tienen una constante de asociación superior a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . Los dímeros se caracterizaron mediante difracción de rayos X, técnica mediante la cual se corroboró el apilamiento que tiene lugar a través de laminas  $\beta$ -antiparalela, y que en el interior del ciclopéptido es de 7 Å y 10 Å para los ciclopéptidos de seis y ocho miembros respectivamente.<sup>71,72</sup> Por estas razones decidimos dar preferencia en nuestros estudios a los ciclopéptidos constituidos por 6 y 8 aminoácidos.

---

<sup>76</sup> Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269.

<sup>75</sup> Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Heterocycles*, **2006**, 67, 575-583.

<sup>169</sup> Qin, B.; Chen, X.; Fang, X.; Shu, Y.; Yip, Y. K.; Yan, Y.; Pan, S.; Ong, W. Q.; Ren, C.; Su, H. *Org. Lett.* **2008**, 10, 5127-5130.

### **Secuencia del anillo y organización:**

La secuencia de aminoácidos empleada en la síntesis del ciclopeptido es determinante, tanto a la hora de realizar la síntesis, como de lograr unas interacciones favorables para la obtención de cristales. El crecimiento a lo largo del tubo es favorable debido a los enlaces de hidrógeno que se establecen entre los grupos amida de las diferentes unidades ciclopeptídicas, por lo que las interacciones en el eje *a* ya están establecidas. Pero los empaquetamientos cristalográficos tienen lugar en las 3 dimensiones, por lo que nos falta establecer que tipo de interacciones son las más adecuadas para favorecer el crecimiento de los cristales a lo largo de los ejes diferentes al crecimiento del nanotubo (ejes *b* y *c*). Los primeros estudios experimentales para la obtención de nanotubos fueron los desarrollados por el Prof. Lorenzi y colaboradores, con ciclopeptidos totalmente hidrofóbicos como el *c*-[(L-Val-D-Val)<sub>3</sub>-], y el *c*-[(L-Phe-D-Phe)<sub>3</sub>-]. A pesar de los estudios acometidos en ninguna caso se pudo demostrar la formación de estructuras tubulares, debido entre otras razones por su baja solubilidad.<sup>54,55</sup>

En el grupo del profesor Ghadiri solucionaron este problema de forma brillante, modificando la secuencia seleccionada, el tamaño del ciclo (anillos de 8 aminoácidos), y el método para solubilizar y posteriormente dirigir el proceso de formación de tubos. La idea consistió en seleccionar residuos polares, favoreciendo la solubilidad de los mismo, además, mediante la modificación del pH de la disolución se lograba disolver los CPs y posteriormente favorecer su cristalización, de estos péptidos ya hemos hablado con anterioridad.<sup>56,167</sup> Dentro de los estudios realizados en el grupo de Ghadiri son de especial interés los trabajos realizados por J. Hartgerink, en los que demostraron que la formación de nanotubos mediante el autoensamblaje de *D,L*- $\alpha$ -

---

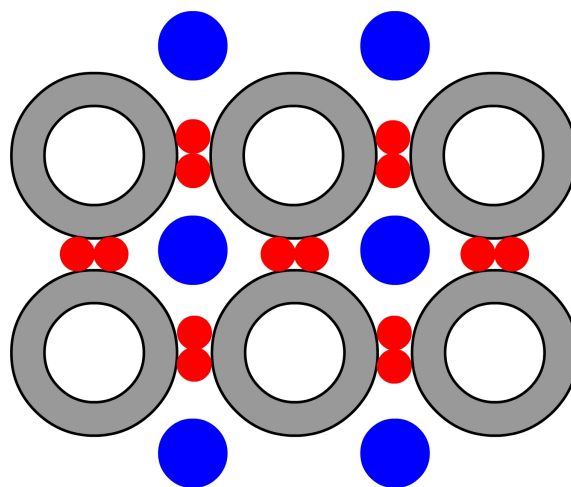
<sup>54</sup> Tomasic, L.; Lorenzi, G. P. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1012-1016.

<sup>55</sup> Pavone, V.; Benedetti, E.; Blasio, B. D.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Lorenzi, G. P. *Biopolymers* **1989**, *28*, 215-223.

<sup>56</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

<sup>167</sup> Khazanovich, N.; Granja, J. R.; McRee, D. E.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011-6012.

ciclopéptidos, del tipo  $c\text{-}[(L\text{-Gln-}D\text{-Xxx})_4\text{-}]$  en los que Xxx son residuos apolares (Xxx = Ala, Val, Leu, Phe).<sup>168</sup> Estos estudios son bastante esclarecedores, ya que se estudiaba el efecto que tenían los empaquetamientos hidrofóbicos en el crecimiento de los cristales (figura 39). De esta forma los residuos más hidrofóbicos daban lugar a cristales de mayor tamaño. Sin embargo, en el caso del ciclopéptido que contiene las valinas (Val) los cristales resultaban muy pequeños, posiblemente debido a la dificultad para empaquetar los nanotubos. A pesar de la mejora en el tamaño de los cristales, fundamentalmente en su longitud, su resolución mediante rayos X no fue factible.



**Figura 39:** Representación esquemática del plano perpendicular al tubo, donde se muestran las diferentes interacciones existentes entre los CPs cuando se autoensamblan para formar nanotubos y después cristales: en color rojo se muestra las posibles interacciones hidrofóbicas de los esqueletos ciclopentílicos; el azul representa los puentes salinos y enlaces de hidrógeno intermoleculares de los grupos amida de las glutaminas. Como se puede apreciar entre cada cuatro nanotubos se genera una cavidad que debe ser ocupada por las cadenas laterales y/o disolventes.

La conclusión que se puede obtener de los resultados descritos para los  $D,L$ - $\alpha$ -nanotubos, es que el uso de aminoácidos con cadenas laterales polares es imprescindible, no sólo por que le confieren solubilidad a los ciclopéptidos, generalmente estos compuestos son muy insoluble debido al establecimiento de enlaces de hidrógeno entre diferentes ciclopéptidos, también por su participación en las interacciones intertubulares necesarias para la ordenación tridimensional de los mismos.

<sup>168</sup> Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

Por lo expuesto se decidió que los ciclopéptidos diseñados estarían formados por 6 u 8 residuos, y que contendrían el  $\gamma$ -Acp, ya que en los estudios iniciales se habían realizado con el Ach, y no se habían obtenido cristales que pudiesen resolverse.<sup>121</sup> Los  $\alpha$ -aminoácidos seleccionados fueron glutaminas y glutámicos, ya que la polaridad de los grupos ácidos y amidas deben proporcionar solubilidad a los ciclopéptidos, también deberían favorecer el empaquetamiento tridimensional de los nanotubos, debido al establecimiento de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Es decir, se prepararon los siguientes ciclopéptidos:  $c$ -[(L-Gln-D-Acp-L-Glu-D-Acp)<sub>2</sub>-] (**15**);  $c$ -[(L-Glu-D-Acp)<sub>3</sub>-] (**16**);  $c$ -[(L-Glu-D-Acp)<sub>4</sub>-] (**17**);  $c$ -[(L-Gln-D-Acp)<sub>3</sub>-] (**18**);  $c$ -[(L-Gln-D-Acp)<sub>4</sub>-] (**19**).

### Síntesis de los ciclopéptidos:

La síntesis del ácido (1*S*,3*R*)-3-amino-N-(9H-fluoren-9-il)metiloxicarbonil ciclopentanocarboxílico (*D*-Fmoc- $\gamma$ -Acp-OH) fue el primer paso a realizar, para ello se disolvió el (1*S*,3*R*)-3-amino-N-*t*-butiloxicarbonilciclopentanocarboxílico (*D*-Boc- $\gamma$ -Acp-OH) (0.1M) en una mezcla de TFA:diclorometano (1:1), y la mezcla resultante se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. El amino resultante se disolvió en una disolución de carbonato sódico al 10% y 1,4-dioxano (2:1), posteriormente se trató con una disolución de Fmoc-OSuccinimida en 1,4-dioxano, dando lugar al aminoácido deseado con buenos rendimientos.

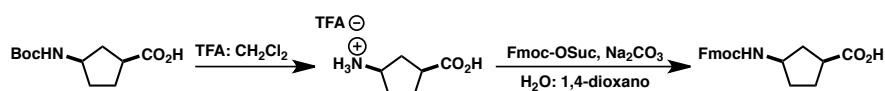


Figura 40: Esquema sintético seguido para la síntesis del (*D*)-Fmoc-Acp-OH.

La síntesis del péptido se basó en la utilización como primer aminoácido del (*L*) Fmoc-Glu-OAll, que se unió al soporte sólido a través de su cadena lateral,<sup>170</sup> mientras que el grupo  $\alpha$ -carboxílico se protegió de forma ortogonal como un éster alílico. Esto permitió que la ciclación se realizase con el péptido aún unido al soporte sólido. La

<sup>121</sup> Amorín, M. *Diseño, síntesis y estudio de  $\alpha$ , $\gamma$ -nanotubos peptídicos*, Universidad de Santiago de Compostela, **2005**.

<sup>170</sup> Kates, S. A.; Solé, H. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G. Y.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1549-1552.

protección del grupo  $\alpha$  carbonílico como éster alílico posibilita que se realice la desprotección selectiva al final de la síntesis, mediante química de Pd. La estrategia usada para la síntesis fue la Fmoc/<sup>t</sup>Bu. El soporte sólido seleccionado fue la resina Wang (resina *p*-benciloxibencil alcohol), para los casos en los se deseaba obtener un grupo ácido tras la ruptura, o la resina Rink Amida (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi) cuando se pretendía obtener los grupos amida. La rotura final de estos soportes sólidos se realizó con una mezcla ácida consistente en TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TIS:H<sub>2</sub>O (90:5:2.5:2.5).

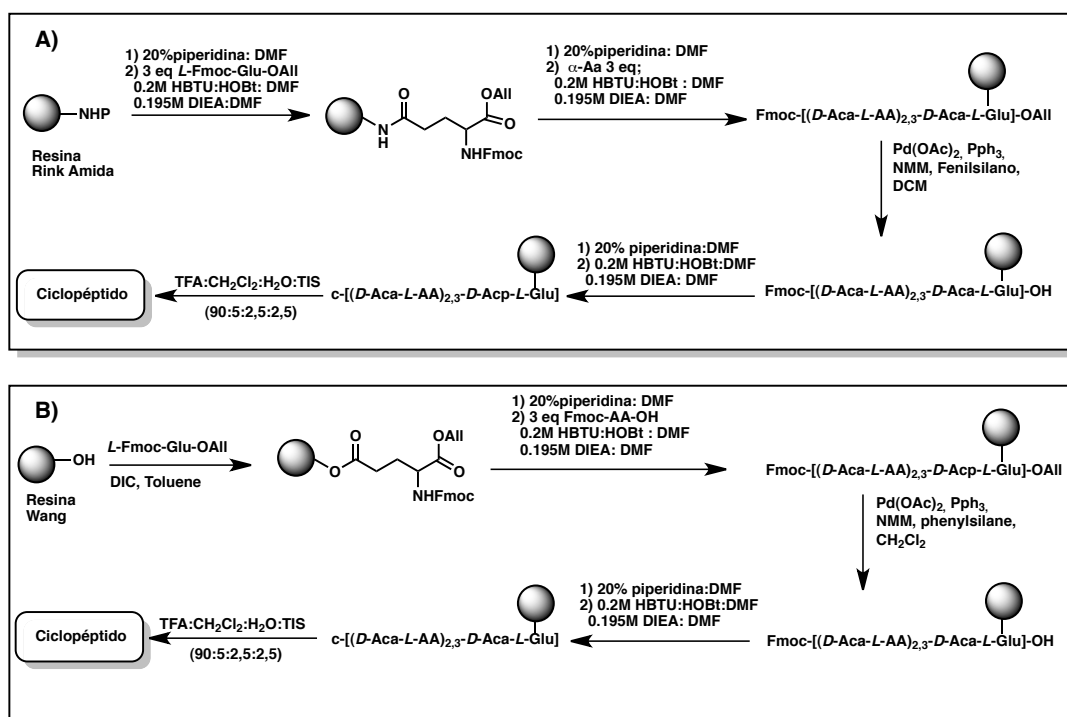
La síntesis de los CPs que contienen Gln, *c*-[(L-Gln-D-Acp)<sub>3</sub>-] (**18**), *c*-[(L-Gln-D-Acp)<sub>4</sub>-] (**19**), *c*-[(L-Gln-D-Acp-L-Glu-D-Acp)<sub>2</sub>-] (**15**), se llevó a cabo empleando la resina Rink Amida, tal y como aparece reflejado en el esquema 2A. Una vez hinchada la resina, 15 min en DMF, se procedió a la desprotección del grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), para ello se trató la resina con una disolución al 20% de piperidina en DMF durante 15 min, transcurrido este tiempo la resina se filtró y se lavó repetidamente con DMF (3 veces). Los acoplamientos se llevaron a cabo mediante la formación *in situ* de ésteres activos, para ello se preactiva el aminoácido (3 eq en el caso del  $\gamma$ -aminoácido; 4 eq con los residuos  $\alpha$ ) disuelto junto con una mezcla de HBTU/HOBt (0.2 M en DMF), y mediante el tratamiento con una disolución de DIEA en DMF (0.195 M), transcurridos 2 min se vierte la disolución sobre la resina. Los acoplamientos se realizaron durante 30 min haciendo pasar N<sub>2</sub> (g) a través de la solución.<sup>145</sup> Para eliminar los excesos de reactivo empleados, se filtró la mezcla y se lavó repetidas veces con DMF. Tras los lavados, se comprobó la eficiencia del acoplamiento mediante un Test TNBS,<sup>171</sup> procediéndose a repetir el proceso si no resultaba cuantitativo. La desprotección del grupo amino se realizó en las mismas condiciones que la desprotección de la resina, 20% de piperidina en DMF durante 15 min. Los posteriores acoplamientos y desprotecciones se llevaron a cabo bajo las condiciones ya descritas, obteniéndose tras los correspondientes acoplamientos, los

---

<sup>145</sup> *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*, Oxford University press, Oxford, **2000**.

<sup>171</sup> Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 71, 110-118.

péptidos lineales de 6 y 8 aminoácidos. Para llevar a cabo la ciclación, el grupo alilo se eliminó empleando cantidades catalíticas de Pd(0), se usó una disolución de Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.2 eq), de Pph<sub>3</sub> (1.25 eq), 4-metilmorfolina (10 eq), y fenilsilano (10 eq) en DCM, previamente desoxigenada bajo corriente de Ar. La mezcla resultante se volvió a desoxigenar y se agitó mecánicamente durante 12 h en presencia de la resina. Transcurrido este tiempo, la resina se lavó sucesivamente con DCM (4x1 min), 2%DIEA/DMF (4x1 min), 0.5% sodio dietilditiocarbamato/DMF (5x2 min), DMF (3x1 min), DCM (3x1 min).<sup>172,173</sup> La eficacia de la desprotección se verificó mediante la ruptura selectiva de 3 mg de resina con el cóctel de TFA anteriormente mencionado, el producto resultante se analizó mediante HPLC-MS en fase reversa. El extremo N-terminal se desprotegió usando las condiciones explicadas anteriormente, disolución al 20% de piperidina en DMF.



Esquema 2: Esquema sintético seguido en las síntesis en fase sólida, Fmoc/Bu, para la preparación de CPs que contienen Gln (A) y en aquellos que no se emplea dicho residuo (B).

<sup>172</sup> Flouzt, C.; Marguerite, F.; Croizet, F.; Percebois, M.; Monteil, A.; Combourieu, M. *Tetrah. Lett.* **1997**, 38, 1191-1194.

<sup>173</sup> Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. *Journ. Pept. Res.* **2001**, 57, 250-256.

Una vez desprotegidos los extremos C- y N-terminal, se procedió a la ciclación, utilizando HBTU o PyAOP. En estos casos se usó 4 eq de agente activante, en presencia de base, DIEA (8 eq), y en la menor cantidad posible de DMF. Transcurridas 12 horas de agitación mecánica a ta, y tras comprobarse mediante el Test TNBS que no quedaban grupos amino libres, se procedió a filtrar la mezcla para eliminar el exceso de reactivos, se lavó con DMF y DCM, y se secó la resina a vacío.

La última etapa de la síntesis era la separación del péptido del soporte sólido. El método comúnmente empleado en la rotura de esta resina es el uso de una disolución ácida formada por TFA, DCM, H<sub>2</sub>O, y TIS (9:5:2.5:2.5), 1 mL de disolución por cada 40 mg de resina. Después de añadir la mezcla ácida sobre la resina, esta se agita 2 h a ta, la disolución se filtra y los filtrados se vierten sobre éter etílico frío, 10 mL por cada mL de disolución ácida. El precipitado se centrifugó, se decantó, y los sólidos se lavaron repetidamente con éter etílico, seguidos de centrifugación y decantación. La purificación se realizó mediante precipitaciones selectivas, seguidas de lavados con agua, acetonitrilo.

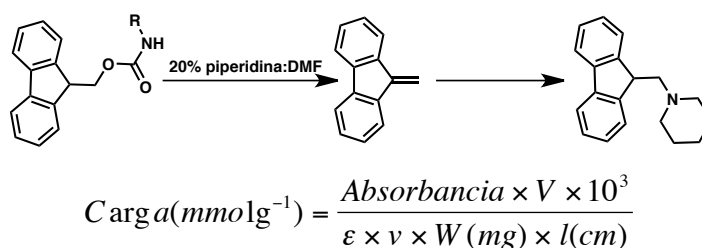
La síntesis de CPs que no contienen Gln en su esqueleto peptídico es ligeramente diferente, ya que en este caso como soporte sólido se usó la resina Wang (resina *p*-benciloxybencil alcohol), cuya carga es 1.1 mmol/g. El acoplamiento del primer aminoácido, Fmoc-*L*-Glu-OAll, se realizó hinchando la resina en THF seco durante 2 h, transcurrido ese tiempo, se disolvió el aminoácido en THF seco y se trató con N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), HOBT, y 4-dimetilaminopiridina, la solución orgánica se añadió sobre la resina y se agitó durante 12 h a ta. Transcurrido ese tiempo se filtró y se lavó con DMF y DCM. La carga de aminoácido se corroboró mediante el Test Fmoc.<sup>171</sup> Para facilitar la etapa de ciclación es importante que la carga formal de la resina sea inferior o similar a 0.5 mmol/g.

El Test Fmoc es un procedimiento mediante el cual se puede monitorizar la síntesis en fase sólida (Fmoc/<sup>t</sup>Bu) de forma cuantitativa, una pequeña muestra de resina (entre 5-10 mg) se desprotege usando una disolución al 20% de piperidina en DMF (figura 41). La formación del pireno-dibencilfulvaleno resultante se cuantificó

---

<sup>171</sup> Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *71*, 110-118.

midiendo la absorbancia de la disolución a las longitudes de onda, 290 nm y/o 301 nm, empleando la ecuación que aparece reflejada en la figura 41.



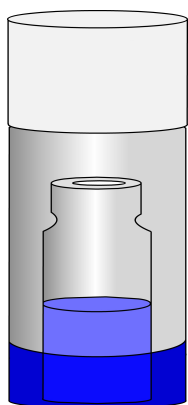
**Figura 41: Test Fmoc para cuantificar la carga de la resina una vez unido el primer aminoácido.**

Cuando la carga de la resina es inferior a 0.5 mmol/g, se repite el proceso de acoplamiento empleando la mitad de equivalentes de aminoácido y de agente de acoplamiento. Una vez que la carga de la resina es entorno 0.5 mmol/g, se realiza un capado de los grupos hidroxilo libres usando una disolución al 20% de anhídrido acético en DMF, en presencia de DIEA.

La síntesis del ciclopéptido se completó siguiendo un procedimiento similar al descrito para los anteriores CPs. Los ciclopéptidos resultantes, por lo general, fueron poco solubles en las condiciones de purificación de fase reversa. Por ello, generalmente se purificaron mediante precipitaciones selectivas y lavados con disolventes en los que los péptidos no son solubles.

#### **Formación de nanotubos, cristalizaciones:**

Pese a no disponer de muestras de gran pureza se comenzaron los estudios de autoensamblaje molecular de estos ciclopéptidos, purificados simplemente mediante precipitados selectivos, exceptuando los CP **16** y **17** que se purificaron mediante HPLC-FR.



La técnica usada en las cristalizaciones es la que se muestra en la figura de la izquierda. Se disuelve la muestra a cristalizar en el disolvente y condiciones apropiadas, se introduce en un vial, y este a su vez se aloja en otro de mayores dimensiones que contiene un disolvente en el que los CPs no son solubles, cerrándose, para que se equilibren ambas disoluciones. De esta forma se logra una atmósfera

saturada del líquido más volátil, y que la disolución en la que se han disuelto los CPs se modifique lentamente de tal forma que facilite la cristalización.

Empezamos nuestro estudio evaluando el cambio de pH como inductor del autoensamblaje. De esta forma, el ciclopeptido  $c\text{-}[(L\text{-Gln-}D\text{-Acp-}L\text{-Glu-}D\text{-Acp})_2\text{-}]$  (**15**), se disolvió 1 mg de muestra en TFA (1 mL), y dicha disolución se alojó en un vial de 2.5 mL, que a su vez se situó en el interior en otros viales que contenían atmósferas de: H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O:ACN; H<sub>2</sub>O:TFA; H<sub>2</sub>O:MeOH; H<sub>2</sub>O:EtOH. En ninguno de estas pruebas se observó la aparición de cristales. Posteriormente se aumentó la concentración del CP para facilitar su cristalización, disolviéndose el CP **15** en TFA (2 mg de CP por mL), y se situó en atmósferas saturadas con H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O:ACN y ACN, desafortunadamente tampoco bajo ninguna de las condiciones estudiadas se observó la formación de cristales. Ante estos resultados decidimos estudiar otras condiciones en las que el CP fuese igualmente soluble. Pasamos en primer lugar a estudiar condiciones básicas (NaOH, 0.5 y 0.1 M) y en concentraciones de péptido de 1 mg/mL y 2 mg/mL. Las mezclas resultantes se situaron en viales que contenían TFA, para neutralizar lentamente las muestras que contenían el ciclopeptido. Sólo en la muestra más concentrada apareció un sólido con forma de pequeñas laminas y esferas, pero que no tenían estructura cristalina. Ampliando el rango de disolventes utilizados también se estudió el 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), ya que este disolvente se usa en la formación de lamina  $\beta$ .<sup>174,175</sup> El CP **15** se disolvió en HFIP (1 mg/mL) usando un baño de ultrasonidos, y la disolución resultante se puso bajo atmósferas de agua y ACN. En este último caso se encontraron mucho núcleos de cristalización, aunque su tamaño no era suficientemente grande para su caracterización. Estos resultados nos animaron a evaluar condiciones en las que se favoreciese el crecimiento de los cristales, para ello se prepararon 3 muestras en condiciones similares, una muestra se puso a 4°C (frigorífico); en el segundo caso a la disolución de HPFI se le añadió 50  $\mu$ L de DMSO; y por último se preparó una disolución de HFIP más diluida (0.5 mg/mL). En ninguno de los casos se consiguió mejorar el resultado obtenido con anterioridad.

---

<sup>174</sup> Kokkoni, N.; Stott, K.; Amijee, H.; Mason, J. M.; Doig, A. J. *Biochemistry* **2006**, 45, 9906-9918.

<sup>175</sup> Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7873-7881.

Los ciclopeptidos  $c\text{-}[(L\text{-Glu-D-Acp})_3\text{-}]$  (**16**) y  $c\text{-}[(L\text{-Glu-D-Acp})_4\text{-}]$  (**17**) eran solubles en medios básicos. Para su estudio se disolvieron mediante sonicación en agua miliQ (1 mg/mL) con una mínima cantidad de una disolución de NaOH (1M). Estas disoluciones, que contienen concentraciones de CP de 1 mg/mL se colocaron en viales que contenían disoluciones de ACN:H<sub>2</sub>O y TFA:H<sub>2</sub>O. Lamentablemente no se lograron cristales, sino que se observó la aparición de un precipitado amorfo. Ante estos resultados se seleccionaron los ciclopeptidos más solubles para purificarlos mediante HPLC-FR, así se tendría la certeza de que la disolución contenía únicamente el CP de estudio a una concentración conocida, además de poder usar disoluciones de péptido más concentradas. Únicamente se purificaron CPs **16** y **17** mediante HPLC-FR (H<sub>2</sub>O:ACN, 0.1%TFA).

En este punto del proyecto, siguiendo los consejos del Dr. Mark J. van Raaij se decidió cambiar la forma de cristalizar los péptidos. En este caso las pruebas de cristalización se realizaron en placas de plástico, con múltiples pocillos donde se introduce la muestra a cristalizar (figura 42). El primer paso es limpiar la placa con una corriente de aire, una vez limpia se cubre toda la placa con n-decano y se coloca cada prueba de cristalización en un pocillo. Una vez colocadas todas las muestras se retira el n-decano y las muestras se cubren con aceite mineral, finalmente se cierra la caja. La función del aceite mineral es la de permitir una evaporación lenta del agua, ya que el aceite mineral no es totalmente inmiscible, permitiendo la difusión del agua de manera muy lenta.

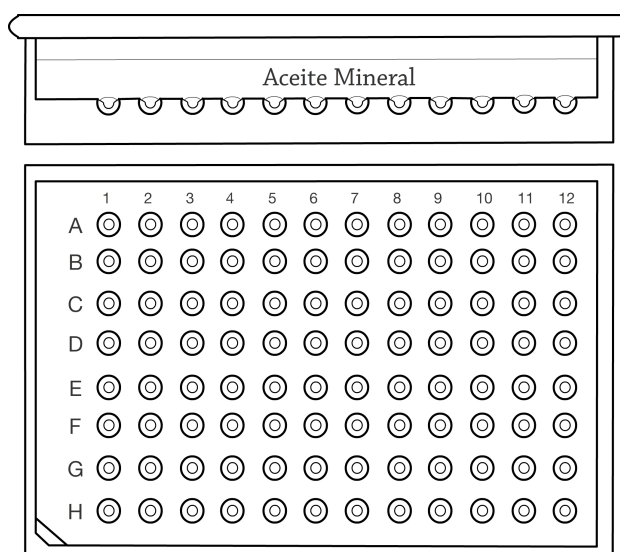


Figura 42: Vista superior y lateral de una placa de cristalización de proteínas.

Las primeras pruebas de cristalización se realizaron con el ciclohexapéptido,  $c$ -[(L-Glu-D-Acp)<sub>3</sub>-] (**16**), y el ciclooctapéptido  $c$ -[(L-Glu-D-Acp)<sub>4</sub>-] (**17**). Estos compuestos se disolvieron en agua miliQ, 1 mg de CP en 100  $\mu$ L de agua, y la mínima cantidad posible de NaOH (1M), generalmente se usaron 5  $\mu$ L. Se probaron múltiples condiciones de cristalización (ver Anexo I), en las que se probaban diferentes pHs, varios tampones, y diferentes agentes que pueden favorecer la cristalización de proteínas, como por ejemplo: sales, diferentes polietilenglicoles (PEG), etc. De todos estos intentos se dedujo que los ciclopeptidos **16** y **17** precipitan en medios ácidos fuertes, y no sucede nada cuando se encuentran en medios básicos, pero en los casos en los que hay acetato sódico a pH 4.6, o disoluciones tampón de bifosfato sódico y potásico, formaban pequeñas agujas. Aunque los cristales eran demasiado pequeños para su caracterización mediante difracción de rayos X, proporcionaban información del camino a seguir.

El siguiente paso que se dio fue la preparación de pruebas de cristalización con disoluciones tampón de fosfato potásico, en un rango de pH entre 1-5. En este caso no se observó la aparición de cristales, por lo que se repitió el experimento usando como tampón una mezcla de disoluciones de fosfato potásico y fosfato sódico (ambas a C=1.5 M). Se obtuvieron cristales en forma de agujas entre los pHs 1.5 y 4.0, dichos cristales se formaban muy rápidamente, en cuestión de horas la cristalización había terminado, eran muy largos, en algún caso estaban cerca de 1 cm, pero extremadamente finos. Aparentemente era necesario que hubiese en el medio tanto sodio como potasio para que la cristalización tuviese lugar.

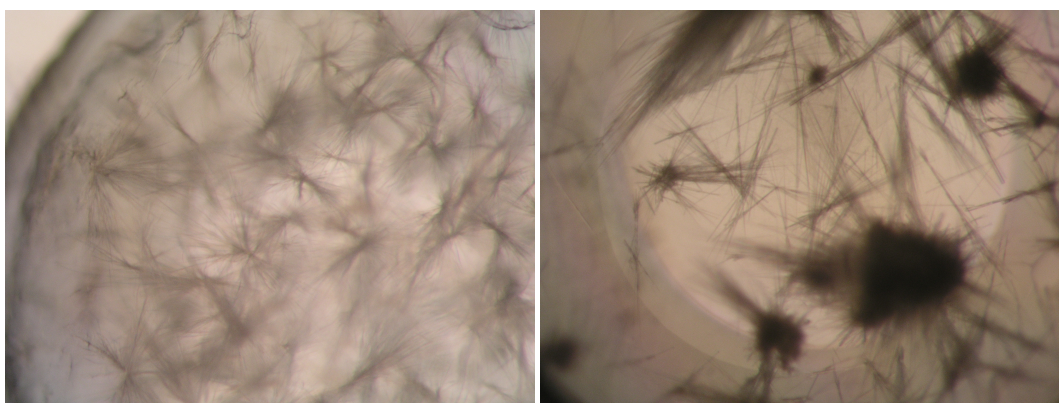


Figura 43: Fotos de los cristales obtenidos mediante la cristalización en tampón fosfato a pH=3, la de  $c$ -[(L-Glu-D-Acp)<sub>3</sub>-] (izquierda) y el  $c$ -[(L-Glu-D-Acp)<sub>4</sub>-] (derecha).

Se intentó obtener cristales de mayor tamaño mediante la adición sales (BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, etc.), con objeto de que los cationes divalente coordinasen con los grupos ácido de las cadenas laterales.<sup>176</sup> Sin embargo, lo que se formaban eran cristales de dichas sales con el fosfato, que aparecían en medio de las agujas de los ciclopéptidos.

El *c*-[(L-Gln-D-Acp-L-Glu-D-Acp)<sub>2</sub>-] (**15**) también se estudió mediante esta técnica de cristalización, aunque en este caso los cristales obtenidos resultaron ser derivados del buffer empleado, pero no estaban relacionados con el CP (Anexo I).

Ante la falta de resultados satisfactorios con los CP derivados de Glu y Gln se decidió preparar dos nuevos ciclopéptidos: *c*-[(L-Gln-D-Acp-L-His-D-Acp)<sub>2</sub>-] (**20**) y *c*-[(L-Glu-D-Acp-L-His-D-Acp)<sub>2</sub>-] (**21**). Se seleccionaron las histidinas por dos motivos; uno era que la presencia de los grupos imidazol aporta solubilidad a los anillos peptídicos cuando se encuentren en medio ácido, y la otra es la posibilidad de hacer crecer los cristales en los ejes perpendiculares al crecimiento del tubo, mediante la formación de enlaces de hidrógeno con los carbonilos de las cadenas laterales de los glutámicos y glutaminas, o con las propias histidinas. Además la adición de metales que se puedan coordinar con las grupos imidazol como por ejemplo: Cu, Zn, Pd, etc. también podría favorecer el empaquetamiento tridimensional de estos compuestos, en la que los tubos podrían orientarse paralelamente entre si formando redes, véase el modelo de la figura 44.<sup>177,178</sup> La coordinación de los grupos imidazol con metales tiene una ventaja extra, y es que puede ayudar al desarrollo de nuevos nanomateriales mediante la biomineralización de metales sobre la superficie de los nanotubos.<sup>179,180</sup> La estrategia sintética desarrollada fue similar a los casos anteriores. Los péptidos, que presentaban una buena solubilidad en medio ácido, se purificaron mediante HPLC por fase reversa (H<sub>2</sub>O:ACN, 0.1%TFA, método en parte experimental).

---

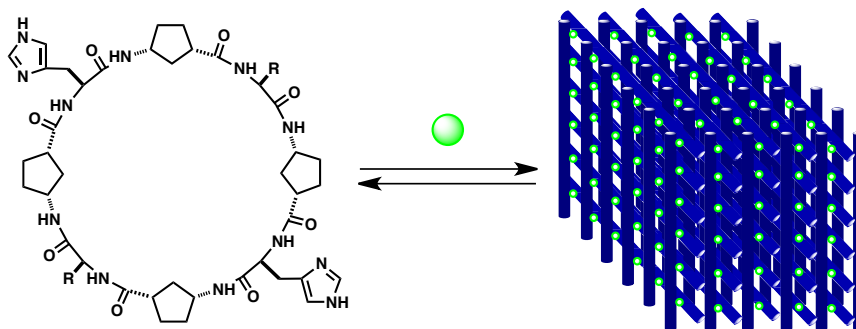
<sup>176</sup> Pérez-Alvite, M. J.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Amino Acids* DOI: 10.1007/s00726-011-0886-2.

<sup>177</sup> Abuskhuna, S.; Mccann, M.; Briody, J.; Devereux, M.; Mckee, V. *Polyhedron*, **2004**, *23*, 1731-1737.

<sup>178</sup> Kelso, M. J.; Hoang, H. N.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10488-10489.

<sup>179</sup> Banerjee, I. A.; Lingtao, Y.; Matsui, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, *100*, 14678-82.

<sup>180</sup> de la Rica, R.; Mendoza, E., Matsui, H. *Small* **2010**, *6*, 1753-1756.



**Figura 44: Modelos de empaquetamiento tridimensional de los nanotubos unidos mediante coordinación con un metal.**

Se empezó estudiando inicialmente el  $c$ -[(*L*-Glu-*D*-Acp-*L*-His-*D*-Acp)<sub>2</sub>-] (**21**). Los grupos imidazol presentes en las cadenas laterales de los residuos de histidina hacen que este compuesto sea muy soluble en disoluciones acuosas ácidas, tal y como se esperaba. Se intentó cristalizar este compuesto de forma similar a los ciclopeptidos con glutámicos en su esqueleto peptídico, es decir, buscando una disolución tampón, de forma que ninguna de las cadenas laterales este protonada, con el objeto de favorecer la agregación de los ciclopeptidos mediante la disminución de su solubilidad. En este caso se usaron dos disoluciones tampón diferentes: La primera fue una mezcla de ácido cítrico (0.1M) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.2M), que mezcladas en diferentes proporciones dan lugar a disoluciones tampón con un rango de pH entre 4.8 y 6.0. La otra disolución se preparó mediante una mezcla de ácido cítrico (0.1M) y citrato sódico (0.1M). También se probaron condiciones de cristalización en presencia de sales Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, o empleando sales percloradas hexahidratadas [X(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O]. Lamentablemente no se lograron obtener cristales en ninguna de las condiciones probadas (Anexo I).

El último ciclooctapéptido usado en la caracterización de nanotubos mediante estado sólido, fue el  $c$ -[(*L*-Gln-*D*-Acp-*L*-His-*D*-Acp)<sub>2</sub>-] (**20**). Al igual que en el caso anterior este compuesto es muy soluble en medios acuosos ácidos, siendo posible su purificación mediante HPLC-FR.

Las primeras pruebas de cristalización se analizaron en medio acuoso en presencia de diferentes sales de cobre, zinc y paladio, se probó el uso de tampones fosfato, en medios ácidos y mediante una evaporación lenta. Ninguno de estas pruebas dio lugar a cristales, por lo que se decidió probar otras condiciones en las que se neutralice el medio ácido, usándose el TRIS·HCl (1.5 M) en un rango de pH entre 10.8

y 8.0. Los resultados fueron asombrosos, ya que se obtuvieron cristales en forma de aguja en todas las condiciones probadas, incluso cuando en el medio de reacción había sales de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CuCO}_3$ ). En los estudios posteriores se pretendía mejorar el tamaño de estos cristales, pero las modificaciones realizadas en torno a estas condiciones no condujeron a mejores resultados.

Por último, también se intentó cristalizar un ciclododecapéptido, el  $c\text{-}[(L\text{-Gln-}D\text{-Acp-(}L\text{-His-}D\text{-Acp)}_2)_2\text{-}]$  (**22**), estudiándose bajo las mismas condiciones que tan buenos resultados habían dado con el CP **20**. Para ello se disolvió el péptido en agua (1 mg/50  $\mu\text{L}$ ) y se pusieron pruebas regulando el pH de la disolución mediante el uso de tampones TRIS·HCl, usando un rango de pH entre 10.8-8.0. Lamentablemente no se encontraron cristales en ninguna de las condiciones probadas. El empleo de sales de cobre tampoco dio lugar a cristales.

En la tabla 4 aparecen resumidas las mejores condiciones para cada uno de los ciclopéptidos estudiados.

<b>Ciclopéptido</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Tiempo</b>
$c\text{-}[(L\text{-Glu-}D\text{-Acp})_3\text{-}]$ ( <b>16</b> )	Na/K $\text{H}_2\text{PO}_4$ (1.5M) pH=3-4	3-4h
$c\text{-}[(L\text{-Glu-}D\text{-Acp})_4\text{-}]$ ( <b>17</b> )	Na/K $\text{H}_2\text{PO}_4$ (1.5M) pH=3-4	3-4h
$c\text{-}[(L\text{-Gln-(+)-Acp-}L\text{-His-}D\text{-Acp})_2\text{-}]$ ( <b>20</b> ).	TRIS·HCl (1.5M) pH=9.6-10.4	1 día
$c\text{-}[(L\text{-Gln-(+)-Acp-}L\text{-His-}D\text{-Acp})_2\text{-}]$ ( <b>20</b> ).	TRIS·HCl (1.5M) pH=9.6-10.4 con $\text{CuCO}_3$ (0.1M) ó $\text{CuSO}_4$ (0.1M)	1 día

**Tabla 4: Resumen de las mejores condiciones encontradas para la formación de cristales para los distintos péptidos estudiados.**

#### **Caracterización de los cristales:**

Los cristales obtenidos para los ciclopéptidos **16** y **17** eran muy largos y muy finos, de un tamaño muy justo para su caracterización mediante difracción de rayos X. En la mayor parte de los estudios realizados se observaba que a partir de un único punto de cristalización surgía un gran número de agujas (ver imagen 43), resultando complicado la extracción de un único cristal. Además, la mayor parte de los cristales resultaban, aparentemente, estar maclados. Lamentablemente ninguno de los cristales tenía la calidad suficiente para su caracterización mediante difracción de Rayos X, los pocos que se montaron apenas difractaban, incluso en el Sincroton de Grenoble.

Dado que la difracción de rayos X no tuvo éxito, se decidió intentar su caracterización mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM).<sup>181</sup> La preparación de las muestras se realizó de forma similar a la descrita por el Prof. Ghadiri en el año 1993,<sup>56</sup> consistía en recoger la muestra del pocillo de cristalización y diluirla en agua miliQ (25  $\mu$ L), se decantaba y se eliminaba el sobrenadante, se volvía añadir agua miliQ (25  $\mu$ L), y se depositaban 5  $\mu$ L de muestra, previamente agitada en el vortex durante 30 seg, sobre una gradilla de Cu/Rh (malla de 400). Una vez seca se lavaba con agua, se teñía negativamente usando una disolución al 2% de acetato de uranilo, transcurridos dos minutos, se lavaba la gradilla con agua miliQ, se dejaba secar y la muestra quedaba lista para su visualización mediante microscopía de transmisión de electrones.

Las primeras imágenes obtenidas mediante TEM de tinción negativa mostraron la existencia de cristales, en su mayor parte de un poco más de 1  $\mu$ m de largo y sobre 125 nm de ancho. En algún caso se observó que los extremos de estos cristales estaban partidos, y mostraban como estaban estructurados a partir de superposiciones de laminas, dando al cristal final estructura cilíndrica. Sin embargo en ninguno de los casos estudiados se podía observar las típicas estrías paralelas a los ejes del tubo, las cuales si se podían observar con los microcristales de los D,L- $\alpha$ -CPs.<sup>56</sup> Desgraciadamente no pudieron caracterizarse mediante crio-microscopía, ya que los cristales quedaban localizados en agrupaciones alrededor de los huecos existentes en la gradilla.

Por todo ello, no fue posible confirmar que los cristales obtenidos estaban formados por haces de nanotubos apilados paralelamente, es decir, que estos cristales estuviesen formados por el apilamiento de CPs en conformación plana, formando nanotubos, y que estos nanotubos se organicen paralelamente.

---

<sup>181</sup> Las imágenes de TEM obtenidas para los ciclopéptidos **16** y **17** fueron obtenidas gracias a la ayuda ofrecida por el Prof. José M. Valpuesta, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC.

<sup>56</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, 366, 324-327.

<sup>56</sup> Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, 366, 324-327.

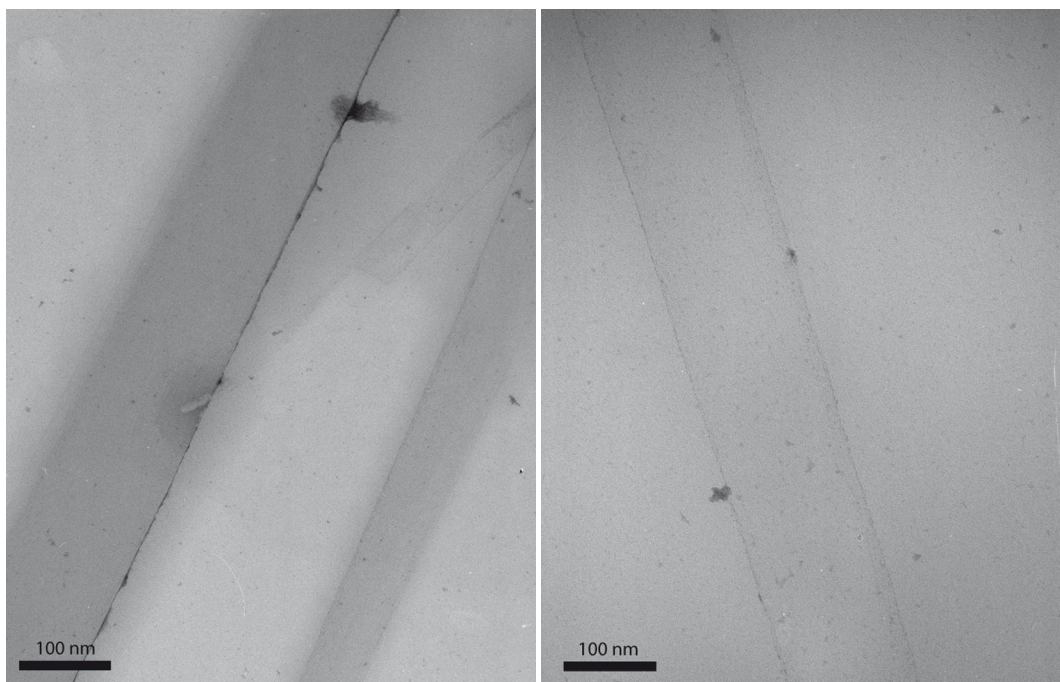


Figura 45: Imágenes de TEM, tinción negativa, del CP 16,  $c$ -[(*L*-Glu-*D*-Acp)<sub>3</sub>]-.

El CP **20** se cristalizó a partir de una disolución tampón de TRIS·HCl (1.5 M), en un rango de pH que va desde 9.0 hasta 10.8. Los mejores cristales fueron aquellos que se cristalizaron a pH=10.0 ó 10.4, estos cristales se intentaron caracterizar mediante TEM, y difracción de electrones.<sup>182</sup> Para la realización de las medidas de crio-TEM y la difracción de electrones, las muestras de la disolución anteriormente preparada se depositaron sobre la rejilla, se secaron con un papel e inmediatamente se sumergieron en una disolución de etano líquido, después se guardaron en nitrógeno líquido. Las imágenes de TEM muestran cristales de forma alargada, y al igual que el caso anterior tienen longitudes de más de 1  $\mu\text{m}$  de largo y entre 60-100 nm de ancho. Lamentablemente la difracción de electrones tampoco dio información acerca de la estructura de este compuesto, ya que difractaban muy poco, y los resultados obtenidos concuerdan con los datos de difracción del hielo, correspondiente a las moléculas de agua que se arrastran de las condiciones de cristalización. Lo más llamativo era el color que presentaban los cristales obtenidos en la disolución que contenía sulfato de cobre (figura 43 derecha).

---

<sup>182</sup> Las imágenes de TEM obtenidas para los ciclopeptidos **20** fueron obtenidas gracias a la ayuda ofrecida por el Prof. Jeffrey D. Hartgerink, Department of Chemistry and Bioengineering, Rice University.

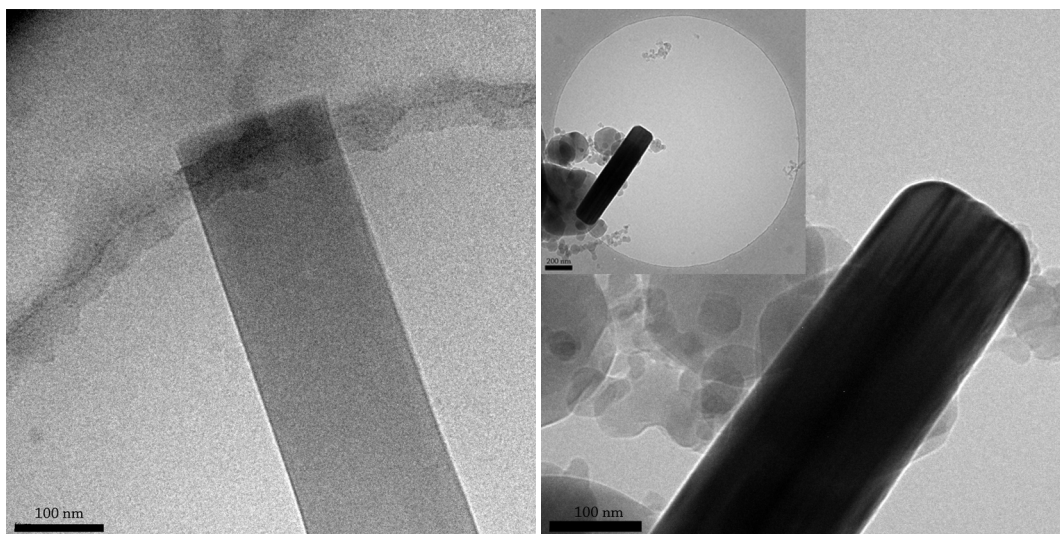


Figura 46: :Imágenes de crio-TEM del  $c$ -[(L-Gln-D-Acp-L-His-D-Acp)<sub>2</sub>-] (**20**) cristalizado de una disolución acuosa en presencia de TRIS (pH=10.4) (izquierda) con y sin CuSO<sub>4</sub> (derecha).

También se intentaron caracterizar mediante difracción de rayos X los cristales que se obtuvieron en la cristalización a pH 10.4. En este caso los cristales difractaban, recogiendo datos con una resolución de hasta 1.8 Å, y que aportaron información importante y sorprendente sobre las estructuras de los nanotubos.

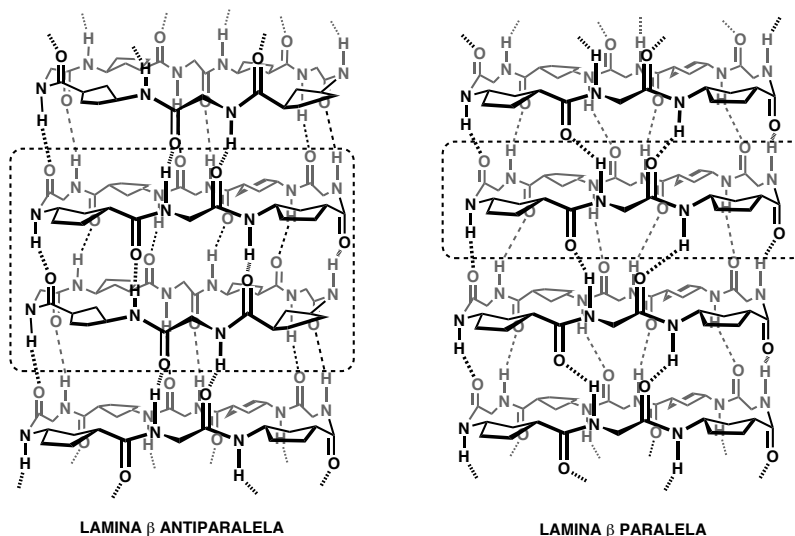
Los datos obtenidos para el ciclopéptido **20**,  $c$ -[(L-Gln-D-Acp-L-His-D-Acp)<sub>2</sub>-], indican que se forma estructuras altamente ordenadas, cuyos datos cristalográficos de la celda aparecen reflejados en la tabla 5.

*dimensiones y ángulos de la celda unidad*

Nanotubo	$a$	$b$	$c$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	V
$c$ -[(L-Gln-(+)-Acp-L-His-(+)-Acp) <sub>2</sub> -]	24.4	4.8	24.5	90	90	90	2865

Tabla 5: Datos cristalográficos de la celdilla unidad del  $c$ -[(L-Gln-D-Acp-L-His-D-Acp)<sub>2</sub>-] (**20**), la unidad de longitud empleada es el Å, y la de volumen es el Å<sup>3</sup>.

La métrica del cristal se corresponde a un sistema monoclinico, el grupo espacial es “P2”, y los valores de los ejes  $a$ ,  $b$  y  $c$  se corresponden con las dimensiones teóricas de una unidad discreta de ciclopéptido. El dato más significativo es la longitud del eje  $b$ , que es 4.8 Å, distancia que concuerdan con las distancias de una típica hoja plegada  $\beta$ , y próximo a los valores calculados para la banda de difracción del NH (3300 cm<sup>-1</sup>) en el infrarrojo.



**Figura 47:** Representación de un nanotubo formado por el autoensamblaje molecular de  $\alpha,\gamma$ -CPs, mediante la formación de laminas  $\beta$  antiparalelas y paralelas. El rectángulo rayado representaría cual sería la celdilla unidad en cada caso.

En estas dimensiones sólo cabe una única unidad ciclopeptídica en conformación plana. Esto nos llevó a proponer que la interacción entre los CPs no sea una hoja plegada antiparalela sino paralela. En caso de los apilamientos antiparalelos debería observarse la difracción en torno a los 9.5 Å, con dos CPs por celdilla unidad (figura 47). Este resultado también se observaba para el caso de los *D,L*- $\alpha$ -CPs, ya que a pesar de ver repeticiones a 4.7 Å, en este caso una de cada dos puntos de difracción se pierde debido a la pseudosimetría que presentan estos compuestos. Dicha pseudosimetría no esta presente en el caso de  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos, ya que esta constituido por  $\alpha$  y  $\gamma$  aminoácidos, con dimensiones y propiedades muy diferentes. Mediante la imagen sintética de difracción del plano  $hk0$  (figura 48), en la que se pueden ver los diagramas de difracción, y como todos los puntos están a una distancia de 4.8 Å entre ellas, no se puede ver ningún punto de reflexión entre estas líneas a 9.5 Å, y puesto que no tenemos ningún eje de simetría por el cual se eliminen esos puntos de difracción podemos afirmar que el autoensamblaje de este  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptido, *c*-[(*L*-Gln-*D*-Acp-*L*-His-*D*-Acp)<sub>2</sub>], para formar  $\alpha,\gamma$ -nanotubos tiene lugar mediante la formación de una lamina  $\beta$  paralela, a diferencia de lo que ocurre con los *D,L*- $\alpha$ -ciclopéptidos o los *N*-metil- $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos que se organizan mediante la formación de laminas  $\beta$  antiparalelas.

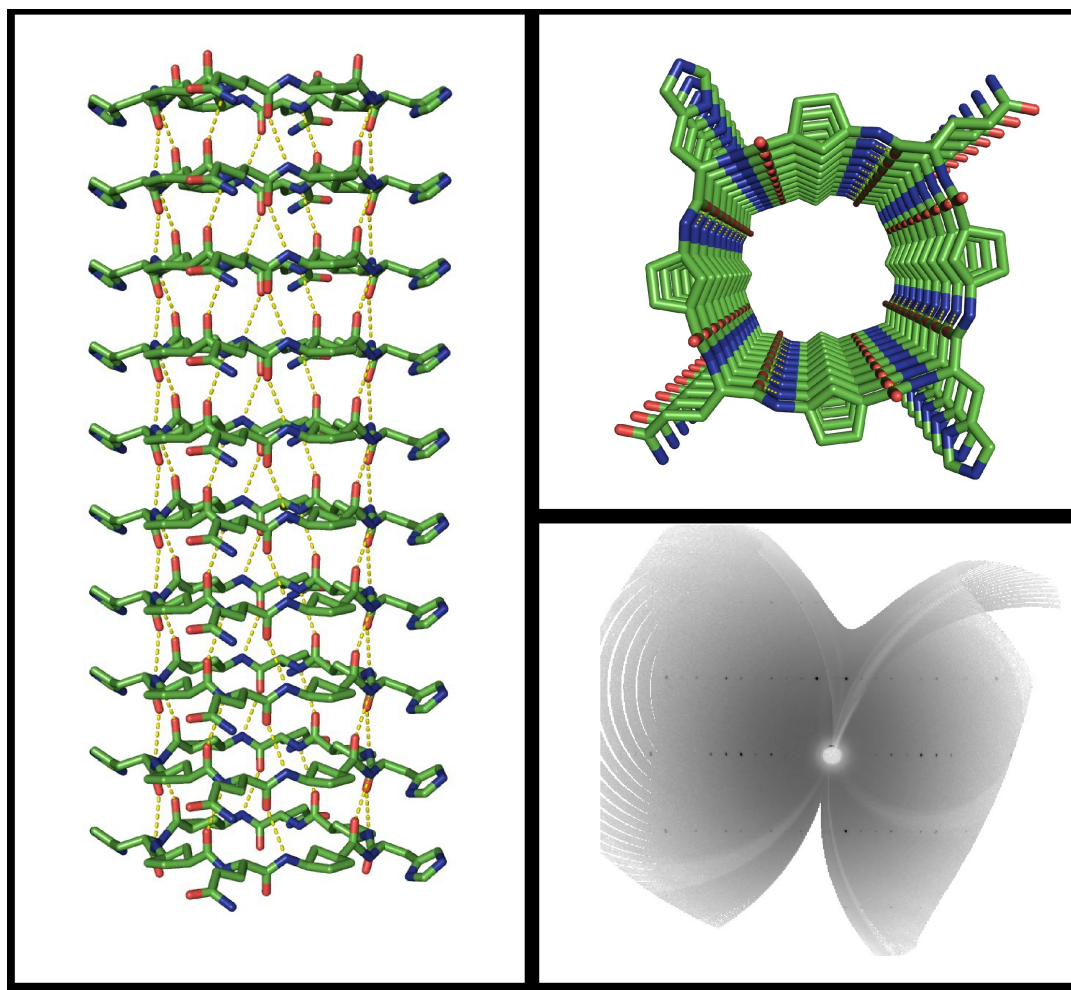


Figura 48: Imagen de rayos X, obtenida para el CP 20. A la izquierda vista frontal de un nanotubo, a la derecha vista superior del nanotubo, y abajo a la derecha la imagen de difracción del plano  $hk0$ .

Desgraciadamente con los datos de los que disponemos hasta el momento desconocemos si este apilamiento es un caso especial para el ciclopéptido **20**, si es un efecto del disolvente (es el primer nanotubos cristalizado únicamente en agua), o si es general para los  $\alpha,\gamma$ -CPs. Necesitamos, por tanto, seguir estudiando y mejorando las condiciones de cristalización empleadas para obtener cristales con mayor tamaño, y mejor resolución que permita caracterizar inequívocamente la estructura de los  $\alpha,\gamma$ -nanotubos.

La caracterización de los  $D,L$ - $\alpha$ -nanotubos basados en el apilamiento de ciclopéptidos a través de laminas  $\beta$  paralelas también se realizó mediante FT-IR, gracias a las bandas de vibración de los carbonilos y las amidas. Por ese motivo se decidió estudiar los cristales obtenidos con nuestros compuestos y comparar los resultados

con los reportados por el grupo del Prof. Ghadiri (véase tabla 6). La medida de estos compuestos se realizó depositando los cristales suspendidos en agua miliQ sobre la cubeta, previamente se habían lavado con agua.

Nanotubo	Vibración Amida Ia	Vibración Amida Ib	Vibración Amida II <sub>N</sub>	Vibración N-H	Distancia entre subunidades
<i>c</i> -[(L-Gln-D-Ala) <sub>4</sub> -]	1630	1672	1549	3282	4.8 Å
<i>c</i> -[(L-Gln-D-Leu) <sub>4</sub> -]	1629	1687	1540	3278	4.8 Å
<i>c</i> -[(L-Gln-D-Ach) <sub>4</sub> -]	1633	1659	1544	3287	4.8 Å
<i>c</i> -[(L-Gln-D-Ach) <sub>3</sub> -]	1631	1659	1544	3282	4.8 Å
<i>c</i> -[(L-Glu-D-Acp) <sub>3</sub> -] <b>(17)</b>	1636	-	1459	3261	4.8 Å
<i>c</i> -[(L-Gln-D-Acp-L-His- D-Acp) <sub>2</sub> -] <b>(20)</b>	1637	-	1464	3280	4.8 Å

**Tabla 6:** Datos de FT-IR para dos *D,L*- $\alpha$ -nanotubos,<sup>168</sup> y  $\alpha,\gamma$ -nanotubos constituidos por  $\gamma$ -Ach,<sup>121</sup> y  $\gamma$ -Acp.

Las principales frecuencias de vibración para péptidos sintéticos que forman laminas  $\beta$  antiparalelas son conocidas.<sup>183</sup> Para el caso de los péptidos que forman laminas  $\beta$  antiparalelas la banda de amida Ia esta a  $1630 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ , y la banda amida Ib se encuentra a  $1695 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ . Estas son las bandas que aparecen en el IR de los *D,L*- $\alpha$ -nanotubos, sin embargo para los  $\alpha,\gamma$ -CPs los resultados son dispares. Los CPs que contienen el  $\gamma$ -Ach, preparados durante la Tesis doctoral de M. Amorín, presentan resultados similares aunque la banda esta deslaza a  $1659 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>121</sup> Por otro lado los cristales derivados del  $\gamma$ -Acp presentan una única banda que se encuentra a  $1636\text{-}1637 \text{ cm}^{-1}$  (CP **17** y CP **20** respectivamente), mientras que la banda de amida Ib no aparece. Esto sólo ocurre en el caso de los péptidos que se estructuran mediante la formación de laminas  $\beta$  paralelas.<sup>184</sup> Estos datos concuerdan con los obtenidos mediante

<sup>168</sup> Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

<sup>121</sup> Amorín, M. *Diseño, síntesis y estudio de  $\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos*, Universidad de Santiago de Compostela, **2005**.

<sup>183</sup> Nevskaya, N. A.; Chirgadze, Y. N. *Biopolymers*, **1975**, *15*, 637-648.

<sup>184</sup> Miyazawa, T.; Blout, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 712-719.

difracción de rayos X para el caso del ciclopeptido  $c-[(L\text{-Gln-}D\text{-Acp-}L\text{-His-}D\text{-Acp})_2-]$  (**20**). Por lo que podemos afirmar que los  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos se autoensamblan para dar lugar a nanotubos mediante el establecimiento de laminas  $\beta$  paralelas.

Un resultado sorprendente si tenemos en cuenta que los N-metil- $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos que tienen el  $\gamma$ -Acp en su esqueleto peptídico, en caso de autoensamblarse, lo hacen a través de la formación de laminas  $\beta$  antiparalelas, y con elevadas constantes de asociación. Es importante resaltar que sólo se produce el proceso de autoensamblaje molecular en aquellos ciclos que tienen bloqueada la cara  $\gamma$ , es decir, que interactúan a través de su cara  $\alpha$ , ya que los péptidos con los  $\alpha$ -Aa-N-metilados, que deberían interactuar a través de una interacción  $\gamma$ - $\gamma$  no dan lugar a la formación de dímeros, si no que se pliegan sobre ellos mismos. Con el fin de verificar que los N-metil- $\alpha,\gamma$ -CPs se ensamblan formando laminas  $\beta$  antiparalelas, y que no es consecuencia de que se les obligase a ello debido a la metilación selectiva de una de sus caras, se decidió estudiar mediante  $^1\text{H-RMN}$  la mezcla de dos CPs, el  $c-[(D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Acp-}L\text{-Leu})_4-]$  (**23**) y el  $c-[(D\text{-Acp-}L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Leu})_4-]$  (**24**). Estos péptidos podían autoensamblarse formando un heterodímero a través de una lamina  $\beta$  paralela. La relación entre homodímeros frente al heterodímero nos daría la estabilidad relativa entre ambas interacciones, el CP **23** forma dímeros con elevadas constante de asociación, mientras que el CP **24** aparece plegado dando lugar a varios conformeros diferentes. En el espectro de la mezcla no se observó ninguna señal que no se correspondiera con las señales de los péptidos por separado. Por tanto, en el caso de los CPs N-metilados parece claro que la interacción antiparalela es más estable que la paralela.

En el caso de los ciclopeptidos capaces de formar nanotubos, la interacción que tienen no es una interacción  $\alpha$ - $\alpha$  o  $\gamma$ - $\gamma$ , si no que la formación de la lamina  $\beta$  paralela tiene lugar mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los carbonilo y NH de un  $\alpha$ -aminoácido con los del residuo  $\gamma$  de una molécula vecina, con una distancia de enlace entorno a los 3 Å, haciendo posible el autoensamblaje molecular en más de dos unidades peptídicas.

Para esclarecer cual de las interacciones es más favorable para la formación de los  $\alpha,\gamma$ -nanotubos, la lamina  $\beta$  paralela o la antiparalela, se realizaron estudios teóricos,

cálculos DFT y dinámica molecular. Una vez más la Dr. Rebeca García-Fandiño fue la encargada de realizar dichos estudios.

Las coordenadas atómicas de los ciclopeptidos se obtuvieron a partir de las estructuras de rayos-X de los ciclopeptidos:  $c$ -[(D-MeN-Ala-L-Ach)<sub>4</sub>],  $c$ -[(D-Phe-L-MeN-Ach)<sub>3</sub>],  $c$ -[(D-Phe-L-MeN-Ach)<sub>4</sub>], y  $c$ -[(D-Leu-L-MeN-Acp)<sub>4</sub>].<sup>71,74,76</sup> A partir de estas estructuras, se eliminaron los grupos metilo de los nitrógenos, y las cadenas laterales del aminoácido alfa se sustituyeron por grupos metileno. Se construyeron 3 dímeros diferentes, el formado por la interacción mediante enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos alfa (interacción  $\alpha$ - $\alpha$ ), y el análogo en donde son los aminoácidos gamma los que forman enlaces de hidrógeno (interacción  $\gamma$ - $\gamma$ ), también se preparó la estructura del dímero formado mediante la lamina  $\beta$  paralela, para ello se replicó el monómero mediante el Gromacs. Con estas tres estructuras se realizaron los cálculos DFT y las dinámicas moleculares con las mismas condiciones empleadas anteriormente pero usando como disolvente agua y cloroformo.

Los resultados de los cálculos DFT para los ciclohexapeptidos indican que los tres dímeros son estables, con energía para las laminas antiparalelas muy similares tanto para la interacción alfa como para la gamma (figura 49). La lamina paralela resulta 2.8 Kcal mol<sup>-1</sup> más estable que cualquiera de las anteriores, es decir, la formación de dos laminas  $\beta$  paralelas es 5.8 Kcal/mol más estable que la formación de dos laminas  $\beta$  antiparalelas, la interacción  $\alpha$ - $\alpha$  más la  $\gamma$ - $\gamma$  (figura 49).

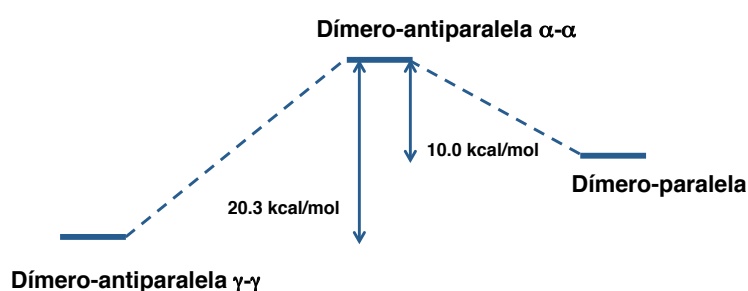


Figura 49: Resultados de los cálculos DFT realizados para el  $c$ -[(D-Ala-L-Acp)<sub>3</sub>].

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

<sup>74</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chemistry* **2005**, *11*, 6543-6551.

<sup>76</sup> Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, *31*, 3267-3269.

Sorprendentemente, esto no es así para el caso de los ciclooctapéptidos (figura 50), donde la interacción más estable es la lamina  $\beta$  antiparalela a través de las caras gamma, 20.3 Kcalmol<sup>-1</sup> más estable que la formación de la interacción  $\alpha$ - $\alpha$ , y 10.0 Kcalmol<sup>-1</sup> más estable que la dimerización a través de una lamina  $\beta$  paralela. Pero si tenemos en cuenta que la formación del nanotubo es una repetición de estas interacciones, la formación de 2 laminas paralelas es sólo 0.3 Kcalmol<sup>-1</sup> menos estable que dos laminas antiparalelas formadas por una interacción  $\alpha$ - $\alpha$  más otra  $\gamma$ - $\gamma$ . Tenemos que tener en cuenta que para estos cálculos se omite el efecto del disolvente, y que como  $\alpha$ -aminoácidos se usaron alaninas, que no fueron empleadas en ninguno de los experimentos de cristalización.

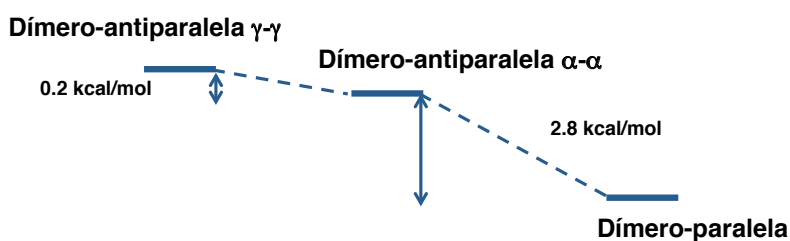
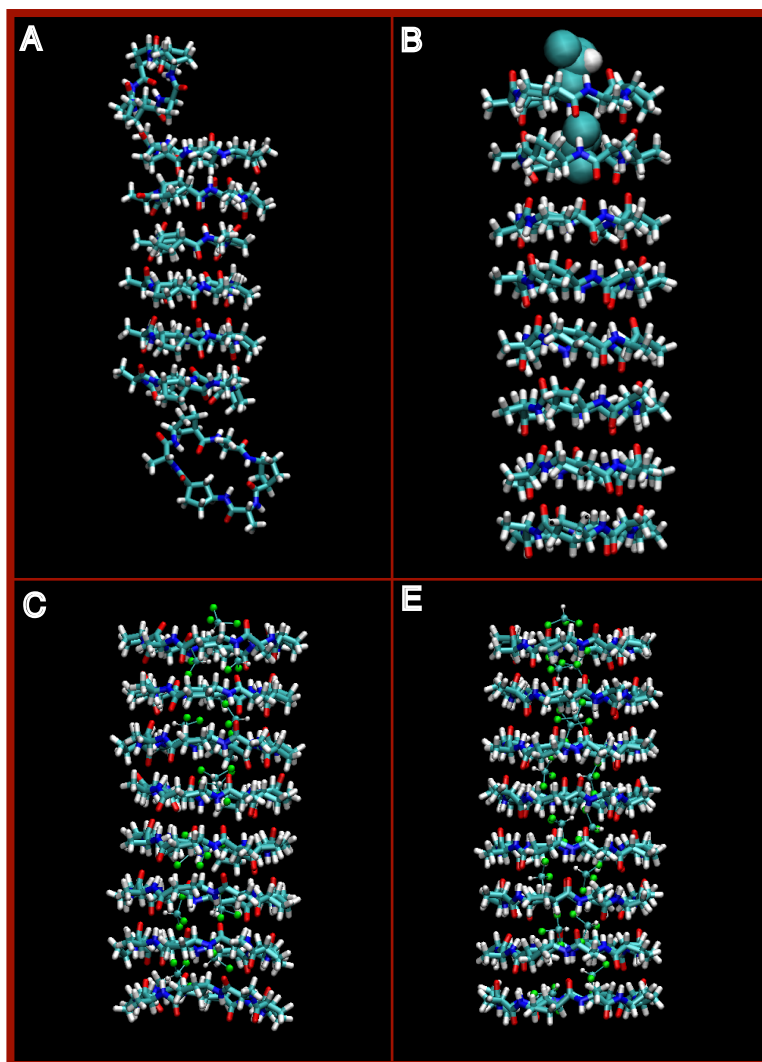


Figura 50: Resultados de los cálculos DFT realizados para el  $c$ -[(*D*-Ala-*L*-Acp)<sub>4</sub>].

Para comprobar la estabilidad de un único nanotubo en disolución se realizaron los cálculos de dinámica molecular. Para el caso del ciclohexapéptido, se realizaron los cálculos en dos disolvente, agua y cloroformo. En agua, después de 10 nanosegundos (ns), ninguno de los nanotubos es estable, ni el formado por laminas  $\beta$  paralelas ni por antiparalelas, esto se debe a que el disolvente compite en la formación de enlaces de hidrógeno con los CPs, y que no existe ningún factor que estabilice el nanotubos salvo las interacciones del esqueleto peptídico.

Cuándo se realizaron los estudios de dinámica molecular en cloroformo, al cabo de 10 ns se observa como el nanotubo formado mediante laminas  $\beta$  paralelas se empezó a deshacer por sus extremos (figura 51 A), sin embargo el nanotubo formado a través de las interacciones antiparalelas es estable, pero sólo cuando la interacción externa es del tipo  $\gamma$ - $\gamma$ , si es a través de las caras  $\alpha$  este tampoco es estable (figura 51 B). Estos resultados no están de acuerdo los datos DFT, pero hay que tener en cuenta que en las dinámicas moleculares es disolvente es un factor importante.

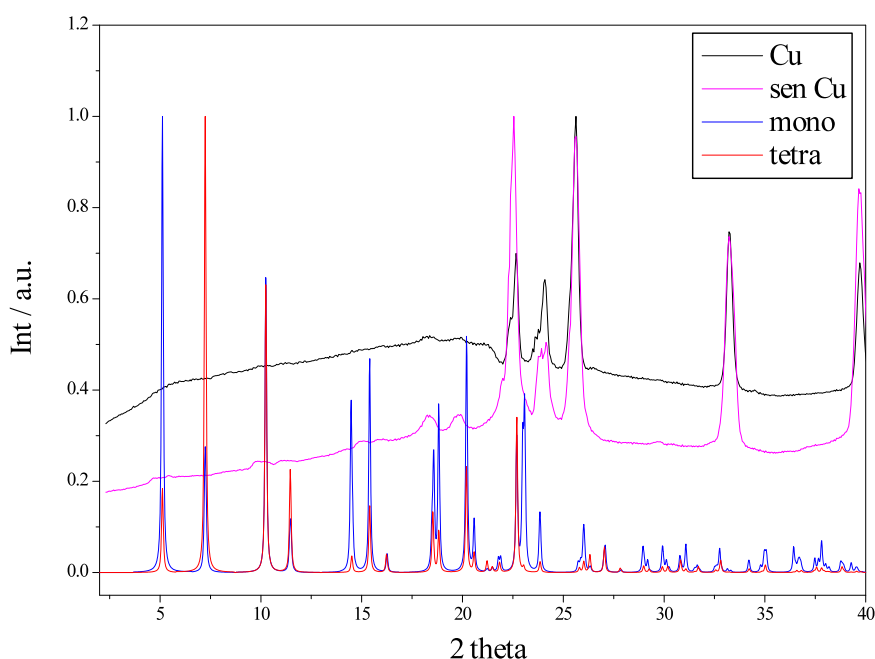


**Figura 51: Modelos computacionales derivados de los estudios de dinámica molecular realizados en  $\text{CHCl}_3$ , para los ciclopéptidos: A)  $c\text{-}[(D\text{-Ala}\text{-}L\text{-Acp})_3\text{-}]$  lamina paralela; B)  $c\text{-}[(D\text{-Ala}\text{-}L\text{-Acp})_3\text{-}]$  lamina antiparalela; C)  $c\text{-}[(D\text{-Ala}\text{-}L\text{-Acp})_4\text{-}]$  lamina paralela; D)  $c\text{-}[(D\text{-Ala}\text{-}L\text{-Acp})_4\text{-}]$  lamina antiparalela.**

Los nanotubos formados por ciclooctapéptidos fueron analizados en cloroformo, y en esta caso tanto el nanotubo formado por laminas  $\beta$  paralelas como por las antiparalelas son estables (figura 51 C y 51 D).

Con estos cálculos se puede concluir que la formación de nanotubos mediante la formación de laminas  $\beta$  paralelas no es tan sorprendente como se esperaba en un principio, y que los metilos son un factor importante en el autoensamblaje molecular, lo que hace que los datos obtenidos para los  $\alpha,\gamma$ -N-metil-ciclopéptidos no sea extrapolable a sus análogos sin metilar.

Los cristales obtenidos en las condiciones que tenían sales de Cu(II) en el medio de cristalización, son de especial interés debido que la coordinación del metal con los grupos imidazol de las histidinas, podrían proporcionarnos hilos de iones metálicos alienados con importantes implicaciones nanotecnológicas.<sup>185,186</sup> Con el objeto de demostrar que los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  estaban coordinados por los imidazoles, se decidió estudiar mediante difracción de rayos X de monocristales, lamentablemente, igual que sucede con las muestras sin metales, los cristales difractaron muy poco por lo que no se obtuvieron resultados mediante esta técnica. Se decidió recurrir a los estudios de estos compuestos mediante difracción en polvo. De los estudios se observa que las muestras cristalizadas con y sin Cu parecen tener la misma celdilla (figura 52), por lo que muy posiblemente el Cu no se incorpora a los nanotubos, en cualquier caso también podrían deberse a que la incorporación tenga lugar sin modificar, a penas, el empaquetamiento molecular que forman los nanotubos.



**Figura 52:** Representación de los patrones de difracción de polvo cristalino para el CP 20, en las que se representan los datos recogidos para los cristales con (negro) y sin Cu (rosa).

Cualquiera de las opciones es probable, porque el agua presente en el medio de cristalización compite con los imidazoles por coordinarse con el cobre. Se intentaron

<sup>185</sup> Barth, J. V.; Costantini, G.; Kern, K. *Nature*, **2005**, 437, 671-679.

<sup>186</sup> Feng, M.; Lee, J.; Zhao, J.; Yates, J. T.; Petek, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12394-12395.

realizar estudios de  $^1\text{H}$ -RMN para ver si en disolución se observaba alguna diferencia en la formación del nanotubo debida a la presencia o ausencia de Cu, pero desgraciadamente las trazas de ácido 3-(trimetilsilil)propanoico- $2,2,3,3\text{-d}_4$  presentes en el agua pesada compiten con los ciclopéptidos por los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  presentes en la disolución, de forma que se observa la formación de cristales cuya resolución indicaban que se trataba del complejo de Cu con el ácido 3-trimetilsililpropanoico.

### $\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: nanotubos individuales.

Uno de los mayores retos que existen en el campo de la nanotecnología es la reducción del tamaño de los materiales, pero no es el único problema al que se enfrenta este campo, la organización interna de esos materiales y la capacidad de los mismos de autoorganizarse de forma adecuada es uno de los objetivos a conseguir, por esto mismo los nanomateriales estructurados en 1, 2, y 3 dimensiones han repercutido en las aplicaciones tecnológicas en farmacología, catálisis y como biosensores.<sup>187,188,189,190</sup> Los nanotubos peptídicos pueden representar un gran avance en este sentido, el hecho de que la orientación de las cadenas laterales de los  $\alpha$ -aminoácidos sea ecuatorial, es decir, hacia el exterior del tubo y formando un ángulo de 90° con el poro, permite que la modificación de las cadenas varíe las propiedades externas del tubo, el control direccional de estos sería un gran avance en el desarrollo de estos sistemas, por este motivo tiene especial relevancia el conocer como se comportan los nanotubos individualmente.

Para el caso de los *D,L*- $\alpha$ -nanotubos se han realizado estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopia de efecto túnel (STM),<sup>191,192,193</sup> donde estudiaron como afecta a la morfología del nanotubo el número y tipo de residuos que componen el ciclopeptido, obteniendo nanotubos individuales y en agrupaciones, pero en ningún

---

<sup>187</sup> Barth, J. V.; Constantini, G.; Kern, K. *Nature*, **2005**, 437, 671-679.

<sup>188</sup> Crespo-Biel, O.; Jan Ravoo, B.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J. *J. Mater. Chem.* **2003**, 16, 3997-4021.

<sup>189</sup> Heath, J. R.; Ratner, M. A. *Phys. Today* **2003**, 56, 43-49.

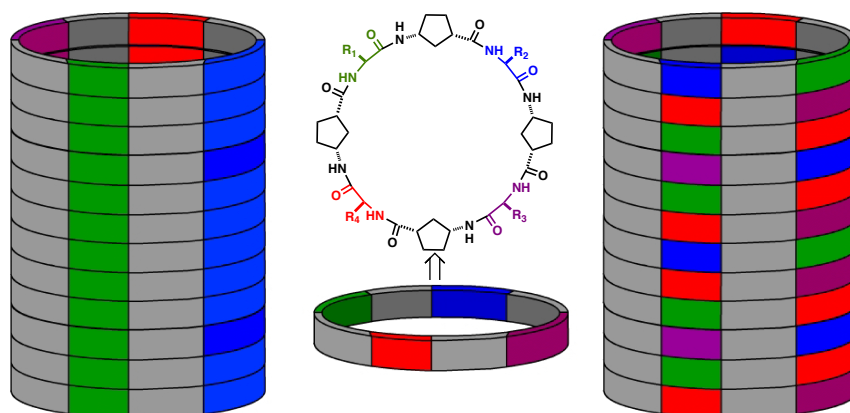
<sup>190</sup> Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547-1562.

<sup>191</sup> Okamoto, H.; Nakanishi, T.; Nagai, Y.; Takeda, K.; Obataya, I.; Mihara, H.; Azehara, H. Mizutani, W. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, 42, 676-679.

<sup>192</sup> Nakanishi, T.; Okamoto, H.; Nagai, Y.; Takeda, K. *Phys. Rev.* **2002**, 66, 165417-1 165417-8.

<sup>193</sup> Okamoto, H.; Yamada, T.; Miyazaki, H.; Nakanishi, T.; Takeda, K.; Usui, K.; Obataya, I.; Mihara, H.; Azehara, H.; Mizutani, W.; Hashimoto, K.; Yamaguchi, H.; Hirayama, Y. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, 44, 8240-8248.

caso se pudo mostrar cual es en la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen el nanotubo.



**Figura 53:** La utilización de CPs formados por diferentes aminoácidos puede dar lugar a diferentes nanotubos, como consecuencia de la libertad de giro entre los anillos ciclopeptídicos. En la figura se pueden ver 2 modelos de nanotubos diferentes generados a partir de un único CP.

Los nanotubos peptídicos presentan una desventaja frente a otro tipo de materiales, los péptidos formados por aminoácidos naturales son eléctricamente aislantes, debido a que el gap homo/lumo es mayor de 4 eV. Estudios teóricos han demostrado que este valor se puede alterar modificando la secuencia peptídica del ciclo, pero las cadenas laterales de los  $\alpha$ -aminoácidos naturales no son suficientes para crear sistemas que se autoensamblan y que sean electrónicamente activos.<sup>194</sup> Ya se comentó en la introducción que el grupo del Prof. Ghadiri logró solventar este problema usando ciclopéptidos cuyas cadenas laterales habían sido modificadas con moléculas de diimida del 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico (NDI), estos ciclopéptidos son capaces de autoensamblarse dando lugar a nanotubos con carga electrónica deslocalizada.<sup>111</sup>

En nuestro grupo se trabaja con  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos que se autoensamblan dando lugar a dímeros, por los problemas de solubilidad comentados anteriormente los estudios con los nanotubos nunca se pudieron abordar. En este capítulo, se mostrará el trabajo realizado con el objeto de demostrar que los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos son capaces de autoensamblarse dando lugar a la formación de nanotubos, y además el estudio

<sup>194</sup> Okamoto, H.; Nakanishi, T.; Nagai, Y.; Kasahara, M.; Takeda, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2756–2769.

<sup>111</sup> Ashkenasy, N.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. *Small* **2006**, *2*, 99-102.

exhaustivo del tamaño y forma que adquieren estos compuestos. A mayores se demostrará como dichos compuestos se pueden modificar a través de sus cadenas laterales, y la disposición que adoptarán estos nuevos grupos será objeto de discusión, con el fin de comprobar que los nanotubos son una herramienta viable para el desarrollo de sistemas complejos ordenados. Los trabajos llevados a cabo se realizaron con CPs modificados con buckminsterfullerenos, C60, debido a las maravillosas propiedades electrónicas que presentan estas moléculas, y a las características estructurales (tamaño y forma) que permiten evaluar una posible orientación selectiva.<sup>195,196,197</sup> De esta manera se intentó crear “arrays” de fullerenos ordenados en 1 dimensión, que podrían permitir en un futuro desarrollar nuevos nanotubos peptídicos con propiedades electrónicas insólitas, los cuales podrían tener múltiples aplicaciones en el campo de la nanoelectrónica.<sup>198,199,197</sup>

### **Diseño:**

Un paso importante a la hora de llevar a buen fin este proyecto es el correcto diseño de los ciclopeptidos objeto de estudio. El primer paso es seleccionar el número de residuos que formaran el péptido, una vez más se decidió realizar los estudios con hexa- y octapeptidos, debido a los buenos resultados demostrados por los anillos de estas dimensiones.<sup>31</sup> Una vez decidida las dimensiones de los anillos, se pasó a seleccionar la secuencia peptídica, como  $\gamma$ -aminoácidos, se decidió usar el ácido *cis*-3-aminociclopentanocarboxílico ( $\gamma$ -Acp), fundamentalmente por su rapidez y eficacia sintética. La síntesis del *cis*- $\gamma$ -Ach es más lenta y peligrosa, mientras que el *cis*- $\gamma$ -Ace

---

<sup>195</sup> Giacalone, F.; Martin, N. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 5136-5190.

<sup>196</sup> Sanchez, L.; Otero, R.; Gallego, J. M.; Miranda, R.; Martin, N. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2081-2091.

<sup>197</sup> Giacalone, F.; Martín, N. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4220-4248.

<sup>198</sup> Feldman, A. K; Steigerwald, M. L.; Guo, X.; Nuckolls, C. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1731-1741.

<sup>199</sup> Wang, Y.; Yamachika, R.; Wachowiak, A.; Grobis, M.; Crommie, M. F. *Nat. Mat.* **2008**, *7*, 194-197.

<sup>31</sup> Brea, R. J.; Reiriz, C.; Granja, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1448-1456.

daba lugar a problemas de isomerización durante el proceso de síntesis de los ciclopeptidos, tal y como se explicó anteriormente.

Una vez decidido que  $\gamma$ -aminoácido se usaría, se procedió a resolver cuales serían los residuos  $\alpha$ , se decidió, por razones sintéticas, que uno de los  $\alpha$ -aminoácidos debería ser un glutámico, facilita el anclaje del péptido al soporte sólido a través de la cadena lateral de dicho aminoácido, y a partir de ahí construir el péptido lineal y llevar a cabo su ciclación sobre el propio soporte.

Una parte indispensable en los estudios de microscopía es el grupo funcional que une, mediante interacciones débiles, el compuesto objeto de estudio a la superficie en la que se realizan los mismos. En este caso se seleccionó la mica como superficie de estudio por diversos motivos: es económica, fácil de manipular ya que es exfoliable, y la superficie es perfectamente lisa a nivel atómico. La mica es un mineral alcalino, por lo tanto su superficie esta cargada negativamente, con lo que el empleo de compuestos cargados positivamente es idóneo ya que establecen interacciones electrostáticas entre la molécula y la superficie fijando de esta forma el compuesto. Por ese motivo decidimos incluir una arginina a la secuencia del CP, ya que su cadena lateral tiene un grupo guanidinio que puede interactuar con la mica dando muy buenos resultados.<sup>200</sup>

Para el caso del ciclohexapéptido sólo tenemos que seleccionar un tercer  $\alpha$ -aminoácido más, y la función de este residuo es la de servir como futuro grupo de unión para otras moléculas, el fullereno en este caso, de forma que estas puedan modificar y aportar nuevas propiedades al ciclopeptido. Pensamos que una lisina podría ser adecuada para tal fin, ya que la amina presente en la cadena lateral puede ser fácilmente modificada mediante la formación de amidas, y este se puede llevar a cabo con el CP aún unido al soporte sólido. En el caso del ciclooctapéptido además de la lisina se decidió usar otro aminoácido que también pudiese ser modificado para aumentar la complejidad estructural del ciclopeptido. Pensamos en una cisteína, ya que la química del azufre puede aportar mayor variedad sintética a la hora de realizar

---

<sup>200</sup> Whitehouse, C.; Fang, J.; Aggeli, A.; Bell, M.; Brydson, R.; Fishwick, C. W. G.; Henderson, J. R.; Knobler, C.M.; Owens, R. W.; Thomson, N. H.; Smith, D. A.; Boden, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1965-1968.

futuras transformaciones en el nanotubo, o facilitar el anclaje del nanotubo a superficies planas de oro.

Una vez decididos los aminoácidos, queda por determinar cual sería el soporte sólido y cuales los grupos protectores a usar en la síntesis de estos péptidos. Como en casos anteriores, la síntesis de ciclopéptidos no N-metilados se realizó en fase sólida siguiendo una estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu, el anclaje del péptido se hizo a través de la cadena lateral de un Glu, por lo que se decidió proteger el grupo ácido en posición  $\alpha$  con un éster alílico, que permite una desprotección ortogonal del ácido y así poder realizar la ciclación del péptido sobre el soporte sólido. La Arg se adquirió con el grupo guanidinio estabilizado mediante el 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofuran-5-sulfonilo (Pbf-), grupo estable al medio básico y lábil en medio ácido. La lisina debe estar protegida ortogonalmente, con un grupo que permita realizar una desprotección sobre la resina sin alterar a los otros grupos presentes, es decir, estable en medio básico, además de no reaccionar con Pd(0), por ello se pensó que el mejor grupo sería el 4-metiltrilitio (Mtt-) ya que se puede eliminar en disoluciones ácidas muy débiles. La complejidad que presenta el sistema hizo que encontrar un buen grupo protector para la Cys no fuese fácil, ya que debe desprotegerse selectivamente en presencia de una amplia variedad de grupos protectores, la solución fue emplear el *S*-*tert*-butilitio (S<sup>t</sup>Bu) que se desprotege selectivamente en presencia de 2-mercaptoetanol en DMF (1:1).<sup>201</sup>

Una vez decididos los aminoácidos a usar y sus grupos protectores se buscó una resina que fuese capaz de soportar todas las condiciones necesarias en la síntesis, es decir, estable al medio básico y al medio ácido débil, a las reacciones de paladio, y a las reacciones con tioles. La resina Wang (resina *p*-benciloxibencil alcohol) es estable en todas las condiciones descritas, ya que se rompe en medios ácidos fuertes, mínimo 90% de ácido trifluoroacético (TFA).

En resumidas cuentas, se usó la resina Wang, y se emplearon los aminoácidos: *D*-Fmoc- $\gamma$ -Acp-OH, *L*-Fmoc-Glu-OAll, *L*-Fmoc-Lys(Mtt)-OH, *L*-Fmoc-Arg(Pbf)-OH y *L*-Fmoc-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-OH. Con lo cual, los ciclopéptidos que se prepararon con objeto de demostrar la capacidad de autoensamblaje de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos para formar

---

<sup>201</sup> Eritja, R.; Ziehler-Martin, J. P.; Walker, P. A.; Lee, T. D.; Legesse, K.; Albericio, F.; Kaplan, B. E. *Tetrahedron*, **1987**, 43, 2675-2680.

nanotubos individuales fueron:  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (**25**) y  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (**26**) (figura 54). A mayores se funcionalizó estos ciclopeptidos uniendo fullerenos a través de la cadena lateral de la lisina, para ello se decidió emplear el ácido [6,6]-fenil C<sub>61</sub> butanoico (PCBA), es decir que también se prepararon:  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Lys(PCBA)-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (**27**) y  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Lys(PCBA)-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (**28**).

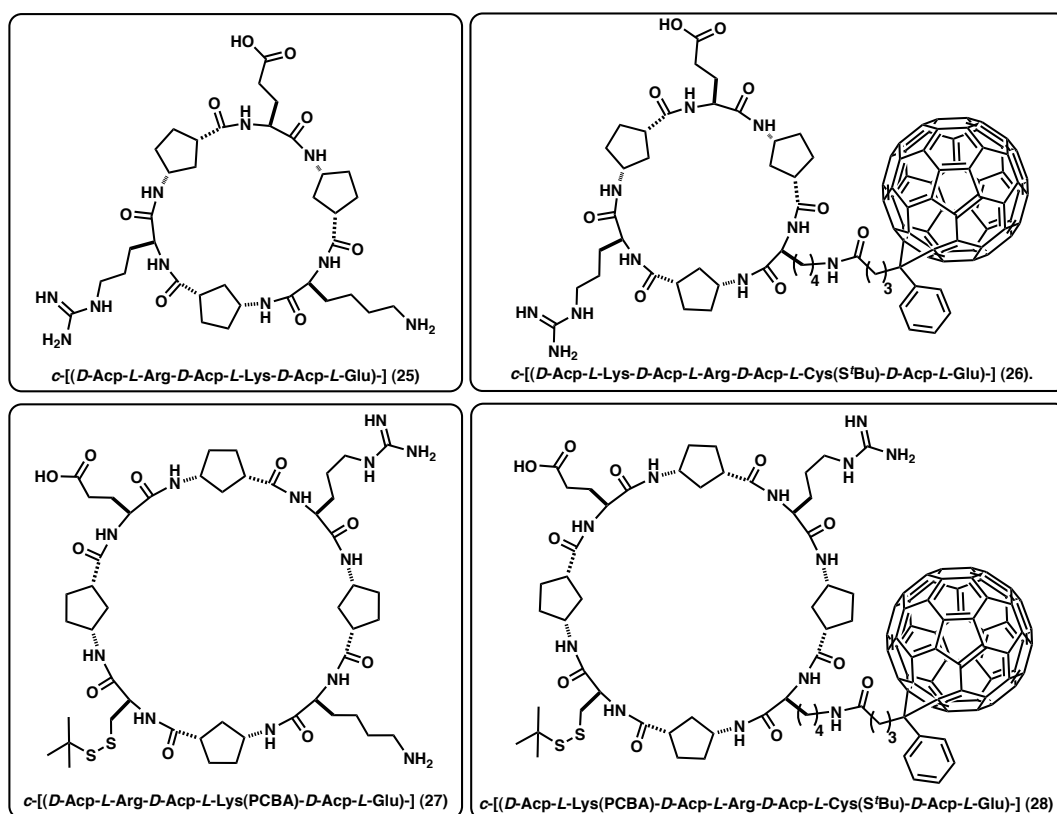


Figura 54: Representación de los CPs 25, 26, 27, 28.

### Síntesis:

La síntesis de los péptidos lineales y las ciclaciones se realizaron siguiendo el procedimiento ya descrito en la sección de síntesis de ciclopeptidos para formar agrupaciones de nanotubos (81, esquema 2B). Siguiendo ese procedimiento se logró obtener CPs unidos al soporte sólido:  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Arg(Pbf)-*D*-Acp-*L*-Lys(Mtt)-*D*-Acp-*L*-Glu(resinaWang))-] (**29**) y  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Lys(Mtt)-*D*-Acp-*L*-Arg(Pbf)-*D*-Acp-*L*-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu(resinaWang))-] (**30**) (figura 55). Ambos compuestos se dividieron en dos partes, una se guardó para realizar modificaciones posteriores y la

otra se trató con TFA:DCM:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5) durante 2 h, tras las cuales la disolución ácida se filtró y se añadió sobre éter etílico frío, se centrifugó y el sólido blanco se purificó mediante HPLC en fase reversa, para obtener los compuestos: *c*-[(D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Glu)-] (**25**) y *c*-[(D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-] (**26**).

Por otro lado, se preparó el ácido [6,6]-fenil C<sub>61</sub> butanoico (PCBA) a partir del éster [6,6]-fenil C<sub>61</sub> butanoato de metilo (PCMB), mediante el tratamiento de este con ácido acético glacial y ácido clorhídrico a reflujo bajo atmósfera de argón durante 20 h, la disolución se concentró y el sólido marrón resultante se lavó con éter etílico repetidas veces, el sólido marrón se secó a 70° C a vacío durante 16 horas. El sólido marrón resultante se identificó como al producto deseado con un rendimiento del 94%.<sup>202</sup>

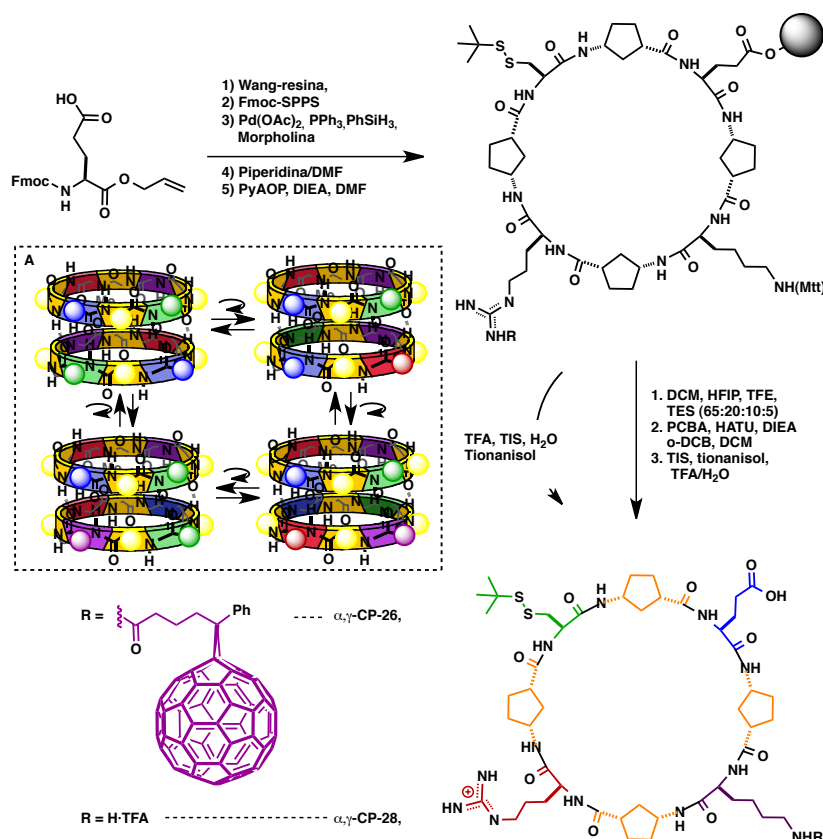


Figura 55: Esquema sintético seguido para la obtención de los CPs 26 y 28.

Para llevar a cabo la síntesis del ciclopeptido *c*-[(D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Lys(PCBA)-D-Acp-L-Glu)-] (**27**), se trató el *c*-[(D-Acp-L-Arg(Pbf)-D-Acp-L-Lys(Mtt)-D-

<sup>202</sup> Hummelen, J.; Knight, B.; LePeq, F.; Wudl, F.; Yao, J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 532-538.

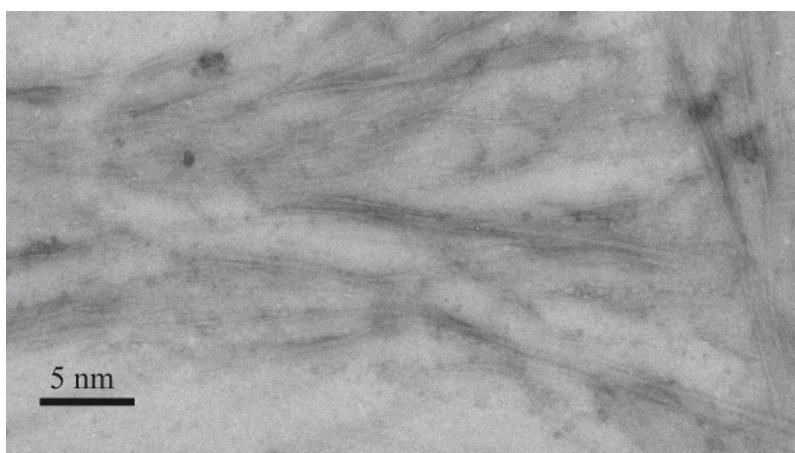
Acp-*L*-Glu(resinaWang))-], con un mililitro de mezcla de disolventes, DCM:HFIP:TFE:TES (6.5:2:1:0.5) durante 90 min, transcurrido este tiempo se filtró y se volvió a tratar la muestra bajo las mismas condiciones durante otros 90 min. Por otro lado, el PCBA se suspendió en 1,2-*o*-diclorobenceno y se agitó en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. A continuación se añadió HATU, se agitó un minuto, y se trató la mezcla con DIEA mientras se mantenía en un baño de ultrasonidos durante 2 min. El PCBA preactivado se vertió sobre el péptido unido al soporte sólido y se agitó mecánicamente durante 2 h. Se filtró la resina y se lavó repetidamente con 1,2-*o*-diclorobenceno y con diclorometano. Es importante observar el cambio de color de la resina, de amarillo a marrón, si esto no sucede se debe a que la reacción no tuvo lugar. Para separar el ciclopéptido del soporte sólido, la resina se trató con una mezcla de disolventes, TFA:TIS:Tioanisol:H<sub>2</sub>O (92.5:2.5:2.5:2.5) durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se filtró la resina y se lavó con TFA, los filtrados se vertieron sobre éter etílico frío, para precipitar el CP. El precipitado marrón se centrifugó, se decantó y el sólido marrón resultante se lavó con éter etílico. La confirmación estructural se realizó con UV, en el que se observa la banda característica del C60 a 324 nm. En el MALDI se observó el pico correspondiente al producto de interés, el cual fue obtenido con un rendimiento del 89%.

La síntesis del ciclooctapéptido **28**, *c*-[(*D*-Acp-*L*-Lys(PCBA)-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-], se realizó a partir del *c*-[(*D*-Acp-*L*-Lys(Mtt)-*D*-Acp-*L*-Arg(Pbf)-*D*-Acp-*L*-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu(resinaWang))-], el procedimiento seguido fue similar que para el CP **27**, aunque en este caso se preactiva el PCBA en una mezcla de 1,2-*o*-diclorobenceno y diclorometano (1:1), ya que si sólo se usa uno de estos disolventes la reacción de condensación del ácido PCBA con la amina de la lisina no tenía lugar.

### Ciclohexapéptidos.

El primer compuesto que se estudió fue el *c*-[(*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (**25**), y para esclarecer el comportamiento del ciclopéptido se debe determinar en que condiciones es soluble, resultando serlo en disoluciones acuosas, pudiéndose purificar mediante HPLC en fase reversa (H<sub>2</sub>O:ACN, 0.1%TFA).

Este compuesto se caracterizó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de transmisión de electrones (TEM), en primer lugar se estudió el comportamiento del ciclopeptido mediante TEM. Para llevarlos a cabo se disolvió la muestra en agua miliQ, 1 mg en 100  $\mu$ L, se realizó a una concentración similar a la que se realizaron las cristalizaciones con el fin de disminuir la probabilidad de no observar los nanotubos. Se depositaron 5  $\mu$ L de disolución en una placa de mica, previamente exfoliada. Una vez seca se realizó el sombreado de carbono mediante la deposición de una fina capa C sobre la superficie de mica. La capa de carbono se flotó sobre una mezcla de agua y etanol, y se recogió sobre una rejilla de Cu/Rh (malla 400). Después de secar la gradilla, esta se tiñó con una disolución de acetato de uranilo al 2% en peso, transcurridos 2 minutos se eliminó el tinte y se lavó con agua miliQ. Las imágenes fueron tomadas mediante un microscopio electrónico operando a 100 kV y usando una magnificación de 60.000X.

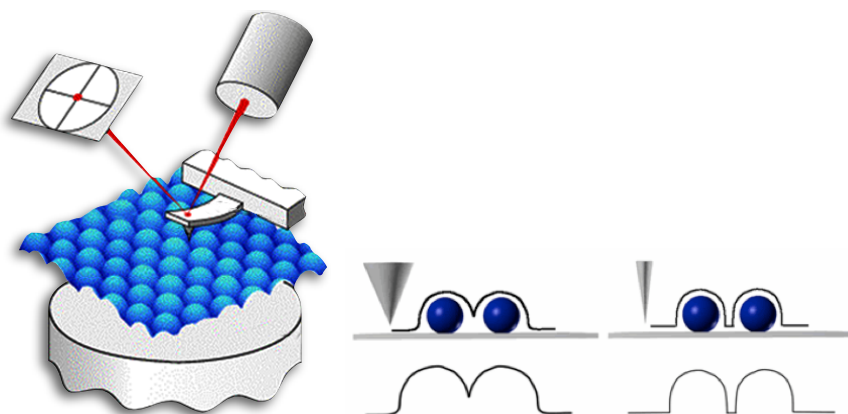


**Figura 56:** Imagen de TEM del ciclopeptido 25, *c-[(D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Glu)-]* adsorbido sobre mica.

En la figura 56 se puede observar como el ciclopeptido se organiza para dar lugar a múltiples filamentos muy largos, que hacen pensar que la formación de nanotubos mediante el autoensamblaje molecular. A pesar de que parece que el autoensamblaje de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos tiene lugar, mediante esta técnica no se pudo confirmar la estructura de los mismos, por lo que se decidió ampliar los estudios de este compuesto mediante el uso de otras microscopías.

La otra técnica usada para la caracterización de este ciclohexapéptido fue la microscopía de fuerza atómica (AFM). El objeto de usar el AFM es obtener medidas

exactas del tamaño de los nanotubos, para lo que debemos tener en cuenta que mediante este método únicamente obtendremos valores fiables de longitud y altura. El error que se comete en la medida correspondiente al ancho es mayor debido a que es dependiente del grosor de la punta que se usó para adquirir las imágenes de AFM (figura 57). Debido a que nuestros compuestos son cilíndricos, la altura se puede extrapolar al diámetro del nanotubo.



**Figura 57: Representación de la microscopía de fuerza atómica y de por que dicha técnica es tan dependiente del grosor de la punta.**

Las medidas de AFM<sup>203</sup> se realizaron sobre una superficie de mica, previamente exfoliada. Y se realizaron dos tipos de medidas, en humedad y en sequedad. Para el caso de las medidas en humedad se depositan, sobre la superficie, 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 10 mM del ciclopéptido **25** en agua miliQ, se deja reposar entre 5 y 10 minutos y se toman imágenes de la muestra directamente. Es importante resaltar que mediante este procedimiento las imágenes no mostraban lo esperado, salvo depósitos amorfos de materia sobre la superficie. Además era muy complicado optimizar las condiciones de adquisición de las imágenes. El otro procedimiento seguido fue en sequedad, sobre la superficie de mica, previamente exfoliada, se depositan 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 10 mM del ciclopéptido **25** en agua miliQ, la muestra se secó con una corriente de aire de alta calidad, se lavó con agua y se volvió a secar. Se capturaron imágenes directamente sobre la superficie seca, en este caso fue más sencillo estabilizar el equipo para la correcta adquisición de imágenes (figura 55).

---

<sup>203</sup> Las imágenes de AFM fueron obtenidas gracias a la ayuda ofrecida por el Prof. Ramón Eritja, perteneciente al IQAC-CSIC, en Barcelona.

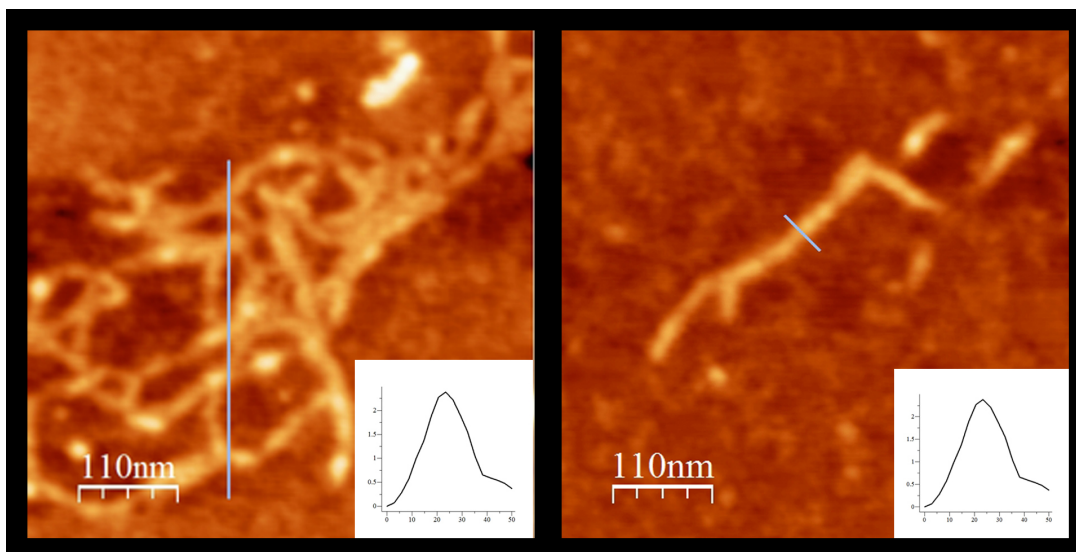


Figura 58: Imágenes de AFM del ciclopeptido XX sobre mica.

En la figura 58 se pueden ver dos imágenes de AFM adquiridas para el ciclopeptido **25**,  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Glu)-], se pueden observar formas alargadas tanto individualmente como formando redes de casi 2  $\mu\text{m}$ . Estas figuras lineales presentan alturas entorno a los 2.2 nm y las longitudes de los mismos generalmente tienen dimensiones entre los 100-400 nm. El ancho de los mismo es de unos 20 nm, pero tal y como hemos explicado antes, la medida del ancho no es fiable ya que es muy dependiente del diámetro de la punta. La altura se corresponde con el diámetro de un ciclohexapéptido individual y por tanto estas figuras alargadas se corresponden con los nanotubos peptídicos.

Podemos concluir que la formación de nanotubos mediante el autoensamblaje molecular de  $\alpha,\gamma$ -ciclohexapéptidos sobre superficie de mica tiene lugar cuando la muestra se lleva a sequedad.

Pasamos a continuación a estudiar el CP que lleva unido un fullereno,  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (**27**), como en anteriores ocasiones, el primer paso a la hora de estudiar el autoensamblaje del ciclopeptido fue buscar el disolvente más apropiado para estos estudios, se probaron: agua, ACN, DMSO, DMF, etc. encontrándose que se disolvía en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  con un 0.1% TFA. Por lo tanto se decidió realizar los estudios de autoensamblaje molecular con una disolución 10 mM del CP **27** en  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  (0.1% TFA).

En primer lugar se quiso verificar, mediante TEM, que el autoensamblaje molecular tenía lugar. Para ello se prepararon gradillas de TEM de la misma forma que para el caso del ciclopeptido **27**, *c*-[(D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Glu)-]. Lamentablemente las imágenes tomadas no resultaron ser lo suficientemente claras como para poder sacar conclusiones, en algún caso se pueden observar pequeños nanotubos (6-8 unidades de ciclopeptido), pero el tamaño del compuesto frente a los depósitos de materia que se forman unidos al efecto del agente de tinción hizo imposible demostrar que no se tratasen de artefactos.

A continuación estudiamos la formación de nanotubos mediante AFM. En este caso se realizaron medidas en múltiples condiciones: se realizaron estudios en sequedad, a temperatura ambiente, sin incubación y encubando la muestra desde 5 h hasta 15 h, también se realizaron medidas en humedad, con y sin incubación, por último se adquirieron imágenes encubando la muestra a baja temperatura, 4°C, para favorecer el proceso de autoensamblaje. Los resultados eran similares en todos los casos, observándose mayoritariamente depósitos amorfos que en ningún caso hacen pensar que este ciclopeptido se autoensamble para formar nanotubos. Estos resultados nos hacen pensar que los problemas de solubilidad generados por la unión de los C60 al CP favorecen que su agregación prevalezca sobre el autoensamblaje del ciclopeptido.

### Ciclooctapeptidos.

El ciclopeptido sin fullereno **26**, *c*-[(D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-], se comportó, en cuanto a solubilidad se refiere, de forma similar a su análogo de seis residuos, para realizar los estudios se disolvió el péptido en una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (1:1) con un 0.1% de TFA. Se trabajó con disoluciones 19 mM de CP en esta mezcla. La muestra (5-10 µL) se depositó sobre la superficie de mica, y se dejó reposar durante 5-10 min. La superficie se lavó con agua y se secó con aire. La muestra se observó mediante AFM en modo tapping y en sequedad (figura 59). En la imágenes tomadas se pueden observar la aparición de hilos de gran longitud 5 µm, 5 nm de alto, dos veces más alta de lo esperado para un CP por lo que se identificaron como una agrupación de dos nanotubos superpuestos uno encima de otro. El ancho de estos agregados es de unos 35 nm. A mayores también se identificaron la formación de unidades sencilla de nanotubos, más cortos, aproximadamente 1 µm de largo, y una

altura de 3 nm, que concuerda con las dimensiones de un ciclooctapéptido (aparecen marcados dentro de círculos de color azul en la figura 59).

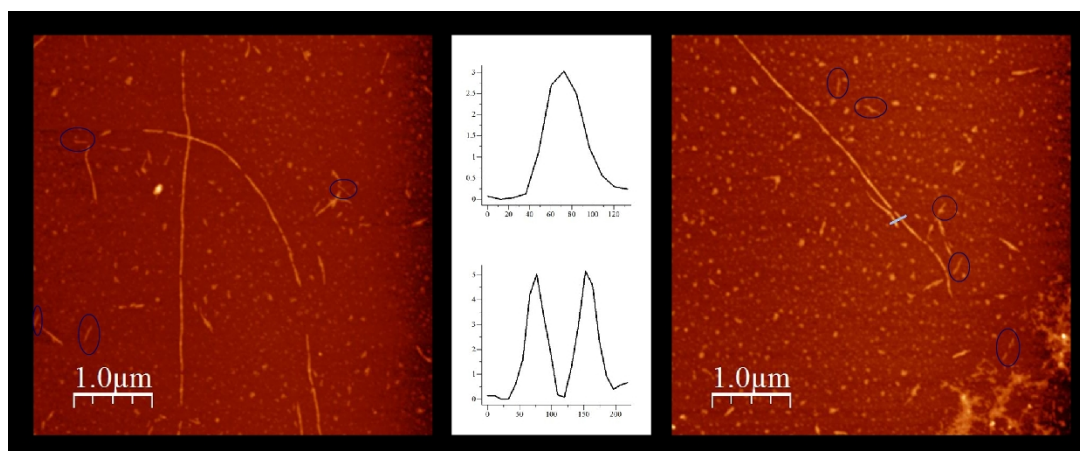


Figura 59: Imágenes de AFM del ciclo péptido *c*-[(*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(*S*<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (26), en la parte central se pueden observar los perfiles correspondientes a nanotubos sencillos (parte superior) y a los agregados de nanotubos (parte inferior).

La aparición de estas largas estructuras se atribuyó a la formación de agrupaciones de nanotubos empaquetados mediante la formación de laminas  $\beta$  antiparalelas.

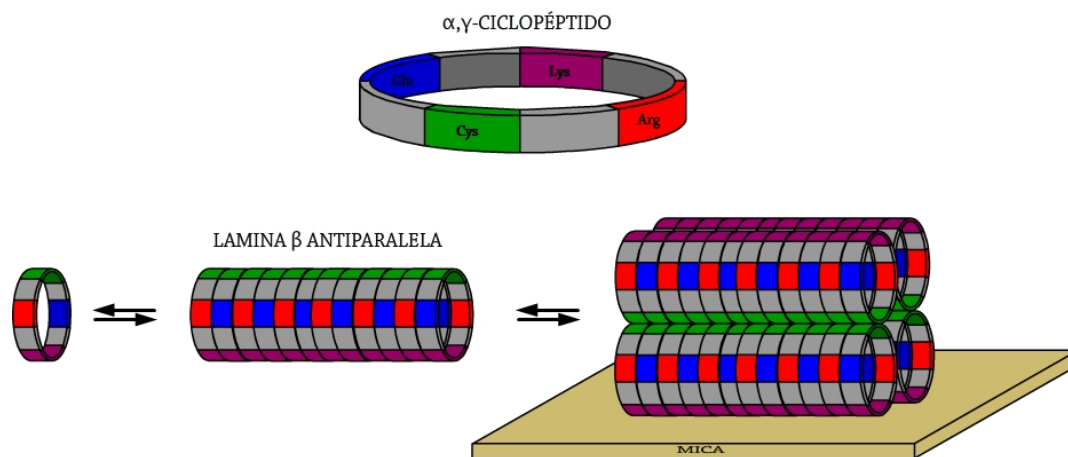
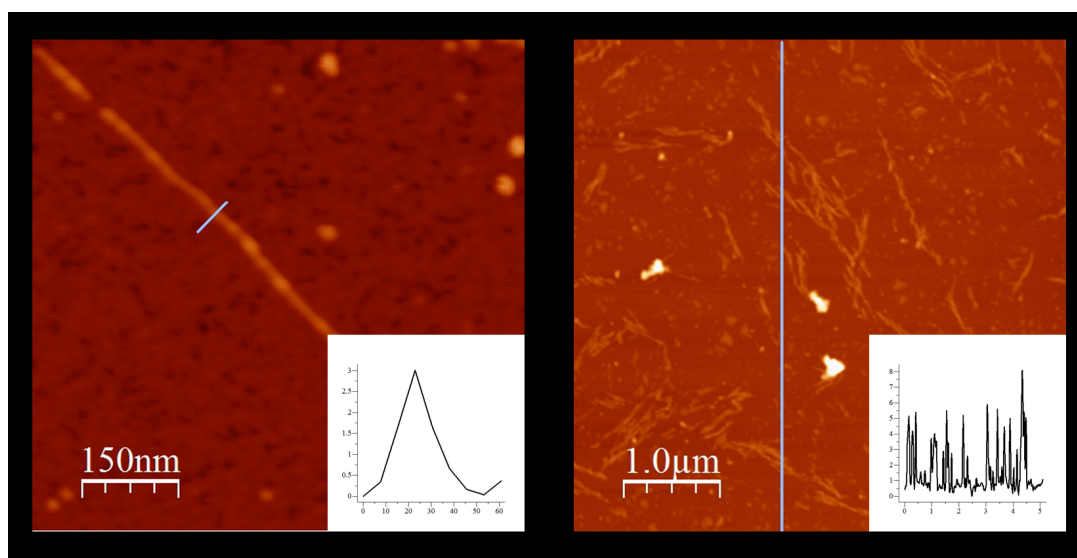


Figura 60: Representación esquemática que justifica la formación de agregados de nanotubos sobre superficies de mica, mediante la organización del CP 26 a través de laminas  $\beta$  antiparalelas.

Esta se pueden justificar observando la secuencia del ciclo péptidos, la formación de puentes salinos (Arg-Glu) obliga a todas las lisinas a estar orientadas hacia el mismo lado y que puedan interactuar con la superficie aniónica de la mica, ya que están cargadas positivamente por estar trabajando en medio ácido. Como consecuencia de esto en el lado opuesto quedan las cisteínas con los grupos *t*-butilo expuesto al medio

acuoso, como consecuencia queda una superficie fundamentalmente hidrofóbica, que se recubriría con una segunda capa de nanotubos, tal y como se representa en la figura 60.

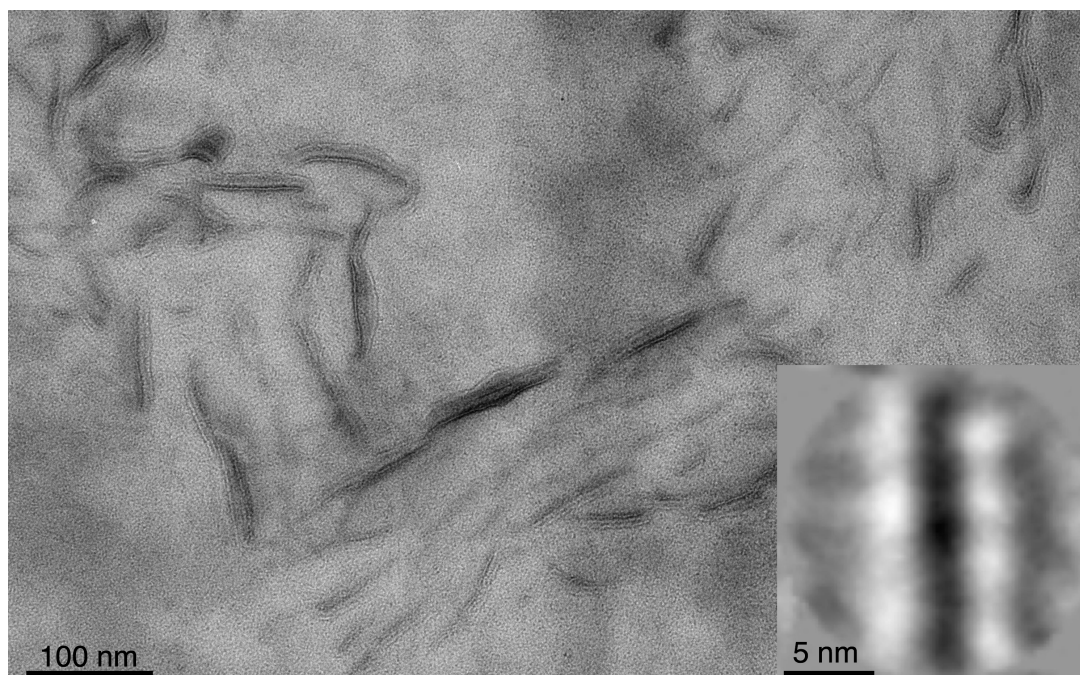
Los estudios de AFM del octapéptido que contiene al fullereno, CP **28**, se realizaron en las mismas condiciones que su análogo sin el PCBA, el CP **26**. Los resultados obtenidos fueron sorprendentemente buenos, teniendo en cuenta el precedente del CP **27**, observándose fue la aparición de múltiples agujas muy cercanas o unidas entre ellas de diferentes longitudes, entre 200-600 nm, y con una altura entre 3-3.5 nm (figura 61, derecha). Estas dimensiones se corresponden con una unidad sencilla de nanotubo. También se observó la presencia de nanotubos aislados y de gran longitud (figura 61, izquierda). La ausencia de agregados de pares de nanotubos, como sucedía en el CP **26**, se debe a que el ciclopeptido sólo se puede unir a la superficie mediante la cadena lateral de la arginina. De esta forma en la parte superior del nanotubo (si este está unido a la superficie por las Arg) quedan expuestas las cadenas laterales de los glutámicos, que interactúan con el agua. Los grupos C60 y S<sup>t</sup>Bu estarían orientados hacia los laterales del tubo, paralelos a la superficie, de forma que no existen más interacciones laterales que las hidrofóbicas.



**Figura 61:** Imágenes de AFM. A la izquierda se presenta un nanotubos sencillo de gran longitud, mientras que a la derecha se muestra una imagen de 4.0 μm x 4.0 μm en la que se observa la aparición de múltiples agujas.

Con el objeto de verificar que este proceso tiene lugar y demostrar, mediante técnicas con mayor resolución, la organización interna de estos compuestos, el CP **28**

fue estudiado mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). En la preparación de la muestra se emplearon condiciones similares a las usadas en el AFM. En este caso, las alícuotas de la muestra se depositaron sobre la superficie de la mica, previamente exfoliada, y se dejaron secar. La muestra fue sombreada mediante deposición de una fina lamina de carbono, la cual fue posteriormente flotada sobre una mezcla de agua y etanol. La capa de carbono se recogió sobre una gradilla de Cu/Rh, se dejó secar y se tinto negativamente. Inicialmente se usó una disolución al 2% de acetato de uranilo, pero el contraste que se lograba no era suficiente para la correcta visualización de esta muestra. Después de un estudio de diferentes agentes de tinción se encontró que la disolución saturada de acetato de uranilo daba los mejores resultados (figura 62).



**Figura 62:** Imagen de TEM obtenida para el  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Lys(PCBA)-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (28). En la esquina inferior se muestra una imagen obtenida mediante sobreposición de áreas.

En estas condiciones la microscopía electrónica mostraba la presencia de largos filamentos, aproximadamente 200 nm, que tenían un grosor de unos 2.5 nm, el cual se corresponde al grosor de los nanotubos. Los nanotubos aparecían como entidades sencillas o agrupados en parejas, también se observaron otro tipo de agregaciones menos frecuentes. Mediante sobreposición de áreas pequeñas de los filamentos dobles,

y usando procedimientos de máxima probabilidad,<sup>204</sup> se confirmó el ancho de los nanotubos y además se reveló que existe periodicidad en la estructura, posiblemente debida a la interacción del agente de tinción con la línea de fullerenos, de 1 nm de ancho, que está localizado en una cara en el caso de los nanotubos sencillos o en ambos lados en el caso de las parejas de tubos. La línea correspondiente a los C60 no siempre es visible, pero en algunos casos presenta un gran contraste debido a la interacción con el agente de tinción, así se confirmó que tiene un ancho de aproximadamente 1 nm, que es el tamaño del C60.

El autoensamblaje de  $\alpha,\gamma$ -nanotubos también se estudió mediante microscopía de efecto túnel (STM). Para estos estudios se decidió usar superficies de grafito, para ser más exactos laminas de grafito pirolítico con altura orientada (HOPG). Se decidió usar esta superficie debido a su fácil manipulación, es exfoliable, precio económico, disponibilidad y debida a los buenos resultados que se obtienen en las medidas de STM con esta superficie.<sup>205</sup> También se intentaron realizar algunos estudios sobre superficies de oro, pero en este caso ninguna de las condiciones que se intentaron se lograron obtener superficies suficientemente planas para poder distinguir los nanotubos.

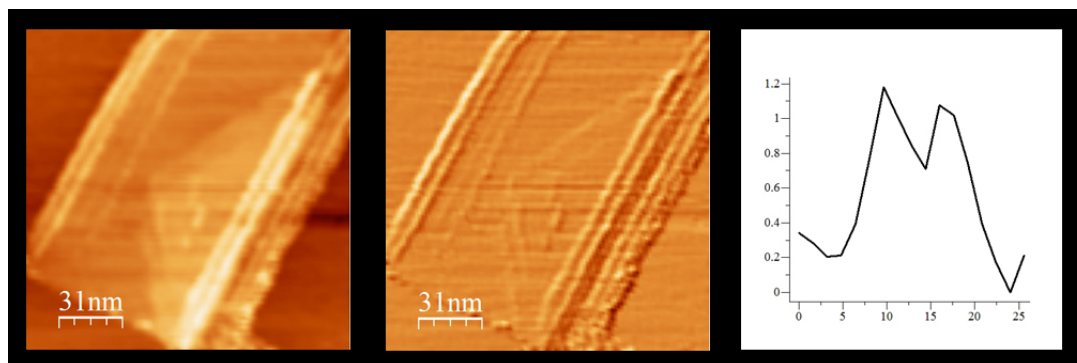
Los estudios se realizaron empleando una disolución 10 mM de CP en la mezcla de ACN:H<sub>2</sub>O con un 0.1% de TFA, anteriormente mencionado. Entre 5-10  $\mu$ L de muestra se depositaron sobre la superficie de HOPG, y después de 5 minutos de incubación se secó la muestra con una corriente de aire y lavó la superficie con una mezcla de agua y acetonitrilo (1:1). Las muestras escaneadas mostraron escasos depósitos de muestra, y en la mayor parte de los casos estos depósitos se encontraron en las terrazas formadas por laminas de grafito, entre las estructuras observadas la más común fue encontrar dos líneas paralelas con una altura de 1 nm de altura, que por sus dimensiones se corresponden con fullerenos organizados (figura 63). El núcleo del nanotubo, el esqueleto peptídico, no se observa debido a que en STM se observan únicamente los materiales conductores y este no lo es. Las moléculas de C60

---

<sup>204</sup> Scheres, S. H. W.; Valle, M.; Núñez, R.; Sorzano, C. O. S.; Marabini, R.; Herman, G. T.; Carazo, J. M. *J. Mol. Biol.* **2005**, 348, 139-149.

<sup>205</sup> Sarraf, H.; Škarpová, L.; Louda, P. *Arch. Mat. Sci.* **2007**, 28, 489-494.

aparecen como barras debido a la densidad electrónica de los fullerenos, que si permite observarlos mediante efecto túnel. Los arrays de fullerenos se encuentran separados por 6-7nm, distancia que se corresponde con la distancia de fullerenos cuando se forman los nanotubos orientado los C60 hacia su exterior.



**Figura 63:** Imágenes de STM obtenidas sobre HOPG para el nanotubo formados por el ciclopeptido,  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-Lys(PCBA)-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-] (28). De izquierda a derecha se muestra la imagen de STM en la cual se pueden ver líneas apareadas de dos en dos, con una altura de 1nm correspondiente al fullerenos. La derivada (dX/dZ) de la primera imagen. El perfil para un par de líneas de nanotubos.

En conclusión se ha demostrado mediante diferentes técnicas, AFM, TEM, STM, que el autoensamblaje de  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos daba lugar a los correspondientes nanotubos. Además estos ciclopeptidos son capaces de organizar fullerenos en 1 dimensión, donde por cada nanotubo se forman 2 líneas de C60 en los extremos del nanotubo. El autoensamblaje de los péptidos tiene lugar mediante la formación de laminas  $\beta$  a través de enlaces de hidrógeno entre los CPs. El control de la disposición de estos compuestos se llevó a cabo mediante la interacción de los péptidos con la superficie, y la formación de puentes salinos entre las cadenas laterales de los  $\alpha$ -Aa. El proceso de autoensamblaje es capaz de organizar la deposición de fullerenos en una dimensión. Como consecuencia de este alineamiento donde los C60 forman dos líneas paralelas separadas por un material aislante, el nanotubo peptídico, basándose en el control de este ordenamiento se abre la oportunidad del desarrollo de nuevas superestructuras, y el desarrollo de nuevos materiales como nanohilos y nuevos dispositivos electrónicos.



**Conclusiones.**



Esta tesis doctoral tenía como principal objetivo el diseño, síntesis y estudio de nuevos  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos capaces de autoensamblarse, con el fin de ampliar los conocimientos y la variedad estructural existente de los nanotubos peptídicos. La realización de este ambicioso objetivo, en nuestro caso, consistió en el estudio de diferentes proyectos: El desarrollo de estructuras diméricas sin la necesidad de utilizar aminoácidos N-alkilados. Por otro lado se quiso demostrar la existencia de los  $\alpha,\gamma$ -nanotubos mediante el autoensamblaje molecular de ciclopéptidos.

Lo primero que se logró fue obtener y resolver enantioméricamente, de forma reproducible y a escala de multigramo, el ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico ( $\gamma$ -Ace). La optimización de la ruta sintética empleada para otro aminoácido, el ácido *cis*-3-aminociclopentanocarboxílico ( $\gamma$ -Acp), muy importante en nuestro grupo de investigación, fue un importante paso para el desarrollo de esta tesis.

En nuestro grupo se demostró que los N-metil- $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos son capaces de autoensamblarse para dar lugar a la formación de dímeros, que se utilizaron para desarrollar sistemas fotosensibles y electrónicos. **En esta tesis se demostró que empleando  $\alpha$ -aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos se pueden formar dímeros de  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos mediante el autoensamblaje molecular de los mismos, sin necesidad de usar los aminoácidos N-alkilados.** También se demostró que los ciclopéptidos que contienen el  $\gamma$ -Ace pueden modificarse mediante una síntesis divergente en su última etapa, de forma que aumenta la variedad estructural de los ciclopéptidos.

**En esta tesis se demostró que la formación de nanotubos peptídicos mediante el autoensamblaje molecular de  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos es posible.** Esto se consiguió a través de diferentes métodos y múltiples técnicas. En una de ellas se sintetizaron y cristalizaron ciclopéptidos en disoluciones acuosas, de los cuales el *c*-[(D-Acp-L-His-D-Acp-L-Gln)<sub>2</sub>-] se caracterizó mediante difracción de rayos X, aunque necesitamos refinar los datos, demostrando que los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos pueden formar nanotubos mediante el autoensamblaje molecular de los mismos a través de la formación de laminas  $\beta$  paralelas, lo que también se demostró mediante FT-IR. Por el momento aún desconocemos si es un comportamiento general para todos los nanotubos que contienen el Acp. Este no fue el único camino mediante el cuál se demostró que la formación de los  $\alpha,\gamma$ -nanotubos es posible, también se obtuvieron

## Conclusiones

---

mediante deposición de los ciclopeptidos sobre diferentes superficies, mica y grafito, posteriormente se caracterizaron, mediante AFM, STM y TEM. Así se verificaron los diámetros y longitudes de diferentes nanotubos formados por ciclohexa- y ciclooctapeptidos, siendo estos últimos los más favorables. Además, estos fueron modificados, demostrando que estos compuestos son capaces de organizar diferentes moléculas, abriendo así un nuevo campo de investigación con el fin de preorganizar diferentes moléculas funcionales mejorando sus propiedades.

**Procedimiento experimental:**



## Descripción general, instrumentos y materiales:

El hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC-Cl), y la resina cloruro de 2-clorotritilo fueron adquiridos a Gl Biochem, el tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), las resinas Rink Amida y Wang se compraron a Novabiochem, la resina Fmoc-PAL-PEG-PS se adquirieron en Applied Biosystem. Los  $\alpha$ -aminoácidos se compraron a Gl Biochem, a excepción del Fmoc-L-Lys(Mtt)-H, Fmoc-L-Glu-OAll que fueron proporcionados por Novabiochem, y los Fmoc-L-His(Trt)-H y Fmoc-D-His(Trt)-H que se obtuvieron en Irish Biotech GmbH. Los demás reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich. Todos los disolventes utilizados son de calidad de síntesis o de HPLC, utilizándolos sin purificación adicional, excepto diclorometano y piperidina que se destilaron de hidruro cálcico, y el tetrahidrofurano que se destiló desde sodio/benzofenona. Para la realización de la síntesis en fase sólida la DMF se utilizó de grado síntesis de péptidos.<sup>206,207</sup> Para las cromatografías en capa fina se emplearon hojas de aluminio y gel de sílice 60 F254 Merk. Los compuestos, que no se visualizaban mediante UV, se revelaron mediante la inmersión en una disolución de ninhydrina (2%) en etanol, seguido de calor. En la columna cromatográfica se usó como soporte sólido el gel de sílice, E. Merck (tipo 60 SDS, 230.400 mesh) y como disolventes hexano, acetato de etilo, diclorometano y/o metanol.

La síntesis de los péptidos en fase sólida se realizó manualmente o bien usando un sintetizador de péptidos automático, Peptide Synthesizer PS3 de Protein Technologies Inc. La realización de medidas de UV/VIS se llevaron a cabo en el espectrómetro Cary 100 Bio UV/Visible, usando una microcubeta estándar Hellma.

La purificación líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en la serie 1100 de Agilent o en un HITACHI D-7000, la fase móvil usada se especificará en cada caso,

---

<sup>206</sup> Brown, H. C. "Organic Synthesis via Boranes", Ed. John Wiley & Sons, **1975**.

<sup>207</sup> Perrin, D. D.; Armarego, W. I. F. "Purification of Laboratory Chemical", Ed. Pergamon Press, **1988**.

pero de forma general se usó una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH para las purificaciones sobre gel de sílice, mientras que para las purificaciones en fase reversa se usó una mezcla de H<sub>2</sub>O y ACN con 0.1% TFA. Las columnas usadas para realizar los análisis de cromatografía líquida y las purificaciones fueron: Kromasil silica (5 μm, 250 mm x 4.6 mm); Eclipse XDB-C18 (5 μm, 150 mm x 4.6 mm); Luna 5u Silica (5 μm, 250 mm x 5.0 mm); Luna 5u Silica C18(5 μm, 250 mm x 5.0 mm).

Los espectros de RMN se registraron en un aparato BRUCKER WM-250, BRUCKER DRX-500, VARIAN Inova-400 y VARIAN Mercury-300. Los disolventes utilizados fueron: CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O, MeOD-d<sup>4</sup>, DMSO-d<sup>6</sup>, y TFA-d, usando la señal del TMS (δ, 0.00) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se dan en unidades de partes por millón (ppm, δ). La asignación de señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, <sup>1</sup>H RMN, se designaron como singlete (*s*), doblete (*d*), triplete (*t*), cuádruplete (*q*), las demás señales fueron designadas como multipletes (*m*) o señales anchas (*br*). Los espectros de carbono <sup>13</sup>C RMN, se asignaron mediante la realización de espectros de DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer) obtenidos con un ángulo de 135. Los experimentos bidimensionales se realizaron con tiempos de mezcla entre 250-400 ms, los cuales no se optimizaron. Los espectros de masas de alta resolución se realizaron en el Servicio de Espectroscopia de Masas de la Universidad de Santiago, usando los espectrofotómetros: Micromass Autospec, Bruker Biotof II, Bruker Microtof, Bruker Autoflex.

Para las medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de efecto túnel (STM) se usó un microscopio Digital Instrument Multimode Nanoscope III y V respectivamente, en modo tapping o en modo STM. Para llevar a cabo el procesado de las imágenes se usó el software WSxM.<sup>208</sup>

Para la realización de las medidas de microscopía de transmisión de electrones (TEM) se usó el microscopio JEOL 1200 EXII operando a 100 kV y con una magnificación de 60.000X. Usando gradillas de Cu/Rh con un malla de 400. Para la deposición de laminas de carbono homogéneas se usó el Balzers Med010. El procesamiento de las imágenes, las micrografías se digitalizaron en un escáner Zess SCAI con una ventana de muestreo correspondiente a 2.33 Å/pixel.

---

<sup>208</sup> Horcas, I.; Fernandez, R.; Gomez-Rodriguez, J. M.; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Baro, A. M. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, 78, 013705

### Síntesis en fase sólida, procedimiento general:

Para la realización de la síntesis en fase sólida se siguió el siguiente procedimiento:

#### Preparación de la resina:

En las síntesis en fase sólida se utilizaron como soportes sólidos las resinas Wang (resina *p*-benciloxibencil alcohol) con una carga 1.1 mmol/g, la resina Rink Amida (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi) con una carga 0.5 mmol/g, la resina Fmoc-PAL-PEG-PS con una carga 0.2 mmol/g, o la resina de cloruro de 2-clorotritilo, 1.0 mmol/g.

Antes de comenzar la síntesis las resinas se preparan de la siguiente forma. La resina se añadió al matraz de reacción, se suspendió en DMF y se agitó el soporte sólido durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se filtró, obteniendo el soporte sólido hinchado y listo para realizar los acoplamientos.

#### Proceso sintético:

El primer acoplamiento se llevó a cabo de forma diferente dependiendo del tipo de resina empleada.

**Resina Wang:** Se suspendió la resina (454 mg 0.5 mmol) en THF seco y se agitó durante 2 h, posteriormente se filtró eliminando el disolvente y sin dejar la resina a sequedad. Una disolución de *L*-Fmoc-Glu-OAll (818.2 mg, 2.0 mmol), DIC (0.310 mL, 2.0 mmol), HOBT (270.2 mg, 2.0 mmol) y DMAP (9.0 mg, 0.075) en 4 mL de THF, agitada previamente durante 5 min se añadió sobre la resina. La suspensión resultante se agitó 12 h a ta, posteriormente se filtró y lavó con THF, DMF y DCM, se secó a vacío durante dos horas. La carga de la resina se determinó mediante el Test Fmoc (se explicará con detalla más adelante).<sup>171</sup> Si la carga es inferior a 0.5 mmol/g se repite el proceso, si es superior se realiza un “capping” de los grupos hidroxilo libres. Para ello se añade Ac<sub>2</sub>O sobre la resina y se agitó 30 min, después se filtró y se lavó con DMF y DCM.

**Resina cloruro de 2-clorotritilo:** Se suspendió la resina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, y se agitó durante 30 min, transcurrido ese tiempo se filtró y se añadió en una disolución

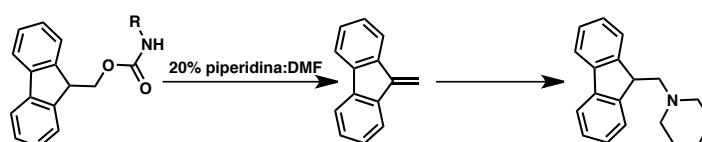
---

<sup>171</sup> Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 71, 110-118.

de Fmoc-Aa-OH (4 eq) y DIEA (16 eq) en DCM. Después de dos horas se filtró, se lavó con DCM, y se secó. Para cerciorarse del rendimiento del acoplamiento se realizó un Test Fmoc, si la carga es adecuada se realiza un capado de los grupos activos, para ello se suspende la resina en MeOH y se agita 30 min, después de los cuales se filtra la resina y se lava con DCM.

**Resina Rink Amida y Fmoc-PAL-PEG-PS:** El procedimiento para acoplar el primer aminoácido en estos soportes es el mismo que para un acoplamiento normal de un aminoácido, el cual se describirá más adelante.

**Test Fmoc:** Una pequeña muestra de resina (entre 5-10 mg) se desprotege usando una disolución al 20% de piperidina en DMF. La formación del pireno-dibencilfulvaleno resultante se cuantifica midiendo la absorbancia de la disolución a las longitudes de onda, 290 nm y/o 301 nm, empleando la ecuación que aparece reflejada en la siguiente figura.



$$Carga(mmole\ g^{-1}) = \frac{Absorbancia \times V \times 10^3}{\epsilon \times v \times W(mg) \times l(cm)}$$

V: volumen total usado.

v: volumen de muestra.

$\epsilon$ = 5800 a 290 nm y 7100 a 310 nm

W: el peso de resina utilizado en mg.

l: longitud de la cubeta en cm.

Una vez se tiene la resina con el extremo Fmoc-NH-, se continuó la síntesis del péptido tal y como se describe a continuación:

- 1) **Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc):** La resina se suspendió en una disolución al 20% piperidina en DMF y se agitó durante 15 min. Después se lavó la resina desprotegida con DMF (3 x 5 mL, 2 min).
- 2) **Acoplamiento:** El aminoácido correspondiente (0.4 mmol) se disolvió en una disolución de HBTU (151.7 mg, 0.4 mmol), HOBT (54.0 mg, 0.4 mmol) y el

aminoácido correspondiente en DMF (2 mL), esta disolución se trató con una mezcla de DIEA (0.1 mL) en DMF (3 mL), y se agitó durante 2 min. Transcurrido este tiempo se vertió sobre la resina y la suspensión resultante se agitó vigorosamente durante 30 min.

- 3) **Lavados:** Después de cada acoplamiento se lavó la resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min).

Una vez la resina está filtrada y lavada, se comprobó mediante el test TNBS, que el acoplamiento había transcurrido cuantitativamente,<sup>171</sup> se continuó con el siguiente paso. En caso de dar positivo, resina de color rojo, se repite el acoplamiento utilizando la mitad de equivalentes de reactivos.

- 4) **Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc):** Una disolución al 20% de piperidina en DMF se añadió sobre la resina y se agitó durante 15 min. Después se lavó la resina desprotegida con DMF (3 x 5 mL, 2 min).

En este punto se repitió el paso 2, y se continuó con el proceso de acoplamientos y desprotecciones hasta obtener el péptido lineal deseado. Una vez llegado a él, la resina se filtró, se lavó con DCM, y se secó con una corriente de Ar. Finalmente se procedió con la ciclación.

- 5) **Desprotección del grupo protector OAll en el extremo C terminal:** Se preparó una disolución de Pph<sub>3</sub> (1.5 eq), 4-metilmorfolina (NMM) (10 eq), y fenilsilano (10 eq) en la menor cantidad posible de DCM, se desoxigenó la disolución mediante el paso de una corriente de Ar durante 15 min. Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.3 eq) se añadió sobre la disolución, y la mezcla resultante se volvió a desoxigenar durante 10 min. La disolución resultante se vertió sobre la resina y se dejó con agitación mecánica toda la noche. Transcurridas 12 h, la resina se filtró y se lavó sucesivamente con DCM (3 x 5 mL, 1 min), 2% DIEA en DMF (3 x 5 mL, 2 min), 0.5% sodio dietilditiocarbamato en DMF (5 x 5 mL, 2 min), DMF (3 x 5 mL, 1 min), y DMC (3 x 5 mL, 1 min). Para constatar si la reacción transcurrió completamente se separaron 3 mg de resina, y se rompió (según el

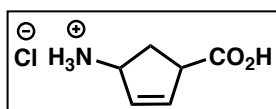
---

<sup>171</sup> Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 71, 110-118.

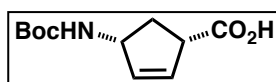
- paso 7) y analizó mediante HPLC-MS. En caso de no observarse la masa del péptido alilado se continua con el paso 6. En caso contrario se repite el paso 5.
- 6) **Ciclación:** Se eliminó el grupo temporal Fmoc del extremo N terminal, añadiendo sobre la resina una disolución de 20% piperidina/DMF y agitándola 15 min. Después la resina desprotegida se lavó con DMF (3 x 5 mL, 2 min). Una vez secada sobre la resina se añadió una disolución de PyAOP (4 eq) en DMF y a continuación se añadió DIEA (6 eq), se agitó mecánicamente durante 12 h a t.a., se filtró, se lavó con DMF (3 x 5 mL, 1 min) y DMC (3 x 5 mL, 1 min). La eficiencia de la ciclación se siguió nuevamente mediante el Test TNBS, en caso de ser negativo se repite esta etapa durante 6 h.
- 7) **Rotura de la unión del péptido a la resina con desprotección total:** Las separaciones de los péptido de las resinas se llevaron a cabo de la siguiente forma. Sobre la resina, en la columna de síntesis, se añadió la una disolución formada por TFA (900  $\mu$ L),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50  $\mu$ L), agua (25  $\mu$ L), y triisopropilsilano (25  $\mu$ L); 1 mL de disolución por cada 40 mg de resina. La mezcla resultante se agitó durante 2 h. La suspensión se filtró para separar la resina de la mezcla de desprotección. La resina se lavó con TFA (200  $\mu$ L aproximadamente). Los filtrados combinados se añadieron lentamente sobre  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL éter por cada 1 mL TFA empleado) previamente enfriado con  $\text{CO}_2$  sólido. La suspensión del péptido en  $\text{Et}_2\text{O}$  se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min, a continuación se separó el líquido sobrenadante del sólido centrifugado. El sólido se suspendió en  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL), se sonicó durante unos minutos, y se centrifugó, después se secó bajo corriente de Ar. Se purificó mediante HPLC en fase reversa, utilizando el siguiente gradiente: 5% del disolvente B durante 5 min, y del 5% de B al 75% de B en 30 min, en los que A es 0.1% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  y B es 0.1% TFA/ACN.

**Nuevos  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos basados en  $\alpha$ -aminoácidos  $\alpha,\alpha$  disustituidos:**

**Síntesis del ácido *cis*-4-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopent-2-enocarboxílico (*cis*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH) y del ácido *cis*-3-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopentanecarboxílico (*cis*-Boc- $\gamma$ -Acp-OH).**

**Hidrocloreto del ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico (ClH·H-Ace-OH).**<sup>209,210</sup>

Una disolución del 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona (25.0 g, 229.30 mmol) en HCl (10%, 1.3 L) se agitó 24 h a temperatura ambiente. La disolución marrón resultante se concentró a vacío y el aceite resultante se lavó repetidamente con acetona para dar lugar al  $\gamma$ -H-Ace-OH como un sólido blanco, que se filtró y lavó con acetona. {29.08 g, 100%, Rf=0.46 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1)]}. **<sup>1</sup>H NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 6.18 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 6.04 – 5.79 (m, 1H), 4.36 (s, 1H), 3.81 – 3.60 (m, 1H), 2.63 (dt,  $J$  = 14.6 y 8.5 Hz, 1H), 2.03 (dt,  $J$  = 14.4 y 4.9 Hz, 1H). **<sup>13</sup>C RMN** (62.83 MHz, D<sub>2</sub>O, d): 177.7 (CO<sub>2</sub>H), 136.6 (CH), 130.0 (CH), 56.5 (CH), 50.1 (CH), 31.6 (CH<sub>2</sub>). **M.S.** (Iq) [m/z (%): 128 [(M+H)<sup>+</sup>, 82], 111 [(M+H)<sup>+</sup>-OH], 53], 110 [(M<sup>+</sup>-OH), 100], 82 [(M<sup>+</sup>-COOH), 50].

**Ácido (1*S*,4*R*)-4-amino-N-t-butoxycarbonilciclopent-2-enocarboxílico (L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH).**

A una disolución del hidrocloreto *cis*- $\gamma$ -Ace (37.0 g, 163.45 mmol) en una mezcla de H<sub>2</sub>O:Dioxano (1:1, 1.5 L) se añadió Boc<sub>2</sub>O (74.0 g, 339.50 mmol) y DIEA (118.6 mL, 679.10 mmol). Después de agitar la mezcla resultante durante 3 h a temperatura ambiente, se acidificó a pH 3 añadiendo HCl (10%) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener un aceite de color amarillo, que se cristalizó en una mezcla CHCl<sub>3</sub>:hexano (1:1), obteniendo en cristalizaciones sucesivas, 41.9 g en la primera cristalización y 11.3 g en la segunda de Boc-*cis*- $\gamma$ -Ace-OH (cristales blancos). La mezcla racémica obtenida se resolvió mediante sucesivas cristalizaciones en CHCl<sub>3</sub>:hexano (desde 1:1), en presencia de (+)-1-fenil-1-etilamina (0.7), en sucesivas cristalizaciones se fue reduciendo paulatinamente la proporción de hexano mientras que se aumentaba la cantidad de la amina hasta

<sup>209</sup> Qiu, J.; Pingsterhaus, J. M.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4725-4728.

<sup>210</sup> Csuk, R.; Dörr, P. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 269-276.

emplear 1 equivalente. Los cristales blancos obtenidos se filtraron, se disolvieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y lavaron con HCl (5%). La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y concentró a vacío, obteniendo como producto resultante un sólido blanco. La repetición de este proceso 3 veces dio lugar al aminoácido deseado con un e.e.>97%. {53.2 g, 99%, Rf = 0.71 [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1)]}.  **$^1\text{H NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10.80 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.90 (s, 2H), 5.21 – 4.39 (m, 2H), 3.51 (s, 1H), 2.52 (s, 1H), 1.92 (s, 1H), 1.49 (d,  $J = 17.6$  Hz, 9H).  **$^{13}\text{C RMN}$**  (62.90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 179.1 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 155.5 (CO), 135.1 (CH), 131.2 (CH), 79.8 (C), 56.1 (CH), 49.4 (CH), 34.2 ( $\text{CH}_2$ ), 28.6 ( $\text{CH}_3$ ). **M. S.** (CI) [m/z (%): 228 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 60], 171 (100), 127 (52), 110 (66).  **$[\text{MH}]^+$  calculado** para  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  es 228.1158 la **encontrada** 228.1238.  $[\alpha]_{\text{D}} = -46.1$  (C=1.0, MeOH).

Los sólidos resultantes de las aguas madres de la primera cristalización, con la (-)-1-fenil-1-etilamina, se pusieron a cristalizar de forma similar a la ya descrita pero con la (+)-1-fenil-1-etilamina, para obtener después de tres cristalizaciones el sólido opuesto, el (1*R*,4*S*)-4-amino-*N*-*t*-butoxicarbonilciclopent-2-enocarboxílico (*D*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH)  $[\alpha]_{\text{D}} = 46.1$  (C=1.0, MeOH).

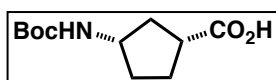
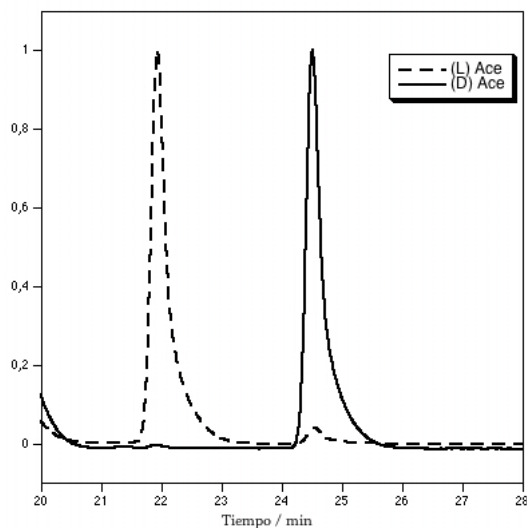
#### **Test de Marfey:**

El ácido (1*S*,4*R*)-4-amino-*N*-*t*-butoxicarbonilciclopent-2-enocarboxílico (*L*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH) (0.5 mg, 0.0020 mmol) se disolvió en diclorometano (0.5 mL) y TFA (0.5 mL), la mezcla se agitó durante 10 min. Después se concentró en el rotavapor, se volvió a disolver en diclorometano y se volvió a concentrar, (se repitió el proceso 3 veces), para eliminar el TFA, el sólido se secó en la bomba de vacío durante 3 horas.

Se disolvió el (1*S*,4*R*)-4-aminociclopent-2-enocarboxílico (0.6  $\mu\text{moles}$ ) en agua (100  $\mu\text{L}$ ) y a continuación se añadió una disolución del 1-fluoro-2,2-dinitrofenil-5-*L*-alanina (1.8 mg) en acetona (200 mL), la mezcla se trató con  $\text{NaHCO}_3$  (40  $\mu\text{L}$ , 1 M) y la disolución amarilla resultante se calentó a 40 °C durante 1 hora. Una vez enfriada la mezcla se añadió HCl (20  $\mu\text{L}$ , 2 M). Se siguió el mismo procedimiento con el otro enantiómero, el ácido (1*R*,4*S*)-4-amino-*N*-*t*-butoxicarbonilciclopent-2-enocarboxílico (*D*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH).

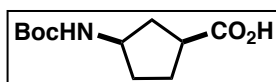
El cálculo de la relación de diastereoisómeros se realizó mediante análisis en HPLC en fase reversa, para ello se empleo una columna analítica de fase reversa (Lichrospher® 100, (RP-18 (5 $\mu\text{m}$ ) 250-4)), empleando un gradiente lineal: (A:  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%TFA; B: ACN,

0.1% TFA) de 20% de B al 40% de B en 1 h. La detección se realizó a una longitud de onda de 340 nm. Obteniéndose los picos a 22 min y 25 min, correspondientes a los dos enantiómeros del  $\gamma$ -Ace, la relación entre estos picos es lo que nos da la relación de ee de la mezcla.



**Ácido (1R,3S)-3-Amino-N-t-butiloxycarbonilciclopentano-carboxílico (L-Boc- $\gamma$ -Acp-OH):**<sup>72</sup> Una solución del

ácido (1S,4R)-Boc- $\gamma$ -Ace-OH (2.58 g, 11.36 mmol) en etanol (40 mL) se trató con 10% Pd/C (120.0 mg, 1.36 mmol) y se desgasificó mediante el burbujeo de Ar durante 15 min. Posteriormente se puso bajo atmósfera de hidrógeno, bajo la presión de un globo. Transcurridas 24 h, el sólido se filtró a través de celita, y se lavó repetidamente con etanol, tras el concentrado de la disolución etanólica resultante condujo a un producto cuyos datos espectroscópicos coinciden con el de la bibliografía.<sup>72</sup> {2.6 g, 99%, Rf=0.60 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1)]}.

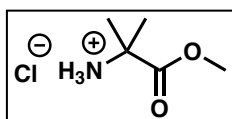


**Ácido (1R,3S)-3-Amino-N-t-butiloxycarbonilciclopentano-carboxílico (L-Boc- $\gamma$ -Acp-OH):**<sup>72</sup> El ácido objetivo se

obtuvo siguiendo el procedimiento anteriormente descrito pero empleando como sustancia de partida el ácido (1R,4S)-Boc- $\gamma$ -Ace-OH.

<sup>72</sup> Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

**Síntesis del c-[(L-Ace-Aib)<sub>3</sub>]-.**



**Hidrocloruro del Metil-2-aminoisobutirato (HCl·H-Aib-**

**OMe)(3):** El ácido 2-aminoisobutírico (1.0 g, 9.70 mmol) se

disolvió en MeOH (10 mL), y la disolución resultante se enfrió a 0

°C mediante un baño de hielo. Sobre la disolución fría, vigorosamente agitada, se

añadió SOCl<sub>2</sub> (0.95 mL, 13.09 mmol) gota a gota. Después de completar la adición del

cloruro de tionilo, la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. Transcurrido ese tiempo,

el disolvente se eliminó a presión reducida, el aceite se redisolvió en MeOH (10 mL) y

se concentró, esta operación se repitió 3 veces. Al aceite amarillo resultante se le

añadió hexano para obtener un sólido blanco, el cual fue filtrado y lavado

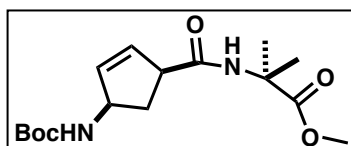
repetidamente con hexano. {1.4 g, 94%, R<sub>f</sub> = 0.17 [diclorometano: metanol, (9:1)]}. **<sup>1</sup>H**

**NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 3.78 (s, 3H), 1.53 (d, J = 6.5 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR** (62.90 MHz,

D<sub>2</sub>O) δ: 173.4 (CO<sub>2</sub>H), 57.2 (C), 54.2 (CH<sub>3</sub>), 23.3 (CH<sub>3</sub>). **MS (CI)** [m/z (%): 117

([M+H]<sup>+</sup>) (63), 88 (15), 57.5 (100). **HRMS calculada** para C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> 118.08608,

**encontrada** 118.0866.



**Boc-[-L-γ-Ace-Aib-]-OMe (4):** Sobre una disolución

de HCl·H-Aib-OMe (812.0 mg, 5.29 mmol) y Boc-L-γ-

Ace-OH (600.0 mg, 2.64 mmol) en diclorometano (30

mL), enfriada a 0 °C, se añadió HATU (1.1 g, 2.90 mmol),

DIEA (1.84 mL, 10.69 mmol). La mezcla resultante se agitó 1 h a 0 °C y

posteriormente se lavó con HCl (5%) y una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase

orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida

para dar lugar a un sólido blanco, que basándose en sus datos espectroscópicos se

identificó como el dipéptido deseado. {858.0 mg, 99%, R<sub>f</sub> = 0.53 [diclorometano:

metanol, (9:1)]. **<sup>1</sup>H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.56 (s, 1H), 6.07 – 5.61 (m, 2H), 5.21

(s, 1H), 4.61 (s, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.30 – 3.11 (m, 1H), 2.74 (s, 1H), 2.38 (dt, J = 13.9

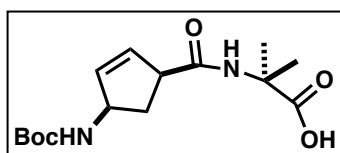
y 8.7 Hz, 1H), 1.76 (dt, J = 13.9 y 3.4 Hz, 1H), 1.54 – 1.00 (m, 16H). **<sup>13</sup>C NMR** (62.90

MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 175.1 (C=O), 173.6 (C=O), 155.4 (C=O), 135.0 (CH), 131.7 (CH), 79.2

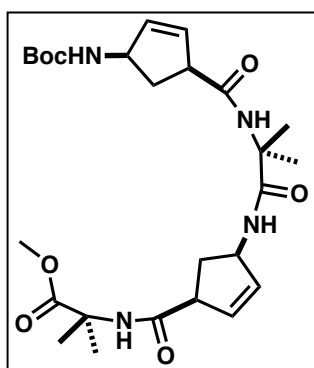
(C), 56.4 (C), 56.0 (CH), 52.7 (OCH<sub>3</sub>), 51.4 (CH), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (CH<sub>3</sub>), 24.9 (CH<sub>3</sub>).

**MS-FAB<sup>+</sup>** [m/z (%): 327 (100) ([M+H]<sup>+</sup>), 227 (41), 154 (65). **HRMS calculada** para

C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 327.1920, **encontrada**: 327.1918.

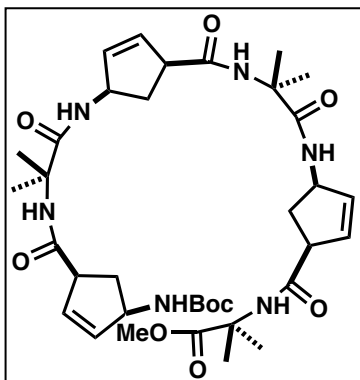


**Boc-[-L- $\gamma$ -Ace-Aib-]-OH (5):** Una solución del Boc-[-L- $\gamma$ -Ace-Aib-]-OMe (400.0 mg, 1.23 mmol) en MeOH (12 mL) se trató con una disolución de CsOH (921.0 mg, 6.15 mmol) en agua (4 mL), y la mezcla resultante se agitó durante 3 h a ta. Después de eliminar el disolvente, el residuo se disolvió en 25 mL de agua, la disolución se acidificó a pH 3 añadiendo HCl (10%), y finalmente se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto deseado como un sólido blanco. {290.0 mg, 75%, Rf= 0.26 [diclorometano: metanol, (9:1)]}. **<sup>1</sup>H NMR** (250 MHz, MeOD)  $\delta$ : 8.24 (s, 1H), 5.80 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 5.49 (s, 1H), 5.15 – 4.32 (m, 6H), 3.54 – 2.93 (m, 3H), 2.71 – 2.19 (m, 1H), 1.97 – 1.06 (m, 19H). **MS (ESI.TOF)** [ $m/z$  (%): 351 ([M+K]<sup>+</sup>), 335 ([M+Na]<sup>+</sup>), 313 [M+H]<sup>+</sup>], 279. **HRMS calculado** para C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> es 327.17188, **encontrado**: 313.1758.



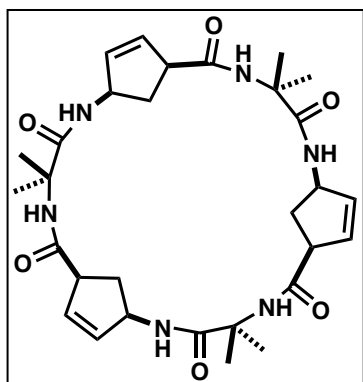
**Boc-[-(L- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>2</sub>-]-OMe (7):** Una solución de Boc-[-L- $\gamma$ -Ace-Aib-]-OMe (420.0 mg, 1.29 mmol) en TFA/DCM (1:1, 13 mL) se agitó 15 min a ta. La mezcla se concentró en el rotavapor, el residuo se volvió a disolver en diclorometano y se volvió a concentrar, repitiéndose este proceso 3 veces para eliminar los restos de TFA. El sólido se secó en la bomba de vacío durante 3 h. Transcurrido este tiempo, la sal de TFA se disolvió en una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:DMF (2:1, 15 mL), y a continuación se añadieron sucesivamente el ácido Boc-[-L- $\gamma$ -Ace-Aib-]-OH (403.0 mg, 1.29 mmol), HATU (539.5 mg, 1.42 mmol), DIEA (1.35 mL, 7.74 mmol). La mezcla de reacción se agitó 1 h a 0 °C, transcurrido este tiempo, la solución se lavó con HCl (5%) y una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener del tetrapéptido deseado. {586.0 mg, 87%, Rf= 0.77 [diclorometano: metanol, (9:1)]}. **<sup>1</sup>H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.73 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.98 – 5.67 (m, 4H), 5.28 (d,  $J$  = 21.8 Hz, 1H), 5.06 – 4.54 (m, 2H), 3.31 – 3.01 (m, 1H), 2.52 – 2.01 (m, 2H), 1.89 – 1.61 (m, 3H), 1.60 – 1.07 (m, 27H). **<sup>13</sup>C NMR** (62.90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 175.0 (CO), 173.8 (CO), 173.7 (CO), 173.4 (CO), 155.4 (CO), 135.1 (CH), 134.8 (CH), 132.3 (CH), 132.1 (CH), 79.2 (C), 77.4 (C), 56.9 (C), 56.6 (CH), 56.0 (C), 54.4 (CH), 52.7 (CH), 51.9 (CH), 51.3 (CH), 35.1 (CH<sub>2</sub>), 34.7

(CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>3</sub>), 25.9 (CH<sub>3</sub>). **MS-FAB**<sup>+</sup> [m/z (%): 521 (86) ([M+H]<sup>+</sup>), 394 (27), 325 (44), 231 (68). **HRMS calculado** para C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> es 521.297525, **encontrado**: 521.298274.



**Boc-[-(L-γ-Ace-Aib)<sub>3</sub>]-OMe (9):** Una solución de Boc-[-(L-γ-Ace-Aib)<sub>2</sub>]-OMe (192.0 mg, 0.37 mmol) en TFA/DCM (1:1, 4 mL) se agitó 15 min a ta. La mezcla se concentró en el rotavapor, el residuo se volvió a disolver en diclorometano y se volvió a concentrar, repitiéndose este proceso 3 veces para eliminar los restos de TFA. El sólido se secó en la bomba de vacío durante 3 h. Transcurrido este tiempo, la sal de TFA se disolvió en

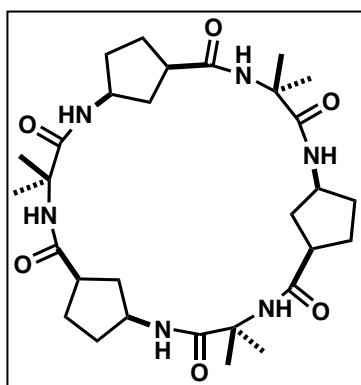
una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:DMF (2:1, 15 mL) y a continuación se añadieron sucesivamente el ácido Boc-[-L-γ-Ace-Aib]-OH (121.0 mg, 0.388 mmol), HATU (162.3 mg, 0.43 mmol), DIEA (0.40 mL, 2.34 mmol). La mezcla de reacción se agitó 1 h a 0 °C, la solución se lavó con HCl (5%) y una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener el hexapéptido deseado. {208.0 mg, 79%, R<sub>f</sub>= 0.72 [diclorometano: metanol, (9:1)]}. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.63 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.35 (dd, J = 28.4, 8.9 Hz, 1H), 6.94 – 6.84 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.94 – 5.70 (m, 6H), 5.38 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.00 – 4.80 (m, 2H), 4.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.24 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 3.72 – 3.53 (m, 4H), 3.32 – 3.16 (m, 4H), 2.42 – 2.04 (m, 3H), 1.84 – 0.57 (m, 59H). **MS (ESI-TOF)** [m/z (%): 738 ([M+Na]<sup>+</sup>), 715 (M<sup>+</sup>), 615, 327. **HRMS calculado** para C<sub>36</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> es 715.3988, **encontrado**: 715.4025.



**c-[(L-γ-Ace-Aib)<sub>3</sub>]- (1):** Una solución de Boc-[-(L-γ-Ace-Aib)<sub>3</sub>]-OMe (65.0 mg, 0.091 mmol) en metanol (4 mL) se trató con CsOH (136.0 mg, 0.91 mmol) en agua (1.5 mL) y se agitó 3 h a ta. Después de eliminar el disolvente, el residuo fue disuelto en agua (10 mL), la disolución se acidificó a pH 3 añadiendo HCl (10%) y finalmente el ácido se extrajo con diclorometano. El combinado de fases orgánicas se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

anhidro, se filtró y se concentró. El sólido resultante se disolvió en 4 mL de una

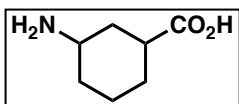
mezcla de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y se agitó 15 min a ta. La mezcla se concentró en el rotavapor, el residuo se volvió a disolver en diclorometano y se volvió a concentrar, repitiéndose este proceso 3 veces para eliminar los restos de TFA. El sólido se secó en la bomba de vacío durante 3 h. El hexapéptido lineal se disolvió en una mezcla de DMF:DCM (1:2, 90 mL), y se añadió PyAOP (78.0 mg, 0.14 mmol), seguido de una adición lenta de DIEA (95 mL, 0.55 mmol). Tras agitar a ta durante 12 h, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se purificó mediante HPLC, obteniéndose un sólido blanco. [9.0 mg, 17%, Columna Inertsil ODS 2; T.R. = 18 min, (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 5% del disolvente B durante 5 min y de 5% de B al 50% B en 30 min]. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500.13 MHz)  $\delta$ : 7.16 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 3H), 6.25 (s, 3H), 5.92 – 5.76 (m, 8H), 4.92 (s, 4H), 2.46 – 2.12 (m, 16H), 1.80 (d,  $J$  = 14.0 Hz, 4H). **MS (ESI-TOF)** [m/z (%): 605 ([M+Na]<sup>+</sup>), 583 (M<sup>+</sup>), 507. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> es 583.3199, **encontrado** 583.3239.



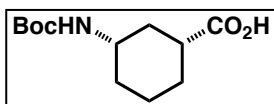
***c*-[(*L*- $\gamma$ -Acp-Aib)<sub>3</sub>-] (10):** Una solución de *c*-[(*L*- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>3</sub>-] (4.0 mg, 7  $\mu$ mol) en MeOH (2 mL), se desgasificó haciendo vacío durante 5 min, después se trató con 10% Pd/C (1.5 mg, 3.5  $\mu$ mol), la mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a ta. Transcurridas 12 h la suspensión se filtró a través de Celita, el sólido se lava repetidamente con metanol. El combinado de las disoluciones orgánicas se

concentró a presión reducida obteniéndose el *c*-[(*L*- $\gamma$ -Acp-Aib)<sub>3</sub>-]. (4.0 mg, sólido blanco, 99%). **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz)  $\delta$ : 7.60 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 5.88 (s, 3H), 4.33 (s, 3H), 3.50 (s, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.25 – 1.14 (m, 80H). **MS (ESI-TOF)** [m/z (%): 611.3 ([M+Na]<sup>+</sup>), 589.3 ([M+H]<sup>+</sup>). **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>1</sub>O<sub>6</sub> es 611.3525, **encontrado** 611.3528.

**Síntesis del ácido *cis*-3-amino-N-*t*-butiloxicarbonilciclohexanocarboxílico (*cis*-Boc- $\gamma$ -Ach-OH):**



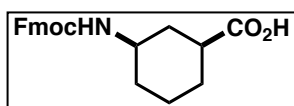
**Ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico ( $\gamma$ -Ach-OH):**<sup>71</sup> En un reactor de Parr de 0.5 L de capacidad se añadió la mezcla de *m*-aminobenzoico (11.3 g, 82.5 mmol), NaOH (3.3 g) en 200 mL de H<sub>2</sub>O y Ni Raney (7.0 g). La mezcla resultante, tras la correspondiente desoxigenación mediante ciclos de vacío y llenado con hidrógeno, se sometió a una presión de 100 atm de H<sub>2</sub> (g), y se agitó vigorosamente mientras se calentaba a 150 °C durante 4 h. Tras ese tiempo la presión descendió a 85 atm, se observó por cromatografía en capa fina que aún quedaba sustancia de partida sin reaccionar, por lo que se volvió a recargar con H<sub>2</sub> hasta las 100 atm, la reacción se mantuvo a 150 °C durante 8 h adicionales. Tras enfriar y liberar la presión, la mezcla se filtró a través de celita, se acidificó a pH 2 con HCl (10%) y se concentró a sequedad para dar lugar a un sólido blanco cuyos datos espectroscópicos coinciden con los de la bibliografía.<sup>71</sup> [9.7 g, 80%, R<sub>f</sub> = 0.48 (metanol)].



**Ácido (1*R*,3*S*)-N-*t*-butiloxicarbonilciclohexanocarboxílico (*L*-Boc- $\gamma$ -Ach-OH):** En un balón de fondo redondo se preparó una disolución del ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico (4.0 g, 28.0 mmol) en una mezcla de agua/dioxano (1:1; 50 mL), se añadió Boc<sub>2</sub>O (7.0 g, 32.0 mmol) y DIEA (14.7 mL, 84.0 mmol). Después de 3 h agitando a ta, se acidificó a pH 3 y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se concentraron a presión reducida y el aceite resultante se cristalizó en CHCl<sub>3</sub>/hexano (1:1) para dar el ácido *cis*-N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico. La mezcla racémica obtenida se resolvió mediante sucesivas cristalizaciones en CHCl<sub>3</sub>:Hexano (desde 1:1), en presencia de (+)-1-fenil-1-etilamina (0.7), en sucesivas cristalizaciones se fue reduciendo paulatinamente la proporción de hexano mientras que se aumentaba la cantidad de la amina hasta emplear 1 equivalente. Los cristales blancos obtenidos se filtraron, se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y lavaron con HCl (5%). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se

<sup>71</sup> Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

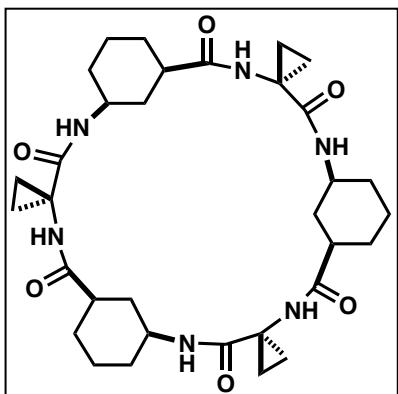
filtró y se concentró a vacío, obteniendo como producto resultante un sólido blanco. La repetición de este proceso 3 veces dio lugar al aminoácido deseado con un e.e.>97%. Los sólidos resultantes de las aguas madres de la primera cristalización, con la (-)-1-fenil-1-etilamina, se pusieron a cristalizar de forma similar a la ya descrita pero con la (+)-1-fenil-1-etilamina, para obtener después de tres cristalizaciones el enantiómero, el (1*S*,3*R*)-*N*-*t*-butiloxicarbonilciclohexanocarboxílico (*D*-Boc- $\gamma$ -Ach-OH).<sup>71</sup>



**Ácido (1*S*,3*R*)-3-Amino-*N*-(9*H*-Fluoren-9-il)metiloxi-carbonilciclohexanocarboxílico (*D*-Fmoc- $\gamma$ -**

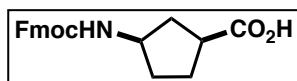
**Ach-OH):** Una disolución del ácido (1*S*,3*R*)-3-amino-*N*-*t*-butiloxicarbonilciclohexanocarboxílico (*D*-Boc- $\gamma$ -Ach-OH) (7.1 g, 3.10 mmol) en una mezcla de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 30 mL) se agitó durante 15 min a ta. La mezcla se concentró en el rotavapor, el residuo se volvió a disolver en diclorometano y se volvió a concentrar, repitiéndose este proceso 3 veces para eliminar los restos de TFA. El sólido se secó en la bomba de vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en una solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%, 57 mL) y 1,4-dioxano (24.5 mL) a 0 °C. Una disolución de Fmoc-OSu (11.5 g, 3.41 mmol) en 1,4-dioxano (41.5 mL) se añadió gota a gota, con la ayuda de un embudo de presión compensada, sobre la disolución vigorosamente agitada. La mezcla resultante se agitó toda la noche a ta y posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida. La suspensión obtenida se diluyó en agua (150 mL), se acidificó a pH 3 con HCl (10%), y el ácido se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y concentraron conduciendo a un aceite de color amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar lugar al *D*-Fmoc- $\gamma$ -Ach-OH, cuyos datos espectroscópicos coinciden con los publicados en la bibliografía. [10.5 g, 97%, R<sub>f</sub> = 0.75 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)].<sup>71</sup>

Síntesis del  $c$ -[(*L*-Ach-Ac<sub>3</sub>c)<sub>3</sub>]-.

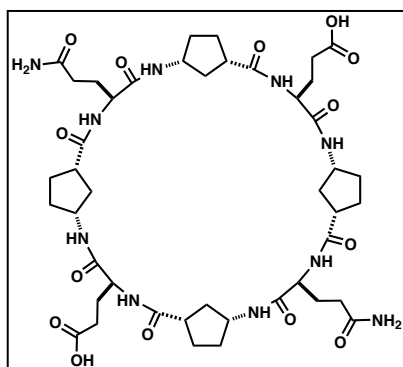


**$c$ -[(*L*- $\gamma$ -Ach-Ac<sub>3</sub>c)<sub>3</sub>- (12):** La síntesis del péptido H-(*L*- $\gamma$ -Ach-Ac<sub>3</sub>c)<sub>3</sub>-OH se llevó a cabo usando como soporte sólido la resina cloruro de 2-clorotritilo (100.0 mg, 0.1 mmol) mediante una estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu, para lo que se emplearon el Fmoc-Ac<sub>3</sub>c-H (96.9 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento) y el *L*-Fmoc-Ach-H (91.2 mg, 0.25 mmol, por acoplamiento), siguiendo el procedimiento general descrito para

síntesis en fase sólida. Tras la correspondiente rotura y purificación por HPLC, el péptido se ciclo en disolución. Se disolvió el péptido H-(*L*- $\gamma$ -Ach-Ac<sub>3</sub>c)<sub>3</sub>-OH (32.5 mg, 0.051 mmol) en DMF seca (50.60 mL), una vez toda la muestra se ha disuelto, se trató con HBTU (28.8 mg, 0.076 mmol) y DIEA (0.035 mL, 0.20 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 24 h a ta, se concentró el disolvente en el rotavapor y el compuesto se purificó mediante HPLC-FR, obteniéndose como un sólido blanco. [17.0 mg, 53%, T.R. = 26 min, (A: H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 5% del disolvente B durante 5 min y de 5% de B al 50% B en 25 min]. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500.13 MHz)  $\delta$ : 8.09 (s, 3H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 3.68 – 3.43 (m, 3H), 2.29 – 2.09 (m, 3H), 2.00 – 1.86 (m, 5H), 1.82 – 1.60 (m, 6H), 1.44 – 0.71 (m, 31H). **MS (ESI-TOF)** [*m/z* (%): 625.3704 ([*M*+*H*)<sup>+</sup>]. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>33</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>: 625.3708, **encontrado** 625.3704.

$\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: agrupaciones de nanotubos.**Ácido (1*S*,3*R*)-3-Amino-N-(9*H*-Fluoren-9-il)metiloxi-carbonilciclopentanocarboxílico (D-Fmoc- $\gamma$ -Acp-OH):**

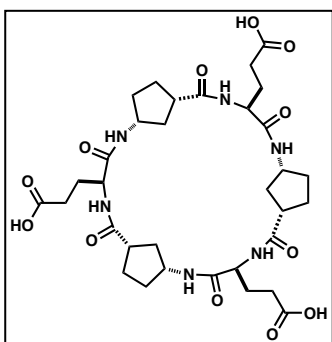
Una disolución del ácido (1*S*,3*R*)-3-amino-N-*t*-butiloxicarbonilciclopentanocarboxílico (D-Boc- $\gamma$ -Acp-OH) (7.1 g, 31.0 mmol) en 30 mL de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) se agitó durante 15 min a ta. La mezcla se concentró en el rotavapor, el residuo se volvió a disolver en diclorometano y se volvió a concentrar, repitiéndose este proceso 3 veces para eliminar los restos de TFA. El sólido se secó en la bomba de vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en una solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%, 57 mL) y 1,4-dioxano (24.5 mL) a 0 °C. Una disolución de Fmoc-OSu (11.5 g, 3.41 mmol) en 1,4-dioxano (41.5 mL) se añadió gota a gota sobre la disolución vigorosamente agitada. La mezcla resultante se agitó toda la noche a ta, posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida. La suspensión obtenida se diluyó en agua (150 mL), se acidificó a pH 3 con HCl (10%), y el ácido se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y concentraron conduciendo a un aceite de color amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar lugar al D-Fmoc- $\gamma$ -Acp-OH. [10.5 g, 97%, R<sub>f</sub> = 0.75 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250.13 MHz)  $\delta$ : 7.76 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.29 (s, 0.3H), 5.28 (s, 0.7H), 4.40 (m, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.35-1.55 (m, 6H). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 62.90 MHz)  $\delta$ : 182.4 (CO), 156.0 (CO), 144.1 (C), 141.5 (C), 127.2 (CH), 125.3 (CH), 125.1 (CH), 120.1 (CH), 67.5 y 66.9 (CH<sub>2</sub>), 52.8 (CH), 47.4 (CH), 41.9 (CH), 36.5 (CH), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 28.2 (CH<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>). **MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([M+Na]<sup>+</sup>) 374.1375, ([M+H]<sup>+</sup>) 352.1558. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub> es 352.1443, **encontrado** 352.1443.



**c-[(L-Gln-D-Acp-L-Glu-D-Acp)<sub>2</sub>-] (15):** Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Amide-MBHA (carga: 0.50 mmol/g; 209.0 mg, 0.10 mmol), para la cual se emplearon: Fmoc-L-Glu-OAll

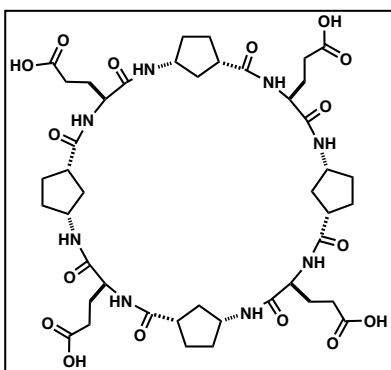
(170.3 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*L*-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH (170.1 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-*L*-Gln(Trt)-OH (245.0 mg, 0.40 mmol), Fmoc-*D*-Acp-OH (104.5 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante sucesivas precipitaciones de una disolución del CP en medio básico (NaOH, 1M) y posterior acidificación con TFA/ACN. El sólido resultante se lavó repetidamente.

**MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([M+Na]<sup>+</sup>) 981.4637, ([M+H]<sup>+</sup>) 959.48388. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>44</sub>H<sub>67</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub> es 959.4833, **encontrado** 959.4838.



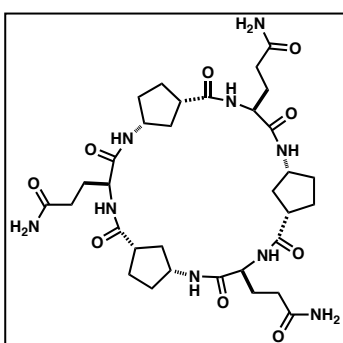
**c-[(*L*-Glu-*D*-Acp)<sub>3</sub>-] (16):** Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Wang previamente cargado con el aminoácido Fmoc-*L*-Glu-OAll (162.6 mg, 0.10 mmol). Para la cual se emplearon: Fmoc-*L*-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH (170.1 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-*D*-Acp-OH (104.5 mg, 0.30

mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante HPLC en fase reversa, siguiendo el siguiente método: (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 10% del disolvente B durante 5 min y de 10% de B al 25% de B en 30 min; T.R.= 17.7 min. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O, NaOH 0.1 mM) δ: 8.24 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 4.37 – 3.90 (m, 6H), 3.74 (s, 3H), 3.15 – 2.61 (m, 3H), 2.53 – 1.10 (m, 37H). **MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([M+H]<sup>+</sup>) 733.3399 **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> es 733.3403, **encontrado** 733.3399.

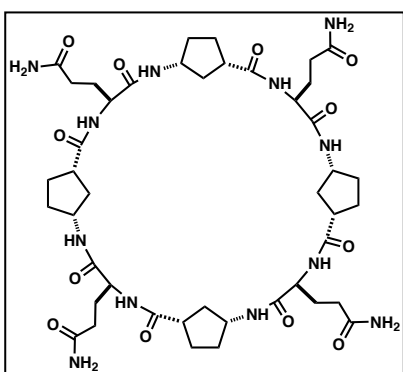


**c-[(*L*-Glu-*D*-Acp)<sub>4</sub>-] (17):** Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Wang previamente cargado con el aminoácido Fmoc-*L*-Glu-OAll (162.6 mg, 0.10 mmol). Para la cual se emplearon: Fmoc-*L*-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH (170.1 mg, 0.40 mmol, por

acoplamiento), , Fmoc-*D*-Acp-OH (104.5 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante HPLC en fase reversa, siguiendo el siguiente método: (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 10% del disolvente B durante 5 min y de 10% de B al 40% de B en 30 min; T.R.= 18.2 min. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O, NaOH 1 mM)  $\delta$ : 4.15 (dd, *J* = 8.6, 5.7 Hz, 1H), 3.52 (s, 1H), 3.07 – 2.71 (m, 1H), 2.46 – 1.39 (m, 6H). **MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([M]<sup>-</sup>) 959.4352. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>44</sub>H<sub>63</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub> es 959.4357, **encontrado** 959.4352.

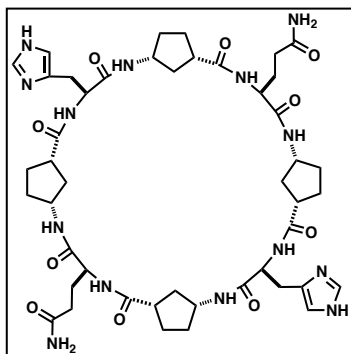


**c-[(L-Gln-D-Acp)<sub>3</sub>-] (18):** Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Amide-MBHA (carga= 0.50 mmol/g; 200.0 mg, 0.10 mmol), para lo cual se emplearon: Fmoc-*L*-Glu-OAll (122.9 mg, 0.30 mmol), Fmoc-*L*-Gln(Trt)-OH (244.3 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-*D*-Acp-OH (105.3 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante repetidas precipitaciones de una disolución del CP, en la mínima cantidad de TFA, con éter etílico. **MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([MH]<sup>+</sup>) 378.6757, ([M+H+K]<sup>+2</sup>) **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>33</sub>H<sub>52</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>K es 378.6766, **encontrado** 378.6757.

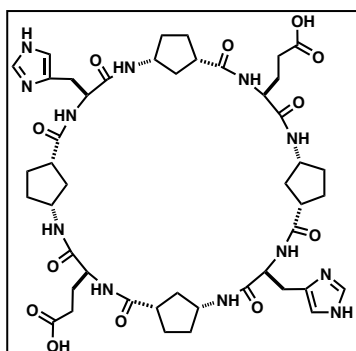


**c-[(L-Gln-D-Acp)<sub>4</sub>-] (19):** Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Amide-MBHA (carga= 0.50 mmol/g; 200.0 mg, 0.10 mmol), para lo cual se emplearon: Fmoc-*L*-Glu-OAll (122.9 mg, 0.30 mmol), Fmoc-*L*-Gln(Trt)-OH (244.3 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-*D*-Acp-OH (105.3 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante repetidas precipitaciones de una disolución del

CP, en la mínima cantidad de TFA, con éter etílico. **MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([M+Na]<sup>+</sup>) 977.4929, ([M+H]<sup>+</sup>) 959.4838. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>44</sub>H<sub>67</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub> es 959.4833, **encontrado** 959.4838.



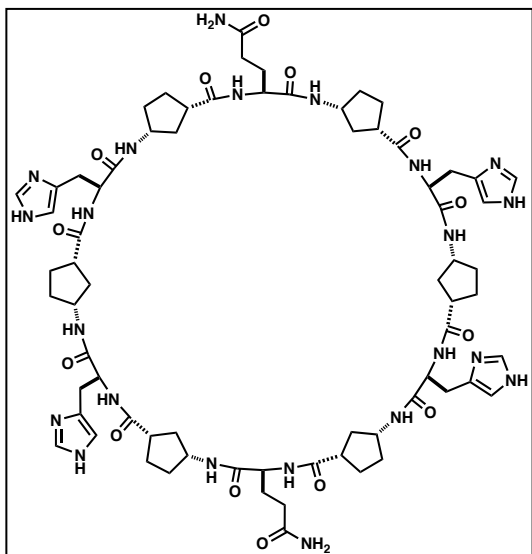
**c-[(L-Gln-D-Acp-L-His-D-Acp)<sub>2</sub>]- (20):** Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Fmoc-PAL-PEG-PS (carga= 0.19 mmol/g; 526.0 mg, 0.10 mmol), para la cual se emplearon: Fmoc-L-Glu-OAll (163.6 mg, 0.40 mmol), Fmoc-L-His(Trt)-OH (247.9 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-L-Gln(Trt)-OH (244.3 mg, 0.40 mmol), Fmoc-D-Acp-OH (105.3 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante HPLC en fase reversa, siguiendo el siguiente método: (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 7% del disolvente B durante 5 min. y de 7% de B al 17% de B en 30 min.; T.R.= 13.9 min. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 8.65 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 4.58 (dd, *J* = 8.9, 6.5 Hz, 3H), 4.32 – 3.90 (m, 8H), 3.37 – 3.04 (m, 5H), 3.00 – 2.75 (m, 5H), 2.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 5H), 2.26 – 2.12 (m, 4H), 2.10 – 1.80 (m, 13H), 1.71 (dq, *J* = 12.8, 8.0 Hz, 2H), 1.57 (td, *J* = 13.5, 7.3 Hz, 10H). **MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([MH]<sup>2+</sup>) 488.2616. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>48</sub>H<sub>68</sub>N<sub>14</sub>O<sub>10</sub> es 488.2610, **encontrado** 488.2616



**c-[(L-Glu-D-Acp-L-His-D-Acp)<sub>2</sub>]- (21):** Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Wang previamente cargada con el Fmoc-L-Glu-OAll (163.6 mg, 0.40 mmol), para la cual se emplearon: Fmoc-L-His(Trt)-OH (247.9 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-L-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH (170.2 mg, 0.40 mmol), Fmoc-D-Acp-OH (105.3 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de

TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante HPLC en fase reversa, siguiendo el siguiente método: (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 8% del disolvente B durante 5 min. y de 8% de B al 25% de B en 30 min.; T.R.= 25.3 min.

**MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([M+2H]<sup>2+</sup>) 489.2459. **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>46</sub>H<sub>66</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub> es 489.2456, **encontrado** 489.2459.



**c-[(L-Gln-D-Acp-(L-His-D-Acp)<sub>2</sub>)]<sub>2</sub>-**

**(22)**: Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Fmoc-PAL-PEG-PS (carga= 0.19 mmol/g; 526.0 mg, 0.1 mmol), para la cual se emplearon: Fmoc-L-Glu-OAll (163.6 mg, 0.40 mmol), Fmoc-L-His(Trt)-OH (247.9 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-L-Gln(Trt)-OH (244.3 mg, 0.40 mmol, por acoplamiento), Fmoc-D-

Acp-OH (105.3 mg, 0.30, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante HPLC en fase reversa, siguiendo el siguiente método: (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 5% del disolvente B durante 5 min. y de 5% de B al 23% de B en 30 min.; T.R.= 26.6 min. **MS (ESI-TOF)** [m/z]: ([MH]<sup>+</sup>) 1471.7708, ([M+2H]<sup>2+</sup>) 736.8855 **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>70</sub>H<sub>99</sub>N<sub>22</sub>O<sub>14</sub> es 1471.7706, **encontrado** 1471.7708.

### **$\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos: nanotubos individuales.**

**Microscopía de fuerza atómica (AFM).** Las medidas de AFM se realizaron bajo condiciones ambientales usando el Digital Instrument Multimode Nanoscope III en modo tapping. Los cantilevers usados eran rectangulares, los tips de silicio se encontraban al final, la frecuencia de resonancia era de 70 kHz y la rigidez de  $2 \text{ Nm}^{-1}$ . Las dimensiones del tips era 15  $\mu\text{m}$  de altura por 7  $\mu\text{m}$  de radio. Las imágenes se procesaron usando el programa WSxM.<sup>208</sup>

**Microscopía de efecto túnel (STM).** Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente usando un Digital Instrumente Nanoscope V, operando en régimen STM. Los tips usados eran de Pt/Ir con una longitud de 14  $\mu\text{m}$ . Las medidas se adquirieron trabajando a 50.0 mV y el efecto túnel entre 30-90 nA. Las imágenes de STM se procesaron usando el programa WSxM.<sup>208</sup>

**Microscopía de transmisión de electrones (TEM).** Para la deposición de laminas homogéneas de C sobre la gradilla de se usó el System Balzers Med10. Las muestra se depositaron sobre gradillas de Cu/Rh (malla 400), se tiñeron negativamente usando soluciones de acetato de uranilo, al 2% en peso o saturadas. Las imágenes se tomaron con un microscopio de electrones Jeol 1200 EXII, operando a 100 kV y usando una magnificación de 60.000X. Para el procesado de las imágenes, estas fueron digitalizadas mediante el uso de un scanner Zess SCAI usando ventanas de 2.33  $\text{\AA}$ /píxeles.

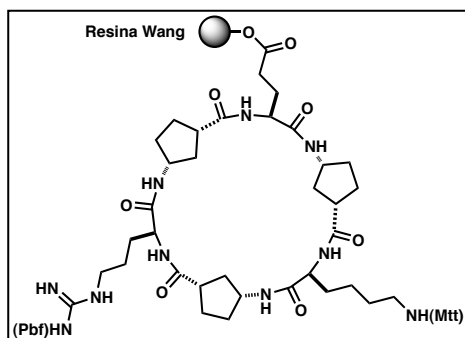
**Ácido [6,6]-fenil  $\text{C}_{61}$  butanoico (PCBA):**<sup>202</sup> Una suspensión el éster [6,6]-fenil  $\text{C}_{61}$  butanoato de metilo (PCBM) (500.0 mg, 0.55 mmol) en 85 mL de tolueno, se agitó y se sonicó durante 15 min a ta, hasta su completa disolución, a continuaciónn se añadió ácido acético glacial (50 mL) y HCl concentrado (20 mL). La mezcla resultante se agitó durante 20 h a reflujo. Transcurrido ese tiempo el disolvente se concentró a vacío y el residuo se suspendió en  $\text{Et}_2\text{O}$  (25 mL) y se traspaso a tubos de centrifugación. La muestra se centrifugó, se decantó, se volvió a suspender en tolueno (25 mL), se centrifugó, se decantó, se volvió a suspender en  $\text{Et}_2\text{O}$ , se centrifugó y decantó. El

---

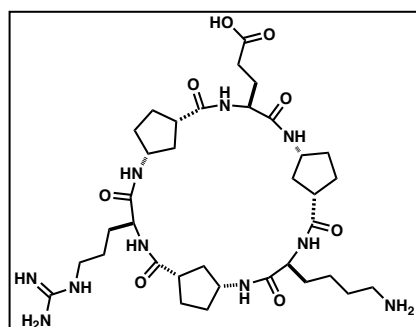
<sup>208</sup> Horcas, I.; Fernandez, R.; Gomez-Rodriguez, J. M.; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Baro, A. M. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, 78, 013705

<sup>202</sup> Hummelen, J.; Knight, B.; LePeq, F.; Wudl, F.; Yao, J. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 532-538.

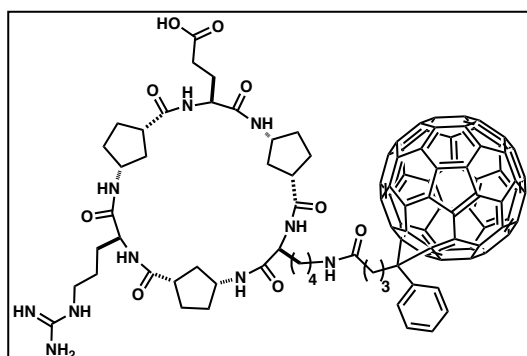
residuo se secó a vacío a 70 °C durante 16 h, para obtener el producto deseado como un sólido marrón. [462.0 mg, 96%]. **MS (MALDI-TOF)** [m/z]: 859.08 ([M-H]) **HRMS (MALDI-TOF) calculado** para  $C_{71}H_{11}O_2$  es 895.0759, **encontrado** 859.0822.<sup>202</sup>



***c*-[(D-Acp-L-Arg(Pbf)-D-Acp-L-Lys(Mtt)-D-Acp-L-Glu(resinaWang))-] (29)**: Este compuesto fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Wang previamente cargado con el Fmoc-L-Glu-OAll (139.0 mg de resina 0.10 mmol), para la cual se emplearon: Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH (249.9 mg, 0.40 mmol), Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (259.5 mg, 0.40 mmol), Fmoc-D-Acp-OH (105.3 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento).

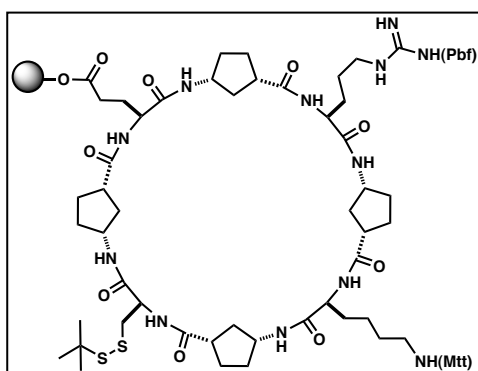


***c*-[(D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Glu)-] (25)**: El soporte sólido anteriormente preparado, *c*-[(D-Acp-L-Arg(Pbf)-D-Acp-L-Lys(Mtt)-D-Acp-L-Glu(resinaWang))-], se trató con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante HPLC en fase reversa, siguiendo el siguiente método: (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 8% del disolvente B durante 5 min. y de 8% de B al 50% B en 30 min. T.R. = 18.6 min. **MS (ESI-TOF)** [m/z]: 747.4512 ([M+H]<sup>+</sup>), 374.2342 ([M+2H]<sup>2+</sup>) **HRMS (MALDI-TOF) calculado** para  $C_{35}H_{59}N_{10}O_8$  es 747.4512, **encontrado** 747.4510.



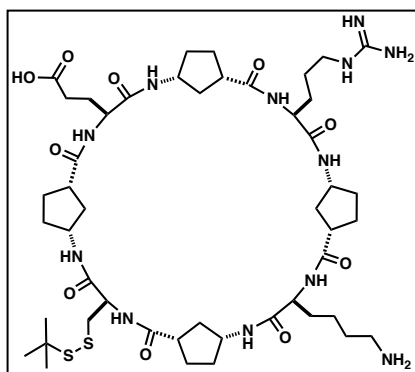
***c*-[(D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Lys(PCBA)-D-Acp-L-Glu)-] (27)**: La resina que contiene al CP, *c*-[(D-Acp-L-Arg(Pbf)-D-Acp-L-Lys(Mtt)-D-Acp-L-Glu(resinaWang))-] (29), (50.7 mg, 0.019 mmol) se suspendió en 1 mL de una mezcla de

DCM:HFIP:TFE:TES (6.5:2:1:0.5) y se agitó 3 h a ta. Pasado este tiempo se filtró, se lavó con DCM (5 x 5 mL, 2 min) y con *orto*-diclorobenceno (3 x 5 mL, 2 min). Una suspensión de PCBA (34.3 mg, 0.038 mmol) en *orto*-diclorobenceno (500 µL) se sonicó durante 10 min, y a continuación se añadió HATU (14.2 mg, 0.037 mmol), agitándose durante 2 min, pasado este tiempo se añadió DIEA (13.4 µL, 0.076 mmol) y se continuo agitando 2 min más. La mezcla resultante de PCBA se añadió sobre la resina anteriormente preparada y se agitó mecánicamente 2 h. Transcurrido este tiempo, la resina se filtró y se lavó con *orto*-diclorobenceno (3 x 5 mL, 2 min) y DCM (5 x 5 mL, 2 min). La separación del péptido del soporte sólido se realizó mediante un tratamiento con una mezcla de TFA:TIS:Tioanisol:H<sub>2</sub>O (92.5:2.5:2.5:2.5). La resina suspendida se agitó 2 h, tras las cuales se filtró, se lavó con TFA (2 x 200 µL) y el combinado de los filtrados se añadió sobre Et<sub>2</sub>O previamente enfriado en CO<sub>2</sub>(s). El precipitado marrón se centrifugó, se decantó y el sólido se resuspendió en Et<sub>2</sub>O, se sónico y centrifugo 3 veces. [13.8 mg, 89%]. **MS (MALDI-TOF)** [m/z]: 1629.5193 ([M+H]<sup>+</sup>) **HRMS (MALDI-TOF) calculado** para C<sub>106</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>9</sub> es 1625.5244, **encontrado** 1629.5190.



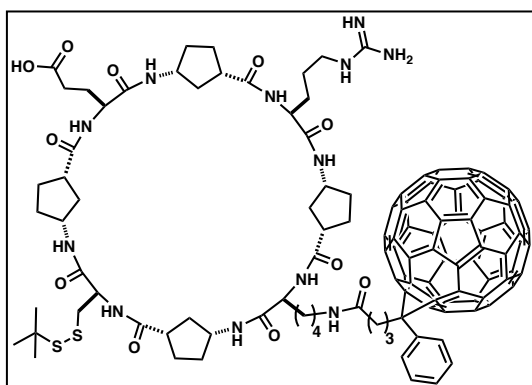
***c*-[(D-Acp-L-Lys(Mtt)-D-Acp-L-Arg(Pbf)-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu(resina Wang))-]** (**30**): Este compuesto fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida anteriormente explicado. Empleando la resina Wang previamente cargado con el Fmoc-L-Glu-OAll

(139.0 mg de resina 0.10 mmol), para la cual se emplearon: Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH (249.9 mg, 0.40 mmol), Fmoc-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-OH (175.0 mg, 0.40 mmol), Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (259.5 mg, 0.40 mmol), Fmoc-D-Acp-OH (105.3 mg, 0.30 mmol, por acoplamiento).



***c*-[(D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-] (26):** El soporte sólido anteriormente preparado, *c*-[(D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-], se trató con la disolución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se purificó mediante HPLC en fase reversa, siguiendo el

siguiente método: (A: H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA; B: ACN, 0.1% TFA), 10% del disolvente B durante 5 min y de 10% de B al 60% B en 30 min. T.R. = 26.5 min. **MS (ESI-TOF)** [m/z]: 525.2873 ([M+H]<sup>2+</sup>) **HRMS (ESI-TOF) calculado** para C<sub>48</sub>H<sub>82</sub>N<sub>12</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> es 525.2854, **encontrado** 525.2873.



***c*-[(D-Acp-L-Lys(PCBA)-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-] (28):** La resina que contiene al CP, *c*-[(D-Acp-L-Lys(PCBA)-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-] (30), (25.0 mg, 0.010 mmol) se suspendió en 0.5 mL de una mezcla de DCM:HFIP:TFE:TES (6.5:2:1:0.5) y se agitó 1 h a ta, este proceso se repitió

una vez más. Pasado este tiempo se filtró, se lavó con DCM (5 x 5 mL, 2 min) y con *orto*-diclorobenceno (3 x 5 mL, 2 min). Una suspensión de PCBA (22.4 mg, 0.025 mmol) en *orto*-diclorobenceno:DCM (1:1, 1 mL) se sonicó durante 10 min, y a continuación se añadió HATU (9.3 mg, 0.024 mmol), agitándose durante 2 min, pasado este tiempo se añadió DIEA (7.0  $\mu$ L, 0.040 mmol) y se continuó agitando 2 min más. La mezcla resultante de PCBA se añadió sobre la resina anteriormente preparada y se agitó mecánicamente 2 h. Transcurrido este tiempo, la resina se filtró y se lavó con *orto*-diclorobenceno (3 x 5 mL, 2 min) y DCM (5 x 5 mL, 2 min). La separación del péptido del soporte sólido se realizó mediante un tratamiento con una mezcla de TFA:TIS:Tioanisol:H<sub>2</sub>O (92.5:2.5:2.5:2.5). La resina suspendida se agitó 2 h, tras las cuales se filtró, se lavó con TFA (2 x 200  $\mu$ L) y el combinado de los filtrados se añadió sobre Et<sub>2</sub>O previamente enfriado en CO<sub>2</sub>(s). El precipitado marrón se centrifugó, se

## Procedimiento Experimental

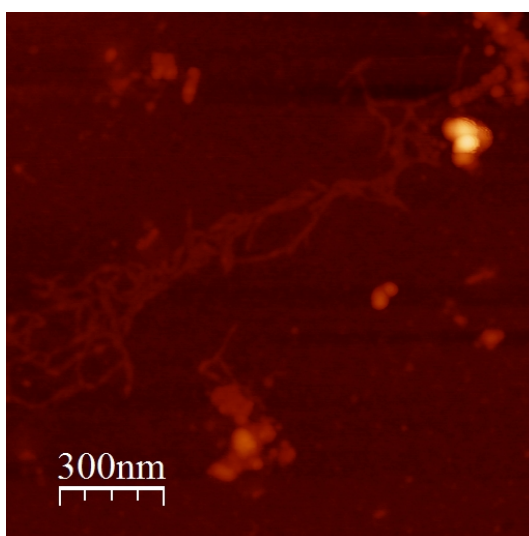
---

decantó y el sólido se resuspendió en Et<sub>2</sub>O, se sónico y centrifugo 3 veces. [15.0 mg, 79%]. **MS (MALDI-TOF)** [m/z]: 1927.625 ([M+H]<sup>+</sup>) **HRMS (MALDI-TOF) calculado** para C<sub>119</sub>H<sub>91</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub> es 1927.6365, **encontrado** 1927.6366.

**Microscopía de fuerza atómica (AFM):**

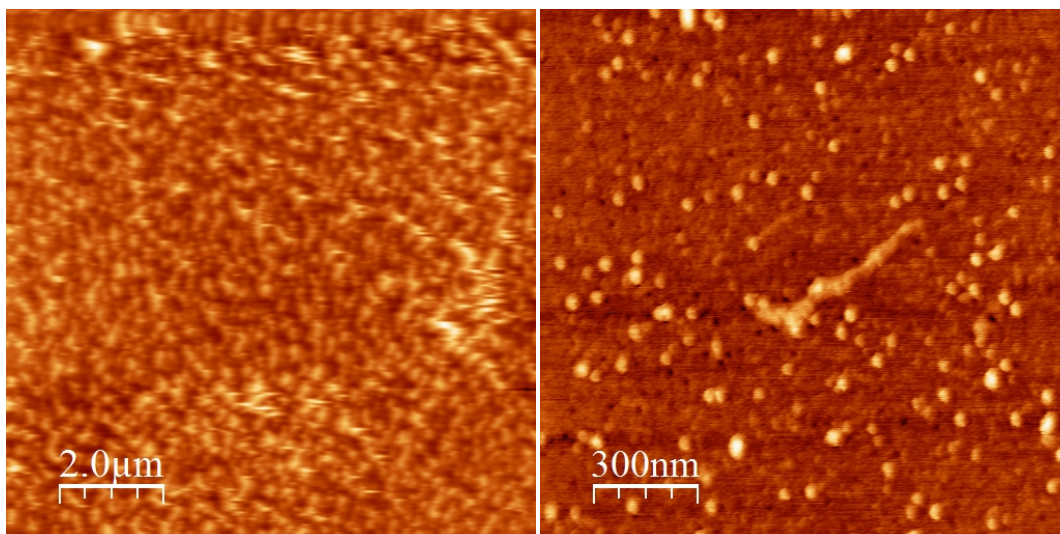
**Medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) para el CP 25, *c*-[(*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Glu)-]:**

El CP **25** (7.5 mg) se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (1:1:0.1% TFA, 1 mL). Una alícuota de la muestra (10  $\mu$ L) se depositó sobre la superficie de mica, previamente exfoliada. Después de 10 min la superficie de mica se lavó con agua y se secó con aire. Las muestras se observaron en AFT modo tapping al aire.



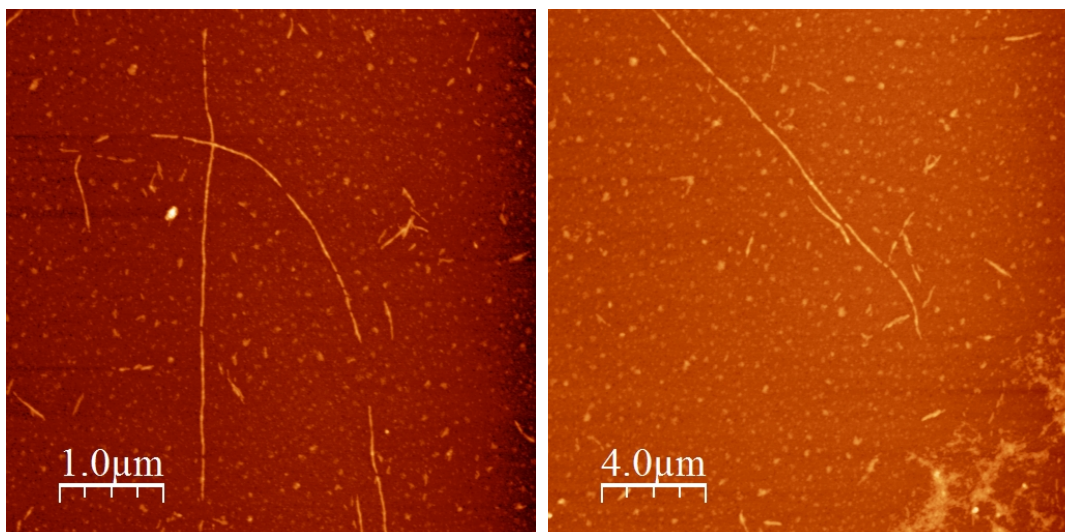
**Medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) para el CP 27, *c*-[(*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Lys(PCBA)-*D*-Acp-*L*-Glu)-]:**

El CP **27** (8.1 mg) se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (1:1:0.1% TFA, 500  $\mu$ L). Una alícuota de la muestra (10  $\mu$ L) se depositó sobre la superficie de mica, previamente exfoliada. Después de 10 min la superficie de mica se lavó con agua y se secó con aire. Las muestras fueron observadas en AFT modo tapping al aire.



**Medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) para el CP 26, *c*-[(*D*-Acp-*L*-Lys-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(*S*<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-]:**

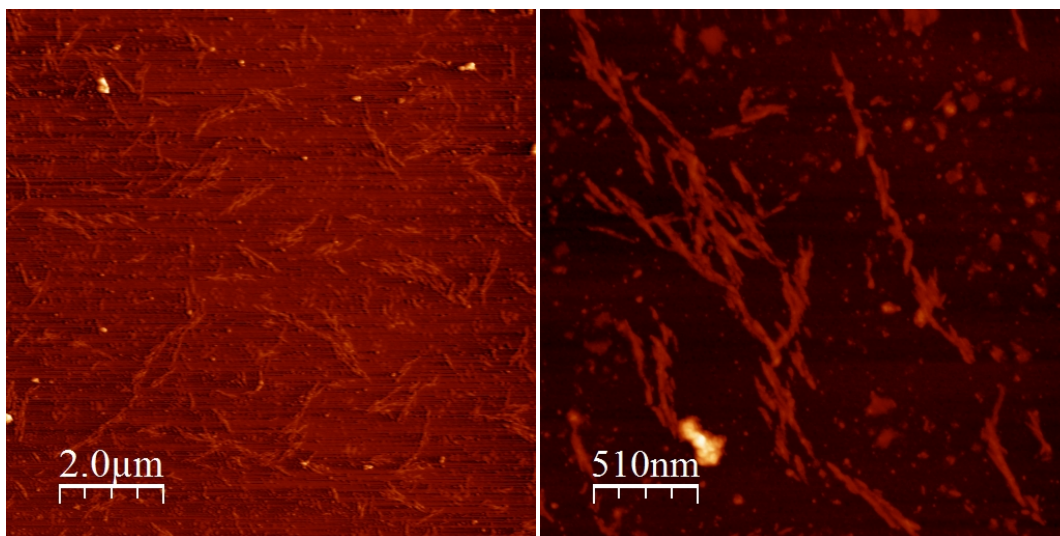
El CP **26** (10.0 mg) se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (1:1:0.1% TFA, 500 μL). Una alícuota de la muestra (10 μL) se depositó sobre la superficie de mica, previamente exfoliada. Después de 10 min la superficie de mica se lavó con agua y se secó con aire. Las muestras fueron observadas en AFT modo tapping al aire.



**Medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) para el CP 28, *c*-[(*D*-Acp-*L*-Lys(PCBA)-*D*-Acp-*L*-Arg-*D*-Acp-*L*-Cys(*S*<sup>t</sup>Bu)-*D*-Acp-*L*-Glu)-]:**

El CP **28** (18.3 mg) se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (1:1:0.1% TFA, 500 μL). Una alícuota de la muestra (10 μL) se depositó sobre la superficie de mica, previamente

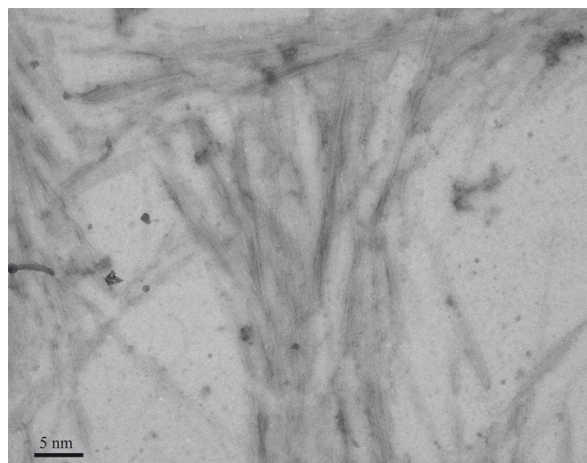
exfoliada. Después de 10 min la superficie de mica se lavó con agua y se secó con aire. Las muestras fueron observadas en AFT modo tapping al aire.



**Microscopía de transmisión de electrones (TEM):**

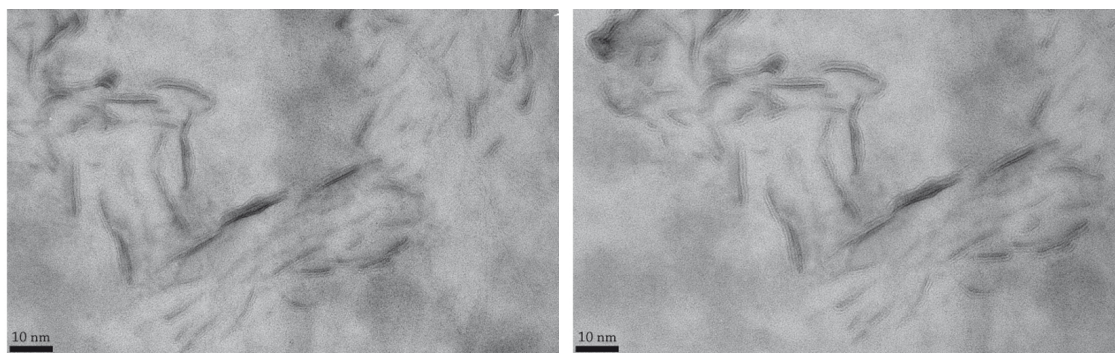
**Medidas de microscopía de transmisión de electrones (TEM) para el CP 25, c-[(D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Lys-D-Acp-L-Glu)-]:**

Se disolvió la muestra **25** (5 mg) en agua miliQ (500  $\mu$ L). Alícuotas de la disolución se depositaron sobre la superficie de mica previamente exfoliada. Transcurridos 30 min se evaporó sobre la superficie mica una fina capa homogénea de C. Las muestras fueron flotadas en una mezcla de agua-etanol y recogidas sobre una gradilla de Cu/Rh (malla 400). Sobre la gradilla, una vez seca, se depositó una gota de una solución al 2% en peso de acetato de uranilo, después de dos minutos se lavó con agua y se secó al aire. Se tomaron imágenes en las condiciones comentadas anteriormente.



**Medidas de microscopía de transmisión de electrones (TEM) para el CP 28, *c*-[(D-Acp-L-Lys(PCBA)-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-]:**

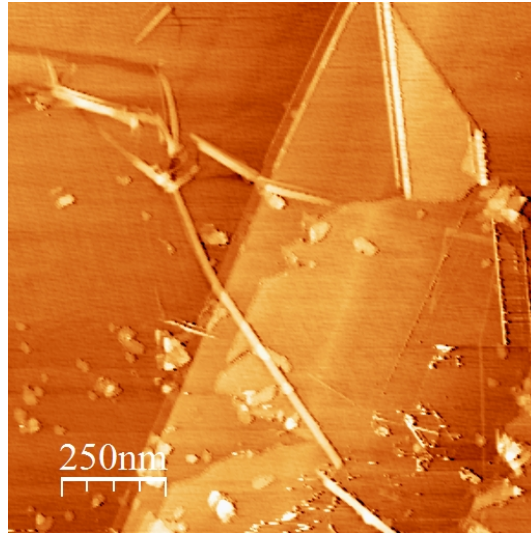
Se disolvió la muestra **28** (18.3 mg) en agua miliQ (500  $\mu$ L). Alícuotas de la disolución se depositaron sobre la superficie de mica previamente exfoliada. Transcurridos 30 min se evaporó sobre la superficie mica una fina capa homogénea de C. Las muestras fueron flotadas en una mezcla de agua-etanol y recogidas sobre una gradilla de Cu/Rh (malla 400). Sobre la gradilla, una vez seca, se depositó una gota de una solución saturada de acetato de uranilo, después de dos minutos se lavó con agua y se secó al aire. Se tomaron imágenes en las condiciones comentadas anteriormente. Mediante sobreposición de áreas pequeñas de las áreas seleccionadas, y usando procedimientos de máxima probabilidad, se revelan filamentos largos, en muchos casos agrupados en parejas.



***Microscopía de efecto túnel (STM):***

**Medidas de microscopía de efecto túnel (STM) para el CP 28, *c*-[(D-Acp-L-Lys(PCBA)-D-Acp-L-Arg-D-Acp-L-Cys(S<sup>t</sup>Bu)-D-Acp-L-Glu)-]:**

El CP **28** (18.3 mg) se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (1:1:0.1% TFA, 500  $\mu$ L). Una alícuota de la muestra (10  $\mu$ L) se depositó sobre la superficie de grafito pirolítico de altura orientada (HOPG), previamente exfoliado, transcurridos 10 min la superficie se lavó con una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (1:1) y se secó con Ar. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente, en las condiciones anteriormente comentadas.





**Anexos:**



## ANEXO I: Pruebas de cristalización.

Los acrónimos utilizados son los siguientes:

T.: Transparente

P.: Precipitado

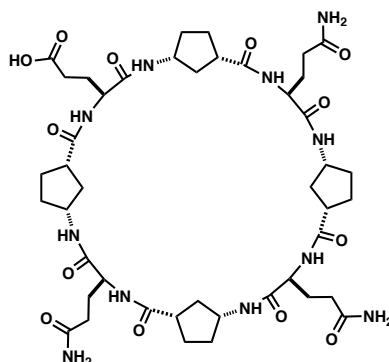
C.: Cristales

C.S.: Cristales de Sales

A.: Agujas

A.F.: Agujas Finas

Cristalización del ciclopeptido:  $c\text{-}[(L\text{-Gln}\text{-}D\text{-Acp}\text{-}L\text{-Glu}\text{-}D\text{-Acp})_2\text{-}]$  (**15**).



A) El ciclopeptido **15** (1.5 mg) se disolvió en 120  $\mu\text{L}$  de agua miliQ y 5  $\mu\text{L}$  de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de muestra en cada intento de cristalización.

Condiciones	Instante	7 días	14 días
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.02M)	T.	T.	T.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.05M)	T.	T.	T.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.1M)	T.	T.	T.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.2M)	T.	T.	P.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (1 M)	T.	T.	P.
2.5 $\mu\text{L}$ 30% MPD, 0.1M NaOAc 4.6, 20 mM CaCl <sub>2</sub>	T.	<b>A. pequeñas</b>	<b>A. pequeñas</b>
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M Tris 8.5, 2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M Tris 8.5, 30% PEG4K, 0.2M MgCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M Hepes 7.4, 30% 2-propanol, 0.2M MgCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 0.2M Nacitrate, 30% 2-propanol	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCitrate 5.5, 30% PEG4K, 0.2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 30% PEG4K, 0.2M AmOAc	T.	T.	<b>C. pequeño</b>
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 30% PEG8K, 0.2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 20% PEG8K, 0.2M MgOAc <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% 2-propanol, 0.2M AmOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 25% PEG4K, 0.2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% PEG4K, 0.2M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 20% 2-propanol, 0.2M CaCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M imidazol 6.5, 1M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 20% 2-propanol	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 30% PEG8K, 0.2M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.2M AmSO <sub>4</sub> , 30% PEG8K	T.	T.	T.
2.5 µL 0.2M AmSO <sub>4</sub> , 30% PEG4K	T.	T.	T.
2.5 µL 2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 4M Na-formate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 2M Na-formate	T.	T.	T.

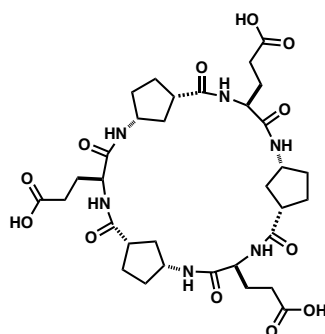
B) El ciclopéptido 15 se disolvió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, 1mg en 150 µL, se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles. Se añadieron 5 µL de muestra en cada intento de cristalización.

Condiciones	Instante	10 día	14 días	44 días
CP	P.	P.	P.	P.
CP + 2.5 µL HCl 0.1M	P.	<b>C. pequeño</b>	<b>C. pequeño</b>	<b>C. pequeño</b>
CP + 2.5 µL HCl 0.01M	P.	T.	P.	P.
CP	P.	T.	P.	P.
CP + 2.5 µL NaOH 0.5M	P.	T.	T.	T.
CP + 2.5 µL NaOH 0.01M	P.	T.	T.	T.
CP + 1µL Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=5.5	P.	T.	P.	P.

CP	P.	P.	P.	P.
CP	P.	P.	P.	P.
CP	P.	P.	P.	P.
CP + 1µL ZnBr 0.1M	P.	T.	P.	P.
CP + 1µL Cu(OAc) 0.1M	P.	T.	P.	P.
CP + 1µL H <sub>2</sub> O	P.	T.	<b>C. pequeño</b>	<b>C. pequeño</b>
CP + 1µL Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=2.0	P.	P.	P.	P.

Cuando se añadió las disoluciones acuosas parecía que precipitaba la muestra, pero al cabo de un días estaba todo solubilizado.

Cristalización del ciclopéptido: *c*-[(*L*-Glu-*D*-Acp)<sub>3</sub>-] (**16**).



A) 2 mg del ciclohexapéptido **16** se disolvieron en 200 µL de agua miliQ, 100 µL de MeOH, 50 µL de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, 5 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Se añadieron 5 µL de muestra en cada intento de cristalización.

Condiciones	Instante	4 días	11 días
CP+ 1µL HCl (0.02M)	T.	T.	T.
CP+ 1µL HCl (0.05M)	T.	T.	T.
CP+ 1µL HCl (0.1M)	P.	P.	P.
CP+ 1µL HCl (0.2M)	P.	P.	P.
CP+ 1µL HCl (1 M)	P.	P.	P.
CP+ 1µL NaOH (0.02M)	T.	T.	T.
CP+ 1µL NaOH (0.05M)	T.	T.	T.
CP+ 1µL NaOH (0.1M)	T.	T.	T.
CP+ 1µL NaOH (0.2M)	T.	T.	T.
CP+ 1µL NaOH (1 M)	T.	T.	T.
2.5 µL 30% MPD, 0.1M NaOAc 4.6, 20 mM CaCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% PEG4K, 0.2M MgCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 30% 2-propanol, 0.2M MgCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 0.2M Nacitrate, 30% 2-propanol	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCitrate 5.5, 30% PEG4K, 0.2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 30% PEG4K, 0.2M AmOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 30% PEG8K, 0.2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 20% PEG8K, 0.2M MgOAc <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% 2-propanol, 0.2M AmOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 25% PEG4K, 0.2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% PEG4K, 0.2M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 20% 2-propanol, 0.2M CaCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M imidazole 6.5, 1M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 20% 2-propanol	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 30% PEG8K, 0.2M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.2M AmSO <sub>4</sub> , 30% PEG8K	T.	T.	T.
2.5 µL 0.2M AmSO <sub>4</sub> , 30% PEG4K	T.	T.	T.
2.5 µL 2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 4M Na-formate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 2M Na-formate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 0.8M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 8% PEG8K	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 8% PEG4K	T.	<b>C. pequeños</b>	<b>C. pequeños</b>
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 1.4M Na-citrate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Na-citrate 5.5, 20% 2-propanol, 20% PEG4KC	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 10% 2-propanol, 20% PEG4K	T.	T.	T.
2.5 µL 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 20% PEG8K	T.	T.	T.
2.5 µL 30% PEG1500	P.. ó C.	<b>A.</b>	<b>A.</b>
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 1.4M Na-acetate	T.	T.	T.

Anexo I: Pruebas de cristalización

2.5 µL 0.1 M Hepes 7.4, 0.2M Na-citrate, 30% MPD	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 1.4M Na-citrate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% PEG400, 0.2M Na-citrate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 28% PEG400, 0.2M CaCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 30% MPD, 0.2M MgOAc <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 30% PEG400, 0.2M MgCl <sub>2</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Na-citrate 5.5, 30% MPD, 0.2M AmOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.4M KNa-tartrate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.4 M AmH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Na-citrate 5.5, 1M AmH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 1.5M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	T.	T.	T.

B) 1 mg del ciclohexapéptido **16** se disolvieron en 60 µL de agua miliQ y 3 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Se usaron 5 µL de muestra en cada prueba de cristalización, y 2.5 µL de un agentes cristalizantes, se usaron disoluciones tampón de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, con pH entre 2 y 4.75 con una variación de 0.25 unidades en cada muestra.

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>2 días</b>	<b>5 días</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.00)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.25)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.50)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.75)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.00)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.25)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.50)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.75)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.00)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.25)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.50)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.75)	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

C) 1 mg del ciclohexapéptido **16** se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de agua miliQ, 3  $\mu\text{L}$  de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de muestra en cada intento de cristalización. Como agentes de cristalización uso una mezcla de disoluciones tampón Na/K  $\text{H}_2\text{PO}_4$  (1.5M), el rango de pH entre 3.5-3.8, se uso 2.5  $\mu\text{L}$  por gota. Además se usaron sales divalentes 2.0  $\mu\text{L}$  por gota

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>
CP+ $\text{BaCl}_2$ 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{BaCl}_2$ 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CaCl}_2$ 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CaCl}_2$ 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CuCl}_2$ 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CuCl}_2$ 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CaSO}_4$ 2M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CaSO}_4$ 2M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{MgSO}_4$ 2.5M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{MgSO}_4$ 2.5M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{MnCl}_2$ 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{MnCl}_2$ 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{NiCl}_2$ 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{NiCl}_2$ 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{SrCl}_2$ 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{SrCl}_2$ 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CdSO}_4$ 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ $\text{CdSO}_4$ 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
$\text{Zn}(\text{OAc})_2$ 1M,(pH=3.5)	P.

D) El ciclohexapéptido **16** (3 mg) se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ (300  $\mu\text{L}$ ), 4.5  $\mu\text{L}$  de NaOH (1M) y 5  $\mu\text{L}$  de NaOH (0.5 M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

En cada prueba de cristalización se usaron 5  $\mu\text{L}$  de disolución de péptido y 2.5  $\mu\text{L}$  de una disolución tampón fosfato, mezcla de fosfato sódico y potásico (1.5M).

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>6 días</b>	<b>8 días</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L HEPES 7.4; 0.8 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
CP+ 3.0 $\mu$ L HEPES 7.4; 0.8 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	P.	P.
CP+ 3.5 $\mu$ L HEPES 7.4; 0.8 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	P.	P.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=5.5)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=5.0)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=4.5)	T.	P.	P.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=4.0)	T.	P./C.	<b>C.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.5)	T.	<b>C.</b>	<b>C.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.0)	T.	<b>C.</b>	<b>C.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=2.5)	P.	P./C.	P./C.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=2.0)	P.	P./C.	P./C.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=1.5)	P.	P./C.	P./C.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=1.0)	P.	P.	P.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=0.8)	P.	P.	P.

E) El ciclohexapéptido **16** (3 mg) se disolvió en H<sub>2</sub>O miliQ (300  $\mu$ L), 4.5  $\mu$ L de NaOH (1M) y 5  $\mu$ L de NaOH (0.5 M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

En cada prueba de cristalización se usaron 5  $\mu$ L de disolución de péptido y 2.5  $\mu$ L de una disolución tampón fosfato, mezcla de fosfato sódico y potásico (1.5M).

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>4 horas</b>	<b>3 días</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.0)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.1)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.2)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.3)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.4)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.5)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.6)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.7)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.8)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5 $\mu$ L tampón (pH=3.9)	T.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>

## Anexo I: Pruebas de cristalización

CP+ 2.5µL tampón (pH=4.0)	T.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.1)	T.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.2)	C.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.3)	T.	<b>A. F.</b>	<b>A. F.</b>

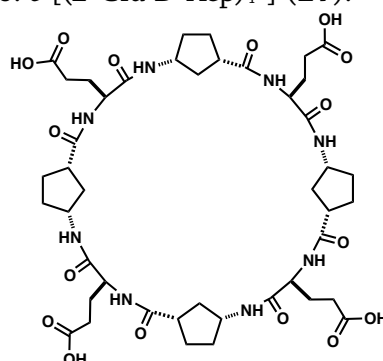
F) El ciclohexapéptido **16** (3 mg) se disolvió en H<sub>2</sub>O miliQ (250 µL), 3.5 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

En cada prueba de cristalización se usaron 5 µL de disolución de péptido y 2.5 µL de una disolución tampón fosfato, mezcla de fosfato sódico y potásico (1.5M). A mayores se añadieron disoluciones de diferentes sales, se adicionó 2 µL por muestra.

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>3 días</b>
CP+ 2.5µL tampón+CaCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+CuCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+CoSO <sub>4</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+MnCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+NiCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+ZnSO <sub>4</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+CaCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.+Prismas</b>
CP+ 2.5µL tampón+CuCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+CoSO <sub>4</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.+Prismas</b>
CP+ 2.5µL tampón+MnCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+NiCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5µL tampón+ZnSO <sub>4</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>

En todos estos casos cristalizan en forma de agujas, pero a mayores se formaron otros cristales en forma de prismas, todos ellos resultaron ser sales.

Cristalización del ciclopeptido:  $c\text{-}[(L\text{-Glu}\text{-}D\text{-Acp})_4\text{-}]$  (**17**).



A) 2 mg del ciclooctapéptido **17** se disolvieron en 200  $\mu\text{L}$  de agua miliQ, 3  $\mu\text{L}$  de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de muestra en cada intento de cristalización.

Condiciones	Instante	4 días	11 días
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.02M)	T.	P.	P.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.05M)	P.	P.	P.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.1M)	P.	P.	P.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (0.2M)	P.	P.	P.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ HCl (1 M)	P.	P.	P.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ NaOH (0.02M)	T.	T.	T.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ NaOH (0.05M)	T.	T.	T.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ NaOH (0.1M)	T.	T.	T.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ NaOH (0.2M)	T.	T.	T.
CP+ 1 $\mu\text{L}$ NaOH (1 M)	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 30% MPD, 0.1M NaOAc 4.6, 20 mM $\text{CaCl}_2$	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M Tris 8.5, 2M $\text{AmSO}_4$	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M Tris 8.5, 30% PEG4K, 0.2M $\text{MgCl}_2$	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M Hepes 7.4, 30% 2-propanol, 0.2M $\text{MgCl}_2$	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M NaCaco 6.5, 0.2M Nacitrate, 30% 2-propanol	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M NaCitrate 5.5, 30% PEG4K, 0.2M $\text{AmSO}_4$	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M NaOAc 4.6, 30% PEG4K, 0.2M $\text{AmOAc}$	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M NaCaco 6.5, 30% PEG8K, 0.2M $\text{AmSO}_4$	T.	T.	T.
2.5 $\mu\text{L}$ 0.1M NaCaco 6.5, 20% PEG8K, 0.2M $\text{MgOAc}_2$	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% 2-propanol, 0.2M AmOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 25% PEG4K, 0.2M AmSO <sub>4</sub>	T.	<b>C. muy pequeños</b>	<b>C. muy pequeños</b>
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 30% PEG4K, 0.2M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 20% 2-propanol, 0.2M CaCl <sub>2</sub>	T.	<b>C. muy pequeños</b>	<b>C. muy pequeños</b>
2.5 µL 0.1M imidazol 6.5, 1M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 20% 2-propanol	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaCaco 6.5, 30% PEG8K, 0.2M NaOAc	T.	T.	T.
2.5 µL 0.2M AmSO <sub>4</sub> , 30% PEG8K	T.	T.	T.
2.5 µL 0.2M AmSO <sub>4</sub> , 30% PEG4K	T.	T.	T.
2.5 µL 2M AmSO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
2.5 µL 4M Na-formate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 2M Na-formate	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M Hepes 7.4, 0.8M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	<b>A.</b>	<b>A.</b>
2.5 µL 0.1M Tris 8.5, 8% PEG8K	T.	T.	T.
2.5 µL 0.1M NaOAc 4.6, 8% PEG4K	T.	T.	T.

B) 1 mg del ciclooctapéptido **17** se disolvieron en 90 µL de agua miliQ y 5 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Se usaron 5 µL de muestra en cada prueba de cristalización, y 2.5 µL de un agentes cristalizantes, se usaron disoluciones tampón de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, con pH entre 2 y 4.75 con una variación de 0.25 unidades en cada muestra.

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>2 días</b>	<b>5 días</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.00)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.25)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.50)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.75)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.00)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.25)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.50)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.75)	T.	T.	T.

Anexo I: Pruebas de cristalización

CP+ 2.5µL tampón (pH=4.00)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.25)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.50)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.75)	T.	T.	T.

C) 1 mg del ciclooctapéptido **17** se disolvieron en 100 µL de agua miliQ, 3 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Se añadieron 5 µL de muestra en cada intento de cristalización. Como agentes de cristalización uso una mezcla de disoluciones tampón Na/K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.5M), el rango de pH entre 3.5-3.8, se uso 2.5 µL por gota. Además se usaron sales divalentes 2.0 µL por gota

Condiciones	Instante
CP+ CaCl <sub>2</sub> 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ ZnCl <sub>2</sub> 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ CoSO <sub>4</sub> 2M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ MnCl <sub>2</sub> 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ ZnSO <sub>4</sub> 1M (pH=3.5)	<b>C.</b>
CP+ CaCl <sub>2</sub> 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ ZnCl <sub>2</sub> 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ CoSO <sub>4</sub> 2M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ MnCl <sub>2</sub> 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>
CP+ ZnSO <sub>4</sub> 1M (pH=3.8)	<b>C.</b>

D) El ciclooctapéptido **17** (3 mg) se disolvió en H<sub>2</sub>O miliQ (250 µL), 3.5 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

En cada prueba de cristalización se usaron 5 µL de disolución de péptido y 2.5 µL de una disolución tampón fosfato, mezcla de fosfato sódico y potásico (1.5M).

Condiciones	Instante	6 días	8 días
CP+ 2.5 µL HEPES 7.4; 0.8 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
CP+ 3.0 µL HEPES 7.4; 0.8 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	T.	T.	T.
CP+ 3.5 µL HEPES 7.4; 0.8 M	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
CP+ 2.5µL tampón (pH=5.5)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=5.0)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.5)	T.	P.	P.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.0)	T.	<b>C.</b>	<b>C.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.5)	T.	<b>C.</b>	<b>C.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.0)	T.	<b>C.</b>	<b>C.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.5)	P.	P./C.	<b>C.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=2.0)	P.	P./C.	<b>C.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=1.5)	P.	P./C.	<b>C.</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=1.0)	P.	P.	P.
CP+ 2.5µL tampón (pH=0.8)	P.	P.	P.

E) El ciclooctapéptido **17** (3 mg) se disolvió en H<sub>2</sub>O miliQ (300 µL), 3.5 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

En cada prueba de cristalización se usaron 5 µL de disolución de péptido y 2.5 µL de una disolución tampón fosfato, mezcla de fosfato sódico y potásico (1.5M).

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>4 horas</b>	<b>3 días</b>
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.0)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.1)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.2)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.3)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.4)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.5)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.6)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.7)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.8)	T.	T.	T.
CP+ 2.5µL tampón (pH=3.9)	P.	P.	P.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.0)	P.	P.	P.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.1)	P.	P.	P.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.2)	P.	P.	P.
CP+ 2.5µL tampón (pH=4.3)	P.	P.	P.

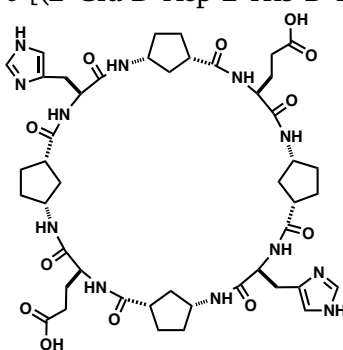
F) El ciclooctapéptido **17** (3 mg) se disolvió en H<sub>2</sub>O miliQ (250 µL), 3.5 µL de NaOH (1M), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

En cada prueba de cristalización se usaron 5  $\mu\text{L}$  de disolución de péptido y 2.5  $\mu\text{L}$  de una disolución tampón fosfato, mezcla de fosfato sódico y potásico (1.5M). A mayores se añadieron disoluciones de diferentes sales, se adicionó 2  $\mu\text{L}$  por muestra.

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>3 días</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+CaCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+CuCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+CoSO <sub>4</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+MnCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+NiCl <sub>2</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+ZnSO <sub>4</sub> (pH=3.5)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+CaCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.+Prismas</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+CuCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+CoSO <sub>4</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.+Prismas</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+MnCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+NiCl <sub>2</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ tampón+ZnSO <sub>4</sub> (pH=3.8)	<b>A.</b>	<b>A.</b>

En todos estos casos cristalizan en forma de agujas, pero a mayores se formaron otros cristales en forma de prismas, todos ellos resultaron ser sales.

Cristalización del ciclopéptido:  $c\text{-}[(L\text{-Glu-D-Acp-L-His-D-Acp})_2\text{-}]$  (**21**).



Se disolvió el ciclopéptido **21** (3 mg) en agua miliQ (300  $\mu\text{L}$ ), se filtró la muestra para eliminar restos de partículas insolubles.

Para la cristalización de este compuesto se probaron dos disoluciones tampón diferentes:

- A. Se mezcló ácido cítrico (0.1 M) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.2 M) en diferentes proporciones para lograr un rango de pH entre 4.8-6.0.
- B. La otra disolución tampón fue una mezcla de ácido cítrico (0.1 M) y citrato sódico (0.1 M), rango de pH entre 4.8-5.8.

También se usaron disoluciones de sales divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), se utilizaron disoluciones de  $[\text{X}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  a dos concentraciones (0.01 M y 0.005 M).

En cada prueba de cristalización se usó 5  $\mu\text{L}$  de CP, 2.5  $\mu\text{L}$  de una de las dos disoluciones tampón y en caso de usarlo 2.5  $\mu\text{L}$  de la disolución de la sal.

Condiciones	Instante	7 días	14 días
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ $\text{Cu}^{2+}$ 0.01M	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ $\text{Cu}^{2+}$ 0.005M	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ $\text{Mn}^{2+}$ 0.01M	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ $\text{Mn}^{2+}$ 0.005M	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ $\text{Zn}^{2+}$ 0.01M	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ $\text{Zn}^{2+}$ 0.005M	T.	T.	T.
CP	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ A (pH=4.8)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ A (pH=5.0)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ A (pH=5.2)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu\text{L}$ A (pH=5.4)	T.	T.	T.

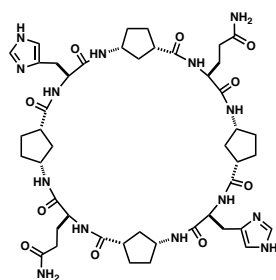
Anexo I: Pruebas de cristalización

CP+ 2.5 µL A (pH=5.6)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.6)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.8)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=6.0)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=4.8) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=4.8) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.0) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.0) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.2) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.2) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.4) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.4) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.6) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.6) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.8) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=5.8) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=6.0) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL A (pH=6.0) + 2.5 µL Cu <sup>+2</sup> (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL B (pH=4.8)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL B (pH=5.0)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL B (pH=5.2)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL B (pH=5.4)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 µL B (pH=5.6)	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.6)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.8)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=4.8) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=4.8) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.0) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.0) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.2) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.2) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.4) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.4) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.6) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.6) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.005M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.8) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.01M)	T.	T.	T.
CP+ 2.5 $\mu$ L B (pH=5.8) + 2.5 $\mu$ L $\text{Cu}^{+2}$ (0.005M)	T.	T.	T.

Cristalización del ciclopeptido:  $c\text{-}[(L\text{-Gln}\text{-}D\text{-Acp}\text{-}L\text{-His}\text{-}D\text{-Acp})_2\text{-}]$  (**20**).



A) Se disolvió el ciclooctapéptido **20** (3 mg) en agua miliQ (300 mL), la disolución se filtró para eliminar restos de partículas sólidas.

Condiciones	Instante	1 día	3 días	7 días
CP	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ HCl 1M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ HCl 0.5M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ HCl 0.2M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ HCl 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ HCl 0.05M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=5.5	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=5.0	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=4.5	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=4.0	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=3.5	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=3.0	T.	T.	T.	<b>A. pequeñas</b>
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=2.5	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=2.0	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=1.5	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Na/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=1.0	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ ZnCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ ZnBr <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Zn-trifluorometanosulfonato 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ Cu(OAc) <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ CuSO <sub>4</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ CuCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu\text{L}$ CuCO <sub>3</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu\text{L}$ PdCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

CP + 5 $\mu$ L Pd(OAc) <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu$ L ZnCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu$ L ZnBr <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu$ L Zn-trifluoro- metanosulfonato 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu$ L Cu(OAc) <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu$ L CuSO <sub>4</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L CuCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L CuCO <sub>3</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L PdCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L Pd(OAc) <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L ZnCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L ZnBr <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L Zn-trifluoro- metanosulfonato 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L Cu(OAc) <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L CuSO <sub>4</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L CuCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L CuCO <sub>3</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L PdCl <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L Pd(OAc) <sub>2</sub> 0.1M	T.	T.	T.	T.

Después de pasar 7 días y no observarse cambios, y como la purificación del compuesto se realizó en medio ácido, se decidió repetir el experimento pero añadiendo disoluciones tampón en las pruebas de cristalización: HEPES (pH=7.8) y TRIS·HCl (1.5M, pH=8.8).

<b>Condiciones</b>	<b>Instante</b>	<b>6 día</b>	<b>27 días</b>	<b>35 días</b>
CP + 2 $\mu$ L HEPES	T.	T.	T.	T.
CP + 2 $\mu$ L TRIS	T.	P.	P.	P.
CP + 2.5 $\mu$ L ZnCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L HEPES	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu$ L ZnBr <sub>2</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L HEPES	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu$ L Zn-trifluoro-	T.	T.	T.	T.

Anexo I: Pruebas de cristalización

metanosulfonato 0.1M+ 2μL HEPES				
CP + 2.5 μL Cu(OAc) <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL HEPES	T.	P.	P.	P.
CP + 2.5 μL CuSO <sub>4</sub> 0.1M+ 2μL HEPES	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 μL CuCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL HEPES	T.	T.	T.	T.
CP + 5 μL CuCO <sub>3</sub> 0.1M+ 2μL HEPES	T.	T.	T.	T.
CP + 5 μL PdCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL HEPES	T.	P.	P.	P.
CP + 5 μL Pd(OAc) <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	T.	T.	T.
CP + 5 μL ZnCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	P.	P.	P.
CP + 5 μL ZnBr <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	P.	P.	P.
CP + 5 μL Zn-trifluoro- metanosulfonato 0.1M+ 2μL TRIS	T.	P.	P.	P.
CP + 5 μL Cu(OAc) <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS+ 2μL TRIS	T.	T.	T.	T.
CP + 5 μL CuSO <sub>4</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	T.	T.	T.
CP + 1 μL CuCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	T.	T.	T.
CP + 1 μL CuCO <sub>3</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	T.	<b>A. muy pequeñas</b>	<b>A. muy pequeñas</b>
CP + 1 μL PdCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	P.	P.	P.
CP + 1 μL Pd(OAc) <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	T.	Lamina	Lamina
CP + 1 μL ZnCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL TRIS	T.	P.	P.	P.
CP + 1 μL ZnBr <sub>2</sub> 0.1M+ 2μL HEPES	T.	T.	T.	T.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

CP + 1 $\mu$ L Zn-trifluorometanosulfonato 0.1M+ 2 $\mu$ L HEPES	T.	T.	T.	T.
CP + 1 $\mu$ L Cu(OAc) <sub>2</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L TRIS	T.	¿A. o P.?	¿A. o P.?	¿A. o P.?
CP + 1 $\mu$ L CuSO <sub>4</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L TRIS	T.	<b>A.</b>	¿A. o P.?	¿A. o P.?
CP + 1 $\mu$ L CuCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L TRIS	T.	T.	¿A. o P.?	¿A. o P.?
CP + 1 $\mu$ L CuCO <sub>3</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L TRIS	T.	<b>A.</b>	<b>A.</b>	<b>A.</b>
CP + 1 $\mu$ L PdCl <sub>2</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L TRIS	T.	P.	P.	P.
CP + 1 $\mu$ L Pd(OAc) <sub>2</sub> 0.1M+ 2 $\mu$ L TRIS	T.	T.	T.	T.

B) Se disolvió 6.2 mg del ciclopéptido **20** en agua miliQ (620  $\mu$ L), y se filtró la disolución para eliminar restos de partículas sólidas.

Se usó 5  $\mu$ L de muestra en cada prueba de cristalización, y se usó 2.5  $\mu$ L de una disolución tampón TRIS·HCl (1.5M) a diferentes pHs.

<b>Condiciones</b>	<b>1 día</b>	<b>3 día</b>	<b>5 días</b>	<b>10 días</b>
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.8)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.5)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.0)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 9.8)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 9.6)	<b>A. F. mejores</b>	A. F.	A. F.	<b>A. mejores</b>
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 9.4)	A. F.	A. F.	<b>A. mejores</b>	<b>A. mejores</b>
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 9.2)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 9.0)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 8.8)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 8.5)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 8.3)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 8.0)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.

Anexo I: Pruebas de cristalización

CP + 2.5 µL TRIS (pH=10.8)+1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 10.5) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F. + C.	A. F. + C.	A. F. + C.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 10.0) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.8) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.6) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.4) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.2) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F. peores	A. F. peores	A. F. peores
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.0) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F. peores	A. F. peores	A. F. peores
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 8.8) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F. peores	A. F. peores	A. F. peores
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 8.5) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F. peores	A. F. peores	A. F. peores
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 8.3) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F. peores	A. F. peores	A. F. peores
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 8.0) +1.5 µL CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F. peores	A. F. peores	A. F. peores
CP + 2.5 µL TRIS (pH=10.8)+1.5 µL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 10.5) +1.5 µL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	A. F.	<b>A. F. mejores</b>	<b>A. F. mejores</b>	<b>A. F. mejores</b>
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 10.0) +1.5 µL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	A. F.	<b>A. F. mejores</b>	<b>A. F. mejores</b>	<b>A. F. mejores</b>
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.8) +1.5 µL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.6) +1.5 µL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.4) +1.5 µL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 µL TRIS (pH= 9.2) +1.5 µL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	A. F.	A. F.	A. F.

## Anexo I: Pruebas de cristalización

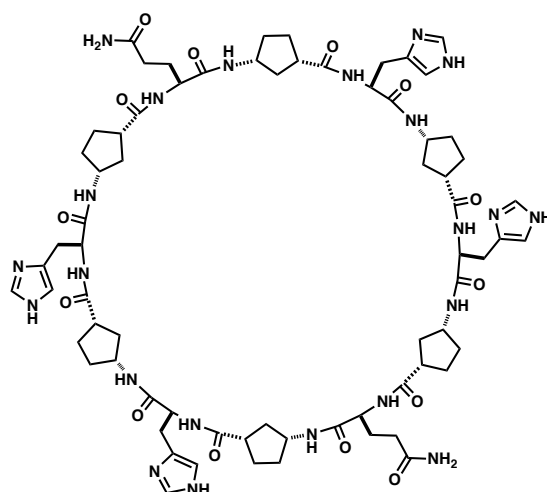
μL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)				
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 9.0) +1.5 μL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.8) +1.5 μL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.5) +1.5 μL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.3) +1.5 μL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.0) +1.5 μL CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 μL TRIS (pH=10.8)+1.5 μL CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 10.5) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 10.0) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 9.8) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 9.6) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 9.4) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 9.2) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 9.0) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.8) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.5) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.3) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 μL TRIS (pH= 8.0) +1.5 μL CuOAc (0.1M)	T.	T.	T.	T.

C) Se repitieron las mejores condiciones con el fin de obtener algún cristal de mejor calidad. Se disolvió el ciclopéptido **20** en agua miliQ (1mg/100  $\mu$ L), y se filtró la disolución para eliminar restos de partículas sólidas.

Se usó 5  $\mu$ L de muestra en cada prueba de cristalización, y se usó 2.5  $\mu$ L de una disolución tampón TRIS·HCl (1.5M) a diferentes pHs.

<b>Condiciones</b>	<b>1 día</b>	<b>3 día</b>	<b>5 días</b>	<b>10 días</b>
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.8)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.5)	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH=10.8)+1.5 $\mu$ L CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.5) +1.5 $\mu$ L CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>	<b>A. F.</b> <b>Mejores</b>
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH=10.8)+1.5 $\mu$ L CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.5) +1.5 $\mu$ L CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH=10.8)+1.5 $\mu$ L Cu(OAc) <sub>2</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.5) +1.5 $\mu$ L Cu(OAc) <sub>2</sub> (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 10.0) +1.5 $\mu$ L CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.
CP + 2.5 $\mu$ L TRIS (pH= 9.8) +1.5 $\mu$ L CuOAc (0.1M)	A. F.	A. F.	A. F.	A. F.

Cristalización del ciclopéptido:  $c\text{-}[(L\text{-Gln}\text{-}D\text{-Acp}\text{-}(L\text{-His}\text{-}D\text{-Acp})_2)_2]$  (**22**).



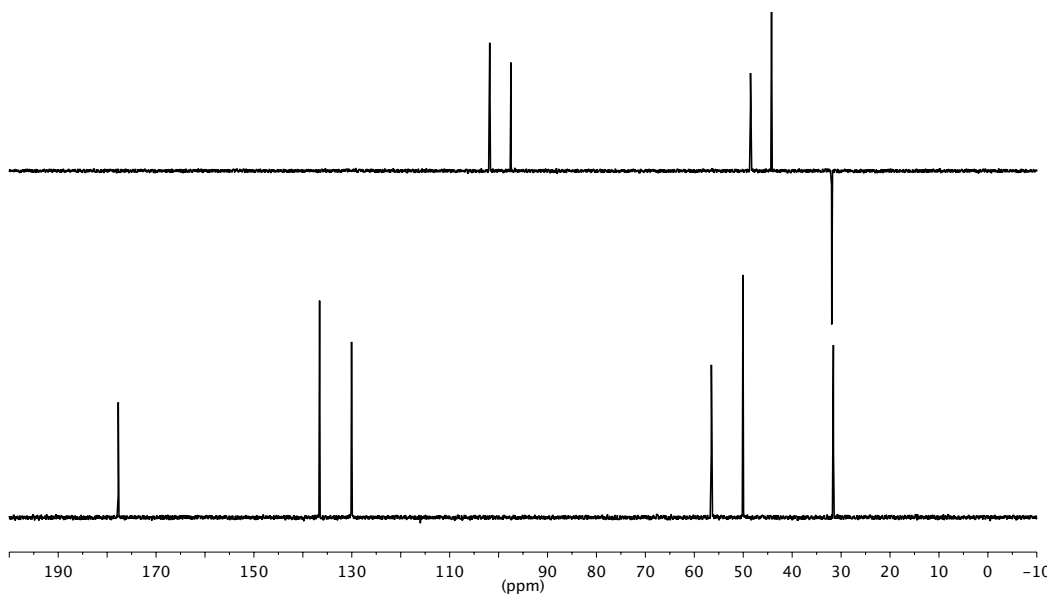
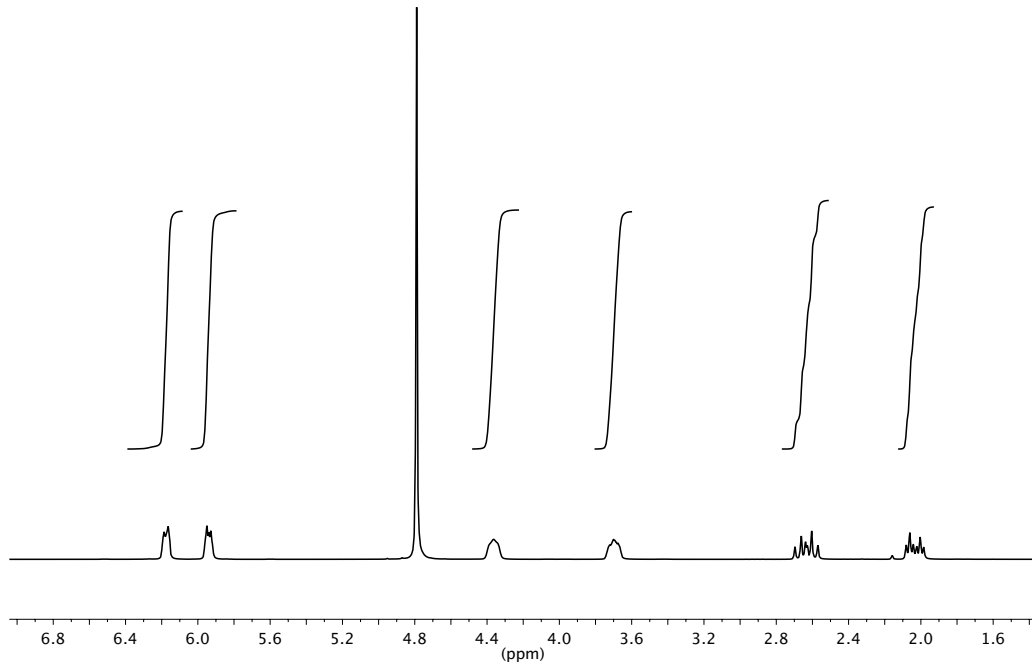
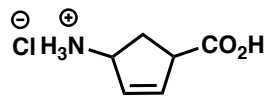
Se disolvió 21mg del ciclododecapéptido en 1 mL de agua miliQ, se filtró la muestra para eliminar restos de partículas sólidas.

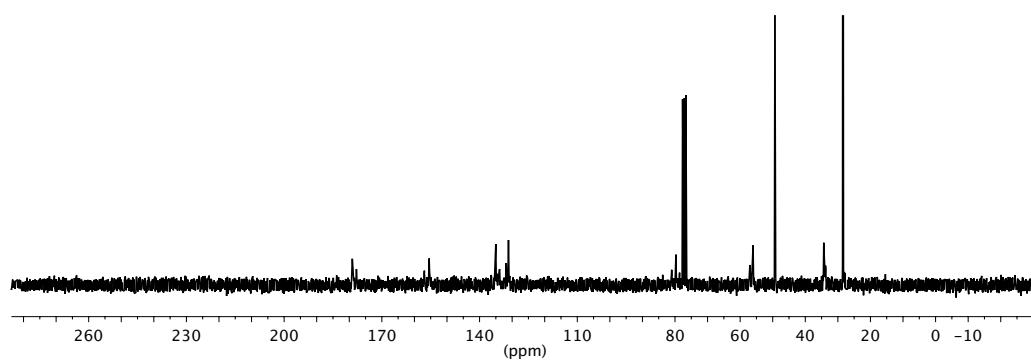
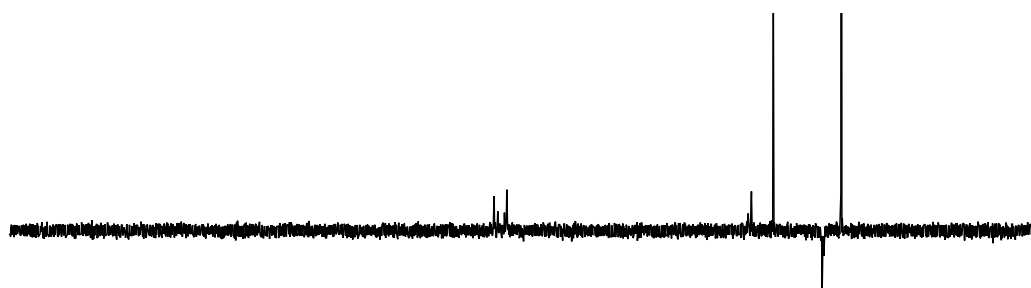
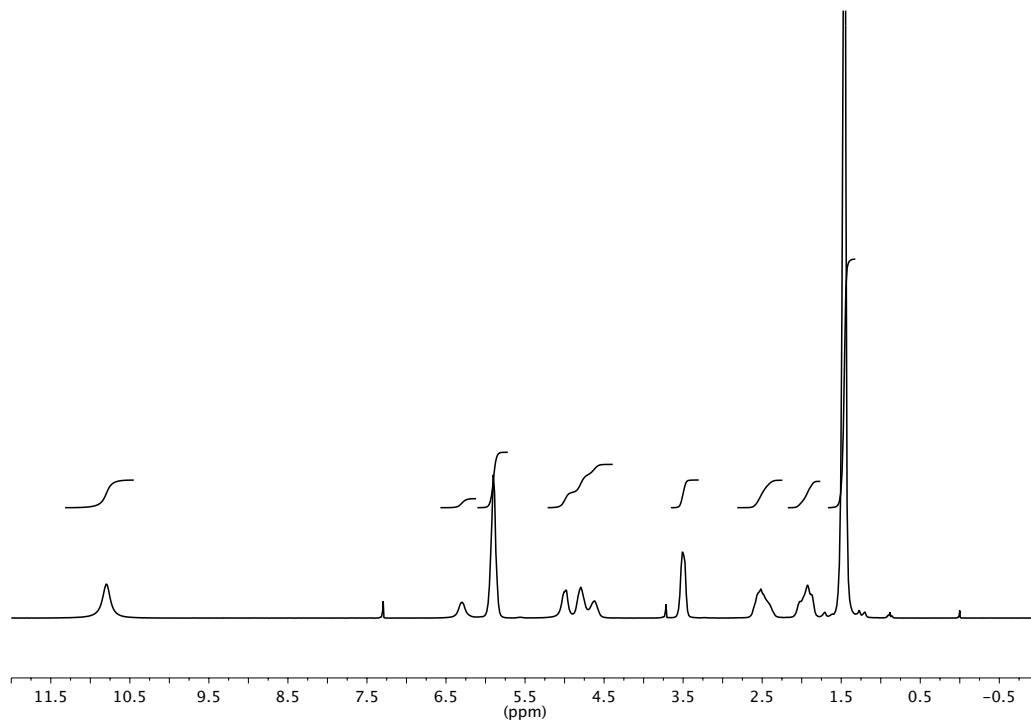
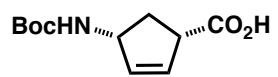
Se usó 5  $\mu\text{L}$  de muestra en cada prueba de cristalización, y 2.5  $\mu\text{L}$  de una disolución tampón, TRIS·HCl (1.5M) a diferentes pHs.

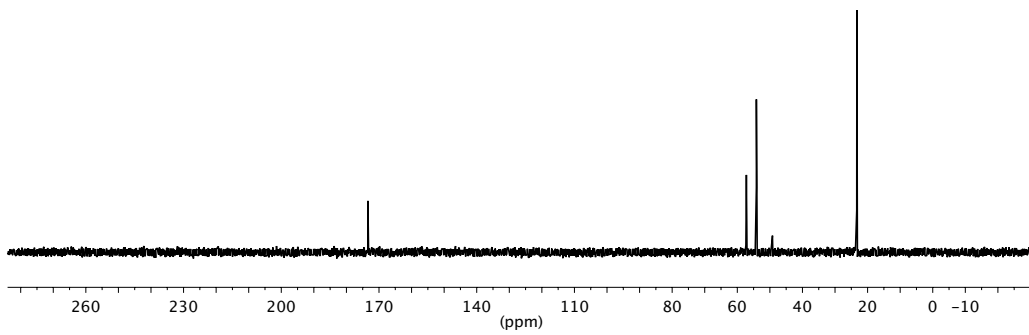
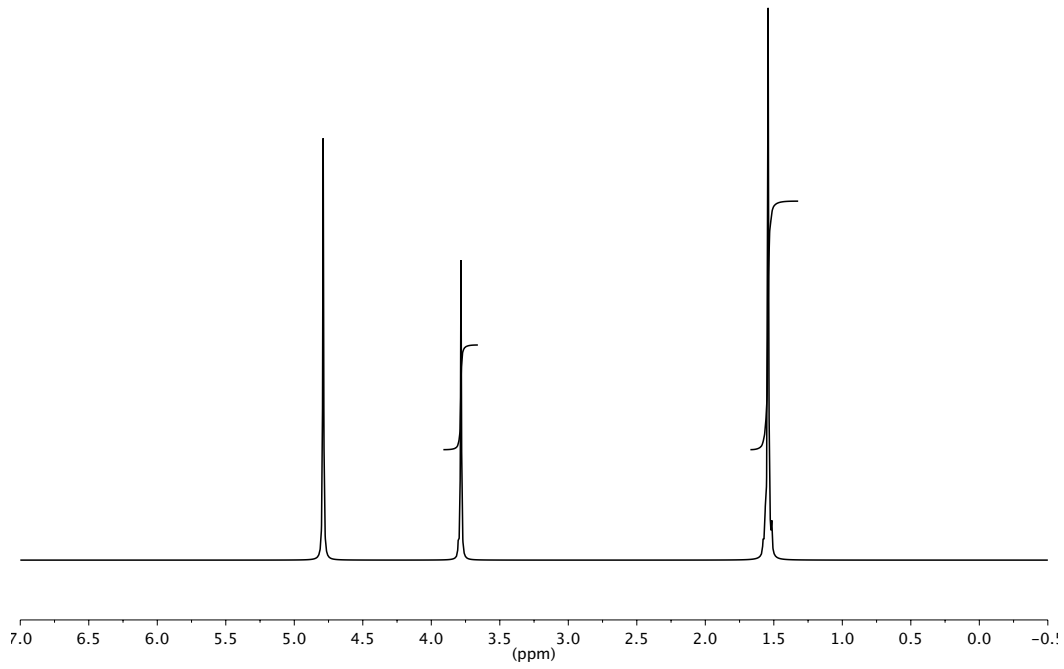
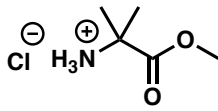
Condiciones	1 día	7 día	30 días	60 días
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 10.8)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 10.5)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 10.0)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 9.8)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 9.5)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 9.2)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 9.0)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 8.8)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 8.5)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ TRIS (pH= 8.0)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ HCl (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 2.5 $\mu\text{L}$ HCl (1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu\text{L}$ CuOAc (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu\text{L}$ CuCO <sub>3</sub> (0.1M)	T.	T.	T.	T.
CP + 5 $\mu\text{L}$ CuSO <sub>4</sub> (0.1M)	T.	T.	T.	T.

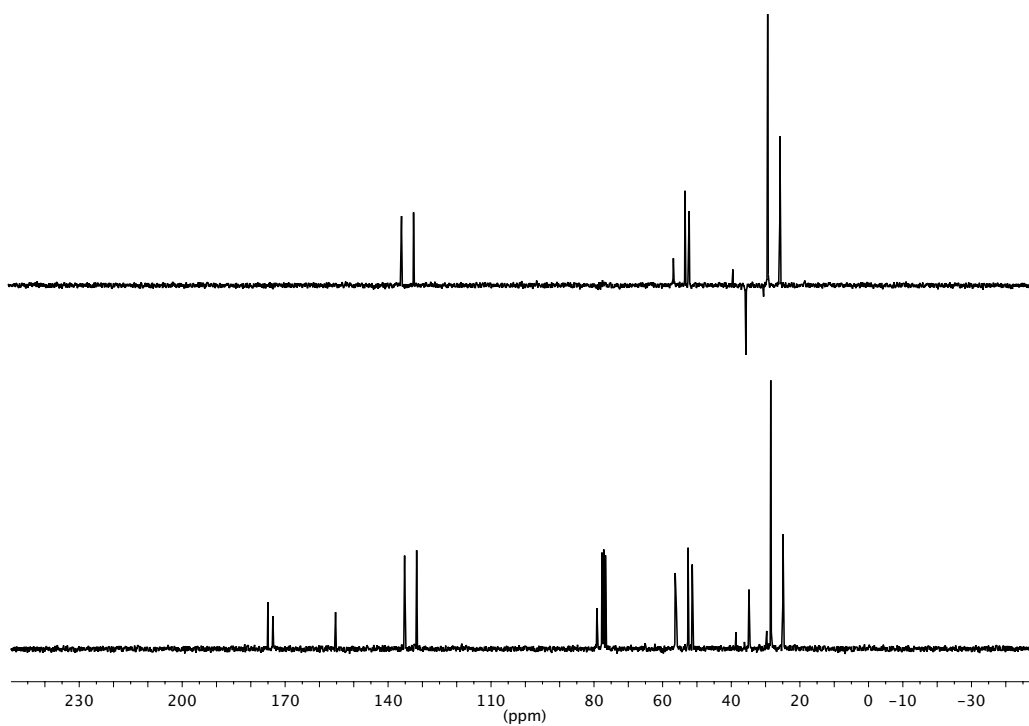
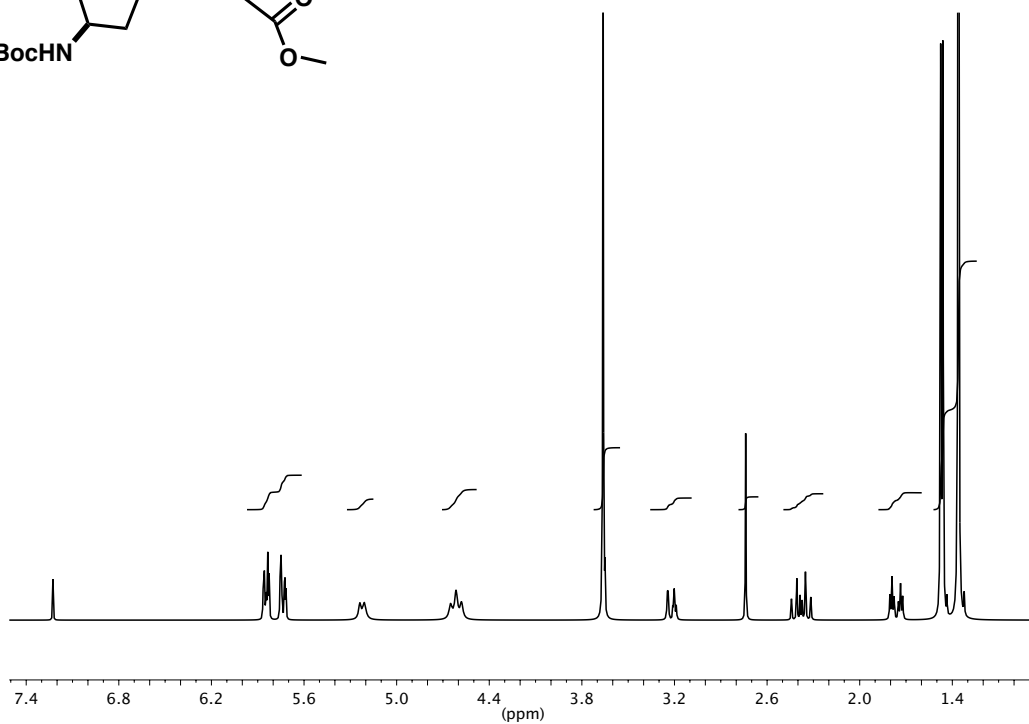
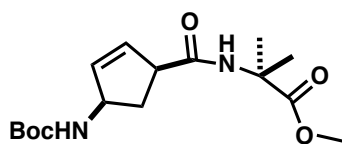


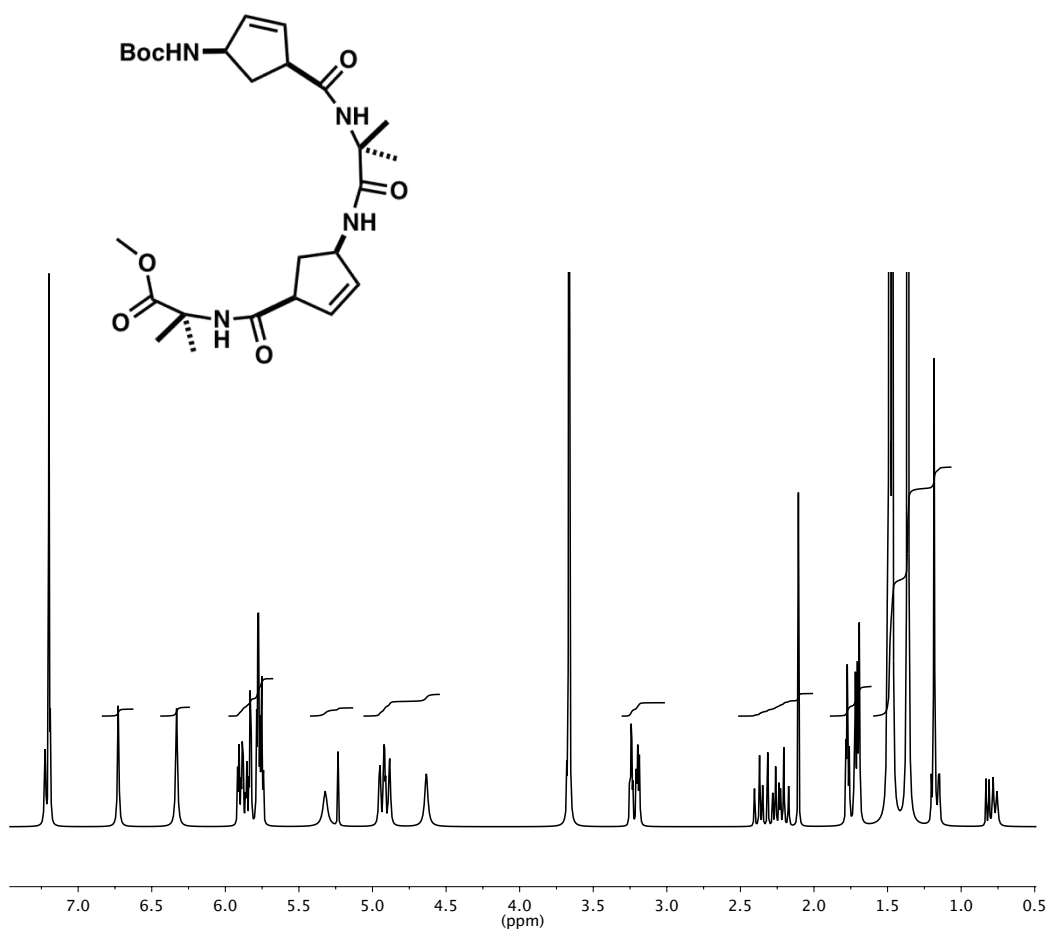
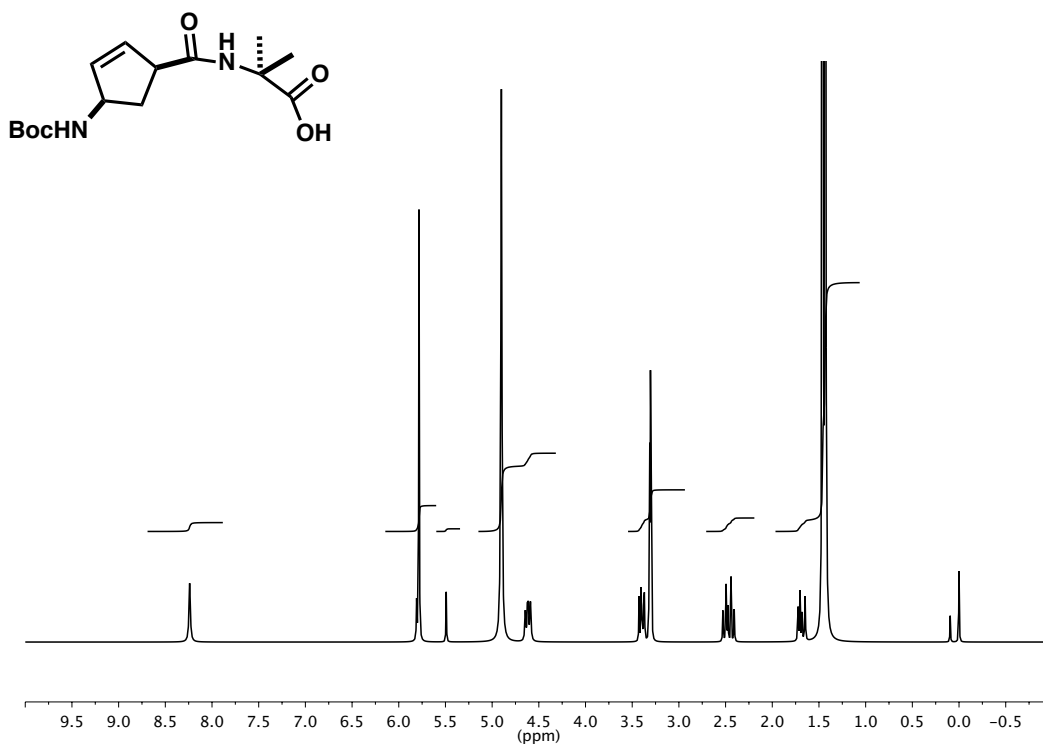
**ANEXO II: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

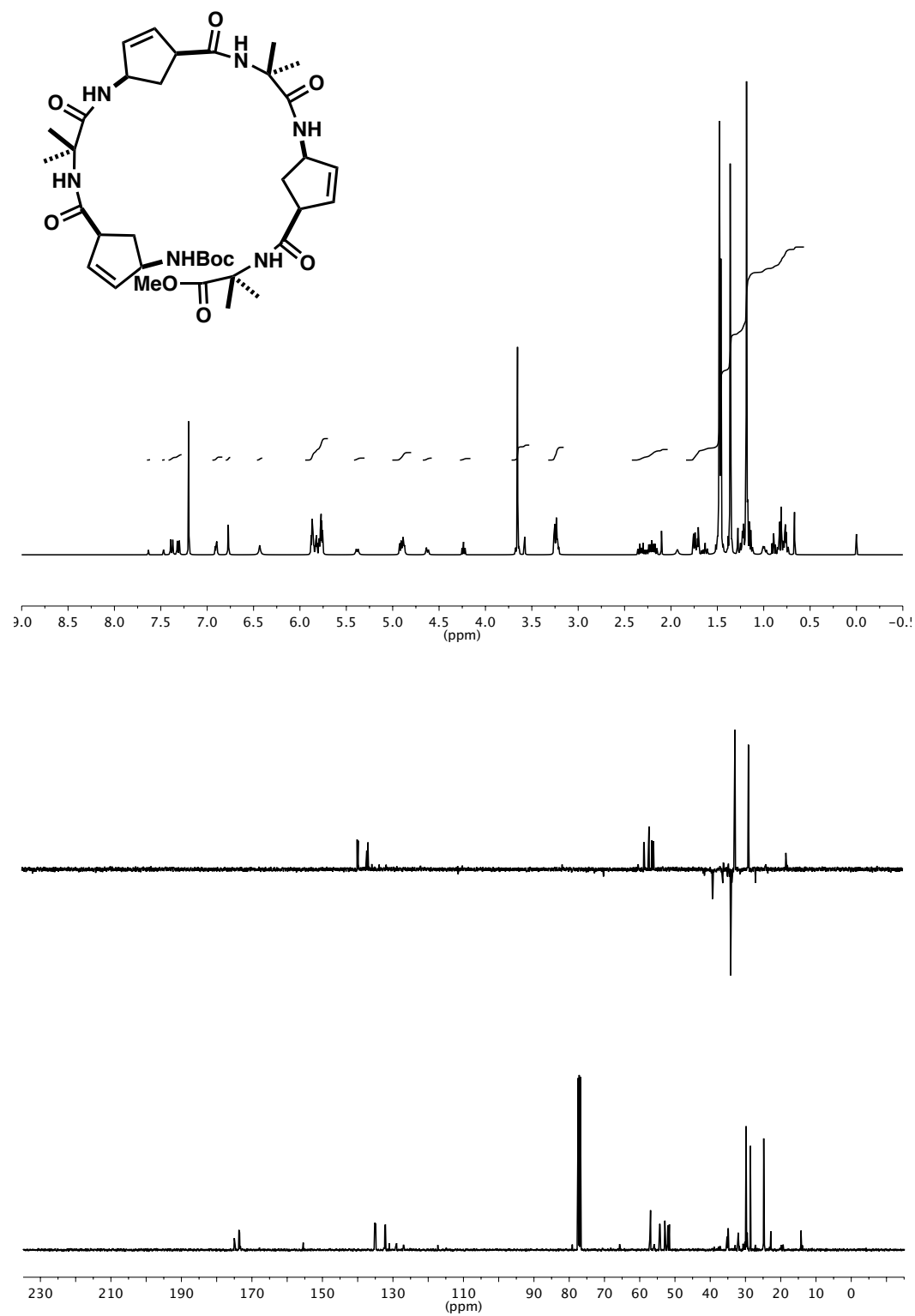


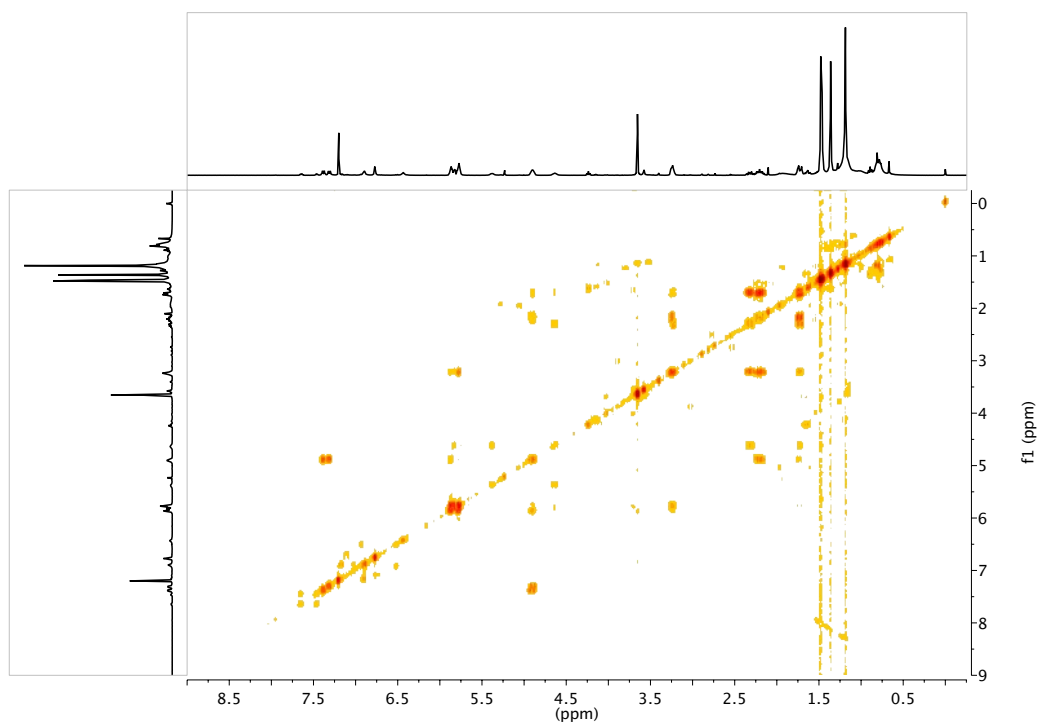


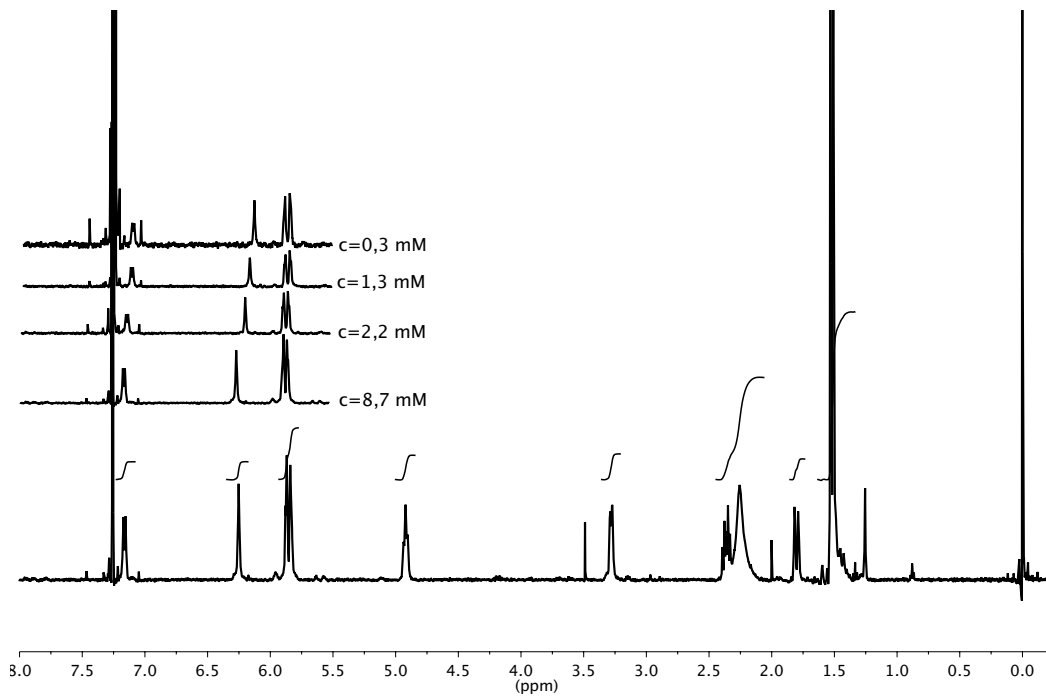
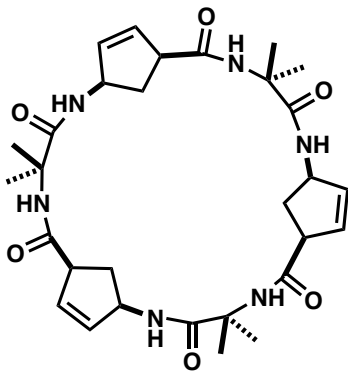


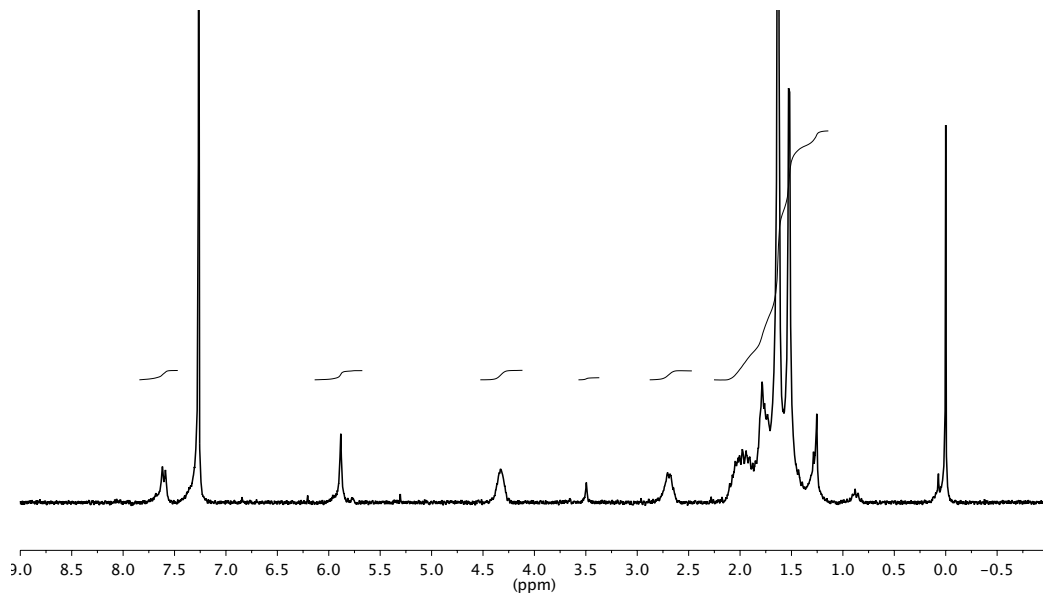
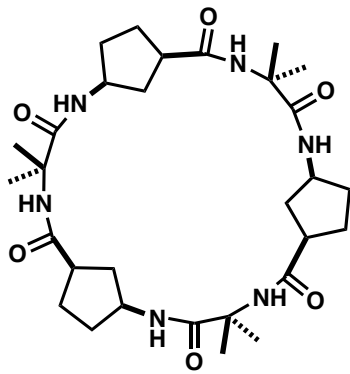






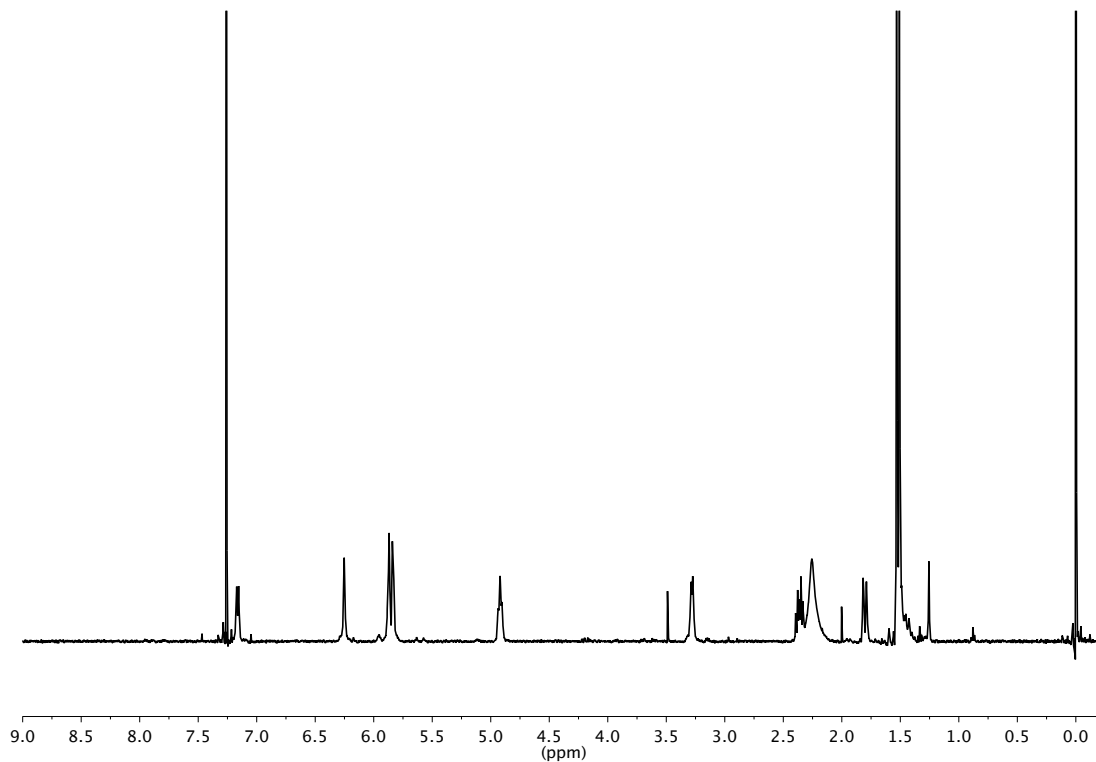




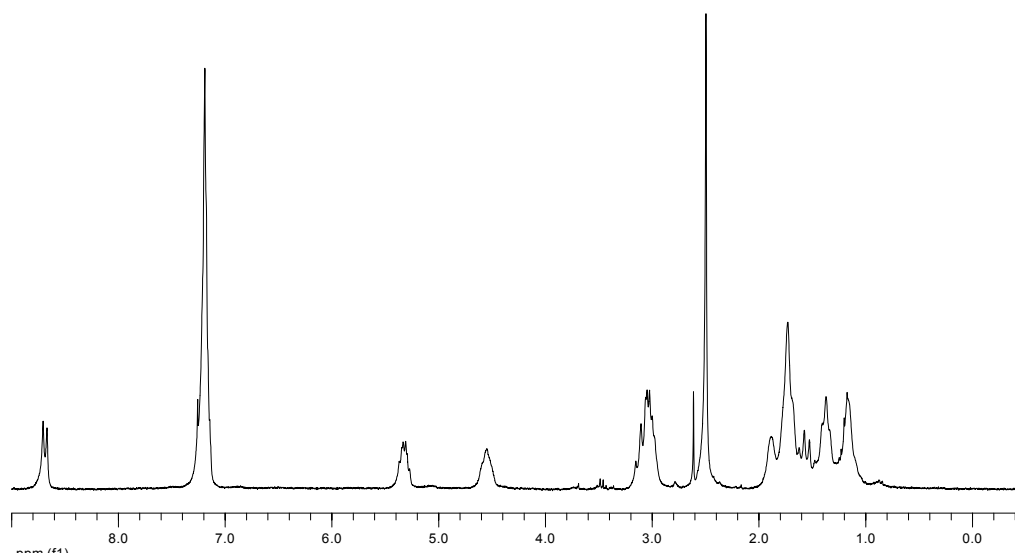


Estudios de RMN, para comprobar si tuvo lugar la formación de heterodímeros entre los CPs:  $c$ -[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>-] (**1**) y  $c$ -[(*D*-Phe-*L*- $\gamma$ -MeN-Ach)<sub>3</sub>-] (**11**):

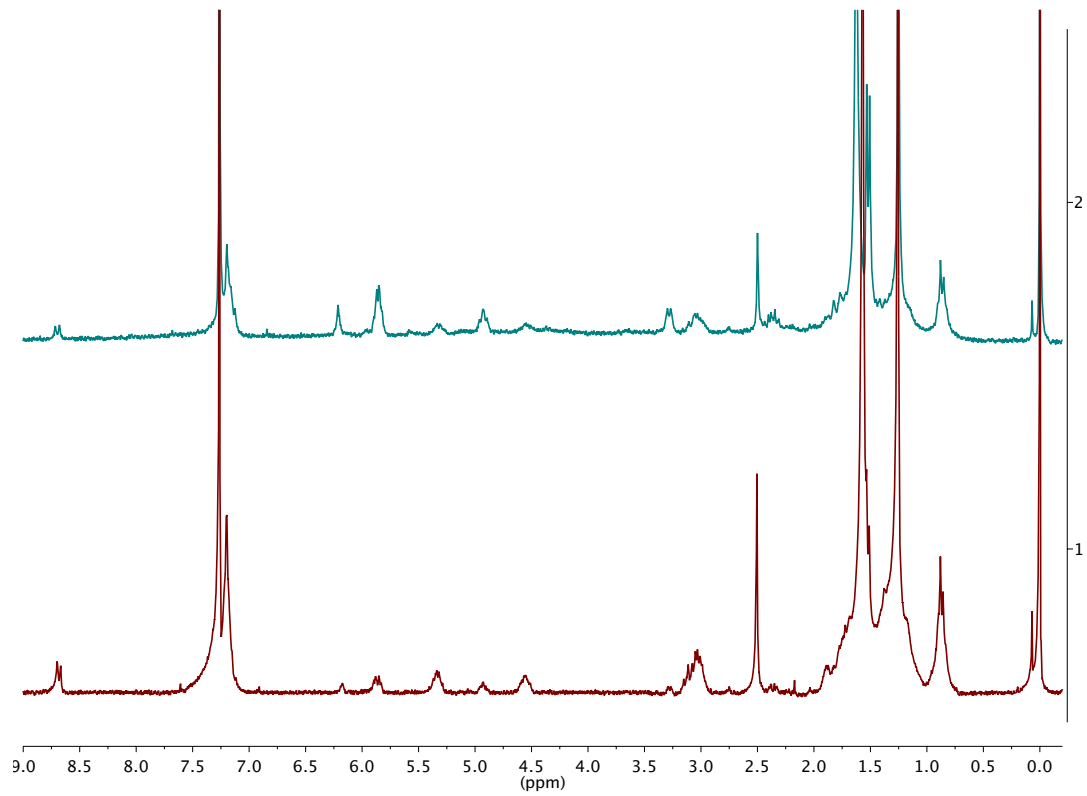
<sup>1</sup>H-RMN del  $c$ -[(*L*-Ace-Aib)<sub>3</sub>-] (**1**):

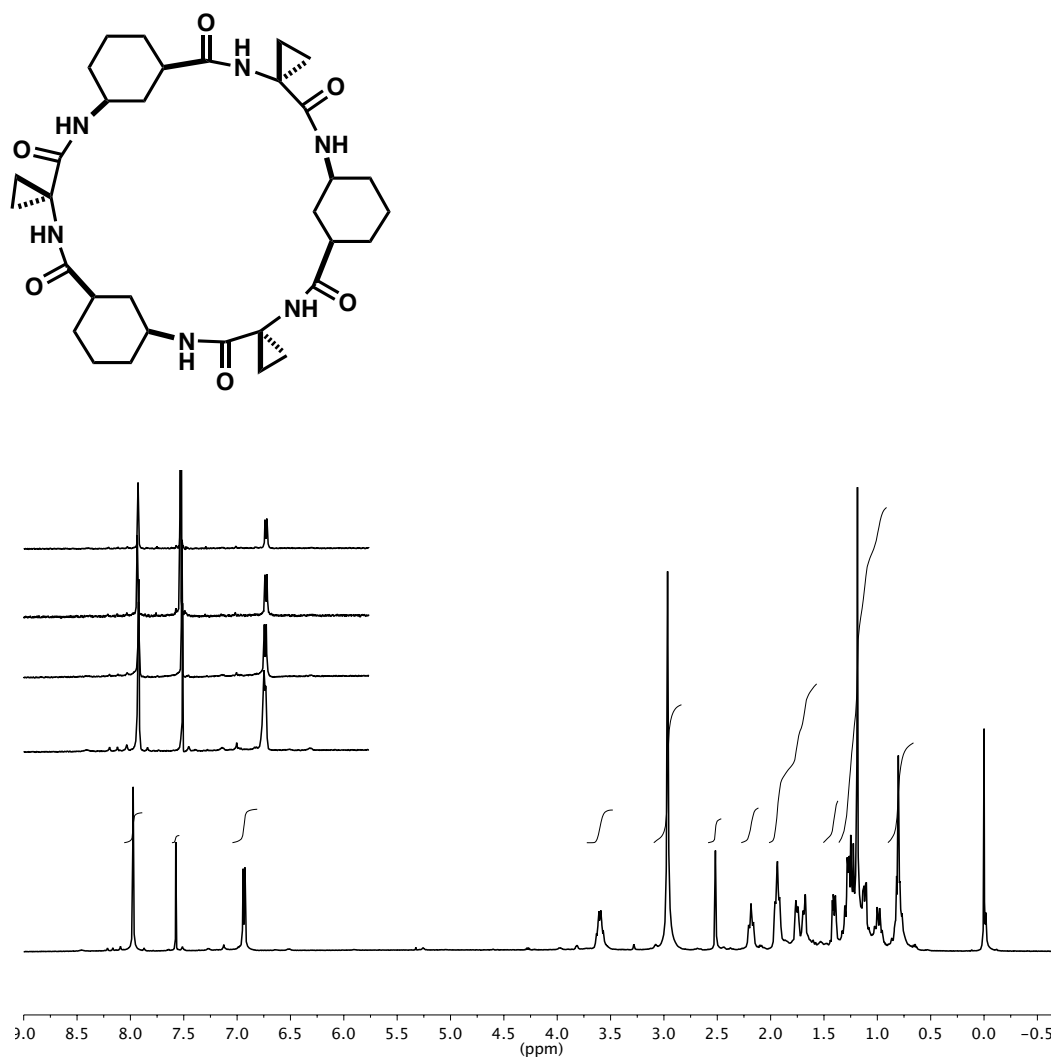


<sup>1</sup>H-RMN del  $c$ -[(*D*-Phe-*L*- $\gamma$ -MeN-Ach)<sub>3</sub>-] (**11**):

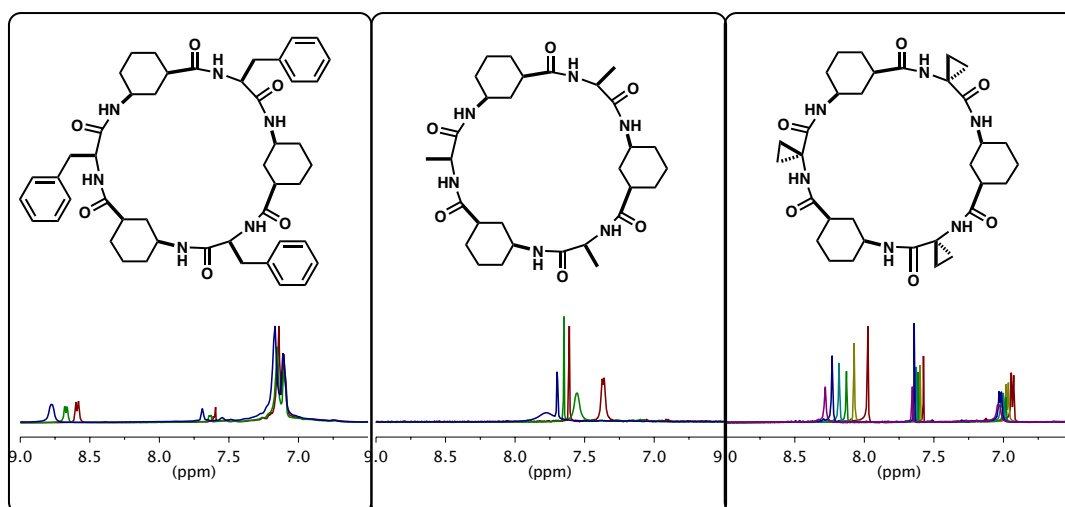


Mezcla de los dos ciclopéptidos,  $c\text{-}[(L\text{-Ace-Aib})_3\text{-}]$  (**1**) y  $c\text{-}[(D\text{-Phe-L-}\gamma\text{-MeN-Ach})_3\text{-}]$  (**11**). En el experimento 2 hay 1 equivalente de cada CP, mientras que en el experimento 2 hay 3 eq del CP **11** y 1 eq del CP **1**.

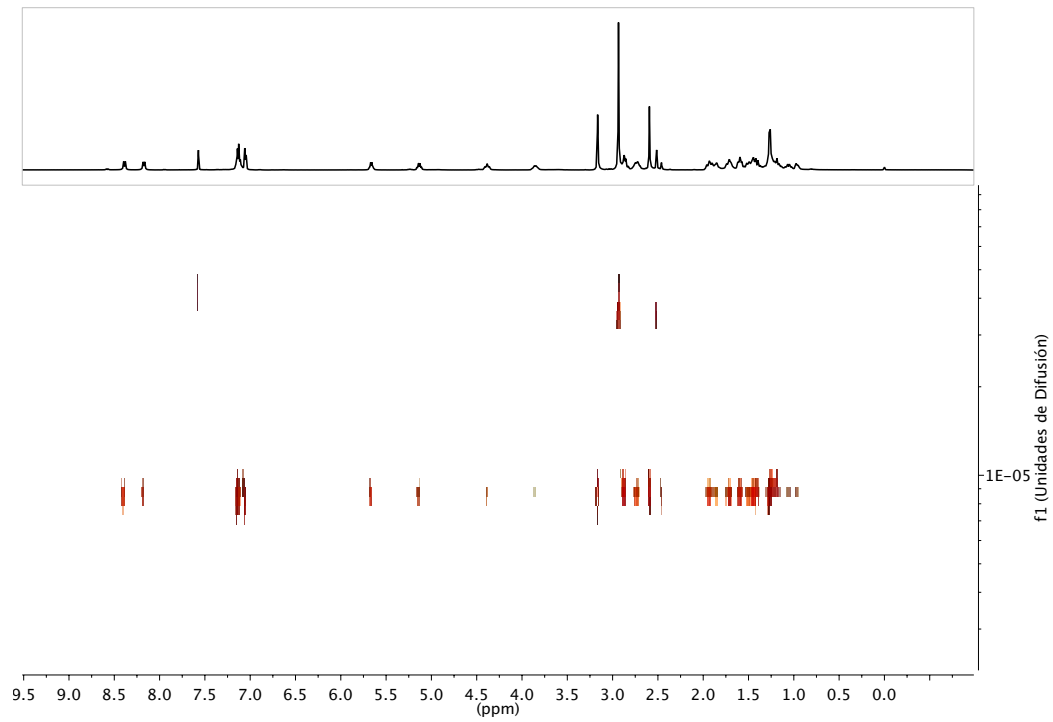




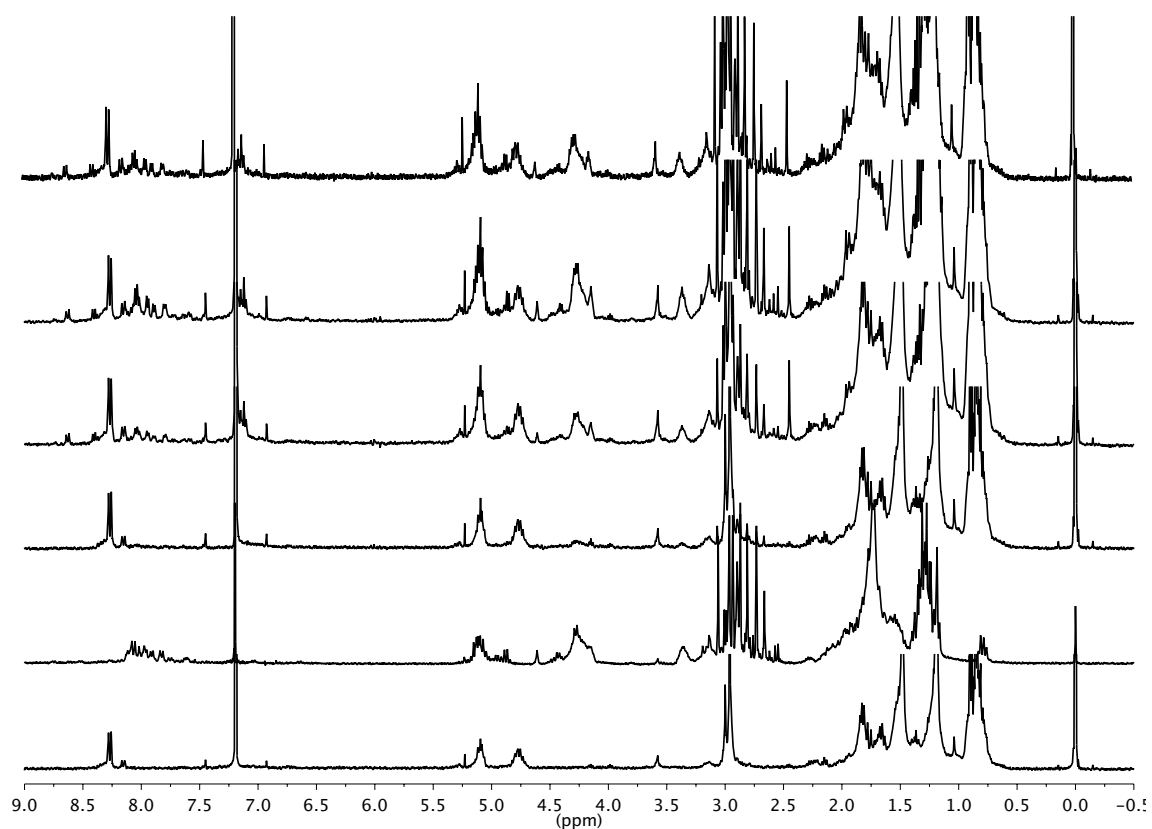
Estudios autoensamblaje a diferentes temperaturas para los ciclopéptidos:  $c$ -[(*L*-<sup>Me</sup>N-Ach-*D*-Phe)<sub>3</sub>-] (**13**),  $c$ -[(*L*-Ach-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>3</sub>-] (**14**), y  $c$ -[(*L*-Ach-Ac<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>-] (**12**).



Experimento de difusión para una mezcla de los ciclopeptidos:  $c\text{-}[(L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ach-D-Phe})_3\text{-}]$  (**13**), y el  $c\text{-}[(L\text{-Ach-D-}^{\text{Me}}\text{N-Ala})_3\text{-}]$  (**14**), la concentración de los CPs fue 5 mM.

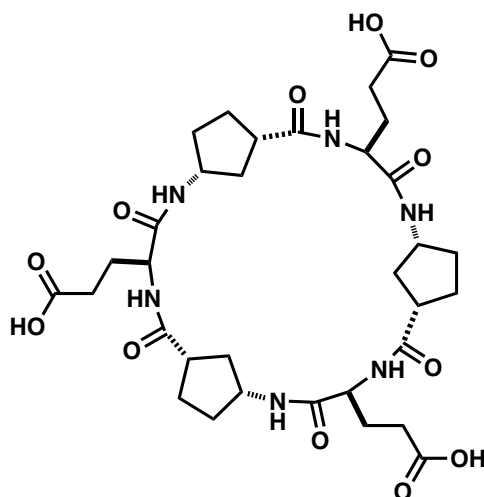


Estudios de RMN para discernir si la formación de laminas  $\beta$  es antiparalela o paralela:  
Se representan, de abajo hacia arriba, los  $^1\text{H}$ -RMN de los siguientes compuestos:  $c$ -[(*D*-<sup>Me</sup>N-Acp-*L*-Leu)<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (**23**),  $c$ -[(*D*-Acp-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (**24**), a partir de aquí los espectros se corresponden con mezclas de los 2 CPs anteriores: **23:24** (1:0.25 eq); **23:24** (1:0.5 eq); **23:24** (1:1 eq); **23:24** (1:2eq).



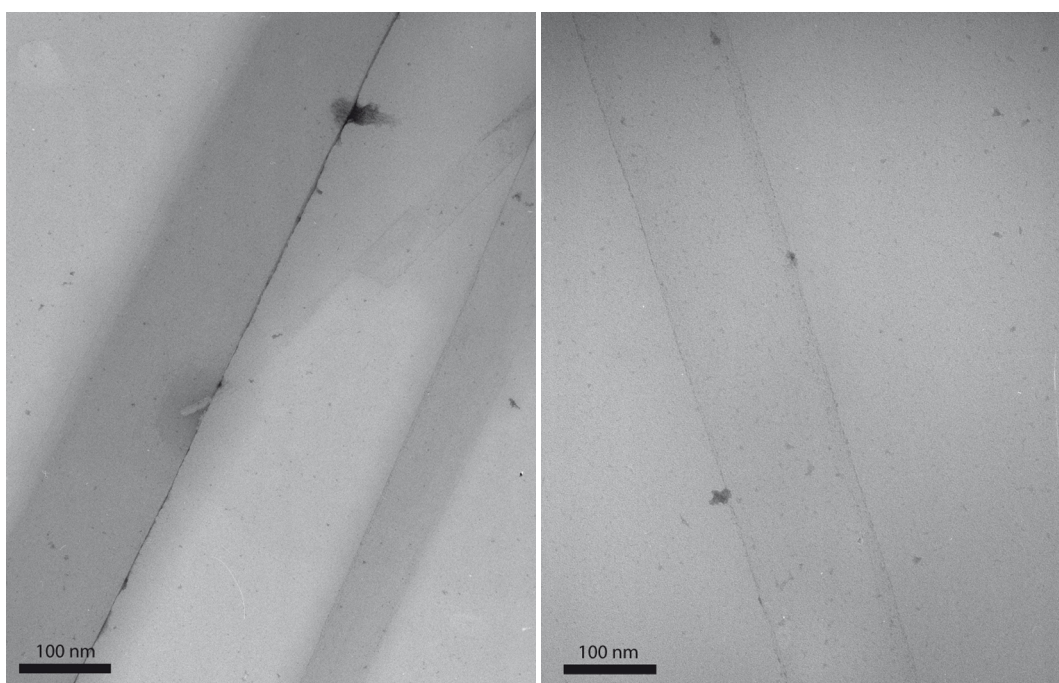
## Anexo III: Imágenes de TEM

Imágenes de TEM del ciclopeptido *c*-[(*L*-Glu-*D*-Acp)<sub>3</sub>] (16):

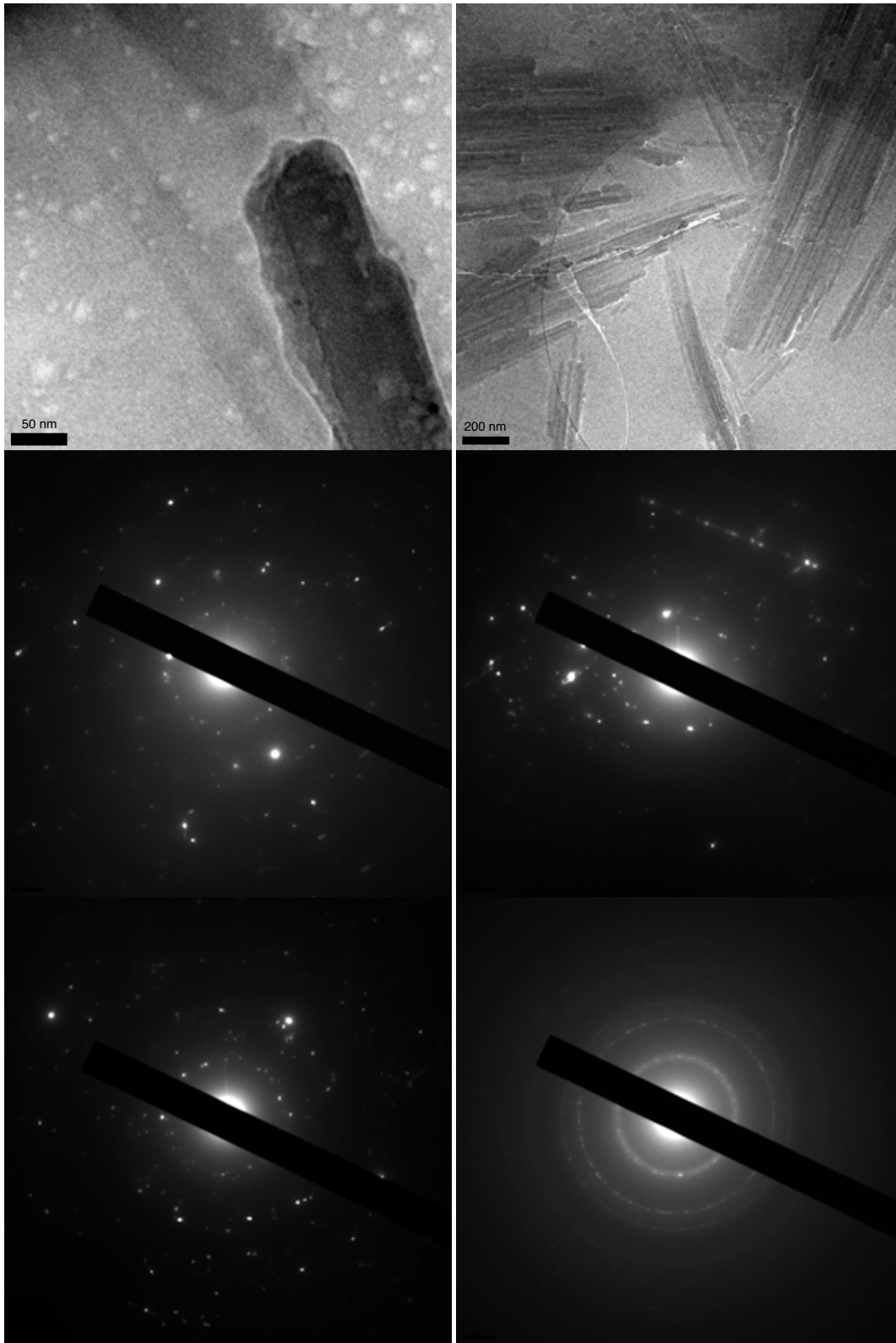


Los cristales utilizados para la adquisición de estas imágenes se obtuvieron en una disolución con tampón fosfato a pH 3.

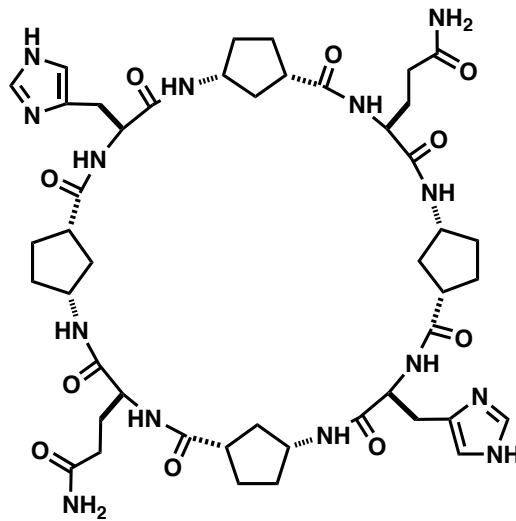
Las dos primeras fueron obtenidas mediante TEM con tinción negativa, usando una disolución de acetato de uranilo al 2%.



Las siguientes son imágenes de crio-TEM:

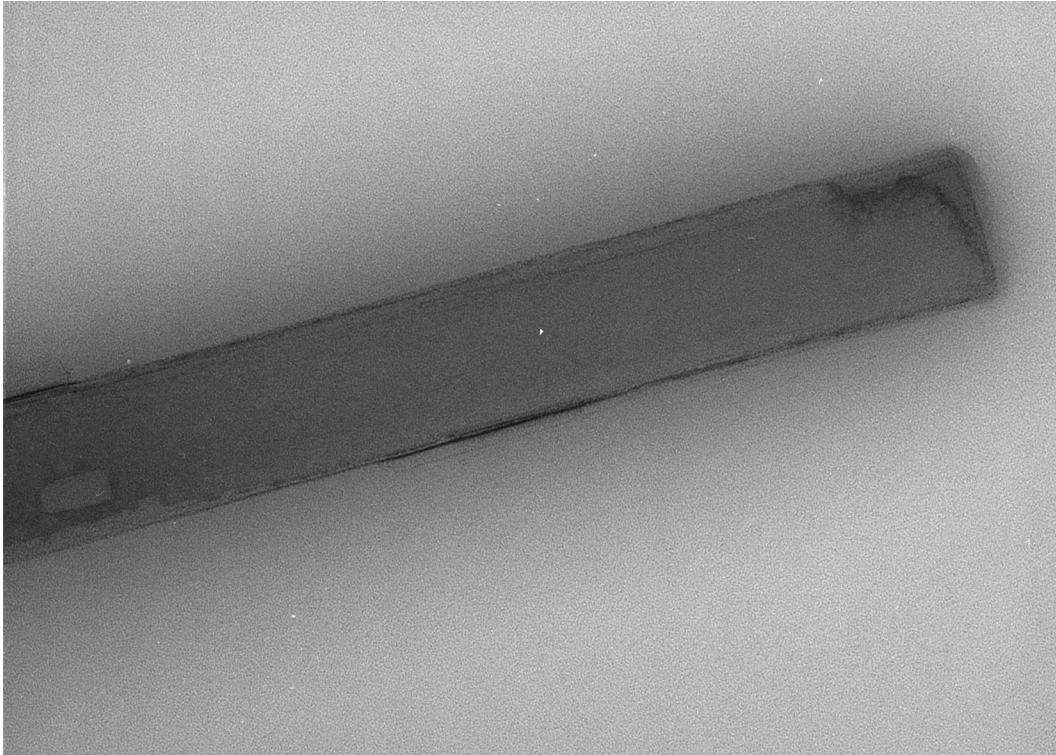


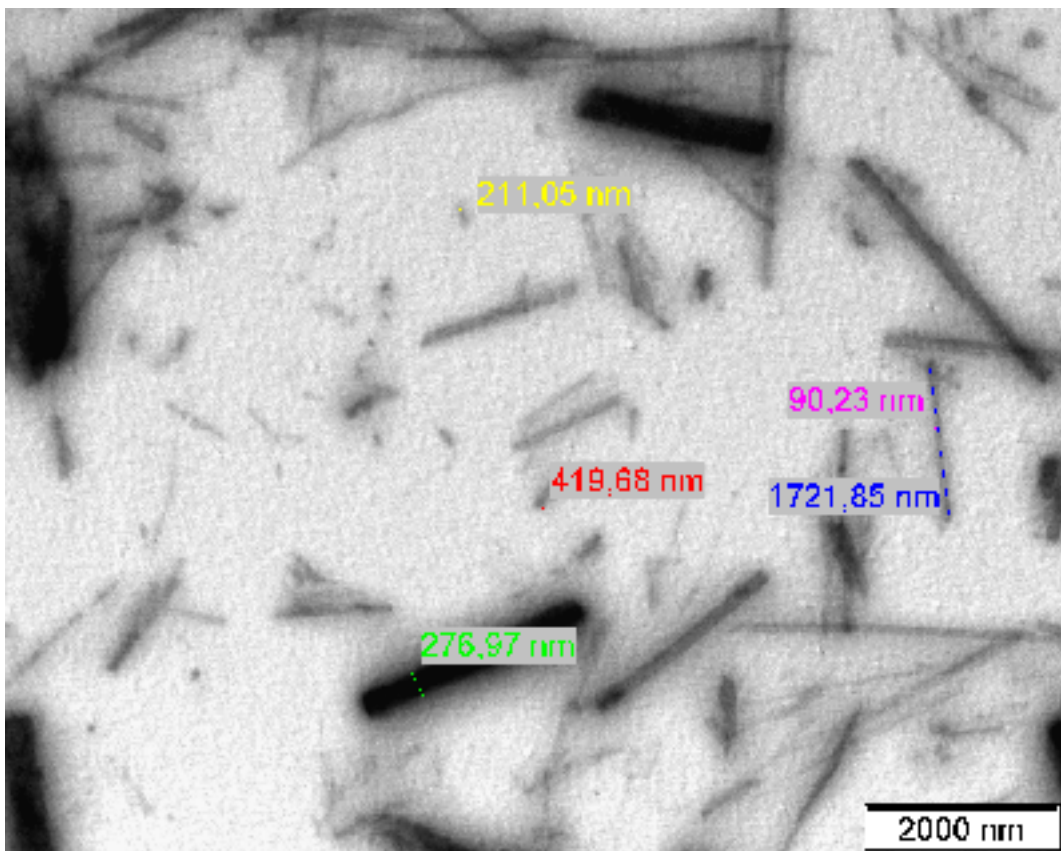
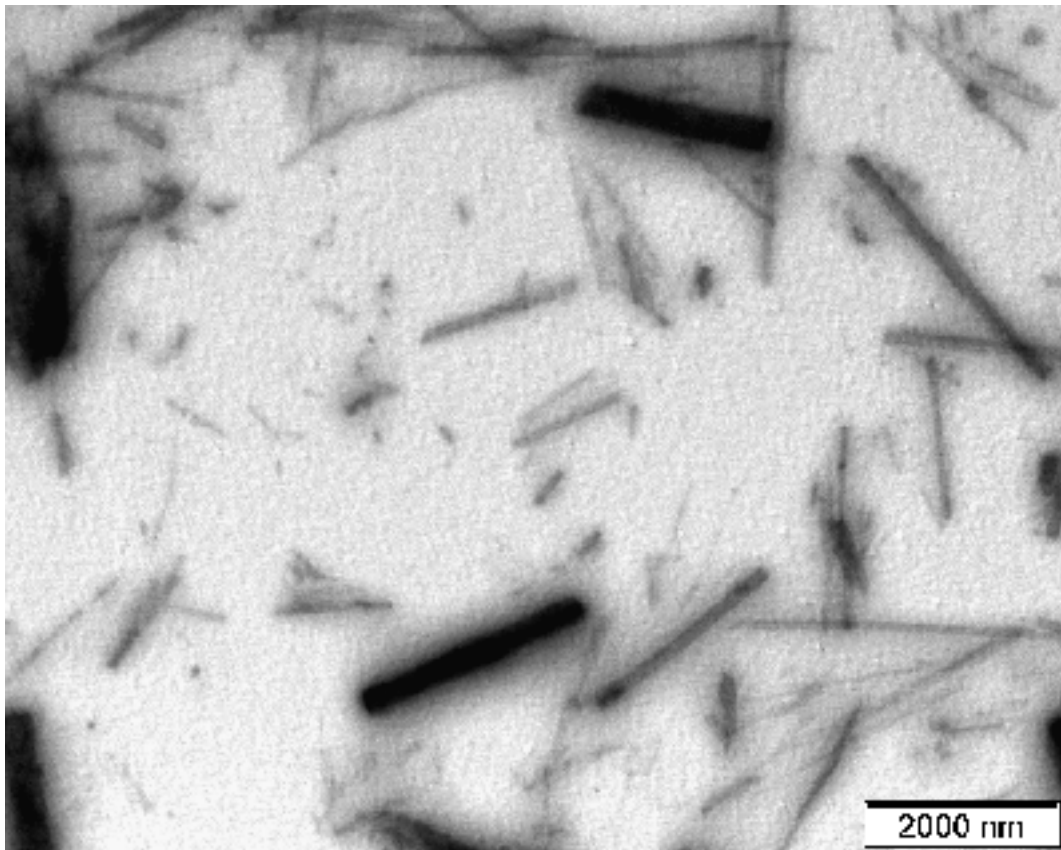
**Imágenes de TEM del ciclopeptido  $c$ -[[*L*-His-*D*-Acp *L*-Gln-*D*-Acp]<sub>2</sub>-] (20):**

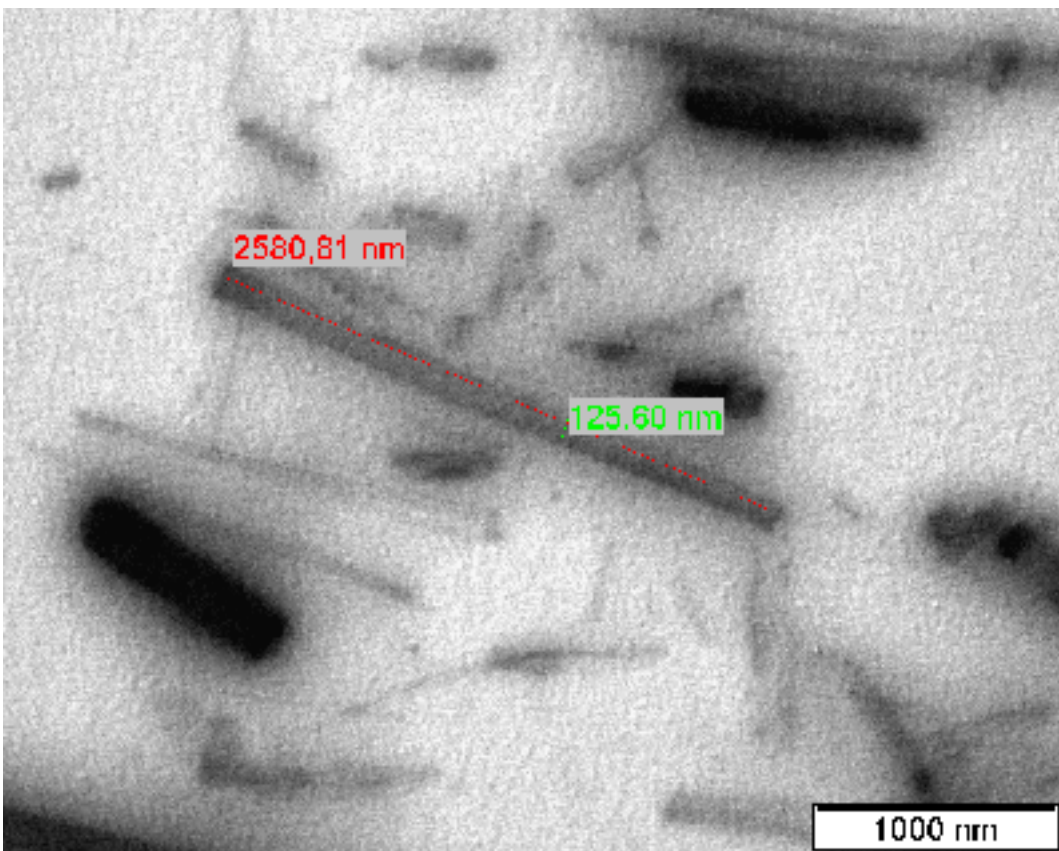
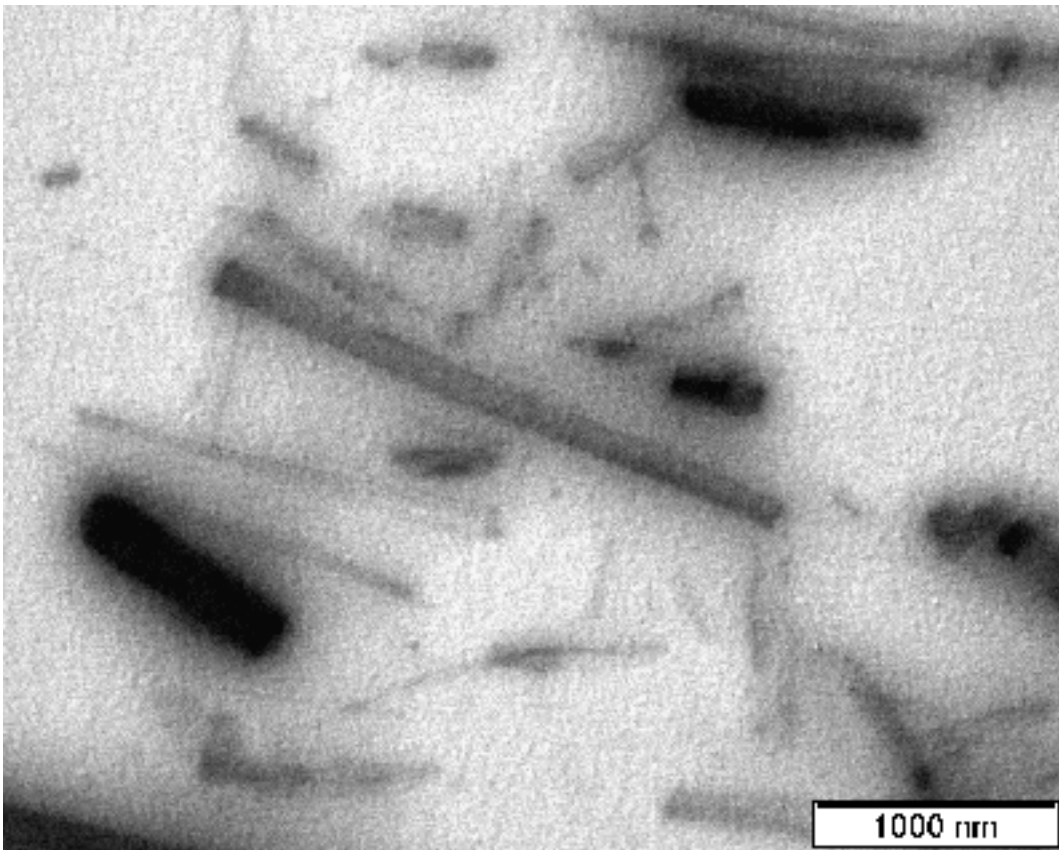


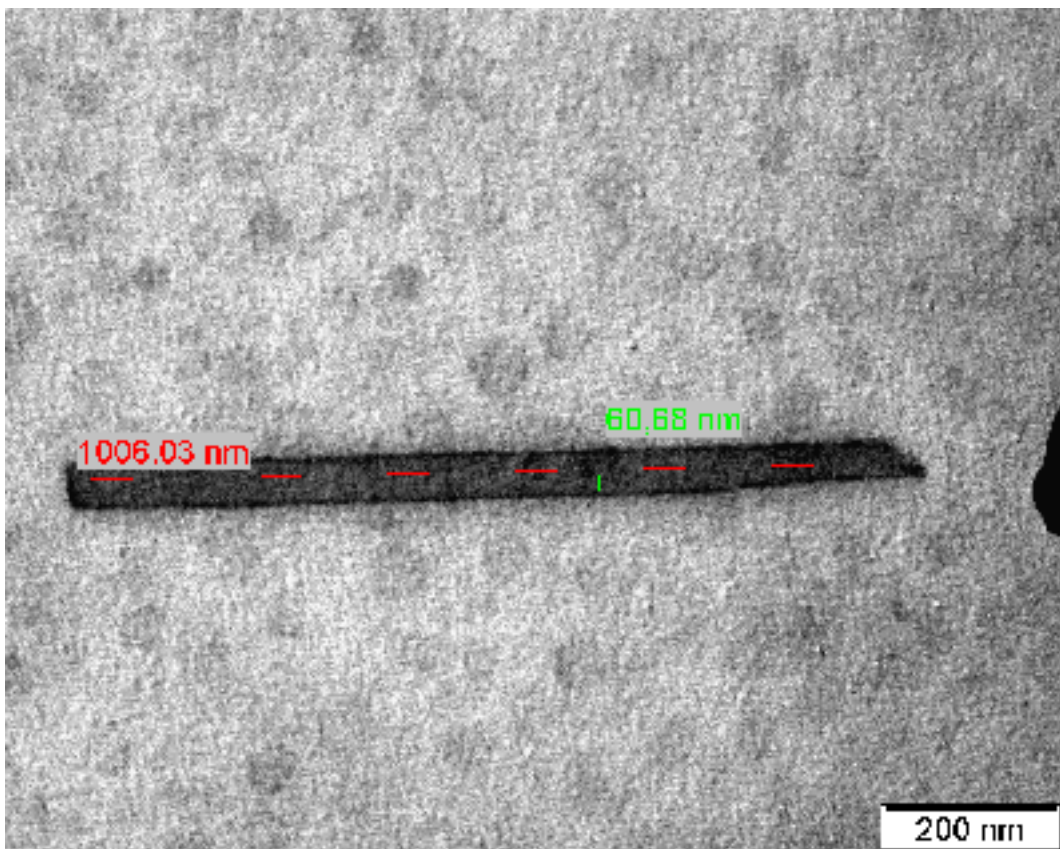
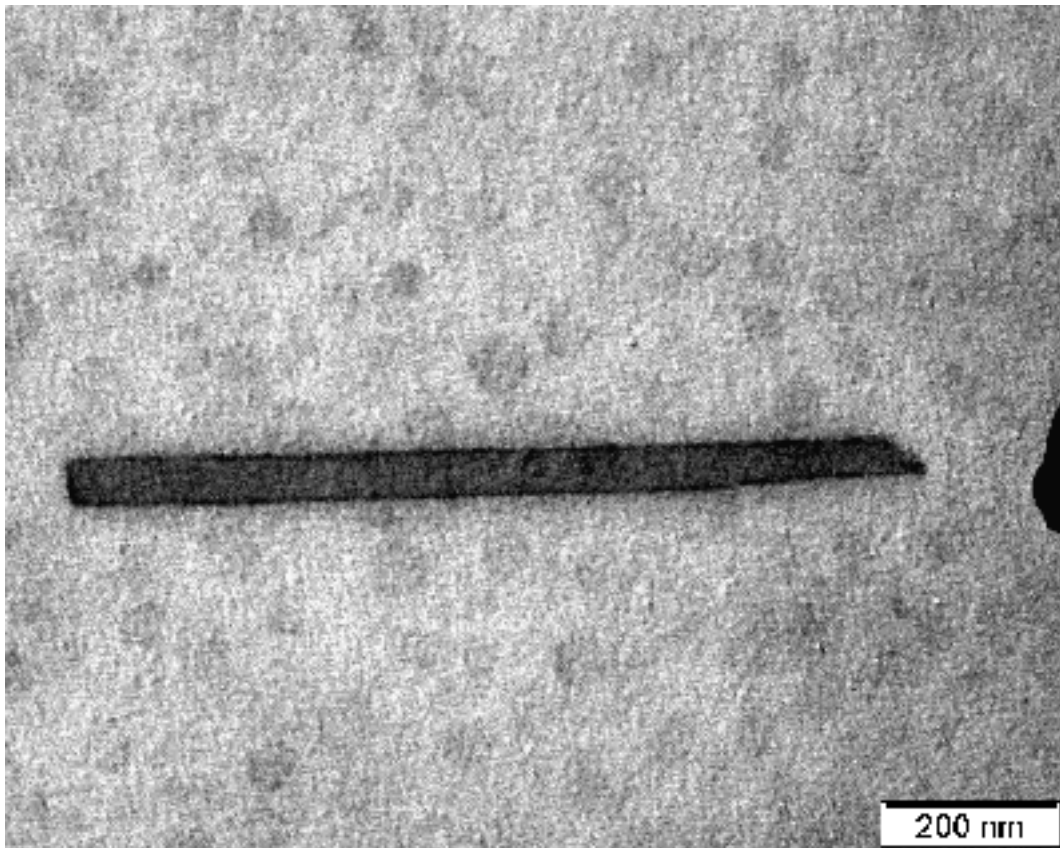
Los cristales se obtuvieron en una disolución de agua en presencia de un tampón, el TRIS·HCl, a pH 10.4.

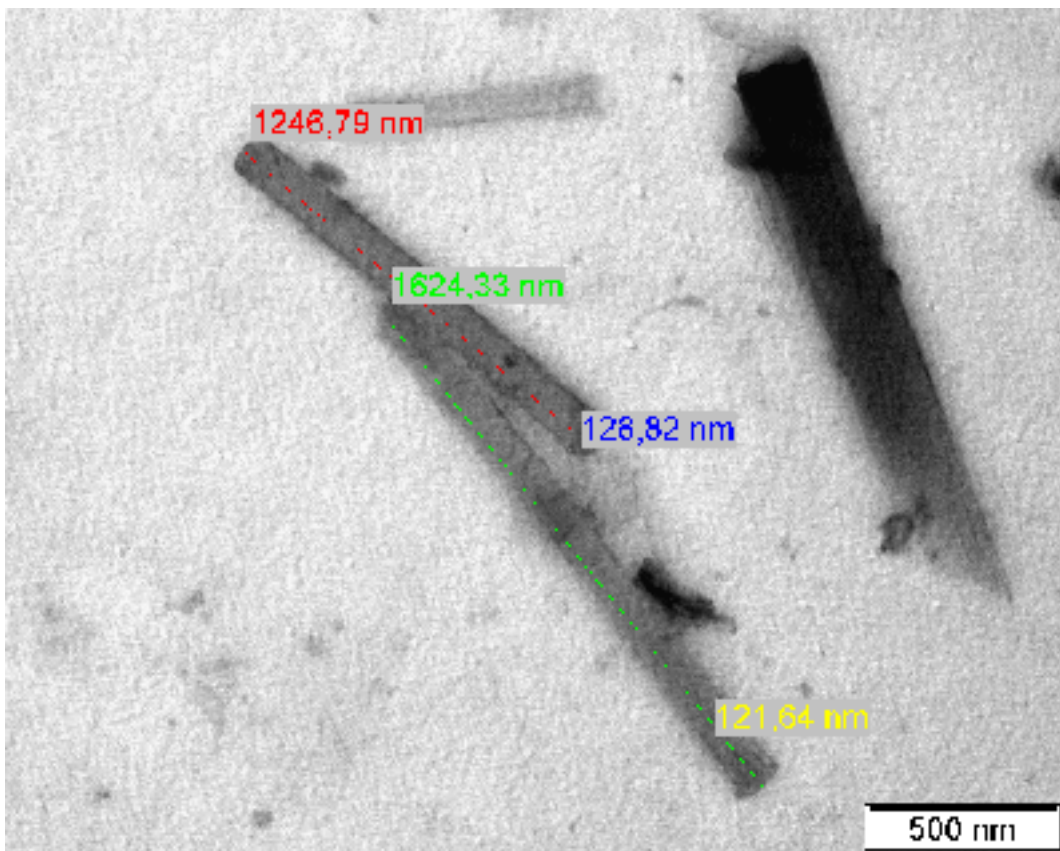
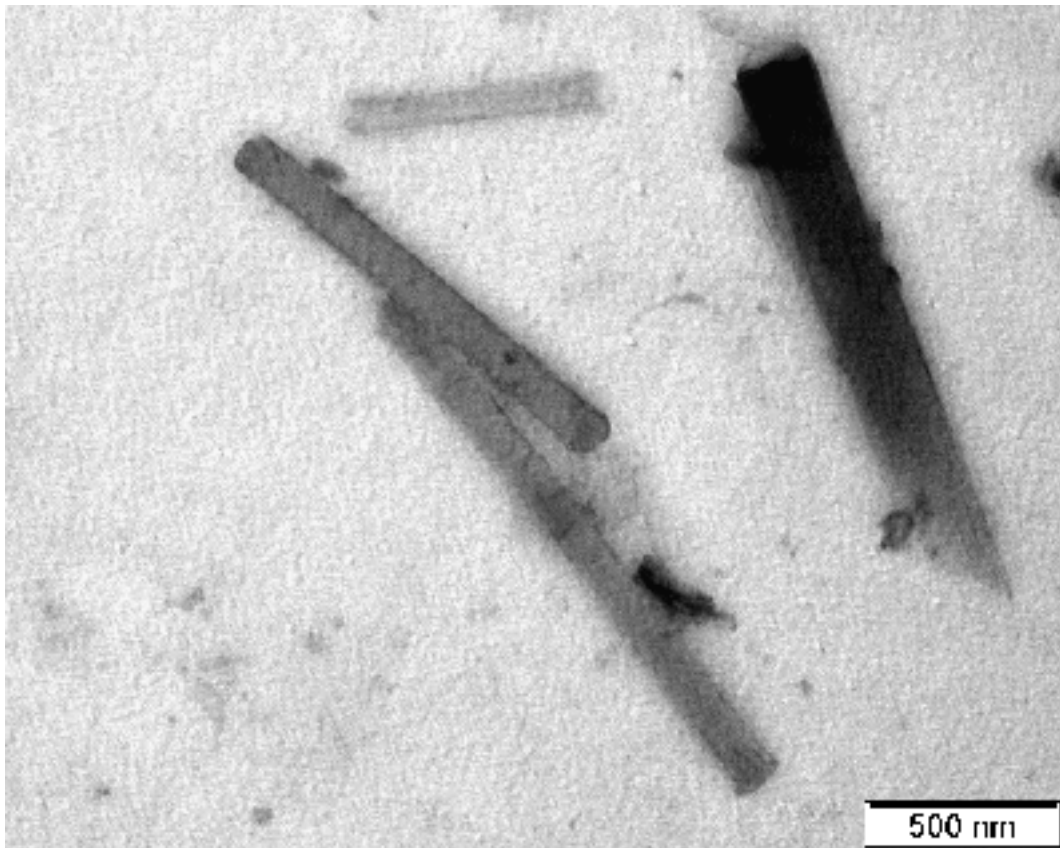
Las siguientes imágenes se obtuvieron mediante tinción negativa con una disolución de acetato de uranilo al 2%.



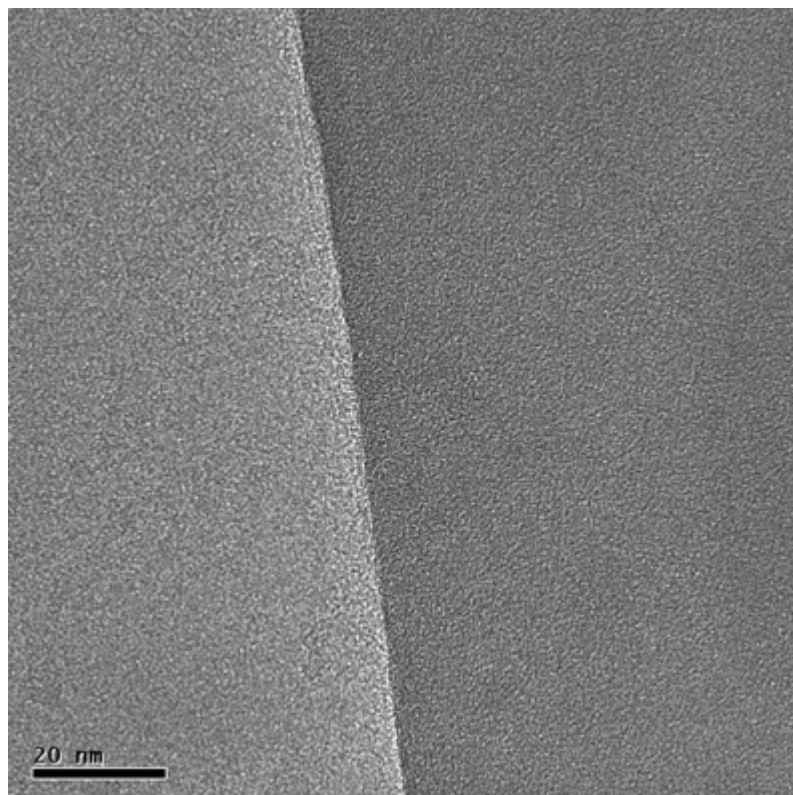
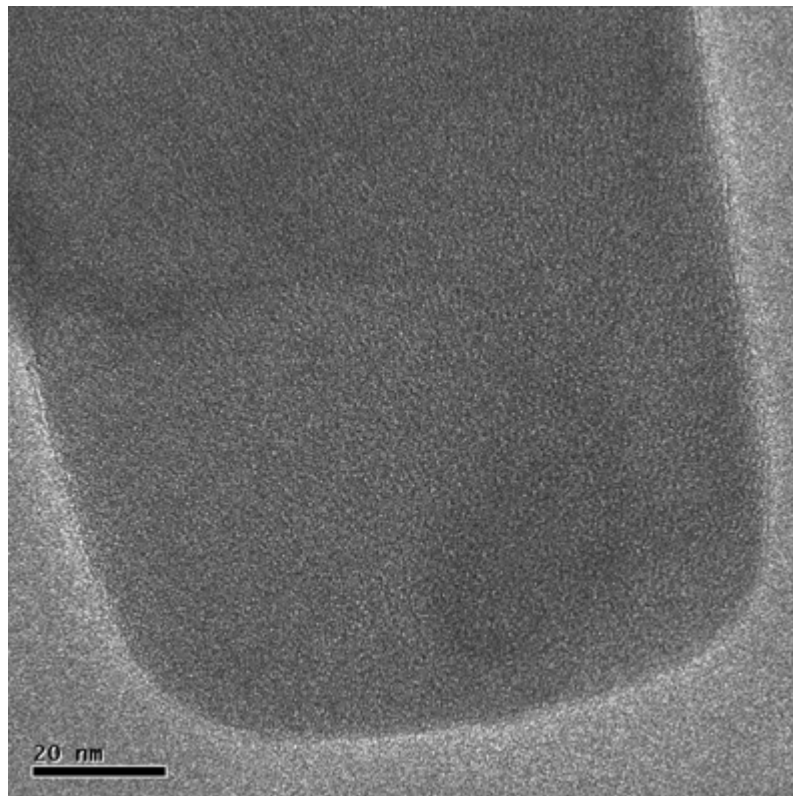








A continuación se mostrarán algunas imágenes obtenidas mediante crio-TEM:



# Towards functional bionanomaterials based on self-assembling cyclic peptide nanotubes

Roberto J. Brea, César Reiriz and Juan R. Granja\*

Received 5th June 2009

First published as an Advance Article on the web 22nd December 2009

DOI: 10.1039/b805753m

In recent years, considerable effort has been devoted to the preparation of artificial nanotubular materials. One of the most successful approaches for the construction of noncovalently bonded nanotube entities is the self-assembly of cyclic polypeptides in stacks that are stabilized by hydrogen bonds. This *tutorial review* covers the history and current situation for synthetic organic nanostructures obtained from self-assembling cyclic peptides. In particular, we describe the evolution to cyclic peptides that not only allow the modification of the outer surface but also the inner cavity by paying special attention to peptide rings that contain cyclic  $\gamma$ -amino acids. In this respect, we describe the synthesis, properties and application of a new class of homo- and heterodimeric supramolecular assemblies that are precursors of cyclic  $\alpha,\gamma$ -peptide nanotubes.

## Introduction

Nanotechnology concerns the preparation and characterization of structures on the nanometre scale and the use of such systems as novel functional materials and devices.<sup>1</sup> Nanotubes are particularly interesting because of their potential applications—sometimes inspired by the remarkable functions of natural tubular structures—in different fields such as molecular separation and transport, catalysis, optics, electronics, chemotherapy and drug delivery.<sup>2</sup> In these contexts, nanotubes have been made of zeolites, graphite, inorganic complexes, lipids and cyclodextrins.<sup>3</sup>

Great advances have been made in the area of covalently bonded nanostructures and over the past few decades special attention has been paid to noncovalently bonded nanotubes because of their significant advantages, the most noteworthy of which include high synthetic convergence, built-in error

correction, high efficiency, control through unit design and self-organization.<sup>4</sup> Several approaches for the preparation of these noncovalently assembled nanotubes have been aimed at a variety of different structures, including helically wound linear species, hollow bundles of rod-like units, helically juxtapositioned truncated wedges and stacked rings (Fig. 1).<sup>3</sup> The latter of these designs is particularly attractive because it allows precise control of the nanotube diameter, which is determined solely by the size of the unit rings and can therefore be controlled more easily than in the other cases.

Among the numerous nanostructure method concepts, the self-assembling peptide nanotubes (SPNs)<sup>5</sup> formed by stacking cyclic peptides (CPs) and stabilized by hydrogen bonds have attracted attention for some time because of the potential ease with which they can be endowed with structural and functional properties (Fig. 2). Suitable peptides are those in which the cyclic unit can adopt a flat conformation with all the amino acid side chains pointing outwards and the carbonyl and amino groups of the amide backbone groups oriented perpendicular to the ring. This approach has two crucial advantages: firstly, the diameter of the nanotube is easily controlled by varying the number of amino acid residues in

---

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: [juanr.granja@usc.es](mailto:juanr.granja@usc.es); Fax: (+34) 981595012; Tel: (+34) 981563100 - 14251



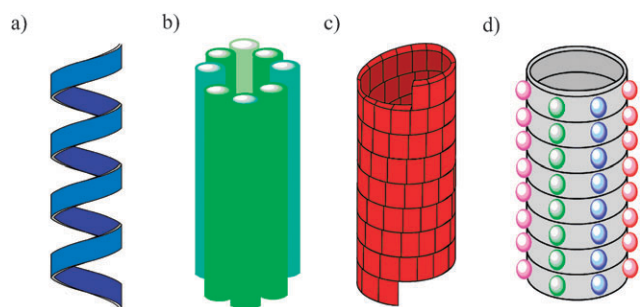
Roberto J. Brea

Roberto J. Brea received his BS degree in chemistry from the University of Santiago de Compostela, where he is now carrying out graduate studies under the supervision of Prof. Juan R. Granja. His current research focuses on the design, synthesis and applications of homo- and heterodimeric supramolecular systems based on  $\alpha,\gamma$ -cyclic peptides.



César Reiriz

César Reiriz received his undergraduate training at the University of Santiago de Compostela. He is currently working towards his PhD in chemistry under the direction of Prof. Juan R. Granja. His research interests are focused on the preparation of a new class of self-assembling peptide nanotubes.



**Fig. 1** Strategies for the self-organization of simple components as tubular structures. (a) Coiling of helical molecules. (b) Assembly of rod-like molecules. (c) Assembly of sector molecules. (d) Stacking of macrocycles.

each ring and, secondly, the properties of the outer surface of the nanotube can easily be modified by varying the amino acid side chains. Appropriate design of the cyclic unit and optimization of self-assembly conditions allows the preparation of nanotubes to be tailored for specific applications.

## Tubular ensembles of cyclic D,L- $\alpha$ -peptides

### Preliminary studies

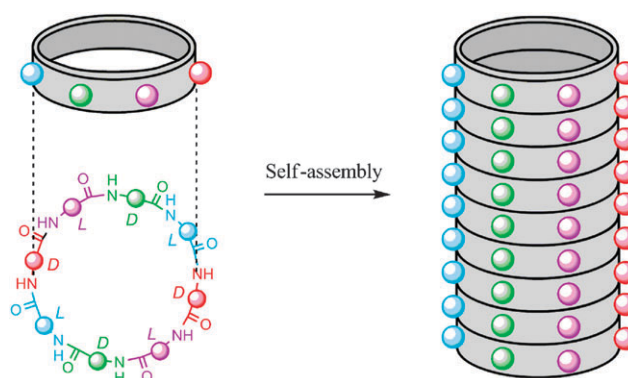
In 1974, within the context of a theoretical analysis, De Santis *et al.* concluded that peptides comprised of an even number of alternating D- and L-amino acid residues with conformationally equivalent  $\beta$ -type dihedral angles would form closed rings capable of stacking through backbone-backbone hydrogen bonding.<sup>6</sup> Initial attempts to demonstrate these predictions experimentally were inconclusive because of the poor solubility of the peptides employed.<sup>7</sup> However, in 1993 Ghadiri and co-workers took advantage of a strategy based on pH variation to control the nanotube formation.<sup>8</sup>



**Juan R. Granja**

*Juan R. Granja received his PhD in chemistry from the University of Santiago de Compostela under the guidance of Profs. Antonio Mouriño and Luis Castedo. After a two-year postdoctoral stint in the group of Prof. Barry M. Trost at Stanford University, he returned to the University of Santiago de Compostela as Assistant Professor. After several periods as a visiting scholar in the group of Prof. M. Reza Ghadiri at the Scripps Research Institute, working on different aspects of self-assembling peptides, he started a program at the University of Santiago on the design, synthesis and applications of peptide nanotubes. He is presently Full Professor at the University of Santiago de Compostela, where he leads an interdisciplinary group focused on the design of artificial self-assembling peptide systems and the construction of polycarbocyclic systems of biological interest by organometallic catalyzed tandem processes.*

*Juan R. Granja received his PhD in chemistry from the University of Santiago de Compostela under the guidance of Profs. Antonio Mouriño and Luis Castedo. After a two-year postdoctoral stint in the group of Prof. Barry M. Trost at Stanford University, he returned to the University of Santiago de Compostela as Assistant Professor. After several periods as a visiting scholar in the group of Prof. M. Reza Ghadiri at the Scripps Research Institute,*

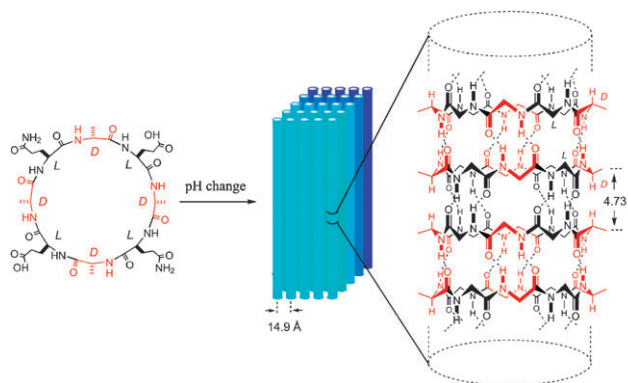


**Fig. 2** Schematic representation of nanotube formation from CPs.

### Microcrystalline peptide nanotubes: solid-state studies

The first well-characterized peptide nanotube was prepared using the octapeptide *cyclo*-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)<sub>2</sub>], which was chosen to impart solubility in basic aqueous solution and thereby to prevent premature subunit association through coulombic repulsion.<sup>8</sup> Controlled acidification produced microcrystalline aggregates that were fully characterized by electron microscopy, electron diffraction, FT-IR spectroscopy and molecular modelling. These analyses convincingly established the expected structure in which the cyclic units stacked through antiparallel  $\beta$ -sheet hydrogen bonding to form ordered hollow tubes with internal diameters of 7.5 Å and distances between ring-shaped subunits of 4.73 Å (Fig. 3). More recently, Lambert and co-workers employed a similar pH-controlled self-assembly strategy to prepare nanotubular microcrystals of a cyclic D,L- $\alpha$ -octapeptide containing two aspartic acid units.<sup>10</sup>

With the aim of improving nanotube characterization, Ghadiri's group also prepared solid-state nanotubular assemblies using several uncharged cyclic D,L- $\alpha$ -octapeptides and explored the effects of intertubular hydrophobic packing interactions on crystal formation.<sup>11</sup> More recently, Undén's group demonstrated heteromeric nanotube formation from enantiomeric pairs of CPs.<sup>12</sup> The use of the bulky amino acid *tert*-leucine (TLe) prevents one enantiomer from self-assembling into



**Fig. 3** Proton-controlled self-assembly process for the preparation of microcrystalline aggregates of nanotubes composed of *cyclo*-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)<sub>2</sub>].

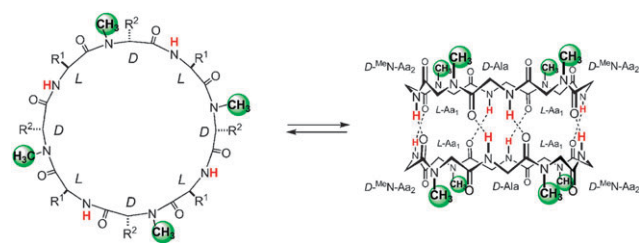
the corresponding SPN because of steric clashes between near-neighbour homochiral residues of TLe, but in the presence of its enantiomer this system readily forms nanotubes.

Dodecapeptide *cyclo*-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)<sub>3</sub>]- also underwent proton-triggered self-assembly in a similar manner to that described above for the octapeptide homologue.<sup>9</sup> The resulting microcrystalline aggregates consist of nanotube bundles with an internal diameter of 13 Å. This finding confirmed that the nanotube internal diameter can be controlled by simply varying the number of amino acid residues in the peptide ring.

### Dimerization: solution-phase studies

The association of CPs in water has recently been explored by Karlström and Undén using a fluorescence-quenching assay, which confirmed that this kind of association also occurs in solution and is not just a consequence of the crystallization process.<sup>13</sup> In order to gain a better understanding of the stacking interactions, dimeric motifs were achieved by selective backbone *N*-alkylation of amino acids of the same chirality. This avoids complications associated with unlimited stacking and only allows the formation of the corresponding two-ring structures because all of the *N*-methyl groups point towards the same face of the peptide ring (Fig. 4). In 1994, Lorenzi's group reported an X-ray crystallographic study of the *N*-methylated hexapeptide *cyclo*-[(D-Leu-L-MeN-Leu)<sub>3</sub>]-, which showed the expected dimeric antiparallel  $\beta$ -sheet structure in the solid state, while NMR investigations revealed that the peptide dimerized in deuteriochloroform with an association constant ( $K_a$ ) of 80 M<sup>-1</sup>.<sup>14</sup> Independent work carried out in Ghadiri's laboratory demonstrated analogous solution and solid-state dimerization by octapeptide *cyclo*-[(L-Phe-D-MeN-Ala)<sub>4</sub>]-, but in this case the  $K_a$  values were higher (2540 M<sup>-1</sup>).<sup>15</sup> However, cyclic D,L- $\alpha$ -deca- and -dodecapeptides fail to dimerize because of the difficulty in adopting the required flat conformation.<sup>12,15</sup>

Studies of side chain–side chain interactions have shown that CPs containing homophenylalanine can be used to induce crystal growth through the prevalent effect of dimer formation.<sup>16</sup> Dimeric structures have also enabled easy comparison of the stabilities of parallel and antiparallel  $\beta$ -sheet structures in solution, showing that antiparallel orientations are 0.8 kcal mol<sup>-1</sup> more stable than the parallel counterparts.<sup>17</sup> Further confirmation of  $\beta$ -sheet-type hydrogen bonding was obtained by covalent consolidation of non-covalently constituted CP dimers.<sup>18</sup>



**Fig. 4** Schematic representation of the antiparallel  $\beta$ -sheet structure of a dimeric tubulet composed of cyclic D,L- $\alpha$ -octapeptide subunits.

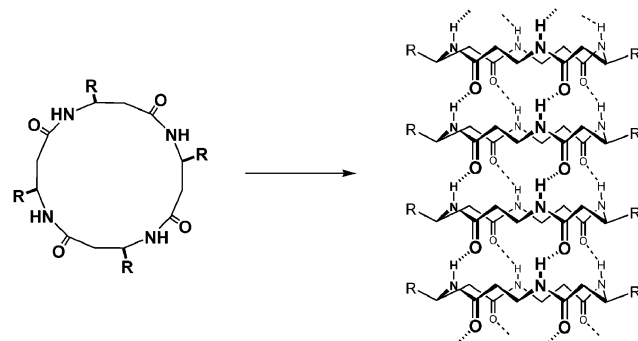
### Tubular ensembles of cyclic $\beta$ -peptides

The ability of  $\beta$ -peptides to resist enzymatic degradation and their favourable conformational properties suggest that such peptides may have interesting applications in different fields.<sup>19</sup> The first designs of peptide nanotubes composed totally of  $\beta$ -amino acids were developed by Seebach.<sup>20</sup> Molecular modelling and X-ray analysis showed that, in the solid state, cyclic tetrapeptides composed of chiral  $\beta^3$ -amino acid residues can adopt flat-ring conformations and stack to form nanotubes as previously described for D,L- $\alpha$ -CPs (Fig. 5). In the case of  $\beta$ -peptides such a conformation can be achieved with CP units composed of homochiral  $\beta$ -amino acid residues as well as with rings of residues of alternating chirality. Exhaustive studies demonstrated that *cyclo*-[( $\beta^3$ -HALa)<sub>4</sub>]- adopted a flat conformation and each subunit stacked through four hydrogen-bonding interactions to give an inner pore with a diameter of approximately 2.6 Å.

Ghadiri's group also studied the self-assembly process of several  $\beta^3$ -CPs and focused on their application in lipid bilayers to form efficient ion channels.<sup>21</sup> More recently, Kimura and co-workers reported the design, synthesis and conformation of a novel class of  $\beta$ -CPs constituted by sugar derived amino acids. The resulting columnar molecular assembly is endowed with affinity sites for proteins (particularly lectins), leading to the construction of a double assembly system composed of lectins as the shell and the  $\beta$ -peptide nanotube as the core template.<sup>22</sup>

### Tubular ensembles of CPs containing $\gamma$ -amino acid residues

A new self-assembling peptide with novel structural and internal cavity properties was reported by Granja's group. These structures are based on hybrids of  $\alpha$ - and cyclic  $\gamma$ -amino acids in which the cycloalkane ring ensures that the peptide backbone has the flat conformation required for the peptide ring to be stackable. In addition, the projection of one of the cycloalkane methylenes into the lumen creates a hydrophobic region. Previous self-assembling nanotubes display a wide range of structural and functional capabilities that have enabled their application in biological as well as materials science (*vide infra*).<sup>3,5</sup> Some of these properties are due to the hydrophilic character of the inner pore, but to improve these properties it is envisaged that some functional groups must be



**Fig. 5** Self-assembly of cyclic  $\beta$ -peptide units as a nanotube.

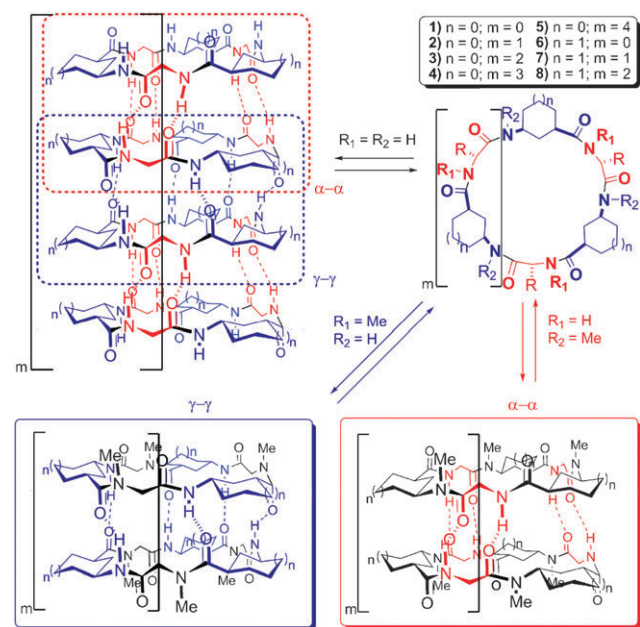
introduced on the inner face. Unfortunately, it is not possible in  $\alpha$ - or  $\beta$ -nanotubes to modify the pore properties because all of the amino acid side chains lie on the exterior of the ensemble and additional modification at  $C_\alpha$  or  $C_\beta$  would disrupt the tube formation process.<sup>23–25</sup>

## Design

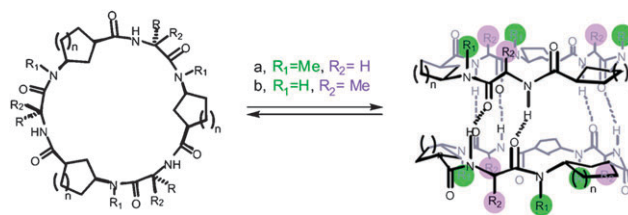
$\alpha,\gamma$ -CPs, such as **1**, adopt the conformation in which the peptide backbone is essentially flat and the C=O and N–H groups lie roughly perpendicular to the plane only when the (1*R*,3*S*)-3-aminocycloalkanecarboxylic acid ( $\gamma$ -Aca-OH) is alternated with a *D*- $\alpha$ -amino acid (*D*- $\alpha$ -Aa). This  $\alpha$  and  $\gamma$  alternation means that the  $\alpha,\gamma$ -CP has the  $\gamma$ -Aca NH and C=O groups on one face (the  $\gamma$ -face) and the *D*- $\alpha$ -Aa amide groups on the other (the  $\alpha$ -face), and due to the different HN...C=O spacings on the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -faces, the orientations of the rings must alternate so that  $\alpha$ -faces bond to  $\alpha$ -faces and  $\gamma$ -faces to  $\gamma$ -faces, in each case through the formation of an antiparallel  $\beta$ -sheet-like set of hydrogen bonds (Fig. 6). In order to establish and evaluate the feasibility and the thermodynamic properties of such nanotubes, dimers featuring each of the two hydrogen-bonding patterns described above were prepared.

## Homo- and heterodimer formation

Dimers featuring each of the two hydrogen-bonding patterns were obtained from CPs in which hydrogen bond donation from one face of the ring structure was blocked by *N*-methylation (Fig. 7a),<sup>23</sup> although other alternatives such as  $\alpha,\alpha$ -dialkylated  $\alpha$ -amino acids have also been used.<sup>25</sup> The axially oriented alkyl groups (*N*- or  $\alpha$ -alkyl) block peptide aggregation by preventing the formation of extensive  $\beta$ -sheet-like hydrogen-bonding networks that are characteristic of peptide nanotubes (Fig. 7b).



**Fig. 6** Design for SPNs composed of *cyclo*-[(*D*- $\alpha$ -Aa-(1*R*,3*S*)- $\gamma$ -Aca)<sub>x</sub>] ( $x = 2$ –6). Dimer models of the two hydrogen-bonded patterns are shown at the bottom of the figure. Amino acid side chains have been omitted for clarity.

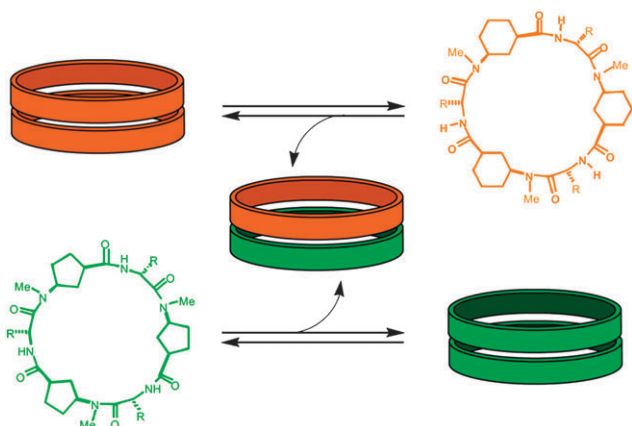


**Fig. 7** Strategies for the selective blocking of nanotube formation. (a) Dimeric structure prepared employing *N*-methyl  $\gamma$ -amino acids. (b) Dimer model obtained using  $\alpha,\alpha$ -dialkylated- $\alpha$ -amino acids.

Initially, *N*-methylated cyclic hexapeptides **7** were prepared using 3-aminocyclohexanecarboxylic acid ( $\gamma$ -Ach-OH).<sup>23</sup> To study the  $\gamma$ - $\gamma$  interaction *N*-methyl  $\alpha$ -amino acids were employed and the resulting CP had a  $K_a$  value of  $230 \text{ M}^{-1}$  in  $\text{CDCl}_3$ , showing that the dimerization process is enthalpy-driven with a contribution of  $2.20 \text{ kJ mol}^{-1}$  per hydrogen bond; a value similar to those found for *D,L*- $\alpha$ -cyclic octapeptides. Additionally, the  $\alpha$ - $\alpha$  interaction was studied using a CP with alternate  $\alpha$ -amino acid and *N*-methyl- $\gamma$ -amino acid units and this showed a large  $K_a$  in chloroform ( $10^5 \text{ M}^{-1}$ ). X-Ray diffraction analysis of a single crystal of this CP showed the dimeric ensemble and corroborated the dimer structure. The cylindrical dimer cavity is filled with one molecule of chloroform, thus confirming the proposed partial hydrophobic character of the cavity.<sup>23</sup> Molecular computational methods applied to *cyclo*-[(*D*-Phe-*L*- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>] revealed that the  $\alpha,\gamma$ -SPNs can be stable in  $\text{CHCl}_3$  during long dynamic simulation times. In addition, the calculations also showed the absorption of chloroform molecules into the nanotube lumen, which suggests their potential ability to transport  $\text{CHCl}_3$ .<sup>26</sup> A more accurate measurement of the  $K_a$  ( $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) was obtained with a CP that contains a fluorophore group and this is the largest  $K_a$  found for nanotube-forming CPs.

Similar studies were carried out with other CPs that differ in the number of amino acids and, therefore, the ensemble diameter. Cyclic octapeptides **8** showed similar properties to hexapeptides, with a  $K_a(\text{CHCl}_3)$  at 373 K of  $340 \text{ M}^{-1}$  (energy per hydrogen bond of only  $1.27 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) for the  $\gamma$ - $\gamma$  interaction and again a  $K_a$  greater than  $10^5 \text{ M}^{-1}$  for the  $\alpha$ - $\alpha$  interaction.<sup>27</sup> On the other hand, cyclic tetrapeptides **6** do not self-assemble through their  $\gamma$ -face and this showed a small  $K_a$  ( $15 \text{ M}^{-1}$ ) for the  $\alpha$ - $\alpha$  interaction, suggesting that the rigidity of the 24-membered ring precludes the CP adopting the flat conformation required for self-assembly, a situation confirmed by X-ray analysis.<sup>28</sup>

More recently, Granja's group extended their studies to other  $\gamma$ -Aca residues by synthesizing *cis*-3-aminocyclopentanecarboxylic acid ( $\gamma$ -Acp-OH)<sup>24</sup> and *cis*-4-aminocyclopent-2-enecarboxylic acid ( $\gamma$ -Ace-OH).<sup>25</sup> These amino acids were easily prepared from Vince's lactam and have a larger angle between the C=O- $C_\alpha$  bond and the NH- $C_\gamma$  bond ( $147^\circ$  and  $162^\circ$ , respectively) compared with the Ach bond, a characteristic that makes them more suitable for large diameter SPNs. For this reason, tetra-,<sup>28</sup> hexa-,<sup>24</sup> octa-,<sup>29</sup> deca-<sup>29</sup> and dodecapeptides<sup>29</sup> (**1**–**5**, respectively) were synthesized with an  $\alpha$ -amino acid alternated with *N*-methyl- $\gamma$ -Acp as model SPNs with diameters ranging from 4 to 17 Å. All of



**Fig. 8** Heterodimeric supramolecular systems. The  $\alpha,\gamma$ -Ach and  $\alpha,\gamma$ -Acp CP combination to obtain new heterodimeric structures.

the CPs form the corresponding dimers through their  $\alpha$ -face and have large  $K_a$  values ( $> 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) in non-polar solvents; one exception is the tetrapeptide, for which the  $K_a$  was estimated to be  $47 \text{ M}^{-1}$ .

Interestingly, Granja and co-workers found that when Ach-based hexapeptides are mixed with the Acp-based CPs the heterodimeric ensemble is mainly formed (Fig. 8) as it is about 30 times more stable than the corresponding homodimers.<sup>24</sup> The heterodimerization selectivity is mainly due to the backbone-to-backbone interactions and not to the cross-strain interactions between the side chains, as is common in biological systems.<sup>30</sup>

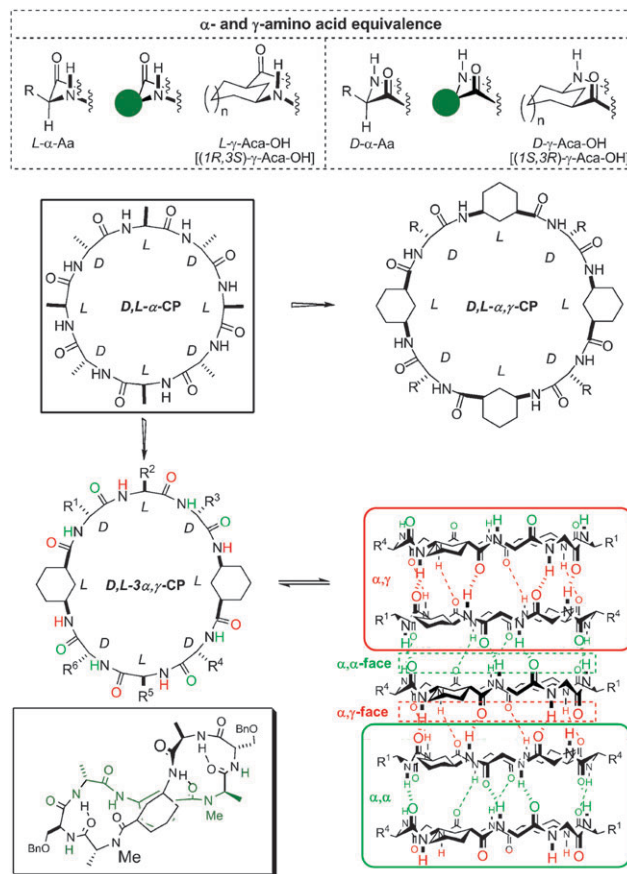
Finally, as described above, the blocking properties of  $\alpha,\alpha$ -dialkylated  $\alpha$ -amino acids were also assessed, although previous studies with D,L- $\alpha$ -CPs showed that they do not adopt the required flat conformation.<sup>14</sup> In non-polar solvents *cyclo*-[(Aib-L-Ace)<sub>3</sub>] self-assembles to form dimeric structures with  $K_a$  values of  $51 \text{ M}^{-1}$  in  $\text{CDCl}_3$ .<sup>25</sup> Interestingly, CP hydrogenation provided *cyclo*-[(Aib-L-Acp)<sub>3</sub>], which failed to self-assemble into dimers, probably because the Acp-based CP is more flexible and the steric interactions between the carbonyl and axial  $\alpha$ -methyl stop them from adopting the flat conformation.

The conformational rigidity of these  $\gamma$ -amino acids means that in the corresponding CPs the cycloalkane ring of the  $\gamma$ -Aca can be considered as a superatom, in which the (1*S*,3*R*)- and (1*R*,3*S*)- $\gamma$ -Aca residues are equivalent to D- and L- $\alpha$ -amino acid residues, respectively (Fig. 9). In terms of this equivalence, the above  $\alpha,\gamma$ -CPs can each be viewed as the result of taking the parent nanotube-forming CP (D,L- $\alpha$ -CP) and replacing alternate  $\alpha$ -Aa residues with  $\gamma$ -Aca residues of the same chirality (Fig. 2), or L- $\gamma$ -Aca residues for only half of the L- $\alpha$ -Aa residues. On the basis of this correspondence, a new class of SPN-forming CP was prepared in which the  $\alpha$ -Aas and  $\gamma$ -Ach-OH were combined in a three to one ratio, “ $3\alpha,\gamma$ -CPs”, derived from the substitution of the first and the fifth  $\alpha$ -Aa residues of the formal cyclic D,L- $\alpha$ -octapeptide parent by  $\gamma$ -Ach residues of identical chirality (Fig. 9).<sup>31</sup> In the flat conformation, like  $\alpha,\gamma$ -CPs,  $3\alpha,\gamma$ -CPs have different faces; in one face ( $\alpha,\alpha$ ) all the amide NH and C=O groups belong to  $\alpha$ -Aas, while in the other ( $\alpha,\gamma$ ) they belong to equal numbers of

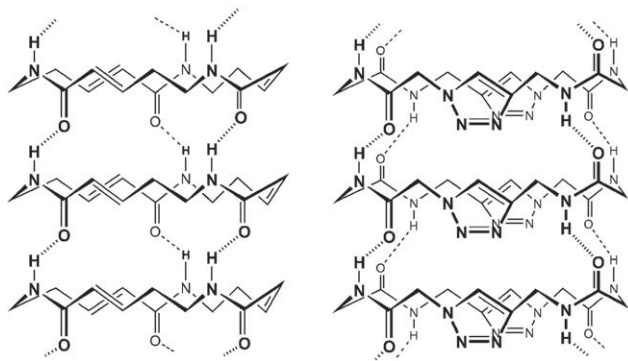
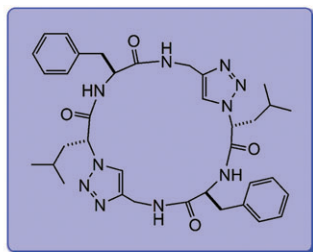
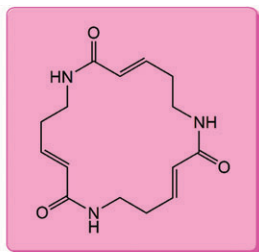
$\alpha$ -Aa and  $\gamma$ -Aca residues. The two types of interactions were studied and it was found that their assembly properties are dictated by the methylation pattern and the medium; monomers of  $3\alpha,\gamma$ -CPs can remain as flat rings or fold into double reverse turns. The flat monomers dimerize through sets of antiparallel  $\beta$ -sheet-type hydrogen bonds to form a “ $\beta$ -band”.

## Tubular ensembles of other CPs

In an effort to improve the applications of peptide nanotubes, several cyclic units composed of novel amino acid residues are currently being developed. Dory and co-workers synthesized a tripeptide that crystallized as bundles of nanotubes.<sup>32</sup> Such a subunit is composed of  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -amino acid residues with a *trans* geometry for the vinyl group, a structure that allows it to adopt the flat conformation required for self-assembly (Fig. 10, left). As the peptide backbone has an even number of atoms between the carbonyl and amino groups of each residue, all the carbonyl groups are oriented in the same direction (as in the  $\beta$ -peptide-based nanotube in Fig. 5), which gives the peptide nanotubes a large dipole moment that results in highly anisotropic crystals. In addition, these  $\delta$ -peptide nanotubes can then self-organize into larger aggregates with the same appearance and this represents the use of liquid crystals for the self-assembly of CPs.<sup>33</sup>



**Fig. 9** Schematic representation of SPNs composed of  $3\alpha,\gamma$ -CP units. Equivalence with other CP designs is shown at the top. The monomeric double reverse turn is represented at the bottom.



**Fig. 10** Schematic representations of nanotubes (bottom) formed by self-assembly from cyclic  $\delta$ - and  $\alpha$ , $\epsilon$ -peptides (top left and top right, respectively).

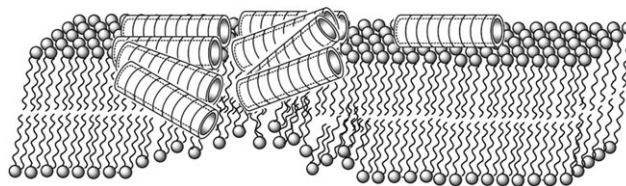
Ghadiri's group reported the design, synthesis and characterization of a new class of peptide-based macrocycle that incorporates 1,2,3-triazole  $\epsilon$ -amino acids in the backbone (Fig. 10, right).<sup>34</sup> The resulting open-ended hollow tubular ensemble combines the structural aspects and capacity for outside surface functionalization of the previously described cyclic  $D,L$ - $\alpha$ -peptide nanotubes and the heterocyclic alterations introduced to modify the physical properties of the inner pore.

## Applications of CP nanotubes

The ease with which the size and external properties of peptide nanotubes can be controlled, along with the fact that their outer surfaces contain regularly oriented arrays of functional groups, has allowed the use of such supramolecular structures in fields such as biosensing, pharmacology, catalysis and electronics.

### Antimicrobials

The proliferation of antibiotic-resistant bacteria has heightened the quest for new antibiotics with novel modes of action.<sup>35</sup> Amphipathic  $D,L$ - $\alpha$ -CPs have been shown to assemble on the bacterial membrane and form nanotubes oriented at an angle of  $20^\circ$  to the membrane plane, with the hydrophobic side chains inserted into the lipidic components of the membrane and the hydrophilic residues remaining exposed to the hydrophilic components of the cell membrane (Fig. 11).<sup>36,37</sup> In this model, peptide nanotubes are believed to permeate membranes through a carpet-like mechanism and cause rapid cell death. Such peptides exhibit significant antibacterial activity *in vitro*, and their preferential action against bacterial cells has been demonstrated in mice, in which they present activity against a broad spectrum of bacteria that include methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).



**Fig. 11** Schematic representation of the formation of lethal CP-based ion channels in bacterial membranes.

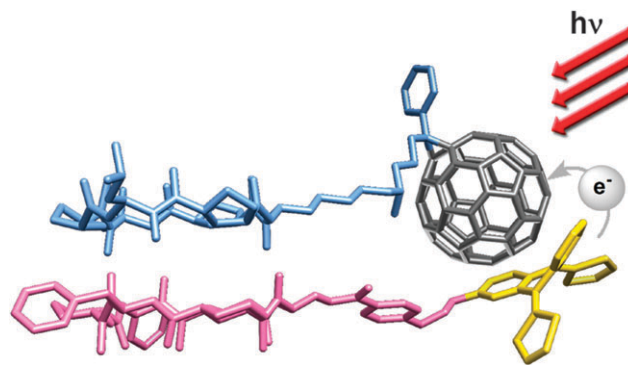
Ghadiri and co-workers also suggested that membrane-associating CPs effectively block key steps involved in virus entry or escape from endosomes, thus providing a new class of antiviral agents with broad-spectrum activity. Towards this goal, these authors utilized a directed combinatorial approach to select potentially membrane-active amphiphilic cyclic  $D,L$ - $\alpha$ -peptides and explored their utility in inhibiting adenovirus (Ad) infections in mammalian cells.<sup>38</sup>

### Artificial photosystems

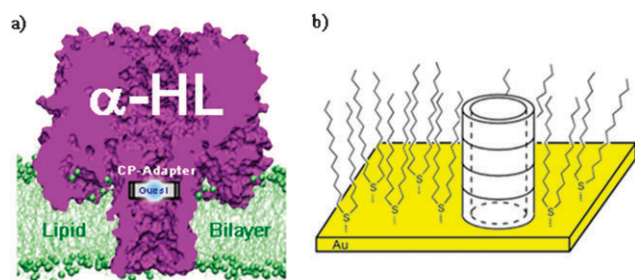
Within the nanobiomaterials field, one of the most actively pursued goals is the design of highly efficient and highly directional electron transfer mimics of the photosynthetic systems of plants and bacteria. In this context, Granja and co-workers described the synthesis and physicochemical properties of a class of nanotubular heterodimers in which a CP bearing an electron-donor unit (exTTF) is coupled by a  $\beta$ -sheet-like hydrogen-bond system to another bearing a photoactive electron-acceptor unit ( $C_{60}$ ) (Fig. 12).<sup>39</sup> These peptide templates were successfully used to form light-harvesting/light-converting hybrid ensembles with a distinctive organization of donor and acceptor units that were able to act as efficient artificial photosystems.

### Biosensors

Cyclodextrins have been shown to act as adapters for the pore-forming protein  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ -HL).<sup>40</sup> The bagel-shaped molecules bind in the lumen of the transmembrane channel formed by  $\alpha$ -HL and alter the properties of the pore, particularly the unitary conductance and ion selectivity. In the search for a more versatile class of adapters, CPs have been fully examined. Exhaustive studies of biosensor systems based on ion channels modified with cyclic  $D,L$ - $\alpha$ -octapeptides have shown the



**Fig. 12** Bio-inspired nanohybrid based on  $\alpha,\gamma$ -CPs, showing photo-induced electron transfer facilitated by the proximity of the donor and acceptor units.

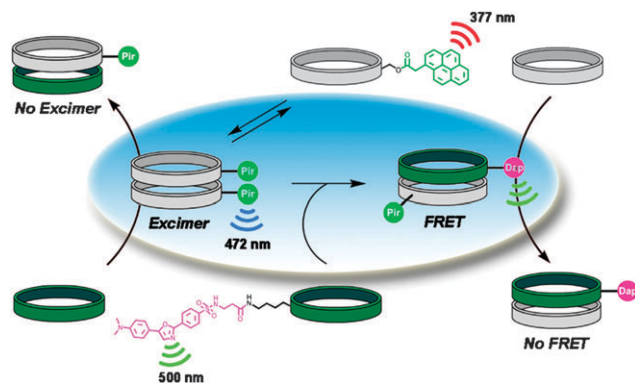


**Fig. 13** (a) Structure of the  $\alpha$ -HL pore containing a CP adapter used as a site for the binding and detection of blockers within the channel lumen. (b) Schematic representation of a biosensor based on CP nanotubes embedded in monolayers supported on gold.

detection of various polyanionic organic molecules, including the second messenger inositol tris-phosphate ( $\text{IP}_3$ ) (Fig. 13a).<sup>41</sup>

Cyclic D,L- $\alpha$ -octapeptide-based nanotubes inserted into self-assembled organosulfur monolayers supported on gold films have also shown the feasibility of diffusion-limited size-selective ion sensing (Fig. 13b).<sup>42</sup> Initial studies revealed, for example, selective redox activity for the smaller  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  complex compared to  $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$  due to the presence of peptide channels.

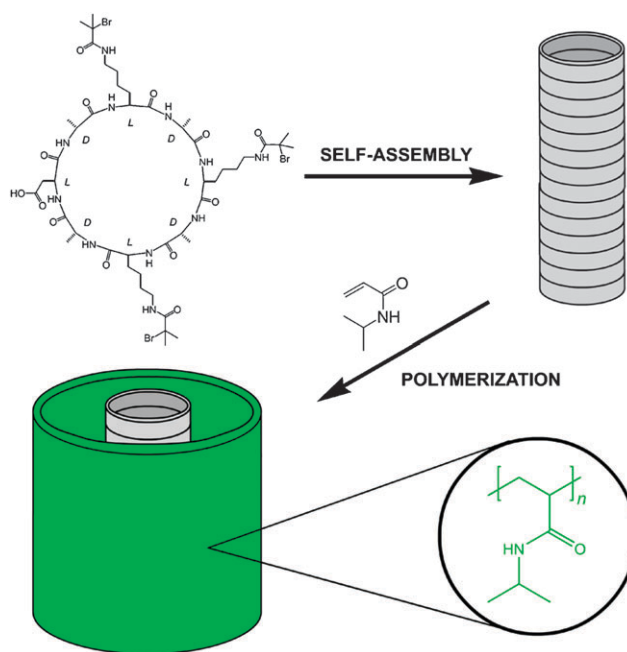
Recently, Granja's group reported the design, preparation and characterization of a novel multicomponent network of pyrene and dapoxy-derivatized CPs that display a controlled fluorescent signal output (Fig. 14).<sup>43</sup> The network takes advantage of the large  $K_a$  of  $\alpha,\gamma$ -CPs and the controlled formation of homo- and heterodimers, and makes use of a combination of excimer/FRET effects to study complex interaction networks. These preliminary studies are particularly relevant for the development of a new class of biosensors and optical devices that are specifically tailored for the study of systems involving homo- and heterodimerization processes.



**Fig. 14** Multicomponent equilibrium network of fluorescently derivatized  $\alpha,\gamma$ -CPs.

### Biomaterials

Inspired by natural mineralization processes, Ghadiri's group investigated the formation and stabilization of metal nanoclusters on the surface of crystals composed of *cyclo*-[(L-Gln-D-Ala-L-Gln-D-Ala)-]<sub>2</sub>-based peptide nanotubes.<sup>44</sup> The array of carboxyl groups on the outer nanotube surface served to nucleate the deposition of copper(I) oxide.



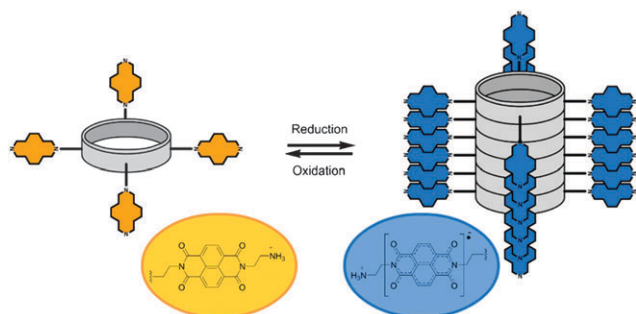
**Fig. 15** Preparation of peptide-polymer nanotubular hybrids.

Biesalski's group recently used peptide nanotubes as structurally defined templates to prepare nanometre-sized peptide-polymer hybrid nanostructures (Fig. 15).<sup>45</sup> This strategy is based on the self-assembly of CPs with polymerization initiator groups on distinct side chains to form a peptide nanotube that has the initiator groups exclusively on the outer surface. A subsequent surface-initiated polymerization coats the peptide core with a covalently bound polymer shell. The design offers a novel approach toward the preparation of a large number of shape-persistent hybrid materials that are not easily accessible by any other technique.

### Electronic devices

Molecular nanowires fabricated by self-assembly have attracted considerable attention in recent years for possible applications in nanoelectronics.<sup>46</sup> In this respect, CP nanotubes are amongst the most suitable molecular objects because they allow optimal size and length control. Ghadiri and co-workers showed that intermolecular peptide self-assembly is an effective template to promote ring stacking and charge transfer between 1,4,5,8-naphthalenetetracarboxylic diimide (NDI) side chains. In addition, they also investigated the redox-promoted self-assembly of an eight-residue cyclic D,L- $\alpha$ -peptide bearing four NDI units, which gave rise to electronically delocalized peptide nanotubes hundreds of nanometres in length (Fig. 16).<sup>47</sup> This supramolecular approach provides a rational basis for the design and fabrication of one-dimensional materials with potential utility in optical and electronic devices.

Recently, Kimura's laboratory reported the assembly formation and metal complexation of a novel cyclic tri- $\beta$ -peptide bearing terpyridine ligands.<sup>48</sup> Such an assembly may have both high electronic conductivity and a large dipole, thus allowing its application in the field of organic electronics. The nanotube-directed self-assembly process of an  $\alpha,\gamma$ -CP allows

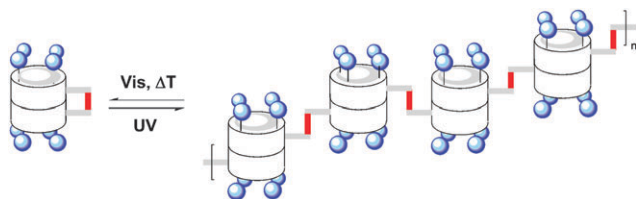


**Fig. 16** Schematic representation of redox-promoted CP nanotube self-assembly.

the organization of  $C_{60}$  moieties into 1D structures that may have applications in the preparation of nanosize wires.<sup>49</sup>

### Photoresponsive materials

In recent years molecules that can be reversibly switched using light have been extensively studied due their applications in electronic and/or optical data storage devices.<sup>50</sup> Ghadiri's group recently reported a novel azo-peptide system, in which cyclic *D,L*-peptide dimers can be *E/Z* isomerized between one state, in which the two rings in each dimer are connected covalently by an azobenzene link in the *Z* conformation, and another, in which the *E* conformation of this link connects neighbouring dimers (Fig. 17).<sup>51,52</sup> Such a photochromic supramolecular system permits reversible switching between inter- and intramolecular hydrogen bonds both in solution and in thin films at the air–water interface.

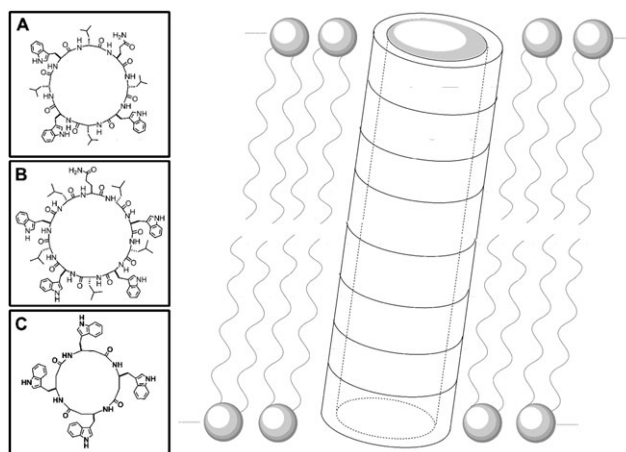


**Fig. 17** Schematic illustration of a reversible switch based on azo-linked cyclic *D,L*-peptides, showing the light- and heat-mediated equilibria between the *cis* dimer and the oligomeric hydrogen-bonded *trans* isomer.

### Selective transmembrane transport channels

Synthetic peptide nanotubes that are internally hydrophilic and externally endowed with appropriate characteristics can mimic certain transmembrane channel functions.<sup>53</sup> In 1994, Ghadiri's group created the first such nanotubes to self-assemble in a lipid bilayer. These compounds consisted of *cyclo*-[L-Gln-(D-Leu-L-Trp)<sub>3</sub>-D-Leu-] units and display transport activities for  $K^+$  and  $Na^+$  greater than  $10^7$  ions  $s^{-1}$  (Fig. 18-A).<sup>54</sup>

These artificial peptide transmembrane channels are naturally size selective. The octapeptide nanotubes described above (internal diameter of approximately 7 Å) avoid the passage of glucose, which is estimated to require a pore diameter larger than 9 Å, while decapeptide [L-Gln-(D-Leu-L-Trp)<sub>4</sub>-D-Leu-] (internal diameter of 10 Å) displays efficient glucose and glutamic acid transport activity (Fig. 18-B).<sup>55,56</sup> These findings



**Fig. 18** Schematic representation of a peptide nanotube self-assembled in a lipid bilayer by association of cyclic peptide units.

suggest that even larger CPs may prove useful in the size-selective molecular delivery of pharmacologically active agents.

Like their *D,L*- $\alpha$ -counterparts, cyclic  $\beta^3$ -peptides *cyclo*-[( $\beta^3$ -HTrp)<sub>4</sub>] and *cyclo*-[( $\beta^3$ -HTrp- $\beta^3$ -Leu)<sub>2</sub>] can also associate in a tubewise manner in lipid bilayers to form channels with  $K^+$  transport rates of  $1.9 \times 10^7$  ions  $s^{-1}$  (Fig. 18-C).<sup>21</sup>

### Conclusions

In this tutorial review we have surveyed aspects of the supramolecular chemistry of CPs, which under appropriate conditions stack through hydrogen bonds to form nanotubular structures. Crucial for this interaction is the adoption of a flat conformation in which the amino acid side chains of the peptide rings have a pseudo-equatorial outward-pointing orientation and the carbonyl and amino groups of the peptide bonds are oriented perpendicular to the ring. This conformation can be achieved by CPs with a wide variety of residues, including  $\gamma$ -amino acids. In all cases, the corresponding nanotubes have uniform internal diameters and external surfaces that can be easily endowed with specific properties by side chain modifications. These nanostructures are being actively investigated due their potential applications in different fields such as chemistry, medicine, pharmacology, biology and materials science.

### Acknowledgements

We would like to thank our co-workers of the past five years for their insightful contributions to our efforts in the area of self-assembling CP nanotubes. We are also grateful to the Spanish Ministry of Education and Science, ERDF and Xunta de Galicia for financial support. R. J. B. and C. R. thank the Spanish M.E.C for their FPU fellowships.

### References

- 1 C. A. Mirkin, *Small*, 2005, **1**, 14.
- 2 C. R. Martin and P. Kohli, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2003, **2**, 29.
- 3 D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 988.

- 4 Special issue on supramolecular chemistry and self-assembly, *Science*, 2002, **295**, 2395.
- 5 R. J. Brea and J. R. Granja, "Self-assembly of cyclic peptides in hydrogen-bonded nanotubes", in *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, ed. J. A. Schwarz, C. I. Contescu and K. Putyera, Marcel Dekker Inc., New York (USA), 2004, pp. 3439–3457.
- 6 P. De Santis, S. Morosetti and R. Rizzo, *Macromolecules*, 1974, **7**, 52.
- 7 L. Tomasic and G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta*, 1987, **70**, 1012.
- 8 M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee and N. Khazanovich, *Nature*, 1993, **366**, 324.
- 9 N. Khazanovich, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 6011.
- 10 M. E. Polaskova, N. J. Ede and J. N. Lambert, *Aust. J. Chem.*, 1998, **51**, 535.
- 11 J. Hartgerink, J. R. Granja, R. A. Milligan and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 43.
- 12 K. Rosenthal, G. Svensson and A. Undén, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3372.
- 13 A. Karlström and A. Undén, *Biopolymers*, 1997, **41**, 1.
- 14 X. C. Sun and G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta*, 1994, **77**, 1520.
- 15 T. D. Clark, J. M. Buriak, K. Kobayashi, M. P. Isler, D. E. McRee and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8949.
- 16 D. T. Bong and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2163.
- 17 K. Kobayashi, J. R. Granja and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 95.
- 18 T. D. Clark, K. Kobayashi and M. R. Ghadiri, *Chem.–Eur. J.*, 1999, **5**, 782.
- 19 R. P. Cheng, S. H. Gellman and W. F. DeGrado, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 3219.
- 20 D. Seebach, J. L. Mathews, A. Meden, T. Wessels, C. Baerlocher and L. B. McCusker, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 173.
- 21 T. D. Clark, L. K. Buehler and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 651.
- 22 F. Fujimura, Y. Horikawa, T. Morita, J. Sugiyama and S. Kimura, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 611.
- 23 M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2844.
- 24 R. J. Brea, M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 5710.
- 25 C. Reiriz, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 241.
- 26 J. Cheng, J. Zhu and B. Liu, *Chem. Phys.*, 2007, **333**, 105.
- 27 M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *Chem.–Eur. J.*, 2005, **11**, 6543.
- 28 M. Amorin, R. J. Brea, L. Castedo and J. R. Granja, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 4681.
- 29 R. J. Brea, L. Castedo and J. R. Granja, *Chem. Commun.*, 2007, 3267.
- 30 P. M. Bowers, S. J. Cokus, D. Eisenberg and T. O. Yeates, *Science*, 2004, **306**, 2246.
- 31 M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *Chem.–Eur. J.*, 2008, **14**, 2100.
- 32 D. Gauthier, P. Baillargeon, M. Drouin and Y. L. Dory, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 4635.
- 33 S. Leclair, P. Baillargeon, R. Skouta, D. Gauthier, Y. Zhao and Y. L. Dory, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 349.
- 34 W. S. Horne, C. D. Stout and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9372.
- 35 Special issue on antibiotic resistance, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 391.
- 36 S. Fernández-López, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon and M. R. Ghadiri, *Nature*, 2001, **412**, 452.
- 37 J. T. Fletcher, J. A. Finlay, M. E. Callow, J. A. Callow and M. R. Ghadiri, *Chem.–Eur. J.*, 2007, **13**, 4008.
- 38 W. S. Horne, C. M. Wiethoff, C. Cui, K. M. Wilcoxon, M. Amorin, M. R. Ghadiri and G. R. Nemerow, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 5145.
- 39 R. J. Brea, M. A. Herranz, L. Sánchez, L. Castedo, W. Seitz, D. M. Guldi, N. Martín and J. R. Granja, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 5291.
- 40 L.-Q. Gu, M. Dalla Serra, J. B. Vincent, G. Vigh, S. Cheley, O. Braha and H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 3959.
- 41 J. Sánchez-Quesada, H. Bayley, M. R. Ghadiri and O. Braha, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 11757.
- 42 K. Motesharei and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 11306–11312.
- 43 R. J. Brea, M. E. Vázquez, M. Mosquera, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1653.
- 44 J. D. Hartgerink, T. D. Clark and M. R. Ghadiri, *Chem.–Eur. J.*, 1998, **4**, 1367.
- 45 J. Couet, J. D. J. S. Samuel, A. Kopyshv, S. Santer and M. Biesalski, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 3297.
- 46 T. Shimizu, M. Masuda and H. Minamikawa, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1401.
- 47 N. Ashkenasy, W. S. Horne and M. R. Ghadiri, *Small*, 2006, **2**, 99.
- 48 F. Fujimura and S. Kimura, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 793.
- 49 C. Reiriz, R. J. Brea, R. Arranz, J. L. Carrascosa, A. Garibotti, B. Manning, J. M. Valpuesta, R. Eritja, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11335.
- 50 J. A. Delaire and K. Nakatani, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 1817.
- 51 M. S. Vollmer, T. D. Clark, C. Steinem and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1999, **38**, 1598.
- 52 C. Steinem, A. Janshoff, M. S. Vollmer and M. R. Ghadiri, *Langmuir*, 1999, **15**, 3956.
- 53 H. Bayley, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, **10**, 94.
- 54 M. R. Ghadiri, J. R. Granja and L. K. Buehler, *Nature*, 1994, **369**, 301.
- 55 J. R. Granja and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 10785.
- 56 J. Sánchez-Quesada, H. S. Kim and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2503.



# New $\alpha,\gamma$ -cyclic peptides-nanotube molecular caps using $\alpha,\alpha$ -dialkylated $\alpha$ -amino acids<sup>‡</sup>

CÉSAR REIRIZ, LUIS CASTEDO and JUAN R. GRANJA\*

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 10 July 2007; Revised 11 October 2007; Accepted 22 October 2007

**Abstract:** We report here the preparation and structural characteristics of a novel self-assembling peptide composed of alternating  $\alpha,\alpha$ -dialkylated  $\alpha$ -amino and *cis*-4-aminocyclopent-2-enecarboxylic acids. The use of  $\alpha,\alpha$ -dialkylated amino acids represents a novel method to prevent the formation of extensive  $\beta$ -sheet-like hydrogen-bonding networks that are characteristic of peptide nanotubes. Copyright © 2007 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Supplementary electronic material for this paper is available in Wiley InterScience at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1075-2617/suppmat/>

**Keywords:** self-assembly; peptide nanotubes; molecular caps;  $\gamma$ -amino acids

## INTRODUCTION

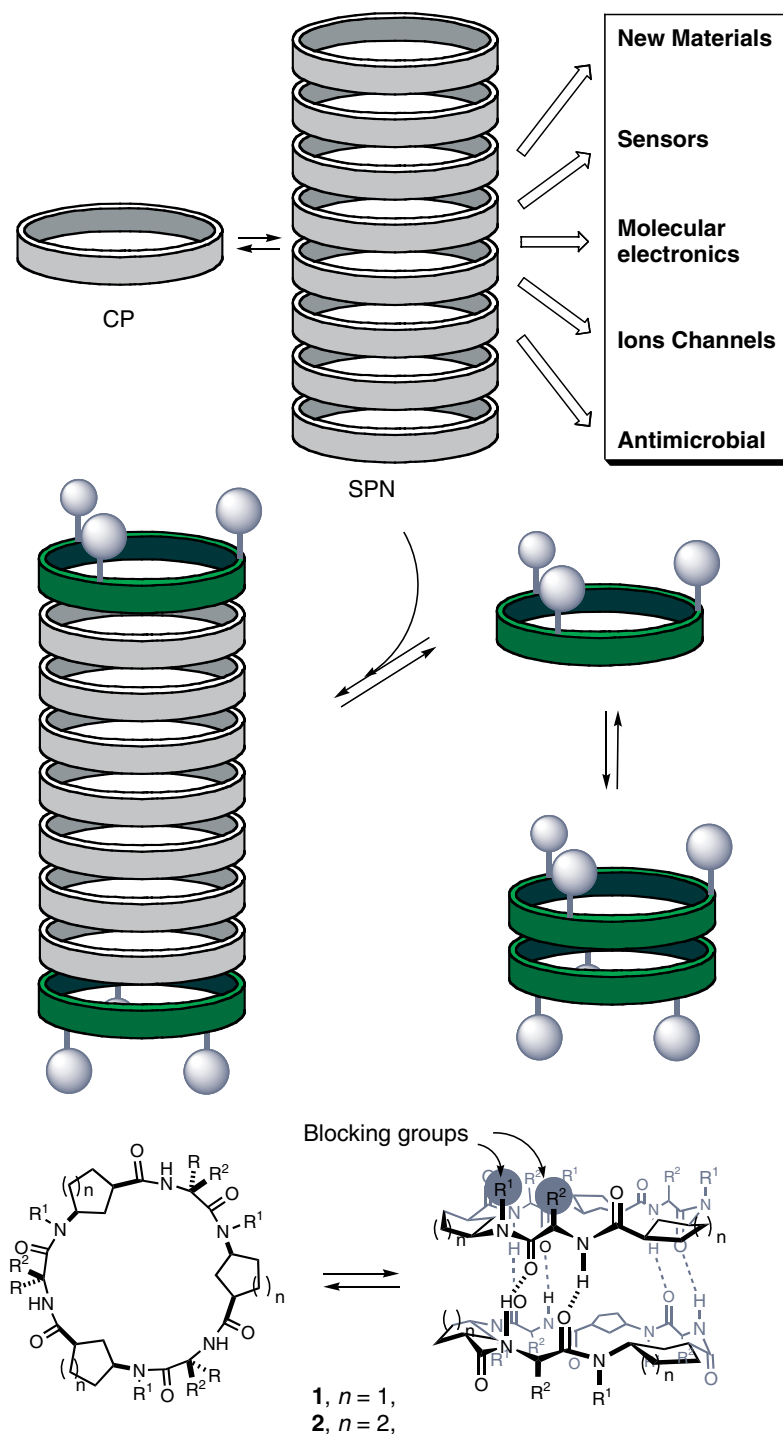
In the pursuit of biomaterials with improved biocompatibility, responsiveness, specificity and other properties that are desirable in medical devices and drug delivery systems, increasing attention is being paid to nanostructures [1–7]. One of the most promising of these structures is the nanotube [8–11], which also has a wide variety of potential chemical and technological applications [12–23]. For this reason, considerable effort devoted to the synthesis of organic and inorganic nanotubes has been seen in recent years. One of the most promising nanotube designs is the self-assembling peptide nanotube (SPN), a stack of cyclic peptides (CPs) (Figure 1) [24–27]. The elementary components of SPNs are CPs in which the chiralities of the amino acids allow the ring to adopt a quasi-planar conformation [28–36]. In this conformation, peptide backbone N–H and C=O groups project in a perpendicular manner from the plane of the ring on either side and are therefore able to form hydrogen bonds with those of neighbouring rings, thus leading to the construction of a nanotube. This design not only offers considerable scope for facile elaboration to incorporate structural and functional properties of practical interest but also facilitates the pre-determination of the internal diameter of the nanotube, a critical parameter that is not easy to fix with other designs.

The possibility of extending this class of nanotubes to include tubes with hydrophobic inner surfaces, an

approach that has not yet been widely studied, has recently been demonstrated through work on dimers that self-assemble from CPs composed of alternating *D*- $\alpha$ -amino and (1*R*,3*S*)-3-aminocycloalkanecarboxylic acids, such as (*cis*)-3-aminocyclohexanecarboxylic acid ( $\gamma$ -Ach) or (*cis*)-3-aminocyclopentanecarboxylic acid ( $\gamma$ -Acp) (**1–2**, Figure 1). The hydrophobic core environment is provided by the projection of one of the cycloalkane methylenes into the lumen [37–41]. The cycloalkane rings of these  $\alpha,\gamma$ -CPs not only direct a hydrophobic, functionalizable methylene towards the interior of the CP ring (thus allowing manipulation of the behaviour of the cavity of  $\alpha,\gamma$ -CP based SPNs) but also ensure the flatness and rigidity of the cycloalkane segments of the CP backbone. The success of this strategy is demonstrated by the large association constants of some of the  $\alpha,\gamma$ -CPs that have been studied previously (which for convenience have substituents within the amide skeleton that limit their stacking to the dimer stage) [42–48]. *N*-methylated peptides have also been used as nanotube caps in synthetic ion channels, an application that leads to altered conductance and rectification properties [49]. The cap subunits can participate in backbone–backbone hydrogen bonding from only one face of the peptide ring structure, thus preventing nanotube growth. The properties of the mouth of the nanotube depend on the characteristics of the CP present at the ends of the assembly. We envisaged that the introduction of methyl substituents at axial  $\alpha$ -positions of every second residue would provide an alternative means of sterically blocking one face of the peptide ring. Although previous studies have shown the preference of  $\alpha,\alpha$ -disubstituted residues for helical rather than  $\beta$ -sheet conformations [50], and also that  $\alpha,\alpha$ -disubstituted *D,L*- $\alpha$ -CPs failed to self-assemble into

\*Correspondence to: Juan R. Granja, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago, 15782 Santiago de Compostela, Spain; e-mail: qojuangg@usc.es

<sup>‡</sup>This article is part of the Special Issue of the Journal of Peptide Science entitled "Peptides in Nanotechnology".

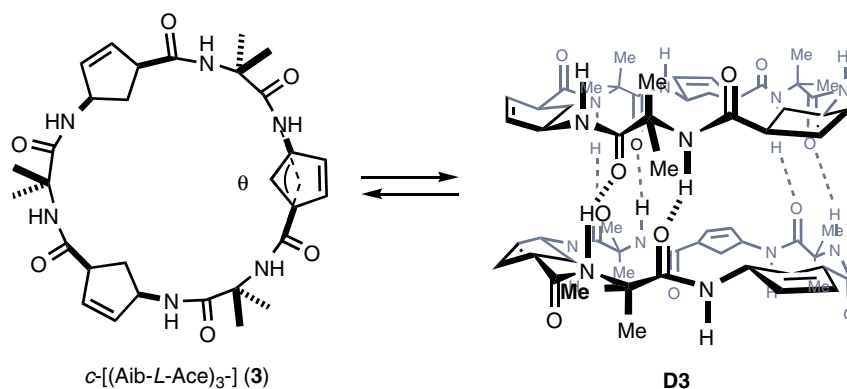


**Figure 1** Strategy for nanotube formation through a self-assembly process of cyclic peptides. Nanotube caps are CPs that contain axially oriented substituents, such as *N*- or  $\alpha$ -Alkyl groups, which block nanotube formation. This figure is available in colour online at [www.interscience.wiley.com/journal/jpepsci](http://www.interscience.wiley.com/journal/jpepsci).

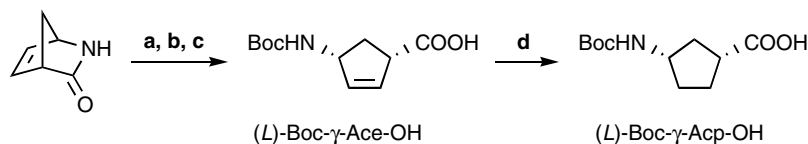
dimers [45,46], we envisaged that the rigidity of the cycloalkane moiety of  $\gamma$ -Aa would ensure the flatness of the CP backbone. Thus, the effect of  $\alpha,\alpha$ -dialkylated  $\alpha$ -amino acids was also examined. In addition, a new  $\gamma$ -Aca, the 4-aminocyclopent-2-enecarboxylic acid ( $\gamma$ -Ace), was also prepared and studied. The use of  $\gamma$ -Ace was chosen not only due to its simple preparation

from Vince's lactam [51] but also because the angle ( $\theta$ ) defined by the C–N and C–C(O) bonds radiating from the cycloalkane ring is wider than the angles in  $\gamma$ -Acp or  $\gamma$ -Ach (Figure 2). This property makes  $\gamma$ -Ace more suitable for the construction of large  $\alpha,\gamma$ -CPs [41].

The required *cis*- $\gamma$ -Ace acid was prepared from Vince's lactam (Scheme 1) by acidic hydrolysis and



**Figure 2** Structure of *cyclo*-[(Aib-L-Ace)<sub>3</sub>-] (**3**) and its corresponding dimer (**D3**). This figure is available in colour online at [www.interscience.wiley.com/journal/jpepsci](http://www.interscience.wiley.com/journal/jpepsci).



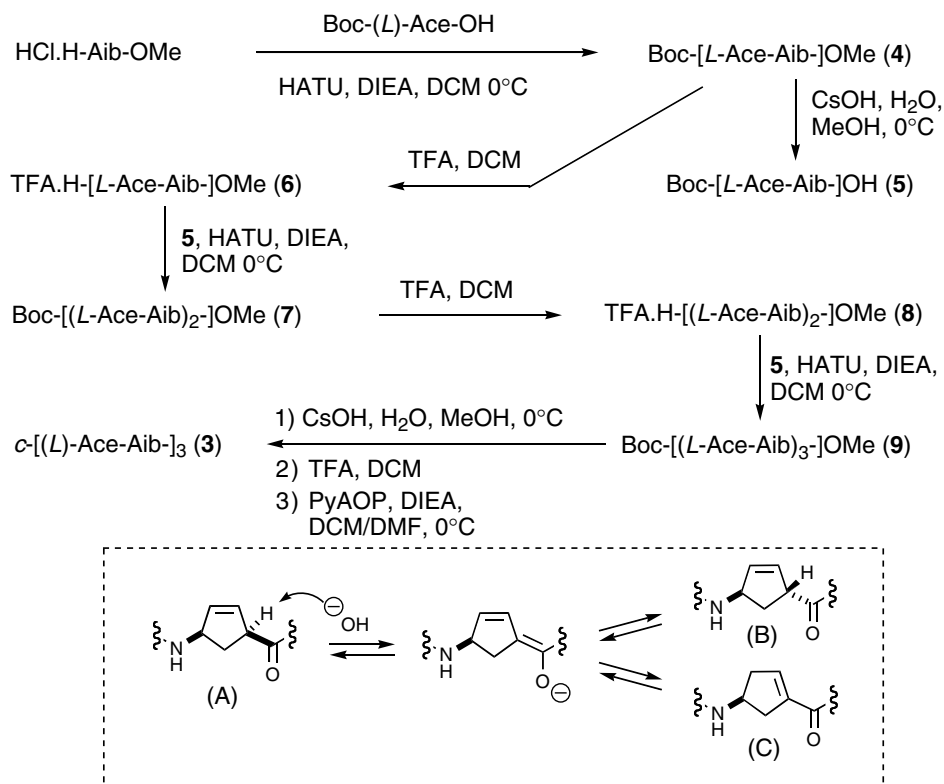
**Scheme 1** Synthesis of (1*S*,4*R*)-Boc- $\gamma$ -Ace-OH and (1*R*,3*S*)-Boc- $\gamma$ -Acp-OH from Vince's lactam; (a) HCl (10%), 100%; (b) (Boc)<sub>2</sub>O, *N,N*-diisopropylethylamine, H<sub>2</sub>O/dioxane 99%; (c) resolution: (+)-phenylethylamine, CHCl<sub>3</sub>/hexane; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -46.1 (*c* = 1.0, MeOH) >97% ee; (d) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH, 99%.

protection to provide *N*-Boc- $\gamma$ -Ace-OH). The resolution of Boc- $\gamma$ -Ace-OH was achieved by crystallization from a chloroform solution containing 0.7 equiv of (+)-phenylethylamine to give, after a couple of crystallizations, (1*R*,4*S*)-Boc- $\gamma$ -Ace-OH (**L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH**) with an enantiomeric purity higher than 97% [52]. Hydrogenation of **L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH** provided the Acp derivative in quantitative yield, representing a new method for this amino acid, with the main advantage that the synthesis of can be carried out using multi-gram quantities and in a more reproducible manner [39].

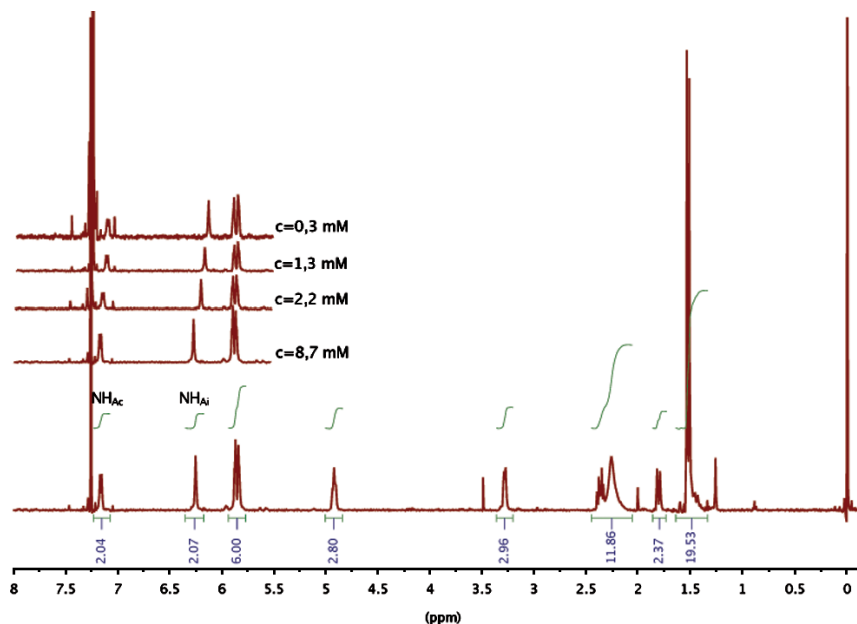
The CP was prepared by solution-phase methods as shown in Scheme 2, starting from the methyl ester of 2-aminoisobutyric acid (Aib-OMe). Coupling of Aib-OMe with **L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH** using HATU at 0 °C proceeded in high yield to give dipeptide **4** (97%) [53,54]. Under standard coupling conditions, i.e. at room temperature and acid pre-activation [55], large amounts of epimer and/or double bond isomer products, which formed through a base-induced mechanism, were observed (Scheme 2, structures **A**, **B** and **C**). Treatment of **4** with lithium hydroxide in methanol provided the corresponding dipeptide **5** in good yield, but again a mixture of isomers was formed. The use of CsOH at 0 °C and with short reaction times reduced the amounts of isomers formed. Under these conditions dipeptide **5** was obtained in 78% yield (90% taken into account recovered starting material). The resulting acid was coupled to dipeptide **6**, obtained by TFA treatment of **4**, using HATU in the presence of DIEA to give tetrapeptide **7** in 87% yield. TFA treatment of **7** followed by coupling with dipeptide **5** provided

hexapeptide **9** in 79% yield. Double deprotection of **9** with CsOH followed by TFA, and cyclization of the resulting peptide, afforded CP **3** in 35% yield from **9**. Unfortunately, methyl ester deprotection again gave the corresponding acid together with a mixture of other isomers at the cyclopentenyl moieties. These isomers were easily removed by reverse-phase HPLC purification. The use of other protecting groups, such as the fluorenylmethyl ester, did not facilitate the peptide synthesis. Although we were able to reduce the level of peptide isomerization, the solubility problems associated with the resulting peptides (dipeptides and tetrapeptides) dramatically reduced the reaction yields.

The <sup>1</sup>H NMR spectra of the cyclopeptide **3**, in both polar and non-polar solvents, are well defined and are highly symmetrical, with a *J*<sub>NH,H $\gamma$</sub>  coupling constant of 7.16 Hz (Figure 3). These observations indicate that the peptide exists in an all-*trans* conformation with a flat-ring-shaped backbone. In non-polar solvents the formation of dimer **D3** is reflected by the downfield shift on increasing the concentration of the N–H resonance of Aib from  $\delta$  6.1 to 6.6 ppm, while the N–H resonance of Ace remains unchanged. The corresponding association constant, determined at 293 K by dilution experiments, is 51 M<sup>-1</sup> in CDCl<sub>3</sub> (see Supporting Information) [56]. Van't Hoff plots for the range 243–303 K afford values of -22.6 KJ mol<sup>-1</sup> for  $\Delta H^\circ_{298}$  and -44.6 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> for  $\Delta S^\circ_{298}$  and these, like the fall in *K*<sub>a</sub> with increasing solvent polarity, are consistent with dimerization being essentially an enthalpy-driven hydrogen-bonding process [57,58].



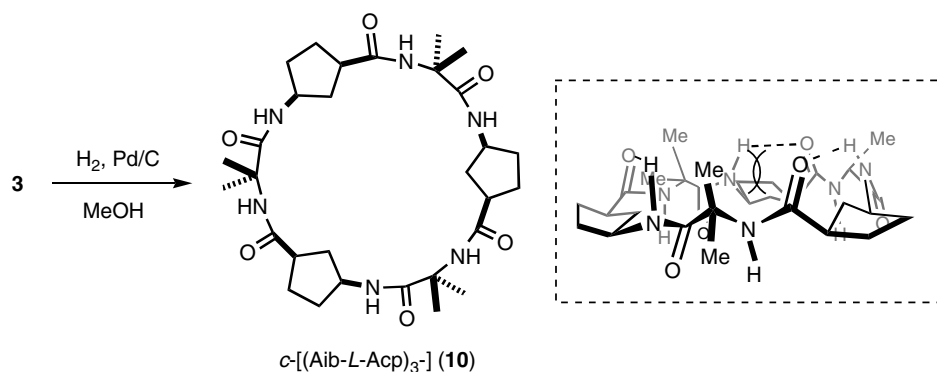
**Scheme 2** Strategy for the synthesis of CP **3**, and proposed mechanism for Ace isomerization under basic conditions.



**Figure 3**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of a 8.7 mM solution of peptide **3** in  $\text{CDCl}_3$  with the 5.5–8.0 ppm region of the spectra of 0.3, 1.3, 2.2, and 8.7 mM solutions, showing the downfield shift of Aib N–H. This figure is available in colour online at [www.interscience.wiley.com/journal/jpepsci](http://www.interscience.wiley.com/journal/jpepsci).

These studies described above show that axially oriented amino acid side-chains can block one face of the peptide ring and the resulting hexapeptide **3** adopts the flat conformation and self-assembles to form dimeric structures. We decided to extend this

strategy to peptides containing other  $\gamma$ -Aca. For this purpose  $\gamma$ -Acp containing CP **10** was easily prepared by hydrogenation of **3** (Scheme 3). Unfortunately, the resulting peptide did not present any of the characteristic features of dimer-forming CPs. The NMR



**Scheme 3** Preparation of CP **10** by hydrogenation of **3** and proposed folded structure for **10**.

spectrum of **10** showed the N–H of the  $\gamma$ -Acp (7.62 ppm for CP **10** and 7.18 for CP **3**). The signal for the N–H proton that is projected towards the solvent-exposed ring face, which should be hydrogen-bonding protected by the axial methyl group of Aib, is shifted down field, while the N–H resonance of Aib, which should be participating in the  $\beta$ -sheet-like hydrogen bonding networks in the dimeric structure, is now up-field shifted (5.88 ppm). Furthermore, concentration-dependent shifts were not observed for any of the proton resonances. These features suggest that the peptide is not forming the dimeric structure because it is folded as a consequence of the steric interactions between the axially oriented  $\alpha$ -methyl and carbonyl groups of the  $\gamma$ -Acp. Another reason for the absence of dimer formation might be the higher degree of flexibility of the cyclopentyl moiety of Acp compared to the cyclopentenyl ring, which might prevent the CP from adopting the flat conformation required for dimerization in the  $\beta$ -strand form.

## Experimental Section

**General methods.** Commercially available amino acid, HATU and (7-azabenzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate (PyAOP) were used as obtained from Novabiochem or GL Shanghai Biochem. All other reagents obtained from commercial suppliers were used without further purification unless otherwise stated. DCM and piperidine were dried and distilled over calcium hydride [59,60]. DIEA was dried and distilled over calcium hydride, and then re-distilled over ninhydrin [59,60]. Analytical thin-layer chromatography was performed on E. Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> plates. Compounds that were not UV-active were visualized by dipping the plates in a ninhydrin solution, and heating. Silica gel flash chromatography was performed using E. Merck silica gel (type 60SDS, 230–400 mesh). Solvent mixtures for chromatography are reported as v/v ratios. HPLC purification was carried out on Inertsil ODS-2 C18 columns with H<sub>2</sub>O(0.1% TFA):ACN(0.1% TFA).

Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra were recorded on Varian Mercury-300 MHz, Bruker AMX-500 MHz or Bruker WM-250 MHz spectrometers. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm,  $\delta$ ) relative to tetramethylsilane ( $\delta$  0.00). <sup>1</sup>H NMR splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q) or quintuplet (p). All first-order splitting patterns were assigned on the basis of the appearance of the multiplet. Splitting patterns that could not be easily interpreted are designated as multiplet (m) or broad (br). Carbon nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C NMR) spectra were recorded on Varian Mercury-300 MHz, Bruker WM-250 MHz or Bruker AMX-500 MHz spectrometers. Carbon resonances were assigned using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) spectra obtained with phase angles of 135°. Chemical ionization (CI) mass spectra were carried out on a Finnigan TraceMS mass spectrometer. FAB mass spectra were recorded on a Micromass Autospec mass spectrometer. ESI-TOF mass spectra were recorded on a Bruker Microtof ESI-TOF. FTIR measurements were made on a JASCO FT/IR-400 spectrophotometer using 5–10 mm solutions in CHCl<sub>3</sub> placed in a NaCl IR cell.

**<sup>1</sup>H NMR assignments of cyclic peptides.** The signals of the <sup>1</sup>H NMR spectra of the peptides in CDCl<sub>3</sub> were identified from the corresponding spectra acquired at the indicated concentrations and temperatures. Mixing times (~250 or 400 ms) were not optimized. Spectra were typically acquired using Bruker standard pulse sequences on 500 MHz spectrometers, and were referenced relative to residual proton resonances in CDCl<sub>3</sub> (at 7.26 ppm). <sup>1</sup>H NMR spectra were also obtained on a Bruker MX-500 spectrometer. Owing to conformational averaging on the NMR time scale, monomeric peptides with C<sub>3</sub> sequence symmetry generally had C<sub>3</sub>-degenerate <sup>1</sup>H NMR spectra, and their dimers D<sub>3</sub>-degenerate spectra.

**cis-4-aminocyclopent-2-enecarboxylic acid hydrochloride (CIH.H-Ace-OMe).** A solution of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one (25.0 g, 229.3 mmol)

in 1.3 l of HCl (10%) was stirred for 24 h at room temperature and then concentrated *in vacuo*. Addition of acetone to the resulting yellow oil gave a white solid, *cis*- $\gamma$ -Ace hydrochloride, that was filtered off and washed with acetone [29.08 g, 100%,  $R_f$  = 0.46 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1 : 1))]. **<sup>1</sup>H NMR** (D<sub>2</sub>O, 250.13 MHz,  $\delta$ ) : 6.2-5.9 (dd, 2H), 4.37 (s, 1H), 3.71 (p, 1H), 2.71-2.58 (dt, 2H), 2.09-1.99 (dt, 2H) [51].

**(1S,4R)-4-Amino-N-*t*-butyloxycarbonylcyclopent-2-enecarboxylic acid (L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH).** To a solution of *cis*- $\gamma$ -Ace hydrochloride (37.0 g, 163.45 mmol) in water (750 ml) and dioxane (750 ml) were added Boc<sub>2</sub>O (74.02 g, 339.55 mmol) and DIEA (118.6 ml, 679.1 mmol). After stirring at room temperature (rt) for 3 h, the solution was acidified to pH 3 by the addition of HCl (10%) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated, providing a yellow oil that was crystallized from 1 : 1 CHCl<sub>3</sub>/hexanes, giving 41.9 g and 11.3 g of Boc- $\gamma$ -Ace-OH in successive crystallizations. This racemic product was resolved by crystallization from 1 : 1 CHCl<sub>3</sub>/hexane in the presence of (+)- $\alpha$ -phenylethylamine (0.7–1 equiv.), and the resulting white crystals were washed with hexane, poured into a separation funnel and dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with HCl (5%) (this operation was repeated 2–3 times). The combined organic layers were dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered, concentrated and the resulting oil crystallized from CHCl<sub>3</sub>/hexane (1 : 1) [99%,  $R_f$  = 0.71 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (1 : 1)), white crystals]. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250.13 MHz,  $\delta$ ) : 10.8 (s, 1H), 6.30 and 4.98 (s, 1H), 5.90 (s, 2H), 4.80-4.51 (m, 1H), 3.51 (s, 1H), 2.64-1.77 (m, 2H), 1.46 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 62.90 MHz,  $\delta$ ) : 179.1 (CO<sub>2</sub>H), 155.5 (CO), 135.1 (CH), 131.2 (CH), 79.8 (C), 56.1 (CH), 49.4 (CH), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>3</sub>). **MS (CI) [m/z (%)]:** 228 ((M + H)<sup>+</sup>, 60), 171 (100), 127 (52), 110 (66). **[MH]<sup>+</sup> calculated** for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> 228.1158, **found:** 228.1238. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -46.1 (C = 1.0, MeOH).

**(1R,3S)-3-Amino-N-*t*-butyloxycarbonyl cyclopentane-carboxylic acid (L-Boc- $\gamma$ -Acp-OH).** A solution of L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH (2.58 mg, 11.36 mmol) in EtOH (40 ml) was treated with 10% Pd/C (120.9 mg, 1.36 mmol) and hydrogenated at balloon pressure for 12 h. The insolubles were separated by filtration through Celite, rinsed with EtOH and concentrated to provide L-Boc- $\gamma$ -Acp-OH as a white solid [2.60 g, 99%,  $R_f$  = 0.60 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9 : 1))] [39].

**HCl.H-Aib-OMe.** 2-Aminoisobutyric acid (1g, 9.70 mmol) was suspended in methanol (10 ml) and cooled with an ice bath. SOCl<sub>2</sub> (0.95 ml, 13.09 mmol) was added dropwise to the stirred solution. After the complete addition of thionyl chloride, the mixture was heated for 3 h at 50 °C. The solvent was evaporated *in vacuo* three times. Addition of CHCl<sub>3</sub> to the resulting yellow oil gave a white solid that was filtered off

and washed with acetone. [1.40 g, 94%,  $R_f$  = 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9 : 1))]. **<sup>1</sup>H NMR** (D<sub>2</sub>O, 250.13 MHz,  $\delta$ ) : 3.79 (s, 3H), 1.55 (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 62.90 MHz,  $\delta$ ) : 173.4 (CO<sub>2</sub>H), 57.2 (C), 54.2 (CH<sub>3</sub>), 23.3 (CH<sub>3</sub>). **MS (CI) [m/z (%):** 117 ((M + H)<sup>+</sup>, 63), 88 (15), 57.5 (100). **[MH]<sup>+</sup> calculated** for C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> 118.08608, **found:** 118.0866.

**Boc-(L- $\gamma$ -Ace-Aib-)-OMe (4).** A suspension of HCl.H-Aib-OMe (812 mg, 5.29 mmol) and L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH (600 mg, 2.64 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) was cooled with an ice bath. The stirred solution was successively treated with HATU (1.10 g, 2.90 mmol) and DIEA (1.84 ml, 10.69 mmol). After 60 min stirring at 0 °C the solution was poured into a separation funnel and washed with HCl (5%) and NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.*). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure to give 858 mg of the target dipeptide (99%, white solid). **<sup>1</sup>H NMR** (250.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) : 6.59 (s, 1H), 5.89-5.76 (m, 2H), 5.24 (s, 1H), 4.64 (t, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.22 (d, 1H), 1.82 (t, 1H), 1.76 (t, 1H), 1.50 (d, 6H), 1.39 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (62.90 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) : 175.1 (C=O), 173.6 (C=O), 155.4 (C=O), 135.0 (CH), 131.7 (CH), 79.2 (C), 56.4 (C), 56.0 (CH), 52.7 (OCH<sub>3</sub>), 51.4 (CH), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (CH<sub>3</sub>), 24.9 (CH<sub>3</sub>). **MS-FAB<sup>+</sup> [m/z (%):** 327 (100) [MH<sup>+</sup>], 227 (41), 154 (65). **HRMS [MH]<sup>+</sup> calculated** for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 327.1920, **found:** 327.1918.

**Boc-(L- $\gamma$ -Ace-Aib)-OH (5).** A solution of Boc-[(L- $\gamma$ -Ace-Aib)-]OMe (4) (400 mg, 1.23 mmol) in MeOH (12 ml) was treated with CsOH (921 mg, 6.15 mmol) in water (4 ml) and stirred at rt for 3 h. After removal of the solvent, the residue was dissolved in water (25 ml) and this solution was acidified to pH 3 by the addition of 10% HCl, and finally extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to give 290 mg of the target dipeptide (75%, white solid). **<sup>1</sup>H NMR** (250.13 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ) : 8.24 (s, 1H), 5.78 (s, 2H), 4.61 (t, 1H), 3.39 (dt, 1H), 2.48 (dt, 1H), 1.65 (dt, 1H), 1.44 (d, 15H). **MS (ESI.TOF) [m/z (%):** 351 [M + K<sup>+</sup>], 335 [M + Na<sup>+</sup>], 313 [MH<sup>+</sup>], 279. **HRMS [MH]<sup>+</sup> calculated** for C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 327.17188, **found:** 313.1758.

**Boc-((L- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>2</sub>)-OMe (7).** A solution of Boc-[(L- $\gamma$ -Ace-Aib)-]OMe (4) (420.0 mg, 1.29 mmol) in TFA/DCM (1 : 1, 13 ml) was stirred at rt for 15 min. After removal of the solvent, the residue was dried under high vacuum for 2 h and then dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:DMF (2 : 1, 15 ml) and **5** (403 mg, 1.29 mmol), HATU (539.5 mg, 1.42 mmol), DIEA (1.35 ml, 7.74 mmol) were successively added. After 60 min stirring at 0 °C the solution was poured into a separation funnel and washed with HCl (5%) and NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.*). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to give 586 mg of the target tetrapeptide (87%, white solid). **<sup>1</sup>H NMR** (250.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) : 7.29 (d, 1H),

6.80 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.96–5.85 (m, 4H), 5.39 (d, 1H), 4.99 (t, 1H), 4.70 (t, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 2.44–2.24 (4 x t, 2H), 1.84–1.76 (m, 4H), 1.56–1.54 (d, 12H), 1.43 (s, 9H).  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 62.90 MHz): 175.0 (CO), 173.8 (CO), 173.7 (CO), 173.4 (CO), 155.4 (CO), 135.1 (CH), 134.8 (CH), 132.3 (CH), 132.1 (CH), 79.2 (C), 77.4 (C), 56.9 (C), 56.6 (CH), 56.0 (C), 54.4 (CH), 52.7 (CH), 51.9 (CH), 51.3 (CH), 35.1 ( $\text{CH}_2$ ), 34.7 ( $\text{CH}_2$ ), 28.6 ( $\text{CH}_3$ ), 25.9 ( $\text{CH}_3$ ). **MS-FAB<sup>+</sup> [m/z (%)]**: 521 (86) [ $\text{MH}^+$ ], 394 (27), 325 (44), 231 (68). **HRMS [MH]<sup>+</sup> calculated** for  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7$ : 521.297525, **found**: 521.298274.

**Boc-((L- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>3</sub>)-OMe (9)**. Prepared in the same way as tetrapeptide Boc-[(L- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>2</sub>]-OMe using Boc-[(LL- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>2</sub>]-OMe (192 mg, 0.370 mmol) and Boc-[(L- $\gamma$ -Ace-Aib)-OH] (121 mg, 0.388 mmol) to afford 208 mg of the desired hexapeptide (79%).  **$^1\text{H}$  NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C,  $\delta$ ): 7.38 (d, 1H), 7.31 (d, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.90–5.70 (m, 6H), 5.37 (s, 1H), 4.90 (t, 2H), 4.64 (t, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.24 (t, 3H), 2.30–2.10 (m, 3H), 2.10–1.56 (m, 8H), 1.47 (d, 18H), 1.36 (s, 9H), 1.15 ( $\text{H}_2\text{O}$ ). **MS (ESI-TOF) [m/z (%)]**: 738 ( $M + \text{Na}^+$ ), 715 ( $M^+$ ), 615, 327. **HRMS [MH]<sup>+</sup> calculated** for  $\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_9$ : 715.3988, **found**: 715.4025.

**cyclo-((L- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>3</sub>)- (3)**. A solution of Boc-[(L- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>3</sub>]-OMe (9) (65 mg, 0.091 mmol) in MeOH (4 ml) was treated with CsOH (136 mg, 0.91 mmol) in water (1.5 ml) and stirred at rt for 3 h. After removal of the solvent, the residue was dissolved in water (10 ml) and this solution was acidified to pH 3 by the addition of 10% HCl, and finally extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in 4 ml of TFA/DCM (1 : 1) and stirred at rt for 15 min. After removal of the solvent, the residue was dried under high vacuum for 3 h and used without further purification. The linear peptide was dissolved in DCM:DMF (2 : 1, 90 ml) and treated with PyAOP (78 mg, 0.14 mmol), followed (dropwise) by DIEA (95  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol). After 12 h, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by HPLC, affording 9 mg of **3** as a white solid {17%,  $R_t$  = 18 min [Inertsil ODS 2 semi-preparative column, 5% ACN (0.1% TFA) 5 min, 5%–50% ACN (0.1% TFA) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA), 25 min]}.  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 500.13 MHz,  $\delta$ ): 7.16 (d, 2H), 6.25 (s, 2H), 5.86 (d, 6H), 4.92 (t, 3H), 3.27 (d, 3H), 2.38–2.36 (dt, 3H), 1.79 (d, 3H), 1.52 (d, 18H). **MS (ESI-TOF) [m/z (%)]**: 605 ( $M + \text{Na}^+$ ), 583 ( $M^+$ ), 507. **HRMS (ESI-TOF) calculated** for  $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_6$ : 583.3199, **found**: 583.3239.

**cyclo-((L- $\gamma$ -Acp-Aib)<sub>3</sub>)- (10)**. A solution of cyclo-[(L- $\gamma$ -Ace-Aib)<sub>3</sub>] (4 mg, 7  $\mu\text{mol}$ ) in MeOH (2 ml) was treated with 10% Pd/C (1.5 mg, 3.5  $\mu\text{mol}$ ) and the mixture was stirred at rt under hydrogen overnight.

The resulting mixture was filtered through a Celite pad, the residue was washed with methanol, and the combined filtrates and washings were concentrated under reduced pressure, affording 4 mg of c-[(L- $\gamma$ -Acp-Aib)<sub>3</sub>] as a white solid (99%).  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 500.13 MHz,  $\delta$ ): 7.59 (d, 3H), 5.88 (s, 3H), 4.33 (m, 3H), 2.67 (m, 3H), 2.12–1.67 (m, 18H), 1.62 (s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 1.52 (d, 18H).

**Measurement of association constants by variable-concentration  $^1\text{H}$  NMR.** The HPLC-purified peptide **3** was dissolved in  $\text{CDCl}_3$  and their association constants  $K_a$  estimated as described in Ref. 56.

**Van't Hoff analysis of dimerization.** The HPLC-purified CP **3** was dissolved in  $\text{CDCl}_3$  at concentrations ranging from 0.1 to 9.0 mM.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at intervals of 10 K in the temperature range 243–303 K.  $K_a$  was estimated at each temperature as described in Ref. 56. Analysis of a plot of  $1/T$  (K) vs  $\ln K_a$  then afforded the values  $\Delta H^\circ_{298} = -22.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $\Delta S^\circ_{298} = -44.6 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

In conclusion, we have shown definitively that the CPs that consist of  $\alpha,\alpha$ -dialkylated  $\alpha$ -amino acids alternated with *cis*-3-aminocyclopent-2-enecarboxylic acid ( $\gamma$ -Ace) form dimers in which anti-parallel peptide rings are linked by a  $\beta$ -sheet-like set of six hydrogen bonds. Axially oriented methyl groups have been shown to block peptide aggregation and limit self-assembly to dimer formation. These CPs represent a novel class of nanotube caps that may find utility in the design of ligand-gated channels and stochastic sensing.

This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science and the ERDF (SAF2004-01044 and SAF2007-61015) and by the Xunta de Galicia [PGIDIT06PXIB209018PR and GRC2006/132]. C. R. thanks the Spanish M.E.C for his FPU fellowship.

## Supplementary Material

Supplementary electronic material for this paper is available in Wiley InterScience at: <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1075-2617/suppmat/>

## REFERENCES

- Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; **428**: 487–492.
- Cui D, Gao H. Advance and prospect of bionanomaterials. *Biotechnol. Prog.* 2003; **19**: 683–692.
- Allen TM, Cullis PR. Drugs delivery systems: Entering the mainstream. *Science* 2004; **303**: 1818–1822.
- Langer R. Drugs delivery: Drugs on Target. *Science* 2001; **293**: 58–59.
- Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999; **354**: SI32–SI34.
- Föster S, Konrad M. From self-organizing polymers to nano- and biomaterials. *J. Mater. Chem.* 2003; **13**: 2671–2688.

7. Föster S, Plantenberg T. From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002; **41**: 688–714.
8. Brea RJ, Granja JR. Self-assembly of cyclic peptides in hydrogen-bonded nanotubes. In *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. Marcel Dekker Inc.: 2004; Monticello, NY (USA); 3439–3457.
9. Patzke GR, Krumeich F, Nesper R. Oxidic nanotubes and nanorods-anisotropic modules for a future nanotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002; **41**: 2446–2461.
10. Bong DT, Clark TD, Granja JR, Ghadiri MR. Self-assembling organic nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001; **40**: 988–1011.
11. Ajayan PM, Zhou OZ. Applications of Carbon Nanotubes. *Top Appl. Phys.* 2001; **80**: 391–425.
12. Martin CR, Kohli P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; **2**: 29–37.
13. Gao X, Matsui H. Peptide-based nanotubes and their applications in bionanotechnology advanced materials. *Adv. Mat.* 2005; **17**: 2037–2050.
14. Ghadiri MR, Granja JR, Buehler LK. Artificial transmembrane ion channels form self-assembling peptide nanotubes. *Nature* 1994; **369**: 301–304.
15. Granja JR, Ghadiri MR. Channel-mediated transport for glucose across lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; **116**: 10785–10786.
16. Sanchez-Quesada J, Kim HS, Ghadiri MR. A Synthetic Pore-Mediated Transmembrane Transport of Glutamic Acid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001; **40**: 2503–2506.
17. Fernández-López S, Kim H-S, Choi EC, Delgado M, Granja JR, Khasanov A, Kraehenbuehl K, Long G, Weinberger DA, Wilcoxon K, Ghadiri MR. Antibacterial agents based on the cyclic D,L- $\alpha$ -peptide architecture. *Nature* 2001; **412**: 452–455.
18. Dartois V, Sanchez-Quesada J, Cabezas E, Chi E, Dubbelde C, Dunn C, Gritzen C, Weinberger D, Granja JR, Ghadiri MR, Parr TR Jr. Systemic Antibacterial Activity of Novel Synthetic Cyclic Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; **49**: 3302–3310.
19. Steinem C, Janshoff A, Vollmer MS, Ghadiri MR. Reversible photoisomerization of self-organized cylindrical peptide assemblies at air-water and solid interfaces. *Langmuir* 1999; **15**: 3956–3964.
20. Vollmer MS, Clark TD, Steinem C, Ghadiri MR. Photoswitchable hydrogen-bonding in self-organized cylindrical peptide systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999; **38**: 1598–1601.
21. Motesharei K, Ghadiri MR. Diffusion-limited size-selective ion sensing based on SAM-supported peptide nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; **119**: 11306–11312.
22. Couet J, Samuel JDJS, Kopyshv A, Santer S, Biesalski M. Peptide-polymers hybrid nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005; **44**: 3297–3301.
23. Ashkenasy N, Horne WS, Ghadiri MR. Design of self-assembling peptide nanotubes with delocalized electronic states. *Small* 2006; **2**: 99–102.
24. Ghadiri MR, Granja JR, Milligan RA, McRee DE, Khazanovich N. Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture. *Nature* 1993; **366**: 324–327.
25. Khazanovich N, Granja JR, McRee DE, Milligan RA, Ghadiri MR. Nanoscale tubular ensembles with specified internal diameters. Design of a self-assembled nanotube with a 13-Å Pore. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; **116**: 6011–6012.
26. Hartgerink JD, Granja JR, Milligan RA, Ghadiri MR. Self-assembling peptide nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; **118**: 43–50.
27. Rosenthal-Aiman K, Svensson G, Undén A. Self-assembling peptide nanotubes from enantiomeric pairs of cyclic peptides with alternating D and L amino acid residues. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; **125**: 3372–3373.
28. Seebach D, Matthews JL, Meden A, Wessels T, Baerlocher C, McCusker LB. Cyclo- $\beta$ -peptides: Structure and tubular stacking of cyclic tetramers of 3-aminobutanoic acid as determined from powder diffraction data. *Helv. Chim. Acta* 1997; **80**: 173–182.
29. Clark TD, Buehler LK, Ghadiri MR. Self-assembling cyclic 3-peptide nanotubes as artificial transmembrane ion channels. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; **120**: 651–656.
30. Karle IL, Handa BK, Hassall CH. The conformation of the cyclic tetrapeptide L-Ser(O-t-Bu)-[ $\beta$ ]-Ala-Gly-L-[ $\beta$ ]-Asp(OMe) containing a 14-membered ring. *Acta Crystallogr. Sect. B* 1975; **31**: 555–560.
31. Gauthier D, Baillargeon P, Drouin M, Dory YL. Self-assembly of cyclic peptide into nanotubes and then into highly anisotropic crystalline materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001; **40**: 4635–4638.
32. Leclair S, Baillargeon P, Skouta R, Gauthier D, Zhao Y, Dory YL. Micrometer-sized hexagonal tubes self-assembled by a cyclic peptide in a liquid crystal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004; **43**: 349–353.
33. Horne WS, Stout CD, Ghadiri MR. A heterocyclic peptide nanotube. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; **125**: 9372–9376.
34. Ranganathan D, Lakshmi C, Karle IL. Hydrogen-bonded self-assembled peptide nanotubes from cysteine-based macrocyclic bisureas. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; **121**: 6103–6107.
35. Semetey V, Didierjean C, Briand JP, Aubry A, Guichard G. Hydrogen-bonded self-assembled peptide nanotubes from enantiopure cyclo-N,N'-linked oligoureas: Design, synthesis, and crystal structure. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002; **41**: 1895–1898.
36. Shimizu LS, Hughes AD, Smith MD, Davis MJ, Zhang BP, zur Loye H-C, Shimizu KD. Self-assembled nanotubes that reversibly bind acetic acid guests. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; **125**: 14972–14973.
37. Amorín M, Castedo L, Granja JR. New cyclic peptide assemblies with hydrophobic cavities: The structural and thermodynamics basis of a new class of peptide nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; **125**: 2844–2845.
38. Amorín M, Castedo L, Granja JR. Self-assembled peptide tubulets with 7 Å pores. *Chem.-Eur. J.* 2005; **11**: 6543–6551.
39. Brea RJ, Amorín M, Castedo L, Granja JR. Methyl-blocked dimeric  $\alpha,\gamma$ -peptide nanotube segments: Formation of a peptide heterodimeric through backbone-backbone interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005; **44**: 5710–5713.
40. Amorín M, Brea RJ, Castedo L, Granja JR. The smallest  $\alpha,\gamma$ -peptide nanotubule segment: Cyclic  $\alpha,\gamma$ -tetrapeptide dimers. *Org. Lett.* 2005; **7**: 4681–4684.
41. Brea RJ, Castedo L, Granja JR. Large-diameter self-assembled dimers of  $\alpha,\gamma$ -cyclic peptides, with the nanotubular solid-state structural of cyclo-[(L-Leu-D-(Me)N- $\gamma$ -Acp)<sub>4</sub>]-4CHCl<sub>2</sub>COOH. *Chem. Com.* 2007; 3267–3269.
42. Ghadiri MR, Kobayashi K, Granja JR, Chadha RK, McRee DE. The structural and thermodynamic basis for the formation of self-assembled peptide nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995; **34**: 93–95.
43. Kobayashi K, Granja JR, Ghadiri MR.  $\beta$ -Sheet peptide architecture: Measuring the relative stability of parallel vs. antiparallel  $\beta$ -sheet. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995; **34**: 95–98.
44. Bong DT, Ghadiri MR. Self-assembling cyclic peptide cylinders as nuclei for crystal engineering. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001; **40**: 2163–2166.
45. Clark TD, Buriak JM, Kobayashi K, Isler MP, McRee DE, Ghadiri MR. Cylindrical  $\beta$ -sheet peptide assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; **120**: 8949–8962.
46. Horne WS, Ashkenasy N, Ghadiri MR. Modulating charge transfer through cyclic D,L- $\alpha$ -peptide self-assembly. *Chem. Eur. J.* 2005; **11**: 1137–1144.
47. Brea RJ, Vázquez ME, Mosquera M, Castedo L, Granja JR. Controlling multiple fluorescent signal output in cyclic peptide-based supramolecular systems. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; **129**: 1653–1657.
48. Brea RJ, Castedo L, Granja JR, Herranz MA, Sanchez L, Martín N, Seitz W, Guldi DM. Donor-acceptor hybrids electron transfer in Me-blocked heterodimeric  $\alpha,\gamma$ -peptide nanotubular. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; **104**: 5291–5294.

49. Sanchez-Quesada J, Isler MP, Ghadiri MR. Modulation ion channels properties of transmembrane peptide nanotubes through heteromeric supramolecular assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; **124**: 10004–10005.
50. Toniolo C, Crisma M, Formaggio M, Valle G, Cavicchioni G, Prêçigoux G, Aubry A, Kamphuis J. Structures of peptides from alpha-amino acids methylated at the alpha-carbon. *Biopolymers* 1993; **33**: 1061–1072.
51. Jagt JC, Van Leusen AM. Diels-Alder cycloadditions of sulfonyl cyanide with cyclopentadiene. Synthesis of 2-azabicyclo[2.2.1] hepta-2,5-dienes. *J. Org. Chem.* 1974; **39**: 564–566.
52. Marfey P. Determination of d-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* 1984; **49**: 591.
53. Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole, an efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* 1993; **115**: 4397–4398.
54. Albericio F, Carpino LA. Coupling reagents and activation. *Meth. Enzymol.* 1997; **289**: 104–126.
55. Schnolzer M, Alewood P, Jones A, Alewood D, Kent SB. *In situ* neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1992; **40**: 180–193.
56. LaPlanche LA, Thompson HB, Rogers MT. Chain association equilibria. A nuclear magnetic resonance study of hydrogen bonding of N-monosubstituted amides. *J. Phys. Chem.* 1965; **69**: 1482–1488.
57. Searle MS, Westwell MS, Williams DH. Application of a generalized enthalpy-entropy relationship to binding co-operatively and weak association in solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1995; 141.
58. Dunitz JD. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem. Biol.* 1995; **2**: 709–712.
59. Brown HC. *Organic Synthesis via Boranes*. John Wiley and Sons: New York, 1975.
60. Chai CLL, Armarego WIF. *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th Ed. Elsevier Science: Burlington, 2003.

## $\alpha,\gamma$ -Peptide Nanotube Templating of One-Dimensional Parallel Fullerene Arrangements

César Reiriz,<sup>†</sup> Roberto J. Brea,<sup>†</sup> Rocío Arranz,<sup>‡</sup> José L. Carrascosa,<sup>‡</sup> Alejandra Garibotti,<sup>§</sup> Brendan Manning,<sup>§</sup> José M. Valpuesta,<sup>‡</sup> Ramón Eritja,<sup>§</sup> Luis Castedo,<sup>†</sup> and Juan R. Granja<sup>\*,†</sup>

Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, E-28049 Madrid, Spain, and Institute for Research in Biomedicine, IQAC-CSIC, CIBER-BBN Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Baldori Reixac 15, E-08028 Barcelona, Spain

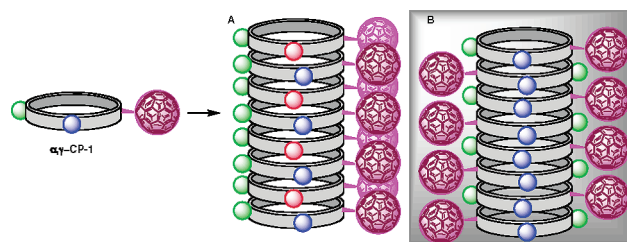
Received June 4, 2009; E-mail: juanr.granja@usc.es

The potential of functional 1D, 2D, and 3D nanostructured materials has intensified the quest for their fabrication because of their technological applications in biosensing, pharmacology, and catalysis.<sup>1</sup> Supramolecular chemistry provides an important method (a bottom-up approach) for the development and preparation of nanoscale objects and devices in which small molecules are combined in a predetermined way and linked by means of noncovalent interactions.<sup>2</sup> In this regard, among the most significant examples are the self-assembling peptide nanotubes (SPNs), in which cyclic peptides (CPs) in a flat conformation stack on top of one another to form cylindrical structures.<sup>3</sup> The amino acid side chains are oriented outward in a very predictable and ordered fashion at the nanotube surface, thus providing the opportunity to design nanotubes with function-based properties.<sup>4</sup>

In the past few years, we have been working on the design of  $\alpha,\gamma$ -SPNs. Although our initial aims were particularly focused on dimeric models (the most basic SPN structure) because of their relative ease of characterization, we were able to show their improved self-assembly properties and control of the ensemble diameter.<sup>5,6</sup> We present here for the first time the full characterization of a single  $\alpha,\gamma$ -SPN bearing fullerene side chains. The nanotube-directed self-assembly process allows the C<sub>60</sub> moieties to be organized into 1D structures that may have applications in the preparation of nanosized wires (Scheme 1).<sup>7</sup> The fullerene moiety was selected to aid in the characterization of the  $\alpha,\gamma$ -SPN as well as for its important chemical, supramolecular, electrochemical, and photophysical properties that may have a role in future applications in the preparation of nanosized wires.<sup>8</sup> Numerous different types of supramolecular arrangements have been described, depending on the conditions and surface properties under which the fullerenes were deposited on the surface.<sup>9</sup> However, from a technological and scientific point of view, new methods (such as that described here) in which the fabrication of ordered arrays of fullerenes on solid surfaces is directed by nanotube formation are needed.<sup>10</sup>

For the nanotube preparation, an  $\alpha,\gamma$ -cyclic octapeptide with a nonsymmetrical structure was designed to disfavor highly ordered nanotube organization. The introduction of hydrophilic residues increases the water solubility of the CP and at the same time helps to induce the self-assembly process under appropriate and controlled conditions (Scheme 1).<sup>11</sup> In order to reduce the register freedom on the nanotube (Scheme 2A and SI-1 in the Supporting Information),<sup>12</sup> hydrophilic amino acids were selected to form complementary interstrand salt-bridge interactions once the self-assembly

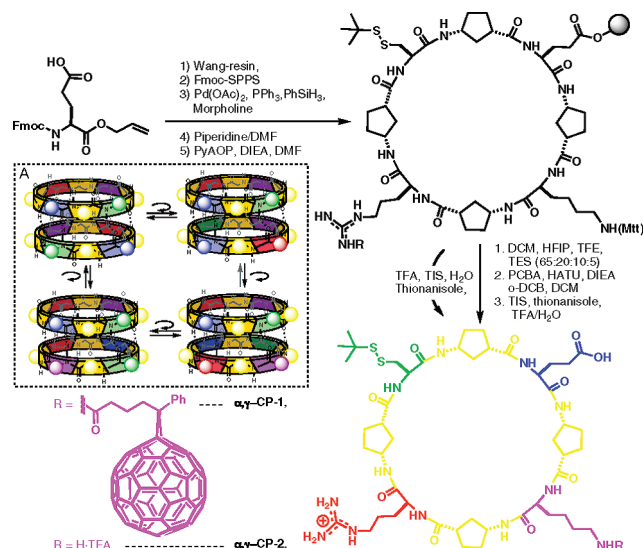
**Scheme 1.** Model for Peptide Nanotube Formation from  $\alpha,\gamma$ -CP-1 in Which the Self-Assembly Process Can Be Directed by (A) Salt-Bridge Interactions (Red and Blue Balls) or (B) Induced by the Surface Properties



process had taken place. These salt-bridge interactions must induce the predominant formation of only one  $\beta$ -sheet register in the nanotube and also reinforce the SPN formation.

The design outlined above was used to prepare  $\alpha,\gamma$ -CP-2 by Fmoc solid-phase synthesis on a Wang resin, and this compound was cyclized prior to cleavage with trifluoroacetic acid (TFA) (Scheme 2). The use of the methyltrityl group for protection of the Lys side chain allowed its selective removal by treatment with trifluoroethanol (TFE) in dichloromethane (DCM) before peptide cleavage. The resulting lysine-deprotected resin-linked CP was then coupled with PCBA<sup>13</sup> in *o*-dichlorobenzene/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in the presence

**Scheme 2.** Structures of  $\alpha,\gamma$ -CP-1 and  $\alpha,\gamma$ -CP-2 and the Solid-Supported Synthetic Strategy Followed for Their Preparation (A Model of the Four Possible  $\beta$ -Sheet Registers Corresponding to the  $\alpha,\alpha$ -Face Hydrogen-Bonding Interaction Is Shown in Inset A)



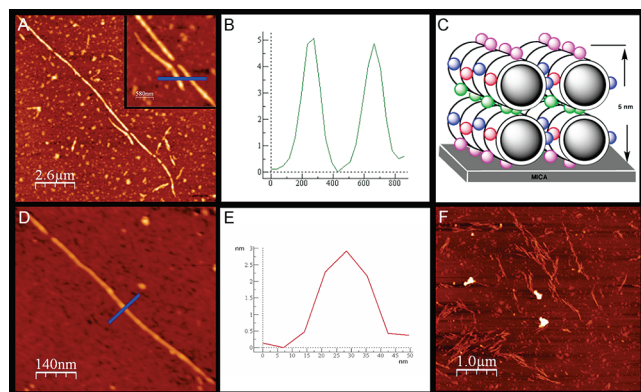
<sup>†</sup> Universidad de Santiago de Compostela.

<sup>‡</sup> Centro Nacional de Biotecnología.

<sup>§</sup> Institute for Research in Biomedicine.

of HATU and DIEA to generate, after cleavage with the TFA cocktail,  $\alpha,\gamma$ -CP-1. While  $\alpha,\gamma$ -CP-2 was purified by reversed-phase HPLC before nanotube formation studies,  $\alpha,\gamma$ -CP-1 was simply resuspended in Et<sub>2</sub>O, centrifuged, decanted, and used without further purification. As a consequence of the 180° orientation between the Arg and Glu residues and the characteristic antiparallel  $\beta$ -sheet-type structure of the nanotube interactions, SPN formation directed by the peptide self-assembly process would give rise to structures in which all of the fullerene moieties are oriented toward the same nanotube side (model A, Scheme 1). On the other hand, anionic surface-induced self-assembling systems, such as mica,<sup>14</sup> should direct all of the Arg residues toward the same nanotube face to interact with the surface, while the Glu side chain, if protonated, could also participate in SPN stabilization through hydrogen-bonding interactions (model B, Scheme 1).<sup>15</sup> In this second nanotube arrangement, the fullerene moieties would be alternately oriented toward the two sides of the nanotube.

With this aim in mind,  $\alpha,\gamma$ -CP-2 was dissolved under acidic conditions (1% TFA), and the resulting solution was placed on a mica surface and removed after 5–10 min. Atomic force microscopy (AFM)<sup>16</sup> images of this adsorbed CP revealed the formation of long fibrous structures that were several micrometers long, 5 nm in height, and more than 100 nm wide (Figure 1A,B). These structures may consist of several SPNs packed in a parallel manner on the anionic surface through the interaction of the Lys side chains with the mica, while the Arg and Glu side chains participate in inter- and intratubular salt-bridge formation. In this type of arrangement, the Cys *tert*-butyl groups are exposed to the solvent medium. In order to reduce the exposure of these groups, a second nanotube sheet must be placed on top of the already-deposited SPN layer (Figure 1C). Additionally, shorter agglomerated structures were also observed. In this case, these arrangements have needle-shaped structures that are 2.5–3.0 nm in height, which corresponds to the expected single-nanotube diameter. The SPNs are probably deposited together as a result of nonspecific hydrophobic interactions or salt-bridge formation (see Figures SI-1–SI-4 in the Supporting Information).

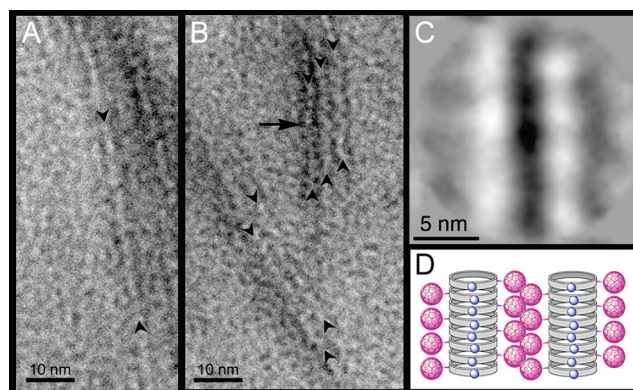


**Figure 1.** (A) AFM image of  $\alpha,\gamma$ -CP-2 adsorbed on mica, showing long linear structures. Inset: magnified image of some of the long linear structures. (B) Profile obtained along the blue line shown in the inset of (A). (C) Schematic illustration of the bilayer arrangement proposed for  $\alpha,\gamma$ -CP-2 deposition on mica. (D) AFM image of an  $\alpha,\gamma$ -CP-1 sample adsorbed on mica, showing a single nanotube. (E) Height profile measured along the blue line shown in (D). (F) AFM image of  $\alpha,\gamma$ -CP-1 adsorbed on mica, showing bundles of nanotubes.

On the basis of the above results, we decided to characterize  $\alpha,\gamma$ -CP-1, in which the introduction of the fullerene moiety not only would help to characterize the nanotube structure but, as mentioned earlier, also would have possible applications in mo-

lecular electronic components such as nanowires because the SPN formation represents a new way to template the 1D supramolecular organization of C<sub>60</sub>. AFM images of  $\alpha,\gamma$ -CP-1, which contains only one basic group (Arg) to interact with the surface and was deposited under similar conditions on mica, revealed the formation of small, needle-shaped structures ranging from 3.0 to 3.5 nm in height and packed together via fullerene-directed nanotube aggregation (Figure 1D,E), although large and isolated linear organizations were also observed (Figure 1F).

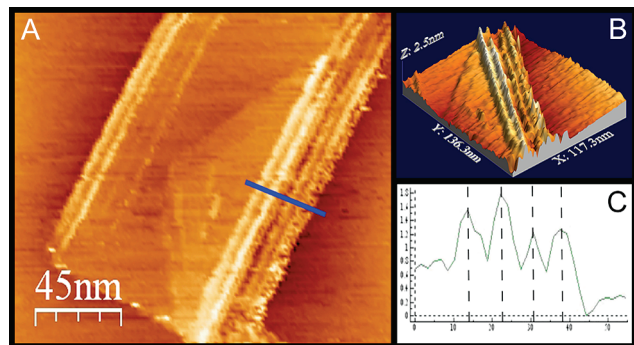
The same sample of  $\alpha,\gamma$ -CP-1 was studied by transmission electron microscopy (TEM). In this case, aliquots of the sample were applied to previously cleaved mica and left to evaporate. The samples were subsequently floated on a water–ethanol mixture and collected over 400 mesh Cu/Rh grids, which were then negatively stained with uranyl acetate solution. Under these conditions, electron microscopy revealed the presence of long filaments (~200 nm) that were ~2.5 nm wide, consistent with the width of the nanotubes. The nanotubes were mainly observed as single entities (arrowheads in Figure 2A) or grouped in pairs (arrowheads in Figure 2B), although other types of aggregations were also observed. The averaging of small areas of these double filaments using maximum-likelihood procedures<sup>17</sup> (Figure 2C) not only confirmed the width of the nanotubes but revealed a periodicity in the structure that we believe is due to the interaction of the stain with the line of fullerenes, which are located on one side in the case of the single nanotubes or both sides in the case of the double ones. The fullerene lines are not always visible but in some cases are contrasted by the stain and detected as a line that is ~1 nm wide (arrow in Figure 2B). These two types of structures correlate quite well with the previously proposed model B (Scheme 1), but the formation of the two parallel nanotubes must be due to fullerene aggregation, in which the C<sub>60</sub> moieties are hydrophobically interdigitated to induce their pairing (Figure 2D).



**Figure 2.** Electron microscopy fields of negatively stained (A) single filaments and (B) two- and three-filament arrangements. Arrowheads indicate the nanotubes, whereas the arrow shows a line of fullerenes. (C) Two-dimensional average image of small areas of the double-filament structure. (D) Model proposed for the nanotube pairs observed by TEM.

Nanotube assemblies were further studied by scanning tunneling microscopy (STM). A 1% TFA solution of  $\alpha,\gamma$ -CP-1 was deposited on a highly ordered pyrolytic graphite surface and allowed to dry. STM images of this surface showed a reduced number of deposited nanotubes, and in most cases, these were found at the edge of graphite plates (Figure 3). Most of the observed structures were characterized by the presence of two parallel lines with heights of 1 nm, and these could correspond to the ordered fullerenes. The peptide backbone was not visible, but the C<sub>60</sub> molecules appeared as bright rods because of their high electron density, which resulted

in an increased tunneling probability. The fullerene arrangements were separated in most cases by 6–7 nm, a distance that corresponds to the distance between fullerenes in the previously described model B (Scheme 1), again confirming the peptide nanotube structure and its capability to organize the fullerene deposition.



**Figure 3.** (A) Constant-current STM image of self-assembled  $\alpha,\gamma$ -CP-2 on highly ordered pyrolytic graphite, in which two parallel strands  $\sim 1$  nm in height are observed. (B) 3D topographic STM image representative of the  $\alpha,\gamma$ -CP-1 arrangement to form the observed parallel  $C_{60}$  organization. (C) Height profile measured along the blue line shown in (A), confirming the proposed nanotube organization.

In conclusion, we have demonstrated the formation and full characterization by AFM, STM, and TEM of a new class of peptide nanotubes from  $\alpha,\gamma$ -CPs. These CPs are able to align the  $C_{60}$  moieties to form 1D fullerene arrangements in which the fullerenes point outward from the nanotube on both sides ( $180^\circ$  orientation) of the SPN. It is worth noting that the observed structure relies on the aforementioned design principles in which the formation of the four nonidentical antiparallel  $\beta$ -sheet forms per CP–CP hydrogen-bonding interaction present in the nanotube ( $D_\alpha, D_\gamma$ ; Scheme SI-1 in the Supporting Information)<sup>12</sup> is restricted and controlled by the interstrand salt-bridge interactions. This control of the self-assembly process is able to organize the fullerene deposition to give 1D structures. As a consequence of this special arrangement, the fullerenes form two parallel wires separated by an insulating material, i.e., the peptide nanotube. The precise nanotube register control demonstrated here opens up opportunities not only for 1D alignment of other materials but also for other supramolecular organizations, such as helical. These structure types may have applications as nanowire components and/or in optical and electronic devices.

**Acknowledgment.** This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science and the ERDF [SAF2007-61015 and Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00006)] and the Xunta de Galicia (GRC2006/132, PGIDIT06PXIB209018PR, PGIDIT08CSA047209PR, and R2006/124). The work by J.M.V. and J.L.C. was supported by Grants BFU2007-62382/BMC from the Spanish MEC (J.M.V.) and S-0505/MAT/0283 from the Madrid Regional Government (J.M.V. and J.L.C.). C.R. and R.J.B. thank the Spanish MEC for their FPU Fellowships. We also thank Dr. Carmen Serra (Nanotechnology and Surface Analysis Service at C.A.C.T.I., University of Vigo) for her help with STM. We also thank Dowpharma for their kind gift of ENZA enzymes used in the preparation of *D*-Boc- $\gamma$ -Acp–OH.

**Supporting Information Available:** Additional AFM, STM, and TEM pictures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References

- (1) (a) Barth, J. V.; Constantini, G.; Kern, K. *Nature* **2005**, *437*, 671. (b) Crespo-Biel, O.; Jan Ravoo, B.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J. *J. Mater. Chem.* **2003**, *16*, 3997. (c) Heath, J. R.; Ratner, M. A. *Phys. Today* **2003**, *56*, 43. (d) Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547.
- (2) (a) For recent reviews on supramolecular chemistry and self-assembly, see this special issue: *Soft Matter* **2009**, *5*, 1109. (b) Rein, V.; Ulijn, R. V.; Smith, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664. (c) Palmer, L. C.; Stupp, S. I. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1674.
- (3) (a) Brea, R. J.; Granja, J. R. In *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*; Schwarz, J. A., Contescu, C. I., Putyera, K., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2004; p 3439. (b) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 988.
- (4) (a) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, *369*, 301. (b) Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785. (c) Dartois, V.; Sanchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Dubbelde, C.; Dunn, C.; Gritzen, C.; Weinberger, D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R.; Parr, T. R., Jr. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3302. (d) Vollmer, M. S.; Clark, T. D.; Steinem, C.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1598. (e) Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11306. (f) Couet, J.; Samuel, J. D. J. S.; Kopyshv, A.; Santer, S.; Biesalski, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297. (g) Ashkenasy, N.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. *Small* **2006**, *2*, 99.
- (5) (a) Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844. (b) Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem.—Eur. J.* **2005**, *11*, 6539. (c) Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, 3267. (d) Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem.—Eur. J.* **2008**, *14*, 2100.
- (6) (a) Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710. (b) Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Herranz, M. A.; Sanchez, L.; Martín, N.; Seitz, W.; Guldí, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 5291. (c) Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1653.
- (7) Feng, M.; Lee, J.; Zhao, J.; Yates, J. T., Jr.; Petek, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12394.
- (8) (a) Sánchez, L.; Otero, J.; Gallego, J. M.; Miranda, R.; Martín, N. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2081. (b) Giacalone, F.; Martín, N. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 5136. (c) Special issue on supramolecular chemistry of fullerenes, edited by N. Martín and J.-F. Nierengarten: *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1905. (d) *The Chemistry of Fullerenes*; Hirsch, A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005.
- (9) (a) Li, M.; Deng, K.; Lei, S.-B.; Yang, Y.-L.; Wang, T.-S.; Shen, Y.-T.; Wang, C.-R.; Zeng, Q.-D.; Wang, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6717. (b) Wang, Y.; Yamachika, R.; Wachowiak, A.; Grobis, M.; Crommie, M.-F. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 194. (c) Georgakilas, V.; Pellarini, F.; Prato, M.; Guldí, D. M.; Melle-Franco, M.; Zerbetto, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5075.
- (10) (a) Theobal, J. A.; Oxtoby, N. S.; Philips, M. A.; Champness, N. R.; Beton, P. H. *Nature* **2003**, *424*, 1029. (b) Guldí, D. M.; Zerbetto, F.; Georgakilas, V.; Prato, M. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 38.
- (11) (a) Okamoto, H.; Nakanishi, T.; Nagai, Y.; Takeda, K.; Obataya, I.; Mihara, H.; Azechara, H.; Mizutani, W. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, *43*, 67. (b) Okamoto, H.; Yamada, T.; Miyazaki, H.; Nakanishi, T.; Takeda, K.; Usui, K.; Obataya, I.; Mihara, H.; Azechara, H.; Mizutani, W.; Hashimoto, K.; Yamaguchi, H.; Hirayama, Y. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, *44*, 8240.
- (12) (a) Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 95. (b) Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43. (c) Horne, W. S.; Ashkenasy, N.; Ghadiri, M. R. *Chem.—Eur. J.* **2005**, *11*, 1137. (d) Murota, K.; Sakamoto, S.; Kudo, K. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 1070.
- (13) Hummelen, J.; Knight, B.; LePeq, F.; Wudl, F.; Yao, J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 532.
- (14) (a) Ulijn, R. V.; Smith, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664. (b) Whitehouse, C.; Fang, J.; Aggeli, A.; Bell, M.; Brydson, R.; Fishwick, C. W. G.; Henderson, J. R.; Knobler, C. M.; Owens, R. W.; Thomson, N. H.; Smith, D. A.; Boden, N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1965.
- (15) (a) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324. (b) Khazanovich, N.; Granja, J. R.; McRee, D. E.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011.
- (16) Horcas, I.; Fernandez, R.; Gomez-Rodríguez, J. M.; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Baro, A. M. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 013705.
- (17) Scheres, S. H. W.; Valle, M.; Núñez, R.; Sorzano, C. O. S.; Marabini, R.; Herman, G. T.; Carazo, J. M. *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 139.

JA904548Q

# $\alpha,\gamma$ -Cyclic peptide ensembles with a hydroxylated cavity†

César Reiriz, Manuel Amorín, Rebeca García-Fandiño, Luis Castedo and Juan R. Granja\*

Received 8th June 2009, Accepted 12th August 2009

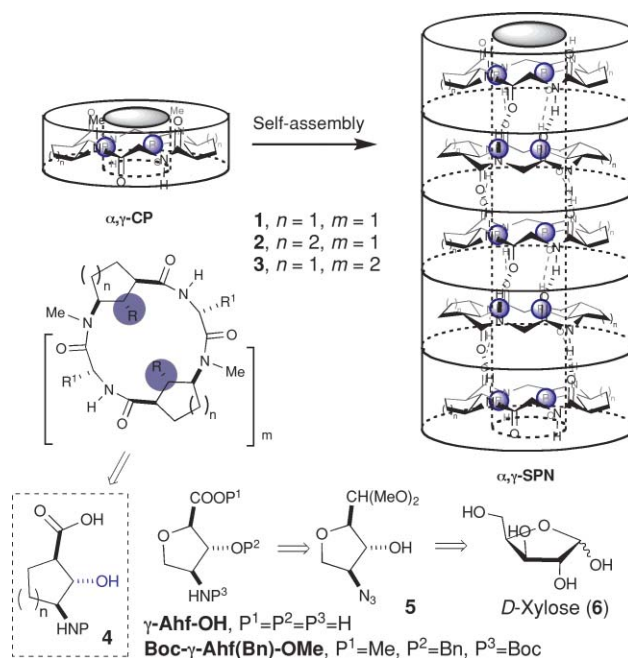
First published as an Advance Article on the web 26th August 2009

DOI: 10.1039/b911247m

Here we describe a self-assembling  $\alpha,\gamma$ -cyclic tetrapeptide that contains the 4-amino-3-hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylic acid, in which the hydroxy group is pointing towards the inner cavity of the resulting dimers.

Peptides have found applications in a variety of areas in science, ranging from drug design to nanomaterials, because of their ease of synthesis, introduction of chemical diversity, and large diversity and ease modulation of their 3D structures.<sup>1</sup> One of the simplest peptide modifications to improve biological properties or induce conformational changes is backbone N-methylation.<sup>2</sup> Cyclic peptides (CPs) that contain tertiary amides have also been used to change the pharmacological properties of peptides, as simple models for  $\beta$ -sheets, turn structures, or peptide nanotubes.<sup>3</sup> For example, self-assembling peptide nanotubes (SPNs)<sup>4</sup> are formed by stacks of CPs stabilized by  $\beta$ -sheet-type hydrogen-bonding interactions and dimer-forming homochiral N-methylated CPs have been used as simple models for the basic structure of nanotubes.<sup>5</sup> We describe here a new member of the dimer-forming CP family that is characterized by a novel structure and internal cavity, in which the use of a  $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -amino acid is able to stabilize the dimer but also to induce the formation of one major topoisomeric dimer. In recent years we have explored the properties of CPs composed of  $\alpha$ -amino acids ( $\alpha$ -Aas) alternated with  $\gamma$ -amino acids, more specifically a *cis*-3-aminocycloalkanecarboxylic acid ( $\gamma$ -Aca).<sup>6,7</sup> In these  $\alpha,\gamma$ -CPs (e.g. 1–3, Scheme 1) the relative rigidity of the cycloalkane ring, besides creating a hydrophobic cavity as a result of the projection of one of the cycloalkane methylenes into the lumen,<sup>7a</sup> ensures that the peptide backbone has the all-*trans* conformation required for the CP ring to be flat and stackable. Furthermore,  $\alpha,\gamma$ -CPs have the largest association constant reported for CPs that form SPNs.<sup>7a,8</sup> We report here our synthetic studies towards a C2-modified  $\gamma$ -amino acid, namely 4-amino-3-hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylic acid ( $\gamma$ -Ahf-OH), and its application in dimer-forming  $\alpha,\gamma$ -CPs.

In general, we envisaged that the 3-amino-2-hydroxy-cycloalkanecarboxylic acid derivatives (**4**) should have the hydroxy group in a *trans* orientation relative to the  $\alpha$ -carboxylic and  $\gamma$ -amino groups, so in the flat peptide conformation the hydroxy group would be projected into the cavity in a pseudoequatorial



**Scheme 1** Model for nanotube formation and synthetic strategy for C2-modified  $\gamma$ -amino acid ( $\gamma$ -Ahf-OH) and cyclic peptide precursor.

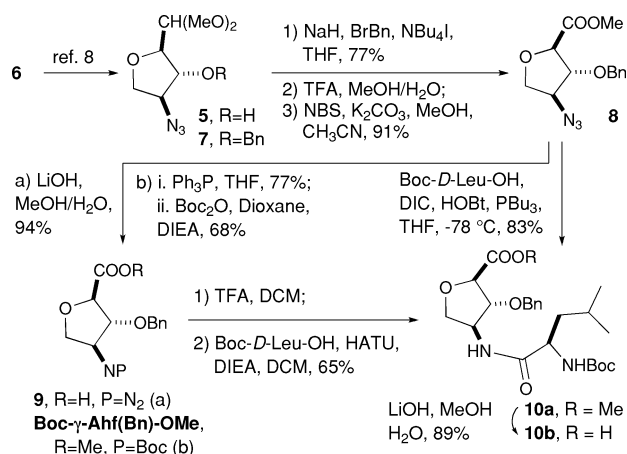
orientation (Scheme 1). In contrast, the all *cis*-isomer of **4** would direct the OH group in a pseudoaxial orientation and thus it would be perpendicular to the plane of the ring.

Given the above structural requirements, our synthetic objective was the fully protected derivative **Boc- $\gamma$ -Ahf(Bn)-OMe** (Scheme 1). We envisioned that this compound could be prepared from *D*-xylose (**6**) by means of previously described intermediate **5**,<sup>9</sup> which could then be transformed into **Boc- $\gamma$ -Ahf(Bn)-OMe** by benzylation, acetal/aldehyde oxidation, azide reduction and protection. The selection of appropriate orthogonal protecting groups for the amino, hydroxy and carboxylic groups would allow the use of this compound in either Fmoc or Boc solid and solution phase synthesis.<sup>10</sup> For our synthetic purposes, Boc, benzyl and methyl groups were selected, respectively, for solution phase synthesis.

According to the proposed synthetic sequence, *D*-xylose was transformed into compound **5** in five steps and 75% overall yield (Scheme 2).<sup>9</sup> Benzylation of the free hydroxy group by treatment of **5** with sodium hydride, benzyl bromide and tetrabutylammonium iodide provided compound **7** in 77% yield. In order to carry out the acetal oxidation, we initially attempted direct transformation to the methyl ester by several methods, including treatment with chromium salts,<sup>11</sup> DDQ,<sup>12</sup> oxone<sup>13</sup> or hydrogen peroxide and hydrogen chloride in methanol.<sup>14</sup> However, the use of these conditions did not give the desired ester in a reasonable yield. It was then decided to transform the acetal in a stepwise fashion

Departamento de Química Orgánica, Laboratorios del CSIC, Facultad de Química, Universidad de Santiago, 15782, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: juanr.granja@usc.es; Fax: (+34)981 5905012; Tel: (+34)981 563100#14251

† Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed descriptions of the synthesis of the key compounds and their complete characterization, atomic cartesian coordinates for the stationary points calculated with basis set [B3LYP/6-31G(d)], and interaction energies for dimers **D**<sub>c-16</sub> and **D**<sub>r-16</sub>. See DOI: 10.1039/b911247m



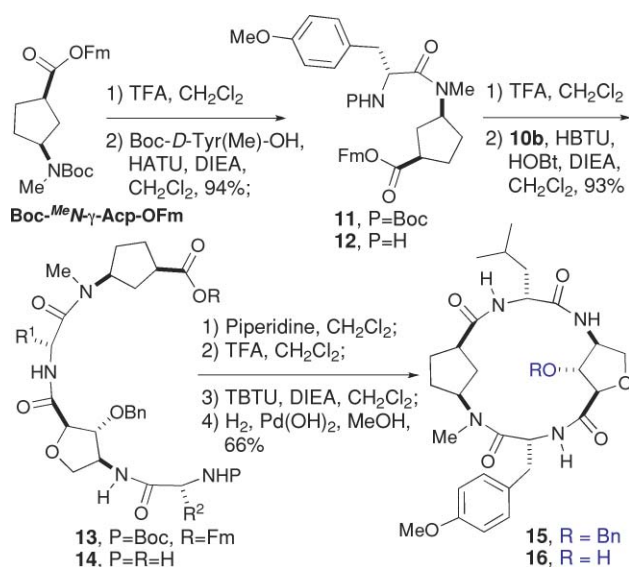
**Scheme 2** Synthesis of **Boc- $\gamma$ -Ahf(Bn)-OMe** and dipeptide **10b**.

to the aldehyde and later to the carboxylic acid derivative. The best conditions involved heating a 1:1 mixture in methanol in the presence of trifluoroacetic acid. The resulting aldehyde was oxidized with N-bromosuccinimide and potassium carbonate to give ester **8** in 91% yield.<sup>15</sup> Hydrolysis of this ester with lithium hydroxide gave the corresponding acid **9** in almost quantitative yield. The 4-azidotetrahydrofancarboxylic acid derivative can be used directly in peptide synthesis on a solid support,<sup>16</sup> where the coupling of each amino acid can be carried out by means of a Staudinger-type reaction.<sup>17</sup> Additionally, the Staudinger reduction with tributylphosphine in THF, followed by reaction with Boc anhydride and diisopropylethylamine in dioxane (route *b* in Scheme 2), provided the desired **Boc- $\gamma$ -Ahf(Bn)-OMe** in seven steps and 27% overall yield.

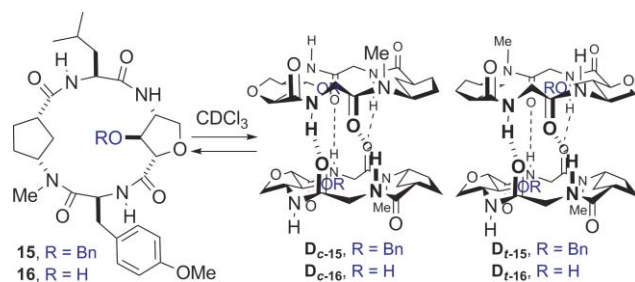
Treatment of **Boc- $\gamma$ -Ahf(Bn)-OMe** with trifluoroacetic acid followed by coupling with Boc-*D*-Leu-OH in the presence of HATU and diisopropylethylamine in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gave dipeptide **10a** in 65% yield.<sup>18</sup> This dipeptide was also obtained in similar overall yield by *in situ* Staudinger coupling of compound **8** with Boc-*D*-Leu-OH in the presence of tributylphosphine, diisopropylcarbodiimide and N-hydroxybenzotriazole.

Hydrolysis of **10a** with lithium hydroxide in a methanol/water mixture provided acid **10b** in 89% yield. The resulting compound was coupled with dipeptide **12** to provide tetrapeptide **13** in 93% yield (Scheme 3). Dipeptide **12** was obtained by TFA treatment of compound **11**, which was prepared from **Boc-MeN- $\gamma$ -Acp-OFm**.<sup>7d,e</sup> The use of *N*-methyl  $\gamma$ -Acp was selected to block nanotube formation by introducing steric impediments and removing hydrogen-donors on the  $\gamma$ -face of the ring.<sup>7</sup> Additionally, *D*-Tyr was selected to simplify peptide characterization and purification because of its spectroscopic properties. Finally, removal of *N*- and *C*-terminal protecting groups, by subsequent treatment with piperidine and TFA, provided the corresponding unprotected peptide **14**. The reaction of this tetrapeptide with TBTU and DIEA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in concentrations between 5–15 mM provided cyclic tetrapeptide **15** in 66% yield.<sup>19</sup> Finally, the benzyl-protecting group was removed by hydrogenolysis with palladium hydroxide in methanol to give **16** in almost quantitative yield.

The self-assembly process of the resulting peptides should provide two non-equivalent dimers depending on the relative orientation between the two  $\beta$ -sheet-forming CPs (Scheme 4). We

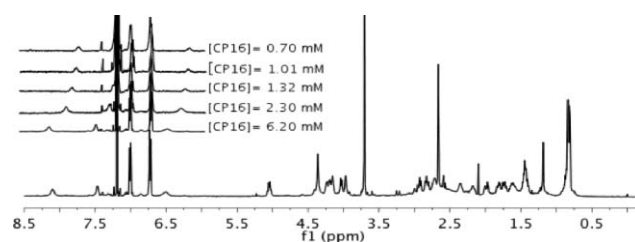


**Scheme 3** Synthesis of CP **16**.



**Scheme 4** Self-assembling properties of CPs **15** and **16** and the structure of the expected dimer registers, which differ in the relative orientation of the  $\gamma$ -Ahf, only CPs **16** is able to give the corresponding dimer (**D<sub>t-16</sub>**).

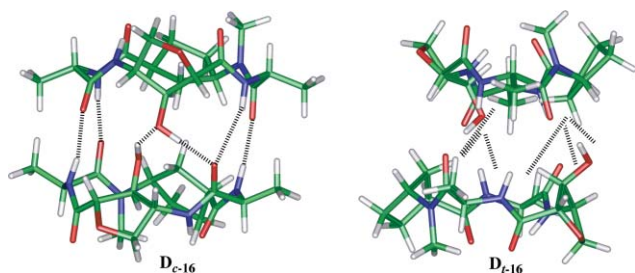
have denoted as *cis*-dimers (**D<sub>c-15</sub>** and **D<sub>c-16</sub>**) those in which the two  $\gamma$ -Ahf residues are on the same side of the dimer, while the *trans*-dimers (**D<sub>t-15</sub>** and **D<sub>t-16</sub>**) are those in which the xylose-derived  $\gamma$ -Aa are on opposite sides. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of protected CP **15** suggests that it does not undergo dimer formation (**D<sub>t-15</sub>**) as the N–H signals are not shifted downfield and are concentration independent. On the other hand, the <sup>1</sup>H NMR spectrum of the unprotected peptide **16** (Fig. 1) clearly shows that the NH groups [8.1 (NH<sub>Tyr</sub>) and 7.4 (NH<sub>Leu</sub>) ppm] are shifted downfield, suggesting their participation in hydrogen-bonding interactions, while the NH<sub>Ahf</sub> proton that is exposed to solvent in the dimeric form gives a signal at 6.6 ppm. The formation of dimers is also reflected



**Fig. 1** <sup>1</sup>H NMR spectrum of a 6.2 mM solution of peptide **16** in CDCl<sub>3</sub> with the 6.0–8.5 ppm region of the spectra of 6.20, 2.30, 1.32, 1.01 and 0.70 mM solutions, showing the downfield shift of NH<sub>Tyr</sub> and NH<sub>Leu</sub>.

by the downfield shift of the N–H resonances on increasing the concentration. The association constant, determined at 298 K by dilution experiments, was estimated to be  $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  in  $\text{CDCl}_3$ , almost two orders of magnitude larger than previously reported tetrapeptides.<sup>20</sup> So, the presence of the equatorially oriented hydroxy group pointing inwards into the ensemble is clearly participating in an intramolecular hydrogen-bonded interaction between both peptides in the dimer that is stabilizing it. Van't Hoff plots for the range 273–313 K afford values of  $-39.31 \text{ KJ/mol}$  for  $\Delta H^\circ_{298}$  and  $-53.38 \text{ J/K.mol}$  for  $\Delta S^\circ_{298}$  and these are consistent with dimerization being essentially an enthalpy-driven<sup>21</sup> hydrogen-bonding process. Dimer formation was also supported by MS, which gave a peak arising from a singly charged species corresponding to sodium dimer  $\mathbf{D}_{16}$  (1111), suggesting self-assembly properties and perhaps a good propensity for cation coordination.

Unfortunately, we were unable to establish the type ( $\mathbf{D}_{c-16}$  and  $\mathbf{D}_{r-16}$ ) or ratio of the topoisomeric dimers formed, either by dimensional NMR or by X-ray crystallography.<sup>22</sup> Computational modelling provided additional insights into the structural properties of peptide nanotubes and helped in the interpretation of experimental observations. These studies were performed using density functional theory (DFT) calculations, with the B3LYP functional and the standard 6-31G(d) basis set for geometry optimizations,<sup>23</sup> in order to evaluate the influence of the OH groups and to explore the dimer preference. As a starting point, we used the X-ray crystallographic data for the homodimer  $c\text{-}[(D\text{-Phe-}L\text{-}^{\text{Mc}}N\text{-}\gamma\text{-Ach})_2\text{-}]$ .<sup>7d</sup> From this structure, one of the *N*-methyl groups and the side chains of the  $\alpha$ -amino acids were removed, with the former change based on the low effect on the global stability of the dimer.<sup>24</sup> The hydroxylated structures  $c\text{-}[D\text{-Ala}_1\text{-}\gamma\text{-Ahf-}D\text{-Ala}_2\text{-}^{\text{Mc}}N\text{-}\gamma\text{-Acp-}]$  were prepared by replacing the corresponding aliphatic hydrogen by an OH group. The final energies were refined by single-point calculations using two different functionals: B3LYP and Truhlar functional M05-2x,<sup>25</sup> both with the 6-31+G(d,p) basis set.<sup>26</sup> The calculations were carried out with the GAUSSIAN03 package.<sup>27</sup> The most stable structure found was  $\mathbf{D}_{c-16}$ , in which both hydroxy groups form a hydrogen bond and at the same time the one acting as the acceptor also interacts with the carbonyl group present in the monomer (Fig. 2). On the other hand in  $\mathbf{D}_{r-16}$  both OH groups form respective hydrogen bonds with the carbonyl groups of the opposite monomer, with  $\text{N}\cdots\text{O}$  distances slightly longer than in  $\mathbf{D}_{c-16}$ . This dimer is between 1.53 (B3LYP functional) and 1.93 kcal/mol (Truhlar's functional) less stable than  $\mathbf{D}_{c-16}$ , suggesting that the strength of the hydrogen bond between the two hydroxyl groups is responsible for the preferential formation of the



**Fig. 2** Structure of two topoisomeric dimers of **16** ( $\mathbf{D}_{c-16}$  and  $\mathbf{D}_{r-16}$ ) optimized at the B3LYP/6-31+G(d,p).

*cis*-dimer ( $\mathbf{D}_{c-16}$ ). These results are consistent with those observed experimentally based on the above-mentioned lack of NOE cross-peaks between the Ahf and Acp  $\alpha$ - and  $\gamma$ -protons.

Interestingly, the analogous dehydroxylated dimers preferred the opposite *trans* conformation (1.59 or 3.21 kcal/mol more stable, using the B3LYP or Truhlar's functional, respectively) and present intersubunit interaction energies that are 11.5 and 10.6 kcal/mol lower than the corresponding *cis* and *trans* hydroxylated dimers, respectively. In other words, the two additional hydrogen bonds formed in the cavity of the hydroxylated dimer are responsible for the higher stability for the ensemble.

## Conclusions

We have successfully prepared from *D*-xylose a new cyclic  $\gamma$ -amino acid (4-amino-3-hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylic acid,  $\gamma$ -Ahf) with appropriate protecting groups that can be used in both solution and solid phase synthesis methods. Furthermore, we used this amino acid in the synthesis of a novel  $\alpha,\gamma$ -CP that form dimers that is simple model for  $\alpha,\gamma$ -SPNs, in which the cavity properties and dimer structure are modulated by the hydroxyl group of the  $\gamma$ -Ahf. This group, as a result of the flat conformational disposition of the CP and its equatorial orientation, points inwards into the ensemble and directs the self-assembly process not only to stabilize the dimer ensemble but also the topoisomeric dimer ( $\mathbf{D}_c$  versus  $\mathbf{D}_r$ ) formed in solution. This cyclic peptide functionalization should lead to nanotubes with greater selectivity as ion channels, catalysts, receptors or molecule containers. Work is in progress to address these possibilities.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia [SAF2007-61015, and Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00006)], and by the Xunta de Galicia (PGIDIT06PXIB209018PR, PGIDIT08CSA047209PR and GRC2006/132). CR, RG-F and MA thank the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for their FPU, postdoctoral, and Ramón y Cajal contracts respectively. We also thank the CESGA and the Centro de Computación Científica (UAM) for computation time.

## Notes and references

- (a) *Peptide-Based Drug Design: Methods and Protocols*, O. Laszlo, Eds., Humana Press, 2008; (b) S. Fernández-López, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. Wilcoxon and M. R. Ghadiri, *Nature*, 2001, **412**, 452; (c) R. V. Ulijn and A. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 664; (d) M. Teixido and E. Giralt, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 163.
- (a) C. Gilon, M. A. Dechantsreiter, F. Burkhart, A. Friedler, H. Kessler, *Synthesis of peptides and peptidomimetics, Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry*, M. Goodman, A. Felix, L. Moroder and C. Tonolio, Eds.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 2002; Vol. E22c, pp 215; (b) N. Kokkoni, K. Stott, H. Amijee, J. M. Mason and A. J. Doig, *Biochemistry*, 2006, **45**, 9906; (c) J. Madine, A. J. Doig and D. A. Middleton, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 7873.
- (a) J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman and H. Kessler, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1331; (b) J. S. Nowick, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1319; (c) J. Chatterjee, D. F. Mierke and H. Kessler, *Chem.–Eur. J.*, 2008, **14**, 1508; (d) M. Sastry, C. Brown, G. Wagner and T. D. Clark, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10650; (e) M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *Chem.–Eur. J.*, 2008, **14**, 2100.

- 4 (a) R. J. Brea, J. R. Granja, *Self-Assembly of Cyclic Peptides in Hydrogen-Bonded Nanotubes*, In Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, J. A. Schwarz, C. I. Contescu and K. Putyera, Eds.; Marcel Dekker Inc., 2004, p. 3439; (b) D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 988; (c) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee and N. Khazanovich, *Nature*, 1993, **366**, 324; (d) N. Khazanovich, J. R. Granja, D. E. McRee, R. A. Milligan and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 6011; (e) M. R. Ghadiri, J. R. Granja and L. K. Buehler, *Nature*, 1994, **369**, 301.
- 5 (a) M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha and D. E. McRee, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 93; (b) K. Kobayashi, J. R. Granja and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 95; (c) D. T. Bong and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2163; (d) M. Saviano, A. Lombardi, C. Pedone, B. Di Blasio, X. C. Sun and G. P. Lorenzi, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 1994, **18**, 27; (e) X. C. Sun and G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta*, 1994, **77**, 1520; (f) W. S. Horne, N. Ashkenasy and M. R. Ghadiri, *Chem.-Eur. J.*, 2005, **11**, 1137.
- 6 C. Reiriz, R. J. Brea, R. Arranz, J. L. Carrascosa, A. Garibotti, B. Manning, J. M. Valpuesta, R. Eritja, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11335.
- 7 (a) M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2844; (b) C. Reiriz, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 241; (c) M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *Chem.-Eur. J.*, 2005, **11**, 6543; (d) M. Amorin, R. J. Brea, L. Castedo and J. R. Granja, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 4681; (e) R. J. Brea, L. Castedo and J. R. Granja, *Chem. Commun.*, 2007, 3267.
- 8 (a) R. J. Brea, M. E. Vázquez, M. Mosquera, L. Castedo and J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1653; (b) R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, M. A. Herranz, L. Sanchez, N. Martín, W. Seitz and D. M. Guldi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 5291.
- 9 R. R. Talekar and R. H. Wightman, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3831; J. Moravková, J. Capková and J. Stanek, *Carbohydr. Res.*, 1994, **263**, 61.
- 10 J. John, *Amino acid and peptide synthesis*, S. G. Davies, R. G. Compton, J. Evans and L. F. Gladden, Eds.: Oxford University Press, 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford, 2002.
- 11 N. Chidambaram, S. Bhat and S. Chandrasekaran, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 5013.
- 12 D. L. Heywood and B. Phillips, *J. Org. Chem.*, 1960, **25**, 1699.
- 13 M. Curini, F. Epifano, M. C. Marcotullio and O. Rosati, *Synlett*, 1999, 777.
- 14 T. Takeda, H. Watanabe and T. Kitahara, *Synlett*, 1997, 1149.
- 15 P. V. Reddy, L. V. R. Reddy, B. Kumar, R. Kumar, P. R. Maulik and A. K. Shaw, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 2153.
- 16 J. Garcia, F. Urpi and J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 4841; J. T. Lundquist and J. C. Pelletier, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 781; X. Wang, S. G. Nelson and C. P. Curran, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 6141.
- 17 Y. G. Gololobov and L. F. Kasukhin, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 1353; V. Maunier, P. Boullanger and D. Lafont, *J. Carbohydr. Chem.*, 1997, **16**, 231; M. Mizuno, I. Muramoto, K. Kobayashi, H. Yaginuma and T. Inazu, *Synthesis*, 1999, 162.
- 18 L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4397; F. Albericio, L. A. Carpino, In: *Methods in Enzymology*, G. B. Fields, Ed. Academic Press, New York, 1997; Vol. 289, pp 104.
- 19 Under these conditions other <sup>15</sup>N-Acp-containing tetrapeptides give rise to cyclic octapeptides, see ref. 7e.
- 20 Tetrapeptides *c*-[(D-Phe-L-<sup>15</sup>N-γ-Ach)<sub>2</sub>-] and *c*-[(L-Leu-d-<sup>15</sup>N-γ-Acp)<sub>2</sub>-] have estimated association constants in chloroform of only 15 M<sup>-1</sup> and 45 M<sup>-1</sup> respectively, see ref. 7d.
- 21 M. S. Searle, M. S. Westwell and D. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1995, 141; J. D. Dunitz, *Chem. Biol.*, 1995, **2**, 709.
- 22 The only nonconclusive evidence of the type of the topoisomeric dimers present in solution is the lack of NOE cross-peak in the ROESY spectrum between H<sub>δ-AH</sub> (4.32 ppm) and H<sub>α-Acp</sub> that would correspond to the **D**<sub>1-16</sub>, suggesting the main formation of the *cis*-topoisomer.
- 23 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648; A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1992, **96**, 2155; C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1988, **37**, 785.
- 24 R. J. Brea, M. Amorin, L. Castedo and J. R. Granja, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 5710.
- 25 Y. Zhao, N. E. Schultz and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2006, **2**, 364.
- 26 This basis set includes diffuse functions on C, N, and O atoms, and polarization functions on hydrogens, which may be important for modeling hydrogen bonding appropriately.
- 27 *Gaussian 03, Revision A.01*, M. J. Frisch, *et al.* Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.