Facultad de Química – Departamento de Química Orgánica

Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares

DISEÑO Y SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS QUE CONTIENEN γ- Y/O δ-AMINOÁCIDOS CÍCLICOS Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES DE AUTOENSAMBLAJE: SÍNTESIS DE NUEVOS NANOTUBOS PEPTÍDICOS

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Química

por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta:

Arcadio José Guerra Fandiño

Santiago de Compostela, febrero de 2017

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- Al Prof. Juan R. Granja, por la confianza, la orientación y la ayuda que me ha dado a lo largo de esta etapa. Su apoyo constante en los buenos y los malos momentos ha sido el mejor empuje para la finalización de este trabajo.
- Al Dr. Manuel Amorín, por su constante dedicación y ayuda. Su aportación a este trabajo no se reduce a la química, sino también al compañerismo y la amistad.
- A los Prof. José Luis Mascareñas, Concepción González Bello y por supuesto a Luis Castedo, por su gran aportación a mi formación a través de los diferentes seminarios y de la convivencia en el centro.
- A todos mis compañeros a lo largo de todos estos años. Creo que es imposible que pueda citarlos a todos. No obstante, intentaré que se me olvide el menor número posible; a César, Chus, Michele, María José, Roberto, Rebeca, Salvador, Jorge, Noel, Lionel, Nuria, Juan, Alberto, Eva, Marisa, Marta y Karen les agradezco todas las horas que pasamos juntos, los buenos y los malos momentos. De todos ellos he aprendido algo, y espero que ellos hayan aprendido algo de mí.
- Al Ministerio de Economía y Competitividad por la beca predoctoral FPI, así como los proyectos que han financiado esta investigación, tanto del Ministerio de Economía y Competitividad (MEC) y ERDF (CTQ2010-15725, CTQ2013-43264-R, CTQ2014-51912-REDC), Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00006) y Xunta de Galicia y ERDF (GPC2013-039 y EM2014/011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

D. JUAN RAMÓN GRANJA GUILLÁN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Y D. MANUEL AMORÍN LÓPEZ, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INFORMAN: Que la memoria adjunta, titulada "DISEÑO Y SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS QUE CONTIENEN γ- Y/O δ-AMINOÁCIDOS CÍCLICOS Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES DE AUTOENSAMBLAJE: SÍNTESIS DE NUEVOS NANOTUBOS PEPTÍDICOS", que para optar al grado de Doctor en Química presenta Don Arcadio José Guerra Fandiño, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en los laboratorios de Química Orgánica y del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS) de la USC.

Considerando que constituye trabajo de tesis, autorizamos su presentación en la Universidade de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 3 de febrero de 2017.

Fdo.: Juan R. Granja Guillán

Fdo.: Manuel Amorín López

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice

Abreviaturas 11

Introducción 17

Nanotecnología 19

Estructuras tubulares 21

Nanotubos de Carbono 22

Nanotubos Peptídicos 25

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos lineales 25

-Nanotubos peptídicos a partir de proteínas 26

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; *D*,*L*-α-ciclopéptidos 27

-Dímeros de *D*,*L*-α-ciclopéptidos 29

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; β-ciclopéptidos 31

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; α,γ-ciclopéptidos 34

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; γ-Ciclopéptidos 43

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; Otros Ciclopéptidos 44

Aplicaciones de los Nanotubos Peptídicos 47

-Antimicrobianos 47

-Canales transmembranosos 49

-Sensores iónicos/Biosensores 53

-Biomateriales 55

-Dispositivos electrónicos 58

-Transporte de fármacos 60

Objetivos 61

Control rotoisomérico de dímeros 67

Nuevos γ-ciclopéptidos que contienen aminoácidos polihidroxilados 103

Nuevos ciclopéptidos que contienen δ-aminoácidos cíclicos 127

Sistemas homodiméricos de α,δ-ciclopéptidos 135

Sistemas heterodiméricos de α,δ-ciclopéptidos 147

Sistemas homodiméricos de γ,δ-ciclopéptidos 163

Nanotubos de α,δ-ciclopéptidos 185

Conclusiones 203

Parte experimental 207
Descripción general, instrumentos y materiales. 209
Síntesis de péptidos en fase sólida. 211
Procedimientos experimentales 215

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Abreviaturas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Lista de abreviaturas:

Aa	Aminoácido
Aca	Ácido aminocicloalcanocarboxílico
γ-Aca	Ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico
γ-Ace	Ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico
γ-Ach	Ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico
δ-Ach	Ácido *trans*-4-aminociclohexano-1-carboxílico
ACN	Acetonitrilo
γ-Acp	Ácido *cis*-3-aminociclopentanocarboxílico
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
Aga	Ácido 1-amino-glucurónico
Ahf	Ácido 4-amino-3-hidroxifuranocarboxílico
Ala	Alanina
All	Alilo
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
Asn	Asparagina
Bn	Bencilo
Boc	*Tert*-butoxicarbonilo
c	Cuadruplete
Ccf	Cromatografía en Capa Fina
Cys	Cisteína
COSY	Espectroscopía de correlación
CP	Ciclopéptido
^{13}C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
CTTP	ácido 4-(10,15,20-tris(4-pentilfenil)porfirin-5-il)benzoico
d	Doblete
DABCO	1,4-diazabiciclo[2.2.2]-octano
DCC	*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona

DIC	*N,N'*-diisopropilcarbodiimida
DIEA	*N,N'*-diisopropiletilamina
DMA	Dimetilacetamida
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPBA	Ácido difenilfosfino benzoico
dppe	1,2-bis(difenilfosfino)etano
EDC·HCl	Hidrocloruro de la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida
ee	Exceso enantiomérico
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
eq	Equivalentes
ESI	Ionización mediante electrospray
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
FAB	Ionización mediante bombardeo con átomos rápidos
Fm	9-fluorenilmetil éster
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
Fm-OH	9-fluorenilmetanol
FT-IR	Espectrometría de Infrarrojos con Transformada de Fourier
GABA	Ácido 4-aminobutírico
Glu	Ácido glutámico
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
^{1}H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
His	Histidina
HOMO	Orbital ocupado de mayor energía
HOBt	1-hidroxibenzotriazol

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Ile	Isoleucina
J	Constante de acoplamiento
K_a	Constante de asociación
Leu	Leucina
LUMO	Orbital libre de menor energía
Lys	Lisina
m	Multiplete
MALDI	Ionización mediante láser asistida por matriz
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
Met	Metionina
MHz	Megahercio
Mtt	4-metiltritilo
m/z	Relación masa carga
N-HATU	Hexafluorofosfato de 1-(Bis(dimetilamino)metilen)-1H-1,2,3-triazol(4,5-b)piridinio-3-óxido
N-HBTU	Hexafluorofosfato de 1-(Bis(dimetilamino)metilen)-1H-benzo(d)1,2,3-triazol-3-óxido
N-TBTU	Tetrafluoroborato de 1-(Bis(dimetilamino)metilen)-1H-benzo(d)1,2,3-triazol-3-óxido
NMM	4-*N*-metilmorfolina
nOe	Efecto nuclear Overhauser
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
PAP	Ácido 2-amino-5-(piren-1-il)pentanoico
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
Ph	Fenilo
Phe	Fenilalanina

ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
q	Cuadriplete
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en plano rotatorio
s	Singlete
SAAs	Aminoácidos derivados de azúcares
Ser	Serina
t	Triplete
Ta	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TIS	Triisopropilsilano
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Espectroscopía de correlación total
Trp	Triptófano
TTF	Tetratiafulvaleno
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Introducción

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Nanotecnología

Las ideas y conceptos detrás de la nanotecnología fueron enunciados por el físico Richard P. Feynman en una charla impartida en el California Institute of Tecnology (CalTech) en diciembre de 1959, titulada "*There's Plenty of Room at the Bottom*".[1] En ella, Feynman describía los procesos que los científicos deberían usar para manipular individualmente átomos y moléculas. Sin embargo, el término nanotecnología no fue acuñado hasta el año 1974 por el Profesor Norio Toniguchi,[2] y no sería hasta el año 1981, con el desarrollo del microscopio de efecto túnel,[3] cuando se considera que nació la nanotecnología moderna.

La nanotecnología es un campo de la ciencia enfocado al desarrollo de métodos sintéticos y herramientas analíticas destinados a la construcción de estructuras y materiales en la escala nanométrica, es decir, entre 1 y 100 nanómetros. También se ocupa del estudio de las propiedades de la miniaturización y de la aplicación de tales propiedades al desarrollo de nuevos materiales y dispositivos.[4]

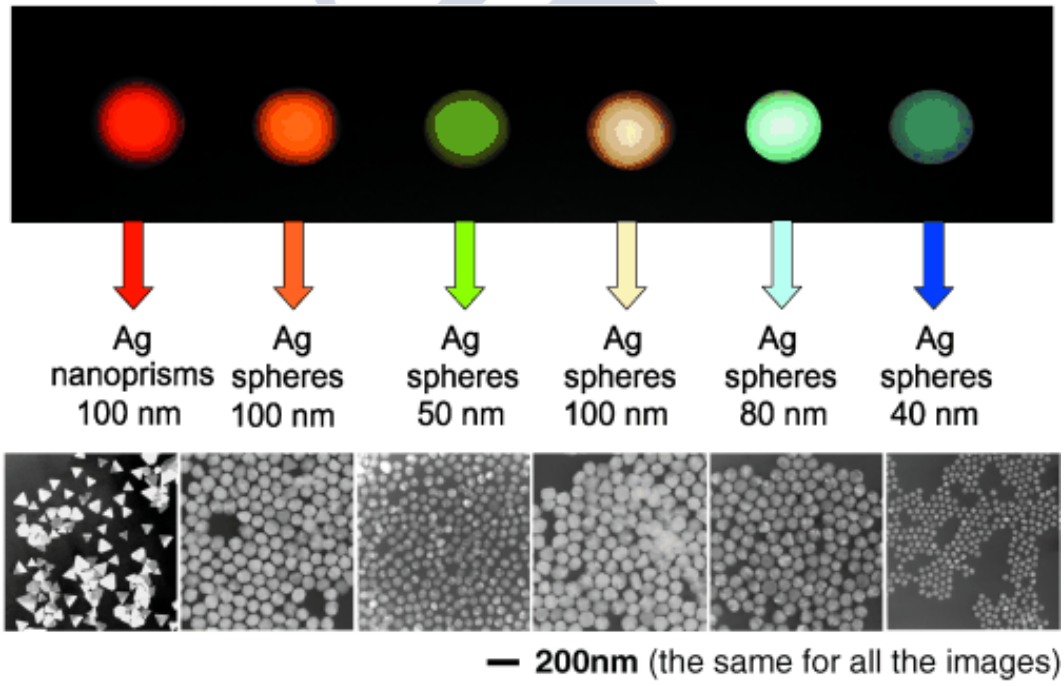


Figura 1: Ilustración que muestra como varían las propiedades de los metales nobles con la miniaturización.

[1] El artículo "*There's Plenty of Room at the Bottom*" fue publicado por primera vez en la revista *CalTech's Engineering and Science Magazine* en febrero de 1960, y posteriormente como un capítulo del libro *Miniaturization*, Horace D. Bilbert, Ed., Reinhold Publishing Corporation, New York, USA.

[2] Taniguchi, N.; "On the Basic Concept of 'Nano-Technology'." *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo*, Part II, Japan Society of Precision Engineering, **1974**.

[3] Binning, G.; Rohrer, H.; *IBM. Journal of Research and Development* **1986**, *30*, 355-369.

[4] Mirkin, C. A. *Small* **2005**, *1*, 14-16.

Todas las sustancias, independientemente de su composición, tendrán nuevas propiedades cuando su tamaño es menor a 100 nanómetros. Podemos manipular las propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas, magnéticas y químicas de esta clase de materiales simplemente ajustando su tamaño, composición y forma.

Existen dos clases de aproximaciones para la construcción de materiales a escala nanométrica. La primera de ellas, conocido como métodos descendentes o "top-down", consiste en la degradación mecánica de objetos de mayor dimensión. La segunda aproximación, conocida como métodos ascendentes o "bottom-up", consiste en la formación de estructuras más complejas a partir de átomos o moléculas, siendo uno de los métodos más conocidos el autoensamblaje molecular.

Podemos definir el autoensamblaje como la organización autónoma de los componentes de un sistema sin la intervención humana. Los procesos de autoensamblaje son comunes en la naturaleza, y pueden implicar componentes desde escala molecular a otros de mayor tamaño y diferentes tipos de interacciones.[5] Sin embargo, desde el punto de vista "químico", es necesario limitar el término a aquellos procesos que implican componentes preexistentes, que son reversibles, y que pueden ser controlados mediante el diseño de sus componentes. En los procesos de autoensamblaje molecular existe una transferencia de información estructural que limita el tamaño de las estructuras formadas. Aquellos procesos donde no existe este tipo de limitaciones son los denominados procesos de autoasociación o cristalización.

Los procesos de autoensamblaje se pueden clasificar, atendiendo a la energía del proceso, en estático y dinámico.[5] El autoensamblaje estático es aquel que está en equilibrio local o global y no disipa energía. La formación de estructuras ordenadas puede requerir el aporte de energía, pero toda vez formadas éstas son estables. Ejemplos de autoensamblaje estático son la formación de cristales moleculares o cristales líquidos.[6,7] El segundo tipo, el autoensamblaje dinámico, es aquel en que las interacciones responsables de la formación de estructuras o patrones sólo ocurren si el sistema disipa energía. Ejemplos de este tipo de autoensamblaje son las reacciones oscilantes o incluso las células biológicas.[8]

[5] Mendes, A. C.; Baran, E. T.; Reis, R. L.; Azevedo, H. S. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2013**, *5*, 582-612.
[6] Loudet, J. C.; Barois, P.; Poulin, P. *Nature* **2000**, *407*, 611-613.
[7] 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.
[8] Jakubith, S.; Rotermund, H. H.; Engel, W.; von Oert-zen, A.; Ertl, G. *Phys. Rev. Lett*. **1990**, *65*, 3013-3016.

Estructuras tubulares

A lo largo de los últimos años se han diseñado nanoestructuras tridimensionales, tales como capsulas moleculares o flores moleculares, bidimensionales, como las hojas de grafeno, monocapas o nanofilms, y de una dimensión, como los nanotubos, las nanofibras y nanocintas, o incluso de cero dimensiones, como los nanoclusters.[9] Los nanotubos son estructuras especialmente interesantes debido a sus potenciales aplicaciones en diferentes campos como el transporte de analitos, reactores para catálisis, biosensores o dispositivos ópticos y electrónicos.[10]

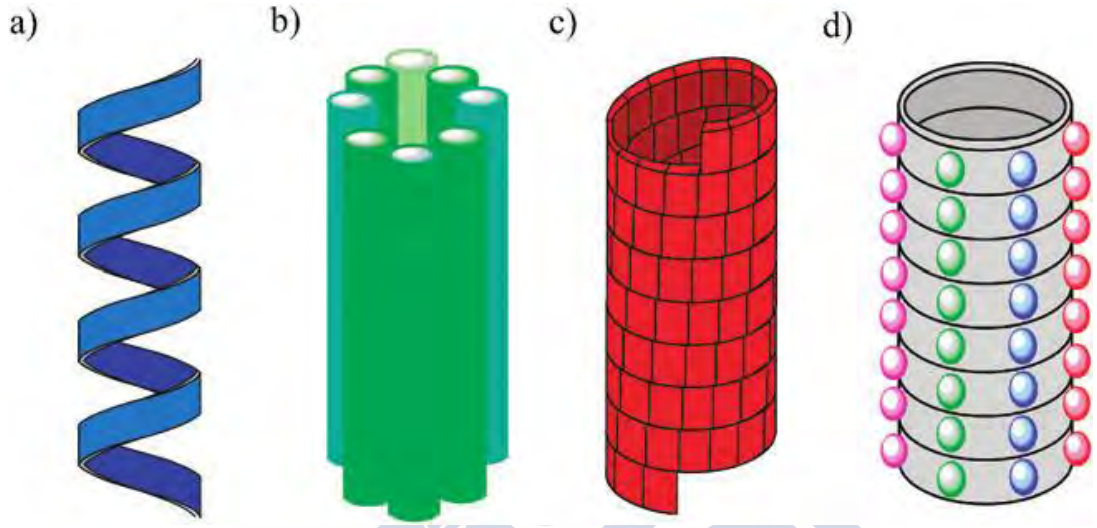


Figura 2: Diferentes estrategias de autoensamblaje para formar nanotubos. a) enrollamiento de moléculas helicoidales, b) agrupación de listones en forma de barril, c) plegamiento de una lámina bidimensional, d) apilamiento de moléculas cíclicas planas.

Conceptualmente existen diversas formas de generar estructuras tubulares mediante procesos de autoensamblaje molecular (Figura 2). Una de ellas es el plegamiento/enrollamiento de estructuras planas, como ocurre en el caso de los nanotubos lipídicos, para los cuales se propone la formación de mono o bicapas que se curvan y enrollan formando nanotubos.[11] Alternativamente, se pueden obtener mediante el ensamblaje de moléculas lineales que se asocian a modo de listones formando estructuras tipo barril, como por ejemplo los canales transmembranosos que forma la α-hemolisina,[12] o los canales de potasio.[13] Otras posibilidades son el enrollamiento de moléculas lineales flexibles que se pliegan formando estructuras

[9] Whitesides, G. H.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, *295*, 2418-2421
[10] Reiriz, C.; Brea, R. J.; Granja, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1448-1456.
[11] Schnur, J. M. *Science*, **1993**, *262*, 1669-1676.
[12] Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Baley, H.; Gounaux, J. E. *Science* **1996**, *274*, 1859-1866.
[13] Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. *Science* **1998**, *280*, 69-77.

helicoidales de forma cilíndrica, como la Gramicidina A.[14] Una última alternativa consiste en el apilamiento de unidades con forma de arco que se organizan formando discos o hélices tal como ocurre con la cubierta proteica del virus de mosaico del tabaco.[15]

Nanotubos de Carbono

Los nanotubos de carbono fueron descubiertos en el año 1991 por Sumio Iijima mientras estudiaba el proceso de formación de fullerenos.[16] Observó "agujas de carbono grafítico" cuando usaba una variación del método de formación de fullerenos, que consiste en la evaporación de carbono mediante descarga de un arco de corriente eléctrica sobre un electrodo de grafito y posterior deposición a bajas presiones en atmósfera inerte. Las agujas así formadas constaban de diámetros comprendidos entre 4 y 30 nm, con longitudes de hasta 1 µm. El análisis de estos filamentos mediante TEM reveló que estaban formadas por varios tubos coaxiales de entre 2 y 50 capas, y en la mayor parte de los casos, estos estaban cerrados en sus extremos. También pudo determinar que en cada tubo, las celdas hexaédricas estaban orientadas fundamentalmente de forma helicoidal con respecto al eje longitudinal, y que el grado de inclinación helicoidal era diferente entre las diferentes agujas y entre las distintas capas de un mismo nanotubo.

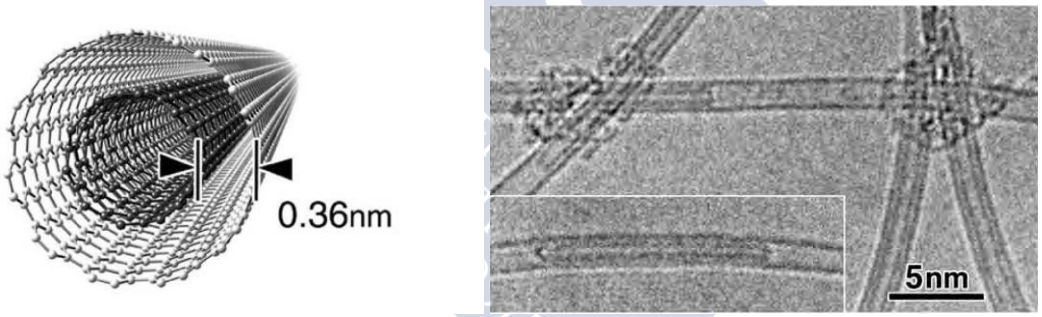


Figura 3: Representación artística (izquierda) e imagen de TEM (derecha) de nanotubos de carbono de pared doble, donde se señala la distancia estimada entre sus paredes.

La estructura de las capas se estudió mediante microscopia de difracción de electrones, observándose que cada tubo estaba constituido por una lámina de hexágonos de carbono enrollada de manera helicoidal.

Así pues, podemos diferenciar dos categorías de nanotubos de carbono. La primera está formada por los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), que están formados por cilindros concéntricos alrededor de un hueco central. La distancia entre las diferentes capas es similar a la distancia que hay entre las láminas que conforman una lámina de grafito (0.34 nm por 0.335 nm) y además, las diferentes capas están

[14] Ketchen, R. R.; Hu, W.; Cross, T. A. *Science* **1993**, *261*, 1457-1460.
[15] Klug, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983,** *22*, 565-582.
[16] Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56-58.

rotacionalmente desordenadas entre ellas. La segunda categoría corresponde a los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs), que poseen una buena uniformidad en su diámetro (1-2 nm), aunque normalmente aparecen agrupados en *bundles* de varias decenas de nanotubos. La pendiente de la helicidad y el número de capas que conformen a los nanotubos de carbono determinará las propiedades electrónicas de los mismos, pudiendo ser semiconductores o metálicos (Figura 4).[17]

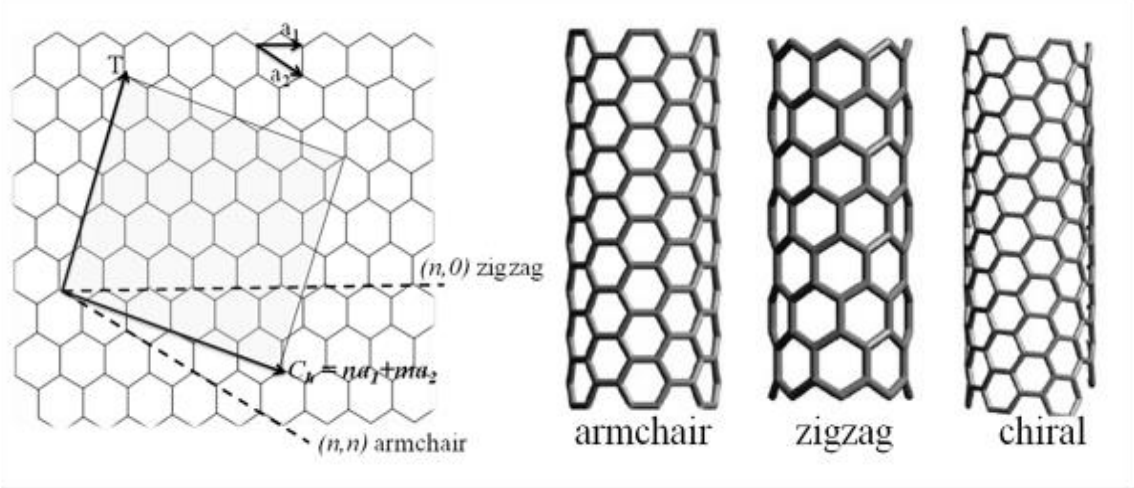


Figura 4: Representación esquemática de la formación de diferentes tipos de nanotubos de carbono de pared simple en función del ángulo de plegamiento de una lámina de grafeno.

[17] Iijima, S.; *Physica B: Condensed Matter* **2002**, *323*, 1-5.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Nanotubos Peptídicos

Los nanotubos de carbono poseen propiedades electrónicas y de dureza que los hacen especialmente atractivos. Sin embargo, su baja solubilidad en la gran mayoría de disolventes, su gran tendencia a la agregación, la dificultad para controlar sus dimensiones y su escasa biocompatibilidad han llevado a la búsqueda de otras alternativas que cubran estas deficiencias y en este sentido, los nanotubos peptídicos resuelven potencialmente muchas de estas carencias/requisitos. Por lo general, estos se obtienen a partir de pequeños péptidos que se asocian en condiciones apropiadas para formar nanotubos. La gran diversidad estructural de los péptidos, la capacidad de modular sus propiedades mediante la sustitución de aminoácidos tanto naturales como sintéticos o su biocompatibilidad, son características que los hacen especialmente atractivos. Son múltiples las plataformas que se han utilizado en la preparación de nanotubos, tales como pequeños péptidos, proteínas, péptidos anfipáticos o ciclopéptidos entre otros. [18]

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos lineales

Una clase de nanotubos peptídicos son aquellos formados mediante la organización de dipéptidos con residuos aromáticos. El análisis de los péptidos que forman parte de las proteínas que forman β-amiloides permitió encontrar que el dipéptido difenilalanina es fundamental en la formación de tales estructuras.[19] Partiendo de esta idea, el grupo de Gazit pudo observar la formación espontánea de nanotubos de peptídicos a partir de este dipéptido simplemente diluyendo con agua una disolución del mismo en hexafluoroisopropanol.[20] Las estructuras observadas tenían diámetros de entre 100 y 150 nm, y poseían una gran rigidez. Sin lugar a dudas, esta alternativa es una de las más estudiadas y de la que se han realizado un mayor número de estudios sobre sus propiedades y aplicaciones.

También se han empleado péptidos de mayor tamaño que emulen las propiedades de los amiloides, como el octapéptido lanreótido, medicamento empleado para el tratamiento de la acromegalia y los síntomas causados por tumores neuroendocrinos, que se autoensambla espontáneamente en agua debido un conjunto de interacciones hidrofóbicas y de enlace de hidrógeno. El resultado es la formación de hebras helicoidales que forman nanotubos, que a su vez se agrupan para formar una fase columnar cristalina hexagonal.[21] En el año 2002, Hecht publicó un completo estudio sobre el comportamiento de los péptidos que forman nanotubos gracias a la alternancia de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos y el efecto de mutaciones en las que se

[18] Hamley, I. W. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2014**, *53*, 6866-6881.
[19] Görbitz, C., H. *Chem. Eur. J.* **2001**, *23*, 5153-5159.
[20] Reches, M.; Gazit, E. *Science* **2003**, *300*, 625-627.
[21] Valéry, C.; Paternostre, M.; Robert, B.; Gulik-Krzywicki, T.; Narayanan, T.; Dedieu, J. C.; Keller, G.; Torres, M. L.; Cherif-Cheikn, R.; Calvo, P.; Artzner, F. *Prod. Nat. Acad. Sci*. **2003**, *100*, 10258-10262.

intercambiaron residuos hidrofóbicos por lisinas, de tal forma que se favorecía la formación de estructuras monoméricas de láminas β en lugar de hebras.[22]

Otras alternativas se basan en el uso de poliglicinas unidas mediante espaciadores que pueden organizarse formando nanotubos en función del pH.[23,24] Estos nanotubos están caracterizados por la disposición cristalina de los péptidos en las paredes que los forman, y se han usado para inmovilizar en su interior péptidos y proteínas,[25,26] e incluso nanopartículas de oro a través de las cadenas laterales de histidina.[27]

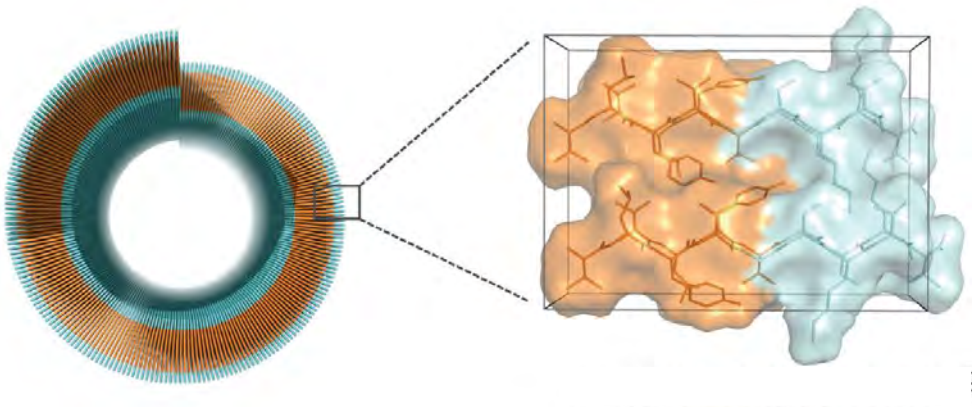


Figura 5: Representación esquemática de un nanotubo formado mediante el empaquetamiento del octapéptido lineal NH_2-Val-Leu-Tyr-Val-Cly-Ser-Lys-Thr-OH.[28] Las regiones hidrofóbicas de los péptidos aparecen en color naranja, mientras que las regiones hidrofílicas aparecen en color azul.

-Nanotubos peptídicos a partir de proteínas

Las proteínas que adoptan estructuras tipo hélice-β, como la familia de las Gramicidinas, forman nanotubos con actividad de canales transmembranosos. [29] En los últimos años han surgido nuevos ejemplos de nanotubos formados por proteínas inspirados en estructuras de proteínas naturales. El grupo de Ballister se basó en la estructura cuaternaria de las proteínas Hcp1, que forma hexámeros con forma de disco, para realizar modificaciones introduciendo cisteínas para formar puentes disulfuro entre las subunidades. [30] De esta forma se formaron nanotubos de 25 subunidades (en torno a

[22] Wang, W.; Hecht, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2760-2765.
[23] Shimizu, T.; Kogiso, M.; Masuda, M. *Nature* **1996**, *383*, 487-488.
[24] Shimizu, T.; Kogiso, M.; Masuda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6209-6210.
[25] Yu, L.; Banerjee, I. A.; Matsui, H.; *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 739-743.
[26] Banerjee, I. A.; Yu, L. T.; Matsui, H.; *Nano Lett.* **2003**, *3*, 283-287.
[27] Djalali, R.; Chen, Y.; Matsui, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13660-13661.
[28] Morris, K. L.; Zibaee, S.; Chen, L.; Goedert, M.; Sikorski, P.; Serpell, L. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2279-2283.
[29] Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemstry* (second edition), Wiley, New York, **1995**.
[30] Ballister, E. R.; Lai, A. H.; Zuckerman, R. N.; Cheng, Y.; Mougous, J. D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 3733-3738.

100 nm de longitud), demostrando además que el mismo método puede ser aplicable para la funcionalización de interior o de los extremos del nanotubo.

También es posible observar la formación de nanotubos en condiciones controladas a partir de proteínas desnaturalizadas. De esta forma, en el año 2013, el grupo de Mezzenga publicó la formación de nanotubos a partir de lisozima.[31] Encontraron que en condiciones de hidrólisis (pH=2, 90 °C), la proteína se encuentra en forma de cintas helicoidales que se cierran formando nanotubos, con un mecanismo muy similar al de los amiloides.

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; *D,L*-α-ciclopéptidos

La primera propuesta de estructuras tubulares formadas mediante apilamiento de péptidos cíclicos fue realizada por Hassall en el año 1972.[32] Propuso el uso de tetrámeros cíclicos de α,β-péptidos que se autoensamblarían a través de la formación de enlaces de hidrógeno formando estructuras tubulares. Sin embargo, su predicción sólo pudo ser parcialmente validada.[33] Los estudios cristalográficos del péptido *c*-[(*L*-Ser(O*t*Bu)-β-Ala-Gly-β-Asp(OMe))] demostraron que el compuesto adopta una estructura cíclica plana que se apila, pero solo dos de sus cuatro amidas participan en la formación de enlaces de hidrógeno.

Sin embargo, en 1974, De Santis fue el primero en proponer el uso de péptidos cíclicos formados por un número par de α-aminoácidos de quiralidad alternada para la obtención de nanotubos. Los *D,L*-α-ciclopéptidos poseerían una conformación en sus ángulos dihédricos equivalente a una lámina β, y estos podrían apilarse mediante interacciones de enlace de hidrógeno.[34]

Los primeros estudios realizados para demostrar las propuestas de De Santis fueron realizados por el Prof. Lorenzi y colaboradores, que en el año 1989 presentó los estudios de rayos X de los ciclohexapéptidos: *c*-[(*D*-Phe-*L*-Phe-)$_3$] y *c*-[(*D*-Val-*L*-Val-)$_3$]. Aunque los péptidos adoptaban la estructura plana propuesta, no existían interacciones entre las unidades cíclicas, sino que formaban enlaces de hidrógeno con las moléculas de disolvente.[35]

En 1993, el grupo de Ghadiri demostró por primera vez la formación de estructuras tubulares a partir de ciclopéptidos constituidos por α-aminoácidos de quiralidad alternada.[36] Para tal fin, sintetizaron el ciclopéptido de ocho residuos *c*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-

[31] Lara, C.; Handschin, S.; Mezzenga, R. *Nanoscale*, **2013**, *5*, 7197, 7201.
[32] Hassal, C. H.; *Proceeding of th Third American Peptide Symposium* (Ed.: Meinhoffer), Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI **1972**, 153-157.
[33] Karle, I. L.; Handa, B. K.; Hassall, C. H. *Acta Crystallogr.* **1975**, *B31*, 555-560.
[34] De Santis, P.; Morosetti, S.; Rizzo, R. *Macromolecules* **1974**, *7*, 52-58.
[35] Pavone, V.; Benedetti, E.; Blasio, B. D.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Lorenzi, G. P. *Biopolymers* **1989**, *28*, 215-223.
[36] Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

Glu-*D*-Ala-)$_2$], en cuyo diseño se postulaba que las subunidades peptídicas adoptarían una conformación plana en la que las amidas estarían orientadas de forma perpendicular al plano del anillo tal y como predijo De Santis. Además, el hecho de alternar *D* y *L* aminoácidos hace que las cadenas laterales queden orientadas hacia el exterior del anillo, dando lugar a una cavidad interna uniforme y una superficie exterior funcionalizable (Figura 6).

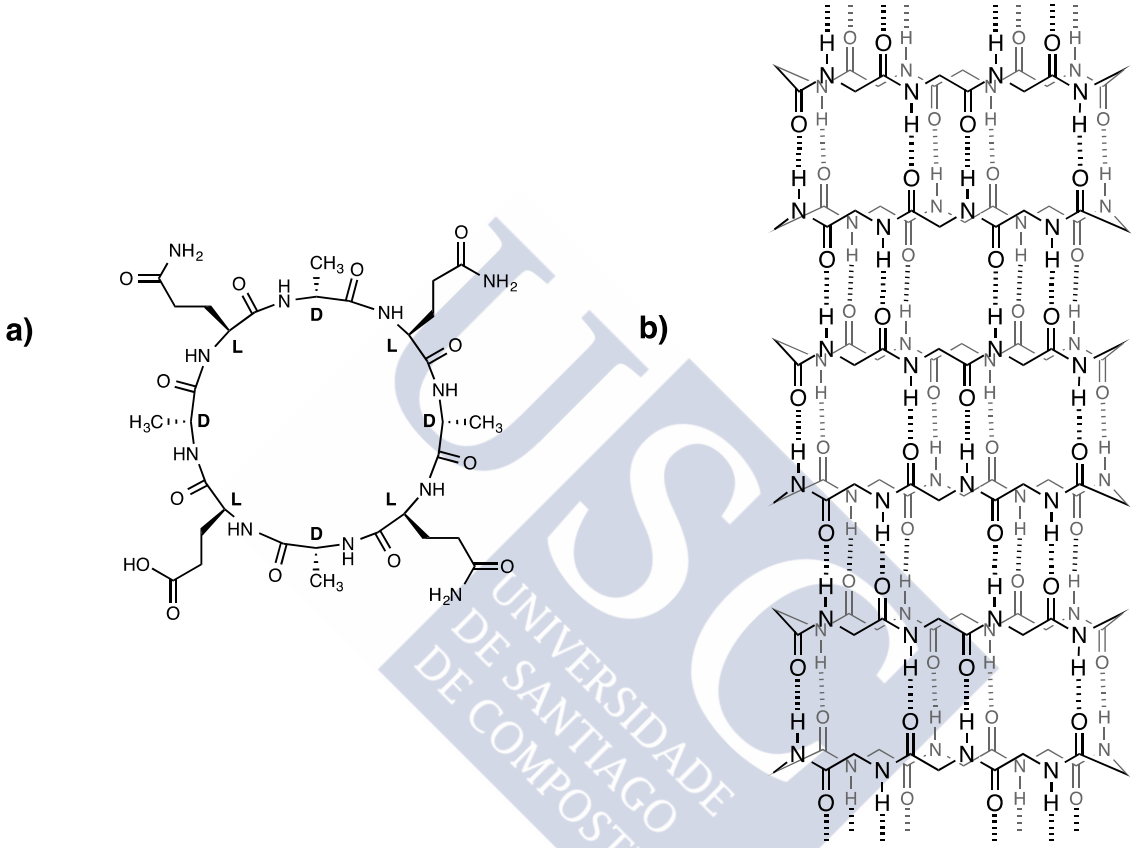


Figura 6: a) Estructura del ciclopéptido *c*-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)$_2$], b) Representación del nanotubo formado mediante apilamiento de subunidades peptídicas. (Para mayor claridad, se han omitido las cadenas laterales)

En los estudios del ciclopéptido, observaron la formación espontánea de agujas mediante la acidificación controlada de una disolución alcalina de dicho compuesto. El posterior análisis de estas agujas mediante diversas técnicas (TEM, difracción electrones…) les permitió confirmar la estructura en la que los ciclopéptidos se apilaban a través de la formación de dicha lámina β antiparalela, formando estructuras tubulares con un diámetro interior en torno a 7 Å. Los estudios posteriores ampliaron el tipo de péptidos cíclicos y las condiciones en las que estos formaban nanotubos peptídicos.[37]

[37] Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

Incluso la utilización de aminoácidos con cadenas laterales fuertemente impedidas permitió la formación de nanotubos heterodiméricos.[38]

-Dímeros de *D,L*-α-ciclopéptidos

A lo largo de los años, se han preparado muchos ciclopéptidos con capacidad para autoensamblarse a través de la formación de nanotubos.[39] En todos los casos, los protones amídicos y los carboxilatos de los grupos amida se orientan paralelamente al eje longitudinal del nanotubo, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos se proyectan hacia el exterior con una orientación pseudoecuatorial. Para estudiar el proceso de autoensamblaje se han utilizado péptidos cíclicos parcialmente alquilados en su esqueleto peptídico (todos los aminoácidos de la misma quiralidad), de tal que forma que se restringe la formación de enlaces de hidrógeno a solo una de las caras del anillo, deteniendo así el autoensamblaje en la formación de dímeros. Este método permite determinar las constantes de equilibrio de dimerización mediante experimentos de ^{1}H-RMN a concentraciones variables.[40]

En 1994, el grupo de Lorenzi publicó el primer estudio de ciclopéptidos parcialmente *N*-metilados, observando mediante estudios de ^{1}H-RMN que el ciclohexapéptido *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-Ala)$_3$] poseía la capacidad de autoensamblarse dando lugar a dímeros a través de la formación de seis enlaces de hidrógeno, exponiendo la cara *N*-metilada hacia el disolvente.[41] Mediante experimentos de RMN se determinó la constante de asociación con un valor de 80 M^{-1}. Además, consiguió la primera estructura cristalográfica de un ciclopéptido *N*-alquilado, demostrando la formación de la lámina β antiparalela para el dímero en estado sólido.

Posteriormente, el grupo de Ghadiri publicó los estudios realizados en disolución que permitieron esclarecer las bases termodinámicas del proceso de autoensamblaje de un octapéptido cíclico parcialmente *N*-metilado, *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-Ala-)$_4$].[42] Al igual que los trabajos de Lorenzi, estos trabajos también se completaron con los correspondientes estudios en disolución. Los experimentos de ^{1}H-RMN demostraron que el ciclopéptido estaba en una conformación plana que se encontraba en equilibrio con el dímero, tal como se extraía de los desplazamientos químicos de las señales de los protones de las amidas a campo más bajo (de 6.98 ppm a 8.73 ppm para el NH de la fenilalanina) y de una constante de acoplamiento (*J*) de 8.8 Hz. Sin embargo, la constante de asociación era dependiente de la concentración y del tipo de disolvente, encontrándose valores de

[38] Rosenthal-Aizman, K.; Svensson, G.; Undén, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3372-3373.
[39] Chapman, R.; Danial, M.; Koh, M. L.; Jollife, K. A.; Perrier, S. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6023-6041.
[40] Ghadiri M. R.; Kobayashi K.; Granja J. R.; Chadha R. K.; McRee D. E. *Angew. Chem. Int. Ed*. **1995**, *34*, 93-95.
[41] Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. *Helv. Chim. Act*a **1994**, *77*, 1520-1526.
[42] Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K, Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 93-95.

1.4 x 10^4 M^{-1} en CCl_4, o de 1.26 x 10^3 M^{-1} en $CDCl_3$. La estructura en estado sólido es un dímero cilíndrico que corrobora los resultados anteriores, y consiste en unidades cíclicas redondas y planas con los grupos amida perpendiculares al plano del anillo; las dos subunidades están muy próximas, apiladas de forma antiparalela con distancias N-O de 2.90 Å, y con un diámetro de Van der Waals interno de 7.5 Å.

A continuación, Ghadiri consiguió la primera comparación entre las estabilidades relativas de láminas β antiparalelas y paralelas para péptidos cíclicos parcialmente *N*-alquilados.[43] Para tal fin, diseñó dos ciclopéptidos sintetizados con aminoácidos de quiralidad opuesta, y que por tanto eran enantiómeros. Cada uno de los ciclos posee capacidad de autoensamblaje, obteniéndose los correspondientes (homo) dímeros en disolución a través de la formación de láminas β antiparalelas. Adicionalmente, ambos enantiómeros podrían interaccionar entre ellos para formar una especie heterodimérica cuyas interacciones serían similares a las de una hoja plegada paralela (Figura 7).

Mediante estudios de ^{1}H-RMN en cloroformo de la mezcla racémica en la que se observaban señales para cada una de las especies diméricas (homo y heterodímero) llegaron a la conclusión de que la lámina β antiparalela era más estable (0.8 Kcal/mol) que la lámina β paralela. Sin embargo, la importancia de este estudio radica en la consecución por vez primera de una estructura de lámina β paralela mediante autoensamblaje de ciclopéptidos.

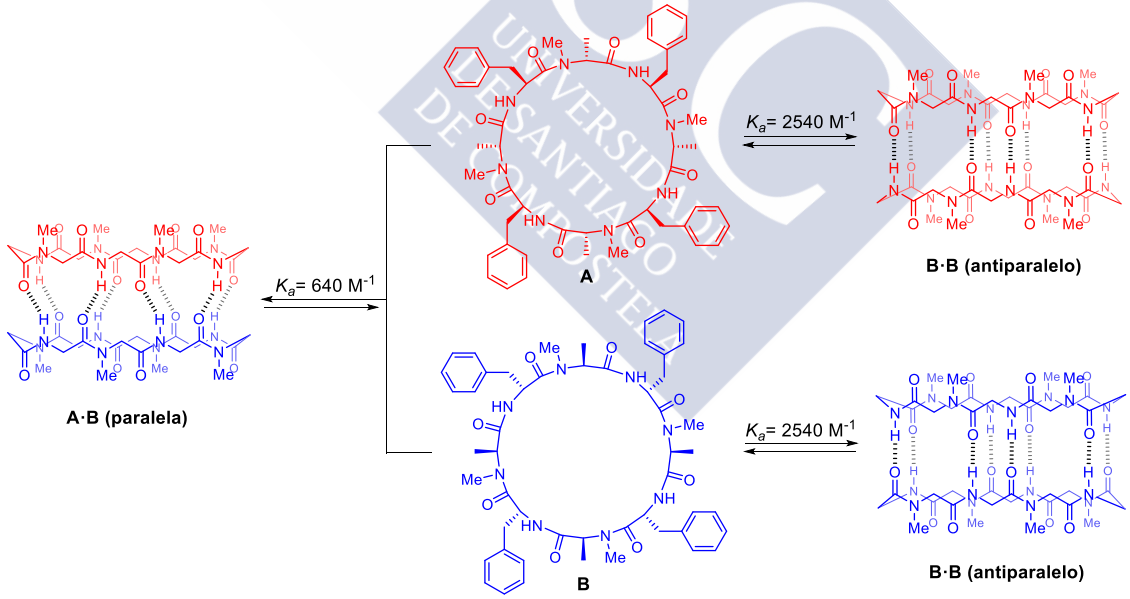


Figura 7: Estrategia empleada para la medida de las estabilidad relativa de la lámina β antiparalela frente a la paralela. Por simplicidad se han omitido las cadenas laterales de los aminoácidos.

En 1998, el grupo de Ghadiri publicó un estudio más extenso en el que se estudiaron las propiedades de veinte *D,L*-ciclopéptidos *N*-alquilados variando el tamaño, el tipo de

[43] Kobayashi, K, Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 95-98.

aminoácidos y los sustituyentes alquílicos.[44] Observaron que mientras los octapéptidos cíclicos generalmente dan lugar a la formación de dímeros, este comportamiento no se cumple en el caso de ciclos de mayor o menor diámetro. También observaron que la constante de asociación era dependiente de los residuos utilizados en la construcción del ciclopéptido, y de los grupos alquílicos de los grupos amino. El papel de estos grupos alquílicos no se reduce al de meros bloqueantes de la autoasociación, sino que su orientación pseudoaxial da lugar a interacciones estéricas (desestabilizantes) que dificultan la conformación plana, y por tanto deben reducir la constante de asociación del proceso.

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; β-ciclopéptidos

En la naturaleza existe un gran número de β-aminoácidos, siendo el más común la β-alanina, componente del ácido pantoténico, coenzima A o de la carnosina.[45] La idea de incorporar β-aminoácidos en α-péptidos normales es muy antigua. En 1928, Aderbalden, un alumno de Emil Fischer, ya expresó la idea de que los péptidos que contengan β-aminoácidos intercalados aumentarían su estabilidad enzimática.[46] Esta idea fue demostrada más tarde por Balaram y Karle, quienes practicaron mutaciones sistemáticas de este estilo, encontrando que las estabilidades de las estructuras secundarias en disolución eran mayores.[47,48]

Debido a la posibilidad de degradación enzimática que pueden padecer los péptidos formados por α-aminoácidos, el estudio de los ciclopéptidos empezó a orientarse en la dirección de otros tipos de aminoácidos. De esta forma surgieron los primeros ejemplos como los ciclo-β-péptidos sintetizados por Seebach.[49] Dichos ciclopéptidos estaban formados por combinaciones de los dos enantiómeros del ácido 3-aminobutanoico (ácido β-aminobutanoico, o β-hAla), y en su posterior estudio mediante difracción de polvo cristalino se pudo observar que el ciclopéptido formado por aminoácidos de igual quiralidad formaba nanotubos peptídicos en estado sólido. No obstante, la presencia de un metileno "extra" entre el carbonilo y el grupo amino hace que todos los protones amídicos estén orientados hacia una de las caras, mientras que los carbonilos se orientan hacia la cara opuesta. Como consecuencia de esto, los ciclopéptidos solo se pueden apilar a través de la formación de láminas β paralelas (Figura 8).

---

[44] Clark T. D.; Buriak J. M.; Kobayashi K.; Isler M. P.; Ghadiri M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.

[45] Seebach, D; Beck, A. K.; Bierhaum, D. J; *Chemistry and Biodiversity* **2004**, *1*, 1111-1239.

[46] Fischer, E. "Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine, Vol I & II", Springer, Berlin, **1906/1923**.

[47] Karle, I. L.; Pramanik, A.; Banerjee, A.; Bhattacharjya, S.; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9087-9095.

[48] Karle, I. L.; Gopi, H. N.; Balaram, P. *Porc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5160-5164.

[49] Seebach, D.; Mathews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80,* 173-182.

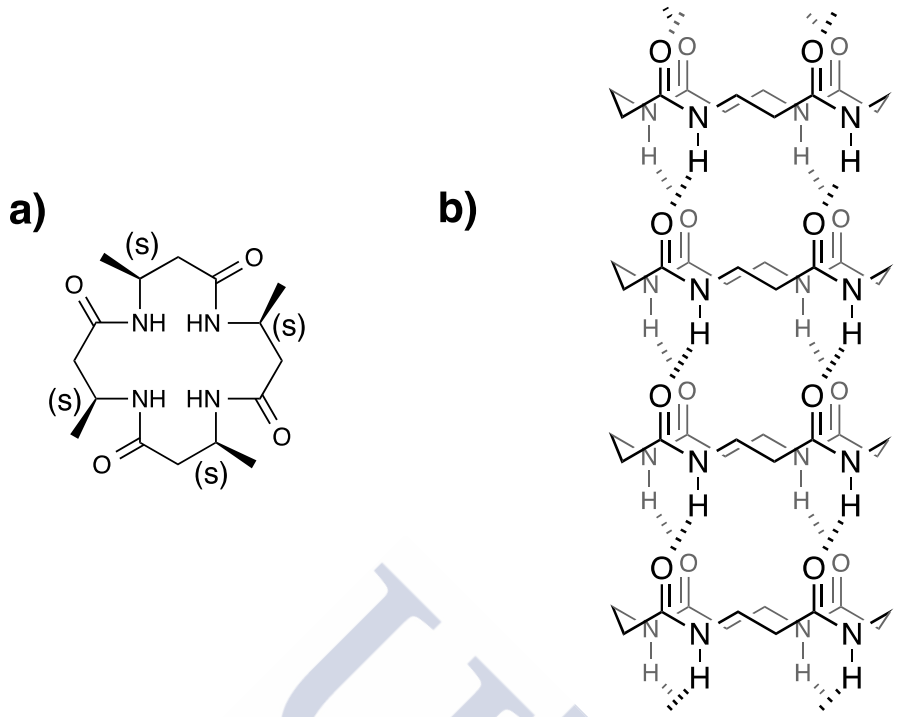


Figura 8: a) Estructura del *c*-[(β-hAla-)$_4$] formado exclusivamente por el enantiómero (*S*) de ácido β-aminobutanoico, b) Modelo de formación de nanotubos a partir del *c*-[(β-hAla-)$_4$] destacando al apilamiento de forma paralela. (Para mayor claridad se han omitido las cadenas laterales)

Paralelamente, Ghadiri y sus colaboradores estudiaron una nueva clase de canales iónicos transmembranosos formados a partir de ciclo-β-péptidos (Figura 9).[50] Emplearon β-aminoácidos homoquirales (de la misma quiralidad) con cadenas laterales hidrofóbicas. De esta forma, las cadenas laterales quedan expuestas hacia el exterior del anillo del ciclopéptido, dejando libre el espacio interior, además, la hidrofobicidad de las cadenas laterales provoca la inclusión de los péptidos en las bicapas lipídicas. Además, el apilamiento paralelo de las subunidades peptídicas aporta un momento dipolar (macrodipolar) a los nanotubos formados similar al de una hélice Alfa, y provoca que las cadenas laterales de los aminoácidos se orienten en una misma dirección.

Las medidas de conductancia de β-ciclopéptidos como *ciclo*-[(β-HTrp-)$_4$] demostraron que se comportaba como un canal iónico para el catión K^+, con una conductancia mayor que la Gramicidina A en condiciones similares y una gran actividad de transporte de protones (Figura 9).[51,52] La estructura de lámina β paralela fue confirmada mediante estudios de FT-IR.

[50] Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.
[51] Hladky, S. B.; Haydon, D. A.; *Biochim. Biophys Acta*, **1972**, *279*, 294-312.
[52] Bamberg, E.; Läuger, P.; *Biochim. Biophys Acta*, **1974**, *367*, 127-133.

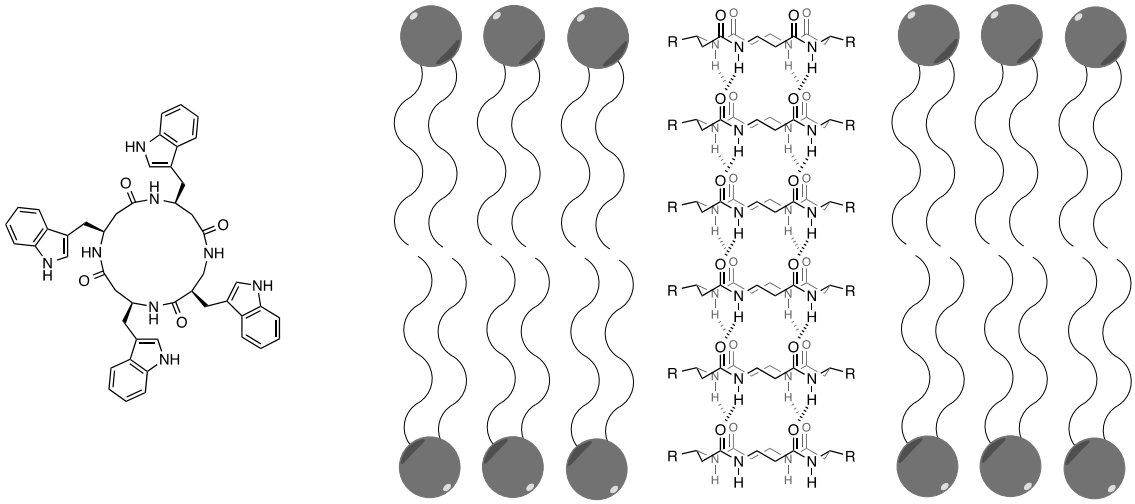


Figura 9: Estructura del ciclo *c*-[(β-HTrp)$_4$] (izquierda) y esquema de la formación de un canal transmembranoso a través de una membrana lipídica (derecha).

En el año 2006, el grupo de Kimura desarrolló la síntesis del primer ciclo-β-péptido formado por tres β-aminoácidos cíclicos (ácido trans-2-aminociclohexanocarboxílico): *ciclo*(ACHC)$_3$ (Figura 10 a).[53] El *c*-(ACHC)$_3$ sintetizado resultó tener una solubilidad muy baja, sin embargo consiguieron obtener cristales que analizaron mediante difracción de electrones, encontrando que los compuestos se apilaban de forma paralela dando lugar a la formación de nanotubos que se agrupaban en "bundles" de 30-40 nm de anchura y hasta 800 nm de longitud. Estos datos concordaban con los observados en técnicas como FT-IR, donde se observan bandas correspondientes con la formación de láminas β. Además, mediante espectrometría de masas observaron la formación de dímeros y trímeros del ciclopéptido, y mediante espectroscopía de ^{13}C-RMN observaron que el compuesto tiene un eje de simetría C_3.

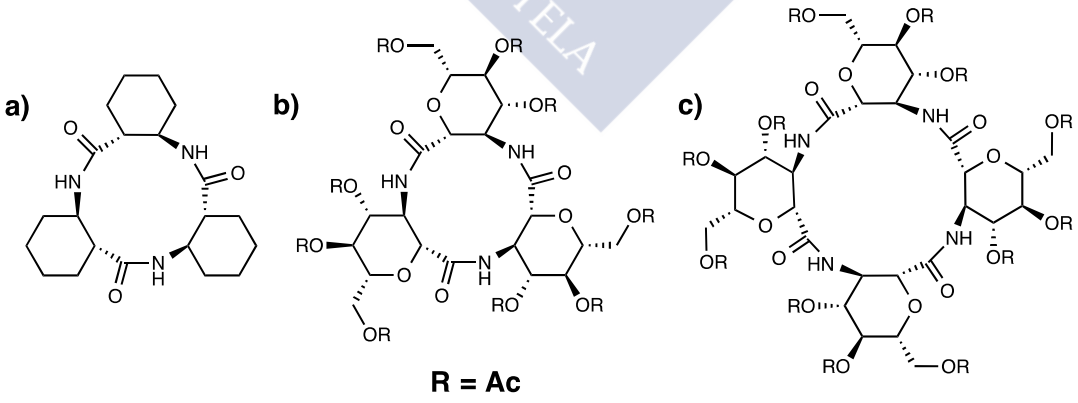


Figura 10: Estructuras químicas de los ciclo-β-péptidos sintetizados por Kimura; los trímeros *c*-(ACHC)$_3$ (a) y *c*-[GA(OAc)$_3$] (b), y el tetrámero *c*-[GA(OAc)$_4$] (c).

[53] Fujimura, F.; Fukuda, M.; Sugiyama, J.; Morita, T.; Kimura, S. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1896-1901.

La baja solubilidad de este compuesto, llevó al grupo de Kimura a estudiar los ciclo-β-péptidos formados por β-glicoaminoácidos (Ga(OAc)) derivados de la piranosa (Figura 10, b y c).[54] Al igual que en el caso anterior, mediante estudios de FT-IR observaron las típicas bandas a las que se asignan la formación de láminas B paralelas, y los estudios de los cristales obtenidos revelaron un comportamiento muy similar al del *ciclo*$(ACHC)_3$ observándose la formación de "bundles".

El aumento de solubilidad gracias al uso del GA(OAc) permitió llevar a cabo diversos estudios de ^{1}H-RMN en los que pudieron medir las constante de acoplamiento entre los protones amídicos (NH) y los protones en posición β, así como entre los protones de las posiciones α y β. Gracias a ello se determinó que el ángulo diedro entre esos protones en disolución era de 172°, muy próximos a los 180° de la conformación *trans*, confirmando que los ciclopéptidos poseen una conformación plana en disolución.[55] Mediante estudios de FT-IR pudieron observar de nuevo las bandas correspondientes con la formación de láminas β. Por último, estudios de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de los cristales obtenidos para el péptido cíclico *c*-$[GA(OAc)_3]$ demostraron que formaba nanotubos mediante apilamiento de las subunidades cíclicas planas, y que estos se agrupan dando lugar a "bundles".

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; α,γ-ciclopéptidos

En los últimos años, se han descrito numerosos ejemplos de estructuras peptídicas que contienen γ-aminoácidos.[56] Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un nuevo tipo de ciclopéptidos con capacidad de autoensamblaje formadas por α-aminoácidos y γ-aminoácidos cíclicos (ácidos 3-aminocicloalcano carboxílicos, o γ-Aca) alternados y de quiralidad determinada.[57]

Para el diseño de este tipo de ciclopéptidos se tuvo en cuenta los tres requerimientos estructurales necesarios para la formación de nanotubos por este método. El primero es que el esqueleto ciclopeptídico debe estar formado por un número par de átomos, el segundo es la complementariedad entre dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, y el tercero es que las cadenas laterales de los aminoácidos deben estar orientadas de forma pseudo-ecuatorial al plano del ciclopéptido, mientras que los grupos involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno deben estar orientados de forma axial.

En nuestro grupo de investigación propusimos que una forma simple de diseñar nuevos ciclopéptidos que contengan α y γ-aminoácidos es partir de un *D,L*-α-Ciclopéptido, y sustituir los α-aminoácidos de una u otra quiralidad por γ-aminoácidos equivalentes.[57] Propusimos las equivalencias entre α y γ-aminoácidos teniendo en cuenta la

[54] Fujimura, F.; Hirata, T.; Morita, T.; Kimura, S.; Horikawa, Y.; Sugiyama, J. *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 2394-2400.
[55] Karplus, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
[56] Brea, R. J.; Reiriz, C.; Granja, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1448-1456.
[57] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.

conformación necesaria para que el ciclopéptido adopte la conformación plana. Tal y como podemos ver en la Figura 11, el (*1R,3S*)-γ-Aca-OH sería el equivalente a un *L*-α-aminoácido, y por ese motivo en muchas ocasiones nos referiremos a él como *L*-γ-Aca-OH. De la misma forma el (*1S,3R*)-γ-Aca-OH sería equivalente a un *D*-α-Aa-OH y por tanto también lo denominaremos *D*-γ-Aca-OH.

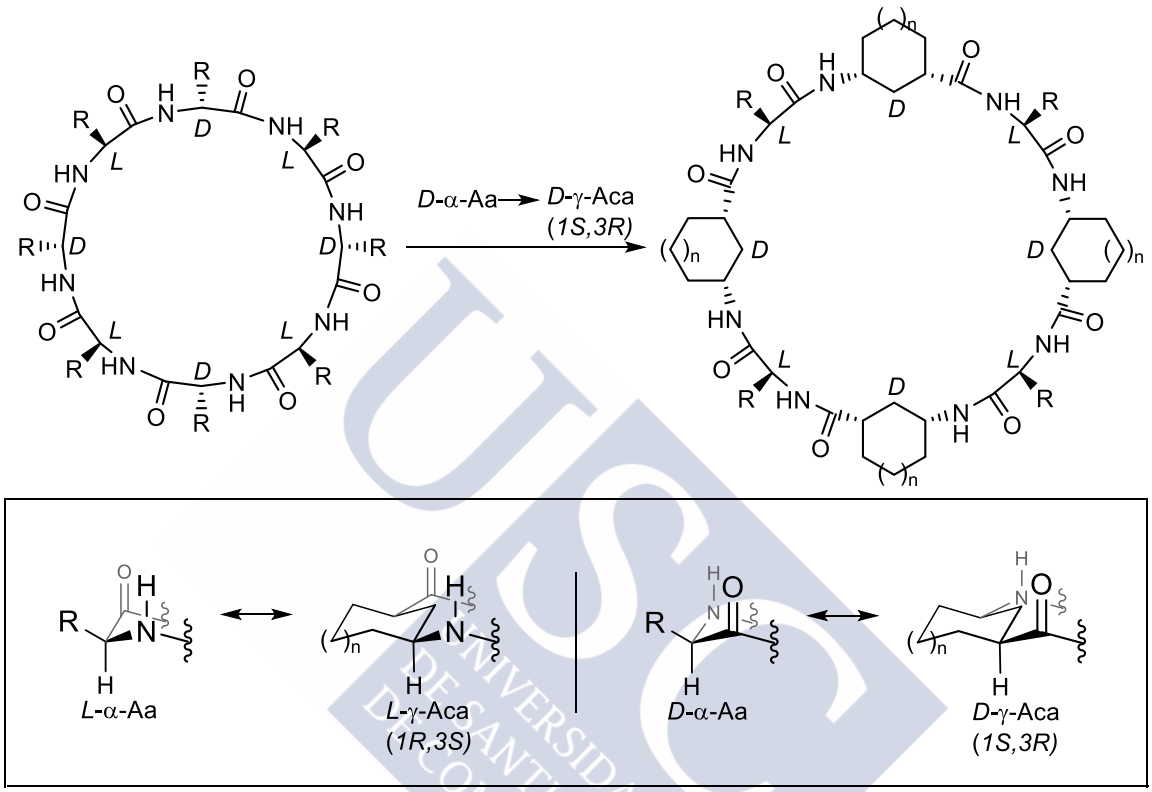


Figura 11: Equivalencia entre *D*-α-aminoácidos y los ácidos (*1S,3R*)-γ-aminocicloalcanocarboxílicos (γ-Acas) o sus correspondientes enantiómeros y diseño de α,γ-ciclopéptidos mediante sustitución de *D*-α-aminoácidos en un *D,L*-α-ciclopéptido por el correspondiente γ-aminoácido.

Esta nueva clase de ciclopéptidos posee varias características que no poseen los ejemplos anteriores (formados por α o β-aminoácidos) y que los hace especialmente interesantes. Una de ellas es que los anillos cicloalcánicos de los γ-Acas aportan rigidez estructural al esqueleto del anillo, garantizando así que el compuesto adopte la conformación plana necesaria para que se apilen. Por otra parte, el metileno en la posición β de los γ-Acas queda orientado hacia el interior de la cavidad del ciclo, lo que le aporta un carácter hidrofóbico a dicha cavidad. Esta orientación hacia el interior de la cavidad aporta una propiedad que no está presente en ninguno de los demás modelos de nanotubos; permite la modificación de dicha posición y por tanto la funcionalización interna de la cavidad de los ciclopéptidos.

La alternancia entre los α-aminoácidos y los γ-aminoácidos también aporta otra característica distintiva de otros nanotubos, los grupos NH y CO de los α-aminoácidos

están orientados hacia una cara del anillo, mientras que los NH y CO de los γ-aminoácidos se orientan hacia la cara contraria. Es decir, poseen dos caras diferenciadas que dependiendo de los grupos amida que quedan expuestos denominamos cara α (aquella en la que los NH y carbonilos de los α-aminoácidos forman los enlaces de hidrógeno) o cara γ (aquella en la que los NH y carbonilos de los γ-aminoácidos forman los enlaces de hidrógeno).[58]

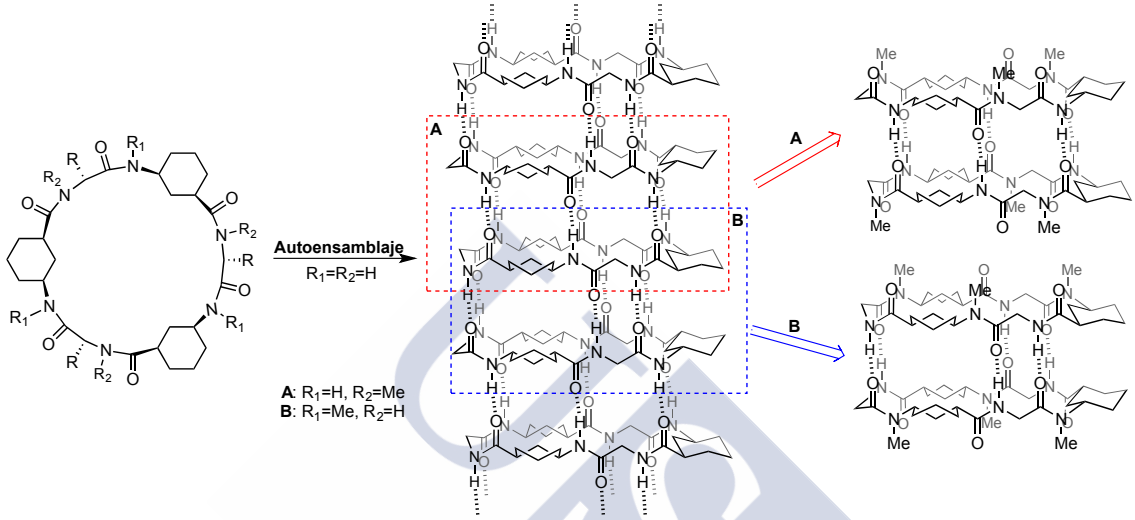


Figura 12: Diseño de nanotubos peptídicos autoensamblantes formados mediante apilamiento de unidades de *c*-[(*1R,3S*)-γ-Aca-*D*-α-Aa-]$_3$ (Se han omitido las cadenas laterales para mayor claridad). Los dos tipos de enlace (α y γ) están marcados de diferente color.

Debido a la separación espacial de los grupos NH y CO de los α y γ-aminoácidos, el apilamiento de las diferentes unidades ocurre preferentemente entre caras "similares". Es decir, la cara alfa de un ciclopéptido forma enlaces de hidrógenos con la cara alfa de otro ciclopéptido (Figura 12, B), mientras que las caras gammas interaccionarán preferentemente entre sí mismas (Figura 12, A). Por lo tanto, el apilamiento que se da en la formación de esta clase de nanotubos es de tipo lámina β antiparalela. Este tipo de apilamiento nos permitió el estudio de las propiedades termodinámicas de cada una de las interacciones (alfa o gamma) mediante el bloqueo selectivo de una de las dos caras. Por ejemplo, bloqueando la cara gamma mediante la *N*-metilación de los γ-aminoácidos se estudió el proceso de autoensamblaje de las caras Alfa (Figura 12, B), mientras que, bloqueando la otra cara, se estudió el proceso de apilamiento entre caras gamma (Figura 12, A).

En los primeros estudios se utilizó el ácido 3-aminociclohexanocarboxílico alternado con α-aminoácidos hidrofóbicos, mostrando que tanto tetrámeros, hexámeros y octámeros eran capaces de dimerizar a través de sus caras alfa.[58,57,59] Las dimerizaciones a través

[58] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.
[57] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.

de las caras gamma tenían lugar con menores constantes de asociación y al aumentar el tamaño de los ciclopéptidos, estos tendían a plegarse para dar lugar a otras conformaciones.

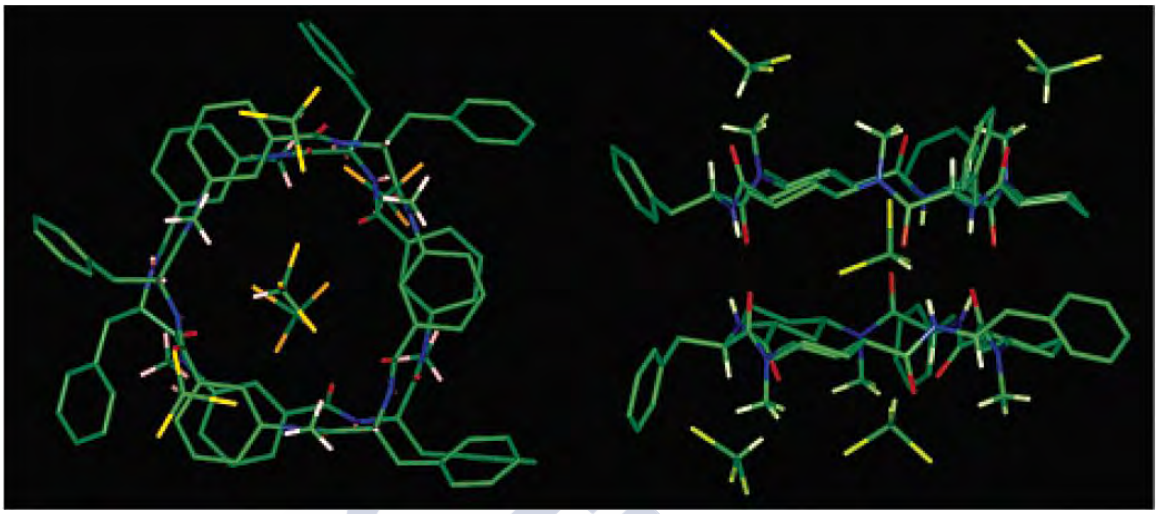


Figura 13: Vista superior (izquierda) y lateral (derecha) de la estructura cristalina formada por el ciclo *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-γ-Ach)$_3$]. Una de las cinco moléculas de cloroformo se encuentra alojada en el centro de la cavidad central del dímero.

Un aspecto relevante observado con el hexapéptido cíclico *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-γ-Ach)$_3$] fue la formación de cristales que permitieron confirmar la estructura dimérica observada en disolución y sobre todo la encapsulación de una molécula de cloroformo en el interior de la cavidad del dímero, lo que confirmó el carácter hidrofóbico de la misma (Figura 13). El autoensamblaje se llevaba a cabo mediante la formación de una lámina β antiparalela, estableciéndose seis enlaces de hidrógeno intermoleculares, con distancias N-O comprendidas entre 2.78 y 2.94 Å y un diámetro interno de 5.4 Å.

También los octapéptidos cíclicos pudieron ser cristalizados y estudiados mediante difracción de rayos-X de monocristal. En ambos casos, se obtuvieron estructuras diméricas en estado sólido donde el autoensamblaje antiparalelo se produce a través de la formación de ocho enlaces de hidrógeno intermoleculares. Para el ciclo *c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-^{Me}*N*-Ala)$_4$], la estructura obtenida es prácticamente circular, con un radio interno de 6.6 Å, y distancias N-O comprendidas entre 2.91 y 3.01 Å. Para el *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-γ-Ach)$_4$] la estructura obtenida está distorsionada adoptando una forma elíptica, con diámetros mínimos y máximos de 8.06 y 12.05 respectivamente, y distancias N-O comprendidas entre 2.84 y 2.93 Å. Lamentablemente en ningún caso fue posible resolver las moléculas alojadas en la cavidad interna del dímero. De todas formas, parecía que eran moléculas tanto polares como apolares ($CHCl_3$, MeOH), lo que sugería el carácter anfipático de dicha cavidad. En este sentido, también es remarcable que el ciclopéptido *c*-[(*D*-Phe-*L*-

[59] Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4681-4684.

^{Me}*N*-γ-Ach)$_4$] también cristalizó de otros disolventes, y que en este caso incorporaba en el interior del dímero moléculas de agua parcialmente desordenadas.[60,61]

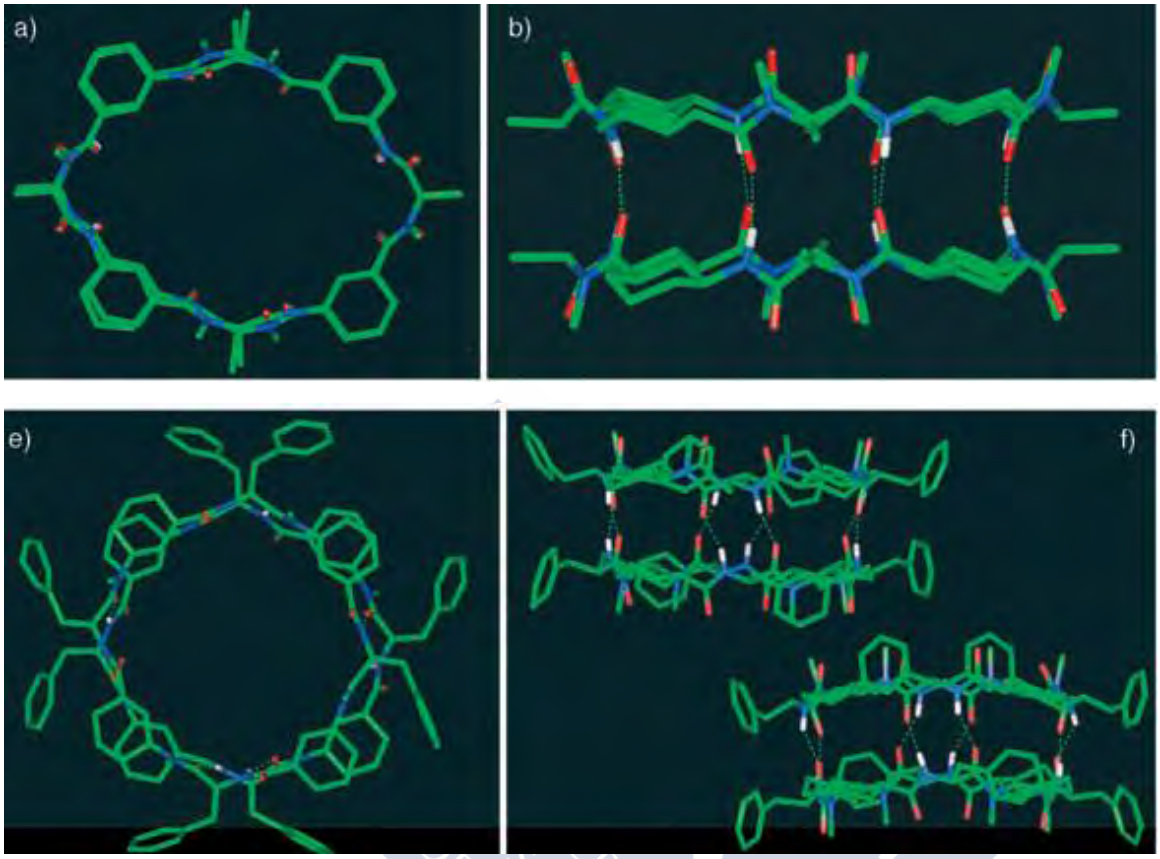


Figura 14: Estructuras cristalográficas de los ciclopéptidos *c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-^{Me}*N*-Ala-)$_4$] y *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N* -γ-Ach-)$_4$]. a) y b) Vista superior y lateral de *c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-^{Me}*N*-Ala-)$_4$], e) y f) Vista superior y lateral de *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N* -γ-Ach-)$_4$].

Posteriormente, nuestro grupo sintetizó un nuevo tipo de α,γ-ciclopéptidos, en los que se utilizaba un nuevo γ-aminoácido, el ácido (*1R,3S*)-3-aminociclopentanocarboxílico, o γ-Acp.[62] Los estudios se iniciaron con hexapéptidos cíclicos, y mediante espectroscopía de RMN y difracción de rayos X se confirmó nuevamente la formación de dímeros con constantes de asociación superior a 10^5 M^{-1}. Sin embargo, la parte más interesante de este trabajo fue la formación de heterodímeros entre el ciclo *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-Acp)$_3$] y su análogo de γ-Ach el ciclo *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach)$_3$]. Al realizar los experimentos de RMN de las adiciones, observaron la aparición de nuevas señales que non se correspondían con los ciclopéptidos de partida o sus dímeros. Además, la presencia de picos de cruce NOE entre el γ-Acp y el γ-Ach confirmaron que la nueva especie formada era un dímero entre ambos ciclopéptidos (Figura 15).

[60] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.
[61] Amorín, M.; Villaverde, V.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Drug. Delivery Sci. Technol*. **2005**, *15*, 87-92.
[62] Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

Por último, la formación de heterodímeros se confirmó en estado sólido mediante difracción de rayos-X. En el cristal formado por el heterodímero, se observó la formación de una lámina β antiparalela entre las caras alfa de los ciclopéptidos, con distancias N-O entre 2.82 y 2.90 Å. Esta mayor estabilidad de heterodímeros frente a homodímeros fue atribuida en base a las estructuras cristalográficas obtenidas, a un mejor empaquetamiento ciclohexano-ciclopentano que ciclohexano-ciclohexano, o ciclopentano-ciclopentano, que además está reflejado en las distancias intermoleculares de los ciclos en fase sólida. Este mejor empaquetamiento permite que la alineación entre dadores y aceptores de hidrógeno sea más eficiente. La utilización de otros ciclopéptidos formados por α-aminoácidos permitió excluir efectos que los atractivos o repulsivos entre las cadenas laterales fuesen responsables de formación de heterodímeros.

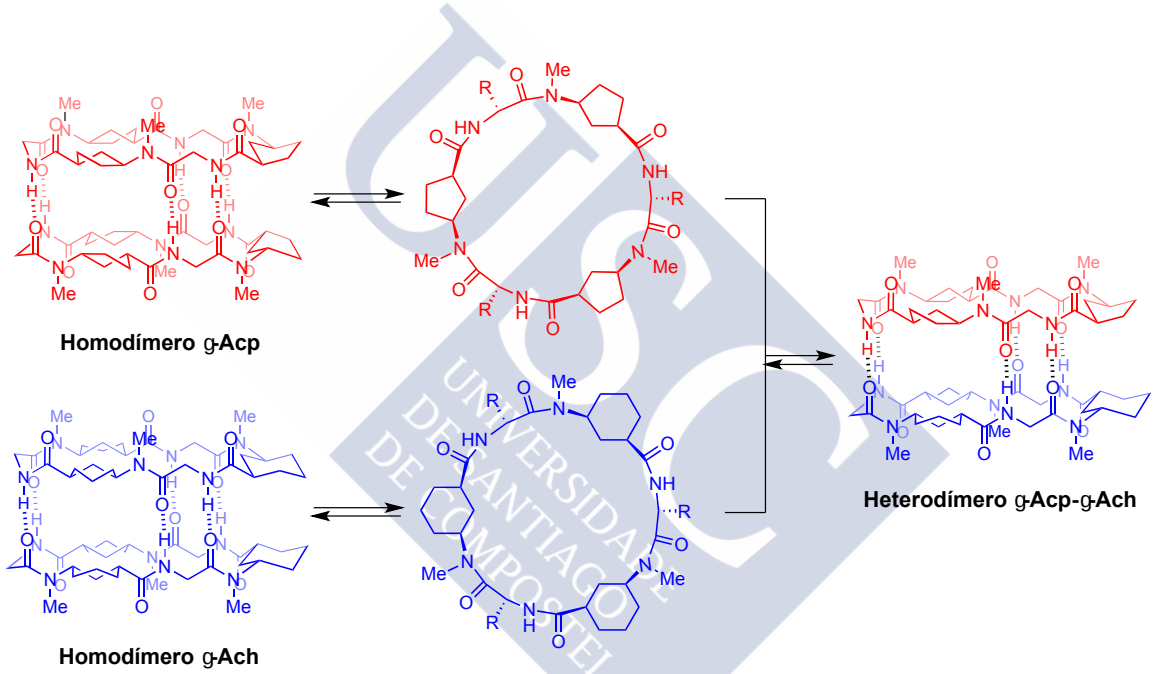


Figura 15: Representación esquemática de los equilibrios de homodimerización de los ciclos formados por γ-Acp (arriba) y γ-Ach (abajo) y formación del heterodímero (derecha).

El γ-Acp resultó un aminoácido muy útil en la formación de estructuras diméricas de mayores diámetros, ya que se sintetizaron deca-, dodeca- y hexadecapéptidos cíclicos que presentaban en sus espectros de RMN las típicas características de las estructuras diméricas; una gran simetría (sólo se detectaban las señales de un α-aminoácidos y un γ-aminoácido), el fuerte desplazamiento a campo bajo de los protones amídicos y la constante de acoplamiento de los mismos superior a 7 Hz.[63]

Posteriormente se llevó a cabo el estudio de los α-aminoácidos α,α-dialquilados como alternativa al bloqueo del crecimiento del nanotubo mediante los sustituyentes en el

[63] Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Comm.* **2007**, 3267-3269.

esqueleto peptídico.[64] En trabajos anteriores se había observado que la inclusión del ácido Isoaminobutírico (Aib) aumentaba la tendencia hacia la formación de hélices α en lugar de láminas β,[65] y que la incorporación del Aib en secuencias de *D,L*-ciclopéptidos tampoco favorecía la formación de dímeros.[44] Además, también se decidió probar un nuevo tipo de γ-aminoácido, el ácido 4-aminociclopent-2-enocarboxílico (o γ-Ace), el cual posee un mayor ángulo entre el grupo ácido y el grupo amino, y que por tanto podría ser útil en la formación de ciclos de mayor tamaño con capacidad de autoensamblaje (Figura 16).

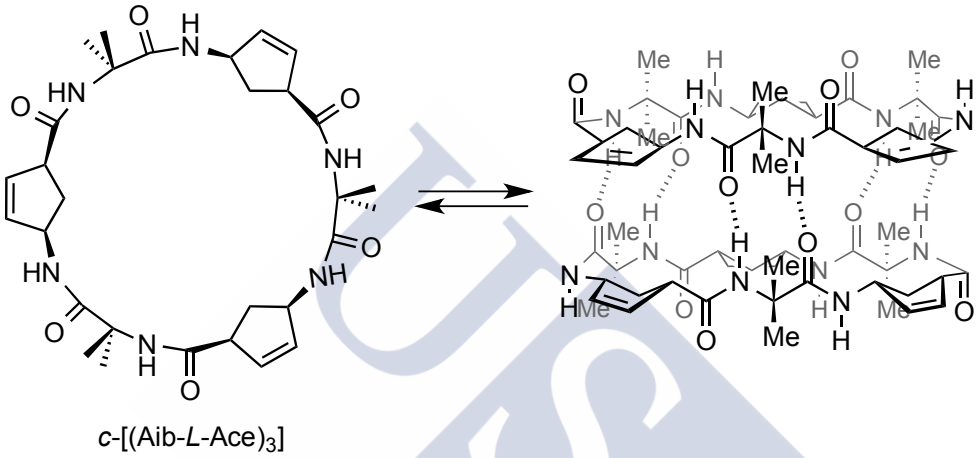


Figura 16: Representación de la estructura del ciclo *c*-[(Aib-*L*-γ-Ace)$_3$] y la formación de dímeros.

Una de las principales limitaciones encontradas en la síntesis de los derivados de γ-Ace fue su gran tendencia a epimerizar bajo las condiciones de acoplamiento peptídico y desprotección típicamente empleadas en nuestro grupo. Debido a ello, fue necesario recurrir a condiciones más suaves, como la utilización de bases más débiles y bajas temperaturas. Aunque no se pudo eliminar la epimerización en su totalidad, sí que se consiguió mitigar en gran medida, pudiéndose completar la síntesis del compuesto con suficiente cantidad para realizar los estudios de autoensamblaje.

En los estudios del ciclopéptido *c*-[(Aib-*L*-Ace)$_3$] se observó que el compuesto forma dímeros en disolventes apolares, aunque con bajas constantes de asociación [K_a(298 k, $CDCl_3$) = 51 M^{-1}], por lo que quedaba demostrado que los α-aminoácidos α,α-disustituidos en el que uno de sus sustituyentes queda orientado en disposición axial pueden servir para bloquear una de las caras del ciclopéptido en los procesos de autoensamblaje, aunque debido a que las tensiones trans-anulares son más importantes

[64] Reiriz, C.; Castedo L.; Granja, J. R. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 241-249.
[65] Toniolo, C.; Crisma, M.; Formagio, M.; Valle, C.; Cavicchioni, G.; Precigoux, G.; Aubry, A.; Kamphuis, J.; *Bioplymers* **1993**, *33*, 1061-1072.
[44] Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Chadiri, M. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.

que en el caso de los grupos situados sobre el grupo amino, las constantes de asociación son menores.

Extender esta idea a ciclopéptidos con otros γ-aminoácidos era muy sencillo, a través de una hidrogenación catalítica se llegó al ciclo *c*-[(Aib-*L*-γ-Acp)$_3$]. Sin embargo, este ciclo no mostró ninguna de las características de formación de dímeros, quizás debido al mayor grado de libertad del anillo ciclopentánico del γ-Acp con respecto al anillo ciclopentánico del γ-Ace.

En el año 2009, apareció el primer α,γ-ciclopéptido que incluía en su estructura γ-aminoácidos funcionalizados en la posición β.[66] Se trataba de un tetrapéptido cíclico *c*-[*D*-Ala-γ-Ahf-*D*-Tyr(Me)-γ-Acp], que además de poseer una unidad de γ-Acp, también incluía una unidad del ácido 4-amino-3-hidroxitetrahidrofuran-2-carboxílico (γ-Ahf), preparado a partir de la *D*-xilosa (Figura 17).

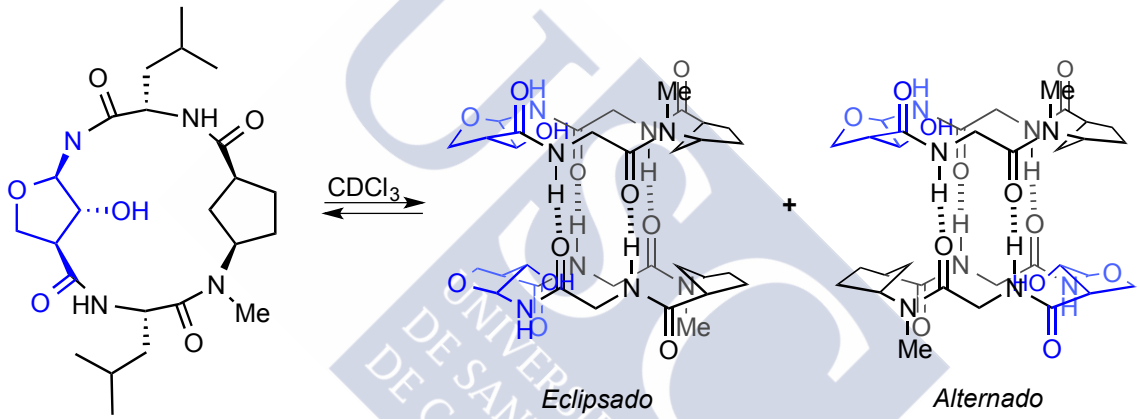


Figura 17: Las dos posibles estructuras diméricas formadas mediante el autoensamblaje del ciclopéptido *c*-[*D*-Ala-γ-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp]; a la izquierda la del dímero eclipsado (los dos Ahf se encuentran apilados); mientras que a la derecha se representa la estructura del dímero alternado.

La síntesis del ciclopéptido se llevó a cabo utilizando el γ-Ahf protegido en forma de éter bencílico. Un hecho destacable es que el ciclopéptido protegido no formaba dímeros en disolución hasta que se eliminó el grupo protector del hidroxilo en posición C2, momento en el cual, la formación de dímeros apareció con una constante de asociación de 1.2 x 10^4 M^{-1}, muy superior a los primeros α,γ-ciclotetrapéptidos sintetizados previamente cuyas constantes de asociación eran de 15 m^{-1}.[59] La relación entre los dos posibles "rotoisómeros" (Figura 17) fue determinada mediante cálculos DFT, encontrándose que la estructura eclipsada es en torno a 2 kcal/mol más estable que la estructura alternada.

[66] Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4358-4361.
[59] Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4681-4684.

El siguiente paso consistió en la incorporación del γ-Ahf a péptidos de mayor tamaño. Durante la escritura de este trabajo de Tesis, nuestro grupo de investigación publicó la síntesis y estudio de las propiedades de los octapéptidos *c*-[(*D*-Leu-γ-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp)$_2$] y *c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-γ-Ahf-*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp)$_2$].[67] El primero de estos dos ciclopéptidos adoptaba una conformación plegada en disolución ya que al no estar N-metilado el γ-Ahf, los grupos NH y CO del mismo forman un enlace de hidrógeno que distorsiona la planaridad de la molécula. En el caso del segundo péptido se obtuvieron diferentes comportamientos en función de si el hidroxilo de la posición C2 se encontraba protegido o no. En caso de encontrarse protegido, el péptido formaba dímeros en disolución con constantes de asociación elevadas y con una relación entre el dímero alternado y el eclipsado de 2:1. Sin embargo, cuando se desprotegió el hidroxilo fue necesario registrar los espectros de ^{1}H-RMN a bajas temperaturas o añadir pequeñas cantidades de MeOH (hasta un 5%) para observar las señales que indican la formación de dímeros.

Sin lugar a dudas, la característica más importante de esta nueva familia de ciclopéptidos es la facilidad para la modificación de las propiedades internas del ciclo funcionalizando el hidroxilo libre del γ-Ahf. Por ejemplo, el acoplamiento de uno de estos hidroxilos con el ácido picolínico dio lugar a un ciclopéptido con una piridina proyectada hacia el interior de ciclo, obteniéndose así un sistema dimérico con dos piridinas (una por cada dímero) que permitió el atrapado tanto de iones de Ag^+, como ácidos dicarboxílicos (ácido oxálico).

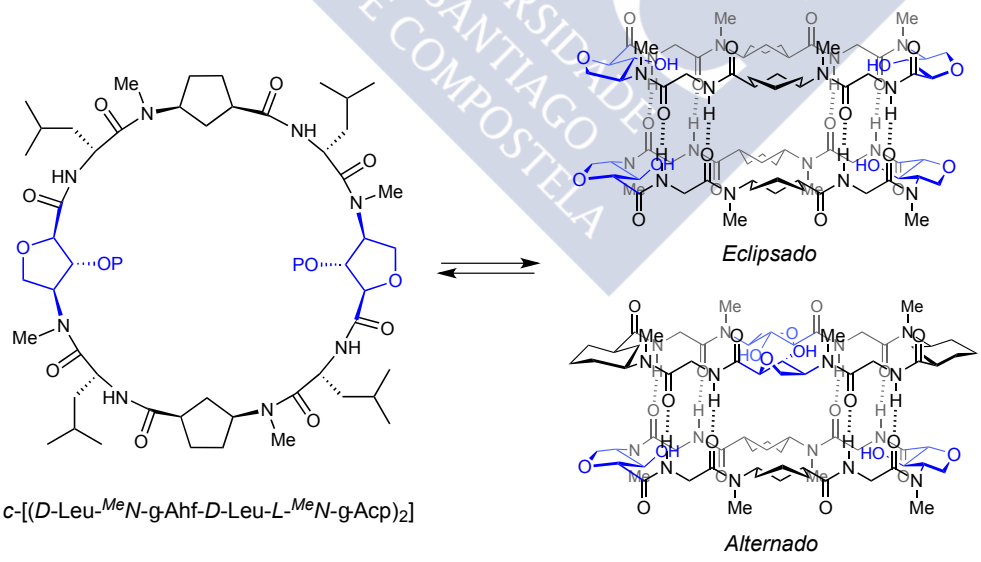


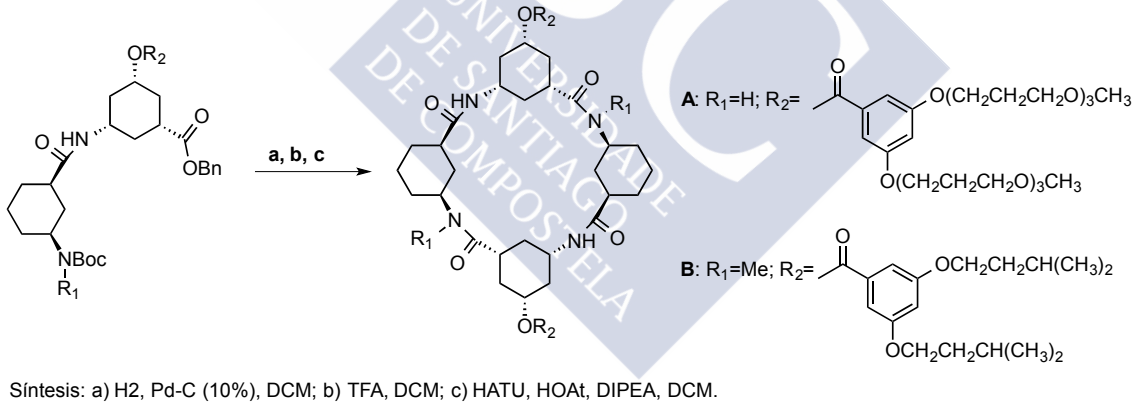
Figura 18: Estructura del ciclopéptido *c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-γ-Ahf-*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp)$_2$] (izquierda) y los dos rotodímeros formados en disolución; eclipsado (centro) y alternado (derecha).

[67] Rodríguez-Vázquez, N.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 183-187.

Otro ejemplo de funcionalización interna utilizando γ-aminoácidos fue publicado por el grupo de Ting Xu en el año 2011, basado en el intercambio de uno de los α-aminoácidos de un *D*,*L*-α-ciclopéptido por una unidad del ácido 3-amino-2-metilbenzoico, o γ-Mba.[68] En los estudios del ciclopéptido *c*-[*L*-Lys-*D*-Ala-*L*-Leu-*D*-Ala-*L*-Lys-D-Ala-γ-Mba-*D*-Ala] observaron que el metilo de la posición C2 está orientado hacia el interior de la cavidad, aportando carácter hidrofóbico a la cavidad del nanotubo formado, si bien el diámetro interno del ciclo (Van der Waals) se reduce de 7.6 a 4.7 Å. Además, la inclusión de un γ-aminoácido aromático provoca una distorsión en el esqueleto peptídico que reduce la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno. De hecho, a través de cálculos de dinámica molecular, llegaron a la conclusión de que la inclusión de otro γ-aminoácido provocaría tal distorsión en la estructura que impediría la formación de nanotubos.

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; γ-Ciclopéptidos

Además de ciclopéptidos que alternan α y γ-aminoácidos, también se han desarrollado otros ciclopéptidos formados exclusivamente por γ-aminoácidos. En el año 2012, simultáneamente a la realización de esta tesis, el grupo de Deng publicó la síntesis de un tetrapéptido cíclico que alterna γ-Ach con un derivado del γ-Ach de quiralidad opuesta y funcionalizado en la posición C5 del anillo de ciclohexano con un grupo hidroxilo, que además de aportar mayor solubilidad al ciclopéptido, permite la incorporación de otros de grupos funcionales que modifiquen las propiedades externas del nanotubo (Figura 19).[69]



Síntesis: a) H2, Pd-C (10%), DCM; b) TFA, DCM; c) HATU, HOAt, DIPEA, DCM.

Figura 19: Esquema de síntesis de los tetrapéptidos cíclicos formados exclusivamente por γ-aminoácidos.

Los resultados obtenidos en ^{1}H-RMN indican que los γ-ciclopéptidos se apilaban mediante una lámina β paralela. Para confirmarlo, sintetizaron la variante *N*-metilada, la cual no formaba dímeros en disolución debido a que la *N*-alquilación sólo permite el apilamiento a través de las láminas β antiparalelas. Sin embargo, una mezcla

[68] Hourami, R.; Zhang, C.; Van der Weeger, R.; Ruiz, C.; Li, C.; Keten, S.; Helms, B. A.; Xu, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15296-15299.

[69] Li, L.; Zhan, H.; Duan, P.; Liao, J.; Quan, J.; Hu, Y.; Chen, Z.; Zhu, J.; Liu, M,; Wu, Y-D.; Jingen Deng, J. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 3051-3056.

equimolecular del ciclopéptido 2b y su enantiómero si dio lugar a la formación de dímeros, cuya interacción es a través de una lámina β paralela. El ciclopéptido 2a se autoensambla de forma paralela para formar de nanotubos que se estudiaron mediante técnicas de microscopia (AFM, TEM), que indicaban la formación de bundles cuyo diámetro variaba en función del disolvente utilizado en la deposición.

Posteriormente nuestro grupo de investigación presentó un estudio con modelos diméricos de ciclooctapéptidos que se autoensamblan a través de una lámina β antiparalela. Una novedad adicional de ese trabajo fue la utilización de un nuevo γ-aminoácido derivado del ácido glucurónico que incorpora un átomo de oxígeno proyectado hacia el interior de la cavidad del dímero.[70]

-Nanotubos peptídicos a partir de péptidos cíclicos; Otros Ciclopéptidos

Desde el descubrimiento de los nanotubos formados a partir *de D,L*-ciclopéptidos se han desarrollado otros tipos de ciclopéptidos capaces de autoensamblarse de forma similar para formar estructuras tubulares.

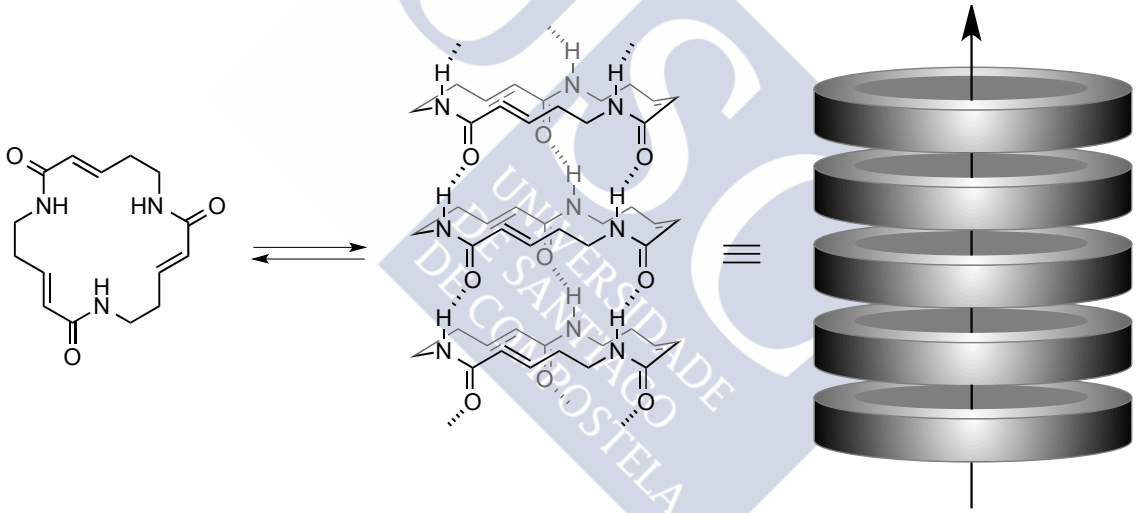


Figura 20: Esquema de la formación de nanotubos a partir de tripéptidos cíclicos formados exclusivamente por δ-aminoácidos α,β-insaturados y representación del momento macrodipolar presente en este tipo de nanotubos.

En el año 2001, el grupo de Dory sintetizó y estudió las características del primer ciclopéptido formado por δ-aminoácidos.[71] Se trataba de péptidos formados por la repetición del ácido (E)-5-aminopent-3-enoico, y aquellos que estaban formados por tres unidades presentaban capacidad para autoensamblarse y formar nanotubos que se agregaban formando bundles (Figura 20). De igual forma que en el caso de los

[70] Guerra, A.; Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8762-8766.

[71] Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635-4638.

β-ciclopéptidos o las hélices alfa, los δ-ciclopéptidos se apilaban de forma paralela, en el que los grupos amida se disponían alineados en la misma dirección, dando lugar a la aparición de un momento macrodipolar.

Otro ejemplo son los α,ε-ciclopéptidos publicados por Ghadiri en el año 2003.[72] Con este diseño también se pretendía modificar la cavidad interna de los nanotubos, por lo que se decidió usar un ε-aminoácido que poseía un grupo triazol. Este aminoácido se preparó a través de una cicloadición 1,3-dipolar entre un derivado aminoacídico en el grupo amino se sustituyó por una acida y un alquino (Figura 21). Estos péptidos se apilaban formando nanotubos, sin embargo, el grupo triazol se orientaba paralelamente al eje del tubo, por lo cual apenas modificaba las propiedades internas del nanotubo.

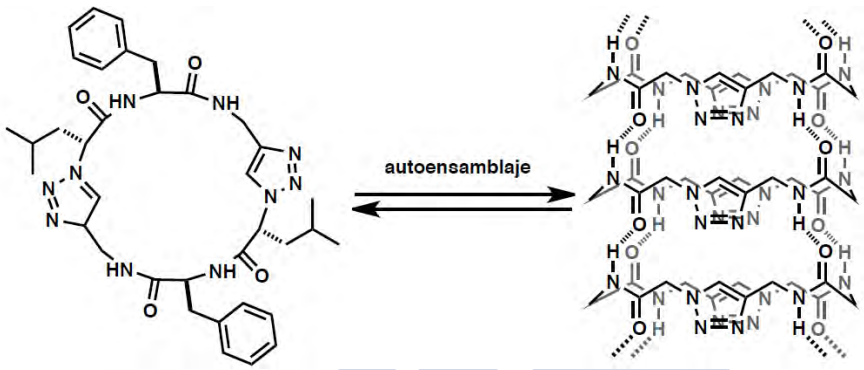


Figura 21: Representación esquemática de autoensamblaje molecular para un α,ε-ciclopéptido.

Los cristales obtenidos indicaron que el ciclopéptido adopta una conformación plana y se apila de forma paralela formando nanotubos con moléculas de etanol (disolvente empleado en la cristalización) ordenadas en su interior. Tres de los cuatro enlaces de hidrógeno se dan entre amidas, con distancias N-O de 3.3 Å, mientras que el cuarto enlace se forma a través de una molécula de etanol, con distancias N-O y O-O de 2.7 Å. La cavidad interna del nanotubo posee una forma ovalada, con diámetros de 5.2 Å (entre los anillos de triazol) y 6.8 Å entre los carbonos α de las fenilalaninas. También cuantificaron las constantes de asociación en base a estudios de espectroscopía de resonancia magnética de protón, obteniendo los valores de $8.6 \cdot 10^4$ M^{-1} para la formación de dímeros, y de $3.8 \cdot 10^4$ M^{-1} para especies de orden superior.

[72] Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 9372-9376.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Aplicaciones de los Nanotubos Peptídicos

Los principales usos de los nanotubos peptídicos se encuentran en el campo de la bioquímica, como antibacterianos o canales iónicos incorporados en bicapas lipídicas. Sin embargo, en los últimos años han aparecido aplicaciones en el campo de nanomateriales tales como sensores iónicos, biomateriales o dispositivos electrónicos.

-Antimicrobianos

Es un aspecto de gran interés por los recientes problemas derivados de la aparición de bacterias resistentes a diferentes agentes antimicrobianos y debido a su estabilidad de los ciclopéptidos de cara a la proteólisis. Los ciclopéptidos anfipáticos con este tipo de propiedad se ensamblan rápidamente en las membranas bacterianas sin unirse a ninguna proteína o receptor específico, por lo que se espera que las bacterias no adquieran resistencia tan fácilmente como contra los antibióticos comunes.[73] El mecanismo de acción consiste en la formación de nanotubos sobre la superficie de la membrana provocando su permeabilidad y pérdida del balance iónico y potencial de membrana, lo que conduce a la muerte celular.

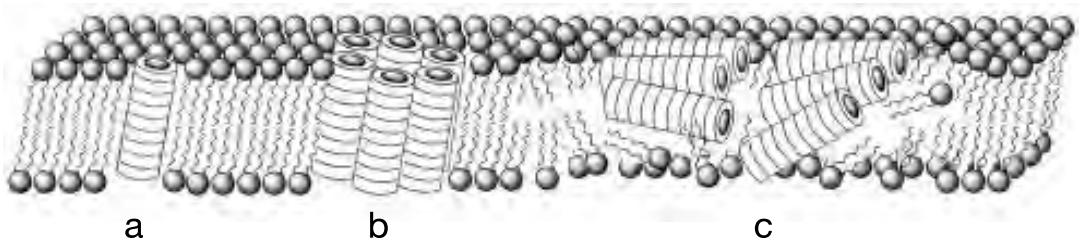


Figura 22: Representación esquemática de los posibles mecanismos de acción de los nanotubos peptídicos antimicrobianos, a) y b) formación de canales o poros a través de la membrana, c) mecanismo “carpet-like” o alfombra.

La actividad antibacteriana está modulada por varios factores, el tamaño del anillo (diámetro del ciclopéptido) siendo el óptimo los ciclopéptidos de 6 y 8 residuos, el tipo de aminoácidos empleados, y el número de aminoácidos básicos que posee el ciclopéptido.

En el año 2001, el grupo de Ghadiri publicó el primer estudio de uso de nanotubos como agentes microbianos. Observaron que *D*,*L*-ciclopéptidos anfifílicos compuestos por tres aminoácidos hidrofílicos (Lys, Arg, Glu, Ser, etc.) seguidos y que además poseen la secuencia (*L*-Trp-*D*-Leu)$_n$, se ensamblan en membranas sintéticas formando estructuras tubulares a modo de mecanismo tipo alfombra que destruye la membrana bacteriana. Por lo general estos ciclopéptidos actuaban preferentemente contra bacterias

[73] Krysmann, M. J.; Castelletto, V.; McKendrick, J. E.; Clifton, L. A.; Hamley, I. W. *Langmuir* **2008**, *25*, 8158-8162.

Gram-positivas, destacando su actividad contra el *staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), una de las cepas más peligrosas contagiadas en hospitales.[74]

También observaron que la actividad antibacteriana de los hexapéptidos cíclicos es menor que la de los octapéptidos, y que el incremento de residuos básicos aumenta la actividad. Es remarcable la relación entre la estructura y la actividad, destacando la mayor actividad de los hexapéptidos cíclicos frente a las bacterias Gram-negativo, mientras que los octapéptidos cíclicos presentaban una mayor actividad frente a las Gram-positivo. Otros ciclopéptidos mediante la evaluación de librerías mostraban una elevada toxicidad y selectividad por algas marinas eucariotas.[75] Los estudios *in vivo* mostraban un alto grado de protección en ratones infectados con MRSA, encontrándose tasas de supervivencia del 90%. Sin embargo, la elevada carga catiónica de los ciclopéptidos repercutía negativamente en el desarrollo de agentes antimicrobianos por lo que en ensayos posteriores se llevaron a cabo estudios para la reducción de estos. Los resultados experimentales demostraron que era posible reducirlos manteniendo su actividad.

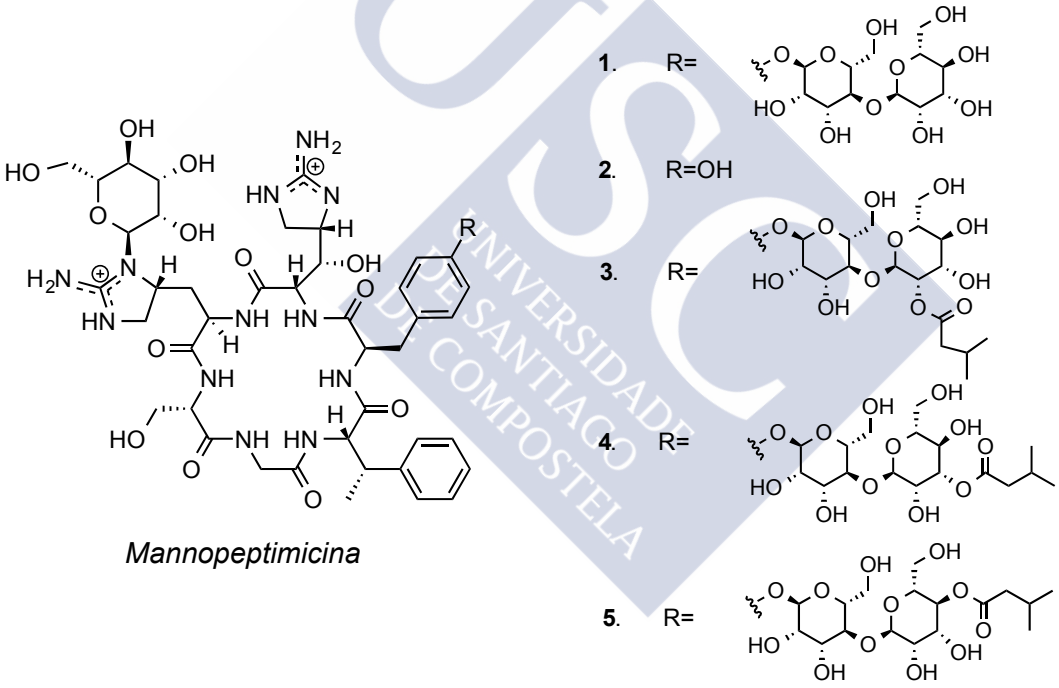


Figura 23: Estructura de las Mannopeptimicinas α-ε (1-5).

Posteriormente a la publicación del primer trabajo de péptidos cíclicos antimicrobianos, se descubrió una nueva familia de antibióticos naturales denominados Mannopeptimicinas con una gran actividad frente a *staphylococcus* resistentes a

[74] Fernandez-Lopez, S.; Hui-Sun, K.; Choi, E. C.; Delgada, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehi, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxen, K. W.; Ghadiri, R. M. *Nature* **2001**, *412*, 452-455.

[75] Fletcher, J. T.; Finlay, J. A.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4008-4013.

meticilina o *enterococcus* resistentes a vancomicina (Gram-positivo)(Figura 23).[76] En su elucidación estructural se encontró una familia de compuestos formados por hexapéptidos cíclicos glicosilados (funcionalizados con manosas a través de cadenas laterales) de quiralidad alternada.

Basándose en el descubrimiento de esta nueva familia de antibióticos, en el año 2009 el Grupo de Ghadiri sintetizó y estudió la actividad de D,L-ciclopéptidos funcionalizados con *D*-glucosamina, *D*-galactosa y *D*-fructosa.[77] Con respecto a sus trabajos anteriores encontraron que la glicosilación no reduce la actividad antibacteriana, pero aumenta sensiblemente su solubilidad.[74]

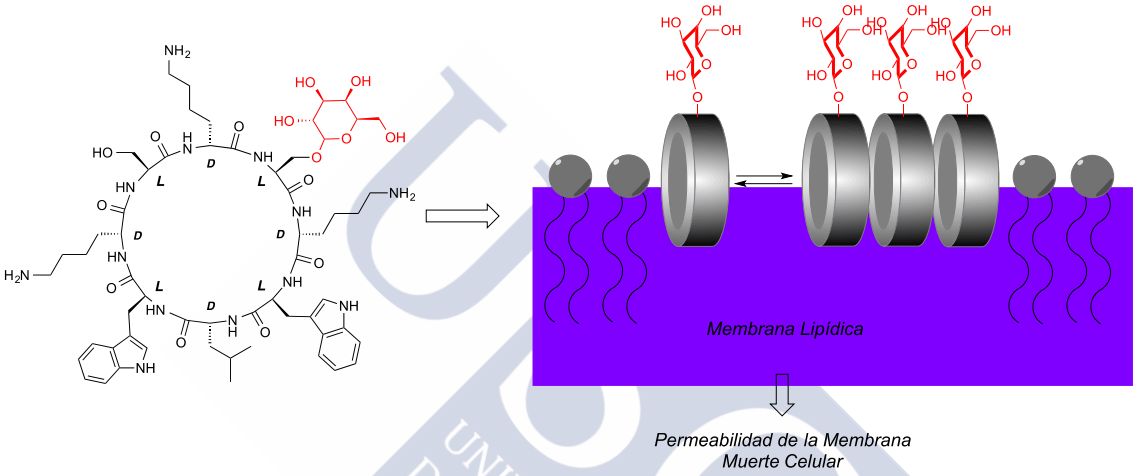


Figura 24: Representación de mecanismo de acción antibacteriana de los glicopéptidos cíclicos al autoensamblarse en una membrana lipídica.

Los ensayos *in vitro* de la actividad de los glicopéptidos arrojaron resultados en el rango 5-10 µM contra bacterias Gram-positivo, indicando que el aumento de hidrofilia debido a glicosilación no representa una influencia negativa. Sin embargo, el tipo de residuo glicosídico y su ubicación en el ciclopéptido modula la selectividad hacia las membranas; aquellos glicopéptidos funcionalizados con β-galactosa presentaron muy baja actividad hemolítica frente a glóbulos rojos de humanos o ratones. Por último, mediante estudios de transporte (de fluoróforos a través de membranas) y experimentos de ATR-FTIR quedó demostrada la formación de nanotubos peptídicos en membranas artificiales.

-Canales transmembranosos

La capacidad de los ciclopéptidos para insertarse en bicapas lipídicas los convierte en buenos candidatos para convertirse en canales iónicos. El grupo de Ghadiri demostró que un octapéptido cíclico formado por aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas,

[76] He, H.; Williamson, R. T.; Shen, B.; Graziani, E. I.; Yang, H. Y.; Sakya, S. M.; Petersen, P. J.; Carter, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9729-9736.
[77] Motiei, L.; Rahimipour, S.; Thayer, D. A.; Wong, C-H.; Ghadiri, M. R.; *Chem. Comm.* **2009**, *25*, 3693-3695.

el *c*-[(Trp-*D*-Leu-)$_3$-Gln-*D*-Leu], era capaz de formar canales iónicos con un diámetro interno de 7.5 Å en vesículas unilamelares.[78] Dicha formación se demostró mediante medidas de intensidad de fluorescencia de un colorante sensible al pH atrapado en las vesículas, observándose que la eficiencia de transporte de protones era similar a la de proteínas como la Gramicidina A o Amfotericina B. Sin embargo, en los estudios con ciclopéptidos con cadenas laterales hidrofílicas, como el ciclo *c*-[(Gln-*D*-Leu-)$_4$], no se observó ninguna actividad de transporte. De igual modo que con el ciclo *c*-[(^{Me}*N*-*D*-Ala-Phe-)$_4$] que, aunque sí que posee cadenas laterales hidrofóbicas, no formaba nanotubos debido a la *N*-metilación de las alaninas.

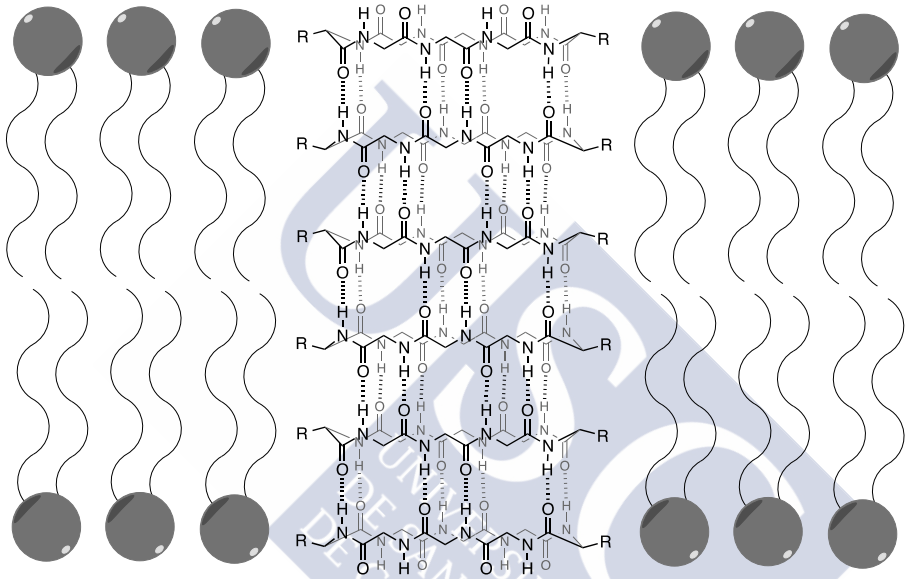


Figura 25: Nanotubo peptídico embebido en una bicapa lipídica. Se han resaltado las cadenas laterales para mostrar sus interacciones con los lípidos.

Las medidas de conductancia demostraron que los ciclopéptidos también transportan iones alcalinos como Na^+ o K^+, aunque la selectividad entre ambos cationes era baja. Por otra parte, los experimentos llevados a cabo para comprobar el transporte de pequeñas moléculas hidrofílicas como la glucosa no dieron resultados positivos, probablemente debido a que el diámetro del poro (7.5 Å) era demasiado pequeño para permitir su paso. Por esa razón, se sintetizó el decapéptido cíclico *c*-[Gln-(*D*-Leu-Trp-)$_4$-*D*-Leu], cuyo diámetro interno era de aproximadamente 10 Å.[79]

El transporte de glucosa se iniciaba al añadir el ciclopéptido sobre una disolución isotónica de vesículas lipídicas con glucosa en su interior, y se monitorizó a través de la banda de absorción a 340 nm del NADPH producido por la enzima hexokinasa/glucosa-6-fosfato hidrogenasa (Figura 26). La relación lineal entre la velocidad de transporte y la concentración micelar de glucosa indica que el fenómeno de transporte es un proceso

[78] Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K.; *Nature* **1994**, *369*, 301-304.
[79] Granja, J. R.; Ghadiri, M. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.

de difusión a través de los canales transmembranosos. De forma similar se llevaron a cabo los estudios de transporte de ácido glutámico, medido a través del sistema enzimático sintetasa/piruvato kinasa/lactato hidrogenasa, donde se medía la oxidación de NADH.[80]

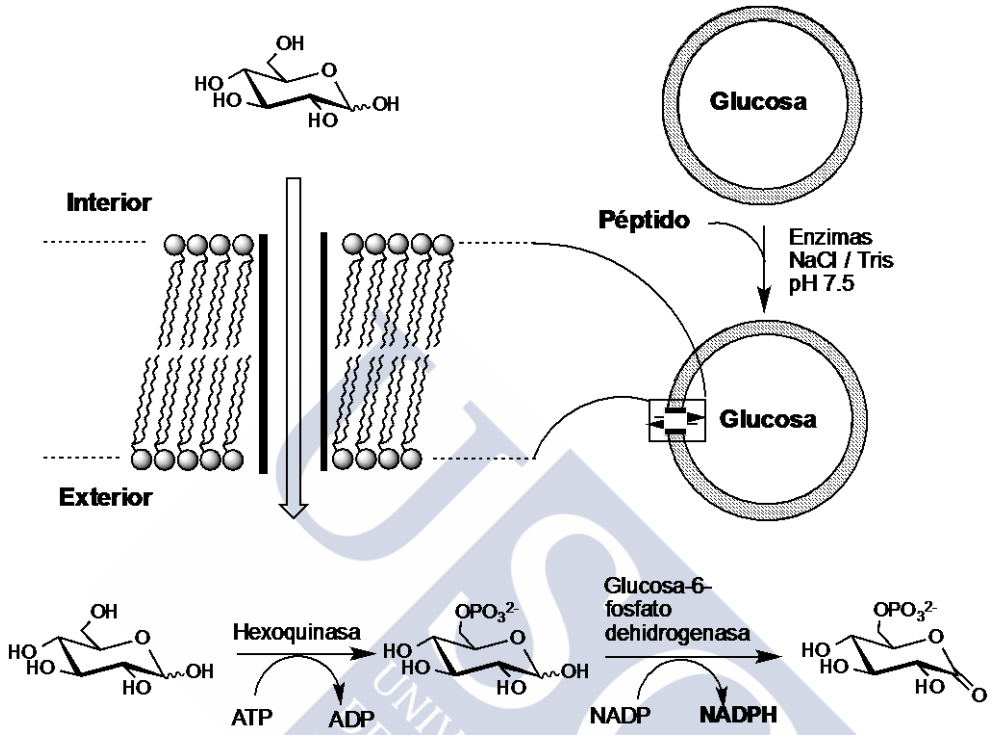


Figura 26: Ilustración esquemática del modo de determinación del transporte de glucosa a través de la membrana facilitada por los nanotubos peptídicos. La formación del nanoporo inicia un flujo de glucosa del liposoma al exterior, que se monitorizó midiendo la velocidad de formación de NADPH en el proceso de oxidación enzimática de la glucosa.

Los ciclopéptidos también se emplearon para modular el transporte a través de proteínas trasnmembranosas como la α-hemolisina.[81] El uso de ciclopéptidos cargados positiva o negativamente forzaba su migración debido a la diferencia de potencial a ambos lados de la bicapa, lo que daba lugar a que se alojaran en la cavidad del poro de la α-hemolisina, modificando las propiedades de transporte de ésta. De este modo, añadiendo péptidos cíclicos cargados negativamente, el poro de la proteína se volvía selectivo a cationes, mientras que utilizando péptidos cargados positivamente, aumentaba la selectividad con respecto a los aniones.

Recientemente, el grupo de Jolliffe publicó un extenso estudio sobre el efecto de la composición de aminoácidos de los *D,L*-α-ciclooctapéptidos sobre su autoensamblaje en

[80] Sanchez-Quesada, J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2503-2506.
[81] Sanchez-Quesada, J.; Ghadiri, M. R.; Bayley, H.; Braha, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10785-10786.

las bicapas lipídicas.[82] Las conclusiones de dicho estudio fueron que los ciclopéptidos con cadenas laterales cargadas forman poros grandes por asociación entre nanotubos, mientras que los ciclopéptidos con cadenas laterales neutras forman poros de un solo nanotubo. Además, también se observó la mayor actividad membranosa de los ciclopéptidos no simétricos frente a los simétricos. Aunque quizás el hallazgo más importante fue la selectividad encontrada en péptidos anfifílicos con respecto a distintos tipos de membrana, ya que se observó una mayor actividad de péptidos anfifílicos en membranas cargadas negativamente (como las extraídas de *E. Coli*) frente a membranas sin carga (como las formadas por fosfatidilcolina de la yema de huevo).

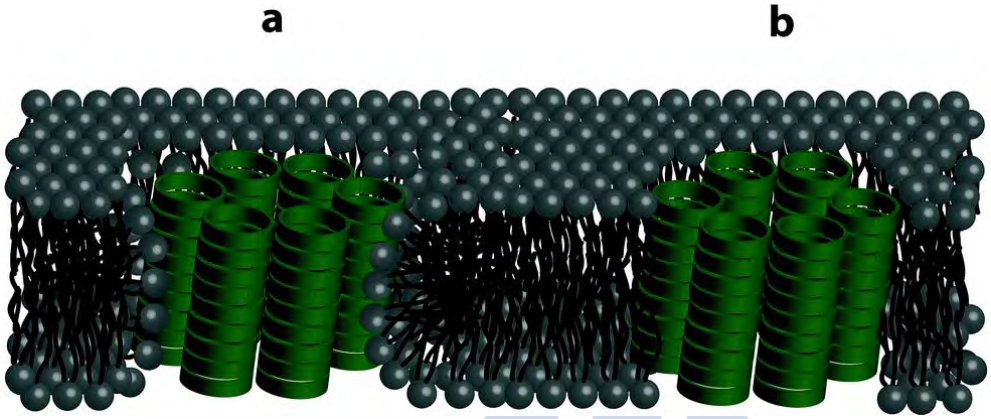


Figura 27:Modelos propuestos para la interacción entre membranas lipídicas de baja carga y ciclopéptidos cargados (a) y membranas lipídicas de alta carga y ciclopéptidos anfifílicos (b).

Probablemente este hecho sea debido a que las membranas con baja carga se pliegan fácilmente alrededor del poro formado, siendo así favorables las interacciones entre los grupos fosfato y las cadenas laterales cargadas del ciclopéptido (Figura 27, a), mientras que membranas con alta carga necesitan una mayor energía para plegarse alrededor del poro, por lo que los ciclopéptidos anfifílicos pueden orientar las cadenas no cargadas hacia las cadenas alifáticas del interior de la membrana (Figura 27 ,b).

En el año 2013, el grupo del Prof. Sébastien Perrier publicó el estudio de las propiedades del primer nanotubo peptídico *Janus*.[83,84] Para ello sintetizaron un *D,L*-α-ciclopéptido funcionalizado con dos polímeros diferentes e inmiscibles; PS y poli-*n*-butil acrilato, el cual se autoensambla dando lugar a las correspondientes estructuras nanotubulares (Figura 28). Las estructuras obtenidas poseen la capacidad de formar grandes poros en membranas lipídicas gracias a la asociación de las "caras" de los nanotubos que son miscibles entre sí, y a que el polímero de poli-*n*-estireno es inmiscible con los fosfolípidos de la membrana.

[82] Danial, M.; Perrier, S. Jolliffe, K. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2464-2473.
[83] Jano (en latín *Janus*, *Ianus*) en la mitología romana es el dios de las puertas, los comienzos y los finales. Generalemente se representa con dos caras opuestas que simbolizan caracteres opuestos.
[84] Danial, M.; My-Nhi Tran, C.; Young, P. G.; Perrier, S.; Jolliffe, K. A. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2780-2793.

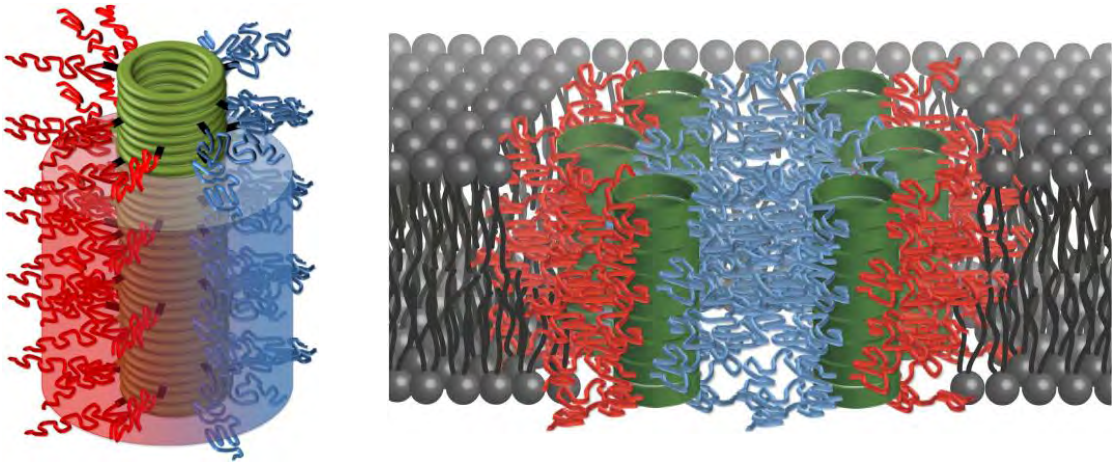


Figura 28: (Izquierda) Representación del nanotubo peptídico *Janus* en la que se puede observar la disposición de los dos polímeros diferentes en las "caras" del nanotubo. (Derecha) Mecanismo de formación de los poros en bicapas lipídicas mediante las interacciones entre los polímeros del mismo tipo.

-Sensores iónicos/Biosensores

Los biosensores pueden ser clasificados en dos grupos: biosensores de afinidad,[85] diseñados en base a reconocimientos moleculares específicos, y biosensores dinámicos, que están basados en procesos de adsorción o difusión no específicos.[86]

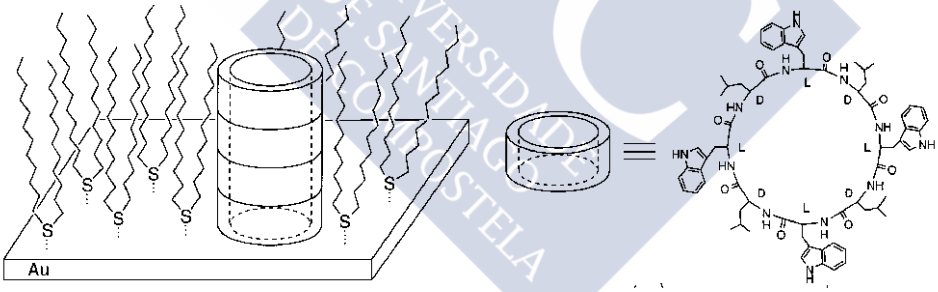


Figura 29: Ilustración de la formación de monocapas que incorporan nanotubos; los ciclopéptidos formados por aminoácidos de cadenas laterales hidrofóbicas pueden incorporarse y formar nanotubos en el entorno apolar de la monocapa lipídica.

En 1997 se describió el primer diseño de sensores dinámicos basados en procesos de difusión a través de canales.[87] Para tal fin, se utilizaron láminas de oro funcionalizadas con organosulfuros o tioéteres donde se incorporaron por diferentes métodos D,L-ciclooctapéptidos con capacidad de autoensamblaje. En función del método de incorporación del ciclopéptido, los nanotubos formados se alinean paralelamente o perpendicularmente al plano de la superficie de oro (Figura 29). La capacidad del

[85] Rogers, K. R. *Mol. Biotech.* **2000**, *14*, 109-129.
[86] Martin, C. R.; Kohli, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 29-37.
[87] Montesharei, K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11306-11312.

sistema de funcionar como un "sensor selectivo por el de tamaño de los iones" fue determinada mediante la técnica de voltametría cíclica usando tres especies electroactivas de diferente tamaño. Tanto $[Fe(CN)_6]^{3-}$ y $[Ru(Nh_3)_6]^{3+}$ con diferente carga, pero tamaño menor que el diámetro del poro del nanotubo (7.5 Å), demostraron actividad redox, mientras que $[Mo(CN)_8]^{4-}$, que es demasiado grande para penetrar en el poro, no mostraba actividad alguna.

Otro ejemplo de sensores basados en ciclopéptidos en el estudio publicado por el nuestro grupo en el año 2007,[88] donde, aprovechando la diferencia en la constante de asociación entre homo y heterodímeros de α,γ-ciclopéptidos,[62] lograron crear un sistema multicomponente de ciclopéptidos fluorescentes que emite una señal de fluorescencia de forma controlada empleando el sistema FRET (Fluorescence Emision Energy Transfer) que forman el grupo pireno y el grupo dapoxilo.[89]

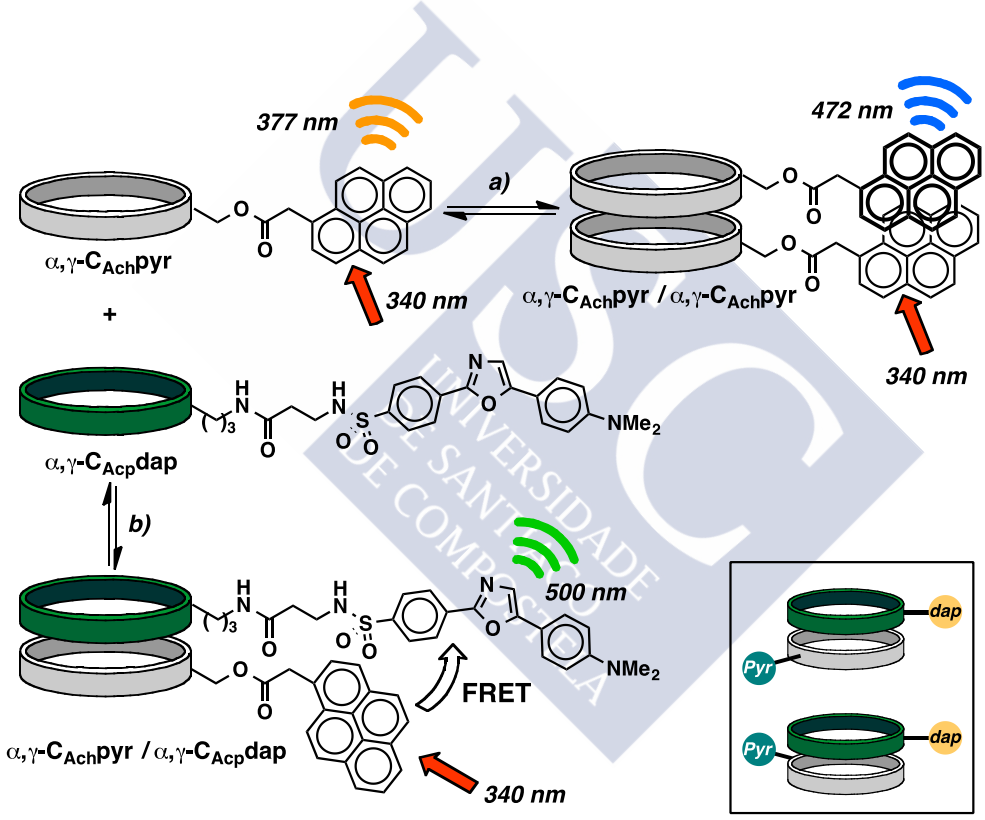


Figura 30: Equilibrios entre α,γ-Cp$_{Ach}$Pyr y α,γ-Cp$_{Acp}$Dap y sus diferentes señales de emisión en función de las diferencies especies diméricas formadas.

Para ello se sintetizaron dos ciclohexapéptidos, uno de los cuales estaba formado por γ-Ach y funcionalizado con un pireno, y el otro formado por γ-Acp y funcionalizado con dapoxilo. Cuando se irradiaba una disolución diluida (50nM) de α,γ-Cp$_{Ach}$Pyr a 340 nm, aparecía la típica banda de emisión de fluorescencia de pireno con dos máximos a 377 y

[88] Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1653-1657.
[89] Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217-224.

397 nm.[90] Sin embargo, cuando aumenta la concentración de ciclopéptido, aparece una nueva banda de emisión a 472 nm que se corresponde con la banda de emisión de fluorescencia del excímero de pireno (Figura 30, a). Por otro lado, cuando se irradia una disolución de α,γ-Cp_{Acp}Dap a 340 nm, aparecía una banda de emisión a 500 nm. Sin embargo, cuando se irradiaba con una longitud de onda de 340 nm la disolución que contenía ambos ciclopéptidos se observaba la banda de emisión de dapoxilo (500nm), como consecuencia de la formación del heterodímero que acercaba espacialmente ambos cromóforos; dador (pireno) y aceptor (dapoxilo) a una distancia en torno a 4 Å (Figura 30, b).

-Biomateriales

En los últimos años ha habido un gran interés en combinar ciclopéptidos con polímeros con el objetivo de crear nuevos materiales con nuevas propiedades que deriven de la combinación de ambos componentes. En estos híbridos los ciclopéptidos actúan como directores del ensamblaje para organizar los polímeros. Los nanotubos poliméricos ofrecen la ventaja de poseer un amplio rango de funcionalidades/utilidades además de control sobre la longitud de los nanotubos. El Prof. Biesalski publicó en el 2005 el primer ejemplo de polimerización a partir de un nanotubo peptídico.[91] Para ello, sintetizaron un ciclo *D,L*-octapéptido funcionalizado con iniciadores de polimerización en las cadenas laterales que provocan la polimerización de la N-isopropilacrilamida (NIPAM) dando lugar a un material híbrido en el cual el núcleo es el nanotubo peptídico enlazado covalentemente a una cubierta polimérica (Figura 31).

Una alternativa desarrollada para sintetizar nanotubos poliméricos consistía en enlazar directamente polímeros al ciclopéptido a través de sus cadenas laterales. El primer ejemplo de este tipo de estrategia data del año 2006, cuando el grupo de Börner publicó la síntesis de un "bioconjugado" cola-anillo-cola formado por un D,L-ciclooctapéptido y dos poli-*n*-butilacrilatos.[92] El ciclopéptido poseía dos lisinas situadas en posiciones opuestas del ciclo, a través de las cuales se enlazaron los dos bloques de polímero. Las propiedades de autoensamblaje del ciclopéptido no se veían apenas alteradas por la conjugación de los polímeros. De hecho, el complejo formado exhibía una fuerte tendencia a la formación de estructuras tubulares, como pudieron comprobar mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica, cuando observaron formaciones tubulares con alturas de 1.4 nm, anchuras de 5nm y longitudes de entre 200 y 300 nm.

[90] Ueno, A.; Suzuki, I.; Osa, T. *J. Am. Chem. Soc*. **1989**, *111*, 6391-6397.
[91] Couet, J.; Jeyaprakash, J. D.; Samuel, S.; Kopyshev, A.; Santer, S.; and Biesalski, M.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297–3301.
[92] ten Cate, M. G. J.; Severin, N.; Börner, H. G.; *Macromolecules*, **2006**, *39*, 7831–7838.

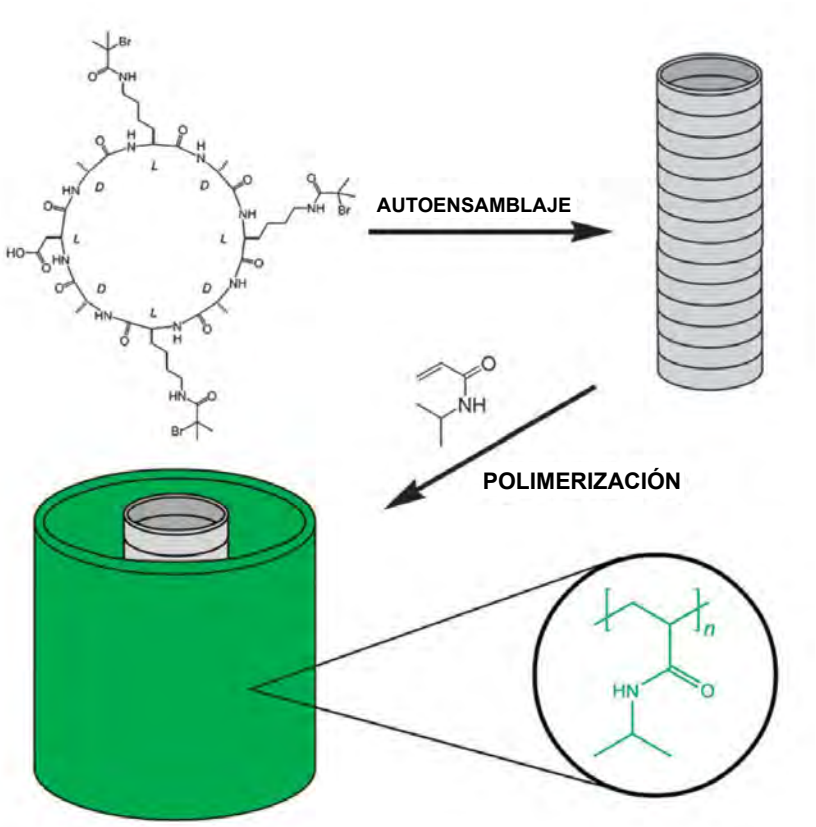


Figura 31: Esquema del proceso de formación de los híbridos polímero-nanotubo peptídico; el ciclopéptido se autoensambla para dar lugar a un nanotubo peptídico, después se inicia el proceso de polimerización a través de las cadenas laterales en presencia de NIPAM que recubre al nanotubo con una cubierta enlazada covalentemente.

En el año 2010, el grupo de Perrier llevó a cabo la conjugación de dos, tres e incluso cuatro unidades de polímero a un mismo *D,L*-ciclopéptido a través de reacciones de cicloadición azida-alquino catalizadas por cobre.[93] El amplio rango de polímeros disponibles para la conjugación permite el diseño de nanotubos solubles en una gran variedad de disolventes, tanto apolares como polares, incluyendo agua. Sin embargo, observaron que cuanto mayor era el polímero enlazado, menor era la longitud del nanotubo formado, por lo que, en cierta medida es uno de los primeros métodos para controlar la longitud del nanotubo. También encontraron la particularidad de que la "corteza" polimérica consigue proteger a los nanotubos de la competición por los enlaces de hidrógeno de disolventes como el ácido trifluroacético o la dimetil formamida, por lo que aumentaba su estabilidad.

[93] Chapman, R.; Jolliffe, K.A.; Perrier, S. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 1169-1172.

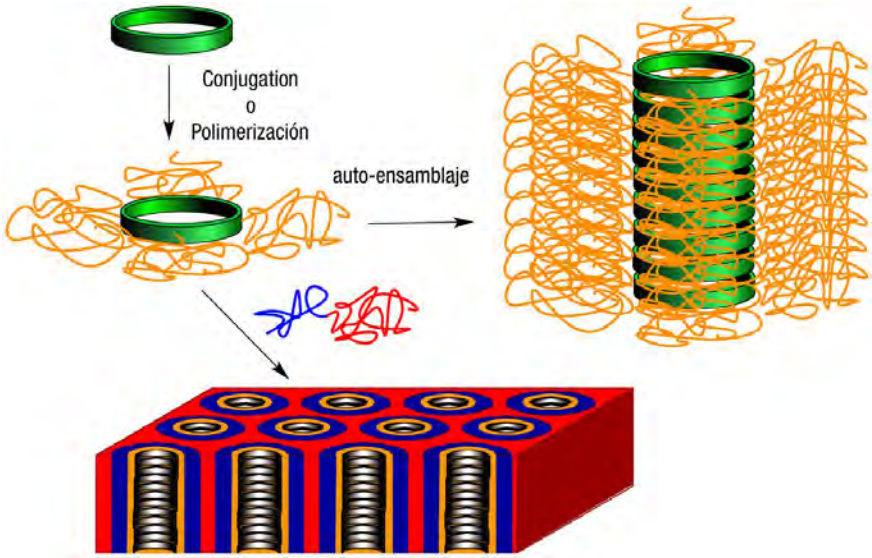


Figura 4. Preparación de polímeros supramoleculares tubulares basados en el auto-ensamblaje molecular de los híbridos cic. lopéptidos/polímeros

Figura 32: Representación esquemática del proceso de generación de films nanoporosos vía co-ensamblaje de ciclopéptidos y copolímeros de bloque formando microdominios cilíndricos.

Xu y colaboradores también funcionalizaron D,L-ciclopéptidos a través de sus cadenas laterales con polímeros de bajo peso molecular, como poli(etilen óxido), poliestireno o polimetilmetacrilato.[94] Posteriormente, depositaron estos conjugados en los huecos hexagonales del copolímero de bloque poliestireno-b-poli(metilmetacrilato), donde los ciclopéptidos se autoensamblaban dando lugar a nanocanales alineados verticalmente al film polimérico (Figura 32). La posibilidad de formar nanotubos en films representa una de las mejores aproximaciones para la obtención de materiales nanoporosos.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se publicó la síntesis y el estudio de las propiedades de un nuevo biomaterial, que conjuga dos de los principales tipos de nanotubos; los nanotubos peptídicos y los nanotubos de carbono de pared simple.[95] Este nuevo material disfruta de las propiedades de ambos nanotubos, la dureza y propiedades electrónicas de los nanotubos de carbono y la biocompatibilidad y facilidad para modificar sus propiedades de los nanotubos peptídicos. Para ello, se empleó un α,γ-ciclopéptido anfifílico, el octapéptido c-[(*D*-Arg-*L*-γ-Acp-*D*-Glu-*L*-γ-Acp-*D*-Lys(Pyr)-*L*-γ-Acp-*D*-Lys-*L*-γ-Acp)], en el que una de las cadenas laterales de lisina se funcionalizó con un grupo pireno a través de la formación de un enlace amida. Este grupo pireno además de aportar hidrofobicidad al ciclopéptido permitió la unión con nanotubos de carbono a través de interacciones π-π. Por otra parte, los residuos cargados del ciclopéptido (lisina, glutámico y arginina) aportaron al péptido una gran solubilidad en agua, por lo que se consiguió la solubilización de los nanotubos de carbono en agua gracias a la formación de este nuevo material híbrido.

---

[94] Xu, T.; Zhao, N.; Ren, F.; Hourani, R.; Lee, M. T.; Shu, J. Y.; Mao, S.; Helms, B. A. *ACS Nano*, **2011**, *5*, 1376–1384.

[95] Montenegro, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Kalinin, A.; Geckeler, K. E.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491.

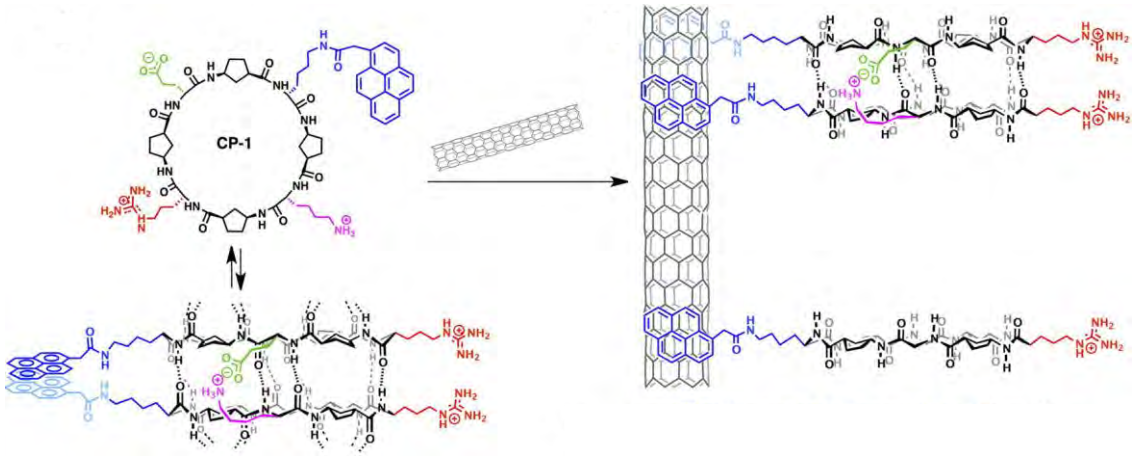


Figura 33: Representación del ciclopéptido empleado para la formación del compuesto híbrido y del nanotubo formado mediante el autoensamblaje del mismo (izquierda), y mecanismo propuesto para la conjugación de los ciclopéptidos con el nanotubo de carbono y posterior formación del nanotubo peptídico.

Además, la formación de la especie híbrida se pudo confirmar mediante técnicas de microscopía (AFM, TEM) donde se pudieron observar formaciones de nanotubos alineados con diámetros que variaron entre 1.5 nm para el nanotubo de carbono y 3.5 nm para la especie híbrida. Por último, se encontró que los nanotubos de carbono que formaron el material híbrido fueron preferentemente semiconductores, por lo que este método también podría ser empleado para la identificación y la separación de nanotubos de carbono semiconductores de metálicos, y a largo plazo para manipular las propiedades de los nanotubos de carbono.

-Dispositivos electrónicos

Los nanocables moleculares formados por nanotubos peptídicos han llamado mucho la atención debido a sus posibles aplicaciones en el campo de la nanoelectrónica, para el diseño y fabricación de materiales unidimensionales con potenciales aplicaciones en el dispositivos ópticos y electrónicos.[96]

Ghadiri y colaboradores funcionalizaron *D,L*-α-ciclopéptidos con 4 unidades de 1,4,5,8-naftalenodiimido (NDI) que se autoensamblaban mediante un proceso redox.[97] De esta forma se obtuvieron nanotubos con densidad electrónica deslocalizada con longitudes de cientos de nanómetros.

El grupo de Ghadiri también realizó el acoplamiento de dos y cuatro unidades NDI sobre ciclopéptidos que formaban dímeros.[98] De esta forma, existían dos interacciones intermoleculares posibles; los enlaces de hidrógeno entre las amidas y los grupos

[96] Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1401-1443.
[97] Ashkenasy, N.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. *Small*, **2006**, *2*, 99-102.
[98] Horne, W. S.; Ashkenasy, N.; Ghadriri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1137-1144.

carbonilo de los ciclopéptidos, y las interacciones hidrofóbicas o empaquetamiento π entre las unidades de NDI. La primera interacción permite que las unidades de NDI estén próximas entre sí, de forma que se producen estados de carga deslocalizada a lo largo de los nanotubos, mientras que la segunda permite el crecimiento de los nanotubos hasta longitudes superiores a los cien nanómetros.

Por otra parte, el grupo de Kimura publicó la síntesis de un ciclo-β-tripéptido funcionalizado con tres terpiridinas a través de las cadenas laterales de ácido glutámico.[99] Los grupos terpiridina proporcionan lugares de unión ideales para metales como el Cu (II). Esta complejación fue observada mediante espectroscopía UV, observando el aumento de la banda de absorbancia a 330 nm al añadir alícuotas de $CuCl_2$ sobre una disolución del ciclopéptido, hasta la adición de dos equivalentes de metal por ciclopéptido. Estos nuevos sistemas poseen, además del momento macrodipolar propio de los nanotubos formados por β-ciclopéptidos, una alta conductividad electrónica, lo que les confiere un gran interés para múltiples aplicaciones.

En nuestro grupo de investigación se ha preparado también un α,γ-ciclopéptidos al que se unió covalentemente un fullereno, y que también podría tener aplicaciones en el desarrollo de nuevos componentes electrónicos moleculares.[100] Dicho ciclopéptido es capaz de alinear las moléculas de fullereno alternadamente a lo largo del nanotubo cuando lo depositaban sobre las superficies de mica o grafito (Figura 34). Como consecuencia de esto, los fullerenos forman dos nanocables paralelos unidos mediante un material aislante, que es el nanotubo peptídico.

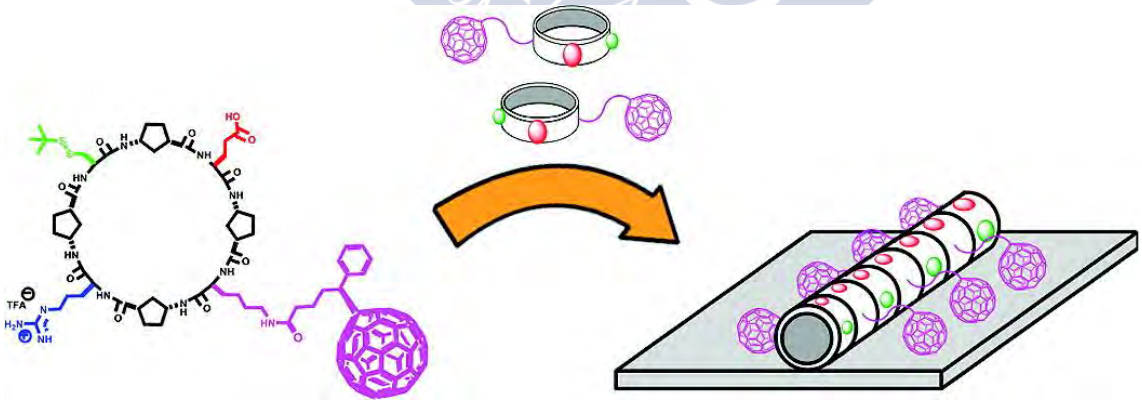


Figura 34: Representación esquemática de un α,γ-ciclopéptido funcionalizado con fullereno y la formación de nanotubos sobre superficie sólida donde se observa la alineación entre ellos.

[99] Fujimura, F.; Kimura, S. *Org Lett.* **2007**, *9*, 793-796.
[100] Reiriz, C.; Brea, R. J.; Arranz, R.; Carrascosa, J. L.; Garibotti, A.; Manning, B.; Valposta, J. M.; Eritja, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11335-11337.

-Transporte de fármacos

En el año 2014, se presentó el primer sistema de transporte de fármacos basado en conjugados de polímeros y ciclopéptidos con capacidad de autoensamblaje.[101] Para ello, se empleó un fármaco anticancerígeno basado en rutenio (RAPTA-C), que se conjugó a un copolímero basado en poli(2-hidroxietil acrilato) (pHEA) que aporta solubilidad y poli(2-cloroetil metacrilato) (pCEMA) que se conjuga con el fármaco, enlazado a un ciclopéptido a través de una reacción de tipo click chemistry.

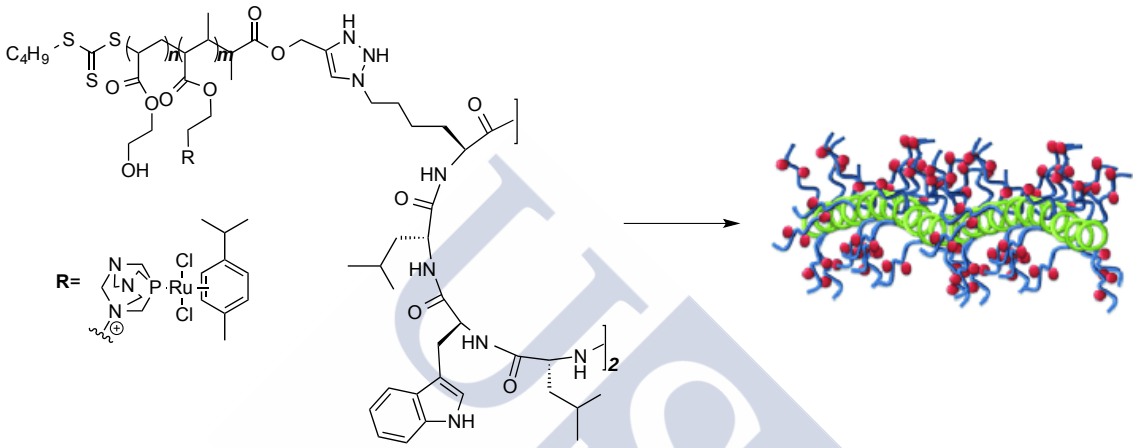


Figura 35: (Izquierda) Estructura del ciclopéptido funcionalizado con el copolímero pHEA-pCEMA conjugado con el fármaco RAPTA-C. (Derecha) Representación de los nanotubos peptídicos formados mediante al autoensamblaje de sistema ciclopéptido-copolímero en el que el fármaco se ha representado como esferas de color rojo.

Las pruebas llevadas a cabo en líneas celulares cancerígenas demostraron que mientras el conjugado péptido-polímero no demostraba toxicidad a concentraciones superiores a 590 µg/mL, el sistema péptido-polímero(RAPTA-C) demostró diez veces más toxicidad en las células cancerígenas que el fármaco aislado. Este aumento en la toxicidad es indicativo de una mejor captación celular del fármaco resultado del transporte de RAPTA-C por parte del sistema péptido-polímero.

[101] Blunden, B. M.; Chapman, R.; Danial, M.; Lu, H.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. Stenzel, M. H. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12745-12749.

Objetivos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Como se ha visto en la introducción de este trabajo de tesis doctoral, nuestro grupo es pionero en el diseño, síntesis y estudio de las propiedades de sistema macromoleculares formados por ciclopéptidos que alternan α y γ-aminoácidos. Gracias a este arduo trabajo, se han descrito las bases estructurales de estos sistemas,[58,60,62] y sus potenciales aplicaciones que abarcan aspectos como el transporte de iones,[102] los dispositivos electrónicos,[100] la señalización molecular,[88] o los biomateriales moleculares,[95] entre otros.

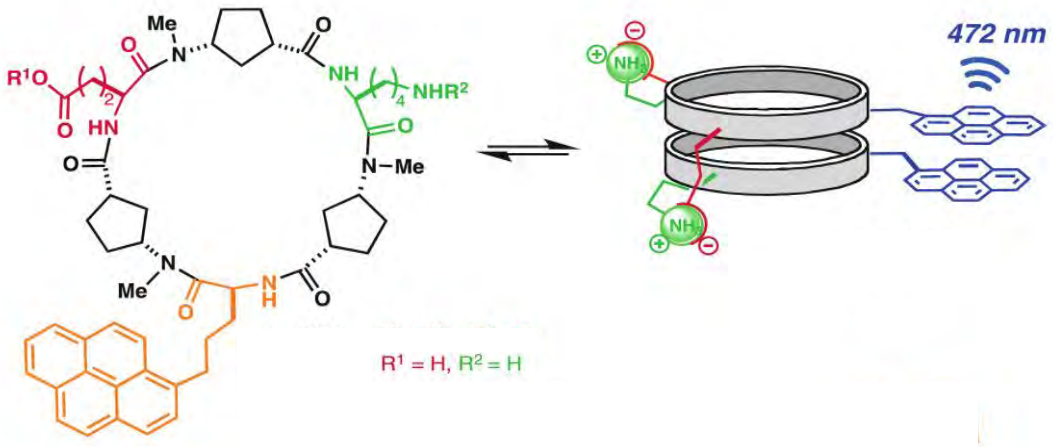


Figura 36: Representación esquemática del proceso de control rotodimérico a través de la formación de puentes salinos entre las cadenas laterales de los α,γ-ciclopéptidos.

El primer objetivo de este trabajo de Tesis consiste en la profundización en el estudio del control rotoisomérico de los dímeros de α,γ-ciclopéptidos. Los primeros estudios en este sentido de nuestro grupo de investigación emplearon la formación de puentes salinos entre las cadenas laterales de los α,γ-ciclopéptido (Figura 36).[103] Posteriormente, se emplearon ciclopéptidos funcionalizados con porfirinas para el mismo fin con el objeto de mejorar la sensibilidad por un ligando específico.[104] Con el objetivo de incidir en las propiedades de reconocimiento y control supramolecular, nos propusimos la síntesis de

[58] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.
[60] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. *R. Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.
[62] Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *11*, 5710-5713.
[102] García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3280-3285.
[100] Reiriz, C.; Brea, R. J.; Arranz, R.; Carrascosa, J. L.; Garibotti, A.; Manning, B.; Valpuesta, J. M.; Eritja, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11335-11337.
[88] Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L. Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 1653-1657
[95] Montenegro, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Kalinin, A.; Geckeler, K. E.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491.
[103] Pérez-Alvite, M. J.; Mosquera, M.; Castedo. L.; Granja, J. R. *Amino Acids* **2011**, *41*, 621-628.
[104] Hernández-Eguía, L. P.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Ballester, P.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J*. **2011**, *17*, 1220-1229.

ciclopéptidos funcionalizados con porfirinas y su posterior metalación con elementos como el Zn y el Sn. Esta selección nos permitirá el control rotoisomérico de los sistemas diméricos mediante la formación de complejos tipo *sándwich* con ligandos bidentados de diferentes propiedades. Además, también se estudiarán las propiedades ópticas y electrónicas de este tipo de sistemas. Para ello proponemos llevar a cabo el estudio de los procesos de transferencia electrónica en sistemas heterodiméricos. El requerimiento básico para que este tipo de sistemas funcione eficientemente consiste en la conexión de un dador y un aceptor, foto y electroactivos, a través de un "linker" que controle sus interacciones. El fullereno C_{60} se ha utilizado ampliamente como aceptor de electrones debido a sus propiedades físico-químicas, mientras que como dadores se han utilizado tetratiafulvalenos (TTF), tetratiafulvalenos extendidos (exTTF), porfirinas metaladas o ftalocianinas.[105] Por estas razones, también se propone la síntesis de ciclopéptidos funcionalizados con fullerenos, que permitan la formación de sistemas heterodiméricos de transferencia de carga con los ciclopéptidos funcionalizados con porfirinas, y el estudio sus propiedades espectroscópicas y fotofísicas.

El segundo objetivo de este trabajo de tesis consiste en el estudio de las propiedades de autoensamblaje de nuevos esqueletos ciclopeptídicos con diferentes propiedades. Con tal fin se propuso la incorporación en estos sistemas de autoensamblaje de nuevos aminoácidos cíclicos (Acas).

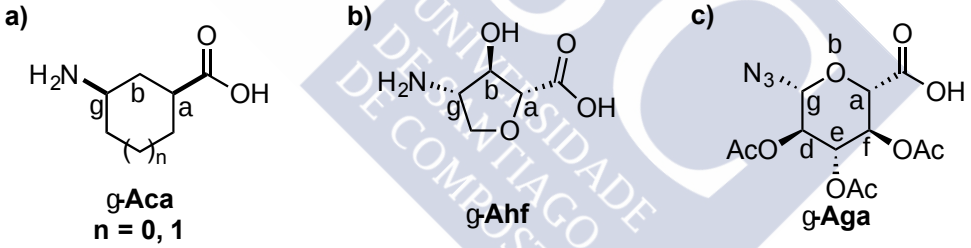


Figura 37: a) Estructura general de los γ-Aca (ácidos *cis*-aminocicloalcanocarboxílicos) donde se señalan las posiciones α, β y γ. b) Ácido 4-amino-3-hidroxifuranocarboxílico (γ-Ahf). c) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-azido-1-deoxy-β-glucopiranurónico (N_3-γ-Aga).

Una de las grandes aportaciones estructurales del uso de los γ-aminoácidos cíclicos en la síntesis de ciclopéptidos es que éstos permiten la modificación de las propiedades de su cavidad sin interferir en el proceso de autoensamblaje gracias a la modificación de la posición β (Figura 37). La orientación del metileno del γ-Acp o γ-Ach hacia la parte interior del ciclo confiere cierto carácter hidrofóbico a la cavidad interna de los nanotubos formados (Figura 37a). Por lo tanto, la modificación de dicha posición es crucial para la modulación de las propiedades internas de los nanotubos.

[105]Enes, R. F.; Cid, J-J.; Hausmann, A.; Trukhina, O.; Gouloumis, A.; Vázquez, P.; Cavaleiro, J. A. S.; Tomé, A. C.; Guldi, D. M.; Torres, T. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1727-1736.

Una forma de acceder a estructuras de γ-aminoácidos funcionalizados en su posición β consiste en la síntesis de aminoácidos derivados de azúcares o SAAs (del inglés *Sugar Amino Acids*) y su uso en la formación de ciclopéptidos. El primer γ-aminoácido funcionalizado en su posición β empleado en nuestro grupo de investigación fue el derivado γ-furanoide; ácido 4-amino-3-hidroxifuranocarboxílico (γ-Ahf) (Figura 37b).[66, 67] Dicho aminoácido posee un grupo hidroxilo en la posición β que se orienta hacia el interior de los ciclopéptidos de los que forma parte, aportando un carácter hidrofílico a la cavidad del complejo supramolecular. Ahora, nos hemos propuesto el diseño, síntesis y estudio de ciclopéptidos que incorporen el ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-azido-1-deoxi-β-glucopiranurónico como precursor de un nuevo γ-aminoácido, el ácido 1-amino-glucurónico o γ-Aga (Figura 37c).

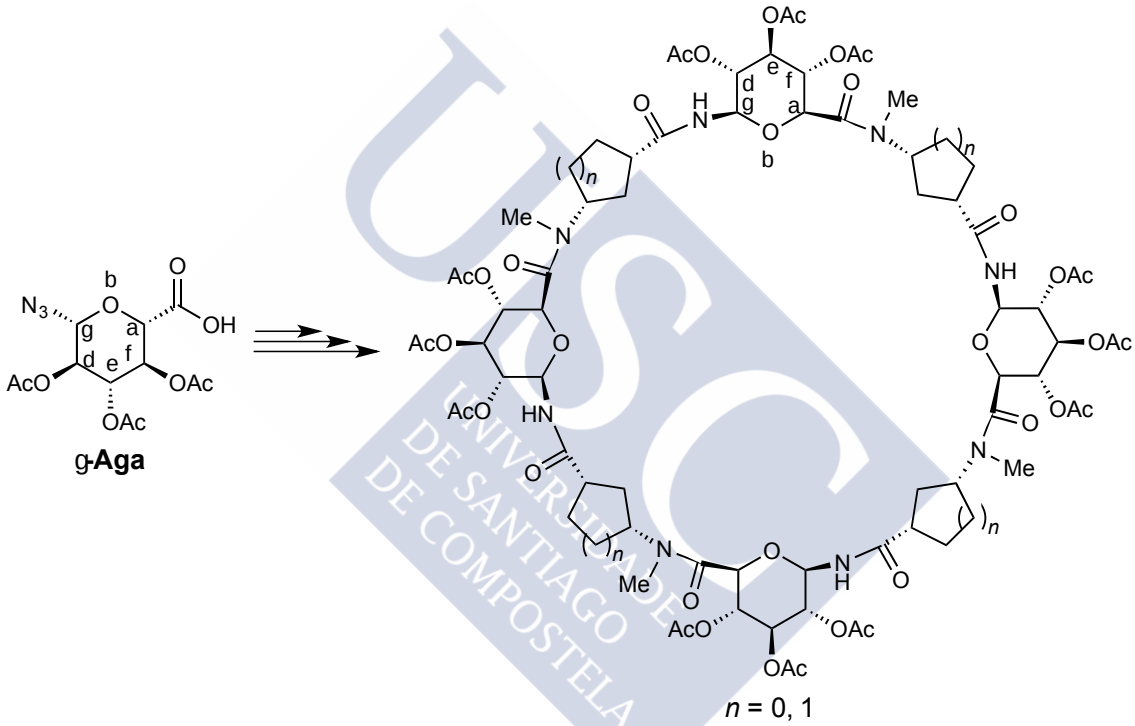


Figura 38: Estructura del ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-azido-1-deoxi-β-glucopiranurónico (izquierda) y modelo de un γ-ciclopéptido que alterna a este derivado con otros γ-Acas.

Este γ-Aca posee un átomo de oxígeno del hemiaminal situado en la posición β del anillo, que se orientará hacia el interior de la cavidad modificando así las propiedades internas de los nanotubos que lo contengan. Además, posee tres grupos hidroxilo en las posiciones δ, ε y φ, que quedarán expuestos hacia el exterior del ciclo, lo que permite modificar la solubilidad de los sistemas peptídicos en diferentes medios.

[66] Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Biomol. Chem*. **2009**, *7*, 4358-4361.
[67] Rodríguez-Vázquez, N.; García-Fandiño, R.; Amorín, M. A.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 183-187.

Por otra parte, también nos propusimos desarrollar nuevos aminoácidos cíclicos que permitan acceder a ciclopéptidos de mayor diámetro y que conserven las propiedades de autoensamblaje. Con tal idea, nos propusimos la síntesis y estudio de una nueva familia de ciclopéptidos que incluyan δ-aminoácidos cíclicos en su estructura, en concreto, el ácido *trans*-aminociclohexanocarboxílico o δ-Ach (Figura 39).

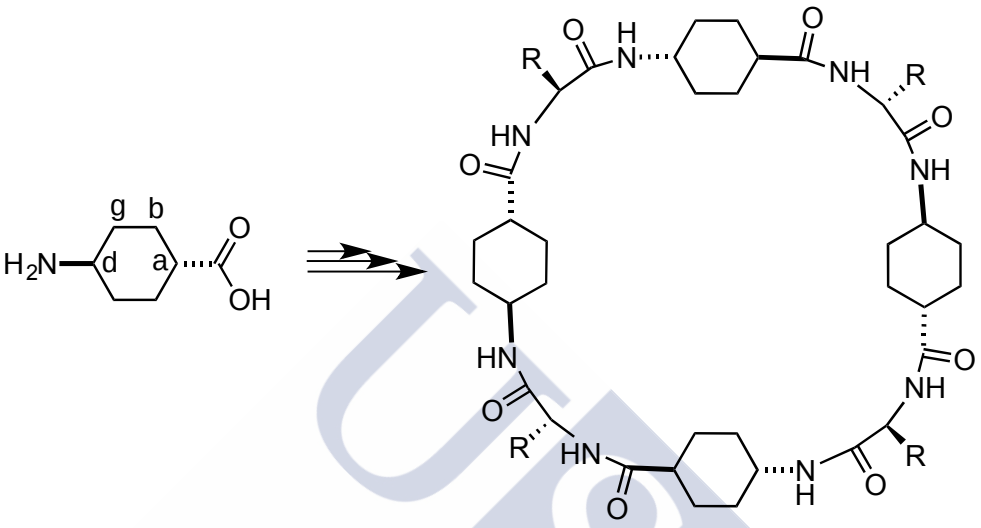
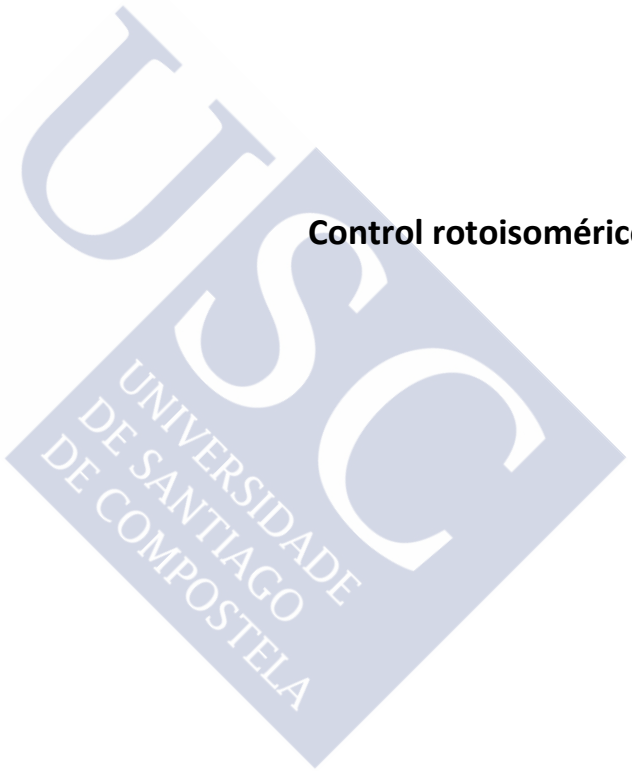


Figura 39: Representación del δ-Ach y prototipo de estructura de un α,δ-ciclopéptido.

La principal característica de este aminoácido es que los grupos amino y carboxílico están orientados en sentido opuesto formando un ángulo de 180**°,** lo cual convierte a este aminoácido en el candidato ideal para actuar como listón o elongador lineal rígido, pudiendo así formar ciclopéptidos de grandes diámetros (superiores a 20 Å) que conserven su planaridad. Aunque dicha característica lo imposibilita para su uso exclusivo en la formación de ciclopéptidos, lo convierte en un gran candidato para formar ciclopéptidos en el que se alternen con α o γ-aminoácidos. Adicionalmente, los δ-Ach tienen metilenos en las posiciones γ y β que están expuestos hacia la cavidad interna del ciclopéptido, aportando un mayor carácter hidrofóbico a la cavidad interna del nanotubo.



Control rotoisomérico de dímeros

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Como hemos visto en la introducción de esta memoria de tesis, los hexapéptidos que carecen de simetría C_3 o los octapéptidos que carecen de simetría C_4 forman diferentes dímeros no equivalentes entre sí, a los que denominamos rotodímeros debido a que su interconversión se produce cuando rotamos uno de los ciclopéptidos con respecto al otro. Por otra parte, cualquier ciclopéptido *c*-[(*L*-α-Aa-*D*-γ-Aca-)$_n$] posee simetría $\boldsymbol{C_n}$, y por lo tanto puede autoensamblarse para formar ***n*** dímeros idénticos.[61, 103] Por ejemplo, para un hexapéptido cíclico no simétrico, existen tres posibles dímeros (rotodímeros) no equivalentes entre sí (Figura 40). La relación entre los diferentes rotodímeros es función de las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos, el rotoisómero que posea las interacciones entre cadenas laterales más favorables prevalecerá sobre los demás.

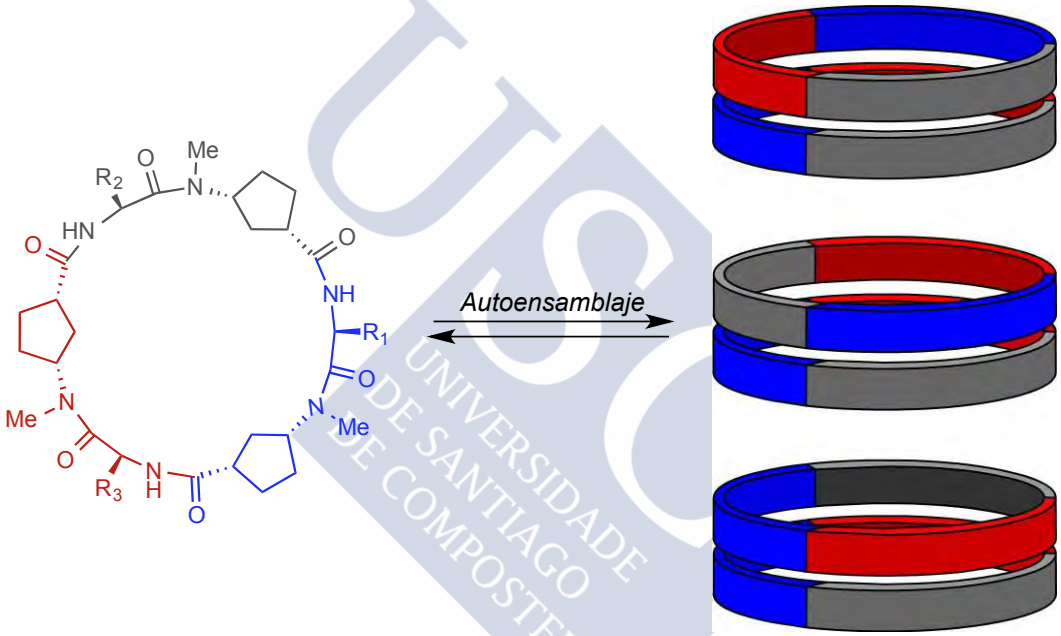


Figura 40: Esquema que muestra los tres posibles rotodímeros que un α,γ-hexapéptido cíclico puede formar mediante el autoensamblaje del mismo.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se estudiaron las interacciones entre las cadenas laterales de los α-aminoácidos que podrían llevar al control rotoisomérico en la formación de dímeros. Así se descubrió que el hexapéptido *c*-[*L*-Ser-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-(*L*-Phe-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$] formaba tres especies diméricas con una relación 1:1:2, siendo la mayoritaria aquella en la que las serinas de cada ciclopéptido se encontraban enfrentadas, posiblemente como consecuencia de la formación de un enlace de hidrógeno entre las mismas. Posteriormente se realizaron estudios adicionales para el octapéptido *c*-[(*L*-Ser-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-*L*-Phe-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$], en el que uno de sus

[61] Amorín, M.; Villaverde, V.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2005**, *15*, 87-92.

[103] Pérez-Alvite, M. J.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Amino Acids* **2011**, *41*, 621-628.

rotoisómeros podría formar dos interacciones de enlace de hidrógeno entre las serinas, provocando que dicha especie fuese la mayoritaria en la relación entre los rotodímeros. Sin embargo los resultados fueron los contrarios a lo esperado, siendo la forma mayoritaria aquella en la que las serinas no se encuentran enfrentadas, con una relación de 14:1.[104] Este extraño comportamiento fue atribuido a una combinación de factores como la baja tendencia de la serina a formar láminas β en comparación con la fenilalanina.[106] Debido a esto, se diseñaron nuevas aproximaciones para el control rotisomérico entre dímeros, basándose de nuevo en el uso de las interacciones entre las cadenas laterales de los α-aminoácidos, pero añadiendo un componente externo que sea capaz de formar interacciones adicionales con las mismas.

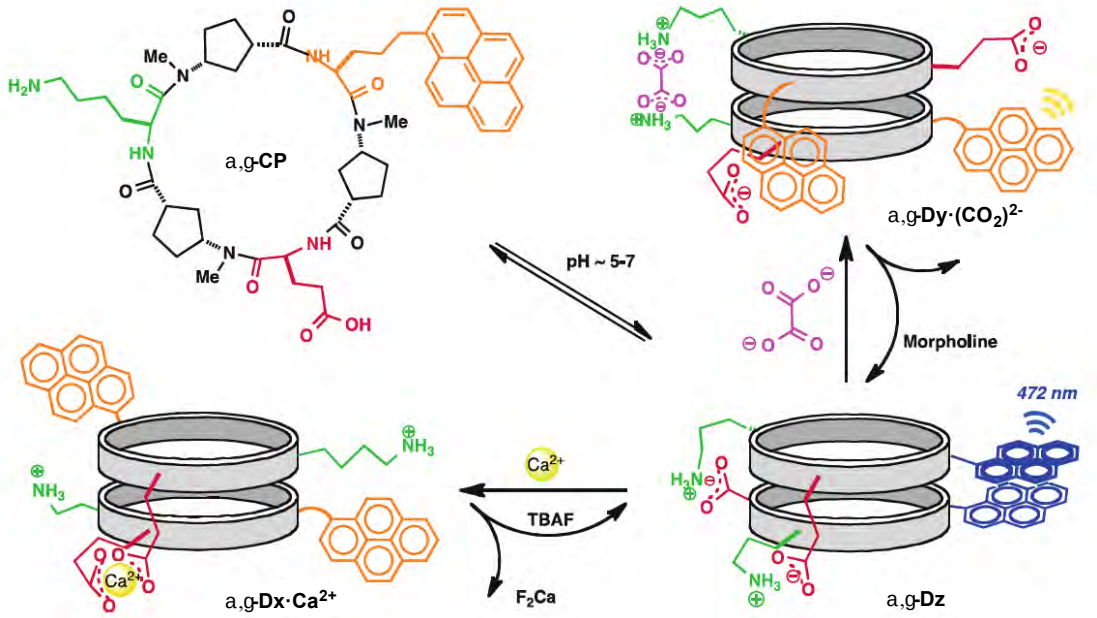


Figura 41: Representación de la interconversión entre dímeros mediante la adición de diferentes agentes químicos cuya interacción con alguno de los grupos funcionales de las cadenas laterales de los ciclopéptidos induce la formación mayoritaria de un rotoisómero.

La primera aproximación usaba la formación de puentes salinos entre las cadenas laterales de los ciclopéptidos. Para ello se diseñó el α,γ-ciclopéptido *c*-[*L*-Pap-*D*-^{Me}*N*-Acp-*L*-Glu-*D*-^{Me}*N*-Acp-*L*-Lys-*D*-^{Me}*N*-Acp],[107] que además de poseer un grupo ácido y un grupo amino en sus cadenas laterales (glutámico y lisina) también tenía un aminoácido derivatizado con un grupo pireno que actuaba como una sonda que permitía seguir el proceso de autoensamblaje supramolecular. La aparición de la típica banda de excímero del pireno en los estudios de fluorescencia indicaba que el péptido formaba el dímero

[104] Hernández-Eguía, L. P.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Ballester, P.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1220-1229.
[106] Muñoz, V.; Serrano, L. *Proteins* **1994**, *20*, 301–311.
[107] Pap es el ácido 2-amino-5-(piren-1-il)pentanoico.

en disolución, donde la especie mayoritaria era aquella en la que los pirenos se encontraban próximos en el espacio o eclipsados (Figura 41, α,γ-Dz). La adición de compuestos químicos externos que pudiesen interaccionar con los carboxilatos, como los cationes divalentes (Ca^{2+}, Ba^{2+} o Mg^{2+}) hacía desaparecer la banda de excímero como consecuencia de la formación preferente del dímero en el que las cadenas laterales de los glutámicos estaban coordinados con dichos cationes (Figura 41, α,γ-Dx·Ca^{2+}). Alternativamente, la adición de ácidos dicarboxílicos como el oxálico desplazaba el equilibrio hacia el dímero α,γ-Dy·$(CO_2)^{2-}$ en el que las dos se encontraban enfrentadas formando un puente salino con el ácido oxálico.

Otra alternativa consistió en el uso de interacciones más selectivas y eficientes, como aquellas que se dan entre las porfirinas de Zn(II) y los ligandos diamínicos.[108] Para ello fue necesario funcionalizar un α,γ-octapéptido cíclico con porfirinas metaladas con Zn (II).[104] Es conocido que los ligandos bidentados pueden formar complejos tipo "sándwich" con las porfirinas cuando estas se hayan unidas mediante un linker de suficiente longitud. Para tal fin, se funcionalizó el péptido *c*-[(*L*-Ser-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-*L*-Phe-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$] con una o dos porfirinas a través de las cadenas laterales de las serinas, y se estudió su comportamiento en disolución en presencia de la 1,4-diazabiciclo[2.2.2]-octano (DABCO) mediante estudios de UV.

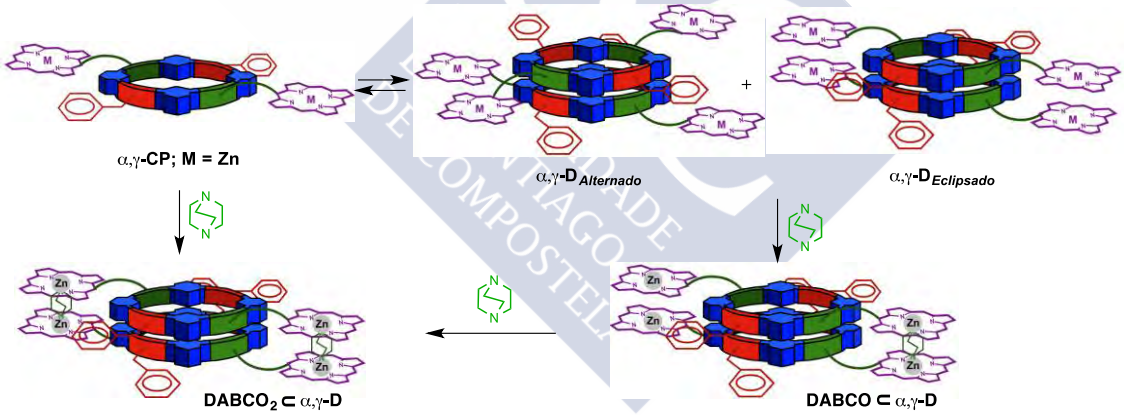


Figura 42: Equilibrio dimérico del ciclooctapéptido funcionalizado con dos porfirinas, mostrando sus dos posibles rotodímeros (alternado y eclipsado). Sólo el dímero eclipsado posee la geometría adecuada para formar el complejo "sándwich" entre las dos porfirinas y el DABCO.

En los estudios de este sistema se observó la formación de un complejo tipo "sándwich" con estequiometría 1:1 (dímero:DABCO) para el ciclopéptido con una sola porfirina, y de 1:2 para el ciclopéptido funcionalizado con dos porfirinas. Los complejos formados eran estables frente a la adición de grandes cantidades de ligando. En el caso del ciclopéptido

[108] Ballester, P.; Costa, A.; Castilla, A. M.; Deyà, P. M.; Frontera, A.; Gomilla, R. M.; Hunter, C. A. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2196-2206.
[104] Hernández-Eguía, L. P.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Ballester, P.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1220-1229.

funcionalizado con dos porfirinas, se observó una cierta cooperatividad, ya que era necesario añadir dos equivalentes de ligando para que el equilibrio se desplazase hacia el rotodímero eclipsado, lo que parece indicar que una vez que se coordinaba la primera molécula de DABCO, la segunda se coordinaba con mayor facilidad gracias a la preorganización existente (Figura 42).

Otra aproximación al control rotodimérico partía de la complejación de diferentes metales a los hexapéptidos cíclicos a través de cadenas laterales convenientemente funcionalizadas con grupos fosfina o piridina.[109] Se estudiaron dichos ciclopéptidos mediante su complejación con Au o Pd, lo que restringió la interconversión entre rotodímeros formándose predominantemente uno de los tres posibles.

Partiendo de esta base, decidimos extender el estudio del control rotoisomérico mediante el uso de porfirinas a sistemas de menor tamaño como los α,γ-hexapéptidos cíclicos, para lo cual diseñamos el ciclopéptido c-[*L*-Ser(CTPP)-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$],[110] en el que los γ-Acp se alternan con dos fenilalaninas y una serina. La porfirina se enlazaría al ciclopéptido a través de la cadena lateral de la serina mediante una unión éster.

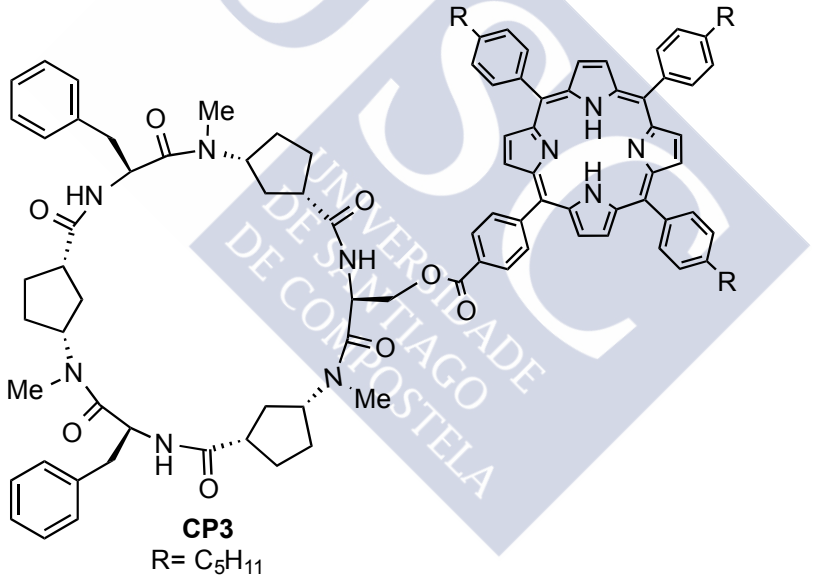


Figura 43: Representación del péptido c-[*L*-Ser(CTTP)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (**CP3**) funcionalizado con una porfirina a través de la cadena lateral de la serina.

Para la construcción del péptido **CP3** decidimos usar una síntesis convergente en disolución, para lo cual fue necesario seleccionar los grupos protectores ortogonales adecuados.[111] La protección del grupo amino tanto de los α- como los γ-aminoácidos se llevó a cabo con el grupo *tert*-butiloxicarbonil (Boc),[112] el cual es estable frente a bases y

[109] Panciera, M.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4826-4834.
[110] CTTP es el ácido 4-(10,15,20-tris(4-pentilfenil)porfirin-5-il)benzoico.
[111] Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.
[112] Anderson, G. W.; Alberston, N. F. *J. Am. Chem. Soc*. **1957**, *79*, 6180-6183.

nucleófilos, además de a hidrogenaciones catalíticas. Las condiciones más comunes para la desprotección del Boc son mezclas del 25% al 50% de ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano,[113] aunque también se han utilizado disoluciones de cloruro de trimetilsililo (1M en fenol/CH_2Cl_2),[114] disolución de ácido clorhídrico (4M en dioxano) o ácido metanosulfónico (2M en dioxano).[115] Además de la amplia disponibilidad comercial de los α-aminoácidos con este grupo protector, la protección de los γ-aminoácidos se realiza fácilmente mediante tratamiento con di-*tert*-butil dicarbonato (anhídrido de Boc) y DIEA.

El grupo ácido de los γ-aminoácidos se protegió como éster de 9-fluorenimetanol (Fm).[116] Este es un grupo estable frente a los ácidos, aunque no resiste bien las condiciones de las hidrogenaciones catalíticas con Pd/C. La forma más común de eliminarlo es empleando aminas secundarias (piperazina o piperidina) en disolventes orgánicos,[117] aunque también se han descrito condiciones con dimetilacetamida (DMA) o disoluciones de morfolina en amoniaco líquido o fluoruro de tetrametilamonio.[118]

Por último, los protectores de las cadenas laterales deben ser resistentes tanto a los medios ácidos como a los básicos. En la síntesis de **CP3**, el único aminoácido que necesita un grupo protector en su cadena lateral es la *L*-serina, y está disponible comercialmente protegida en forma de éter bencílico. Aunque es un grupo sensible a ácidos fuertes como el HF, resiste tratamientos prolongados con TFA/CH_2Cl_2, y la manera más común de eliminarlo es mediante hidrogenólisis.[119]

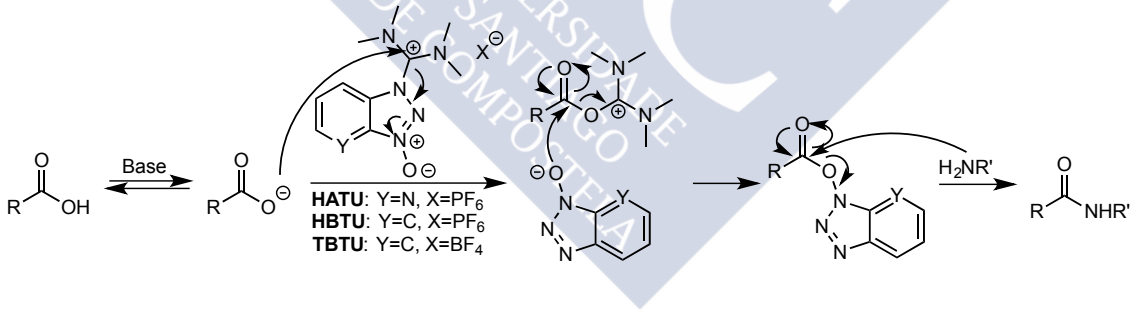


Figura 44: Mecanismo de activación de ácidos carboxílicos mediante el uso de sales de guanidinio/amidinio para su posterior acoplamiento con otro aminoácido para dar lugar a la formación del enlace peptídico.

[113] Merrifield, R. B. *Adv. Enzymol.* **1969**, *32*, 221-296.
[114] Kaiser, E.; Picart, F.; Kubiak, T.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5167-5175.
[115] Stewart, J. M.; Young, J. D. *Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed*.; Pierce Chemical Company: Rockford, IL, USA, **1984**.
[116] Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
[117] Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*. **1978**, *13*, 537-539.
[118] Butwell, F. G. W.; Haws, E. J.; Epton, R. *Makromol. Chem., Macromol. Symp*. **1988**, *19*, 69.
[119] Yamashiro, D.; Li, C. H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1972**, *4*, 181-185.

Existe una amplia variedad de reactivos de acoplamiento para la síntesis de péptidos.[120] En nuestro grupo de investigación se han utilizado para tal fin sales de guanidinio/amidinio (el *N*-isómero es mayoritario, aunque menos reactivo que el *O*-isómero) cuyo mecanismo de acción consiste en la activación del grupo ácido mediante la formación de un éster activo del *N*-hidroxibenzotriazol (Figura 44).

La síntesis del *D*-Boc-γ-Acp-OH (Ácido (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclopentano-1-carboxílico, **5**) se realizó a partir de la lactama de Vince (2-azabiciclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona, **1**). El primer pasó consistió en la apertura de la lactama mediante una hidrólisis ácida, por tratamiento con una disolución acuosa de HCl (10%) durante veinticuatro horas, obteniéndose el hidrocloruro del ácido *cis*-4-aminociclopent-2-eno carboxílico (HCl.H-Ace-OH, **2**) en forma racémica con un rendimiento cuantitativo. Después se protegió el grupo amino por tratamiento con anhídrido de Boc (dicarbonato de di-*t*-butilo) y DIEA en una mezcla de H_2O/Dioxano (1:1) durante tres horas, para obtener el ácido *cis*-4-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclopent-2-eno-1-carboxílico (Boc-γ-Ace-OH), el cual se purificó mediante cristalización de una disolución de $CHCl_3$/hexano (3:1). Posteriormente, se llevó a cabo la resolución de la mezcla racémica, para lo cual se cristalizó el γ-aminoácido racémico en presencia de la (-) 1-fenil-1-etanamina (0.7 equivalentes), en una disolución $CHCl_3$/Hexano (1:1). Este último paso se repitió hasta tres veces, incrementando los equivalentes de amina (hasta 1 equivalente) y la concentración de $CHCl_3$ (hasta el 100%) progresivamente, hasta obtener el ácido (*1R,4S*)-4-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclopent-2-eno-1-carboxílico (Boc-*D*-γ-Ace-OH, **3**) con un exceso enantiomérico superior al 98% (Figura 45). La obtención del enantiómero Boc-*L*-γ-Ace-OH (**4**) se utilizaron las mismas condiciones de cristalización empleando la amina de quiralidad contraria, la (+) 1-fenil-1-etanamina.

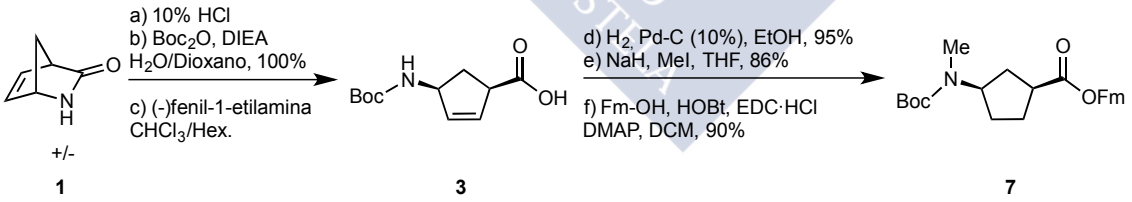
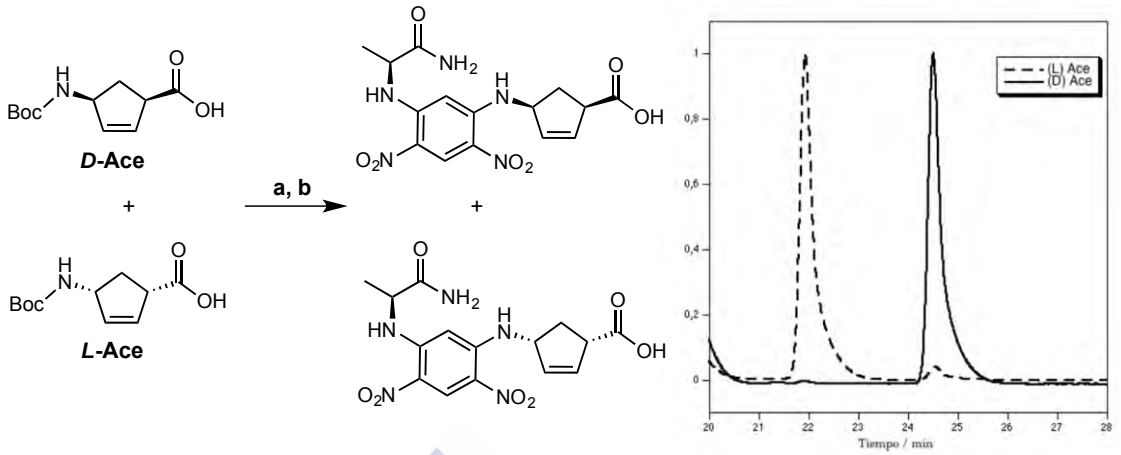


Figura 45: Esquema sintético para la obtención del (9H-fluoren-9-il)metil (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)(metil) amino]-ciclopentano-1-carboxilato (*D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm, **7**) a partir de la Lactama de Vince (**1**).

Para conocer con exactitud el exceso enantiomérico del Boc-γ-Ace-OH se llevó a cabo el Test de Marfey,[121] el cual consiste en la derivatización del γ-aminoácido con el reactivo quiral 1-Fluoro-2,4-dinitrofenil-5-*L*-Alaninamida (reactivo de Marfey) y posterior análisis mediante HPLC en fase reversa. Tras la derivatización, los enantiómeros pasan a ser diastereoisómeros con diferentes tiempos de retención (Figura 46). Mediante la

[120] El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.
[121] Marfey, P. *Calsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.

integración de las señales de cada especie se pudo hallar la relación entre cada uno de los enantiómeros del Boc-γ-Ace-OH.



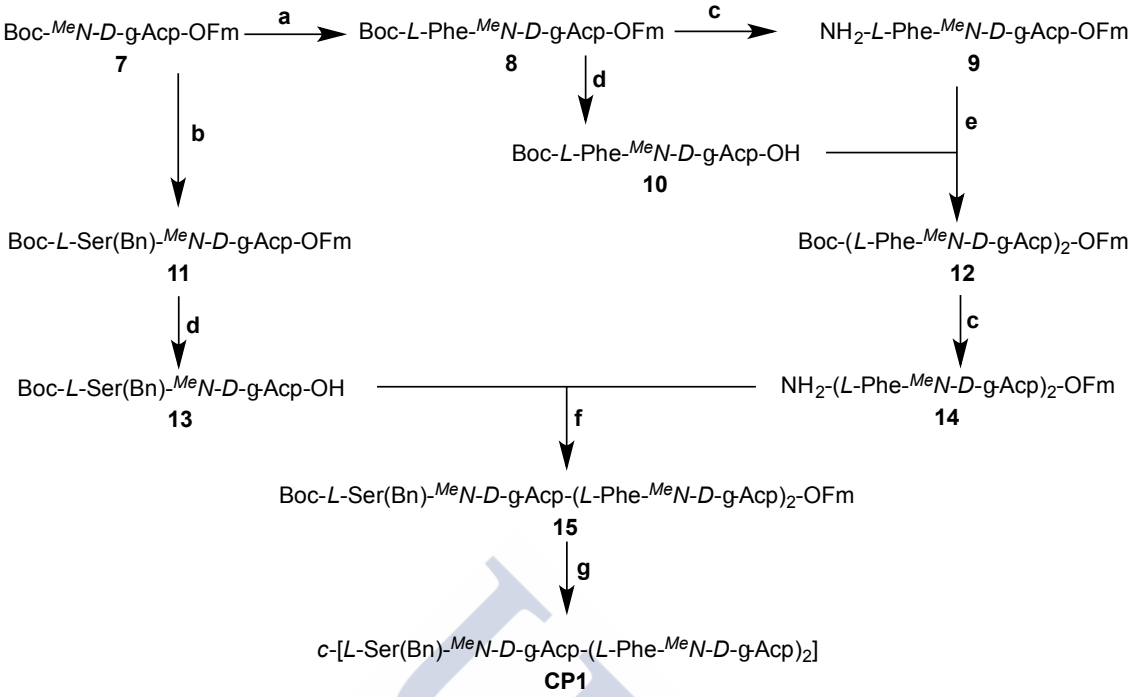
Reactivos: **a**) TFA/CH_2Cl_2 (1:1); **b**) 1-Fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-Alanina, $NaHCO_3$, H_2O/Acetona (1:1).
Condiciones HPLC: Columna analítica C18 (25.0x4.0 mm), gradiente lineal de 20% a 40% de B en 60 min (A: H2O·0.1%TFA, B: MeCN·0.1%TFA)

Figura 46: (izquierda) Derivatización del Boc-γ-Ace-OH utilizando el reactivo de Marfey. (derecha) Cromatogramas obtenidos con el test de Marfey para una mezcla de enantiómeros *D/L*-Boc-γ-Ace-OH enriquecidas en el enantiómero *D* (línea continua) o en el enantiómero *L* (línea discontinua).

Una vez obtenido el *D*-Ace en forma enantioméricamente pura, se redujo el doble enlace mediante una hidrogenación catalítica con Pd/C (10%) en etanol con una carga de catalizador entre 0.05 y 0.1 equivalentes, obteniéndose el ácido (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclopentano-1-carboxílico (Boc-*D*-γ-Acp-OH, **5**) con un rendimiento superior al 95%. Posteriormente se realizó la metilación del grupo amino utilizando hidruro sódico como base y ioduro de metilo como agente alquilante, para conseguir el Boc-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-OH (ácido (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)(metil)amino]-ciclopentano-1-carboxílico, **6**) con un rendimiento del 86% (Figura 45).

Por último, se protegió el grupo ácido del Boc-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-OH (**6**) como éster de fluorenilmetanol, empleando 9-fluorenilmetanol (o (9-hidroximetil)-fluoreno), DMAP, EDC·HCl y HOBt en CH_2Cl_2, obteniendo el Boc-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-OFm (**7**) con un rendimiento del 90%.

Como se muestra en la Figura 47, la síntesis del péptido comenzó con la formación de los dipéptidos Boc-*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-OFm (**8**) y Boc-*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-OFm (**11**). Para ello se desprotegió el grupo amino del γ-Acp por tratamiento con TFA/DCM (1:1) durante treinta minutos y después se acoplaron los α-aminoácidos mediante la preactivación con *N*-HATU y DIEA en diclorometano, para obtener los dipéptidos con rendimientos del 78% para el compuesto **8** y del 73% para el compuesto **11**.



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1), 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Phe-OH, DCM, 78%; **b**) 1. TFA/DCM (1:1), 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Ser(Bn)-OH, DCM, 73%; **c**) TFA/DCM (1:1); **d**) Piperidina/DCM (2:8), **e**) *N*-HBTU, DIEA, DCM, 95%; **f**) *N*-HBTU, DIEA, DCM, 96%; **g**) 1. Piperidina/DCM (2:8), 2. TFA/DCM (1:1), 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM, 78%.

Figura 47: Esquema sintético seguido para la obtención del péptido c-[*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (**CP1**).

El siguiente paso fue la formación del tetrapéptido Boc-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp)$_2$-OFm (**12**), para lo que se tomaron dos fracciones del dipéptido **8**. Un de estas fracciones se trató con una disolución de piperidina en diclorometano (20%) durante media hora para eliminar el grupo protector del extremo ácido, dando lugar al intermedio **10**. Por otro lado, la segunda fracción se trató con la mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1) para desproteger el extremo amino, obteniéndose el intermedio **9**. Ambos intermedios se acoplaron empleando *N*-HBTU como agente acoplante en medio básico (DIEA) en CH_2Cl_2, obteniéndose el péptido deseado **12** con un 95% de rendimiento.

Para la obtención del hexapéptido lineal Boc-[*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp)$_2$]-OFm (**15**) se siguió una estrategia muy similar. El extremo ácido del dipéptido **11** se trató con una disolución de piperidina en diclorometano (20%) para dar el intermedio **13**, mientras que el extremo amino del tetrapéptido **12** se desprotegió con la mezcla TFA/CH_2Cl_2. Igual que en el caso anterior, el acoplamiento de los intermedios **13** y **14** se llevó a cabo utilizando *N*-HBTU como agente de acoplamiento y DIEA en CH_2Cl_2, obteniéndose el péptido **15** deseado con un rendimiento del 96%.

Por último, se llevó a cabo la ciclación del péptido **15** para obtener el ciclopéptido *c*-[*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-)$_2$] (**CP1**), que se realizó desprotegiendo ambos extremos en las mismas condiciones que los péptidos lineales, y posterior ciclación empleando *N*-TBTU y DIEA en CH_2Cl_2 en condiciones de alta dilución (1 mM) para evitar

reacciones intermoleculares. De esta forma se obtuvo el ciclopéptido **CP1** con un rendimiento del 78%.

El análisis de la zona aromática del espectro de ^{1}H-RMN del ciclopéptido **CP1** nos mostró tres grupos de señales a 8.62 (1.44 H), 8.43 (1.35 H) y 8.17 (0.34 H) ppm, lo que indica que el ciclopéptido en disolución forma tres dímeros no equivalentes (Figura 48). A través del análisis de RMN bidimensional (COSY) pudimos observar que las tres formas se encuentran en proporción equimolecular.

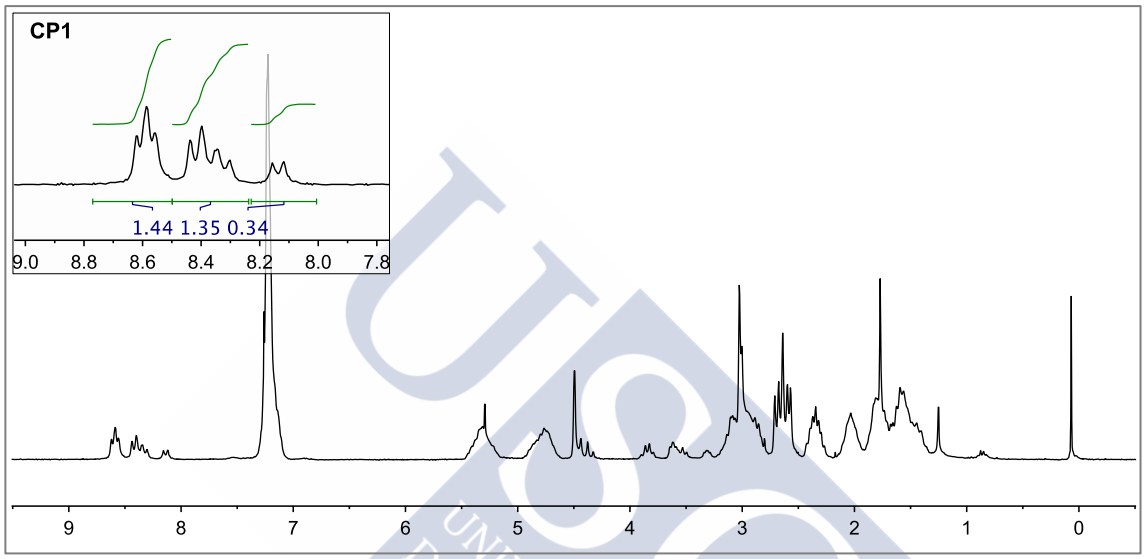


Figura 48: Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de **CP1**. En el recuadro se puede observar una ampliación entre 7.8 y 9.0 ppm, donde se encuentran las señales correspondientes con los protones amídicos y sus integrales.

La funcionalización del péptido **CP1** con la porfirina CTTP se realizó a través de la cadena lateral de la serina. En primer lugar se eliminó el grupo bencilo a través de una hidrogenólisis, empleando $Pd(OAc)_2$ como catalizador con una carga de 0.1 equivalentes en una mezcla de disolventes de $MeOH/CH_2Cl_2$, para obtener el péptido desprotegido (**CP2**) con un rendimiento del 96%.[122] Posteriormente se introdujo la 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-pentilfenil)porfirina (CTTP) a través de la formación de un éster entre el grupo hidroxilo de la serina y el ácido carboxílico de la porfirina usando la combinación de DIC y HOBt como reactivos de acoplamiento en presencia de DMAP como base.

Las porfirinas son una familia de heteromacrociclos planos con 18 electrones π compuestos por cuatro anillos de pirrol enlazados a través de cuatro carbonos sp^2, y son, sin duda, el pigmento más importante que se encuentra en la naturaleza.[123] Las porfirinas poseen ciertas ventajas sobre otros compuestos electro y fotoactivos, ya que poseen altos coeficientes de absortividad molar, y una alta capacidad para dar lugar a

[122] Felpin, F-X.; Fouquet, E. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12440-12445.
[123] Tanaka, T.; Osuka, A.; *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 943-969.

procesos rápidos de transferencia de energía o electrónica. Otra de sus ventajas es la posibilidad de modificar los sustituyentes en posición *meso* y *beta*, o los nitrógenos internos mediante la coordinación de átomos metálicos (Figura 49). Gracias a estas características, se han usado para el desarrollo de receptores artificiales para el reconocimiento molecular,[124,] como catalizadores quirales para síntesis asimétrica,[125] para la exploración de mecanismos de importancia biológica como la fotosíntesis,[126,127] e incluso como catalizador de reacciones redox.[128,129]

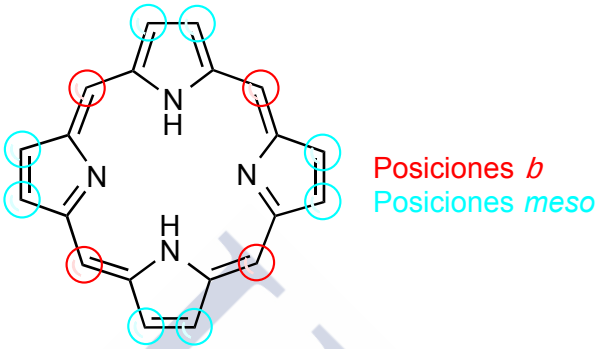


Figura 49: Posiciones funcionalizables en las porfirinas.

La porfirina empleada en este trabajo fue sintetizada en el grupo de Pablo Ballester utilizando la metodología descrita para la síntesis de porfirinas asimétricas (Figura 50).[130,131] El primer paso de la síntesis fue la obtención del 4-pentilbenzaldehído mediante el tratamiento de 4-pentilbenceno con hexametil tetramina en TFA a 100 °C durante dos horas. El siguiente paso fue la formación de la porfirina mezclando 4-pentilbenzaldehído, 5-formilbenzoato de metilo y pirrol en una disolución de CH2Cl2 y EtOH, en presencia de $BF_3{\cdot}Et_2O$ como ácido de Lewis, y tras el correspondiente tratamiento con DDQ, se obtuvo la porfirina **16** con el grupo ácido protegido con un 7.5% de rendimiento. El último paso fue la desprotección del ácido carboxílico mediante una hidrólisis básica del éster metílico empleando hidróxido potásico en una mezcla de H_2O y THF a 90 °C durante catorce horas.

[124] Ogoshi, H.; Mizutani, T. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31,* 81-89.
[125] Fackler, P.; Huber, S. M.; Bach, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12869-12878.
[126] Wasielewski, M. R. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 435-461.
[127] Peng, H. Q.; Niu, L. Y.; Chen, Y. Z.; Wu, L. Z.; Tung, C. H.; Yang, Q. Z. *Chem. Rev*. **2015**, *115*, 7502-7542.
[128] Konishi, K.; Oda, K-I.; Nishida, K.; Aida, T.; Inoue, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992, *114*, 1313-1317**.
[129] Fackler, P.; Berthold, C.; Voss, F.; Bach, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *132*, 15911-15913.
[130] Lindsey, J. S; Hsu, H. C.; Shreiman, I. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 827-836.
[131] Forneli, A.; Planells, M.; Sarmentero, M. A.; Martínez-Ferrero, E.; O'Regan, B. C.; Ballester, P.; Palomares, E. *J. Mater. Chem*. **2008**, *18*, 1652-1658.

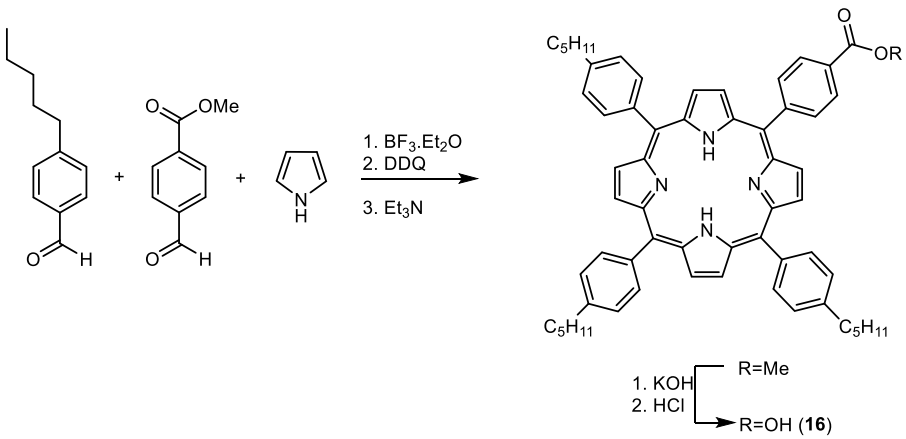


Figura 50: Síntesis del ácido 4-(10,15,20-tris(4-pentilfenil)porfirin-5-il)benzoico (CTTP, **16**).[131]

La unión de la porfirina a través de la cadena lateral de la serina se realizó empleando las condiciones de formación de ésteres ampliamente utilizadas en nuestro grupo de investigación, empleando HOBt y DIC como agentes de acoplamiento y DMAP como base, según se ilustra en la Figura 51, para obtener el híbrido ciclopéptido-porfirina (**CP3**) con un rendimiento del 60%. Por último, se metaló la porfirina empleando $Zn(OAc)_2$ en una mezcla MeOH/DCM para dar lugar al compuesto **CP3$_{Zn}$** con un rendimiento del 89% (Figura 51).

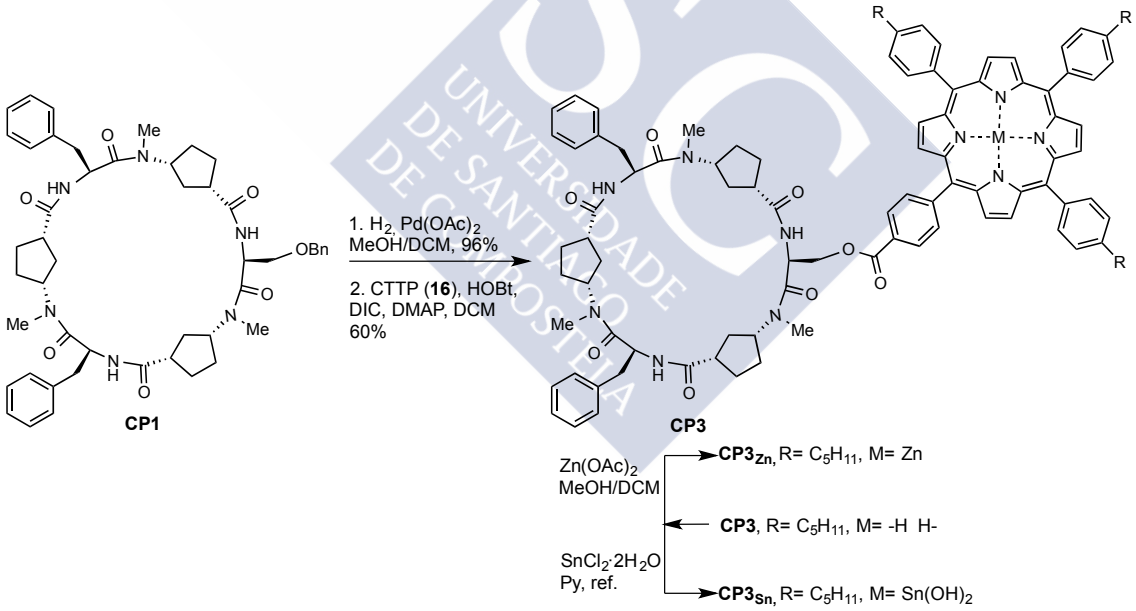


Figura 51: Síntesis del ciclopéptido funcionalizado con la porfirina CTTP (**CP3**) a partir de **CP1** y metalación posterior para la obtención de **CP3$_{Zn}$** y **CP3$_{Sn}$**.

Las señales de los espectros de ^{1}H-RMN de los ciclopéptidos **CP1**, **CP2** y **CP3** en disolventes apolares ($CDCl_3$, CD_2Cl_2) eran invariables con la concentración, por lo que en base a estudios anteriores del grupo asignamos un valor de $K_a \approx 10^5$-10^6 M^{-1} para dichos

ciclopéptidos en disolventes apolares.[88] Todos los ciclopéptidos dieron lugar en disolución a la mezcla de los tres rotodímeros (Figura 52). En el caso de los ciclopéptidos **CP3** y **CP3$_{Zn}$** fue difícil determinar su relación ya que las señales de los protones amídicos se encontraban solapadas con las señales de los pirroles y fenilos de la porfirina. De todas formas, la complejidad de las señales de estos grupos nos hizo suponer que existe un equilibrio entre los tres dímeros como el que se ilustra en la Figura 53 aunque no se pudo determinar su relación.

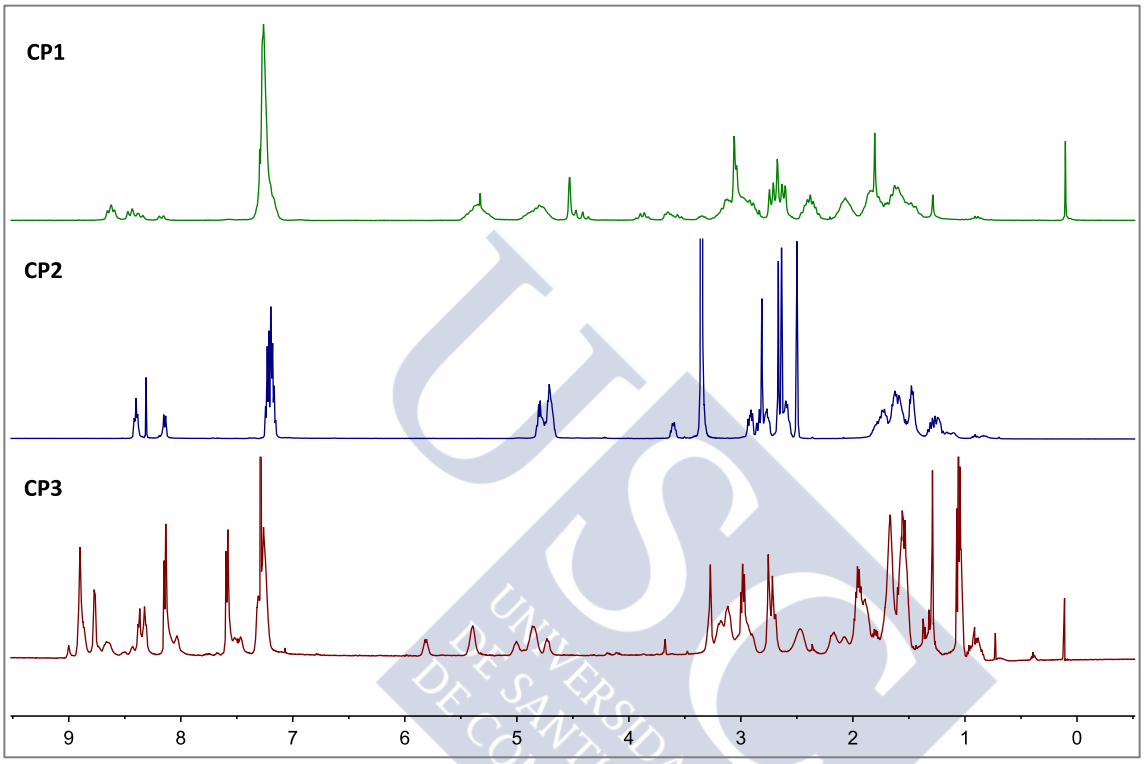
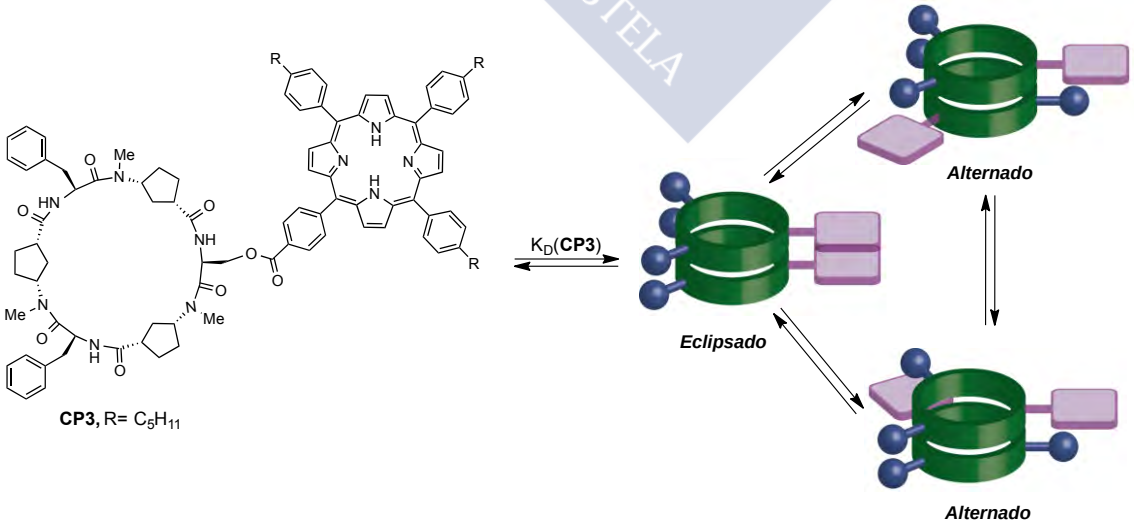


Figura 52: Espectros de ^{1}H-RMN de **CP1** ($CDCl_3$), **CP2** ($DMSO_{d6}$) y **CP3** ($CDCl_3$).



[88] Brea, R. J; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1653-1657.

Figura 53: Representación esquemática de los tres posibles rotodímeros del ciclopéptido **CP3** en disolución.

Estudios previos del grupo de Ballester sobre la coordinación de DABCO con Zinc(II)-bisporfirinas unidas a través de espaciadores covalentes mostraban la formación de complejos tipo sándwich estables de estequiometría 1:1, que se abrían con la adición de mayores cantidades de la diamina.[108] Experimentos posteriores en nuestro grupo de investigación para péptidos funcionalizados con una y dos porfirinas (Figura 42) mostraron un comportamiento similar para la coordinación de una o dos moléculas de DABCO.[104]

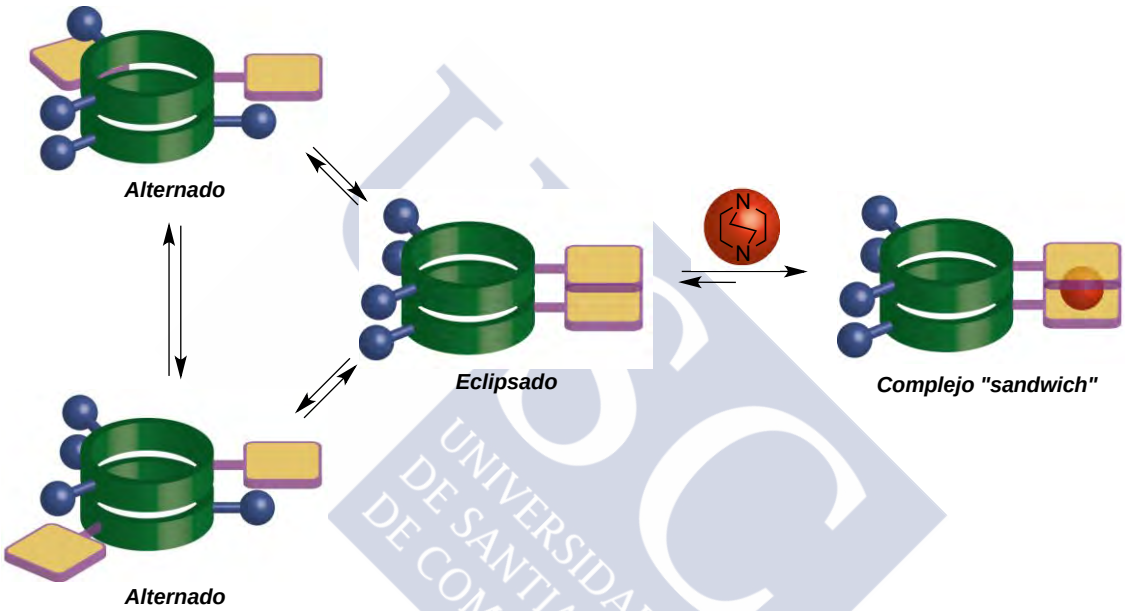


Figura 54: Representación del equilibrio rotodimérico de **CP3$_{Zn}$** y formación del complejo "sándwich" entre el rotodímero eclipsado y una molécula de DABCO (esfera roja).

Los primeros estudios de la coordinación entre el dímero de **D3$_{Zn}$** (el dímero formado por el ciclopéptido **CP3$_{Zn}$** en disolución) y el DABCO se llevaron a cabo mediante mediciones en el UV/Vis usando $CDCl_3$ como disolvente. En estos experimentos la concentración de partida del péptido fue de 10^{-6} M (1 mL), y el "guest" (DABCO) fue añadido en pequeñas alícuotas de 25 µL (con una concentración de $4x10^{-5}$ M), por lo que la concentración de péptido apenas varió, aunque de todas formas la variación de la concentración se tuvo en cuenta para el cálculo de la constante de asociación. Dadas las altas constantes de asociación para sistemas similares, asumimos que a esa concentración el ciclopéptido estaba formando dímeros, y por tanto se estimó una

[108] Ballester, P.; Costa, A.; Castilla, A. M.; Deyà, P. M.; Frontera, A.; Gomilla, R. M.; Hunter, C. A. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2196-2206.
[104] Hernández-Eguía, L. P.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Ballester, P.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1220-1229.

concentración de **D3$_{Zn}$** de $0.5 \cdot 10^{-6}$ M. Por otra parte, de los tres dímeros posibles sólo uno de ellos, el eclipsado, podría formar el complejo sándwich (Figura 54). Por lo tanto, la coordinación con el Zn desplazaba el equilibrio hacia la especie que permite formar el complejo sándwich, lo que nos permitió conocer la especie existente en disolución.

La adición de un equivalente de DABCO daba lugar a un significativo aumento de la intensidad y un leve desplazamiento batocrómico (de 424 nm a 426 nm) de la banda Soret, indicando la formación del complejo sándwich con estequiometria 1:1 entre el dímero **D3$_{Zn}$** y el DABCO (Figura 55). Este resultado era acorde con los obtenidos anteriormente en nuestro grupo, pero no lo era con respecto a los resultados obtenidos para bisporfirinas unidas covalentemente,[108] que muestran desplazamientos batocrómicos mayores (5-10 nm) relacionados con el apilamiento cofacial de las porfirinas. El hecho de que el desplazamiento sea menor podría suponer que el dímero se encontraba ya mayoritariamente en su forma eclipsada antes de la adición de DABCO. La posterior adición de más equivalentes de DABCO provocó la lenta reducción en la intensidad de la banda y la aparición de otra banda a 431 nm que se corresponde con la formación del complejo en que hay un DABCO coordinado a cada una de las porfirina, formándose un complejo de estequiometría 1:2 entre el dímero **D3$_{Zn}$** y el DABCO. Un hecho relevante que se produjo en los experimentos de adición fue la necesidad de añadir grandes cantidades de la diamina (10000 equivalentes) para destruir el complejo sándwich, cuando con los octapéptidos la destrucción del complejo sólo requería la adición de 1500 equivalentes.

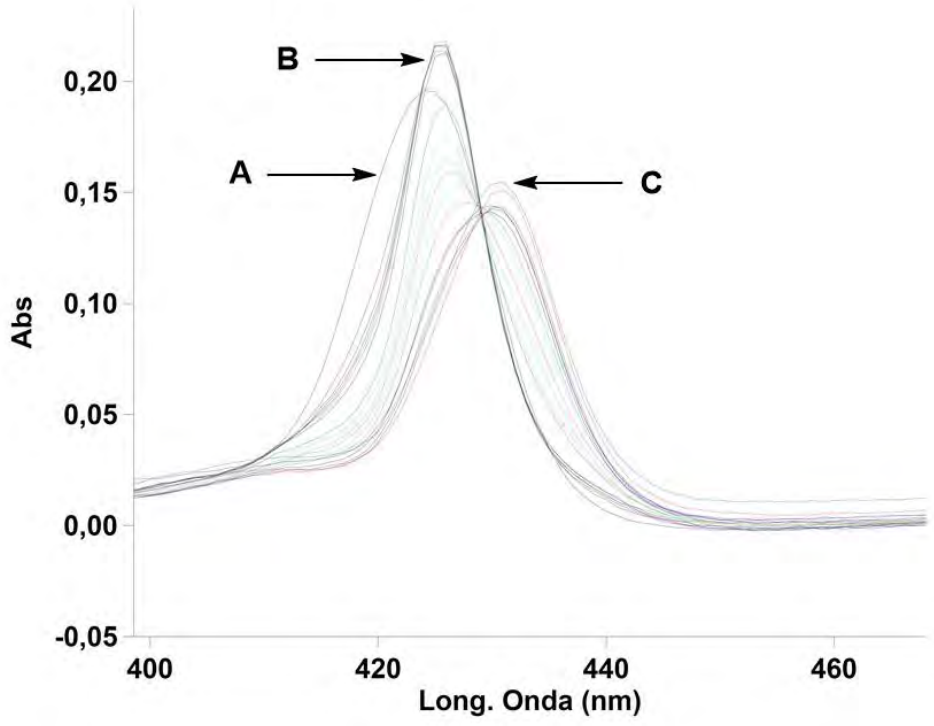


Figura 55: Valoración UV/Vis del dímero **D3$_{Zn}$** con cantidades crecientes de DABCO: a) **D3$_{Zn}$**+ 0 eq. de DABCO; b) **D3$_{Zn}$**+ 1,0 eq. de DABCO; c) **D3$_{Zn}$**+ 10000 eq. de DABCO.

Este resultado nos llevó a reevaluar los espectros de RMN de **D3$_{Zn}$**, encontrándose que la relación entre los dímeros era de 10:1:1 a favor de la forma eclipsada. Esta evaluación se basa en las señales de los protones de los grupos aromáticos de la porfirina, tal como se muestra en la Figura 56. En la ampliación del espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) entre 9 y 7 ppm se observa la relación entre el valor de las integrales para dichos protones entre la forma eclipsada y las alternadas.

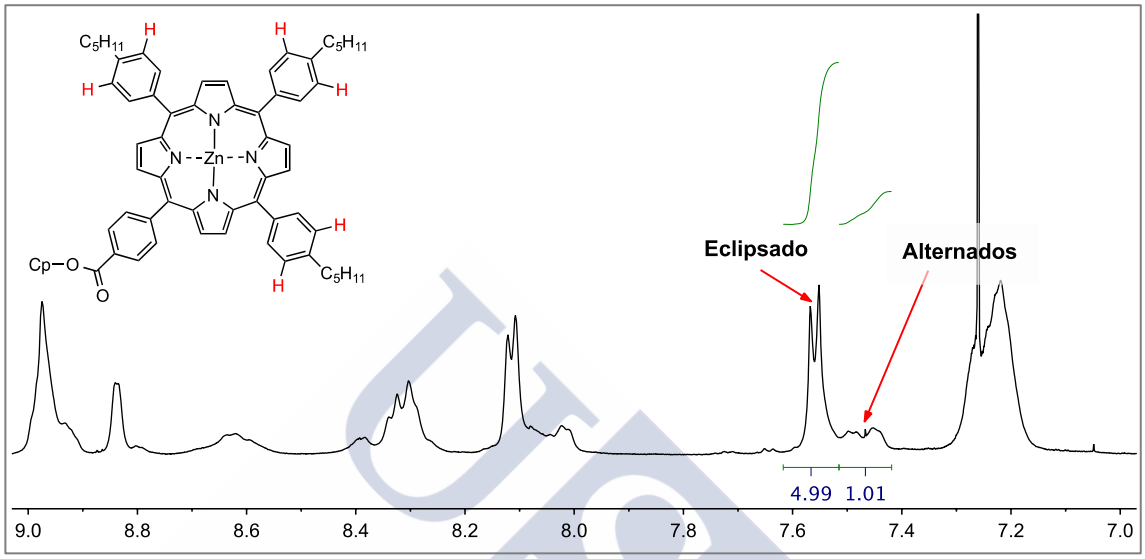


Figura 56: Ampliación del de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de **CP3$_{Zn}$** entre 9 y 7 ppm en la que observa la diferencia en el valor de las integrales de los protones aromáticos indicados entre la forma eclipsada y las alternadas.

Continuando con los estudios de ^{1}H-RMN, también nos fue posible observar la formación del complejo tipo sándwich entre el dímero **D3$_{Zn}$** y DABCO. En estos experimentos se utilizó una concentración inicial de péptido de 6.4 mM en 600 µL $CDCl_3$, y se añadió sucesivamente DABCO en proporción de 0.2 equivalentes (10 µL de disolución 0.0384 M en $CDCl_3$) con respecto al dímero (Figura 57). Con la adición de 0.4 eq de DABCO sobre la disolución del péptido **CP3$_{Zn}$** se observaba la aparición un singlete a un desplazamiento de -5 ppm, correspondiente a las señales de los metilenos del DABCO intercalado entre las dos porfirinas. Este desplazamiento a campo alto de los protones indica que se encuentran formando parte de un complejo tipo sándwich 1:1 con las dos porfirinas del dímero. El aumento de los equivalentes de la diamina provocó un ensanchamiento en la señal y un desplazamiento a campo más bajo (0.8 eq), hasta que se volvió prácticamente indetectable (1.2 eq). Este comportamiento se debe al rápido intercambio de DABCO entre el medio y el complejo **CP3$_{Zn}$·DABCO**.

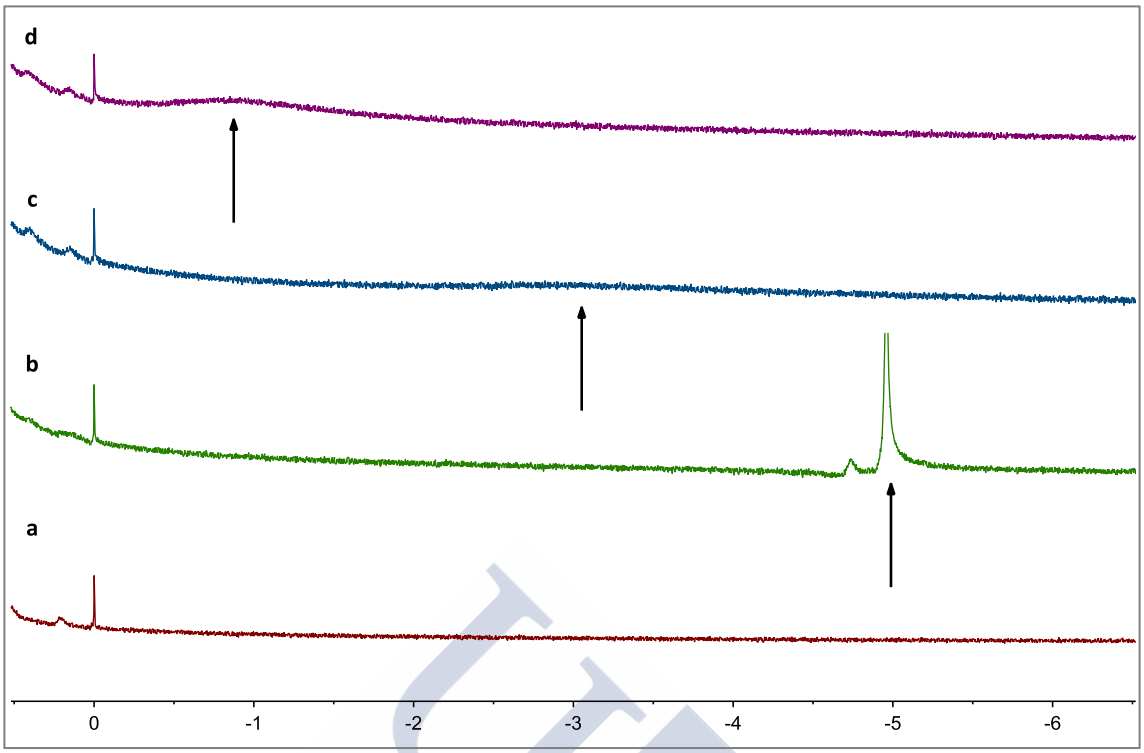


Figura 57: Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) entre 0.5 y -6.5 ppm del experimento de adición de DABCO sobre el péptido **CP3$_{Zn}$**. a) **CP3$_{Zn}$**, b) **CP3$_{Zn}$** +0.4 equivalentes de DABCO, c) **CP3$_{Zn}$** +0.8 equivalentes de DABCO, d) **CP3$_{Zn}$** +1.2 equivalentes de DABCO.

Una vez confirmado que las diaminas eran capaces de restringir el equilibrio entre las tres especies diméricas no equivalentes, decidimos ampliar el tipo de reconocimiento molecular a ácidos dicarboxílicos.[132] Para ello pensamos en las porfirinas de Sn(IV) ya que estas pueden coordinar uno o dos carboxilatos. Las porfirinas de Sn(IV) están entre las primeras porfirinas sintetizadas artificialmente,[133] y en este tipo de porfirinas el metal adopta una geometría octaédrica, coordinando preferentemente dos ligandos dadores de oxígeno aniónicos, aunque a diferencia de lo que ocurre con las porfirinas de Zn(II) su velocidad de intercambio es lenta. Su síntesis es sencilla, sólo se requiere el calentamiento a reflujo de la porfirina libre en presencia de $SnCl_2{\cdot}2H_2O$ en piridina (Figura 51).[134] Utilizando estas condiciones se obtuvo el compuesto **CP3$_{Sn}$** con un rendimiento de 93%.

Basándonos en trabajos previos de Crossley,[135] seleccionamos el ácido succínico para los estudios de coordinación de **CP3$_{Sn}$** con diácidos. En dichos trabajos se observaba la formación de complejos sándwich entre porfirinas de Sn(IV) enlazadas covalentemente cuando se añadía el ácido succínico. Con la adición de menos de un equivalente de ácido succícino se formaría un complejo ditópico a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos y los ácidos carboxílicos. Estos enlaces de hidrógeno

[132] Arnold D.P., Blok J. Coord. Chem. Rev. **2004**, 248, 299-319.
[133] Webb, S. J.; Sanders, J. K. M. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 5920-5929.
[134] Kim, H-J.; Bampos, N.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8120-8121.
[135] Brotherhood, P. R.; Wu, R. S-A.; Turner, P.; Crossley, M. J. *Chem. Comm.* **2007**, 225-227.

favorecen la protonación del hidroxilo de Sn(IV) y la pérdida de una molécula de agua que se intercambia como ligando con el carboxilato (Figura 58, de a) a c)). La segunda condensación conduce a la especie d) de la Figura 58, y la adición de más de un equivalente de ácido succínico daría lugar a la formación del complejo f) de la misma figura, con estequiometria 2:3.

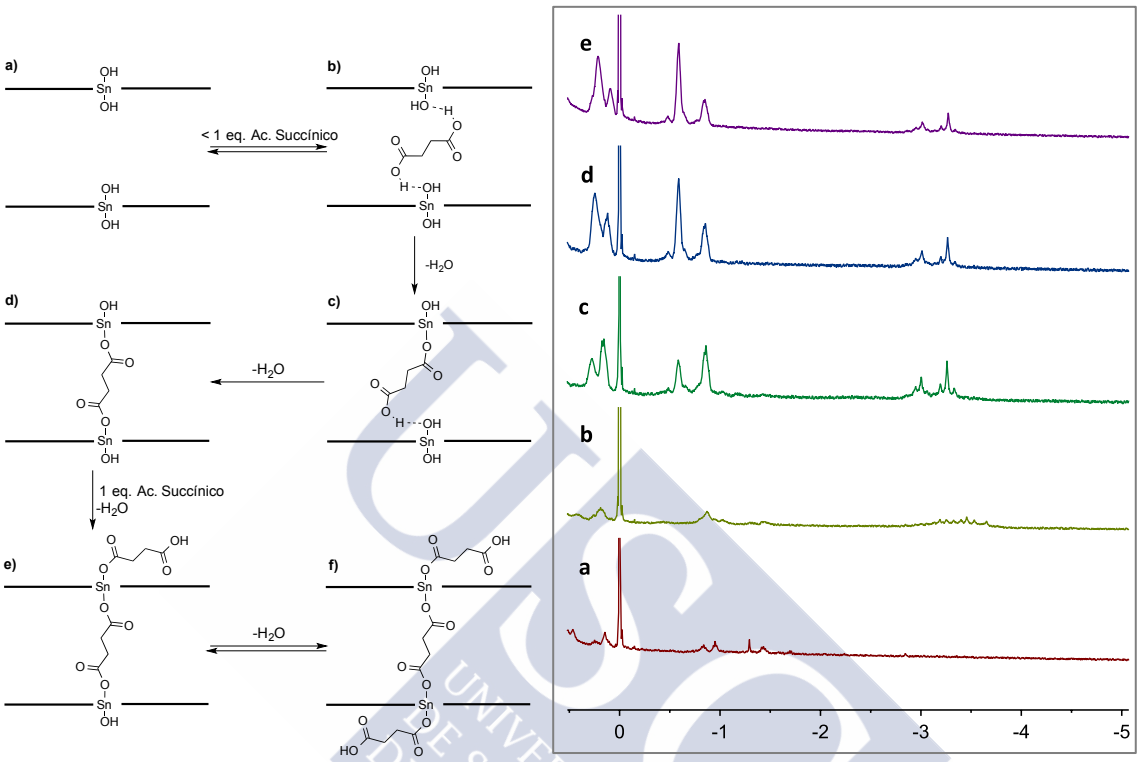


Figura 58: Mecanismo propuesto para la coordinación de hasta tres moléculas de ácido succínico con el dímero del péptido **CP3$_{Sn}$**, donde las líneas horizontales representan los esqueletos de las porfirinas (izquierda). Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, entre 0.5 y -5 ppm) de las adiciones de ácido succínico sobre una disolución 3.0 mM de **CP3$_{Sn}$** (derecha); a) **CP3$_{Sn}$**, b) **CP3$_{Sn}$** + 1 eq Ac. Succínico, c) **CP3$_{Sn}$** + 2 eq Ac. Succínico, d) **CP3$_{Sn}$** + 3 eq Ac. Succínico, e) **CP3$_{Sn}$** + 4 eq Ac. Succínico.

Esperábamos que la formación de la especie sándwich correspondiente a d) en la Figura 58 facilitase el aislamiento e identificación de la especie monocoordinada con dos grupos hidroxilos. La posterior adición de más equivalentes de succínico debería formar la especie dicoordinada f) (Figura 58, izquierda). En los estudios de ^{1}H-RMN de adición de ácido succínico sobre el péptido **CP3$_{Sn}$** pudimos comprobar la formación del complejo sándwich debido al cambio en el desplazamiento de las señales de los protones alifáticos a campo alto. Sin embargo, debido a la posibilidad de coordinación de dos moléculas de ácido succínico por cada porfirina, y al mecanismo de intercambio de ligandos del estaño, el análisis de los espectros es más complejo que en el caso de las porfirinas de Zn(II).

Sin embargo, los experimentos seguidos por RMN de protón mostraron un comportamiento mucho más complejo, como se muestra en la Figura 58 (derecha),

donde se adjunta una ampliación de la zona entre 0.5 y -5.0 ppm de los espectros tras la adición de 1, 2, 3 y 4 equivalentes de ácido succínico sobre una disolución del péptido **CP3$_{Sn}$**. La adición de 1 equivalente del ácido dio lugar a un grupo de señales que atribuimos a que coexistían en disolución el complejo ditópico b) (señales entre -3 y -4 ppm) y otra especie donde además hay una molécula de ácido coordinada por el exterior del sándwich (señales entre 0.5 y -1 ppm). La adición de otro equivalente más dio lugar a una especie que se corresponde con la condensación de los carboxilatos (señales entre -3 y -3.5 ppm) pero también a la coordinación de una mayor cantidad de moléculas en el exterior de las bisporfirina, mientras que la adición de más equivalentes (3 eq) parece hacer que el equilibrio entre los diferentes complejos se desplace hacia la complejación de dos ácidos por las caras externas de las porfirinas y la destrucción del complejo sándwich. Por tanto, el equilibrio debe desplazarse hacia la formación de los dos dímeros alternados en el que cada Sn(IV)-porfirina está coordinando a dos moléculas de ácido diferentes. Así que aunque se pudo observar la formación de un complejo tipo sándwich en el homodímero de Sn(IV)-porfirinas, la formación de dicho complejo no fue en ningún caso cuantitativa, sino que dio lugar a la aparición de varias especies. Desafortunadamente este proceso no se pudo seguir mediante estudios de UV observando los desplazamientos de la banda Soret de la porfirina debido al menor carácter dador del oxígeno comparado con el de las aminas para el caso de las Zn(II)-porfirinas.

Toda vez comprobada la posibilidad de formación de complejos tipo sándwich para los dímeros **D3$_{Zn}$** y **D3$_{Sn}$**, decidimos avanzar un paso más intentando la formación de complejos sándwich con un heterodímero de los péptidos **CP3$_{Zn}$** y **CP3$_{Sn}$**. Dado que la Zn(II)-porfirina del péptido **CP3$_{Zn}$** forma complejos con aminas, y la Sn(IV)-porfirina de **CP3$_{Sn}$** forma complejos con carboxilatos, un heterodímero formado por ambos péptidos podría atrapar moléculas con ambos grupos funcionales, como por ejemplo aminoácidos. De esta forma se mezclaron ambos ciclopéptidos que en disolución debían dar lugar a una mezcla compleja de ambos homodímeros, **D3$_{Zn}$** y **D3$_{Sn}$**, y el heterodímero **D3$_{Zn}$·3$_{Sn}$**, y cada uno de ellos existiría como tres rotoisómeros no equivalentes (un total de nueve especies en disolución). Así se hicieron estudios de valoración UV/Vis donde se añadieron cantidades crecientes de ácido isonicotínico (ácido 4-piridinocarboxílico) sobre una mezcla equimolecular de **CP3$_{Zn}$** y **CP3$_{Sn}$**. Sin embargo solo se obtuvo un descenso en la intensidad de la banda Soret (a 426 nm), mientras que aparecía y aumentaba la banda de absorción del ácido isonicotínico a 280 nm. Desafortunadamente, los estudios de RMN tampoco arrojaron resultados claros sobre la formación del complejo, sobre todo debido a la complejidad del espectro de la mezcla de los péptidos **D3$_{Zn}$** y **D3$_{Sn}$**. En los espectros de las adiciones no se observaron las señales de los protones aromáticos del ácido isonicotínico (dos dobletes a 8.65 y 7.88 ppm, Figura 59 e), aunque si se observó la aparición de dos pequeñas señales a 6.91 y 6.56 ppm como se muestra en la Figura 59 (marcadas con flechas rojas).

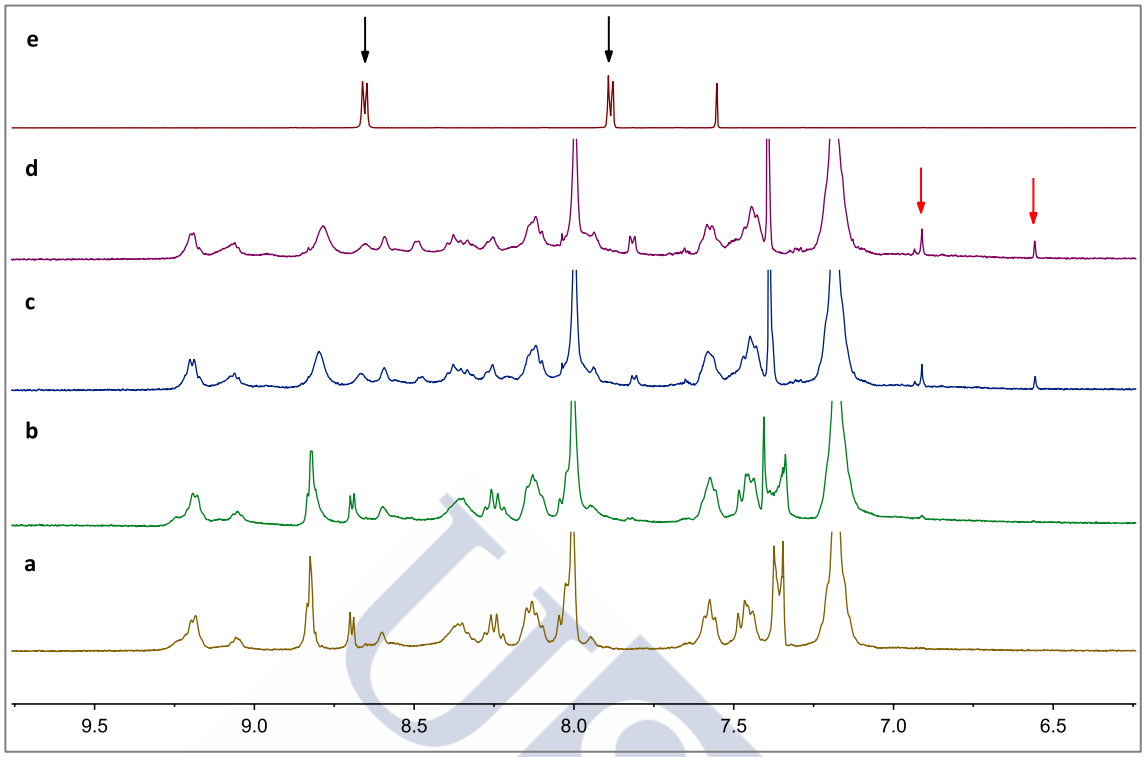


Figura 59: Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$/$MeOD_{d4}$, 7:3) entre 9.75 y 6.25 ppm del estudio de adición del ácido isonicotínico sobre el heterodímero **D3$_{Zn}$·3$_{Sn}$**. a) **D3$_{Zn}$·3$_{Sn}$**; b) **D3$_{Zn}$·3$_{Sn}$** + 0.4 eq. Ac. Isonicotínico; c) **D3$_{Zn}$·3$_{Sn}$** + 0.8 eq. Ac. Isonicotínico; d) **D3$_{Zn}$·3$_{Sn}$** + 1.2 eq. Ac. Isonicotínico; e) Ac. Isonicotínico ($CDCl_3$/$MeOD_{d4}$, 1:1).

Aunque sí que existían evidencias de coordinación y de la formación de un complejo sándwich, los espectros de RMN obtenidos eran de una elevada complejidad. Además, el diseño de los péptidos no parecía ser el más idóneo, dado que al partir del mismo ciclopéptido (**CP3**) tampoco era posible diferenciar el tipo de estructura formada mediante experimentos de RMN bidimensional. Por estas razones, no se continuó el estudio de la formación de complejos sándwich con sistemas bisporfirínicos Zn(II)-Sn(IV) y se decidió continuar hacia el estudio del control rotoisomérico en heterodímeros mediante otro tipo de interacciones.

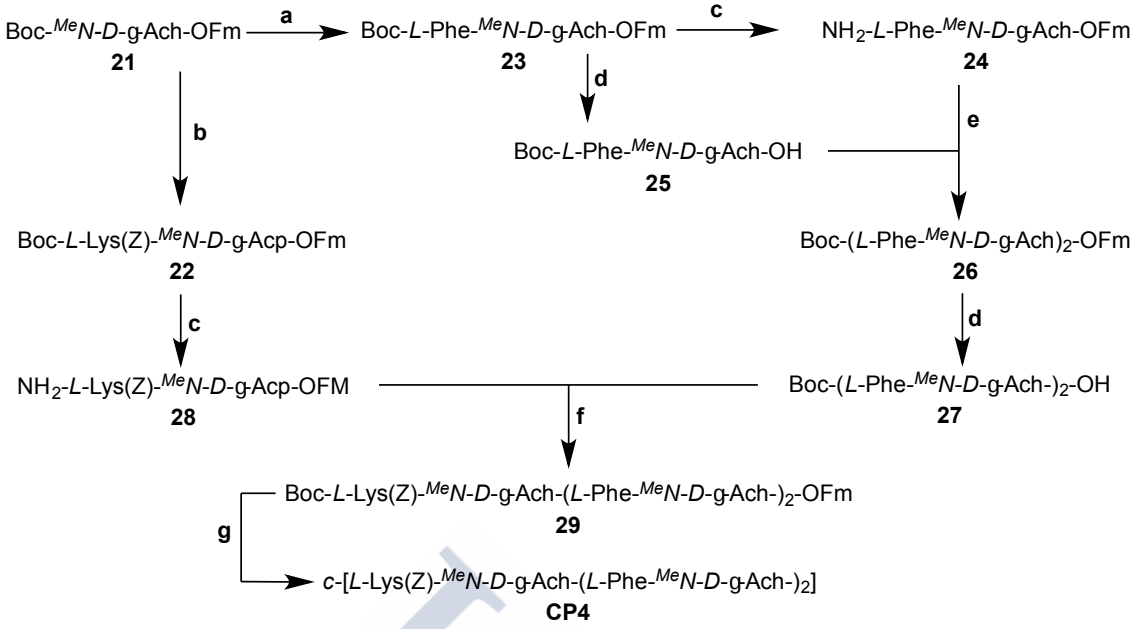
Como hemos visto, las porfirinas son "building blocks" altamente versátiles para la construcción de múltiples sistemas supramoleculares.[136,137] Además de sus interesantes características formando parte de sistemas redox o fotoquímicos, se ha descubierto que forman interacciones atractivas con los fullerenos.[138] La estabilidad de los complejos supramoleculares se basa en cierta medida en la forma complementaria entre el receptor y el ligando, por eso los sustratos esféricos se complementan bien con receptores macromoleculares capaces de deformarse para rodearlos, dado que se magnifican las interacciones de Van der Waals. De hecho, se han descrito múltiples sistemas macrocíclicos de dímeros y trímeros de metaloporfirinas capaces de formar complejos estables con fullerenos.[139,140] Este hecho, unido a la preferencia por la formación de heterodímeros entre ciclopéptidos formados por γ-aminoácidos de cinco miembros (γ-Acp) y ciclopéptidos formados por γ-aminoácidos de seis miembros (γ-Ach), nos llevó a diseñar un sistema heterodimérico basado en un α,γ(Acp)-ciclopéptido unido a una porfirina metalada (péptido **CP3$_{Zn}$**) y otro α,γ(Ach)-ciclopéptido funcionalizado con un fullereno, el cual nos permitiría el estudio de las propiedades termodinámicas y cinéticas de la formación de los heterodímeros. El ciclopéptido diseñado para formar un heterodímero con **CP3** fue el ciclo *c*-[*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-)$_2$] o **CP4**, que se funcionalizó a través de la cadena lateral de la lisina con el fullereno PCBA para obtener *c*-[*L*-Lys(PCBA)-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-)$_2$] (**CP6**).

La síntesis de **CP6** se realizó a partir del ácido (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclohexano-1-carboxílico, o Boc-*D*-γ-Ach-OH (**14**).[58] Este compuesto se *N*-metiló y se protegió su grupo ácido en forma de éster de fluorenilmetanol para obtener el (9H-fluoren-9-il)metil (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)(metil)amino]-ciclohexano-1-carboxilato (*D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm, **17**) utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente para el Boc-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-OH (**7**).

La síntesis del péptido comenzó con la formación de los dipéptidos Boc-*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-OFm (**22**) y Boc-*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-OFm (**23**). En ambos casos se llevó a cabo la desprotección del grupo amino del Boc-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-OFm mediante el tratamiento con una disolución de TFA/DCM (1:1) durante treinta minutos, y posteriormente se acopló con el correspondiente α-aminoácido (Boc-*L*-Lys(Z)-OH o Boc-*L*-Phe-OH) usando *N*-HATU y DIEA en diclorometano durante cuarenta y cinco minutos. De esta forma se obtuvieron los correspondientes dipéptidos **22** y **23** con rendimientos de 72% y 78% respectivamente.

---

[136] Burrel, A. K.; Officer, D. L.; Plieger, P. G.; Reid, D. C: W. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2751-2796.
[137] Mohnani, S.; Bonifazi, D. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2342-2362.
[138] Toshiro, K.; Takuzo, A. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 189-197.
[139] Gil-Ramirez, G. A. D.; Karlen, S. D.; Shundo, A.; Porfykaris, K.; Ito, Y.; Briggs, G. A. D.; Morton, J. J. L.; Anderson, H. C. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3544-3547.
[140] Nobukuni, H.; Shimazaki, Y.; Tani, F.; Naruta, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8975-8978.
[58] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.



Condiciones: **a**) 1. TFA/DCM (1:1), 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Phe-OH, DCM, 73%; **b**) 1. TFA/DCM (1:1), 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Lys(Z)-OH, DCM, 72%; **c**) TFA/DCM (1:1); **d**) Piperidina/DCM (2:8), **e**) *N*-HBTU, DIEA, DCM, 95%; **f**) *N*-HBTU, DIEA, DCM, 88%; **g**) 1. Piperidina/DCM (2:8), 2. TFA/DCM (1:1), 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM, 68%.

Figura 60: Esquema sintético para la obtención del péptido c-[*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-γ-Ach-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$] (**CP4**).

Para la formación del tetrapéptido lineal Boc-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach)$_2$-OFm (**26**) se tomaron dos fracciones del dipéptido **23**. En una de ellas se desprotegió el grupo amino por tratamiento con una mezcla de TFA/CH_2Cl_2 (1:1) durante treinta minutos, dando lugar al intermedio **24**. El grupo ácido de la otra fracción se desprotegió con una mezcla piperidina/CH_2Cl_2 (1:4), obteniéndose el intermedio **25**. Ambos dipéptidos se acoplaron, empleando *N*-HBTU como agente de acoplamiento y DIEA como base, obteniéndose el tetrapéptido **26** en un 95% de rendimiento. El hexapéptido Boc-*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach)$_2$-OFm (**29**) se sintetizó a partir del dipéptido **22** y el tetrapéptido **26**. Para ello, el compuesto **22** se desprotegió en su extremo amino terminal mediante su tratamiento con una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1) en treinta minutos, y el compuesto **26** se desprotegió en su extremo ácido terminal mediante tratamiento con una mezcla de piperidina/CH_2Cl_2 (1:4) durante media hora. El acoplamiento de los péptidos se realizó con *N*-HBTU y DIEA en CH_2Cl_2 durante sesenta minutos, para dar el hexapéptido lineal **29** con un 88% de rendimiento.

Una vez obtenido el hexapéptido **29**, se llevó a cabo la ciclación desprotegiendo ambos extremos en condiciones similares a las empleadas en las desprotecciones de los péptidos anteriores. La ciclación se realizó en condiciones de alta dilución (1 mM), empleando *N*-TBTU y DIEA. De esta forma se obtuvo el péptido cíclico c-[*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-)$_2$] (**CP4**) con un 68% de rendimiento en la etapa de ciclación.

El siguiente paso fue la funcionalización del péptido a través de la cadena lateral de la lisina, para lo que fue necesario eliminar el grupo benciloxicarbonilo de su cadena

lateral. La eliminación de este grupo protector se puede realizar en condiciones ácidas,[141] o mediante una hidrogenólisis catalizada por Pd/C,[122] y dado que estas condiciones son más suaves y compatibles con otros grupos protectores, nos decantamos por ellas. Con este método se llevó a cabo la desprotección de **CP4** para obtener el péptido **CP5** con un rendimiento del 95%.

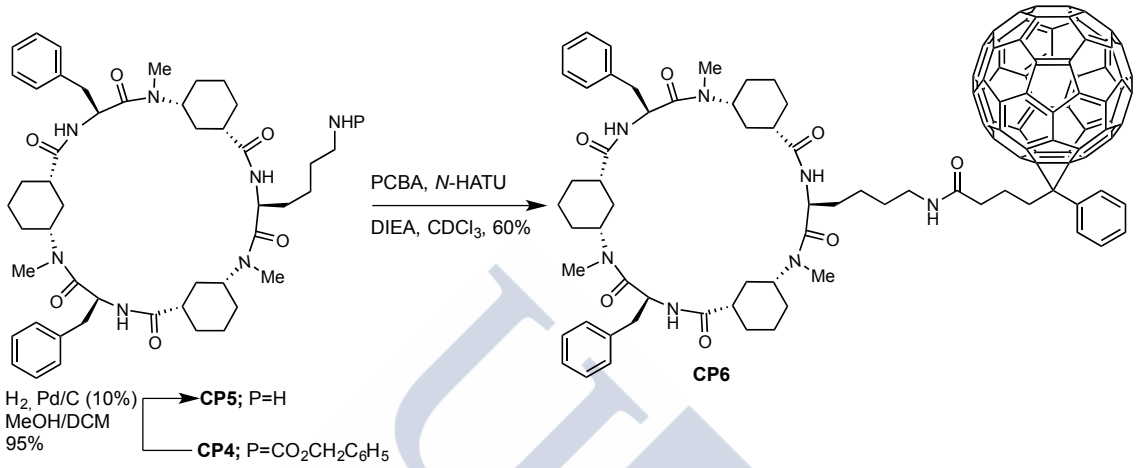


Figura 61: Metodología seguida para la síntesis de **CP6**, partiendo de la desprotección del péptido cíclico **CP4** para posteriormente acoplarlo con PCBA (**31**).

El fullereno escogido para ser unido covalentemente al ciclopéptido fue el ácido [6,6]-fenil C_{61} butírico (PCBA, **31**), que se obtuvo comercialmente protegido como éster metílico (PCBM, **30**). La desprotección del éster se realizó mediante tratamiento con una mezcla de ácido acético glacial y ácido clorhídrico en tolueno a reflujo durante veinte horas.[142] Con estas condiciones se obtuvo el PCBA con un 96% de rendimiento. El acoplamiento con el péptido **CP5** se realizó en $CDCl_3$, con *N*-HATU y DIEA, obteniéndose el ciclo c-[*L*-Lys(PCBA)-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-(*L*-Phe-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-)$_2$] (**CP6**) con un rendimiento del 60% (Figura 61).

[141] Erickson, B. W.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3750-3756.
[142] Hummelen, J.; Knight, B.; LePeq, F.; Wudl, F.; Yao, J. *J. Org. Chem*. **1995**, *60*, 532-538.

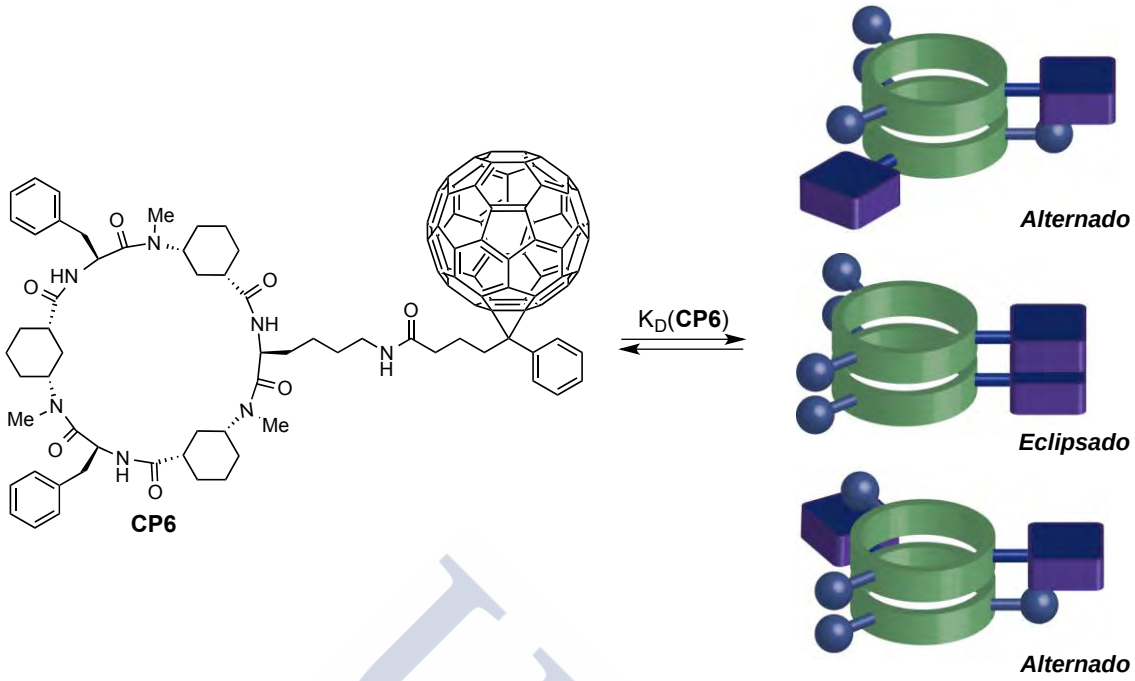


Figura 62: Representación esquemática de los tres rotodímeros a los que da lugar el péptido **CP6** en disolución.

Durante el análisis y comparación de los espectros de RMN de los ciclopéptidos **CP4**, **CP5** y **CP6** pudimos observar la diferencia en la distribución de los rotodímeros en disolución para cada uno de ellos. En ^{1}H-RMN, los NH de los grupos amida del péptido **CP4** se mostraron como tres grupos de señales formados por nueve dobletes, lo que implica que los tres posibles dímeros están presentes en disolución. Los protones amídicos de la lisina aparecían como dos dobletes solapados a 8.41 ppm (J = 9.5 Hz) y 8.36 ppm (J = 9.5 Hz) y un doblete solitario a 8.23 ppm (J = 9.4 Hz) en una relación de 6 a 4, lo que parece indicar que hay dos formas energéticamente similares y una tercera forma con una pequeña preferencia (Figura 63 superior). En base a esto, supusimos que las dos señales con desplazamientos químicos más próximos corresponden a las dos formas alternadas, y la tercera señal pertenecía a la forma eclipsada. En base a las intensidades de las señales la distribución entre rotodímeros era de 3:3:4 para las formas alternada$_1$:alternada$_2$:eclipsada; donde el dímero con las lisinas enfrentadas era el mayoritario, aunque con muy poca preferencia.

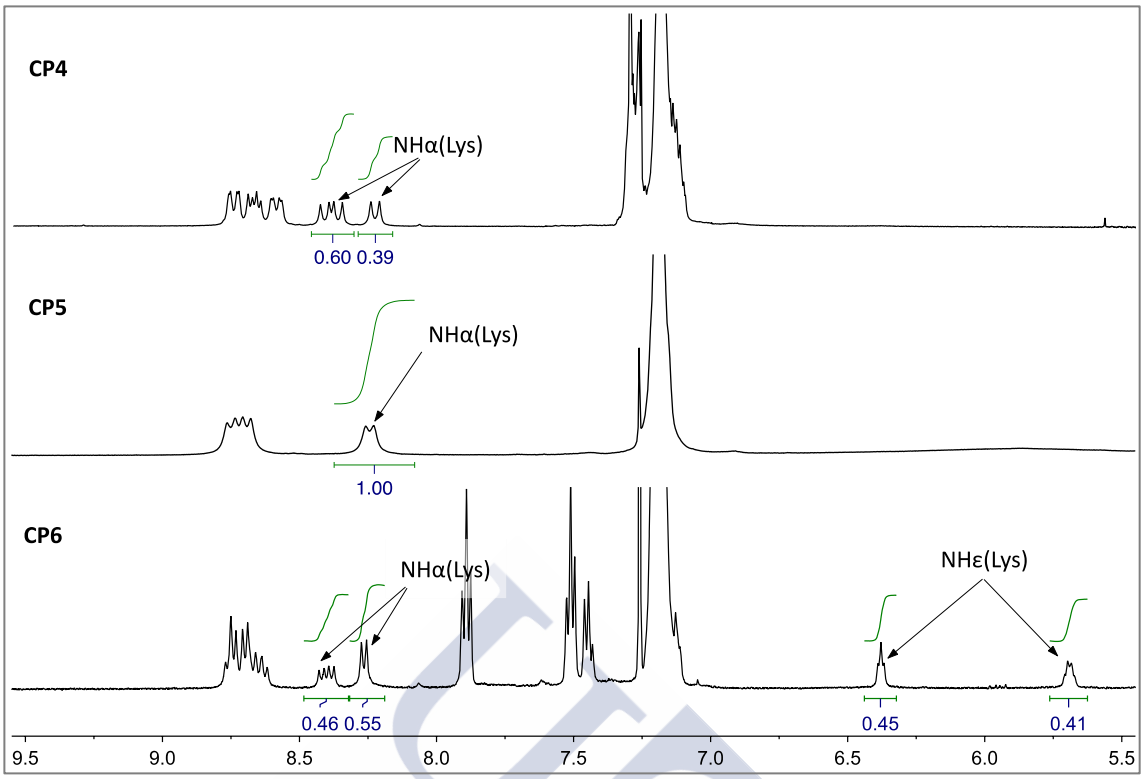


Figura 63: Comparación entre los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, ampliación entre 5.5 y 9.5 ppm) de los péptidos **CP4**, **CP5** y **CP6** donde se puede observar las señales correspondientes a los protones amídicos (NHα(Lys)) y de la cadena lateral de la lisina (NHε(Lys)) y sus correspondientes integrales. De esta forma se pudo obtener las relaciones entre los rotodímeros en disolución de los tres péptidos.

El análisis del ^{1}H-RMN del péptido **CP5** arrojó una pequeña sorpresa, debido a que las señales correspondientes con los NH del esqueleto peptídico del ciclo aparecían como tres dobletes a 8.75 ppm (J = 9.4 Hz), 8.69 ppm (J = 9.2 Hz) y 8.24 ppm (J = 9.2 Hz), lo que indicaría que el péptido en disolución está formando exclusivamente un rotodímero (Figura 63 centro). Este hecho probablemente fue debido a la posible formación de un enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales desprotegidas de la lisina, ya que las condiciones de desprotección dejan los grupos amino sin protonar. También es destacable el hecho de que estas señales permanecieron invariables a diferentes concentraciones (entre 8 mM y 30 mM). El análisis de los protones amínicos de la cadena lateral de la lisina no arrojó ninguna información debido a que aparecieron como una banda muy ancha entre 6.5 ppm y 5.5 ppm.

Por último, las señales de los protones amídicos del ciclo **CP6** aparecieron de nuevo desdobladas como tres grupos de señales, confirmando nuevamente la formación de tres especies diméricas no superponibles. Las señales correspondientes a los protones amídicos de la lisina en el esqueleto peptídico resonaron como tres dobletes a 8.44 ppm (J = 9.5 Hz), 8.41 ppm (J = 9.5 Hz) y 8.29 ppm (J = 9.4 Hz), y con intensidades relativas de 1:1:2 (Figura 63 inferior). Aplicando un razonamiento similar al aplicado al péptido **CP3** llegamos a la conclusión de que la forma eclipsada era de nuevo la especie mayoritaria, aunque en este caso la diferencia en la distribución de los rotodímeros era mayor.

Además la señal correspondiente al protón amídico de la cadena lateral de la lisina (unida al fullereno) aparece desdoblada, a 6.40 ppm (t, *J* = 5.7 Hz), 5.72 ppm y 5.71 ppm (dos tripletes solapados), con una relación similar (2:1:1). Teniendo en cuenta el desplazamiento a campo bajo de la señal mayoritaria, que se corresponde con la forma dimérica eclipsada, creemos que existe una interacción de enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de las lisinas que estabiliza esta forma.

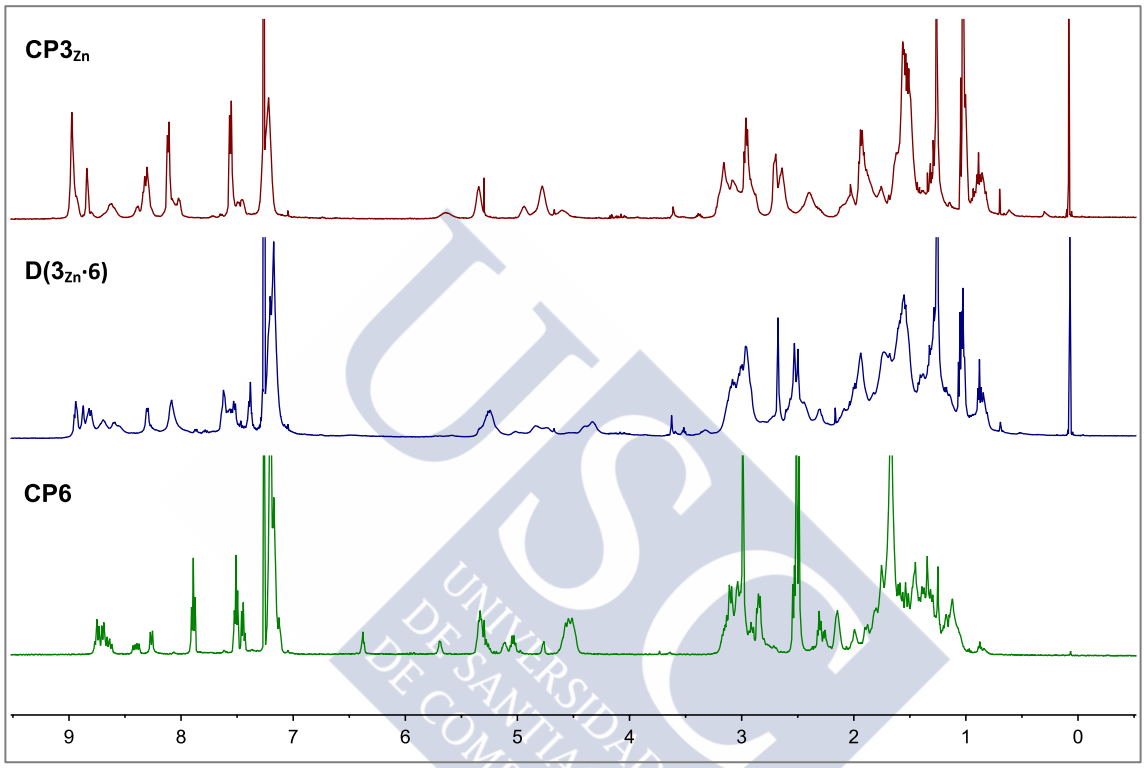


Figura 64: Comparación de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de **CP3$_{Zn}$**, **D(3$_{Zn}$·6)** y **CP6**.

El espectro de ^{1}H-RMN de una mezcla equimolecular de los péptidos cíclicos **CP3$_{Zn}$** y **CP6** mostró nuevas señales que no aparecían en los espectros de los homodímeros de partida, lo que confirmaba la formación exclusiva de una nueva especie heterodimérica **D(3$_{Zn}$·6)**, lo que concuerda con experimentos anteriores realizados con mezclas de α,γ(Acp)- y α,γ(Ach)-ciclopéptidos. Lamentablemente, la complejidad del espectro de protón para el heterodímero no nos permitió el análisis de las especies rotoisoméricas existentes en el equilibrio en disolución (Figura 64, centro).

La caracterización termodinámica del heterodímero **D(3_{Zn}·6)** y el estudio de sus propiedades espectroscópicas y fotofísicas fueron llevados a cabo por los grupos de investigación del Prof. Pablo Ballester en el *Institut Catalá d'Investigació Química* (ICIQ) y de la Dra. Lucia Flamigni en el *Istituto per la Sintesis Organica e la Fotoreattività* (ISOF). Dicha caracterización comenzó con la cuantificación de las constantes de homodimerización (K_{DHomo}) para los péptidos **$CP3_{Zn}$** y **CP6** a través de experimentos de dilución en UV/Visible con concentraciones comprendidas entre 10^{-5} y 10^{-7} M. Sin embargo debido a que las bandas de mayor intensidad en el espectro UV no sufrieron cambios apreciables, no se pudo realizar un cálculo de las constantes, por lo que se adoptó la estimación K_{DHomo}= 10^{6} M^{-1} en base a péptidos similares estudiados con anterioridad.[143]

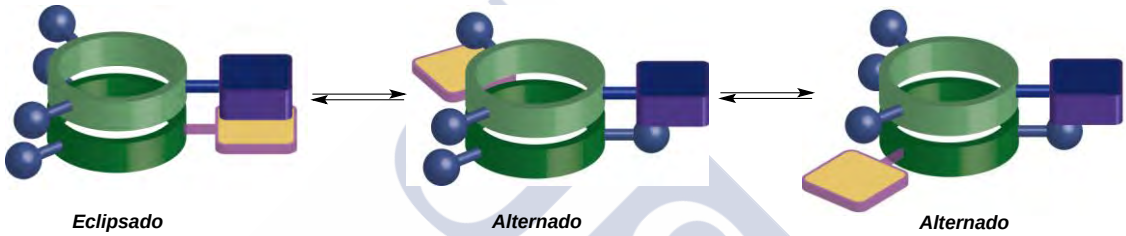


Figura 65: Representación esquemática del equilibrio entre los tres rotoisómeros del heterodímero **D(3_{Zn}·6)** (**$CP3_{Zn}$** anillo verde oscuro, **CP6** anillo verde claro).

Para evaluar la estabilidad relativa de los homodímeros de **$CP3_{Zn}$** y **CP6** frente al heterodímero **D(3_{Zn}·6)**, se realizaron experimentos de adición del péptido funcionalizado con fullereno sobre el péptido funcionalizado con la Zn(II)-porfirina en espectroscopía UV/Visible (Figura 66).

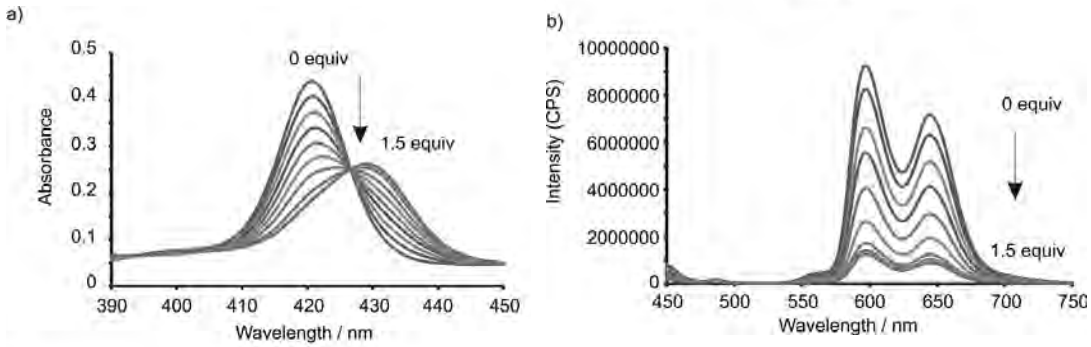


Figura 66: Espectros de absorción UV/Vis (a) y de emisión de Fluorescencia (b) de los experimentos de adición del péptido CP6 (0-1.5 eq) sobre $CP3_{Zn}$ (10^{-7} M).[144]

[143] Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Herranz, M. A.; Sanchez, L.; Martin, N.; Seitz, W.; D. M. Guldi, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5291–5294.
[144] Aragay, G.; Ventura, B.; Guerra, A.; Pintre, I.; Chiorboli, C.; García-Fandiño, R.; Flamigni, L.; Granja, J. R.; Ballester, P. *Chem. Eur. J*. **2014**, *20*, 3427-3438.

La adición del péptido **CP6** sobre una disolución del péptido **CP3$_{Zn}$** en diclorometano provocó un marcado descenso en la absorbancia de la banda Soret de la porfirina (Figura 66 a) y el desplazamiento de la señal desde 422 nm a 430 nm, requiriéndose 1.5 equivalentes de **CP6** para alcanzar el máximo de absorción. Se llevó a cabo un análisis matemático de los datos obtenidos en base a un modelo teórico simplificado, obteniéndose un buen ajuste que proporcionó una constante de estabilidad K(**3$_{Zn}$·6**)= 1.8 x 10^8 M^{-1} (considerando K_{DHomo}= 10^6 M^{-1}). Esta elevada constante es al menos un orden de magnitud superior a las anteriormente descritas para sistemas heterodiméricos Acp:Ach,[88,143] y el aumento probablemente fue debido a las ya conocidas interacciones entre fullerenos y porfirinas.[138] Además, esta hipótesis está apoyada por la observación de una banda de transferencia de carga en el espectro de absorción UV/Visible del heterodímero (720 nm).

Para un complejo supramolecular formado mediante interacciones no-covalentes podemos definir el "estado de enlace" como la suma de las contribuciones de los complejos con geometría parcial o totalmente enlazada. Podemos considerar que la constante de estabilidad del complejo heterodimérico **D(3$_{Zn}$·6)** es la suma de las constantes de estabilidad de los tres posibles rotoisómeros. Entonces, se podría asignar al rotoisómero eclipsado un estado de enlace "completo", ya que todas las interacciones estarían presentes, mientras que en los alternados no se establecen todas las posibles interacciones. De esta forma, podemos considerar la constante de estabilidad como:

$$K(\mathbf{3}_{\mathbf{Zn}} \cdot \mathbf{6}) = 2K_0 + K_0K_1EM$$

Donde K_0 se corresponde con la constante de estabilidad de un heterodímero Acp:Ach sin interacciones entre sus cadenas laterales, K_1 es la constante de asociación entre Zn(II)-Porfirina y fullereno, *EM* representa la molaridad efectiva de la formación intramolecular debido a la asociación Zn(II)-Porfirina y fullereno, y *2* es un factor estadístico debido a que se consideró que los dos estados alternados son isoenergéticos. Por lo tanto, asignando un valor a K_0 podremos conocer el valor de *EM*, que nos dará la relación entre las especies total y parcialmente enlazada (o lo que es lo mismo, la relación eclipsado/alternados). Dado que no se pudo hallar dicho valor, se asumió que era un orden de magnitud superior a la constante de dimerización, K_0=10^7 M^{-1} en base a los estudios precedentes con heterodímeros.[62] De esta forma se halló que la distribución entre las especies es de un 89% para la especie eclipsada y un 11% para las especies alternadas. Sin embargo, si asumimos el valor de K_0=2x10^7 M^{-1} el porcentaje del rotodímero eclipsado desciende hasta el 78%. De todas formas, el cálculo indicó de forma inequívoca que el dímero eclipsado es la especie más abundante dentro del equilibrio.

[88] Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1653-1657.
[62] Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

Teniendo en cuenta las constantes de estabilidad para los homodímeros de los péptidos **CP3$_{Zn}$** y **CP6**, y la constante de estabilidad para el heterodímero **D(3$_{Zn}$·6)**, fue posible hallar la constante del equilibrio entre ambos homodímeros y el heterodímero, obteniendo un valor de K_{ss}(**3$_{Zn}$·6**)=1.3x10^5. Dicha constante es al menos tres órdenes de magnitud superior a los sistemas heterodiméricos estudiados con anterioridad, en las que no existía ninguna interacción entre las cadenas laterales, por lo que podemos afirmar que la interacción entre la Zn(II)-Porfirina y C_{60} es la responsable del aumento de la estabilidad termodinámica y del elevado porcentaje del rotodímero eclipsado.

A continuación, se estudiaron las variaciones en el espectro de emisión de la porfirina del péptido **CP3$_{Zn}$** en experimentos de valoración con **CP6** (Figura 66 b) (excitando a la longitud de onda del punto isosbéstico (427 nm)). El espectro de emisión del ciclopéptido funcionalizado con la porfirina (**CP3$_{Zn}$**) mostraba las dos típicas bandas de las porfirinas a 596 y 642 nm. A medida que se incrementaban las cantidades presentes del péptido **CP6** la intensidad de las señales decaía, lo que apoyaba la hipótesis de la existencia de interacciones tipo π-π entre la porfirina y el fullereno que provocarían el "quencheo" de la emisión de la porfirina mediante un proceso de trasferencia electrónica fotoinducida hacia el fullereno.

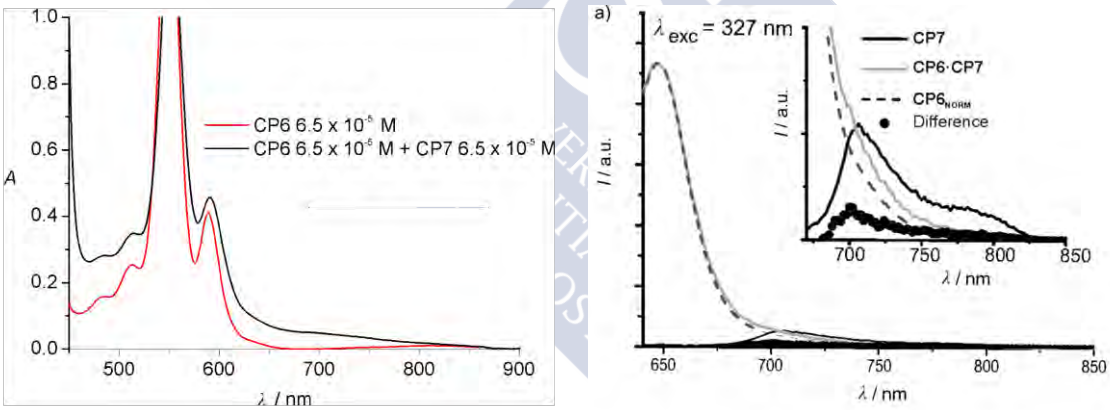


Figura 67: a) Superposición de los espectros de absorción para el homodímero **D3** y el heterodímero **D(3$_{Zn}$·6)**, donde se puede observar la banda de transferencia de carga a 720 nm. b) Espectros de emisión de **CP3$_{Zn}$**, **CP6** y **D(3$_{Zn}$·6)** (1x10^{-5} M, λ_{exc}=327 nm). Los puntos representan la contribución calculada debido a la componente del fullereno.

También se llevó a cabo un estudio de las propiedades fotofísicas tanto de los ciclopéptidos **CP3$_{Zn}$** y **CP6** como del heterodímero formado por ambos. El primer paso fue la realización de espectros UV/Vis de los péptido **CP3$_{Zn}$** y **CP6** en el rango de concentraciones entre 10^{-6} y 10^{-4} M, donde no se observaron diferencias significativas, lo que indica que en ese rango de concentraciones prácticamente sólo existen las especies diméricas. En cuanto a los espectros de emisión, un dato reseñable es la aparición de dos bandas de fosforescencia a 800 y 808 nm para **CP3$_{Zn}$**, y que se relaciona con el estado triplete de la porfirina.

En los espectros de absorción de disoluciones equimoleculares de los péptidos **CP3$_{Zn}$** y **CP6** se detectaron bandas a 720 nm, atribuibles a los fenómenos de transferencia de carga, y que son debidas a las interacciones electrónicas entre el fullereno y la porfirina en el estado fundamental (Figura 67 a).[145] Nuevamente los resultados confirmaron las interacciones entre las cadenas laterales en al menos una de las especies presentes en el equilibrio.

Además, se llevaron a cabo una serie de experimentos tanto estáticos como dinámicos. Así, se estudió el espectro de emisión del homodímero **D3$_{Zn}$** y del heterodímero **D(3$_{Zn}$·6)** irradiando a 556 nm, longitud de onda donde prácticamente sólo se excita a la porfirina. Los resultados obtenidos indicaban que existía una luminiscencia residual de la porfirina en el heterodímero **D(3$_{Zn}$·6)** del 28%. Por otra parte, la excitación a 327 nm, donde se excita mayoritariamente al fullereno, también daba lugar a una fluorescencia residual del 25% (Figura 67 b). Todo ello ponía de manifiesto que una cuarta parte de la fluorescencia no sufría el apagado de la emisión de la porfirina.

Se realizó un estudio más exhaustivo mediante experimentos cinéticos *single-photon-counting* mediante la excitación con un láser de 560 nm (λ_{Obs}=600 nm) donde se observó un decaimiento monoexponencial de la fluorescencia de la porfirina con un tiempo de vida de 1.6 nanosegundos, que se asoció al estado excitado singlete de la porfirina (**^{1}CP3$_{Zn}$·CP6**). Adicionalmente, en la región de emisión del fullereno (740-830 nm) se detectó una débil emisión con un decaimiento biexponencial, encontrándose tiempos de vida de 60 ps para el 71% del decaimiento, y de 1.3 ns para el 29% restante. Este último se asoció con el estado excitado singlete del fullereno, que no sufre "quenching". En base a esto se supuso que el "quenching" de la porfirina era tan rápido que no se detectaba (menos de 10 ps). En todo caso, se confirmó la presencia de cromóforos no "quencheados" en la disolución equimolar de **CP3$_{Zn}$** y **CP6**.

Explorando escalas de tiempo superiores, cuando se excitaba a 532 nm se observaba un componente con una vida media de 170 ns con bandas de absorción a 460-470 nm y 650-680 nm. Estas últimas bandas se asignaron a la especie catiónica de la porfirina, y por lo tanto se pueden atribuir al estado dirradical con separación de cargas **CP3$_{Zn}^{+\cdot}$·CP6$^{-\cdot}$**. Este estado de separación de cargas del heterodímero resulta de la transferencia electrónica LUMO-LUMO intermolecular desde el singlete excitado de la porfirina al fullereno en su estado fundamental. Cuando se compararon los espectros del triplete **^{3}CP3$_{Zn}$·CP6** con los de **CP3$_{Zn}$**, quedó claro que se reducían hasta el 25% en el caso del heterodímero. Además el tiempo de vida se reducía de los 180 ns anteriormente mencionados a los 20 ns característicos de las porfirinas. Un comportamiento análogo se observó cuando se irradió el fullereno a 355 nm, con una reducción hasta el 20%.

[145] Hosseini, A.; Taylor, S.; Accorsi, G.; Armaroli, N.; Reed, C. A.; Boyd, P. D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15903-15913.

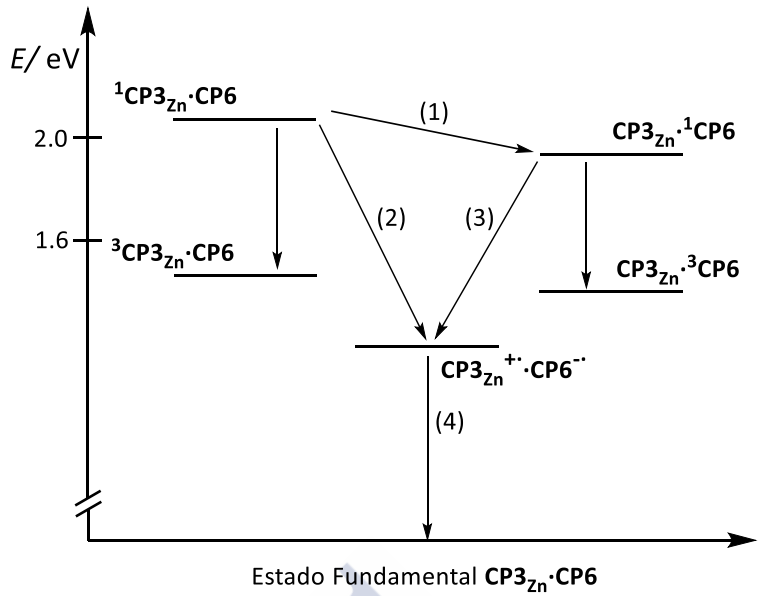


Figura 68: Esquema de niveles de energía y los procesos de desactivación del heterodímero **D(3$_{Zn}$·6)** después de la excitación. (**1**) Transferencia electrónica de **^{1}CP3Zn·CP6** a **CP3Zn·^{1}CP6**; (**2**) Transferencia electrónica LUMO-LUMO; (**3**) Transferencia electrónica HOMO-HOMO; (**4**) Desactivación mediante un proceso de recombinación de carga.

Por último, se realizó un estudio de los procesos fotoinducidos para el heterodímero. Basándose en los estados energéticos calculados para los singletes y el triplete de la Zn(II)TPPP y en el triplete del metanofullereno (similar a MCPBA) se calculó un diagrama de niveles de energía para el sistema heterodimérico **D(3$_{Zn}$·6)** (Figura 68), y en base a sus potenciales redox se pudo estimar que el estado de separación de cargas en diclorometano poseía una energía de 1.4 eV.

El apagado de la fluorescencia de los cromóforos se explica mediante la transferencia electrónica LUMO-LUMO a través del paso 2, o como la transferencia electrónica HOMO-HOMO a través del paso 3 (Figura 68). Aunque para que ocurra este último, primero debe existir un proceso de transferencia paralelo (1) desde el singlete excitado de la porfirina al singlete excitado del fullereno, que al ser un proceso permitido tanto termodinámicamente como por spin, es muy rápido. En cualquier caso, la diferencia de energía entre ambos caminos es muy pequeña, aunque es más probable el camino (2) debido a una mayor fuerza impulsora del LUMO-LUMO. Toda vez formado el estado de separación de cargas **CP3$_{Zn}^{+\cdot}$·CP6$^{-\cdot}$**, este sólo puede evolucionar desactivándose al estado de partida (4) mediante una recombinación de cargas, ya que ambos estados triplete son de energía superior.

Aproximadamente un 25% de las especies presentes en la mezcla equimolecular sobreviven al apagado y por tanto, evolucionan dando lugar simplemente a los estados triplemente degenerados. Esto explicó el hecho de que el tiempo de vida del estado triplete para el péptido con la porfirina **CP3$_{Zn}$** sea extremadamente largo (180 µs), y se reduzca drásticamente en la mezcla equimolecular **CP3$_{Zn}$·CP6** (20 µs). Aunque no es sencillo atribuir una estructura a las especies que no dan lugar a fluorescencia se

propuso una explicación en base a las diferentes especies presentes en disolución. Para ello, se partió de las constantes de asociación estimadas para este sistema, y de las concentraciones empleadas en este estudio. De esta forma se estimó que las especies monoméricas y homodiméricas presentes en disolución representaban aproximadamente un 5%, mientras que el 95% sería el heterodímero que estaba en equilibrio en sus tres formas rotodiméricas. En base a ello se consideró que las estructuras alternadas eran las responsables del restante 20% de fluorescencia residual observada.

Estos resultados son concordantes con otros sistemas heterodiméricos estudiados previamente, donde los cromóforos eran el exTTF y el fullereno,[143] si bien los resultados de la relación de los diferentes dímeros (eclipsado/alternados) es superior en el caso del heterodímero **D3$_{Zn}$·6** y éste posee además una constante de asociación al menos un orden de magnitud superior (debido a la interacción atractiva entre la Zn(II)-porfirina y el fullereno), lo que lo convierte en un sistema de mayor eficiencia en cuanto a la conversión de luz solar en energía.

Adicionalmente, la doctora Rebeca García Fandiño llevó a cabo estudios de modelización molecular para el heterodímero formado por los ciclopéptidos **CP3$_{Zn}$** y **CP6**. Los estudios de mecánica molecular sugirieron que tanto las especies alternadas como la eclipsada pueden adoptar una conformación de similar energía en la que los cromóforos se encuentren a distancias que permitan la interacción π-π entre la porfirina y el fullereno, encontrándose distancias de 2.9 Å para las formas alternadas y 2.8 Å para la eclipsada. Cálculos más precisos llevados a cabo con Gaussian 09 aumentaron la distancia en ambos casos hasta los 3.8 Å.[146] En ambos casos, entre los esqueletos ciclopeptídicos se establecían los seis enlaces de hidrógeno intermoleculares, aunque en el caso del eclipsado las distancias fueron más uniformes, lo que sugiere que las estructuras alternadas están más distorsionadas para satisfacer la formación de la interacción π-π.

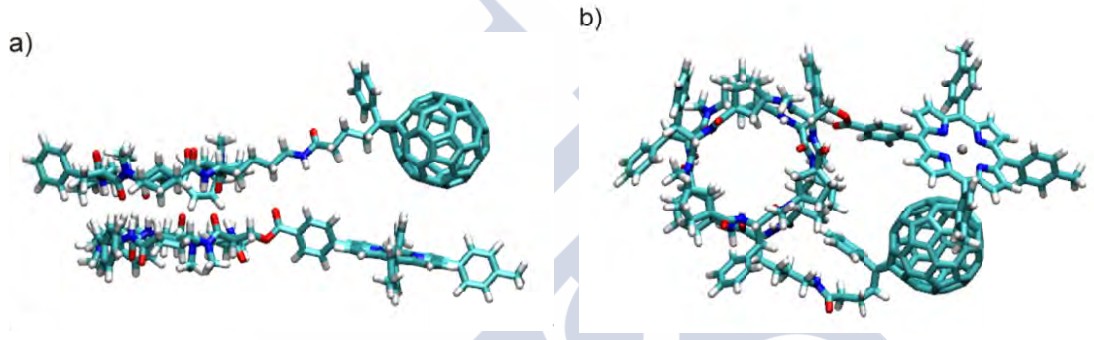


Figura 69: Minimizaciones de energía para las estructuras heterodiméricas eclipsada (**a**) y alternada (**b**) llevadas a cabo empleando el software CAChe.[147]

Además, se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular (40 ns, $CHCl_3$) para analizar el comportamiento estructural y dinámico de los rotoisómeros. Para las simulaciones se empleó como punto de partida las estructuras alternadas en las que los cromóforos del sistema heterodimérico se encontraban formando una interacción π-π (Figura 69 b). Estos cálculos conducían a una nueva especie en la que ambos cromóforos se separaban alcanzando una distancia de 21.2 ± 6.3 Å (Figura 71 b). Este dato fue consistente con trabajos previos del grupo con sistemas FRET (Föster Resonance Energy Transfer) entre un pireno y un dapoxilo que indicaban una distancia superior a los 15 Å. Sin embargo, los estudios llevados a cabo partiendo de la forma eclipsada (Figura 69 a) daban lugar a unas estructuras en las cuales las distancias entre cromóforos eran mucho menores, 6.6 ± 1.1 Å (Figura 71 a). Además, en más de la mitad de las estructuras se pudo observar la aparición de un enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de los péptidos, lo que está en consonancia con los datos experimentales de ^{1}H-RMN en CD_2Cl_2 del heterodímero **D(3$_{Zn}$·6)** (Figura 70).

[146] Gaussian 09, Revision E.02, Frisch, M. J. *et al* Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
[147] CAChe WorkSystem, versión 6.1.12.33; Fujitsu Limited (USA) 2004.

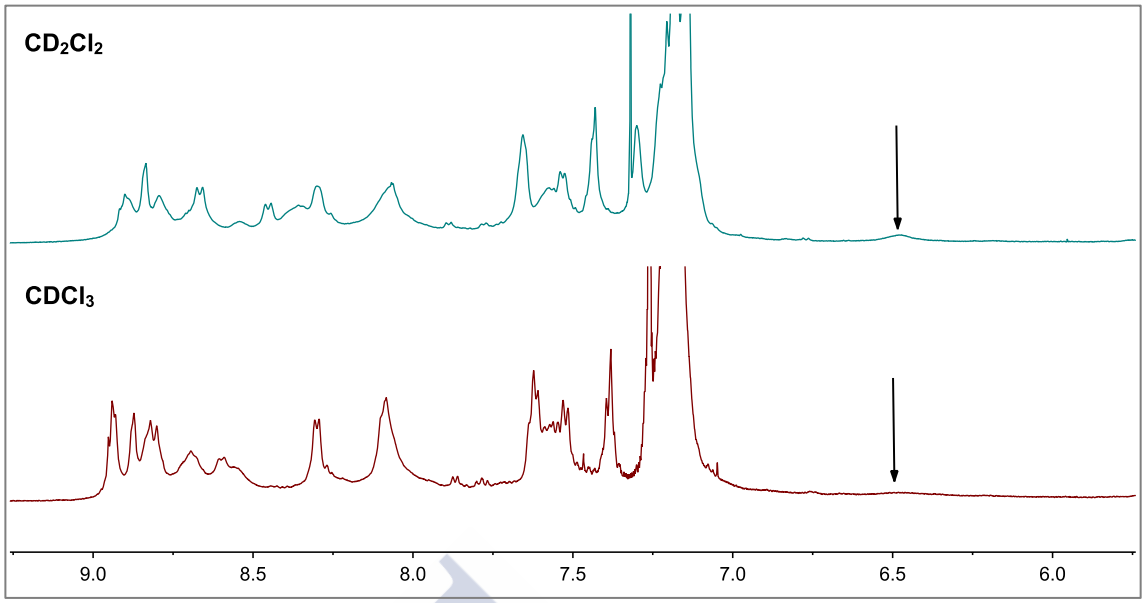
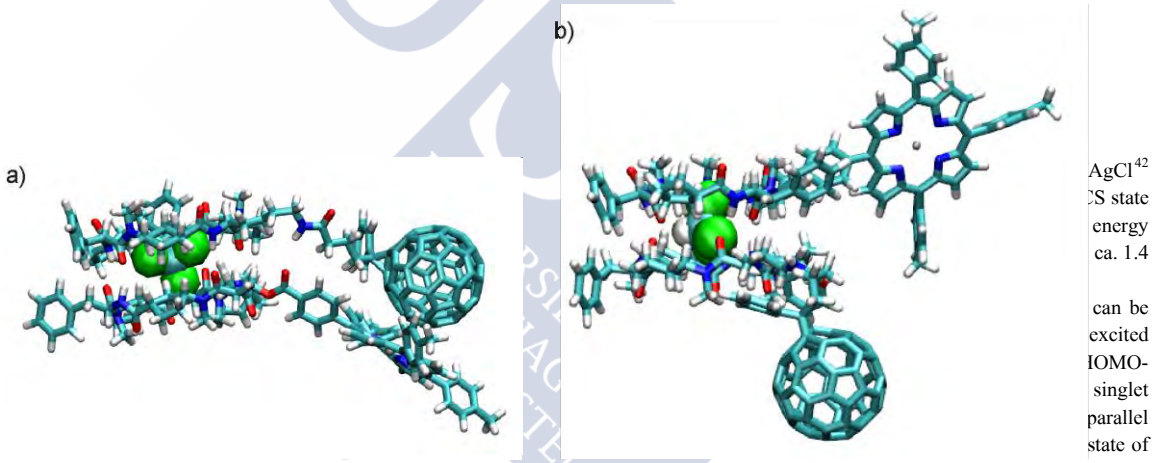


Figura 70: Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN (desde 9.25 ppm a 5.75 ppm) del heterodímero **D(3$_{Zn}$·6)** en CD_2Cl_2 y $CDCl_3$ donde se señalan las señales de los NH que forman el enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de **CP3$_{Zn}$** y **CP6**.



AgCl[42]
CS state
energy
ca. 1.4

can be
excited
HOMO-
singlet
parallel
state of

the porphyrin yielding the excited singlet state of the fullerene, step

Figura 71: Estructuras de Dinámica Molecular obtenidas mediante GROMACS 4.0 para los heterodímeros eclipsado (**a**) y alternado (b).[148]

El análisis de las diferentes contribuciones energéticas durante las simulaciones de dinámica molecular sugiere que mientras que las interacciones coulombicas de las conformaciones eclipsadas y alternadas son similares, la contribución Lennard-Jones es mucho más favorable para la conformación eclipsada (28 kcal/mol más estable). Por lo tanto, los estudios de modelización molecular indican que es más probable que los fenómenos de fotoreactividad ocurran en el dímero eclipsado.

[148] Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. *J. Chem. Theory Comput*. **2008**, *4*, 435-447.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Nuevos γ-ciclopéptidos que contienen aminoácidos polihidroxilados

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Como hemos visto en la introducción de este trabajo de tesis, los requisitos estructurales que deben poseer los ciclopéptidos para que se autoensamblen y formen nanotubos eran tres. En primer lugar, el esqueleto peptídico debe estar formado por un número par de átomos, en segundo lugar, debe existir complementariedad entre los grupos dadores y aceptores de enlace de hidrógeno, y por último, las cadenas laterales de los aminoácidos deben adoptar una disposición pseudo-ecuatorial. A partir de estas tres premisas se diseñaron los primeros ciclopéptidos formados por α-aminoácidos de quiralidad alternada.[36] Como hemos visto, una de las formas más sencillas de diseñar ciclopéptidos que contengan γ-aminoácidos consiste en reemplazar los residuos de los α-aminoácidos por γ-aminoácidos que sean estereoquímicamente equivalentes (Figura 72).

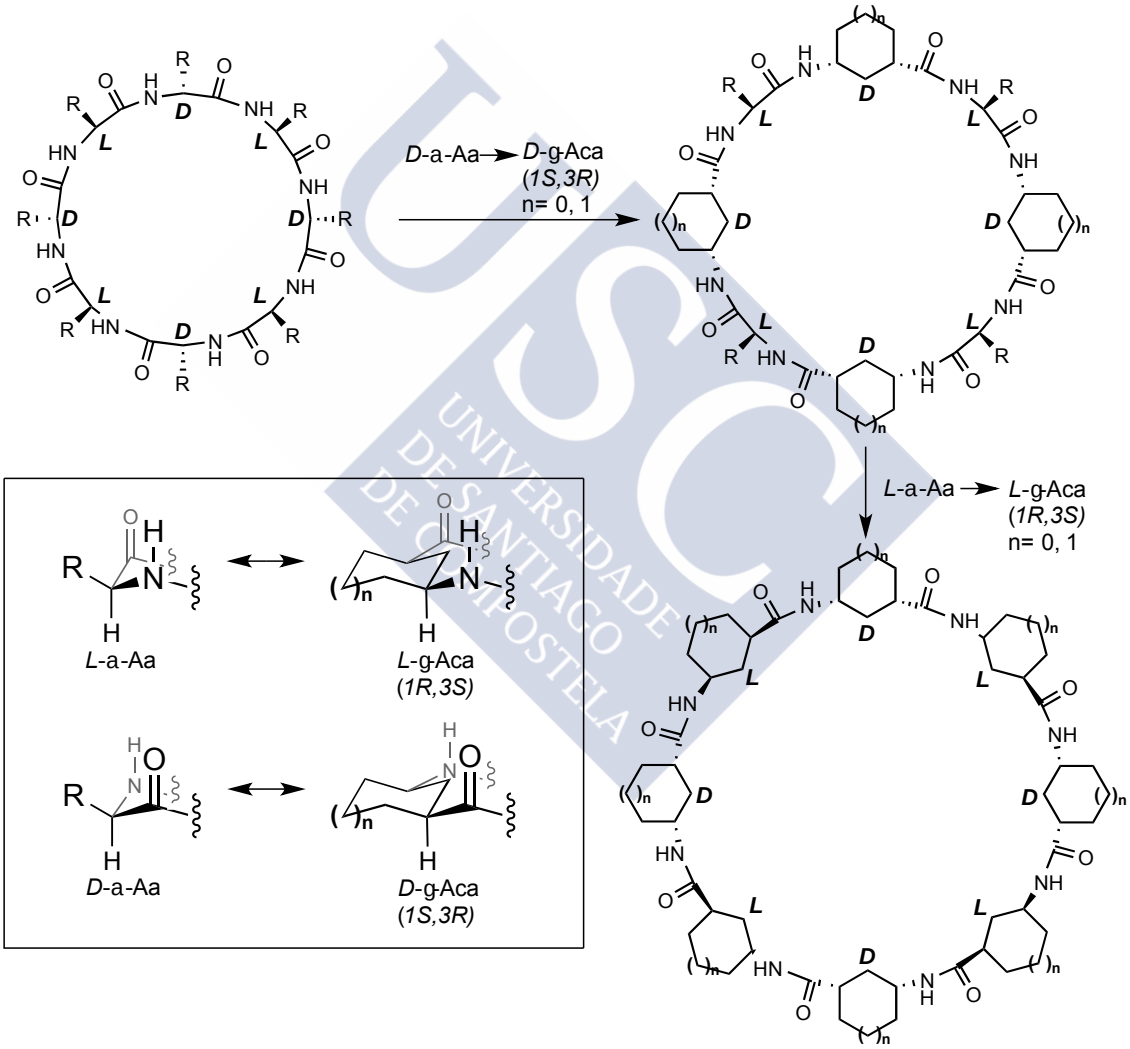


Figura 72: Equivalencia entre *D*-α-aminoácidos y los ácidos (1S,3R)-γ-aminocicloalcano carboxílicos (*D*-γ-Acas) o sus correspondientes enantiómeros (en el recuadro) y diseño de α,γ-ciclopéptidos y γ-ciclopéptidos mediante la sustitución de los α-aminoácidos por los correspondientes γ-Acas.

[36] Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

Basándonos en este criterio, se diseñaron los primeros α,γ-ciclopéptidos en el que todos los α-aminoácidos de quiralidad *L* se sustituían por los isómeros (*1R,3S*) del γ-Ach, a los que debido a dicha equivalencia se denominó *L*-γ-Ach.[149, 58] Mediante dicho procedimiento también es posible diseñar ciclopéptidos formados exclusivamente por γ-aminoácidos que mantengan intacta sus propiedades para formar nanotubos. Para ello se sustituyeron los *D*-α-aminoácidos por los γ-Aca equivalentes, en este caso el enantiómero (*1S,3R*). En el recuadro de la Figura 72 se muestra la equivalencia establecida entre los α- y los γ-aminoácidos para lo que se tuvo en cuenta la orientación relativa de los grupos amino y carboxilato con respecto al carbono α (α-aa) y al anillo central del γ-Aca.

El primer ejemplo de ciclopéptidos con capacidad para autoensamblarse formado exclusivamente por γ-aminoácidos cíclicos fue publicado por el grupo de Deng en el año 2012, cuando nuestro trabajo ya estaba próximo a su conclusión. En dicho artículo se describía la síntesis y el estudio de un γ-ciclotetrapéptido en el que se alternaba el *L*-γ-Ach con unidades de *D*-γ-Ach funcionalizado en la posición C5 con un hidroxilo, lo que permitía la funcionalización exterior de los nanotubos generados por el apilamiento de dicho ciclopéptido (Figura 73).[69] Un aspecto relevante de este trabajo era que el apilamiento de las unidades ciclopeptídicas se daba, al contrario de lo esperado, mediante una hoja plegada paralela. Este hecho probablemente se debía a que la gran tensión anular que sufre el tetrapéptido cíclico provoca que los grupos amidas no estén perpendiculares al plano del anillo, de forma que deben encontrar una mejor alineación entre los grupos dadores y aceptores de enlace de hidrógeno cuando la interacción es a través de la lámina β paralela. Aunque la constante de asociación era muy pequeña y sólo se apreciaba con cierta claridad cuando se añadía hexano sobre la disolución del ciclopéptido en cloroformo.

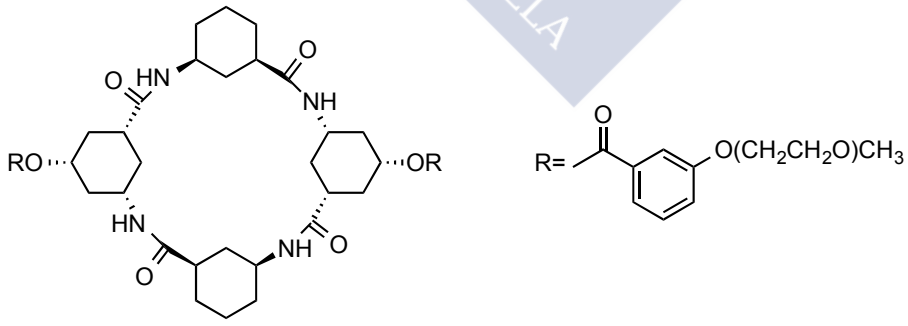
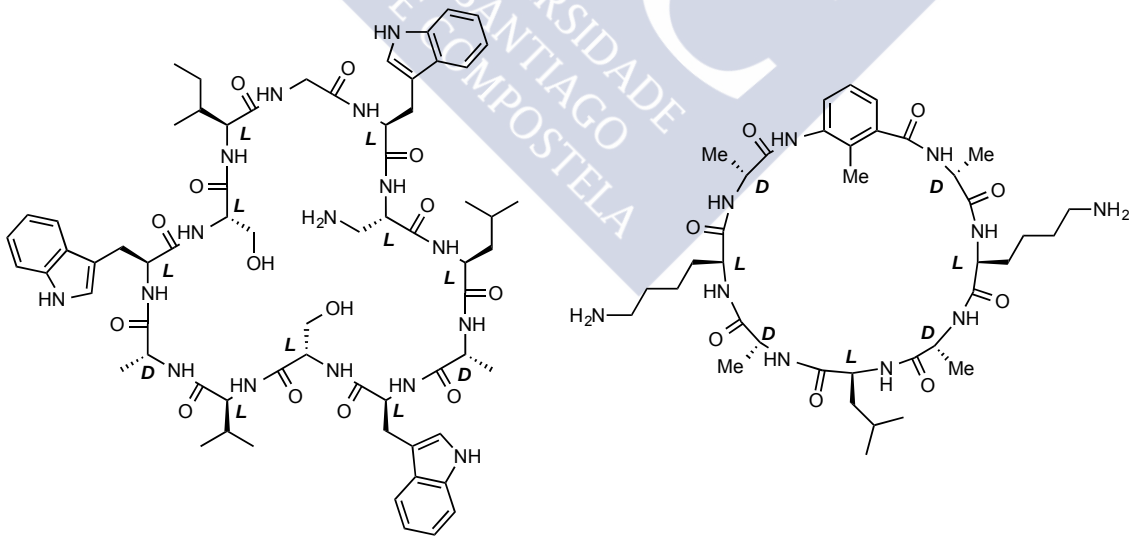


Figura 73: Ciclo-γ-tetrapéptidos basados en el γ-Ach sintetizados por el grupo de Deng.

[149] A lo largo de esta memoria denominaremos, por tanto, como *L*-γ-Aca a los γ-aminoácidos cuya quiralidad es equivalente a los *L*-α-aminoácidos, y *D*-γ-Aca a sus enantiómeros.
[58] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.
[69] Li, L.; Zhan, H.; Duan, P.; Liao, J.; Quan, J.; Hu, Y.; Chen, Z.; Zhu, J.; Liu, M.; Wu, Y-D.; Deng, J. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 3051-3056.

La cavidad interna de los (*D*,*L*)-α-ciclopéptidos es hidrofílica,[79] y no permite la modificación de las propiedades internas sin intercambiar alguno de los α-aminoácidos de forma que no se interrumpa el autoensamblaje. Un diseño interesante en un intento por modificar la cavidad interna del nanotubo fueron los canales iónicos formados por α-(*L*,*L*,*L*,*D*)$_3$-ciclopéptidos, en los que el α-aminoácido central de la serie *L,L,L* queda orientado hacia el interior de la cavidad (Figura 74, izquierda).[150] Sorprendentemente, desde su publicación en el año 2001 no se ha continuado trabajando en este tipo de diseños. La inclusión de γ-aminoácidos cíclicos (γ-Acas) modifica las propiedades de la cavidad interna de los nanotubos, aumentando su hidrofobicidad, debido a la proyección del metileno en posición β del aminoácido hacia el interior de dicha cavidad (Figura 72). Por lo tanto, la funcionalización de la posición β del γ-Aca podría permitir la modulación de las propiedades de la cavidad interna de los nanotubos. Un ejemplo de la funcionalización interna a través del uso de γ-Acas fue la síntesis y estudio del péptido cíclico *c*-[*L*-Lys-*D*-Ala-*L*-Leu-*D*-Ala-*L*-Lys-D-Ala-γ-Mba-*D*-Ala-] llevada a cabo por el grupo de Xu.[68] En este caso se sustituyó uno de los α-aminoácidos por el ácido 3-amino-2-metilbenzoico (γ-Mba-OH, Figura 74, derecha) en un *D,L*-α-ciclopéptido. Este nuevo péptido cíclico poseía la capacidad para autoensamblarse formando nanotubos en el que el grupo metileno de la posición C2 del Mba se proyectaba hacia la cavidad interna del mismo. Sin embargo, la incorporación del γ-Mba distorsionaba la planaridad del anillo ciclopeptídico, de forma que la inclusión de dos o más unidades de dicho aminoácido provocaba la pérdida de su capacidad para apilarse y formar nanotubos.



[79] Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.

[150] Wang, D.; Guo, L.; Zhang, J.; Jones, L. R.; Chen, Z.; Pritchard, C.; Roeske, R. W. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*, 301-306.

[68] Hourami, R.; Zhang, C.; Van der Weeger, R.; Ruiz, C.; Li, C.; Keten, S.; Helms, B. A.; Xu, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15296-15299.

Figura 74: Estructura del ciclopéptido α-(*L*,*L*,*L*,*D*)$_3$ sintetizado por Pritchard (izquierda) y estructura del *c*-[*L*-Lys-*D*-Ala-*L*-Leu-*D*-Ala-*L*-Lys-D-Ala-γ-Mba-*D*-Ala-] sintetizado por el grupo de Xu (derecha).

En nuestro grupo de investigación se llevaron a cabo varias aproximaciones hacia la modulación de las propiedades internas de los nanotubos usando γ-aminoácidos derivados de azúcares o SAAs (del inglés Sugar Aminoacids) en α,γ-ciclopéptidos.[151] Los aminoácidos derivados de azúcares son compuestos en los que los grupos funcionales amino y ácido carboxílico se encuentran unidos directamente a la estructura de un carbohidrato.[152] Esta familia de compuestos es ampliamente empleada en la naturaleza como "elementos de construcción". Probablemente el más extendido sea el ácido siálico, una familia de SAAs formada por *N*- y *O*-acetilderivados del ácido neurámico, y que se localiza a menudo en la periferia de las glicoproteínas.[153] Otro ejemplo son los ácidos glicosaminourónicos, que se suelen encontrar formando parte de las paredes celulares bacterianas,[154] o el ácido 2-acetamido-2-deoxigalacturónico, que es uno de los componentes del antígeno Vi de la *salmonella typhimurium*. Incluso se han encontrado cicloglicopéptidos con actividad antibiótica, como las manopeptimicinas.[76]

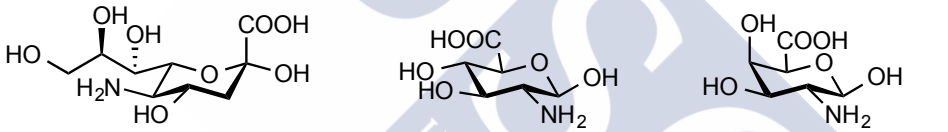


Figura 75: Ejemplos de ácidos aminosacáridos (SAAs) presentes en la naturaleza.

En los últimos años se han preparado diversos SAAs sintéticos que se han empleado como elementos de construcción para la preparación de análogos de péptidos y de oligonucleótidos.[155] Otra de sus aplicaciones es la síntesis de análogos de productos naturales debido a que su rigidez le confiere una potencial actividad biológica, tal como realizó el Dr. M. Overhand, en el que se incorporaron ácidos aminosacáridos a la secuencia de la Gramicidina S aportándole nuevas propiedades antimicrobianas.[156] En

[151] Rodríguez-Vázquez, N.; Salzinger, S.; Silva, L. F.; Amorín, M. A.; Granja, J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3477-3493.
[152] Gruner, S. A. W.; Locardi, E.; Lohof. E.; Kessler, H.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491-514.
[153] Varki, A.; Schauer, R. "Sialic Acids". En *Essentials of Glycobiology* (2nd Ed.); Eds A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Eso, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (USA), **2009**, 199-217.
[154] Gervay-Hague, J.; Weathers, J.T.M.; *J. Carbohydr. Chem*. **2002**, *21*, 867-910.
[76] He, H.; Williamson, R. T.; Shen, B.; Graziani, E. I.; Yang, H. Y.; Sakya, S. M.; Petersen, P. J.; Carter, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9729-9736.
[155] Jensen, K. J.; Brask, J. *Biopolymers Pept. Sci*. **2005**, *80*, 747-761.
[156] Grotenbreg, G. M.; Buizert, A. E. M.; Llamas-Sainz, A. L.; Spalburg, E.; van Hoof, P. A. V.; de Neeling, A. J.; Noort, D.; van Raaij, M. J.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7559-7565.

función del tamaño del anillo de los SAAs, se pueden clasificar en dos grandes grupos; los furanoides, que poseen un anillo de cinco miembros, y que se diferencian en los derivados α, β, γ y δ, en función de las posiciones relativas de los grupos amino y ácido (Figura 76, derecha), y los piranoides, cuyo anillo está formado por seis átomos, y que se clasifican a su vez en α, β, γ, δ y ε dependiendo del número de átomos que separan al grupo ácido y al amino (Figura 76, izquierda).[152]

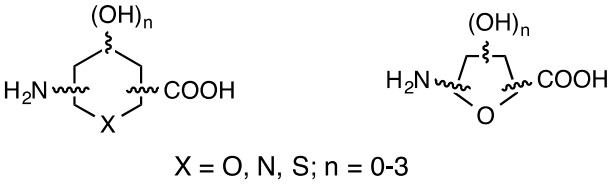


Figura 76: Estructuras generales de los azucaraminoácidos: piranoides (izquierda) y furanoides (derecha).

El primer ejemplo de ciclopéptidos capaces de autoensamblarse en estructuras tubulares y que incluían SAAs en su esqueleto peptídico procede del grupo de Kimura, que en el año 2006 publicó la síntesis de un ciclo-β-tripéptido y un ciclo-β-tetrapéptido formados exclusivamente por un β-piranoide derivado de la *D*-glucosamina (Figura 77).[54] Dichos ciclopéptidos se autoensamblaban en forma de agregados columnares dando lugar a una nueva familia de nanotubos peptídicos.

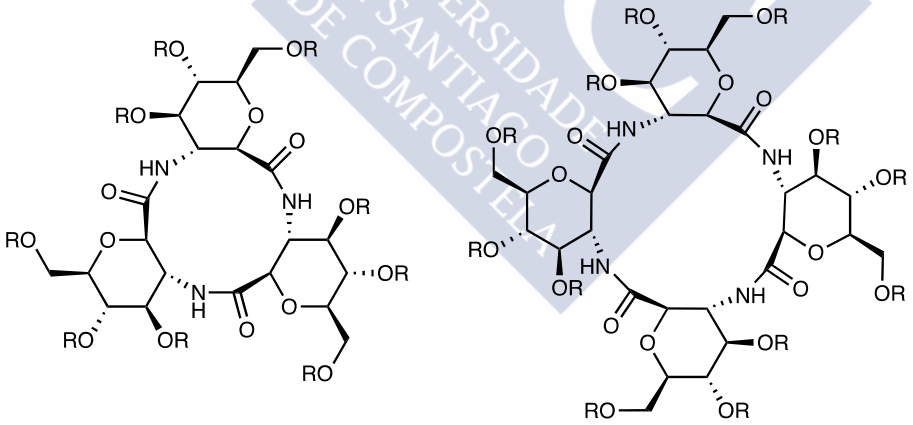


Figura 77: Estructuras del ciclo-β-tripéptido y del ciclo-β-tetrapéptido sintetizados por Kimura.[54]

La incorporación de los β-SAAs permitía la obtención de nanotubos con una superficie externa funcionalizable, permitiéndose la unión a las lectinas,[157] pero no admitía la funcionalización interna de los nanotubos. Por ello, en trabajos recientes de nuestro

[54] Fujimura, F.; Hirata, T.; Morita, T.; Kimura, S. *Biomacromol*. **2006**, *7*, 2394-2400.
[157] Fujimura, F.; Horikawa, Y.; Morita, T.; Sugiyama, J.; Kimura, S. *Biomacromol.* **2007**, *8*, 611-616.

grupo de investigación se ha llevado a cabo la síntesis y el estudio de las propiedades de ciclopéptidos que incluyen γ-SAAs en su estructura.

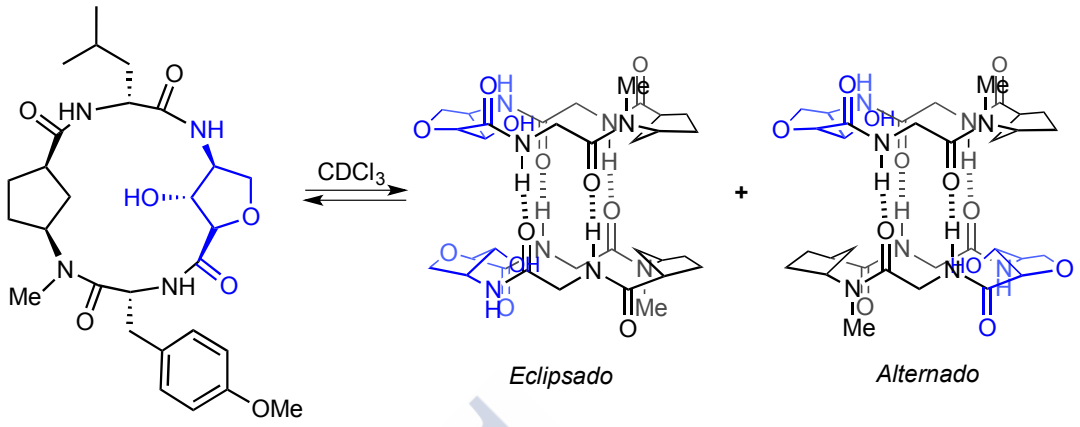
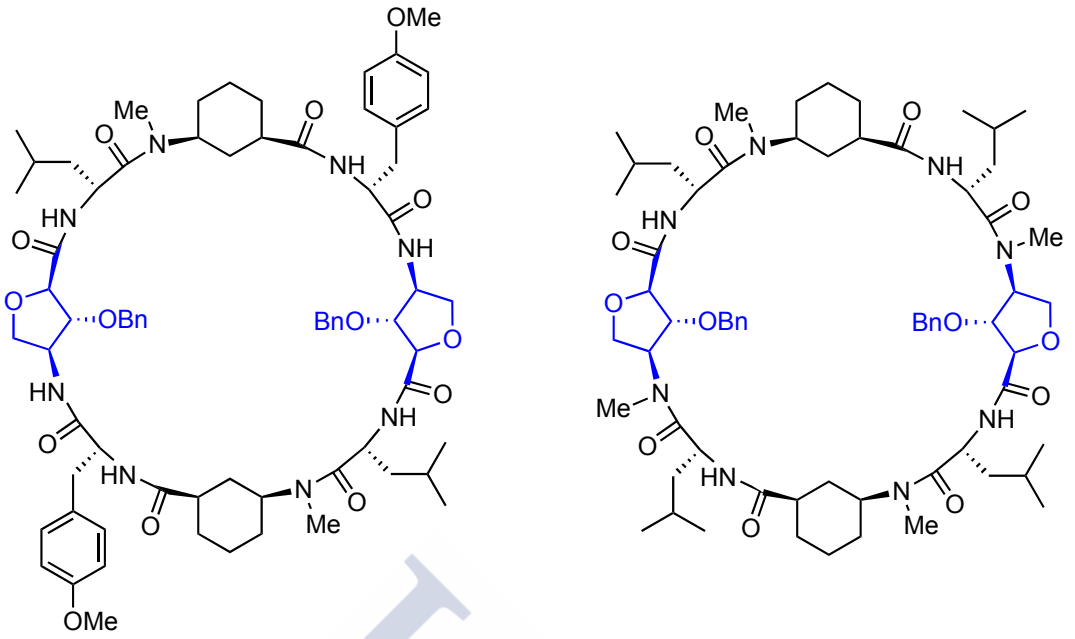


Figura 78: Estructura del péptido *c*-[*D*-Leu-*L*-γ-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-] (izquierda) y sus dos posibles especies diméricas en disolución: eclipsada (centro) y alternada (derecha).

El primer ciclopéptido estudiado fue el tetrapéptido *c*-[*D*-Leu-*L*-γ-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-] que incorporaba en su estructura el derivado γ-furanoide; ácido 4-amino-3-hidroxifuranocarboxílico (γ-Ahf) cuyo grupo hidroxilo en la posición C2 quedaba enfocado hacia el interior de la cavidad, aportando un carácter hidrofílico al interior del dímero.[66]

Los estudios de ^{1}H-RMN del ciclo *c*-[*D*-Ala-*L*-γ-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-] demostraron que el péptido formaba dímeros en disolución con una constante de asociación en cloroformo de 10^4 M^{-1} aunque no se pudo hallar la relación entre los diferentes dímeros. Sin embargo, mediante cálculos DFT se pudo establecer que la forma eclipsado era entre 1.53 y 1.93 kcal/mol más estable que la forma alternada debido a la formación de un enlace de hidrógeno entre los dos hidroxilos de los γ-Ahf en la cavidad del dímero. La funcionalización de la cavidad interna gracias al uso del γ-Ahf permitirá en un futuro la formación de nanotubos peptídicos que deben poseer una gran selectividad para el transporte de iones mediante la formación de canales iónicos, así como catalizadores y contenedores moleculares.

[66] Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Biomol. Chem*. **2009**, *7*, 4358-4361.



c-[(*D*-Leu-g-Ahf(Bn)-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}*N*-g-Ach-)$_2$] *c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-g-Ahf(Bn)-*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-g-Ach-)$_2$]

Figura 79: Estructuras de los primeros α,γ-octapéptidos cíclicos que incluyen en sus estructuras unidades del ácido 4-amino-3-hidroxifuranocarboxílico (γ-Ahf).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado la síntesis de α,γ-octapéptidos cíclicos que contenían en su estructura dos unidades del γ-Ahf, los péptidos *c*-[(*D*-Leu-γ-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$] y *c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-γ-Ahf-*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$].[67] El primero de ambos péptidos adoptaba una conformación plegada en disolución, al formarse un enlace de hidrógeno intramolecular entre el protón amídico y el carbonilo del γ-Ahf (Figura 79, izquierda). Dicho comportamiento fue consistente con el comportamiento de los α,γ-ciclopéptidos sintetizados con anterioridad en nuestro grupo de investigación empleando γ-Acas no metilados de cinco miembros (γ-Acp).[158] Sin embargo el segundo de los péptidos, donde el γ-Ahf se encontraba *N*-metilado (Figura 79, derecha), sí mostró capacidad de autoensamblaje, y la modificación de las propiedades internas del ciclopéptido se apreció en la diferencia de polaridad del péptido una vez eliminados los grupos Bn, ya que el péptido a temperatura ambiente sólo era capaz de autoensamblarse para dar dímeros en medios levemente polares (3% de MeOH en $CDCl_3$). Adicionalmente, a través de los grupos hidroxilos se pudo modificarla cavidad del péptido con ácido picolínico, de tal forma que se obtuvo un sistema dimérico con dos grupos piridina proyectados hacia el interior de la cavidad, y que fue capaz de atrapar cationes de Ag^+ o ácidos dicarboxílicos como el ácido oxálico.

[67] Rodríguez-Vázquez, N.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 183-187.

[158] Tesis Doctoral de D. Roberto J. Brea, "Diseño, síntesis y aplicaciones de sistemas supramoleculares homo- y heterodiméricos selectivos y eficientes basados en α,γ-ciclopéptidos". Universidade de Santiago de Compostela (USC), Febrero de 2013.

La segunda aproximación llevada a cabo en nuestro grupo de investigación usó un derivado γ-piranoide, el ácido 1-amino-glucurónico (γ-Aga) (Figura 80).[158, 159] Este aminoácido fue estudiado con anterioridad por el grupo del Prof. Kessler debido a su capacidad para inducir giros β cuando se insertaba en una secuencia peptídica.[160] El interés de su uso en los ciclopéptidos radicó en que el oxígeno del hemiaminal quedaría orientado hacia el interior del ciclo, y los hidroxilos en las posiciones δ, ε y ϕ hacia se proyectarían hacia el exterior del mismo, permitiendo la modificación de las propiedades internas y externas de los nanotubos formados. Estos grupos hidroxilos podrían modular la solubilidad del péptido en disolventes orgánicos o acuosos en función de sus grupos protectores.

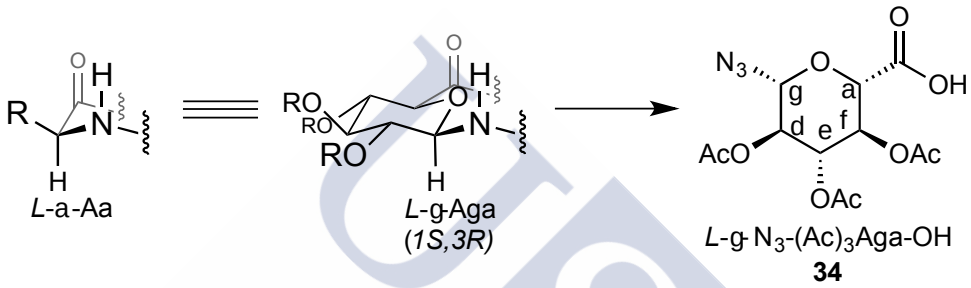


Figura 80: Equivalencia entre el *L*-γ-Aga y los *L*-α-aminoácidos y su precursor, el ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-azido-1-deoxy-β-glucopiranurónico (**34**).

El ácido 1-amino-glucurónico (el *L*-γ-Aga, Figura 80) posee el grupo amino en la posición anomérica formando un hemiaminal cíclico. Por tanto, dicho aminoácido está sujeto a la interconversión entre las formas α y β, así que la síntesis del mismo debe tener en cuenta dicho equilibrio, de tal forma que se prevenga la isomerización. De esta forma, la elección de los grupos protectores durante la síntesis depende de la estereoquímica deseada en el carbono anomérico del sacárido. En el mencionado trabajo del Prof. Kessler, se utilizó un grupo acida que servía como grupo protector, y que a su vez permitió su reducción y posterior formación de un enlace peptídico mediante un acoplamiento de Staudinger sin que se observara la isomerización en la posición anomérica. En cuanto a la protección de los grupos hidroxilos, es conocida la influencia del tamaño y del tipo de los grupos protectores del azúcar para la obtención de las formas α o la β.[161] En este sentido, el uso de ésteres como grupos protectores participativos promovió la forma β debido a la estabilización del carbocatión intermedio generado en las reacciones de intercambio del grupo funcional sobre el carbono anomérico. En este caso se seleccionó el grupo acetilo debido a su comportamiento

[159] El ácido 1-amino-glucurónico es el ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxílico.
[160] Von Roedem, E. G.; Lohof, E.; Hessler, G.; Hoffmann, M.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc*. **1996**, *118*, 10156-101167.
[161] Guo, J.; Ye, X-S. *Molecules*, **2010**, *15*, 7235-7265.

como grupo protector participativo y su sencilla eliminación.[162] Por todo esto, se empleó como precursor del ácido 1-amino-glucurónico el ácido 2,3,4-tri-O-acetil-1-azido-desoxi-β-glucopiranurónico (*L*-N_3-$(Ac)_3$-Aga-OH, **34**), sintetizado a partir del ácido *D*-glucurónico (**32**).

La reacción de Staudinger fue descubierta en el año 1919 por el químico alemán Hermann Staudinger.[163] En dicha reacción, una fosfina reacciona con el nitrógeno terminal de una acida, dando lugar a la formación de una fosfacida que evoluciona a través de un estado de transición cíclico de cuatro miembros para dar un iminofosforano mediante la pérdida de una molécula de nitrógeno (Figura 81). La posterior hidrólisis de este intermedio iminofosforano da lugar a la correspondiente amina primaria y al óxido de fosfina. Además de producirse en condiciones suaves, es prácticamente cuantitativa y no se observa la formación de productos de reacciones laterales.

Una variante muy útil sintéticamente es el acoplamiento Staudinger que requiere la presencia de un ácido carboxílico activado que reaccione con el iminofosforano generado antes de su hidrólisis, para dar lugar a la amida (Figura 81). Esta reacción se ha establecido como uno de los métodos más importantes para la obtención de glicosilamidas.[164]

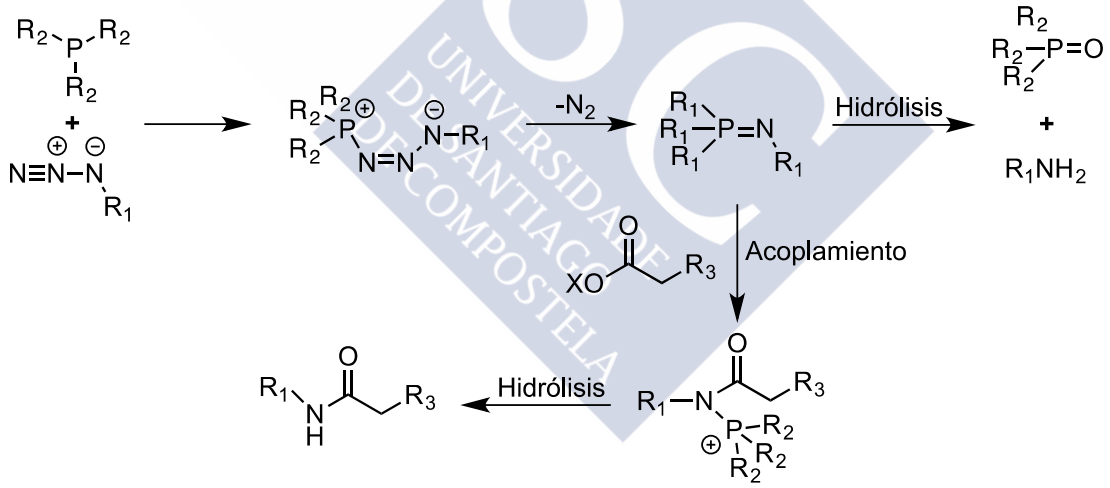
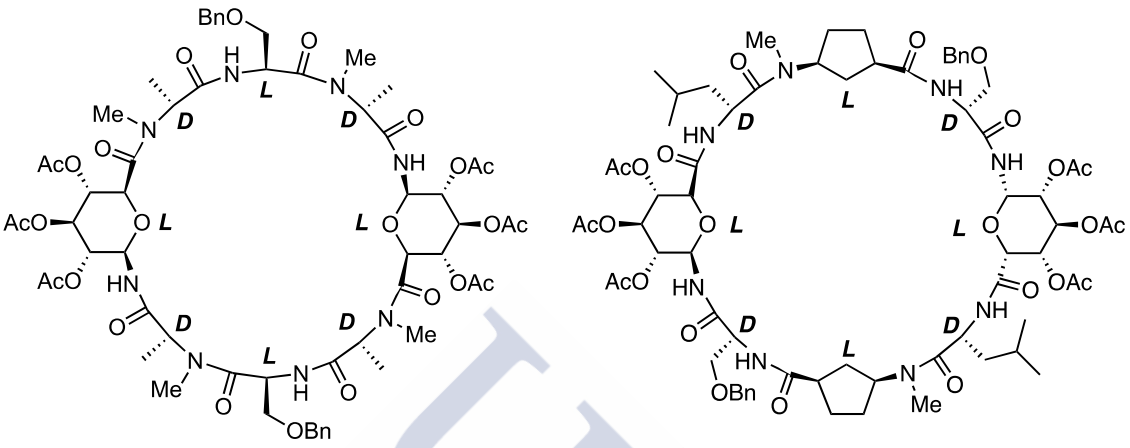


Figura 81: Mecanismos propuestos para la transformación de acidas en aminas y/o amidas mediante el tratamiento con fosfinas (reacción de Staudinger), que implica la formación de un intermedio iminofosforanino cuya hidrólisis conduce a la formación del óxido de trifenilfosfina y la correspondiente amina primaria, y para el acoplamiento del iminofosforanino con ácidos carboxílicos preactivados (acoplamiento de Staudinger).

Empleando esta metodología se sintetizaron dos ciclopéptidos que incluían en su estructura al ácido 1-amino-glucurónico, el *c*-[(*L*-Ser(Bn)-*D*-^{Me}*N*-Ala-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-*D*-^{Me}*N*-

[162] Malkinson, J. P.; Falconer, R. A.; Toth, I. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5249-5252.
[163] Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim Acta* **1919**, *2*, 635-646.
[164] Maunier, V.; Boullanger, P.; Lafont, D. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 231-235.

Ala-)$_2$] y el *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-*D*-Ser(Bn)-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-)$_2$] (Figura 82), siendo la etapa clave de su síntesis la formación de los correspondientes tetrapéptidos Boc-(*L*-Ser(Bn)-*D*-^{Me}*N*-Ala-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-^{Me}*N*-Ala)-OPac y Boc-(*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-*D*-Ser(Bn)-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga)$_2$-OPac a través de un acoplamiento de Staudinger.



c-[(*L*-Ser(Bn)-*D*-^{Me}*N*-Ala-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-^{Me}*N*-Ala-)$_2$] *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-*D*-Ser(Bn)-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-)$_2$]

Figura 82: Estructuras de los péptidos cíclicos 3α,1γ-CP (izquierda) y α,γ-CP que contienen dos unidades del ácido 1-amino-glucurónico sintetizados en nuestro grupo de investigación por el Dr. Roberto J. Brea.[158]

Los estudios de ^{1}H-RMN en cloroformo del 3α,1γ (péptido formado por una relación de tres α-aminoácidos de quiralidad alternada y un γ-aminoácido) *c*-[(*L*-Ser(Bn)-*D*-^{Me}*N*-Ala-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-^{Me}*N*-Ala-)$_2$] (Figura 82, izquierda) mostraron unos espectros mucho más complejos de lo esperado, y que apenas variaba en función de la concentración o de la temperatura, por lo que se llegó a la conclusión de que dicho ciclopéptido adoptaba una conformación plegada en disolución para satisfacer la formación de enlaces de hidrógeno en lugar de formar estructuras diméricas. Sin embargo, el uso de pequeños porcentajes de TFA o de H_2O (hasta un 2%) en cloroformo permitió la obtención de espectros con mayor definición en los que las señales correspondientes a los protones amídicos (responsables de la formación de enlace de hidrógeno) se hallaron desplazados a campo bajo (entre 7.5 y 7.8 ppm) aunque el estudio de los espectros bidimensionales de RMN confirmó de nuevo la obtención de estructuras plegadas.

La obtención de estructuras complejas con los 3α,1γ-ciclopéptidos conteniendo dos residuos de γ-Aga motivó la síntesis del α,γ-ciclopéptidos en los que además del ácido 1-amino-glucurónico se empleaba el γ-Acp. El objetivo era dotar de una mayor rigidez al ciclopéptido para inducir la formación de estructuras diméricas en lugar de las estructuras plegadas mencionadas. De esta forma se sintetizó el péptido *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-γ-Acp-*D*-Ser(Bn)-γ-(Ac)$_3$Aga-)$_2$] (Figura 82, derecha) en el que existían sólo dos aminoácidos *N*-metilados (Acp) y por lo tanto dos de los protones amídicos deberían quedar expuestos hacia el disolvente sin participar en la formación de enlaces de

hidrógeno. Los espectros de ^{1}H-RMN en cloroformo del péptido, de nuevo fueron más complejos de lo esperado, especialmente en la zona característica de los protones amídicos, lo que indicaba que el péptido se hallaba involucrado en un equilibrio complejo en el que coexistían diversas formas plegadas. La conclusión de los trabajos iniciales fue que la fuerte tendencia a provocar giros β del γ-Aga provocaba el plegamiento de los ciclopéptidos, por lo que su uso se debería acotar a sistemas de mayor rigidez.

Los sistemas 3α,1γ-ciclopeptídicos ya se habían estudiado ampliamente en nuestro grupo de investigación para comprobar la posible influencia de la *N*-metilación de α- o γ-aminoácidos sobre el comportamiento de los ciclopéptidos en disolución,[57] ya que el bloqueo selectivo de las caras α o γ en los α,γ-ciclopéptidos condujo a resultados muy dispares en cuanto a los valores de las constantes de asociación de los dímeros estudiados.[58]

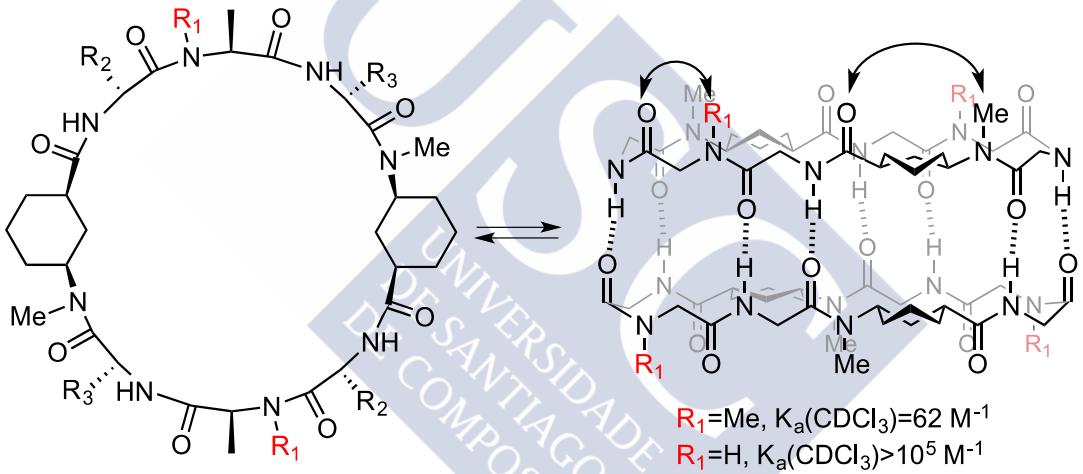


Figura 83: Representación esquemática de los dímeros de 3α,γ-ciclopéptidos donde se señalan las posiciones que provocan un descenso en la constante de asociación cuando se intercambia en la posición R_1 el hidrógeno por un metilo (las cadenas laterales se han omitidas para una mayor claridad).

Una hipótesis razonable que justifica este comportamiento se basa en la repulsión existente entre el metilo amídico del α-aminoácido y el grupo carbonilo (repulsiones 1,3-diaxiales), que provocaría una distorsión en el esqueleto ciclopeptídico en la conformación plana del anillo, lo que da como resultado una menor capacidad para la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Dicha repulsión no está presente en el caso de la *N*-metilación de γ-aminoácidos, debido a la mayor distancia, con una separación de 5 átomos frente a tres de los α-aminoácidos, entre el grupo *N*-metilo y el carbonilo. Los estudios realizados en el año 2008 por nuestro grupo de investigación con

[57] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.
[58] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 2844-2845.

los 3α,1γ-ciclopéptidos concuerdan con esta hipótesis (Figura 83).[57] La constante de asociación de los octapéptidos que contenían dos o cuatro aminoácidos *N*-alquilados eran muy dispares. Mientras que el ciclopéptido donde sólo los dos γ-aminoácidos estaban *N*-metilados poseía unas constantes de asociación con valores superiores a 10^5 M^{-1}, el que contenía también los dos α-aminoácidos *N*-metilados poseía constantes de asociación en torno a 62 M^{-1}. Otro aspecto resaltable del estudio con los 3α,1γ-ciclopéptidos era la metilación de la otra cara del ciclopéptido en la que se observó que la presencia de los *N*-metilos en α-aminoácidos producía giros y plegamientos en los péptidos, impidiendo la conformación plana necesaria para el autoensamblaje.

En base a todos estos precedentes, nos propusimos llevar a cabo la síntesis y estudio de un nuevo ciclopéptido con capacidad para autoensamblarse que incluyese en su estructura el ácido 1-amino-glucurónico. En vista de los resultados obtenidos para dicho ácido aminosacárido en 3α,1γ-ciclopéptidos y los α,γ-ciclopéptidos que contenían dos residuos del γ-Aga, decidimos emplear un sistema de mayor rigidez, formado exclusivamente por γ-aminoácidos. Además, debido a los requerimientos sintéticos derivados del uso del ácido 2,3,4-tri-O-acetil-1-azido-desoxi-β-glucopiranurónico como precursor del γ-Aga, la etapa clave de la síntesis del ciclopéptido consiste en un acoplamiento Staudinger cuyas condiciones deberían ser optimizadas. Por último, este novedoso diseño nos permitirá estudiar en mayor profundidad las interacciones gamma entre ciclopéptidos desde el punto de vista estructural y termodinámico a través del estudio en disolución de péptidos parcialmente *N*-metilados.

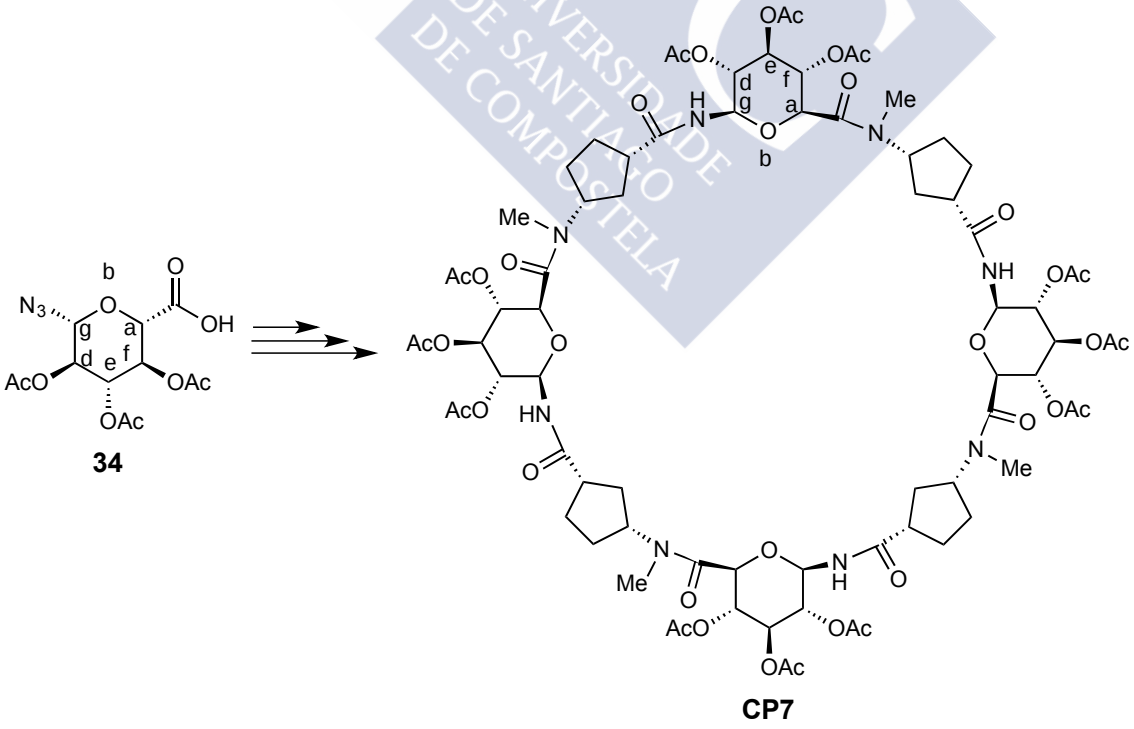


Figura 84: Ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetil-1-acido-1-deoxi-β-glucopiranurónico (*L*-N_3-$(Ac)_3$Aga-OH, **34** izquierda), y diseño propuesto para el ciclopéptido **CP7** (derecha).

En base a estos objetivos, decidimos sintetizar el ciclopéptido **CP7**, en el que se alternase el ^{Me}*N*-γ-Aca con el ácido 1-amino-glucurónico (γ-Aga) (Figura 84). Este ácido aminosacárido permitiría modificar tanto las propiedades internas como las externas de los nanotubos, ya que posee un átomo de oxígeno en la posición β, y tres grupos hidroxilo en las posiciones δ, ε y φ, que quedarían expuestos hacia el exterior del anillo ciclopeptídico. Estos grupos hidroxilo aportarían una mayor solubilidad en disolventes orgánicos o acuosos en función de los grupos protectores empleados. A partir de la elección del aminoácido glicosilado, se seleccionaron los γ-Acas con la estereoquímica adecuada para obtener un ciclopéptido plano con capacidad para el autoensamblaje. Para ello, como se observa en la Figura 72, tendremos que alternar los *D*- y *L*-γ-Acas como ya se indicó de forma general con anterioridad. Al γ-Aga le hemos atribuido la quiralidad *L* por su similitud con los *L*-α-aminoácidos (véase recuadrado en la Figura 72). El bloqueo del crecimiento del nanotubo y la consiguiente formación de dímeros fue posible al optar por un *D*-γ-Aca *N*-alquilado como el *L*-^{Me}N-γ-Acp, dado que la metilación del grupo amino del γ-Aga implicaría una mayor complejidad sintética.

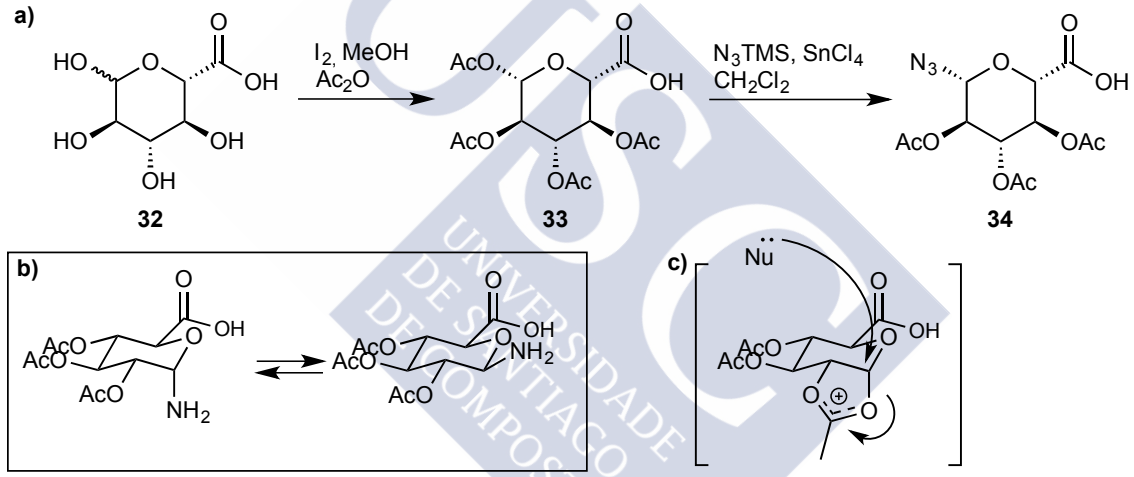


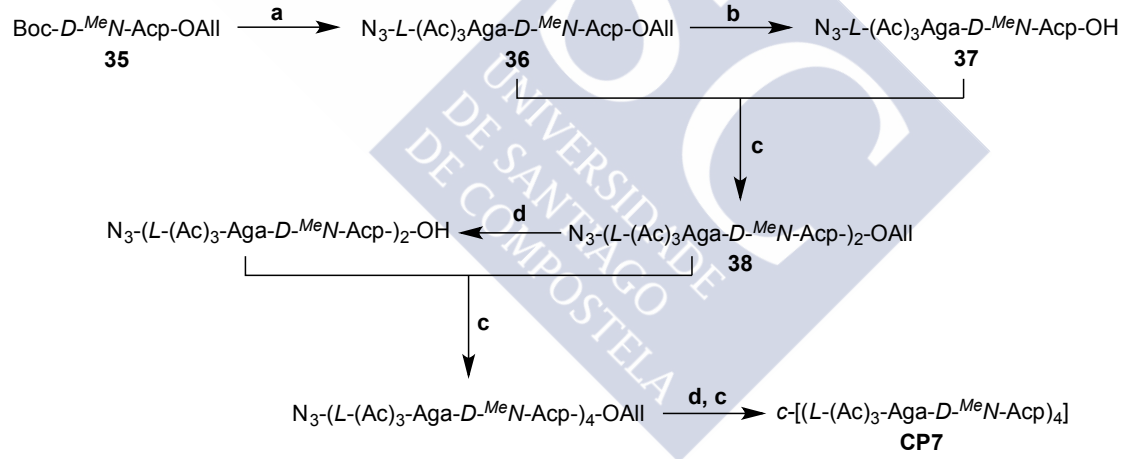
Figura 85: a) Esquema sintético seguido para la obtención del ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-acido-1-deoxy-β-glucopiranurónico precursor del *L*-γ-Aga (**34**); b) Equilibrio de la isomerización de la posición anomérica del *L*-γ-Aga; c) Representación esquemática del comportamiento del grupo protector acetilo como grupo participativo frente a la adición de nucleófilos en la posición anomérica.

Para la construcción del ciclopéptido planteamos una síntesis rápida y convergente en disolución (Figura 86) hasta llegar al octapéptido lineal. El último paso sería la etapa de ciclación que conduce al péptido cíclico protegido que finalmente sería tratado con una disolución de hidróxido amónico para eliminar los grupos acetilos. Debido a la simetría del ciclopéptido **CP7**, sólo sería necesario sintetizar un dipéptido, a partir del cual se prepararían todos los demás intermedios peptídicos lineales, el tetrapéptido y el octapéptido.

Gracias a los estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, decidimos emplear el ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetil-1-acido-1-deoxi-β-glucopiranuronico (**34**) como precursor del ácido 1-amino-glucurónico, para lo que se partió del ácido *D*-

glucurónico (**32**).[165] El primer paso consistió en la protección de los grupos hidroxilos mediante su tratamiento con anhídrido acético en presencia de I_2 durante veinticuatro horas, obteniéndose el ácido 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-β-glucurónico (**33**) con un 85% de rendimiento. El tratamiento del compuesto **33** con la acida de trimetilsililo y tetracloruro de estaño en diclorometano sustituyó el grupo acetilo de la posición anomérica por el grupo acida, obteniéndose **34** con un rendimiento del 82%.

En el capítulo anterior utilizamos la estrategia de los grupos protectores Boc, para el grupo amino, y fluorenilmetanol, para el grupo ácido; mientras que para los grupos funcionales de las cadenas laterales se seleccionaron derivados bencílicos. Sin embargo, esta estrategia no es compatible con los acetilos del N_3-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-OH, ya que se eliminarían en las condiciones básicas y nucleófilas empleadas para la eliminación del fluorenilo. Debido a este hecho, decidimos proteger el extremo ácido en forma de éster alílico, el cual necesita unas condiciones más suaves en cuanto a la basificación del medio, para su desprotección.[111] El grupo alilo es un grupo protector ortogonal a los grupos sensibles a los ácidos o las bases, y su eliminación se produce a través de un mecanismo de transferencia del grupo alilo a un nucleófilo débil catalizada por paladio.[166,167]



Condiciones: **a**) 1. TFA/CH_2Cl_2 (1:1), 2. *N*-HATU, DIEA, N_3-*L*-$(Ac)_3$Aga-OH (**34**), 80%; **b**) $Pd(PPh_3)_4$, morfolina, THF, 70%; **c**) PBu_3, HOBt, DIC, THF, -78ºC; **d**) $Pd(PPh_3)_4$, morfolina, THF;

Figura 86: Esquema sintético propuesto para la preparación del péptido cíclico *c*-[(*L*-Aga-*D*-^{Me}*N*-Acp)$_4$] (**CP7**).

El tratamiento del Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH (**6**) con 2-propen-1-ol en presencia de DCC y DMAP durante cuatro horas dio lugar al Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (**35**) con un rendimiento

[165] El ácido *D*-glucurónico es el ácido (*2S,3S,4S,5R*)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxílico.

[111] Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev*. **2009**, *109*, 2455-2504.

[166] Tsuji, J. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 4361-4401.

[167] Trost, B. M.; van Vranker, D. L. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 395-422.

del 84 % (Figura 87). El resto de los aminoácidos de partida se sintetizaron acorde con lo descrito en el anterior capítulo.

6 **35**

Figura 87: Protección del grupo ácido del *D*-Boc-^{Me}N-Acp-OH en forma de éster alílico.

El primer paso en la síntesis de **CP7** fue la preparación del dipéptido N_3-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (**36**). Para ello, se utilizaron las condiciones empleadas habitualmente en nuestro grupo de investigación, que constan de dos pasos. En el primer paso se eliminó el grupo *t*-butoxicarbonilo del Boc-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-OAll (**35**) mediante el tratamiento con el ácido trifluoroacético en CH_2Cl_2 durante treinta minutos. A continuación, el enlace peptídico se formó mediante la preactivación del ácido carboxílico del N_3-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-OH (**34**) con *N*-HATU (dado que se pretendía formar un enlace amida mediante el ataque de una amina secundaria) en presencia de una base estéricamente impedida. Así, el dipéptido **36** se obtuvo como un único producto con un rendimiento del 80%.

El siguiente paso fue la etapa clave de la síntesis, la formación de un tetrapéptido **38** a través de un acoplamiento tipo Staudinger entre la acida del dipéptido **36** y una segunda fracción de dicho dipéptido, pero con su extremo *C*-terminal libre (**37**). Para llevar a cabo la reacción de acoplamiento, el primer paso fue la desprotección del extremo ácido de una fracción del dipéptido **36**, para lo que se utilizó una mezcla de $Pd(OAc)_2$, *N*-metilmorfolina, trifenilfosfina y fenilsilano en THF. En este coctel, previamente mezclado y agitado a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de Ar, se produce la reducción del $Pd(OAc)_2$ y la formación de $Pd(PPh_3)_4$, que es el catalizador responsable de llevar a cabo la activación del grupo alilo. Bajo estas condiciones se obtuvo el derivado **37** con un rendimiento del 70%. Para el acoplamiento tipo Staudinger se probaron las condiciones empleadas anteriormente por el Dr. Brea,[158] sin que se observase la formación de un producto mayoritario que se pudiera identificar con el tetrapéptido **38**. Se probaron, por tanto, diferentes condiciones existentes en la bibliografía.[168] En los primeros intentos se probó la formación *in situ* del iminofosoforano a -78 °C mediante la reducción de la acida de **36** con PBu_3, en condiciones anhidras para prevenir la hidrólisis, y sobre esta disolución se añadió el péptido **37** con el grupo ácido preactivado mediante su tratamiento con DIC y HOBt. Sin embargo, solo se obtuvieron mezclas complejas en las que el producto deseado se hallaba sólo en forma de trazas. La observación del mecanismo de la reacción nos llevó a una hipótesis sobre este comportamiento; es posible que el primer paso de formación del iminofosforano sea más lento de lo propuesto en un inicio, de tal forma que en el medio de reacción exista una cantidad

[168] Könh, M.; Breinbauer, R. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2004**, *43*, 3106-3116.

significativa de fosfina libre que puede reaccionar con la acida del segundo péptido, dando lugar a la formación aleatoria de especies en un proceso de polimerización.

Debido a lo anterior, decidimos utilizar una fosfina más reactiva, para lo cual empleamos la PMe_3 y la reacción se llevó a cabo a -20 °C.[162] Sin embargo, los resultados no fueron mejores. Otras condiciones en las que se varió el agente activante (*N*-HATU o *N*-HBTU), el agente reductor (PPh_3, PBu_3, PMe_3 o dppe) y la temperatura (-78 °C, -50 °C, 0 °C, ta) no dieron lugar a mejora alguna, por lo que nos vimos obligados a modificar el diseño del péptido, de tal forma que no se requiriese el acoplamiento sobre la acida de un ácido que contuviese otro grupo acida (Figura 88).

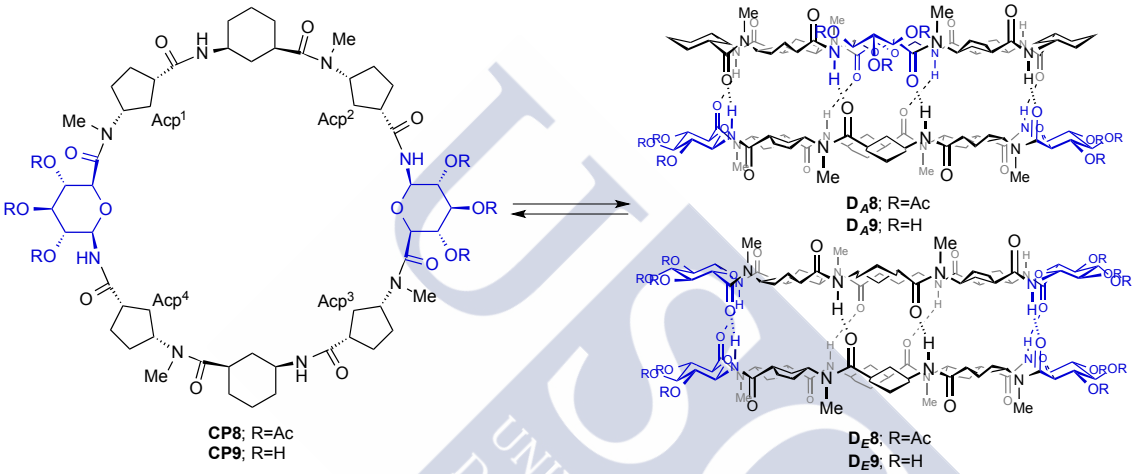
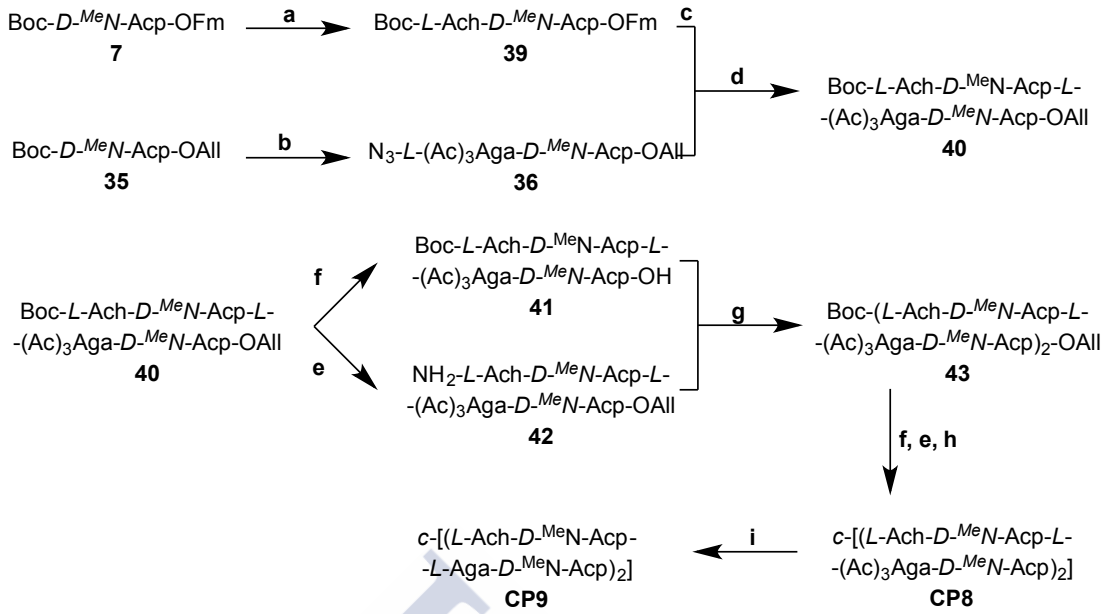


Figura 88: Representación de los ciclopéptidos *c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] (**CP8**; R=Ac) y *c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*L*-γ-Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] (**CP9**; R=H) y de las dos posibles especies rotoisoméricas; alternada (derecha, arriba) y eclipsada (derecha, abajo).

Nuestro objetivo fue el péptido *c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] **CP8**, el cual sólo posee dos unidades del ácido 1-amino-glucurónico y por tanto se pudo plantear una síntesis en la que sólo se tenga que realizar un acoplamiento de Staudinger (Figura 88). En este diseño además del dipéptido **36** requeríamos un segundo dipéptido, el Boc-*L*-Ach-*D*-^{Me}*N*-Acp-OFm (**39**), cuyo acoplamiento diese lugar al tetrapéptido **40** protegido como alil éster en un extremo y como carbamato de *t*-butilo en el otro extremo. Para su síntesis se desprotegió el grupo amino del Boc-*D*-^{Me}*N*-Acp-OFm (**7**) mediante tratamiento con una disolución de TFA/CH_2Cl_2 en treinta minutos, y se acopló con el Boc-*L*-Ach-OH (**19**) empleando *N*-HATU y DIEA en CH_2Cl_2 bajo atmósfera inerte a temperatura ambiente, obteniéndose el dipéptido **39** con un 83% de rendimiento.

[162] Malkinson, J. P.; Falconer, R. A.; Toth, I. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5249-5252.



Condiciones: **a**) 1. TFA/CH_2Cl_2 (1:1), 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Ach-OH (**19**), CH_2Cl_2, 83%; **b**) 1. TFA/CH_2Cl_2 (1:1), 2. *N*-HATU, DIEA, N_3-$(Ac)_3$Aga-OH (**34**), 80%; **c**) Piperidina/CH_2Cl_2 (2:8); **d**) PBu_3, DIC/HOBt, -50ºC, THF, 72%; **e**) TFA/CH_2Cl_2 (1:1); **f**) Pd(OAc), PPh_3, $PheSiH_3$, *N*-metilmorfolina; **g**) *N*-HBTU, DIEA, CH_2Cl_2, 70%; **h**) *N*-TBTU, DIEA, CH_2Cl_2, 36%; **i**) NH_4OH, MeOH, 90%.

Figura 89: Esquema sintético para la obtención de los ciclopéptidos **CP8** y **CP9**.

Sin embargo, la formación del tetrapéptido Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (**40**) a través de un acoplamiento tipo Staudinger no fue una transformación limpia por lo que fue necesario realizar un nuevo estudio para su optimización en el que se evaluaron diferentes fosfinas (PPh_3, PBu_3, PMe_3 o dppe), agentes activantes (DIC/HOBt, *N*-HBTU o *N*-HATU), disolventes (CH_2Cl_2 o THF), así como temperaturas (-78 °C, -50 °C, 0 °C o ta) o concentraciones (0.05, 0.075 y 0.1 M). Los resultados más relevantes de este estudio aparecen resumidos en la Tabla 1. Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó PBu_3 como reductor, DIC/HOBt para la activación del ácido libre y llevando a cabo la reducción de la acida en THF a -50 °C para posteriormente dejar que la reacción alcanzase la temperatura ambiente durante doce horas, obteniéndose el mencionado tetrapéptido **40** con un rendimiento en torno al 70% (entrada 6 de la Tabla 1).

Para continuar con la síntesis de **CP8**, una fracción del compuesto **40** se desprotegió en su extremo ácido mediante tratamiento con la mezcla de $Pd(OAc)_2$, PPh_3, $PheSiH_3$ y *N*-metilmorfolina en THF, dando lugar al tetrapéptido desprotegido en su extremo ácido (**41**) con un rendimiento del 90%. Una segunda fracción de **40** se desprotegió en su extremo amino mediante tratamiento con TFA en CH_2Cl_2, obteniéndose el intermedio **42**. Por último, ambos tetrapéptidos se acoplaron utilizando *N*-HBTU como agente activante y DIEA como base. El octapéptido lineal Boc-(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp)$_2$-OAll (**43**) se obtuvo con un rendimiento de 70%.

	Temperatura (°C)	Disolvente	Concentración (M)	Fosfina	Reactivos de Acoplamiento	Rendimiento %
1	-50	THF	0.1	PPh_3	DIC/HOBt	--------
2	-78	THF	0.1	PMe_3	DIC/HOBt	trazas
3	-12	THF	0.1	PMe_3	DIC/HOBt	50
4	-78	THF	0.1	PBu_3	DIC/HOBt	52
5	-78	THF	0.075	PBu_3	DIC/HOBt	40
6	-50 a ta	THF	0.1	PBu_3	DIC/HOBt	72
7	0	THF	0.05	DPPE	HATU	trazas
8	0	DCM	0.05	DPPE	HATU	trazas

Tabla 1: Condiciones más representativas empleadas para la síntesis del tetrapéptido **40**.

Una vez obtenido el octapéptido lineal protegido **43**, el último paso fue su ciclación. Para tal fin se eliminaron los grupos protectores de ambos extremos empleando condiciones similares a las ya descritas para la desprotección de los extremos *N*- y *C*-terminal. Finalmente, la ciclación se realizó a alta dilución (1.0 mM) en CH_2Cl_2, empleando el *N*-TBTU como agente activante y DIEA como base. Bajo estas condiciones, el péptido cíclico **CP8** se obtuvo con un rendimiento del 36%.

Una vez sintetizado y purificado el **CP8** se inició el estudio de sus propiedades estructurales. Los experimentos de ^{1}H-RMN del ciclopéptido **CP8** en disolventes apolares ($CDCl_3$) mostraron unas señales que concordaban con las de un péptido que adopta una conformación plana caracterizada por el desdoblamiento de los protones amídicos que aparecieron como dobletes. Así, las señales de los protones amídicos aparecieron fuertemente desplazadas a campo bajo apareciendo a 7.50 ppm (NH de γ-Ach) y 9.04 ppm (NH de γ-Aga), con constantes de acoplamiento de 9.8 y 9.4 Hz respectivamente. Estas constantes de acoplamiento concuerdan con una disposición antiperiplanar con respecto al protón en posición γ.[55] Este comportamiento sugiere que el péptido **CP8** adopta una conformación plana y que se autoensambla para formar los correspondientes dímeros. Otro aspecto relevante es que en el ^{1}H-RMN sólo aparecen dos señales de los NH del esqueleto peptídico, lo que sugiere la formación de un único dímeros de los dos posibles (Figura 88).

[55] Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.

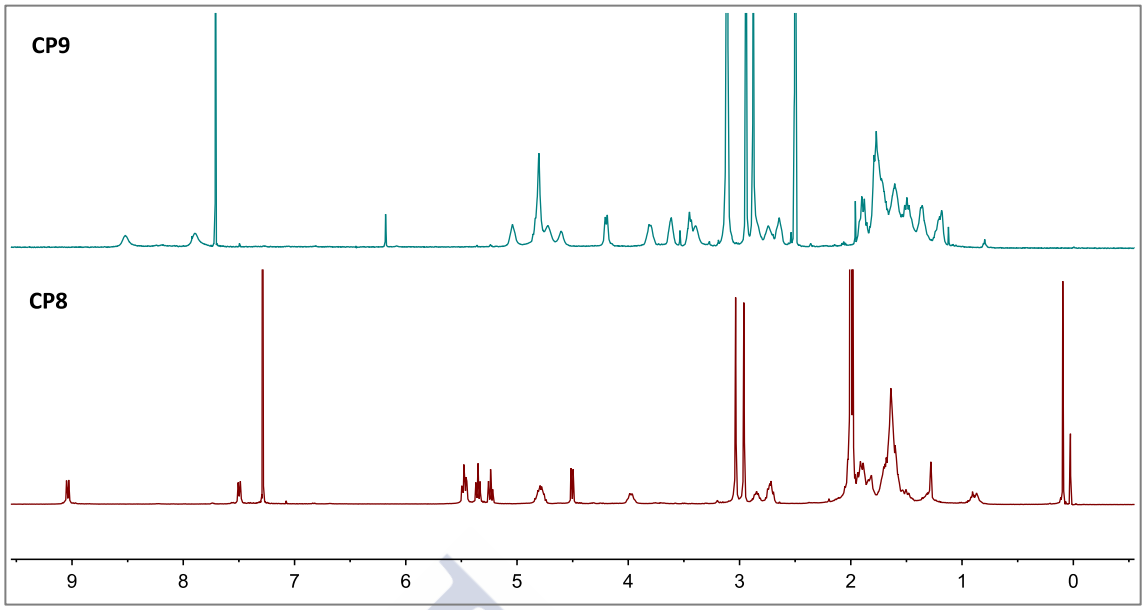


Figura 90: Espectros de ^{1}H-RMN de los ciclopéptidos **CP8** ($CDCl_3$) y **CP9** ($CDCl_3$/$DMSO_{d6}$ 7:3).

Como se puede ver en la Figura 88, el péptido **CP8** posee un eje de simetría C_2, por lo que al autoensamblarse en disolución puede formar dos dímeros diferentes a los que hemos denominado *eclipsado* (**D**$_E$) y *alternado* (**D**$_A$). En el dímero *eclipsado* (Figura 88, abajo), los aminoácidos γ-(Ac)$_3$Aga de los dos monómeros están apilados formando enlaces de hidrógeno entre ellos, al igual que entre los γ-Ach. En el dímero *alternado* (Figura 88, arriba), los γ-(Ac)$_3$Aga de un ciclopéptido se apilan sobre los γ-Ach del otro ciclopéptido, formándose enlaces de hidrógeno entre ellos. Adicionalmente, la simetría C_2 del ciclopéptido determina que los cuatro ^{Me}*N*- γ-Acp sean equivalentes por pares; el Acp^1 con el Acp^3, y el Acp^2 con el Acp^4 son equivalentes entre ellos. En la forma dimérica eclipsada, el Acp^1/Acp^3 se apila sobre el Acp^2/Acp^4, mientras que en la forma alternada los Acp^1/Acp^3 y los Acp^2/Acp^4 se apilan sobre ellos mismos.

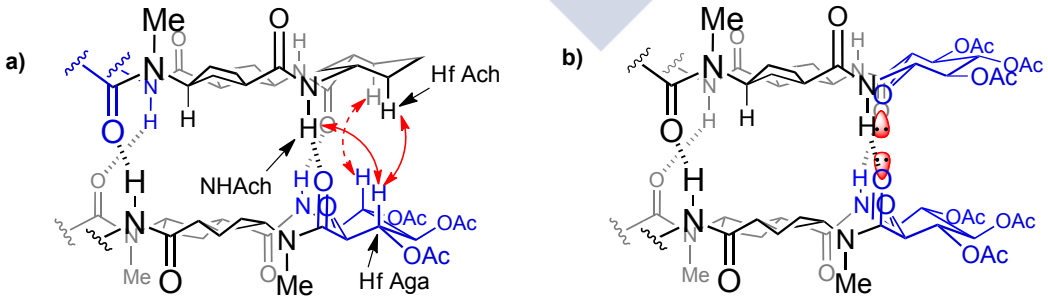


Figura 91: a) Representación esquemática de las señales de cruce (nOes) en el dímero alternado **D**$_A$**8**. b) Representación de las posibles repulsiones entre los pares electrónicos del átomo de oxígeno en posición β del γ-Aga en el dímero eclipsado **D**$_E$**8**.

Para determinar la estructura del dímero que se forma en disolución recurrimos a los experimentos de RMN bidimensional. Los experimentos NOESY proporcionaron señales de cruce nOe entre el protón amídico del γ-Ach (7.48 ppm) y el protón Hϕ del γ-Aga

(5.45 ppm). También se observaron señales nOe entre los protones del ácido aminosacárido (Hδ y Hϕ, a 5.25 y 5.45 ppm respetivamente) con las señales correspondientes a los protones alifáticos que indudablemente se corresponden a los protones axiales del anillo ciclohexánico del γ-Ach (Flechas rojas de la Figura 91, a). Todas estas señales nOe sugieren que la especie formada en disolución se corresponde con el dímero alternado **D_A8**. Una posible explicación a la selectividad observada entre dímeros es la posible repulsión electrónica de los pares electrónicos del oxígeno del anillo. Como se puede observar en la Figura 91, en la forma eclipsada los pares electrónicos de los oxígenos del anillo piránico del γ-Aga se sitúan próximos en el espacio. Sin embargo, en la forma alternada el par electrónico queda próximo al protón del carbono β del γ-Ach formando una interacción débil de enlace de hidrógeno que contribuiría levemente a su estabilización.

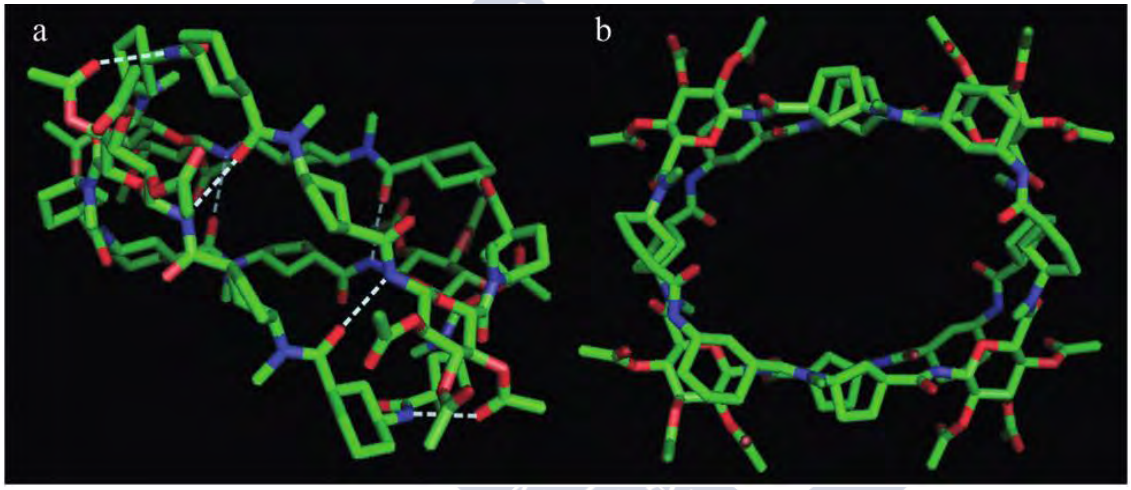


Figura 92: Vista lateral (a) y superior (b) de la estructura cristalina del dímero **D_A8** formada mediante una interacción de lámina β de tipo antiparalelo.

Finalmente, se pudo confirmar la estructura dimérica de **CP8** mediante la difracción de rayos-X de monocristal. Los cristales se obtuvieron de una disolución de DCM/MeOH (95:5) situada en una atmósfera saturada de hexano. La estructura estaba formada por dímeros distorsionados formados a través de una lámina β antiparalela, con cuatro enlaces de hidrógeno entre los NH(Aga) y los carbonilos del γ-Ach, con distancias N---O de 2.86 Å y otros cuatro enlaces de hidrógeno entre los NH(Ach) y el grupo acetato sobre el hidroxilo de la posición ϕ del γ-$(Ac)_3$Aga, con una distancia N---O de 3.01 Å.

Nuestro siguiente estudio consistió en el análisis estructural de **CP9**, que se preparó mediante el tratamiento de **CP8** con hidróxido amónico en metanol durante treinta minutos, obteniéndose el péptido desprotegido con un 90% de rendimiento. Los primeros experimentos de ^{1}H-RMN del péptido desprotegido se llevaron a cabo en una mezcla de $CDCl_3$/DMSO (7:3) dada su insolubilidad en $CDCl_3$, y sus señales características parecían coincidir con la formación de las especies diméricas. Las señales del espectro de ^{1}H-RMN son más anchas que en el caso del péptido protegido **CP8**, lo que impidió el

cálculo de sus constantes de acoplamiento. Sin embargo, se observó una alta simetría, y como en el caso de **CP8**, el desplazamiento a campo bajo de las señales de los protones amídicos (8.52 ppm para el NH(γ-Aga) y 7.89 ppm para el NH(γ-Ach)) que indica que participaban en la formación de enlaces de hidrógeno.

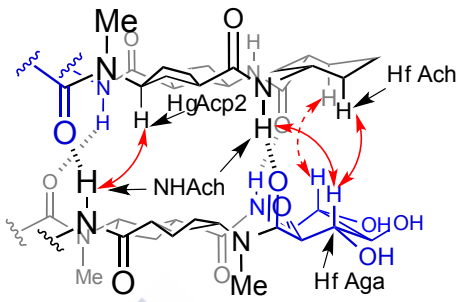


Figura 93: Representación esquemática de las señales de cruce (nOes) en el dímero alternado **D$_A$9**.

Además, los desplazamientos químicos de estas señales variaban con la temperatura, mientras que el resto del espectro permanecía invariable. Para diferenciar si estos enlaces de hidrógeno se daban con el disolvente o eran debidos a la formación del dímero, se midió la variación del desplazamiento químico de estas señales con respecto a la temperatura, obteniéndose una variación ($\Delta\delta/\Delta T$) de 4 ppb para el NH γ-Aga y de 2 ppb para el NH γ-Ach por grado en el rango de 253-303 K, valores que se encuentran por debajo de los 5 ppb por grado que generalmente se atribuyen a las interacciones de enlace de hidrógeno que se dan entre estructuras peptídicas rígidas intermoleculares, y no con el disolvente.[169] En el espectro de ^{1}H-RMN del péptido **CP9** las señales de los protones en posición γ de los γ-Acp son distinguibles, lo que nos ayudó a establecer que rotoisómero estaba presente en disolución a través de experimentos bidimensionales (NOESY). En dichos experimentos se pudo observar picos de cruce nOe entre los protones Hγ(Acp^2) y los protones amídicos NH(Aga) y NH(Ach), que sólo se pueden explicar desde el dímero alternado **D$_A$9**. Además, los nOes entre el NH(Ach) y el Hϕ(Aga), y los nOes entre el Hϕ(Aga) y el Hδ(Aga) con los protones alifáticos de γ-Ach corroboraron la propuesta estructural de **D$_A$9** (Figura 93).

Dada la solubilidad de **CP9** en H_2O, también estudiamos su comportamiento en este disolvente mediante espectroscopía de RMN de protón. En este medio, lo más llamativo fue observar la desaparición de la simetría C_2 observada en medios apolares. De esta forma, por cada protón se pudo observar cuatro dobletes diferentes a 8.87, 8.85, 8.82 y 8.59 ppm para el NH de γ-Aga y 7.98, 7.91, 7.83 y 7.79 ppm para el NH de γ-Ach (Figura 94). La relación y forma de estas señales no varía en función de la temperatura o de la concentración, aunque su desplazamiento químico si es función de la temperatura. El

[169] Andersen, N. H.; Neidigh, J. W.; Harris, S. M.; Lee, G. M.; Liu, Z.; H. Tong, H. J. Am. Chem. Soc. **1997**, 117, 8547-8561.

valor de Δδ/ΔT hallado es superior a 7 ppb/K (en el rango de 278 a 298 K), indicando que los enlaces de hidrógeno son con moléculas del disolvente.[169]

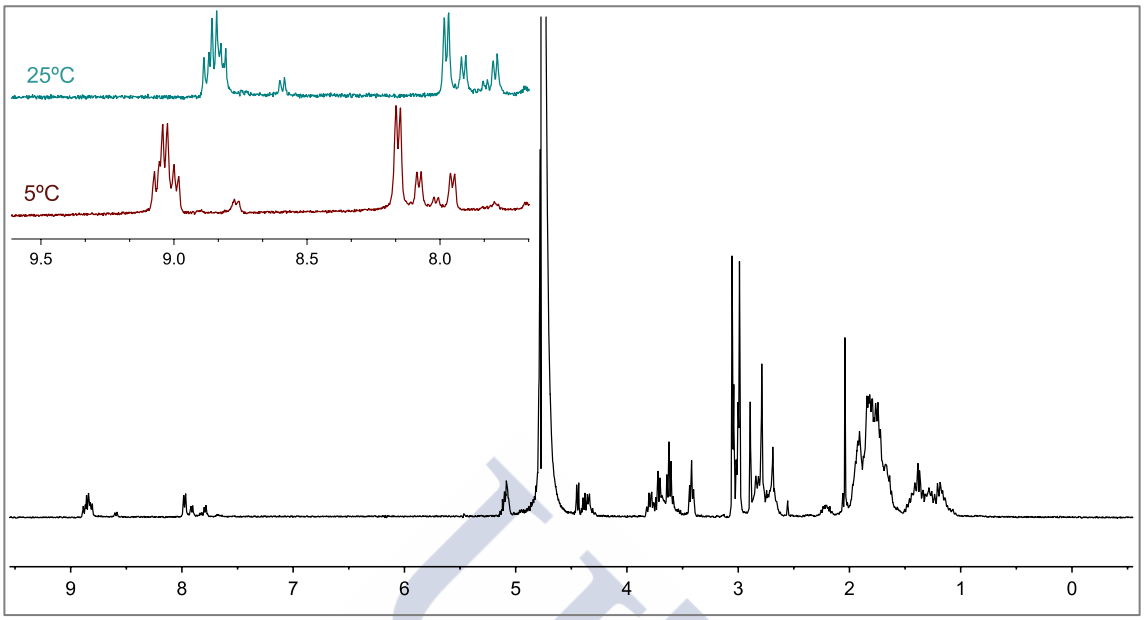


Figura 94: Espectro de ^{1}H-RMN de **CP9** en D_2O. En la ampliación (esquina superior, izquierda) se puede observar el desplazamiento de las señales de los protones amídicos en función de la temperatura.

Ninguna de estas formas parece corresponderse con giros en los que los protones amídicos participen en algún enlace intramolecular. Por lo que concluimos que existen tres formas diferentes en las que la mayoritaria podría corresponderse con la conformación plana (*trans*), otra minoritaria en la que todos los enlaces amida tendrían una conformación *cis*, mientras que en una tercera forma algunas de las amidas estarían en conformación *trans* y las restantes en *cis*, por lo que en esta última se diferencian dos grupos de señales por cada NH.

Nuevos ciclopéptidos que contienen δ-aminoácidos cíclicos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Desde la aparición de los primeros (*D,L*)-α-ciclopéptidos con capacidad para autoensamblarse,[36] surgieron un gran número de variantes que incluían en su esqueleto ciclopeptídico β-, γ-, δ- o ε-aminoácidos,[170] alternándolos con α-aminoácidos o como constituyentes únicos. Los sistemas formados por δ- y ε-aminoácidos son los menos estudiados hasta le fecha. El tipo de aminoácido empleado, o más concretamente, el número de átomos que separan los grupos funcionales amino y ácido carboxílico, provoca que los péptidos que los contienen se apilen formando hojas plegadas que siguen diferentes patrones. El uso de aminoácidos que poseen un número impar de átomos de carbono entre el carbonilo y la amina (uno para el caso de los α-aminoácidos, o tres para los γ-aminoácidos) provoca, cuando el péptido adopta la conformación extendida característica de las hojas plegadas, que los protones amídicos y los carbonilos de un mismo aminoácido se orienten en el mismo sentido (Figura 95). Esto conduce a que los esqueletos peptídicos puedan apilarse a través de la formación de una lámina β paralela o antiparalela.

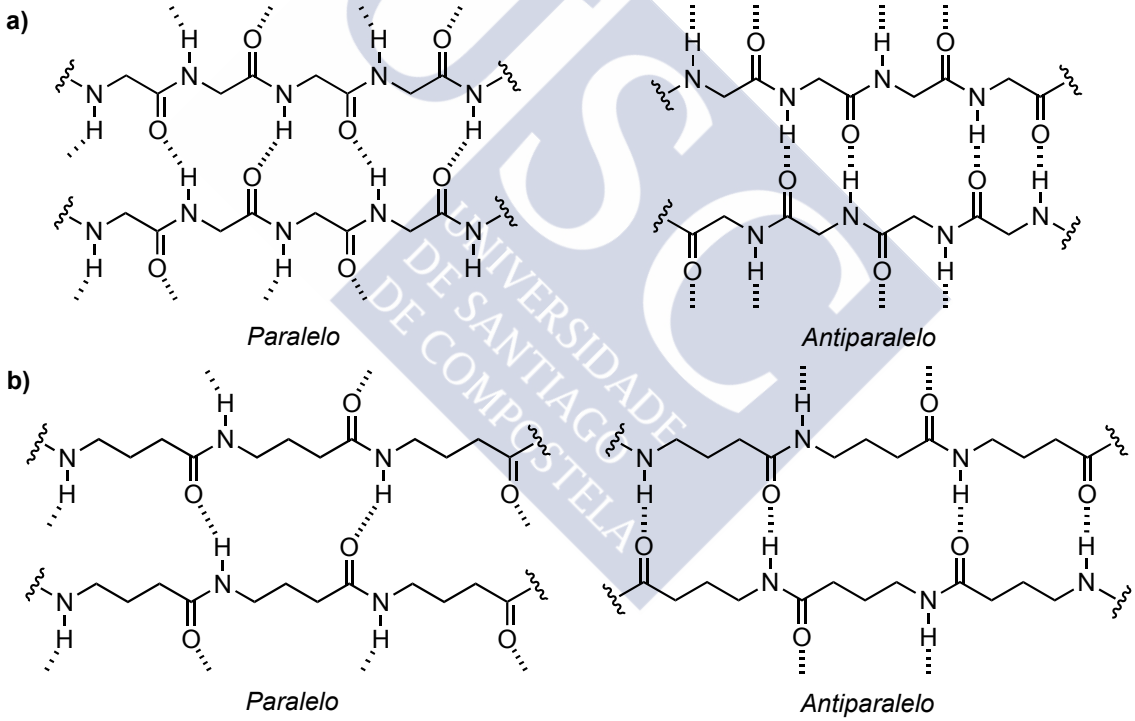


Figura 95: Representación de los apilamientos paralelos y antiparalelos de los esqueletos peptídicos formados por α-aminoácidos (a) y γ-aminoácidos (b).

[36] Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

[170] Para ciclopéptidos formados por α, β, γ, y ε-aminoácidos ver: Chapman, R.; Danial, M.; Koh, M. L.; Jollife, K. A.; Perrier, S. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6023-6041. Para δ-aminoácidos ver: Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635-4638.

El primer estudio de la estabilidad relativa de la formación de láminas β paralelas frente a antiparalelas llevado a cabo con (*D,L*)-α-ciclopéptidos demostró que el apilamiento a través de una lámina β antiparalela era 0.8 Kcal/mol más estable que la paralela para este tipo de sistemas.[43] Estudios similares con (3α,1γ)-ciclopéptidos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación demostraron que ese tipo de sistemas se apilan únicamente de forma antiparalela.[57] Por otro lado, los γ-ciclopéptidos, tal y como se vio en el capítulo anterior, se podrían apilar mediante interacciones paralelas,[69] como el observado en tetrámeros o antiparalela como el obtenido en los octapéptidos.[70]

Por otro parte, el uso de aminoácidos cuyos grupos amino y carbonilo se encuentran separados por un número par de átomos de carbono (dos en el caso de β-aminoácidos o cuatro para δ-aminoácidos) provoca que los protones amídicos y los grupos carbonilo se orienten en sentido opuesto, razón por la cual el apilamiento de este tipo de péptidos solo se puede producir mediante una interacción de tipo paralelo (Figura 96).

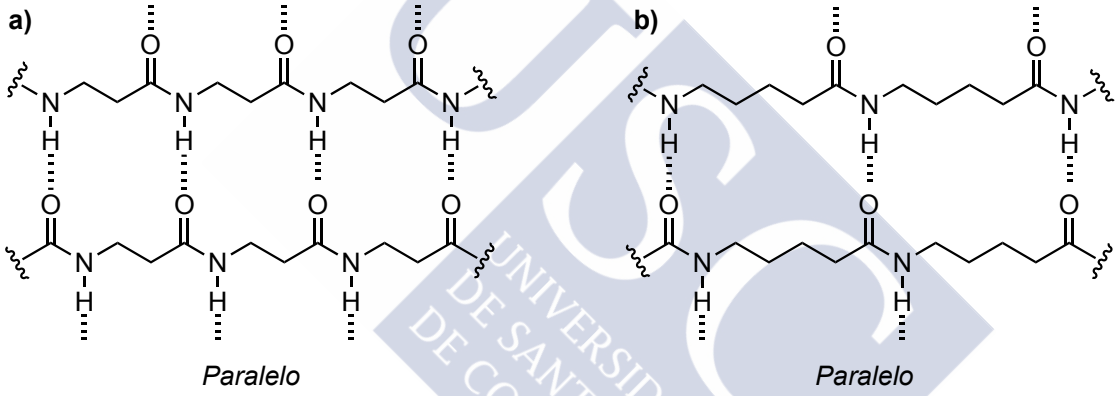


Figura 96: El apilamiento de β-péptidos (a) y δ-péptidos (b) sólo se puede producir a través de una interacción de lámina paralela.

Las propiedades de los β-ciclopéptidos han sido estudiadas por los grupos de Seebach, Ghadiri y Kimura,[171] confirmándose mediante diversas técnicas que el apilamiento de los péptidos formados por β-aminoácidos se da a través de la formación de una lámina β paralela, en la que todos los grupos carbonilos se alinean en el mismo sentido, lo que da lugar a nanotubos con un momento macrodipolar.

---

[43] Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 95-98.
[57] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.
[69] Li, L.; Zhan, H.; Duan, P.; Liao, J.; Quan, J.; Hu, Y.; Chen, Z.; Zhu, J.; Liu, M.; Wu, Y-D.; Deng, J. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 3051-3056.
[70] Guerra, A.; Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8762-8766.
[171] a) Seebach, D.; Mathews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80,* 173-182. b) Clark, D. E.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656. c) Fujimura, F.; Fukuda, M.; Sugiyama, J.; Morita, T.; Kimura, S. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1896-1901.

Los ciclopéptidos formados por δ-aminoácidos también se apilan paralelamente, dando lugar a nanotubos con un momento macrodipolar. La mayor flexibilidad de los δ-aminoácidos lineales llevó al grupo de Dory a sintetizar δ-ciclopéptidos a partir de δ-aminoácidos que presentaban una insaturación de configuración *E* que imposibilita la formación de giros β.[71] En los primeros estudios sobre δ-ciclopéptidos se observó que solo los tripéptidos cíclicos formados por un δ-aminoácido α,β-insaturado formaba nanotubos y cristalizaba dando lugar a racimos de nanotubos (Figura 97). Debido al apilamiento paralelo de los δ-ciclopéptidos los nanotubos obtenidos poseían un momento macrodipolar, lo que dio lugar a cristales altamente anisotrópicos. Además, la presencia de zonas polares (amidas) y zonas lipofílicas (alquenos) en los ciclopéptidos provocaba que los δ-nanotubos se organizaran formando fases mesogénicas.[172]

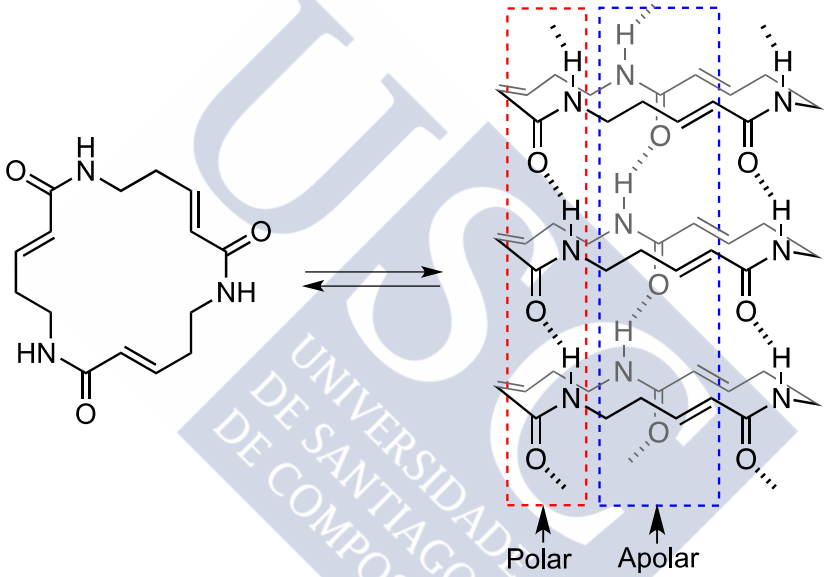


Figura 97: Representación del apilamiento paralelo de los δ-tripéptidos cíclicos formados por un δ-aminoácido α,β-insaturado donde se remarcan las zonas apolares (alquenos) y polares (amidas) de los δ-nanotubos.

En base a estos precedentes, nos propusimos estudiar las capacidades de autoensamblaje de ciclopéptidos que incluyan en su estructura δ-aminoácidos cíclicos. Los estudios previos en nuestro grupo de investigación con α,γ-ciclopéptidos demostraron que la proyección del metileno de la posición β de los γ-Acas modifica las propiedades internas de los nanotubos.[58] Por todo esto, pensamos en el ácido *trans*-4-aminociclohexano-1-carboxílico (δ-Ach) como un precursor adecuado para la síntesis de ciclopéptidos capaces de autoensamblarse y que presenten cavidades hidrofóbicas. En

[71] Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635-4638.
[172] Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, S.; Gauthier, D.; Zhao, Y.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 349-353.
[58] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 2844-2845.

estas estructuras dos metilenos del δ-Ach quedarían orientados hacia la cavidad interna del ciclo. Sin embargo, el ángulo diedro entre el grupo amino y el carboxilato (180°) impide su uso único en la síntesis de δ-ciclopéptidos. Propusimos, por tanto, la síntesis de ciclopéptidos que alternasen tanto α- como γ-aminoácidos con el δ-Ach (Figura 98). En este nuevo sistema el δ-aminoácido se comportaría como un "elongador rígido" del α- o del γ-aminoácido que le precede, cuya rigidez se deriva de la tendencia de los sustituyentes de los ciclohexanos a situarse en una disposición ecuatorial (Figura 98, centro).

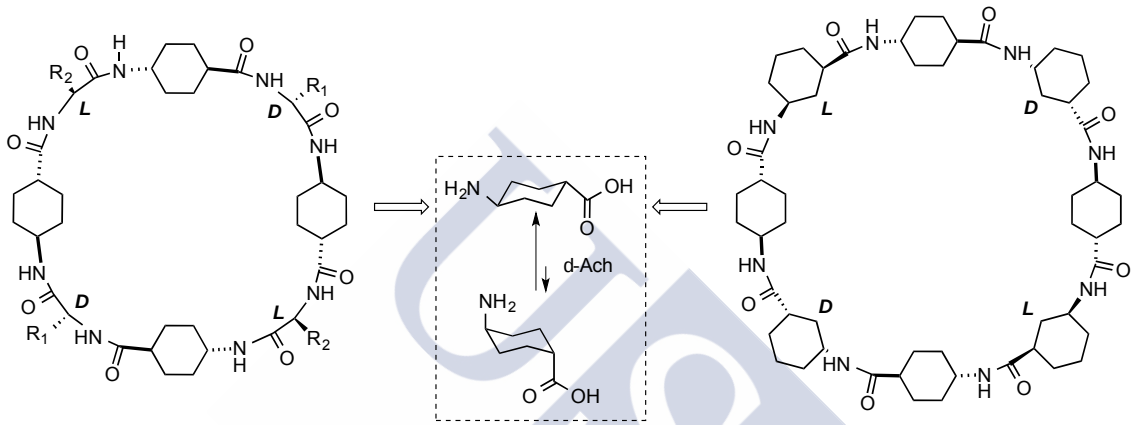


Figura 98: Diseños de α,δ-ciclopéptidos (izquierda) y γ,δ-ciclopéptidos (derecha) que intercalan δ-Ach en un esqueleto ciclopeptídico de quiralidad alternada. En el centro (recuadro) se señala la tendencia de los sustituyentes de los ciclohexanos (en este caso amino y ácido carboxílico) a situarse en una conformación ecuatorial, lo que confiere una gran rigidez a este tipo de sistemas.

Sin embargo, el diseño de este tipo de ciclopéptidos es complejo debido a la diferente orientación relativa de los protones amídicos y los carbonilos entre los α- o γ-aminoácidos, y los δ-aminoácidos, y sus diferentes tendencias hacia la formación de láminas β antiparalelas y paralelas. En una conformación extendida, el carbonilo del δ-Ach se orienta en el mismo sentido que el del residuo del α- o γ-aminoácido precedente, mientras que el protón amídico queda orientado en el mismo sentido que el protón amídico del α- o γ-aminoácido posterior (Figura 99). En este sentido, en su utilización con (*D,L*)-α-ciclopéptidos se tendrá que la orientación de los grupos dadores y aceptores de protones dependerá de la quiralidad del aminoácido que le precede. Por lo tanto, la intercalación de un δ-aminoácido después de cada residuo de un (*D,L*)-α-ciclopéptido o un (*D,L*)-γ-ciclopéptido dará lugar a un δ-Ach que irá alternando la orientación de sus grupos carbonilo y amina.

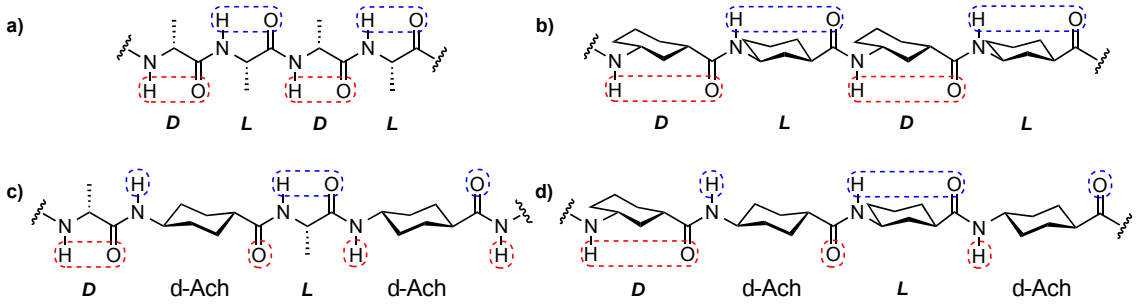


Figura 99: Conformaciones extendidas de esqueletos peptídicos de quiralidad alternada formados por α y γ-aminoácidos (a y b respectivamente), y el resultado de intercalar δ-Ach en las mismas (c y d). Nótese la diferente orientación de los protones amídicos y el grupo carbonilo de los δ-Ach.

Este hecho posee gran relevancia de cara al uso de la *N*-alquilación selectiva para su estudio como sistemas diméricos, ya que para realizar el bloqueo selectivo de una de las caras del ciclopéptido mediante la *N*-metilación es necesario definir el patrón de *N*-metilación de los δ-aminoácidos. En el estudio de sistemas diméricos es necesaria la *N*-metilación del δ-Ach cuyo protón amídico quede orientado hacia la cara *N*-metilada definida por el α- o γ-aminoácido. Esto es, el δ-Ach tiene que ser el que precede al α- o γ-aminoácido metilado (Figura 100). Por consiguiente, la siguiente unidad de δ-Ach no estará metilada, de igual modo que el α- o γ-aminoácido que lo sigue en la secuencia.

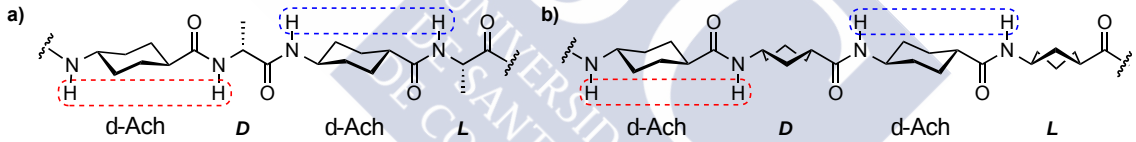


Figura 100: Representación de las orientaciones relativas de los protones amídicos de los α,δ- (a) y γ,δ-péptidos (b) que nos indican que protones deben ser sustituidos por grupos metilos si se pretende bloquear la cara superior (azul) o la inferior (rojo).

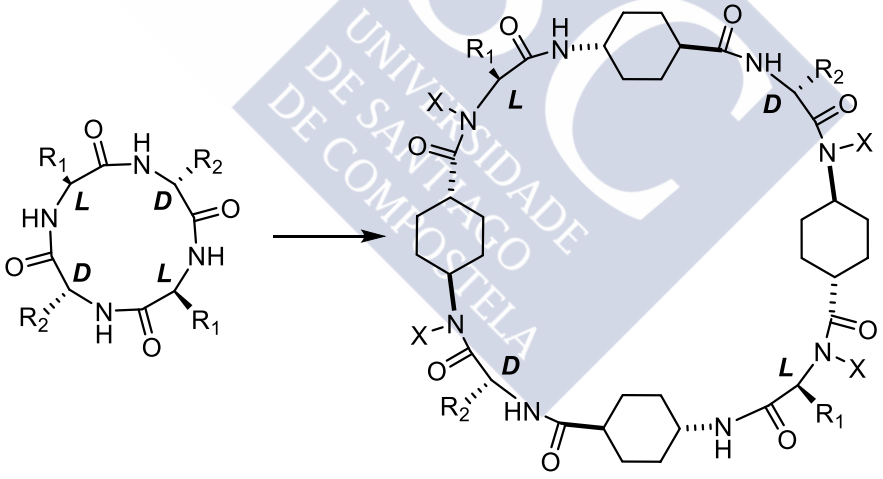
Debido a esto, y al contrario de lo que sucede con los α,γ-ciclopéptidos, en este tipo de sistemas no es posible el estudio de las propiedades de autoensamblaje entre los grupos aceptores y dadores de α/γ-aminoácidos por un lado y de los δ-aminoácidos por otro.[58]

[58] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 2844-2845.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Sistemas homodiméricos de α,δ-ciclopéptidos

La primera aproximación que nos planteamos para probar el uso de los δ-Ach como "elongadores rígidos" fue su incorporación en *D,L*-α-ciclopéptidos con capacidad para autoensamblarse. En el año 1998, el grupo de Ghadiri publicó un extenso estudio sobre la influencia de varios factores estructurales sobre las constantes de asociación de dímeros formados por *D,L*-α-ciclopéptidos.[44] Para ello, sintetizaron y estudiaron la serie *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-Ala-)$_n$], donde *n* se correspondía con valores entre 3 - 6, junto con el tetrapéptido *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{All}*N*-Ala-)$_2$].[173] Los estudios realizados confirmaron que el octapéptido cíclico (*n* = 4) poseía el tamaño de anillo ideal para el autoensamblaje. En cuanto al tetrapéptido *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{All}*N*-Ala-)$_2$], no se halló ninguna prueba de formación de dímeros mediante espectroscopía de ^{1}H-RMN. Los decapéptidos (*n* = 5) y dodecapéptidos (*n* = 6) tampoco poseían capacidad de autoensamblaje, probablemente debido que poseían una gran flexibilidad conformacional que provocaba preorganización demasiado baja para establecer enlaces de hidrógeno intermoleculares. Por último, tampoco se hallaron evidencias del autoensamblaje para el hexapéptido cíclico (*n* = 3), lo que contradecía los estudios de Lorenzi con los péptidos *c*-[(*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-Leu-)$_3$] y *c*-[(*D*-Leu-*L*-Leu-)$_2$-*D*-Leu-*L*-^{Me}*N*-Leu],[174,41] los cuales si mostraban capacidad para formar dímeros, por lo que se explicó este comportamiento anómalo en base a la influencia de las cadenas laterales sobre el autoensamblaje.



CP10, X=R_1=Me, R_2=$CH_2C_6H_4OCH_3$

[44] Clark T. D.; Buriak J. M.; Kobayashi K.; Isler M. P.; Ghadiri M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.

[173] Nótese que el grupo elegido para la *N*-alquilación del tetrapéptido *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{All}*N*-Ala-)$_2$] fue el *alilo* en lugar del *metilo*, si bien no se han encontrado evidencias de que el intercambio de estos grupos afecte a las capacidades de autoensamblaje de los ciclopéptidos.

[174] Saviano, M.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Di Blasio, B.; Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. *J. Incl. Phenom.* **1994**, *18*, 27-36.

[41] Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77,* 1520-1526.

Figura 101: Octapéptido obtenido por la intercalación de un δ-Ach entre cada uno de los residuos de un *D,L*-α-tetrapéptido cíclico.

Para estudiar el autoensamblaje de este tipo de sistemas se diseñó un ciclopéptido en el que todos los protones amídicos orientados en el mismo sentido se sustituyeron por grupos metilo, mientras se mantenían los restantes con orientación opuesta. Teniendo en cuenta los requisitos estructurales derivados del uso de los δ-aminoácidos, cuyo protón amídico se orienta en el mismo sentido que el protón amídico del siguiente α-aminoácido de la secuencia peptídica, nos propusimos la síntesis del péptido *c*-[(*D*-Tyr(Me)-δ-^{Me}*N*-Ach-*L*-^{Me}*N*-Ala-δ-Ach-)$_2$] (**CP10**, Figura 101) en el que una unidad de δ-Ach y el siguiente α-aminoácido, *L*-Ala, se encuentran *N*-metilados. La incorporación de la *D*-Tyr se decidió para facilitar la síntesis dado su elevado coeficiente de extinción (ε) que permite seguir las diferentes modificaciones mediante cromatografía en capa fina gracias al uso de la lámpara de luz UV. Por otra parte, para evitar la formación de diferentes rotodímeros, se decidió emplear un ciclopéptido de simetría C_2.

Para la preparación del ciclopéptido nos planteamos una síntesis convergente en disolución empleando la táctica Boc/Fluorenilo. El α-aminoácido *D*-Tirosina se obtuvo comercialmente protegido en su cadena lateral en forma de éter metílico, grupo protector que soporta las condiciones de desprotección y acoplamiento requeridas durante este tipo de síntesis. Por otra parte, la protección del grupo carboxílico del Boc-δ-Ach-OH (**44**) en forma de éster de fluorenilo se llevó a cabo en las típicas condiciones de esterificación empleadas en nuestro grupo de investigación,[59] obteniendo el Boc-δ-Ach-OFm (**45**) con un 82% de rendimiento (Figura 102).

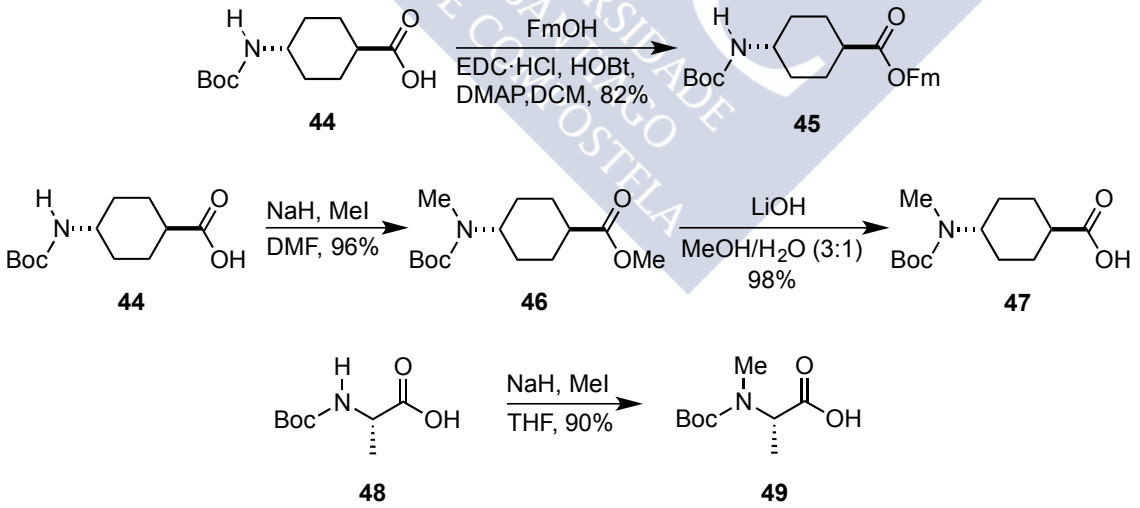
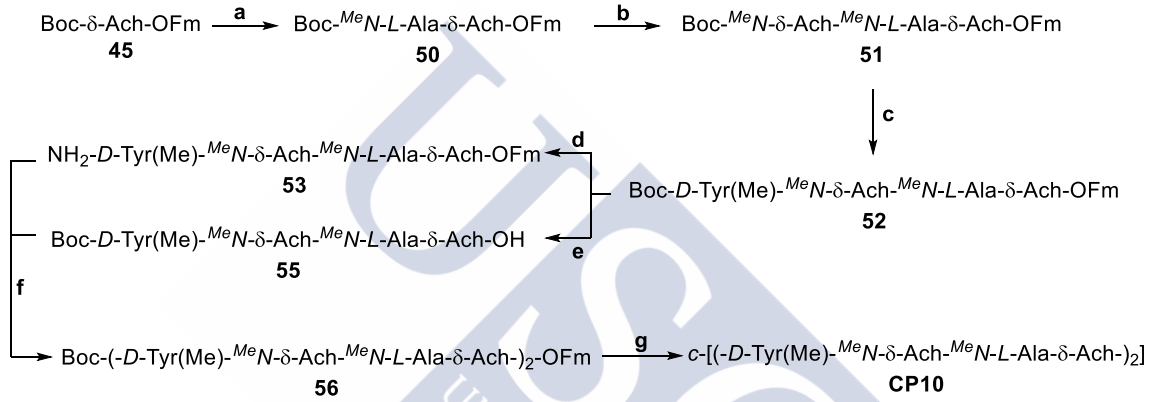


Figura 102: Secuencia sintética empleada para la obtención de los aminoácidos de partida para la síntesis de **CP10**.

Para la obtención de la Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-OH (**49**) se partió de la Boc-*L*-Ala-OH comercial que se *N*-metiló mediante el tratamiento del aminoácido de partida con hidruro sódico e

[59] Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett*. **2005**, *7*, 4681-4684.

Ioduro de metilo en THF (Figura 102). De esta forma el compuesto **49** se obtuvo con un rendimiento del 90%. Sin embargo, la *N*-metilación del Boc-δ-Ach-OH en las mismas condiciones condujo a bajos rendimientos (probablemente debido a la baja solubilidad en THF del intermedio aniónico), lo que implicaba purificaciones muy complejas debido a la difícil separación del Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**) de la sustancia de partida. Por esta razón decidimos probar la reacción de alquilación empleando DMF como disolvente, de tal forma que se obtuvo el producto de la *N*- y *O*-metilación Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OMe (**46**). El éster metílico resultante se hidrolizó fácilmente mediante tratamiento con LiOH en una mezcla de MeOH y H_2O (3:1) (Figura 102). Con este procedimiento en dos etapas, el compuesto **47** se obtuvo con un rendimiento global del 94%.



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HBTU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-OH (**49**), DCM, 80%; **b)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**35**), DCM, 90%; **c)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*D*-Tyr-OH, DCM, 82%; **d)** TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65); **e)** Piperidina/DCM (2:8); **f)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 61%; **g)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/$PhSiH_3$/DCM (25/10/65) Piperidina/DCM (2:8); 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM, 42%.

Figura 103: Esquema sintético seguido para la obtención del ciclopéptido **CP10**.

Una vez obtenidos los aminoácidos de partida se inició la síntesis del péptido. La estrategia empleada debido a la existencia de posiciones contiguas de aminoácidos *N*-metilados, consistió en la obtención del tetrapéptido **52** de forma lineal (Figura 103). De esta forma se evitaba la formación de un tetrapéptido mediante la condensación de dos dipéptidos que conllevaba el acoplamiento sobre una amina secundaria. El acoplamiento de dos unidades del tetrapéptido **52** formaría el octapéptido **56**, que una vez ciclado daría el ciclopéptido **CP10**.

Para la obtención del dipéptido **50** se desprotegió el grupo amino del compuesto **45** tratándolo con una mezcla de TFA/CH_2Cl_2 (1:1) durante quince minutos, y a continuación el enlace peptídico se formó mediante la preactivación del ácido carboxílico libre de la Boc-*L*-^{Me}*N*-Ala-OH con *N*-HBTU en presencia de DIEA. El dipéptido **50** se obtuvo como un único producto con un rendimiento del 80%. A continuación, se preparó el tripéptido Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm mediante el acoplamiento del dipéptido **50**, previamente tratado con TFA para eliminar el grupo Boc del extremo *N*-terminal, con el

Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH. Para ello empleamos *N*-HATU como agente activante en presencia de DIEA. Bajo estas condiciones se obtuvo el compuesto **51** con un rendimiento del 90%. Por último, este tripéptido se transformó en el tetrapéptido **52** mediante el tratamiento con una mezcla de TFA/CH_2Cl_2 seguido de un acoplamiento con la Boc-*D*-Tyr(Me)-OH. Así, el péptido **52** se obtuvo con un rendimiento global, para los tres acoplamientos, del 59%.

Para continuar con la síntesis de **CP10** una fracción del compuesto **52** se desprotegió en su extremo ácido mediante su tratamiento con una mezcla de piperidina (20%) en CH_2Cl_2 para obtener el intermedio **55**. Otra fracción del péptido **52** se intentó desprotegió en su extremo amino mediante el tratamiento con una mezcla de TFA en CH_2Cl_2. Sin embargo, bajo estas condiciones se observó la formación de dos compuestos en una relación aproximada de 1:1, el intermedio **53** y un producto que no se pudo identificar, y que poseía una masa 178 unidades menor que **53**. Debido a la imposibilidad de separar ambos compuestos, decidimos emplear dicha mezcla en el posterior acoplamiento con el intermedio **55** esperando que mejorase su purificación. De esta forma se obtuvo el octapéptido **56** con un rendimiento de sólo el 45%. Este compuesto se obtuvo acompañado del compuesto fruto de la reacción lateral durante la desprotección y posterior acoplamiento con el tetrapéptido desprotegido en su extremo ácido. El subproducto poseía una masa 178 unidades menor, y el espectro de ^{1}H-RMN era muy similar al de **56**, aunque se encontraron diferencias en las señales de los protones de la cadena lateral de la *D*-Tyr, lo que nos llevó a pensar en algún tipo de descomposición o de pérdida de su grupo protector durante el tratamiento con ácido trifluoroacético. A pesar de nuestros esfuerzos no fue posible realizar la caracterización de este subproducto. Sin embargo, sí se pudo minimizar de alguna forma esta reacción lateral mediante el uso de la mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:10:65) durante tiempos de reacción muy cortos (entre cinco y diez minutos). De esta forma se logró aumentar el rendimiento global para la formación del octapéptido lineal **56** hasta el 61%.

Por último, se llevó a cabo la etapa de ciclación, para lo que se desprotegieron ambos extremos del péptido **56**. Para la desprotección del extremo *C*-terminal se utilizó la disolución de piperidina (20%) en diclorometano durante treinta minutos, mientras que para el extremo *N*-terminal se empleó la mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:10:65) por un tiempo de cinco minutos. El péptido resultante mostraba en su espectrometría de masas un pico con una pérdida de 178 unidades de masa de forma similar a la observada en la desprotección de tetrapéptido **52**, por lo que suponemos que nuevamente se reproducían los problemas en esta transformación. El acoplamiento entre ambos extremos se realizó empleando *N*-TBTU como agente activante en presencia de DIEA y en condiciones de alta dilución (1 mM) en CH_2Cl_2, obteniéndose el péptido *c*-[(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_2$] (**CP10**) con un rendimiento del 42%.

Una vez purificado el ciclopéptido **CP10** se inició el estudio de sus propiedades supramoleculares mediante RMN de protón. El espectro de ^{1}H-RMN en disolventes

apolares ($CDCl_3$) mostró unas señales bien definidas y simétricas. Las señales correspondientes a los protones amídicos concuerdan con una conformación *trans* de las amidas (característica típica de esqueletos peptídicos extendidos).

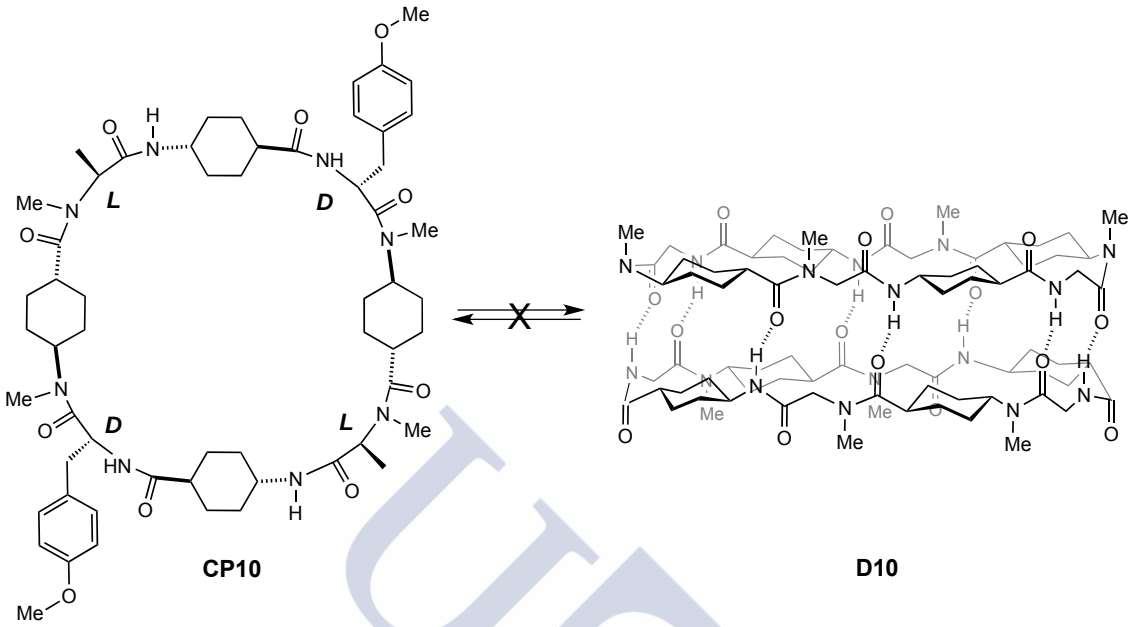


Figura 104: Estructura dimérica propuesta como resultado del autoensamblaje del ciclopéptido **CP10**. Para mayor claridad se han omitido las cadenas laterales en el dímero.

Estos protones aparecían como dobletes con unas constantes de asociación de 8.0 Hz para el NH de la tirosina y de 9.1 Hz para el NH de δ-Ach (Figura 105). Sin embargo, los desplazamientos químicos de estas señales, 6.47 ppm (Tyr) y 6.22 ppm (δ-Ach) indicaban que estos protones no formaban enlaces de hidrógeno. Además, el desplazamiento químico de las señales de **CP10** era independiente de la concentración, como mostraron los estudios realizados a concentraciones entre 1 mM y 20 mM.

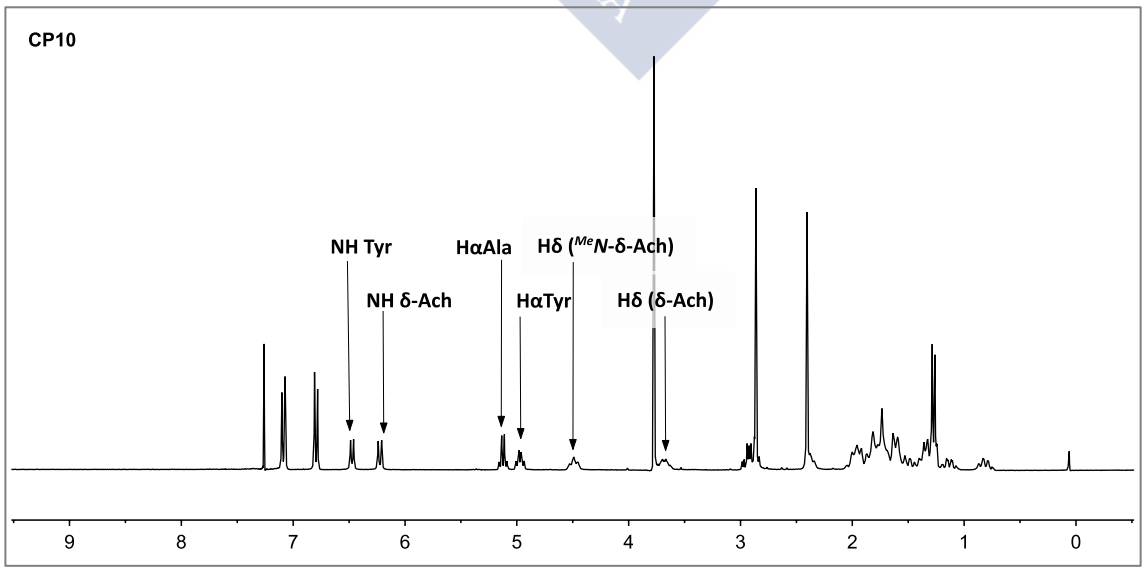


Figura 105: Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de **CP10** en el que resuenan las señales de los protones amídicos a 6.47 (Tyr) y 6.22 ppm (δ-Ach), lo que indica que no están formando enlaces de hidrógeno.

En los estudios realizados a diferentes temperaturas ($CDCl_3$) entre -40 °C y 25 °C pudimos observar una variación en los desplazamientos de los protones amídicos, con valores de 1.5 ppb/°C para el NH de la tirosina y de 1.8 ppb/°C para el NH de δ-Ach (Figura 106). También se observó un ligero apantallamiento de la señal del Hα de la ^{Me}*N*-Ala que pasa de 5.15 a 5.12 ppm, o del Hα de la Tyr, que pasa de 5.00 a 4.96 ppm. Por lo tanto, a bajas temperaturas el ciclopéptido empieza a participar en la formación de enlaces de hidrógeno, y por lo tanto a dimerizar, aunque de forma muy débil.

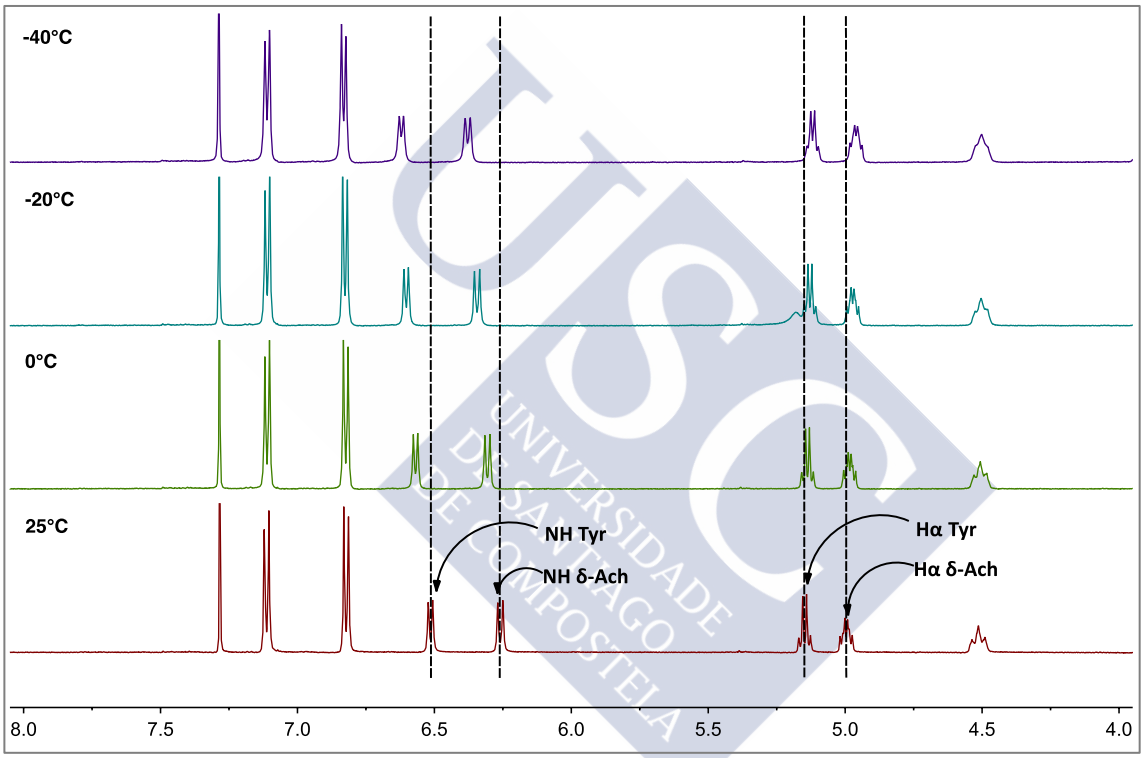


Figura 106: Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN de **CP10** ($CDCl_3$, desde 4.0 a 8.0 ppm) a diferentes temperaturas, donde se puede observar el desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes a los protones amídicos con el descenso de la temperatura.

También se estudió el comportamiento de **CP10** en medios menos polares que el $CDCl_3$, para lo que se empleó CCl_4. Sin embargo, debido a la baja solubilidad del péptido en tetracloruro de carbono sólo se pudieron emplear mezclas $CDCl_3$/CCl_4. Bajo estas condiciones se observó un descenso en la resolución de las señales, aunque no se pudo apreciar ninguna variación reseñable en los desplazamientos químicos de las señales más características.

Los estudios previos por parte de los grupos de Ghadiri y De Lorenzi con α-ciclopéptidos mostraron bandas de vibración de Amida A en torno a 3309 cm^{-1} para los péptidos cuyos protones amídicos participan en enlaces de hidrógeno, y mayores de 3360 cm^{-1} para los

ciclopéptidos que carecían de dicha capacidad.[44,174] Por otra parte, los δ-ciclopéptidos sintetizados por Dory mostraron señales de Amida A en dos bandas, a 3358 y 3319 cm^{-1}.[172] Sin embargo, el péptido **CP10** mostró una banda de vibración a 3307 cm^{-1}, que no se corresponde con lo esperable para α-ciclopéptidos que no formen dímeros ni con lo esperable para δ-ciclopéptidos que si los formen. La única explicación posible es la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares o con el disolvente, pero esto se descarta en base a los experimentos de RMN. El resto de las bandas observadas (amida I, amida II y amida II_B) poseen desplazamientos similares a los *D,L*-α-ciclopéptidos.

De esta forma concluimos que el péptido adoptaba la conformación plana en disolución, pero parece que sólo se autoensambla a muy bajas temperaturas. Esta limitación puede deberse a la fuerte tensión anular que tendría el ciclopéptido en una conformación completamente plana en el que sus grupos amida se dispongan perpendicularmente orientados con respecto al plano del anillo. El comportamiento de **CP10** concuerda con el comportamiento de sus análogos *D*,*L*-α-tetrapéptidos cíclicos, los cuales no son capaces de dar lugar al proceso de autoensamblaje. Hay que tener en cuenta que los δ-Ach se comportan como extensores moleculares rígidos, siendo muy poco flexibles para facilitar la correcta orientación de los grupos amida que forman los enlaces de hidrógeno.

En base a estos resultados, decidimos dar el siguiente paso en el estudio de las propiedades de los α,δ-ciclopéptidos, intercalando las unidades de δ-Ach en un *D*,*L*-α-ciclohexapéptido. Por tanto, nuestro objetivo fue un α,δ-dodecapéptido cíclico. Para tal fin decidimos seguir la misma estrategia sintética empleada en la síntesis de **CP10** y simplemente añadir una unidad del tetrapéptido **52** sobre el octapéptido lineal **56** antes del paso de ciclación. Al igual que en el paso anterior, el ciclopéptido propuesto *c*-[(-*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_3$] (**CP11**) forma tres dímeros idénticos gracias a su eje de simetría C_3. Por lo tanto, de aquí en adelante hablaremos de un único dímero para el ciclopéptido **CP11**.

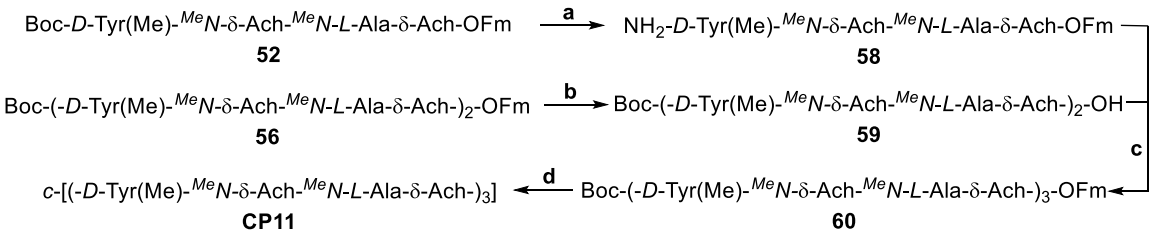
El tratamiento del tetrapéptido **52** con la mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:10:65) dio lugar al intermedio **58**, que se acopló con el octapéptido resultante del tratamiento de **56** con una disolución de piperidina (20% en CH_2Cl_2). De esta forma el dodecapéptido **60** se obtuvo con un 48% de rendimiento. Por último, se realizó la ciclación del péptido **60** en condiciones similares a las descritas para el péptido **56**. El ciclopéptido **CP11** se obtuvo con un rendimiento del 35%.

---

[44] Clark T. D.; Buriak J. M.; Kobayashi K.; Isler M. P.; Ghadiri M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.

[174] Saviano, M.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Di Blasio, B.; Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. *J. Incl. Phenom.* **1994**, *18*, 27-36.

[172] Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, R.; Gauthier, D.; Zhao, Y.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 349-353.



Condiciones: a) TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65); **b)** Piperdidina/DCM (2:8); **c)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 48%; **d)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65), *N*-TBTU, DIEA, DCM, 35%.

Figura 107: Esquema sintético seguido para la obtención del dodecapéptido cíclico **CP11** a partir del tetrapéptido **52** y el octapéptido **56**.

Los experimentos de ^{1}H-RMN del péptido **CP11** en $CDCl_3$ mostraban de nuevo un espectro con unas señales bien definidas que concordaban con las de un péptido que adopta una conformación plana y que forma dímeros (láminas β antiparalelas) en disolución (Figura 108). Las señales de los protones amídicos resonaban a campo bajo, 8.68 ppm para el NH de la Tyr y 7.78 para el NH del δ-Ach, lo que indicaba que estaban participando en la formación de enlaces de hidrógeno, y sus constantes de acoplamiento (9.0 Hz para el NH de la Tyr y 8.7 Hz para el NH del δ-Ach) indicaban que las amidas se encontraban en una configuración *trans* con respecto a los protones vecinos (Hα y Hδ respectivamente).

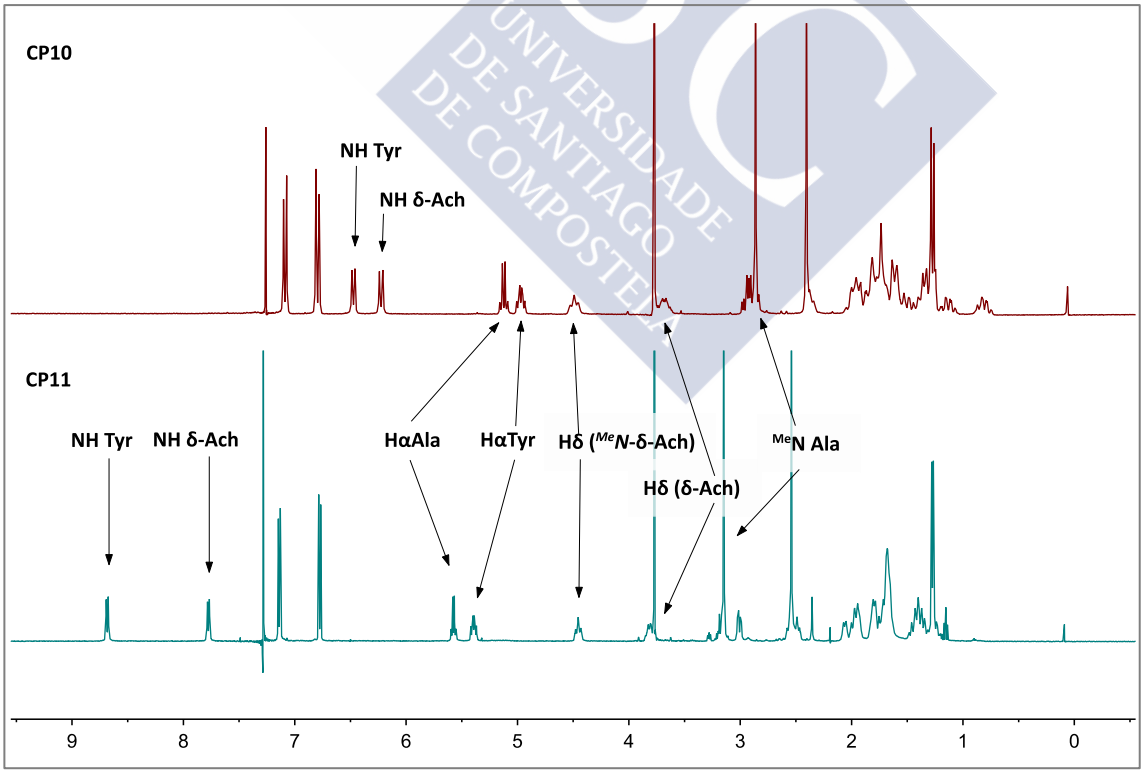


Figura 108: Espectros apilados de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) del péptido **CP10** (arriba) y **CP11** (abajo) donde se identifican las principales señales que varían al establecerse la lámina β antiparalela de **CP11**.

Además, los desplazamientos de las señales no eran dependientes de la concentración, por lo que pudimos estimar el valor para la constante de asociación superior a 10^5 M^{-1}. La formación del dímero se confirmó mediante espectroscopía de RMN bidimensional, por la aparición de señales de cruce nOe entre el protón amídico de la tirosina y el protón en posición δ del ^{Me}*N*-δ-Ach y entre este último y el protón en posición α del δ-Ach (Figura 109). Estas señales sólo se podrían justificar mediante la formación del dímero.

De nuevo el análisis de los datos de FT-IR no aportó ninguna información adicional sobre el comportamiento del ciclopéptido, ya que en el espectro aparecían las bandas de vibración de Amida A a 3307 cm^{-1}, exactamente el mismo valor que había mostrado el ciclopéptido **CP10**. El resto de las bandas relacionadas con la vibración de las amidas aparecían a unas longitudes de onda similares a las observadas en los espectros de los *D,L*-α-ciclopéptidos.

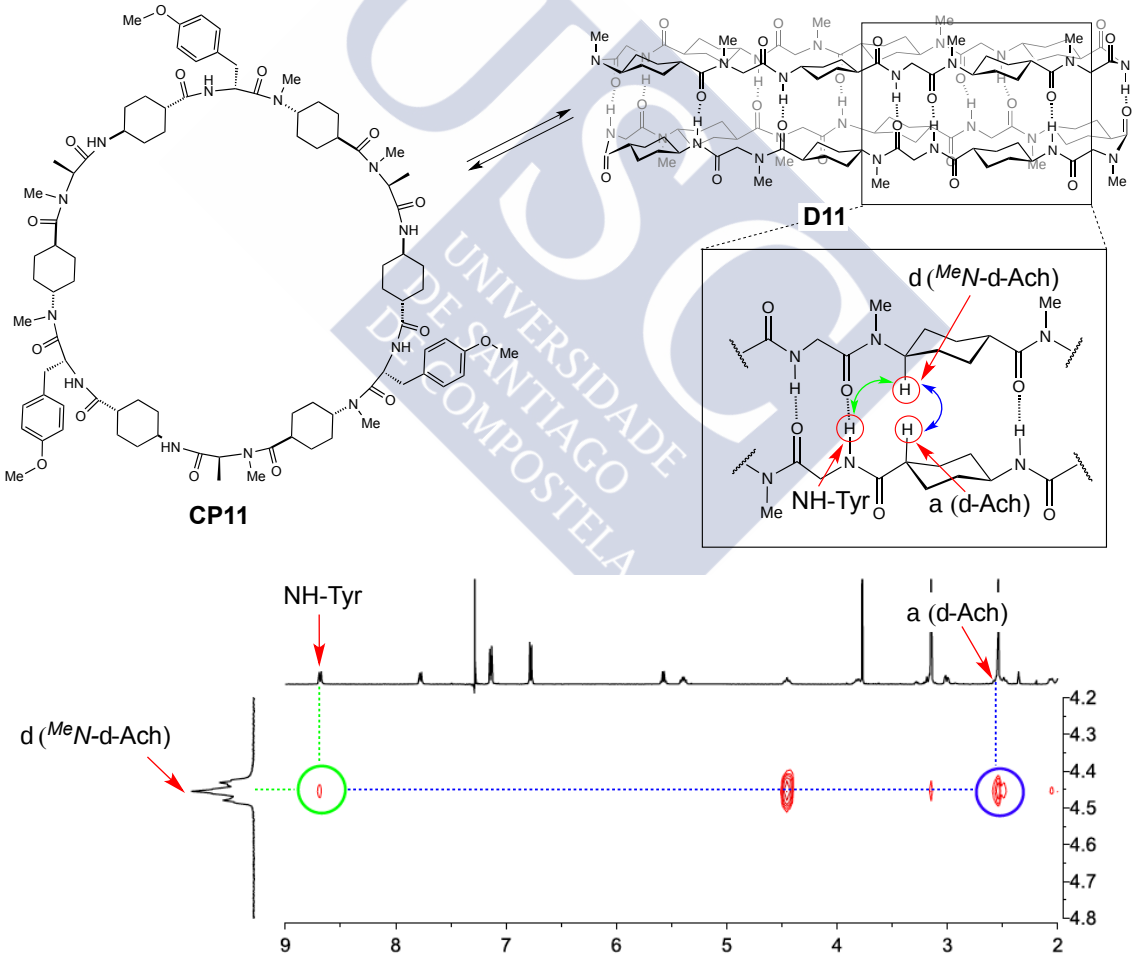
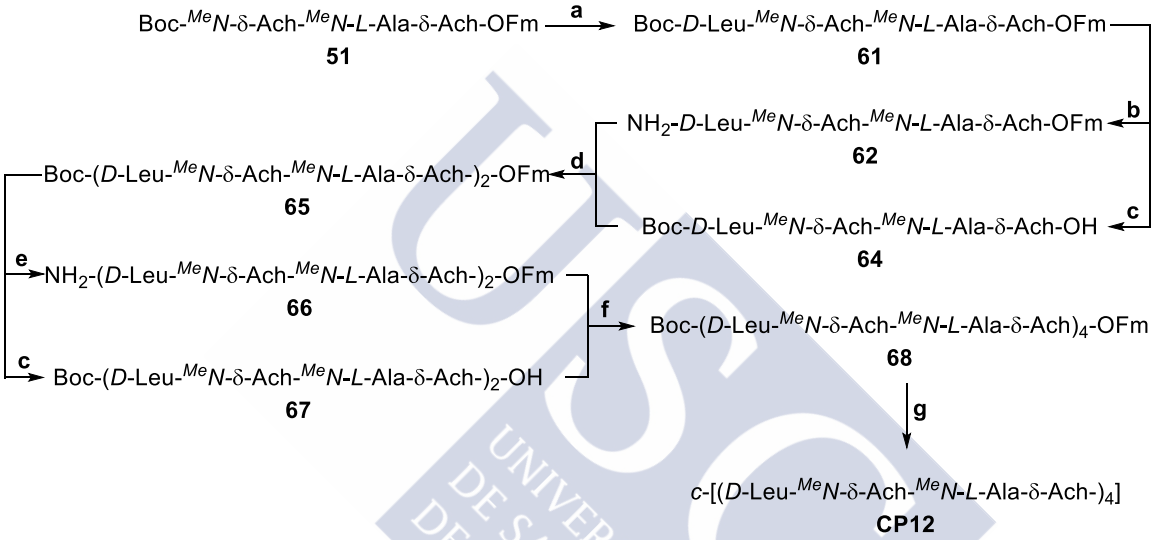


Figura 109: Estructura del péptido **CP11** y dímero que forma en disolución (se han omitido las cadenas laterales en el dímero). En la ampliación (recuadro) se pueden observar los protones que dan lugar a señales características de nOe en este dímero (abajo).

Teniendo en cuenta la capacidad de autoensamblaje para los sistemas *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-Ala-)$_n$] estudiados por el grupo del Prof. Ghadiri, decidimos estudiar también el empleo de estos "elongadores" en los sistemas *D,L*-α-octapeptídicos. Para tal fin nos planteamos la síntesis del hexadecapéptido cíclico *c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_4$]. En este diseño se utilizó la *D*-Leu en lugar de la *D*-Tyr, para intentar evitar la formación de los productos secundarios generados durante la desprotección del grupo amino del tetrapéptido **52**. El nuevo ciclopéptido diseñado también poseía un eje de simetría igual al número de dímeros posibles (C_4), por lo que deberíamos observar únicamente un dímero.



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, DCM, Boc-*D*-Leu-OH, 49%; **b)** TFA/DCM (1:1); **c)** Piperidina/DCM (2:8); **d)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 49%; **e)** TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65); **f)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 65%; **g)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65); 3. *N*-TBTU, DIEA, 35%.

Figura 110: Esquema sintético seguido para la obtención del ciclopéptido **CP12**.

Para la síntesis de este nuevo péptido, partimos del tripéptido **51** anteriormente preparado. Mediante su tratamiento con una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1) durante 15 minutos y posterior acoplamiento con la Boc-*D*-Leu-OH empleando *N*-HATU como agente de acoplamiento, condujo al tetrapéptido Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (**61**) con un rendimiento del 49%. El siguiente paso consistió en la síntesis del octapéptido **65** (Figura 110), para lo que se desprotegió el grupo amino de **61** mediante el tratamiento con la mezcla TFA/CH_2Cl_2 durante quince minutos. En contra de lo esperado también en este caso se observó la formación de un segundo producto en una proporción 1:1 con respecto a la amina **62**. Este compuesto poseía una masa de 1048 unidades, lo que supone una pérdida de 172 unidades que coincidía exactamente con lo observado en la desprotección de **52**. Por tanto, esta reacción secundaria es independiente del tipo de α-aminoácido y es una consecuencia de una reacción relacionada con el esqueleto peptídico del tetrapéptido y no de la cadena lateral de un

α-aminoácido. Aún así decidimos continuar la síntesis con la mezcla obtenida, para lo que se trató otra fracción de **61** con una mezcla del 20% de piperidina en diclorometano durante treinta minutos. El acoplamiento de los intermedios **62** y **64** se llevó a cabo empleando *N*-HBTU en presencia de DIEA para obtener el octapéptido Boc-(*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_2$-OFm (**65**) con un rendimiento moderado del 49%.

Siguiendo la misma metodología empleada para el péptido **65** se sintetizó el hexadecapéptido **68**, que se cicló previa desprotección del extremo *C*-terminal mediante el tratamiento con una mezcla piperidina/CH_2Cl_2 (2:8) durante treinta minutos, y del extremo *N*-terminal tratándolo con una mezcla TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65). Para ciclar el péptido desprotegido, este se trató con *N*-TBTU y DIEA en condiciones de alta dilución en CH_2Cl_2 (1 mM), y se obtuvo el péptido *c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala- δ-Ach-)$_4$], **CP12**, con un rendimiento del 35%.

El análisis del espectro de RMN de protón de **CP12** volvió a mostrar las características de un ciclopéptido en conformación plana con capacidad para el autoensamblaje. Las señales de los protones amídicos estaban de nuevo desplazadas a campo bajo, 8.30 ppm para el NH de la Leu y 7.89 para el NH del δ-Ach, lo que confirmó su participación en la formación de enlaces de hidrógeno (Figura 111).

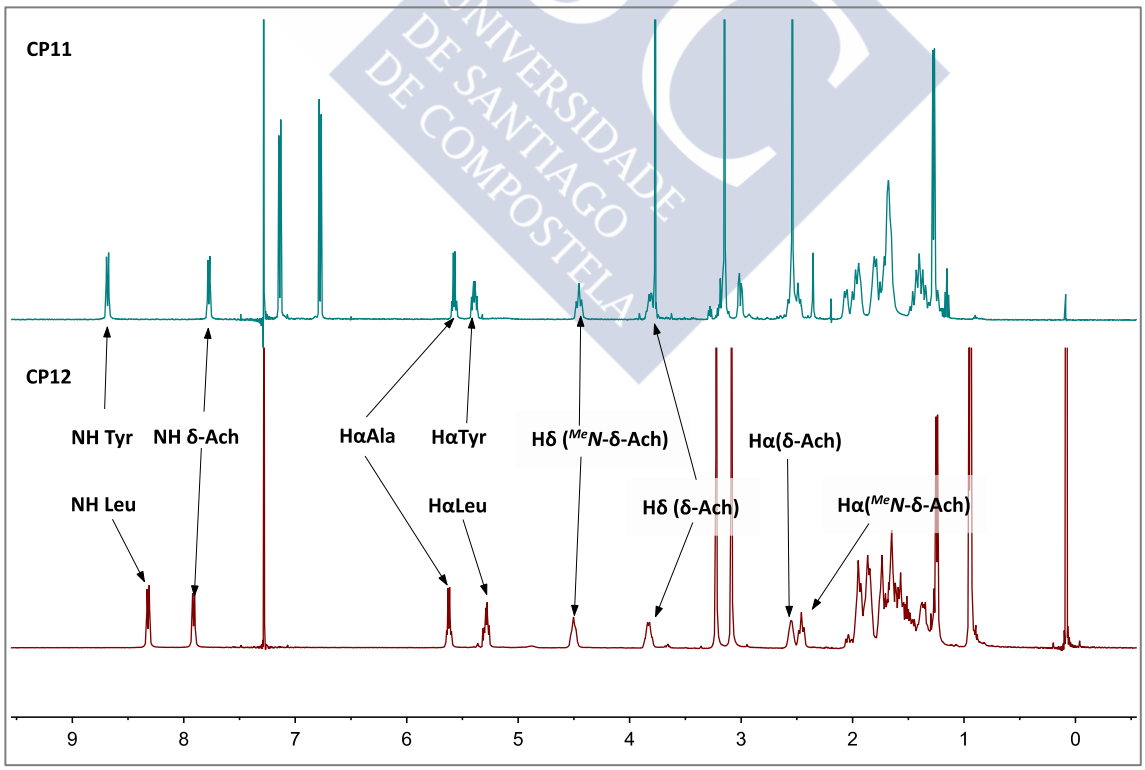


Figura 111: Espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) apilados correspondientes a los péptidos **CP11** (arriba) y **CP12** (abajo).

Al igual que para el péptido **CP11**, los desplazamientos químicos de las señales del espectro de protón no son dependientes de la concentración, por lo que se estimó un valor para la constante de asociación en $CDCl_3$ superior a 10^5 M^{-1}. El autoensamblaje en disolución también se pudo confirmar mediante espectroscopía de RMN bidimensional, por la aparición de señales nOe entre el protón amídico de la leucina y el protón en posición δ del *Me*N-δ-Ach y entre este último y el protón en posición α del δ-Ach (Figura 112).

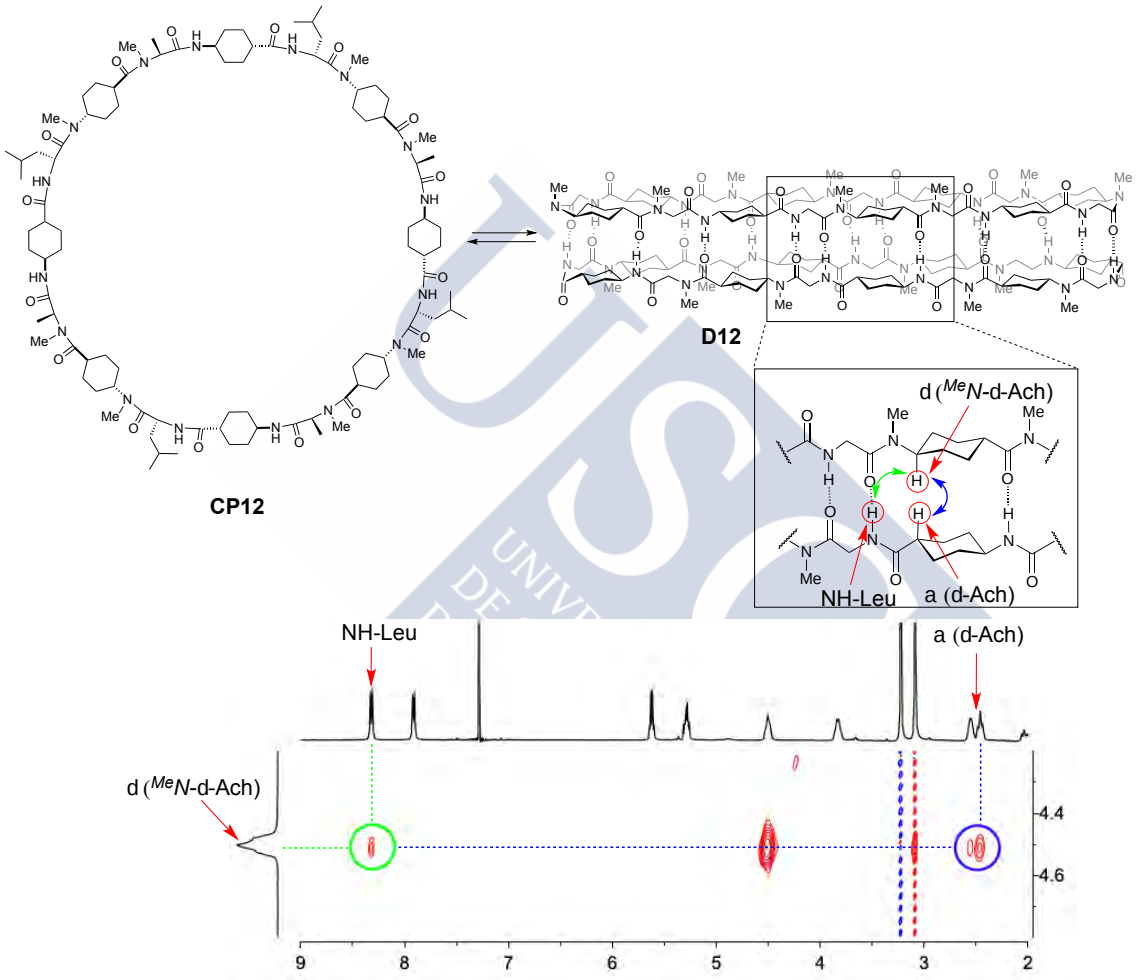


Figura 112: Estructura del péptido **CP12** y dímero que forma en disolución (las cadenas laterales del dímero se han omitido para una mayor claridad). En el recuadro inferior se destacan los protones que dan lugar a señales nOe que confirman la estructura dimérica.

Sistemas heterodiméricos de α,δ-ciclopéptidos

Toda vez que se comprobó que los α,δ-ciclopéptidos poseen una capacidad de autoensamblaje análoga a los sistemas *D,L*-α-ciclopeptídicos, y que por lo tanto se había demostrado que es posible usar los δ-Ach como "listones moleculares" o "elongadores rígidos" en los anillos ciclopeptídicos, decidimos estudiar la tendencia que poseen estos péptidos para autoensamblarse a través de una lámina β paralela o antiparalela, ya que los dos tipos de aminoácidos presentes en estos ciclopéptidos poseen tendencias contrarias en cuanto al tipo de empaquetamiento más favorable. Por lo tanto, queríamos determinar cual de los dos tipos de aminoácidos era el que predominaba en el equilibrio, los α-aminoácidos con los que se favorecen las láminas antiparalelas, o los δ-aminoácidos que favorecen las asociaciones paralelas. En cuanto a los péptidos **CP11** y **CP12**, éstos sólo pueden autoensamblarse a través de la formación de una lámina β antiparalela ya que la cara *N*-metilada bloquea la formación de la lámina paralela.

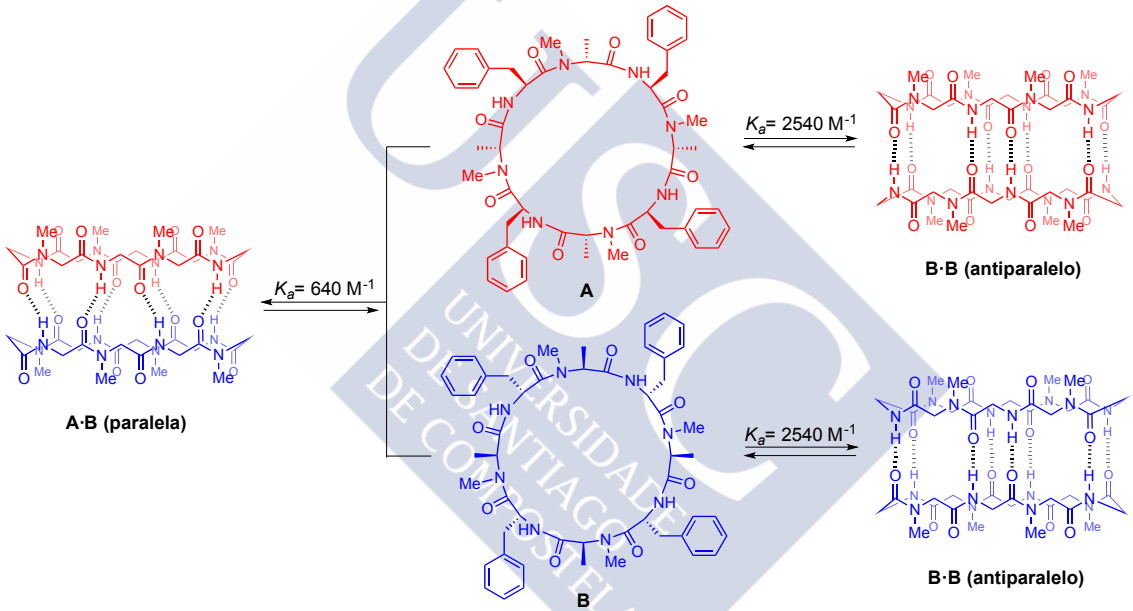


Figura 113: Estrategia empleada por el grupo del Prof. Ghadiri para medir la estabilidad relativa de los dímeros formados mediante una lámina β paralela frente a la antiparalela. Para una mayor simplicidad se han omitido las cadenas laterales en los dímeros.

Como ya vimos en la introducción de este trabajo de tesis, en 1995 el grupo del Prof. Ghadiri publicó el primer estudio acerca de las estabilidades relativas de láminas β paralelas frente a antiparalelas en sistemas diméricos formados por *D,L*-α-ciclopéptidos. Para ello estudiaron el comportamiento en disolución de una mezcla equimolar de los péptidos *c*-[(*^{Me}N-L*-Ala-*D*-Phe-)$_4$] y su enantiómero *c*-[(*^{Me}N-D*-Ala-*L*-Phe-)$_4$] mediante espectroscopía de ^{1}H-RMN.[43] Los espectros de protón de cada uno de los péptidos por separado en $CDCl_3$ mostraban las típicas señales de los ciclopéptidos que se autoensamblan formando dímeros antiparalelos. Sin embargo, en el espectro de RMN

[43] Kobayashi, K; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 95-98.

de la mezcla racémica, además de las señales originales, aparecían otras que se atribuyeron a la formación de una nueva especie en disolución, el heterodímero A-B (Figura 113).

Como se puede observar en la Figura 113, cada uno de los ciclopéptidos (A o B) se autoensamblaba en disolución dando lugar a los correspondientes homodímeros, y debido al bloqueo selectivo de una de sus caras sólo se puede apilar a través de una lámina β antiparalela. Sin embargo, en una mezcla equimolecular de ambos péptidos coexisten además de ambos homodímeros una tercera especie minoritaria que se corresponde con el heterodímero. Esta nueva especie sólo se puede formar a través del establecimiento de una lámina β paralela. De esta forma se estableció que, aunque los *D,L*-α-ciclopéptidos pueden apilarse a través de láminas β paralelas o antiparalelas, el empaquetamiento más estable se da en la forma antiparalela. Por otra parte, los δ-ciclopéptidos poseen la tendencia contraria, dado que el grupo carbonilo y el protón amídico se orientan hacia diferentes caras del plano del anillo, la única posibilidad de empaquetamiento es el paralelo. [172]

En base a estas dos diferentes tendencias, decidimos aplicar la estrategia empleada por el grupo de Ghadiri con los α,δ-ciclopéptidos, para lo que sintetizamos el "enantiómero" del péptido *c*-[(*D*-Tyr(Me)-δ-^{Me}*N*-Ach-*L*-^{Me}*N*-Ala-δ-Ach-)$_2$] (**CP10**), el *c*-[(*L*-Tyr(Bn)-δ-^{Me}*N*-Ach-*D*-^{Me}*N*-Ala-δ-Ach-)$_2$] (**CP13**). Como se puede observar, el grupo protector de la Tyr es diferente en ambos casos, lo que nos permitió emplear ambos grupos como sonda durante los estudios de RMN para conocer las concentraciones relativas de ambos péptidos (Figura 114).

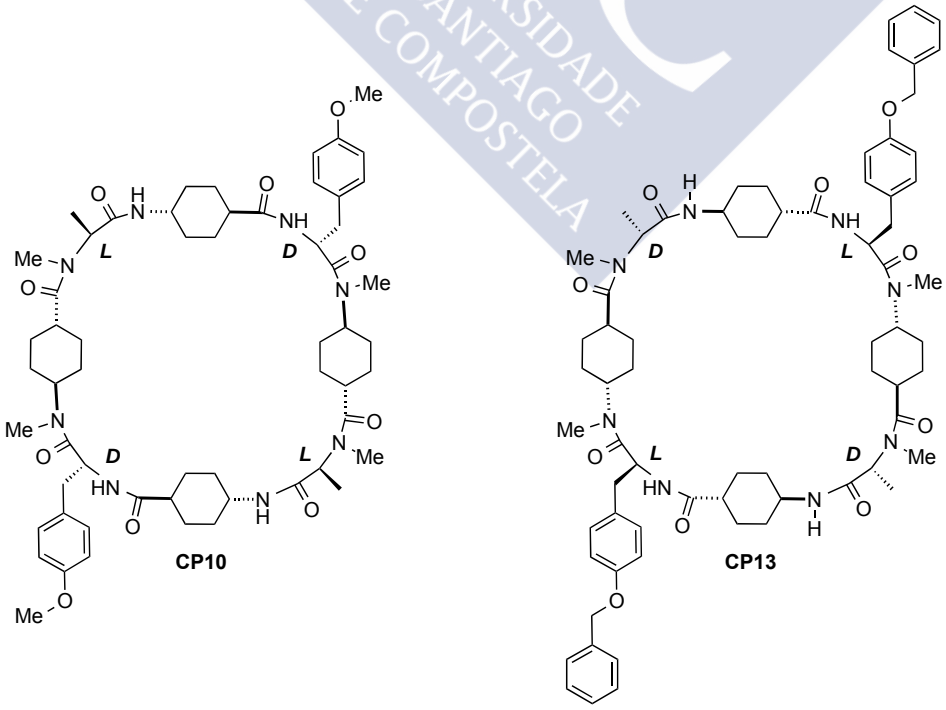
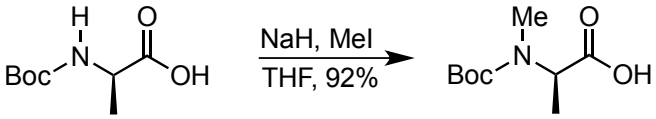


Figura 114: Estructuras del octapéptidos cíclico **CP10** (izquierda) y su pseudoenantiómero **CP13** (derecha).

La estrategia sintética que se siguió para la obtención de **CP13** fue similar a la de **CP10**. El Boc-^{Me}*N*-*D*-Ala-OH (**69**) se preparó de forma similar a la descrita anteriormente para el enantiómero natural, obteniéndose con un rendimiento del 92% (Figura 115).

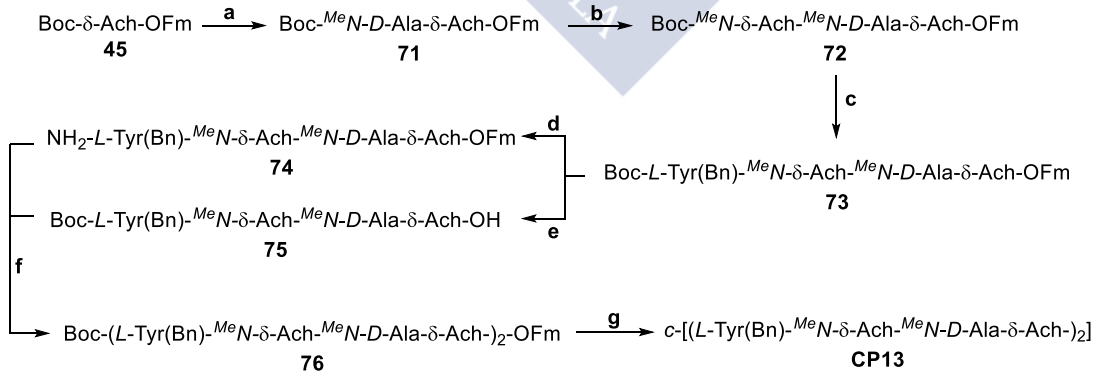


69 **70**

Figura 115: Reacción de *N*-alquilación de la Boc-*D*-Ala-OH (**69**) para la obtención de la Boc-^{Me}*N*-*D*-Ala-OH (**70**).

Para la síntesis del péptido decidimos repetir la metodología empleada para **CP10**, siguiendo una síntesis lineal hasta la obtención del tetrapéptido **73**, y a partir del mismo formar el octapéptido **76** gracias a la simetría que posee **CP13** (Figura 116).

La obtención del dipéptido Boc-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-OFm (**71**) se llevó a cabo desprotegiendo el grupo amino del compuesto **45** tratándolo con una mezcla de TFA/CH_2Cl_2 (1:1) durante quince minutos, y formando a continuación el enlace peptídico mediante la preactivación del ácido carboxílico libre de la Boc-*D*-^{Me}*N*-Ala-OH (**70**) con *N*-HBTU en presencia de una base impedida. El dipéptido **71** se obtuvo con un rendimiento del 87%. Después se desprotegió el grupo amino del dipéptido **71** tratándolo con ácido TFA en CH_2Cl_2 durante quince minutos, y una vez eliminados los restos de TFA se acopló con el Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**) usando *N*-HATU como agente activante en presencia de DIEA. De esta forma se obtuvo el compuesto **72** con un rendimiento cuantitativo. Por último, el tetrapéptido Boc-*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (**73**) se obtuvo con un rendimiento del 80% siguiendo un procedimiento similar al descrito (Figura 116).



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HBTU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-*D*-Ala-OH (**70**), DCM, 87%; **b)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**), DCM, 99%; **c)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*D*-Tyr(Bn)-OH, DCM, 80%; **d)** TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65); **e)** Piperidina/DCM (2:8); **f)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 68%; **g)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65); 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM, 42%.

Figura 116: Esquema sintético seguido para la obtención del ciclopéptido **CP13**.

La síntesis de **CP13** continuó con la formación del octapéptido lineal **76**. Para ello una fracción del compuesto **73** se trató con una disolución de piperidina (20%) en CH_2Cl_2 durante treinta minutos, obteniéndose el intermedio **75**. Una segunda fracción del péptido **73** se trató con la mezcla TFA/$PhSiH_3$/DCM (25:10:65) durante cinco minutos para dar lugar al intermedio **74**. El acoplamiento de ambos compuestos se llevó a cabo con *N*-HBTU y DIEA en CH_2Cl_2, dando el octapéptido **76** con un 68% de rendimiento y a un subproducto con una pérdida de 190 unidades de masa, análogo al obtenido durante la formación del péptido **56**.

La última etapa fue la ciclación del péptido **76**, para lo que se llevó a cabo la desprotección de ambos extremos tratándolo con una disolución de piperidina (20%) en CH_2Cl_2 durante treinta minutos, seguido de un tratamiento con la mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:10:65) durante cinco minutos. Para su ciclación se empleó *N*-TBTU como agente activante en presencia de DIEA en condiciones de alta dilución (1 mM), obteniéndose el ciclopéptido *c*-[(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_2$] (**CP13**) con un rendimiento del 42%.

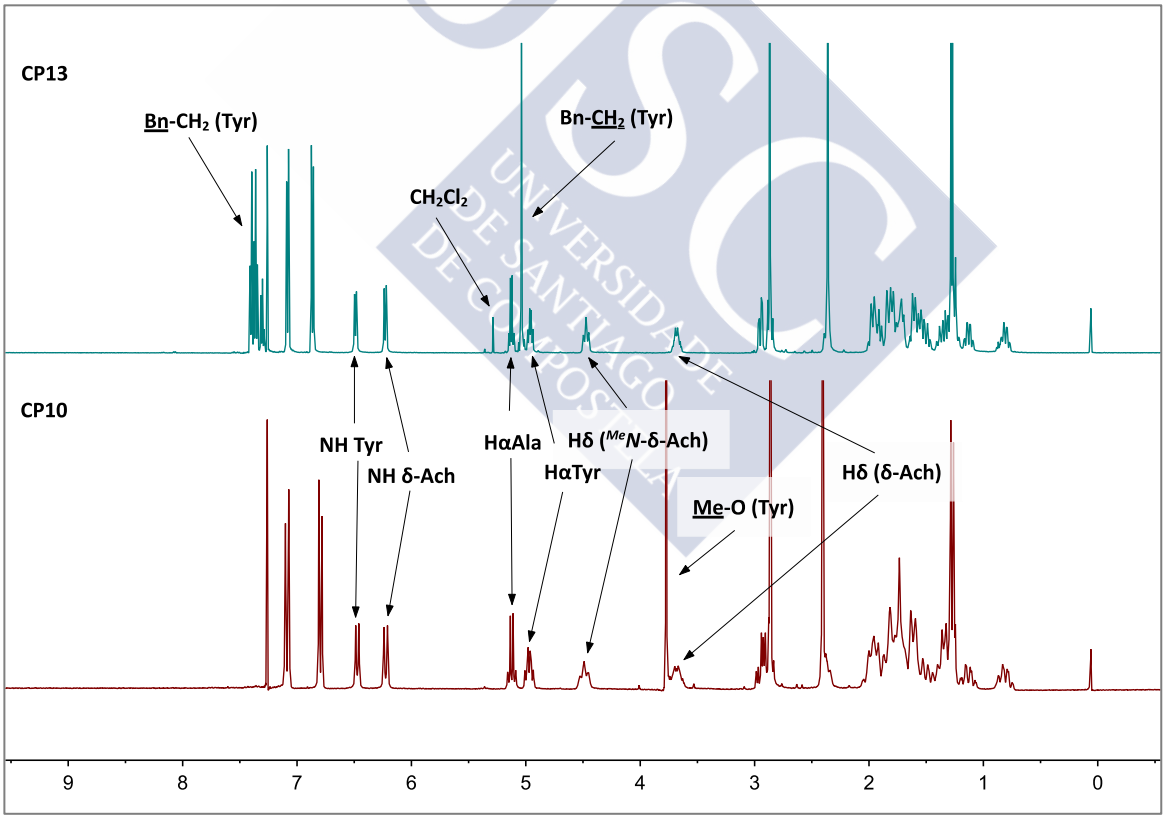


Figura 117: Comparación de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de los ciclopéptidos **CP13** (arriba) y **CP10** (abajo) donde se pueden observar que existen muy pocas diferencias entre las señales más significativas.

Una vez finalizada la síntesis del ciclopéptido, se estudiaron sus propiedades de autoensamblaje en disolución. El espectro de ^{1}H-RMN de **CP13** resultó, como era de

esperar, prácticamente superponible con el espectro de **CP10**, con la única diferencia de las señales pertenecientes a los grupos protectores de las tirosinas. Como podemos observar en la Figura 117, el grupo protector de la *D*-Tyr de **CP10** (metilo) aparece como un singlete con un desplazamiento químico de 3.77 ppm, mientras que el grupo protector de la *L*-Tyr de **CP13** (bencilo) posee señales aromáticas entre 7.42 y 7.27 ppm, además del metileno en posición bencílica, un singlete que aparece a 5.04 ppm. El resto de señales permanecieron prácticamente invariables.

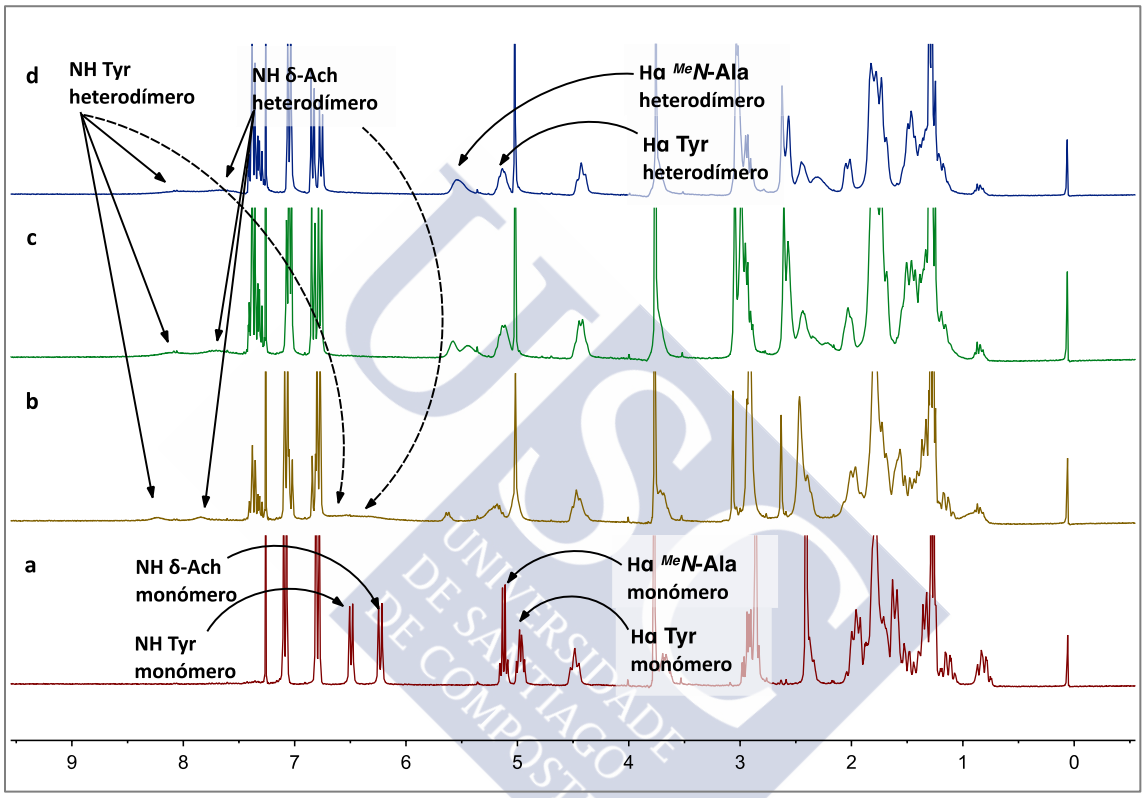


Figura 118: Superposiciones de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) obtenidos de las adiciones de **CP13** sobre una disolución de **CP10**. Las señales más relevantes en el monómero **CP10** aparecen indicadas en la figura. a) **CP10**; b) **CP10** + 0.2 equivalentes de **CP13**; c) **CP10** + 0.6 equivalentes de **CP13**; d) **CP10** + 1 equivalente de **CP13**.

Para los estudios de formación de heterodímeros decidimos realizar un experimento de adición de **CP13** sobre **CP10** monitorizado mediante espectroscopía de RMN de protón. Sobre una disolución de **CP10** (20 mM) se añadieron pequeñas alícuotas de otra disolución de **CP13** de 0.2 equivalentes cada una, hasta alcanzar una proporción equimolar (Figura 118). La adición de 0.2 equivalentes fue suficiente para provocar cambios significativos en el espectro de **CP10** que no pueden justificarse por la mera superposición de las señales correspondientes al segundo ciclopéptido. El cambio más obvio era la desaparición de los protones amídicos de **CP10** a 6.49 y 6.23 ppm con la adición de sólo 0.2 equivalentes de **CP13** y la aparición de unas bandas muy anchas (y poco visibles) a campo más bajo, en torno a 8.24 y 7.85 ppm. Estas señales se

desplazaban a campo alto a medida que aumentaba el número de equivalentes de **CP13**. Por otra parte, la intensidad de las señales de los protones α de los α-aminoácidos (5.12 y 4.97 ppm) descendía con las adiciones mientras que aparecían nuevas señales poco definidas entre 5.6-5.5 ppm y 5.2-5.14 ppm. La señal del protón δ del ^{Me}*N*-δ-Ach también sufrió modificaciones, cambiando su desplazamiento de 4.48 a 4.42 ppm con la adición de 1.0 equivalente, aunque con 0.4 y 0.6 equivalentes parece observarse dos señales solapadas, que indicarían la presencia de al menos dos especies diferentes. La señal del protón δ del δ-Ach también sufrió modificaciones, pero no fue posible medirlas debido a que ésta se solapaba con la señal del metilo protector de la cadena lateral de la *D*-Tyr de **CP10**. Las señales de los *N*-metilos también sufrieron modificaciones, desplazándose a campo bajo con las paulatinas adiciones del segundo ciclopéptido

Para intentar observar mejor los cambios en el espectro decidimos probar entornos de menor polaridad, empleando tetracloruro de carbono como disolvente. Sin embargo, dada la baja solubilidad de los ciclopéptidos **CP10** y **CP13** en ese disolvente se emplearon mezclas $CDCl_3/CCl_4$ (en la Figura 119 se muestran los espectros de protón tomados a diferentes proporciones de $CDCl_3$ y CCl_4, en los que se puede apreciar como los protones amídicos se hacen más visibles y se desplazan a campo bajo a medida que aumenta la proporción de CCl_4). A pesar de que las señales del espectro de protón eran anchas, se observaron los protones amídicos a desplazamientos químicos mayores de 7.5 ppm, un claro indicador de que estos protones estaban formando parte de un enlace de hidrógeno. De todas formas, se observaban las señales de los protones amídicos (8.24 y 7.85 ppm), protones α (5.54 ppm para Hα ^{Me}*N*-Ala y 5.13 ppm para Hα Tyr) así como los *N*-metilos (3.02 y 2.63 ppm) que no coinciden con las observadas para uno solo de los ciclopéptidos bajo idénticas condiciones.

Por último, se realizaron experimentos de la mezcla equimolecular **CP10·CP13** a diferentes concentraciones y temperaturas para intentar establecer una constante de asociación del sistema mediante la Ecuación de Van´t Hoff.[175] Desafortunadamente, la resolución de las señales de los protones amídicos y de los protones Hα era demasiado baja como para usarlos como referencia entre la forma dimérica y la monomérica, lo que no nos permitió el cálculo de una constante de asociación para este sistema.

En cuanto a la espectroscopía de FT-IR, es conocido que el desplazamiento de las bandas correspondientes a los grupos NH de los α-péptidos que forman una lámina β varía en función del tipo de lámina. Con respecto al desplazamiento de las bandas Amida I_a y Amida I_b, las láminas β paralelas poseen el máximo de absorción a número de onda mayor que las correspondientes láminas β antiparalelas, aunque la diferencia puede llegar a ser muy pequeña.[176] Sin embargo, en el caso de los α,δ-ciclopéptidos no ocurre

[175] Enunciada por el químico neerlandes Jacobus Henricus van't Hoff en 1884, esta ecuación relaciona la variación de la temperatura con la variación de la constante de equilibrio de un proceso.

[176] Barth, A. *BBA-Bioenergetics*, **2007**, *1767*, 1073-1101.

el mismo comportamiento. Los valores de los desplazamientos de las bandas Amida I_a para **CP10**, **CP13** y **D10·13** poseen un valor muy similar (1622, 1624 y 1620 cm^{-1} respectivamente). De la misma forma, el número de onda de la banda Amida I_b para **CP10**, **CP13** y **D10·13** también resultó prácticamente el mismo (1670, 1670 y 1672 cm^{-1} respectivamente) por lo que los valores del desplazamiento de las bandas en IR no nos aportaron ninguna información estructural.

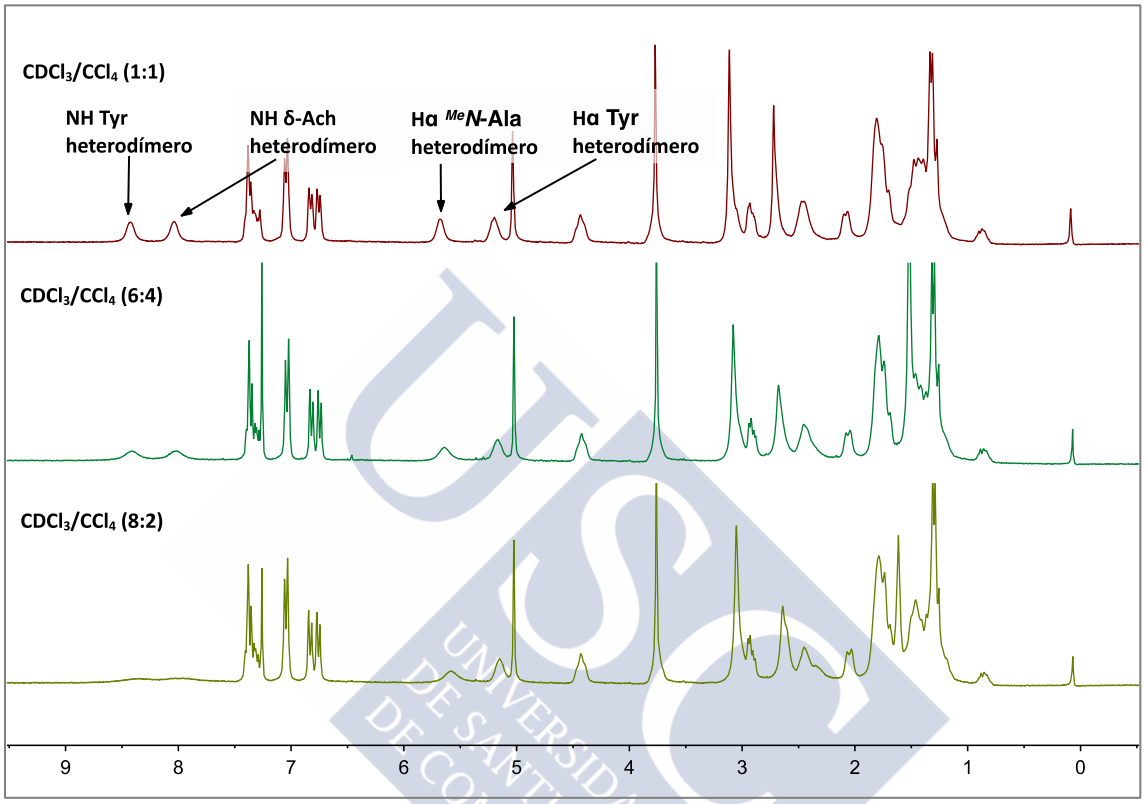


Figura 119: Apilamiento de los espectros de ^{1}H-RMN de la mezcla equimolar de **CP10** y **CP13** en diferentes relaciones de $CDCl_3/CCl_4$ (5 mM). Nótese un aumento en la intensidad de las señales correspondientes con los protones amídicos a medida que desciende la polaridad del medio.

En conclusión, estos resultados claramente indican que hay un equilibrio cuya escala de tiempo es similar a la escala de tiempo en ^{1}H-RMN entre las dos formas monoméricas y el heterodímero formado mediante una hoja plegada paralela. Creemos que esta diferencia entre la formación de los homodímeros (lámina antiparalela) y del heterodímero (lámina paralela) entre los péptidos **CP10** y **CP13** se debe a que la gran rigidez que aporta el δ-Ach no permite alcanzar la disposición geométrica entre los NH y carbonilos necesaria para apilarse a través de una lámina β antiparalela, que es la única forma posible de generar los homodímeros. Sin embargo, parece que esta geometría si permite el apilamiento a través de una lámina β paralela, aunque con constantes de asociación bajas.

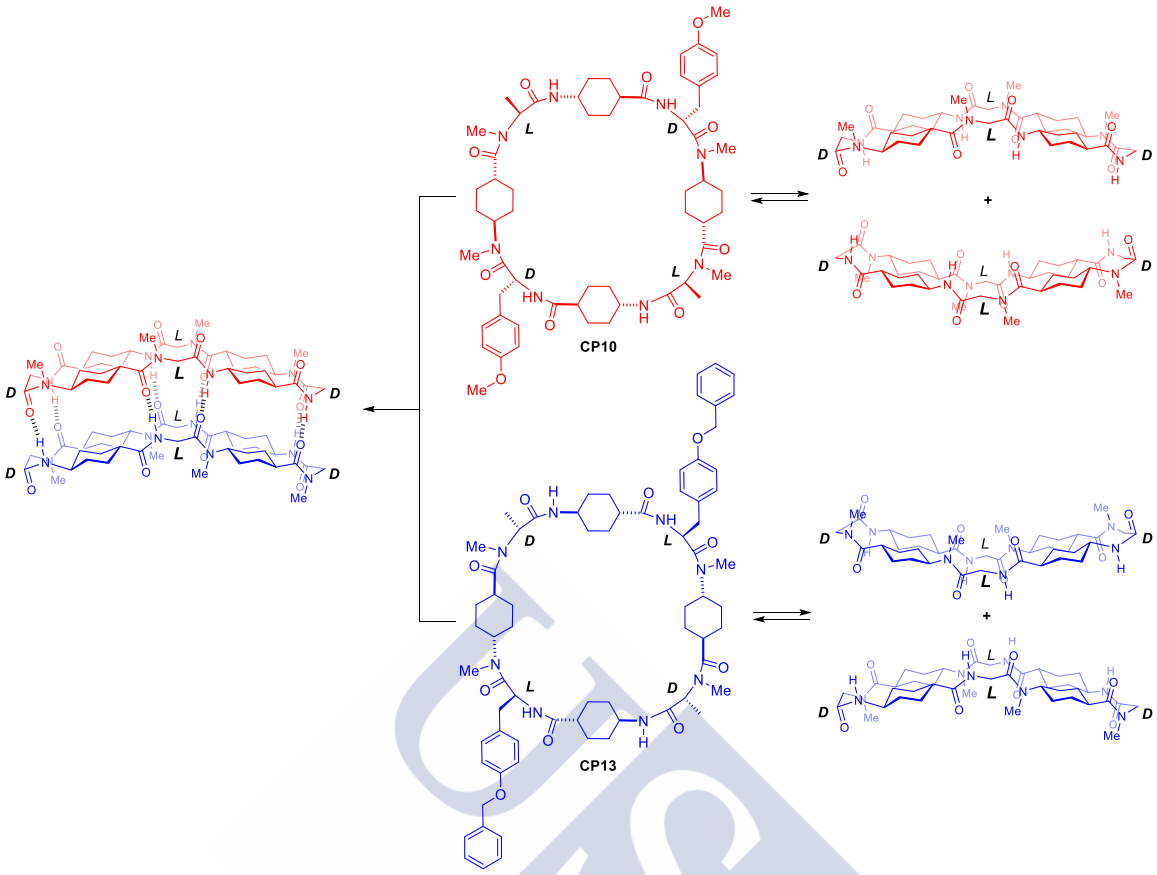


Figura 120: La distorsión debida a la tensión anular podría deformar el ciclopéptido de tal forma que éste sólo puede autoensamblarse de forma paralela como ocurre en el heterodímero **D10·13** (izquierda) y sea imposible la forma antiparalela como ocurre en el homodímero de **CP10** o **CP13** (derecha). Para una mayor claridad, se han omitido las cadenas laterales en las representaciones diméricas.

Una teoría que explica este comportamiento parte de la gran tensión anular que debe sufrir este péptido; al intercalar unidades de δ-Ach, éstas actúan como elongadores lineales rígidos, de forma que los cuatro α-aminoácidos tienen que soportar todo el giro del ciclopéptido. Esto es, cada α-aminoácido debe generar el ángulo de 90° necesario para esta estructura cuadrada. Creemos que la rigidez del δ-Ach hace que la tensión que tienen que soportar los α-aminoácidos sea similar a la observada en *D,L*-α-tetrapéptidos de configuración alternada. Sin embargo, los ciclopéptidos que contienen γ-aminoácidos, cuyo ángulo diedro varía entre 120° y 140°**,** permiten el autoensamblaje de los α,γ-tetrapéptidos cíclicos en una lámina β-antiparalela.[59] Por este motivo, tal como se muestra en la Figura 120, es probable que los *N*-metilos de los α-aminoácidos no se encuentren en una disposición completamente perpendicular con respecto al plano del ciclo, sino que estará ligeramente desviada hacia el exterior o el interior de la estructura. La rigidez del enlace peptídico da lugar a que los grupos carbonilo del próximo residuo (^{Me}*N*-δ-Ach) y amino (NH de δ-Ach) también se desplacen para mantener la planaridad del enlace peptídico. Asimismo, la rigidez del anillo ciclohexánico

[59] Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett*. **2005**, *7*, 4681-4684.

hace que esta distorsión se propague hacia el siguiente α-aminoácido, aunque este no esté *N*-metilado. Dada esta rigidez y la tensión del anillo, la molécula se distorsiona perdiendo parte de la planaridad, tal como se muestra en el modelo de la Figura 120. Como consecuencia de esta pérdida de la planaridad la forma antiparalela no es complementaria consigo misma por lo que no puede dimerizar. Por el contrario, en la mezcla racémica los ciclopéptidos son complementarios pudiendo formar la hoja plegada paralela.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Prosiguiendo con el estudio de las estabilidades relativas de láminas β antiparalelas frente a paralelas, decidimos repetir el estudio de formación de heterodímeros a través del apilamiento de pseudoenantiómeros con los α,δ-dodecapéptidos cíclicos. Para ello decidimos sintetizar el péptido *c*-[(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_3$] (**CP14**), partiendo del octapéptido **76** y el tetrapéptido **73**.

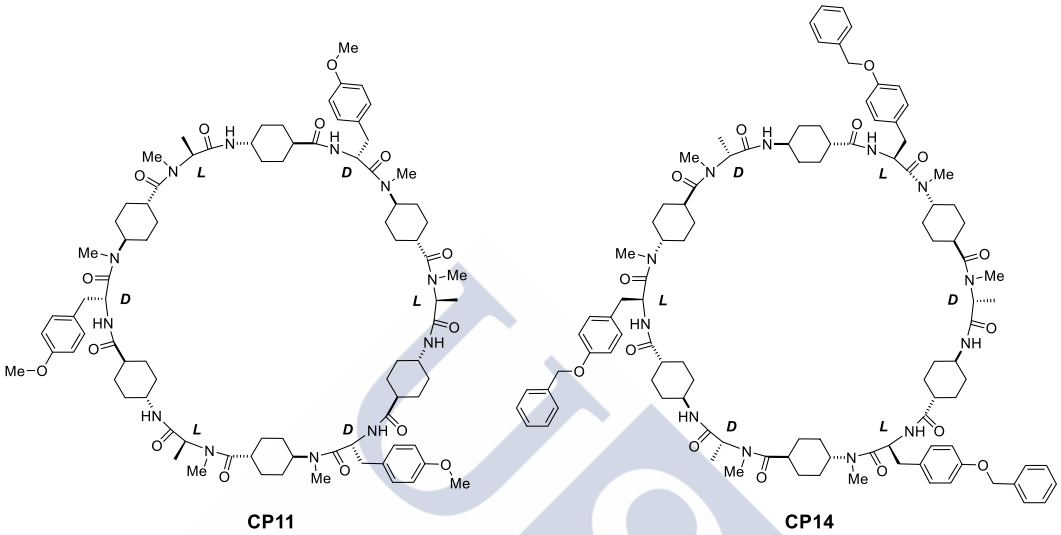
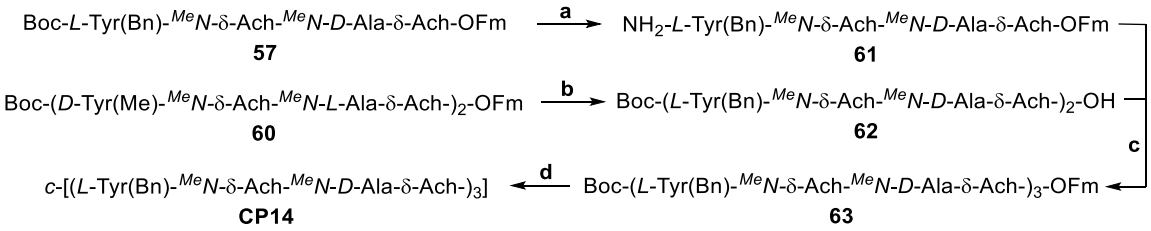


Figura 121: Estructura del dodecapéptido cíclico **CP11** (izquierda) y su pseudoenantiómero **CP14** (derecha).

La desprotección del extremo amino del tetrapéptido **57** con la mezcla TFA/PhSiH$_3$/DCM (25:10:65) dio lugar al intermedio **61**, mientras que mediante el tratamiento del octapéptido **60** con una disolución de piperidina (20%) en CH_2Cl_2 se obtuvo el intermedio **62**. Ambos intermedios se acoplaron empleando *N*-HBTU como agente de acoplamiento y DIEA como base, obteniéndose el dodecapéptido lineal **63** con un 70% de rendimiento. El último paso de la síntesis consistió en la ciclación de **63** para lo cual se desprotegieron ambos extremos del péptido en similares condiciones a los anteriores péptidos, y se cicló empleando *N*-TBTU y DIEA en CH_2Cl_2 en condiciones de alta dilución. El ciclopéptido **CP14** se obtuvo con un rendimiento del 43% (Figura 122).



Condiciones: a) TFA/PhSiH$_3$/DCM (25:10:65); **b)** Piperididina/DCM (2:8); **c)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 70%; **d)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/PhSiH$_3$/DCM (25:10:65), *N*-TBTU, DIEA, DCM, 43%.

Figura 122: Procedimiento sintético empleado para la obtención del ciclopéptido **CP14**.

El comportamiento del péptido **CP14** en disolución era similar al de **CP11**. De hecho, los espectros de ^{1}H-RMN de ambas especies son prácticamente superponibles a excepción de las señales correspondientes a los grupos protectores de la *L*-Tyr(Bn) (grupo de señales entre 7.41 y 7.27 ppm y singlete a 5.01 ppm) o la *D*-Tyr(Me) (singlete a 3.75 ppm). Las señales correspondientes con los NH de **CP14** aparecían a 8.64 ppm (NH de la tirosina) frente a los 8.66 ppm de **CP11** y a 7.74 ppm (NH del δ-Ach) frente a los 7.75 de **CP11**. Sus constantes de acoplamiento eran de 9.0 y 8.6 Hz respectivamente, lo que concuerda con un ciclopéptido que adopta una conformación plana en disolución y que es capaz de formar dímeros.

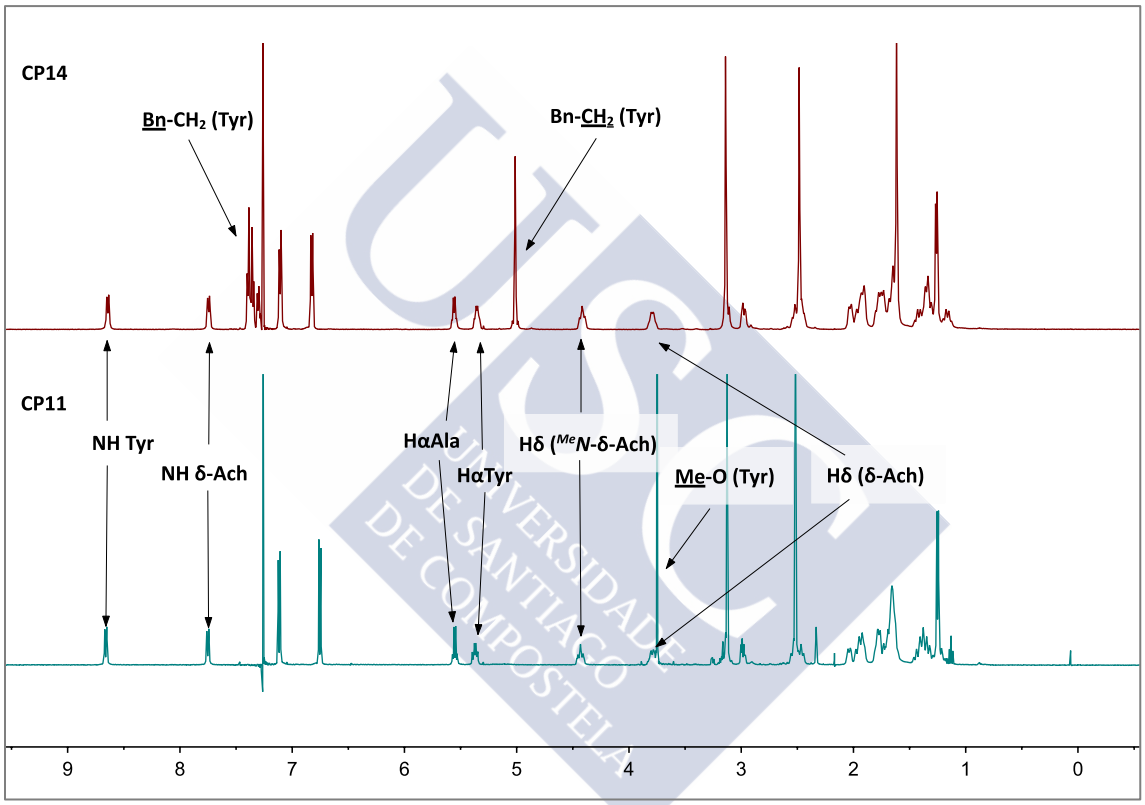


Figura 123: Comparación de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de los péptidos **CP11** y **CP14** donde se indican las señales más características.

Para estudiar la estabilidad relativa de las láminas paralelas frente a las antiparalelas en el sistema heterodimérico **CP11·CP14** decidimos repetir el experimento de adición monitorizado mediante RMN de protón. En esta ocasión, decidimos añadir pequeñas proporciones de **CP14** sobre una disolución de **CP11**.

Los espectros de ^{1}H-RMN de las sucesivas adiciones de **CP14** sobre **CP11**, que se muestran en la Figura 124, confirmaron la formación mayoritaria de una nueva especie. La aparición de las señales de esta nueva especie llevaba asociado el descenso paulatino de las señales correspondientes al homodímero del péptido de partida (**CP11**). Las señales de esta nueva especie se asignaron a la estructura del dímero **D11·14** (Figura

124). De esta forma, las señales de los protones amídicos de la tirosina (8.64 ppm, d, *J* = 9.0 Hz) y del δ-Ach (7.75 ppm, d, *J* = 8.7 Hz), iban desapareciendo a medida que aparecían nuevas señales a 8.49 ppm (d, *J* = 9.3 Hz) y 7.99 (dos dobletes solapados con *J* = 8.3 Hz) correspondientes con los protones amídicos de cada ciclopéptido (NH Tyr(Bn), NH Tyr(Me) y NH δ-Ach). También se observaba el mismo descenso en la intensidad de las señales de los protones en posición α de la ^{Me}*N*-Ala (5.58 ppm, q, *J* = 7.1 Hz) y de la Tyr (5.40 ppm, td, *J* = 9.5, 5.6 Hz), mientras que surgían señales a 5.84 y 5.30 ppm. También son destacables los cambios de las señales de los *N*-metilos, que en los péptidos de partida eran dos singletes a 3.15 y 2.54 ppm cuya intensidad descendía simultáneamente con la aparición de dos pares de singletes, uno a 3.24 y 3.22 ppm, y otro a 2.66 y 2.64 ppm.

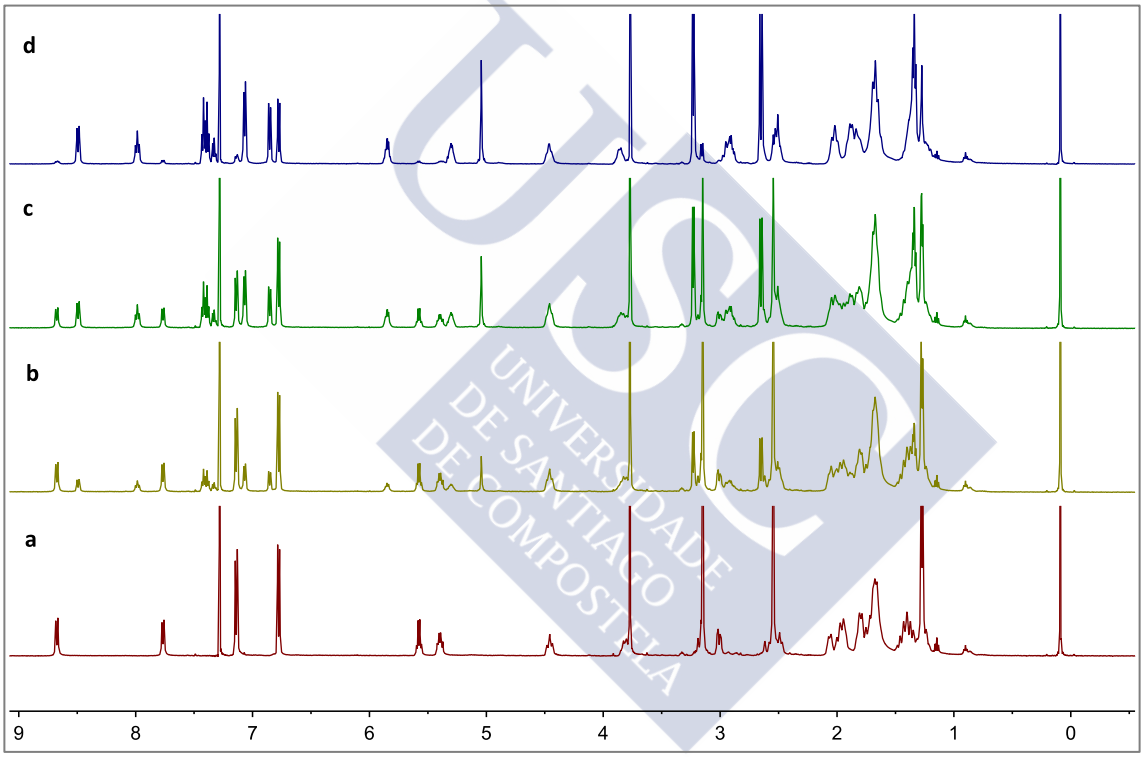


Figura 124: Espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) apilados correspondientes con las adiciones de **CP14** sobre una disolución de **CP11** (5.0 mM). a) **CP11**; b) **CP11** + 0.3 equivalentes de **CP14**; c) **CP11** + 0.6 equivalentes de **CP14**; d) **CP11** + 1 equivalente de **CP14**.

Observando las integrales de las señales de los protones amídicos de los homodímeros **D11** y **D14** y del heterodímero **D11·14** en la mezcla equimolecular (Figura 125), podemos establecer una relación entre las integrales de 10:1 a favor del heterodímero. Teniendo en cuenta que las señales del homodímero se corresponden a dos dímeros diferentes, **D11** y **D14**, esto implica una relación entre heterodímero y homodímero de casi 20:1. En base a esta relación podemos establecer que la constante de asociación (K_a) del heterodímero **D11·14** es al menos un orden de magnitud superior a la constante de asociación de los homodímeros **D11** y **D14**.

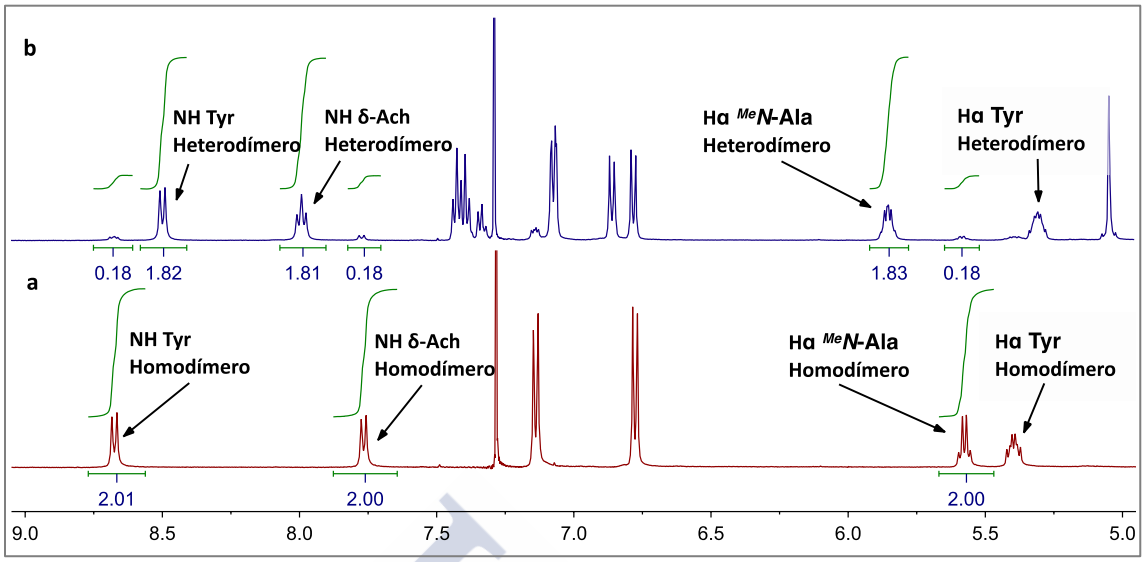


Figura 125: Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de las adiciones de **CP14** sobre **CP11** donde podemos observar las integrales de las señales más relevantes correspondientes a los homodímeros y al heterodímero. a) **CP11**; c) **CP11** + 1 equivalente de **CP14**.

Es importante resaltar que, aunque se aprecian tres señales correspondientes a los protones amídicos para **D11·14**, en disolución sólo existe un único heterodímero. Mientras que los protones amídicos de las dos tirosinas aparecen a un mismo desplazamiento químico, los dos NH de los δ-Ach poseen un desplazamiento ligeramente diferente, por lo que aparecen como dos dobletes solapados que aparentan un triplete.

Además, los experimentos bidimensionales (NOESY) confirmaron la formación del heterodímero **D11·14** ya que se observaron las señales nOe que no se pueden dar en los homodímeros (Figura 126). Se observaron picos de cruce entre los protones en posición δ del ^{Me}*N*-δ-Ach y el NH de δ-Ach, así como entre el NH de la tirosina y el protón en posición α de la ^{Me}*N*-Ala (Figura 126, recuadro de la izquierda). Por otra parte, dada la diferente orientación de las cadenas laterales en los dímeros apilados a través de una lámina β paralela con respecto a una antiparalela, también se observaron los picos de cruce entre las cadenas laterales de los α-aminoácidos (Figura 126, recuadro de la derecha).

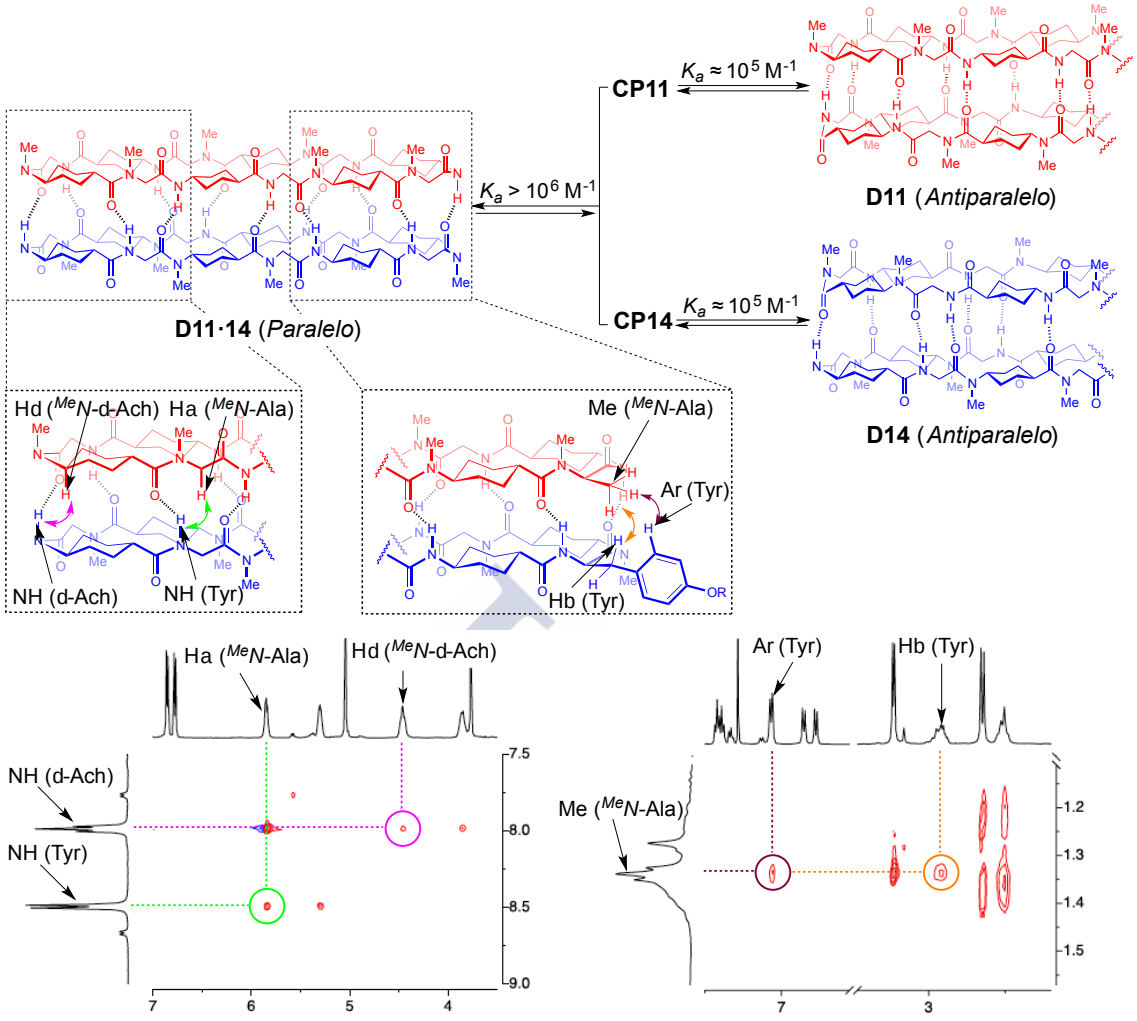


Figura 126: Esquema de la formación del heterodímero **D11·14** y de los dímeros **D11** y **D14** a partir de **CP11** y **CP14**. En los recuadros se señalan los protones que presentan señales nOe que confirman la formación del heterodímero.

En cuanto a los desplazamientos de las bandas en FT-IR de los homodímeros de **CP11** y **CP14**, y del heterodímero **D11·14**, resultaron ser tan similares que no aportaron ninguna información estructural. Los valores de los desplazamientos de las bandas Amida I_a para **CP11**, **CP14** y **D11·14** poseen un valor muy similar (1620, 1622 y 1622 cm^{-1} respectivamente). Igualmente, el desplazamiento de la banda Amida I_b para **CP11**, **CP14** y **D11·14** no presentó ninguna variación significativa (1671, 1670 y 1672 cm^{-1} respectivamente). Los valores de los desplazamientos de las bandas pueden verse resumidos en la Tabla 2.

Ciclopéptido	Vibración Amida A (cm^{-1})	Vibración Amida I_a (cm^{-1})	Vibración Amida I_b (cm^{-1})	Vibración Amida II_{II} (cm^{-1})
CP10	3307	1622	1670	1511(----)
CP13	3313	1624	1670	1510(1529)
D10·13	3311	1620	1672	1511(1535)
CP11	3307	1620	1671	1512(1533)
CP14	3310	1622	1670	1509(1530)
D11·14	3316	1622	1672	1510(1536)

Tabla 2: Valores del desplazamiento de las bandas más relevantes para los ciclopéptidos **CP10**, **CP11**, **CP13**, **CP14** y los heterodímeros **D10·13** y **D11·14** expresados en cm^{-1}.

De esta forma ha quedado demostrado que la tendencia mayoritaria para el autoensamblaje de los α,δ-dodecapéptidos cíclicos es a través del establecimiento de una lámina β paralela.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Sistemas homodiméricos de γ,δ-ciclopéptidos

Nuestro estudio sobre las propiedades de autoensamblaje de sistemas que intercalan δ-aminoácidos en su estructura continuó con los sistemas γ,δ-ciclopeptídicos. Como hemos visto en la introducción de este trabajo de tesis, los γ-tetrapéptidos cíclicos poseen la capacidad de autoensamblarse para formar nanotubos a través de una lámina β paralela. Posteriormente, en nuestro grupo de investigación se estudió el comportamiento de sistemas diméricos formados por γ-octapéptidos cíclicos, los cuales mostraron una gran capacidad de formar dímeros de forma antiparalela en disolventes apolares con constantes de asociación elevadas. En base a estos dos precedentes decidimos sintetizar un γ,δ-octapéptido cíclico en el que se intercalan unidades de δ-Ach en el esqueleto peptídico de un γ-ciclotetrapéptido.

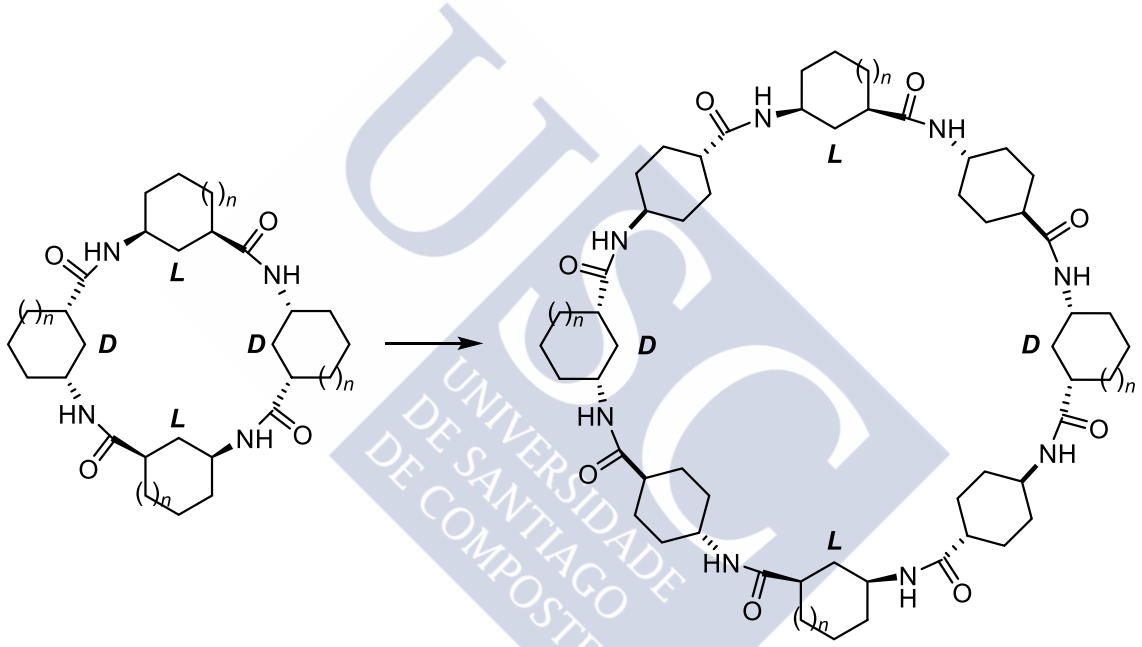
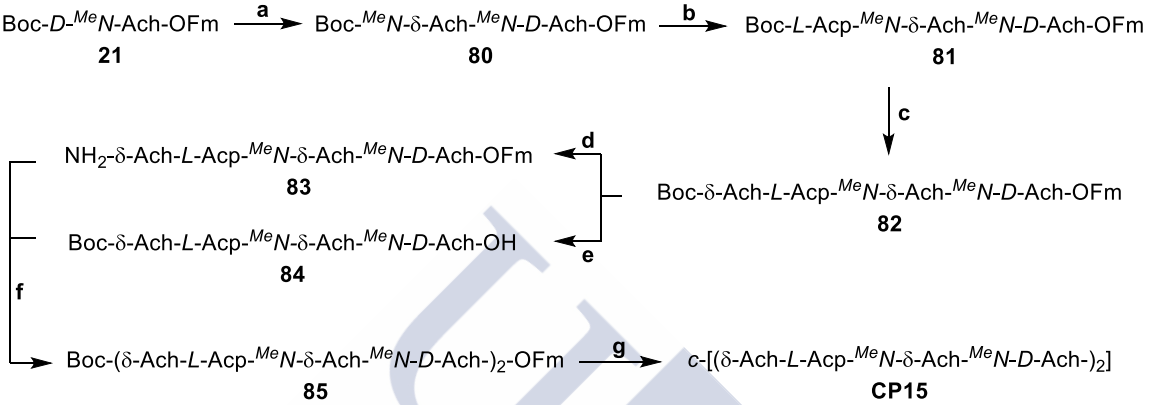


Figura 127: Propuesta de estudio de un γ,δ-octapéptido cíclico diseñado a partir de un γ-tetrapéptido mediante la intercalación de δ-Ach entre cada residuo.

Para llevar a cabo el estudio de las propiedades de este sistema, diseñamos un γ,δ-ciclopéptido bloqueado en una de sus caras mediante el empleo de los aminoácidos *N*-metilados de tal forma que el apilamiento de las unidades peptídicas dé lugar a la formación de dímeros. Para el primer diseño decidimos alternar unidades de los γ-aminoácidos empleados anteriormente (γ-Acp y γ-Ach) con unidades de δ-Ach. De nuevo, los requisitos estructurales derivados del uso de los δ-aminoácidos supone la utilización de aminoácidos *N*-metilados contiguos, de igual forma que en los α,δ-ciclopéptidos. Esto es, los ^{Me}*N*-δ-Ach se acoplarían sobre los γ-aminoácidos *N*-metilados mientras que los δ-Ach sin metilar se acoplarán sobre los γ-residuos no metilados.

El primer diseño propuesto fue el péptido *c*-[(δ-Ach-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$] (**CP15**), que alterna unidades de *L*-γ-Acp, *D*-γ-Ach y δ-Ach. De nuevo nos planteamos una síntesis lineal en disolución hasta la obtención del tetrapéptido **82**, a partir del cual se formará el octapéptido lineal **85** gracias a que el ciclopéptido final posee un eje de simetría C_2. En cuanto a la elección de los grupos protectores, se empleó el método Boc/Fm usado con anterioridad.



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**), DCM, 64%; **b)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Acp-OH (**5**), DCM, 73%; **c)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-δ-Ach-OH (**32**), DCM, 81%; **d)** TFA/DCM (1:1); **e)** Piperidina/DCM (2:8); **f)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 87%; **g)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/DCM (1:1); 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM.

Figura 128: Ruta sintética seguida para la obtención de **CP15**.

Como en los casos anteriores seguimos la estrategia de preparar de forma lineal el tetrapéptido **82**. Para ello empleamos las condiciones habituales para desproteger el extremo *C*-terminal, con disoluciones de un 20% de piperidina en diclorometano, y el *N*-terminal con la mezcla TFA/CH_2Cl_2. Los distintos acoplamientos se llevaron a cabo empleando alguno de los típicos agentes de acoplamiento, *N*-HATU para los impedidos (sobre aminas secundarias) y *N*-HBTU para los restantes, con la excepción de la etapa de ciclación, en la que se empleó *N*-TBTU. De esta forma se preparó el **CP15**. La aparición de turbidez durante la adición de la base en la etapa de ciclación podría indicar la insolubilidad del octapéptido lineal en estas condiciones. Sin embargo, la desaparición paulatina de dicha turbidez pareció indicar el progreso de la reacción. Pasadas doce horas se comprobó el avance de la reacción mediante espectrometría de masas, sin hallar la masa de la sustancia de partida en la misma, y detectando la masa de **CP15**, por lo que se procedió a su elaboración.

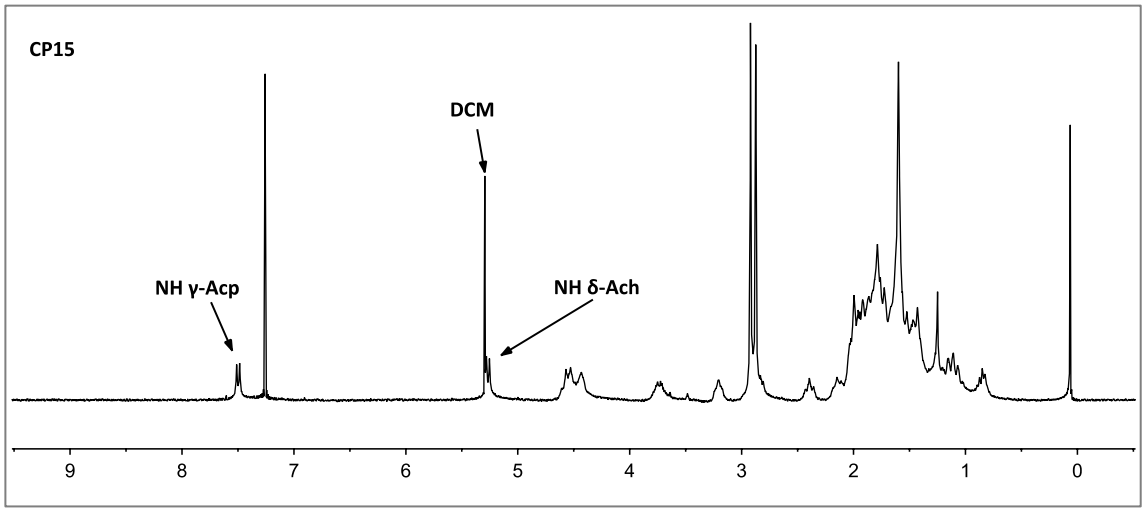


Figura 129: Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de **CP15**. Sobre la figura se remarcan las señales de los protones amídicos.

Los problemas comenzaron con la purificación del compuesto. Debido a la falta de cromóforos de **CP15** o de grupos fácilmente oxidables para el seguimiento de la purificación mediante el uso de reveladores, apenas se pudo conseguir una pequeña fracción del ciclopéptido deseado con un bajo grado de pureza. Pero afortunadamente la cantidad y pureza obtenidas fueron suficientes para observar el comportamiento en disolución del péptido mediante ^{1}H-RMN. Mientras que uno de los protones amídicos se encontró desplazado a campo bajo (7.50 ppm, J = 8.0 Hz) y por lo tanto estaba interviniendo en la formación de un enlace de hidrógeno, la señal del otro protón amídico se encontró a un desplazamiento de 5.27 ppm (J = 8.6 Hz) lo que indicaba que este NH no formaba enlaces de hidrógeno (Figura 129).

Este hecho indica que probablemente el péptido se encontraba plegado en disolución, lo que es compatible con la tendencia al plegamiento observada en péptidos que contienen γ-Acp no *N*-alquilado sintetizados anteriormente en nuestro grupo de investigación.[158] En los estudios realizados por el Dr. Brea con el ciclopéptido c-[(*L*-γ-Acp-*D*-^{Me}*N*-Ala-)$_4$] se observó el plegamiento del ciclopéptido debido a la formación de enlace de hidrógeno entre el NH y carbonilo de una unidad de γ-Acp.

[158] Tesis Doctoral de D. Roberto J. Brea, "Diseño, síntesis y aplicaciones de sistemas supramoleculares homo- y heterodiméricos selectivos y eficientes basados en α,γ-Ciclopéptidos". Universidade de Santiago de Compostela (USC), Febrero de 2013.

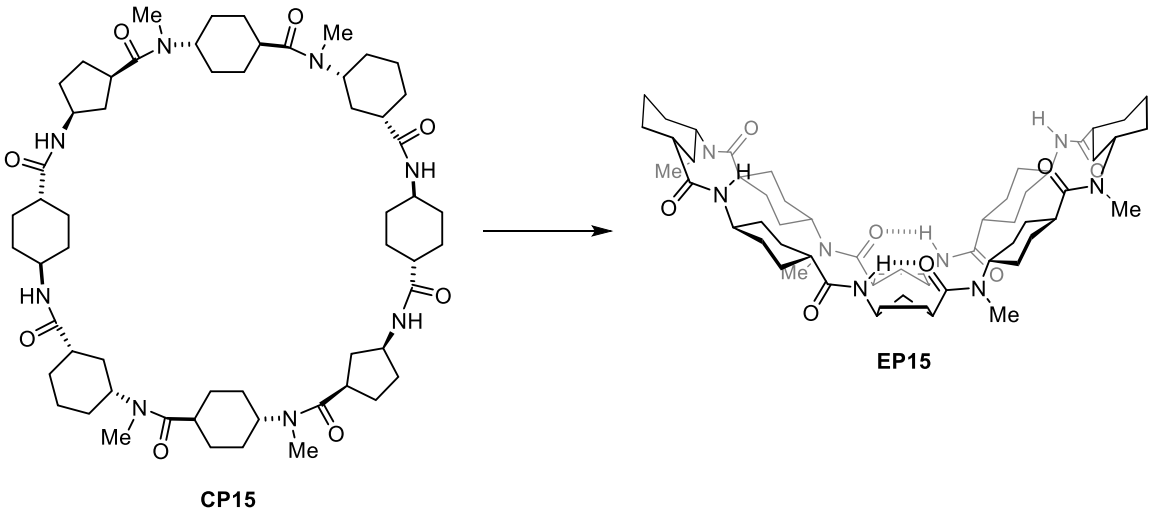
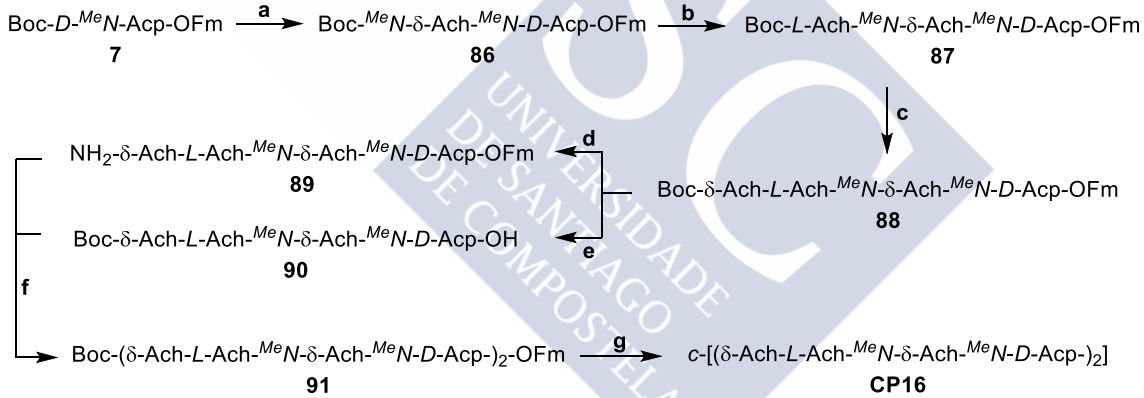


Figura 130: Estructura del ciclopéptido **CP15** y estructura plegada (**EP15**) propuesta en disolución.

Debido al contratiempo derivado del uso de *L*-γ-Acp no metilado, decidimos comenzar la síntesis del péptido equivalente en el que los γ-Acas no metilados fuesen los *D*-γ-Ach, los cuales no tienen tendencia a dar enlaces de hidrógeno intramoleculares como los observados para el γ-Acp.



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**), DCM, 82%; **b)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Ach-OH (**19**), DCM, 86%; **c)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-δ-Ach-OH (**44**), DCM, 83%; **d)** TFA/DCM (1:1); **e)** Piperidina/DCM (2:8); **f)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 68%; **g)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/DCM (1:1); 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM.

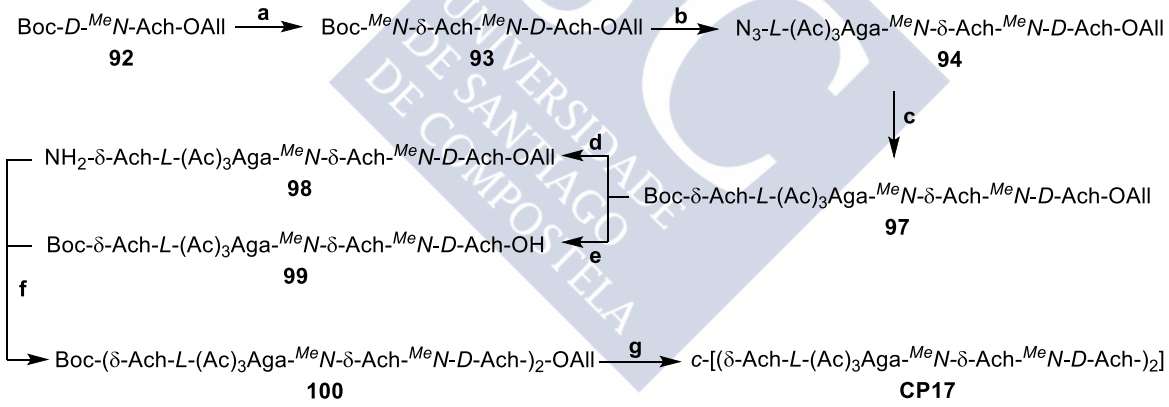
Figura 131: Esquema sintético empleado para la obtención de **CP16**.

La síntesis de **CP16** se llevó a cabo de la misma forma que el **CP15**, obteniéndose rendimientos muy similares (Figura 131). Sin embargo, los problemas de solubilidad aparecieron durante la formación del octapéptido lineal. Para llevar a cabo el acoplamiento entre los intermedios **89** y **90** (el tetrapéptido desprotegido en su extremo *C*-terminal resultó ser insoluble en CH_2Cl_2) fue necesaria la adición de un elevado porcentaje de DMF (50%) sobre CH_2Cl_2. De todas formas, se consiguió el octapéptido lineal **91** con un 68% de rendimiento. Sin embargo, en la etapa de ciclación no pudimos obtener el ciclopéptido **CP16**, debido a un aumento considerable en la insolubilidad del

péptido lineal, y aunque sí se pudo observar la masa del ciclopéptido en el crudo de reacción, no fue posible purificarlo por ninguna de las diversas técnicas probadas.

En vista del poco éxito cosechado por nuestros primeros diseños de γ,δ-ciclopéptidos, decidimos emplear un tipo de γ-aminoácido distinto, que pudiera aportar una mayor solubilidad al sistema y que además nos permitiera realizar un mejor seguimiento durante la síntesis del ciclopéptido. Debido a la experiencia reciente con γ-Acas, nos decidimos por el *L*-γ-Aga empleado para la síntesis de **CP8**. De esta forma, nos propusimos la síntesis del péptido *c*-[(δ-Ach-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$], **CP17** (

Figura 132), cuyo cambio con respecto a **CP15** fue el intercambio del *L*-γ-Acp por el *L*-γ-(Ac)$_3$Aga. Ya se mostró en el capítulo anterior para la síntesis de **CP8** que la protección del extremo *C*-terminal en forma de éster de fluorenilmetanol no era compatible con los grupos acetilos protectores de los hidroxilos del *L*-γ-(Ac)$_3$Aga, por lo que se decidió cambiar los grupos protectores del extremo *C*-terminal. Por lo tanto, se decidió emplear el éster alílico como protector del extremo ácido. También nos planteamos una síntesis lineal hasta la etapa clave de formación del tetrapéptido **97** a través de un acoplamiento de Staudinger, a partir del cual se formó el precursor lineal **100** que finalmente se cicló para la obtención de **CP17**.



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**), DCM, 98%; **b)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, N$_3$-*L*-(Ac)$_3$Aga-OH (**34**), DCM, 97%; **c)** Boc-δ-Ach-OPh(PPh$_2$) (**96**), DMF, 65 ºC, 66%; **d)** TFA/DCM (1:1); **e)** Pd(PPh$_3$)$_4$, Morfolina, THF; **f)** *N*-HATU, DIEA, DCM/DMF (1:1), 45%; **g)** 1. Pd(PPh$_3$)$_4$, Morfolina, THF 2.TFA/DCM (1:1); 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM/DMF (1:1), 53%.

Figura 132: Ruta sintética seguida para la obtención de **CP17**.

El primer paso de la síntesis consistió en la obtención de los aminoácidos de partida, siendo el único no sintetizado hasta este momento el Boc-*D*-^{Me}*N*-Ach-OAll (**92**) (Figura 133). Este aminoácido se obtuvo fácilmente mediante la esterificación de **20** con alcohol alílico empleando DCC y DMAP en CH_2Cl_2, con un rendimiento del 70%.

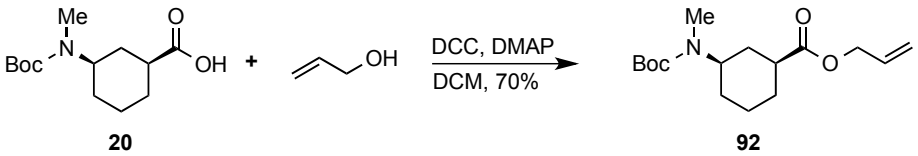


Figura 133: Síntesis de Boc-*D*-^{Me}*N*-Ach-OAll (**92**) mediante la esterificación de **20** con el alcohol alílico.

En la

Figura 132 se ilustra la secuencia sintética seguida para la preparación del mencionado ciclopéptido. Al igual que en los casos anteriores, las primeras etapas se centraron en obtener el tripéptido **94** siguiendo los mismos procedimientos descritos para los anteriores ciclopéptidos.

La principal diferencia consistió en la incorporación del cuarto residuo para obtener el tetrapéptido Boc-δ-Ach-*L*-(Ac)$_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OAll (**97**), para lo cual se recurrió a un acoplamiento tipo Staudinger entre el grupo acida de **94** y el ácido carboxílico de Boc-δ-Ach-OH (**44**). Sin embargo, la baja reproducibilidad de las condiciones empleadas anteriormente para la obtención de **CP8** nos llevó a buscar una alternativa sintética. En la bibliografía existen varias alternativas que emplean la formación de tioésteres para activar el grupo ácido que será atacado por el iminofosforano resultante de la reducción de la acida con una fosfina.[177] Finalmente, nos decantamos por la alternativa publicada por el grupo de Bernardi en 2006, en la que se preactivan los ácidos carboxílicos mediante su esterificación con la (2-hidroxifenil)-difenilfosfina (**95**).[178]

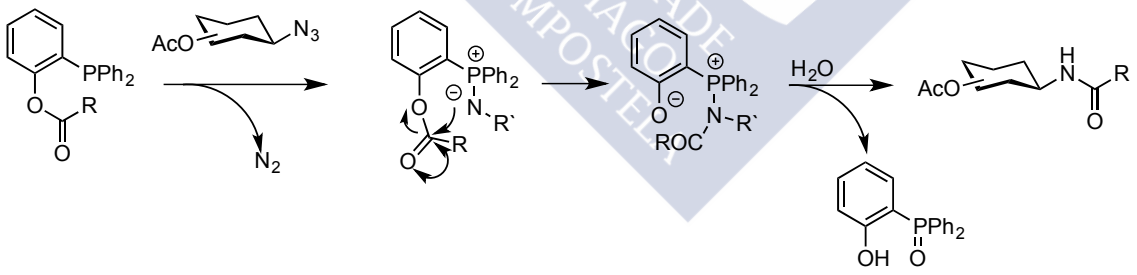
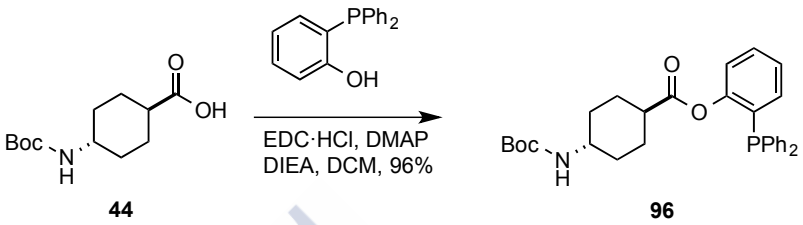


Figura 134: Mecanismo propuesto por Bernardi para la reacción de Acoplamiento de Staudinger mediante la preactivación del ácido carboxílico con *O*-difenilfosfinofenol.[178]

Las ventajas de esta alternativa radican en que la fosfina que reduce al grupo acida se encuentra acoplada al ácido carboxílico, de tal forma que el iminofosforano se encuentra preorganizado para favorecer el ataque nucleófilo (Figura 134). Posteriormente se hidroliza este intermedio mediante la adición de H_2O, dando lugar al

[177] a) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9-12. b) Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820-8828.
[178] Bianchi, A.; Bernardi, A. *J. Org. Chem*. **2006**, *71*, 4565-4577.

óxido de la fosfina y al producto de acoplamiento. Otra ventaja de esta alternativa es que la reacción no necesita transcurrir a baja temperatura, sino que requiere un leve calentamiento (en torno a 65 °C) para que tenga lugar. Por lo tanto, se procedió a la esterificación del Boc-δ-Ach-OH con la (2-hidroxifenil)-difenilfosfina, empleando EDC·HCl, DMAP y DIEA en CH_2Cl_2, obteniéndose el derivado **96** con un rendimiento del 96% (Figura 135).

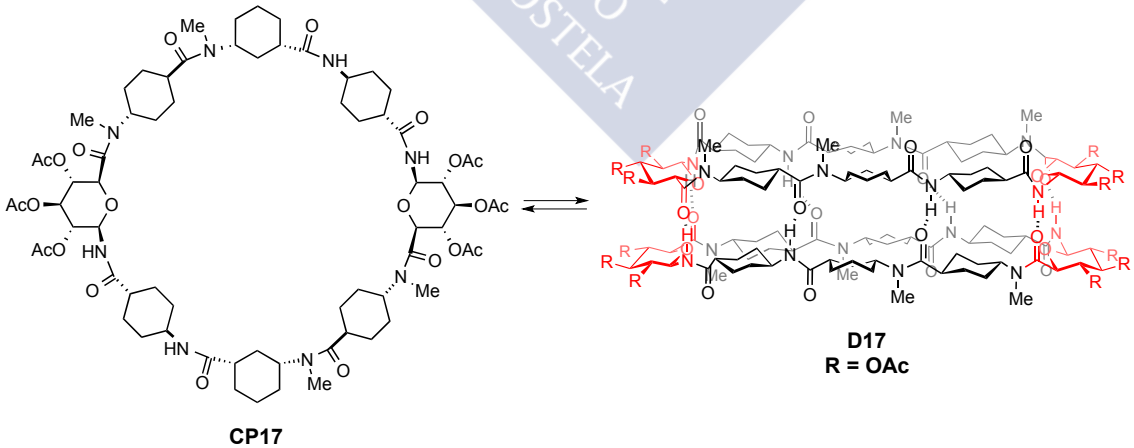


44 **96**

Figura 135: Reacción de esterificación del Boc-δ-Ach-OH (**44**) con la (2-hidroxifenil)-difenilfosfina.

Una vez obtenido el Boc-δ-Ach-OPh(PPh_2) (**96**) se procedió a la síntesis del tetrapéptido **97** mediante al acoplamiento de Staudinger. Para ello se disolvieron los compuestos **96** y **94** en DMF y se calentó hasta 65 **°C** durante cinco horas (

Figura 132). Pasado ese tiempo no se detectó la presencia del tripéptido de partida en el medio, por lo que se añadió H_2O para hidrolizar el intermedio de la reacción. De esta forma, y una vez purificado mediante cromatografía en gel de sílice, se obtuvo el tetrapéptido Boc-δ-Ach-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OAll (**97**) con un rendimiento del 66%.



CP17

Figura 136: Representación de la estructura de **CP17** y de su posible dímero (**D17**).

La síntesis de **CP17** continuó con la formación del octapéptido lineal **100**. Para ello, se desprotegió el extremo *C*-terminal de una fracción del péptido **97** mediante el tratamiento con la mezcla de $Pd(PPh_3)_4$ y morfolina en THF, condiciones en las cuales se

obtuvo el péptido **99**. Por otra parte, se desprotegió el extremo *N*-terminal de otra fracción del péptido **97** tratándola con una mezcla de TFA en CH_2Cl_2 (50%). Ambos péptidos, **98** y **99**, se acoplaron empleando *N*-HBTU y DIEA, dando lugar al octapéptido lineal **100** con un rendimiento moderado del 45%. Por último, se procedió a la ciclación del octapéptido lineal, desprotegiendo ambos extremos en las condiciones ya descritas. El tratamiento de la muestra resultante con *N*-TBTU en presencia de DIEA dio lugar, tras la correspondiente purificación mediante HPLC, al ciclopéptido *c*-[(δ-Ach-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$], **CP17**, con un rendimiento del 53%.

El ciclopéptido **CP17** resulto ser sólo parcialmente soluble en cloroformo, por lo que el espectro obtenido en este disolvente resultó ser complejo además de tener una pobre resolución. Por esta razón decidimos probar diversas mezclas de disolventes, comenzando por la adición de un porcentaje de DMSO (20%) sobre $CDCl_3$. De esta forma se obtuvieron espectros de ^{1}H-RMN bien definidos que mostraron las señales correspondientes con los protones amídicos a 8.06 ppm (*J* = 9.7 Hz) para el NH de *L*-$(Ac)_3$Aga y 6.98 ppm (*J* = 8.5 Hz) para el NH de δ-Ach, aunque también aparecieron pequeños dobletes próximos a éstos, lo que indicaría la presencia de otras formas minoritarias. Otras señales características eran los protones del esqueleto del *L*-$(Ac)_3$Aga, que aparecen como un conjunto de tres tripletes solapados entre 5.42 y 5.15 ppm (Hδ, Hε y Hϕ), y otro triplete a 4.92 ppm (Hγ), el protón Hδ del ^{Me}*N*-δ-Ach a 4.41 ppm o el protón Hα del *L*-$(Ac)_3$Aga que aparece como un doblete a 4.30 ppm, y que apareció solapado con el protón Hδ del δ-Ach a 4.25 ppm (Figura 137).

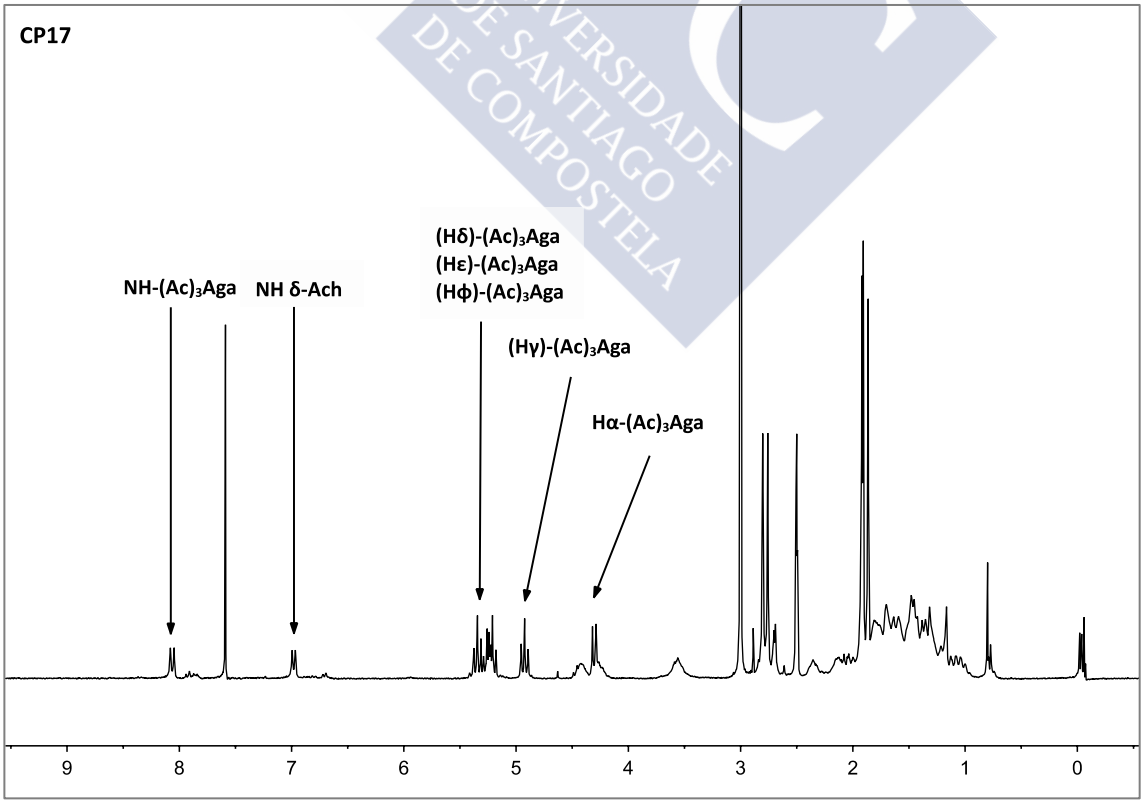


Figura 137: Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$/$DMSO_{d6}$, 8:2) de **CP17** donde se indican las señales más características.

Podríamos pensar que los desplazamientos y constantes de acoplamiento de los protones amídicos parecen indicar que el péptido adopta una conformación plana en disolución y que está participando en un proceso de autoensamblaje. Sin embargo, el desplazamiento químico de dichos protones también puede deberse al uso de DMSO (20%) como disolvente, ya que se establecen enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y las moléculas de DMSO. Pudimos ratificar este hecho cuando se realizó el espectro de ^{1}H-RMN con una proporción menor de $DMSO_{d6}$ (10%), o empleando $MeOH_{d3}$ (10%) como codisolvente (Figura 138).

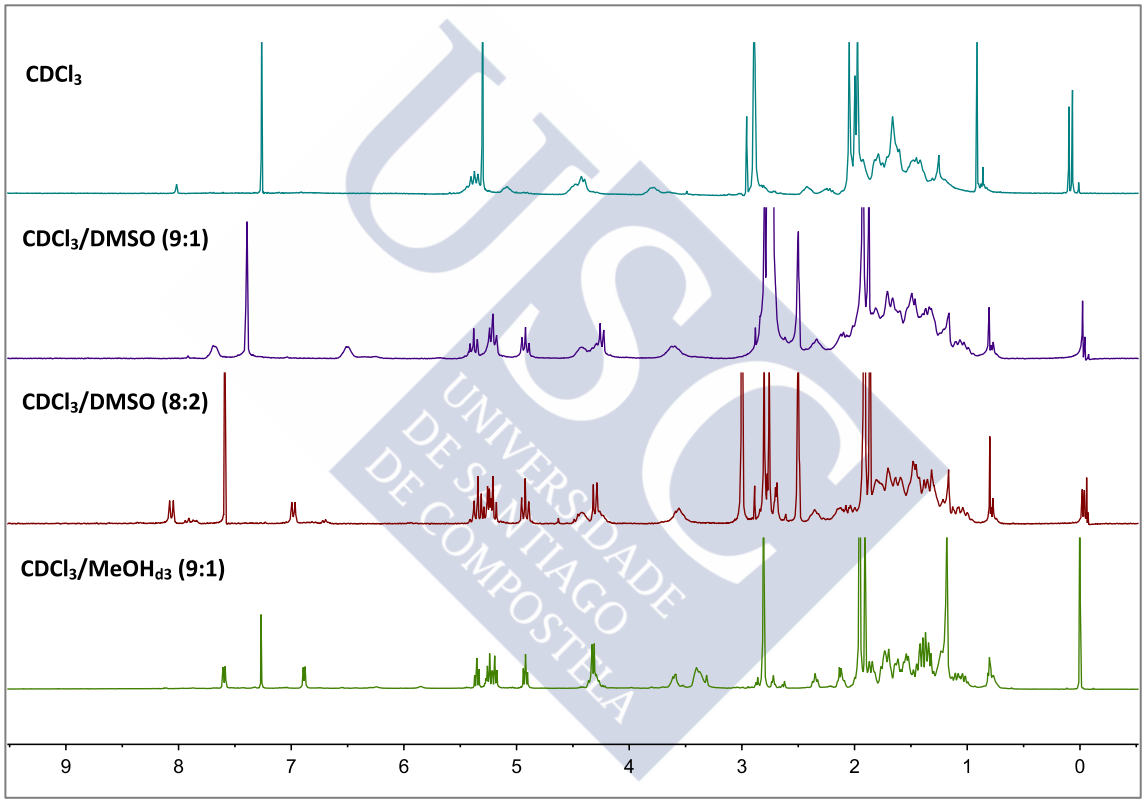


Figura 138: Espectros de ^{1}H-RMN de **CP17** en diferentes mezclas de disolventes deuterados.

Para intentar esclarecer el comportamiento de **CP17** en disolución decidimos repetir los experimentos de espectroscopía de RMN a concentraciones variables para comprobar si el desplazamiento de los protones amídicos era dependiente de la concentración. Para ello, decidimos emplear el mínimo porcentaje de DMSO (5% en $CDCl_3$) en el que el péptido era soluble para minimizar su efecto sobre el desplazamiento de los grupos NH. Los espectros se realizaron a concentraciones comprendidas entre 1.34 y 5.36 mM (Figura 139), pudiéndose observar que el desplazamiento los protones amídicos es dependiente de la concentración, aunque dichos desplazamientos, entre 7.25 y 7.32 ppm para el NH de *L*-$(Ac)_3$Aga y 6.04 y 6.19 ppm para el NH de δ-Ach no parecen aclarar

el comportamiento de este péptido en disolución, ya que estas pequeñas diferencias se podrían deber a otros factores, como por ejemplo pequeñas variaciones en la relación DMSO/$CHCl_3$ o de agua en el DMSO.

A la vista de estos resultados decidimos repetir los experimentos a distintas concentraciones empleando una mezcla $CDCl_3$/$MeOH_{d3}$ (9:1). En dicha mezcla se consiguieron espectros con un buen nivel de resolución, apareciendo las señales de los protones amídicos como dos dobletes a unos desplazamientos químicos de 7.54 ppm (*J* = 9,6 Hz) para el NH de *L*-$(Ac)_3$Aga y de 6.84 ppm (*J* = 8.5 Hz) para el NH de δ-Ach a una concentración de 7.17 mM en dicha mezcla.

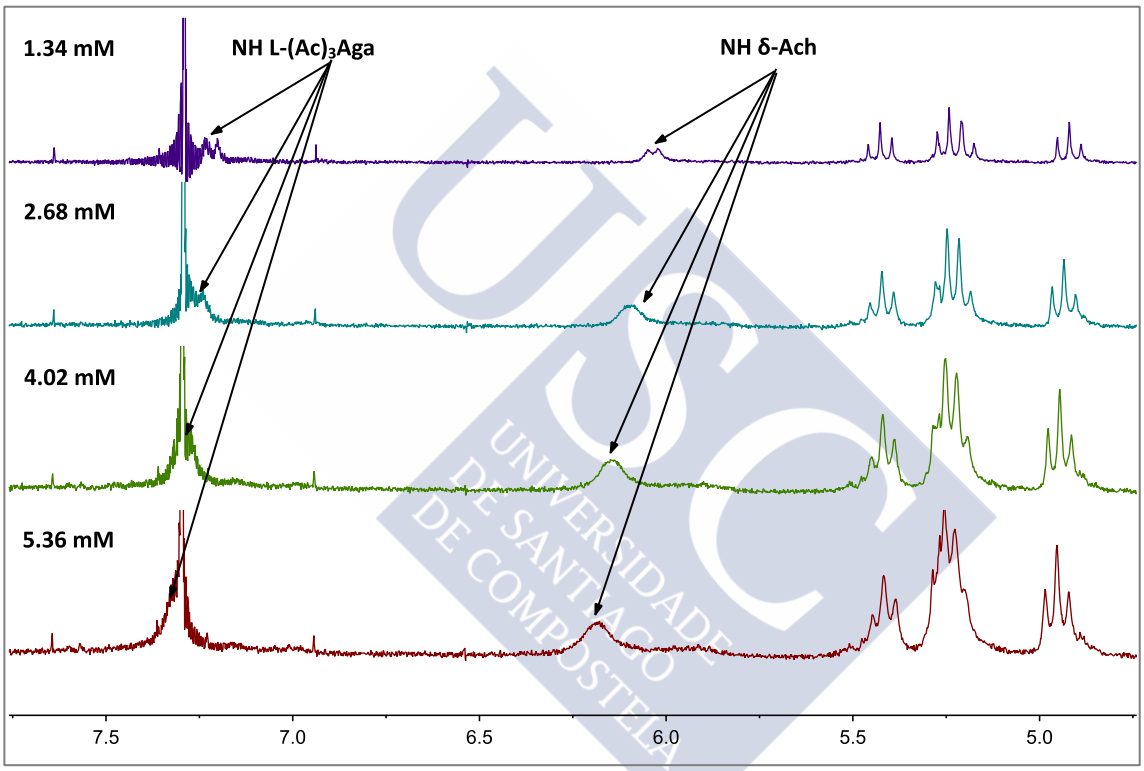


Figura 139: Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN (7.75 a 4.75 ppm) de **CP17** en $CDCl_3$/DMSO (95:5) a diferentes concentraciones. Además del desplazamiento de los protones amídicos señalados, también se puede observar la perdida de resolución con el aumento de la concentración debido a la baja solubilidad del péptido en estas condiciones.

De nuevo podríamos pensar que las señales aparecen a campo bajo debido a la formación del dímero **D17**, aunque este desplazamiento también puede ser debido a interacciones con el metanol. Cuando se realizaron espectros de ^{1}H-RMN (Figura 140) a menores concentraciones (hasta 1.19 mM) la diferencia en los desplazamientos de estas señales fue prácticamente inapreciable (0.01 ppm para cada señal). Por último, se realizó el experimento nOe irradiando selectivamente las señales de los protones amídicos sin encontrarse ningún pico de cruce que pudiese confirmar la presencia de la forma dimérica en esta mezcla de disolventes.

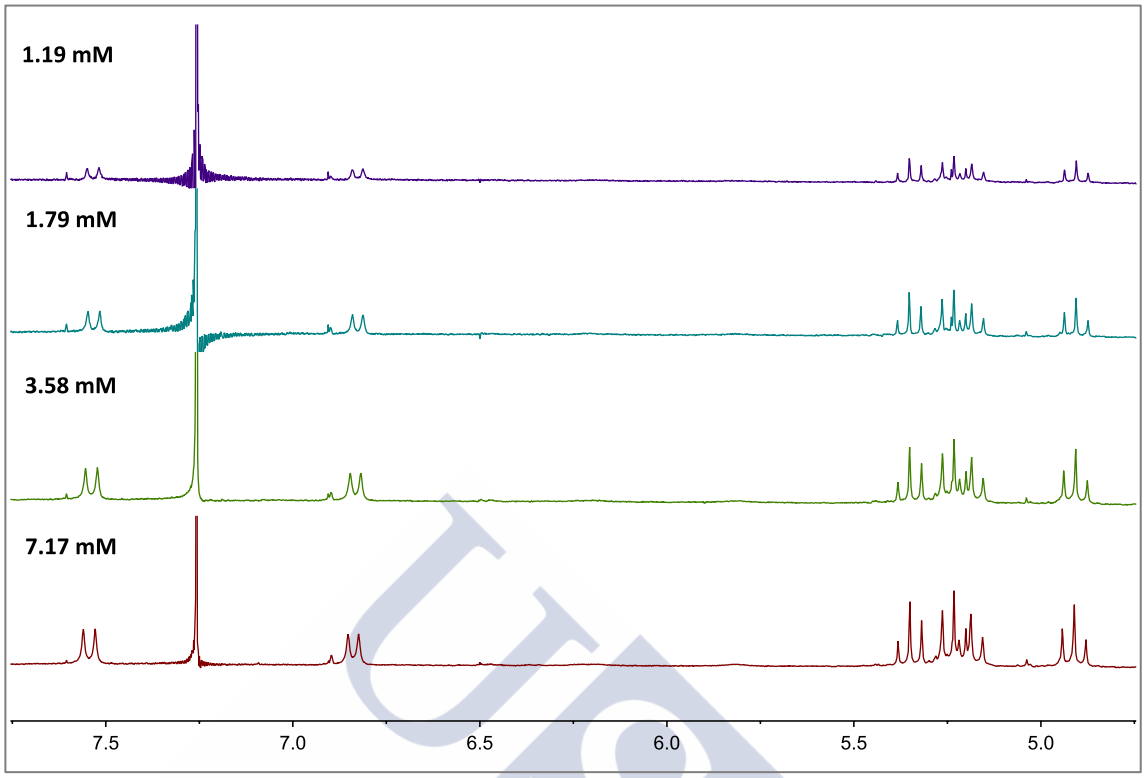


Figura 140: Ampliación de los espectros de ^{1}H-RMN (7.75 a 4.75 ppm) de **CP17** en $CDCl_3$/$MeOH_{d3}$ (95:5) a diferentes concentraciones. Se puede observar que el desplazamiento de los protones amídicos (7.54 y 6.84 ppm) es prácticamente despreciable.

En base a los resultados obtenidos concluimos que, aunque el compuesto **CP17** posiblemente adopta la conformación aparentemente plana en disolución, este no es capaz de autoensamblarse para dar lugar al dímero deseado en las condiciones estudiadas. En primer lugar, la parcial insolubilidad de **CP17** en disolventes halogenados de uso común como CH_2Cl_2 o $CHCl_3$ nos obligó a emplear mezclas de disolventes de mayor polaridad, para lo que se emplearon disolventes que compiten con la formación de los enlaces de hidrógeno intermoleculares, como el DMSO o MeOH. En segundo lugar, la única forma de autoensamblaje posible para **CP17** debido a la geometría de su diseño es un apilamiento antiparalelo en el que los *L*-$(Ac)_3$Aga se encuentran enfrentados (Figura 136). En este dímero, los pares electrónicos no enlazantes del átomo de oxígeno del hemiaminal se encuentran muy próximos, lo que podría generar repulsiones electrónicas que impedirían la formación de los dímeros. Por último, el diseño de los γ,δ-octapéptidos cíclicos procede de la intercalación de unidades de δ-Ach en un γ-tetrapéptido cíclico, y como se vio en los estudios del grupo de Deng,[69] éstos se apilan mediante la formación de una lámina β paralela, probablemente debido a

[69] Li, L.; Zhan, H.; Duan, P.; Liao, J.; Quan, J.; Hu, Y.; Chen, Z.; Zhu, J.; Liu, M.; Wu, Y-D.; Deng, J. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 3051-3056.

restricciones conformacionales similares a las que ocurrían en el sistema heterodimérico **CP10**·**CP13**.

Sistemas homodiméricos de α,γ,δ-ciclopéptidos

Para finalizar el estudio de las propiedades de los sistemas ciclopeptídicos que incluyen δ-aminoácidos en su estructura, decidimos sintetizar y estudiar el comportamiento en disolución de sistemas que alternasen α-, γ- y δ-aminoácidos. Para su diseño, partimos del sistema α,γ-ciclopeptídico de menor tamaño sintetizado, un α,γ-tetrapéptido cíclico. En el año 2005, nuestro grupo de investigación publicó la síntesis y el estudio de los tetrapéptidos cíclicos *c*-[(*L*-^{Me}*N*-Ala-*D*-Ach-)$_2$], *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach-)$_2$] y *c*-[(*L*-Leu-*D*-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] (Figura 141), encontrando que el segundo de los ciclopéptidos (donde el γ-Aca es Ach) daba lugar a la formación de dímeros en disolución con una constante de asociación ($CDCl_3$) de 15 M^{-1}, mientras que para el tercero (donde el γ-Aca es Acp) la constante ascendía a 47 M^{-1}. Para el derivado donde el bloqueo se producía en los α-aminoácidos (Figura 141, a) no se hallaron pruebas de la formación de dímeros.

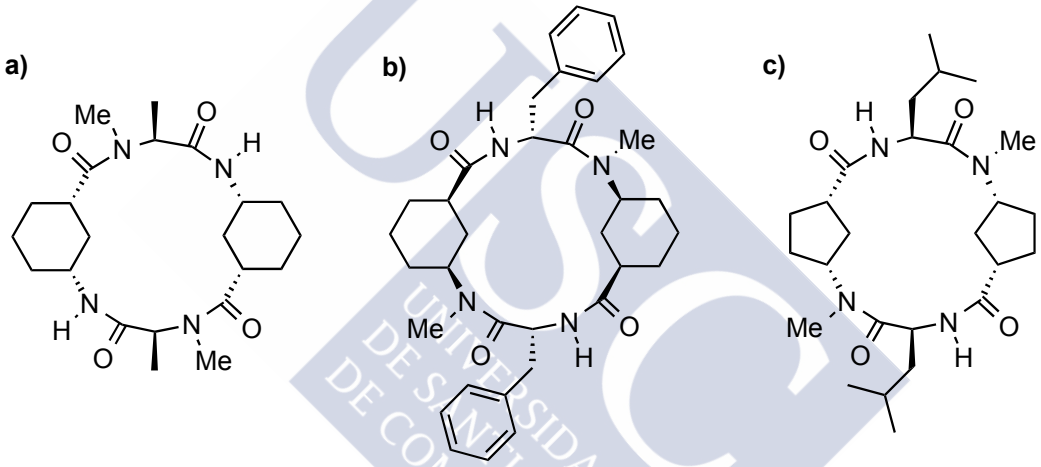


Figura 141: Estructuras de los ciclopéptidos *c*-[(*L*-^{Me}*N*-Ala-*D*-Ach-)$_2$] (a), *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach-)$_2$] (b) y *c*-[(*L*-Leu-*D*-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] (c).

Partiendo de este trabajo diseñamos el primer α,γ,δ-ciclopéptido, el octapéptido cíclico *c*-[(δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-)$_2$], **CP18**. Para ello, partimos del diseño con una mayor constante de asociación, en el que alternaban *L*-α-aminoácidos y ^{Me}*N*-*D*-γ-Acp. El α-aminoácido seleccionado fue la *L*-Tyr, que se obtuvo comercialmente como la Boc-*L*-Tyr(Bn)-OH, en la que la cadena lateral está protegida en forma de éter bencílico, grupo protector estable frente a las condiciones de reacción a lo largo de la síntesis. Para la síntesis del péptido recurrimos, de nuevo, a la síntesis en disolución empleando los grupos protectores ortogonales Boc para el extremo *N*-terminal y Fm para el extremo *C*-terminal. De nuevo se propuso una síntesis lineal hasta la obtención del tetrapéptido, a partir del cual, debido a la simetría C_2 del ciclopéptido final, se obtendría el octapéptido lineal que se ciclaría en la última etapa de la síntesis. El bloqueo selectivo de una de las caras del ciclopéptido para evitar el autoensamblaje de más de dos unidades de ciclopéptido se realizó mediante la *N*-metilación de los grupos amino. Teniendo en cuenta el diseño del tetrapéptido cíclico de partida y las particularidades

derivadas de la geometría del δ-Ach, se bloquearon los *D*-γ-Acp y el δ-aminoácido posterior en la secuencia (Figura 142). Por último, es importante resaltar el hecho de que según el diseño del ciclopéptido, éste puede dar lugar a la formación de dos dímeros, que debido al ya mencionado eje de simetría C_2 serán equivalentes, por lo que hablaremos exclusivamente de un sólo dímero.

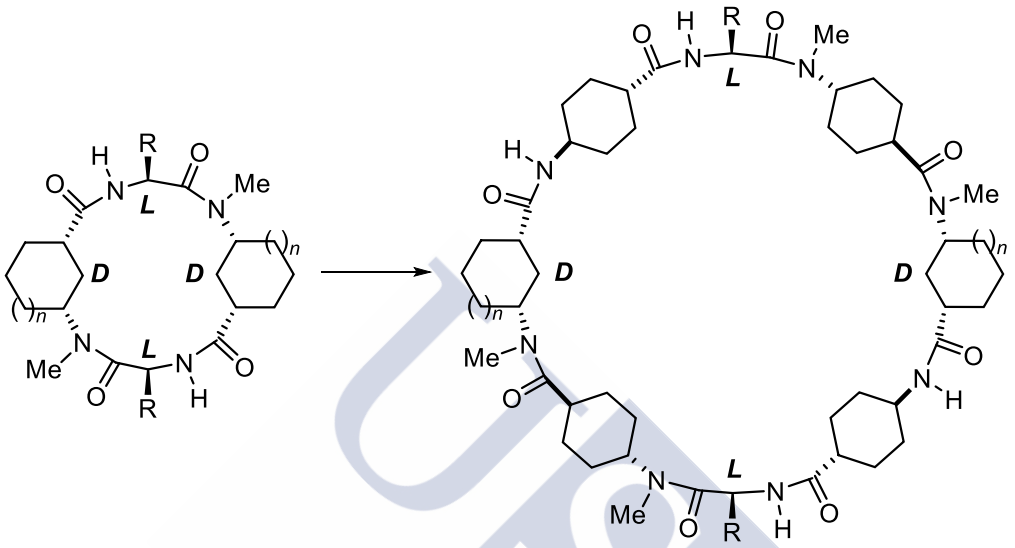
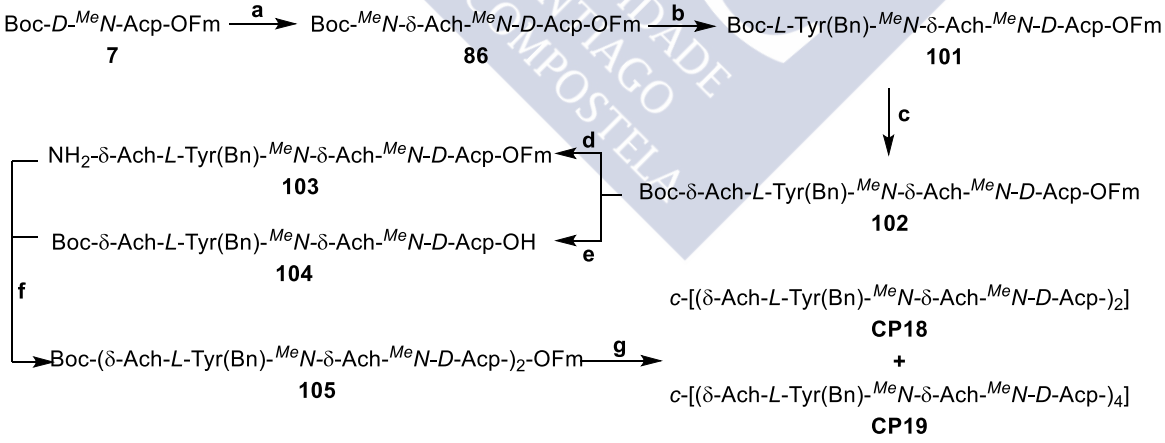


Figura 142: Representación esquemática del resultado de la intercalación de δ-Ach en un α,γ-ciclotetrapéptido para la obtención de **CP18**.



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**), DCM, 96%; **b)** 1.TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Tyr(Bn)-OH, DCM, 92%; **c)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-δ-Ach-OH (**44**), DCM, 97%; **d)** TFA/DCM (1:1); **e)** Piperidina/DCM (2:8); **f)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 67%; **g)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/DCM (1:1); 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM, 12% **CP18**, 12% **CP19**.

Figura 143: Esquema sintético seguido para la obtención de **CP18**.

La síntesis del ciclopéptido se llevó a cabo siguiendo la secuencia sintética ilustrada en la Figura 143. Así, los correspondientes aminoácidos de partida se transformaron en el

tetrapéptido **102**, utilizando las habituales reacciones de desprotección y acoplamiento ya descritas.

La síntesis de **CP18** continuó con la formación del octapéptido lineal **105**. Para ello, se desprotegió el extremo *C*-terminal de una fracción del tetrapéptido **102** mediante su tratamiento con una mezcla de 20% de piperidina en CH_2Cl_2, obteniéndose el intermedio **104**. Por otra parte, se desprotegió el extremo *N*-terminal de otra fracción de **102** tratándola con una mezcla del 50% de TFA en CH_2Cl_2, dando lugar al intermedio **103**. El acoplamiento de ambos intermedios se llevó a cabo usando *N*-HBTU como agente acoplante y DIEA como base en CH_2Cl_2, dando lugar al octapéptido lineal **105** con un rendimiento del 67%. En el último paso de la síntesis se procedió a la ciclación del octapéptido, previa desprotección de ambos extremos en las condiciones ya descritas. De forma sorpresiva, se obtuvieron dos productos de reacción, el ciclopéptido deseado *c*-[(δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-)$_2$], **CP18**, con un rendimiento del 12%, y el producto de acoplamiento de dos unidades del octapéptido lineal desprotegido y posterior ciclación, *c*-[(δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-*D*-γ-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-)$_4$], **CP19**, con un rendimiento del 12.4%. Este segundo ciclopéptido fue identificado fundamentalmente por la masa de su ion molecular de 2569.51 frente a 1284.76 observado para **CP18** y por las pequeñas diferencias en el desplazamiento de las señales del espectro de ^{1}H-RMN.

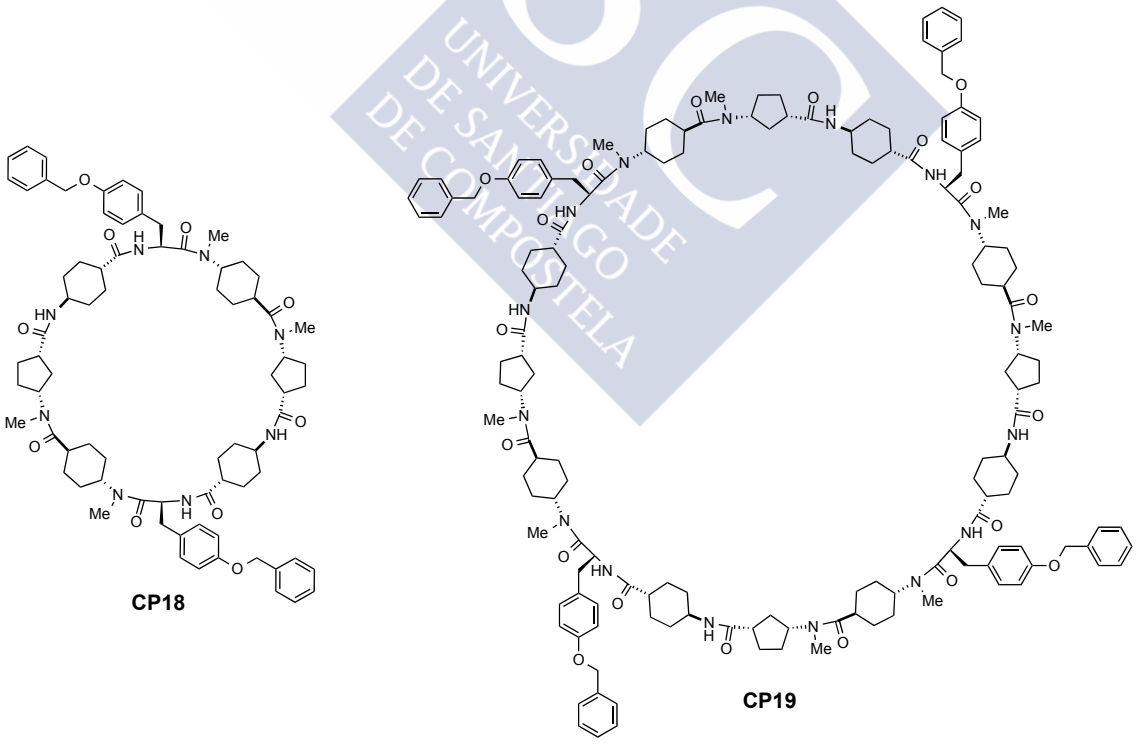


Figura 144: Estructuras de los ciclopéptidos **CP18** y **CP19** obtenidos en la ciclación del octapéptido lineal **105**.

Además de la obtención de **CP19**, también nos sorprendió que este fuese el producto mayoritario de la reacción. Pensamos que esto se debía a la rigidez que confieren los

δ-Ach. Es probable que el péptido desprotegido se encuentre mayoritariamente en una conformación extendida en disolución que dificultaría la ciclación del octapéptido, mientras que el producto de acoplamiento entre los péptidos desprotegidos estaría mejor preorganizado para ciclarse. Un resultado similar ya se había observado en el trabajo realizado anteriormente en nuestro grupo de investigación para la obtención de α,γ-tetrapéptidos cíclicos.[59] Cuando se realizó la ciclación del tetrapéptido lineal H-(*^{Me}N*-*L*-Acp-*D*-Phe-)$_2$-OH a una concentración de 3 mM el producto mayoritario era el octapéptido cíclico, mientras que la reducción de la concentración hasta 0.5 mM condujo a la formación del tetrámero *c*-[(*^{Me}N*-*L*-Acp-*D*-Phe-)$_2$].

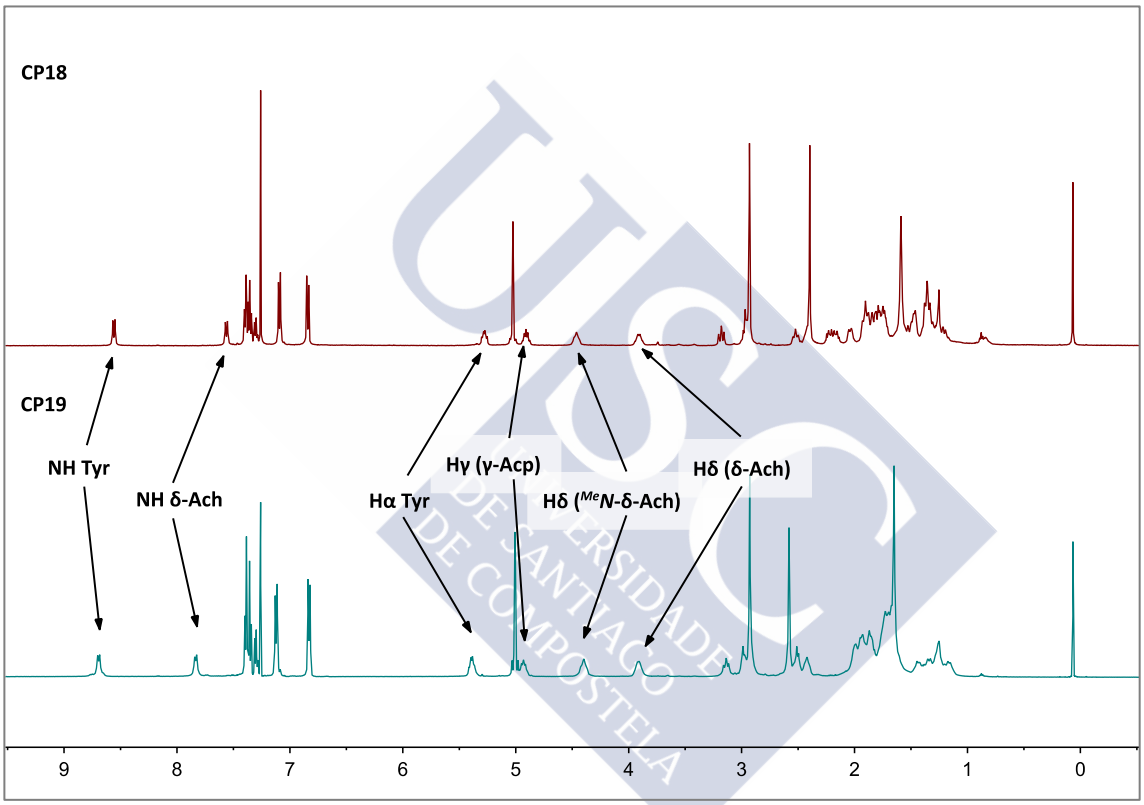


Figura 145: Espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de los ciclopéptidos **CP18** y **CP19**.

El análisis de los espectros de ^{1}H-RMN en $CDCl_3$ de ambos péptidos mostró señales bien definidas y simétricas. Las diferencias más notables entre ambos compuestos corresponden a los desplazamientos de los protones amídicos, apareciendo desplazados a campo más bajo los NH de **CP19**, como se ilustra en la Figura 145. Los NH de la *L*-Tyr resonaban a 8.56 ppm (d, *J* = 9.3 Hz) para **CP18** y a 8.69 ppm (d, *J* = 9.0 Hz) para **CP19**, mientras que los NH de δ-Ach aparecían a 7.56 ppm (d, *J* = 9.3 Hz) para **CP18** y a 7.83 ppm (d, *J* = 9.0 Hz) para **CP19**. En cuanto al resto de las señales más características, los protones Hα de la *L*-Tyr resonaban a 5.28 ppm (td, *J* = 9.9 y 5.0 Hz) para **CP18** y a 5.39 ppm (td, *J* = 9.2 y 5.7 Hz) para **CP19**, mientras que los protones Hγ de *^{Me}N*-*D*-γ-Acp eran

[59] Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett*. **2005**, *7*, 4681-4684.

multipletes que aparecían a 4.91 ppm para **CP18** y a 4.93 ppm para **CP19**. Las señales de los protones Hδ de ^{Me}*N*-δ-Ach, tenían un desplazamiento químico de 4.46 ppm para **CP18** y de 4.40 ppm para **CP19**.

Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de los protones amídicos de **CP18** y **CP19**, unidos a la alta simetría de los espectros, parecen indicar que ambos ciclopéptidos adoptaban una conformación plana en disolución y que se autoensamblan formando dímeros. Además, los desplazamientos químicos de estas señales para ambos péptidos resultaron no ser dependientes de la concentración, lo que indica una K_a superior a 10^5 M^{-1}. Por último, los estudios de RMN bidimensional confirmaron la formación de los dímeros **D18** y **D19** al aparecer señales de nOe que sólo son justificables en los dímeros correspondientes. En el caso de **CP18** (Figura 146), en el experimento NOESY aparecieron claras señales de cruce entre los protones NH de *L*-Tyr (8.56 ppm) y Hδ de ^{Me}*N*-δ-Ach (4.46 ppm), entre los NH de δ-Ach (7.56 ppm) y Hγ de *D*-γ-Acp (4.91 ppm), y por último entre los protones Hδ de ^{Me}*N*-δ-Ach (4.46 ppm) y Hα de δ-Ach (2.52 ppm).

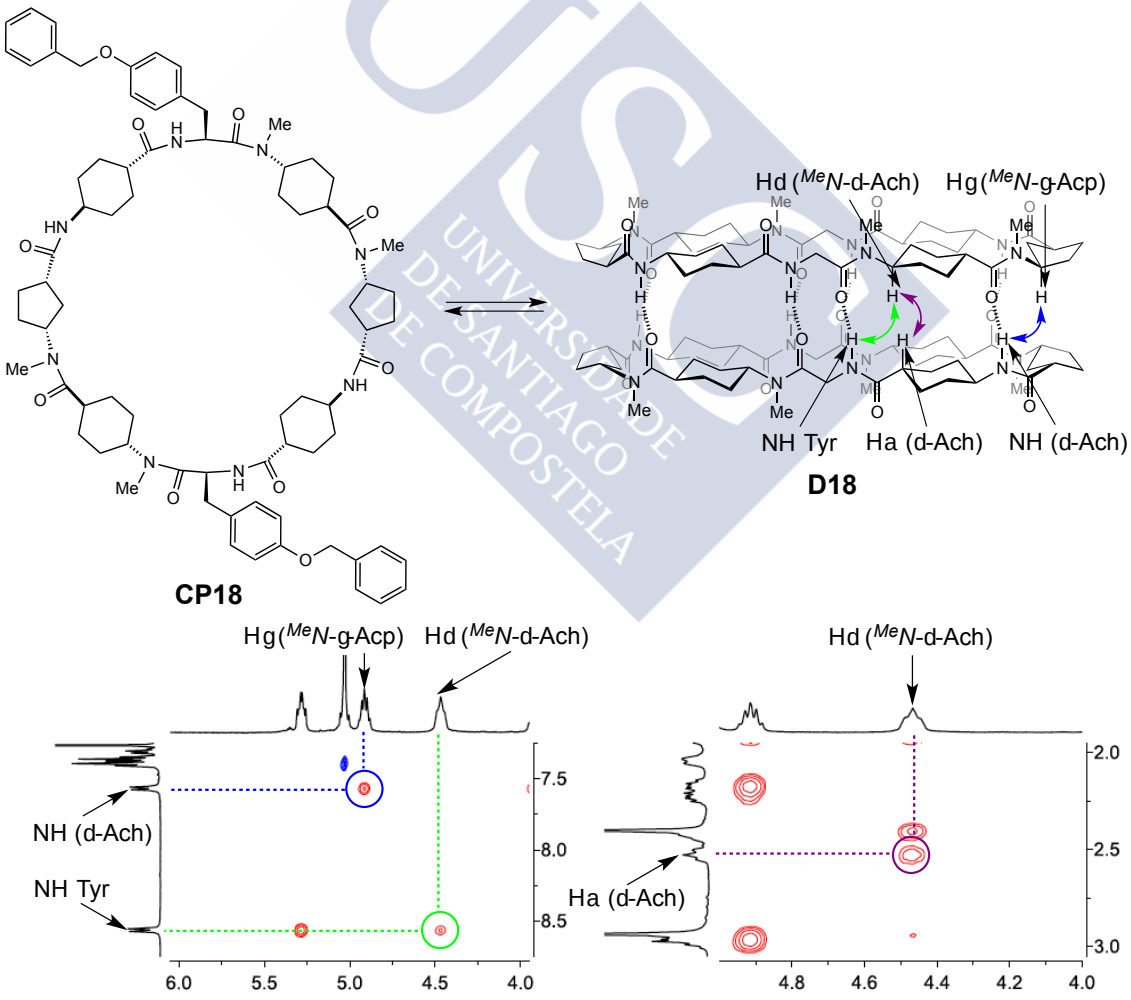


Figura 146: Representación del equilibrio entre **CP18** y su dímero **D18**, donde se señalan los protones que dieron lugar a picos de cruce nOe. En el dímero se han omitido las cadenas laterales para mayor claridad.

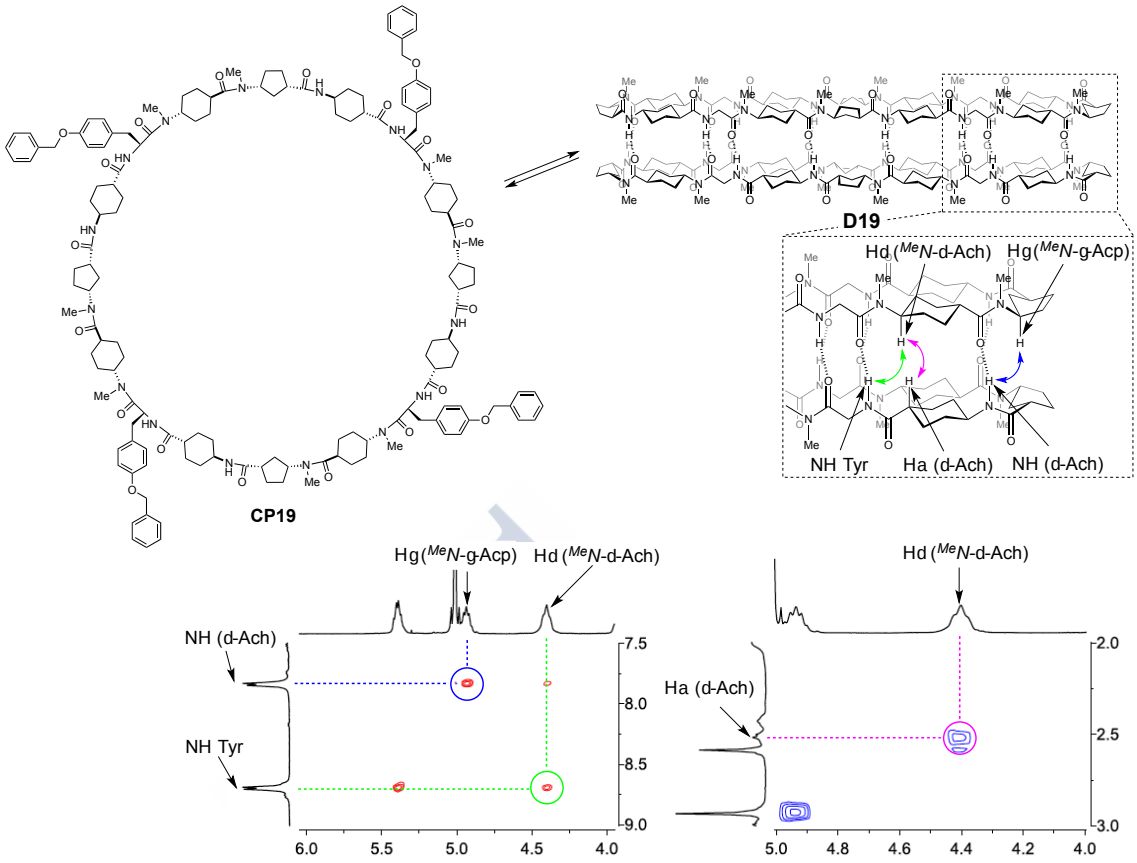


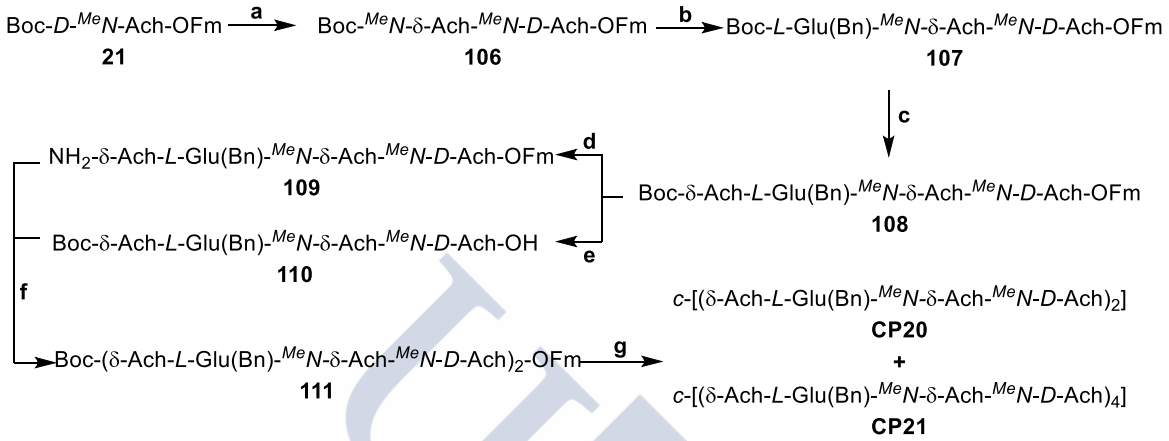
Figura 147: Representación del equilibrio entre **CP19** y su dímero **D19,** donde se señalan los protones que dieron lugar a picos de cruce nOe (recuadro). En el dímero se han omitido las cadenas laterales para mayor claridad.

Por otra parte, el experimento de RMN bidimensional NOESY para **CP19** (Figura 147) mostró los mismos picos de cruce nOe que confirmaron la formación de dímeros, entre el NH de *L*-Tyr (8.69 ppm) y Hδ de ^{Me}*N*-δ-Ach (4.40 ppm), entre el NH de δ-Ach (7.83 ppm) y Hγ de *D*-γ-Acp (4.93 ppm), y por último entre el protón Hα de δ-Ach (2.51 ppm) y el protón Hδ de ^{Me}*N*-δ-Ach (4.40 ppm).

A partir de estos resultados, llegamos a la conclusión de que los péptidos **CP18** y **CP19** se autoensamblan en disolución para dar lugar a la formación de los dímeros **D18** y **D19** con elevadas constantes de asociación (del orden de 10^5 M^{-1}). El ciclopéptido **CP19** es el mayor ciclopéptido sintetizado hasta la fecha que posee capacidad de autoensamblaje, siendo un ciclo formado por 80 átomos.

Para verificar la tendencia de los α,γ,δ-ciclopéptidos para formar dímeros, decidimos sintetizar un nuevo α,γ,δ-ciclopéptido empleando otro α-aminoácido, y que además permitiese la modificación de sus propiedades a través de la funcionalización de la cadena lateral del mismo. Para tal fin, decidimos utilizar el *L*-Glu(Bn), cuya desprotección se llevaría a cabo a través de una reacción de hidrogenólisis empleando Pd/C como catalizador. También decidimos sustituir el γ-Acp por el γ-Ach para corroborar que el

autoensamblaje no estaba restringido a un tipo de γ-aminoácido. La síntesis del ciclopéptido *c*-[(δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-*D*-γ-Ach-^{Me}*N*-δ-Ach-)$_2$] (**CP20**) se llevó a cabo de la misma forma que para **CP18**, obteniéndose rendimientos análogos y dos productos en la etapa de ciclación, con la salvedad de que la relación entre los dos ciclopéptidos obtenidos fue muy diferente (Figura 148).



Condiciones: a) 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**), DCM, 96%; **b)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-*L*-Glu(Bn)-OH, DCM, 94%; **c)** 1. TFA/DCM (1:1); 2. *N*-HATU, DIEA, Boc-δ-Ach-OH (**44**), DCM, 97%; **d)** TFA/DCM (1:1); **e)** Piperidina/DCM (2:8); **f)** *N*-HBTU, DIEA, DCM, 95%; **g)** 1. Piperidina/DCM (2:8); 2. TFA/DCM (1:1); 3. *N*-TBTU, DIEA, DCM, 49% **CP20**, 15% **CP21**.

Figura 148: Esquema sintético empleado para la obtención de los péptidos **CP20** y **CP21**.

Como se comentó anteriormente, la ciclación del péptido **105** daba lugar a la mezcla de dos ciclopéptidos, el ciclooctapéptido **CP18**, y el ciclohexadecapéptido **CP19**, en una relación prácticamente 1:1. En el caso de la ciclación, en idénticas condiciones (1 mM) del péptido **111**, la relación ciclooctа/ciclohexadecapéptido (**CP20**/**CP21**) cambiaba a favor del octapéptido hasta una relación 10:3. Este cambio, muy probablemente se debió al γ-aminoácido empleado, ya que los ángulos diedro entre los C-N y C-C(O) para el γ-Ach son ligeramente inferiores (120°) que para el γ-Acp (138°), lo que favorece la formación de anillos de menor diámetro.

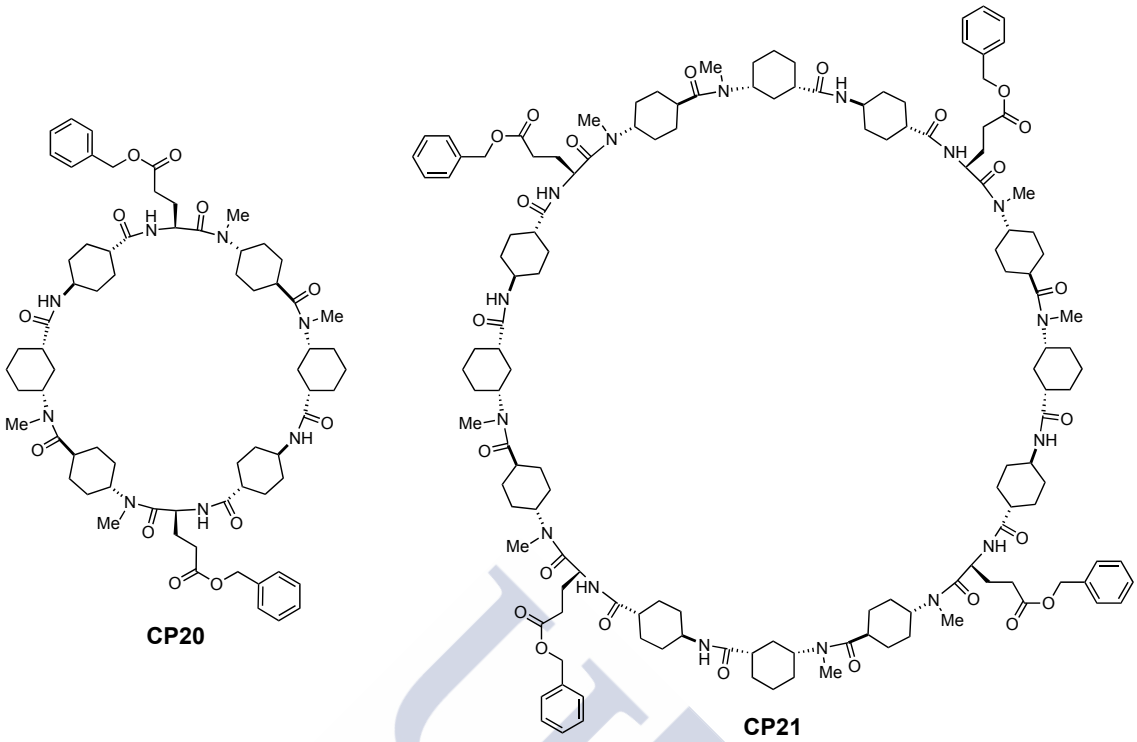


Figura 149: Estructuras de los ciclopéptidos **CP20** y **CP21** obtenidos en la ciclación del octapéptido lineal **111**.

El comportamiento de los ciclopéptidos **CP20** y **CP21** en disolución fue análogo al de los ciclopéptidos **CP18** y **CP19**, como se pudo extraer del análisis de los espectros de ^{1}H-RMN (Figura 150). De nuevo, los protones del hexadecapéptido cíclico **CP21** aparecían más desapantallados que los protones del octapéptido cíclico **CP20**. Las señales de los NH del *L*-Glu resonaban a 8.06 ppm (d, *J* = 9.0 Hz) para **CP20**, y a 8.30 ppm (d, *J* = 8.7 Hz) en el caso de **CP21**. De la misma forma, los NH de δ-Ach aparecieron a un desplazamiento químico de 7.39 ppm (d, *J* = 9.4 Hz) para **CP20** y 7.63 ppm (d, *J* = 9.2 Hz) para **CP21**. El resto de las señales características poseían similares desplazamientos químicos. Teniendo en cuenta estos desplazamientos químicos y sus constantes de acoplamiento, y la no dependencia de los desplazamientos de estas señales con respecto a la concentración de los péptidos, estimamos una constante de asociación (K_a) en $CDCl_3$ superior a 10^5 M^{-1}.

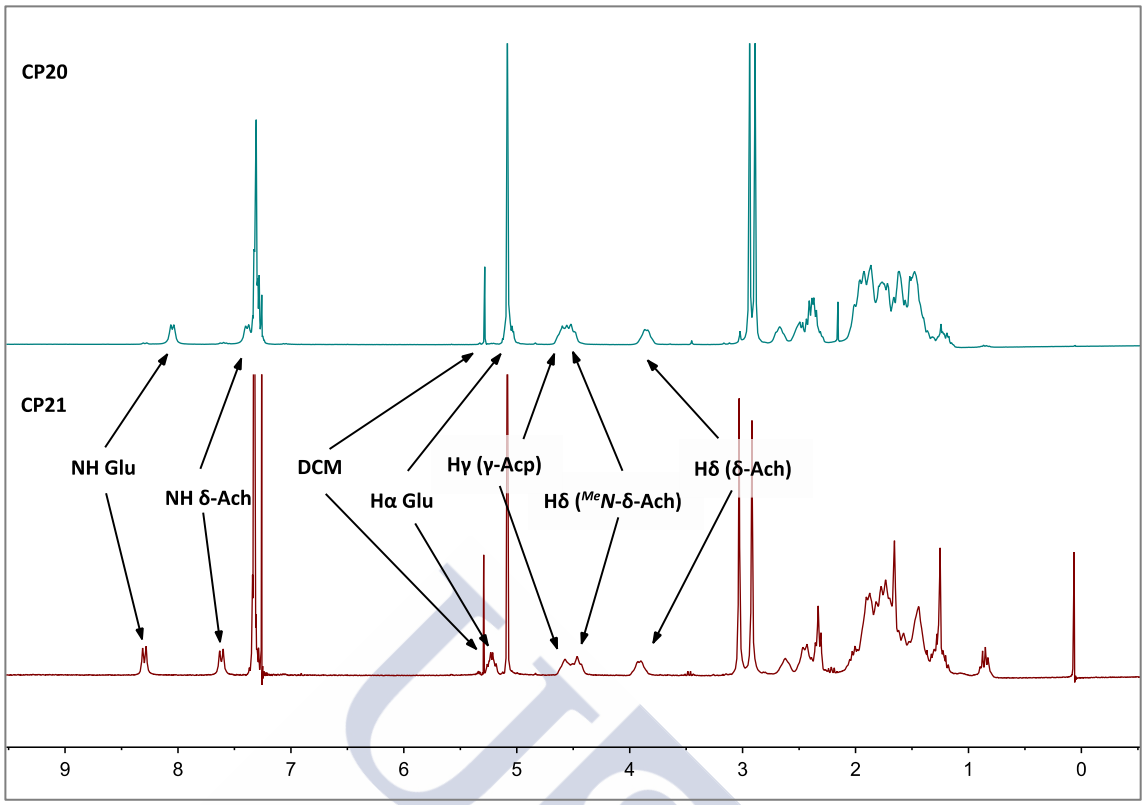
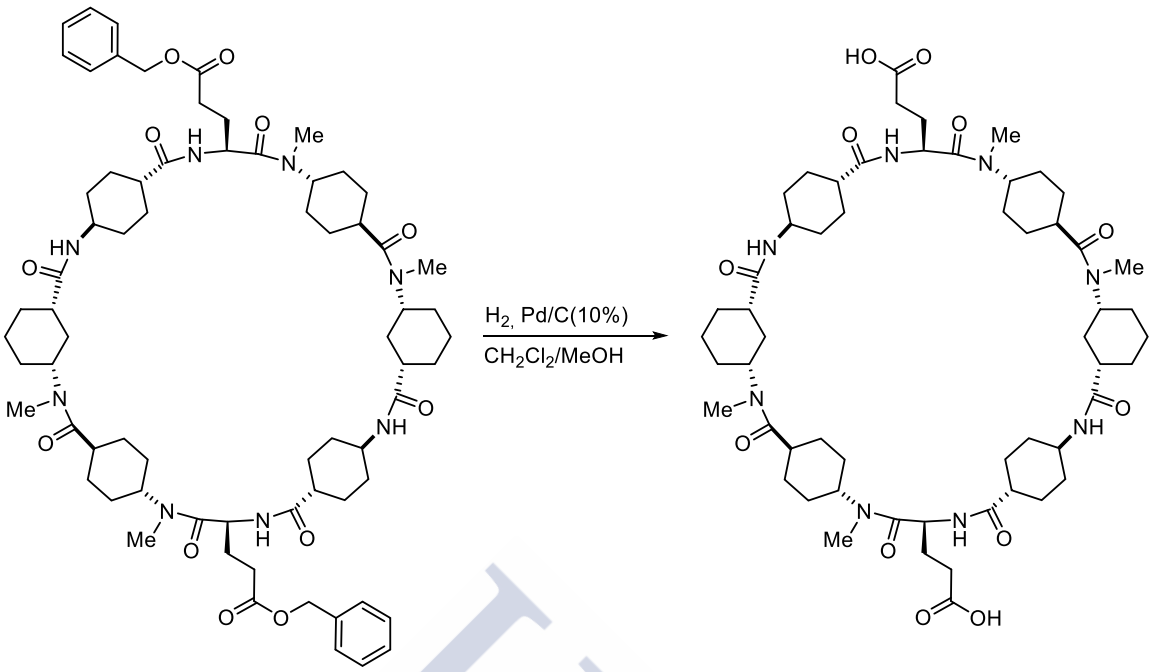


Figura 150: Espectros de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de los ciclopéptidos **CP20** y **CP21**.

Una vez obtenido el péptido **CP20** decidimos probar la desprotección de las cadenas laterales de *L*-Glu mediante el tratamiento con Pd/C (10%) bajo atmósfera de hidrógeno en una mezcla CH_2Cl_2/MeOH (1:1). La reacción se completó en dos horas, sin embargo apenas se pudo recuperar el producto de la reacción, **CP22**, debido a su limitada solubilidad en mezclas CH_2Cl_2/MeOH, MeOH o H_2O.



CP20 **CP22**

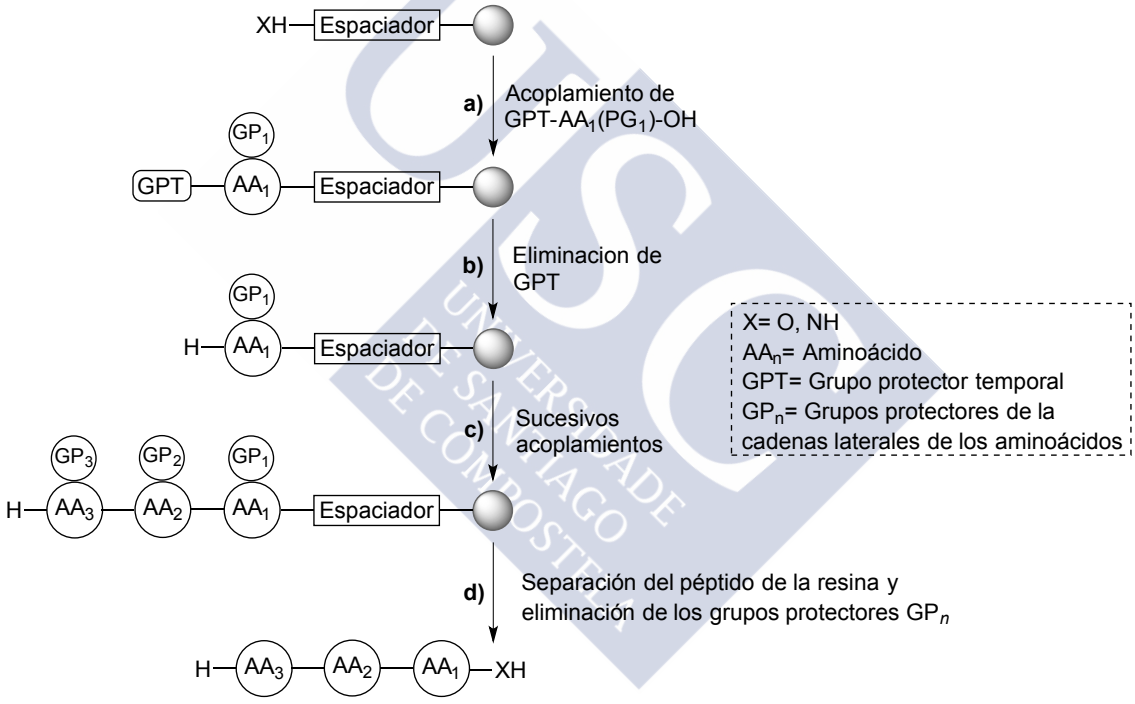
Figura 151: Reacción de desprotección de **CP20** mediante hidrogenólisis de los grupos bencílicos para la obtención de **CP22**.

En el caso de los α,γ,δ-ciclopéptidos no se estudiaron los sistemas heterodiméricos. Sin embargo, creemos que ello es posible y de gran interés, por lo que sería necesario abordarlo en un futuro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nanotubos de α,δ-ciclopéptidos

El último paso del estudio de los sistemas α,δ-ciclopeptídicos consistió en la síntesis, la caracterización y el estudio de nanotubos formados por α,δ-ciclopéptidos. Como hemos visto a lo largo de este trabajo de tesis, los ciclopéptidos se apilan para formar nanotubos mediante interacciones no covalentes dando lugar a la formación de nanotubos peptídicos. Para facilitar el estudio de las interacciones que dan lugar al autoensamblaje molecular se recurrió al bloqueo selectivo de las caras de los ciclopéptidos, de tal forma que se obtiene el nanotubo más corto posible, que es el dímero. Sin embargo, la síntesis de ciclopéptidos no *N*-alquilados es compleja debido a la baja solubilidad de los péptidos y su elevada polaridad, lo cual hace que su purificación sea muy dificultosa. Por ello, para la síntesis de ciclopéptidos no *N*-metilados se recurrió a la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida.



a) Carga del soporte sólido con el primer aminoácido; **b)** Desprotección del extremo *N*-terminal; **c)** Crecimiento del péptido a través de multiples pasos de desprotección y acoplamiento; **d)** Separación del péptido del soporte sólido y eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales.

Figura 152: Esquema de la metodología sintética empleada en la síntesis de péptidos lineales en fase sólida.

La síntesis de péptidos en fase sólida engloba toda una seria de técnicas y procedimientos que permiten la preparación de compuestos/macromoléculas que van desde pequeños péptidos a proteínas. El primer ejemplo de esta metodología data del año 1963 y fue llevado a cabo por Robert B. Merrifield.[179] Podemos definir la síntesis en fase sólida como el proceso mediante el cual se forma un péptido unido a través de su

[179] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

extremo *C*-terminal a un polímero insoluble mediante la adición sucesiva de los aminoácidos convenientemente protegidos que lo constituyen (Figura 152). La adición de cada aminoácido consiste en un ciclo formado por cuatro pasos. El primero consiste en la desprotección del extremo amino del péptido enlazado al polímero insoluble, seguido de una segunda etapa de lavado. Debido a que la cadena peptídica se encuentra enlazada a un soporte sólido, el exceso de reactivos y los subproductos de la reacción se eliminan fácilmente mediante la adición de disolventes y su filtración. El tercer paso consiste en el acoplamiento propiamente dicho del nuevo aminoácido, y por último se lleva a cabo otra etapa de lavado.

La metodología descrita en el párrafo anterior sólo es válida para la síntesis de péptidos lineales. Para la síntesis de ciclopéptidos en fase sólida el péptido lineal se encuentra anclado al soporte sólido a través de la cadena lateral de un aminoácido, generalmente ácido glutámico o ácido aspártico.[180] También existe la alternativa en la que se usa un espaciador entre el esqueleto peptídico y la resina, lo que permite ciclar cualquier péptido y, en principio, sobre cualquier posición.[181] Después del crecimiento y la ciclación del péptido lineal se produce la separación del péptido de la resina. Por lo tanto, la estrategia de grupos protectores necesaria para la síntesis de ciclopéptidos en fase sólida es más compleja que en el caso de la síntesis de péptidos lineales, que se podría denominar estrategia ortogonal de tres dimensiones.[182] Además de la ortogonalidad requerida entre los extremos *N*- y *C*-terminal durante la síntesis y ciclación del péptido lineal, también debe existir ortogonalidad con el anclaje del péptido a la resina (Figura 153).

El primer ejemplo de esta metodología fue puesto en práctica por el grupo del profesor Fabri para la síntesis del heptapéptido cíclico *c*-[-*L*-Tyr-*D*-Trp-*L*-Val-*D*-Trp-*D*-Trp-*L*-Arg-*L*-Asp-].[183] Para lo cual empleó los grupos protectores Boc para el extremo *N*-terminal y fluorenilo para el *C*-terminal. La unión a la resina PAM se realizó a través de la cadena lateral de ácido aspártico, y la separación del péptido cíclico del soporte sólido se llevó a cabo mediante el tratamiento con ácido fluorhídrico.

Por otro lado, en el año 1993 el grupo de Ghadiri empleó esta misma estrategia para sintetizar el primer péptido cíclico que formaba nanotubos peptídicos, el ciclo *c*-[(*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala-*L*-Gln-)$_2$].[36] En este caso la unión al soporte sólido se realizó a través de la

[180] White, C. J.; Yudin, A. K. *Nat. Chem*. **2011**, *3*, 509-524.
[181] Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, F. S.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441-5452.
[182] Kates, S. A.; Solé, N. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549-1552.
[183] Rovero, P.; Quartara, L.; Fabbri, G. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2693-2642.
[36] Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

cadena lateral del ácido glutámico, y se empleó el protocolo de ésteres activos *in situ* descritos por Kent.[184]

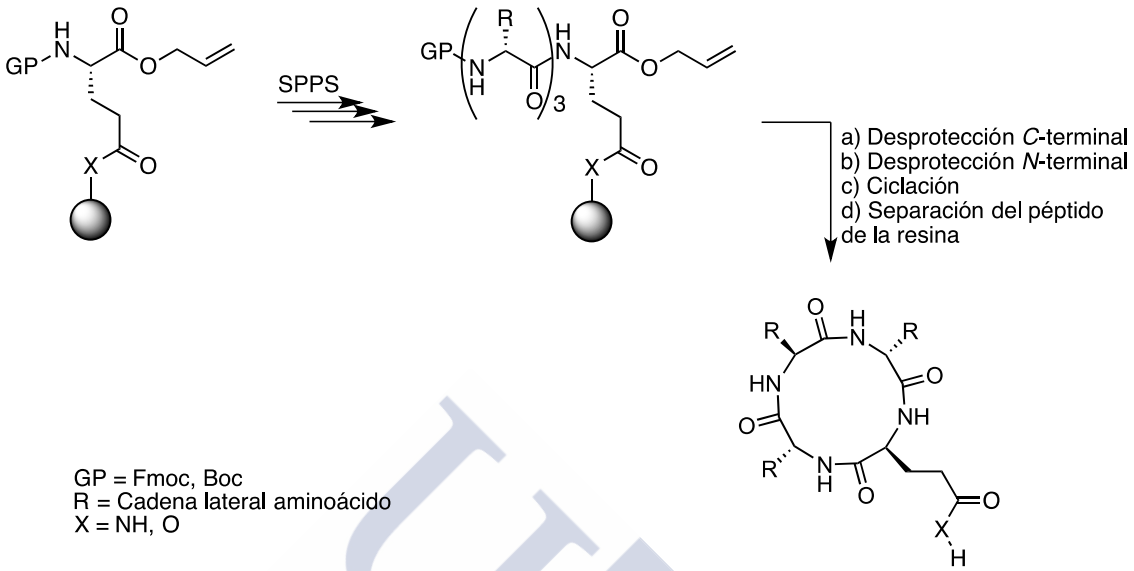


Figura 153: Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida para la obtención de un tetrapéptido cíclico que contiene un residuo de ácido carboxílico.

En nuestro grupo de investigación, el Dr. Manuel Amorín sintetizó los primeros nanotubos formados por α,γ-ciclopéptidos empleando la misma metodología sintética que el grupo de Ghadiri.[185] Sin embargo, la formación de nanotubos peptídicos mediante el autoensamblaje de los ciclopéptidos *c*-[(*L*-Gln-*D*-γ-Ach-)$_3$] o *c*-[(*L*-Gln-*D*-γ-Ach-)$_4$] no pudo ser caracterizada mediante cristalografía de rayos X ni difracción de electrones. Con el fin de obtener estructuras cristalinas que pudieran ser estudiadas mediante alguna de estas técnicas, el Dr. César Reiriz empleó la química Fmoc para la síntesis de α,γ-hexapéptidos y α,γ-octapéptidos cíclicos que alternaban unidades de γ-Acp con α-aminoácidos polares que le aportaron una mayor solubilidad.[186,100] En cualquier caso, la síntesis de estos ciclopéptidos comenzó con el anclaje al soporte sólido del Fmoc-*L*-Glu-OAll a través de su cadena lateral. Los datos cristalográficos obtenidos para el péptido *c*-[(*L*-Gln-*D*-Acp-*L*-His-*D*-Acp-)$_2$] indicaban que este α,γ-ciclopéptido daba lugar a nanotubos mediante una interacción de lámina β paralela.

En base a estos antecedentes, decidimos realizar la síntesis de α,δ-ciclopéptidos no *N*-metilados que permitieran el estudio del proceso de formación de α,δ-nanotubos

[184] Schnolzer, M.; Alewood, P.; Alewood, D.; Kent, S. B. *J. Pept. Prot. Res.* **1992**, *40*, 180-193.
[185] Tesis Doctoral de D. Manuel Amorín López, "Diseño, síntesis y estudio de α,γ-nanotubos peptídicos". Universidade de Santiago de Compostela (USC), **2005**.
[186] Tesis Doctoral de D. César Reiriz Armantel; "α,γ-Nanotubos peptídicos: Diseño y síntesis". Universidade de Santiago de Compostela (USC), **2011**.
[100] Reiriz, C.; Brea, R. J.; Arranz, R.; Carrascosa, J. L.; Garibotti, A.; Manning, B.; Valpuesta, J. M.; Eritja, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11335-11337.

peptídicos. Para el diseño del ciclopéptido partimos de los resultados obtenidos en los estudios previos de sistemas diméricos de los α,δ-ciclopéptidos. En cuanto al diámetro, las mejores constantes de asociación se obtuvieron con los sistemas homodiméricos de dodeca- y hexadecapéptidos cíclicos, y debido a la mayor complejidad de la síntesis de un hexadecapéptido, decidimos optar por el dodecapéptido. Para la elección de las cadenas laterales se tuvo en cuenta la experiencia previa de nuestro grupo de investigación. Dado que nuestro objetivo era la consecución de ciclopéptidos solubles en sistemas acuosos, se seleccionaron como residuos los α-aminoácidos glutamina, lisina y ácido glutámico. Además, una de nuestras prioridades era el estudio de la formación de nanotubos peptídicos a través de la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) sobre superficies aniónicas como la mica, para lo cual era necesaria la presencia de un residuo cargado positivamente. Para tal fin seleccionamos la arginina, cuyo grupo guanidinio se encuentra protonado en un amplio rango de pH (inferiores a pH 12). Basándonos en todas estas premisas, la secuencia seleccionada para el péptido objetivo (**CP23**) fue *c*-[(δ-Ach-*D*-Glu-δ-Ach-*L*-Glu-δ-Ach-*D*-Arg-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Lys-δ-Ach-*L*-Gln-)].

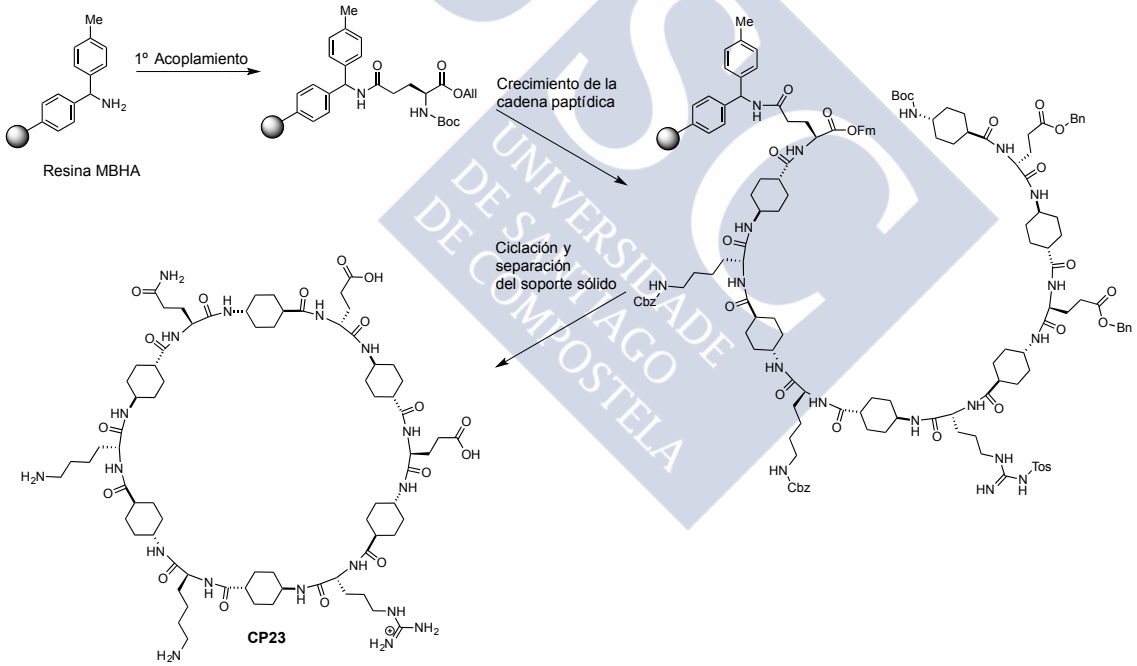
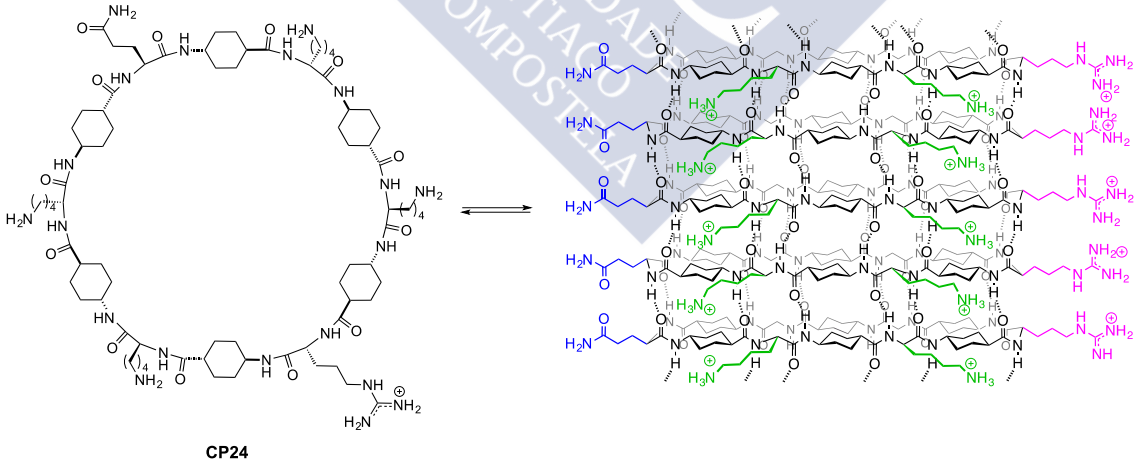


Figura 154: Esquema de síntesis de **CP23** empleando la química Boc para el crecimiento de la cadena peptídica y la resina MBHA como soporte sólido.

El siguiente paso consistió en la selección de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, que además motivarían la selección del tipo de soporte sólido. Debido a la disponibilidad comercial de todos los α-aminoácidos necesarios para la síntesis de **CP23** protegidos en forma de Boc en el grupo amino, y con sus cadenas laterales protegidas con grupos resistentes a tratamientos fuertemente ácidos, decidimos emplear la táctica Boc/Fm para la síntesis. De esta forma, el soporte sólido

elegido fue la resina MBHA,[187] que resiste las condiciones de tratamiento con ácidos fuertes necesario para le desprotección del grupo Boc. El anclaje al soporte sólido se realizó a través de la cadena lateral del Boc-*L*-Glu-OFm empleando *N*-HBTU como agente activante y DIEA como base. A continuación, se realizó el bloqueo de los grupos amino de la resina remanentes del primer acoplamiento mediante el tratamiento con anhídrido acético y DIEA. Para los sucesivos acoplamientos, se realizaron las desprotecciones del grupo Boc con la mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1) y la introducción de los nuevos aminoácidos empleando de nuevo *N*-HBTU y DIEA.

Se realizaron controles de la síntesis cada cuatro acoplamientos. Para ello se tomó una pequeña porción de la resina (en torno a 5 mg) y se trató con una mezcla de pentametilbenceno, anisol, TFA y HBr con agitación durante tres horas.[188] Empleando estas condiciones se logra la separación del péptido del soporte sólido (dando lugar a una amida en lugar de ácido carboxílico en la cadena lateral del ácido glutámico), y además, la desprotección de la cadena lateral de la Arg. Pasado ese tiempo, se filtró para eliminar el soporte sólido, y se añadió éter etílico sobre la disolución filtrada, dando lugar a la aparición de un precipitado. Para su posterior análisis, el precipitado se redisolvió en una mezcla de acetonitrilo y agua (1:1), y se inyectó en un equipo de HPLC-MS, obteniéndose así el tiempo de retención y la masa del péptido. Sin embargo, a medida que aumentaba la longitud del péptido, los cromatogramas obtenidos eran cada vez de mayor complejidad, hasta tal punto que no llegamos a observar el dodecapéptido lineal NH_2-δ-Ach-*D*-Glu-δ-Ach-*L*-Glu-δ-Ach-*D*-Arg-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Lys-δ-Ach-*L*-Gln-OFm.



CP24

Figura 155: Diseño propuesto para el ciclopéptido *c*-[(δ-Ach-*D*-Lys-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Arg-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Lys-δ-Ach-*L*-Gln-)], **CP24**.

[187] La resina MBHA consiste en el hidrocloruro de la 4-metilbencilhidrilamina sobre poliestireno.
[188] Wang, S. S.; Wang, B. S. H.; Hughes, J. L.; Leopold, E. J.; Wu, C. R.; Tam, J. P. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1992**, *40*, 344–349.

En base a los resultados obtenidos, achacamos las dificultades en el primer intento de síntesis de **CP23** en fase sólida a problemas de solubilidad del péptido durante la síntesis. Por esta razón, decidimos intentar la síntesis de un nuevo ciclopéptido en el que todas las cadenas laterales fuesen catiónicas, el péptido cíclico *c*-[(δ-Ach-*D*-Lys-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Arg-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Lys-δ-Ach-*L*-Gln-)], **CP24** (Figura 155).

Lamentablemente, los problemas acaecidos durante la síntesis de **CP23** se repitieron durante la síntesis de **CP24**. Debido a esto, decidimos cambiar el tipo de soporte sólido para la síntesis, pasando a emplear la resina 2-Clorotritilo (2-CTC).[189] Se trata de una resina empleada en la síntesis de péptidos protegidos con Fmoc en su extremo amino, donde los aminoácidos se unen al soporte sólido a través de la sustitución del átomo de cloro del grupo tritilo mediante tratamiento con DIEA.[190] El primer paso para la reacción de acoplamiento del primer aminoácido consiste en la rápida eliminación del heteroátomo, dando lugar a un catión tritilo estable. El segundo paso consiste en el ataque del nucleófilo al catión formado (Figura 156). La separación del péptido de la resina se lleva a cabo en condiciones ácidas moderadas, mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético (1%), Hexafluoro-2-propanol o 2,2,2-trifluoroetanol.[191]

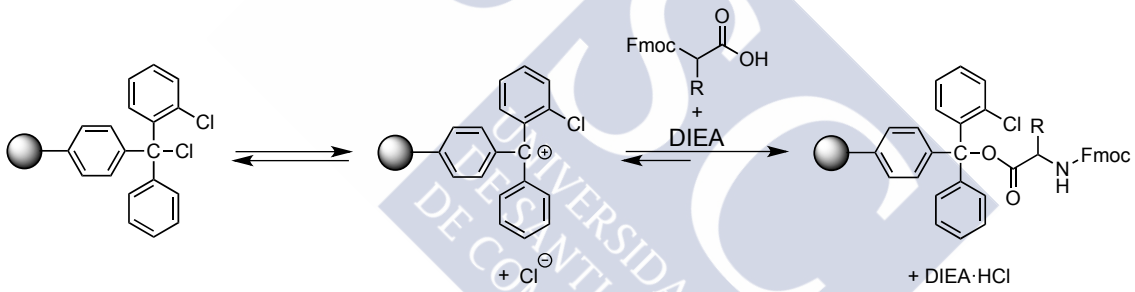


Figura 156: Esquema mecanístico del acoplamiento de un Fmoc-α-aminoácido sobre la resina 2-clorotritilo a través de su grupo ácido.

Para el diseño del ciclopéptido partimos de la estructura de **CP23**, introduciendo una leucina en lugar de una glutamina que aportaría una cierta hidrofobicidad al ciclopéptido y que podría favorecer la formación de los nanotubos. De esta forma, la secuencia de **CP25** sería *c*-[(δ-Ach-*L*-Leu-δ-Ach-*D*-Glu-δ-Ach-*L*-Glu-δ-Ach-*D*-Arg-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Lys-)] (Figura 157).

[189] La resina 2-Clorotritilo se trata del cloruro de Cloro(2-Clorofenil)difenilmetano sobre el copolímero poli(estireno 1% divinilbenceno).

[190] Barlos, K.; Gatos, D.; Kapolos, S.; Poulos, C.; Schäfer, W.; Wenqing, Y. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37*, 513-520.

[191] Barlos, K.; Gatos, D; Kapolos, S.; Poulos, C.; Schafer, W.; Yao, W. *Int. J. of Pept. Prot. Res.* **1991**, *38*, 555-561.

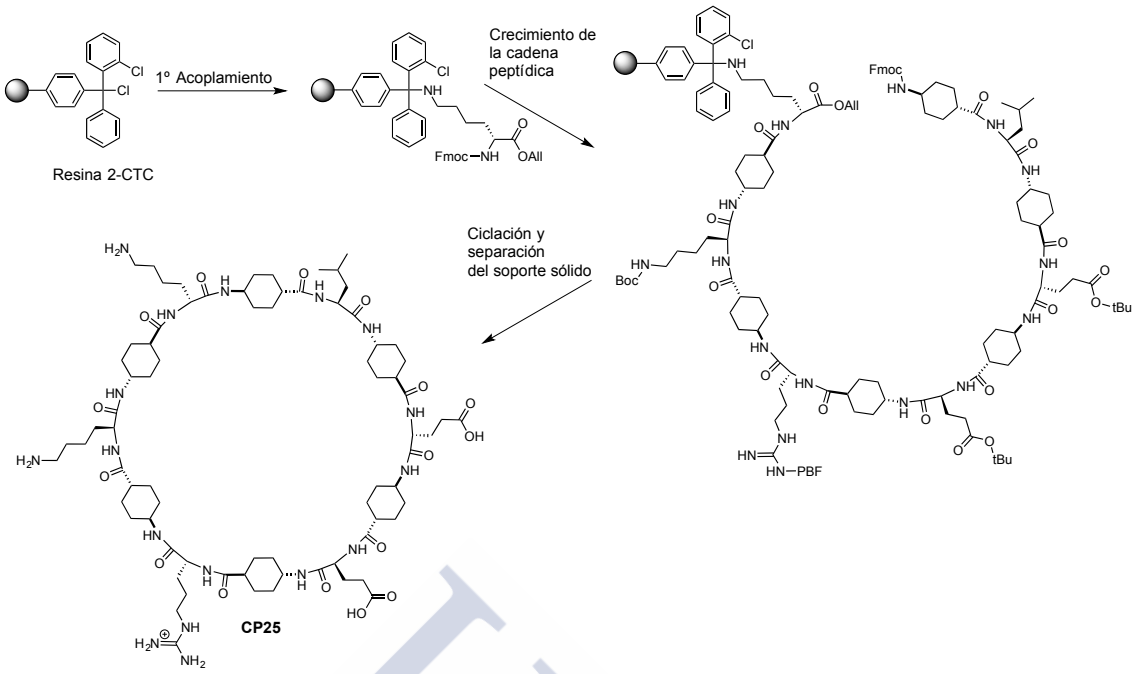


Figura 157: Esquema de síntesis de **CP25** empleando química Fmoc y la resina 2-CTC como soporte sólido.

Todos los Fmoc-α-aminoácidos necesarios para la síntesis, excepto el Fmoc-*D*-Lys-OAll (**114**), se pudieron obtener de forma comercial. Dicho aminoácido se utilizó para realizar la unión con la resina a través de su cadena lateral y posteriormente llevar a cabo la ciclación sobre su grupo ácido. La síntesis de **114** se llevó a cabo mediante la desprotección del grupo ácido de la Fmoc-*D*-Lys(Boc)-OH comercial mediante la esterificación del grupo ácido libre con alcohol alílico en presencia de DCC y DMAP, dando lugar al compuesto **113** con un rendimiento del 74%. Posteriormente se trató con la mezcla TFA/CH_2Cl_2 para desproteger el grupo amino de la cadena lateral obteniéndose el compuesto **114** de forma cuantitativa (Figura 158).

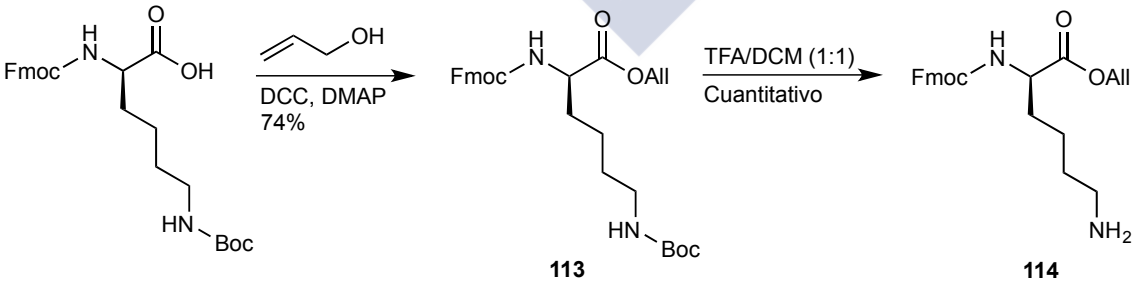


Figura 158: Síntesis de la Fmoc-*D*-Lys-OAll (**114**) a partir de la Fmoc-*D*-Lys(Boc)-OH comercial.

Por otra parte, el Fmoc-δ-Ach-OH (**112**) se obtuvo a partir del Boc-δ-Ach-OH (**44**), mediante la desprotección del grupo amino de **44** y posterior tratamiento con Fmoc-*O*-Succinimida[192] en medio básico (Figura 159).

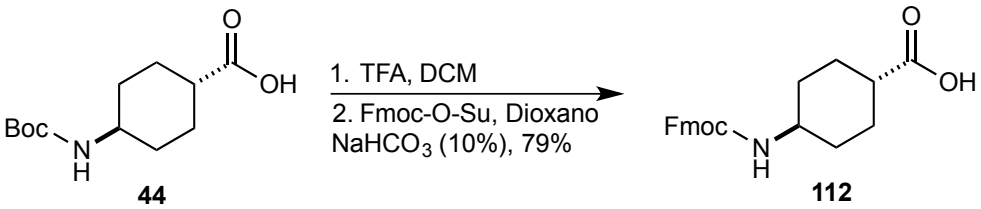


Figura 159: Síntesis de Fmoc-δ-Ach-OH (**112**) mediante la desprotección de **44** y posterior incorporación del grupo Fmoc.

El anclaje a la resina se llevó a cabo a través de la cadena lateral de la Fmoc-*D*-Lys-OAll empleando DIEA como base. El crecimiento de la cadena peptídica se realizó desprotegiendo el extremo *N*-terminal del péptido mediante el tratamiento con una disolución de piperidina (20%) en DMF y acoplando el siguiente aminoácido empleando *N*-HBTU como agente acoplante y en presencia de DIEA como base. Una vez preparado el péptido lineal se procedió a la desprotección del extremo *C*-terminal, para lo que se trató con la mezcla $Pd(OAc)_2$, PPh_3, $PheSiH_3$ y NMM en CH_2Cl_2 durante doce horas. Por último, se realizó la ciclación del péptido tratando la resina con PyAOP en presencia de base (DIEA). La separación del ciclopéptido de la resina y la desprotección de las cadenas laterales del mismo se llevaron a cabo en un mismo paso, tratando el soporte sólido con la mezcla de TFA, TiS, CH_2Cl_2 y H_2O (9:2.5:5:2.5) durante una hora.

Para nuestra sorpresa, el crudo obtenido resultó ser insoluble en agua, y parcialmente soluble en mezclas con una composición de acetonitrilo en agua menor al 50%, por lo que no fue posible su purificación mediante HPLC. Debido a esto, la purificación se llevó a cabo mediante lavados del sólido obtenido con éter, diclorometano y agua. De esta forma obtuvimos el ciclopéptido **CP25** con suficiente pureza para realizar un ^{1}H-RMN en DMSO y en DMSO/$MeOH_{d3}$. La masa de dicho compuesto ([MH^+] calculado para $C_{76}H_{127}N_{17}O_{16}$: 1534.96, encontrado: 1534.8625) coincide con la del péptido objetivo.

[192] La Fmoc-*O*-Succinimida es el (9H-fluoren-9-il)metil (2,5-dioxopyrrolidin-1-il) carbonato.

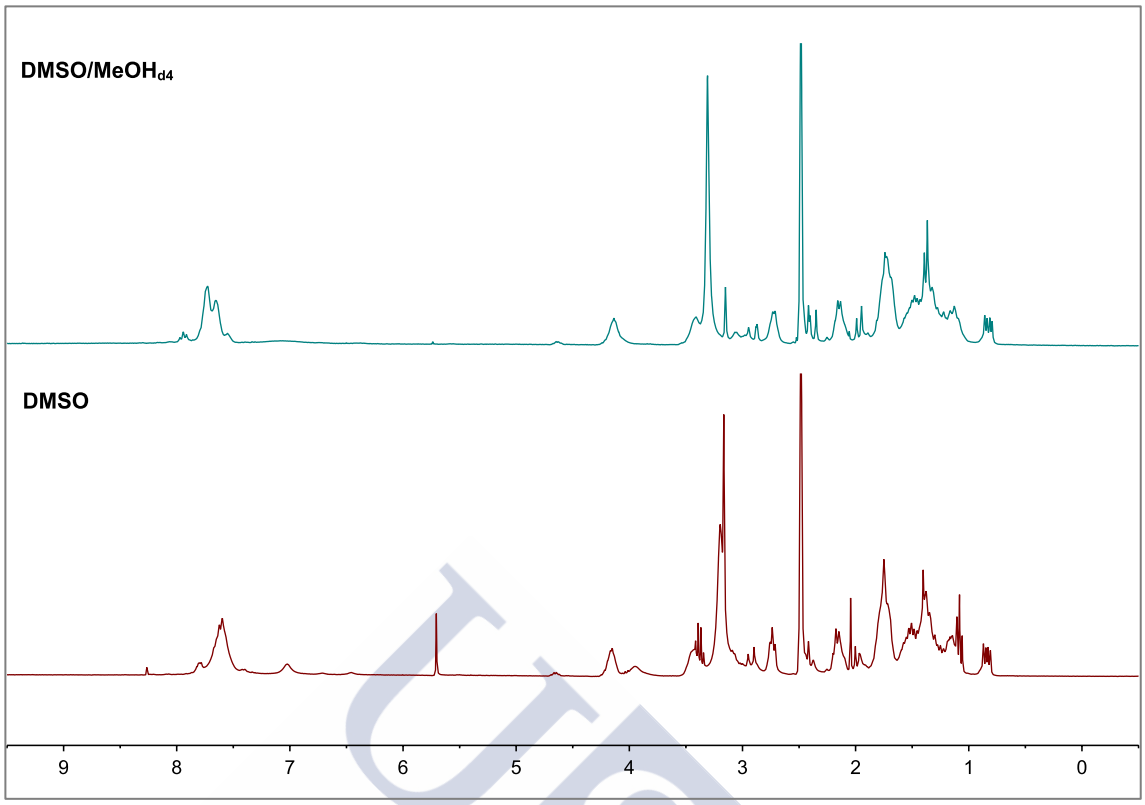


Figura 160: Espectros de ^{1}H-RMN de **CP25** en diferentes disolventes.

El siguiente paso consistió en el estudio de las propiedades de autoensamblaje de **CP25** empleando la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Como se comentó anteriormente, la cadena lateral del residuo de Arginina posee un grupo guanidinio en su cadena lateral, que se mantiene protonado en un amplio rango de pH. Por ello, decidimos depositar el ciclopéptido sobre superficies de mica, que se encuentra cargada negativamente. De esta forma, el ciclopéptido se quedaría adherido a dicha superficie a través de fuerzas electrostáticas.

Para la deposición de las muestras se añadieron diversas disoluciones de **CP25** sobre la superficie de mica, variando parámetros tales como la concentración, el pH o el tiempo de deposición (Tabla 3). Pasado un determinado tiempo de deposición se lavó la superficie con agua y se secó bajo una corriente de argón. Las diversas condiciones probadas para la deposición del ciclopéptido se encuentran resumidas en la Tabla 3.

En prácticamente todas las muestras se observó la aparición de aglomerados con alturas comprendidas entre 5 y 10 nm. Sin embargo, en las condiciones de la entrada 4 (H_2O/MeOH (1:7), 0.25 mM, pH 1.8), también se pudieron observar formaciones longitudinales con alturas de entre 2 y 4 nanómetros, que asociamos con la altura de uno y dos nanotubos respectivamente. La longitud de estas formaciones no superaba los 200 nanómetros, y en muchas ocasiones se encontraban fragmentadas.

	Disolvente	Concentración (mM)	pH	T. Deposición (min)
1	H_2O/MeOH (1:1)	1.0	2.40	5
2	H_2O/MeOH (1:3)	0.5	2.34	5
3	H_2O/MeOH (1:7)	0.25	1.8	5
4	H_2O/MeOH (1:7)	0.25	1.8	Hasta sequedad
5	H_2O	1.0	2.28	5
6	H_2O	0.5	2.21	5
7	H_2O	0.2	2.27	Hasta sequedad
8	H_2O/MeCN (6:4)	0.2	2.24	Hasta sequedad
9	H_2O	0.02	2.18	Hasta sequedad
10	H_2O/MeCN (6:4)	0.02	2.12	Hasta sequedad

Tabla 3: Diferentes condiciones probadas para la deposición de **CP25** sobre superficies de mica para su estudio mediante AFM.

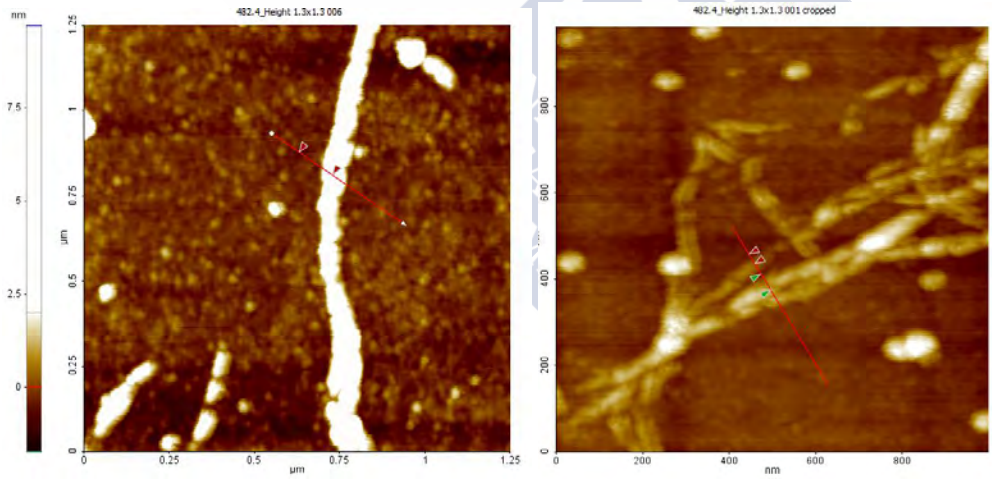


Figura 161: Imágenes obtenidas mediante AFM de los nanotubos formados mediante la deposición de las disoluciones de **CP25** sobre superficies de mica (Entrada 4 de la Tabla 3).

Debido a que nuestros esfuerzos por demostrar la formación de nanotubos peptídicos mediante el apilamiento de α,δ-ciclopéptidos no ofrecieron los resultados deseados, decidimos probar otro diseño que incluyese un grupo fluoróforo como sonda en su estructura. Para tal fin seleccionamos el grupo pireno, ya que permite seguir fácilmente los procesos de autoensamblaje molecular a través de técnicas de fluorescencia.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, se demostró que el pireno es un grupo excelente para estudiar los procesos de autoensamblaje de los

ciclopéptidos.[88 , 95 , 193] El grupo pireno es un hidrocarburo policíclico formado por cuatro anillos bencénicos perifusionados. Es un compuesto aromático y plano, que no cumple la regla de Hückel ya que no posee *4n + 2* electrones aromáticos. El pireno posee unas magníficas propiedades espectroscópicas, entre las cuales destaca la formación y emisión de su excímero.

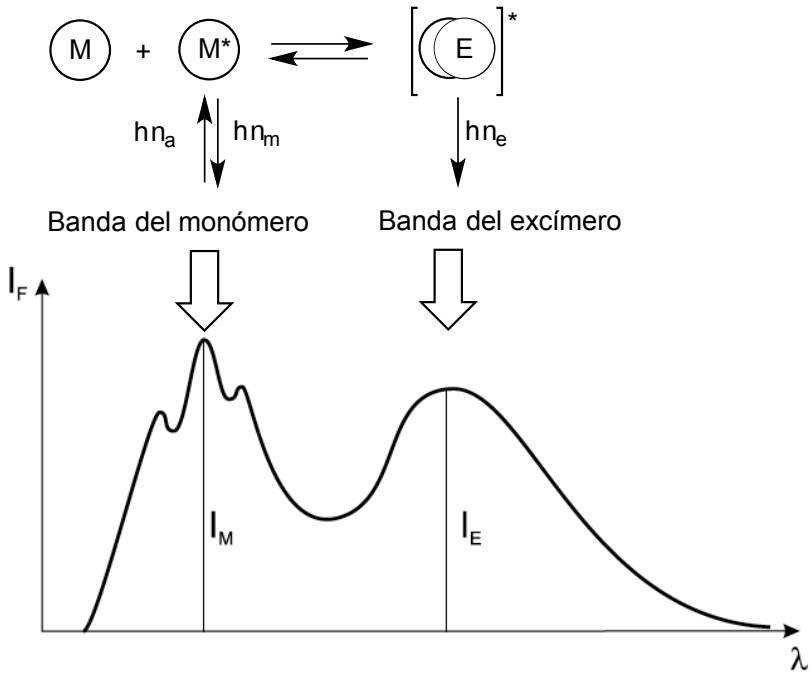


Figura 162: Esquema de formación de un excímero donde se indican las diferentes bandas de emisión para la especie monomérica excitada (M*) y el excímero (E).

Un excímero es un dímero en estado excitado (la palabra excímero proviene de la contracción de las palabras "*excited*" *y* "*dimer*") que se forma mediante la colisión entre una molécula excitada y una molécula idéntica no excitada (Figura 162).[194] En un excímero, la energía de excitación se encuentra deslocalizada entre los dos fragmentos. Además, como podemos ver en la Figura 162, la banda de emisión de un excímero se encuentra situada a una longitud de onda mayor que la correspondiente al monómero.

El espectro de emisión del grupo pireno (λ_{exc}= 340 nm) posee dos bandas características a 375 y 395 nm. Sin embargo, cuando las unidades de pireno se apilan de forma adecuada dan lugar a un excímero, apareciendo una nueva banda de emisión entre 470

[91] Brea, J. R.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 1653-1657

[95] Montenegro, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Kalinin, A.; Geckeler, K. E.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491.

[193] Cuerva, M.; García-Fandiño, R.; Vázquez-Vázquez, C.; López-Quintela, A.; Montenegro, J.; Granja, J. R. *ACS Nano*, **2015**, *9*, 10834-10843.

[194] Valeur, B. Molecular Fluorescence: Priciples and Applications. Wiley-VCH, **2002**.

y 480 nm. En el caso de los ciclopéptidos funcionalizados con pireno, sólo se observa la formación de excímero cuando se produce el proceso de autoensamblaje y los grupos pireno se encuentran alineados. En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, se empleó este principio para realizar el estudio de las constantes de asociación (K_a) de dímeros tanto en disoluciones orgánicas como acuosas.[88,195,193] Para ello, se relacionó la intensidad de la emisión de fluorescencia asociada al pireno (I_{pyr}) con la emisión asociada al excímero del pireno (I_{exc}) a diferentes concentraciones. Representando los valores obtenidos para I_{exc}/I_{pyr} con respecto a la concentración, se obtuvo una curva relacionada con la siguiente ecuación:

$$I_{pyr} = I_{exc}\frac{(4K_aC_{Tot}+1)-\sqrt{8K_aC_{Tot}+1}}{4K_aC_{Tot}}$$

Ecuación 1: Ecuación que relaciona la intensidad de la emisión de la fluorescencia del grupo pireno (I_{pyr}) y del excímero (I_{exc}) que forma con la concentración total del ciclopéptido (C_{Tot}) y la constante de asociación (K_a).

Aunque esta metodología se diseñó para el cálculo de la concentración de sistemas homodiméricos de α,γ-hexapéptidos cíclicos, recientemente se usó para el cálculo aproximado de la constante de asociación de nanotubos formados por α,γ-octapéptidos cíclicos.[95]

La forma más sencilla de introducir un grupo pireno en el ciclopéptido es a través de la funcionalización de la cadena lateral de un α-aminoácido. Existen varias formas de obtener α-aminoácidos funcionalizados con un grupo pireno, como el acoplamiento cruzado de Sonogashira entre la propargilglicina y pireno convenientemente funcionalizado con un halógeno,[196] o el acoplamiento entre la cadena lateral de un α-aminoácido con un pireno funcionalizado con un ácido carboxílico.[88] En este caso nos decantamos por la segunda opción, y nos propusimos acoplar el ácido 1-pirenoacético a la cadena lateral de la Fmoc-*L*-Lys-OH a través de la formación de un enlace amida, para lo que fue necesario proteger el grupo ácido del α-aminoácido en forma de éster alílico (Figura 163).

---

[88] Brea, J. R.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 1653-1657.

[195] Brea, R. J.; Pérez-Alvite, M. J.; Panciera, M.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. Chem. Asian. J. **2011**, 5, 110-121.

[193] Cuerva, M.; García-Fandiño, R.; Vázquez-Vázquez, C.; López-Quintela, A.; Montenegro, J.; Granja, J. R. ACS Nano, **2015**, 9, 10834-10843.

[95] Montenegro, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Kalinin, A.; Geckeler, K. E.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491.

[196] López-Deber, M. P.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2823-2826.

[88] Brea, J. R.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 1653-1657.

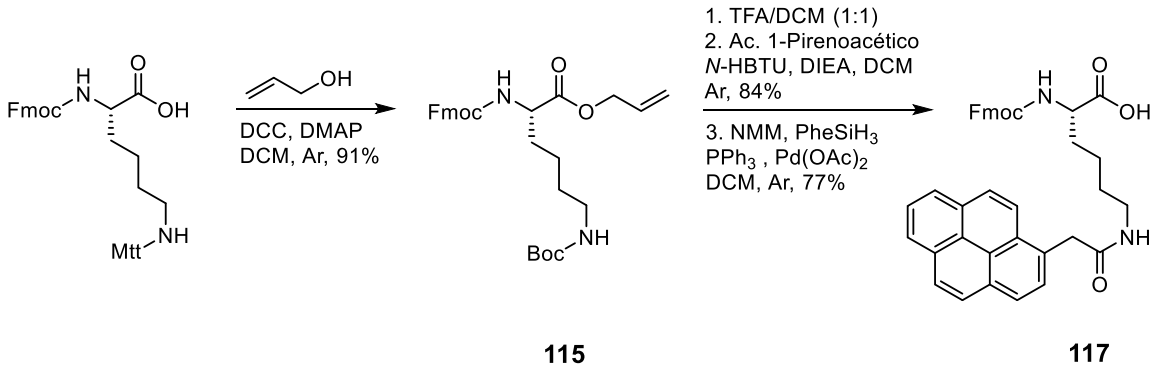


Figura 163: Funcionalización de la cadena lateral de la Fmoc-*L*-Lisina con el ácido 1-pirenoacético para obtener el Fmoc-*L*-Lys(Pyr)-OH (**117**).

Además, a la vista de los problemas surgidos durante las síntesis en fase sólida de los α,δ-ciclopéptidos, decidimos simplificar el nuevo diseño. Propusimos sintetizar un octapéptido cíclico que intercalase un δ-aminoácido por cada tres α-aminoácidos; un (3α,1δ)-ciclopéptido con la secuencia *c*-[(*L*-Lys(Pyr)-*D*-Glu-δ-Ach-*L*-Gln-*D*-Arg-*L*-Glu-δ-Ach-*D*-Gln-)] (**CP26**, Figura 164). Para la síntesis, el soporte sólido escogido fue la Rink Amide Resin.[197] La unión del péptido a esta resina se realizó a través de la formación de una amida entre la amina secundaria del soporte sólido y un ácido carboxílico. Por eso, este es un soporte ideal para anclar grupos ácidos como el extremo *C*-terminal o las cadenas laterales del ácido glutámico o aspártico. La separación del péptido de la resina se realiza en condiciones fuertemente ácidas (95% de TFA en CH_2Cl_2),[198] y da lugar a una amida (glutamina) en lugar del ácido de partida (ácido glutámico).

La construcción del péptido comenzó con el anclaje a la resina del Fmoc-*D*-Glu-OAll empleando DIEA como base y *N*-HBTU como reactivo de acoplamiento en DMF. El crecimiento de la cadena peptídica se realizó desprotegiendo el extremo *N*-terminal del péptido mediante el tratamiento con una disolución de piperidina (20%) en DMF y acoplando el siguiente aminoácido empleando *N*-HBTU como agente acoplante y DIEA como base. El último aminoácido acoplado fue el Fmoc-*L*-Lys(Pyr)-OH (**117**).

[197] La Rink Amide Resin es la Fmoc-2,4-dimetoxi-4'-(carboximetiloxi)-benzhidrilamina unida a la resina AminoMetil.

[198] Bernatowicz, M. S.; Daniels, S. B.; Köster, H.; Tetrahedron Lett. **1989**, *30*, 4645-4650.

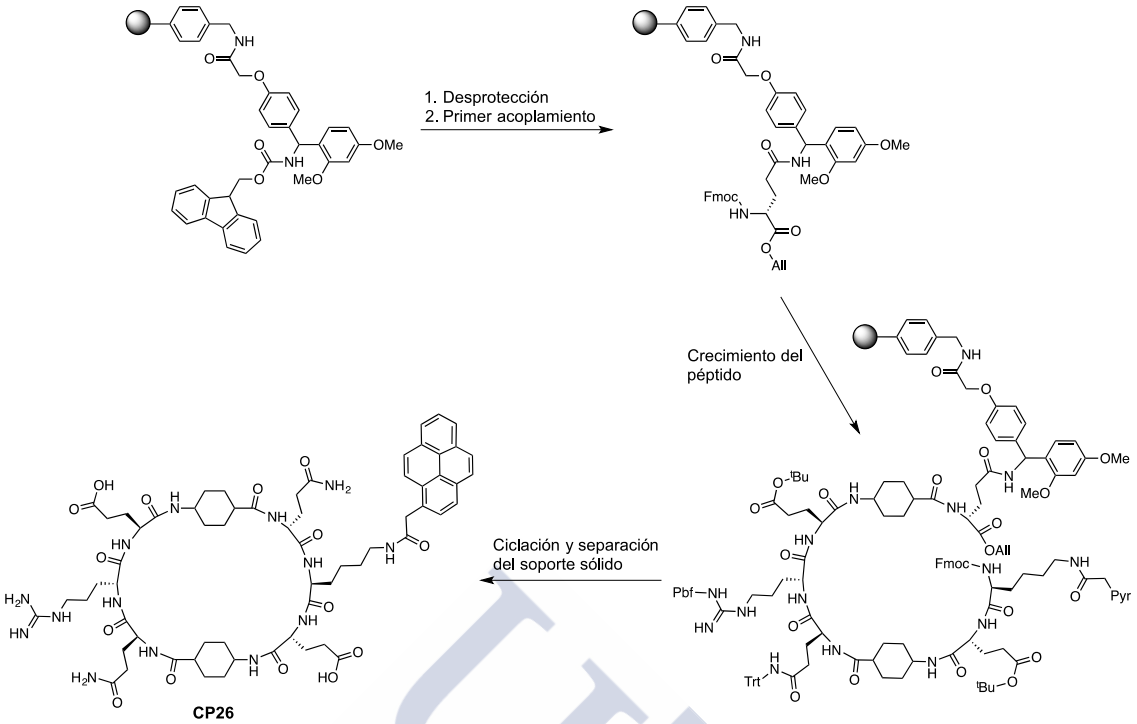


Figura 164: Esquema de síntesis de **CP26** empleando química Fmoc y la resina Rink-Amide como soporte sólido.

Una vez preparado el péptido lineal se procedió a la desprotección del extremo *C*-terminal, para lo que se trató con la mezcla $Pd(OAc)_2$, NMM, PPh_3 y $PheSiH_3$ en CH_2Cl_2 durante doce horas. Por último, se realizó la ciclación del péptido tratando la resina con PyAOP y DIEA. La rotura del ciclopéptido de la resina, junto con la desprotección de las cadenas laterales se llevó a cabo tratando el soporte sólido con la mezcla de TFA, TiS, CH_2Cl_2 y H_2O (9:2.5:5:2.5) durante una hora. De nuevo, el péptido obtenido resultó ser insoluble en las típicas mezclas de H_2O y MeCN, por lo que la purificación se llevó a cabo mediante lavados del sólido obtenido con éter, diclorometano y agua. De esta forma obtuvimos el ciclopéptido **CP26** con suficiente pureza para realizar un espectro de ^{1}H-RMN en DMSO. La masa del ion molecular obtenida mediante ESI (1291.6) coincide con la del producto esperado.

A continuación, se procedió al estudio de las propiedades de autoensamblaje de **CP26**. Dada la presencia de un grupo fluoróforo en el ciclopéptido, decidimos estudiar su comportamiento en disolución mediante espectroscopía de fluorescencia. Para ello se registraron los espectros de emisión de **CP26** a diferentes concentraciones (entre 0.1 y 150 µM) en una mezcla H_2O/MeCN (6:4), y se observó la relación de intensidad entre las bandas de emisión del pireno libre y el excímero del pireno.

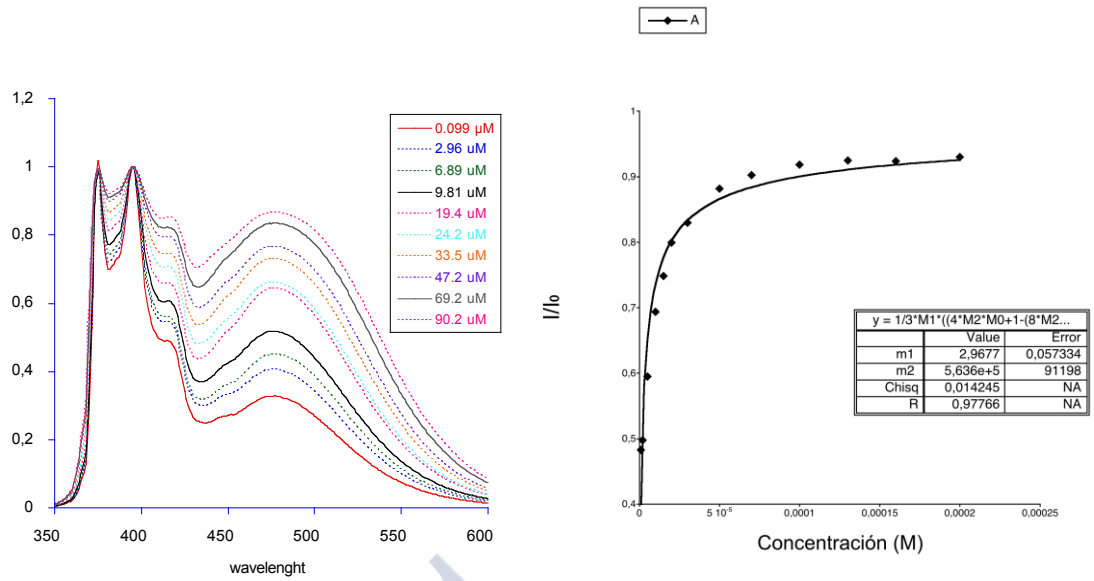


Figura 165: (Izquierda) Espectros de emisión de fluorescencia (normalizada) a diferentes concentraciones de **CP26** en una mezcla de agua y acetonitrilo (6:4). (Derecha) Representación de la relación de intensidades monómero/nanotubo con respecto a la concentración, y ajuste de la curva a la Ecuación 1.[199]

Como se puede observar en la Figura 165, a una concentración de 0.1 µM se muestran, además de las bandas típicas de emisión de pireno a 375 y 395 nm, una banda de emisión ancha (475 nm) correspondiente a la formación de un excímero de pireno. Dicha banda indica que existe una distancia muy corta entre dos unidades de pireno (entre 3 y 4 nm), y dicha distancia sólo se daría en el caso de que **CP26** se estuviera autoensamblando en disolución. Por otra parte, en el estudio de control en las mismas condiciones empleando el ácido 1-pirenoacético, no se observó la señal del excímero. Representando la relación de intensidades monómero/dímero con respecto a la concentración, y ajustando los datos obtenidos empleando la Ecuación 1, se obtuvo una estimación de la constante de asociación del orden de 10^5 M^{-1} para este sistema en una mezcla H_2O/MeCN (6:4).[199]

Además de los estudios de emisión de fluorescencia en disolución, también se llevaron a cabo los estudios de microscopía de fluorescencia. Para ello, se prepararon varias disoluciones con diferentes concentraciones y valores de pH reflejadas en la Tabla 4.

Las imágenes obtenidas para las entradas 1 y 3 de la Tabla 4 (condiciones ácidas) muestran la formación de aglomerados amorfos. Sin embargo, las imágenes obtenidas para 2 y 4 (condiciones neutras) muestran la formación de estructuras lineales que forman fibras. Si bien, las estructuras observadas no se corresponden con nanotubos discretos, debido a que poseen unos diámetros comprendidos entre los 600 nm y 1.2 µm.

[199] El cálculo de la constante de asociación (K_a) se llevó a cabo mediante el ajuste por mínimos cuadrados a la Ecuación 1 empleando el software KaleidaGraph 4.1 (Synergy Software).

Entrada	Concentración (µM)	Disolvente	pH
1	500	H_2O/MeCN (1:1)	2.55
2	500	H_2O/MeCN (1:1)	7.48
3	250	H_2O/MeCN (1:1)	2.37
4	250	H_2O/MeCN (1:1)	7.57

Tabla 4: Diferentes condiciones probadas para el estudio de **CP26** mediante microscopía de fluorescencia.

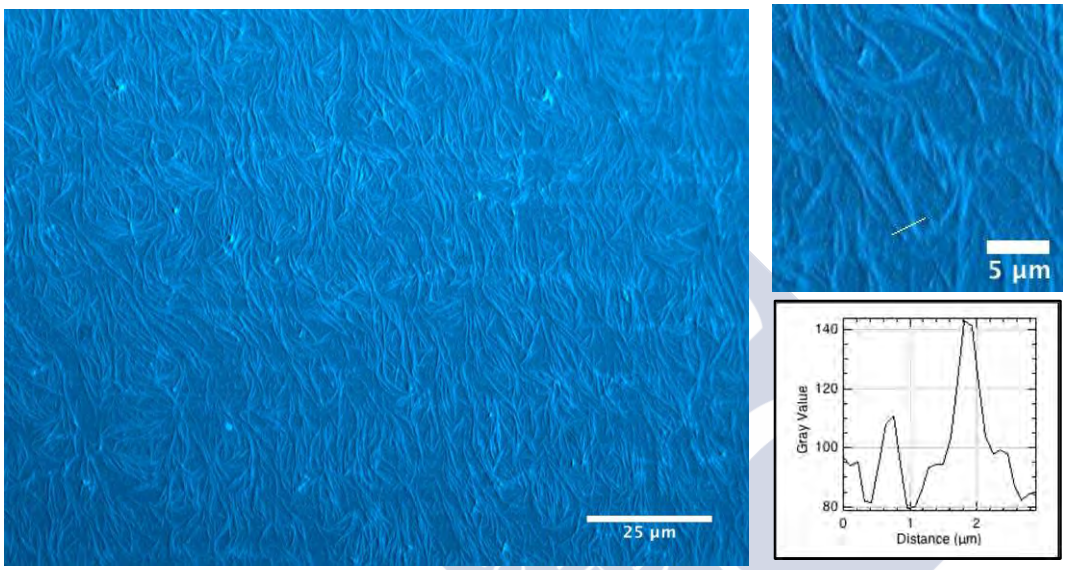


Figura 166: Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia del péptido **CP26** correspondientes con la entrada 4 de la Tabla 4.[200]

El siguiente paso consistió en el estudio de la formación de nanotubos de **CP26** mediante AFM. De nuevo, el ciclopéptido posee un residuo de Arginina, el cual se empleó para la deposición de **CP26** sobre superficies de mica. La deposición de las diferentes disoluciones de **CP26** sobre mica se llevó a cabo empleando la misma metodología que en el caso de **CP25**. Las condiciones de deposición estudiadas se encuentran reflejadas en la Tabla 5.

[200] Las imágenes de microscopía de fluorescencia se han tratado con el software ImageJ 2.0.

	Disolvente	Concentración (mM)	T. Deposición (min)
1	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	1.0	4
2	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	1.0	Hasta sequedad
3	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.1	5
4	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.1	Hasta sequedad
5	H_2O/MeOH (1:1)·0.1% TFA	0.01	3
6	H_2O/MeOH (1:1)·0.1% TFA	0.01	15
7	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.001	1
8	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.001	5
9	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.001	15
10	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.002	1
11	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.002	5
12	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.002	15
13	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.02+10 eq. $Ca(OH)_2$	5
14	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.02+10 eq. Ac. Succínico	5
15	H_2O/MeOH (1:1)·0.01% TFA	0.02 + 10 eq. Ac. Succínico +10 eq. $Ca(OH)_2$	5

Tabla 5: Diferentes condiciones probadas para la deposición de **CP26** sobre superficies de mica para su estudio mediante AFM.

En ninguna de las condiciones probadas se observó la formación de pequeñas estructuras lineales que podrían coincidir con la de un nanotubo individual. En los experimentos correspondientes a las entradas 1, 2, 8, 10 y 11 de la Tabla 5 se pudo observar formaciones lineales con una longitud no superior a los 200 nm. Las alturas de dichas formaciones no fueron constantes, si no que variaron entre los 2.5 y los 6 nm, sugiriendo que están formados por agrupaciones de pequeños nanotubos, posiblemente empaquetados por el efecto hidrofóbico del pireno.

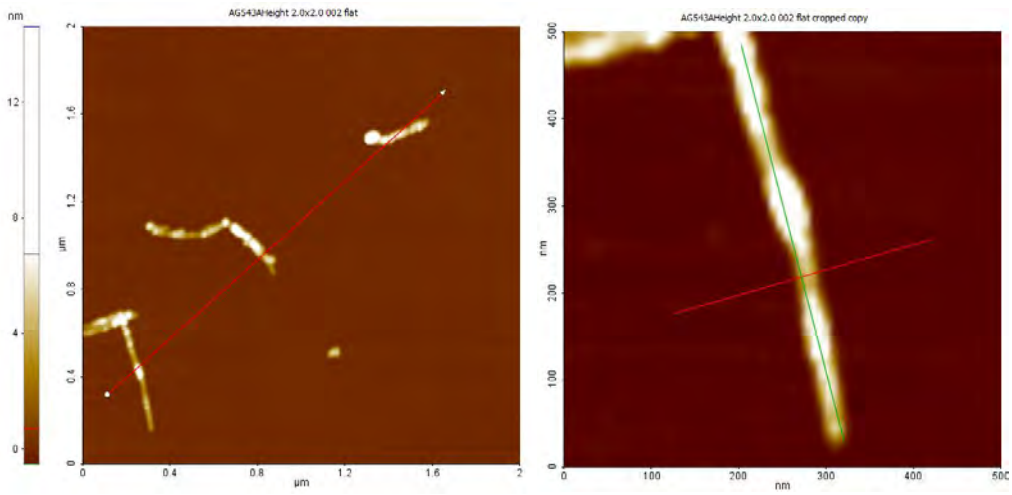


Figura 167: Imágenes obtenidas mediante AFM de los nanotubos formados mediante la deposición de las disoluciones de **CP26** sobre superficies de mica (Entrada 1 de la Tabla 5).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Conclusiones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Se sintetizó y caracterizó un hibrido de ciclopéptido y porfirina (**CP3$_{Zn}$**) con el que se pudo determinar el control rotoisomérico del heterodímero formado por dicho ciclopéptido y un segundo ciclopéptido que poseía un fullereno unido a su cadena lateral (**CP6**). Dicho heterodímero posee una elevada constante de asociación ($K_a \approx 10^8$ M^{-1}) debido a las fuertes interacciones entre los cromóforos de las cadenas laterales. Se ha comprobado que existe un proceso eficiente de transferencia electrónica fotoinducida entre la porfirina y el fullereno en aproximadamente un 80% del heterodímero presente en la disolución, y que da lugar a un estado de separación de cargas con largos tiempos de vida. La gran eficiencia del proceso se ha atribuido a la formación preferencial del rotoisómero eclipsado, debido a las interacciones atractivas entre el fullereno y la porfirina.

Se sintetizó un γ-ciclopéptido selectivamente *N*-metilado (**CP8**) formado exclusivamente por γ-aminoácidos de quiralidad alternada. Este péptido se autoensamblaba para formar dímeros a través de una interacción de tipo lámina β antiparalela. La presencia de un γ-aminoácido derivado de sacárido (γ-Aga), que expone el oxígeno del hemiaminal hacia el interior de la cavidad del ciclo y los grupos hidroxilo hacia el exterior, provoca la formación única del dímero alternado.

Se demostró que el δ-Ach se comporta como un elongador rígido cuando se intercala entre cada uno de los residuos de los *D,L*-α- y α,γ-ciclopéptidos. Estos péptidos poseían un comportamiento supramolecular análogo al de los péptidos de partida. Así, los α-tetrapéptidos cíclicos selectivamente *N*-metilados son incapaces de autoensamblarse debido a su rigidez, mientras que sus análogos extendidos, los α,δ-octapéptidos (**CP10** y **CP13**), tampoco formaban los dímeros correspondientes. Los α-hexa y α-octapéptidos cíclicos selectivamente *N*-metilados forman dímeros a través de láminas β antiparalelas con elevadas constantes de asociación, al igual que los α,δ-dodeca (**CP11** y **CP14**) y α,δ-hexadecapéptidos cíclicos (**CP12**). Sin embargo, estos péptidos presentan novedosas propiedades que se derivan de las características del δ-aminoácido como es la formación de láminas β paralelas preferentemente sobre las antiparalelas. Así, cuando uno de estos CPs (**CP10** o **CP13**) se puso en presencia de su enantiómero (**CP13** o **CP14**), se observó la formación de nuevas especies mayoritarias que se identificaron como los heterodímeros **D10·13** y **D11·14**. En el caso de los α,γ,δ-ciclopéptidos selectivamente *N*-alquilados (**CP18**, **CP19**, **CP20** y **CP21**) también se demostró el comportamiento del δ-Ach como listón molecular, ya que tuvieron el mismo comportamiento que los α,γ-ciclopéptidos equivalentes. De esa forma, se obtuvieron los ciclopéptidos con el mayor diámtero hasta la fecha que poseen capacidad de autoensamblaje. El estudio de la intercalación de δ-Ach en los γ-ciclopéptidos arrojó resultados diferentes a los anteriores, ya que dieron lugar a estructuras plegadas (**CP15**), o a estructuras planas sin capacidad para el autoensamblaje y de baja solubilidad (**CP17**). Todos estos estudios han demostrado que el δ-Ach puede actuar como un listón molecular dando lugar a una nueva familia de ciclopéptidos con nuevas propiedades.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Parte experimental

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Descripción general, instrumentos y materiales.

Tanto los Boc-α-aminoácidos como los Fmoc-α-aminoácidos, y los reactivos de acoplamiento *N*-HATU, *N*-HBTU, *N*-TBTU, PyAOP, HOBt y EDC·HCl fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, NovaBiochem o Bachem. Tanto los disolventes deuterados ($CDCl_3$, CD_2Cl_2, DMSO-d_6, MeOH-d_3, MeOH-d_4, TFA-d_1), como los reactivos DIC, DMAP, piperidina y DIEA se obtuvieron a través de Sigma-Aldrich. La DIEA empleada para la síntesis en disolución se destiló sobre hidruro cálcico, sobre ninhidrina y posteriormente se almacenó bajo atmósfera inerte con tamices moleculares. EL resto de los disolventes empleados fueron de calidad Síntesis o HPLC y se utilizaron sin ninguna purificación adicional, excepto el diclorometano, que fue destilado sobre hidruro cálcico, y el tetrahidrofurano, que se destiló sobre sodio/benzofenona.[201,202] La DMF empleada en la síntesis de péptidos en fase sólida fue de grado de síntesis de péptidos.

Las cromatografías en capa fina se realizaron con láminas de aluminio y sílica Merck 60 F_{254}, o aluminio y alúmina neutra Merck 60 F_{254}. Los compuestos que no mostraron actividad en el ultravioleta fueron revelados mediante inmersión de la capa fina en disolución de Ninhidrina (2% en Etanol) o Ce/Mo (200 mg de $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$, 9.6 g de molibdato amónico, 11.2 mL H_2SO_4, 200 mL H_2O) y posteriormente se calentó empleando un decapador. Para las columnas cromatográficas se empleó como fase estacionaria sílica-gel Acros 60 A, 40-60 µm y alúmina neutra Merck 90 active. Los disolventes empleados en las purificaciones fueron hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol. Para las purificaciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizaron los equipos Hitachi D-7000 (fase normal) y Agilent serie 1100 (fase reversa). Para la purificación mediante exclusión por tamaños se empleó la resina lipofílica Sephadex® LH20 suministrada por Sigma-Aldrich.

Los experimentos de resonancia magnética se llevaron a cabo en los espectrómetros Varian Inova 500 MHz, Varian Inova 400 MHz, Varian Mercury 300 MHz y Bruker DPX 250. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm) usando la señal del TMS como referencia interna, mientras que las constantes de acoplamiento (*J*) se expresaron en Hz. Las señales de ^{1}H-RMN se asignaron en función de los patrones de desdoblamiento como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuadruplete (q) o multiplete (m). En el caso de ^{13}C-RMN, la asignación de señales se realizó empleando experimentos DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) empleando un ángulo de 135°. Los experimentos bidimensionales se llevaron a cabo empleando tiempos de mezcla entre 250 y 400 ms sin mayor optimización.

Los espectros de masas de baja resolución se llevaron a cabo en equipos LC/MS Bruker AmaZon SL y Agilent 1100 series. Los espectros de masas de alta resolución se realizaron

[201] Brown, H. C. "*Organic Synthesis via Boranes"*, Ed. John Wiley & Sons, **1975**.
[202] Perrin, D. D.; Armarego, W. I. F. *"Purification of Laboratory Chemicals"*, Ed. Pergamon Press, **1988**.

en el Servicio de Espectrometría de Masas y Proteómica de la Universidade de Santiago de Compostela, usando los equipos Bruker Autoflex, Bruker Amazon ETD, Ultraflex III TOF/TOF y Micromass Autospec.

Las medidas de FTIR se realizaron en un equipo JASCO FT/IR-400, usando disoluciones 5-10 mM en $CHCl_3$ depositadas sobre pastillas de CaF_2.

Las medidas de Difracción de Rayos X se tomaron con el difractómetro Bruker X8 Kappa APEXII a baja temperatura (100 K).

Las medidas de rotación óptica $[\alpha]_D^T$ se llevaron a cabo en un polarímetro digital Jasco DIP-370 DIGITAL POLARIMETER, utilizando la longitud de onda correspondiente a la línea D del sodio y empleando en todos los casos MeOH de calidad HPLC como disolvente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Síntesis de péptidos en fase sólida.

Los péptidos precursores de nanotubos peptídicos se prepararon utilizando la metodología en fase sólida para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

a) Preparación de la resina:

En función del tipo de péptido deseado se emplearon las resinas Rink Amide, con una carga de 0.48 mmol/g, cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC), con una carga de 1.60 mmol/g para síntesis Fmoc y la MBHA con una carga de 0.67 mmol/g para síntesis Boc.

La resina Fmoc-Rink Amide se preparó suspendiéndola en DMF en un reactor con placa filtrante y agitando mecánicamente o mediante burbujeo de argón durante 30 min. La resina cloruro de 2-clorotritilo se preparó mediante suspensión en CH_2Cl_2 seco y agitación mecánica durante 20 min. Por último, la resina MBHA se preparó suspendiéndola y agitando primero en CH_2Cl_2 (4 ciclos de 1 min), después en DMF (4 ciclos de 1 minuto) y de nuevo en CH_2Cl_2 (4 ciclos de 1 min).

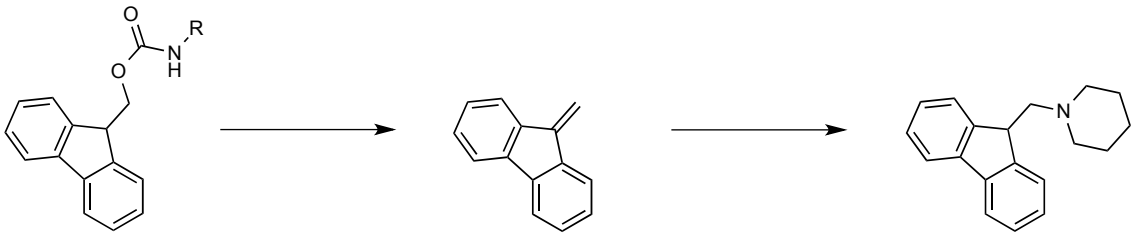
b) Síntesis de los péptidos:

Para el primer acoplamiento con la resina Fmoc-Rink Amide, ésta se desprotegió empleando una disolución de 20% de piperidina en DMF y agitación durante 20 min. Posteriormente se acopló el primer aminoácido en las condiciones estándar de acoplamiento para la síntesis Fmoc.

Para el primer acoplamiento de la resina de cloruro de 2-clorotritilo, se suspendió la resina en CH_2Cl_2 seco, se añadió el primer aminoácido (Lys o Glu) protegido en su extremo amino con un grupo Fmoc y en su grupo carboxilato como éster alílico (Fmoc-Aa-OAll) (4 eq.) y DIEA (12 eq.) y se agitó durante 2 h. Pasado ese tiempo, se filtró y la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y se secó. Para conocer el rendimiento del primer acoplamiento se realizó un Test Fmoc.[203]

Para realizar el Test Fmoc se desprotegió una pequeña fracción de la resina seca (en torno a 10 mg) mediante el tratamiento con disolución del 20% piperidina/DMF. La disolución resultante se diluyó en DMF y se midió la absorbancia del subproducto generado en la desprotección a 290 nm y 301 nm, y la carga de la resina se determinó utilizando la relación que aparece mostrada a continuación:

[203] El Test Fmoc es un test colorimétrico que consiste en acoplar un Fmoc-Aminoácido y medir la absorbancia en UV de la muestra después de la desprotección usando una disolución del 20% de piperidina en DMF.



$$Carga\ (mmol \cdot g^{-1}) = \frac{Absorvancia \times V \times 10^3}{\varepsilon \times v \times W \times l}$$

V = Volumen total de muestra (µL).

ε = Coeficiente de Absortividad Molar (5800 para λ=290 nm, 7100 para λ=310 nm).

v = Volumen de muestra medida (µL).

W = Peso de la resina (mg).

l = Longitud de la cubeta (cm)

En caso de que la carga de la resina tras el primer acoplamiento fuese correcta, se realizaría un capado de los grupos activos libres, para lo cual se suspendió la resina en MeOH y se agitó durante 30 min.

La resina MBHA, se trató con TFA durante 15 segundos, se lavó con CH_2Cl_2 y DMF, y a continuación se realizó el primer acoplamiento en condiciones estándar.

El crecimiento de los péptidos se llevó a cabo empleando la misma metodología:

Eliminación del grupo protector del aminoácido: empleando una disolución del piperidina/DMF (20%) para los aminoácidos protegidos como Fmoc, mientras que para los aminoácidos protegidos como Boc se trataron con una mezcla de TFA en CH_2Cl_2 (50%).

Lavados: La resina se lavó con DMF (3 x 1 min) para eliminar los excesos de los reactivos.

Acoplamiento: Sobre la resina lavada se añadió una disolución del nuevo aminoácido (4 eq) preactivado con *N*-HBTU (4 eq.) y DIEA (12 eq.), y la mezcla resultante se agitó durante 40 min. Para el seguimiento de los acoplamientos se empleó el Test TNBS.[204]

Lavados: Se lavó la resina con DMF (generalmente 3 veces) para eliminar excesos de los reactivos.

[204] 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.

Desprotección del grupo OAll del extremo C-terminal: Una vez completada la síntesis, la resina se trató con una mezcla de $Pd(OAc)_2$ (0.3 eq), PPh_3 (1.5 eq), NMM (10 eq) y $PheSiH_3$ (10 eq). La suspensión resultante se agitó bajo argón durante 12 h.

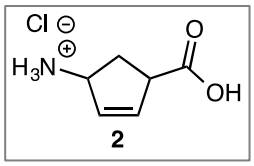
Ciclación: Una vez eliminados los grupos protectores de los extremos *N- y C*-terminal la resina se trató con una mezcla de PyAOp (4 eq) y DIEA (12 eq) en DMF, y la disolución resultante se agitó durante 4 h.

Separación del péptido del soporte sólido o resina: Las condiciones de separación del péptido de la resina dependieron del tipo de resina empleada. Para las resinas utilizadas en la síntesis Fmoc (Rink amida, y cloruro de 2-clorotritilo) se usó una mezcla de TFA, TiS, CH_2Cl_2 y H_2O (90:2.5:5:2.5) agitando durante 45 min. Para la resina MBHA se empleó una mezcla de TFA (200 µL), Anisol (12 µL), HBr (33% en Ác. Acético, 8 µL) y pentametilbenceno (10 mg) y se agitó durante 60 min. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se filtró y la resina se lavó repetidas veces con TFA y el ciclopéptido libre se precipitó con éter, se centrifugó y se secó el sólido para su posterior purificación mediante HPLC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

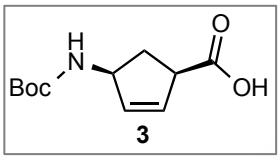
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Procedimientos experimentales



2

Hidrocloruro del ácido *cis*-4-aminociclopent-2-eno-1-carboxílico [HCl.H-Ace-OH (2)]:[205] Se disolvió el 2-azabiciclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona (Lactama de Vince, 35 g, 320.7 mmol) en una disolución acuosa de HCl (10%, 1.5 L) y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La disolución se concentró a vacío obteniéndose un sólido marrón, el cual se lavó repetidas veces con acetona hasta obtener un sólido blanco cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los publicados en la bibliografía. [Rendimiento cuantitativo, R_f = 0.75 (50% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** (250 MHz, D_2O, 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* = 14.4 y 4.9 Hz, 1H).



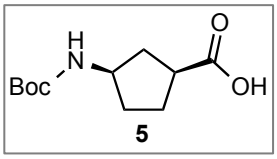
3

Ácido (*1R,4S*)-4-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclopent-2-eno-1-carboxílico [*D*-Boc-γ-Ace-OH, (3)]: Una disolución de HCl.H-Ace-OH (**2**) (14.5 g, 87.61 mmol) en H_2O/Dioxano (1:1, 1.5 L) se trató con anhídrido de Boc (28.65 g, 131.42 mmol) y DIEA (45.91 mL, 262.84 mmol). Después de agitar durante 3 h, la mezcla se concentró a vacío para eliminar el dioxano, y la fase acuosa restante se acidificó hasta pH 3 con una disolución acuosa de HCl (10%), observándose la aparición de un precipitado que se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron a vacío, obteniéndose un aceite amarillento que se purificó mediante cristalización en $CHCl_3$/hexano (3:1). Los cristales blancos resultantes de la mezcla racémica se resolvieron mediante cocristalización con (-)-*S*-fenil-1-etilamina (0.7 eq) en $CHCl_3$/hexano (1:1). Los cristales resueltos se filtraron y lavaron con una mezcla de CH_2Cl_2/hexano (1:1), se disolvieron en una disolución acuosa de HCl (5%) y se extrajeron con CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío. El aminoácido obtenido se volvió a recristalizar bajo las mismas condiciones, pero incrementando la cantidad de la amina quiral hasta 1 equivalente, mientras que se redujo la proporción de hexano. La repetición de este proceso 3 veces dio lugar a la obtención de 6.23 gramos del *D*-Boc-γ-Ace-OH (**3**) (sólido blanco) con un exceso enantiomérico superior al 97% y cuyos datos espectroscópicos coinciden con los ya publicados. [86%, R_f = 0.82 (MeOH)]. ^{1}H-RMN (250 MHz, $CDCl_3$) δ: 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). $[\alpha]_D$= -46.1 (C=1.0, MeOH).

Con las aguas madres obtenidas en la primera cristalización, enriquecidas en el enantiómero contrario, se repitió el procedimiento utilizando la (+)-fenil-1-etilamina para obtener el Ácido (*1S,4R*)-4-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclopent-2-eno carboxílico

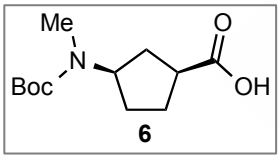
[205] Jagt, J. C.; Van Leusen, A. M. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 565-566.

[*L*-Boc-γ-Ace-OH, (4)]; $[\alpha]_D$= +46.1 (C=1.0, MeOH). Para hallar el exceso enantiomérico se llevó a cabo un Test de Marfey.[121]



5

Ácido (*1S,3R*)-3-[*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclopentano-1-carboxílico [*D*-Boc-γ-Acp-OH (5)]: En un matraz de fondo redondo se disolvió el *D*-Boc-γ-Ace-OH (**3**) (1.85 g, 8.15 mmol) en etanol (80 mL) y se añadió Pd/C (10%, 0.435 g, 0.41 mmol). A continuación, se desgasificó mediante dos ciclos de vacío/argón (5 min) y se creó la atmósfera de H_2 mediante el uso de dos globos. La mezcla resultante se agitó a t. a. bajo la atmósfera hidrógeno. Pasadas 24 h, se filtró a través de celita, lavando los residuos sólidos con etanol, y se concentró a vacío obteniéndose 1.84 gramos del compuesto como un sólido blanco, cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los publicados en la bibliografía. [98%, R_f = 0.57 (5% MeOH en CH_2Cl_2 + 25 µL de Ac. Acético)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 250.13 MHz, δ): 6.34 y 5.03 (m, 1H), 4.15-3.73 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.39 (s, 9H). [α]D = +16.8 (c = 1.0, MeOH).

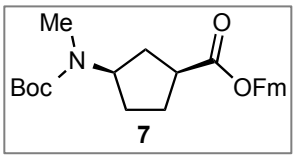


6

Ácido (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)(metil)amino]-ciclopentano-1-carboxílico [*D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Acp-OH (6)]:[62] En un matraz de fondo redondo se disolvió el compuesto **5** (1.844 g, 8.05 mmol) en THF (seco, 80 mL) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua. Pasados 10 min se añadió NaH (60% en peso, 0.965 g, 24.15 mmol) observándose la aparición de turbidez en la reacción. Pasados 30 min se retiró el baño de hielo-agua, se añadió MeI (1.5 mL, 3.426 g, 24.15 mmol) y se agitó durante 12 h. Pasado ese tiempo, se volvió a enfriar la mezcla de reacción en un baño de hielo-agua, y el exceso de NaH se eliminó mediante la adición lenta de agua. A continuación, se concentró el THF y la fase acuosa se lavó con éter para eliminar el exceso de MeI. Después se acidificó hasta pH 3 y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró, obteniéndose 1.68 g de *D*-Boc-^{Me}N-γ-Acp-OH como sólido blanco que se empleó en el siguiente paso sin purificación adicional y cuyos datos coinciden con los publicados en la bibliografía. [86%, R_f = 0.4 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 250.13 MHz, δ): 4.53 (m, 1H, Hγ), 2.82 (m, 1H, Hα), 2.76 (s, 3H, MeN), 2.2-1.6 (m, 6H, alifáticos), 1.46 (s, 9H, Boc).

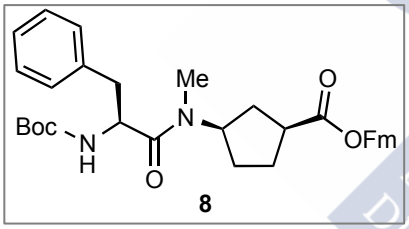
[121] Marfey, P. *Calsberg Res. Commun*. **1984**, *49*, 591-596.

[62] Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.



7

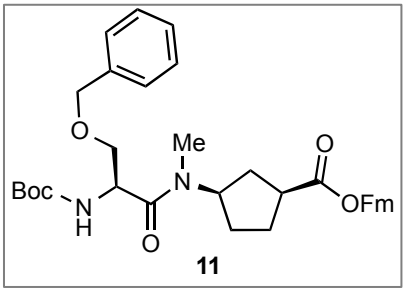
(9H-fluoren-9-il)metil (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)(metil) amino]-ciclopentano-1-carboxilato [*D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm (7**)]**:[62] En un matraz de fondo redondo se disolvió el *D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Acp-OH (**6**) (300 mg, 1.23 mmol) y (9-fluorenil)-metanol (290 mg, 1.48 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 12.3 mL). A continuación, se añadió DMAP (226 mg, 1.85 mmol), EDC·HCl (353 mg, 1.84 mmol) y HOBt (248 mg, 1.84 mmol), y la mezcla resultante se agitó a ta. Transcurridas 4 h la mezcla se vertió en un embudo de decantación y se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice en columna (10-15% de AcOEt/hexano) para obtener 470 mg de una espuma blanca cuyos datos espectroscópicos coinciden con los presentes en la bibliografía. [90%, R_f = 0.5 (AcOEt/hexano 3:1)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.77 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.61 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.48-7.27 (m, 4H, Ar), 4.47 (m, 2H, Hγ + CH-Fm), 4.31-3.99 (m, 2H, CH_2-Fm), 2.77 (m, 1H, Hα), 2.69 (s, 3H, MeN), 2.13-1.64 (m, 6H), 1.47 (s, 9H, BocN).



8

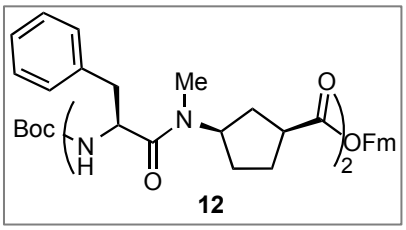
Boc-*L*-Phe-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm (8): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 25 mL se disolvió *D*-Boc-γ-^{Me}*N*-Acp-OFm (**7**) (300 mg, 0.71 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 8 mL) y se agitó a t. a. durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. El residuo fue disuelto en CH_2Cl_2 (seco, 8 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-*L*-Phe-OH (231 mg, 0.781 mmol), *N*-HATU (324 mg, 0.852 mmol) y DIEA (730 µL, 4.26 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la disolución se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (25-40% EtOAc en hexano) que dio lugar a 316 mg del producto deseado en forma de espuma blanca. [67%, R_f = 0.67 (50% EtOAc en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 250 MHz, δ): 7.75 (d solapados, 2H, Ar), 7.56 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, Ar), 7.44-7.15 (m, 9H, Ar), 5.44 (m, 1H, NH), 4.92-4.73 (m, 2H, $H\alpha_{Phe}$ y $H\gamma_{Acp}$), 4.52-4.40 (m, 2H, CH_{2Fm}), 4.16 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CH_{Fm}), 2.99-288 (m, 1H, $H\alpha_{Acp}$), 2.80 (s, 2H, $H\beta_{Phe}$), 2.80 y 2.64 (2s, 3H, MeN), 1.43 (s, 9H, BocN). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 63 MHz, δ): 175.6 y 175.1 (CO), 171.8 y 171.3 (CO), 154.9 (CO), 143.6 (C), 141.3 y 141.3 (C), 136.5 (C), 136.3 (C), 129.4 (CH), 129.4 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.0 (CH), 126.9 (CH), 124.8 (2 CH), 124.7 (CH), 120.0 (CH), 79.6 (C), 65.9 y 65.8 (CH_2), 57.7 (CH), 53.9 (CH), 52.0 (CH), 51.3 (CH), 46.9 (CH), 41.4 (CH), 40.4 (CH_2), 38.6 (CH), 31.3 (CH_2), 30.9 (CH_2), 28.9 (CH_3), 28.3 (2 CH_3), 27.5 (CH_2), 27.0 (CH_2), 26.8 (CH_2). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 591.3 ([M+Na]$^+$, 100), 569.5 ([MH]$^+$, 8), 513.5 ([M-^{t}Bu]$^+$, 53),

469.3 ([MH-Boc]$^+$, 43). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{35}H_{40}N_2O_5Na$ ([MNa]$^+$): 591.2829, **encontrado**: 591.2828.



11

Boc-*L*-Ser(Bn)-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm (11): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 25 mL se disolvió *D*-Boc-γ-^{Me}*N*-Acp-OFm (**7**) (162 mg, 0.37 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 4 mL) y se agitó a t. a. durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. El residuo fue disuelto en CH_2Cl_2 (seco, 8 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-*L*-Ser(Bn)-OH (121 mg, 0.407 mmol), *N*-HATU (155 mg, 0.407 mmol) y DIEA (380 µL, 2.22 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (20-30% AcOEt en hexano) que dio lugar a 168 mg del producto deseado en forma de espuma blanca [73%, R_f = 0.77 (50% EtOAc en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.57 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ar), 7.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.44-7.26 (m, 9H, Ar), 5.50 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H, NH), 4.91 (m, 1H, Hα_{Ser}), 4.58-4.40 (m, 4H, CH_2-Bn + $CH_{2\text{-}Fm}$), 4.31 (m, Hγ_{Acp}), 4.20 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, CH_{Fm}), 2.84 y 2.74 (2s, 3H, MeN), 2.61 (m, 1H, Hα_{Acp}), 1.44 ppm (s, 9H, BocN). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 63 MHz, δ): 175.6 y 175.3 (CO), 171.0 y 170.3 (CO), 155.1 (CO), 143.6 (C), 141.3 (C), 137.8 (C), 137.6 (C), 128.3 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.4 (CH), 127.0 (CH), 124.8 (CH), 120.0 (CH), 79.7 (C), 73.2 y 73.1 (CH_2), 71.1 (CH_2), 65.9 (CH_2), 57.5 (CH), 54.2 (CH), 50.4 (CH), 50.0 (CH), 46.9 (CH), 41.5 (CH), 41.3 (CH), 38.5 (CH), 31.8 (CH_2), 30.9 (CH_2), 29.4 (CH_3), 28.3 (CH_3), 28.0 (CH_2), 27.7 (CH), 27.5 (CH_2), 27.3 (CH_2), 27.1 ppm (CH_2). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 621.3 ([M+Na]$^+$, 100), 599.5 ([MH]$^+$, 2), 543.5 ([MH-^{t}Bu]$^+$, 15), 499.4 ([MH-Boc]$^+$, 8). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{36}H_{42}N_2O_6Na$ ([MNa]$^+$): 621.2935, **encontrado**: 621.2927.

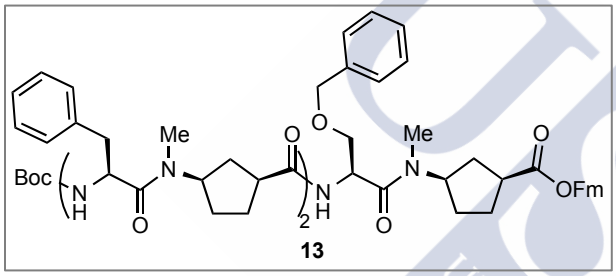


12

Boc-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-γ-Acp-)$_2$]-OFm (12): Una disolución del dipéptido Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}N-Acp-OFm (**8**) (130 mg, 0.22 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH que se utilizó sin purificación adicional.

Una segunda disolución del dipéptido Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OFm (**8**) (130 mg, 0.22 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con TFA (1 mL) y se agitó a ta durante 30 min.

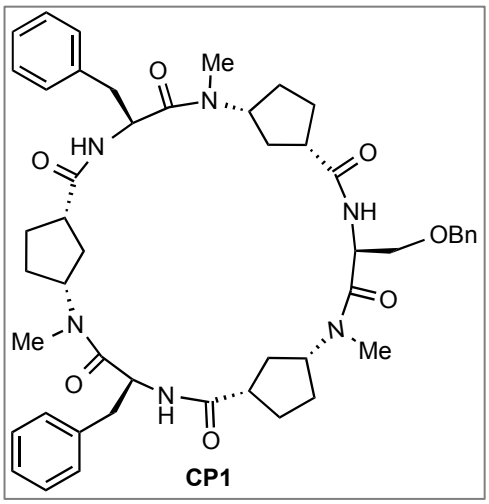
Transcurrido ese tiempo, la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3 h. El dipéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL) y se trató con DIEA (150 µL, 0.88 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH, DIEA (75 µL, 0.44 mmol) y *N*-HBTU (100.1 mg, 0.264 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-2% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 260 mg del tetrapéptido en forma de espuma blanquecina. [95%, R_f = 0.38 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 893.5 ($[M+Na]^+$, 57), 871.5 ($[MH]^+$, 100), 771.4 ($[MH\text{-}Boc]^+$, 2). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{52}H_{63}N_4O_8$ ($[MH]^+$): 871.4640, **encontrado**: 871.4635.



13

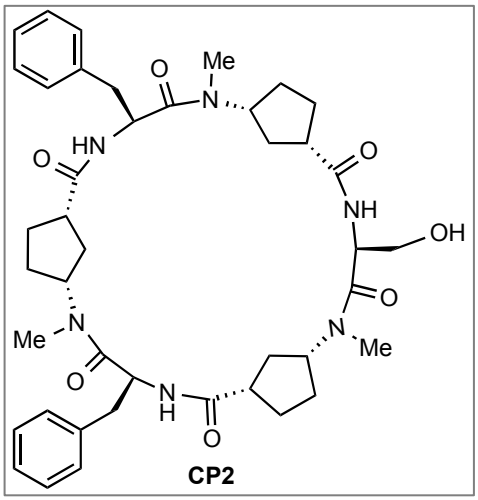
Boc-[(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$-*L*-Ser (Bn)-^{Me}*N*-γ-Acp-]-OFm (15): Una disolución del Boc-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$]OFm (**12**) (185 mg, 0.21 mmol) en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 3 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, se trató con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4, se filtró y concentró, obteniéndose el tetrapéptido desprotegido en su extremo *C*-terminal y que se usó sin purificación adicional.

Una disolución del dipéptido Boc-*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-γ-Ach-OFm (**11**) (134 mg, 0.22 mmol) en una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL) y se agitó durante 30 min a ta. Pasado ese tiempo, la mezcla se concentró y el crudo resultante se secó durante 3 h a alto vacío. El dipéptido desprotegido en su extremo amino se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL) y se trató con DIEA (151 µL, 0.88 mmol). Posteriormente sobre ésta se añadió una disolución de Boc-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-γ-Acp-)$_2$]-OH, DIEA (75 µL, 0.44 mmol) y *N*-HBTU (92 mg, 0.242 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL). Transcurridos 60 min de agitación bajo atmósfera inerte de Ar a ta, la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se concentró a vacío, obteniéndose un aceite que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-3% MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 240 mg del mencionado hexapéptido **13**. [96%, R_f = 0.24 (5 % MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1165.5 ($[M+Na]^+$, 62), 1143.6 ($[MH]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{68}H_{83}N_6O_{10}$ ($[MH]^+$): 1143.6165, **encontrado**: 1143.6157.



CP1

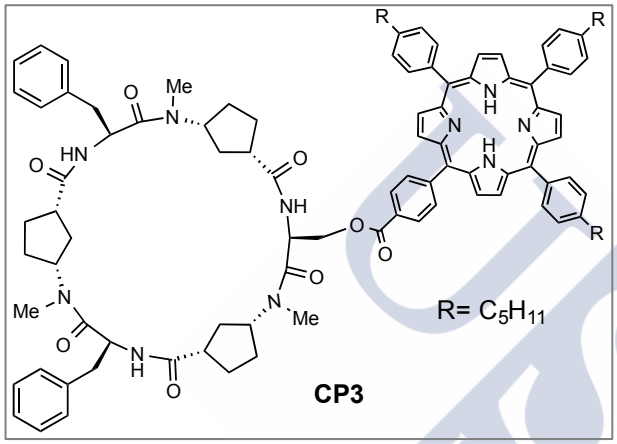
***c*-[*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP1)**: El hexapéptido Boc-[*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$]-OFm (**13**) (180 mg, 0.16 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 4 mL) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla de CH_2Cl_2 y TFA (1:1, 3 mL), y se dejó agitando durante 30 min. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 160 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (62 mg, 0.19 mmol) y DIEA (165 µL, 0.96 mmol). Pasadas 12 h, la mezcla se concentró a volumen reducido (20 mL), y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y Na_2CO_3 (saturada, 3 x 10mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-6% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 104 mg del ciclopéptido **CP1** en forma de sólido blanco. [78%, R_f = 0.2 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 8.62 (d solapados, 1.4 H, NH_{Phe}), 8.51-8.31 (m, 1.40 H; 0.80 H NH_{Phe} + 0.6 H NH_{Ser}), 8.17 (d, *J* = 9.5 Hz, 0.4 H, NH_{Ser}), 7.26 (m, 15 H, Ar), 5.33 (m, 3 H; 2Hα_{Phe} + Hα_{Ser}), 4.80 (m, 3 H, Hγ_{Acp}), 4.53 (s, 2 H, $\underline{CH_2}$-Bn), 3.88 (m, 0.74 H, Hβ_{Ser}), 3.61 (m, 1 H, Hβ_{Ser}), 3.35 (m, 0.26 H, Hβ_{Ser}), 3.20 – 2.80 (m, 7 H; 4 Hβ_{Phe} + 3 Hα_{Acp}), 3.06, 3.04, 2.74, 2.71, 2.67, 2.63 y 2.60 (s solapados, 9H, $\underline{Me}$N). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 869.4 ([M+Na]$^+$, 100), 847.7 ([MH]$^+$, 22). **EMAR (ESI)** calculada para $C_{49}H_{62}N_6O_7$ ([MH]$^+$): 847.4753, encontrada: 847.4745. **FTIR** (298 K, $CHCl_3$): 3300 (amida A), 2991, 2954, 1670 (amida I_{II}), 1616 (amida I), 1529 cm^{-1} (amida II).



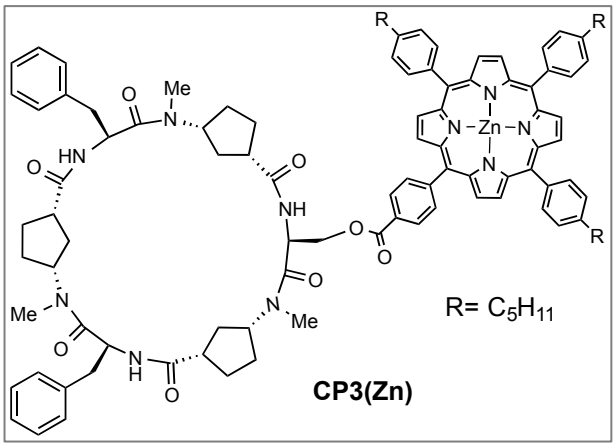
CP2

***c*-[*L*-Ser-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP2)**: Una disolución del péptido *c*-[*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (**CP1**) (78.0 mg, 0.092 mmol) en una mezcla MeOH/CH_2Cl_2 (2:1, 4 mL), que se desgasificó durante 5 min, se trató con $Pd(OH)_2$ (20% sobre carbono, 12.8 mg, 0.018 mmol) y se agitó a ta bajo atmósfera de hidrógeno generada por dos globos. Transcurridas 4 h, la mezcla resultante se filtró a través de celita, y el residuo se lavó con

CH_2Cl_2/MeOH (1:1). La disolución filtrada se concentró hasta sequedad, obteniéndose 70 mg del ciclopéptido en forma de sólido blanco. [rendimiento cuantitativo, R_f = 0.28 (5%MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** (DMSO-d_6, 500 MHz, δ): 8.40 (d solapados, 2 H, NH_{Phe}), 8.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, NH_{Ser}), 7.24-7.15 (m, 10 H, Ar), 4.85-4.65 (m, 6 H; 2 Hα_{Phe}+ 1 Hα_{Ser} + 3 Hγ_{Acp}), 3.60 (m, 2 H, Hβ_{Ser}), 2.95-2.88 (m, 2 H, Hβ_{Phe}), 2.85-2.72 (m, 2 H, Hβ_{Phe}), 2.81 (s, 3 H, MeN), 2.67 (s, 3 H, MeN), 2.64 (s, 3 H, MeN), 2.62-2.55 (m, 3 H, Hα_{Acp}). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 779.4 ([M+Na]$^+$, 67), 757.4 ([MH]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{42}H_{57}N_6O_7$ ([MH]$^+$): 757.4283, **encontrado**: 757.4278. **FTIR** (298 K, $CHCl_3$): 3298 (amida A), 2999, 2957, 2875, 1659 (amida I_{II}), 1622 (amida I), 1533 cm^{-1} (amida II).

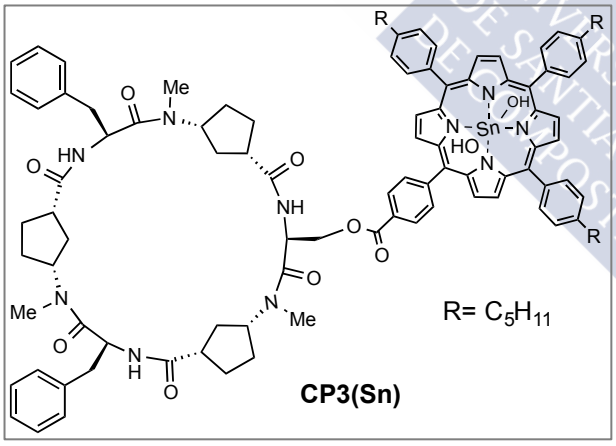


***c*-[*L*-Ser(CTPP)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP3)**: Una disolución del péptido c-[*L*-Ser-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (**CP2**) (30 mg, 0.04 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL) se trató con DIC (9.5 μL, 0.06 mmol), HOBt (9 mg, 0.06 mmol), 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris (4-pentilfenil) porfirina CTTP (**12**) (34.7 mg, 0.04 mmol) y, por último, se añadió DMAP (7.3 mg, 0.06 mmol). La disolución obtenida se agitó durante 24 h y transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente. El residuo marrón-violáceo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-5% MeOH en CH_2Cl_2), seguido de cromatografía de exclusión por tamaños (Phenomenex LH-20 resin, CH_2Cl_2/MeOH (1:1)) para obtener 38.5 mg of CP3 [60%, R_f = 0.45 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 8.92 (s, 6 H, Pirrol), 8.76 (m, 2.5H; 2H Pirrol + 0.5 H NH_{Ser}), 8.65 (m, 1.5 H, NH_{Phe}), 8.54 (d, *J* = 10.2 Hz, 0.5 H, NH_{Ser}), 8.47 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.5 H, NH_{Phe}), 8.44-8.32 (m, 4 H, $Ar_{Porphirina}$), 8.18-8.08 (d solapados, *J* = 7.6 Hz, *J*= 7.8 Hz, 5 H $Ar_{Porphirina}$), 8.05 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, $Ar_{Porphirina}$), 7.63-7.43 (d solapados, *J* = 7.6, 7.1 y 7.3 Hz, 6 H, $Ar_{Porphirina}$), 7.38-7.21 (m, 10 H, Ar_{Phe}), 5.85 (q, *J* = 7.9 Hz, 1 H, Hα_{Ser}), 5.42 (m, 2 H, Hα_{Phe}), 5.11-4.71 (m, 5 H, Hγ_{Acp}, Hβ_{Ser}), 3.33 y 3.30 (2 s, 3 H, MeN$_{Ser}$), 3.27-3.03 (m, 4 H, Hβ_{Phe}), 2.98 (t, *J* = 7.8 Hz, 6 H, Ar-CH_2-C_4H_9), 2.78, 2.75 y 2.73 (3 s, 6 H, MeN$_{Phe}$), 2.52 (m, 3 H, Hα_{Acp}). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{102}H_{114}N_{10}O_8$ ([MH]$^+$): 1607.8894, **encontrado**: 1607.8891. **FTIR** (298 K, $CHCl_3$): 3305 (amida A), 3310, 2957, 2855, 1669 (amida I_{II}), 1623 (amida I), 1531 cm^{-1} (amida II).



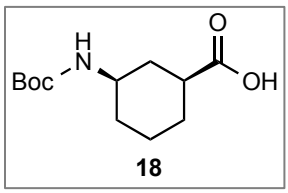
CP3(Zn)

***c*-[*L*-Ser(CZnTPP)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] [CP3(Zn)]**: Una disolución del péptido **CP3** (15.5 mg, 0.0095 mmol) en una mezcla $CHCl_3$/MeOH (3:1, 3 mL) se trató con $Zn(OAc)_2{\cdot}2H_2O$ (21.2 mg, 0.095 mmol) y se agitó a ta durante 2 h de agitación protegida de la luz. Pasado ese tiempo se evaporó el disolvente, dando lugar a un sólido marrón-anaranjado que se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Phenomenex LH-20 resin, CH_2Cl_2/MeOH (1:1)), obteniéndose 14.2 mg del compuesto metalado. [89%, R_f = 0.45 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.97 (s, 6 H, Pirrol CTPP), 8.84 (m, 2 H, Pirrol CTPP) 8.73-8.51 (m, 2 H, NH_{Phe} + NH_{Ser}), 8.44-8.22 (m, 5 H; 4 H Ar CZnTPP + 0.5 H NH_{Phe} + 0.5 H NH_{Ser}), 8.17-7.97 (m, 6H Ar CTPP), 7.61-7.42 (m, 6 H, Ar CTPP), 7.33-7.13 (m, 10 H, Ar Phe), 5.64 (m, 1 H, Hα_{Ser}), 5.35 (m, 2 H, Hα_{Phe}), 4.99-4.50 (m, 5 H, Hγ_{Acp} , Hβ_{Ser}), 3.26-2.83 (m, 4 H, Hβ_{Phe}, 3 Hα_{Acp}, 3H MeN, 6 H, Ar-CH_2-C_4H_9), 2.77-2.53 (m, 6H, MeN), 2.39 (m, 6H, Hβ_{Acp}). **EMAR (MALDI-TOF) calculado** para $C_{102}H_{112}N_{10}O_8Zn$ ($[MH]^+$): 1670.7971, **encontrado**: 1670.7874. **FTIR** (298 K): 3301 (amide A), 1671, 1624 (amida I), 1524 cm^{-1} (amida II).



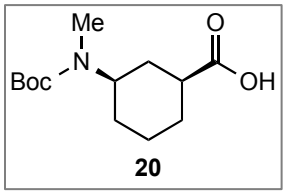
CP3(Sn)

***c*-[*L*-Ser(CSn(OH)$_2$TPP)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] [CP3(Sn)]**: Una disolución del péptido **CP3** (9 mg, 0.0056 mmol) en piridina (4 mL) se trató con $SnCl_2{\cdot}2H_2O$ (8 mg, 0.034 mmol) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 h. Transcurrido ese tiempo la mezcla se enfrió a ta y se concentró hasta sequedad. El residuo se redisolvió en $CHCl_3$ (5 mL) y se lavó con disolución acuosa de HCl (2%, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró, obteniéndose 9 g de un sólido verde-violáceo. [92%, R_f = 0.45 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ):): 9.26-9.06 (m, 6 H, Pirrol CTPP), 9.05-8.90 (m, 2 H, Pirrol CTPP) 8.77-8.46 (m, 2 H, NH), 8.45-7.85 (m, 10 H), 8.17-7.97 (m, 6H Ar CTPP), 7.60-7.47 (m, 4 H, Ar CTPP), 7.14 (m, 10 H, Ar Phe), 5.71 (m, 1 H, Hα_{Ser}), 5.28 (m, 2 H, Hα_{Phe}), 4.99-4.49 (m, 5 H, Hγ_{Acp} , Hβ_{Ser}), 3.26-2.83 (m, 4 H, Hβ_{Phe}, 3 Hα_{Acp}, 3H MeN, 6 H, Ar-CH_2-C_4H_9), 2.77-2.53 (m, 6H, MeN), 2.39 (m, 6H, Hβ_{Acp}). **EM (MALDI)** [m/z, (%)]: 1724.61 ($[M\text{-}2OH]^+$, 100), 1759.58 ($[MH]^+$, 35).



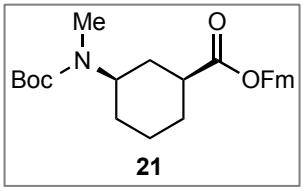
18

Ácido (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclohexano-1-carboxílico [*D*-Boc-γ-Ach-OH (18)]: [60] Se realizó la resolución enantiomérica del compuesto comercial Ácido *cis*-3-amino-*N*-*t*-butoxicarbonil ciclohexanocarboxílico (**17**) en las mismas condiciones que el compuesto **3**. [82%, R_f = 0.45 (5% de MeOH en CH_2Cl_2]. **^{1}H-RMN** (250 MHz, $CDCl_3$, δ): 5.56 (s, 1H, NH), 4.46 (s. 1H, Hγ) 3.47 (s, 1H, Hα), 24-1.0 (m, 8H, Alifáticos), 1.43 (s, 9H, Boc-N). $[\alpha]_D$= -50.1 (C=1.0, MeOH).



20

Ácido (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)(metil)amino]-ciclohexano-1-carboxílico [*D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Ach-OH (20)]:[60] En un matraz de fondo redondo se disolvió el *D*-Boc-γ-Ach-OH (**18**) (1.020 g, 4.1 mmol) en THF (seco, 40 mL) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua. Pasados 10 min se añadió NaH (60% en peso, 0.5 g, 12.3 mmol) observándose la aparición de turbidez en la reacción. Pasados 30 min se retiró el baño de hielo-agua, se añadió MeI (0.77 mL, 1.760 g, 12.3 mmol) y se agitó durante 12 h. Entonces, se volvió a enfriar la mezcla de reacción en un baño de hielo-agua, y el exceso de NaH se eliminó mediante la adición lenta de agua. A continuación, se concentró el THF y la fase acuosa se lavó con éter (3 x 40 mL) para eliminar el exceso de MeI. Después se acidificó hasta pH 3 y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró, obteniéndose 1.68 g de *D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Ach-OH como sólido blanco que se empleó en el siguiente paso sin purificación adicional y cuyos datos coinciden con los publicados en la bibliografía. [98%, R_f = 0.33 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 250.13 MHz, δ): 4.02 y 3.78 (m, 1H, Hγ), 2.72 (s, 3H, MeN), 2.45 (m, 1H, Hα), 2.01-1.14 (m, 8H, alifáticos), 1.45 (s, 9H, BocN).

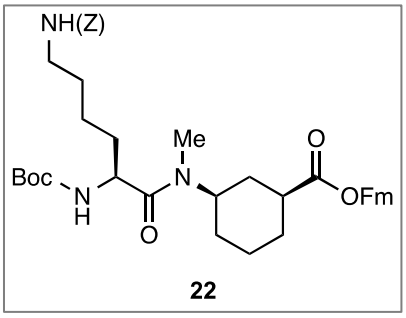


21

(9H-fluoren-9-il)metil (*1S,3R*)-3-[(*t*-butoxicarbonil)(metil) amino]-ciclohexano-1-carboxilato [*D*-Boc-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm (21)]:[60] En un matraz de fondo redondo se disolvió el Boc-^{Me}*N*-γ-Ach-OH (**20**) (1.00 g, 3.9 mmol) y (9-fluorenil)-metanol (918 mg, 4.68 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 40 mL). A continuación, se añadió DMAP (715 mg, 5.85 mmol), EDC·HCl (1.122 g, 5.85 mmol) y HOBt (790 mg, 5.85 mmol), y la mezcla resultante se agitó a ta. Transcurridas 4 h la mezcla se vertió en un embudo de decantación y se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5 %, 3 x 15 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillento que fue purificado mediante cromatografía rápida en gel de sílice (Isocrática: AcOEt/Hex (1:3)) para obtener 1.68 g de un sólido blanco cuyos datos espectroscópicos coinciden con los presentados en la bibliografía. [98%, R_f = 0.57 (AcOEt/hexano, 1:3)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 250 MHz, δ): 7.70 (d, *J*

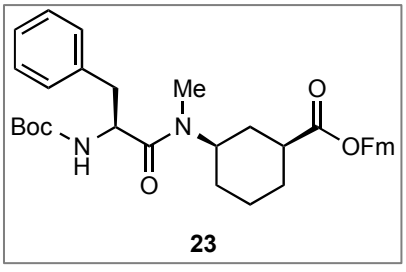
[61] Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. *R. Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.

= 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.53 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.38-7.21 (m, 4H, Ar), 4.36 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, $\underline{CH_2}$-Fm), 4.14 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.99 y 3.74 (m, 1H), 2.67 (s, 3H, <u>Me</u>N), 2.43 (m, 1H, Hα), 2.13-1.16 (m, 8H, alifáticos), 1.42 (s, 9H, <u>Boc</u>N).



22

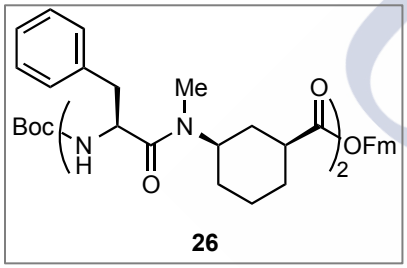
Boc-*L*-Lys(Z)-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-OFm (22): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 25 mL se disolvió *D*-Boc-γ-^{Me}*N*-Ach-OFm (**21**) (200 mg, 0.46 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 5 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. El residuo fue disuelto en CH_2Cl_2 (seco, 5 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-*L*-Lys(Z)-OH (210 mg, 0.55 mmol), *N*-HATU (209 mg, 0.55 mmol) y DIEA (0.48 mL, 2.76 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (40-50% AcOEt en hexano) que dio lugar a 230 mg del producto deseado en forma de espuma blanca. [72%, R_f = 0.56 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.45-7.27 (m, 9H, Ar), 5.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 5.08 (s, 2H, Bn) 4.94 (m, 1H, $H\alpha_{Lys}$), 4.62-4.35 (m, 3H, CH_{2Fm} y $H\gamma_{Ach}$), 4.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH_{Fm}), 3.28-2.98 (m, 2H, $H\delta_{Lys}$), 2.87 y 2.79 (s, 3H, NMe), 2.48 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 1.43 (s, 9H, Boc). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 174.7 (CO), 174.2 (CO), 171.9 (CO), 156.4 (CO), 155.6 (C), 143.7 (C), 141.3 (C), 128.4 (CH), 128.1 (C), 122.8 (C), 127.1 (CH), 124.9 (CH), 120.0 (CH), 79.6 (C), 66.6 (CH_2), 66.2 (CH_2), 65.8 (CH_2), 55.1 (CH), 51.7 (CH), 50.3 (CH), 49.8 (CH), 47.0 (CH), 42.5 (CH), 40.8 (CH_2), 33.1 (CH_2), 32.1 (CH_2), 31.4 (CH_2), 29.4 (CH_3), 28.9 (CH_2), 28.3 (CH_3), 24.3 (CH_2), 22.4 (CH_2). **EM (FAB$^+$)** [m/z, (%)]: 706 ([MH+Na]$^+$, 9), 684 ([MH]$^+$, 50), 584 ([MH-Boc]$^+$, 66). **EMAR (FAB$^+$) calculado** para $C_{40}H_{50}N_3O_7$ ([MH]+): 684.364877, **encontrado**: 684.365090.



23

Boc-*L*-Phe-*D*-^{Me}N-γ-Ach-OFm (23): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 25 mL se disolvió *D*-Boc-γ-^{Me}*N*-Ach-OFm (**21**) (424 mg, 0.975 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 10 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en la bomba de alto vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 10 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-*L*-Phe-OH (260 mg, 0.975 mmol), *N*-HATU (445 mg, 1.17 mmol) y DIEA (1.0 mL, 5.85 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x

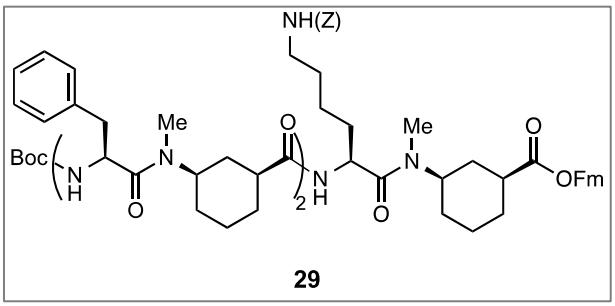
10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (25-50% AcOEt en hexano) que dio lugar a 450 mg del producto deseado en forma de espuma blanca. [78%, R_f = 0.55 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.76 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, Ar), 7.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.47-7.14 (m, 9H, Ar), 5.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH), 4.80 (td, *J* = 8.6, 5.8 Hz, 1H, $H\alpha_{Phe}$), 4.52-4.33 (m, 3H, CH_{2Fm} y $H\gamma_{Ach}$), 3.28 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.97 (m, 2H, $H\beta_{Phe}$), 2.71 y 2.46 (s, 3H, MeN), 1.42 (s, 9H, BocN) 2.04-1.05 (m, 8H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 174.7 (CO), 171.3 (CO), 154.9 (CO), 143.7 (C), 141.3 (C), 136.4 (C), 129.5 (CH), 128.4 (CH), 127.7 (CH), 127.1 (CH), 126.8 (CH), 124.9 (CH), 119.9 (CH), 79.6 (C) 66.1 (CH_2), 55.2 (CH), 51.9 (CH), 51.6 (CH), 46.9 (CH), 42.6 (CH), 42.4 (CH), 40.8 (CH_2), 40.5 (CH_2), 32.1 (CH_2), 31.4 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.1 (CH_3), 28.4 (CH_3), 24.3 (CH_2). **EM (FAB$^+$)** [m/z, (%)]: 583 ([MH]$^+$, 22), 483 ([MH-Boc]$^+$, 100). **EMAR (FAB$^+$) calculada** para $C_{36}H_{43}N_2O_5$ ([MH]+): 583.3172, **encontrada**: 583.3191.



26

Boc-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$]-OFm (26): Una disolución del dipéptido Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}N-Ach-OFm (**23**) (191 mg, 0.34 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1.6 mL) se trató con piperidina (0.8 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5 %, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4, se filtró y se concentró para obtener Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OH que se utilizó sin purificación adicional.

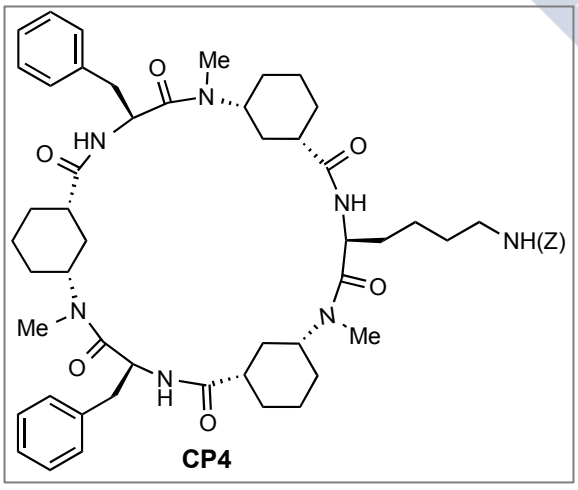
Una segunda disolución del dipéptido Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OFm (**23**) (190 mg, 0.34 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con TFA (1 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3 h. El dipéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL) y se trató con DIEA (220 µL, 1.28 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-*L*-Phe-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OH, DIEA (110 µL, 0.64 mmol) y *N*-HBTU (146 mg, 0.384 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5 %, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-3% MeOH en CH_2Cl_2), dando lugar a 260 mg del tetrapéptido en forma de espuma blanca. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 869.3 ([MH]$^+$, 100), 769.3 ([M-Boc]$^+$, 75). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{53}H_{65}N_4O_7$ ([MH]$^+$): 869.4848, **encontrado**: 869.4838.



29

Boc-[(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$-*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-γ-Ach]-OFm, (29): Una disolución del Boc-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$]-OFm (**26**) (140 mg, 0.16 mmol) en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 3 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, se trató con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró, obteniéndose el tetrapéptido desprotegido en su extremo *C*-terminal y que se usó sin purificación adicional.

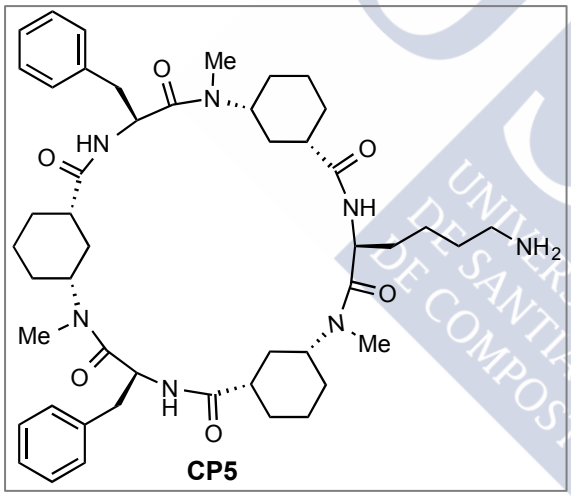
Una disolución del dipéptido Boc-*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-γ-Ach-OFm (**22**) (118 mg, 0.17 mmol) en una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL) y se agitó durante 30 min a ta. Pasado ese tiempo, la mezcla se concentró y el crudo resultante se secó durante 3 h a alto vacío. El dipéptido desprotegido en su extremo amino se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL) y se trató con DIEA (88 µL, 0.68 mmol). Posteriormente sobre esta disolución se añadió una disolución de Boc-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-γ-Ach-)$_2$]-OH, DIEA (44 µL, 0.34 mmol) y *N*-HBTU (71 mg, 0.187 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL). Transcurrida una hora de agitación bajo atmósfera inerte de Ar a ta, la disolución orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se concentró a vacío, obteniéndose un aceite que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-3% MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 240 mg del mencionado hexapéptido **29**. [88%, R_f = 3.1 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1292.7 ([M+Na]$^+$, 26), 657.4 ([M+Na]$^{2+}$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{75}H_{95}N_7O_{11}Na$ ([MNa]$^+$): 1292.6982, **encontrado**: 1292.6971.



CP4

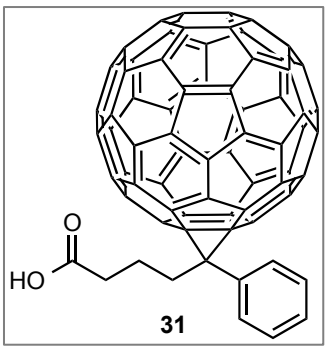
c-[*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-γ-Ach-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$], (CP4): El hexapéptido lineal Boc-[(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$-*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-γ-Ach-]-OFm (**29**) (100 mg, 0.079 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 4 mL) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se redisolvió en una mezcla de CH_2Cl_2 y TFA (1:1, 2 mL), y se dejó agitando durante 30 min. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 80 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió

sucesivamente *N*-TBTU (28 mg, 0.87 mmol) y DIEA (82 µL, 0.474 mmol). Pasadas 12 h agitando a ta, la mezcla se concentró a volumen reducido (20 mL), y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y Na_2CO_3 (saturada, 3 x 10mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-6% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 57 mg del ciclopéptido **CP4** en forma de sólido blanco. [74%, R_f = 0.22 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.75 (d solapados, *J* = 9.1 y *J* = 9.2 Hz, 0.80 H, NH_{Phe}), 8.68 (d solapados, *J* = 9.1 y *J* = 9.0 Hz, 0.75 H, NH_{Phe}), 8.60 (d solapados, *J* = 9.0 y *J* = 9.2 Hz, 0.5 H, NH_{Phe}), 8.42 (d, *J* = 9.4 Hz, 0.40 H, NH_{Lys}), 8.37 (d, *J* = 9.4 Hz, 0.35 H, NH_{Lys}), 8.24 (d, *J* = 9.4 Hz, 0.30 H, NH_{Lys}), 7.23 (m, 15 H, Ar), 5.28 (m, 2 H, $H\alpha_{Phe}$), 5.16-4.81 (m, 3 H; $H\alpha_{Lys}$ + $\underline{CH_2}$-Bn), 4.54 (m, 3 H, $H\gamma_{Ach}$), 3.14-2.70 (m, 9 H; 3 $H\alpha_{Ach}$+ 4 $H\beta_{Phe}$ + 2 $H\omega_{Lys}$), 2.99 (s, 3 H, MeN) 2.54-2.48 (s solapados, 6 H, MeN). EM (ESI) [m/z, (%)]: 996.6 ($[M+Na]^+$, 100), 974.6 ($[MH]^+$, 43). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{56}H_{75}N_7O_8$ ($[MH]^+$): 996.5569, **encontrado**: 996.5576. **FTIR** (298K, $CHCl_3$): 3302 (amida A), 1716, 1666, 1624 (amida I), 1525 cm^{-1} (amida II).



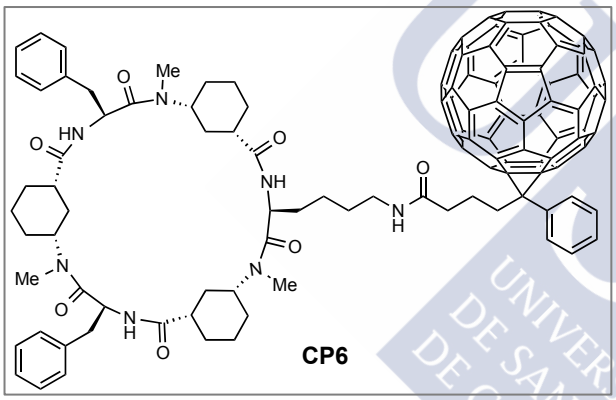
CP5

c-[*L*-Lys-^{Me}*N*-γ-Ach-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$], (CP5): Una disolución del péptido c-[*L*-Lys(Z)-^{Me}*N*-γ-Ach-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$] (**CP4**) (78.0 mg, 0.092 mmol) en una mezcla MeOH/CH_2Cl_2 (2:1, 4 mL), que se desgasificó durante 5 min, se trató con Pd/C (10%, 10 mg, 0.01 mmol) y se agitó a ta bajo atmósfera de hidrógeno generada por dos globos. Transcurridas 2 h, la mezcla resultante se filtró a través de celita, y el residuo se lavó con CH_2Cl_2 /MeOH (1:1). La disolución filtrada se concentró hasta sequedad, obteniéndose 40 mg del ciclopéptido en forma de sólido blanco. [95%, R_f = 0.05 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.75 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH_{Phe}), 8.69 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, NH_{Phe}), 8.24 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH_{Lys}), 7.20 (m, 10 H, Ar), 5.34 (m, 2 H, $H\alpha_{Phe}$), 4.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, $H\alpha_{Lys}$), 4.53 (m, 3 H, $H\gamma_{Ach}$), 3.15-2.74 (m, 9 H; 2 $H\beta_{Phe}$ + 4 $H\omega_{Lys}$ + 3 $H\alpha_{Ach}$), 2.98 (s, 3 H, MeN), 2.51 (s, 3 H, MeN), 2.50 (s, 3 H, MeN). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 840.5 ($[MH]^+$, 100), 420.8 ($[MH]^{2+}$, 19). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{48}H_{70}N_7O_6$ ($[M+H]^+$): 840.5382, **encontrado**: 840.5398. **FTIR** (298 K, $CHCl_3$): 3301 (amida A), 1662, 1623 (amida I), 1530 cm^{-1} (amida II).

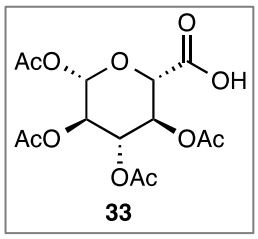


31

Ácido [6,6]-fenilC_{61} butanoico (PCBA, 31): Una suspensión del éster [6,6]-fenilC_{61} butanoato de metilo (PCBM, **30**) (500 mg, 0.55 mmol) en tolueno (85 mL) se agito y sonicó durante 15 min a ta. A continuación, se añadió ácido acético glacial (50 mL) y HCl (concentrado, 20 mL) y la mezcla se agitó a reflujo durante 20 h. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se concentró a vacío, y el residuo obtenido se suspendió en Et_2O (25 mL), se centrifugó y se decantó, y se repitió el proceso suspendiendo el residuo en tolueno (25 mL) y de nuevo en Et_2O (25 mL). El sólido resultante se secó a vacío a 70 °C durante 16 h, obteniéndose 462 mg del producto deseado **31** como un sólido marrón. [96%, R_f = 0.51 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (MALDI)** [m/z]: 859.08 ($[MH]^+$). **EMAR (MALDI-TOF) calculado** para $C_{71}H_{11}O_2$ ($[MH]^+$): 895.0759; **encontrado**: 895.0822.

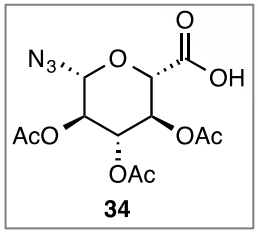


c-[*L*-Lys(PCBA)-^{Me}*N*-γ-Ach-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$], (CP6): Se disolvió PCBA (**31**) (43 mg, 0.04 mmol) en $CDCl_3$ (1 mL) y se sonicó durante 15 min bajo atmósfera de Ar. Entonces, se añadieron *N*-HATU (18.3 mg, 0.048 mmol) y DIEA (41 μL, 0.24 mmol) y se agitó durante 10 min. Pasado ese tiempo, se añadió el péptido c-[*L*-Lys-^{Me}*N*-γ-Ach-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-)$_2$], (**CP5**) (40 mg, 0.04 mmol) y se agitó durante 1 hora a ta bajo atmósfera de Ar. Transcurrido ese tiempo, se concentró la disolución orgánica, se redisolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y Na_2CO_3 (saturada, 3 x 5mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El sólido marrón obtenido se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (5% MeOH en CH_2Cl_2) seguida de una cromatografía rápida en gel de sílice (3-8% MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 49 mg del péptido **CP6** como un sólido marrón [78%, R_f = 0.35 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.85-8.59 (m, 2H, NH_{Phe} + NH_{Lys}), 8.44 (d, *J* = 9.6 Hz, 0.25 H, NH_{Phe}), 8.42 (d, *J* = 9.5 Hz, 0.25 H, NH_{Phe}), 8.29 (d, *J* = 9.4 Hz, 0.5 H, NH_{Lys}), 7.92 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H, Ar_{PCBA}), 7.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, Ar_{PCBA}), 7.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H, Ar_{PCBA}), 7.28-7.09 (m, 10 H, Ar_{Phe}), 6.40 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.5 H, $NH\varepsilon_{Lys}$), 5.71 (t solapados, *J* = 6.5 y 6.1 Hz, 0.5 H, $NH\varepsilon_{Lys}$), 5.36 (m, 2 H, $H\alpha_{Phe}$), 4.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, $H\alpha_{Lys}$), 4.53 (m, 3 H, $H\gamma_{Ach}$), 3.15-2.74 (m, 9 H; 4 $H\beta_{Phe}$ + 2 $H\omega_{Lys}$ + 3 $H\alpha_{Ach}$), 2.98 (s, 3H, MeN), 2.51 (s, 3H, MeN), 2.50 (s, 3H, MeN). **EM (MALDI)** [m/z, (%)]: 1719.5 ($[MH]^+$, 100), 1742.6 ($[MNa]^+$, 36). **EMAR (MALDI-TOF) calculado** para $C_{119}H_{79}N_7O_7$ ($[MH]^+$): 1718.6074 **encontrado**: 1719.5831. **FTIR** (298 K, $CHCl_3$): 3302 (amida A), 1666, 1623 (amida I), 1529 cm^{-1} (amida II).



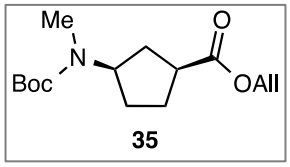
33

Ácido 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucurónico (33): [206] Una suspensión de ácido *D*-glucurónico (**32**) (4.0 g, 20.6 mmol) en anhídrido acético (50 mL) enfriada a 0 °C, se trató I_2 (adición lenta, 260 mg, 1.1 mmol), y la mezcla resultante se agitó durante 2 h a 0 °C y una hora a ta. Transcurrido ese tiempo, se enfrió el matraz a 0 °C y se añadió mediante el goteo de un embudo de adición compensada MeOH (20 mL) y se agitó durante 18 h a ta. La mezcla resultante se concentró a vacío y el aceite obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 (70 mL) y se lavó con unas disoluciones acuosas de $Na_2S_2O_3$ (1 M, 3 x 50 mL) y salmuera (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4, se filtraron y concentraron para obtener un sólido blanco, que se disolvió en una mezcla Et_2O/$CHCl_3$/hexano (1:1:1, 50 mL) y se concentró la disolución para obtener una espuma blanca, que se redisolvió en Et_2O (100 mL), se filtró y concentró. Por último, el residuo obtenido se cristalizó en una mezcla AcOEt/hexano (1:1) para dar 6.4 g del producto deseado en forma de sólido blanco, cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los publicados en la bibliografía. [85%, R_f = 0.64 (MeOH)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 6.33 (brs, 1H), 5.71 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.30-5.05 (m, 3H), 4.16 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.01-1.91 (m, 9H).



34

Ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetil-1-acido-1-deoxi-β-glucopiranurónico [*L*-N_3-$(Ac)_3$Aga-OH, (34)]:[206] En un matraz de fondo redondo se disolvió el compuesto (**33**) (1.0 g, 2.8 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 20 mL), se trató con $TMSN_3$ (960 µL, 6.9 mmol), $SnCl_4$ (1 M en heptano, 1.40 mL, 1.4 mmol) y se agitó durante 18 h a ta bajo atmósfera de Ar. Transcurrido ese tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 (15 mL) y se lavó con una disolución acuosa de $Na_2S_2O_3$ (1 M, 3 x 15 mL), se secó con Na_2SO_4 se filtró y concentró para dar 780 mg del compuesto **31** como una espuma blanca, cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los ya publicados. [82%, R_f = 0.59 (10% MeOH + 1% AcOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 9.07 (brs, 1H), 5.32-5.12 (m, 2H), 4.92 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.13 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H).

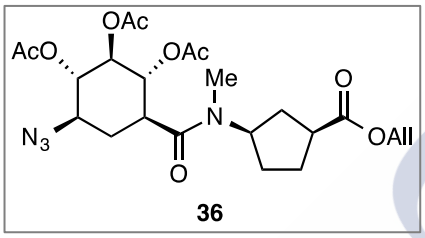


35

Alil (1*S*,3*R*)-3-((*t*-butoxicarbonil)(metil)amino)ciclopentano-1-carboxilato [Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (35)]: En un matraz de fondo redondo se disolvió el compuesto Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH (**6**) (1.00 g, 4.12 mmol) en 2-propen-1-ol (seco, 40 mL) y se añadió DCC (1.70 g, 8.24 mmol) y DMAP (100.0 mg, 0.82 mmol) y se agitó a ta durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró el disolvente, se redisolvió en CH_2Cl_2 (40 mL) y se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 15 mL) y $NaHCO_3$ (saturado, 3 x 15

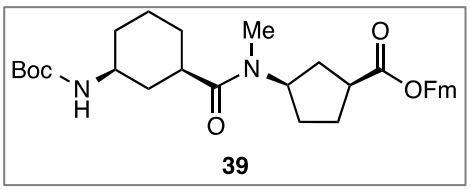
[206] J. P. Malkinson, R. A. Falconer y I. Toth, *J. Org. Chem.* 2000, **65**, 5249–5252.

mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (10-30% AcOEt en hexano) para obtener 986 mg del compuesto deseado como un aceite transparente. [84%, R_f = 0.85 (50% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 250 MHz, δ): 5.86 ppm (ddt, *J* = 17.2, 10.4 y 5.7 Hz, 1H), 5.25 ppm (dq, *J* = 17.2 y 1.5 Hz, 1H), 5.18 ppm (dq, *J* = 10.4 y 1.3 Hz, 1H), 4.52 (ddt, *J* = 5.4, 2.6, 1.4 Hz, 3H), 2.76 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 62.9 MHz, δ): 179.9 (CO), 156.2 (CO), 132.6 (CH), 118.4 (CH_2), 79.7 (C), 65.5 (CH_2), 56.0 (CH), 42.6 (CH_2), 41.6 (CH), 32.2 (CH_3), 29.2 (CH_2), 28.7 (CH_3), 27.6 (CH_2). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 306.1 ([MNa]$^+$, 20). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{15}H_{25}NO_4Na$ ([MNa]$^+$): 306.1676, **encontrado**: 306.1664.



36

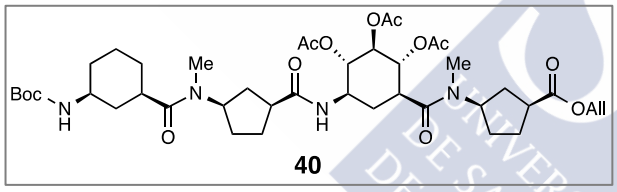
N_3-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (36): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 25 mL se disolvió Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OAll (**35**) (280 mg, 0.99 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 10 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. El residuo fue redisuelto en CH_2Cl_2 (seco, 5 mL) bajo atmósfera de Ar y se trató con DIEA (691 µL, 1.98 mmol) y una disolución de N_3-Aga$(Ac)_3$-OH (**26**) (345 mg, 1.00 mmol), *N*-HATU (451 mg, 3.96 mmol) y DIEA (346 µL, 1.98 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 5 mL). Después de 45 min de agitación a ta, la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar una espuma amarilla que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (40-60 % AcOEt en hexano) que dio lugar a 405 mg del dipéptido **36** deseado en forma de espuma blanca. [80%, R_f = 0.46 (2% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 250 MHz, δ): 5.85 (m, 1H), 5.45 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.32-5.05 (m, 3H), 4.92 (td, *J* = 9.1 y 4.0 Hz, 1H), 4.67 (dd, *J* = 8.6 y 6.7 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.41-4.21 (m, 2H), 2.92-2,79 (2s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.90 (s, 3H). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 62.9 MHz, δ): 175.8 (CO), 170.5 (CO), 169.3 (CO), 169.0 (CO), 164.8 (CO), 132.3 (CH), 118.5 (CH_2), 74.1 (CH), 73.7 (CH), 70.5 (CH), 69.2 (CH), 65.5 (CH_2), 55.0 (CH), 41.6 (CH), 32.7 (CH_2), 31.4 (CH_2), 29.3 (CH_3), 27.2 (CH_2), 20.8 (3xCH_3). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 511.2 ([MH]$^+$, 100)]. **EMAR (FAB+) calculado** para $C_{22}H_{31}N_4O_{10}$ ([MH]$^+$): 511.2040, **encontrado**: 511.2053.



39

Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OFm (39): En un matraz de fondo redondo se disolvió Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OFm (**7**) (250 mg, 0.59 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 6 mL) y se agitó a ta durante 25 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el crudo obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. El crudo se redisolvió

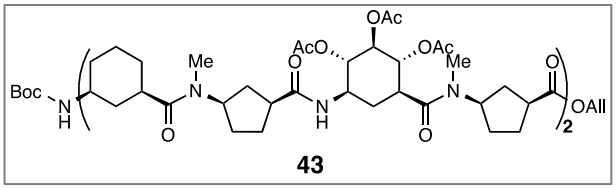
en CH_2Cl_2 (seco, 3 mL) bajo atmósfera de Ar y se trató con DIEA (410 µL, 2.36 mmol) y una disolución de Boc-*L*-γ-Ach-OH (**19**) (158 mg, 0.65 mmol), *N*-HATU (270 mg, 0.71 mmol) y DIEA (200 µL, 1.18 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 3 mL). Después de 45 min de agitación a ta, la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron dando lugar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (20-40% AcOEt en hexano) que dio lugar a 267 mg del dipéptido **39** deseado en forma de espuma blanca. [83%, R_f = 0.55 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz, δ): 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 5.03 (m, 1H), 4.63-4.47 (m, 4H), 4.24 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.53 (m, 1H), 2.85 (s, 3H), 1.47 (s, 9H). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 62.9 MHz, δ): 175.9 (CO), 175.2 (CO), 155.3 (CO), 143.8 (C), 141.5 (C), 127.9 (CH), 127.2 (CH), 125.0 (CH), 120.1 (CH), 79.3 (C), 66.1 (CH_2), 57.5 (CH), 53.7 (CH), 49.2 (CH), 47.1 (CH), 41.7 (CH), 40.4 (CH), 39.9 (CH) 35.9 (CH_2) 33.0 (CH_2) 31.4 (CH_2), 29.3 (CH_3), 29.0 (CH_2), 28.5 (CH_3), 28.5 (CH_2), 28.3 (CH_2), 27.7 (CH_2), 27.2 (CH_2). **EM (FAB$^+$)** [m/z, (%)]: 569.3 ([MNa]$^+$, 5), 547.3 ([MH]$^+$, 39), 447.2 ([MH-Boc]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{33}H_{43}N_2O_5$ ([MH]$^+$): 547.3172, **encontrado**: 547.3165.



40

Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (40): Una disolución del dipéptido Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OFm (**39**) (250 mg, 0.46 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 4.0 mL) se trató con piperidina (1.0 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5 %, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4, se filtró y se concentró para obtener Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH que se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

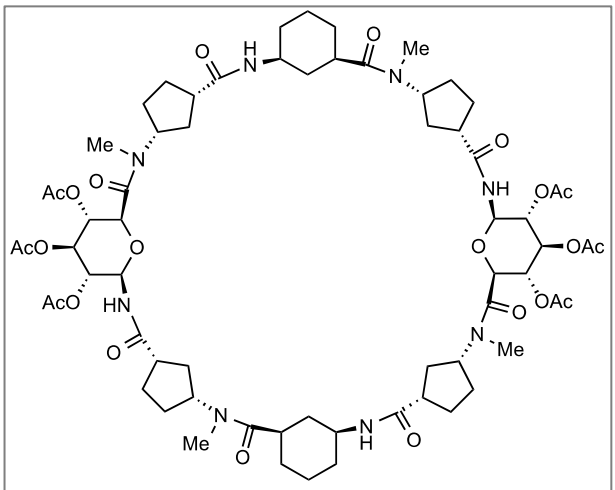
En un matraz de fondo redondo se disolvió el N_3-*L*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (**36**) (256 mg, 0.5 mmol) en THF (seco, 3 mL) bajo atmósfera de argón a -55 °C, se trató con tri-*n*-butilfosfina (140 µL, 0.55 mmol) y se agitó durante 30 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se añadió una disolución de Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH, DIC (94 µL, 0.6 mmol), HOBt (81 mg, 0.6 mmol) en THF (seco, 3 mL), y se agitó durante doce h mientras que se aumentó lentamente la temperatura hasta ta. A continuación, se concentró el disolvente y se redisolvió el crudo en CH_2Cl_2 (10 mL) y se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-3% MeOH en CH_2Cl_2) para dar 230 mg del producto deseado **40** como una espuma amarillenta. [60%, R_f = 0.33 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (FAB$^+$)** [m/z, (%)]: 835.5 ([MH]$^+$, 15), 735.5 ([MH-Boc]$^+$, 100). **EMAR (FAB+) calculado** para $C_{41}H_{63}N_4O_{14}$ ([MH]$^+$): 835.4341, **encontrado**: 835.4327.



43

Boc-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$]-OAll (43): En un matraz de fondo redondo se disolvió una fracción del tetrapéptido **40** (150 mg, 0.18 mmol) en THF (seco, 2.6 mL) y se trató con morfolina (159 µL, 1.8 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (20.8 mg, 0.018 mmol) y se agitó bajo atmósfera de Ar durante 2 h a ta. Transcurrido ese tiempo, se concentró el THF y se redisolvió el crudo en CH_2Cl_2 (5 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (3-8% de MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 130 mg de Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH.

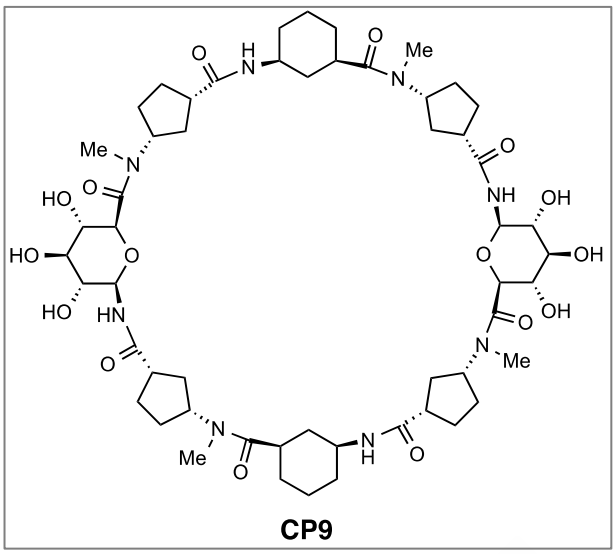
Otra fracción del péptido **40** (130 mg, 0.16 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (1 mL) y se trató con TFA (1 mL). Después de 30 min de agitación, se eliminó el disolvente y el crudo obtenido se secó durante 3h en alto vacío. Transcurrido ese tiempo, se redisolvió el crudo en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (112 µL, 0.65 mmol) y una disolución de Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OH (130 mg, 0.16 mmol), *N*-HATU (75 mg, 0.196 mmol) y DIEA (56 µL, 0.35 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) bajo atmósfera de Ar. La mezcla resultante se agitó durante 1 h a ta, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-7% de MeOH en CH_2Cl_2) para dar 175 mg del octapéptido **43** como una espuma amarillenta. [70%, R_f = 0.30 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (FAB$^+$)** [m/z, (%)]: 1512.8 ($[MH]^+$, 1), 756.9 ($[MH]^{2+}$, 15), 756.4 ($[MH]^{2+}$, 18), 706.9 ($[MH\text{-}Boc]^{2+}$, 25). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{74}H_{112}N_8O_{25}$ ($[MH]^{2+}$): 756.3864, **encontrada**: 756.3861.



CP8

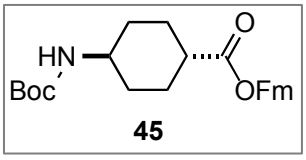
***c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] (CP8):** El octapéptido lineal **43** (90.0 mg, 59.6 µmol) se disolvió en THF (seco, 1 mL) bajo atmósfera de Ar y se trató con $Pd(PPh_3)_4$ (7.0 mg, 6.0 µmol) y morfolina (53 µL, 0.6 mmol) durante 2 h a ta. Transcurrido ese tiempo, se concentró el THF y el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (2 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío obteniéndose un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (3-8% de MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 75 mg de **Boc-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$]-OH**. [85%, *Rf* = 0.20 (5% MeOH/CH_2Cl_2)]

El péptido desprotegido en su extremo ácido se disolvió en una mezcla de CH_2Cl_2 y TFA (1:4, 2 mL), y se dejó agitando durante 30 min. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 60 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (26 mg, 68.5 µmol) y DIEA (60 µL, 0.336 mmol). Pasadas 12 h, la mezcla se concentró a volumen reducido (10 mL), y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y Na_2CO_3 (saturada, 3 x 10mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (Phenomenex Luna 5µ sílica, 5-10% MeOH/CH_2Cl_2, tr = 25 min) para obtener 16 mg del ciclopéptido **CP8** en forma de sólido blanco (25%). **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 9.01 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, NH_{Aga}), 7.47 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH_{Ach}), 5.45 (m, 2H, $H\gamma_{Aga}$ y $H\phi_{Aga}$), 5.32 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, $H\varepsilon_{Aga}$), 5.21 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, $H\delta_{Aga}$), 4.76 (m, 2H, $H\gamma_{Acp}$), 4.48 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, $H\alpha_{Aga}$), 3.95 (m, 1H, $H\gamma_{Ach}$), 3.01 (s, 3H, MeN), 2.94 (s, 3H, MeN), 2.82 (m, 1H, $H\alpha_{Ach}$), 2.69 (m, 2H, $H\alpha_{Acp}$), 1.98 (s, 3H, AcO), 1.97 (s, 3H, AcO), y 1.95 (s, 3H, AcO). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 126.0 MHz, δ): 175.9 (CO), 175.5 (CO), 173.9 (CO), 170.2 (CO), 169.3 (CO), 168.7 (CO), 165.9 (CO), 78.3 (CH), 73.5 (CH), 72.0 (CH), 70.7 (CH), 70.6 (C), 55.1 (CH), 54.4 (CH), 46.7 (CH), 43.1 (CH), 42.7 (CH), 40.4 (CH), 36.0 (CH_2), 32.3 (CH_2), 31.1 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.4 (CH_3), 29.3 (CH_3), 28.2 (CH_2), 28.1 (CH_2), 27.9 (CH_2), 27.6 (CH_2), 26.3 (CH_2), 24.8 (CH_2), 20.6 y 20.5 (3xCH_3). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1375.6 ([MH+Na]$^+$, 4), 1354.8 ([MH]$^+$, 5), 677.5 ([MH]$^{2+}$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{68}H_{97}N_8O_{22}$ ([MH]$^+$)**:** 1353.6717, **encontrado**: 1353.6713. **FTIR** (293 K, $CHCl_3$): 3321 y 3276 (amida A), 1639, 1626 (amida I), 1534 cm^{-1} (amida II$_{II}$).



CP9

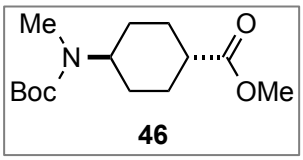
***c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] (CP9):** Una disolución del ciclopéptido **CP8** (3.0 mg, 2.2 µmol) en MeOH (400 µL) se trató con una disolución comercial de NH_3 acuoso (28%, 100 µL) y se agitó durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró el disolvente, y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa [Phenomenex Luna 5µ C18, 5% a 40% ACN/H_2O (0.1%TFA)] para obtener 2.2 mg del producto deseado como un sólido blanco (90%). **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$/DMSO-*d_6* (7:3), 500 MHz, δ): 8.53 (m, 2H, NH_{Aga}), 7.90 (m, 2H, NH_{Ach}), 5.05 (m, 2H, $H\gamma_{Aga}$), 4.81 (brs, 6H; $H\gamma_{Acp2}$ + OH_{Aga}), 4.73 (brs, 2H, $H\gamma_{Acp1}$), 4.61 (brs, 2H, OH_{Aga}), 4.21 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H $H\alpha_{Aga}$), 3.82 (s, 2H ($H\gamma_{Ach}$)), 3.62 (brs, 2H, $H\phi_{Aga}$), 3.46 (brs, 2H, $H\varepsilon_{Aga}$), 3.40 (s, 2H, H, $H\delta_{Aga}$), 2.95 (s, 6H, MeN), 2.88 (s, 6H, MeN), 2.86 (s, 2H, $H\alpha_{Acp1}$), 2.75 (s, 2H, $H\alpha_{Acp2}$), 2.65 (s, 2H, $H\alpha_{Ach}$). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1123.5 ([MNa]$^+$, 4), 1101.6 ([MH]$^+$, 8), 551.4 ([MH]$^{2+}$, 50). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{54}H_{85}N_8O_{16}$ [MH]$^+$: 1101.6084, **encontrado**: 1101.6069. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3433 y 3311 (amida A), 1676, 1620 (amida I), 1545 cm^{-1} (amida II$_{II}$).



45

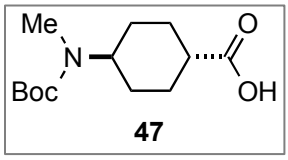
(9*H*-fluoren-9-il)metil(*trans*)-4-[(*t*-butoxicarbonil)amino] ciclohexano-1-carboxilato [Boc-δ-Ach-OFm (45)]: En un matraz de fondo redondo se disolvió el Boc-δ-Ach-OH (**44**) (1.00 g, 4.11 mmol) y (9-fluorenil)-metanol (0.966 g, 4.9 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 40 mL). A continuación, se añadió DMAP (745 mg, 6.17 mmol), EDC·HCl (1.183 mg, 6.17 mmol) y HOBt (834 mg, 6.17 mmol), y la mezcla resultante se agitó a ta. Transcurridas 4 h la mezcla se vertió en un embudo de decantación y se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 20 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillento que fue purificado mediante cromatografía rápida en gel de sílice en columna (Isocrático, 25% de AcOEt/hexano) para obtener 1.41 g de un sólido blanco. [82%, R_f = 0.7 (50% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 4.42 (m, 3H, CH_2 Fm y $H\delta_{\delta Ach}$), 4.18 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH Fm), 3.40 (m, 1H, $H\delta_{\delta Ach}$), 2.24 (tt, *J* = 12.0, 3.5 Hz, 1H, $H\alpha_{\delta Ach}$), 1.45 (s, 9H, Boc), 2.11-1.89 (m, 4H, alifáticos), 1.57-1.1 (m, 4H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 175 ($\underline{C}O_2$, Fm), 155.6 ($\underline{C}O_2$, ^{t}Bu), 143.8 (C, Ar), 141.3 (C, Ar), 127.8 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 120 (CH, Ar), 79.2 (C-(CH_3)$_3$, BOC), 66.1 (CH_2, Fm), 48.9 (CH, $C\delta_{Ach}$), 47.0 (CH, Fm), 42.4 (CH, $C\alpha_{\delta Ach}$), 32.4 (CH_2, Alifático), 28.4 (C-($\underline{C}H_3$)$_3$, BOC), 27.7 (CH_2, alifático). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 444.2 ([MH]$^+$,

100), 388.1 ([MH-^{t}Bu]$^+$, 10). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{26}H_{31}NNaO_4$ ([MNa]$^+$) 444.2145, **encontrada**: 444.2147.



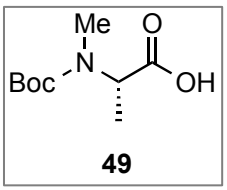
46

Metil-(*trans*)-4-[(*t*-butoxicarbonil)(metil)amino]-ciclohexano -1-carboxilato [Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OMe, 46]: En un matraz de fondo redondo se disolvió el ácido (*trans*)-4-[(*t*-butoxicarbonil)amino]-ciclohexano-1-carboxílico (**44**) (1.00 g, 4.11 mmol) en DMF (seco, 30 mL) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua. Pasados 10 min se añadió NaH (60% en peso, 0.493 g, 12.33 mmol) observándose la aparición de turbidez en la reacción. Pasados 30 min se retiró el baño de hielo-agua, se añadió MeI (0.76 mL, 1.74 g, 12.33 mmol) y se agitó durante 12 h. Pasado ese tiempo, se volvió a enfriar la mezcla de reacción en un baño de hielo-agua, y el exceso de NaH se eliminó mediante la adición lenta de agua. A continuación, se concentró hasta sequedad obteniéndose un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice en columna (isocrático, 20% de AcOEt en hexano) para obtener 1.07 g del Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OMe como un aceite transparente. [96%, R_f = 0.55 (25% AcOEt/Hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 3.84 (m, 1H, Hδ$_{δAch}$), 3.58 (s, 3H, O<u>Me</u>), 2.64 (s, 3H, N<u>Me</u>), 2.12 (m, 1H, Hα$_{δAch}$), 2.03-1.3 (m, 8H, alifáticos), 1.37 (s, 9H, Boc). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 175.6 (CO, <u>C</u>O$_2$Me), 155.4 (CO, <u>C</u>O$_2$^{t}Bu), 79.1 (C, <u>C</u>-(CH$_3$)$_3$ BOC), 53.1 (CH, Cδ$_{δAch}$), 51.4 (CH$_3$, CO$_2$<u>Me</u>), 42.3 (Cα, δ$_{Ach}$), 28.89 (N<u>Me</u>), 28.3 (C-(<u>C</u>H$_3$)$_3$ (BOC) y CH$_2$ (alifático)), 28.2 (CH$_2$, alifático). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 294.2 ([M+Na]$^+$, 100), 238.1 ([MH-OMe]$^+$, 60). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{14}H_{25}NNaO_4$: 294.1676, **encontrado**: 294.1676.



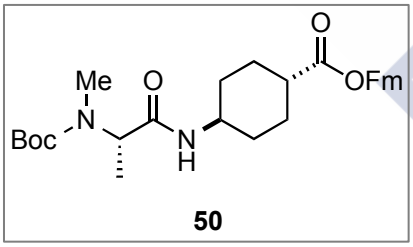
47

Ácido (*trans*)-4-[(*t*-butoxicarbonil)(metil)amino]-ciclohexano-1-carboxílico [Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH, 47]: Una disolución de Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OMe (**46**) (600 mg, 2.21 mmol) en una mezcla MeOH/H_2O (3:1, 20 mL) se trató con LiOH (258 mg, 11.1 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró el metanol, la fase acuosa se acidificó hasta pH 3 y se lavó con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con $NaHCO_3$ anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad para obtener 560 mg del compuesto **47** como un sólido blanco [98%, R_f = 0.4 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 3.93 (m, 1H, Hδ$_{δAch}$), 2.72 (s, 3H, N<u>Me</u>), 2.22 (m, 1H, Hα$_{δAch}$), 2.14-1.4 (m, 8H, alifáticos), 1.45 (s, 9H, Boc). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 181.2 (C, <u>C</u>O$_2$H), 155.6 (C, <u>C</u>O$_2$^{t}Bu), 79.5 (C, <u>C</u>-(CH$_3$)$_3$, BOC), 53.0 (CH, Cδ$_{δAch}$), 42.2 (CH, Cα$_{δAch}$), 28.9 (CH$_2$, alifático), 28. (C-(<u>C</u>H$_3$)$_3$, (BOC) + CH$_3$, <u>Me</u>N), 28.1 (CH$_2$, alifático)). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 280.2 ([MH+Na]$^+$, 100), 156.1 ([MH-Boc]$^+$, 54). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{13}H_{23}NNaO_4$ ([MNa]$^+$): 280.1519, **encontrado**: 280.1522.



49

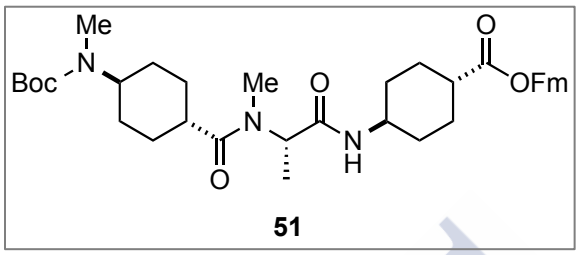
***N-t*-butoxicarbonil-*N*-metil-*L*-Alanina [Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-OH, 49]**: En un matraz de fondo redondo se disolvió la Boc-*L*-Ala-OH (**48**) (1.00 g, 5.29 mmol) en THF (seco, 50 mL) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua. Pasados 10 min se añadió NaH (60% en peso, 0.635 g, 15.87 mmol) observándose la aparición de turbidez en la reacción. Pasados 30 min se retiró el baño de hielo-agua, se añadió MeI (0.983 mL, 2.237 g, 15.87 mmol) y se agitó durante 12 h. Entonces se volvió a enfriar la mezcla de reacción en un baño de hielo-agua, y el exceso de NaH se eliminó mediante la adición lenta de agua. A continuación, se concentró el THF y la fase acuosa se lavó con éter para eliminar el exceso de MeI. Después se acidificó hasta pH 3 y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró, obteniéndose 1.02 g de Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-OH como aceite transparente que se empleó en el siguiente paso sin purificación adicional. [95%, R_f = 0.25 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN:** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 10.73 (s, 1H, COOH), 4.82 y 4.41 (2 d, 1H, Hα_{Ala}), 2.83 y 2.78 (2 s, 3H, MeN), 1.40 (s, 9H, Boc), 1.37 (s, 3H, CH_3 cadena lateral). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 177.5 (C, COOH), 156.2 y 155.4 (C, $CO_2{}^t$Bu), 80.7 y 80.4 (C, C-$(CH_3)_3$, BOC), 54.9 y 53.6 (CH, Cα_{Ala}), 31.3 y 30.5 (CH_3, NMe), 28.3 (CH_3, C(CH_3)$_3$ Boc), 15.0 y 14.5 (CH_3, cadena lateral Ala). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 226.1 ([MH+Na]$^+$, 14), 126.0 ([M-Boc+Na]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_9H_{17}NNaO_4$ ([MNa]$^+$): 226.1050, **encontrada**: 226.1049.



50

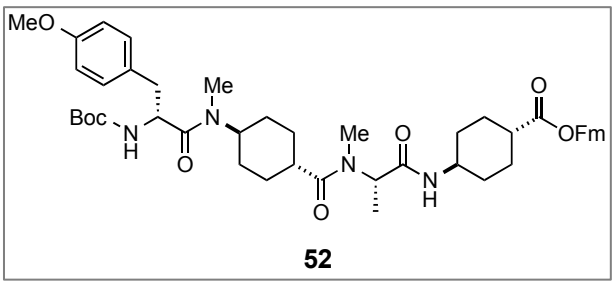
Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (50): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 25 mL se disolvió Boc-δ-Ach-OFm (**45**) (400 mg, 0.95 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 10 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 10 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-*L*-^{Me}N-Ala-OH (**49**) (192.9 mg, 0.95 mmol), *N*-HATU (398 mg, 1.045 mmol) y DIEA (0.975 µL, 5.7 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la disolución se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (25-40% AcOEt en hexano), obteniéndose 386 mg del dipéptido **50** deseado como una espuma blanca. [80%, R_f = 0.28 (40% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN:** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.60 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ar), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.34 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 2H, Ar), 4.65 (m, 1H, Hα_{Ala}), 4.44 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH_2 OFm), 4.21 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH OFm), 3.73 (m, 1H, Hδ (δ-Ach)), 2.78 (s, 2H, MeN$_{Ala}$), 2.28 (tt, *J* = 12.0, 3.5 Hz, 1H, H$\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 2.06-1.90 (m, 4H, alifáticos), 1.59-1.49 (m, 2H, alifáticos), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, Me cadena lateral Ala), 1.22-1.06 (m, 2H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 126 MHz, δ): 175.08 (C, CO), 170.66 (C, CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 143.75 (C, Ar) 141.33 (C, Ar),

127.79 (CH, Ar), 127.09 (CH, Ar), 124.92 (CH, Ar), 120.03 (CH, Ar), 80.62 (C, CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 66.12 (CH_2, OFm), 53.44 (CH, $C\alpha_{Ala}$), 47.53 (CH, $C\delta_{\delta\text{-Ach}}$), 46.69 (CH, OFm), 42.43 (CH, $C\alpha_{\delta\text{-Ach}}$), 32.12 ($CH_2$, alifáticos), 32.00 ($CH_2$, alifáticos), 28.41 ($CH_3$, CO-C-($CH_3$)$_3$ BOC), 27.60 (CH_2, alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 529.3 ($[MH+Na]^+$, 79), 507.3 ($[MH]^+$, 33), 407.3 ($[MH\text{-Boc}]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado para** $C_{30}H_{38}N_2O_5$: 507.2853, **encontrada**: 507.2875.



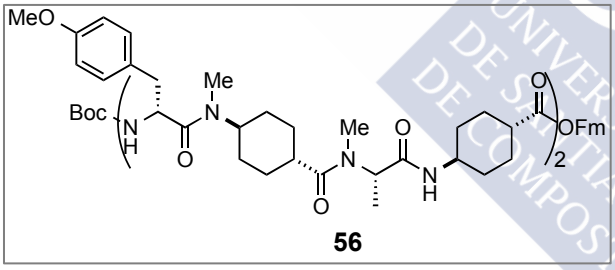
51

Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (51): En un matraz de fondo redondo se disolvió el dipéptido **50** (221 mg, 0.43 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 5 mL) y se agitó a ta durante 15 min. A continuación, se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. Transcurrido ese tiempo, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 3 mL) y se trató con DIEA (290 µL, 1,72 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**) (121.6 mg, 0.473 mmol), DIEA (150 µL, 0.473 mmol) y *N*-HATU (196.2 mg, 0.473 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 3 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-2 % MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 275 mg del tripéptido en forma de espuma blanquecina. [99%, R_f = 0.4 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN:** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar), 7.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.25 (m, 2H, Ar), 6.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.06 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, $H\alpha_{Ala}$), 4.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, $\underline{CH_2}$ OFm), 4.12 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, $\underline{CH}$ Fm), 4.10-3.80 (m, 1H, $H\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 3.65 (m, 1H, $H\delta_{\delta\text{-}Ach}$), 2.93 (s, 3H, $N\underline{Me}_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 2.74 (s, 3H, $N\underline{Me}_{Ala}$), 2.42 (m, 1H, $H\alpha_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 2.26 (m, 1H, $H\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 2.06-1.50 (m, 10H alifáticos), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, Me cadena lateral Ala), 1.20-1.00 (m, 2H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 176.3(CO), 175.0(CO), 170.2 (CO), 155.5 (CO), 143.7 (C, Ar), 141.3 (C, Ar), 127.7 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 119.9 (CH, Ar), 79.3 (C, CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 66.0 (CH_2, OFm), 53.5 (CH, $C\alpha_{Ala}$), 51.3 (CH, $C\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 47.3 (CH, $\delta_{\delta\text{-}Ach}$), 46.9 (CH, FM), 42.3 (CH, $C\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 40.1 (CH, α(^{Me}N-δ-Ach)), 38.5 (N-$\underline{C}H_3$, ^{Me}N-Ala), 31.91 (CH_2, alifático), 31.76 (CH_2, alifático), 30.1 (CH_3, $MeN_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 29.03 ($CH_2$, alifático), 28.45 ($CH_3$, CO-C-($\underline{C}H_3$)$_3$ BOC), 28.31 (CH_2, alifático), 28.16 (CH_2, alifático), 27.54 (CH_2 alifático), 13.10 (CH_3, cadena lateral Ala). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 646.4 ($[MH]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado para** $C_{38}H_{52}N_3O_6$ ($[MH]^+$): 646.3851, **encontrado**: 646.3851.



52

Boc-*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (52): En un matraz de fondo redondo se disolvió el tripéptido **51** (142 mg, 0.22 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 4 mL) y se agitó a ta durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL) y se trató con DIEA (0.075 µL, 0.86 mmol) y se añadió una disolución de Boc-*D*-Tyr(Me)-OH (171.5 mg, 0.242 mmol), DIEA (0.075 µL, 0.0.44 mmol) y *N*-HATU (100.4 mg, 0.264 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-2% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 180 mg del tetrapéptido **52** en forma de espuma blanquecina. [82%, R_f = 0.33 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 845.5 ([MH+Na]$^+$, 100) 823.5 ([MH]$^+$, 88), 723.4 ([MH-Boc]$^+$, 41). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{48}H_{63}N_4O_8$ ([MH]$^+$): 823.4640, **encontrado**: 823.4642**.**

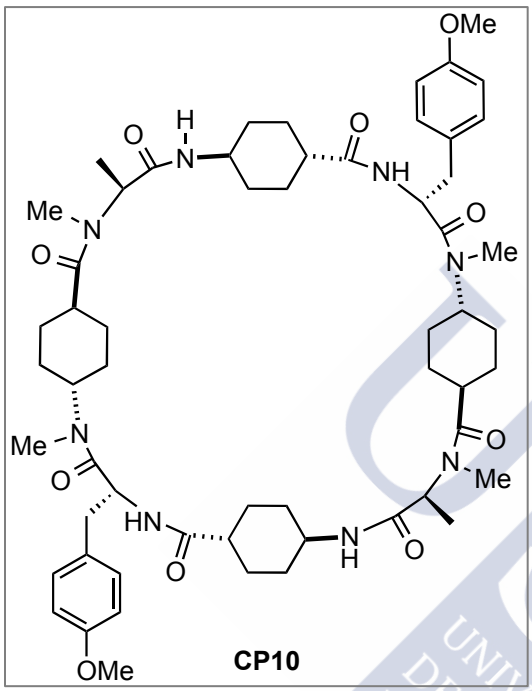


56

Boc-[(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_2$]-OFm (56): Una disolución del tetrapéptido **52** (60 mg, 0.072 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5 %, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OH desprotegido que se utilizó sin purificación adicional.

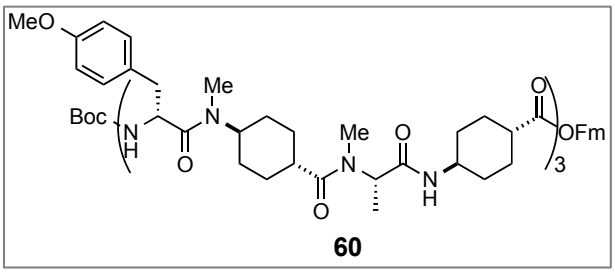
Una segunda disolución del tetrapéptido **52** (57 mg, 0.069 mmol) en CH_2Cl_2 (1.3 mL) se trató con TFA (0.5 mL) y $PhSiH_3$ (0.2 mL) y se agitó a ta durante 5 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (40 µL, 0.24 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OH, DIEA (25 µL, 0.12 mmol) y *N*-HBTU (28 mg, 0.073 mmol) en de CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite

amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-5 % MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 50 mg del octapéptido en forma de espuma blanquecina. [61%, R_f = 0.28 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1371.8 ([MH+Na]$^+$, 60), 1349.8 ([MH]$^+$, 100), 1249.7 ([MH-Boc]$^+$, 51). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{77}H_{105}N_8O_{13}$ ([MH]$^+$): 1349.7796, **encontrado**: 1349.7818.



CP10

***c*-[(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_2$] (CP10):** El octapéptido **56** (175 mg, 0.129 mmol) se disolvió en una mezcla de 20% de piperidina en CH_2Cl_2 (4 mL) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a. Transcurrido ese tiempo, la disolución se lavó con una disolución acuosa de HCl (5 %, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:10:65, 3 mL), y se dejó agitando durante 10 min a ta. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 130 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (45.6 mg, 0.142 mmol) y DIEA (135 µL, 0.774 mmol). Pasadas 12 h, la mezcla se concentró a volumen reducido (20 mL), y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 10mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-6 % MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 104 mg del ciclopéptido **CP10** en forma de sólido blanco. [42%, R_f = 0.22 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar (cadena lateral Tyr)), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar (cadena lateral Tyr)), 6.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH Tyr), 6.22 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 5.12 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, $Hα_{MeN\text{-}Ala}$), 4.97 (td, *J* = 8.4, 5.3 Hz, 1H, $Hα_{Tyr}$), 4.49 (m, 1H, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.77 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}Ala}$), 3.69 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 3.00-2.80 (m, 2H, $Hβ_{Tyr}$), 2.41 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.38 (m, 1H, $Hα_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.10-1.4 (m, 14H, alifáticos), 1.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH-($C\underline{H}_3$) cadena lateral Ala), 1.13 (m, 1H, alifáticos), 0.81 (m, 1H, alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1072.6 ([MH+Na]$^+$, 49), 1053.6 ([MH]$^+$, 100), 723.4 ([MH]$^{2+}$, 41). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{58}H_{85}N_8O_{10}$ ([MH]$^+$): 1053.6383, **encontrado**: 1053.6398. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3307 (amida A), 1670, 1622 (amida I), 1511 cm^{-1} (amida II_{II}).

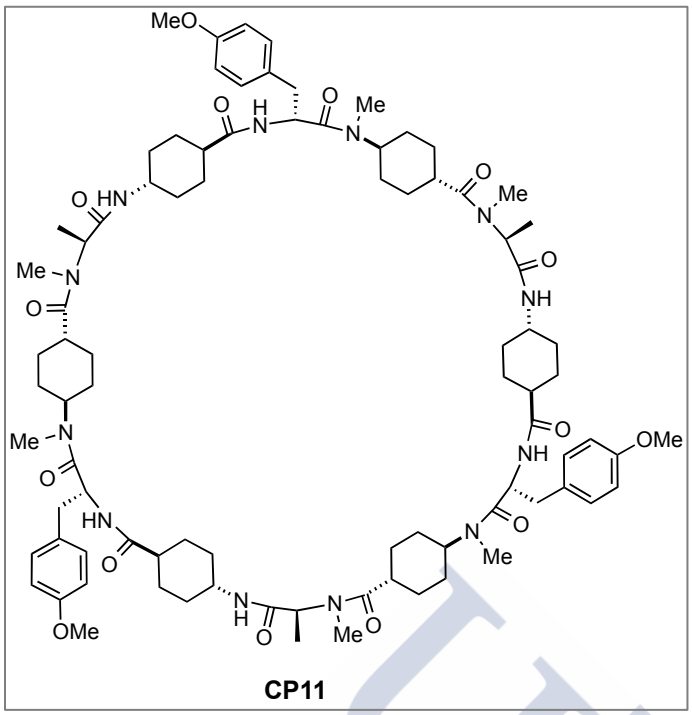


60

Boc-[(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_3$]-OFm (60): Una disolución del octapéptido **56** (45 mg, 0.035 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el octapéptido Boc-(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach)$_2$-OH que se utilizó sin purificación adicional.

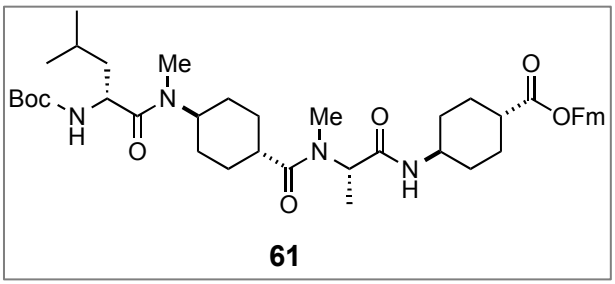
Una disolución del tetrapéptido **52** (35 mg, 0.040 mmol) en CH_2Cl_2 (1.3 mL) se trató con TFA (0.5 mL) y $PhSiH_3$ (0.2 mL) y se agitó a ta durante 5 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (24 µL, 0.14 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_2$-OH, DIEA (12 µL, 0.07 mmol) y *N*-HBTU (15 mg, 0.039 mmol) en de CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 3 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 3 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-7% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 31 mg del dodecapéptido **60** en forma de espuma blanquecina. [48%, R_f = 0.25 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EMAR (ESI) calculado** para $C_{106}H_{146}N_{12}O_{18}$ ($[MH]^{2+}$): 1876.0912, **encontrado**: 1876.0898.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



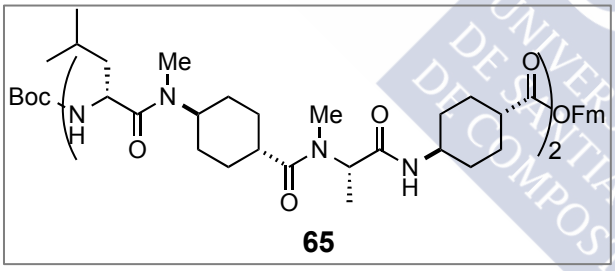
CP11

***c*-[(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_3$], CP11:** El dodecapéptido **60** (30 mg, 0.129 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 2 mL) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:15:60, 2 mL), y se dejó agitando durante 5 min. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 16 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (5.6 mg, 0.0176 mmol) y DIEA (12.4 µL, 0.096 mmol). Pasadas 12 h, se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 10mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-10% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 8 mg del ciclopéptido **CP11** como un sólido blanco. [30%, R_f = 0.45 (10% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.68 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH_{Tyr}), 7.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar Tyr cadena lateral), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar Tyr cadena lateral), 5.57 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, $Hα_{MeN\text{-}Ala}$), 5.39 (td, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 1H, $Hα_{Tyr}$), 4.45 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.81 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 3.77 (s, 3H, O-Me), 3.17 (m, 1H, $Hβ_{Tyr}$), 3.15 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}Ala}$), 3.01 (dd, *J* = 12.8, 5.4 Hz, 1H, $Hβ_{Tyr}$), 2.6-2.45 (m, 2H, $Hα_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$ y $Hα_{δ\text{-}Ach}$), 2.54 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}Ach}$), 2.1-1.3 (m, 14H, alifáticos), 1.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH-(CH_3) Ala cadena lateral). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1580.9 ($[MH]^+$, 4), 791.0 ($[MH]^{2+}$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{87}H_{126}N_{12}O_{15}$ ($[MH]^+$): 1579.9538, **encontrado**: 1579.9520. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3307 (amida A), 1669, 1620 (amida I), 1512 cm^{-1} (amida II_{II}).



61

Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}N-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (61): En un matraz de fondo redondo se disolvió el tripéptido **51** (580 mg, 0.88 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 10 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 5 mL) y se trató con DIEA (456 µL, 3.52 mmol) y se añadió una disolución de Boc-*D*-Leu-OH·H_2O (203.5 mg, 0.88 mmol), DIEA (229 µL, 1.76 mmol) y *N*-HATU (368 mg, 0.968 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 5 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 12 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 12 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-3% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 320 mg del tetrapéptido **61** en forma de espuma blanquecina. [49%, R_f = 0.4 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 781.4 ($[MH+Na]^+$, 62), 759.4 ($[MH]^+$, 25), 659.4 ($[M\text{-}Boc]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{44}H_{63}N_4O_7$ ($[MH]^+$): 759.4691, **encontrado**: 759.4708**.**

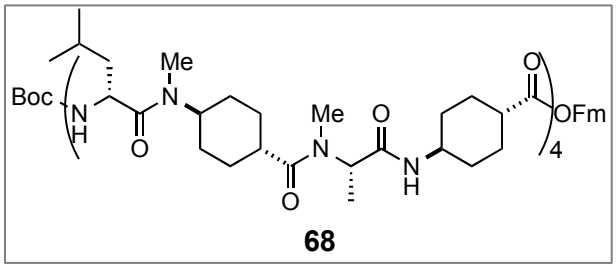


65

Boc-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_2$]-OFm, 65: Una disolución del tetrapéptido **61** (150 mg, 0.2 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2.4 mL) se trató con piperidina (0.6 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OH desprotegido que se utilizó sin purificación adicional.

Una segunda disolución del tetrapéptido **61** (150 mg, 0.2 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con TFA (1 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (140 µL, 0.8 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OH, DIEA (70 µL, 0.4 mmol) y *N*-HBTU (91 mg, 0.24 mmol) en de CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 4 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 4 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-7% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a

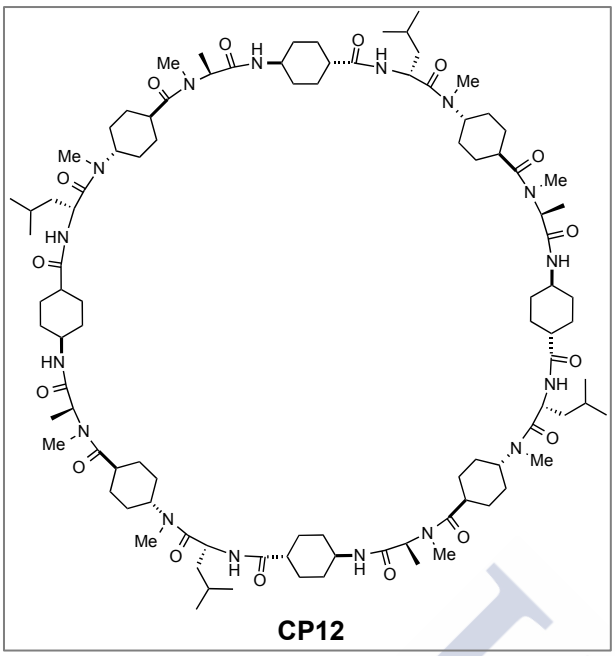
120 mg del octapéptido **64** en forma de espuma blanquecina. [49%, R_f = 0.2 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1243.8 ($[MH+Na]^+$, 63), 1221.8 ($[MH]^+$, 100), 1121.7 ($[M-Boc]^+$, 65). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{69}H_{105}N_8O_{12}$ ($[MH]^+$): 1221.7897, **encontrado**: 1221.7838**.**



68

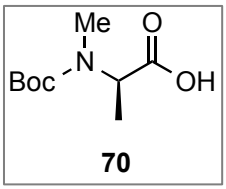
Boc-([*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_4$]-OFm, 68: Una disolución del octapéptido **65** (50 mg, 0.041 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 25 min. Pasado ese tiempo, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-(*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach)$_2$-OH desprotegido que se utilizó sin purificación adicional.

Una segunda disolución del octapéptido **65** (50 mg, 0.041 mmol) en CH_2Cl_2 (1.4 mL) se trató con TFA (0.4 mL) y $PheSiH_3$ (0.2 mL) y se agitó a ta durante 6 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3h. El octapéptido desprotegido en su extremo amino se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (28 µL, 0.164 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-(*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach)$_2$-OH, DIEA (14 µL, 0.082 mmol) y *N*-HBTU (19 mg, 0.049 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 45 min, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 3 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 3 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (3-8% de MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 58 mg del hexadecapéptido **68** en forma de espuma blanquecina. [65%, R_f = 0.38 (10% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1074.2 ($[MH]^{2+}$, 100), 1024.2 ($[M-Boc]^{2+}$, 33). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{119}H_{190}N_{16}O_{19}$ ($[MH]^{2+}$): 1073.7191, **encontrado**: 1073.7152**.**



CP12

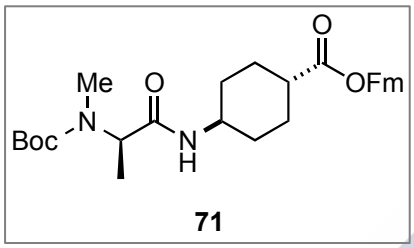
***c*-[(*D*-Leu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_4$] (CP12):** El hexadecapéptido **68** (50 mg, 0.0233 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 2 mL) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a. Transcurrido ese tiempo, la disolución se lavó con una disolución acuosa de HCl (5 %, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:15:60, 1 mL), y se dejó agitando durante 5 min. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 23 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (11 mg, 0.028 mmol) y DIEA (18 µL, 0.14 mmol). Pasadas 12 h, se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5 %, 3 x 10 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 10mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (4-9 % MeOH en CH_2Cl_2), y después se repurificó mediante HPLC (7%-14% de MeOH en CH_2Cl_2 en 35 min, tr = 33 min) para obtener 15 mg del ciclopéptido **CP12** en forma de sólido blanco. [35%, R_f = 0.35 (10% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.32 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH_{Tyr}), 7.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 5.62 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, $Hα_{MeN\text{-}Ala}$), 5.28 (td, *J* = 9.0, 5.6 Hz, 1H, $Hα_{Leu}$), 4.50 (m, 1H, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.83 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 3.22 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}Ala}$), 3.09 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.55 (m, 1H, $Hα_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.46 (m, 1H, $Hα_{δ\text{-}Ach}$), 2.00-1.30 (m, 18H, alifáticos), 1.24 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, $C\underline{H_3}$ Ala cadena lateral), 0.94 (dd, *J* = 6.4, 4.4, 6H, CH-($\underline{CH_3}$)$_2$ Leu cadena lateral). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 926.2 ($[MH]^{2+}$, 100), 617.8 ($[MH]^{3+}$, 6). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{100}H_{170}N_{16}O_{16}$ ($[MH]^{2+}$): 925.6485, **encontrado**: 925.6472. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3305 (amida A), 1658, 1621 (amida I), 1526 cm^{-1} (amida II_{II}).



70

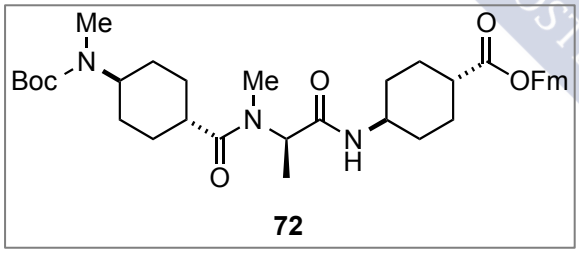
***N*-*t*-butoxicarbonil-*N*-metil-*D*-Alanina [Boc-^{Me}*N*-*D*-Ala-OH, 70]**: En un matraz de fondo redondo con capacidad de 100 mL se disolvió la Boc-*D*-Ala-OH (**69**) (1.00 g, 5.29 mmol) en THF (seco, 50 mL) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua. Pasados 10 min se añadió NaH (60% en peso, 0.635 g, 15.87 mmol) observándose la aparición de turbidez en la reacción. Pasados 30 min se retiró el baño de hielo-agua, se añadió MeI (0.983 mL, 2.237 g, 15.87 mmol) y se agitó durante 12 h. Pasado ese tiempo, se

volvió a enfriar la mezcla de reacción en un baño de hielo-agua, y el exceso de NaH se eliminó mediante la adición lenta de agua. A continuación, se concentró el THF y la fase acuosa se lavó con éter para eliminar el exceso de MeI. Después se acidificó hasta pH 3 y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4, se filtró y concentró, obteniéndose 1.02 g de Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-OH como aceite transparente que se empleó en el siguiente paso sin purificación adicional, y cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los del compuesto **49**. [92%, R_f = 0.25 (5% MeOH en CH_2Cl_2)].



71

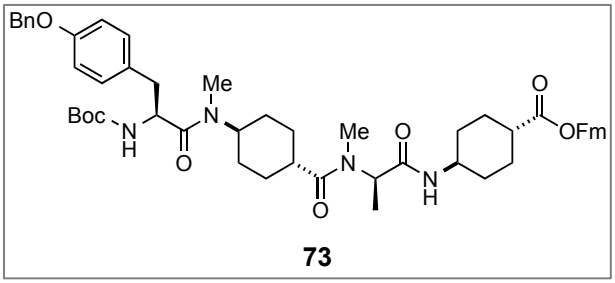
Boc-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-OFm, 71: En un matraz de fondo redondo con capacidad para 25 mL se disolvió Boc-δ-Ach-OFm (**45**) (600 mg, 1.42 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 15 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en bomba de alto vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 14 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-*D*-^{Me}N-Ala-OH (**70**) (288.4 mg, 1.42 mmol), *N*-HBTU (646 mg, 1.7 mmol) y DIEA (1.1 mL, 8.52 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la disolución se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (25-40% AcOEt en hexano), obteniéndose 630 mg del dipéptido **71** deseado como una espuma blanca, y cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los de su enantiómero (**50**). [87%, R_f = 0.28 (40% AcOEt en hexano)].



72

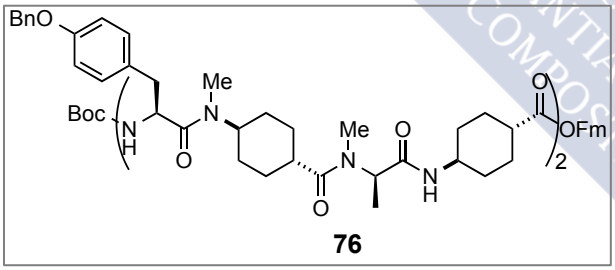
Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-OFm (72): En un matraz de fondo redondo se disolvió el dipéptido **71** (450 mg, 0.88 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 9 mL) y se agitó a ta durante 15 min. A continuación, se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. Transcurrido ese tiempo, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 4 mL) y se trató con DIEA (450 µL, 3.52 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**) (226.2 mg, 0.88 mmol), DIEA (230 µL, 1.76 mmol) y *N*-HATU (368 mg, 0.968 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 5 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-2 % MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 275 mg del tripéptido en forma de espuma blanquecina, y cuyos datos espectroscópicos

coincidieron con los del compuesto **51**. [99%, R_f = 0.4 (5% MeOH en CH_2Cl_2)].



73

Boc-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-OFm, 73: En un matraz de fondo redondo se disolvió el tripéptido **72** (490 mg, 0.76 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 8 mL) y se agitó a ta durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 4 mL) y se trató con DIEA (520 µL, 3.04 mmol) y se añadió una disolución de Boc-*L*-Tyr(Bn)-OH (310 mg, 0.836 mmol), DIEA (260 µL, 1.52 mmol) y *N*-HATU (347 mg, 0.912 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 4 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-2% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 550 mg del tetrapéptido **73** en forma de espuma blanquecina. [80%, R_f = 0.44 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 921.5 ($[M+Na]^+$, 46), 899.5 ($[MH]^+$, 27), 799.4 ($[M-Boc]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{54}H_{67}N_4O_8$ ($[MH]^+$): 899.4953, **encontrado**: 899.4946.

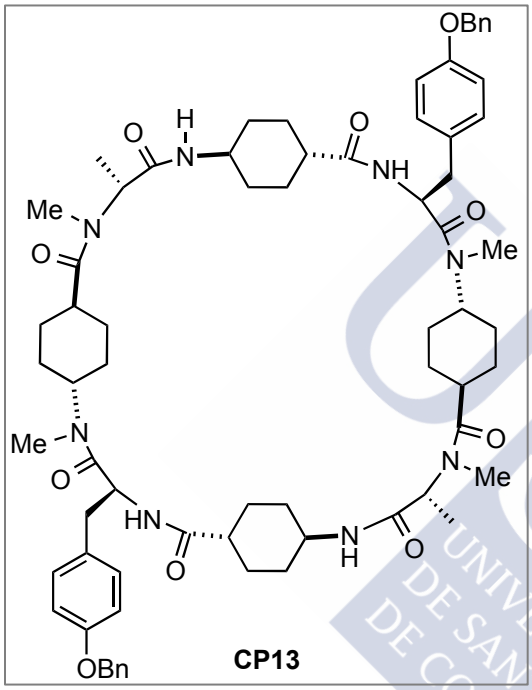


76

Boc-[(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_2$]-OFm, 76: Una disolución del tetrapéptido **73** (180 mg, 0.2 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2.4 mL) se trató con piperidina (0.6 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-OH que se utilizó sin purificación adicional.

Una segunda disolución del tetrapéptido **73** (180 mg, 0.2 mmol) en CH_2Cl_2 (2.5 mL) se trató con TFA (0.71 mL) y $PhSiH_3$ (0.35 mL) y se agitó a ta durante 12 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL) y se trató con DIEA (142 µL, 0.8 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-OH, DIEA (70 µL, 0.4 mmol) y *N*-HBTU (95 mg, 0.24 mmol) en de CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase

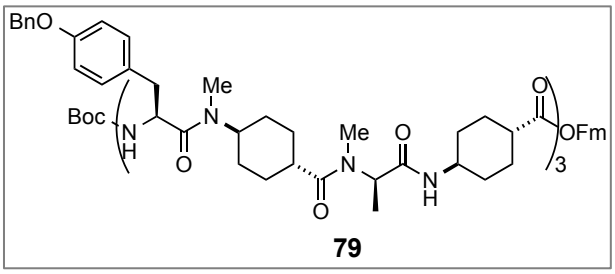
orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 4 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 4 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-5% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 229 mg del octapéptido **76** en forma de espuma blanquecina. [76%, R_f = 0.24 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1524.8 ($[M+Na]^+$, 22), 1502.8 ($[MH]^+$, 100), 1401.8 ($[M\text{-}Boc]^+$, 16). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{89}H_{113}N_8O_{13}$ ($[MH]^+$): 1501.8422, **encontrado**: 1501.8409**.**



CP13

***c*-[(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_2$] (CP13):** El octapéptido **76** (200 mg, 0.133 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 2 mL) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:10:65, 2 mL), y se dejó agitando durante 10 min. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 130 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (52 mg, 0.16 mmol) y DIEA (104 µL, 0.798 mmol). Pasadas 12 h, la mezcla se concentró a volumen reducido (15 mL), y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 10mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-5% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 62 mg del ciclopéptido **CP13** en forma de sólido blanco. [38%, R_f = 0.24 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 7.46-7.37 (m, 4H, Ar), 7.36-7.31 (m, 1H, Ar), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar (cadena lateral Tyr)), 6.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar cadena lateral Tyr), 6.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH_{Tyr}), 6.25 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 5.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, $Hα_{MeN\text{-}Ala}$), 5.06 (s, 2H, $\underline{CH_2}$-C_6H_5) 4.99 (td, *J* = 8.4, 5.1 Hz, 1H, $Hα_{Tyr}$), 4.50 (m, 1H, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.70 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 2.99-2.90 (m, 2H, $Hβ_{Tyr}$), 2.86 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}Ala}$), 2.41 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.36 (m, 1H, $Hα_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.10-1.4 (m, 14H, alifáticos), 1.30 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH-($C\underline{H_3}$) cadena lateral Ala), 1.13 (m, 1H, alifáticos), 0.81 (m, 1H, alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1227.7 ($[M+Na]^+$, 59), 1205.7 ($[MH]^+$, 100), 603.3 ($[MH]^{2+}$, 16). **EMAR (ESI) calculado** para

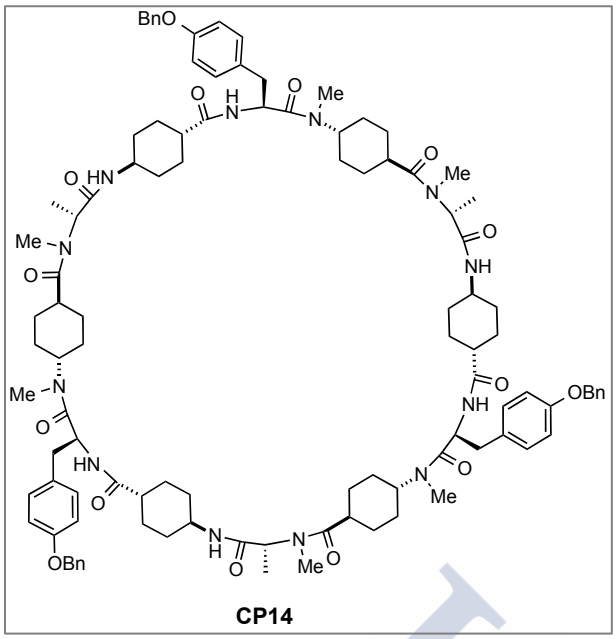
$C_{70}H_{93}N_8O_{10}$ ([MH]$^+$): 1205.7009, **encontrado**: 1205.7019. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3313 (amida A), 1670, 1624 (amida I), 1510 cm^{-1} (amida II_{II}).



79

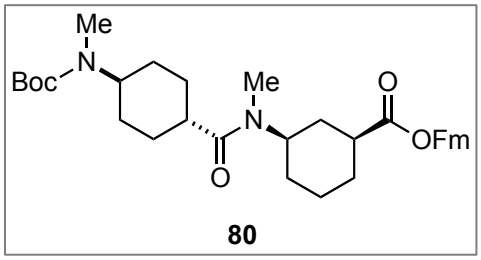
Boc-([*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_3$]-OFm (79): Una disolución del octapéptido **76** (110 mg, 0.073 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el octapéptido Boc-(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_2$-OH que se utilizó en el paso de acoplamiento sin purificación adicional.

Una disolución del tetrapéptido **73** (65 mg, 0.073 mmol) en CH_2Cl_2 (2.1 mL) se trató con TFA (0.6 mL) y $PhSiH_3$ (0.3 mL) y se agitó a ta durante 10 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (50 µL, 0.29 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach)$_2$-OH, DIEA (25 µL, 0.146 mmol) y *N*-HBTU (34 mg, 0.087 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (3-7% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 110 mg del dodecapéptido **79** en forma de espuma blanquecina. [70%, R_f = 0.22 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1053.1 ([MH]$^{2+}$, 100), 1003.1 ([M-Boc]$^{2+}$, 36). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{124}H_{159}N_{12}O_{18}$ ([MH]$^+$): 2104.1890, **encontrado**: 2104.1896.



CP14

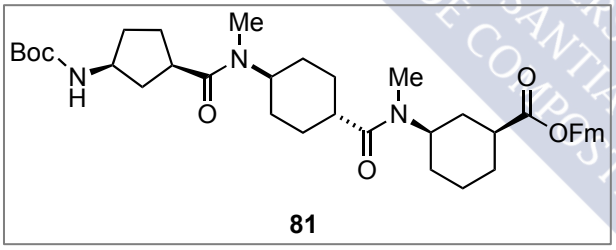
c-[(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_3$] (CP14): El dodecapéptido **79** (100 mg, 0.048 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 2 mL) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/$PhSiH_3$/CH_2Cl_2 (25:15:60, 2.2 mL), y se dejó agitando durante 10 min. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 50 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (19 mg, 0.0576 mmol) y DIEA (37 µL, 0.288 mmol). Pasadas 12 h, se concentró la mezcla hasta un volumen reducido (15 mL) y se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 15 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 15 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-7% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 38 mg del ciclopéptido **CP14** en forma de sólido blanco. [43%, R_f = 0.21 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH_{Tyr}), 7.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 7.42-7.32 (m, 4H, Ar), 7.33-7.27 (m, 1H, Ar), 7.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar cadena lateral Tyr), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar cadena lateral Tyr), 5.56 (q, *J* = 7.8, 7.2 Hz, 1H, $Hα_{MeN\text{-}Ala}$), 5.36 (td, *J* = 9.3, 5.4 Hz, 1H, $Hα_{Tyr}$), 5.01 (s, 1H, $\underline{CH_2}$-Bn) 4.42 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.79 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 3.19-3.11 (m, 1H, $Hβ_{Tyr}$), 3.14 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}Ala}$), 3.04-2.96 (m, 1H, $Hβ_{Tyr}$), 2.59-2.44 (m, 2H, $Hα_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$ y $Hα_{δ\text{-}Ach}$), 2.51 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.09-1.50 (m, 14H, alifáticos), 1.28 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH-(CH_3) cadena lateral Ala), 1.52-1.10 (m, 8H, alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1227.7 ([M+Na]$^+$, 51), 1205.7 ([MH]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{105}H_{139}N_{12}O_{15}$ ([MH]$^+$): 1808.0477, **encontrado**: 1808.0476. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3310 (amida A), 1670, 1622 (amida I), 1510 cm^{-1} (amida II_{II}).



80

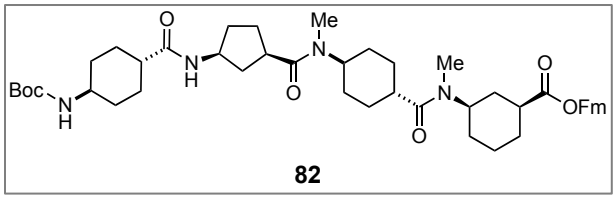
Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OFm (80): En un matraz de fondo redondo se disolvió Boc-^{Me}*N*-*D*-Ach-OFm (**21**) (350 mg, 0.8 mmol) en la mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 8 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el

disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 8 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**) (226 mg, 0.88 mmol), *N*-HATU (335 mg, 0.88 mmol) y DIEA (0.82 mL, 4.8 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la disolución se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). A continuación, se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (30-50% AcOEt en hexano), obteniéndose 325 mg del dipéptido **80** como una espuma blanca. [71%, R_f = 0.33 (50% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, δ):** 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.62-7.57 (m, 2H, Ar), 7.42 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz 2H, Ar), 7.34 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2H, Ar), 4.61-4.48 (m, 2H, $H\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$ + $H\gamma_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 4.42 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH_2 OFm), 4.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH OFm), 2.89 (s, 2H, MeN), 2.81-2.71 (m, 4H, MeN), 2.55 (m, 1H, $H\alpha_{\gamma\text{-}Ach}$), 2.28 (m, 1H, $H\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.98-1.18 (m, 16H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 126 MHz, δ): 175.0 (CO), 174.3 (CO) 155.6 (CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 143.7 (C, Ar) y 141.3 (C, Ar), 127.8 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 120.0 (CH, Ar), 79.3 (CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 66.3 (CH_2, OFm), 55.1 (CH, OFm), 50.9 (CH, $C\gamma_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 46.9 (CH, $C\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 42.5 (CH, CH, $C\alpha_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 40.5 (CH, $C\alpha_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 33.1 ($CH_2$, alifáticos), 31.8 ($CH_2$, alifáticos), 29.3 ($CH_3$, MeN), 29.0 ($CH_2$, alifáticos), 28.8 ($CH_2$, alifáticos), 28.52 (C, CO-C-(CH_3)$_3$ BOC), 28.42 (CH_2, alifáticos), 28.28 (CH_2, alifáticos), 27.70 (CH_2, alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 597.3 ($[M+Na]^+$, 100), 575.3 ($[MH]^+$, 40). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{35}H_{47}N_2O_5$ ($[MH]^+$): 575.3479, **encontrado**: 575.3475.



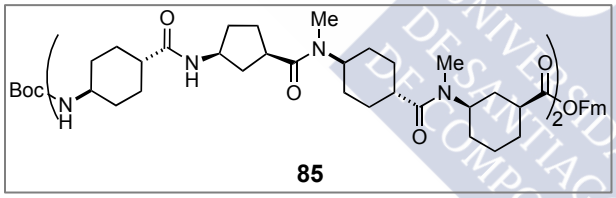
81

Boc-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OFm, (81): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 10 mL se disolvió el dipéptido **80** (250 mg, 0.43 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 5 mL) y se agitó a ta durante 20 min. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. A continuación, se redisolvió el residuo en CH_2Cl_2 (seco, 3 mL) y se trató con DIEA (294 µL, 1.72 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-*L*-Acp-OH (**4**) (108 mg, 0.473 mmol), DIEA (148 µL, 0.86 mmol) y *N*-HATU (180 mg, 0.473 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación. La fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-2% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 280 mg del tripéptido en forma de espuma blanquecina. [95%, R_f = 0.31 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 708.4 ($[M+Na]^+$, 43), 586.4 ($[MH\text{-}Boc]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{41}H_{55}N_3NaO_6$ ($[MH]^+$): 708.3983, **encontrado**: 708.3981.



82

Boc-δ-Ach-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OFm (82): En un matraz de fondo redondo se disolvió el tripéptido **81** (260 mg, 0.38 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 4 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 4 mL) y se trató con DIEA (270 µL, 1.52 mmol) y se añadió una disolución de Boc-δ-Ach-OH (**44**, 102 mg, 0.41 mmol), DIEA (135 µL, 0.76 mmol) y *N*-HATU (160 mg, 0.41 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-4% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 250 mg del tetrapéptido **82** en forma de espuma blanquecina. [81%, R_f = 0.26 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 833.5 ([M+Na]$^+$, 100), 811.5 ([MH]$^+$, 37), 711.5 ([M-Boc]$^+$, 2). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{48}H_{66}N_4O_7$ ([MH]$^+$): 811.5004, **encontrado**: 811.5004.

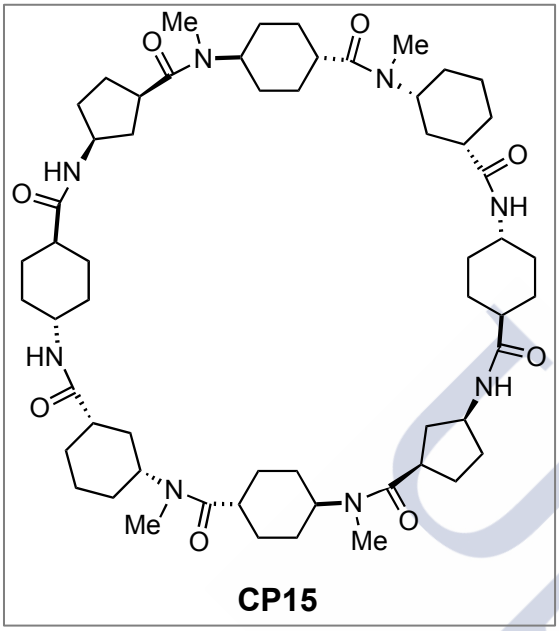


85

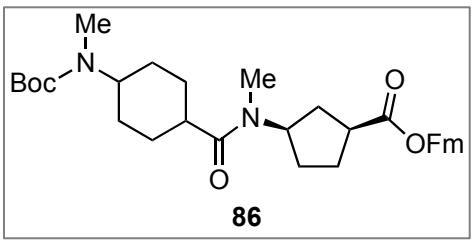
Boc-[(δ-Acp-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$]-OFm (85): Una disolución del tetrapéptido **82** (110 mg, 0.13 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se arrastró a un embudo de decantación y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL). A continuación, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-δ-Ach-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OH desprotegido que se utilizó sin purificación adicional.

Una segunda disolución del tetrapéptido **82** (111 mg, 0.13 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con TFA (1 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó en la bomba de alto vacío durante 3 h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (90 µL, 0.52 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-δ-Ach-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OH, DIEA (45 µL, 0.26 mmol) y *N*-HBTU (60 mg, 0.156 mmol) en de CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 45 min, y a continuación se lavó la fase orgánica con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida

en gel de sílice (2-8% MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 150 mg del octapéptido **85** en forma de espuma blanquecina. [87%, R_f = 0.11 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1347.9 ([M+Na]$^+$, 73), 1325.9 ([MH]$^+$, 94), 1225.8 ([M-Boc]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{77}H_{113}N_8O_{11}$ ([MH]$^+$): 1325.8523, **encontrado**: 1325.8523.

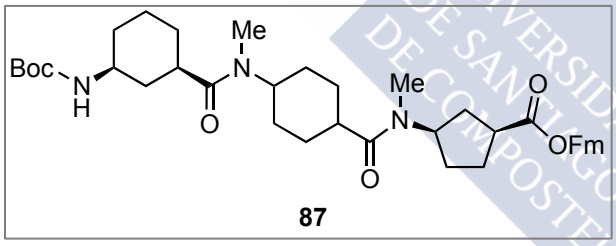


***c*-[(δ-Acp-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$] (CP15):** El octapéptido **85** (150 mg, 0.11 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1.4 mL), se trató con piperidina y se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL), y se agitó durante 10 min a ta. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 110 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (43 mg, 0.132 mmol) y DIEA (114 µL, 0.66 mmol), momento en el cual apareció turbidez en el crudo de reacción. Pasadas 12 h de agitación a ta, se concentró la mezcla hasta un volumen reducido (25 mL) y se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 20 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 20 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-8% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 5 mg del ciclopéptido **CP15** en forma de sólido blanco. [4.3%, R_f = 0.8 (10% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, $MH_{z\text{-}Acp}$), 5.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, $NH_{\delta\text{-}Ach}$), 4.63-4.34 (m, 3H, $H\gamma_{\gamma\text{-}Acp}$, $H\gamma_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$, $H\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 3.74 (m, 1H, $H\delta_{\delta\text{-}Ach}$), 3.20 (m, 1H, $H\alpha_{\gamma\text{-}Acp}$), 2.92 y 2.87 (s, 6H, MeN), 2.94-2.79 (1H, $H\alpha_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 2.39 (1H, $H\alpha_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$, 2.15 (1H, $H\alpha_{\delta\text{-}Ach}$). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1030.2 ([MH]$^+$, 30), 515.5 ([MH]$^{2+}$, 100).



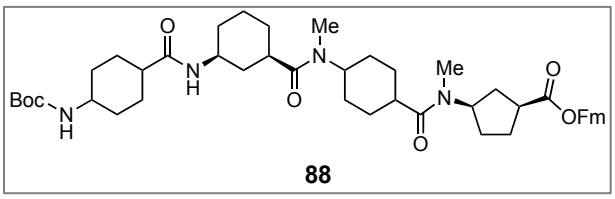
Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OFm (86): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 10 mL se disolvió Boc-^{Me}*N*-*D*-Acp-OFm (**7**) (90 mg, 0.21 mmol) en la mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 3 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 8 mL)

bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (**47**) (54 mg, 0.21 mmol), *N*-HATU (96 mg, 0.254 mmol) y DIEA (0.216 mL, 1.26 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). A continuación, se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (30-50% AcOEt en hexano), obteniéndose 113 mg del dipéptido **86** como una espuma blanca. [96%, R_f = 0.37 (50% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, δ):** 7.76 (d, *J* = 8.02 Hz, 2H, Ar), 7.58 (2, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.40 (t, *J* = 7.2 Hz 2H, Ar), 7.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 5.02 (m, 1H, Hγ$_{MeN\text{-}γ\text{-}Acp}$), 4.55 (m, 1H, Hδ$_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 4.46 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH_2 OFm), 4.20 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH OFm), 2.83 (s, 2H, MeN), 2.75-2.65 (m, 4H, MeN), 2.36 (t, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hα$_{MeN\text{-}γ\text{-}Acp}$), 1.45 (s, 9H, Boc), 2.06-1.37 (m, 14H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 126 MHz, δ): 175.0 (CO), 174.3 (CO) 155.6 (CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 143.7 (C, Ar) y 141.3 (C, Ar), 127.8 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 120.0 (CH, Ar), 79.3 (CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 66.3 (CH_2, OFm), 55.1 (CH, OFm), 50.9 (CH, Cγ$_{MeN\text{-}γ\text{-}Ach}$), 46.9 (CH, Cδ$_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 42.5 (CH, CH, Cα$_{MeN\text{-}γ\text{-}Ach}$), 40.5 (CH, Cα$_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 33.1 ($CH_2$, alifáticos), 31.8 ($CH_2$, alifáticos), 29.3 ($CH_3$, MeN), 29.0 ($CH_2$, alifáticos), 28.8 ($CH_2$, alifáticos), 28.52 (C, CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 28.42 (CH_2, alifáticos), 28.28 (CH_2, alifáticos), 27.70 (CH_2, alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 583.3 ([M+Na]$^+$, 100), 561.1 ([MH]$^+$, 1). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{34}H_{45}N_2O_5$ ([MH]$^+$): 561.3323 **encontrado**: 561.3328.



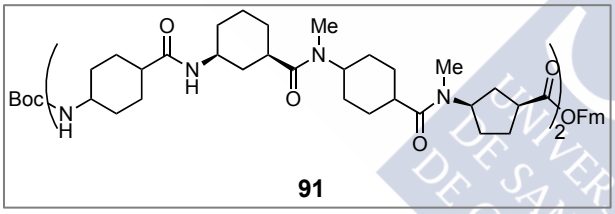
87

Boc-*L*-Ach-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OFm (87): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 5 mL se disolvió el dipéptido **86** (98 mg, 0.175 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL) y se agitó a ta durante 20 min. A continuación, se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3h en alto vacío. Entonces se redisolvió el residuo en CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL) y se trató con DIEA (120 µL, 0.7 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-*L*-Ach-OH (**19**) (43 mg, 0.175 mmol), DIEA (60 µL, 0.35 mmol) y *N*-HATU (80 mg, 0.21 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación. La fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 3 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 3 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-2 % MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 103 mg del tripéptido **87** en forma de espuma blanquecina. [86%, R_f = 0.34 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EMAR (ESI) calculado** para $C_{41}H_{57}N_3O_6$ ([MH]$^+$): 687.4245, **encontrado**: 687.4247.



88

Boc-δ-Ach-*L*-Ach-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OFm (88): Se disolvió el tripéptido **87** (100 mg, 0.15 mmol) en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h bajo alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (106 µL, 0.6 mmol) y se añadió una disolución de Boc-δ-Ach-OH (**44**, 37 mg, 0.15 mmol), DIEA (54 µL, 0.3 mmol) y *N*-HATU (68 mg, 0.18 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1.5 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 60 min, y a continuación se lavó la fase orgánica con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-6 % MeOH en CH_2Cl_2), para dar lugar a 110 mg del tetrapéptido **88** como una espuma blanquecina. [91%, R_f = 0.31 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 833.4 ([M+Na]$^+$, 100), 711.5 ([MH]$^+$, 25). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{48}H_{67}N_4O_7$ ([MH]$^+$): 811.5004, **encontrado**: 811.5005.

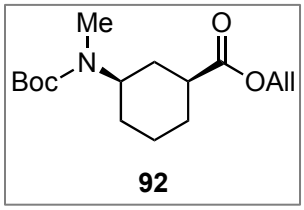


91

Boc-[(δ-Ach-*L*-Ach-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-)$_2$]-OFm (91): Una disolución del tetrapéptido **88** (59 mg, 0.073 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se arrastró a un embudo de decantación y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL). A continuación, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-δ-Ach-*L*-Ach-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OH desprotegido que se utilizó sin purificación adicional.

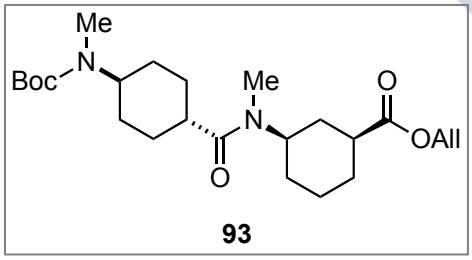
Una segunda disolución del tetrapéptido **88** (60 mg, 0.074 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con TFA (1 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó bajo alto vacío durante 3 h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL), se trató con DIEA (54 µL, 0.29 mmol) y a continuación se añadió una disolución de Boc-δ-Ach-*L*-Ach-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OH, DIEA (26 µL, 0.15 mmol) y *N*-HATU (34 mg, 0.088 mmol) en de CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 50 min, y a continuación se lavó la fase orgánica con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-8% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 150 mg del octapéptido **91** en forma de espuma

blanquecina. [87%, R_f = 0.11 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EMAR (ESI) calculado** para $C_{77}H_{113}N_8O_{11}$ ([MH]$^+$): 1325.8524, **encontrado**: 1325.8527



92

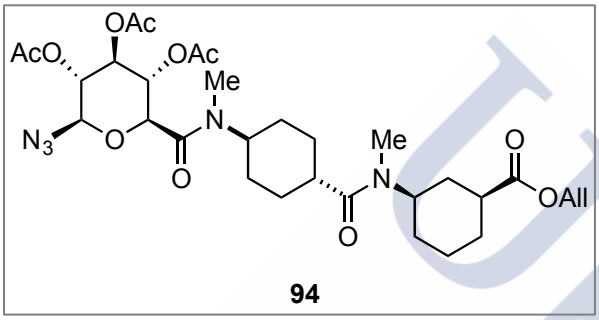
Alil (1*S*,3*R*)-3-((*t*-butoxicarbonil)(metil)amino)ciclohexano-1-carboxilato [Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OAll, (92)]: En un matraz de fondo redondo se disolvió el compuesto Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OH (**20**) (800 mg, 3.11 mmol) en 2-propen-1-ol (seco, 18 mL) y se añadió DCC (1.28 g, 6.22 mmol) y DMAP (76 mg, 0.62 mmol) y se agitó a ta durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró el disolvente, se redisolvió en CH_2Cl_2 (20 mL) y se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 15 mL) y $NaHCO_3$ (saturado, 3 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró para obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (10-20% AcOEt en hexano) para obtener 640 mg del compuesto deseado como un aceite transparente. [70%, R_f = 0.77 (50% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 5.86 (m, 1H, $OCH_2C\underline{H}CH_2$), 5.37-512 ppm (m, 2H, $OCH_2CHC\underline{H_2}$), 4.53 (dd, *J* = 5.7, 1.3 Hz, 2H, $OC\underline{H_2}CHCH_2$), 4.11-3.85 (m, 1H, Hγ), 2.69 (s, 3H, MeN), 2.42 (m, 1H, Hα), 1.41 (s, 9H, Boc), 1.98-1.75 (m, 3H, alifáticos), 1.70-1.20 (m, 5H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 174.6 (CO), 155.5 (CO), 132.1 ($OCH_2\underline{C}HCH_2$), 118.0 ($OCH_2CH\underline{C}H_2$), 79.3 ($\underline{C}$-$(CH_3)_3$ (BOC)), 64.9 (CH_2, $O\underline{C}H_2CHCH_2$), 52.8 (CH, Hγ), 42.7 (CH, Hα), 32.2 (CH_2, alifático), (CH_3, MeN), 29.3 (CH_2, alifático), 28.5 (CH_3, (C-($\underline{C}H_3$)$_3$ (BOC)), 28.2 (CH_2, alifático), 24.5 (CH_2, alifático). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 320.2 ([M+Na]$^+$, 100), 198.1 ([M-Boc]$^+$, 35). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{16}H_{27}NNaO_4$ ([MNa]$^+$): 320.1832, **encontrado**: 320.1832.



93

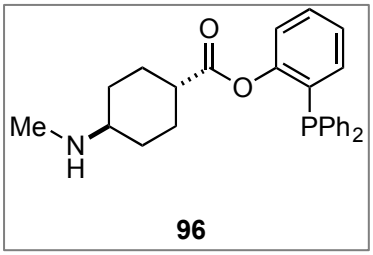
Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OAll (93): En un matraz de fondo redondo se disolvió **Boc-^{Me}*N*-*D*-Ach-OAll** (**92**) (230 mg, 0.77 mmol) en la mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 8 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en la bomba de alto vacío. El residuo así obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 8 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente **Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH** (**47**) (198 mg, 0.77 mmol), *N*-HATU (351 mg, 0.924 mmol) y DIEA (0.79 mL, 4.62 mmol). Después de 45 min de agitación a ta, la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). A continuación, se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró dando lugar una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (Isocrático, 40% de AcOEt en hexano), dando lugar a 296 mg del dipéptido **93** como una espuma blanca. [68%, R_f = 0.4 (50% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 5.93-5.96 (m, 1H, $OCH_2C\underline{H}CH_2$), 5.30-5.12 (m, 2H, $OCH_2CHC\underline{H_2}$), 4.57-4.39 (m, 3H, $OCH_2CHC\underline{H_2}$ + $H\gamma_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 3.85 (s, 1H,

Hδ$_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 2.83 y 2.75 (s, 3H, MeN), 2.70 y 2.68 (s, 3H, MeN), 2.45 (ddt, *J* = 12.0, 7.3, 3.6 Hz, 1H, Hα$_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 2.32 (td, *J* = 9.7, 8.3, 5.8 Hz, 1H, Hα$_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 1.40 (s, 9H, Boc), 2.00-1.14 (m, 16H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 175.0 (CO), 174.0 (CO), 155.5 (CO), 132.1 ($OCH_2\underline{C}HCH_2$), 118.0 ($OCH_2CH\underline{C}H_2$), 79.3 ($\underline{C}$-$(CH_3)_3$ (BOC)), 64.9 (CH_2, $O\underline{C}H_2CHCH_2$), 55.2 (CH, Hγ$_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 50.9 (CH, Hδ$_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 42.5 (CH, Cα$_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 40.4 (CH, Cα$_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 33.1 ($CH_2$, alifático), 31.7 ($CH_2$, alifático), 30.3 ($CH_2$, alifático), 29.2 ($CH_3$, MeN), 28.8 ($CH_2$, alifático), 28.4 ($CH_3$, (C-($\underline{C}H_3$)$_3$ BOC), 28.3 (CH_2, alifático), 27.4 (CH_3, MeN), 24.5 (CH_2, alifático). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 459.3 ([M+Na]$^+$, 100), 359.2 ([M+Na-Boc]$^+$, 41). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{24}H_{40}N_2NaO_5$ ([M+Na]$^+$): 459.2829, **encontrado:** 459.2829.



94

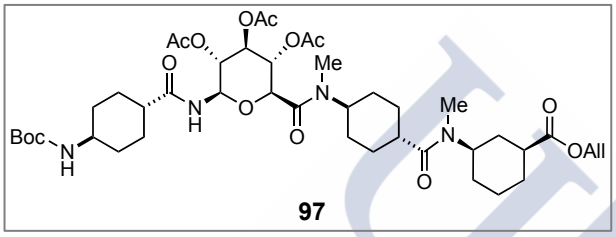
N_3-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OAll (94): Sobre una disolución del dipéptido **93** (180 mg, 0.41 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) se añadió TFA (2 mL) y se agitó a ta durante 15 min. A continuación, se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. Entonces, el residuo obtenido se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL) y se trató con DIEA (280 µL, 1.64 mmol) y a continuación se trató con una disolución de **N_3-*L*-$(Ac)_3$Aga-OH** (**34**) (156 mg, 0.451 mmol), DIEA (140 µL, 0.82 mmol) y *N*-HATU (171 mg, 0.451 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se vertió en un embudo de decantación. La fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 8 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 8 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-4% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 245 mg del tripéptido **94** en forma de espuma blanquecina. [90%, R_f = 0.42 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 686.3 ([M+Na]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{31}H_{45}N_2NaO_{11}$ ([M+Na]$^+$): 686.3008, **encontrado**: 686.3009.



96

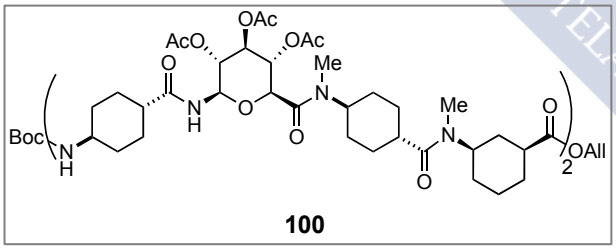
Boc-δ-Ach-OPh(PPh_2) (96): En un balón de fondo redondo se disolvió el **Boc-δ-Ach-OH** (**44**) (200 mg, 0.82 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 10 mL) y se trató con DMAP (8.3 mg, 0.068 mmol), EDC·HCl (183 mg, 0.952 mmol), (2-hidroxifenil)-difenilfosfina (190 mg, 0.68 mmol) y DIEA (165 µL, 0.952 mmol), y la mezcla se agitó a ta durante 3 h. Transcurrido ese tiempo, la fase orgánica se lavó con una disolución de HCl (5%, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró para dar lugar a un sólido amarillento, que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (Isocrático, 25% de AcOEt en

hexano) para obtener 330 mg de **96** como un sólido blanco. [96%, R_f = 0.42 (25% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.40-7.22 (m, 11H, Ar), 7.15-7.05 (m, 2H, Ar), 6.80-6.73 (m, 2H, Ar) 3.32 (m, 1H, $H\delta_{\delta\text{-Ach}}$), 2.17 (m, 1H, $H\alpha_{\delta\text{-Ach}}$), 2.05-1.94 (m, 2H, Alifáticos), 1.95-1.82 (m, 2H, Alifáticos), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.40-1.33 (m, 2H, Alifáticos), 1.11-0.94 (m, 2H, Alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 173.0 (CO), 155.1 (CO), 152.7 (C, Ar), 135.6 (C, Ar), 130.2 (C, Ar), 133.9 (CH, Ar), 133.6 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.0, (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 122.3 (CH, Ar), 79.2, ($\underline{C}$-$(CH_3)_3$ (Boc)), 48.8 (CH, $C\delta_{\delta\text{-Ach}}$), 42.4 (CH, $C\alpha_{\text{MeN-}\gamma\text{-Ach}}$), 32.3 ($CH_2$, Alifáticos), 28.4 (C-($\underline{C}H_3)_3$ (BOC)), 27.3 (CH_2, Alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 526.2 ([M+Na]$^+$, 100), 504.2 ([MH]$^+$, 44), 404.2 ([M-Boc]$^+$, 34). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{30}H_{35}NO_4P$ ([MH]$^+$): 504.2298, **encontrado**: 504.2295.



97

Boc-δ-Ach-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OAll (97): Sobre una disolución del tripéptido **94** (104.5 mg, 0.157 mmol) en DMF (seca, 5 mL) se añadió Boc-δ-Ach-OPh(PPh_2) (**96**, 79.2 mg, 0.157 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 65 °C durante 5 h. Pasado ese tiempo, se añadió H_2O (6 mL) y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 2 h. A continuación, se concentraron los disolventes y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-4% de MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 87 mg del tetrapéptido **97** como una espuma blanca. [66%, R_f = 0.33 (5 % de MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 885.4 ([M+Na]$^+$, 67), 863.4 ([MH]$^+$, 100), 807.4 ([M-OAc]$^+$, 19), 763.4 ([M-Boc]$^+$, 2). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{43}H_{67}N_4O_{14}$ ([MH]$^+$): 863.4653, **encontrado**: 863.4627.

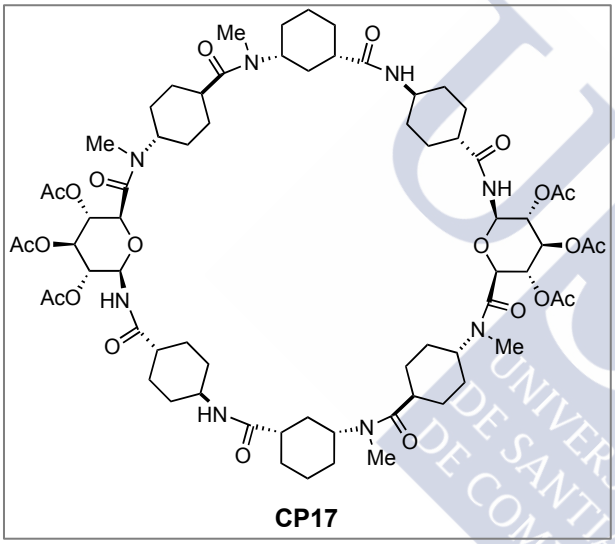


100

Boc-[(δ-Ach-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-)$_2$]-OAll (100): En un matraz de fondo redondo se disolvió una fracción del tetrapéptido **97** (40 mg, 0.046 mmol) en THF (seco, 2 mL) y se trató con morfolina (41 µL, 0.46 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (5.3 mg, 0.0046 mmol) y se agitó a ta bajo atmósfera de Ar durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró el THF y se redisolvió el crudo en CH_2Cl_2 (5 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-8% de MeOH en CH_2Cl_2) para obtener Boc-δ-Ach-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OH con un rendimiento cuantitativo.

Otra fracción del péptido **97** (40 mg, 0.046 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (1 mL) y se trató con TFA (1 mL). Después de 15 min de agitación, se eliminó el disolvente y el crudo

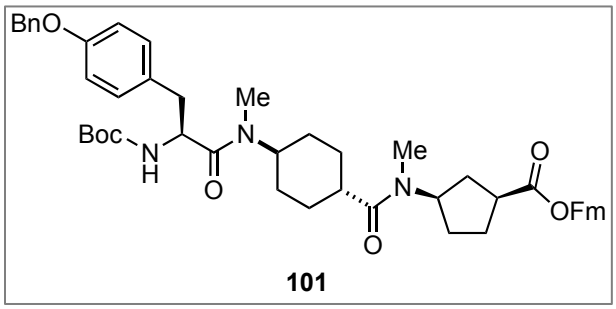
obtenido se secó durante 3h en alto vacío. Transcurrido ese tiempo, se redisolvió el crudo en una mezcla CH_2Cl_2/DMF (1:1, seco, 1 mL) y se trató con DIEA (32 µL, 0.184 mmol) y una disolución de Boc-δ-Ach-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-OH (39 mg, 0.0.046 mmol), *N*-HATU (20 mg, 0.0506 mmol) y DIEA (16 µL, 0.092 mmol) en CH_2Cl_2/DMF (1:1, seco, 1 mL) bajo atmósfera de Ar. La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se concentró el disolvente, se redisolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL). A continuación, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-8% de MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 32 mg del octapéptido **100** como una espuma amarillenta. [45%, R_f = 0.36 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EMAR (ESI) calculado** para $C_{78}H_{119}N_8O_{25}$ ($[MH]^+$): 1567.8286, **encontrado**: 1567.8282.



CP17

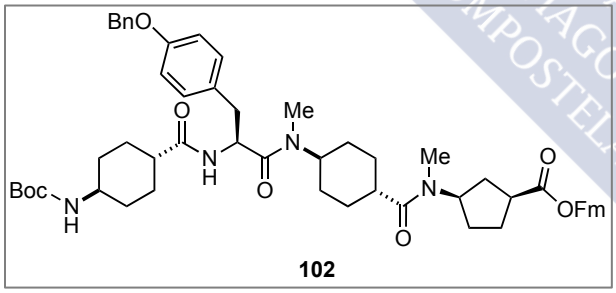
***c*-[(δ-Ach-*L*-$(Ac)_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Ach-)$_2$] (CP17):** En un matraz de fondo redondo con capacidad para 5 mL se disolvió el octapéptido **100** (30 mg, 0.02 mmol) en THF (seco, 2 mL) y se trató con morfolina (18 µL, 0.2 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (3.1 mg, 0.002 mmol) y se agitó bajo atmósfera de Ar durante 3 h a ta. Transcurrido ese tiempo, se concentró el THF, se redisolvió el crudo en CH_2Cl_2 (3 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró obteniéndose un aceite amarillento. A continuación, el crudo obtenido se disolvió en una mezcla 1:1 de CH_2Cl_2/TFA (2 mL) y se agitó a ta durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en la bomba de alto vacío. El residuo así obtenido se disolvió en la mezcla CH_2Cl_2/DMF (1:1, seco, 20 mL) bajo atmósfera de Ar y se añadieron sucesivamente DIEA (21 µL, 0.12 mmol) y N-TBTU (7.7 mg, 0.024 mmol), y se agitó a ta durante 12 h. Entonces, se eliminó la mezcla de disolventes y el crudo obtenido se redisolvió en CH_2Cl_2 (5 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía en HPLC (Phenomenex Luna 5µ sílica, 3-12% MeOH/CH_2Cl_2, Tr = 22.5 min) para obtener 15.1 mg de **CP17** como un sólido blanco. [54%]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 7.60 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH_{Aga}), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 5.35 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, $Hφ_{Aga}$), 5.24 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, $Hε_{Aga}$), 5.19 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, $Hγ_{Aga}$), 4.92 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, $Hδ_{Aga}$), 4.32 (m, 3H, $Hα_{Aga}$, $Hγ_{MeN\text{-}γ\text{-}Ach}$, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.61 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 2.81 y 2.80 (2 s, 6H, 2 x MeN), 2.35 (m, 1H, $Hα_{MeN\text{-}γ\text{-}Ach}$), 2.12 (m, 2H,

$H\alpha_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$, $H\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 1.96, 1.95 y 1.91 (3 s, 3 x OAc), 1.88-0.70 (22H, alifáticos). **EM (MALDI) calculado** para $C_{70}H_{104}N_8NaO_{22}$ ([MNa]$^+$): 1431.72, **encontrado**: 1431.715. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3307 (amida A), 1672, 1641 (amida I), 1529 cm^{-1} (amida II_{II}).



101

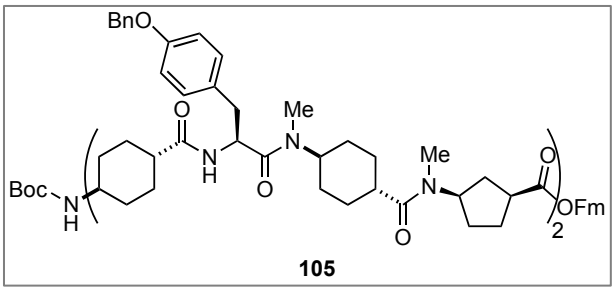
Boc-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OFm (101): Sobre una disolución del dipéptido **86** (210 mg, 0.375 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) se añadió TFA (2 mL) y se agitó a ta durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL) y se trató con DIEA (262 µL, 1.5 mmol) y se añadió una disolución de Boc-*L*-Tyr(Bn)-OH (167 mg, 0.45 mmol), DIEA (131 µL, 0.75 mmol) y *N*-HATU (171 mg, 0.45 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 60 min, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (50-100 % AcOEt en hexano), para obtener 239 mg del tripéptido **101** en forma de espuma blanca. [78%, R_f = 0.44 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 836.4 ([M+Na]$^+$, 30), 814.4 ([MH]$^+$, 100), 714.4 ([M-Boc]$^+$, 12). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{50}H_{60}N_3O_7$ ([MH]$^+$): 814.4425, **encontrado**: 814.4426.



102

Boc-δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OFm (102): En un matraz de fondo redondo con capacidad para 5 mL se disolvió el tripéptido **101** (153 mg, 0.188 mmol) en la mezcla 1:1 TFA/CH_2Cl_2 (2 mL) y se agitó durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se concentró el disolvente y el residuo obtenido se secó durante 3 h en la bomba de alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL) y se trató con DIEA (133 µL, 0.752 mmol) y se añadió una disolución de Boc-δ-Ach-OH (**44**, 56 mg, 0.23 mmol), DIEA (67 µL, 0.376 mmol) y *N*-HATU (88 mg, 0.23 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 45 min, y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-3% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 175 mg del tetrapéptido **102** en forma de espuma blanca. [99%,

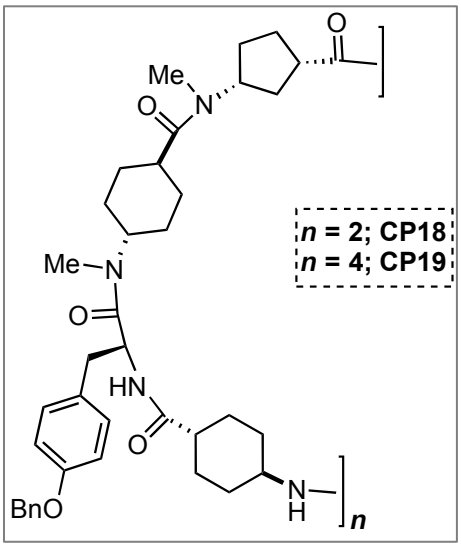
R_f = 0.36 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EMAR (ESI) calculado** para $C_{57}H_{70}N_4O_8$ ([MH]$^+$): 939.5270, **encontrado**: 939.5272.



105

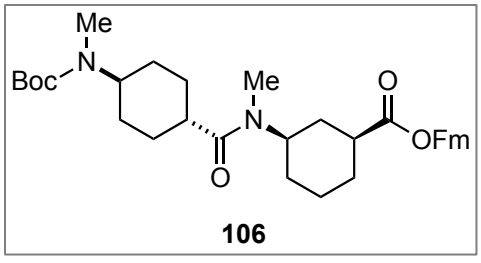
Boc-[(δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-)$_2$]-OFm (105): Una disolución del tetrapéptido **102** (100 mg, 0.106 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 25 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL). A continuación, se secó con Na_2SO_4, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OH desprotegido que se utilizó sin purificación adicional.

Una segunda disolución del tetrapéptido **102** (100 mg, 0.106 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con TFA (1 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó bajo alto vacío durante 3 h. El tetrapéptido desprotegido en su extremo *N*-terminal se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL), se trató con DIEA (72 µL, 0.424 mmol) y a continuación se trató con una disolución de Boc-δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OH, DIEA (37 µL, 0.212 mmol) y *N*-HATU (48 mg, 0.127 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 45 min, y a continuación se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-7% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 110 mg del octapéptido **105** en forma de espuma blanquecina. [67%, R_f = 0.2 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EMAR (ESI) calculado** para $C_{95}H_{120}N_8O_{13}$ ([MH]$^+$): 1580.8975, **encontrado**: 1580.8969.



***c*-[(δ- Ach-*L* -Tyr(Bn)- ^{Me}*N*-δ- Ach- ^{Me}*N*-*D*-Acp-)$_2$] y *c*-[(δ- Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*-δ- Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-)$_4$] (CP18 y CP19):** El octapéptido **105** (110 mg, 0.069 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1.2 mL), se trató con piperidina (0.3 mL) y se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 1.5 mL), y se agitó durante 15 min a ta. A continuación, se concentró a

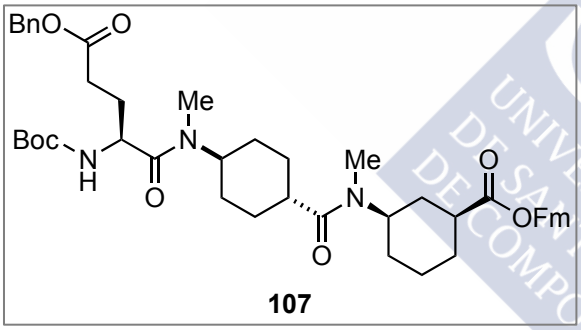
sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 70 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (27 mg, 0.083 mmol) y DIEA (71 µL, 0.414 mmol). Pasadas 12 h, se concentró la mezcla hasta un volumen reducido (20 mL) y se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 15 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 15 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-6% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 5 mg del ciclopéptido **CP18** y 11 mg del ciclopéptido **CP19** en forma de sólidos blancos. **CP18**: [12%, R_f = 0.22 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.56 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH_{Tyr}), 7.56 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 7.43-7.32 (m, 4H, Ar), 7.33-7.27 (m, 1H, Ar), 7.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar Tyr cadena lateral), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar Tyr cadena lateral), 5.28 (td, *J* = 9.9, 5.0 Hz, 1H, $Hα_{Tyr}$), 5.03 (s, 1H, $\underline{CH_2}$-O-Bn), 4.91 (m, $Hγ_{MeN\text{-}γ\text{-}Acp}$) 4.46 (m, 1H, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.91 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 3.18 (t, *J* = 11.8 Hz, 1H, $Hβ_{Tyr}$), 2.97 (m, 1H, $Hβ_{Tyr}$), 2.93 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}γ\text{-}Acp}$), 2.50 (m, 1H, $Hα_{δ\text{-}Ach}$), 2.42 (m, 2H, $Hα_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.40 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.27-2.12 (m, 2H, alifáticos), 2.09-1.98 (m, 1H, alifático), 1.97-1.67 (m, 9H, alifáticos), 1.54-1.02 (m, 9H, alifáticos), 0.91-0.78 (m, 1H, alifático). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1307.7 ($[M+Na]^+$, 15), 1307.7 ($[MH]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{76}H_{101}N_8O_{10}$ ($[MH]^+$): 1285.7635, **encontrado**: 1285.7635. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3305 (amida A), 1658, 1621 (amida I), 1510 cm^{-1} (amida II_{II}). **CP19**: [12.4%, *Rf* = 0.16 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH_{Tyr}), 7.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 7.42-7.32 (m, 4H, Ar), 7.33-7.27 (m, 1H, Ar), 7.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar Tyr cadena lateral), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar Tyr cadena lateral), 5.39 (td, *J* = 9.2, 5.7 Hz, 1H, $Hα_{Tyr}$), 5.01 (s, 1H, $\underline{CH_2}$-O-Bn), 4.93 (m, $Hγ_{MeN\text{-}γ\text{-}Acp}$), 4.40 (m, 1H, $Hδ_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 3.91 (m, 1H, $Hδ_{δ\text{-}Ach}$), 3.14 (t, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hβ Tyr), 2.99 (m, 1H, $Hβ_{Tyr}$), 2.93 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}γ\text{-}Acp}$), 2.58 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.52 (m, 1H, $Hα_{δ\text{-}Ach}$), 2.42 (m, 1H, $Hα_{MeN\text{-}δ\text{-}Ach}$), 2.27-2.12 (m, 2H, alifáticos), 2.09-1.98 (m, 1H, alifático), 2.10-1.56 (m, 16H, alifáticos), 1.50-1.00 (m, 6H, alifático). **EM (MALDI)**: 2571.3 ($[MH]^+$); calculado para **EMAR (ESI) calculado** para $C_{76}H_{101}N_8O_{10}$ ($[MH]^{2+}$): 1285.7635, **encontrado**: 1285.7638. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3310 (amida A), 1663, 1618 (amida I), 1510 cm^{-1} (amida II_{II}).



106

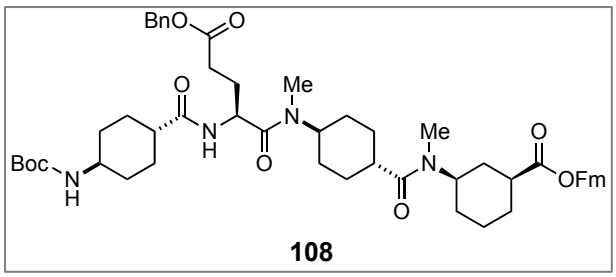
Boc-*^{Me}N*-δ-Ach-*^{Me}N-D*-Ach-OFm (106): En un matraz de fondo redondo se disolvió Boc-*^{Me}N-D*-Ach-OFm (**21**) (350 mg, 0.8 mmol) en la mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 8 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Pasado ese tiempo se concentró el disolvente y el residuo obtenido se secó durante 3 h bajo alto vacío. Entonces, el crudo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 4 mL), se trató con DIEA (540 µL, 3.2 mmol) y se añadió una disolución de **Boc-*^{Me}N*-δ-Ach-OH** (**47**, 227 mg, 0.88 mmol), *N*-HATU (354 mg, 0.93 mmol) y DIEA (270 µL, 1.56 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 4 mL). La mezcla resultante se agitó durante 45 min a ta, y pasado ese tiempo la fase

orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar una espuma amarillenta que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (30-60% de AcOEt en hexano) para obtener 403 mg del dipéptido **106**. [88%, R_f = 0.18 (40% AcOEt en hexano)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.62-7.57 (m, 2H, Ar), 7.42 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz 2H, Ar), 7.34 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2H, Ar), 4.61-4.48 (m, 2H, $H\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$ + $H\gamma_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 4.42 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH_2 OFm), 4.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH OFm), 2.89 (s, 2H, MeN), 2.81-2.71 (m, 4H, MeN), 2.55 (m, 1H, $H\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 2.28 (m, 1H, $H\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.98-1.18 (m, 16H, alifáticos). **^{13}C-RMN** ($CDCl_3$, 126 MHz, δ): 175.0 (CO), 174.3 (CO) 170.6 (CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 143.7 (C, Ar) y 141.3 (C, Ar), 127.8 (CH, Ar), 127.1 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 120.0 (CH, Ar), 79.3 (CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 66.2 y 65.8 (CH_2, OFm), 50.8 (CH, $C\alpha_{MeN\text{-}Ala}$), 46.9 (CH, $C\delta_{\delta\text{-}Ach}$), 42.5 (CH, OFm), 40.5 (CH, $C\alpha_{\delta\text{-}Ach}$), 33.1 ($CH_2$, alifáticos), 31.8 ($CH_2$, alifáticos), 29.3 ($CH_3$, MeN), 29.0 ($CH_2$, alifáticos), 28.8 ($CH_2$, alifáticos), 28.52 (CO-C-$(CH_3)_3$ BOC), 28.42 (CH_2, alifáticos), 28.28 (CH_2, alifáticos), 27.70 (CH_2, alifáticos). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 597.3 ($[M+Na]^+$, 100), 575.3 ($[MH]^+$, 40). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{35}H_{47}N_2O_5$ ($[MH]^+$): 575.3479, **encontrado:** 575.3475.



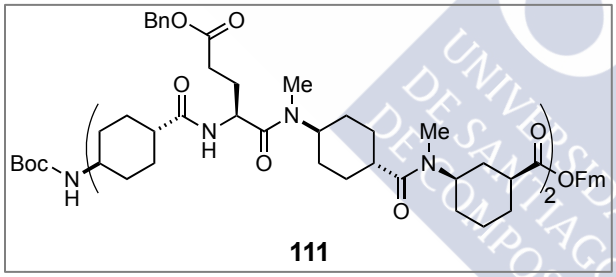
107

Boc-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OFm (107): Sobre una disolución del dipéptido **106** (300 mg, 0.52 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) se añadió TFA (3 mL) y se agitó a ta durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente y el aceite obtenido se secó durante 3 h en alto vacío. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 3 mL) y se trató con DIEA (360 µL, 2.1 mmol) y se añadió una disolución de Boc-*L*-Glu(Bn)-OH (194 mg, 0.57 mmol), DIEA (180 µL, 1.05 mmol) y *N*-HATU (237 mg, 0.62 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 3 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 60 min, y a continuación se vertió en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-2% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 402 mg del tripéptido **101** en forma de espuma blanca. [97%, R_f = 0.4 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 816.4 ($[M+Na]^+$, 100), 794.4 ($[MH]^+$, 4), 694.4 ($[M\text{-}Boc]^+$, 51). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{47}H_{60}N_3O_8$ ($[MH]^+$): 794.4375, **encontrado**: 794.4372.



108

Boc-δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OFm (108): En un matraz de fondo redondo se disolvió el tripéptido **107** (300 mg, 0.37 mmol) en una mezcla TFA/ CH_2Cl_2 (1:1, 4 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se concentró el disolvente y el aceite obtenido se secó en la bomba de alto vacío durante 3 h. A continuación, el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL), se trató con DIEA (255 µL, 1.48 mmol) y una disolución de Boc-δ-Ach-OH (**44**, 99 mg, 0.41 mmol), *N*-HATU (168 mg, 0.41 mmol) y DIEA (125 µL, 0.74 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 2 mL). La mezcla resultante se agitó durante 45 min a ta, y entonces la fase orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-3% de MeOH en CH_2Cl_2), dando 330 mg del tetrapéptido **108**. [97%, R_f = 0.38 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 941.5 ($[M+Na]^+$, 99), 919.5 ($[MH]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{54}H_{71}N_4O_9$ ($[MH]^+$): 919.5216, **encontrado**: 919.5215.

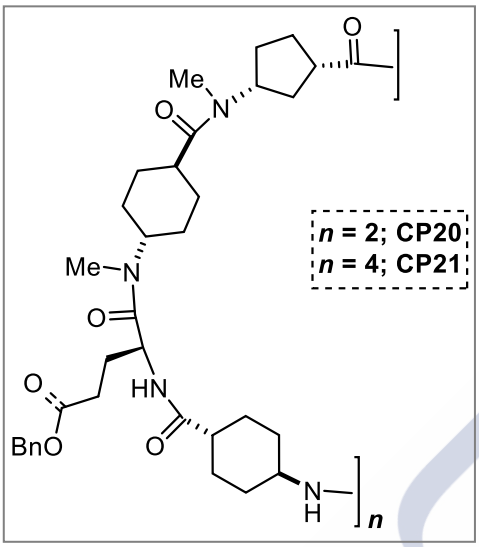


111

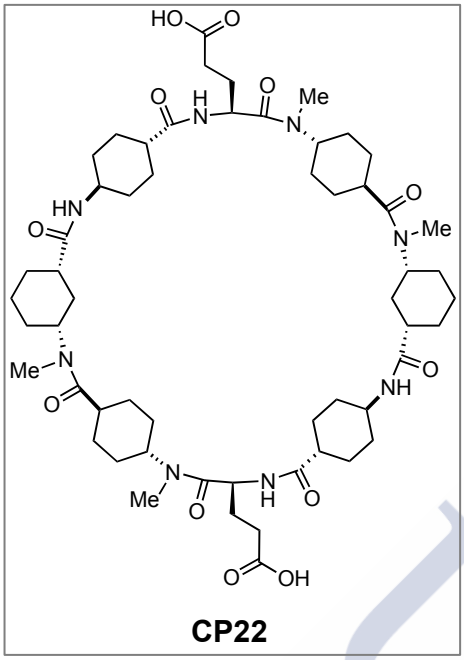
Boc-[(δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$]-OFm (111): Una disolución del tetrapéptido **108** (150 mg, 0.16 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.6 mL) se trató con piperidina (0.4 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL). A continuación, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para obtener el tetrapéptido Boc-δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OH desprotegido que se utilizó sin ninguna purificación adicional.

Una segunda disolución del tetrapéptido **111** (150 mg, 0.16 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con TFA (1 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó bajo alto vacío durante 3 h. El residuo obtenido se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL), se trató con DIEA (110 µL, 0.64 mmol) y a continuación se trató con una disolución de Boc-δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OH, DIEA (55 µL, 0.32 mmol) y *N*-HATU (73 mg, 0.192 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a ta durante 45 min, y a continuación se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (2-8% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 230 mg del octapéptido **111** en forma de espuma blanquecina.

[95%, R_f = 0.24 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1563.9 ([M+Na]$^+$, 35), 1542.9 ([MH]$^+$, 53), 1441.8 ([M-Boc]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{89}H_{121}N_8O_{15}$ ([MH]$^+$): 1541.8946, **encontrado**: 1541.8945.

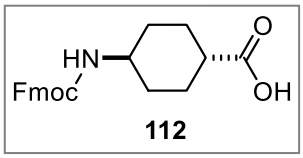


***c*-[(δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-)$_2$] y *c*-[(δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-)$_4$] (CP20 y CP21):** El octapéptido **111** (200 mg, 0.13 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 1.2 mL), se trató con piperidina (0.3 mL) y se agitó durante 30 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío para obtener una espuma blanca. El crudo obtenido se disolvió en una mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 1.5 mL), y se agitó durante 15 min a ta. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo resultante se secó bajo alto vacío durante 3 h. El péptido lineal desprotegido se disolvió en CH_2Cl_2 (seco, 130 mL) bajo atmósfera de Ar, y se añadió sucesivamente *N*-TBTU (50 mg, 0.15 mmol) y DIEA (134 µL, 0.78 mmol). Pasadas 12 h, se concentró la mezcla hasta un volumen reducido (25 mL) y se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 15 mL) y de Na_2CO_3 (saturada, 3 x 15 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1-8% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 78 mg del ciclopéptido **CP20** y 23.8 mg del ciclopéptido **CP21** en forma de sólidos blancos. **CP20**: [49%, R_f = 0.28 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH_{Glu}), 7.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 7.35-7.25 (m, 5H, Ar), 5.08 (s, 2H, $\underline{CH_2}$-O-Bn), 5.05 (m, 1H, $H\alpha_{Glu}$), 4.67-4.44 (m, 2H, $H\gamma_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$ + $H\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 3.86 (m, 1H, $H\delta_{\delta\text{-}Ach}$), 2.94 (s, 3H, MeN), 2.91 (m, 1H, $H\alpha_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 2.89 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 2.68 (m, 1H, $H\alpha_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 2.57-2.31 (m, 4H; $H\alpha_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$ + 2H, $H\beta_{Glu}$ + 1H, $H\alpha_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 2.10-1.10 (m, 26H, alifático). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1267.7 ([M+Na]$^+$, 19), 1245.7 ([MH]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{70}H_{101}N_8O_{12}$ ([MH]$^+$): 1245.7533, **encontrado**: 1245.7534. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3308 (amida A), 1659, 1618 (amida I), 1528 cm^{-1} (amida II_{II}). **CP21**: [15 %, R_f = 0.25 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 8.30 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, NH_{Glu}), 7.62 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, $NH_{δ\text{-}Ach}$), 7.35-7.29 (m, 5H, Ar), 5.22 (m, 1H, $H\alpha_{Glu}$), 5.08 (s, 2H, $\underline{CH_2}$-O-Bn), 4.64-4.40 (m, 2H; $H\gamma_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$ + $H\delta_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 3.91 (m, 1H, $H\delta_{\delta\text{-}Ach}$), 3.03 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 2.93 (s, 3H, $MeN_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$), 2.91 (m, 1H, $H\alpha_{MeN\text{-}\gamma\text{-}Ach}$), 2.63 (m, 1H, $H\alpha_{\gamma\text{-}Ach}$), 2.54-2.28 (m, 4H; $H\alpha_{MeN\text{-}\delta\text{-}Ach}$ + 2H, $H\beta_{Glu}$ + $H\alpha_{\delta\text{-}Ach}$) 2.07-1.32 (m, 26H, alifático). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{140}H_{200}N_{16}NaO_{24}$ ([MH]$^{2+}$): 1256.7455, **encontrado**: 1256.7455. **FTIR** (293K, $CHCl_3$): 3313 (amida A), 1659, 1618 (amida I), 1530 cm^{-1} (amida II_{II}).



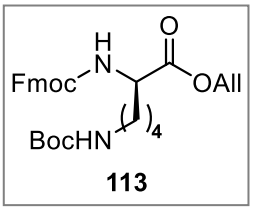
CP22

***c*-[(δ-Ach-*L*-Glu-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$] (CP22):** Una disolución del péptido *c*-[(δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$] (**CP20**) (35.0 mg, 0.028 mmol) en una mezcla MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL), que se desgasificó durante 5 min, se trató con Pd/C (10% sobre carbono, 0.6 mg, 0.0056 mmol) y se agitó a ta bajo atmósfera de hidrógeno generada por dos globos. Transcurridas 2 h, la mezcla resultante se filtró a través de celita, y el residuo se lavó con CH_2Cl_2/MeOH (1:1) y con MeOH. La disolución filtrada se concentró hasta sequedad, obteniéndose 5 mg del ciclopéptido en forma de sólido blanco. [16%, R_f = 0.28 (5% MeOH en CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1065.6 ([MH]$^+$, 20), 533.5 ([MH]$^{2+}$, 100).



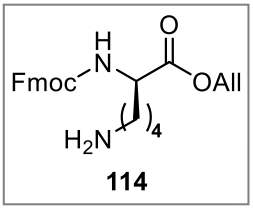
112

Ácido (*trans*)-4-amino-N-9H-fluoren-9-il-metoxi-carbonilciclohexano-1-carboxílico (Fmoc-δ-Ach-OH, 112): En un matraz de fondo redondo se disolvió Boc-δ-Ach-OH (**44**) (2.0 g, 8.24 mmol) en la mezcla TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 40 mL) y se agitó a ta durante 15 min. Pasado ese tiempo se concentró el disolvente y el residuo obtenido se secó durante 3 h bajo alto vacío. A continuación, el residuo se disolvió en una disolución de Na_2CO_3 (10%, 40 mL) y se añadió lentamente, por medio de un embudo de adición compensada, una disolución de Fmoc-O-Suc (3.05 g, 9.06 mmol) en dioxano (40 mL). Después de 4 h de agitación a ta, se concentró el dioxano y apareció un precipitado que se filtró y se lavó con CH_2Cl_2, AcOEt y Éter. A continuación, se disolvió el crudo en una mezcla CH_2Cl_2/MeOH (1:1, 20 mL) se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad, para obtener 2.68 g del Fmoc-δ-Ach-OH en forma de sólido blanco. [88%, R_f = 0.75 (CH_2Cl_2)]. **^{1}H-RMN** (DMSO$_{d6}$, 500 MHz, δ): 12.03 (s, 1H, COOH), 7.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.67 (d, *J* = 7.4, 2H, Hz, Ar), 7.45-7.35 (m, 2H, Ar), 7.31 (td, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 2H, Ar), 7.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, NH), 4.32-4.23 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.22-4.14 (m, 1H, CH Fmoc), 3.21 (m, 1H, Hδ), 2.15-2.01 (m, 1H, Hα), 1.95-1.75 (m, 4H, Alifáticos), 1.42-1.08 (m, 4H, Alifáticos). **^{13}C-RMN** (DMSO$_{d6}$, 125 MHz, δ): 177.0 (CO), 155.7 (CO), 144.3, (C, Ar), 141.2 (C, Ar), 128.0 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 125.6 (CH, Ar), 120.5 (CH, Ar), 110.2 (CH, Fm), 65.5 (CH_2, Fm), 49.7 (CH, C_δ), 47.2 (CH, Fm), 42.1 (CH, C_α), 32.1 (CH_2, Alifáticos), 28.1 (CH_2, Alifáticos) **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 388.2 ([M+Na]$^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{22}H_{23}NNaO_4$ ([MH]$^+$): 388.1519, **encontrado**: 388.1517.



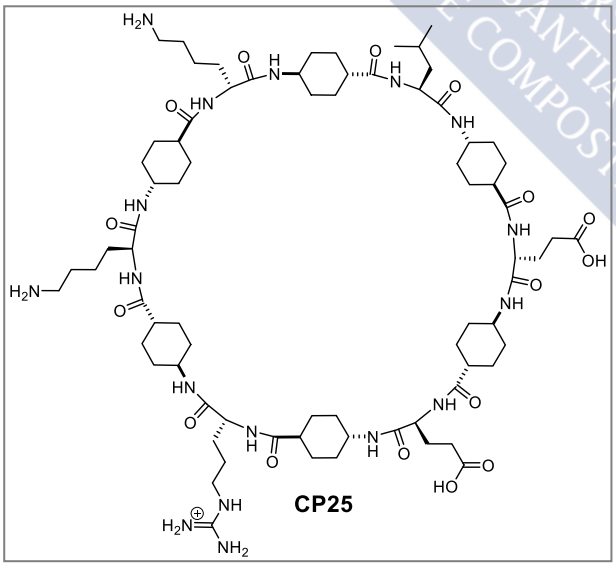
113

Fmoc-*D*-Lys(Boc)-OAll (113): Una disolución del aminoácido comercial Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (500 mg, 1.07 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 6 mL), se trató con DCC (440 mg, 2.13 mmol), DMAP (26 mg, 0.213 mmol) y alcohol alílico (5.58 g, 6.2 mL, 96 mmol), y se agitó a ta bajo atmósfera de Ar durante 4 h. Pasado ese tiempo, se concentró el disolvente, y el crudo obtenido se redisolvió en CH_2Cl_2 (10 mL). La disolución orgánica se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 10 mL) y $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_3 anhidro, y se concentró para dar un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-1% MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 503 mg del Fmoc-*D*-Lys(Boc)-OAll en forma de aceite incoloro, y cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los publicados en la bibliografía. [93%, R_f = 0.77 (5% MeOH en CH_2Cl_2)].

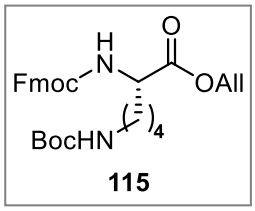


114

Fmoc-*D*-Lys-OAll (114): En un balón de fondo redondo se disolvió el Fmoc-*D*-Lys(Boc)-OAll (**113**) en CH_2Cl_2 (4 mL), se trató TFA (4 mL) y se agitó a ta durante 30 min. Pasado ese tiempo, se concentró el disolvente y el residuo obtenido se secó durante 3 h bajo alto vacío. El crudo obtenido se empleó en el siguiente paso de reacción sin ninguna purificación adicional.

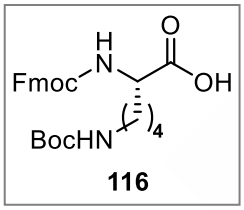

CP25

***c*-[(δ-Ach-*L*-Leu-δ-Ach-*D*-Glu-δ-Ach-*L*-Glu-δ-Ach-*D*-Arg-δ-Ach-*L*-Lys-δ-Ach-*D*-Lys-)] (CP25):** El ciclopéptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptido en fase sólida descrito anteriormente, empleando la resina 2-CTC precargada con Fmoc-*D*-Lys-OAll (**114**) (carga: 0.4 mmol/g, 250 mg, 0.1 mmol). Se emplearon los aminoácidos Fmoc-δ-Ach-OH (146.0 mg, 0.4 mmol por acoplamiento), Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OH (187.4 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*D*-Arg(Pbf)-OH (260.0 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*L*-Glu(^{t}Bu)-OH (164.5 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*D*-Glu(^{t}Bu)-OH (164.5 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*L*-Leu-OH (141.4 mg, 0.4 mmol). Tras el correspondiente tratamiento con una disolución de TFA/CH_2Cl_2/H_2O/TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se lavó con éter, AcOEt, CH_2Cl_2 y CH_2Cl_2/MeOH (1:1). EMAR (MALDI): **calculado** para $C_{76}H_{127}N_{17}O_{16}$: 1534.9719, **encontrado**: 1534.8625.



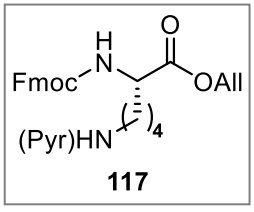
115

Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OAll (115): En un balón de fondo redondo se disolvió el Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OH (1.0 g, 2.13 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 12 mL), se añadió sucesivamente DCC (880 mg, 4.26 mmol), DMAP (52 mg, 0.426 mmol) y 2-propen-1-ol (12 mL, 190 mmol) y se agitó a ta durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró el disolvente, se redisolvió en CH_2Cl_2 (20 mL) y se lavó con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 15 mL) y $NaHCO_3$ (saturado, 3 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró para obtener un aceite amarillento que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-2% MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 1.12 g del compuesto deseado como un aceite transparente cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los publicados en la bibliografía. [98%, R_f = 0.75 (5% MeOH en CH_2Cl_2)].



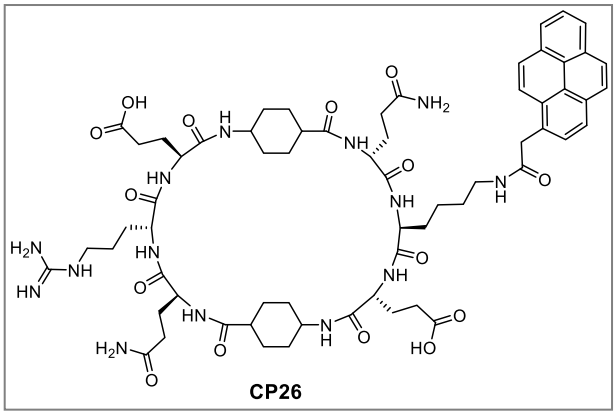
116

Fmoc-*L*-Lys(Pyr)-OAll (116): En un balón de fondo redondo se disolvió el Fmoc-*L*-Lys(Boc)-All (**115**) (720 g, 1.41 mmol) en una mezcla de TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 14 mL) y se agitó a ta durante 20 min. Transcurrido ese tiempo la mezcla se concentró y el residuo se secó bajo alto vacío durante 3 h. El residuo obtenido se redisolvió en CH_2Cl_2 (seco, 14 mL), se trató con DIEA (1.17 mL, 6.84 mmol), *N*-HBTU (640 mg, 1.69 mmol) y ácido 1-pirenoacético (367 mg, 1.41 mmol). La mezcla resultante se agitó a ta durante 45 min, y a continuación se lavó la fase orgánica con unas disoluciones acuosas de HCl (5%, 3 x 5 mL) y de $NaHCO_3$ (saturada, 3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar un sólido amarillo que se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (0-4% MeOH en CH_2Cl_2) para obtener 705 mg de 116 como un sólido amarillo pálido cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los publicados en la bibliografía. [77%, R_f = 0.2 (2% MeOH en CH_2Cl_2)].



117

Fmoc-*L*-Lys(Pyr)-OH (117): Sobre una disolución de Fmoc-*L*-Lys(Pyr)-OAll (**116**) (250 mg, 0.38 mmol) en CH_2Cl_2 (seco, 35 mL) se añadió NMM (0.418 mL, 3.8 mmol), PPh_3 (150 mg, 0.57mmol) y $PheSiH_3$ (0.469 mL, 3.8 mmol) y se desoxigenó la disolución durante 5 min. A continuación, se añadió $Pd(OAc)_2$ (22 mg, 0.095 mmol) y se agitó a ta durante 2 h. Pasado ese tiempo, se lavó la disolución orgánica con una disolución acuosa de HCl (3 x 10 mL) se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró hasta sequedad. El sólido amarillo obtenido se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (1-4% MeOH en CH_2Cl_2 + 0.05% de TFA) para obtener 175 mg de **117** como un sólido amarillo pálido cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los publicados en la bibliografía. [75%, R_f = 0.25 (5% MeOH en CH_2Cl_2)].



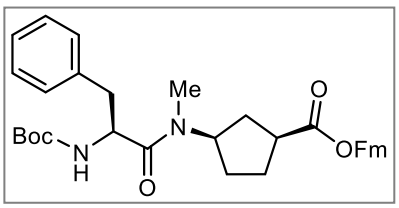
***c*-[(*L*-Lys(Pyr)-*D*-Glu-δ-Ach-*L*-Gln-*D*-Arg-*L*-Glu-δ-Ach-*D*-Gln-)] (CP26):** El ciclopéptido fue preparado siguiendo el procedimiento general de síntesis de péptido en fase sólida descrito anteriormente, empleando la resina Rink Amida (carga: 0.48 mmol/g, 210 mg, 0.1 mmol). Se emplearon los aminoácidos Fmoc-D-Glu-OAll (164 mg, 0.4 mmol), Fmoc-δ-Ach-OH (146.0 mg, 0.4 mmol por acoplamiento), Fmoc-*L*-Glu(^{t}Bu)-OH (170 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*D*-Arg(Pbf)-OH (260.0 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*L*-Gln(Trt)-OH (244 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*D*-Glu(^{t}Bu)-OH (177 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*L*-Lys(Pyr)-OH (61 mg, 0.1 mmol). Tras el correspondiente tratamiento con una disolución de TFA/CH_2Cl_2/H_2O/TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo resultante se lavó con éter, AcOEt, CH_2Cl_2 y CH_2Cl_2/MeOH (1:1). **EM (ESI)** [m/z, (%)]: 1291.1 ([MH]$^+$, 60), 646.3 ([MH]$^{2+}$, 100). EMAR (ESI): **calculado** para $C_{64}H_{87}N_{14}O_{15}$: 1291.6470, **encontrado**: 1291.6471.

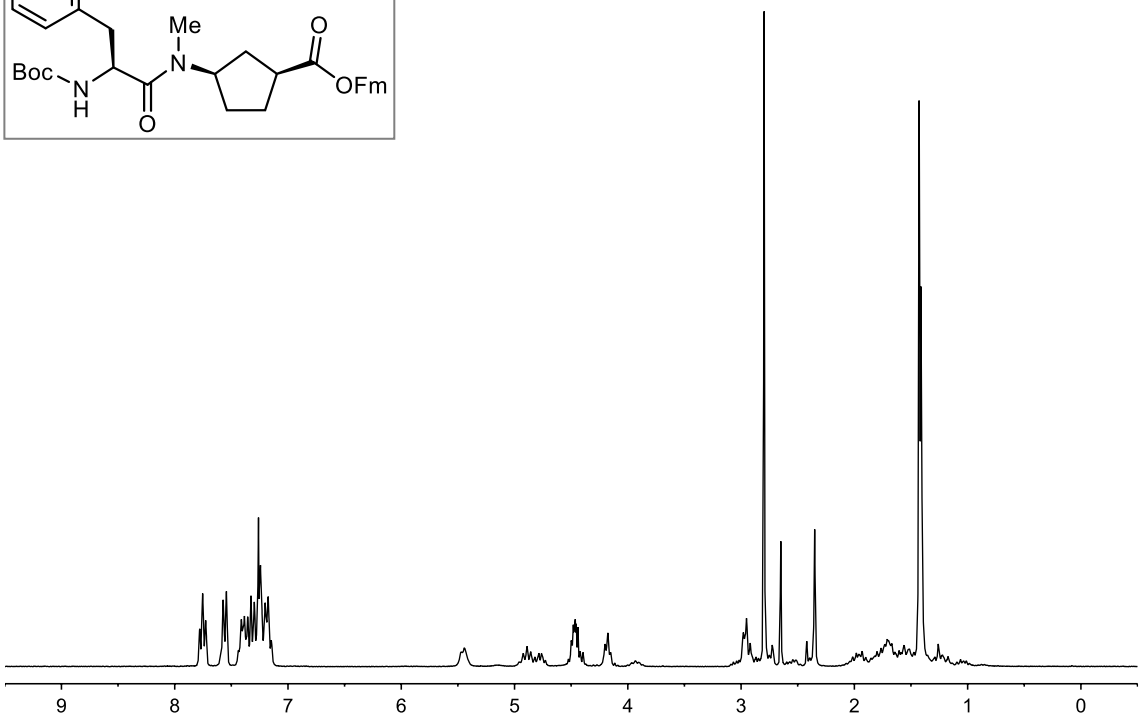
Anexo

Anexo I (Espectros de RMN y FTIR de los compuestos)

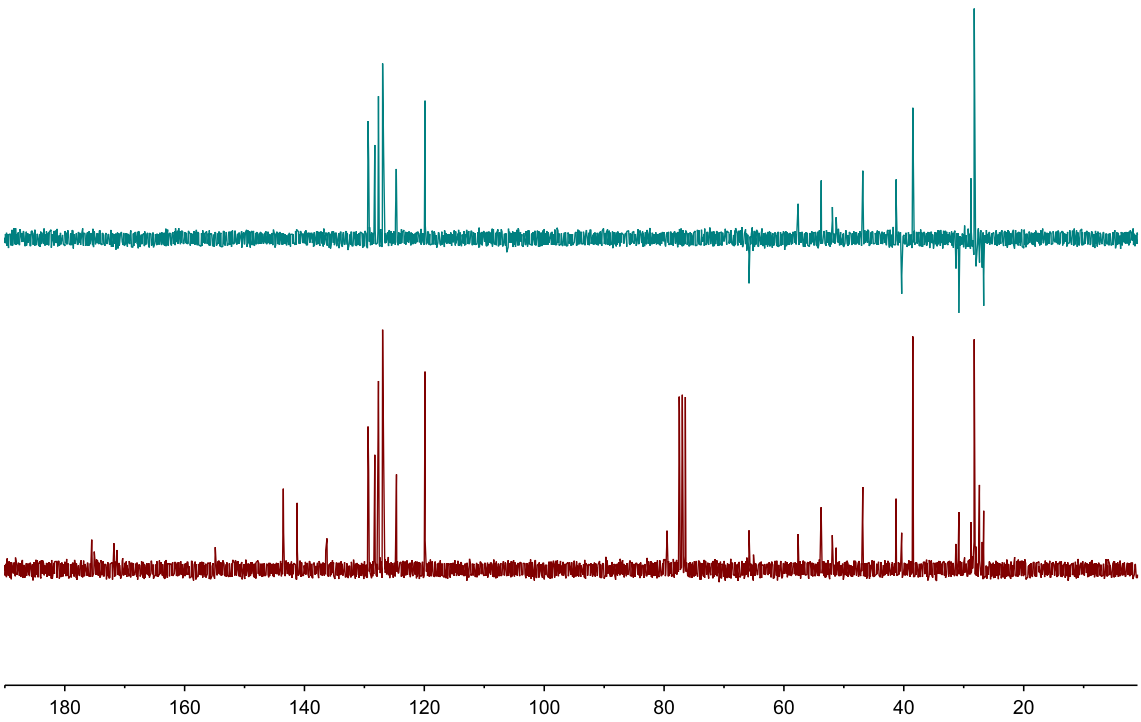
Boc-*L*-Phe-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm (8)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 298K, 300 MHz)



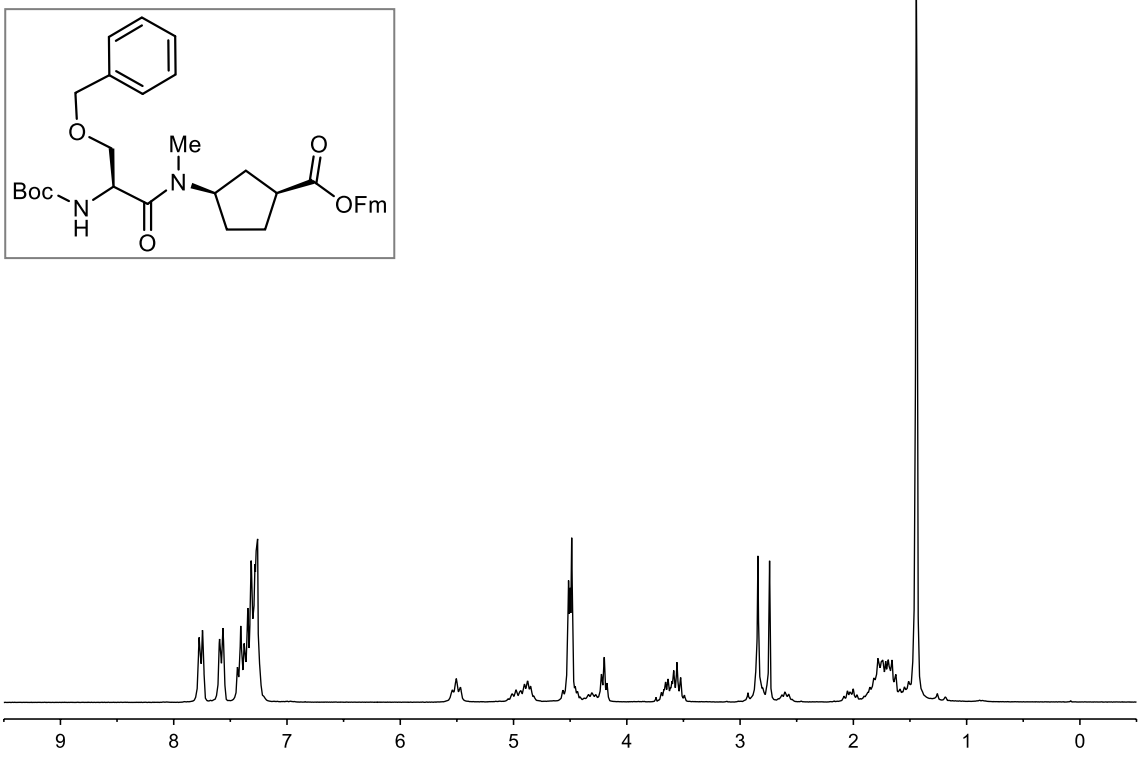


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 298K, 63 MHz)

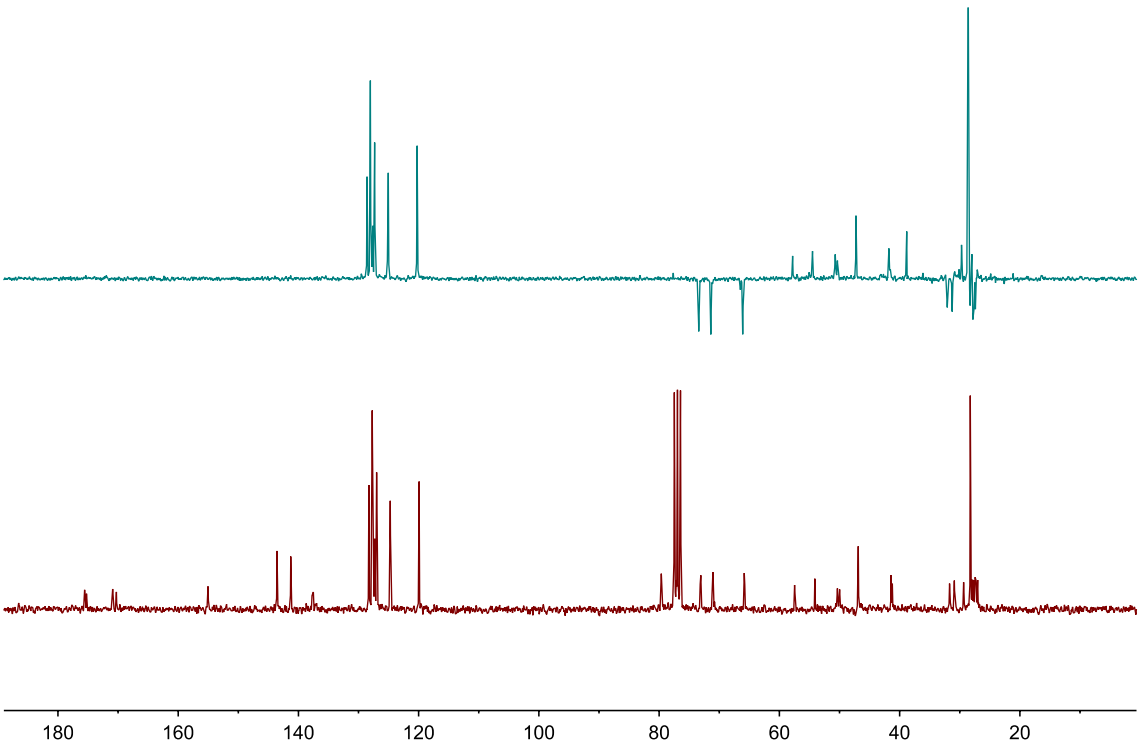


Boc-*L*-Ser(Bn)-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-OFm (11)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 298K, 300 MHz)

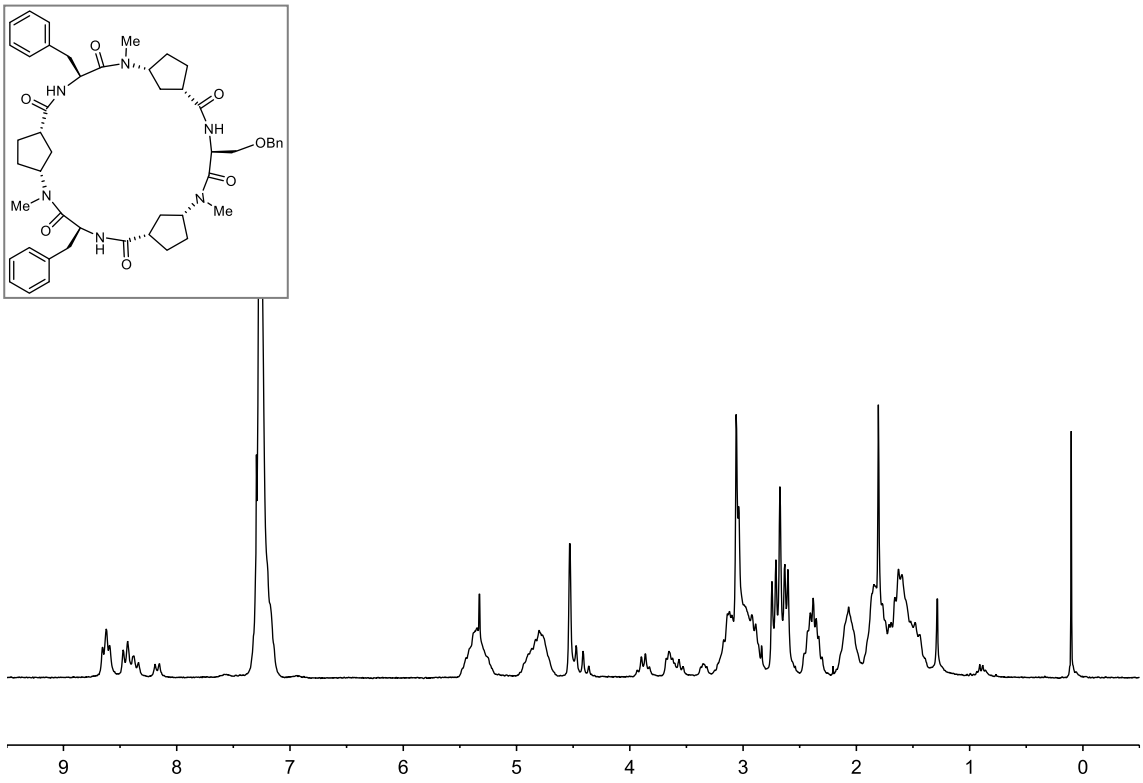


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 298K, 63 MHz)

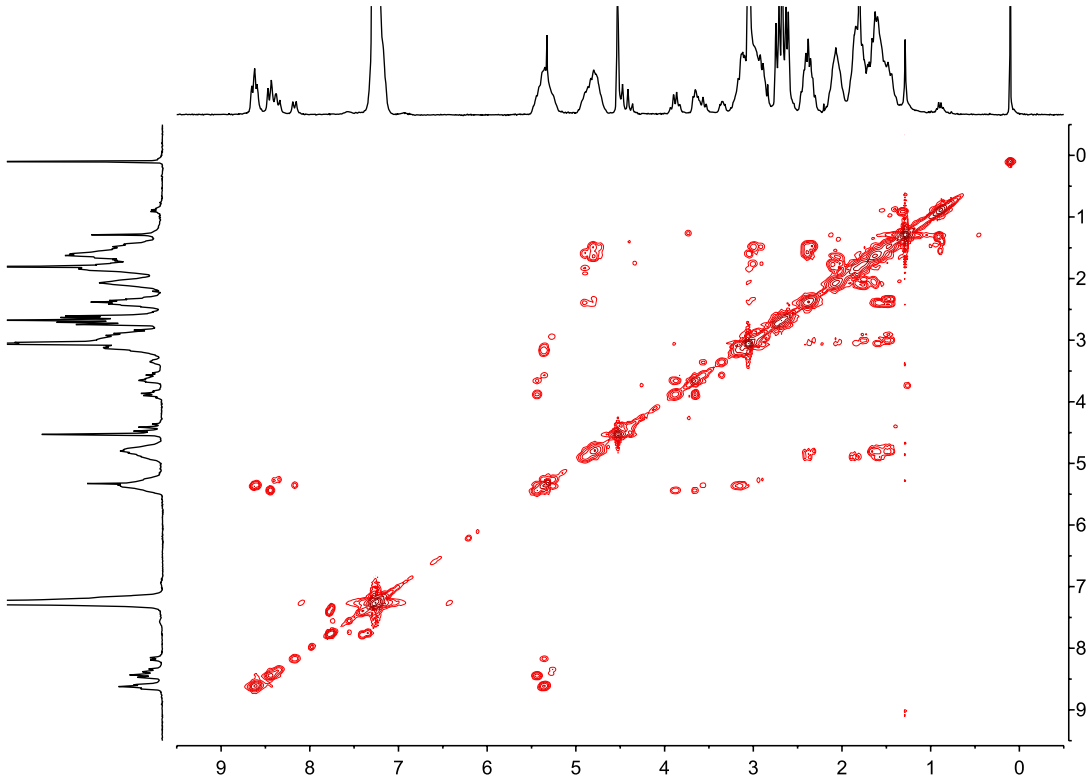


c-[*L*-Ser(Bn)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP1)

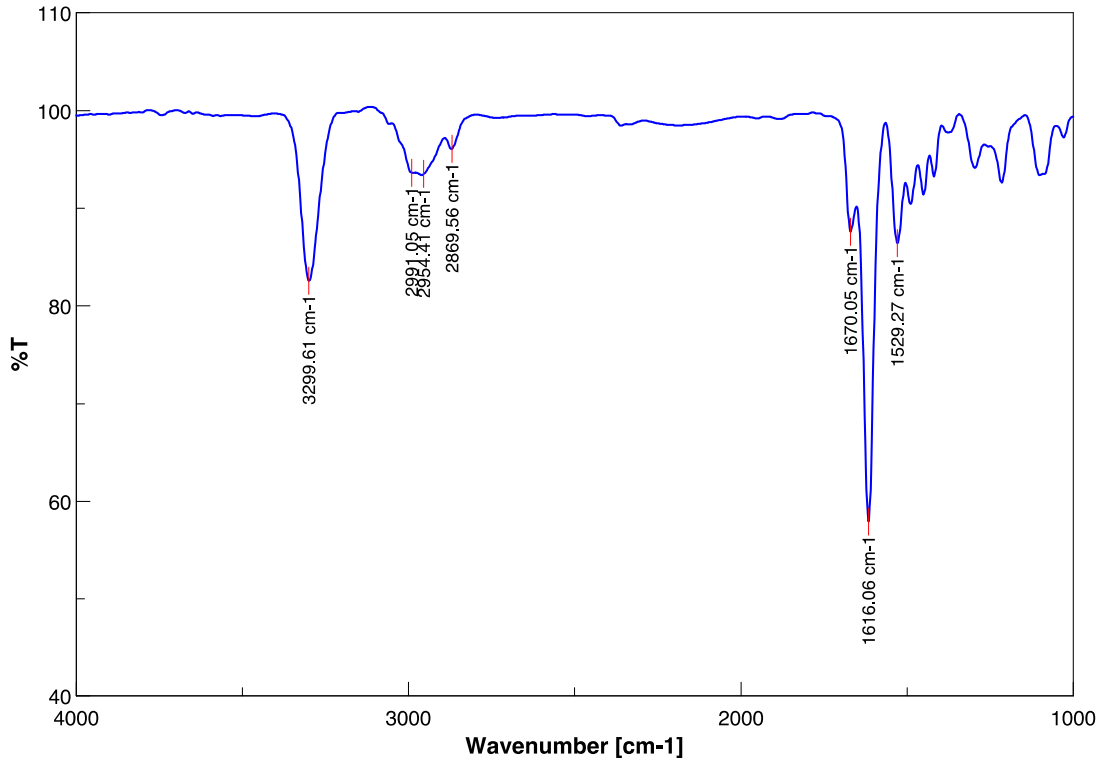
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 298K, 500 MHz)



b) **COSY** ($CDCl_3$, 298K, 500 MHz)

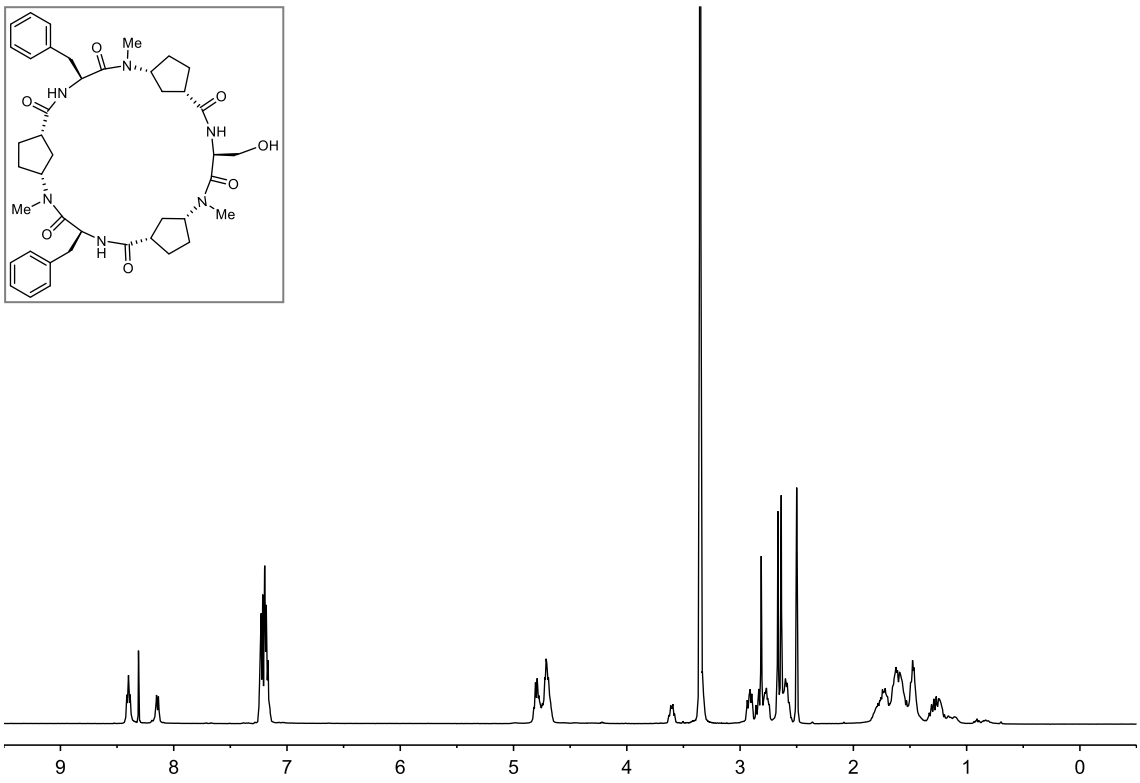


a) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298K)

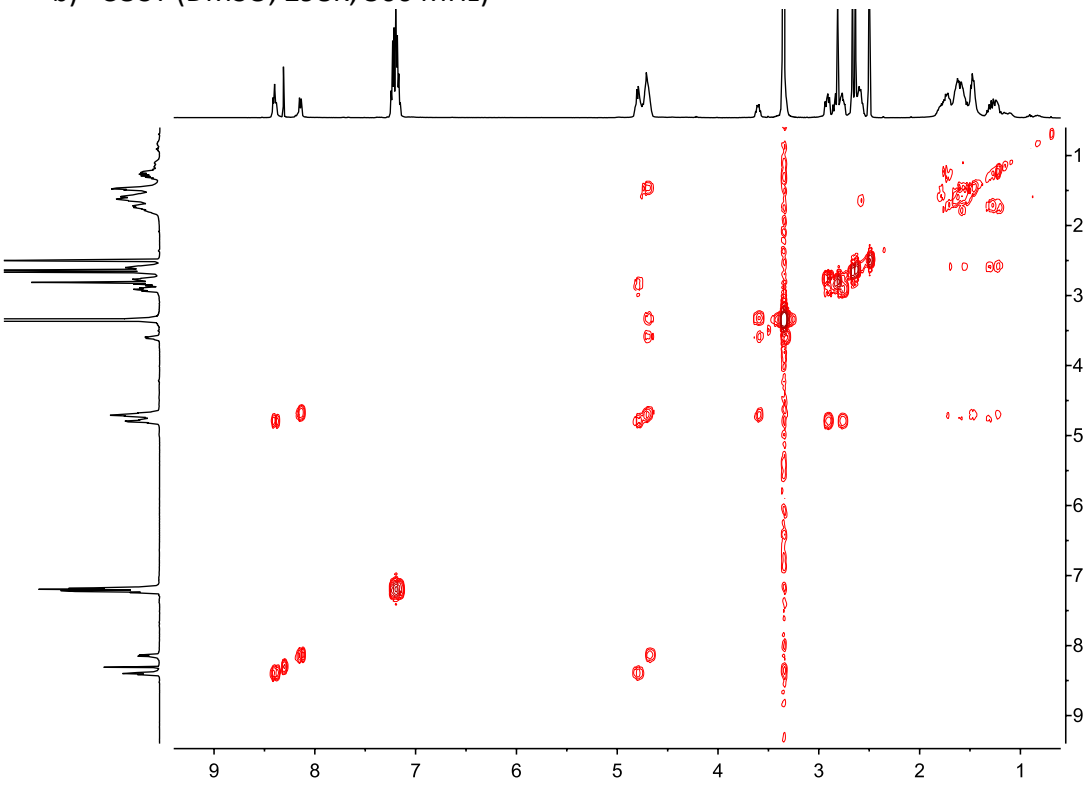


c-[*L*-Ser-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP2)

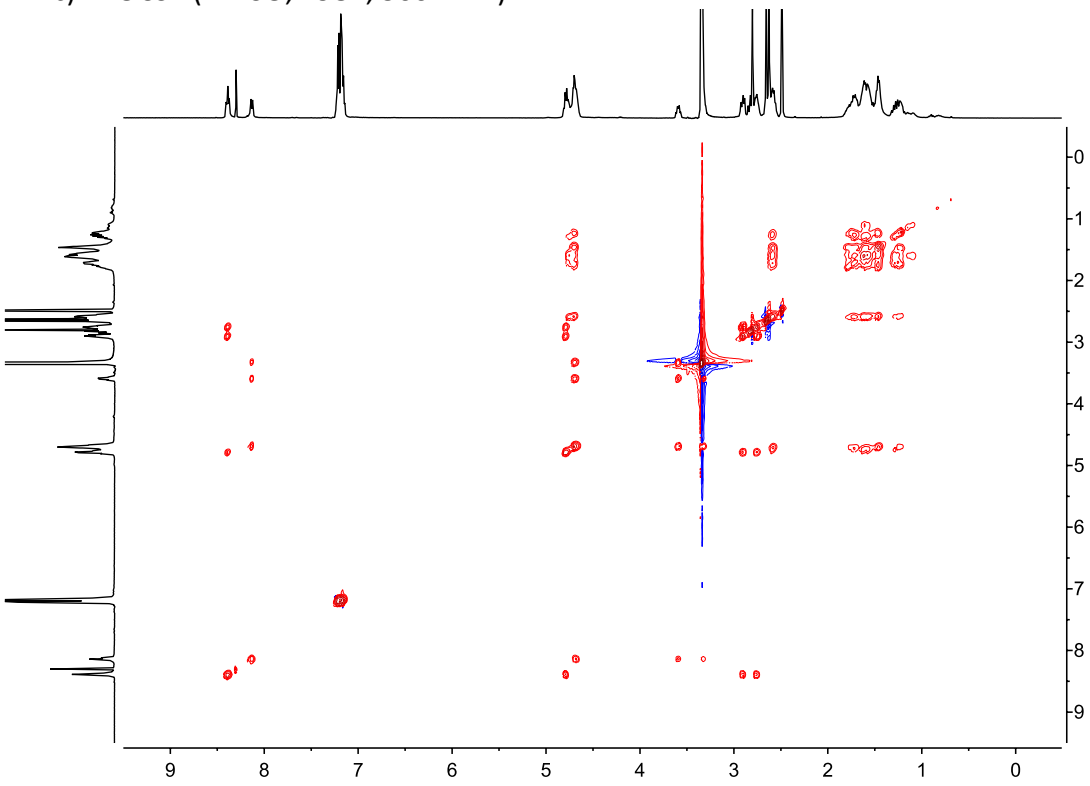
a) **^{1}H RMN** (DMSO, 298K, 500 MHz)



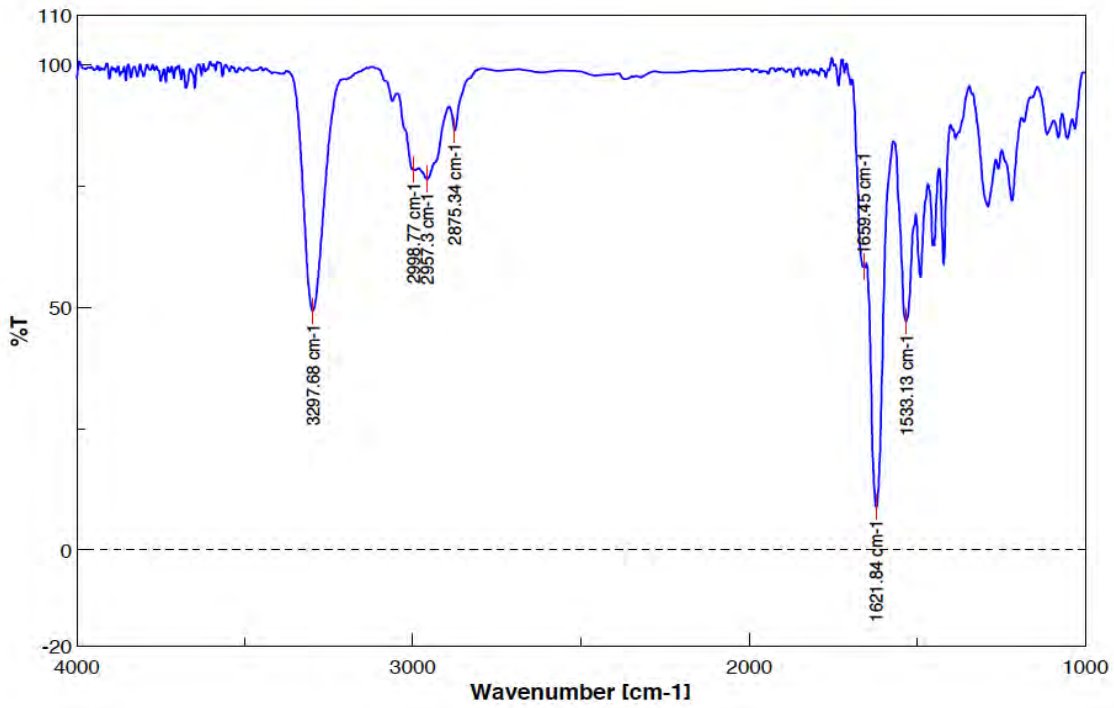
b) COSY (DMSO, 298K, 500 MHz)



c) TOCSY (DMSO, 298K, 500 MHz)

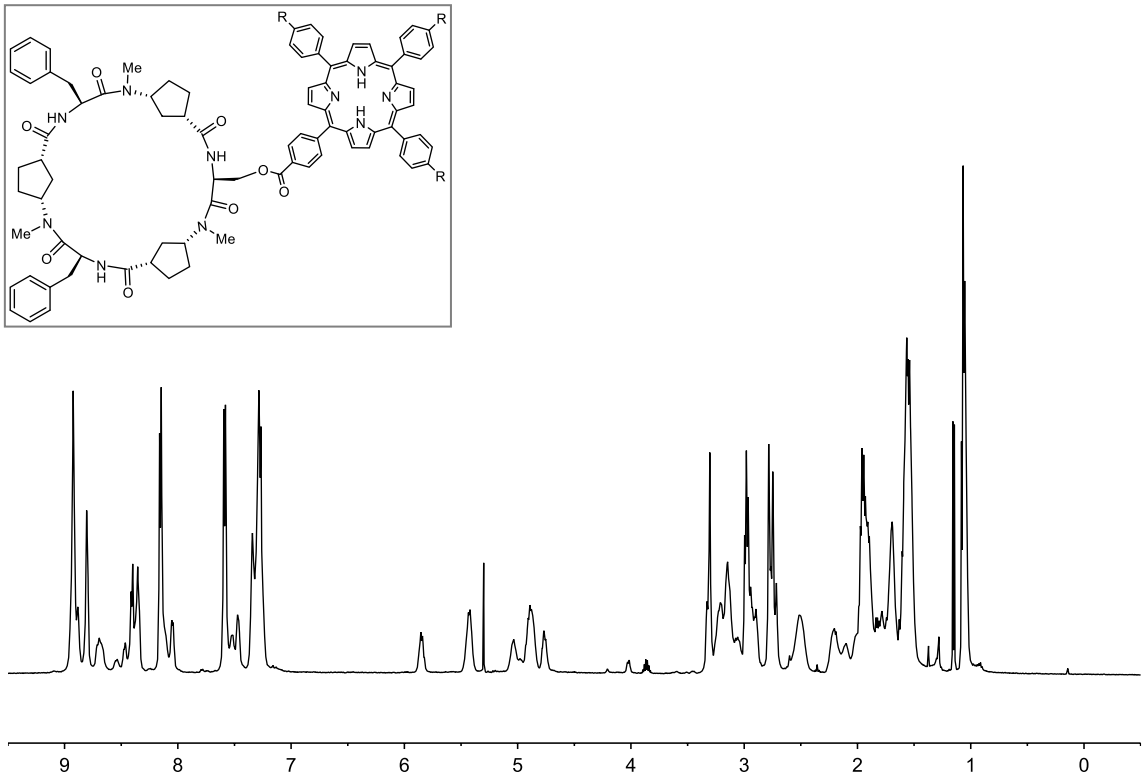


d) FT-IR ($CHCl_3$, 298 K)

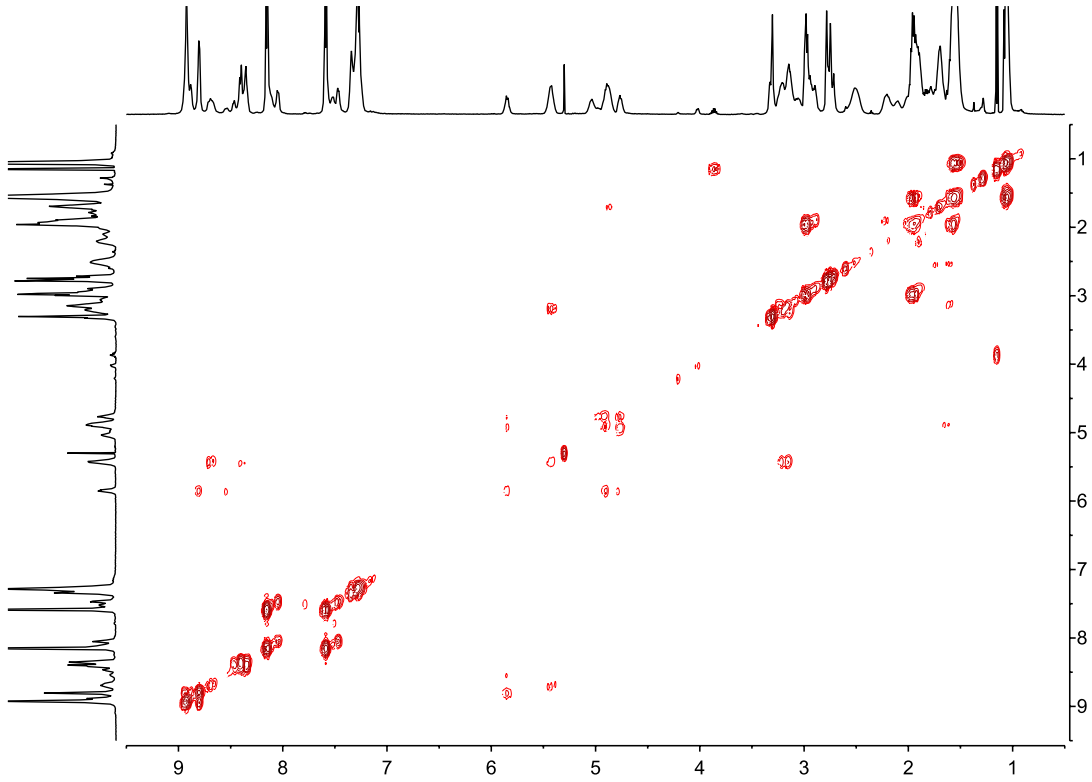


c-[*L*-Ser(CTTP)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP3)

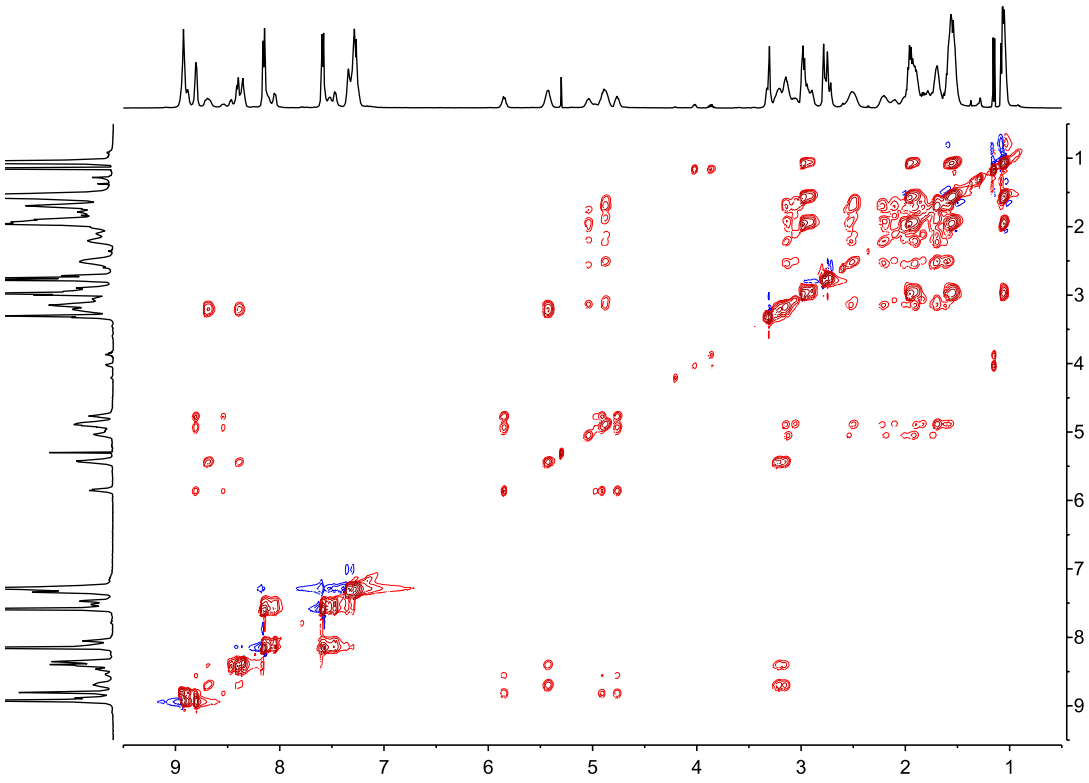
a) **^{1}H RMN** ($CHCl_3$, 298K, 500 MHz)



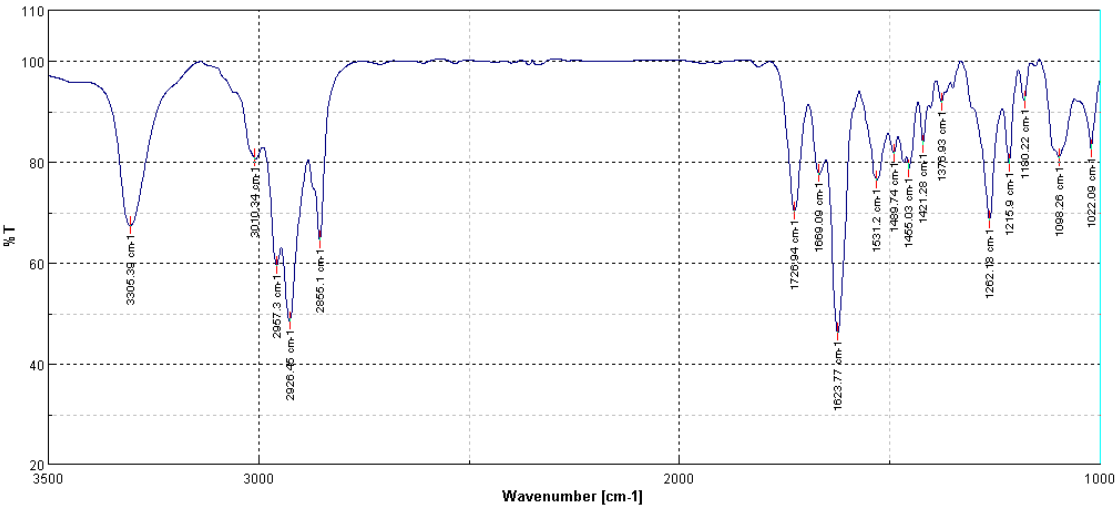
b) **COSY** ($CHCl_3$, 298K, 500 MHz)



c) **TOCSY** ($CHCl_3$, 298K, 500 MHz)

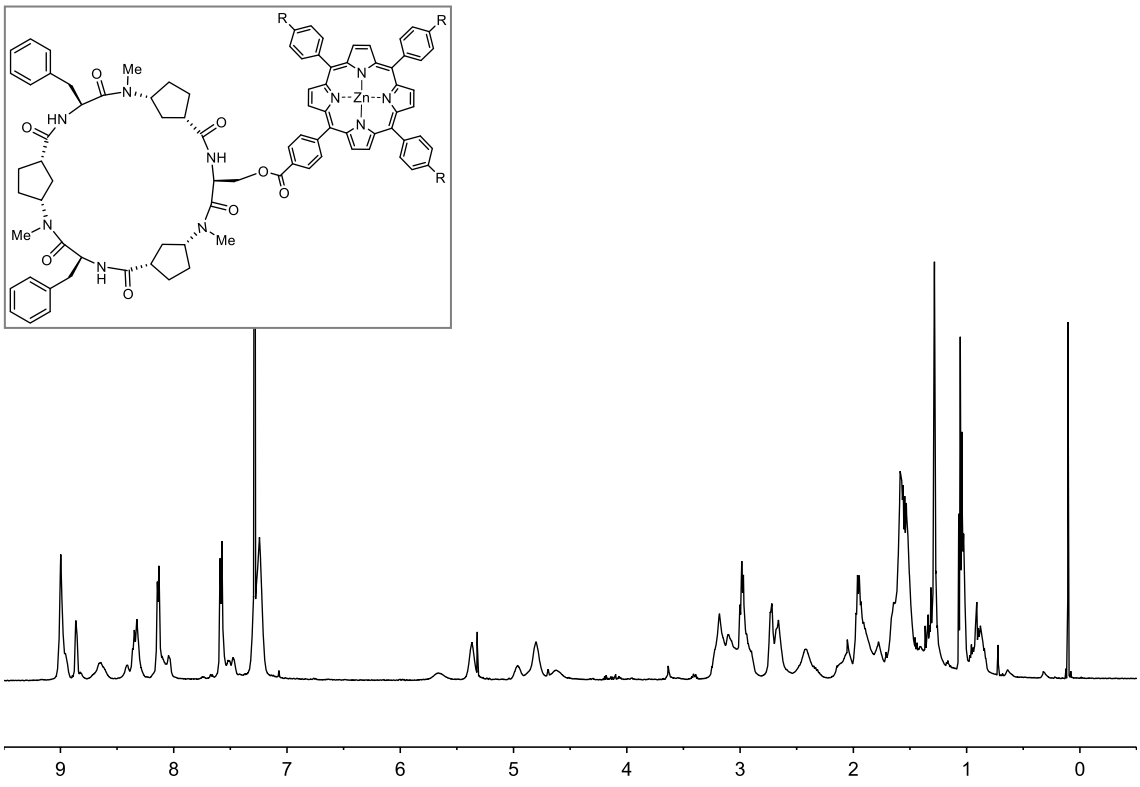


d) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298 K)

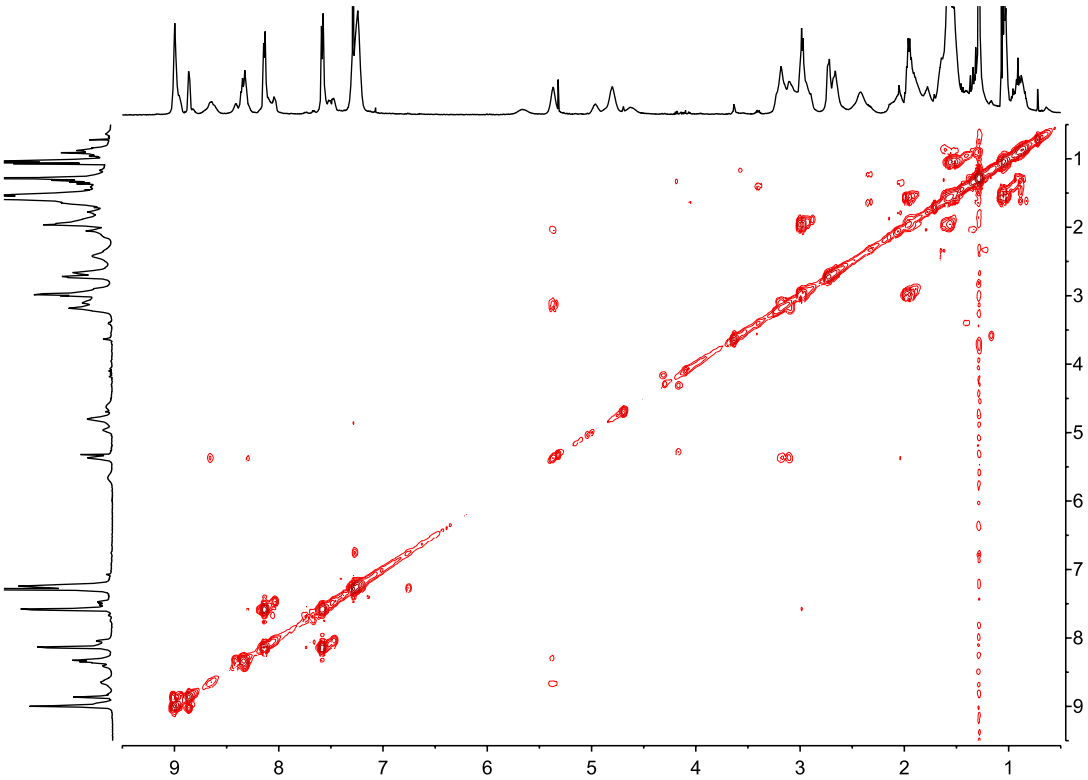


c-[*L*-Ser(CZnTTP)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP3$_{Zn}$)

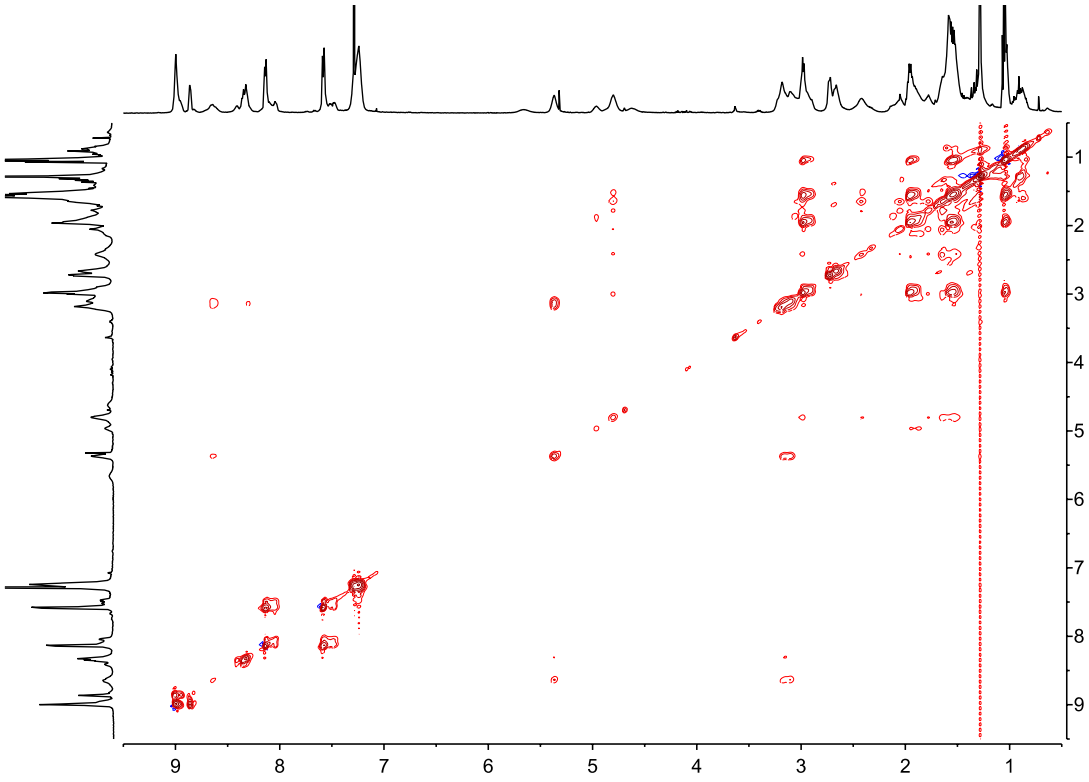
a) **^{1}H RMN** ($CHCl_3$, 298K, 500 MHz)



b) **COSY** ($CHCl_3$, 298K, 500 MHz)

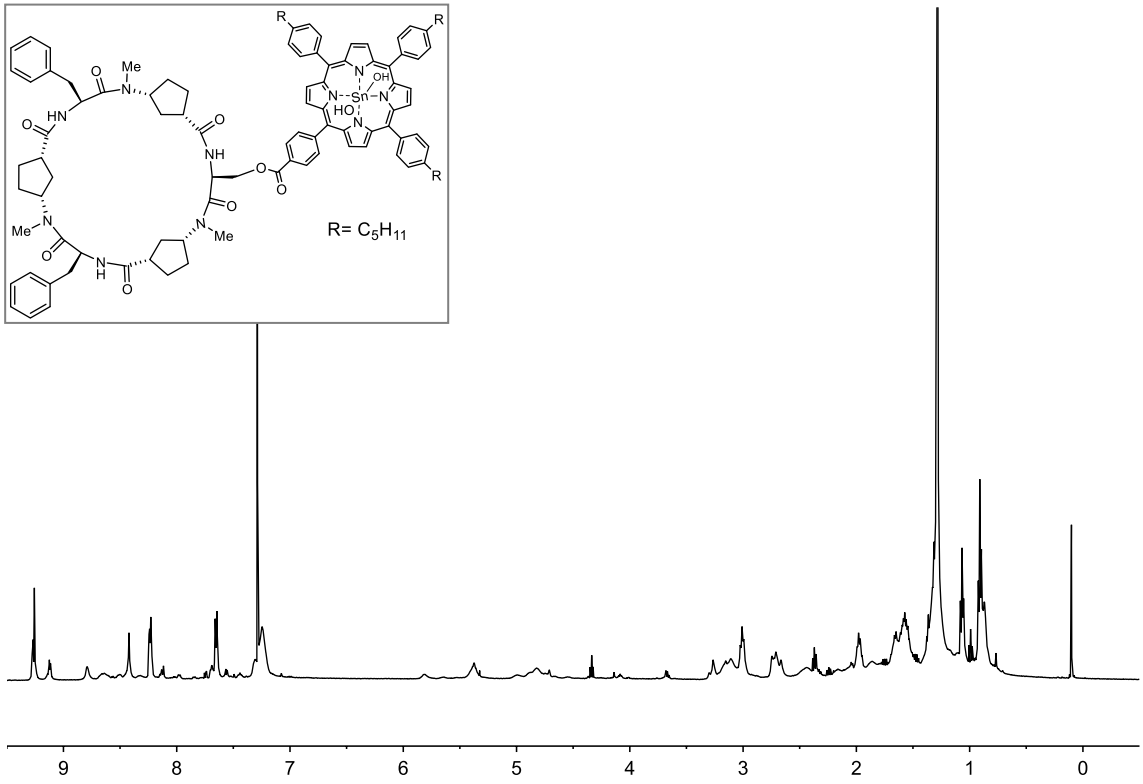


c) **TOCSY** ($CHCl_3$, 298K, 500 MHz)



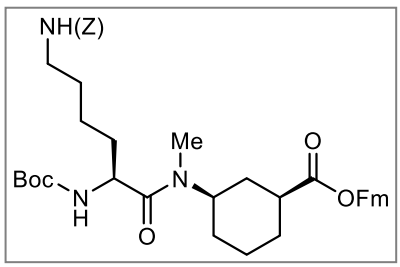
c-[*L*-Ser(CSn(OH)$_2$TTP)-^{Me}*N*-γ-Acp-(Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Acp-)$_2$] (CP3$_{Sn}$)

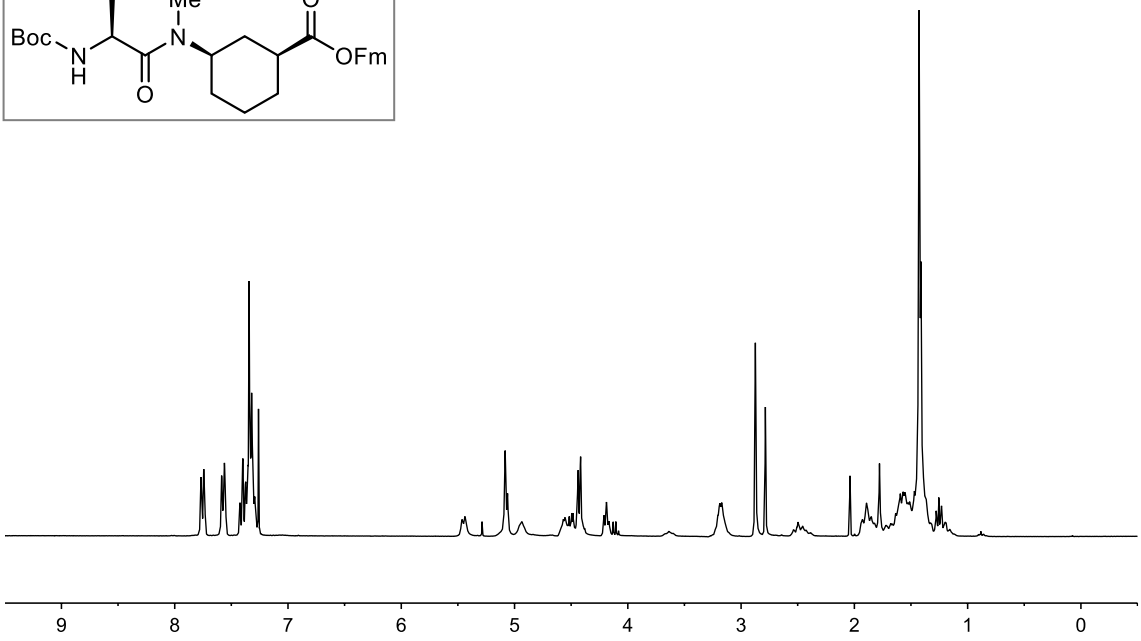
a) **^{1}H RMN** ($CHCl_3$, 298K, 500 MHz)



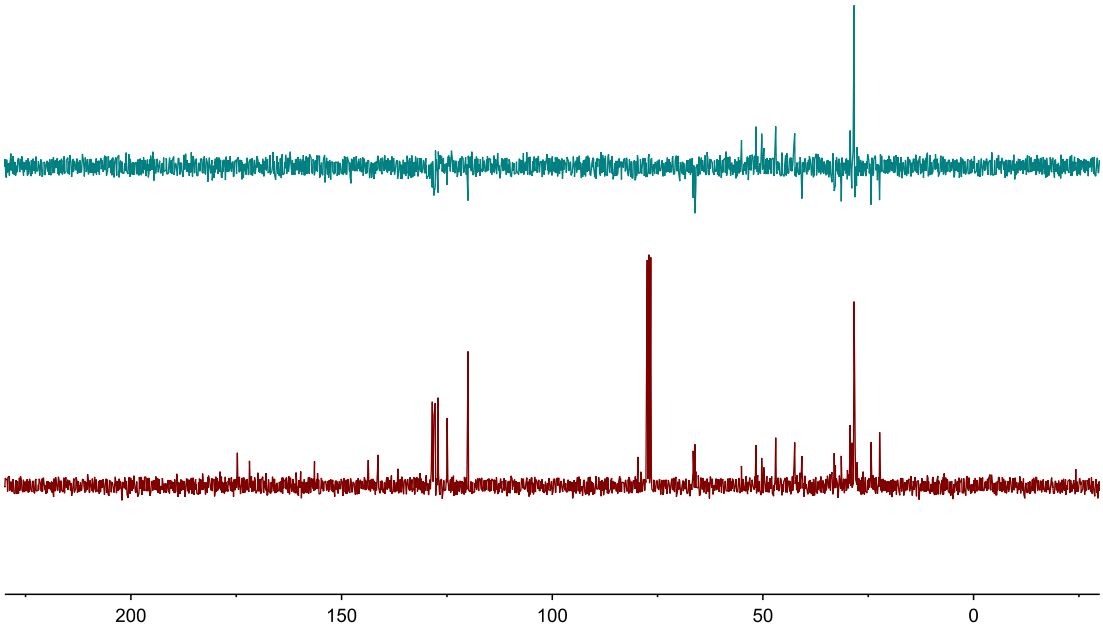
Boc-*L*-Lys(Z)-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-OFm (22)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ)



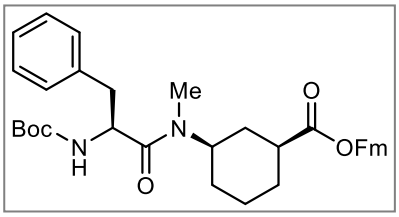


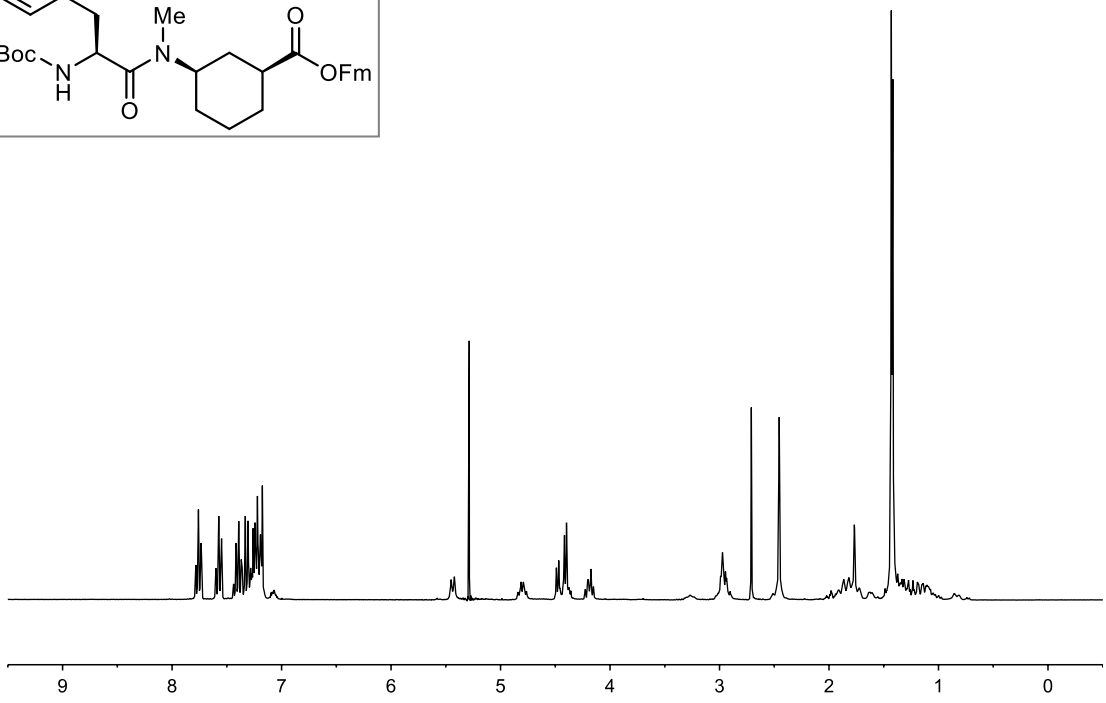
b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 63 MHz, δ)



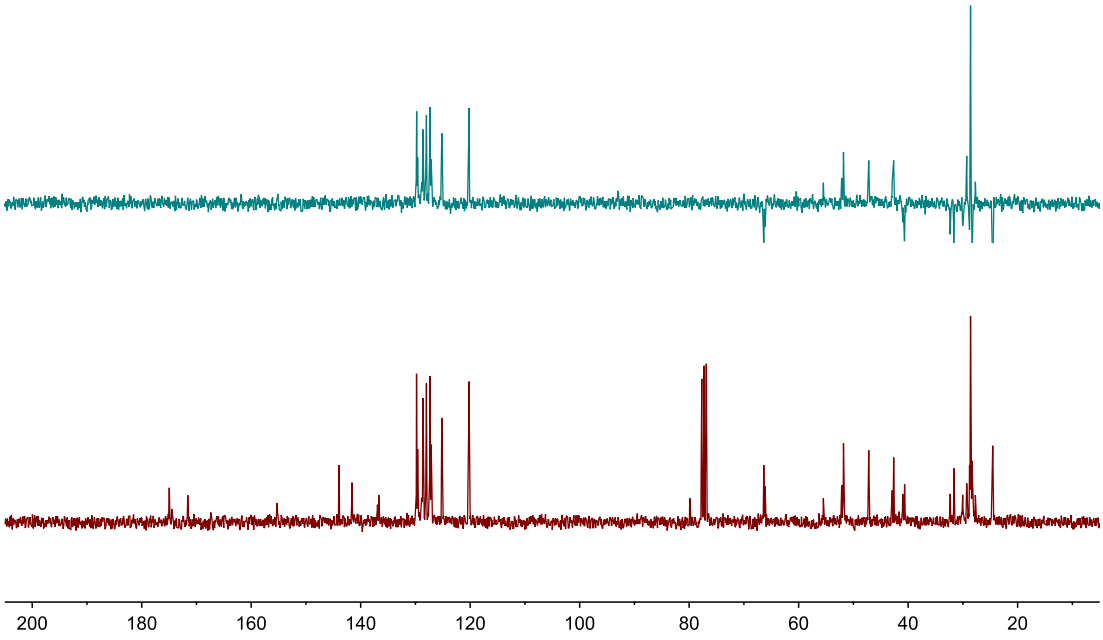
Boc-*L*-Phe-*D*-^{Me}*N*-γ-Ach-OFm (23)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)



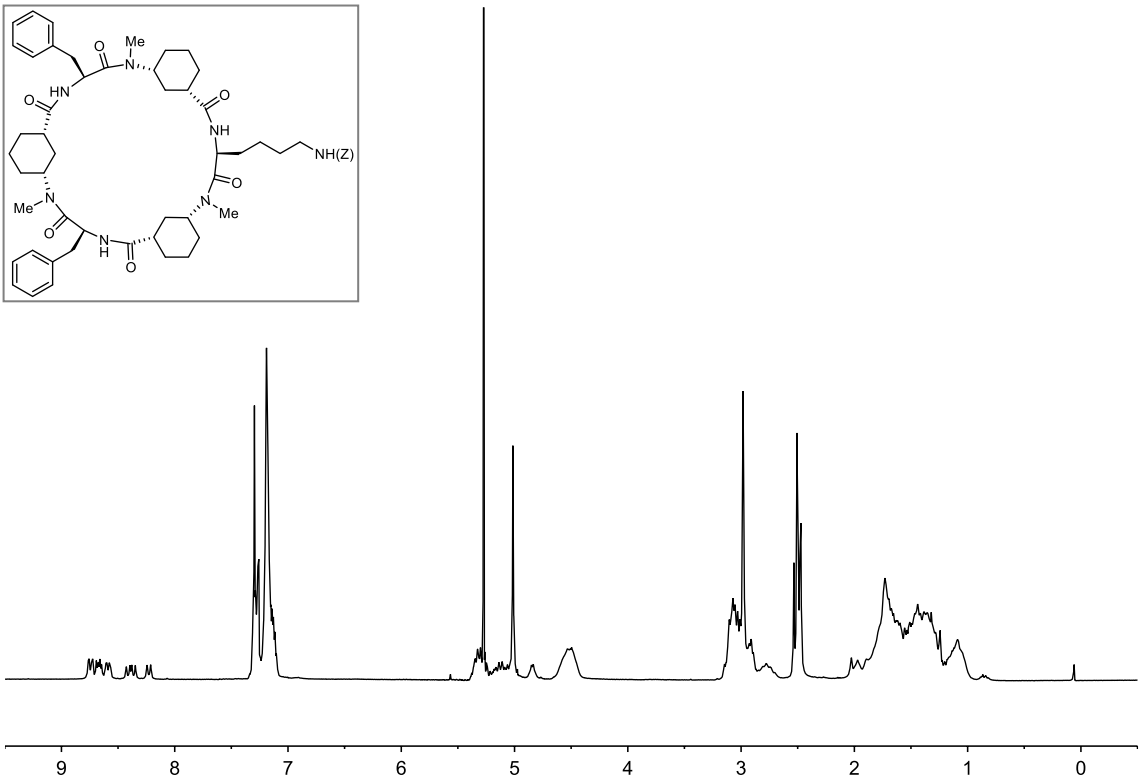


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 63 MHz, 298 K)

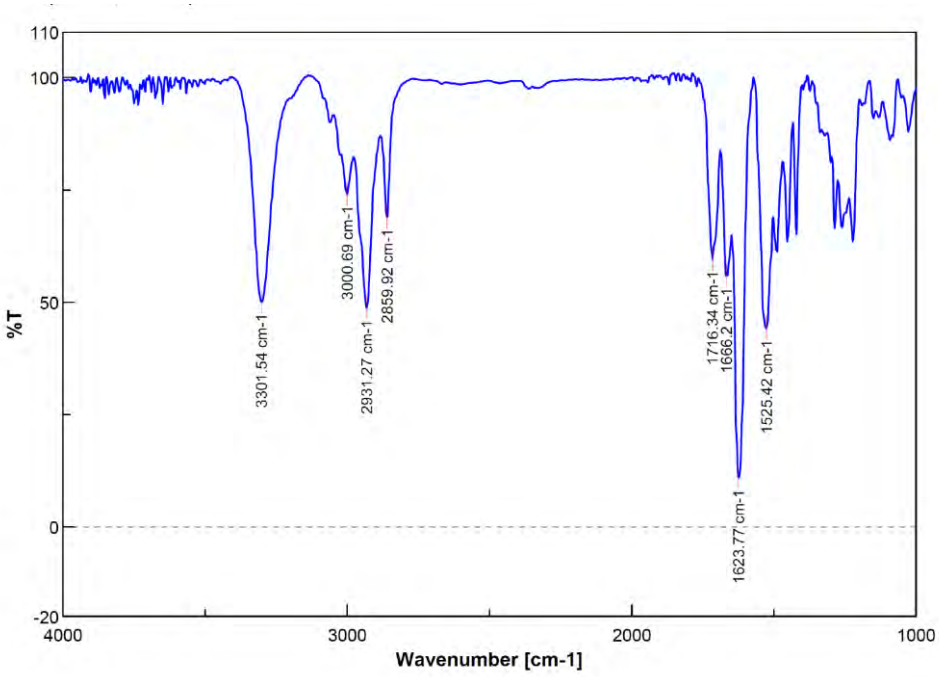


***c*-[-*L*-Lys(Z)-*D*-^{Me}N-Ach-(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-Ach-)$_2$] (CP4)**

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

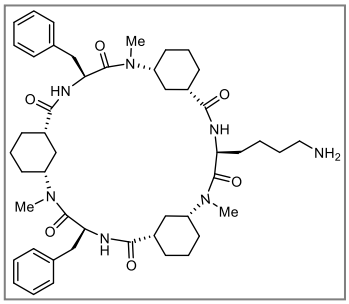


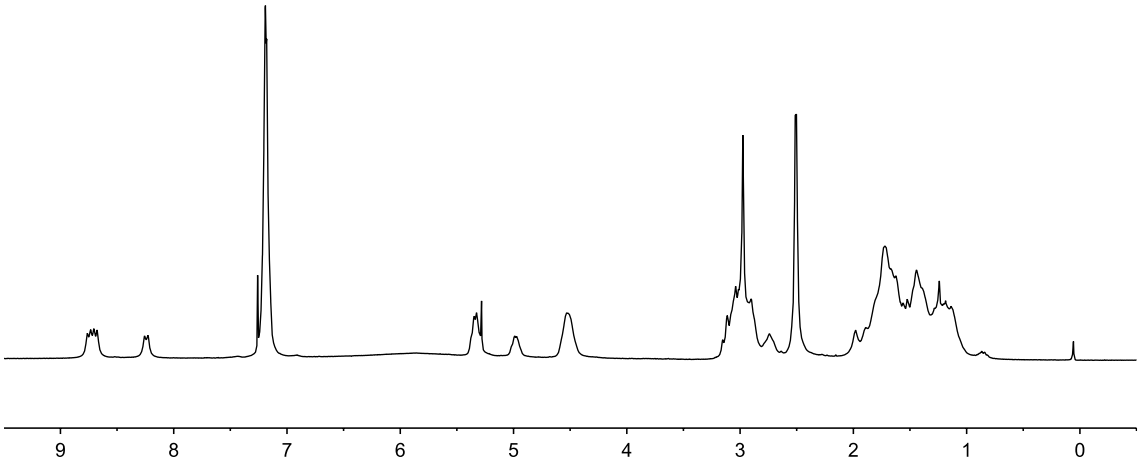
b) **FT-IR**($CDCl_3$, 298 K)



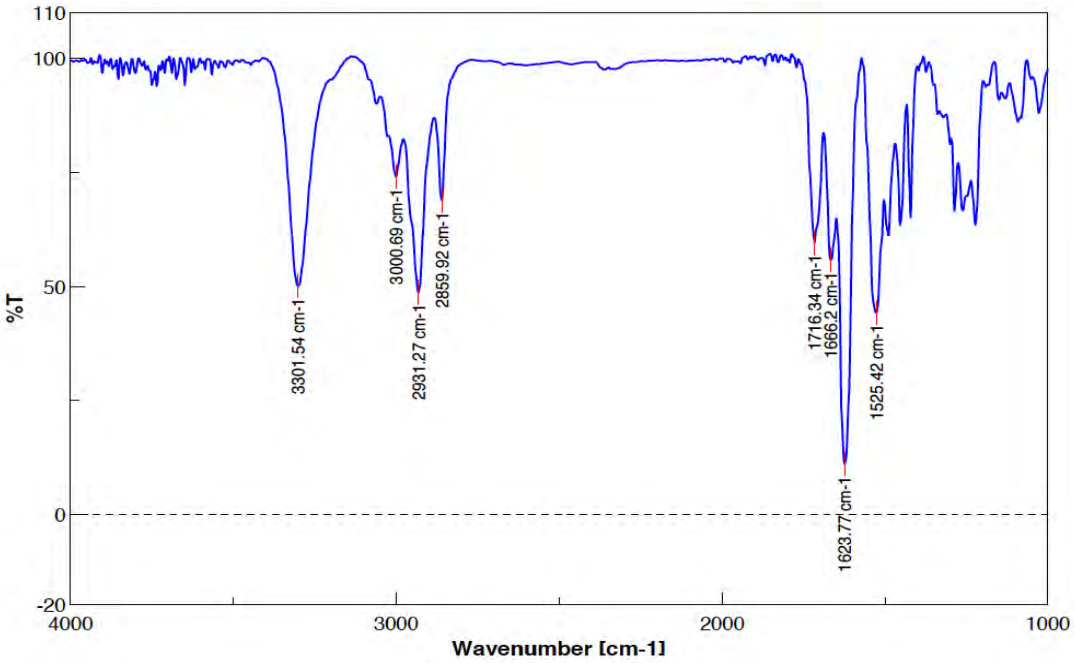
***c*-[-*L*-Lys-*D*-^{Me}N-Ach-(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-Ach-)$_2$] (CP5)**

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)



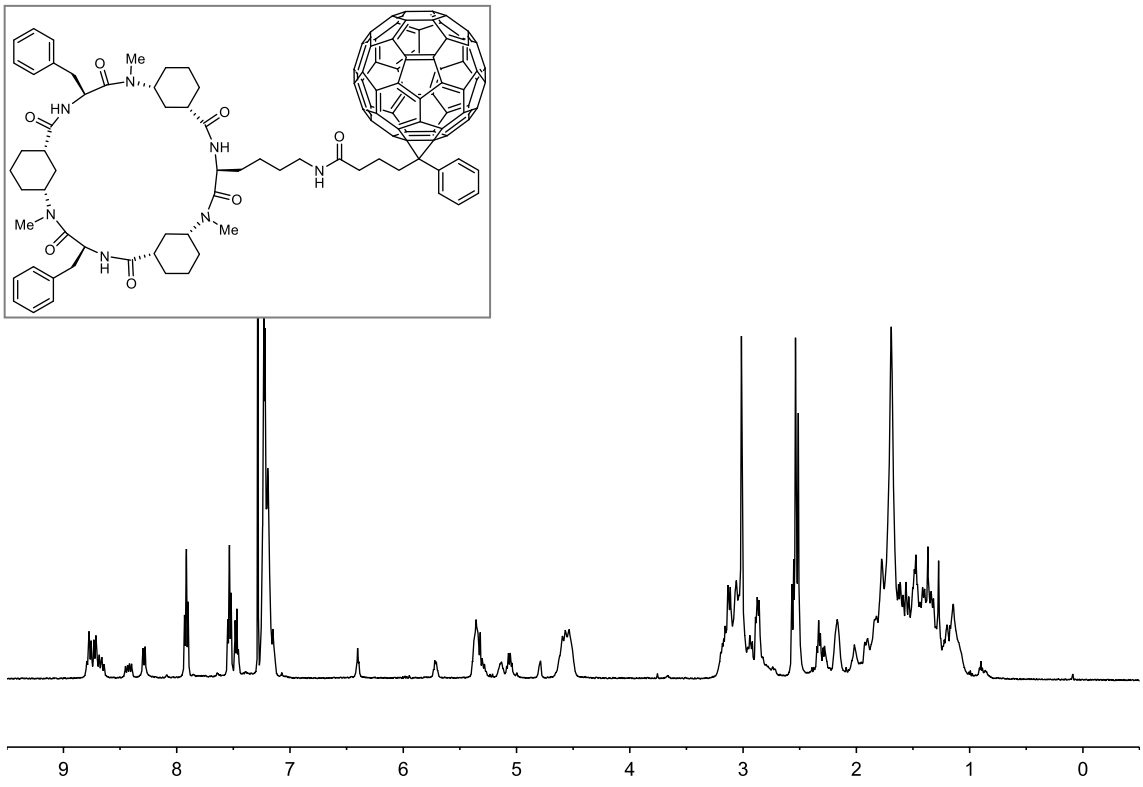


b) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298 K)

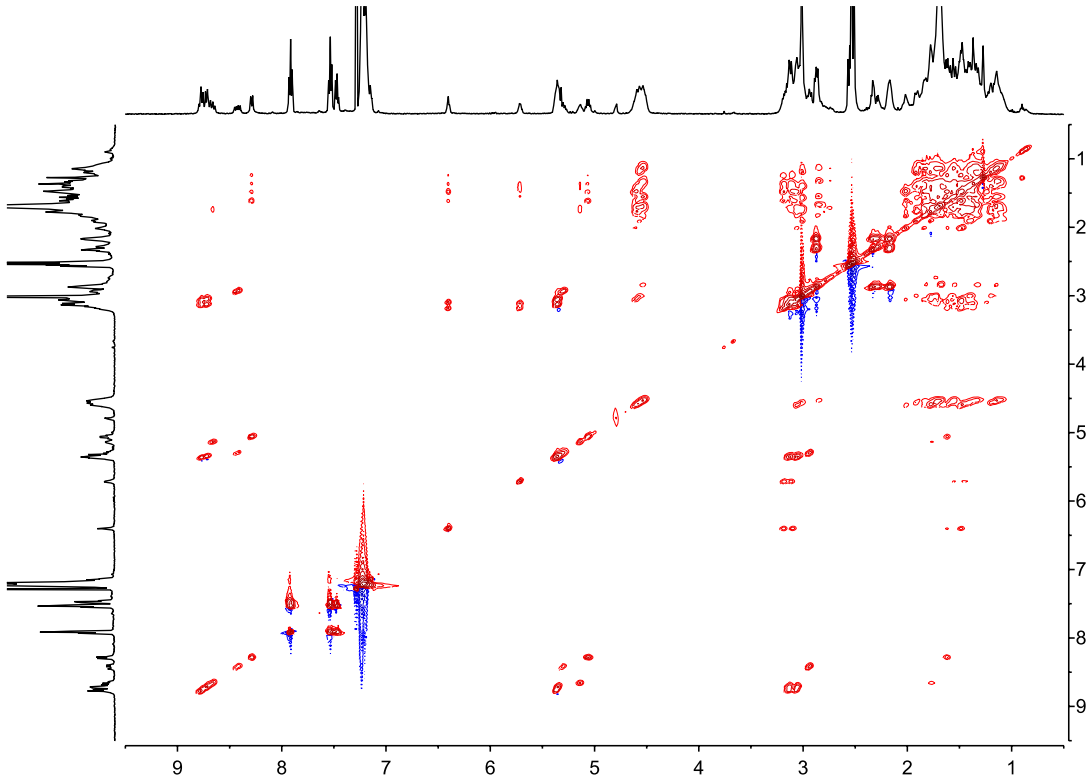


***c*-[-*L*-Lys(PCBA)-*D*-^{Me}N-Ach-(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-Ach)$_2$-] (CP6)**

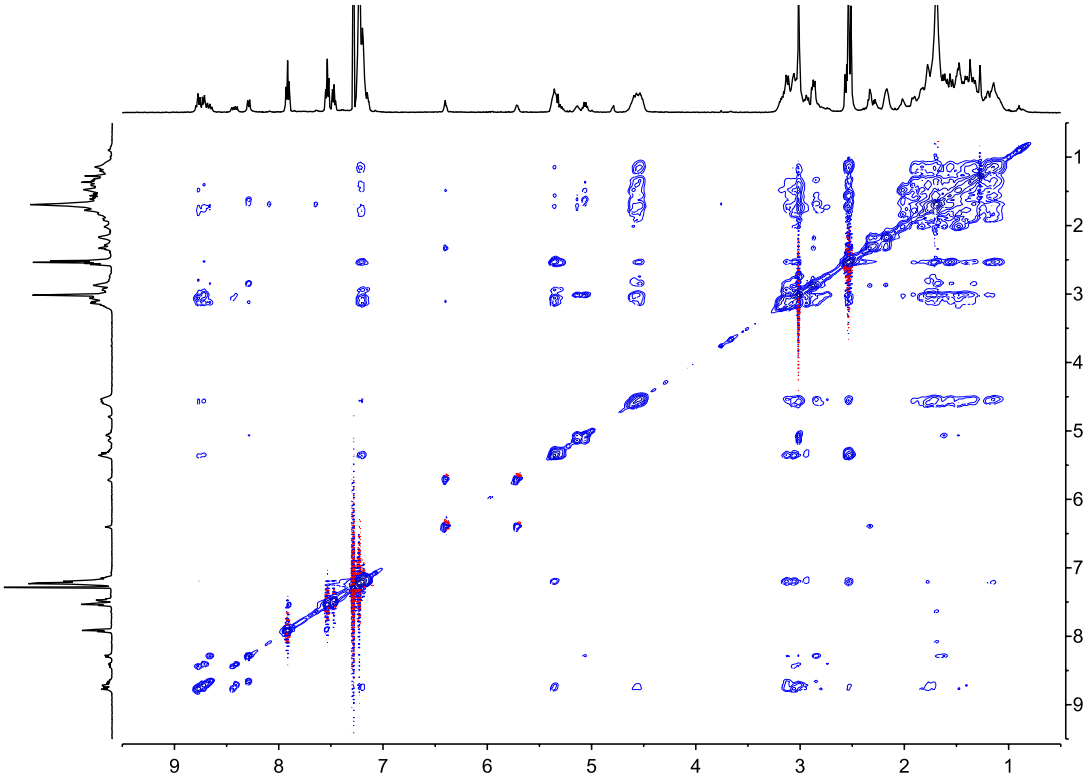
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



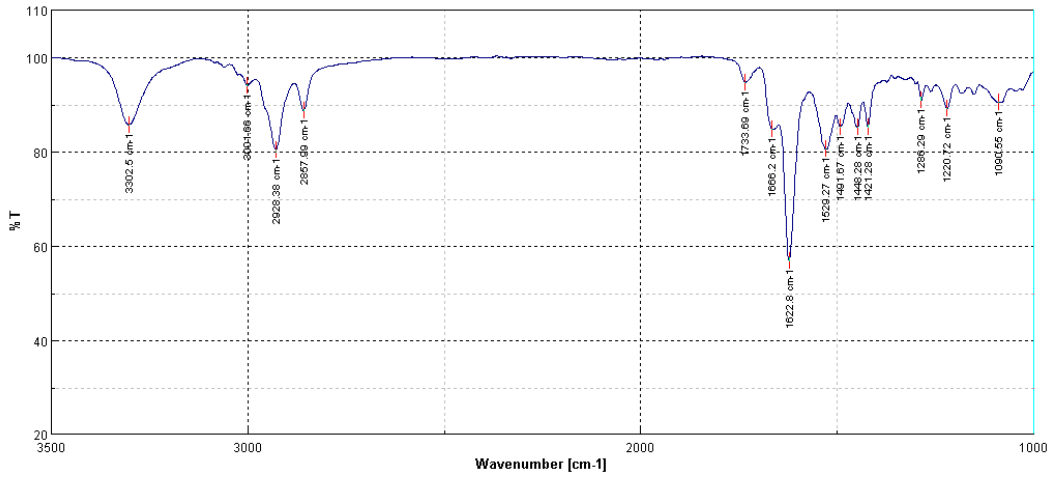
b) TOCSY (CDCl3, 125 MHz, 298 K)



c) NOESY ($CDCl_3$, 125 MHz, 298 K)

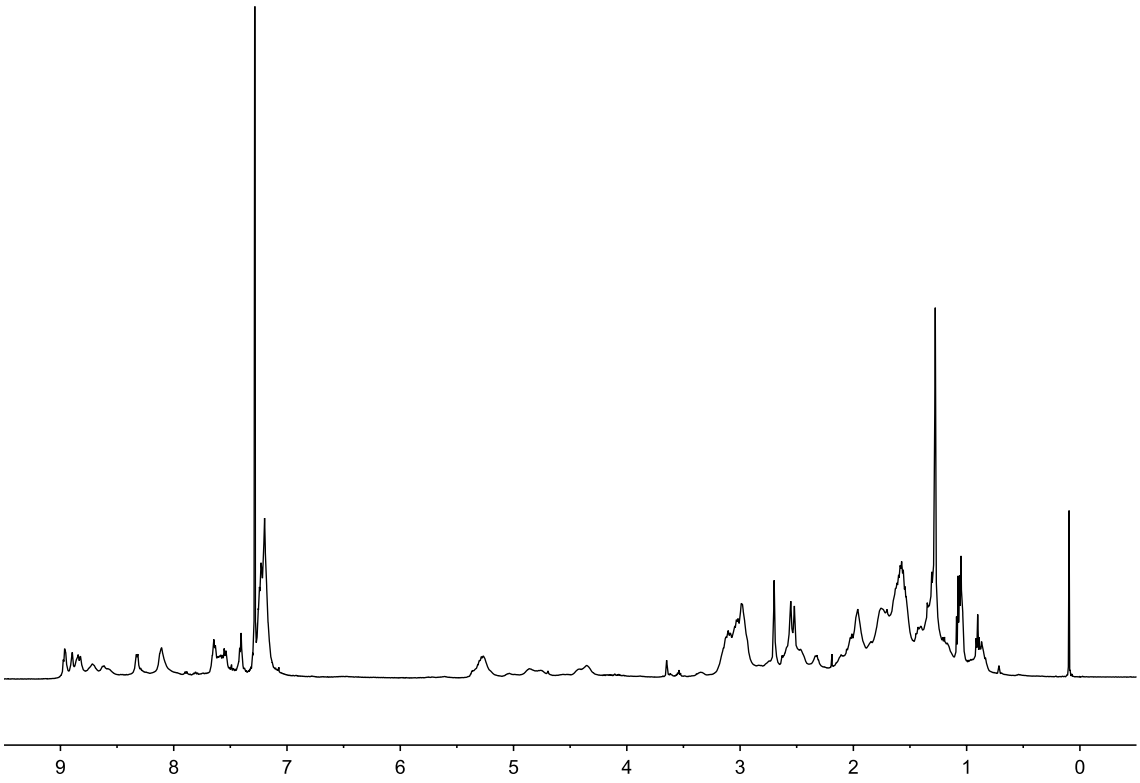


d) FT-IR ($CHCl_3$, 298 K)

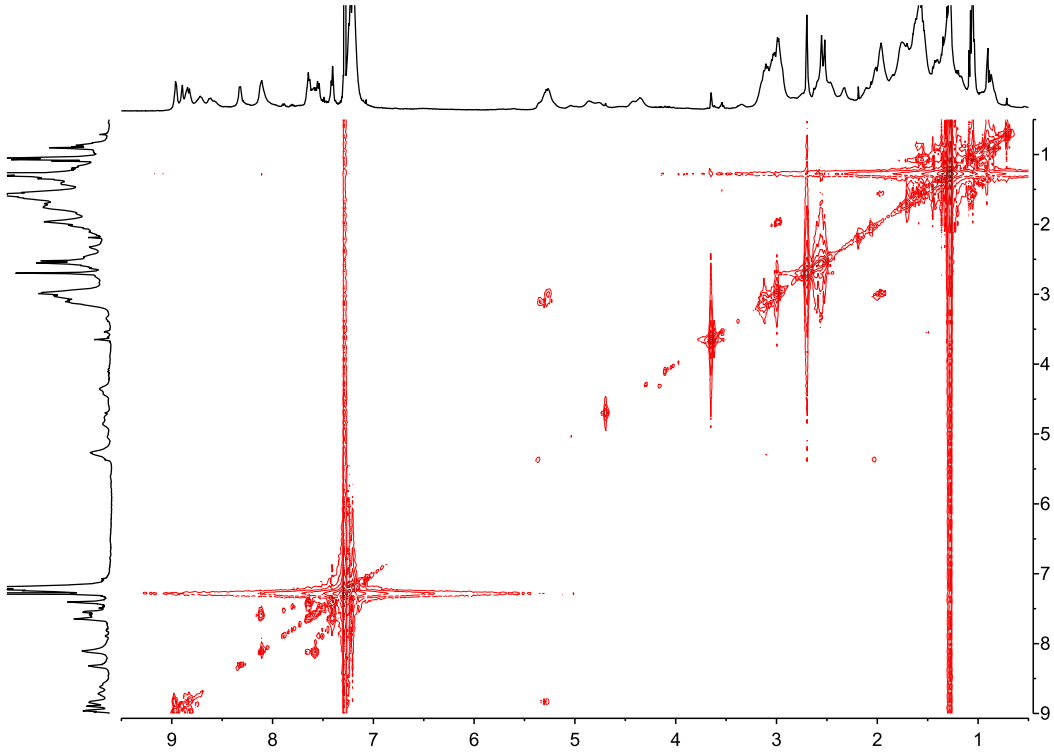


Heterodímero de $CP3_{Zn}$ y CP6; $D3_{Zn}$·6

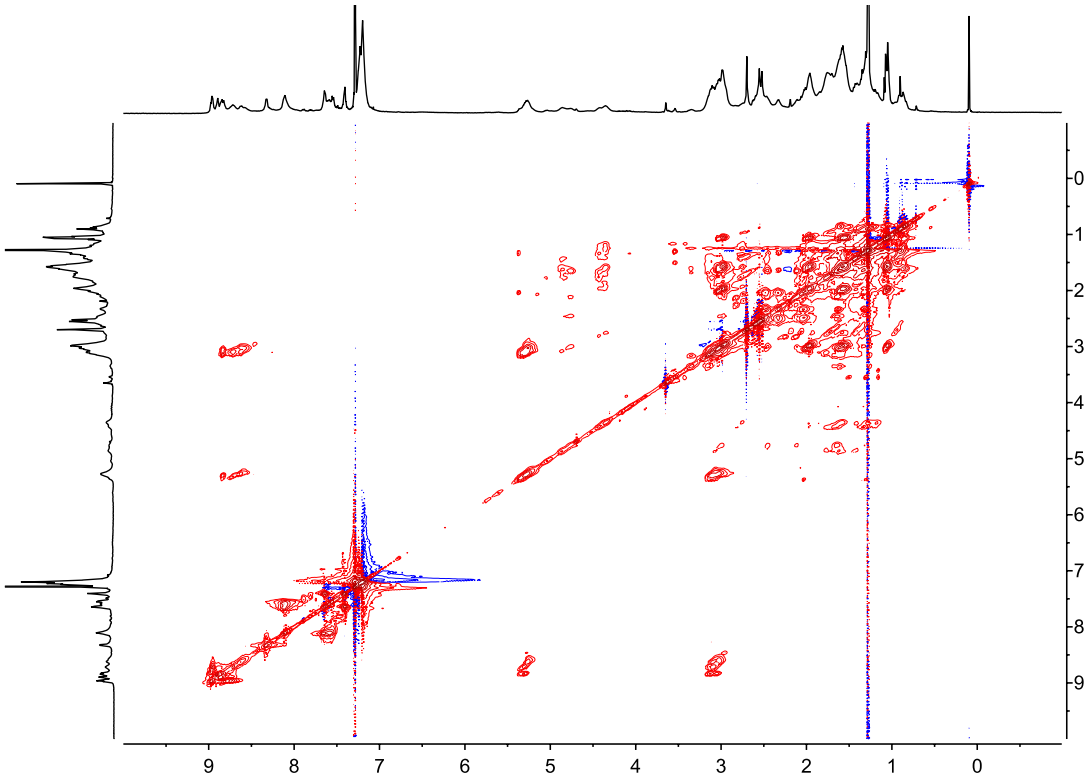
a) **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



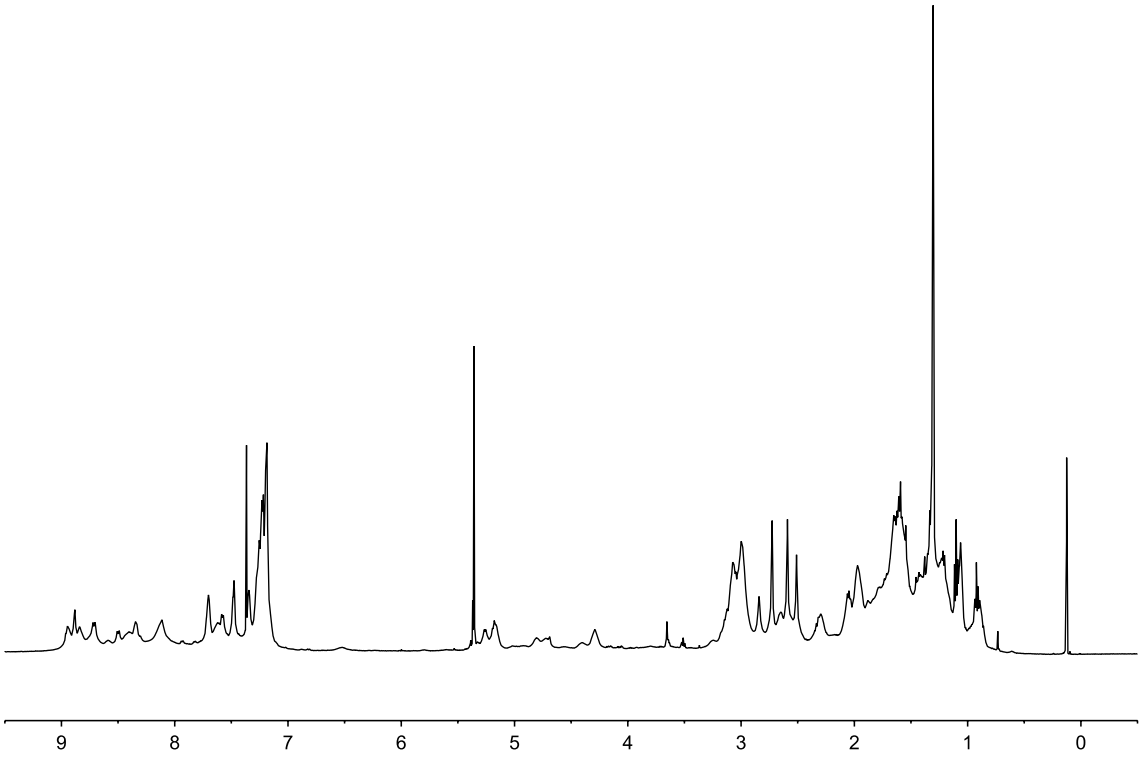
b) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



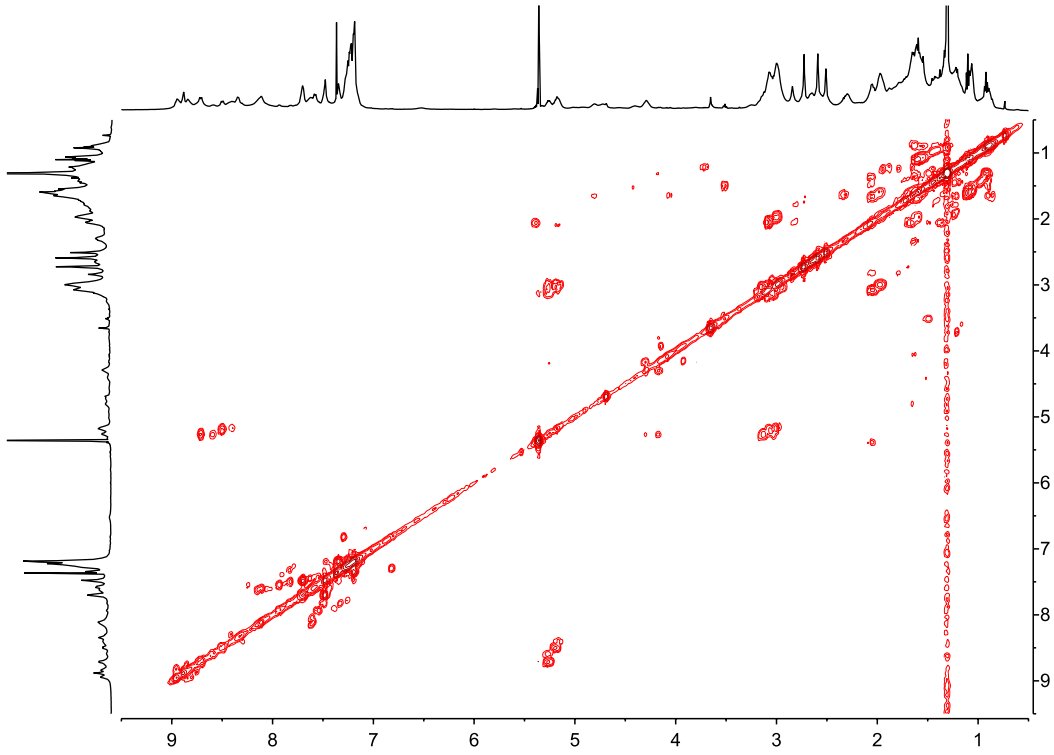
c) TOCSY ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



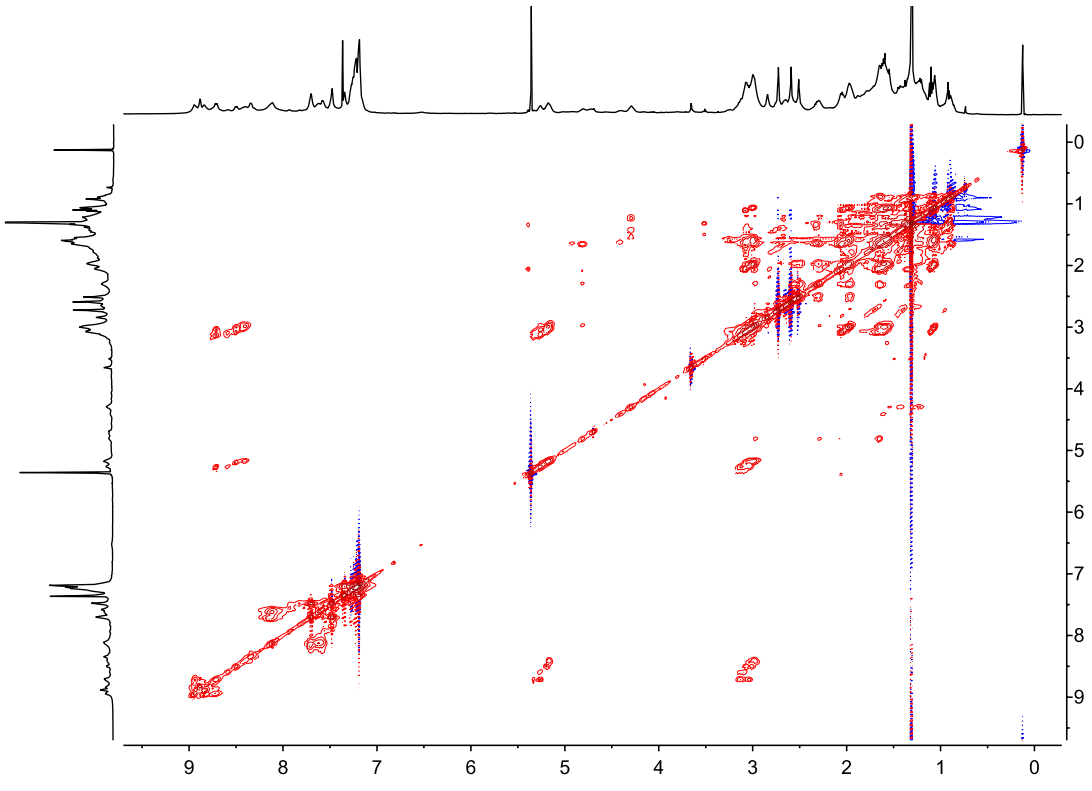
d) ^{1}H-RMN (CD_2Cl_2, 500 MHz, 298 K)



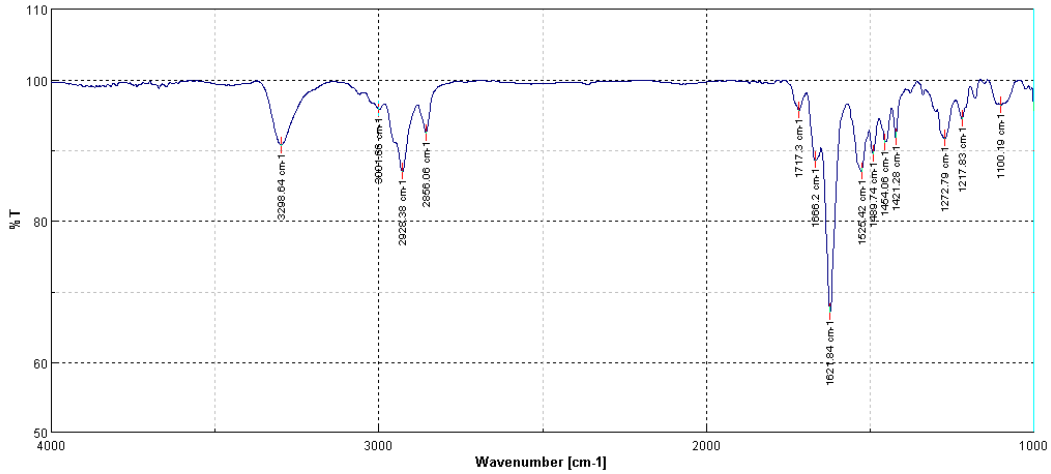
e) COSY (CD_2Cl_2, 500 MHz, 298 K)



f) TOCSY (CD_2Cl_2, 500 MHz, 298 K)

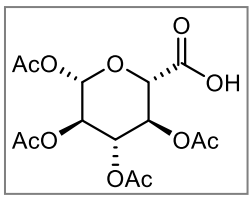


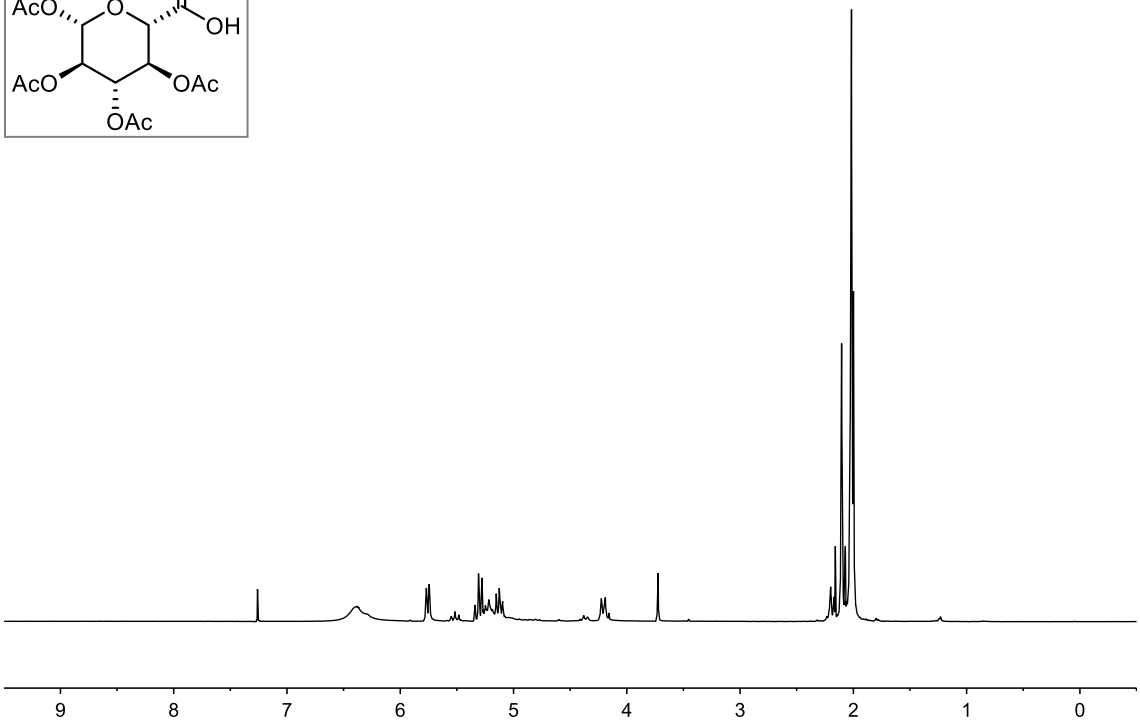
g) FT-IR ($CHCl_3$, 298 K)



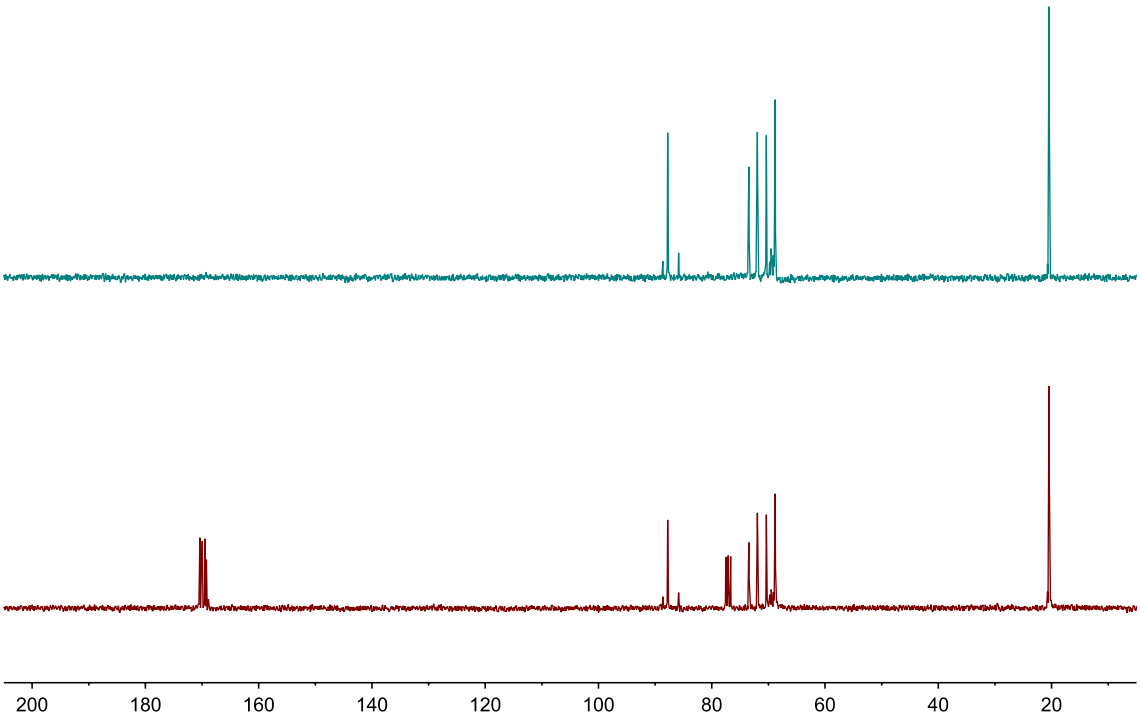
Ácido 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucurónico (33)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



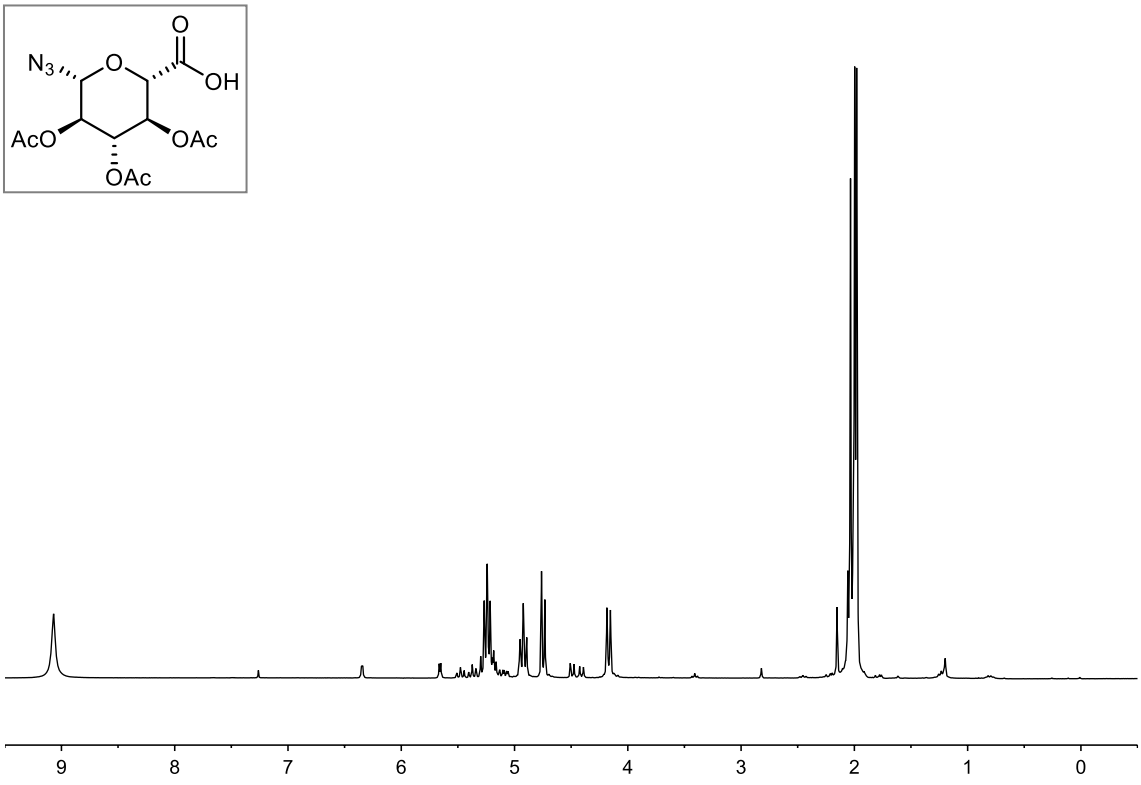


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 298 K, 63 MHz)

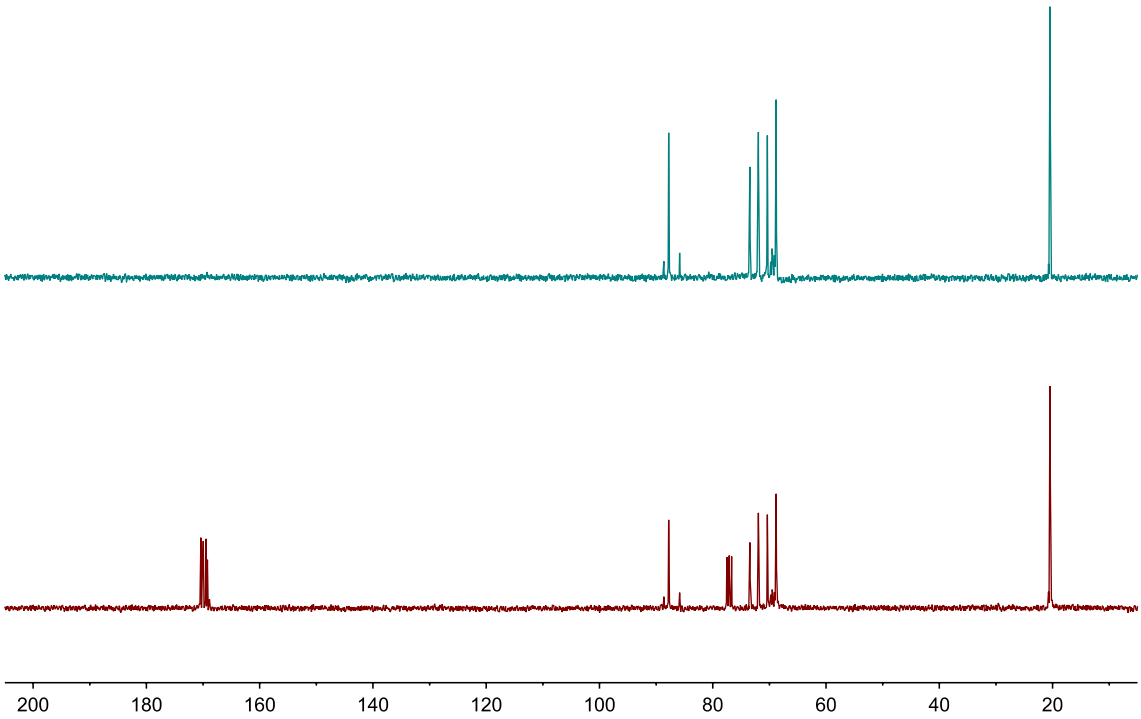


Ácido 2,3,4-Tri-*O*-acetil-1-azido-1-deoxi-β-glucopiranuronico [*L*-N_3-$(Ac)_3$Aga-OH, (34)]

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

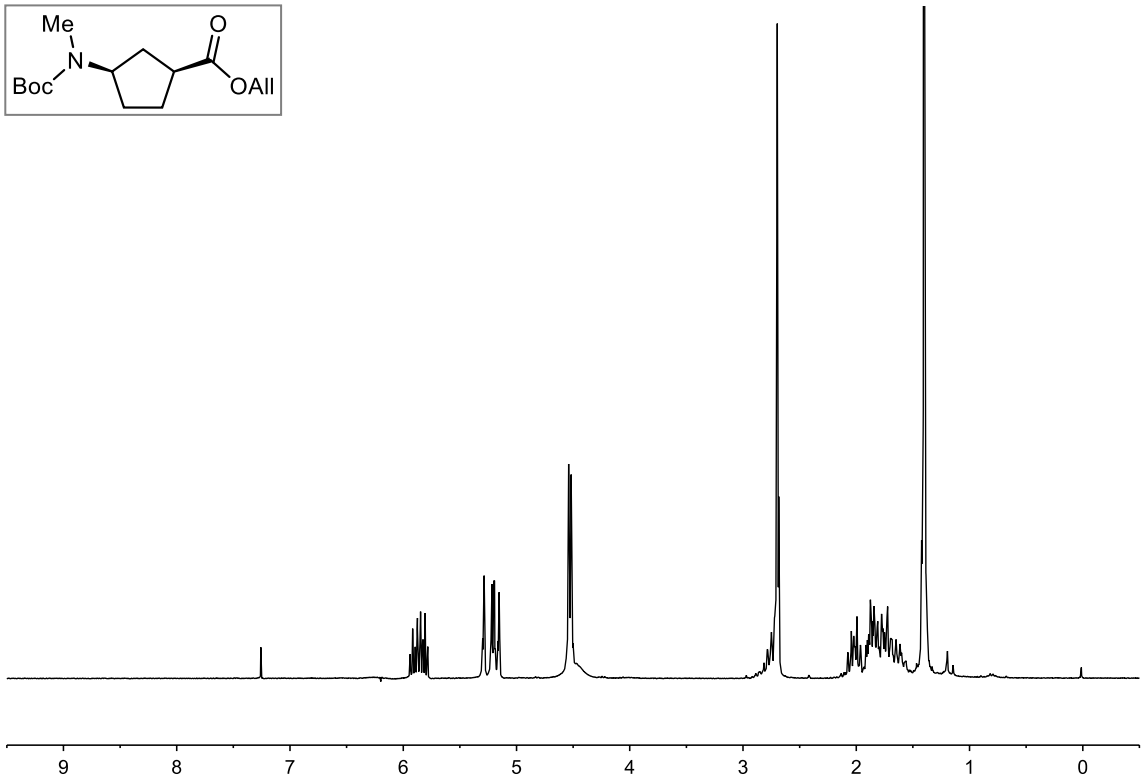


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K)

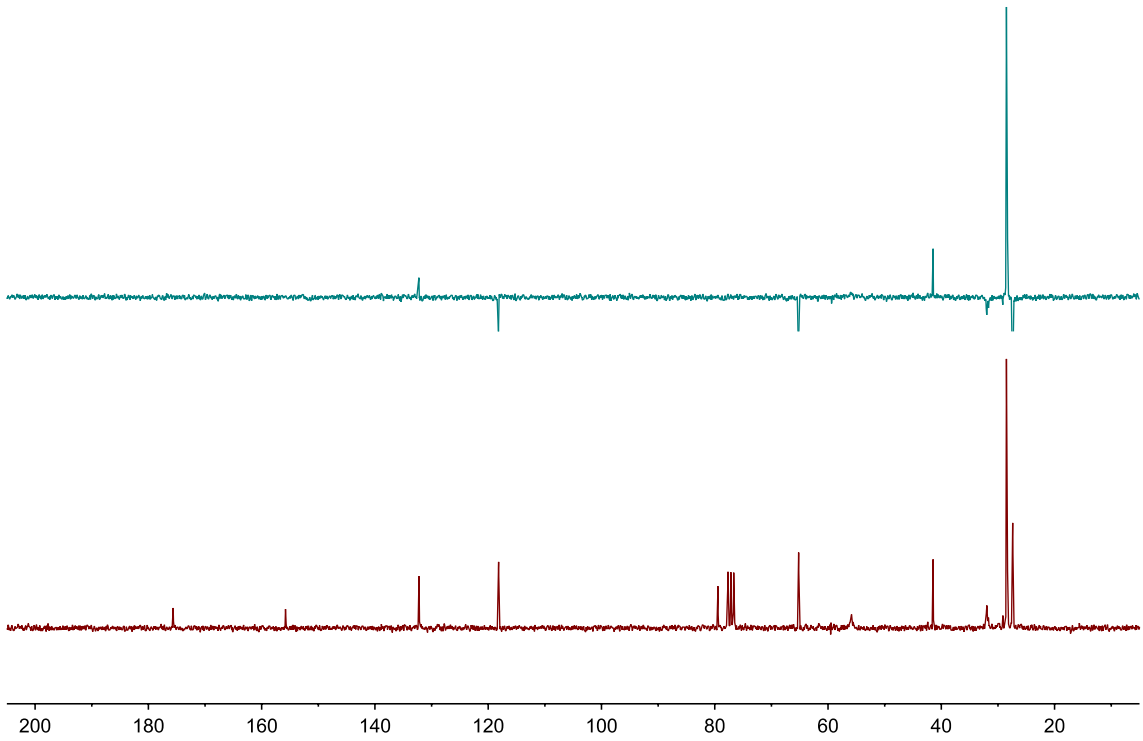


Alil (1*S*,3*R*)-3-((*t*-butoxicarbonil)(metil)amino)ciclopentano-1-carboxilato [Boc-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (35)]

a) **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz,)

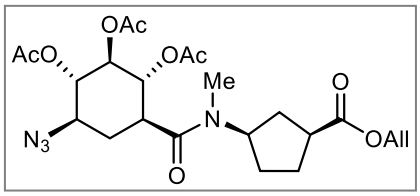


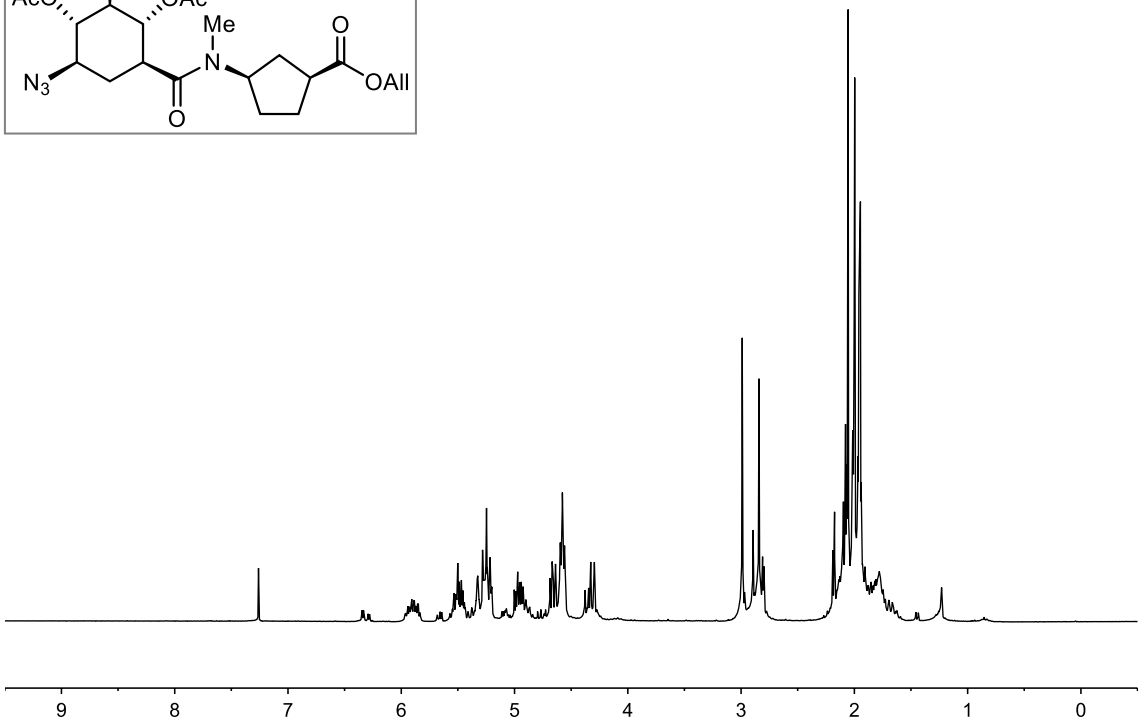
b) ^{13}C-RMN y DEPT ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K)



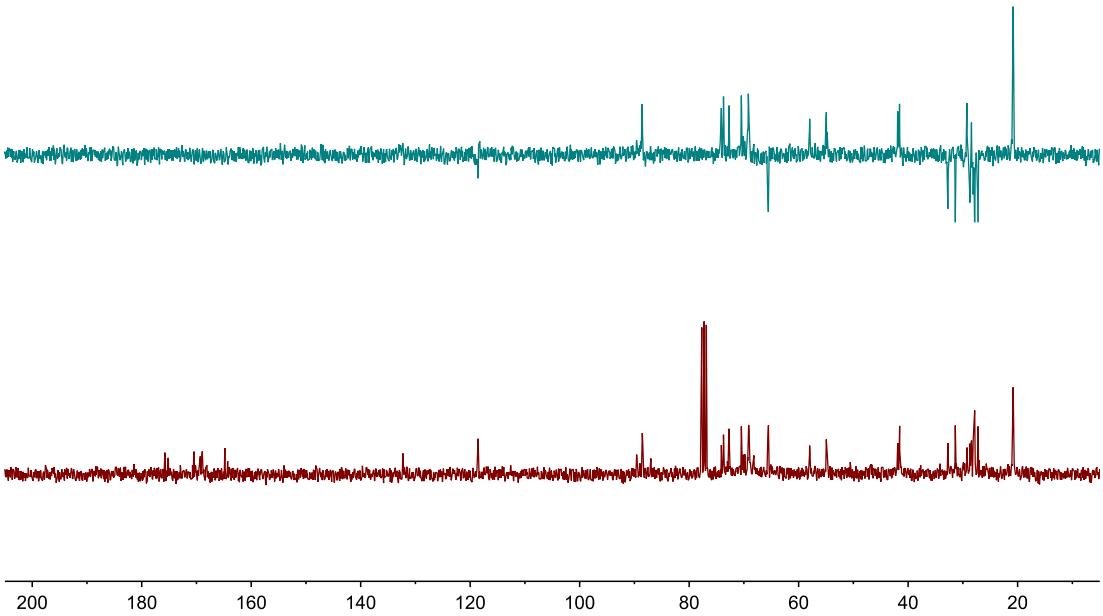
N_3-*L*-γ-$(Ac)_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OAll (36)

a) **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)



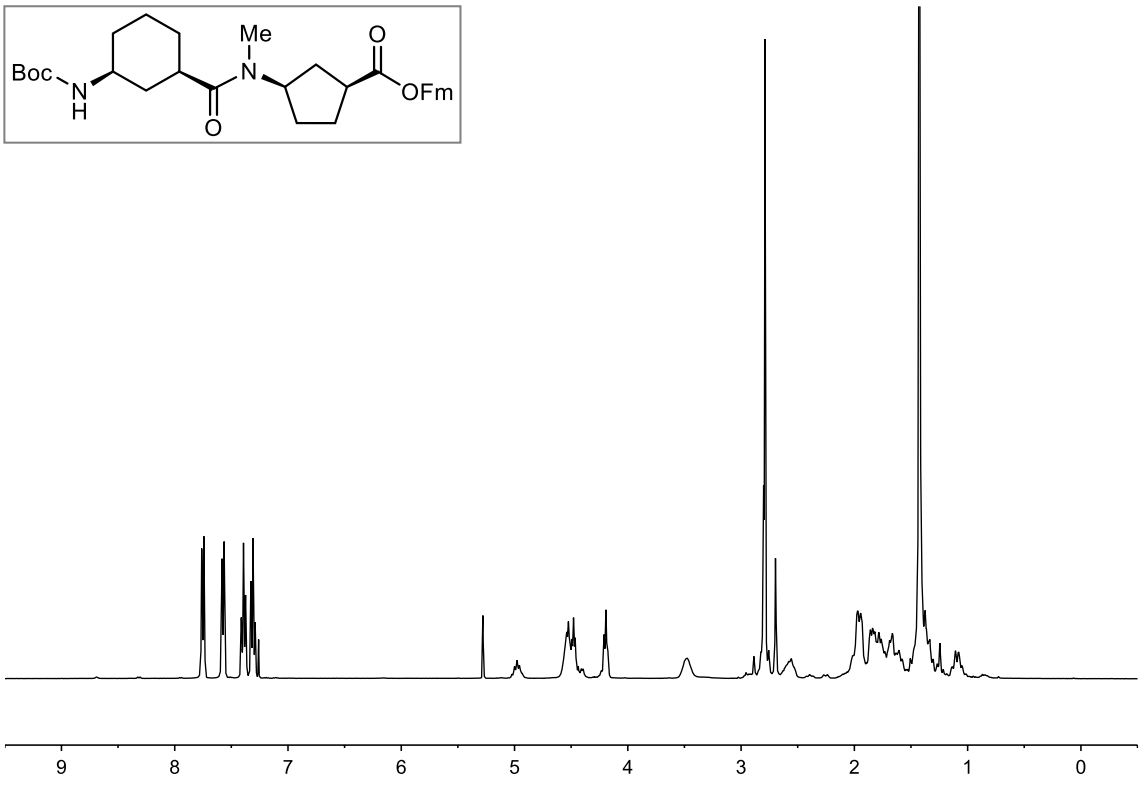


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 298 K, 75 MHz)

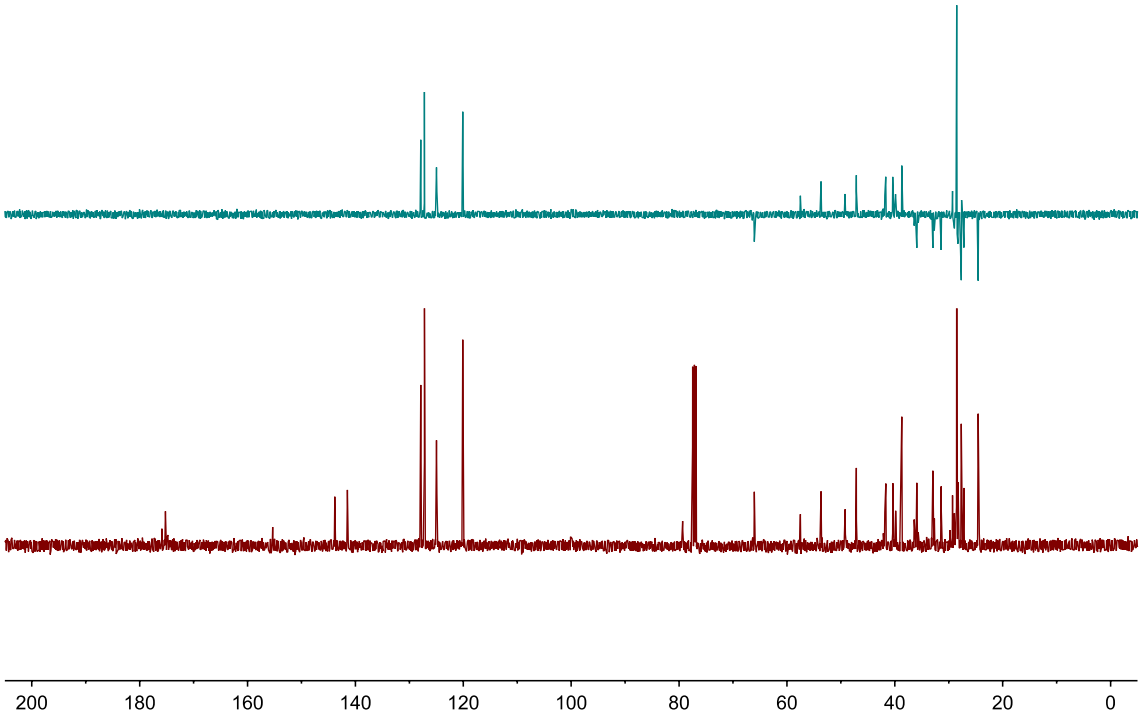


Boc-*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-OFm (39)

a) **^{1}H-RMN** ($CDCl_3$,298 K, 300MHz)

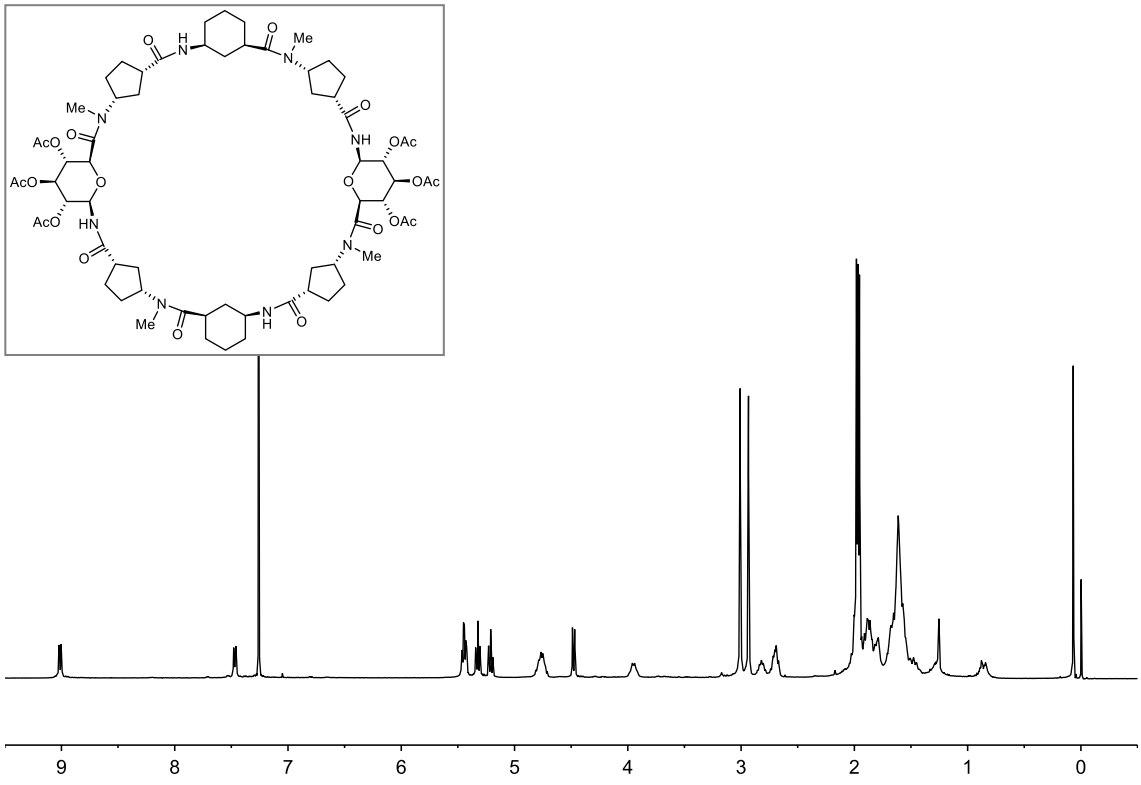


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K)

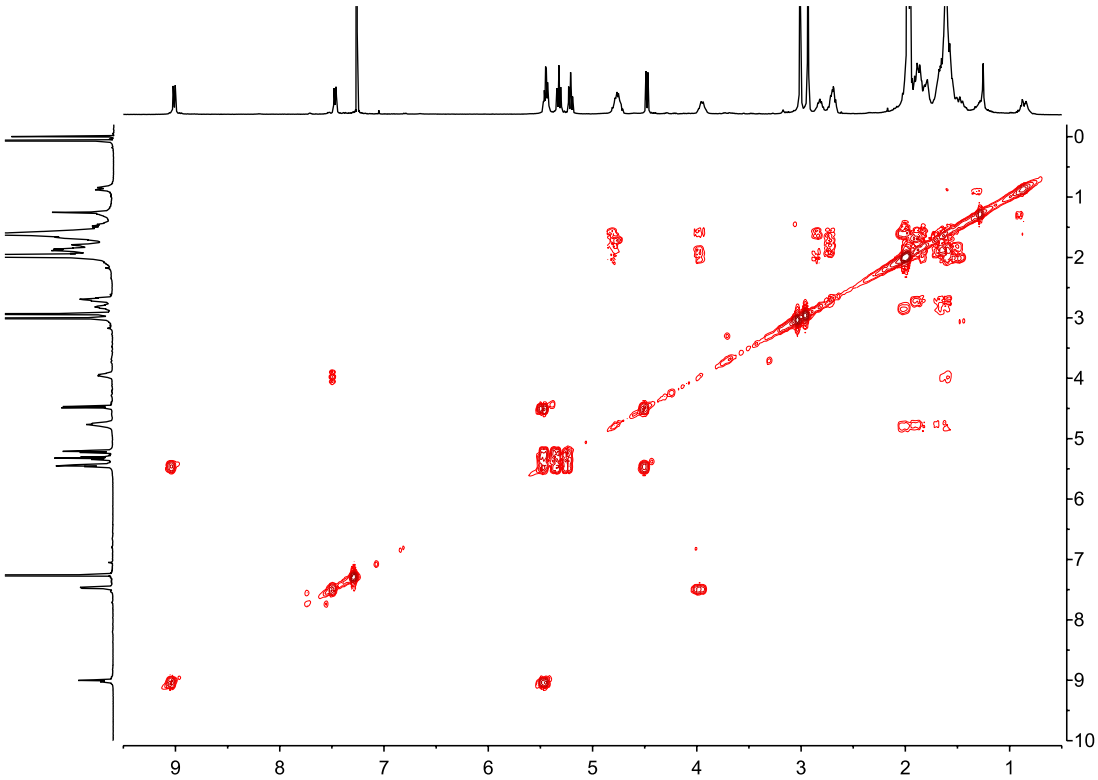


***c*-[*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-(Ac)$_3$Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-]$_2$ (CP8)**

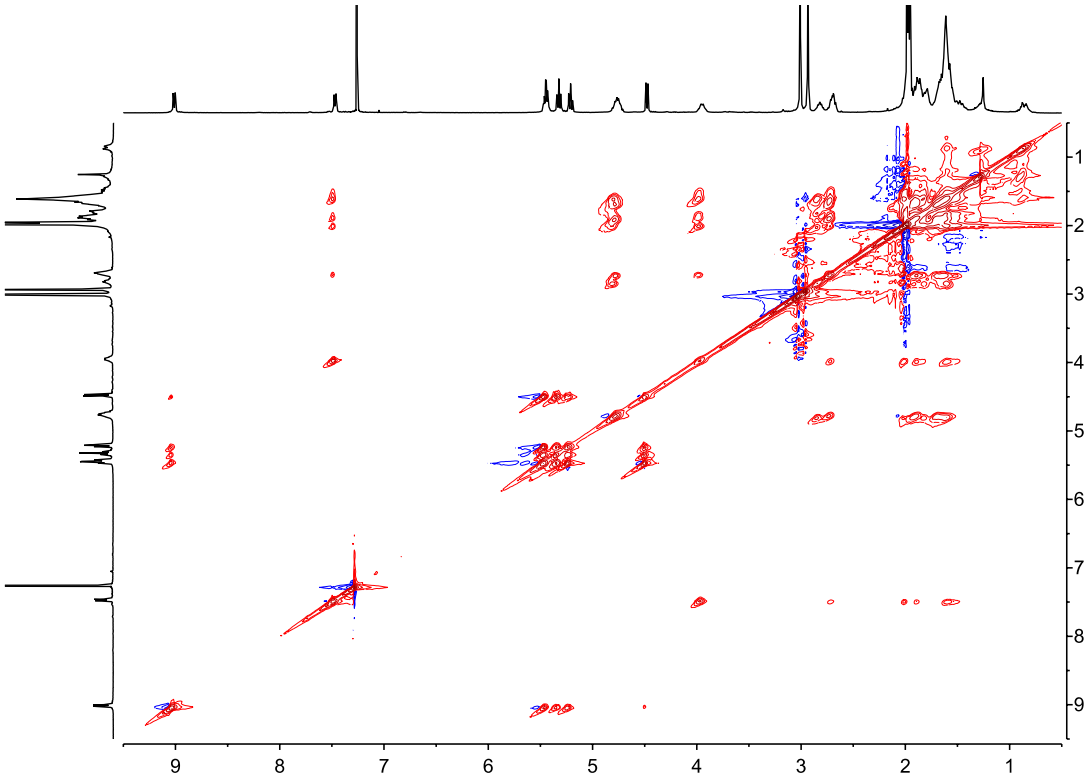
a) ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



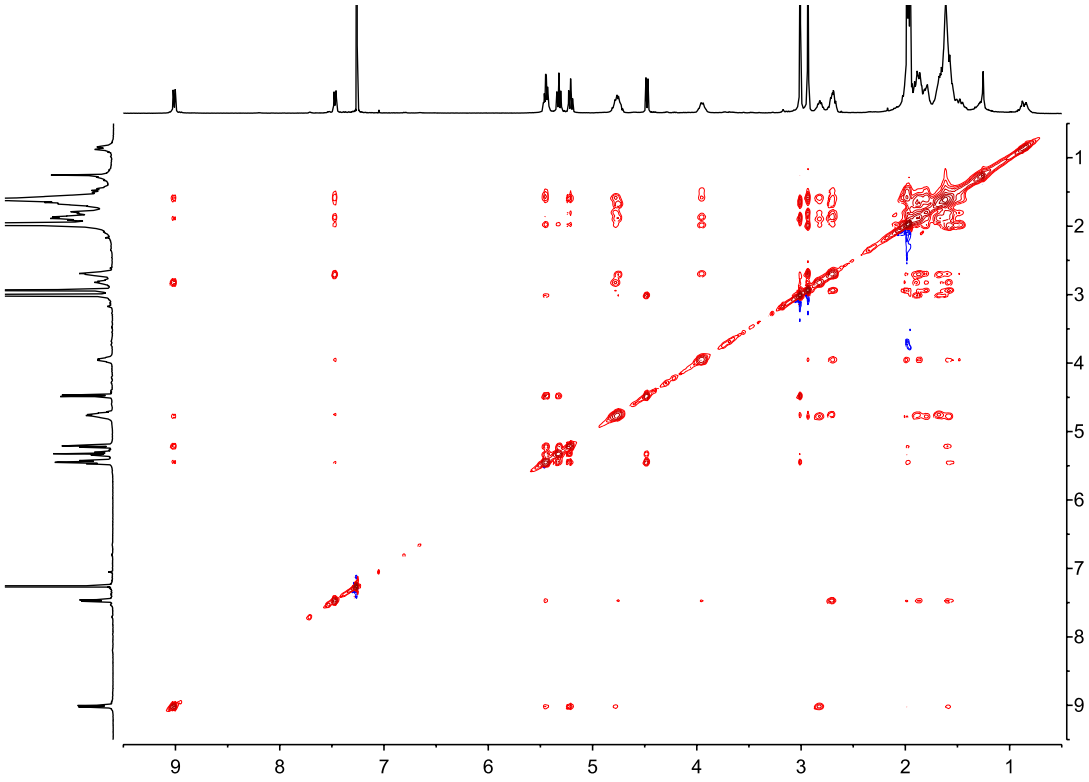
b) COSY ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



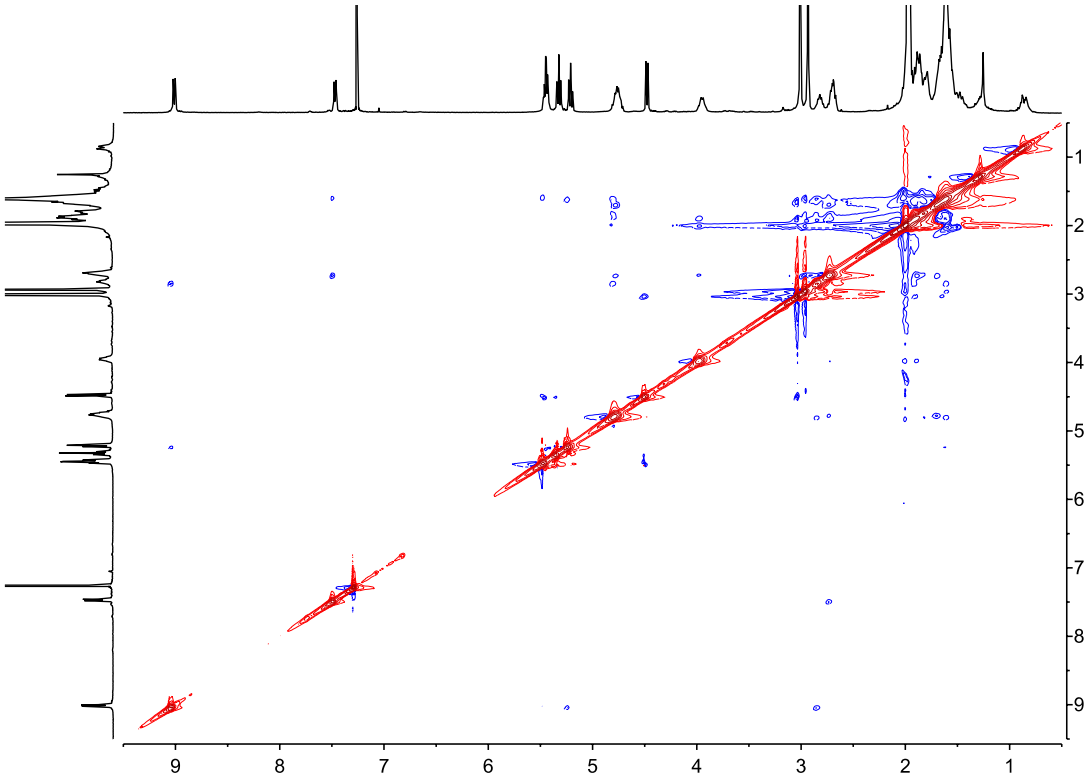
c) TOCSY ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



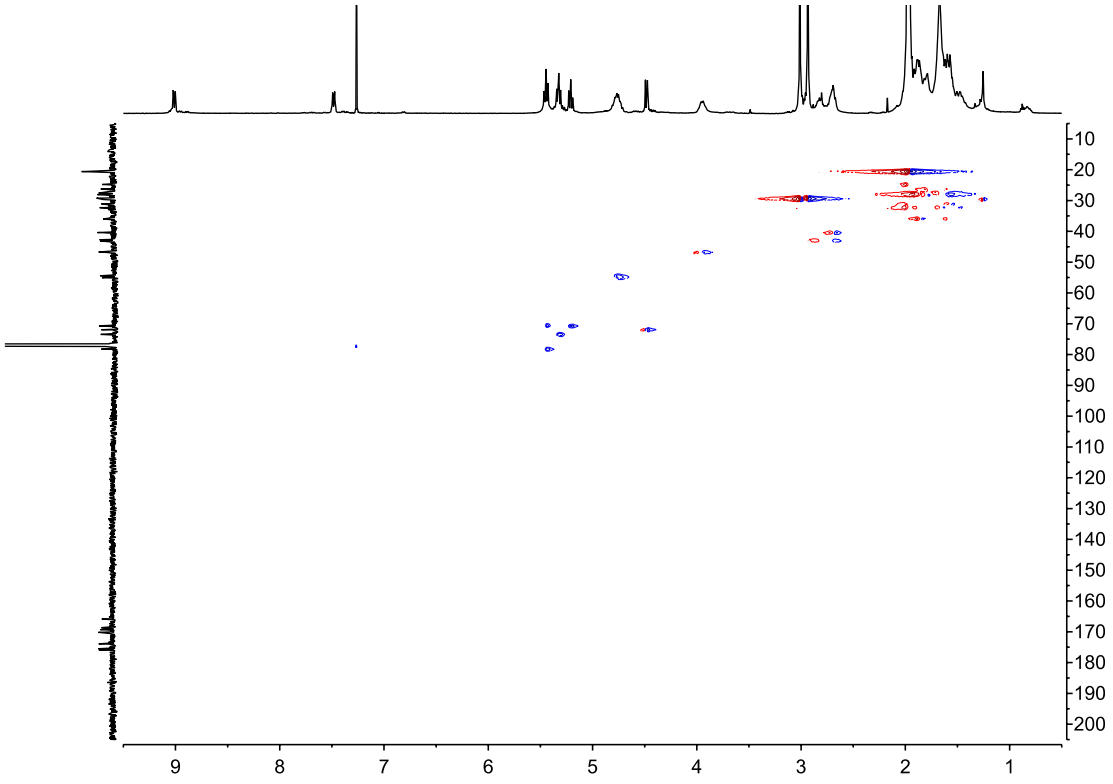
d) NOESY ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



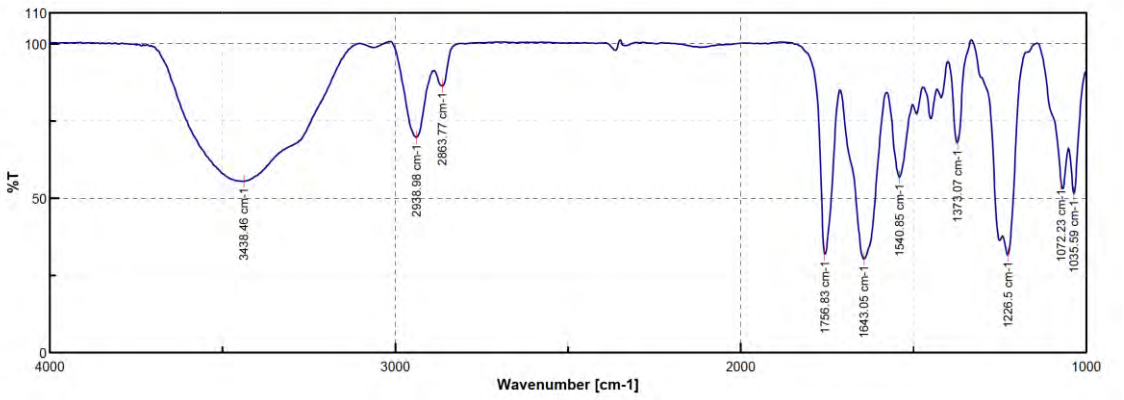
e) ROESY ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



f) HSQC ($CDCl_3$, 125 MHz, 198 K)

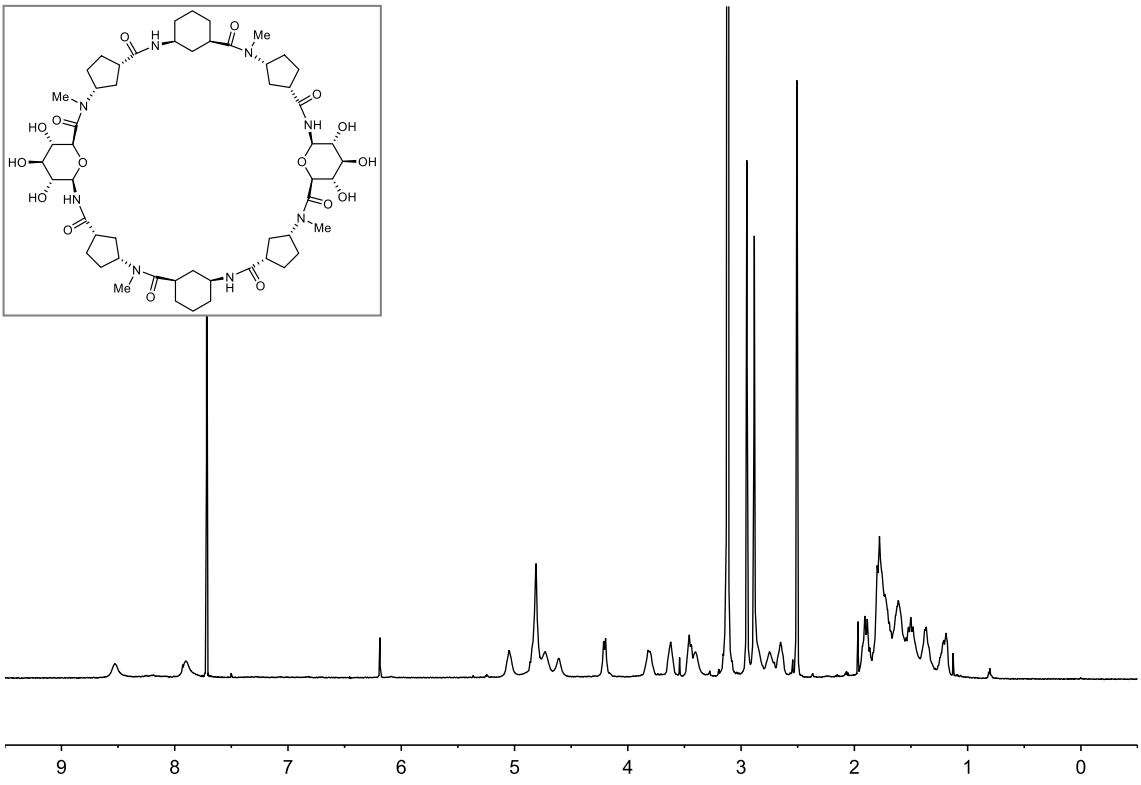


g) FT-IR ($CHCl_3$, 298 K)

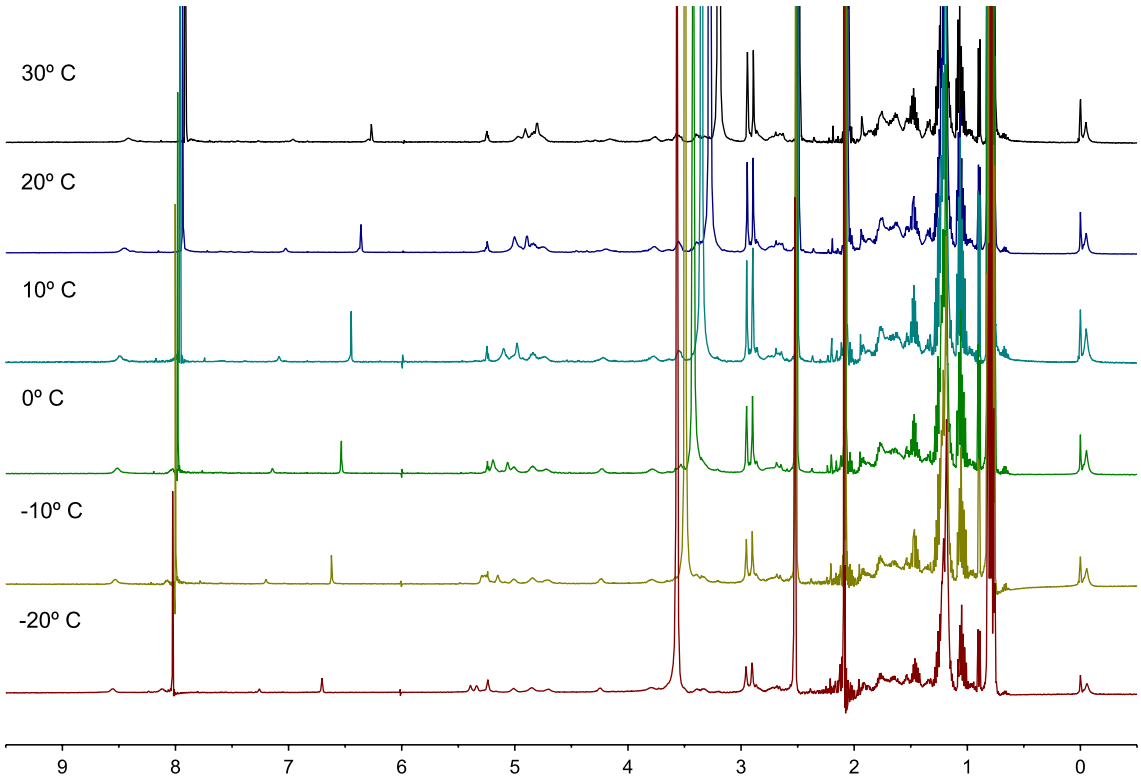


***c*-[(*L*-γ-Ach-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-*D*-γ-Aga-*D*-γ-^{Me}*N*-Acp-)$_2$] (CP9)**

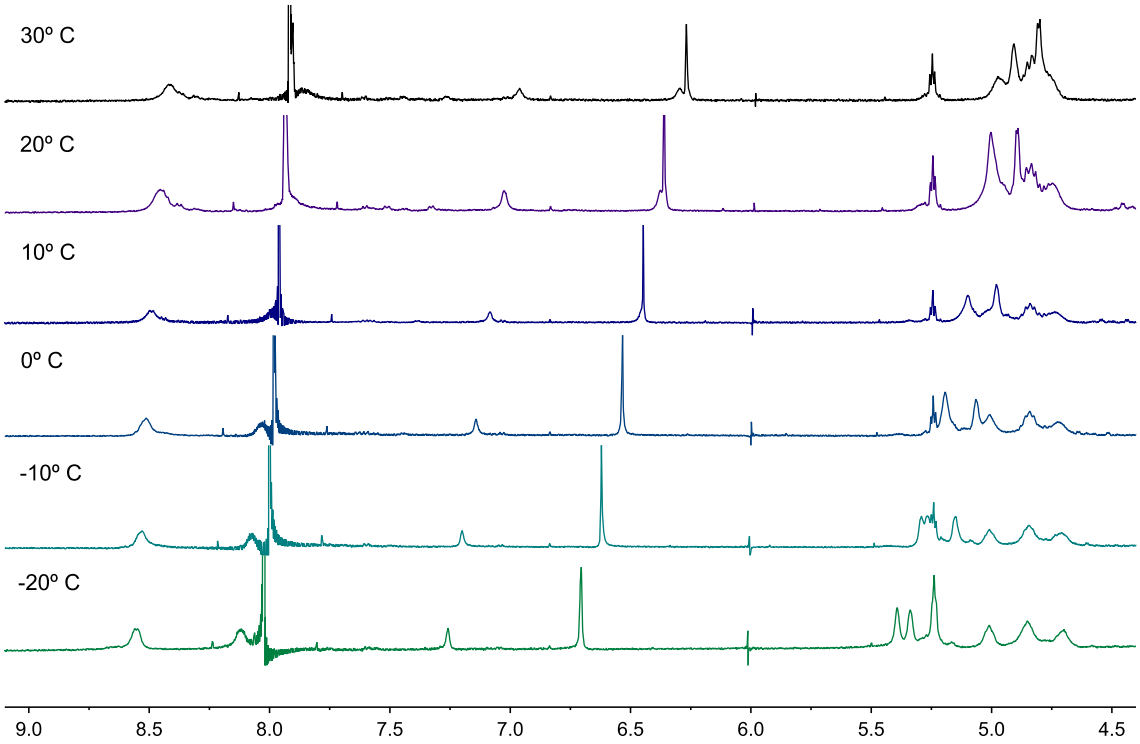
a) ^{1}H-RMN ($CDCl_3$/DMSO (3:1), 500 MHz, 298 K)



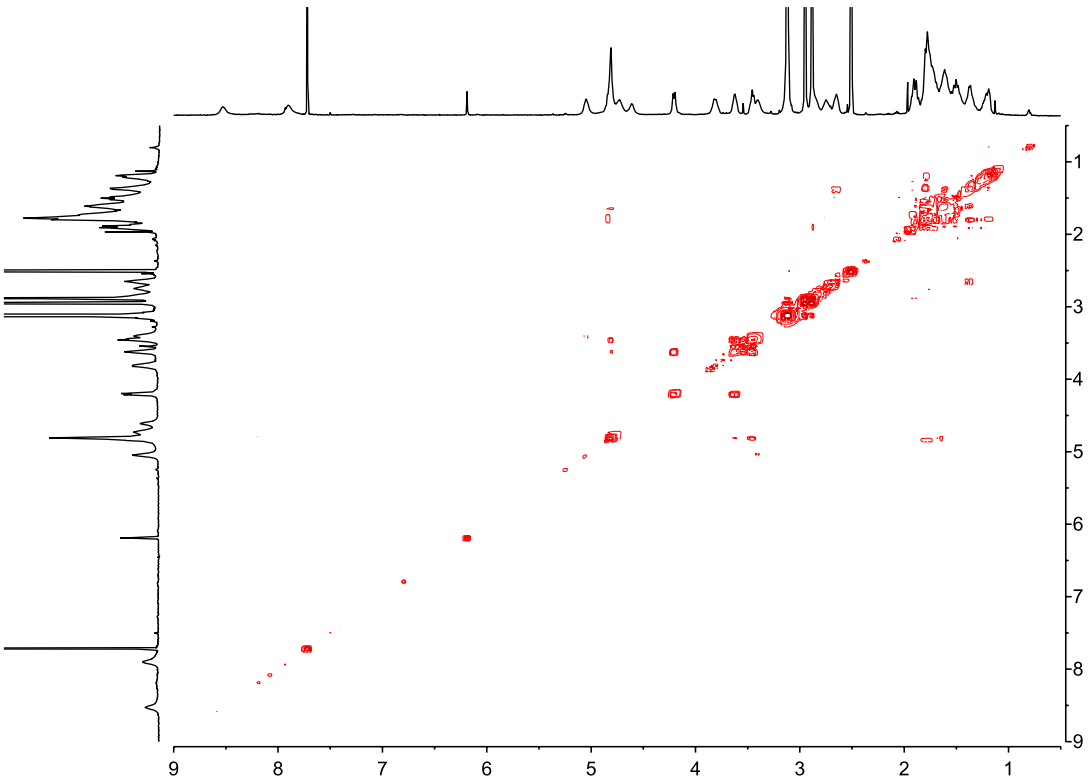
b) ^{1}H- RMN, ΔT ($CDCl_3$/DMSO (3:1), 500 MHz)



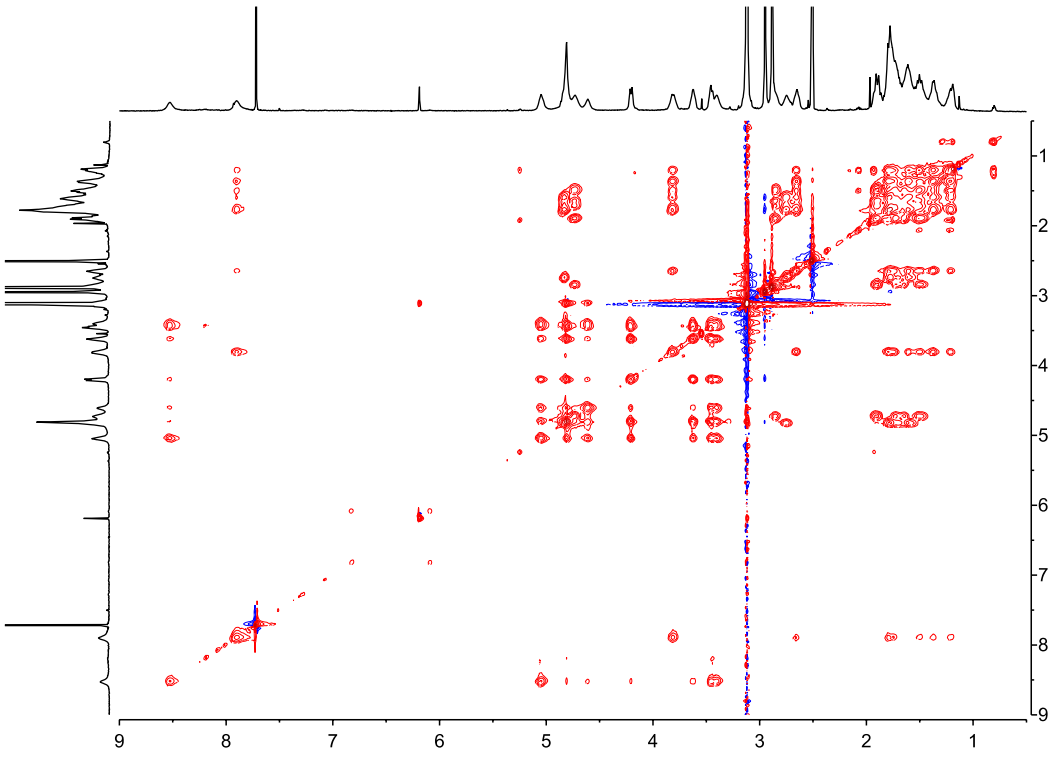
c) ^{1}H- RMN, ΔT, Ampliación ($CDCl_3$/DMSO (3:1), 500 MHz, 298 K)



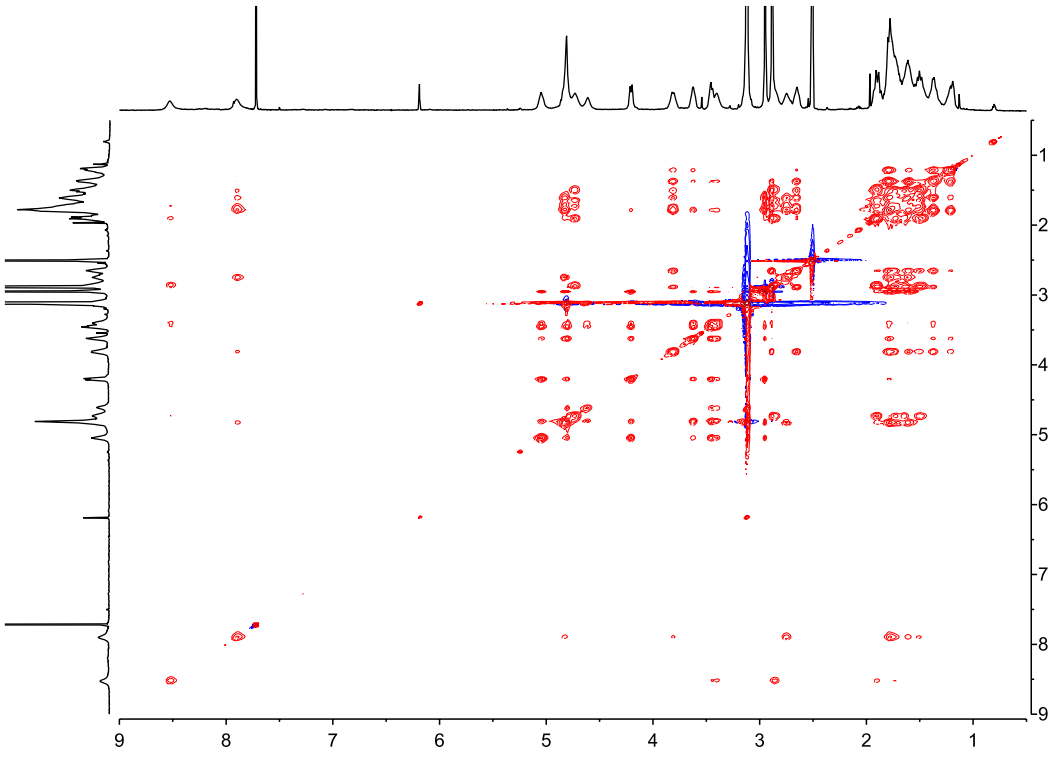
d) COSY ($CDCl_3$/DMSO (3:1), 500 MHz, 298 K)



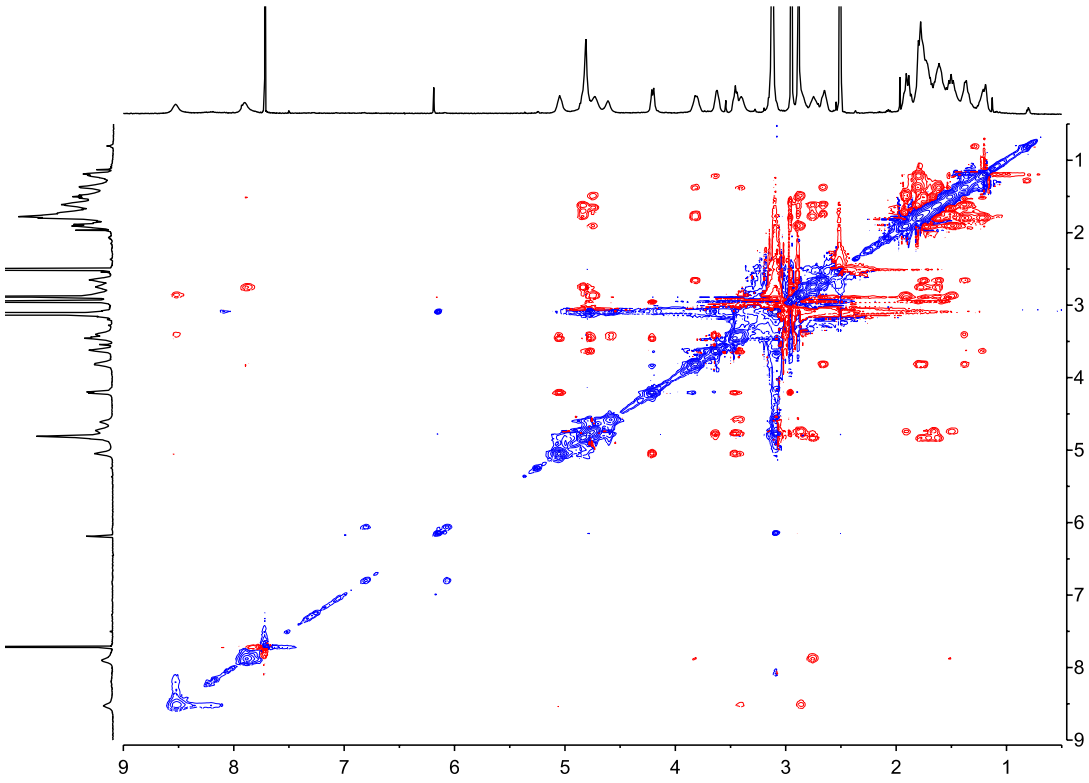
e) TOCSY ($CDCl_3$/DMSO (3:1), 500 MHz, 298 K)



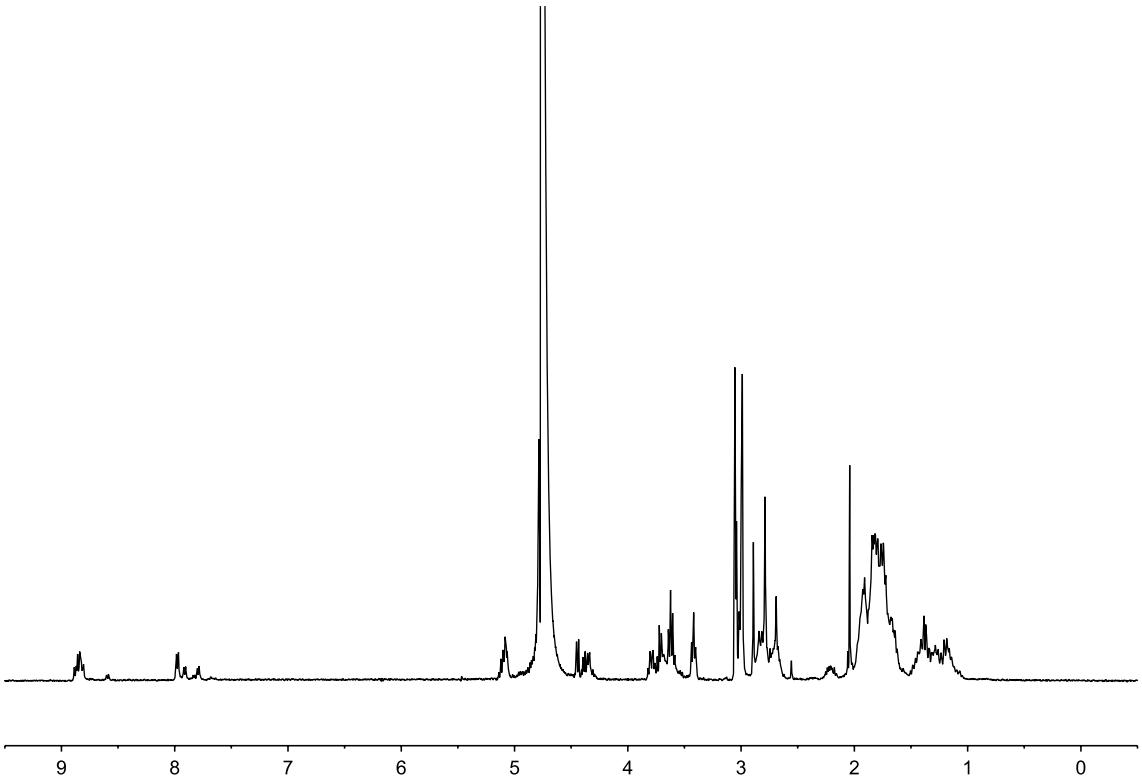
f) NOESY ($CDCl_3$/DMSO (3:1), 500 MHz, 298 K)



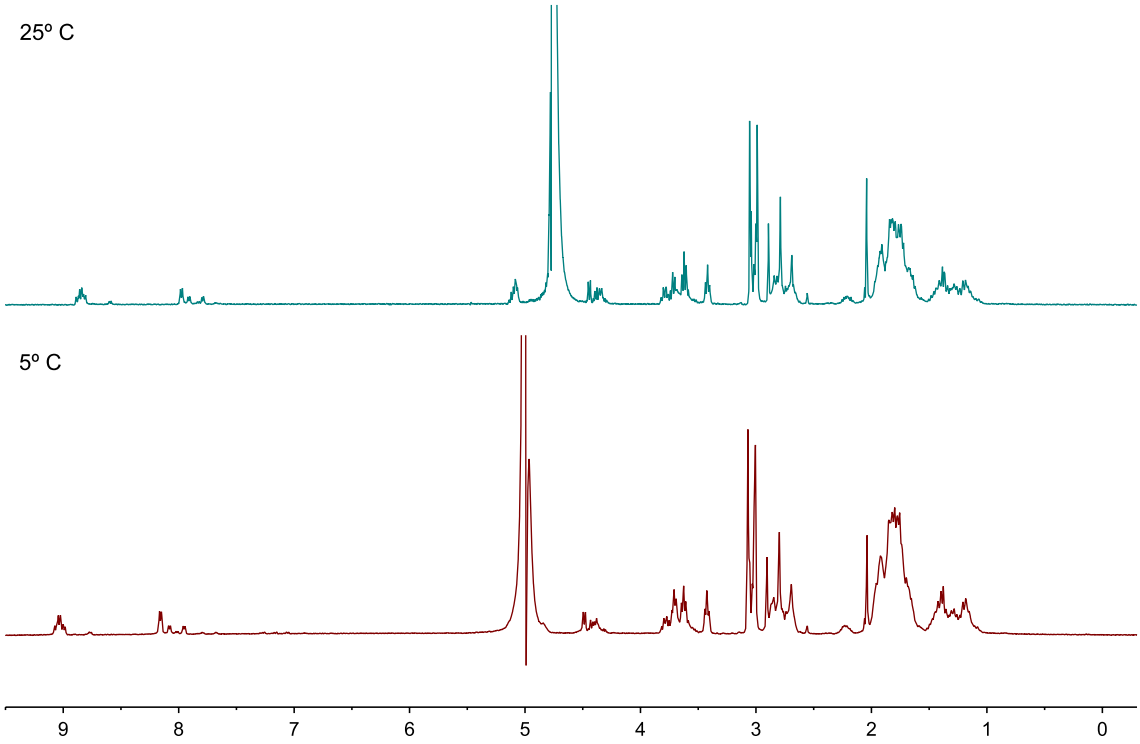
g) ROESY ($CDCl_3$/DMSO (3:1), 500 MHz, 298 K)



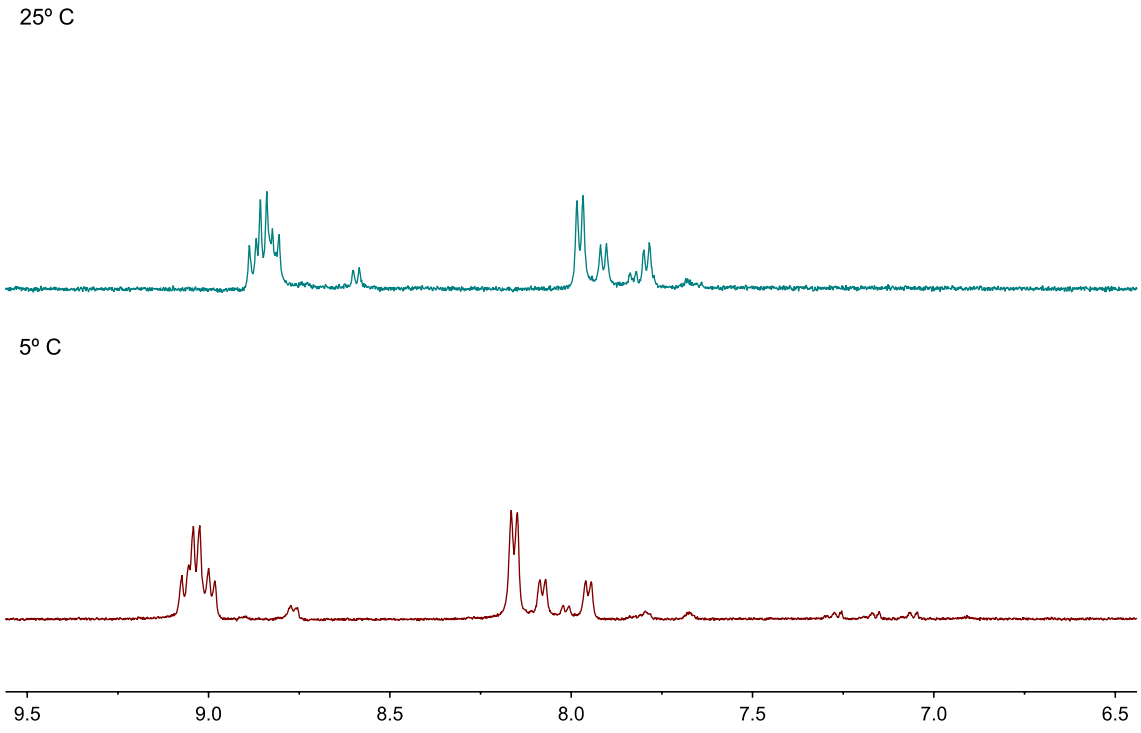
h) ^{1}H-RMN (D_2O, 500 MHz, 298 K)



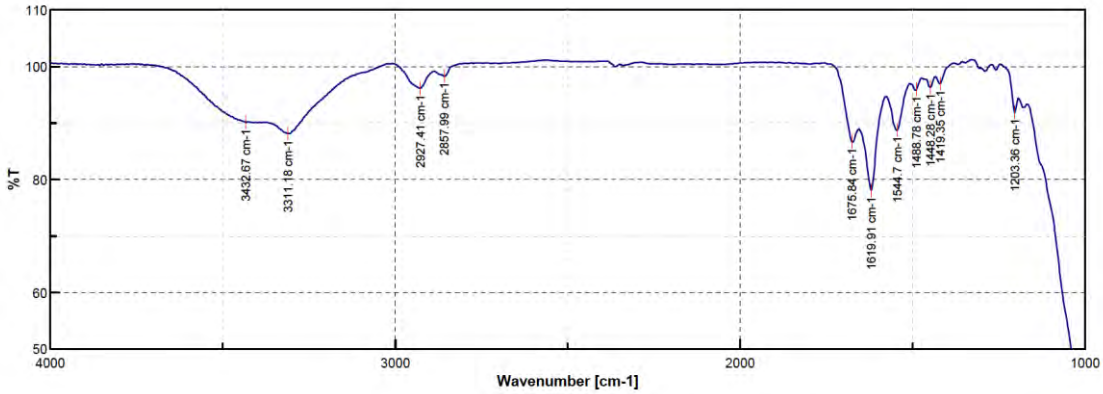
i) ^{1}H-RMN, ΔT (D_2O, 500 MHz, 298 K)



j) ^{1}H-RMN, ΔT, Ampliación (D_2O, 500 MHz, 298 K)

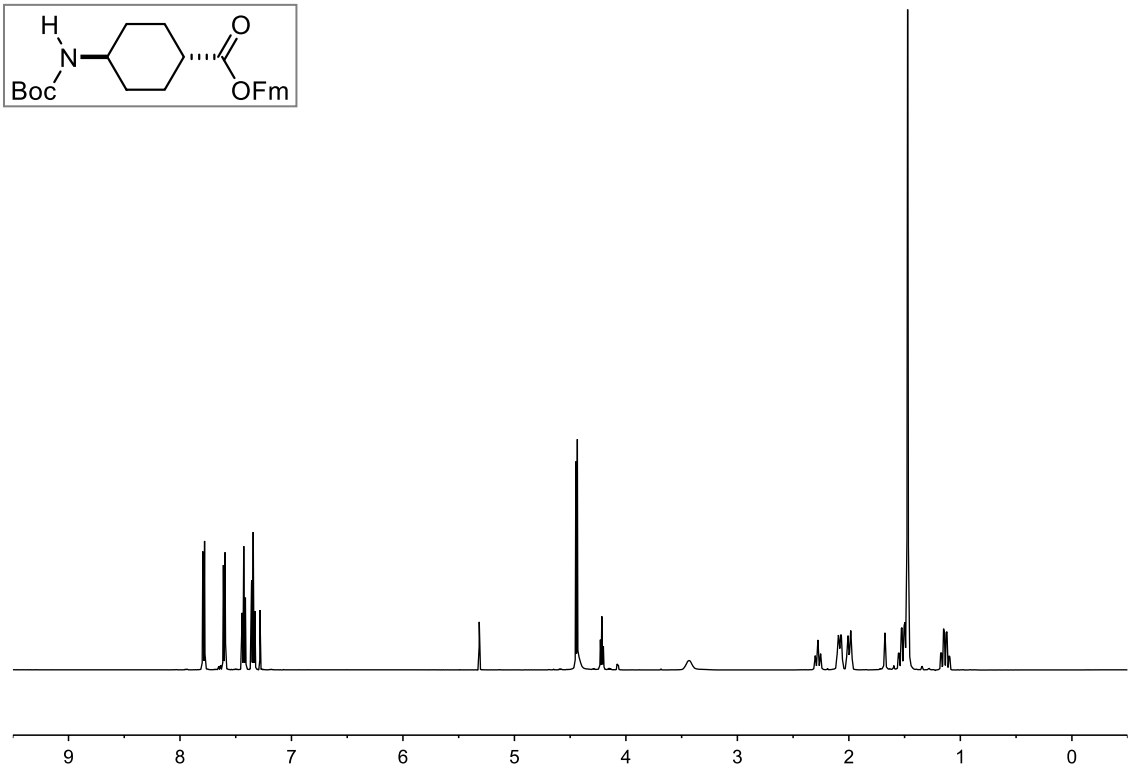


k) IR (MeOH, 298 K)

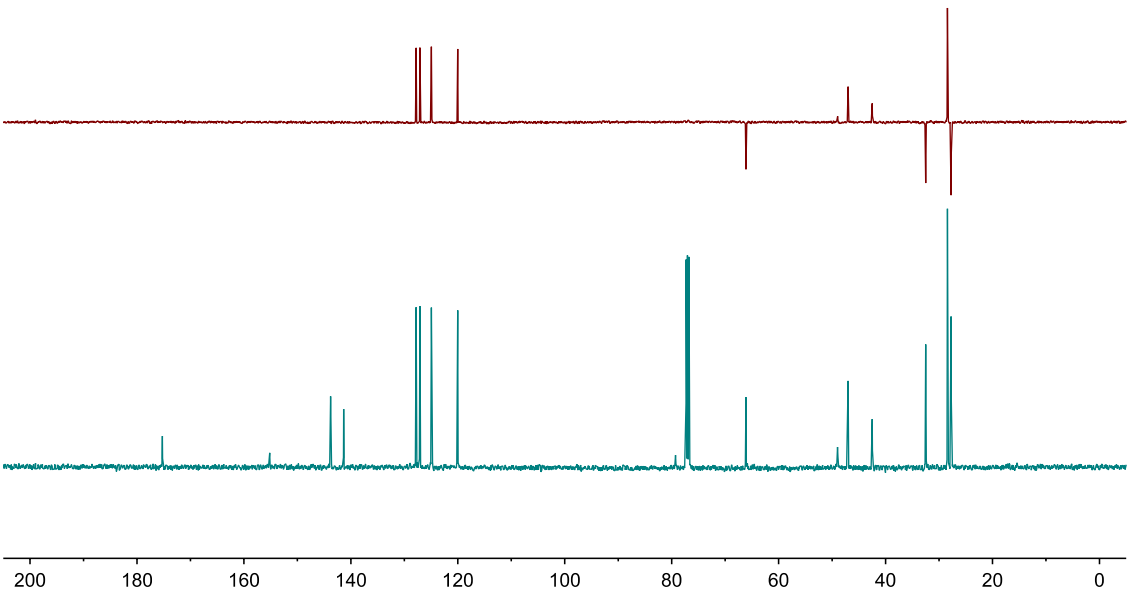


Boc-δ-Ach-OFm (45)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

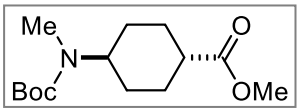


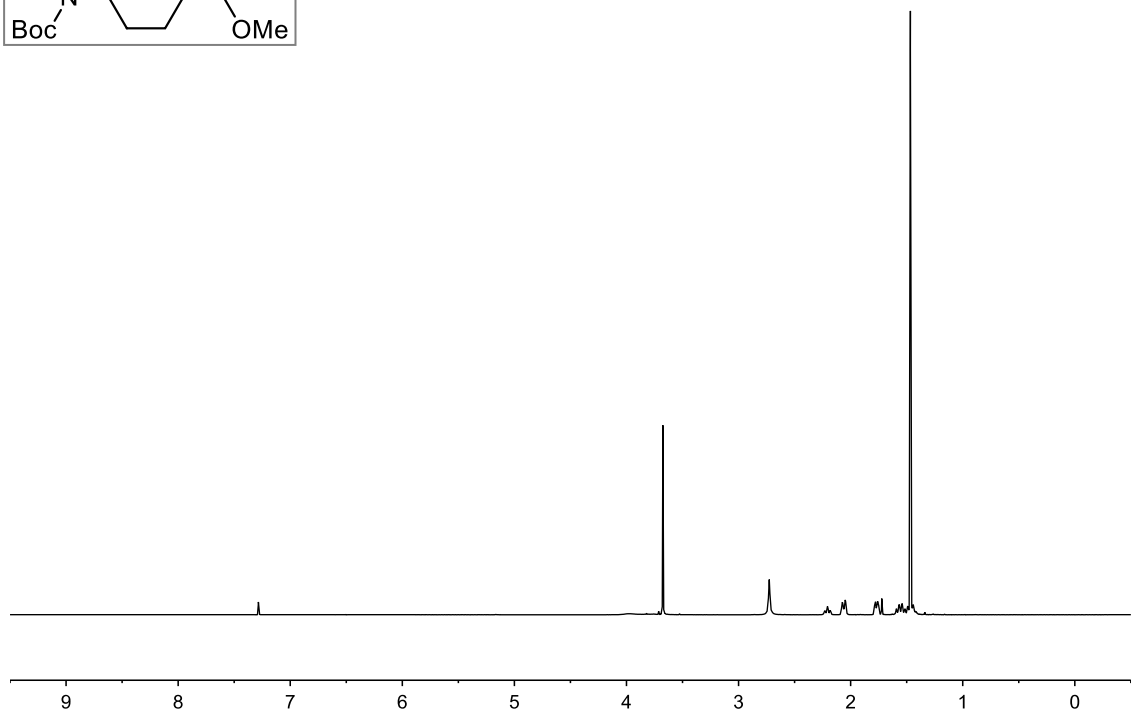
b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 63 MHz, 298 K)



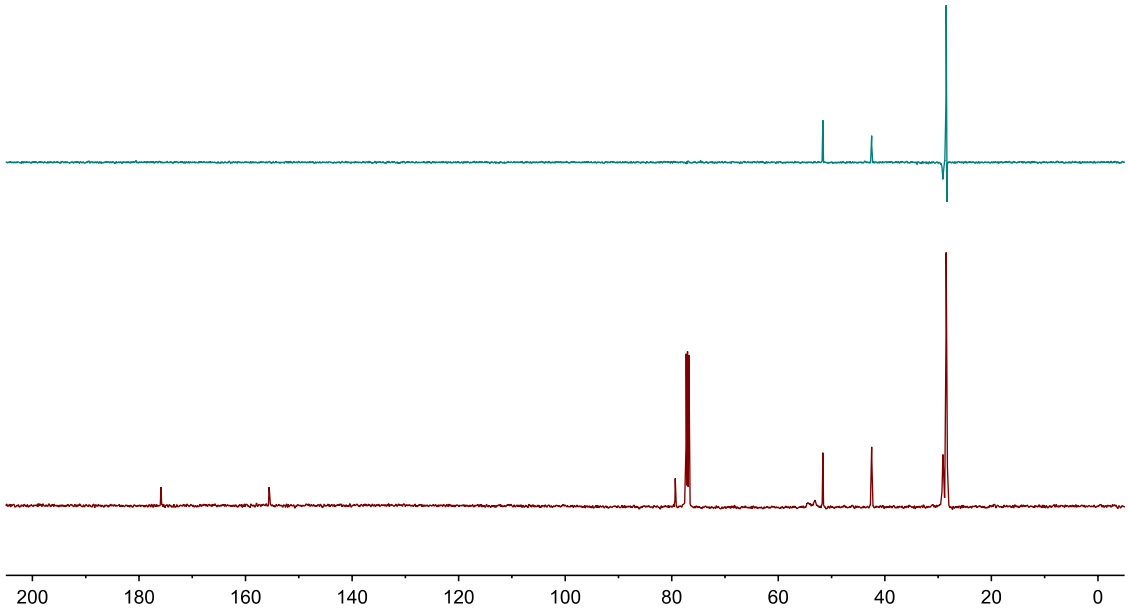
Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OMe (46)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)



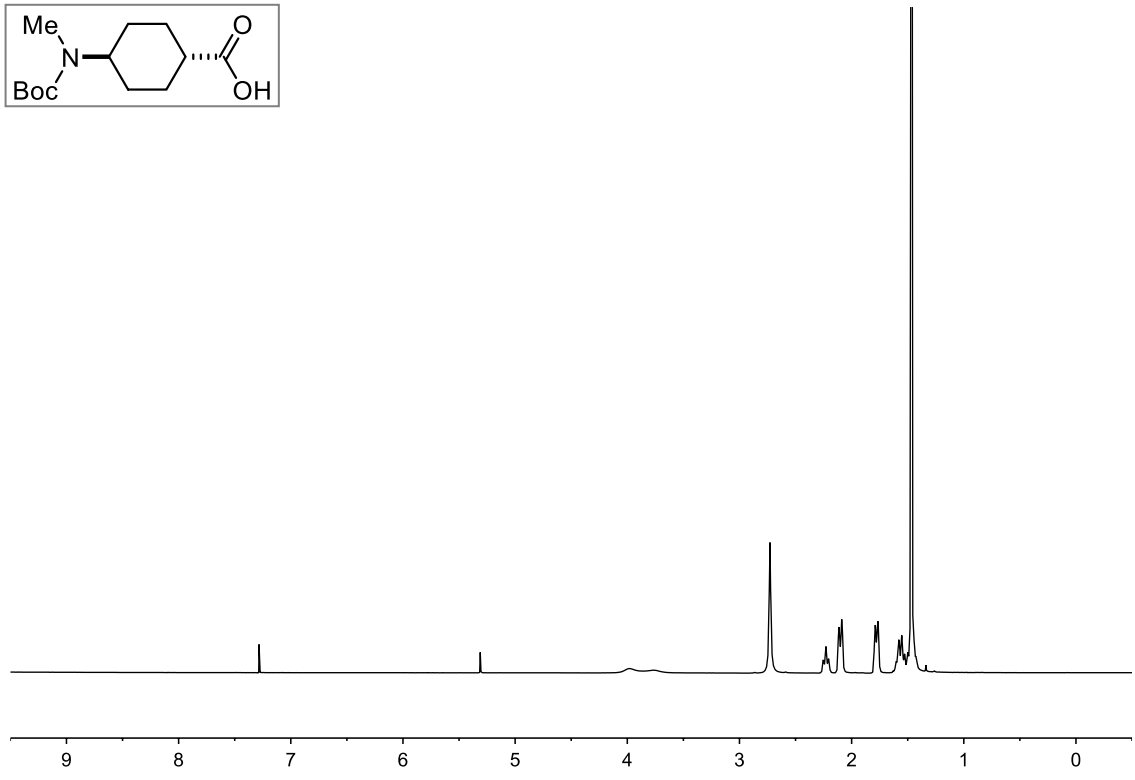


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 63 MHz, 298 K)

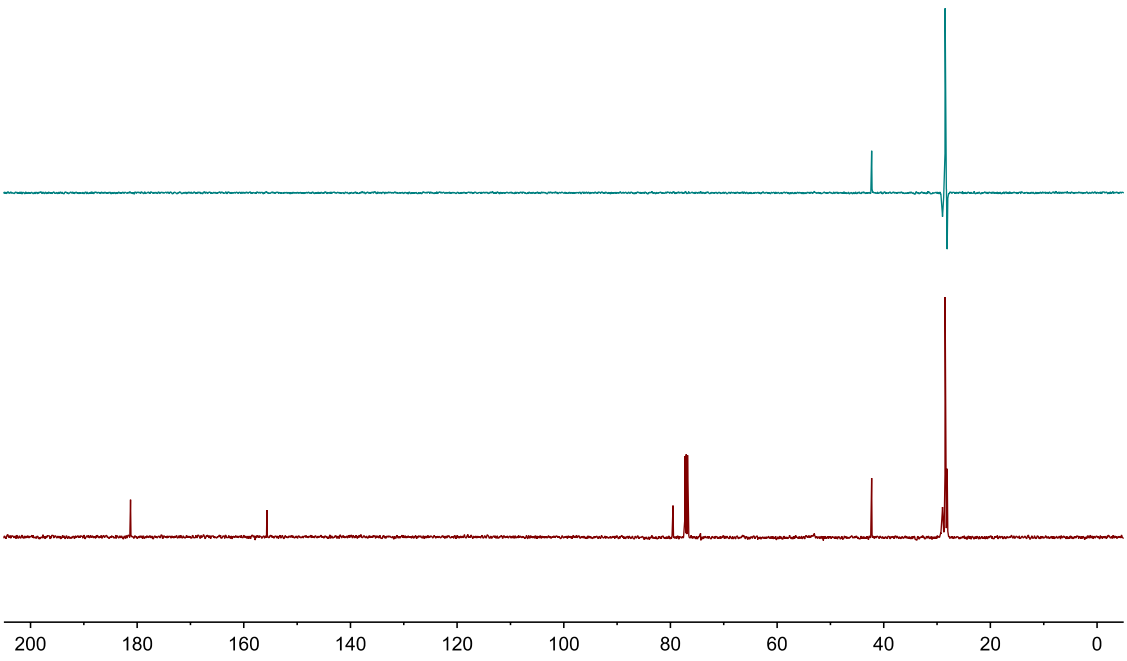


Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OH (47)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

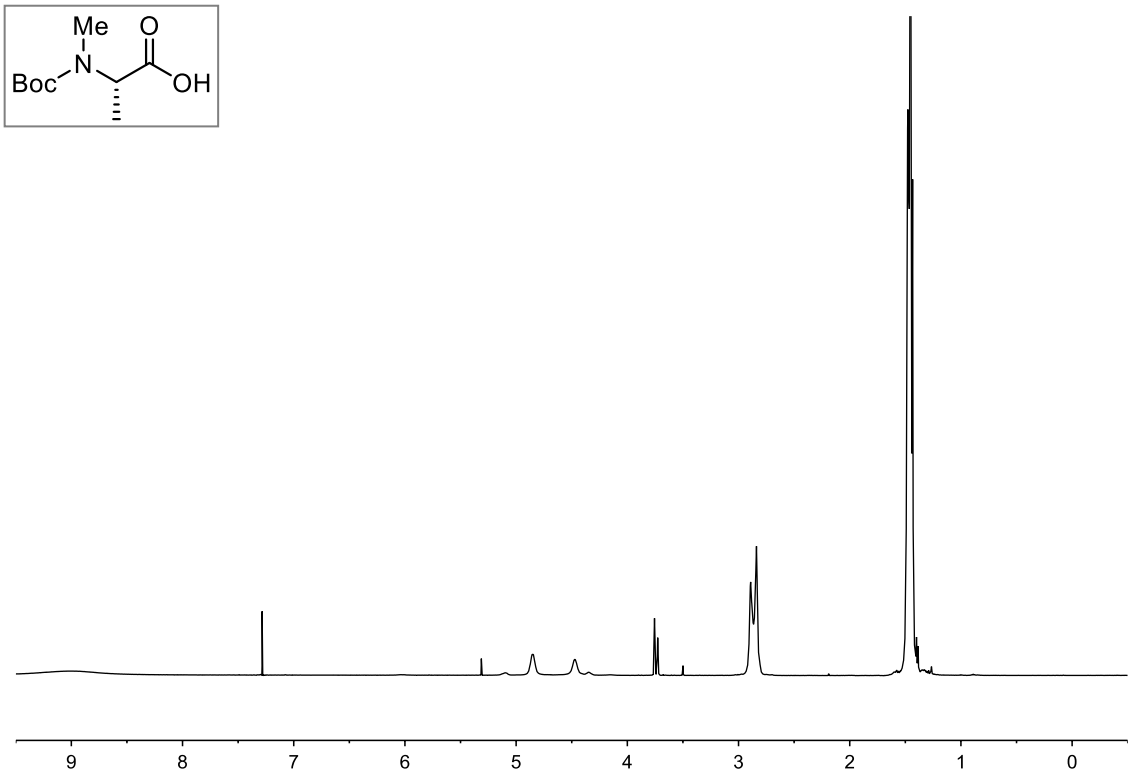


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 63 MHz, 298 K)

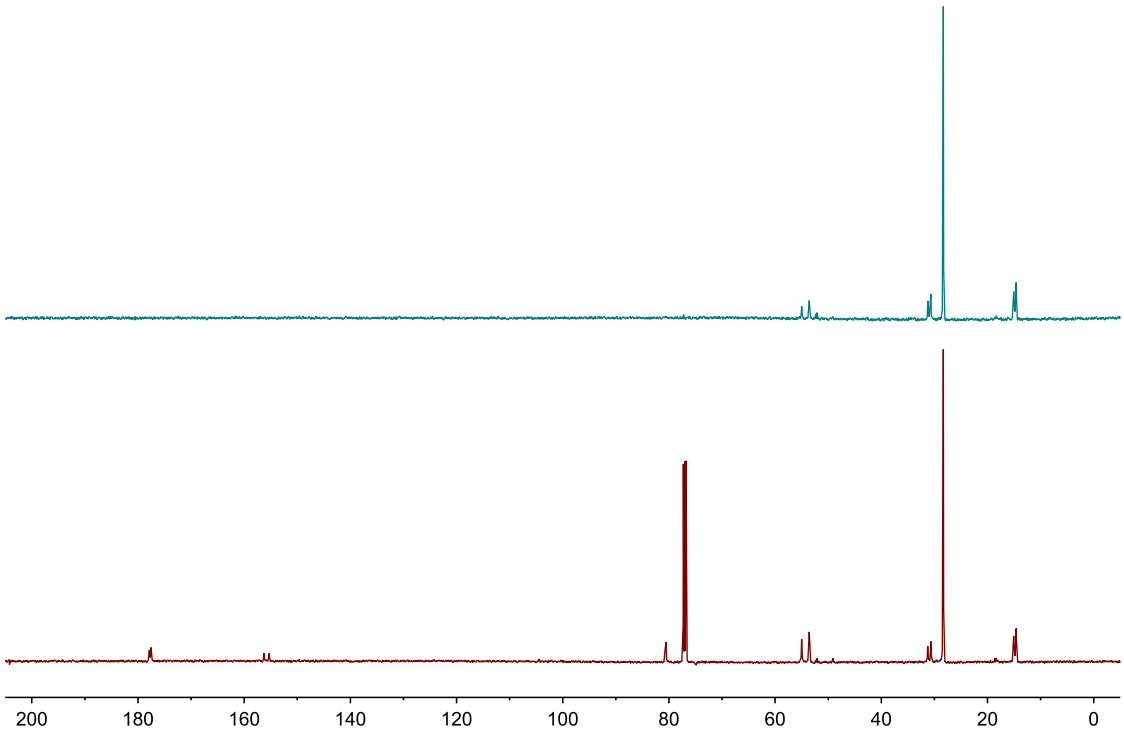


Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-OH (49)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

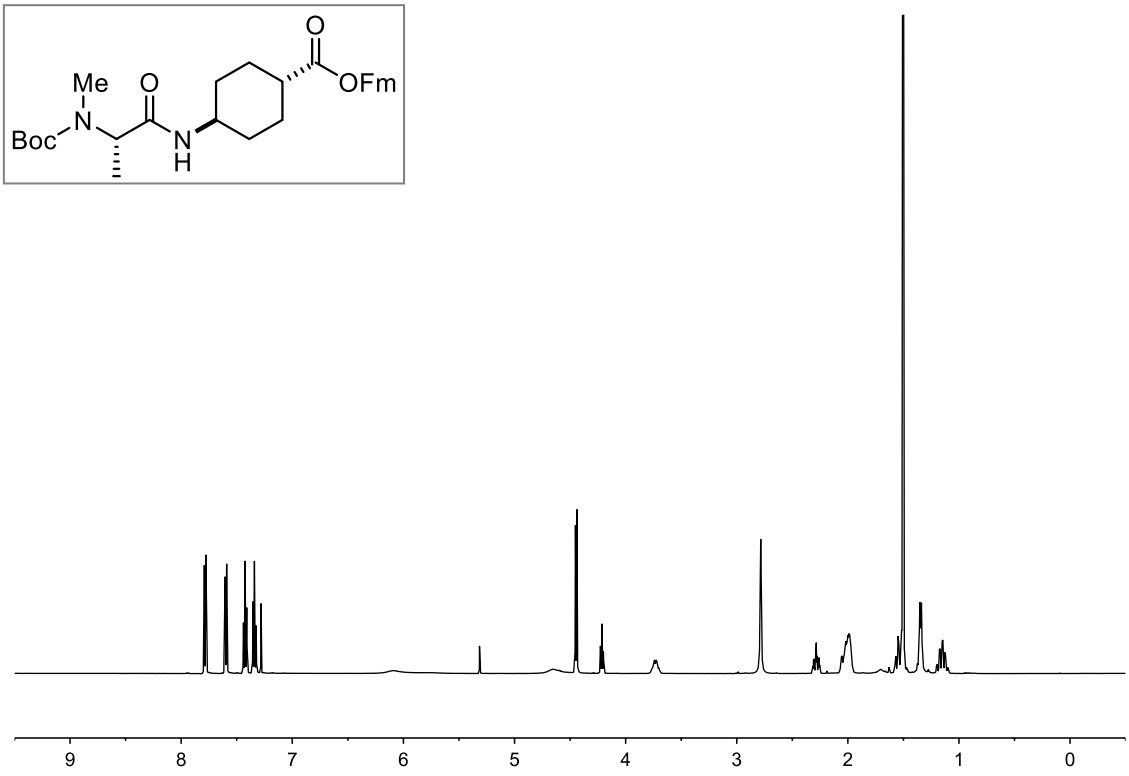


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 63 MHz, 298 K)

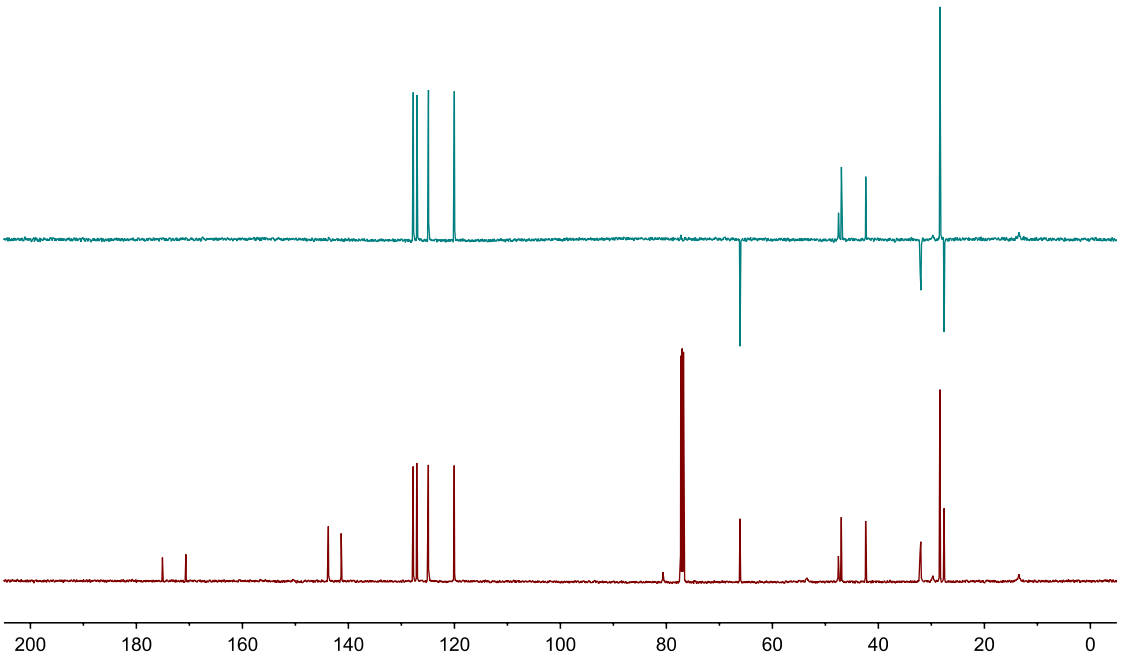


Boc-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (50)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

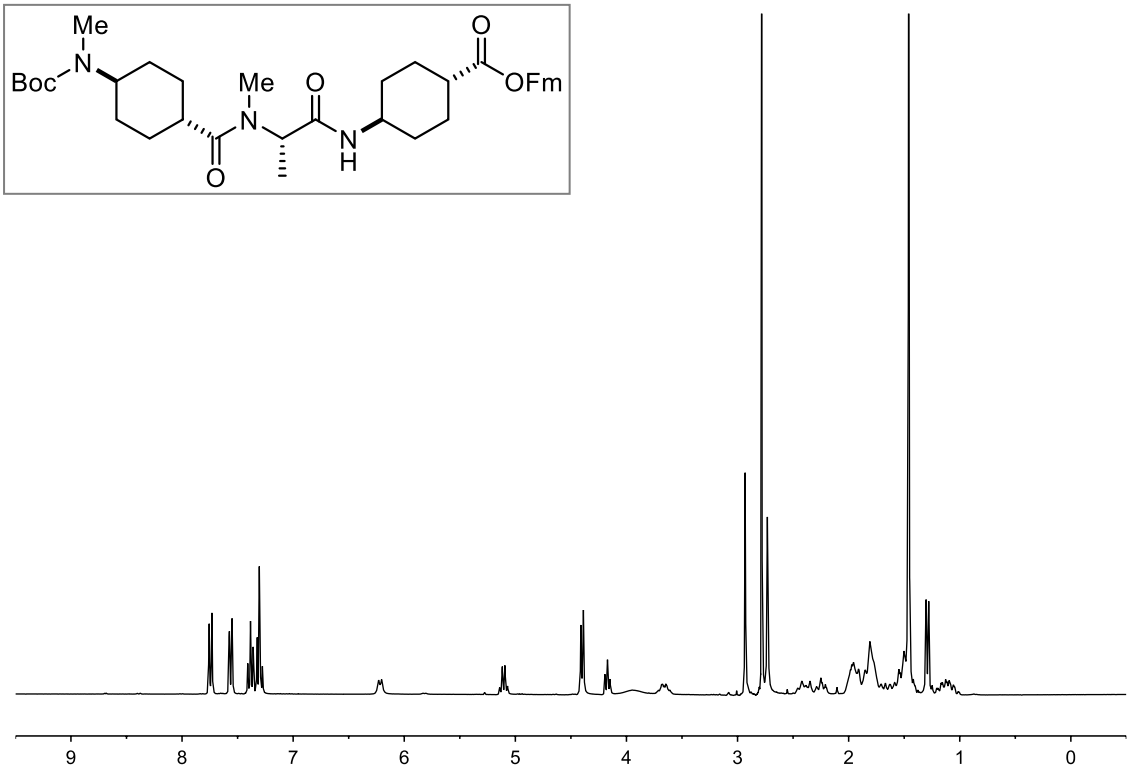


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 63 MHz, 298 K)

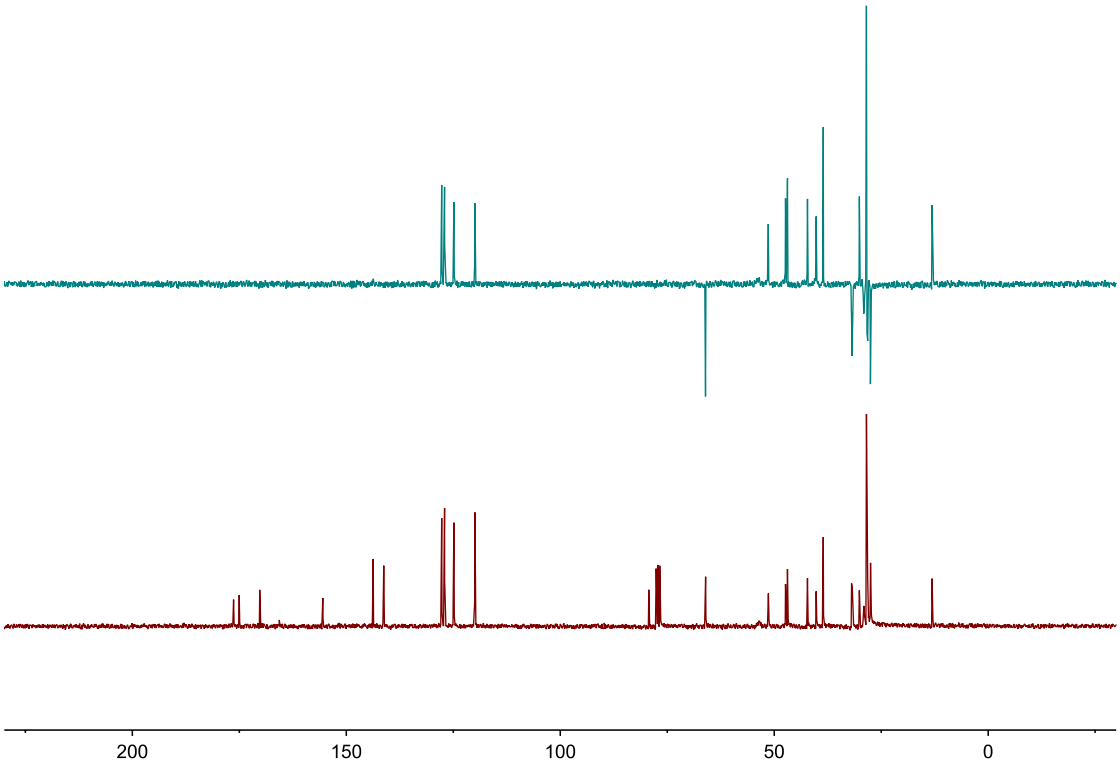


Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-OFm (51)

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

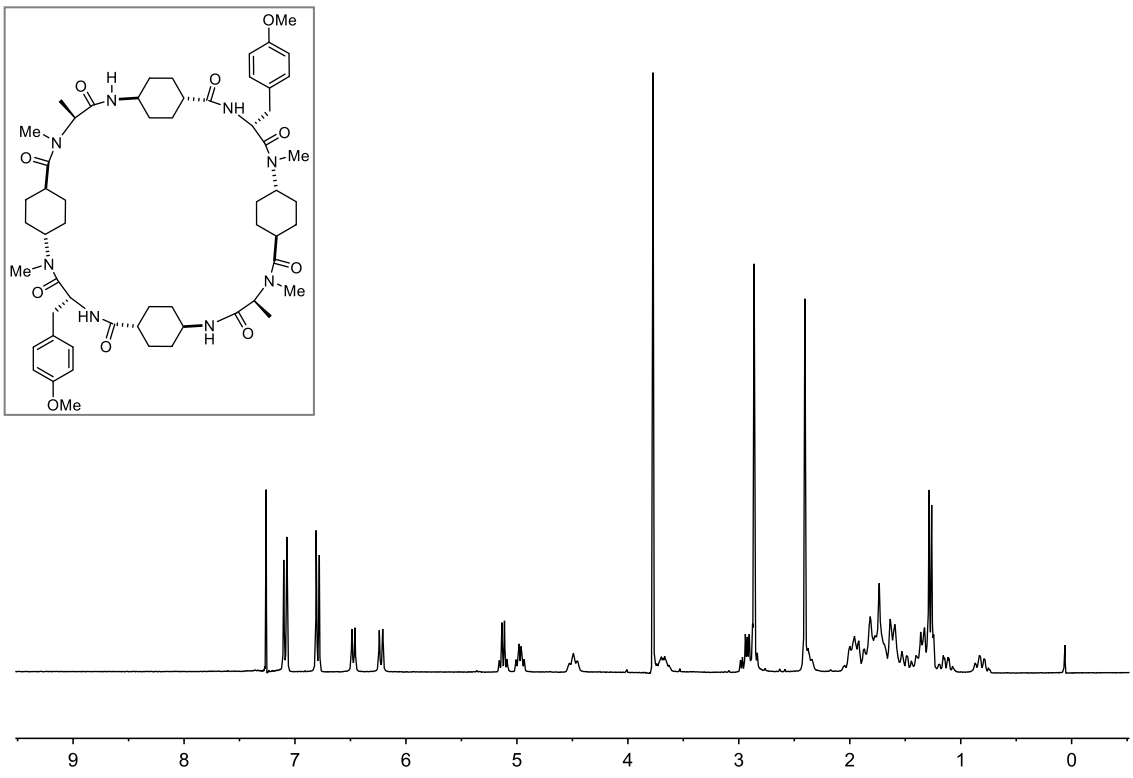


b) **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

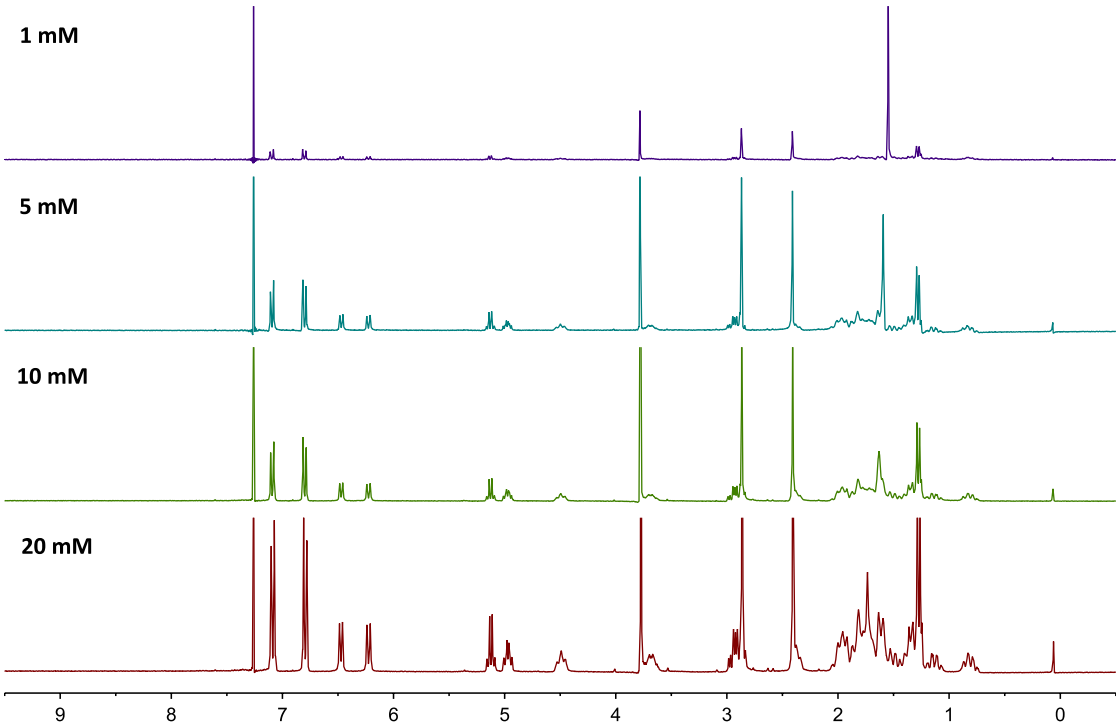


c-[(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*- δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_2$], CP10

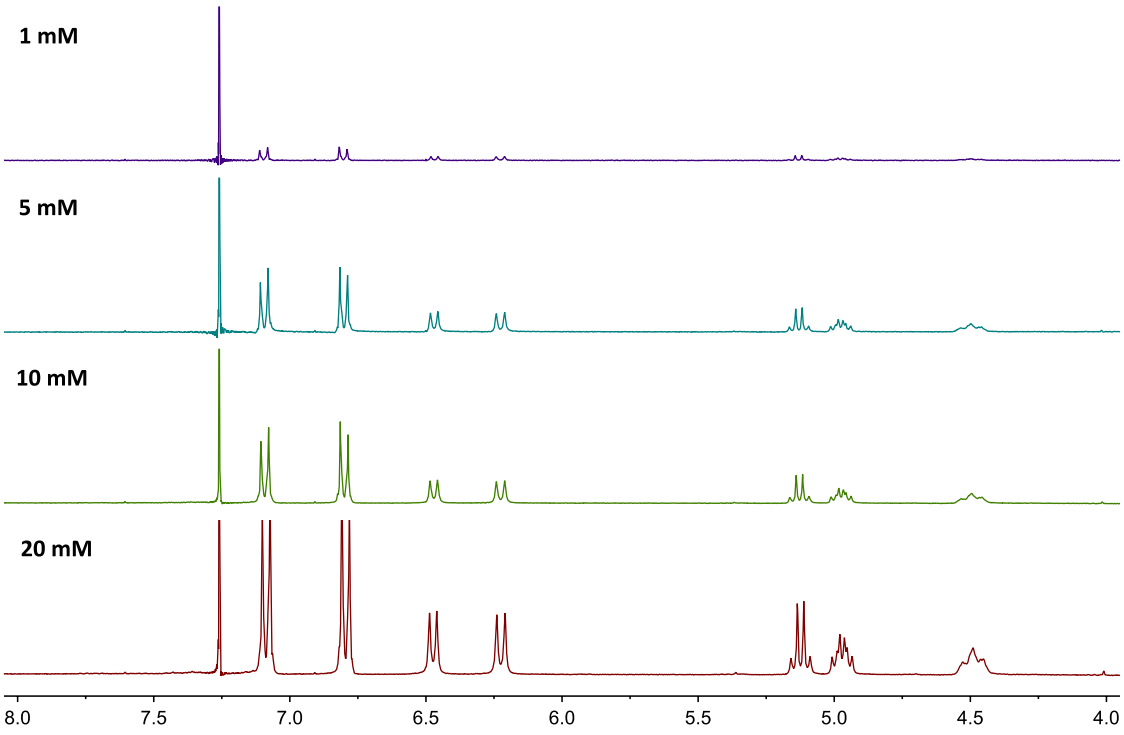
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)



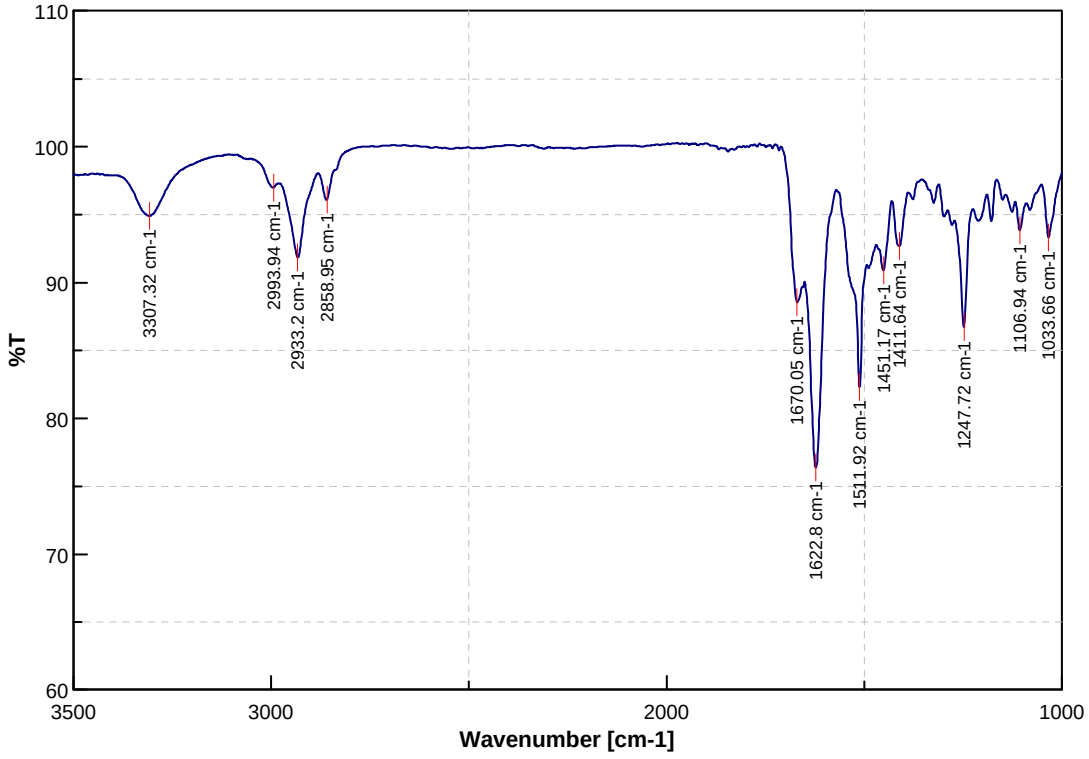
b) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K), Diferentes concentraciones.



c) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K), Diferentes concentraciones (ampliación).

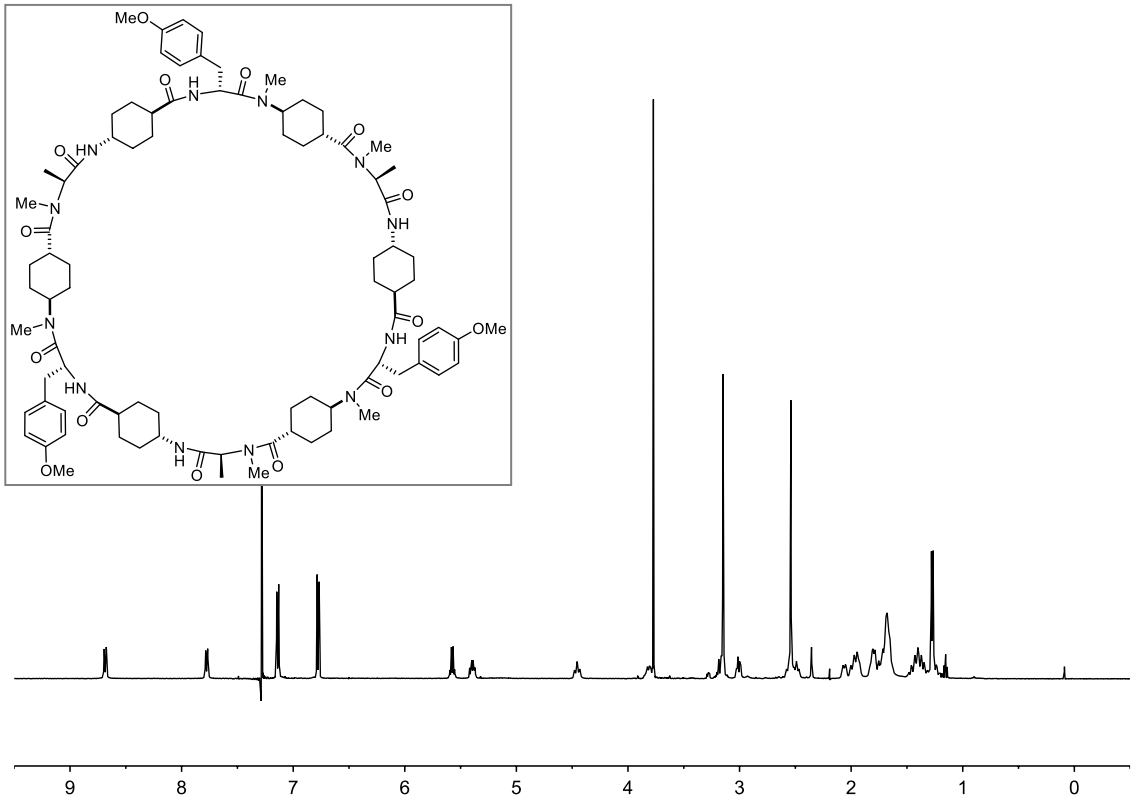


d) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298 K).

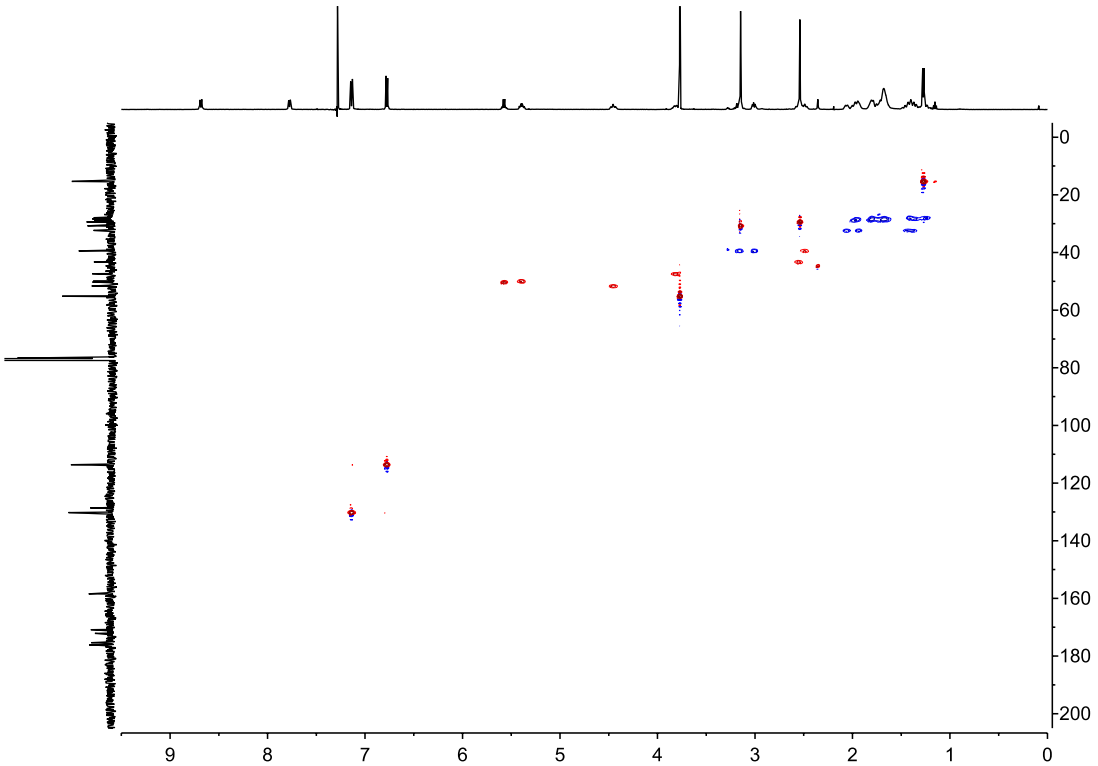


c-[(*D*-Tyr(Me)-^{Me}*N*- δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_3$], CP11

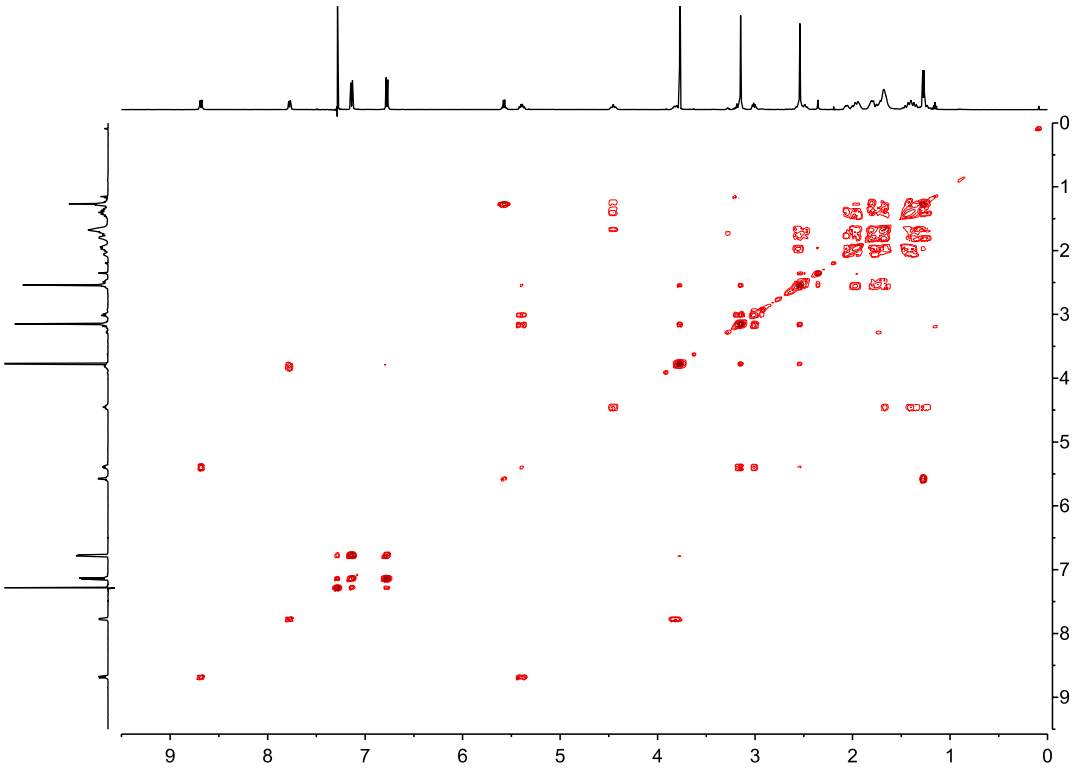
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



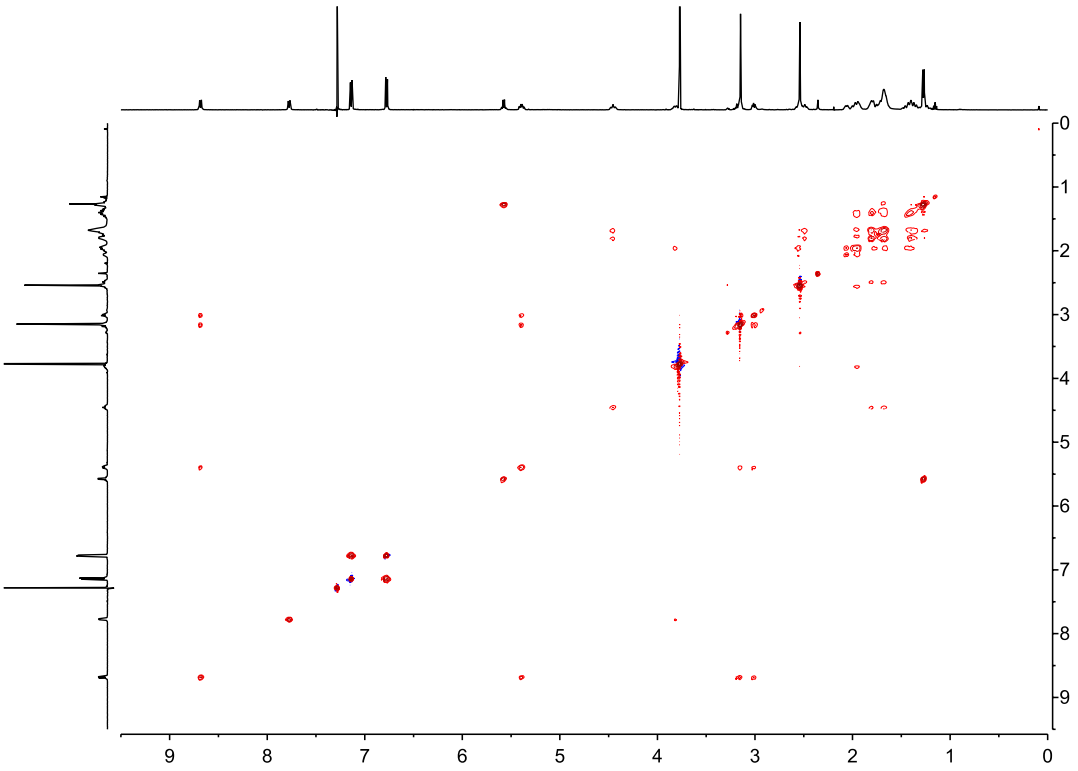
b) **HSQC** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



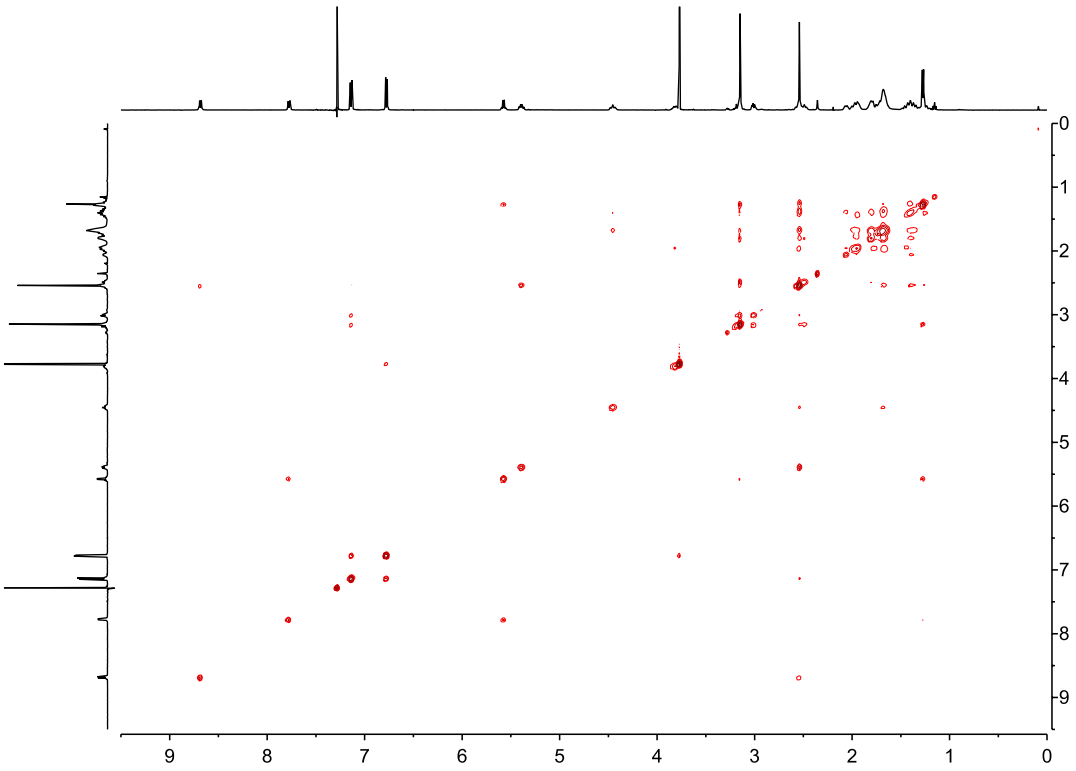
c) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



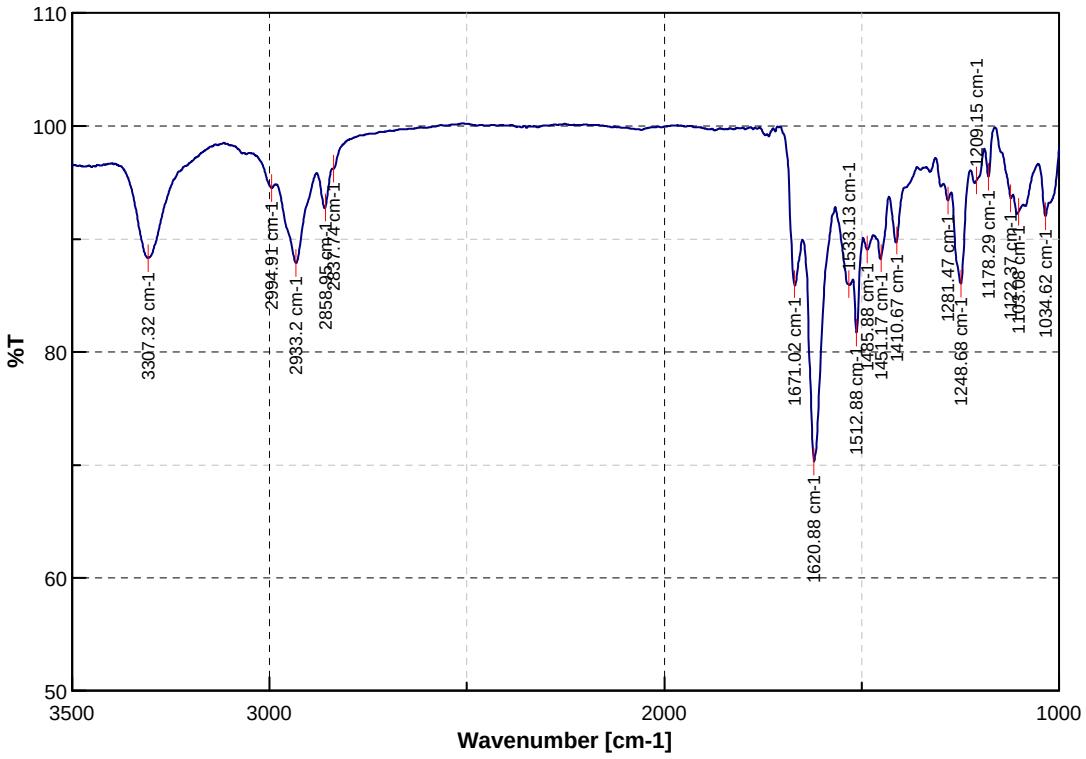
d) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



e) **NOESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)

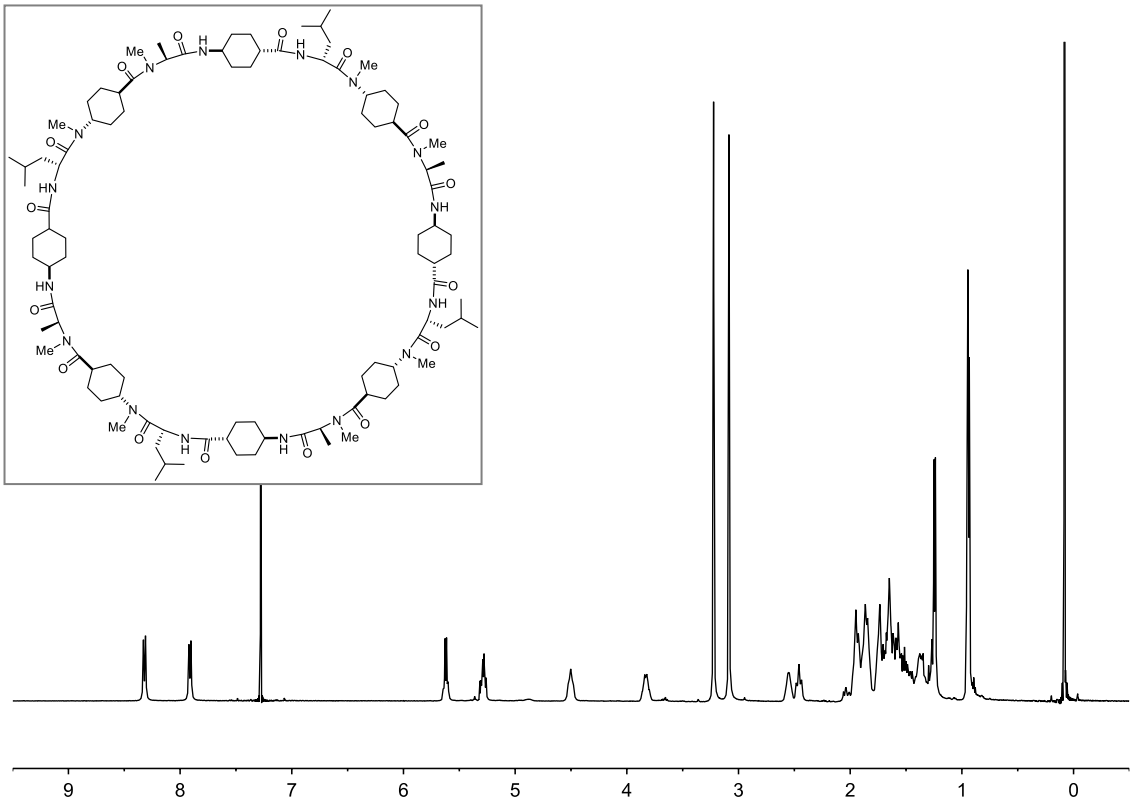


a) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298 K)

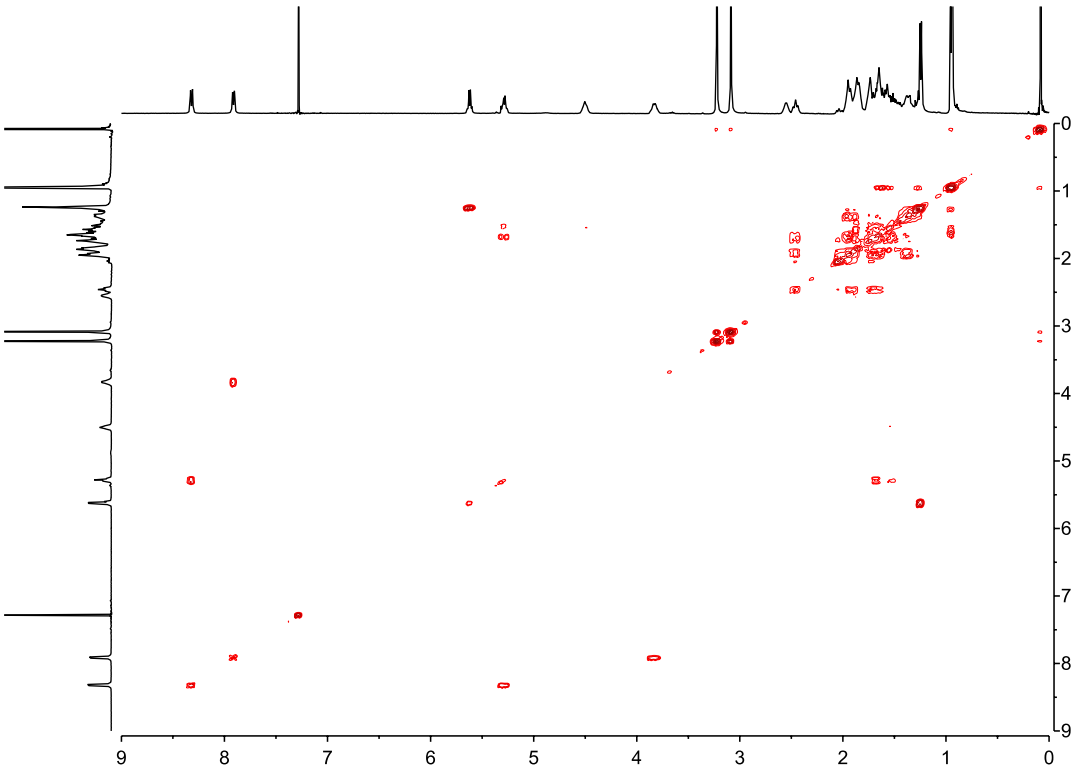


c-[(*D*-Leu-^{Me}*N*- δ-Ach-^{Me}*N*-*L*-Ala-δ-Ach-)$_4$] (CP12)

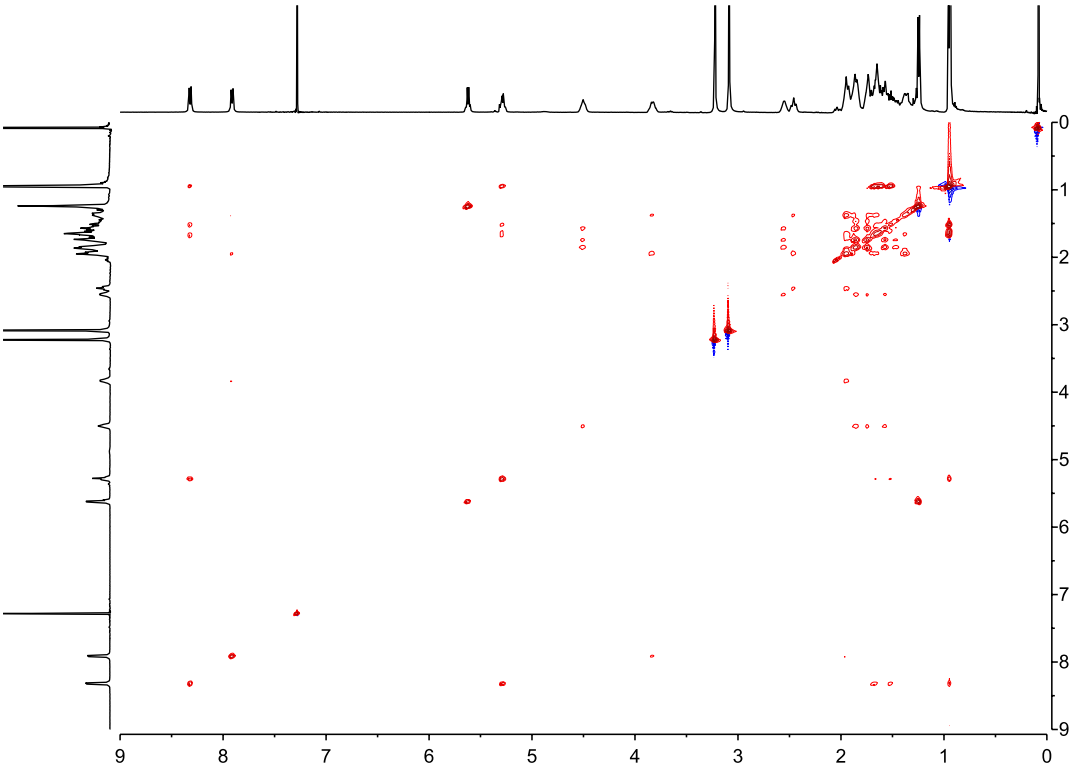
f) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



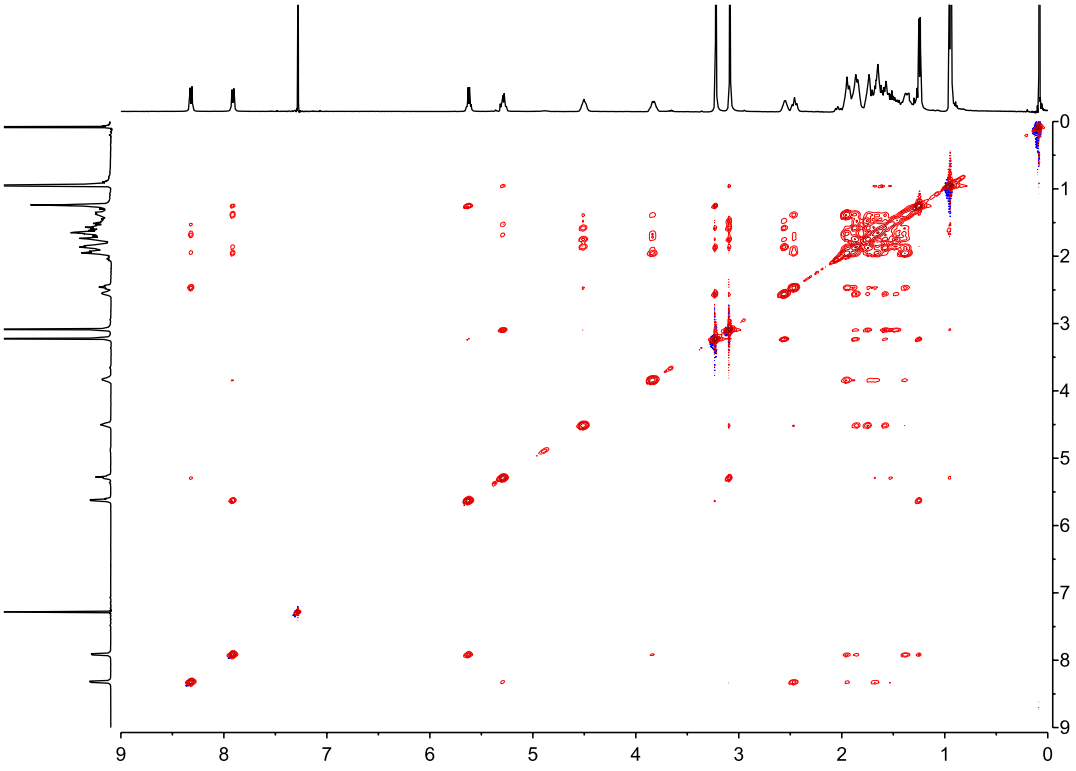
g) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



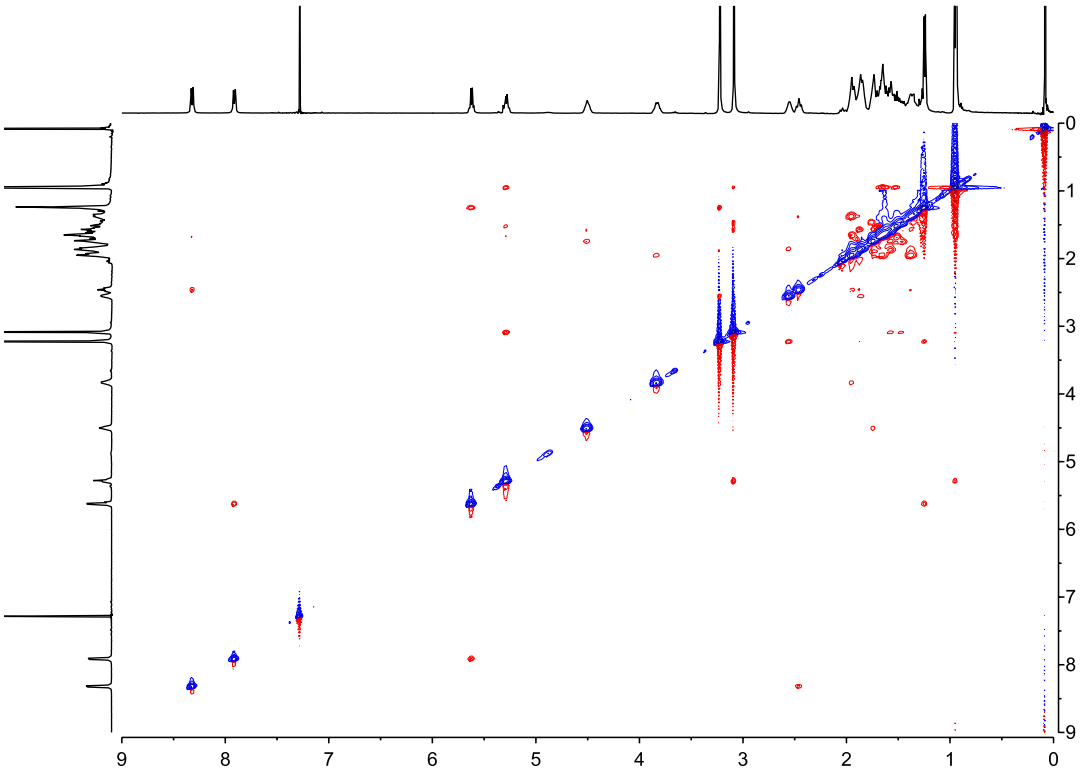
h) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



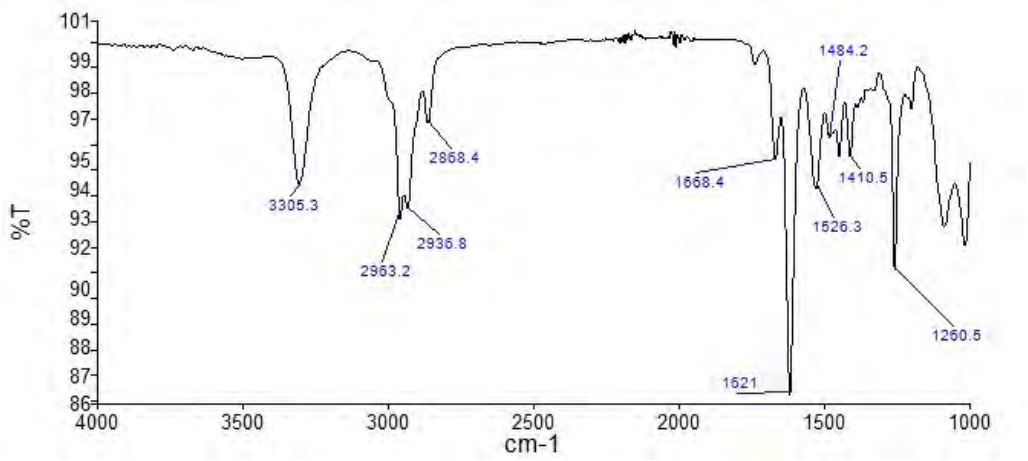
i) **NOESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



j) **ROESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)

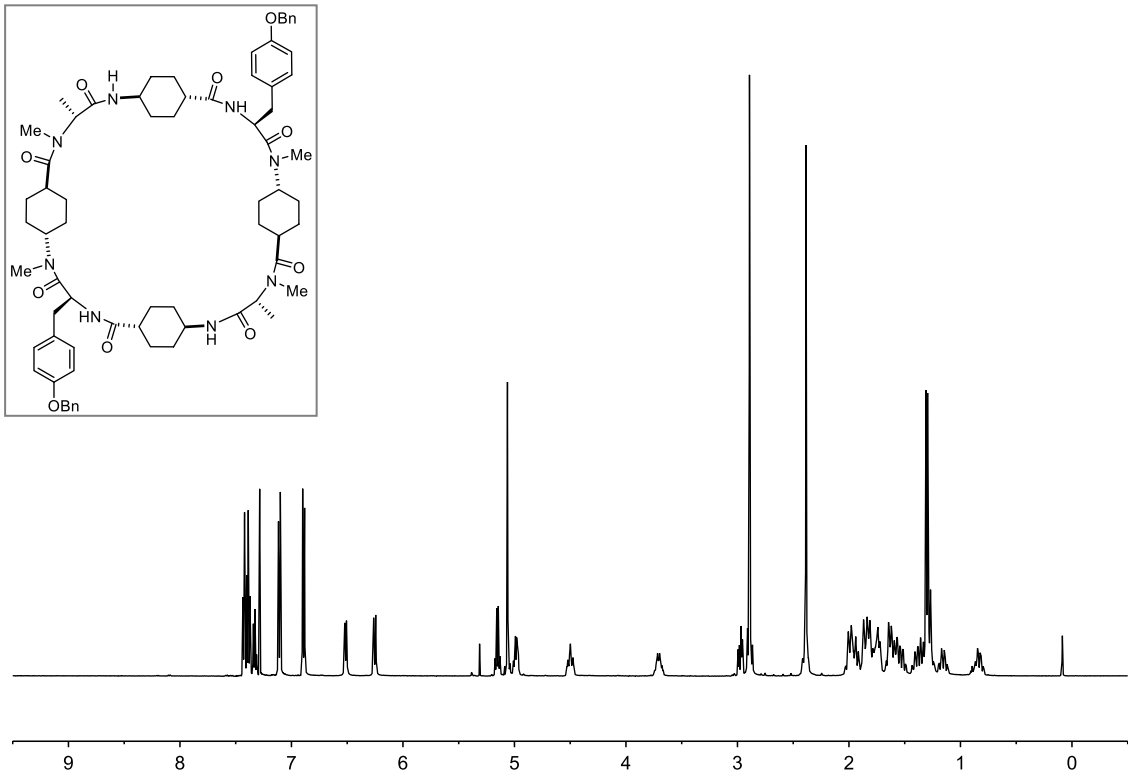


k) FT-IR ($CHCl_3$, 298 K)

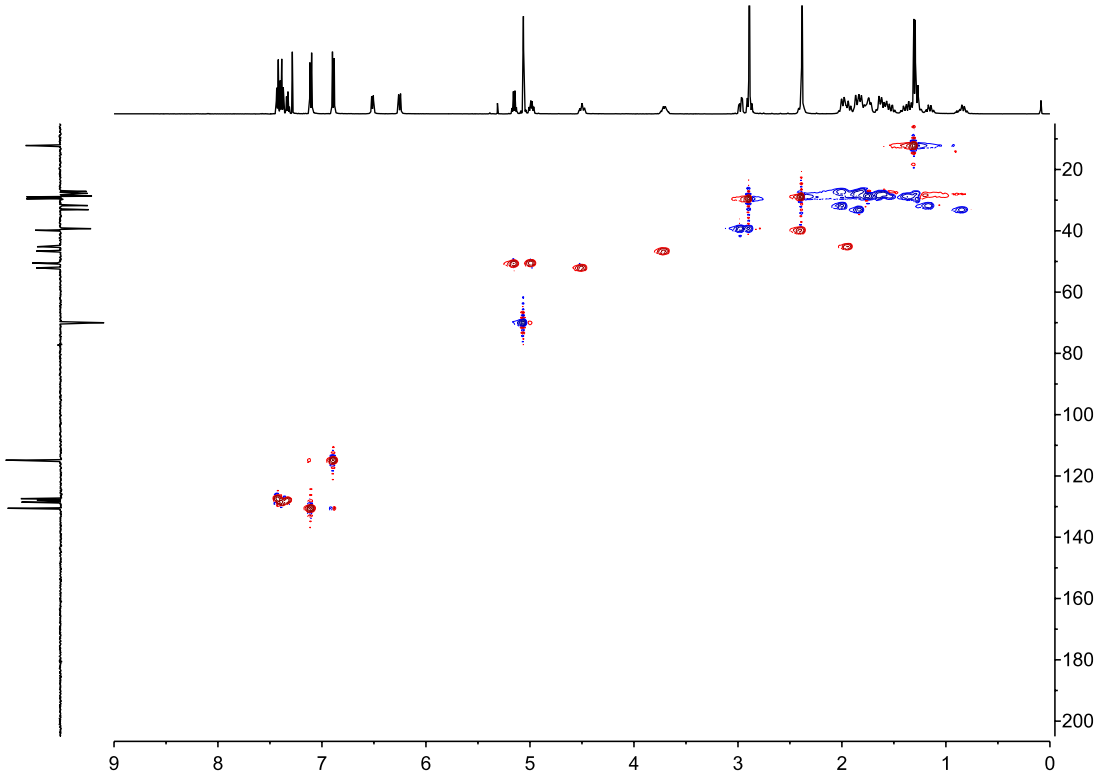


c-[(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*- δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_3$], CP13

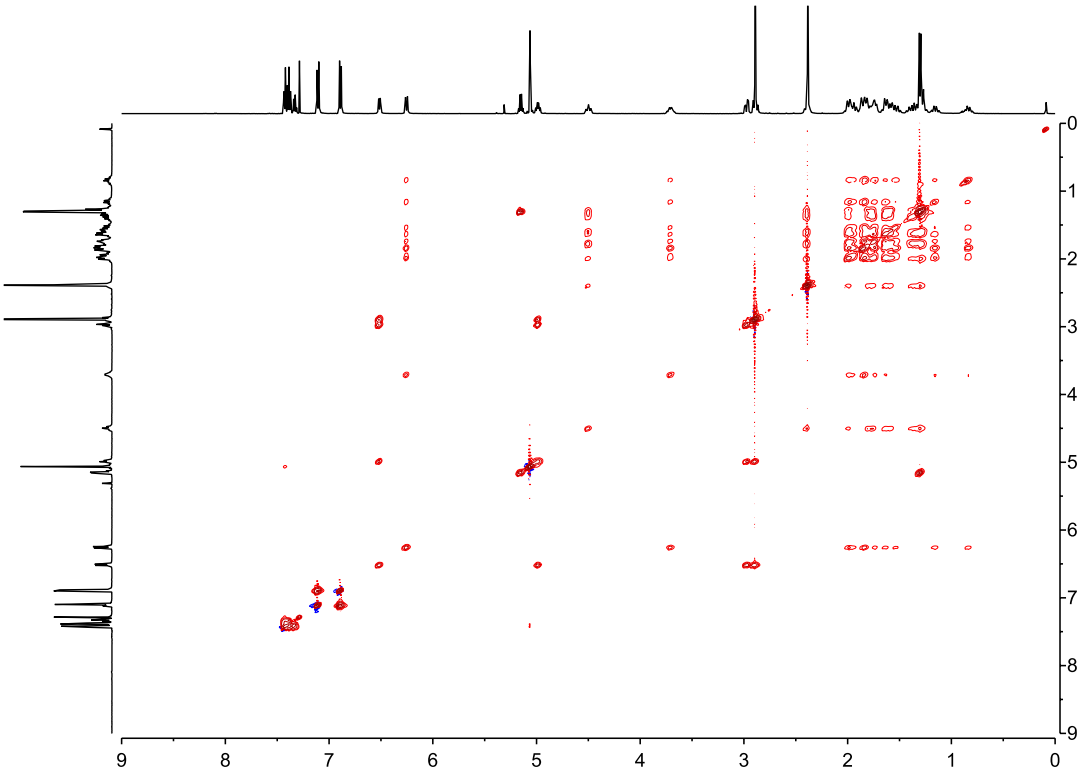
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



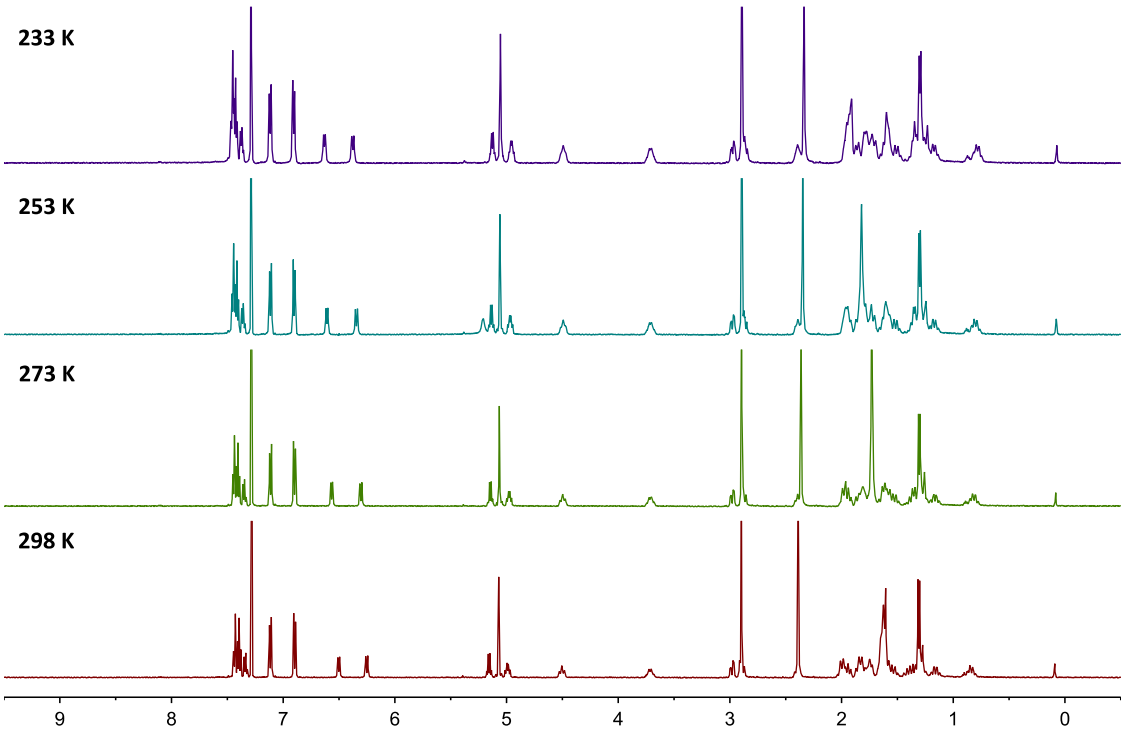
b) **HSQC** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



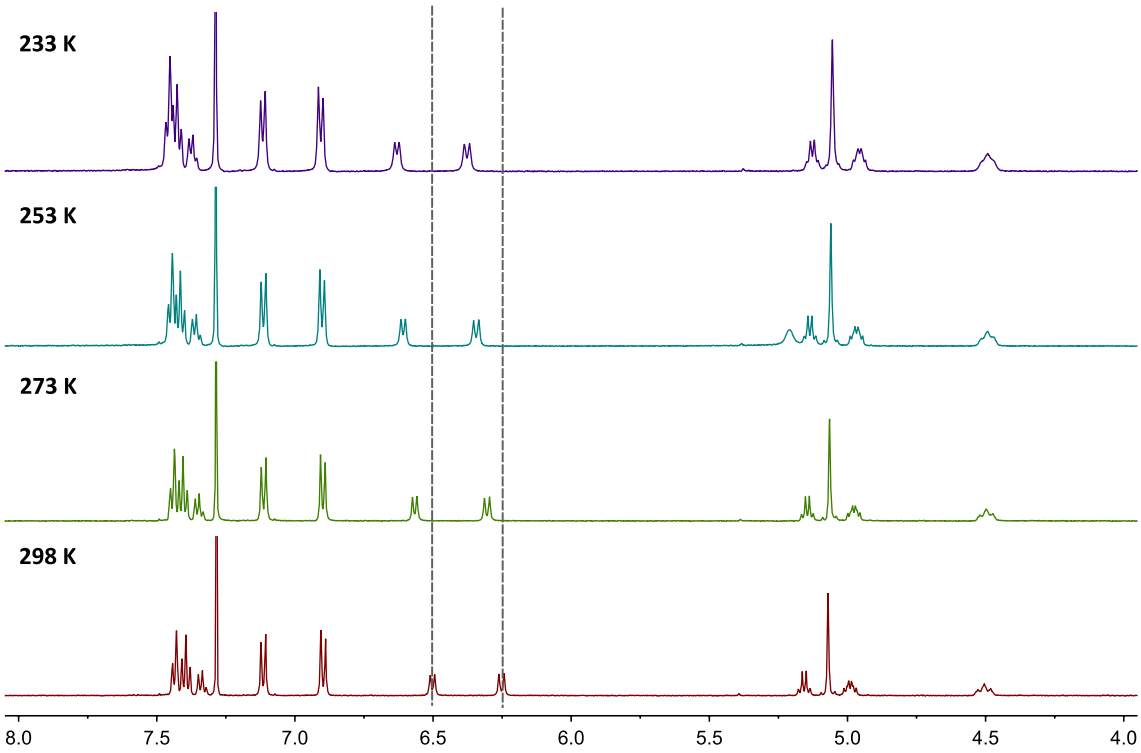
c) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



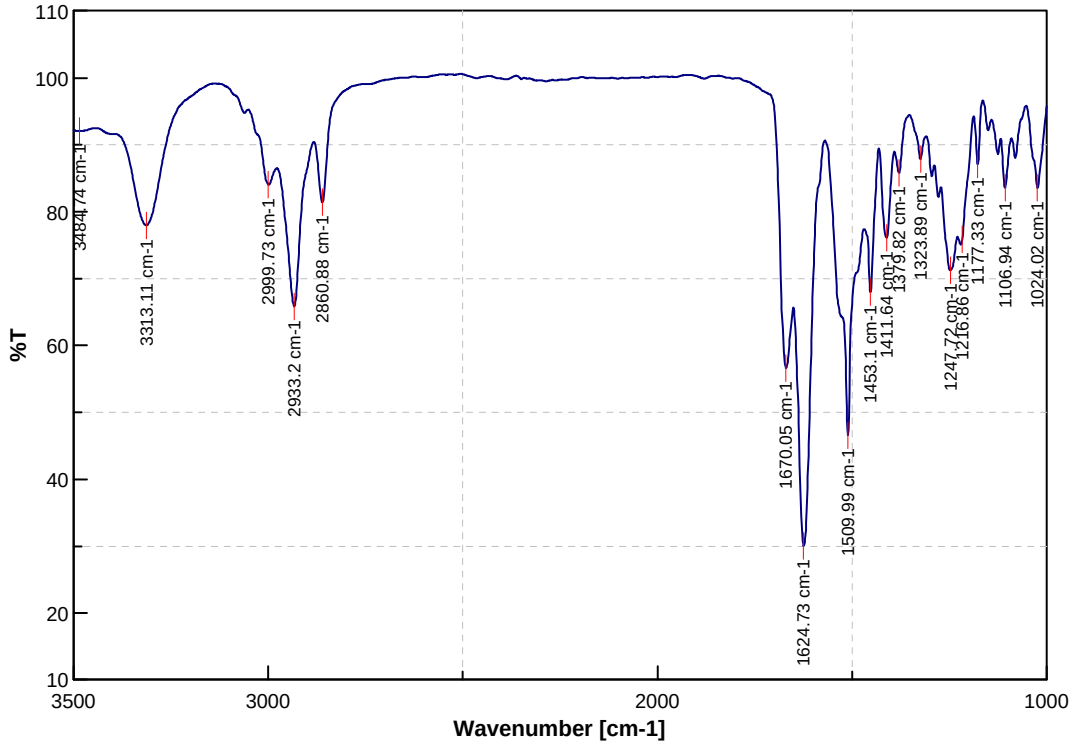
d) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K), **ΔT**



e) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K), **ΔT** (ampliación)

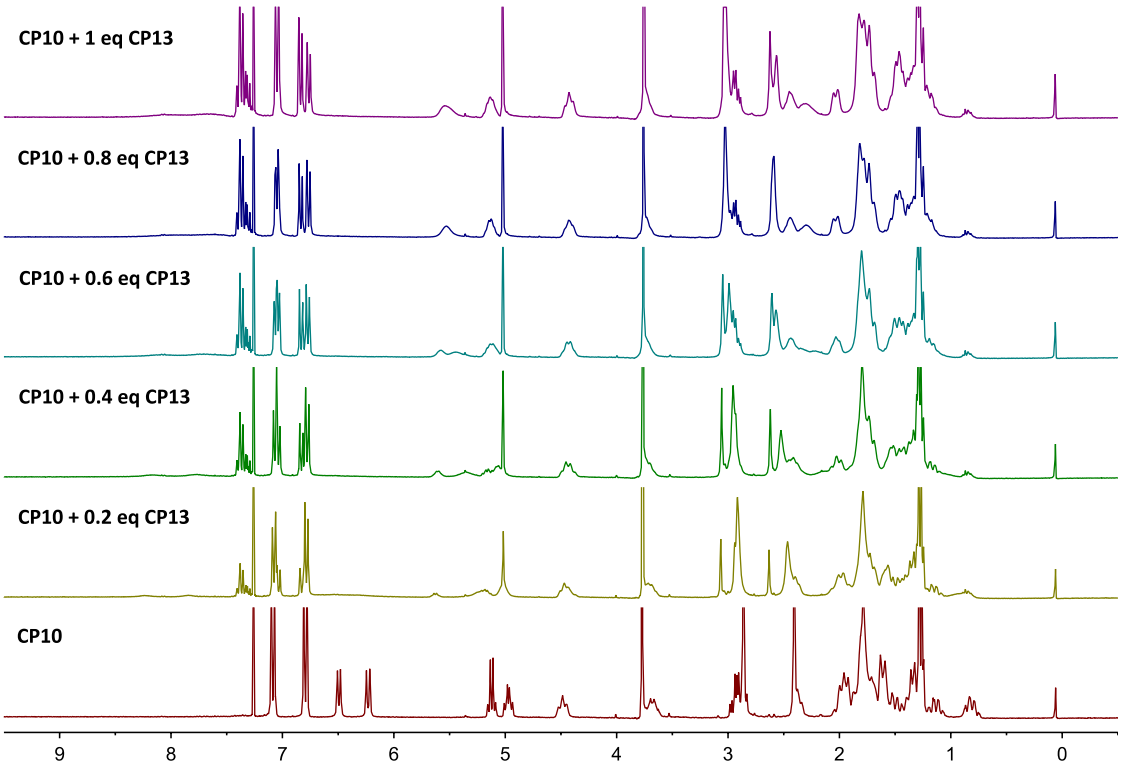


f) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298 K)

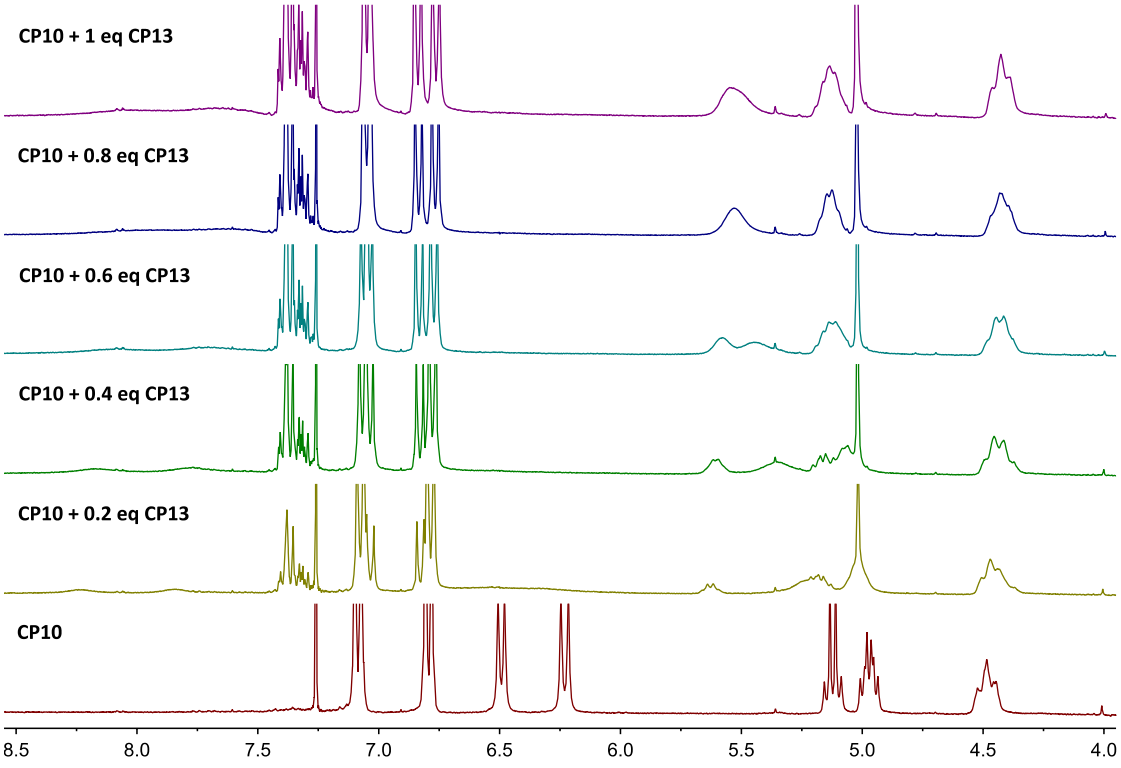


Heterodímero de **CP10** y **CP13**; **D(10·13)**

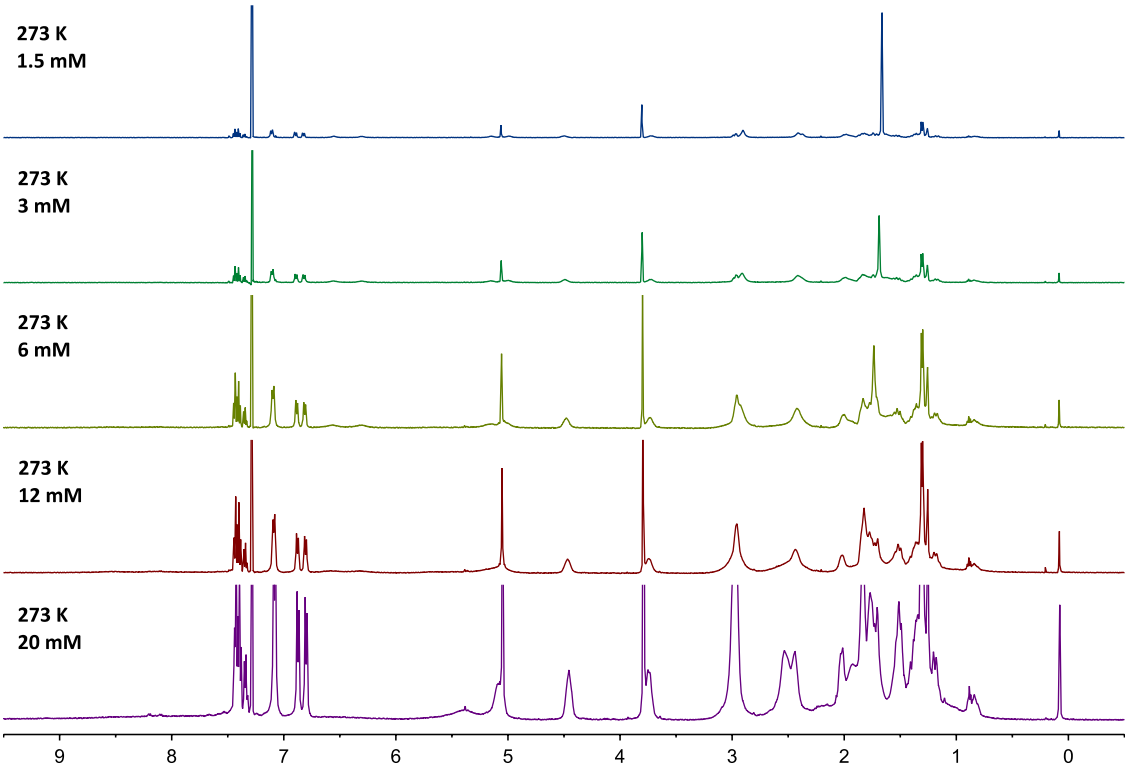
a) Experimento de Adición de CP13 sobre CP10. **^{1}H-RMN** (300 MHz, $CDCl_3$, 298 K)



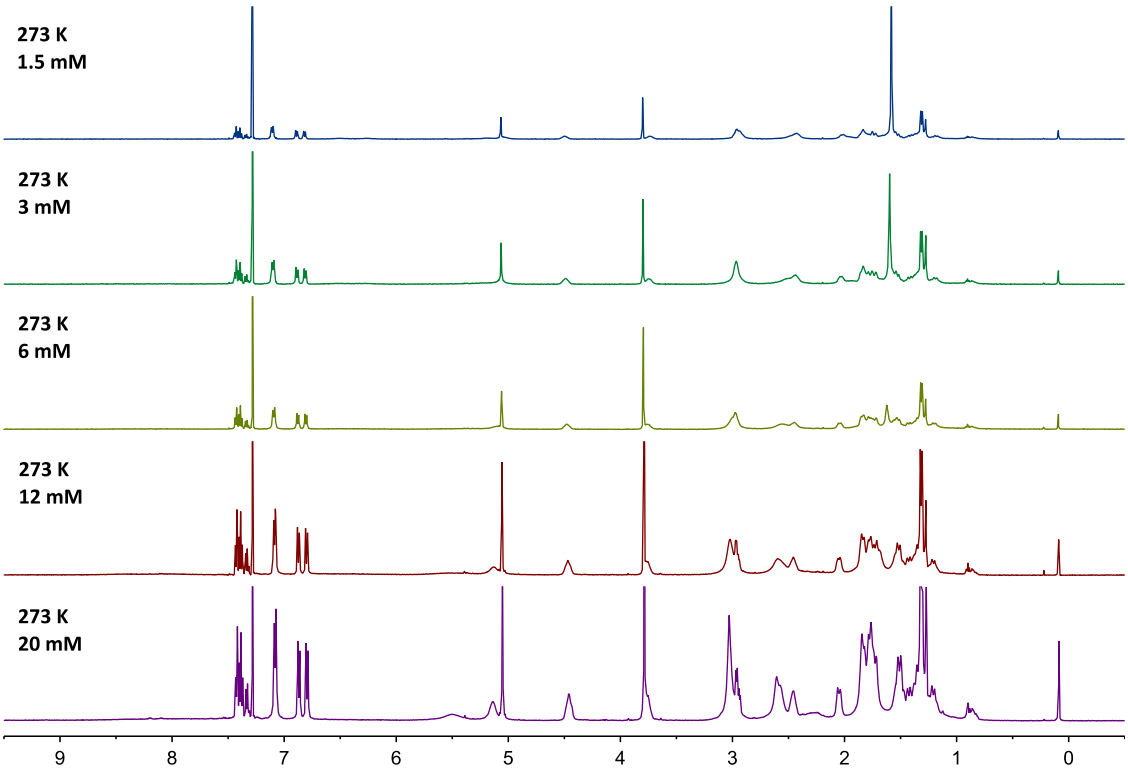
b) Experimento de Adición de CP13 sobre CP10. **^{1}H-RMN** (300 MHz, $CDCl_3$, 298 K), ampliación



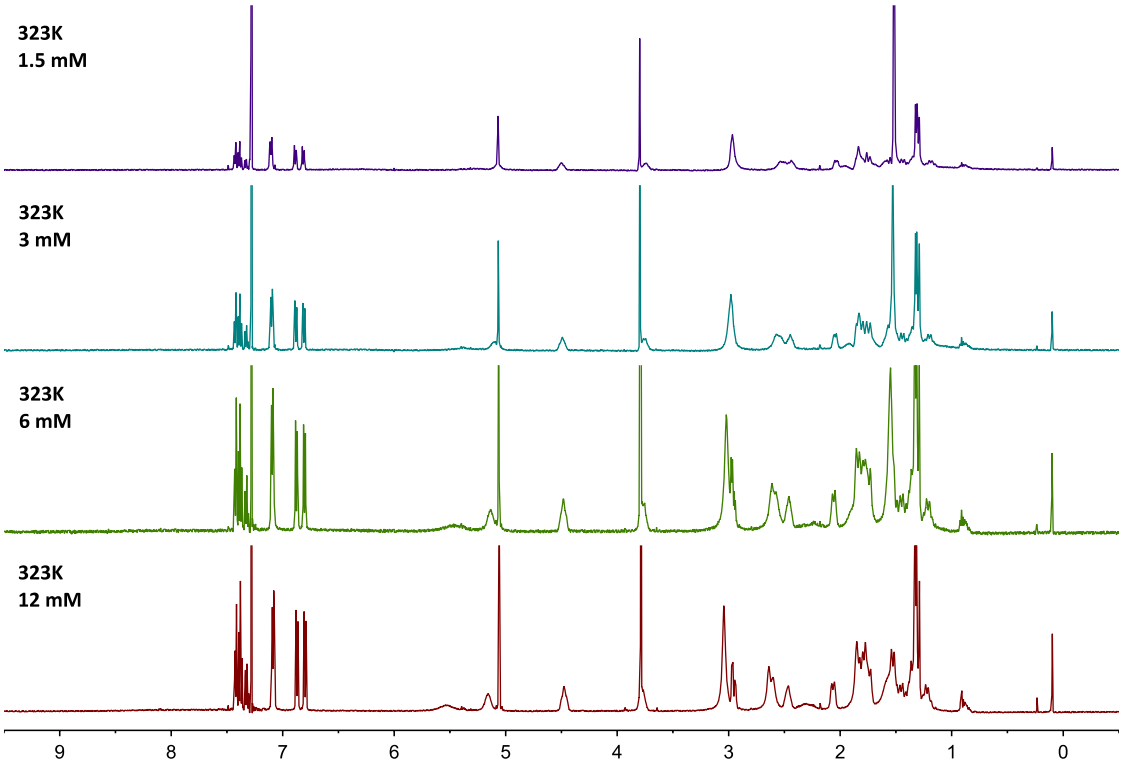
c) Heterdímero **D(10·13)**; **^{1}H-RMN** (500 MHz, $CDCl_3$, 273 K) a diferentes concentraciones



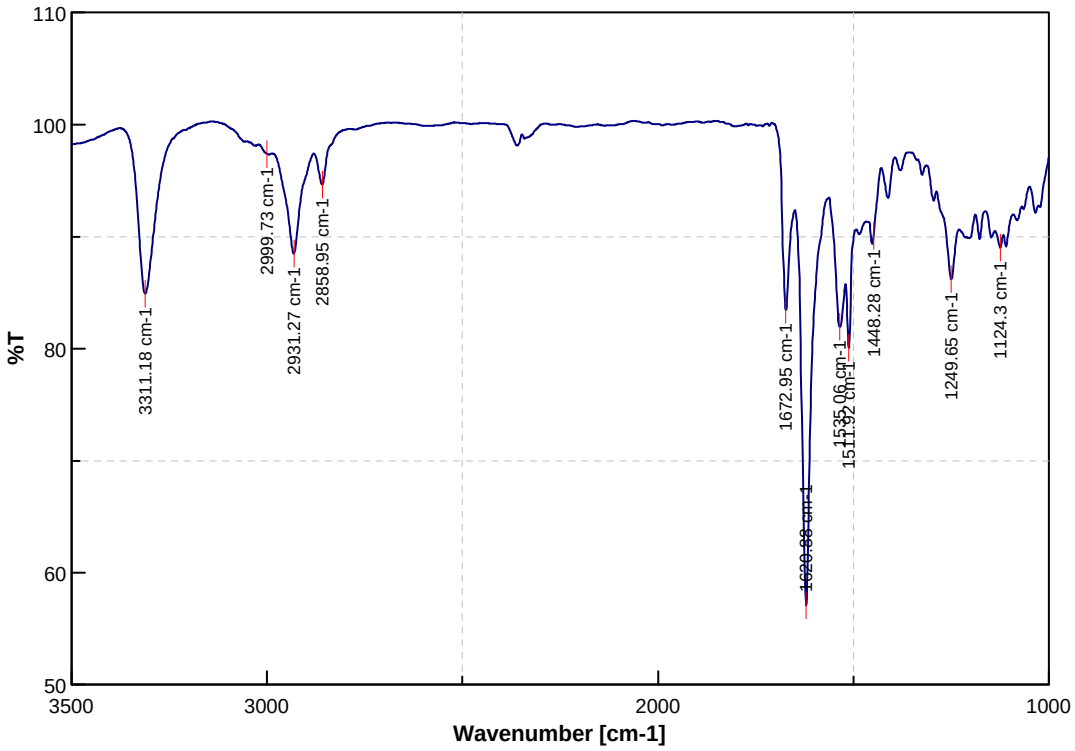
d) Heterdímero **D(10·13)**; **^{1}H-RMN** (500 MHz, $CDCl_3$, 298 K) a diferentes concentraciones



e) Heterdímero **D(10·13)**; **^{1}H-RMN** (500 MHz, $CDCl_3$, 323 K) a diferentes concentraciones

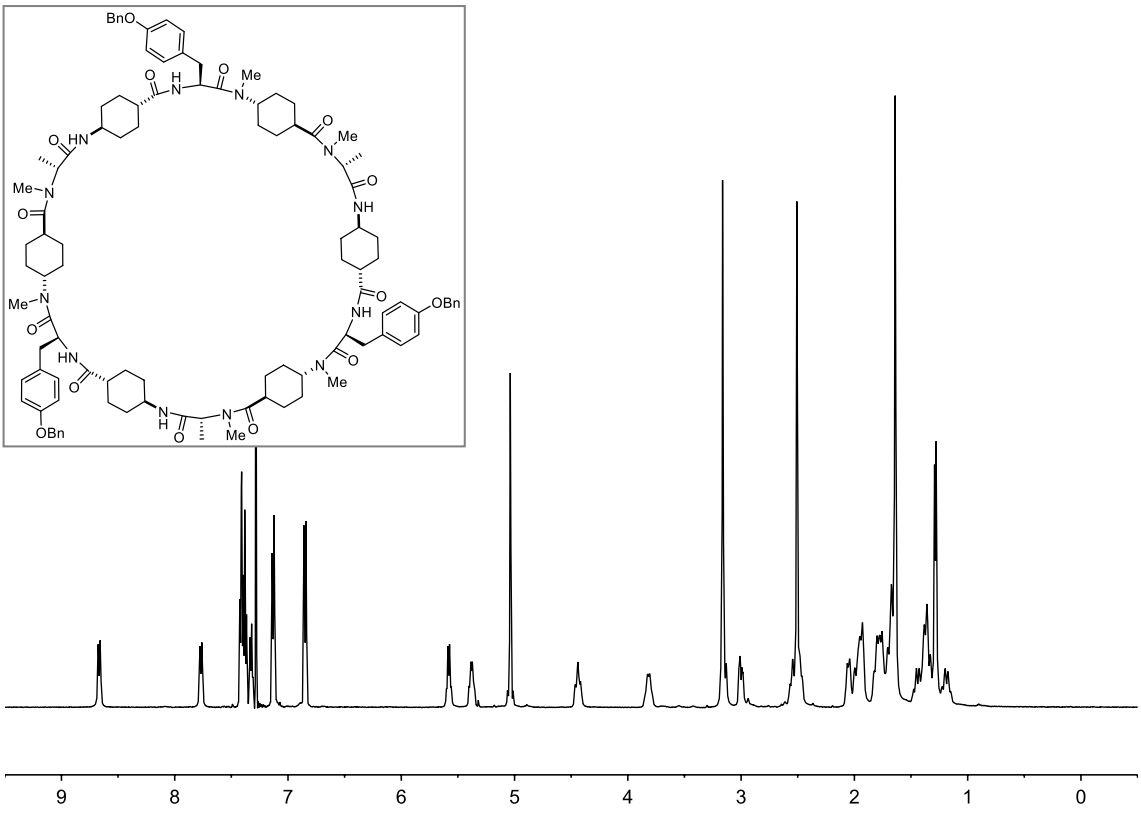


f) Heterdímero **D(10·13)**; **FT-IR** ($CHCl_3$, 298K)

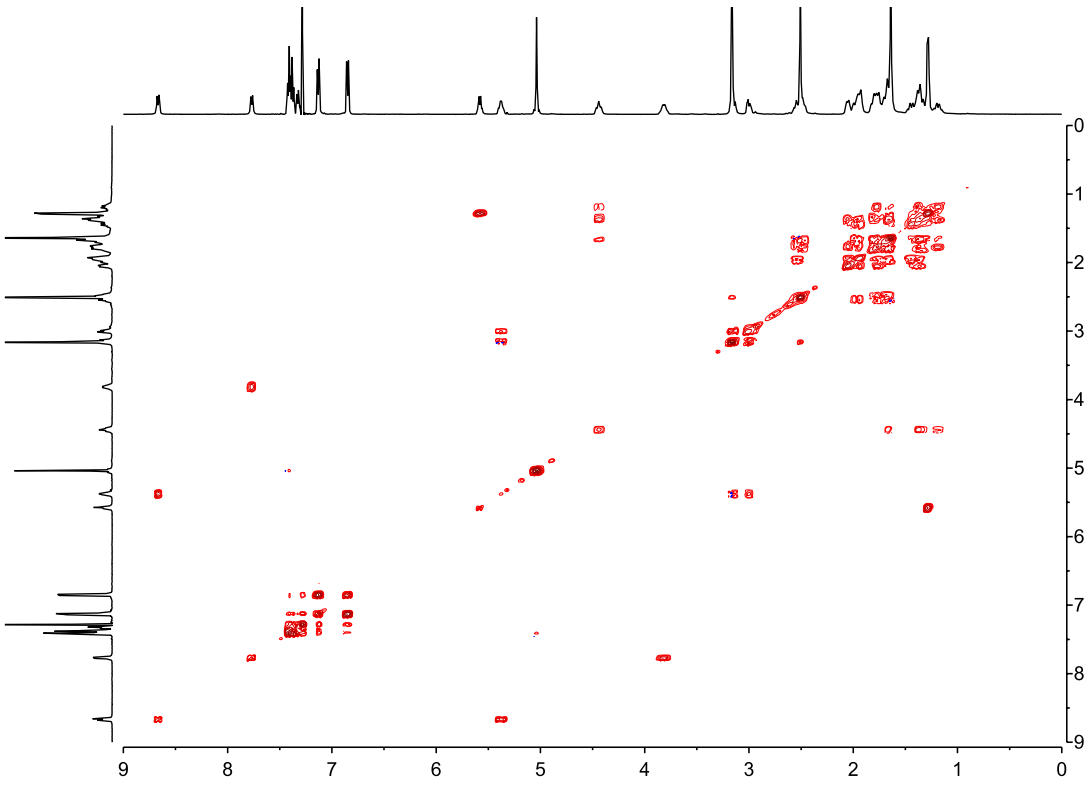


c-[(*L*-Tyr(Bn)-^{Me}*N*- δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ala-δ-Ach-)$_3$], CP14

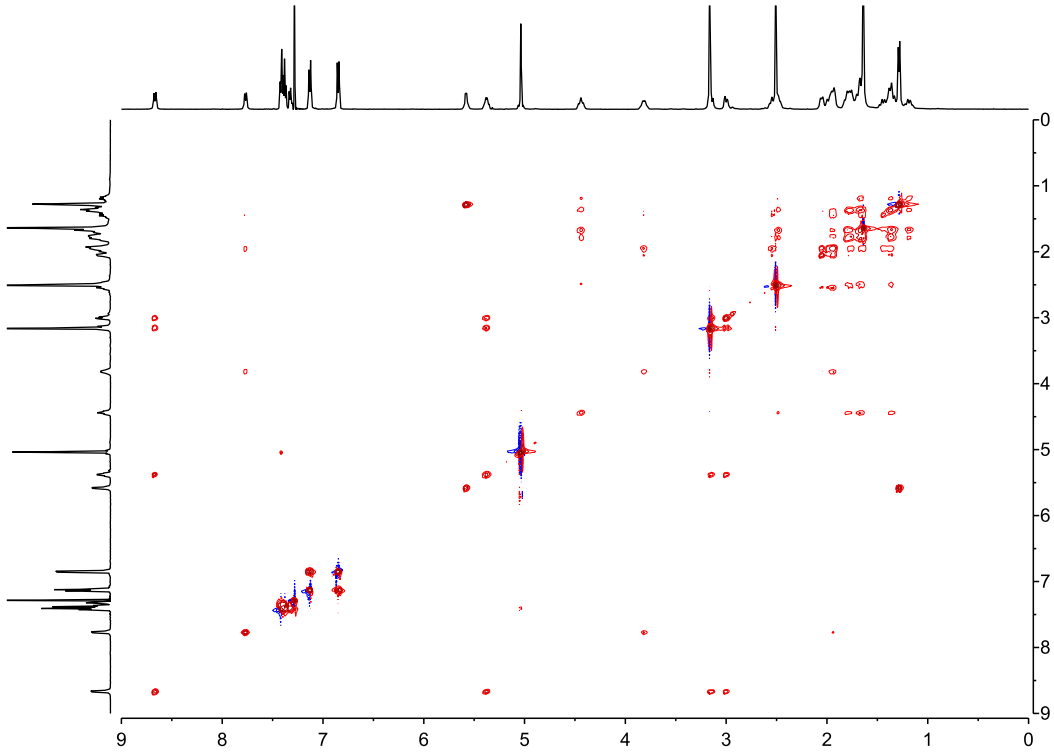
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



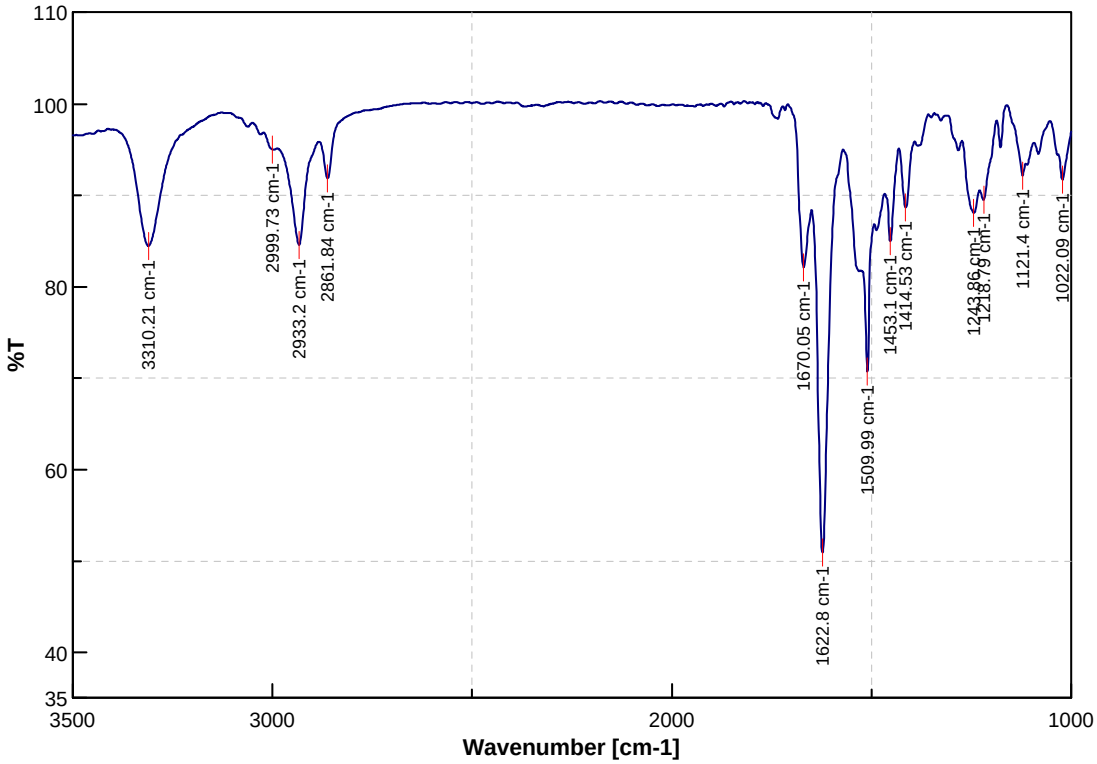
b) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



c) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)

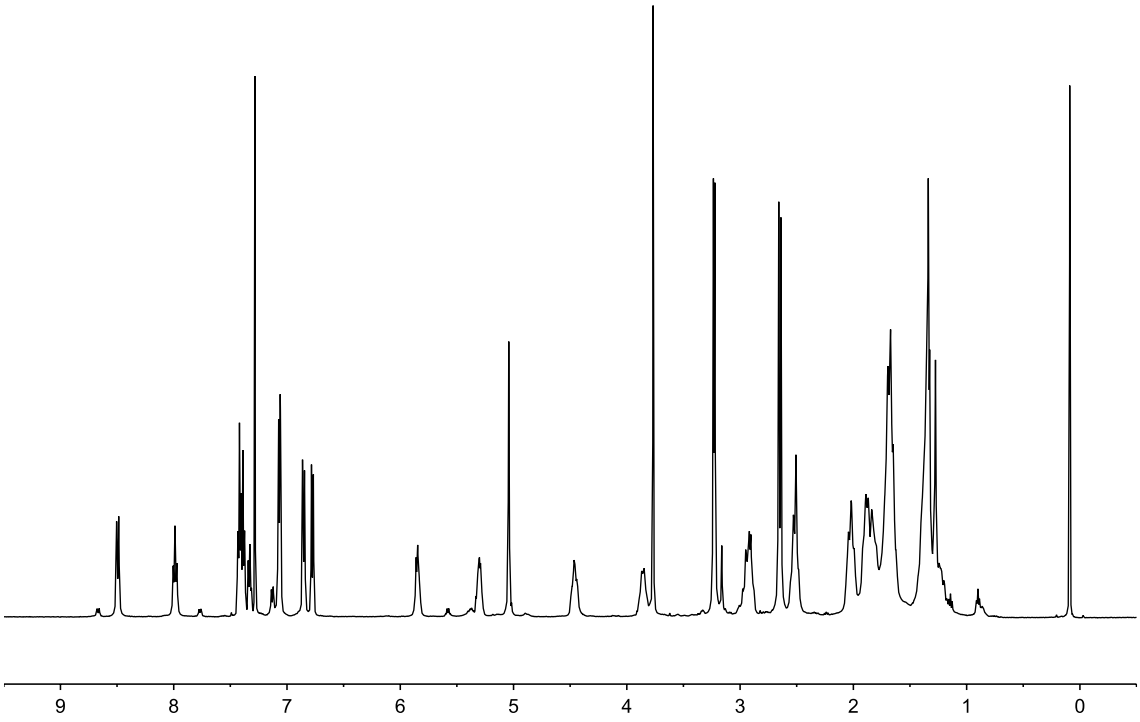


d) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298 K)

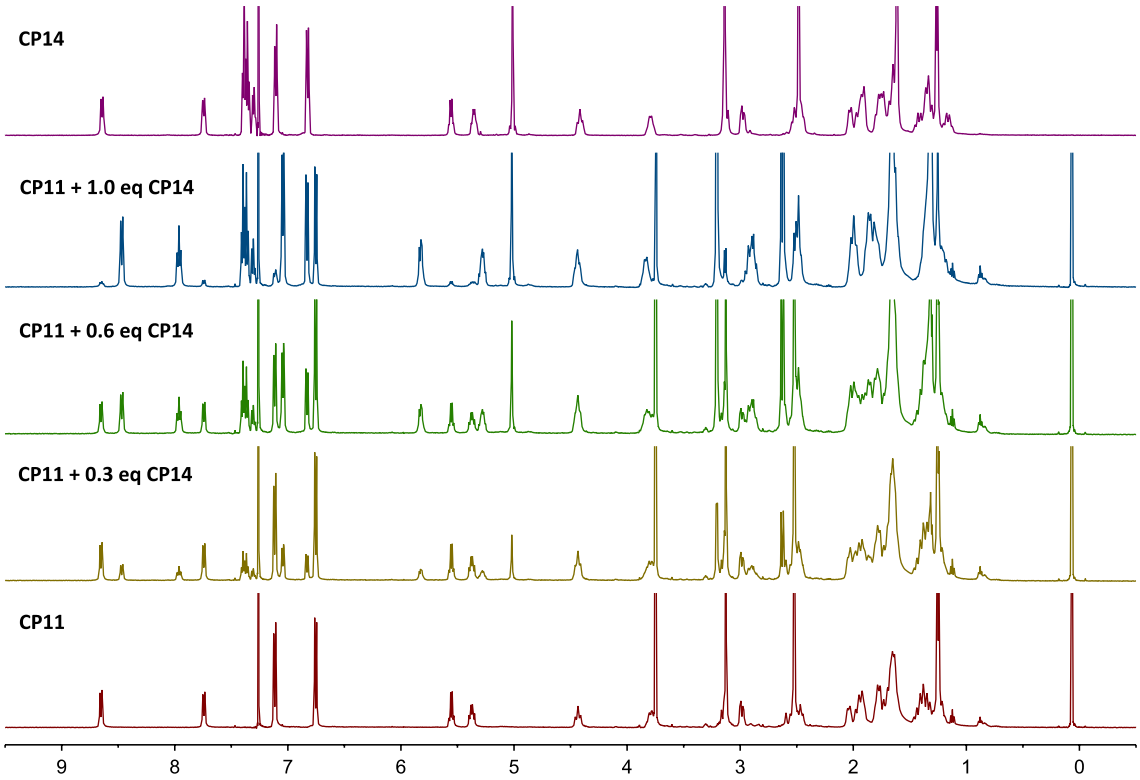


Heterodímero de CP11 y CP14; D(11·14)

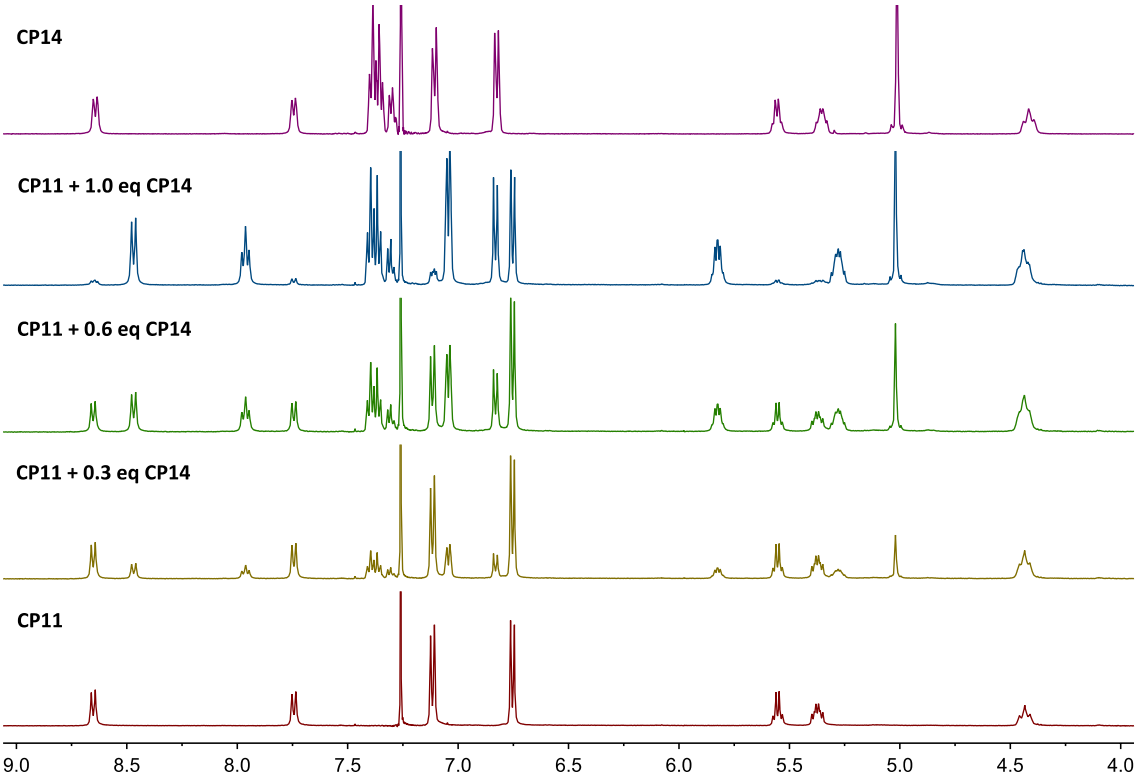
a) **^{1}H-RMN** (300 MHz, $CDCl_3$, 298K)



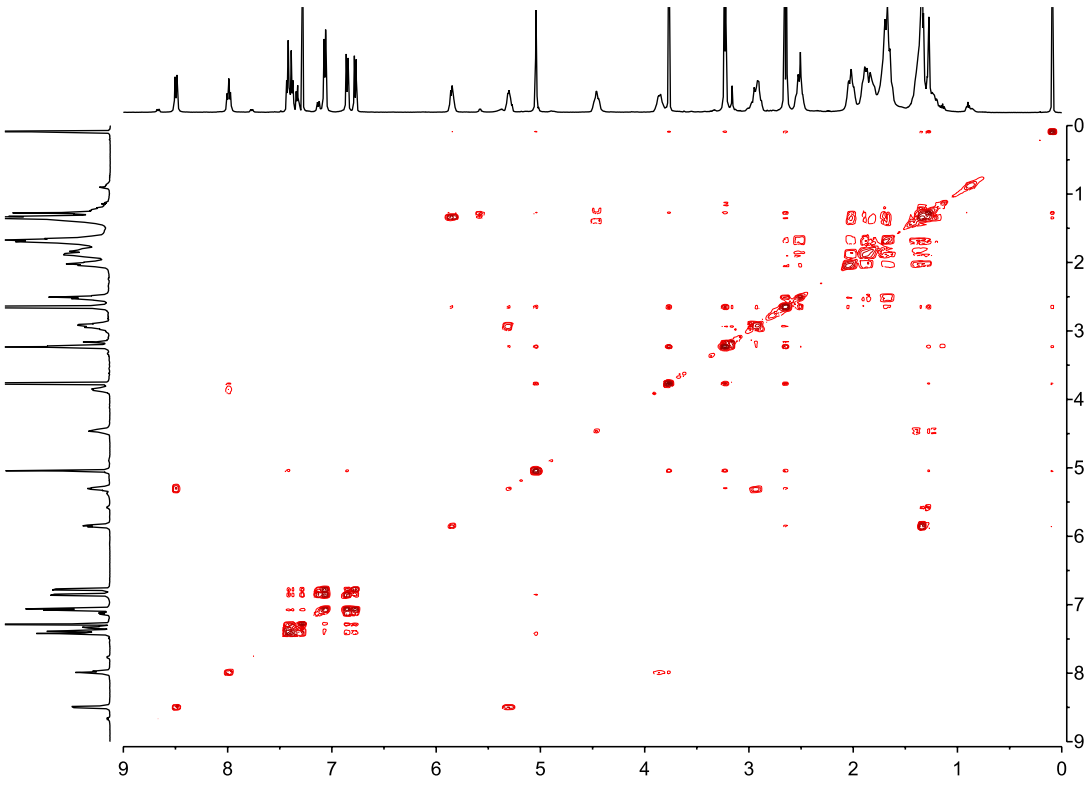
b) Adición de **CP14** sobre **CP11**. **^{1}H-RMN** (300 MHz, $CDCl_3$, 298K)



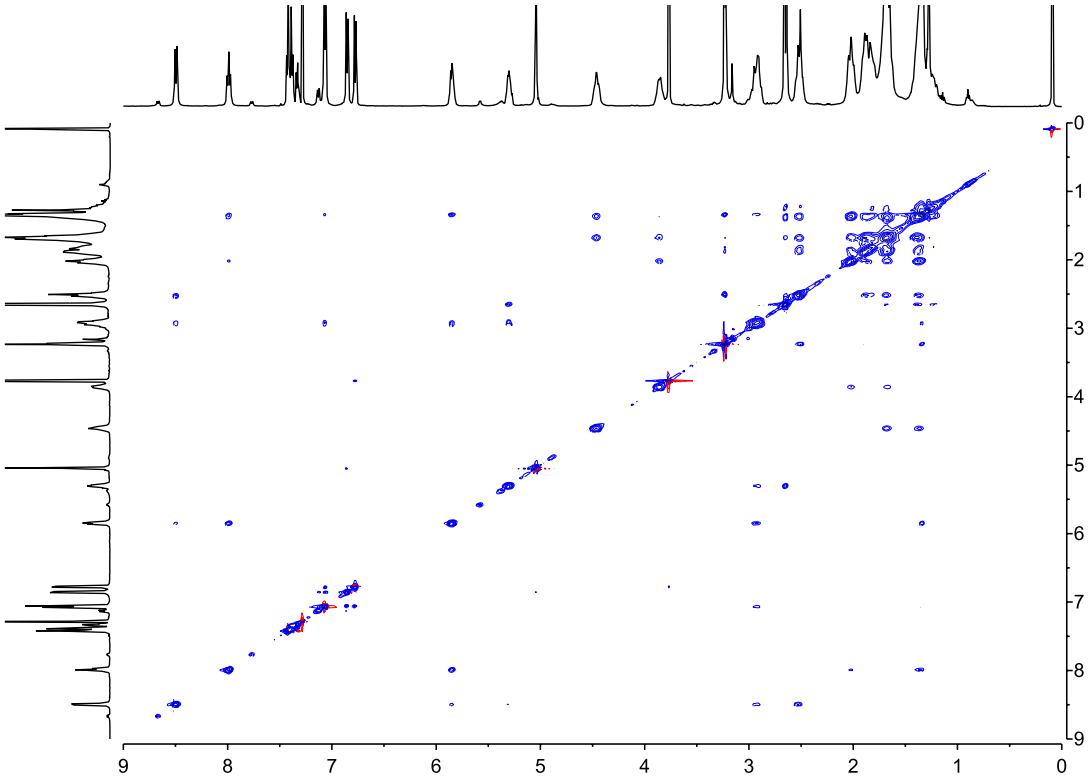
c) Adición de **CP14** sobre **CP11**, ampliación. **^{1}H-RMN** (300 MHz, $CDCl_3$, 298K)



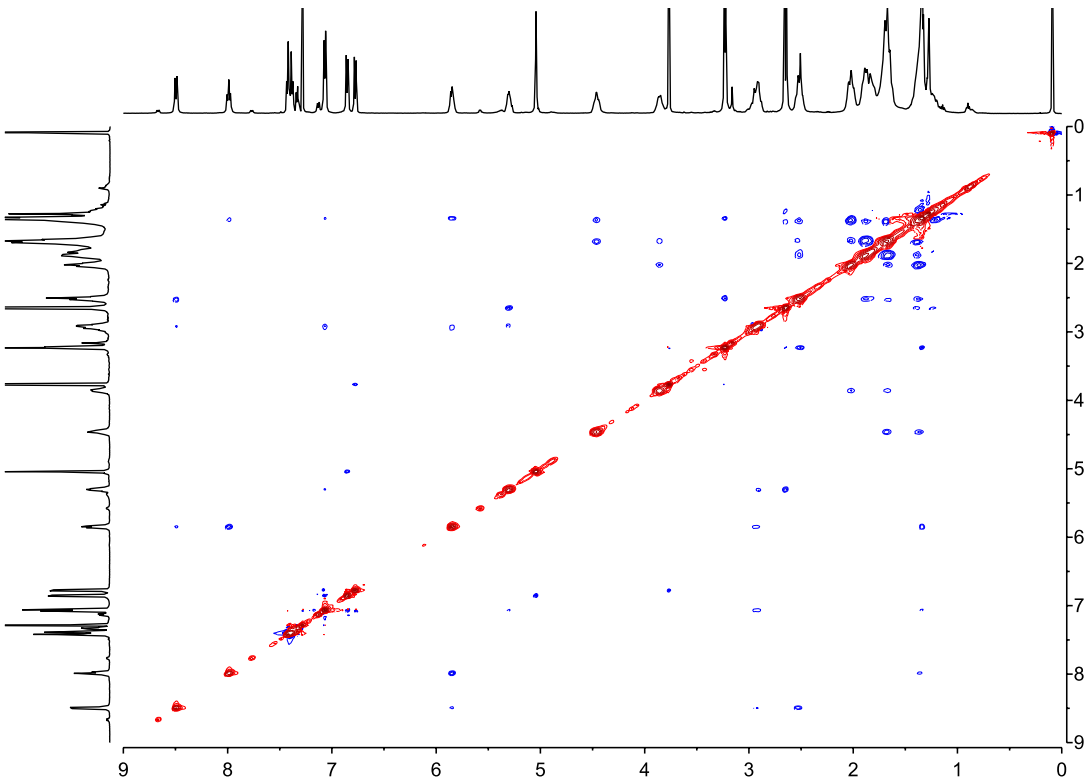
d) **COSY** (500 MHz, $CDCl_3$, 298K).



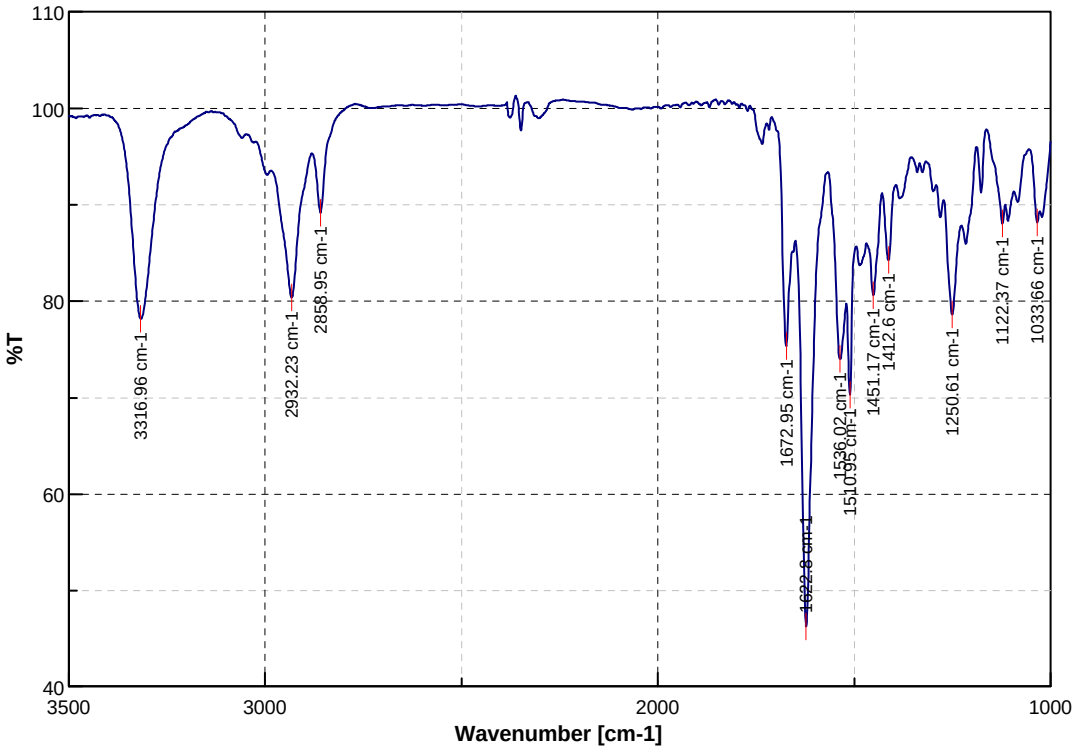
e) **NOESY** (500 MHz, $CDCl_3$, 298K).



f) **ROESY** (500 MHz, $CDCl_3$, 298K).

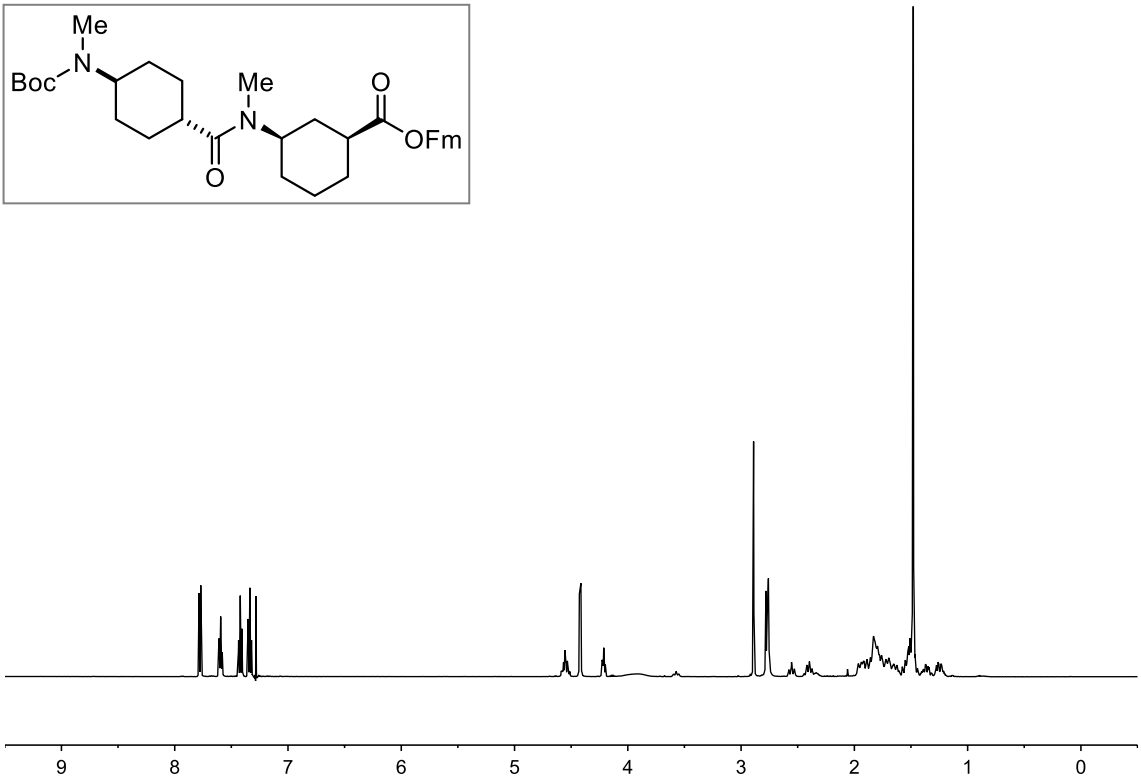


g) **FT-IR** ($CHCl_3$, 298K)

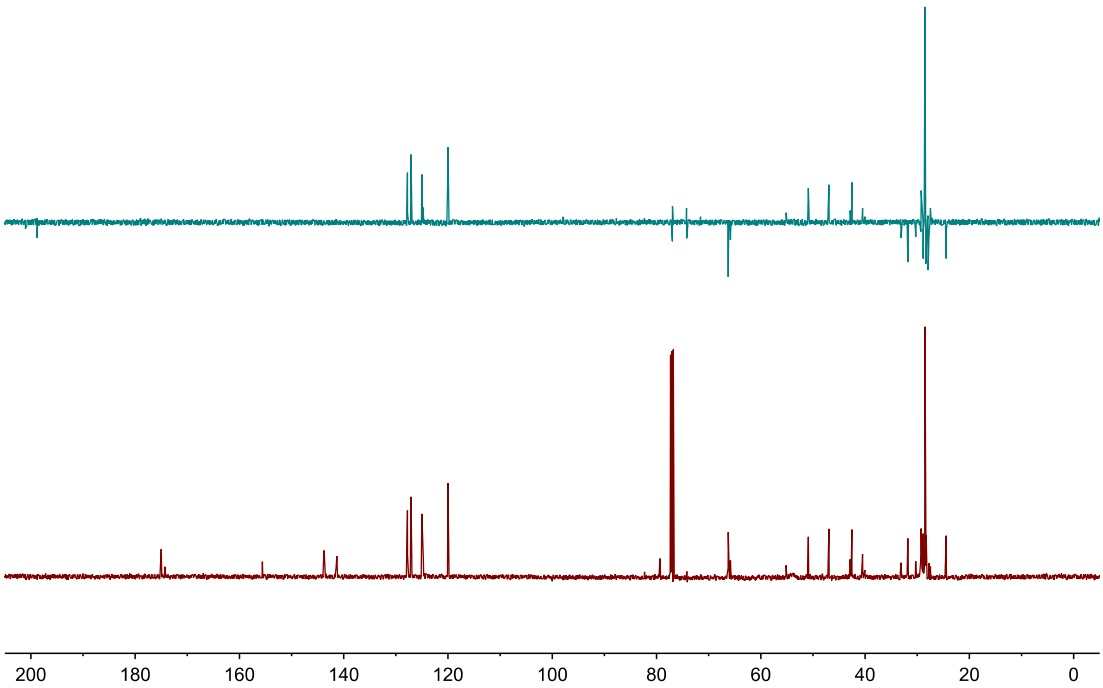


Boc-^{Me}*N*- δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OFm, 80

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

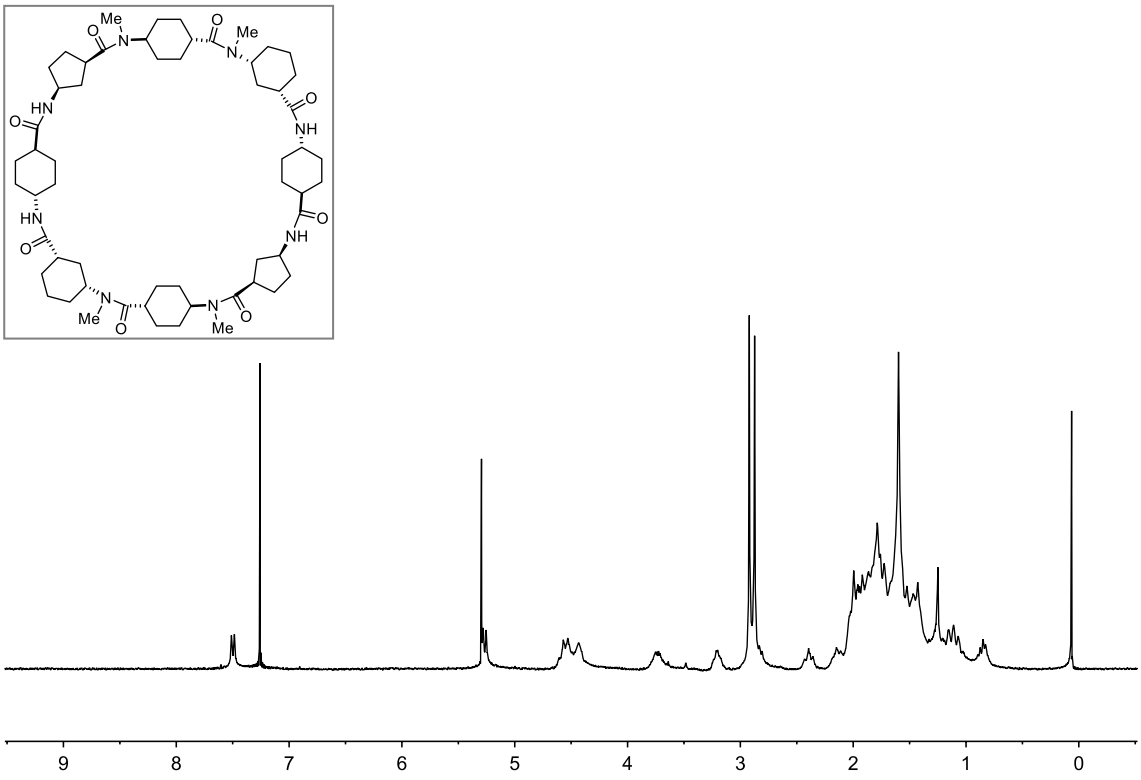


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)



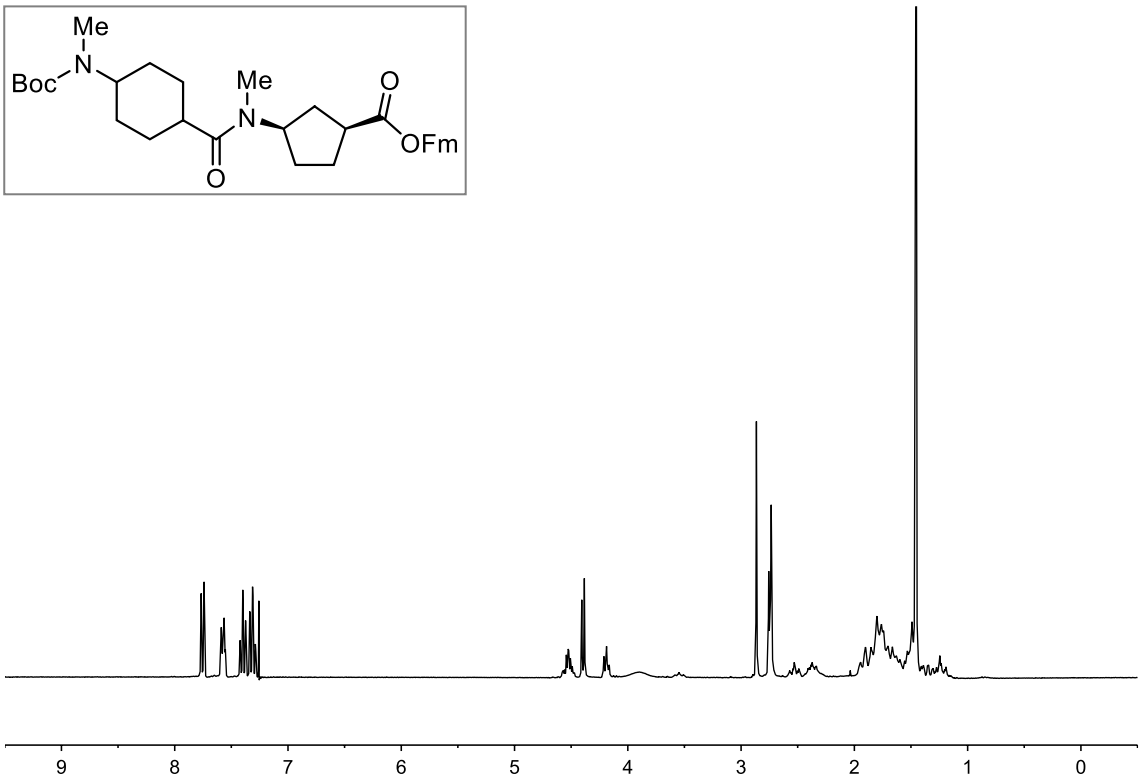
***c*-[(δ-Ach-*L*-Acp-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-)$_2$], CP15**

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

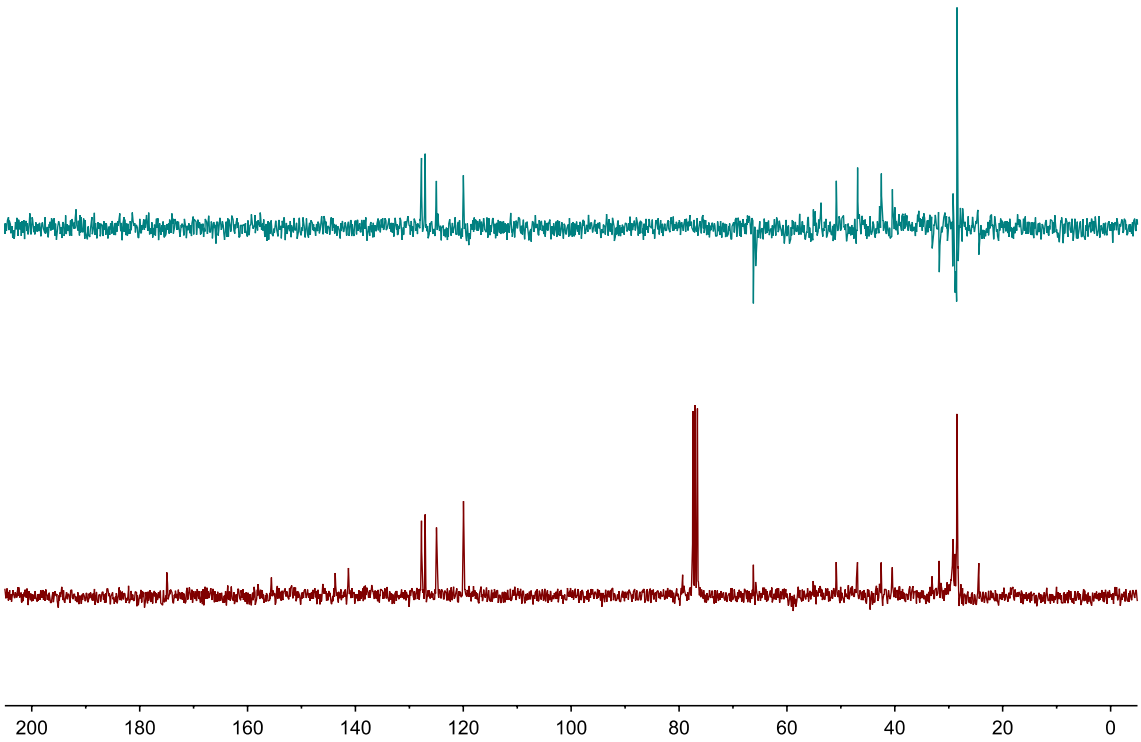


Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Acp-OFm, 86

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

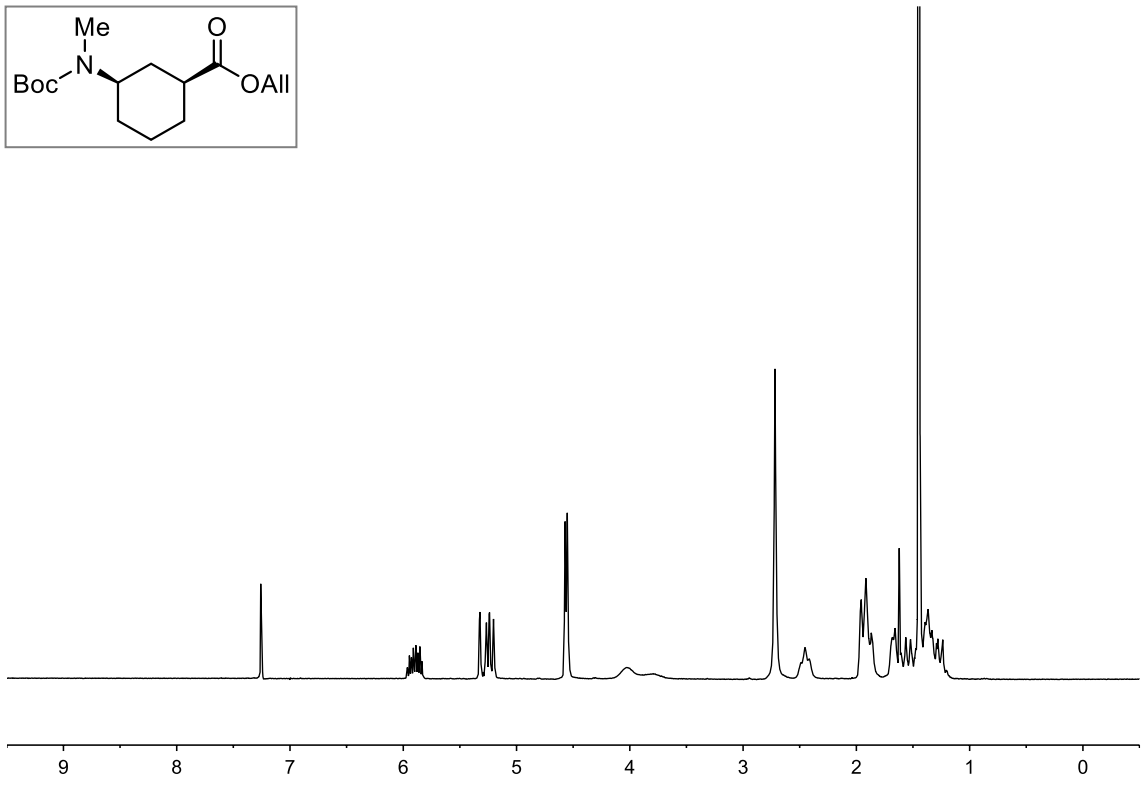


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

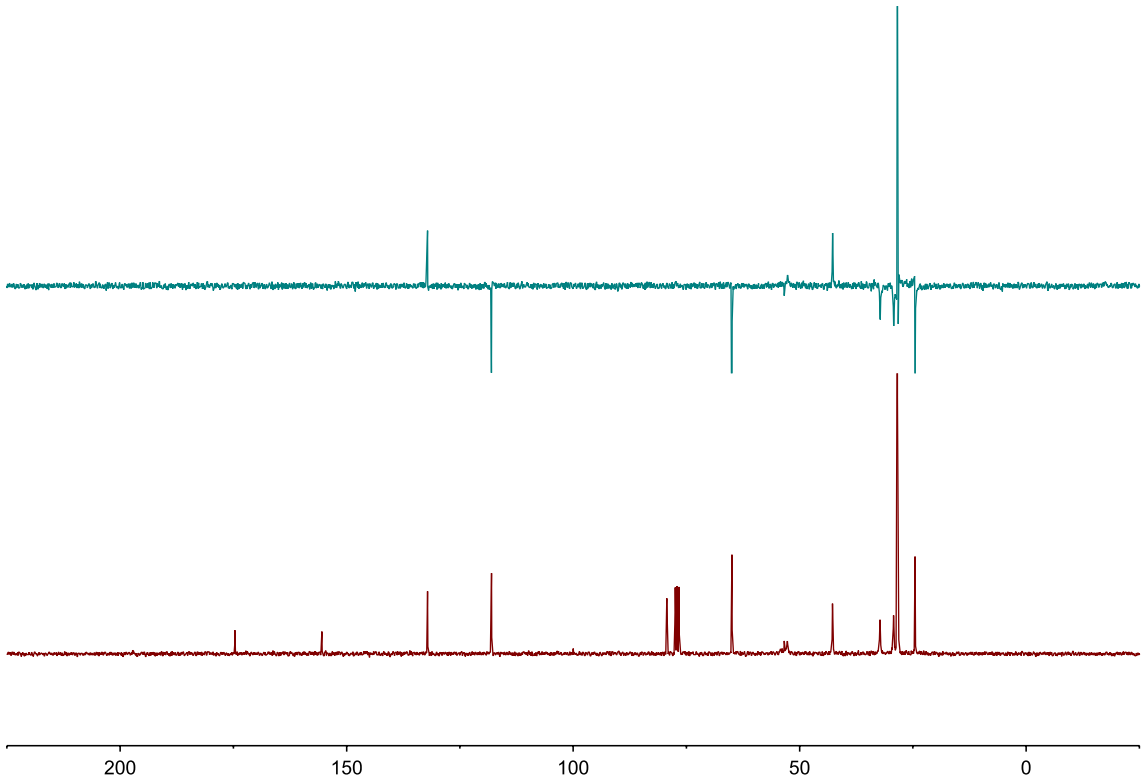


Boc-^{Me}*N*-*D*-Ach-OAll, 92

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

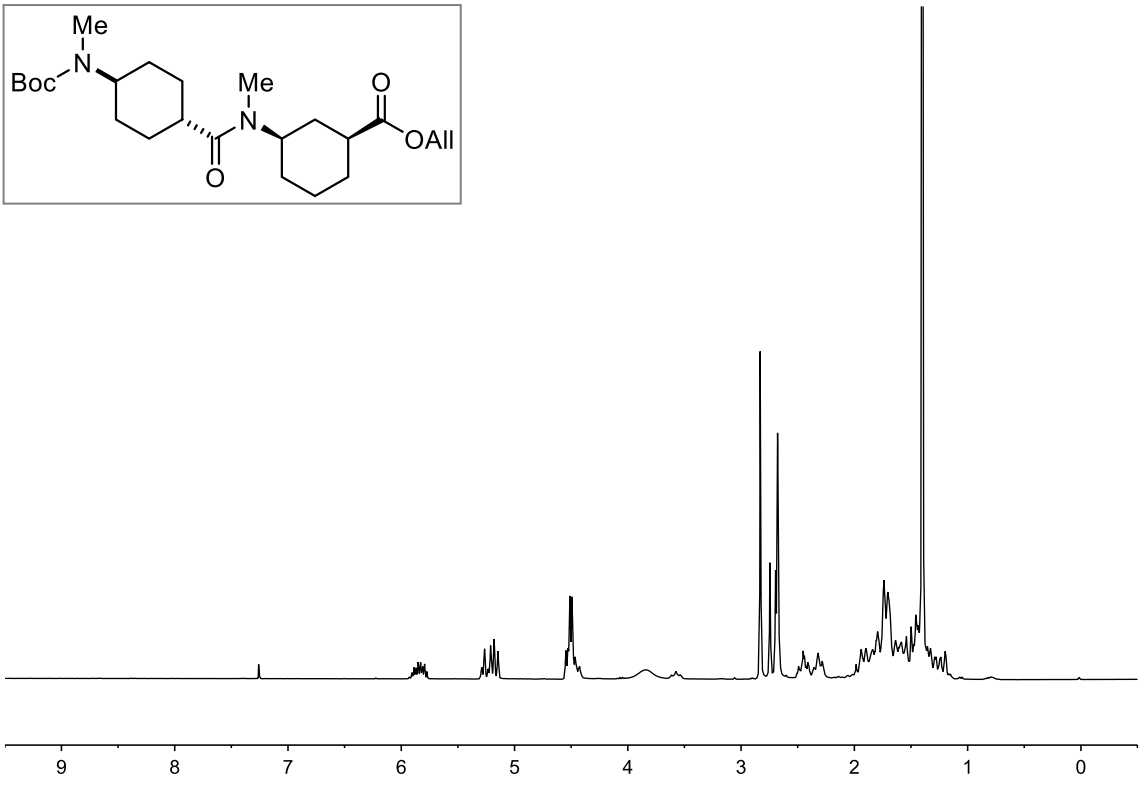


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

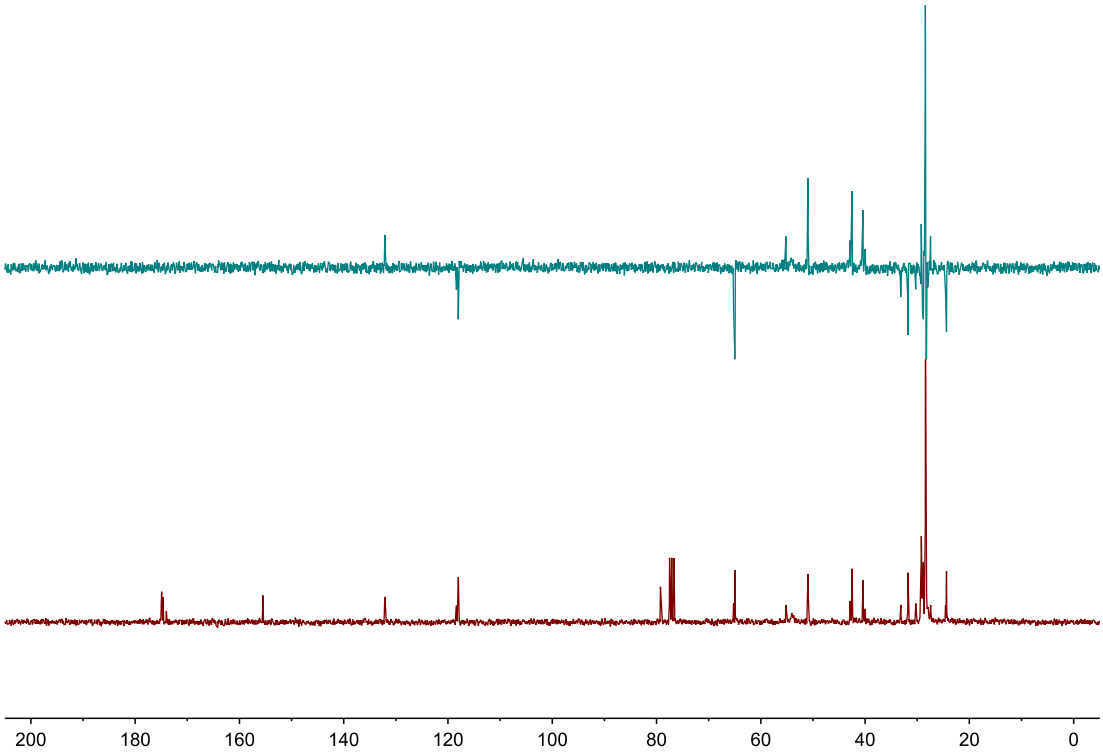


Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach-OAll, 93

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

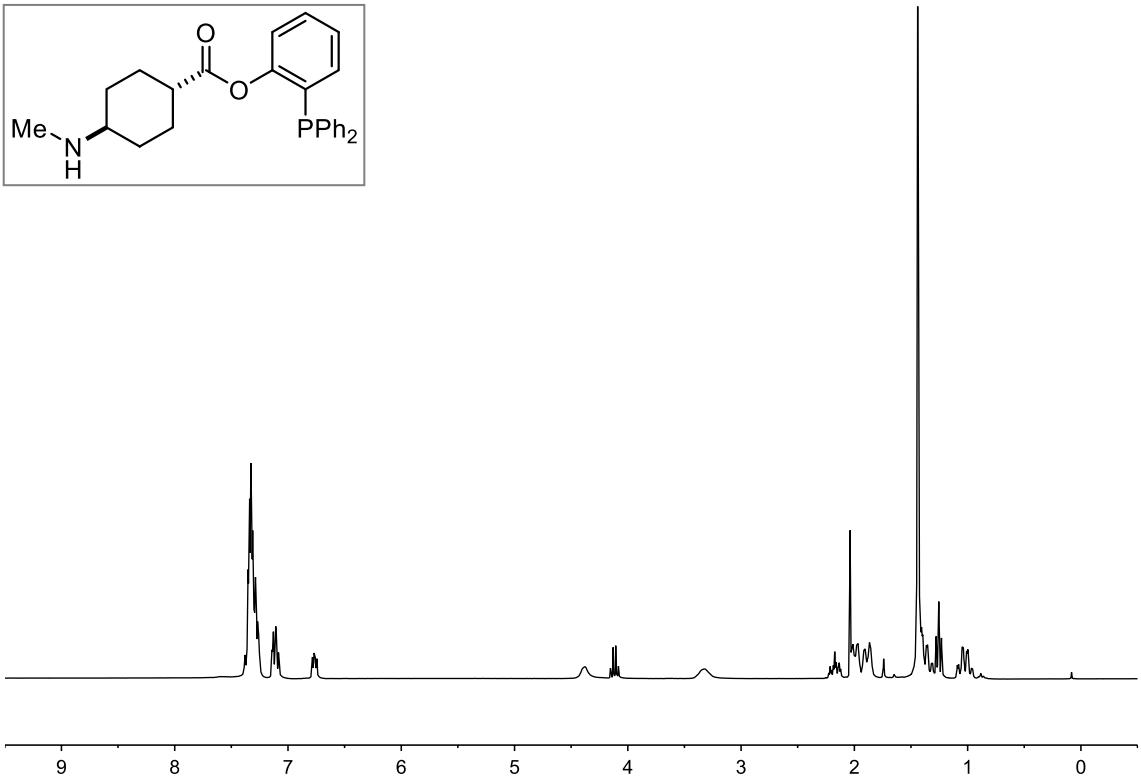


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

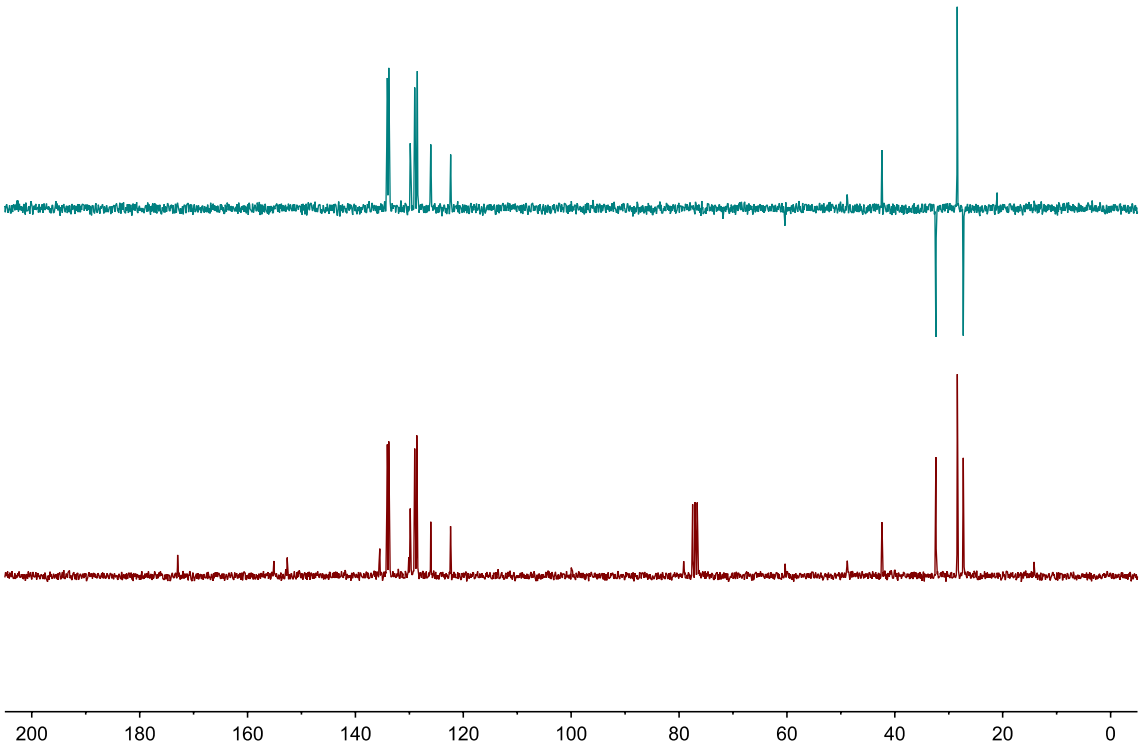


Boc-^{Me}*N*-δ-Ach-OPos, 96

a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

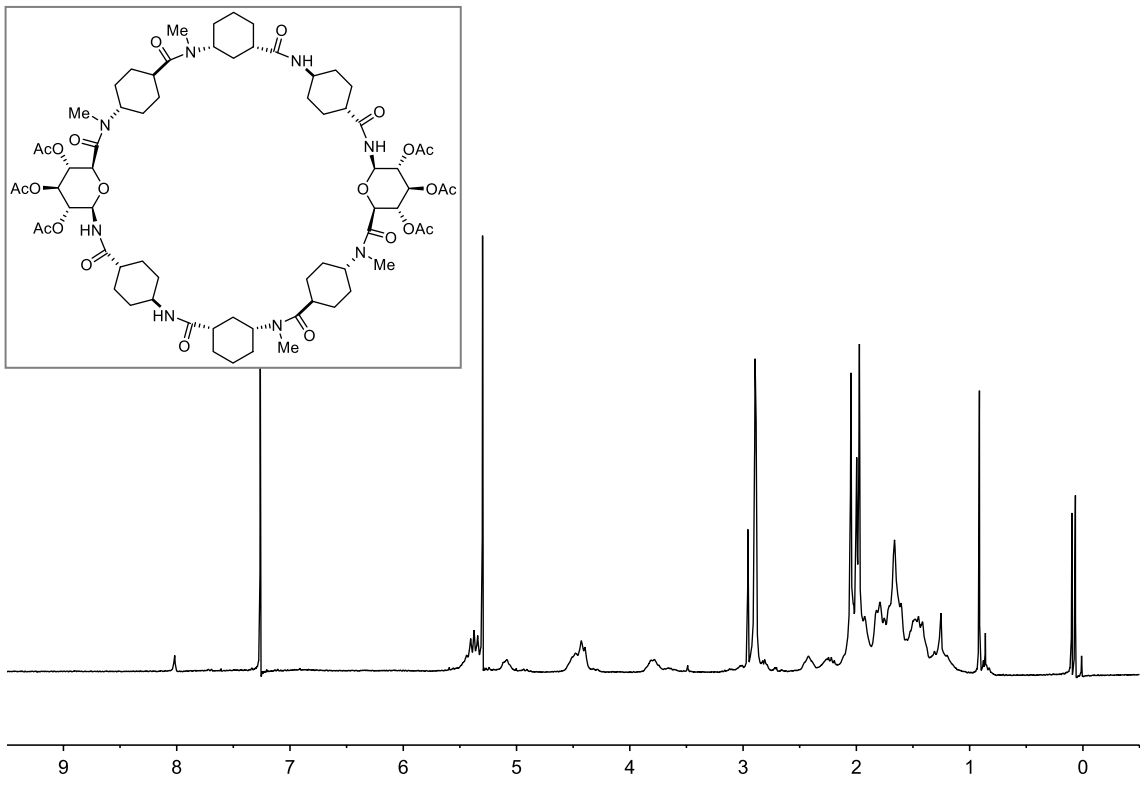


b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)

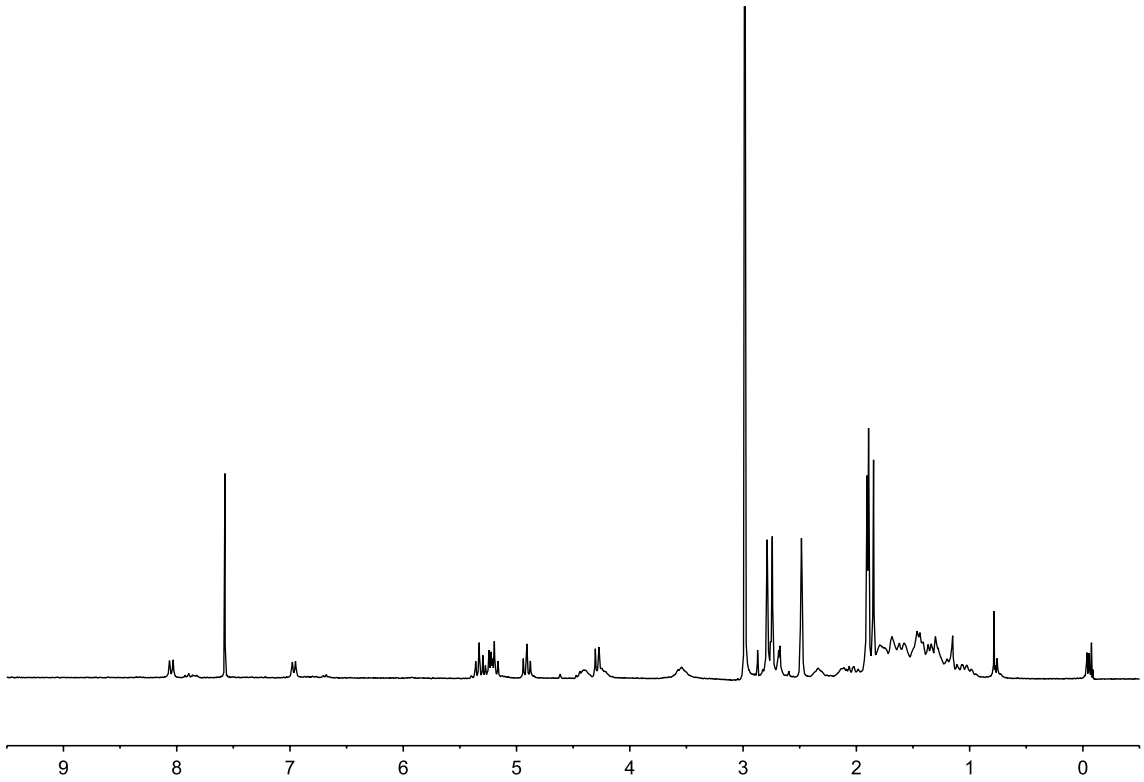


***c*-[(δ-Ach-*L*-(Ac)$_3$Aga-^{Me}*N*-δ-Ach-^{Me}*N*-*D*-Ach)$_2$], CP17**

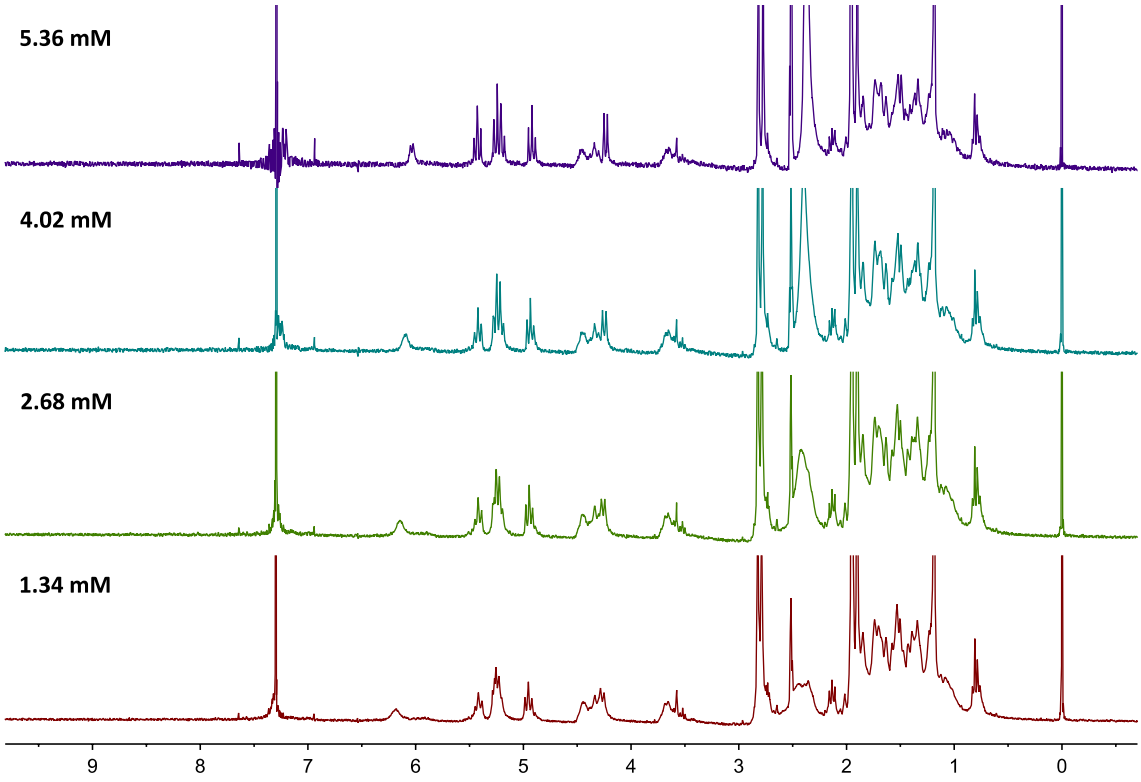
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K)



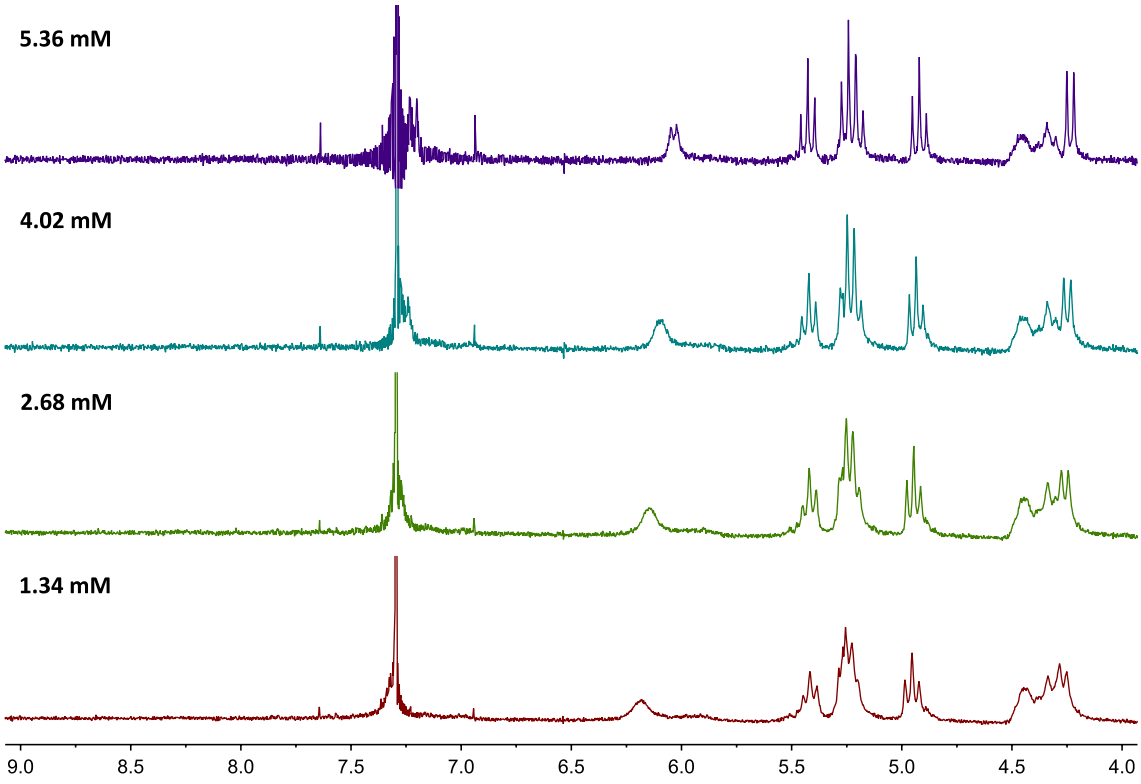
b) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$/$DMSO_{d6}$ (8:2), 300 MHz, 298 K)



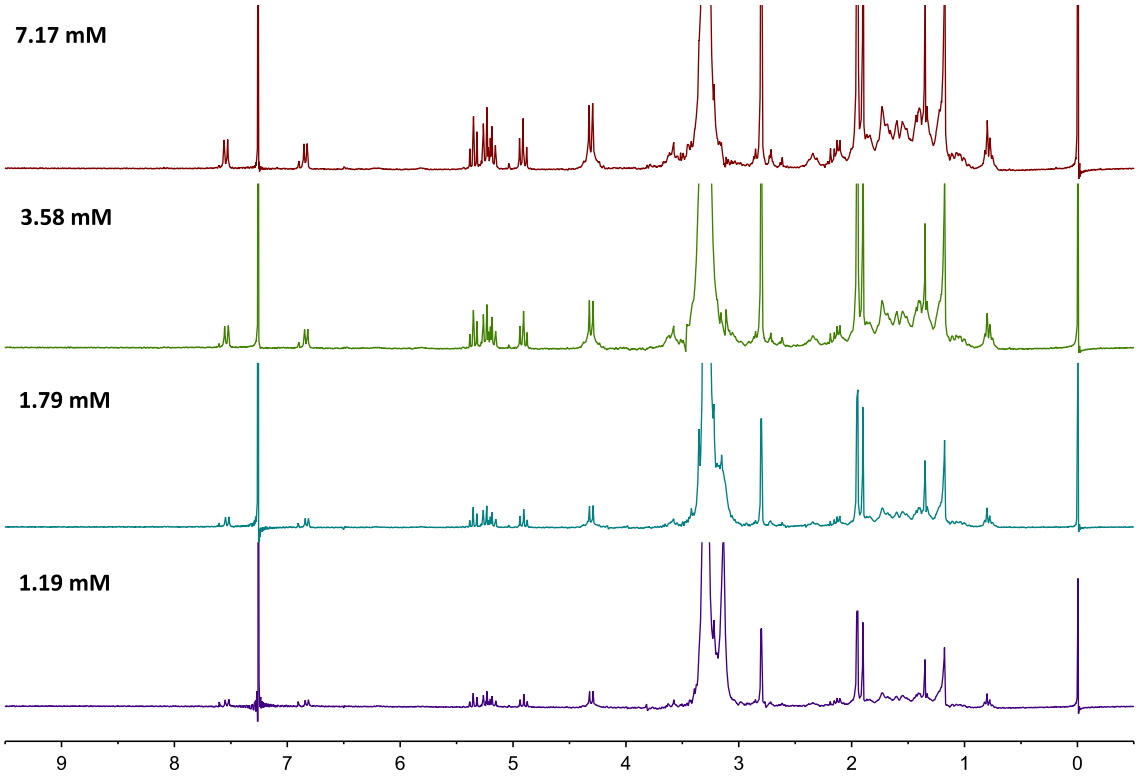
c) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$/$DMSO_{d6}$ (95:5), 300 MHz, 298 K)



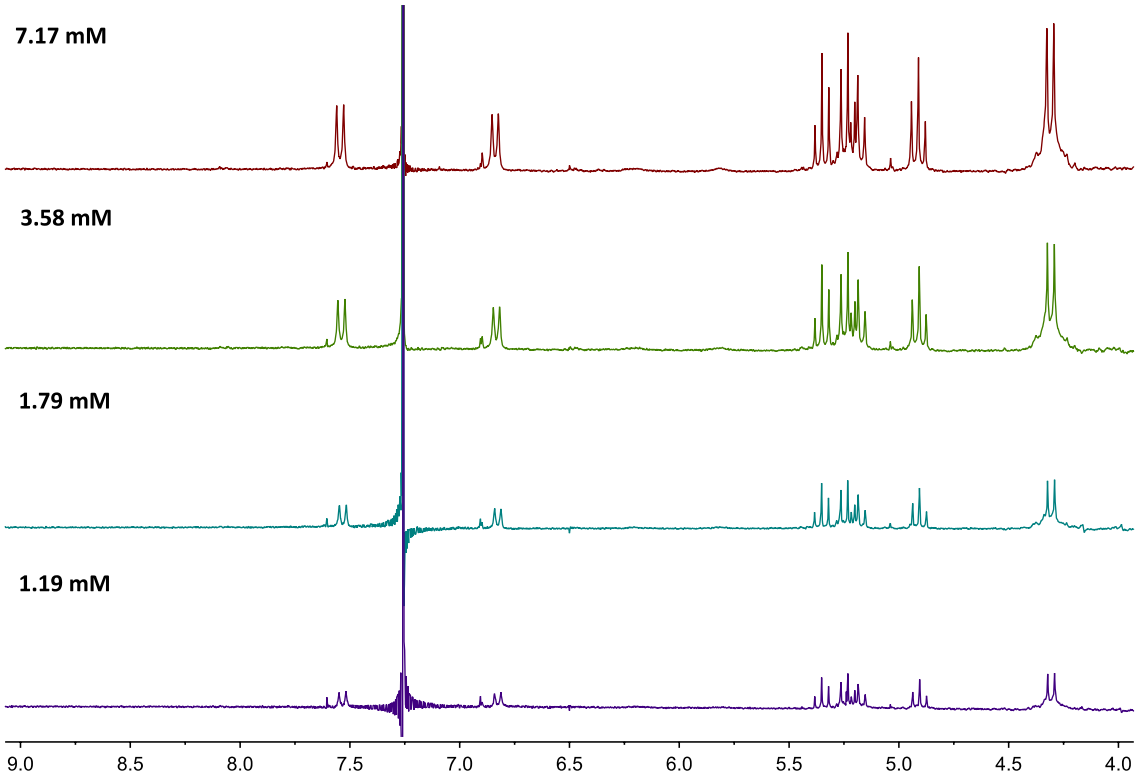
d) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$/$DMSO_{d6}$ (95:5), 300 MHz, 298 K), ampliación.



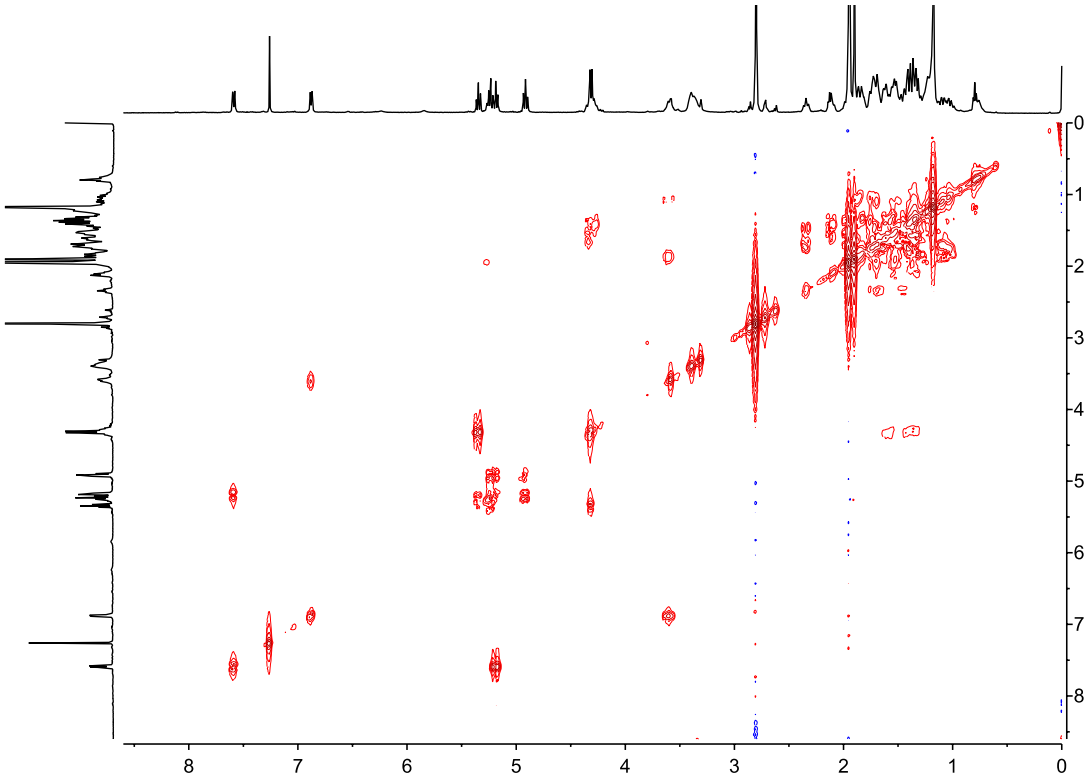
e) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$/$MeOH_{d3}$ (95:5), 300 MHz, 298 K).



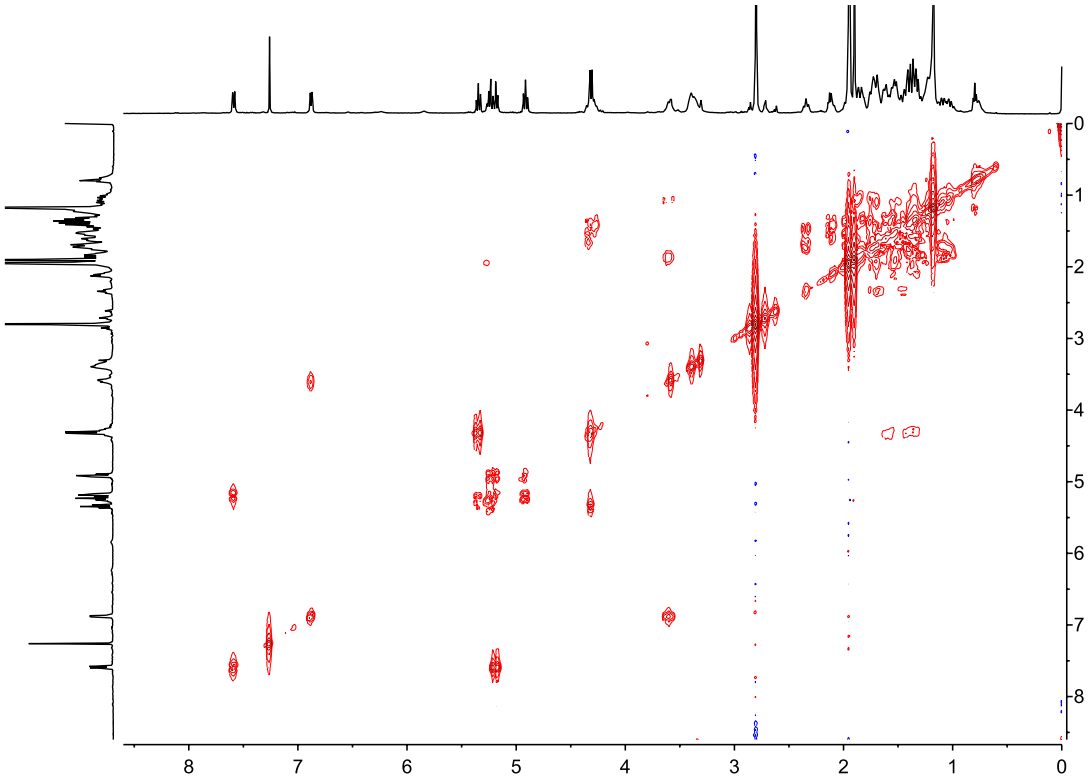
f) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$/$MeOH_{d3}$ (95:5), 300 MHz, 298 K), ampliación.



g) **COSY** ($CDCl_3$/$MeOH_{d3}$ (95:5), 300 MHz, 298 K).

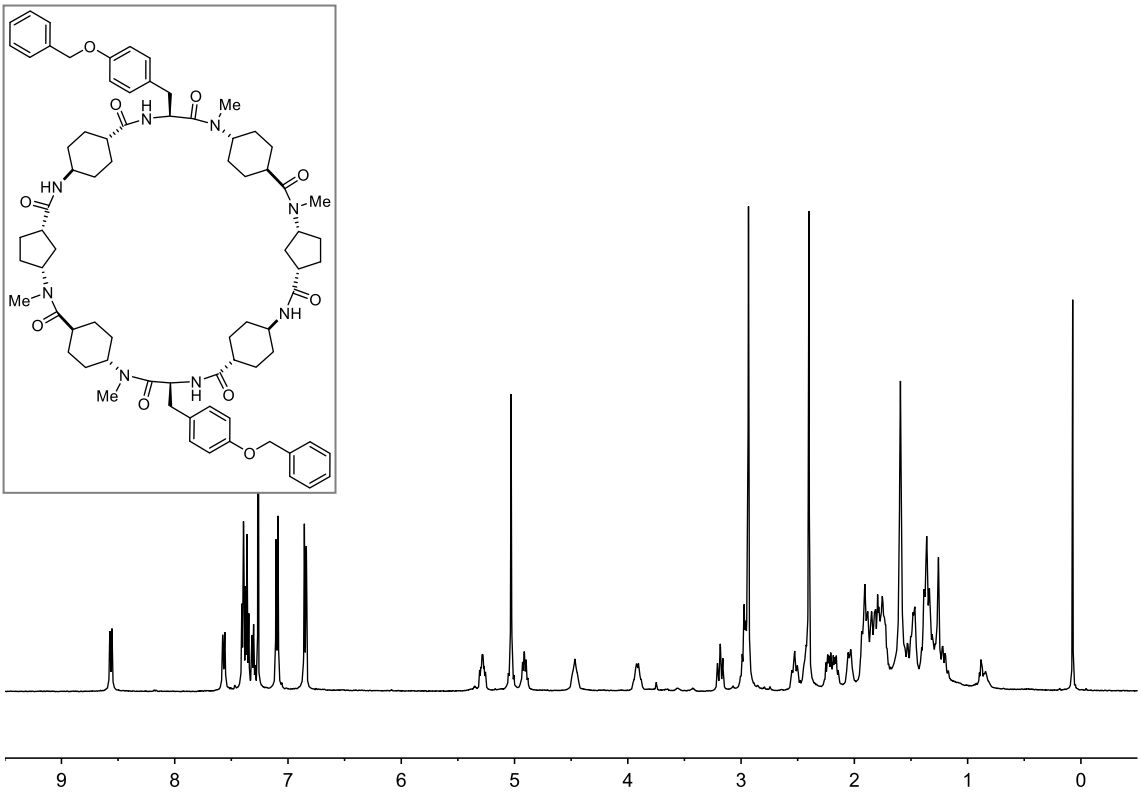


h) **TOCSY** ($CDCl_3$/$MeOH_{d3}$ (95:5), 300 MHz, 298 K).

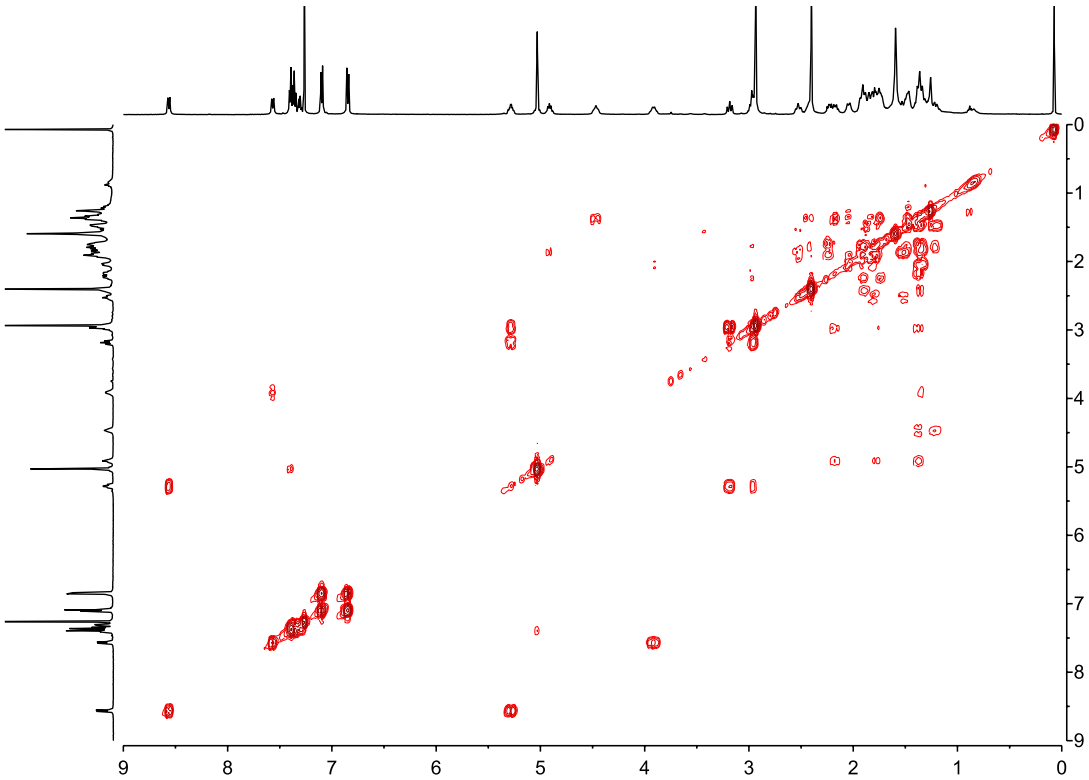


***c*-[(δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}N-δ-Ach-^{Me}N-*D*-Acp-)$_2$], CP18**

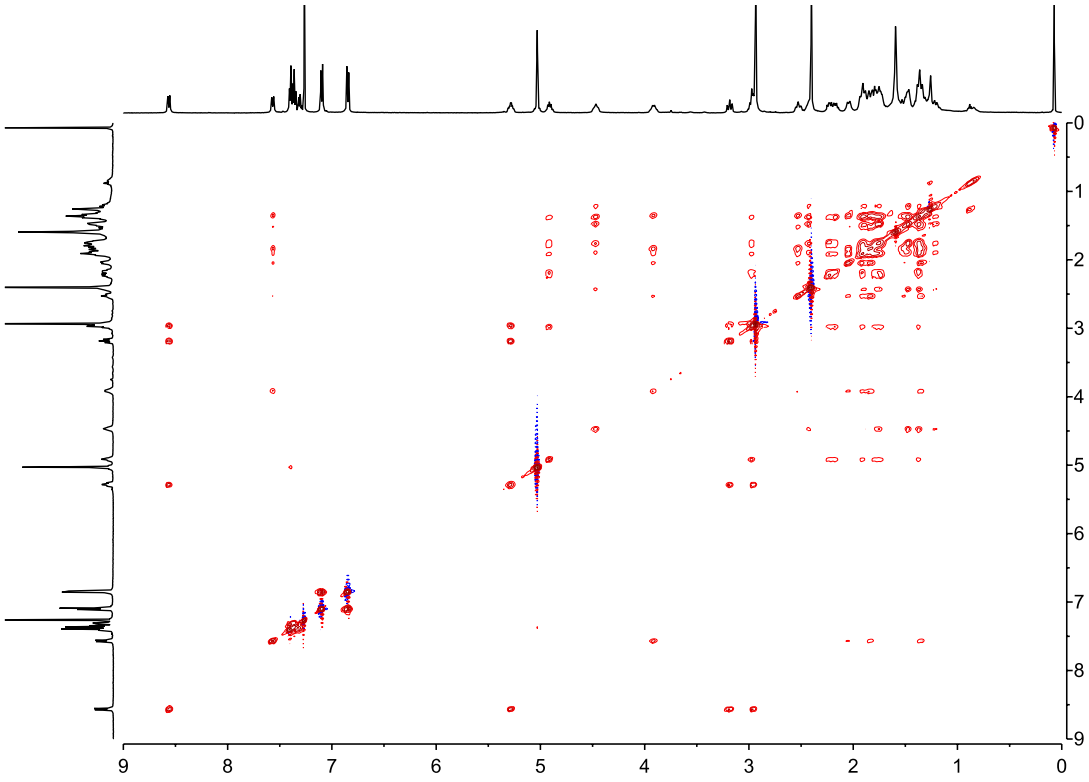
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



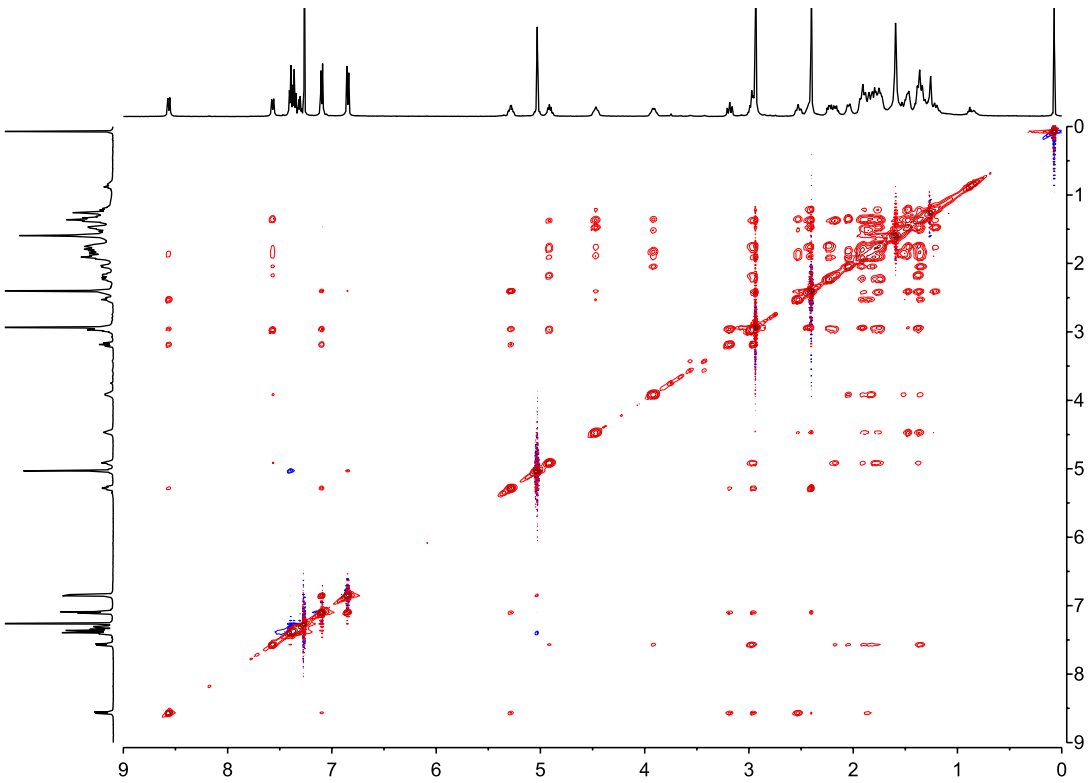
b) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



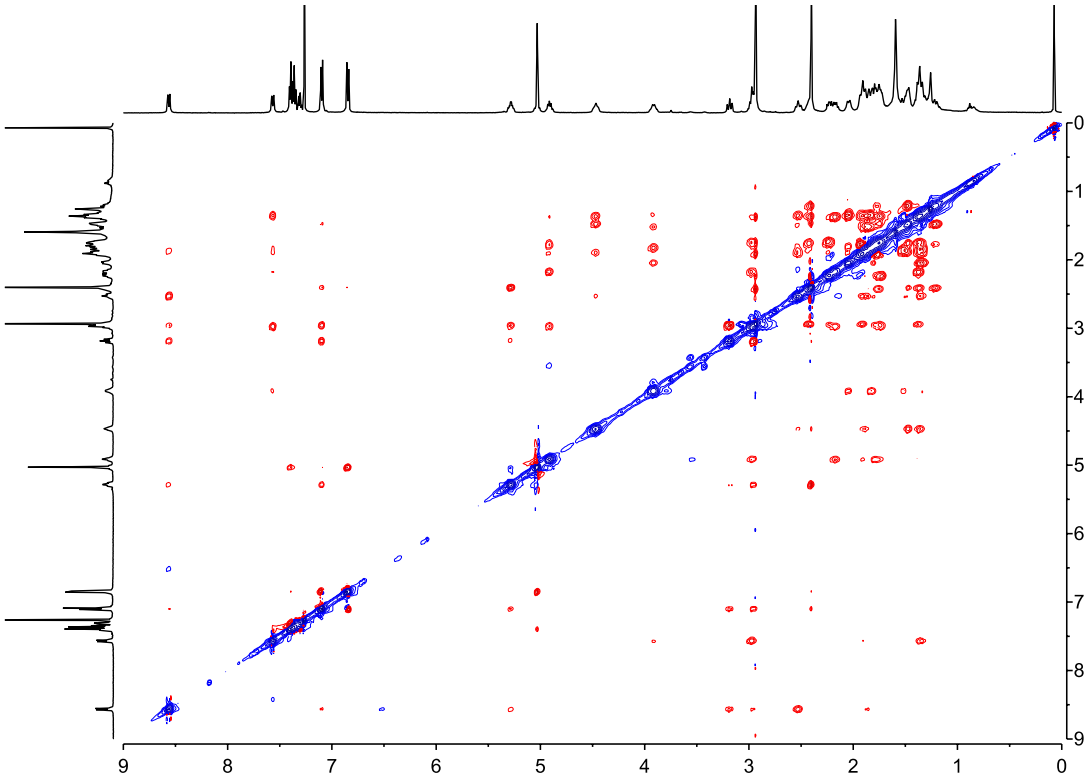
c) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



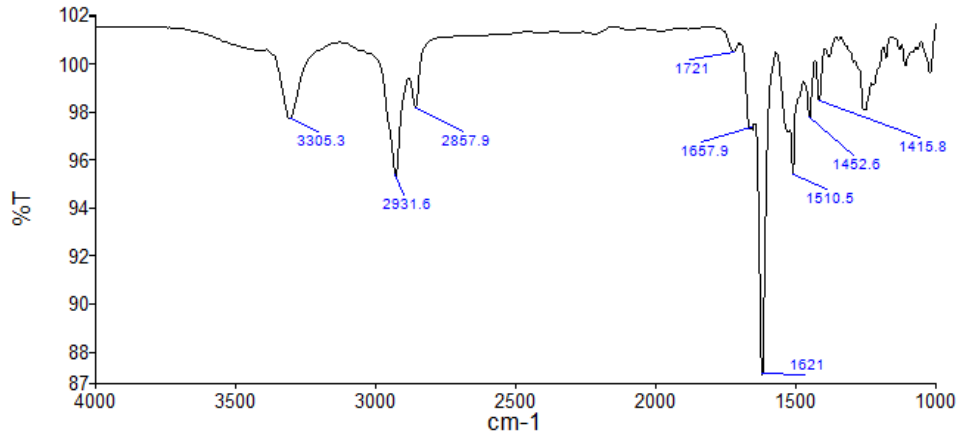
d) **NOESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



e) **NOESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)

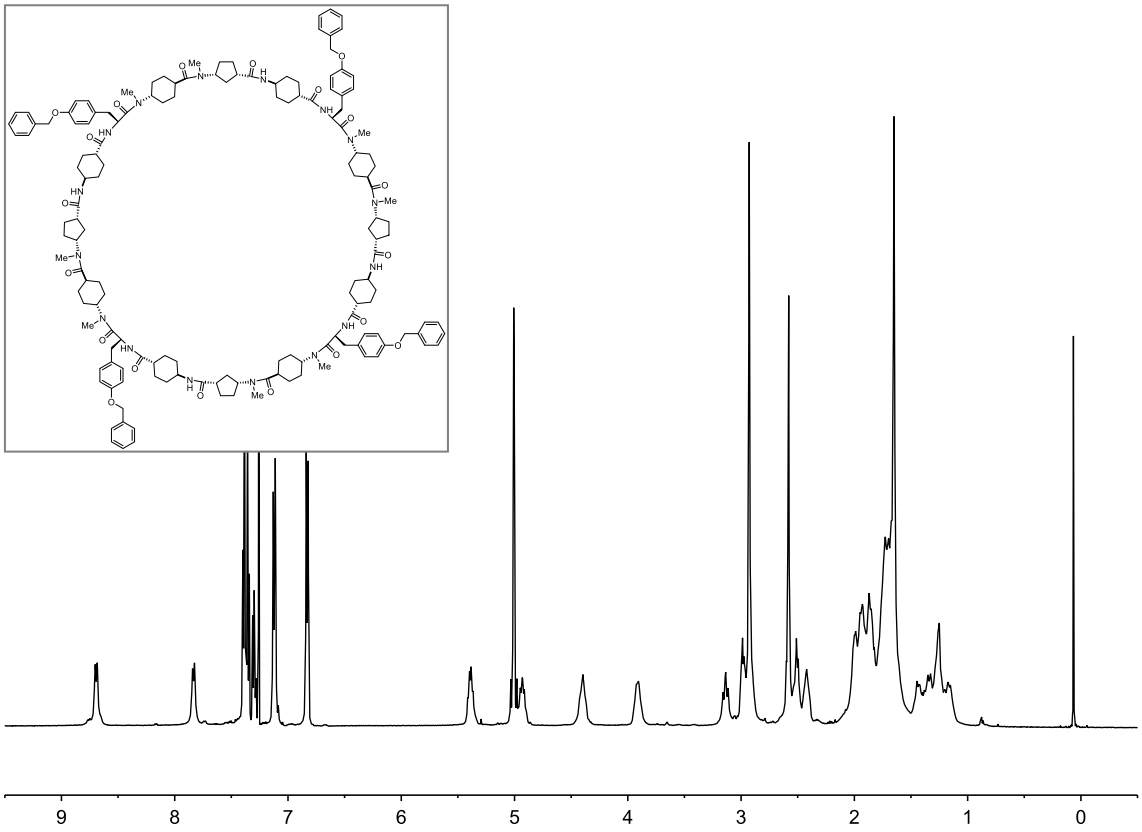


f) FT-IR ($CHCl_3$, 273 K)

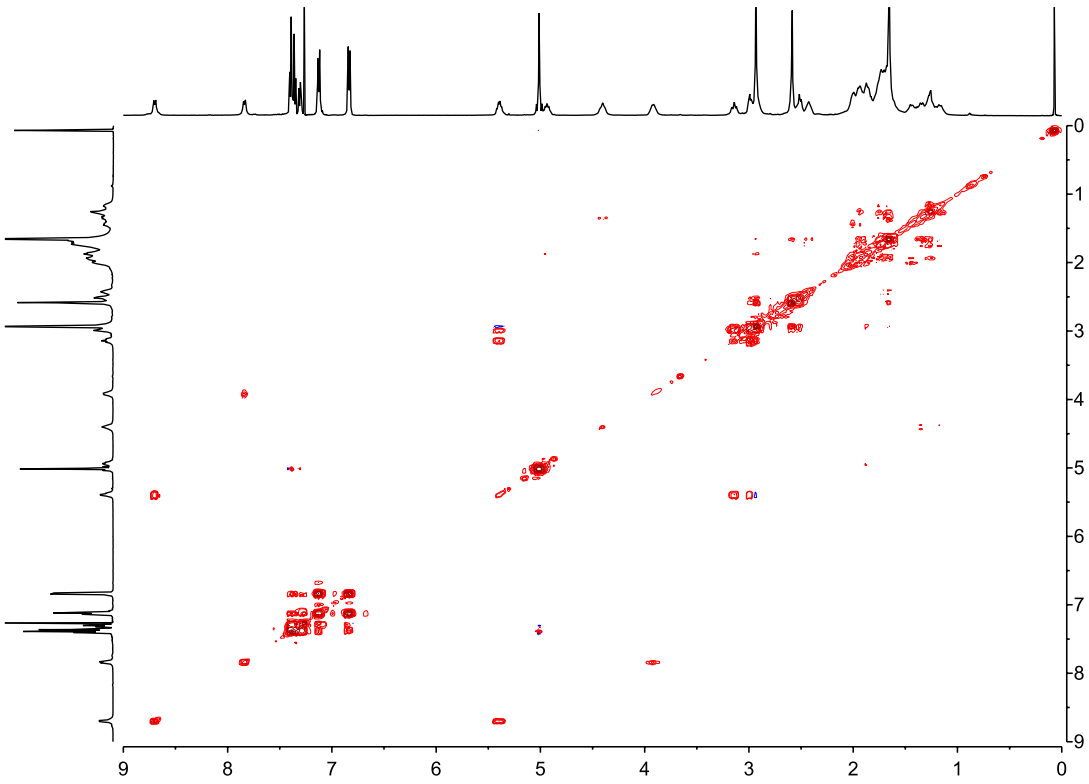


***c*-[(δ-Ach-*L*-Tyr(Bn)-^{Me}N-δ-Ach-^{Me}N-*D*-Acp-)$_4$], CP19**

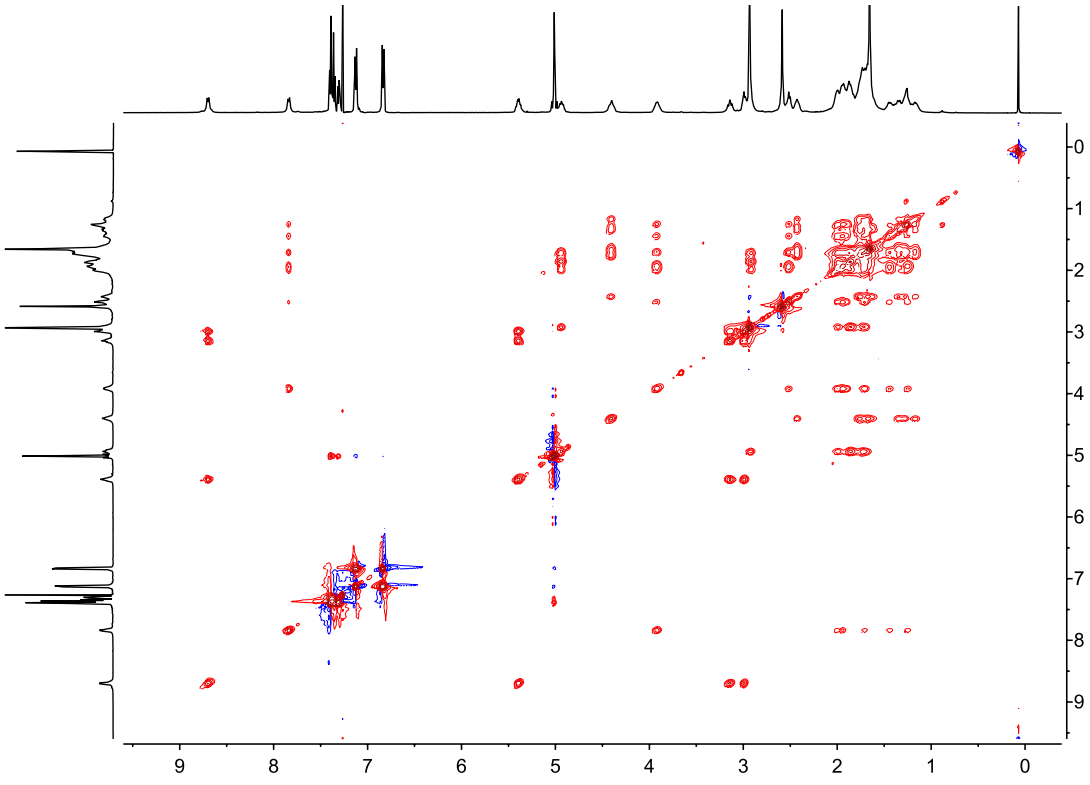
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



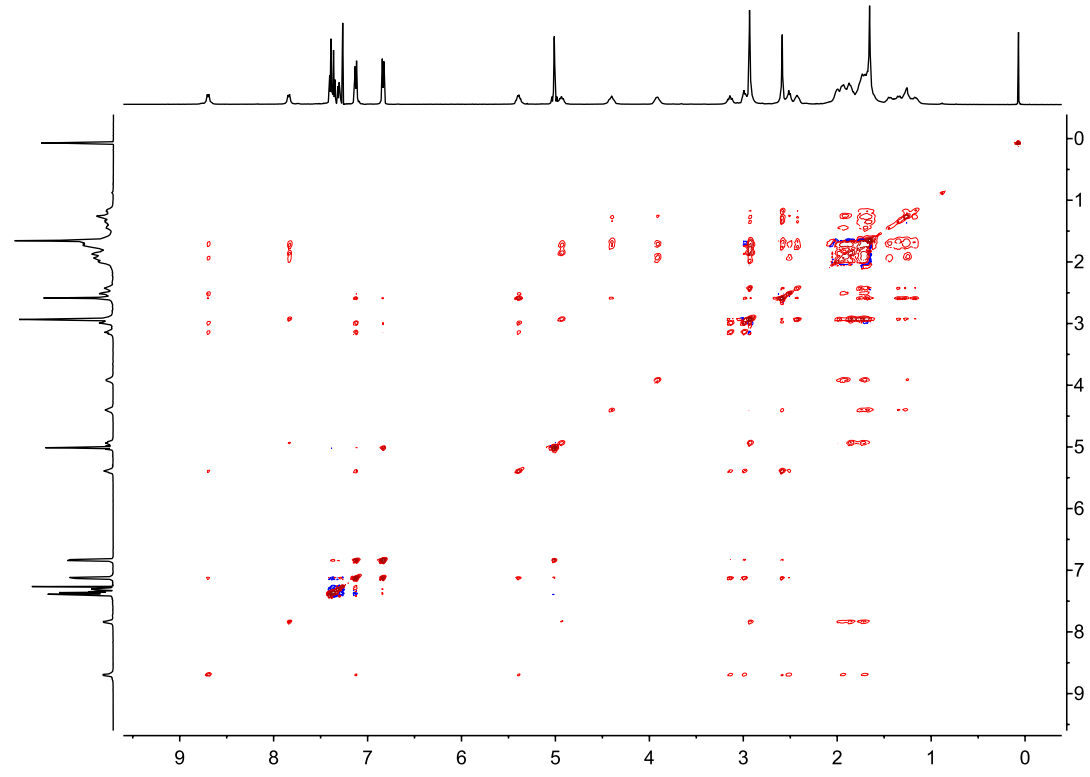
b) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



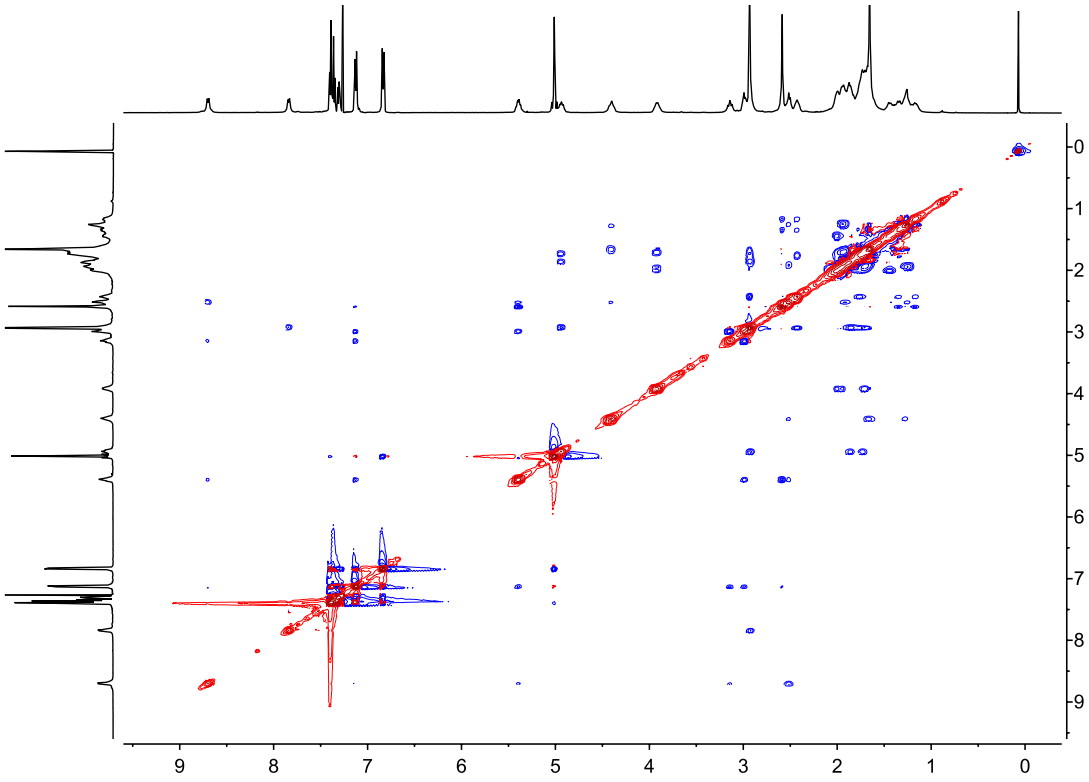
c) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



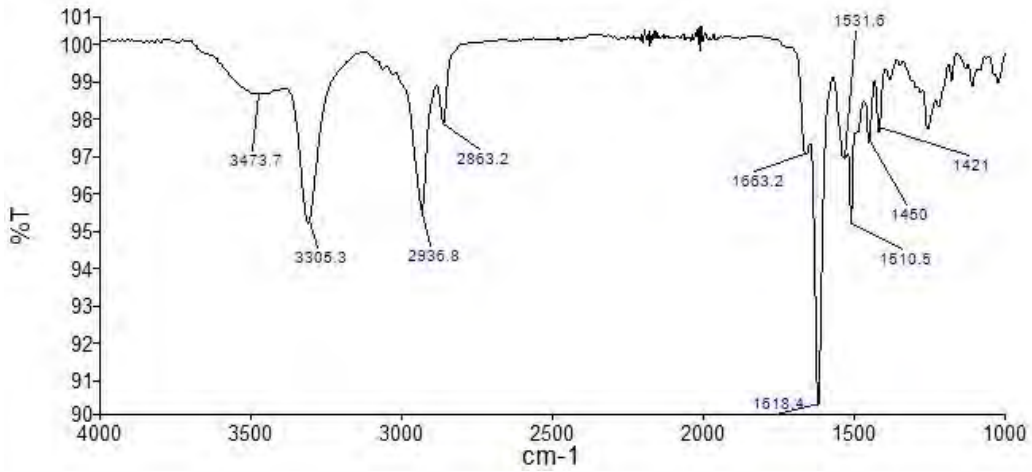
d) **NOESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



e) **ROESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)

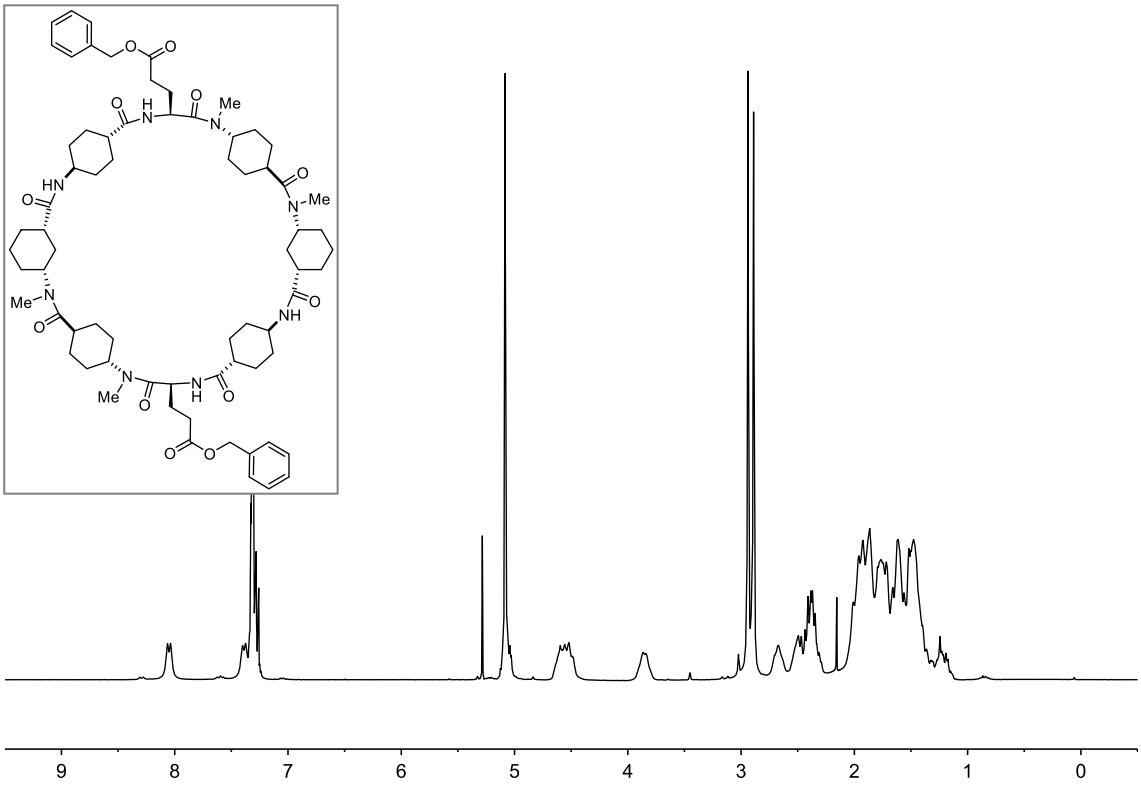


f) FT-IR ($CHCl_3$, 298 K)

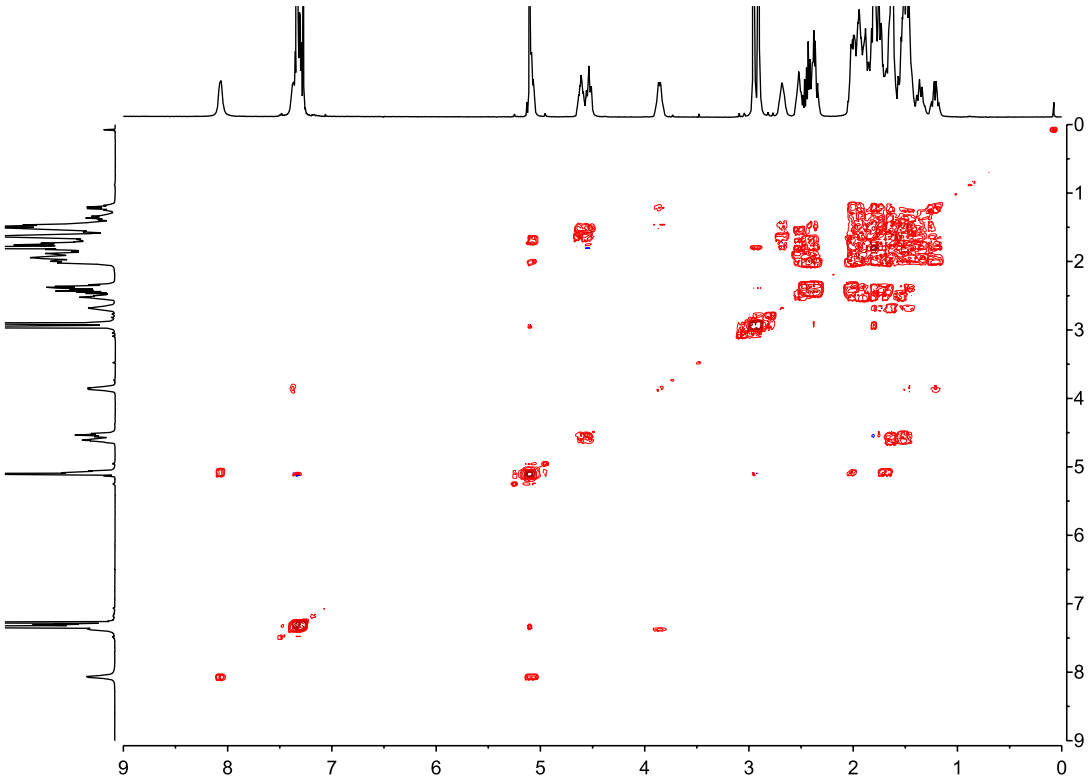


***c*-[(δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}N-δ-Ach-^{Me}N-*D*-Ach-)$_2$], CP20:**

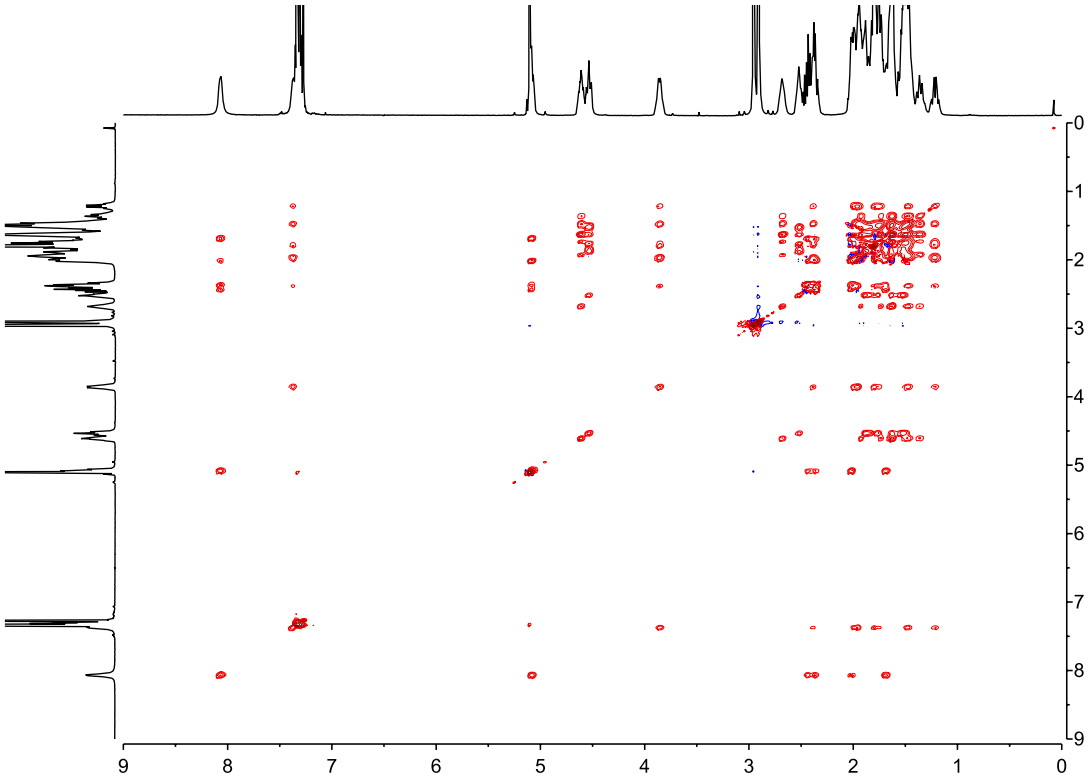
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).



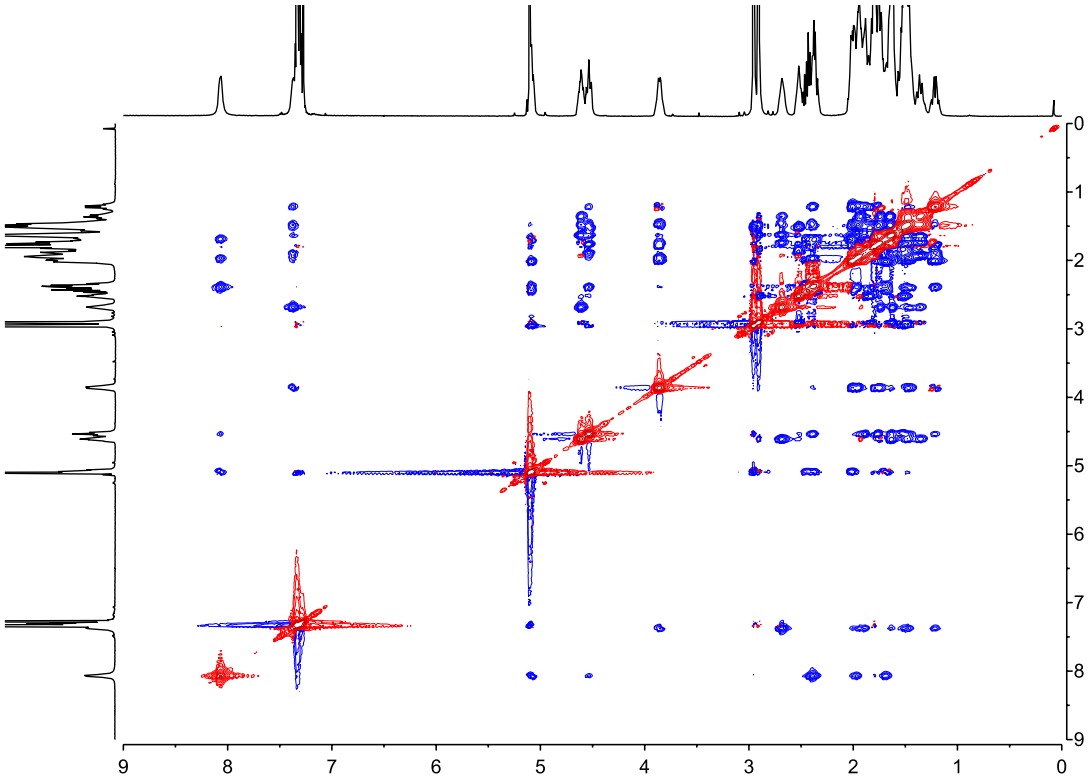
b) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)



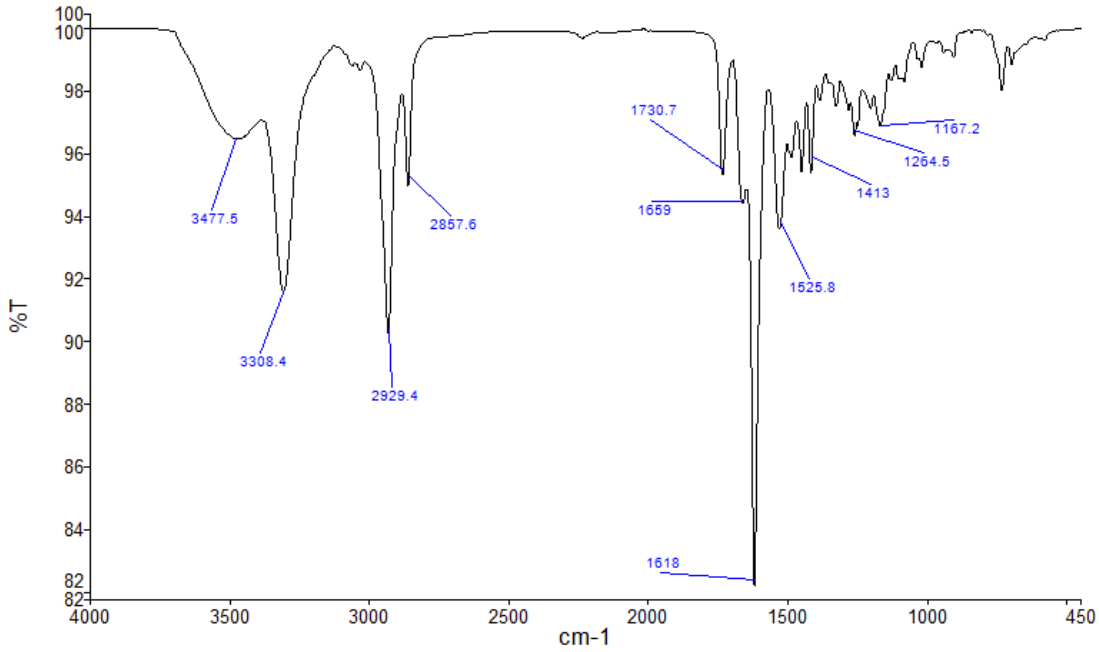
c) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).



d) **ROESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K)

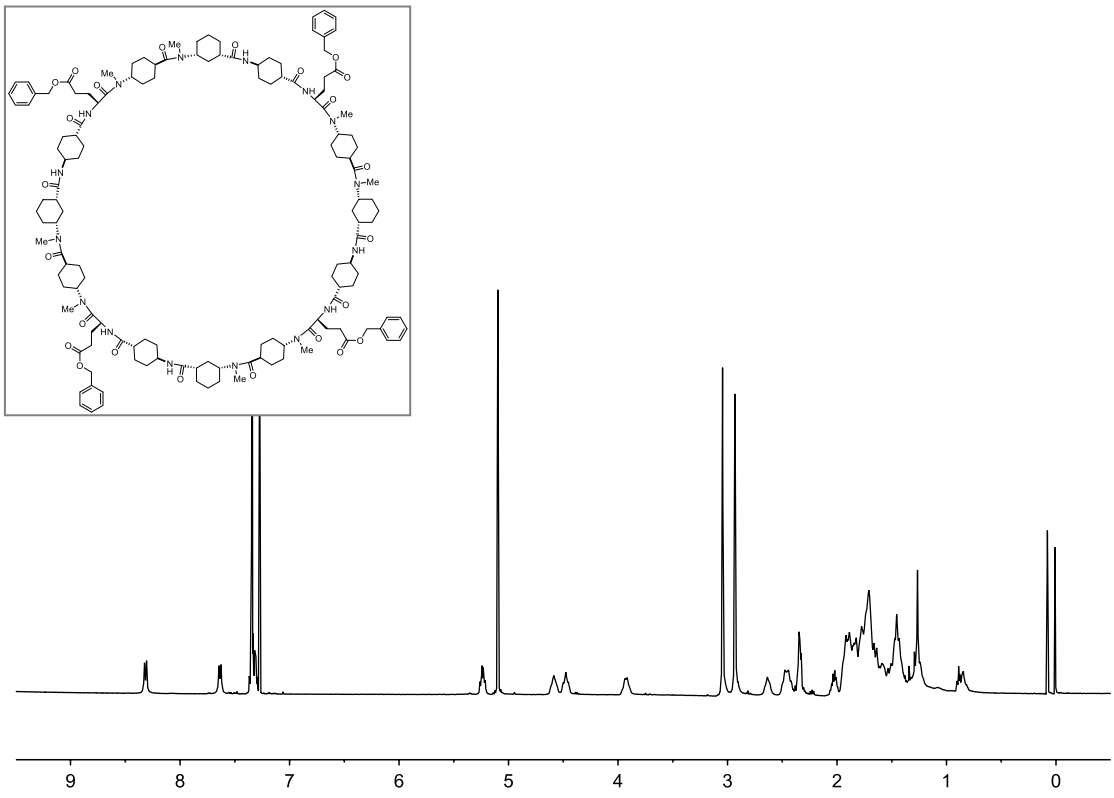


e) **TF-IR** ($CHCl_3$, 298 K).

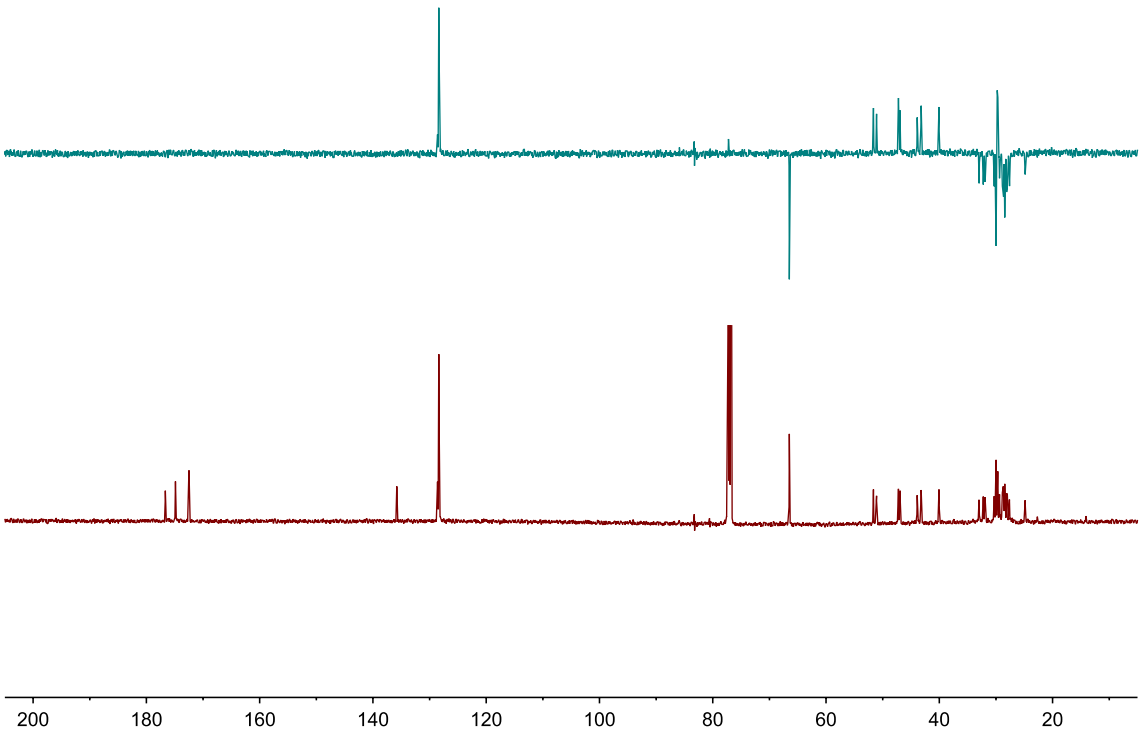


***c*-[(δ-Ach-*L*-Glu(Bn)-^{Me}N-δ-Ach-^{Me}N-*D*-Ach-)$_4$], CP21:**

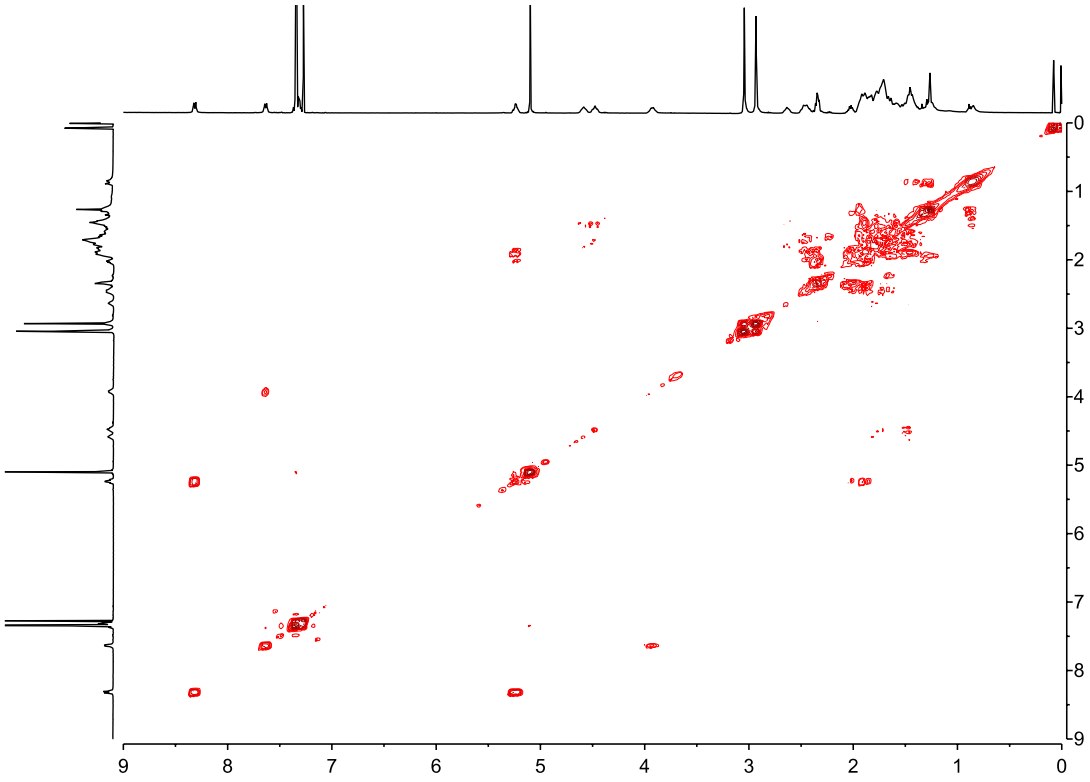
a) **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).



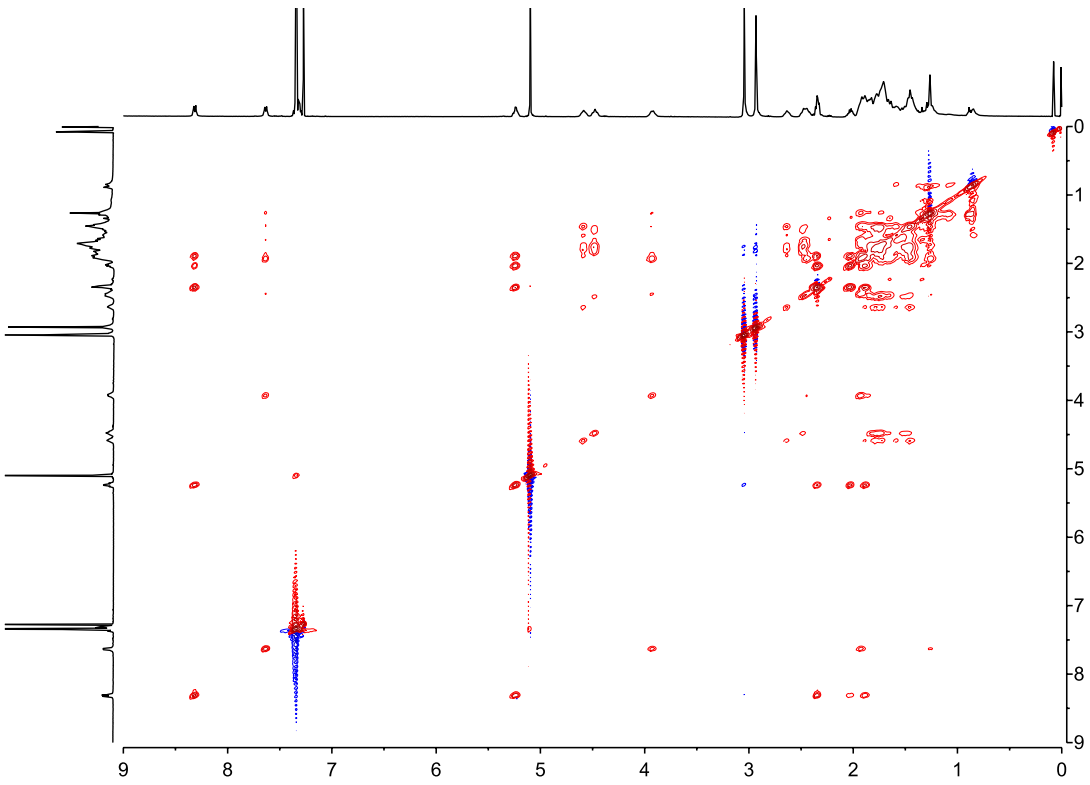
b) **^{13}C RMN y DEPT** ($CDCl_3$, 125 MHz, 298 K).



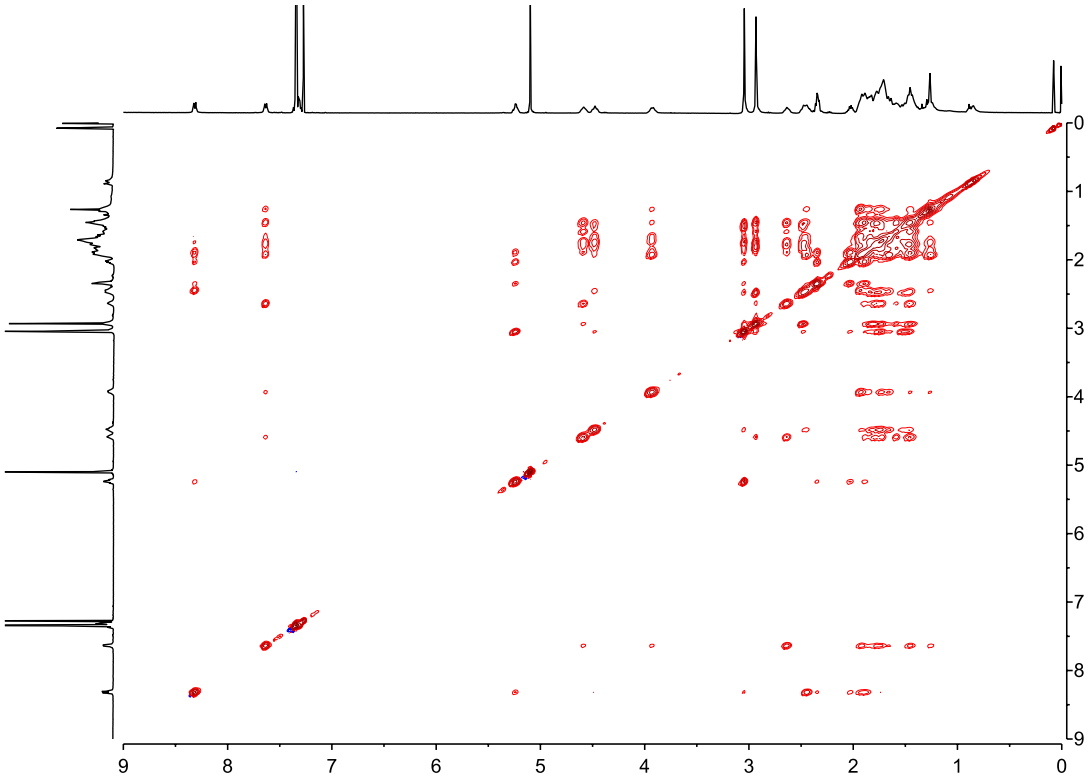
c) **COSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).



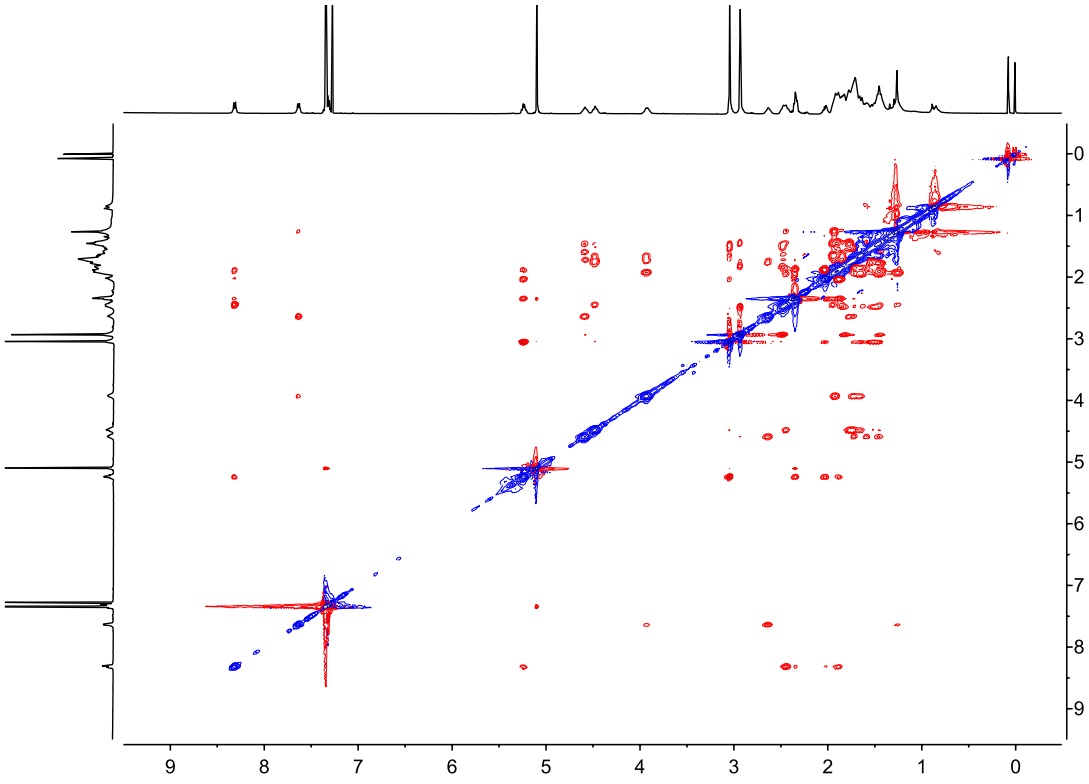
d) **TOCSY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).



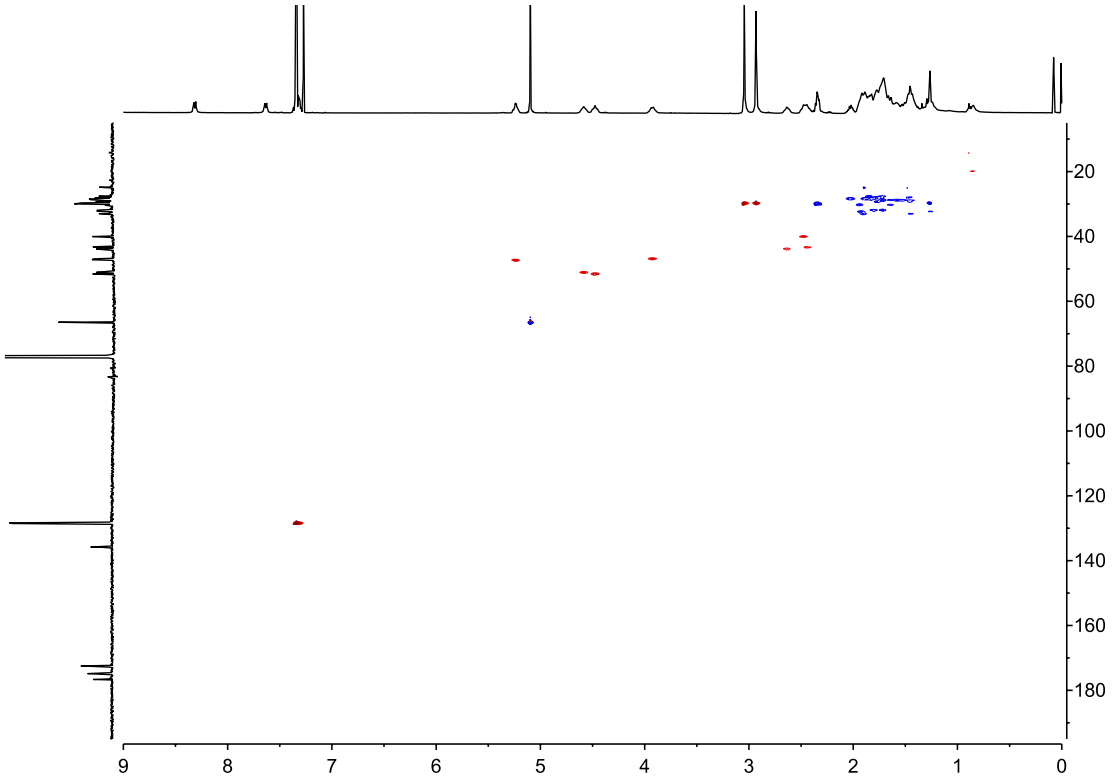
e) **NOESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).



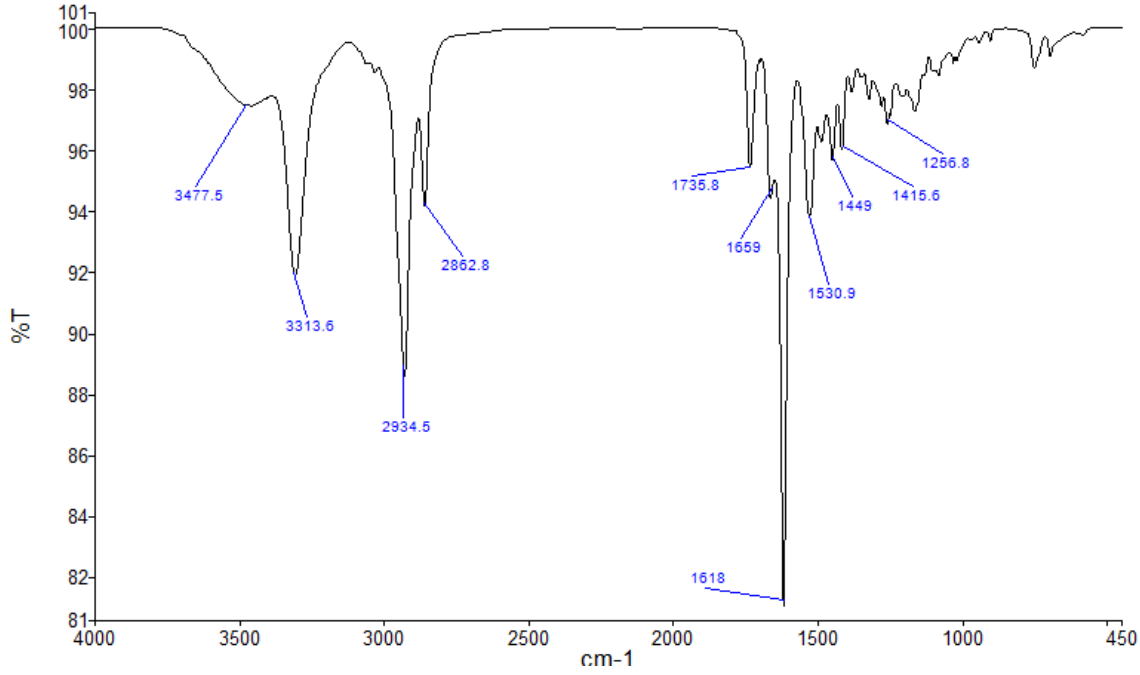
f) **ROESY** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).



g) **HMQC** ($CDCl_3$, 500 MHz, 298 K).

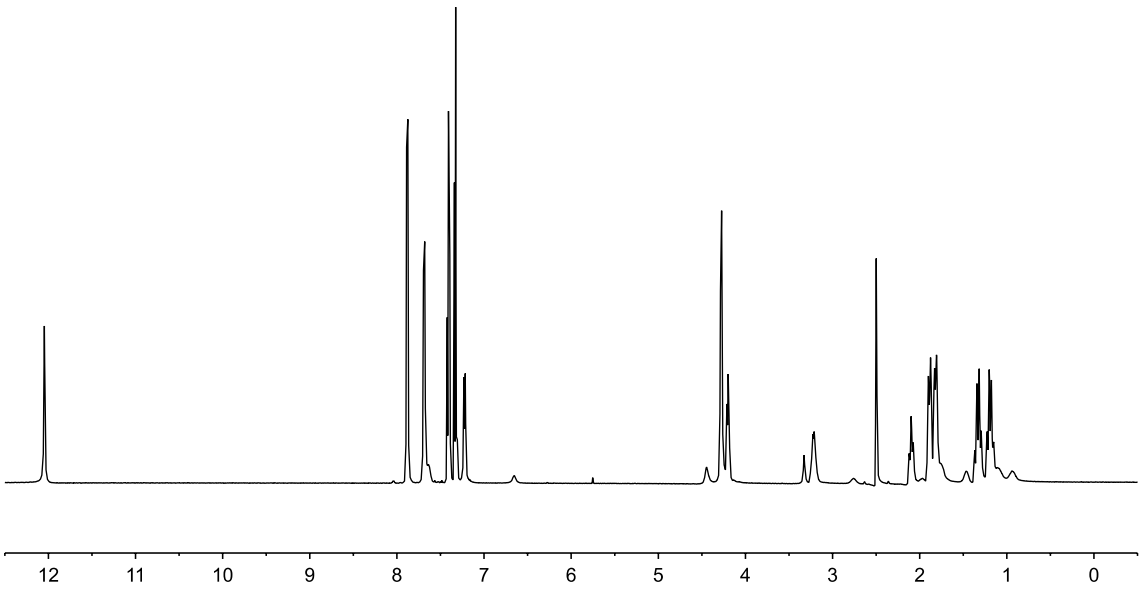


h) **FT-IR** ($CDCl_3$, 298 K).

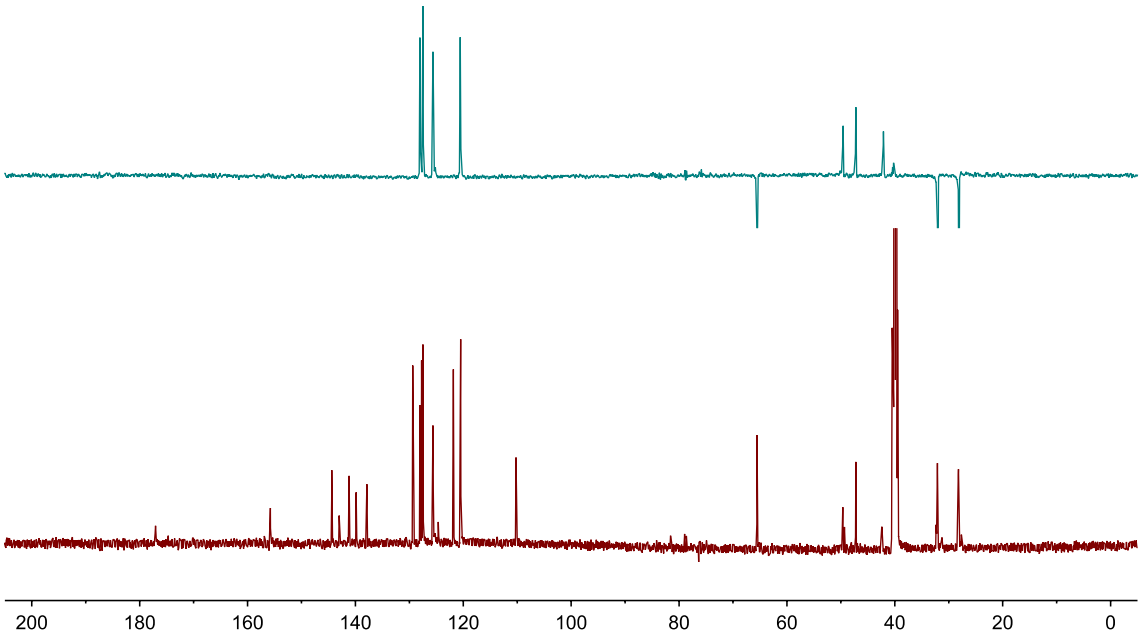


Fmoc-δ-Ach-OH, 112

a) **^{1}H-RMN** (DMSO, 298 K, 500 MHz)

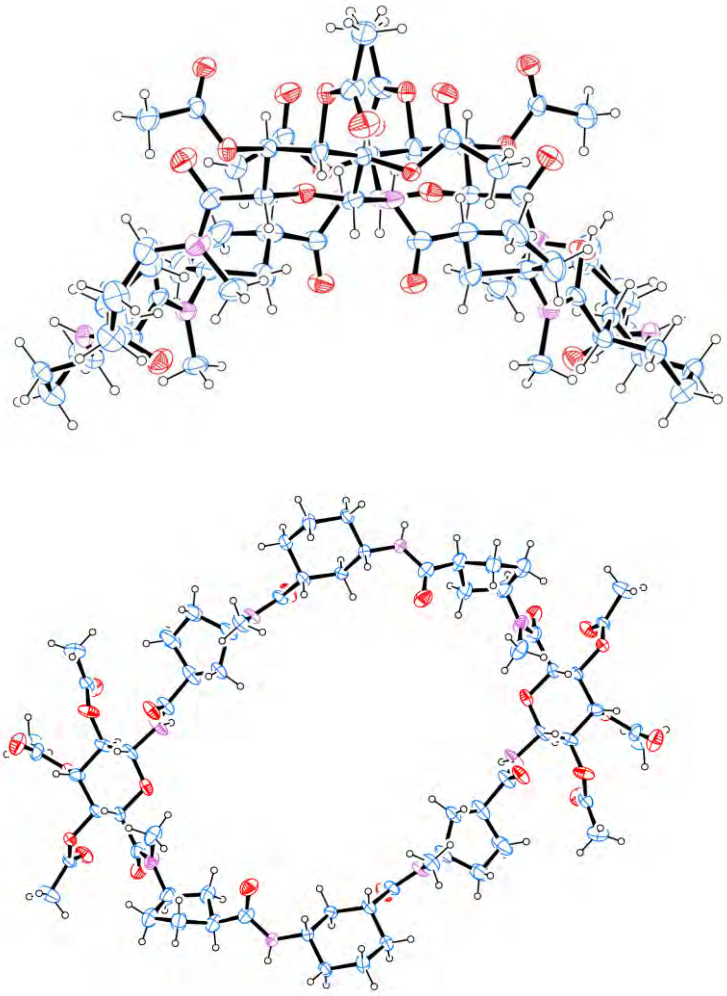


b) **^{13}C-RMN y DEPT** (DMSO, 298 K, 125 MHz)



Datos cristalográficos

CP8: Los datos de Difracción de Rayos X de **CP8** se tomaron en un difractómetro Bruker X8 Kappa APEXII a baja temperatura (100 K). La resolución de los datos obtenidos fue de 0.94 Å. En la celda unidad sólo se encontró la mitad de la estructura propuesta para la molécula ya que la molécula completa se genera a partir de un eje de simetría binario que forma parte del grupo espacial del cristal (Hexagonal P 62 2 2).
La estructura incluía disolvente desordenado (al menos 2 moléculas de CH_2Cl_2 y varias de H_2O) que tuvieron que ser eliminadas para conseguir refinar la estructura de CP8 empleando el procedimiento SQUEEZE[1] implementado en el programa PLATON.[2]



[1] Van der Sluis, P.; Spek, A. L. *Acta Cryst.* **1990**, *A46*, 194-201.
[2] Spek, A. L. *Acta Cryst.* **2009**, *D65*, 148-155.

Tabla 1: Datos del cristal y refinamiento de la estructura para **CP8**:

Identification code	**CP8**	
Fórmula Empírica	$C_{66}H_{96}N_8O_{22}$	
Peso molecular	1353.51	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalográfico	Trigonal	
Grupo espacial	$P6_222$	
Dimensiones celda unidad	a = 22.8898(13) Å	α = 90°
	b = 22.8898(13) Å	β = 90°
	c = 32.1163(19) Å	γ = 120°
Volumen	14572.7(15) $Å^3$	
Z	6	
Densidad (calculada)	0.925 mg/m^3	
Coeficiente de absorción	0.070 mm^{-1}	
F(000)	4344	
Tamaño del cristal	0.96 x 0.70 x 0.39 mm^3	
Rango zeta de recolección de datos	1.21 a 22.29°	
Rango de índices	-20<=h<=0, 0<=k<=24, 0<=l<=34	
Reflexiones recogidas	147356	
Reflexiones independientes	3607 [R(int) = 0.0618]	
Integridad Zeta = 22.29°	99.7 %	
Corrección de absorción	Semiempírica de equivalentes	
Max. y min. de transmisión	0.9124 and 0.8066	
Método de refinamiento	Matriz de mínimos cuadrados en F^2	
Datos / restricciones / parámetros	3607 / 743 / 497	
Calidad de ajuste en F^2	1.082	
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0718, wR2 = 0.2052	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0859, wR2 = 0.2190	
Mayor dif. Max. min.	0.588 y -0.201 $e.Å^{-3}$	