



***'SÍNTESIS DE GAMMA-AMINOÁCIDOS  
FUNCIONALIZADOS CON  
POLIETILENGLICOLES'***

Trabajo de fin de grado

Grado en química

Curso 2013/2014

Sergio Santorio Aldariz

Santiago de Compostela, julio 2014

Departamento de Química Orgánica y  
Centro Singular de Investigaciones en Química Biológica e Materiais Moleculares  
(CIQUS)

D. JUAN GRANJA GUILLÁN, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y D. MANUEL AMORÍN LÓPEZ, CONTRATADO PROFESOR INTERINO (T3) EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

INFORMAN: que la memoria adjunta titulada “*Síntesis de gamma-aminoácidos funcionalizados con polietilenglicoles*” que presenta Sergio Santorio Aldariz para superar la asignatura Trabajo de Fin de Grao, perteneciente al Grao en Química ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica en el CIQUS y autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente autorización en Santiago de Compostela a 14 de julio de 2014.

Fdo: Prof. Juan Granja Guillán

Fdo: Prof. Manuel Amorín López

# Índice:

Abreviaturas.	3
<b>1.</b> Resumen (abstract).	4
<b>2.</b> Introducción.	5
<b>2.1</b> Diseño de nanotubos ciclopeptídicos.	8
<b>2.2</b> Estructuras nanotubulares constituidas por <i>D,L-<math>\alpha</math></i> -ciclopéptidos .	10
<b>2.3</b> Nanotubos basados en $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos.	13
<b>2.4</b> Aplicaciones de los nanotubos peptídicos.	13
<b>3.</b> Materiales y técnicas experimentales.	20
<b>4.</b> Objetivos.	24
<b>5.</b> Resultados experimentales.	23
<b>6.</b> Discusión de los resultados experimentales.	30
<b>6.1</b> Grupos protectores.	30
<b>6.2</b> Síntesis del aminoácido Boc- <i>L-<math>\gamma</math></i> -Ace-OH [ácido (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> )- <i>cis</i> -4-amino-N-tert-butiloxicarbonilciclopenteno carboxílico].	33
<b>6.3</b> Funcionalización del Boc- <i>L-<math>\gamma</math></i> -Acp-OH con el polietilenglicol (2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etanol) para dar el Boc- <i>L</i> -3PEGN- $\gamma$ -Acp-OMe.	36
<b>7.</b> Conclusiones	39
Anexo: Espectros de RMN	40

# Abreviaturas

$\delta$	Desplazamiento químico
Aa	Aminoácido
$\gamma$ -Ace	Ácido <i>cis</i> -4-aminociclopent-2-enocarboxílico
$\gamma$ -Acp	Ácido <i>cis</i> -3-aminociclopentanocarboxílico
3PEG-OH	2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etanol
Boc	tert-butoxicarbonil
(Boc) <sub>2</sub> O	Anhídrido de tert-butoxycarbonyl
DEAD	Azodicarboxilato de dietilo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	<i>N,N</i> -4-dimetil-4-aminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
Leu	Leucina
MS (ESI)	Espectrometría de masas: ionización mediante electrospray
m/z	Relación masa/carga
TFA	Ácido trifluoroacético

# 1. Resumen (Abstract):

Cyclicpeptides formed by stereo-alternating amino acids subunits are macromolecules with the ability of adopting a planar conformation and self-stack on top of each other through the formation of hydrogen bonds to give nanotubes. The peptide nanotubes external surface can be modulated by the side chain of the amino acids used in the cyclic peptides. The incorporation of  $\gamma$ -amino acids in the peptide skeleton provides to the cyclic peptides new properties like the inner modulation for the synthesis of ion selective channels. This functionalizacion in contrast with other systems i.e. carbon nanotubes, is at the moment impossible to other nanotube forming strategies.

Hence, the first synthetic steps towards the construction of a new nanotube based on  $\alpha,\gamma$ -cyclicpeptides is the  $\gamma$ -amino acid synthesis. In this work, we synthesized the  $\gamma$ -amino acid called Acp (*cis*-3-aminecyclicpentanecarboxylic acid) from the Vince's lactame and then it was modified at the amino group by a covalent coupling with a polietelenglycol group (PEG). These  $\gamma$ -amino acids with polietelenglycol groups could create hidrophylic channel useful to carry out molecular or ion transport in cell membranes like specific proteins.

## 2. Introducción:

El desarrollo de la ciencia y de la tecnología sigue siendo uno de los motores de avance de la sociedad tal y como la conocemos, esto se hace evidente en todos los ámbitos de nuestra vida cotidiana, por ejemplo en el uso de dispositivos de transmisión de información, aparatos electrónicos (televisores, móviles, etc.). También se observan estos avances en campos más complejos y esenciales como la medicina o la alimentación que han experimentado un gran desarrollo gracias a una investigación intensiva en este campo. Asimismo, la ciencia está presente en cada una de las actividades humanas, aunque en la mayoría de los casos no seamos plenamente conscientes de ello.

Uno de los mayores retos de nuestro siglo, especialmente de estos últimos años, es el desarrollo de nuevos materiales y estructuras funcionales de tamaños cada vez más reducidos. Por este motivo, en los últimos años ha emergido una nueva disciplina, la nanociencia,<sup>1</sup> como un esfuerzo multidisciplinar que procura, no solo la obtención, sino el perfecto entendimiento de las propiedades moleculares, ópticas, eléctricas, magnéticas y mecánicas de las estructuras y materiales de dimensiones nanométricas.

Con intención de superar las dificultades antes mencionadas que limitan la aplicabilidad de estas tecnologías, se planteó la posibilidad de utilizar unidades sencillas que se organicen y se unan entre sí de manera espontánea mediante enlaces no covalentes. Este procedimiento se conoce como *autoensamblaje molecular*,<sup>2</sup> y se basa en una serie de equilibrios de asociación y disociación que conducen a la estructura termodinámicamente más estable. Las interacciones que mantienen unidas las distintas unidades son de tipo no covalentes, tales como fuerzas de enlace débil (enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , ion-dipolo, dipolo-dipolo, etc.). Aunque la fuerza de dichas interacciones son relativamente pequeñas en comparación con la de un enlace covalente, gracias a la cooperatividad de un gran número de las mismas, dan lugar a un balance energético realmente importante desde el punto de vista entálpico. De todas formas la componente entrópica en este tipo de transformaciones suele ir en contra del proceso, ya que el sistema final está más ordenado que el de partida. Dentro de las fuerzas débiles cabe destacar los enlaces de hidrógeno debido a su intensidad y a su carácter direccional, lo que facilita el diseño de las unidades básicas que participan en el proceso, además su interacción es bastante fuerte para tratarse de un enlace no covalente.

---

<sup>1</sup> G. M. Whitesides, *Small* 2005, 1, 172-179.

<sup>2</sup> G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Setho, *Science* 1991, 254, 1312-1319.

Estos nuevos métodos sintéticos han permitido obtener nanoestructuras con nuevas formas, composiciones y aplicaciones como nanocristales,<sup>3</sup> copolímeros de bloque,<sup>4</sup> nanohilos,<sup>5</sup> nanotubos,<sup>6</sup> etc. Estos últimos están inspirados en las estructuras tubulares naturales y son particularmente interesantes por sus aplicaciones en campos como la inclusión y la separación molecular, la catálisis, la óptica, la electrónica, la quimioterapia o el transporte a través de membranas.<sup>7</sup> En los últimos tiempos se han desarrollado multitud de aproximaciones sintéticas a estas estructuras basadas en distintos materiales, tales como zeolitas,<sup>8</sup> carbono grafito,<sup>9</sup> compuestos inorgánicos,<sup>10</sup> lípidos<sup>11</sup> o ciclodextrinas.<sup>12</sup> Sin embargo, el difícil control sobre el diámetro y la longitud, sumado a la toxicidad que presentan algunos de estos compuestos, han limitado mucho el desarrollo de alguna de las aplicaciones más importantes. Es por ello, que aún es necesario seguir buscando nuevas estrategias que permitan solucionar estas limitaciones.

En los últimos años se han desarrollado multitud de técnicas para la obtención de estructuras tubulares mediante enlaces no covalentes (figura 2.1), muchas de ellas inspiradas en motivos presentes en la Naturaleza. Una primera estrategia consiste en la construcción de estructuras helicoidales a partir de moléculas lineales que se pliegan adquiriendo dicha forma.<sup>13</sup> Otra alternativa consiste en la utilización de moléculas rígidas a modo de listones que se apilan dejando un poro central.<sup>14</sup> Un tercer método utiliza moléculas con forma sectorial (cuñas) que se asocian en discos o rosetas y que, posteriormente, se apilan o enrollan formando la estructura tubular.<sup>15</sup> Una última aproximación más reciente consiste en el apilamiento de macrociclos para dar lugar a nanotubos.<sup>16</sup> Esta técnica es especialmente atractiva debido a la facilidad para controlar el diámetro interno del tubo y es la que se emplea en la preparación de nanotubos ciclopeptídicos.

---

<sup>3</sup> C. B. Murray, S. Sun, W. Gaschler, H. Doyle, T. A. Betley, C. R. Kagan, *IBM J. Res. Dev.* 2001, 45, 47-56.

<sup>4</sup> M. Lazzari, M. A. López-Quintela, *Adv. Mater.* 2003, 15, 1583-1594.

<sup>5</sup> C. Quian, F. Kim, L. Ma, F. Tsui, P. Yang, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 1195-1198.

<sup>6</sup> M. Terrones, W. K. Hsu, H. W. Kroto, D. R. M. Walton, "Nanotubes: a revolution in materials science and electronics", *Top. Curr. Chem.* 1999, 199, 189-234.

<sup>7</sup> C. R. Martin, P. Kohli, *Nature Reviews* 2003, 2, 29-37.

<sup>8</sup> J. Langley, J. Hulliger, *Chem. Soc. Rev.* 1999, 28, 279-291.

<sup>9</sup> R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer, *Science* 2002, 297, 787-792.

<sup>10</sup> G. R. Patzke, F. Krumeich, R. Nesper, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2446-2462.

<sup>11</sup> Q. S. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petroff, F. Schüth, G. D. Stucky, *Nature* 1994, 368, 317-321.

<sup>12</sup> A. Harada, J. Li, M. Karachi, *Nature* 1993, 364, 516-518.

<sup>13</sup> R. B. Prince, L. Brunsveld, E. W. Meijer, J. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 228-230.

<sup>14</sup> N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* 2005, 38, 79-87.

<sup>15</sup> J. G. Morales, J. Raez, T. Yamazaki, K. Motkuri, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 8307-8309.

<sup>16</sup> J. Hartgerink, T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* 1998, 4, 1367-1372.

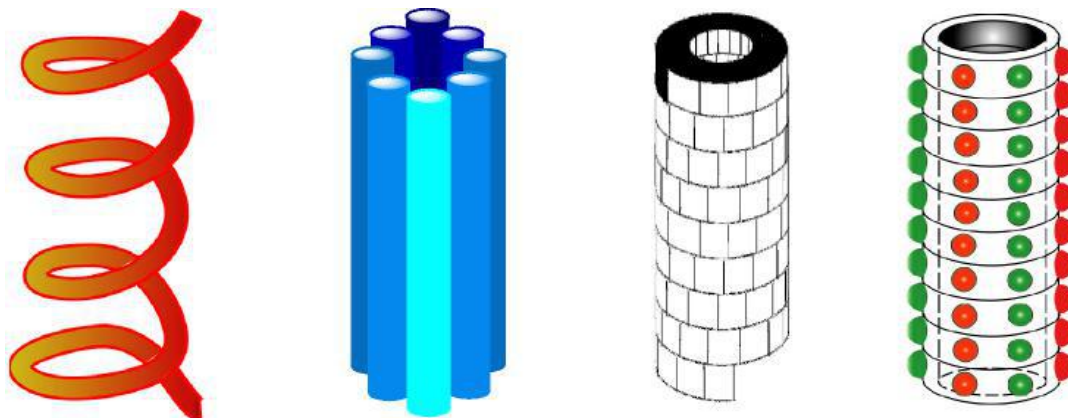


Figura 2.1: Representación de cuatro estrategias para la obtención de estructuras con topología tubular: 1) Plegamiento de moléculas lineales para dar estructuras helicoidales con un canal interno, 2) Apilamiento de listones formados por moléculas rígidas, 3) Asociación de moléculas con forma sectorial, 4) Apilamiento de moléculas cíclicas.

## 2.1 Diseño de nanotubos ciclopeptídicos:

Los nanotubos ciclopeptídicos se forman por apilamiento de ciclopeptidos entre los que se establecen interacciones de enlace de hidrógeno.<sup>17</sup> En todos ellos el ciclopeptido adopta una disposición plana, dejando las cadenas laterales de los aminoácidos que lo componen en una conformación pseudo-ecuatorial, mientras que los grupos amida se disponen de forma perpendicular al plano del anillo. De este modo se tiene una situación en la que, para cada enlace amida los grupos carbonilo se orientan hacia una cara del ciclopeptido y los correspondientes grupos NH lo hacen en sentido opuesto, de manera que la disposición es la adecuada para que se puedan establecer enlaces de hidrógeno entre subunidades ciclopeptídicas debido a la complementariedad entre los grupos dadores y aceptores del enlace de hidrógeno (figura 2.2).

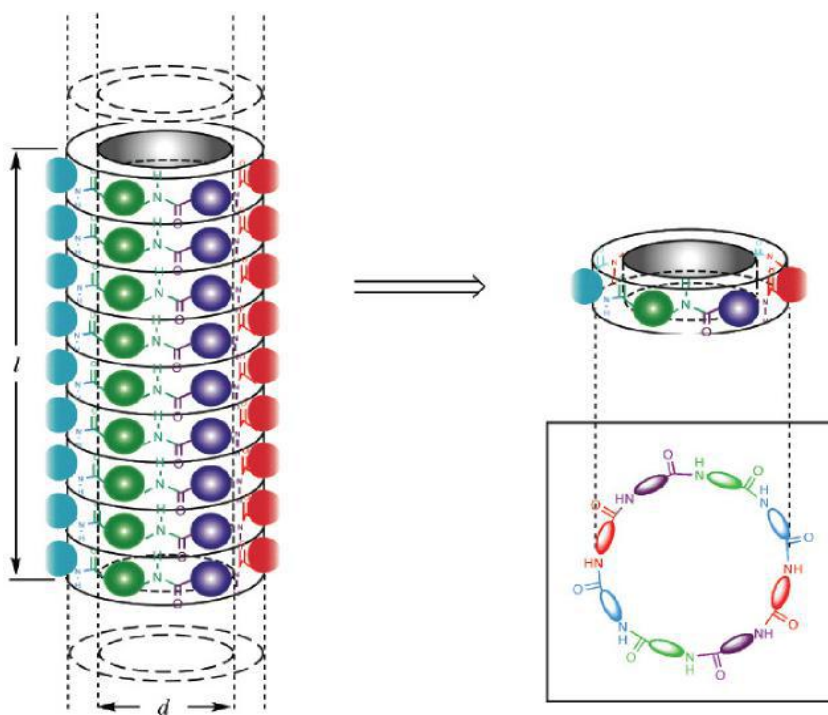


Figura 2.2: Representación esquemática de la estrategia general para la formación de nanotubos mediante autoensamblaje de ciclopeptidos.

Esta estrategia presenta dos grandes ventajas con respecto al resto de los métodos. En primer lugar, el control sobre el diámetro interno del nanotubo, uno de los mayores

<sup>17</sup> R. Garcia-Fandiño, M. Amorín, L. Castedo and J. R. Granja, *Chem. Sci.* 2012, 3, 3280-3285.

*hándicaps* en el resto de los métodos, es una tarea sencilla que se consigue variando el número de aminoácidos que constituyen cada subunidad. En segundo lugar, las propiedades de la superficie externa del tubo se pueden modificar variando las cadenas laterales de los aminoácidos. De esta forma, se favorece la solubilidad de estas macroestructuras en medios lipídicos o acuosos a través de la introducción en la subunidad ciclopeptídica de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas o hidrofílicas, respectivamente. La optimización adecuada del ciclopeptido y de las condiciones de autoensamblaje permite da lugar a estructuras de gran interés con aplicaciones en ciencia de materiales, medicina, electrónica, etc.<sup>18</sup>

---

<sup>18</sup> D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 988–1011.

## 2.2. Estructuras nanotubulares constituidas por *D,L*- $\alpha$ -ciclopéptidos:

En 1975, De Santis, basándose en estudios teóricos, reportó que ciclopéptidos formados por un número par de  $\alpha$ -aminoácidos con estereoquímica *D* y *L* alternante, tienen una disposición adecuada para autoensamblarse.<sup>19</sup> El estudio predecía que dichos ciclopéptidos adoptarían una conformación plana en la que los grupos C=O y NH estarían dispuestos de forma perpendicular al plano del anillo, permitiendo la formación de enlaces de hidrógeno con otras subunidades. Además, las cadenas laterales de los aminoácidos, según el autor, quedarían orientadas hacia el exterior de la estructura resultante. Aunque estos estudios despertaron el interés de la comunidad científica llevándose a cabo numerosos estudios para probar la tesis de De Santis, los resultados experimentales no permitieron confirmar estas expectativas debido a la escasa solubilidad de los péptidos empleados.<sup>20</sup> Tras una serie de intentos frustrados, en 1993, el grupo de Ghadiri empleó una sencilla estrategia basada en la variación del pH del medio para inducir la formación de los primeros nanotubos ciclopeptídicos.<sup>21</sup> Los estudios iniciales se llevaron a cabo usando el octapéptido *ciclo*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)<sub>2</sub>], que debido a su gran solubilidad en medio acuoso básico, la formación de la nanoestructura tenía lugar cuando se acidificaba de manera controlada las disoluciones básicas del ciclooctapéptido, observándose la aparición de cristales alargados, cuya longitud variaba entre 10 y 30  $\mu\text{m}$  y su diámetro entre 100 y 500 nm. Dichos agregados microcristalinos se caracterizaron por TEM, difracción de electrones y espectroscopía FT-IR. En este caso, las cadenas laterales de Gln y Glu también contribuían de manera importante a la formación de nanotubos. Todos los restos homóquiales de los distintos ciclopéptidos dentro de un mismo nanotubo se encuentran superpuestos, de tal forma que las cadenas de Gln y Glu pueden formar enlaces de hidrógeno intermoleculares, colaborando en el proceso de ensamblaje. Además la Gln también puede contribuir a formar enlaces de hidrógeno intertubulares, facilitando la formación de nanotubos orientados paralelamente (figura 2.3).

---

<sup>19</sup> P. De Santis, S. Morosetti, R. Rizzo, *Macromolecules* 1974, 7, 52–58.

<sup>20</sup> L. Tomasic, G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* 1987, 70, 1012–1016.

<sup>21</sup> M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* 1993, 366, 324–327.

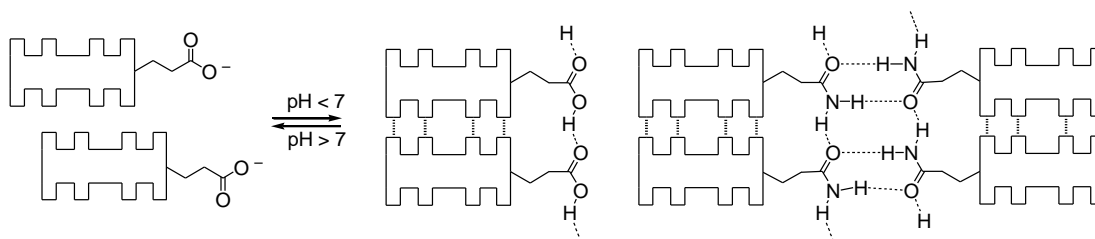


Figura 2.3: Esquema que ilustra el proceso de autoensamblaje del *ciclo-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)<sub>2</sub>]*. A pH básico (izquierda), las repulsiones electrostáticas de los carboxilatos dificultan la interacción de las distintas subunidades peptídicas. A pH ácido, la protonación de las cadenas laterales del Glu permite la formación de los puentes de hidrógeno entre los distintos ciclopeptidos. La presencia de Gln favorece la formación de puentes de hidrógeno tanto inter como intratubular (Izquierda).

Esta estrategia permitió también la obtención de agregados microcristalinos de nanotubos constituidos por unidades de *ciclo-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)<sub>3</sub>]*, que presentaban diámetros internos de 13 Å.<sup>22</sup> Este hecho confirmó que el diámetro interno del nanotubo se podía determinar variando el número de aminoácidos presentes en la unidad ciclopeptídica. Todos los cristales obtenidos hasta entonces se caracterizaron mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), difracción de electrones y FT-IR; ninguno fue validado para estudiarlo por difracción de rayos X, debido a que los cristales resultaron eran demasiado pequeños.

Con la finalidad de obtener monocristales aptos para su estudio por difracción de rayos X, el grupo de Ghadiri desarrolló un sistema en el que sólo se permitía la formación de estructuras constituidas por dos unidades cíclicas (dímeros). De este modo se evitaban los problemas derivados del apilamiento ilimitado de ciclopeptidos tales como la baja solubilidad. La técnica consistía en bloquear una de las caras del ciclopeptido mediante la N-alkilación de aminoácidos de la misma quiralidad (*L* o *D*). Al sustituir todos los enlaces N-H por enlaces N-R (mediante la incorporación de un grupo alquilo) de los aminoácidos homocirales, se impedía la formación de enlace de hidrógeno por una de las caras del ciclo, de forma que únicamente podía autoensamblarse por la cara opuesta (figura 2.4).

<sup>22</sup> N. Khazanovich, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, *116*, 6011–6012.

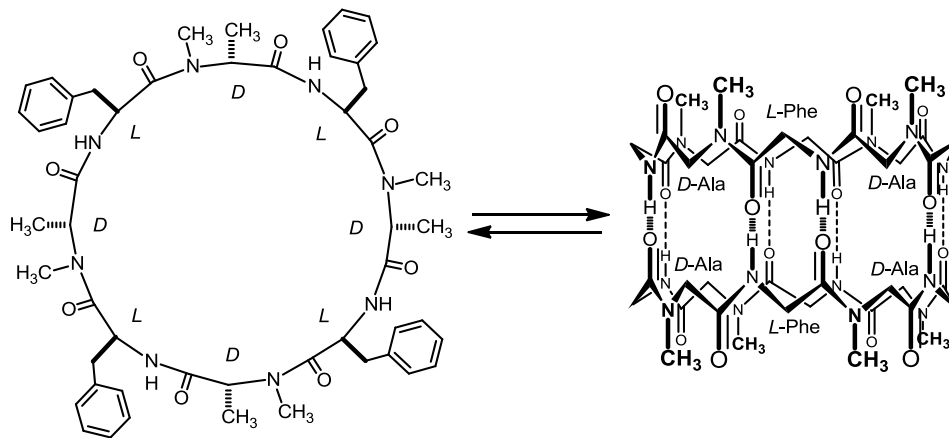


Figura 2.4: Esquema representativo de la formación de dímeros. La presencia de grupos metilo unidos a los nitrógenos de aminoácidos de igual configuración bloquean una de las caras del ciclopéptido, por lo que impide el establecimiento de enlaces de hidrógeno con una nueva unidad cíclica. Para mayor claridad se han omitido las cadenas laterales de los aminoácidos en el dímero.

En los primeros estudios de dimerización se empleó *ciclo*-[(*L*-Phe-*D*<sup>Me</sup>-N-Ala)<sub>4</sub>] como unidad fundamental. Los análisis en estado sólido, mediante difracción de rayos X, permitieron corroborar los estudios anteriores, demostrándose que los anillos adoptaban una conformación plana y que los grupos amida de los enlaces peptídicos se situaban paralelamente al eje del tubo. Los rayos X también pudieron determinar la presencia de una moléculas de agua desordenadas en la cavidad interna, lo que evidencia la naturaleza hidrofílica del poro.<sup>23</sup>

Todos estos estudios se extendieron posteriormente a otros sistemas, aportando información muy valiosa. Así, por ejemplo, e pudo demostrar que los ciclohexapéptidos N-metilados dimerizaban con constantes de asociación más bajas y que los tetra-, deca-, y dodecaciclopéptidos no formaban dímeros, debido a la dificultad de los mismos para adoptar la conformación plana requerida.<sup>24</sup>

<sup>23</sup> M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha, D. E. McRee, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995, 34, 93–95.

<sup>24</sup> X. C. Sun, G. P. Lorenzi, *Helv. Chem. Acta* 1994, 77, 1520–1526.

## 2.3 Nanotubos constituidos por $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos:

Durante los últimos años se han descrito numerosos ejemplos de estructuras peptídicas basados en aminoácidos no naturales, tales como ciclopéptidos formados por  $\beta$ -aminoácidos,<sup>25</sup>  $\alpha,\gamma$ -aminoácidos,<sup>26</sup>  $\delta$ -aminoácidos,<sup>27</sup>  $\alpha,\varepsilon$ -aminoácidos, e incluso cicloureas.<sup>28</sup> De todas ellas, quizás el diseño más destacado sean los ciclopéptidos que contienen  $\gamma$ -aminoácidos.<sup>29,30</sup> Las características de estos  $\gamma$ -residuos, junto con las propiedades que confieren a la estructura resultante, han provocado que dichos aminoácidos adquieran gran relevancia en la preparación de nuevas estructuras nanotubulares funcionales.<sup>31</sup>

Las cavidades internas de los nanotubos formados por  $\alpha$ -aminoácidos de estereoquímica (*D*, *L*) alternada son hidrofílicas y no se pueden funcionalizar, ya que toda sustitución en el *C* $\alpha$  afectaría al apilamiento de los ciclopéptidos. Esto supone una gran limitación de cara a algunas de sus potenciales aplicaciones. Sin embargo, este problemas se pueden solventar empleando un híbridos  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptídicos como unidad básica para construir el nanotubo.

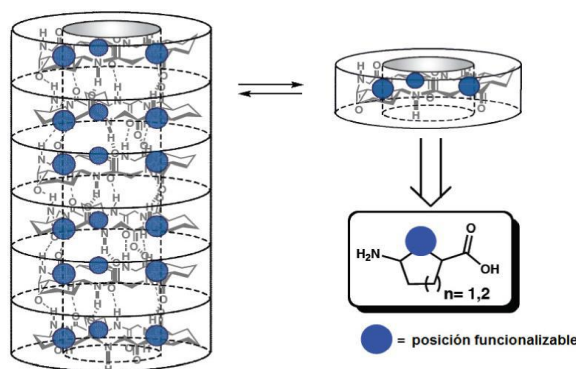


Figura 2.6: Representación de un nanotubo constituido por subunidades  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptídicas. Como se puede observar, el metileno de la posición  $\beta$  (círculo azul) es susceptible de ser funcionalizado; por lo que sirve de base para modificar las propiedades internas de la estructura.

<sup>25</sup> T. D. Clark, L. K. Buehler, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, *120*, 651-656.

<sup>26</sup> M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 2844-284.

<sup>27</sup> S. Leclair, P. Baillargeon, R. Skouta, D. Gauthier, Y. Zhao, Y. L. Dory, *Angew. Chem.* 2004, *116*, 353-357; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, *43*, 349-353.

<sup>28</sup> J. L. López, E. M. Pérez, P. M. Viruela, R. Viruela, E. Ortí and N. Martín, *Org. Lett.* 2009, *11*, 4524-4527.

<sup>29</sup> J. Farrera-Sinfreu, E. Giralt, S. Castel, F. Albericio, M. Royo, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 9459-9468.

<sup>30</sup> D. Seebach, L. Schaeffer, M. Brenner, D. Hoyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, *42*, 776-778.

<sup>31</sup> N. Rodríguez-Vázquez, S. Salzinger, L F. Silva, M. Amorín, J.R. Granja, *Eur. J. Org. Chem.* 2013, *17*, 3477-3493.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación diseñó, sintetizó y caracterizó una nueva clase de ciclopéptidos compuestos por unidades de  $\alpha$ -aminoácido y ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico ( $\gamma$ -Aca) alternadas con capacidad para autoensamblarse. La incorporación de  $\gamma$ -aminoácidos cíclicos en la estructura del ciclopéptido restringe la flexibilidad del anillo y facilita que éstos adopten la conformación plana necesaria para la formación de los nanotubos. Además, estos  $\gamma$ -derivados también permiten funcionalizar el poro de la nanoestructura modificación de su la posición  $\beta$  (o C2) del  $\gamma$ -aminoácido (figura 2.6).<sup>32</sup>

Una característica diferenciadora de los nanotubos constituidos por  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos es que presentan dos tipos de interacciones, debido a su alternancia. Esto implica que cuando el péptido adopta la conformación plana necesaria para el autoensamblaje, los  $\alpha$ -aminoácidos dispongan sus grupos C=O y NH orientados hacia una cara del plano y los  $\gamma$ -aminoácidos hacia la cara opuesta. De este modo, se denomina *cara  $\alpha$*  a la parte del plano de ciclopéptido a la que se orientan los grupos C=O y NH de los  $\alpha$ -aminoácidos, *cara  $\gamma$*  a la opuesta, en la que se encuentran los grupos C=O y NH de los  $\gamma$  aminoácidos. En el momento en que se producen las interacciones entre estos ciclopéptidos mediante una lámina plegada  $\beta$  antiparalela, se pudo determinar que los grupos carbonilo y NH de la *cara  $\alpha$*  se complementaban e interaccionaban con los  $\alpha$ -aminoácidos de la siguiente subunidad (*interacción  $\alpha$ - $\alpha$* ). De la misma forma, los grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno de la *cara  $\gamma$*  interaccionaban con los de la *cara  $\gamma$*  de la otra subunidad (*interacción  $\gamma$ - $\gamma$* ). Por lo tanto, el nanotubo se basaba en la alternancia a lo largo del mismo de las interacciones entre las *caras  $\alpha$*  con las interacciones entre las *caras  $\gamma$*  (figura 2.7).

Los primeros estudios con  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos se realizaron en disolución con ciclopéptidos especialmente diseñados para la formación de dímeros, de forma que fue posible analizar el proceso de autoensamblaje y establecer con ello las bases termodinámicas y estructurales de los mismos. De este modo, se llevó a cabo la síntesis de ciclohexapéptidos (anillos de 24 eslabones) N-metilados en una de sus cara, en los que se alternan diversos  $\alpha$ -aminoácidos y unidades de ácido 3-aminociclohexanocarboxílico ( $\gamma$ -Ach).<sup>33,34</sup> Esto permitió el estudio de los dos tipos de interacción presentes en la estructura nanotubular. Por una parte se estudió la *interacción  $\gamma$ - $\gamma$*  bloqueando la *cara  $\alpha$*  mediante sustitución de los protones amídicos de los  $\alpha$ -aminoácidos por grupos metilo.

---

<sup>32</sup> C. Reiriz, M. Amorín, R. García-Fandiño, L. Castedo, J.R. Granja, *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 4358-4361.

<sup>33</sup> M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 2844-284.

<sup>34</sup> M. Amorín, V. Villaverde, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Drug. Delivery Sci. Technol.* 2005, 15, 87-92.

Como consecuencia se obtiene el dímero correspondiente, con valores de  $K_a$  de aproximadamente  $10^2 \text{ M}^{-1}$ , cuyos valores son comparables a los obtenidos para los *D,L*-ciclooctapéptidos. Por otra parte, este estudio mostró que las *interacciones*  $\alpha$ - $\alpha$ , medidas en ciclopéptidos con los residuos  $\gamma$  N-metilados, daban lugar a dímeros que presentaban unas constantes de asociación mucho más elevada ( $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Así, por ejemplo, el *ciclo*-[(*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-] reveló que los dímeros unidos a través de los  $\alpha$ -aminoácidos eran extremadamente estables en disolventes no polares. La confirmación de dicho dímero se realizó mediante RMN, FT-IR y rayos-X. El análisis cristalográfico corroboró la estructura dimérica, observándose además una molécula de  $\text{CHCl}_3$  ocupando su cavidad interna, hecho que demuestra el carácter hidrófobo del interior de la nanoestructura. Los estudios realizados posteriormente, demostraban que el carácter anfipático de esta cavidad, ya que también eran capaces de encapsular moléculas de agua.

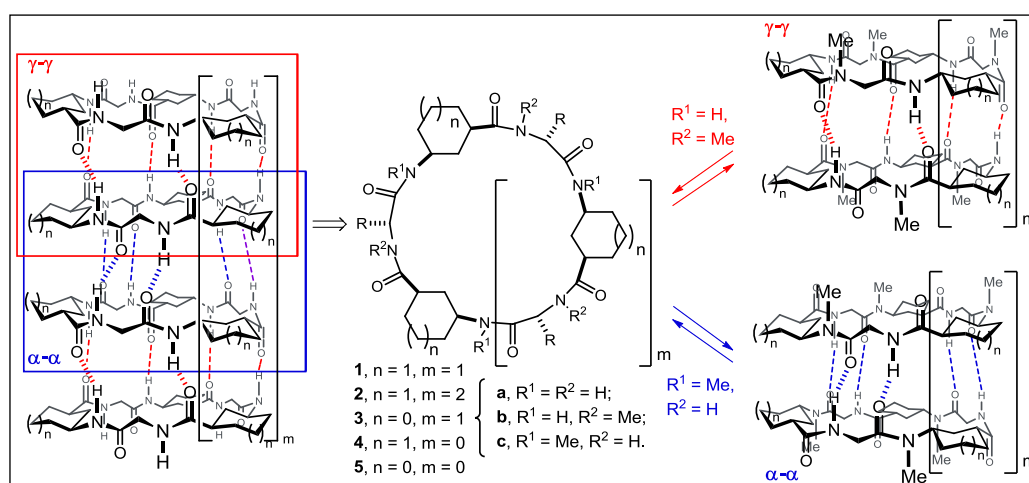


Figura 2.7: Nanotubo (izquierda) y dímeros (derecha) preparado a partir del ciclo-[(*D*- $\alpha$ -Aa-*L*- $\gamma$ -Aa-)<sub>x</sub>], subunidades ( $x=2-6$ ). Se pueden observar dos interacciones diferentes en los dímeros:  $\alpha$ - $\alpha$  o  $\gamma$ - $\gamma$ .

La expansión del anillo hacia ciclooctapéptidos condujo a resultados similares, observándose de nuevo que la *interacción*  $\gamma$ - $\gamma$  era más débil que la  $\alpha$ - $\alpha$ .<sup>35</sup> En cuanto a los ciclotetrapéptidos, no se observó la aparición de los dímeros resultantes de la interacción por sus *caras*  $\gamma$ , mientras que los diseñados para interactuar por sus *caras*  $\alpha$  poseen una constante de asociación débil ( $K_a \sim 15 \text{ M}^{-1}$ ), aunque la existencia de dímero no deja de ser relevante.<sup>36,37</sup>

<sup>35</sup> M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* 2005, 11, 6543–6551.

<sup>36</sup> M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Org. Lett.* 2005, 7, 4681–4684.

La menor constante de asociación de las *interacciones*  $\gamma$ - $\gamma$  frente a las  $\alpha$ - $\alpha$  se puede atribuir a la menor polarización de los enlaces NH de los  $\gamma$ -Ach, debida a la mayor distancia del grupo carboxilo, que ejerce mayor efecto inductivo en los  $\alpha$ -aminoácidos. Además, la posición del metilo en los nitrógenos de los  $\alpha$ -aminoácidos puede desestabilizar la conformación plana del anillo por repulsiones estéricas con el carbonilo y la cadena lateral.

A la vista de los buenos resultados obtenidos en los estudios de nanotubos  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptídicos, debidos en buena medida a la rigidez que otorga la unidad cicloalcanica, que permite que se adopte la conformación plana necesaria para el autoensamblaje ciclopeptídico; nuestro grupo de investigación decidió seguir profundizando en esta tarea y se propuso introducir en la secuencia el ácido 3-aminociclopentanocarboxílico ( $\gamma$ -Acp). La utilización de unidades de  $\gamma$ -Acp parece mostrar ciertas ventajas frente al empleo de  $\gamma$ -Ach. En primer lugar, la obtención del  $\gamma$ -aminoácido de cinco miembros es más sencilla que la del  $\gamma$ -Ach con lo que se agiliza el proceso de síntesis. En segundo lugar, presenta un ángulo definido en el plano del anillo ciclopeptídico por los enlaces O=C-C $\alpha$  y C $\gamma$ -N mayor que el del  $\gamma$ -Ach (140° frente a 120°), lo que debería de favorecer la construcción de anillos ciclopeptídicos de gran tamaño, tal como se demostró posteriormente construyendo unidades diméricas con diámetros internos superiores a 13 Å. Además, presenta una superficie hidrófoba externa menor (dos metilenos para  $\gamma$ -Acp frente a tres para  $\gamma$ -Ach), lo que repercute en las propiedades del nanotubo. También cabe destacar que de nuevo el metileno  $\beta$  del ciclopentilo queda orientado hacia el interior del canal, lo que aporta cierto carácter hidrofóbico, a la vez que sirve como base para llevar a cabo cualquier posible funcionalización de dicho poro. Así se observó que  $\alpha,\gamma$ -(Acp)-ciclopéptidos constituidos por 4, 6, 8, 10 o 12 aminoácidos formaban los correspondientes dímeros con elevada  $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ , excepto en el caso del ciclotetrapéptido cuyas constantes son inferiores a  $100 \text{ M}^{-1}$ .<sup>31,32,38,39</sup>

---

<sup>37</sup> M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Heterocycles* 2006, 67, 575–583.

<sup>38</sup> R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5710–5713.

<sup>39</sup> R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* 2007, 31, 3267–3269.

## 2.4 Aplicaciones de los ciclopéptidos:

Los ciclopéptidos sintéticos así como las nanoestructuras resultantes del proceso de autoensamblaje presentan un gran potencial para ser usados en numerosos fines. La facilidad con la que se puede controlar el diámetro, únicamente variando el número de aminoácidos que componen el ciclopéptido, y las propiedades de los nanotubos ciclopeptídicos, unido a la regularidad en la orientación que adquieren los grupos funcionales de la superficie externa, han permitido la utilización de estas estructuras supramoleculares como biosensores,<sup>40</sup> biomateriales,<sup>41</sup> dispositivos electrónicos,<sup>42</sup> canales transmembrana,<sup>43</sup> antibióticos<sup>44</sup> o materiales fotosensibles.<sup>45</sup>

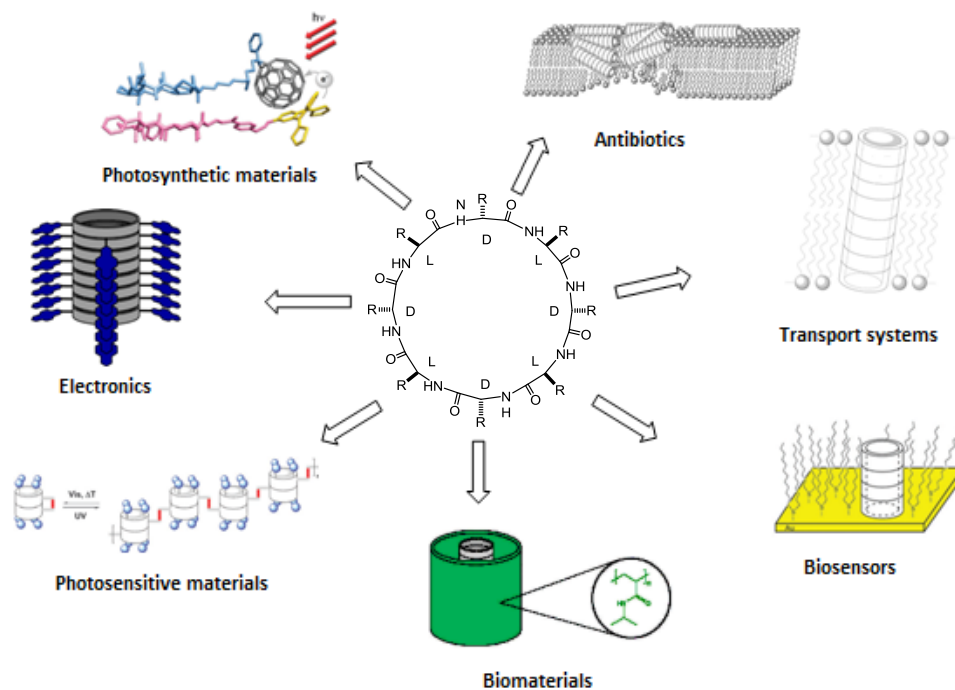


Figura 2.8: Ejemplos de aplicaciones de ciclopéptidos. A la derecha tenemos su uso como canales transportadores transmembrana, sensores biológicos; a la izquierda su uso como elementos fotosensibles y como circuitos electrónicos; en la parte inferior su uso como biomateriales; en la parte superior su uso como sistemas antibióticos que se unen a la membrana y su uso en materiales fotosintéticos.

<sup>40</sup> K. Motesharei, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 11306–11312.

<sup>41</sup> J. Couet, J. D. J. S. Samuel, A. Kopyshv, S. Santer, M. Biesalski, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3297–3301.

<sup>42</sup> N. Ashkenasy, W. S. Horne, M. R. Ghadiri, *Small* 2006, 2, 99–102.

<sup>43</sup> M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* 1994, 369, 301–304.

<sup>44</sup> 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, M. R. Ghadiri, *Nature* 2001, 412, 452–455.

<sup>45</sup> M. S. Vollmer, T. D. Clark, C. Steinem, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 1598–1601.

Una aplicación desarrollada recientemente es el uso de ciclopeptidos como agentes antibacterianos donde el nanotubo se unen a la pared bacteriana desestabilizándola y haciendo así imposible la supervivencia de la bacteria o bien forma canales transmembranales capaces de interrumpir por el equilibrio osmótico característico de la bacteria, causando su muerte.<sup>46</sup> En ambos casos, es necesario utilizar un ciclopeptido anfipático que presente una cara hidrofílica y en la cara opuesta hidrofóbica que es capaz de interactuar con la bicapa fosfolipídica. En este campo, también hay que destacar la utilización de nanotubos ciclopeptídicos glico-conjugados que aportan una mayor selectividad frente a otro tipo de organismos.<sup>47</sup>

Cabe destacar la función de los nanotubos ciclopeptídicos para construcción de canales de transporte hidrofílicos. Dada la gran relevancia que tiene el transporte de analitos en los organismos vivos, y más particularmente los problemas derivados de su mal funcionamiento en los seres humanos, conocidos como canalopatías,<sup>48</sup> surge la necesidad de sintetizar canales transmembranales para el transporte de analitos polares. En cuanto al uso de nanotubos ciclopeptídicos, los primeros experimentos se llevaron a cabo usando *D,L*- $\alpha$ -ciclopeptidos que contenían una gran proporción de Aas hidrofóbicos como triptófano para facilitar su inserción perpendicular en las membranas lipídicas.<sup>49</sup> Estas moléculas eran capaces de transportar iones sodio y potasio con un flujo mayor incluso que otras moléculas transportadoras de origen natural, como la gramicidina A<sup>50</sup> o la anfotericina B.<sup>51</sup> En cuanto al uso de  $\gamma$ -Aas, hay que destacar varios diseños de  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos conteniendo una alta proporción de unidades de triptófano que también eran capaces de transportar iones alcalinos de manera selectiva frente a otros iones biológicamente relevantes como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$ , siendo particularmente destacado el elevado flujo de  $\text{Na}^+$ .<sup>52</sup> Con este trabajo también se demostró que el tamaño mínimo para el transporte de iones metálicos era el de los ciclooctapeptidos compuestos por cuatro  $\alpha$ -Aas y cuatro  $\gamma$ -Aas, puesto que ciclos más pequeños como ciclohexapeptidos sólo eran aparentemente lo suficientemente grandes como para transportar protones a través de la membrana.

En el ámbito científico sería de gran interés conseguir sintetizar sistemas que se asemejen lo máximo posible a las proteínas transportadoras para imitar en la medida de lo

---

<sup>46</sup> 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, M. R. Ghadiri, *Nature* 2001, 412, 452–455.

<sup>47</sup> L. Motiei, S. Rahimipour, D.A. Thayer, C.-H. Wong, M.R. Ghadiri, *Chem. Commun.* 2009, 3693-3695.

<sup>48</sup> R. S. Kass, *J. Clin Invest.* 2005, 115, 1986–1989.

<sup>49</sup> H. Sun, J.D. Hartgerink, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4417-4424.

<sup>50</sup> R. Ketchum, W. Hu, T. Cross, *Science.* 1993, 261, 1457–1460.

<sup>51</sup> A. Cass, A. Filkenstein, V. Krespi, *J. Gen. Physiol.* 1970, 56, 100-124.

<sup>52</sup> R. García-Fandiño, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Sci.* 2012, 3, 3280–3285.

posible su función. Estos sistemas tendrían gran aplicabilidad en el ámbito de la biomedicina y podrían solucionar problemas relacionados con el transporte transmembrana, pero no es sencillo imitar dichos sistemas que son el resultado de millones de años de selección natural y evolución. Nuestro grupo de investigación se ha propuesto utilizar los sistemas ciclopeptídicos para conseguir integrarlos en las membranas celulares y que estos puedan llevar a cabo el transporte de forma selectiva y eficiente.

### 3. Materiales, Métodos y Técnicas Experimentales:

Todos los disolventes empleados ( $\text{CHCl}_3$ , MeOH, DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , THF, etc.) eran de calidad de síntesis o HPLC, utilizándose directamente sin purificación adicional, excepto el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y el THF que se secaron por destilación de hidruro cálcico ( $\text{CaH}_2$ ) y Na/Benzofenona respectivamente. El HOBt (1-hidroxibenzotriazol) y EDC•HCl (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) provienen de las casas comerciales Novabiochem, Applied Biosystems, Aldrich, Global Sales Manager y GL Biochem (Shanghai) Ltd. Los demás reactivos comercialmente disponibles: lactama de Vince, anhídrido de tert-Butoxicarbonilo, N,N-diisopropiletilamina, metilbenzilamina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 1-hidroxibenzotriazol, 4-dimetilaminopiridina, cloruro de nosilo, 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etanol (3PEG-OH), trifenilfosfina, azodicarboxilato de dietilo, cloruro de tosilo, trietilamina, carbonato potasico, etc. se emplearon sin tratamiento previo a no ser que se indique otra cosa. Los reactivos sensibles al aire o a la humedad, se manejaron con jeringas y se adicionaron bajo una ligera presión de atmósfera inerte (argón). Las columnas cromatográficas se realizaron usando como soporte sólido gel de sílice E. Merck (tipo 60 SDS, 230,400 mesh) y como disolventes acetato de etilo y hexano o diclorometano y metanol. Para las cromatografías en capa fina se emplearon cromatofolios de gel de sílice Merk (tipo 69 F254). Como reveladores se usaron luz ultravioleta UV (254 nm) y disoluciones como ninhidrina (2% en EtOH) o Ce/Mo (200 mg de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  + 9.6 g de molibdato amónico + 11.2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ), seguidas de calor. Las mezclas de los disolventes para las cromatografías se indican en relaciones v/v.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) se realizaron en los espectrómetros Bruker WM-250 o Varian Mercury-300. Los desplazamientos químicos están referidos a partes por millón (ppm,  $\delta$ ) usando tetrametilsilano como referencia ( $\delta = 0,00$ ) o el disolvente deuterado usado:  $\text{D}_2\text{O}$  y  $\text{CDCl}_3$ . La multiplicidad de las señales de  $^1\text{H}$ -RMN se designan como: singlete (s), doblete (d), triplete (t) o cuadruplete (c) en base a su apariencia y, en los casos en los que no se observaban las multiplicidades con claridad, se designaron como multiplete (m) o ancho (ancho). Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se emplearon los espectrómetros Bruker WM-250 o Varian Mercury-300; y se asignaron

mediante la realización de “distortionless enhancement by polarization transfer” (DEPT) obtenidos con un ángulo de 135°. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están referidos a ppm y los disolventes deuterados fueron los mismos que se emplearon para  $^1\text{H}$ -RMN.

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas BRUKER BIOTOF II mediante las técnicas de Ionización Química.

Las medidas de rotación óptica se llevaron a cabo en un polarímetro JASCO.DIP-370 DIGITAL POLARIMETER utilizando la longitud de onda correspondiente a la línea D del sodio y empleando en todos los casos metanol de calidad HPLC como disolvente. Las medidas de  $[\alpha]$  se realizaron por triplicado y se utilizó el valor promedio para hallar  $[\alpha]_{\text{D}}^{298}$ .

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para el caso de la HPLC quiral, se llevó a cabo en un Agilent HPLC 1100 Series utilizando como columna quiral Chiralpack® IC-3 (0,4 x 1 cm, DAIC 83311).

## 4. Objetivos:

El objetivo a largo plazo de este proyecto es la síntesis de  $\gamma$ -aminoácidos modificados en el grupo amino con una cadena polioxigenada de 3,6,9-Trioxadecano que después se utilizaran para sintetizar  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos que sean transportadores iónicos transmembranales. Para ello, el primer objetivo es la funcionalización de los grupos amino de los ciclopeptidos con sustituyentes hidrofílicos del tipo polietilenglicol (PEG), lo cual constituye el objetivo de este TFG.

El grupo seleccionado para estos primeros estudios es un oligomero formado por 3 subunidades oxietileno. Estos grupos deben proporcionar polaridad a los ciclopeptidos favoreciendo la solubilidad en agua y facilitar su migración hasta las membranas lipídicas.

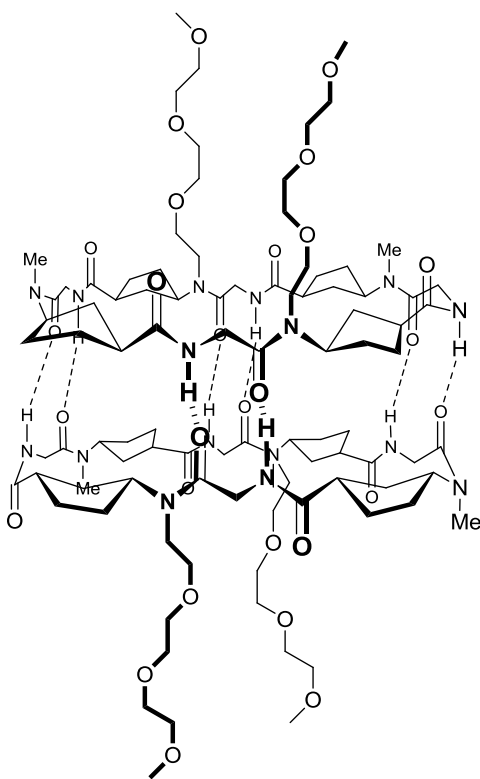


Figura 4.1: Dímero ciclopeptídico funcionalizado con una cadena polioxigenada de 3,6,9-Trioxadecano.

Considerando los antecedentes expuestos en la bibliografía, los precedentes de este grupo de investigación y el objetivo a largo plazo del proyecto, el objetivo a alcanzar en este trabajo es la síntesis del  $(1R,3S)$ - $^3\text{PEG}$ N-Acp-OMe (figura 4.3), lo cual se puede dividir en dos etapas:

1. Síntesis del ácido (1*R*,3*S*)-3-(*N*-*t*-butiloxicarbonil)aminociclopentanocarboxílico de forma enantiomérica (*L*-Boc- $\gamma$ -Acp-OH) a partir de la 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona (lactama de Vince).

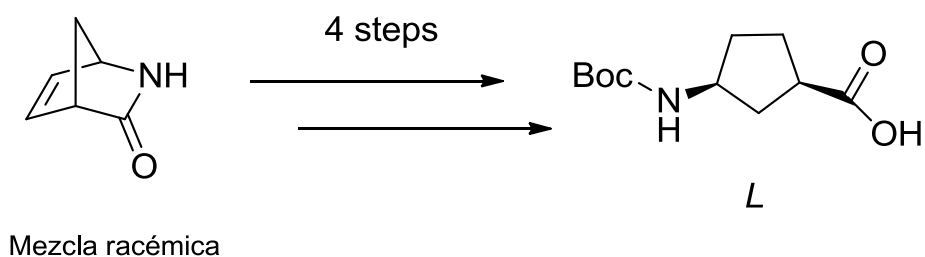


Figura 4.2: Obtención del *L*-Boc- $\gamma$ -Acp-OH mediante la apertura de la lactama de Vince, posterior protección con Boc, resolución del enantiomero *L* e hidrogenolisis del mismo.

2. Funcionalización del ácido (1*R*,3*S*)-Acp-OMe con el 2-(2-(2-metoxietioxi)etoxi)etanol (3PEG-OH) para dar el (1*R*,3*S*)-<sup>3</sup>PEG-N-Acp-OH.

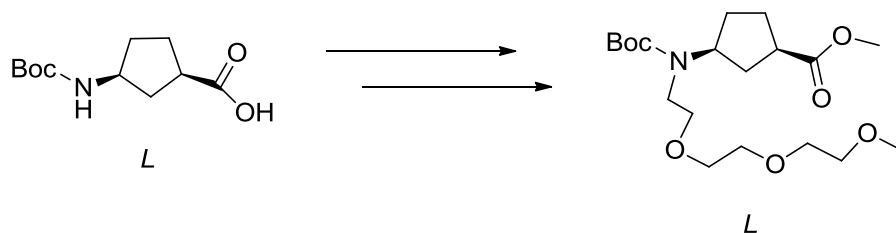
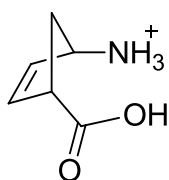


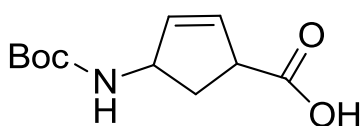
Figura 4.3: funcionalización del *L*-Boc- $\gamma$ -Acp-OH para obtener el (1*R*,3*S*)-Boc-<sup>3</sup>PEG-N-Acp-OMe.

## 5. Resultados experimentales:



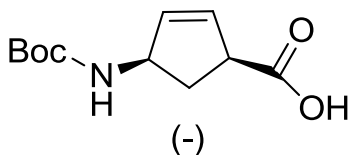
**Hidrocloruro del ácido *cis*-4-aminopent-2-eno carboxílico (ClH·H-Ace-OH).** Una disolución de la azabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-3-ona (Lactama de Vince) (25,0 g, 229,64 mmol) en una disolución acuosa de HCl (10%, 1000 mL) se agitó durante 17 h.

A continuación, la disolución se concentró a sequedad para dar lugar a un sólido blanco, que se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación. [37,1 g; 99%; Rf= 0,37 (50% MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. <sup>1</sup>H RMN (250 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 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* = 14,6 y 4,9 Hz, 1H).<sup>53</sup>



**Ácido *cis*-4-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopentanocarboxílico (Boc-γ-Ace-OH).** El hidrocloruro del ácido *cis*-4-aminopent-2-enocarboxílico (37,1 g, 230,5 mmol) se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O y dioxano (1:1, 600 mL).

A continuación se añadió DIEA (122 mL, 702.7 mmol) y finalmente Boc<sub>2</sub>O (60,9 g, 278.28 mmol) en dos porciones, en un intervalo de 15 minutos entre ellas. Esta mezcla se agitó durante 20 h y posteriormente se acidificó con una disolución acuosa HCl (10%) hasta alcanzar pH = 3. Luego el **Boc-γ-Ace-OH** se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x100 mL), y las fases orgánicas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron para dar lugar a un sólido blanco que se identificó como **Boc-γ-Ace-OH**. [43,3 g, 82%, Rf= 0,33 (10% MeOH/ 90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. <sup>1</sup>H RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 10,8 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H); 6,30 y 4,98 (s, 1H, NH); 5,90 (s, 2H, CH=CH); 4,80 – 4,51 (m, 1H, H<sub>γ</sub>); 3,51 (s, 1H, H<sub>α</sub>); 2,54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1,43 (s, 9H, Boc).<sup>53</sup>

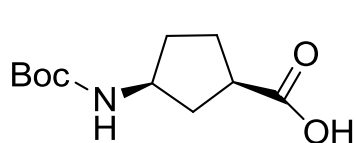


**Ácido (1*R*,4*S*)-*cis*-4-(N-t-butoxycarbonil)amino ciclopentanocarboxílico (L-Boc-γ-Ace-OH).** La mezcla racémica del **Boc-γ-Ace-OH** (43,3 g, 190,0 mmol) se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (630 mL) y a continuación se añadió

lentamente (+)-1-feniletanamina (11,51 mL, 95,0 mmol) mientras la muestra se agitaba y

finalmente el hexano (210 mL), evitando la aparición rápida del precipitado de la sal. Esta mezcla se dejó cristalizar durante una semana, tiempo tras el cual aparecieron cristales blancos en su seno, los cuales se filtraron a vacío lavándolos repetidamente con  $\text{CHCl}_3$ . A continuación, el sólido se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (350 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3x250 mL). La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y concentró a vacío. El sólido obtenido estaba enriquecido en el enantiómero (levorotatorio) o L del  $\gamma$ -amino ácido **Boc- $\gamma$ -Ace-OH** ( $[\alpha]_D^{298} = -12,5$ ). Tras repetir este proceso otra vez, reduciendo las proporciones de hexano y de amina quiral empleada, el exceso enantiomérico llegó al 99%, siendo el  $[\alpha]_D^{298} = -48,6$ . [5,14 g, Rf = 0,71 (50%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ )].  $^1\text{H RMN}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 10,8 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ); 6,30 y 4,98 (s, 1H, NH); 5,90 (s, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 4,80 – 4,51 (m, 1H,  $\text{H}_\gamma$ ); 3,51 (s, 1H,  $\text{H}_\alpha$ ); 2,54 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 1,43 (s, 9H, Boc).

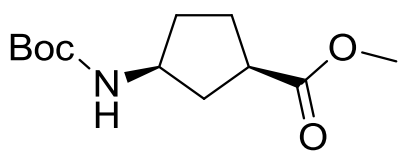
Por otra parte, las aguas madres de la primera cristalización se concentraron, y el sólido resultante se trató con (-)-1-feniletanamina repitiéndose el proceso ya descrito para el otro enantiómero. Tras repetir nuevamente 3 veces la cristalización se obtuvo el ácido **(1R,4S)-cis-4-(N-t-butoxicarbonil)aminociclopentanocarboxílico** (**D-Boc- $\gamma$ -Ace-OH**).  $[[\alpha]_D^{298} = +46,3]$ .<sup>53</sup>



**Ácido (1R,3S)-3-(N-t-butoxicarbonil)aminociclopentanocarboxílico** (**L-Boc- $\gamma$ -Acp-OH**). El aminoácido **L-Boc- $\gamma$ -Ace-OH** (0,5 g, 2,20 mmol) se

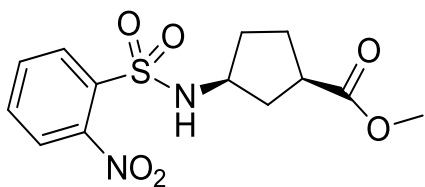
disolvió en EtOH (22 mL) y la disolución resultante se desgasificó y se añadió Pd/C en polvo (5%, 0,46 g, 0,22 mmol). Por último se aplicó la presión de dos globos de  $\text{H}_2$  y la mezcla se agitó durante 26 h bajo esta atmósfera, cuando se observaba que la presión de los globos disminuía se volvieron a rellenar a lo largo de ese tiempo. Finalmente, la disolución se filtró sobre celita lavando repetidamente con EtOH y las aguas madres se concentraron a sequedad para obtener un sólido blanco que se utilizó en el siguiente paso sin más purificación. [0,504 g; 99%; Rf=0,55 (5% MeOH/ 95%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )].  $^1\text{H RMN}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 6,34 y 5,03 (m, 1H); 4,15 – 3,73 (m, 1H); 2,81 (m, 1H); 2,18 (m, 1H); 2,05 – 1,50 (m, 5H); 1,39 (s, 9H). **M.S. (ESI)** [ $m/z$  (%): 230 ( $[\text{MH}]^+$ , 1); 174 ( $[\text{MH}]^+$  - (t-butilo), 45); 130 ( $[\text{MH}]^+$  - Boc, 100); 112 ( $[\text{MH}]^+$  - (OH), 88)].<sup>53</sup>

<sup>53</sup> R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5710–5713.



**(1R,3S)-3-(N-t-butoxycarbonyl)aminociclopentanocarboxilato de metilo (*L*-Boc- $\gamma$ -Acp-OMe).** El aminoácido *L*-Boc- $\gamma$ -

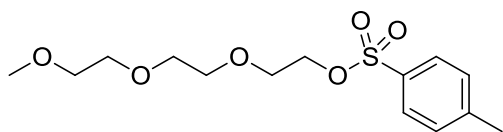
*Acp-OH* (0,504 g, 2,20 mmol) del experimento anterior se disolvió en MeOH (22 mL) y se añadieron por este orden; EDC·HCl (0,632 g, 3,3 mmol), HOBt (0,445 g, 3,3 mmol) y DMAP (0,403 g, 3,3 mmol). La disolución resultante se agitó durante 24 h bajo atmósfera de argón. Transcurrido ese tiempo, se concentró en el rotavapor y el residuo se redisolvió (en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL). La disolución organoclorada se lavó con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> (sat., 3x50 mL), y otra de HCl (5%, 3x50 mL). Tras secar (MgSO<sub>4</sub>), filtrar y concentrar, el sólido resultante se purificó mediante cromatografía en columna (8-15% AcOEt/Hexano) para dar el producto deseado como un sólido blanco. [0,465 g; 87%; R<sub>f</sub>=0,78 (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 4,93 y 4,45 (ancho, 1H, NH); 4,04 (br, 1H, H $\gamma$ ); 3,67 (2s, 3H, CO<sub>2</sub>Me); 2,85-2,79 (ancho, 1H, H $\alpha$ ); 1,43 (s, 9H, Boc). <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  177,1 (C=O); 155,2 (C=O), 78,8 (C (Boc)); 51,8 (CH); 51,6 (CH<sub>3</sub>); 41,5 (CH); 36,3 (CH<sub>2</sub>); 36,2 (CH<sub>2</sub>); 32,3 (CH<sub>2</sub>); 28,2 (CH<sub>3</sub>); 27,8 (CH<sub>3</sub>). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 266 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100); 267 ([M + Na]<sup>+</sup>, 25); 228 ([M]<sup>+</sup> - Me, 1).



**(1R,3S)-3-[N-(o-nosil)]aminociclopentanocarboxilato de metilo (<sup>N<sub>15</sub></sup>N-*L*- $\gamma$ -Acp-OMe).** A una disolución del *L*-Boc- $\gamma$ -Acp-OMe (0,465 g, 1,91 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8,6 mL) se le añadió TFA (8,6 mL) y se agitó a T<sup>a</sup>

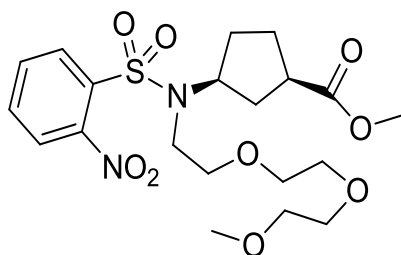
durante 15 minutos. La disolución se concentró en el rotavapor y luego a alto vacío durante 2 h. El sólido resultante se redisolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (9,5 mL) y se añadió DIEA (2,05 mL, 11,46 mmol), seguida de cloruro de o-nitrobenzenosulfonilo (0,445 g, 2,01 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación durante 22 h bajo atmósfera de argón, a continuación se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2x30 mL) y de NaHCO<sub>3</sub> (sat., 2x30 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a vacío. Tras realizar una purificación mediante cromatografía en columna del sólido resultante (20-40% AcOEt/Hexano) se obtuvo <sup>N<sub>15</sub></sup>N-*L*- $\gamma$ -Acp-OMe como un sólido amarillo. [0,34 g; 55%; R<sub>f</sub>= 0,68 (50% AcOEt/Hexano)]. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 8,16 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, Ar); 7,86 (d, *J* = 8,8 Hz, H, Ar); 7,72 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, Ar); 5,84 y 5,33 (d, *J* = 6,9 y 7,2 Hz, 1H, NH); 3,61 y 3,57 (2s, 3H, CO<sub>2</sub>Me); 3,78 (ancho, 1H, H $\gamma$ ); 2,76 (m, 1H, H $\alpha$ ). <sup>13</sup>C

**RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  176,6 (C=O); 150,0 (Ar); 133,7 (Ar); 133,4 (Ar); 132,8 (Ar); 130,7 (Ar); 125,3 (Ar); 55,5 (CH<sub>3</sub>); 52,8 (CH); 41,6 (CH); 36,4 (CH<sub>2</sub>); 33,2 (CH<sub>2</sub>); 27,9 (CH<sub>2</sub>). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 328 ([M]<sup>+</sup>, 100).



**2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil-4-methylbenzenosulfonato (3PEG-OTs).** A

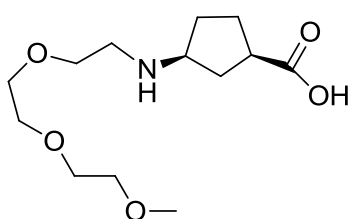
una disolución de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etanol (3PEG-OH) (3,38 g, 20 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se le añadió Et<sub>3</sub>N (3,61 mL, 40 mmol,) y cloruro de tosilo (4,28 g, 22 mmol) y se agitó durante 24 h bajo atmósfera de argón. A continuación se lavó con H<sub>2</sub>O Mili-Q (2x100mL), se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró a vacío. Finalmente se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (15%-50% AcOEt/Hexano), obteniéndose el mencionado tosionato como un aceite transparente poco viscoso. [5,70 g; 89%; R<sub>f</sub> = 0,40 (50%AcOEt/Hexano)]. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 7,77 (d, J = 8,5 Hz, 2H, Ar); 7,33 (d, J = 7,9 Hz, 2H, Ar); 4,14 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OTs); 3,67 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 3,6 - 3,2 (m, 8H, 4 x O-CH<sub>2</sub>); 3,35 (s, 3H, MeO-); 2,43 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 144,7 (C (Ar)); 132,9 (C (Ar)); 129,8 (CH (Ar)); 127,9 (CH (Ar)); 71,8 (CH<sub>2</sub>); 70,6 (CH<sub>2</sub>); 70,5 (CH<sub>2</sub>); 69,2 (CH<sub>2</sub>); 68,6 (CH<sub>2</sub>); 58,9 (CH<sub>3</sub>); 21,6 (CH<sub>3</sub> (Ar)). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 319 ([M]<sup>+</sup>, 100).



**(1R,3S)-3-[N,N-(o-nosil, 2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil]aminociclopentacarboxilato de metilo (L-Ns-<sup>3</sup>PEG-N-Acp-OMe).** El

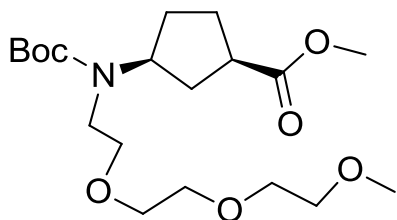
2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil-4-metilbenzenosulfonato (1,40 g; 4,39 mmol) se disolvió en 3 mL de DMF seco bajo atmosfera de argón y se añadió el <sup>15</sup>N-L- $\gamma$ -Acp-OMe (0,24 g, 0,73 mmol) y el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,81 g, 5,48 mmol). La disolución resultante se agitó durante 20 h bajo atmosfera de argón para a continuación concentrar en el rotavapor a alto vacío. El residuo se disolvió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75 mL) y se lavó con H<sub>2</sub>O Mili-Q (2x75 mL) y una disolución acuosa de NaCl (sat., 2x75 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtro y se concentró a vacío. Finalmente, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10%-60% AcOEt/Hexano) para dar lugar al L-Ns-<sup>3</sup>PEG-N-Acp-OMe como

un sólido blanco. [0,29 g; 83%;  $R_f = 0,55$  (50% AcOEt/Hexano)].  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,06 (m, 1H, Ar); 7,7 – 7,2 (3H, Ar); 4,18 (m, 1H,  $\text{H}_\gamma$ ); 3,57 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ); 3,55 – 3,35 (12H, PEG); 3,27 (s, 3H, MeO); 2,74 (m, 1H,  $\text{H}_\alpha$ ); 2,2 - 1,6 (6H,  $3 \times \text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 175,8 (C=O); 133,4 (CH (Ar)); 131,8 (CH (Ar)); 130,5 (C (Ar)); 124,2 (C (Ar)); 71,9 ( $\text{CH}_2$ ); 70,5 ( $\text{CH}_3$ ); 70,4 ( $\text{CH}_2$ ); 60,0 ( $\text{CH}_3$ ); 58,9 ( $\text{CH}_2$ ); 43,4 (CH); 40,6 ( $\text{CH}_2$ ); 32,7 (CH); 28,4 ( $\text{CH}_2$ ); 26,6 ( $\text{CH}_2$ ). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 266 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 100).



**Ácido** (1R,3S)-3-N-[2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil]aminociclopentacarboxílico. A

una disolución del producto generado en la reacción anterior (*L*-Ns- $^3\text{PEG}$ N-Acp-OMe) (312 mg, 0,66 mmol) en DMF (3,5 mL) se le añadieron por este orden:  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (273 mg, 1,97 mmol) y tiofenol (0,1 mL). La disolución se dejó con agitación 15 h bajo atmosfera de argon, a continuación se concentró a vacío para eliminar el disolvente y el producto se utilizó en la siguiente reacción sin purificaciones adicionales. **M.S. (ESI)** [m/z (%): 276 ( $[\text{M}]^+$ , 45); 298 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 55).



(1R,3S)-3-[N,N-2-(2 (2-metoxietoxi)etoxi)etil)-t-butoxicarbonil]aminociclopentacarboxilato de metilo. El producto obtenido en la reacción anterior (*L*- $^3\text{PEG}$ N-Acp-OH) (0,19 g, 0,66 mmol) se disolvió en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}$ /dioxano (1:1, 11 mL) y se añadió DIEA

(350  $\mu\text{L}$ , 1,98 mmol) y  $\text{Boc}_2\text{O}$  (0,19 g, 0,825 mmol) dividido en dos porciones y con un intervalo de 15 minutos. La disolución se agitó durante 20 h y a continuación se acidificó con una disolución acuosa de HCl (10%) hasta obtener un pH de 3. La disolución se concentró a vacío para eliminar el disolvente y el residuo se disolvió en MeOH (6,8 mL). Sobre esta disolución se añadieron por este orden: la EDC·HCl (0,20 g, 1,02 mmol), HOBt (0,14 g, 1,02 mmol) y DMAP (0,125 g, 1,02 mmol). La disolución resultante se agitó durante 24 h bajo atmósfera de argón y posteriormente se concentró a vacío. El residuo se redisolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con una disolución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  (sat.  $3 \times 50$  mL) y de HCl (5%,  $3 \times 50$  mL) y se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y concentró. El sólido resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (0-8%

AcOEt/Hexano) para dar el producto deseado como un sólido blanco. [15 mg; 5%;  $R_f$ = 0,80 (15% MeOH/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )].  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 4,30 (ancho, 1H,  $\text{H}_\gamma$ ); 3,7 – 3,30 (18H, 12H PEG, 3H OMe, 3H  $\text{CO}_2\text{Me}$ ); 2,73 (m, 1H,  $\text{H}_\alpha$ ); 1,45 (s, 9H, Boc); 2,1 – 1,2 (6H, 3x $\text{CH}_2$ ).  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,06 (m, 1H, Ar); 7,7 – 7,2 (3H, Ar); 4,18 (m, 1H,  $\text{H}_\gamma$ ); 3,57 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ); 3,55 – 3,35 (12H, PEG); 3,27 (s, 3H, MeO); 2,74 (m, 1H,  $\text{H}_\alpha$ ); 2,2 – 1,6 (6H, 3x $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 176,2 (C=O); 155,5 (C); 71,9 ( $\text{CH}_2$ ); 70,6 ( $\text{CH}_2$ ); 70,5 ( $\text{CH}_2$ ); 70,4 ( $\text{CH}_2$ ); 70,0 ( $\text{CH}_2$ ); 59,0 ( $\text{CH}_3$ ); 51,7 ( $\text{CH}_3$ ); 41,2 (CH); 33,2 (CH); 29,7 ( $\text{CH}_2$ ); 28,5 ( $\text{CH}_3$  (Boc)); 26,9 ( $\text{CH}_2$ ). **M.S. (ESI)** [m/z (%]): 389 ( $[\text{M}]^+$ , 1); 290 ( $[\text{M}]^+ - (\text{Boc})$ , 60); 412 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 39).

## 6. Discusión de los resultados:

### 6.1 Grupos protectores:

En la síntesis química de péptidos es muy importante que tanto la reactividad del grupo amino de un extremo y del grupo ácido del otro sean específicas en cada paso de la secuencia sintética, lo cual implica que la reactividad sea total en uno de estos grupos funcionales mientras que no presente reactividad en el otro. Por lo cual es necesario diseñar rutas sintéticas que incluyan grupos protectores ortogonales, que puedan ser añadidos o eliminados selectivamente sin que esto afecte a los demás grupos funcionales del péptido. También es necesario tener en cuenta que las condiciones para llevar a cabo la protección y desprotección de estos grupos deben respetar la estereoquímica presente en el péptido para no perder sus propiedades futuras. Por lo tanto, hay que mantener en la medida de lo posible la quiralidad en los centros estereogénicos presentes, ya que así evitamos la aparición de mezclas de productos que harían mucho más difíciles los procesos de separación y purificación y reducirían el rendimiento global de la ruta sintética. Teniendo todos estos factores en cuenta, nos hemos decantado por utilizar los siguientes grupos protectores:

#### Extremo amino-terminal: Grupo Boc (*tert*-butiloxicarbonilo):

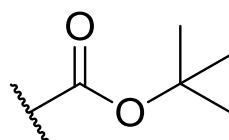


Figura 6.1: Ilustración de la estructura del grupo Boc.

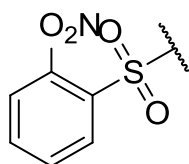
Es uno de los grupos protectores más comunes en la síntesis de aminas. Se basa en la formación de un carbamato que es inerte a la hidrogenación y a las alquilaciones y que no reacciona con nucleófilos. Los carbamatos también son útiles en la síntesis de péptidos con reducidos porcentajes de epimerización ya que el protón en la posición  $\alpha$  es menos ácido, reduciéndose la epimerización en las condiciones ligeramente básicas de los acoplamientos peptídicos.

Desprotección: La eliminación del Boc se realiza por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA), ya sea solo o diluido en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La reacción es muy rápida,

terminando normalmente en menos de 10 minutos. Para los sustratos con un mayor número de grupos Boc, esta etapa de desprotección puede llevar más tiempo. El TFA presenta algunas desventajas; es volátil, corrosivo y bastante caro, así que para los procesos de gran escala se utilizan condiciones ácidas alternativas usando disoluciones acuosas de HCl.

Protección: Los reactivos más comunes para la formación del carbamato de Boc son: el *t*-butiloxicarbonilo anhídrido (Boc<sub>2</sub>O) o el 2-(*t*-butiloxicarboniloxiimina)-2-fenilacetronitrilo (Boc-ON). Estas protecciones se llevan a cabo normalmente en medio básico (DIEA, NaHCO<sub>3</sub>) y una mezcla de disolventes de base acuosa (es decir, H<sub>2</sub>O/TFH o Dioxano/H<sub>2</sub>O), con muy buenos rendimientos, normalmente mayores del 90%.

#### Extremo amino-terminal: Grupo *o*-Nosilo (2-Nitro-sulfonamida)



*o*-nosilo

Figura 6.2: Ilustración de la estructura del grupo Boc.

Durante las reacciones de N-alquilación, se requiere la abstracción del protón en la amina del aminoácido. Para reducir al mínimo los productos polialquilados, durante la alquilación directa de aminas, es preferible la reacción con sobre un derivado protegido. En nuestro grupo de investigación hemos visto que el nosilo (nitrosulfonamida) es un grupo protector muy útil para ese propósito ya que incrementa la acidez del protón del NH y se pueden usar bases débiles, por lo que se reduce el problema de la epimerización anteriormente mencionado.<sup>54</sup> Por tanto, la abstracción de protones se puede llevar a cabo bajo condiciones suaves, debido al efecto aceptor de electrones del grupo nitro en las posiciones resonantes del anillo (*orto* o *para*). Además este grupo se puede eliminar de forma quimiosselectiva y suave sin afectar a otros grupos funcionales. Para este trabajo en particular se utilizó el *o*-nosilo (2-nitro-sulfonamida) porque se pensó que sería más factible la N-alquilación cuando se insertasen grupos voluminosos.

<sup>54</sup> M.P. Lopez-Deber, L. Castedo, J.R. Granja, *Org. Lett.* 2001, 18, 2823-2826.

Desprotección: La desprotección selectiva de los grupos nosilo puede llevarse a cabo con tiofenol en DMF, en presencia de una base débil ( $K_2CO_3$ ) a temperatura ambiente.

Protección: La formación del grupo nosilo se lleva a cabo por reacción de la amina con cloruro de 2-nitrosulfonamida en presencia de una base (DIEA) en  $CH_2Cl_2$  bajo condiciones secas.

### **Extremo carboxi-terminal: grupo éster metílico ( $CO_2Me$ )**

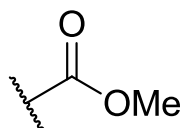


Figura 6.3: Ilustración de la estructura del grupo éster metílico.

El grupo metílico se utiliza como un grupo protector en el extremo carboxi-terminal. Es muy fiable en cuanto a que es muy fácil de formar y que también es estable a condiciones ácidas, y tolera bien el tratamiento con TFA.

Desprotección: esta se lleva a cabo mediante hidróxidos de metales alcalinos inorgánicos (LiOH, NaOH, KOH) que se utilizan para formar el ácido carboxílico en un rendimiento casi cuantitativo. Las desprotecciones se llevan a cabo en una variedad de disolventes, siendo las mezclas más comunes de MeOH/ $H_2O$  y THF/ $H_2O$ .

Protección: se llevan a cabo utilizando una doble estrategia de activación para ácidos carboxílicos. En primer lugar, se utiliza EDC o DCC (carbodiimidas) y después HOBt (hidroxibenzotriazol) para formar el éster activo en presencia de una base voluminosa como el DMAP (dimetilaminopiridina). Se usa el metanol como disolvente, lo que lleva a la formación del éster de metilo con muy buenos rendimientos bajo condiciones muy suaves, en comparación con otros métodos.

## 6.2 Síntesis del aminoácido Boc-*L*- $\gamma$ -Ace-OH [ácido (1*R*,4*S*)-*cis*-4-amino-*N*-*tert*-butiloxicarbonilciclopenteno carboxílico]:

El primer objetivo de este proyecto fue la síntesis del ácido (1*R*,4*S*)-*cis*-4-amino-*N*-*tert*-butiloxicarbonilciclopenteno carboxílico en escala de multigramo, seguido de su resolución enantiomérica. El precursor comercial inicial es el 2-azabicyclo [2.2.1]-hept-5-en-3-ona (o más comúnmente conocido por lactama de Vince) (**1**). La primera etapa es la hidrólisis del enlace amina de la lactama que se llevó a cabo bajo condiciones ácidas (disolución acuosa de HCl al 10%). La reacción transcurre con rendimiento casi cuantitativo pudiéndose utilizar sin necesidad de purificación. El compuesto resultante se protegió por tratamiento con anhídrido de Boc para dar el aminoácido protegido (**3**) como una mezcla racémica. La formación de dicho compuesto se identificó por la presencia de una señal en torno a 1,5 ppm que integra por 9 hidrógenos.

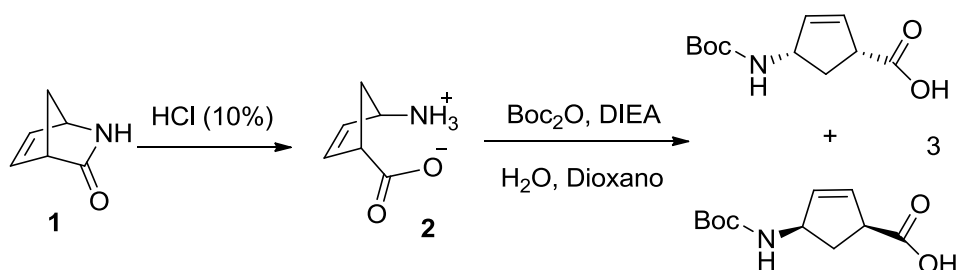


Figura 6.4: Apertura de la lactama de Vince (**2**) y posterior protección de la mezcla racémica con con Boc<sub>2</sub>O para da el Boc-Ace-OH (**3**).

El siguiente paso fue la resolución de (**3**), que se llevó a cabo mediante cocristalización con una amina quiral. Esto se consigue al formar una sal entre la amina quiral y uno de los enantiómeros de la mezcla racémica, ya que cristaliza más eficientemente uno de los dos posibles diastereoisómeros. Los diastereoisómeros tienen diferentes propiedades químicas y por lo tanto se pueden separar mediante diferentes técnicas, algunas tan sencillas como la cristalización. En este caso, se partió de la mezcla **3** y se trató con la (*R* o *S*) 1-feniletanamina. Esta amina se utiliza debido a que ambos enantiómeros están comercialmente disponibles a bajo costo y la experiencia conseguida en nuestro grupo de investigación indica que es un método óptimo para la separación de estos enantiómeros.

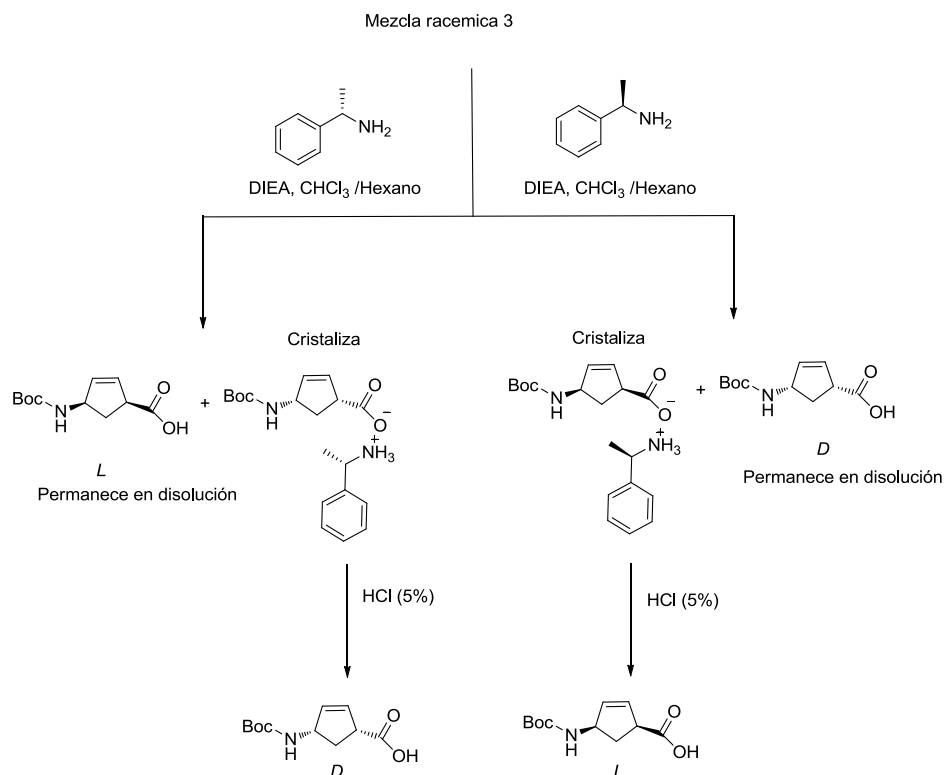


Figura 6.5: Resolución de la mezcla racémica del Boc- $\gamma$ -Ace-OH para separar los enantiómeros Boc-*L*- $\gamma$ -Ace-OH y Boc-*D*- $\gamma$ -Ace-OH mediante cocrystalización con una amina quiral.

Para este caso particular, la solución racémica de **3** en CDCl<sub>3</sub>/Hexano (1:1) se trató con 0,5 equivalentes de *R*-1-feniletanamina, y se dejó cristalizar. El primer núcleo de cristal apareció en menos de 24 h, pero la cristalización total duro siete días. Es de indicar que el uso del enantiómero de la amina *R*, provoca la cristalización del enantiómero (1*S*, 4*R*) (o *L*) del  $\gamma$ -aminoácido, y la amina *S* cristaliza el otro enantiómero (1*R*, 4*S*). El sólido se filtró y los cristales se suspendieron entonces en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavaron con una disolución acuosa de HCl (5%) por lo que el ácido carboxílico se podría protonar y liberarse de la sal con la amina. El exceso enantiomérico de la fracción enriquecida se comprobó con una medición simple y rápida de la rotación óptica  $[\alpha]_D^{298}$ , ya que se sabe que el compuesto enantioméricamente puro tiene un valor de rotación óptica de  $[\alpha]_D^{298} \pm 50^\circ$ . La primera cristalización dio lugar al ácido con una rotación óptica  $-12,5^\circ$ . Durante la segunda cristalización, se aumentó los equivalentes de la amina quiral (1,0 equivalentes) y se redujo la cantidad de hexano que se utilizó en la mezcla de disolventes. En apenas 6 h se completó la segunda cristalización y se alcanzó un valor de  $[\alpha]_D^{298} = -48,6^\circ$ ; lo que indica que la riqueza enantiomérica es elevada. En estos casos recurrimos a

un sistema más preciso para asegurarse del grado de riqueza enantiomérica que sea menos sensible a los errores experimentales como en el caso de la medida de la rotación óptica.

Los resultados definitivos los obtuvimos mediante una columna quiral de HPLC. La fase estacionaria de la columna es quiral y cada enantiómero interacciona de forma diferente y por tanto presenta un tiempo de retención diferente. Para ello se inyectó una muestra del Boc-Ace-OH obtenido y se comparó con el cromatograma de una muestra patrón previamente preparada que incluía un ligero exceso del enantiómero *L* del Ace ( $t_r=15,7$  min) frente al enantiómero *D* ( $t_r=12,7$  min). Así, simplemente comparando la integral relativa de la señal de cada enantiómero se puede detectar el exceso enantiomérico de nuestra resolución, dando un exceso enantiomérico del 99%.

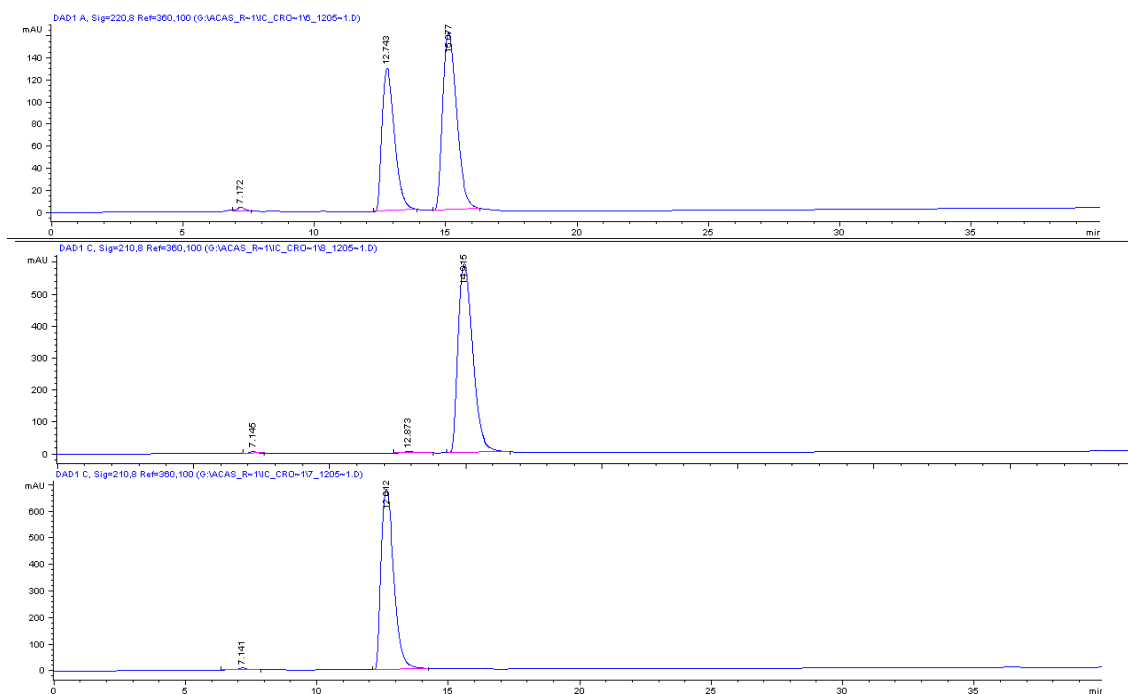


Figura 6.6: En la parte superior se muestra el cromatograma de una mezcla que contiene un ligero exceso del enantiómero *L*. Mientras que en el cromatograma centro corresponde a la muestra obtenida tras la segunda cristalización y que corresponde mayoritariamente al enantiómero *L* y en la parte inferior está presente la muestra obtenida después de cristalizar tres veces con la amina S.

### 6.3 Funcionalización del Boc-*L*- $\gamma$ -Acp-OH con el polietilenglicol (2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etanol) para dar el Boc-*L*-<sup>3PEG</sup>N- $\gamma$ -Acp-OMe:

El primer paso para la obtención del compuesto deseado (Boc-*L*-<sup>3PEG</sup>N- $\gamma$ -Acp-OMe) fue la hidrogenación del Boc-*L*- $\gamma$ -Ace-OH para dar el Boc-*L*- $\gamma$ -Acp-OH. Que se llevó a cabo utilizando Pd/C como catalizador en presencia de una atmosfera de hidrogeno.

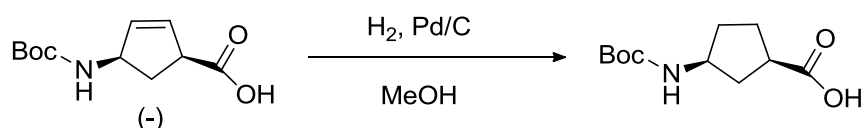


Figura 6.7: Reacción llevada a cabo para la reducción del doble enlace del Boc-*L*- $\gamma$ -Ace por tratamiento con Pd/C bajo atmosfera de H<sub>2</sub> para dar el Boc-*L*- $\gamma$ -Acp-OH.

El siguiente paso es la funcionalización del N del Acp con un grupo el 3,6,9-troxadecano, pero para llevar a cabo esta funcionalización surge un problema y es que el hidrogeno del grupo amina no es especialmente ácido, por lo que es difícil arrancarlo, y si usamos bases fuerte el carbono  $\alpha$  del Acp epimeriza. Para solventar este problema se decidió cambiar el grupo protector Boc por un grupo *o*-Nosilo (Ns), que como se comentó anteriormente, retira carga del nitrógeno por resonancia haciéndolo más ácido y se pueden abstraer empleando condiciones básicas suaves. Para llevar a cabo la reacción N-alkilación decidimos inicialmente proteger el grupo carboxílico por formación de un grupo éster metílico. la reacción se llevo a cabo por tratamiento de una disolución metanólica de Boc- $\gamma$ -Acp-OH con EDC en presencia de DMAP. Este éster se identificó por la aparición de un singlete a 3,7 ppm, que corresponde al éster metílico. El compuesto resultante se trató con TFA para eliminar el grupo Boc y a continuación se trató con el cloruro de O-Nitrobenzoilo en presencia de DIEA. el compuesto se obtuvo con un rendimiento de 61%. La presencia de señales aromáticas a 8,16, 7,86, 7,72 en una relación de 1:1:2 confirman la incorporación del grupo nosilo. Aparentemente no se produjo la epimerización del C $\alpha$  tal como confirma el H RMN en el que aparece una única señal a 2,8 ppm correspondiente a H $\alpha$ .

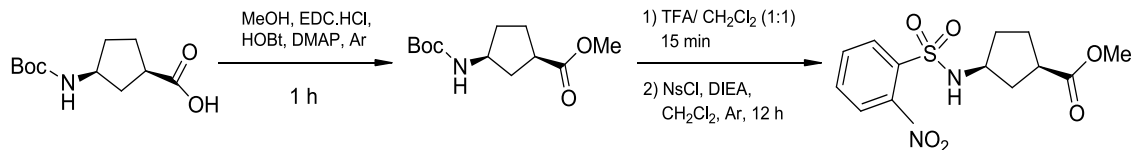
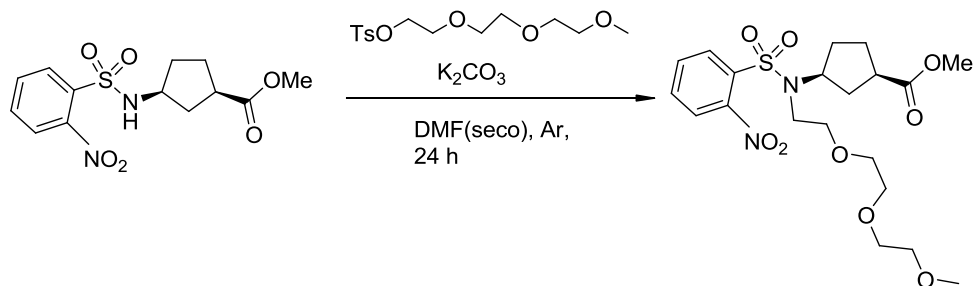


Figura 6.8: Secuencia sintética para la protección de ambos extremos del aminoácido: el C-terminal mediante la formación del éster metílico y el N-terminal a través de un grupo *o*-nosilo.

Una vez tuvimos el compuesto (**Ns-L- $\gamma$ -Acp-OMe**) se pensó en lograr su N-funcionalización con el polietilenglicol [2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etanol (3PEG-OH)] mediante una reacción de Mitsunobu,<sup>55</sup> ya que esta reacción permite acoplar alcoholes como el grupo 3PEG-OH sobre una amina en un solo paso, además las condiciones de reacción son suaves y los reactivos económicamente asequibles. Por lo que se hizo una prueba con el Ns-L- $\gamma$ -Acp-OMe en THF (seco) en presencia de 3PEG-OH, DEAD y PPh<sub>3</sub>, pero la reacción no tuvo lugar, posiblemente debido al impedimento estérico que sufre el hidrogeno del grupo amina que no permite la entrada del 3PEG-OH.

Ante la imposibilidad de utilizar la reacción de Mitsunobu, se optó por transformar el grupo alcohol del 3PEG-OH en un buen grupo saliente, como es el tosilato, mediante tratamiento con cloruro de tosilo obteniéndose el 3PEG-OTs con un rendimiento cercano al 90%. Una vez formado el tosilato se realizó una reacción de tipo S<sub>N</sub>2 para acoplar el 3PEG-OTs usando una base débil para arrancar el protón del NH. Esta reacción también tuvo lugar satisfactoriamente con un buen rendimiento (89%). A pesar el H RMN era bastante complejo, las señales entre 3,75-3,40 en las que se encuentran los metilenos pertenecientes al PEG junto con las señal a 3,30 ppm que integra por 3 protones que corresponde al grupo metilo del PEG confirman la incorporación del mismo a la molécula.



<sup>55</sup> O. Mitsunobu, *O. Synthesis* 1981, 1-28.

Figura 6.9: Acoplamiento del polietilenglicol (3PEG-OTs) mediante una reacción  $S_N2$  sobre el Ns-*L*- $\gamma$ -Acp-OMe.

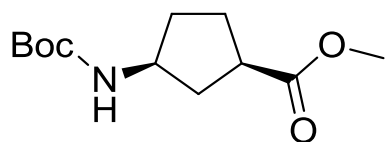
Una vez funcionalizado nuestro aminoácido se decidió cambiar el grupo protector del grupo amina, ya que el nosilo (Ns) no es el más idóneo para la posterior síntesis peptídica. Durante la eliminación del grupo Ns (tal como se ha indicado previamente usando tiofenol y carbonato sódico) nos encontramos con que el extremo C-terminal, protegido como éster metílico, también se había desprotegido y nuestro compuesto al llevar a cabo la elaboración se pasaba a la fase acuosa (esto pudo deberse a que el grupo 3PEG le confiere gran polaridad al aminoácido, lo cual es uno de los objetivos buscado en este proyecto). Pero todo esto hacía muy complicado seguir con la elaboración y purificación del producto, por lo que se decidió eliminar el agua (mediante una liofilización) y proceder a proteger el extremo N-terminal con Boc<sub>2</sub>O usando condiciones ya descritas previamente. El producto resultante, protegido con Boc, seguía siendo muy soluble en medios acuosos por lo que se procedió a proteger el extremo C-terminal sin llevar a cabo ninguna otra etapa que la eliminación del disolvente (H<sub>2</sub>O/dioxano) usado para acoplar el grupo Boc. De esta forma el producto resultante se trató con EDC, HOBT, DMAP en metanol, condiciones en la que se obtenía el éster metílico con un rendimiento global de 5% desde el Ns<sup>3PEG</sup>N-Acp-OMe. La señal en el H RMN entre 3,55 – 3,35 que integra por 12 hidrógenos confirman la formación del producto deseado.

## 7. Conclusiones (Conclusions):

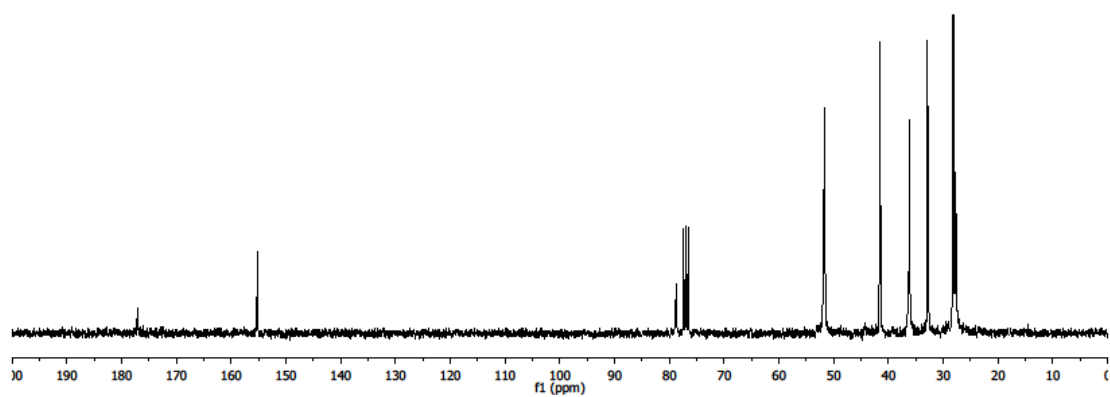
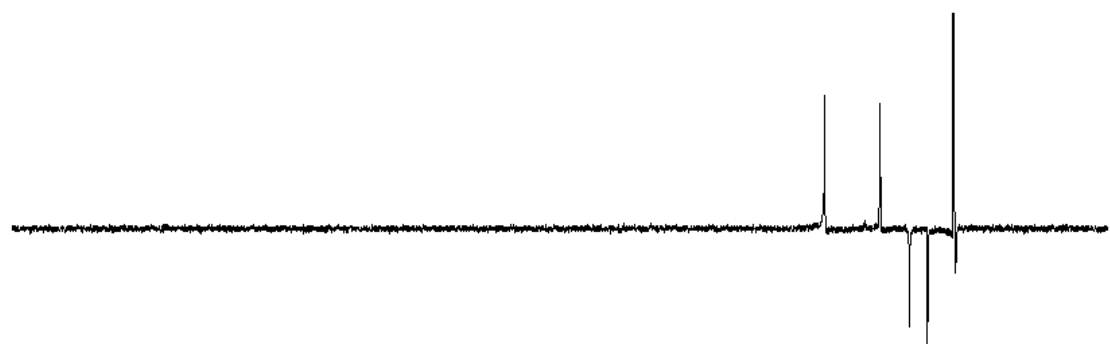
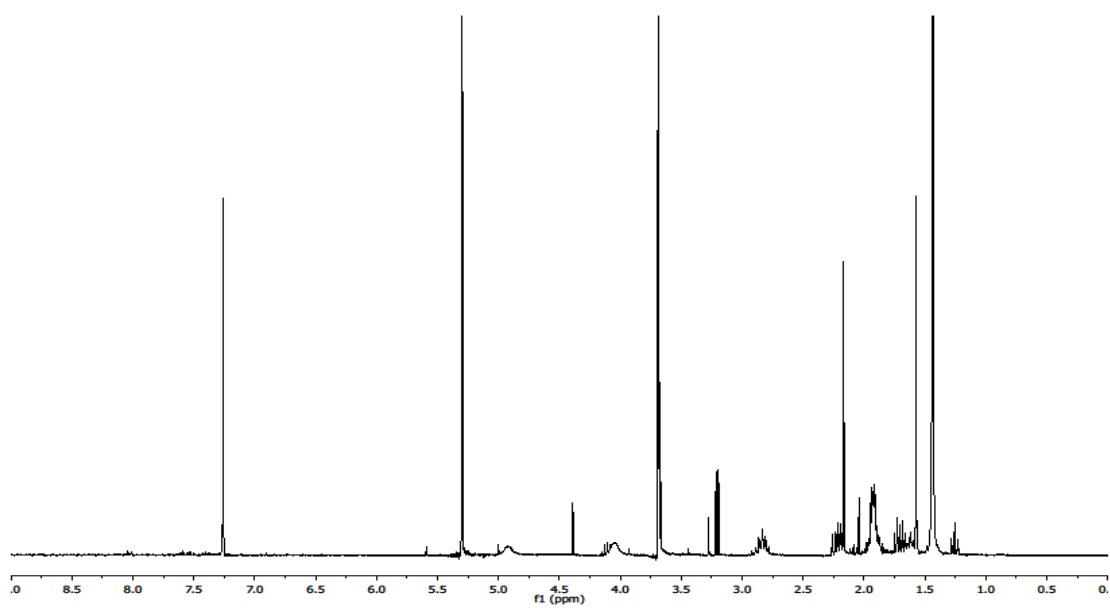
After all the laboratory work done, the following conclusions can be obtained:

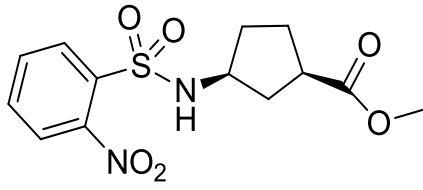
1. (1*R*,3*S*)-3-amino-N-Boc-cyclopetanecarboxylic acid (Boc-*L*- $\gamma$ -Acp-OH) was obtained in 99% ee from Vince's lactame in 4 steps (including racemic resolution) in a yield of about 25%.
2. Boc-*L*- $\gamma$ -Acp-OH was properly protected in its C-terminal (Methyl) and its N-terminal (Nosyl by Boc) for its functionalization to give the wished product (Boc-*L*-<sup>3PEG</sup>N- $\gamma$ -Acp-OMe).

## Anexo: Espectros de RMN

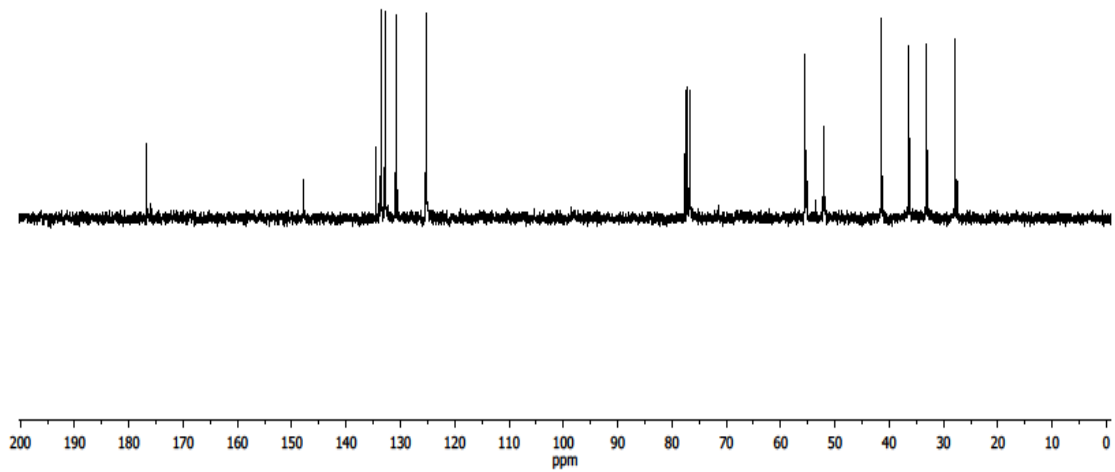
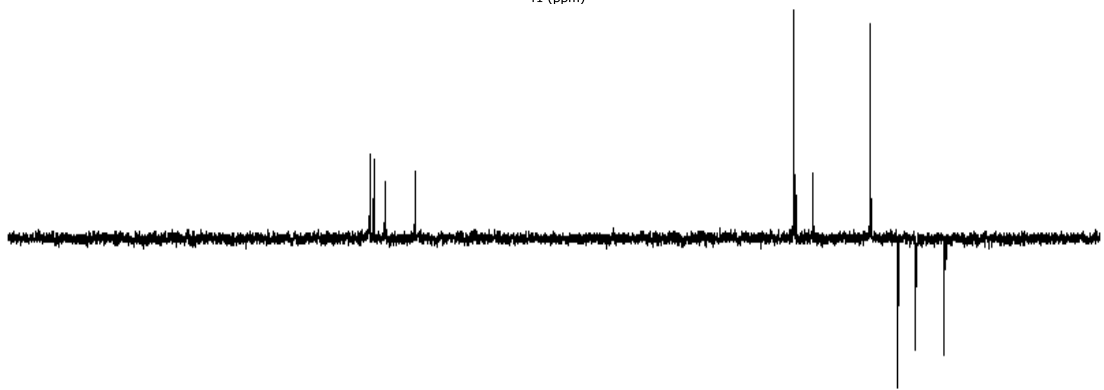
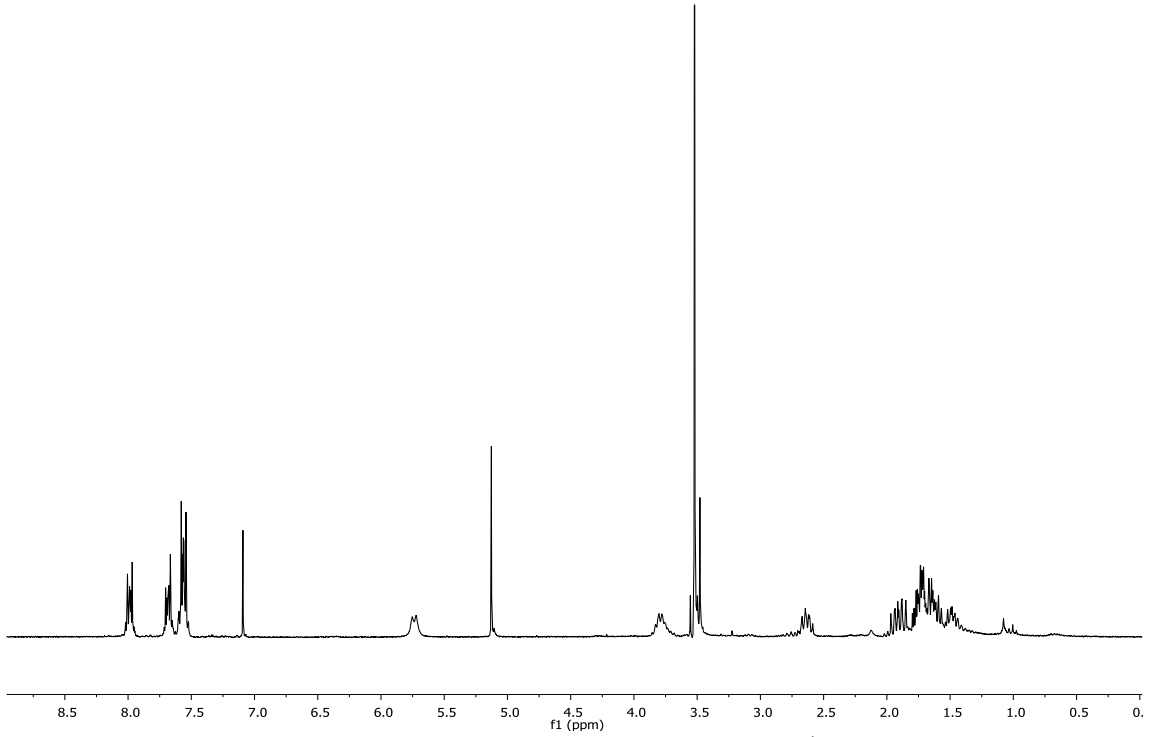


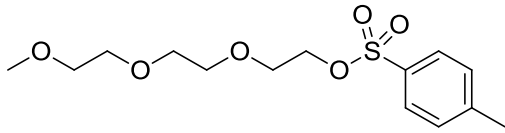
(1*R*,3*S*)-3-(*N*-*t*-butoxycarbonyl)aminociclopentanocarboxilato de metilo (*L*-Boc- $\gamma$ -Acp-OMe)



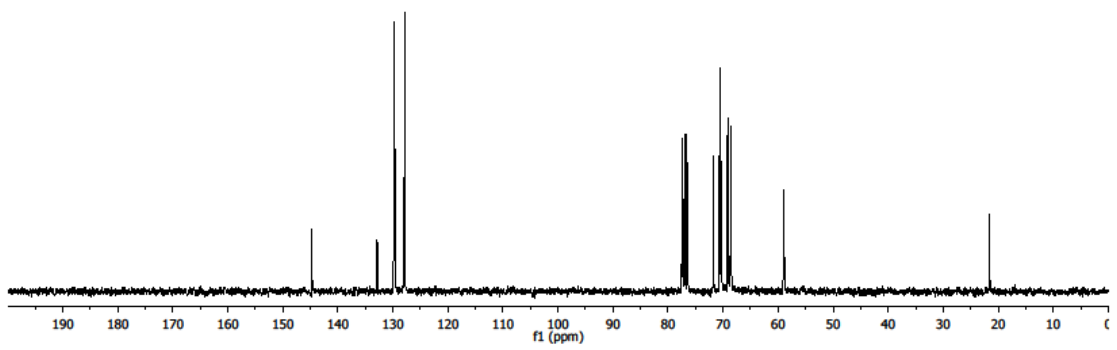
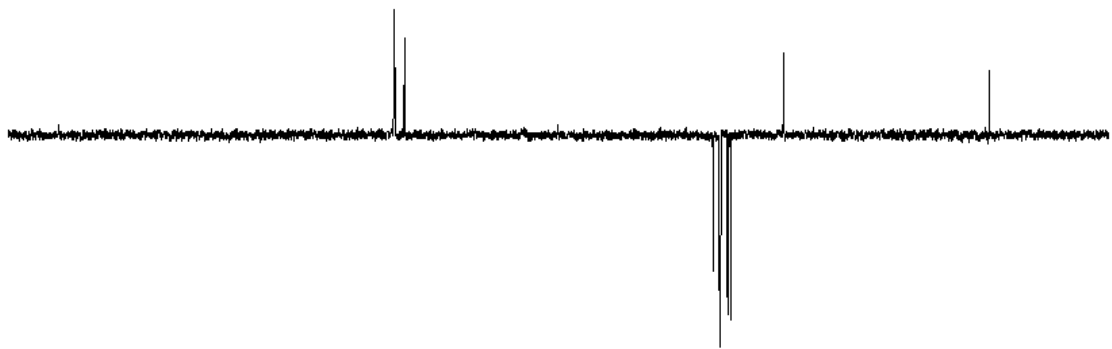
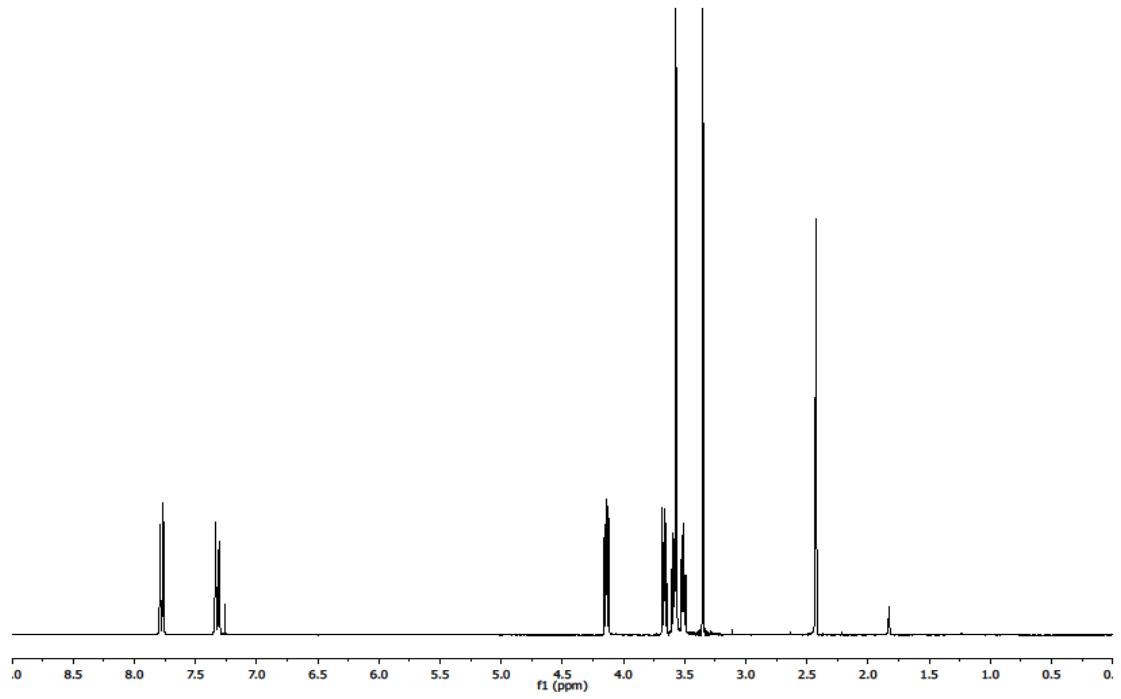


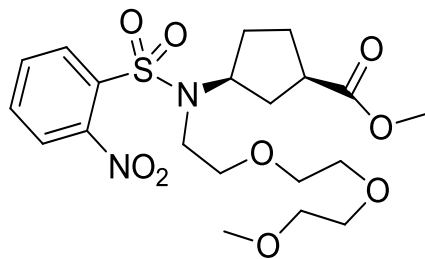
(1*R*,3*S*)-3-[N-(*o*-nosil)]aminociclopentanocarboxilato de metilo (<sup>15</sup>N-*L*- $\gamma$ -Acp-OMe).



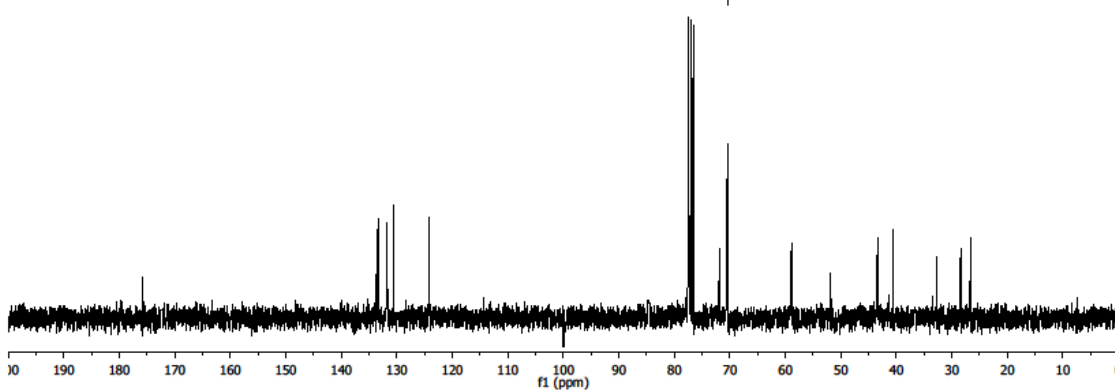
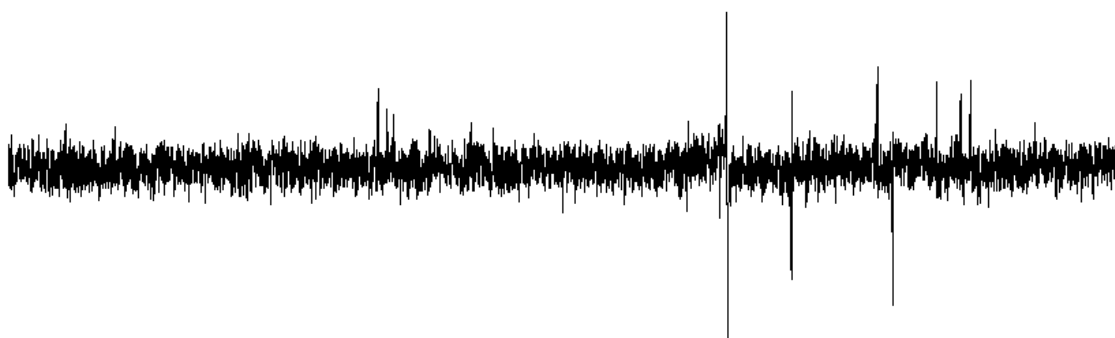
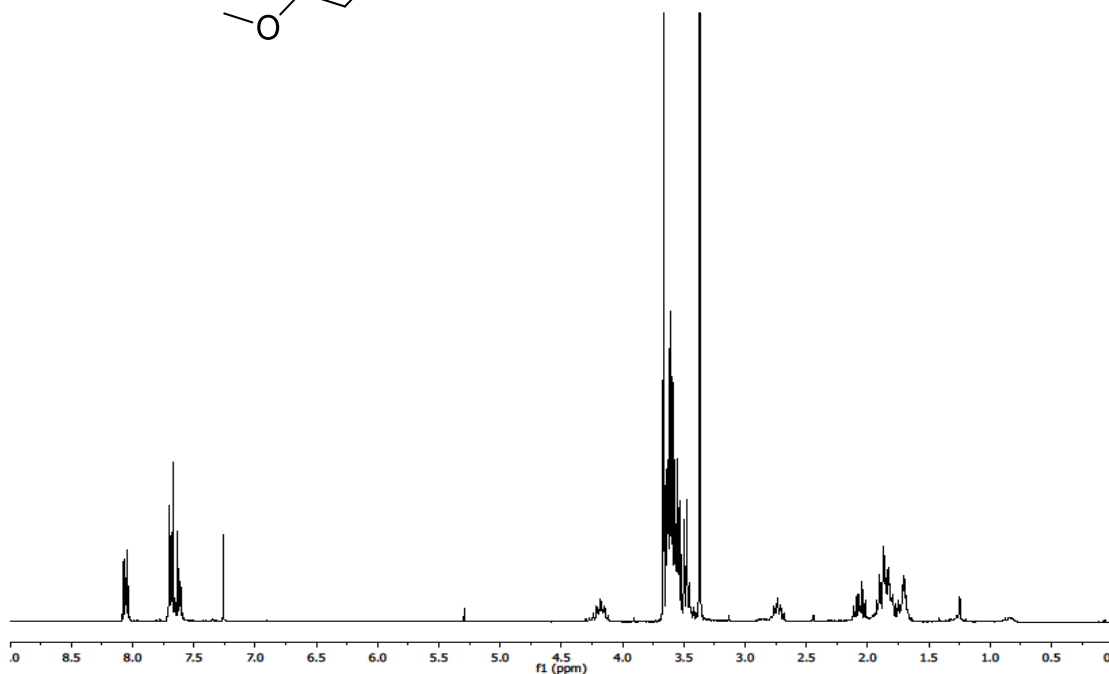


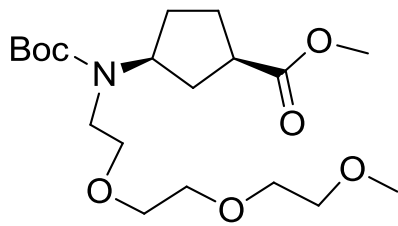
2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil-4-metilbenzenosulfonato.





(1*R*,3*S*)-3-[*N,N*-(*o*-nosil,  
2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)]aminociclopentacarboxilato  
de metilo.





**(1*R*,3*S*)-3-[*N,N*-2-(2-metoxietoxi)etilo)-*t*-butoxicarbonil]aminociclopentacarboxilato de metilo.**

