



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Alberto G.
Fernández Fernández

Tesis doctoral

Contribución al estudio de
péptidos de beta 2,2 y beta 2,3
aminoácidos cicloalcánicos y
azacicloalcánicos: Síntesis,
estudio estructural y
propiedades

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Química



TESIS DE DOCTORADO

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE
PÉPTIDOS DE BETA 2,2- Y BETA 2,3-
AMINOÁCIDOS CICLOALCÁNICOS Y
AZACICLOALCÁNICOS: SÍNTESIS,
ESTUDIO ESTRUCTURAL Y
PROPIEDADES**

Alberto G. Fernández Fernández

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE PÉPTIDOS DE
BETA 2,2- Y BETA 2,3-AMINOÁCIDOS CICLOALCÁNICOS
Y AZACICLOALCÁNICOS: SÍNTESIS, ESTUDIO
ESTRUCTURAL Y PROPIEDADES

D./Dña. Alberto G. Fernández Fernández

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, el 15 de diciembre de 2021.



Fdo. Alberto G. Fernández Fernández



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Juan Carlos Estévez Cabanas y Ramón J. Estévez Cabanas.**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la Tesis: **Contribución al estudio de péptidos de beta 2,2- y beta 2,3-aminoácidos cicloalcanicos y azacicloalcanicos: síntesis, estudio estructural y propiedades.**

INFORMA:

Que la presente Tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Alberto G. Fernández Fernández**, bajo nuestra dirección/tutorización, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores/tutores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 22 de diciembre de 2021**

Fdo: Juan Carlos Estévez Cabanas

Fdo: Ramón J. Estévez Cabanas.





A Josefa, José Benito, Gerardo y Carmen



“La educación científica de los jóvenes es al menos tan importante, quizá incluso más, que la propia investigación”. Glenn Theodore Seaborg

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a mis directores de tesis, el profesor Dr. D. Juan Carlos Estévez Cabanas y el profesor Dr. D. Ramón José Estévez Cabanas por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación y brindarme sus enseñanzas, dedicación, esfuerzo, paciencia, y en especial, su continuo apoyo durante estos años.

Al Dr. D. Victor Sánchez Pedregal, por haberme ayudado a ampliar mis conocimientos sobre RMN, y por brindarme su apoyo siempre que se lo pedí.

Al Dr. D. Pau Nolis Fañanás, por su colaboración en esta tesis con los experimentos de RMN.

A Galchimia S.A., por haberme ayudado durante esta etapa y haberme dado la oportunidad de formar parte de su empresa.

A los técnicos del CIQUS y del CACTUS, en especial, a Arcadio Guerra, M^a Carmen Mosquera y Manuel Martín Pastor por su apoyo y horas compartidas.

A mis compañeros de laboratorio:

A Marcos González por enseñarme con paciencia y cariño el funcionamiento de un laboratorio de investigación, nunca olvidaré esas comidas hablando sobre fútbol chileno discutiendo con Tomas y Lino sobre el.

A los compañeros que pude guiar en su estancia en nuestro grupo de investigación: James Kapp, Iona Hardy, Antonio Rey, Bea Ignatiuk, Soufian El Ayadi, Nacho Zegri, Jose Aja, Miguel Ferrer, Mohammed Saleh. Gracias a todos por poner vuestro granito de arena y hacer que los días en el laboratorio fueran inolvidables.

Una mención especial se merecen los compañeros que formaron parte de mi vida durante estos años, porque no son solo compañeros, sino que los considero mis amigos: A Lino, por ser un gran apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio, aunque con una vista pesimista de la vida siempre acaba viendo las cosas buenas; a María, desde el primer día que pisé el laboratorio, siempre estuviste cuando te necesité y desde luego fuiste el pegamento que unió a todo el grupo, sin ti estos años no serían lo mismo, no cambies nunca; a David, desde que entraste en el laboratorio fuiste un emisor de buenas ondas, compañero de incontables horas siempre con cosas interesantes que contar; a Pablo, por compartir aficiones y gusto por las bromas, nunca olvidaré todos los ratos libres hablando sobre baloncesto; A Capi, mi último “pupilo” del que no puedo estar más orgulloso, eres un desastre pero siempre dispuesto y listo para el trabajo duro y para una buena broma.

A mis compañeros del CIQUS, no solo por su ayuda desinteresada, si no por compartir esos momentos juntos que hacen que esta etapa sea única. Especialmente, quiero agradecer a Roberto Colunga, Iván Varela, David Fernández, Ronald Nelson y a todo el equipo de futbol sala CIQUS FS, con el que, a parte de un par de títulos de liguilla, me llevo un gran recuerdo.

A mis compañeros de carrera, en especial a L, V y X por hacer de la Química mucho más que una ciencia.

A todas mis amistades y compañeros de equipo, por su apoyo, cariño y distracciones durante estos años.

A mi familia, por su cariño y por creer en mis sueños, vosotros sois mis alas.

A mis padres Mari y Marcial por darme una educación, unos valores, y un apoyo insuperable, por todo ello ¡os amo!

A mis hermanos Marci y Jose, por todos esos momentos inolvidables vividos juntos, por todos los pasados y por todos lo que vendrán.

A Maia, mi ahijada y primera sobrina, por ser un sol siempre centelleante de felicidad.

A Miriam, por ser simplemente tú, por los viajes, aventuras, malos y buenos momentos. Me siento feliz por compartir mi vida contigo, gracias por hacer que el tiempo pase rápido en los malos momentos y lento en lo momentos más hermosos.

Abreviaturas y acrónimos

a	Ancho	LMOGs	Low molecular mass organic gelators
ABq	Cuartete AB	mgc	Concentración mínima de gelificación
Ac	Acetilo	ⁿ BuLi	N-Butil-Litio
ac.	Acuoso	NOE	Efecto Nuclear Overhauser
Ar	Aromático	NOESY	Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser
Bn	Bencilo	ppm	Partes por millón
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo	q	Cuartete
Cbz	Benciloxicarbonilo	Ph	Fenilo
ccf	Cromatografía en capa fina	ref.	Reflujo
d	Doblete	R _f	Factor de retención
DBU	1,8-Diazabicyclo[4.5.0] undec-7-eno	ROESY	Espectroscopía de efecto Overhauser nuclear de marco giratorio
DCM	Diclorometano	t.a.	Temperatura ambiente
DEPT	Distorsionless enhancement by polarization transfer	t	Triplete
DIC	<i>N,N'</i> -Dimetilaminopiridina	TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
DIEA	Diisopropiletilamina	T-coef	Coeficiente de temperatura
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida	THF	Tetrahidrofurano
DMSO	Dimetilsulfóxido	RMN	Resonancia magnética nuclear
DOSY	Difusion-Ordered Spectroscopy	s	Singulete
ed.	Editorial	TMS	Trimetilsilano
EMAR	Espectroscopía de masas de alta resolución	TOCSY	Total correlation spectroscopy
eq	Equivalenteed		
ESI*	Ionización por electrospray		
EXSY	Exchange Spectroscopy		
Hex	Hexano		
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia		
IR	Infrarrojo		
<i>J</i>	Constante de acoplamiento		
Leu	Leucina		

Índice

1	Introducción	1
1.1	Consideraciones generales	3
1.1.1	α -Aminoácidos y sus péptidos	3
1.1.2	β -Aminoácidos y sus péptidos	5
1.1.2.1	β -Aminoácidos	5
1.1.2.2	β -péptidos	7
1.1.2.3	α,β -Péptidos	13
1.1.3	$\beta^{2,3}$ -Aminoácidos ciclopentánicos y sus péptidos	16
1.1.4	$\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos y sus péptidos	23
1.1.5	$\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclohexánicos y sus péptidos	24
2	Objetivos	27
2.1	Síntesis y estudio estructural de péptidos de $\beta^{2,3}$-aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados	29
2.1.1	Síntesis de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados	29
2.1.2	Síntesis de β -péptidos derivados de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos	29
2.2	Síntesis y estudio de $\beta^{2,2}$-aminoácidos ciclopentánicos y sus péptidos	30
2.2.1	Síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos	30
2.2.2	Síntesis de α,β -péptidos derivados de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos	30
2.3	Síntesis de $\beta^{2,2}$-aminoácidos piperidínicos y sus péptidos	31
2.3.1	Síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos	31
2.3.2	Síntesis de α,β -péptidos derivados de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos	32
2.4	Síntesis y estudios de las propiedades gelificantes de bisamidas derivadas de $\beta^{2,2}$-aminoácidos piperidínicos	32
3	Discusión de resultados	33
3.1	Síntesis y estudio estructural de $\beta^{2,3}$-aminoácidos ciclopentánicos y β-péptidos	35
3.1.1	Antecedentes	37
3.1.2	Objetivos y plan de trabajo	45
3.1.3	Síntesis del (3aS,4R,5R,6S,6aS)-5-(bencilamino)-6-metoxi-2,2-dimetiltetrahydro-4H-ciclopenta[d][1,3]dioxolo-4-carboxilato de 2-(trimetilsilil)etilo (67e)	47
3.1.4	Síntesis del pentapéptido 68	48
3.1.5	Estudio estructural del pentapéptido 68	50
3.1.5.1	Estudios de RMN	50
3.1.6	Conclusión	55
3.2	Síntesis y estudio estructural $\beta^{2,2}$-aminoácidos ciclopentánicos y sus α,β-péptidos	57
3.2.1	Antecedentes	59
3.2.2	Plan de trabajo	60
3.2.3	Síntesis del éster etílico ácido 1-aminometilciclopentanocarboxílico (49a)	61
3.2.4	Síntesis del α,β -péptido 74a	62
3.2.5	Estudio estructural del α,β -hexapéptido 74a	65
3.2.5.1	Estudio de CD de los péptidos 127a , 73a y 74a	65
3.2.5.2	Estudio de IR de los péptidos 127a , 73a y 74a	66
3.2.5.3	Estudio de ^1H -RMN de hexapéptido 74a	67
3.2.5.4	Conclusión	73
3.2.6	Síntesis del (3S,4S)-1-(aminometil)-3,4-dimetoxiciclopentanocarboxilato de etilo (49b)	74

3.2.7	Síntesis de péptido 74b	75
3.2.8	Estudio estructural de hexapéptido 74b.	78
3.2.8.1	Estudio de CD	78
3.2.8.2	Estudio de IR	79
3.2.8.3	Estudio de RMN	80
3.2.9	Conclusión	84
3.3	Síntesis y estudio estructural $\beta^{2,2}$-aminoácidos piperidínicos y sus α,β-péptidos	85
3.3.1	Antecedentes y plan de trabajo.	87
3.3.2	Síntesis del 4-(aminometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)piperidin-4-carboxilato de etilo (78b)	88
3.3.3	Síntesis del hexapéptido 80a	90
3.3.4	Estudio estructural del hexapéptido 80a	92
3.3.4.1	Estudio de dicroísmo circular	92
3.3.4.2	Estudio de IR	93
3.3.4.3	Estudios de RMN	94
3.3.4.4	Conclusión	101
3.4	Síntesis y estudio estructural de las propiedades gelificantes de piperidindicarboxamidas	103
3.4.1	Introducción agentes gelificantes	105
3.4.1.1	Geles moleculares	105
3.4.1.2	Clasificación de los geles moleculares	106
3.4.1.3	Caracterización	106
3.4.1.4	Consideraciones estructurales	107
3.4.1.5	Aplicaciones	108
3.4.2	Antecedentes	112
3.4.3	Plan de trabajo	115
3.4.4	Síntesis del β -aminoácido 78e	117
3.4.5	Síntesis de las bisamidas 78f, 78g y 78h	118
3.4.6	Estudio de las propiedades de las bisamidas 78f, 78g y 78h	120
3.4.6.1	Estudio de gelificación	120
3.4.6.2	Estudio DLS	122
3.4.6.3	Estudio SEM	122
4	Conclusiones	125
5	Parte experimental	129
5.1	Técnicas Experimentales	131
5.2	Síntesis de $\beta^{2,3}$-Aminoácidos cicloalcánicos y β-péptido	133
5.2.1	(3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,6 <i>aS</i>)-5-(bencilamino)-6-metoxi-2,2-dimetiltetrahydro-4 <i>H</i> -ciclopenta[<i>d</i>][1,3]dioxolo-4-carboxilato de 2-(trimetilsilyl)etilo (67e)	133
5.2.2	Síntesis de dipéptido 119b	135
5.2.3	Síntesis del dipéptido 119c	136
5.2.4	Síntesis del tripéptido 120a	137
5.2.5	Síntesis del pentapéptido 68	139
5.2.5.1	^1H -RMN (5 mM, 5- 20° C, 300 MHz).	141
5.2.5.2	TOCSY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, CDCl_3).	143
5.2.5.3	ROESY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, t-mix= 300 ms, CDCl_3).	144
5.3	Síntesis de $\beta^{2,2}$- aminoácidos ciclopentánicos polisustituidos y sus α,β-péptidos.	145
5.3.1	Síntesis del 1,4-Diyodobutano (70a)	145
5.3.2	Síntesis del 1-cianociclopentanocarboxilato de etilo (71a)	146
5.3.3	Síntesis del 1-(aminometil)ciclopentanocarboxilato de etilo (49a)	147
5.3.4	Síntesis del dipéptido 127a	148

5.3.5	Síntesis del dipéptido 127c	150
5.3.6	Síntesis del dipéptido 127b	151
5.3.7	Síntesis del tetrapéptido 73a	152
5.3.8	Síntesis del tetrapéptido 73d	154
5.3.9	Síntesis del hexapéptido 74a	155
5.3.9.1	¹ H-RMN (1, 5, 10 mM; 25 °C; 300 MHz).	157
5.3.9.2	¹ H-RMN (5 mM, -15-45 °C, 300 MHz).	158
5.3.9.3	TOCSY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, CDCl ₃).	159
5.3.9.4	NOESY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, t-mix= 300 ms, CDCl ₃).	160
5.3.10	Síntesis del (2S,3S)-2,3-dimetoxisuccinato de dietilo (129a)	161
5.3.11	Síntesis de (2S,3S)-2,3-dimetoxibutan-1,4-diol (69b)	162
5.3.12	Síntesis de (2S,3S)-2,3-dimetoxibutan-1,4-diilbis(4-metilbencenesulfonato) (70c)	163
5.3.13	Síntesis de (2R,3R)-1,4-diiodo-2,3-dimetoxibutano (70b)	164
5.3.14	Síntesis del (3S,4S)-1-ciano-3,4-dimetoxiciclopentan-1-carboxilato de etilo (71b)	165
5.3.15	Síntesis del (3R,4R)-1-(aminometil)-3,4-dimetoxiciclopentan-1-carboxilato de etilo (49b)	166
5.3.16	Síntesis del dímero 127d	168
5.3.17	Síntesis del dímero 127f	170
5.3.18	Síntesis del dímero 127e	171
5.3.19	Síntesis del tetramero 73b	172
5.3.20	Síntesis del tetramero 73e	174
5.3.21	Síntesis del hexámero 74b	175
5.3.21.1	¹ H-RMN (1, 5, 10 mM; 25 °C; 300 MHz).	177
5.3.21.2	¹ H-RMN (5 mM, -5- 45°C, 300 MHz).	178
5.3.21.3	TOCSY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, CDCl ₃).	179
5.3.21.4	NOESY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, t-mix= 300 ms, CDCl ₃).	180
5.4	Síntesis de β²⁻²-Aminoácidos piperidínicos y sus péptidos	181
5.4.1	Síntesis del cloruro de bis(2-cloroetil)amino (76b)	181
5.4.2	Síntesis del bis(2-cloroetil) carbamato de <i>terc</i> -butilo (76c)	182
5.4.3	Síntesis del 1- <i>terc</i> -butil 4-etil 4-cianopiperidina-1,4-dicarboxilato (77a)	183
5.4.4	Síntesis del 1-(<i>terc</i> -butil) 4-etil 4-(aminometil)piperidina-1,4-dicarboxilato (78b)	185
5.4.5	Síntesis del dipéptido 132a	186
5.4.6	Síntesis del dipéptido 132c	188
5.4.7	Síntesis del dipéptido 132b	190
5.4.8	Síntesis del tetrapéptido 79a	191
5.4.9	Síntesis del tetrapéptido 79b	193
5.4.10	Síntesis del hexapéptido 80a	194
5.4.10.1	¹ H-RMN (2, 6, 8 mM; 25 °C; 300 MHz).	196
5.4.10.2	¹ H-RMN (6 mM, -15- 45 °C, 300 MHz).	197
5.4.10.3	TOCSY (6 mM, 25 °C, 600 MHz, CDCl ₃).	198
5.4.10.4	ROESY (6 mM, 25 °C, 600 MHz, t-mix= 500 ms, CDCl ₃).	199
5.5	Síntesis de compuestos organogelantes anfílicos basados en β-piperidínicos	200
5.5.1	Síntesis de bis(2-cloroetil)carbamato de bencilo (76d)	200
5.5.2	Síntesis de 4-Cianopiperidina-1,4-dicarboxilato de 1-bencilo 4-etilo (77b)	201
5.5.3	Síntesis de 4-(aminometil)piperidina-1,4-dicarboxilato de 1-benzil, 4-etil (78e)	203
5.5.4	Síntesis de 4-(dodecanamidometil)piperidina-1,4-dicarboxilato de 1-benzil 4-etil (78i)	204
5.5.5	Síntesis de 1 Ácido ((benziloxi)carbonil)-4-(dodecanamidometil)piperidina-4-carboxílico (78j)	206
5.5.6	Síntesis de Benzil 4-(dodecanamidometil)-4-(hexadecilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato (78f)	207
5.5.7	Síntesis de 4-(dodecanamidometil)-N-hexadecilpiperidino-4-carboxamida (78g)	209
5.5.8	Síntesis de 4-(dodecanamidometil)-4-(hexadecilcarbamoil)piperidin-1-ium (78h)	211

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CONSIDERACIONES GENERALES

1.1.1 α -Aminoácidos y sus péptidos

Los α -aminoácidos son moléculas orgánicas cuya característica estructural común es la de ser derivados del aminoácido más sencillo, el ácido 2-aminoetanoico (glicina, Figura 1). Los más comunes son los derivados monosustituídos, entre los cuales ocupan una posición relevante los α -aminoácidos proteinogénicos, un conjunto de los veinte α -aminoácidos presentes en una diversidad amplia de productos naturales,¹ que intervienen en el metabolismo del nitrógeno y son las materias primas necesarias para la producción de algunos metabolitos primarios y secundarios de vital importancia.² Pero su mayor interés reside en el hecho de que su unión secuencial, mediante enlaces covalentes de tipo amida, da lugar a la gran diversidad de α -péptidos y proteínas existentes,³ desde las que aparecen en las bacterias más antiguas hasta las de los organismos más evolucionados.⁴

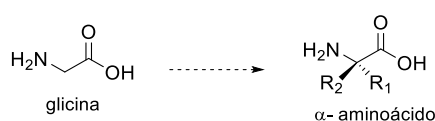


Figura 1. Estructura de los α -aminoácidos.

Se conoce también una relación amplia de α -aminoácidos no proteinogénicos, tanto naturales como sintéticos, así como α,α' -aminoácidos y diaminoácidos^{5,6,7,8} que han encontrado muy diversas aplicaciones biológicas⁹ y fundamentalmente químicas, como sustancias de partida,^{10,11} habiendo sido también ampliamente utilizados como reactivos y auxiliares quirales.¹²

¹ Barton, D.; Nakanisky, K.; Meth-Cohn, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, O., Eds.; Pergamon: Exeter. **1999**.

² a) Izuni, Y.; Chibata, I.; Itoh, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 176. b) Herbert, R. A. *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*; Chapman & Hall: Londres. **1981**.

³ Una secuencia peptídica de 50 unidades de estos veinte aminoácidos puede dar lugar a 20⁵⁰ proteínas distintas.

⁴ a) Jones, J. H. En *Comprehensive Organic Chemistry: The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*; Barton D.; Ollis, W. D., Eds. Pergamon press: Exeter. 1979. Vol. 2, p. 815. b) Stryer, L. *Biochemistry*; W. H. Freeman & Cia: New York. **1988**.

⁵ Urech, F. *Justus Liebigs. Ann. Chem.* **1872**, *164*, 255.

⁶ Wirth, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 225.

⁷ a) Yamashita, T.; Iijima, M.; Nakamura, H.; Isshi, K.; Naganawa, H.; Hattori, S.; Hamada, H.; Ishizuka, M.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 557. b) Horn, W. S.; Smith, J. L.; Bills, G. F.; Raghoobar, S. L.; Helms, G. L.; Kurtz, M. B.; Marrinan, J. A. M.; Frommer, B. R.; Thornton, R. A.; Mandala, S. M. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1962. c) Yano, S.; Nakanishi, Y.; Ikuina, Y.; Ando, K.; Yoshida, M.; Saitoh, Y.; Matsuda, Y.; Bando, C. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 992. d) Becker, D.; Kiess, M.; Brückner, H. *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 767.

⁸ a) Kiick, D. M.; Cook, P. F. *Biochemistry* **1983**, *22*, 375. b) Stinson, S. C. *Chem. Eng. News* **1992**, *70*, 46.

⁹ , Rubiralta, M.; Giralt, E.; Díez, A. En *Studies in Organic Chemistry*; Elsevier: New York. **1991**. Vol. 43, Cap. 1.

¹⁰ Williams, R. M.; Hendrix, J. A. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 889.

¹¹ Kazmaier, U. *Liebigs. Ann./Recueil* **1997**, 285.

¹² a) Valentine, D.; Scott, J. W. *Synthesis*, **1978**, 329. b) Drauz, K.; Kleemann, A.; Martens, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 584. c) Martens, J. *Top. Curr. Chem.* **1984**, *125*, 165. d) Reetz, M. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1531. e) Jones, J. *Amino Acids and Peptide Synthesis*; Oxford University Press: Oxford. **1992**. f) Seyden-Penne, J. *Chiral Auxiliaries and Ligands in Asymmetric Synthesis*; J. Wiley & Sons: New York. **1995**. g) Stephenson, G. R. *Advanced Asymmetric Synthesis*; Chapman & Hall: Londres. **1996**. h) Studer, A. *Synthesis* **1996**, 793. i) Sardina, F. J.; Rapoport, H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1825.

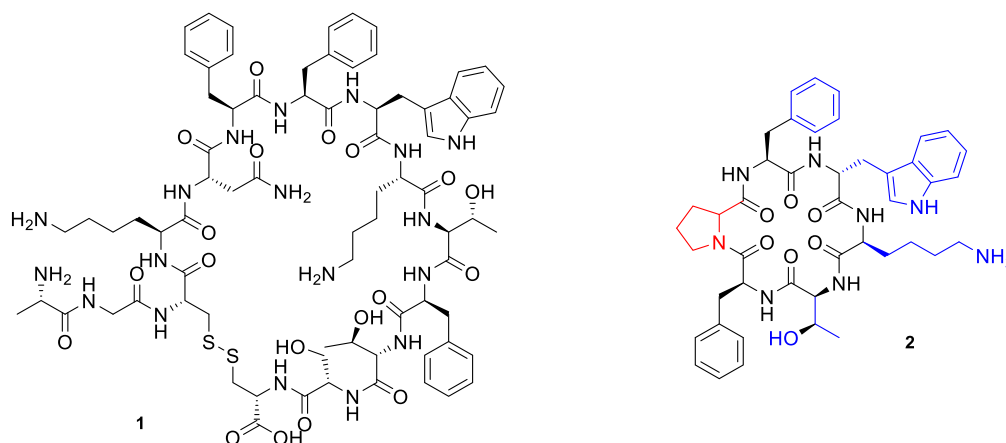


Figura 2. Estructura de la somatostatina (**1**) y un peptidomimético de la misma **2**. En rojo el aminoácido de nueva incorporación prolina, en azul los residuos que interaccionan con el receptor.

En el ámbito de los péptidos de α -aminoácidos se han descubierto un gran número de péptidos naturales con importantes funciones biológicas, entre los que destaca su actuación como neurotransmisores, hormonas, inhibidores enzimáticos e inmunomoduladores. Una vez unidos a sus correspondientes receptores, pueden influenciar la comunicación entre las células y controlar multitud de funciones vitales. Un ejemplo de ello es la hormona peptídica somatostatina (**1**) (Figura 2),¹³ que interviene directamente en la regulación de la glucemia, inhibiendo la secreción de insulina y glucagón. La utilización de los péptidos como fármacos presenta limitaciones de alcance, que son básicamente las siguientes:

- Su flexibilidad conformacional permite en muchas ocasiones la unión del péptido a más de un receptor, dando ello lugar a efectos secundarios no deseados.
- Su inestabilidad metabólica, debida a su fácil degradación por algunas peptidasas específicas y no específicas.
- Su baja solubilidad y la consiguiente tendencia a formar agregados.
- La reducida diversidad estructural de péptidos que pueden generarse con el pequeño número de aminoácidos proteínogénicos.

En un intento por superar estas limitaciones y de avanzar en el diseño de péptidos sintéticos que mejoren las propiedades catalíticas y de reconocimiento de los péptidos naturales, ha surgido un campo de investigación que trata de desarrollar estructuras moleculares que se aproximen a los α -péptidos en complejidad estructural y funcional. Estas estructuras se conocen como peptidomiméticos.¹⁴

La estrategia habitual en el diseño de peptidomiméticos consiste básicamente en modificar la estructura de un péptido natural, con objeto de generar estructuras con las siguientes propiedades:

- Alta estabilidad metabólica y biodisponibilidad, alejando lo más posible la estructura del peptidomimético de la del péptido natural, con objeto de evitar que pueda ser reconocido y degradado por las proteasas.

¹³ MacDonald, M.; Aubé, J. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 417-438.

¹⁴ Wu, Yun-Dong; Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1231-1232.

- Alta selectividad y afinidad por los receptores, para lo que es necesario conseguir estructuras compactas y estables en disolución, que no puedan adoptar distintas conformaciones y, por tanto, generar efectos secundarios.

En la Figura 2 se muestra un péptidomimético de la somatostatina (**2**) que mantiene la secuencia de aminoácidos Phe-Trp-Lys-Thr-Phe presente en el compuesto natural, ya que es la responsable de la interacción con el receptor y por lo tanto de su actividad, e incorpora una unidad de prolina en sustitución del resto de su cadena peptídica.

1.1.2 β -Aminoácidos y sus péptidos

1.1.2.1 β -Aminoácidos

Los β -aminoácidos son derivados del ácido 3-aminopropanoico que pueden encontrarse en la Naturaleza tanto en forma libre, como formando parte de numerosos compuestos, con propiedades antibióticas, citotóxicas o fungicidas.¹⁵ Por ejemplo, la emeriamina (**3**)¹⁶ que inhibe la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y el taxol (**4**)¹⁷ utilizado para el tratamiento de diversos tumores (Figura 3).

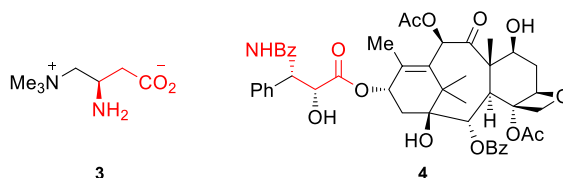


Figura 3. Ejemplos de β -aminoácidos presentes en la Naturaleza (en rojo aparece destacada la unidad β -aminoácido).

Un caso de compuestos relacionados con los β -aminoácidos son las β -lactamas, que incluyen antibióticos tan conocidos como la penicilina G (**5**) y la cefalosporina (**6**) (Figura 4)

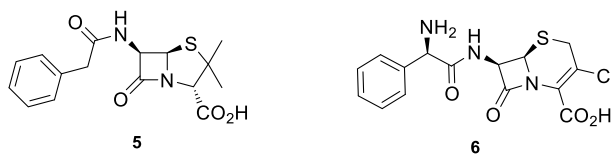


Figura 4. Ejemplos de β -lactamas con propiedades medicinales, penicilina G (**5**) y la cefalosporina (**6**).

También existe una cierta diversidad de péptidos naturales biológicamente activos que incorporan β -aminoácidos, como la bestatina (**7**) y la amastatina (**9**), que son inhibidores de aminopeptidasas,¹⁸ o el ciclodepsipeptido jasplakinolide¹⁹ (**8**), que presenta actividad antifúngica y antihelmíntica (Figura 5).

¹⁵ Lelais, G.; Seebach, D. *Biopolymers* **2004**, 76, 206.

¹⁶ a) Kanamaru, T.; Shinagawa, S.; Assai, M.; Okazaki, Sugiyama, Y.; Fujita, T.; Iwatsuka, H.; Yoneda, M. *Life. Sci.* **1985**, 37, 217; b) Shinagawa, S.; Kanamaru, T.; Harada, S.; Assai, M.; Okazaki, H. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1458.

¹⁷ Guenard, D.; Gueritte-Voegelein, F.; Poitier, P. *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 160.

¹⁸ Rich, D. H.; Moon, B. J.; Harbeson, S. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 417.

¹⁹ Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2797.

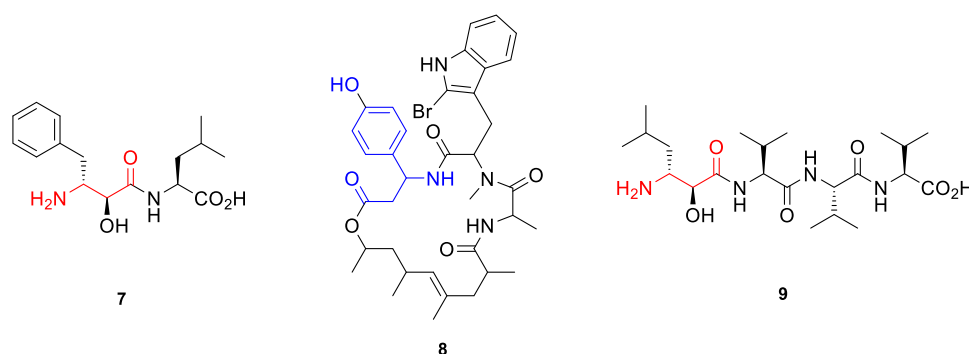


Figura 5. Ejemplos de péptidos naturales que contienen β -aminoácidos: bestatina (7), amastatina (9) y jasplakinolide (8).

Los β -aminoácidos son los candidatos ideales para reemplazar a los α -aminoácidos en los α -péptidos, dado que sólo se diferencian de los α -aminoácidos en un átomo de carbono adicional, situado entre los grupos amino y carboxilo terminales (Figura 6).²⁰ Esta diferencia estructural se traduce en notables ventajas cuando se incorporan en péptidos, siendo una de las principales el incremento significativo de la diversidad estructural que permiten generar.

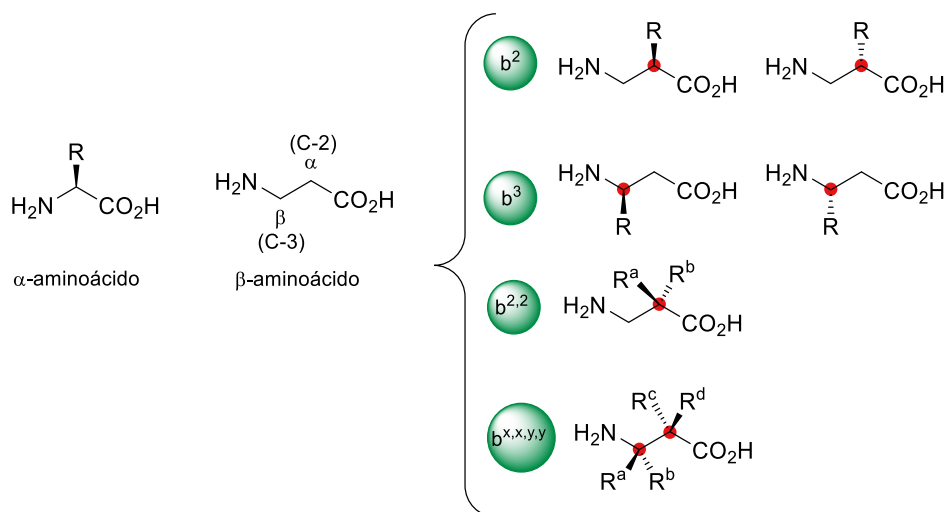


Figura 6. Diversidad estructural de los β -aminoácidos con respecto a los α -aminoácidos.

Si en los α -aminoácidos proteinogénicos se inserta un grupo metileno entre el carboxilo y el amino se genera el panel de los β -aminoácidos que han sido denominados proteinogénicos. Así, a partir de la α -glicina ($\text{R}=\text{H}$) resulta únicamente la β -glicina. Sin embargo, cada uno de los restantes diecinueve α -aminoácidos proteinogénicos permite generar un total de cuatro β -aminoácidos: dos β^2 -aminoácidos enantioméricos, en los que

²⁰ Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 1111.

el sustituyente se encuentra dispuesto en el carbono de la posición C-2, y dos β^3 -aminoácidos enantioméricos, con el sustituyente dispuesto en la posición C-3.²¹

Las posibilidades de diversidad estructural en β -aminoácidos se ven incrementadas todavía más al contemplar la posibilidad de polisustitución ($\beta^{2,2}$ y $\beta^{x,x,y,y}$ de la Figura 6), que amplía enormemente la diversidad estructural en relación con los α -aminoácidos.

Otro aspecto destacable de los β -aminoácidos es la resistencia a la proteólisis que aportan cuando se incorporan en péptidos. Éstos, al ser tratados con proteasas, permanecen inalterados durante días, mientras que los correspondientes α -péptidos se descomponen en pocos minutos.²² El mecanismo propuesto para explicar la estabilización de un enlace peptídico cuando un β -aminoácido ocupa la posición de un α -aminoácido, reside en el hecho de que el átomo de carbono adicional que contiene su esqueleto desplaza el enlace peptídico del sitio activo de la proteasa (Figura 7).

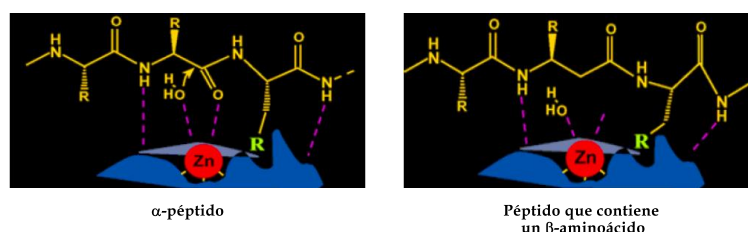


Figura 7. Representación de la unión enzima-sustrato de un α -péptido y de un mimético que contiene un β -aminoácido.

La molécula de agua coordinada al zinc presente en el centro activo de la proteasa puede llevar a cabo el ataque proteolítico sobre el carbonilo escindible para el caso del α -péptido. Por el contrario, esta interacción no puede existir para el péptido que contiene en su secuencia un β -aminoácido, porque el carbonilo ahora no se encuentra en la posición adecuada para la proteólisis, aunque el peptidomimético puede unirse igualmente al centro activo y bloquear la enzima.

1.1.2.2 β -péptidos

Al igual que los α -péptidos, los β -péptidos pertenecen a una clase de polímeros que tienden a formar plegamientos estables, dando lugar a conformaciones compactas y bien definidas.²³ Los β -péptidos juegan por tanto un papel muy importante en el estudio de la estructura de las proteínas, así como en su estabilización, debido a que los β -aminoácidos son los aminoácidos no naturales estructuralmente más parecidos a los α -aminoácidos.²⁴



²¹ Aguilar, M. -I.; Purcell, A. W.; Devi, R.; Lew, R.; Rossjohn, J.; Smith, A. I.; Perlmutter, P. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2884.

²² Seebach, D.; Abele, S.; Schreiber, J. V.; Martinoni, B.; Nussbaum, A. K.; Schild, H.; Schulz, H.; Hennecke, H.; Woessner, R.; Bitsch, F. *Chimia* **1998**, *52*, 734.

²³ (a) DeGrado, W.F.; Scheider, J.P.; Hamuro, Y. *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 206. (b) Gademann, K.; Hintermann, T.; Schreiber, J.V. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 905.

²⁴ Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219.

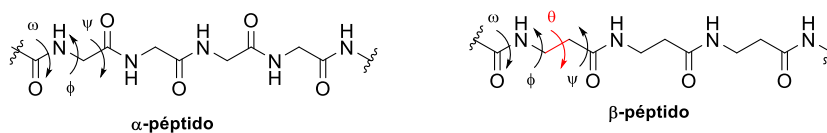


Figura 8. Ángulos de torsión de los α -péptidos y de los β -péptidos.

Las conformaciones de los β -péptidos se estudian analizando los ángulos de torsión ω , ϕ y θ de su cadena carbonada (Figura 8), siguiendo la convención de Balaram.²⁵ La presencia de un átomo de carbono adicional en cada residuo del β -péptido, en relación con los α -péptidos, debería dificultar el plegamiento de los β -péptidos, al ser necesario superar una elevada entropía conformacional en los procesos de autoorganización. Sin embargo, el grupo de Seebach observó que los β -péptidos se pliegan de manera más predecible y rápida que los α -análogos,²⁶ haciendolo en los mismos tipos de plegado que los α -péptidos (hélices, láminas, giros, etc.). Esto ha sido relacionado con la especial estabilidad de las posibles conformaciones que pueden adoptar (*anti* y *gauche*), tomando como referencia el enlace C α -C β de los restos de β -aminoácido (Figura 9).

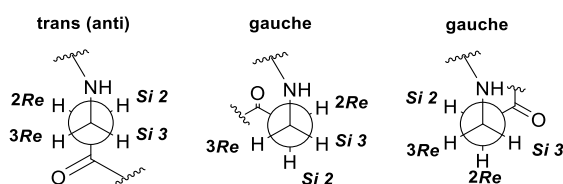


Figura 9. Rotámeros, para la β -alanina a través del ángulo de torsion θ .

Una conformación *gauche* del ángulo θ definido por el enlace (C-2)- (C-3) da lugar a estructuras de tipo hélice y bucle. Un rotámero *anti* genera una conformación peptídica totalmente extendida, lo que refuerza la formación de estructuras laminares.

Los efectos de los sustituyentes en la conformación de los β -aminoácidos, que influyen decisivamente sobre las propiedades de plegado de los β -péptidos, han sido objeto de muchos estudios experimentales, así como de cálculos de orbitales, de mecánica y de dinámica moleculares (Figura 10).

²⁵ Banerjee, A.; Balaram, P. *Curr. Science*, **1997**, *73*, 1067.

²⁶ (a) Seebach, D. Matthews, A. Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173. (b) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043. (c) Seebach, D.; Hook, D. F. *Peptide Science* **2006**, *84*, 23. (d) Seebach, D.; Gardiner, J. *ASAP Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1366-1375.

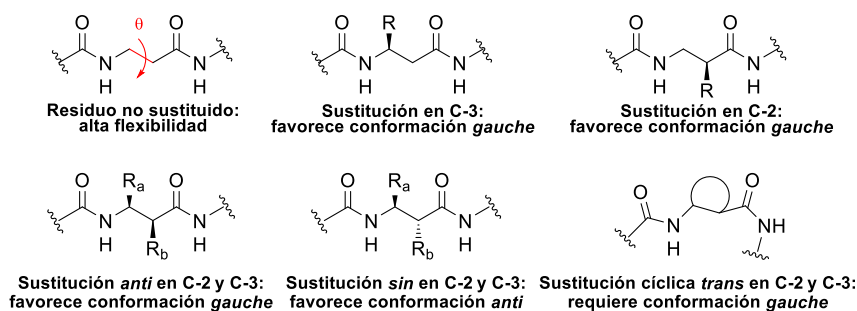


Figura 10. Efecto de los sustituyentes en el ángulo de torsión θ .

Como se observa en la Figura 10 la β -glicina, único β -aminoácido no sustituido, presenta como conformación más estable la *anti*. La adición de un grupo metileno con respecto a su análogo α no aporta ninguna rigidez, por lo que el comportamiento de ambos será muy semejante. Por el contrario, los restantes β -aminoácidos, sustituidos en C₂ y/o C₃, ven favorecida la conformación *segsada*. Como consecuencia, sus péptidos tienen más tendencia a plegarse como hélices o como giros.

La nomenclatura de las hélices de los β -péptidos no es única, por lo que en esta Tesis Doctoral se ha optado por emplear la convención establecida por Gellman, que utiliza como criterio el número de átomos que forman el anillo descrito por el enlace de hidrógeno.

Se han descrito para los β -péptidos la diversidad de plegados en hélice que se muestran en la Figura 11.²⁴

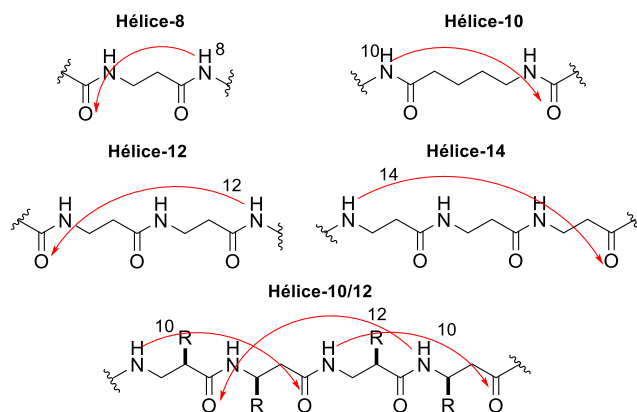


Figura 11. Nomenclatura de las hélices de los β -péptidos.

Nos referiremos a continuación a las tres hélices más comunes en los β -péptidos (hélice-14, hélice-12 y hélice-10/12) y a los dos tipos de conformaciones laminares.

Conformación del tipo hélice-14: La conformación de la hélice-14 está estabilizada por la presencia de enlaces de hidrógeno del protón de la amida en un residuo *i* y el carbonilo del residuo *i*+2 de la cadena peptídica, formando una secuencia de anillos interconectados de 14 miembros (Figura 12). Este tipo de hélice específica se caracteriza por poseer valores de -134° para su ángulo ϕ , 60° para su ángulo θ , -140° para su ángulo

ψ y 180° para su ángulo ω , presentando también un radio de hélice de 2.7 \AA , una ratio de residuos por vuelta de 3.0 unidades y un paso de hélice de 4.7 \AA Tabla 1. Comparándola con la hélice- α , la hélice-14 tiene un radio ligeramente más amplio y se necesitan menos residuos para generar una vuelta de hélice.

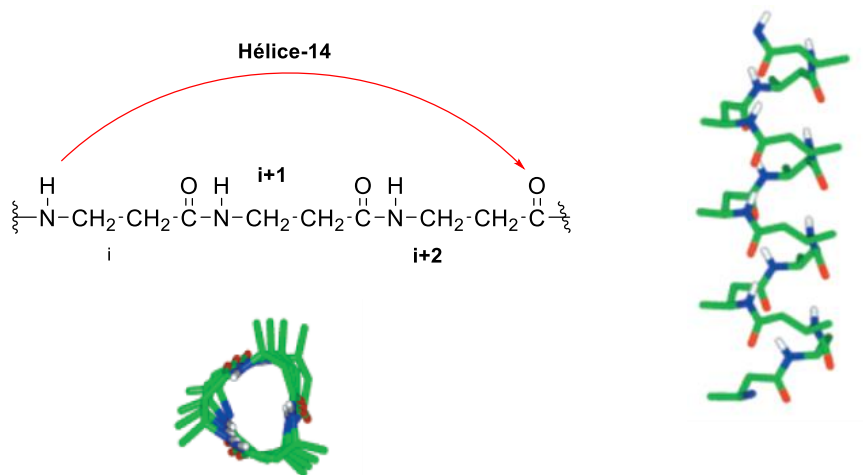


Figura 12. Representación de la hélice 14, vista longitudinal (derecha) y transversal (inferior).

Un ejemplo de hélice-14 es la adoptada por el β -péptido constituido por seis unidades de ácido (1*S*,2*S*)-*trans*-2-aminociclohexanocarboxílico que se pliega como una hélice bien definida en disolución de metanol y en estado sólido (Figura 13).^{27,28}

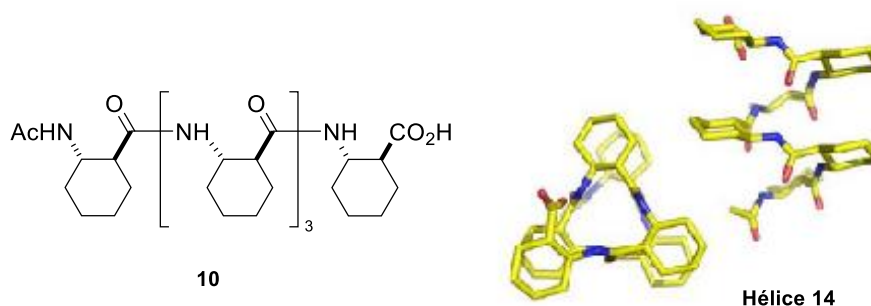


Figura 13. Ejemplo de plegamiento de una hélice-14. Vista transversal y longitudinal.

Conformación del tipo hélice-12: La conformación del tipo hélice-12 está estabilizada por enlaces de hidrógeno entre el carbonilo de la amida del residuo i y el protón de la amida del residuo $i+3$, formando una serie de anillos interconectados de 12 eslabones (Figura 14). Este tipo de hélice específica se caracteriza por poseer valores de 95° para su ángulo ϕ , -94.3° para su ángulo θ , 103° para su ángulo ψ y -180° para su ángulo ω , presentando también un radio de hélice de 2.3 \AA , una ratio de residuo por vuelta de 2.5 unidades y un paso de hélice de 5.3 \AA . Los $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos

²⁷ Applequist, J.; Bode, K. A.; Apella, D. H.; Christianson, L. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Soc. Soc.* **1998**, *120*, 4891.

²⁸ Chem. Commun., **2019**, 55, 3061--3064

son particularmente interesantes, porque generan estructuras secundarias muy similares a las de los α -péptidos.

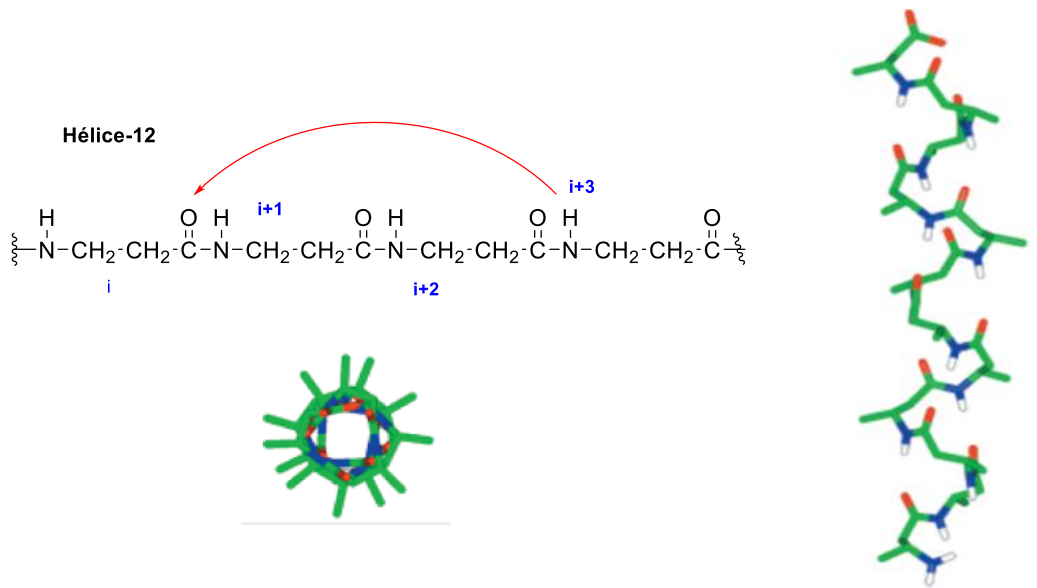


Figura 14. Representación de la hélice-12. Vista longitudinal (derecha) y transversal (inferior).

Conformación del tipo hélice-10/12: La característica principal de esta hélice es una combinación de enlaces de hidrógeno que alternan la formación de anillos interconectados de 10 y 12 eslabones. En este tipo de hélice las amidas rodeadas por grupos metileno se enlazan unas a otras (i , $i+2$) formando anillos de 10 miembros, mientras que los anillos de 12 átomos se forman entre las amidas rodeadas por las cadenas laterales ($i+1$, $i+3$) (Figura 15)

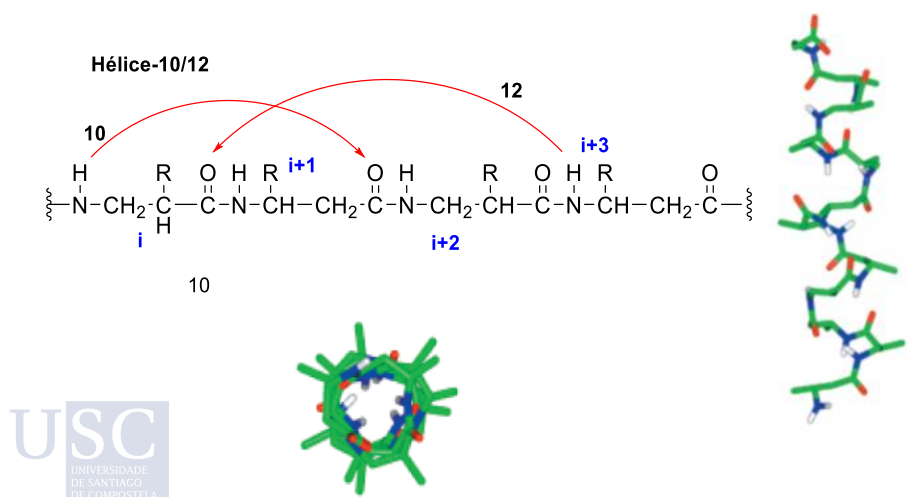


Figura 15. Representación de una hélice 10/12. Vista longitudinal (derecha) y transversal (inferior).

Características	ϕ (°)	θ (°)	ψ (°)	ω (°)	Radio (Å)	Residuo/vuelta	elevación/residuo (Å)	Paso de Hélice (Å)
α -Hélice	-57		-47	180	2.2	3.6	1.5	5.4
Hélice 12	95	-94	103	-180	2.3	2.5	2.1	5.3
Hélice 14	-134	60	-140	180	2.7	3.0	1.6	4.7

Tabla 1. Valores topológicos de las hélices de α -hélice y β -Péptidos.

Conformaciones laminares: Se conocen dos tipos de estructuras laminares posibles en los β -péptidos, una paralela y otra antiparalela. En la lámina β paralela, las dos cadenas están dispuestas en la misma dirección desde el extremo *N*- al *C*-terminal. Sin embargo, en la lámina β antiparalela, las dos cadenas están dispuestas en dirección opuesta una con respecto a la otra (Figura 16).

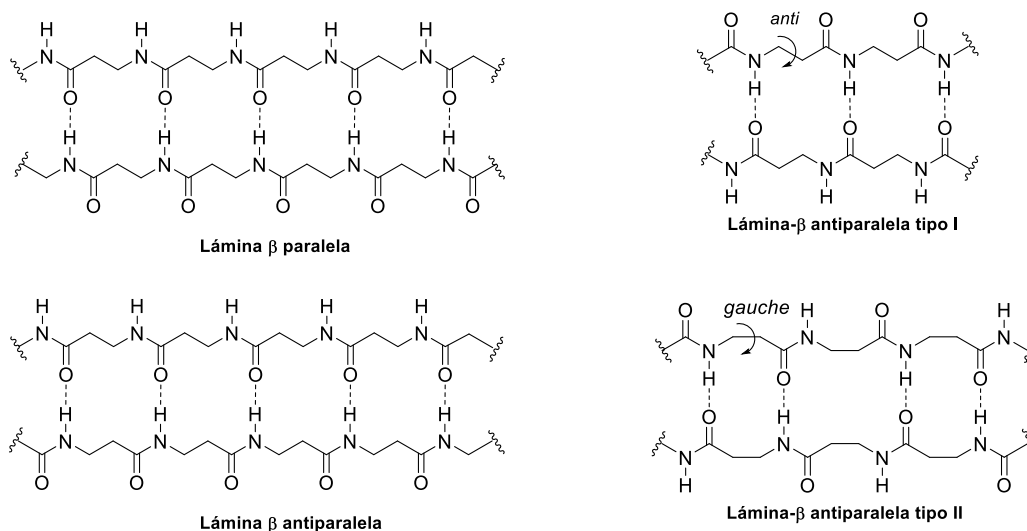


Figura 16. Representación de las dos posibles conformaciones laminares y tipos de láminas antiparalelas.

Además, existen dos tipos de láminas β antiparalelas: una en que cada residuo tiene una disposición *anti* del ángulo de torsión C_2-C_3 y otra en que cada residuo tiene una disposición *gauche* del ángulo de torsión. El *tipo I* de lámina β se distingue porque los grupos carbonilo del esqueleto están orientados aproximadamente en la misma dirección, lo que proporciona una lámina con un dipolo neto; en cambio, el *tipo II* se caracteriza porque el esqueleto alterna los carbonilos en la dirección de cada cadena, hecho que impide la aparición de un dipolo neto (Figura 16).

1.1.2.3 α,β -Péptidos

Además, de los β -péptidos, existen otros tipos de foldámeros que incorporan β -péptidos, entre ellos destacan los heterooligómeros (α,β) o péptidos mixtos (α,β), que disponen una estructura alternada un α -aminoácido con un β - aminoácido. Se ha encontrado que estos α,β -péptidos tienen una mayor diversidad estructural que los β -péptidos, pudiendo formar una mayor variedad de hélices, reflejadas en la Tabla 2 y en la Figura 17.

Características	ϕ (°)	θ (°)	ψ (°)	ω (°)
α -Hélice	-57.0	-	-47	180
Hélice 11	72/94	-/-77	20/87	-180
Hélice 14/15	-72/-116	-/78	-24/-130	-180
Hélice 9/11	148/-90	-/57	-42/90	-180
Hélice 11/9	64/-77	-59	-150/97	-180
	Radio (Å)	Residuo/ vuelta	elevación/ residuo (Å)	Paso de Hélice (Å)
α -Hélice	2.2	3.6	1.5	5.4
Hélice 11	2.0	2.2	0.9	5.5
Hélice 14/15	2.2	2.61	1.18	4.1
Hélice 9/11	2.3	3.3	1.4	5.7
Hélice 11/9	2.0	3.0	2.1	6.1

Tabla 2. Valores topológicos de las hélices de α,β -Péptidos.²⁹

Alguna de las hélices que se han encontrado y estudiado en este tipo de péptidos son las siguientes: hélice-11, hélice-11/9, hélice-9/11 y hélice-14/15 (Figura 17). Sus características topológicas aparecen recogidas en la Tabla 2.

²⁹ Carsten Baldauf, Robert Günther, Hans-Jörg Hofmann. *Biopolymers*, 2006, 84, 408-413.

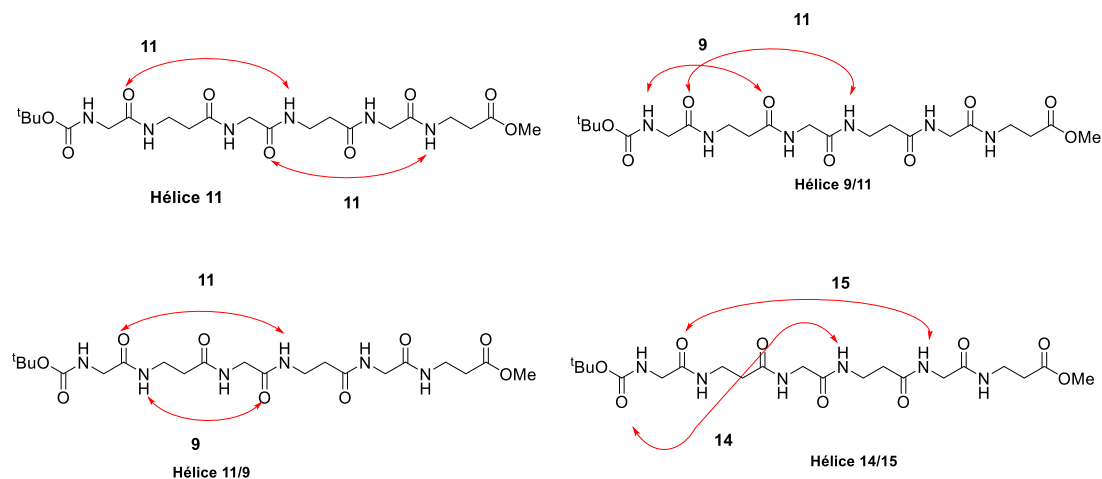


Figura 17. Nomenclatura de las helices de los α,β -péptidos.

Nos referiremos brevemente a los tres tipos de α,β -hélices más comunes (hélice-11, hélice-11/9 y hélice 9/11).

Conformación del tipo hélice 11: Se caracteriza, como en los casos previos, definiendo tanto sus ángulos diedros, como su radio, su ratio por vuelta y su paso de hélice. Los valores de los ángulos de las subunidades mixtas de α -aminoácidos y β -aminoácidos son las siguientes: α -aminoácidos ($\phi = 72^\circ$, $\psi = 20^\circ$) y β -aminoácido ($\phi = 94^\circ$, $\theta = -77^\circ$, $\psi = 87^\circ$). Presenta también un radio de hélice de 2.0 Å, una ratio de residuos por vuelta de 2.2 unidades y un paso de hélice de 5.4 Å, en la Figura 18 se puede observar un ejemplo de este tipo de hélice.

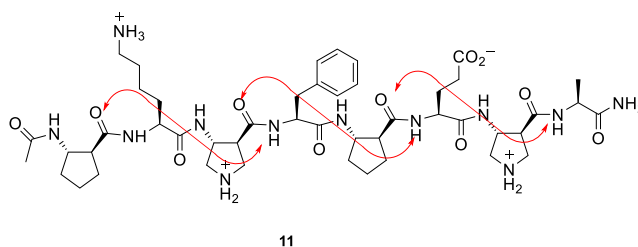


Figura 18. Ejemplo de α,β -péptido que adopta una conformación de hélice-11 en estado sólido.³⁰

Conformación del tipo hélice 11/9: Se caracteriza por los valores de los ángulos de las subunidades mixtas de α -aminoácidos y β -aminoácidos siguientes: α -aminoácidos ($\phi = 64^\circ$, $\psi = -150^\circ$) y β -aminoácido ($\phi = -78^\circ$, $\theta = -59^\circ$, $\psi = 97^\circ$). Presenta un radio de

³⁰ Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 13130–13131

hélice de 2.0 Å, una ratio de residuo por vuelta de 3.0 unidades y un paso de hélice de 6.1 Å.

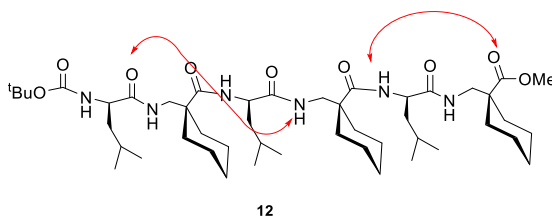


Figura 19 Ejemplo de α,β -péptido que adopta una conformación de hélice-11/9. ³¹

Conformación del tipo hélice 9/11: Otra estructura secundaria que pueden adoptar los α, β -péptidos es la hélice 9/11. Los valores de los ángulos de las subunidades mixtas de α -aminoácidos y β -aminoácidos son las siguientes: α -aminoácidos ($\phi = 147^\circ$, $\psi = -42^\circ$) y β -aminoácido ($\phi = -90^\circ$, $\theta = 57^\circ$, $\psi = 90^\circ$), así como un radio de hélice de 2.3 Å, una ratio de residuos por vuelta de 3.25 unidades y un paso de hélice de 5.7 Å.³²

Los α,β -péptidos presentan funciones biológicas únicas y muy considerables como pueden ser:

- **Antiviral:** Se conocen estudios donde los α,β -péptidos han sido utilizados para bloquear la subunidad GP41 proteína necesaria para la unión del virus del VIH a las células huésped, estos estudios demostraron ser que este tipo de péptidos eran también muy eficientes contra las proteasas del VIH.³³

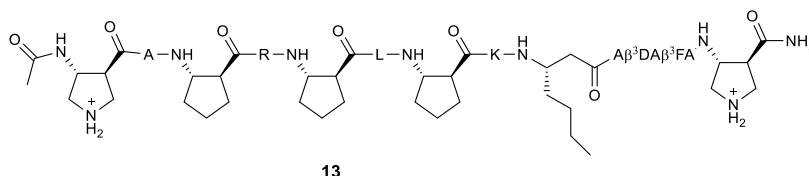


Figura 20. α,β -péptido, donde se indica los α -aminoácidos con su código de una letra.

- **Inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular:** Se han sintetizado y testado peptidomiméticos del factor de crecimiento endotelial vascular en los que sustituyó parte de los α -aminoácidos por β -aminoácidos. Estos peptidomiméticos mostraron la misma afinidad por el receptor y una mayor resistencia a la proteólisis cuando la sustitución de los residuos α -aminoácidos por β -aminoácidos no fue superior al 30%.³⁴

³¹ Basuroy, Krishnayan; Karuppiyah, Vasantham; Balaram, Padmanabhan. *Organic Letters*, **2014**, *16*, 4614-4617.

³² Sharma, G. V. M., Sridhar, T., Reddy, P. P., & Kunwar, A. C. (2013). *European Journal of Organic Chemistry*, **2013**, *17*, 3543–3554.

³³ Horne, W. S.; Johnson, L. M.; Ketas, T. J.; Klasse, P. J.; Lu, M.; Moore, J. P.; Gellman, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 14751–14756.

³⁴ Haase, H. S.; PetersonKaufman, K. J.; Levengood, S. K. L.; Checco, J. W.; Murphy, W. L.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7652–7655

- *Antimicrobiano*: En esta línea de trabajo ya se han logrado algunos resultados muy satisfactorios y prometedores, como el α,β -péptido **14** (Figura 21), que demostró poseer actividad como antibiótico.³⁵

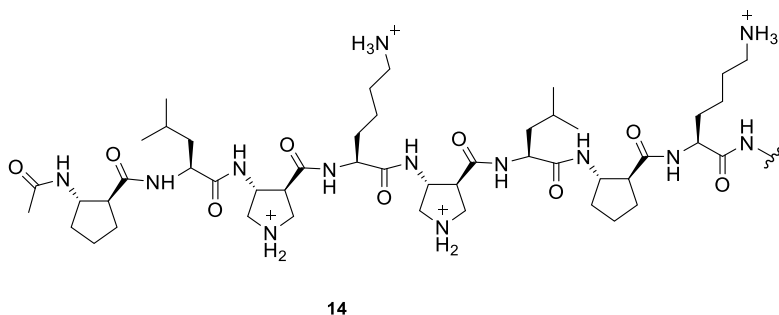
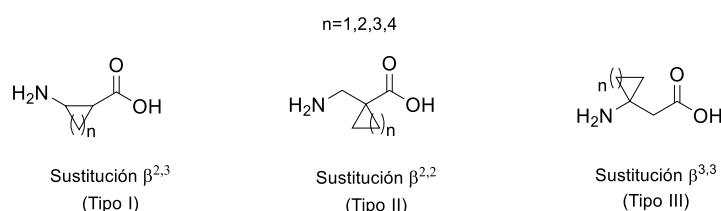


Figura 21.

1.1.3 $\beta^{2,3}$ -Aminoácidos ciclopentánicos y sus péptidos

Como se ha indicado, los β -aminoácidos son los candidatos ideales para reemplazar α -aminoácidos en los α -péptidos, al permitir generar peptidomiméticos que conservan e incluso mejoran las propiedades biológicas de los α -péptidos, mostrándose una mayor estabilidad conformacional, que se traduce en una mejor interacción con los receptores enzimáticos y en la ausencia de efectos secundarios. Además, su mayor estabilidad metabólica determina que tengan una vida media mayor.

Particularmente interesantes para estos propósitos son los β -aminoácidos cicloalcánicos, que pueden ser de tres tipos, como se representa en la Figura 22.

Figura 22. Tipos de β aminoácidos cicloalcánicos.

El primer tipo son los $\beta^{2,3}$ -aminoácidos cicloalcánicos (*Tipo I*), que con estructura ciclopentánica son tratados en el capítulo 3.1 de esta Tesis. El segundo tipo son los $\beta^{2,2}$ -aminoácidos cicloalcánicos (*Tipo II*), que con estructura ciclopentánica se abordan en el capítulo 3.2 y con estructura ciclohexánica en el capítulo 3.3, también de esta Tesis. Y, por último, están $\beta^{3,3}$ -aminoácidos cicloalcánicos (*Tipo III*), que no son objeto de estudio de esta Tesis.

Por lo tanto, en esta tesis doctoral nos referimos primero al caso de los ácidos 2-aminociclopentanocarboxílicos, cuyos cuatro estereoisómeros son conocidos, siendo

35 (a) Epand, R. F.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *17*, 1343–1350. (b) Gellman, S.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12447.

particularmente interesante la cispentacina (**15**) (isómero *R, S*), un compuesto natural aislado de *Bacillus cereus* y de *Streptomyces setonii*, que presenta una potente actividad antifúngica contra *Candida albicans*.³⁶

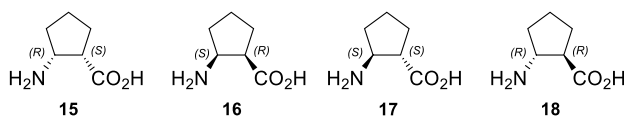


Figura 23. $\beta^{2,3}$ -Aminoácidos ciclopentánicos no sustituidos.

Un caso relevante de incorporación de estos β -aminoácidos ciclopentánicos en péptidos está relacionado con la morficeptina (**19**) (Figura 24), que es un péptido opioide con importantes propiedades analgésicas, pero cuya utilización como fármaco presenta la limitación de su baja estabilidad metabólica, razón por la que ha sido objeto de numerosos estudios destinados a preparar peptidomiméticos con propiedades más convenientes.³⁷

Un peptidomimético de la morficeptina es el péptido **20** (Figura 24), que resulta de sustituir la unidad central de prolina de la morficeptina por una unidad de cispentacina (**16**). Este peptidomimético resultó ser seis veces más activo frente al receptor μ -opioide y veinte veces más activo frente al receptor δ -opioide que la propia morficeptina.³⁸

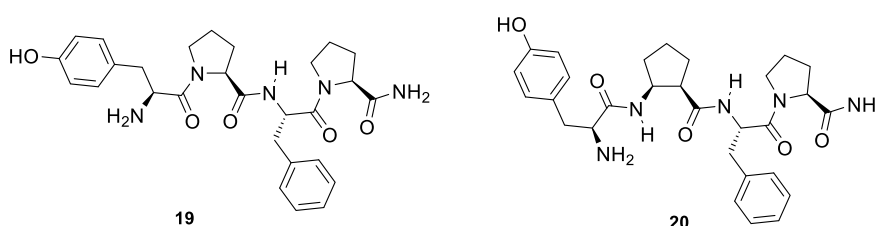


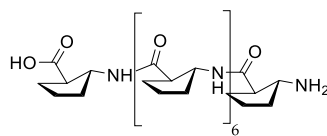
Figura 24. Morficeptina (**19**) y un peptidomimético de la misma **20**.

Por otra parte, el profesor Gellman ha llevado a cabo diversos estudios sobre péptidos de los ácidos 2-aminociclopentanocarboxílicos, habiendo encontrado que sus homopolímeros muestran una gran tendencia a plegarse en hélices-12 de gran rigidez conformacional, en secuencias peptídicas muy cortas.

³⁶ (a) Konishi, M.; Nishio, M.; Saitoh, K.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1749. (b) Kawabata, K.; Inamoto, Y.; Sakana, K.; Iwamoto, T.; Hashimoto, S. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 513. (c) Iwamoto, T.; Tsujii, E.; Ezaki, M.; Fujie, A.; Hashimoto, S.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Imanaka, H.; Kawabata, K. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1.

³⁷ Chang, K. J.; Lillian, A.; Hazum, E.; Cuatrecasas, P.; Chang, J. K. *Science* **1981**, *212*, 75.

³⁸ (a) Yamazaki, T.; Pröbsti, A.; Schiller, P. W.; Goodman, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 364-381. (b) Mierke, D. F.; Nossner, G.; Schiller, P. W.; Goodman, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 35-45.



21
Homopolímero de ácido
trans-2-aminociclopentanocarboxílico

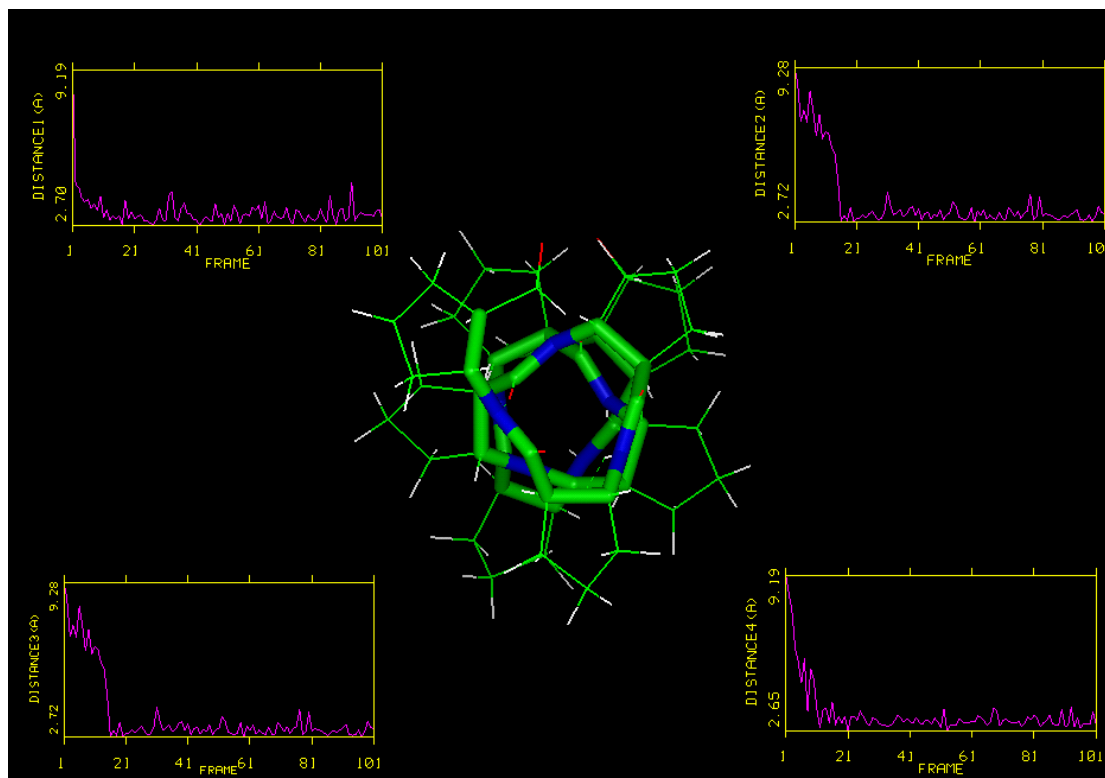


Figura 25. Representación de la longitud de los cuatro enlaces de hidrógeno frente al tiempo durante la modelización de la estructura helicoidal.

La gran estabilidad conformacional de las hélices de los homopolímeros de ácidos 2-aminociclopentanocarboxílicos viene puesta de manifiesto por las cuatro gráficas que acompañan la visión transversal de la hélice del octapéptido **21** (Figura 25), generadas mediante estudios de modelización molecular llevados a cabo en nuestro grupo de investigación. Se puede observar que una vez formados los cuatro enlaces de hidrógeno, su longitud experimenta oscilaciones muy pequeñas, lo que constituye una evidencia de la gran rigidez conformacional (estabilidad termodinámica) de la hélice.

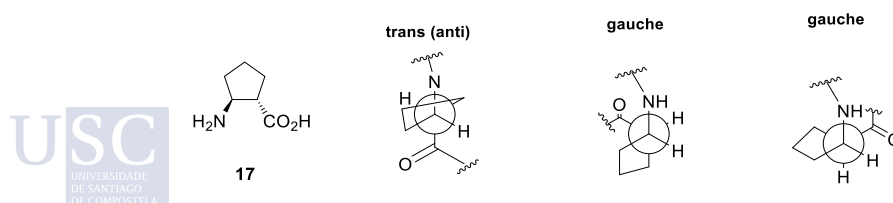


Figura 26. Conformaciones de los $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos.

Como ya se indicó en el apartado sobre β -péptidos (pág. 8), en los $\beta^{2,3}$ -aminoácidos cicloalcanicos está favorecida la conformación *gauche* con respecto a la *anti*. Esta

conformación *gauche* está más fuertemente favorecida cuando las posiciones C₂ y C₃ forman parte de un anillo, como en el caso del ácido *trans*-2-aminociclohexanocarboxílico **17**³⁹ mostrado en la Figura 27. Este hecho es el que determina la mayor tendencia que muestran sus homopolímeros a plegarse, la mayor rigidez conformacional y que se produzcan plegados en secuencias peptídicas cortas, bastando sólo cuatro unidades para que se forme un enlace de hidrógeno intramolecular.

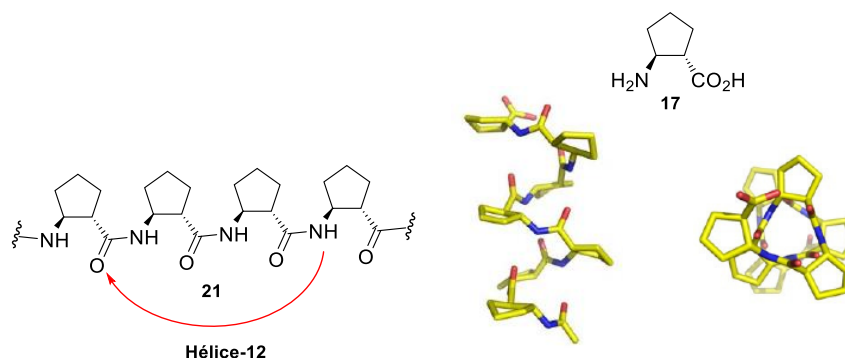


Figura 27. Vista lateral y superior de la hélice-12 de los homopolímeros de los ácidos *trans*-2-aminociclopentanocarboxílicos.

También es conocido que estos $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos pueden presentar otros tipos de plegados, dependiendo de su estereoquímica. Fülöp demostró que los homoligómeros formados por el ácido (*1R,2S*)-aminociclopentanocarboxílico **16**, con disposición *cis* de los grupos amino y carboxilo, se pliegan en forma de lámina β ,⁴⁰ habiéndose encontrado también que el heteropolímero constituido por residuos alternos del ácido (*1S,2R*)-aminociclopentánico **15** y su enantiómero, el ácido (*1R,2S*)-aminociclopentanocarboxílico **16**, se pliegan como hélices 10/12.⁴¹

Otro caso característico es el heteropolímero constituido por secuencias alternas de ácido (*1S,2S*)-2-aminociclopentanocarboxílico **17** y el ácido (*1S,2S*)-2-aminociclohexanocarboxílico **22** que se pliegan formando una hélice 14⁴² (Figura 28).

³⁹ (a) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071. (b) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206.

⁴⁰a) Tamás A. Martinek, Anasztázia Hetényi, Lívía Fülöp, István M. Mándity, Gábor K. Tóth, Imre Dékány, Ferenc Fülöp. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2396–2400. b) Martinek, T. A.; Toth, G. K.; Vass, E.; Hollosi, M.; Fulop, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1718-1721.

⁴¹ Tamás A. Martinek, István M. Mándity, Lívía Fülöp, Gábor K. Tóth, Elemér Vass, Miklós Hollósi, Eniko Forró, and Ferenc Fülöp. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13539-13544

⁴² Dr. Fredy Sussman, Prof. Víctor M. Sánchez-Pedregal, Prof. Juan C. Estévez, Rosalino Balo, Prof. Jesús Jiménez-Barbero, Dr. Ana Ardá, Dr. Ana Gimeno, Dr. Miriam Royo, Prof. M. Carmen Villaverde, Prof. Ramón J. Estévez. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10625–10629.

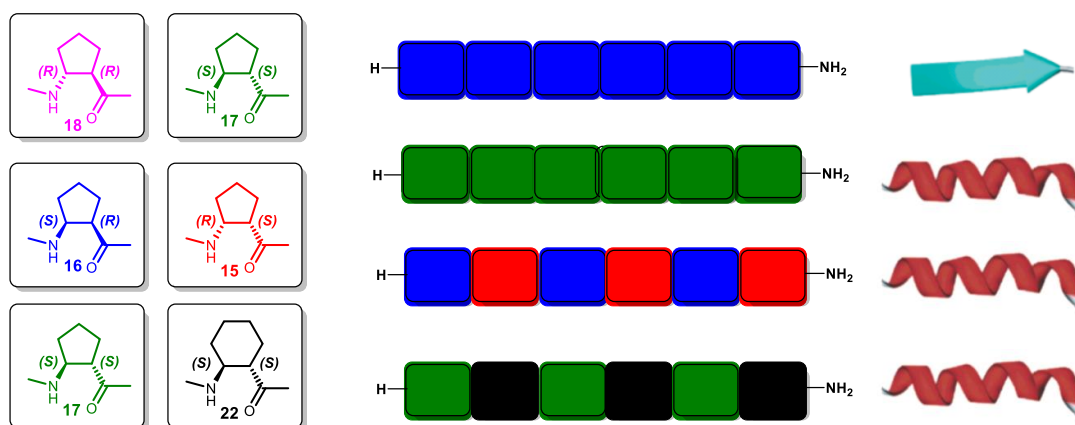
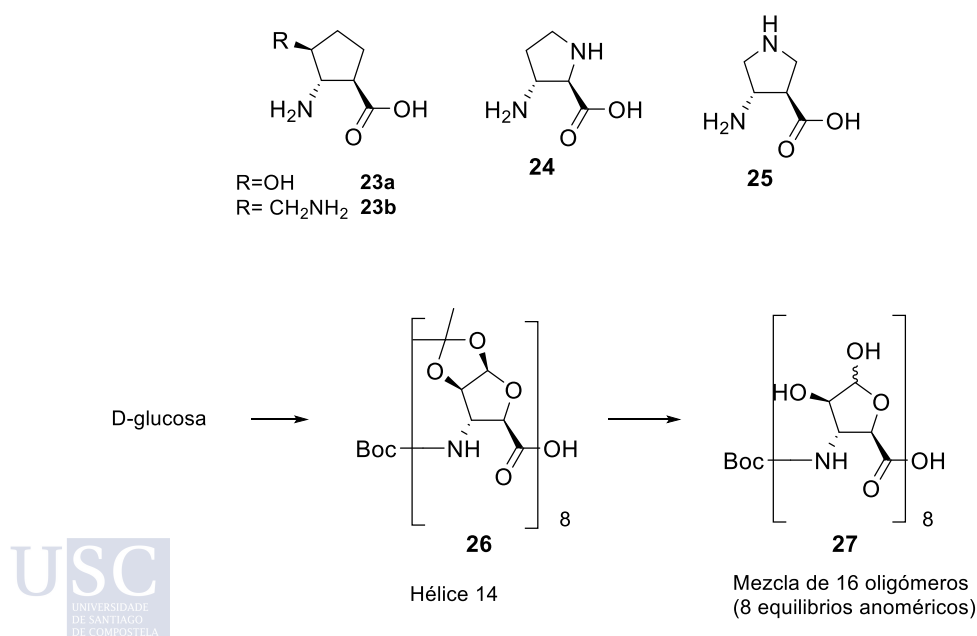


Figura 28. Relación entre la composición de los diferentes tipos de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos que constituyen los β -péptidos y su conformación.

A pesar del interés evidente de los β -aminoácidos ciclopentánicos, su número es limitado, debido a las dificultades encontradas para sintetizar aminoácidos sustituidos en el anillo, como manera de incrementar significativamente su diversidad y consiguientemente la diversidad y funcionalidad de los péptidos correspondientes.

Una de las funcionalidades de mayor interés es el de la solubilidad en agua.

Una primera aportación a esta problemática de solubilidad de péptidos, que resultó ser de alcance limitado, consistió en insertar en péptidos el β -aminoácido monohidroxilado **23a** o los β -aminoácidos **23b**, **24** e **25**, con un átomo de nitrógeno susceptible de protonarse en medio ácido.³⁵



Esquema 1. β -aminoácidos sustituidos en el anillo ciclopentánico.

Una segunda alternativa, representada por el péptido **26**, consistió en considerar el empleo de β -aminoácidos derivados de carbohidratos. Se trata de una alternativa

extraordinariamente interesante, al combinar la capacidad de creación de diversidad química proporcionada por los azúcares con la capacidad para generar péptidos liposolubles (grupos OH protegidos) o hidrosolubles (grupos OH libres). Sin embargo no ha sido suficientemente explotada por dos razones: a) en casos como **26**, al retirar el grupo protector de los grupos hidroxilo, con vistas a obtener el péptido **27**, soluble en agua, lo que se genera realmente en una mezcla de 16 péptidos, como resultado de la presencia de ocho equilibrios anoméricos; b) la presencia de heteroátomos en el sistema anular afecta sustancialmente las propiedades de plegado: el péptido **26** se pliega como una hélice-14, en lugar de plegarse como una hélice-12, como lo hace su análogo carbocíclico sin sustituyentes en el anillo.

Es evidente que podrían ser particularmente interesantes para estos propósitos los β -aminoácidos ciclopentánicos con sustituyentes hidroxilo, toda vez que abrirían la posibilidad de acceder a péptidos hidrofílicos o lipofílicos, según que los grupos hidroxilo se encuentre libres o protegidos. Su condición de carboazúcares evita estos dos problemas de los β -aminoácidos de azúcares, al desaparecer los problemas de la presencia de equilibrios anoméricos y de heteroátomos endocíclicos.

Un indicio en este sentido lo constituye el caso de β -péptido **28**, un homopolímero con sustituyentes metoxilo en sus ocho anillos de ciclopentano. Un estudio de modelización molecular llevado a cabo en nuestro grupo de investigación permitió predecir que se conservan las propiedades de plegado de su análogo sin sustituyentes, al haberse establecido que se pliega como una hélice-12, con los grupos metoxilo orientados hacia el exterior de la hélice, cumpliéndose con ello un requisito estructural imprescindible para la solubilidad en agua.

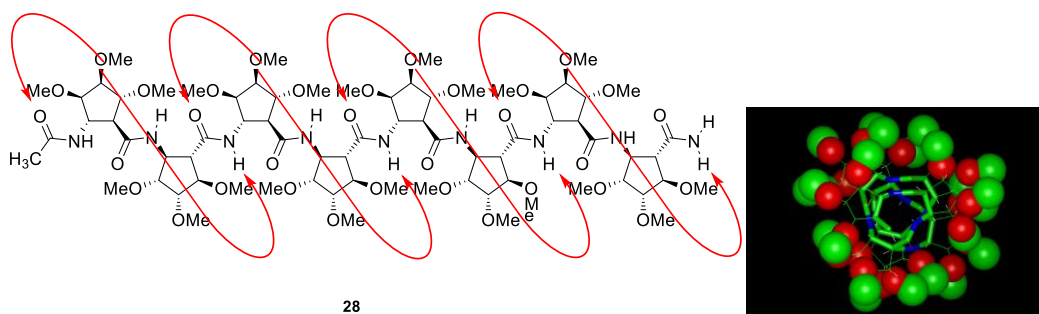


Figura 29. Hélice-12 teórica y su vista transversal para el péptido **28**.

Ahora bien, a pesar de su potencialidad, la diversidad de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos hidroxilados conocidos es todavía limitada. Siendo únicamente conocidos los que aparecen relacionados a continuación en la Tabla 3.

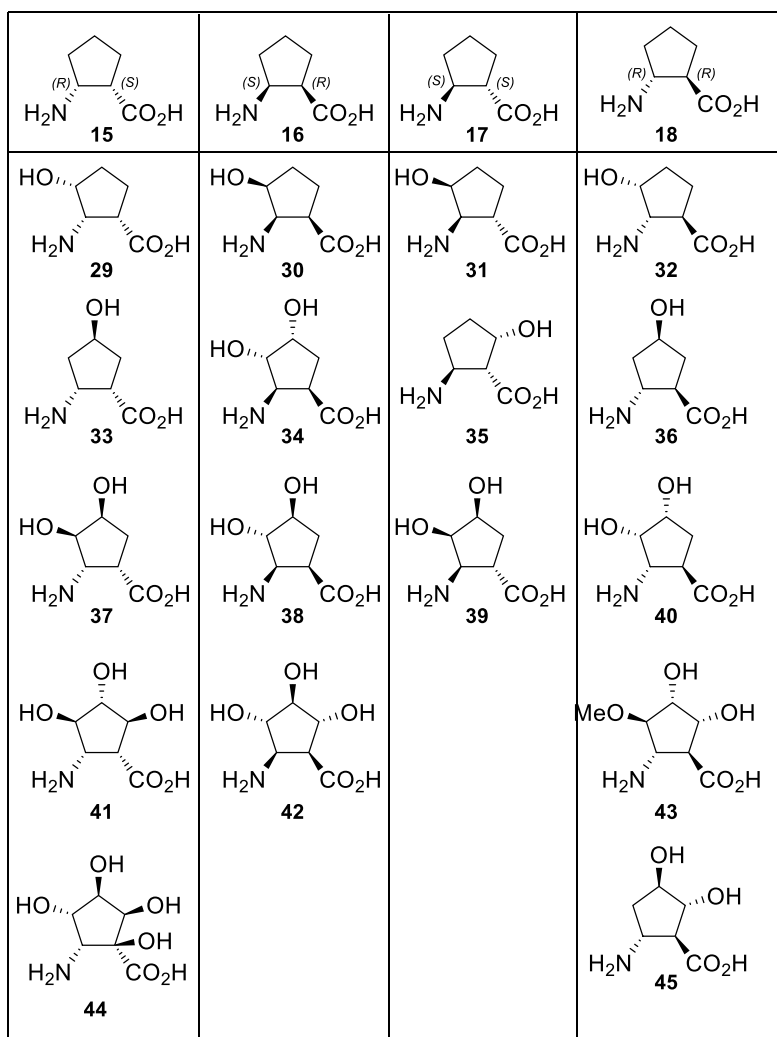


Tabla 3. $\beta^{2,3}$ -Aminoácidos ciclopentánicos hidroxilados descritos en la bibliografía.

Algunos de estos β -aminoácidos han sido utilizados para preparar peptidomiméticos. Es el caso de los $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos **42**, **38** y **30**,⁴³ que se introdujeron en la posición central de la morficeptina (**19**) en lugar de la correspondiente prolina, para dar lugar a los péptidos **46a**, **46b** y **46c**. También el $\beta^{2,3}$ -aminoácido ciclopentánico **44**,⁴⁴ que se incorporó a la Trehazolina, un potente inhibidor de la trehalasa, en lugar de la glucosa, eliminando de esta forma la problemática de los equilibrios anoméricos presentes en los azúcares (Figura 30). Con la introducción de estos $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados se busca una mejor solubilidad en agua, manteniendo intactos las demás propiedades biológicas.



⁴³ a) R. Soengas, M. Lorca, B. Pampín, V.M. Sánchez-Pedregal, R.J. Estévez, J.C. Estévez. *Molecules*, **2020**, *25*, 2574.
b) Gabriella Benedek, Márta Palkó, Edit Wéber, Tamás A. Martinek, Enikő Forró, Ferenc Fülöp. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *21*, 3724–3730

⁴⁴ Elliott, R. P., Hui, A., Fairbanks, A. J., Nash, R. J., Winchester, B. G., Way, G. Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Letters*, **1993**, *34*, 7949–7952.

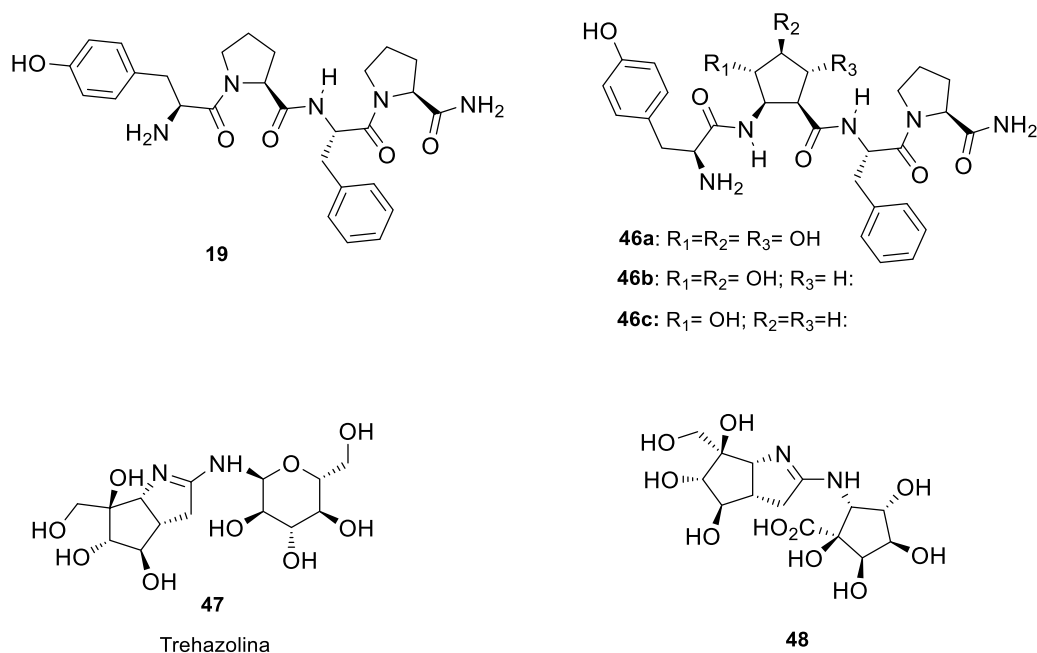


Figura 30. Peptidomiméticos preparados utilizando β -aminoácidos hidroxilados.

1.1.4 $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos y sus péptidos

El segundo objeto de interés de esta tesis son los ácidos 1-aminometilciclopentanocarboxílicos y sus péptidos.

La diversidad estructural de estos aminoácidos es todavía más limitada que la de sus análogos $\beta^{2,3}$. En la Figura 31 aparecen una relación de los $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos conocidos hasta el momento, de los cuales, con sustituyentes en el ciclo, se debe mencionar aquí el único componente descrito, con sustituyentes hidroxilo en el anillo. Se trata del compuesto **58**, que aparece recogido en base de datos de compuestos químicos comerciales, pero sin hacer mención a sus péptidos.

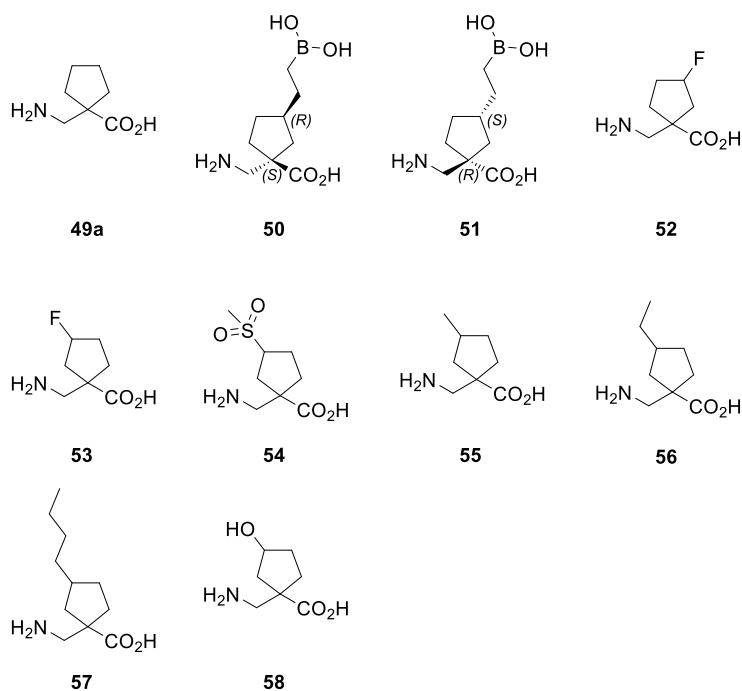


Figura 31. Relación de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos conocidos.

El hecho de que forme parte del anillo uno sólo de los dos átomos de carbono de la cadena principal del aminoácido, determina que los $\beta^{2,2}$ -aminoácidos cicloalcanicos presentan una rigidez conformacional menor que la de los $\beta^{2,3}$, lo que debería traducirse en una mayor flexibilidad conformacional de sus péptidos (Figura 32).

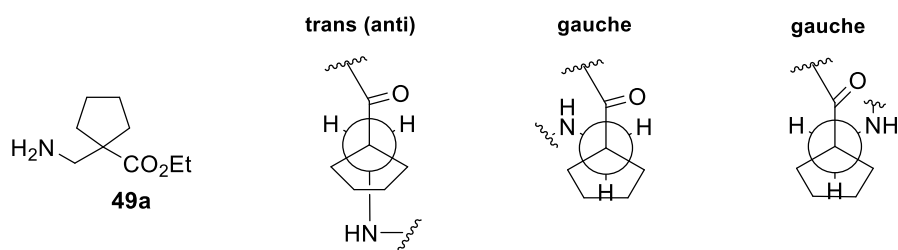


Figura 32. Diferentes conformaciones de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos cicloalcanicos.

Sin embargo, los péptidos que incluyen en su estructura $\beta^{2,2}$ -aminoácidos han recibido poca atención hasta el momento, lo que ha llevado a nuestro grupo de investigación a interesarse por estos compuestos como se describirá más adelante.

1.1.5 $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclohexánicos y sus péptidos

El tercer tipo de aminoácidos que estudiamos son los ácidos 1-metilciclohexanocarboxílicos y sus péptidos.

La diversidad estructural de los ácidos 1-aminometilciclohexanocarboxílicos es también escasa. En la Figura 33 aparecen la relación de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclohexánicos

conocidos hasta el momento; de estos $\beta^{2,2}$ -aminoácidos sólo se describe su incorporación en péptidos para el compuesto **59**.⁴⁵

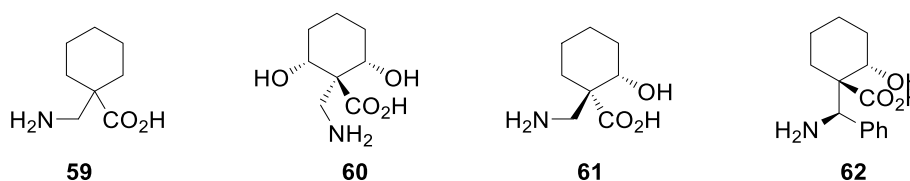


Figura 33. Relación de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclohexánicos conocidos.

Al igual que sus análogos ciclopentánicos, los ácidos 1-aminometilciclohexanocarboxílicos deberían conducir a péptidos con una rigidez conformacional menor que la de los péptidos de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos (ver Figura 32.). Sin embargo, sí se han descrito péptidos de estos aminoácidos que han resultado tener conformaciones secundarias estables similares a las de los péptidos de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos.^{45,31}

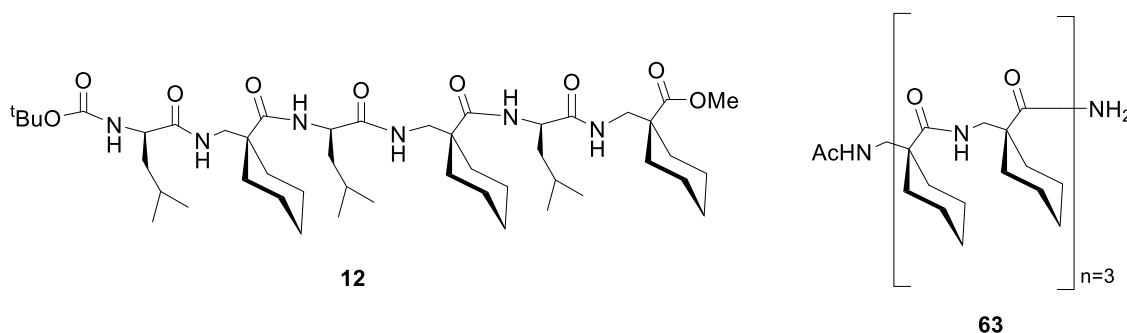


Figura 34. Relación de péptidos conocidos del $\beta^{2,2}$ -aminoácido **59**.

Los β -péptidos de estos β -aminoácidos ciclohexánicos tienen una gran tendencia a plegarse como hélices. El α,β -péptido **12**, como ya se explicó, presenta una conformación de hélice 11/9 y el β -péptido **63** una conformación de hélice 12/10.

2 OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo genérico diseñar y sintetizar β -aminoácidos conformacionalmente restringidos, más concretamente $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentano polihidroxilados, $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos, (sin sustituyentes y polihidroxilados en el anillo) y $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos, para abordar luego la preparación y estudio estructural de péptidos basados en estos aminoácidos, así como estudiar las propiedades gelificantes de algunos de sus derivados.

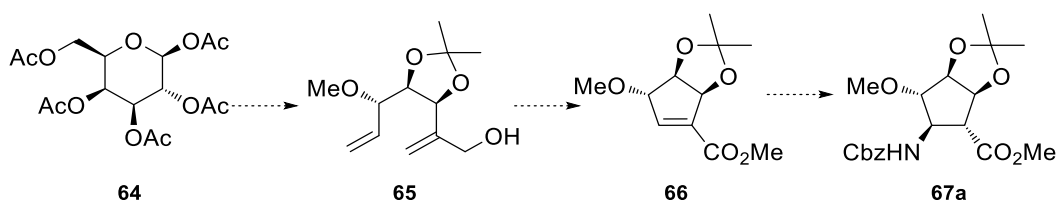
Con ello se pretende aportar nuevo conocimiento al diseño, síntesis y desarrollo de foldámeros que incluyan los tres motivos estructurales de los α -péptidos (hélices, giros y láminas), con vistas al desarrollo futuro de enzimas artificiales, nuevos materiales, fármacos, etc.

Enmarcados en este objetivo genérico, se plantearon en esta tesis doctoral los siguientes objetivos específicos:

2.1 SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE PÉPTIDOS DE $\beta^{2,3}$ -AMINOÁCIDOS CICLOPENTÁNICOS POLIHIDROXILADOS

2.1.1 Síntesis de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados

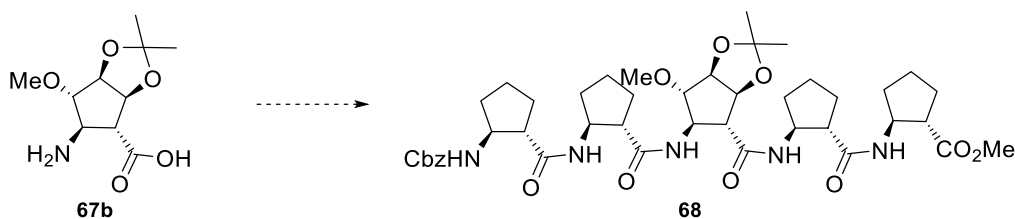
Se trata de optimizar la estrategia de síntesis del β -aminoácido ciclopentánico polihidroxilado **67a** a partir de la penta-*O*-acetil- β -D-galactopiranososa (**64**) (Esquema 2), desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación. Se pretende ahora obtener este aminoácido en cantidad suficiente, para abordar los estudios sobre péptidos a los que se refiere el subobjetivo 2.1.2.



Esquema 2. Plan de síntesis de $\beta^{2,3}$ -aminoácido ciclopentánico polihidroxilado **67a**.

2.1.2 Síntesis de β -péptidos derivados de $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánicos

Se plantea preparar el β -péptido **68**, derivado del $\beta^{2,3}$ -aminoácido ciclopentánico sin sustitución **18** y del $\beta^{2,3}$ -aminoácido ciclopentánico polihidroxilado **67b**, para comprobar mediante estudios estructurales las propiedades de plegado predichas mediante cálculos de modelización molecular llevados a cabo previamente en nuestro grupo de investigación.



Esquema 3. Hexapéptido 68.

2.2 SÍNTESIS Y ESTUDIO DE $\beta^{2,2}$ -AMINOÁCIDOS CICLOPENTÁNICOS Y SUS PÉPTIDOS

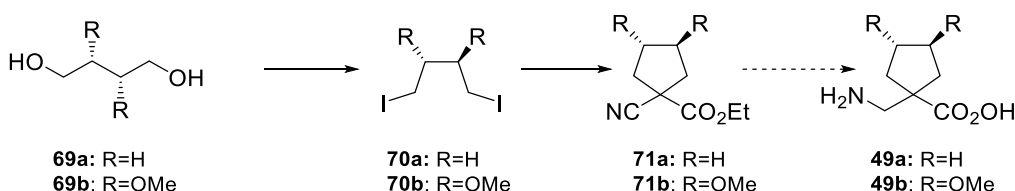
El presente objetivo forma parte de un proyecto más amplio, de síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos (sin sustitución y polihidroxilados) y de estudio comparativo de sus péptidos.

Nuestro objetivo concreto será la síntesis del β -aminoácido ciclopentánico sin sustitución **49a** y de su análogo dihidroxilado **49b** (Esquema 4), para abordar luego la preparación y estudio de sus péptidos recogidos en el Esquema 5.

2.2.1 Síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos

Se plantea aplicar la síntesis cianoacética a la preparación de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos, transformando 1,4-diyodobutananos **70a** y **70b** en 1-cianociclopentanocarboxilatos de alquilo **71a**, **71b** y reduciendo luego el grupo ciano a amino.

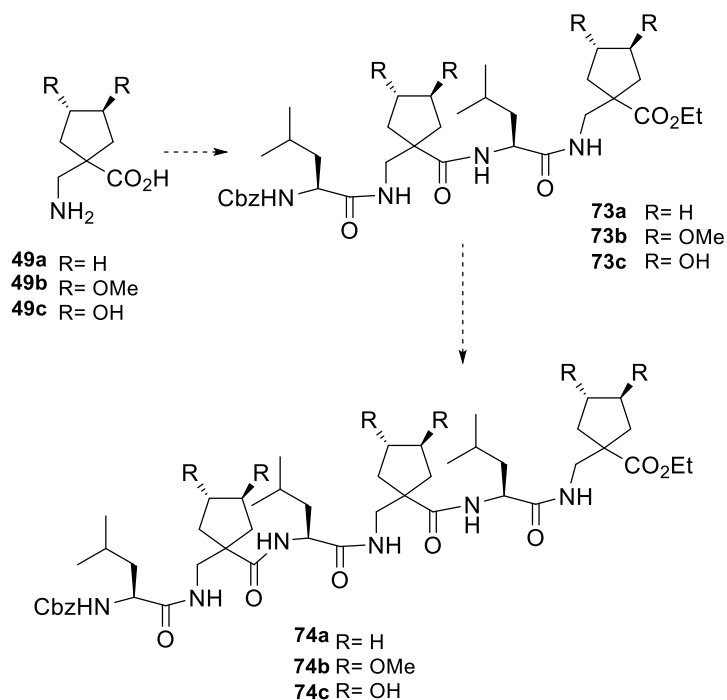
Se ensayará primero la síntesis del 1-aminometilciclopentanocarboxilato de etilo **49a** a partir de 1,4-butanodiol (**69a**), previamente descrita, para abordar luego, de manera similar, la preparación del 1-aminometil-3,4-dimetoxiciclopentanocarboxilato de etilo (**49b**), a incorporar luego ambos en péptidos (Esquema 5).

Esquema 4. Síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos.

2.2.2 Síntesis de α,β -péptidos derivados de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos

Este segundo subobjetivo engloba la síntesis y el estudio estructural de los α,β -péptidos recogidos en el

Esquema 5, diseñados sobre la base de alternar los $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos **49a** y **49b** con el α -aminoácido proteinogénico L-leucina.



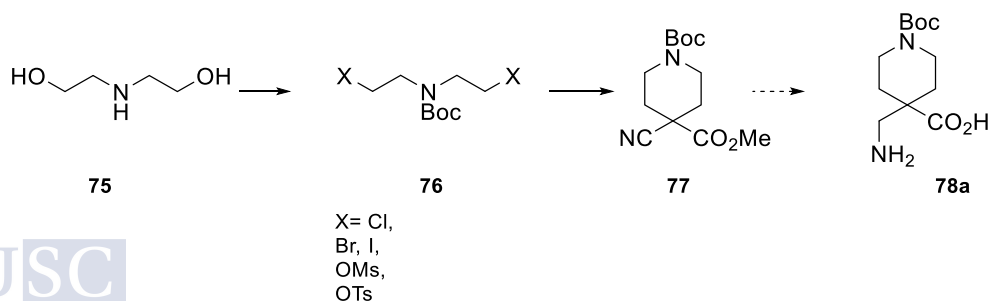
Esquema 5. Estrategia general de síntesis de los α,β -péptidos derivados de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos.

2.3 SÍNTESIS DE $\beta^{2,2}$ -AMINOÁCIDOS PIPERIDÍNICOS Y SUS PÉPTIDOS

El tercer objetivo de esta tesis se refiere a la síntesis y estudio estructural de péptidos de ácidos 4-aminometilpiperidin-4-carboxílicos, a abordar como se indica en los dos subobjetivos siguientes:

2.3.1 Síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos

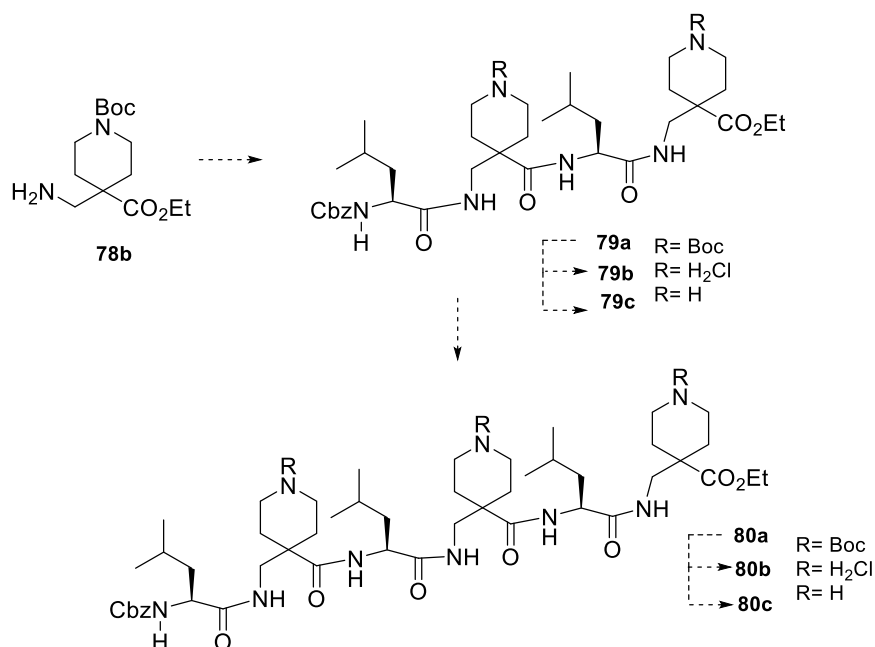
Se trata en primer lugar de optimizar la estrategia conocida de síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos a partir de dietanolamina (**75**) recogida en el Esquema 6, basada, como en el caso del apartado previo, en la síntesis cianoacética. El objetivo específico es la síntesis del aminoácido **78a**, para abordar luego su incorporación en péptidos, como se indica en el subapartado siguiente.



Esquema 6. Estrategia general de síntesis de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos.

2.3.2 Síntesis de α,β -péptidos derivados de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos

Este segundo subobjetivo engloba la síntesis de los α,β -péptidos **80a**, **80b** y **80c** recogidos en el Esquema 7, diseñados alternando el $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínico **78b** con el α -aminoácido proteinogénico L-leucina, con objeto de llevar a cabo sobre ellos estudios estructurales y de sus potenciales propiedades gelificantes.



Esquema 7. Estrategia general de síntesis de α,β -péptidos derivados de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos.

2.4 SÍNTESIS Y ESTUDIOS DE LAS PROPIEDADES GELIFICANTES DE BISAMIDAS DERIVADAS DE $\beta^{2,2}$ -AMINOÁCIDOS PIPERIDÍNICOS

El último de los objetivos de esta tesis doctoral es la síntesis y el estudio de las propiedades organogelantes de la quimioteca de bisamidas derivadas de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos piperidínicos recogidas en la Figura 35.

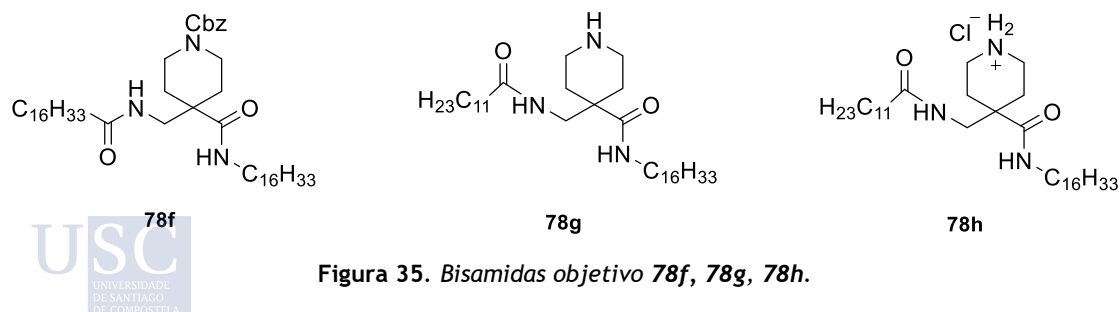


Figura 35. Bisamidas objetivo **78f**, **78g**, **78h**.

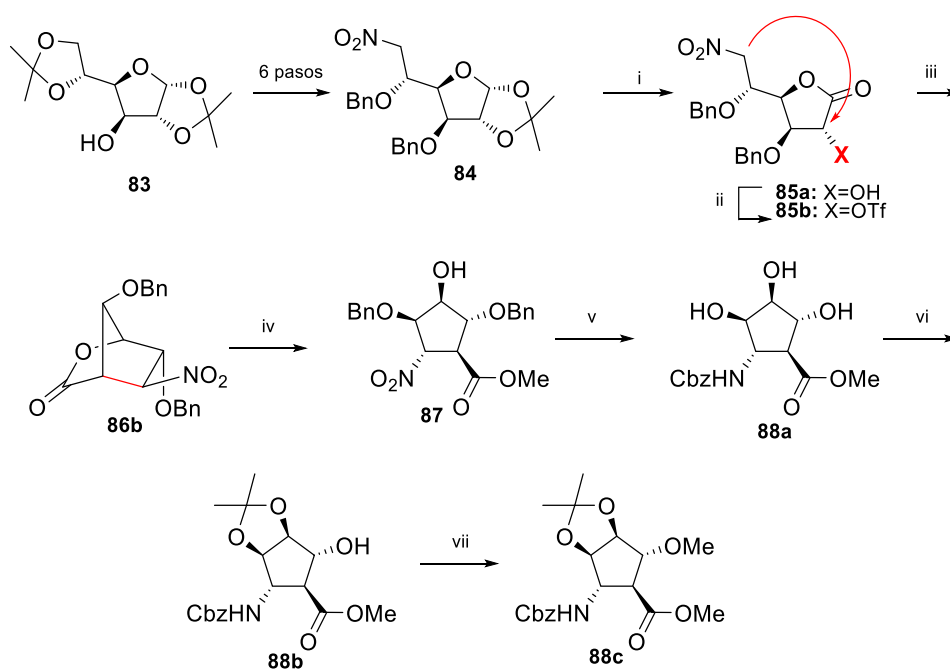
3 **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

3.1 SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE $\beta^{2,3}$ -AMINOÁCIDOS CICLOPENTÁNICOS Y β -PÉPTIDOS

3.1.1 Antecedentes

Nuestro grupo de investigación desarrolló la primera síntesis estereoselectiva de β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados mediante la estrategia recogida en el Esquema 8, en que se combinó la capacidad de los azúcares para generar compuestos carbocíclicos altamente funcionalizados con la propiedad de los nitrocompuestos de permitir formar eficientemente enlaces carbono-carbono, previamente a la reducción del grupo nitro al grupo amino de los aminoácidos.

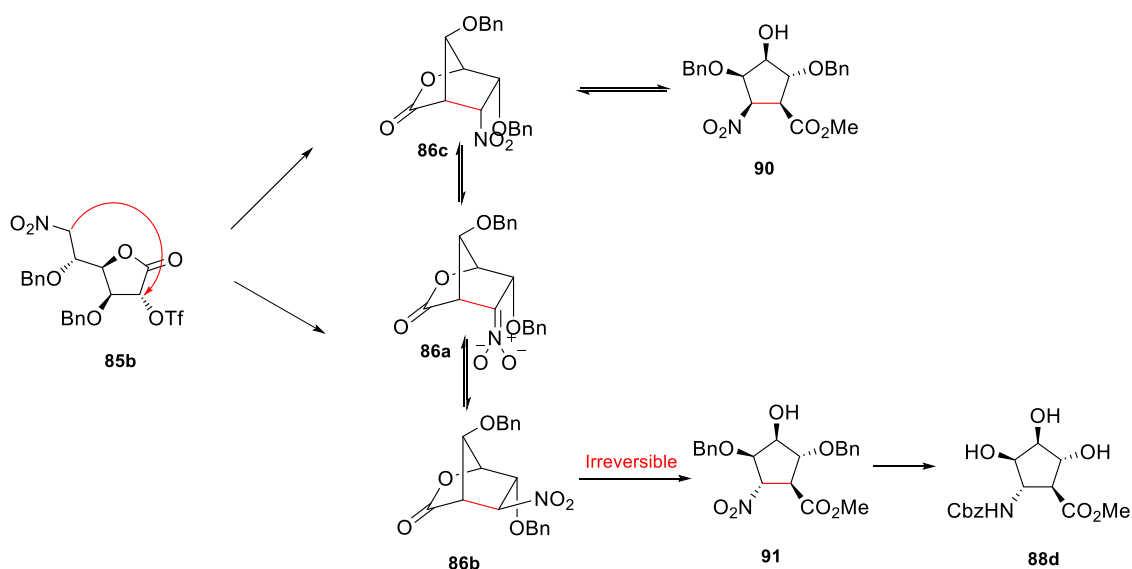
Esta aproximación se aplicó primero al caso de la D-glucosa, cuyo derivado comercial **83** se transformó en la nitrolactona **85a**, a través del nitrozúcar **84**. Al tratar a continuación la 2-trifilnitrolactona **85b** con fluoruro de tetrabutilamonio, se transformó en su nitronato, que experimentó la reacción alquilación intramolecular señalizada en el Esquema 8, que condujo a la nitrolactona bicíclica **86b**. Sometida esta mezcla a las condiciones de apertura de su subunidad de lactona que se indican, se obtuvo el β -nitroácido ciclopentánico **87**, que se transformó estereoselectivamente en β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado **88a** mediante una secuencia en dos pasos, que supuso someter el compuesto **87** a hidrogenación catalítica, para reducir el grupo nitro a amino y desproteger los grupos OH protegidos como benciloxi, lo que fue seguido del tratamiento del β -aminoácido precursor de **88b**, para proteger el grupo amino con Cbz y su grupo hidroxilo como éter de metilo.



Esquema 8. Condiciones: i) a) TFA/H₂O (1:1), ta, 19 h; b) Br₂, BaCO₃, dioxano/H₂O (2:1), ta, 36 h (94%). ii) Tf₂O, piridina, DMF, -30 °C, 1.5 h. iii) TBAF, THF, ta, 6 h (75%, dos pasos). iv) MeONa/MeOH (0.5 M), ta, 1.5 h, 65%; v) a) H₂, Pd/C, MeOH, 50 h; b) CbzCl, NaHCO₃, MeOH, ta, 6 h (60%). vi) 2,2-DMP, PTSA, CuSO₄, acetona, ta, 12 h (88%) vii) MeI, Ag₂O, MeCN, 50 °C, 60 h (93%).

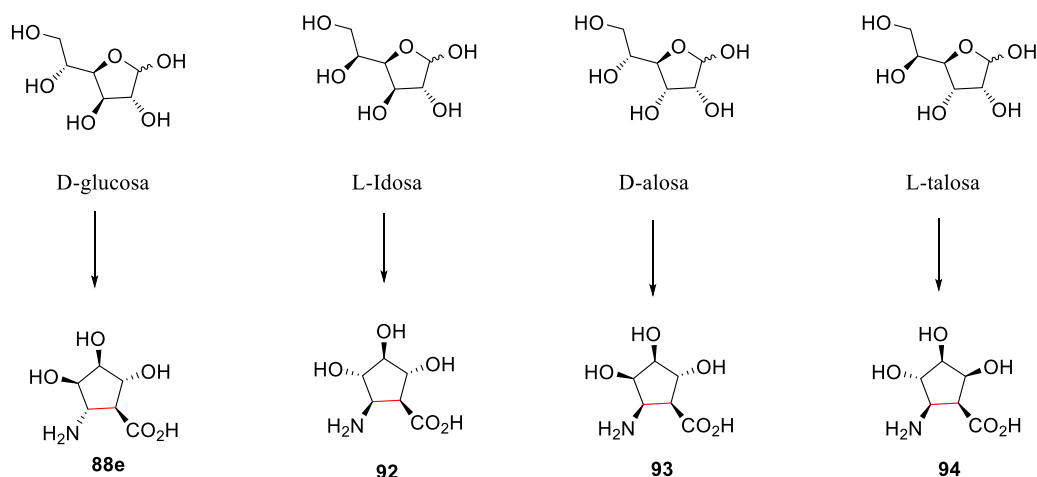
Esta estrategia sintética constituyó una aproximación novedosa a la síntesis de compuestos ciclopentánicos polisustituídos, todavía no resuelta de forma satisfactoria, permitiendo obtener el primer β -aminoácido ciclopentánico polihidroxilado descrito (compuesto **88c**) mediante una secuencia de 15 pasos, con un rendimiento global del 13%.

La estereoselectividad de la reacción se ha explicado admitiendo que, como se indica en el Esquema 9, las dos modalidades de ataque del nitronato de la nitrolactona **85b** al carbono C-2, portador del grupo saliente OTf, conducirían a las **86a** y **86c** respectivamente. La nitrolactona **86c** conduciría al β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado **90**, con configuración *cis* de la subunidad de β -aminoácido, mientras que la nitrolactona **86a** conduciría al β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado **91**, con configuración *trans* de la subunidad aminoácido. La obtención exclusiva del β -aminoácido **88d** se ha explicado admitiendo que las nitrolactonas **86b** y **86c** están en equilibrio a través del nitronato común **86a**, estando el equilibrio fuertemente desplazado hacia **86c**, de mayor estabilidad termodinámica. La apertura de ambas lactonas por transesterificación está sometida a control termodinámico, lo que determina que la apertura conduzca al β -aminoácido de mayor estabilidad termodinámica, justamente el β -aminoácido **88d**.



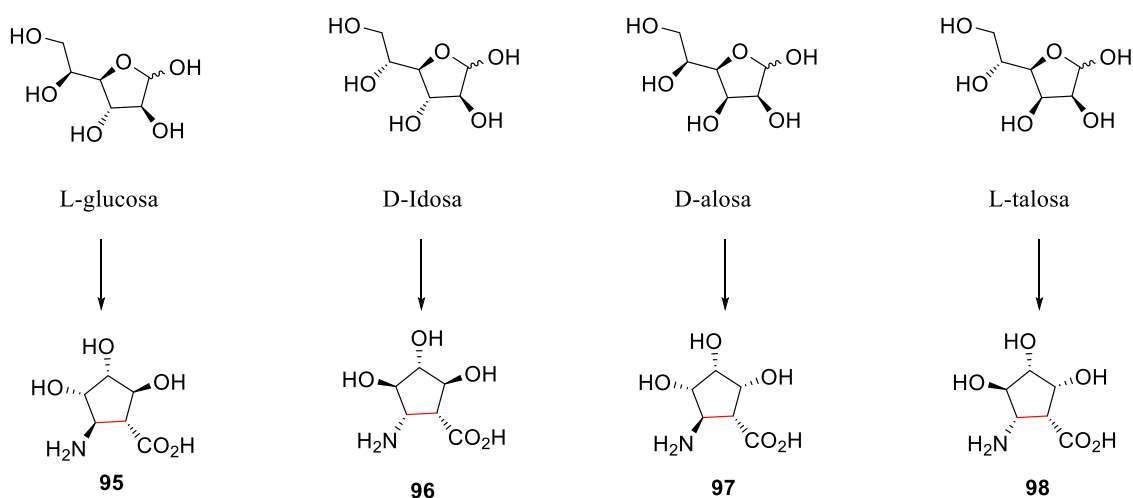
Esquema 9.

Una limitación de esta estrategia sintética reside en el hecho evidente de que puede ser aplicada solamente a aquellas hexosas que reúnen los requisitos estereoquímicos necesarios para que sus nitrolactonas correspondientes experimenten la etapa crítica de alquilación intramolecular de nitronatos en que se genera el anillo de ciclopentano. Tales hexosas son la D-glucosa, la D-idosa, la D-alosa, la D-talosa y las correspondientes hexosas de la serie L.



Esquema 10

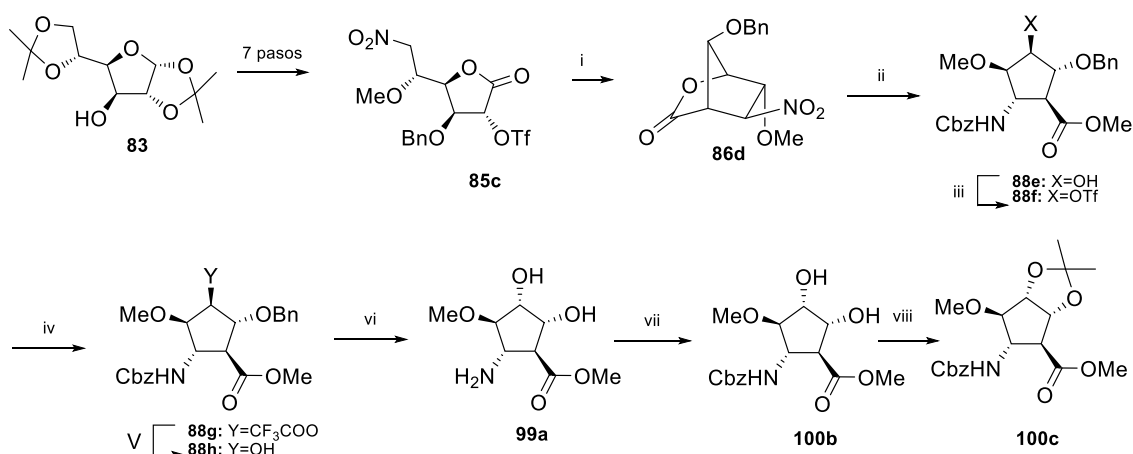
Consiguientemente, la estrategia permitiría obtener como máximo ocho de los treinta y dos β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados, justamente los cuatro aminoácidos recogidos en el Esquema 10 y sus cuatro enantiómeros, recogidos en el Esquema 11.



Esquema 11.

De hecho, la L-idosa ha sido transformada en el primer β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado con configuración *cis* de la subunidad amino y ácido, implicando ello una ruta sintética de 5 pasos, que ha permitido obtener el β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado con un rendimiento global del 34%.⁴³

Esta estrategia ha podido ser aplicada a la síntesis de otro β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados procediendo como se indica en el Esquema 12.

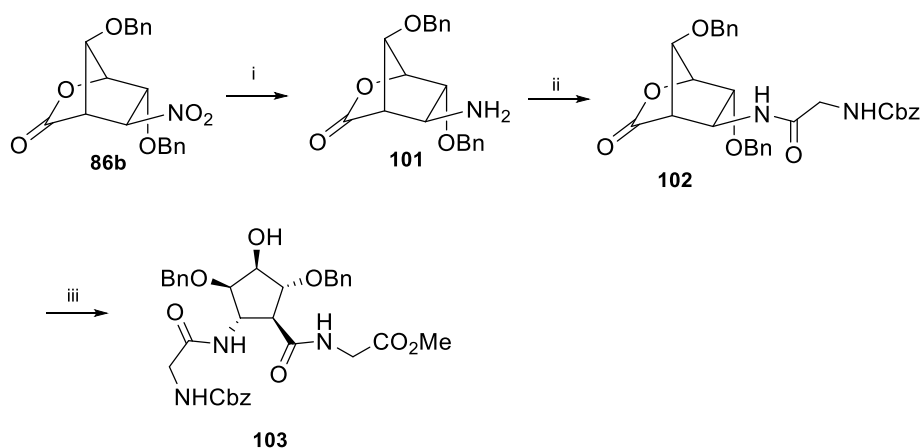


Esquema 12. Condiciones: i) TBAF, THF, *ta*, 4 h (54%); ii) a) H_2 , Ni-Raney, ácido cítrico, MeOH, *ta* 24 h; b) CbzCl, $NaHCO_3$, MeOH, *ta*, 6 h (60%). iii) Tf_2O , piridina, DCM, $-30\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; iv) CF_3CO_2Na , DMF, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h; v) $MeONa/MeOH$ (1 M), *ta*, 24 h (45% desde 5a); vi) H_2 , Pd/C, ácido cítrico, MeOH, *ta*, 5 h; vii) CbzCl, $NaHCO_3$, MeOH, *ta*, 4 h. viii) 2,2-DMP, PTSA, $CuSO_4$, acetona, *ta*, 12 h (80% desde 5b).

Efectivamente, tras obtener el β -aminoácido **88e** a partir de la diacetonglucosa (**83**), mediante la estrategia de alquilación intramolecular de nitonatos, a través de la nitrolactona **85c** y la biclonitrolactona **86d**, el compuesto **88e** se sometió al protocolo que se indica de epimerización de su centro estereogénico de la posición 4, que condujo a su isómero **88h**. Este, a su vez, se transformó en sus derivados **100b** y **100c**.

Se han llevado a cabo también estudios de incorporación de estos β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados en péptidos.

La incorporación del β -aminoácido **88a** se ha llevado a cabo indirectamente a partir de su nitrobiclonitrolactona precursora **86b**, procediendo como se indica en el Esquema 13.

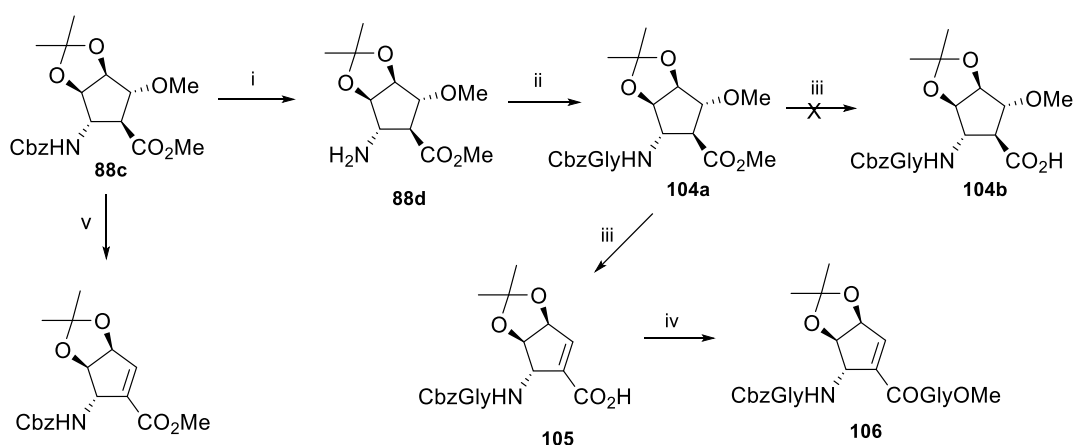


Esquema 13. Condiciones: i) H_2 , Ni-Raney MeOH. ii) Cbz-gly-OH, $ClCO_2Et$ Et_3N (58%, 2 pasos); iii) a) H_2NNH_2 , MeOH; b) $tBuNO_2$, HCl, DMF, dioxano; c) $GlyCO_2Me$, Et_3N , DMF (66%, 3 pasos).

Así, tras reducir el grupo nitro de la nitrolactona **86b** a amino mediante hidrogenación catalítica, se acopló al grupo amino de la aminolactona **101** resultante a una unidad de glicina, tratándola con Cbz-glicina en medio básico. Ello permitió obtener la dipeptidolactona **102**, que se sometió a un protocolo de incorporación de una segunda

unidad de glicina. Primeramente, se hace reaccionar al dipéptido **102** con hidrazina en metanol, abriendo de esta manera la lactona, obteniéndose la hidrazida intermedia, la cual se trató con *tert*-butilnitrilo en medio ácido obteniéndose una acilazida, esta es la que reacciona con el éster metílico del hidrocloreto de glicina lo cual condujo al tripéptido **103**, que incluye como unidad central un β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado, constituyendo el primer α,β -peptido de esta naturaleza sintetizado.

Se ha intentado preparar también un tripéptido análogo del β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado **103**, que condujo a un resultado inesperado.



ácido 5-aminociclopent-1-encarboxílico

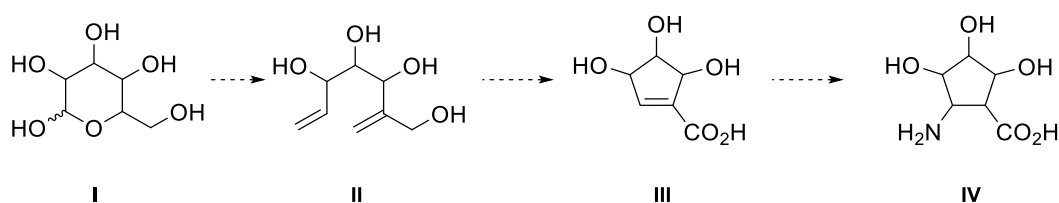
Esquema 14. Condiciones: i) H_2 , Pd/C, EtOAc, *ta*, 2 h; ii) Cbz-Gly-OH, DIEA, TBTU, DCM, *ta*, 12 h (88% desde 1); iii) NaOH, THF, *ta*, 2 h; iv) H-Gly-OMe.HCl, DIEA, TBTU, DCM, *ta*, 12 h (65% from 3). v) NaOH, THF, *ta*, 2 h, 90%.

Siguiendo un protocolo habitual de incorporación de aminoácidos en péptidos, basado en el empleo de TBTU como agente acoplante, la hidrogenación catalítica del β -aminoácido **88c** condujo a su análogo **88d**, con su grupo amino libre. La reacción de este compuesto con Cbz-glicina, TBTU y DIEA condujo al dipéptido **104a** deseado, que se sometió a continuación a hidrólisis básica, con objeto de liberar su grupo carboxilo y proceder a acoplar una segunda unidad de glicina al extremo C-terminal. Sin embargo, inesperadamente se obtuvo el dipéptido **105**, indicando ello que la hidrólisis de la función éster de compuesto **104a** fue acompañada de la eliminación de metanol, al que se acopló un grupo Cbz-glicina. Finalmente, al tratar este dipéptido **105** con glicinato de metilo, TBTU y DEA, se obtuvo el tripéptido correspondiente (compuesto **106**), el primer péptido descrito que incorpora un ácido 5-aminociclopent-1-encarboxílico, el primer aminoácido de estas características estructurales descrito, que se obtuvo eficientemente por hidrólisis básica del éster **88c**, que también fue acompañada de la generación del doble enlace carbono-carbono endocíclico por eliminación de MeOH.

Con objeto de obviar las limitaciones que presenta esta primera estrategia de síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxilados, de gran interés para acceder a β -péptidos hidrofílico e hidrofóbicos, se planteó una ruta sintética alternativa, fundamentada en las dos estrategias que ofrece la utilización de monosacáridos como

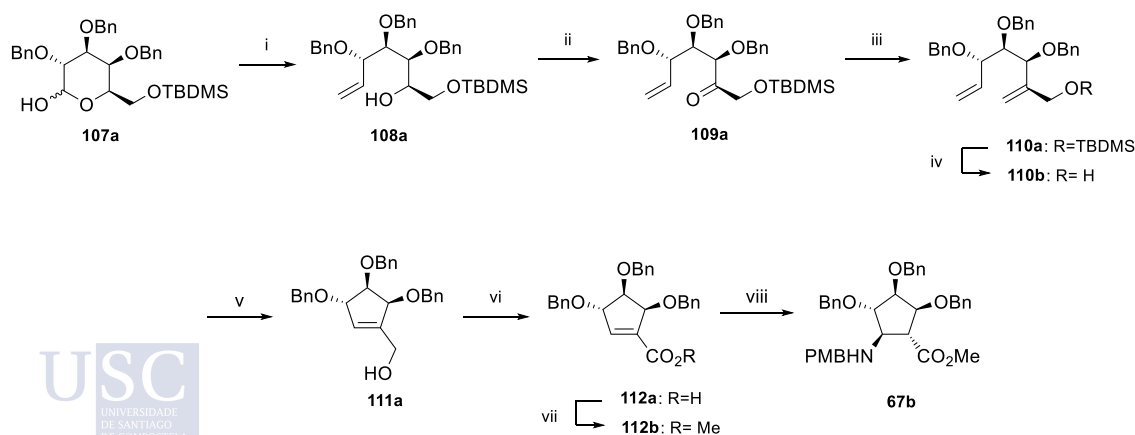
sustancias de partida para la síntesis de compuestos carbocíclicos y heterocíclicos altamente funcionalizados, denominada *Chiron Approach*. Efectivamente, esta estrategia sintética ofrece dos alternativas, que optamos por denominar *aproximación a* y *aproximación b*. La *aproximación a*, empleada en la síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos que acabamos de describir, conlleva formar el ciclopentano previamente a la apertura del anillo del monosacárido de partida. La *aproximación b* supone invertir estas dos tareas, transformando primero el monosacárido de partida en un compuesto de cadena abierta, que se somete luego al proceso de ciclación apropiado, para generar el anillo de ciclopentano.

Nuestro grupo planteó en su momento una segunda estrategia de síntesis de β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxiados basada en la *aproximación b*, que supone las tres secuencias recogidas en el Esquema 15: la secuencia de apertura del anillo de las piranosas I para transformarlas en compuestos de cadena abierta de naturaleza diénica II, la secuencia de ciclación de los compuestos II mediante Ring Closing Metathesis (RCM) para generar el anillo pentacíclico de los compuestos III y la secuencia final de generación de la subunidad de aminoácido de los β -aminoácidos ciclopentánicos polihidroxiados III



Esquema 15.

Esta aproximación sintética ha sido ensayada por nuestro grupo para diversas hexosas, entre ellas la D-galactosa, que permitió obtener el aminoácido ciclopentánico tri-*O*-bencilado **67b**, procediendo como se indica en el Esquema 16.



Esquema 16. Condiciones: i) *n*-BuLi, $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br}$, THF, -78°C hasta ref., 12 h, 80%. ii) Dess-Martin, DCM, rt, 2 h, 82%. iii) *n*-BuLi, $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br}$, THF, -78°C hasta t.a, 12 h, 85%. iv) TBAF, THF, rt, 1 h, 87%. v) Grubbs 2nd, toluene, ref., 24 h, 89%. vi) a. TEMPO, BAIB, NBu_4 , DCM/ H_2O , rt, 2 h. b. NaClO_2 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2-methyl-2-butene. vii) NaHCO_3 , MeI, DMF, rt, 12 h, 97%. (desde 9a). viii) NH_2PMB , DMF, rt, 24 h, 80%.

El dieno debidamente protegido **110a** se obtuvo a partir de la D-galactosa **107a**,⁴⁶ a través de los compuestos **108a** y **109a**⁴⁷ en las condiciones indicadas. La eliminación del grupo sililéter en C-1 de **110a** por tratamiento TBAF dio lugar a la diolefina **110b**, que se sometió a un proceso de RCM, que requirió emplear un catalizador de Grubbs de segunda generación. Se obtuvo así el hidroximetilciclopentano **111a** esperado con un rendimiento del 89%. La oxidación de este compuesto dio lugar directamente al ácido ciclopentenocarboxílico **112a**, que al ser tratado con NaHCO₃ e ioduro de metilo proporcionó el éster metílico **112b** con un rendimiento del 97% (tres últimos pasos).

Se obtuvo así un compuesto apropiadamente funcionalizado para generar β -aminoácidos empleando el método bien establecido de adición de Michael de aminas a ésteres α,β -insaturados. De hecho, la reacción del ciclopentenocarboxilato de etilo con *p*-metoxibencilamina como nucleófilo, condujo estereoselectivamente al β -aminoácido **67b** con un rendimiento del 80%. Se seleccionó la *p*-metoxibencilamina, con objeto de tener para el grupo amino una protección ortogonal a la de los grupos hidroxilo.

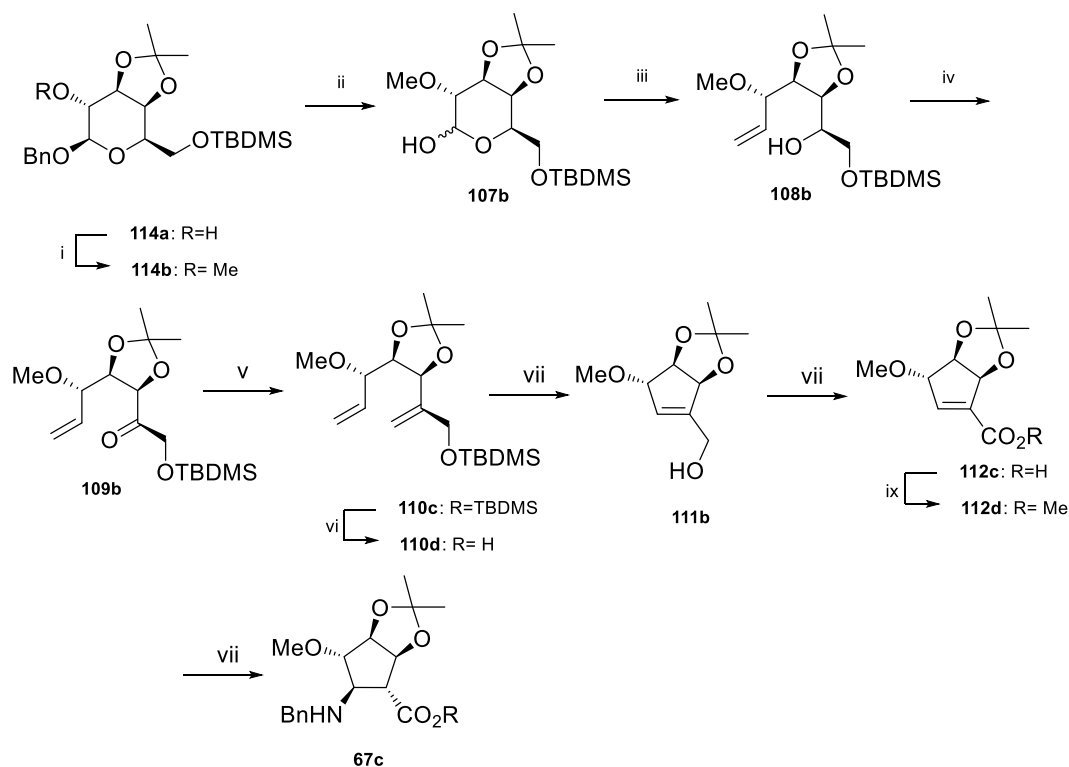
Esta estrategia se pudo aplicar a una hexosa, la D-galactosa, a la que no se le puede aplicar la estrategia previa de la alquilación intramolecular de nitronatos. Ello hace previsible que pueda ser aplicada a la totalidad de las hexosas, y que, consiguientemente, puedan obtenerse mediante esta estrategia de RCM al menos los dieciseis β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados con disposición *trans* de los grupos amino y carboxilo de la subunidad de aminoácido, lo que supondría una limitación de estrategia, justamente la de acceder a los dieciseis β -aminoácidos ciclopentánicos trihidroxilados con configuración *cis* de esta subunidad.

Se abordó a continuación la transformación de la D-galactosa en un segundo β -aminoácido ciclopentánico trihidroxilado, el compuesto **67c** (Esquema 17) con sus grupos OH en *cis* protegidos como acetónido, enantiómero del β -aminoácido **100c** (Esquema 12).



⁴⁶ Shiozaki, M.; Tashiro, T.; Koshino, H.; Shigeura, T.; Watarai, H.; Taniguchi, M.; Mori, K. *Carbohydr. Res.* **2013**, *370*, 46–66.

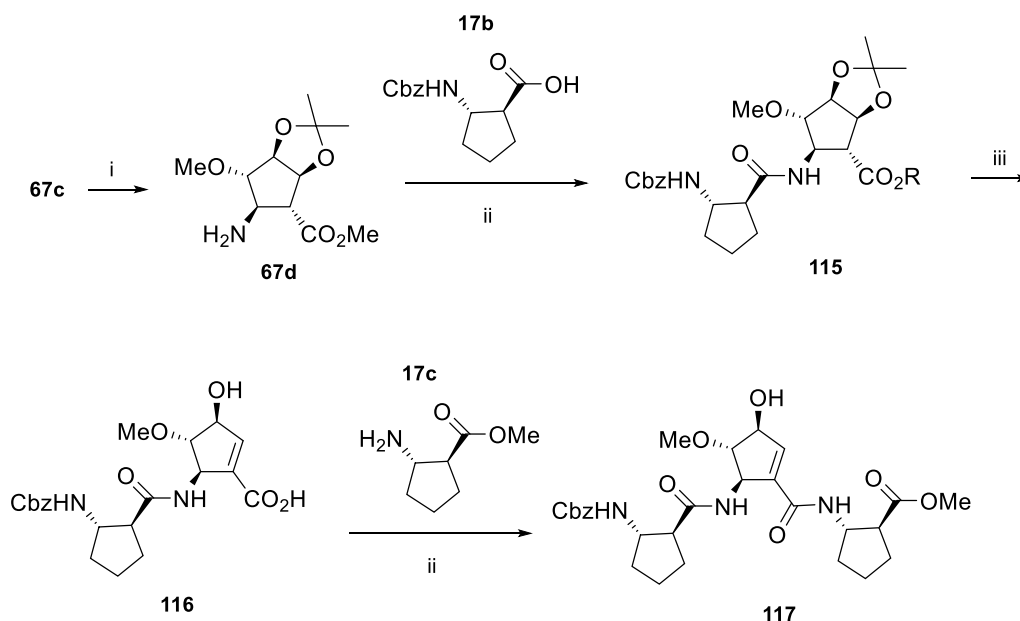
⁴⁷ (a) Gillaizeau, I.; Charamon, S.; Agrofoglio, L. A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8817–8819. (b) Jung, Y. H.; Kim, S. I.; Hong, Y. J.; Park, S. J.; Kang, K. T.; Kim, S. Y.; Kim, I. S. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1068–1073. (c) Jung, Y. H.; Kim, S. I.; Hong, Y. J.; Park, S. J.; Kang, K. T.; Kim, S. Y.; Park, J. S.; Kim, I. S. *Synlett* **2015**, *26*, 1089–1092



Esquema 17. Condiciones- i) NaH, MeI, THF, 0 °C a ta, 4 h, 93%. ii) NH_4HCO_2 , Pd/C, MeOH, ta, 12 h, 86%. iii) *n*-BuLi, $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$, THF, -78 °C a ta, 12 h, 80%. iv) Dess-Martin, DCM, ta, 24 h, 81%. v) *n*-BuLi, $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$, THF, 78 °C hasta ta, 2 h, 93%. vi) TBAF, THF, ta, 1 h, 82%. vii) Grubbs 1st, DCM, ta, 24 h, 92%. viii) a: TEMPO, BAIB, NBu₄I, DCM/H₂O, ta, 2 h; b: NaClO₂, NaH₂PO₄·2H₂O, 2-metil-2-buteno. ix) NaHCO₃, MeI, DMF, ta, 12 h, 82% (from 10c). x) NH₂Bn, DMF, ta, 24 h, 80%.

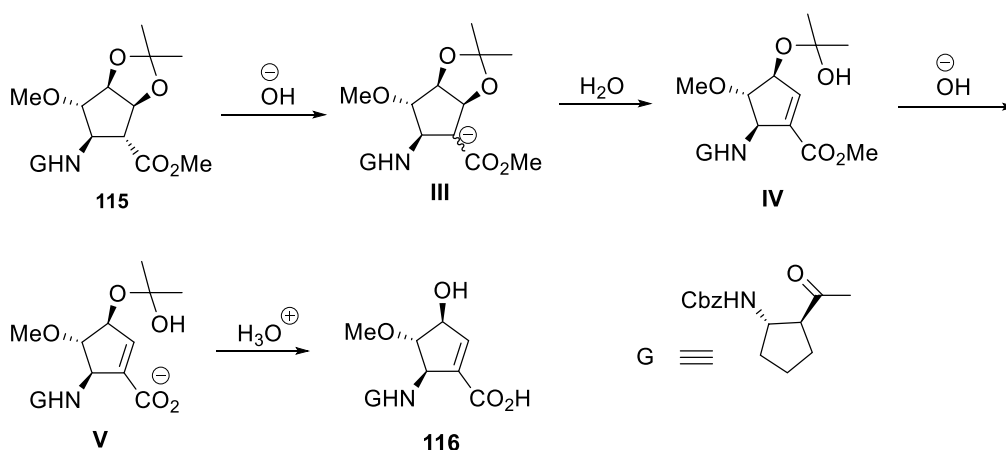
Procediendo como se indica en el Esquema 17, la reacción del derivado **114a**²² de la galactosa con yoduro de metilo dió su derivado *O*-metilado **114b**, que se convirtió luego en la mezcla anomérica **107b** y esta en el dieno clave **110d** a través de los compuestos **108b**, **109b** y **110c**, siguiendo el protocolo empleado para preparar su análogo **110b** (Esquema 12). A continuación, el dieno **110d** se sometió a condiciones estándar de reacción de RCM, para dar el ciclopentano **111b**²³ deseado, con un rendimiento del 92%. Este compuesto **111b** se convirtió a continuación en el ciclopentanocarboxilato de metilo **112d**, a través del compuesto **112c**, procediendo como se indica en el Esquema 17. La reacción de **112d** con BnNH₂ dio como resultado una adición aza-Michael estereoselectiva que condujo al nuevo β-aminoácido **67c** derivado de la D-galactosa.

Se llevaron a cabo previamente también estudios de incorporación del β-aminoácido **67c** derivado de la D-galactosa en péptidos. Para ello, el grupo bencilo del compuesto **67c** se eliminó por hidrogenación catalítica y el aminoéster **67d** resultante se acopló directamente el β-aminoácido comercial **17b**. Ello proporcionó el dipéptido **115** con un rendimiento del 93%, que fue sometido a condiciones básicas, para transformarlo en su derivado con un carboxilo libre para acceder a la síntesis de tripeptidos. Esta hidrólisis se ensayó con LiOH, Ba(OH)₂, obteniéndose siempre el mismo el dipéptido **116**. Se confirmó este resultado cuando se obtuvo el tripeptido **117**, como resultado del acoplamiento de **116** con el aminoácido comercial **17c**.



Esquema 18. Condiciones i) H_2 , 10% Pd/C, AcOEt, ta, 48 h. ii) PyBop, HOBT, DIEA, tamices moleculares, DCM/DMF, ta, 2 h, 93% (2 pasos). iii) $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, THF/ H_2O , ta, 2 h, 98%.

La formación del dipéptido **116** puede explicarse suponiendo que el dipéptido **115** en condiciones básicas experimenta una eliminación espontánea que conlleva la apertura del anillo de dioxolano de su enolato **III**, un proceso que debería proporcionar un éster α,β -insaturado **IV** (Esquema 19). La posterior hidrólisis básica de este compuesto debería dar el carboxilato **V**, que, bajo tratamiento ácido, debería proporcionar el dipéptido **116**, como resultado de la protonación de su grupo carboxilato y la hidrólisis de su resto hemiacetal.



Esquema 19.

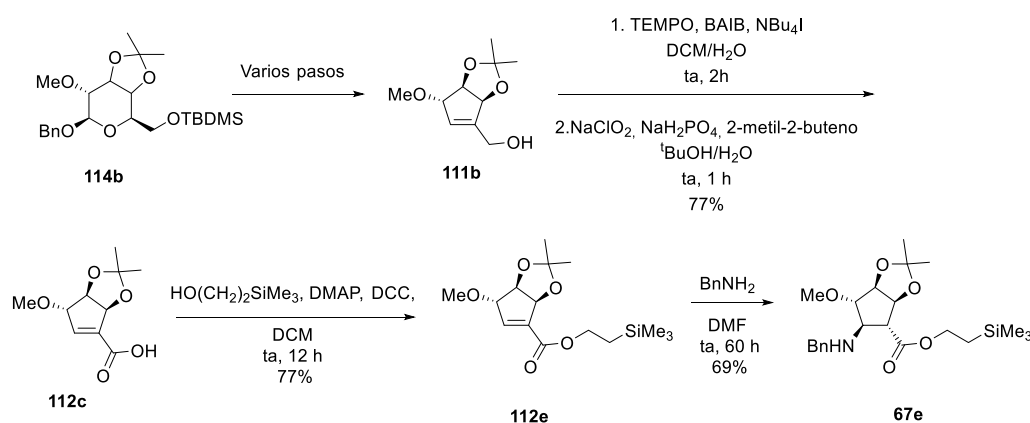


3.1.2 Objetivos y plan de trabajo

Nosotros nos fijamos como primer objetivo de esta tesis doctoral la búsqueda de un protocolo que permita incorporar el β -aminoácido ciclopentánico trisustituído **67** en péptidos, para lo que es necesario llevar a cabo la hidrólisis del grupo éster evitando la reacción antedicha de eliminación generadora del doble enlace endocíclico del ciclopenteno.

3.1.3 Síntesis del (3a*S*,4*R*,5*R*,6*S*,6a*S*)-5-(bencilamino)-6-metoxi-2,2-dimetiltetrahidro-4*H*-ciclopenta[*d*][1,3]dioxolo-4-carboxilato de 2-(trimetilsilil)etilo (67e)

De acuerdo con nuestro plan, una vez obtenido el hidroximetilciclopentenol precursor **111b** como se ha indicado previamente (Esquema 21), este compuesto se trató TEMPO/BAIB para obtener el aldehído intermedio, que se sometió directamente a una reacción de oxidación de Pinnick que permitió obtener el ácido ciclopentenocarboxílico correspondiente. Como primer paso de la química nueva desarrollada, la esterificación de Fischer-Speier de este ácido **112c** con 2-(trimetilsilil)etan-1-ol, utilizando DCC como agente acoplante permitió obtener el éster **112e** deseado, con un rendimiento del 77% para los dos pasos.



Esquema 22. Síntesis del compuesto 67a.

La formación de este compuesto **112e** pudo constatarse fácilmente a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectométricas. En su espectro de $^1\text{H-RMN}$ se observa la presencia del grupo $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ a partir de las siguientes señales: un singulete de nueve protones a 0.05 ppm, que corresponde a los tres grupos metilo unidos al átomo de silicio; un multiplete que integra por dos protones entre 0.88 y 1.19 ppm, del grupo CH_2 unido al átomo de silicio y un multiplete de dos protones entre 4.21 y 4.38 ppm, debido al un grupo CH_2 unido a oxígeno. La presencia de tal grupo se confirmó mediante las señales siguientes presentes en el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$: una señal a -1.4 ppm, correspondiente a los grupos metilo unido a silicio; otra señala a 17.4 ppm, debida al grupo CH_2 unido al átomo de silicio y una tercera señal a 63.4 ppm, del grupo CH_2 unido al átomo de oxígeno. Además, su espectro de masas de alta resolución muestra una señal con una relación $m/z=337.1447$ correspondiente al ion $(\text{M}+\text{H})^+$ (valor teórico $m/z=337.1442$), que confirmó su fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{Si}$.

Se procedió a continuación a transformar este éster ciclopentenocarboxílico en el aminoácido **67e**, optándose por proteger el grupo NH_2 como con un bencilo, con vistas a su incorporación subsiguiente en péptidos. De acuerdo con ello la reacción de adición de Michael de BnNH_2 al compuesto **112e** condujo únicamente a este β -aminoácido ciclohexánico **67e**,⁴⁹ como consecuencia de la adición de Michael estereoselectiva de la

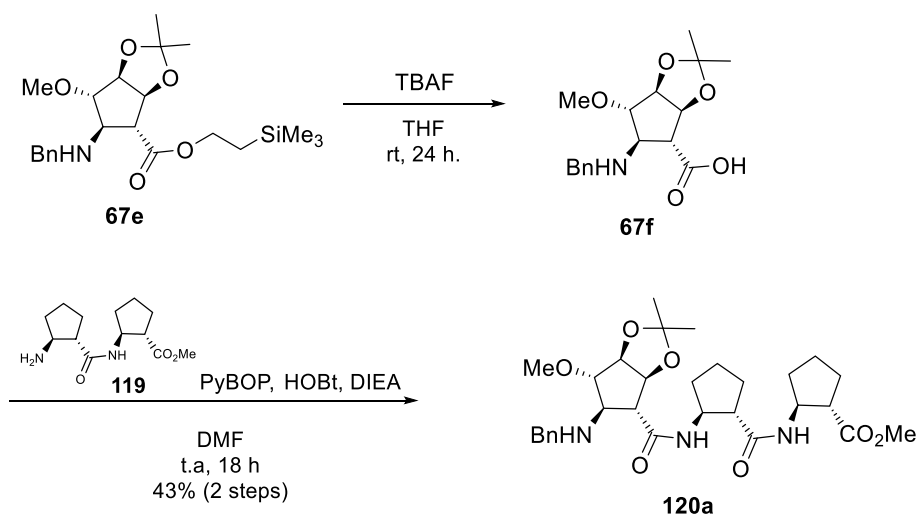
⁴⁹ Chen, Q.; Qiu, X. -L.; Qing, F. -L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3762.

amina al doble enlace carbono-carbono, dirigida por el grupo metoxilo de la posición C-3.

Este compuesto pudo identificarse perfectamente a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectométricas. En su espectro de ^1H -RMN se observan, entre otras, las siguientes señales del grupo NBn: un doblete de dos protones a 3.82 ppm, correspondiente al grupo CH_2Bn y un multiplete de cinco protones entre 7.18-7.37 ppm, debido al anillo aromático. Su espectro de ^{13}C -RMN confirmó la presencia de este grupo bencilo mediante las siguientes señales: una señal a 17.5 ppm, del grupo metileno CH_2Bn y señales a 27.1 ppm, 128.3 ppm, 128.5 ppm que corresponden a los carbonos del anillo aromático. Su espectro de masas de alta resolución mostró una señal con una relación $m/z = 422.2360$ correspondiente al ion molecular $(\text{M}+\text{H})^+$ (valor teórico $m/z = 422.2357$), que confirmó su fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{Si}$.

3.1.4 Síntesis del pentapéptido 68

Prosiguiendo con nuestro plan de trabajo se llevó a cabo la transformación del $\beta^{2,3}$ -aminoéster **67e** en el tripéptido **120a**.



Esquema 23. Síntesis del tripéptido **120a**.

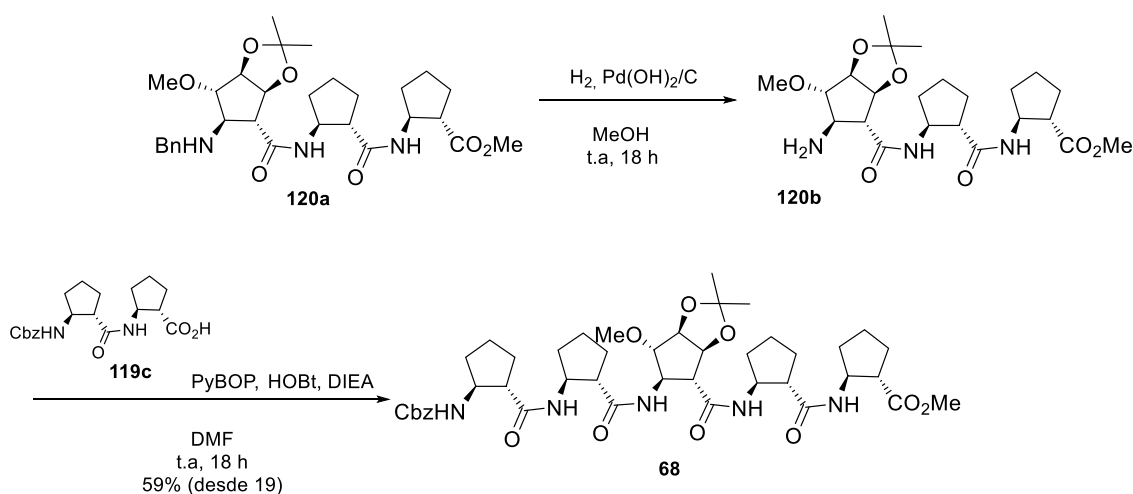
La hidrólisis del β -aminoéster **67e** con TBAF en THF condujo, como se esperaba, al ácido carboxílico correspondiente **67f**, que se trató directamente con el dipéptido **119**, cuya síntesis está descrita en la bibliografía,⁵⁰ utilizando PyBOP y HOBT como agentes de acoplamiento y DIEA como base, dando lugar al tripéptido **120a** con un rendimiento moderado del 43% (Esquema 23).

Este tripéptido **120a** pudo ser identificado a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectométricas. En su espectro de ^1H -RMN se observan, entre otras, las siguientes señales: un multiplete de cuatro protones entre 1.53-1.79 ppm, debido a dos grupos CH_2 ; un multiplete de siete protones entre 1.83-2.27 ppm, correspondiente a grupos CH_2 y al HN de amina, y a 7.65 y 7.92 ppm dos dobletes de un protones cada uno,

⁵⁰ Karen Wright, Laurence Dutot, Michel Wakselman, Jean-Paul Mazaleyrat, Marco Crisma, Fernando Formaggio, Claudio Toniolo, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4416-4426.

correspondientes a grupos HN de amida. En cuanto a su espectro de ^{13}C -RMN, cabe destacar la selección siguiente de señales: 23.1, 24.8, 27.2, 28.4, 32.8 y 33.3 ppm, correspondientes a los CH_2 alifáticos del compuesto y 172.5, 173.3, 175.6 ppm, debida a los grupos carbonilo de amida y de éster. En su espectro de IR se observan las tres bandas de los grupos $\text{C}=\text{O}$ a 1732, 1643, 1546 cm^{-1} y su espectro de masas de alta resolución mostró una señal con $m/z = 558.3174$ ($\text{M}+\text{H}^+$) (valor teórico $m/z = 558.3174$), que confirmó su fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$.

Finalmente, el tripéptido **120a** se transformó en el pentapéptido **68** (Esquema 24). Para ello, el tripéptido **120a** fue sometido a hidrogenación catalítica, utilizando hidróxido de paladio como catalizador. El tripéptido **120b** obtenido, con su grupo amino libre, se acopló directamente con el dipéptido **120c**, descrito en la bibliografía,⁵¹ empleando las mismas condiciones usadas para preparar el tripéptido **120a**. Ello condujo al pentapéptido **68**, que se obtuvo con un rendimiento del 59%.



Esquema 24. Síntesis del pentapéptido **68**.

Este pentámero **68** pudo ser identificado a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. En su espectro de ^1H -RMN se observan, entre otras señales, un multiplete de doce protones entre 1.55–1.81 ppm debido a seis de sus grupos metileno alifáticos; un multiplete de trece protones entre 1.90–2.17 ppm, debido a sus otros grupos metileno alifáticos y al protón del grupo $\text{CH}_2\text{-CO}$; una señal ABq de dos protones a 5.12 ppm, correspondiente al metileno del grupo carboxibencilo; tres dobletes de un protón cada uno a 5.89, 6.47 y 7.69 ppm y un multiplete de dos protones entre 8.13–8.48 ppm, todos ellos correspondientes a protones HN de amida y uretano, y finalmente, un singulete 7.36 ppm de cinco protones correspondiente al anillo aromático del grupo carboxibencilo de la molécula. En su espectro de ^{13}C -RMN destacan, entre otras, las siguientes señales: a 23.6, 24.1, 24.4, 25.5, 28.3, 28.9, 29.0, 29.8, 32.5, 33.6, 33.9 ppm señales correspondientes a los grupos metileno alifáticos; a 67.0 ppm una señal de CH_2 del grupo carboxibencilo; a 127.9, 128.4, 128.8 ppm señales correspondientes a grupos CH del carboxibencilo; a 136.4 ppm una señal correspondiente al C del grupo carboxibencilo, y

⁵¹ Abraham, Elin; Bailey, Callum W.; Claridge, Timothy D. W.; Davies, Stephen G.; Ling, Kenneth B.; Odell, Barbara; Rees, Thomas L.; Roberts, Paul M.; Russell, Angela J.; Smith, Andrew D. *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21*, 1797–1815

a 156.8, 171.2, 174.3, 174.6, 175.1, 176.6 ppm señales correspondientes a los grupos carbonilo de la molécula. En su espectro de IR se observan las bandas de los grupos C=O a 1699, 1645, 1555 cm^{-1} . Finalmente, su espectro de masas de alta resolución mostró una señal con una relación $m/z = 846.4262$ correspondiente al ion $(M+Na)^+$ (valor teórico $m/z = 846.4260$) que confirmó la fórmula molecular esperada $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{O}_{11}$.

3.1.5 Estudio estructural del pentapéptido 68

Una vez sintetizado el pentámero **68**, decidimos llevar a cabo un estudio estructural del mismo para corroborar si la presencia del β -aminoácido ciclopentánico polisustituido de su posición central distorsiona el plegado como hélice-12 predicho por estudios de modelización molecular llevado a cabo previamente en nuestro grupo de investigación.⁵² (Figura 36).

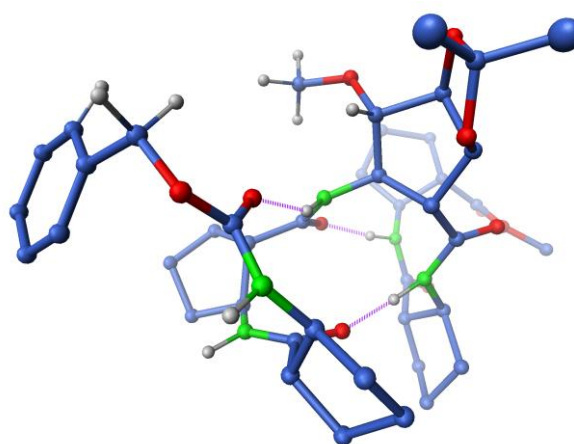


Figura 36. Estructura predicha para el pentapéptido **68**.⁵²

3.1.5.1 Estudios de RMN

Para ello, se realizaron experimentos de RMN (^1H , ^{13}C , TOCSY), con objeto de asignar las señales del espectro de ^1H -RMN del compuesto. La asignación se realizó nombrando cada uno de los aminoácidos como residuos (desde R1 hasta R5) y aparece recogida en la Tabla 4.

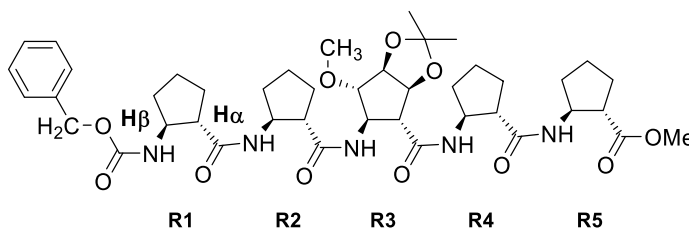


Figura 37

⁵² (a) Imamura, Y., Watanabe, N., Umezawa, N., Iwatsubo, T., Kato, N., Tomita, T., & Higuchi, T. (n.d.). *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7353–7359. (b) Sussman, F.; Villaverde, M.C. Estevez, J.C. Estevez, R.J. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 9669–9680. (c) S.H. Gelmann. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4891–4892

Residuo	HN	H α	H β	Otros
R1	5,96	2,82	4,09	1.58, 1.75, 1.90, 1.99, 2.13
R3	7,76	2,73	4,16	3.89 (H γ), 4.47 (H δ), 4.95 (H ϵ), 3.47 (OMe), 1.32 (Me α), 1.28 (Me β)
R4	9,47	3,35	4,23	1.74 - 2.02 - 2.29
R2 o R5	10,36	3,24	4,57	1.72 - 1.88 - 2.06-2.17-br

Tabla 4. Asignación de las señales de ^1H -RMN del compuesto **68**. (278 K, CDCl_3 , 500 MHz).

Tras ello, se llevaron a cabo los experimentos siguientes de ^1H -RMN destinados a determinar la existencia de la estructura helicoidal predicha para la molécula:

- A: un primer estudio de disolución seriada, seguido de un experimento DOSY para descartar posibles agregados moleculares.
- B: un estudio de los coeficientes de temperatura (T-coef) de los protones unidos a nitrógeno para detectar posibles enlaces de hidrógeno de estos con los grupos carbonilo de amida.
- C: por último, un estudio de NOE (ROESY) para localizar la posición de los posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares.

A. Disolución seriada

Con el objeto de conocer si nuestro pentapéptido **68** forma agregados en disolución, lo que podría interferir con los estudios de sus posibles interacciones intramoleculares, se llevaron a cabo experimentos de ^1H -RMN en CDCl_3 a 25°C y a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 mM).

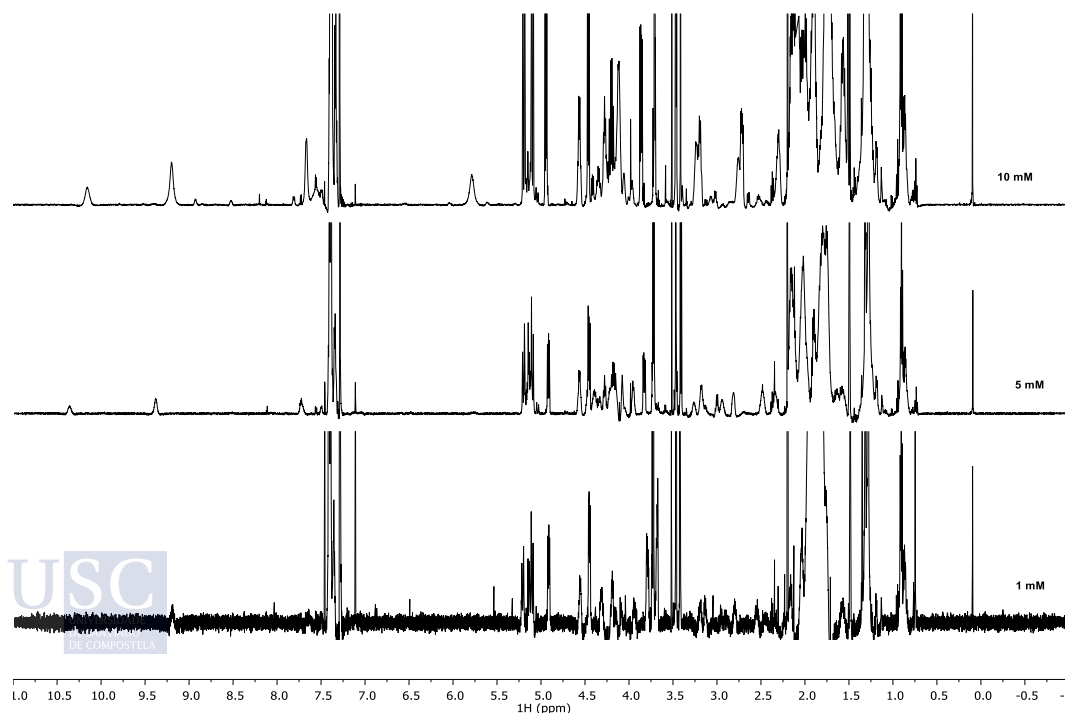


Figura 38. ^1H -RMN del compuesto **68** en CDCl_3 a 25°C y a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 mM).

Dichos experimentos aparecen recogidos en la Figura 38, y de ellaos se puede concluir que:

1. Se producen pocos cambios con la concentración.
2. Al pasar de 5 mM a 10 mM, alguna señal se desplaza, lo que puede significar que por encima de 5 mM se produce agregación.

B. DOSY

Para confirmar los indicios de agregación de nuestro péptido **68** se realizaron experimentos de RMN de tipo DOSY a las mismas concentraciones (1, 5 y 10 mM). (Figura 39),

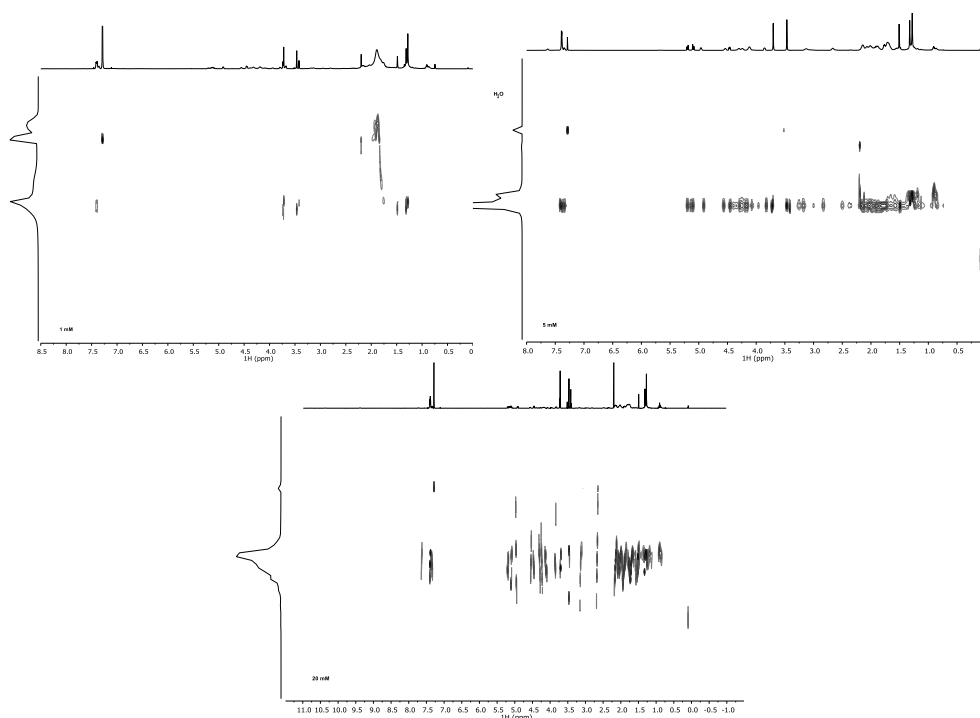


Figura 39. DOSY del compuesto **68** en $CDCl_3$ a 25 °C y a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 mM).

Los datos se obtuvieron midiendo la atenuación de las señales de la muestra para diferentes valores de gradiente de campo electromagnético. Con los datos recolectados se obtuvo el espectro en dos dimensiones DOSY en el cual las señales se separan de acuerdo con su desplazamiento químico en una dimensión y según su coeficiente de difusión en la otra dimensión.

Estos experimentos confirmaron el resultado obtenido con el anterior experimento de disolución seriada, que nos ha permitido establecer que la agregación del compuesto **68**, en disoluciones de $CDCl_3$ a 25 °C, se observa a concentraciones superiores a 5 mM.

C. Estudio de coeficientes de temperatura (T-coef)

Está comúnmente aceptado que un compuesto presenta enlaces de hidrógeno intramoleculares si el T-coef del protón que forma el enlace de hidrógeno es menor que 5 ($-\Delta\delta/\Delta T < 5$). En caso de que el T-coef de un protón sea mayor que 5 ($-\Delta\delta/\Delta T \geq 5$) se

considera que el protón está en posiciones accesibles para el disolvente y por lo tanto no forma enlace de hidrógeno.

Para evaluar la existencia de enlaces de hidrógeno intramolecular que puedan estabilizar una estructura secundaria en forma de hélice para nuestro compuesto **68**, determinamos ahora los T-coef. Para ello se realizaron experimentos de ^1H -RMN empleando CDCl_3 libre de agua y ácido, a una concentración de 5 mM y en un rango de temperaturas desde 5 a 20 °C (con variaciones de temperatura entre medidas de 5 °C). Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la Figura 40.

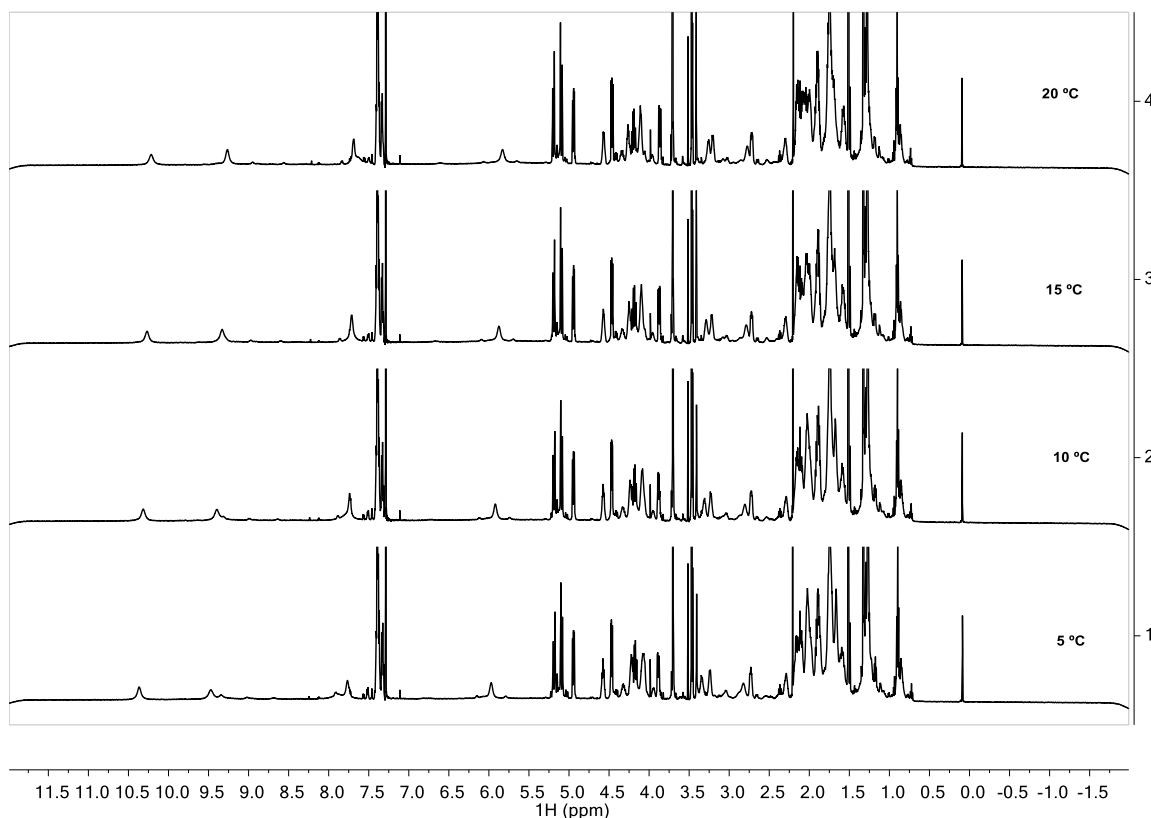


Figura 40. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **68** en CDCl_3 a 5mM y a diferentes temperaturas (5, 10, 15 y 20 °C).

Los T-coef de los seis protones unidos a nitrógeno (H^{N}) de nuestra molécula aparecen reflejados en la Tabla 5, mostrando que cuatro de los cinco protones HN no están formando enlaces de hidrógeno. Únicamente el protón HN5 (7.8 ppm) presenta un posible enlace de hidrógeno, con un T-coef ligeramente superior a cinco.

HN	HN/ ppm	$\Delta\delta$ /ppm	Temperatura/ °C	T-coef, ppb/K
H1	5,5	0,142	15	9,2
H3	7.6-7.9	0,239	15	16,5
H5	7,8	0,075	15	5,1
H4	9,5	0,208	15	14,0
H2	10,35	0,151	15	9,8

Tabla 5. T-coef del compuesto **68**.

D. ROESY

Para confirmar las evidencias que mostraron los estudios de dinámica molecular que mostraban el plegado como hélice-12 del compuesto **68**, se llevó a cabo un estudio de ^1H -RMN de 2D (ROESY). Los experimentos fueron realizados en CDCl_3 y los parámetros empleados fueron: 600 MHz, un tiempo de mezcla de 500 ms, una concentración de 6 mM a 25 °C y a 5 °C.

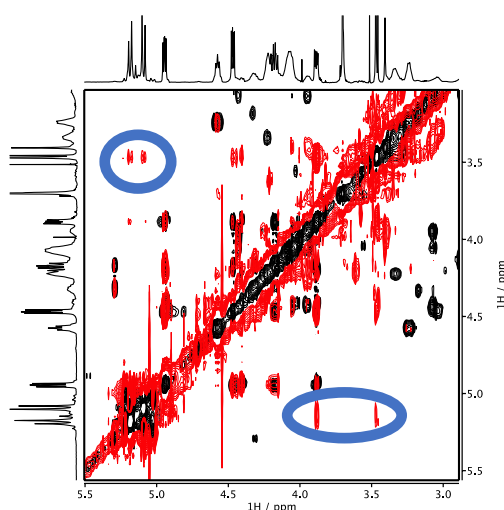


Figura 41. Imagen superpuesta de los espectros TOCSY (negro) y ROESY (rojo) a 5 °C para el compuesto **68**.

Los resultados obtenidos a 25 °C no evidencian una conformación plegada. No se observan señales interresiduos y se observan señales de intercambio de los HN con el agua del disolvente. Lo cual confirma inequívocamente que nuestro β - aminoácido polisustituído **67** introducido en la posición central del pentapéptido **68** perturba su plegado como una hélice-12 similar a la que adopta su análogo constituido por β - aminoácidos ciclopentánicos no sustituidos, previamente reportada.³⁹

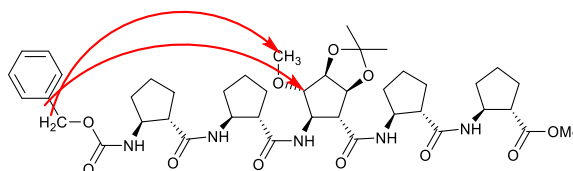


Figura 42. NOEs observados en el pentapéptido **68** en su 2D ROESY (CDCl_3 , 500 MHz, 5 °C).

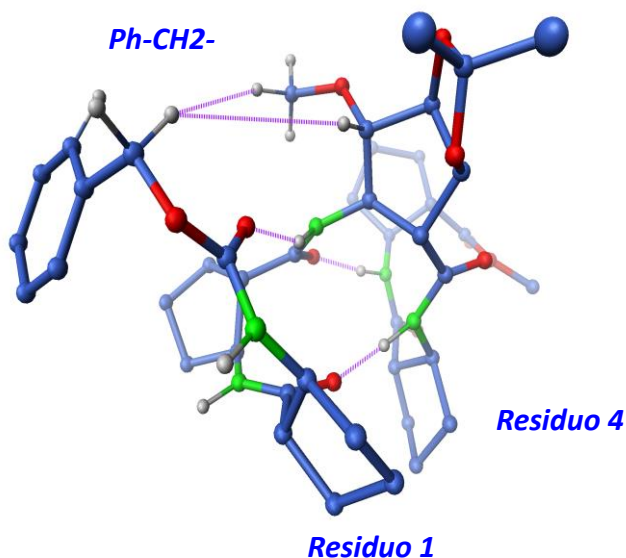


Figura 43. Estructura predicha para el compuesto pentapéptido **68** y a partir de los NOEs observados.

3.1.6 Conclusión

A la vista de los resultados anteriores se procedió a realizar el mismo estudio, pero disminuyendo la temperatura a 5 °C, favoreciendo de esta manera el plegamiento de la molécula. Los resultados obtenidos, los cuales pueden verse en la Figura 42, muestran señales de NOE intermoleculares, y de ellos destacan por su importancia para nuestro estudio:

- Una señal: R1: ArCH_2 / R3: OMe.
- Una señal: R1: ArCH_2 / R3: H- γ .

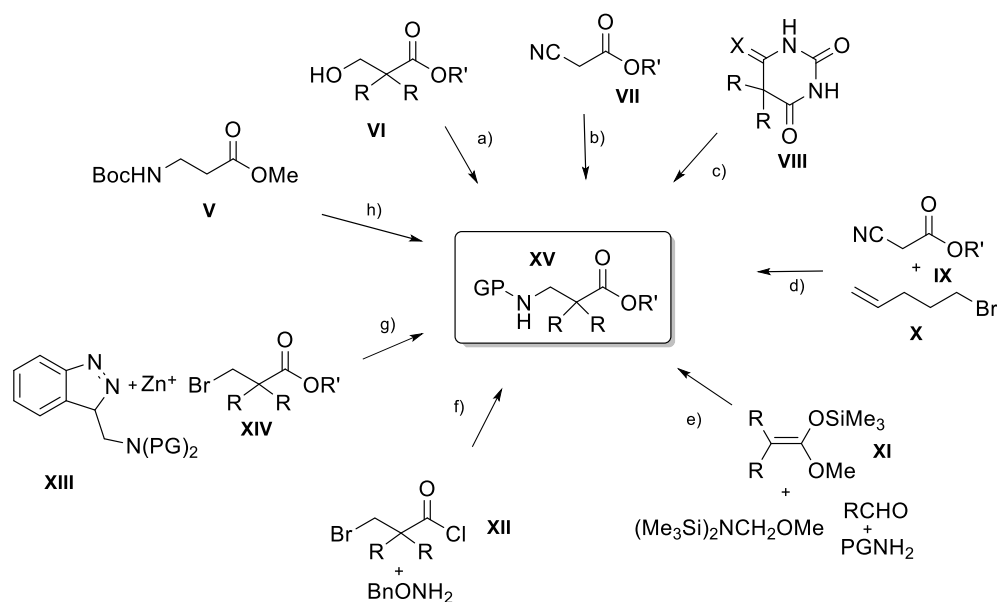
Ante los resultados obtenidos en los diferentes estudios de RMN realizados; estudio de DOSY, coeficientes de temperaturas y de las señales NOE, se concluye que estos respaldan inequívocamente que nuestra molécula muestra una conformación mayoritaria, esto se evidencia en tanto en el espectro de ^1H -RMN y en su TOCSY donde solo es observable un único conformero mayoritario del compuesto **68**, concluyendo además que existe una distorsión de la hélice del péptido **68** con respecto a la de su homólogo sin sustituyentes en el anillo ciclopentánico.

3.2 SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL $\beta^{2,2}$ -AMINOÁCIDOS CICLOPENTÁNICOS Y SUS α,β -PÉPTIDOS



3.2.1 Antecedentes

El Esquema 25 incluye una presentación simplificada de las estrategias descritas de preparación de $\beta^{2,2}$ -aminoácido⁵³ todas ellas empleadas también para preparar β^2 -aminoácidos.

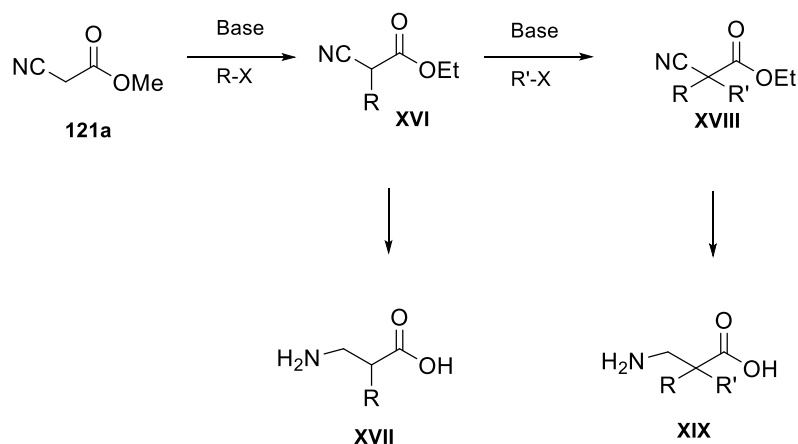


Esquema 25. Aproximaciones sintéticas conocidas para la obtención de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos quirales.

Estas aproximaciones incluyen: (a) Desplazamiento nucleófilo del grupo hidroxilo con PBr_5 seguido de tratamiento con una disolución de amoníaco en etanol. (b) Dialquilación de cianoacetatos con haluros de alquilo. (c) Rotura hidrolítica de derivados del ácido 5,5-diethyl-4-tiobarbitúrico. (d) Alquilación de cianoacetato con 5-bromo-1-penteno, seguido de una ciclación radicalaria. (e) Aminometilación sobre acetales de sililceteno en agua, en presencia de InCl_3 como catalizador. (f) Cierre de anillo de bencilhidroxiamina sobre cloruro de β -bromopropinil, para dar su una β -lactama que permita obtener el β -aminoácido libre. (g) Reacción de Reformatzky sobre el correspondiente derivado de benzotriazol con 2-bromoalcanoato. (h) Dialquilación sobre 3-aminopropanato de metilo protegido como Boc, utilizando metalocompuestos de litio. (PG= grupo protector).

Una de las estrategias presentadas en el Esquema 25 hace uso de la síntesis cianoacética. Como se indica, el protocolo implica una doble alquilación del metileno activo del éster cianoacético, a lo que sigue la reducción del grupo ciano a amino y la hidrólisis de la función éster, accediendo, de esta manera a ácidos 2,2-dialquil-3-aminopropiónicos (Esquema 26).

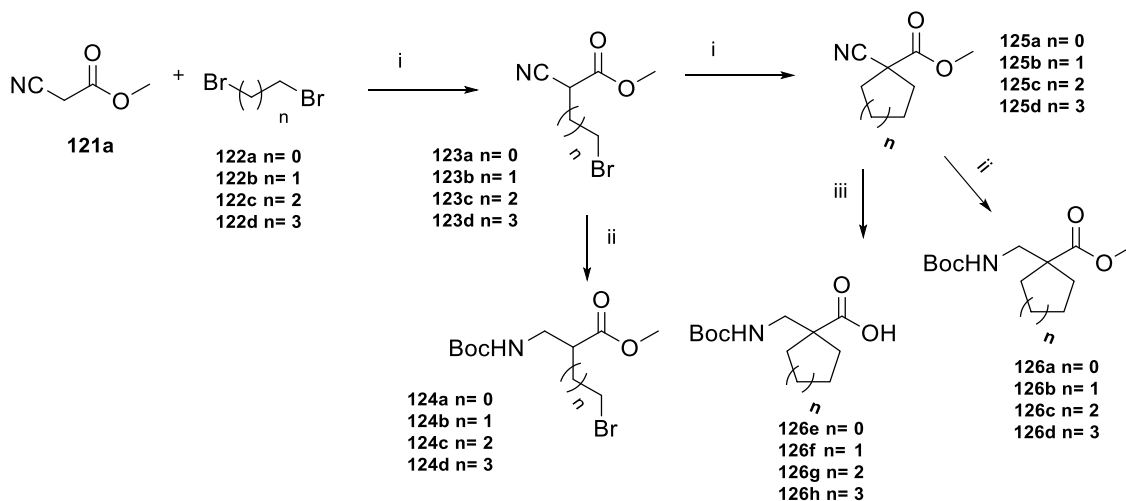
⁵³ Yu, J.-S., Noda, H., & Shibasaki, M. *Angewandte Chemie International Edition*, **2018**, 57, 818–822.



Esquema 26. Esquema general de la aplicación de la síntesis cianoacética para la preparación de β²-aminoácidos y β²,²-aminoácidos.

Esta estrategia ha resultado ser especialmente apropiada para la preparación de ácidos 2-aminometilcicloalcanocarboxílicos, en la que se emplean derivados dihalogenados (habitualmente dibromados) de cadena carbonada apropiada para generar el ciclo mediante la secuencia recogida en el Esquema 27. Implica una primera alquilación del metileno del éster cianoacético, a la que sigue una reacción de alquilación intramolecular, en que se forma el ciclo. Las dos etapas finales son las ya indicadas: reducción del grupo ciano a aminometilo e hidrólisis de la función éster.

Esta estrategia ha sido empleada por Seebach para preparar ácidos 1-aminometilciclopentánocarboxílicos,⁴⁴ como puede verse en este Esquema 27.

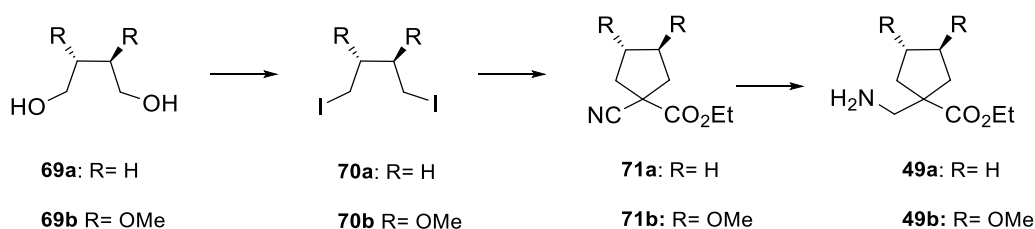


Esquema 27. i) Na₂CO₃, DMF. ii) a) H₂, Ni-Raney, MeOH, 1 atm, t.a. b) Boc₂O, MeCN, Et₃N, 0 °C. iii) iia, iib y c) LiOH, MeOH, t.a, 3 días.

3.2.2 Plan de trabajo

Nosotros nos hemos planteado aplicar la estrategia basada en la síntesis cianoacética a la preparación del éster etílico del ácido 1-aminometilciclopentánocarboxílico **49a** y a la de su derivado dimetoxilado **49b** mediante el plan de síntesis que se recoge en el

Esquema 28, empleando derivados diyodados obtenidos a partir de los dioles correspondientes.



Esquema 28. Síntesis de los derivados de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos ciclopentánicos.

Como se indicó en el apartado de objetivos, estos dos aminoácidos son los dos bloques sintéticos que hemos establecido para sintetizar y estudiar estructuralmente los péptidos siguientes:

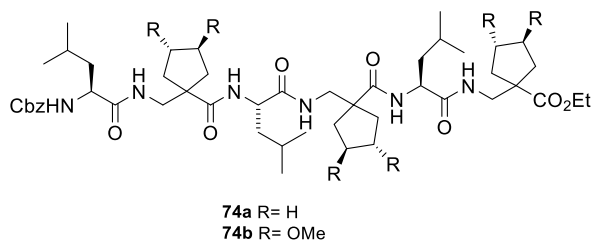
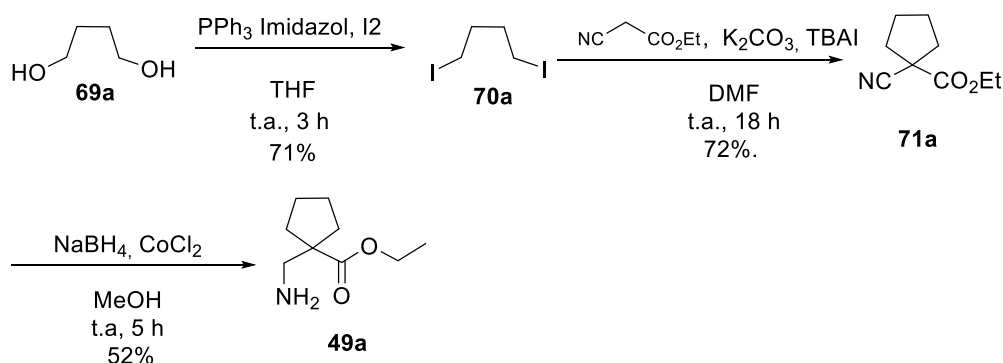


Figura 44. Hexapéptidos seleccionados **74a** y **74b**.

Se describen a continuación los resultados logrados.

3.2.3 Síntesis del éster etílico ácido 1-aminometilciclopentanocarboxílico (**49a**)

Procediendo de acuerdo con nuestro plan, para preparar el ácido 1-aminometilciclopentanocarboxílico (**49a**), se sometió el 1,4-butanodiol comercial a una reacción de Appel con trifenilfosfina y yodo molecular, utilizando imidazol como catalizador. Esto indujo la formación de 1,4-diiodobutano (**70a**) con un rendimiento del 71%, que fue identificado por comparación de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con las descritas en la bibliografía.⁵⁴

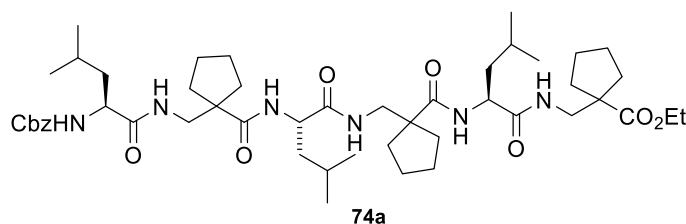
Esquema 29. Síntesis del éster **49a**.

A continuación, este diyododerivado **70a** se hizo reaccionar con cianoacetato de etilo, utilizando como catalizador de transferencia de fase TBAI y como base K_2CO_3 . Ello permitió generar el anillo ciclopentánico del β -cianoéster **71a** (rendimiento del 72%), que también se identificó por comparación de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con las descritas descritas en la bibliografía.⁵⁵

Nuestro plan de síntesis se completó tratando este cianoéster **71a** con $NaBH_4$, en presencia de $CoCl_2$, lo que permitió reducir eficientemente el grupo ciano al grupo aminometil del β -aminoácido ciclopentánico **49a**, que se utilizó directamente para su incorporación en péptidos.

3.2.4 Síntesis del α,β -péptido **74a**

Para nuestros estudios sobre α,β -péptidos derivados del ácido 1-aminometilciclopentanocarboxílico se eligió como compuesto modelo el hexapéptido **74a** (Figura 44), constituido por unidades alternadas del ácido 1-aminometilciclopentanocarboxílico (**49a**) y de L-leucina.

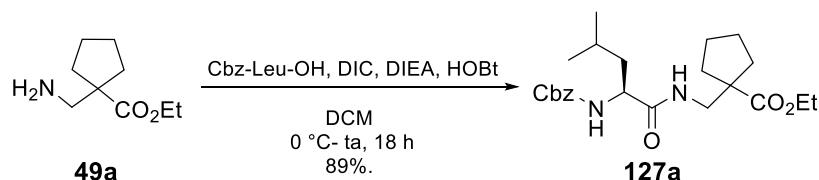
Figura 45. Hexapéptido **74a**.

Este α,β -péptido novedoso, fue elegido tomando como referencia su análogo con anillos ciclohexánicos descrito en la introducción (compuesto **12**, pág. 15), para comprobar si también nuestro péptido presenta una estructura helicoidal definida. De ser así, servirá como estructura básica para estudiar los efectos que sobre la estructura del péptido ejerce la presencia de grupos hidroxilo en el anillo cicloalcano.

⁵⁵ Masanobu Nagano, Masakazu Tanaka, Mitsunobu Doi, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, and Hiroshi Suemune. *Organic Letters*, **2009**, *11*, 1135-1137.

La preparación de este hexapéptido mixto se llevó a cabo mediante síntesis en disolución, como se describe a continuación.

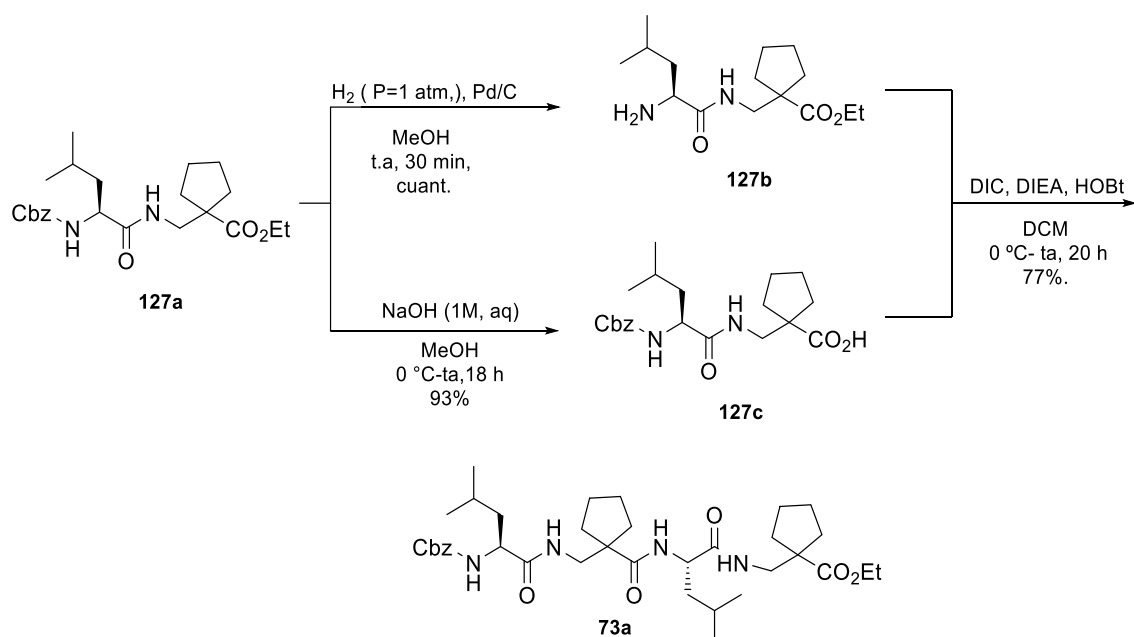
El β -aminoéster **49a** se sometió a una reacción de acoplamiento peptídico con Cbz-Leu-OH comercial, utilizando como agentes acoplantes DIC y HOBT y como base DIEA, lo que dio lugar al dipéptido **127a**, con un 89% rendimiento. (Esquema 30).



Esquema 30. Síntesis del dipéptido **127a**.

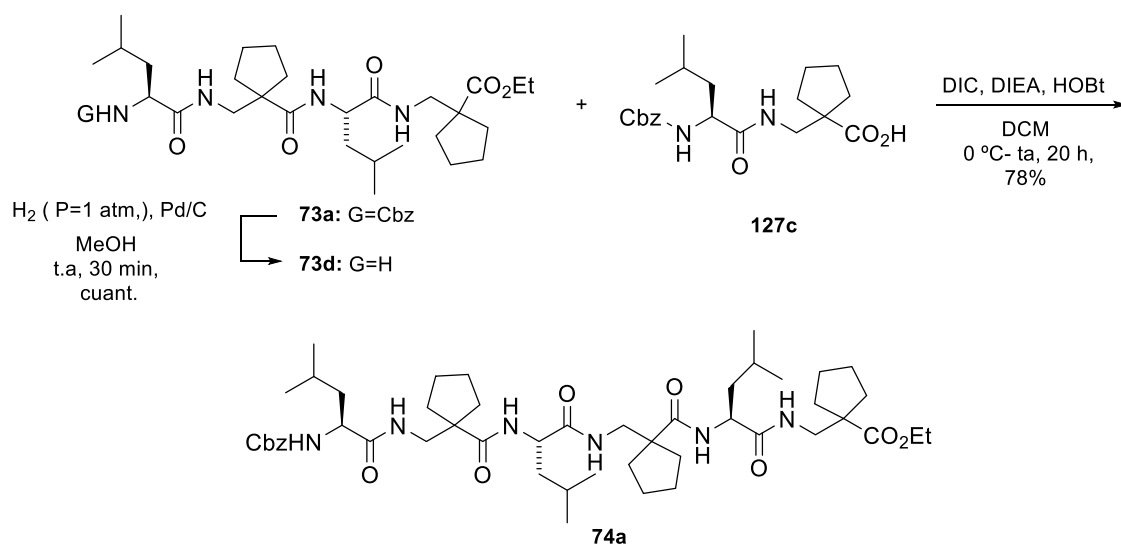
Este dipéptido **127a** se caracterizó a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas, destacando en su espectro de $^1\text{H-RMN}$, dos singuletes anchos a 5.15 y a 6.56 ppm, de un protón cada uno, debidos a los dos protones unidos los nitrógenos de amida y carbamato, así como una señal a 7.34 ppm, que integra por cinco protones, correspondiente al anillo aromático del grupo benciloxicarbonilamino. Su espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ muestra las tres señales de los grupos carbonilo, que aparecen a 156.2, 172.7, 177.5 ppm. En su espectro de IR destacan las bandas de los grupos carbonilo, a 1722 y 1661 cm^{-1} . Su espectro de masas de alta resolución presenta una señal con una relación $m/z=441.2360$ (valos teórico 441.2468) correspondiente al ion $[\text{M}^{++}\text{Na}]$, que confirmó la fórmula molecular esperada $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5$.

Se llevó a cabo a continuación la transformación de este dipéptido **127a** en el tetrapéptido **73a** (Esquema 31). Para ello, el dipéptido **127a** se sometió por una parte a un proceso de hidrogenación catalítica de su grupo benciloxicarbonilo, utilizando como catalizados Pd/C, lo que condujo al péptido **127b** con su grupo amino libre. Por otra parte, el dipéptido **127a** se sometió a una hidrólisis de su grupo éster etílico, utilizando NaOH como base, que condujo al dipéptido **127c** con su grupo ácido carboxílico libre.

Esquema 31. Síntesis del tetrapéptido **73a**.

Una vez obtenidos estos dos dipéptidos **127b** y **127c** ortogonalmente protegidos, su acoplamiento peptídico, usando también DIC y HOBt como agentes acoplantes, DIEA como base y diclorometano como disolvente, condujo con buen rendimiento (93%) al tetrapéptido **73a**, que fue caracterizado en base a sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. Su espectro de ^1H -RMN presenta cuatro singuletes anchos a 5.40, 6.51, 6.87 y 8.48 ppm, de un protón cada uno, debidos a los tres grupos -NH de amida y al -NH del grupo carbamato. También aparece un singulete a 7.31 ppm, que integra por cinco protones, que corresponde al anillo aromático del grupo benciloxicarbonilamino. En su espectro de ^{13}C -RMN, cabe destacar seis señales a 156.3, 173.2, 174.6, 177.5, 177.6 ppm, correspondientes a los grupos carbonilo, confirmandos por la presencia en su espectro de IR de dos bandas a 1702 y 1641 cm^{-1} . Añadido a ello, su espectro de masas de alta resolución muestra un pico con una relación $m/z = 679.4039$ (valor teórico 679.4149), correspondiente al ion $[\text{M}^+ + \text{Na}]$, que corresponde a su fórmula molecular esperada $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_7$.

Continuando con nuestro plan de trabajo, se sometió el tetrámero **73a**, a una reacción de hidrogenación catalítica de su grupo benciloxicarbonilo, utilizando como catalizadores Pd/C, lo que condujo al tetrapéptido **73d** con su grupo amino libre. Procedimos a continuación a acoplar este tetrapéptido con el dipéptido **127c**, antes obtenido. Las condiciones de acoplamiento fueron las de los casos previos (DIC y HOBt como agentes acoplantes, DIEA como base), obteniéndose así de forma satisfactoria el hexapéptido **74a** deseado, con un rendimiento del 78% (Esquema 32).


 Esquema 32. Síntesis del hexapéptido **74a**.

El compuesto **74a** fue caracterizado también basándonos en sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. En el espectro ^1H -RMN se observaron seis singuletes anchos, de un protón cada uno, a 5.47, 6.61, 7.00, 7.48, 8.32, 8.90 ppm, debidos a los cinco grupos -NH de amida y al grupo -NH del carbamato. También se observó un singulete que integra por cinco protones a 7.37 ppm, que corresponde a los protones aromáticos del grupo benciloxicarbonilamino. Su espectro de ^{13}C -RMN muestra las señales de los siete grupos carbonilo de la molécula a 156.0, 173.2, 175.1, 175.6, 177.4 ppm, que también aparecen en su espectro de IR como bandas a 1704 y 1638 cm^{-1} . Por último, en su espectro de masas de alta resolución se observó una señal con relación $m/z=895.5903$ (valor teórico 895.5830) correspondiente al ion $[\text{M}^++\text{H}]$, que confirmó la fórmula molecular esperada $\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_9$.

3.2.5 Estudio estructural del α,β -hexapéptido **74a**

Una vez preparados el dipéptido **127a**, el tetrapéptido **73a** y el hexapéptido **74a**, se llevaron a cabo estudios estructurales destinados a establecer si el hexámero **74a** adoptan un plegado helicoidal similar al que presenta su análogo **12** (Pág. 15) con anillos de ciclohexano.

3.2.5.1 Estudio de CD de los péptidos **127a**, **73a** y **74a**

El fenómeno de dicroísmo circular muestra la estructura secundaria de las proteínas naturales porque el enlace peptídico es asimétrico y en las moléculas sin un plano de simetría se observa dicho fenómeno. El cromóforo amida tiene dos estados de transición de baja energía, los cuales están bien caracterizados. Son la transición $n \rightarrow \pi^*$, asociada al momento dipolar magnético y $\pi_0 \rightarrow \pi^*$, asociada al momento dipolar eléctrico, viéndose en el espectro de dicroísmo circular a 215-230 nm y 185-200 nm respectivamente. Este fenómeno se observa también en las estructuras secundarias distintas de la hélice- α de las proteínas naturales, pero los desplazamientos de las curvas, así como su intensidad y signo dependen de cada estructura.

Con el objeto de ver si nuestros péptidos presentaban estructura secundaria en disolución se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular en metanol con los

péptidos que hemos sintetizado: el dímero **127a**, el tetrámero **73a**, y el hexámero **74a**, cuyas imágenes superpuestas pueden verse en la Figura 46.

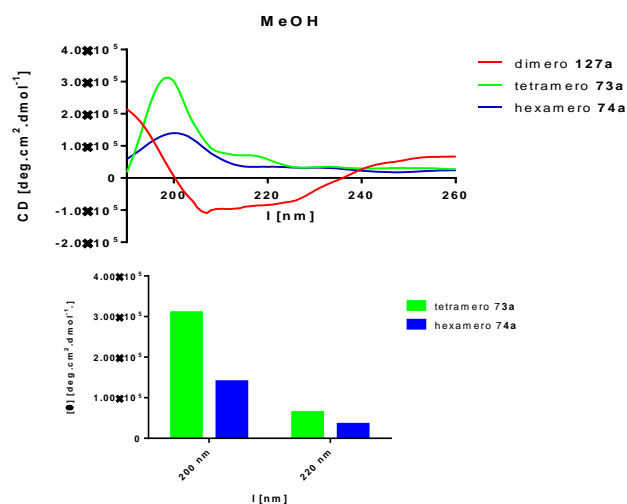


Figura 46. Dicroísmo circular de los α,β -péptidos **127a** (línea roja), **73a** (línea verde) y **74a** (línea azul) a una temperatura de 20°C y a una concentración 100 mM.

A partir de los experimentos realizados, puede verse claramente como el dipéptido **127a** (línea roja) no presenta prácticamente actividad (no puede presentar estructura secundaria). Sin embargo, en los casos del tetrámero **73a** (línea verde) y el hexámero **74a** (línea azul) pueden verse dos bandas de absorción en torno a 200 nm (intensa) y 220 nm (débil) características de las hélices-9/11 y 11/9.

Estos resultados, por comparación con los de la bibliografía⁵⁶, nos permiten proponer que nuestros péptidos (tetrámero y hexámero) se estructuran en disolución metanólica como hélices, pero no es posible distinguir entre las dos posibles hélices (9/11 y 11/9) con esta técnica.

3.2.5.2 Estudio de IR de los péptidos **127a**, **73a** y **74a**

La espectroscopia de infrarrojo permite establecer de forma fácil y económica la formación de enlaces de hidrógeno, aunque requiere un estudio exhaustivo que tenga en cuenta múltiples factores, como el disolvente empleado, la concentración de la muestra, etc. Pero, de forma general, se puede considerar que proporcionan una buena evidencia de la presencia de enlaces de hidrógeno:

- Un desplazamiento hacia el rojo de las señales de tensión de los grupos funcionales C=O de amida, junto con un aumento de su intensidad.
- Un desplazamiento hacia el azul de las señales de la tensión de los grupos funcionales C=N de amida, junto con un aumento de su intensidad.

⁵⁶ (a) *Angew. Chem.*, **2005**, *117*, 6028–6032. (b) *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, *16*, 433–438. (c) *Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *71*, 8395–8400.

- Un desplazamiento hacia el rojo de las señales de tensión de los grupos funcionales NH junto con un ensanchamiento de las mismas y un aumento de su intensidad.⁵⁷

En la Figura 47 aparecen superpuestos los espectros de IR del dímero **127a**, el tetrámero **73a** y el hexámero **74a**.

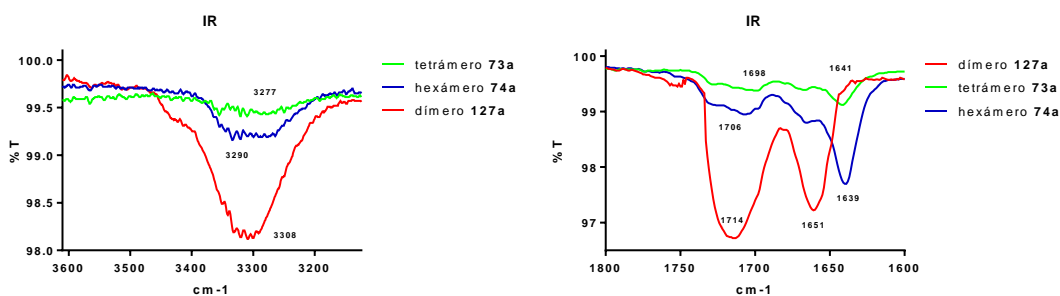


Figura 47. Espectros de IR de los péptidos **127a** (línea roja), **73a** (línea verde) y **74a** (línea azul). Zonas de vibración de tensión de los grupos NH de amida (izquierda) y carbonilo de amida (derecha).

Puede observarse como la banda de tensión de los enlaces NH de amida experimenta un desplazamiento desde 3308 cm^{-1} (dímero **127a**, línea roja), a 3290 cm^{-1} (tetrámero **73a**, línea verde) y a 3277 cm^{-1} (hexámero **74a**, línea azul). El desplazamiento a frecuencias más cortas a medida que aumenta la longitud del péptido constituye una primera evidencia de que se va adoptando una estructura secundaria más consistente a medida que aumenta el número de potenciales enlaces de hidrógeno.

3.2.5.3 Estudio de ^1H -RMN de hexapéptido **74a**

Para confirmar estas dos primeras evidencias sobre la estructura helicoidal de nuestro hexapéptido **74a** se llevó a cabo un estudio estructural más robusto utilizando la técnica de RMN.

Se realizaron en primer lugar experimentos de RMN (^1H , ^{13}C , TOCSY) con objeto de asignar las señales del espectro de ^1H -RMN. A partir de estos experimentos se asignan las señales de los protones de la molécula, las más importantes de las cuales aparecen recogidas en la Tabla 6.

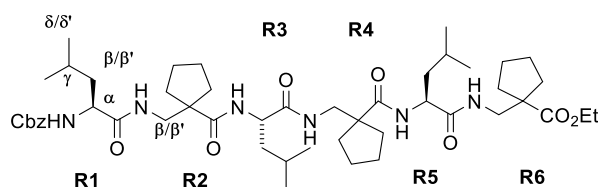


Figura 48. Hexapéptido **74a**.

⁵⁷ a) Beslvisi, L.; Gennari, C.; Mielgo, A.; Porenza, D.; Scolastico, C. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 389. b) Gellman, S.; Dado, G.; Liang, G.-B; Adams, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1164. c) Arnaudov, M Ivanova, B; Dinkov, S. *Central European Journal of Chemistry* **2004**, *2*, 589-597.

Residuo	HN	H α / H α '	H β / H β '	H γ	H δ /H δ '
R1	5.24	4.11/-	1,37	1.54	0.85
R2	8.15	-	3.76/2.84	-	-
R3	7.50	4.16/-	1.48	1.62	0.86
R4	7.77	-	3.66/3.04	-	-
R5	7.20	4.20/-	1.44	1.64	0.84
R6	6.46	-	3.48/3.32	-	-

Tabla 6. Asignación de las señales de ^1H -RMN-del hexapéptido **74a**. (278 K, CDCl_3 , 500 MHz).

Una vez llevada a cabo la asignación de las señales del espectro de ^1H -RMN de **74a**, fijamos nuestra atención en experimentos clave para poder determinar la existencia o no de una estructura helicoidal: estudio de disolución seriada, estudio de los coeficientes de temperatura (T-coef) de los protones unidos a nitrógeno (NH), valoración con DMSO de los protones unidos a nitrógeno (NH) y estudio de NOE (NOESY).

A. Disolución seriada

Con el objeto de conocer si nuestro hexapéptido **74a** se agrega en disolución, lo que podría interferir con los estudios de sus posibles interacciones intramoleculares, se llevaron a cabo experimentos de ^1H -RMN en CDCl_3 a 25°C y a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 mM).

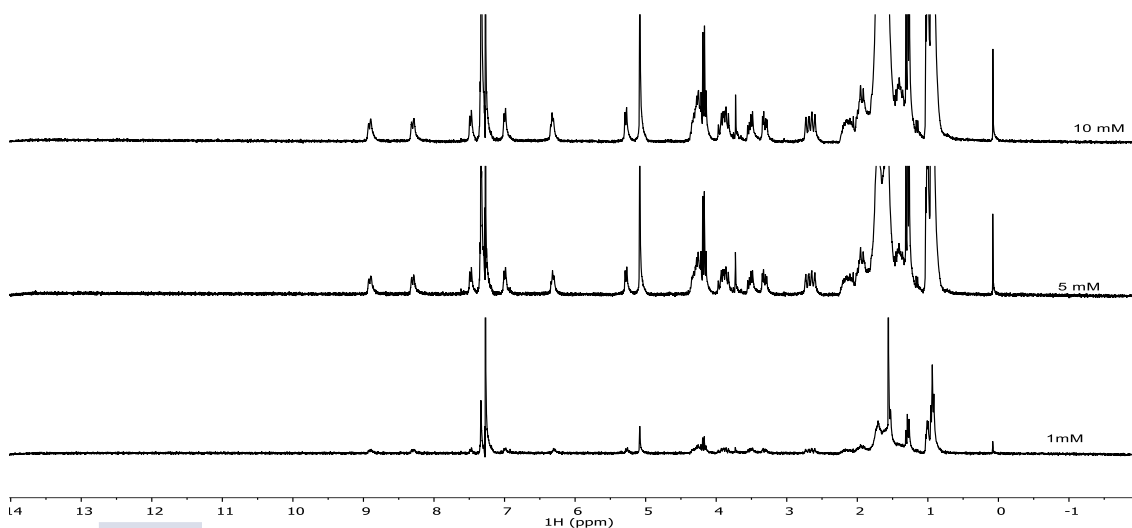


Figura 49. ^1H -RMN-del compuesto **74a** en CDCl_3 a 25°C y a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 mM).

Dichos experimentos aparecen recogidos en la Figura 49, y de ellos se puede concluir que no se aprecia agregación al aumentar las concentraciones dentro del rango descrito. Por lo tanto, decidimos estudiar el péptido a una concentración 5 mM, ya que las señales con una concentración menor son muy débiles.

B. Estudio de coeficientes de temperatura (*T-coef*)

Como ya se comentó anteriormente, está comúnmente aceptado que un compuesto presenta enlaces de hidrógeno intramoleculares si el *T-coef* del protón que forma el enlace de hidrógeno es menor que 5 ($\Delta\delta/\Delta T < 5$). En caso de que el *T-coef* de un protón sea mayor que 5 ($-\Delta\delta/\Delta T \geq 5$) se considera que el protón está en posiciones accesibles para el disolvente y por lo tanto no forma enlace de hidrógeno.

Para evaluar la existencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares que puedan estabilizar una estructura secundaria en forma de hélice en nuestro compuesto **74a**, se determinaron ahora los *T-coef*. Para ello se realizaron experimentos de ¹H-RMN empleando CDCl₃ libre de agua y ácido, a una concentración de 5 mM y en un rango de temperaturas desde -15 a 45 °C (con variaciones de temperatura de 5 °C). Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la Figura 50.

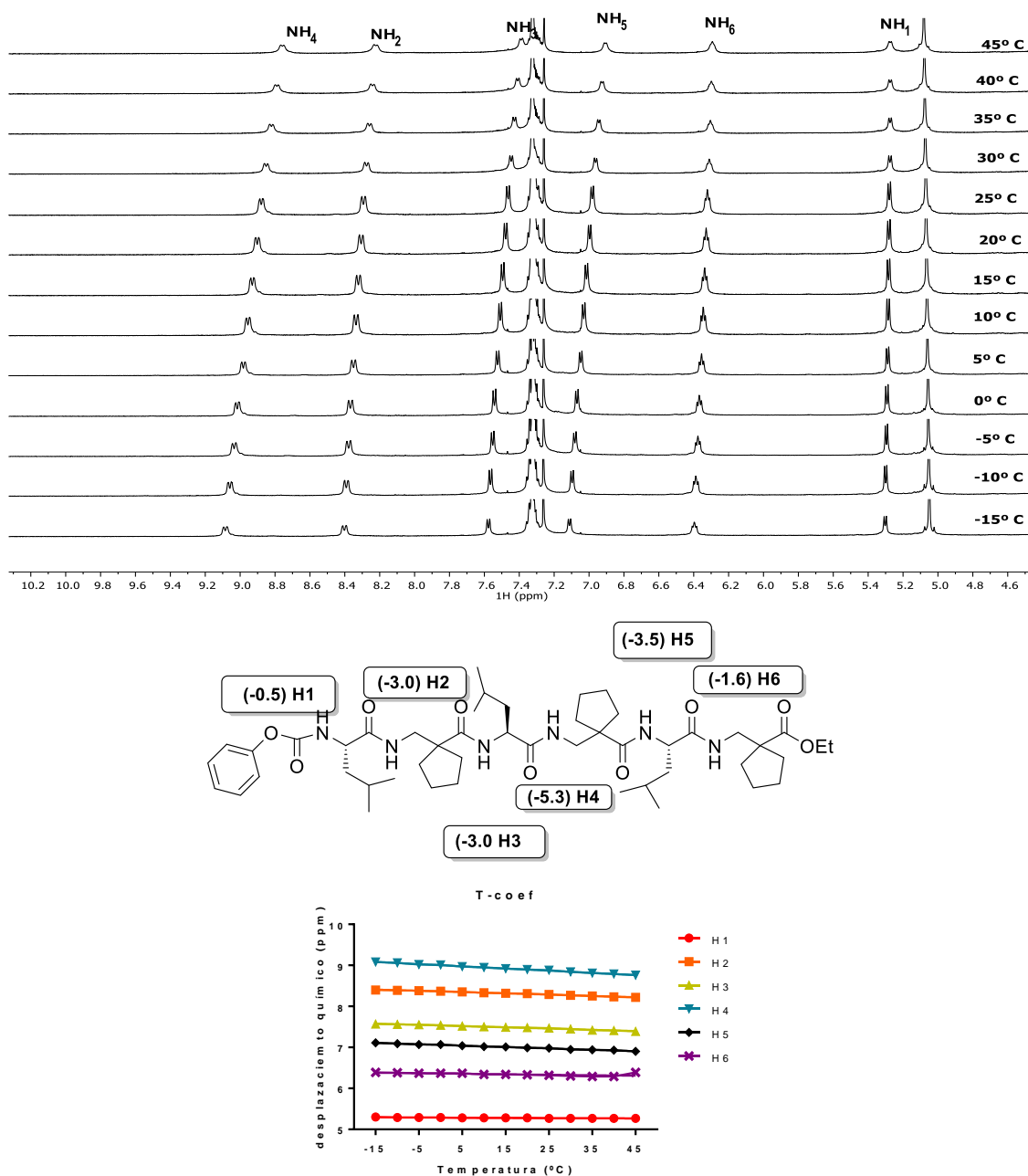


Figura 50. $^1\text{H-NMR}$ del compuesto **74a** en CDCl_3 a 5 mM y a diferentes temperaturas (-15°C - 45°C).

Los T-coef de los seis protones unidos a nitrógeno (NH) de nuestro hexámero aparecen reflejados en la Tabla 7 y en la Figura 50. Estos muestran que cinco de los seis protones NH están claramente formando enlaces de hidrógeno, únicamente el protón HN_4 presenta una situación dudosa, con un T-coef ligeramente superior a cinco.

HN	δ -max (45 °C) /ppm	d- min (-15 °C) /ppm	rango T/ K	T-coef/ ppb*K ⁻¹
H6	6,29	6,39	60	-1,6
H5	6,90	7,11	60	-3,5
H4	8,76	9,08	60	-5,3
H3	7,39	7,59	60	-3,0
H2	8,22	8,40	60	-3,0
H1	5,27	5,30	60	-0,5

Tabla 7. T-coef del compuesto **74a**.

C. Valoración con DMSO-d6

Con el objeto de confirmar si los NH de nuestro péptido **74a** están formando enlace de hidrógeno intramolecular, decidimos realizar un experimento de valoración con DMSO-d6. Este experimento nos permitirá observar la interacción de los protones NH con el DMSO-d6 y, por lo tanto, lo comprometidos que están en la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares.⁵⁸

Para ello, a una disolución 10 mM de **74a** en CDCl₃ (500 μ L) se le fueron añadiendo gradualmente cantidades de DMSO-d6. Después de cada adición se obtuvo el espectro de ¹H-RMN, para ver el cambio que sufría en su desplazamiento los protones NH.

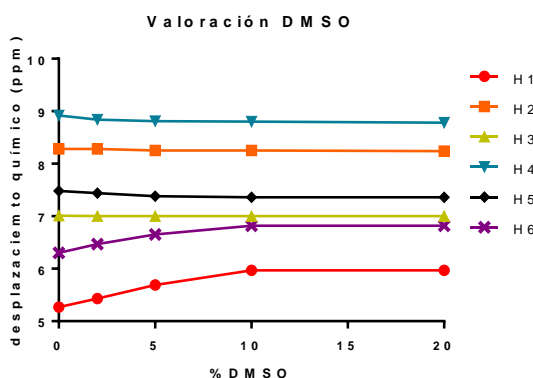


Figura 51. Valoración DMSO de una disolución 10 mM del hexámero **74a** en CDCl₃.

Como puede observarse en la gráfica de la Figura 51, en la que se representa el valor de desplazamiento químico de los protones HN de **74a** con respecto a la proporción de DMSO-d6 añadida, H1 y H6 sufren un desplazamiento mayor al aumentar la proporción de DMSO-d6. Estos resultados sugieren que H1 y H6 son más accesibles a la formación de enlaces de hidrógeno con el DMSO-d6, lo cual puede ser debido a que al encontrarse en los extremos del hexapéptido están más expuestos al disolvente. Estos datos y los datos de T-coef tan bajos son llamativos, ya que se esperaría que los enlaces de hidrogeno que podrían estar formando estos protones sean fuertes. Los protones H2, H3, H4 y H5 no

⁵⁸ Fischer, L.; Didierjcan, C.; Jolibois, F.; Semetey, V.; Lozano, J. M.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Poteau, R.; Guichard, G. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 2596-2610.

varían su desplazamiento químico con la concentración de DMSO-d₆, lo que indica que no están accesibles para formar enlaces de hidrógeno con el DMSO-d₆, confirmando ello que están implicados en la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

D. Estudio de NOESY

Para confirmar las evidencias mostradas anteriormente sobre la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en el péptido **74a** y por lo tanto su plegado como estructura secundaria como hélice, se llevaron a cabo también estudios de ¹H-RMN de 2D (NOESY). Los experimentos fueron realizados en CDCl₃ y los parámetros empleados fueron: 500 MHz, un tiempo de mezcla de 600 ms, una concentración de 5 mM y a una temperatura de 25 °C.

Los resultados obtenidos, que pueden verse en la Figura 52, no muestran señales NOESY intermoleculares, de lo que se deduce la ausencia de agregación a esta concentración. Por lo tanto, todos los NOE observados son intramoleculares y de ellos destacan por su importancia cuatro señales de NOE a larga distancia entre HN5 y el protón en α del residuo 3, así como entre los protones de amida: HN2 y HN3, HN4 y HN5 y HN1 y HN2 (Figura 52).

Señal NOE	
HN5 -> N α 3 (i -> i-2)	débil
HN2 -> HN3 (i -> i+1)	fuerte
HN4 -> HN5 (i -> i+1)	fuerte
HN1-HN2 (i -> i+1)	fuerte

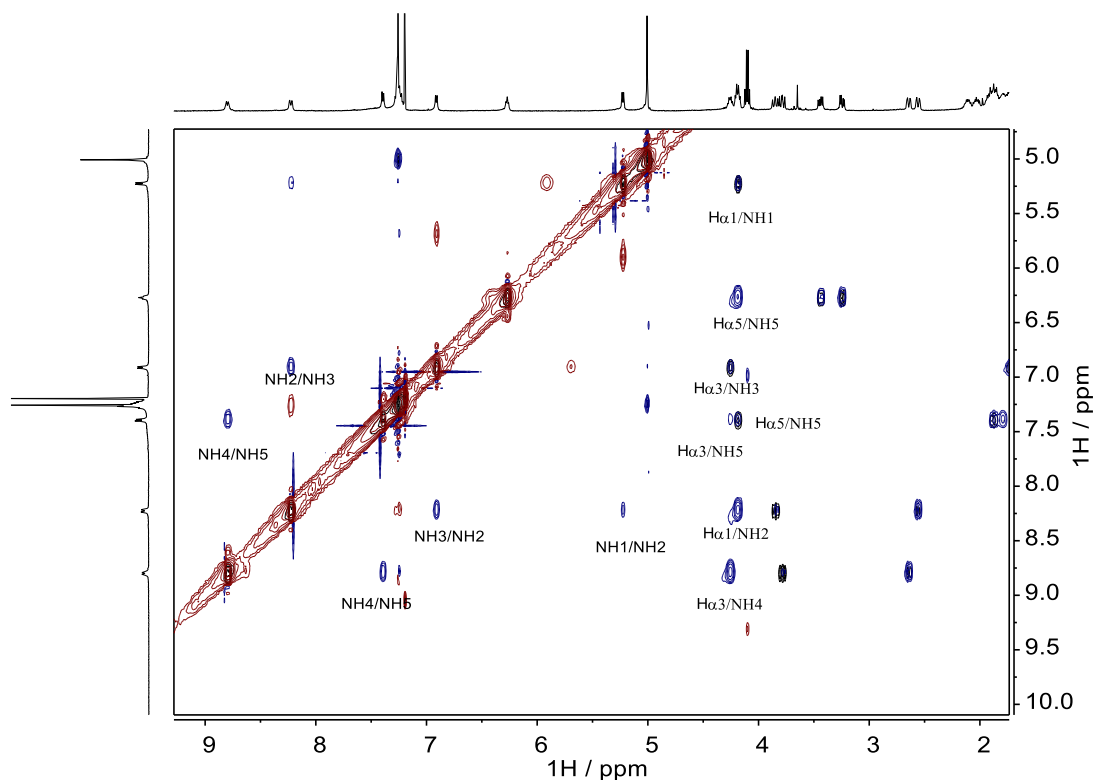
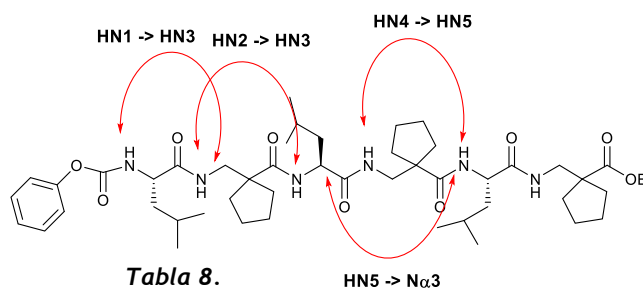


Figura 52. Espectros TOCSY y NOESY (500 MHz, 600 ms) superpuestos.

3.2.5.4 Conclusión

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados de CD, IR y RMN (^1H -, ^{13}C -, TOCSY, coeficientes de temperaturas, valoración con DMSO y NOESY), nos permiten concluir de forma inequívoca que:

- Nuestro hexámero **73a** muestra en disolución de Cl_3CD una conformación mayoritaria, que se evidencia en el espectro de ^1H -RMN y en su TOCSY donde se observa un único conformero.
- La conformación del hexámero **73a** en disolución de Cl_3CD es helicoidal, hecho soportado por: los valores de los coeficientes de temperatura de los enlaces HN, (exceptuando el NH4, el cual se encuentra en una situación dudosa).
- La valoración con DMSO, que nos indica que los NH1 y NH6 se encuentran más expuestos al disolvente que los enlaces HN centrales.

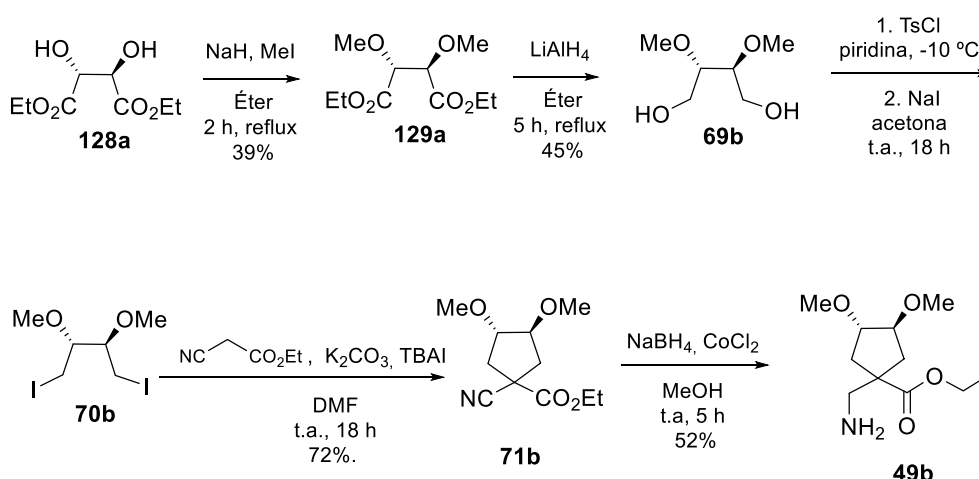
- Los estudios de NOE que muestran interacciones a larga distancia compatibles con una hélice, no siendo suficientes para diferenciar indistinguiblemente entre los dos tipos de hélices posibles, la hélice-9/11 y la hélice-11/9.

3.2.6 Síntesis del (3*S*,4*S*)-1-(aminometil)-3,4-dimetoxiciclopentanocarboxilato de etilo (**49b**)

Continuando con nuestro plan de trabajo, de acuerdo con lo establecido en el objetivo 2.2 de esta tesis doctoral, se procedió a extender la química descrita en el apartado previo, abordando la preparación del éster etílico del ácido (3*S*,4*S*)-1-(aminometil)-3,4-dimetoxiciclopentanocarboxílico **49b**, para utilizarlo luego para preparar el péptido mixto **74b**, análogo al pentapéptido **49a**, sin sustituyentes en los anillos ciclopentánico.

Se partió para ello del L-(+)- tartrato de dietilo (**128a**) comercial, que al ser tratado con hidruro de sodio y yoduro de metilo dio lugar a su derivado di-O-metoxilado **129a** con un rendimiento del 39%, que se identificó por comparación con los datos bibliográficos.⁵⁹

A continuación, la reducción de los grupos éster del compuesto **129b** con hidruro de litio y aluminio proporcionó el diol **69b** con un rendimiento del 45%, que también se identificó por comparación con los datos espectroscópicos descritos en la bibliografía.⁶⁰



Esquema 33. Síntesis del aminoéster **49b**.

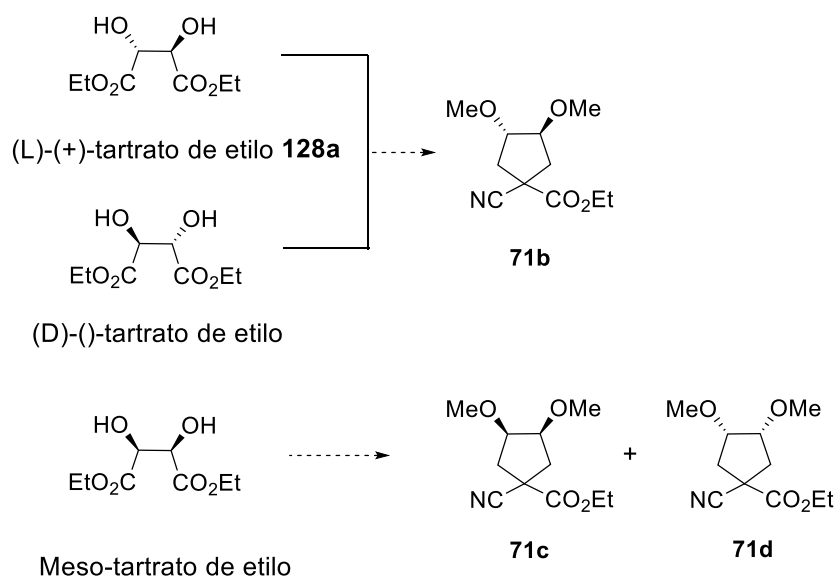
Después de transformar este diol **69b** en su derivado diyodado **70b** también conocido,⁶¹ a través del ditosilato correspondiente, este diyoduro **70b** se sometió a un protocolo de síntesis cianoacética, haciéndolo reaccionar con cianoacetato de etilo, en presencia de carbonato potásico y TBAI. Ello condujo al 1-cianociclopentanocarboxilato de etilo **71b** esperado, que se obtuvo con un rendimiento de un 89%. El compuesto **71b** se caracterizó

⁵⁹ Zuolin Wu Yanjiong Huang Chunhua Zhang Danyang Zhu Zheng Bian Mengxian Ding Lianxun Gao Zhenghua Yang. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117* (6), 3558–3567.

⁶⁰ Kozo Shishido, Kazuyuki Takahashi, Keiichiro Fukumoto, Tetsuji Kametani, and Toshio Honda. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5704–5714.

⁶¹ Yosuke Demizu. Mitsunobu Doi, Masaaki Kurihara, Tokumi Maruyama, Hiroshi Suemune, Masakazu Tanaka. *Chemistry A European Journal*, **1987**, *18*, 2430-2439.

de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas y espectrométrica. Así, su espectro de ^1H -RMN presenta, en otras, las siguientes señales: a 1.25 ppm un triplete de tres protones, correspondiente al CH_3 del éster etílico, a 3.24 y 3.29 ppm dos singuletes de tres protones cada uno correspondientes a los grupos éter de metilo y a 4.20 ppm un cuádruplete de dos protones, debido al CH_2 del éster etílico. En su espectro de ^{13}C -RMN cabe destacar, entre otras, las siguientes señales: a 62.9, 39.6 y 39.1 ppm tres señales correspondientes a los grupos metileno, a 168.3 ppm una señal correspondiente al grupo CN y a 120.5 ppm una señal correspondiente al grupo carbonilo. En su espectro de IR aparece la banda del grupo carbonilo del éster a 1742 cm^{-1} y a 2242 cm^{-1} una banda poca intensa correspondiente al grupo CN. Por último, en su espectro de masas de alta resolución se observó una señal con una relación m/z de 250.1050 $[\text{M}^+ + \text{Na}]$ (valor teórico $m/z = 250.1047$ correspondiente al ion $[\text{M}^+ + \text{Na}]$) que corresponde con la fórmula molecular esperada $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_4$.



Esquema 34. Productos posibles de ciclación de los diferentes estereoisómeros del tartrato de dietilo.

El resultado obtenido durante la etapa de ciclación demostró que la elección del producto de partida (L)-(+)-tartrato de dietilo (**128a**) fue la correcta, ya que sólo esta estereoquímica, o la de su enantiómero, pueden dar lugar a un producto único a partir de los dos modos de ciclación posibles. La forma meso daría lugar a un par de diastereoisómeros durante la etapa de ciclación, como se muestra en el esquema anterior.

Finalmente, el tratamiento del cianoacetato de etilo alicíclico **71b** obtenido con NaBH_4 , en presencia de CoCl_2 , permitió reducir el grupo ciano a aminometil y obtener, consiguientemente, el β -aminoéster **49b** y que se utilizó directamente para su incorporación en péptidos.

3.2.7 Síntesis de péptido **74b**

Elegimos ahora como péptido modelo para nuestro estudio el hexámero **74b**.

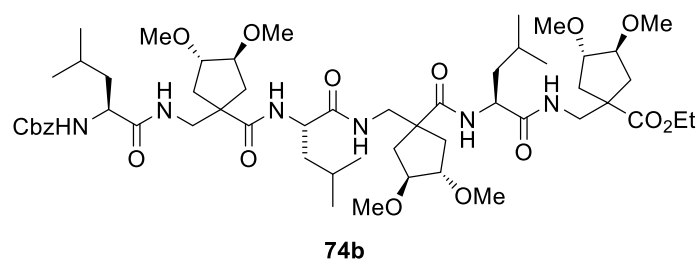
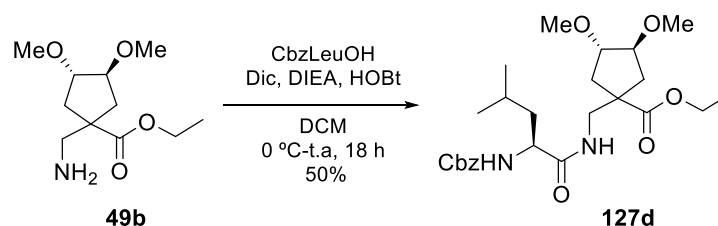


Figura 53. Péptido modelo seleccionado para nuestro estudio.

La elección de este péptido, como ya se explicó en el apartado de objetivos, tiene por objeto estudiar el efecto que sobre la estructura secundaria del péptido con anillos ciclopentánico no sustituidos **74a**, estudiada en el capítulo anterior, tiene la presencia de sustituyentes (en este caso dos grupos metoxilo en cada uno de los anillos ciclopentánicos).

El protocolo para la preparación del hexapéptido **74b** se inició con la síntesis del dipéptido **127d**, que se llevó a cabo tratando el β -aminoéster **49b**, anteriormente sintetizado, con el α -aminoácido Cbz-Leu-OH comercial, utilizando como agentes acoplantes DIC y HOBT y como base DIEA. Se obtuvo de esta forma el dímero **127d** esperado con un rendimiento 50% (Esquema 35).

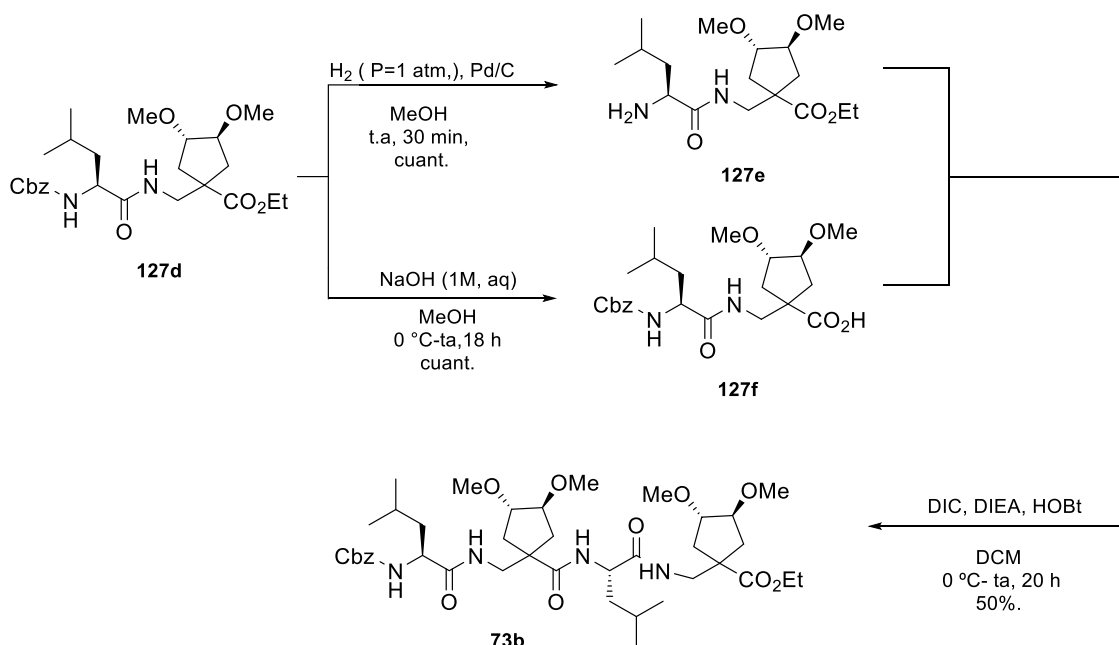


Esquema 35. Síntesis del dipéptido **127d**.

Este dipéptido **127d** se caracterizó de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas, destacando en su espectro de ^1H -RMN, dos singuletes anchos a 5.37 y a 6.70 ppm, de un protón cada uno, que corresponden a los grupos -NH de amida y de carbamato, así como un singulete a 7.31 ppm, que integra por los cinco protones del anillo aromático del grupo benciloxicarbonilamino. En su espectro de ^{13}C -RMN son representativas las señales a 156.1, 172.5, 175.7 ppm, todas ellas correspondientes a los grupos carbonilo de la molécula, que aparecen también en su espectro de IR como bandas a 1721 y 1660 cm^{-1} . Su espectro de masas de alta resolución presenta una señal con una relación $m/z = 501.2572$ correspondiente al ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$, que se corresponde con la fórmula molecular esperada $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7$.

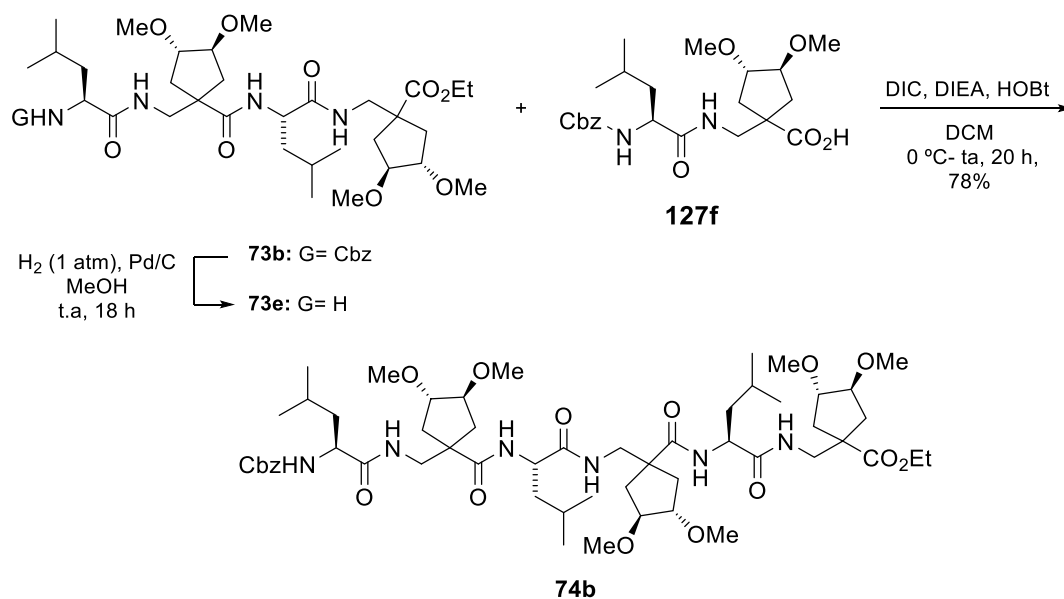
El dipéptido **127d**, se sometió por una parte la hidrólisis en medio básico de su grupo éster de etilo, haciéndolo reaccionar con una disolución 1 M de NaOH en MeOH, lo que permitió obtener el ácido dimérico **127f** de manera cuantitativa. Y, por otra parte, a la hidrogenación catalítica de su grupo benciloxicarbonilo, llevada a cabo por hidrogenación catalítica utilizando como catalizador Pd/C 10%, lo que condujo dipéptido **127e**, con su grupo amino libre. Ambos dipéptidos **127e** y **127f** fueron utilizados directamente en la siguiente etapa de la síntesis.

Una vez obtenidos los dos dipéptidos ortogonalmente protegidos, con el grupo ácido libre (**127f**) y con el grupo amino libre (**127e**), se procedió a acoplarlos, usando también ahora DIC y HOBt como agentes acoplantes y DIEA como base. Ello condujo como se esperaba al tetrapéptido **73b** con un 50% de rendimiento (Esquema 36).



Esquema 36. Síntesis del tetrapéptido **73b** a partir del dipéptido **127d**.

Este tetrapéptido **73b** fue caracterizado de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. En su espectro de ¹H-RMN presenta tres singuletes anchos a 5.47, 6.57, y 7.65 ppm, de un protón cada uno, que corresponden a tres grupos NH. La señal del cuarto NH aparece incluida en un multiplete de seis protones a 7.38–7.29 ppm, que incluye también las señales de los protones aromáticos del grupo benciloxicarbonilamino. En cuanto a su espectro de ¹³C-RMN, cabe destacar las cinco señales a 156.1, 172.7, 173.2, 176.0, 178.3 ppm, debidas a los grupos carbonilo. En su espectro de IR son relevantes las bandas de los grupos carbonilo a 1726, 1702, 1672 y 1642 cm⁻¹ y en su espectro de masas de alta resolución muestra un pico con una relación m/z=777.4644 correspondiente al ion [M+Na]⁺, que coincide con fórmula molecular esperada C₄₀H₆₄N₄O₁₁.



Finalmente, se llevó a cabo la transformación del tetrapéptido **73b** en el hexapéptido **74b**. Para ello, la hidrogenación catalítica del tetrámero **73b** utilizando Pd/C 10% como catalizador, permitió generar el correspondiente derivado **73e**, con su grupo amino libre, que se acopló directamente con el dipéptido **127f** antes preparado, utilizando las condiciones habituales de acoplamiento peptídico (DIC y HOBT como agentes acoplantes, DIEA como base). Obteniéndose de este modo el hexámero **74b** deseado con un rendimiento del 78% (Esquema 37).

Las propiedades espectroscópicas y espectrométrica de este hexapéptido permitieron determinar su estructura. Su espectro de $^1\text{H-RMN}$ incluye seis singuletes anchos a 5.25, 6.52, 7.57, 7.41-7.30, 7.88, 8.24 ppm, de un protón cada uno, debidos a los cinco grupos NH de amida y al grupo NH de carbamato. También se observa un multiplete entre 7.41-7.30 ppm, debido a los cinco protones aromáticos del grupo benciloxycarbonilamino. Su espectro de masas de alta resolución presenta una señal con una relación $m/z=1075.6537$ correspondiente al ion $[\text{M}+\text{H}]^+$, que confirmó la fórmula molecular esperada $\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{15}$.

3.2.8 Estudio estructural de hexapéptido 74b.

Una vez sintetizados los péptidos **127d**, **73b** y **74b** decidimos llevar a cabo un estudio estructural de los mismos para comprobar si presentan estructura secundaria.

3.2.8.1 Estudio de CD

Comenzamos el estudio de la estructura secundaria de nuestros péptidos, al igual que en el caso previo, realizando con ellos experimentos de dicroísmo circular en metanol, cuyas imágenes superpuestas pueden verse en la Figura 54.

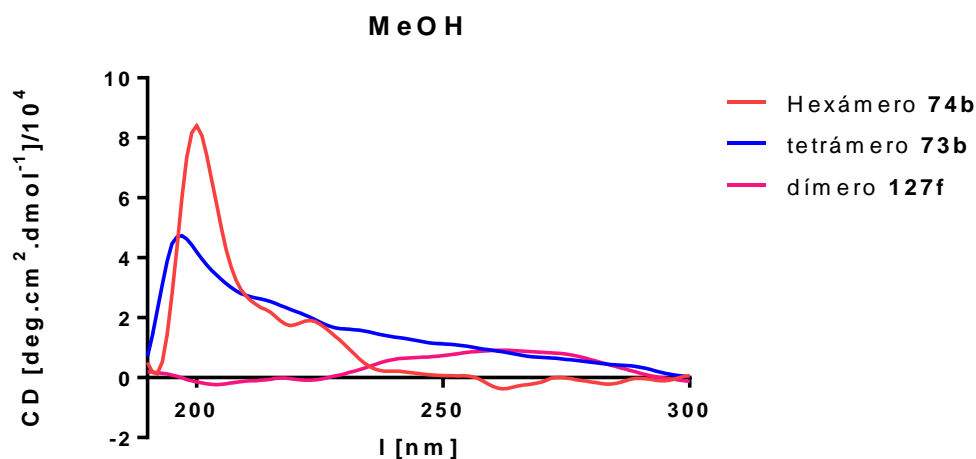


Figura 54. Dicroísmo circular de los α,β -péptidos 127f, 74b y 73b.

Estos espectros de dicroísmo circular muestran la ausencia de estructura secundaria en el dímero **127f** (no puede representar estructura secundaria), y una cierta estructuración en el tetrámero **73b**, con dos máximos de absorción a 201 y 224 nm. Esta tendencia parece acrecentarse en el hexámero **74b**, donde aparecen más marcados los dos máximos de absorción a 198 y 218 nm.

3.2.8.2 Estudio de IR

Continuamos nuestro estudio realizando espectros de IR para los péptidos objetivo **127f**, **73b** y **74b**, de los que destacamos en la siguiente figura, por su interés, una ampliación y superposición de las bandas de tensión de los enlaces HN de amida.

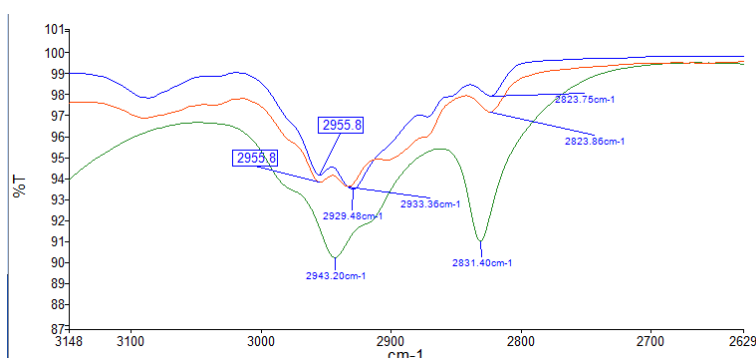


Figura 55. Espectros de IR del dipéptido **127f** (línea azul), tetrapéptido **73b** (línea naranja), hexapéptido **74b** (línea verde). Ampliación de la zona de tensión de los enlaces HN de amida.

Como podemos observar en la Figura 55 existe un desdoblamiento de la banda de absorción IR de los enlaces de amida HN al ir aumentando el número de residuos de los

péptidos (**127f**, **73b** y **74b**), lo cual es un indicio claro de la existencia de enlaces de hidrógeno en el tetrapéptido **73b** y el hexapéptido **74b**.

3.2.8.3 Estudio de RMN

Para completar el estudio estructural del hexapéptido **74b** llevamos a cabo estudios de RMN del mismo. Se realizaron en primer lugar experimentos de RMN (^1H , ^{13}C , TOCSY) conducentes a la asignación de las señales de sus protones.

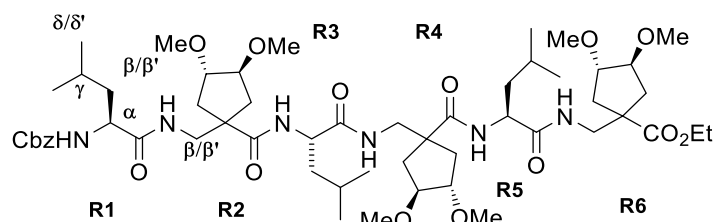


Figura 56. Hexapéptido **74b**.

Residuo	HN	H α	H β /H β'	H γ	H δ /H δ'
R1	5.24	4.11	1,37	1.54	0.85
R2	8.15	-	3.76/2.84	-	-
R3	7.50	4.16	1.48	1.62	0.86
R4	7.77	-	3.66/3.04	-	-
R5	7.20	4.20	1.44	1.64	0.84
R6	6.46	-	3.48/3.32	-	-

Tabla 9. Asignación de las señales de ^1H -RMN del compuesto **74b**. (278 k, CDCl_3 , 500 MHz).

Una vez llevada a cabo la asignación de las señales del espectro de ^1H -RMN de **74b**, cuyos resultados aparecen recogidos en la Figura 56 y la Tabla 9 fijamos nuestra atención en tres experimentos claves para poder determinar la existencia o no de una estructura secundaria (supuestamente helicoidal), que son: estudio de los coeficientes de temperatura (T-coef) de los protones unidos a nitrógeno (HN), valoración con DMSO y estudio de NOE (NOESY).

A. Disoluciones seriadas

Con el objeto de conocer si nuestro hexámero **74b** se agrega en disolución, lo que podría interferir con los estudios de sus posibles interacciones intramoleculares, se llevaron a cabo experimentos de ^1H -RMN en CDCl_3 a 25°C y a diferentes concentraciones (1, 5, 10 mM).

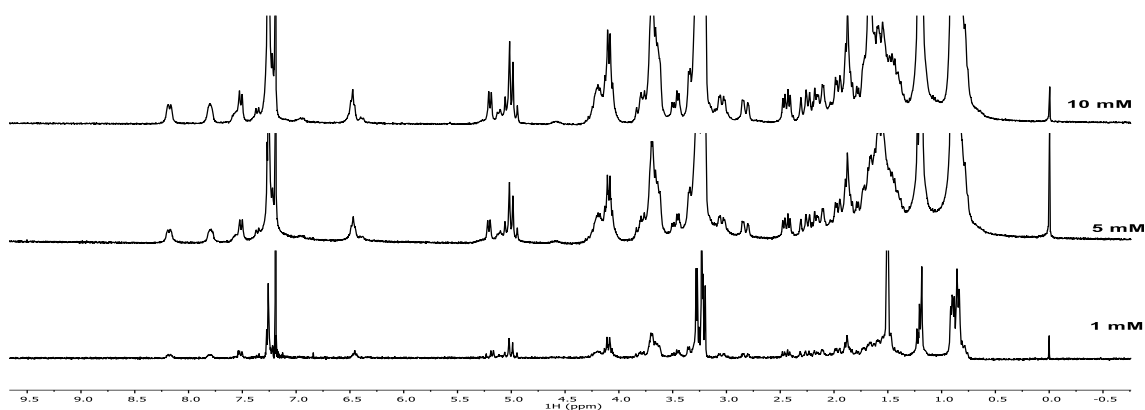


Figura 57. Espectros de ^1H -RMN del hexámero **74b** a distintas concentraciones (10, 5 y 1 mM).

Dichos experimentos aparecen recogidos en la Figura 57, y de ellos se puede concluir que no se aprecia agregación al aumentar las concentraciones dentro del rango descrito. Por lo tanto, decidimos estudiar el péptido con una concentración 5 mM, ya que las señales con una concentración menor son muy débiles.

B. Estudio de coeficientes de temperatura (T -coef)

Para evaluar la existencia de enlaces de hidrógeno intramolecular que puedan estabilizar una estructura secundaria nuestro compuesto **74b**, determinamos ahora los T -coef. Para ello se realizaron experimentos de ^1H -RMN empleando CDCl_3 libre de agua y ácido, a una concentración de 5 mM y en un rango de temperaturas desde -15 a 45 $^\circ\text{C}$ (con variaciones de temperatura entre medidas de 10 $^\circ\text{C}$). Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la Figura 58.

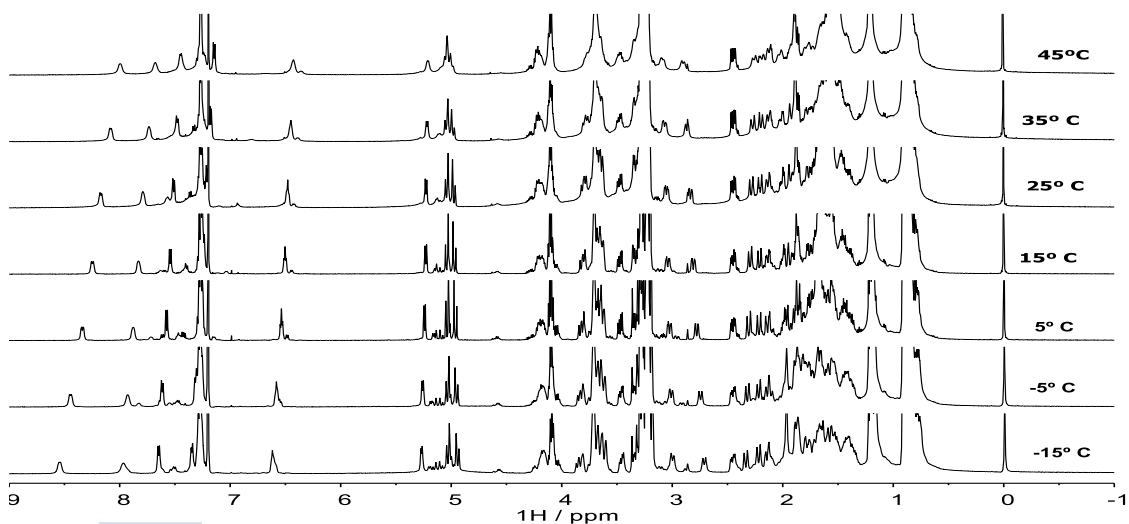
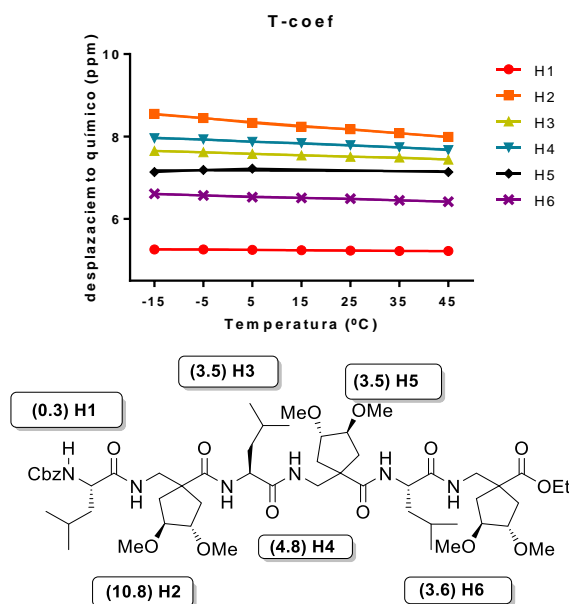


Figura 58. Espectros de ^1H -RMN del hexámero **74b** a distintas temperaturas (-15 - 45 $^\circ\text{C}$) a 5 mM.

nombre	δ - max (45 °C) /ppm	d- min (-15 °C) /ppm	rango T/ K	T-coef/ ppb*K ⁻¹
H6	6,42	6,61	60	3,6
H5	7,14	7,35	60	3,5
H4	7,67	7,96	60	4,8
H3	7,44	7,65	60	3,5
H2	7,67	8,55	60	10,8
H1	5,22	5,26	60	0,3

Tabla 10. T-coef del compuesto **74b**.

Los T-coef de los seis protones unidos a nitrógeno (HN) de nuestra molécula aparecen reflejados en la Tabla 10 y en la Figura 58. Estos coeficientes de temperatura muestran que cinco de los seis protones HN están claramente formando enlaces de hidrógeno, únicamente el protón H4 presenta una situación dudosa, con un T-coef ligeramente superior a cinco.

Figura 59. T-coef de los seis protones unidos a nitrógeno del hexapéptido **74b**.

C. Valoración con DMSO-d₆

Para afianzar el resultado previo obtenido sobre los posibles enlaces de hidrógeno de los HN de amida de nuestro compuesto, decidimos realizar un experimento de valoración con DMSO-d₆. Este experimento nos permitirá observar la interacción de los protones HN de nuestro compuesto con el DMSO-d₆ y, por lo tanto, los comprometidos que están en la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares.⁵⁸

Para ello, a una disolución 10 mM de **74b** en CDCl₃ (500 μ L) se le fueron añadiendo gradualmente cantidades de DMSO-d₆. Después de cada adición se midió el espectro de ¹H-RMN para ver el cambio que sufría en su desplazamiento los protones HN.

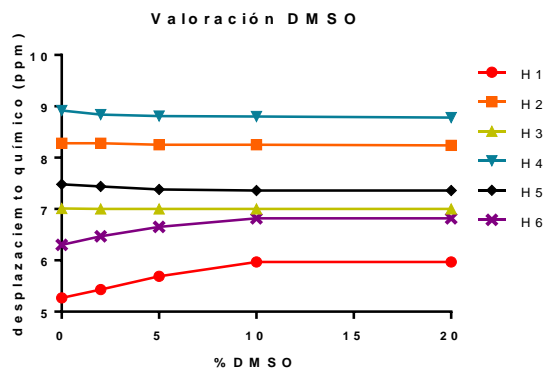


Figura 60. Valoración DMSO de una disolución 10 mM del hexámero **74b** en $CDCl_3$.

Como puede observarse en la Figura 60 en la que se representa el valor de desplazamiento químico de los protones HN de **74b** con respecto a la proporción de DMSO- d_6 añadida, H1 y H6 sufren un desplazamiento al aumentar la proporción de DMSO- d_6 . Estos resultados sugieren que H1 y H6 son más accesible a la formación de enlaces de hidrógeno con el DMSO- d_6 , lo cual puede ser debido a que al encontrarse en los extremos del hexapéptido estén expuestos al disolvente. Sin embargo, los protones H2, H3, H4 y H5 no varían su desplazamiento químico respecto a la concentración de DMSO- d_6 , por lo que parecen estar formando los cuatro enlaces de hidrógeno, incluso el protón H2 que presenta un T-coef elevado, por lo que su participación en un enlace de hidrogeno previsiblemente sea descartable, estos datos en la valoración con DMSO- d_6 se puede explicar al encontrarse H2 en posiciones intermedias del péptido estando ligeramente expuesto al disolvente.

D. Estudio de NOESY

Por último, realizamos un experimento NOESY y otro TOCSY para ver las posibles interacciones entre protones a larga distancia y poder corroborar así las evidencias obtenidas anteriormente sobre la posible estructura secundario del hexapéptido **74b**, así como si esta estructura es de tipo helicoidal. Los experimentos fueron realizados en $CDCl_3$ y los parámetros empleados fueron: 500 MHz, un tiempo de mezcla de 600 ms, una concentración de 5 mM y a una temperatura de 25 °C.

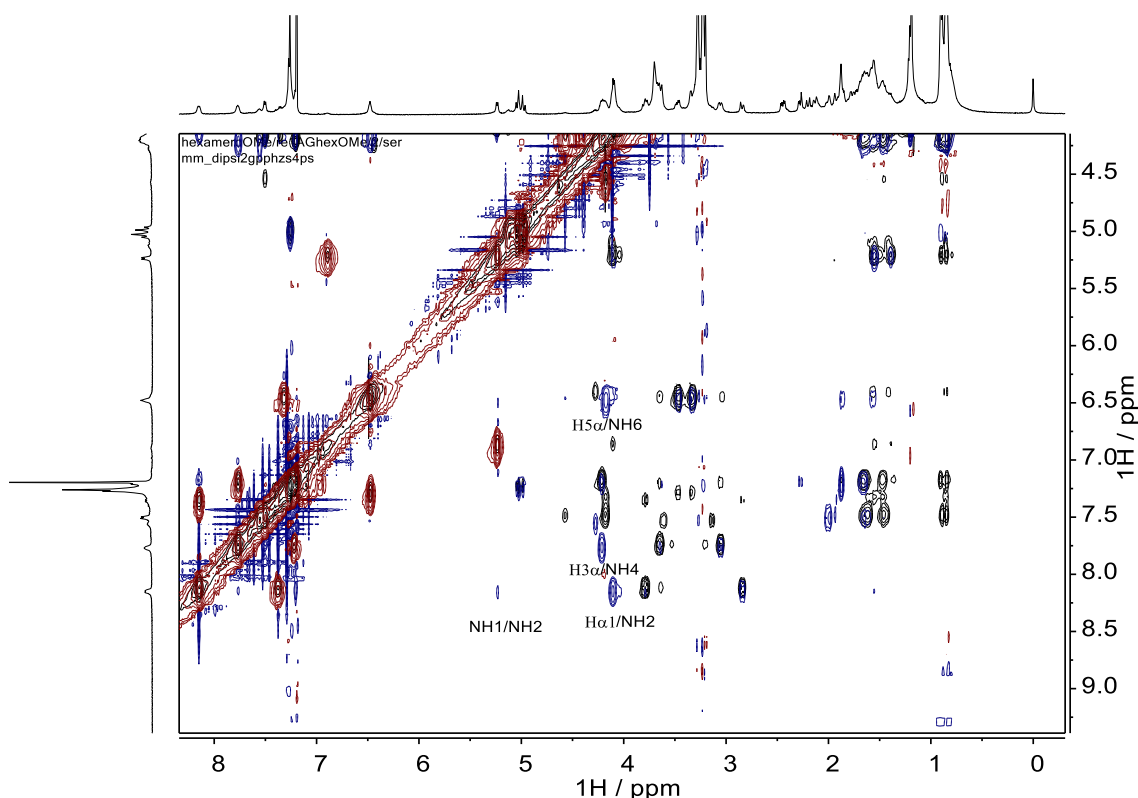


Figura 61. Espectros TOCSY y NOESY (500 MHz, 600 ms, 5mM en $CDCl_3$) superpuestos del hexapéptido **74b**.

En el espectro de NOESY (Figura 61) se observan picos del mismo signo que la diagonal de los HN, que también se observan en el experimento TOCSY. Estas señales pueden ser EXSY, señales que ponen de manifiesto que un HN del mismo residuo está en intercambio entre las dos conformaciones. Un estudio más detallado de este fenómeno nos llevó a determinar, a partir del experimento de 1H -RMN, la existencia de un conformero minoritario y un conformero mayoritario, con una relación 1: 8.9.

Los estudios de NOESY no muestra ninguna conexión que no sea entre residuos secuenciales, lo que no nos permite determinar con seguridad ningún tipo de estructura secundaria para este compuesto, aunque todos los experimentos anteriores avalan su existencia.

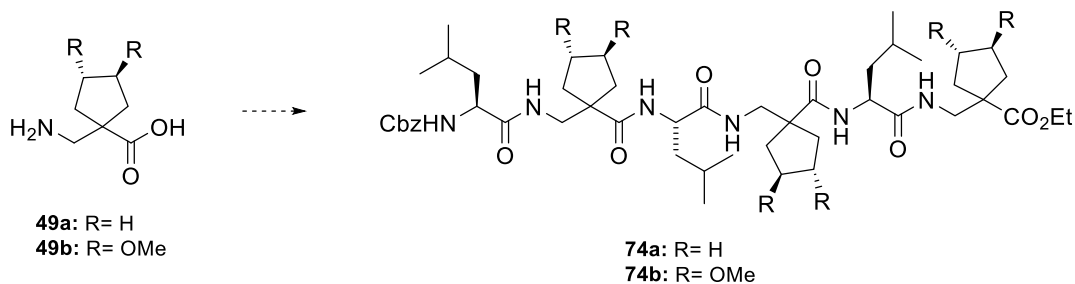
3.2.9 Conclusión

Todo esto parece indicar que, de existir, estos enlaces de hidrógeno son débiles y, por lo tanto, las distancias $NH-O=C$ serían más largas en este caso que para la hélice del hexámero **74a**. Por lo que podemos concluir que la modificación del β -aminoácido, introduciendo dos grupos metoxilo en el cada uno de los anillos ciclopentánicos del péptido, hace que la hélice de este hexámero **74b** esté menos estructurada que la hélice del hexámero **74a** con los anillos ciclopentánicos sin sustituir.

3.3 SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL $\beta^{2,2}$ -AMINOÁCIDOS PIPERIDÍNICOS Y SUS α,β -PÉPTIDOS

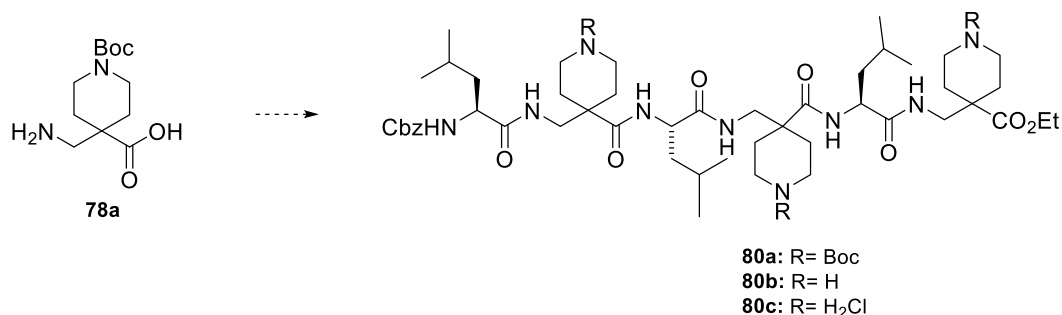
3.3.1 Antecedentes y plan de trabajo.

En el capítulo previo se expusieron los resultados de nuestros estudios iniciales sobre la síntesis y estudio estructural de péptidos de ácidos 1-aminometilcicloalcánocarboxílicos, que consistieron en abordar la síntesis de los β -aminoácidos ciclopentánicos **49a** y **49b**, su incorporación en los α,β -péptidos **74a** y **74b** y los estudios estructurales de estos dos péptidos (pág. 60).



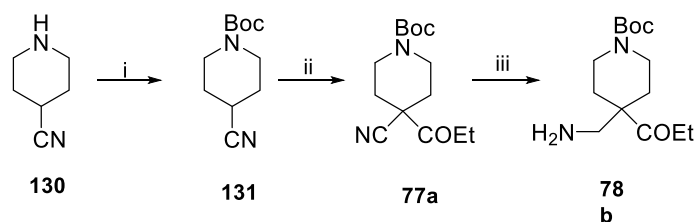
Esquema 38.

En este capítulo se describe la extensión de estos estudios al caso del ácido 4-(aminometil)piperidin-4-carboxílico **78a**, para incorporarlo en los tres α,β -péptidos **80a-c** indicados en el Esquema 39, con objeto de estudiar también sus propiedades estructurales.



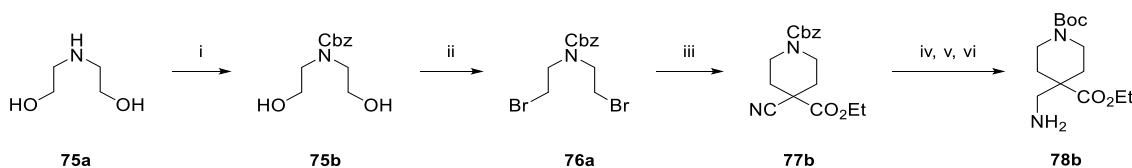
Esquema 39.

La síntesis del β -aminoácido piperidínico **78a**, necesario para nuestro trabajo, está descrita en la bibliografía, a partir de 4-cianopiperidina **130** comercial, por protección del grupo amino de la piperidina con anhídrido de *tert*-butoxicarbonilo y metalación del compuesto formado con diisopropilamiduuro de litio, seguida de reacción con cloroformiato de etilo y reducción final del grupo ciano por hidrogenación catalítica; como se muestra en el Esquema 40.⁶²



Esquema 40. Condiciones: i) Boc_2O , DIEA, THF. ii) a: $\text{Li}(\text{iPr})_2$, THF. b: Cloroformiato de etilo, NaHCO_3 , H_2O . iii) H_2 , PtO_2 , AcOH, 5 bar.

Otra interesante aproximación sintética conducente también a nuestro β -aminoácido piperidínico **78b**, más sencilla, parte de dietanolamina (**75a**) comercial. Tras proteger el grupo amino de este diol como *N*-Cbz, el diol **75b** resultante se transformará en el dibromuro **76a**, a través del correspondiente dimesilato. Luego, este compuesto se sometió a un protocolo de síntesis cianoacética, tratándolo con cianoacetato de etilo en medio básico, lo que permitió generar el α -cianoacetato azaciclohexánico **77b**. Finalmente, el cianoéster **77b** se transforma en el β -aminoácido piperidínico **78b**, ortogonalmente protegido, desprotegiendo el grupo *N*-Cbz por hidrogenación catalítica, sin reducción del grupo ciano, reprotendiendo la amina así obtenida como *N*-Boc y reduciendo al final el grupo ciano a amino, como puede verse en el Esquema 41.⁶³



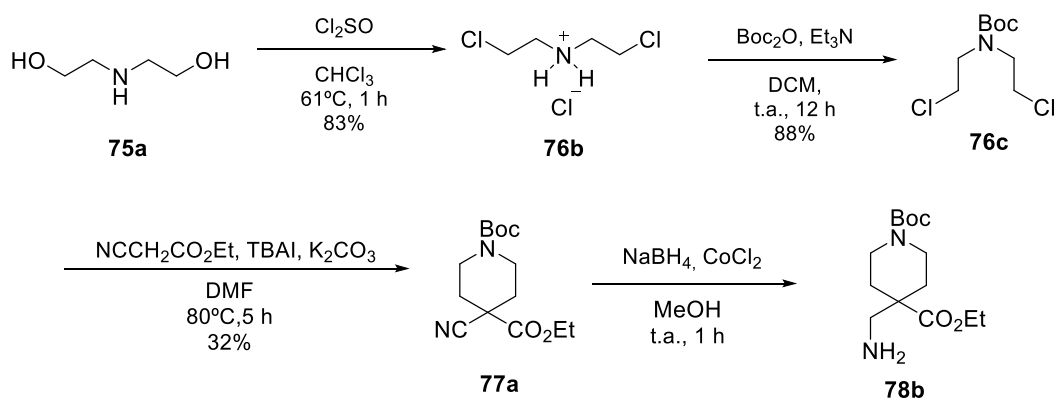
Esquema 41. Condiciones: i) CbzCl , DIEA, THF. ii) a: MsCl , DIEA, THF. b: LiBr , THF. iii) a: Cianoacetato de etilo, NaH , DMF. iv): H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2$, AcOEt . v): Boc_2O , DIEA, THF. Vi) H_2 , PtO_2 , AcOH, 5 bar.

A la vista de los antecedentes bibliográficos conducentes a la síntesis de nuestro β -aminoácido objetivo **78b**, decidimos estudiar un método de síntesis basado en la síntesis cianoacética descrita anteriormente, que introduce una enorme simplicidad y que se expone a continuación.

3.3.2 Síntesis del 4-(aminometil)-1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-carboxilato de etilo (**78b**)

Nuestra síntesis del β -aminoácido objetivo **78b** se llevó a cabo partiendo también de dietanolamina comercial (**75a**), empujando una aproximación más sencilla que la recogida en el Esquema 41, que aparece recogida en el Esquema 42.

⁶³PCT Int. Appl., 2001070734. 27 sept. 2001



Esquema 42. Síntesis del β -aminoácido **78b**.

Comenzamos la ruta sintética transformando el dietanolamina comercial (**75a**) en su correspondiente dicloruro **76b**. Para ello, el producto de partida se trató con cloruro de tionilo en cloroformo a 61° C durante una hora, lo que condujo con buen rendimiento (83%) a **76b**, en forma de sal de amonio. Este dicloruro **76b** se transformó en su carbamato de *tert*-butilo **76c**, tratándolo con Boc_2O , utilizando trietilamina como base y diclorometano como disolvente. Esta transformación tuvo lugar con un rendimiento del 88%. Este carbamato **76c** se caracterizó por comparación de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con las descrito en la bibliografía.⁶⁴

La síntesis se continuó sometiendo el dicloruro **76c** a un protocolo de síntesis cianoacética, tratándolo con cianoacetato de etilo, utilizando carbonato potásico como base y yoduro de tetrabutilamonio como catalizador, lo que condujo al α -cianoacetato de etilo azaciclohexánico **77a** esperado, con un rendimiento del 32%. Aunque la ciclación del cianoacetato de etilo con el dicloruro **76c** transcurre con un rendimiento menor que el descrito en la bibliografía con el dibromuro **76a** (Esquema 41), la mayor simplicidad de nuestro protocolo, que implica menos etapas, hace que sea más aconsejable.

Este cianoéster **77a** se caracterizó a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. Su espectro de ^1H -RMN presenta entre otras las siguientes señales: un triplete de tres protones a 1.30 ppm y un cuartete de dos protones a 4.26 ppm, debidos al grupo carboxietilo y un singulete a 1.40 de nueve protones correspondiente al grupo protector *tert*-butoxocarbonilo. Su espectro de ^{13}C -RMN incluye: dos señales a 43.7 ppm y a 28.3 ppm, debidas a los grupos metileno y metilo del etoxicarbonilo, una señal 117.9 ppm, del grupo CN, dos señales a 167.9 y 154.2 ppm, de los grupos carbonilo. En su espectro de IR son relevantes la banda del grupo carbonilo a 1690 cm^{-1} y una banda débil a 2200 cm^{-1} correspondiente al grupo ciano. Su espectro de masas de alta resolución presenta una señal con una relación $m/z = 305.1471$ correspondiente al ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$, que se corresponde con la fórmula molecular del compuesto esperado $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$.

La última etapa de la ruta sintética conducente a nuestro β -aminoácido **78b** fue la reducción del grupo ciano de su precursor **77a** a amino. La reacción se llevó a cabo utilizando borohidruro sódico como reductor y cloruro de cobalto (II), lo que condujo al

⁶⁴ Burakova, E. A.; Saranina, I. V.; Tikunova, N. V.; Nazarkina, Z. K.; Laktionov, P. P.; Karpinskaya, A.; Anikin, V. B.; Zarubaev, V. V.; Silnikov, V. N. Biological Evaluation of Tetracationic Compounds Based on Two 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane Moieties Connected by Different Linkers. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 6012–6020.

aminoéster esperado **78b**, como un aceite inestable, que se acopló a nuestros péptidos objetivo directamente, como se indica en el siguiente apartado.

3.3.3 Síntesis del hexapéptido **80a**

Continuando con nuestro plan de trabajo, se abordó a continuación la síntesis de nuestro siguiente objetivo, el hexapéptido **80a**.

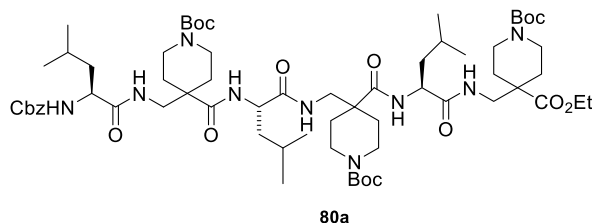
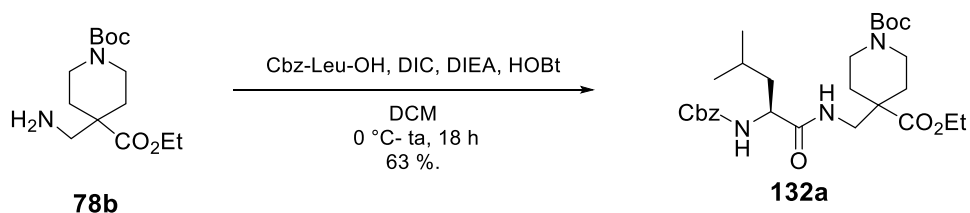


Figura 62. Hexapéptidos **80a**.

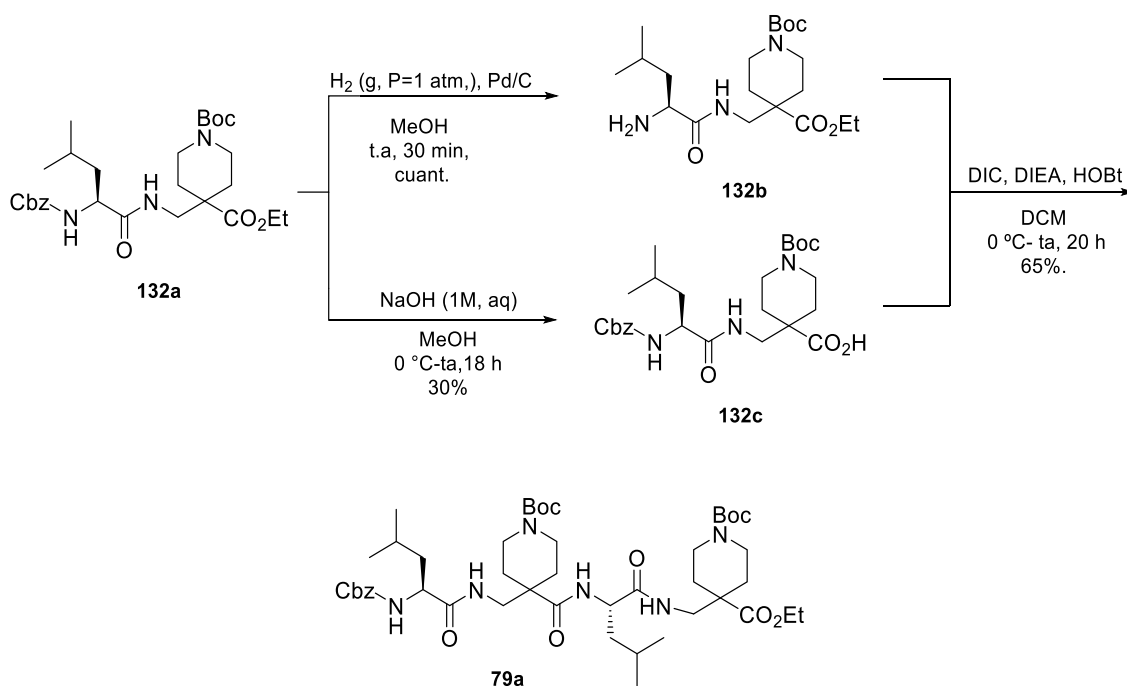
Para ello, se realizó una primera reacción de acoplamiento peptídico del β -aminoéster **78b**, obtenido anteriormente, con Cbz-Leu-OH comercial, utilizando como agentes acoplantes DIC y HOBt y como base DIEA. Ello condujo con un rendimiento del 63% al dipéptido **132a** esperado (Esquema 43).



Esquema 43. Síntesis del dipéptido **132a**.

El dipéptido **132a**, así obtenido, fue caracterizado basándonos en sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas, destacando en su espectro de $^1\text{H-RMN}$ dos singletes anchos a 5.17 y 6.41 ppm, de un protón cada uno, que corresponden a los dos protones NH de amida y de cabamato. Lo que evidencia la formación del enlace peptídico. Además, su espectro de masas de alta resolución mostró una señal con una relación $m/z=534.3174$ correspondiente al ion molecular $[\text{M}]^+$, que corresponde a la fórmula molecular del compuesto esperado $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$.

Una vez obtenido este dipéptido **132a**, se abordó su transformación en el tetrapéptido **79a**, procediendo como se indica en el Esquema 44.



Esquema 44. Síntesis del tetrapéptido **79a**.

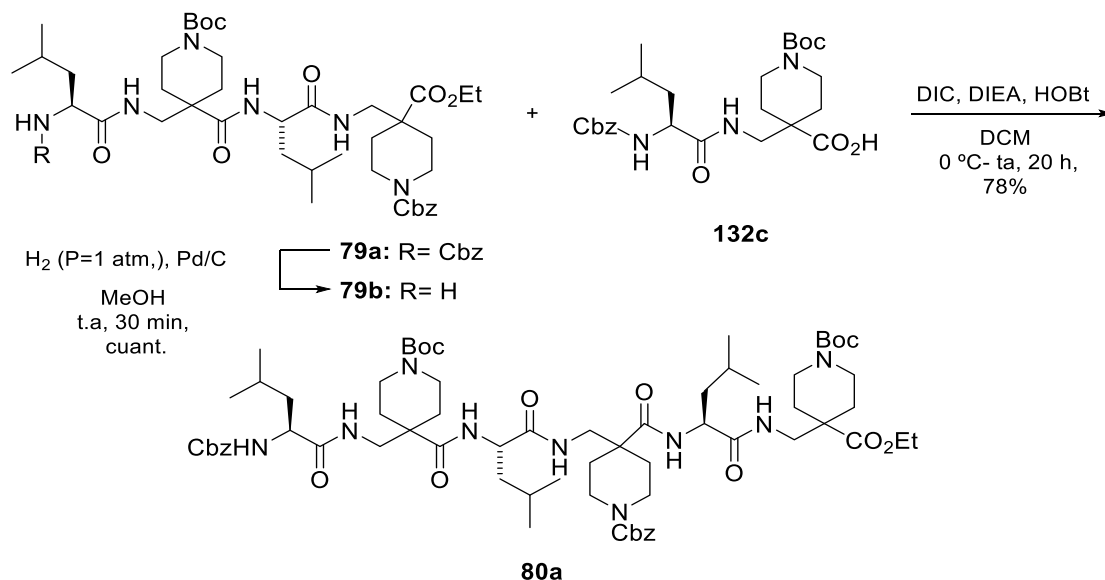
La hidrólisis básica de la función éster del dipéptido **132a**, llevada a cabo con NaOH en MeOH, condujo al dipéptido **132c** correspondiente, con su grupo carboxilo libre, aunque con un rendimiento bajo (30%), debido probablemente a razones de tipo estérico. La hidrólisis de la función éster pudo constatarse fácilmente a partir de su espectro de ^1H -RMN, en que están ausentes las señales del grupo etoxilo del compuesto de partida. Además, su fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_7$ fue confirmada mediante su espectro de masas de alta resolución, a partir del pico con una relación $m/z = 534.3168$ del ión molecular M^+ .

A continuación, se abordó la eliminación del grupo carboxibencilo del dipéptido **132a**, que se llevó a cabo mediante hidrogenación catalítica, utilizando Pd/C como catalizador. Ello proporcionó cuantitativamente el dipéptido **132b**, con su grupo amino libre, que se utilizó sin mayor purificación en la siguiente reacción.

Una vez transformado el dipéptido **132a** inicial en los dipéptidos con su grupo carboxilo libre **132c** y en el dipéptido con su grupo amino desprotegido **132b**, se procedió a transformarlo en el tetrapéptido **79a**, utilizando las condiciones usuales de acoplamiento péptidico (agentes acoplantes DIC y HOBt, base DIEA y disolvente diclorometano seco, se obtuvo el tetrapéptido **79a** como esperábamos con buen rendimiento (65%), como se muestra en el Esquema 44.

El tetrapéptido **79a** formado, fue caracterizado también basándonos en sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. Así, su espectro de ^1H -RMN presenta cuatro singuletes a 4.36, 5.29, 6.47 y 8.60 ppm, de un protón cada uno, debidos a los tres protones NH de amida y al protón NH del carbamato. Por otra parte, su espectro de masas de alta resolución muestra una señal con una relación $m/z = 887.5494$ correspondiente al ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ del compuesto $\text{C}_{46}\text{H}_{75}\text{N}_6\text{O}_{11}$.

Una vez obtenido el tetramero **79a**, se llevó a cabo su transformación en el hexapéptido **80a**. Para lo cual el tetrapéptido **79a** se sometió a una reacción de hidrogenación catalítica, utilizando Pd/C como catalizador, con objeto de dejar libre el grupo amino de su extremo *N*-terminal. Esta reacción transcurrió satisfactoriamente de forma cuantitativa, lo que se evidenció mediante su espectro de ^1H -RMN que mostró tres singules a 7.5, 6.6 y 6.5 ppm, de un protón cada uno, que corresponden a los tres grupos NH de amida (uno menos que el compuesto de partida).



Esquema 45. Síntesis del hexapéptido **80a**.

Finalmente, el tetrapéptido **79b** con su grupo amino terminal libre se acopló con el dipéptido **132c**, antes obtenido, empleando las condiciones usuales (agentes acoplantes DIC y HOBT, base DIEA y disolvente diclorometano seco), lo que condujo al hexapéptido **80a** deseado con un buen rendimiento (78%). Este hexapéptido **80a** fue caracterizado a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. En su espectro de ^1H -RMN presenta entre 7.3-7.5 ppm un multiplete de los cinco protones bencílicos de la unidad dimérica acoplada. Además, se observan a 5.10, 6.12, 7.25, 7.47, 8.14 y 8.62, ppm seis señales, de un protón cada una, debidas a los protones NH de la molécula. Su espectro de masas de alta resolución muestra un pico con una relación $m/z = 1262.7622$ correspondiente al ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ acorde con la fórmula molecular esperada $\text{C}_{67}\text{H}_{103}\text{N}_9\text{O}_{15}$.

3.3.4 Estudio estructural del hexapéptido **80a**

Una vez sintetizados los péptidos **132a**, **79a** y **80**, decidimos llevar a cabo un estudio estructural de los mismos para comprobar si presentan estructura secundaria en disolución y si esta es de naturaleza helicoidal.

3.3.4.1 Estudio de dicroísmo circular

Como en los casos previos comenzamos el estudio estructural realizando espectros de dicroísmo circular de todos los péptidos sintetizados, el dímero **132a**, tetramero **79a** y el hexámero **80a**, en disolución metanólica. Los resultados de estos experimentos pueden verse en la Figura 63.

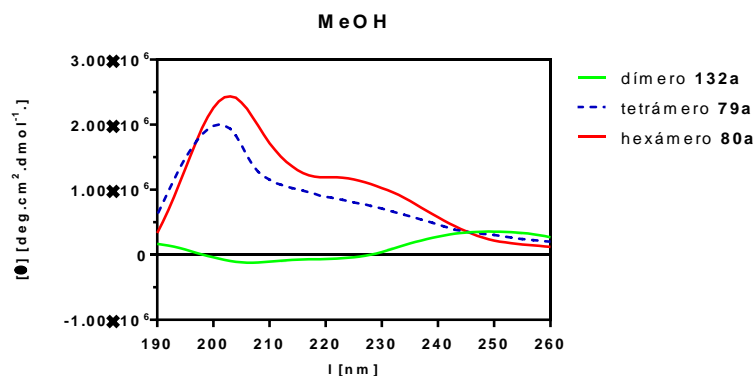


Figura 63. Espectros de CD de los compuestos 132a, 79a y 80a en metanol a 25°C.

El dímero **132a** presenta un espectro de CD plano, por su incapacidad para establecer una estructura secundaria, pero los otros dos péptidos muestran una curva con un máximo alrededor 200 nm y otro máximo a 230 nm, lo cual concuerda con la posible presencia de una hélice, como en el caso del hexámero **74a** y **74b**. También se observa un aumento de la elipticidad molar al aumentar el número de residuos en los péptidos estudiados, lo cual se traduce a una mayor estabilidad de la hélice formada al aumentar el número de los mismo, esto se representa en el diagrama de barras de la Figura 64.

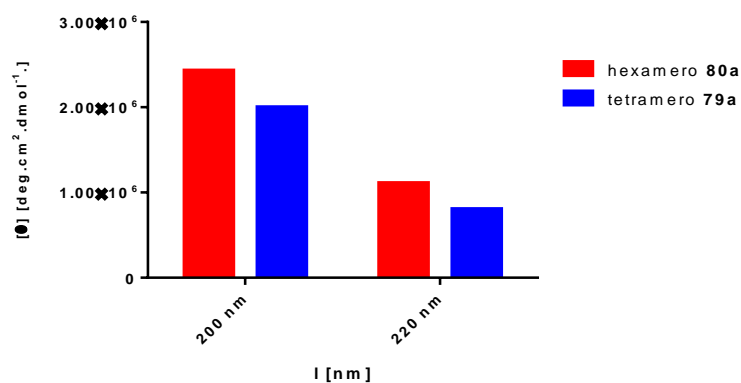


Figura 64. Representación de los máximos a 200 nm y 220 nm de los espectros de CD de los compuestos 79a y 80a.

3.3.4.2 Estudio de IR

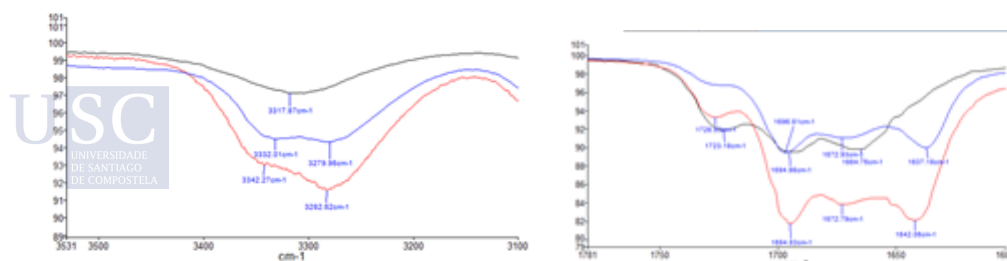


Figura 65. Espectros de IR de los péptidos 132a (línea negra), 79a (línea roja) y 80a (línea azul).

La espectroscopia en el infrarrojo permite establecer la formación de enlaces de hidrógeno, entre ellos los enlace N-H de amidas, que muestran bandas en el intervalo de 3300-3370 cm^{-1} cuando participan en este tipo de uniones débiles, mientras que tales bandas aparecen desplazadas al intervalo 3400-3500 cm^{-1} , cuando se encuentran libres.⁶⁵

En la Figura 65 aparecen superpuestos los espectros de IR del dímero **132a**, el tetrámero **79a** y el hexámero **80a**.

Puede observarse claramente como la banda de los enlaces NH de amida experimenta un desplazamiento desde 3317 cm^{-1} (dímero **132a**, línea negra), a 3282 cm^{-1} (tetrámero **79a**, línea roja) y a 3282 cm^{-1} (hexámero **80a**, línea azul). El desplazamiento a frecuencias más cortas a medida que aumenta la longitud del péptido constituye una evidencia de que se va adoptando una estructura secundaria más consistente a medida que aumenta el número de potenciales enlaces de hidrógeno.

3.3.4.3 Estudios de RMN

Para poder corroborar las evidencias encontradas anteriormente sobre la helicidad de los péptidos **79a** y **80a**, decidimos llevar a cabo un estudio de RMN del hexámero **80a**. Como en los casos previos comenzamos este estudio realizando experimentos de RMN (^1H , ^{13}C , TOCSY) conducentes a la asignación de las señales de los protones del compuesto.

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Figura 71 y Figura 73.

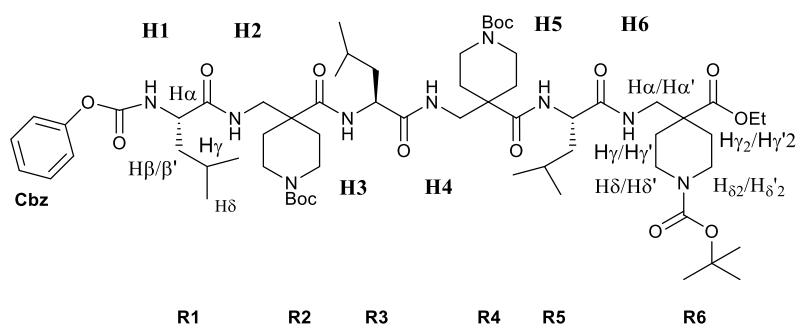


Figura 66. Hexámero **80a**.

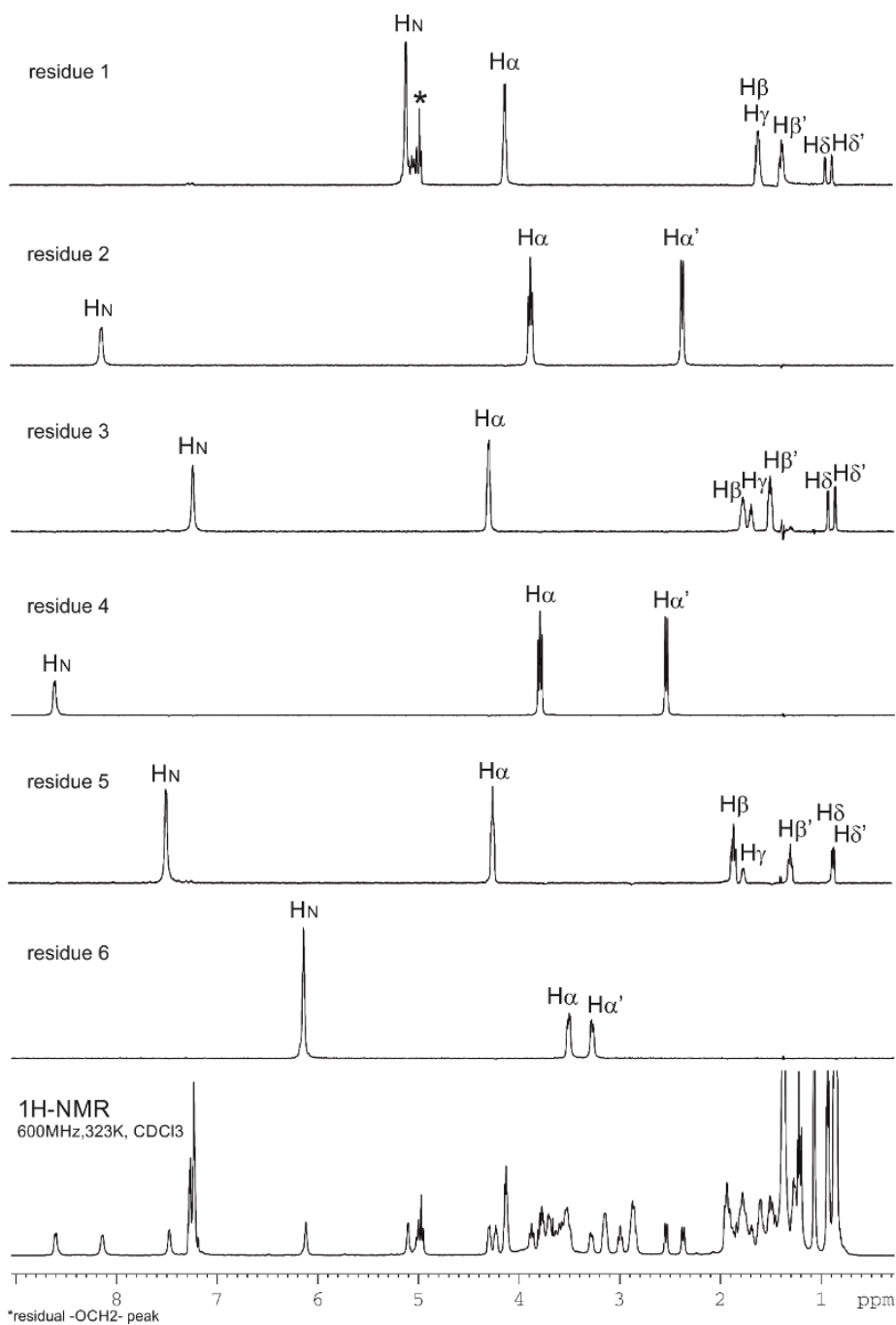


Figura 67. Espectro de ^1H -RMN para el hexámero **80a** adquirido a 600MHz en CDCl_3 a 323K (espectro final) y TOCSY selectivos de los NH de cada residuo, excepto para el residuo 3, donde su NH se solapa con la señal aromática de los protones del grupo.

	CO	H _N	H α /C α	H β /H β' /C β	H γ /C γ	H δ /C δ H δ' /C δ'
Residue 1	173.32	5.10	4.12/55.00	1.61/1.37/41.03	1.60/25.06	0.87/22.43 0.94/22.97
Residue 3	175.94	7.25	4.30/55.41	1.77/1.50/39.42	1.69/25.31	0.85/21.99 0.92/22.99
Residue 5	175.40	7.47	4.23/54.29	1.84/1.28/40.46	1.74/25.52	0.86/23.29 0.84/21.23

	CO	H _N	H α /H α' /C α	C β	H γ 1/H γ 1'/C γ 1 H γ 2/H γ 2'/C γ 2	H δ 1/H δ 1'/C δ 1 H δ 2/H δ 2'/C δ 2
Residue 2	176.24	8.14	3.87/2.37/46.62	48.13	1.89/1.27/31.33 1.79/1.51/29.86	3.63/2.88/41.18 3.71/2.87/41.18
Residue 4	175.12	8.62	3.79/2.54/46.62	48.25	1.79/1.46/30.54 1.95/1.25/31.33	3.71/2.87/41.18 3.59/2.99/41.18
Residue 6	175.22	6.12	3.51/3.28/45.26	46.46	1.93/1.40/30.99 1.93/1.34/30.89	3.54/3.15/40.63 3.54/3.15/40.63

Tabla 11. Asignación de las señales de ^1H -RMN del compuesto **80a** (323 k, CDCl_3 , 600 MHz).

Una vez llevada a cabo la asignación de las señales de ^1H -RMN del compuesto **80a**, fijamos nuestra atención en los experimentos clave para poder determinar la existencia o no de una estructura helicoidal, que son: el estudio de los coeficientes de temperatura (T-coef) de los protones unidos a nitrógeno (NH) y el estudio del NOE (ROESY).

A. *Disolución seriada*

Con el objeto de conocer si nuestro hexámero **80a** se agrega en disolución, lo que podría interferir con los estudios de sus posibles interacciones intramoleculares, se llevaron a cabo experimentos de ^1H -RMN en CDCl_3 a 25°C y a diferentes concentraciones (2, 6, 8 mM). Dichos experimentos aparecen recogidos en la Figura 68, y de ellas se puede concluir que:

- Se producen pocos cambios con la concentración.

- Entre 2 y 6 mM apenas hay cambios, por lo que puede concluirse que a estas concentraciones no hay agregación y las moléculas se encuentran como moléculas discretas en disolución.
- Al pasar de 6mM a 8mM, alguna señal se desplaza lo que puede significar que por encima de 6 mM se produce agregación.

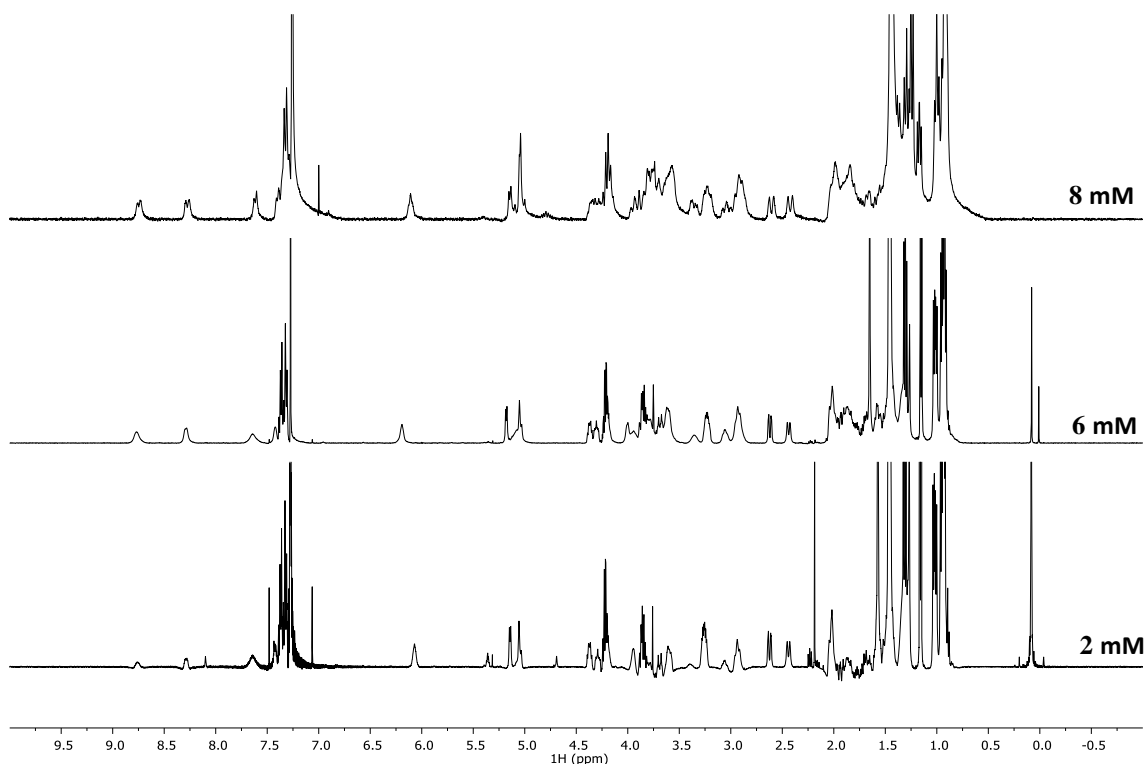


Figura 68. ^1H -RMN del compuesto **80a** en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y a diferentes concentraciones (2, 6 y 8 mM).

Por tanto, los coeficientes de temperatura (T-coef) se determinaron con muestras de concentración 6 mM.

B. Coeficientes de temperatura (T-coef)

Para evaluar la existencia de enlaces de hidrógeno intramolecular que puedan estabilizar una estructura secundaria en forma de hélice para nuestro compuesto **80a**, determinamos ahora los T-coef. Para ello se realizaron experimentos de ^1H -RMN empleando CDCl_3 libre de agua y ácido, a una concentración de 6 mM y en un rango de temperaturas desde -15 a $45\text{ }^\circ\text{C}$ (con variaciones de temperatura entre medidas de $5\text{ }^\circ\text{C}$). Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la Figura 69.

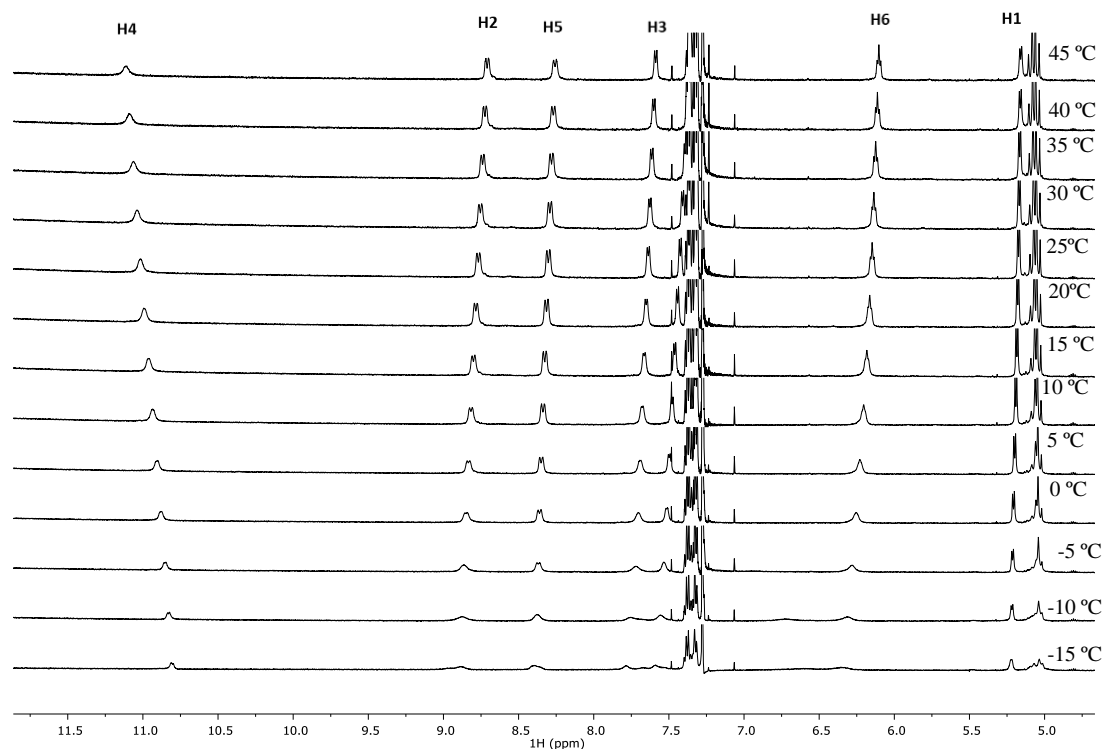


Figura 69. Experimento de ^1H -RMN del compuesto **80a** a temperatura variable. Temperaturas de abajo a arriba: -10 a 45 °C (CDCl_3 , 500 MHz).

Los T-coef de los seis protones unidos a nitrógeno (HN) de nuestra molécula aparecen reflejados en la Figura 70 y en la Tabla 12. Los coeficientes de temperatura muestran que cinco de los seis protones NH están claramente formando enlaces de hidrógeno. Por último, el protón NH4 presenta una situación dudosa, con un T-coef igual a cinco.

nombre	δ - max (45 °C) /ppm	d- min (-15 °C) /ppm	rango T/ K	T-coef/ ppb*K ⁻¹
H6	6,1	6,31	60	-3,50
H5	8,26	8,36	60	-1,67
H4	11,12	10,82	60	5,00
H3	7,60	7,79	60	-3,17
H2	8,71	8,92	60	-3,50
H1	5.16	5.23	60	-1,17

Tabla 12. Coeficientes de temperatura de los protones HN del compuesto **80a**.

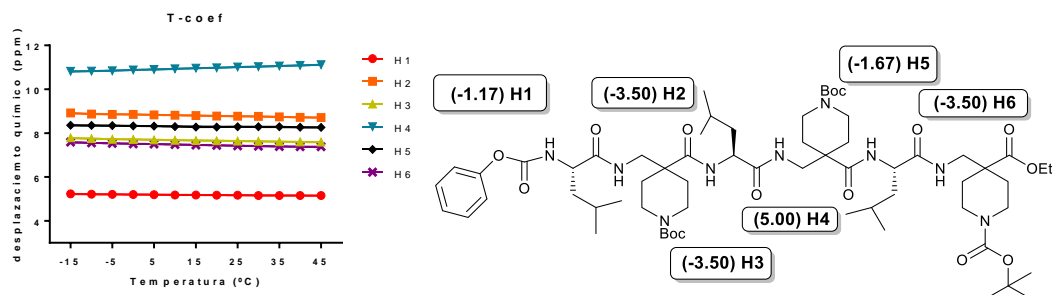


Figura 70. Representación de los coeficientes de temperatura de los protones HN del compuesto **80a**.

C. ROESY

Para confirmar las evidencias mostradas anteriormente sobre la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en nuestro compuesto y por lo tanto de una estructura secundaria en forma de hélice, se llevaron a cabo estudios de ^1H -RMN de 2D (ROESY). Los experimentos fueron realizados en CDCl_3 y los parámetros empleados fueron: 600 Mz, un tiempo de mezcla de 500 ms, una concentración de 6 mM y 25 °C.

Los resultados obtenidos, que pueden verse en la Figura 72 y en la Tabla 13, no muestran señales NOESY/ROESY intermoleculares, de lo que se deduce que las moléculas no presentan agregación a esa concentración. Por lo tanto, todos los NOE observados son intramoleculares y de ellos destacan por su importancia para nuestro estudio:

- Una señal débil $\text{NH}_2/\text{H}\alpha_4$.
- Una señal media $\text{NH}_3/\text{H}\alpha_1$.
- Una señal débil $\text{NH}_4/\text{H}\alpha_6$.
- Una señal media $\text{NH}_5/\text{H}\alpha_3$.

Estas cuatro señales muestran que los residuos se encuentran en una conformación adecuada para dar lugar a una hélice del tipo 9/11 (Figura 71 y Figura 73).

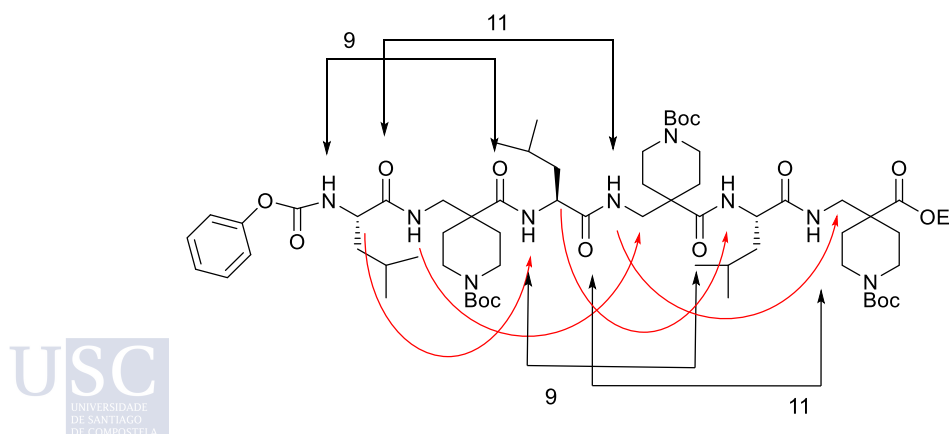


Figura 71. Resumen de los NOEs más importantes (rojo) y representación de la hélice que forma el compuesto **80a** (negro).

	Distancias simuladas/ Å (mimización por Spartan)	NOE	Estructura
NH2/H α 4	4.09	Débil	9 ciclo
NH3/H α 1	3.07	Media	11 ciclo
NH4/H α 6	4.09	Débil	9 ciclo
NH5/H α 3	3.07	Media	11 ciclo

Tabla 13. Relación de las señales NOEs más importantes.

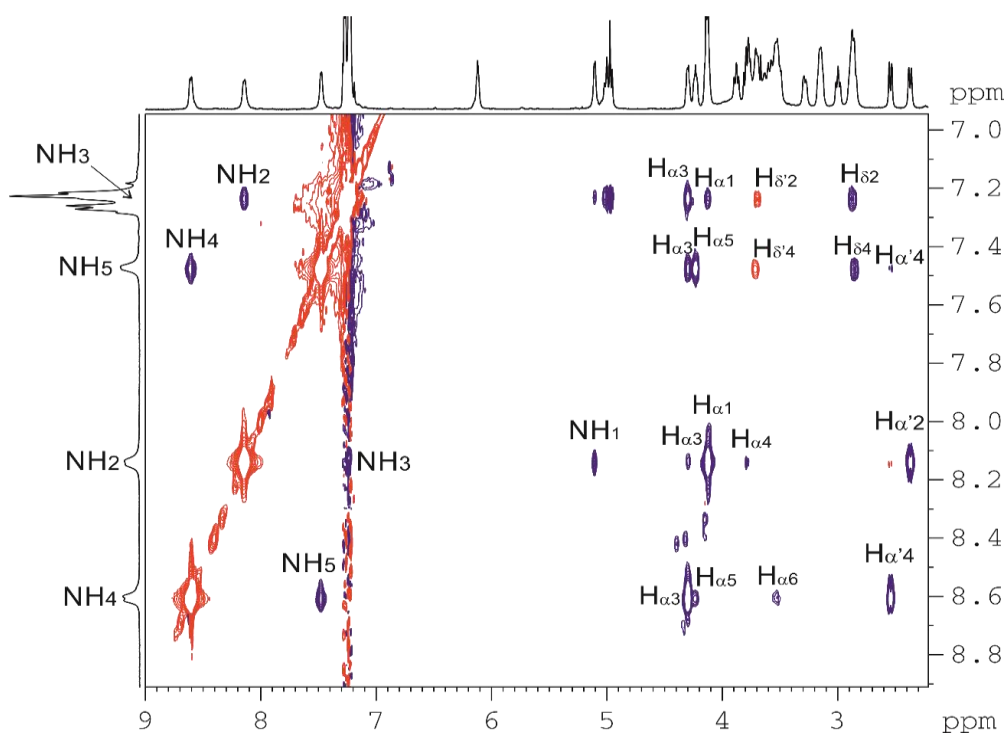


Figura 72. Espectro de 2D NOESY del compuesto **80a** a +25 °C, $t_{\text{mix}}=500$ ms (CDCl_3 , 600 MHz). Signo de los picos de NOE; azul negativo, rojo positivo.

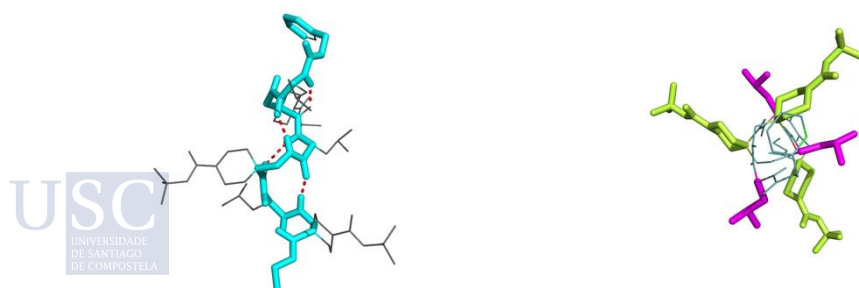


Figura 73. Simulación de la hélice dextrorotaria 9/11 del compuesto **80a** utilizando los programas Spartan y Pymol, utilizando los datos teóricos sacado de Biopolymers, 2006, 84, 408-413.

3.3.4.4 Conclusión

La combinación de evidencias encontradas en el estudio de coeficientes de temperatura y de los NOEs confirma inequívocamente que nuestra molécula **80a**, en su conformación mayoritaria se encuentra en forma de hélice dextrógira 9/11 (Figura 73).

3.4 SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LAS PROPIEDADES GELIFICANTES DE PIPERIDINDICARBOXAMIDAS

3.4.1 Introducción agentes gelificantes

Un gel, del participio latino "*gelare*" (helar), es un sistema coloidal⁶⁶ donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida. Los geles exhiben propiedades microestructurales y mecánicas muy diversas de tal forma que es difícil definirlos.⁶⁷ Así, también se define un gel como una sustancia que posee una estructura continua con dimensiones macroscópicas, que debe ser permanente en la escala de tiempo de un experimento analítico y es como un sólido respecto de su comportamiento reológico.⁶⁸ Y También se puede definir un gel como un sistema coloidal de aspecto sólido que fluye al someterlo a esfuerzos relativamente débiles.⁶⁹

Desde el punto de vista de sus propiedades físicas se podría decir que se trata de líquidos con aspecto de sólidos. Los geles no fluyen, pero son elásticos y retienen en su interior grandes cantidades de líquido.

Desde el punto de vista de su estructura puede ser una red sólida ordenada de moléculas que alberga en su interior grandes cantidades de líquido.

Los geles se forman cuando se añade a un líquido un agente gelificante (su cantidad no suele ser superior al 2%), que es una molécula capaz de generar un sistema tridimensional que retenga en su interior grandes cantidades del líquido (del 98% o superiores).

Pueden clasificarse de diversas formas, aunque las clasificaciones más generales son:

De acuerdo con la naturaleza de la fase sólida (agente gelificante):

- Geles moleculares. Constituidos por moléculas discretas, orgánicas o inorgánicas, de peso molecular entre 200 y 400 Dalton. Es el caso de los geles de los jabones de aluminio o de zinc.
- Geles poliméricos. Constituidos por polímeros, naturales o sintéticos, de pesos moleculares entre 3000 y 50.000 Dalton. En este caso podríamos poner como ejemplos la goma tragacanto, el almidón, los derivados de la celulosa o algunos silicatos de aluminio y magnesio.

De acuerdo con el líquido que retienen:

- Hidrogeles. Son aquellos que retienen en su interior agua o líquidos hidrofílicos (glicerina, propilenglicol, etc).
- Organogéles o lipogéles. Son los que retienen en su interior moléculas apolares (parafina, aceite, etc.).
- Xerogéles: Son sólidos que provienen de un gel que ha perdido o se le ha extraído el disolvente.

3.4.1.1 Geles moleculares

En la ciencia de los geles se han estudiado profusamente y son por lo tanto muy conocidos los geles que pueden obtenerse a partir de polímeros sintéticos, proteínas

⁶⁶ Los coloides se componen de dos fases no solubles entre sí: una continua (normalmente fluida) y una dispersa, en forma de partículas. Los geles se consideran un caso especial de los coloides en los que la fase continua es sólida y su fase dispersa es líquida.

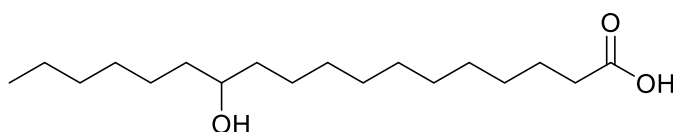
⁶⁷ Diccionario Esencial de las Ciencias: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Editorial Espasa Calpe, S.A., Madrid, España.

⁶⁸ Flory, P.J. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1974**, *57*, 7-18

⁶⁹ Multon, J. L. *Aditivos y auxiliares de fabricación en industrias agroalimentarias*. Zaragoza: Editorial Acribia. **1988**

naturales y compuestos inorgánicos y mucho menos conocida la formación de geles a partir de compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Estos últimos se llaman también agentes gelantes, gelificantes, organogelantes o LMOGs (por sus siglas en inglés "low molecular mass organic gelators") y sus geles se conocen con el nombre de geles moleculares.

Los LMOGs son un tipo de compuestos orgánicos que ha llamado la atención de los químicos, físicos y biofísicos en los últimos años. Se caracterizan por su bajo peso molecular que oscila alrededor de 300 Dalton. Un ejemplo de este tipo de agentes gelificantes puede ser el ácido 12-hidroxióctadecanoico (**133**) con un peso molecular de 301 Dalton.



133

Figura 74.

Los geles moleculares tienen puntos de coincidencia de divergencia con los geles macromoleculares. Así, por ejemplo, los dos tipos de geles forman una red continua tridimensional, la cual está formada en el caso de los geles macromoleculares por el conjunto de enlaces fuertes (covalentes) que constituyen la propia macromolécula. En contraste, en geles moleculares esta estructura tridimensional está sostenida por enlaces débiles (no covalentes).

Las moléculas orgánicas sencillas que dan lugar a geles (LMOGs) se autoorganizan en polímeros supramoleculares de naturaleza fibrilar, cuya estructura se mantiene debido a interacciones no covalentes, (ion-ion, enlace de hidrógeno, interacciones C-H... π , interacciones π - π , fuerzas de van der Waals, etc). Los organogelantes autoensamblados tienen dimensiones del orden de los nanómetros, es por esto que se conocen también como nanogeles.

3.4.1.2 Clasificación de los geles moleculares

Los geles moleculares pueden clasificarse, como todos los demás geles, en hidrogeles y organogeles. En los primeros los LMOGs se autoorganizan en agua o en un disolvente hidrófilo y en los últimos los LMOGs lo hacen en una sustancia lipófila, generalmente un disolvente orgánico de polaridad baja o media.

3.4.1.3 Caracterización

Los geles moleculares, al tratarse de macroestructuras como los geles poliméricos, requieren de las mismas metodologías que éstos para su estudio: termogravimetría, calorimetría diferencial de barrido, reometría, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y otras técnicas como WAXD (wide-angle X-ray diffraction), SAXS (small-angle X-ray scattering) y SANS (small-angle neutron scattering). Aunque los métodos como fluorescencia, UV, IR, RMN, EM y dicroísmo

circular también pueden dan información importante acerca de la estructura de los geles moleculares.

3.4.1.4 Consideraciones estructurales

Desde el punto de vista estructural, los compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son agentes gelificantes poseen una naturaleza química diversa y son difícilmente clasificables. De manera general se puede decir que son moléculas capaces de autoorganizarse de tal forma que dan lugar una red tridimensional capaz de estabilizar en su interior una gran cantidad de disolvente.

Según el tipo de red que forman se pueden clasificar de una forma muy general en:

Tipo I: En ellos encontramos un extremo rígido que puede ser polar o apolar. Esta parte de la molécula aparece siempre unida a otra parte apolar, generalmente constituida por cadenas hidrocarbonadas, relacionadas con la estabilidad del agente gelificante, como se esquematiza a continuación.⁷⁰

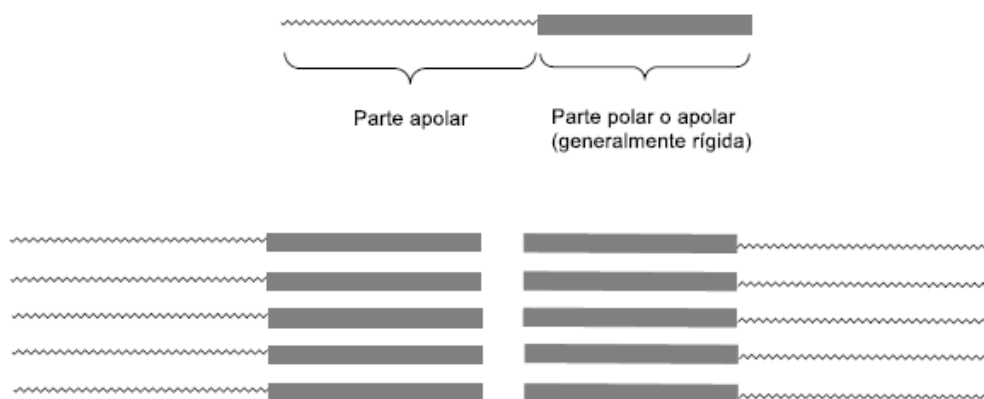


Figura 75. Estructura general de los organogeles Tipo I

Tipo II: En este caso la parte central rígida puede ser polar o apolar y estar unida a dos o más partes apolares.

⁷⁰ Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201-1217.

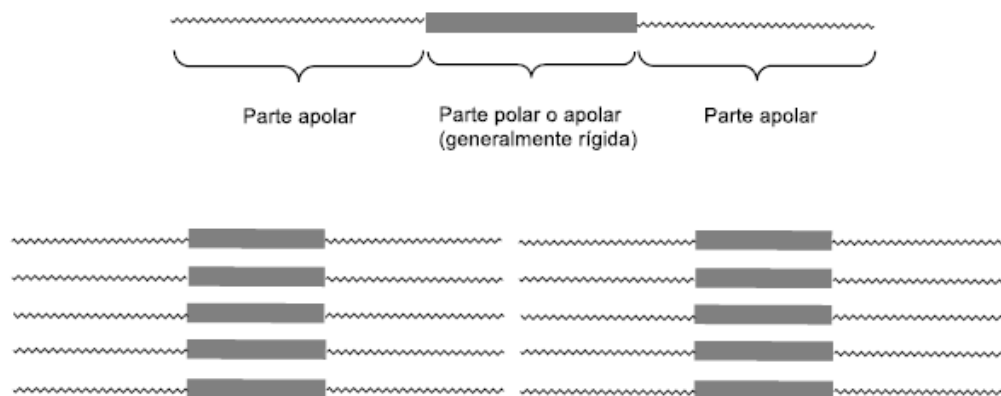
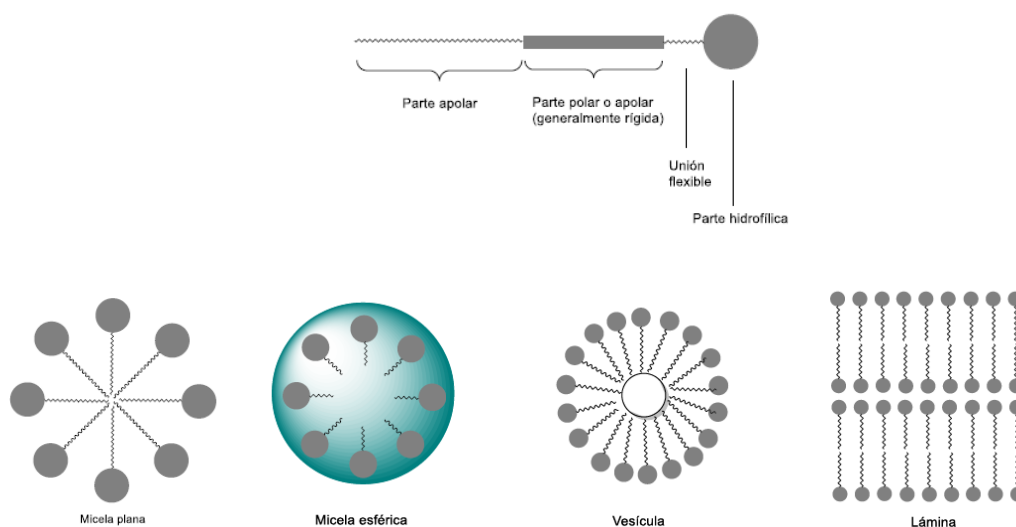


Figura 76. Estructura general de los organogeles Tipo II

Tipo III: son moléculas que presentan una parte hidrofóbica, cuya función es el ordenamiento supramolecular, y una parte hidrofílica, cuya función es estabilizar el disolvente. Ambas partes suelen estar unidas por un espaciador rígido, que también suele contribuir al ordenamiento supramolecular, pudiendo estar presente también algún otro nexo de unión. Cuando estas moléculas se ordenan, orientan sus partes hidrofóbicas hacia un punto central, dejando las partes hidrofílicas dispuestas hacia el exterior, en contacto con el disolvente. Esto puede dar lugar a una estructura en forma de micela plana, micelas esféricas, vesículas o láminas.



3.4.1.5 Aplicaciones

Los geles moleculares han llamado la atención de los investigadores debido a que ofrecen un excelente campo para el estudio del fenómeno de autoensamblado y también debido a sus aplicaciones:

En ciencia de materiales e ingeniería biomédica. Se sabe que los ácidos biliares juegan un papel fisiológico importante en la digestión y adsorción de grasas. Una variación en la concentración y proporción de ácidos biliares puede ser un indicador en enfermedades hepáticas, disfunciones intestinales y susceptibilidad a cáncer colorectal, de manera que es importantísimo separar y cuantificar con exactitud estos componentes.

En relación con esto se ha investigado acerca de la preparación de geles moleculares que reconocen selectivamente el ácido cólico y otros ácidos biliares.⁷¹

Como soporte en ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos tiene como objetivo crear nuevos tejidos como alternativa para el trasplante de órganos. Uno de los métodos para crear nuevos tejidos es incorporar células en estructuras poliméricas biodegradables, las cuales están diseñadas para soportar temporalmente la formación de nuevos tejidos. Uno de los requerimientos de estas estructuras es la homogeneidad, la cual asegura integridad estructural, distribución uniforme de células y el control del tamaño de poro; este último, necesario para regular el intercambio de nutrientes y productos de desecho de las células. En este sentido se han desarrollado hidrogeles peptídicos **134** con propiedades estructurales y físicas que forman redes fibrosas estables en cultivo celular, de dimensiones apropiadas para ser utilizadas como míméticos de una matriz celular (ECM) y capaces de soportar el cultivo celular de condrocitos, células formadoras de la matriz cartilaginosa, en dos y tres dimensiones.⁷²

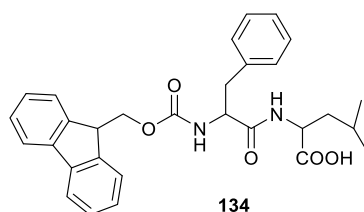


Figura 77

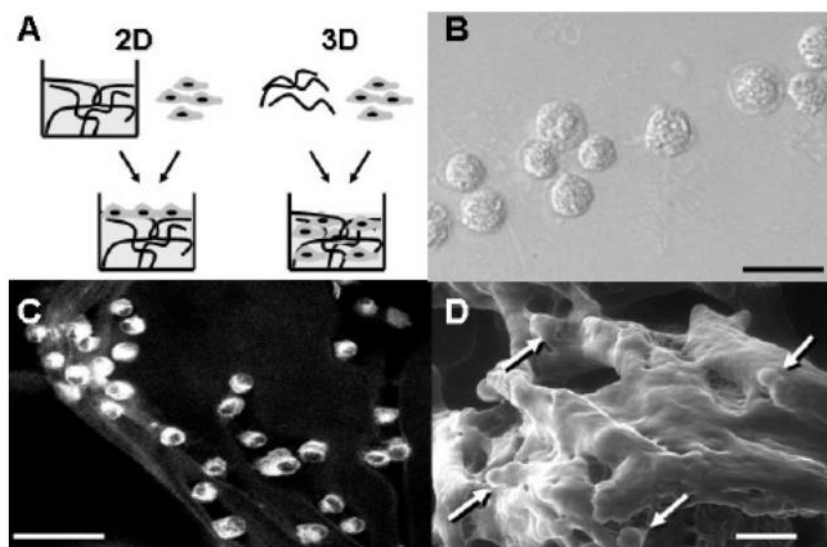


Figura 78. A) Representación del cultivo celular de condrocitos del dipéptido **134**. B) Imagen de SEM de los condrocitos. C) imagen de SEM donde se revela la presencia de células teñidas con DAPI dentro de la estructura de hidrogel del compuesto **134**. La barra de escala representa 50 μm . D) Imagen que muestra la estructura del compuesto **134**, con condrocitos presentes en todas partes (indicado por flechas).

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

⁷¹ Yoshida R, Okano T. Stimuli, *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, Springer Science. **2010**,19-43.

⁷² Lizarbe, M. A. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat*, **2007**,101, 227-249.

Como vehículo para la liberación de fármacos. El hecho de que los organogelantes tengan capacidad para gelificar agua, los hace altamente atractivos como materiales para liberar fármacos. Así, hace ya un tiempo se ha publicado la liberación de 8-aminoquinolina y 2-hidroxiquinolina, utilizando como vehículo geles de *N,N*-dibenzoil-L-cistina.⁷³

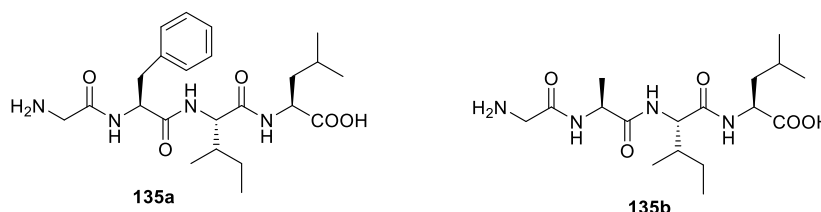
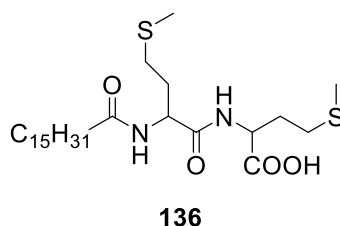


Figura 79

Generalmente, se han utilizado hidrogeles poliméricos para administrar fármacos. Sin embargo, en algunos casos, estos compuestos poliméricos exhiben toxicidad.⁷⁴ Por lo tanto, se ha prestado una atención considerable a la búsqueda de hidrogeles de bajo peso molecular que respondan como vehículos de administración de fármacos. Se sabe que la doxorubicina como agente único proporciona una alta respuesta contra el cáncer de mama avanzado y un resultado favorable en el carcinoma gástrico, un tumor contra el que se cree que solo unos pocos fármacos son potencialmente activos.⁷⁵ Los péptidos **135a** y **135b** pueden autoensamblarse en forma hidrogeles en una solución acuosa que contiene doxorubicina y estos geles son capaces de liberar el fármaco posteriormente.

En la captura y retirada de contaminantes ambientales: el dipéptido **136** es capaz de formar una fuerte red enlaces de hidrógeno intermoleculares dando lugar a geles estables de compuestos apolares, como aceites vegetales, petróleo o diesel. Lo que permite su retirada de vertidos acuosos de éstos en agua, por medios mecánicos.⁷⁶



⁷³ Caputo, Claudia B.; Wolanin, Donald J.; Roberts, Richard A.; Sygowski, Linda A.; Patton, Steven P.; Caccese, Robert G.; Shaw, Andrew; DiPasquale, Gene. *Biochemical Pharmacology*, **1987**, *36*, 995-1002.

⁷⁴ Herold, D. A.; Rodeheaver, G. T.; Bellamy, W. T.; Fitton, L. A.; Bruns, D. E.; Edlich, R. F. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1982**, *65*, 329. (b) Wolfert, M. A.; Seymour, L. W. *Gene Ther.* **1996**, *3*, 269.

⁷⁵ Arcamone, F. Doxorubicin, *Anticancer Antibiotic*; New York: Academic Press, **1981**, 16-47, 93-125.

⁷⁶ Kesava Raju, C. S., Pramanik, B., Kar, T., Rao, P. V. C., Choudary, N. V., & Ravishankar, *RRSC Advances*, **2018**, *6*, 53415-53420.

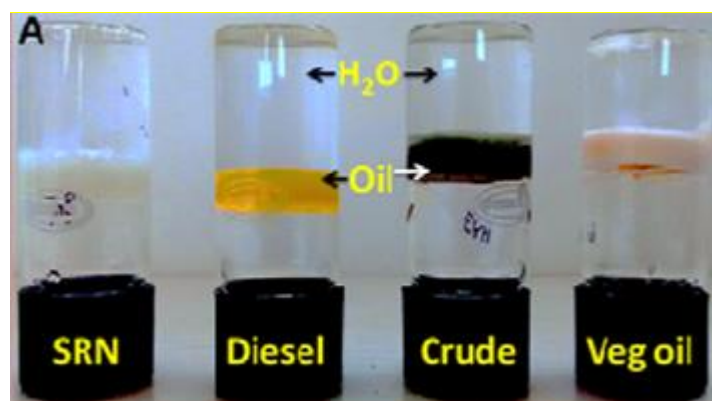


Figura 80

Uso en catalisis: En las últimas décadas ha aumentado considerablemente el interés en sistemas catalíticos para transformaciones en medios acuosos, ya que presentan una mejora tanto desde el punto de vista medioambiental (la no utilización de disolventes orgánicos es la base de lo que se conoce como química verde) como económico (al ser el agua es un disolvente barato y fácilmente asequible). En este campo no se trabaja exclusivamente de forma homogénea en disolución, sino que también existen casos donde se trabaja de forma heterogénea en medio acuoso con catalizadores soportados en: polímeros orgánicos e inorgánicos,⁷⁷ dispersores micelares,⁷⁸ o en microemulsiones entre otros.⁷⁹ En este campo tienen una especial importancia aquellas moléculas de bajo peso molecular que tienen la habilidad de gelificar agua (hidrogeles). Estos pueden presentar propiedades catalíticas, como es el caso del hidrogel derivado de L-prolina **137** que se comporta como un organocatalizador heterogéneo para la reacción aldólica con una alta estereoselectividad (hasta el 90% ee) y reciclabilidad (hasta tres ciclos completos).⁸⁰

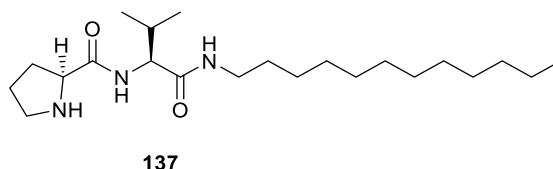


Figura 81

En general podemos decir que los geles moleculares ofrecen una amplia gama de caminos en los cuales el reconocimiento molecular puede transcribir información desde el nivel molecular al nivel de nanoescala y finalmente expresar sus propiedades macroscópicas en términos de propiedades de materiales.



⁷⁷ (a) S. Minakata; M. Komatsu *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 711; (b) A. F. Trindade, P. M. P. Gois and C. A. M. Afonso, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 418.

⁷⁸ Reactions and Synthesis in Surfactant Systems, in Surfactant Science Series, ed. J. Texter, Marcel Dekker, New York, **2001**, vol. 100.

⁷⁹ K. Holmberg, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 731.

⁸⁰ Rodríguez-Llansola, F; Miravet, J.; Escuder, B. *Chem. Commun.*, **2009**, *49*, 7303–7305.

3.4.2 Antecedentes

Recientemente se ha publicado la preparación de las *N,N'*-diacilciclohexano-1,2-diamidas **138a-i**, obtenidas a partir de la (1*R*,2*R*)-ciclohexano-1,2-diamina y ácidos alcano carboxílicos de distinta longitud, habiéndose estudiado también sus propiedades como agentes gelificantes⁸¹.

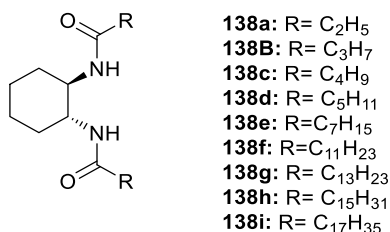


Figura 82. Estructura de las bisamidas **83a-i**.

Este tipo de bisamidas pueden ser consideradas como agentes gelificantes anfífilicos del Tipo I, constituidos por una parte polar, con capacidad para formar enlaces de hidrógeno estabilizantes de la estructura tridimensional del organogel, así como una parte apolar, constituida por cadenas hidrocarbonadas capaces de establecer interacciones de Van der Waals estabilizantes entre ellas y con el disolvente.

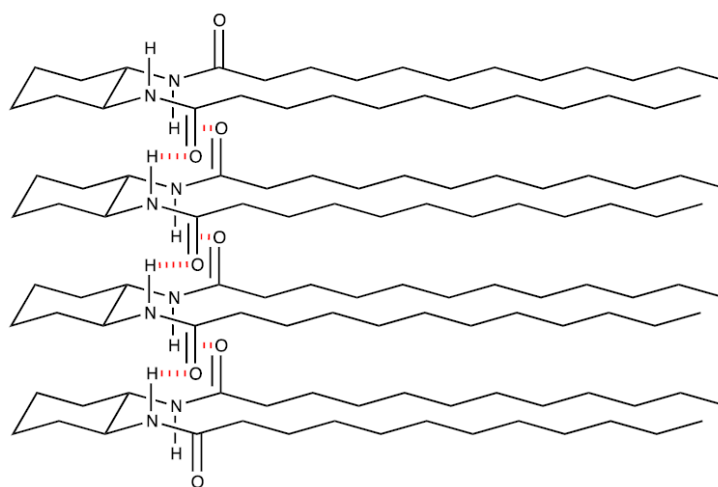


Figura 83. Interacciones intermoleculares en geles los geles formados por las bisamidas **83a-i**.

Por lo tanto, se ha propuesto para este tipo de geles una estructura tridimensional basada en el apilamiento de bisamidas estabilizada por enlaces de hidrógeno, con las cadenas hidrocarbonadas ordenadas maximizando las interacciones por fuerzas de Van der Waals (Figura 76).

⁸¹ Zweep, N.; Hopkinson, A.; Meetsma, A.; Browne, W. R.; Feringa, B. L.; Van Esch, J. H. *Langmuir* **2009**, *25*, 8802-8809.

Se ha establecido, además, la existencia de una relación entre las propiedades gelificantes de estas bisamidas y la longitud de su cadena alquílica, siendo tanto más lipofílico el organogel cuanto más larga sea esta cadena.

Estos resultados eran previsibles, toda vez que se había publicado anteriormente que la ciclohexano-1,2-bisamida derivada del ácido decanoico (homóloga de las bisamidas **138**) tenía propiedades gelificantes, habiéndose propuesto ya para ella la estructura tridimensional de la Figura 83.⁸²

Estas bisamidas derivadas de 1,2-ciclohexanodiaminas han sido muy estudiadas por varios grupos de investigación y han resultado ser excelentes agentes gelificantes. Sin embargo, sus análogas ciclohexánicas con estructura de 1,2-diácido y β -aminoácido han recibido poca o nula atención.

Es por ello que nuestro grupo de investigación se interesó por las bisamidas alquílicas derivadas de ácidos 1,2-ciclohexanodicarboxílicos. Un tipo de amidas que presentan los mismos motivos estructurales que las anteriormente descritas (grupos amida y cadenas alquílicas largas), aunque con una disposición distinta. Y que, por lo tanto, deberían dar lugar también a geles, aunque seguramente con propiedades diferentes.

Para ello, decidimos llevar a cabo en primer lugar la síntesis y el estudio de las propiedades gelificantes de las bisamidas **139a** y **140a**, ambas bisamidas derivadas de los ácidos *trans*-1,2-ciclohexanodicarboxílico y *cis*-1,2-ciclohexanodicarboxílico respectivamente.



⁸² Okabe, S.; Hanabusa, K.; Shibayama, M. *Polymer Physics* **2005**, *43*, 3567-3574.

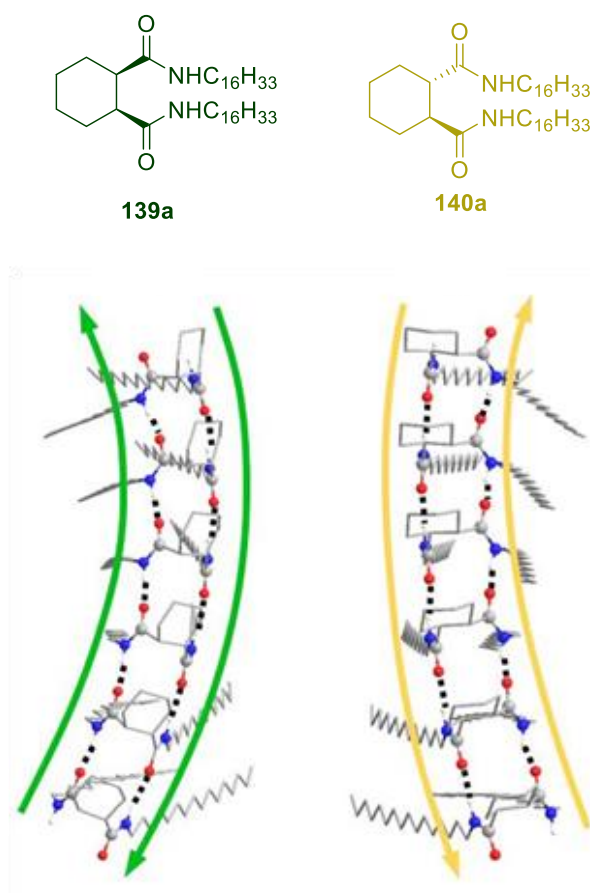


Figura 84. Bisamidas derivadas de ácidos 1,2-ciclohexanodicarboxílicos y modelo teórico de su organización.

El estudio del poder gelificante de las bisamidas **139a** y **140a** reveló que ambas presentan una capacidad gelificante de moderada a buena en disolventes apolares. El compuesto **139a** gelifica pentano y 1,4-dioxano con valores moderados de *mgc* y el isómero **140a** gelifica 1,3-dioxano, tolueno y cloroformo con valores de *mgc* más bajos. Esto parece indicar que la estereoquímica *cis/trans* no tiene influencia importante en su capacidad de gelificación.

Los resultados prometedores encontrados cuando se estudiaron las propiedades gelificantes de las bisamidas **139a** y **140a** nos llevaron a plantearnos el estudio de sus análogas derivadas del ácido (-)-shikímico comercial. Éstas, mantiene los motivos estructurales de las anteriores (grupos amida y cadenas alquílicas largas) y añaden la presencia de sustituyentes hidroxilo en su anillo ciclohexánico, lo que permitió obtener compuestos con polaridades muy distintas, dependiendo de su grado de protección o desprotección de estos grupos hidroxilo.

Para ello preparamos las C16-alquil diamidas **139b** y **140b**, derivadas de los ácidos trihidroxiciclohexano-1,2-dicarboxílicos con configuración *cis* y *trans*, sintetizados a su vez a partir del ácido (-)-shikímico. Así como de sus derivados **139c**, **139d** y **140c** producto de la desprotección total de sus grupos hidroxilo.

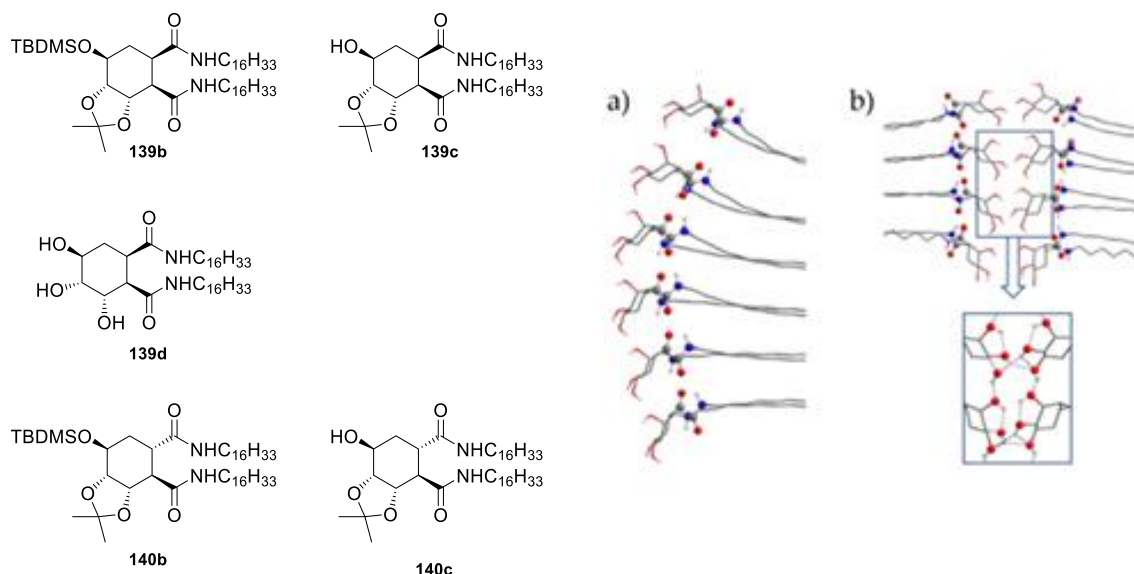


Figura 85. Bisamidas derivadas de ácidos 1,2-ciclohexanodicarboxílicos polihidroxilados y modelo teórico de su organización.

Los compuestos sintetizados mostraron una relación entre su capacidad de gelificación y el patrón de sustitución de sus grupos hidroxilo. Mientras que las bisamidas con grupos hidroxilo totalmente protegidos **140b** y **139b** son buenos organogelificantes para alcoholes (metanol, etanol, isopropanol), el organogelificante con un grupo hidroxilo libre **139d** y **140c** presenta una capacidad ambivalente para gelificar tanto disolventes apolares como polares. El compuesto que tiene tres grupos hidroxilo libres **139d** es insoluble en agua y disolventes polares, incluidos los alcoholes, pero curiosamente es capaz de gelificar disolventes de baja polaridad.

Este comportamiento aparentemente aleatorio podría racionalizarse asumiendo que los compuestos del grupo hidroxilo totalmente protegidos adoptan un orden jerárquico basado en un fuerte enlace de hidrógeno entre los grupos amida de las moléculas del organogelificante (*modelo a*). Mientras que los compuestos de grupos hidroxilo parcial o totalmente desprotegidos pueden adoptar la estructura anterior o una completamente distinta basada en un fuerte enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo libres de las moléculas del organogelificante (*modelo b*), dependiendo de la polaridad del disolvente.

3.4.3 Plan de trabajo

El último de los subobjetos de esta Tesis Doctoral es iniciar estudios sobre bisamidas alquílicas 1,2-disustituidas derivadas de los β -aminoácidos sintetizados en el capítulo 3.3.

El interés en este estudio viene condicionado por la interesante estructura de estos aminoácidos, que presentan dos grupos amino y uno ácido que puede dar lugar a:

- Una estructura de bisamida con cadenas alquílicas largas, que aporta los condicionantes necesarios para dar lugar un sistema gelificante (enlaces de hidrogeno intermoleculares y asociación por fuerzas de Van der Waals).
- Un anillo ciclohexánico con una función amina secundaria que dependiendo de su grado de protección o desprotección puede conducir a moléculas de polaridades muy diferentes sensibles a los cambios en el pH del medio.

Para ello decidimos abordar la síntesis y el estudio de las propiedades organogelantes de las bisamidas **78f**, **78g** y **78h**, derivadas del β -aminoácido **78d**, cuya estructura aparece representada en el siguiente esquema.

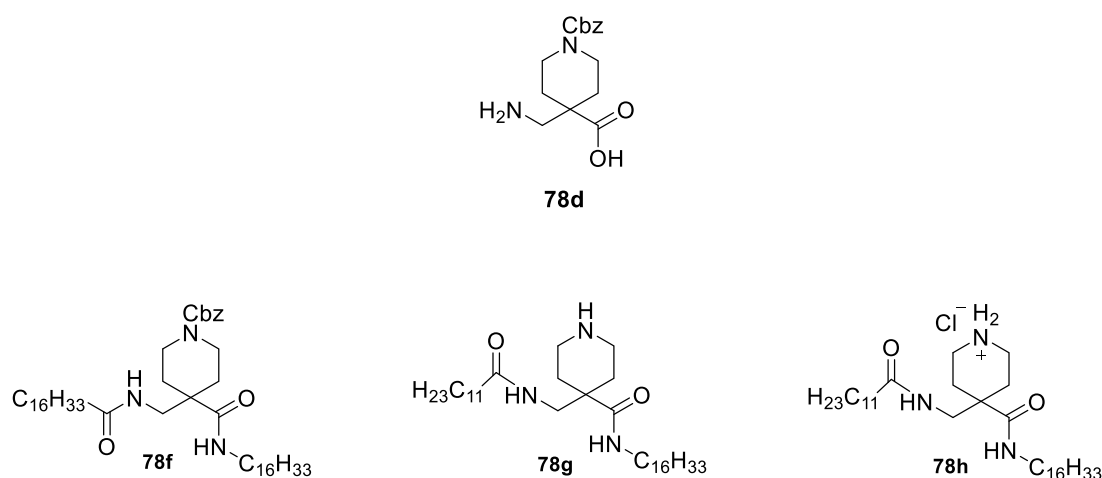


Figura 86. Bisamidas objetivo, derivadas del β -aminoácido **78d**.

El plan de trabajo, indicado en el esquema retrosintético siguiente, implica partir de la dietanolamina **75a**, y transformarlo en su aminoéster **78e**. El acoplamiento peptídico de este aminoéster con el ácido dodecanoico, seguido de la hidrólisis de su grupo éster a ácido y un segundo acoplamiento peptídico con hexadecilamina, nos conducirá a la primera de nuestras bisamidas **78f**. La posterior hidrólisis de su grupo carbamato de bencilo nos conducirá a la bisamida **78g**, que por tratamiento en medio ácido generará la tercera de nuestras amidas **78h**.

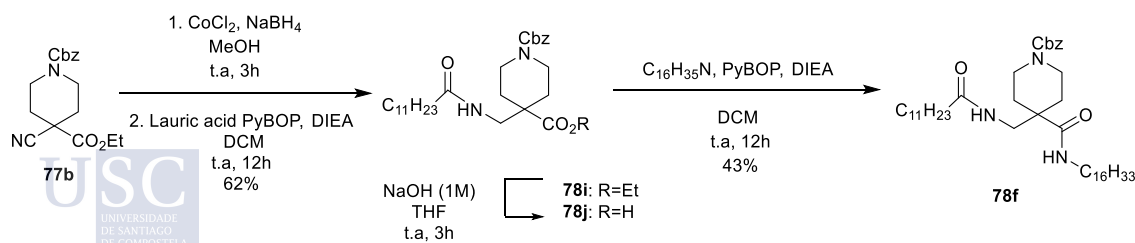
base y yoduro de tetrabutilamonio como catalizador, lo que condujo al α -cianoacetato de etilo azaciclohexánico **77b** esperado con un rendimiento del 80%.

Este cianoéster **77b** se caracterizó a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. Su espectro de ^1H -RMN muestra como señales características un triplete de tres protones a 1.33 ppm, debidos al grupo carboxietilo, un singulete a 7.35 ppm correspondiente a los 5 protones de su anillo aromático y un singulete a 5.13 ppm de dos protones correspondiente al metileno de su grupo protector cbz. Su espectro de ^{13}C -RMN muestra una señal 117.9 ppm, del grupo CN. En su espectro de IR son relevantes la banda del grupo carbonilo a 1690 cm^{-1} y una banda débil a 2200 cm^{-1} correspondiente al grupo ciano. Su espectro de masas de alta resolución presenta una señal con una relación $m/z = 316.1471$ correspondiente al ion $[\text{M}]^+$ que coincide con la fórmula molecular del compuesto esperado $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$.

La última etapa de esta ruta sintética, conducente al β -aminoácido **78e**, fue la reducción del grupo ciano de su precursor **77b** a amino. Esta reacción se llevó a cabo utilizando borohidruro sódico como agente reductor y cloruro de cobalto (II) como catalizador, lo que condujo al aminoéster esperado **78e** como un aceite inestable que se utilizó directamente en la siguiente reacción, sin purificación adicional.

3.4.5 Síntesis de las bisamidas **78f**, **78g** y **78h**

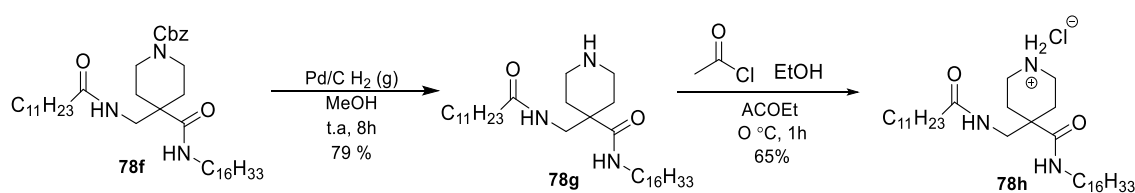
Para preparar las bisamidas **78f**, **78g** y **78h** de acuerdo con el plan previsto, partimos de la amina anteriormente obtenida, que se sometió directamente a una reacción de acoplamiento peptídico con ácido dodecanoico (ácido laúrico), utilizando como agente activante PyBop y DIEA como catalizador. Obtuvimos de esta forma la amida esperada **78i** con un rendimiento del 62% que fue caracterizada a partir de sus datos espectroscópicos. Así en su espectro de ^1H -RMN se observan como señales más características un multiplete de seis protones a 0.87 ppm que corresponden con sus dos grupos metilo, uno del éster etílico y el otro del ácido láurico. También, a 5.76 ppm un singulete de un protón correspondiente a su protón amídico y a 7.34 ppm un singulete de cinco protones correspondiente al anillo aromático del grupo protector Cbz. Su espectro de ^{13}C -RMN muestra una señal a 14 ppm correspondiente a sus dos grupos metilo y a 173 y 175 ppm las señales de los dos grupos carbonilo. En su espectro de IR se observan también las bandas de los grupos carbonilo a 1727 y 1703 cm^{-1} y la banda de los grupos NH a 3323 cm^{-1} . Por último, su espectro de masas de alta resolución muestra una señal con una relación $m/z = 503.3479$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ que confirmó su fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_5$.



Esquema 48. Síntesis de la bisamida **78f**.

Continuando con nuestro plan sintético la amida anteriormente obtenida **78i** fue sometida a una reacción de hidrólisis básica de su grupo éster etílico, haciéndola

reaccionar con una disolución 1M de NaOH en THF, obteniendo así el ácido **78j**, que fue directamente sometido a una reacción de acoplamiento con hexadecilamina, usando también como agente activante PyBOP y como catalizador DIEA. Obtuvimos de esta forma la primera de nuestras bisamidas objetivo **78f**, cuya formación pudo confirmarse a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. En su espectro de $^1\text{H-RMN}$ se observa un multiplete de seis protones a 0.79 ppm que corresponden con los dos grupos metilo de sus cadenas alquílicas, a 5.89 ppm y 6.08 ppm dos siguletes anchos de sus protones HN de amida y a 7.34 un singulete correspondiente a los 5 protones aromáticos del grupo protector Cbz. En su espectro de IR se observan las bandas de los grupos carbonilo de amida y uretano a 1660 y 1657 cm^{-1} y la banda de los grupos NH a 3323 cm^{-1} . El espectro de masas de alta resolución, que muestra una señal con una relación $m/z= 698.5830$ de su ion $[\text{M}+\text{H}]^+$, confirmó la fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_4$ del compuesto.



Esquema 49. Síntesis de los compuestos **78g** y **78h**.

Una vez obtenida la primera de nuestras bisamidas objetivo **78f** llevamos a cabo la eliminación de su grupo protector Cbz mediante una reacción de hidrogenación catalizada por Pd-C, obteniéndose de esta forma la bisamida **78g** esperada con un rendimiento del 79%. La formación de esta bisamida pudo confirmarse fácilmente a partir de su espectro de $^1\text{H-RMN}$ donde se observa a 0.87 ppm un triplete que corresponde con los dos grupos metilo de sus cadenas alquílicas, un singulete a 1.25 ppm de cuarenta y ocho protones correspondientes a veinticuatro metilenos de las cadenas alifáticas y dos singuletes anchos a 5.84 ppm y 6.08 ppm correspondientes los dos protones HN de amida de la molécula, siendo característico también en este caso la ausencia de señales a campo más bajo que éstas últimas descritas, indicador de la ausencia del grupo Cbz del compuesto de partida. En su espectro de IR se observan las bandas de los grupos carbonilo de amida a 1659 y 1657 cm^{-1} y la banda de los grupos NH de amida a 3327 cm^{-1} . El espectro de masas de alta resolución muestra una señal con una relación $m/z= 564.5463$ correspondiente al ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ que confirmó la fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_2$ del compuesto.

Finalmente, para transformar el compuesto **78g** en la tercera de nuestras bisamidas objetivo **78h**, éste fue sometido a condiciones fuertemente ácidas, disolviéndolo en una disolución de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo y concentrando la disolución a sequedad, lo que permitió obtener la bisamida **78h** en forma de hidrocioruro.

La bisamida **78h** pudo caracterizarse también a partir de su espectro de $^1\text{H-RMN}$ donde se observan señales de $^1\text{H-RMN}$ e IR muy similares a las de su bisamida precursora, siendo en el caso de este compuesto la prueba más concluyente su formación su espectro de masas de alta resolución que muestra una señal con una relación $m/z= 564.5463$ correspondiente al ion $[\text{M}]^+$ que permitió confirmar la fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_2$ del compuesto.

3.4.6 Estudio de las propiedades de las bisamidas 78f, 78g y 78h

Una vez llevada a cabo la síntesis de nuestras tres bisamidas objetivo **78f**, **78g** y **78h**, pasamos a estudiar sus propiedades como agentes gelificantes.

3.4.6.1 Estudio de gelificación

El procedimiento que utilizamos para realizar este estudio es el test de inversión. Para ello disolvemos 5 mg del compuesto objeto de estudio en 100 μ L del disolvente correspondiente (50 mg/mL) y sonicamos durante 3 min., observando si se disuelve o no. En el caso de que no se disuelva se calienta la suspensión sin llegar a ebullición y se observa si el compuesto se solubiliza.

- Si no se solubiliza consideramos que el compuesto es **insoluble**.
- Si se solubiliza se deja la disolución en reposo durante 10 minutos y al cabo de este tiempo se invierte el vial.
- Si fluye como la disolución inicial consideramos que el compuesto es **soluble**.
- Si no fluye consideramos que el compuesto es un **agente gelificante** del disolvente objeto de estudio.
- En el caso de fluya, pero más lentamente que la disolución de partida, se calienta de nuevo la suspensión sin llegar a ebullición y se repite la observación.

Para conocer la capacidad de gelificación de nuestras bisamidas, se llevo a cabo el proceso anteriormente descrito con cada una de las tres bisamidas en 14 disolventes de distinta constante dieléctrica (hexano, dioxano, tolueno, éter, cloroformo, acetato de etilo, tetrahidrofurano, diclorometano, acetona, etanol, metanol, acetonitrilo y agua). Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Tabla 14.

Disolvente	78f	78g	78h
Hexano	I	I	S
Dioxano	I	S	Sus
Tolueno	I	S	Sus
Éter	I	Sus	Sus
CHCl ₃	I	I	Sus
AcOEt	I	A	Sus
THF	I	Sus	Sus
DCM	I	Sus	Sus
i-PrOH	I	Sus	S
Acetona	I	Sus	S
EtOH	I	S	S
MeOH	I/S*(c)	S	I
MeCN	I	I	Sus
Agua	I	I	Sus

Tabla 14. Capacidad gelificante de las bisamidas **78f**, **78g** y **78h**. a 22°C (S = soluble, I = insoluble, GP = gel parcial, G(CMG) = gel y su concentración mínima de gelificación en mg/mL, A = formación de agregados macromoleculares, Sus = observación de una suspensión o turbidez sin llegar a ser un precipitado en la disolución).

Del estudio de la capacidad gelificante de nuestras amidas podemos deducir que el compuesto **78f** no gelifica ninguno de los 14 disolventes ensayados, resultando:

- Insoluble a temperatura ambiente en todos ellos.
- Soluble al calentar en acetonitrilo.

El compuesto **78g** tampoco gelifica ninguno de los 14 disolventes ensayados, resultando:

- Soluble a temperatura ambiente en tolueno.
- Insoluble a temperatura ambiente en dioxano, éter, cloroformo, tetrahidrofurano, diclorometano, acetona, etanol, metanol, acetonitrilo, agua y hexano.
- Además, el compuesto **78g** al calentarse hasta una temperatura cercana a ebullición del disolvente se solubilizó en dioxano, éter, tetrahidrofurano, acetona, etanol, acetonitrilo.

Por último, el compuesto **78h** no gelifica tampoco ninguno de los 14 disolventes ensayados, resultando:

- Soluble a temperatura ambiente en etanol, cloroformo y hexano.
- Insoluble a temperatura ambiente en dioxano, tolueno, éter, acetato de etilo, tetrahidrofurano, diclorometano, acetona, agua y acetonitrilo,

- Soluble al calentar en dioxano, tolueno, éter, acetato de etilo, tetrahidrofurano, diclorometano, acetona y agua.

El estudio de gelificación llevado a cabo demuestra que nuestras bisamidas no son un buen sistema gelificante, sin embargo, durante este estudio se observó que la bisamida **78g** disuelta en acetato de etilo formó un agregado esférico macroscópico que desapareció pasado un tiempo dando lugar a una suspensión. Este agregado macroscópico no volvió a observarse, pero si se observa la conversión de las disoluciones de **78g** en acetato de etilo en suspensiones con el tiempo, fenómeno que también se observa en las disoluciones de esta bisamida en diclorometano.

3.4.6.2 Estudio DLS

Es por ello que creímos oportuno estudiar si estas suspensiones turbias se debían a la presencia de algún tipo de agregado microscópico y para ello decidimos realizar experimentos de DLS.

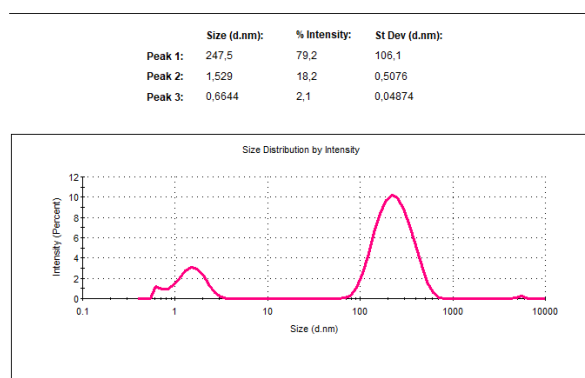


Figura 87. Estudio de DLS del compuesto 78g.

El estudio de DLS, que se realizó con disoluciones de la bisamida **78g** en acetato de etilo (con la misma concentración que los test de gelificación, 50 mg/mL), nos muestra dos poblaciones con diferencia en su tamaño, lo que puede asociarse con:

- La presencia de las moléculas discretas en la disolución *pico 1* (tamaño medio de 1.5 nm).
- La formación de agregados de tamaño superior *pico 2* (tamaño medio de 247.5 nm.)

Este experimento de DLS parece confirmar nuestra sospecha de que la suspensión que se forma al dejar reposar la disolución de la bisamida **78g** en acetato de etilo está formada por agregados microscópicos de tamaño bastante regular. Por ello nos planteamos la realización de experimentos de microscopía electrónica de barrido (SEM) de estas suspensiones como forma de obtener información sobre la morfología concreta de estos agregados nanométricos.

3.4.6.3 Estudio SEM

Los experimentos de SEM se llevaron a cabo con las suspensiones de la bisamida **78g** en acetato de etilo a la misma concentración que los estudios anteriores (50 mg/mL). Para llevar a cabo el experimento se deposita una gota de la disolución en una placa semiconductor de silicio, se deja evaporar el disolvente y se observa con el microscopio

Zeiss Fesem Ultra Plus. Las imágenes obtenidas pueden verse en la Figura 88 con diferente aumento.

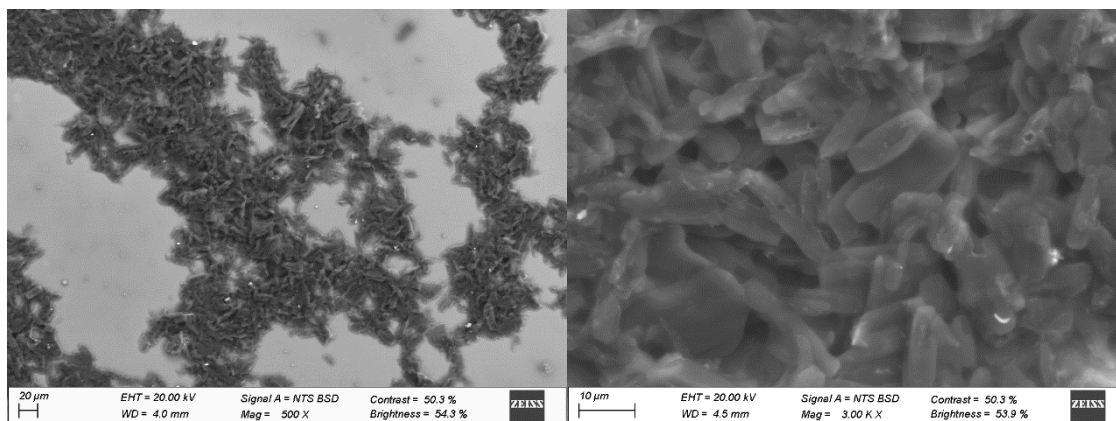


Figura 88. Imágenes SEM de 78g, imagen izquierda 500x, imagen derecha 3000x.

En la Figura 88 de SEM a 500 aumentos pueden observarse agregados microscópicos que parecen colapsar. Sin embargo, en la misma imagen a 3000 aumentos se observa que estos agregados, aunque colapsados, tienen una forma ovalada de unos 15 µm. Por ello decidimos repetir el experimento en un doble sentido:

- Aumentando la concentración de la disolución a 75 mg/mL para confirmar si realmente estos agregados están colapsados.
- Reduciendo la concentración a 25 mg/mL, para ver si también pueden observarse de manera aislada.

La Figura 89 de SEM, que corresponde con la disolución de la bisamida 78g en acetato de etilo a mayor concentración que la anterior (75 mg/mL), se puede apreciar cómo, de forma idéntica para el caso de 50 mg/mL, los agregados forman complejos informes de gran tamaño, los cuales están colapsados entre si, sin llegar a observarse nanocomplejos discretos.

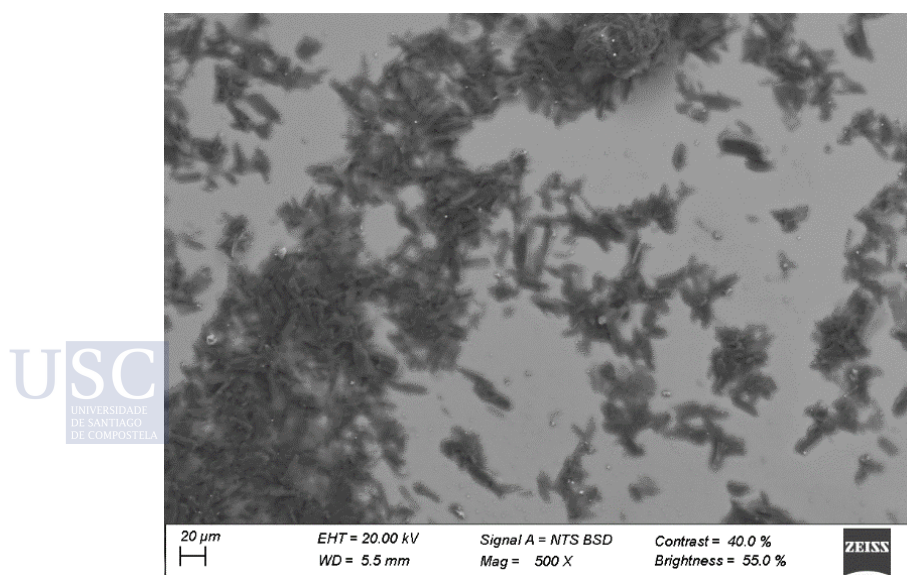


Figura 89. Imagen de SEM del compuesto 78g a 500x.

Sin embargo, en la Figura 90 de SEM, realizada sobre la disolución de la bisamida **78g** en acetato de etilo a menor concentración (25 mg/mL) puede observarse un grado mucho menor de agregación y que los agregados están constituidos por estructuras esféricas con un diámetro de aproximadamente 300 nm. Este dato del diámetro obtenido por SEM está en sintonía con el obtenido anteriormente mediante DLS, el cual sugiere el tamaño medio de los agregados de 247.5 nm.

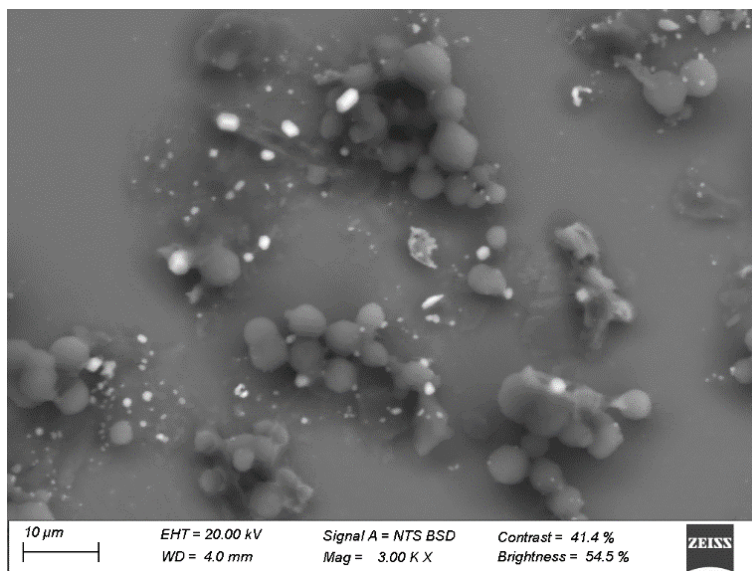


Figura 90. Imagen SEM del compuesto **78g** a 3000x.

Queda pendiente y fuera del alcance de esta Tesis Doctoral la realización de estudios de SEM con diluciones de esta bisamida **78g** a concentraciones menores a 25 mg/mL, para comprobar si pueden observarse estos agregados de forma individual. Y, si es así, experimentos de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para comprobar si estamos ante agregados de tipo micelar o vesicular.

4 CONCLUSIONES

1. Se ha optimizado síntesis del $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánico polihidroxiado **67a** a partir de la penta-*O*-acetil- β -D-galactopiranososa comercial (**64**).
2. Se ha sintetizado β -péptido **68**, derivado del $\beta^{2,3}$ -aminoácido ciclopentánico sin sustitución **18** comercial y del $\beta^{2,3}$ -aminoácidos ciclopentánico polihidroxiado **67b**.
3. Se han llevado a cabo estudios estructurales de las propiedades de plegado del pentapéptido **68**, para comprobar si éstas coincidían con la hélice-12 predicha mediante los cálculos de modelización molecular llevados a cabo previamente en nuestro grupo de investigación. Estos estudios nos han permitido concluir que la presencia de un $\beta^{2,3}$ -aminoácido ciclopentánico polisustituido impide alcanzar tal plegado.
4. Se ha optimizado la síntesis del $\beta^{2,2}$ -aminoácido ciclopentánico sin sustitución **49a** a partir del 1,4-butanodiol (**69a**) comercial, mediante un protocolo de síntesis cianoacética.
5. Se ha sintetizado el α,β -péptido mixto **74a**, constituido por unidades del $\beta^{2,2}$ -aminoácido ciclopentánico sin sustitución **49a** alternadas con unidades del α -aminoácido proteinogénico L-Leucina.
6. Se han llevado a cabo estudios estructurales de las propiedades de plegado del péptido **74a**, que permitieron determinar que se pliega en forma helicoidal, aunque no se pudo determinar de forma inequívoca si se trata de una hélice 9/11 o 11/9.
7. Se ha sintetizado el $\beta^{2,2}$ -aminoácido ciclopentánico disustituido **49b** a partir del L-(+)-tartrato de dietilo comercial (**128a**), mediante un protocolo de síntesis cianoacética.
8. Se ha sintetizado el α,β -péptido mixto **74b**, constituido por unidades del $\beta^{2,2}$ -aminoácido ciclopentánico disustituido **49b** alternadas con unidades del α -aminoácido proteinogénico L-Leucina.
9. Se han llevado a cabo estudios estructurales de las propiedades de plegado del péptido **49b**, que permitieron determinar que presenta propiedades de plegado similares a las de su análogo sin sustituyentes en los anillos ciclopentánicos **49a** (estructura helicoidal 9/11 o 11/9), si bien la introducción de sustituyentes en los anillos ciclopentánicos del péptido hace que esta estructura esté menos definida.
10. Se ha sintetizado el $\beta^{2,2}$ -aminoácido azaciclohexánico **78a** a partir de la 2,2'-azanediildietanol comercial (**75a**), mediante un protocolo de síntesis cianoacética.
11. Se ha sintetizado el α,β -péptido mixto, constituido por unidades del $\beta^{2,2}$ -aminoácido azaciclohexánico **78a** alternadas con unidades del α -aminoácido proteinogénico L-Leucina.
12. Se han llevado a cabo estudios estructurales de las propiedades de plegado del péptido **80a**, que permitieron determinar que se pliega en forma helicoidal, describiendo una hélice dextrógira 9/11.
13. Se ha sintetizado el $\beta^{2,2}$ -aminoácido azaciclohexánico **78e** a partir de la 2,2'-azanediildietanol comercial (**75a**), mediante un protocolo de síntesis cianoacética.
14. Se han sintetizado las bisamidas **78f**, **78g** y **78h** a partir del $\beta^{2,2}$ -aminoácido azaciclohexánico **78e**, la hexadecilamina y el ácido láurico.
15. Se han llevado a cabo estudios sobre la gelificación de las bisamidas **78f**, **78g** y **78h**, que han permitido determinar que muestran unas propiedades gelificantes moderadas. Sin embargo, se ha demostrado que la bisamida **78g** presenta en disoluciones de acetato de etilo y de diclorometano una microestructuración en forma de corpúsculos esféricos, que el estudio preliminar realizado no permite determinar si se trata de micelas o vesículas.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando disolventes y reactivos comerciales y, para aquellos que necesitaron algún tipo de purificación adicional, ésta se llevó a cabo mediante los procesos estándares descritos en la bibliografía⁸⁴ que se especifican en cada caso. Las reacciones que se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte fueron realizadas en matraces previamente flameados y purgados repetidas veces bajo atmósfera de argón.

Los espectros de RMN se realizaron en un espectrómetro Varian Mercury 300, Espectrómetro Bruker DRX-500. Los desplazamientos químicos (ppm) de ¹H se tomaron como referencia a la señal del TMS (0 ppm) en CDCl₃. En D₂O, MeOD y CD₃CN no se utilizó referencia interna, a no ser que se especifique lo contrario, tomándose la señal del disolvente como referencia. Los espectros que se incluyen en la parte experimental fueron procesados con el software MestRe Nova 8.1.4.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Jasco P2000 usando una lámpara de Na (589 nm) y una cubeta de 1 cm. Los valores de concentración de la muestra se dan en g/100 mL.

Los espectros de masa de baja resolución se realizaron en un espectrómetro cuadrupolar Hewlett Packard 5988 mediante inserción directa, usando la técnica de ionización química y electrospray positivo. Los espectros de masa de alta resolución se realizaron en un espectrómetro VG Autospect 20-250 mediante inserción directa, usando la técnica de electrospray positivo.

Los experimentos de IR se realizaron en un espectrofotómetro MIDAC Prospect-IR con software Grams/386 cuando la muestra se midió en forma de pastilla de KBr y en un FT-IR PerkinElmer Spectrum Two cuando la muestra se depositó sobre un accesorio ATR de diamante.

Los puntos de fusión se determinaron en un bloque Köfeler-Thermograte y están sin corregir.

Los experimentos de HPLC se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hitachi LaChrom Elite con detector UV-Vis.

Las cromatografías en columna se hicieron sobre gel de sílice 60 Merck 230-400 mesh (flash, 0.04-0.063) y las ccf se realizaron sobre gel de sílice 60 GF₂₅₄ Merck. Como reveladores se utilizaron una lámpara de UV-Vis (254 nm) y las mezclas Hanessian, ninhidrina (5% en MeOH) y permanganato.

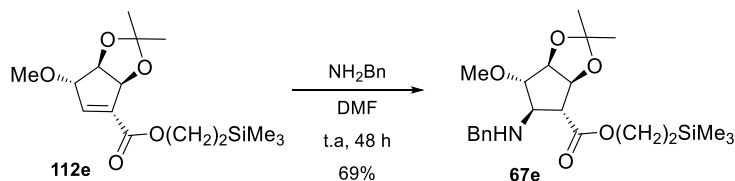
Los filtrados sobre celita se llevaron a cabo utilizando Celita 545 Coarse de Fluka.



⁸⁴ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; "Purification of laboratory chemicals" 1988, Pergamon Press, Oxford.

5.2 SÍNTESIS DE $\beta^{2,3}$ -AMINOÁCIDOS CICLOALCÁNICOS Y β -PÉPTIDO

5.2.1 (3*aS*,4*R*,5*R*,6*S*,6*aS*)-5-(bencilamino)-6-metoxi-2,2-dimetiltetrahidro-4*H*-ciclopenta[*d*][1,3]dioxolo-4-carboxilato de 2-(trimetilsilyl)etilo (67e)



Sobre una disolución del compuesto **112e** (42 mg, 0.134 mmol) en DMF seca (23.5 mL) se añadió NH_2Bn (18 μL , 0.16 mmol) y la disolución obtenida se agitó a t.a. durante 48 h, al cabo de las cuales se observó por ccf (ccf AcOEt/Hex. 1:4) la desaparición del producto de partida ($R_f=0.5$) y la aparición de un nuevo producto ($R_f=0.3$). La mezcla de reacción se diluyó entonces con disolución acuosa saturada de NH_4Cl (20 mL) y se extrajo con AcOEt (20 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El crudo así obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex. 1:3), aislándose el compuesto **67e** (39 mg, 69%) como un aceite ligeramente amarillo.

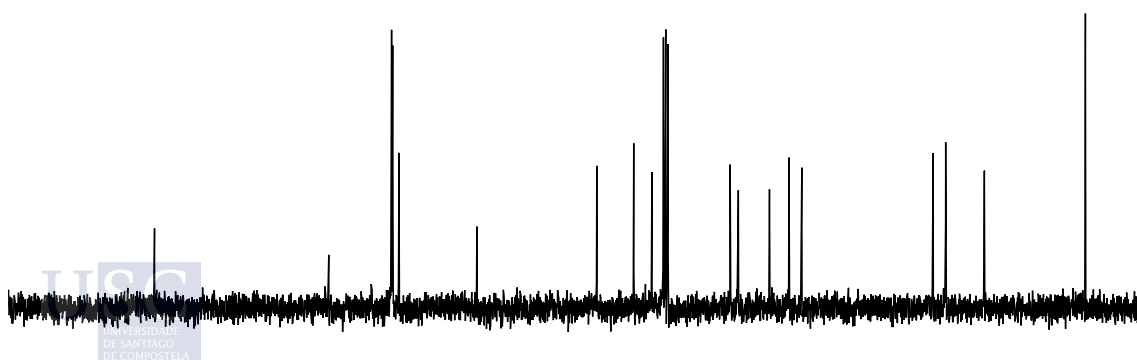
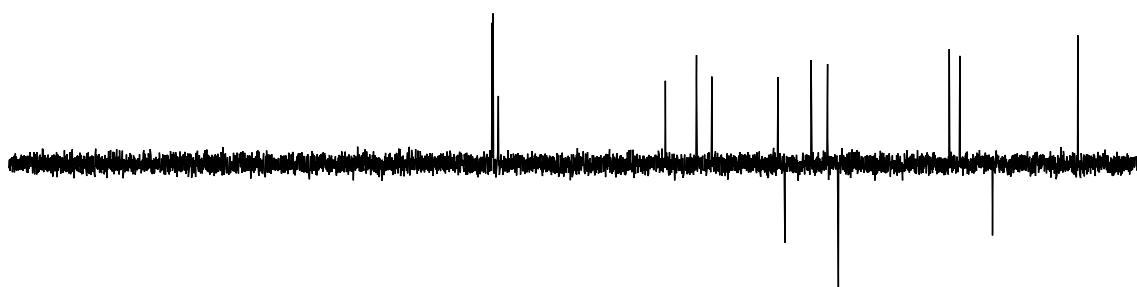
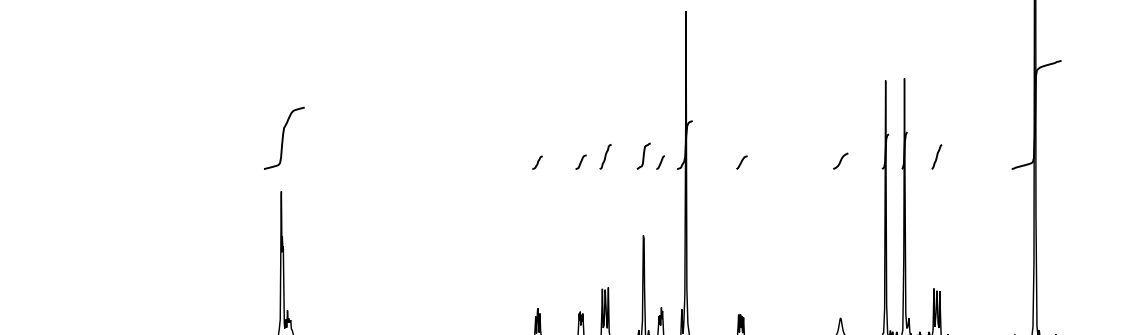
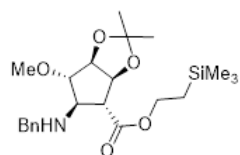
$[\alpha]_D^{22}$: 5.4 (c 3.4, CHCl_3).

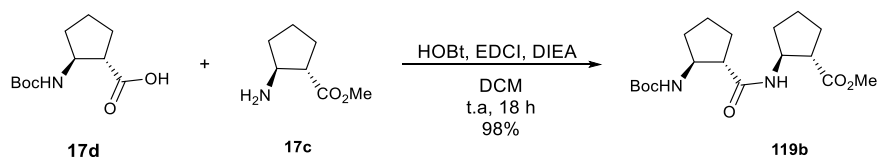
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 0.04 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$), 0.99 (ddd, $J = 9.1, 7.1, 1.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Si}$), 1.30 (s, 3H, CH_3), 1.48 (s, 3H, CH_3), 1.92 (s, 1H, NH), 2.88 (dd, $J = 9.1, 5.3$ Hz, 1H, H-4), 3.37 – 3.47 (m, 4H, OMe+H-5), 3.65 (dd, $J = 7.2, 3.3$ Hz, 1H, H-6), 3.82 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, CH_2Bn), 4.19 (ddd, $J = 9.2, 7.1, 1.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.42 (dd, $J = 7.3, 3.3$ Hz, 1H, H-6a), 4.84 (dd, $J = 7.3, 5.3$ Hz, 1H, H-3a), 7.18 – 7.37 (m, 5H, $5\times\text{H-Ar}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, ppm): -1.4 ($3\times\text{CH}_3$), 17.5 (CH_2), 24.8 (CH_3), 27.1 (CH_3), 51.7 (CH_2), 54.1 (CH), 57.7 (CH_3), 63.6 (CH_2), 65.1 (CH), 79.8 (CH), 83.2 (CH), 90.1 (CH), 112.5 (C), 127.1 (CH-Ar), 128.3 ($2\times\text{CH-Ar}$), 128.5 ($2\times\text{CH-Ar}$), 140.2 (C-Ar), 172.9 (CO).

IR (ν , cm^{-1}): 3350 (a, NH), 1726 (f, C=O).

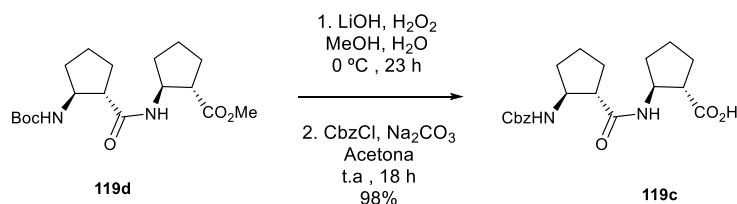
HRMS (ESI⁺): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Si}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 422.2357, encontrado 422.2360.



5.2.2 Síntesis de dipéptido **119b**

Sobre una disolución del β -aminoácido comercial **17d** (180 mg, 0.785 mmol) en DCM seco (3 mL) se añadieron 151 mg de EDCI (0.785 mmol, 1.2 eq) y 120 mg de HOBt (0.785 mmol, 1.2 eq). Después de agitar la mezcla 10 min. a t.a., se añadieron (117 mg, 0.654 mmol) de **17c** y (0.466 mL, 2.616 mmol) de DIEA en 3 mL de DCM seco. Tras 18 horas de agitación a t.a. la reacción se diluyó con 14 mL de DCM y se lavó con 20 mL de una disolución 1 M de HCl (aq), 20 mL de una disolución saturada de NaHCO₃ y 20 mL de una disolución saturada de salmuera. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhídrido, se filtró y se concentró a sequedad. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt: Hex 1:3) obteniéndose 228 mg del dipéptido **119b** esperado con un rendimiento del 98% como un aceite transparente. Que se identificó por comparación de sus datos espectroscópicos con los de la bibliografía.⁸⁵

5.2.3 Síntesis del dipéptido **119c**

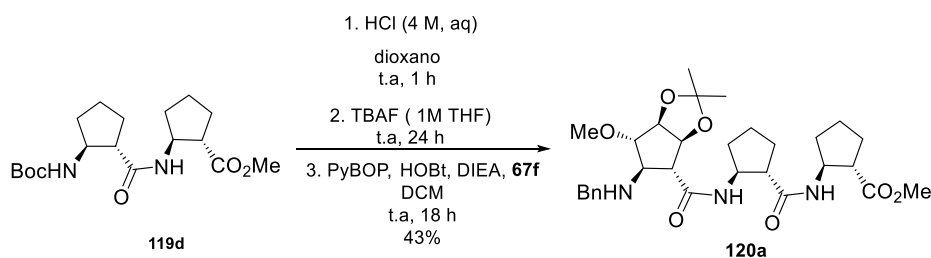


Sobre una disolución de **119d** (100 mg, 0.282 mmol) en 4 mL de metanol y 1.6 mL de agua, se añadieron 118 mg de LiOH·H₂O (2.82 mmol). La disolución resultante se enfrió a 0 °C, sobre ella se añadieron 0.125 mL de una disolución acuosa al 30 % de H₂O₂ y se dejó continuar la reacción a t.a con agitación durante 23 h. La reacción se enfrió de nuevo a 0 °C, se añadieron 2 mL de una disolución acuosa saturada de Na₂SO₃, se concentró el metanol, la disolución resultante se adificó hasta pH 2 con una disolución acuosa 1 M de HCl y se extrajo con DCM (4x10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhídrido, se filtró y se concentró a sequedad.

El residuo así obtenido se disolvió con 4 mL de dioxano y 2 mL de una disolución acuosa 4 M de HCl y la disolución se agitó durante 1 h a t.a. Se concentró entonces a sequedad y el nuevo residuo se disolvió en 8 mL de una disolución acuosa 1 M de HCl, se lavó con 10 mL de AcOEt y la fase acuosa se concentró.

El crudo de reacción anteriormente obtenido se disolvió en 15 mL de acetona y 2 mL de agua y se añadieron Na₂CO₃ (124 mg, 1.13 mmol) y CbzCl (50 µL). Tras 18 horas de agitación, la mezcla de reacción se lavó con Éter (2x10 mL), la fase acuosa se adificó hasta pH 2 con una disolución acuosa 1 M de HCl y se extrajo con AcOEt (2x15 mL). La fase orgánica así obtenida se secó con Na₂SO₄ anhídrido, se filtró y se concentró a sequedad. Se obtuvieron 101 mg del dipéptido esperado **119c** como un aceite transparente (rendimiento del 96%), que se identificó por comparación con los datos publicados en la bibliografía.⁸⁶

⁸⁶ Tarek Sammakia, Hallie A. Latham, and David R. Schaad. *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21*, 197-1815

5.2.4 Síntesis del tripéptido **120a**

Una disolución de **119d** (65 mg, 0.154 mmol) en 4 mL de dioxano y 3 mL de una disolución 4 M de HCl se agitó durante 1 h a t.a. y a continuación se concentró a sequedad para dar lugar al compuesto **119** que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Sobre una disolución del compuesto **119** en THF (3 mL) se añadieron 0.17 mL de una disolución 1 M en THF de TBAF y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 24 horas. La reacción se diluyó entonces con 5 mL de NH_4Cl , se extrajo AcOEt (3x5 mL), las fases orgánicas se secaron con Na_2SO_4 anhídrido, se filtraron y concentraron a sequedad. El crudo obtenido se disolvió en 4 mL de DMF, se le añadió PyBOP (104 mg, 0.200 mmol) y HOBT (31 mg, 0.200 mmol), y después de 10 min agitando a t.a., se añadió una disolución de **67f** (54 mg, 0.185 mmol) y DIEA (0.110 mL, 0.616 mmol) en 4 mL de DMF. La reacción se agitó durante 18 h a t.a. y pasado este tiempo se diluyó con 20 mL de DCM, se lavó con 20 mL de una disolución 1 M de HCl, 20 mL de una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y 20 mL de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhídrido, se filtró y se concentró a sequedad. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt), obteniéndose así 37 mg del tripéptido esperado **120a** como un aceite transparente con un rendimiento de 43%.

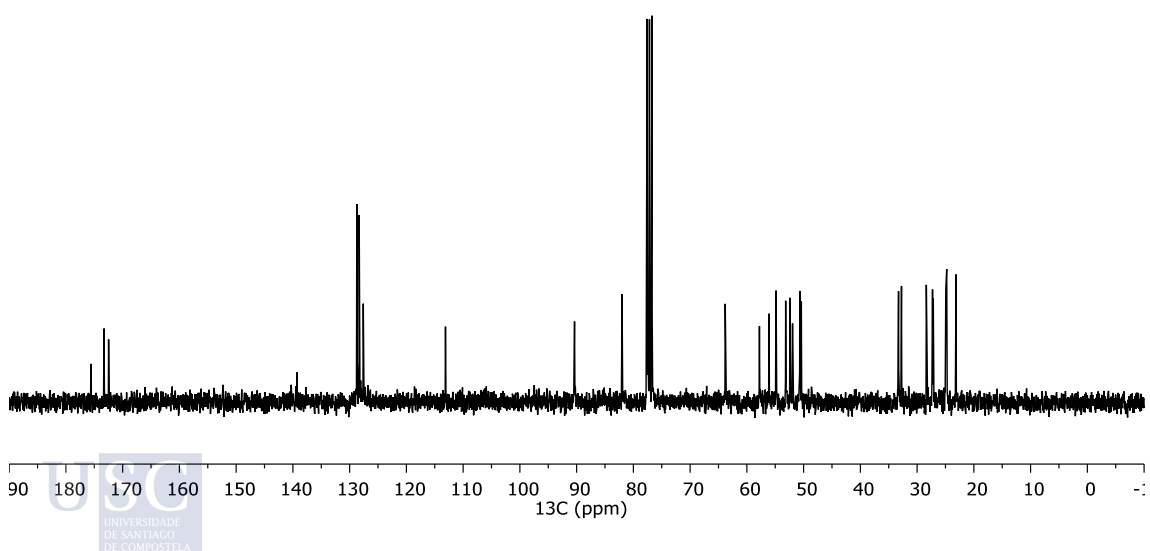
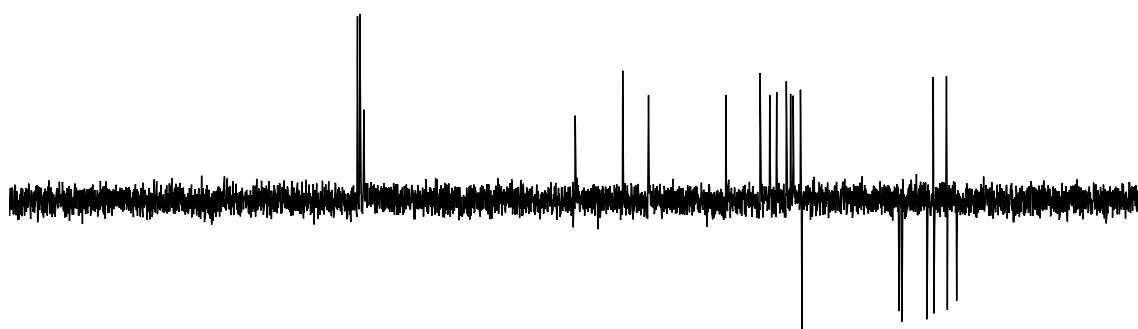
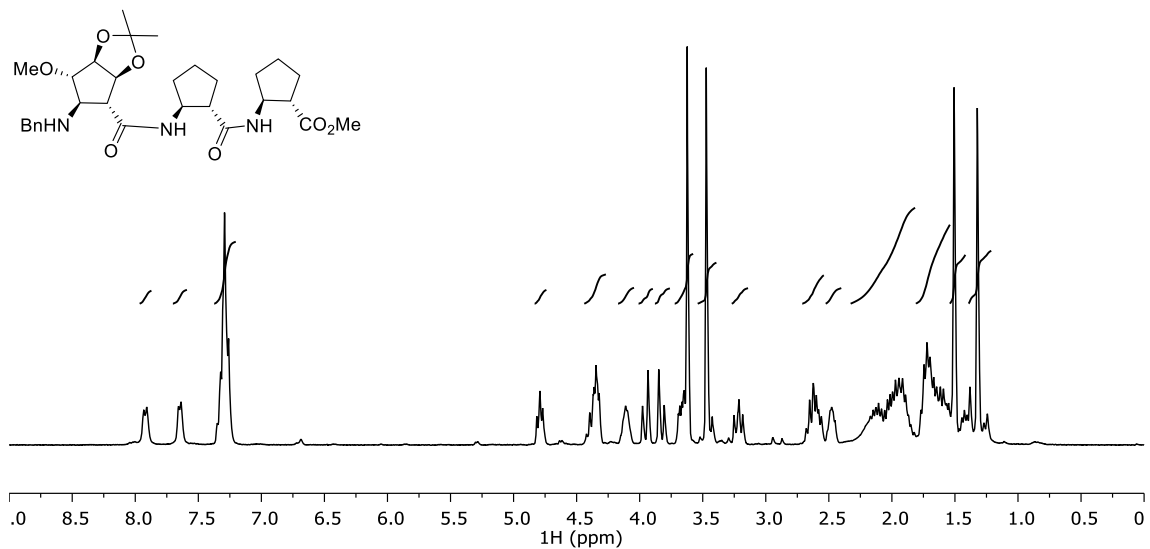
$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: +29.1 (c 2.0, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 1.22 – 1.45 (m, 4H, CH_3+CH_2), 1.51 (s, 3H, CH_3), 1.53 – 1.79 (m, 5H, $2\times\text{CH}_2+\text{CH}_2$), 1.83 – 2.27 (m, 7H, $3\times\text{CH}_2+\text{NH}$), 2.47 (dd, $J = 8.4, 4.5$ Hz, 1H, $\text{CH}-\text{CO}$), 2.56-2.68 (m, 2H, $2\times\text{CH}-\text{CO}$), 3.22 (dd, $J = 11.9, 8.6$ Hz, 1H, $\text{CH}-\text{N}$), 3.47 (s, 3H, OMe), 3.59 – 3.71 (m, 4H, OMe+ $\text{CH}-\text{N}$), 3.83 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H, CH_2), 3.96 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, CH_2), 4.11 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, $\text{CH}-\text{N}$), 4.30 – 4.41 (m, 2H, $2\times\text{CH}-\text{O}$), 4.79 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, $\text{CH}-\text{O}$), 7.30 (td, $J = 9.6, 8.6, 3.6$ Hz, 5H, $5\times\text{H}-\text{Ar}$), 7.65 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, NH), 7.92 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, NH).

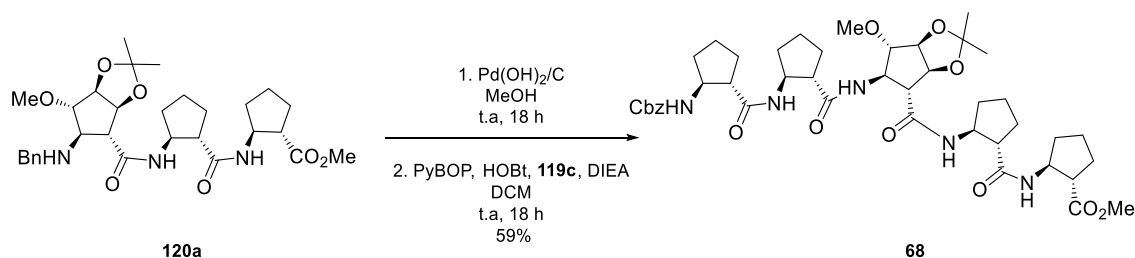
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, ppm): 23.1 (CH_2), 24.8 (CH_2), 24.9 (CH_3), 27.2 (CH_2), 27.3 (CH_3), 28.4 (CH_2), 32.8 (CH_2), 33.3 (CH_2), 50.4 (CH_2), 50.7 (CH), 52.0 (CH_3), 52.4 (CH), 53.2 (CH), 54.9 (CH), 56.1 (CH), 57.8 (CH_3), 63.8 (CH), 77.4 (CH), 82.0 (CH), 90.4 (CH), 113.1 (C), 127.6 (CH-Ar), 128.3 ($2\times\text{CH}-\text{Ar}$), 128.7 ($2\times\text{CH}-\text{Ar}$), 139.3 (C-Ar), 172.5 (CO), 173.3 (CO), 175.6 (CO).

IR (ATR, cm^{-1}): 3287 (a, NH), 1732 (f, C=O), 1643f, (C=O), 1546 (f, C=O).

HRMS (ESI⁺): calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_7$ (M+H)⁺ 558.3174, encontrado 558.3174.



5.2.5 Síntesis del pentapéptido 68



Sobre una disolución del compuesto **120a** (23 mg, 0.041 mmol) en 4 mL de metanol se añadieron 12 mg de Pd(OH)₂/C al 20 % en peso, la suspensión resultante se desoxigenó y se agitó bajo atmósfera de H₂ (P= 1 atm) a t.a. durante 18 horas. La reacción se filtró entonces sobre celita, se lavó con metanol y el filtrado se concentró a sequedad. El crudo resultante se disolvió en 5 mL de DCM seco, se le añadió DIEA (0.28 mL, 1.59 mmol) y la disolución resultante se añadió sobre otra disolución del dímero **119c** (20 mg, 0.054 mmol), PyBOP (28 mg, 0.054 mmol) y HOBT (8 mg, 0.054 mmol) en 1 mL de DMF seca. Después de agitar la mezcla durante 18 h a t.a. la reacción se diluyó en 10 mL de DCM y se lavó con 10 mL de disolución acuosa 1 M de HCl, 10 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y 10 mL de una disolución acuosa saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhídrido, se filtró y se concentró a sequedad. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt: Hex 4:1) obteniéndose 20 mg del pentámero **68** esperado con un rendimiento del 59% como un sólido blanquecino.

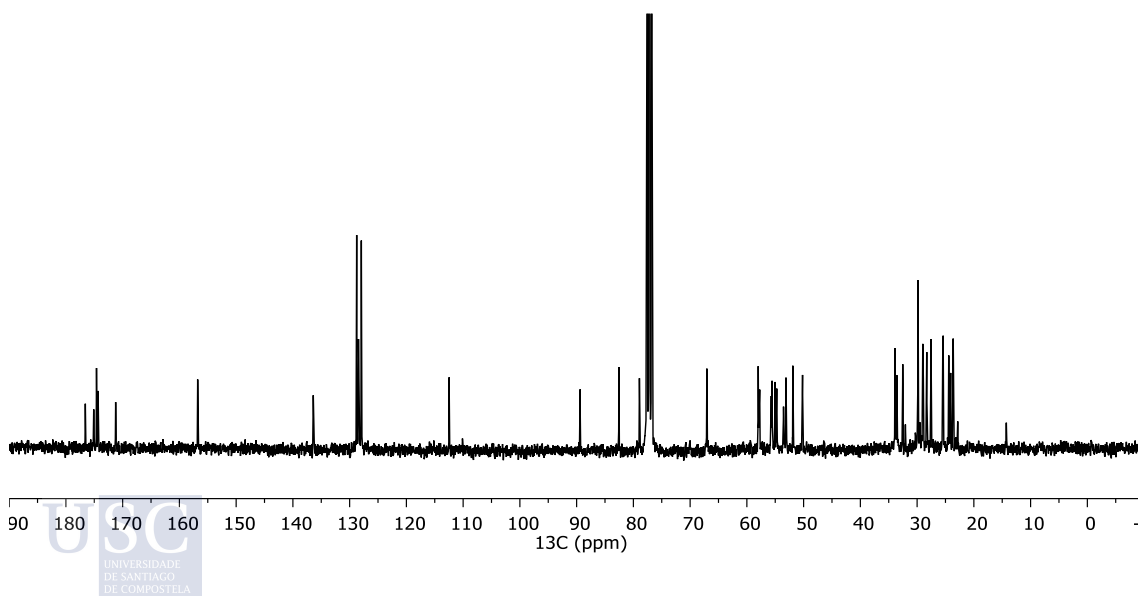
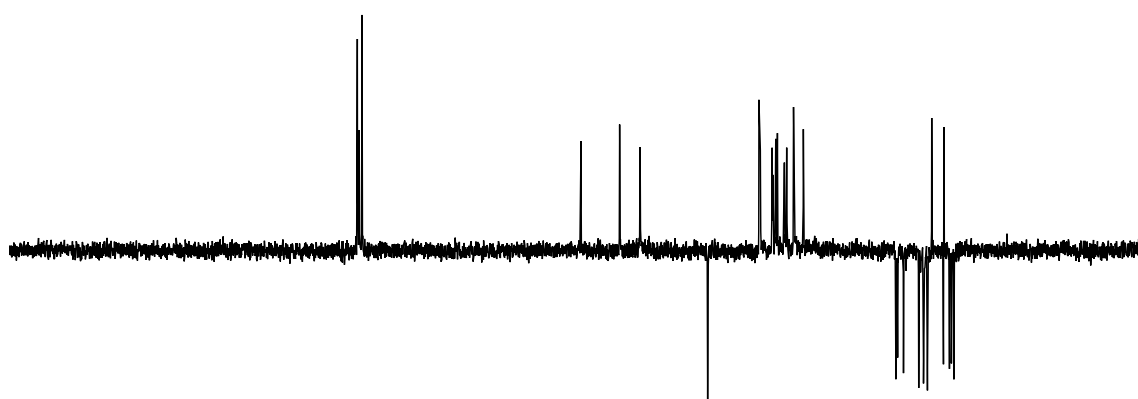
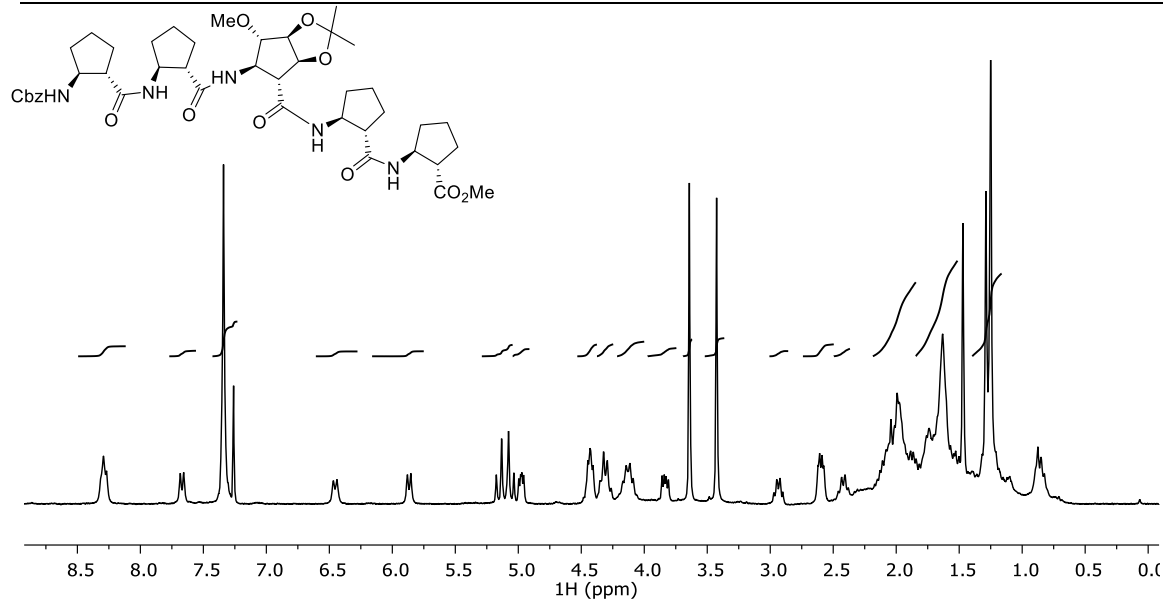
[α]_D²²: +47.7 (c 1.0, CHCl₃).

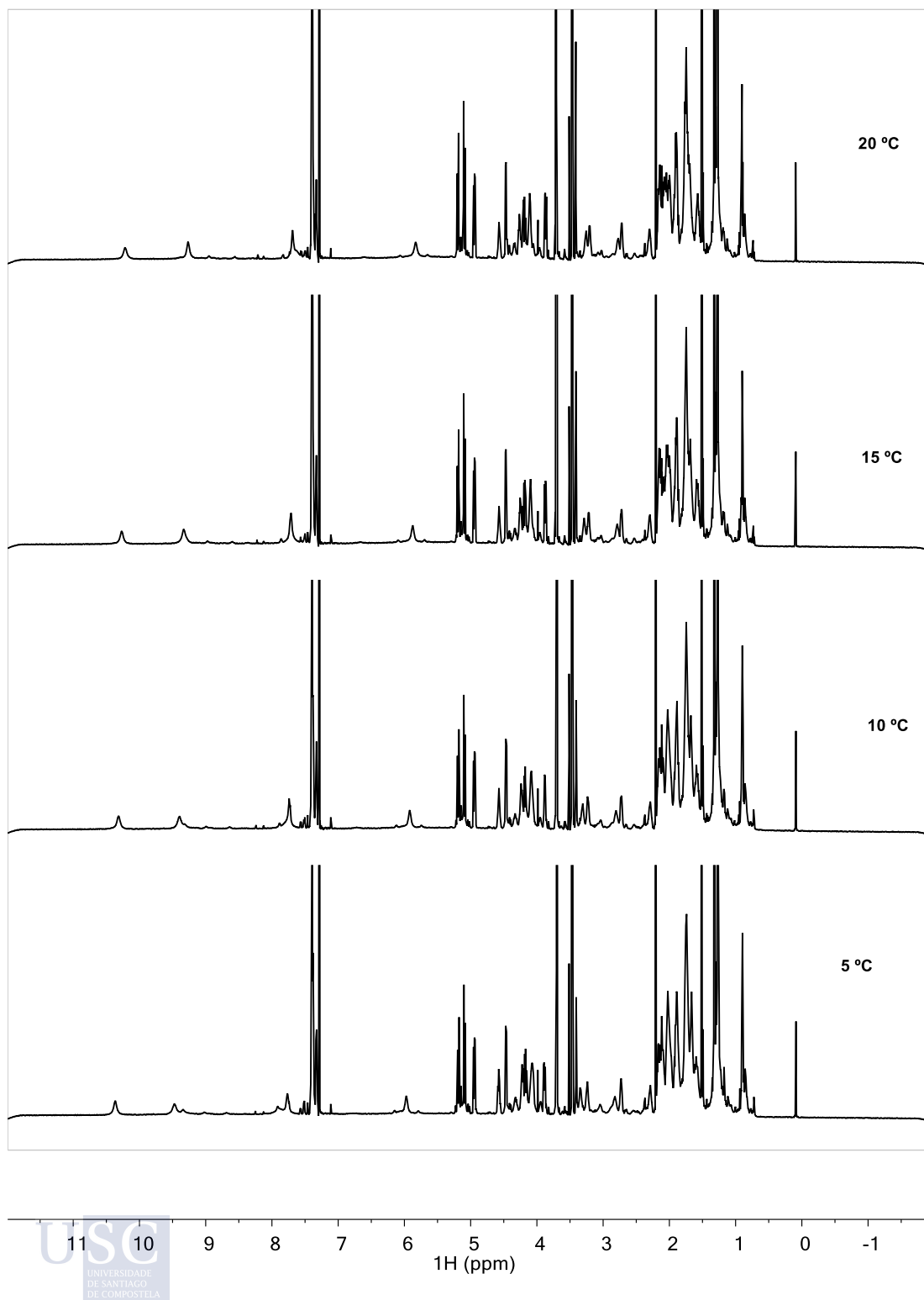
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, ppm): 1.27 (s, 3H, CH₃), 1.31 (s, 3H, CH₃), 1.55 – 1.81 (m, 12H, CH₂), 1.90 – 2.17 (m, 12H, CH₂+ CH-CO), 2.38 – 2.49 (m, 1H, CH-CO), 2.62 (dd, *J* = 9.5, 4.1 Hz, 2H, CH-CO), 2.89 – 3.04 (m, 1H, CH-CO), 3.45 (s, 3H, OMe), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.85 (dd, *J* = 9.8, 5.4 Hz, 1H, CH-N), 4.08 – 4.22 (m, 3H, CH-N+ CH-O), 4.33 (q, *J* = 9.1, 8.6 Hz, 2H, CH-N), 4.41 – 4.51 (m, 2H, CH-O), 5.00 (dd, *J* = 7.2, 4.3 Hz, 1H, CH-O), 5.12 (dd, *J* = 12.3, 16.7 Hz, 2H, CH₂-Ar), 5.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 6.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 7.36 (s, 5H, CH₂-Ar), 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 8.13 – 8.48 (m, 2H, NH).

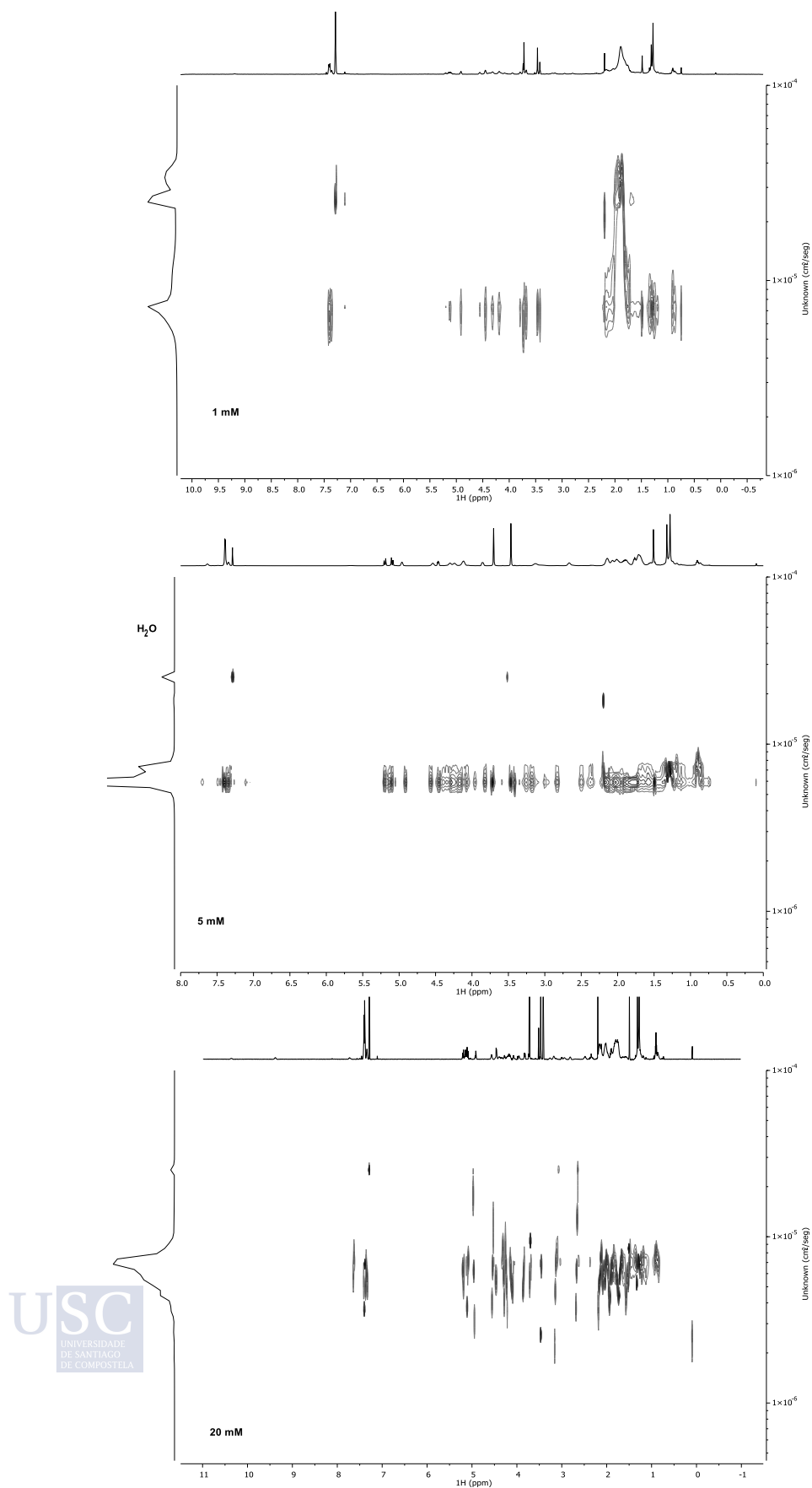
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, ppm): 23.6 (CH₂), 24.1 (CH₂), 24.4 (CH₂), 25.4 (CH₃), 25.5 (CH₂), 27.6 (CH₃), 28.3 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.8 (CH₂), 32.5 (CH₂), 33.6 (CH₂), 33.9 (CH₂), 50.2 (CH), 51.8 (CH₃), 51.9 (CH), 53.1 (CH), 53.5 (CH), 54.7 (CH), 55.0 (CH), 55.6 (CH), 55.7 (CH), 57.7 (CH₃), 57.9 (CH), 58.0 (CH), 67.0 (CH₂), 78.9 (CH), 82.5 (CH), 89.4 (CH), 112.5 (C), 127.9 (2xCH-Ar), 128.4 (CH-Ar), 128.8 (2xCH-Ar), 136.4 (C-Ar), 156.8 (CO), 171.2 (CO), 174.3 (CO), 174.6 (CO), 175.1 (CO), 176.6 (CO).

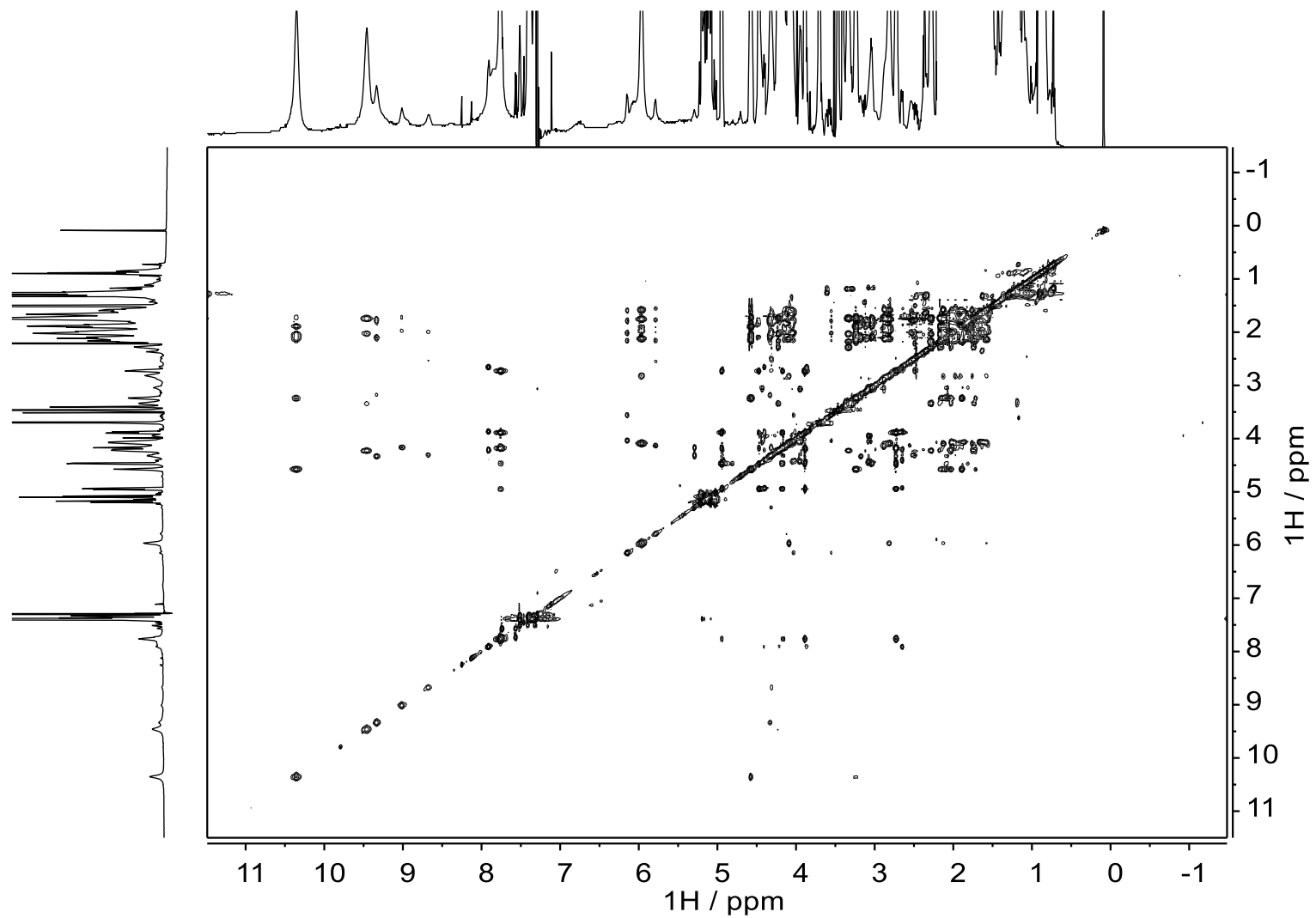
IR (ATR, cm⁻¹): 3289 (a, NH), 3037 (a, NH), 1699 (f, C=O), 1645 (f, C=O), 1555 (f, C=O).

HRMS (ESI⁺): calculado para C₄₃H₆₁N₅NaO₁₁ (M+Na)⁺ 846.4260, encontrado 846.4262.

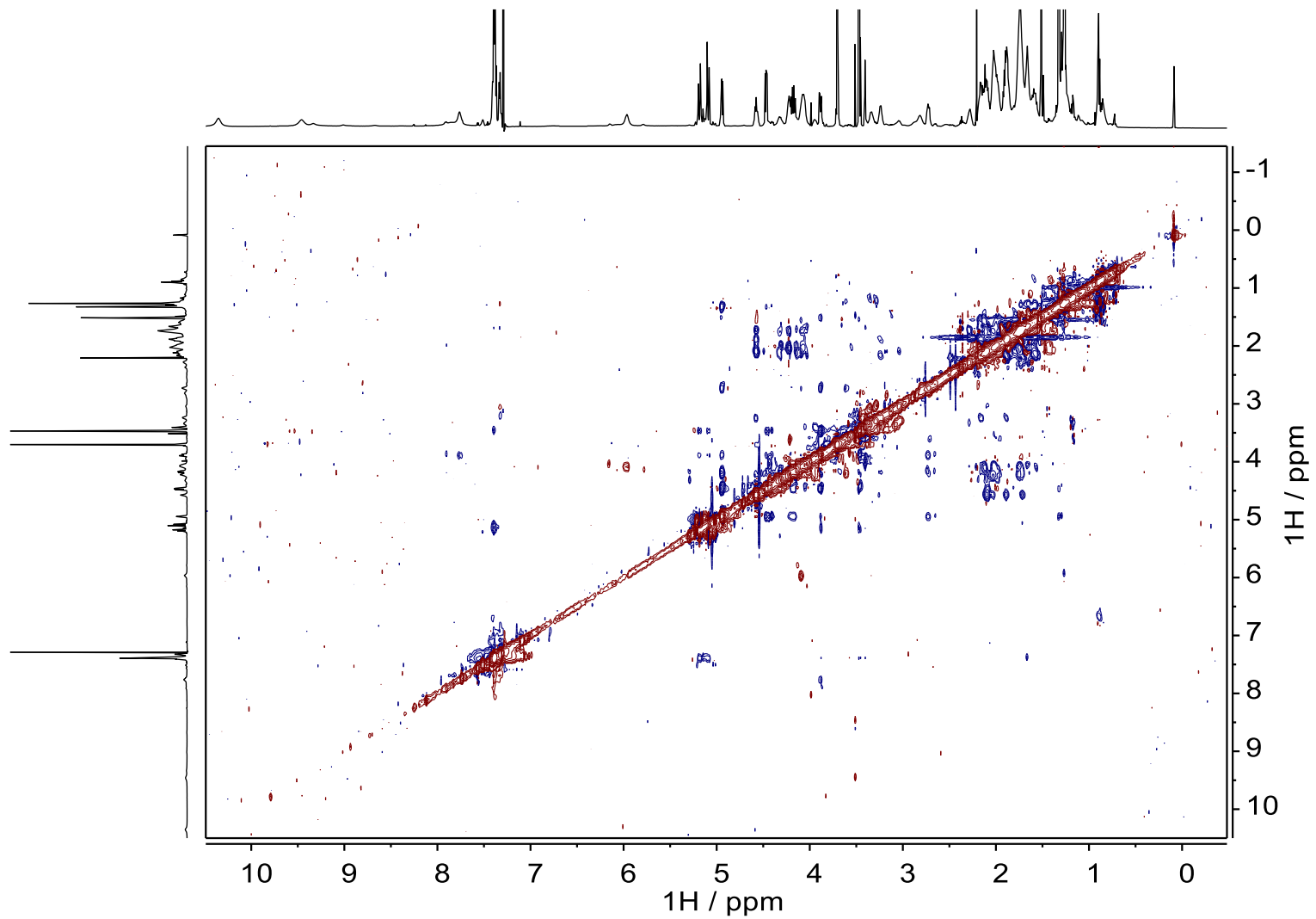


5.2.5.1 ^1H -RMN (5 mM, 5- 20° C, 300 MHz).

5.2.5.1.A.1 DOSY (1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 °C, 500 MHz, $t_{\text{mix}} = 600$ ms).

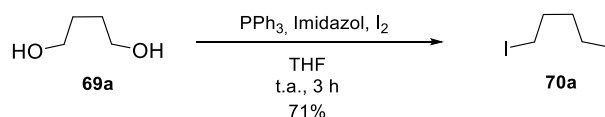
5.2.5.2 TOCSY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, CDCl₃).

5.2.5.3 ROESY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, t-mix= 300 ms, CDCl₃).



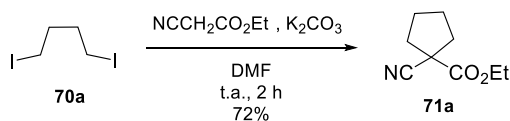
5.3 SÍNTESIS DE β^2 - AMINOÁCIDOS CICLOPENTÁNICOS POLISUSTITUIDOS Y SUS α,β -PÉPTIDOS.

5.3.1 Síntesis del 1,4-Diyodobutano (70a)



Sobre una disolución de 1,4-butanodiol (**69a**) (1.00 g, 11.1 mmol) en 89 mL de THF seco se añadió PPh_3 (11.65 g, 44.4 mmol, 4.0 eq), imizadol (4.53 g, 66.6 mmol, 6.0 eq) y I_2 (11.27 g, 44.4 mmol, 4.0 eq). La mezcla resultante se agitó durante 3 h a t.a. y entonces se observó mediante ccf (AcOEt) la desaparición del producto de partida ($R_f=0.2$) y la aparición de un producto ($R_f=1.0$). La reacción se paró adicionando tiosulfato sódico, hasta decoloración de la disolución y en ese momento se extrajo con AcOEt (2x15 mL) y se lavó con 10 mL de H_2O , 10 ml de una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y 10 mL de disolución acuosa saturada NaCl . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se concentró a sequedad en el rotavapor y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (Hexano), obteniéndose de este modo 2.43 g del 1,4-Diyodobutano (**70a**) esperado como un aceite transparente con un rendimiento del 71%.⁸⁷

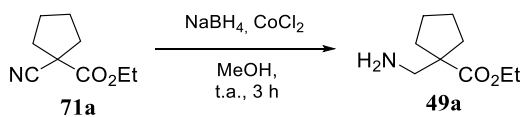
5.3.2 Síntesis del 1-cianociclopentanocarboxilato de etilo (**71a**)



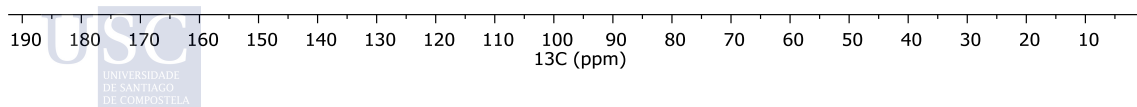
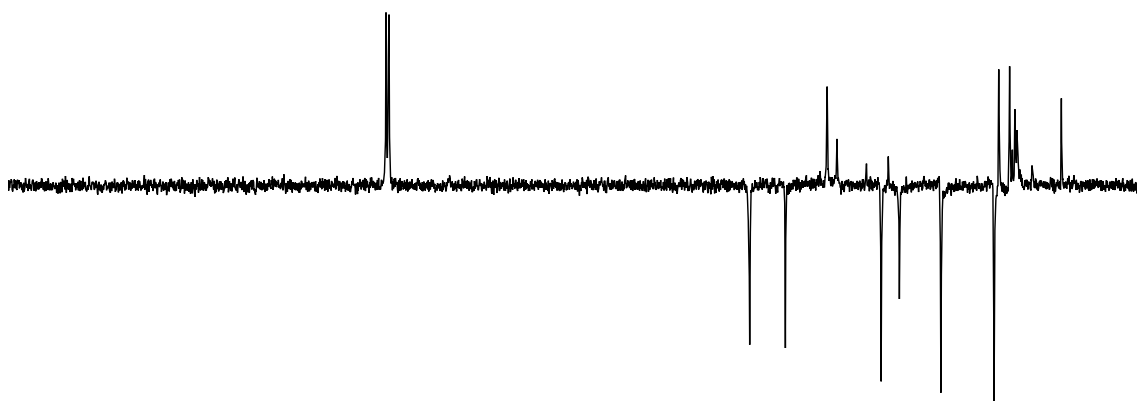
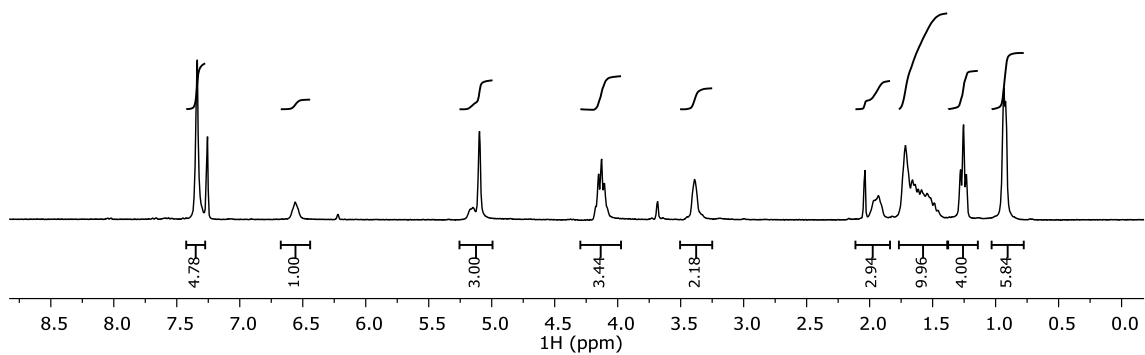
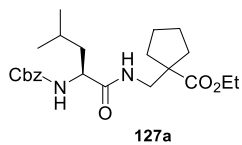
Sobre una disolución del compuesto **70a** (200 mg, 0.645 mmol) en 9 mL de DMF seca se añadió cianoacetato de etilo (83 μL , 0.774 mmol, 1.2 eq) y K_2CO_3 (214 mg, 1.55 mmol, 2.4 eq). Después de agitar la mezcla durante 2 horas a t.a. se observó mediante ccf (AcOEt/Hex 1:9) la desaparición del producto de partida ($R_f=0.7$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f=0.4$). La mezcla de reacción se concentró entonces a sequedad, el residuo obtenido se redisolvió en 50 mL de agua y se extrajo con Et_2O (2x15 mL). Los extractos orgánicos se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se concentraron a sequedad en el rotavapor y se purificaron por cromatografía en columna ($\text{Et}_2\text{O}/\text{Hex}$ 1:9). Se obtuvieron de esta forma 72 mg del 1-cianociclopentano carboxilato de etilo (**71a**) esperado como un aceite transparente con un rendimiento del 72%, que fue caracterizado por comparación con sus datos espectroscópicos que aparecen en la bibliografía.⁸⁸

⁸⁸Muthusamy, S.; Gnanaprakasam, B. Imidazolium Salts as Phase Transfer Catalysts for the Dialkylation and Cycloalkylation of Active Methylene Compounds. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46 (4), 635–638.

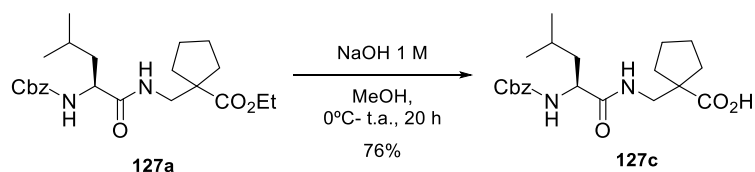
5.3.3 Síntesis del 1-(aminometil)ciclopentanocarboxilato de etilo (**49a**)



Sobre una disolución del compuesto **71a** (0.072 g, 0.431 mmol) en 21 mL de MeOH se añadió CoCl₂ (0.196 g, 1.51 mmol, 3.5 eq) y NaBH₄ (0.341 g, 9.05 mmol, 21 eq). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 3 horas, al cabo de las cuales se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:5) la desaparición del producto de partida (R_f= 0.4) y la aparición de un producto de reacción (R_f= 0.1). La mezcla de reacción se concentró entonces a sequedad en el rotavapor, al residuo obtenido se le añadió 30 mL de H₂O y la suspensión resultante se extrajo con AcOEt (2x15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución acuosa saturada de NaCl (2x10 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron en el rotavapor, obteniéndose así el compuesto **49a** como un aceite transparente que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

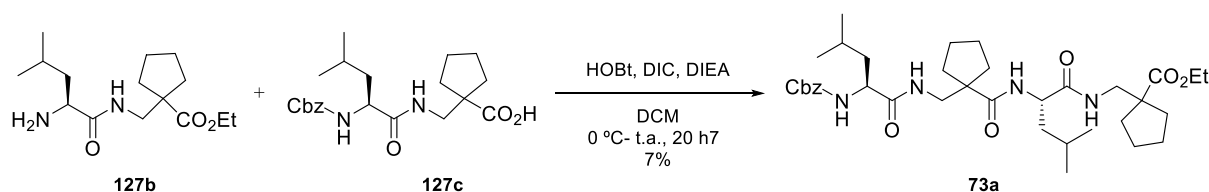


5.3.5 Síntesis del dipéptido **127c**



Sobre una disolución del compuesto **127a** (0.122 g, 0.292 mmol) en 2 mL de MeOH, se añadieron a 0°C 2 mL de una disolución acuosa de NaOH 1 M y se dejó alcanzar la temperatura ambiente, tras reaccionar durante 20 horas, se observó el avance de la reacción por ccf (AcOEt/Hex 1:3), detectándose un producto de partida ($R_f=0.4$), y un producto de reacción ($R_f= 0.1$). La reacción se paró adicionando HCl 1M hasta alcanzar un pH= 4. Posteriormente se concentró el MeOH en el rotavapor. Después se extrajo con 3x10 mL DCM. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad en el rotavapor obteniéndose un sólido blanco del compuesto esperado **127c** (0.247 g, 0.633 mmol) con un rendimiento del 76%. El producto de reacción se utilizó sin más purificación.

5.3.7 Síntesis del tetrapéptido 73a



En un matraz de fondo redondo, previamente purgado bajo argón, se preparó una disolución del compuesto **127c** (0.048 g, 0.12 mmol) en 2 mL de DCM seco y sobre ella se añadieron HOBt (0.022 g, 0.144 mmol, 1.2 eq) y DIC (22 μL , 0.144 mmol, 1.2 eq) (*Disolución 1*).

En un segundo matraz de fondo redondo, también purgado, se disolvió el compuesto **127b** (0.034 g, 0.1196 mmol) en 2 mL de DCM seco y después se añadió DIEA (83 μL , 0.478 mmol, 4 eq) (*Disolución 2*).

A continuación, se adicionó la *disolución 1* lentamente sobre la *disolución 2*, la mezcla resultante se dejó alcanzar la t.a y se agitó a esta temperatura durante 20 h. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.6$). La mezcla de reacción se lavó entonces con 10 mL H_2O , 10 mL de disolución acuosa 1M de HCl, 10 mL H_2O , 10 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO_3 , se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad en el rotavapor. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex 1:1), obteniéndose el tetrapéptido esperado **73a** (0.061 g, 0.092 mmol) como un aceite transparente con un rendimiento del 77%.

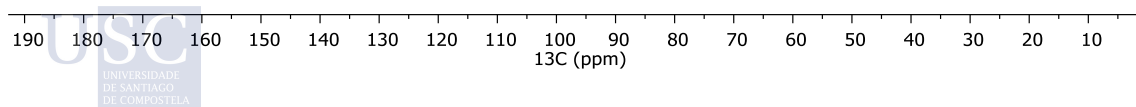
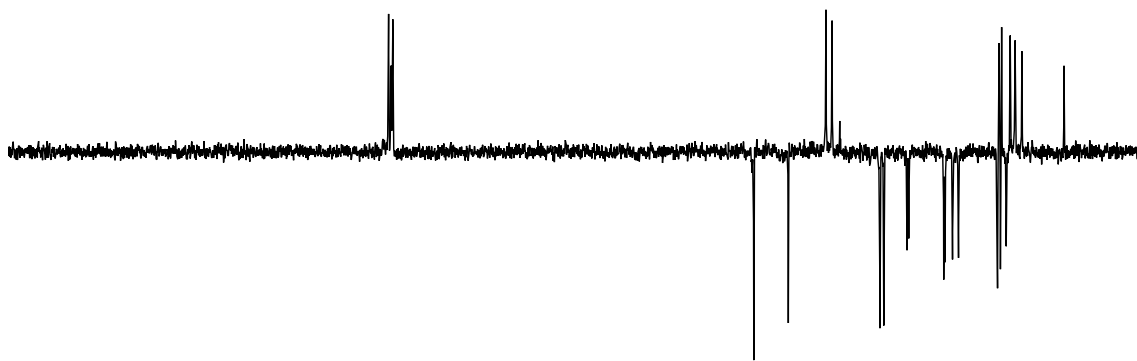
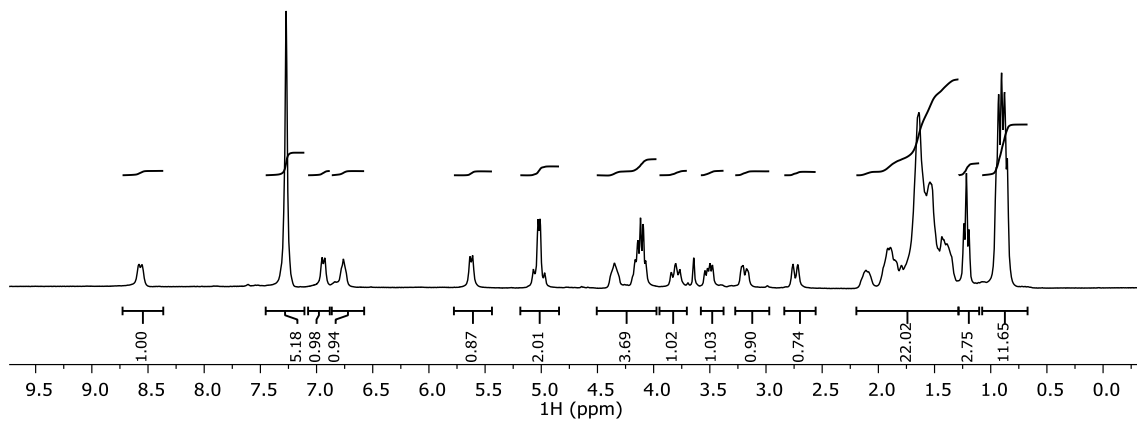
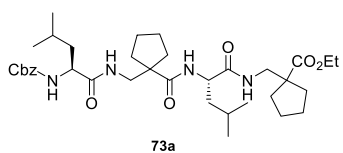
$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: -0.2293 (1.7 c, CHCl_3)

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , ppm): 0.93 (dt, $J = 11.3, 5.3$ Hz, 12H, CH_3), 1.24 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.32 – 1.80 (m, 22H, CH_2), 3.27 (dd, $J = 13.7, 5.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.47 (dd, $J = 13.5, 6.7$ Hz, 2H, CH_2), 3.82 (t, $J = 11.6$ Hz, 1H), 3.95–4.44 (m, 3H, $\text{CH} + \text{O-CH}_2$), 5.06 (t, $J = 9.3$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-Ph}$), 5.40 (sa, 1H, NH), 6.51 (sa, 1H, NH), 6.87 (sa, 1H, NH), 7.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 5H, Ar-H), 8.48 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NH).

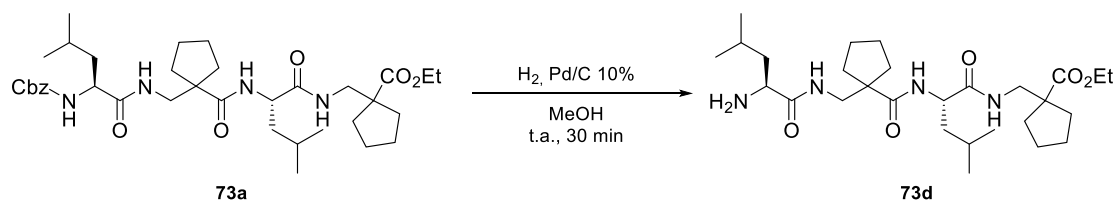
^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , ppm): 14.1(CH_3), 21.2(CH_3), 22.4(CH_3), 22.4(CH_3), 23.2(CH_3), 23.9(CH), 24.7(CH), 24.9(CH_2), 25.1(CH_2), 25.4(CH_2), 25.4(CH_2), 32.0(CH_2), 33.0(CH_2), 34.2(CH_2), 34.5(CH_2), 40.4(CH), 40.7(CH), 44.6(C), 45.2(C), 53.3(CH), 54.1(CH), 54.4(CH_2), 56.7(CH_2), 60.8(CH_2), 66.6(CH_2), 127.7(Ar-C), 128.4(Ar-C), 136.4(Ar-C), 156.3(C=O), 173.2(C=O), 174.6(C=O), 177.5(C=O), 177.6(C=O).

IR (v, cm^{-1}): 3283 (a, -NH), 1702 (f, C=O), 1641 (f, C=O).

MS-ESI (m/z, %): Calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}]^+$: 656.4041. Encontrado: 679.4039.

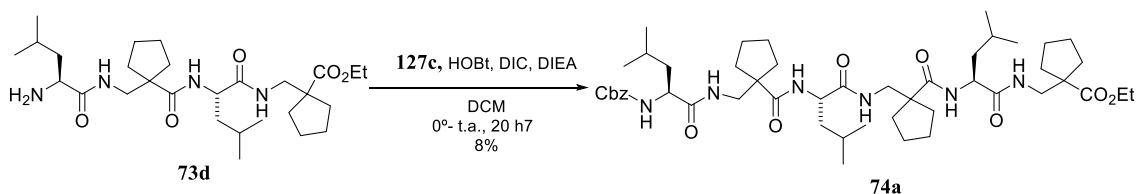


5.3.8 Síntesis del tetrapéptido 73d



Sobre una disolución del compuesto **73a** (0.184 g, 0.280 mmol) en 4 mL de MeOH, que se desoxigenó haciendo vacío e introduciendo argón, se añadió Pd/C 10% (0.184 g). La suspensión resultante se volvió a desoxigenar, se colocó bajo atmósfera de hidrógeno ($P=1\text{atm}$) y se agitó vigorosamente durante 30 min. a t.a. Al cabo de este tiempo, se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f=0.6$) y la aparición de un producto de reacción con ($R_f= 0.1$). La mezcla de reacción se filtró entonces a vacío sobre celita, se lavó con MeOH (2x10 mL) y el filtrado se concentró a sequedad en el rotavapor, obteniéndose así el tetrapéptido **73d** esperado como un aceite transparente que se utilizó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

5.3.9 Síntesis del hexapéptido 74a



En un matraz de fondo redondo, previamente purgado bajo argón, se preparó una disolución del compuesto **127c** (0.106 g, 0.269 mmol) en 3 mL de DCM seco y sobre ella se añadieron HOBT (0.050 g, 0.323 mmol, 1.2 eq) y DIC (50 μ L, 0.323 mmol, 1.2 eq) (*Disolución 1*).

En un segundo matraz de fondo redondo, también purgado, se disolvió el compuesto **73d** (0.151 g, 0.269 mmol) en 3 mL de DCM seco y después se añadió DIEA (188 μ L, 1.076 mmol, 4.0 eq) (*Disolución 2*).

A continuación, se adicionó la *disolución 1* lentamente sobre la *disolución 2*, la mezcla resultante se dejó alcanzar la t.a y se agitó a esta temperatura durante 20 h. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción (Rf= 0.7). La mezcla de reacción se lavó entonces con 10 mL H₂O, 10 mL de disolución acuosa 1M de HCl, 10 mL H₂O, 10 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO₃, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad en el rotavapor. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex 1:1), obteniéndose el hexapéptido esperado **74a** (0.185 g, 0.207 mmol) como un aceite transparente con un rendimiento del 78%.

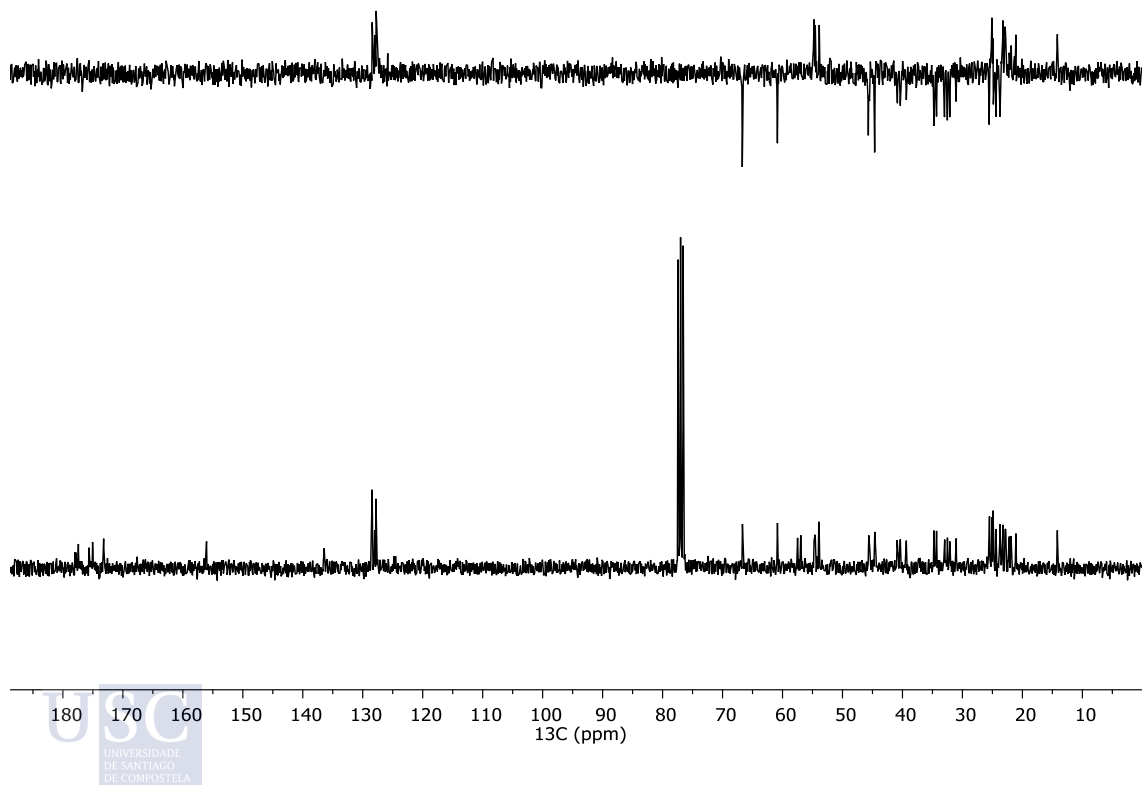
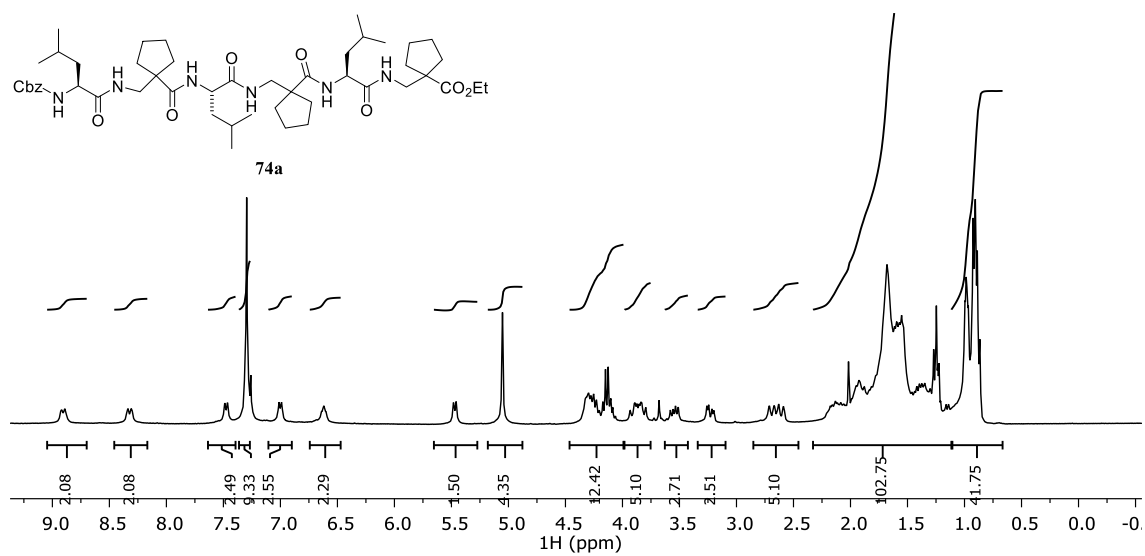
$[\alpha]_D^{22}$: + 99.7 ° (2.1 c, CHCl₃).

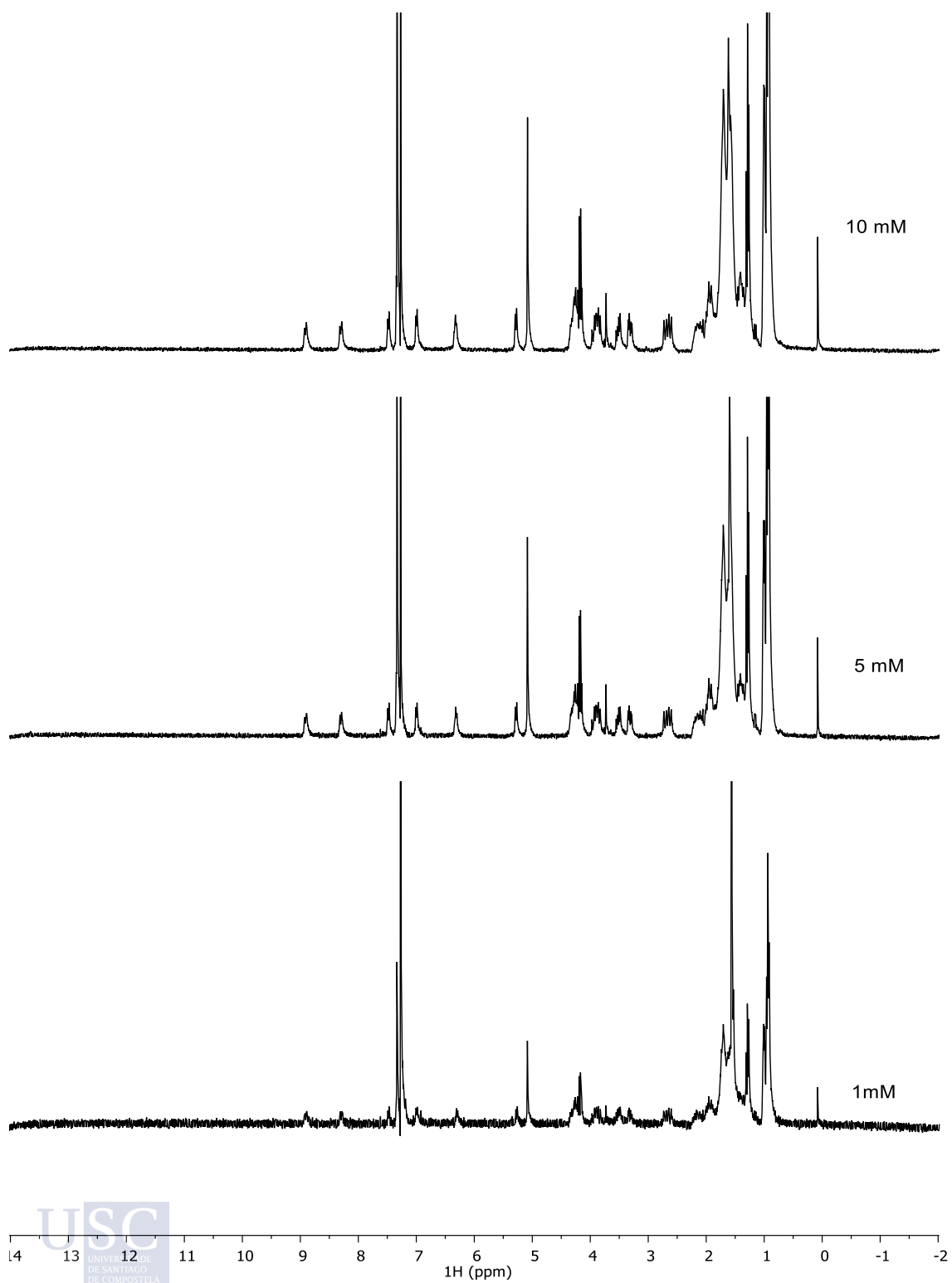
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): 1.09 (s, 18H, CH₃), 1.10 – 2.30 (m, 36H, CH₃,CH₂+CH), 3.23 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 2H, CH₂), 3.54 (dd, *J* = 13.6, 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.86 (ddd, *J* = 11.7, 13.3, 10.1 Hz, 2H, CH₂), 4.00 – 4.52 (m, 5H, CH+CH₂), 5.05 (s, 2H, -CH₂-), 5.47 (sa, 1H, -NH), 6.61 (sa, 1H, NH), 7.00 (sa, 1H, -NH), 7.37 (s, 5xAr-H), 7.48 (sa, 1H, NH), 8.32 (sa, 1H, NH), 8.9 (sa, 1H, -NH).

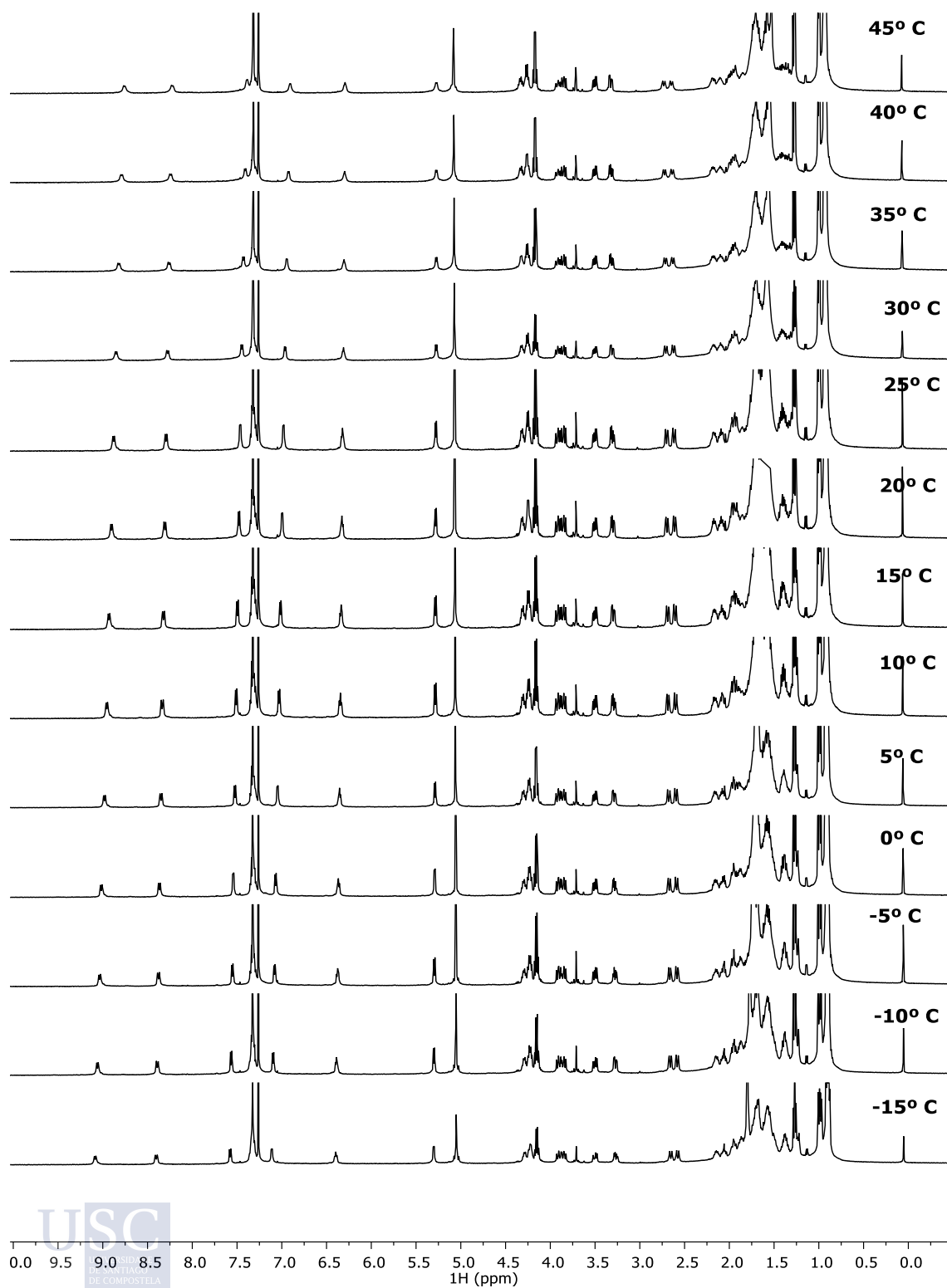
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃, ppm): 14.2(CH₃), 21.1(CH₃), 21.9(CH₃), 22.2(CH₃), 22.8(CH₃), 22.9(CH₃), 23.3(CH₂), 23.6(CH₂), 23.7(CH₂), 24.4(CH), 24.8(CH), 24.9(CH), 25.1(CH₂), 25.5(CH₂), 25.5(CH₂), 31.0(CH₂), 32.1(CH₂), 32.5(CH₂), 33.0(CH₂), 34.3(CH₂), 34.7(CH₂), 39.4(CH₂), 40.4(CH₂), 40.9(CH₂), 44.6(C), 45.6(C), 53.9(C), 54.0(CH), 54.5(CH), 57.0(CH), 57.5(CH), 60.8(CH₂), 66.7(CH₂), 127.8(Ar-C), 128.0(Ar-C), 128.4(Ar-C), 136.4(Ar-C), 156.0(C=O), 173.2(C=O), 175.1(C=O), 175.6(C=O), 177.4(C=O).

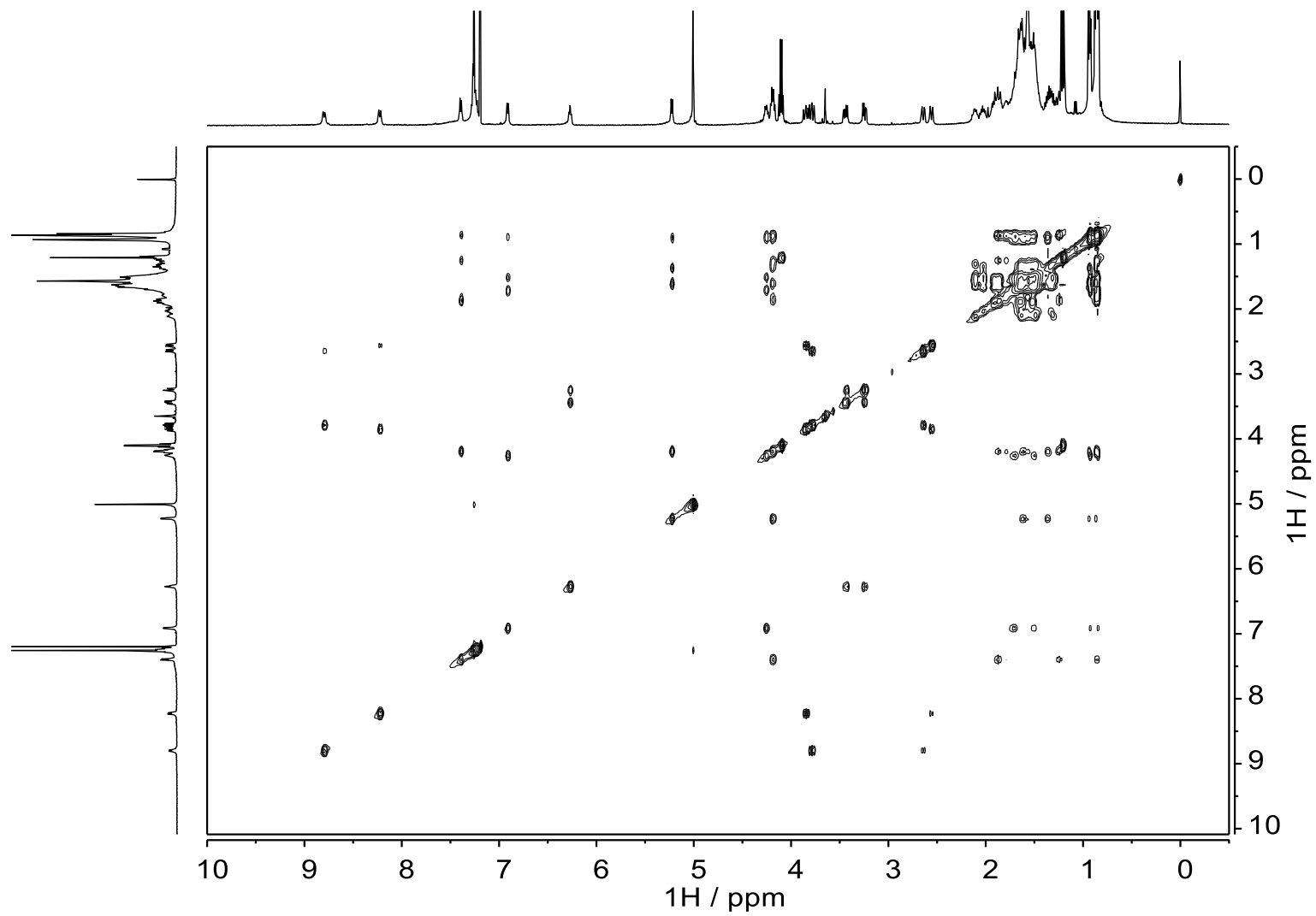
IR (v, cm⁻¹): 3278 (a, -NH), 1704.25 (f, C=O), 1638 (f, C=O).

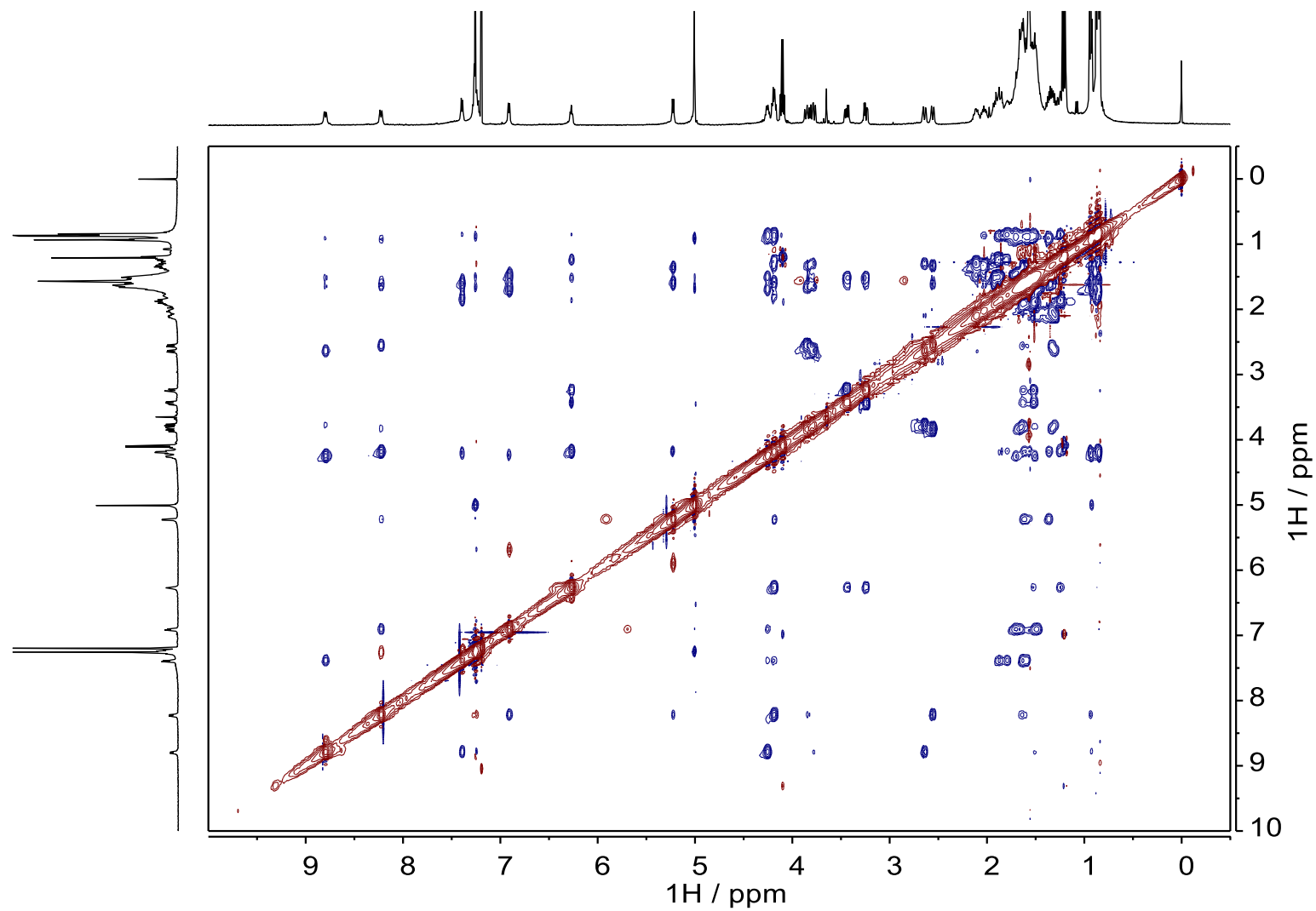
MS-ESI (m/z, %): Calculado para C₄₉H₇₈N₆O₉ [M+]⁺: 894.5800. Encontrado: 895.5903.



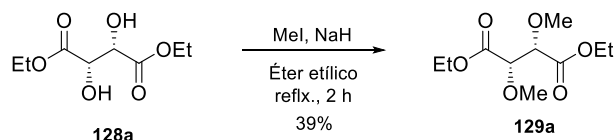
5.3.9.1 ^1H -RMN (1, 5, 10 mM; 25 °C; 300 MHz).

5.3.9.2 ^1H -RMN (5 mM, -15-45 °C, 300 MHz).

5.3.9.3 TOCSY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, CDCl₃).

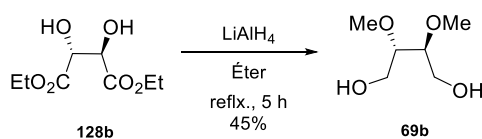
5.3.9.4 NOESY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, t-mix= 300 ms, CDCl₃).

5.3.10 Síntesis del (2*S*,3*S*)-2,3-dimetoxisuccinato de dietilo (**129a**)



Sobre una disolución de NaH (1.22 g, 60% en aceite mineral, 2.1 eq) en 7 mL éter etílico seco, se añadió el compuesto **128a** (3g, 14.55 mmol) en 15 mL de éter etílico seco, la suspensión resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, entonces se le añadió MeI (3.6 mL, 4.1 eq) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 h. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.3$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.5$). La mezcla de reacción se filtró, el precipitado se lavó con éter etílico, el filtrado se concentró a sequedad y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt: Hex 1:4). Se obtuvieron de esta forma 1.33 g del compuesto **129a** esperado como un aceite amarillento con un rendimiento del 39%, que se caracterizó por comparación de sus datos espectroscópicos con los de la bibliografía.⁸⁹

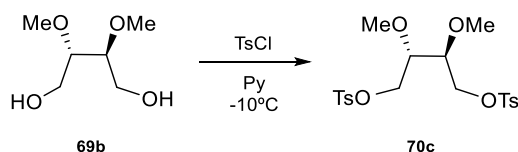
⁸⁹Wu, Z.; Huang, Y.; Zhang, C.; Zhu, D.; Bian, Z.; Ding, M.; Gao, L.; Yang, Z. A Simple and Efficient Way to Synthesize Optically Active Polyamides by Solution Polycondensation of Di-O-Methyl-L-Tartaryl Chloride with Diamines. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117* (6), 3558–3567.

5.3.11 Síntesis de (2S,3S)-2,3-dimetoxibutan-1,4-diol (69b)

Sobre una suspensión de LiAlH₄ (538 mg, 14.18 mmol, 2.2 eq) en 10 mL de éter etílico seco, sometida a reflujo durante 30 min. y después enfriada a temperatura ambiente, se añadió gota a gota una disolución de **128b** (1.33 g, 6.45 mmol) en 10 mL de éter etílico y se agitó primero durante 2 horas a temperatura ambiente y después durante 3 horas a reflujo. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:2) la desaparición del producto de partida (R_f=0.5) y la aparición de un producto de reacción (R_f= 0.1). Se añadió entonces 1 mL de AcOEt, se enfrió la reacción a 0 °C y sobre ella se añadieron sucesivamente: 1 mL de agua, 1 mL de disolución acuosa 1M de NaOH y 2 mL de agua. La mezcla resultante se filtró lavando con éter etílico, el filtrado se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna eluyendo con una mezcla de DCM: MeOH 1:19. Se obtuvieron de esta forma 242 mg (45%) del compuesto esperado **69b** como un aceite amarillento que se identificó por comparación de sus datos espectroscópicos con los recogidos en la bibliografía.⁹⁰

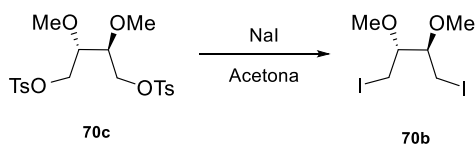
⁹⁰Shishido, K.; Takahashi, K.; Fukumoto, K.; Kametani, T.; Honda, T. Synthetic Approach to (-)-Quassimarín Based on Intramolecular Diels-Alder Strategy. *J. Org. Chem.* **1987**, 52 (26), 5704–5714.

5.3.12 Síntesis de (2S,3S)-2,3-dimetoxibutan-1,4-diilbis(4-metilbencenesulfonato) (70c)



Sobre una disolución del compuesto **69b** (427 mg, 2.84 mmol) en 3 mL de piridina seca, enfriada a -10 °C, se añadió TsCl (1.1 g, 2.1 eq). La reacción se dejó alcanzar la t.a. y se continuó agitando a esta temperatura durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (DCM: MeOH 1:19) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.4$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.8$). Entonces se añadieron sobre la disolución 15 mL de DCM y ésta se lavo con 2x 5 mL de una disolución acuosa 1M de HCl. Los extratos orgánicos se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad para dar lugar al compuesto **70c** que se caracterizó por comparación de sus datos espectroscópicos con los de la bibliografía.⁹¹ y se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

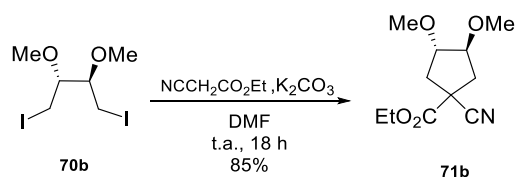
⁹¹ Seebach, D.; Kalinowski, H.-O.; Bastani, B.; Crass, G.; Daum, H.; Dörr, H.; Dupreez, N. P.; Ehrig, V.; Langer, W.; Nüssler, C.; et al. Herstellung von Hilfsstoffen Für Die Asymmetrische Synthese Aus Weinsäure. Addition von Butyllithium an Aldehyde in Chiralem Medium. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60* (2), 301–325.

5.3.13 Síntesis de (2R,3R)-1,4-diyodo-2,3-dimetoxibutano (70b)

Sobre una disolución del ditosilato **70c** (1.30 g, 2.84 mmol) en 85 mL de acetona se añadió NaI (8.5 g, 20 eq) y la mezcla resultante se mantuvo a reflujo durante 18 h. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:4) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.3$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.8$). La reacción se concentró entonces a sequedad, el residuo obtenido se redisolvió en 100 mL de éter etílico, se lavó con agua (20 mL) y con disolución acuosa saturada de tiosulfato sódico (20 mL). Los extractos orgánicos se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad, para dar lugar al diyoduro **70b** que se caracterizó a partir de sus datos espectroscópicos coincidentes con los descritos en la bibliografía⁹² y se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

⁹² Demizu, Y.; Doi, M.; Kurihara, M.; Maruyama, T.; Suemune, H.; Tanaka, M. One-Handed Helical Screw Direction of Homopeptide Foldamer Exclusively Induced by Cyclic α -Amino Acid Side-Chain Chiral Centers. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (8), 2430–2439

5.3.14 Síntesis del (3S,4S)-1-ciano-3,4-dimetoxiciclopentan-1-carboxilato de etilo (71b)



Sobre una disolución de **70b** (450 mg, 1.22 mmol) en 15 mL de DMF se añadió cianoacetato de etilo (0.155 mL, 1.2 eq) y K_2CO_3 (403 mg, 2.4 eq). La mezcla resultante se calentó 8 horas a reflujo, a cabo de las cuales se añadió 1 equivalente más de cianoacetato de etilo y se mantuvo el reflujo otras 40 horas. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:19) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.3$) y la aparición del producto de partida ($R_f = 0.1$). La reacción se concentró entonces a sequedad y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (ACOEt: Hex 1:3) para dar lugar al producto esperado **71b** (235 mg, 85%) como un aceite transparente.

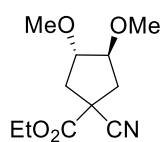
$[\alpha]_D^{22}$: + 0.99° (2.5 c, CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 2.32 – 2.23 (m, 1H, CH_2), 2.48 – 2.43 (m, 2H, CH_2), 2.48 – 2.43 (m, 2H, CH_2), 2.48 – 2.43 (m, 2H, CH_2), 2.57 (dd, $J = 14.3, 5.2$ Hz, 1H, CH_2), 3.29 (s, 3H, $-\text{OMe}$), 3.24 (s, 3H, $-\text{OMe}$), 3.82 – 3.72 (m, 2H, 2x CH), 4.20 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

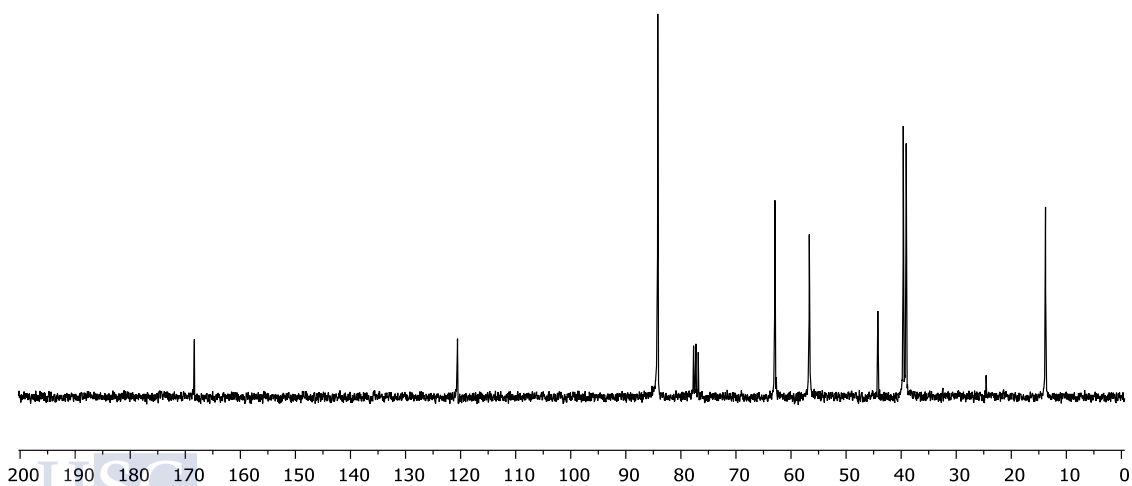
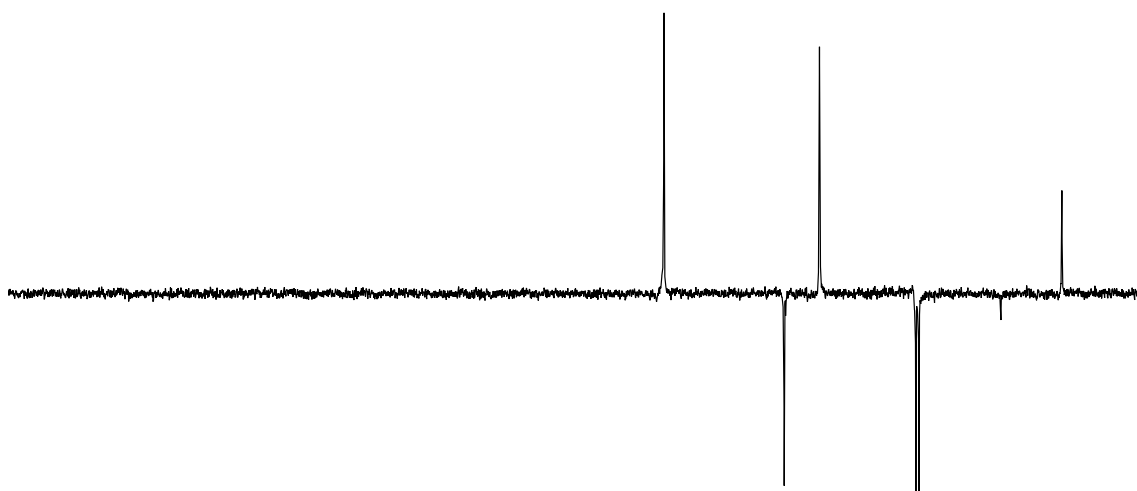
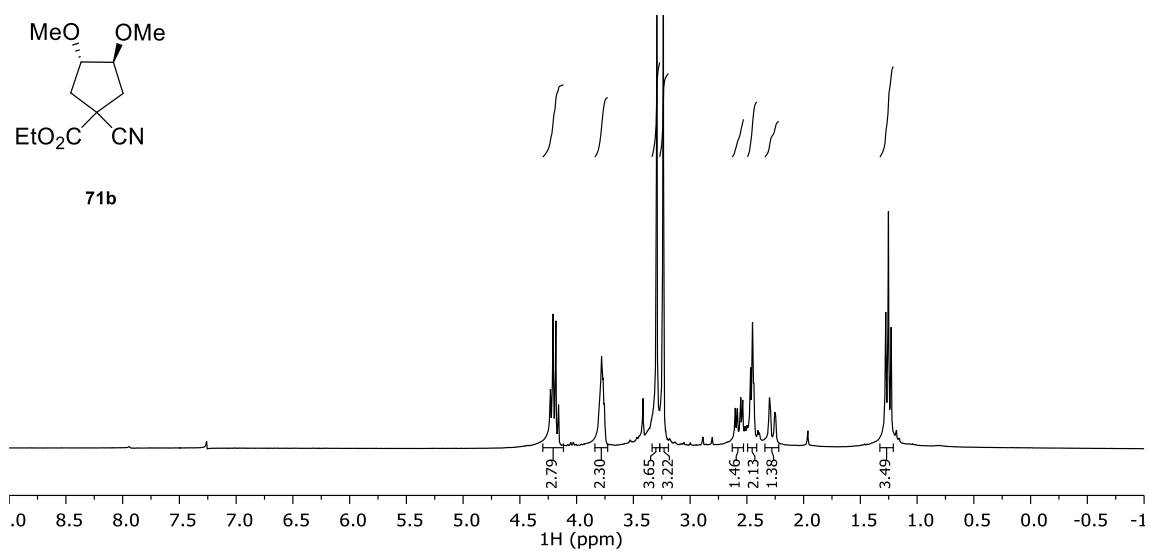
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm): 13.7(CH_3), 39.0(CH_2), 39.5(CH_2), 44.2(C), 56.5(2x CH_3), 62.9(CH_2), 84.1(2xCH), 120.5(C), 168.3(C).

IR (v, cm^{-1}): 2242 (d, CN), 1742 (f, C=O).

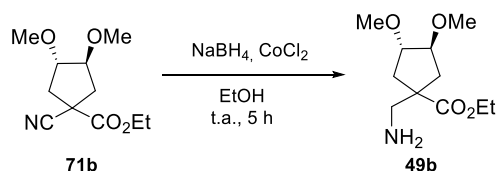
MS-ESI (m/z, %) Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 250.1047. Encontrado: 250.1050.



71b



5.3.15 Síntesis del (3*R*,4*R*)-1-(aminometil)-3,4-dimetoxiciclopentan-1-carboxilato de etilo (49b)



Sobre una disolución de **71b** (235 mg, 1.03 mmol) en 50 mL EtOH se añadió CoCl_2 (468 mg, 3.5 eq) y NaBH_4 (817 mg, 21 eq). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, al cabo de las cuales observó por ccf (AcOEt: Hex 1:3) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.4$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.1$, que revela en ninhidrina). La reacción se filtró entonces sobre celita lavando con metanol, el filtrado se concentró a sequedad, se redisolvió en 50 mL agua y se extrajo con 3x 20 mL de AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se concentraron a sequedad y el producto obtenido **49b** se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

5.3.16 Síntesis del dímero 127d



Sobre una disolución de **49b** de partida (238 mg, 1.03 mmol) y DIEA (0.72 mL, 4 eq) en 8 mL de DCM seco, enfriada a 0° C, se añadió otra disolución de CbzLeuOH (34mg, 1.2eq), HOBT (189 mg, 1.2 eq) y de DIC (0.19 mL, 1.2 eq) en 8 mL de DCM seco, también enfriada a 0° C. La mezcla resultante se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante 18 horas, al cabo de la cuales se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.5$). La reacción se lavó entonces con H₂O (2x 5 mL), disolución acuosa 1 M de HCl (2x 5 mL), H₂O (2x 5 mL) y disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2x 5 mL). La fase orgánica se secó entonces con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad para dar lugar a un residuo que se purificó por cromatografía en columna (AcOEt: Hex 1:1), obteniéndose así el dímero esperado **127d** (236 mg, 50%) como un aceite transparente.

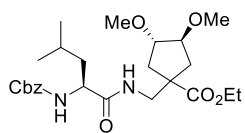
$[\alpha]_D^{23}$: +0.64° (*c* 5.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0.91 (d, $J = 4.9$ Hz, 6H, 2x CH₃), 1.23 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.71–1.42 (m, 4H, 2x -CH₂), 2.02 (s, 1H, CH₂), 2.03 (m, 1H, CH₂), 2.48 (dd, $J = 13.8, 5.7$ Hz, 1H, CH), 3.39–3.20 (m, 7H, 2x OMe+ COCH), 3.57–3.46 (m, 1H, CH), 3.74 (s, 2H, CH₂), 4.12–4.02 (m, 3H, CH₂+ CH), 5.07 (s, 2H, Ar-CH₂), 5.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 6.70 (s, 1H, NH), 7.31 (s, 5H, Ar).

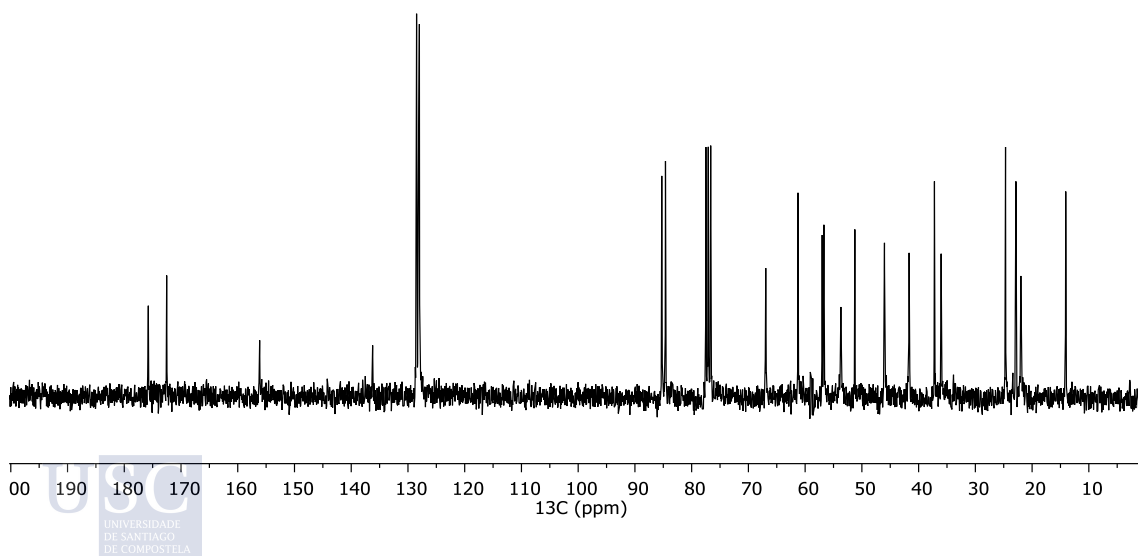
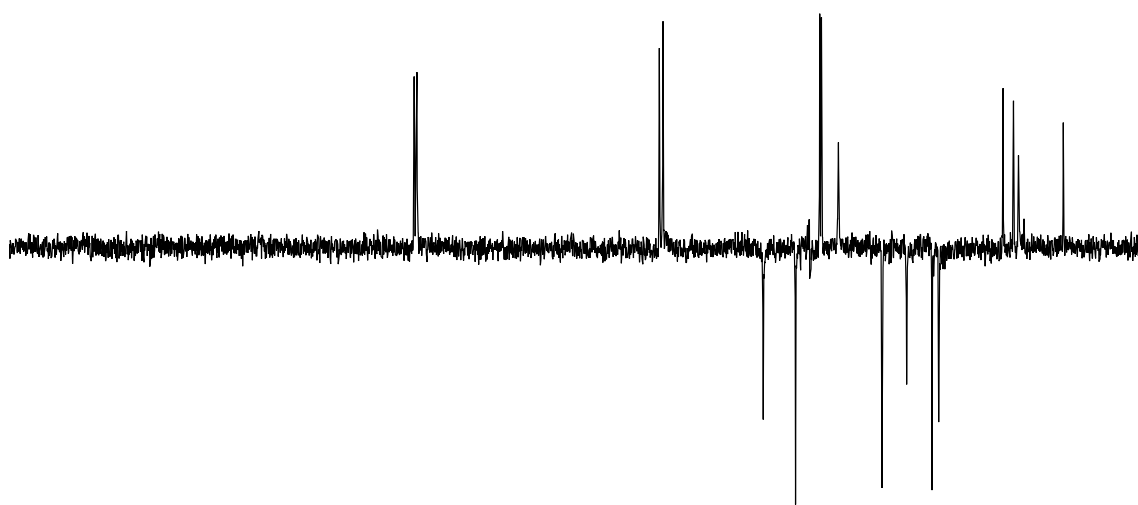
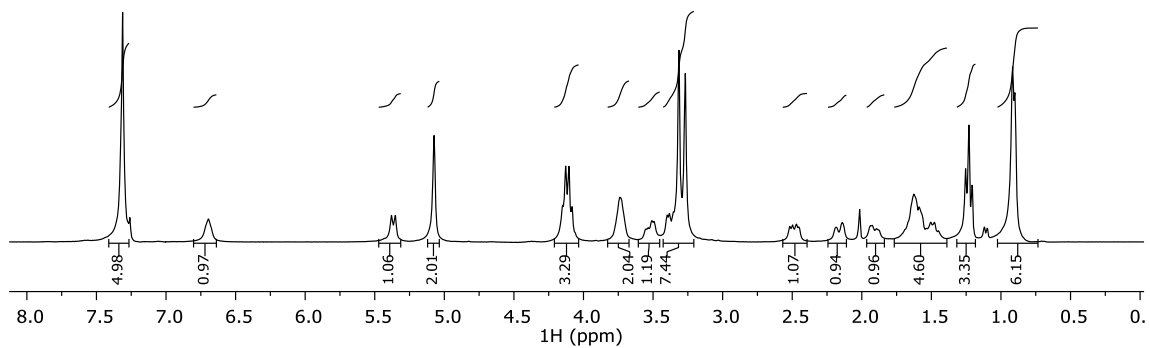
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): 14.1(CH₃), 22.0(CH₃), 22.9(CH₃), 24.7(CH₃), 36.0(CH₂), 37.2(CH₂), 41.7(CH₂), 46.0(CH₂), 51.2(C), 53.7(CH₃), 56.7(CH₃), 57.0(CH₃), 61.2(CH₂), 66.9(CH₂), 84.6(CH), 85.2(CH), 127.9(CH), 128.4(CH), 136.2(C), 156.1(C), 172.5(C), 175.7(C).

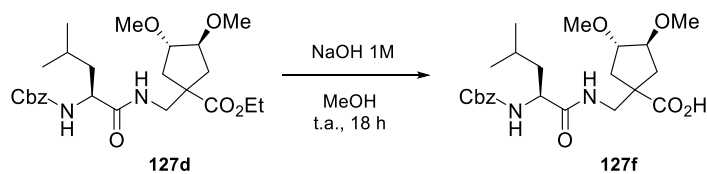
IR cm⁻¹ 3304 (a, -NH), 1721 (f, C=O), 1660 (f, C=O).

MS-ESI (m/z, %) Calculado para C₂₅H₃₈N₂O₇Na [M+Na]⁺: 501.2572. Encontrado: 501.2571.



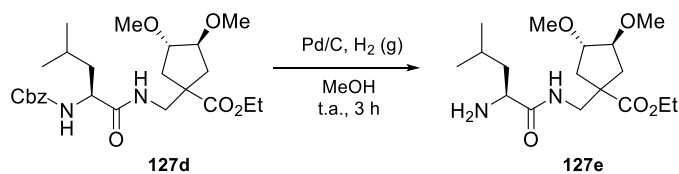
127d



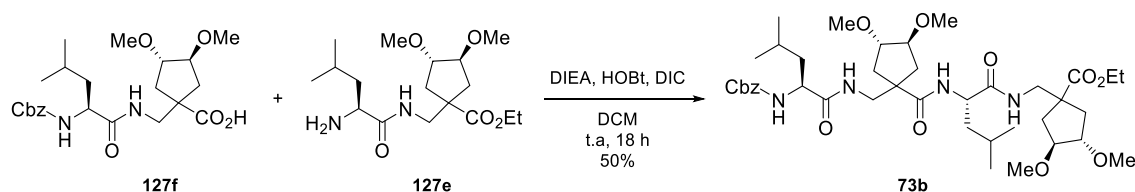
5.3.17 Síntesis del dímero 127f

Sobre una disolución de **127d** (100 mg, 0.21 eq) en 1 mL MeOH se añadió disolución acuosa 1M de NaOH (0.1 mL) y la reacción se agitó a t.a. durante 18 horas, al cado de las cuales se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f=0.5$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f=0.3$, con cola). La reacción se concentró entonces hasta obtener un residuo al que se añadieron 5 mL de H₂O, la disolución resultante se adificó con disolución acuosa 1M de HCl hasta pH=4 y se extrajo con DCM (3x5 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad. Se obtuvo así el producto de reacción esperado **127f** que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

5.3.18 Síntesis del dímero **127e**



Sobre una disolución del compuesto **127d** (100 mg, 0.21 mmol) en 1 mL de MeOH, que se desoxigenó haciendo vacío e introduciendo argón, se añadió Pd/C 10% (100 mg). La suspensión resultante se volvió a desoxigenar, se colocó bajo atmósfera de hidrógeno (P=1atm) y se agitó vigorosamente durante 3 h a t.a. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la desaparición del producto de partida (R_f=0.5) y la aparición de un producto de reacción con (R_f= 0.1). La mezcla de reacción se filtró entonces sobre celita, se lavó con AcOEt (3x 5 mL) y el filtrado se concentró a sequedad en el rotavapor, obteniéndose así el dímero **127e** como un aceite transparente que se utilizó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

5.3.19 Síntesis del tetrámero **73b**

Sobre una disolución de la amina **127e** y DIEA (0.14 mL, 4 eq) en 2 mL de DCM seco, enfriada a 0° C, se añadió otra disolución del ácido **127f**, HOBT (39 mg, 1.2 eq) y DIC (0.04 mL, 1.2 eq) en 2 mL de DCM seco, también enfriada a 0° C. La mezcla resultante se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante 18 horas, al cabo de la cuales se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.4$). La reacción se lavó entonces con H₂O (2x 1 mL), disolución acuosa 1M de HCl (2x 1 mL), H₂O (2x 1 mL) y disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2x 1 mL). La fase orgánica se secó entonces con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad para dar lugar a un residuo que se purificó por cromatografía en columna (AcOEt: Hex 1:1), obteniéndose así el tetrámero esperado **73b** (80 mg, 50%, 3 pasos) como un aceite transparente.

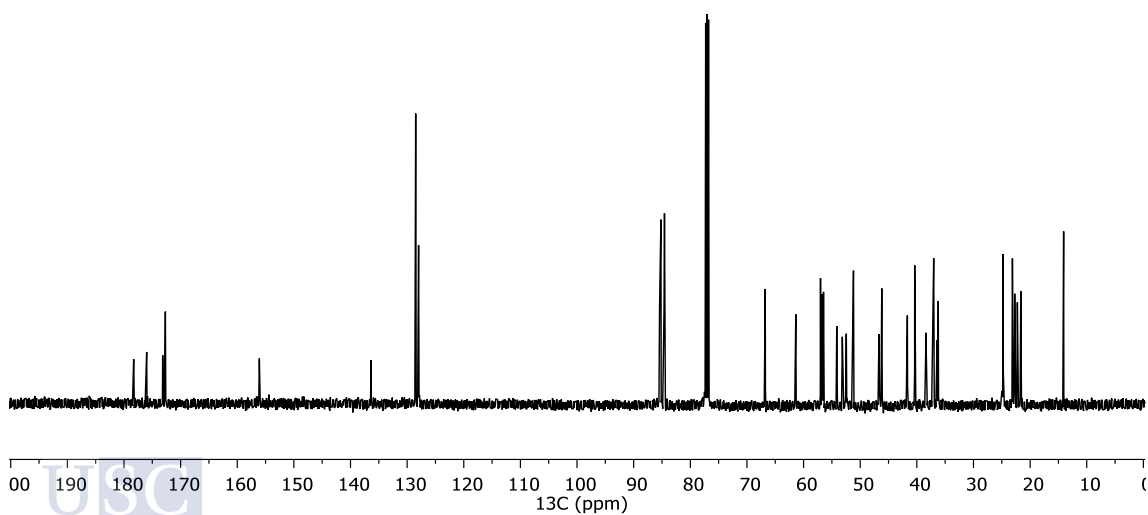
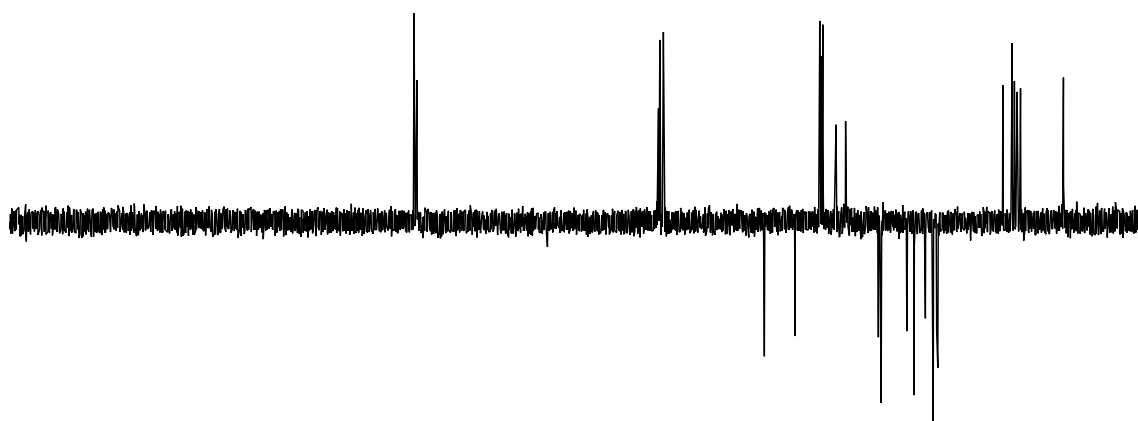
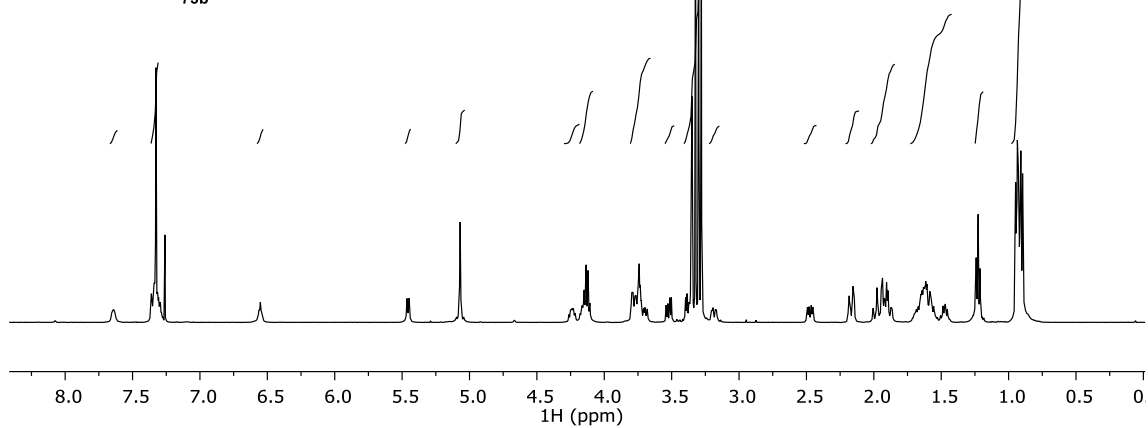
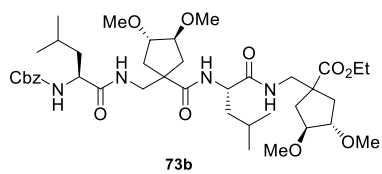
$[\alpha]_D^{22}$: 25.1° (0.7, CHCl₃)

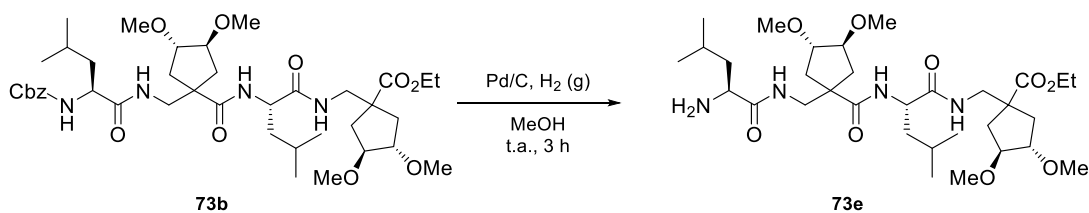
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): 1.01–0.87 (m, 12H, 4x -CH₃), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, -OCH₂CH₃), 1.75–1.53 (m, 8H, 4x CH₂), 2.04–1.83 (m, 5H, 2x CH₂+CH), 2.18 (dd, $J = 14.1, 5.0$ Hz, 2H, CH₂), 2.49 (dd, $J = 14.2, 5.9$ Hz, 1H, CH), 3.18 (dd, $J = 13.0, 4.20$ Hz, 1H, -CH), 3.57–3.49 (m, 1H, CH), 3.85–3.65 (m, 5H, 2x CH₂+CH), 3.42–3.14 (m, 12H, 4x -OMe), 4.18–4.10 (m, 3H, CH₂+CH), 4.27–4.20 (m, 1H, CH), 5.08 (s, 2H, Ar-CH₂), 5.47 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 6.57 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, NH), 7.38–7.29 (m, 5H, Ar-H), 7.65 (s, 1H, NH),

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, ppm): 14.1(CH₃), 21.6(CH₃), 22.2(CH₃), 22.7(CH₃), 23.1(CH₃), 24.8(CH₃), 25.0(CH₃), 36.2(CH₂), 36.4(CH₂), 37.0(CH₂), 38.4(CH₂), 40.4(CH₂), 41.7(CH₂), 46.2(CH₂), 46.7(CH₂), 51.2(CH), 52.5(CH), 53.2(CH), 54.1(CH), 56.5(CH), 56.6(CH), 56.7(CH), 57.0(CH), 61.4(CH), 66.8(CH), 76.8(CH), 77.0(CH₂), 77.3(CH₂), 84.6(CH), 85.2(CH), 85.4(CH), 128.0(CH), 128.1(CH), 128.5(CH), 136.4(C), 156.1(C), 172.7(C), 173.2(C), 176.0(C), 178.3(C).

IR cm⁻¹ 3283 (a, -NH), 1726 (f, C=O), 1702 (f, C=O) 1672 (f, C=O), 1642 (f, C=O).

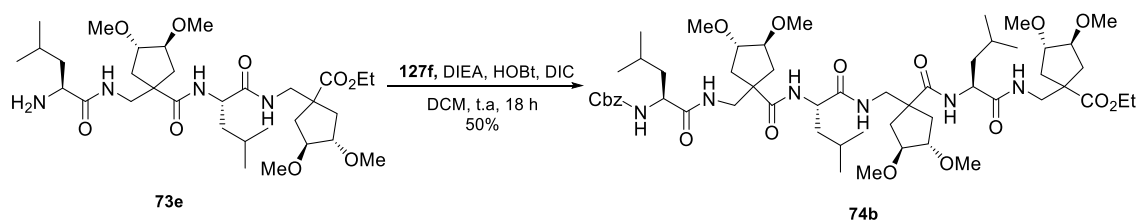
MS-ESI (m/z, %) Calculado para C₄₀H₆₅N₄O₁₁ [M+H]⁺: 777.4644. Encontrado: 777.4644.



5.3.20 Síntesis del tetrámero 73e

Sobre una disolución del compuesto **73b** (80 mg, 0.10 mmol) en 2 mL de MeOH, que se desoxigenó haciendo vacío e introduciendo argón, se añadió Pd/C 10% (80 mg). La suspensión resultante se volvió a desoxigenar, se colocó bajo atmósfera de hidrógeno (P=1atm) y se agitó vigorosamente durante 3 h a t.a. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la desaparición del producto de partida (R_f=0.4) y la aparición de un producto de reacción con (R_f= 0.1). La mezcla de reacción se filtró entonces sobre celita, se lavó con AcOEt (2x 1 mL) y el filtrado se concentró a sequedad en el rotavapor, obteniéndose así el terapéutico esperado **73e** como un aceite transparente que se utilizó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

5.3.21 Síntesis del hexámero 74b

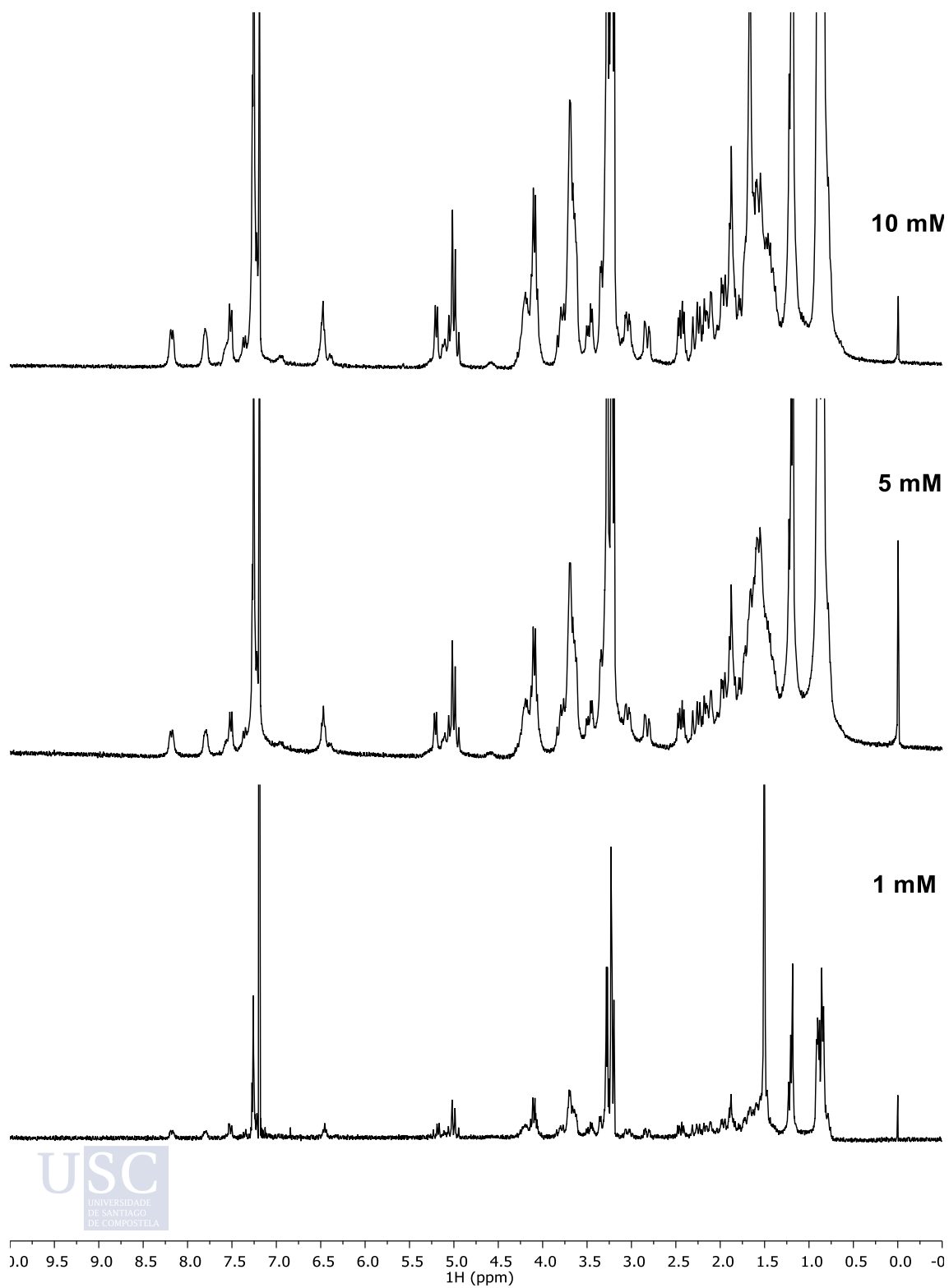


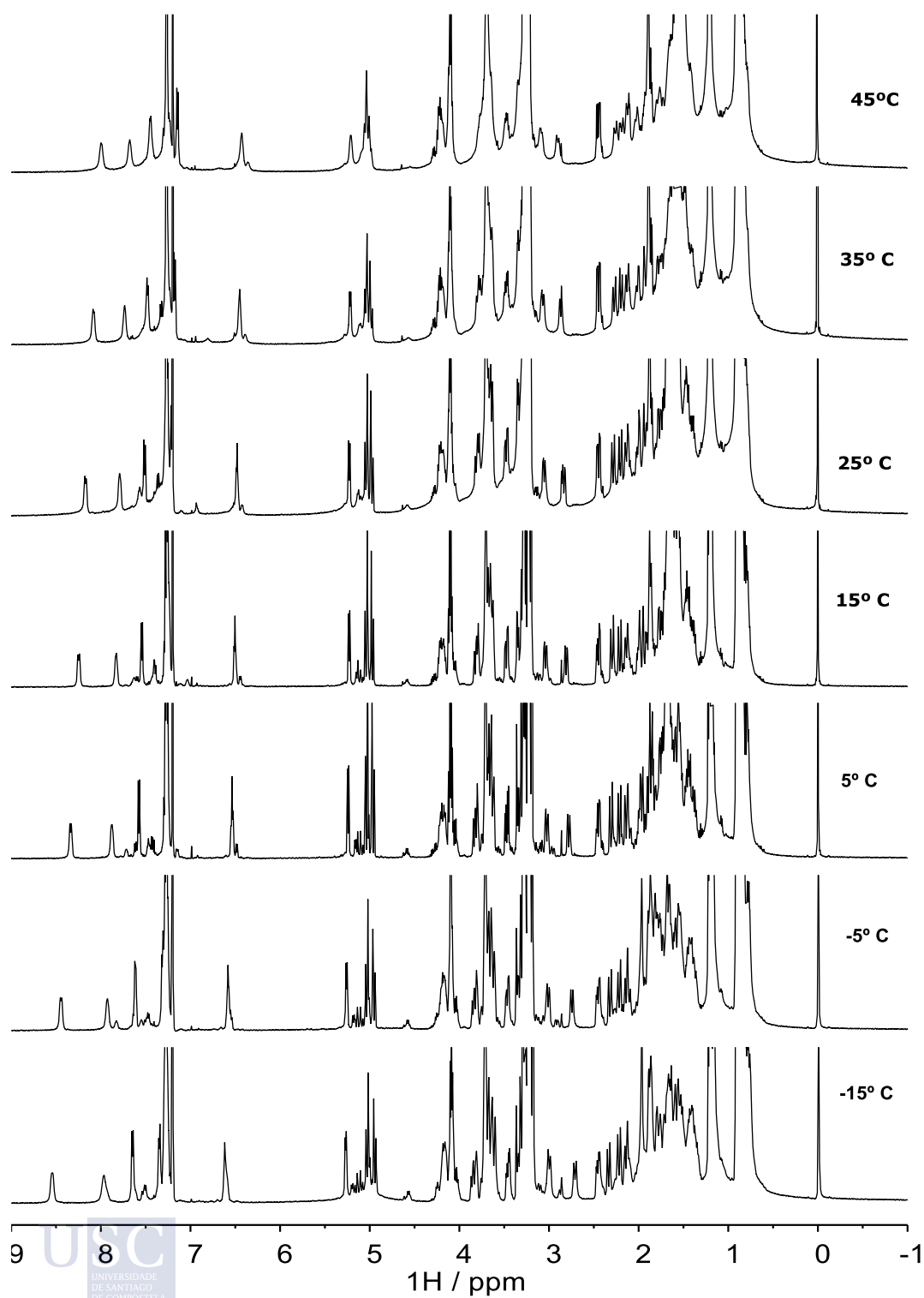
Sobre una disolución de la amina **73e** y DIEA (0.015 mL, 4 eq) en 1 mL de DCM seco, enfriada a 0° C, se añadió gota a gota otra disolución del ácido **127f** (50 mg, 1.2 eq), HOBt (14 mg, 1.2 eq) y de DIC (0.015 mL, 1.2 eq) en 10 mL de DCM seco, también enfriada a 0° C. La mezcla resultante se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante 18 horas, al cabo de la cuales se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción (Rf= 0.3). A la reacción se le añadió 5 mL de DCM se lavó entonces con H₂O (2 x 2 mL), disolución acuosa 1M de HCl (2 x 2 mL), H₂O (2 x 2 mL) y disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 x 2 mL). La fase orgánica se secó entonces con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad para dar lugar a un residuo que se purificó por cromatografía en columna (AcOEt), obteniéndose así el producto esperado **74b** (22 mg, 26%, 3 pasos) como un aceite transparente.

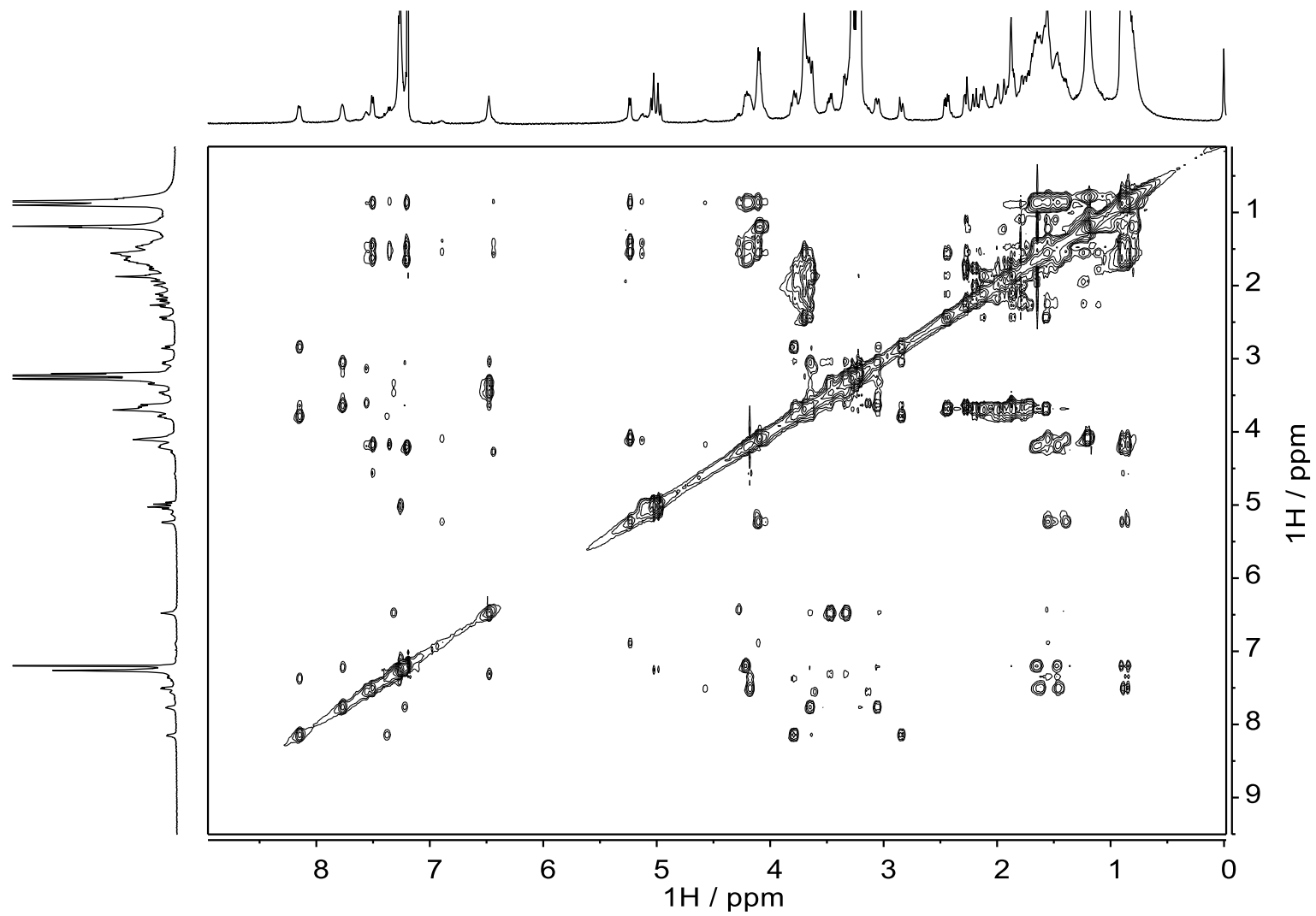
$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: 28.1° (0.5, CHCl₃)

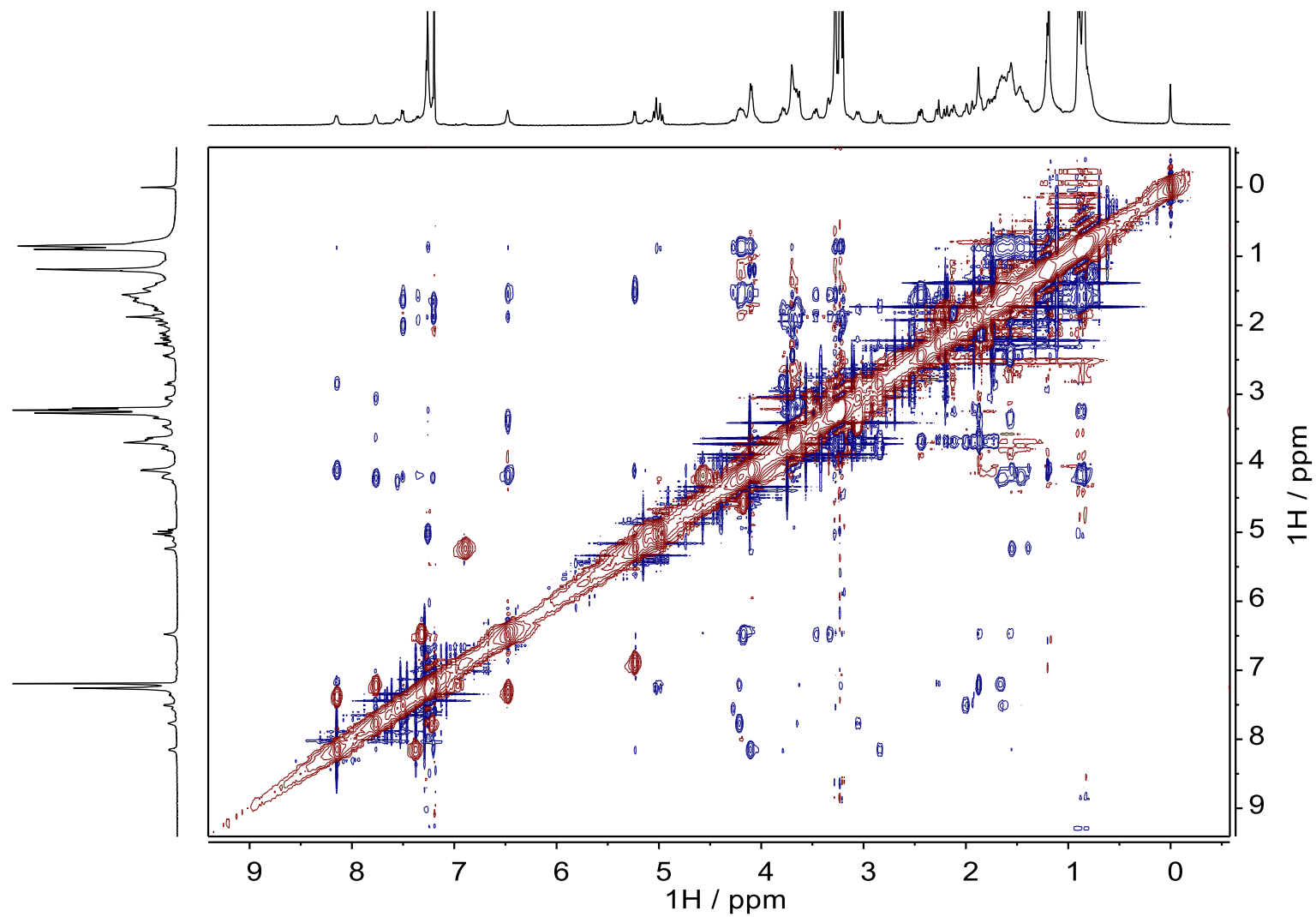
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): 1.07–0.80 (m, 18H, CH₃x6), 1.28 (td, J = 7.4, 2.8 Hz, 3H, O CH₂CH₃), 2.40–1.39 (m, 20H, 6x CH₂ + NCH₂), 2.99–2.83 (m, 1H, CH), 3.12 (dd, J = 12.9, 3.9 Hz, 1H, CH), 3.45–3.22 (m, 20H, 6x O-CH₃ + CH₂), 3.55 (dd, J = 13.3, 6.2 Hz, 1H, CH), 3.97–3.60 (m, 8H, 3x CH₂-N+ 2x HC-O), 4.46 – 4.05 (m, 6H, O CH₂CH₃ + 4x HC-O), 5.17 – 4.94 (m, 2H, Ar-CH₂), 5.25 (dd, J = 35.5, 6.5 Hz, 1H, NH), 6.52 (s, 1H, NH), 7.41 – 7.30 (m, 5H Ar-H), 7.57 (s, 1H, NH), 7.88 (s, 1H, NH), 8.24 (d, J = 6.7 Hz, 1H, NH),

MS-ESI (m/z, %) Calculado para C₅₅H₉₀N₆O₁₅ [M+H]⁺: 1075,6537. Encontrado: 1075,6535

5.3.21.1 ^1H -RMN (1, 5, 10 mM; 25 °C; 300 MHz).

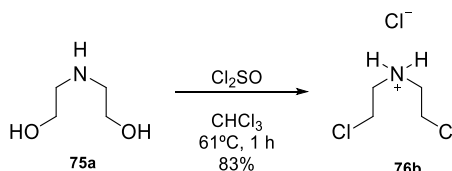
5.3.21.2 ^1H -RMN (5 mM, -5- 45°C, 300 MHz).

5.3.21.3 TOCSY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, CDCl₃).

5.3.21.4 NOESY (5 mM, 25 °C, 500 MHz, t-mix= 300 ms, CDCl₃).

5.4 SÍNTESIS DE $\beta^2,2$ -AMINOÁCIDOS PIPERIDÍNICOS Y SUS PÉPTIDOS

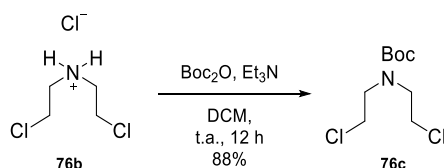
5.4.1 Síntesis del cloruro de bis(2-cloroetil)amino (**76b**)



Sobre una disolución del 2,2'-azanediiidietanol (**75a**) (4g, 38 mmol) en 12 mL de CHCl_3 se añadió gota a gota una disolución de Cl_2SO (10.26 mL, 140 mmol) en CHCl_3 (10.26 mL). La mezcla resultante se agitó a reflujo bajo un tubo de CaCl_2 durante 1 h, al cabo de este tiempo se enfrió 0°C , se filtró y el filtrado se lavó con CHCl_3 (1x 10 mL) y con éter (3x 20mL). La fase acuosa se concentró entonces a sequedad, obteniéndose la bis(2-cloroetil)amina **76b** (83%) como un sólido amorfo de color blanco que se identificó por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados en la bibliografía.⁹³

⁹³ Burakova, E. A.; Saranina, I. V.; Tikunova, N. V.; Nazarkina, Z. K.; Laktionov, P. P.; Karpinskaya, A.; Anikin, V. B.; Zarubaev, V. V.; Silnikov, V. N. Biological Evaluation of Tetracationic Compounds Based on Two 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane Moieties Connected by Different Linkers. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 6012–6020.ç

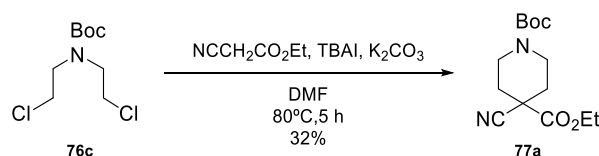
5.4.2 Síntesis del bis(2-cloroetil) carbamato de *tert*-butilo (**76c**)



Sobre una disolución de **76b** (3g, 16.9 mmol) en 100 mL de DCM seco se añadió Boc_2O (4.4 g, 20.1 mmol) y Et_3N (3.67 mL). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 12 horas, al cabo de las cuales se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:5) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.7$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.3$). La reacción se lavó entonces con agua (3x 30 mL), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a vacío en rotavapor. El residuo así obtenido se purificó por cromatografía en columna (Éter Etílico/Hex, 1:9) obteniéndose el bis(2-cloroetil) carbamato de *tert*-butilo (**76c**) esperado (88%) como un aceite transparente que se identificó por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados en la bibliografía.⁹⁴

⁹⁴ Hulshof, J. W.; Vischer, H. F.; Verheij, M. H. P.; Fratantoni, S. A.; Smit, M. J.; De Esch, I. J. P.; Leurs, R. Synthesis and Pharmacological Characterization of Novel Inverse Agonists Acting on the Viral-Encoded Chemokine Receptor US28. **2006**.

5.4.3 Síntesis del 1-*tert*-butil 4-etil 4-cianopiperidina-1,4-dicarboxilato (77a)



Sobre una disolución del producto de partida **76c** (3.5 g, 14.5 mmol) en 150 mL de DMF seca se añadió cianoacetato de etilo (216 μL , 20.3 mmol), K_2CO_3 (4.8 g, 34.8 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (TBAI) (1.29 g, 3.5 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80°C durante 5 horas, después de las cuales se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:5) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.5$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.4$). La reacción se concentró entonces en el rotavapor de alto vacío, el residuo obtenido se disolvió en éter etílico (100 mL) y se lavó con agua (3x30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en rotavapor. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex 1:5), obteniéndose así 1.2 g (32%) del 1-*tert*-butil 4-etil 4-cianopiperidina-1,4-dicarboxilato (**77a**) como un aceite amarillento que se identificó por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados en la bibliografía.⁹⁵

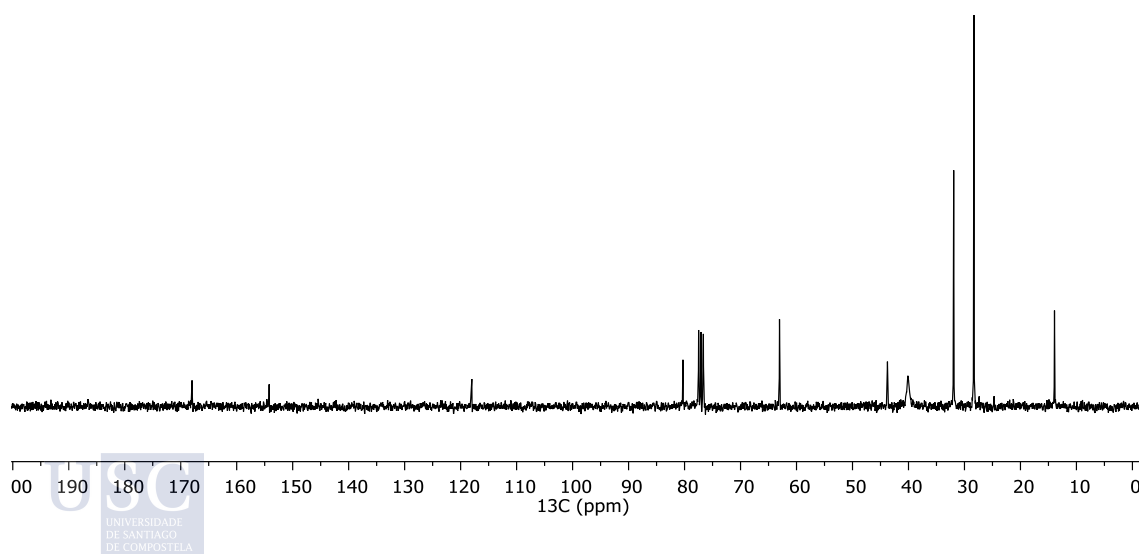
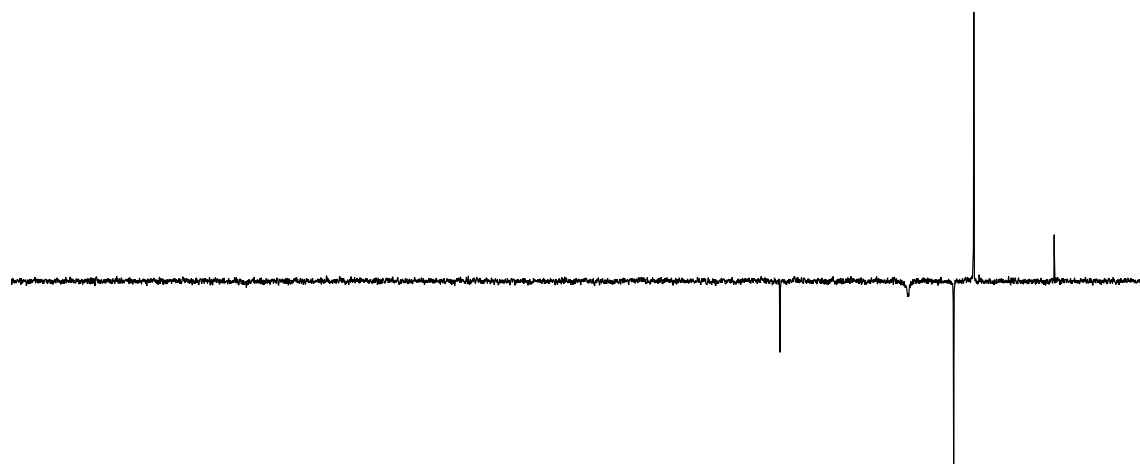
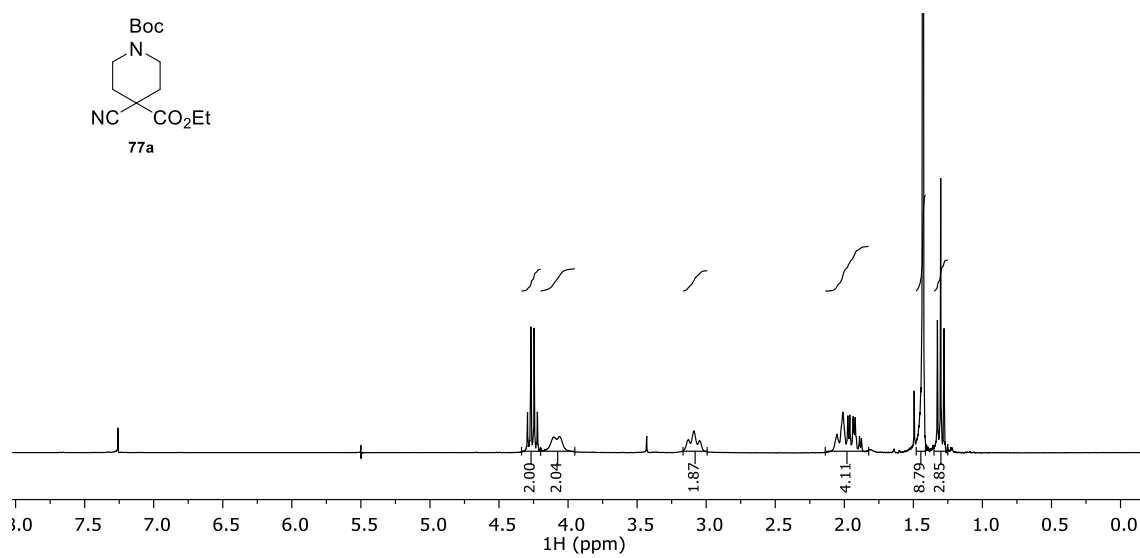
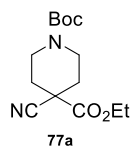
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.40 (m, 9H), 2.15-1.85 (m, 4H), 3.09 (t, $J = 12.1$ Hz, 2H), 4.08-4.10 (m, 2H), 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz, ppm): 13.9 (CH_3), 28.3 (CH_3), 31.9 (CH_2), 40.0 (C), 43.7 (CH_2), 63.0 (CH_2), 80.3 (C), 117.9 (CN), 154.19 (C=O), 167.9 (C=O).

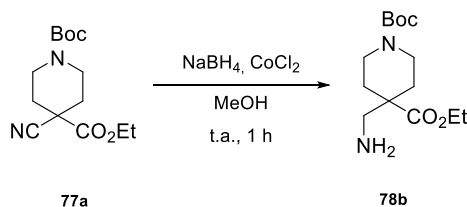
IR (ν , cm^{-1}): 2200 (d, CN), 1690 (f, C=O).

MS-ESI (m/z , %): Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 305.1472. Encontrado: 305.1471.

⁹⁵Liu, X.; Chen, P.; He, F.; Wang, S.; Song, H.; Li, Z. Structure, Bioactivity and Theoretical Study of 1-Cyano-N-p-Tolylcyclo-Propanecarboxamide. *Struct. Chem.* **2007**, *18* (5), 563–568.



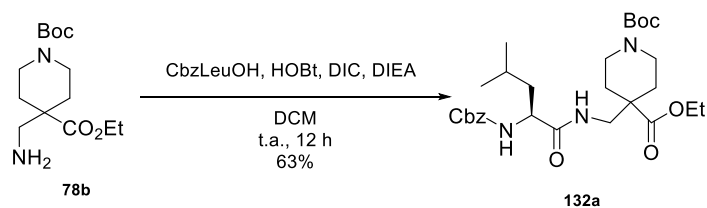
5.4.4 Síntesis del 1-(*tert*-butil) 4-etil 4-(aminometil)piperidina-1,4-dicarboxilato (**78b**)



Sobre una disolución de la 1-*tert*-butil 4-etil 4-cianopiperidina-1,4-dicarboxilato **77a** (72.2 mg, 0.26 mmol) en MeOH (12 mL), se añadió primero CoCl₂ (116 mg, 5.37 mmol) y luego progresivamente NaBH₄ (202 mg, 5.37 mmol) en pequeñas porciones. Tras 1 hora de reacción se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:2) la desaparición del producto de partida (R_f= 0.5) y la aparición de un producto de reacción (R_f= 0.1). La mezcla se concentró entonces a sequedad en el rotavapor. El residuo resultante se disolvió en agua (50 mL) y se extrajo con AcOEt (3x 15mL). Las fases orgánicas reunida se lavaron con salmuera (3x15 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a sequedad en rotavapor. Se obtuvo así la amina **78b** esperada, que se caracterizó por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados en la bibliografía.⁹⁶ y se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

⁹⁶Vera-Ayoso, Y.; Borrachero, P.; Cabrera-Escribano, F.; Diáñez, M. J.; Estrada, M. D.; Gómez-Guillén, M.; López-Castro, A.; Pérez-Garrido, S. Towards Cyclic, Conformationally Constrained, Fluorine-Containing β-Amino Acid Derivatives from d-Glucose. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (14), 2031–2041.

5.4.5 Síntesis del dipéptido 132a



En un matraz de fondo redondo, previamente purgado y bajo argón, se disolvió la 1-*terc*-butil 4-etil 4-(aminometil) piperidina-1,4-dicarboxilato (**78b**) (85 mg, 0.3 mmol) en DCM seco (2 mL), se añadió DIEA (209 μ L, 1.2 mmol) y la mezcla resultante se enfrió a 0° C (*disolución 1*). En otro matraz de fondo redondo, también purgado y bajo argón, se disolvió la Cbz-Leu-OH comercial (95 mg, 0.36 mmol) en DCM seco (2mL), se le añadió DIC (46 mg, 0.36 mmol), HOBT (55 mg, 0.36 mmol) y por último una gota de DMF para favorecer la disolución (*disolución 2*). A continuación, se añadió la *disolución 2* sobre la *disolución 1* y tras 12 h de agitación a temperatura ambiente se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.7$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.3$). Se añadieron entonces 15 mL de DCM, la reacción se lavó con 5 mL de agua, 5 mL disolución acuosa de HCl (10%), 5 mL de agua y 5 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica así obtenida se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna en gradiente (AcOEt/Hex 1:3 > 1:1), obteniéndose el dipéptido **132a** (149 mg, 63%) como un sólido amorfo de color blanco.

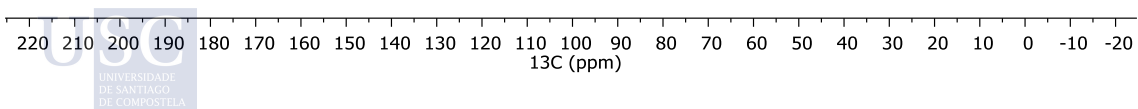
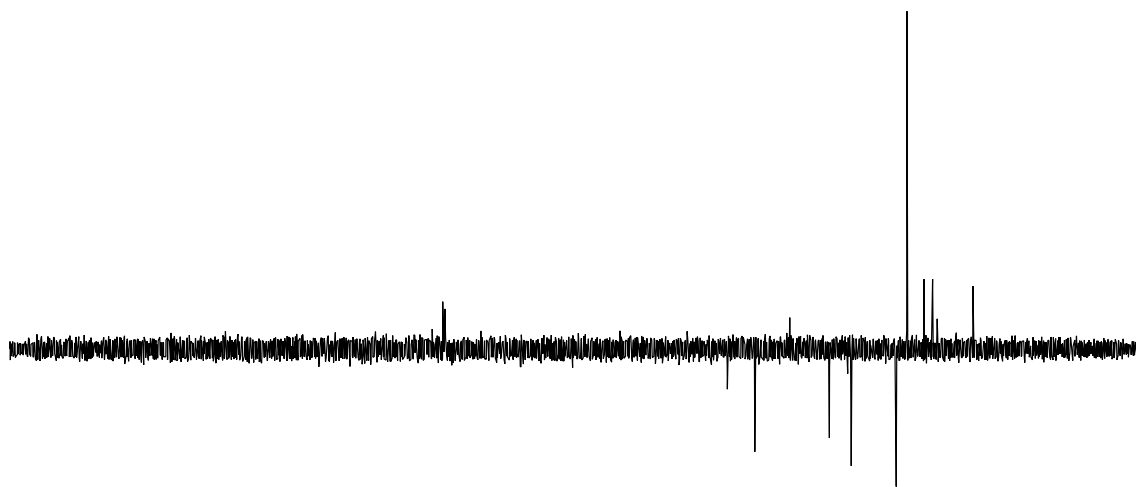
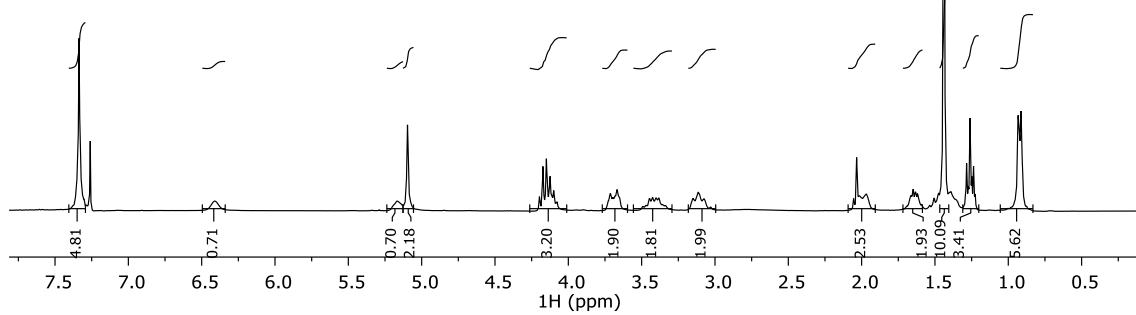
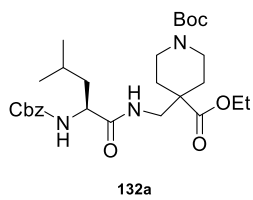
$[\alpha]_D^{22}$: -16.8° (c 3.2, CHCl₃).

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz, ppm): 1.09-0.83 (m, 6H), 1.25 (td, $J = 7.1, 3.5$ Hz, 3H), 1.51-1.38 (m, 12H), 1.74-1.60 (m, 2H), 2.02 (dd, $J = 15.7, 10.0$ Hz, 2H), 3.11 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 3.41 (qd, $J = 13.6, 6.2$ Hz, 2H), 3.69 (dt, $J = 13.2, 4.3$ Hz, 2H), 4.14 (m, 3H), 5.10 (s, 2H), 5.17 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 7.36 (d, $J = 12.3$ Hz, 5H).

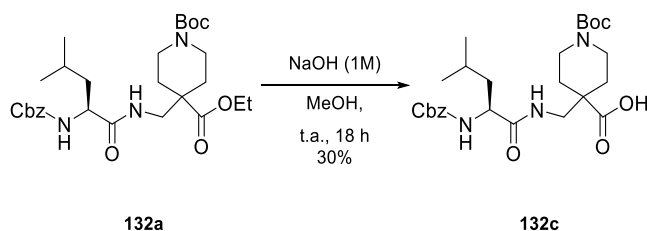
¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz, ppm): 14.2 (CH₃), 21.9 (CH₃), 22.9 (CH₃), 24.7 (CH₃), 28.4 (CH₃), 30.7 (CH₂), 40.4 (CH₂), 41.2 (CH₂), 45.1 (CH₂), 46.2 (CH₂), 53.7 (CH), 61.2 (CH₂), 67.13 (CH₂), 79.6 (C), 130 x 2 (C-Ar), 154.7 (C=O), 172.3 (C=O), 174.7 (C=O).

IR (ν, cm⁻¹): 3308 (a, -NH), 1690 (f, C=O)

MS-ESI (m/z, %): Calculado para C₂₈H₄₄N₃O₇ [M+H]⁺: 534.3174. Encontrado: 534.3168.



5.4.6 Síntesis del dipéptido **132c**



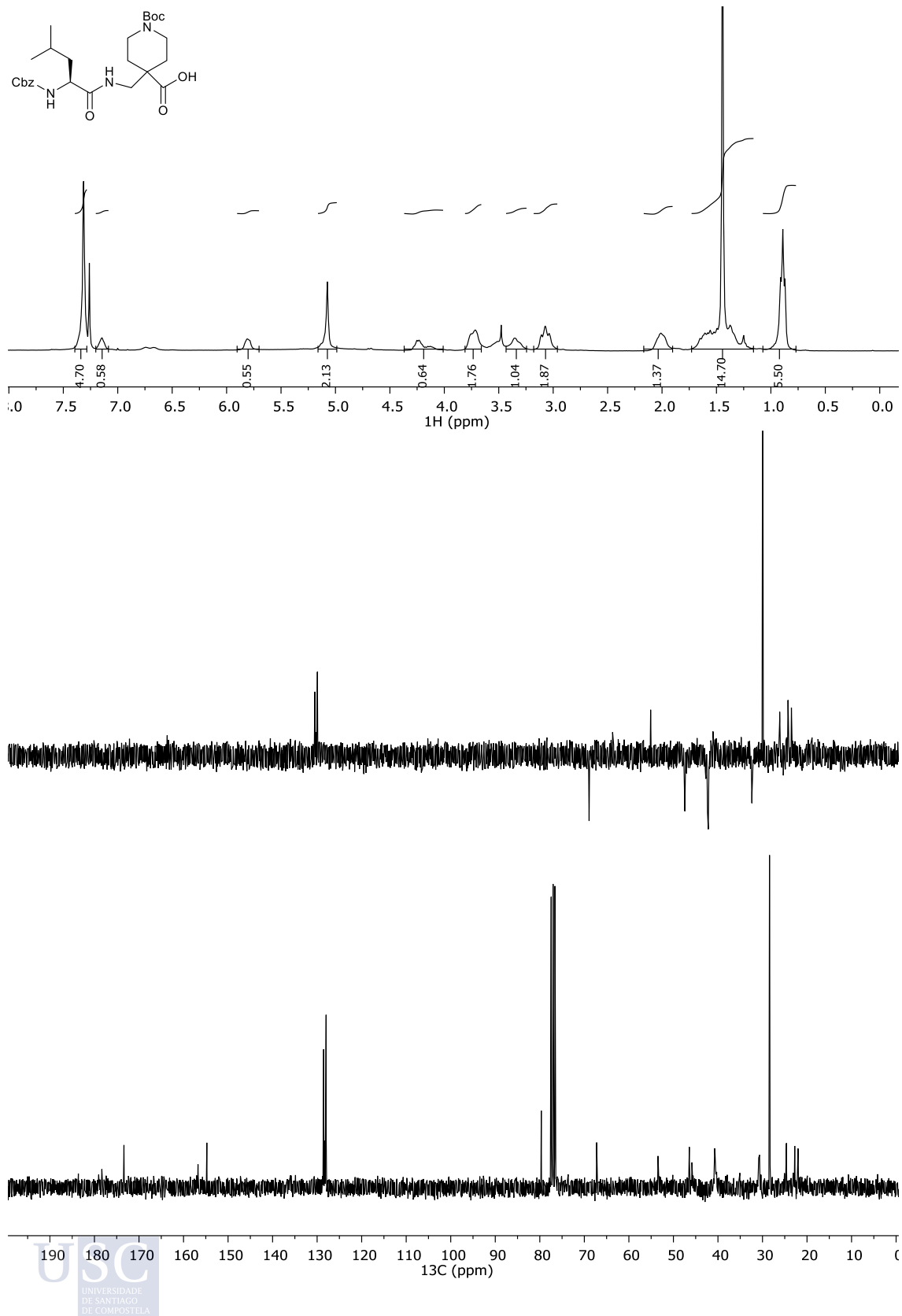
Sobre una disolución del producto de partida **132a** (100 mg, 0.19 mmol) en 1 mL MeOH, enfriada a 0 °C, se añadió disolución acuosa 1M de NaOH (0.1 mL), también enfriada a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a 0 °C y transcurrido ese tiempo se dejó llegar a temperatura ambiente. Tras 18 horas de reacción se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.5$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.2$). La reacción se enfrió entonces a 0 °C y se adificó con disolución acuosa 1 M de HCl (10%) hasta pH= 5. Se concentró el MeOH en el rotavapor y la mezcla resultante se extrajo con DCM (3x 5mL). Los extractos orgánicos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se concentraron y se purificaron por cromatografía en columna con un gradiente (AcOEt/Hex 1:2 > AcOEt). Se obtuvieron así 28 mg del dipéptido **132c** (30%) como un aceite transparente.

$[\alpha]_D^{22}$: +30.3° (c 2.2, CHCl₃)

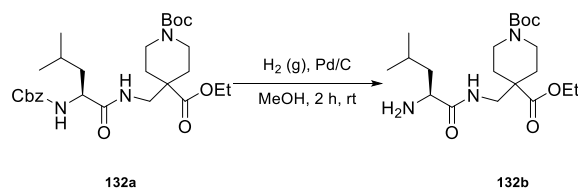
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz, ppm): 0.89 (t, J = 6.0 Hz, 6H), 1.19-1.71 (m, 15H), 2.01 (s, 2H), 3.06 (t, J = 10.6 Hz, 2H), 3.35 (s, 1H), 3.73 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 4.23 (s, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.81 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.31 (s, 5H).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz, ppm): 21 (CH₃), 22.0 (CH), 28.4(CH₃), 29.0 (CH₃), 30.8 (CH₂), 40.7 (CH), 46.4 (CH₂), 53.4 (CH), 67.2 (CH₂), 79.7 (C), 129.0 x 2 (C-Ar), 154.8 (C), 156.7 (C=O), 173.4 (C=O), 178.3 (C=O).

MS-ESI (m/z, %): Calculado para C₂₆H₄₀N₃O₇ [M+H]⁺:506.2859. Encontrado: 506.2861.

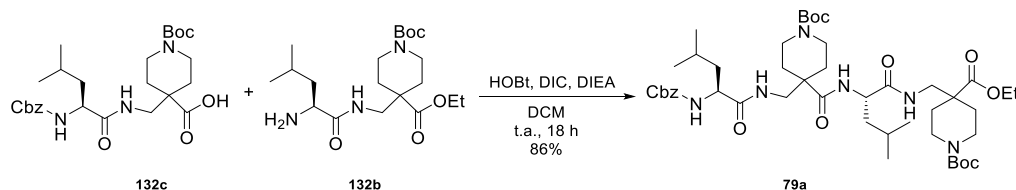


5.4.7 Síntesis del dipéptido **132b**



En un matraz de fondo redondo se disolvió el 1-(*tert*-butil) 4-etil (*S*)-4-(((2-((benciloxi)carbonilo)amino)-4-metilpentanamido)metil)piperidina-1,4-dicarboxylato (**132a**) (100 mg, 0.18 mmol) en 2.5 mL de MeOH y la disolución resultante se desoxigenó haciendo sobre ella vacío e introduciendo argón tres veces. Sobre esta disolución se añadió Pd/C (100 mg, 10%) y la suspensión obtenida se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno ($P=1$ atm) a temperatura ambiente. Tras 2 horas de reacción se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f=0.5$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f=0.1$, que revela con nihidrina). La mezcla se filtró sobre celita, lavando con MeOH, el filtrado se concentró en rotavapor y la amina **132b**, así obtenida, se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

5.4.8 Síntesis del tetrapéptido 79a



En un matraz de fondo redondo, previamente purgado y bajo argón, se disolvió el dipéptido **132c** (18mg, 0.036mmol) en 1 mL de DCM y después se añadió HOBt (6.4 mg, 0.042 mmol), DIC (6 μ L, 0.042 mmol) y una gota de DMF para facilitar la solubilidad de los reactivos (*disolución 1*).

En otro matraz de fondo redondo, previamente purgado y bajo argón, se disolvió el dipéptido **132b** (16 mg, 0.041 mmol) en 1 mL de DCM, se añadió DIEA (25 μ L, 0.144 mmol) y la disolución se enfrió a 0°C (*disolución 2*).

La *disolución 1* se añadió gota a gota sobre la *disolución 2*, enfriada a 0 °C, y una vez añadida se dejó llegar la mezcla a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción (Rf= 0.5). Se añadieron entonces 15 mL de DCM, la reacción se lavó con 5mL de agua, 5 mL disolución acuosa de HCl (10%), 5 mL de agua y 5 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica así obtenida se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex 1:1) obteniéndose así el tetrapéptido **79a** esperado (23 mg, 86%) como un sólido amorfo de aspecto blanquecino.

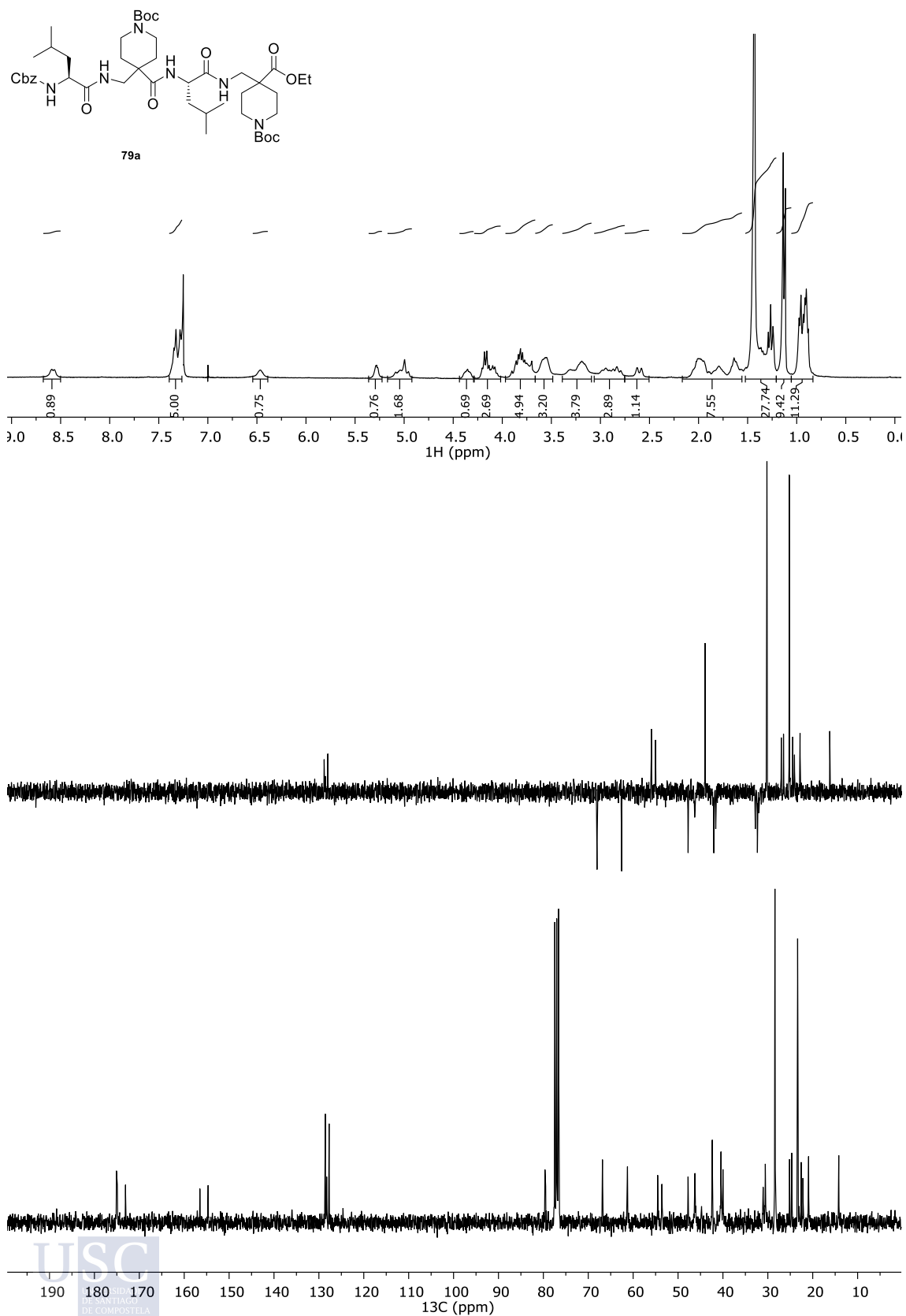
[α]_D: +38.3° (c 2.3, CHCl₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz, ppm): 1.03-0.84 (m, 12H), 1.53-1.08 (m, 23H), 2.11-1.54 (m, 8H), 2.67-2.54 (1H), 3.03-2.75 (3H), 3.38-3.08 (m, 4H), 3.93-3.47 (m, 9H), 4.23-4.06, 3H), 4.36 (s, 1H, NH), 5.14–4.93 (m, 2H, CH₂-Ph), 5.29 (s, 1H, NH), 6.47 (s, 1H, NH), 7.47–7.22 (m, 5H, Ph), 8.60 (s, 1H, NH).

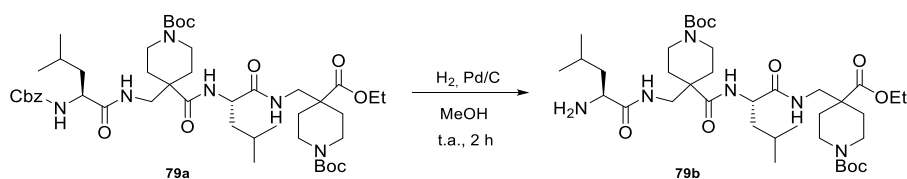
¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz, ppm): 14.2 (CH₃), 20.9 (CH₃), 22.2 (CH₃), 22.6 (CH₃), 23.4 (CH₃), 25.2 (CH₃), 28.4 (CH₃), 30.5 (CH₂), 31.0(CH₂), 40.0(CH₂), 40.4(CH₂), 42.0 (CH), 46.2 (CH₂), 47.8 (CH₂), 53.6 (CH), 54.5 (CH), 61.3 (CH₂), 66.8 (CH₂), 79.5 (C), 128.4 (CH-Ar), 128.6 (CH-Ar), 154.7 (C=O), 156.5 (C=O), 174.9 (C=O), 175.1 (C=O).

IR (ν, cm⁻¹): 3282 (a, -NH), 1634 f, (C=O).

MS-ESI (m/z, %): Calculado para C₄₆H₇₅N₆O₁₁ [M+H]⁺: 887.5494. Encontrado: 887.5469.

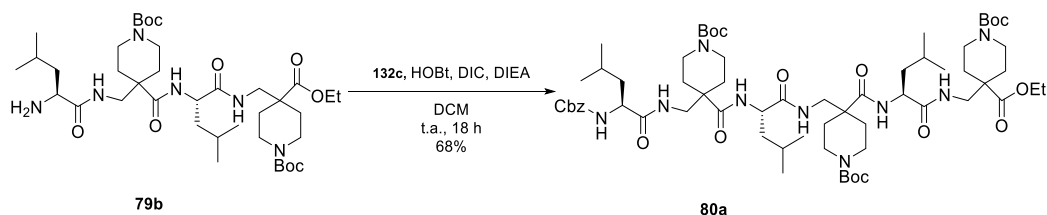


5.4.9 Síntesis del tetrapéptido **79b**



Una disolución del tetrapéptido (**79a**) (38 mg, 0.07 mmol) en 2.5 mL de MeOH se desoxigenó haciendo sobre ella vacío e introduciendo argón tres veces. Sobre esta disolución se añadieron 38 mg de Pd/C (10%) y la suspensión obtenida se agitó bajo atmósfera de hidrógeno ($P=1$ atm) a temperatura ambiente. Tras 2 horas de reacción se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f=0.3$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f=0.1$, que revela con ninhidrina). La mezcla se filtró entonces sobre celita, lavando con MeOH. El filtrado se concentró en rotavapor y el tetrapéptido **79b**, así obtenido, se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

5.4.10 Síntesis del hexapéptido 80a



En un matraz de fondo redondo, previamente purgado y bajo argón, se disolvió el dipéptido **132c** (35 mg, 0.07 mmol) en 1 mL de DCM, se añadió HOBT (9.19 mg, 0.06 mmol), DIC (9 μ L, 0.06 mmol) y una gota de DMF para facilitar la solubilidad de los reactivos (*disolución 1*).

En otro matraz de fondo redondo, también purgado y bajo argón, se disolvió e tetrapéptido **79b** (38 mg, 0.05 mmol) en 1 mL de DCM, se añadió DIEA (35 μ L, 0.2 mmol) y la mezcla resultante se enfrió a 0°C (*disolución 2*).

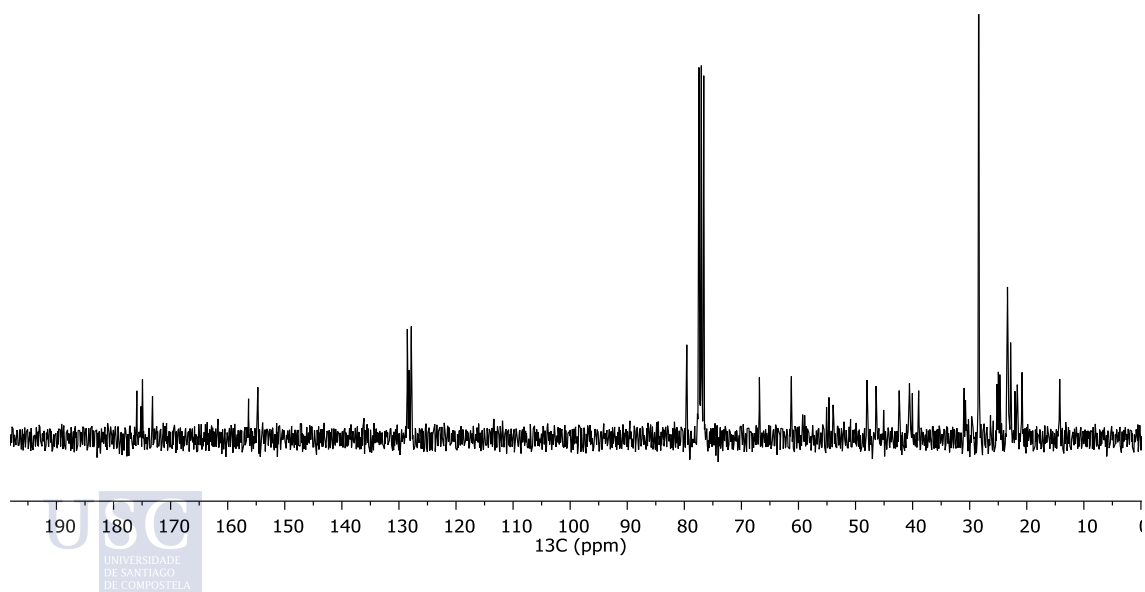
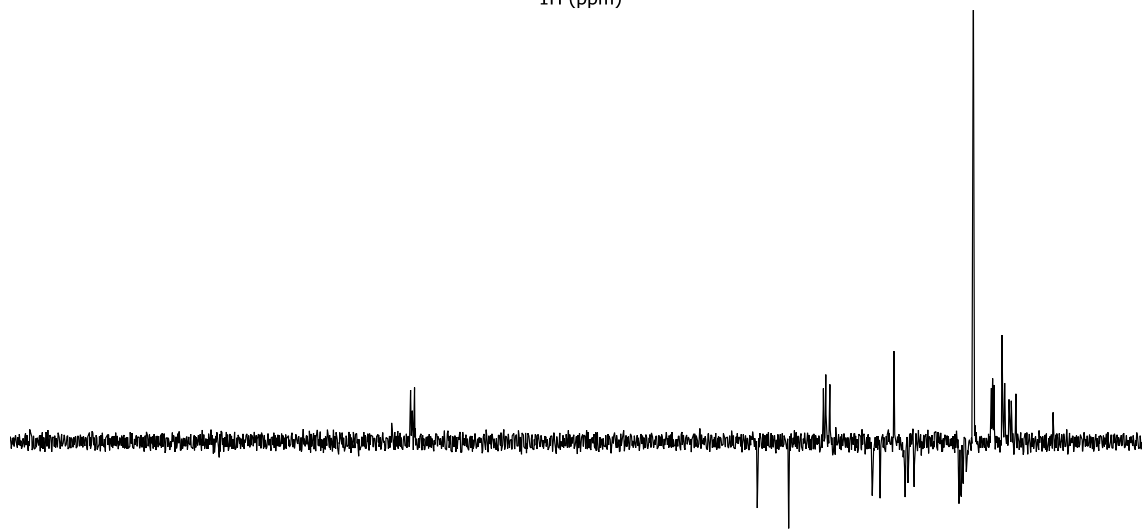
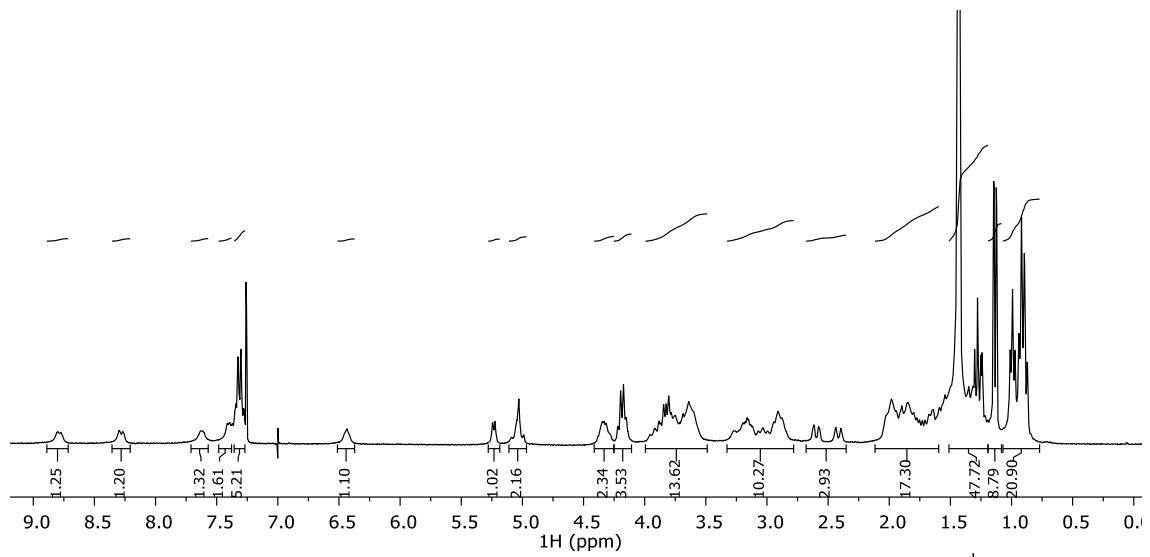
La *disolución 1* se añadió gota a gota sobre la *disolución 2* enfriada a 0°C y una vez añadida se dejó llegar la mezcla a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 3:2) la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.3$). Se añadieron entonces 15 mL de DCM, la reacción se lavó con 5 mL de agua, 5 mL disolución acuosa de HCl (10%), 5 mL de agua y 5 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica así obtenida se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt: Hex 3:2) obteniéndose el hexapéptido esperado **80a** (38 mg, 68%) como un sólido amorfo de aspecto blanquecino.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz, ppm): 1.06-0.79 (m, 18H), 1.18-1.09 (m, 8H), 2.00-1.18 (m, 40H), 2.46-2.35 (m, 1H), 2.65-2.53 (m, 1H), 3.27-2.79 (m, 8H), 4.00-3.52 (m, 10H), 4.43-4.04 (m, 6H), 5.05-4.93 (m, 2H, CH₂-Ph), 5.10 (d, $J = 5.28$ Hz, 1H, NH), 6.12 (s, 1H, H), 7.38-7.23 (m, 5H, Ph) 7.25 (as, 1H, NH), 7.47 (s, 1H, NH), 8.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, NH).

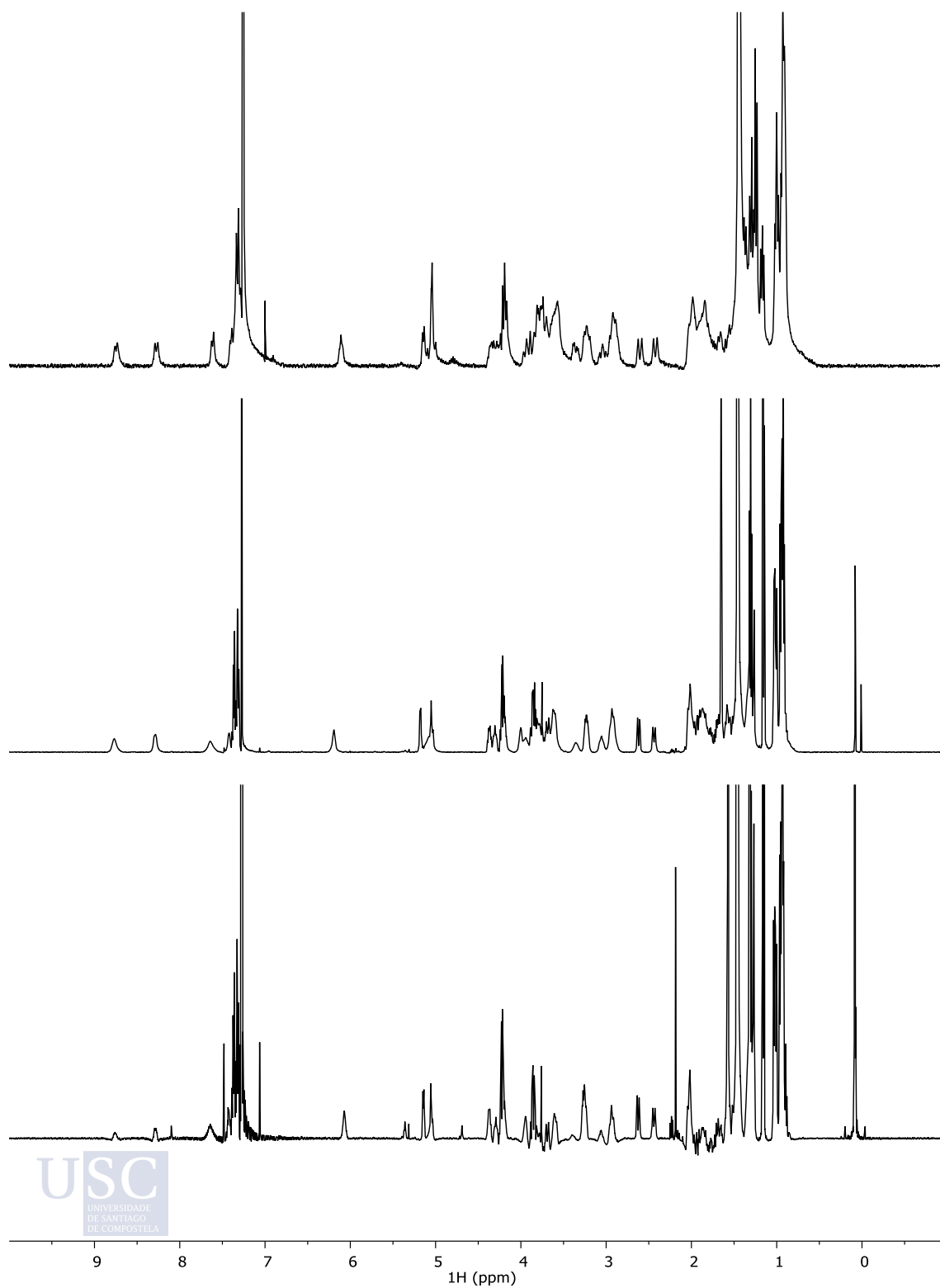
¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz, ppm): 14.2 (CH₃), 20.8 (CH₃), 21.7 (CH₃), 22.0 (CH₃), 22.8 (CH₃), 23.3 (CH₃), 24.7 (CH₃), 25.0 (CH₃), 25.2 (CH₃), 28.41 (CH₃), 29.7 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.7 (CH₂), 31.0 (CH₂), 39.0 (CH₂), 40.0 (CH₂), 40.5 (CH₂), 42.5 (CH), 45.0 (CH₂), 46.3 (CH₂), 48.0 (C), 53.9 (CH), 54.7 (CH), 55.0 (CH), 61.3 (CH₂), 66.9 (CH₂), 79.6 (C), 127.8 (CH-Ar), 128.2 (CH-Ar), 128.5 (CH-Ar), 154.7 (C=O), 156.3 (C=O), 173.2 (C=O), 175.0 (C=O), 175.1 (C=O), 175.9 (C=O).

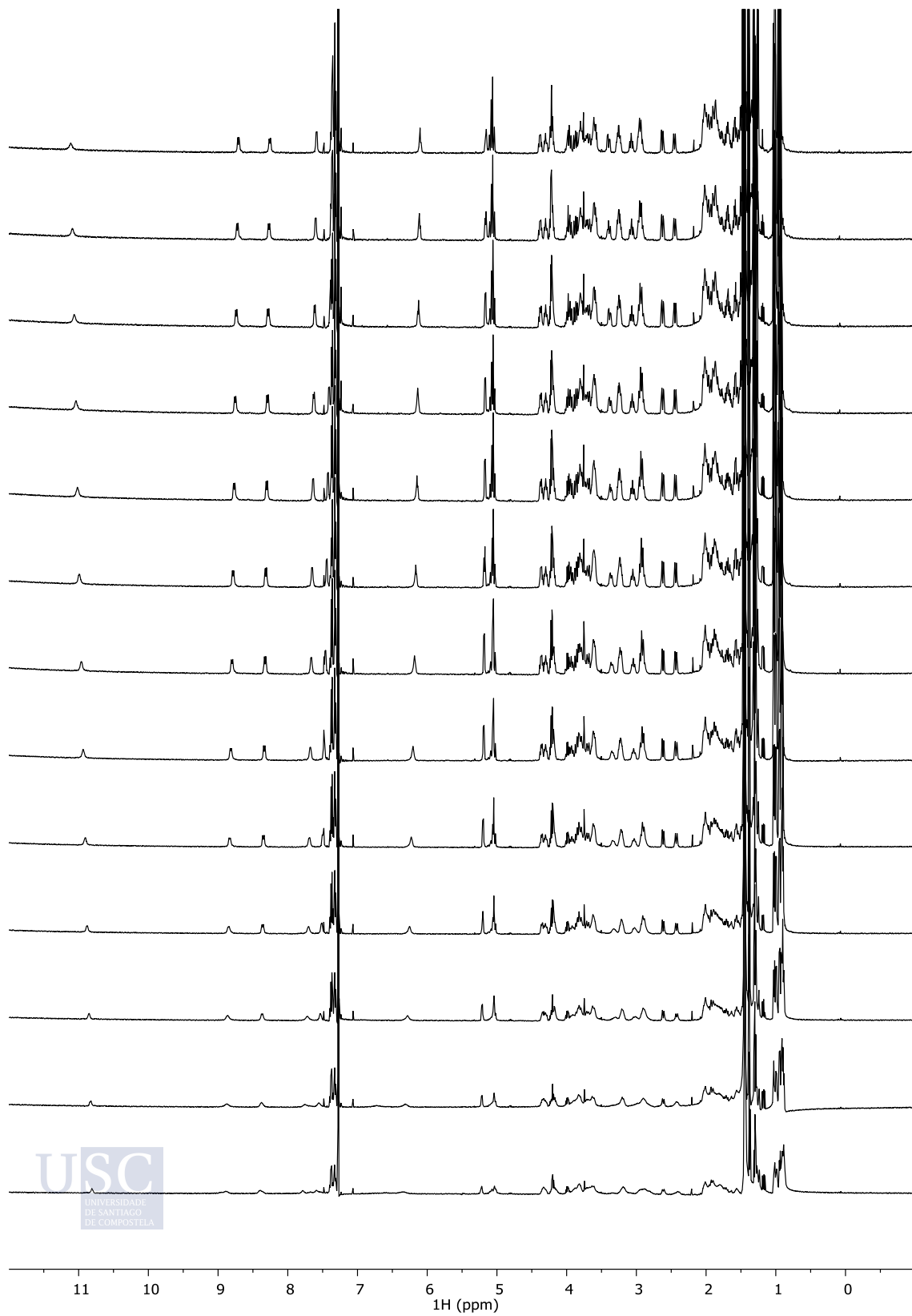
IR (v, cm⁻¹): 3332 (a, NH), 1699 (f, C=O), 1630 (f, C=O).

MS-ESI (m/z, %): Calculado para C₆₄H₁₀₅N₉O₁₅Na [M+Na]⁺: 1262.7628. Encontrado: 1262.7622

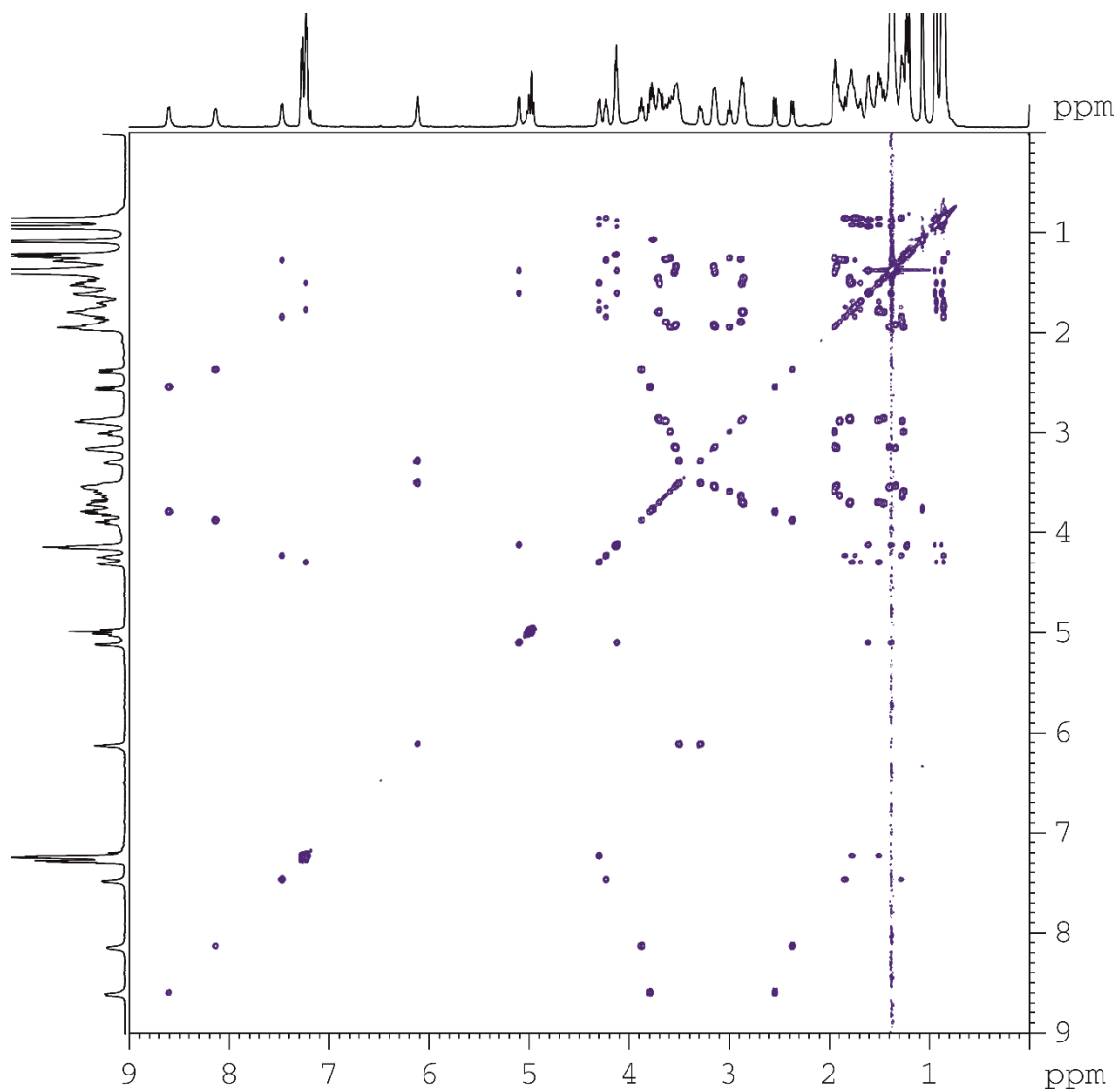


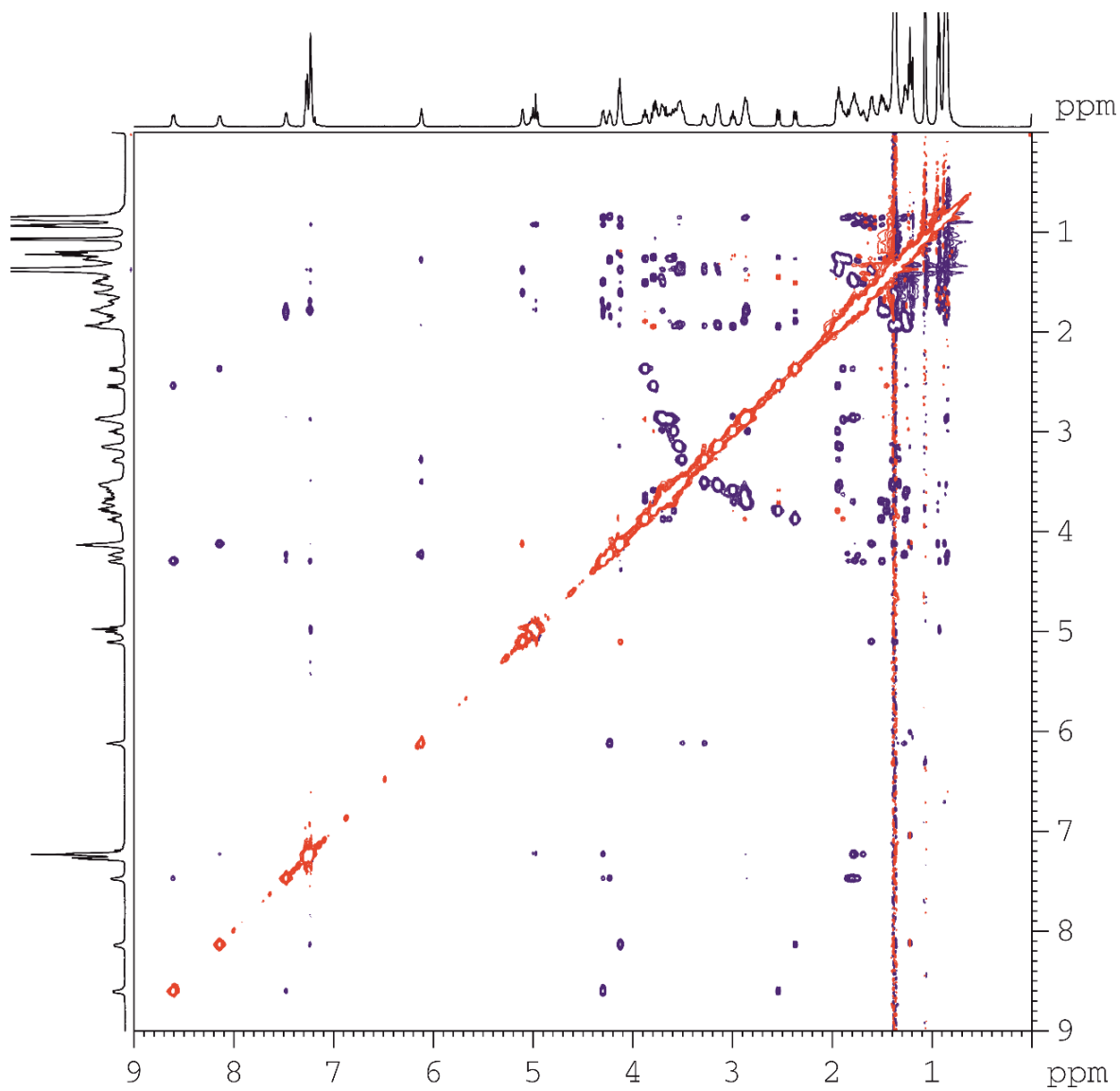
5.4.10.1 ^1H -RMN (2, 6, 8 mM; 25 °C; 300 MHz).



5.4.10.2 ^1H -RMN (6 mM, -15- 45 °C, 300 MHz).

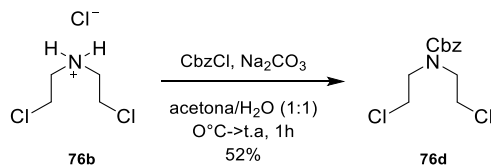
5.4.10.3 TOCSY (6 mM, 25 °C, 600 MHz, CDCl₃).



5.4.10.4 ROESY (6 mM, 25 °C, 600 MHz, t-mix= 500 ms, CDCl₃).

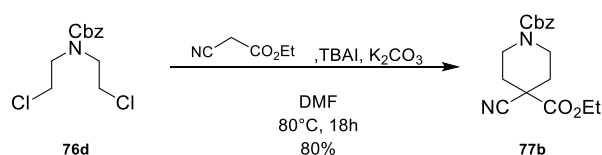
5.5 SÍNTESIS DE COMPUESTOS ORGANOGELANTES ANFIFÍLICOS BASADOS EN β -PIPERIDÍNICOS

5.5.1 Síntesis de bis(2-cloroetil)carbamato de bencilo (76d)



Sobre una disolución del cloruro de bis(2-cloroetil)amino **76b** (4.5 g, 25.5 mmol) en 200 mL una mezcla 1:1 de acetona y agua, enfriada a 0 °C, se añadió carbonato sódico (8.9 g, 84.0 mmol, 3.33 eq) y cloroformiato de bencilo (4.7 mL, 33.6 mmol, 1.3 eq). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 1 h y entonces se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:9) la aparición de un producto de reacción (R_f = 0.4). Se concentró entonces la acetona y la suspensión acuosa resultante se extrajo con AcOEt (3x50 mL), los extractos orgánico reunidos se lavaron con salmuera (50 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El residuo así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna AcOEt: Hex 1:9. Para dar lugar a 5.3 g del compuesto **76d** esperado (61%) que se identificó por comparación de sus datos espectroscópicos con los descritos en la bibliografía¹¹

5.5.2 Síntesis de 4-Cianopiperidina-1,4-dicarboxilato de 1-bencilo 4-etilo (77b)



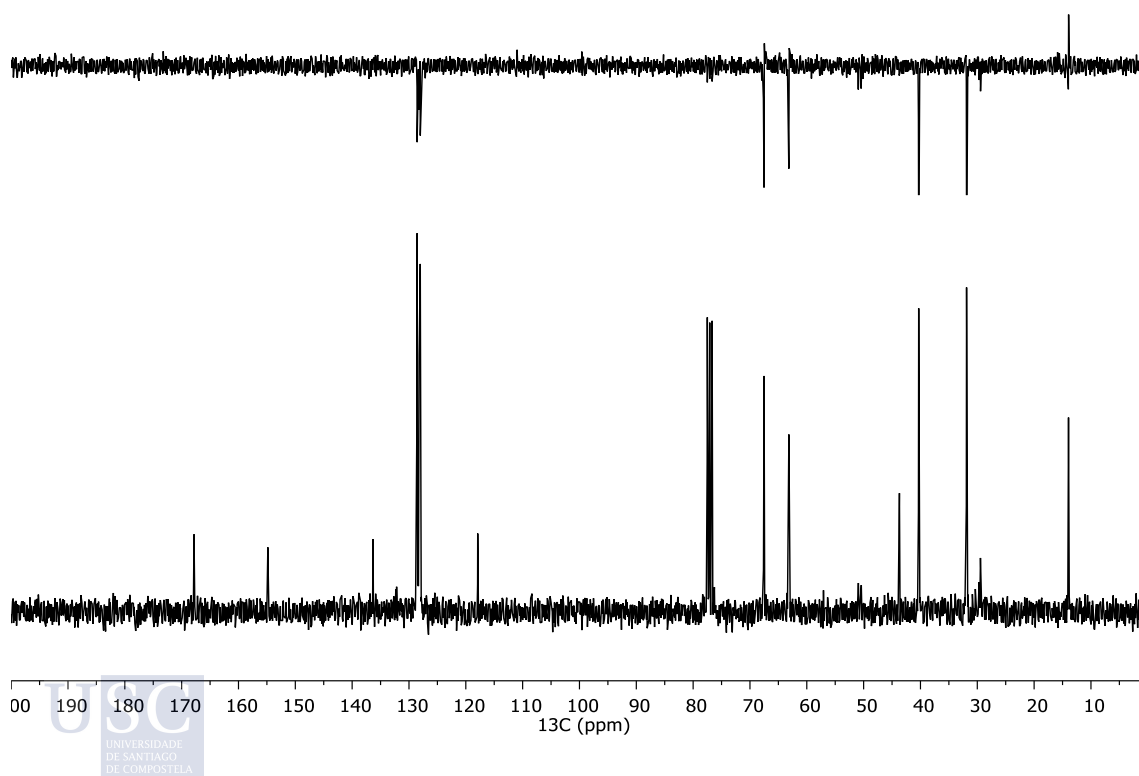
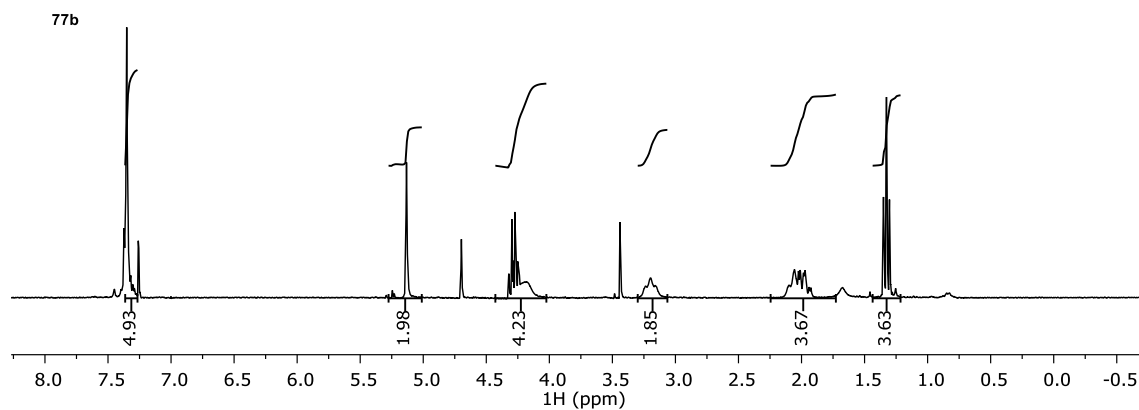
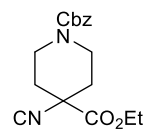
Sobre una disolución del producto de partida **76d** (0.200 g, 0.73 mmol) en 10 mL de DMF seca se añadió cianoacetato de etilo (114 mg, 1.4 eq), K_2CO_3 (239 mg, 2.4 eq) y yoduro de tetrabutilamonio (TBAI) (6.4 mg, 0.02 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80° C durante 18 horas, después de las cuales se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:5) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.5$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.3$). La reacción se concentró entonces en el rotavapor de alto vacío, el residuo obtenido se disolvió en éter etílico (15 mL) y se lavó con agua (3x5 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en rotavapor. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex 1:2), obteniéndose así 0.18 g (80%) de **77b** como un aceite amarillento que se identificó por sus datos espectroscópicos.

1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, ppm): 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 2.15 – 1.85 (m, 4H), 3.27-3.11 (m, 2H), 4.45 – 4.07 (m, 4H), 5.13 (s, 2H), 7.35 (s, 5H).

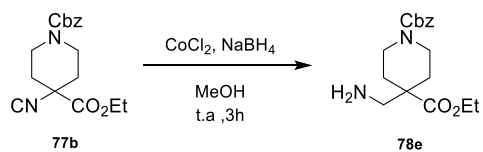
^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 75 MHz, ppm): 14.0 (CH_3), 29.4 (CH_3), 31.9 (CH_2), 40.3 (C), 43.7 (CH_2), 63.2 (CH_2), 67.5 (CH_2), 117.9 (CN), 128.1 (CH), 128.6 (CH), 136.3 (CH), 154.9 (C=O), 167.8 (C=O).

IR (ν , cm^{-1}): 2200 (d, CN), 1690 (f, C=O).

EMAR (ESI+): (m/z, %): calculado para $C_{17}H_{20}N_2O_4$ $[M]^+$: 316.1423. Encontrado: 316.1491

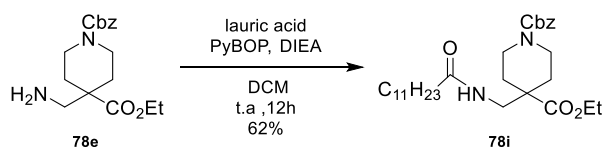


5.5.3 Síntesis de 4-(aminometil)piperidina-1,4-dicarboxilato de 1-benzil, 4-etil (78e)



Sobre una disolución de 4-isocianopiperidina-1,4-dicarboxilato de 1-benzil 4-etilo (**77b**) (72.2 mg, 0.26 mmol) en 12 mL de Metanol, se añadió 116 mg de CoCl₂ (2.5 eq), y 202 mg de NaBH₄ (21 eq) en porciones. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras ese tiempo se observó por ccf (AcOEt/Hex 1:2) la desaparición del producto de partida (R_f= 0.5) y la aparición de un producto de reacción (R_f= 0.1). La mezcla de reacción se concentró a sequedad, se redisolvió en 50 mL de agua y se extrajo con 3x 5 mL de AcOEt. Se juntaron las fases orgánicas, se secaron con Na₂SO₄, filtraron y concentraron hasta sequedad. El residuo se utilizó sin mayor purificación debido a su alta inestabilidad.

5.5.4 Síntesis de 4-(dodecanamidometil)piperidina-1,4-dicarboxilato de 1-benzil 4-etil (**78i**)



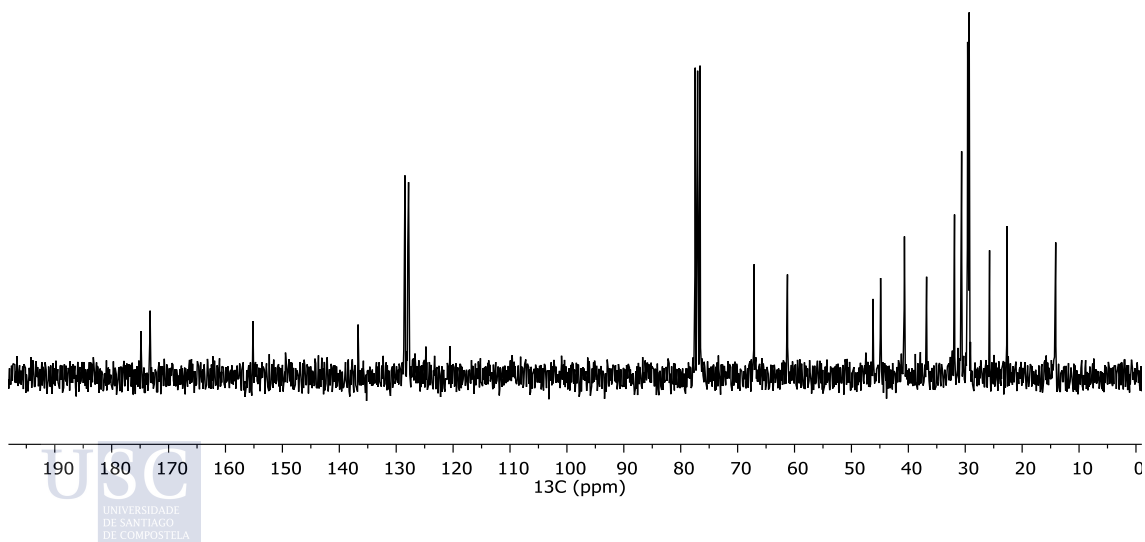
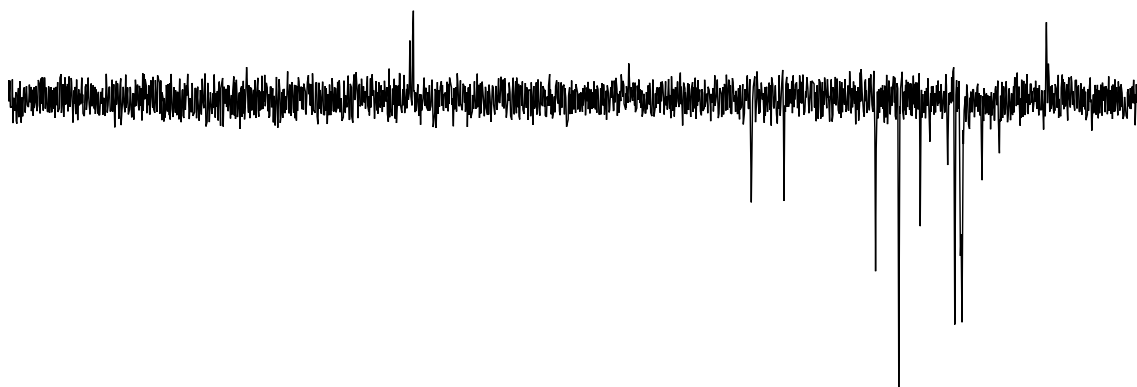
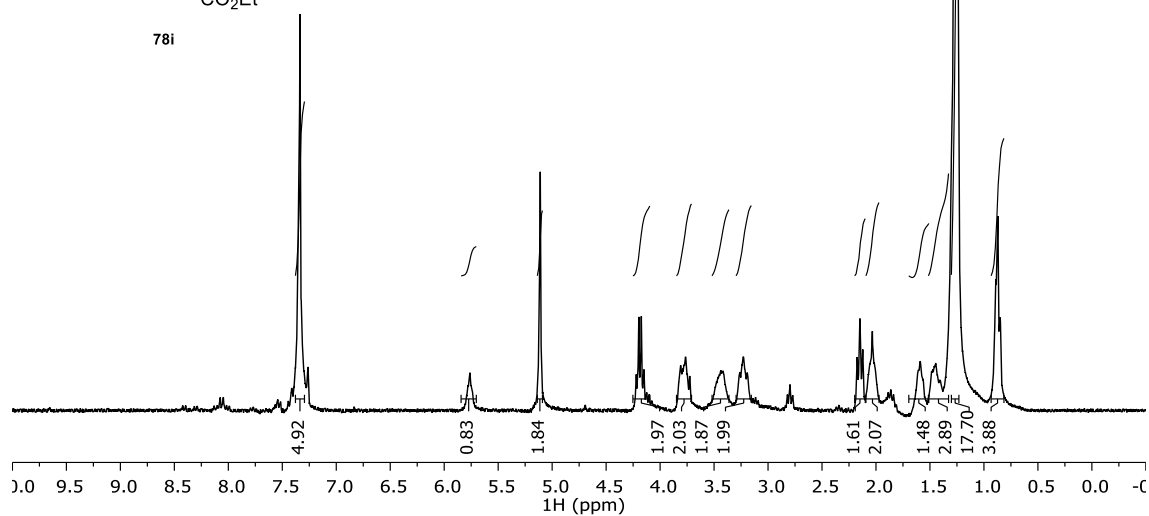
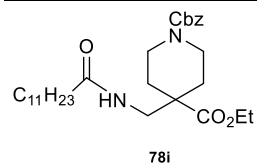
Sobre una disolución de 4-(aminometil)piperidina-1,4-dicarboxilato de 1-benzil, 4-etil (**78e**) (0.26 g, 0.81 mmol) en 13 mL de DCM seco, se añadió 202 mg de ácido láurico (1.2 eq), 657 mg de PyBOP (1.5 eq) y 0.141 mL de DIEA (4 eq). La mezcla resultante se agitó durante 12 horas. Tras ese tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.4$). La mezcla de reacción se lavó con 10 mL de agua, 10 mL de una disolución acuosa 1M de HCl y 10 mL de una disolución acuosa saturada de NHCO_3 . La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica AcOEt: Hex 1:1. Para obtener 0.25 g, con un rendimiento del 62 % del compuesto **78i**.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.20 – 1.32 (m, 18H), 1.44 (t, $J = 11.4$ Hz, 3H), 1.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.99 – 2.07 (m, 2H), 2.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.25 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 3.39 – 3.56 (m, 2H), 3.69 – 3.87 (m, 2H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.76 (s, 1H), 7.34 (s, 5H).

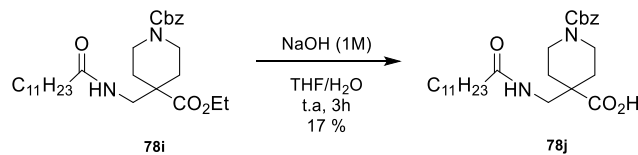
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, ppm): 14 (CH_3), 23 (CH_2), 26 (CH_2), 29 (CH_2), 30 (CH_2), 30 (CH_2), 31 (CH_2), 32 (CH_2), 37 (CH_2), 41 (CH_2), 45 (CH_2), 46 (CH_2), 61 (CH_2), 67 (CH_2), 128 (CH-Ar), 128 (CH-Ar), 129 (CH-Ar), 137 (C), 155 (C), 173 (C=O), 175 (C=O).

EMAR (ESI+): calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_5$ 503.3479; encontrado 503.3479

IR (ν , cm^{-1}): 3323 (NH), 1727 (C=O), 1703 (C=O)

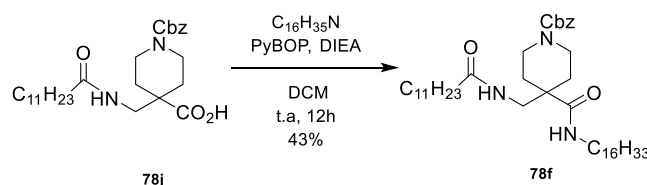


5.5.5 Síntesis de 1 Ácido ((benziloxi)carbonil)-4-(dodecanamidometil)piperidina-4-carboxílico (78j)



Sobre una disolución de 200 mg de (dodecanamidometil)piperidina-1,4-dicarboxylato de 1-benzil 4-etil (**78i**) (0.39 mmol) en 5 mL de THF, se añadió 1.2 mL de una disolución acuosa 1M de NaOH. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras esse tiempo se paró la reacción. Se lavó con DCM a pH= 14 y se llevó la mezcla de reacción a pH=4 y se extrajo con DCM, la fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y concentró hasta sequedad. El residuo se utilizó sin mayor purificación.

5.5.6 Síntesis de Benzil 4-(dodecanamidometil)-4-(hexadecilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato (78f)



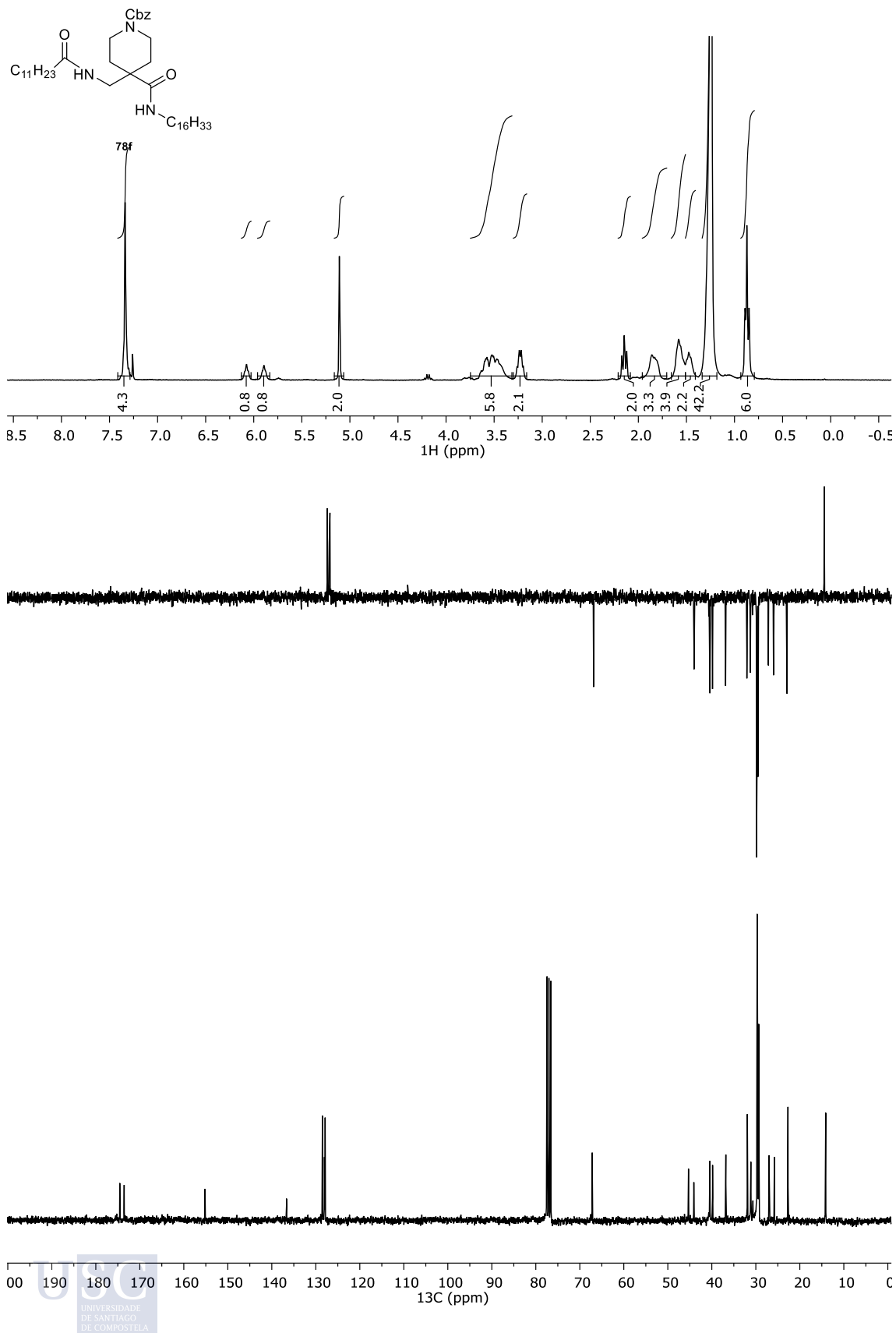
Sobre una disolución de 24.5 mg el ácido ((benziloxi)carbonil)-4-(dodecanamidometil)piperidina-4-carboxílico (**78j**) (0.05 mmol) en 2 mL de DCM seco, se añadió 15 mg de hexadecilamina (1.2 eq), 42 mg de PyBOP (1.5 eq) y 0.370 mL de DIEA (4 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras ese tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la aparición de un producto de reacción ($R_f=0.4$). A la mezcla se añadieron 20 mL de DCM, se lavó con 10 mL de agua, 10 mL HCl, 10 mL de agua, 10 mL de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró hasta sequedad. Posteriormente se purificó por cromatografía en columna (AcOEt: Hex 1:1) obteniendo 15 mg con un rendimiento del 43 % de **78f**.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, ppm) 0.79 – 0.93 (m, 6H), 1.24 (s, 42H), 1.46 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.57 (q, $J = 8.9, 7.8$ Hz, 4H), 1.83 (dt, $J = 12.3, 5.1$ Hz, 4H), 2.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.23 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.32 – 3.75 (m, 6H), 5.11 (s, 2H), 5.89 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 6.08 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.34 (s, 5H)

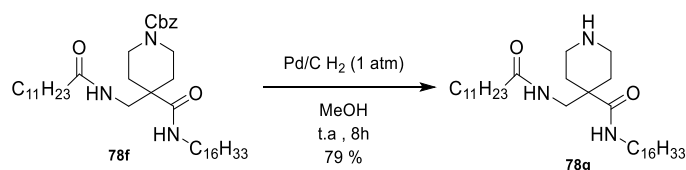
^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, ppm) 14 (CH_3), 23 (CH_2), 26 (CH_2), 27 (CH_2), 29 (CH_2), 29 (CH_2), 30 (CH_2), 30 (CH_2), 30 (CH_2), 30 (CH_2), 30 (CH_2), 31 (CH_2), 31 (CH_2), 32 (CH_2), 37 (CH_2), 40 (CH_2), 40 (CH_2), 44 (CH_2), 45 (CH_2), 67 (CH_2), 128 (CH-Ar), 128 (CH-Ar), 129 (CH-Ar), 137 (C), 155 (C), 174 (CO), 175 (CO).

IR (ν, cm^{-1}): 3323 (NH), 2921 (CH-Ar), 2851 (CH-Ar), 1660 (C=O), 1657 (C=O)

EMAR (ESI⁺): calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_4$ 698.5830; encontrado 698.5830.



5.5.7 Síntesis de 4-(dodecanamidometil)-N-hexadecilpiperidino-4-carboxamida (78g)



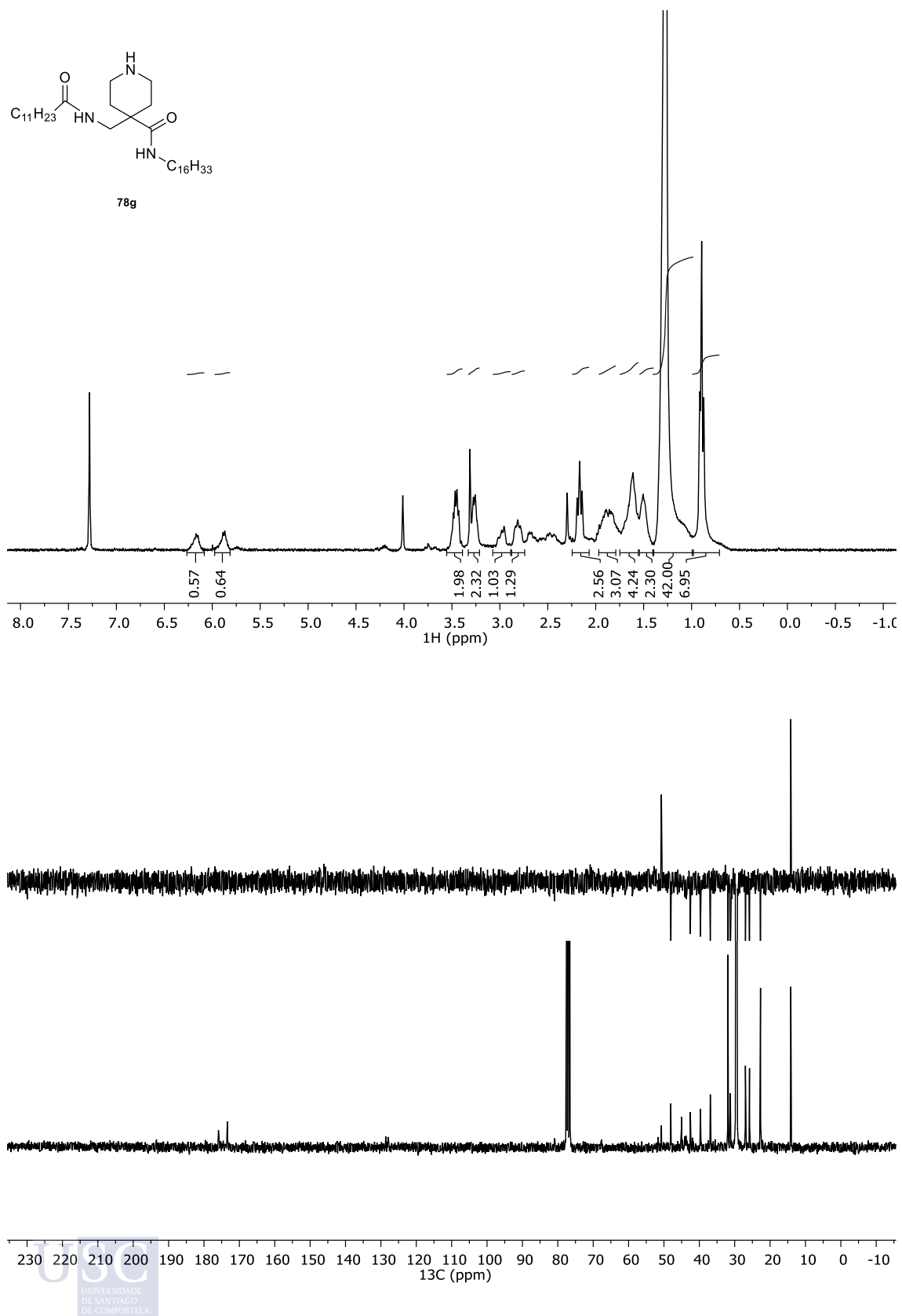
Sobre una disolución de 9 mg benzil 4-(dodecanamidometil)-4-(hexadecilcarbamoyl) piperidina-1-carboxilato (**78f**) (0.01 mmol) en 2 mL de metanol, se añadió 8.9 mg (10 %) de paladio soportado en carbono al 10 % bajo argón. A continuación, se desgasificó el medio y se dejó bajo una atmósfera de hidrógeno (1 atm). La mezcla resultante se dejó con agitación durante 8 horas. Tras ese tiempo se observó por ccf (AcOEt: Hex 1:1) la desaparición del producto de partida ($R_f = 0.4$) y la aparición de un producto de reacción ($R_f = 0.1$). La mezcla de reacción se filtró sobre celita y se concentró a sequedad obteniendo de esta manera 5.8 mg de **78g** con un rendimiento del 79 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, ppm) 0.87 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H), 1.25 (s, 42H), 1.42 – 1.53 (m, 2H), 1.59 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H), 1.86 (ddd, $J = 16.2, 11.7, 6.7$ Hz, 4H), 2.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 2.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.24 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.39 – 3.49 (m, 2H), 5.84 (s, 1H), 6.08 (s, 1H).

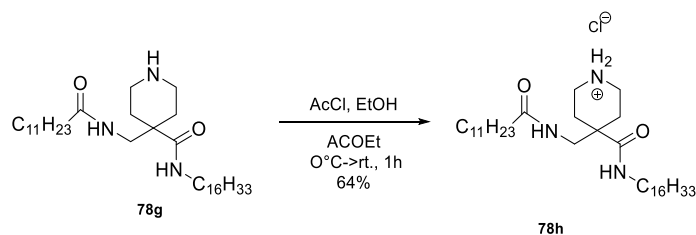
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, ppm) 14 (CH_3), 23 (CH_2), 26 (CH_2), 29 (CH_2), 30 (CH_2), 32 (CH_2), 37 (CH_2), 40 (CH_2), 43 (CH_2), 45 (CH_2), 48 (CH_2), 51 (CH_2), 77 (CH_2), 78 (CH_2), 129 (CH-Ar), 173 (CO), 176 (CO).

EMAR (ESI⁺): Calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_2$ 564.5467; encontrado 564.5463.

IR (ν , cm^{-1}): 3327 (NH), 2919 (CH-Ar), 2851 (CH-Ar).



5.5.8 Síntesis de 4-(dodecanamidometil)-4-(hexadecilcarbamoil)piperidin-1-ium (78h)

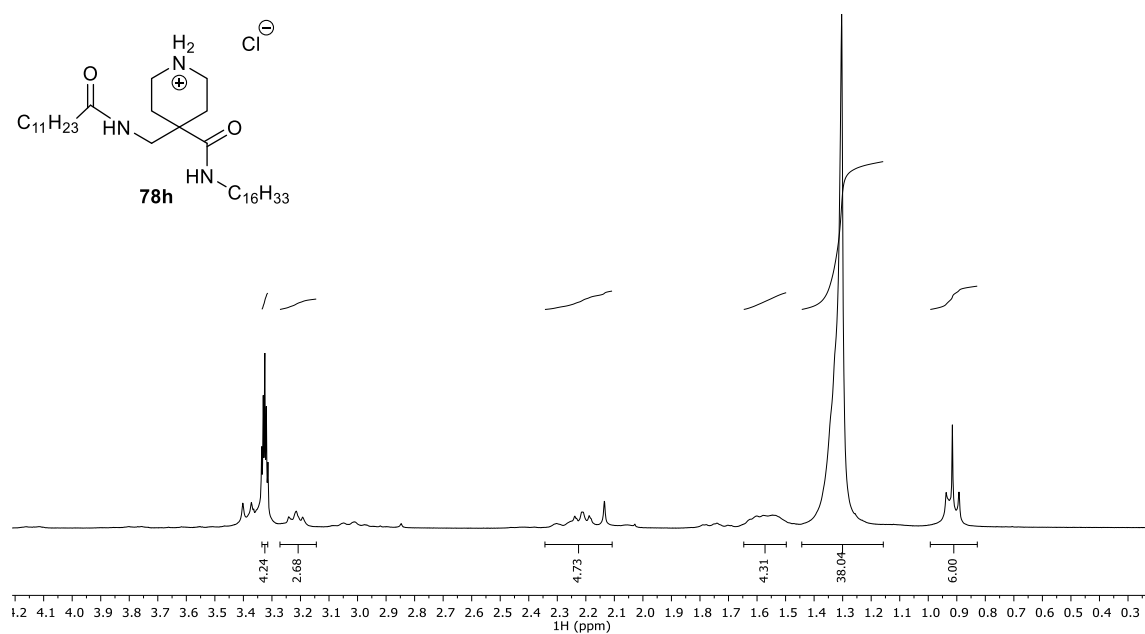


Se disolvieron 39 mg de 4-(dodecanamidometil)-N-hexadecilpiperidino-4-carboxamida (**78g**) (0.09 mmol) en 4 mL de acetato de etilo. Esta disolución se añadió sobre una disolución de 1 mL de cloruro de acetilo y 1.2 mL de etanol a 0 °C. La mezcla resultante se dejó llegar a temperatura ambiente con agitación durante una hora. Tras ese tiempo la mezcla se concentró a sequedad y se purificó mediante columna cromatográfica (DCM/MeOH: 5 %) obteniéndose 35 mg de **78h** con un rendimiento del 64 %.

¹H NMR (Methanol-d₄, 300 MHz, ppm) 0.85 – 0.97 (m, 1H), 1.17 – 1.42 (m, 7H), 1.59 (dd, J = 17.4, 9.6 Hz, 1H), 2.10 – 2.34 (m, 0H), 3.22 (t, J = 7.4 Hz, 0H), 3.33 (p, J = 1.7 Hz, 1H).

EMAR (ESI⁺): calculado para C₃₅H₇₀N₃O₂ 564.5463; encontrado 564.5464

IR (ν, cm⁻¹): 3300 (NH), 2916 (CH-Ar), 2850 (CH-Ar), 1627 (C=O).





Esta tesis se subdivide en tres subproyectos claramente diferenciados:

- El primero subproyecto trata de la exploración de las posibilidades de obtención de β 2,3 aminoácidos ciclopentánicos altamente funcionalizados a partir de productos naturales o sintéticos asequibles económicamente.
- El segundo subproyecto trata de la exploración de las posibilidades de obtención de β 2,2 aminoácidos ciclopentánicos y la síntesis y estudio estructural de sus α,β -péptidos.
- El tercero subproyecto trata de la exploración de las posibilidades de obtención de β 2,2 aminoácidos piperidínicos y la síntesis y estudio estructural de sus α,β -péptidos.
- Por último, el cuarto subproyecto trata de la exploración de las posibilidades de obtención de