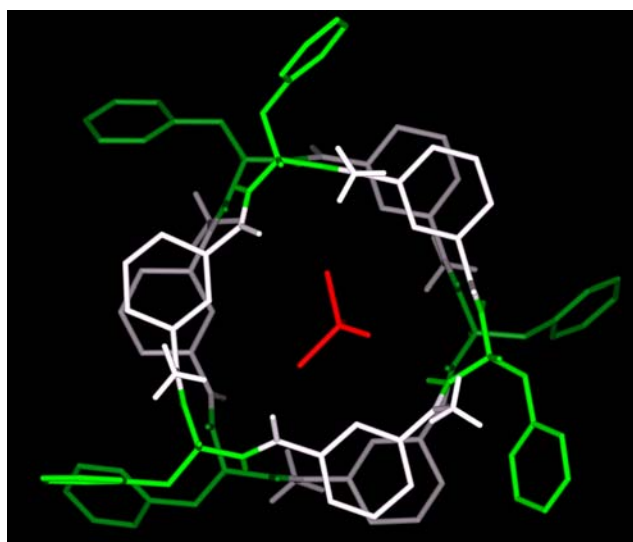


UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

# DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO DE $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS



TESIS DOCTORAL

**MANUEL AMORÍN LÓPEZ**  
Santiago de Compostela, 2005



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

# DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO DE $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS

Memoria que, para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Santiago de Compostela, presenta

**MANUEL AMORÍN LÓPEZ**  
Santiago de Compostela, 2005



D. JUAN R. GRANJA GUILLÁN, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA:

INFORMA: Que la memoria adjunta titulada: “Diseño, Síntesis y Estudio de  $\alpha,\gamma$ -Nanotubos Peptídicos” que, para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, presenta D. Manuel Amorín López, ha sido realizada bajo mi dirección, en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica.

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

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 20 de Julio de 2005.

Fdo.: Manuel Amorín López

Fdo.: Juan R. Granja Guillán



## **AGRADECIMIENTOS:**

Quisiera dar las gracias y compartir este trabajo con todas aquellas personas que de una forma más o menos relevante han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible.

- En primer lugar, al Prof. Juan Granja, por la dirección de este trabajo, su ayuda, enseñanzas y buenos consejos durante el reto que supuso el comenzar un proyecto totalmente novedoso. También a los Profesores Luis Castedo, M. Reza Ghadiri (*The Scripps Research Institute, La Jolla, CA*) y Hagan Bayley (*Universidad de Oxford*) por haberme permitido tener la experiencia de trabajar en sus laboratorios.

- Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca FPU.

- A los Ministerios de Educación y Ciencia, y Ciencia y Tecnología (PB97-0524, SAF2001-3120, SAF2004-01044) y a la Xunta de Galicia (PGIDT00PXI20912PR, PGIDT02BTF20901PR, PGIDT04BTF209006PR) por la financiación de este trabajo.

- A la Universidad de Santiago de Compostela por sus instalaciones y medios, entre los que cabe destacar los servicios de apoyo a la investigación, así como al personal que en ellos trabaja: Servicio de Masas (Esteban, Isabel, etc), RMN (Manuel, Ramón y Mencha) y Rayos X (Antonio).

- A aquellas personas con las que he pasado numerosas horas en el laboratorio: los integrantes del grupo: (Roberto, Rebeca, María José, etc.), los técnicos de laboratorio: (María, Rosa, Áurea, Muras, etc.), y todos aquellos que me han acompañado en el laboratorio durante estos años (Juan, Jorge, Emilio, Verónica, Cris, Eduardo, Iago, Checho, etc.).

- A mis amigos y a todos aquellos de los que me hubiese podido olvidar.

- A mis padres y a mi hermana con los que he compartido menos horas de lo que me gustaría durante estos años.



*A mis padres y a mi hermana.*



*El hombre está dispuesto siempre  
a negar aquello que no comprende.  
Pascal (1623-1662).*

*El mejor modo de resolver una  
dificultad es no tratar de soslayarla.  
Noel Claraso (1905-1985)*



# ÍNDICE:

## ABREVIATURAS

<b>CAPÍTULO 1: ESTRUCTURAS TUBULARES</b>	<b>1</b>
1.1. NANOTUBOS DE CARBONO	6
1.2. NANOTUBOS INORGÁNICOS	8
1.3. NANOTUBOS ORGÁNICOS	9
<b>CAPÍTULO 2: NANOTUBOS PEPTÍDICOS</b>	<b>23</b>
2.1. NANOTUBOS PEPTÍDICOS EN ESTADO SÓLIDO	26
2.2. NANOTUBOS PEPTÍDICOS EN DISOLUCIÓN	32
2.3. NANOTUBOS PEPTÍDICOS EN MEMBRANAS LIPÍDICAS	38
2.4. EXPANSIÓN DEL MODELO DE NANOTUBOS PEPTÍDICOS A NUEVOS DISEÑOS	41
<b>CAPÍTULO 3: OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
3.1. MODOS DE ESTUDIO	55
<b>CAPÍTULO 4: PRECEDENTES DE <math>\alpha,\gamma</math>-CICLOPÉPTIDOS</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 5: SÍNTESIS DE <math>\gamma</math>-AMINOÁCIDOS Y METODOLOGÍA DE SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS</b>	<b>61</b>
5.1. SÍNTESIS DEL N-Boc- <i>cis</i> -3-AMINOCICLOHEXANO- CARBOXÍLICO (Boc- $\gamma$ -Ach-OH)	63
5.2. SÍNTESIS DEL N-Boc- <i>cis</i> -3-AMINO-2- METILCICLOHEXANOCARBOXÍLICO	68
5.3. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS	72
<b>CAPÍTULO 6: <math>\alpha,\gamma</math>-CICLOPÉPTIDOS N-METILADOS</b>	<b>77</b>
6.1. $\alpha,\gamma$ -CICLOHEXAPÉPTIDOS N-METILADOS	81
6.2. $\alpha,\gamma$ -CICLOTETRAPÉPTIDOS N-METILADOS	92
6.3. $\alpha,\gamma$ -CICLOOCTAPÉPTIDOS N-METILADOS	97
6.4. ( $3\alpha,1\gamma$ )-CICLOOCTAPÉPTIDOS N-METILADOS	115
<b>CAPÍTULO 7: <math>\alpha,\gamma</math>-NANOTUBOS PEPTÍDICOS SÓLIDOS</b>	<b>137</b>
7.1. FORMACIÓN DE NANOTUBOS	144
<b>CAPÍTULO 8: <math>\alpha,\gamma</math>-NANOTUBOS PEPTÍDICOS DE MEMBRANA</b>	<b>147</b>
8.1 ESTUDIOS DE TRANSPORTE	152



<b>CAPÍTULO 9: <math>\alpha,\gamma</math>-NANOTUBOS PEPTÍDICOS ANTIMICROBIANAS</b>	<b>163</b>
<b>9.1. ESTUDIOS BIOLÓGICOS</b>	<b>168</b>
<b>CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES</b>	<b>171</b>
<b>CAPÍTULO 11. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>175</b>
<b>11.1. GENERAL</b>	<b>177</b>
<b>11.2. SÍNTESIS del ácido N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico y de sus derivados N-metilados</b>	<b>179</b>
<b>11.3. SÍNTESIS del ácido N-Boc-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico</b>	<b>182</b>
<b>11.4. <math>\alpha</math>-AMINOÁCIDOS</b>	<b>183</b>
<b>11.5. SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS N-METILADOS</b>	<b>185</b>
<b>11.6. <math>\alpha,\gamma</math>-CICLOPÉPTIDOS N-METILADOS</b>	<b>194</b>
<b>11.6.1. <math>\alpha,\gamma</math>-Ciclohexapéptidos N-metilados</b>	<b>194</b>
<b>11.6.2. <math>\alpha,\gamma</math>-Ciclotetrapéptidos N-metilados</b>	<b>196</b>
<b>11.6.3. <math>\alpha,\gamma</math>-Ciclooctapéptidos N-metilados</b>	<b>196</b>
<b>11.6.4. (3<math>\alpha,1\gamma</math>)-Ciclohexapéptidos N-metilados</b>	<b>198</b>
<b>11.7. <math>\alpha,\gamma</math>-NANOTUBOS PEPTÍDICOS SÓLIDOS, SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA</b>	<b>203</b>
<b>11.8. <math>\alpha,\gamma</math>-NANOTUBOS PEPTÍDICOS DE MEMBRANA, SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA</b>	<b>206</b>
<b>11.9. <math>\alpha,\gamma</math>-NANOTUBOS PEPTÍDICOS ANTIMICROBIANOS</b>	<b>209</b>
<b><u>Análisis de Van't Hoff</u></b>	<b>211</b>
<b><u>Datos de IR</u></b>	<b>213</b>
<b>ANEXO 1: DATOS DE RMN</b>	
<b>ANEXO 2: DATOS DE RAYOS-X</b>	



## ABREVIATURAS

$\delta$	desplazamiento químico (ppm)
Aa	aminoácido
Aib	ácido aminoisobutírico
$\gamma$ -Ach	ácido 3-aminociclohexanocarboxílico
Aca	ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico
ACN	acetonitrilo
Boc	tert-butiloxicarbonilo
(Boc) <sub>2</sub> O	anhídrido de di-tert-butoxicarbonilo
$\beta^3$ -HAla	$\beta$ -Homoalanina
$\beta^3$ -HLeu	$\beta$ -Homoleucina
$\beta^3$ -HTrp	$\beta$ -Homotriptófano
c	cuadruplete
CD	dicroísmo circular
Cys	cisteína
d	doblete
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DIEA	diisopropiletilamina
DMAP	N,N-dimetilaminopiridina
EDC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
EM	espectrometría de masas
EMAR	espectrometría de masas de alta resolución
EM-IE	espectrometría de masas de impacto electrónico
eq	equivalente
ES	espectrometría de masas de electrospray
FAB	masas de bombardeo con átomos rápidos
Fm	9-fluorenilmetil
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
Hag	homoalilglicina (ácido 2-aminohex-5-enoico)
HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetrametiluronio
HBTU	hexafluorofosfato 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetrametiluronio
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
<i>J</i>	constante de acoplamiento
IE	impacto electrónico

Maldi-Tof	espectrometría de masas de ionización mediante desorción por láser asistida mediante matriz
Maldi-Tof-Ar	maldi de masas exactas
MBHA	resina 4-metilbenzohidrilamina
MOPS	ácido 3-[N-Morfolino]propanosulfónico
MSAR	masas de alta resolución
MHz	megahertzio
MWNT	nanotubo de carbono formado por múltiples nanotubos coaxiales
NMM	N-metilmorfolina
PAM	resina 4-hidroximetil-fenilacetamidametil
ppm	partes por millón
py	piridina
$R_f$	factor de retención
Rink amida	ácido 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacético
RMN	resonancia magnética nuclear
s	singlete
SWNT	nanotubo de carbono formado por un solo nanotubo coaxial
t	triplete
TBTU	O-(Benzotriazol-1-ilo)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato
TEM	microscopía de transmisión de electrones
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
Tos	Tosilo

## LEYENDA:

**HC-número:** ciclohexapéptidos.

**TC-número:** ciclotetrapéptidos.

**OC-número:** ciclooctapéptidos.

**OC<sub>3;1</sub>-número:** (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-ciclooctapéptidos (3  $\alpha$ -Aa por cada  $\gamma$ -Aa).

## **CAPÍTULO 1: ESTRUCTURAS TUBULARES**



El desarrollo de materiales y estructuras de tamaño cada vez menor constituye uno de los mayores retos de la ciencia y la tecnología actuales. El objetivo es obtener materiales de dimensiones nanométricas que posean nuevas propiedades físicas, electrónicas o químicas. Las primeras técnicas para preparar estos materiales se basaban en métodos físicos (nanofísica) que suponían la construcción de materiales mediante la degradación de otros de mayores dimensiones (top-down). Sin embargo, al aumentar el grado de miniaturización y complejidad, surge un problema: las partículas son de un tamaño demasiado pequeño para ser fabricadas mediante estos procesos. Por ello, en los últimos años, se ha recurrido a nuevos métodos basados en procesos químicos (nanoquímica),<sup>1</sup> que pretenden su construcción mediante la manipulación de moléculas hasta alcanzar el tamaño y la forma adecuadas (bottom-up). No obstante, estas estructuras son demasiado grandes para ser sintetizadas mediante la formación controlada de enlaces covalentes, usando las estrategias clásicas de los químicos sintéticos, por lo que se ha recurrido a su formación a partir de varias unidades simples que se organizan y se unen entre sí espontáneamente mediante enlaces no covalentes. Esta técnica se conoce como **autoensamblaje** molecular,<sup>2,3</sup> y se basa en equilibrios de asociación y disociación que conducen a la estructura termodinámicamente más estable, en la que las distintas subunidades están unidas mediante fuerzas de enlace débil (puentes de hidrógeno, van der Waals, etc.). Para lograr la formación de estas estructuras supramoleculares mediante esta técnica, es fundamental el diseño racional de la/s unidad/es básica/s y el control del proceso de ensamblaje.

Durante los últimos treinta años los químicos orgánicos como Cram<sup>4</sup> y Lehn<sup>5</sup> han estudiado las bases de los procesos de autoensamblaje, lo que ha permitido construir diversas estructuras de mayor o menor complejidad y asentar las bases de una nueva rama de la química, la química supramolecular. Gracias a estos estudios también se han podido establecer las bases termodinámicas de los procesos de autoensamblaje, lo que en muchos casos ha permitido predecir de forma apropiada la estructura supramolecular.

Para las construcciones supramoleculares mediante procesos de autoensamblaje molecular se emplean todas aquellas fuerzas de enlace débil que son responsables del estado de agregación de la materia, así como de multitud de sistemas de autoensamblaje existentes tanto en la naturaleza como en la química sintética. Todas las fuerzas intermoleculares son, en el fondo, interacciones entre una carga positiva y otra negativa, bien sean cargas formales (iones) para dar lugar a sales, o bien sean dipolos

- 
- 1) Wouters, D.; Schubert, U. S. "Nanolithography and Nanochemistry: Probe-Related Patterning Techniques and Chemical Modification for Nanometer-Sized Devices" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2480-2495.
  - 2) El autoensamblaje molecular consiste en el ensamblaje espontáneo de moléculas para formar estructuras estables y está dirigido por enlaces no covalentes; a diferencia de la **autoorganización**, que es la distribución espacial de las moléculas, átomos o iones, buscando un mínimo energético donde las posiciones no son fijas ni están controladas por la naturaleza química de los mismos; ejemplos de autoorganización son: cristales moleculares, cristales líquidos, micelas, emulsiones, etc. Para un estudio sobre estos procesos, véase: Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Setho, C. T. "Molecular Self-Assembly and Nanochemistry: A Chemical Strategy for the Synthesis of Nanostructures" *Science*, **1991**, *254*, 1312-1319.
  - 3) Para una visión general de la importancia de la química supramolecular y de los procesos de autoensamblaje: *Science* **2002**, *295*, 2395-2421 y *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 4762-5188.
  - 4) Cram, D. J. "The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes (Nobel Lecture)" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1009-1112.
  - 5) Lehn, J.-M. "Supramolecular Chemistry-Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture)" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 89-112.

permanentes o inducidos.<sup>6</sup> Entre las distintas fuerzas no covalentes utilizadas en procesos de ensamblaje podemos mencionar todas las fuerzas no covalentes que se conocen como débiles (van der Waals, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , ion-dipolo, dipolo-dipolo, etc.); además de estas fuerzas, una de las que más habitualmente se ha empleado en química supramolecular son los puentes de hidrógeno, gracias a su direccionalidad e intensidad, haciéndola más versátil en este tipo de procesos. Debido a que todas estas fuerzas son muy débiles, los procesos de autoensamblaje están gobernados por un conjunto de interacciones que cooperan conjuntamente. El balance energético es muy importante, en el que la entropía juega un papel muy importante ya que los procesos de autoensamblaje suponen la agregación de múltiples moléculas, por lo que el factor entrópico es generalmente negativo.

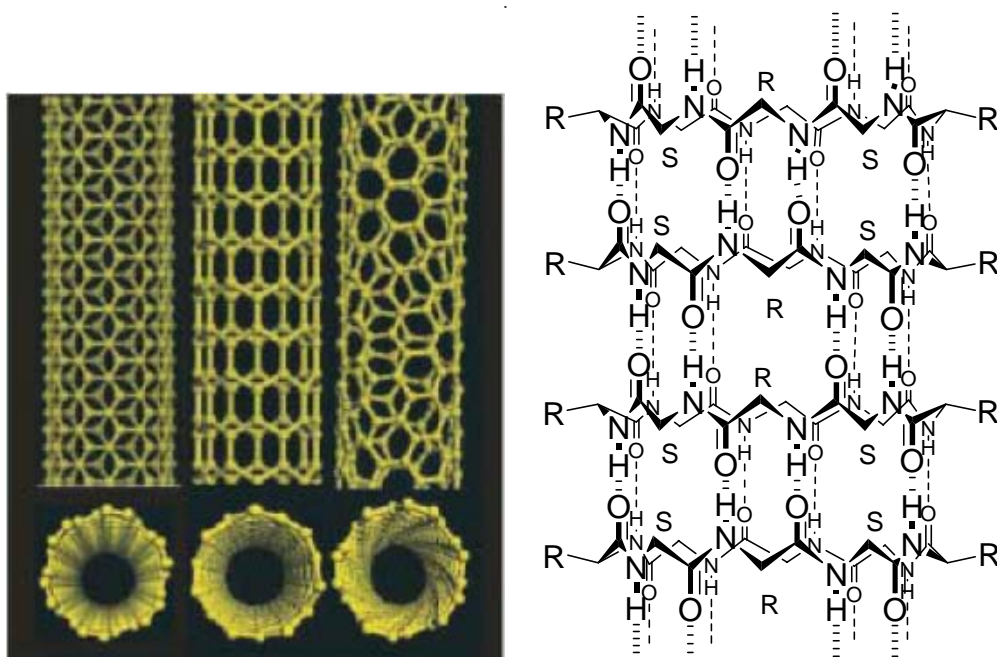


Figura 1: Derecha: Modelo de la estructura de los nanotubos de carbono. Izquierda: Modelo de autoensamblaje de un nanotubo peptídico formado por *D,L*-ciclopéptidos.

Una de las nanoestructuras de mayor interés es aquella que posee forma tubular - los **nanotubos** (cilindros huecos de dimensiones nanométricas)-, por su potencial aplicación en áreas tan diversas como las tecnologías de separación e inclusión molecular, catálisis, fabricación de nanofibras y alambres microscópicos, uso en dispositivos ópticos y electrónicos, vehículos para la administración de medicamentos, canales transmembránicos (que atraviesen la membrana celular), etc.<sup>7</sup> En los últimos años se han preparado diversos tipos de nanotubos -que se diferencian en su composición química-, entre los cuales han adquirido gran importancia los nanotubos de carbono y los peptídicos (figura 1). Para los nanotubos de carbono, que se forman por descargas eléctricas sobre carbono grafito, ya se han encontrado diversas aplicaciones tecnológicas como, por ejemplo, puntas de aparatos de AFM (microscopio de fuerzas

6) Willians, D. H.; Westwell, M. "Aspects of weak interactions" *Chemical Society Reviews* **1998**, 27, 57-62.  
 7) Ejemplos sobre aplicaciones biotecnológicas de nanotubos: Martin, C. R.; Kohli, P. "The Emerging Field of Nanotube Biotechnology" *Nature Reviews* **2003**, 2, 29-37.

atómicas) o como microconductores.<sup>8</sup> Los nanotubos peptídicos se prepararon mediante procesos de autoensamblaje molecular a partir de ciclopéptidos sencillos.<sup>9</sup>

Hoy en día existen otros ejemplos de nanotubos orgánicos, unos obtenidos directamente de la naturaleza y otros a partir de un trabajo de diseño en el laboratorio. Las estructuras tubulares más destacadas preparadas últimamente son las formadas por ciclopéptidos<sup>10</sup>, ciclodextrinas,<sup>11</sup> oligofenilacetilenos,<sup>12</sup> lípidos,<sup>13</sup> etc. También existen numerosos ejemplos de nanotubos inorgánicos.<sup>14</sup>

- 
- 8) Edelman, F. T. "Fullerene Pipes, Tube-in-tube Membranes, and Carbon-Nanotube Tips: Adding New Dimensions to Molecular Technology" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1381-1387.
  - 9) a) Brea, R., J.; Granja, J. R. "Self-Assembly of Cyclic Peptides in Hydrogen-Bonded Nanotubes". In *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*; Marcel Dekker Inc.; 2004, pp 3439-3457. b) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Organic Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988-1011.
  - 10) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. "Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture" *Nature* **1993**, *366*, 324-327.
  - 11) Harada, A.; Li, J. y Kamachi, M. "Synthesis of a tubular polymer from threaded cyclodextrins" *Nature* **1993**, *364*, 506-518.
  - 12) Moore, J. S. "Shape-Persistent Molecular Architecture of Nanoscale Dimension" *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 402-413.
  - 13) Schnur, J. M. "Lipid Tubules: A Paradigm for Molecularly Engineered Structures" *Science* **1993**, *262*, 1669-1676.
  - 14) Greta, R. P.; Krumeich, F.; Nesper, R. "Oxidic Nanotubes and Nanorods-Anisotropic Modules for a Future Nanotechnology" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2446-2461.

## 1.1. NANOTUBOS DE CARBONO

En 1991, Iijima<sup>15</sup> observó la formación de nanotubos de grafito al preparar fulerenos mediante la evaporación de carbono por descarga de un arco de corriente continua en atmósfera de argón a baja presión. En el extremo negativo del electrodo de grafito aparecían, además de las partículas esféricas esperadas, agujas de grafito con diámetros comprendidos entre 4 y 30 nm y longitudes mayores de 1  $\mu\text{m}$ . Dichas agujas se examinaron mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM), resultando estar compuestas cada una de ellas por varios tubos coaxiales (entre 2 y 50), cuyos extremos por lo general se encontraban cerrados (figura 2). La estructura de las capas se estudió mediante microscopía de difracción de electrones; observándose que cada tubo estaba constituido por una lámina de hexágonos de carbono enrollada de manera helicoidal (figura 2c). Además, la orientación de la lámina respecto al eje del cilindro era variable (figura 2d). En 1992, el mismo laboratorio propuso un modelo de crecimiento de estas estructuras que justificaba, entre otros hechos, el cierre de los extremos de los tubos como causa de la presencia de pentágonos y hexágonos (similares a los que hay en los fulerenos).<sup>16</sup>

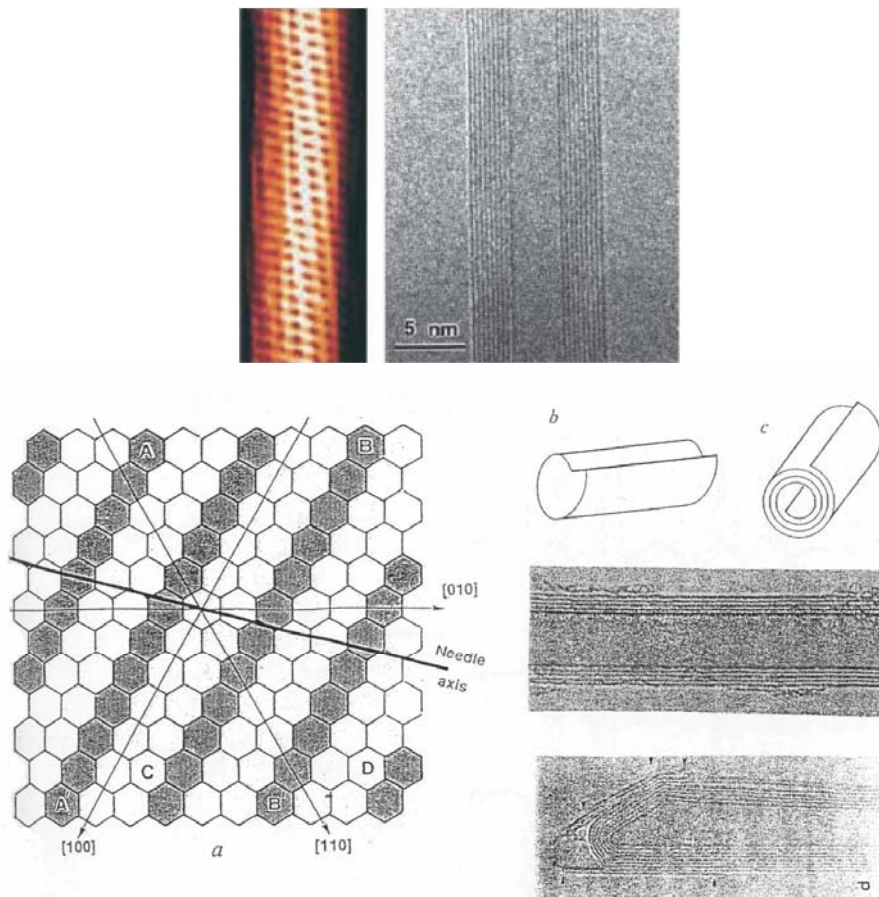


Figura 2: Superior: Imagen de microscopio de efecto túnel, mostrando una estructura helicoidal de 1,3 nm de diámetro de un nanotubo de carbono de una única pared (SWNT), e imagen de un microscopio electrónico (TEM) de un nanotubo de carbono. Inferior: Esquema que muestra la disposición helicoidal de un tubo de carbono, desenrollado para mayor claridad. Las líneas de hexágonos sombreados describen una hélice alrededor del eje.

15) Iijima, S. "Helical microtubules of graphitic carbon" *Nature*, **1991**, 354, 56-58.

16) Iijima, S.; Ajayan, P. M.; Ichihashi, T. "Growth model for carbon nanotubes" *Phys. Rev. Lett.*, **1992**, 69, 3100-3103.

En 1992, Pederson y Broughton dedujeron mediante cálculos semiempíricos que un determinado tubo de grafito era capaz de succionar dos moléculas de HF (nanocapilaridad),<sup>17</sup> y propusieron el uso de estas estructuras como contenedores más o menos selectivos (según las dimensiones de los cilindros) de distintas moléculas. Al año siguiente, Iijima y Ajayan consiguieron rellenar nanotubos de grafito con plomo gracias a la capilaridad de éstos;<sup>18</sup> posteriormente, incluso se obtuvieron metales monodimensionales en el interior de estos buckytubos.<sup>19</sup>

En estos últimos años se han desarrollado otras técnicas para la obtención de diferentes tipos de nanotubos.<sup>20</sup> Éstos se clasifican en dos grandes grupos atendiendo al número de capas que los forman: nanotubos de carbono formados por un solo nanotubo coaxial (SWNTs) y nanotubos de carbono formados por múltiples nanotubos coaxiales (MWNTs). El número de capas y su tipo condicionan las propiedades de los nanotubos, pudiéndose comportar como materiales conductores o aislantes.<sup>21</sup>

Lo más destacable de estos nanotubos son sus potenciales aplicaciones nanotecnológicas, como por ejemplo, en electrónica (componentes de circuitos electrónicos), fabricación de “nanocomposites” (esto es, fibrillas microscópicas formadas por un núcleo de metal recubierto de carbono), moldes para la obtención de alambres nanométricos, encapsulación de pequeñas cantidades de sustancia (para aislarla, bien de campos eléctricos, bien de la atmósfera), etc.<sup>6,22</sup>

- 
- 17) Pederson, M. R.; Broughton, J. Q. “Nanocapillarity in flurellene tubules” *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *69*, 2689-2692.
- 18) Ajayan, P. M.; Iijima, S. “Capillarity-induced filling of carbon nanotubes” *Nature*, **1993**, *361*, 333-334.
- 19) Guerret-Piecourt, C.; Le Bouar, Y.; Loiseau, A.; Pascard, H. “Relation between metal electronic structure and morphology of metal compounds inside carbon nanotubes” *Nature*, **1994**, *372*, 761-765.
- 20) Rao, C. N. R.; Govindaraj, A.; Gundiah, G.; Vivekchand, S. R. C. “Nanotubes and nanowires” *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 4665-4671.
- 21) a) Louie, S. G. “Electronic properties, junctions, and defects of carbon nanotubes” *Top. Appl. Phys.* **2001**, *80* (*Carbon nanotubes*), 113-145. b) Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. “Carbon Nanotubes-the Route Toward Applications” *Science* **2002**, *297*, 787-792.
- 6) Ejemplos sobre aplicaciones biotecnológicas de nanotubos: Martin, C. R.; Kohli, P. “The Emerging Field of Nanotube Biotechnology” *Nature Reviews* **2003**, *2*, 29-37.
- 22) a) Bachtold, A.; Hadley, P.; Nakanishi, T.; Dekker, C. “Logic Circuits with Carbon Nanotubes Transistors” *Science* **2001**, *294*, 1317-1320. b) Iijima, S. “Carbon nanotubes: past, present, and future” *Physica B*, **2002**, *323*, 1-5. Dalton, A. B.; Collins, Steve; Razal, J.; Munoz, E.; Ebron, V. H.; Kim, Bog G.; Coleman, Jonathan N.; Ferraris, John P.; Baughman, R. H. “Continuous carbon nanotube composite fibers: properties, potential applications, and problems” *Journal of Materials Chemistry* **2004**, *14*, 1-3.

## 1.2. NANOTUBOS INORGÁNICOS

El gran interés despertado por los nanotubos de carbono ha llevado al estudio y descubrimiento de otras clases de nanotubos dependiendo de los materiales empleados en su preparación. Los nanotubos inorgánicos<sup>23</sup> -compuestos por un elevado número de complejos inorgánicos, como sulfuros, óxidos, nitruros, etc.- son uno de los materiales más importantes dentro de este campo.<sup>24,25</sup>

En los últimos años se han encontrado múltiples óxidos capaces de formar nanotubos de un modo similar a como lo hacen los nanotubos de carbono.<sup>20</sup> Destacan entre éstos los óxidos de vanadio, de titanio y de silicio, aunque existe una gran variedad de otros óxidos metálicos capaces de formar estructuras tubulares.<sup>14,23</sup> Entre las aplicaciones desarrolladas para los mismos, destacan los intercambiadores de cationes.<sup>26</sup>

Existen materiales que se forman dando lugar a una estructura porosa con numerosos canales y cavidades, entre los que destacan las zeolitas, que dejan en su estructura canales con diámetros entre 4-10 Å,<sup>27</sup> y para las cuales se han descrito múltiples aplicaciones como catalizadores y como sistemas para la separación de compuestos en base a su tamaño.<sup>28</sup> En muchas de estas zeolitas no naturales, el tamaño del poro depende de las aminas, que actúan como moldes, y se emplean en el proceso de formación de las mismas. Las zeolitas son derivados de silicatos en los que se sustituye alguno de los silicios por átomos de aluminio, dando lugar a diversos tipos de canales, dependiendo del modo de preparación empleado, con diferentes propiedades (ácidas, básicas, etc.) dependiendo de la proporción de Al que se incorpora en la zeolitas.<sup>29</sup>

- 
- 23) Tremel, W. "Inorganic Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2175-2179.
- 24) a) Gautam, U., K.; Vivekchand, S. R. C.; Govindaraj, A.; Kulkarni, G., U.; Selvi, N., R.; and Rao, C., N., R. "Generation of Onions and Nanotubes of GaS and GaSe through Laser and Thermally Induced Exfoliation" *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3658-3659. b) Tenne, R. "Doped and heteroatom-containing fullerene-like structures and nanotubes" *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 965-972. Parilla, P. A.; Dillon, A. C.; Jones, K. M.; Riker, G.; Schulz, D. L; Ginley, D. S.; Heben, M. J. "The first true inorganic fullerenes?" *Nature*, **1999**, *397*, 114. c) Tenne, R. "Inorganic nanotubes and fullerene-like materials" *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5296-5304. d) Nath, M.; Rao, C. N. R. "inorganic nanotubes" *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2003**, *1*, 1-24.
- 25) Hacohen, Y. R.; Grunbaum, E.; Tenne, R.; Sloan, J.; Hutchison, J. L. "Cage structures and nanotubes of NiCl" *Nature* **1998**, *395*, 336-337.
- 20) Rao, C. N. R.; Govindaraj, A.; Gundiah, G.; Vivekchand, S. R. C. "Nanotubes and nanowires" *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 4665-4671.
- 14) Greta, R. P.; Krumeich, F.; Nesper, R. "Oxidic Nanotubes and Nanorods-Anisotropic Modules for a Future Nanotechnology" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2446-2461.
- 26) Como intercambiadores de cationes: Reinoso, J. M.; Muhr, H.-J.; Krumeich, F.; Bieri, F.; Nesper, R. "Controlled uptake and release of metal cations by vanadium oxide nanotubes" *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 1724-1733.
- 27) Meier, W. M., Olsen, D. H. *Atlas of Zeolite Structure Types*, 3rd rev. Ed., Butterworth-Heinemann, Boston, 1992. Ver también <http://www.iza-sc.ethz.ch/IZA-SC/AtlasHome.html>
- 28) Corma, A. "From Microporous to Mesoporous Molecular Sieve Materials and Their Use in Catalysis" *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2373-2419.
- 29) Bein, T. "Synthesis and Applications of Molecular Sieve Layers and Membranes" *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 1636-1653. Ramamurthy, V.; Eaton, D. F. "Perspectives on Solid-State Host-Guest Assemblies" *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1128-1136. Ozin, G. A.; Kuperman, A.; Stein, A. "Advanced zeolite materials science" *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 373.

### 1.3. NANOTUBOS ORGÁNICOS

La formación de nanoestructuras se basa en muchos casos en el establecimiento de interacciones débiles reversibles a partir de unidades más sencillas, siendo el objetivo actual en esta rama el desarrollo de agregados moleculares que puedan desempeñar funciones específicas en base a su estructura tridimensional.<sup>2,3,9</sup> La naturaleza ha sido en muchas ocasiones una fuente de inspiración para la preparación de los nanotubos, ya que ésta forma sus estructuras funcionales a partir de subunidades relativamente sencillas. Los nanotubos son estructuras especialmente importantes por la gran variedad de las aplicaciones propuestas para ellos. No es sorprendente, por tanto que en los últimos años se desarrollasen métodos altamente eficientes para la obtención de estas estructuras, con elevados rendimientos y un mayor o menor control del diámetro interno y de su longitud. Muchas de estas estrategias se han desarrollado imitando los modelos biológicos, aunque en otros casos se han propuesto alternativas altamente novedosas. Dentro de estos modelos, figuran los métodos que tratan de construir canales a partir de moléculas lineales que se pliegan, dando lugar a hélices (helicatos) (figura 3 b). Otra alternativa emplea moléculas rígidas que actúan a modo de listones que se agrupan en torno a un orificio (figura 3 c). Una tercera estrategia consiste en la utilización de moléculas con forma sectorial, que se asocian en rosetas y que posteriormente se apilan o se enrollan formando una superestructura tubular (figura 3 d). Finalmente, la estrategia más reciente consiste en utilizar moléculas cíclicas que se pueden apilar formando nanotubos (figura 3 e).

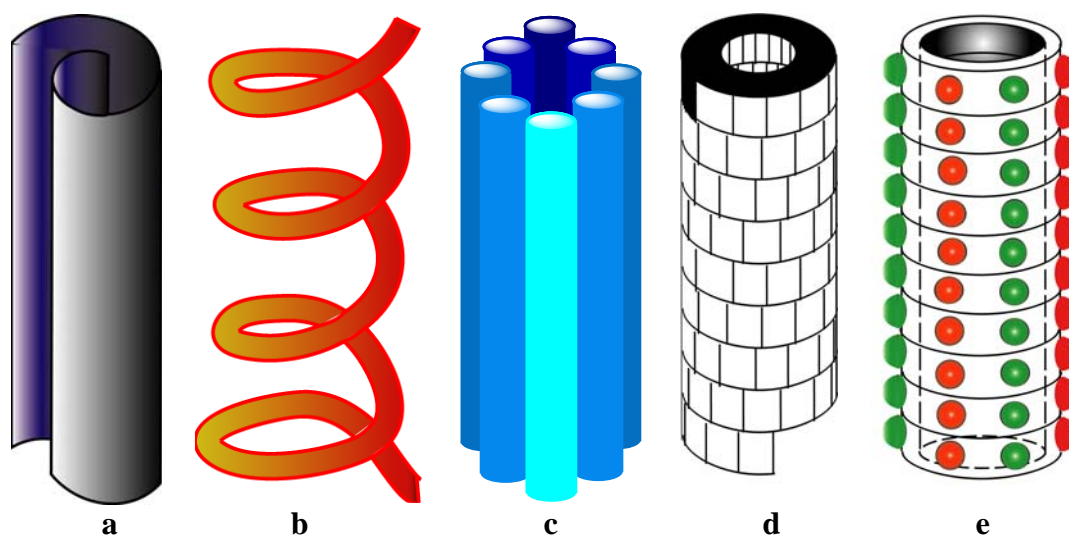


Figura 3: a) Modelo de plegamiento de una lámina de modo similar a como lo hacen los nanotubos de carbono. b) Modelo de nanotubo helicoidal en el que una molécula lineal se pliega formando una hélice que deja un orificio a lo largo del eje de la misma. c) Modelo de nanotubo basado en el autoensamblaje de moléculas rígidas. d) Modelo de formación de nanotubos mediante la asociación de moléculas con forma sectorial (cuña). e) Modelo de apilamiento de moléculas cíclicas para dar lugar a nanotubos.

- 2) Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Setho, C. T. "Molecular Self-Assembly and Nanochemistry: A Chemical Strategy for the Synthesis of Nanostructures" *Science*, **1991**, 254, 1312-1319.
- 3) Para una visión general de la importancia de la química supramolecular y de los procesos de autoensamblaje: *Science* **2002**, 295, 2395-2421 y *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 4762-5188.
- 9) a) Brea, R., J.; Granja, J. R. "Self-Assembly of Cyclic Peptides in Hydrogen-Bonded Nanotubes". In *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*; Marcel Dekker Inc.; 2004, pp 3439-3457. b) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Organic Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 988-1011.

### 1.3.1. ESTRUCTURAS HELICOIDALES QUE FORMAN UN CANAL CENTRAL

En la naturaleza existen numerosos ejemplos de estructuras que, una vez sintetizadas, se pliegan para dar lugar a distintos tipos de hélices. Algunas de ellas dejan un poro central lo suficientemente grande como para ser canales activos en diversas aplicaciones biológicas, principalmente en el transporte activo de iones y moléculas.<sup>30</sup> La gramicidina A es un péptido de 18 Aa en el que se alternan aminoácidos de configuración *L* y *D* y que posee propiedades antibióticas. Su modo de acción se debe a la formación de conductos en las membranas celulares que facilitan el paso de iones e impiden el balance iónico de la célula. Este conducto está formado por dos subunidades con forma helicoidal que se unen conectando el interior con el exterior de la membrana. La disposición de las cadenas laterales, apolares todas ellas, hacia el exterior del conducto facilita la inserción en las membranas lipídicas, mientras que el interior de la hélice, cuyo orificio es de 2,5 Å de diámetro, tiene un carácter hidrofílico que posibilita el tránsito de los cationes alcalinos de menor tamaño.<sup>31</sup> En los últimos años se han realizado múltiples estudios para entender su mecanismo de transporte y tratar de regular su actividad biológica.<sup>32</sup>

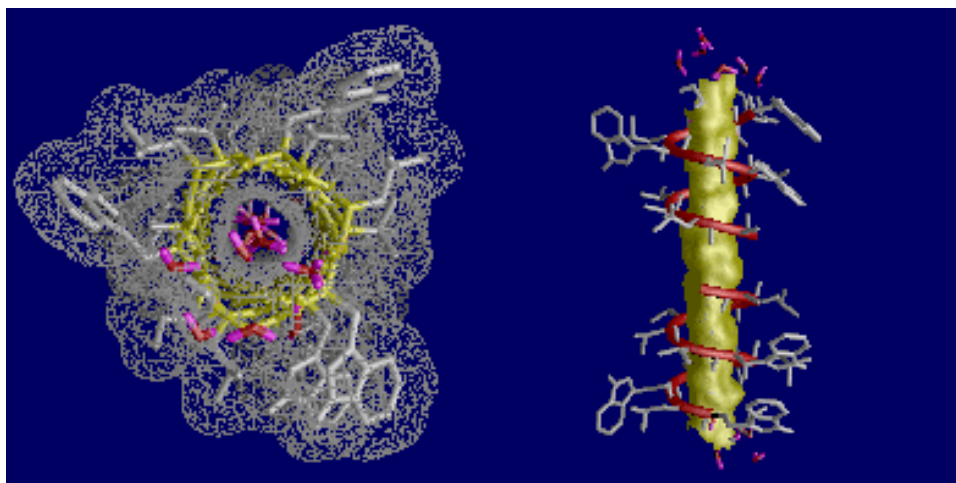


Figura 4: Gramacidina A, hélice  $\beta$  formada por dos subunidades.

Utilizando este modelo helicoidal, los químicos han sintetizado otras estructuras en el laboratorio que forman heli-catos que dejan un canal central, siendo uno de los ejemplos más significativos los “1,3-oligofenilacetilenos” preparados por Moore y colaboradores. Estos oligómeros, debido a su rigidez y a la meta sustitución de los anillos, se pliegan para dar lugar a una hélice que deja un orificio en su interior

- 
- 30) Bayley, H.; Martin, C. R. “Resistive-Pulse Sensing-From Microbes to Molecules” *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2575-2594.
- 31) a) Weinstein, S.; Wallace, B. A.; Blout, E. R.; Morrow, J. S.; Veatch, W. “Conformation of gramicin A channel in phospholipic vesicles: A carbon C-13 and fluorine-19 nuclear magnetic resonance study” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1979**, *76*, 4230-4234. b) Ketchum, R. R.; Hu, W.; Cross, T. A. “High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR” *Science*, **1993**, *261*, 1457-1460.
- 32) a) Loughed, T.; Borisenko, V.; Hennig, T.; Rück-Braun, K.; Woolley, G. A. “Photomodulation of ionic current through hemithioindigommodified gramicidin channels” *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2798-2801. b) Lien, L.; Jaikaran, D. C. J.; Zhang, Z.; Woolley, G. A. “Photomodulated Blocking of Gramicidin Ion Channels” *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12222-12223.

(figuras 5 y 6).<sup>12,33</sup> Las propiedades interiores y exteriores de estos canales se pueden modular según los grupos funcionales presentes en el C2 (X) y en el C5 (R<sub>1</sub>) del fenilo (figura 5). Modificando el C2 podemos cambiar las propiedades internas del canal y hacerlos más o menos selectivos al transporte o encapsulación de diferentes moléculas; mientras que la modificación del grupo funcional en C5 permite modular las propiedades del exterior de la estructura (figura 5). De esta forma, la hélice formada por 1,3-fenilacetilenos es capaz de encapsular etilen glicol<sup>34</sup> y binaptol.<sup>35</sup> El sentido de giro de la hélice se puede modificar al añadir moléculas quirales que al ser encapsuladas en el orificio del tubo determinan el sentido del giro. Así, cuando se añade (+)- $\alpha$ -pineno o (-)- $\alpha$ -pineno, el espectro de CD es diferente según el enantiómero presente, lo que implica una interacción entre el interior del oligofenilacetileno y el pineno.<sup>36</sup>

Cuando estos oligofenilacetilenos poseen un grupo ciano en el carbono 2 (X = CN) y son tratados con sales de plata dan lugar a un complejo en relación 2:1 (Ag:oligómero) donde los doce fenilenos (6 de ellos poseen el grupo CN) dejan una cavidad aproximada de 4 Å en la que se encuentran los dos iones Ag<sup>+</sup>.<sup>37</sup>

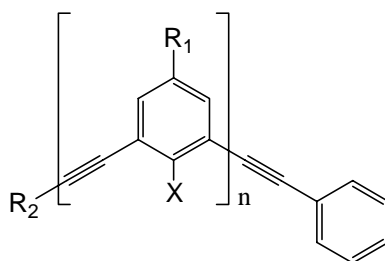


Figura 5: Estructura de los polifenilenos.

- 
- 12) Moore, J. S. "Shape-persistent molecular architecture of nanoscale dimension" *Acc. Chem.* **1997**, *30*, 402-413.
- 33) Nelson, J. C.; Saven, J. G.; Moore, J. S.; Wolynes, P. G. "Solvophobic driven folding of nonbiological oligomers" *Science* **1997**, *277*, 1793-1796.
- 34) a) Prince, R. B.; Brunsveld, L.; Meijer, E. W.; Moore, J. S. "Twist Sence Bias Induced by Chiral Side Chains in Helically Folded Oligomers" *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 234-236; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 228-230.
- 35) Gin, M. S.; Yokozawa, T.; Prince, R. B.; Moore, J. S. "Helical Bias in Solvophobiclly Folded Oligo(Phenylene Ethynylene)s" *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2643-2644.
- 36) Prince, R. B.; Barnes, S. A.; Moore, J. S. "Foldamer-Based Molecular Recognition" *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2758-2762.
- 37) Prince, R. B.; Okada, T.; Moore, J. S. "Controlling the Secondary Structure of Nonbiological Oligomers with Solvophobic and Coordination Interactions" *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 245-249; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 233-236.

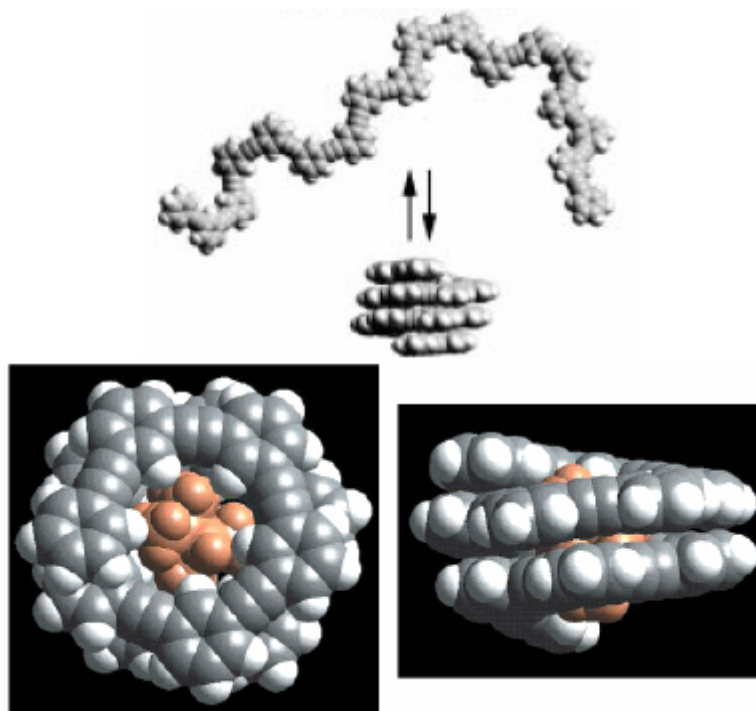


Figura 6: Oligofenilacilenos en equilibrio entre la forma extendida y la plegada con forma helicoidal. Sus propiedades dependen de los sustituyentes orientados hacia el exterior del canal y de los sustituyentes orientados hacia el interior del canal.

De modo similar, las oligopiridinas, unidas mediante uniones amida, también se pliegan de forma parecida a los fenilacilenos. Es importante destacar que la presencia del N de la piridina permite encapsular diferentes disolventes en su interior (figura 7).<sup>38</sup>

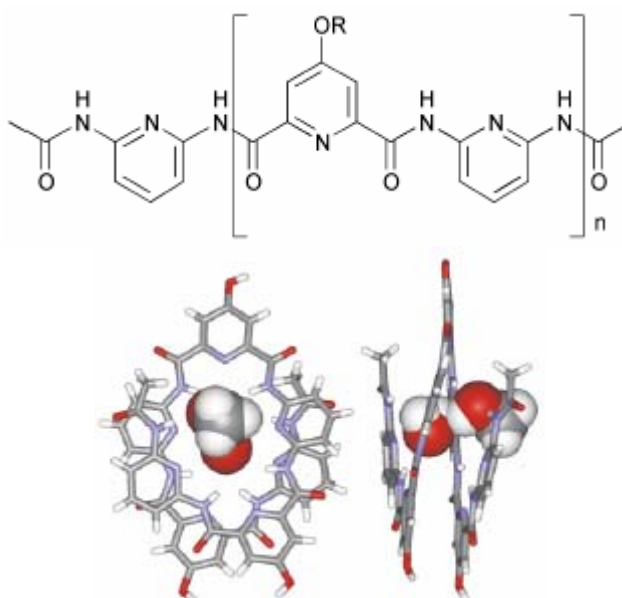


Figura 7: Oligopiridinas dicarboxiamidas formando foldámeros.<sup>38</sup>

38) Huc, I.; Maurizot, V.; Gornitzka, H.; Leger, J.-M. "Hydroxy-substituted oligopyridine dicarboxamide helical foldamers" *Chem. Commun.* **2002**, 6, 578-579.

### 1.3.2. UNIDADES QUE SE ENSAMBLAN DEJANDO UN ORIFICIO CENTRAL

En este diseño se emplean moléculas más o menos rígidas que se comportan como “listones” que se autoensamblan entre sí a modo de un “barril molecular”. Esta es una de las estrategias más recurridas por la naturaleza para la formación de canales, en la que los “listones” del “barril molecular” son hojas plegadas  $\beta$  o  $\alpha$ -hélices de carácter anfipático, en las que el orificio central posee propiedades hidrofílicas, mientras que hacia el exterior queda orientada la parte más lipófila de estas moléculas que estarán en contacto con las membranas celulares. Un ejemplo de este tipo de proteínas es la hemolisina,<sup>39</sup> una toxina bacteriana formada por siete subunidades idénticas que se autoensamblan en contacto con las membranas celulares, dando lugar a una estructura con forma de seta cuyo tronco, formado por un barril  $\beta$ , se inserta en las membranas celulares formando un conducto de 13 Å en su parte más estrecha, por el que pueden transitar iones y otras moléculas. Otros ejemplos naturales basados en este modelo, pero utilizando hélices  $\alpha$  en vez de hojas  $\beta$ , son: la toxina del cólera,<sup>40</sup> los canales de potasio,<sup>41</sup> las porinas<sup>42</sup> o las acuoporinas. Estas últimas son proteínas con estructura de  $\alpha$ -hélices que poseen seis dominios que se agrupan dejando un canal central que permite el transporte de H<sub>2</sub>O mediante ósmosis.<sup>43</sup> Una proteína similar formada por tres dominios y que consta de 11  $\alpha$ -hélices que se ordenan siguiendo este mismo diseño es la AmtB, que pertenece a la familia de las Amt/MEP/Rh, y es capaz de transportar NH<sub>3</sub>.<sup>44</sup> Son de destacar los estudios pioneros realizados por Mauricio Montal<sup>45</sup> en San Diego con distintos péptidos helicoidales para establecer las bases moleculares del transporte transmembranoso de iones.

- 
- 39) Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E. “Structure of Staphylococcal  $\alpha$ -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore” *Science* **1996**, *274*, 1859-1866.
- 40) Merritt, E. A.; Sarfaty, S.; Van den Akker, F.; L’Hoir, C.; Martial, J. A.; Hol, W. G. J. “Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide” *Protein science* **1994**, *3*, 166-175.
- 41) Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. “The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity” *Science* **1998**, *280*, 69-77.
- 42) a) Schirmer, T.; Keller, T. A.; Wang, Y.-F.; Rosenbusch, J. P. “Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution” *Science* **1995**, *267*, 512-514. b) Cowan, S. W.; Schirmer, T.; Rummel, G.; Steiert, M.; Ghosh, R.; Pauptit, R. A.; Jansonius, J. N.; Rosenbusch, J. P. “Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins” *Nature* **1992**, *358*, 727-733. c) Weiss, M. S.; Schultz, G. E. “Structure of porin refined at 1.8 Å resolution” *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 493-509.
- 43) Agre, P. “Aquaporin Water Channels (Nobel Lectura)” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4278-4290.
- 44) Khademi, S.; O’Connell III, J.; Remis, J.; Robles-Colmenares, Y.; Miercke, L. J. W.; Stroud, R. M. “Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å” *Science* **2004**, *305*, 1587-1594.
- 45) a) Montal, M. “Protein folds in channel structure” *Current Opinion in Structure Biology* **1996**, *6*, 499-510. b) Montal, M.; Opella, S. J. “The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor” *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, *1565*, 287-293.

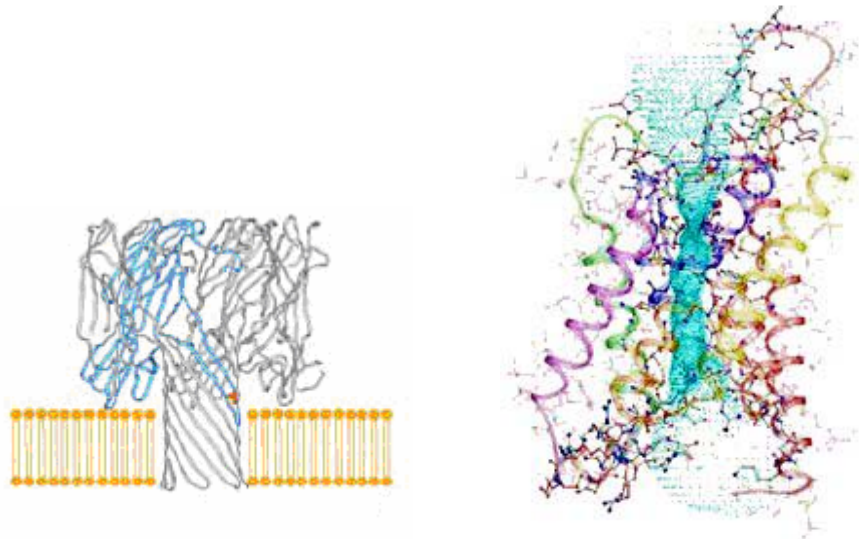


Figura 8: Izquierda:  $\alpha$ -hemolisina en una membrana lipídica. Derecha: Acuoporina.

Otro ejemplo natural de la formación de canales mediante esta estrategia aunque no de tipo proteico, es el caso de la anfotericina. Se trata de un macrociclo poliénico polihidroxilado que se asocia con una molécula de ergosterol para dar un dímero; y a su vez, estos dímeros se asocian entre sí para dar una supramolécula compuesta por ocho unidades de anfotericina y ergosterol (figura 9). Dos de estos octámeros permiten la generación de un canal entre los dos lados de una membrana lipídica, que es la base del mecanismo de acción de este agente antimicrobiano. Dado que el ergosterol no está presente en células animales, la anfotericina (a pesar de su alta toxicidad) se ha convertido en uno de los últimos recursos hospitalarios para el tratamiento de infecciones sistémicas de hongos como por ejemplo el aspergillus.

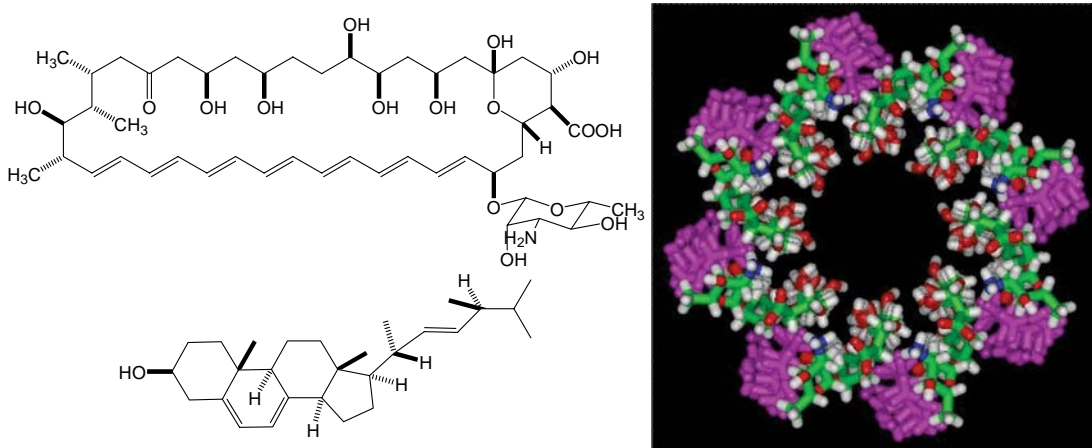


Figura 9: Izquierda superior: Anfocetaracina. Izquierda inferior: Ergosterol. Derecha: Anfotericina y ergosterol, que se asocian para dar canales al juntarse con otra unidad equivalente.

Este modelo de formación de nanotubos ha inspirado a un gran número de químicos en el desarrollo de estrategias eficientes para la obtención de estructuras tubulares. Un ejemplo interesante lo constituyen los trabajos de Matile y colaboradores con polibisfenoles, que en membranas lipídicas se autoensamblan unos con otros dejando entre ellos un canal central, lo que da lugar a nanotubos capaces de transportar

iones u otras moléculas (figura 10).<sup>46</sup> De cada fenilo cuelga una cadena peptídica con un número variable de Aa (3-5); las repulsiones entre los péptidos determinan que los fenilos se orienten dejando espacio para intercalar otra cadena peptídica del siguiente oligo. La formación de estas hojas plegadas  $\beta$  conduce finalmente al “barril molecular” mediante la asociación de 4 a 6 unidades de oligofenoles. Adicionalmente, las cadenas laterales de los péptidos se disponen proyectándose hacia el interior y el exterior del nanotubo de forma alterna, de tal forma que se pueden modular las propiedades internas y externas del canal. Gracias a este especial diseño, el grupo de Matile ha centrado su trabajo en el desarrollo de sistemas de transporte,<sup>47</sup> biosensores,<sup>48</sup> sistemas catalíticos,<sup>49</sup> etc.<sup>46</sup>

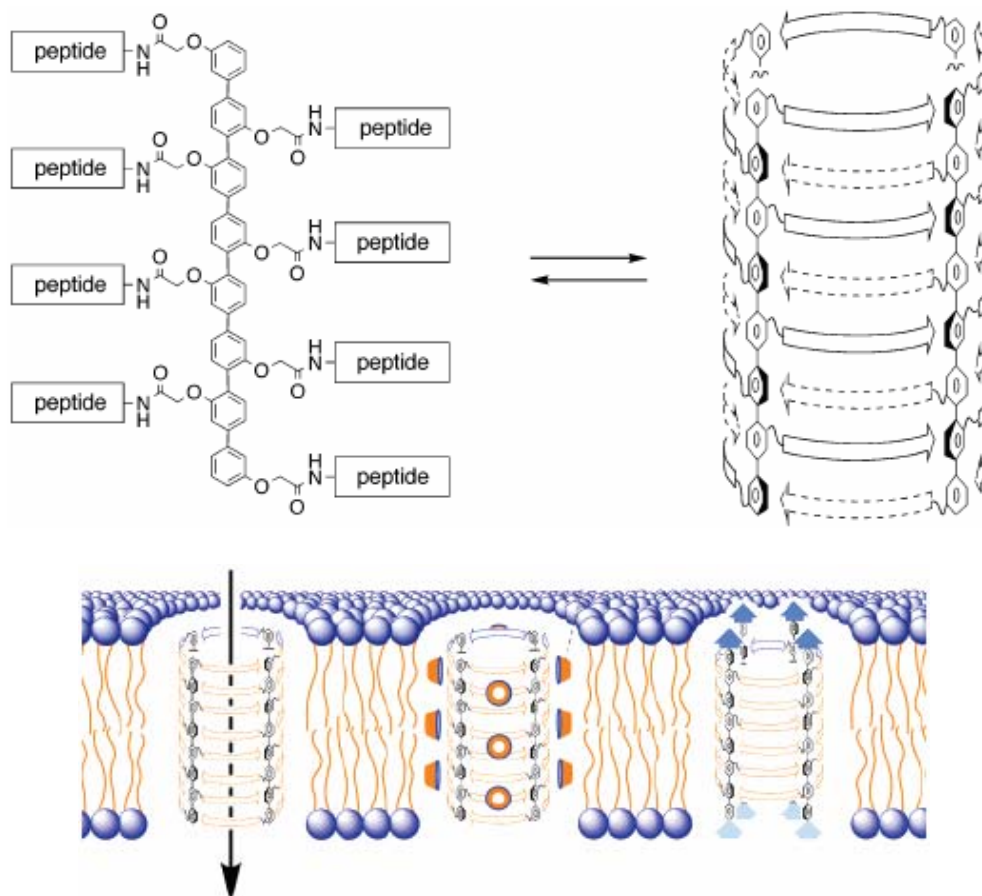


Figura 10: Superior: Oligobisfenoles utilizados en la síntesis de los barriles beta y modelo de uno de estos nanotubos formados, en el que las distintas cadenas polipeptídicas se representan mediante una flecha. Inferior: Distintos modelos de nanotubos en membranas lipídicas preparados por el grupo de Matile.

- 46) Sakai, N.; Mareda, J.; Matile, S. “Rigid-Rod Molecules in Biomembrane Models: From Hydrogen-Bonded Chains to Synthetic Multifunctional Pores” *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 79-87.
- 47) a) Sakai, N.; Matile, S. “Synthetic multifunctional pores: lessons from rigid-rod  $\beta$ -barrels” *Chem. Comm.* **2003**, *20*, 2514-2523. b) Talukdar, P.; Bollot, G.; Mareda, J.; Sakai, N.; Matile, S. “Synthetic Ion Channels with Rigid-Rod  $\pi$ -Stack Architecture that Open in Response to Charge-Transfer Complex Formation” *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6528-6529.
- 48) Das, G.; Talukdar, P.; Matile, S. “Fluorometric Detection of Enzyme Activity with Synthetic Supramolecular Pores” *Science* **2002**, *298*, 1600-1602.
- 49) Litvinchuk, S.; Bollot, G.; Mareda, J.; Som, A.; Ronan, D.; Shah, M. R.; Perrottet, P.; Sakai, N.; Matile, S. “Thermodynamic and Kinetic Stability of Synthetic Multifunctional Rigid-Rod  $\beta$ -Barrel Pores: Evidence for Supramolecular Catalysis” *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10067-10075.

Otro de estos ejemplos utiliza la química de coordinación como base del autoensamblaje molecular de unidades rígidas de oligo(3,5-piridinas) que, al coordinarse con Pd (II), dan lugar a una estructura con forma de prisma hueco; la longitud del canal depende del número de piridinas del oligo, mientras que el tamaño del conducto viene determinado por la tendencia del Pd a adoptar, cuando está unida a la 1,2-etanodiamina, ángulos de 90° entre las dos piridinas a las que se coordina (figura 11).<sup>50</sup>

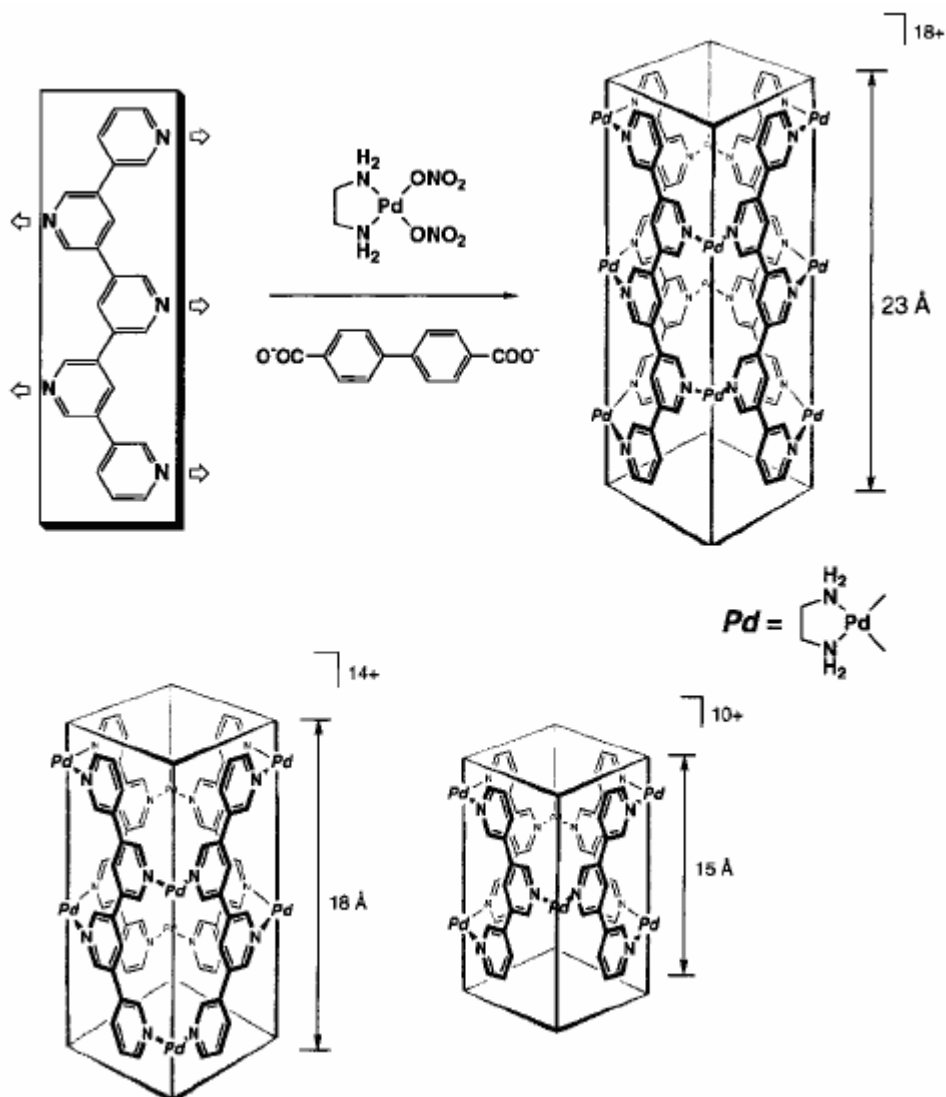


Figura 11: Oligo(3,5-piridina)s de diferente tamaño que se coordinan a Pd (II).

50) a) Aoyagi, M.; Biradha, K.; Fujita, M.; "Quantitative Formation of Coordination nanotubes Templated by Rodlike Guest" *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7457-7458. b) Aoyagi, M.; Tashiro, S.; Tominaga, M.; Biradha, K.; Fujita, M. "Spectroscopic and crystallographic studies on the stability of self-assembled coordination nanotubes" *Chem. Comm.* **2002**, *18*, 2036-2037.

### 1.3.3. SECCIONES DE UN DISCO QUE SE ENSAMBLAN EN TORNO A UN EJE CENTRAL DEJANDO UN CANAL INTERNO

Este tercer modelo se basa en la construcción de estructuras tubulares a partir de moléculas capaces de asociarse formando rosetas, que posteriormente propaguen su crecimiento a lo largo del eje perpendicular a dicha roseta. Uno de los ejemplos más espectaculares es la cápside del virus del mosaico del tabaco (TMV), que está compuesto por 2130 subunidades proteicas idénticas que se enrollan sobre una molécula de ARN formada por 6400 residuos nucleotídicos. El proceso de formación es tan favorable que, en condiciones fisiológicas, las unidades básicas se autoensamblan para recomponer un virus que posee intacta su capacidad infectiva (figura 12). El autoensamblaje está íntimamente ligado a la idea del reconocimiento molecular, ya que el reconocimiento de las subunidades guía la construcción de la supramolécula. Las unidades de proteína TMV se ensamblan a gran escala con la ayuda del ARN que actúa como guía del proceso.

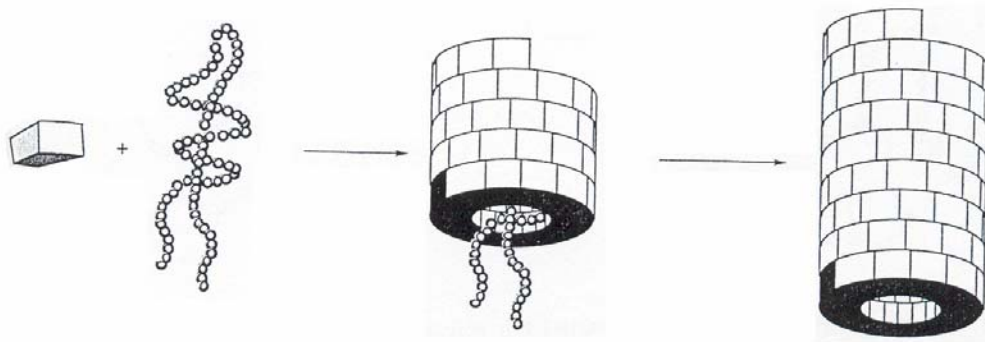


Figura 12: Esquema de un proceso de autoensamblaje del virus del mosaico del tabaco, en el que 2130 subunidades se van ensamblando en torno a un eje central (cadena de ARN) para dar lugar a las partículas de virus con dimensiones de 300 nm de longitud.

Los nanotubos de fosfolípidos<sup>13,51</sup> han merecido especial atención, pues constituyen otro ejemplo de formación de nanotubos a partir de componentes naturales, dando lugar a la encapsulación de diversos compuestos.<sup>52</sup> Dependiendo de las condiciones y disolventes empleados, las cadenas polares pueden orientarse hacia el exterior mientras que las cadenas apolares quedan dispuestas en el interior o viceversa. La formación de estos nanotubos es facilitada por las interacciones hidrófobas entre cadenas y por la forma cónica de los fosfolípidos.

13) Schnur, J. M. "Lipid Tubules: A Paradigm for Molecularly Engineered Structures" *Science* **1993**, 262, 1669-1676.

51) a) Masuda, M.; Shimizu, T. "Lipid Nanotubes and Microtubes: Experimental Evidence for Unsymmetrical Monolayer Membrane Formation from Unsymmetrical Bolaamphiphiles" *Langmuir* **2004**, 20, 5969-5977. b) Dang, T. X.; Farah, S. J.; Gast, A.; Robertson, C.; Carragher, B.; Egelman, E.; Wilson-Kubalek, E. M. "Helical crystallization on lipid nanotubes: Streptavidin as a model protein" *J. Struct. Biol.* **2005**, 150, 90-99.

52) Yang, B.; Kamiya, S.; Shimizu, Y.; Koshizaki, N.; Shimizu, T. "Glycolipid Nanotube Hollow Cylinders as Substrates: Fabrication of One-Dimensional Metallic-Organic Nanocomposites and Metal Nanowires" *Chem. Mater.* **2004**, 16, 2826-2831.

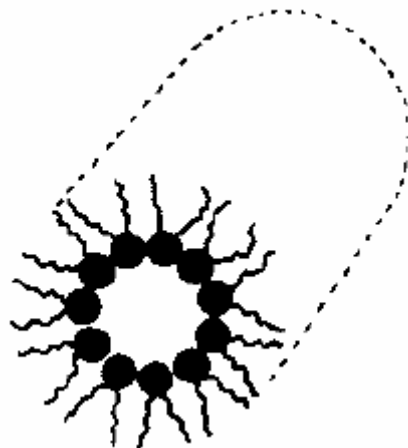


Figura 13: Modelo de nanotubo formado por un lípido, quedando las cabezas polares hacia el interior y las cadenas apolares hacia el exterior, dejando un hueco que depende de las características de las moléculas.

Basándose en este modelo, Percec y colaboradores han desarrollado moléculas anfipáticas con forma de cuña que poseen, al igual que los fosfolípidos, una cadena o grupo polar en un extremo del benceno mientras que en las posiciones 3, 4 y 5 se disponen tres cadenas alquílicas. Estas moléculas se agrupan de forma hexagonal quedando los grupos hidrofílicos hacia el interior y los hidrofóbicos hacia el exterior, formando una columna hexagonal que deja un canal interno (figura 14).<sup>53</sup>

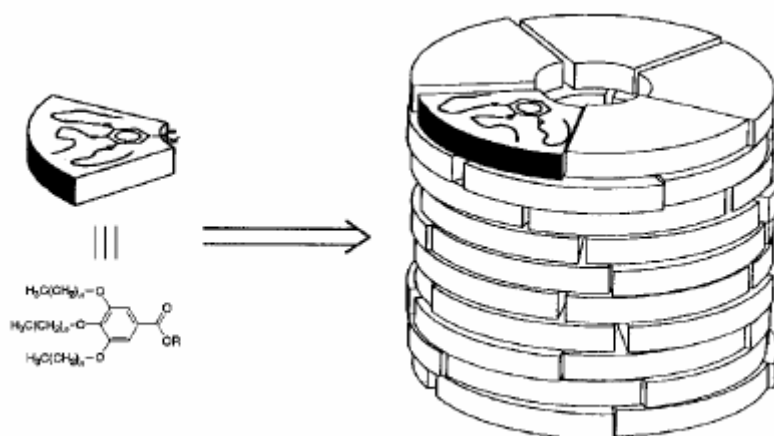


Figura 14: Esquema del proceso de autoensamblaje de moléculas anfipáticas con forma de cuña desarrolladas por el grupo de Percec.

Estas estructuras se autoorganizan originando cristales líquidos. De esta forma la utilización de cadenas alquílicas adecuadamente funcionalizadas permite su

53) a) Percec, V.; Johansson, G.; Ungar, G.; Zhou, J. "Fluorophobic Effect Induces the Self-Assembly of Semifluorinated Tapered Monodendrons Containing Crown Ethers into Supramolecular Columnar Dendrimers Which Exhibit a Homeotropic Hexagonal Columnar Liquid Crystalline Phase" *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9855-9866. b) Percec, V.; Ahn, C.-H.; Bera, T. K.; Ungar, G.; Yeardley, D. J. P. "Coassembly of a Hexagonal Columnar Liquid Crystalline Superlattice from Polymer(s) Coated with a Three-Cylindrical Bundle Supramolecular Dendrimer" *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1070-1083.

polimerización, dando lugar a materiales rígidos y porosos que consolidan la estructura tubular a lo largo de todo el sistema (figura 15).<sup>54</sup>

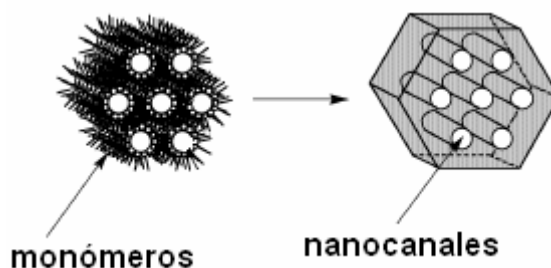


Figura 15: Modelos de nanotubos derivados de 3,4,5-trihidroxibenzoico formando cristales líquidos y posterior polimerización dando lugar a estructuras porosas rígidas.

De modo similar a como vimos en los trabajos de Percec, las rosetas desarrolladas por el grupo de Fenniri se autoensamblan en torno a un eje central (figura 16),<sup>55</sup> formando anillos de seis miembros, gracias a la formación de tres puentes de hidrógeno entre cada subunidad.

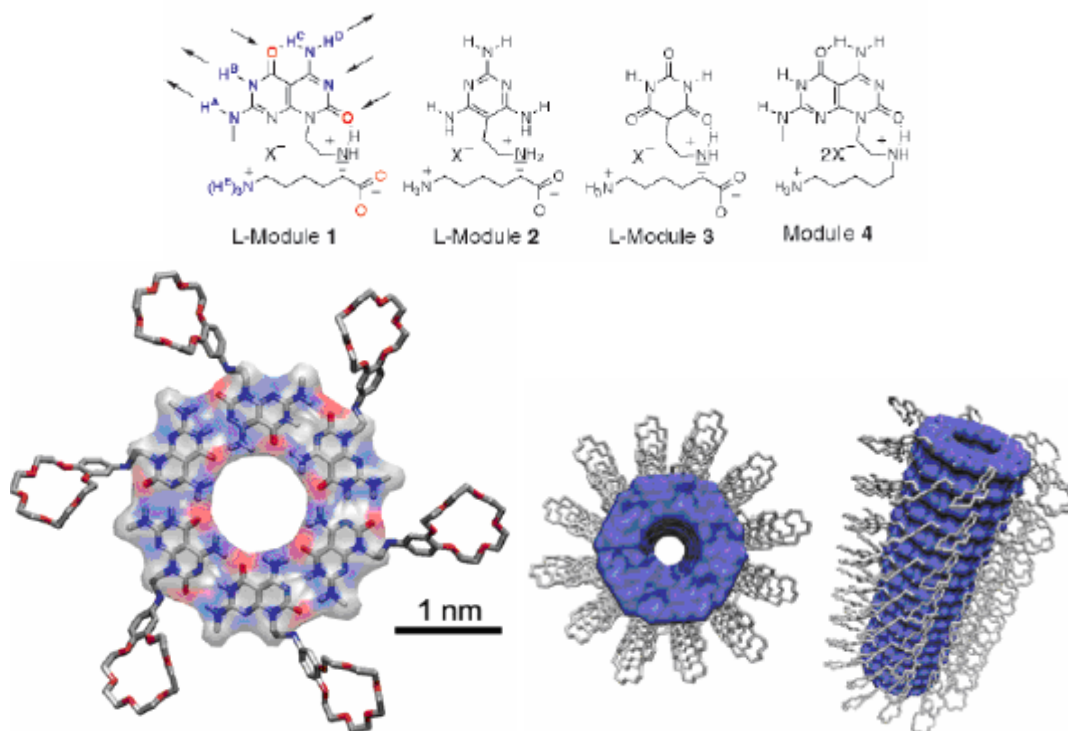


Figura 16: Superior: Diseño de diversas moléculas que dan lugar a rosetas. Inferior: Esquema del autoensamblaje de las rosetas desarrolladas por el grupo de Fenniri, en el que además del orificio interno, el nanotubo está decorado en su parte externa con éteres corona que permiten coordinar  $\text{Na}^+$ .

- 54) a) Ungar, G.; Liu, Y.; Zeng, X.; Percec, V.; Cho, W.-D. "Giant Supramolecular Liquid Crystal Lattice" *Science* **2003**, 299, 1208-1211. b) Zeng, X.; Ungar, G.; Liu, Y.; Percec, V.; Dulcey, A. E.; Hobbs, J. K. "Supramolecular dendritic liquid quasicrystals" *Nature* **2004**, 428, 157-160.
- 55) a) Fennini, H.; Mathivanan, P.; Vidale, K. L.; Sherman, D. M.; Hallenga, K.; Wood, K. V.; Stowell, J. G. "Helical Rosette Nanotubes: Design, Self-Assembly, and Characterization" *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3854-3855. b) Fenniri, H.; Deng, B.-L.; Ribbe, A. E. "Helical Rosette Nanotubes with Tunable Chiroptical Properties" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11064-11072. c) Moralez, J. G.; Raez, J.; Yamazaki, T.; Motkuri, K. "Helical Rosette Nanotubes with Tunable Stability and Hierarchy" *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8307-8309.

Otras moléculas que se ensamblan siguiendo este modelo lo constituyen los calixarenos. Atwood y colaboradores han sintetizado *p*-sulfonatocalix[4]areno que se autoensamblan dando lugar a nanotubos, gracias a la adición de N-óxidos de piridina, y que se coordinan con iones  $\text{Na}^+$  de los sulfatos.<sup>56</sup> El grupo de Kim también ha empleado calixarenos en la formación de sus nanotubos, que han sido usados como moldes para la formación de nanohilos de plata. Las subunidades de calix[4]hidroquinonas se van autoensamblando a modo de rosetas, gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos. El bajo potencial de oxidación de las hidroquinonas se emplea para inducir la formación de hilos metálicos de Ag de 0,4 nm de diámetro cuando los nanotubos se ponen en presencia de sales de plata (figura 18).<sup>57</sup>

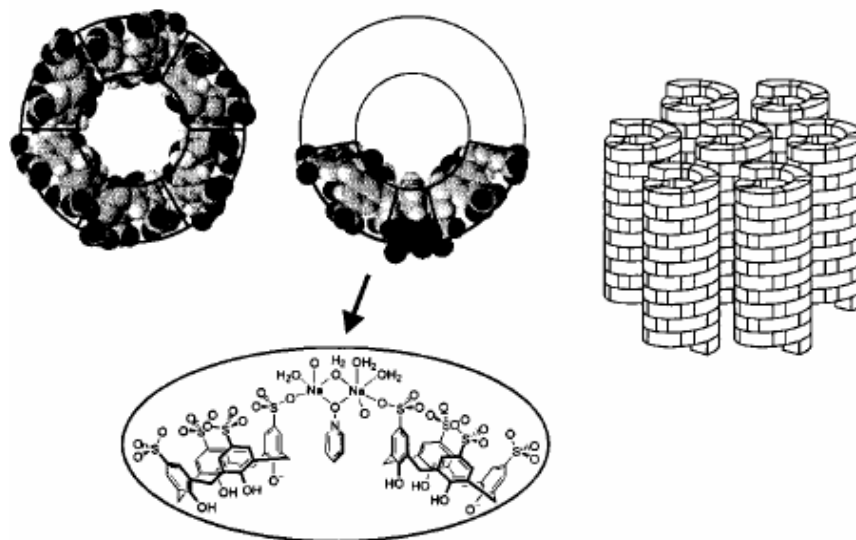


Figura 17: Nanotubos formados por calixarenos logrados en el grupo de Atwood.<sup>56</sup>

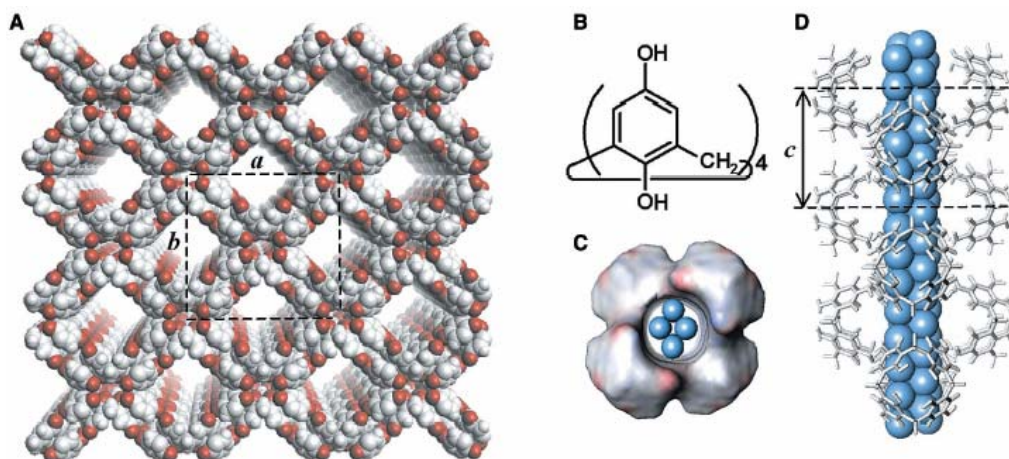


Figura 18: **A:** Visión de los nanotubos de calix[4]hidroquinonas en base a los datos de rayos X. **B:** Estructura de calix[4]hidroquinonas. **C** y **D:** Visión superior y lateral de los nanohilos de Ag y su envoltorio orgánico formado por las calix[4]hidroquinonas.<sup>57</sup>

56) Orr, G. W.; Barbour, L. J.; Atwood, J. L. "Controlling Molecular Self-Organization: Formation of Nanometer-Scale Spheres and Tubules" *Science* **1999**, 285, 1049-1052.

57) a) Hong, B. H.; Bae, S. C.; Lee, C.-W.; Jeong, S.; Kim, K. S. "Ultrathin Single-Crystalline Silver Nanowire Arrays Formed in an Ambient Solution Phase" *Science* **2001**, 294, 348-351. b) Hong, B. H.; Lee, J. Y.; Lee, C.-W.; Kim, J. C.; Bae, S. C.; Kim, K. S. "Self-Assembled Arrays of Organic Nanotubes with Infinitely Long One-Dimensional H-Bond Chains" *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10748-10749.

Otro ejemplo sencillo lo conforman los trabajos con diversos péptidos hidrofóbicos, tales como: (Phe-Phe), (Leu-Phe), (Phe-Leu) y (Leu-Leu); que cristalizan dejando un canal hidrofílico formado por los NH y C=O; mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos quedan hacia el exterior de modo similar a los lípidos. El número de dipéptidos por vuelta en los nanotubos varía entre cuatro y seis unidades, siendo el diámetro de van der Waals del nanotubo de 10 Å.<sup>58</sup>

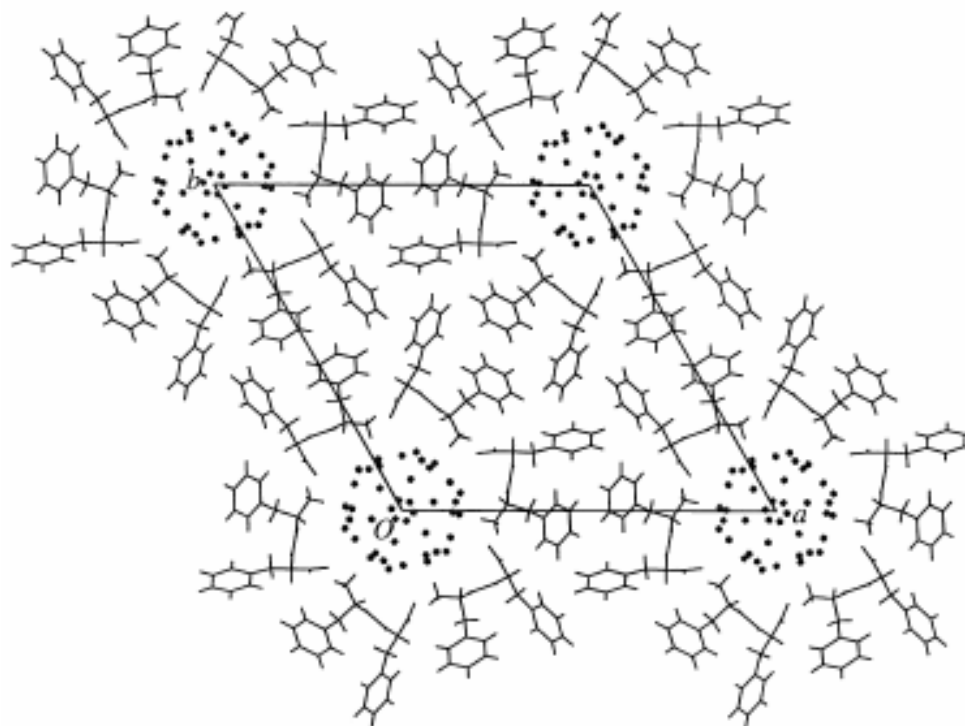


Figura 19: Estructura de dipéptidos Phe-Phe vista a lo largo del eje *c*. En el interior hay moléculas de agua representadas como esferas.

58) Gorbitz, C. H. "Nanotube Formation by Hydrophobic Dipeptides" *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5153-5159.

### 1.3.4. FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES A PARTIR DE MOLÉCULAS CON FORMA DE DISCO

La existencia de anillos que se autoensamblan dando lugar a canales, constituye el último diseño desarrollado para la construcción de nanotubos, cuyos únicos representantes hasta ahora son los generados en el laboratorio. Uno de los primeros ejemplos publicados se basaba en ciclodextrinas,<sup>11</sup> que se ensamblan mediante la combinación de los procesos de autoensamblaje molecular con uniones covalentes. Las ciclodextrinas se ensamblan a lo largo de un polietilenglicol para dar lugar a un rotaxano, y a continuación se hacen reaccionar los grupos hidroxílicos de las ciclodextrinas con cloroepidrina para formar uniones covalentes. Finalmente, se suprime el “hilo director” mediante la hidrólisis básica de los grupos dinitroanilina que actúan como “nudos”. En este caso, la química no covalente nos permite controlar el tamaño del nanotubo, ya que dicho tamaño depende de la longitud del oligómero del etilenglicol y una vez formado covalentemente ya no va a variar en sus dimensiones. De esta manera, su tamaño no depende del proceso aleatorio de autoensamblaje, además de formarse un nanotubo con una elevada estabilidad cinética.

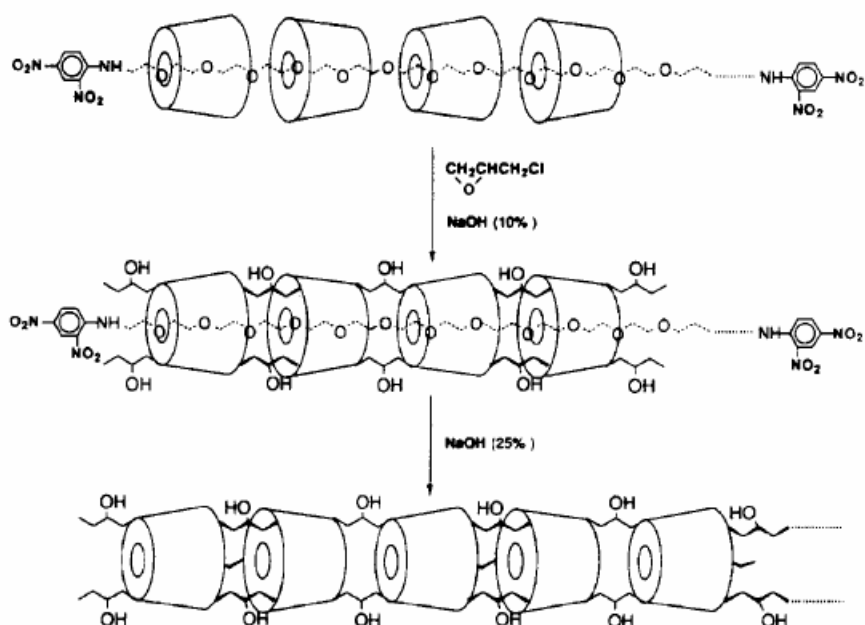


Figura 20: Proceso de formación de los nanotubos mediante la unión covalente de ciclodextrinas.

Los nanotubos peptídicos a partir de ciclopeptidos son, sin lugar a dudas, el diseño de este tipo que ha tenido un mayor desarrollo en los últimos años. Las distintas unidades ciclopeptídicas que forman el nanotubo están unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno a través de los grupos amida de su esqueleto peptídico. Por tanto, la formación del nanotubo se produce en las condiciones que favorecen el autoensamblaje molecular. El requisito fundamental de este proceso es que el péptido adopte una conformación plana y que exista complementariedad entre grupos aceptores y donadores de puentes de hidrógeno entre distintas subunidades.<sup>59,60</sup>

11) Harada, A.; Li, J. y Kamachi, M. “Synthesis of a tubular polymer from threaded cyclodextrins” *Nature* **1993**, *364*, 506-518.

59) a) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. “Self-assembling organic nanotubes” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988-1011. b) Hartgerink, J. D.; Clark, T. D.; Ghadiri, M. R. “Peptide nanotubes and beyond” *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1367-1372.

60) Ghadiri, M. R. “Self-assembled nanoscale tubular ensembles” *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 675-677.

## **CAPÍTULO 2: NANOTUBOS PEPTÍDICOS**



Los nanotubos peptídicos forman un grupo importantísimo dentro de los nanotubos moleculares, tanto por su gran diversidad estructural:  $\alpha$ -Aa,<sup>10</sup>  $\beta$ -Aa,<sup>61,62</sup>  $\alpha,\beta$ -Aa,<sup>63</sup>  $\delta$ -Aa,<sup>64,65</sup> etc. como por sus diferentes propiedades dependiendo de las cadenas laterales de los aminoácidos empleados. Todos ellos se basan en el mismo principio, el ciclopéptido, cuyo esqueleto contiene un número par de átomos, adopta una conformación plana en la que los grupos amida (C=O y NH) quedan orientados perpendicularmente al plano del disco, de tal forma que se pueden establecer puentes de hidrógeno entre las subunidades peptídicas, gracias a la complementariedad entre los grupos dadores y aceptores de puentes de hidrógeno en ambas caras del ciclopéptido.

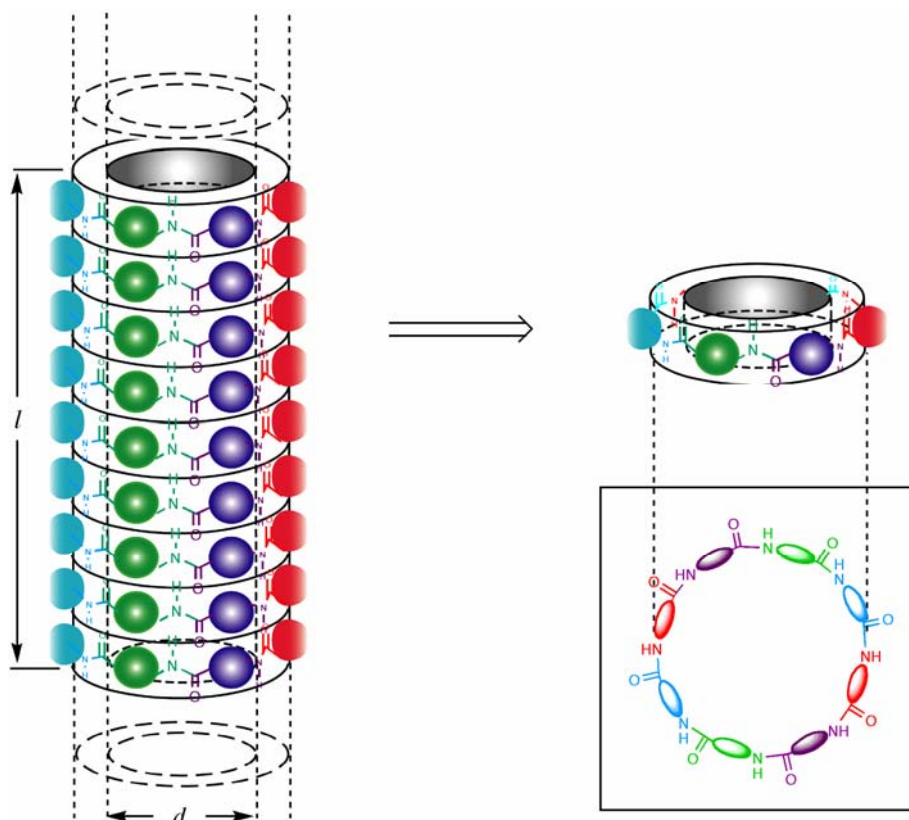


Figura 21: Ejemplo de nanotubo peptídico, que se forma por autoensamblaje de ciclopéptidos gracias a los puentes de hidrógeno que se establecen entre las distintas subunidades.

- 10) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. "Self-Assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture" *Nature* **1993**, *366*, 324-327.
- 61) Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B.; "Cyclo- $\beta$ -peptide. Structure and tubular stacking of cyclic tetramers of 3-aminobutanoic acid as determined from powder diffraction data" *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173-182.
- 62) Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Cyclic  $\beta$ 3-Peptide Nanotubes as Artificial Ion Channels" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.
- 63) Karle, I. L.; Handa, B. K.; Hassall, C. H. "The Conformation of the Cyclic Tetrapeptide L-Ser(O-t-Bu)- $\beta$ -Ala-Gly-L- $\beta$ -Asp(OMe) Containing a 14-Membered Ring" *Acta Crystallogr. Sect. B* **1975**, *31*, 555-560.
- 64) Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. "Self-Assembly of Cyclic Peptides into Nanotubes and Then into Highly Anisotropic Crystalline Materials" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635-4638.
- 65) Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, R.; Gauthier, D.; Zhao, Y.; Dory, Y. L. "Micrometer-Sized Hexagonal Tubes Self-Assembled by a Cyclic Peptide in a Liquid Crystal" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 349-353.

## 2.1. NANOTUBOS PEPTÍDICOS EN ESTADO SÓLIDO

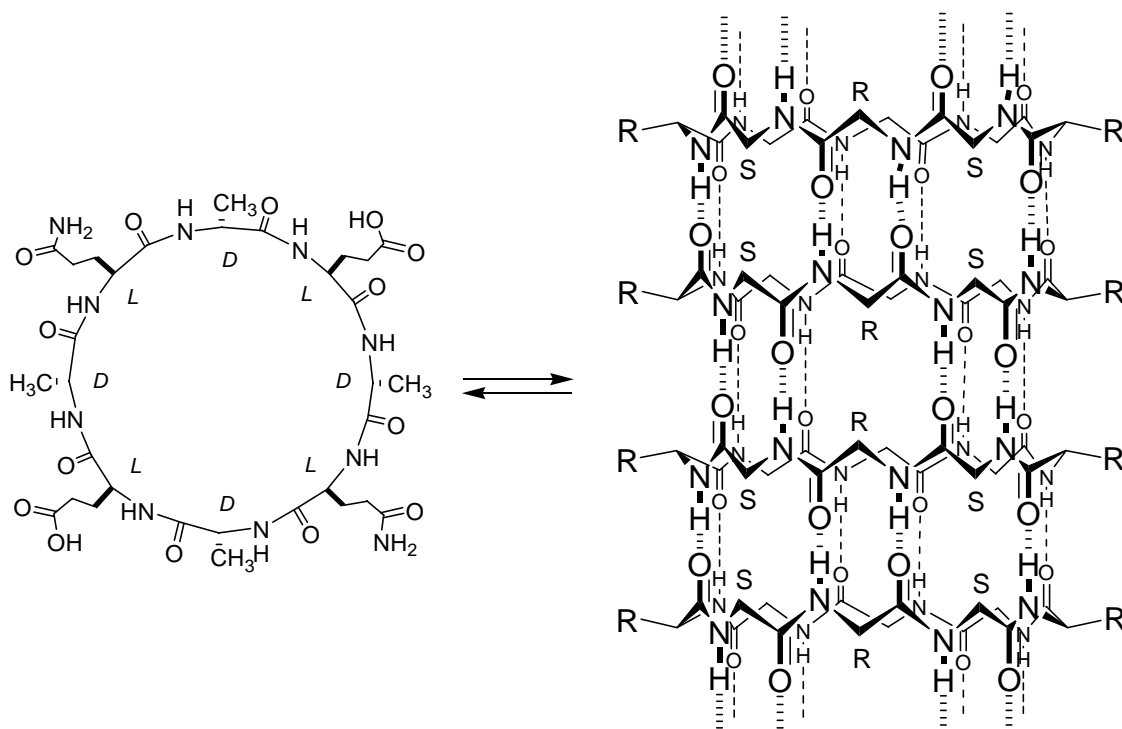


Figura 22: Estructura del ciclopeptido precursor de los primeros nanotubos y estructura del nanotubo peptídico en el que se resaltan las interacciones moleculares (puentes de hidrógeno) entre las distintas unidades ciclopeptídicas responsables de la formación del nanotubo. Las cadenas laterales de los Aa han sido omitidas para mayor claridad.

En 1974, De Santis<sup>66</sup> publicó un trabajo teórico en el que proponía la formación de estructuras tubulares mediante ciclopeptidos formados por  $\alpha$ -aminoácidos de estereoquímica *D* y *L* alternante. Su formación se basaba en que estos ciclopeptidos compuestos por un número par de aminoácidos, podían adoptar una conformación plana en la que los C=O y NH quedaban dispuestos perpendicularmente al plano de los anillos, permitiendo el establecimiento de puentes de hidrógeno con la siguiente subunidad. En esta conformación, todas las cadenas laterales de los ciclopeptidos quedaban situadas hacia el exterior del nanotubo. Sin embargo, los primeros nanotubos peptídicos no se prepararon hasta el año 1993 por el grupo de Ghadiri.<sup>10</sup> Para su preparación se emplearon aminoácidos (glutámicos) cuyas propiedades varían según el pH del medio, lo cual los hacía solubles en medios básicos. La formación del nanotubo tenía lugar al acidificar de manera controlada las disoluciones del *ciclo*[(*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala-*L*-Glu)<sub>2</sub>] (figura 22), formándose cristales alargados, cuya longitud variaba entre 10 y 30  $\mu\text{m}$  y el diámetro entre 100 y 500 nm, y estaban formados por haces de nanotubos peptídicos orientados todos ellos hacia la misma dirección. La caracterización de los mismos se llevó a cabo mediante microscopía electrónica, infrarrojo, difracción de electrones, etc.

66) De Santis, P.; Morosetti, S.; Rizzo, R. "Conformational analysis of regular enantiomeric sequences" *Macromolecules* **1974**, *7*, 52-58.

10) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. "Self-Assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture" *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

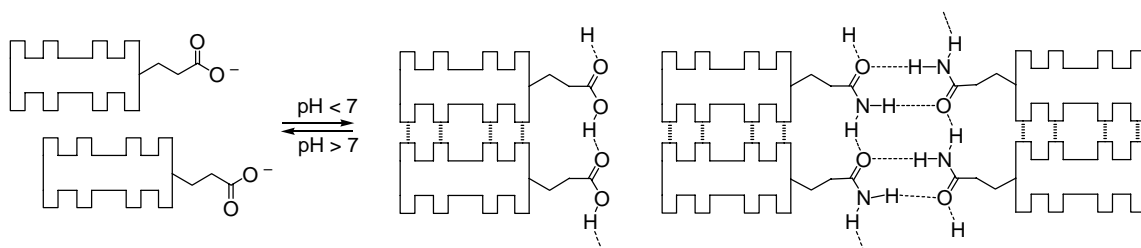


Figura 23: Esquema que ilustra el proceso de autoensamblaje del *ciclo[(D-Ala-L-Glu-D-Ala-L-Glu)<sub>2</sub>]*. A pH básico (izquierda), las repulsiones electrostáticas de los carboxilatos dificultan la interacción de las distintas subunidades peptídicas; a pH ácido, la protonación de las cadenas laterales del Glu permite la formación de los puentes de hidrógeno entre los distintos ciclopeptidos. La presencia de Gln favorece la formación de puentes de hidrógeno tanto inter como intratubular.

La clave fundamental del éxito en la formación de los nanotubos está en la elección de la secuencia del ciclopeptido, ya que las cadenas laterales de las Gln y Glu contribuyen de manera importante en dicha formación y también en su estabilización. A pH básico se impide el autoensamblaje molecular, gracias a la formación de los glutamatos y a sus repulsiones electrostáticas; y la protonación de las cadenas laterales induce la formación de los nanotubos, no sólo por la formación de puentes de hidrógeno del esqueleto peptídico, sino también gracias a la participación de los Glu y Gln en la formación de puentes de hidrógeno, tanto intra como intertubulares (figura 23). Estas interacciones entre las cadenas laterales se ven favorecidas por las características especiales del diseño, en el que todos los restos de igual quiralidad de los distintos ciclopeptidos se encuentran superpuestos dentro del nanotubo (figura 22).

En posteriores estudios con los ciclopeptidos, en los que los Glu se habían sustituido por Gln, se observó que también se obtenían nanotubos cuando aumentaba el pH de la disolución del ciclopeptido en TFA. Se encontró que los nanotubos resultantes presentaban mayores dimensiones y que los efectos hidrofóbicos de otros aminoácidos también jugaban un papel determinante en las dimensiones de los nanotubos, para cuyo estudio se sintetizaron: *ciclo[(L-Gln-D-Ala)<sub>4</sub>]*, *ciclo[(L-Gln-D-Leu)<sub>4</sub>]*, *ciclo[(L-Gln-D-Phe)<sub>4</sub>]*, *ciclo[(L-Gln-D-Val)<sub>4</sub>]* (figura 24).<sup>67</sup> Los tres primeros cristalizaron, observándose que la longitud de los tubos se incrementaba al aumentar las interacciones hidrofóbicas, mientras que el derivado de la valina tendía a generar pequeños microcristales que se agrupaban de forma desordenada, probablemente debido a un problema de empaquetamiento entre los distintos nanotubos.

67) Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Peptide Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

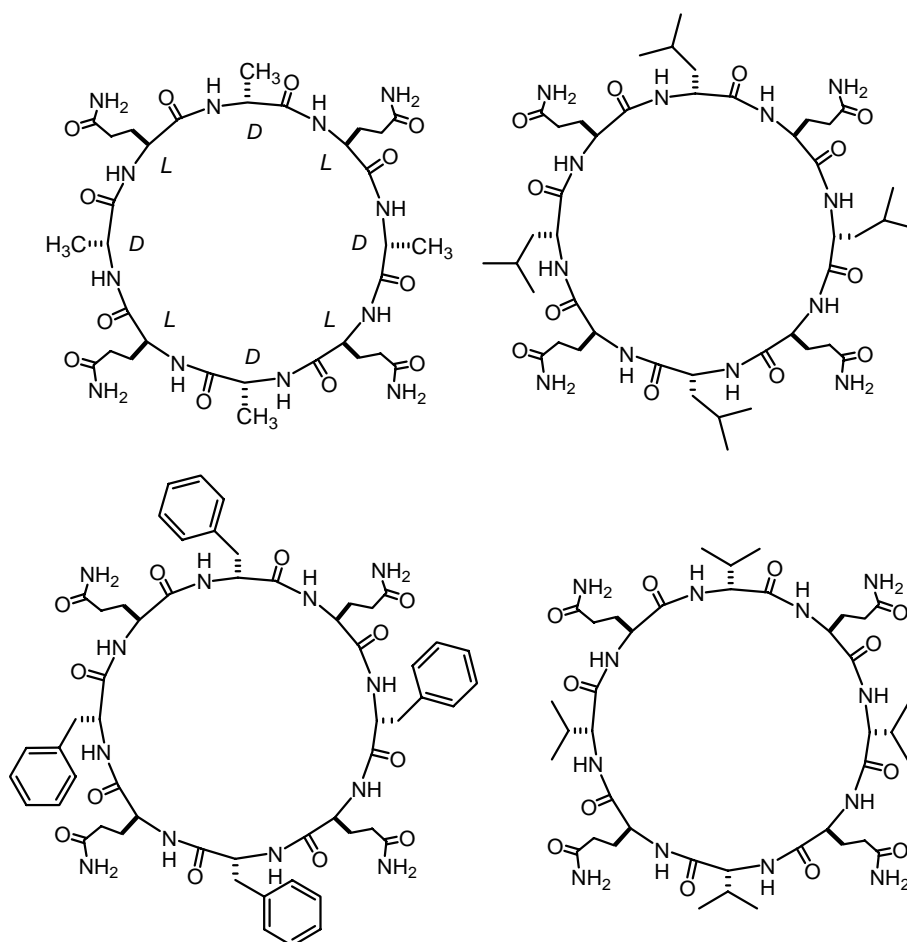


Figura 24: Ciclopéptidos estudiados en la formación de nanotubos.

Con anterioridad a estos trabajos, el grupo de Lorenzi estudió los ciclohexapéptidos *ciclo[(L-Phe-D-Phe)<sub>3</sub>-]* y *ciclo[(L-Val-D-Val)<sub>3</sub>-]*, pero en este caso, debido a la baja solubilidad de los mismos y al hecho de carecer de un mecanismo apropiado para inducir la formación de los nanotubos, no se obtuvieron tales estructuras supramoleculares.<sup>68</sup> Por otro lado, los dodecapéptidos se utilizaron en la formación de nanotubos de 13 Å de diámetro. Estos ciclopéptidos presentaban una mayor dificultad para autoensamblarse, como lo constatan las menores dimensiones de estos cristales frente a las de los octapéptidos.<sup>69</sup> Los estudios teóricos realizados sugieren que los nanotubos más favorables son los formados por ciclopéptidos de 6 y de 8 aminoácidos, ya que son las estructuras más predispuestas a adoptar la conformación plana necesaria.<sup>70</sup>

68) Pavone, V.; Benedetti, E.; Di Blasio, B.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Lorenzi, G. P. "Regularly alternating L,D-peptides. III. Hexacyclic peptides from valine or phenylalanine" *Biopolymers* **1989**, *28*, 215-223.

69) Khazanovich, N.; Granja, J. R.; McRee, D. E.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. "Nanoscale Tubular Ensembles with Specified Internal Diameters. Design of a Self-Assembled Nanotube with a 13-Å Pore" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011-6012.

70) a) Okamoto, H.; Takeda, K. "Molecular Design and Morphology of Peptide Nanotubes: toward the novel drug delivery materials" *J. Drugs Delivery Science and Technology* **2005**, *15*, 97-107.  
b) Okamoto, H.; Nakanishi, T.; Nagai, Y.; Kasahara, M.; Takeda, K. "Variety of the Molecular

La introducción de una mayor diversidad en los ciclopeptidos y por tanto en los nanotubos, es otro de los grandes retos en este campo. Por ello, resultan interesantes las variaciones estructurales desarrolladas recientemente en el grupo de Undén, como son los nanotubos heteroméricos. En este trabajo se utilizan dos péptidos enantioméricos, que se alternan a lo largo del nanotubo. El principio fundamental de este diseño se basa en la homocircularidad de los apareamientos de las hojas plegadas *D,L*-, es decir, los *L*-Aa sólo forman puentes de hidrógeno con los *L*-Aa. Para asegurar la alternancia en el nanotubo, los autores utilizan *t*-Butil leucina, de tal forma que el homoapareamiento queda impedido debido a los impedimentos estéricos entre los grupos *t*-Butilo de idéntica quiralidad; no obstante, sí se favorece la formación del heterodímero en el que los grupos *t*-Butilo se enfrenta a las Gln o Glu de igual configuración (figuras 25 y 26).<sup>71</sup>

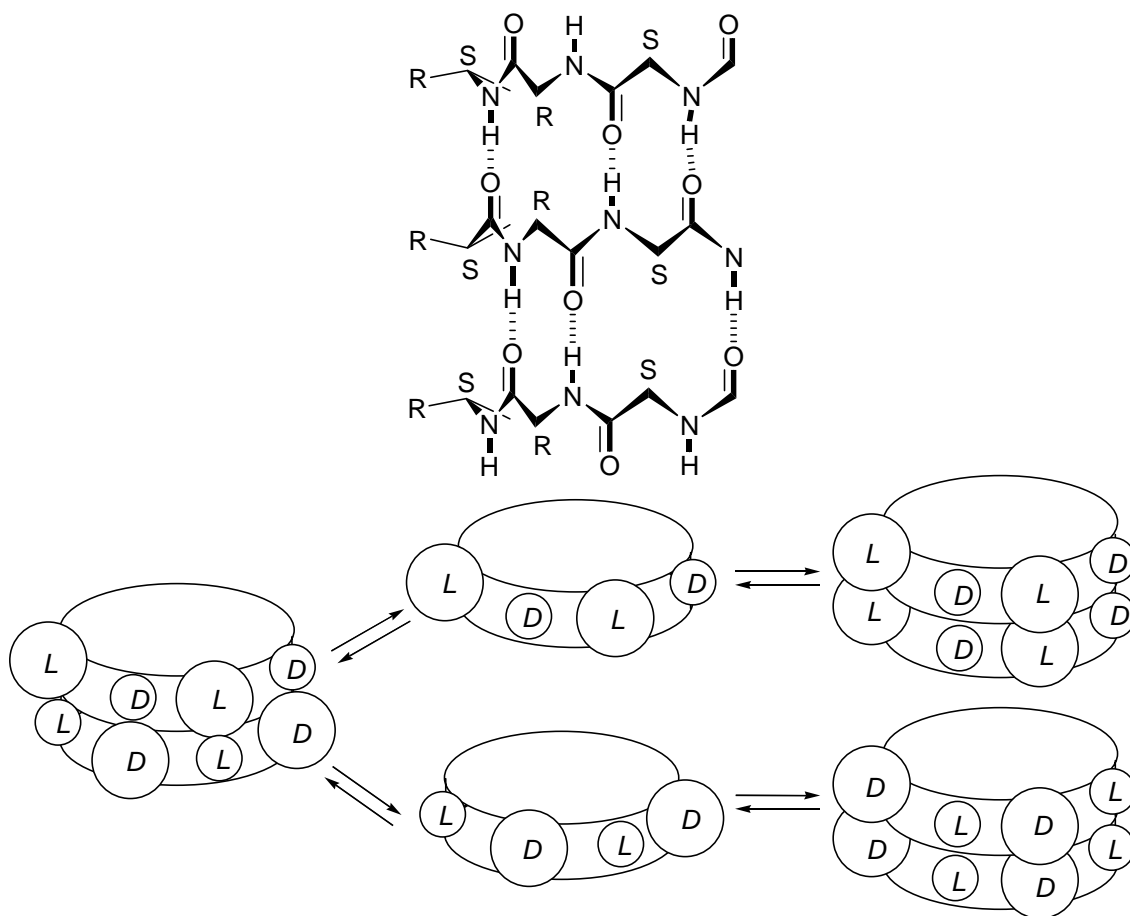


Figura 25: Modelo que representa la formación de nanotubos heterodiméricos, en el que el volumen estérico que ocupa la cadena lateral de la *t*-Butil leucina (representada por la bola grande) dificulta la homodimerización, mientras que sí se favorece la heterodimerización gracias al acoplamiento de la *t*-Butil leucina (*L*) con la Gln (*L*) y de la *t*-Butil-*D*-leucina con la *D*-Gln.

Conformation in Peptide Nanorings and Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2756-2769.  
 c) Okamoto, H.; Nakanishi, T.; Nagai, Y.; Takeda, K.; Obataya, I.; Mihara, H.; Azebara, H.; Mizutani, W. "Theoretical Prediction and Atomic Force Microscope Observations of the Protein Nanotube Consisting of Homo-1-Amino Acid Penta-Peptide Nanorings" *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, *42*, 676-679.

71) Rosenthal, K.; Svensson, G.; Undén, A. "Self-Assembling Peptide Nanotubes from Enantiomeric Pairs of Cyclic Peptides with Alternating D and L Amino acids Residues" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3372-3373.

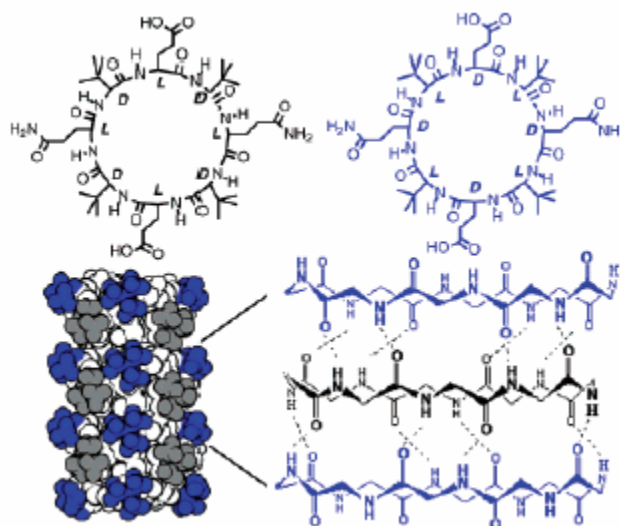


Figura 26: Nanotubo formado por ciclooctapéptidos de estereoquímica opuesta que se van alternando a lo largo del nanotubo.

Un caso particular de formación de nanotubos que no cumple las reglas básicas para su formación, es el del *ciclo*[(*L*-Gln)<sub>5</sub>]. Dicho pentapéptido se ensambla siguiendo un modelo como el que se indica en la figura 27. Los estudios realizados mediante microscopía de fuerzas atómicas, han permitido observar una estructura tubular ligeramente curvada con dimensiones apropiadas para un nanotubo peptídico.<sup>70</sup> El principio de formación de los nanotubos es muy diferente al postulado para los *D,L*-nanotubos, debiéndose dicha formación no a la conformación plana sino a una estructura distorsionada, estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares, que le permiten al ciclopeptido apilarse con otras subunidades mediante la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.

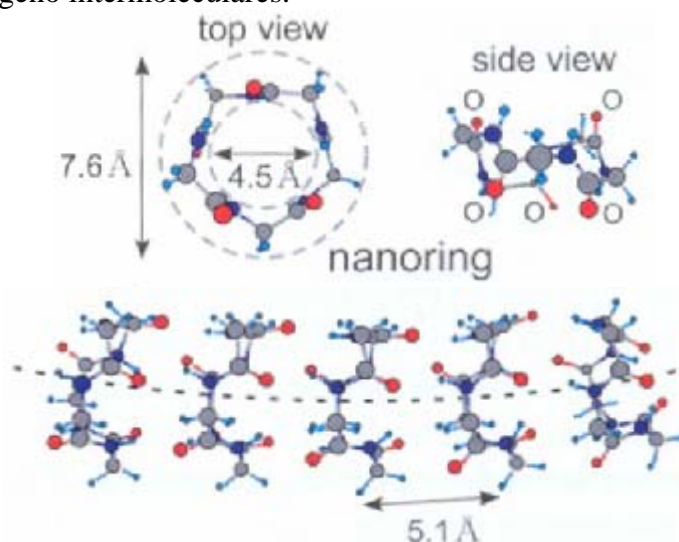


Figura 27: Autoensamblaje paralela de los nanotubos de *ciclo*[(*L*-Gln)<sub>5</sub>].

- 70) a) Okamoto, H.; Takeda, K. "Molecular Design and Morphology of Peptide Nanotubes: toward the novel drug delivery materials" *J. Drugs Delivery Science and Technology* **2005**, *15*, 97-107. b) Okamoto, H.; Nakanishi, T.; Nagai, Y.; Kasahara, M.; Takeda, K. "Variety of the Molecular Conformation in Peptide Nanorings and Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2756-2769. c) Okamoto, H.; Nakanishi, T.; Nagai, Y.; Takeda, K.; Obataya, I.; Mihara, H.; Azehara, H.; Mizutani, W. "Theoretical Prediction and Atomic Force Microscope Observations of the Protein Nanotube Consisting of Homo-1-Amino Acid Penta-Peptide Nanorings" *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, *42*, 676-679.

Como se ha mencionado, son muchas las aplicaciones propuestas para los nanotubos peptídicos; por ello no sorprende que, desde su primera preparación, se desarrollasen algunas aplicaciones tales como: biosensores, materiales fotosensibles, agentes antimicrobianos o sistemas de transporte selectivo. Uno de estos ejemplos es el primer sensor, que posee una marcada selectividad por tamaños. Para ello, se formó una monocapa de organosulfuro sobre una superficie de oro en la que se pueden ensamblar los ciclopéptidos que poseen aminoácidos hidrófobos, dando lugar a nanotubos capaces de detectar y transportar iones dependiendo del tamaño. La detección de estos iones se realiza mediante voltimetría y espectroscopia, mostrando, por ejemplo, una selectividad redox del  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$  frente al  $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{-4}$ . Los estudios realizados han demostrado la fiabilidad de la difusión según el tamaño.<sup>72</sup> El gran potencial de esta estrategia se basa en la posibilidad de que al variar el ciclopéptido, su tamaño o el tipo de aminoácidos que lo componen, o las cadenas alquílicas de los organosulfurados se puede lograr modular los potenciales eléctricos, etc.

El grupo de Ghadiri ha investigado la formación y estabilización de nanoclusters metálicos en la superficie de cristales de nanotubos peptídicos compuestos por *ciclo[(L-Gln-D-Ala-L-Gln-D-Ala)<sub>2</sub>]*,<sup>59</sup> en el cual los grupos carboxilo sirven como núcleo para la deposición de óxido de cobre (I). El nanocompuesto resultante se caracterizó por TEM (microscópico electrónico) y EELS (electron energy loss scopy), que a su vez actuaban como núcleos para la cristalización de otros compuestos.

Dadas las múltiples posibilidades de desarrollo de estas estructuras supramoleculares como: cambios en la superficie externa e interna, tamaño del ciclo, etc.; es de esperar que se sigan aumentando y mejorando las aplicaciones de los nanotubos incluyendo: catálisis, nuevas aplicaciones biológicas, propiedades electrónicas,<sup>73</sup> propiedades ópticas, ingeniería molecular, etc.

- 
- 72) Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. "Diffusión-Limited Size-Selective Ion Sensing Based on SAM-Supported Peptide Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11306-11312. Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. "Diffusion-limited size-selective ion sensing based on SAM-supported peptide nanotubes" [Erratum to document cited in CA128:32011] *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1347.
- 59) a) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. "Self-assembling organic nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988-1011. b) Hartgerink, J. D.; Clark, T. D.; Ghadiri, M. R. "Peptide nanotubes and beyond" *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1367-1372.
- 73) a) Okamoto, H.; Kasahara, M.; Takeda, K.; Shiraishi, K. *In Theoretical Possibility of Semiconductive Properties in Peptide Nanotubes*, Proceedings of the 25<sup>th</sup> International Conference on the Physics of Semiconductors, Osaka, Japan, Sept. 17-22, **2000**; Miura, N., Ando T., Eds.; Springer: Berlin, **2001**; ia457FC1 (I041). b) Okamoto, H.; Kasahara, M.; Takeda, K.; Shiraishi, K. "Theoretical possibility of semiconductive properties in peptide nanotubes" *Springer Proceedings in Physics* **2001**, *87*, 1637-1638.

## 2.2. NANOTUBOS PEPTÍDICOS EN DISOLUCIÓN

Hasta el momento, los *D,L*-nanotubos peptídicos se han caracterizado mediante TEM, difracción de electrones y FT-IR, pero ninguno de ellos a dado lugar a cristales de forma y tamaño adecuados para su resolución a nivel atómico a través de estudios de rayos X. Con la finalidad de establecer las bases termodinámicas del proceso de autoensamblaje y obtener monocristales aptos para difracción de rayos X, se sintetizó el *ciclo*[(*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>4</sub>]- (1) (figura 28). En éste, los grupos Me situados en los nitrógenos de las alaninas bloquean el crecimiento del nanotubo al sustituir en una de las caras del ciclopeptido los grupos dadores de puentes de hidrógeno, de tal forma que, tanto la falta de dichos grupos como los impedimentos estéricos originados por el metilo, impiden la formación de redes de enlace de hidrógeno características de los nanotubos. Dichos ciclopeptidos están, por tanto, predispuestos a formar dímeros que pueden ser solubles en disolventes orgánicos y obtener información sobre la dinámica del proceso y sus bases termodinámicas.<sup>74</sup> A partir de los estudios en disolventes apolares del ciclopeptido (1) se determinó la constante de asociación y las diferentes variables termodinámicas del proceso de autoensamblaje: [ $K_{a(293)}(\text{CDCl}_3) = 1,26 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ;  $K_{a(293)}(84\% \text{ CCl}_4/16\% \text{ CDCl}_3) = 1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ;  $\Delta H^\circ_{(298)}(\text{CDCl}_3) = -11,0 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta S^\circ_{(298)}(\text{CDCl}_3) = -23,7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ]. Es por tanto, como cabría de esperar, un proceso dirigido entálpicamente gracias a la formación de ocho puentes de hidrógeno, pero entrópicamente desfavorable. Es importante mencionar que la contribución de cada puente de hidrógeno es únicamente de entre 0,5 y 0,7 Kcal mol<sup>-1</sup> (2,0 y 3,0 KJ mol<sup>-1</sup>), valores que están muy lejos de lo que cabría esperar para este tipo de interacciones en medios apolares.<sup>75</sup>

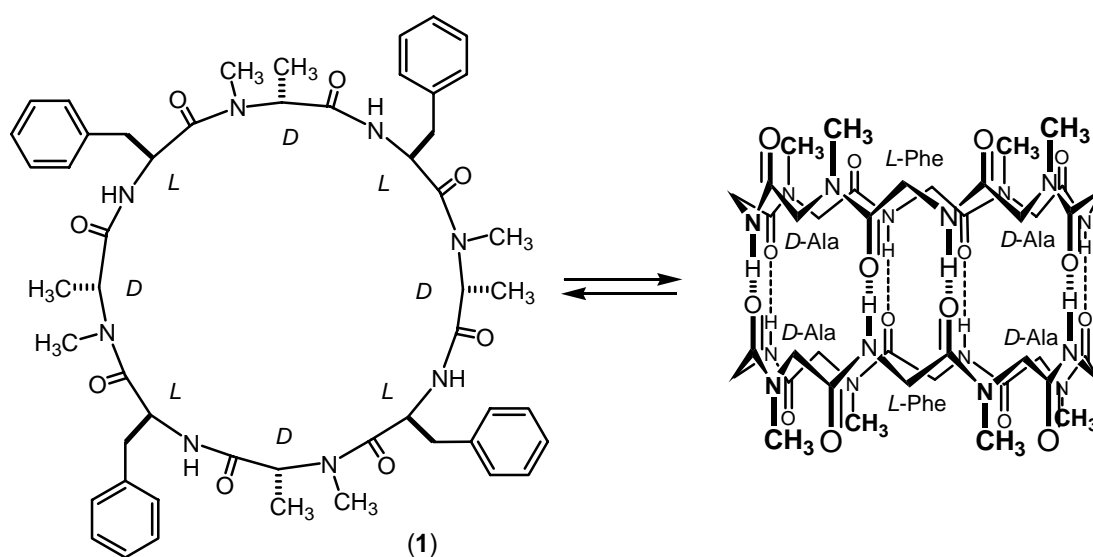


Figura 28: Esquema de la formación del dímero de *ciclo*[(*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>4</sub>]- (1). Para mayor claridad, se ha omitido la representación de algunos restos.

74) Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K; Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. "The Structural and Thermodynamic Basis for the Formation of Self-Assembled Peptide Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.

75) a) Sartorius, J.; Schneider, H.-J.; "A general scheme based on empirical increments for the prediction of hydrogen-bond associations of nucleobases and of synthetic host-guest complexes" *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1446-1452. b) Prins, L. J.; Reinhoudt, D. N.; Timmerman, P. "Noncovalent synthesis using hydrogen bonding" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2328-2426.

Los datos en estado sólido mediante difracción de rayos X permitieron corroborar los anteriores estudios, observándose que los anillos adoptaban una conformación plana, apilándose en láminas  $\beta$  antiparalelas, de manera que los grupos amida de los enlaces peptídicos se situaban paralelos al eje del tubo, dejando una cavidad interior de aproximadamente 7,5 Å de diámetro. Estos dímeros quedaban estabilizados por la formación de ocho enlaces de hidrógeno entre cada par de ciclopeptidos, con una distancia N...O de 2,90 Å. Además se observó que la cavidad interna contenía moléculas de agua desordenadas en su interior, lo que suponía una clara evidencia del carácter hidrofílico del orificio del nanotubo.

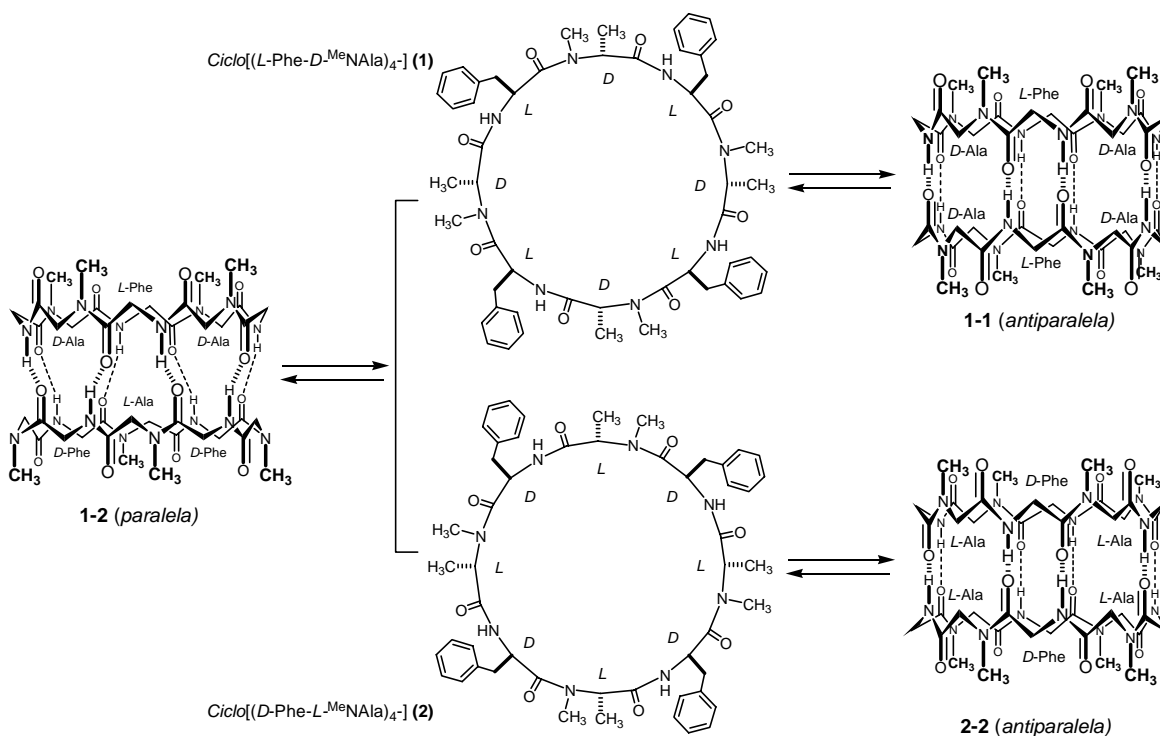


Figura 29: Esquema que ilustra la estrategia seguida para medir las estabildades relativas de las láminas  $\beta$  paralela (**1-2**) y antiparalela (**1-1** y **2-2**). Para mayor claridad, se han omitido las cadenas laterales en los dibujos de los dímeros.

La presencia de los metilos unidos a los nitrógenos bloqueando una de las caras del anillo, determinó que, al dimerizar, los péptidos sólo podían adoptar una lámina  $\beta$  antiparalela en la que los restos homocirales estaban enfrentados: (**1-1**, figura 29). Sin embargo, los estudios realizados con mezcla racémica formada por los péptidos **1** y **2**, mostraban que, además de formarse los dímeros homocirales **1-1** y **2-2**, también se formaba el heterodímero de **1-2**.<sup>76</sup> La lámina  $\beta$  de este último dímero es paralela, lo que permitió estudiar la estabilidad relativa de ambas láminas. En las disoluciones de **1** ó **2** se identificó en el  $^1\text{H}$  RMN la señal de los hidrógenos de los enlaces amida en láminas antiparalelas, siendo los ocho puentes de hidrógeno idénticos; y resonando a 8,73 ppm. En la mezcla racémica se observó la aparición de una nueva señal a  $\delta$  8,49 ppm que correspondía a las láminas paralelas (**1-2**). A partir de las intensidades relativas de ambas señales se determinó que la lámina  $\beta$  antiparalela era 0,8 Kcal mol<sup>-1</sup> (3,3 KJ mol<sup>-1</sup>) más estable que la paralela.

76) Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. "β-Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antipararel β-Sheet" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 95-98.

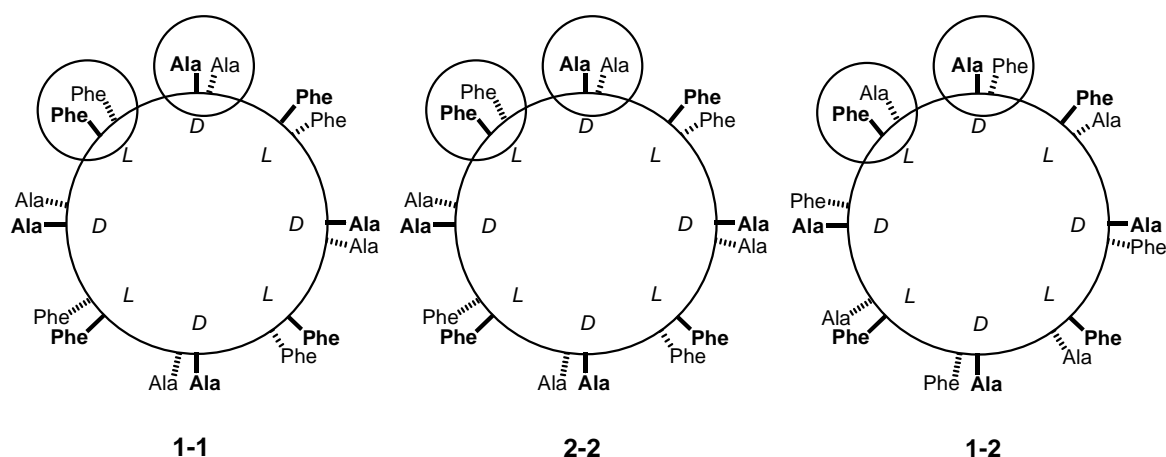


Figura 30: Esquema que representa los dímeros donde se señalan las interacciones entre sus cadenas laterales, para los dímeros **1-1**, **2-2** y **1-2**.

Para demostrar que el resultado anterior no se debía a diferentes interacciones entre las cadenas laterales en uno y otro dímero (figura 29), se sintetizó el péptido *ciclo*[(L-Phe-D<sup>Me</sup>N-Ala-L-Leu-D<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-] (**3**) (figura 31). El eje de simetría de este ciclopéptido es de orden 2 (frente al eje C<sub>4</sub> de **1** y **2**), por lo que podía dar lugar a dos dímeros antiparalelos diastereoméricos, que se diferencian en las distintas interacciones entre las cadenas laterales (figura 31). Una mayor proporción de uno de esos dímeros en disolución indicaría que las interacciones entre las cadenas laterales juegan un papel importante en la estabilización o desestabilización de los dímeros. Sin embargo, el espectro de <sup>1</sup>H RMN de una disolución de **3** indica que la proporción de ambos dímeros es prácticamente la misma. Es decir, las interacciones entre las cadenas laterales no contribuyen de forma significativa a la estabilidad de las láminas β.

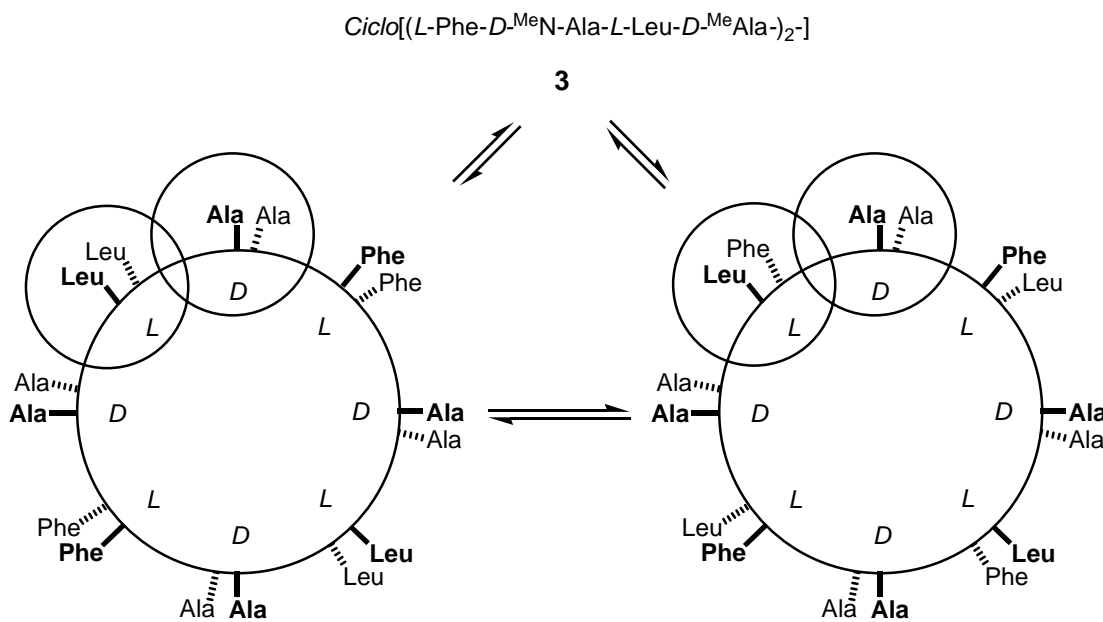


Figura 31: Esquema que representa los dos posibles dímeros que se forman a partir del ciclopéptido **3**.

La existencia de dímeros también se ha estudiado mediante fluorescencia empleando para ello un ciclopeptido como el *ciclo*[Ala-*D*-Leu-<sup>Me</sup>Ala-*D*-Leu-Lys<sub>NDI</sub>-<sup>Me</sup>*D*-Leu-<sup>Me</sup>Ala-*D*-Leu], al que se le ha modificado la cadena lateral de la lisina con un fluoróforo (NDI).<sup>77</sup> La presencia del fenómeno de transferencia de fluorescencia (escímeros) en disolución del ciclopeptido en CHCl<sub>3</sub> permitió estimar una  $K_a \sim 10^2$ , valor similar a los medidos mediante RMN y que dista mucho de los observados en los anteriores ciclopeptidos.



Figura 32: La proximidad entre los grupos cromóforos del ciclopeptido *ciclo*[Ala-*D*-Leu-<sup>Me</sup>Ala-*D*-Leu-Lys<sub>NDI</sub>-<sup>Me</sup>*D*-Leu-<sup>Me</sup>Ala-*D*-Leu] “NDI = ácido 1,4,5,8-naftalenetetracarboxílico diimida” permite cuantificar mediante fluorescencia la proporción de dímero/monómero.

Una de las grandes ventajas que tiene esta tecnología es que permite, al menos teóricamente, controlar el diámetro interno del nanotubo cambiando el número de Aa de la unidad básica, siempre y cuando se mantengan los principios básicos del autoensamblaje.<sup>78</sup> Es por esto que se han realizado diversos estudios en disolución utilizando estos nanotubos trucados. Los trabajos realizados por el grupo de Lorenzi<sup>79</sup> con hexámeros {*ciclo*[(*D*-Leu-*L*-Leu)<sub>2</sub>-*D*-Leu-*L*-<sup>Me</sup>N-Leu-] y *ciclo*[(*D*-Leu-*L*-<sup>Me</sup>N-Leu)<sub>3</sub>-]} encontraron la formación de dímeros con una constante de asociación de 80 M<sup>-1</sup>, a pesar de que en posteriores trabajos del grupo de Ghadiri con *ciclo*[(*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>3</sub>-], éstos no mostraban evidencias de autoensamblaje. Los estudios con anillos mayores a los octapéptidos, como decapeptidos y dodecapeptidos N-metilados, tampoco se obtuvieron evidencias de la formación de dímeros, debido a que se pliegan bien en una o múltiples conformaciones. Como cabría de esperar, los estudios de los ciclotetrapeptidos empleando el péptido *ciclo*[(*D*-Phe-*L*-<sup>All</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-] no ha mostrado evidencias de autoensamblaje.

Otro efecto estudiado lo constituye la naturaleza del grupo alquilante y la sustitución de los  $\alpha$ -Aa, encontrándose que no existen claras diferencias entre Me, All, Pr, etc. Por el contrario, cuando el aminoácido N-alquilado es diferente a la Ala (o Leu en los trabajos de Lorenzi) no se encuentran evidencias de un proceso de dimerización, así el *ciclo*[(*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>4</sub>-] posee una  $K_a = 1260$  M<sup>-1</sup> mientras que el *ciclo*[(*L*-<sup>Me</sup>N-Phe-*D*-Ala)<sub>4</sub>-] no dimeriza. La explicación de este hecho se ha atribuido a los impedimentos estéricos entre las cadenas laterales de los Aa y el metilo.

Otro reto, abordado por el grupo de Ghadiri, fue la captura del dímero mediante uniones covalentes (figura 33) entre los dos ciclopeptidos que lo componen, con lo que se amplía la diversidad y aplicaciones de estos ciclopeptidos. Para ello, en estos dímeros

77) Horne, W. S.; Ashkenasy, N.; Ghadiri, M. R. “Modulating Charge Transfer through Cyclic *D,L*- $\alpha$ -Peptide Self-assembly” *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1137-1144.

78) Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri M. R. “Cylindrical  $\beta$ -Sheet Peptide Assemblies” *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8960.

79) a) Saviano, M.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Di Blasco, B.; Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. “A structural two-ring version of a tubular stack of  $\beta$ -ring in crystals of a cyclic *D,L*-hexapeptide” *J. Incl. Phenom.* **1994**, *18*, 27-36. b) Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. “On the Stacking of  $\beta$ -Ring: The Solution Self-association Behavior of Two Partially N-Methylated Cyclo(hexaleucines)” *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1520-1526.

covalentes, se trata de añadir una estabilidad cinética a las supramoléculas, caracterizados por su estabilidad termodinámica. Se estudiaron dos ciclopéptidos que se diferenciaban en la estructura de los grupos reactivos responsables de la formación de los enlaces covalentes, el primero de los cuales constaba de dos homoalilglicinas (Hag), mientras que el segundo contenía dos cisteínas. En el primero, se utilizó una reacción de metátesis para capturar el dímero, que se veía favorecida cuando dicho dímero (*ciclo*[(*D*-<sup>Me</sup>Ala-*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>Ala-*L*-Hag)<sub>2</sub>-]) enfrenta las Hag dejando las olefinas próximas, facilitando la reacción.<sup>80</sup>

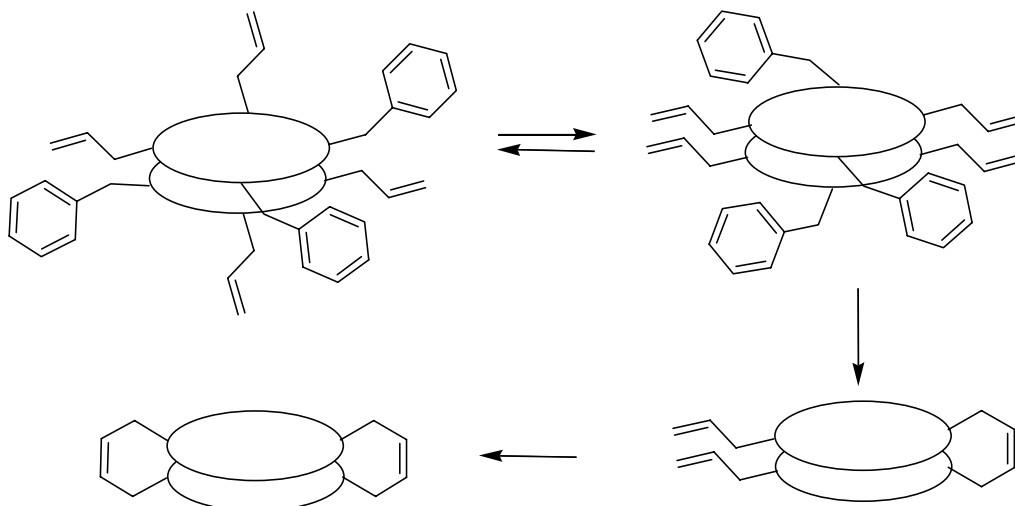


Figura 33: Proceso de captura covalente del dímero: *ciclo*[(*D*-<sup>Me</sup>Ala-*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>Ala-*L*-Hag)<sub>2</sub>-].

Este diseño podría mejorarse, ya que la segunda reacción de metátesis no parece especialmente favorable, como lo demuestra el hecho de que el producto de la primera reacción se pueda aislar y se necesiten tiempos prolongados de reacción para completar la segunda ciclación. La importancia del autoensamblaje como fuerza directora del proceso se evidencia al comprobar que cuando esta reacción se lleva a cabo en presencia de disolventes que inhiben la formación del dímero (DMF, EtOH), no se observa la formación de los productos de metátesis.

El segundo ejemplo utiliza Cys y la oxidación entre los grupos tioles para formar disulfuros. Este proceso, como en el caso anterior, está dirigido por el autoensamblaje molecular que favorece la formación de dímeros, aunque en este caso se observa la formación de otras especies como polímeros o monómeros plegados. Son estas últimas especies las que al reducirse inducen o facilitan la formación de los dímeros covalentes.

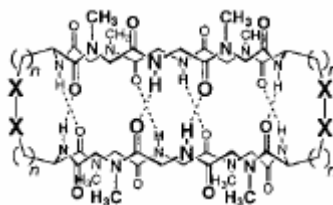


Figura 34: Péptido *ciclo*[(*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala-*L*-Cys-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-], siendo el enlace covalente formado S-S (X = S).

80) a) Clark, T. H.; Kobayashi, K.; Ghadiri, M. R. "Covalent Capture and Stabilization of Cylindrical  $\beta$ -Sheet Peptide Assemblies" *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 782-792. b) Clark, T. D.; Ghadiri, M. R. "Supramolecular Design by Covalent Capture. Design of a Peptide Cylinder via Hydrogen-Bond-Promoted Intermolecular Olefin Metathesis" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12364-12365.

El desarrollo de interruptores moleculares también ha sido estudiado con este tipo de dímeros. En este caso se han seleccionado, como conectores covalentes de los dímeros, grupos azobenceno, con el objetivo de usar sus propiedades ópticas como sensores para el almacenamiento de datos. El azobenceno puede existir en dos conformaciones E-Z. En la conformación Z los dos ciclopéptidos unidos por el azobenceno están orientados de forma que pueden dar un dímero entre los dos ciclopéptidos unidos covalentemente, mientras el isómero E da lugar a especies de mayor peso molecular (polímeros o oligómeros), donde cada ciclopéptido se encuentra unido a dos péptidos diferentes. La interconversión entre E-Z se realiza irradiando, con la longitud de onda adecuada, luz ultravioleta para los isómeros  $Z \rightarrow E$  y luz visible para el proceso inverso. Esta interconversión es clara en disolución; pero no ocurre así cuando se encuentra formando películas en la interfase (figura 35).<sup>81</sup>

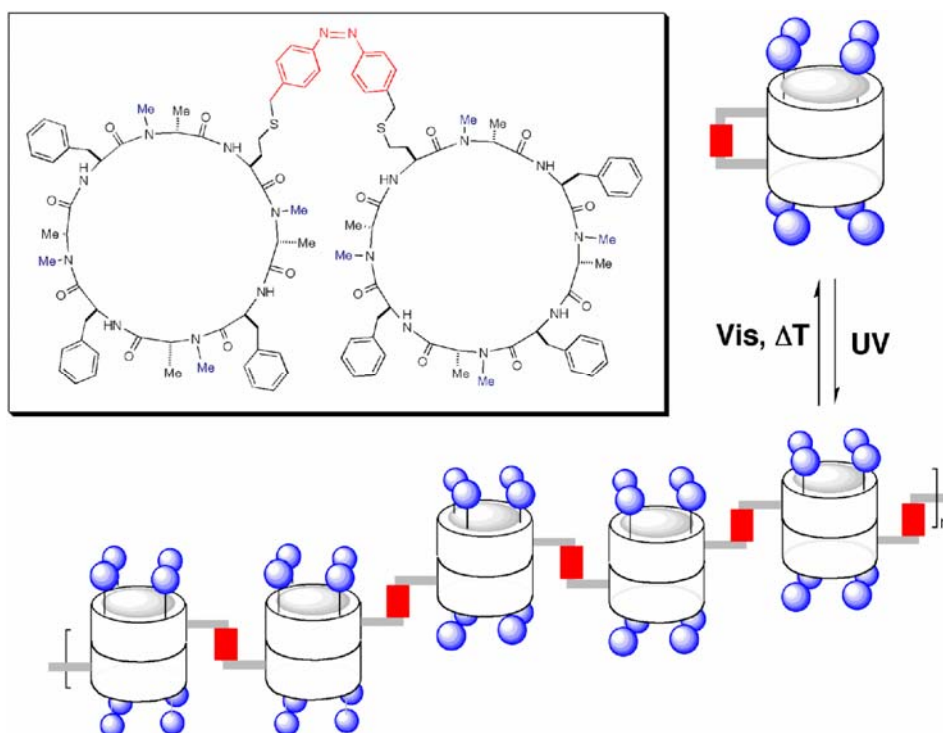


Figura 35: Proceso de interconversión entre los estados E-Z del azobenceno y por tanto formación de dímeros o polímeros.

81) a) Vollmer, M. S.; Clark, T. D.; Steinem, C.; Ghadiri, M. R. "Photoswitchable hydrogen-bonding in self-organized cylindrical peptide systems" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1598-1601. b) Steinem, C.; Janshoff, A.; Vollmer, M.S.; Ghadiri, M. R. "Reversible photoisomerization of self-organized cylindrical peptide assemblies at air-water and solid interfaces" *Langmuir* **1999**, *15*, 3956-3964.

### 2.3. NANOTUBOS PEPTÍDICOS EN MEMBRANAS LIPÍDICAS

Hay que destacar que en la síntesis de nanotubos mediante el autoensamblaje de ciclopeptidos es posible modificar las propiedades de los mismos dependiendo de las características del ciclopeptido que lo constituye, de tal forma que se pueden establecer de antemano las propiedades del nanotubo o las condiciones más apropiadas para su formación simplemente seleccionando la secuencia de los ciclopeptidos precursores. Por ejemplo, el diámetro interno del nanotubo está determinado por el tamaño del ciclopeptido, esto es, el número de aminoácidos que lo componen (7,5 Å para los ciclooctapeptidos y unos 13 Å para ciclos de 12 aminoácidos). Otra propiedad que puede ser modulada es la topología de la superficie externa, que depende de las cadenas laterales de los aminoácidos utilizados, ya que al ensamblarse el ciclopeptido deja éstas expuestas hacia el exterior del nanotubo. Debido a esto, se prepararon ciclopeptidos constituidos por aminoácidos con cadenas laterales no polares que se ensamblan en las bicapas lipídicas, formando nanotubos que atraviesan las bicapas y por las que se transportan de manera muy eficaz iones pequeños como  $K^+$  y  $Na^+$ .<sup>82</sup> Los estudios realizados sobre modelos sintéticos de membranas fosfolipídicas, tanto en liposomas como en membranas planas, confirman esta disposición a la formación de conductos transmembranosos y al desarrollo de un transporte de iones altamente eficientes. El transporte es selectivo en base al tamaño y/o en función de la polaridad de los compuestos, ya que el interior de los nanotubos peptídicos es hidrofílico.<sup>83</sup>

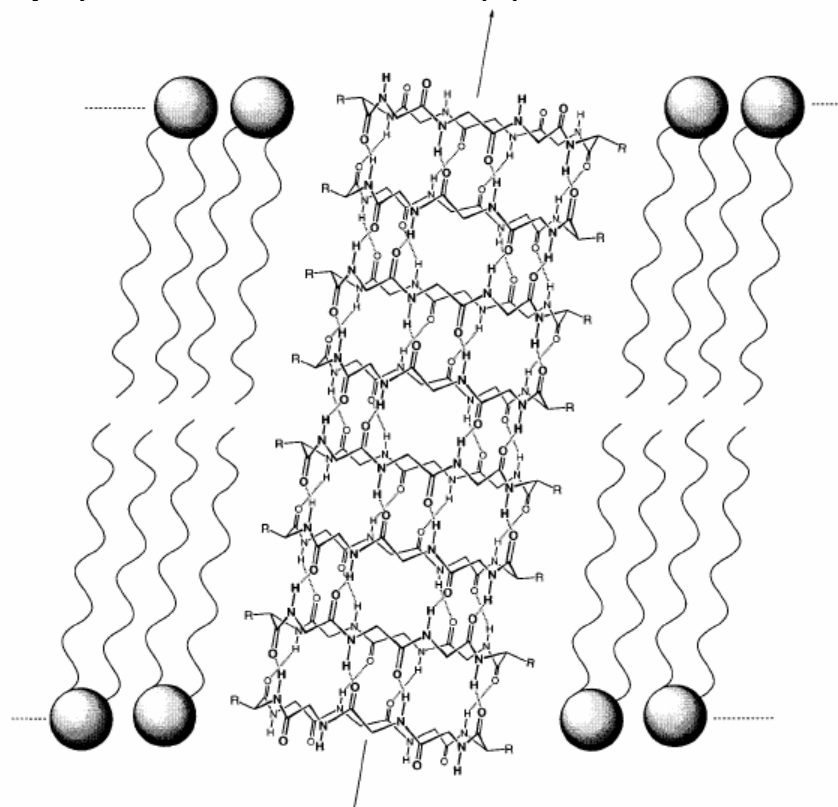


Figura 36: Nanotubo insertado en una bicapa lipídica.

- 82) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. "Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes" *Nature* **1994**, *369*, 301-304.
- 83) La difusión del agua en el interior de los nanotubos se estudió teóricamente: Engels, M.; Bashford, D. and Ghadiri, M. R. "Structure and Dynamics of Self-Assembling Peptide Nanotubes and the Channel-Mediated Water Organization and Self-Diffusion. A Molecular Dynamics Study" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9151-9158.

Los estudios de FT-IR llevados a cabo con el *ciclo[(L-Trp-D-Leu)<sub>3</sub>-L-Gln-D-Leu-]*, mostraron que la orientación del nanotubo no es perpendicular a la membrana lipídica, sino que éste se desvía unos 15° de la perpendicular,<sup>84</sup> siguiendo la inclinación habitual de las cadenas lipídicas.

El primer ciclopeptido estudiado *ciclo[L-Gln-(D-Leu-L-Trp)<sub>3</sub>-D-Leu-]* mostró una conductividad de  $10^7$  iones  $s^{-1}$  tanto de los  $Na^+$  como de los  $K^+$ . Los estudios de patch clamp (figura 37) confirmaron que el transporte de estos iones es tres veces más rápido que el que se produce a través del canal que genera un compuesto natural como la gramicidina A.

Variando el número de Aa de los ciclopeptidos se pueden generar canales de diferentes dimensiones, permitiendo el transporte de pequeñas moléculas que no pueden ser transportadas por los ciclooctapeptidos. El decapeptido *ciclo[Gln-(D-Leu-Trp)<sub>4</sub>-D-Leu-]* forma canales en liposomas y es capaz de transportar glucosa o ácido glutámico.<sup>85,86</sup> Este comportamiento se puede explicar por el tamaño del poro interno para los diferentes ciclopeptidos: *D-L*-octa-, deca-, dodecapeptidos poseen un diámetro interno de van der Waals de unos ~7, ~10 y ~13 Å respectivamente.

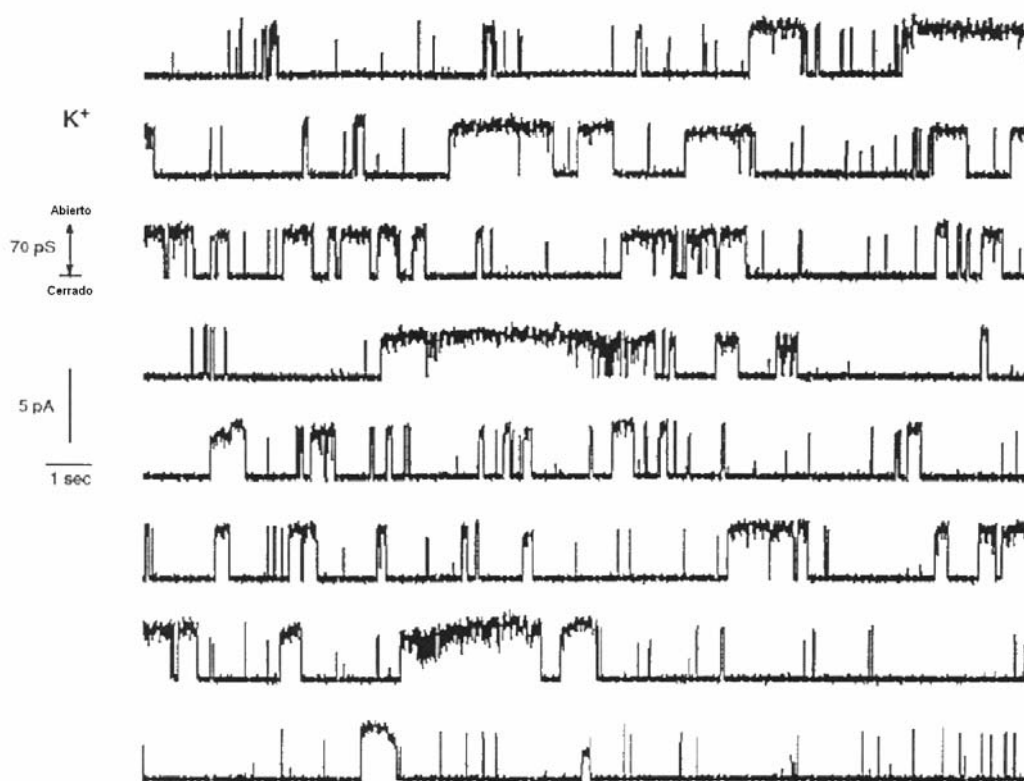


Figura 37: En este estudio de patch clamp se puede ver la apertura y cierre de los canales que generan el *ciclo[L-Gln-(D-Leu-L-Trp)<sub>3</sub>-D-Leu-]*.

- 
- 84) Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, M. R. "Oriented Self-Assembly of Cyclic Peptide Nanotubes in Lipid Membranes" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4417-4424.
- 85) Granja, J. R.; and Ghadiri, M. R. "Channel-Mediated Transport of Glucose across Lipid Bilayers" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.
- 86) Sánchez-Quesada J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. "A Synthetic Pore-Mediated Transmembrane Transport of Glutamic Acid" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2503-2506.

El diseño de tapas moleculares para los nanotubos de membrana es un gran reto que también se ha abordado con el objetivo de controlar la apertura y el cierre del canal, así como de modular su selectividad en el transporte. Para ello se han usado ciclopeptidos N-alquilados (como los anteriormente estudiados en disolución), que pueden bloquear el crecimiento del canal, también se han utilizado diversos grupos catiónicos y aniónicos en el grupo N-alquilo o en las cadenas laterales de los Aa. Gracias a ello, estas unidades ciclopeptídicas tienden a situarse en la interfase de la disolución acuosa y de las cadenas fosfolipídicas, de tal forma que sólo pueden interactuar con los extremos del nanotubo. Así, los nanotubos heterodiméricos resultantes presentan modulada su capacidad de transporte: por ejemplo, se incrementa la conductividad (10-15 % en 20 mM KCl).<sup>87</sup> Esta modificación de los extremos del nanotubo puede dar lugar a novedosas propiedades como mayor selectividad en el transporte, sistemas de control de apertura y cierre, puertas lógicas, etc.

---

87) Sánchez-Quesada, J.; Isler, M. P.; Ghadiri, M. R. "Modulating ion channel properties of transmembrane peptide nanotubes through heteromeric supramolecular assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10004-10005.

## 2.4. EXPANSIÓN DEL MODELO DE NANOTUBOS PEPTÍDICOS A NUEVOS DISEÑOS

La formación de nanotubos a partir de ciclopeptidos se ha extendido con la incorporación al esqueleto básico de  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ -aminoácidos y de oligoureas, dando lugar a una serie de híbridos que amplían el potencial de esta tecnología.

Los primeros nanotubos que aparecieron fueron los  $\beta$ -nanotubos desarrollados por el grupo de Seebach.<sup>61</sup> Estos nanotubos, que se identificaron mediante difracción de rayos X de polvo cristalino, se prepararon a partir del ciclotetrapéptido *ciclo*[( $\beta^3$ -HAla)]. Se pudo observar que el ciclopeptido adopta una conformación plana y las distintas subunidades se asocian mediante cuatro puentes de hidrógeno dejando un orificio central de 2,6-2,7 Å.

La estereoquímica de los  $\beta$ -Aa (con una única cadena lateral en el carbono  $\beta$ ) no parece ser en este caso de gran importancia, ya que tanto los ciclopeptidos compuestos por aminoácidos de igual conformación como los que alternan isómeros *S* y *R*, dan lugar a los correspondientes nanotubos.<sup>61</sup>

Estos nanotubos formados por  $\beta$ -Aa son anisotrópicos, ya que todos los carbonilos están orientados hacia el mismo lado del ciclopeptido, mientras que los NH se orientan en sentido opuesto. Esta anisotropía del nanotubo se deriva de la propia estructura del ciclopeptido, al estar compuesto por Aa que poseen un número par de átomos entre el C=O y el NH, formándose un nanotubo con hojas  $\beta$  paralelas, en vez de las antiparalelas características de los *D,L*-ciclopeptidos (figura 38).

El grupo de Ghadiri sintetizó ciclotetrapéptidos constituidos por  $\beta$ -Aa: *ciclo*[( $\beta^3$ -HTrp)<sub>4</sub>-], *ciclo*[( $\beta^3$ -HTrp- $\beta^3$ -HLeu)<sub>2</sub>-] y *ciclo*[( $\beta^3$ -HLeu)<sub>4</sub>-], que se insertan en membranas lipídicas y dan lugar a canales transmembranosos, observándose que el tetrapéptido formado por  $\beta$ -HTrp transporta más de  $1,9 \times 10^7$  iones ( $K^+$ ) por segundo.<sup>62</sup>

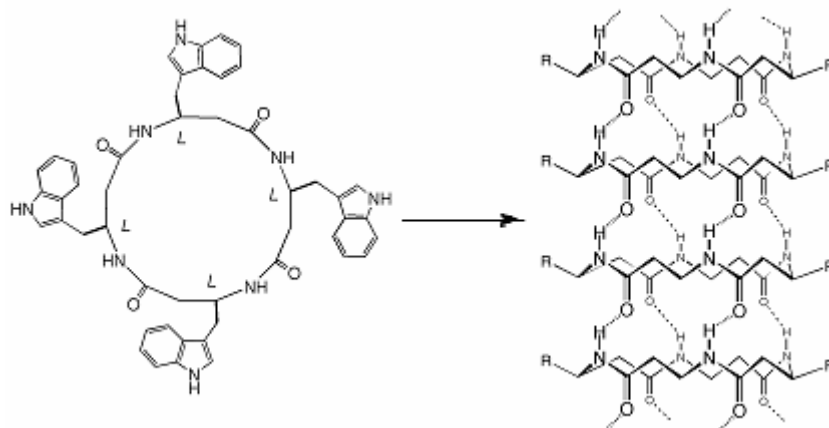


Figura 38: Modelo de nanotubo peptídico formado por  $\beta$ -Aa y su precursor ciclopeptídico empleado en los estudios de transporte de iones.<sup>62</sup>

Los primeros nanotubos peptídicos se formaron en el año 1975 a partir de híbridos de  $\alpha$  y  $\beta$ -aminoácidos. Aunque en su momento no se le dio ninguna trascendencia a los nanotubos realizados con *ciclo*[*L*-Ser(O-*t*-Bu)- $\beta$ -Ala-Gly-*L*- $\beta$ -

61) Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B.; "Cyclo- $\beta$ -peptide. Structure and tubular stacking of cyclic tetramers of 3-aminobutanoic acid as determined from powder diffraction data" *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173-182.

62) Clark, T. D.; Buehler, L. K., Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Cyclic  $\beta^3$ -Peptide Nanotubes as Artificial Ion Channels" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.

Asp(OMe)], éstos mostraban una estructura tubular en la que sólo había dos puentes de hidrógeno entre subunidades. Tal como se muestra en la figura 39, el ciclopéptido no adopta la conformación plana como en los anteriores nanotubos.<sup>63</sup>

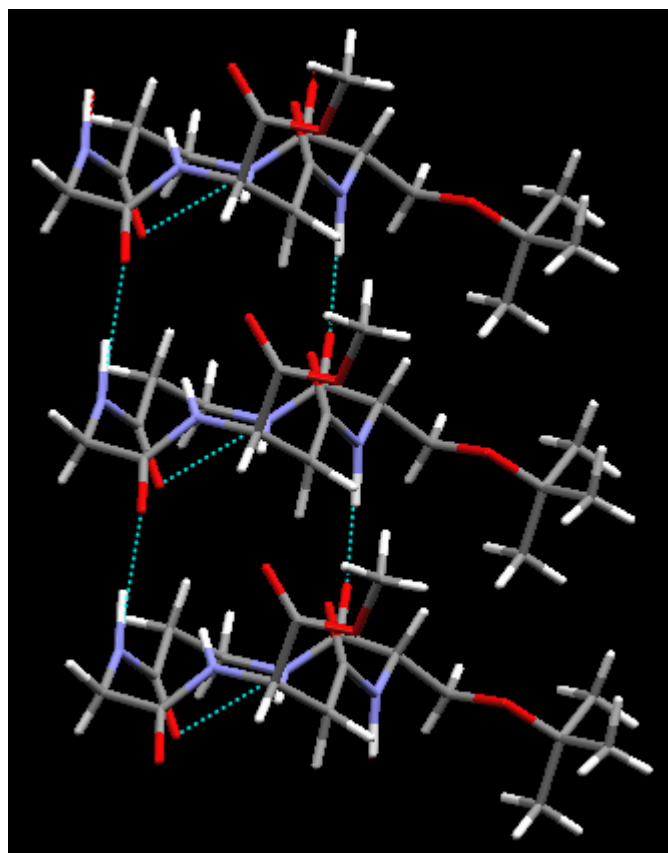


Figura 39: Estructura de los nanotubos formados por  $\alpha,\beta$ -ciclotetrapéptidos, en la que se observa la presencia de dos puentes de hidrógeno entre cada subunidad y de un puente de hidrógeno intramolecular que estabiliza la estructura plegada del ciclopéptido.<sup>63</sup>

Los  $\delta$ -nanotubos fueron preparados por el grupo de Dory a partir de ciclotripéptidos.<sup>64</sup> Estos ciclopéptidos están constituidos por  $\delta$ -aminoácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados con una geometría *trans* del doble enlace, lo que le permite al ciclopéptido adoptar la conformación plana adecuada para el autoensamblaje. Dado que el esqueleto posee un número par de átomos entre el carbonilo y el amino de cada aminoácido (como los  $\beta$ -péptidos), todos los carbonilos quedan orientados hacia el mismo lado del ciclopéptido y las aminas hacia la otra cara, lo que proporciona al nanotubo, de forma similar a lo comentado para los  $\beta$ -nanotubos, un momento bipolar, resultando un cristal altamente anisotrópico. A su vez, los nanotubos de ciclotripéptidos se autoorganizan dando cristales líquidos; y cada nanotubo se comporta como un listón que se autoorganiza en estructuras supramoleculares más complejas. Seis nanotubos se organizan en un nuevo nanotubo de mayores dimensiones; así mismo, seis de estos

63) Karle, I. L.; Handa, B. K.; Hassall, C. H. "The Conformation of the Cyclic Tetrapeptide L-Ser(O-t-Bu)- $\beta$ -Ala-Gly-L- $\beta$ -Asp(OMe) Containing a 14-Membered Ring" *Acta Crystallogr. Sect. B* **1975**, *31*, 555-560.

64) Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. "Self-Assembly of Cyclic Peptides into Nanotubes and Then into Highly Anisotropic Crystalline Materials" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635-4638.

nuevos nanotubos de segunda generación vuelven a comportarse de forma similar dando lugar a un nuevo nanotubo tal y como se aprecia en la figura 40.<sup>65</sup> El material resultante es altamente poroso, observándose tres tipos de orificios diferentes.

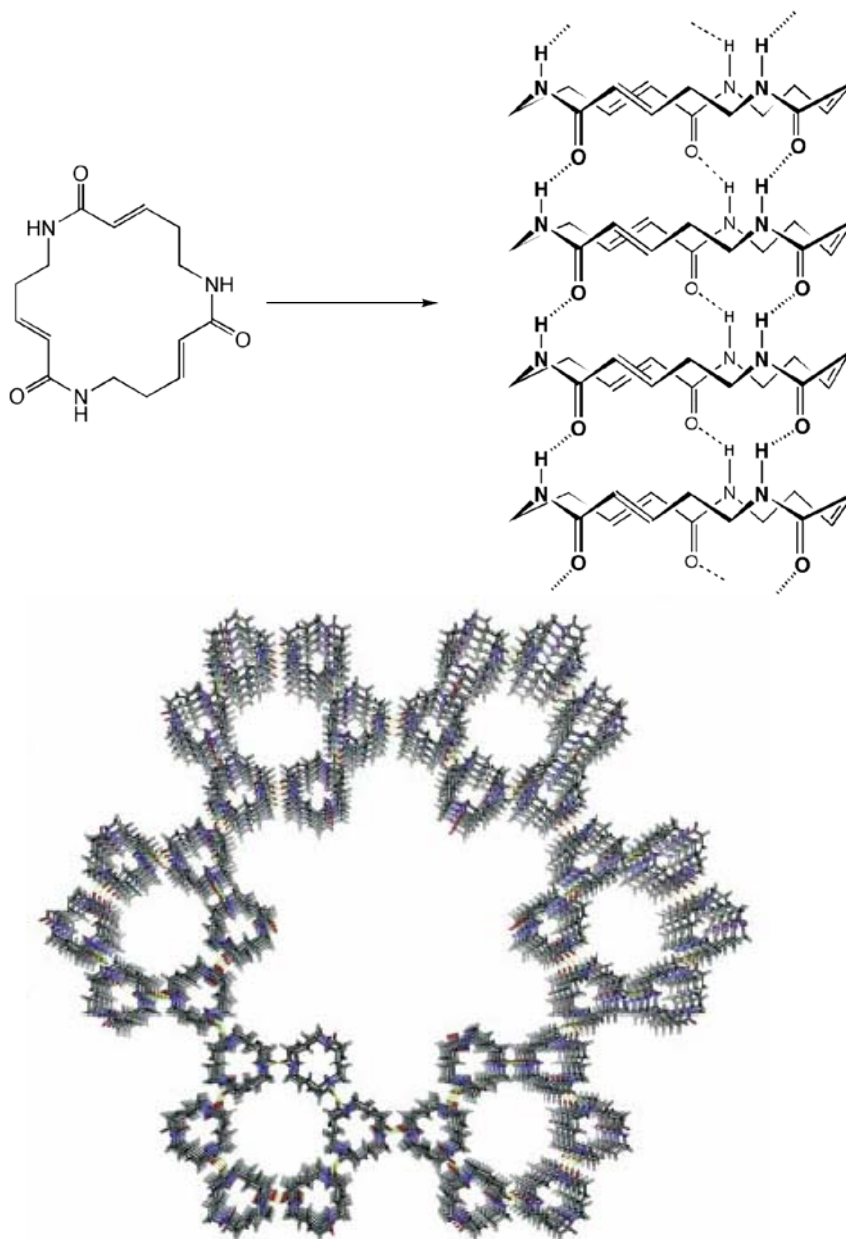


Figura 40: Superior: Modelo de proceso de autoensamblaje de los ciclotropéptidos constituidos por  $\delta$ -aminoácidos, para generar un nanotubo. Inferior: Autoorganización observada para estos nanotubos cuando forman cristales líquidos.<sup>64, 65</sup>

64) Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. "Self-Assembly of Cyclic Peptides into Nanotubes and Then into Highly Anisotropic Crystalline Materials" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635-4638.

65) Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, R.; Gauthier, D.; Zhao, Y. and Dory, Y. L. "Micrometer-Sized Hexagonal Tubes Self-Assembled by a Cyclic Peptide in a Liquid Crystal" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 349-353.

Uno de los últimos ejemplos de ciclopéptidos son los  $\alpha,\epsilon$ -ciclopéptidos,<sup>88</sup> formados por  $\alpha$ -Aa y  $\epsilon$ -aminoácidos derivados del 1,2,3-triazol preparado a partir de la Leu mediante click-chemistry.<sup>89</sup> Este trabajo abordaba la modificación de la cavidad del interior del canal con los ácidos del 1,2,3-triazólicos. Estos nanotubos, que además se han podido estudiar tanto en disolución como en estado sólido, muestran que la orientación del triazol es paralela al eje del nanotubo y no perpendicular al mismo, y que poseen una cavidad de 80 Å<sup>3</sup>. Se debe destacar que, para la formación de nanotubos, se necesita la utilización de disolventes próticos que participan en la estabilización del nanotubo.

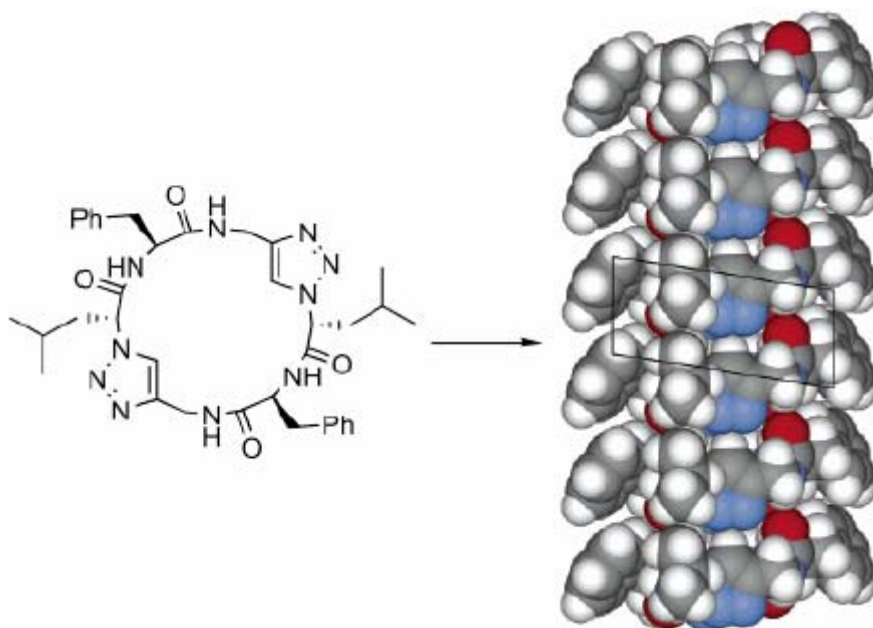


Figura 41: Los  $\alpha,\epsilon$ -ciclopéptido se autoensamblan dando nanotubos peptídicos.<sup>88</sup>

Basándose en los modelos de nanotubos peptídicos, también se han sintetizado cicloureas que dan lugar a nanotubos similares a los descritos anteriormente. Las ureas son las responsables, por tanto, de establecer los puentes de hidrógeno necesarios para que las cicloureas se orienten y asocien. Uno de estos ejemplos se muestra en la figura 42, en la que los conectores utilizados entre ureas (dos en este caso) es un difenil éter.<sup>90</sup> El sistema forma un anillo que deja los C=O y NH de las ureas en posición adecuada para formar los puentes de hidrógeno (posición perpendicular al plano del esqueleto de la molécula) entre las distintas subunidades. Al cristalizar, el nanotubo de cicloureas deja moléculas de ácido acético en su interior.

88) Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. "A Heterocyclic Peptide Nanotube" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9372-9376.

89) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

90) Shimizu, L. S.; Hughes, A. D.; Smith, M. D.; Davis, M. J.; Zhang, B. P.; Loye, H.-C. zur; Shimizu, K. D. "Self-Assembled Nanotubes that Reversible Bind Acetic Acid Guest" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14972-14973.

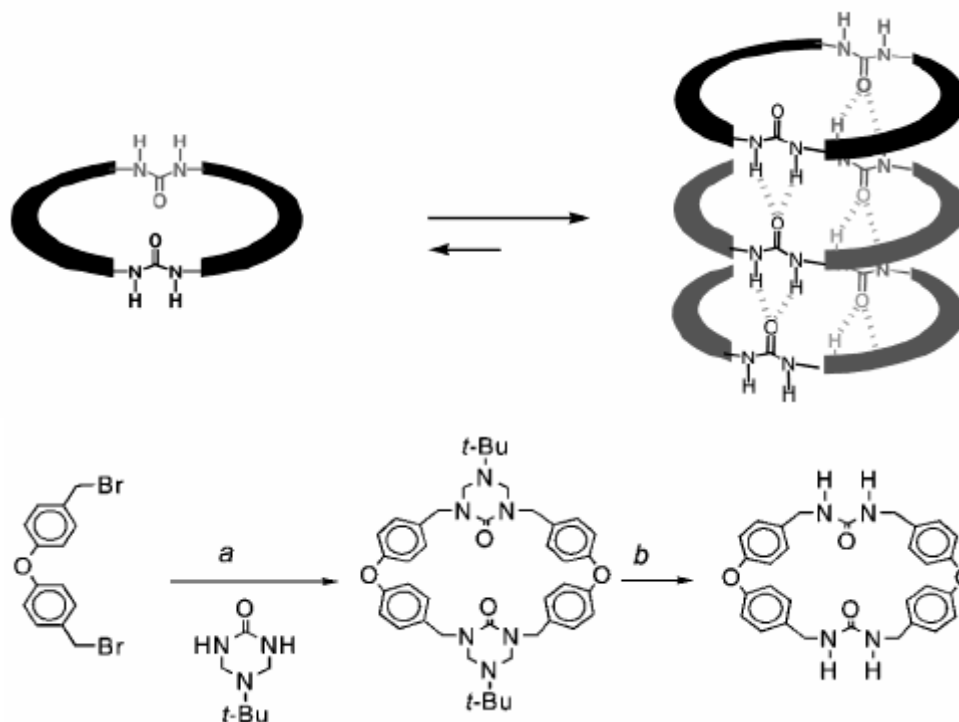


Figura 42: Superior: Modelo simplificado de la formación de nanotubos a partir de una bisciclourea, cuya estructura y síntesis se muestran en la parte inferior de la figura. (a) *t*-butil triazona, NaH, THF, 20% y b) 20% dietanol amina, MeOH, reflujo 85%).

Guichard y colaboradores han demostrado que se pueden reemplazar  $\alpha$ -Aa por ureas en una secuencia ciclopeptídica y aprovechar los puentes de hidrógeno que pueden establecer las ureas para formar nanotubos. Estas cicloureas cristalizan de modo similar a como lo hacen los nanotubos peptídicos,<sup>91</sup> observándose el apilamiento de las distintas unidades cíclicas unidas mediante dos puentes de hidrógeno entre el oxígeno de una urea y los dos grupos NH de la siguiente subunidad. Al igual que con los  $\beta$ -Aa, las unidades se orientan de forma paralela, disponiéndose todos los C=O del mismo ciclopeptido en la misma orientación, mientras que los NH lo hacen en sentido opuesto.

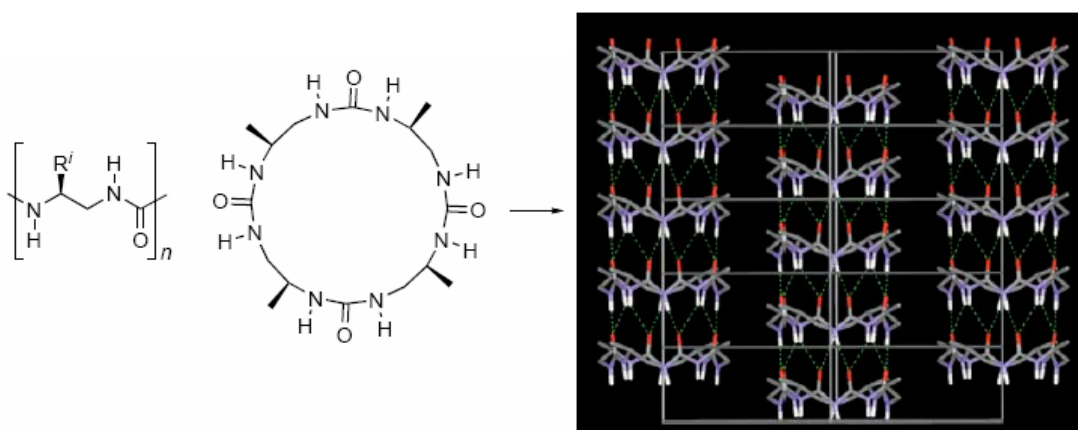


Figura 43: Cicloloigoureas que se autoensamblan dando los nanotubos de la derecha.<sup>91</sup>

91) Semetey, V.; Didierjean, C.; Briand, J. P.; Aubry, A.; Guichard, G. "Self-assembling organic nanotubes from enantiopure cyclo- $N,N'$ -linked oligoureas: design, synthesis, and crystal structure" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1895-1898.

Ranganathan y colaboradores han utilizado como análogos de ciclopeptidos macrociclos de bisureas preparadas a partir de cisteínas.<sup>92</sup> A pesar de su flexibilidad, estas moléculas cristalizan como nanotubos, estableciendo puentes de hidrógeno entre las ureas tal y como se aprecia en la figura 44.

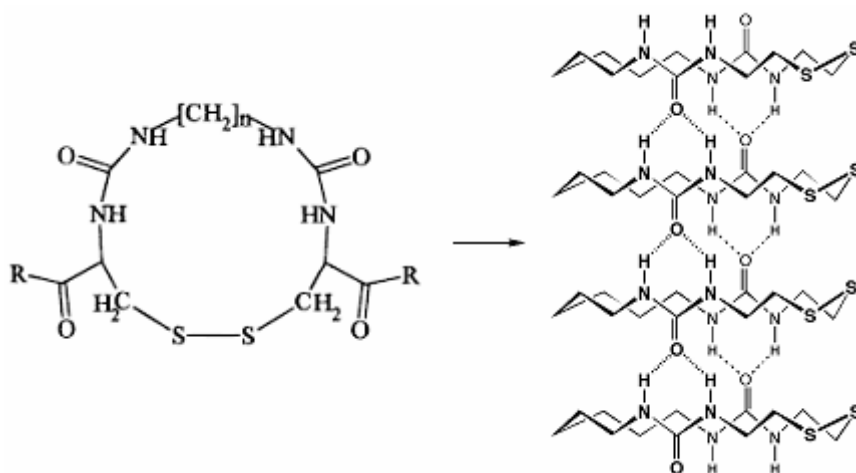
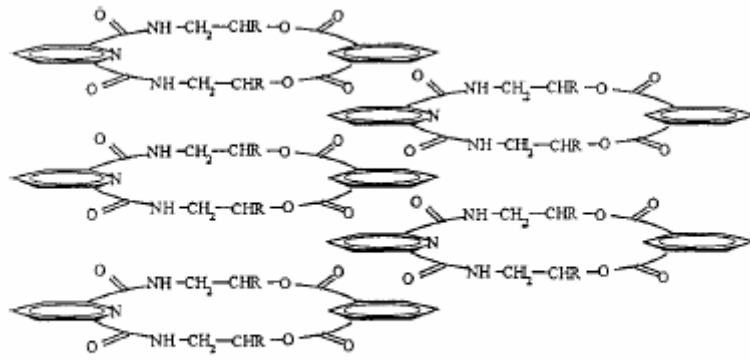


Figura 44: Esquema de un nanotubo formado por dos ureas por macrociclo.

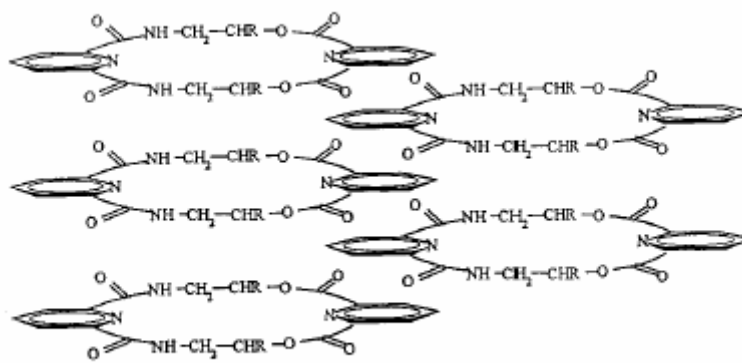
También el grupo de Ranganathan ha formado nanotubos usando ciclodepsipéptidos en los que, en estado sólido, se establecen interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los fenilos y las piridinas que componen el depsipéptido, como forma promotora del apilamiento de los mismos sin que se observe la formación de puentes de hidrógeno que estabilicen el nanotubo (figura 45).<sup>93</sup> Tal como se muestra en la figura 45, los grupos amida se orientan en el plano del macrociclo y no intervienen en la formación de los puentes de hidrógeno que estabilizan el nanotubo.

92) Ranganathan, D.; Lakshmi, C.; Karle, I. L. "Hydrogen-Bonded Self-Assembled Peptide Nanotubes from Cystine-Based Macrocyclic Bisureas" *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6103-6107.

93) Ranganathan, D.; Haridas, V.; Gilardi, R.; Karle, I. L. "Self-assembling aromatic-bridged serine-based cyclodepsipeptides (serinophanes): a demonstration of tubular structures formed through aromatic  $\pi$ - $\pi$  interactions" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10793-10800.



(a)



(b)

Figura 45: (a) y (b) representan dos depsipéptidos diferentes que dan lugar a nanotubos.



## **CAPÍTULO 3: OBJETIVOS**



El objetivo de este trabajo es el diseño, síntesis y estudio de las propiedades de nuevos nanotubos peptídicos cuya cavidad interior sea diferente a la de los preparados hasta el momento y que además puede permitir en un futuro su modificación. Estos nanotubos posibilitarían el desarrollo de sistemas de transporte moleculares más selectivos en base a sus propiedades físicas y químicas, y no sólo por tamaño; así como el desarrollo de nuevos contenedores moleculares o nanotubos con propiedades catalíticas o capaces de reconocer distintos tipos de moléculas. Los nanotubos peptídicos preparados hasta ahora (capítulo 2) no permiten modificar las propiedades del nanotubo mediante la introducción de diferentes grupos funcionales sin distorsionar la estructura ni la conformación plana necesaria para la formación de nanotubos.

Los nanotubos de alfa y beta Aa tienen una cavidad interior de carácter hidrofílico que se debe a la presencia de los grupos amida que forman puentes de hidrógeno con otras subunidades (figura 22, capítulo 2). Se cree que las interacciones de esta red de puentes de hidrógeno con los pares electrónicos del oxígeno del H<sub>2</sub>O, son las responsables de la hidrofilia del nanotubo, como lo demuestra el hecho de que sean capaces de transportar iones<sup>82</sup> y azúcares<sup>85</sup> o la presencia de moléculas de H<sub>2</sub>O en los cristales de estos nanotubos.<sup>74,94</sup> La especial composición de estos ciclopeptidos, en los que se alternan *L*- y *D*-Aa,<sup>95</sup> determina que todas las cadenas laterales de los distintos Aa queden orientados hacia el exterior del nanotubo, mientras que el H $\alpha$  queda orientado paralelamente al eje del tubo, dejando hueco el interior de la supermolécula. Por tanto, no es posible modificar el carbono  $\alpha$  u orientar la cadena lateral de los  $\alpha$ -Aa sin distorsionar la conformación plana con el objetivo de cambiar las propiedades internas del nanotubo *L,D*-.

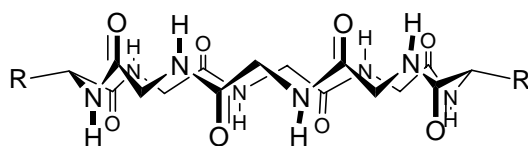


Figura 46: Disposición plana de los ciclopeptidos necesaria para la formación de nanotubos, donde las cadenas laterales de los  $\alpha$ -Aa quedan hacia el exterior para no interferir en la formación de éstos, y ninguno de los grupos se proyecta hacia el interior.

Nuestro primer objetivo fue diseñar un ciclopeptido que pudiese formar nanotubos mediante un proceso de autoensamblaje molecular, que a su vez permitiese

- 
- 82) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. "Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes" *Nature* **1994**, *369*, 301-304.
- 85) Granja, J. R.; and Ghadiri, M. R. "Channel-Mediated Transport of Glucose across Lipid Bilayers" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.
- 74) Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. "The Structural and Thermodynamic Basis for the Formation of Self-Assembled Peptide Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.
- 94) Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. R.; Ghadiri, M. R. "Cylindrical  $\beta$ -sheet Peptide Assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.
- 95) Los  $\beta$ -aminoácidos que forman los ciclopeptidos pueden ser todos de la misma quiralidad o de quiralidad alternada, ya que en ambos casos los ciclopeptidos dan lugar a la conformación plana necesaria para la formación de nanotubos: a) Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B.; "Cyclic- $\beta$ -peptides. Structure and tubular stacking of cyclic tetramers of 3-aminobutanoic acid as determined from powder diffraction data" *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173-182. b) Clark, T. D.; Buehler, L. K., Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Cyclic  $\beta^3$ -Peptide Nanotubes as Artificial Transmembrane Ion Channels" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.

funcionalizar su interior. Para ello, pensamos en utilizar ciclopéptidos compuestos por  $\gamma$ -aminoácidos, como por ejemplo el 4-aminobutírico, que permitiría modificar las propiedades del nanotubo si el carbono 3, en la conformación plana que da lugar al nanotubo, quedase proyectado hacia el interior de la cavidad (figura 47).<sup>96</sup> Las modificaciones de este carbono ( $R^2$  diferente de H) permitirían por tanto variar las propiedades del nanotubo. Sin embargo, esta conformación, con  $R^2$  orientado hacia el interior de la cavidad, no es la más estable; y probablemente, en disolución, este péptido se plegaría para adoptar una conformación diferente a la deseada. La introducción de sustituyentes en los carbonos 2 y 4 del aminoácido podría favorecer esta conformación, aunque probablemente induciría al ciclopéptido hacia otros tipos de plegamientos no deseados o dificultaría su apilamiento para la formación de nanotubos. Para prevenir estos plegamientos decidimos utilizar ácidos 3-aminocicloalcanocarboxílicos de geometría *cis* ( $\gamma$ -Aca) (figura 48). En concreto, pensamos en usar el ácido 3-aminociclohexanocarboxílico ( $\gamma$ -Ach) ( $n = 1$ ), que en su conformación silla más estable dejaría a ambos sustituyentes orientados ecuatorialmente, favoreciendo la conformación plana del ciclopéptido necesaria para la formación de nanotubos (figura 48). El sustituyente del carbono C2 del anillo, en disposición ecuatorial, quedaría orientado hacia el interior del canal sin intervenir en el proceso de autoensamblaje.

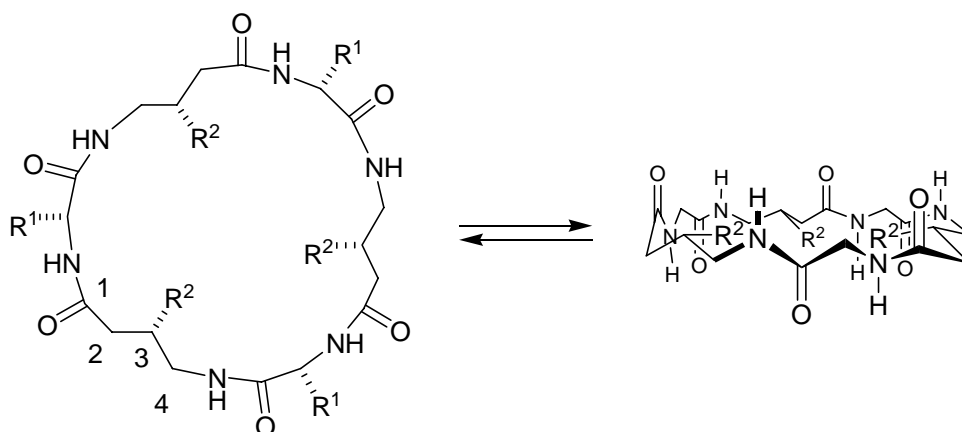


Figura 47: Ciclopéptido formado por el ácido 4-aminobutírico y  $\alpha$ -Aa.

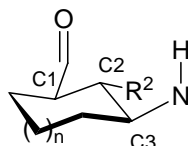


Figura 48: Modelo de la disposición de los  $\gamma$ -Aca en la estructura de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos.

El primer motivo estructural propuesto para este estudio fue la alternancia de  $\alpha,\gamma$ -aminoácidos: un ciclopéptido en el que se alternasen los  $\alpha$ -Aa con los  $\gamma$ -Aca, y en el que estos últimos deberían favorecer la conformación plana.

96) Revisión de la nomenclatura de péptidos y ciclopéptidos: Jones, J. H. "A short guide to abbreviations and their use in peptide science" *Int. J. Peptide Sci.* **1999**, 5, 465-471.

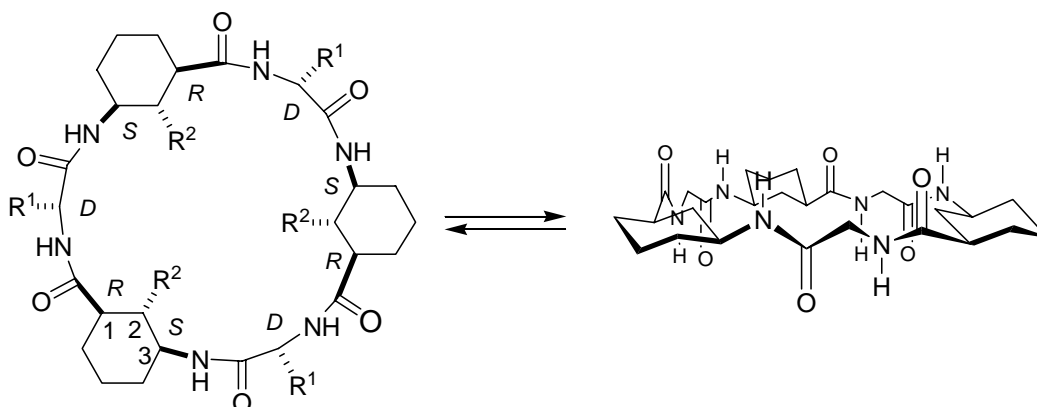


Figura 49: En la izquierda se representa un ciclopeptido formado por  $\alpha$ -Aa y  $\gamma$ -Ach, mientras que en la derecha se muestra el modelo en perspectiva de la conformación plana precursora de nanotubos. Las interacciones puente de hidrógeno entre los C=O y los NH del esqueleto peptídico con otras subunidades debe conducir a la formación de nanotubos. Para facilitar la visión de este modelo se han suprimido las cadenas laterales de los  $\alpha$ -Aa.

La quiralidad de los Aa es altamente importante, ya que sólo ciclopeptidos en los que los  $\alpha$ -aminoácidos de configuración natural *-L-* se alternan con  $\gamma$ -aminoácidos cíclicos ( $\gamma$ -Aca) de configuración (*1S,3R*) pueden adoptar la conformación plana necesaria para la formación de nanotubos (figura 49). En realidad, dado que los  $\gamma$ -Aca poseen un número impar de átomos (5) al igual que los  $\alpha$ -Aa (3) (figura 48), en principio podríamos sustituir cualquier  $\alpha$ -Aa de los *D,L*- $\alpha$ -péptidos por un  $\gamma$ -Aca, siempre y cuando los  $\alpha$ -Aa de configuración natural (*L*) los sustituyamos por el isómero (*1R,3S*) y los *D*-Aa los intercambiamos por el (*1S,3R*) (figura 49).<sup>97</sup> Por ello, en este trabajo nos planteamos, como objetivo simultáneo, confirmar la hipótesis de que el anillo cicloalcánico del  $\gamma$ -Aca es equivalente a un  $C\alpha$  voluminoso. Esta hipótesis la podríamos confirmar mediante el desarrollo de otros motivos estructurales, tales como (3  $\alpha$ -Aa por cada 1  $\gamma$ -Aca), en el cual 2  $\alpha$ -Aa (*D*, por ejemplo) de un *D,L*-ciclooctapéptido se sustituyen por 2  $\gamma$ -Aca de configuración (*1S,3R*), y obtener nanotubos peptídicos.

97) Dada esta equivalencia estereoquímica, a lo largo de este trabajo utilizaremos la nomenclatura *D*- $\gamma$ -Ach para referirnos al (*1S,3R*)-3-aminociclohexanocarboxílico y la *L*- $\gamma$ -Ach para referirnos al isómero (*1R,3S*).

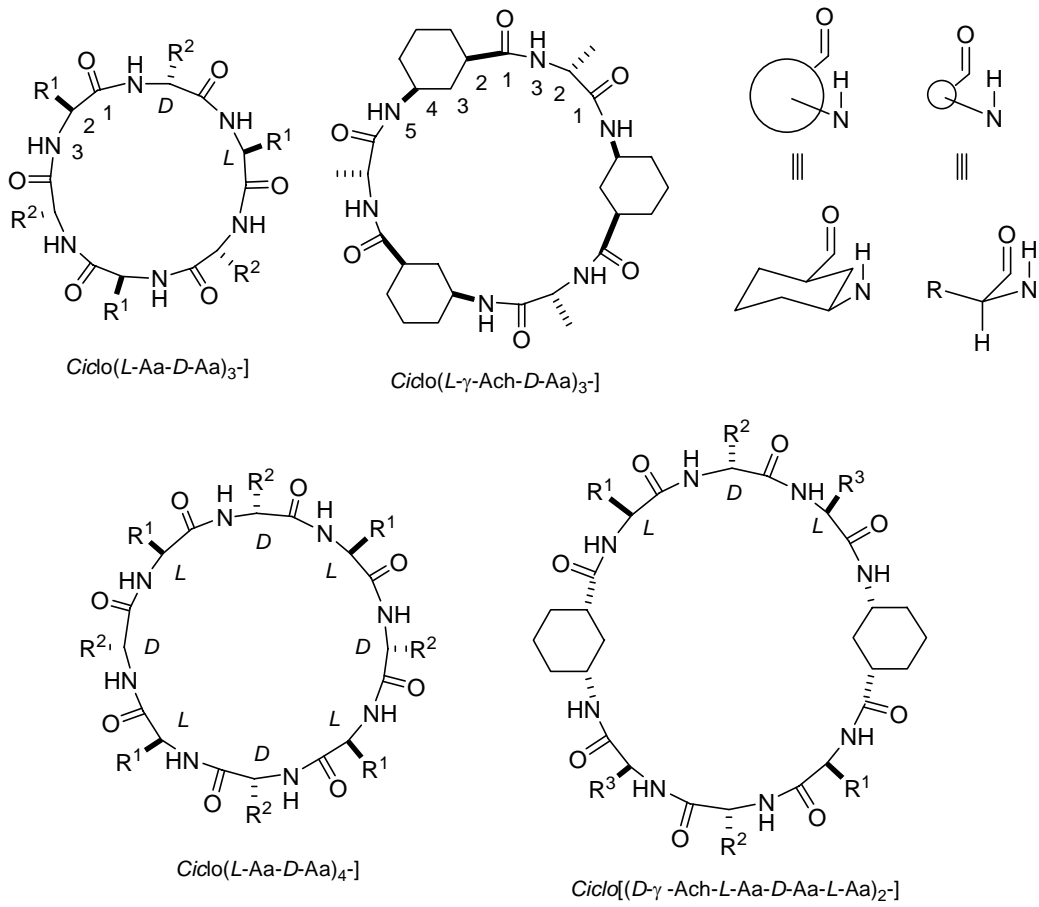


Figura 50: Esquema de ciclopeptidos formados por  $\alpha$ -aminoácidos (izquierda) y de otros formados por  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos (derecha). Los R pueden corresponder a iguales o a diferentes Aa, pero siempre respetando la estereoquímica.

### 3.1. MODOS DE ESTUDIO

Para estudiar estas nuevas estructuras supramoleculares se pueden plantear tres estrategias diferentes. La primera consistiría en un estudio en estado sólido, para lo cual se prepararían ciclopeptidos que se autoensamblen mediante un cambio de las condiciones del medio en las que se disuelve el péptido (cambio de pH, polaridad, etc.), tal como realizó Ghadiri en sus primeros estudios.<sup>10,67</sup> Por ejemplo, ciclopeptidos formados por Gln y  $\gamma$ -Ach podrían ser solubles en disoluciones fuertemente ácidas, mientras que una lenta basificación conduciría a la formación del nanotubo. El estudio de estos nanotubos se tendría que realizar mediante microscopía electrónica, difracción de electrones o rayos X si se formasen cristales de tamaño adecuado. Otra posibilidad sería anclar y hacer crecer los nanotubos sobre superficies de oro o mica y estudiarlos mediante microscopio de fuerzas atómicas (AFM).<sup>98</sup> Para estos estudios se requeriría al menos una Cys en la secuencia del ciclopeptido para facilitar su anclaje (figura 51 A).<sup>72</sup>

La segunda alternativa se basaría en el estudio de los procesos de autoensamblaje en disolución con ciclopeptidos que tuviesen bloqueada una de sus caras, por ejemplo, con grupos metilo que sustituyesen a los protones de las amidas y por tanto que sólo pudiesen dar lugar a dímeros (figura 51 B).<sup>74,78</sup> La adecuada elección de los aminoácidos permitiría estudiar estas especies en disolución y determinar los factores termodinámicos y estructurales que gobiernan estos procesos, utilizando para ello la resonancia magnética nuclear. Los estudios en disolución nos proporcionarían además una gran información sobre la dinámica del autoensamblaje, aunque menos información sobre los nanotubos propiamente dichos.

La tercera estrategia supondría estudiar la formación de nanotubos mediante la puesta a punto de alguna de las propiedades características de los mismos, como por ejemplo, el transporte molecular o iónico (figura 51 C).<sup>82,85</sup> Para ello, se sintetizarían ciclopeptidos compuestos por Aa hidrofóbicos (como Trp o Leu) capaces de solubilizarse en bicapas fosfolipídicas y de ensamblarse en el interior de las mismas dando lugar a canales transmembranales. El transporte de iones u otras especies de un lado a otro de la bicapa, impulsadas por la presión osmótica o la diferencia de potencial electrostático, sería un claro indicio de la formación de nanotubos.

En este trabajo hemos abordado estas tres estrategias para determinar la formación de nanotubos, aunque hemos dedicado un mayor esfuerzo al estudio en

- 
- 10) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. "Self-Assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture" *Nature* **1993**, *366*, 324-327.
- 67) Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R.; "Self-Assembling peptide Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.
- 98) Song, S. H.; Park, K. M.; Chang, S. M.; Nakamura, C.; Miyake, J.; Kim, W. S. "Analysis of the Structure and Morphology of Oligopeptide SAM using XPS and AFM" *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2003**, *407*, 531-536.
- 72) Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. "Diffusión-Limited Size-Selective Ion Sensing Based on SAM-Supported Peptide Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11306-11312. Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. "Diffusion-limited size-selective ion sensing based on SAM-supported peptide nanotubes" [Erratum to document cited in CA128:32011] *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1347.
- 74) Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. "The Structural and Thermodynamic Basis for the Formation of Self-Assembled Peptide Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.
- 78) a) Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M.; P.; McRee, D. E.; Ghadiri M. R. "Cylindrical  $\beta$ -Sheet Peptide Assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *35*, 8949-8960.
- 82) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes. *Nature* **1994**, *369*, 301-304.
- 85) Granja, J. R.; and Ghadiri, M. R. "Channel-Mediated Transport of Glucose across Lipid Bilayers" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.

disolución con péptidos N-alquilados, ya que no requieren técnicas especiales con las que no contamos en nuestros laboratorios (criomicroscopía, AFM, patch clamp, etc.).

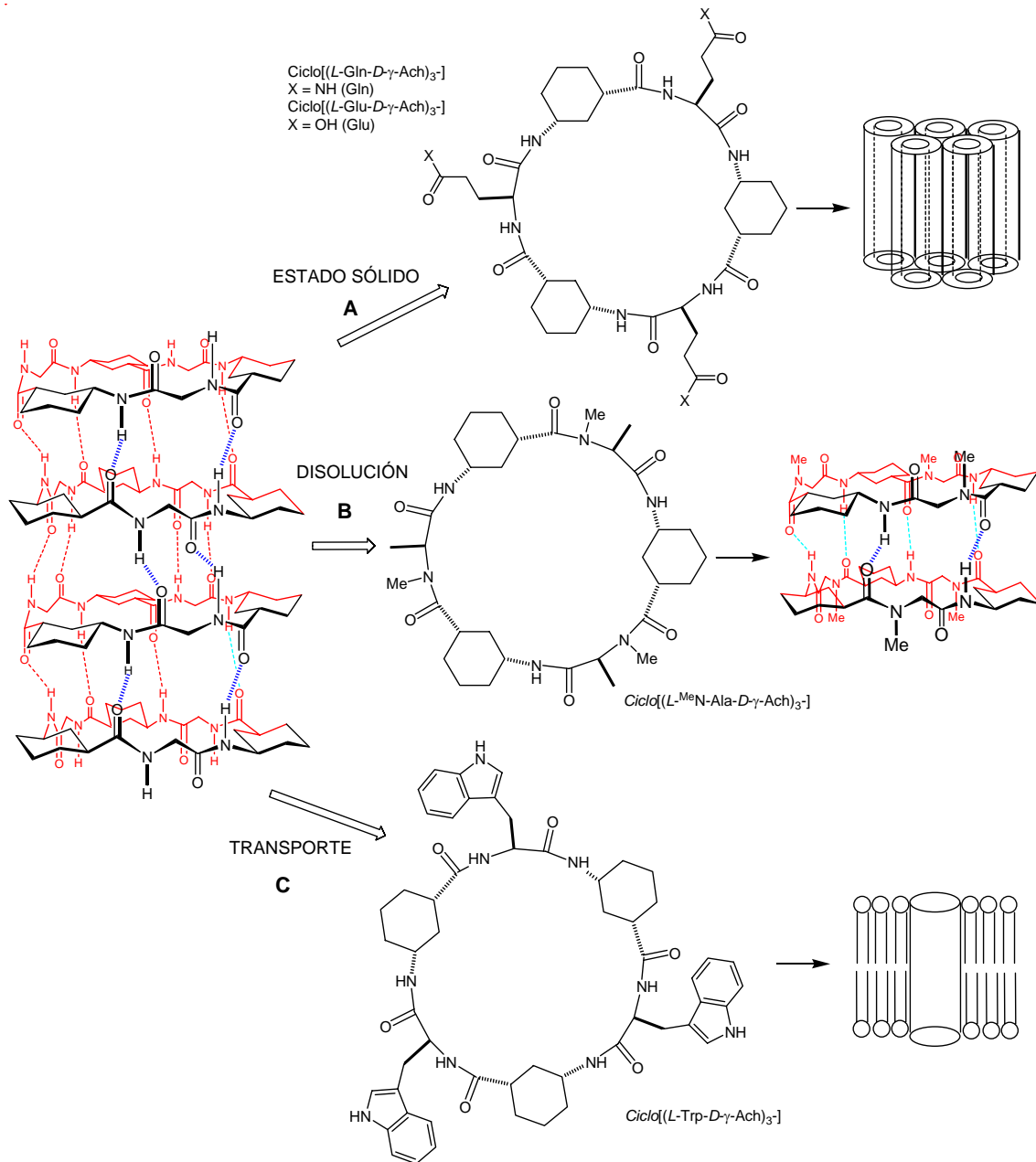


Figura 51: Representación de las tres estrategias abordadas en el estudio del proceso de formación de nanotubos. Superior: Estudio en estado sólido mediante la formación de nanotubos sólidos. Centro: Estudio en disolución mediante la formación de dímeros usando ciclopeptidos con Aa N-metilados. Inferior: Formación de nanotubos en membranas lipídicas.

## **CAPÍTULO 4: PRECEDENTES DE $\alpha,\gamma$ -CICLOPÉPTIDOS**



Durante la realización de este trabajo de tesis doctoral nos hemos encontrado con algunos ejemplos de ciclopéptidos que pretenden objetivos similares a los propuestos en esta memoria. Así por ejemplo, en 1999, Kubik preparó el primer ejemplo de  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptido usando el ácido 3-aminobenzoico o bien un derivado de éste con diferentes sustituyentes. Estos trabajos concluyeron que los péptidos se plegaban actuando como receptores de cationes o aniones, o bien como receptores de monosacáridos.<sup>99,100,101</sup>

Derivados del ácido 3,5-diaminobenzoico, funcionalizados en la posición 5 del anillo con diferentes ácidos carboxílicos, se emplearon para dar lugar a ciclopéptidos capaces de, aparentemente, formar un canal transmembranoso en membranas fosfolípidas. El modelo de canal propuesto se basa en un dímero en el que los ciclopéptidos forman los extremos del canal (cabeza y cola), mientras las cadenas alquiladas de la posición 5 se insertan en la membrana para formar dicho canal y transportar iones, mostrando una selectividad por los cationes frente a los aniones, que a su vez son ligeramente más selectivos al transporte de  $K^+$  que de  $Na^+$ .<sup>102</sup>

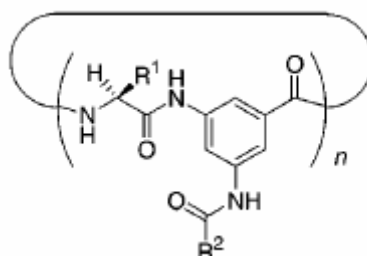


Figura 52: Diseño de ciclopéptidos formados por derivados del 3-aminobenzoico funcionalizado con cadenas alifáticas que formarán el canal.<sup>102</sup>

Ejemplos de otros trabajos sobre  $\gamma$ -Aa son los foldámeros desarrollados por el grupo de Albericio, en los que las cadenas peptídicas constituidas por *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina forman hélices,<sup>103</sup> así como los estudios de Seebach sobre los plegamientos de péptidos constituidos por  $\gamma$ -Aa que también dan lugar a hélices.<sup>104</sup>

- 99) Kubik, S. "Large Increase in Cation Binding Affinity of Artificial Cyclopeptide Receptors by an Allosteric Effect" *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5846-5855.
- 100) a) Kubik, S. and Goddard, R. "A New Cyclic Pseudo-peptide Composed of (L)-Proline and 3-Aminobenzoic Acid Subunits as a Ditopic Receptor for the Simultaneous Complexation of Cations and Anions" *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9475-9486. b) Pohl, S.; Goddard, R. and Kubik, S. "A new cyclic tetrapeptide composed of alternating L-proline and 3-aminobenzoic acid subunits" *Tetrahedron Letters*, **2001**, *42*, 7555-7558.
- 101) Bitta, J. and Kubik, S. "Cyclic Hexapeptides with Free Carboxylate Groups as New Receptors for Monosaccharides" *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2637-2640.
- 102) a) Qi, Z.; Sokabe, M.; Donowaki, K.; Ishida, H. "Structure-Function Study on a *de Novo* Synthetic Hydrophobic Ion Channel" *Biophysical Journal* **1999**, *76*, 631-641. b) Ishida, H.; Qi, Z.; Sokabe, M.; Donowaki, K. and Inoue, Y. "Molecular Design and Synthesis of Artificial Ion Channels Based on Cyclic Peptides Containing Unnatural Amino Acids" *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2978-2989.
- 103) a) Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F.; Royo, M. "Cell-Penetrating *cis*- $\gamma$ -Amino-L-Proline-Derived Peptides" *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459-9468. b) Aspa, Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F.; Royo, M. "A new Class of foldamers Based on *cis*- $\gamma$ -Amino-L-proline" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048-6057.
- 104) a) Seebach, D.; Schaeffer, L.; Brenner, M.; Hoyer, D. "Design and synthesis of  $\gamma$ -peptide derivatives with submicromolar affinities for human somatostatin receptors" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 776-778. b) Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Jaun, B.; " $\gamma^2$ ,  $\gamma^3$ , and  $\gamma^{2,3,4}$ -Amino Acids,

Un trabajo ya mencionado (página 44, capítulo 2) que perseguía la modificación de la cavidad del interior del canal es el de los  $\epsilon,\alpha$ -ciclopéptidos, en los que el grupo triazólico debía modificar las propiedades del nanotubo. Es notorio, sin embargo, que dicho anillo se orienta paralelamente al eje del nanotubo y que, aunque cambia las propiedades del mismo, no permite añadir otros grupos funcionales que se proyecten hacia el interior de la cavidad.<sup>88</sup>

---

Coupling to  $\gamma$ -Hexapeptides: CD Spectra, NMR Solution and X-ray Crystal Structures of  $\gamma$ -Peptide” *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 573-584.

88) Horne, W. S., Stout, C. D. and Ghadiri, M. R. “A Heterocyclic Peptide Nanotube” *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9372-9376.

**CAPÍTULO 5: SÍNTESIS DE  $\gamma$ -AMINOÁCIDOS Y METODOLOGÍA DE  
SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS**



### 5.1. SÍNTESIS DEL N-Boc-*cis*-3-AMINOCICLOHEXANOCARBOXÍLICO (Boc- $\gamma$ -Ach-OH)

Los objetivos planteados para este trabajo consistieron en la preparación de nuevos nanotubos peptídicos a partir de ciclopéptidos que contuviesen gamma aminoácidos cíclicos. La orientación del carbono C2 del anillo hacia el interior del orificio central del nanotubo debía conferirle un carácter hidrofóbico que los diferenciaría de los  $\alpha$ -nanotubos.

Con este propósito se diseñaron péptidos cíclicos formados por  $\gamma$ -Ach alternados con  $\alpha$ -Aa. En dicho diseño, para que el ciclopéptido pudiese adoptar la conformación plana necesaria para el proceso de autoensamblaje, era fundamental el empleo del (*1R,3S*)-3-aminociclohexanocarboxílico = *L*- $\gamma$ -Ach alternado con  $\alpha$ -aminoácidos de configuración *D* [o bien la combinación: (*1S,3R*)-3-aminociclohexanocarboxílico (*D*- $\gamma$ -Ach) con  $\alpha$ -aminoácidos de configuración *L*]. Sólo esta especial alternancia de enantiómeros permitiría la conformación plana del ciclopéptido, necesaria para el proceso de autoensamblaje y para que las cadenas laterales de los distintos aminoácidos no interfirieran en el apilamiento de los ciclopéptidos.

La síntesis enantioméricamente pura del  $\gamma$ -Ach propuesto para este proyecto fue nuestro primer objetivo. Según los precedentes bibliográficos existían dos métodos alternativos para la preparación del  $\gamma$ -Ach. El primero de ellos, realizado por el grupo de Allan, se basaba en la reducción del ácido 3-metoxibenzoico con Na en  $\text{NH}_3$ , para dar lugar a la 3-carboxiciclohexanona (figura 53). El posterior tratamiento de esta ciclohexanona con hidroxilamina, seguido de una nueva reducción con Na en  $\text{NH}_3$  de la oxima resultante, conducía al 3-aminociclohexanocarboxílico que resultaba ser mayoritariamente el isómero *cis*. Los autores también llevaron a cabo una resolución del ácido 3-oxociclohexanocarboxílico mediante la cristalización en presencia de brucina.<sup>105</sup>

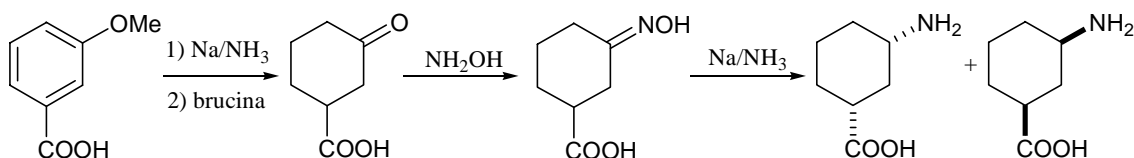


Figura 53: Síntesis del 3-aminociclohexanocarboxílico a partir del 3-metoxibenzoico.<sup>105</sup>

En el segundo método (figura 54) se empleó como sustancia de partida el 3-nitrobenzoico que se hidrogenó en medio básico acuoso en presencia de Ni Raney a 100 atmósferas de presión de  $\text{H}_2$  y 150 °C, obteniéndose el ácido 3-aminociclohexanocarboxílico con un rendimiento del 76%. Es interesante mencionar que en estas condiciones se obtenía mayoritariamente el isómero *cis*. Para confirmar dicha obtención y facilitar su purificación, se trató el compuesto con hidróxido de bario para inducir la forma de la lactama bicíclica (sólo es posible en los isómeros *cis*), que posteriormente se hidrolizó por calentamiento con HCl.<sup>106</sup>

105) Allan, R. D.; Johnston, G. A.; Twitchin, B. "Synthesis of Analogues of *cis*-3-aminocyclohexanecarboxylic Acid" *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 2231-2236.

106) Palaima, A.; Staniulyte, Z.; Podeniene, D. "Synthesis of derivatives of *cis*-3-aminocyclohexanecarboxylic acid" *Chemija* **1997**, *54*, 92-96.

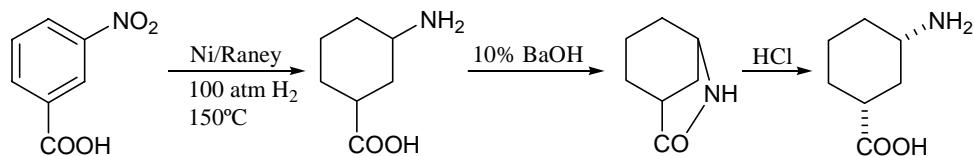


Figura 54: Síntesis del 3-aminociclohexanocarboxílico a partir del 3-nitrobenzoico.<sup>106</sup>

Debido a la sencillez que entrañaba este segundo método, basado en la hidrogenación del *m*-nitrobenzoico comercial, se optó por él, pero partiendo del *m*-aminobenzoico comercial, disponible en nuestro laboratorio en gran cantidad. El principal inconveniente de esta estrategia era que debíamos poner a punto la resolución del aminoácido, ya que la anterior estrategia basada en la resolución del ácido 3-oxociclohexanocarboxílico con brucina no era aplicable en ésta. Para poder realizar esta hidrogenación a más de 100 atmósferas y a 150 °C de temperatura se empleó un reactor Parr. Así, se sometió una disolución de *m*-aminobenzoico que contenía 1 eq. de NaOH y Ni Raney con H<sub>2</sub> a una presión de 100 atm, y a 150 °C de temperatura. Se observó que tras 4 h la presión disminuía a 80 atm, aunque por ccf se podía constatar aún la presencia de la sustancia de partida, por lo que se volvió a recargar con H<sub>2</sub> hasta las 100 atm, dejando la mezcla a 150 °C durante 8 h adicionales. Una vez concluida la reacción, la mezcla se filtró sobre celita y se acidificó con HCl (10%) hasta pH 2 para evitar la formación de la lactama. El producto se estudió por RMN de protón, y aunque no se pudo determinar la relación entre diastereoisómeros *cis*-*trans* debido a la complejidad de su <sup>1</sup>H RMN, decidimos proceder a la protección sin mayor purificación.

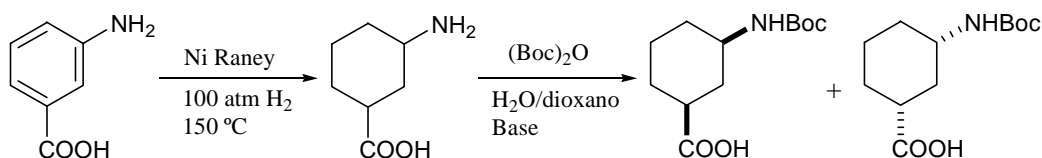


Figura 55: Síntesis propuesta para la obtención del  $\gamma$ -Ach.

La protección del grupo amino se realizó con anhídrido de Boc en medio básico, sin embargo, la reacción requería de una gran proporción de éste para completar el proceso. Este problema con la protección surgía siempre que intentábamos realizarla sin eliminar las sales que acompañan al aminoácido. Sin embargo, estas dificultades desaparecían cuando se eliminaban las sales, lo cual se llevó a cabo mediante una columna de intercambio iónico (Dowex AG 50 WX 8). La posterior protección en dioxano/agua empleando como base DIEA condujo al compuesto deseado con un rendimiento global del 65%. El aminoácido resultante se cristalizó de una mezcla 2:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano, resaltando que en esta primera cristalización se obtenía únicamente el isómero *cis* con un rendimiento del 50%, mientras que de las aguas madres se recuperaba una mezcla de isómeros *cis/trans* en una relación aproximada de 2:1. Esto nos permitió establecer que la hidrogenación da lugar a ambos isómeros en una relación aproximada de 85:15.

106) Palaima, A.; Staniulyte, Z.; Podeniene, D. "Synthesis of derivatives of *cis*-3-aminocyclohexanecarboxylic acid" *Chemija* **1997**, *54*, 92-96.

Una vez sintetizado el Boc- $\gamma$ -Ach-OH se procedió a estudiar su resolución. Para ello se hicieron diferentes intentos de cristalización con diversas aminas quirales. En la tabla 1 se muestra un resumen de los estudios realizados.

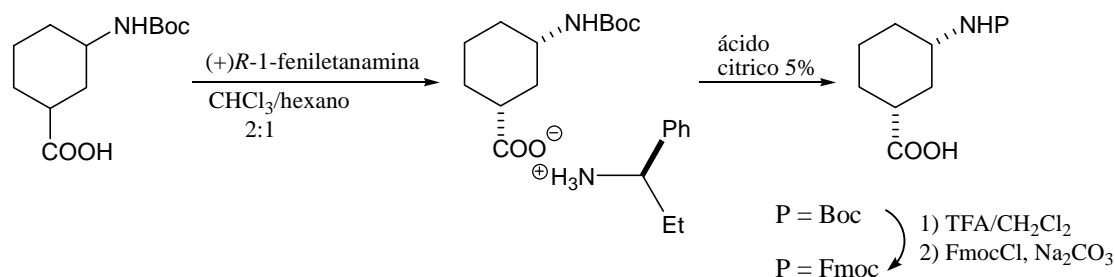


Figura 56: Esquema de la resolución del ácido *cis*-3-aminociclohexocarboxílico con (+)*R*-1-feniletanamina.

Amina quiral	Disolventes en que se cristaliza	Proporción disolventes	$[\alpha]_D^{20}$ (c=1,0 en MeOH)
Brucina	Diferentes disolventes	Varias	+0
Quinina	Diferentes disolventes	Varias	+0
(-)efedrina	AcOEt/éter	1:1	+7
(-)feniletanamina	CHCl/hexano	2:1	+ 49,8
(+)feniletanamina	CHCl/hexano	2:1	- 50,5

Tabla 1: Resultados de la resolución obtenidos con diferentes aminas.

La utilización de brucina en las condiciones de resolución descritas por el grupo de Allan, no dio ningún resultado positivo, y no se obtuvo bajo ninguna de las condiciones estudiadas, cristales de pureza adecuada. Tampoco resultaron positivos los estudios realizados con quinina, con la que no conseguimos que cristalizase el Boc- $\gamma$ -Ach-OH. Con efedrina se obtuvieron unos cristales en los que la rotación óptica del Aa, una vez eliminada la amina quiral, era de  $[\alpha]_D^{20} = +7$ . El principal inconveniente de este método era la baja solubilidad de la efedrina en los disolventes estudiados (CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etc.), lo que hacía muy difícil reproducir o mejorar estos resultados. Finalmente se encontró que la utilización de 1 eq de (+)*R*-1-feniletanamina en DCM/hexano daba lugar a cristales cuyas rotaciones ópticas, después de eliminar la amina, registraban un valor promedio de  $[\alpha]_D^{20} = -35$ ; sin embargo, estas rotaciones se correspondían con excesos enantioméricos no superiores al 66%. Para mejorar la pureza óptica era necesario repetir el proceso de cristalización un par de veces, obteniéndose finalmente cristales que contenían el Boc- $\gamma$ -Ach-OH con una actividad óptica de  $[\alpha]_D^{20} = -50$  (c=1,0 en MeOH).

Para determinar la pureza enantiomérica y el enantiómero resuelto, fue necesario desproteger el grupo Boc para compararlo con los datos del Aa desprotegido publicado. El tratamiento con TFA del Boc- $\gamma$ -Ach-OH, seguida de la eliminación de sales mediante una columna de intercambio iónico, dio lugar al ácido 3-aminociclohexancarboxílico ( $\gamma$ -Ach), con una rotación óptica de ( $[\alpha]_D^{20} = -5,3$  (c=1,0 en H<sub>2</sub>O)), similar a la

publicada anteriormente, y que nos permitió concluir que el isómero levorrotatorio se corresponde con el (*1R,3S*)- $\gamma$ -Ach.<sup>105</sup>

Una ventaja de este método frente a la resolución con brucina es que es posible obtener ambos enantiómeros, ya que la (-)-*S*-1-feniletanamina también es comercial y económicamente asequible. Este método también permite la recuperación de la amina, ya que los cristales de la resolución se disuelven en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavan con ácido cítrico al 10% para eliminar la amina, la cual se podría recuperar de las aguas de lavado, aunque para este trabajo no se llevó a cabo.

Una determinación de la pureza enantiomérica más precisa se llevó a cabo mediante el método de Marfey (figura 57),<sup>107</sup> que consiste en la derivatización (mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática) del aminoácido con el reactivo 2-(5-fluoro-2,4-dinitrofenilamino)propanamida. La posterior separación de la mezcla diastereomérica resultante mediante el HPLC permitió cuantificar la relación diastereomérica y con ello la relación entre ambos enantiómeros.

La derivatización con el reactivo de Marfey de la mezcla racémica del  $\gamma$ -Ach permitió obtener las condiciones de separación de ambos diastereoisómeros (*RS* y *SS*). Posteriormente se inyectó el enantiómero resuelto, cuya rotación óptica era de  $[\alpha]_D^{20} = -50$  (*c*=1,0 en MeOH), resultando una relación 97,5:2,5 y por tanto un e.e. del 95%. Como se aprecia en los cromatogramas de la figura 58, cuando el (+) (*1S,3R*)- $\gamma$ -Ach se derivatiza tiene un tiempo de retención de 23,5 min, mientras que el del derivatizado del (-) (*1R,3S*)- $\gamma$ -Ach es de 15,5 min.

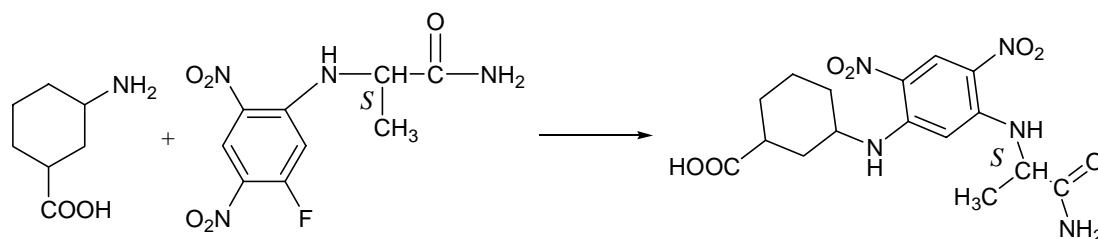


Figura 57: Reacción del  $\gamma$ -Ach con el reactivo de Marfey mediante una sustitución nucleófila aromática, para dar lugar al correspondiente diastereoisómero.

La síntesis del Fmoc- $\gamma$ -Ach-OH se realizó a partir de la desprotección del Boc- $\gamma$ -Ach-OH ya resuelto con TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posteriormente se protegió empleando FmocCl y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en dioxano/H<sub>2</sub>O (capítulo 11).

105) Allan, R. D.; Johnston, G. A.; Twitchin, B. "Synthesis of Analogues of *cis*-3-aminocyclohexanecarboxylic Acid" *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 2231-2236.

107) Marfey, P. "Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene" *Carlsberg. Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.

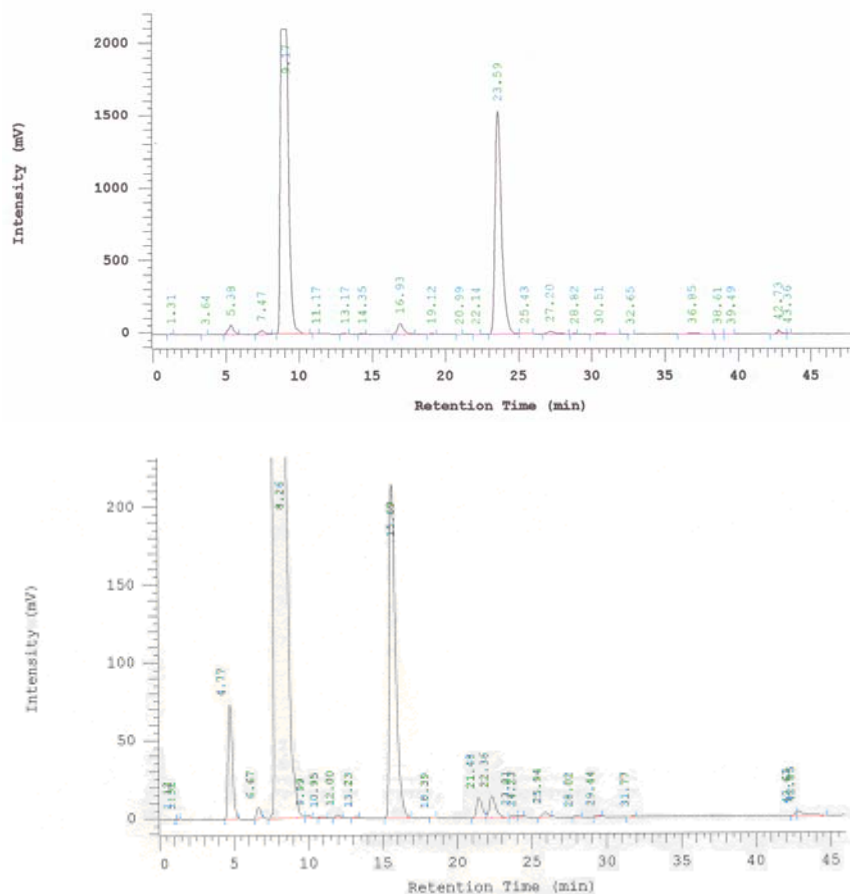


Figura 58: Cromatograma del HPLC de cada uno de los enantiómeros derivatizados con el reactivo de Marfey. El diastereoisómero obtenido del aminoácido dextrorrotatorio [(1*S*,3*R*)- $\gamma$ -Ach] posee un tiempo de retención de 23,5 min, mientras que el obtenido del levorrotatorio [(1*R*,3*S*)- $\gamma$ -Ach] es de 15,5 min. Condiciones: 20% a 40% de MeCN/H<sub>2</sub>O en 40 min. (0,1% de TFA).

La N-metilación del Boc- $\gamma$ -Ach-OH se llevó a cabo por tratamiento con NaH y yodometano sobre el Boc- $\gamma$ -Ach-OH resuelto. Es importante asegurarse de que la alquilación del  $\gamma$ -Ach tiene lugar de forma total, ya que resulta muy complicada la separación de la sustancia de partida y del producto de reacción. En el espectro de RMN hay que destacar el desdoblamiento del protón H $\gamma$ , debido al equilibrio conformacional de los grupos carbamato (*cis/trans*). Esta isomerización *cis/trans* complica en gran medida el espectro y desgraciadamente dificulta la posterior caracterización de los péptidos lineales sintetizados.<sup>108</sup>

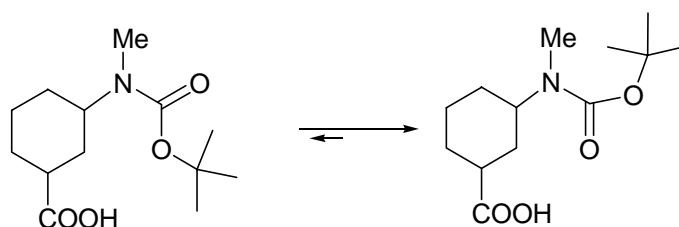


Figura 59: Equilibrio del enlace amida entre las formas *cis* y *trans*.

108) La alquilación del nitrógeno de la amida reduce la energía entre las formas *cis* y *trans* a aproximadamente 2,1 KJ/mol, mientras que esta diferencia es de 10,9 KJ/mol para los aminoácidos convencionales: Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. "Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures" *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 253-260.

## 5.2. SÍNTESIS DEL N-Boc-*cis*-3-AMINO-2-METILCICLOHEXANO-CARBOXÍLICO

Un segundo objetivo sintético que nos fijamos en este trabajo fue la preparación de algún derivado del  $\gamma$ -Ach que estuviese sustituido en el carbono 2 del ciclohexilo. Por su sencillez sintética, nos planteamos la preparación del ácido 3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico (2-MeAch), ya que ésta se podía llevar a cabo a partir del ácido 3-amino-2-metilbenzoico utilizando una estrategia sintética similar a la aplicada en la obtención del  $\gamma$ -Ach.

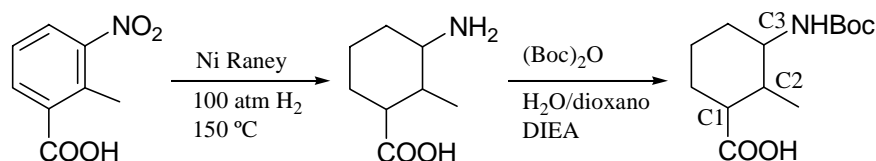


Figura 60: Síntesis propuesta para la obtención de los diferentes diastereoisómeros del ácido N-Boc-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico.

Confiábamos en que, en estas condiciones de reacción, la termodinámica del proceso podía favorecer la formación del producto más estable, el isómero *trans-trans* frente al cinético *cis-cis* (figura 61). Este segundo isómero también tiene un gran interés, pues permitiría desarrollar tapas moleculares de nanotubos manteniendo intacto el esqueleto peptídico del ciclopeptido, ya que dicho grupo podría impedir la aproximación de otra subunidad ciclopeptídica a una distancia que permitiese formar los puentes de hidrógeno.

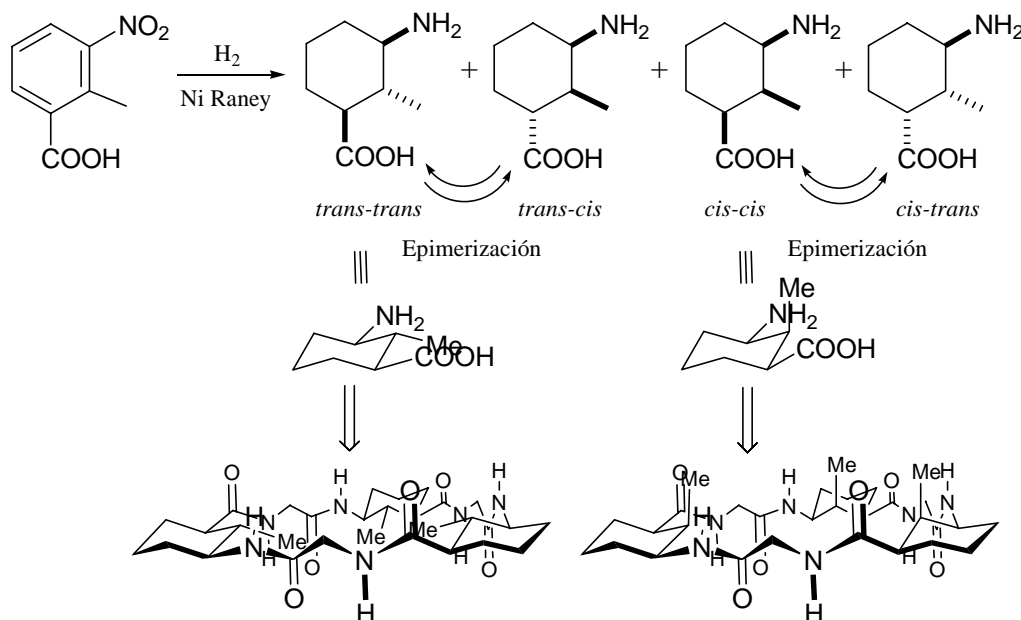


Figura 61: La hidrogenación del ácido 3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico conduce a una mezcla de cuatro diastereoisómeros. Modelos de los ciclopeptidos resultantes que contienen los 2-MeAch *trans-trans* y *cis-cis* en los que se puede observar la diferente orientación del metilo.

Los otros dos isómeros tendrían un menor interés sintético, aunque podrían ser transformados en los correspondientes isómeros *cis-cis* o *trans-trans*, a través de epimerizaciones en medio básico (figura 61).

El tratamiento del 3-nitro-2-metilbenzoico en las condiciones anteriormente desarrolladas ( $H_2$  100 atm, Ni (Raney), NaOH) condujo a una mezcla compleja de isómeros, cuyo espectro de RMN no permitía determinar ni la relación de isómeros ni su identificación. Por ello procedimos a la protección del grupo amino (anhídrido de Boc, DIEA, dioxano/agua) de la mezcla previamente pasada a través de una columna de intercambio iónico, para eliminar las sales.

El RMN de protón permitió identificar la existencia de los cuatro diastereoisómeros a los que designamos **A:B:C:D**, y que se encontraban en relación aproximada 3:3:1:3 (otros intentos de hidrogenación variando la presión y la temperatura no proporcionaron una relación de diastereoisómeros significativamente diferente). La identificación se realizó en base a los Me en C2 del producto protegido con Boc, los cuales presentaban unos desplazamientos de 1,03 (**A**), 0,98 (**B** y **C**, en un principio se pensó que se trataba de un único isómero) y 0,84 ppm (**D**) en  $CDCl_3$ .

Su separación mediante columna de gel de sílice no fue posible. Los isómeros **A** y **D** eran poco solubles en  $CH_2Cl_2$  o  $CHCl_3$ ; esta menor solubilidad en estos disolventes permitió hacer extracciones selectivas de los isómeros **B** y **C** mediante repetidos lavados de la mezcla de los cuatro diastereoisómeros, obteniéndose fracciones enriquecidas en **A** y **D**, por un lado, y otras en **B** y **C**, correspondientes a las disoluciones cloradas. La cristalización en MeOH de la mezcla **A-D** condujo al isómero **D** puro, mientras que de las aguas madres se obtuvo el isómero **A** en relación 9:1 con **D**. De igual manera, por cristalización en  $CHCl_3$ /hexano de la mezcla de **B** y **C**, se lograron cristales puros de **B**, y otros cristales de diferente aspecto y textura que se identificaron como el isómero **C**, por lo que al final se obtuvieron entre 2-150 mg puros o casi puros de cada uno de los diastereoisómeros.

El estudio de dichos diastereoisómeros mediante RMN y rayos X nos permitió determinar su estructura. La resonancia magnética nuclear de  $^{13}C$  resultó ser una técnica que aportó gran información estructural para la identificación de cada uno de los estereoisómeros. En la tabla 2 se detallan los desplazamientos químicos estimados para dichos carbonos dependiendo de la orientación de los sustituyentes.<sup>109</sup> Dicha identificación se basó en que la orientación axial de cada uno de los tres grupos da lugar a un mayor apantallamiento del carbono del anillo. Así, el carbono C1 tendría teóricamente su señal a mayor campo para el isómero *cis-trans*. Al isómero *trans-cis* le correspondería un C3 a mayor campo y sería el *cis-cis* el que tendría el C2 más apantallado.

Una detenida observación de los distintos  $^{13}C$  nos llevó a plantear como posibles estructuras: *cis-trans* = **A**, *trans-trans* = **B**, *trans-cis* = **C** y *cis-cis* = **D** (figura 62). La orientación axial de los metilos del C2 también está basada en el desplazamiento químico; el isómero **D** es el único que está orientado axialmente y que aparece a un campo de 8,2 ppm, mientras que para los otros tres aparece entre 14,7 y 15,9 ppm.

---

109) Pretsch, E.; Cler, T.; Seibl, J.; Simon, W. Versión española: Castells, J.; Camps, F. "Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos." Ed. Alhambra, Madrid, 1980.

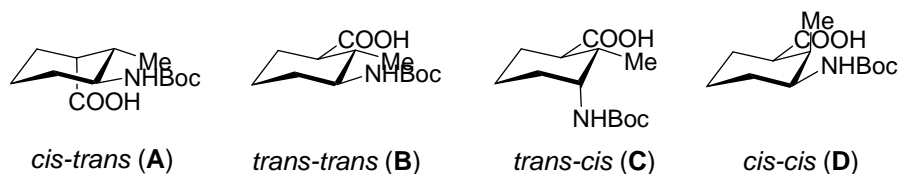


Figura 62: Configuración propuesta para cada diastereoisómero (del ácido N-Boc-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico) en base a los  $^{13}\text{C}$  RMN.

	Determinación teórica <sup>109</sup>				Datos experimentales			
	<i>cis-trans</i>	<i>trans-trans</i>	<i>trans-cis</i>	<i>cis-cis</i>	A exp. DMSO	B exp. CDCl <sub>3</sub>	C exp. DMSO	D exp. CDCl <sub>3</sub>
C $\alpha$ (COOH) C1	<b>45,6</b>	49,5	46,0	46,0	<b>42,9</b>	50,0	44,2	45,8
C $\alpha$ (Me) C2	40,5	42,5	40,0	<b>38,0</b>	36,4	39,6	36,0	<b>33,7</b>
C $\alpha$ (NH) C3	60,4	63,0	<b>58,0</b>	60,0	49,9	54,0	<b>49,1</b>	51,9
Me					14,7	16,5	15,9	<b>8,2</b>

Tabla 2: Datos experimentales y teóricos de los carbonos C1, C2 y C3 del anillo de los diferentes diastereoisómeros. En negrita, los datos a mayor campo para cada diastereoisómero, que en un principio se asignaron a una orientación axial.

Todo parece indicar que los isómeros de mayor interés son **B** y **D**, que por fortuna pudimos confirmar gracias a la obtención de cristales de tamaño adecuado de ambos diastereoisómeros. El diastereoisómero **B** cristalizó de una mezcla CHCl<sub>3</sub>/hexano (2:1), mientras que el diastereoisómero **D** cristalizó de etanol. La difracción de rayos X confirmó las estructuras propuestas, como se puede apreciar en las figuras 63 y 64.

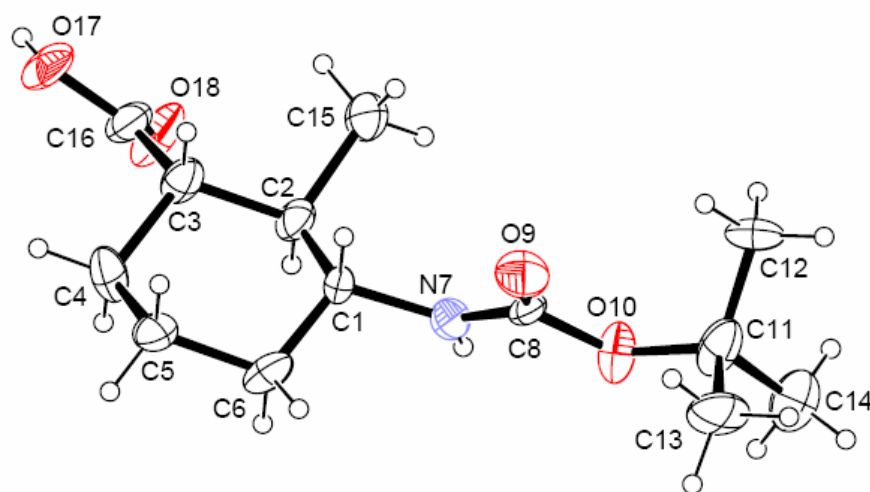


Figura 63: Ortep del diastereoisómero **B** (*trans-trans*).

109) Pretsch, E.; Cler, T.; Seibl, J.; Simon, W. Versión española: Castells, J.; Camps, F. "Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos." Ed. Alhambra, Madrid, 1980.

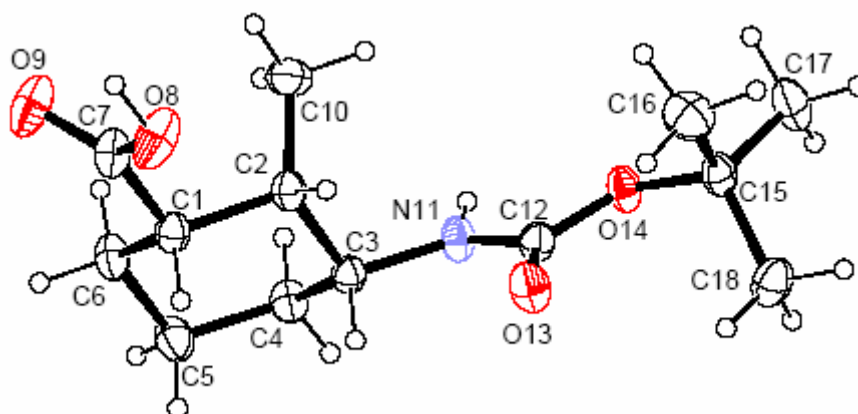


Figura 64: Ortep del diastereoisómero **D** (*cis-cis*).

También realizamos un intento de resolución de **B** con (-)-*S*-1-feniletanamina, obteniendo unos cristales que, una vez filtrados y extraída la amina, presentaban un  $[\alpha]_D^{20} = +20,4$  ( $c=1,0$  en MeOH). Dado que sólo disponíamos de unos pocos mg no fue posible realizar una segunda resolución; sin embargo, este primer intento era suficiente para comprobar que la resolución con feniletanamina era también factible.

De esta manera se demostró que es posible la obtención de los diferentes diastereoisómeros del ácido 3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico y que además, los dos que más nos interesaban (**B** y **D**), podían ser obtenidos mediante cristalizaciones selectivas.

### 5.3. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS

Existe una gran diversidad de estrategias sintéticas desarrolladas para la obtención de péptidos cíclicos. Las más comunes se llevan a cabo en fase sólida,<sup>110</sup> mediante la unión del primer residuo, apropiadamente protegido, a un soporte polimérico adecuadamente funcionalizado, a través del grupo carboxilo (figura 65 a). Existen otras alternativas sintéticas en las que el primer Aa se une al soporte sólido a través de su cadena lateral (figura 65 b) o mediante un espaciador unido a su esqueleto peptídico (figura 65 c).<sup>111</sup> Esta unión debe ser resistente a las distintas etapas de la síntesis (acoplamientos y desprotecciones) pero suficientemente lábil para permitir la separación del péptido una vez sintetizado. Estas estrategias suelen ser síntesis lineales en las que se van introduciendo uno a uno los distintos Aa, que llevan protegidos sus grupos  $\alpha$ -amino, generalmente como carbamatos, y sus cadenas laterales (si las hubiese) con grupos protectores ortogonales resistentes a las distintas etapas sintéticas.

Los grupos protectores de los  $\alpha$ -aminos determinan en gran medida la elección de resinas, método de separación del soporte sólido (rotura) y grupos protectores de las cadenas laterales. En general, podemos hablar de 3 ó 4 grupos protectores diferentes (todos ellos carbamatos, ya que se ha comprobado que dificultan la epimerización del C $\alpha$  en los acoplamientos). El Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonil)<sup>112</sup> es estable en medios ácidos (incluso extremadamente fuertes como el HF líquido), pero se elimina con facilidad en medios básicos o nucleófilos, siendo la piperidina el reactivo generalmente empleado en las desprotecciones. Estas propiedades implican la utilización de resinas lábiles al medio ácido, pero estables en medio básico; y las cadenas laterales se suelen proteger con grupos t-Butilo que son estables en los medios básicos. El grupo Boc (t-Butiloxycarbonil) fue durante mucho tiempo el más popular de todos, aunque su importancia ha decaído en gran medida en los últimos años, debido a la necesidad de utilizar los HF para la separación del péptido del soporte sólido. Es un grupo estable en medios básicos pero se desprotege en condiciones ácidas. El ácido trifluoroacético es el que se utiliza con más frecuencia, gracias a su capacidad para mantener hinchada la resina, generalmente poliestirénica, consiguiendo rendimientos del 100% en tiempos muy cortos; por otro lado, no es lo suficientemente ácido como para romper el espaciador que une la resina con el ciclopéptido. Por todo ello, se suelen usar resinas

110) a) Stewart, J. M.; Young, J. D. Eds "Solid phase in peptide synthesis" 2<sup>nd</sup> edition, Pierce Chemical Company, Rocford, Illinois, 1984. b) Blackburn, C.; Kates, S. A. "Solid-Phase Synthesis of Cyclic Homodetic Peptides" *Methods in Enzymology*, **1997**, 289, 3-13.

111) a) Unión a través de un Glu: Kates, S. A.; Solé, H. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G. Y Albericio, F. "A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for Solid-Phase synthesis of cyclic peptides" *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1549-1552. b) Unión a través de una Ser: Alsina, J.; Chiva, C.; Ortiz, M.; Rabanal, F.; Giralt, E. Y Albericio, F. "Active Carbonate Resins for Solid-Phase Synthesis Through the Anchoring of a Hydroxyl Function. Synthesis of Cyclic and Alcohol Peptides" *Tetrahedron Lett.* **19937**, 38, 883-886. c) Unión a través de una His: Isied, S. S.; Kuehn, C. G. y Lyon, J. M. "Specific Peptide Sequences for Metal Ion Coordination. 1. Solid-Phase Synthesis of *cyclo-(Gly-His)<sub>3</sub>*" *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 2632-2634. Existen algunas estrategias basadas en la unión del primer aminoácido por el extremo N-terminal para hacer crecer el péptido hacia el C-terminal. Esta estrategia tiene como principal inconveniente la elevada proporción de racemización que se observa durante los acoplamientos. Un reciente trabajo en el que los autores solucionan parcialmente este problema es: Thieriet, N.; Guibé, F. y Albericio, F. "Solid-Phase Peptide Synthesis in the Reverse (N - C) Direction" *Org. Lett.* **2000**, 2, 1815-1817. d) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F. Barany, G. "Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5441-5442.

112) Fields, G. B.; Noble, R. L. "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids" *Int. J. Peptide Proteins Res.* **1990**, 35, 161-214.

con espaciadores o uniones al péptido que resistan estas condiciones. Como grupos protectores se utilizan habitualmente derivados bencílicos, mientras que las condiciones de desprotección más comunes emplean, como ya se ha comentado, el HF (líquido). Otro grupo protector es el Aloc (aliloxycarbonilo),<sup>113</sup> estable tanto en condiciones ácidas como básicas, y que se elimina por tratamiento con disoluciones de Pd (0) en presencia de nucleófilos.

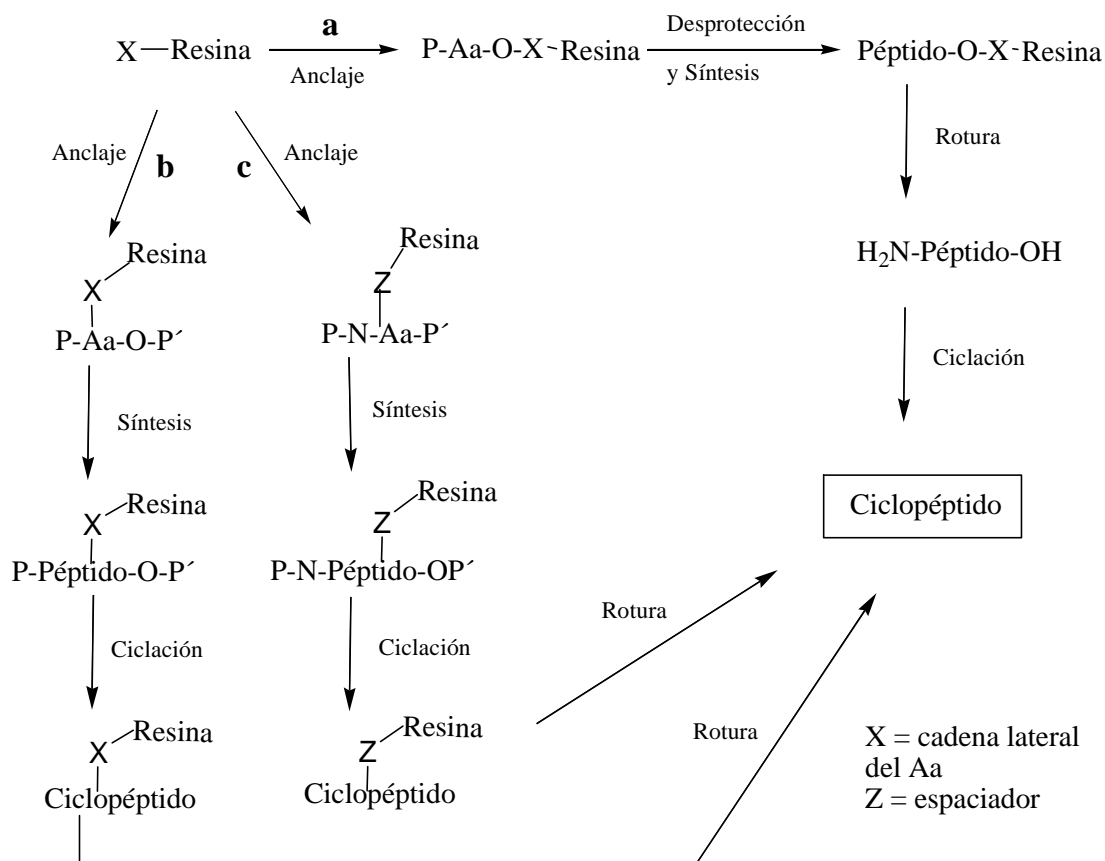


Figura 65: Esquema sintético de péptidos en fase sólida. **a:** Unión del primer Aa a la resina por el grupo ácido. **b:** Unión del primer Aa a la resina por la cadena lateral. **c:** Unión del primer Aa a la resina mediante un espaciador.

La última etapa en esta síntesis es la ciclación, que generalmente se realiza en disolución tras la separación del péptido de la resina. De nuevo resulta de gran importancia la selección del método de rotura, de la resina que se va a utilizar y de los grupos protectores de las cadenas laterales, ya que el péptido resultante debe poseer los grupos que intervienen en la ciclación (C- y N-terminal) libres, mientras que los demás grupos funcionales que pudiesen interferir en la ciclación deben permanecer bloqueados

113) a) Ernst, M.; Vargas-Berenguel, A.; Meldal, M.; Paulsen, H.; Bock, K. "Comparison of N-Dts and N-Aloc in the solid-phase synthesis of O-GlcNAc glycopeptide fragments of RNA-polymerase II and mammalian neurofilaments" *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* **1995**, *17*, 2165-2175. b) Kunz, H.; Friedrich-Bochnitschek, S.; Waldmann, H.; Unverzagt, C. "The allyloxycarbonyl (Aloc) group and allyl esters as protecting functions in the synthesis of peptides and glycopeptides" *Chemistry of peptides and Proteins* **1989**, *4*, 119-123. c) Kunz, H.; Unverzagt, C. "Allyloxycarbonyl (Aloc) part – conversion of an unsuitable amino protective group to a useful one peptide synthesis" *Angew. Chemie* **1984**, *96*, 426-427.

para impedir la formación de productos no deseados. En estos casos, se requiere una etapa adicional de desprotección de dichos grupos funcionales una vez llevada a cabo la ciclación, como ya se comentó. Existen otras estrategias sintéticas que permiten realizar la ciclación en fase sólida, uniendo el primer Aa por su cadena lateral o a través de un espaciador que lo une al esqueleto polipeptídico. Otra alternativa bastante interesante es la utilización de resina tipo oxima, en la que este grupo oxima, además de permitir la unión del primer aminoácido al soporte sólido, actúa como grupo saliente permitiendo la ciclación simultáneamente a la separación del soporte sólido.<sup>114</sup> Su principal inconveniente es que se producen, a lo largo de la síntesis, reacciones de ciclación no deseadas cada vez que se elimina el grupo protector del extremo N-terminal, por lo que los rendimientos suelen ser bajos.

Dado que estas estrategias son lineales y que se realiza una única purificación al finalizar la síntesis, es fundamental asegurar elevados rendimientos en cada una de las etapas sintéticas. Especialmente importante resulta la etapa de acoplamiento entre el grupo amino de la cadena polipeptídica unida al soporte sólido y el siguiente aminoácido. Es por ello que, en los últimos años, se han desarrollado diversos agentes de acoplamiento que permiten la formación, en el mismo medio de reacción, de un derivado del ácido activado que facilita dichos acoplamientos. Hay que destacar las carbodiamidas (como DIC, EDC, etc.) o sales de uronio, como el HATU, HBTU, TBTU, etc.,<sup>115</sup> con los que se forma un éster de gran reactividad, y que además permite llevar a cabo los acoplamientos con reducida o nula proporción de epimerización/racemización. Otros derivados permiten la preparación de fluoruros, anhídridos mixtos, etc.<sup>116</sup> Especial mención merece el HATU, uno de los mejores agentes de acoplamiento, que incluso permite condensaciones con aminas secundarias y/o cadenas laterales voluminosas con elevados rendimientos. A pesar de estos magníficos agentes de acoplamiento, sigue siendo necesario utilizar un elevado número de equivalentes de Aa y de agente de acoplamiento (4-10) para obtener buenos rendimientos. Esta circunstancia dificulta su aplicación en la síntesis de péptidos que emplean Aa no naturales, ya que tienen que prepararse en el laboratorio o comprarse a precios elevados.

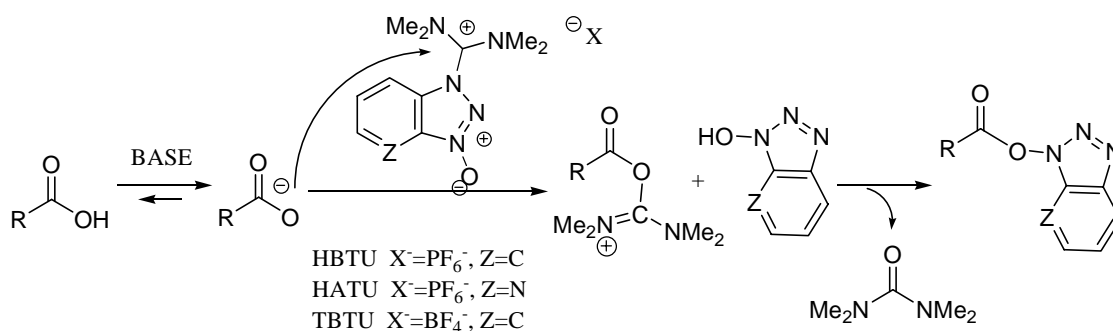


Figura 66: Mecanismo de formación de un éster activo con una sal de uronio (HBTU, HATU o TBTU).

- 114) a) Ösapray, G.; Profit, A.; Taylor, J. W. "Synthesis of Tyrocidine A: use of oxime resin for peptide chain assembly and cyclization" *Tetrahedron Lett.* **1993**, *31*, 6121-6124. b) Kapurniotu, A. y Taylor, J. W. "Head-to-Tail Cyclization and Use of  $\alpha$ -Allyl Ester Protection Improves the Yield of Cyclic Peptides Synthesized by the Oxime Resin Method" *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7031-7034.
- 115) Albericio, F.; Carpino, L. "Coupling Reagents and Activation" *Methods in Enzymology* **1997**, *284* 104-126.
- 116) Carpino, L. A.; El-Faham, A. "Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate: A Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid Phase Peptide Synthesis" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.

La síntesis en fase sólida se empleó en este trabajo para la preparación de ciclopeptidos precursores de nanotubos tanto de membrana como en estado sólido.

El segundo método consiste en la síntesis en disolución, para lo cual se suelen utilizar estrategias convergentes en las que se van preparando pequeñas unidades (dipéptidos, tetrapéptidos, etc.) que posteriormente se acoplan formando fragmentos mayores hasta la obtención del péptido lineal deseado (figura 67). La síntesis en disolución requiere una planificación para optimizar los recursos, los aminoácidos, los grupos protectores y la secuencia de unión de los distintos fragmentos. La elección del grupo amino sobre el que se va a realizar la ciclación determina muchas veces la elección de la estrategia de unión de estos fragmentos, en el caso de péptidos homodépticos (aquellos en los que la ciclación se produce entre los N- y C-terminales y no entre las cadenas laterales). La viabilidad de la síntesis y los rendimientos dependen en gran medida de la alternativa sintética seleccionada que implique el menor número posible de etapas.

Esta estrategia, por lo general, suele necesitar tiempos más prolongados, requiriendo una etapa de purificación tras cada acoplamiento para eliminar los reactivos utilizados, las sustancias de partida que no han reaccionado y los subproductos formados. Sus ventajas son: que no se emplean grandes excesos de ninguno de los reactivos y que se conocen los productos formados en cada etapa, por lo que generalmente la planificación final es más sencilla.

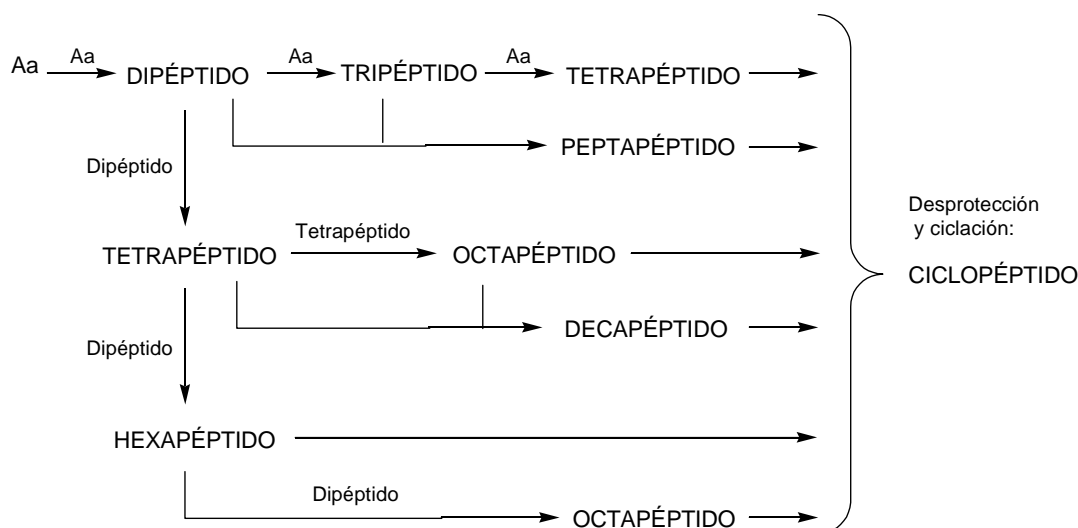


Figura 67: Estrategia general de síntesis de ciclopeptidos en disolución mediante la preparación y condensación de pequeñas unidades peptídicas (dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, etc.).

La síntesis en disolución es la que emplearemos en la síntesis de péptidos N-metilados, cuya estrategia general se ilustra en la figura 68. Su principal ventaja es que sólo se realiza un acoplamiento sobre los Aa N-metilados al comienzo de cada síntesis, ya que es una de las etapas más difíciles incluso empleando reactivos altamente eficientes como el HATU. Además, estos acoplamientos resultan más difíciles a medida que crece el tamaño del péptido, ya que el plegamiento del mismo puede interferir.

La ortogonalidad de los grupos protectores permite la desprotección selectiva del extremo N-terminal por tratamiento con TFA o del C-terminal por reacción con la piperidina. De esta forma, el tratamiento con TFA seguido de acoplamiento con el Boc-Aa correspondiente, empleando como agente activante el HATU para las aminas secundarias (N-metilaminoácidos), daría lugar al dipéptido deseado. El tratamiento con TFA o con piperidina conduciría a dipéptidos con extremos N-terminales o

C-terminales libres, que pueden ser acoplados para conducir al tetrapéptido correspondiente (figura 68). La desprotección del extremo N-terminal de un tetrapéptido y el acoplamiento con el dipéptido que posee el grupo carboxilo libre conduciría a un hexapéptido, mientras que el acoplamiento con un tetrapéptido que posee su extremo C-terminal libre conduciría al octapéptido lineal protegido.

La última etapa de estas síntesis, la ciclación, implica el tratamiento del péptido lineal protegido con piperidina y después con TFA; y el péptido resultante se cicla en disolución por tratamiento con TBTU.<sup>117</sup> Empleando esta estrategia se prepararon los ciclopéptidos N-metilados a partir de la <sup>Me</sup>N-Ala y del <sup>Me</sup>N-Ach. Hay que destacar que las ciclaciones, en algunos casos, se llevaron a cabo a concentraciones 6 mM sin que se detectase la formación de péptidos lineales o cíclicos de mayor tamaño. En todos los casos los ciclopéptidos preparados se purificaron mediante HPLC en fase normal (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) o fase reversa (C18, ACN/H<sub>2</sub>O/TFA) y se caracterizaron mediante MS y resonancia magnética nuclear de protón y carbono.

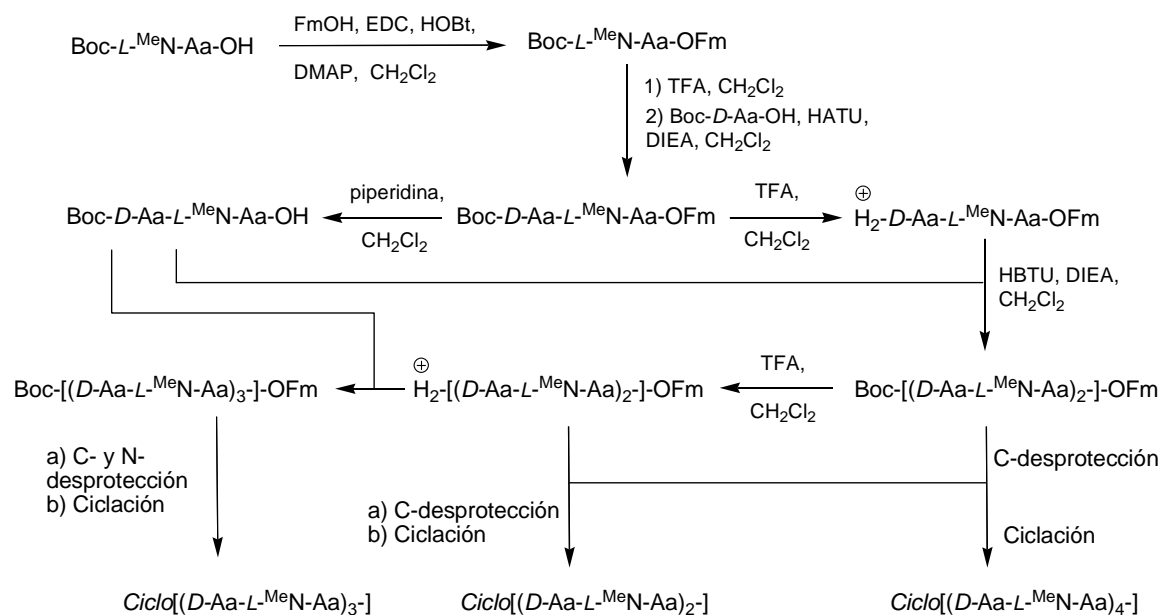


Figura 68: Estrategia sintética seguida en disolución para la preparación de los tetra-, hexa- y octapéptidos objetivo de este trabajo.

117) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W. Y.; Gillissen, D. "New coupling reagents in peptide chemistry" *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.

## **CAPÍTULO 6: $\alpha,\gamma$ -CICLOPÉPTIDOS N-METILADOS**



Los primeros estudios los realizamos con ciclopéptidos especialmente diseñados para la formación de dímeros, de tal manera que pudiera analizarse el proceso de autoensamblaje en disolución y establecerse las bases termodinámicas y estructurales de los mismos.

Nuestro primer objetivo fue estudiar un hexapéptido en el que se alternasen los  $\alpha$  y  $\gamma$ -aminoácidos. Esta elección se basaba en que el tamaño del ciclopéptido resultante, 24 eslabones, es similar al de los estudiados para *D,L*-ciclooctapéptidos, aunque el número de grupos dadores y aceptores de puentes de hidrógeno es únicamente seis.

La adecuada preorganización de los ciclopéptidos resulta de gran importancia en los procesos de autoensamblaje. Nótese que para compuestos con grupos capaces de formar cuatro puentes de hidrógeno y dependiendo de la orientación ADAD (Aceptor-Dador- Aceptor-Dador), se puede llegar a valores  $>10^4 \text{ M}^{-1}$ ,<sup>75</sup> mientras que los *D,L*-ciclooctapéptidos que dan lugar a dímeros formados por ocho puentes de hidrógeno presentan en el mejor de los casos una constante de asociación de  $2500 \text{ M}^{-1}$ . Esto implica que la preorganización de los ciclopéptidos, para dar lugar a los dímeros, tiene un elevado coste entrópico que no poseen otros sistemas más rígidos. Además, ni la orientación de los puentes de hidrógeno es la más idónea ni la distancia intermolecular entre los dos péptidos que forman el dímero es la más adecuada para formar un puente de hidrógeno. Por todo ello la contribución de cada puente de hidrógeno es únicamente de  $2,0 \text{ KJ/mol}$  ( $0,5 \text{ Kcal/mol}$ ), un valor demasiado pequeño para este tipo de interacciones.<sup>76</sup>

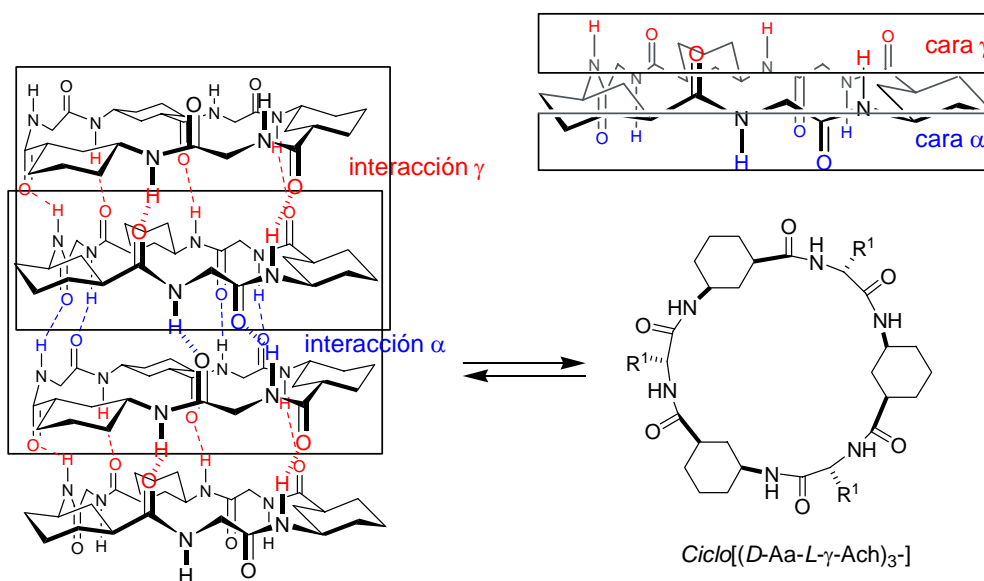


Figura 69: Superior derecha: Esquema que muestra la orientación de los grupos dadores y aceptores de los  $\alpha$  y  $\gamma$ -aminoácidos hacia caras diferentes del ciclopéptido, cuando la secuencia entre  $\alpha$  y  $\gamma$ -Aa es alternada. Izquierda: Nanotubo al que daría lugar el ciclohexapéptido de la derecha. Para mayor claridad, las cadenas laterales han sido suprimidas.

En el diseño de estos ciclopéptidos es importante tener en cuenta las novedosas características de estos nanotubos, en los que existen dos tipos de interacciones debido a

75) a) Sartorius, J.; Schneider, H.-J.; "A general scheme based on empirical increments for the prediction of hydrogen-bond associations of nucleobases and of synthetic host-guest complexes" *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1446-1452. b) Prins, L. J.; Reinhoudt, D. N.; Timmerman, P. "Noncovalent synthesis using hydrogen bonding" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2328-2426.

76) Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. " $\beta$ -Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antiparallel  $\beta$ -Sheets" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 95-98.

que los ciclopéptidos están formados por  $\alpha$  y  $\gamma$ -aminoácidos. Tanto los  $\alpha$  como los  $\gamma$ -aminoácidos están compuestos por un número impar de átomos, lo que implica que cuando el péptido adopta la conformación plana necesaria para el autoensamblaje, los aminoácidos disponen sus grupos C=O y NH orientados hacia el mismo lado del plano. La disposición alternada de  $\alpha$  y  $\gamma$ -Aa provoca que todos los grupos C=O y NH de los  $\gamma$ -aminoácidos queden orientados hacia una cara del ciclopéptido, mientras que hacia la otra cara se situarían los grupos correspondientes a los  $\alpha$ -aminoácidos (figura 69). Así, a la hora de interaccionar estos ciclopéptidos mediante una hoja  $\beta$  plegada antiparalela, los grupos C=O y NH de la cara  $\alpha$  lo harían con los  $\alpha$ -Aa de la siguiente subunidad y de la misma forma la cara  $\gamma$  interaccionaría con la cara  $\gamma$  de la otra subunidad (figura 70). Por lo tanto, el nanotubo se basaría en la alternancia de interacciones de las caras  $\alpha$  con las interacciones de las caras  $\gamma$  a lo largo del mismo. Otra visión de los nanotubos muestra que están formados por unidades diméricas unidas entre sí mediante hojas plegadas  $\beta$  antiparalelas. Así, por ejemplo, entre las caras  $\gamma$  de los ciclopéptidos se forman dímeros y estas unidades diméricas se unen entre sí mediante hojas plegadas  $\beta$  antiparalelas a través de sus caras  $\alpha$  o viceversa.

## 6.1. $\alpha,\gamma$ -CICLOHEXAPÉPTIDOS N-METILADOS<sup>118</sup>

Decidimos comenzar el estudio de este nuevo diseño de nanotubos peptídicos analizando los hexámeros formados por tres aminoácidos  $\alpha$  y tres  $\gamma$  alternados. Para establecer las bases estructurales de estos nanotubos era necesario diseñar dos ciclopéptidos diferentes que permitiesen analizar ambos tipos de interacciones. Las interacciones  $\gamma$ - $\gamma$  se podían estudiar con ciclopéptidos en los que el protón amida de los  $\alpha$ -aminoácidos se sustituye por grupos metilo. De la misma forma, las interacciones  $\alpha$ - $\alpha$  podían ser estudiadas mediante ciclopéptidos con  $\gamma$ -aminoácidos N-metilados (figura 70).

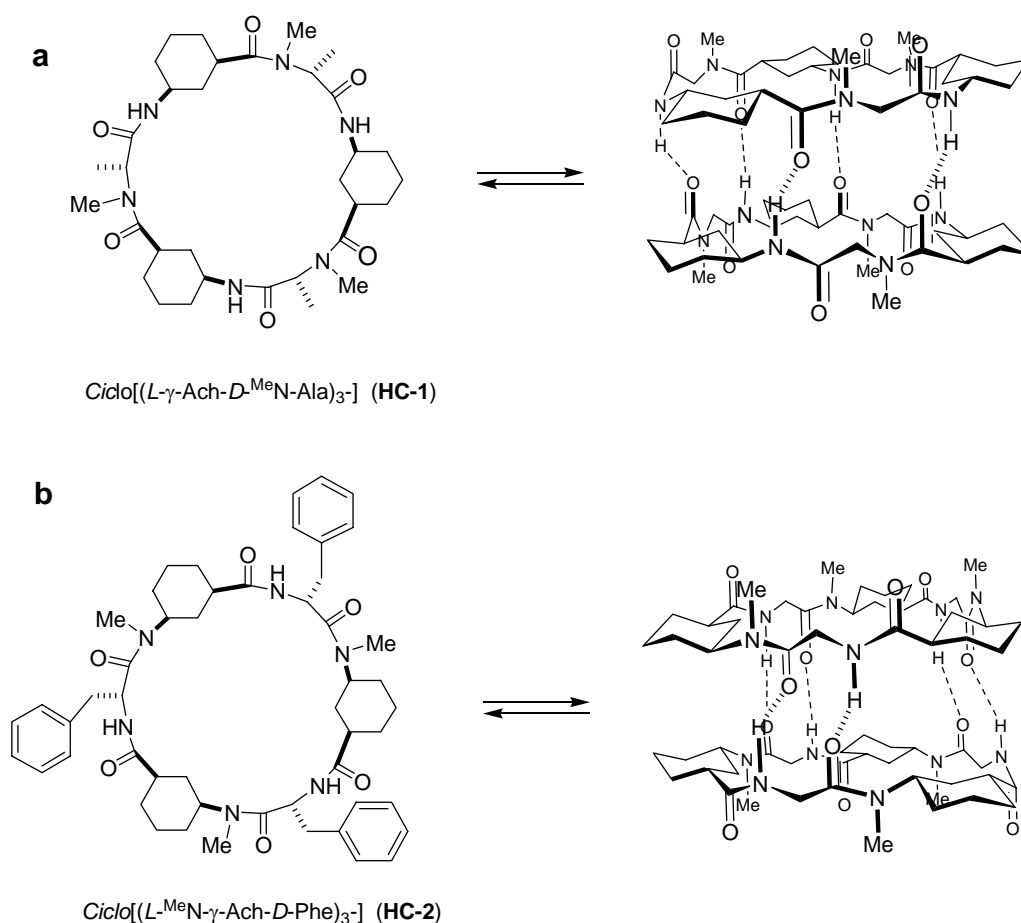


Figura 70: Superior: Ciclohexapéptido con los  $\alpha$ -Aa (Ala) N-metilados, que daría lugar a dímeros que permitirían estudiar el puente de hidrógeno dado por los  $\gamma$ -Ach. Inferior: Ciclohexapéptido con los  $\gamma$ -Ach N-metilados, que daría lugar a dímeros que permitirían estudiar el puente de hidrógeno dado por los  $\alpha$ -Aa.

Nuestro primer objetivo fue el hexapéptido *ciclo*[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>] (HC-1) (figura 70 a), que se preparó siguiendo el esquema sintético comentado

118) a) Amorín, M.; Castedo, L. Granja, J. R. "New Cyclic peptide Assemblies with Hydrophobic Cavities: The Structural and Thermodynamic Basic of a New Class of Peptide Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845. b) Amorín, M.; Villaverde, V.; Castedo, L. Granja, J. R. "New  $\alpha,\gamma$ -peptide tubulets" *Drug Del. Sci. Tech.* **2005**, *15*, 87-92. c) Brea, R. J.; Amorín M.; Castedo, L.; Granja, J. R. "Methyl-Blocked Dimeric  $\alpha,\gamma$ -Peptide Nanotube Segments: Formation of a Peptide Heterodimer through Backbone-Backbone Interactions" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

anteriormente (capítulo 5, página 76). Como sustancia de partida empleamos el Boc-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm. Hay que subrayar también los buenos rendimientos (69%) observados en la etapa de ciclación, llevada a cabo a una concentración de 6 mM. Además, esta ciclación resultó ser sorprendentemente rápida, a pesar de que estábamos formando un macrociclo de 24 eslabones.<sup>119</sup> La elección de la <sup>Me</sup>N-Ala se debió a los precedentes anteriores,<sup>76,78</sup> en los que la desfavorable interacción entre el grupo N-metilo y los sustituyentes del carbono β de las cadenas laterales de los aminoácidos dificultaba la formación de dímeros.

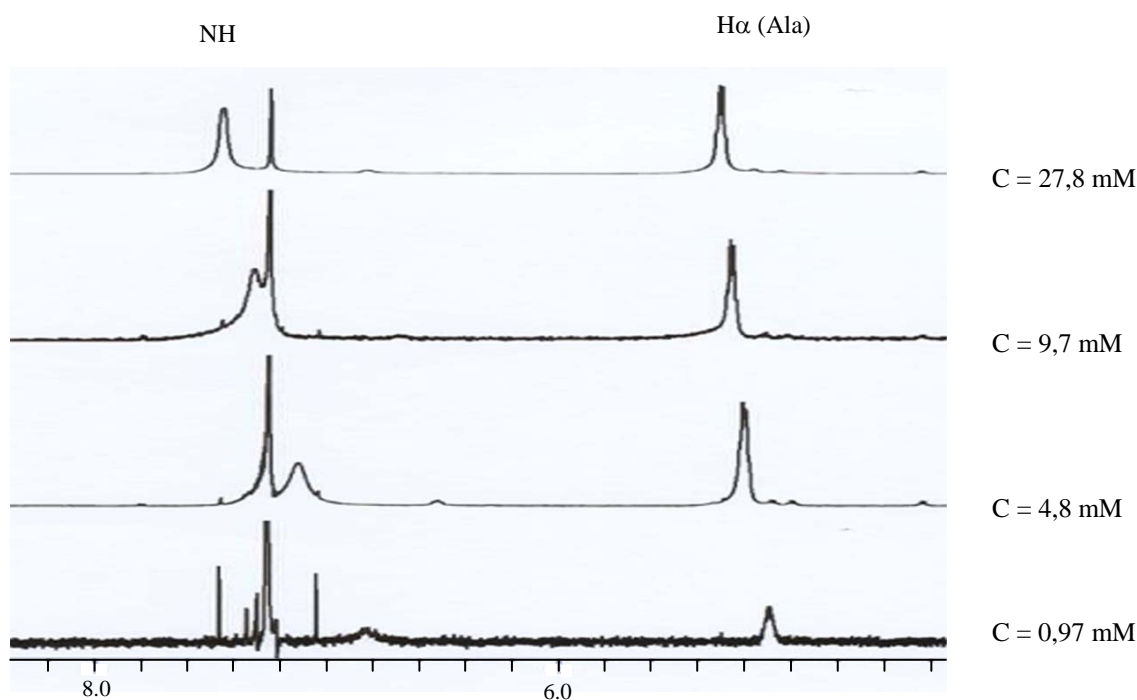


Figura 71: La proporción de monómero-dímero varía con la concentración de **HC-1** (25 °C).

Los primeros análisis de <sup>1</sup>H RMN, tanto en disolventes apolares como polares, muestran que el ciclopeptido adopta una conformación plana altamente simétrica, dada la simplicidad de su RMN, ya que sólo se pueden observar las señales correspondientes a una <sup>Me</sup>N-Ala y a un γ-Ach, es decir, los tres <sup>Me</sup>N-Ala y los tres γ-Ach son equivalentes. La constante de acoplamiento (*J*) posee un valor entre 7,5 y 8,2 Hz que se ajusta a la orientación *trans* (entre los protones H<sub>γ</sub> y NH) tanto en disolventes polares como apolares (CCl<sub>4</sub>, CDCl<sub>3</sub>, MeOH y DMSO).<sup>120</sup> En disolventes apolares se observa que el desplazamiento químico de algunas señales (especialmente los protones de las amidas) depende de la concentración (figura 71), desapantallándose cuando aumenta la concentración; así por ejemplo, la señal de amida se desplaza de 7,05 ppm (2,43 mM) a

119) La reacción de ciclación se siguió mediante HPLC analítico, observándose que una vez añadido el agente de acoplamiento ya no se detectaba la sustancia de partida en el cromatograma.

76) Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. "β-Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antiparallel β-Sheets" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 95-98.

78) Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri M. R. "Cylindrical β-Sheet Peptide Assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8960.

120) Smith, L. J.; Bolin, K. A.; Schawalb, E. H.; MacArthur, M. W.; Thornton, J. M.; Dobson, C. M. "Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations" *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 494-506.

7,47 ppm (27,78 mM). Se puede entender que este desplazamiento químico es debido a un equilibrio rápido entre monómero y dímero, dando una señal promedio según la contribución de cada especie. Las señales del protón de la amida se desplazan más de 1 ppm entre la más diluida (2,43 mM) y la más concentrada. La formación de dímeros implica la formación de puentes de hidrógeno y por tanto los protones de la amida se desapantallan. También se observa que el H $\alpha$  de la Ala y el H $\gamma$  del  $\gamma$ -Ach, al quedar situados próximos al grupo carbonilo, se desplazan ligeramente a campo más bajo al aumentar la concentración, aunque en este caso el desplazamiento es únicamente de 0,15 ppm.<sup>121</sup>

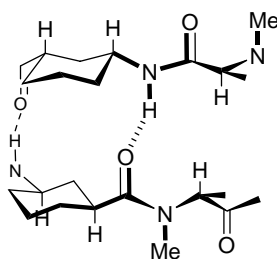


Figura 72: Disposición de los puentes de hidrógeno que se forman entre los  $\gamma$ -aminoácidos del ciclopéptido *ciclo*[(*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>3</sub>] (**HC-1**).

Otra evidencia de la existencia de un proceso de equilibrio entre monómero y dímero se obtuvo al realizar un RMN a baja temperatura (189 K) y baja concentración (0,5 mM) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (figura 73). A esta temperatura el equilibrio es más lento que la escala de tiempo del RMN, por lo que se puede observar ambas especies, monómero y dímero, en equilibrio. Así por ejemplo, la señal del NH del dímero aparece a un campo de 7,79 ppm, mientras que la señal del monómero resuena a 6,49 ppm. La señal del H $\alpha$  de la Ala de la especie dimérica aparecen a 5,31 ppm, solapada por el disolvente, mientras que a 4,80 ppm se observa la señal correspondiente a la especie monomérica.

121) La variación del campo de los C $\alpha$ H es característica de láminas  $\beta$ . a) Maynard, A. J.; Sharman, G. J. Searle, M. S. "Origin of  $\beta$ -Hairpin Stability in Solution: Structural and Thermodynamic Analysis of the Folding of a Model Peptide Supports Hydrophobic Stabilization in Water" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1996-2007. b) Haque, T. S.; Gellman, S. H. "Insights on  $\beta$ -Hairpin Stability in Aqueous Solution from Peptides with Enforced Type I' and Type II'  $\beta$ -Turns" *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2303-2304.

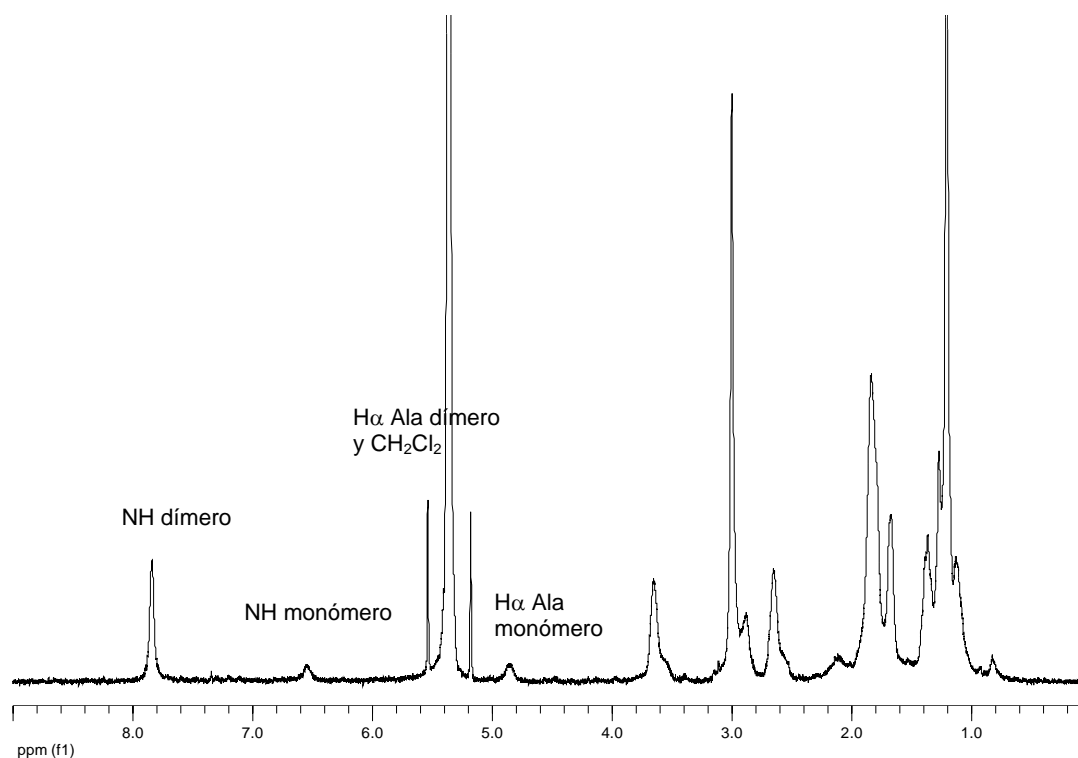


Figura 73:  $^1\text{H}$  RMN del *ciclo*[(*L*- $\gamma$ -Ach-*D*- $^{\text{Me}}$ N-Ala) $_3$ -] (**HC-1**) (0,5 mM) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y a 198 K. En estas condiciones se pueden apreciar las señales de monómero y de dímero, tal como aparecen marcados en el espectro.

Para el cálculo de las variables termodinámicas se midieron los desplazamientos de los NH a diferentes temperaturas (a intervalos de 10 K en un rango de temperaturas comprendido entre 243-313 K) y a diferentes concentraciones ( $3 \times 10^{-2}$  -  $5 \times 10^{-4}$  M) usando la ecuación de regresión no lineal, que correlaciona los desplazamientos de los NH con la constante de asociación para un proceso en equilibrio entre monómero y dímero (modelo de LaPlanche)<sup>122</sup>:  $\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{dim}} + (\delta_{\text{mon}} - \delta_{\text{dim}})[-1 + (1 + 8K_a C)^{1/2}]/(4K_a C)$  [donde C corresponde a la concentración del experimento, mientras que  $K_a$ ,  $\delta_{\text{mon}}$  y  $\delta_{\text{dim}}$  son valores calculados a partir de los datos observados ( $\delta_{\text{obs}}$ )]. Para las condiciones estudiadas se calcularon los valores de las  $K_a$  a diferentes temperaturas. La correlación entre el log  $K_a$  con el inverso de la T (conocido como representaciones de Van't Hoff) nos permite obtener una recta a partir de la cual se relaciona la  $\Delta H$  con la pendiente y la  $\Delta S$  con la coordenada en el origen.

Los valores termodinámicos de este proceso son:  $\Delta H_{298}^\circ = -34,1 \text{ KJ mol}^{-1}$  y  $\Delta S_{298}^\circ = -69,8 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Es por tanto un proceso dirigido entálpicamente, aunque entrópicamente desfavorable, ya que el paso de monómero a dímero implica un aumento del orden.<sup>123,124</sup>

122) LaPlanche, L. A.; Thompson, H. B.; Rogers, M. T.; "Chain Association Equilibria. A Nuclear Magnetic Resonance Study of the Hydrogen Bonding of N-Monosubstituted Amides" *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 1482-1488.

123) Searle, M. S.; Westwell, M. S.; Williams, D. H. "Application of a generalized enthalpy-entropy relationship to binding co-operativity and weak associations in solution" *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1995**, *2*, 141-151.

124) Dunitz, J. D. "Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions" *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 709-712.

La  $K_{a\ 298} = 230\text{ M}^{-1}$  es ligeramente superior a las encontradas por Lorenzi en sus hexámeros (en los que también se formaban 6 puentes de hidrógeno),<sup>79</sup> pero ligeramente inferiores a los mejores datos obtenidos para los  $\alpha$ -ciclooctámeros. La contribución por puente de hidrógeno es similar a las reportadas por Ghadiri,<sup>74,78</sup> estimadas en torno a 2,0-3,0 KJ/mol (0,5-0,7 Kcal/mol) por puente de hidrógeno, ya que se estima una contribución de 2,20 KJ mol<sup>-1</sup> (0,53 Kcal mol<sup>-1</sup>) por puente de hidrógeno en la formación de estos dímeros, valor similar a los obtenidos para los *D,L*-ciclooctámeros.

Como cabría esperar para este tipo de procesos, una disminución de la constante dieléctrica del medio conduce a mayores  $K_a$ , tal como se observa en el estudio realizado con la mezcla de CDCl<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub> 2:3 en el que la constante de asociación es aproximadamente de  $2,5 \times 10^4\text{ M}^{-1}$ .

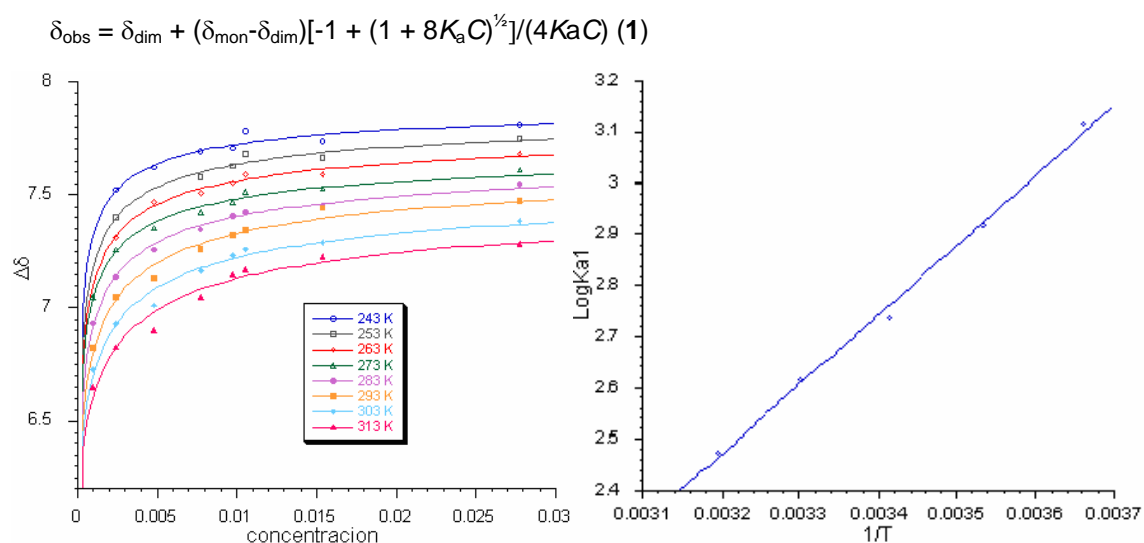


Figura 74: Izquierda: Gráfica en la que se han representado los desplazamientos químicos observados en el RMN frente a la concentración, las líneas representadas corresponden al ajuste según la ecuación (1). Derecha: Representación de Van 't Hoff de las  $K_a$  observadas frente al inverso de la temperatura.

La técnica de IR permite caracterizar de forma bastante precisa el tipo de estructura secundaria que adoptan los péptidos. Los trabajos de Krimm<sup>125</sup> y otros posteriores han demostrado que las señales de vibración de los grupos C=O y los N-H pueden describir el tipo de motivo estructural del que forman parte, ya que las bandas IR de  $\alpha$ -hélice (n+4),  $3_{10}$   $\alpha$ -hélice (n+3),  $\beta$ -lámina (n+2) o giro (n+1) son características

- 79) a) Saviano, M.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Di Blasco, B.; Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. "A structural two-ring version of a tubular stack of  $\beta$ -ring in crystals of a cyclic *D,L*-hexapeptide" *Incl. Phenom.* **1994**, *18*, 27-36. b) Sun, X. C.; Lorenzi, G. P. "On the Stacking of  $\beta$ -Ring: The Solution Self-association Behavior of Two Partially N-Methylated Cyclo(hexaleucines)" *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1520-1526.
- 74) Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. "The Structural and Thermodynamic Basis for the Formation of Self-Assembled Peptide Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.
- 78) Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri, M. R. "Cylindrical  $\beta$ -Sheet Peptide Assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.
- 125) a) Krimm, S.; Bandekar, J. "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins" *In Advances in protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1986; pp 181-364. b) Demirdöven, N.; Cheatum, C. M.; Chung, H. S.; Khalil, M.; Knoester, J.; Tokmakoff, A. "Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of Antiparallel  $\beta$ -Sheet Secondary Structure" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7981-7990.

de cada estructura. Las bandas más importantes corresponden a: el modo de vibración llamado amida Ia (vibración del C=O en la componente perpendicular al plano de la amida), la vibración amida Ib (que corresponde al C=O en su componente paralela), que suele ser más débil y también está relacionada con la vibración del carbonilo libre, mientras que la llamada amida II<sub>II</sub> es la vibración en el plano del N-H y es la vibración del C-N. Finalmente la vibración amida A es el *stretching* del grupo amida.

A modo de ejemplo, en la tabla 3, se muestran los resultados de varios estudios hechos con diferentes motivos estructurales.

Motivo estructural	Modo de vibración: Amida Ia (perpendicular)	Modo de vibración: Amida Ib (paralela)	Modo de vibración: Amida II (paralela)
Lámina $\beta$ antiparalela, para $\beta$ -Poli(L-alanina)	1632 (S)	1694 (W)	1524 (S) (paralela) 1545 (W) (perpendicular)
Lámina $\beta$ antiparalela para $Gly_nI$	1636 (S)	1685 (W)	1517 (W) (paralela)
Lámina $\beta$ Antiparalela para $\beta$ -(GluCa) <sub>n</sub>	1624 (S)	1693 (W)	1560 (S) (perpendicular)
Hélice $\alpha$ , para Poli(L-alanina)	1658 (S)		1516 (W) (paralela) 1545 (S) (perpendicular)
Hélice $\alpha$ , para Poli(L- glutámico)	1653 (S)		1510 (W) (paralela) 1550 (S) (perpendicular)
Hélice $3_{10}$ , para $\alpha$ -Poli(L- aminoisobutírico)	1656 (S)		1545 (S) (perpendicular)

Tabla 3: Ejemplos de diferentes estructuras secundarias de péptidos y sus respectivas bandas de IR, que reflejan el motivo estructural que forman. S (fuerte), M (media) y W (débil).<sup>125</sup>

El péptido **HC-1** muestra en su IR (293 K, CHCl<sub>3</sub>, ver anexo 1) las bandas típicas de una hoja plegada  $\beta$  antiparalela: amida Ib 1669 cm<sup>-1</sup>,<sup>126</sup> amida Ia a 1626 cm<sup>-1</sup> y la banda de la amida II<sub>II</sub> a 1542 cm<sup>-1</sup> confirman la estructura propuesta de lámina  $\beta$  antiparalela.

Otra información importante que nos aporta el IR es la banda del N-H (amida A), que se puede correlacionar con la distancia N...O (de un puente de hidrógeno) a través de la frecuencia de la amida A, de tal forma que la frecuencia aumenta a medida

125) a) Krimm, S.; Bandekar, J. "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins" *In Advances in protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1986; pp 181-364. b) Demirdöven, N.; Cheatum, C. M.; Chung, H. S.; Khalil, M.; Knoester, J.; Tokmakoff, A. "Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of Antiparallel  $\beta$ -Sheet Secondary Structure" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7981-7990.

126) Relacionado con la vibración del carbonilo no implicado en la formación de puentes de hidrógeno.

que lo hace la fuerza del puente de hidrógeno (por tanto menor longitud de onda ( $\lambda$ )). El valor de esta banda, cuando está implicado un enlace puente de hidrógeno, aparece en torno a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , mientras que cuando éste no está implicado el valor de la banda es de unos  $3400\text{ cm}^{-1}$ . El **HC-1** muestra una banda propia de vibración a  $3318\text{ cm}^{-1}$  del N-H, característica de una asociación puente de hidrógeno N-H ... O=C.

Sin embargo, esta banda que se observa experimentalmente no nos permite medir la distancia directamente, ya que dicha banda está desdoblada, por el efecto conocido como resonancia de Fermi, con la amida II, apareciendo una banda amida B de pequeña intensidad entre  $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ . A partir de la intensidad de estas señales y de la diferencia de longitud de onda se pueden calcular los valores fundamentales de  $\nu_A^\circ$ , que es lo que permite determinar distancias d-(N...O) según Krimm. Por ejemplo, la  $\alpha$ -Ply(L-alanina) presenta las bandas  $\nu_A$   $3307\text{ cm}^{-1}$  y  $\nu_B$   $3058\text{ cm}^{-1}$ ; esto da  $\nu_A^\circ$  no perturbada de  $3279\text{ cm}^{-1}$  y por lo tanto la distancia es de  $2,84\text{ \AA}$ . En nuestro caso, no hemos podido hacer esta discriminación entre las dos bandas, sin embargo este valor es bastante similar al real, por lo que estimamos que una banda de  $3318\text{ cm}^{-1}$  correspondería a una distancia entre  $2,85\text{-}2,95\text{ \AA}$ .

Finalmente se trató de obtener otra prueba de la existencia de dímeros. Para ello se consiguió cristalizar el ciclo péptido **HC-1** en  $\text{CHCl}_3$  equilibrado en una atmósfera de hexano después de 2-4 días. Los cristales incoloros resultantes difractaron con una buena calidad, sin embargo resultó que dichos cristales obtenidos bajo estas condiciones están maclados en una proporción próxima al 50%, no siendo posible su resolución. Otros intentos de cristalización en distintas condiciones y disolventes resultaron infructuosos.

Para el estudio de las interacciones entre los  $\alpha$ -Aa, es decir, de las caras  $\alpha$ , decidimos sintetizar el ciclo[(D-Phe-L-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-] (**HC-2**), para lo cual utilizamos la misma estrategia indicada en el capítulo 5 (página 76), partiendo en este caso del Boc- $\gamma$ -<sup>Me</sup>N-Ach-OH. Este péptido también adopta una conformación plana y altamente simétrica (C<sub>3</sub>), tanto en disolventes polares como apolares, con una constante de acoplamiento ( $J_{\text{NH,H}\alpha} = 9,0\text{-}9,5\text{ Hz}$ ) que es característica de una disposición *trans* del enlace amida.<sup>120</sup> En  $\text{CDCl}_3$ , la señal correspondiente a los NH de la Phe es constante a  $8,7\text{ ppm}$ , incluso a concentraciones tan diluidas como  $2 \times 10^{-4}\text{ M}$  ( $0,2\text{ mM}$ ), o calentando a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . En los RMN realizados en proporciones de metanol próximas al 90%, condiciones en las que el péptido precipita, la señal de la amida también se observa a similar desplazamiento químico. Todo esto implica la existencia de un dímero con una altísima constante de asociación, que estimamos superior a  $10^6\text{ M}^{-1}$  en  $\text{CDCl}_3$ , que es la mayor  $K_a$  encontrada hasta el momento para este tipo de estructuras supramoleculares.

El IR ( $293\text{ K}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , ver anexo 1) del **HC-2** muestra la banda de la amida A (correspondiente a una interacción de los NH con los carbonilos) a  $3303\text{ cm}^{-1}$ , característica de un enlace puente de hidrógeno que sugiere una menor distancia entre las dos subunidades peptídicas que la existente entre las del dímero del **HC-1**. El péptido también muestra las bandas típicas de una hoja plegada  $\beta$  a  $1665\text{ cm}^{-1}$  y  $1625\text{ cm}^{-1}$  de la amida I y a  $1527\text{ cm}^{-1}$  de la amida II.

La fuerza de esta interacción también fue confirmada por la espectrometría de masas (EM-FAB) en la que se observan las señales correspondientes al dímero a  $[\text{2MH}]^+$   $1718,3\text{ umas}$  y al monómero a  $[\text{MH}]^+$   $859,3\text{ umas}$ .

---

120) Smith, L. J.; Bolin, K. A.; Schawalb, E. H.; MacArthur, M. W.; Thornton, J. M.; Dobson, C. M. "Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations" *J. Mol. Biol.* **1996**, 255, 494-506.

Una prueba concluyente de que este péptido **HC-2** forma dímeros se obtuvo en estado sólido, mediante la difracción de rayos X de cristales incoloros (monoclínicos) obtenidos de una disolución en cloroformo (3,5 mM) equilibrada en atmósfera de hexano. En el cristal aparecen dos ciclopéptidos formando un dímero con estructura de lámina  $\beta$  antiparalela, en el que existen seis puentes de hidrógeno entre ambas subunidades con una distancia N...O que varía entre 2,78-2,94 Å. Este dímero está ligeramente distorsionado debido al empaquetamiento con cuatro moléculas de disolvente, observándose una molécula de cloroformo que ocupa la cavidad interna del dímero, lo que muestra una hidrofobicidad de su interior probablemente debido al efecto del C2. El dímero tiene un diámetro de van der Waals interno de unos 4,3 Å y un volumen de 80 Å<sup>3</sup> (figura 75). Este volumen se calculó como una esfera con centro en el centroide del dímero, siendo su radio la distancia más corta con cualquier H ecuatorial del C2 del ciclohexilo (figura 76). En el resto de la estructura hay 3-4 moléculas de CHCl<sub>3</sub>.<sup>127</sup>

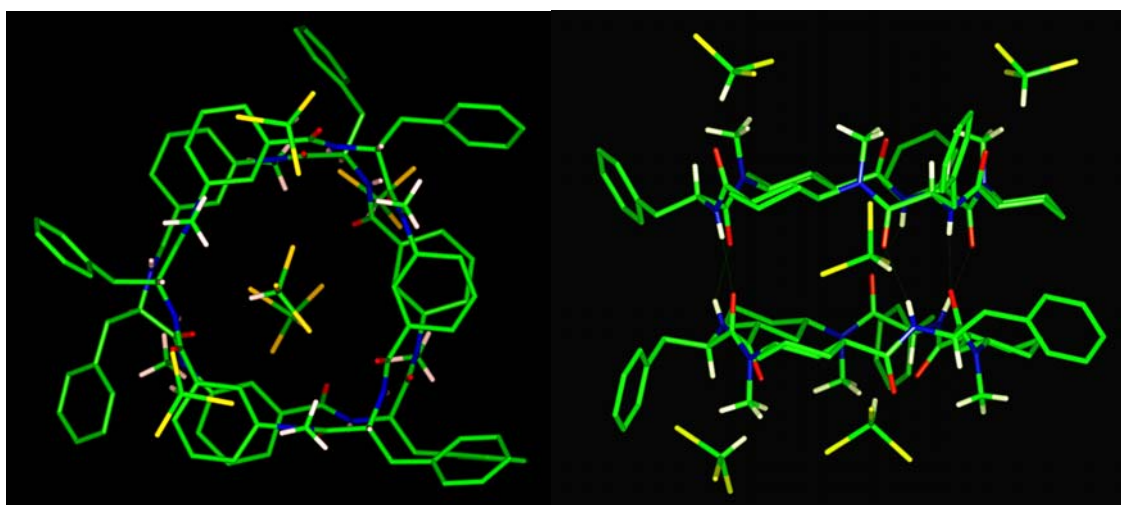


Figura 75: Izquierda: Vista superior del dímero del *ciclo*[(D-Phe-L<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-] (**HC-2**). Derecha: Vista lateral de dicho dímero. Se obtuvieron de la resolución mediante rayos X del **HC-2** en cloroformo y atmósfera de hexano. En su interior se puede apreciar una molécula de CHCl<sub>3</sub>.

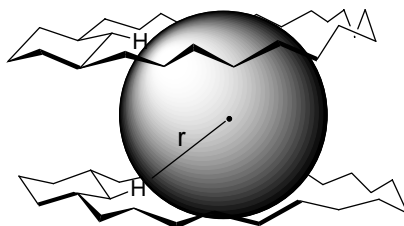


Figura 76: Modelo utilizado para la determinación del volumen de la cavidad interna del dímero formado por dos **HC-2**.

127) La variación del número de moléculas de CHCl<sub>3</sub> depende de la cristalización. Cristaliza con diferente proporción de CHCl<sub>3</sub> o, una vez que el cristal se separa de las aguas madre, comienza a perder el disolvente y a las pocas horas éste se vuelve opaco, efecto que atribuimos a la pérdida de disolvente.

El ciclopéptido *ciclo*[(*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-] (**HC-2**) también cristalizó de MeOH y atmósfera de hexano dando lugar a un cristal incoloro, cuya resolución volvió a mostrar un dímero cilíndrico en el que las dos subunidades están unidas mediante seis puentes de hidrógeno formando una lámina  $\beta$  antiparalela. En este caso las distancias N...O son ligeramente más largas: 2,87-3,08 Å. La diferencia más importante respecto al cristal anterior es que la cavidad interior del dímero está ocupada por dos moléculas de H<sub>2</sub>O que llenan dos posiciones al 50% (figura 77), lo que pone de manifiesto una propiedad anfipática de esta cavidad. Externamente, cada dímero se asocia con dos moléculas ordenadas de MeOH y H<sub>2</sub>O y una tercera molécula de H<sub>2</sub>O repartida al 50% en dos posiciones.

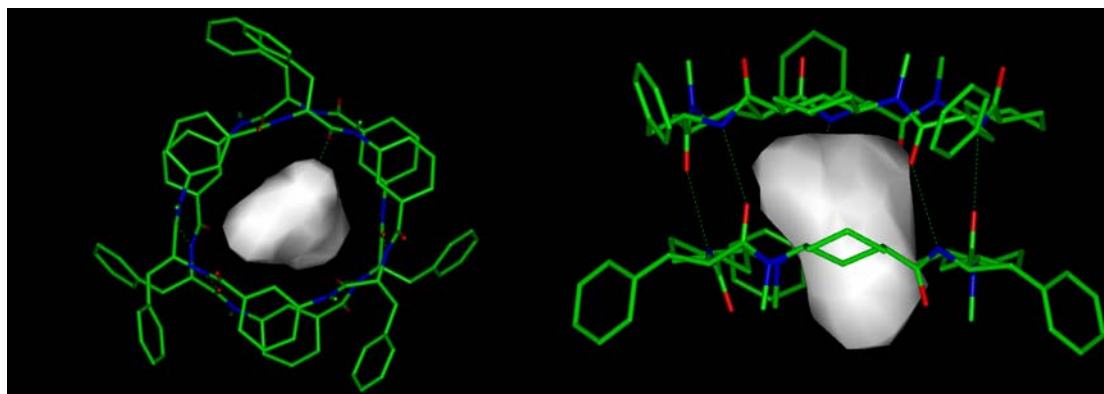


Figura 77: Izquierda: Vista superior del dímero del **HC-2**. Derecha: Vista lateral de dicho dímero. Dímeros obtenidos de la resolución mediante rayos X del **HC-2** en metanol. En el interior se muestra la región ocupada por moléculas de H<sub>2</sub>O.

Los datos obtenidos con los péptidos **HC-1** y **HC-2** sugieren unas propiedades anfipáticas de las cavidades de los dímeros formados por estos ciclopéptidos, nos hacen ser optimistas sobre las propiedades transportadoras de los nanotubos peptídicos de membrana con el mismo motivo estructural. Hay que destacar la elevada constante de asociación que presentan estos ciclopéptidos cuando forman los puentes de hidrógeno entre los  $\alpha$  aminoácidos ( $K_a > 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), mientras que la interacción entre los  $\gamma$ -aminoácidos ( $10^2 \text{ M}^{-1}$ ) es algo menor, aunque comparable a la observada para el mejor de los *D,L*-ciclooctapéptidos de Ghadiri.<sup>76,78</sup> Esta menor constante de asociación se la podemos atribuir a diferentes factores. En primer lugar, la podemos atribuir a la menor polaridad de los enlaces N-H de los  $\gamma$ -Ach, debido a la mayor distancia del grupo carboxilo que ejerce un fuerte efecto inductivo en los  $\alpha$ -Aa. Además, la posición del grupo metilo en los nitrógenos de la Ala puede desestabilizar la conformación plana del anillo por repulsiones estéricas con el carboxilo y la cadena lateral. A su vez, esta distorsión de la planaridad puede dar lugar a una conformación en la que los puentes de hidrógeno están ligeramente distorsionados. Esta menor intensidad también se ve reflejada en el IR de ambos ciclopéptidos, sobre todo en la banda de vibración de las amidas (amida A), ya que en el dímero de interacción  $\alpha$ - $\alpha$  vibra a  $3303 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que la banda de la interacción  $\gamma$ - $\gamma$  vibra a  $3318 \text{ cm}^{-1}$ .

76) Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. “ $\beta$ -Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antiparallel  $\beta$ -Sheets” *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 95-98.

78) Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri M. R. “Cylindrical  $\beta$ -Sheet Peptide Assemblies” *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8960.

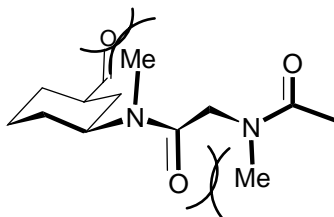


Figura 78: Esquema de proximidad entre los N-metilos y los carbonilos para los  $\alpha$ -Aa y los  $\gamma$ -Ach.

Determinados estos parámetros básicos del autoensamblaje, decidimos aclarar el efecto de las cadenas laterales en dicho proceso. Es conocido que los aminoácidos con cadenas laterales ramificadas en  $\beta$  o  $\gamma$  favorecen la formación de hojas plegadas  $\beta$ ; de esta forma, Leu, Val, Ile o Phe se suelen encontrar en una elevada proporción de las láminas  $\beta$  naturales.<sup>128</sup> Por ello, decidimos reemplazar los fenilos por otros aminoácidos no ramificados como la Ser, para evaluar dicho efecto, así como la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales. Por último, queríamos analizar la introducción de otros grupos funcionales en las cadenas laterales, lo cual nos permitiría ampliar las propiedades y aplicaciones de los dímeros o futuros nanotubos.

El estudio de los ciclopeptidos: *ciclo*[[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach]<sub>3</sub>-] (**HC-3**) y del *ciclo*[(L-Ser-D-MeN- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-] (**HC-4**) mostró que éstos adoptan una conformación plana y altamente simétrica. En el <sup>1</sup>H RMN del péptido **HC-3** en CDCl<sub>3</sub>, el desplazamiento de las señales de los NH de la Ser es constante a 8,29 ppm ( $J_{\text{NH,H}\alpha}$  = 9,3 Hz) e incluso a concentraciones tan bajas como  $4 \times 10^{-4}$  M, por lo que estimamos que la  $K_a$  debía ser similar a la del péptido **HC-2**.

La desprotección del **HC-3** para dar lugar el **HC-4** se realizó con Pd/C en etanol; sin embargo, el péptido resultante sólo era soluble en disolventes polares. En CD<sub>3</sub>OH muestra una conformación plana y altamente simétrica con una  $J_{\text{NH,H}\alpha}$  = 8,1 Hz, típica de una conformación *trans* del enlace amida ( $J_{\text{NH,H}\alpha}$  = 8,2 Hz en DMSO). En CD<sub>3</sub>OH el desplazamiento de los NH de la Ser aparece a 8,1 ppm, pero no pudimos estimar si este desplazamiento se debe a la interacción con el disolvente o a la formación de dímeros, lo que implicaría unas elevadas constantes de asociación en disolventes próticos. La similitud en el desplazamiento químico con lo observado en CDCl<sub>3</sub> parece indicar que éstas se deben a la formación del dímero.

El IR (293 K, CHCl<sub>3</sub>, ver anexo 1) del **HC-3** presenta una banda de la amida A a  $3302 \text{ cm}^{-1}$  (típica de la existencia de un puente de hidrógeno), así como las bandas típicas de una hoja plegada  $\beta$  a  $1665$  y  $1627 \text{ cm}^{-1}$  de la amida I y a  $1531 \text{ cm}^{-1}$  de la amida II. El IR del **HC-4** (293 K, CaF<sub>2</sub>, puesto que no es soluble en CHCl<sub>3</sub>) posee

128) a) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. "Conformational parameters for amino acids in helical,  $\beta$ -sheet, and random coil regions calculated from peptides" *Biochemistry* **1974**, *13*, 211-222. b) Muñoz, V.; Serrano, L.; "Intrinsic secondary structure propensities of the amino acids, using statistical  $\phi$ - $\psi$  matrixes: comparison with experimental scales" *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1994**, *20*, 301-311. c) Swindells, M. B. MacArthur, M. W.; Thornton, J. M.; "Intrinsic  $\phi$ , $\psi$  propensities of amino acids, derived from the coil regions of known structures" *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 596-603. d) Finkelstein, A. V. "Predicted beta-structure stability parameters under experimental test" *Protein Eng.* **1995**, *8*, 207-209. e) Minor, D. L. Jr; Kim, P. S. "Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence" *Nature* **1996**, *380*, 730-734. f) Smith, C. K.; Regan, L. "Guidelines for protein design: the energetics of  $\beta$  sheet side chain interactions" *Science* **1995**, *270*, 980-982. f) Kubelka, J.; Keiderling, T. A. "Differentiation of  $\beta$ -Sheet-Forming Structures: Ab Initio-Based Simulations of IR Absorption and Vibrational CD for Model Peptide and Protein  $\beta$ -Sheets" *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12048-12058.

bandas características de la existencia de dímeros: amida A a  $3308\text{ cm}^{-1}$  y bandas a  $1685$ ,  $1627$  y  $1533\text{ cm}^{-1}$  de una lámina  $\beta$ .

El masas del péptido **HC-3** muestra (EM-FAB<sup>+</sup>) el pico correspondiente al dímero a  $1897,8$  umas [ $2\text{MH}^+$ ] y la del monómero  $949,6$  umas [ $\text{MH}^+$ ], mientras que para el **HC-4** no se observa señal del dímero.

## 6.2. $\alpha,\gamma$ -CICLOTETRAPÉPTIDOS N-METILADOS<sup>129</sup>

El siguiente paso que decidimos abordar fue la modificación del diámetro interno del nanotubo que, en principio, sólo depende del número de Aa presentes en el ciclopeptido. Por supuesto, esta modificación no es tan trivial ya que el péptido debe seguir adoptando la conformación plana necesaria para el autoensamblaje. Las tensiones anulares son factores que se deben tener en cuenta y que pueden dificultar el proceso de autoensamblaje, sobre todo cuando se aumenta el tamaño del ciclo. Los factores entrópicos, que implican congelar al macrociclo en una conformación determinada, también pueden jugar un papel importante.

Los nanotubos más pequeños que podríamos formar son los derivados de ciclotetrapéptidos. Las estructuras tubulares preparadas según este modelo tendrían un diámetro interno inferior a 1 Å. Cuando abordamos este estudio ya suponíamos que la formación de dímeros en disolución podría no estar muy favorecida ya que las unidades ciclopeptídicas están unidas entre sí por únicamente cuatro puentes de hidrógeno. Si la aportación energética de cada puente de hidrógeno es similar a las observadas para los ciclohexapéptidos, su formación, sobre todo en las interacciones  $\gamma$ - $\gamma$ , parecía complicada. Al igual que con los  $\alpha,\gamma$ -ciclohexapéptidos, el nanotubo está constituido por dos tipos de interacciones diferentes: las  $\alpha$ - $\alpha$ , que tienen lugar entre las dos caras  $\alpha$  de dos péptidos orientados antiparalelamente, y las  $\gamma$ - $\gamma$ , en la que los grupos dadores y aceptores de puentes de hidrógeno son los de los  $\gamma$ -aminoácidos (figura 79).

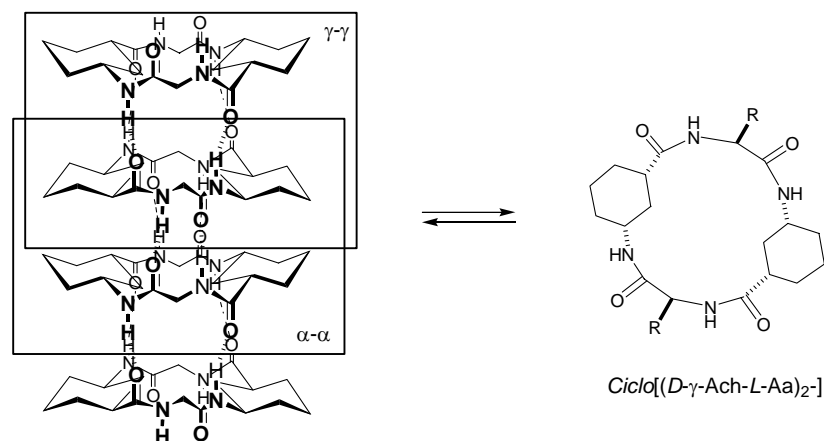


Figura 79: Derecha: Modelo de nanotubos formados por  $\alpha,\gamma$ -ciclotetrapéptidos, así como la estructura de un precursor ciclopeptídico. Para mayor claridad, las cadenas laterales de los  $\alpha$ -Aa han sido suprimidas.

Por tanto, para poder estudiar las interacciones básicas de estos nanotubos, es necesario preparar dos tipos de péptidos N-metilados: los ciclopeptidos con los  $\alpha$ -Aa bloqueados para estudiar las interacciones  $\gamma$ - $\gamma$  y los ciclopeptidos con los  $\gamma$ -Ach metilados para estudiar las interacciones  $\alpha$ - $\alpha$ , preparándose los péptidos: *ciclo*[(D- $\gamma$ -Ach-L-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-] (**TC-1**) y *ciclo*[(D-Phe-L-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>-] (**TC-2**) (figura 80).

129) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. "The Smallest  $\alpha,\gamma$ -Peptide Nanotubes Segments: Cyclic  $\alpha,\gamma$ -Tetrapeptide Dimers" *Org. Lett.* **2005.**, 7, 4681-4684.

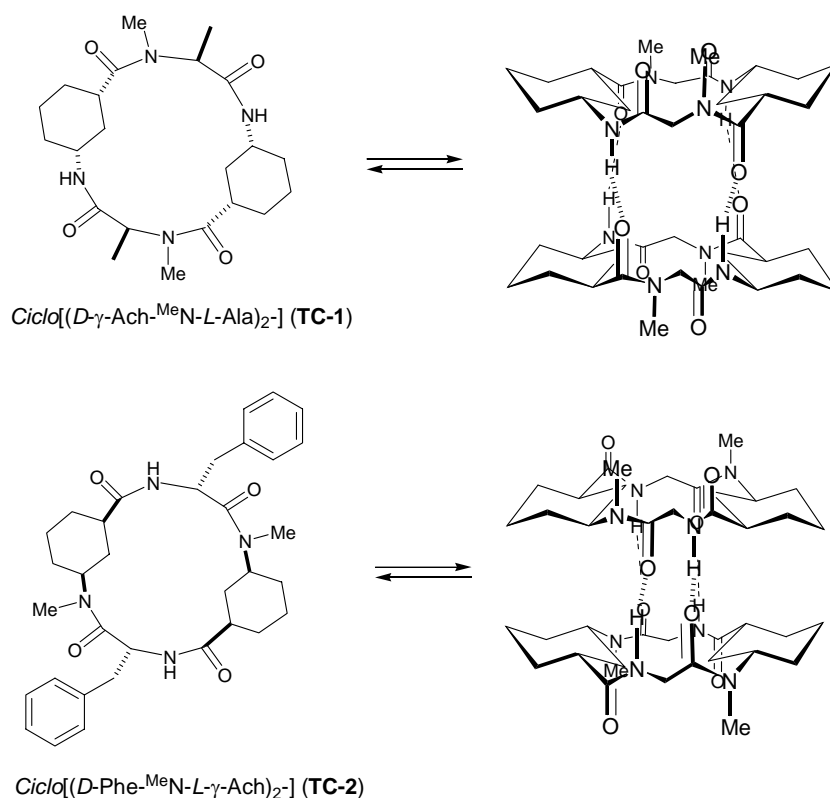


Figura 80: Modelo del autoensamblaje molecular propuesto para los péptidos **TC-1** (superior) y **TC-2** (inferior).

La síntesis de dichos péptidos se realizó en disolución de la manera ya descrita, (capítulo 5, página 76) partiendo del Boc-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm para la obtención de **TC-1** y del Boc-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-OFm para la obtención del **TC-2**. Una vez ciclados se purificaron por HPLC y se caracterizaron mediante MS, FT-IR, RMN y rayos X.

El ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>] (**TC-1**) presenta un espectro de RMN de protón en el que se observan las señales de dos Aa con una  $J_{\text{NH,H}\gamma} = 10,1$  Hz, que claramente parece indicar que adopta la conformación plana necesaria para la formación de dímeros; sin embargo, la señal del NH a 5,86 ppm es independiente de la concentración y de la temperatura. La adición de CCl<sub>4</sub> (9:1 CCl<sub>4</sub>/CDCl<sub>3</sub>) para disminuir la polaridad del medio tampoco produce ningún cambio significativo en su espectro. Estos datos sugieren que el péptido no se autoensambla para dar lugar a dímeros.

El IR (CHCl<sub>3</sub> a 293 K),<sup>125</sup> como ya se mencionó, correlaciona la banda de la amida A, que corresponde a la vibración del N-H, con la existencia de un puente de hidrógeno; y cuanto más fuerte es éste, menor es la longitud de onda de dicha banda. El **TC-1** muestra un valor de la amida A a 3366 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al NH libre, constituyendo esto otra evidencia de que no existen dímeros. Otras bandas de este péptido son: amida Ib 1679 cm<sup>-1</sup>, amida Ia 1621 cm<sup>-1</sup> y la banda de la amida II<sub>II</sub> a 1522 cm<sup>-1</sup>. Todo esto confirma que el péptido posee una conformación de lámina  $\beta$ , pero sin embargo no es capaz de formar puentes de hidrógeno con otra subunidad.

125) a) Krimm, S.; Bandekar, J. "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins" *In Advances in protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J.T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1986; pp 181-364. b) Demirdöven, N.; Cheatum, C. M.; Chung, H. S.; Khalil, M.; Knoester, J.; Tokmakoff, A. "Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of Antiparallel  $\beta$ -Sheet Secondary Structure" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7981-7990.

El segundo péptido sintetizado *ciclo*[(*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>-] **TC-2** muestra en su espectro de protón una conformación plana con simetría C2 característica del ciclopéptido. Esta conformación plana se aprecia tanto en disolventes polares como apolares, mostrando una  $J_{\text{NH,H}\alpha} = 10,0$  Hz. En cloroformo, el espectro muestra que los NH de la Phe se desplazan a campo bajo al incrementarse la concentración del péptido y al bajar la temperatura (figura 81). Esto es característico, al igual que ocurría con el hexámero **HC-1**, de un proceso de asociación entre monómero y dímero más rápido que la escala de tiempos de RMN; y por tanto lo que observamos es una señal promedio de los NH entre el monómero y el dímero. Dicha señal aparece entre  $\delta$  6,0-7,8 ppm según la concentración y temperatura.

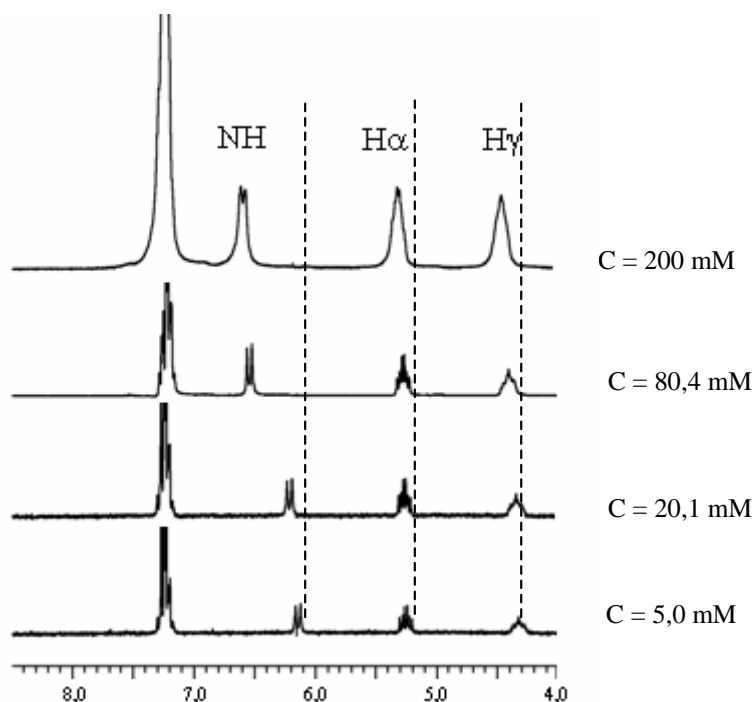


Figura 81: Ampliación (8,5-4,0 ppm) del espectro <sup>1</sup>H RMN en CDCl<sub>3</sub> a 25 °C del péptido **TC-2** a cuatro concentraciones diferentes.

A partir de los desplazamientos de los NH de las Phe a diferentes concentraciones (50-2 mM) y temperaturas (233-313) y usando la ecuación mediante regresión no lineal anteriormente utilizada,<sup>130</sup> se pudo obtener la constante de asociación, encontrando que a 298 K, en CDCl<sub>3</sub>, la  $K_a$  es de 15,0 M<sup>-1</sup>. Además mediante representaciones de Van't Hoff (log  $K_a$  frente a 1/T) se obtuvieron las variables termodinámicas del proceso de dimerización para **TC-2**:  $\Delta H^\circ_{298} = -30,8$  KJ mol<sup>-1</sup> y  $\Delta S^\circ_{298} = -82,0$  J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.<sup>131</sup>

El IR (CHCl<sub>3</sub> a 293 K)<sup>125</sup> de este péptido muestra dos bandas características de una vibración amida A de los N-H. Una de ellas, a 3411 cm<sup>-1</sup>, es característica de un

130)  $\{\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{dim}} + (\delta_{\text{mon}} - \delta_{\text{dim}})[-1 + (1+8K_aC)^{1/2}]/(4K_aC)$ ;  $\delta(\text{NH})$  son los desplazamientos de los <sup>1</sup>H NMR y C la concentración total de péptido.

131) Valor que corresponde a una contribución de 0,5 Kcal mol<sup>-1</sup> por enlace puente de hidrógeno, un valor similar al obtenido para los *D,L*-ciclooctapéptidos.

125) a) Krimm, S.; Bandekar, J. "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins" *In Advances in protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J.T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1986; pp 181-364. b) Demirdöven, N.; Cheatum, C. M.; Chung, H. S.;

N-H libre (especie monomérica), mientras que la otra a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , es propia de un N-H que forma puentes de hidrógeno (dímero). También se observaron las bandas a  $1673\text{ cm}^{-1}$  (amida Ib),  $1627\text{ cm}^{-1}$  (amida Ia) y  $1522\text{ cm}^{-1}$  (amida II<sub>II</sub>), que son típicas de una estructura de lámina  $\beta$ .

Una prueba concluyente de que el ciclopéptido **TC-2** da lugar a dímeros, la proporcionó la resolución por difracción de rayos X de un cristal del péptido que cristaliza formando dímeros. El cristal se obtuvo por cristalización en tetracloroetano, equilibrado mediante difusión con una atmósfera de hexano. Los cristales incoloros muestran la existencia de ciclotetrapéptidos con una conformación plana y formando dímeros unidos por cuatro puentes de hidrógenos, con una distancia N...O comprendida entre  $2,91\text{-}3,08\text{ \AA}$  (figura 82). El volumen de van der Waals dentro del ciclopéptido es de sólo  $10\text{ \AA}^3$ , no dejando espacio en su interior para la encapsulación de alguna molécula. Como se puede observar, los grupos amida se orientan ligeramente hacia el interior de la cavidad, no siendo lineales los puentes de hidrógeno, lo que podría explicar la pequeña constante de asociación observada.

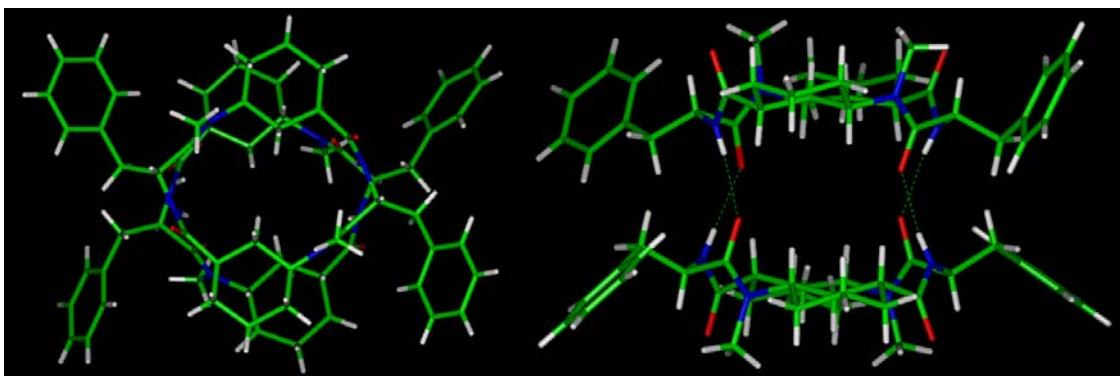


Figura 82: Izquierda: Visión superior del dímero del **TC-2**. Derecha: Visión lateral del dímero, donde se aprecia la existencia de cuatro puentes de hidrógeno entre ambos ciclopéptidos.

Un segundo tipo de cristal se obtuvo por cristalización del péptido de una disolución de MeOH, equilibrada en atmósfera de hexano. En este caso, probablemente debido a que el disolvente compite por los puentes de hidrógeno, no se observa la formación del dímero (figura 83). La estructura cristalina está formada por el ciclopéptido en una conformación plana similar a la mostrada en el dímero cristalizado en cloroformo. No obstante los C=O y NH del esqueleto peptídico crean puentes de hidrógeno con seis moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  y una de metanol por ciclopéptido; tres de estas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  están desordenadas en la estructura cristalina entre seis posiciones diferentes, mientras que la molécula de metanol existe en dos posiciones diferentes.

---

Khalil, M.; Knoester, J.; Tokmakoff, A. "Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of Antiparallel  $\beta$ -Sheet Secondary Structure" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7981-7990.

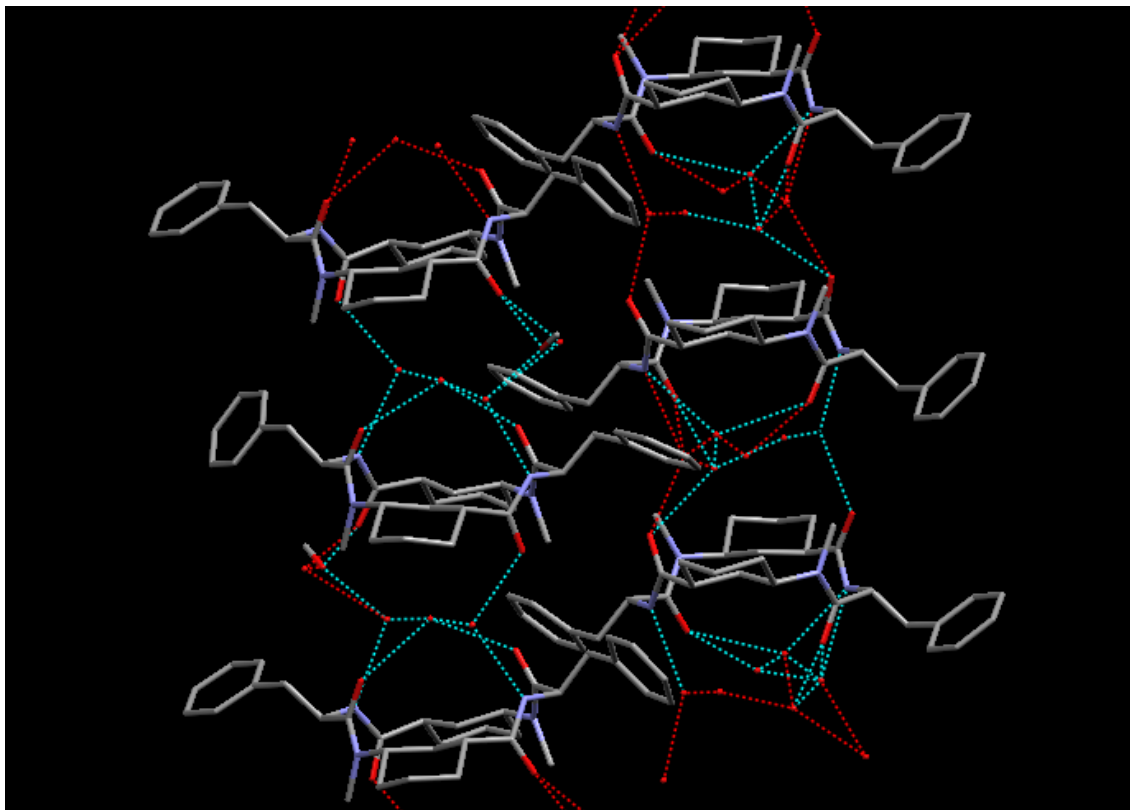


Figura 83: Visión de la estructura cristalina obtenida por difracción de rayos X del cristal del **TC-2** en MeOH. Los puntos rojos corresponden a los oxígenos del H<sub>2</sub>O.

En resumen, hemos demostrado que ciclopéptidos formados por dos  $\alpha$ -Aa y dos  $\gamma$ -Ach alternados pueden dar lugar a puentes de hidrógeno a través de las interacciones  $\alpha$ - $\alpha$ . La formación de nanotubos no parece factible debido a la imposibilidad de formar interacciones estables a través de las caras  $\gamma$ . Sin embargo, este hecho podría deberse a la distorsión generada por los grupos metilo que bloquean la cara  $\alpha$ , fenómeno ya observado en el hexapéptido, y que puede estar amplificado por la tensión anular del ciclopéptido, pues se trata de un macrociclo de 16 eslabones con fuertes restricciones geométricas.

### 6.3. $\alpha,\gamma$ -CICLOOCTAPÉPTIDOS N-METILADOS<sup>132</sup>

A continuación abordamos el estudio de los octámeros cíclicos, con la esperanza de que el aumento del tamaño del anillo a 32 eslabones y la mayor libertad conformacional, no dificulten la disposición del péptido a adoptar la conformación plana requerida para el autoensamblaje. Por otro lado, la formación de los ocho puentes de hidrógeno debería favorecer su asociación (figura 84).

Los principios de formación de estos nanotubos son idénticos a los ya descritos anteriormente, existiendo dos tipos de interacciones alternadas a lo largo del nanotubo, las  $\alpha$ - $\alpha$  y las  $\gamma$ - $\gamma$ . Por tanto, sintetizamos los modelos peptídicos sencillos para estudiar por separado dichas interacciones. Siguiendo la estrategia sintética anteriormente mencionada (capítulo 5, página 76) se prepararon los ciclopéptidos *ciclo*[(*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>4</sub>-] (**OC-1**) como modelo de la interacción  $\gamma$ - $\gamma$  y el *ciclo*[(*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>4</sub>-] (**OC-2**) como modelo de la interacción  $\alpha$ - $\alpha$  (figura 85).

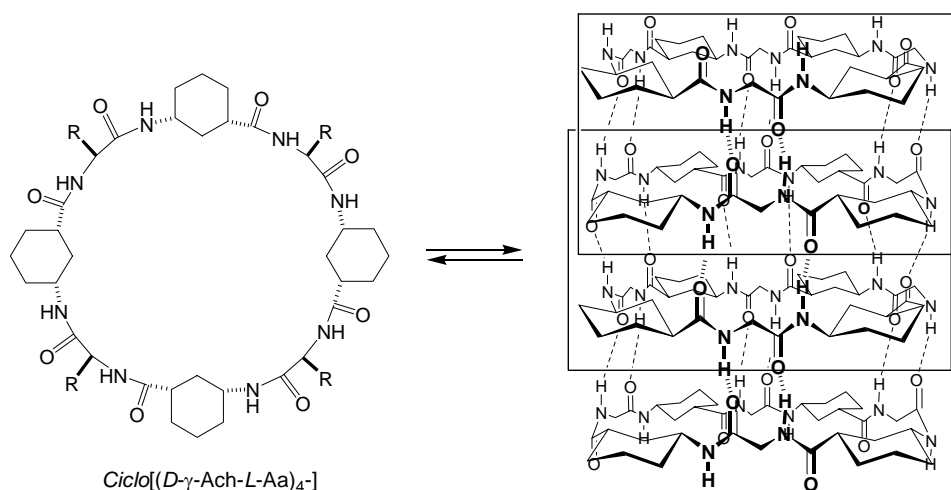


Figura 84: Nanotubo al que darían lugar los ciclooctapéptidos. Para mayor claridad, las cadenas laterales han sido suprimidas.

132) Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. "Self-Assembled Peptide Tubelets with 7 Å Pores" *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6539-6547.

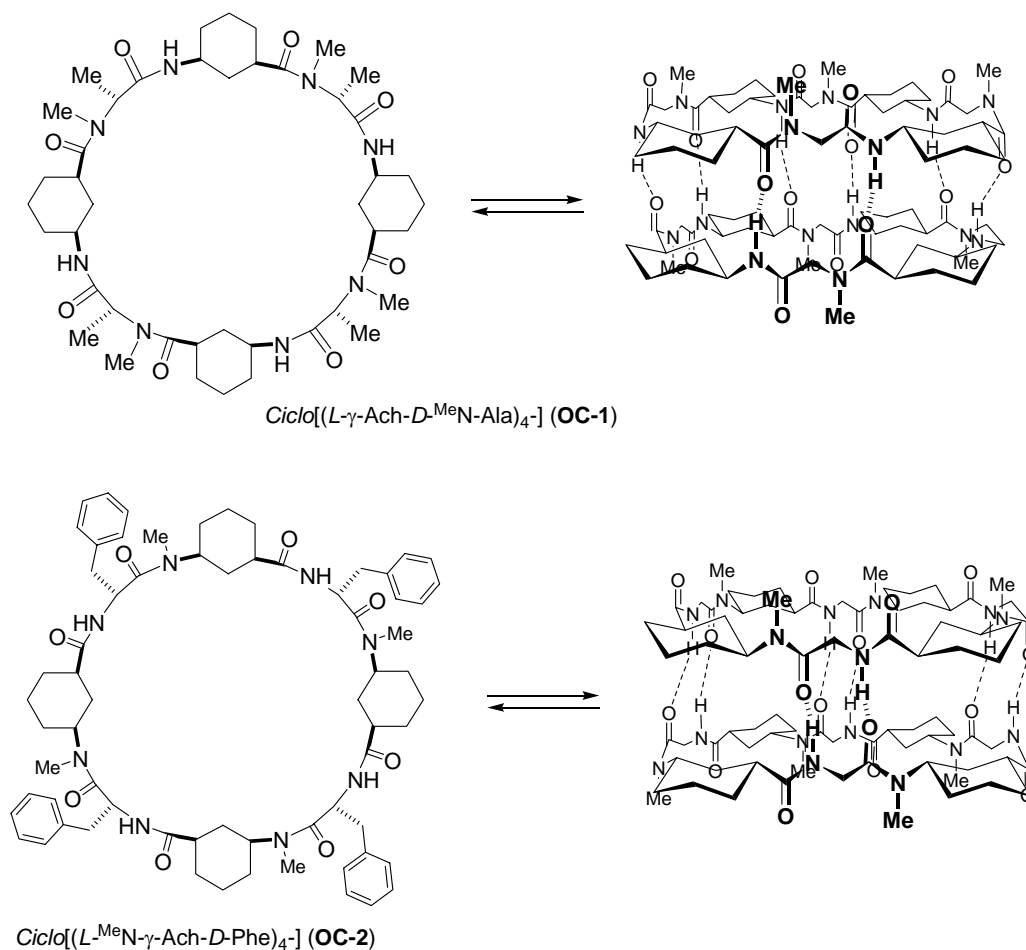


Figura 85: Superior: Ciclooctapéptido **OC-1** compuesto por 4 N-Metil Ala, que daría lugar a dímeros que permitirían estudiar la hoja plegada  $\beta$  antiparalela en la que participan los grupos amida de los  $\gamma$ -Ach (cara  $\gamma$ - $\gamma$ ). Inferior: Ciclooctapéptido **OC-2** formado por 4  $\gamma$ -Ach N-Metilados, que daría lugar a dímeros que permitirían estudiar los puentes de hidrógeno dados por los grupos amida de las Ala (cara  $\alpha$ - $\alpha$ ).

Una vez preparado el péptido *ciclo[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>4</sub>]* (**OC-1**) se purificó por HPLC usando fase normal y un gradiente de (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y se caracterizó mediante MS, FTIR, RMN y rayos X. Este péptido muestra en disolución, independientemente de su polaridad, una conformación mayoritariamente plana, siendo la constante de acoplamiento  $J_{\text{NH},\text{H}\gamma} = 7,4\text{-}8,2$  Hz. En disolventes como el cloroformo, el espectro se complica por el desdoblamiento de muchas de las señales características del mismo. La intensidad de estas señales depende de la concentración y de la temperatura. Se observa que las señales más desapantalladas (figura 86) aumentan al incrementarse la concentración o al disminuir la temperatura. Siendo este comportamiento característico de un equilibrio lento en la escala de tiempos del RMN entre el monómero -en el que las señales están más apantalladas, y que es la especie mayoritaria a bajas concentraciones- y su dímero -en el que la proximidad de los dos ciclopéptidos y la formación de los puentes de hidrógeno desapantalla las señales más características, siendo ésta la especie mayoritaria a elevadas concentraciones o bajas temperaturas-. A temperatura ambiente las señales son más anchas, probablemente debido a que a estas temperaturas estamos próximos a la coalescencia; sin embargo, a 283 K las señales resultan bastante afiladas y bien resueltas (figura 86).

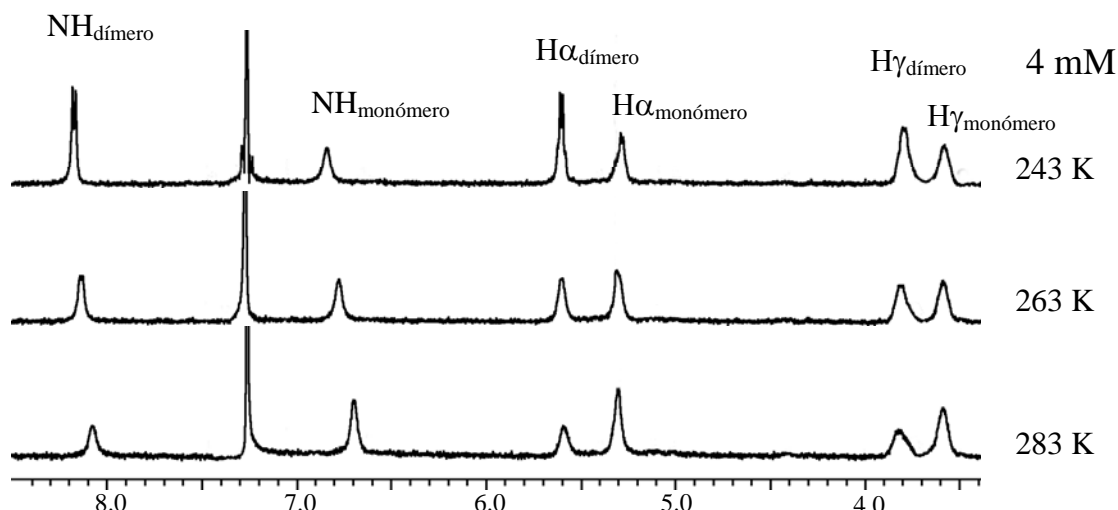


Figura 86:  $^1\text{H}$  RMN a diferentes temperaturas del **OC-1** en  $\text{CDCl}_3$ , donde se aprecia el equilibrio entre la especie monomérica y su dímero.

Protón	Dímero (ppm)	Monómero (ppm)
NH	8,12	6,76
H $\alpha$ Ala	5,59	5,31
H $\gamma$ $\gamma$ -Ach	3,82	3,59

Tabla 4: Desplazamientos de los diversos protones del ciclopéptido **OC-1** para el monómero y el dímero.

En base a los experimentos de RMN calculamos la relación entre dímero y monómero a diferentes concentraciones (30-2 mM) y temperaturas (243-283 K), lo cual nos permitió estimar las  $K_a$  a diferentes temperaturas mediante ajuste no lineal usando la ecuación  $[P]_t = \{\Delta I_{\text{obs}}/K_a\} \cdot \{2\Delta I_{\text{sat}}(1-(\Delta I_{\text{obs}}/\Delta I_{\text{sat}}))^2\}$ , donde P corresponde a la concentración total de péptido de cada experimento,  $K_a$  es la constante de asociación calculada,  $\Delta I_{\text{obs}}$  es la relación de péptido que está como dímero y  $\Delta I_{\text{sat}}$  es todo el péptido que está en forma de dímero, siendo la  $K_{a\ 298} = 60\ \text{M}^{-1}$  ( $K_{a\ 273} = 340\ \text{M}^{-1}$ ).

A partir de las  $K_a$  a diferentes temperaturas y realizando representaciones de  $\log K_a$  frente a  $1/T$  (K) (análisis de Van 't Hoff), calculamos los parámetros termodinámicos para el proceso de dimerización de **OC-1**:  $\Delta H^\circ_{298} = -38,2\ \text{KJ mol}^{-1}$  y  $\Delta S^\circ_{298} = -94,2\ \text{J K}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$ .

La energía libre por cada puente de hidrógeno es  $1,27\ \text{KJ mol}^{-1}$  ( $0,3\ \text{Kcal mol}^{-1}$ ), lo que implica que el enlace es más débil que el del hexámero **HC-1** [ $2,20\ \text{KJ mol}^{-1}$  ( $0,5\ \text{Kcal mol}^{-1}$ )]. Esto puede ser debido a la contribución entrópica, causada por la gran flexibilidad del anillo.

El estudio de IR ( $\text{CHCl}_3$  a 293 K)<sup>125</sup> muestra una banda a  $3315\ \text{cm}^{-1}$  característica de una vibración asociada al N-H que corresponde a la formación de un puente de hidrógeno, lo que nos hacía suponer la existencia de dímeros. El IR también muestra las bandas típicas de una hoja plegada  $\beta$  a  $1672$  y  $1627\ \text{cm}^{-1}$  (amida I) y  $1540\ \text{cm}^{-1}$  (amida II).

125) Krimm, S.; Bandekar, J. "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins" *In Advances in protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J.T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1986; pp 181-364.

En un intento por confirmar la estructura dimérica mediante difracción de rayos X, se sometió el ciclopéptido **OC-1** a las condiciones de cristalización anteriormente descritas (cloroformo/atmósfera de hexano), obteniéndose unos cristales de tamaño y consistencia adecuada para su resolución. Para gran sorpresa nuestra, el péptido no cristalizó formando estructuras diméricas sino que se plegó, en una conformación tipo “silla de montar”, con los cuatro ciclohexanos situados en los cuatro vértices de dicha estructura (figura 87). Las distintas subunidades empaquetan sus caras convexas: dejando una subunidad entre las caras convexas de otras dos subunidades (vista desde los ejes c y a; figura 87 y 88) sin que entre ellas se establezca ningún puente de hidrógeno, sino que la estructura presenta moléculas de H<sub>2</sub>O que forman puente de hidrógeno con los ciclopéptidos. Esta especial disposición del ciclopéptido y su empaquetamiento con las otras subunidades da lugar a canales continuos a lo largo de los tres ejes, generando una estructura poroso tipo zeolita orgánica.<sup>133</sup> Los canales que dan lugar a esta estructura están ocupados por H<sub>2</sub>O (a pesar de no usarse como disolvente). El agua se encuentra ordenada formando clusters, en los que las moléculas crean una red tridimensional de puentes de hidrógeno entre ellas y los C=O y los NH de los ciclopéptidos.

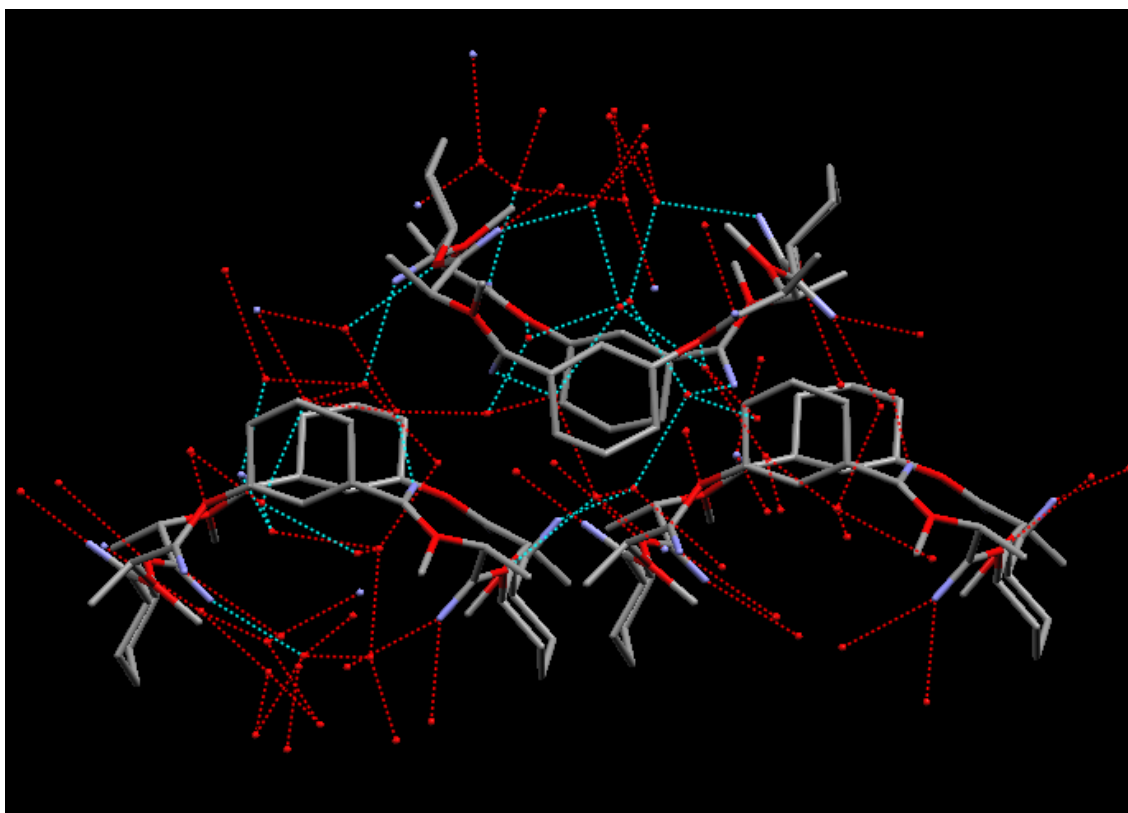


Figura 87: Representación mediante modelo de varillas de tres **OC-1**, obtenidos al cristalizar en CHCl<sub>3</sub>.

A pesar de que el agua ha recibido más atención científica, tanto experimental como teórica y tecnológica, que cualquier otra sustancia, no se entienden completamente las interacciones de una molécula de H<sub>2</sub>O con sus vecinas.<sup>134</sup> Por ello, se requiere una información detallada de pequeños clusters de H<sub>2</sub>O que permita

133) Batten, S. R.; Robson, R. “Interpenetrating Nets: Ordered, Periodic Entanglement” *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1460-1494.

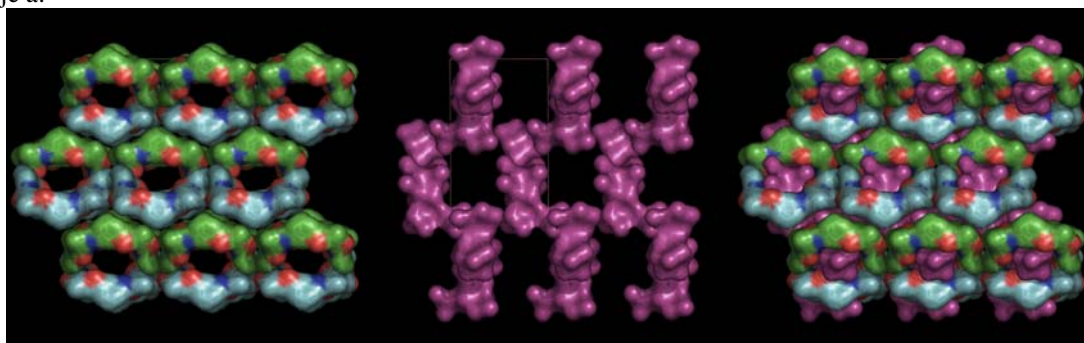
134) Ludwig, R. “Water: From Clusters to the Bulk” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1808-1827.

entender el comportamiento macroscópico del agua. Gracias al trabajo realizado en estos últimos años se ha conseguido caracterizar agrupaciones de 6,<sup>135</sup> 8,<sup>136</sup> 10,<sup>137</sup> etc.<sup>138</sup> moléculas de agua, confinadas en el interior de diversos sustratos, encontrándose configuraciones muy diferentes como pequeños agregados de agua/hielo o polímeros que se encuentran en el paso intermedio entre los clusters y el agua macroscópica. Sin embargo, el crecimiento de grandes clusters de agua y cómo se unen para formar las redes tridimensionales es todavía un gran reto.

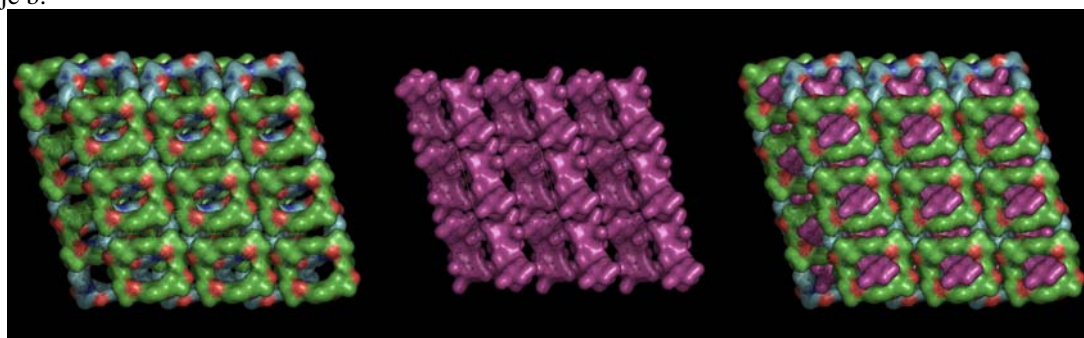
La estructura del agua aquí presente puede aportar un mayor entendimiento de la estructura del agua y del crecimiento de los clusters. Por cada dos moléculas de ciclopéptido existen 33,5 moléculas de agua en 34 posiciones. Estas moléculas forman redes tridimensionales en las que se ha podido determinar la posición de la mayor parte de los oxígenos. Las moléculas de agua crean puentes de hidrógeno entre ellas, y otras los generan también con los ciclopéptidos; además, una de las moléculas actúa de unión entre los canales de agua.<sup>139</sup>

- 
- 135) Moorthy, J. N.; Natarajan, R.; Venugopalan, P. "Characterization of a Planar Cyclic Form of Water Hexamer in an Organic Supramolecular Complex: An Unusual Self-Assembly of Bimesityl-3,3'-Dicarboxylic Acid" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3417-3420.
- 136) a) Atwood, J. L.; Barbour, L. J.; Ness, T. J.; Raston, C. L.; Raston, P. L. "A well-Resolved Ice-like (H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub> Cluster in an Organic Supramolecular Complex" *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7192-7193. b) Blanton, W. B.; Gordon-Wylie, S. W.; Clark, G. R.; Jordan, K. D.; Wood, J. T.; Geiser, U.; Collins, T. J. "Synthesis and Crystallographic Characterization of an Octameric Water Complex, (H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>" *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3551-3552.
- 137) Haug, G. H.; Tiedemann, R. "An intermolecular (H<sub>2</sub>O)<sub>10</sub> cluster in a solid-state supramolecular complex" *Nature* **1998**, *393*, 671-673.
- 138) Para un amplio estudio sobre clusters de agua: a) Infantes, L.; Motherwell, S. "Water clusters in organic molecular crystals" *Cryst Eng Comm*, **2002**, *4*, 454-461. b) Infantes, L.; Chisholm, J.; Motherwell, S. "Extended motifs from water and chemical functional groups in organic molecular crystals" *Cryst Eng Comm*, **2003**, *5*, 480-486.
- 139) a) Ball, P. "H<sub>2</sub>O: A Biography of Water" Weldenfeld and Niclolsar, London, **1999**. b) *Chem. Rev.* **2002**, *102* número especial. c) Zubavicus, Y.; Grunze, M. "New Insights into the Structure of Water with Ultrafast Probes" *Science* **2004**, *304*, 974-976.

Eje a:



Eje b:



Eje c:

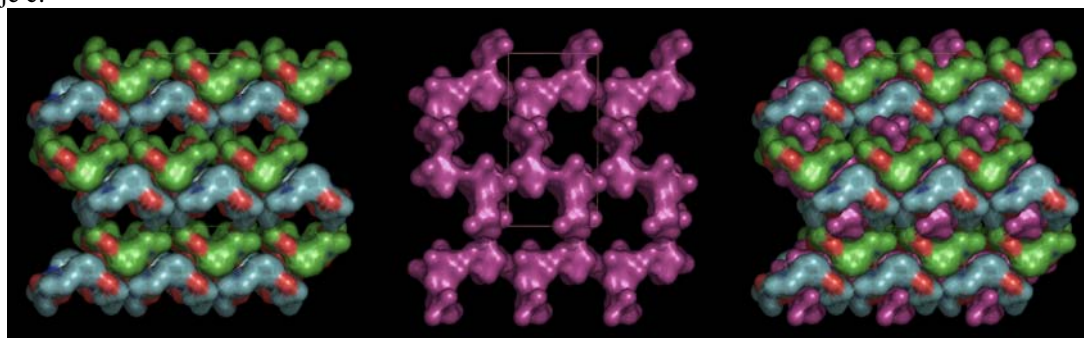


Figura 88: Estructura del **OC-1**, obtenido mediante resolución de rayos X del cristal formado a partir de una disolución de  $\text{CHCl}_3$  y atmósfera de hexano. Vista tridimensional de dicha estructura a lo largo de los ejes a, b y c. La primera columna representa únicamente los ciclopeptidos, en los que se pueden apreciar los canales formados; la segunda columna representa el volumen ocupado por las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  incluidas en los poros; y la tercera muestra el péptido con el agua.

La adición de  $\text{CCl}_4$  a una disolución del **OC-1** en  $\text{CHCl}_3$  dio lugar a un cristal (monoclínico) cuya resolución permitió confirmar la predisposición de estos ciclopeptidos para formar dímeros. En dicho cristal las dos subunidades ciclopeptídicas están unidas entre sí a través de ocho puentes de hidrógeno cuyas distancias  $\text{N}\dots\text{O}$  varían entre 2,84 y 2,93 Å. El ciclopeptido adopta una conformación plana pero con forma ovalada, cuya distancia  $\text{C}\alpha\text{-C}\alpha$  es de 8,06 Å para el eje menor y de 12,05 Å para el mayor. Los grupos  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{NH}$  que intervienen en el puente de hidrógeno no se disponen perpendicularmente al eje del ciclopeptido, sino que aparecen apuntando hacia el interior de la cavidad. Esta distorsión de los puentes de hidrógeno puede explicar la baja constante de asociación encontrada en estos péptidos.

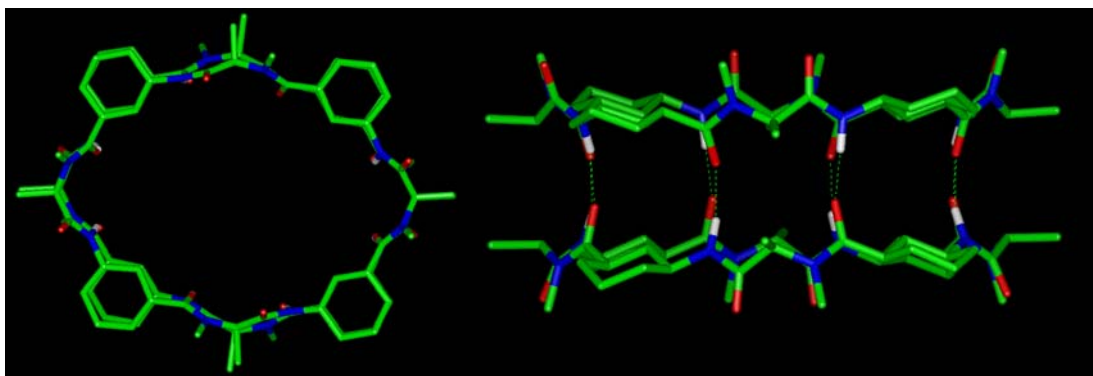


Figura 89: Visión superior y lateral del **OC-1**, obtenido por resolución de los cristales del ciclopeptido cristalizado en  $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$ .

El orificio interior del dímero, con un volumen de van der Waals de aproximadamente  $230 \text{ \AA}^3$ , parece estar ocupado por moléculas de  $\text{CCl}_4$  o  $\text{CHCl}_3$  desordenadas, aunque para el refinado de la estructura se recurrió a la eliminación de la contribución del disolvente, de tal manera que se consiguió un R final de 0,11 (para dicha eliminación se usó la función SQUEEZE del programa PLATON,<sup>140</sup> siendo el R inicial de 0,18). La estructura del cristal está formada por capas de dímeros, uno de los cuales se encuentra sobre cuatro dímeros de la siguiente capa, de tal forma que da lugar a canales hidrofóbicos a lo largo del eje b, en el que se alternan los dominios hidrofóbicos de las cavidades internas del dímero con los orificios generados por los metilos de las Ala y ciclohexilos de las cuatro unidades peptídicas de la siguiente capa, siendo la distancia entre planos equivalentes de  $10,5 \text{ \AA}$ .

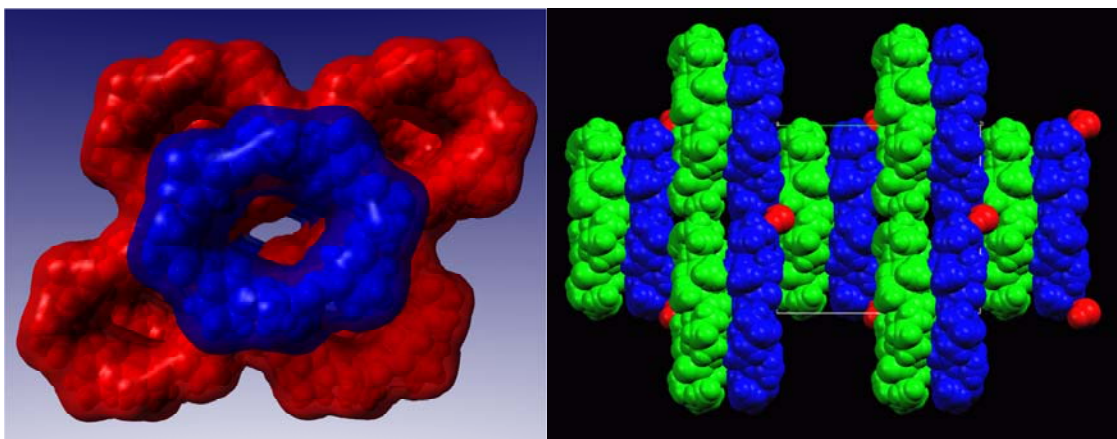


Figura 90: Visión de los dímeros a lo largo del eje b (izquierda) y c (derecha) de los cristales del ciclopeptido **OC-1**.

El *ciclo*[( $L$ -<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach- $D$ -Phe)<sub>4</sub>-] (**OC-2**), preparado a partir del Boc-<sup>Me</sup>N-Ach-OFm, fue el péptido seleccionado para estudiar la interacción  $\alpha$ - $\alpha$  característica de los nanotubos formados por  $\alpha,\gamma$ -ciclooctapéptidos. Una vez ciclado en disolución y purificado por HPLC, el péptido fue caracterizado por espectroscopia de masas, IR y

140) Para la función SQUEEZE del programa PLATON, ver: Spek, A. L. **2001**, PLATON, Universidad de Utrecht, Holanda; van der Sluis, P.; Spek, A. L. *Acta Cryst.* **1990**, *A46*, 194-201. "R es una medida del grado de acuerdo entre los factores de estructura experimentales y los factores de estructura calculados con el modelo resuelto."

RMN de protón y carbono. En el espectrómetro se pudo observar la señal correspondiente al  $[\text{MH}^+]$  (1145,7), pero no la correspondiente al dímero.

En contra de lo observado anteriormente, el **OC-2** muestra en disolventes polares tales como el DMSO un equilibrio lento de interconversión entre diferentes conformeros, cuya interconversión se acelera con el aumento de la temperatura hasta que se colapsan en una única especie a 343 K, lo que implica una barrera energética de  $62,7 \text{ KJ mol}^{-1}$ .<sup>78</sup> Sin embargo, en  $\text{CDCl}_3$  muestra una conformación plana y altamente simétrica donde la constante de acoplamiento ( $J_{\text{NH,H}\alpha} = 8,6 \text{ Hz}$ ) es típica de una amida *trans*.<sup>120</sup> El desplazamiento químico de los NH de la Phe en  $\text{CDCl}_3$  es constante a 8,57 ppm e incluso a concentraciones de 1 mM. Ni la adición de MeOH (35%) ni el calentamiento a 333 K producen desplazamientos químicos significativos de dicha señal, por lo que estimamos que la constante de asociación es superior a  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , es decir, similar a las estimaciones hechas para el hexámero **HC-2**.

El IR (293 K,  $\text{CHCl}_3$ ) muestra las bandas típicas de una hoja plegada  $\beta$  a  $1660$  y  $1623 \text{ cm}^{-1}$  de la amida I, y a  $1525 \text{ cm}^{-1}$  de la amida II, lo que constituye otra evidencia de la existencia de una conformación plana de los ciclopéptidos. Así mismo, la amida A del N-H a  $3312 \text{ cm}^{-1}$  coincide con la de un N-H que participa en un puente de hidrógeno, tal como se ha descrito anteriormente.

Como en otros péptidos, el estudio cristalino también proporcionó una prueba concluyente de la existencia de los dímeros. Hay que destacar que en este caso el cristal se obtuvo por cristalización del ciclopéptido **OC-2** de MeOH (equilibrado en atmósfera de hexano). El cristal muestra los ciclopéptidos **OC-2** formando dos dímeros no equivalentes, uno de ellos plano y otro ligeramente arqueado (figura 91). Los ciclopéptidos constituyen dímeros que presentan una estructura circular y están unidos a través de ocho puentes de hidrógeno con una distancia N...O que varía entre 2,91 y 3,01 Å para el dímero plano y entre 2,86 y 3,12 Å para el plegado. El diámetro de van der Waals que queda entre los H de los C2 del ciclohexano es de 6,6 Å, dejando en su interior una cavidad de  $286 \text{ Å}^3$  que está ocupada por moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  y MeOH (el refinado de la estructura se realizó eliminando la contribución del disolvente, obteniendo un R final de 0,07).<sup>140</sup> Esto indica un cierto carácter hidrofílico de la cavidad de estos dímeros, en contraposición al **OC-1**, lo que sugiere nuevamente que nos encontramos ante cavidades internas de carácter anfipático.

78) Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri M. R. "Cylindrical  $\beta$ -Sheet Peptide Assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8960.

120) Smith, L. J.; Bolin, K. A.; Schawalb, E. H.; MacArthur, M. W.; Thornton, J. M.; Dobson, C. M. "Analysis of main chain torsion angles in proteins: prediction of NMR coupling constants for native and random coil conformations" *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 494-506.

140) Función SQUEEZE del programa PLATON, ver: Spek, A. L. **2001**, PLATON, Universidad de Utrecht, Holanda; van der Sluis, P.; Spek, A. L. *Acta Cryst.* **1990**, *A46*, 194-201.

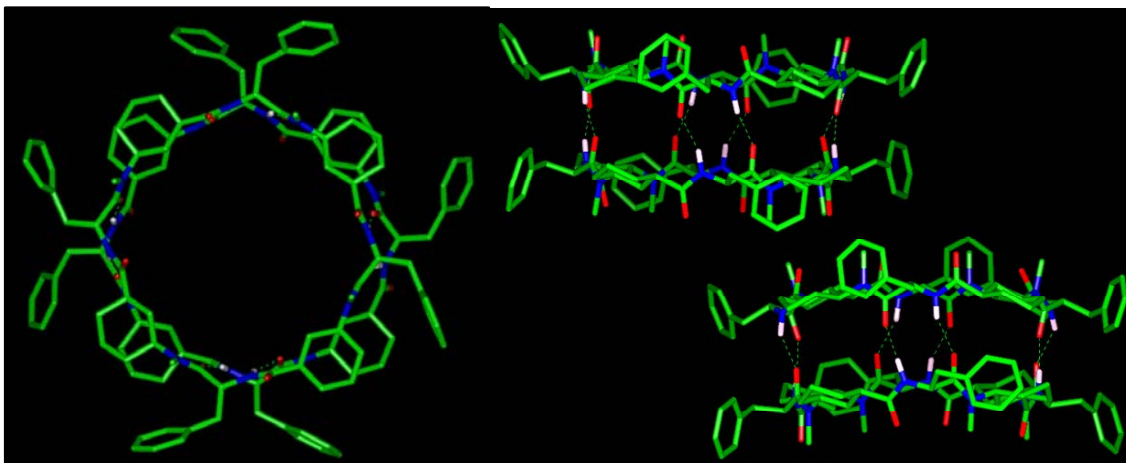


Figura 91: Visión superior y lateral de los dímeros, donde se puede apreciar que uno de ellos está ligeramente arqueado.

Al igual que se observa en el **OC-1**, la estructura cristalina está formada por capas en las que se van alternando los planos de los dímeros: cada dímerno de una capa se sitúa sobre cuatro dímeros de la capa adyacente, siendo la distancia entre capas equivalentes de 12,5 Å (figura 92). La estructura cristalina da lugar a canales en los que se alternan los orificios internos del dímerno con los canales formados por los fenilos y ciclohexanos de las siguientes cuatro subunidades. Este canal resulta bastante sinuoso debido en gran medida a la distorsión presentada por uno de los dímeros, lo que provoca que la unión entre las cavidades de los dímeros superpuestos no sea tan perfecta como en el **OC-1**.

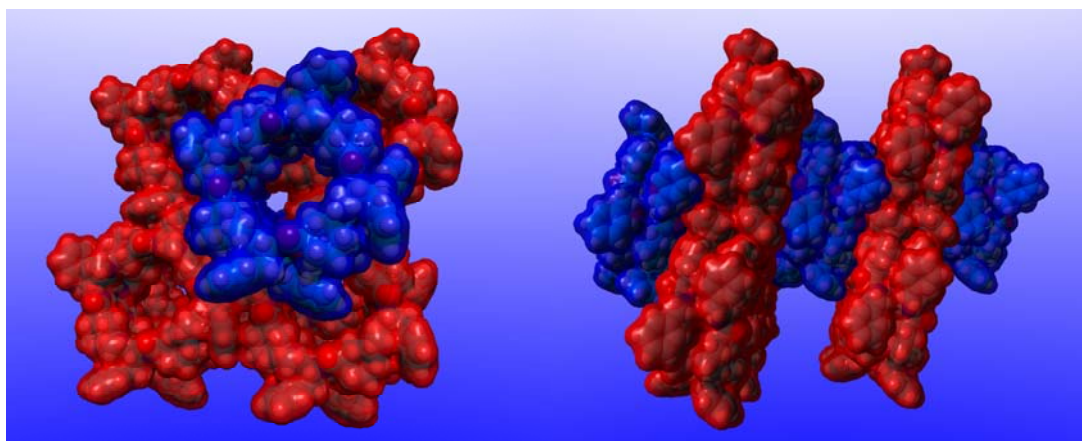


Figura 92: Visión de los dímeros a lo largo del eje c (izquierda) y a (derecha) de los cristales del ciclo péptido **OC-2**.

El péptido *ciclo*{[L-Ser(Bn)-(1*S*,3*R*)-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach]<sub>4</sub>-} (**OC-3**) presentó el mismo comportamiento que el **OC-2** y la desprotección del grupo Bn con Pd/C condujo a la obtención del *ciclo*{[L-Ser(Bn)-(1*S*,3*R*)-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach]<sub>4</sub>-} (**OC-4**) que presentó una baja solubilidad, incluso en CD<sub>3</sub>OH, por lo que no está clara su estructura secundaria.

Con los estudios realizados con los péptidos **OC-1** y **OC-2** concluimos que la formación de nanotubos por autoensamblaje molecular de  $\alpha,\gamma$ -ciclooctapéptidos puede ser viable. Los dos tipos de interacciones son favorables, siendo las interacciones entre los grupos dadores y aceptores de los  $\alpha$ -Aa más fuertes que las que se producen entre

las caras  $\gamma$ . Esta diferencia es similar a la observada entre los hexámeros. De todas formas llegamos a la conclusión de que el diámetro interno de los nanotubos se puede modular variando el número de Aa que constituyen la unidad básica, ya que hemos demostrado que las interacciones entre los ciclopéptidos  $\alpha,\gamma$ - son termodinámicamente favorables tanto para hexámeros como para octámeros.

Por otro lado, nos planteamos realizar un estudio analizando el efecto de las cadenas laterales sobre la constante de asociación de la cara  $\alpha$ , para lo cual preparamos diversos hexámeros y octámeros constituidos por Ser y Phe.

En primer lugar, nos propusimos la síntesis del *ciclo*{[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach-[L-Phe-D-MeN- $\gamma$ -Ach]<sub>2</sub>]-} (**HC-5**) y de su derivado desprotegido *ciclo*[L-Ser-D-MeN- $\gamma$ -Ach-(L-Phe-D-MeN- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>]-] (**HC-6**), ambos carentes de la simetría C<sub>3</sub>. Esta falta de simetría provoca que, al autoensamblarse los péptidos, se originen tres dímeros diastereoméricos que se diferencian en la orientación relativa de sus cadenas laterales. Por ejemplo, en el dímero **HC-6C** (figura 93) los dos grupos hidroxilos quedan orientados hacia el mismo lado de la molécula, mientras que en el dímero **HC-6A** (figura 93) el grupo OH de uno de los ciclopéptidos se encuentra próximo a la Phe1, sin embargo, en el dímero **HC-6B** es la Phe2 la que está próxima al grupo hidroxilo. La presencia del grupo hidroxilo de la serina y la posible formación de puentes de hidrógeno entre las serinas de los dos ciclopéptidos podría desplazar el equilibrio de los dímeros hacia esta forma más estable.

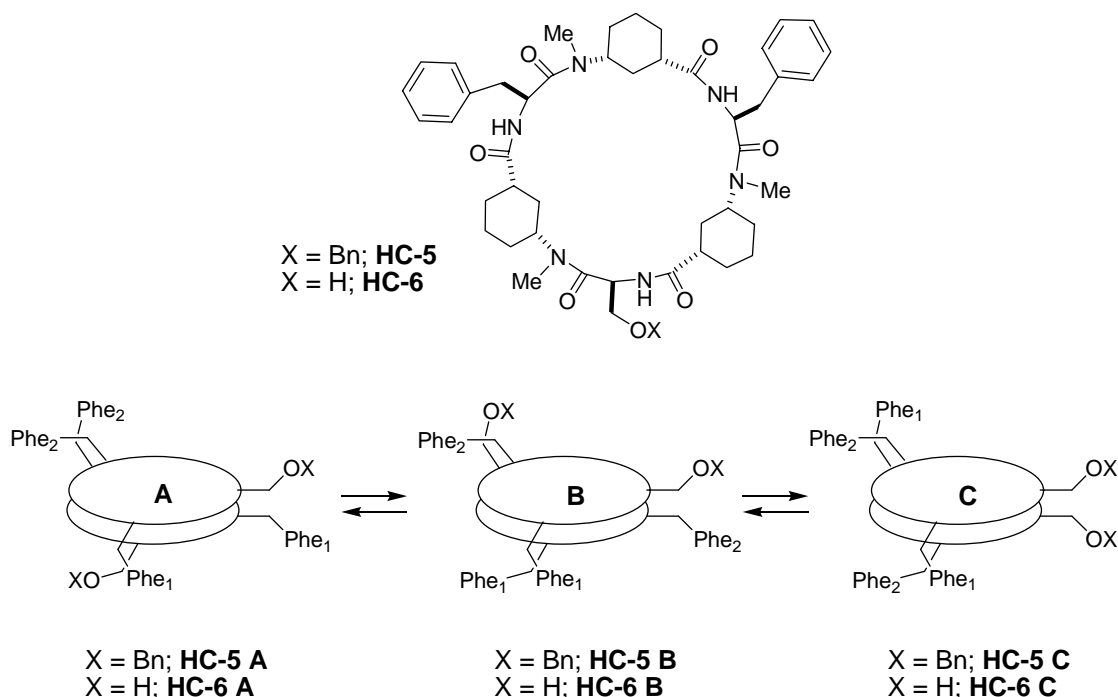


Figura 93: Estructuras de los péptidos **HC-5** y **HC-6**. El autoensamblaje molecular de estos ciclopéptidos da lugar a 3 dímeros que se diferencian en el apareamiento entre los  $\alpha$ -aminoácidos que los componen. En los dímeros **A** los puentes de hidrógeno entre los  $\alpha$ -Aa tienen lugar entre: Phe1-Ser, Phe2-Phe2 y Ser-Phe1; en los dímeros **B** los puentes de hidrógeno son entre: Phe2-Ser, Ser-Phe2 y Phe1-Phe1; y en los dímeros **C** los puentes de hidrógeno son entre: Ser-Ser, Phe1-Phe2 y Phe2-Phe1.

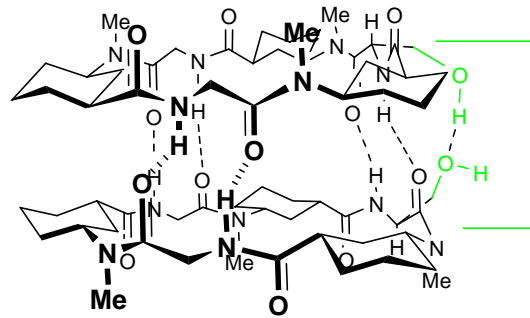


Figura 94: Dímero mayoritario (**HC-6C**) en el que se muestra la posible interacción puente de hidrógeno entre las Ser, aumentando su estabilidad.

El RMN del ciclopéptido protegido *ciclo*[*L*-Ser(Bn)-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-(*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>] (**HC-5**) es muy complejo debido al equilibrio dinámico entre los tres dímeros (**HC-5A**, **HC-5B** y **HC-5C**). No obstante, el desapantallamiento de los NH a un campo entre 8,79-8,24 ppm, así como la  $J_{\text{NH,H}\alpha} = 9,2$  Hz en CDCl<sub>3</sub> que se puede observar para alguno de los protones, parece confirmar la existencia de ciclopéptidos en una conformación plana y a la vez un equilibrio entre diferentes dímeros. Dada la superposición de señales, no fue posible caracterizar los tres posibles dímeros; y mediante experimentos de dilución, observamos que ninguna de las señales características de los dímeros dependía de la concentración, y por tanto, aparentemente la proporción entre dímeros es independiente de la concentración.

El tratamiento de este péptido con Pd/C en atmósfera de H<sub>2</sub> permitió eliminar los grupos bencilos en rendimiento cuantitativo. El péptido resultante, una vez filtrado el paladio y purificado el péptido por HPLC, fue caracterizado como el ciclopéptido *ciclo*[*L*-Ser-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-(*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>] (**HC-6**). El RMN de protón permite ahora obtener una mayor información estructural, ya que las señales de los protones de las amidas aparecen a un rango del campo químico mucho mayor 8,81-7,92 ppm. Esta dispersión posibilita la identificación de un dímero mayoritario y su relación con los otros dos (1,8:1:1) gracias a la realización de diversos experimentos de RMN. Así, la señal que aparece más apantallada (7,92 ppm), la identificamos con el NH de la Ser gracias a los acoplamientos con el H $\alpha$ , que a su vez está acoplado con el H $\beta$  de la Ser.

Cada una de las tres señales (7,92; 8,31 y 8,36 ppm) está relacionada con otras dos señales diferentes entre 8,81-8,59 ppm, probablemente de intercambio, como parece indicar el ROESY (figuras 96).<sup>141</sup> Por ejemplo, la señal a 7,92 ppm correlaciona con protones del multiplete a 8,65 ppm y con la señal que aparece a 8,75 ppm correspondiente al protón amídico de la serina en cada uno de los tres dímeros, debido a que la Ser estaría apareada con otra Ser, con Phe1 y Phe2 en cada uno de los dímeros. Por otro lado, las señales a 8,31 y 8,36 ppm corresponderían a dímeros diferentes al dímero de la señal 7,92 ppm. A partir de estas tres señales podemos conocer la relación entre los tres dímeros, siendo la señal a 7,92 ppm de la Ser (dímero Ser-Ser), mientras

141) La existencia de una señal en el NOESY puede ser debido a una proximidad espacial (NOE) o a un intercambio (ya que nos encontramos en un régimen donde el NOE y el intercambio poseen el mismo signo, típico de macromoléculas). Esto puede diferenciarse al realizarse el ROESY ya que ambos poseen signo distinto (signo contrario a la diagonal es proximidad espacial (NOE), pero si son del mismo signo se debe a un intercambio). Desafortunadamente no siempre se consiguen obtener los dos tipos de experimentos, ya que en macromoléculas la eficaz relajación T2 resta gran sensibilidad al experimento de ROESY. Neuhaus, D.; Williamson, M. P.; "The Nuclear Overhauser Effect: Chemical Applications" VCH Publishers, N.Y. 1983.

que las otras dos corresponden a los dímeros donde se enfrentan las Phe1-Phe1 y Phe2-Phe2 (ya que las dos Phe son diferentes, pues una va antes del extremo N-terminal y la otra después del C-terminal de la Ser) (ver: capítulo 11 y anexo 1). La relación entre los tres dímeros diferentes se puede, por tanto, deducir a partir de la integral de estos protones, correspondiendo a una relación 1,8:1:1 entre los dímeros, y siendo mayoritario aquel dímero en el que las Ser están enfrentadas. Esto lo atribuimos al hecho de que se pueda establecer un puente de hidrógeno entre las Ser, tal como en un principio fue diseñado (figuras 94). Esta relación entre los dímeros supone una diferencia energética de unos  $1,45 \text{ KJ mol}^{-1}$  a 298 K.

Los RMN muestran que la conformación plana es la predominante tanto en disolventes polares como apolares ( $J_{\text{NH,H}\alpha} = 7,8\text{-}8,7 \text{ Hz}$ ) y que el desplazamiento y la relación de los NH son constantes incluso a concentraciones de 0,5 mM en  $\text{CDCl}_3$ , lo que, también en este caso, muestra la existencia de dímeros con elevadas constantes de asociación y que la selección de uno u otro no depende de la concentración.

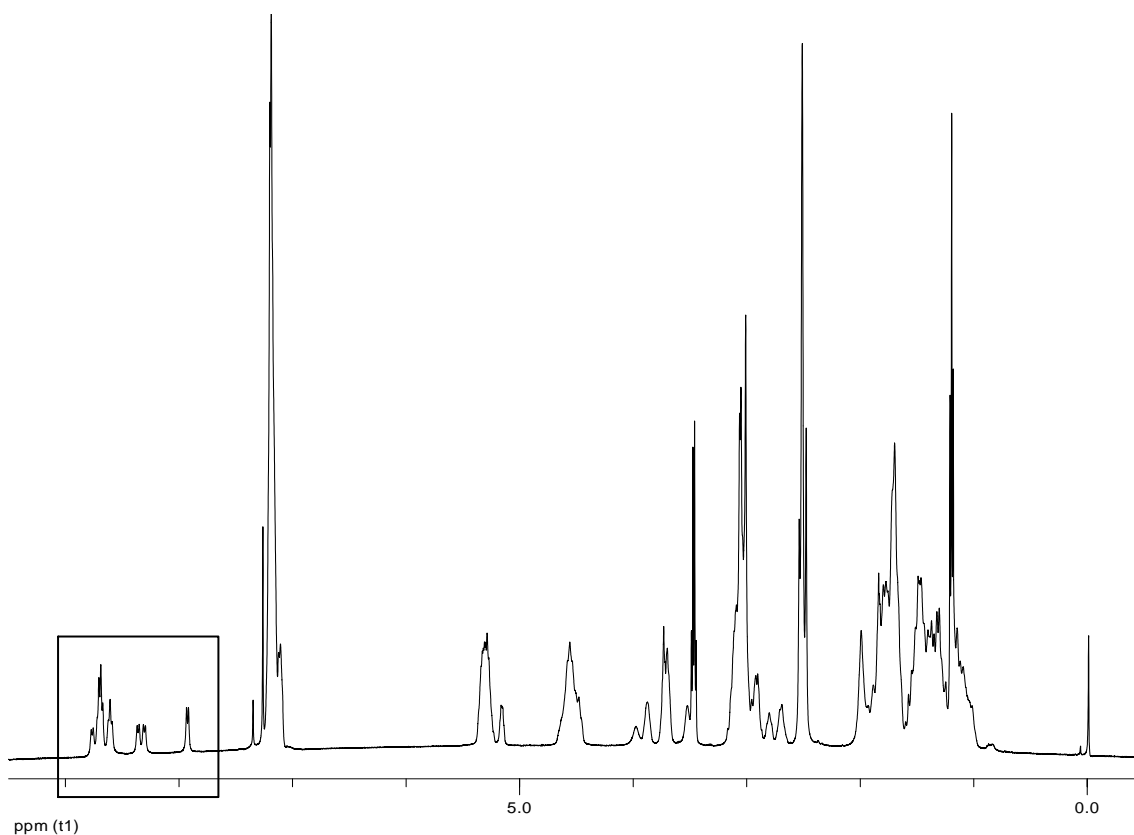


Figura 95:  $^1\text{H}$  RMN del péptido **HC-6**. A la izquierda se ha recuadrado la zona mostrada en el ROESY de la figura 96.

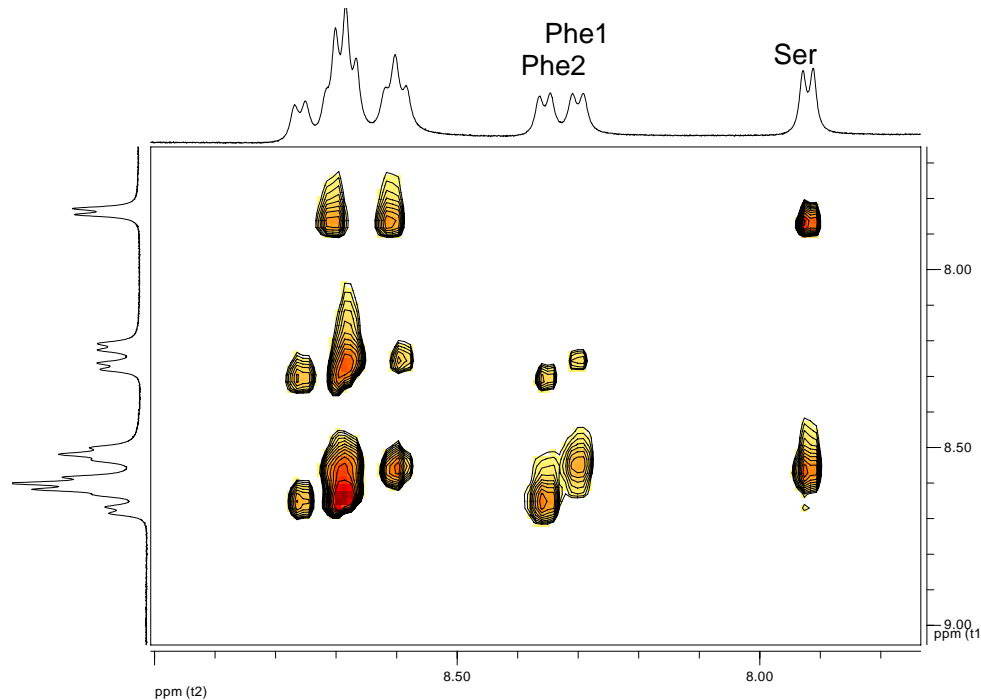


Figura 96: ROESY de la región de los NH-NH (9,0-7,75 ppm).

La realización de diversos experimentos a través de la medición del pico de intercambio mediante NOE con transferencia de saturación (STD) a diferentes tiempos de mezcla, así como de la intensidad de la señal NOE transferida a los otros dímeros, permite estimar el tiempo de interconversión entre dímeros. La pendiente de la recta se calcula según la ecuación ( $y = mx + k$ ), en la que “y” corresponde a la intensidad de la señal transferida, “m” a la pendiente de la recta (velocidad de interconversión) y “x” a los tiempos de mezcla.<sup>142</sup> De la m se obtiene la velocidad de interconversión; en este caso de  $2,4 \text{ s}^{-1}$ .

142) a) Mayer, M.; Meyer, B. “Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Different NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor” *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117. b) Mayer, M.; Meyer, B. “Mapping the Active Site of Angiotension-Converting Enzyme by Transferred NOE Spectroscopy” *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2093-2099. c) Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B. “Detecting Binding Affinity to Immobilized Receptor Proteins in Compound Libraries by HR-MAS STD NMR” *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336-5337. d) Lane, A. N.; Kelly, G.; Ramosa, A.; Frenkielb, T. A. “Determining binding sites in protein-nucleic acid complexes by cross-saturation” *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 127-139.

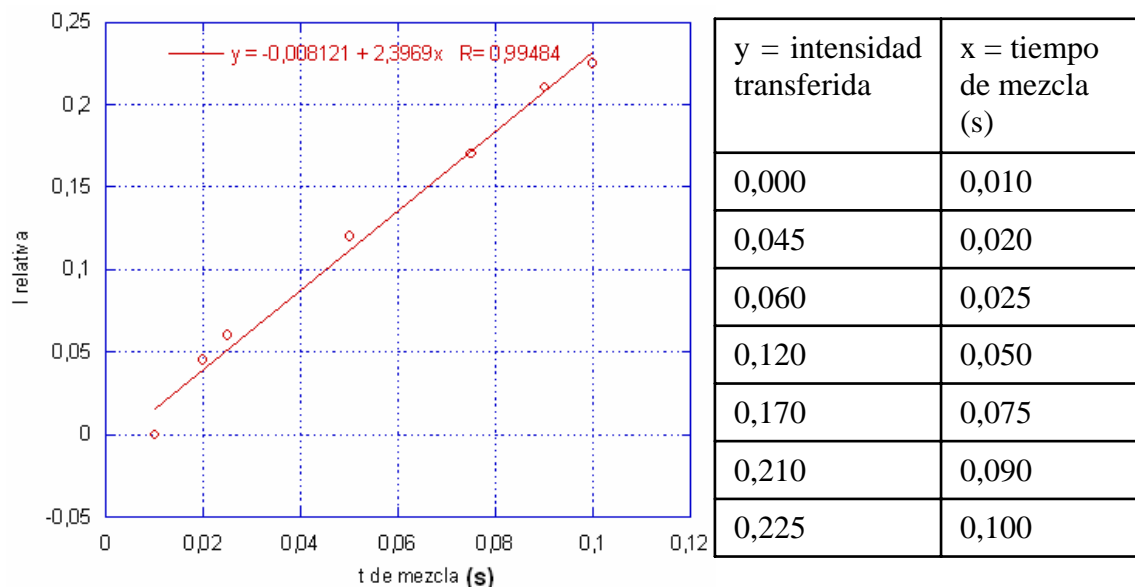


Figura 97: Representación de los datos de la tabla ajustados mediante una recta. Valor de la intensidad de la transferencia de NOE entre dímeros “y” frente a los tiempos de mezcla “x” para calcular la velocidad de interconversión entre dímeros.

La amida A (293 K, CHCl<sub>3</sub>) del **HC-5** a 3303 cm<sup>-1</sup> es típica de la existencia de un enlace puente de hidrógeno, y las bandas a 1664 y 1627 cm<sup>-1</sup> de la amida I y a 1529 cm<sup>-1</sup> de la amida II son típicas de una hoja plegada β. El **HC-6** también muestra bandas similares a 3303, 1661, 1624 y a 1525 cm<sup>-1</sup>.

De igual modo que en los otros péptidos (**HC-2** y **HC-3**), también el **HC-5** (EM-FAB<sup>+</sup>) muestra el pico correspondiente al dímero a 1777,8 [2MH<sup>+</sup>] y al monómero 889,4 [MH<sup>+</sup>]; el **HC-6**, sin embargo, no presenta el pico del dímero.

La cristalización del **HC-6** en CHCl<sub>3</sub> equilibrado con atmósfera de hexano dio lugar a un cristal en el que se aprecia la existencia de un único dímero de los tres posibles rotámeros. El dímero resultante es aquel en el que una Ser se solapa con una Phe y cada OH de la Ser genera un enlace puente de hidrógeno con el carbonilo de un ciclopéptido que forma parte de otro dímero. Los dos ciclopéptidos dan lugar a un dímero asimétrico orientado de forma antiparalela e interaccionando a través de seis puentes de hidrógeno con una distancia N...O que varía entre 2,89-2,99 Å, presentando uno de los anillos del γ-Ach dos conformaciones diferentes dentro de la estructura cristalina. El interior del dímero lo ocupa una molécula de CHCl<sub>3</sub> (figura 98). En el resto de la estructura hay 7,8 moléculas de CHCl<sub>3</sub> desordenadas en múltiples posiciones; tres de ellas están fijas, mientras que la del interior del dímero aparece desordenada en tres posiciones.

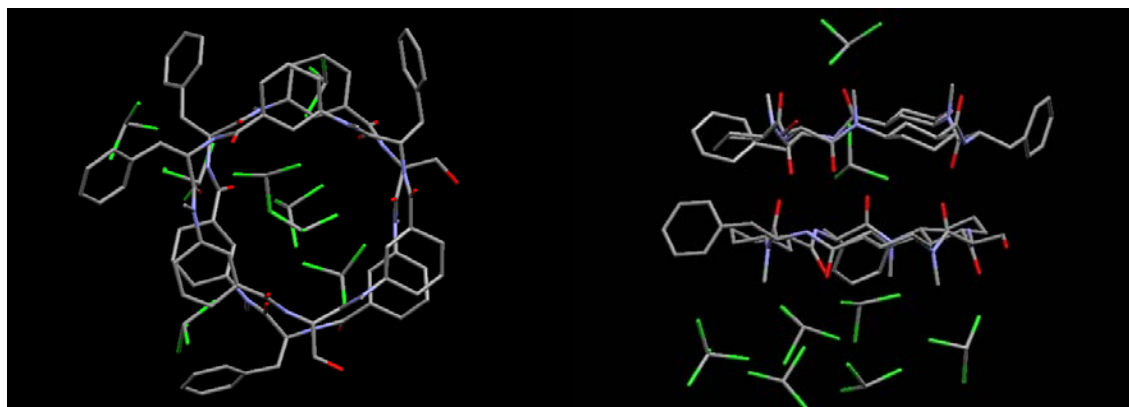


Figura 98: Derecha: Imagen superior del dímero **HC-6**. Inferior: Imagen lateral del dímero, en cuyo interior se aprecia una molécula de  $\text{CHCl}_3$ .

Para el estudio de la influencia de la cadena lateral en los ciclooctapéptidos se pensó en el *ciclo*{[*L*-Ser(Bn)-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach]<sub>2</sub>-} (**OC-5**) que posee simetría  $C_2$ , de tal manera que en este caso pueden darse dos dímeros: uno es el dímero alternado en el que los fenilos de las Phe se enfrentan a las Ser del otro ciclopéptido; mientras que en el segundo las Phe y las Ser de cada dímero estarían enfrentados con sus homólogos (figura 99). Esperábamos que esta segunda conformación, se viese favorecida por la existencia de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de las Ser desprotegidas.

Una vez sintetizado, siguiendo la estrategia ya mencionada (capítulo 5, página 76) se obtuvo el péptido *ciclo*{[*L*-Ser(Bn)-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach]<sub>2</sub>-} (**OC-5**), cuyo espectro de resonancia magnética nuclear de protón confirma la estructura plana y la formación de dos dímeros: donde los protones de la amida resuenan a:  $\text{NH}_{\text{Ser}}$  a 8,67 ppm y  $\text{NH}_{\text{Phe}}$  a 8,59 ppm, junto con otro conjunto de señales en menor intensidad (6:1), cuyos protones amida aparecen a:  $\text{NH}_{\text{Ser}}$  a 8,59 ppm y  $\text{NH}_{\text{Phe}}$  a 8,28 ppm, mostrando claramente una predisposición mayoritaria para uno de los dímeros.

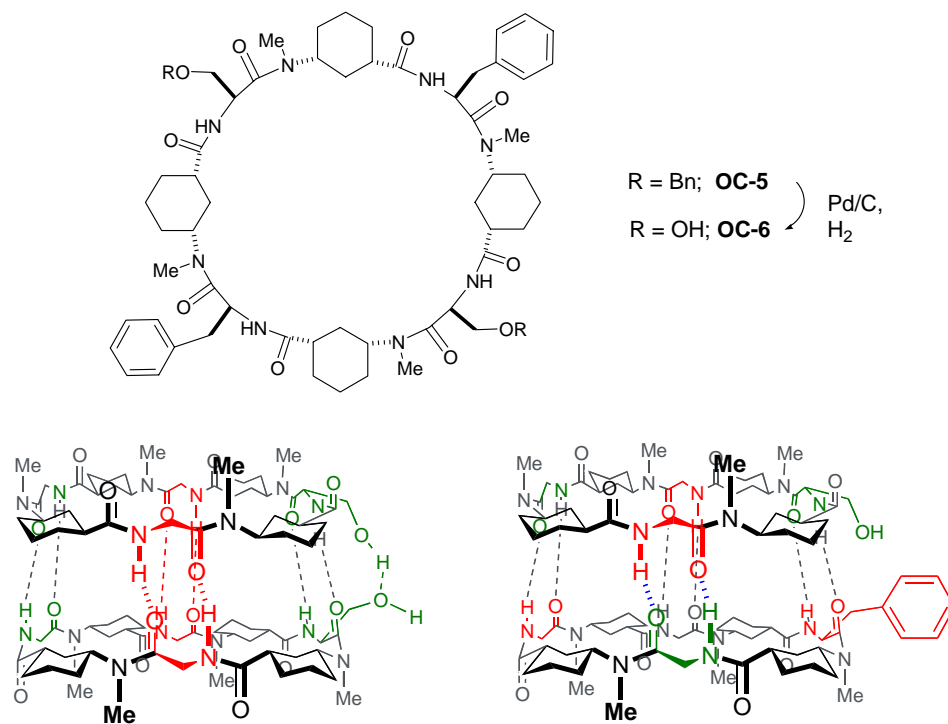


Figura 99: Representación de los dos posibles rotámeros a los que daría lugar el ciclooctapéptido **OC-6**. La interacción puede ser: Phe-Phe y Ser-Ser (Izquierda) o Phe-Ser (Derecha).

La presencia del NOE entre los H $\beta$  de la Ser con H $\beta$  de la Phe sugiere que el dímero mayoritario es aquel en el que se enfrentan las Ser con las Phe (anexo 1).

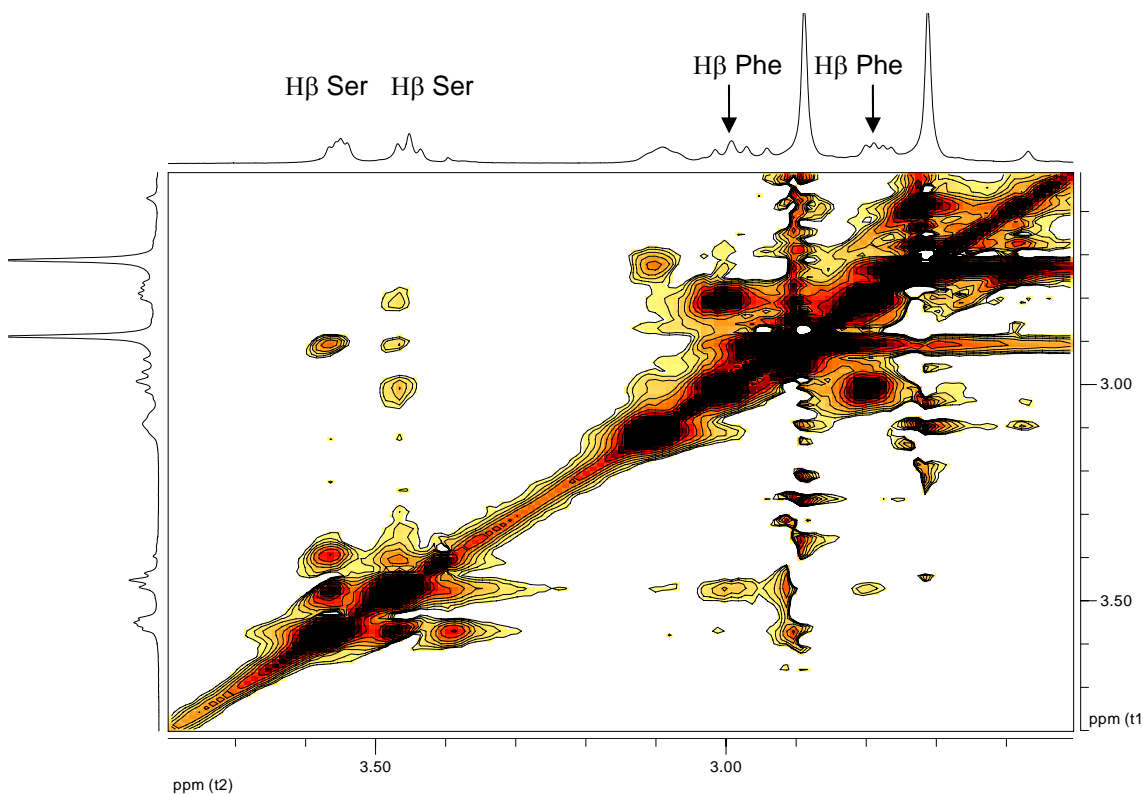


Figura 100: NOESY donde se aprecia el NOE entre los protones  $\beta$  de la Ser y de la Phe del ciclooctapéptido **OC-5**.

El tratamiento con  $H_2$  en presencia de 10% de Pd/C permite eliminar el grupo protector (Bn) de la serina. En el RMN de protón vuelve a aparecer una especie mayoritaria, en la cual el ciclopéptido adopta la conformación plana, formando puentes de hidrógeno con otra subunidad. En este caso también existe una segunda especie en una relación similar a la observada para el péptido bencilado (6:1). Esperábamos que la eliminación del Bn diese lugar a un nuevo equilibrio, en el que ahora la especie dominante fuese el dímero eclipsado, gracias a la formación de puentes de hidrógeno Ser-Ser, pero los espectros bidimensionales indican que la especie mayoritaria vuelve a ser el dímero alternado (Ser-Phe), observándose señales características de esta forma (figura 102). Se aprecian las señales del dímero mayoritario:  $NH_{Ser}$  a 8,96 ppm y  $NH_{Phe}$  a 8,65 ppm, y las del dímero minoritario:  $NH_{Ser}$  a 8,14 ppm y  $NH_{Phe}$  a 8,49 ppm.

Una posible explicación de esta forma mayoritaria podría hallarse en la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la serina y el anillo aromático.<sup>143</sup> Sin embargo, esta interacción no está presente en el **OC-5**, en el que también es la forma mayoritaria. Por otro lado, sí figura en el hexámero **HC-6**, en el que la especie mayoritaria corresponde al dímero en el que Ser y Ser pueden formar puente de hidrógeno. Otra explicación más plausible tiene en cuenta los diferentes impedimentos estéricos entre cadenas laterales de las Phe y las Ser; provocando que la conformación plana más estable esté ligeramente curvada, de tal forma que los dos dímeros resultantes formen puentes de hidrógeno de diferente longitud.

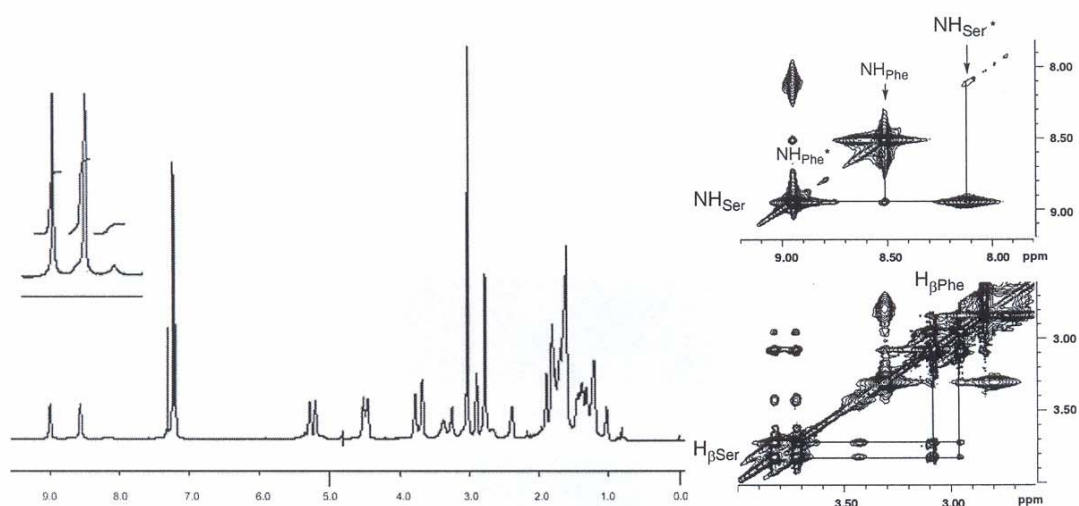


Figura 102: Izquierda:  $^1H$  RMN del ciclopéptido **OC-6**. Derecha superior: NOESY donde se aprecian los picos de los NH del dímero mayoritario (NOE) y del dímero minoritario, así como los picos de interconversión entre ambos dímeros. Derecha inferior: NOESY donde se muestran los picos NOE entre  $H_{\beta Phe}$ - $H_{\beta Ser}$ . (\*: señales del dímero minoritario, Ser-Ser).

De este modo, el dímero eclipsado tendría unos puentes de hidrógeno Phe-Phe ligeramente más cortos que los Ser-Ser. Esta interpretación está de acuerdo con los desapantallamientos químicos observados para los protones amida, en los que los NH de la Ser-Ser constituyen las señales más apantalladas que podrían corresponder a un puente de hidrógeno de mayor longitud (figura 103).

En la segunda forma, los dos ciclopéptidos acomodan mejor sus puentes de hidrógeno, apareciendo ahora mucho más próximos y desapantallados los NH. Como se

143) Un puente de hidrógeno entre OH y anillos aromáticos supone una estabilización de  $12,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$  ( $3 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ): Cheney, B. V.; Schulz, M. W.; Cheney, J.; Richards, W. G. "Hydrogen-Bonded Complexes Involving Benzene as a H Acceptor" *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4195-4198.

puede apreciar en la figura 102, el protón de la amida de la Phe se encuentra ligeramente más apantallada que en el dímero mayoritario, pero esto se compensa con una mayor interacción del NH de la Ser con el carbonilo de la Phe.

El pico de intercambio mediante NOE con transferencia de saturación (STD) permitió estimar la velocidad de interconversión entre dímeros con una velocidad de 1,5-10 ms, ya que a 10 ms se observó un NOE de intensidad del 100%; y el dato de 1,5 ms se estimó a partir de la separación de las señales de ambos dímeros en un campo de 750 MHz (que corresponde a 1,5 ms).

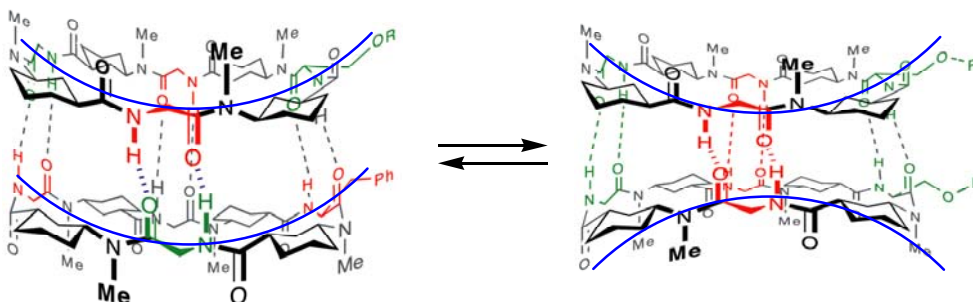


Figura 103: Posible estructura plegada de los péptidos **OC-5** y **OC-6**. Izquierda: Enlaces entre Ser-Ser y Phe-Phe. Derecha: Enlaces entre Ser-Phe.

Los IR ( $\text{CDCl}_3$  a 293 K) confirman la estructura tipo  $\beta$  de los péptidos **OC-5** [1660, 1625 (amida I); 1523  $\text{cm}^{-1}$  (amida II<sub>II</sub>)] y **OC-6** [1660, 1620 (amida I); 1524  $\text{cm}^{-1}$  (amida II<sub>II</sub>)]. La banda del N-H a 3311  $\text{cm}^{-1}$  para el **OC-5** y a 3317  $\text{cm}^{-1}$  para el **OC-6** coinciden con lo esperado para estos péptidos que forman dímeros fuertes.

A pesar de múltiples intentos de cristalización, y del buen aspecto de los cristales preparados a partir de **OC-5** y **OC-6**, éstos no llegaron a difractar, y por tanto no pudimos obtener información en estado sólido.

#### 6.4. (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-CICLOOCTAPÉPTIDOS N-METILADOS

Uno de los objetivos planteados en este trabajo era demostrar una equivalencia entre  $\alpha$ -Aa y  $\gamma$ -Aa (que podríamos considerar como “ $\alpha$ -Aa voluminoso”, en el que el carbono  $\alpha$  sería el anillo cicloalcanico), así como el desarrollo de nuevas estructuras ciclopeptídicas capaces de autoensamblarse en estructuras supramoleculares de forma tubular cuyas cavidades internas tienen diferentes propiedades. Además, nos interesaba el estudio de un nuevo motivo peptídico, en el que sustituyésemos los dos  $\alpha$ -Aa de los *D,L*-octapéptidos por dos  $\gamma$ -Aa. Este tipo de estructuras, a las que hemos denominado 3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ , presenta como principales novedades: un tamaño de anillo de 28 eslabones intermedio entre los *D,L*-ciclooctapéptidos (24 eslabones) y los  $\alpha,\gamma$ -ciclooctapéptidos (32 eslabones) y una cavidad interior que proyecta únicamente dos metilos de los grupos ciclohexilos, lo que da lugar a una simetría C2 frente a la simetría C3 del hexámero y a la C4 del octámero.

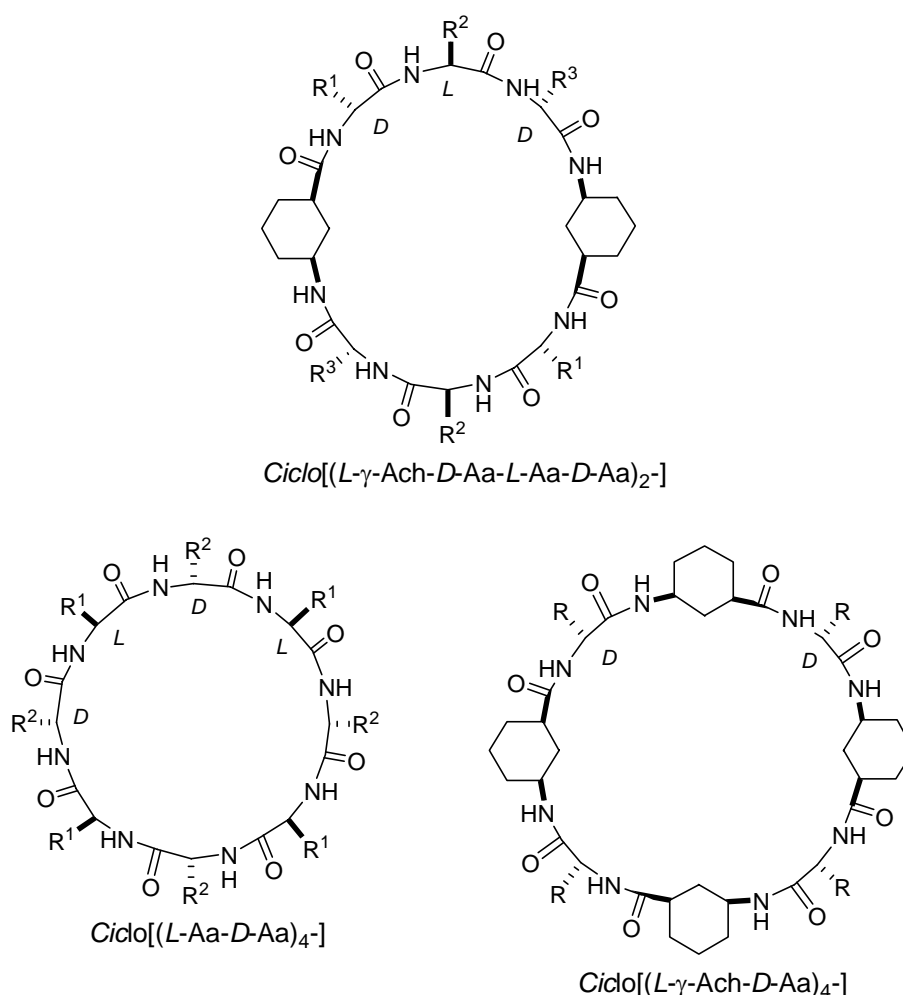


Figura 104: Diseño de diferentes ciclopeptidos formados por  $\alpha$ -Aa y por  $\alpha,\gamma$ -Aa.

Como se puede observar en la figura 105, la formación de nanotubos a partir de estos ciclopeptidos se basaría en la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amida del esqueleto peptídico. Al igual que ocurría con los  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos, los 3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ -ciclopeptidos presentan dos caras no equivalentes. En una de ellas los grupos

dadadores y aceptores de puentes de hidrógeno son de los *D*- $\alpha$ -Aa (cara  $\alpha$ - $\alpha$ ), mientras que en la otra se encuentran el *L*- $\gamma$ -Ach y el *L*- $\alpha$ -Aa (cara  $\alpha$ - $\gamma$ ) o sus enantiómeros.

Debido a ello, la formación de nanotubos se basa en interacciones entre láminas  $\beta$  antiparalelas en las que interaccionan la cara  $\alpha$  de uno de los ciclopéptidos con la cara  $\alpha$  del siguiente; o las caras  $\alpha$ - $\gamma$  entre sí. Por tanto, siguiendo con la metodología de los estudios en disolución de ciclopéptidos predispuestos para formar únicamente estructuras diméricas, se hace necesario preparar dos péptidos diferentes. Nos propusimos, por tanto, la preparación de ciclopéptidos en los que bloquearíamos la cara  $\alpha$ - $\gamma$  con el *ciclo*[(*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe)<sub>2</sub>-] (**OC<sub>3,1-1</sub>**), mientras que la interacción entre la cara  $\alpha$ - $\alpha$  las estudiaríamos con el péptido *ciclo*[(*L*-Ser(Bn)-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-] (**OC<sub>3,1-2</sub>**) (figura 106).

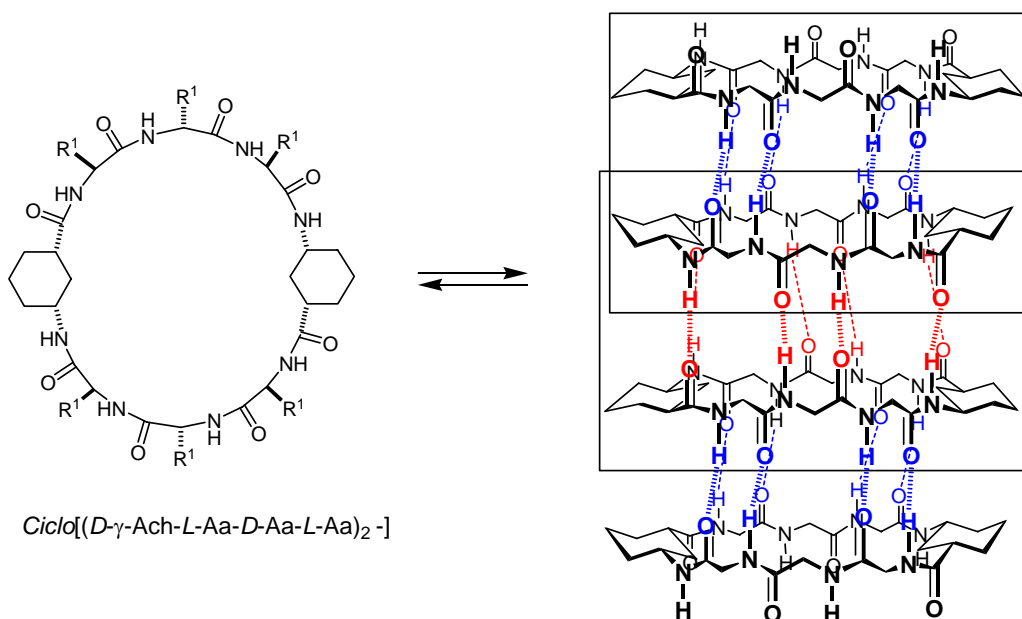


Figura 105: Modelo de (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-nanotubos peptídicos formados por autoensamblaje molecular de ciclopéptidos del tipo *ciclo*[(*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Aa-*D*-Aa-*L*-Aa)<sub>2</sub>-]. En el nanotubo se pueden observar dos tipos de puentes de hidrógeno diferentes, las interacciones antiparalelas entre las caras ( $\alpha$ - $\alpha$ ) y las ( $\alpha$ - $\gamma$ ). Para mayor claridad, las cadenas laterales han sido suprimidas.

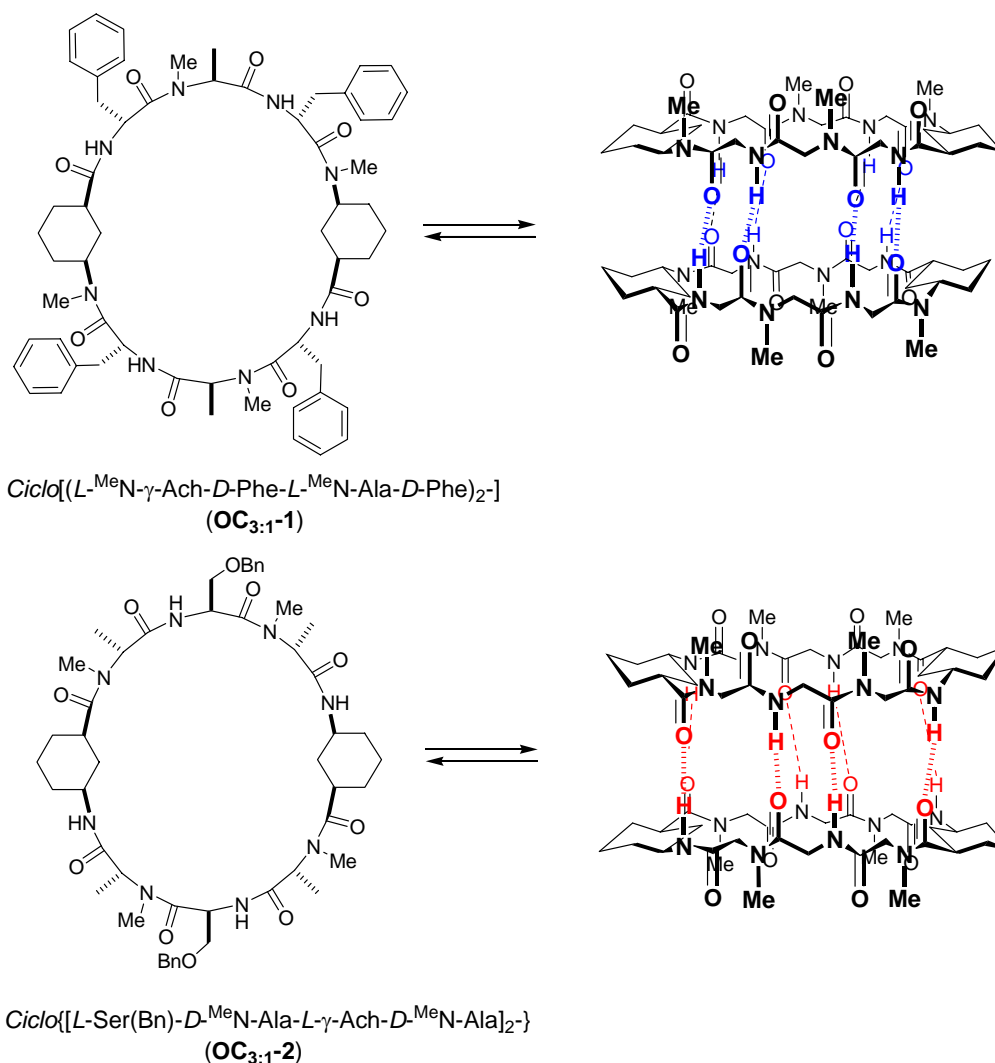


Figura 106: Superior: El *ciclo*[(*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe)<sub>2</sub>-] (**OC<sub>3:1</sub>-1**) es el modelo seleccionado para el estudio de la hoja plegada  $\beta$  antiparalela entre las caras ( $\alpha$ - $\alpha$ ). Inferior: El *ciclo*{[*L*-Ser(Bn)-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>-} (**OC<sub>3:1</sub>-2**) es el modelo seleccionado para el estudio de la hoja plegada  $\beta$  antiparalela entre las caras ( $\alpha$ - $\gamma$ ).

Para la preparación de estos ciclopéptidos se varió un poco la estrategia anteriormente descrita para los ciclopéptidos. En la figura 107 se ilustra la metodología seguida para la preparación de parte de estos ciclopéptidos. En este caso se seleccionó una estrategia más lineal preparándose de forma correlativa dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos. Estos tetrapéptidos se transformaron posteriormente en los octapéptidos que tras la desprotección se ciclaron para dar lugar a los correspondientes (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-ciclooctapéptidos.

El ciclopéptido **OC<sub>3:1</sub>-1** se preparó a partir del dipéptido Boc-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe-OFm que posteriormente, tras eliminar el grupo Boc con TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se acopló con Boc-*D*-Phe-OH usando HATU como agente de acoplamiento. El tripéptido resultante se trató nuevamente con TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y a continuación se acopló el Boc-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-OH, obteniéndose el tetrapéptido Boc-*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe-OFm. Dicho tetrapéptido se transformó en el correspondiente octapéptido por desprotección del grupo Boc de la mitad del tetrapéptido, mientras que la otra mitad se trató con piperidina, procediendo al acoplamiento de ambos péptidos. Su ciclación se realizó en

disolución, de forma similar a las ya descritas; y posteriormente se purificó, lo cual permitió obtener el péptido deseado, tal como se muestra en el esquema general de la figura 107.

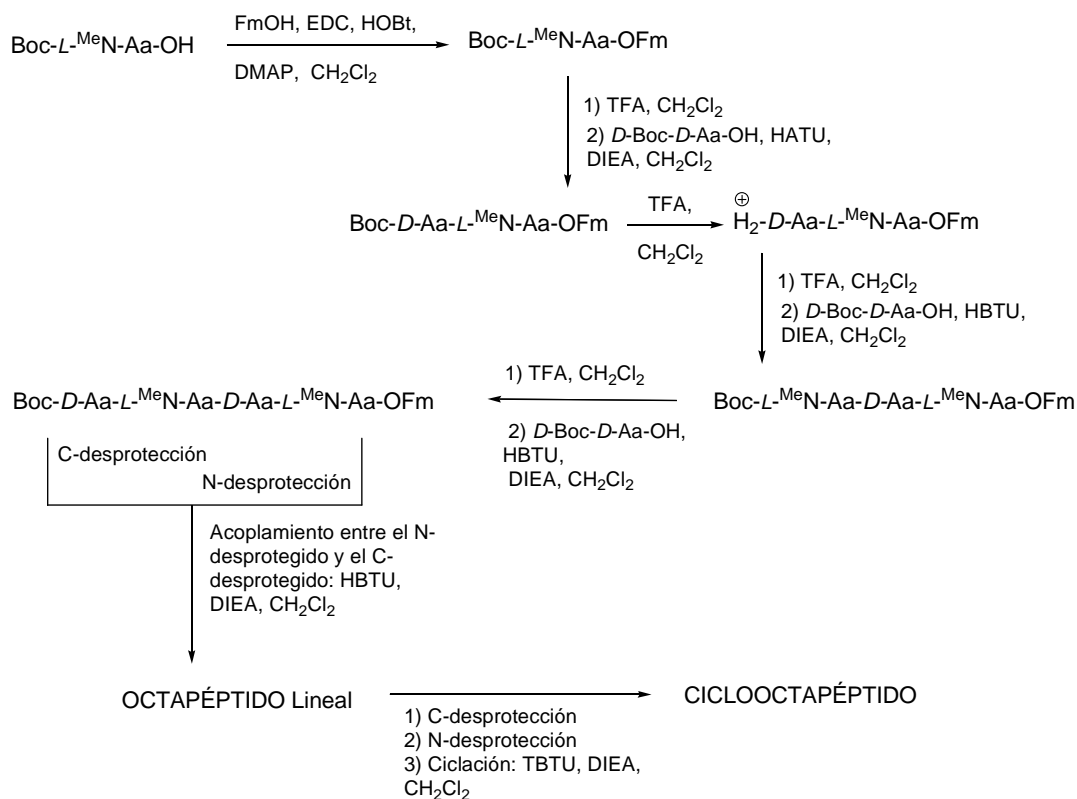


Figura 107: Esquema seguido para la síntesis de los **OC<sub>3:1-1</sub>**, **OC<sub>3:1-2</sub>**, etc.

El **OC<sub>3:1-1</sub>**, una vez purificado, se caracterizó por MS:  $[\text{MH}]^+$  1037,6 umas. El espectro de RMN en disolventes polares presenta una gran complejidad, algo que atribuimos a un equilibrio conformacional entre varias especies que equilibran lentamente en la escala de tiempos del RMN. Sin embargo, en disolventes apolares, el espectro se simplifica, mostrando señales debidas al equilibrio entre dos especies (monómero/dímero). Las señales del dímero las asignamos a las más desapantalladas que a su vez son las que aumentan con la concentración: los NH de la Phe1 del dímero están a  $\delta$  8,80 ppm, los NH de la Phe2 a 8,31 ppm y las señales de los NH de los monómeros a  $\delta$  7,49 y 7,10 ppm.<sup>144</sup>

144) El protón a 7,10 ppm se identificó al realizar los experimentos bidimensionales (anexo 1).

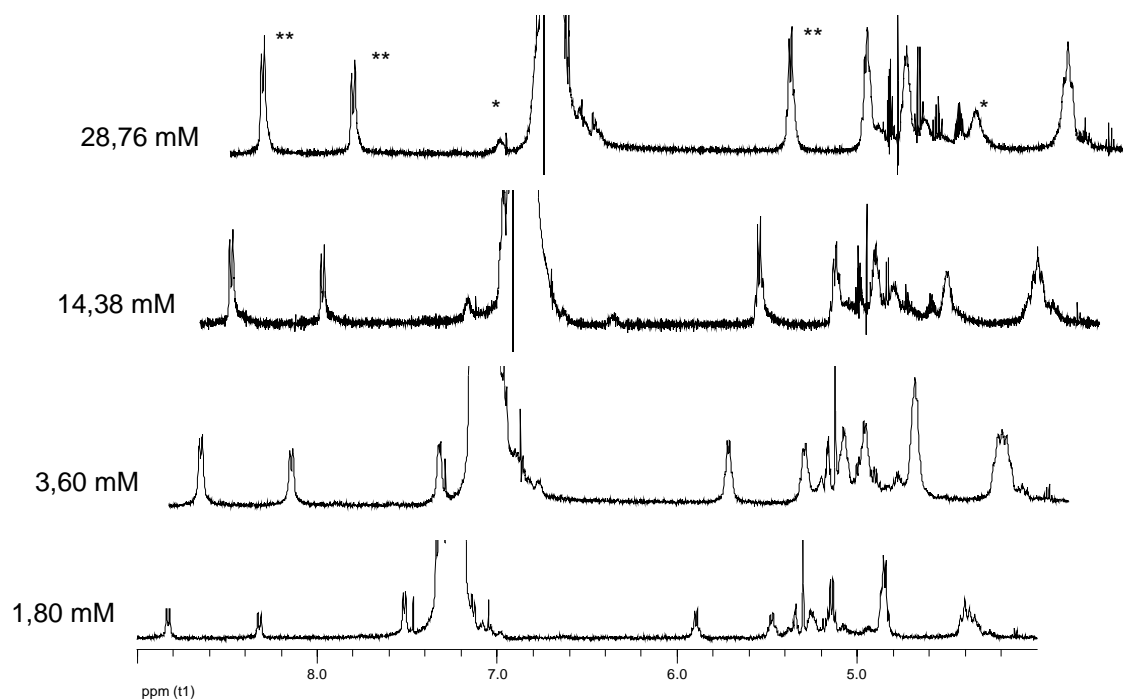


Figura 108:  $^1\text{H}$  RMN a diferentes concentraciones del *ciclo*[(*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe)<sub>2</sub>]- (**OC<sub>3,1</sub>-1**), donde se aprecian algunas señales características del dímero (\*\*) y monómero (\*). Se observan claramente las  $^1\text{H}$  del dímero (\*\*): NH (8,80 y 8,31 ppm) y H $\alpha$  Ala (5,89 ppm); y los  $^1\text{H}$  del monómero (\*): NH (7,49 ppm) y H $\alpha$  Phe (4,86 ppm), todos ellos a 293 K.

Los experimentos bidimensionales no permitieron confirmar la estructura dimérica, debido a que aquellos protones más significativos no presentaban un NOE característico por estar orientados hacia el exterior del dímero o demasiado alejados. La única señal que podría ser característica, era el NOE entre los protones de las amidas NH Phe1 y NH Phe2, que sin embargo no se observó (capítulo 11 y anexo 1).

Los experimentos de RMN a diferentes concentraciones y temperaturas (313-233 K) nos permitieron estimar una  $K_a$  293 = 92 M<sup>-1</sup> y una contribución:  $\Delta H^\circ_{298} = -47,8$  KJ mol<sup>-1</sup> y  $\Delta S^\circ_{298} = -126,1$  J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. Es por tanto un proceso dirigido entálpicamente (gracias a la formación de ocho puentes de hidrógeno) pero entrópicamente desfavorable.

El IR (en CHCl<sub>3</sub> a 293 K) muestra las bandas características de una lámina  $\beta$  plegada a 1669, 1627 (amida I) y 1525 cm<sup>-1</sup> (amida II), valores comparables a los de los ciclopéptidos estudiados previamente. De igual manera, se observa una banda a 3310 cm<sup>-1</sup> (amida A) característica de la existencia de un enlace puente de hidrógeno.

La confirmación definitiva de la estructura dimérica la obtuvimos mediante rayos X. La cristalización del ciclopéptido **OC<sub>3,1</sub>-1** se realizó en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> equilibrado en una atmósfera de hexano, obteniéndose un cristal incoloro (ortorrómbico) después de 24 h. Los ciclopéptidos forman un dímero a través de ocho puentes de hidrógeno y presentan una estructura ovalada. La distancia N...O entre las subunidades unidas mediante puentes de hidrógeno varía entre 2,9 y 3,0 Å. Los dímeros están alineados formando canales a lo largo del eje a, de tal forma que la estructura cristalina está constituida por capas en las que se van alternando los planos de dímeros: cada dímero de una capa se sitúa sobre cuatro dímeros de la capa adyacente, siendo la distancia entre capas equivalentes de 13,8 Å. La distancia C $\alpha$ -C $\alpha$  entre las alaninas es de 12,2 Å (y la distancia media entre las Phe es de 12 Å), mientras que el espacio de van der Waals entre los H de los C2 es de sólo 4,0 Å, quedando por tanto una cavidad de van der

Waals en el interior de  $108 \text{ \AA}^3$  (figura 109). También existen dos medias moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  entre cada dos dímeros, no apreciándose más disolvente (anexo 2).

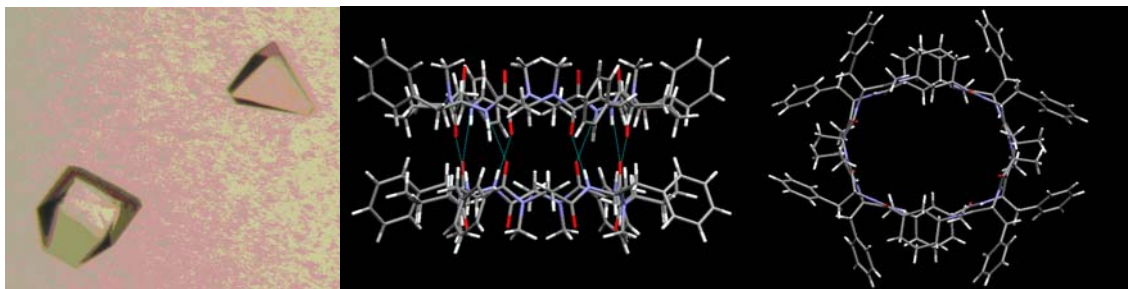


Figura 109: Izquierda: Fotografía de los cristales del péptido  $\text{OC}_{3:1}\text{-1}$ . Centro y derecha: Vista lateral y superior del ciclopéptido  $\text{OC}_{3:1}\text{-1}$  obtenido por resolución de los rayos X, en el que se puede apreciar la estructura dimérica mediante la formación de ocho puentes de hidrógeno.

Por tanto, estos datos confirman la capacidad de las interacciones entre las caras ( $\alpha, \alpha$ ) para formar nanotubos peptídicos. La constante de asociación tiene un valor similar al determinado para los  $D,L$ -ciclopéptidos y por tanto no se descarta la formación de nanotubos.<sup>74,78</sup>

El ciclopéptido *ciclo*{[ $L$ -Ser(Bn)- $D$ -<sup>Me</sup>N-Ala- $L$ - $\gamma$ -Ach- $D$ -<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>-} ( $\text{OC}_{3:1}\text{-2}$ ) se preparó siguiendo la estrategia indicada en el capítulo 5, página 76, partiendo de los dipéptidos Boc- $L$ -Ser(Bn)- $D$ -<sup>Me</sup>N-Ala-OFm y Boc- $L$ - $\gamma$ -Ach- $D$ -<sup>Me</sup>N-Ala-OFm. Tras la síntesis y purificación por HPLC, se obtuvo suficiente cantidad para su caracterización por MS ( $[\text{MH}]^+$  945,5 umas) y RMN, confirmando la estructura del ciclopéptido. El RMN de protón en  $\text{CD}_3\text{OH}$  muestra la presencia de un equilibrio conformacional lento entre diversas especies, mientras que en cloroformo su espectro se simplifica en gran medida. En contra de lo observado en anteriores ciclopéptidos, a temperatura ambiente no es posible apreciar las señales de la amida en cloroformo; pero al enfriar a temperaturas inferiores a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  se aprecian dichas señales a 8,62 ppm (NH Ser) y a 8,15 ppm (NH  $\gamma$ -Ach), que son desplazamientos característicos de protones de las amidas que participan en la formación de puentes de hidrógeno.

Estas señales eran bastante anchas y la presencia de los grupos bencilo dificultaba la caracterización de los monómeros. Desgraciadamente tampoco disponíamos de suficiente cantidad de producto para mejorar su caracterización o eliminar los grupos bencilo, por lo que decidimos emprender una nueva síntesis con un diseño más acorde con nuestros objetivos, sustituyendo la Ser por una Leu, para eliminar protones de la cadena lateral y del bencilo que pudiesen interferir en la caracterización monómero/dímero, siendo el péptido sintetizado: *ciclo*[( $L$ -Leu- $D$ -<sup>Me</sup>N-Ala- $L$ - $\gamma$ -Ach- $D$ -<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-] ( $\text{OC}_{3:1}\text{-3}$ ), siguiendo la estrategia empleada para la síntesis del  $\text{OC}_{3:1}\text{-1}$  (página 118).

74) Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K; Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. "The Structural and Thermodynamic Basis for the Formation of Self-Assembled Peptide Nanotubes" *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.

78) Clark, T. D.; Buriak, J. M., Kobayashi, K, Isler, M. P., McRee, D. E., and Ghadiri M. R. "Cylindrical  $\beta$ -Sheet Peptide Assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8960.

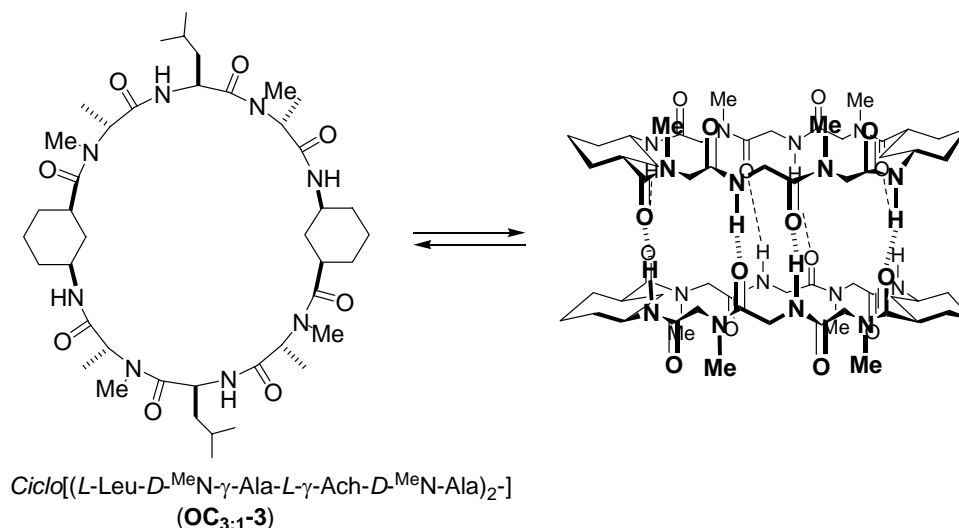


Figura 110: Péptido **OC<sub>3:1</sub>-3** y modelo del dímero al que daría lugar mediante autoensamblaje molecular.

Dicho péptido en metanol también presentaba un espectro complejo debido a los equilibrios conformacionales lentos. En cloroformo volvimos a obtener el mismo resultado anteriormente descrito, siendo necesario enfriar la muestra por debajo de 0 °C para que se pudiese observar claramente las señales de dos especies (monómero/dímero) cuya proporción dependía de la concentración (20-5 mM) y la temperatura (213-253 K) (figura 111). Estos experimentos a distintas temperaturas y concentraciones no aportaron una gran información al no ser reproducibles debido a la poca solubilidad del péptido a bajas temperaturas; de todas formas, estimamos una  $K_{a\ 243} \sim 10\text{ M}^{-1}$ . Se trata de un equilibrio desplazado hacia la formación del monómero, en la que la mayor flexibilidad del péptido debe tener una gran contribución en el coste energético para la formación de dímeros.

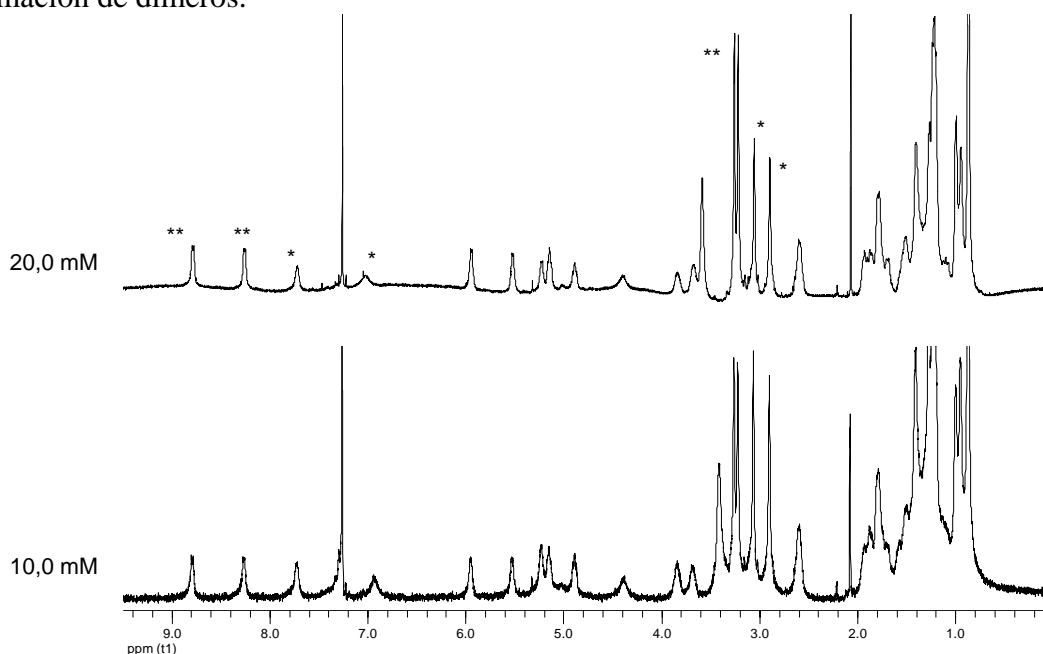
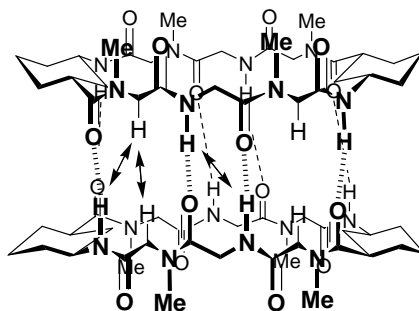


Figura 111:  $^1\text{H}$  RMN del **OC<sub>3:1</sub>-3** a dos concentraciones diferentes, donde se aprecia la variación entre monómero y dímero. Al disminuir la concentración, la proporción de monómero aumenta. Esto se aprecia en los  $^1\text{H}$  de los NH (6,5-9,0 ppm) y de los Me de los N-Metilados (2,5-3,5 ppm). Dímero (\*\*), monómero (\*). A 223 K (-50 °C).

Los experimentos bidimensionales realizados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  nos permiten asignar las señales características de los protones de los distintos Aa que componen el ciclopéptido. Además, la presencia de un NOE entre el protón  $\text{H}\alpha$  de la  $^{\text{Me}}\text{N-Ala1}$  y el  $\text{H}\alpha$  de la  $^{\text{Me}}\text{N-Ala3}$  (orientados hacia el interior del dímero) sólo puede deberse a la presencia del dímero; así mismo, el NOE entre los NH del Ach con los  $\text{H}\alpha$  de la Ala confirma la estructura dimérica (figuras 112 y 113, anexo 1).

En este caso, la interconversión entre dímero y monómero parece tener una baja constante de asociación y los NH son muy anchos, debido a que se trata de un equilibrio con una velocidad de intercambio similar a la escala de tiempo del RMN.



$\text{Ciclo}[(L-\gamma\text{-Ach-}^{\text{Me}}\text{N-D-Aa-L-Aa-}^{\text{Me}}\text{N-D-Aa})_2\text{-}]$

Figura 112: Vista del dímero del  $\text{OC}_{3:1-3}$  (o  $\text{OC}_{3:1-2}$ ), formado por una lámina  $\beta$  antiparalela. Las flechas señalan los NOEs más característicos de dicha especie. (Sólo se han indicado los posibles NOEs intermoleculares).

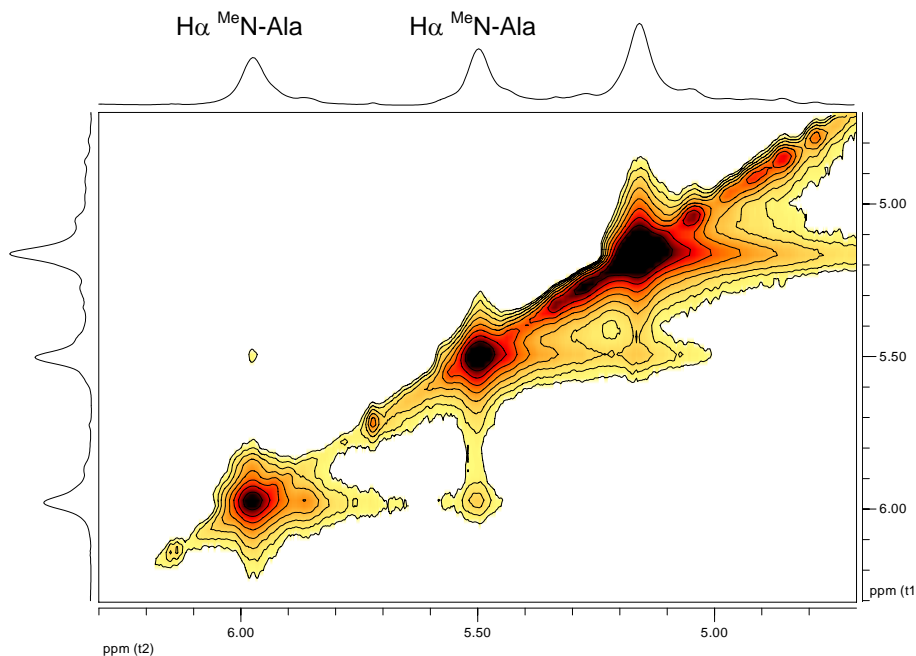


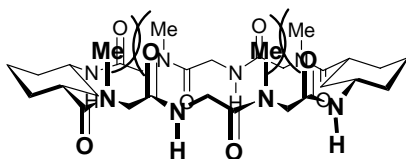
Figura 113: NOE entre los  $\text{H}\alpha$  de las dos  $^{\text{Me}}\text{N-Ala}$ , lo que constituye una evidencia de la formación del dímero como una lámina  $\beta$  antiparalela. (capítulo 11 y anexo 1).

Otra evidencia de que estos dos péptidos ( $\text{OC}_{3:1-2}$  y  $\text{OC}_{3:1-3}$ ) adoptan una conformación plana necesaria para la dimerización, la proporciona el IR ( $\text{CHCl}_3$  a  $293\text{ K}$ ), mostrando las bandas características de una hoja plegada  $\beta$ :  $1673, 1631\text{ cm}^{-1}$

(amida I) y 1528  $\text{cm}^{-1}$  (amida II) para **OC<sub>3:1-2</sub>** y 1673, 1632 (amida I) y 1542  $\text{cm}^{-1}$  (amida II) para **OC<sub>3:1-3</sub>**. Otra importante información que aporta el IR es el dato de la amida A: 3412 y 3313  $\text{cm}^{-1}$  para **OC<sub>3:1-2</sub>**, las cuales podrían asignarse a la existencia de monómero y dímero; el **OC<sub>3:1-3</sub>** también presenta bandas similares a 3413 y 3310  $\text{cm}^{-1}$  (amida A). Todo esto parece confirmar que los péptidos adoptan una conformación plana y que entre ellos se establecen enlaces puentes de hidrógeno.

Desafortunadamente, en este caso no se obtuvieron cristales de tamaño adecuado para obtener datos sobre la formación de dímeros en estado sólido.

Las constantes de asociación en ambos tipos de interacciones son bastante débiles, sobre todo si las comparamos con la de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos formados por seis puentes de hidrógeno entre  $\alpha$ -Aa (**HC-2**), donde el dímero es mucho más fuerte que en estos modelos (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ ) en los que, a pesar de formar ocho puentes de hidrógeno entre los Aa, poseen valores de las  $K_a$  al menos tres órdenes de magnitud más débiles. (Bien es verdad que estos valores son similares a los obtenidos por Ghadiri con sus octapéptidos). Parte de esta baja constante de asociación puede ser debida a los impedimentos estéricos entre los grupos N-metilo y el carbonilo (figura 114), que deben modificar la conformación plana o al menos distorsionarla lo suficiente como para dificultar su autoensamblaje. Es por ello que nos planteamos, a continuación, tratar de estudiar el efecto que pueden tener los grupos metilo en el proceso de autoensamblaje.



Ciclo[(L- $\gamma$ -Ach-<sup>Me</sup>N-D-Aa-L-Aa-<sup>Me</sup>N-D-Aa)<sub>2</sub> -]

Figura 114: Representación plana de un (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-ciclopéptido, en el que se indican las repulsiones estéricas entre los Me de los N-Metil aminoácidos y el grupo carbonilo.

Cuando estudiamos las interacciones entre las caras ( $\alpha$ - $\alpha$ ) nos encontramos con que los modelos diméricos presentan dos tipos de metilos bien diferentes: uno sobre el  $\gamma$ -Ach y el otro sobre el  $\alpha$ -Aa.

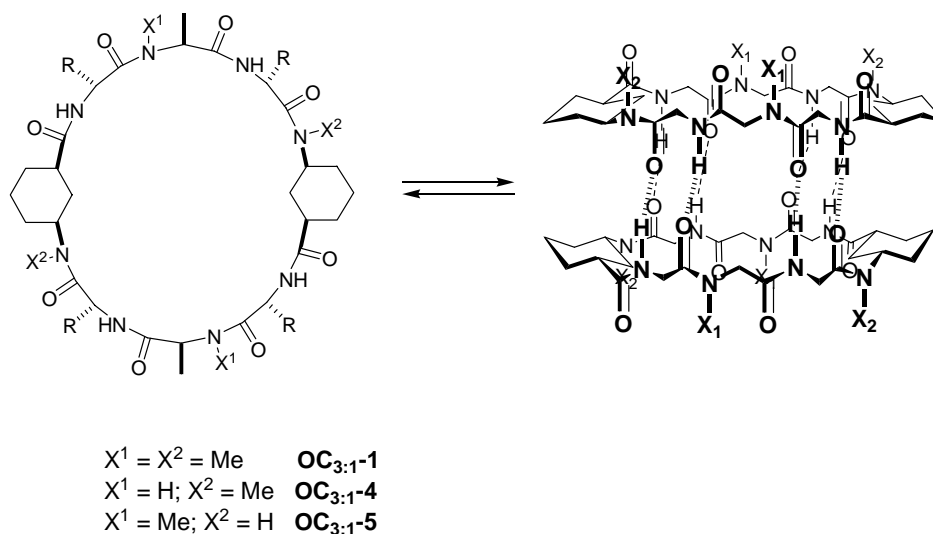


Figura 115: Estructura de los péptidos: *ciclo*[(L-<sup>Me</sup>N-γ-Ach-D-Phe-L-<sup>Me</sup>N-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>] (**OC<sub>3:1-1</sub>**) ( $X^1 = X^2 = \text{Me}$ ), *ciclo*{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-γ-Ach-L-Phe-D-Ala-]<sub>2</sub>} (**OC<sub>3:1-4</sub>**) ( $X^1 = \text{H}; X^2 = \text{Me}$ ) y *ciclo*[(L-γ-Ach-D-Phe-L-<sup>Me</sup>N-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>] (**OC<sub>3:1-5</sub>**) ( $X^1 = \text{Me}; X^2 = \text{H}$ ) y modelo de los dímeros correspondientes dependiendo de las características de los grupos X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup>.

Nos propusimos entonces sintetizar los péptidos *ciclo*{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-γ-Ach-L-Phe-D-Ala-]<sub>2</sub>} (**OC<sub>3:1-4</sub>**) y *ciclo*[(L-γ-Ach-D-Phe-L-<sup>Me</sup>N-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>] (**OC<sub>3:1-5</sub>**) y estudiar sus propiedades.

El primero de ellos, el ciclopéptido con <sup>Me</sup>N-γ-Ach (*ciclo*{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-γ-Ach-L-Phe-D-Ala-]<sub>2</sub>} (**OC<sub>3:1-4</sub>**), se sintetizó siguiendo la estrategia anteriormente indicada para el **OC<sub>3:1-1</sub>** (figura 107, página 118) y se caracterizó por RMN e IR, confirmándose la estructura ciclopeptídica. El RMN de protón presenta una estructura sencilla con dos protones de amida fuertemente desapantallados: 8,66 ppm NH Phe ( $J = 7,6$  Hz) y 8,58 ppm NH Ser ( $J = 9,1$  Hz), que confirman su participación en la formación de puentes de hidrógeno. Un tercer protón aparece a 6,49 ppm NH Ala ( $J = 6,5$  Hz), que pertenece al grupo amida situado en el exterior del dímero y que no participa en la formación de puentes de hidrógeno. Lo más interesante es observar que estas señales no son dependientes de la concentración entre 1 y 30 mM, lo que confirma que la presencia de dos metilos en la D-Ala juega un papel determinante en la formación de la hoja plegada β, según indicamos anteriormente, debido a las repulsiones estéricas entre los carbonilos y el metilo.

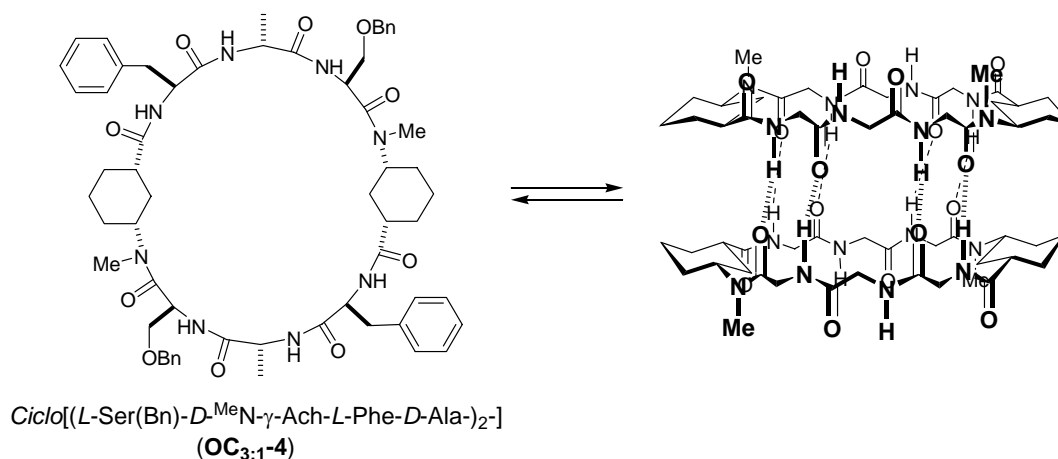


Figura 116: Péptido *ciclo*[[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-Ala-]<sub>2</sub>] (**OC<sub>3:1-4</sub>**) y modelo del dímero correspondiente.

Sin embargo, al igual que ocurría con el derivado tetrametilado, los experimentos bidimensionales de RMN no permiten ver claramente la estructura dimérica, dado que la proximidad entre los NH (de la Ser y la Phe) no permite conformar un NOE -señal que confirmaría el dímero- entre ellos de forma rotunda (anexo 1).

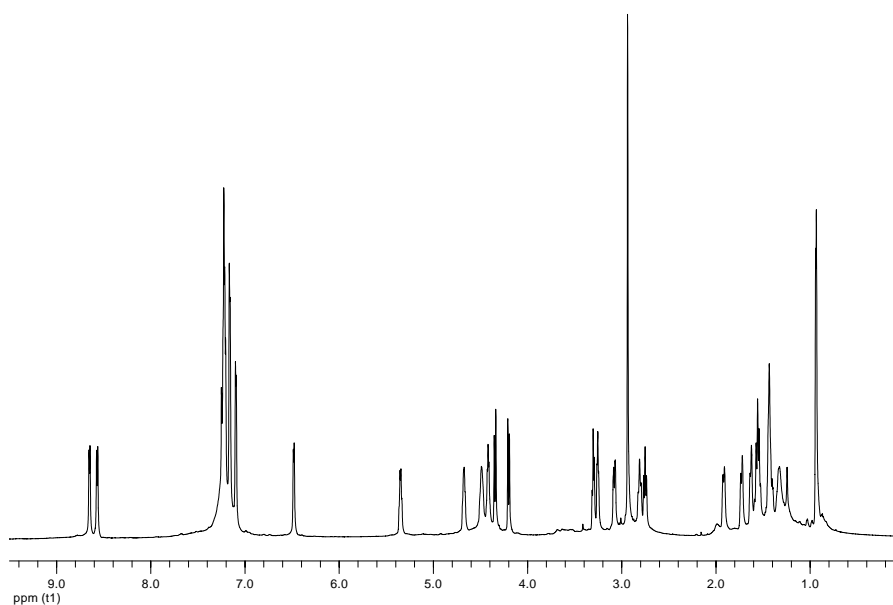


Figura 117: <sup>1</sup>H RMN del ciclopéptido **OC<sub>3:1-4</sub>**. Los NH que participan en la formación del dímero, están a un campo de 8,66 ppm (NH Phe) y 8,58 ppm (NH Ser) respectivamente, y el NH que no participan en la formación del dímero resuena a 6,49 ppm (NH Ala).

El IR (CHCl<sub>3</sub> a 293 K) confirma la estructura de hoja plegada  $\beta$  antiparalela, mostrando las bandas a: 1681 y 1642 cm<sup>-1</sup> de la amida I y a 1515 cm<sup>-1</sup> de la amida II. La banda del N-H a 3296 cm<sup>-1</sup> coincide con la de un N-H que participa en un puente de hidrógeno, mientras que la banda a 3403 cm<sup>-1</sup> es característica del N-H de la Ala (6,49 ppm, figura 117) que queda hacia el exterior del dímero y no participa en la formación de los enlaces puentes de hidrógeno.

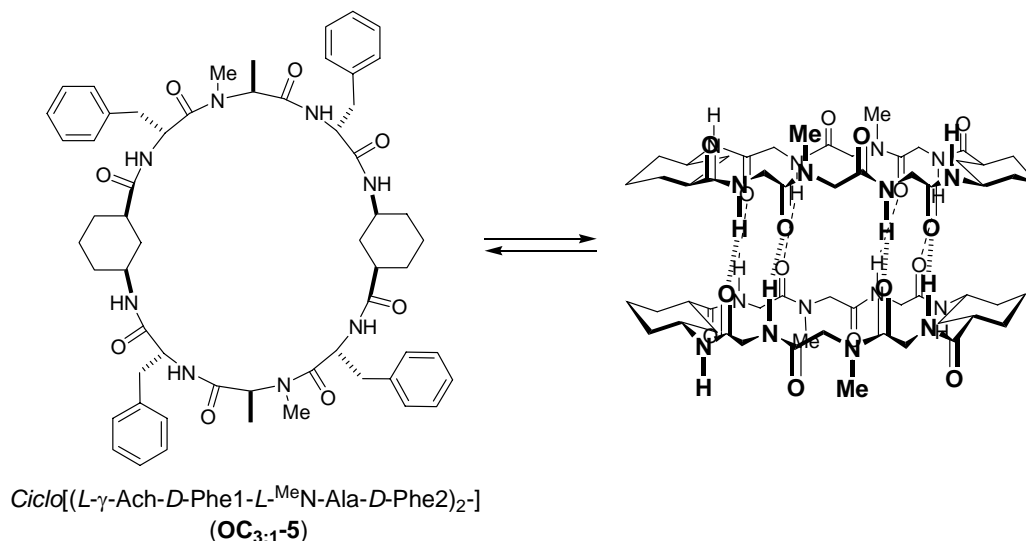


Figura 118: Péptido *ciclo*[(*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe1-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe2)<sub>2</sub>-] (OC<sub>3:1-5</sub>) y modelo del dímero correspondiente.

El siguiente péptido sintetizado, el *ciclo*[(*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe)<sub>2</sub>-] (OC<sub>3:1-5</sub>), se diseñó con el objetivo de identificar los efectos que tenía el metilo en la  $\alpha$ -Ala en el proceso de autoensamblaje.

El espectro de protón de este péptido, para nuestra sorpresa, es bastante complejo. Lo más llamativo es observar que los tres grupos amida aparecen ligeramente desapantallados y a similar campo magnético (como señales anchas), no apreciándose diferencia entre los protones situados hacia el exterior de la cavidad y los dispuestos hacia el interior. Estos datos nos hicieron pensar en una estructura totalmente diferente a la del dímero cíclico en conformación plana; por ejemplo, en algún tipo de plegamiento en el que los tres grupos participan en la formación de puentes de hidrógeno. No obstante, en el RMN parece observarse únicamente tres NH diferentes, tal como lo confirma la correlación <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H (anexo 1). Estas señales se desplazan a campo bajo al disminuir la polaridad del medio (adición de CCl<sub>4</sub>). Aparentemente, dichas señales no presentan un desplazamiento significativo con la concentración, aunque uno de los H $\alpha$  se ve afectado, circunstancia que nos lleva a suponer que podrían existir procesos de asociación. Sin embargo los experimentos bidimensionales en disolventes CDCl<sub>3</sub> no aportan ningún dato que nos permita, de momento, determinar la estructura de este péptido en disolventes apolares.

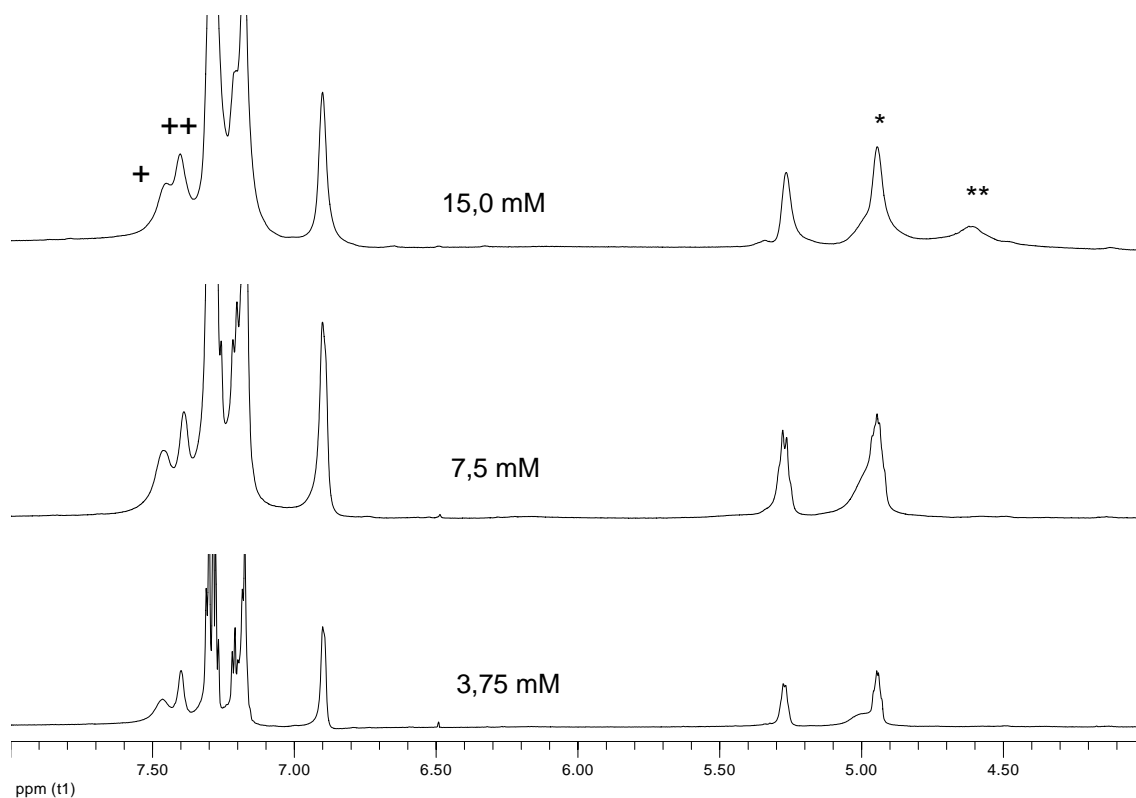


Figura 119:  $^1\text{H}$  RMN del ciclo péptido  $\text{OC}_{3:1-5}$  en  $\text{CDCl}_3/\text{CCl}_4$  1/1 a  $25^\circ\text{C}$ . En estas condiciones los NH (+) aparecen todos juntos entre 7,50-7,40 ppm. Sin embargo, se aprecia un cambio en el  $\text{H}\alpha$  de las Phe (\*\*), la señal se va desplazando a campo bajo al ir disminuyendo la concentración.

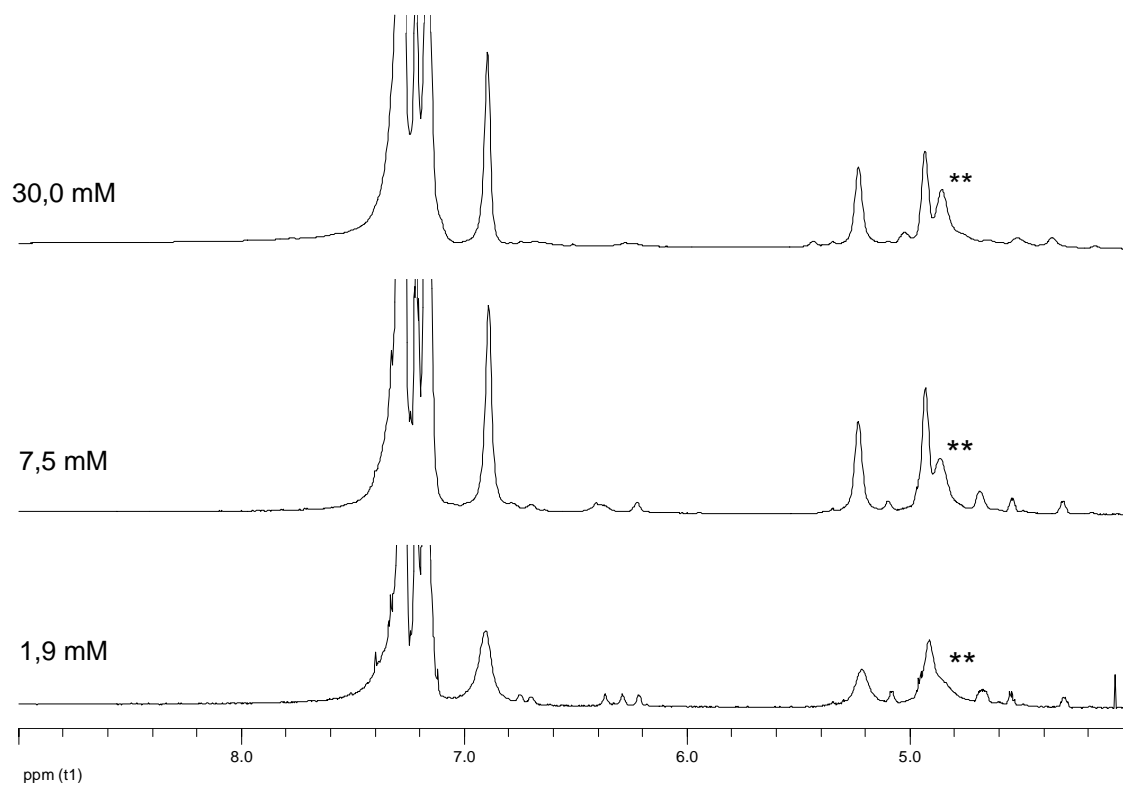


Figura 120:  $^1\text{H}$  RMN del ciclo octapéptido  $\text{OC}_{3:1-5}$  en  $\text{CDCl}_3$  a  $25^\circ\text{C}$  a diferentes concentraciones. Se puede observar como el  $\text{H}\alpha$  Phe (\*\*\*) se desplaza a campo bajo al disminuir la concentración.

Resulta de interés mencionar que la adición de metanol produce un cambio drástico en la estructura del ciclopéptido, en el que las señales de los NH se desapantallan; incluso una de ellas (NH Phe2) aparece a un campo próximo a 9 ppm (figura 121). El segundo protón que se aprecia es el del  $\gamma$ -Ach, lo que indica que éstos forman un puente de hidrógeno bastante fuerte, mientras que el tercer protón de la amida permanece oculto entre las señales aromáticas. Como se puede observar, todos los protones del ciclohexilo aparecen claramente definidos, lo cual nos lleva a deducir que están en un ambiente muy diferente. Esta estructura es independiente de la concentración y se produce tanto en CD<sub>3</sub>OH como en otros disolventes polares como DMSO y acetona.

Los espectros bidimensionales NOESY/ROESY sugieren un plegamiento del péptido, ya que, por ejemplo, existen NOEs entre: el protón amídico de la Phe2 (8,81ppm) con el H $\alpha$  del  $\gamma$ -Ach y del NH<sub>Ach</sub> con el H $\alpha$  Phe1. Estas señales sólo parecen posibles en una estructura plegada como la que se muestra en la figura 122 (capítulo 11 y anexo 1).

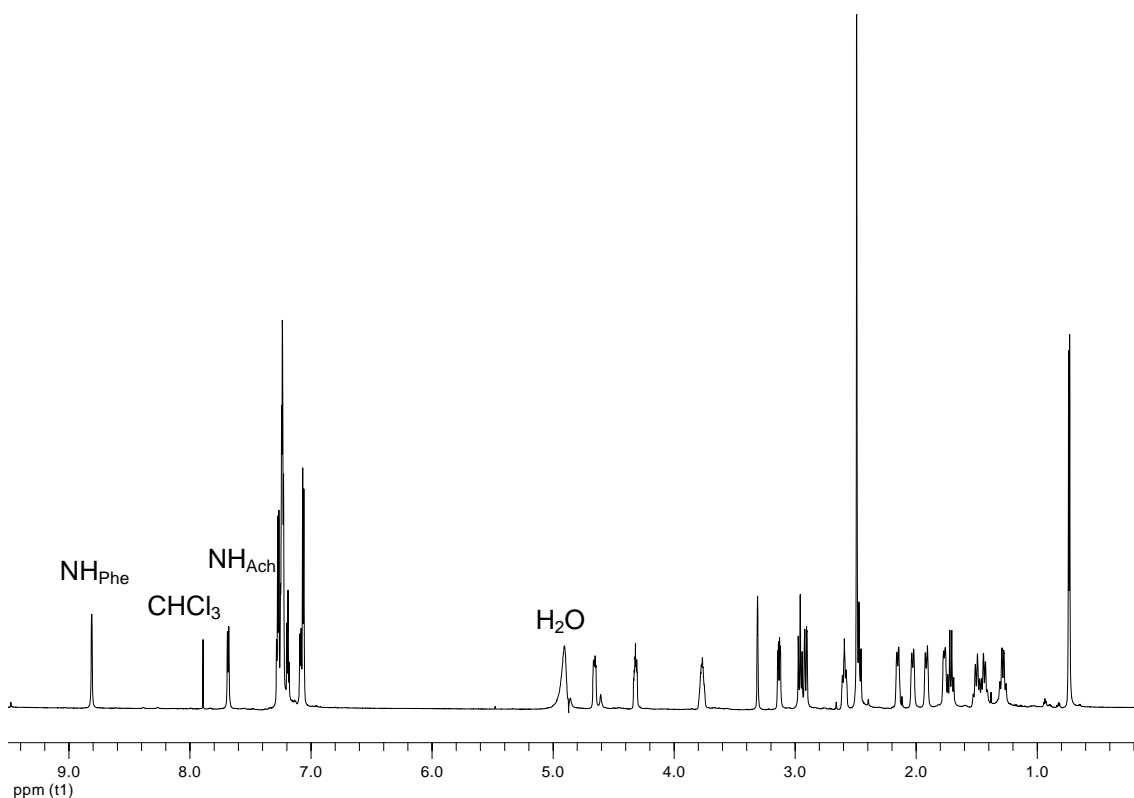


Figura 121: <sup>1</sup>H RMN del ciclopéptido **OC<sub>3:1-5</sub>** en CD<sub>3</sub>OH.

Los valores de la vibración del IR (CHCl<sub>3</sub> a 293 K) en este caso son ligeramente diferentes a los esperados para hojas plegadas  $\beta$ : 1687, 1652 (amida I) y 1537 cm<sup>-1</sup> (amida II), mientras que el valor de la amida A es 3324 cm<sup>-1</sup>. Los reiterados intentos por obtener cristales que nos permitiesen establecer claramente la estructura del péptido resultaron fallidos, ya que aunque se obtuvieron cristales, éstos resultaron demasiado inestables (CHCl<sub>3</sub>) o no difrataron (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>) para poder ser utilizados en difracción de rayos X.

Dadas estas dificultades, decidimos preparar un segundo péptido *ciclo*{[L-Ser(Bn)-D- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (**OC<sub>3:1-6</sub>**), en el que sustituimos la Phe2 por una Ser con el objetivo de diferenciar claramente los L-aminoácidos.

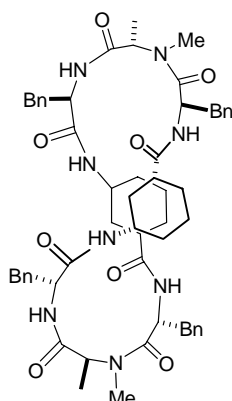


Figura 122: Posible estructura plegada en MeOH del *ciclo*[(*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe)<sub>2</sub>]-] (**OC<sub>3:1-5</sub>**).

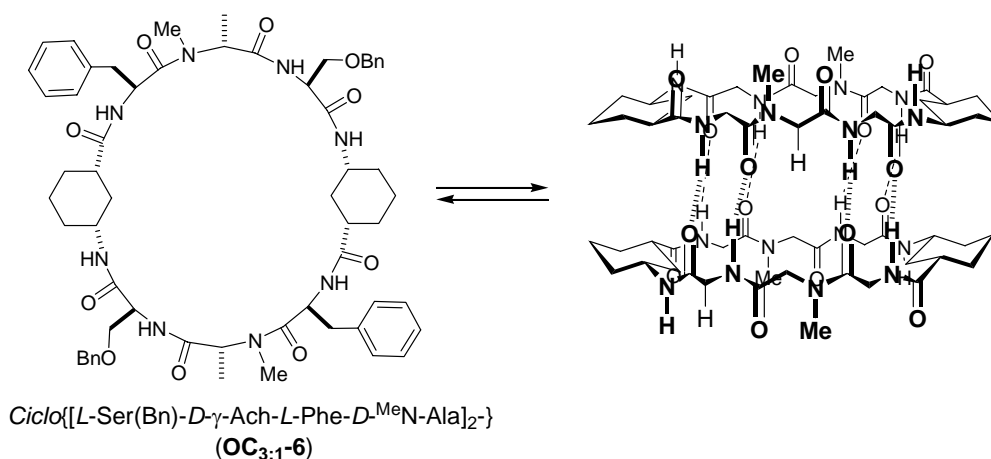


Figura 123: *Ciclo*[(*L*-Ser(Bn)-*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Phe-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>]-] (**OC<sub>3:1-6</sub>**) y dímero formado mediante autoensamblaje molecular.

Los IR en CDCl<sub>3</sub> muestran bandas muy similares para ambos péptidos; **OC<sub>3:1-6</sub>**: 1684, 1655, 1630 y 3327 cm<sup>-1</sup>; mientras que las bandas del **OC<sub>3:1-5</sub>** son: 1687, 1652, 1637 y 3324 cm<sup>-1</sup>. Cada péptido sólo posee una banda correspondiente a la amida A, con un valor que hace suponer la existencia de un puente de hidrógeno débil.

En este caso, los <sup>1</sup>H RMN del **OC<sub>3:1-6</sub>** -tanto en disolventes apolares como polares- han mostrado un comportamiento muy similar al **OC<sub>3:1-5</sub>**. El RMN en CD<sub>3</sub>OH no aportó datos nuevos a la estructura, en parte porque los experimentos bidimensionales realizados no tenían la calidad suficiente, aunque afortunadamente el **OC<sub>3:1-6</sub>** cristalizó en MeOH (figura 124). Se encontró que el péptido no existe como dímero sino que presenta una estructura tipo 8 en la que se puede apreciar que el NH del  $\gamma$ -Ach y el NH de la Ser forman puentes de hidrógeno simultáneamente con el mismo carbonilo ( $\gamma$ -Ach), mientras que el NH de la Phe se halla hacia el exterior formando un puente de hidrógeno con el disolvente.

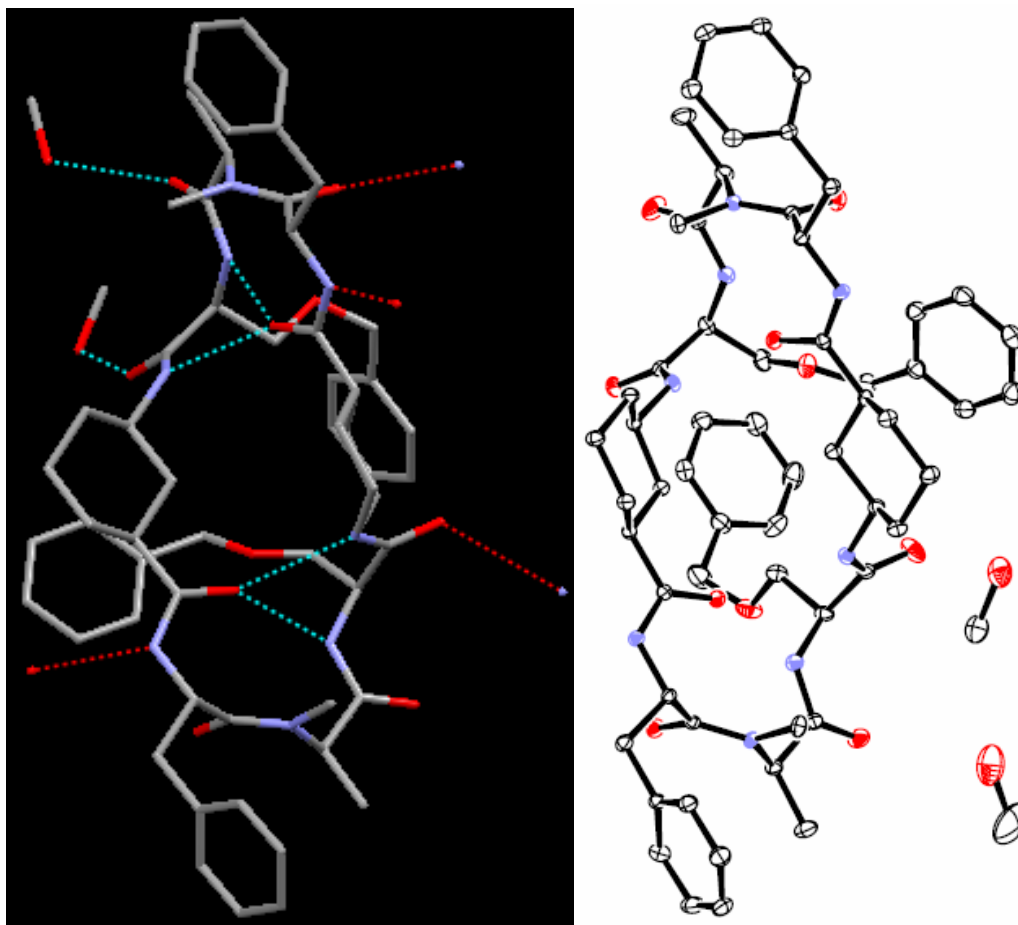


Figura 124: Rayos X del ciclopéptido **OC<sub>3:1</sub>-6** cristalizado en MeOH. Izquierda: Se muestran los puentes de hidrógeno que existen en la estructura. Derecha: Ortep de la estructura.

Obtenidos estos resultados, volvimos a hacer un estudio del **OC<sub>3:1</sub>-6** en CDCl<sub>3</sub>, dado que en este caso los NH y los H $\alpha$  se diferencian mejor, gracias a la sustitución de una Phe por una Ser. Los espectros de RMN bidimensionales (NOESY y ROESY) muestran dos NOEs muy interesantes: NH Ser con H $\alpha$ <sup>Me</sup>N-Ala y NH  $\gamma$ -Ach con H $\alpha$  Ser (este NOE no es posible en el plegamiento tipo 8 de la figura 124). Esto parece indicar que el plegamiento podría ser de tipo “silla de montar” formando puentes de hidrógeno intramolecular.

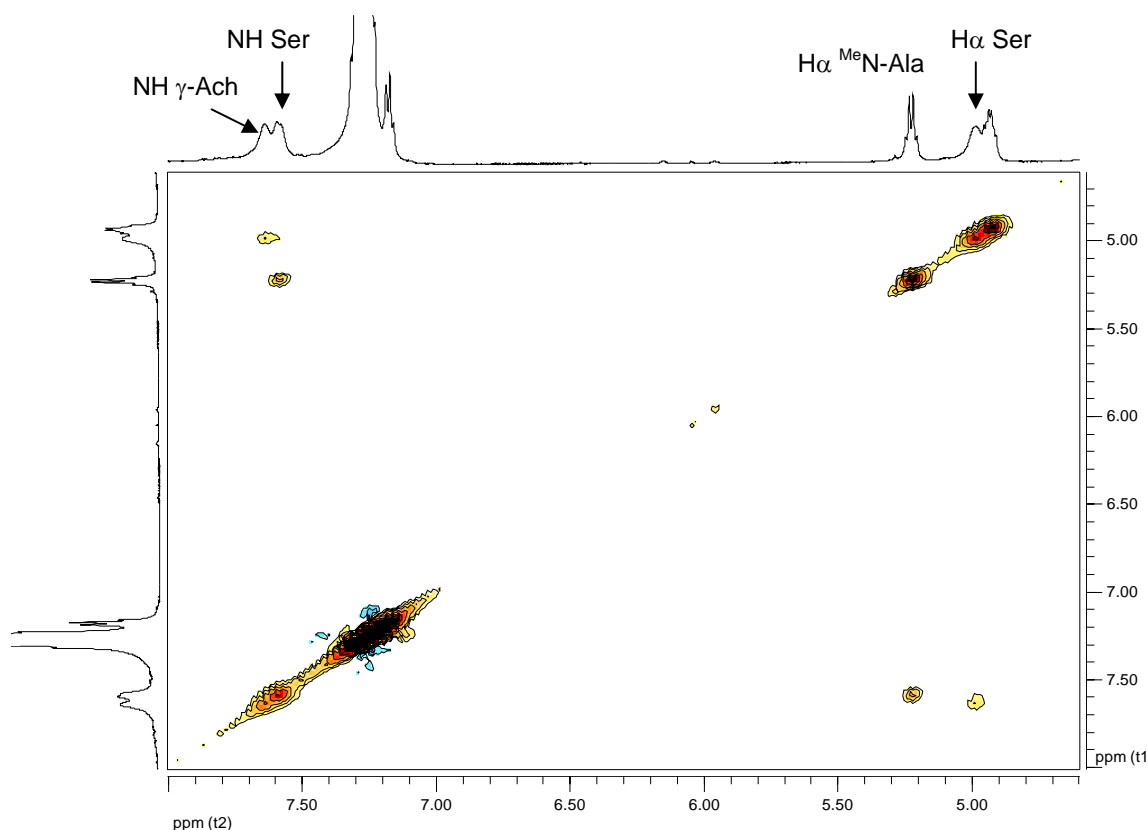


Figura 125: NOE entre los NH  $\gamma$ -Ach con H $\alpha$  Ser (NOESY en 40:60 CDCl<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub>).

A partir de estos datos, se deduce que estos ciclopéptidos no adoptan la conformación plana necesaria para la formación del dímero, sino que se pliegan.

Comparando los ciclopéptidos en los que el  $\gamma$ -Ach no participa en la formación de los puentes de hidrógeno: **OC<sub>3:1-1</sub>** (los dos  $\gamma$ -Ach y los dos  $\alpha$ -Aa N-metilados), **OC<sub>3:1-4</sub>** (los dos  $\gamma$ -Ach N-metilados), **OC<sub>3:1-5</sub>** y **OC<sub>3:1-6</sub>** (los dos  $\alpha$ -Aa N-metilados), se observa una gran influencia según la posición de los grupos metílicos ( $\gamma$ -Ach o  $\alpha$ -Aa). La presencia de los metilos en los  $\gamma$ -Ach parece tener un mayor efecto del esperado ya que facilita la conformación plana. Sin embargo, cuando éste falta tiende a formar puentes de hidrógeno intramoleculares. Este efecto puede estar propiciado por el N-Metilo del  $\alpha$ -Aa que da una congestión estérica en la conformación plana, que es liberada al plegarse.

Resulta evidente que los impedimentos estéricos entre el carbonilo y el metilo juegan un papel determinante en la formación plana. Cuando suprimimos el metilo de los  $\alpha$ -Aa el péptido puede adoptar una mejor conformación plana, lo que le permite dar lugar a una mayor  $K_a$ . Si mantenemos este grupo y eliminamos el metilo de los  $\gamma$ -Ach, las repulsiones entre los metilos y los carbonilos de las Ala siguen existiendo y el péptido se pliega a través del  $\alpha$ -Aa, lo cual a su vez le permite formar puentes de hidrógeno intramoleculares estabilizando la estructura.

Decidimos acometer el mismo estudio con la otra interacción (cuyo estudio se inicio con **OC<sub>3:1-2</sub>** y **OC<sub>3:1-3</sub>**). En este caso los metilos están situados en los  $\alpha$ -Aa y por tanto no era previsible encontrar el mismo tipo de comportamiento. De todos modos, apostamos por eliminar de forma selectiva dos de los grupos metilos y sintetizar en primer lugar el ciclopéptido *ciclo*{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-Ala-L- $\gamma$ -Ach-D-Ala]<sub>2</sub>-} (**OC<sub>3:1-7</sub>**) (figura 126). Este péptido vuelve a mostrar una conformación plana apropiada para la

formación de dímeros, estructura que podemos confirmar por el desplazamiento observado para los protones: 8,70 ppm NH Ser ( $J = 9,5$  Hz); 7,91 ppm NH  $\gamma$ -Ach ( $J = 8,9$  Hz); mientras que el protón situado en el exterior de la estructura: 6,55 ppm NH Ala ( $J = 6,5$  Hz). Al igual que en otros péptidos anteriormente preparados, se puede observar que el proceso de autoensamblaje molecular posee una elevada  $K_a > 10^4$ , ya que su espectro de  $^1\text{H}$  RMN es independiente de la concentración (hasta 0,2 mM).

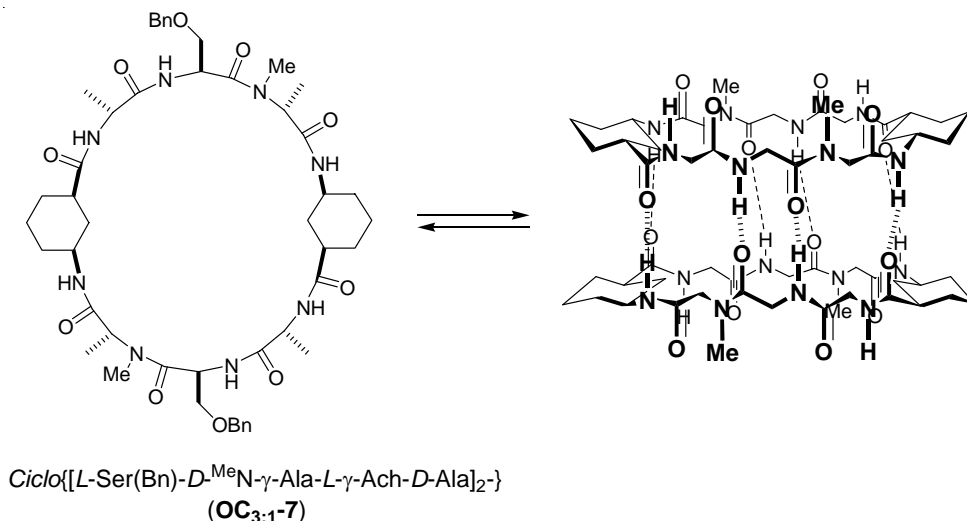


Figura 126: *Ciclo*{[*L*-Ser(Bn)-*D*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ala-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Ala]<sub>2</sub>} (**OC<sub>3:1-7</sub>**) y modelo del dímero formado por autoensamblaje molecular.

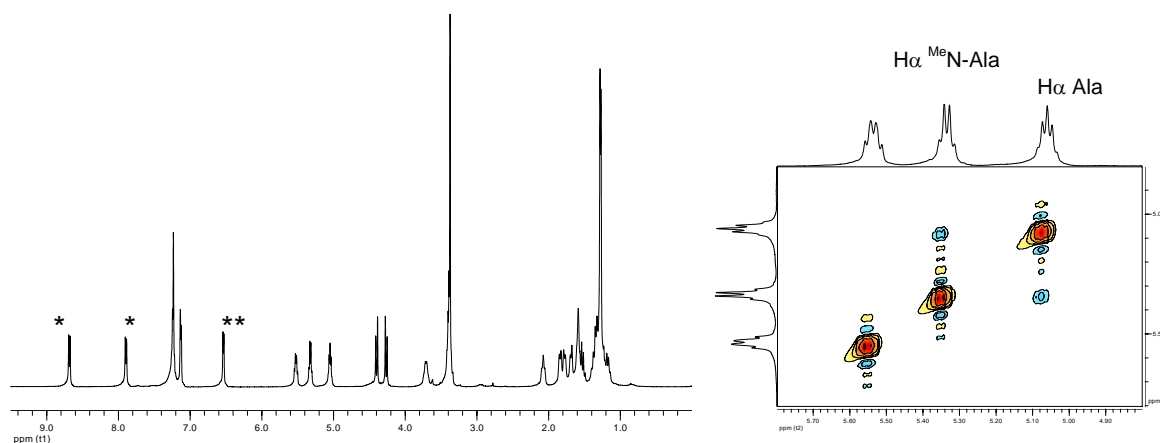


Figura 127:  $^1\text{H}$  RMN del ciclopéptido **OC<sub>3:1-7</sub>**. NH que participan en la formación del dímero: NH Ser (8,70 ppm) y NH  $\gamma$ -Ach (7,91 ppm) aparecen marcados con (\*), mientras que el NH que no participa en la formación del dímero: NH Ala (6,55 ppm) se ha marcado con (\*\*). Derecha: ROESY del ciclopéptido **OC<sub>3:1-7</sub>** (entre 5,8-4,8 ppm): la presencia de un NOE entre  $\text{H}\alpha$  <sup>Me</sup>N-Ala (5,34 ppm) y el  $\text{H}\alpha$  Ala (5,06 ppm) es indicativo de la existencia de un dímero.

Los experimentos bidimensionales de este péptido muestran claramente la existencia de un NOE entre los  $\text{H}\alpha$  de la <sup>Me</sup>N-Ala (5,34 ppm) y la Ala (5,06 ppm), algo sólo posible en la estructura dimérica.

El IR ( $\text{CHCl}_3$  a 293 K) posee las bandas típicas de una hoja plegada  $\beta$  a 1683, 1651, 1616, 1543  $\text{cm}^{-1}$ ; y las bandas de la amida A: 3312 y 3417  $\text{cm}^{-1}$ . La presencia de

esta banda a 3417  $\text{cm}^{-1}$  la atribuimos al N-H que no participa en la formación de puentes de hidrógeno.

La elevada constante de asociación ( $> 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) del ciclo péptido **OC<sub>3:1-7</sub>** resultó sorprendente, ya que los resultados obtenidos con los  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptídicos nos hacían pensar que los ciclo péptidos en los que el  $\gamma$ -Ach forma puentes de hidrógeno daban lugar a dímeros con mayor dificultad, debido a la menor polaridad de dichos enlaces. Por otro lado, de nuevo se evidencia que la N-metilación de los ciclo péptidos ejerce una gran influencia sobre la conformación del ciclo péptido (orientación de los C=O y NH) y por tanto sobre la formación de los dímeros.

El siguiente péptido sintetizado fue el *ciclo*{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (**OC<sub>3:1-8</sub>**) (figura 128), cuyo espectro de RMN en cloroformo presenta unas señales claramente diferenciadas y afiladas que parecían indicar que se trataba de una conformación plana, y que formaba un dímero con una elevada  $K_a$ , ya que el RMN era independiente de la concentración. Sin embargo, fue asombroso comprobar que el protón más apantallado correspondía a la Ser, cuando debería de participar en la formación de puentes de hidrógeno si se tratase de una estructura dimérica (figura 128).

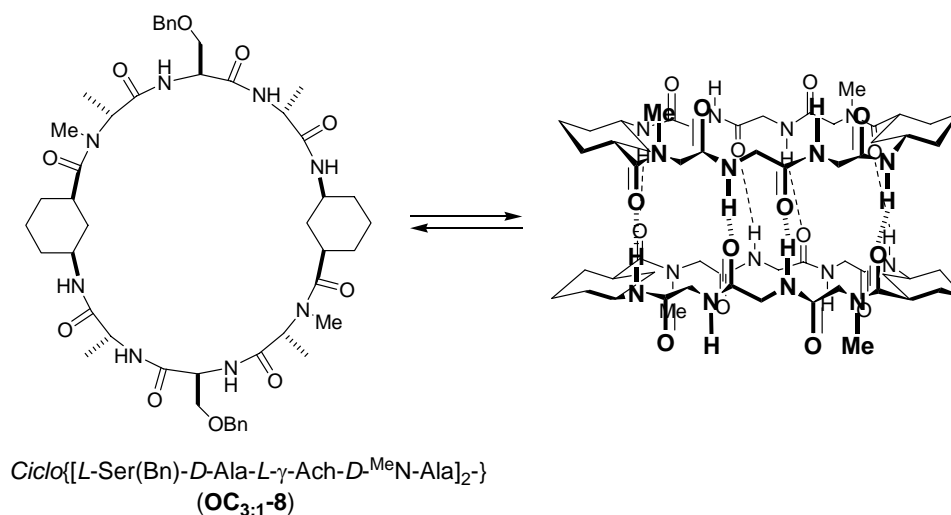


Figura 128: *Ciclo*{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (**OC<sub>3:1-8</sub>**) y modelo del dímero formado por autoensamblaje molecular.

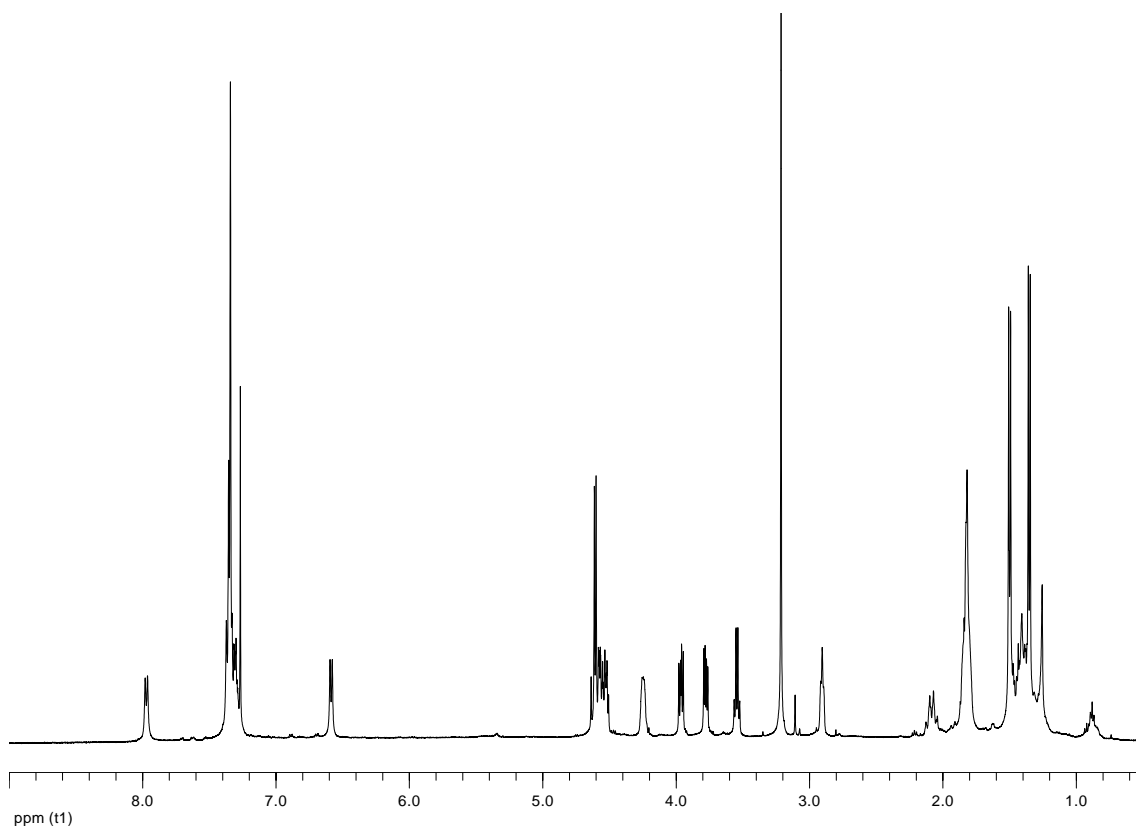


Figura 129:  $^1\text{H}$  RMN del ciclopeptido **OC<sub>3:1</sub>-8** en  $\text{CDCl}_3$ : 7,97 ppm (NH  $\gamma$ -Ach); 7,37-7,27 ppm (NH Ala y Bn); 6,59 ppm (NH Ser).

Nuevamente resultó muy difícil determinar la estructura secundaria del ciclopeptido en disolución debido a la elevada simetría. De todas formas, podemos afirmar que éste no adopta la conformación plana y que la falta de dos metilos permite el plegamiento en el que el protón amida del  $\gamma$ -Ach forma un enlace puente de hidrógeno muy fuerte -cuando no debería de formarlos si se tratase de un dímero (figura 128)-, mientras que la Ser queda orientada hacia el exterior de la estructura sin participar en la formación de puentes de hidrógeno.

En  $\text{CD}_3\text{OH}$ , los NH están más desapantallados: [9,20 ppm (NH  $\gamma$ -Ach); 8,09 ppm (NH Ala); 7,70 ppm (NH Ser)]. Todas estas evidencias llevan a suponer que este ciclopeptido adopta una conformación no plana también en este disolvente. (Los bidimensionales, tanto en  $\text{CDCl}_3$  como en  $\text{CD}_3\text{OH}$ , no permitieron determinar la estructura secundaria).

De nuevo la posición del Me que bloquea la cara determina la estructura secundaria del ciclopeptido, de tal forma que en los  $^{\text{Me}}\text{N}-\alpha\text{-Aa}$  unidos al extremo N-terminal del  $\gamma$ -Ach favorecen la conformación plana. Sin embargo, cuando el enlace se produce por el extremo C-terminal, el péptido se pliega, posiblemente debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular.

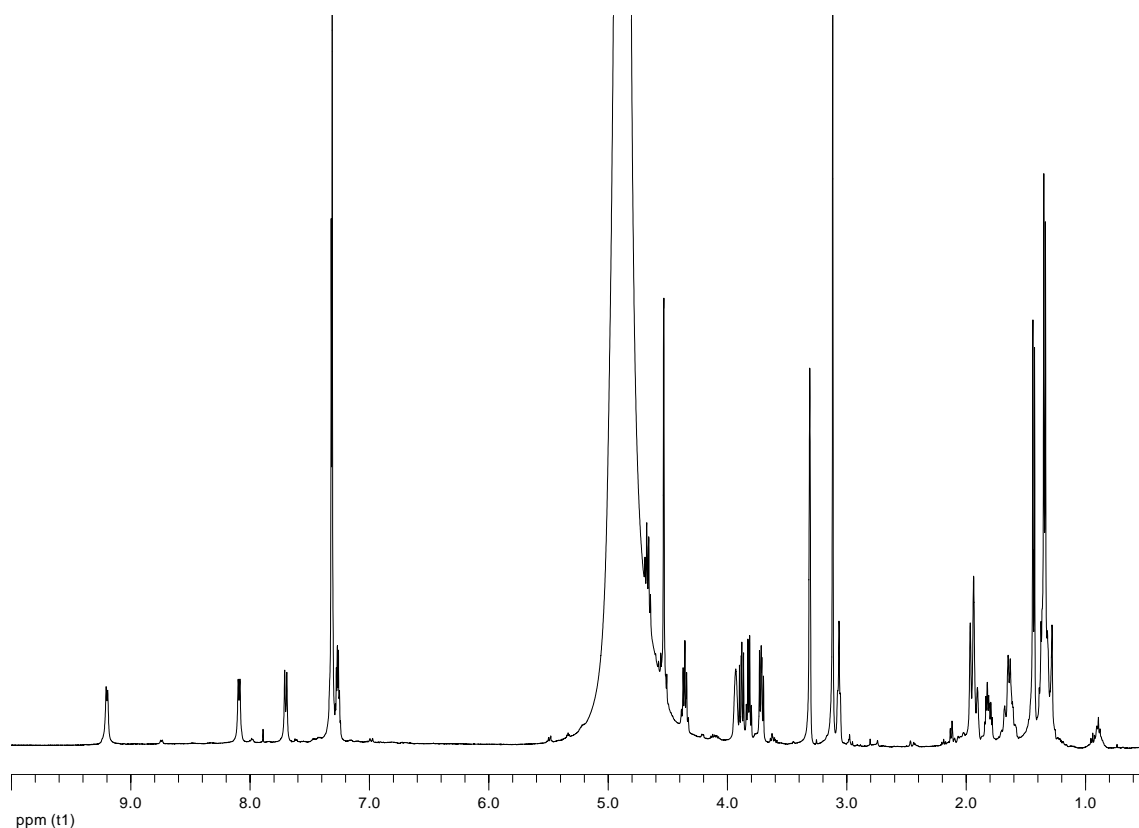


Figura 130:  $^1\text{H}$  RMN del ciclopeptido  $\text{OC}_{3:1}\text{-8}$  en  $\text{CD}_3\text{OH}$ : 9,13 ppm (NH  $\gamma$ -Ach); 8,02 ppm (NH Ala); 7,63 ppm (NH Ser).

El IR ( $\text{CHCl}_3$  a 293 K) muestra bandas a 1671 y 1629  $\text{cm}^{-1}$  de la amida I y a 1521  $\text{cm}^{-1}$  de la amida II. La banda del N-H a 3326  $\text{cm}^{-1}$  coincide con la de un N-H que participa en un enlace puente de hidrógeno, mientras que la banda a 3432  $\text{cm}^{-1}$  es típica de un N-H que no participa en la formación de dichos enlaces.

Ciclopeptido	Vibración Amida Ia	Vibración Amida Ib	Vibración Amida II	Vibración Amida A
$\text{OC}_{3:1}\text{-1}$	1627	1669	1525	3310
$\text{OC}_{3:1}\text{-2}$	1631	1673	1528	3313/3412
$\text{OC}_{3:1}\text{-3}$	1632	1673	1542	3310/3413
<b><math>\text{OC}_{3:1}\text{-4}</math></b>	<b>1642</b>	<b>1681</b>	<b>1515</b>	<b>3296/(3403)</b>
$\text{OC}_{3:1}\text{-5}$	1652	1687	1537	3324
$\text{OC}_{3:1}\text{-6}$	1655	1684	1530	3327
<b><math>\text{OC}_{3:1}\text{-7}</math></b>	<b>1616, 1651</b>	<b>1683</b>	<b>1543</b>	<b>3312/(3417)</b>
$\text{OC}_{3:1}\text{-8}$	1629	1671	1521	3326/3432

Tabla 5: Bandas del IR en  $\text{CHCl}_3$  de los diferentes  $\text{OC}_{3:1}$ . ( $\text{OC}_{3:1}\text{-4}$  y  $\text{OC}_{3:1}\text{-7}$  poseen bandas, respectivamente, a 3403 y 3417  $\text{cm}^{-1}$  del N-H que no participa en la formación del dímero).

El análisis de los datos de IR parece confirmar que el  $\text{OC}_{3:1}\text{-1}$  es un dímero más fuerte, pues sólo se aprecia la banda de la amida A correspondiente al dímero. Por el contrario, los péptidos  $\text{OC}_{3:1}\text{-2}$  y  $\text{OC}_{3:1}\text{-3}$  muestran la banda del dímero y la del monómero. Esta última banda presenta un valor muy similar a la amida A, de los N-H,

de los **OC<sub>3:1-4</sub>** y **OC<sub>3:1-7</sub>**, que no participan en la formación de los puentes de hidrógeno.

Los péptidos *OC<sub>3:1-5</sub>* y *OC<sub>3:1-6</sub>* muestran bandas (amida A) de un enlace puente de hidrógeno no muy fuerte, que es lo que se aprecia en los RMNs. El *OC<sub>3:1-8</sub>* posee una banda de N-H típica de un enlace puente de hidrógeno (con un valor similar al de los anteriores ciclopéptidos: *OC<sub>3:1-5</sub>* y *OC<sub>3:1-6</sub>*) y otra típica de un N-H libre que no forma puentes de hidrógeno.

## **CAPÍTULO 7: $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS SÓLIDOS**



La segunda estrategia abordada en la formación de nanotubos derivados de  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos consistió en el estudio de éstos en estado sólido. Para ello diseñamos hexa- y octa- péptidos que permiten inducir la formación de nanotubos mediante el cambio de pH, tal como llevó a cabo el grupo de Ghadiri.<sup>10</sup> Seleccionamos, por tanto, el derivado de la Gln y el  $\gamma$ -Ach, en el que la protonación del grupo amida de las cadenas laterales del péptido en medios fuertemente ácidos debe solubilizar al ciclopéptido, mientras que la lenta basificación del medio favorece el autoensamblaje molecular a medida que se desprotona el ciclopéptido.

En la figura 131 se muestra un resumen de la secuencia sintética seguida para la preparación de los ciclopéptidos *ciclo*[(L-Gln-D- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-] (**HC-7**) y *ciclo*[(L-Gln-D- $\gamma$ -Ach)<sub>4</sub>-] (**OC-7**). Esta síntesis se basa en la utilización, como primer aminoácido, de Glu, que se une al soporte sólido a través de su cadena lateral,<sup>111</sup> mientras que se protege de forma ortogonal el grupo  $\alpha$ -carboxilo. Esto permite que la ciclación se lleve a cabo cuando el péptido aún permanece unido a la resina. La protección del grupo  $\alpha$  carbonilo como éster de Fm posibilita que se realice la desprotección selectiva al final de la síntesis, mediante el tratamiento con piperidina. La estrategia seleccionada para la síntesis es la Boc/bencilo. La resina elegida es un polímero funcionalizado con un grupo Metilbencil Amino (MBHA); y la rotura final se realiza con HF (líquido), en el que se libera el péptido como una amida (la rotura transforma el Glu utilizado inicialmente en Gln).

---

10) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. "Self-Assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture" *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

111) a) Unión a través de un Glu: Kates, S. A.; Solé, H. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G. Y Albericio, F. "A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for Solid-Phase synthesis of cyclic peptides" *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549-1552. b) Unión a través de una Ser: Alsina, J.; Chiva, C.; Ortiz, M.; Rabanal, F.; Giralt, E. Y Albericio, F. "Active Carbonate Resins for Solid-Phase Synthesis Through the Anchoring of a Hydroxyl Function. Synthesis of Cyclic and Alcohol Peptides" *Tetrahedron Lett.* **19937**, *38*, 883-886. c) Unión a través de una His: Isied, S. S.; Kuehn, C. G. y Lyon, J. M. "Specific Peptide Sequences for Metal Ion Coordination. 1. Solid-Phase Synthesis of *cyclo*-(Gly-His)<sub>3</sub>" *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2632-2634.

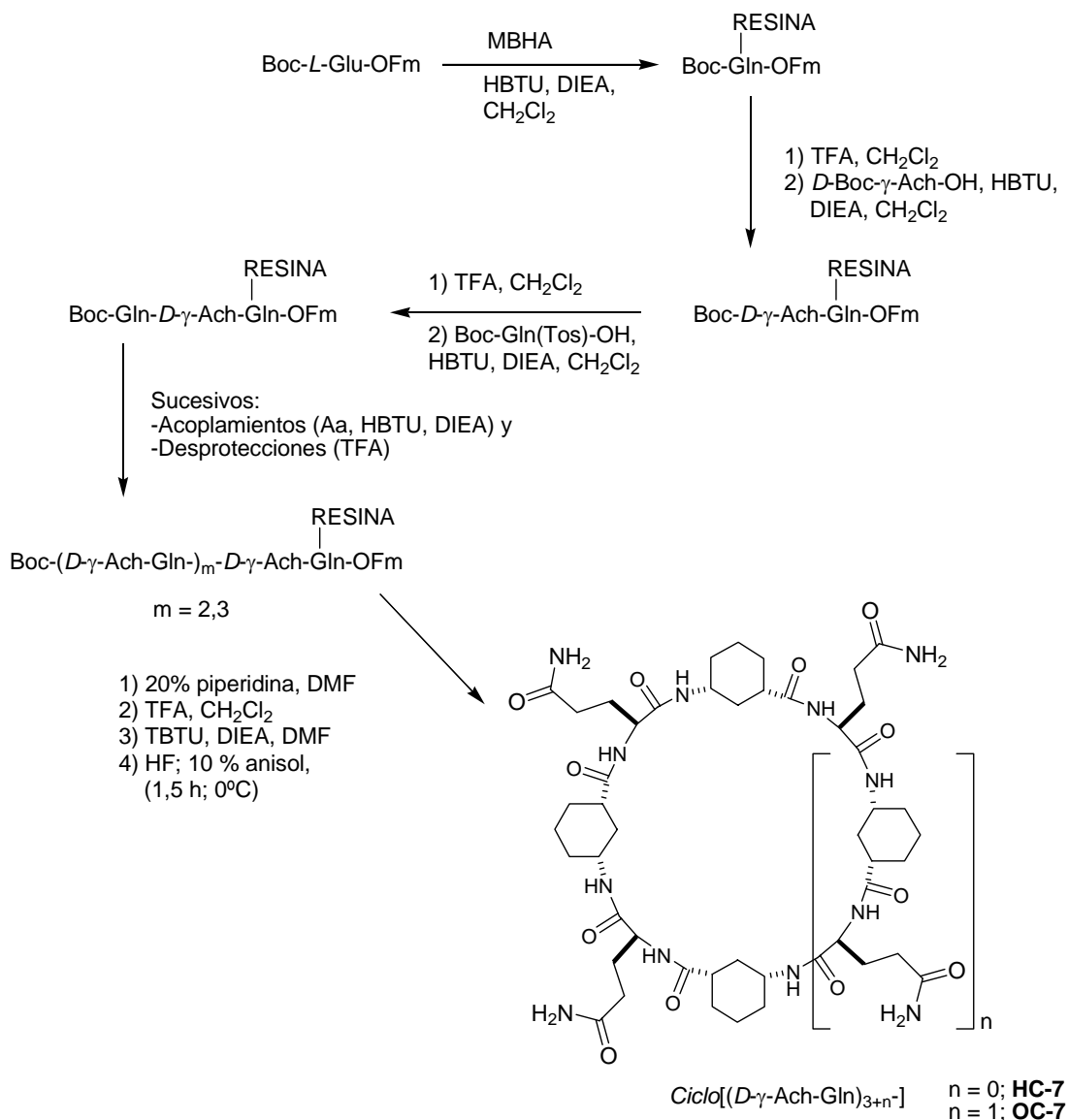


Figura 131: Secuencia sintética seguida para la obtención de los ciclopeptidos **HC-7** y **OC-7**.

Con el objeto de sintetizar dichos péptidos y ciclarlos sobre la resina, se utilizó una resina de baja carga/MBHA con una carga de 0,4 mmol grupos NH<sub>2</sub>/por gramo de resina.

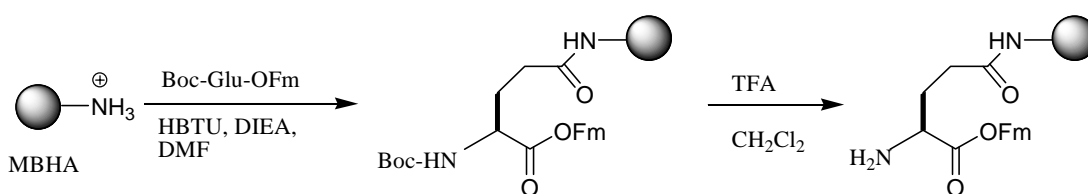


Figura 132: Unión del primer aminoácido directamente a la resina.

Una vez hinchada la resina, se procede a la reacción de acoplamiento del primer aminoácido (siendo, como ya se indicó, Boc-L-Glu-OFm), que se une a la resina

MBHA por su cadena lateral. Para el acoplamiento nos valimos de la formación de ésteres activos *in situ*, usando HBTU y DIEA, según el protocolo descrito por Kent.<sup>145</sup> Para este primer acoplamiento se utilizaron 3 eq de aminoácidos mezclados con 2,85 eq de HBTU y 6,0 eq de DIEA. La mezcla se agitó durante 1 min (preactivación), se vertió sobre la resina y se agitó durante 1 h. Para eliminar los excesos de reactivos empleados, se filtró la mezcla y se lavó repetidas veces con DMF. Tras los lavados, se comprobó mediante el test de Kaiser la eficiencia del acoplamiento,<sup>146</sup> procediéndose a repetir el proceso si no resultaba cuantitativo. La desprotección del grupo amino se realizó por tratamiento de la resina con TFA. Tras lavar la resina con DCM y DMF en repetidas ocasiones para eliminar los restos de TFA, se procedió a acoplar el *D*-Boc- $\gamma$ -Ach-OH empleando únicamente 2 eq. El acoplamiento se realizó durante 30 min. Los posteriores acoplamientos y desprotecciones se llevaron a cabo bajo las condiciones ya descritas, obteniéndose los correspondientes hexámeros y octámeros lineales. La ciclación se realizó mediante la desprotección de los grupos C- y N-terminales, mediante el tratamiento con 20% de piperidina para eliminar el grupo fluorenilo, mientras que el TFA se empleó para eliminar el grupo Boc.

Una vez desprotegidos los extremos C- y N-terminal, se procedió a la ciclación, utilizando como agente activante el TBTU.<sup>147</sup> En estos casos se emplea únicamente 1 eq de agente activante y 2 eq de base. Transcurridas 24 h se observó mediante el test de Kaiser que no quedaban grupos amino libres, por lo que se filtró la mezcla para eliminar los reactivos en exceso y se lavó con DMF, DCM y finalmente con éter (disolvente que no solvata bien la resina de poliestireno y que por lo tanto facilita el secado final).

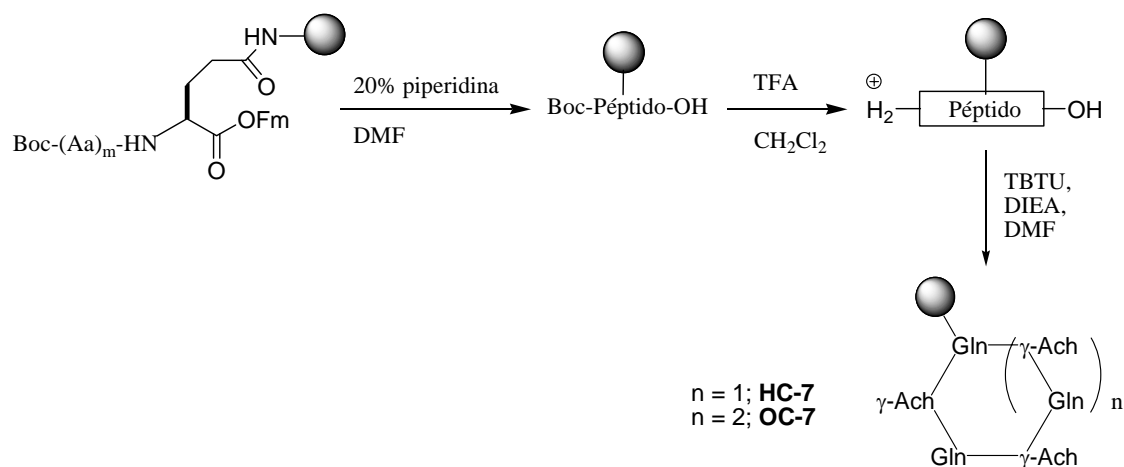


Figura 133: Desprotección del extremo C y N-terminal y ciclación.

- 145) Schnolzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. "In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences" *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 180-193.
- 146) a) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides" *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598. b) Stewart, J. M.; Young, J. D. Eds *Solid phase in peptide synthesis*, 2<sup>nd</sup> edition, Pierce Chemical Company, Rocford, Illinois, 1984.
- 147) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W. Y Gillesen, D. "New coupling reagents in peptide chemistry" *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.

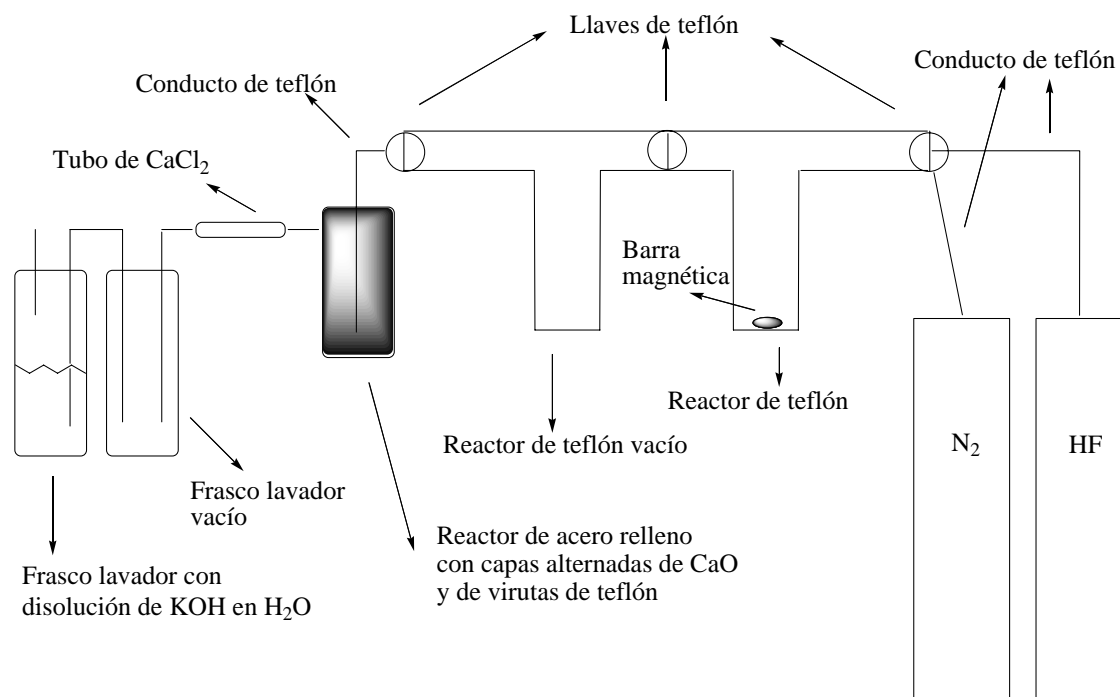


Figura 134: Montaje empleado para la rotura con HF.

La última etapa era la separación del péptido del soporte sólido. Dado que usamos una resina HMBA se requería un ácido fuerte. El más comúnmente utilizado es el HF líquido, ácido que se elimina con facilidad y que suele dar lugar a reacciones muy limpias con cantidades no muy elevadas de otros subproductos. Las condiciones óptimas de reacción requieren la presencia de reactivos que atrapen los carbocationes que se generan en este medio tan ácido. Para evitar la alquilación del esqueleto peptídico o de los anillos aromáticos, en este trabajo usamos un 10% de anisol. El principal inconveniente de este método es la peligrosidad del HF, requiriéndose un montaje y una protección especial (figura 134). El material que permanece en contacto con HF debe ser de teflón (es la única sustancia inerte frente a este ácido). Una vez lavada y secada la resina, se situó en el reactor de teflón junto con un 10% (del volumen total) de anisol y se colocó el reactor en el montaje. Tras purgar con N<sub>2</sub> y comprobar que no había fugas, el reactor se enfrió a -78 °C (baño de acetona/CO<sub>2</sub>) y se condensó HF y se agitó a 0 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo se eliminó el HF lentamente mediante corriente de N<sub>2</sub>. Para evitar que el gas saliese a la atmósfera, se atrapó en un reactor de acero cuyo interior contenía capas de CaO separadas entre sí por virutas de teflón. El nitrógeno que salió de este reactor se pasó por un frasco lavador con disolución básica por si acaso llevaba trazas de HF.<sup>148</sup>

Una vez retirado el fluoruro de hidrógeno, se precipitó el péptido adicionando éter. La disolución etérea se decantó y el sólido se lavó con Et<sub>2</sub>O repetidamente para eliminar las impurezas solubles. A continuación, el péptido se arrastró con TFA, recogiendo los lavados en un balón, y se concentró a sequedad. La resina se lavó adicionalmente con 10% de AcOH en H<sub>2</sub>O y se juntó a la anterior fracción. La disolución resultante se liofilizó.

148) El mecanismo propuesto para la desprotección y rotura propone la protonación de los grupos carbonilo y la formación de carbocationes benéficos. Estos carbocationes son atrapados a continuación por los *scavengers*.

Los péptidos sintetizados resultan poco solubles en las condiciones de fase reversa y normal de HPLC, por lo que tuvimos que recurrir, para su purificación, a reiterados lavados con H<sub>2</sub>O primero (3 veces) y con éter después (3 veces). Los crudos así obtenidos se caracterizaron mediante MS y RMN, confirmándose la formación del péptido deseado.

El <sup>1</sup>H RMN del crudo se realizó en TFA deuterado, uno de los disolventes en los que son solubles estos ciclopéptidos. En el espectro de RMN se pudieron observar como señales más características las correspondientes a los NH (8,47 ppm del **HC-7**), los H $\alpha$  de la Gln (5,00 ppm del **HC-7**; 4,96 ppm **OC-7**) y los H $\gamma$  de los  $\gamma$ -Ach (4,20 ppm del **HC-7**; 4,15 ppm **OC-7**) (capítulo 11 y anexo 1).

## 7.1. FORMACIÓN DE NANOTUBOS

Pese a no disponer de estas muestras en gran pureza, comenzamos a estudiar el proceso de autoensamblaje. Para ello se disolvió el péptido en TFA y se introdujo el vial que contenía la disolución en recipientes con distintas disoluciones (TFA/H<sub>2</sub>O, EtOH/H<sub>2</sub>O, ACN/H<sub>2</sub>O, etc.) (figura 135), encontrándose que el ACN/H<sub>2</sub>O era el más apropiado. En algunos casos se pudo observar con el microscopio óptico (después de 2-4 días) que en el recipiente existían pequeños cristales con forma de aguja (figura 136), que es la característica para este tipo de procesos en los que el crecimiento de los cristales a lo largo del eje del nanotubo es más favorable que en las otras direcciones.

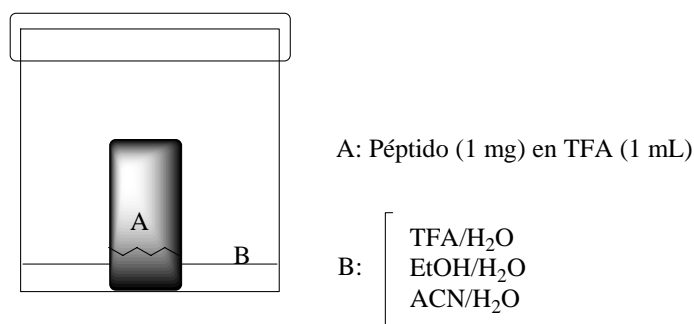


Figura 135: Representación del método de cristalización de los ciclopéptidos **HC-7** y **OC-7**.

Con el objetivo de caracterizar estos nanotubos se recurrió a la microscopía de transmisión de electrones (figuras 137) y al IR (realizados en KBr). La FTIR es una de las técnicas que permitió caracterizar los anteriores nanotubos gracias a las bandas características correspondientes a la vibración de los C=O y los N-H. La banda observada entre 3270-3300 cm<sup>-1</sup> corresponde a la vibración del N-H, y el desplazamiento de ésta permite determinar las distancias N...O de grupos unidos mediante puentes de hidrógeno, utilizando para ello la correlación de Krimm.<sup>125</sup> La banda a 3283 cm<sup>-1</sup> (**HC-7**) y 3287 cm<sup>-1</sup> (**OC-7**) se puede correlacionar con una distancia de 4,7-4,8 Å entre subunidades, siendo éste un valor característico entre dos segmentos peptídicos unidos por hojas β paralelas o antiparalelas y comparables a los valores obtenidos con los péptidos N-alquilados. Además de esta banda, también se observaron las bandas de la amida I y de la amida II<sub>II</sub> (tabla 6) acordes con la existencia de una hoja plegada β. Los datos obtenidos del FT-IR de estos microcristales parecen confirmar la formación de nanotubos peptídicos.

125) Krimm, S.; Bandekar, J. "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins" *In Advances in protein Chemistry*; Anfinsen, C. B.; Edsall, J.T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1986; pp 181-364.

Nanotubos	Vibración Amida Ia	Vibración Amida Ib	Vibración Amida II <sub>II</sub>	Vibración N-H	Distancia entre subunidades
$c\text{-}\{[\text{Gln-}(1S,3R)\text{-}\gamma\text{-Ach}]_3\text{-}\}$	1631	1663	1541	3283	4,7-4,8 Å
$c\text{-}\{[\text{Gln-}(1S,3R)\text{-}\gamma\text{-Ach}]_4\text{-}\}$	1633	1659	1544	3287	4,7-4,8 Å
$c\text{-}[(\text{Gln-}D\text{-Ala})_4\text{-}]$	1630	1672	1549	3282	4,74-4,80 Å
$c\text{-}[(\text{Gln-}D\text{-Leu})_4\text{-}]$	1629	1688	1540	3278	4,72-4,75 Å

Tabla 6: Datos de FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) de diferentes péptidos: los dos primeros son los sintetizados en este trabajo, mientras que los otros corresponden a la referencia 67.

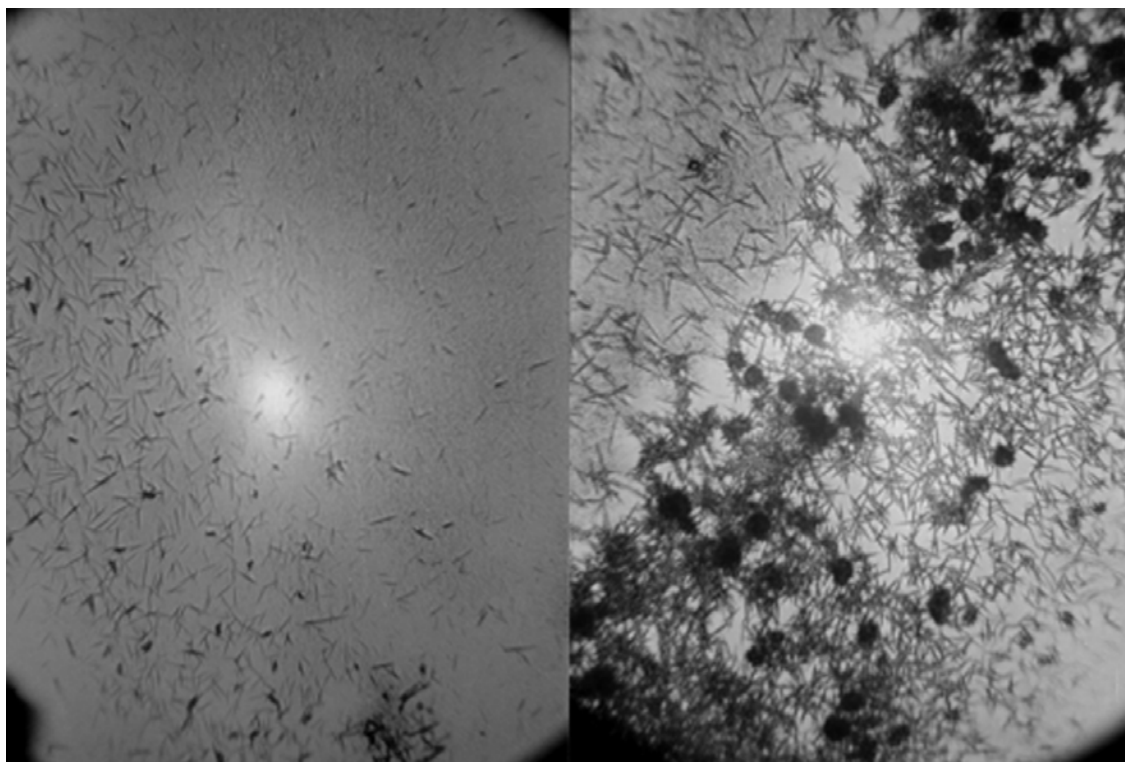


Figura 136: Cristales con forma de aguja formados por el OC-7.

La segunda técnica empleada para el estudio de estos nanotubos fue la microscopía electrónica, trabajando a 120 kV. En la figura 137, se muestran las fotografías de estos cristales, con una dimensión entre los 200 y los 600 nm. Los distintos intentos por obtener más información mediante difracción de electrones (para determinar las distancias intertubulares y las existentes entre las subunidades peptídicas dentro del nanotubo) resultaron infructuosos debido a la descomposición de los nanotubos. Cuando éstos se someten al haz de electrones se descomponen, tal vez debido a la participación de alguna moléculas de TFA en la estructura cristalina del nanotubo.

67) Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Peptide Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

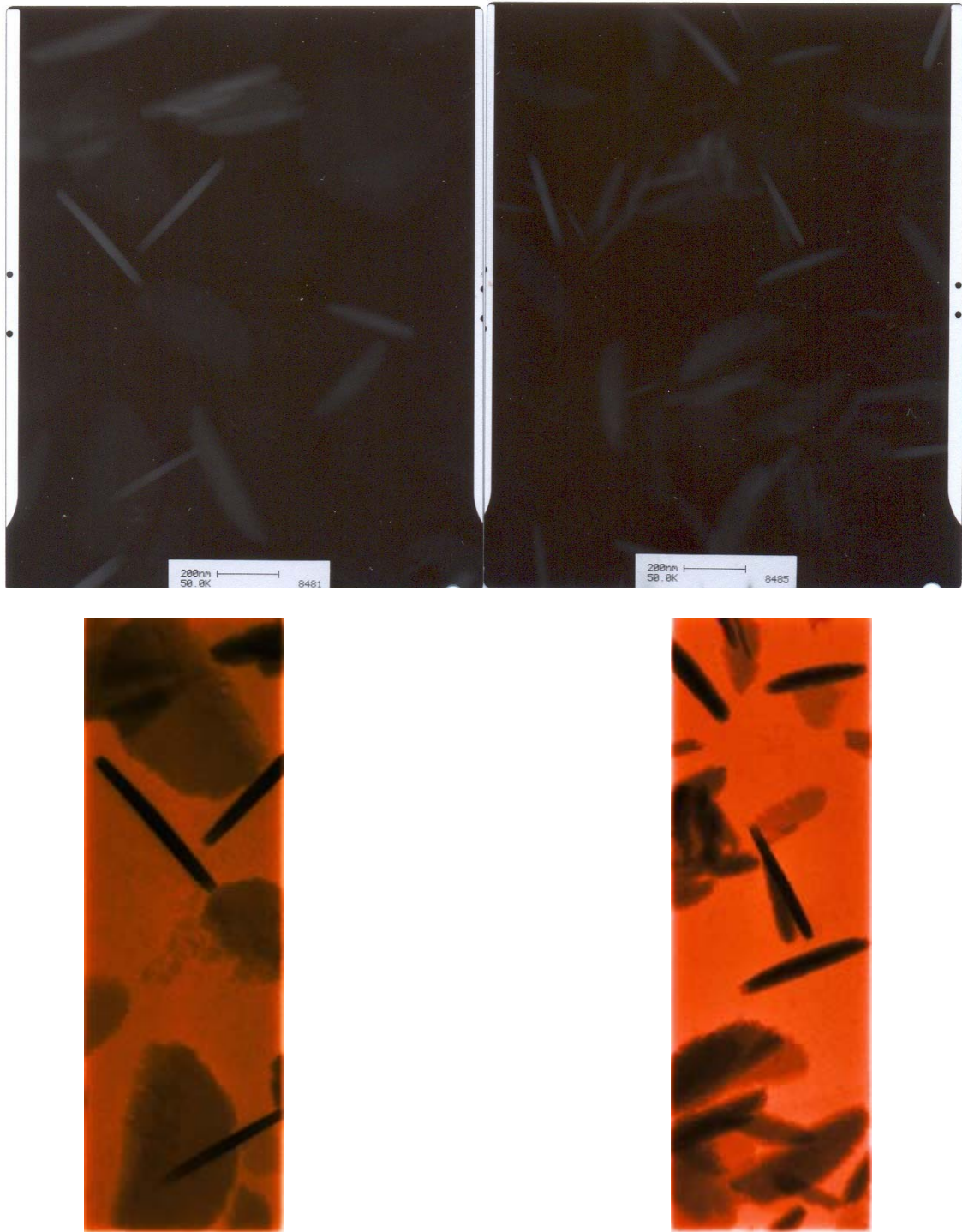


Figura 137: Superior: Fotografías de TEM para el **OC-7**. (Longitud 200-600 nm. Diámetro 10-30 nm). (La escala situada en la parte inferior del negativo equivale a 200 nm). Inferior: Positivado de los negativos superiores.

## **CAPÍTULO 8: $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS DE MEMBRANA**



Un tercer aspecto que decidimos abordar en esta tesis fue el diseño de péptidos hidrofóbicos que diesen lugar a nanotubos en las bicapas lipídicas; y así estudiar su capacidad como transportadores de iones. Esperábamos que estos nanotubos con una cavidad interna parcialmente hidrofóbica pudiesen dar lugar a conductos con una mayor selectividad entre iones (trabajos en los que se mide la conductividad de canales sintéticos, cuya formación se atribuye al autoensamblaje de los ciclopéptidos en la membrana lipídica).<sup>61,62,82,84-87</sup> Para llevar a cabo este estudio, que requiere un equipo especial para los estudios electrofisiológicos en bicapas fosfolipídicas, colaboramos con el grupo del profesor Hagan Bayley (Departamento de Química, Universidad de Oxford), uno de los mayores expertos en esta técnica.

Como en el anterior capítulo, la síntesis de dichos péptidos se realizó en fase sólida, realizándose la ciclación antes de separarlos del soporte sólido. En este caso, se seleccionó un método de síntesis Fmoc/Bn. Como grupo protector del extremo C-terminal se optó por un éster alílico, compatible con la química Fmoc/Bn, y que se desprotege selectivamente por tratamiento con Pd (0). La resina utilizada fue un poliestireno funcionalizado con un grupo amino (Rink amida) cuya rotura se puede realizar por tratamiento con TFA (figura 138).

- 
- 61) Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B.; "Cyclo- $\beta$ -peptide. Structure and tubular stacking of cyclic tetramers of 3-aminobutanoic acid as determined from powder diffraction data" *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173-182.
  - 62) Clark, T. D.; Buehler, L. K., Ghadiri, M. R. "Self-Assembling Cyclic  $\beta^3$ -Peptide Nanotubes as Artificial Ion Channels" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.
  - 82) a) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. "Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes" *Nature* **1994**, *369*, 301-304.
  - 84) Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, M. R. "Oriented Self-Assembly of Cyclic Peptide Nanotubes in Lipid Membranes" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4417-4424.
  - 85) Granja, J. R.; and Ghadiri, M. R. "Channel-Mediated Transport of Glucose across Lipid Bilayers" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.
  - 86) Sánchez-Quesada J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. "A Synthetic Pore-Mediated Transmembrane Transport of Glutamic Acid" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2503-2506.
  - 87) Sánchez-Quesada, J.; Isler, M. P.; Ghadiri, M. R. "Modulating ion channel properties of transmembrane peptide nanotubes through heteromeric supramolecular assemblies" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10004-10005.

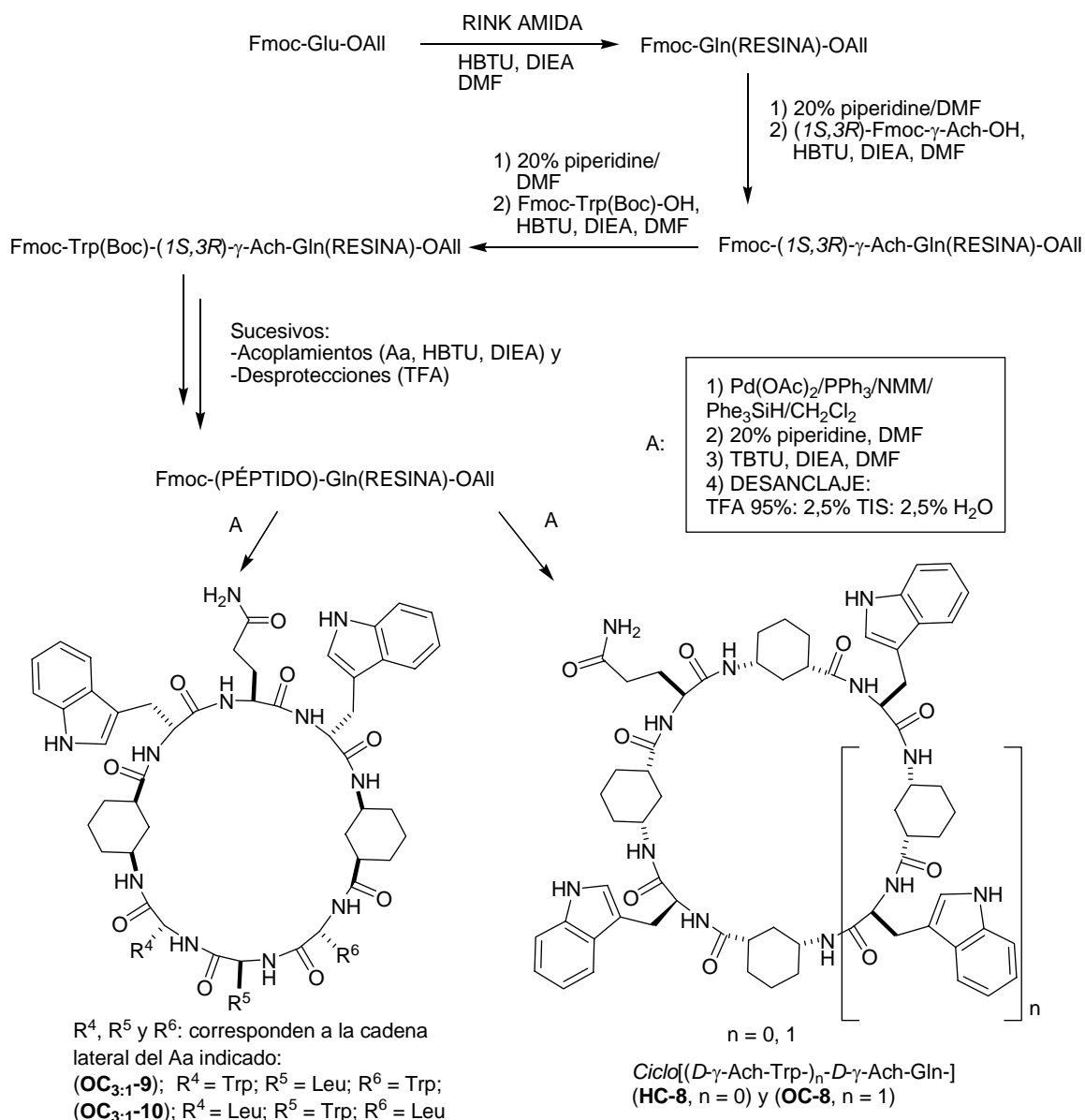


Figura 138: Esquema seguido en la síntesis de los ciclopeptidos: *ciclo[(D-γ-Ach-L-Trp)<sub>2</sub>-D-γ-Ach-L-Gln-]* (**HC-8**), *ciclo[(D-γ-Ach-L-Trp)<sub>3</sub>-D-γ-Ach-L-Gln-]* (**OC-8**), *ciclo(D-Trp-L-γ-Ach-D-Trp-L-Leu-D-Trp-L-γ-Ach-D-Trp-L-Gln-)* (**OC<sub>3:1-9</sub>**) y *ciclo(D-Trp-L-γ-Ach-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-γ-Ach-D-Trp-L-Gln-)* (**OC<sub>3:1-10</sub>**).

Siguiendo la estrategia anteriormente indicada, y una vez finalizada la síntesis del péptido lineal, se procedió a la ciclación. En primer lugar, se eliminó el grupo alilo empleando un catalizador de Pd (0) en presencia de un nucleófilo. Para ello se preparó una disolución con 1,25 eq de PPh<sub>3</sub>, 10 eq de NMM y 10 eq de fenilsilano; que se desgasificó con corriente de Ar durante 15 min; a continuación se añadió 0,25 eq de Pd(OAc)<sub>2</sub> y la mezcla se vertió sobre la resina, manteniendo durante 15 min adicionales la corriente de Ar. Después de 4 h se lavó la resina con DCM, 2% de DIEA/DMF, 0,5% de sodio dietilditricarbonato y DMF. La desprotección se basó en la formación de un intermedio π-alilo que a continuación sufre el ataque nucleófilo de la NMM.<sup>149</sup>

149) a) Flouzat, C.; Marguerite, F.; Croizet F.; Percebois, M.; Monteil, A.; Combourieu, M. "Solid-phase synthesis of "head-to-side chain" cyclic tripeptides using allyl deprotection" *Tetrahedron Letters*

La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo por tratamiento con 20% de piperidina en DMF. Una vez desprotegidos los extremos N- y C-terminal y realizados los lavados necesarios para eliminar los restos de reactivos, se cicló el péptido usando como agente activante TBTU (5 eq). Transcurridas 24 h y comprobado mediante el test de Kaiser que no quedaban grupos amino libres, se lavó la resina con DMF, DCM y finalmente con éter.

El péptido se separó de la resina mediante el tratamiento con una mezcla de TFA, H<sub>2</sub>O y TIS (95:2,5:2,5) durante 1 h. Tras este tiempo, se filtró y la resina se lavó con TFA. Finalmente se concentró la mayor parte del TFA, y se precipitó el péptido con éter y se centrifugó eliminando el sobrenadante.

La purificación de estos péptidos tampoco fue sencilla, en este caso debido a la alta hidrofobicidad del péptido y a su baja solubilidad en disolventes polares y apolares, por lo que se lavó con H<sub>2</sub>O (3 veces), después con MeCN (3 veces) y finalmente con éter (3 veces). Cada lavado consistió en la sonicación de la suspensión durante 1 min; y posteriormente, la suspensión resultante se centrifugó y se eliminó el sobrenadante por decantación. Al final, los péptidos presentaban la pureza suficiente como para realizar los estudios de transporte.

La caracterización del crudo mediante MS y RMN de la muestra nos permitió confirmar la presencia de los ciclopéptidos. Los <sup>1</sup>H RMN se realizaron en DMSO, uno de los disolventes en el que son solubles estos péptidos, y en el que se pudieron observar como señales más características las correspondientes a los NH del indol (10,7 ppm), los protones aromáticos y los NH de las amidas (8,4-6,7 ppm), así como los H $\alpha$  de los  $\alpha$ -Aa y los H $\gamma$  de los  $\gamma$ -Ach (capítulo 11).

---

1997, 38, 1191-1194. b) Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. "Preparation of "side-chain-to-side-chain" cyclic peptides by Allyl and Alloc strategy: potential for library synthesis" *Journal of Peptide Research* 2001, 57, 250-256.

## 8.1 ESTUDIOS DE TRANSPORTE

Los estudios de transporte de iones se llevaron a cabo utilizando técnicas de electrofisiología.<sup>150</sup> A continuación describimos el material y el procedimiento empleados en estos experimentos.

El equipo consta de una caja de Faraday donde se encuentra la celda con la disolución salina, los lípidos, la muestra a estudiar y el generador de voltaje, a parte de otros elementos que más adelante detallaremos. También se compone de un amplificador de corriente para poder detectar y medir la pequeña corriente (milivoltios y picoamperios), de un ordenador donde se almacenan los datos del experimento y de una “interface” que transforma los datos analógicos procedentes del amplificador en señales digitales para el ordenador.

Con esta técnica, se estudia el paso de iones a través de las membranas lipídicas como consecuencia de la diferencia de voltaje que se aplica a ambos lados de la bicapa lipídica que separa las dos cubetas de la celda (figura 139). Según la caracterización de este transporte, éste se puede relacionar con la presencia de conductos o canales. Esta técnica permite identificar y estudiar una única molécula (canal iónico) gracias a sus propiedades transportadoras. Es además de una gran importancia biológica, ya que permite esclarecer el mecanismo de transporte de algunas proteínas de membrana.<sup>151</sup>

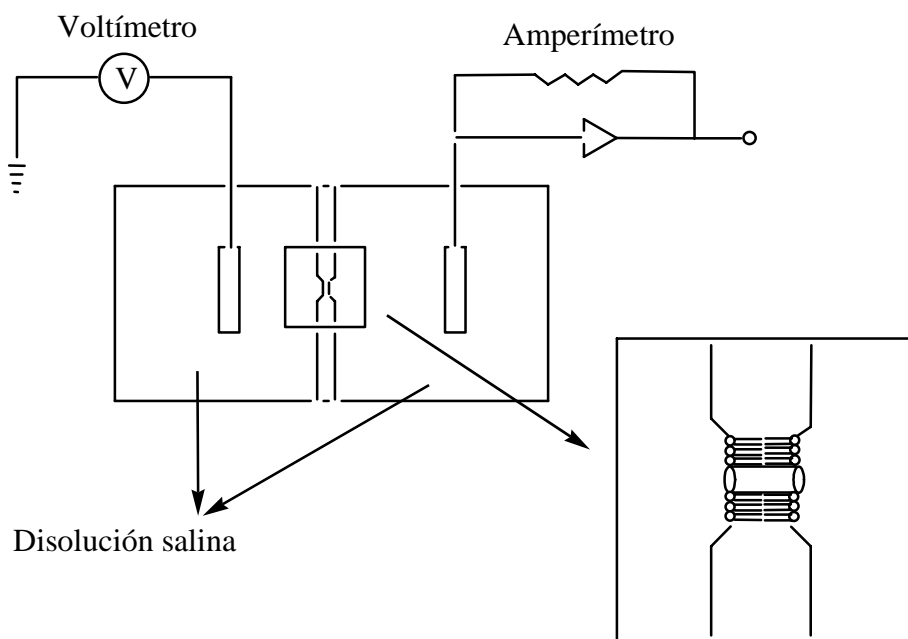


Figura 139: Esquema de un equipo de electrofisiología.

La técnica de patch clamp consiste en el aislamiento de una pequeña área de una membrana biológica en una micropipeta, para poder así estudiarla en detalle. Cuando en esta área queda aislada una proteína de transporte, ésta se puede investigar a través de técnicas de electrofisiología. Esta técnica ha contribuido al conocimiento de la fisiología

150) Aidley, D. J.; Stanfield, P. R. “Ion Channels Molecules in Action” Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1996.

151) a) Hille, B. “Ionic Channels of Excitable Membranes” 2<sup>a</sup> ed.; Sinauer: Sunderland, MA, 1992.  
 b) Lienhard, G. E.; Slot, J. W.; Mueckler, M. M. “How cells absorb glucose” *Scientific American* **1992**, 266, 86-91.

de las membranas. El estudio de las bicapas lipídicas planares constituye otra estrategia para el estudio de los fenómenos de transporte de las proteínas de membrana, en la que se utiliza un único tipo de lípidos, estas técnicas se denominan en general como electrofisiología.<sup>152</sup>

El principio de esta técnica se basa en que las membranas fosfolipídicas actúan como aislantes y así, cuando entre ambos lados de la bicapa lipídica se genera una pequeña diferencia de potencial (generalmente inferior a 200 mV), no se produce el paso de corriente eléctrica. Cuando existe un conducto por el que pueden pasar iones, la diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana obliga a éstos a migrar de un lado a otro en respuesta a esta diferencia de potencial. Este flujo de iones se detecta en el medidor (amplificador) de corriente. La intensidad de este transporte es por tanto proporcional al número de iones que pasan por unidad de tiempo (la relación de estos equipos hoy en día es de 1 ms).

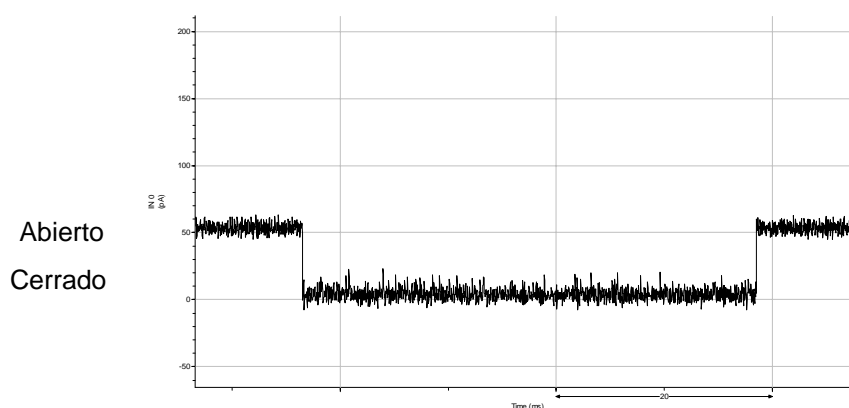


Figura 140: La apertura del canal implica un paso de corriente, mientras que su cierre supone que no hay paso de corriente.

Los diagramas de transporte representan las intensidades de la corriente (pA) frente al tiempo, mostrando éstos diferentes eventos (cualquier cambio en el paso de corriente): si no existe corriente significa que el canal está cerrado (los valores de los eventos son próximos a 0 pA), mientras que cuando éste se abre, se producen pequeñas corrientes mediadas en pA. Generalmente, esta apertura de la señal posee un valor constante, ya que el número de iones que deja pasar esa especie es también constante. Según la ecuación de Ohm, la resistencia de un poro es proporcional a su longitud e inversamente proporcional al radio del canal. Por ello, poros de mayor tamaño dan lugar a un mayor transporte, y poros de mayor longitud, a un menor transporte.

152) a) Neher, E.; Sakman, B.; "Singel channel recording" Plenum Press, New York, 1983. b) Hanke, W.; Schlue, W. -R.; "Planar lipid bilayer. Method and applications" Academic Press, London, 1992.

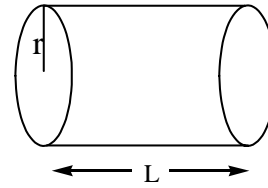
Ecuación de Ohm:

$$I = g E$$

$$E = I R$$

$$I = \rho L/A$$

$$R_{\text{poro}} = \rho L/(\pi a^2)$$



E: potencial

I: intensidad

g : conductancia

R: resistencia

$\rho$ : resistividad

L: longitud

A: área

a: radio del poro

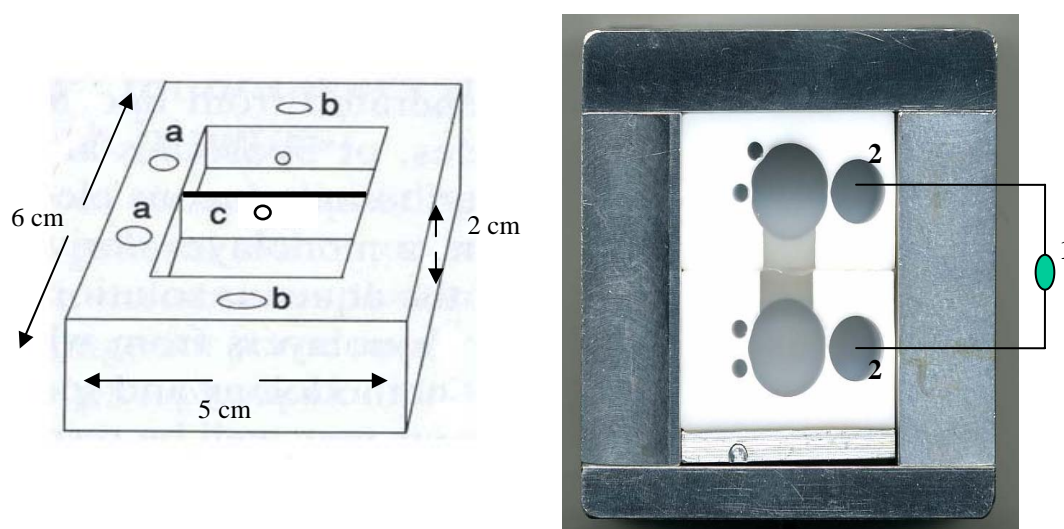
La ecuación de electrodifusión de Nerst-Planck<sup>153</sup> es empleada para correlacionar los niveles de conductancia observados (g) con la longitud del canal (L), donde z es la carga del ion,  $D_+$  y  $D_-$  son los correspondientes coeficientes de difusión, c es la concentración del electrolito, A es el área del canal y F es la constante de Faraday.

$$g = [(z^2 F^2)/(RT)] [(D_+ + D_-)cA/L]$$

Para construir una membrana lipídica se prepara un film de teflón con un agujero generado mediante una descarga eléctrica, que se produce colocando dicho film entre dos electrodos, siendo el tamaño medio del agujero de unos 100  $\mu\text{m}$ . Después, éste se introduce en medio de la celda, separando las dos partes de la misma que quedan comunicadas por el agujero existente en el film (figura 141), y la celda se asegura con un molde de metal para que ambas piezas no se separen.

La celda es el recipiente que contendrá todos los elementos no electrónicos (excepto las terminaciones de los electrodos) necesarios para realizar los experimentos (lípidos, disoluciones salinas, moléculas a estudiar para la formación de canales, etc.). En la celda con el film de teflón agujereado se genera la membrana lipídica. A ambos lados del film se encuentran los dos recipientes con las disoluciones salinas tamponadas requeridas para realizar los experimentos. Además, existen otros dos canales (a y b) a cada lado de la celda, comunicados con el recipiente principal por su parte inferior; la función de (a) consiste en permitir la introducción de los electrodos necesarios para generar el voltaje y medir la corriente eléctrica entre las dos cavidades de la celda; y (b) se usa para formar las membranas lipídicas, retirando y volviendo a introducir la disolución salina, gracias a una micropipeta (figura 142).

153) Hodgkin, A. L.; Katz, B. "The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid" *Journal of physiology* **1949**, *109*, 240-249.



1: Bilayer Model Cell

2: Electrodos

Figura 141: Izquierda: Esquema de una celda donde se realizan los experimentos de transporte. Derecha: Celda empleada en los experimentos de electrofisiología.

Una vez que disponemos de una celda con el film de teflón, se procede a preparar la bicapa lipídica. Para ello, primero se añaden a cada lado del film de teflón  $5 \mu\text{L}$  de una disolución del 10% de hexadecano en pentano y se deja secar unos segundos. De este modo, el lípido se adhiere a la superficie de teflón. Seguidamente, se añaden a cada lado de la celda  $600 \mu\text{L}$  de la disolución salina tamponada a partir de la cual realizamos los experimentos. Sobre esta disolución, adicionamos  $10 \mu\text{L}$  del lípido disuelto en pentano, con el que después generaremos la membrana lipídica. Tras evaporarse el pentano, añadimos otros  $600 \mu\text{L}$  de la disolución salina para completar el volumen de trabajo requerido para esta celda. Finalmente, si se va a agitar la disolución, se introducen unas barritas magnéticas y se conectan los electrodos en los agujeros (a) de la celda, procurando que no quede aire entre la disolución y los electrodos, lo que impediría una buena transmisión de la corriente eléctrica.

Una vez preparada la celda con los electrodos, ésta se introduce en la caja de Faraday y se conectan los electrodos a la Bilayer Model Cell (dispositivo que genera los voltajes y mide las corrientes). Se procede a hacer un balance de los electrodos para que la diferencia entre ellos sea cero y no haya un potencial residual. A continuación, se forma la membrana lipídica retirando e introduciendo lentamente parte de la disolución salina a través de uno de los agujeros de menores dimensiones (b). El volumen retirado debe dejar al descubierto el agujero en el teflón para que así se pueda formar la bicapa lipídica, tal como muestra la figura 141 (este proceso se puede realizar en una o en ambas partes de la celda, comprobándose finalmente la capacitancia de la membrana, esto es, una medida de la calidad de la membrana).

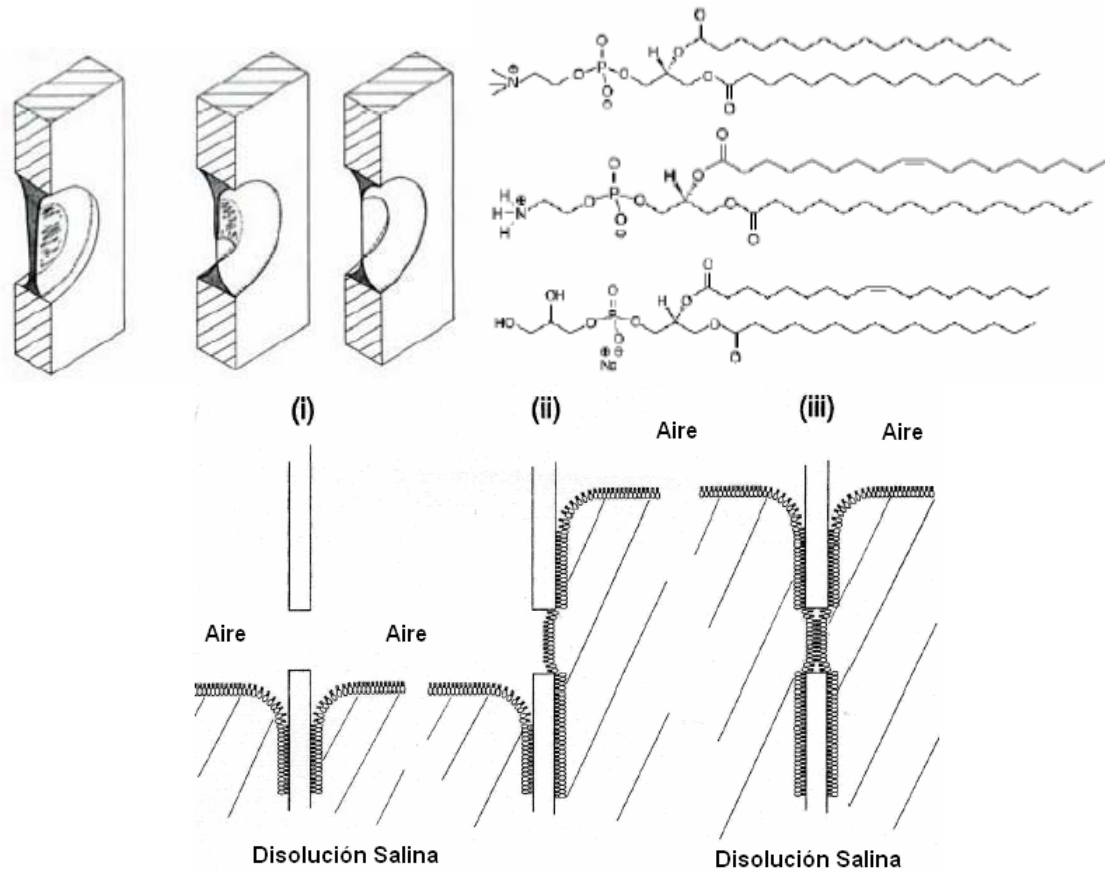


Figura 142: Inferior: Formación de una membrana lipídica. (i) Se retira parte de la disolución sobre la que se ha formado una monocapa en su superficie; y tras volver a añadir la disolución, la bicapa recubre la superficie del teflón y el orificio que separa las dos partes de la celda queda recubierto por la membrana lipídica. Superior izquierda: Esquema de la formación de la membrana lipídica en el agujero del film de teflón. Superior derecha: DPPC = 1,2-Difitanoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina. Medio: POPE = 1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina. POPG = 1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sódico).

Formada la membrana y comprobada su calidad, se añade el péptido o proteína objetivo del estudio. La parte más importante del mismo se basa en la formación de un canal en el orificio que separa ambas celdillas, para lo cual, en algunas ocasiones, es necesario reconstruir las membranas lipídicas. La formación del canal se detecta por la aparición de pequeñas corrientes eléctricas, que dependen de la estructura y de las propiedades de la molécula que transporta los iones.

Los trabajos realizados en el laboratorio del Prof. Hagan Bayley se llevaron a cabo con los péptidos: *ciclo*[(*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Trp-)<sub>2</sub>-*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Gln-] (**HC-8**), *ciclo*[(*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Trp-)<sub>3</sub>-*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Gln-] (**OC-8**), *ciclo*(*D*-Trp-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Trp-*L*-Leu-*D*-Trp-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Trp-*L*-Gln-) (**OC<sub>3:1-9</sub>**) y *ciclo*(*D*-Trp-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Leu-*L*-Trp-*D*-Leu-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Trp-*L*-Gln-) (**OC<sub>3:1-10</sub>**) (figura 138), los cuales fueron diseñados con una estructura altamente hidrofóbica que les permite solubilizarse en membranas lipídicas. La aparición de eventos de transporte de iones nos proporcionaría, en primer lugar, información sobre la formación de nanotubos. La baja solubilidad de los péptidos en disoluciones acuosas nos obligó a utilizar pequeñas proporciones de DMSO. Estas cantidades no podían ser muy grandes, ya que afectaban a las propiedades de la membrana. La cantidad de péptido empleada variaba, ya que se aumentaba cuando no se observaba la aparición de eventos de transporte. Cuando se usaba una cantidad excesiva

de péptido y éste migraba a la membrana, se formaban múltiples canales, o se alteraban las propiedades de la misma.<sup>154</sup>

Esta técnica es por tanto altamente tediosa, pues conlleva la realización de numerosas mediciones y la preparación de múltiples membranas a fin de esperar la formación de un único canal que pueda ser estudiado. Dado que el azar juega un papel tan importante en estas mediciones, en ocasiones se produce un canal al cabo de unos minutos, y en otras no se consigue realizar ningún estudio en toda la jornada.

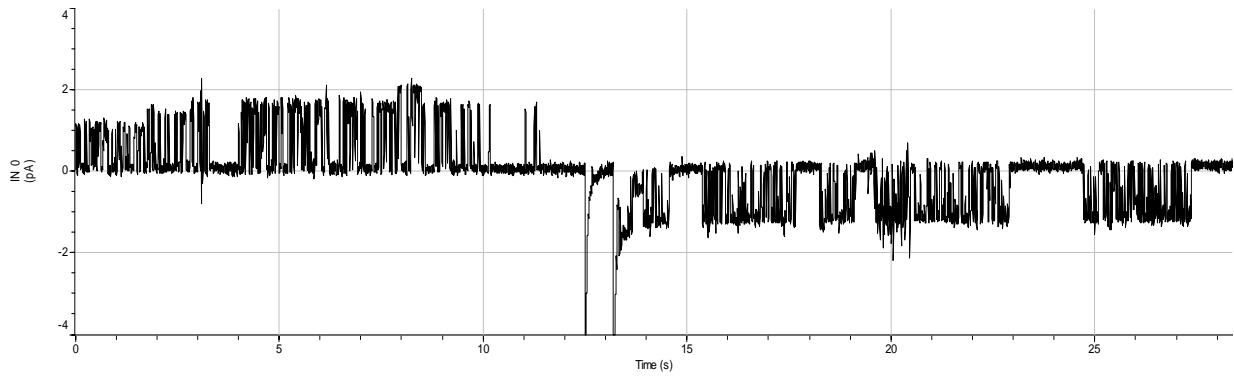
Los experimentos de transporte con los cuatro ciclopéptidos estudiados: (**HC-8**, **OC<sub>3:1-9</sub>**, **OC<sub>3:1-10</sub>** y **OC-8**), en diferentes medios salinos (KCl, NaCl y CsCl 0,5 mM), usando como tampón el MOPS (10 mM a pH 7,5), se llevaron a cabo con diferentes lípidos: DPPC o POPE/POPG 3:1 (figura 142). Dependiendo de los diversos estudios realizados hemos extraído las siguientes conclusiones.

Los ciclopéptidos **HC-8**, **OC<sub>3:1-9</sub>** y **OC<sub>3:1-10</sub>** no mostraron evidencias de la formación de canales. El hexámero **HC-8** parece modificar con gran facilidad las propiedades de la membrana aumentando la permeabilidad de la misma, tal vez debido a la formación de múltiples canales.

El péptido *ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-L-Trp-)<sub>2</sub>-D- $\gamma$ -Ach-L-Gln-]* (**OC-8**) parece autoensamblarse en la membrana lipídica y formar canales comunicando los dos lados de la celda a través de la membrana lipídica. Así, el **OC-8** dio evidencias claras de la formación de canales, siendo capaz de transportar K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>. No es fácil analizar estos datos, ya que los eventos son de una amplitud pequeña (1-5 pA) y duración corta (no superiores a 0,5 segundos). Cada evento implica la formación de un canal y su amplitud y duración en el tiempo dependen del tamaño y las propiedades del mismo (figura 143). Se observa que la amplitud es proporcional al voltaje aplicado, lo cual coincide con un mecanismo de transporte.

---

154) Para la realización de los experimentos, se disolvió 1 mg de péptido en 1 mL de DMSO y 100  $\mu$ L de esta disolución en 1 mL de MeOH; de esta última se añadieron entre 0,5-2,0  $\mu$ L a cada lado de la celda.



Ampliación:

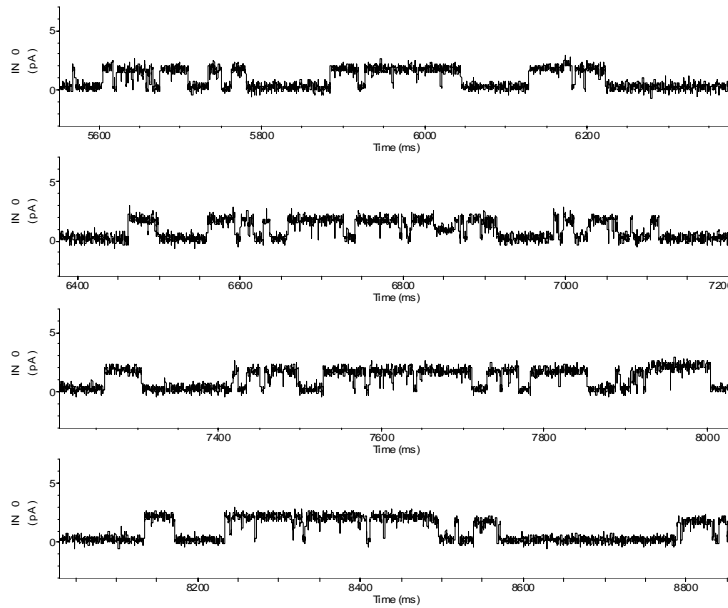


Figura 143: Superior: Electrofisiograma generado por el péptido **OC-8** en una membrana de POPE/POPG 3:1 a +100 mV con una disolución 0,5 M de NaCl (pH 7,5 usando 10 mM MOPS como tampón). Inferior: Ampliación parcial de los datos anteriores para distinguir claramente la apertura y cierre de los canales. (Filtro: Gaussian 100 Hz).

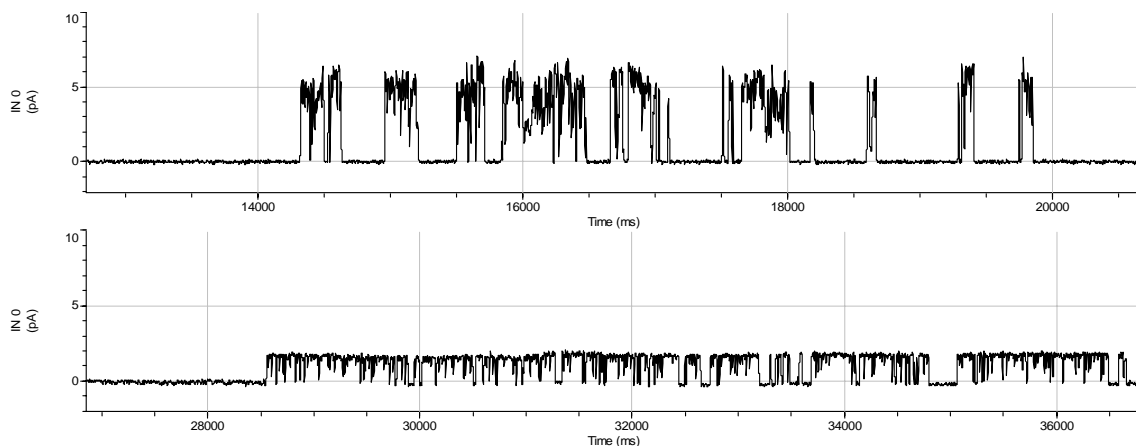


Figura 144: Electrofisiograma del péptido **OC-8** medido a 100 mV. Superior: 0,5 M CsCl e Inferior: 0,5 M NaCl (pH 7,5 usando 10 mM MOPS como tampón; lípido DPPC). Se aprecian diferentes amplitudes, pero éstas son mayores con CsCl. (Filtro: Gaussian 100 Hz).

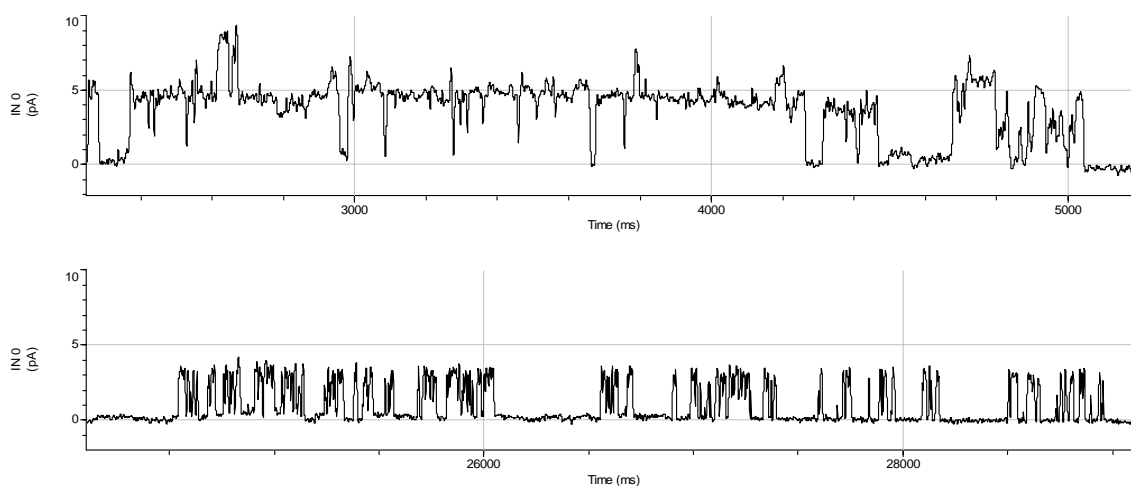


Figura 145: Electrofisiograma del péptido **OC-8** medido a 120 mV. Superior: 0,5 M CsCl (donde se observan eventos que podríamos atribuir a la formación simultánea de dos canales) e Inferior: 0,5 M KCl (pH 7,5 usando 10 mM MOPS como tampón; lípido DPPC). Se aprecian diferentes amplitudes, pero éstas son mayores con CsCl. (Filtro: Gaussian 100 Hz).

Como se puede apreciar en la figura 144, a 100 mV los eventos de transporte son de corta duración, aunque todos ellos de similar amplitud. El mecanismo de apertura y cierre, que se conoce como gating, se debe a las propias características estructurales del nanotubo (figura 143-145). Éstos deben estar formados por entre 8 y 12 subunidades unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno, en los que la presión de la bicapa lipídica puede inducir la disociación y por tanto provocar el cerrado del nanotubo.

Dadas las diferentes constantes de asociación observadas en estos nanotubos, es muy probable que esta disociación se produzca en las interacciones de la cara  $\gamma$ , que parece ser menos fuerte que la cara  $\alpha$  (capítulo 6).

Como se observa en la figura 143, no todos los eventos tienen idéntica longitud. Así, por ejemplo, en 0,5 M KCl a 100 mV, son de: 1,2; 1,4; 1,6 y 1,8 pA. Estas diferentes propiedades se pueden interpretar nuevamente en base a los procesos de asociación y disociación. Así, canales con 8 subunidades presentarían una mayor conductividad, por ejemplo de 1,8 pA frente a los conductos de 10 ó 12 subunidades, precisando que la capacidad para transportar iones es inversamente proporcional a la longitud del conducto.<sup>82</sup>

Los datos obtenidos suponen una conductancia de: [ $\text{Cs}^+ = 25 \text{ pS}$ ;  $\text{K}^+ = 15 \text{ pS}$  y  $\text{Na}^+ = 10 \text{ pS}$ ], lo que representa una velocidad de transporte para los diferentes cationes de: ( $\text{Cs}^+ = 1,5 \times 10^7 \text{ iones s}^{-1}$ ;  $\text{K}^+ = 1,0 \times 10^7 \text{ iones s}^{-1}$  y  $\text{Na}^+ = 0,6 \times 10^7 \text{ iones s}^{-1}$ ). La comparación de esta velocidad de transporte de los diferentes iones a través del canal con los respectivos coeficientes de difusión de los iones hidratados,<sup>155</sup> parece indicar que entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  no hay selectividad, mientras que con  $\text{Cs}^+$  sí parece haberla; ya que la relación entre los coeficientes de difusión es de [ $2,06 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  ( $\text{Cs}^+$ )]/[ $1,33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  ( $\text{Na}^+$ )] = 1,55, mientras que para el transporte de iones es de:

82) a) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. "Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes" *Nature* **1994**, 369, 301-304.

155) Los coeficientes de difusión de los diferentes iones hidratados son:  $\text{Na}^+ = 1,33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ;  $\text{K}^+ = 1,96 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ;  $\text{Cs}^+ = 2,06 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ; (Robinson, R. A.; Stokes, R. H. "Electrolyte Solutions" Butterworths, London, pp 571). [ $1,96 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  ( $\text{Cs}^+$ )]/[ $1,33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  ( $\text{Na}^+$ )] = 1,47; mientras que la relación para el transporte de iones es de: [ $1,0 \times 10^7 \text{ iones s}^{-1}$  ( $\text{Na}^+$ )]/[ $0,6 \times 10^7 \text{ iones s}^{-1}$  ( $\text{Na}^+$ )] = 1,67.

$[1,5 \times 10^7 \text{ iones s}^{-1} (\text{Cs}^+) / [0,6 \times 10^7 \text{ iones s}^{-1} (\text{Na}^+) ] = 2,5$ . Esto implica una relación  $2,5/1,55 = 1,61$ ; lo que supone una selectividad al transporte de  $\text{Cs}^+$ .

Estos datos los relacionamos con el tamaño del ion hidratado de estos cationes, que al ser menor para el  $\text{Cs}^+$  provoca que su transporte sea más eficiente (tabla 7); pero además también puede relacionarse con la capacidad para deshidratar dichos cationes, ya que si tuviésemos en cuenta el tamaño efectivo del canal del octapéptido, unos  $7 \text{ \AA}$ , los iones tendrían que perder parte de su esfera de hidratación para atravesar el nanotubo.

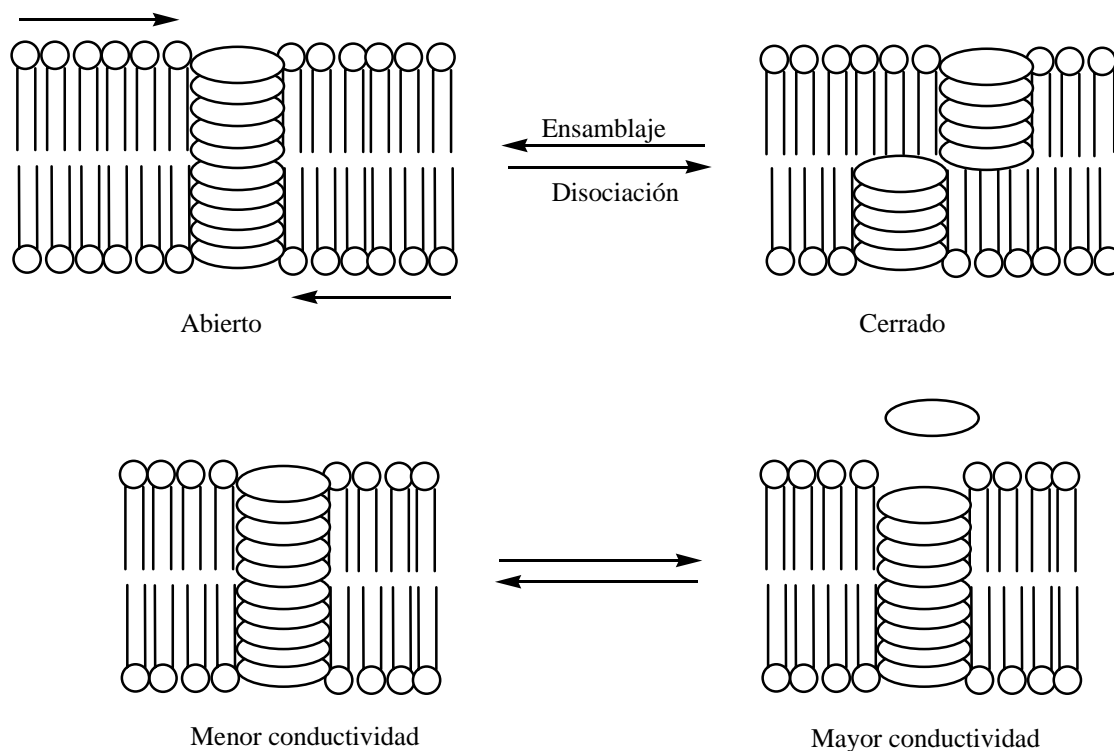


Figura 146: Superior: La apertura y cierre de un canal se conoce como gating; la tensión de la bicapa hace que se ensamble y se rompa el nanotubo. Inferior: El número de unidades (ciclopéptidos) que componen el canal es variable, lo que se traduce en diferentes niveles de conductividad.

La falta de evidencias de transporte para los otros ciclopéptidos encuentra varias posibles explicaciones. Por un lado, el hexapéptido **HC-8** con un diámetro interno de  $4 \text{ \AA}$  no parece muy apropiado para transportar dichos iones. Aunque sí posee un diámetro interno adecuado para transportar iones no hidratados, su cavidad interna presenta un marcado carácter hidrofóbico, y por tanto no parece idóneo para estabilizar el paso de iones, que se verían forzados a perder la esfera de hidratación. Es éste uno de los principios en el que se basan los canales de  $\text{K}^+$  para diferenciar entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .<sup>41,156</sup> Este último pierde con mayor facilidad su esfera de hidratación, debido a que la boca del canal posee un marcado carácter hidrofóbico.

41) Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of  $\text{K}^+$  Conduction and Selectivity" *Science* **1998**, *280*, 69-77.

156) Roux, B.; MacKinnon, R. "The cavity and pore helices ion the KcsA  $\text{K}^+$  channel: electrostatic stabilization of monovalent cations" *Science* **1999**, *285*, 100-102.

Iones	Diámetro hidratado	Diámetro no hidratado
K <sup>+</sup>	> 6,5 Å	> 2,98 Å
Na <sup>+</sup>	> 7 Å	> 2,34 Å
Li <sup>+</sup>	> 7,5 Å	> 1,88 Å
Cs <sup>+</sup>	6,5 Å	> 3,72 Å
Ca <sup>2+</sup>	> 8 Å	> 2,0 Å

Tabla 7: Dimensiones de los cationes más frecuentes, tanto hidratados como deshidratados.

Péptido:	Diámetro interno (dímeros)	Otros canales	Diámetro interno
(OC-) 32 eslabones	6,6 Å	Canales de K <sup>+</sup>	3 Å
(OC <sub>3:1</sub> -) 28 eslabones	4,2 Å	Canales de Na <sup>+</sup>	4 Å
(HC-) 24 eslabones	<= 4,3 Å	Gramidicinas	2-4 Å

Tabla 8: Dimensión del canal de los ciclopeptidos en función de su diseño; y dimensiones de otros canales existentes en la naturaleza.



## **CAPÍTULO 9: $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS ANTIMICROBIANOS**



A pesar de los numerosos descubrimientos de agentes antimicrobianos acaecidos a mediados del siglo pasado -penicilina, macrólidos, vancomicina, etc.- que parecían haber resuelto los problemas infecciosos; en los últimos años han aparecido múltiples microorganismos que son resistentes a uno o a varios tipos de antibióticos.<sup>157</sup> Por ejemplo, la vancomicina es el último recurso hospitalario para infecciones en el riego sanguíneo; sin embargo, ya existen varias cepas de enterococos (VRE) que son resistentes a este tratamiento. Urge pues desarrollar nuevos fármacos antimicrobianos, que posean un modo de acción novedoso que dificulte la aparición de resistencias.

En la naturaleza existen múltiples compuestos con propiedades antimicrobianas como los mencionados, que constituyen defensas naturales contra los microorganismos. Entre estos productos naturales se encuentran los péptidos antimicrobianos,<sup>158</sup> tales como las defensinas, que actúan como primera línea de defensa de los animales contra las infecciones. Estos péptidos presentan generalmente una elevada toxicidad, por lo que no suelen ser utilizados en el interior del organismo multicelular sino en las vías de entrada de los organismos con el fin de prevenir infecciones.<sup>159</sup> Estos péptidos se caracterizan además por poseer una estructura anfipática y catiónica que actúa destruyendo las membranas lipídicas de los microorganismos, matándolas al desestabilizar el potencial electrostático o el gradiente iónico a través de un mecanismo tipo alfombra o mediante la generación de canales.<sup>160</sup>

Un reciente descubrimiento que ha revitalizado este campo lo forman los nanotubos peptídicos basados en ciclopéptidos anfipáticos y catiónicos, lo cual les permite establecer interacciones con las membranas bacterianas, que poseen una elevada proporción de fosfolípidos negativos si las comparamos con las células animales. En este trabajo se ha demostrado que tanto *D,L*-octapéptidos como hexapéptidos constituidos por un conjunto de aminoácidos apolares (3-5) y otros hidrofílicos (3-5), presentan una marcada actividad antimicrobiana, con un MIC (mínima concentración que inhibe el crecimiento bacteriano) en torno a 4  $\mu\text{g/mL}$  y una buena selectividad frente a las células mamíferas ( $\text{LD}_{50}$ ) > 100  $\mu\text{g/mL}$ . Hay que tener en cuenta, además, que los estudios realizados en ratones con estos ciclopéptidos también han demostrado su buena actividad antimicrobiana *in vivo* al poseer un aceptable índice terapéutico.<sup>161</sup>

Los trabajos realizados por el grupo de Ghadiri parecen indicar que la actividad antimicrobiana se debe a la formación de nanotubos, y que éstos se hallan orientados

---

157) a) Neu, H. C. "The crisis in antibiotic resistance" *Science* **1992**, *257*, 1064-1073. b) Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Paged, C. "The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs" *Nature drug discovered* **2002**, *1*, 895-910.

158) Zasloff, M. "Antimicrobial peptides of multicellular organisms" *Nature* **2002**, *415*, 389-395.

159) a) Mor, A. "Peptide-based antibiotics: a potential answer to raging antimicrobial resistance" *Drug Dev. Res.* **2000**, *50*, 440-447. b) Kelly, K. J. "Using host defenses to fight infectious diseases" *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 587-588. c) Hancock, R. E. "Peptide antibiotics" *Lancet* **1997**, *349*, 418-422.

160) Para ver diferentes modos de acción de péptidos antimicrobianos: Huang, H. W. "Action of antimicrobial peptides: two-state model" *Biochemistry* **2000**, *39*, 8347-8352.

161) a) Fernández-López, S.; Kim, H. S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R. Antibacterial agents based on the cyclic *D,L*-peptide architecture. *Nature* **2001**, *412*, 452-455. Ganz, T. "Rings of destruction" *Nature* **2001**, *412*, 392-393. b) Fernandez López, S. "Biological Applications of Peptide Nanotubes" *Tesis Doctoral*, 2001. c) Horne, W. S.; Wiethoff, C. M.; Cui, C.; Wilcoxon, K. M.; Amorín, M.; Ghadiri, M. R.; Nemerow, G. "Antiviral cyclic *D,L*- $\alpha$ -peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections" *Bioorganic and Medical Chemistry* **2005**, *13*, 5145-5153. d) Dartois, V.; Sanchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Dubbelde, C.; Dunn, C.; Granja, J.; Gritzen, C.; Weinberger, D.; Ghadiri, M. R.; Parr, T. R. Jr. "Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 3302-3310.

casi paralelamente a la membrana lipídica; por tanto, su actividad se basa en este mecanismo “tipo alfombra”. Los estudios realizados por el grupo de Ghadiri, parecen indicar que los Aa hidrofílicos son altamente importantes en la selectividad de los ciclopéptidos. Es probable que una contribución significativa de la actividad de los péptidos se deba a las interacciones de los mismos con los sacáridos que recubren las membranas celulares, siendo estas interacciones las que además facilitan la formación del nanotubo. Un papel relevante en esta selectividad lo constituye la posibilidad de conseguir, a partir de un mismo ciclopéptido, una gran variedad de nanotubos (figura 147). Estos fármacos supramoleculares con un gran número de interacciones entre el fármaco y el objetivo molecular darán lugar en un futuro próximo a fármacos más selectivos y eficientes, contra los que además será más difícil desarrollar resistencia.

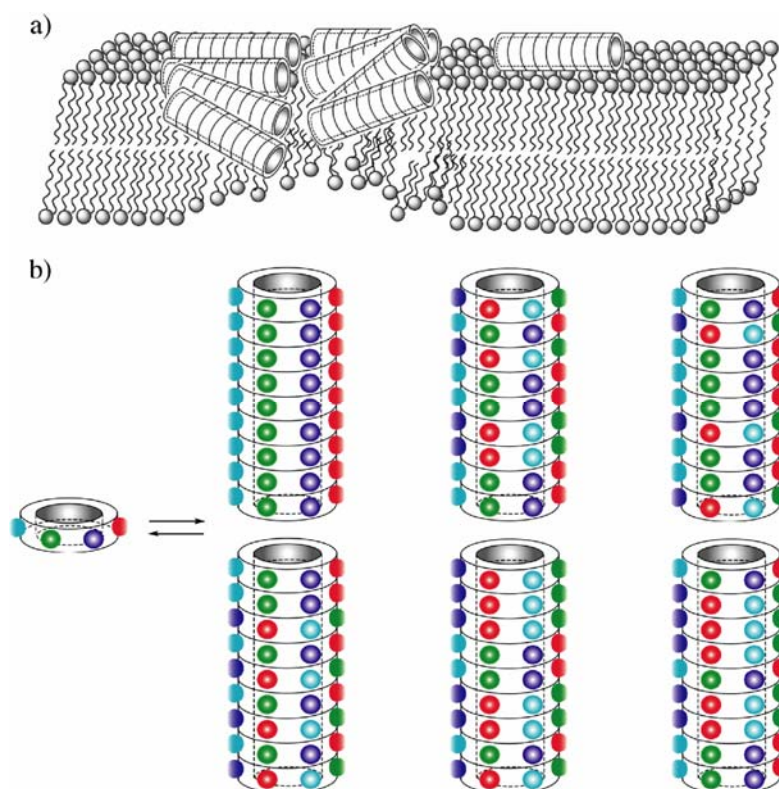


Figura 147: a) Los nanotubos alteran las propiedades de las membranas desestabilizándolas. b) Un ciclopéptido se puede ensamblar con el siguiente péptido enfrentando diferentes cadenas laterales, lo que permite obtener una gran variedad de posibles agentes antimicrobianos.

Basándonos en estos descubrimientos, creímos oportuno preparar una serie de péptidos que poseyesen  $\gamma$ -Aca y cuya secuencia se pareciese a los *D,L*-octapéptidos biológicamente activos, así como estudiar sus propiedades biológicas. Por otra parte, la estrecha relación que nuestro grupo de investigación mantiene con el grupo de Ghadiri, nos ha facilitado el estudio de dichas propiedades. Para ello, se prepararon los péptidos que se muestran en la [tabla 9](#) (página 170), en la que se enumeran ocho distintos, empleando como  $\gamma$ -Aca tres derivados diferentes: el ácido 3-aminociclohexanocarboxílico (Ach), el ácido 3-aminociclopentanocarboxílico (Acp) y la 3-aminoprolina (Apr). Para este estudio llevamos a cabo diversos diseños peptídicos de tipo  $\alpha,\gamma$  (entradas 3 y 4), otros con diseños de tipo  $3\alpha,1\gamma$  (entradas 1, 2, 5 y 6) y finalmente otros

en los que sustituimos un  $\alpha$ -Aa en un octapéptido biológicamente activo por un Acp [entradas 7 (**OC-9**) y 8 (**OC-10**)] en base a la similitud de un  $\gamma$ -Aca con un  $\alpha$ -Aa voluminoso demostrado en los apartados anteriores.

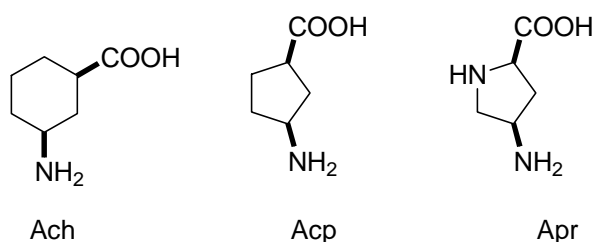


Figura 148:  $\gamma$ -Aca usados en la síntesis de los  $\alpha,\gamma$ -ciclopeptidos con actividad biológica.

Se prepararon hexámeros y octámeros con diferentes Aa hidrofóbicos e hidrofílicos, parte de los cuales poseen grupos catiónicos. De esta forma se prepararon dos hexámeros con tres grupos hidrofóbicos y tres grupos hidrofílicos. En la parte hidrofóbica variamos el número de triptófanos usados: dos en el **HC-9** y uno en el **HC-10**. En ambos casos, los dos péptidos presentan tres aminoácidos catiónicos: el **HC-9** posee dos Lys, y una aminoprolina y el **HC-10** una Lys y dos aminoprolinas.

Con respecto a los octámeros, preparamos péptidos con cinco Aa hidrofóbicos, el **OC<sub>3:1</sub>-11** y el **OC<sub>3:1</sub>-12** (con dos residuos catiónicos de los tres hidrofílicos, entradas 1 y 2), y por último dos ciclopeptidos con únicamente cuatro y tres residuos hidrofóbicos en los que variamos el número de Aa catiónicos: **OC<sub>3:1</sub>-13** (tres catiónicos) y **OC<sub>3:1</sub>-14** (cuatro catiónicos), empleando dos  $\gamma$ -Aca diferentes (un Apr y un Acp por cada uno de ellos).

La síntesis de estos ciclopeptidos se llevó a cabo en fase sólida siguiendo una estrategia Boc/bencilo o bien Fmoc/bencilo como la descrita en los capítulos 7 y 8, en la que los péptidos fueron ciclados en fase sólida y posteriormente separados del soporte sólido. Posteriormente, fueron purificados por HPLC mediante fase reversa y caracterizados por masas (electrospray). Los péptidos liofilizados se disolvieron en (2-4 mM) 5% DMSO en agua (concentraciones de DMSO que no afectan a las distintas cepas de microorganismos).

## 9.1. ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los agentes patógenos elegidos para estudiar fueron: E. Coli, bacteria de doble membrana externa (gram-negativa) causante de problemas intestinales; S. Aureus, bacteria de membrana sencilla (gram-positiva); VRA, bacteria de membrana sencilla (gram-positiva) que es resistente a la vancomicina. MRSA: estafilococos (gram-positiva), resistente a la meticilina; y Bacillus cereus (gram-positiva), modelo de bacilo.<sup>162,163</sup> Dicho cultivo se efectuó durante 24 h a 37 °C con ligera agitación mecánica, con el fin de obtener una concentración de agente patógeno idónea, que después se diluyó para realizar los test con el péptido. Tras los cultivos, se comprobó que el crecimiento fue óptimo mediante un cultivo en placa Petri.

La incubación se llevó a cabo depositando en una placa de 96 pocillos el agente patógeno y añadiendo a cada fila distintas concentraciones de péptido, duplicando la concentración tal como es habitual (2, 4, 8, 16, 32, etc.) (figura 149). Se dejó incubar la mezcla 24 h con ligera agitación mecánica. Trascurrido este tiempo se comprobó si el agente patógeno estaba muerto o vivo. Si estaba muerto, la disolución continuaba incolora; si permanecía vivo y crecía, la disolución se tornaba turbia. Incluso algunos agentes patógenos tiñen la disolución de un color particular (por ejemplo, las pseudomonas dejan un color verde intenso). De esta forma determinamos el MIC (figura 149) a partir del pocillo en el que ya no crecía el patógeno.

En cada pocillo se colocó uno de los péptidos y, para evitar falsos positivos, realizamos por triplicado cada uno de los experimentos. En cada plato depositamos un tipo distinto de agente patógeno.

---

162) Cuando la bacteria posee únicamente una membrana externa (ej. VRA, MRSA, etc.) es más fácil tratar sus efectos, ya que son menos resistentes a los agentes antimicrobianos; mientras que si poseen dos membranas son más resistentes (ej. E. Coli, pseudomonas, etc.), especialmente si el antibiótico tiene un efecto sobre la membrana de la bacteria.

163) Para mayor información sobre estos agentes patógenos, cepas resistentes y diferentes agentes antimicrobianos: Halls, G. "The complete guide to anti-infectives" *Scrip Reports* 1999.



Secuencia	Hemólisis LH50 (µg/mL)	E. Coli 29214	E. Coli 29425	S. Aureus 27853	VRE 29425	MRSA 335912	B. cereus 4342
<i>c</i> -[ <u>K</u> -Apr- <u>K</u> -Acp- <u>W</u> -Acp-] <b>HC-9</b>	>530	64	64	64	64	64	–
<i>c</i> -[Apr- <u>H</u> -Apr- <u>W</u> -Acp- <u>W</u> -] <b>HC-10</b>	>560	64	64	16	32	32	–
<i>c</i> -[Ach- <u>W</u> -L- <u>W</u> -Ach- <u>K</u> -Q- <u>K</u> -] <b>OC<sub>3,1</sub>-11</b>	180	>64	>64	–	16	16	8
<i>c</i> -[Ach- <u>W</u> -L- <u>W</u> -Ach- <u>K</u> -Q- <u>R</u> -] <b>OC<sub>3,1</sub>-12</b>	<b>230</b>	>64	>64	–	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>8</b>
<i>c</i> -[K- <u>S</u> -Apr- <u>K</u> -L- <u>W</u> -Acp- <u>W</u> -] <b>OC<sub>3,1</sub>-13</b>	>530	64	64	16	64	16	–
<i>c</i> -[K- <u>H</u> -Apr- <u>K</u> -S- <u>W</u> -Acp- <u>W</u> -] <b>OC<sub>3,1</sub>-14</b>	>560	64	64	16	32	32	–
<i>c</i> -[ <u>K</u> -S- <u>K</u> -K- <u>F</u> -Acp- <u>F</u> -L] <b>OC-9</b>	>530	64	64	64	64	64	–
<i>c</i> -[K- <u>H</u> -K- <u>H</u> -K- <u>W</u> -Acp- <u>W</u> -] <b>OC-10</b>	>560	32	32	16	64	32	–

Tabla 9: Péptidos sintetizados y sus actividades biológicas frente a diferentes agentes patógenos. Los estudios se realizaron en los laboratorios del Prof. M. R. Ghadiri (*The Scripps Research Institute, La Jolla, CA*) y en los de la compañía: *Adaptive therapeutics*.

Una vez estudiada la actividad biológica de los péptidos como antipatógenos, se analizó su actividad biológica sobre células de mamíferos, es decir, medimos la citotoxicidad, realizando un test de hemólisis. La sangre de un ratón (células estudiadas) es centrifugada y los glóbulos rojos son separados del suero. Después se prepara una disolución de los glóbulos rojos con suero fetal bovino y disolución salina (5%). A éstos se les añaden diferentes concentraciones de péptido y se deja incubar durante 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifuga la muestra y se comprueba el efecto de los péptidos sobre los glóbulos rojos. Si la muestra es rojiza, esto implica que el ciclopéptido ha destruido los glóbulos rojos y que por tanto es tóxico a esa concentración (no es selectivo entre bacteria y células animales); pero si los glóbulos rojos no son destruidos, se confirma la selectividad, ya que los ciclopéptidos no destruyen las células animales. (En la tabla 9 se muestran también los resultados del test de hemólisis). Presentando estos ciclopéptidos buenas selectividades entre células animales y bacterias.

## **CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES**



El objetivo de este trabajo de tesis doctoral consistió en el diseño, síntesis y estudio de las propiedades de ciclopéptidos constituidos por  $\gamma$ -Aa cíclicos como precursores de nanotubos peptídicos, proponiendo el estudio de diversos motivos estructurales, tales como la alternancia de  $\alpha$  y  $\gamma$ -Aa o la combinación de  $3\alpha$  y  $1\gamma$ -Aa. Nuestro primer objetivo fue la síntesis del  $\gamma$ -Aa; por ello propusimos y preparamos el ácido *cis*-3-amicociclohexanocarbónico ópticamente puro.

La caracterización de los nanotubos basados en estos motivos estructurales se abordó utilizando diferentes estrategias, tales como: el estudio en disolución de diferentes ciclopéptidos diseñados para autoensamblarse en dímeros, la formación de  $\alpha,\gamma$ -nanotubos peptídicos en estados sólido y finalmente el estudio de las propiedades transportadoras basadas en canales transmembranosos.

Los primeros estudios los realizamos con ciclopéptidos especialmente diseñados para la formación de dímeros, de tal manera que pudiera analizarse el proceso de autoensamblaje en disolución y establecerse las bases termodinámicas y estructurales de los mismos. Nuestros primeros objetivos fueron hexapéptidos (anillos de 24 eslabones) en los que se alternaban los  $\alpha$  y  $\gamma$ -aminoácidos, con el fin de estudiar los dos tipos de interacciones presentes en estos nanotubos ( $\alpha$ - $\alpha$  ó  $\gamma$ - $\gamma$ ). Las interacciones  $\gamma$ - $\gamma$  se estudiaron con ciclopéptidos en los que los protones amida de los  $\alpha$ -aminoácidos se sustituyen por grupos metilo; de igual modo, las interacciones  $\alpha$ - $\alpha$  las estudiamos mediante ciclopéptidos con  $\gamma$ -aminoácidos N-metilados, mostrando éstos últimos una elevada constante de asociación ( $K_a > 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), mientras que la interacción entre los  $\gamma$ -aminoácidos es menor ( $10^2 \text{ M}^{-1}$ ) aunque comparable a la observada para los *D,L*-ciclooctapéptidos de Ghadiri. Los dímeros se caracterizaron mediante técnicas de RMN, IR y rayos X. Resultados similares se obtuvieron con la expansión del anillo a ciclooctapéptidos (anillos de 32 eslabones), resultando la interacción  $\gamma$ - $\gamma$  más débil que la interacción  $\alpha$ - $\alpha$ . La utilización de otros  $\alpha$ -Aa (con diferentes cadenas laterales) en los  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos que dan lugar a dímeros que interactúan a través de sus caras  $\alpha$  no modifica de modo significativo ni la estructura ni la elevada constante de asociación. Los ciclotetrapéptidos, diseñados para interactuar a través de sus caras  $\gamma$ , no forman dímeros, mientras que los ciclopéptidos diseñados para generar interacciones  $\alpha$ - $\alpha$ , poseen una constante de asociación débil, pero lo relevante es la existencia del dímero.

Esta menor constante de asociación entre las interacciones  $\gamma$ - $\gamma$  frente a las interacciones  $\alpha$ - $\alpha$  la atribuimos a diferentes factores. A la menor polaridad de los enlaces N-H de los  $\gamma$ -Ach debido a la mayor distancia del grupo carboxilo que ejerce un mayor efecto inductivo en los  $\alpha$ -Aa. Además, la posición del grupo metilo en los nitrógenos de la Ala puede desestabilizar la conformación plana del anillo por repulsiones estéricas con el carboxilo y la cadena lateral.

Otros motivos estructurales como los ( $3\alpha,1\gamma$ )-ciclopéptidos confirmaron la capacidad de estos ciclopéptidos para autoensamblarse en dímeros de hoja plegada  $\beta$  antiparalela, y por tanto, que estos ciclopéptidos compuestos por  $3\alpha$  por cada  $\gamma$ -Aa con la quiralidad adecuada pueden dar lugar a nanotubos en los que dos unidades metilénicas del anillo (C2) del ciclohexilo quedan orientadas hacia el interior de la cavidad. Todos estos estudios confirman la predisposición de estos ciclopéptidos para formar nanotubos peptídicos con diferente tamaño y propiedades en el interior de la cavidad.

También se demostró la formación de los dos tipos de interacciones presentes en estos nanotubos mediante el estudio con dímeros. Es de destacar, en este caso, el gran efecto que tiene la presencia de los grupos metilo tanto en el proceso de autoensamblaje como en la conformación predominante del ciclopéptido.

La segunda estrategia abordada consistió en la formación de nanotubos derivados de  $\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos en estado sólido. Para ello diseñamos hexa- y octapéptidos formados por Gln y  $\gamma$ -Ach que, una vez disueltos en medios fuertemente ácidos y tratados de forma controlada con disolución ACN/H<sub>2</sub>O, dan lugar a microcristales cuyo estudio sugiere que están formados por la asociación de nanotubos peptídicos.

Un tercer aspecto que decidimos abordar en esta tesis fue el diseño de péptidos hidrofóbicos que diesen lugar a nanotubos en las bicapas lipídicas, así como su capacidad para transportar iones. El estudio realizado en los laboratorios del Prof. Hagan Bayley sugiere que el octapéptido: *ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-L-Trp)<sub>3</sub>-D- $\gamma$ -Ach-L-Gln]* (**OC-8**) es capaz de dar lugar a nanotubos de membrana y desarrollar un transporte de iones alcalinos de forma altamente eficiente, mostrando además una aparente selectividad por el Cs<sup>+</sup> frente a K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>.

Por último, dados los precedentes de los *D,L*-ciclopéptidos como antimicrobianos, estudiamos distintos ciclopéptidos que contienen ácidos *cis*-3-aminoalcanocarboxílicos. En dichos estudios se encontró un ciclopéptido con un MIC de 8  $\mu$ g/mL frente a cepas de VRE y Bacilus, confirmando que estos ciclopéptidos pueden ser precursores de novedosos agentes antimicrobianos.

## **CAPÍTULO 11: PARTE EXPERIMENTAL**



## 11.1. GENERAL

Los reactivos HBTU, TBTU, HATU, Boc-alanina, fenilalanina, leucina, serina y N-metilalanina fueron proporcionados por Novabiochem, Advanced ChemTech o Peptech Corporation. Todos los disolventes ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CCl}_4$ , MeOH, DMF, THF, etc.) son de calidad síntesis o HPLC, utilizándose directamente sin purificación adicional, excepto que se especifique lo contrario. Así el THF fue destilado de sodio/benzofenona bajo argón inmediatamente antes de ser usado. El  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y la piridina usada como disolventes fueron destiladas de  $\text{CaH}_2$  bajo argón inmediatamente antes de ser usados. La DIEA se destiló en primer lugar de ninhidrina; y a continuación de  $\text{CaH}_2$ , almacenándose sobre tamices moleculares; mientras que la piperidina se destiló solo de  $\text{CaH}_2$ , almacenándose igualmente sobre tamices moleculares.

Los espectros de resonancia magnética de los protones ( $^1\text{H}$  RMN) fueron realizadas en los espectrómetros BRUKER WM-250 (250 MHz), Varian Mercury-300 (300 MHz), Varian INOVA-400 (400 MHz), BRUCKER AMX-500 (500 MHz) y Varian INOVA-750 (750 MHz). Los desplazamientos químicos están referidos a partes por millón (ppm,  $\delta$ ) relativos al tetrametilsilano ( $\delta$  0.00), siendo los disolventes deuterados usados ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CD}_3\text{OH}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$  y  $\text{DMSO-d}_6$ ). La multiplicidad de las señales de  $^1\text{H}$  RMN se designan como singulete (s), doblete (d), triplete (t) o cuádruplete (c) en base a su apariencia y en los casos en que la multiplicidad no estaba clara se designaron como multiplete (m) o sigulete ancho (ancho). Los espectros de resonancia magnética de los carbonos ( $^{13}\text{C}$  RMN) fueron realizadas en los espectrómetros Bruker WM-250 (250 MHz), Varian Mercury-300 (300 MHz) y Varian INOVA-400 (400 MHz); y se asignaron mediante la realización de espectros de “distortionless enhancement by polarization transfer” (DEPT) obtenidos con un ángulo de 135 y los experimentos bidimensionales se realizaron con tiempos de mezcla entre 250-400 ms. Los espectros de masas (EM) fueron realizados usando un Bruker Autoflex MALDI-TOF (matriz: HCCA = dietilditiocarbamato sódico trihidratado) y Micromass Autospec mass spectrometers (FAB y masas de alta resolución, siendo la matriz: disulfuro o tioglicerol). Los datos cristalográficos fueron adquiridos en los equipos: FR591-KappaCCD2000 Bruker-Nonius diffractometer; Bruker X1000 o en un Nonius “MACH3”. FTIR fueron medidos en un espectrofotómetro JASCO FT/IR-400 (espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier) usando concentraciones de 5-10 mM en  $\text{CHCl}_3$  siendo las celdillas de NaCl y en los casos en que los compuestos no eran solubles en  $\text{CHCl}_3$ , se realizaron los espectros depositando las muestras sobre pastillas de  $\text{CaF}_2$  o bien se prepararon pastillas de KBr. Las rotaciones ópticas se midieron en un aparato JASCO.DIP-370 DIGITAL POLARIMETER. Cubeta de 5 cm. Las imágenes de microscopio electrónico se tomaron en un TEM Jeol 200 con rejillas de 400 poros recubiertas con un polímero de celulosa. La columnas cromatográficas se realizaron usando EM Sciealizadas en sílica gel 60 (230-400 mesh) y para las cromatografías en capa fina se emplearon hojas de aluminio y gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck. Como reveladores se usaron luz ultravioleta (254 nm) y ninhidrina (2% en EtOH). Las mezclas de los disolventes para las cromatografías se indican en relaciones v/v. Las purificaciones en el HPLC usando fase reversa se realizaron en una columna C<sub>18</sub> con un gradiente de  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA}$  entre 99:1:0,1 y 10:90:0,1; y las purificaciones en fase normal en el HPLC se realizaron en una phenomenex maxsil-10 silica column con gradientes de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  entre 100:0 y 85:15. Para la síntesis del ácido 3-aminociclohexanocarboxílico se usó un reactor Parr 3915 de capacidad 0,5 L; y éste se purificó en una columna de intercambio iónico

Dowex 50 WX 8 [Nuclear sulfonic cation exchanger. Fine bead. 0,08-0,25 mm (60-170 mesh ASTM) Merck].

Las medidas de patch clamp se realizaron de la forma descrita en el capítulo 8, en el grupo del profesor Hagan Bayley en la Universidad de Oxford, Departamento de Química. Los datos se analizaron usando el programa: **pClamp** 8 y 9. Los datos fueron medidos usando en un amplificador Dagan 3900A integrated patch clamp con un DigiData 1200 series A/D converter. Axon Instruments, Inc. Siendo el lado *cis* de la celda el “ground”. Los datos se salvaron a 5 kHz. Los lípidos usados fueron proporcionados por Avanti Polar Lipids.

**Test de Kaiser:**<sup>146</sup> Para el test de Kaiser cualitativo se usaron tres disoluciones que contienen: a) ninhidrina en n-butanol (500 mg en 10 mL), b) fenol en n-butanol (80 mg en 10 mL) y c) disolución de cianuro (2 mL de KCN 0,01 M en agua llevados a 100 mL con piperidina). Sobre una pequeña porción de resina depositada en un tubo de ensayo, se añadió 1 gota de cada una de las tres disoluciones y la mezcla se calentó en baño de agua caliente durante 5 min. La aparición de color azul en la disolución indica que el acoplamiento no fue completo.

---

146) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. “Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides” *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598. b) Stewart, J. M.; Young, J. D. Eds *Solid phase in peptide synthesis*, 2<sup>nd</sup> edition, Pierce Chemical Company, Rocford, Illinois, 1984.

## 11.2. SÍNTESIS del ácido Boc-3-aminociclohexanocarboxílico y de sus derivados N-metilados

**Ácido del *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico ( $\gamma$ -Ach-OH).** En un reactor Parr de capacidad 0,5 L se añadió la mezcla de *m*-aminobenzoico (11,3 g; 82,5 mmol), NaOH (3,3 g) en 200 mL de H<sub>2</sub>O y Ni Raney (7,0 g). La mezcla resultante se sometió a una presión de 100 atm y se calentó 150 °C durante 4 h; tras este tiempo la presión descendió a 85 atm, observadas por ccf que aún quedaba de sustancia de partida sin reaccionar, por lo que se volvió a recargar con H<sub>2</sub> hasta las 100 atm y la reacción se mantuvo a 150 °C durante 8 h adicionales. Tras enfriar y liberar la presión la mezcla se filtró sobre celita, se acidificó a pH 2 con HCl 10% y se concentró para dar una mezcla que contenía el aminoácido y sales. A continuación la mezcla se pasó a través de una columna de intercambio iónico. Eliminando las sales en una columna Dowex 50 WX 8 con una disolución de piridina 1 M, obteniéndose 9,73 g de sólido blanco que se identificó como el ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico. [80%, *R<sub>f</sub>* 0,48 (MeOH; revelador: UV y ninhidrina)]. <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 250 MHz,  $\delta$ ): 3,04 (m, 1H, H $\gamma$ ); 2,20-1,70 (5H, ciclohexilo) y 1,3-0,9 (m, 4H, ciclohexilo).

**Ácido (*1R,3S*)-N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico (*L*-Boc- $\gamma$ -Ach-OH).** En un balón de fondo redondo preparamos una disolución del ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico (4,0 g; 28 mmol) en H<sub>2</sub>O (25 mL) y dioxano (25 mL), se le añadió Boc<sub>2</sub>O (7,0 g; 32 mmol) y DIEA (14,7 mL; 84 mmol). Después de 3 h agitando a temperatura ambiente, se acidificó a pH 2 y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se concentraron a presión reducida y el aceite resultante se cristalizó de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /hexano (2:1) para dar 3,4 g del ácido *cis*-N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico [80 %, *R<sub>f</sub>* 0,85 (MeOH; revelador: UV y ninhidrina), Fp 136-138 °C].

Una disolución del **Ácido N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico** (0,85 g; 3,5 mmol) en CHCl<sub>3</sub> (12 mL) se trató con (+)*R*-1-feniletanamina (0,41 mL; 0,047 mmol). A continuación se añadió hexano (6 mL) y la mezcla se dejó cristalizar durante 6 días. Los cristales se filtraron y se lavaron con hexano (3 x 5 mL), después se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavaron con ácido cítrico (5%, 3 x 10 mL) hasta que ya no se observó la señal de la feniletanamina en ccf. Las fases orgánicas se secaron y concentraron dando un sólido blanco, cuya pureza enantiomérica se determinó mediante su rotación óptica. Las porciones cuya rotación óptica fue inferior a 47 se volvieron a someter a una nueva cristalización. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 5,56 (m, 1H, NH), 4,47 (m, 1H, H $\gamma$ ); 3,44 (m, 1H, H $\alpha$ ); 2,40-0,90 (8H, ciclohexilo); 1,42 (s, 9H, Boc). <sup>13</sup>C RMN (CD<sub>3</sub>OD, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 178,7 (C=O); 157,6 (C=O); 79,8 (C Boc); 50,2 (CH $\gamma$ ); 43,5 (CH $\alpha$ ); 36,5 (CH<sub>2</sub>); 33,4 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>); 28,9 (CH<sub>3</sub> Boc); 25,4 (CH<sub>2</sub>). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 487 ([M<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, 17%); 387 ([M<sub>2</sub>H-Boc]<sup>+</sup>, 18%); 244 ([MH]<sup>+</sup>, 66); 188 ([MH-CH<sub>2</sub>=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 94); 144 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -50,5 (c, 1 en MeOH).<sup>164</sup> **Análisis Encontrado:** Calculado: C= 58,99%; H= 8,68%; N= 5,73%.

164) La configuración absoluta se confirmó por desprotección del grupo amino con TFA para dar el ácido (*1R,3S*)-3-aminociclohexanocarboxílico y la rotación óptica se midió [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -5,4 (c,1 en H<sub>2</sub>O), (lit. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -5,0 (c, 1 en H<sub>2</sub>O): Allan, R. D.; Johnston, G. A.; Twitchin, B. "Synthesis of Analogues of *cis*-3-Aminocyclohexanecarboxylic Acid" *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 2231-2236.

Experimental: C= 58,13%; H= 9,032%; N= 5,747%. “**E.M. (FAB<sup>+</sup>)** [*m/z* (%)]: 244 ([MH]<sup>+</sup>, 66); 144 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +49,8 (c, 1 en MeOH).<sup>165</sup>”

**Ácido (1*R*,3*S*)-N-Boc-3-amino-N-Metilciclohexanocarboxílico (L-Boc-MeN- $\gamma$ -Ach-OH).** Una disolución del L-Boc- $\gamma$ -Ach-OH (1,38 g; 5,68 mmol) en THF seco (50 mL) a 0 °C se trató con NaH (0,68 g; 60% en aceite mineral; 17,1 mmol) y la mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 30 min, y a continuación se añadió MeI (1,06 mL; 17,1 mmol). Después de 12 h a temperatura ambiente, la mezcla se enfrió a 0 °C y se adicionaron otros 3 equivalentes de NaH (0,68 g; 17,1 mmol) y MeI (1,06 mL; 17,1 mmol) y la mezcla se agitó 3 h más. Tras adicionar H<sub>2</sub>O (5 mL), el THF se eliminó a presión reducida y se lavó la fase acuosa con éter (3 x 50 mL). La mezcla se acidificó a pH 3 por adición de HCl (10%) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y concentraron a presión reducida. El crudo se cristalizó de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano para dar el ácido (1*R*,3*S*)-Boc-N-metil-3-aminociclohexanocarboxílico como un sólido blanco [1,29 g; 88,5%, *R<sub>f</sub>* 0,58 (10% MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; revelador: UV y ninhidrina), Fp 141-143 °C]. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 4,01 y 3,77 (m, 1H, H $\gamma$ ); 2,69 (s, 3H, NMeBoc); 2,42 (m, 1H, H $\alpha$ ); 2,00-1,10 (8H, ciclohexilo); 1,42 (s, 9H, Boc). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 180,5 (C=O); 155,6 (C=O); 79,6 (C Boc); 54,0 y 52,6 (CH $\gamma$ ); 42,4 (CH $\alpha$ ); 31,9 (CH<sub>2</sub>); 29,1 (CH<sub>2</sub>); 28,4 (CH<sub>3</sub> Boc); 28,2 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,0 (CH<sub>2</sub>); 24,4 (CH<sub>2</sub>). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -51,7 (c, 1 en MeOH). **E.M. (FAB<sup>+</sup>)** [*m/z* (%)]: 515 ([2MH]<sup>+</sup>, 6); 258 ([MH]<sup>+</sup>, 78); 158 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 258,17053; **experimental:** 258,17042.

**Boc-3-(((9H-fluoren-9-ilo)metoxi)carbonil)ciclohexilmetilcarbamato (L-Boc-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm).** Una disolución de L-Boc- $\gamma$ -MeN-Ach-OH (100 mg; 0,389 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 mL; 40 mM) se trató con EDC (112 mg; 0,584 mmol), HOBt (079 mg; 0,584 mmol), 9-fluorenilmetanol (0,092 g; 0,467 mmol) y DMAP (71  $\mu$ L; 0,584 mmol). Después de 1 h agitando a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico (5%, 3 x 10 mL) y NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentraron a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante una columna rápida de gel de sílice (50% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar L-Boc-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm como un aceite amarillo [143,9 mg; 85%, *R<sub>f</sub>* 0,95 (10% MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,70 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, Ar Fm); 7,53 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, Ar Fm); 7,38-7,20 (m, 4H, Ar Fm); 4,36 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,14 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, CH Fm); 3,99 y 3,74 (m, 1H, H $\gamma$ ); 2,67 (s, 3H, NMeBoc); 2,43 (m, 1H, H $\alpha$ ); 2,00-1,10 (8H, ciclohexilo); 1,42 (s, 9H, Boc). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 174,9 (C=O); 155,5 (C=O); 143,7 (C Ar); 141,3 (C Ar); 127,7-119,9 (CH Ar); 79,3 (C Boc); 66,6 (CH<sub>2</sub> Fm); 52,7 (CH $\gamma$ , de escasa intensidad debido al característico equilibrio del carbamato o a la relajación de la señal); 46,9 (CH Fm); 42,7 (CH $\alpha$ ); 32,2 (CH<sub>2</sub>); 29,2 (CH<sub>2</sub>); 28,4 (CH<sub>3</sub> Boc); 28,2 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,1 (CH<sub>2</sub>); 24,5 (CH<sub>2</sub>). **E.M. (FAB<sup>+</sup>)** [*m/z* (%)]: 436 ([MH]<sup>+</sup>, 7); 336 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 436,24878; **experimental:** 436,24997.

El (1*S*,3*R*)-Boc-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm se preparó de idéntica forma a la anteriormente descrita para el (1*R*,3*S*)-Boc-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm.

165) La obtención del enantiómero (1*S*,3*R*) del Ácido N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico se realizó a partir del aminoácido recuperado de las aguas madres -de la primera resolución-, empleando la (-)-*S*-1-feniletanamina.

**Ácido (1*R*,3*S*)-N-Fmoc-3-aminociclohexanocarboxílico (L-Fmoc-N- $\gamma$ -Ach-OH).** Una disolución del ácido L-Boc- $\gamma$ -<sup>Me</sup>N-Ach-OH (0,50 g; 2,058 mmol) en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y a continuación se concentró a vacío y se secó a alto vacío durante 2 h. La sal resultante se disolvió en Dioxano/H<sub>2</sub>O (24 mL) y se trató con FmocCl (0,692 g; 2,675 mmol). Después de 15 min se añadió Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (654 mg; 6,174 mmol) y a continuación la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y la disolución resultante se trató con ácido cítrico 5% y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante una columna rápida de gel de sílice (0-5%MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar Fmoc-N- $\gamma$ -Ach-OH como un sólido blanco [0,524 g; 70%; *R<sub>f</sub>* 0,90 (10% MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Fp 187-189 °C]. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz,  $\delta$ ): 7,76 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H, Ar Fm); 7,58 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, Ar Fm); 7,42-7,29 (m, 4H, Ar Fm); 4,86-4,21 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH Fmoc); 3,54 (m, 1H, H $\gamma$ ); 2,46 (m, 1H, H $\alpha$ ); 2,32-0,83 (8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,40 MHz,  $\delta$ ): 178,8 (C=O); 155,6 (C=O); 143,9 (C, Ar); 141,3 (C, Ar); 127,7-120,0 (Ar); 66,5 (CH<sub>2</sub> Fmoc); 49,3 (CH); 47,3 (CH); 41,7 (CH); 35,2 (CH<sub>2</sub>); 32,6 (CH<sub>2</sub>); 28,0 (CH<sub>2</sub>); 24,1 (CH<sub>2</sub>). **E.M.-FAB [m/z (%)]:** 368,1 (MH<sup>+</sup>, 12,4). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]:** 366 ([MH]<sup>+</sup>, 62); 197 ([Fm-OH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 366,17053; **experimental:** 366,17069.

El enantiómero **D-Fmoc- $\gamma$ -Ach-OH** se preparó de idéntica forma a la anteriormente descrita.

### 11.3. SÍNTESIS del ácido N-Boc-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico (N-Boc-2MeAch-OH)

Seguendo el procedimiento descrito para el  $\gamma$ -Ach-OH se sintetizó el (2MeAch-OH) a partir de 3-nitro-2-metilciclohexanocarboxílico (10 g; 0,55 mol), NaOH (3,0 g), H<sub>2</sub>O (180 mL) y Ni Raney (6,5 g) para dar 8,0 g del cloruro (75%). Seguidamente se procedió a su protección (ClH.2MeAch-OH) (2,0 g; 10,42 mmol) con Boc<sub>2</sub>O (2,62 g; 12,0 mmol) y DIEA (5,48 mL; 31,2 mmol) en H<sub>2</sub>O/Dioxano (25 mL). Después de 3 h agitando a temperatura ambiente, se acidificó a pH 2 y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a presión reducida para dar 2,2 g del ácido N-Boc-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico (N-Boc-2MeAch-OH) [80 %, *R<sub>f</sub>* 0,85 (MeOH; revelador: UV y ninhidrina)]. El producto se disolvió en 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se filtró; obteniéndose las aguas madres enriquecidas en **B** y **D** y el sólido enriquecido en **A** y **C**. 0,5 g de la fracción de **B** y **D** se disolvieron en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se dejó en atmósfera de hexano, obteniéndose cristales tras 2-4 días. 0,5 g de la fracción rica en **A** y **D** se disolvieron en MeOH y se dejó en atmósfera de hexano, obteniéndose cristales tras 2-4 días.

**A (cis-trans):** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz,  $\delta$ ): 6,71 (m, 1H, NH); 3,60 (m, 1H, H $\alpha$  NH); 2,63 (m, 1H, H $\alpha$  COOH); 1,72 (m, 1H, H $\alpha$  Me); 1,64-1,18 (6H, ciclohexilo); 1,38 (Boc); 0,87 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, Me). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100,53 MHz,  $\delta$ ): 175,4 (C=O); 155 (C=O); 77,1 (C); 49,9 (CH); 42,9 (CH); 36,4 (CH); 29,2 (CH<sub>2</sub>); 28,1 (Boc); 25,3 (CH<sub>2</sub>); 20,1 (CH<sub>2</sub>); 14,7 (CH<sub>3</sub>).

**B (trans-trans):** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 10,6 (m, 1H, COOH); 6,27 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, NH); 4,41 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, H $\alpha$  NH); 3,21-2,98 (3,19) (m, 1H, H $\alpha$  COOH); 2,99 (m, 1H, H $\alpha$  Me); 2,11-1,00 (6H, ciclohexilo); 1,42 (Boc); 0,98 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H, Me). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 180,7 (C=O); 155,6 (C=O); 79,3 (C); 54,0 (CH); 50,4 (CH); 39,6 (CH); 33,5 (CH<sub>2</sub>); 29,5 (CH<sub>2</sub>); 28,4 (Boc); 24,4 (CH<sub>2</sub>); 16,5 (CH<sub>3</sub>).

**C (trans-cis):** <sup>1</sup>H RMN (DMSO, 250 MHz,  $\delta$ ): 6,72 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H, NH); 3,68 (m, 1H, H $\alpha$  NH); 2,32 (2H, H $\alpha$ ); 1,74-1,26 (6H, ciclohexilo); 1,37 (Boc); 0,75 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H, Me). <sup>13</sup>C RMN (DMSO, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 176,8 (C=O); 155,6 (C=O); 77,4 (C); 49,1 (CH); 44,2 (CH); 36,0 (CH); 30,6 (CH<sub>2</sub>); 28,3 (CH<sub>2</sub>); 28,5 (Boc); 19,1 (CH<sub>2</sub>); 15,9 (CH<sub>3</sub>).

**D (cis-cis):** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 4,80 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, NH); 3,66 (d, 1H, H $\alpha$  NH); 2,55 (m, 2H, H $\alpha$  COOH, H $\alpha$  Me); 1,77-1,32 (6H, ciclohexilo); 1,44 (Boc); 0,84 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, Me). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 179,7 (C=O); 155,1 (C=O); 79,3 (C); 51,9 (CH); 45,8 (CH); 33,7 (CH); 28,3 (Boc); 26,5 (CH<sub>2</sub>); 23,2 (CH<sub>2</sub>); 21,1 (CH<sub>2</sub>); 8,2 (CH<sub>3</sub>). **I. E.** [*m/z* (%): 257 ([MH]<sup>+</sup>, 3); 201 ([M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 100); 156 ([M-Boc]<sup>+</sup>, 51).

## 11.4. $\alpha$ -AMINOÁCIDOS

**N-Boc-Alanina de *D*-(9*H*-fluoren-9-ilo)-metilo (*D*-Boc-Ala-OFm).** Una disolución de *D*-Boc-Ala-OH (0,200 g; 1,06 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (25 mL, 42,4 mM) se trató con EDC (0,303 g; 1,59 mmol), HOBt (0,214 g; 1,59 mmol), 9-fluorenilmétanol (249 mg; 1,27 mmol) y DMAP (193 mg; 1,59 mmol). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico (5%, 3 x 25 mL) y NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 3 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentraron a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante una columna rápida de gel de sílice (50% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar *D*-Boc-Ala-OFm como un aceite amarillo [330 mg; 85%, *R<sub>f</sub>* 0,88 (10% MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,72 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, Ar Fm); 7,56 (m, 2H, Ar Fm); 7,72-7,20 (m, 4H, Ar Fm); 5,09 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, NH), 4,43 (m, 3H, H $\alpha$ , CH<sub>2</sub> Fm), 4,17 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, CH Fm), 1,42 (s, 9H, Boc); 1,28 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H, Me Ala). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 173,2 (C=O); 155,0 (C=O); 143,5 (C Ar); 141,2 (C Ar); 127,7-119,9 (CH Ar); 79,8 (C Boc); 66,8 (CH<sub>2</sub> Fm); 49,1 (CH), 46,7 (CH), 28,2 (CH<sub>3</sub> Boc); 18,4 (CH<sub>3</sub> Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 368 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 368,18618; **experimental:** 368,18724.

**N-Boc-N-metilalanina de *L*-(9*H*-fluoren-9-ilo)-metilo (*L*-Boc-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm).** Una disolución de *L*-Boc-<sup>Me</sup>N-Ala-OH (2,000 g; 9,852 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20 mL; 0,50 M) se trató con EDC (2,833 g; 14,778 mmol), HOBt (1,997 g; 14,778 mmol), 9-fluorenilmétanol (2,317 g; 11,822 mmol) y DMAP (1,803 g; 14,778 mmol). Después de 4 h agitando a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico (5%, 3 x 20 mL) y NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentraron a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante una columna rápida de gel de sílice (50% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar *L*-Boc-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm como un aceite amarillo [3,190 g; 85%, *R<sub>f</sub>* 0,85 (10% MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,69 (m, 2H, Ar Fm); 7,53 (m, 2H, Ar Fm); 7,35-7,24 (m, 4H, Ar Fm); 5,22 y 4,90 (m, 1H, H $\alpha$ ); 4,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,13 (m, 1H, CH Fm); 2,76-2,67 (s, 3H, NMe); 1,42 (m, 12H, Me Ala, Boc). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 172,1 (C=O); 155,7 y 154,9 (C=O, se ha desdoblado); 143,5 (C Ar); 141,2 (C Ar); 127,7-119,8 (CH Ar); 79,9 (C Boc); 66,6 (CH<sub>2</sub> Fm); 54,9 y 52,3 (CH $\alpha$ ); 46,7 (CH Fm); 30,8 y 30,1 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,2 (CH<sub>3</sub> Boc); 15,1 y 14,6 (CH<sub>3</sub> Ala). **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +24,7°** (c=1,0 en MeOH). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 382 ([MH]<sup>+</sup>, 37), 179 ([M-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 382,20183; **experimental:** 382,20190.

Enantiómero *D*-Boc-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm se preparó de idéntica forma a la anteriormente descrita para el *L*-Boc-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm.

**N-Boc-fenilalanina de *D*-(9*H*-fluoren-9-ilo)-metilo (*D*-Boc-Phe-OFm).** Una disolución de *D*-Boc-Phe-OH (0,500 g; 1,885 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (30 mL; 62,8 mM) se trató con EDC (0,540 g; 2,828 mmol), HOBt (0,382 g; 2,828 mmol), 9-fluorenilmétanol (0,444 g; 2,828 mmol) y DMAP (0,345 g; 2,828 mmol). Después de 18 h agitando a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico (5%, 3 x 30 mL) y NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante una columna rápida de gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar *D*-Boc-Phe-OFm como un aceite amarillo [0,793 g; 95%, *R<sub>f</sub>* 0,97 (10% MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,72 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, Ar Fm) 7,50 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar Fm); 7,39-7,07 (m, 9H, Ar Fm); 5,07 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, NH); 4,68 (m, 1H, H $\alpha$ ); 4,39 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>

Fm); 4,10 (t,  $J = 6,7$  Hz, 1H, CH Fm); 3,02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Phe); 1,42 (s, 9H, Boc). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 171,7 (C=O); 155,0 (C=O), 143,3 (C Ar); 141,1 (C Ar); 135,9 (C, Ar); 129,1-119,9 (CH Ar); 79,8 (C Boc); 66,9 (CH<sub>2</sub> Fm); 54,4 (CH); 46,5 (CH); 38,1 (CH<sub>2</sub>β Phe); 28,2 (CH<sub>3</sub> Boc). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 444 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 444,21748; **experimental:** 444,21770.

El enantiómero ***L*-Boc-Phe-OFm** se preparó de idéntica forma a la anteriormente descrita para el ***D*-Boc-Phe-OFm**.

## 11.5. SÍNTESIS DE CICLOPÉPTIDOS N-METILADOS

Los ciclopéptidos fueron sintetizados siguiendo la estrategia que se muestra en el figura 68 (capítulo 5), comenzando por los ésteres de los aminoácidos protegidos con Boc y N-metilados, [Boc-MeN-Aa-OFm para los ciclopéptidos precursores de interacciones  $\gamma$ - $\gamma$  y Boc-MeN-Ach-OFm para los ciclopéptidos precursores de interacciones  $\alpha$ - $\alpha$ , (con la estereoquímica adecuada para el correspondiente ciclopéptido)]. Los correspondientes dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, hexapéptidos y octapéptidos fueron sintetizados mediante una síntesis estandar en fase líquida; y los ciclopéptidos finales desprotegidos se ciclaron usando TBTU y DIEA a alta dilución (6-0,6 mM) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los diferentes péptidos intermedios sintetizados en disolución fueron caracterizados por masas y <sup>1</sup>H RMN. Los ciclopéptidos fueron caracterizados por RMN, IR, masas y rayos X.

**Boc-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm.** Una disolución de D-Boc-MeN-Ala-OFm (160 mg; 0,570 mmol) en TFA/DCM (1:1) se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y a continuación se concentró a sequedad en el rotavapor y el residuo se secó a alto vacío durante 2 h. Posteriormente se disolvió en DCM seco (40 mM) y se añadió (1*R*,3*S*)-Boc- $\gamma$ -Ach-OH (138 mg; 0,568 mmol), HATU (229 mg; 0,601 mmol) y DIEA (400  $\mu$ L, 2,280 mmol). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico 5% (3 veces) y con NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 5 x 5 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a presión reducida; y finalmente se purificó mediante una cromatografía rápida en gel de sílice (0-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar 231 mg del mencionado dipéptido (80%, espuma blanca). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz,  $\delta$ ): 7,72 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H, Ar); 7,50 (t,  $J = 9,2$  Hz, 2H, Ar); 7,40-7,23 (m, 4H, Ar); 5,14 (c,  $J = 7,2$  Hz, 1H, H $\alpha$  Ala); 4,68 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, NH); 4,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,12 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H, CH Fm); 3,46 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 2,62 (s, 3H, NMe); 2,44 (m, H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 1,42 (s, 9H, Boc); 1,22 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3H, Me Ala); 2,00-0,80 (8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,40 MHz,  $\delta$ ): 174,6 (C=O); 171,5 (C=O); 155,0 (C=O); 143,4 y 143,2 (C, Ar); 141,2 y 141,1 (C Ar); 127,6-119,7 (CH Ar); 78,8 (C Boc); 66,4 y 65,9 (CH<sub>2</sub> $\beta$  Fm); 54,6 y 51,9 (CH); 48,7 (CH); 46,7 y 46,6 (CH); 39,5 y 39,2 (CH); 35,8 y 35,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 32,8 y 32,6 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 30,9 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,6 y 28,2 (CH<sub>3</sub> Boc); 27,8 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 15,4 y 14,1 (CH<sub>3</sub> Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%)]:** 507 ([MH]<sup>+</sup>, 18); 407 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 507,28590; **experimental:** 507,28780.

**Boc-D- $\gamma$ -Ach-L-MeN-Ala-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-D- $\gamma$ -Ach-L-MeN-Ala-OFm a partir de L-Boc-MeN-Ala-OFm (163 mg; 0,427 mmol) para dar 171 mg del dipéptido deseado (80%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%)]:** 507 ([MH]<sup>+</sup>, 22); 407 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100).

**Boc-D-Phe-L-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm a partir de L-Boc-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm (145 mg; 0,334 mmol) para dar 164 mg del dipéptido deseado (84%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,76 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H, Ar); 7,57 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H, Ar); 7,41-7,16 (m, 9H, Ar); 5,43 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, NH); 4,79 (dd,  $J = 7,8$  y 13,7 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe); 4,47-4,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,18 (dd,  $J = 6,8$  y 13,6 Hz, 1H, CH Fm); 3,25 (m, 1 H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 2,96 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Phe); 2,70 y 2,44 (s, 3H, NMe); 1,86-0,84 (8H, ciclohexilo); 1,42 (9H, Boc). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 174,4 (C=O); 171,1 (C=O); 154,8 (C=O);

143,4 y 143,4 (C, Ar); 141,1 (C Ar); 136,5 y 136,2 (C Ar); 129,3-119,7 (CH Ar); 79,3 y 79,3 (C Boc); 66,8 y 65,8 y 65,6 (CH<sub>2</sub> Fm); 54,9 (CH); 51,7 y 51,3 (CH); 46,8 y 46,7 (CH); 42,4 y 42,1 (CH); 40,4 y 40,1 (CH<sub>2</sub>β Phe); 31,8 y 31,1 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,5 y 29,4 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 28,8 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,1 y 27,2 (CH<sub>3</sub> Boc); 27,8 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,0 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 583 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 483 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 70). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 583,31273; **experimental:** 583,31460.

**Boc-L-Phe-D-MeN-γ-Ach-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-OFm a partir de D-Boc-MeN-γ-Ach-OH (1,336 g; 3,071 mmol) para dar 1,611 g del dipéptido deseado (90%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 583 ([MH]<sup>+</sup>, 69); 483 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100).

**Boc-[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-OFm a partir de D-Boc-MeN-γ-Ach-OFm (1,055 g; 2,425 mmol) para dar 1,290 g del dipéptido deseado (90%) **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 7,71 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, Ar); 7,54 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, Ar); 7,39-7,18 (m, 9H, Ar); 5,51 (m, 1H, NH); 4,85 (m, 1H, Hα Ser); 4,48-4,37 (m, 4H, CH<sub>2</sub> Fm y CH<sub>2</sub> Bn Ser); 4,23 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H, CH Fm); 3,80 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,57 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Ser); 2,86 y 2,78 (s, 3H, NMe); 2,47 (m, 1H, Hα γ-Ach); 2,14-0,83 (8H, ciclohexilo); 1,42 (s, 9H, Boc). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 174,5 y 174,1 (C=O); 170,2 y 170,0 (C=O); 155,0 y 154,9 (C=O); 143,5 (C, Ar); 141,1 (C Ar); 137,6 y 137,3 (C Ar); 128,1-119,8 (CH Ar); 79,5 y 79,5 (C Boc); 73,1 y 73,0 (CH<sub>2</sub>); 71,1 y 70,0 (CH<sub>2</sub>); 65,9 y 65,8 (CH<sub>2</sub>); 54,7 (CH); 51,6 y 51,1 (CH); 50,1 y 49,8 (CH); 49,8 y 46,7 (CH); 42,2 y 42,1 (CH); 32,2 y 31,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,5 y 28,5 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,4 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,2 y 27,6 (CH<sub>3</sub> Boc); 27,6 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,1 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 613 ([MH]<sup>+</sup>, 48); 513 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 613,32776; **experimental:** 613,32607.

**Boc-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-OFm a partir de D-Boc-Phe-OFm (612 mg; 1,38 mmol) y (HBTU, ya que el acoplamiento es sobre una amina primaria), para dar 584 mg del dipéptido deseado (80%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 7,76 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, Ar Fm); 7,52 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H, Ar Fm); 7,40-7,03 (m, 9H, Ar: Fm y Phe); 7,03 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, NH); 4,85 (m, 2H, Hα Ala, Hα Phe); 4,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,15 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, CH Fm); 3,01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,67 (s, 3H, NMe); 1,42 (s, 9H, Boc); 1,29 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, Me Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 171,4 (C=O); 143,4 y 143,3 (C, Ar); 141,3 y 141,2 (C, Ar); 135,6 (C, Ar); 129,1-120,0 (CH Ar); 80,6 (C Boc); 67,1 (CH<sub>2</sub> Fm); 53,0 (CHα); 46,6 (CHα); 37,8 (CH<sub>2</sub> Phe); 29,7 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,3 (CH<sub>3</sub> Boc); 13,5 (CH<sub>3</sub>). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 529 ([MH]<sup>+</sup>, 13); 429 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 529,27025; **experimental:** 529,27035.

**Boc-L-Phe-D-MeN-Ala-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-OFm a partir de D-Boc-MeN-Ala-OFm (172 mg; 0,45 mmol) para dar 213 mg del dipéptido deseado (95%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 7,77 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, Ar); 7,55 (m, 2H, Ar); 7,44-7,21 (m, 9H, Ar); 5,55 (m, 1H, NH); 5,24 y 5,10 (m, 1H, Hα Ala); 4,86 (m, 1H, Hα Phe); 4,46 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,19 (m, 1H, CH Fm); 3,02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,62 y 2,45 (s, 3H, NMe); 1,42 (s, 9H, Boc); 1,13 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H, Me Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 172,9 y 172,0

(C=O); 171,2 (C=O); 155,2 y 154,9 (C=O); 143,5 y 143,3 (C Ar); 141,3 y 141,2 (C Ar); 136,2 (C Ar); 129,5-120,0 (CH Ar); 79,7 (C Boc); 66,9 (CH<sub>2</sub> Fm); 52,7-51,7 (CH); 46,7 (CH); 40,5 y 39,9 (CH<sub>2</sub> Phe); 30,9 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,3 (CH<sub>3</sub> Boc); 14,1 (CH). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]**: 529 ([MH]<sup>+</sup>, 48); 429 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada**: 529,27025; **experimental**: 529,27172.

**Boc-L-Phe-D-Ala-OFm.** Una disolución de *D*-Boc-Ala-OFm (349 mg; 0,95 mmol) en TFA/DCM (1:1) se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y a continuación se concentró a sequedad en el rotavapor y el residuo se secó a alto vacío durante 2 h. Posteriormente se disolvió en DCM seco (40 mM) y se añadió *D*-Boc-Phe-OH (252 mg; 0,95 mmol), HBTU (250 mg; 0,95 mmol) y DIEA (663 μL, 3,80 mmol). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico 5% (3 x 20 mL) y con NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 5 x 5 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a presión reducida; y finalmente se purificó mediante una cromatografía rápida en gel de sílice (0-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar 464 mg del mencionado dipéptido (95%, espuma blanca). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 7,79 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H, Ar); 7,58 (m, 2H, Ar); 7,43-7,24 (m, 9H, Ar); 6,34 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, NH); 5,14 (m, 1H, H<sub>α</sub> Phe); 4,57 (m, 1H, H<sub>α</sub> Ala); 4,48 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,22 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH Fm); 3,08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Phe); 1,42 (s, 9H, Boc); 1,18 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, Me Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 172,4 (C=O); 170,6 (C=O); 155,3 (C=O); 143,4 y 143,1 (C Ar); 141,3 (C Ar); 136,6 (C Ar); 129,2-120,0 (CH Ar); 80,2 (C Boc); 66,9 (CH<sub>2</sub> Fm); 55,7 (CH); 47,9 (CH); 46,7 (CH); 38,7 (CH<sub>2</sub> Phe); 28,2 (CH<sub>3</sub> Boc); 17,9 (CH<sub>3</sub>). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]**: 1029 ([2MH]<sup>+</sup>, 9); 515 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 415 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 75). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada**: 515,25460; **experimental**: 515,25411.

**Boc-L-γ-Ach-D-Ala-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el Boc-L-Phe-D-Ala-OFm a partir de *D*-Boc-Ala-OFm (0,330 mg; 0,90 mmol) para dar 405 mg del dipéptido deseado (100%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ): 7,76 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, Ar); 7,57 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, Ar); 7,43-7,25 (m, 4H, Ar); 5,98 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, NH); 4,57 (m, 1H, H<sub>α</sub> Ala); 4,50 (d, *J* = 6,5 Hz 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,21 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH Fm); 3,46 (m, 1H, H<sub>γ</sub> γ-Ach); 2,10-1,00 (9H, H<sub>α</sub> γ-Ach y ciclohexilo); 1,42 (s, 9H, Boc) y 1,27 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H, Me Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75,40 MHz, δ): 174,3 (C=O); 172,9 (C=O); 155,1 (C=O); 143,5 y 143,2 (C, Ar); 141,3 (C Ar); 127,8-119,9 (CH Ar); 79,2 (C Boc); 66,8 y 65,0 (CH<sub>2</sub> Fm); 48,9 y 47,8 (CH); 46,7 (CH); 43,9 (CH); 38,5 (CH); 36,0 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 32,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 28,3 (CH<sub>3</sub> Boc); 24,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 18,2 (CH<sub>3</sub> Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]**: 493 ([MH]<sup>+</sup>, 25); 393 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada**: 493,27025; **experimental**: 493,27050.

**Boc-[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-Ala-]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-L-γ-Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm a partir de *D*-Boc-<sup>Me</sup>N-Ala-OFm (690 mg; 1,811 mmol) para dar 1,011 g del dipéptido deseado (100%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ): 7,72 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, Ar); 7,52 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, Ar); 7,40-7,17 (m, 13H, Ar); 5,52 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH); 5,26 (dd, *J* = 7,2 y 7,2 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Ala); 4,87 (m, 1H, H<sub>α</sub> Ser); 4,52-4,35 (m, 4H, CH<sub>2</sub> Fm, CH<sub>2</sub> Bn); 4,15 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH Fm); 2,66-3,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 2,81 (s, 3H, NMe); 1,42 (s, 9H, Boc); 1,25 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, Me Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75,40 MHz, δ): 171,1 (C=O); 170,9 (C=O); 154,9 (C=O); 143,4 y 143,3 (C Ar); 141,2 y 141,1 (C Ar); 137,6 (C Ar);

128,2-119,9 (CH Ar); 79,6 (C Boc); 73,1 (CH<sub>2</sub>); 70,9 (CH<sub>2</sub>); 66,7 (CH<sub>2</sub>); 55,0 y 52,3 (CH); 50,1 (CH); 46,6 (CH); 31,3 (CH<sub>3</sub> NMe); 29,4 y 28,2 (CH<sub>3</sub> Boc); 15,6 y 14,1 (CH<sub>3</sub> Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 559 ([MH]<sup>+</sup>, 83); 459 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 559,28081; **experimental:** 559,28186.

**Boc-L-Leu-D-MeN-Ala-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el dipéptido Boc-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-OFm a partir de D-Boc-MeN-Ala-OFm (172 mg; 0,45 mmol) para dar 193 mg del dipéptido deseado (95%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ): 7,77 (m, 2H, Ar); 7,58 (m, 2H, Ar); 7,42 (m, 2H, Ar); 7,35 (m, 2H, Ar); 5,33 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, NH); 5,13 (dd, *J* = 7,3 y 7,2 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Ala); 5,21 y 5,06 (m, 4H, H<sub>α</sub>, Leu; CH<sub>2</sub> Fm, CH Fm); 2,94 (s, 3H, NMe); 1,47-1,35 (3H, CH<sub>β</sub> y CH<sub>γ</sub> Leu); 1,42 (9H, Boc); 1,03-0,85 (d, 9H, Me Ala y Me Leu). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100,53 MHz, δ): 173,4 (C=O); 171,2 (C=O); 155,5 (C=O); 143,6 y 143,4 (C Ar); 141,3 (C Ar); 127,8-120,0 (CH Ar); 79,4 (C Boc); 66,9 (CH<sub>2</sub>); 52,9 (CH); 49,0 (CH); 46,8 (CH); 43,0 (CH<sub>2</sub>); 31,6 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,3 (CH<sub>3</sub> Boc); 24,6; 23,5; 21,9 (CH<sub>3</sub>; CH<sub>3</sub>; CH Leu); 14,4 (CH<sub>3</sub> Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 495 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 395 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 69). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 495,28590; **experimental:** 495,28748.

**Boc-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm.** Una disolución de Boc-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm (966 mg; 1,83 mmol) en TFA/DCM (1:1) se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y a continuación se concentró a sequedad en el rotavapor y el residuo se secó a alto vacío durante 2 h. Posteriormente se disolvió en DCM seco (40 mM) y se añadió D-Boc-Phe-OH (584 mg; 2,20 mmol), HATU (838 mg; 2,20 mmol) y DIEA (1,537 mL; 8,80 mmol). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico (5%, 3 x 5 mL) y con NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 5 x 5 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a presión reducida; y finalmente se purificó mediante una cromatografía rápida en gel de sílice (0-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar 1,162 g del mencionado dipéptido (94%, espuma blanca). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 7,75 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar); 7,51 (m, 2H, Ar); 7,40-7,10 (m, 14H, Ar); 5,41 (m, 1H, NH); 5,24 (m, 1H, H<sub>α</sub> Ala); 4,81 (dd, *J* = 6,9 y 13,9 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Phe); 4,68 (dd, *J* = 6,9 y 13,8 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Phe); 4,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,09 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Fm); 3,00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,46 (s, 3H, NMe); 1,42 (s, 9H, Boc); 1,08 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H, Me Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 676 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 576 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 13). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 676,33866; **experimental:** 676,33962.

**Boc-D-γ-Ach-L-Phe-D-MeN-Ala-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tripéptido Boc-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm a partir de Boc-L-Phe-D-MeN-Ala-OFm (213 mg; 0,40 mmol) para dar 264 mg del tripéptido deseado (100%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 7,75 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, Ar); 7,66-7,17 (m, 11H, Ar); 6,59 y 6,20 (d, *J* = 6,3 Hz, m, 3H, NH); 5,17 (m, 2H, H<sub>α</sub> Ala y Phe); 4,53-4,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,20 (m, 1H, CH Fm); 2,95-2,48 (5H, NMe y CH<sub>2</sub>β Phe); 1,42 (9H, Boc); 2,00-1,00 (d, 8H, ciclohexilo); 1,15 (d, 3H, Me Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 654 ([MH]<sup>+</sup>, 44); 554 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 654,35431; **experimental:** 654,35406.

**Boc-D-MeN-γ-Ach-L-Phe-D-Ala-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tripéptido Boc-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm a partir de Boc-L-Phe-D-Ala-OFm (231 mg; 0,45 mmol) para dar 220 mg del tripéptido deseado (75%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 7,74 (d, 2H, Ar); 7,53 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H, Ar); 7,40-7,16

(m, 9H, Ar); 6,10 (m, 2H, NH); 4,62-4,42 (m, 4H, H $\alpha$  Ala y Phe; CH<sub>2</sub> Fm); 4,17 (m, 1H, CH Fm); 3,01 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 2,79 (s, 3H, NMe); 2,66 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Phe); 2,18 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 1,42 (9H, Boc); 1,78-1,20 (m, 8H, ciclohexilo); 1,11 (d, 3H, Me Ala,  $J = 7,1$  Hz). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%)]:** 654 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 554 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 33). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 654,35431; **experimental:** 654,35376.

**Boc-D-Ala-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tripéptido Boc-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm a partir de Boc-L-MeN- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm (437 mg; 0,864 mmol) para dar 498 mg del tripéptido deseado (100%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,76 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H, Ar); 7,55 (t,  $J = 8,2$  Hz, 2H, Ar); 7,42-7,25 (m, 4H, Ar); 6,24 (m, 1H, NH); 5,15 (c,  $J = 7,3$  Hz, 1H, H $\alpha$  Ala); 4,94 (m, 1H, NH o H $\alpha$  Ala); 4,51 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Fm); 4,17 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H, CH Fm); 4,10 (m, 1H, H $\alpha$  Ala o NH); 3,82 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 2,71 (3H, NMe); 2,56 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 1,42 (9H, Boc); 1,9-1,1 (m, 8H, ciclohexilo, Me Ala); 1,32 (d, 3H,  $J = 7,1$  Hz, Me Ala); 1,27 (d, 3H,  $J = 7,3$  Hz, Me Ala). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%)]:** 578 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 478 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 62). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 578,31854; **experimental:** 578,32022.

**Boc-[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm.** Una disolución de Boc-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm (1,012 g; 2,000 mmol) en TFA/DCM (1:1) se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Después se eliminó el disolvente y el residuo se secó a alto vacío durante 2 h para dar el TFA.H-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm que se usó sin más purificaciones.

Una disolución de Boc-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm (1,012; 2,000 mmol) en 20% piperidina en DCM (5 mL) se agitó durante 30 min y después se concentró en el rotavapor a sequedad. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con ácido cítrico (3-4 veces, hasta la completa eliminación de la piperidina), se seco con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a vacío para dar el Boc-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OH que se usó sin más purificaciones. Este péptido se disolvió en DCM seco (25 mL) se trató sucesivamente con TFA.H-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm, HBTU (758 mg; 2,000 mmol) y DIEA (1,354 mL; 0,800 mmol). Después de 30 min agitando a temperatura ambiente se lavó con ácido cítrico (5%, 3 x 10 mL) y con NaHCO<sub>3</sub> (*dil. sat.* 3 x 10 min). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a presión reducida; y finalmente se purificó por columna cromatográfica (0-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar 1,156 g del mencionado dipéptido (81%, espuma blanca). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%)]:** 717 ([MH]<sup>+</sup>, 42); 617 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 717,42273; **experimental:** 717,42222.

**Boc-[(D- $\gamma$ -Ach-L-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc-[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-D- $\gamma$ -Ach-L-MeN-Ala-OFm (108 mg; 0,33 mmol) para dar 185 mg del tetrapéptido deseado (79%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%)]:** 717 ([MH]<sup>+</sup>, 22%); 617 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100%).

**Boc-[(D-Phe-L-MeN- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc-[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-D-Phe-L-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm (280 mg; 0,481 mmol) para dar 380 mg del tetrapéptido deseado (91%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%)]:** 869 ([MH]<sup>+</sup>, 10); 769 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 869,48532; **experimental:** 869,48466.

**Boc- $\{[L\text{-Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach}]_2\}\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc- $[(L\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala})_2]\text{-OFm}$  a partir de Boc- $[L\text{-Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach}]\text{-OFm}$  (563 mg; 0,968 mmol) para dar 609 mg del tetrapéptido deseado (73%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 929 ([MH]<sup>+</sup>, 54); 829 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 929,50646; **experimental:** 929,50596.

**Boc- $[L\text{-Phe-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-L-Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach}]\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc- $[(L\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala})_2]\text{-OFm}$  a partir de los dipéptidos Boc- $L\text{-Phe-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach}\text{-OFm}$  (387 mg; 0,663 mmol) y Boc- $[L\text{-Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach}]\text{-OFm}$  (392 mg; 0,663 mmol) para dar 477 mg del tetrapéptido deseado (80%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 899 ([MH]<sup>+</sup>, 14); 799 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 899,49589; **experimental:** 899,49656.

**Boc- $L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tripéptido Boc- $D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$  a partir de Boc- $D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$  (562 mg; 0,83 mmol) para dar 638 mg del tetrapéptido deseado (94%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 815 ([MH]<sup>+</sup>, 33); 715 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 815,43838; **experimental:** 815,43647.

**Boc- $[\text{Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-L-Phe-}D\text{-Ala}]\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc- $L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$  a partir de Boc- $D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-L-Phe-}D\text{-Ala}\text{-OFm}$  (294 mg; 0,45 mmol) para dar 295 g del tetrapéptido deseado (79%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 831 ([MH]<sup>+</sup>, 46); 731 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 831,43329; **experimental:** 831,43392.

**Boc- $L\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc- $L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$  a partir de Boc- $D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$  (562 mg; 0,83 mmol) para dar 0,664 mg del tetrapéptido deseado (100%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 801 ([MH]<sup>+</sup>, 30); 701 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 801,41826; **experimental:** 801,41943.

**Boc- $[L\text{-Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}\gamma\text{-Ach-L-Phe-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc- $L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}D\text{-Phe}\text{-OFm}$  a partir de Boc- $D\text{-}\gamma\text{-Ach-L-Phe-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}\text{-OFm}$  (275 mg; 0,41 mmol) para dar 349 mg del tetrapéptido deseado (100%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 831 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 731 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 78). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 831,43329; **experimental:** 831,43323.

**Boc- $[L\text{-Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc- $[(L\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala})_2]\text{-OFm}$  a partir de los dipéptidos Boc- $[L\text{-Ser(Bn)}\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]\text{-OFm}$  (460 mg; 0,823 mmol) y Boc- $L\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}\text{-OFm}$  (417 mg; 0,823 mmol) para dar 655 mg del tetrapéptido deseado (100%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 770 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 670 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 41). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 769,41764; **experimental:** 769,41800.

**Boc- $L\text{-Leu-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}^{\text{Me}}\text{N-D-Ala}\text{-OFm}$ .** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc- $[(L\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala})_2]\text{-OFm}$  a partir de los dipéptidos Boc- $L\text{-Leu-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}\text{-OFm}$  (204 mg; 0,412 mmol) y Boc- $L\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}\text{-OFm}$  (208 mg; 0,412 mmol) para dar 229 mg del tetrapéptido deseado

(72%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 706 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 605 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 29). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 705,42273; **experimental:** 705,42234.

**Boc-[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-Ala-]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm a partir de los dipéptidos Boc-[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala-]-OFm (460 mg; 0,823 mmol) y Boc-L-γ-Ach-D-Ala-OFm (406 mg; 0,823 mmol) para dar 644 mg del tetrapéptido deseado (100%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 755 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 655 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 44). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 755,40200; **experimental:** 755,40272.

**Boc-[L-Ser(Bn)-D-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc-L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm a partir de Boc-D-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-OFm (478 mg; 0,828 mmol) para dar 203 mg del tetrapéptido deseado (33%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 755 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 655 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 49). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 755,40199; **experimental:** 755,40076.

**Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm (353 mg; 0,492 mmol) que se desprotegió con TFA y posterior acoplamiento con el dipéptido correspondiente Boc-L-γ-Ach-D-MeN-Ala-OFm (249 mg; 0,492 mmol) tras su desprotección con piperidina, para dar 376 mg del hexapéptido deseado (82%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 927 ([MH]<sup>+</sup>, 82); 827 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 927,55508; **experimental:** 927,55534.

**Boc-[(D-Phe-L-MeN-γ-Ach)<sub>3</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el hexapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>]-OFm a partir de Boc-[(D-Phe-L-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]-OFm (236 mg; 0,272 mmol) para dar 250 mg del hexapéptido deseado (88%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 1155 ([MH]<sup>+</sup>, 38); 1055 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1155,65262; **experimental:** 1155,65273.

**Boc-{{L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach}<sub>3</sub>}-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el hexapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>]-OFm a partir de Boc-{{L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach}<sub>2</sub>}-OFm (252 mg; 0,272 mmol) para dar 250 mg del hexapéptido deseado (65%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 1246 ([MH]<sup>+</sup>, 37); 1146 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1245,68515; **experimental:** 1245,68696.

**Boc-{{L-Phe-D-MeN-γ-Ach}<sub>2</sub>-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-}-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el hexapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>]-OFm a partir de Boc-[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-]-OFm (551 mg; 0,614 mmol) para dar 581 mg del hexapéptido deseado (80%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 1186 ([MH]<sup>+</sup>, 8); 1086 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1185,66766; **experimental:** 1185,66618.

**Boc-[(D-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>4</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el tetrapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm (352 mg; 0,492 mmol) para dar 512 mg del octapéptido deseado (92%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 1138 ([MH]<sup>+</sup>, 81); 1038 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1137,70002; **experimental:** 1137,69933.

**Boc-[(D-Phe-L-MeN-γ-Ach)<sub>4</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>4</sub>]-OFm a partir de Boc-[(D-Phe-L-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]-OFm (174 mg; 0,200 mmol) para dar 201 mg del octapéptido deseado (73%). **MALDI-TOF (m/z [MNa]<sup>+</sup>):** calculada: 1463,8; **experimental:** 1462,4. Para el **H-(D-Phe-L-MeN-γ-Ach)<sub>4</sub>-OH:** **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]:** 1263 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1162,68307; **experimental:** 1162,68245.

**Boc-{[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>4</sub>}-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>4</sub>]-OFm a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>}-OFm (241 mg; 0,224 mmol) para dar 183 mg del octapéptido deseado (52%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]:** 1562 ([MH]<sup>+</sup>, 20); 1462 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1561,86384; **experimental:** 1561,86563.

**Boc-{[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>}-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>4</sub>]-OFm a partir de Boc-[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]-OFm (477 mg; 0,531 mmol) para dar 541 mg del octapéptido deseado (68%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]:** 1502 ([MH]<sup>+</sup>, 10); 1402 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH-Boc]<sup>+</sup> calculada:** 1402,79364; **experimental:** 1402,79118.

**Boc-[(L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc-[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm (306 mg; 0,374 mmol) para dar 498 mg del octapéptido deseado (100%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]:** 1334 ([MH]<sup>+</sup>, 50); 1234 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1333,72321; **experimental:** 1333,72437.

**Boc-{[Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-L-Phe-D-Ala]<sub>2</sub>}-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc-[(L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-[Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-L-Phe-D-Ala]-OFm (150 mg; 0,181 mmol), para dar 228 mg del octapéptido deseado (92%). **MALDI-TOF [m/z (%)]:** 1387 ([MNa]<sup>+</sup>, 30); 1287 ([MNa-Boc]<sup>+</sup>, 100). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1387,6989; **experimental:** 1387,6973.

**Boc-[(L-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc-[(L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-L-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm (348 mg; 0,433 mmol) para dar 564 mg del octapéptido deseado (100%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]:** 1306 ([MH]<sup>+</sup>, 11); 1206 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1327,6778; **experimental:** 1327,6778.

**Boc-{[L-Ser(Bn)-D-γ-Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>}-OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc-[(L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-OFm a partir de Boc-[L-Ser(Bn)-D-γ-Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]-OFm (174 mg; 0,206 mmol) para dar 290 mg del octapéptido deseado (95%). **MALDI-TOF [m/z (%)]:** 1366 ([MH]<sup>+</sup>, 34); 1266 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1387,6989; **experimental:** 1387,6962.

**Boc- $\{[L\text{-Ser}(\text{Bn})\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]_2\}$ -OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc- $\{[L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-D-Phe}]_2\}$ -OFm a partir de Boc- $[L\text{-Ser}(\text{Bn})\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-}(1R,3S)\text{-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]$ -OFm (420 mg; 0,528 mmol) para dar 543 mg del octapéptido deseado (83%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>)** [*m/z* (%)]: 1242 ([MH]<sup>+</sup>, 61); 1142 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1241,68174; **experimental:** 1241,68279.

**Boc- $\{[L\text{-Leu-D-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]_2\}$ -OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc- $\{[L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-D-Phe}]_2\}$ -OFm a partir de Boc- $[L\text{-Leu-D-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]$ -OFm (145 mg; 0,206 mmol) para dar 27 mg del octapéptido deseado (12%). **MALDI-TOF** [*m/z* (%)]: 1153 ([MK]<sup>+</sup>, 48); 1136 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 1014 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 34). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1135,6778; **experimental:** 1135,6763.

**Boc- $\{[L\text{-Ser}(\text{Bn})\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Ala}]_2\}$ -OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc- $\{[L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-D-Phe}]_2\}$ -OFm a partir de Boc- $[L\text{-Ser}(\text{Bn})\text{-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Ala}]$ -OFm (300 mg; 0,384 mmol) para dar 465 mg del octapéptido deseado (100%). **E.M. (FAB<sup>+</sup>)** [*m/z* (%)]: 1214 ([MH]<sup>+</sup>, 39); 1114 ([MH-Boc]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1213,65044; **experimental:** 1213,65083.

**Boc- $\{[L\text{-Ser}(\text{Bn})\text{-}D\text{-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]_2\}$ -OFm.** Se sintetizó empleando el procedimiento descrito para el octapéptido Boc- $\{[L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-Phe-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ala-D-Phe}]_2\}$ -OFm a partir de Boc- $[L\text{-Ser}(\text{Bn})\text{-}D\text{-Ala-L-}\gamma\text{-Ach-}D\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ala}]$ -OFm (90 mg; 0,119 mmol) para dar 124 mg del octapéptido deseado (87%). **MALDI-TOF** [*m/z* (%)]: 1236 ([MNa]<sup>+</sup>, 45); 1136 ([MNa-Boc]<sup>+</sup>, 100). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1235,6363; **experimental:** 1235,6315.

## 11.6. $\alpha,\gamma$ -CICLOPÉPTIDOS N-METILADOS

### 11.6.1. $\alpha,\gamma$ -Ciclohexapéptidos N-metilados

**Ciclo[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>-] (HC-1).** Una disolución del hexapéptido Boc-[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>]-OFm (101 mg; 0,156 mmol) con 20% piperidina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Tras concentrar en el rotavapor la disolución resultante, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con ácido cítrico al (10%, 3 x 10 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a vacío. El crudo resultante se disolvió en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se eliminó el disolvente y se dejó secar a alto vacío durante 2 h y se procedió a su ciclación sin más purificación. El péptido lineal se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (26 mL) y se trató con TBTU (50 mg; 0,156 mmol) y DIEA (109  $\mu$ L; 0,624 mmol). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo disuelto en 3 mL de 2:1 (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O se purificó por HPLC (C18 columna/CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/0,1% TFA) para dar 68 mg de **HC-1** (69%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,34 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H, NH); 5,26 (c,  $J$  = 7,0 Hz, 1H, H $\alpha$  Ala); 3,70 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 3,12 (s, 3H, NMe); 2,70 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 1,25 (d,  $J$  = 7,0 Hz, 3H, Me Ala); 2,1-1,2 (m, 8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 175,4 (C=O); 170,4 (C=O); 50,9 (CH); 47,4 (CH); 40,1 (CH); 35,0 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 32,4 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 30,6 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 14,6 (CH<sub>3</sub> Me Ala). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3318 (amida A); 2933, 2860, 1669, 1626 (amida I); 1542 cm<sup>-1</sup> (amida II<sub>II</sub>). E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%): 631,3 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup>: calculada: 631,41830; experimental: 631,41750.

**Ciclo[(D-Phe-L-MeN- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>-] (HC-2).** Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **HC-1** a partir de Boc-[(D-Phe-L-MeN- $\gamma$ -Ach)<sub>3</sub>]-OFm (159 mg; 0,181 mmol); para dar, después de la purificación por HPLC (Phenomenex Maxsil 10 silica columna, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 111 mg de **HC-2** (71%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 8,73 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 1H, NH), 7,19 (m, 5H, Ar Phe); 5,32 (c,  $J$  = 6,0 Hz, 1H, H $\alpha$  Phe); 4,56 (s, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 3,2-3,0 (m, 3H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Phe y H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 2,50 (s, 3H, NMe  $\gamma$ -Ach); 1,9-1,2 (m, 8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 175,4 (C=O); 171,7 (C=O); 136,5 (C Ar); 129,3 (CH Ar); 128,3 (CH Ar); 126,9 (CH Ar); 51,3 (CH); 49,5 (CH); 43,1 (CH); 40,5 (CH<sub>2</sub> $\beta$  Phe); 32,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 28,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo y CH<sub>3</sub> NMe); 28,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,8 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3303 (amida A); 2930, 2860, 1665, 1625 (amida I); 1527 (amida II<sub>II</sub>) cm<sup>-1</sup>. E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%): 1718,3 ([2MH]<sup>+</sup>, 13); 859,3 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup>: calculada: 859,51221; experimental: 859,51020.

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach]<sub>3</sub>-} (HC-3).** Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **HC-1** a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach]<sub>3</sub>}-OFm (230 mg; 0,238 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (Phenomenex Maxsil 10 silica columna, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 110 mg de **HC-3** (49 %). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 8,29 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 1H, NH); 7,16 (m, 5H, Ar y Bn); 5,37 (c,  $J$  = 4,7 Hz, 1H, H $\alpha$  Ser); 4,61 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 4,42 (d,  $J$  = 12,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn); 4,28 (d,  $J$  = 12,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn); 3,47 (t,  $J$  = 9,20 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser); 3,48 (t,  $J$  = 9,20 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser); 3,30 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser); 3,02 (s, 3H, NMe  $\gamma$ -Ach); 2,87 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 2,0-1,2 (m, 8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 175,5 (C=O); 171,2 (C=O); 138,0

(C Ar); 128,3 (CH Ar); 127,5 (CH Ar); 127,0 (CH Ar); 72,8 (CH<sub>2</sub>); 70,7 (CH<sub>2</sub>); 51,5 (CH); 47,3 (CH); 43,0 (CH); 32,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 30,0 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 28,4 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3302 (amida A); 2935, 2863, 1665, 1627 (amida I); 1531 (amida II<sub>II</sub>) cm<sup>-1</sup>. **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]**: 1897,8 ([2MH]<sup>+</sup>, 17); 949,6 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup>: calculada**: 948,54419; **experimental**: 948,54125.

**Ciclo[L-Ser-D-MeN-γ-Ach]<sub>3</sub>-] (HC-4)**. Una disolución del péptido **HC-3** (25 mg, 0,026 mmol) en etanol (0,5 ml) se trató con 10% Pd/C (5 mg) y se agitó durante 12 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de H<sub>2</sub>. La mezcla se filtró a través de celita, se lavó con etanol y se concentró a presión reducida, para dar 18 mg de **HC-4** (100%). **<sup>1</sup>H RMN** (MeOH, 250 MHz, δ): 8,16 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH); 4,96 (c, *J* = 6,7 Hz, 1H, Hα Ser); 4,42 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,68-3,47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 2,94 (s, 3H, NMe γ-Ach); 2,54 (m, 1H, Hα γ-Ach); 1,9-1,0 (m, 8H, ciclohexilo). **<sup>13</sup>C RMN** (MeOH, 62,83 MHz, δ): 178,1 (C=O); 172,9 (C=O); 64,1 (CH<sub>2</sub> Ser); 54,0 (CH); 52,8 (CH); 45,6 (CH); 33,6 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 31,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 30,7 (CH<sub>3</sub> NMe); 30,1 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 26,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). **FTIR** (293 K, CaF<sub>2</sub>): 3308 (amida A); 2935, 2866, 1685, 1627 (amida I); 1533 cm<sup>-1</sup> (amida II<sub>II</sub>). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]**: 679,5 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup>: calculada**: 679,40305; **experimental**: 679,40317.

**Ciclo{L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-[L-Phe-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>-} (HC-5)**. Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **HC-1** a partir de Boc-{L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-[L-Phe-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>-}-OFm (188 mg; 0,207 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (Phenomenex Maxsil 10 silica column, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 125 mg de **HC-5** (68%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 8,79-8,24 (dobletes superpuestos, *J* = 9,2 Hz, 3H, NH); 7,20 (m, 15H, Ar Phe y Bn); 5,48-5,21 (m, 3H, Hα Phe y Hα Ser); 4,70-4,24 (m, 3H, Hγ γ-Ach); 3,77-3,63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,15-3,01 (m, 4H, CH<sub>2</sub>β Phe CH<sub>2</sub> Bn); 2,88-2,78 (m, 3H, Hα γ-Ach); 2,51 (s, 9H, NMe γ-Ach); 2,0-1,0 (m, 24H, ciclohexilo). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3303 (amida A); 2934, 2863, 1664, 1627 (amida I); 1529 cm<sup>-1</sup> (amida II<sub>II</sub>). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]**: 1777,8 ([2MH]<sup>+</sup>, 12); 889,4 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup>: calculada**: 889,52277; **experimental**: 889,52190.

**Ciclo[L-Ser-D-MeN-γ-Ach-(L-Phe-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>-] (HC-6)**. Una disolución de **HC-5** (40 mg, 0,045 mmol) en etanol (1 mL) se trató con 10% Pd/C (8 mg) y se agitó durante 12 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de H<sub>2</sub>. La mezcla se filtró a través de celita, se lavó con etanol y se concentró a presión reducida, para dar 36 mg de **HC-6** (100%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz, δ): 8,81-8,59 (m, 2H, NH); 8,36 (d, *J* = 8,5 Hz, 0,26H, NH Phe); 8,31 (d, *J* = 8,7 Hz, 0,26H, NH Phe); 7,92 (d, *J* = 8,1 Hz, 0,47H, NH-Ser); 7,20 (m, 10H, Ar Phe); 5,33 y 5,12 (m, 3H, Hα Phe y Hα Ser); 4,57 (m, 3H, Hγ γ-Ach); 3,90 y 3,75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,11-2,92 (m, 7H, CH<sub>2</sub>β Phe y Hα γ-Ach); 2,52 y 2,48 (s, 9H, NMe γ-Ach); 2,0-1,0 (m, 8H, ciclohexilo). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 175,4 (C=O); 171,8 (C=O); 136,5 (C Ar); 129,3-126,9 (CH Ar). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3303 (amida A); 2928, 2857, 1661, 1624 (amida I); 1525 cm<sup>-1</sup> (amida II<sub>II</sub>). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [m/z (%)]**: 799,3 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup>: calculada**: 799,47582; **experimental**: 799,47647.

### 11.6.2. $\alpha,\gamma$ -Ciclotetrapéptidos N-metilados

**Ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-L-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-] (TC-1).** Una disolución del tetrapéptido Boc-[(D- $\gamma$ -Ach-L-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>2</sub>-]-OFm (100 mg; 0,140 mmol) con 20% piperidina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Tras concentrar en el rotavapor la disolución resultante, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con ácido cítrico al (10%, 3 x 10 mL) se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a vacío. El crudo resultante se disolvió en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se eliminó el disolvente y se dejó secar a alto vacío durante 2 h y se procedió a su ciclación sin más purificación. El péptido lineal resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23 mL, 6 mM) y se trató con TBTU (49,5 mg; 0,154 mmol) y DIEA (97  $\mu$ L; 0,560 mmol). Después de 12 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo disuelto en 3 mL de 2:1 (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O se purificó por HPLC (C18 columna/CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/0,1% TFA) para dar 30 mg de **TC-1** (51%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 5,86 (d,  $J$  = 10,1 Hz, 1H, NH); 5,13 (c,  $J$  = 7,0 Hz, 1H, H $\alpha$  Ala); 3,83 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 2,89 (s, 3H, NMe); 2,63 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 2,00-0,82 (8H, ciclohexilo); 1,27 (d,  $J$  = 7,0 Hz, 3H, Me Ala). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 175,9 (C=O); 170,0 (C=O); 50,5 (CH); 46,5 (CH); 39,2 (CH); 38,9 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 31,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,4 (CH<sub>3</sub> NMe); 26,0 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 23,4 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 12,2 (CH<sub>3</sub> Me Ala). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3366 (amida A); 2943, 2859, 1679, 1621 (amida I); 1522 cm<sup>-1</sup> (amida II). E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%): 421,3 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada: 421,28148; experimental: 421,28246.

**Ciclo[(D-Phe-L-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>-] (TC-2).** Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **HC-1** a partir de Boc-[(D-Phe-L-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>-]-OFm (120 mg, 0,138 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 48,5 mg de **TC-2** (61%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz,  $\delta$ ): 7,27 (m, 5H, Ar); 6,92 (d,  $J$  = 10,0 Hz, 1H, NH); 5,33 (dd,  $J$  = 5,7 Hz 1H, H $\alpha$  Phe); 4,41 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 3,29-3,20 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Phe); 3,00-2,92 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Phe); 2,75 (s, 3H, NMe); 2,47 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 2,00-1,10 (m, 8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz,  $\delta$ ): 175,6 (C=O); 173,0 (C=O); 136,9 (C Ar); 129,0-126,6 (CH Ar); 52,5 (CH); 50,3 (CH); 43,6 (CH); 37,8 (CH<sub>2</sub> Phe); 35,6 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,5 (CH<sub>3</sub> NMe); 28,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 25,4 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 23,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3411 y 3300 (amida A); 2940, 2866, 1673, 1627 (amida I); 1523 (amida II) cm<sup>-1</sup>. E.M. (FAB<sup>+</sup>) [ $m/z$  (%): 573,3 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada: 573,34408; experimental: 573,34390.

Nota: H<sub>2</sub>O a 3,07 ppm.

### 11.6.3. $\alpha,\gamma$ -Ciclooctapéptidos N-metilados

**Ciclo[(L- $\gamma$ -Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>4</sub>-] (OC-1).** Una disolución del octapéptido Boc-[(L- $\gamma$ -Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala)<sub>4</sub>-]-OFm (170 mg; 0,150 mmol) con 20% piperidina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Tras concentrar en el rotavapor la disolución resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con ácido cítrico al (10%, 3 x 10 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a vacío. El crudo resultante se disolvió en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se eliminó el disolvente y se dejó secar a alto vacío durante 2 h

y se procedió a su ciclación sin más purificación. El péptido lineal resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL; 6 mM) y se trató con TBTU (53 mg, 0,165 mmol) y DIEA (105 µL; 0,660 mmol). Después de 12 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se disolvió en 3 mL de 2:1 (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O para ser purificado por HPLC mediante fase reversa (C18 columna/CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/0,1% TFA) para dar 125 mg de **OC-1** (50%). <sup>1</sup>H RMN (DMSO, 400 MHz, δ): 7,54 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, NH); 4,86 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, Hα Ala); 3,63 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 2,90 (s, 3H, NMe); 2,69 (m, 1H, Hα γ-Ach); 1,17 (d, *J* = 7,2 Hz 3H, Me Ala); 1,72-1,06 (8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (DMSO, 100,53 MHz, δ): 183,9 (C=O); 179,6 (C=O); 60,9 (CH); 56,4 (CH); 49,5-48,5 (CH); 44,0 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 41,8 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 40,0 (CH<sub>3</sub> NMe); 37,5 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 33,4 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,2 (CH<sub>3</sub> NMe). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3315 (amide A); 2934, 2859, 1672, 1627 (amide I); 1540 cm<sup>-1</sup> (amide II). E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%): 841 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada: 841,55514; experimental: 841,55643.

**Ciclo[(D-Phe-L-MeN-γ-Ach)<sub>4</sub>]** (**OC-2**). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-[(D-Phe-L-MeN-γ-Ach)<sub>4</sub>]-OFm (201 mg; 0,140 mmol); para dar, después de la purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 112 mg de **OC-2** (70%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ): 8,57 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, NH); 7,17 (5H, Ar Phe); 5,30 (dd, *J* = 5,7 Hz, 1H, Hα Phe); 4,45 (s, 1H, Hγ γ-Ach); 3,0-2,7 (m, 3H, CH<sub>2</sub>β Phe, Hα γ-Ach); 2,64 (s, 3H, NMe γ-Ach); 1,8-1,0 (8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,40 MHz, δ): 175,1 (C=O); 171,3 (C=O); 136,5 (C); 129,6 (CH); 128,2 (CH); 126,8 (CH); 51,4 (CH); 49,9 (CH); 43,3 (CH); 40,4 (CH<sub>2</sub>); 30,8 (CH<sub>2</sub>); 30,1 (CH<sub>2</sub>); 29,5 (CH<sub>3</sub>); 28,5 (CH<sub>2</sub>); 24,7 (CH<sub>2</sub>). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3312 (amida A); 2935, 2864, 1660, 1623 (amida I); 1525 (amida II) cm<sup>-1</sup>. E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%): 1145 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada: 1145,68034; experimental: 1145,68176.

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>4</sub>}** (**OC-3**). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>4</sub>}-OFm (99 mg; 0,078 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 50 mg de **OC-3** (50%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz, δ): 8,41 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, NH); 7,3-7,1 (m, 5H, Ar Ser); 5,39 (dd, *J* = 21,8 Hz, 1H, Hα Ser); 4,54 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 4,37 (d y d, *J* = 8,0 Hz, 1H, 1H, CH<sub>2</sub> Bn); 3,6-3,4 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,04 (s, 3H, NMe γ-Ach); 2,84 (m, 1H, Hα γ-Ach); 1,9-1,2 (8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 175,4 (C=O); 170,6 (C=O); 137,9 (C); 128,2 (CH); 127,5 (CH); 127,1 (CH); 73,1 (CH<sub>2</sub>); 71,4 (CH<sub>2</sub>); 51,7 (CH); 47,9 (CH); 43,2 (CH); 31,1 (CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>3</sub>); 29,8 (CH<sub>2</sub>); 28,7 (CH<sub>2</sub>); 24,6 (CH<sub>2</sub>). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3309 (amida A); 2936, 2863, 1660, 1628 (amida I); 1524 (amida II) cm<sup>-1</sup>. E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%): 1265,6 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada: 1265,72260; experimental: 1265,72583.}

**Ciclo{[L-Ser-D-MeN-γ-Ach]<sub>4</sub>}** (**OC-4**). Una disolución de **OC-3** (50 mg; 0,040 mmol) en etanol (1,5 ml) se trató con 10% Pd/C (12 mg) y se agitó durante 12 h a temperatura ambiente bajo presión de H<sub>2</sub>. La mezcla se filtró sobre celita y se lavó con etanol, después se concentró a presión reducida, para dar 36 mg de **OC-4** (100%). <sup>1</sup>H RMN (DMSO, 250 MHz, δ): 8,14-7,87 (m, 1H, NH); 4,71 (m, 1H, Hα Ser); 4,27 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,40 (2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 2,86 (s, 3H, NMe γ-Ach); 1,72-1,20 (8H, ciclohexilo). <sup>13</sup>C RMN (DMSO, 62,83 MHz, δ): 174,0 (C=O); 169,8 (C=O); 61,8 (CH<sub>2</sub>β Ser); 51,2

(CH); 42,7 (CH); 39,7 (CH); 31,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,1 (CH<sub>3</sub> NMe); 29,0 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 28,5 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). **FTIR** (293 K, CaF<sub>2</sub>): 3310 (amida A); 2933, 2864, 1621 (amida I); 1541 cm<sup>-1</sup> (amida II). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]**: 905,6 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada**: 905,53480; **experimental**: 905,53476.

**Ciclo{[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>}** (**OC-5**). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-{[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>}-OFm (188 mg; 0,125 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica column/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 112 mg de **OC-5** (75%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz, δ): 8,67 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, NH Ser); 8,59 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, NH Phe); 7,22-7,16 (10H, Ar Phe y Bn); 5,39 (dd, *J* = 5,0 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Ser); 5,25 (dd, *J* = 6,9 Hz, 1H, H<sub>α</sub> Phe); 4,50 (d, *J* = 15,3 Hz, 1H, H<sub>γ</sub> γ-Ach); 4,39 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Bn); 3,64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,18 (s, 1H, H<sub>α</sub> γ-Ach); 3,08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,98 (s, 3H, NMe γ-Ach); 3,88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,80 (s, 3H, NMe γ-Ach); 2,46 (s, 1H, H<sub>α</sub> γ-Ach); 1,8-0,9 (8H, ciclohexilo). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 175,9 (C=O); 174,5 (C=O); 171,5 (C=O); 169,9 (C=O); 137,6 (C); 137,2 (C); 127-126 (CH Ar); 73,2 (CH<sub>2</sub>); 71,6 (CH<sub>2</sub>); 51,9 (CH); 51,0 (CH); 49,8 (CH); 48,5 (CH); 44,2 (CH); 42,4 (CH); 38,9 (CH<sub>2</sub>); 31,8 (CH<sub>2</sub>); 31,0 (CH<sub>2</sub>); 30,3 (CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>3</sub>); 29,6 (CH<sub>3</sub>); 28,7 (CH<sub>2</sub>); 28,4 (CH<sub>2</sub>); 24,6 (CH<sub>2</sub>). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3311 (amida A); 2934, 2861, 1660, 1625 (amida I); 1523 cm<sup>-1</sup> (amida II). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]**: 1205,5 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada**: 1205,70147; **experimental**: 1205,70536.

**Ciclo[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>** (**OC-6**). Una disolución del péptido *ciclo*{[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>} (49 mg; 0,041 mmol) en etanol (1,5 ml) se trató con 10% Pd/C (10-30 mg) y se agitó 12 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de H<sub>2</sub>. La mezcla se filtró sobre celita, se lavó con etanol y se concentró a presión reducida, para dar 41 mg de **OC-6** (100 %). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz, δ): 8,96 (s, 1H, NH Ser); 8,49 (d, *J* = 9,8 Hz, 1H, NH Phe); 7,17 (s, 5H, Ar Phe y Bn); 5,27 (m, 1H, H<sub>α</sub> Ser); 5,19 (m, 1H, H<sub>α</sub> Phe); 4,48 (m, 2H, H<sub>γ</sub> γ-Ach); 3,8-3,7 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,28 (m, 1H, H<sub>α</sub> γ-Ach); 3,05 (4H, NMe γ-Ach y CH<sub>2</sub>β Phe); 3,94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,80 (s, 3H, NMe γ-Ach); 2,42 (m, 1H, H<sub>α</sub> γ-Ach); 1,9-1,0 (8H, ciclohexilo). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75,40 MHz, δ): 177,9 (C=O); 174,2 (C=O); 171,8 y 171,6 (C=O); 168,6 y 168,6 (C=O); 136,8 y 136,8 (C); 129,8-126,7 (CH Ar); 67,0 (CH<sub>2</sub>β Ser); 53,3 (CH); 52,2 (CH); 51,2 (CH); 50,0 (CH); 44,4 (CH); 42,5 (CH); 39,3 (CH<sub>2</sub>β Phe); 32,2 y 32,1 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 30,8 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,9 y 29,8 (CH<sub>3</sub> NMe); 29,1, 28,7 y 28,6 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 24,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3317 (amida A); 2935, 2863, 1660, 1620 (amida I); 1524 cm<sup>-1</sup> (amida II). **E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]**: 1025,7 ([MH]<sup>+</sup>, 100). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada**: 1025,60757; **experimental**: 1025,60908.

#### 11.6.4. (3α,1γ)-Ciclohexapéptidos N-metilados

**Ciclo[L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe]<sub>2</sub>** (**OC<sub>3,1</sub>-1**). Una disolución del octapéptido Boc-[L-MeN-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe]<sub>2</sub>-OFm (210 mg; 0,158 mmol) con 20% piperidina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Tras concentrar en el rotavapor la disolución resultante, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con ácido cítrico al 10%, se secó

con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y concentró a vacío. El crudo resultante se disolvió en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se eliminó el disolvente y se dejó secar a alto vacío durante 2 h y se procedió a su ciclación sin más purificación. El péptido lineal se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (260 mL; 0,6 mM) y se trató con TBTU (56 mg; 0,174 mL) y DIEA (122 μL; 0,696 mmol). Después de 12 h de agitación, se concentró a presión reducida y el crudo se disolvió en 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para ser purificado por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) para dar 35 mg de **OC<sub>3:1-1</sub>** (21%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, δ): 8,80 (d, *J* = 7,5 Hz, 0-1H, NH dímero: NH-Phe-C=O-<sup>Me</sup>N-γ-Ach-); 8,31 (d, *J* = 8,2 Hz, 0-1H, NH dímero); 7,49 (s, 0-1H, NH monómero); 7,32-7,19 (m, 5H, Ar); 7,10 (0-1H, NH monómero: NH-Phe-C=O-<sup>Me</sup>N-γ-Ach-); 5,89 (d, *J* = 5,9 Hz, 0-1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala dímero); 5,48 (m, 0-1 H, Hα Phe dímero); 5,26 (m, 0-1H, Hα Phe dímero); 5,16 (m, 0-1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala monómero); 4,86 (m, 0-2H, Hα Phe monómero); 4,39 (m, 0-1H, Hγ γ-Ach); 3,06 (s, 0-3H, <sup>Me</sup>N-Ala dímero); 2,92 (m, 4H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,72 (s, 0-3H, <sup>Me</sup>N-γ-Ach dímero); 2,61 (s, 0-3H, <sup>Me</sup>N-Ala monómero); 2,52 (s, 0-3H, <sup>Me</sup>N-γ-Ach monómero); 2,02-0,80 (m, 11H, ciclohexilo y Me Ala). <sup>13</sup>C RMN (DMSO, 62,83 MHz, δ): 173,4-169,7 (C=O); 138,0-136,6 (C Ar); 129,4-126,4 (CH, Ar); 51,1-50,1 (CH); 40,0-39,0 (CH); 38,1(CH<sub>2</sub>β Phe); 35,1 (CH<sub>2</sub>β Phe); 31,0-24,3 (CH, CH<sub>2</sub> ciclohexilo, CH<sub>3</sub> Me γ-Ach y CH<sub>3</sub> <sup>Me</sup>N-Ala); 16,9-13,9 (CH<sub>3</sub> Ala). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3310 (amida A); 2934, 2860, 1669, 1627 (amida I), 1525 cm<sup>-1</sup> (amida II). E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%): 1037,7 ([MH]<sup>+</sup>, 100). EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada: 1037,59454; experimental: 1037,59087.

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-Ala-L-γ-Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>}(OC<sub>3:1-2</sub>)**. Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-Ala-L-γ-Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>}-OFm (255 mg; 0,206 mmol), para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 15 mg de **OC<sub>3:1-2</sub>** (8 %). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, δ): 8,62 (s, 0-1H, NH Ser); 8,15 (s, 0-1H, NH γ-Ach); 7,26-7,10 (m, 5-7H, Ar y NH monómero); 5,84 (s, 0-1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala); 5,54 (s, 0-1H, Hα Ala); 5,27 (s, 0-1H, Hα Ser); 4,53 (d, *J* = 12,3 Hz, 0-1H, CH<sub>2</sub> Bn); 4,41 (d, *J* = 12,3 Hz, 0-1H, CH<sub>2</sub> Bn); 3,71 (m, 0-1H, Hγ γ-Ach); 3,25 (s, 0-3H, <sup>Me</sup>N-Ala); 3,16 (s, 0-3H, <sup>Me</sup>N-Ala); 3,30-2,80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 2,63 (m, 1H, Hα γ-Ach); 1,9-0,9 (m, 14H, ciclohexilo y Me Ala). <sup>13</sup>C RMN (CD<sub>3</sub>OD, 100,53 MHz, δ): 177,5 (C=O); 173,2 (C=O); 172,5 (C=O); 172,2 (C=O); 139,1 (C Ar); 129,3-128,6 (CH Ar); 74,4 y 74,3 (CH<sub>2</sub>); 71,0 y 70,8 (CH<sub>2</sub>); 55,6 (CH); 54,4 (CH); 50,6 (CH); 49,6 (CH); 41,2 (CH); 34,4 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 32,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 32,9 (CH<sub>3</sub> NMe); 31,9 (CH<sub>3</sub> NMe); 29,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 25,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 17,5 y 14,9 (CH<sub>3</sub> Me Ala); 16,2 y 14,3 (CH<sub>3</sub> Me Ala). FTIR (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3412 y 3313 (amida A), 3011, 2939, 2862, 1673, 1631 (amida I), 1528 (amida II) cm<sup>-1</sup>. MALDI-TOF [*m/z* (%): 945,5 ([MH]<sup>+</sup>, 44); 967,6 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 983,6 ([MK]<sup>+</sup>, 66). MALDI-TOF-AR Maldi-ME [MH]<sup>+</sup> calculada: 945,5444; experimental: 945,5419.

**Ciclo{[L-Leu-D-<sup>Me</sup>N-Ala-L-γ-Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>}(OC<sub>3:1-3</sub>)**. Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-{[L-Leu-D-<sup>Me</sup>N-Ala-L-γ-Ach-D-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>}-OFm (124 mg; 0,100 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 27 mg de **OC-3** (33%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, 213 K, δ): 8,67 (d, 1H, NH Leu); 8,10 (d, 1H, NH γ-Ach); 5,95 (s, 1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala, γ-Ach-C=O-<sup>Me</sup>N-Ala); 5,47 (s, 1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala, <sup>Me</sup>N-Ala-C=O-NH-γ-Ach); 5,13 (s, 1H, Hα Leu); 3,70 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,22 (m, 6H, NMe); 2,65 (m, 1H, Hα γ-Ach); 2,00-0,88 (m, 23H, ciclohexilo, Me Ala, CH<sub>2</sub>β, CHγ y CH<sub>3</sub>δ

Leu).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100,53 MHz,  $\delta$ ): 178,1 y 177,4 (C=O); 175,6 y 174,6 (C=O); 173,5 y 173,3 (C=O); 172,3 y 172,1 (C=O); 79,4 (C Ar); 56,3-48,9 (CH); 42,4 y 40,4 ( $\text{CH}_2\beta$  Leu); 36,3; 35,8 y 35,2 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 33,5 y 33,1 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 32,6-31,4 ( $\text{CH}_3$  NMe); 29,5 y 29,2 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 26,2-25,9 (CH); 25,4 y 25,2 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 23,6-21,9 ( $\text{CH}_3$  NMe); 17,7-14,2 ( $\text{CH}_3$  Me Ala y Leu). FTIR (293 K,  $\text{CHCl}_3$ ): 3413 y 3310 (amida A); 2955, 2937, 2860 (amida I); 1673, 1632, 1542 (amida II)  $\text{cm}^{-1}$ . MALDI-TOF [ $m/z$  (%): 817,5 ( $[\text{MH}]^+$ , 40); 839,6 ( $[\text{MNa}]^+$ , 49); 855,6 ( $[\text{MK}]^+$ , 100). MALDI-TOF-AR  $[\text{MH}]^+$  calculada: 817,5546; experimental: 817,5505.

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D- $^{14}\text{C}$ -N- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-Ala] $_2$ -}** ( $\text{OC}_{3:1-4}$ ). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el  $\text{OC}_{3:1-1}$  a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D- $^{14}\text{C}$ -N- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-Ala] $_2$ -}-OFm (130 mg; 0,094 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ), 37 mg de  $\text{OC}_{3:1-4}$  (28%).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz,  $\delta$ ): 8,66 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, NH Phe); 8,58 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, NH Ser); 7,23-7,11 (m, 10H, Phe y Bn); 6,49 (d,  $J = 6,5$  Hz, 1H, NH Ala); 5,36 (c,  $J = 7,7$  Hz, 1H, H $\alpha$  Ser); 4,68 (m, 1H, H $\alpha$  Phe); 4,50 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 4,43 (m, 1H, H $\alpha$  Ala); 4,36 (d,  $J = 12,3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  Bn); 4,21 (d,  $J = 12,3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  Bn); 3,31 (m, 1H,  $\text{CH}_2\beta$  Ser); 3,26 (m, 1H,  $\text{CH}_2\beta$  Ser); 3,08 (m, 1H,  $\text{CH}_2\beta$  Phe); 2,95 (s, 3H, NMe); 2,82 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 2,76 (m, 1H,  $\text{CH}_2\beta$  Phe); 1,95-1,25 (m, 8H, ciclohexilo); 0,95 (d,  $J = 5,4$  Hz, 3H, Me Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 62,83 MHz,  $\delta$ ): 175,0 (C=O); 171,5 (C=O); 170,3 (C=O); 168,9 (C=O); 137,7 (C Ar); 136,6 (C Ar); 129,4-126,8 (CH Ar); 72,7 ( $\text{CH}_2$ ); 71,1 ( $\text{CH}_2$ ); 54,6 (CH); 51,6 (CH); 47,3 (CH) y 47,3 (CH); 43,0 (CH); 41,1 ( $\text{CH}_2\beta$  Phe); 32,5 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 29,9 ( $\text{CH}_3$  NMe); 28,9 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 27,5 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 24,3 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 21,3 ( $\text{CH}_3$  Me Ala). FTIR (293 K,  $\text{CHCl}_3$ ): 3296 (3403) (amida A); 2934, 2863, 1681, 1642 (amida I); 1515  $\text{cm}^{-1}$  (amida II). MALDI-TOF [ $m/z$  (%): 1069,6 ( $[\text{MH}]^+$ , 13); 1091,6 ( $[\text{MNa}]^+$ , 100); 1107,5 ( $[\text{MK}]^+$ , 46). MALDI-TOF-AR  $[\text{MNa}]^+$  calculada: 1091,5577; experimental: 1091,5563.

**Ciclo[(L- $\gamma$ -Ach-D-Phe-L- $^{14}\text{C}$ -N-Ala-D-Phe) $_2$ -]** ( $\text{OC}_{3:1-5}$ ). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el  $\text{OC}_{3:1-1}$  a partir de Boc-[(L- $\gamma$ -Ach-D-Phe-L- $^{14}\text{C}$ -N-Ala-D-Phe) $_2$ -]-OFm (0,354 mg; 0,267 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) 130 mg de  $\text{OC}_{3:1-5}$  (48%).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OH}$ , 750 MHz,  $\delta$ ): 8,81 (s, 1H, -NH-Phe2-C=O-NH- $\gamma$ -Ach-); 7,68 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, NH  $\gamma$ -Ach); 7,3-7,0 (m, 11H, NH Phe1 y Ar); 4,90 (m, 1H, H $\alpha$   $^{14}\text{C}$ -Ala y MeOH irradiado); 4,66 (m, 1H, H $\alpha$  Phe: -NH-Phe2-C=O-NH- $\gamma$ -Ach-); 4,32 (m, 1H, H $\alpha$  Phe1); 3,77 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 3,31 (MeOH); 3,2-2,90 (m, 4H,  $\text{CH}_2\beta$  Phe); 2,59 (m, 1H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 2,49 (s, 3H, NMe); 2,15 (d,  $J = 11,9$  Hz, 1H, ciclohexilo); 2,03 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1H, ciclohexilo); 1,92 (d,  $J = 13,1$  Hz, 1H, ciclohexilo); 1,77 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1H, ciclohexilo); 1,72 (d,  $J = 12,2$  Hz, 1H, ciclohexilo); 1,50 (d,  $J = 13,1$  Hz, 1H, ciclohexilo); 1,44 (d,  $J = 12,1$  Hz, 1H, ciclohexilo); 1,29 (d,  $J = 10,1$  Hz, 1H, ciclohexilo); 0,74 (d,  $J = 7,1$  Hz, 3H, Me Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75,4 MHz,  $\delta$ ): 178,1 (C=O); 175,6 (C=O); 173,7 (C=O); 172,4 (C=O); 137,4 (C Ar); 136,9 (C Ar); 130,4-128,0 (CH Ar); 57,9 (CH $\alpha$  Phe); 53,7 (CH $\alpha$  Phe: -NH-Phe-C=O-NH- $\gamma$ -Ach-); 52,6 (CH  $^{14}\text{C}$ -Ala); 48,9 (CH $\gamma$   $\gamma$ -Ach) 42,9 (CH H $\alpha$   $\gamma$ -Ach); 40,9 ( $\text{CH}_2\beta$  Phe); 38,3 ( $\text{CH}_2\beta$  Phe); 35,5 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 32,4 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 31,9 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 31,4 ( $\text{CH}_3$  NMe); 25,8 ( $\text{CH}_2$  ciclohexilo); 12,6 ( $\text{CH}_3$  Me Ala). FTIR (293 K,  $\text{CHCl}_3$ ): 3324 (amida A); 2939, 2860, 1687, 1652 (amida I); 1537  $\text{cm}^{-1}$  (amida II).

**E.M. (FAB<sup>+</sup>) [*m/z* (%)]:** 1009,5 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 1031,5 ([MNa]<sup>+</sup>, 11). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 1009,55514; **experimental:** 1009,55409.

Nota: CHCl<sub>3</sub> a 7,89 ppm.

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz (293 K), δ): 7.4-6.8 (m, 13H, NH and Ar), 5.23 (d, *J* = 7.1, 1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala), 4.93 (m, 1H, Hα Phe: -NH-Phe-C=O-NH-γ-Ach-), 4.86 (m, 1H, Hα Phe), 3.39 (m, 1H, Hγ γ-Ach), 3.02 (m, 4H, CH<sub>2</sub>β Phe), 2.47 (s, 3H, NMe), 2.36 (m, 1H, Hα γ-Ach), 2.1-0.7 (m, 8H, cyclohexyl), 1.20 (d, *J* = 5.7 Hz, 3H, Me Ala).

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-γ-Ach-L-Phe-D-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>-}** (**OC<sub>3:1-6</sub>**). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D-γ-Ach-L-Phe-D-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>-}-OFm (70,8 mg; 0,050 mmol); para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 15 mg de **OC<sub>3:1-6</sub>** (28%). **<sup>1</sup>H RMN** (CD<sub>3</sub>OH, 750 MHz, δ): 8,56 (s, 1H, NH Ser); 7,49 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, NH γ-Ach); 7,4-7,2 (m, 11H, NH Phe y Ar); 5,15 (c, *J* = 7,0 Hz, 1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala); 4,91 (MeOH); 4,63 (m, 1H, Hα Ser); 4,50 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn); 4,40 (m, 1H, Hα Phe); 4,22 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn); 3,66 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,42-3,35 (m, 4H, CH<sub>2</sub>β Phe); 3,31 (MeOH); 3,12 y 3,00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 2,53 (s, 3H, NMe); 2,33 (m, 1H, Hα γ-Ach); 1,95 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, ciclohexilo); 1,83 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H, ciclohexilo); 1,78 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H, ciclohexilo); 1,62 (d, 2H, ciclohexilo); 1,39 (d, 1H, ciclohexilo); 1,16 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H, ciclohexilo); 0,86 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H, Me Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75,4 MHz, δ): 178,0 (C=O); 175,7 (C=O); 172,9 (C=O); 171,3 (C=O); 138,9 (C Ar); 137,2 (C Ar); 130,4-128,7 (CH Ar); 73,8 (CH<sub>2</sub>); 70,0 (CH<sub>2</sub>); 56,4 (CH); 53,6 (CH); 52,5 (CH); 48,9 (CH); 43,1 (CH); 38,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 35,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 32,3 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 31,0 (CH<sub>3</sub> NMe); 25,9 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 12,6 (CH<sub>3</sub> Me Ala). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3327 (amida A); 2941, 2862, 1684, 1655 (amida I); 1530 cm<sup>-1</sup> (amida II<sub>II</sub>). **MALDI-TOF [*m/z* (%)]:** 1069,5 ([MH]<sup>+</sup>, 5); 1091,5 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 1107,5 ([MK]<sup>+</sup>, 48). **MALFI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1091,5577; **experimental:** 11091,5527.

Nota: CHCl<sub>3</sub> a 7,89 ppm; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 5,48 ppm.

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, δ): 7,64 (m, 1H, NH γ-Ach); 7,59 (m, 1H, NH Ser); 7,26 (m, 11H, NH Phe y Ar); 5,23 (c, *J* = 7,0 Hz, 1H, Hα <sup>Me</sup>N-Ala); 4,99 (m, 1H, Hα Ser); 4,94 (m, 1H, Hα Phe); 4,44 (m, 1H, CH<sub>2</sub> Bn); 3,51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,44 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,35 y 2,80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β Phe); 2,54 (s, 3H, NMe); 2,33 (m, 1H, Hα γ-Ach); 2,2-1,0 (m, 11H, ciclohexilo y Me).

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-Ala-L-γ-Ach-D-Ala]<sub>2</sub>-}** (**OC<sub>3:1-7</sub>**). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-Ala-L-γ-Ach-D-Ala]<sub>2</sub>-}-OFm (140 mg; 0,116 mmol), para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 74 mg de **OC<sub>3:1-7</sub>** (70%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz, δ): 8,70 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H, NH Ser); 7,91 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, NH γ-Ach); 7,26-7,15 (m, 10H, Ar); 6,55 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, NH Ala); 5,54 (dd, *J* = 7,0 Hz, 1H, Hα Ser); 5,34 (c, *J* = 7,1 Hz, 1H, <sup>Me</sup>N-Ala); 5,06 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, Hα Ala); 4,41 y 4,28 (d, *J* = 12,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>β Ser); 3,72 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,39 (5H, CH<sub>2</sub>β Ser y <sup>Me</sup>N-Ala); 2,09 (m, 1H, Hα γ-Ach); 1,9-1,1 (m, 8H, ciclohexilo); 1,30 y 1,28 (Me Ala y Me <sup>Me</sup>N-Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 173,9; 172,3; 171,5; 169,9 (C=O); 137,5 (C, Ar); 129-127 (CH, Ar); 72,9 (CH<sub>2</sub> Bn); 71,0 (CH<sub>2</sub> Phe); 51,1 (CH <sup>Me</sup>N-Ala); 48,9 (CH Ala); 47,4 (CHα Ser); 46,4 (CHγ γ-Ach); 45,1 (CHα γ-Ach); 34,4 (CH<sub>2</sub>); 32,7 (CH<sub>2</sub>); 31,4 (CH<sub>3</sub> N-Me); 29,0 (CH<sub>2</sub>); 24,1 (CH<sub>2</sub>); 20,0 (CH<sub>3</sub>); 17,2 (CH<sub>3</sub>). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3312 (3417) (amida A); 2935, 2862, 1683, 1651, 1616

(amida I); 1543 (amida II<sub>II</sub>) cm<sup>-1</sup>. **E.M. (FAB<sup>+</sup>)** [*m/z* (%)]: 917,4 ([MH]<sup>+</sup>, 100); 1833,4 ([2MH]<sup>+</sup>, 3). **EMAR [MH]<sup>+</sup> calculada:** 917,51367; **experimental:** 917,51484.

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>}** (**OC<sub>3:1-8</sub>**). Se cicló empleando el procedimiento descrito para el **OC-1** a partir de Boc-{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>}-OFm (71,6 mg; 0,060 mmol), para dar, después de su purificación por HPLC (phenomenex maxsil 10 silica columna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 15 mg de **OC<sub>3:1-8</sub>** (28%). **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, δ): 7,97 (d, *J* = 8,80 Hz, 1H, NH γ-Ach); 7,37-7,27 (m, 6H, NH Ala y Bn); 6,59 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, NH Ser); 4,61 (m, *J* = 6,40 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Bn); 4,58-4,51 (m, 2H, Hα Ala y Ser); 4,25 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,96 (dd, *J* = 6,1 y 10,1 Hz, 1H, Hβ Ser); 3,78 (dd, *J* = 5,1 y 10,1 Hz, 1H, Hβ Ser); 3,54 (c, *J* = 7,0 Hz, 1H, Hα MeN-Ala); 3,21 (s, 3H, NMe); 2,91 (m, 1H, Hα γ-Ach); 2,10-0,88 (m, 8H, ciclohexilo); 1,50 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H, MeN-Ala); 1,35 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, Me Ala). **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 62,83 MHz, δ): 179,2; 173,2; 170,5; 169,2 (C=O); 137,7 (C, Ar); 128,5-127,8 (CH, Ar); 73,4 (CH<sub>2</sub> Bn); 66,9 (CH<sub>2</sub>β Ser); 61,8 (CH<sub>3</sub> NMe); 52,7 (CH MeN-Ala); 49,0 (CH Ser); 42,9 (CH Ala); 38,7 (CHγ γ-Ach); 31,7 (CHα γ-Ach); 29,5 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 29,2 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 26,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 17,6 (CH<sub>3</sub> Me Ala); 16,7 (CH<sub>2</sub> ciclohexilo); 13,6 (CH<sub>3</sub> MeN-Ala). **FTIR** (293 K, CHCl<sub>3</sub>): 3432 y 3326 (amida A); 2935, 2855, 1671, 1629 (amida I); 1521 (amida II<sub>II</sub>) cm<sup>-1</sup>. **MALDI-TOF** [*m/z* (%)]: 917 ([MH]<sup>+</sup>, 9); 939 ([MNa]<sup>+</sup>, 100). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 939,495; **experimental:** 939,495.

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH, 500 MHz, δ): 9,20 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, NH γ-Ach); 8,09 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, NH Ala); 7,70 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, NH Ser); 7,32 (m, 5H, Bn); 4,68 (m, 1H, Hα Ser); 4,53 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Bn); 4,36 (m, 1H, Hα Ala); 3,93 (m, 1H, Hγ γ-Ach); 3,88 (dd, *J* = 7,4 y 9,7 Hz, 1H, Hβ Ser); 3,82 (c, *J* = 7,10 Hz, 1H, Hα MeN-Ala); 3,71 (dd, *J* = 7,0 y 9,7 Hz, 1H, Hβ Ser); 3,31 (MeOH); 3,12 (s, 3H, NMe); 3,06 (m, 1H, Hα γ-Ach); 2,0-1,3 (m, 8H, ciclohexilo); 1,43 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H, MeN-Ala); 1,34 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, Me Ala).

## 11.7. $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS SÓLIDOS, SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

### 11.7.1. SÍNTESIS DE *ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-L-Gln)<sub>3</sub>-]* (HC-7) y *ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-L-Gln)<sub>4</sub>-]* (OC-7)

Se colocó la cantidad de resina (MBHA) que se deseaba funcionalizar en un reactor con placa filtrante. La resina seca se hinchó por adición de DCM (4 x 1 min) (1 x 5 min), DMF (4 x 1 min) (1 x 5 min), TFA (1 x 15 seg), DCM (4 x 1 min) y se lavó con DCM (4 x 1 min) y DMF (6 x 1 min).

### 11.7.2. UNIÓN DEL PRIMER AMINOÁCIDO

Se disolvieron 3 eq del Fmoc-*D*-Glu-OFm y 2,85 eq de HBTU en la mínima cantidad de DMF y a continuación se adicionaron 6 eq de DIEA, se agitó durante 1 min y se añadió sobre la resina. Se dejó reaccionar el tiempo necesario para obtener un ensayo de ninhidrina negativo. Después de 1 h de reacción se eliminaron los excesos de reactivos por filtración y se lavó la resina. Si el ensayo es positivo, se reacoplan 0,5 eq de aminoácido en las condiciones anteriores, si es negativo se lava exhaustivamente la resina con DMF. Tras los lavados, se comprobó con el test de Kaiser que el acoplamiento fue total y se desprotegió el grupo amino por adición de piperidina en DMF 20% (2 x 15 min, 5 mL) para eliminar el Fmoc, dejando el grupo amino preparado para el siguiente acoplamiento.

### 11.7.3. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO

La síntesis se realizó en un reactor de volumen adecuado a la cantidad de resina empleada (1,875 g; 0,750 mmol) y provistos de una placa filtrante. Los volúmenes añadidos de los reactivos o disolventes han de ser suficientes como para cubrir la resina en su totalidad, de modo que la solvatación de la misma sea óptima. La agitación se llevó a cabo con la ayuda de un agitador mecánico y después de cada ciclo se eliminaron por filtración los excesos de reactivos, subproductos o disolventes.

La elongación de la cadena peptídica sobre el soporte polimérico se llevó a cabo según las etapas 1-9 del protocolo detallado a continuación (tabla 10).

Etapa	Reactivo <sup>a</sup>	Tratamiento	Número de lavados x tiempo (min)
1	DCM	Lavado	3 x 0,5
2	TFA 50% en DCM	Pre-equilibrado (desprotección)	1 x 1
3	TFA 50% en DCM	Desprotección	1 x 10
4	DCM	Lavado	5 x 0,5
5	DIEA 5% en DCM	Neutralización	3 x 1
6	DMF	Lavado	5 x 0,5
7	Boc-Aa-OH/HBTU/DIEA/DMF	Acoplamiento	1 x 45-60
8	DMF	Lavado	3 x 1
9	DCM	Lavado	5 x 0,5
10	DIEA 5% en DCM	Neutralización	3 x 1
11	DCM	Lavado	5 x 0,5
12	DMF	Lavado	5 x 0,5
13	Ac <sub>2</sub> O/ 1:1 en DMF	Acetilación	1 x 20
14	DMF	Lavado	3 x 1
15	DCM	Lavado	5 x 0,5

Tabla 10: Protocolo para los acoplamientos. <sup>a</sup>Las relaciones entre volúmenes y disolventes son volumétricas.

El soporte polimérico empleado en química Boc fue de tipo *p*-MBHA de sustitución 0,40 mmol/g. Los Boc-Aa-OH se disolvieron en el mínimo volumen de DMF. El Boc-Aa-OH correspondiente junto con el agente acoplante, debidamente disuelto, se adicionó al soporte polimérico. Los tiempos de acoplamiento son de 30 min.

Después del acoplamiento y los lavados se comprobó la incorporación del aminoácido mediante el test de Kaiser. Si el ensayo es positivo, se repite el acoplamiento desde la etapa 5, en general con menos equivalentes y con la posibilidad de utilizar un agente de acoplamiento alternativo. En caso de no conseguirse la incorporación total del aminoácido, se acetila la resina según el protocolo especificado en las etapas 10-15, controlándose de forma idéntica por ensayo de ninhidrina. Una vez se consiguió un ensayo negativo se procedió a la incorporación del siguiente aminoácido, comenzando por la etapa 2 de eliminación del grupo Boc.

Aminoácido	Agente activante	Tiempo	Test
1) Fmoc- <i>D</i> -Glu-OAll	HBTU	1 h	Kaiser (-)
2) Boc-( <i>1S,3R</i> )- $\gamma$ -Ach	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
3) Boc- <i>D</i> -Gln	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
4) Boc-( <i>1S,3R</i> )- $\gamma$ -Ach	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
5) Boc- <i>D</i> -Gln	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
6) Boc-( <i>1S,3R</i> )- $\gamma$ -Ach	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
7) Boc- <i>D</i> -Gln	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
8) Boc-( <i>1S,3R</i> )- $\gamma$ -Ach	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)

Tabla 11: Secuencia de aminoácidos acoplados. De 1 a 6 para la síntesis del hexámero y de 1 a 8 para la obtención del octámero.

Acabada la síntesis del hexámero lineal la resina se dividió en dos porciones una con el hexámero y a la otra porción se le acoplaron dos aminoácidos más para completar la síntesis del octámero lineal. La peptidil-resina de ambos péptidos lineales se desprotegeron y se procedió a su ciclación (punto 10.6.4).

#### 11.7.4. CICLACIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL UNIDO A LA RESINA

El extremo C-terminal se desprotegió con piperidina al 20% en DMF durante 15 min (eliminación del grupo protector Fm). Después se lavó con DMF (3 x 1 min) y con DCM (3 x 1 min), para a continuación proceder a la desprotección del extremo N-terminal por tratamiento con: TFA (1 x 1min), TFA/DCM (1 x 5 min) y TFA (1 x 1 min) (eliminación del Boc). Y se lavó con DCM (1 x 1 min) y DMF (5 x 1 min). A continuación se ciclaron los péptidos en DMF con 1,0 eq de TBTU (120 mg; 0,375 mmol) y 2,0 eq de DIEA (131  $\mu$ L; 0,750 mmol) durante 24 h, para la obtención del hexámero y del octámero ciclados. Finalmente se comprobó mediante el test de Kaiser que no quedaban aminos libres.

La peptidil-resina de ambos péptidos cíclicos se lavaron con DMF (3 x 1 min), DCM (3 x 1 min), MeOH (2 x 1 min), DCM (1 x 1 min) y éter (5 x 0,5 min), y finalmente se secó a vacío. Y se procedió a la separación del soporte sólido.

#### 11.7.5. SEPARACIÓN DEL PÉPTIDO DEL SOPORTE SÓLIDO

A la peptidil-resina seca en un reactor de teflón (figura 134, página 142), se le añadieron 0,300 mL de anisol. Se dejó pasar N<sub>2</sub> durante 10 min, se enfrió exteriormente el reactor durante 20 min a -78 °C con acetona/CO<sub>2</sub> y se condensaron 3,0 mL HF anhidro sobre la resina. La mezcla resultante de color púrpura se agitó magnéticamente a 0 °C durante 1,5 h. Tras este tiempo, se retiró lentamente el HF con una corriente de N<sub>2</sub>. Se adicionó al residuo éter dietílico a fin de precipitar el péptido, filtrándose la suspensión a través de una placa filtrante. Se lavó el residuo con más éter y finalmente se extrajo el material peptídico primero con TFA. La disolución de péptido se suspendió en agua (3 x 1 mL) y centrifugó, posteriormente se suspendió en MeCN y se centrifugó. Se obtuvieron unos 60 mg para **HC-7** y unos 80 **OC-7** de un sólido blanquecino, lo que representa un rendimiento medio del 40%.

#### 11.7.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS **HC-7** y **OC-7**

**Ciclo{[(1S,3R)- $\gamma$ -Ach-L-Gln]<sub>3</sub>-} (HC-7).** <sup>1</sup>H RMN (TFA, 250 MHz,  $\delta$ ): 8,47 (s, H, NH); 5,00 (m, 1H, H $\alpha$  Glu); 4,20 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 3,0-1,7 (m, 13H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach, ciclohexilo, CH<sub>2</sub> $\beta$  Gln y CH<sub>2</sub> $\gamma$  Gln). IR (293 K, pastilla de KBr, cm<sup>-1</sup>): 3408, 3283 (amida A); 2935, 2858, 1663, 1631 (amida I); 1541 cm<sup>-1</sup> (amida II<sub>II</sub>). MALDI-TOF [*m/z* (%): 760 ([MH]<sup>+</sup>, ); 783 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 799 ([MK]<sup>+</sup>, 22). MALDI-TOF-AR [MH]<sup>+</sup> calculada: 760,4352; encontrada: 760,4357.

**Ciclo{[(1S,3R)- $\gamma$ -Ach-L-Arg]<sub>4</sub>-} (OC-7).** <sup>1</sup>H RMN (TFA, 250 MHz,  $\delta$ ): 4,96 (m, 1H, H $\alpha$  Glu); 4,15 (m, 1H, H $\gamma$   $\gamma$ -Ach); 3,0-1,7 (m, 13H, H $\alpha$   $\gamma$ -Ach, CH<sub>2</sub> $\beta$  Gln y CH<sub>2</sub> $\gamma$  Gln). IR (293 K, pastilla de KBr, cm<sup>-1</sup>): 3413, 3287 (amida A); 3090, 2933, 2859, 1659, 1633 (amida I); 1544 cm<sup>-1</sup> (amida II<sub>II</sub>). MALDI-TOF [*m/z* (%): 1015 ([MH]<sup>+</sup>, 22); 1036 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 1053 ([MK]<sup>+</sup>, 36). MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada: 1035,5598; encontrada: 1035,5552.

## 11.8. $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS DE MEMBRANA, SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

11.8.1. SÍNTESIS DE *ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-L-Trp-)<sub>2</sub>-D- $\gamma$ -Ach-L-Gln-]* (**HC-8**), *ciclo[(D- $\gamma$ -Ach-L-Trp-)<sub>3</sub>-(D- $\gamma$ -Ach-L-Gln-)]* (**OC-8**), *ciclo(D-Trp-L- $\gamma$ -Ach-D-Trp-L-Leu-D-Trp-L- $\gamma$ -Ach-D-Trp-L-Gln-)* (**OC<sub>3:1</sub>-9**) y *ciclo(L-Trp-L- $\gamma$ -Ach-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L- $\gamma$ -Ach-D-Trp-L-Gln-)]* (**OC<sub>3:1</sub>-10**).

Se colocó la cantidad de resina (Rink amida) que se deseaba funcionalizar en un reactor con placa filtrante. La resina seca se hinchó por adición DCM (1 x 1 h; el DCM se almacena sobre Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, para eliminar la trazas de acidez del DCM), DMF (3 x 1 min) y se desprotegió el Fmoc con piperidina al 20% en DMF (2 x 10 min) y se lavo con DMF (6 x 1 min) para proceder a continuación al acoplamiento del primer Aa.

### 11.8.2. UNIÓN DEL PRIMER AMINOÁCIDO

Se disolvieron 2 eq del Fmoc-D-Glu-OAll y 1,95 eq de HBTU en la mínima cantidad de DMF y a continuación se adicionaron 8 eq de DIEA, se agitó durante 1 min y se añadió sobre la resina. Se dejó reaccionar el tiempo necesario para obtener un ensayo de ninhidrina negativo. Después de 2 h de reacción se eliminaron los excesos de reactivos por filtración y se lavó la resina. Si el ensayo es positivo, se reacoplan 0,5 eq de aminoácido en las condiciones anteriores, si es negativo se lava exhaustivamente la resina con DMF. Tras los lavados, se comprobó con el test de Kaiser que el acoplamiento fue total y se desprotegió el grupo amino por adición de piperidina en DMF 20% (2 x 15 min) para eliminar el Fmoc, dejando el grupo amino preparado para el siguiente acoplamiento.

### 11.8.3. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO

La síntesis se realizó en un reactor de volumen adecuado a la cantidad de resina empleada provisto de una placa filtrante. Los volúmenes añadidos de los reactivos o disolventes han de ser suficientes como para cubrir la resina en su totalidad, de modo que la solvatación de la misma sea óptima. La agitación se llevó a cabo con la ayuda de un agitador mecánico y después de cada ciclo se eliminaron por filtración los excesos de reactivos, subproductos o disolventes.

La elongación de la cadena peptídica sobre el soporte polimérico se llevó a cabo según las etapas 1-5 del protocolo detallado a continuación (tabla 11).

Etapa	Reactivo <sup>a</sup>	Tratamiento	Número de lavados x tiempo (min)
1	DMF	Lavado	3 x 0,5
2	Piperidina 20% en DMF	Desprotección	2 x 15
3	DMF	Lavado	5 x 0,5
4	Boc-Aa-OH/HBTU /DIEA/DMF	Acoplamiento	1 x 45-60
5	DMF	Lavado	5 x 0,5
6	Ac <sub>2</sub> O/DIEA 10:20 eq en DMF	Acetilación	1 x 20
7	DMF	Lavado	5 x 0,5

Tabla 12: Protocolo para los acoplamientos. <sup>a</sup>Las relaciones entre volúmenes y disolventes son volumétricas.

El soporte polimérico empleado en química Fmoc fue de tipo Cloro Tritilo de sustitución 0,47 mmol/g (179 mg; 0,085 mmol). Los Fmoc-Aa-OH se disolvieron en el mínimo volumen de DMF. El Fmoc-Aa-OH (2 eq de Fmoc- $\gamma$ -Ach-OH y 4 eq de Fmoc-Aa-OH) correspondiente junto con el agente acoplante (0,95 eq por cada eq de Aa) y 4 eq de DIEA por cada Aa; todo ello debidamente disuelto (1 min de preactivación), se adicionó al soporte polimérico. Los tiempos de acoplamiento son de 30 o 60 min.

Después del acoplamiento y los lavados se comprobó la incorporación del aminoácido mediante el test de Kaiser. Si el ensayo es positivo, se repite el acoplamiento desde la etapa 3, en general con menos equivalentes y con la posibilidad de utilizar un agente de acoplamiento alternativo. En caso de no conseguirse la incorporación total del aminoácido, se acetila la resina según el protocolo especificado en las etapas 10-15, controlándose de forma idéntica por ensayo de ninhidrina. Una vez se consiguió un ensayo negativo se procedió a la incorporación del siguiente aminoácido, comenzando por la etapa 2 de eliminación del grupo Fmoc.

Aminoácido	Agente activante	Tiempo	Test
1) Fmoc- <i>L</i> -Glu-OAll	HBTU	2 h	Kaiser (-)
2) Fmoc- <i>D</i> - $\gamma$ -Ach	HBTU	1 h	Kaiser (-)
3) Fmoc- <i>L</i> -Trp	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
4) Fmoc- <i>D</i> - $\gamma$ -Ach	HBTU	1 h	Kaiser (-)
5) Fmoc- <i>L</i> -Boc-Trp	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
6) Fmoc- <i>D</i> - $\gamma$ -Ach	HBTU	1 h	Kaiser (-)
7) Fmoc- <i>L</i> -Boc-Trp	HBTU	0,5 h	Kaiser (-)
8) Fmoc- <i>D</i> - $\gamma$ -Ach	HBTU	1 h	Kaiser (-)

Tabla 13: Secuencia de aminoácidos acoplados. De 1 a 6 para la síntesis del hexámero **HC-7** y de 1 a 8 para la obtención del octámero **OC-7**. La síntesis de **OC<sub>3,1</sub>-9** y **OC<sub>3,1</sub>-10** se realizó con los Aa correspondientes.

Acabada la síntesis de los péptidos lineales, se procedió a la desprotección y ciclación de los mismos (punto 10.7.4).

#### 11.8.4. CICLACIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL UNIDO A LA RESINA

En el reactor de síntesis del péptido, la resina se trató con una mezcla de PPh<sub>3</sub> (1,25 eq), NMO (10 eq) y Fenilsilano (10 eq) en DCM recién destilado y desgasificada bajo Ar durante 15 min se transfiere sobre la resina junto con Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,25 eq) y a continuación se añadió bajo Ar durante otros 15 min y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Después se filtró y se lavó para eliminar el exceso de reactivos con DCM (4 x 1 min), 2% DIEA/DMF (4 x 1 min), 0,5% dietilditiocarbamato de sodio en DMF (4 x 1 min) y DMF (4 x 1 min). A continuación se desprotegió el extremo amino con piperidina 20% en DMF 1:1 (2 x 15 min) y se lavó con DMF (6 x 1 min), 5% DIEA/DMF (6 x 1 min), 5% de disolución 0,8 M de LiCl en DMF y DMF (6 x 1 min) obteniéndose el péptido con los extremos C- y N- desprotegidos. Seguidamente se activó el extremo carboxílico con 3,0 eq de TBTU y 8,0 eq DIEA en DMF que se vertió sobre la resina. Se dejó agitando 24 h. Finalmente se comprobó mediante el test de Kaiser que no quedaban aminos libres.

La peptidil-resina de ambos péptidos cíclicos se lavaron con DMF (4 x 1 min), DCM (4 x 1 min), MeOH (2 x 1 min), DCM (1 x 1 min) y éter (4 x 1 min), y finalmente se secó a vacío. Y se procedió a la separación del soporte sólido.

#### 11.8.5. SEPARACIÓN DEL PÉPTIDO DEL SOPORTE SÓLIDO

La peptidil-resina seca en un balón de fondo redondo y se le añadió TFA/Me<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O 95/2,5/2,5 % durante 1h. Tras este tiempo, se eliminó a presión reducida la disolución lentamente. Se adicionó al residuo éter dietílico a fin de precipitar el péptido, filtrándose la suspensión a través de una placa filtrante. Se lavó el residuo con más éter y finalmente se extrajo el material peptídico con TFA. La disolución de péptido se liofilizó. Dada las dificultades que presentaban para su purificación por HPLC debida a su escasa solubilidad, el producto se lavó con H<sub>2</sub>O, MeCN y éter; para ello se sonicó con el disolvente correspondiente y se centrifugó, eliminándose posteriormente el sobrenadante. Se obtuvieron un sólido blanquecino, lo que representa un rendimiento medio del 50% después de los lavados.

#### 11.8.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS HC-8, OC-8, OC<sub>3:1</sub>-9 y OC<sub>3:1</sub>-10

**Ciclo[(D-γ-Ach-L-Trp)-<sub>2</sub>-D-γ-Ach-L-Gln-] (HC-8).** <sup>1</sup>H RMN (DMSO, 300 MHz, δ): 10,72 (s, NH del indol); 7,8-6,7 (m, NH y H del indol). **MALDI-TOF [m/z (%)]:** 898 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 914 ([MK]<sup>+</sup>, 21). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 898,4586; **encontrada:** 898,4570.

**Ciclo[(D-γ-Ach-L-Trp)-<sub>3</sub>-D-γ-Ach-L-Gln-] (OC-8).** <sup>1</sup>H RMN (DMSO, 300 MHz, δ): 10,74 (s, NH del indol); 7,8-6,7 (m, NH y H del indol). **MALDI-TOF [m/z (%)]:** 1210 ([MNa]<sup>+</sup>, ); 1226 ([MK]<sup>+</sup>, 20). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1209,6220; **encontrada:** 1209,6279.

**Ciclo(D-Trp-L-γ-Ach-D-Trp-L-Leu-D-Trp-L-γ-Ach-D-Trp-L-Gln-) (OC<sub>3:1</sub>-9).** <sup>1</sup>H RMN (DMSO, 300 MHz, δ): 10,91 y 10,74 (m, NH del indol); 8,4-6,7 (m, NH e indol). **MALDI-TOF [m/z (%)]:** 1259 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 1275 ([MK]<sup>+</sup>, 36). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1258,6172; **encontrada:** 1258,6164.

**Ciclo(L-Trp-L-γ-Ach-D-Leu-L-Trp-D-Leu-(1R,3S)-γ-Ach-D-Trp-L-Gln-) (OC<sub>3:1</sub>-10).** <sup>1</sup>H RMN (DMSO, 300 MHz, δ): 10,7 (m, NH del indol); 8,4-6,7 (m, NH e indol), 4,4-4,0 (m, Hα). **MALDI-TOF [m/z (%)]:** 1186 ([MNa]<sup>+</sup>, 100); 1202 ([MK]<sup>+</sup>, 32). **MALDI-TOF-AR [MNa]<sup>+</sup> calculada:** 1185,6220; **encontrada:** 1185,6229.

### 11.9. $\alpha,\gamma$ -NANOTUBOS PEPTÍDICOS ANTIMICROBIANOS

Todos los péptidos fueron sintetizados usando síntesis Fmoc, siguiendo la metodología empleada en el punto 10.8. Todos ellos se identificaron mediante MASAS-ES.

Secuencia	Masas calculada [M]	Masas ElectroSpray [MH] <sup>+</sup>
c-[ <u>Ach</u> - <u>W</u> - <u>L</u> - <u>W</u> - <u>Ach</u> - <u>K</u> - <u>Q</u> - <u>K</u> -] <b>OC-9</b>	1119,66	1120,7
c-[ <u>Ach</u> - <u>W</u> - <u>L</u> - <u>W</u> - <u>Ach</u> - <u>K</u> - <u>Q</u> - <u>R</u> -] <b>OC-10</b>	1147,67	1148,5
c-[ <u>K</u> - <u>Apr</u> - <u>K</u> - <u>Acp</u> - <u>W</u> - <u>Acp</u> -] <b>HC-9</b>	776,47	777,7
c-[ <u>Apr</u> - <u>H</u> - <u>Apr</u> - <u>W</u> - <u>Acp</u> - <u>W</u> -] <b>HC-10</b>	844,41	844,5
c-[ <u>K</u> - <u>S</u> - <u>Apr</u> - <u>K</u> - <u>L</u> - <u>W</u> - <u>Acp</u> - <u>W</u> -] <b>OC-11</b>	1051,60	1052,6
c-[ <u>K</u> - <u>H</u> - <u>Apr</u> - <u>K</u> - <u>S</u> - <u>W</u> - <u>Acp</u> - <u>W</u> -] <b>OC-12</b>	1075,57	1075,7
c-[ <u>K</u> - <u>S</u> - <u>K</u> - <u>K</u> - <u>F</u> - <u>Acp</u> - <u>F</u> - <u>L</u> -] <b>OC-13</b>	989,61	990,7
c-[ <u>K</u> - <u>H</u> - <u>K</u> - <u>H</u> - <u>K</u> - <u>W</u> - <u>Acp</u> - <u>W</u> -] <b>OC-14</b>	1141,63	1142,8

Tabla 14: masas calculadas y obtenidas por HPLC-MASAS-ES.



## Análisis de Van't Hoff

### HC-1:

**Análisis de dimerización mediante Van't Hoff.** El péptido **HC-1** después de ser purificado por HPLC se disolvió en  $\text{CDCl}_3$ : concentraciones de 27,8; 15,4; 9,7; 7,7; 4,8; 2,4 y 0,97 mM. Los  $^1\text{H}$  NMR fueron adquiridos a intervalos 10 K en un rango de temperaturas comprendido entre 273-313 K. La  $K_a$  (constante de asociación) fue determinada para cada temperatura mediante regresión no lineal ajustado a la ecuación  $\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{dim}} + (\delta_{\text{mon}} - \delta_{\text{dim}})[-1 + (1+8K_a C)^{1/2}] / (4K_a C)$  para los datos de  $\delta(\text{NH})$  obtenidos de  $^1\text{H}$  NMR y de la concentración total de monómero  $C$ . La gráfica hecha entonces, representando  $1/T$  (K) y  $\log K_a$ , permitió calcular los parámetros termodinámicos del proceso de dimerización ( $2,3RT\log K = \Delta H - T \Delta S$ ), (la  $\Delta H^\circ$  se calculó a partir de la pendiente y la  $\Delta S^\circ$  se calculó a partir de la ordenada en el origen.  $\Delta H^\circ_{298} = -34,1 \text{ KJ mol}^{-1}$ , y  $\Delta S^\circ_{298} = -69,8 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

### TC-2:

**Análisis de dimerización mediante Van't Hoff.** El péptido **TC-2** después de ser purificado por HPLC se disolvió en  $\text{CDCl}_3$ : concentraciones de 50,0; 20,0; 10,0; 5,0 y 2,0 mM. Los  $^1\text{H}$  NMR fueron adquiridos a intervalos 20 K en un rango de temperaturas comprendido entre 233-313 K. La  $K_a$  fue determinada para cada temperatura mediante regresión no lineal ajustado a la ecuación  $\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{dim}} + (\delta_{\text{mon}} - \delta_{\text{dim}})[-1 + (1+8K_a C)^{1/2}] / (4K_a C)$  para los datos de  $\delta(\text{NH})$  obtenidos de  $^1\text{H}$  NMR y de la concentración total de monómero  $C$ . La gráfica hecha entonces, representando  $1/T$  (K) y  $\log K_a$ , permitió calcular los parámetros termodinámicos del proceso de dimerización ( $2,3RT\log K = \Delta H - T \Delta S$ ), (la  $\Delta H^\circ$  se calculó a partir de la pendiente y la  $\Delta S^\circ$  se calculó a partir de la ordenada en el origen.  $\Delta H^\circ_{298} = -42,0 \text{ KJ mol}^{-1}$ , y  $\Delta S^\circ_{298} = -133,5 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

### OC-1:

**Análisis de dimerización mediante Van't Hoff.** El péptido **OC-1** después de ser purificado por HPLC se disolvió en  $\text{CDCl}_3$ : concentraciones de 28,6; 14,3; 7,1; 7,7; 3,6 y 1,78 mM. Los  $^1\text{H}$  NMR fueron adquiridos a intervalos 10 K en un rango de temperaturas comprendido entre 233-313 K. La  $K_a$  fue determinada para cada temperatura mediante regresión no lineal ajustado a la ecuación:  $[P]_t = \{\Delta I_{\text{obs}}/K_a\} / \{2\Delta I_{\text{sat}}(1-(\Delta I_{\text{obs}}/\Delta I_{\text{sat}}))^2\}$  para los datos de  $\delta(\text{NH})$  obtenidos de  $^1\text{H}$  NMR y de la concentración total de monómero  $C$ . La gráfica hecha entonces, representando  $1/T$  (K) y  $\log K_a$ , permitió calcular los parámetros termodinámicos del proceso de dimerización ( $2,3RT\log K = \Delta H - T \Delta S$ ), (la  $\Delta H^\circ$  se calculó a partir de la pendiente y la  $\Delta S^\circ$  se calculó a partir de la ordenada en el origen.  $\Delta H^\circ_{298} = -94,2 \text{ KJ mol}^{-1}$ , y  $\Delta S^\circ_{298} = -38,2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

**OC<sub>3:1-1</sub>:**

**Análisis de la dimerización mediante Van't Hoff.** El péptido **OC<sub>3:1-1</sub>** después de ser purificado por HPLC se disolvió en CDCl<sub>3</sub>: concentraciones de 8,00; 6,00; 4,00; 2,00; 1,00 mM. Los <sup>1</sup>H NMR fueron adquiridos a intervalos 10 K en un rango de temperaturas comprendido entre 263-303 K. La  $K_a$  (constante de asociación) fue determinada para cada temperatura mediante regresión no lineal ajustado a la ecuación:  $[P]_t = \{\Delta I_{\text{obs}}/K_a\} / \{2\Delta I_{\text{sat}}(1-(\Delta I_{\text{obs}}/\Delta I_{\text{sat}}))^2\}$  para los datos obtenidos de <sup>1</sup>H RMN según la relación de integrales (Phe dímero C<sub>α</sub>H)/[(Phe dímero C<sub>α</sub>H)+2(Phe monómero C<sub>α</sub>H)] y de la concentración total de monómero  $C$ . La gráfica hecha entonces, representando  $1/T$  (K) y  $\log K_a$ , permitió calcular los parámetros termodinámicos del proceso de dimerización ( $2,3RT\log K = \Delta H - T \Delta S$ ), (la  $\Delta H^\circ$  se calculó a partir de la pendiente y la  $\Delta S^\circ$  se calculó a partir de la ordenada en el origen.  $\Delta H^\circ_{298} = -47,8 \text{ KJ mol}^{-1}$ , y  $\Delta S^\circ_{298} = -126,1 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

**Datos de IR**

El IR (293 K, CHCl<sub>3</sub>) del **HC-3** presenta una banda de la amida A a 3302 cm<sup>-1</sup> (típica de la existencia de un puente de hidrógeno), así como las bandas típicas de una hoja plegadas β a (1665) y 1627 cm<sup>-1</sup> de la amida I y a 1531 cm<sup>-1</sup> de la amida II<sub>II</sub>.

Ciclopéptido	Vibración Amida Ia	Vibración Amida Ib	Vibración Amida II <sub>II</sub>	Vibración Amida A
<b>HC-1</b>	1626	1669	1542	3318
<b>HC-2</b>	1625	1665	1527	3303
<b>HC-3</b>	1665	1627	1531	3302
<b>HC-4</b>	1685	1627	1533	3308
<b>HC-5</b>	1664	1627	1529	3303
<b>HC-6</b>	1661	1624	1525	3303
<b>TC-1</b>	1621	1679	1522	3366
<b>TC-2</b>	1627	1673	1522	3300/3411
<b>OC-1</b>	1627	1672	1540	3315
<b>OC-2</b>	1623	1660	1525	3312
<b>OC-3</b>	1628	1660	1524	3309
<b>OC-4</b>	1621		1541	3310
<b>OC-5</b>	1625	1660	1523	3311
<b>OC-6</b>	1620	1660	1524	3317
<b>OC<sub>3:1</sub>-1</b>	1627	1669	1525	3310
<b>OC<sub>3:1</sub>-2</b>	1631	1673	1528	3313/3412
<b>OC<sub>3:1</sub>-3</b>	1632	1673	1542	3310/3413
<b>OC<sub>3:1</sub>-4</b>	1642	1681	1515	3296/3403
<b>OC<sub>3:1</sub>-5</b>	1652	1687	1537	3324
<b>OC<sub>3:1</sub>-6</b>	1655	1684	1530	3327
<b>OC<sub>3:1</sub>-7</b>	1616, 1551	1583	1543	3312/3417
<b>OC<sub>3:1</sub>-8</b>	1629	1671	1521	3326/3432

Tabla 15: Resumen de las bandas del IR realizados en CHCl<sub>3</sub> de los diferentes péptidos estudiados (los IR del **HC-4** y **OC-4**, se realizaron en pastilla de CaF<sub>2</sub>).



## ÍNDICE:

### ANEXO 1: DATOS DE RMN

11.2. Síntesis del ácido N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico y de sus derivados	2
11.3. Síntesis del ácido N-Boc- <i>cis</i> -3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico	7
11.4. $\alpha$ -aminoácidos	11
11.5. Síntesis de péptidos en disolución	14
11.6. Ciclopéptidos N-metilados	25
11.6.1. Ciclohexapéptidos	25
11.6.2. Ciclotetrapéptidos	31
11.6.3. Ciclooctapéptidos	33
11.6.4. (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-Ciclooctapéptidos	39
11.7. $\alpha$ , $\gamma$ -Nanotubos peptídicos sólidos; síntesis en fase sólida	47
11.8. $\alpha$ , $\gamma$ -Nanotubos peptídicos de membrana, síntesis en fase sólida	49
<u>BIDIMENSIONALES</u> (COSY, NOESY, ROESY, etc.)	51

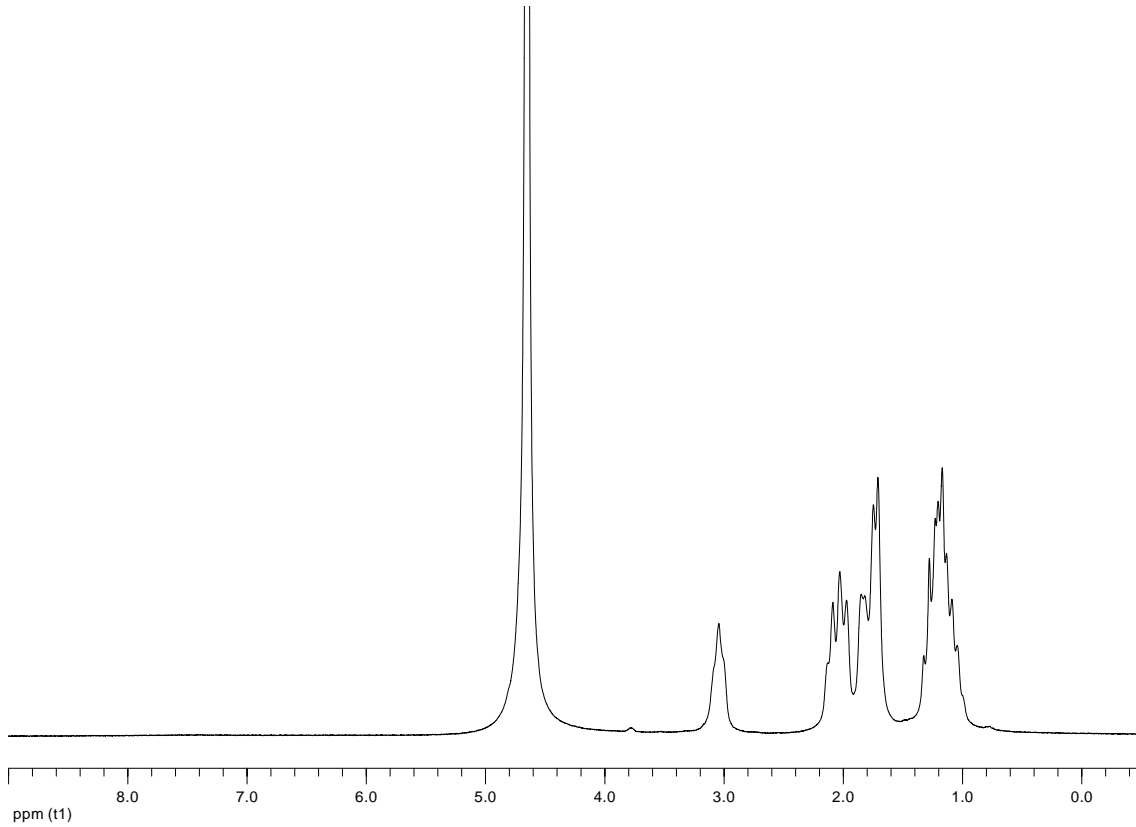
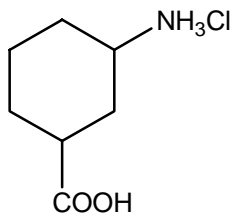
### ANEXO 2: DATOS DE RAYOS X

<u>Ácido (<i>trans,trans</i>)-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico</u>	3
<u>Ácido (<i>cis,cis</i>)-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico</u>	5
<u>Ciclohexapéptidos</u>	8
<u>Ciclotetrapéptidos</u>	18
<u>Ciclooctapéptidos</u>	25
<u>(3<math>\alpha</math>,1<math>\gamma</math>)-ciclooctapéptidos</u>	37

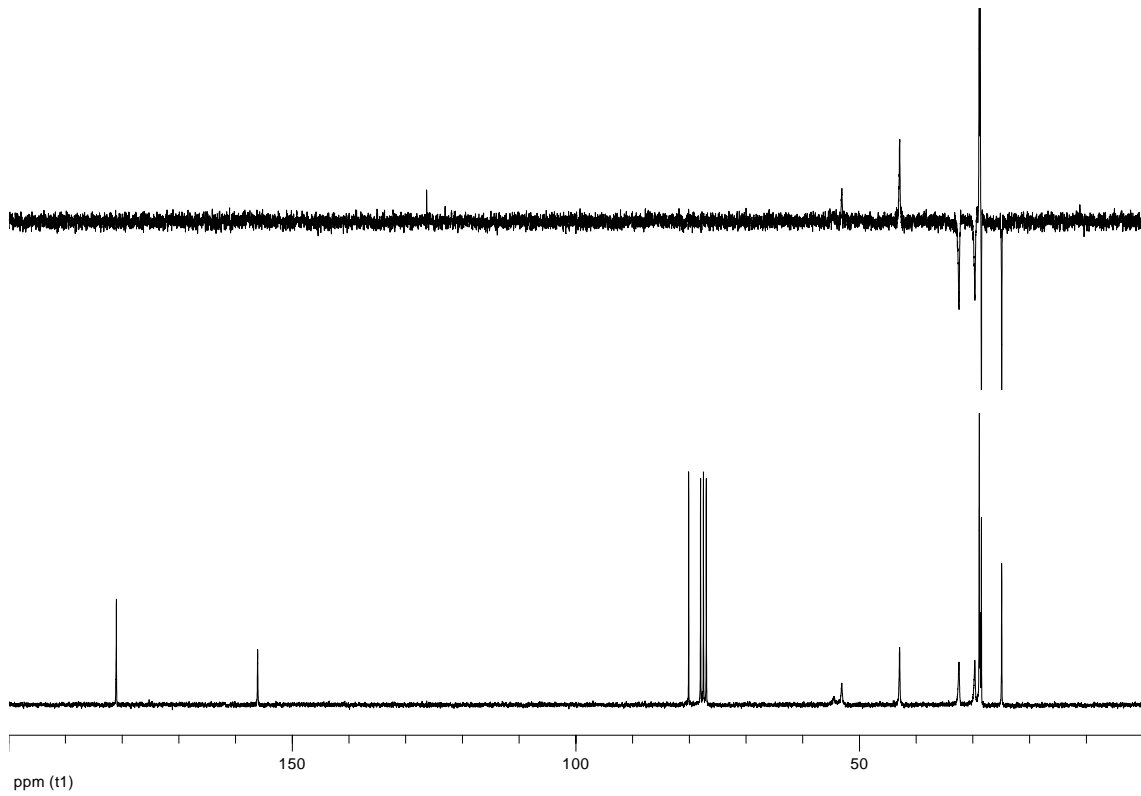
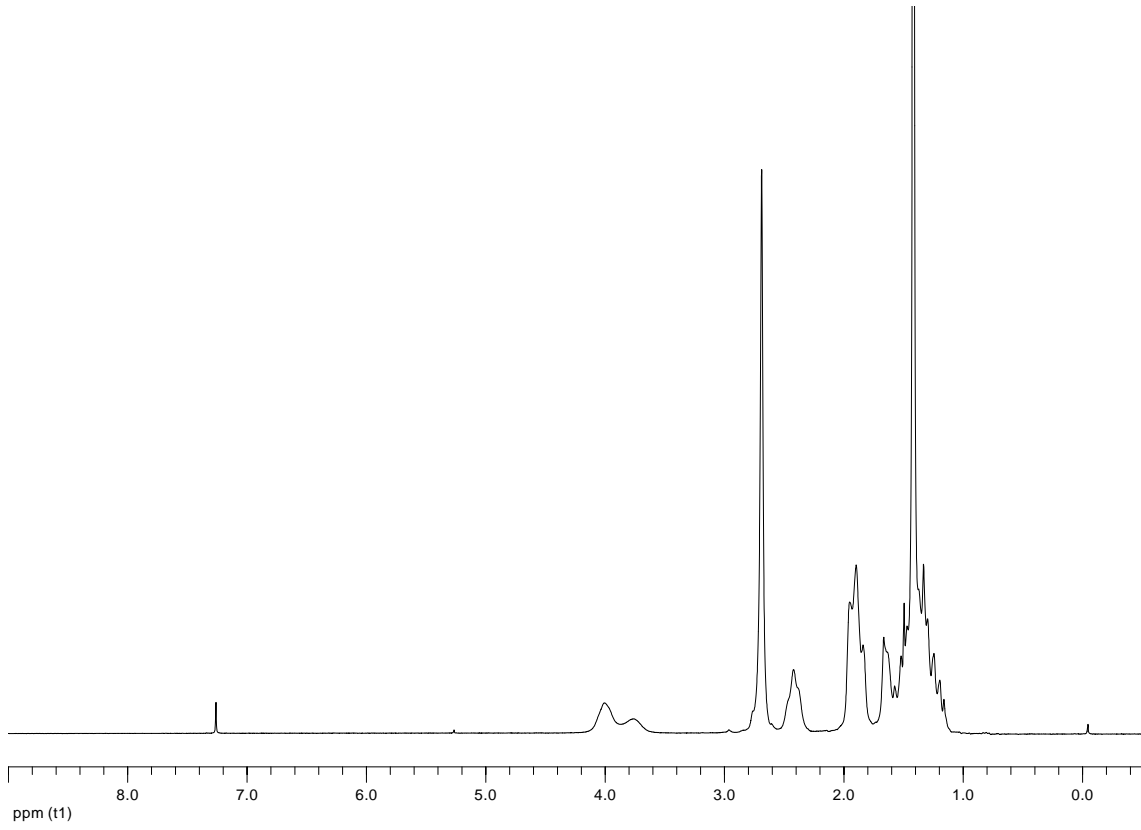
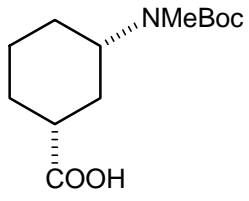


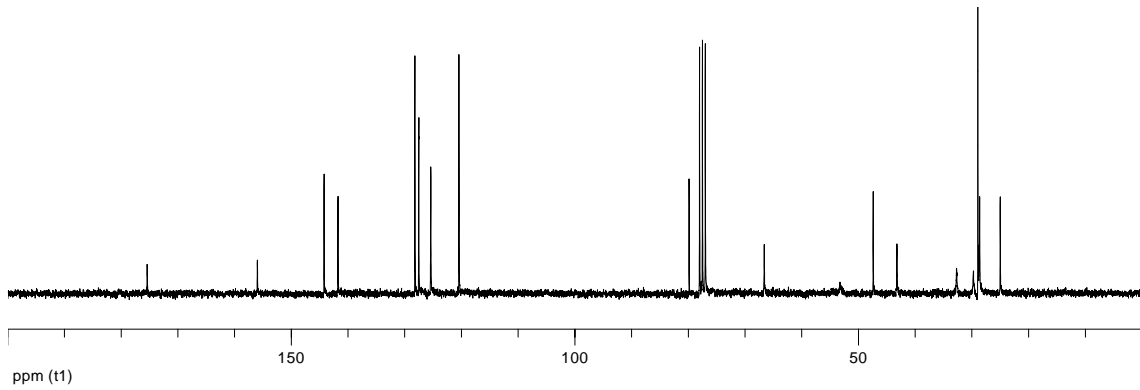
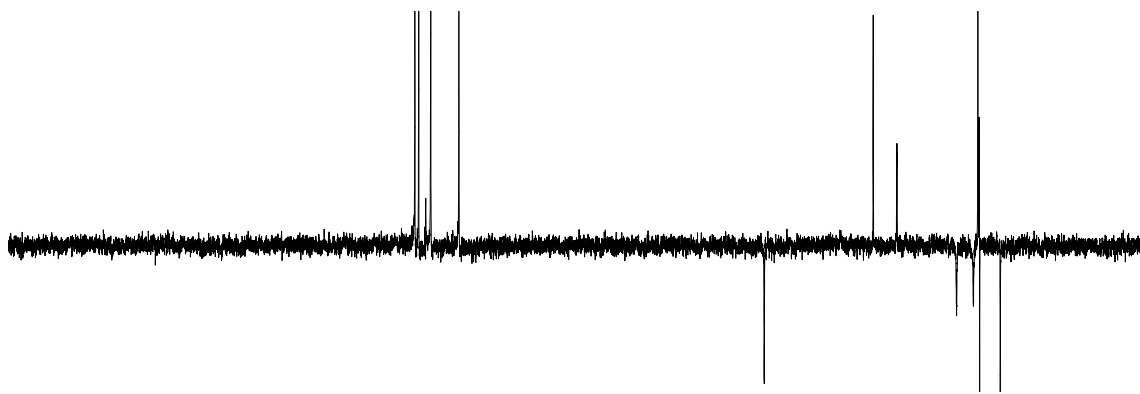
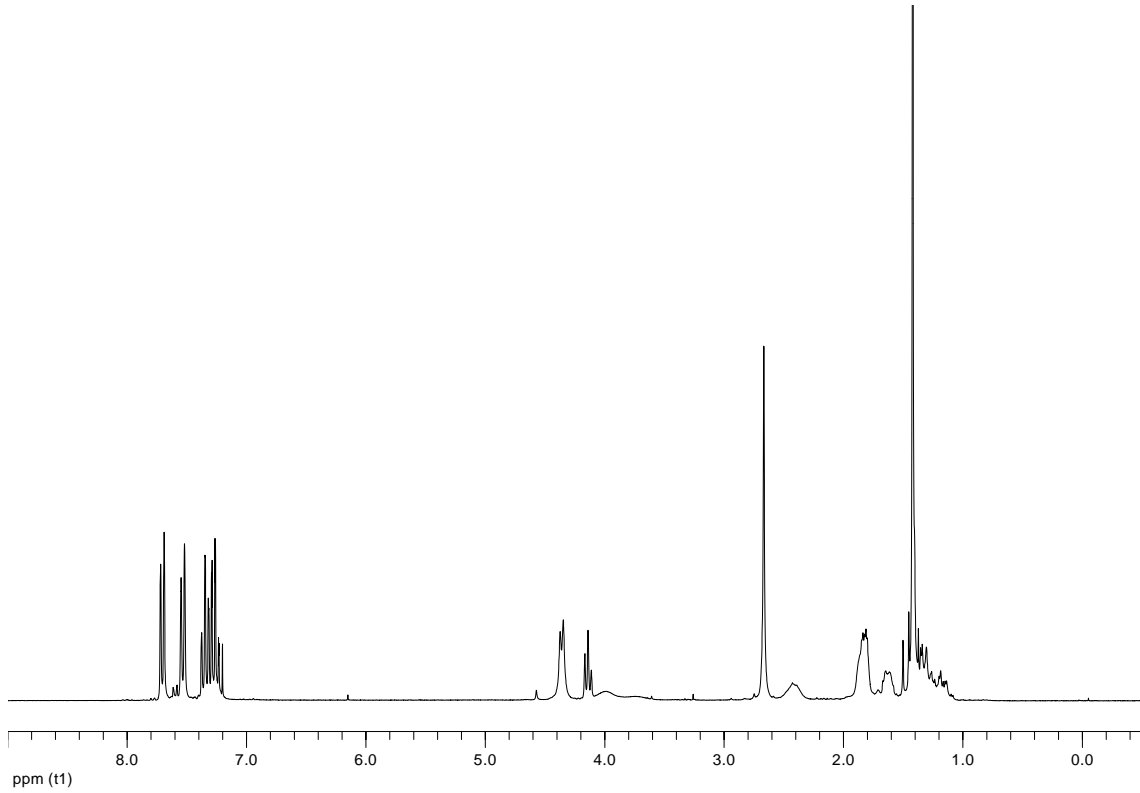
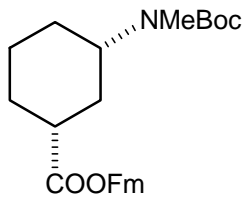
## **ANEXO 1: DATOS DE RMN**

### 11.2. Síntesis del ácido N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico y de sus derivados

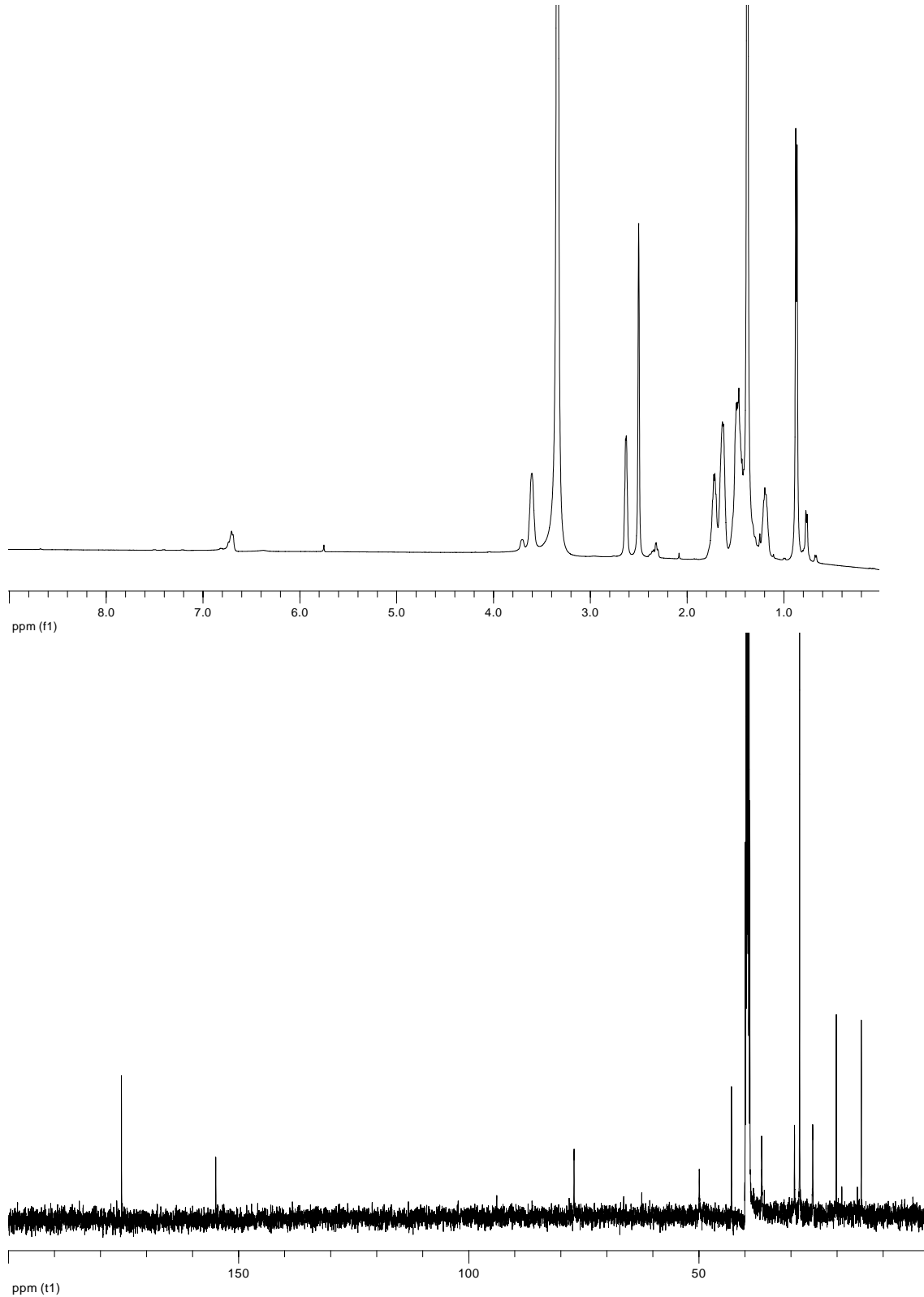
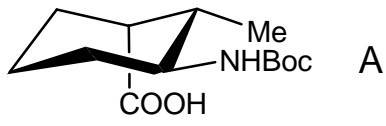


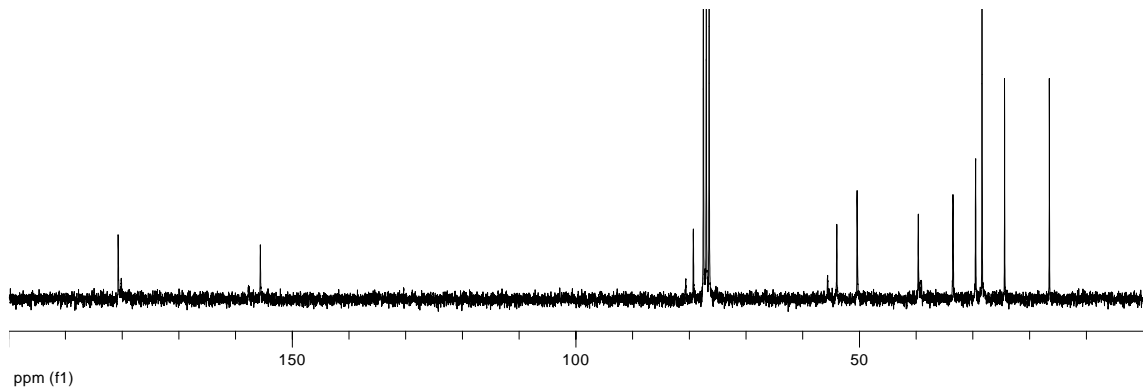
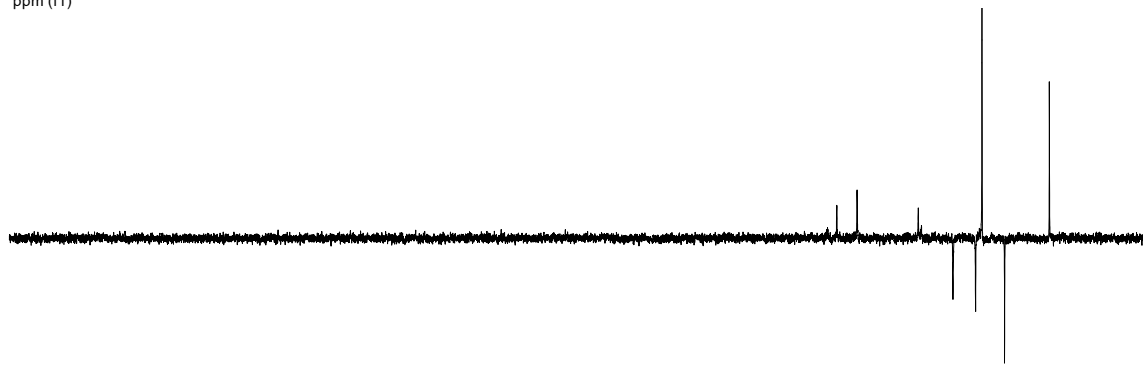
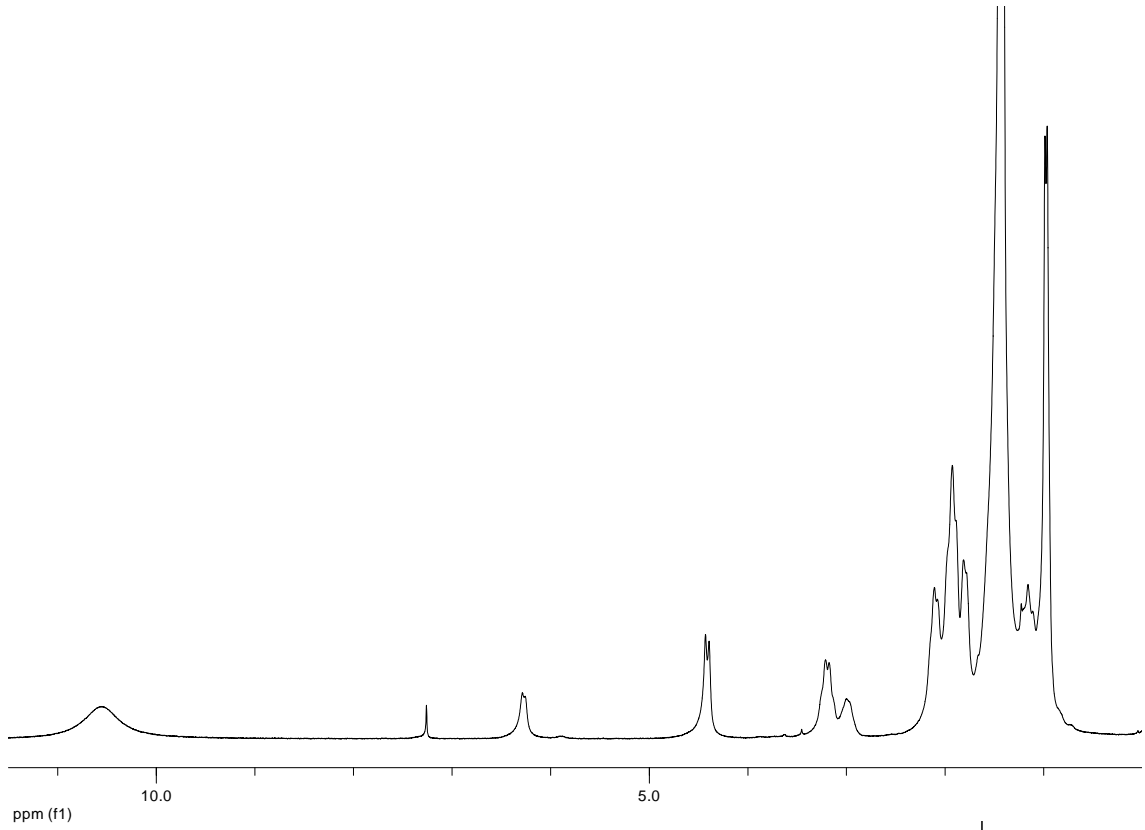
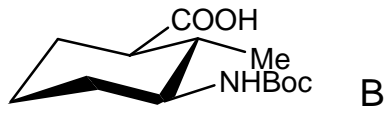


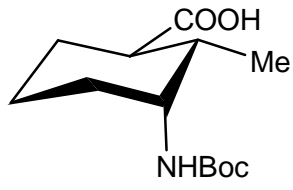




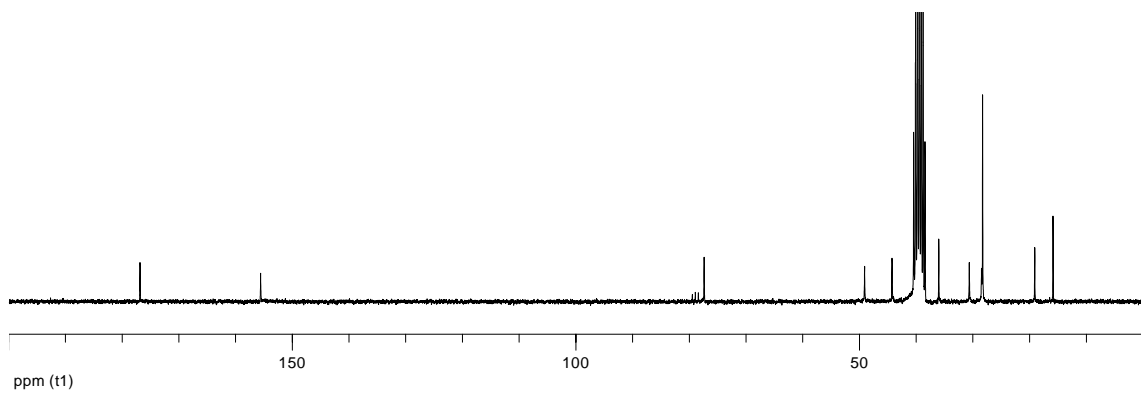
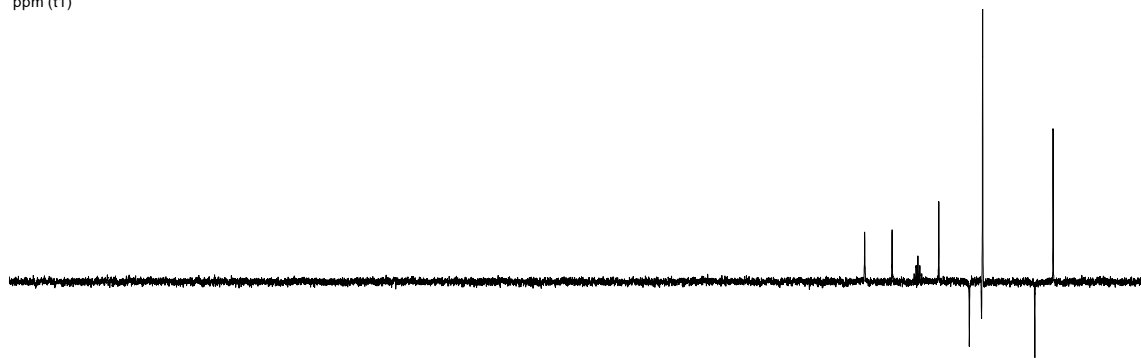
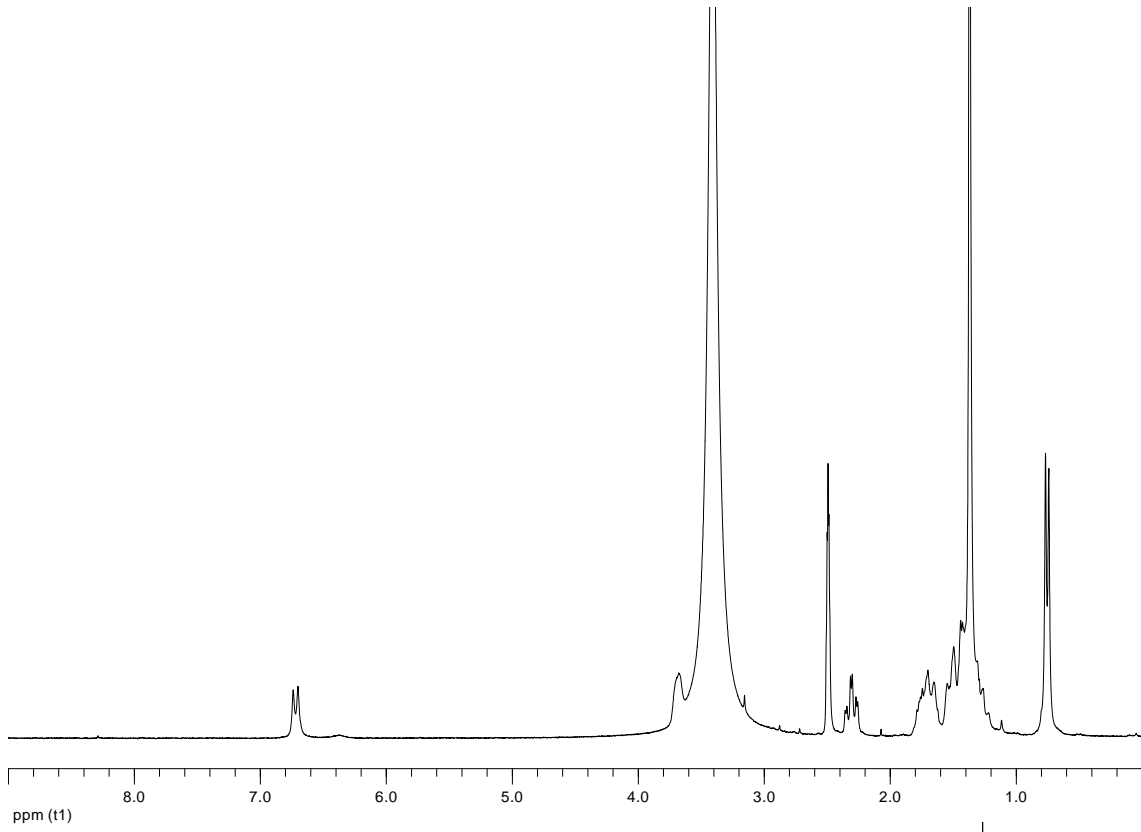


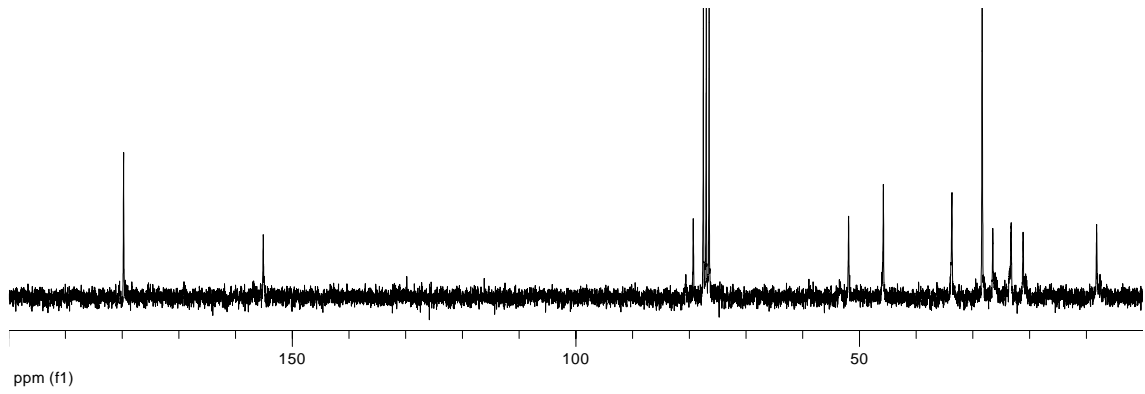
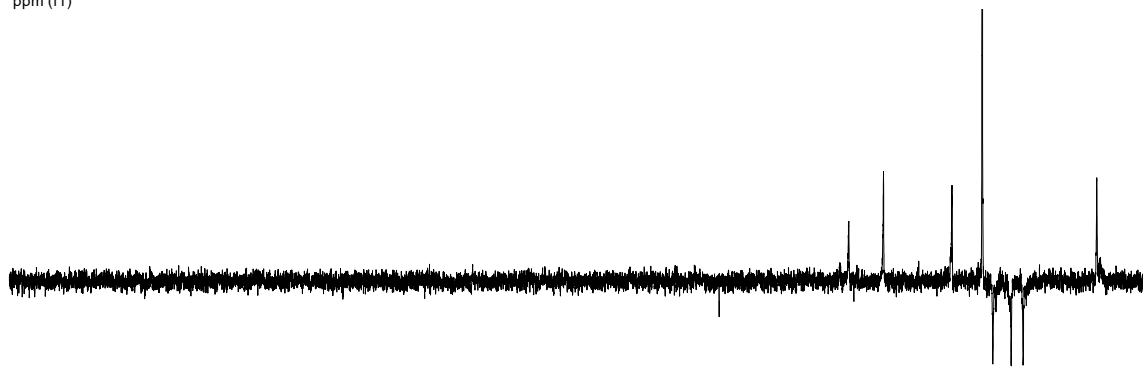
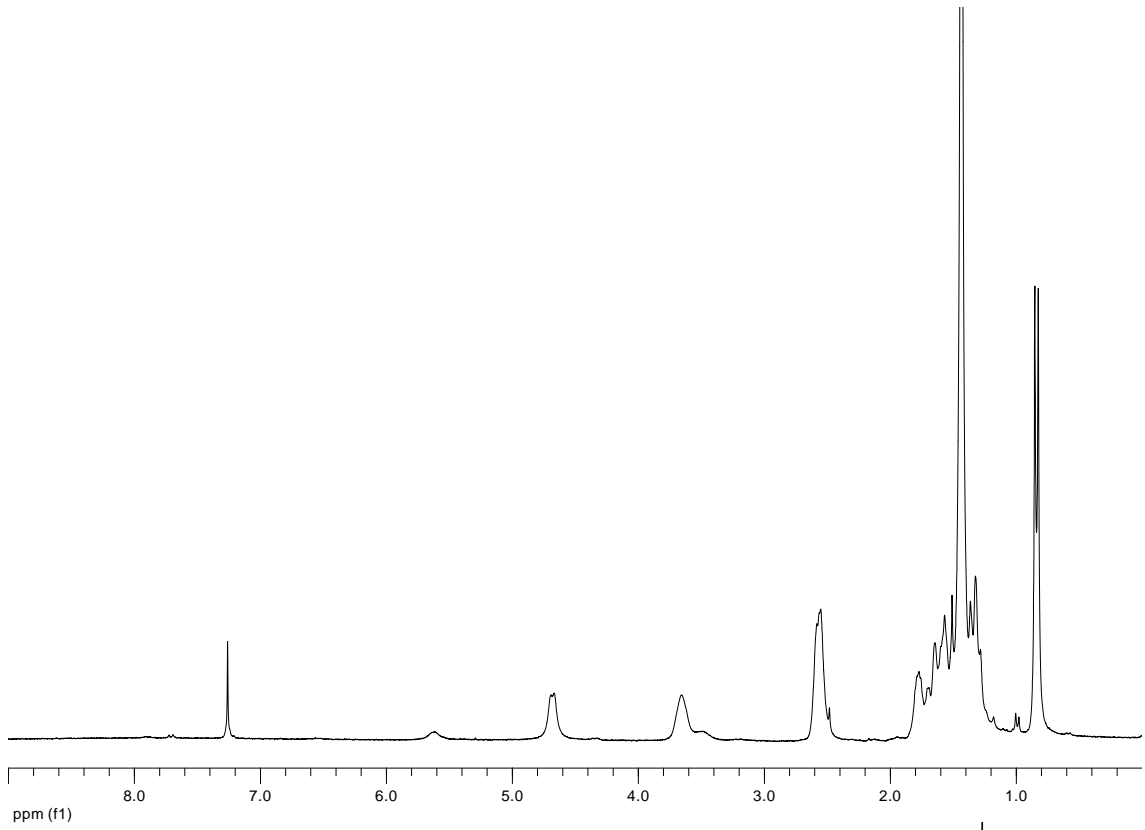
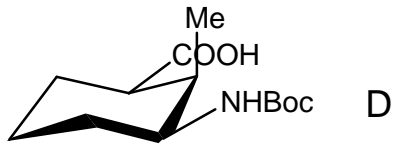
**11.3. Síntesis del ácido N-Boc-*cis*-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico**

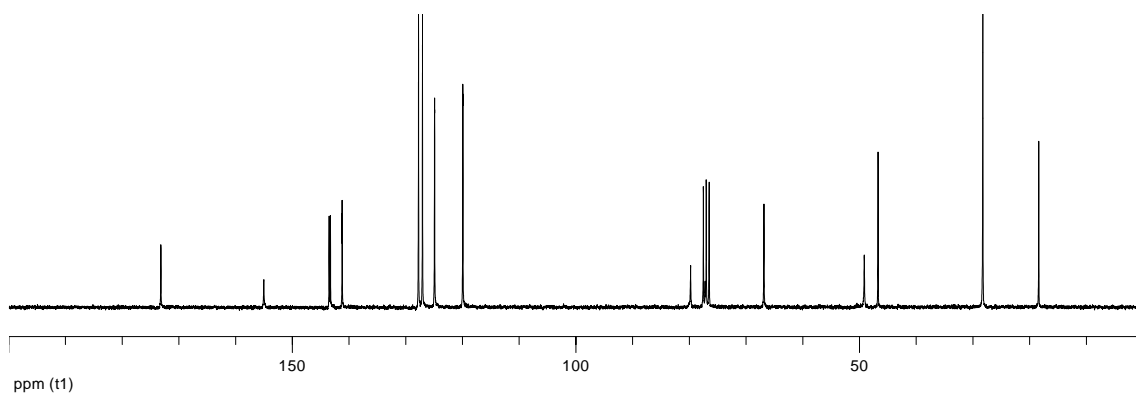
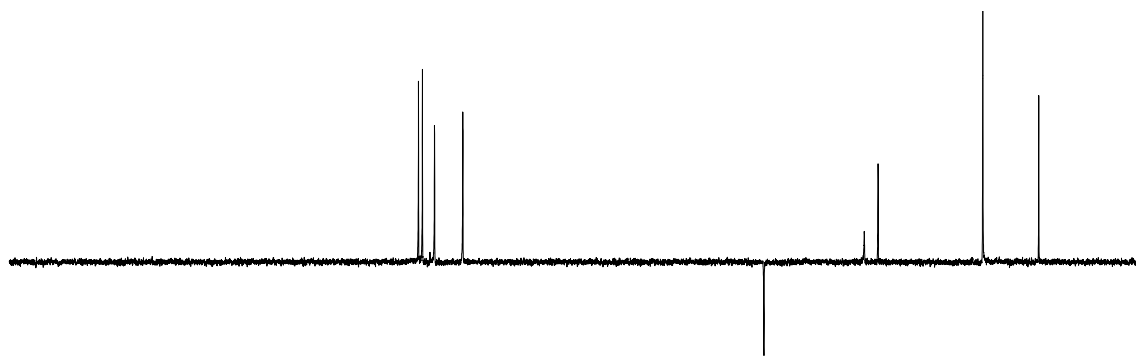
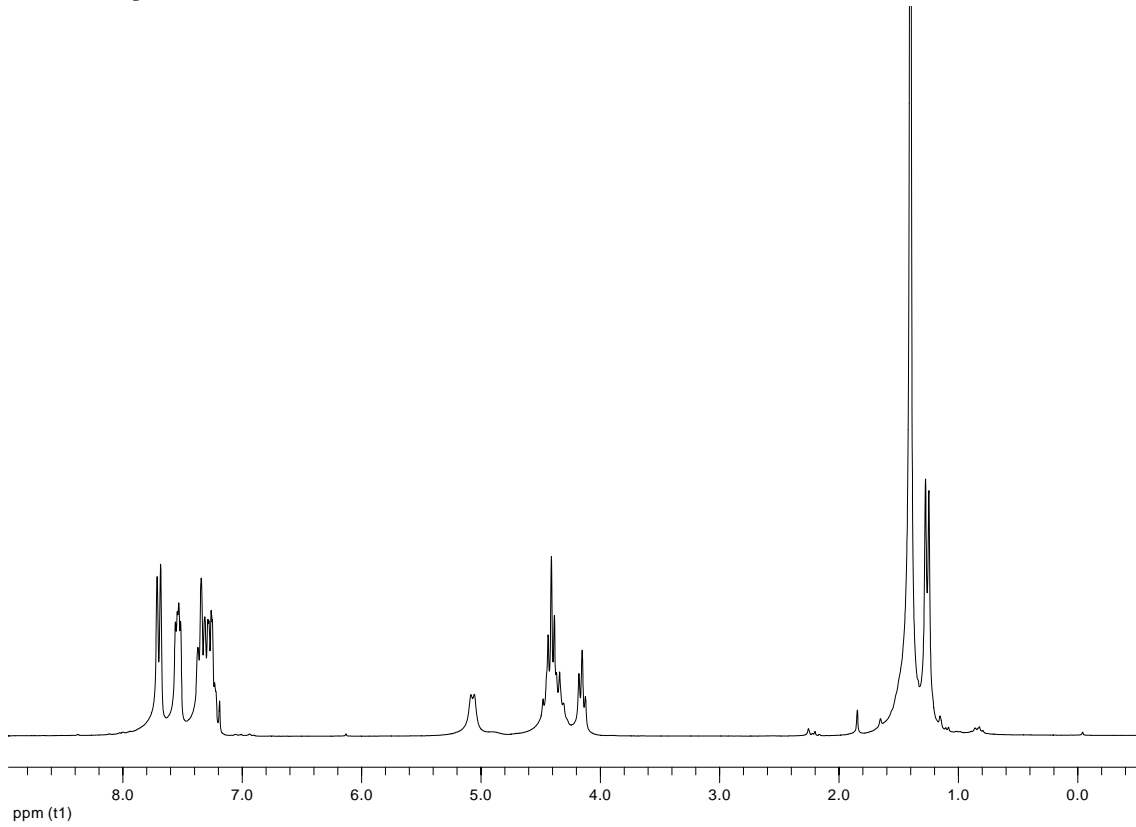
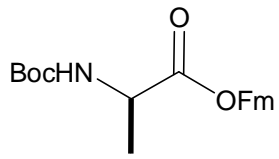


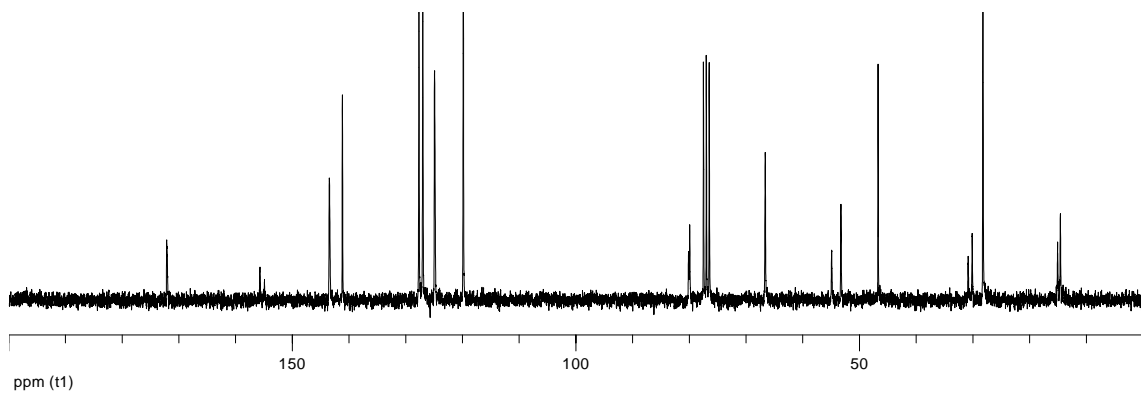
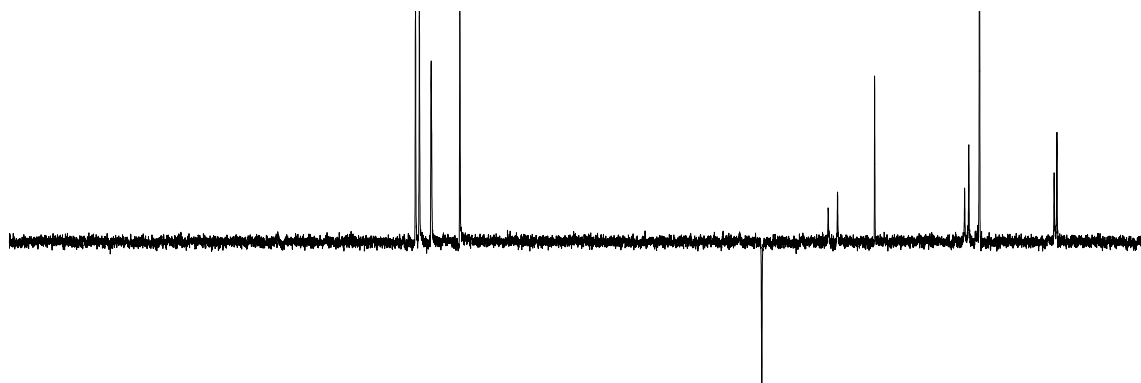
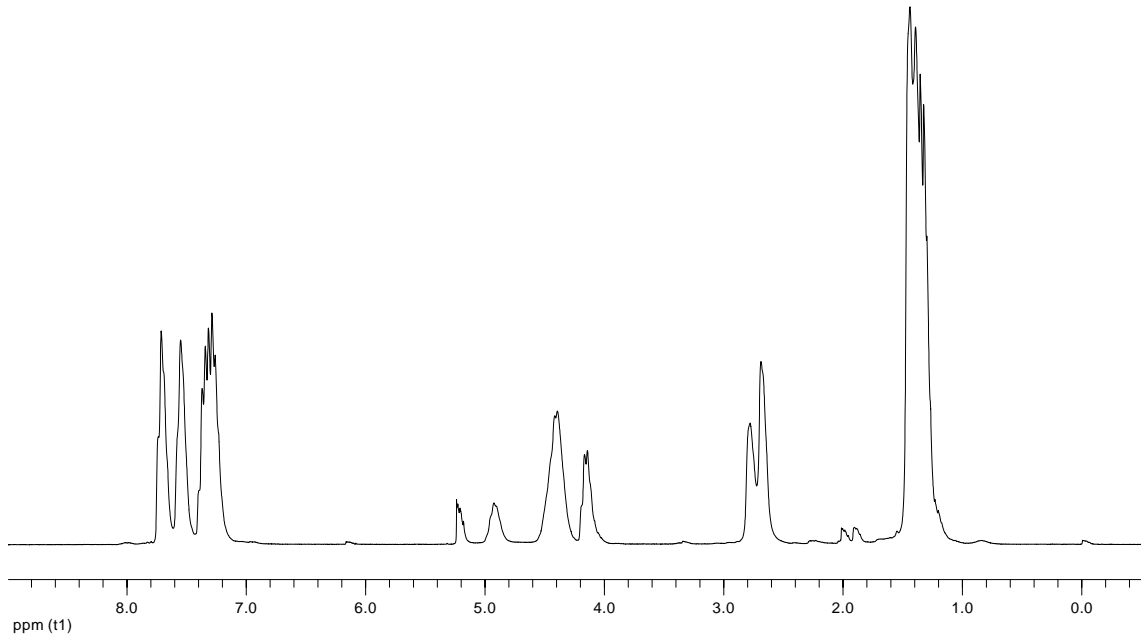
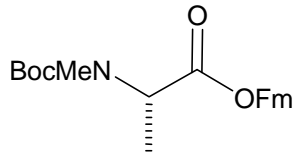


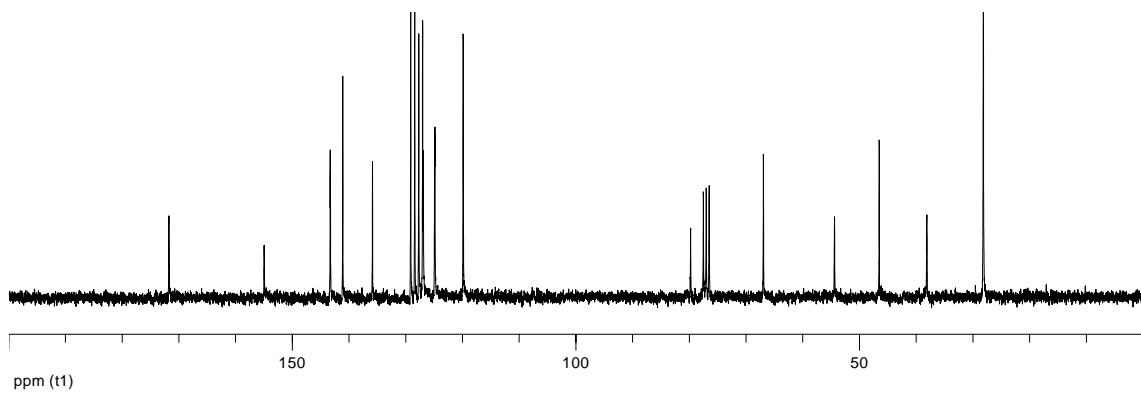
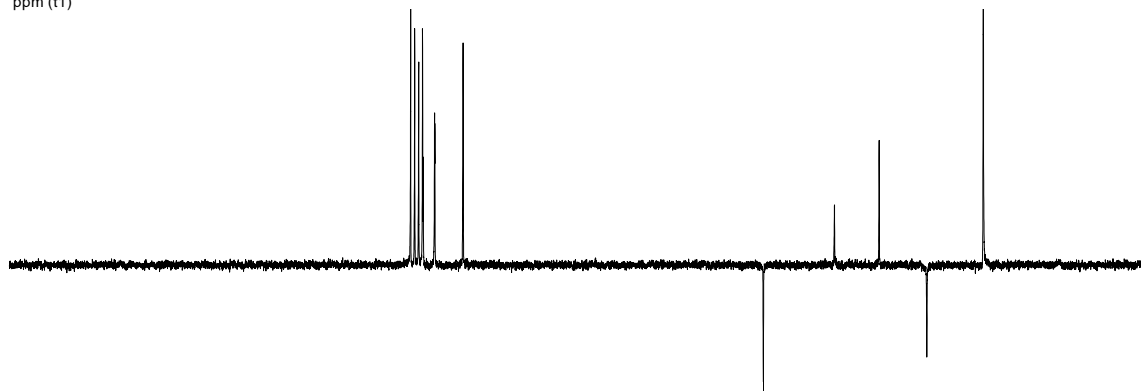
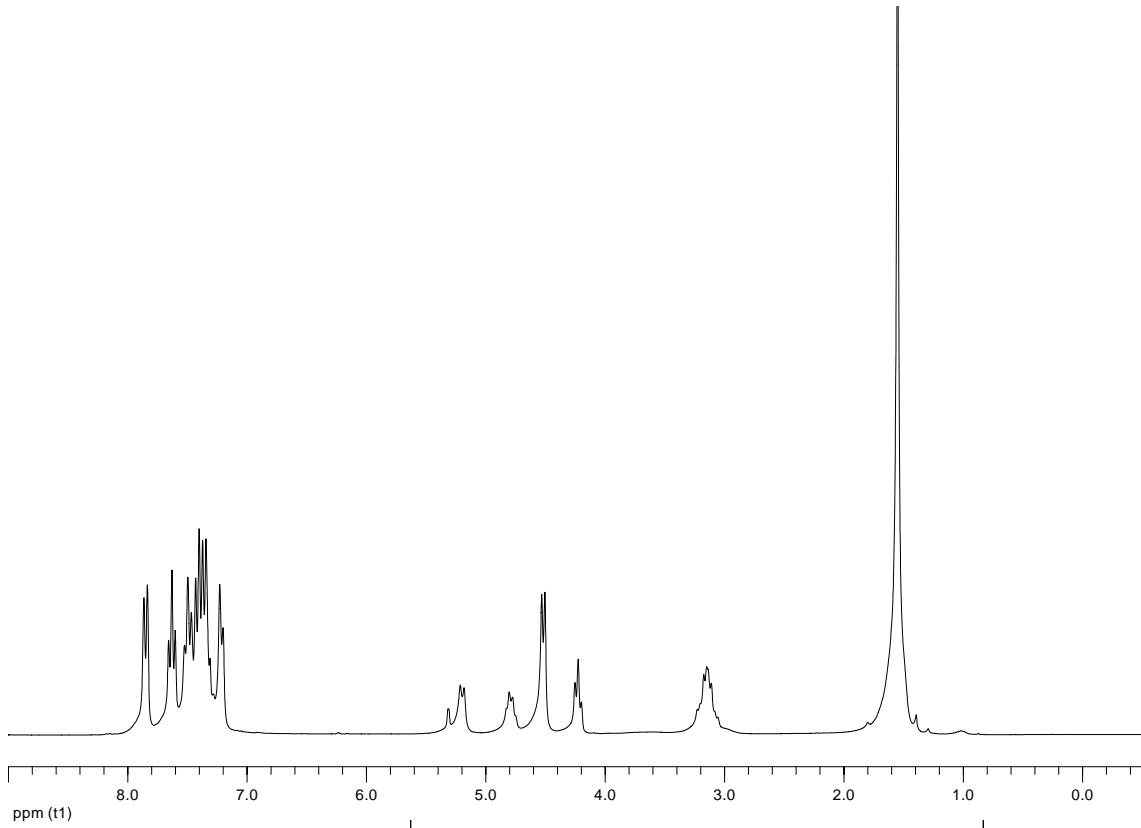
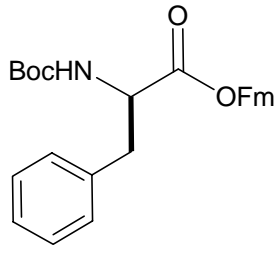
C





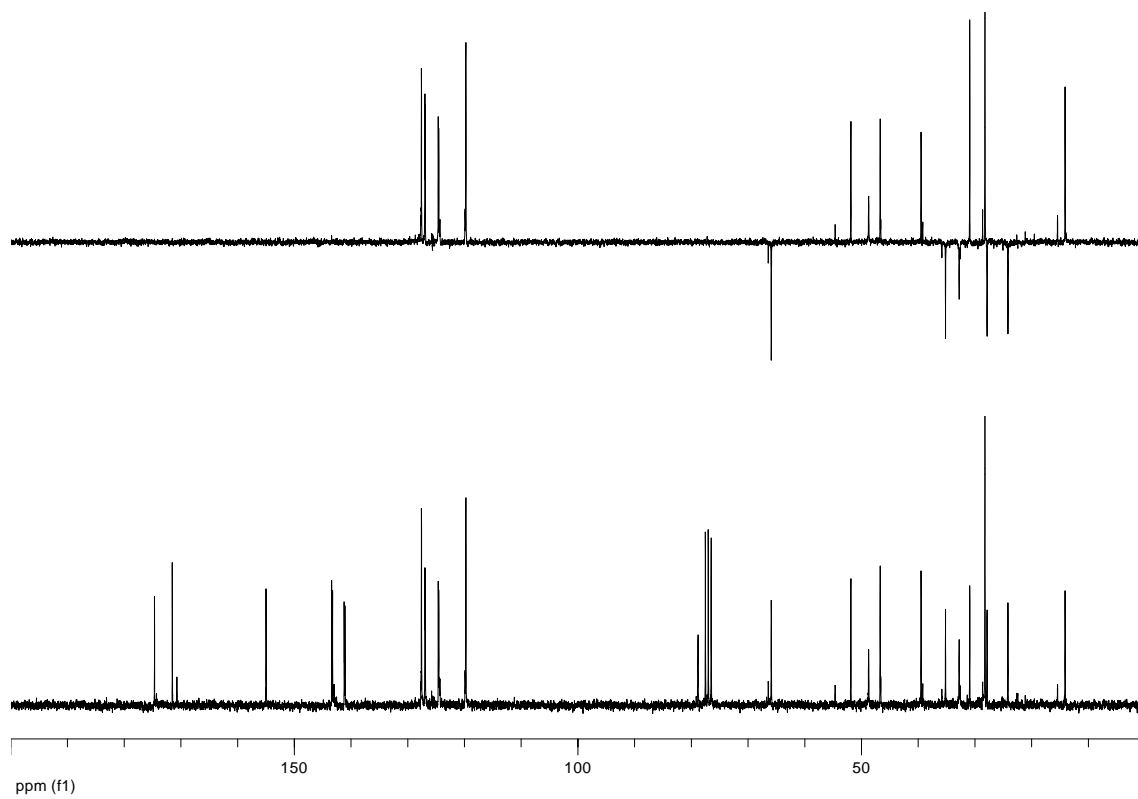
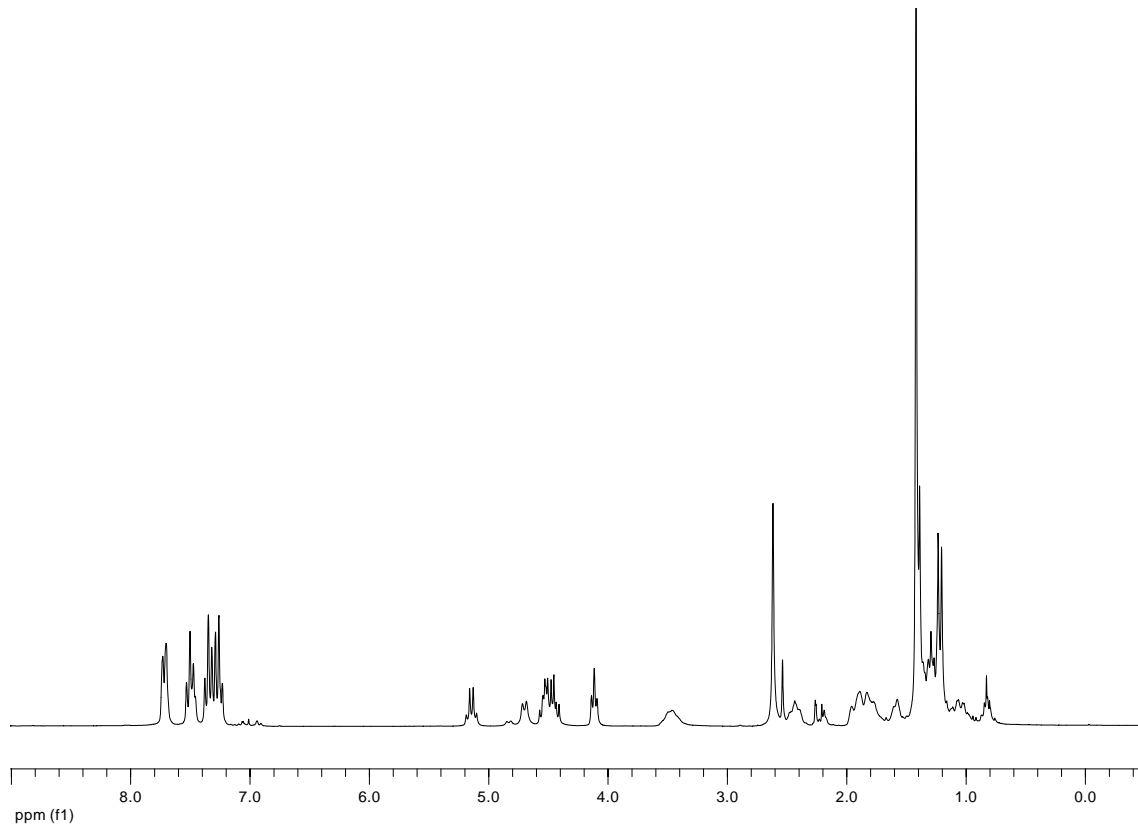
11.4.  $\alpha$ -aminoácidos



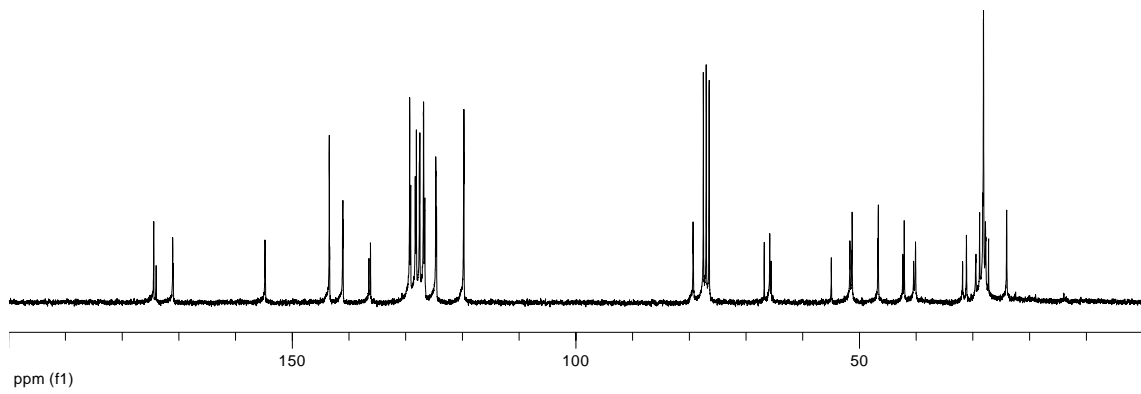
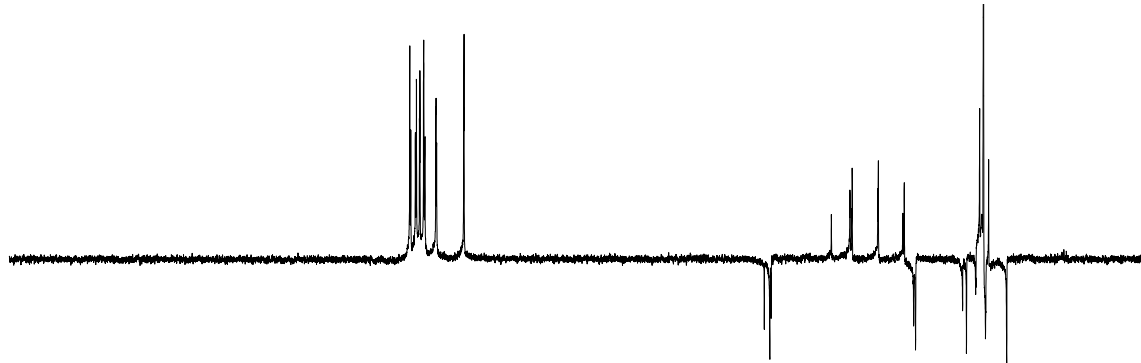
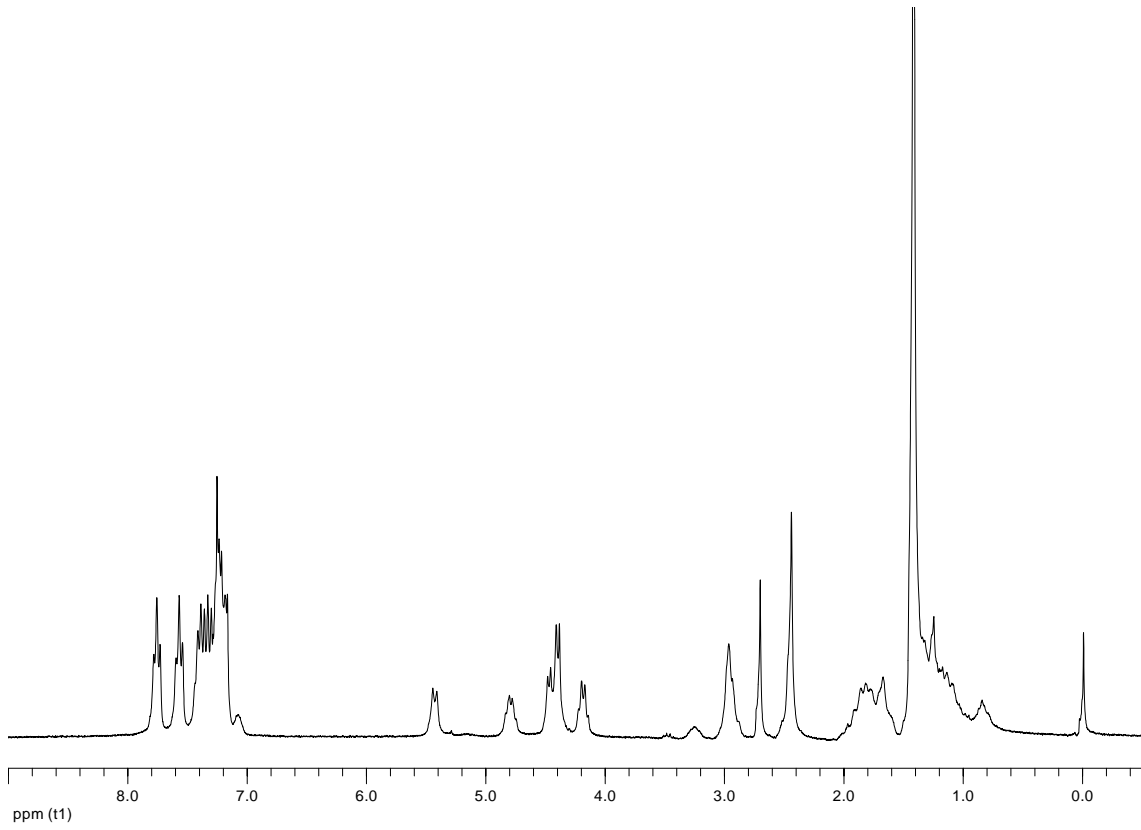


## 11.5. Síntesis de péptidos en disolución

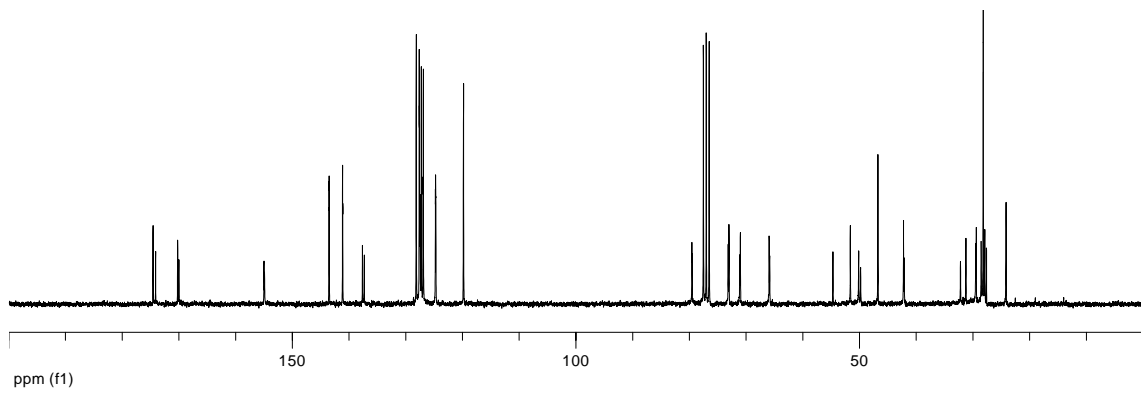
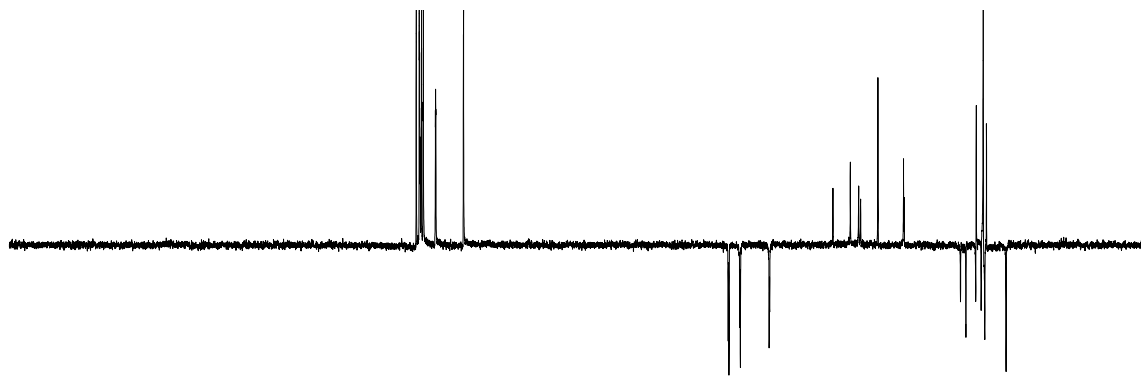
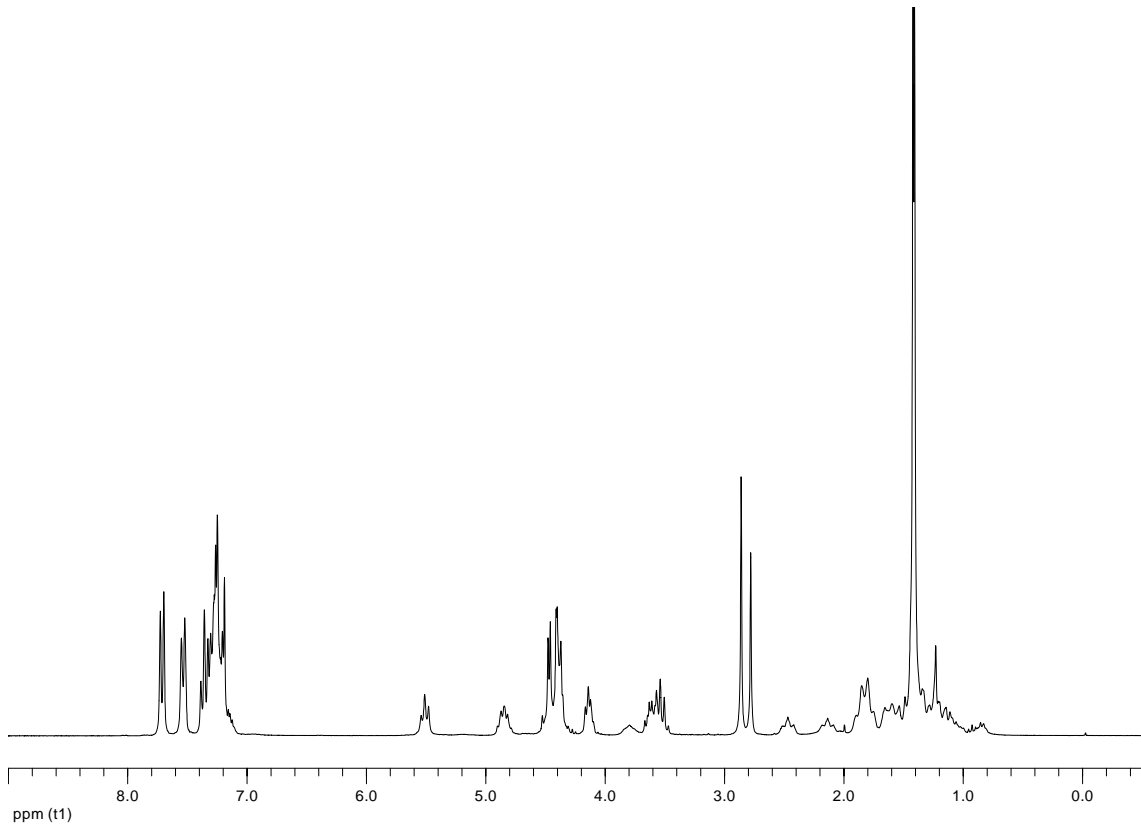
### Boc-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala-OFm



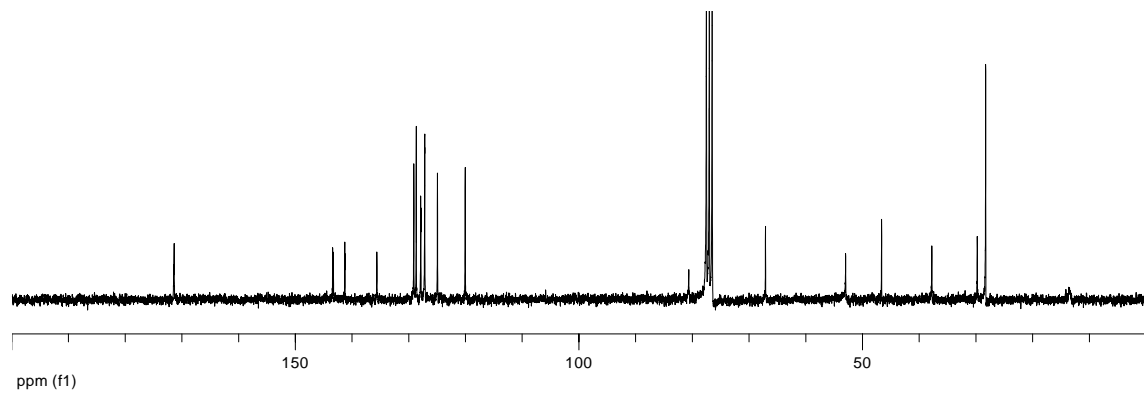
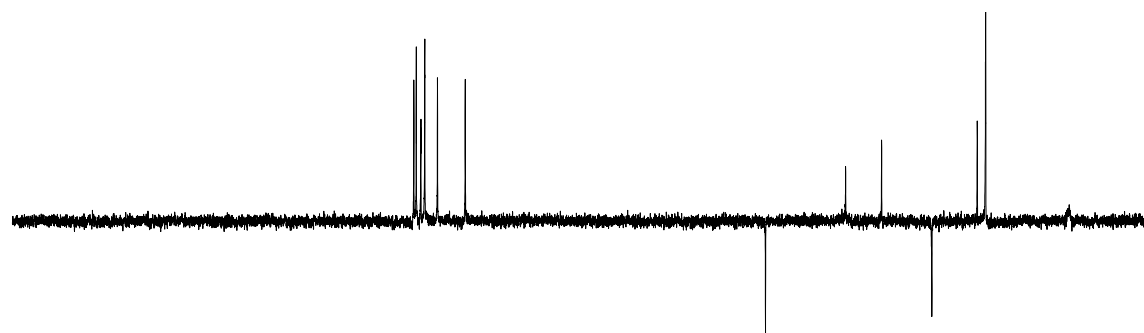
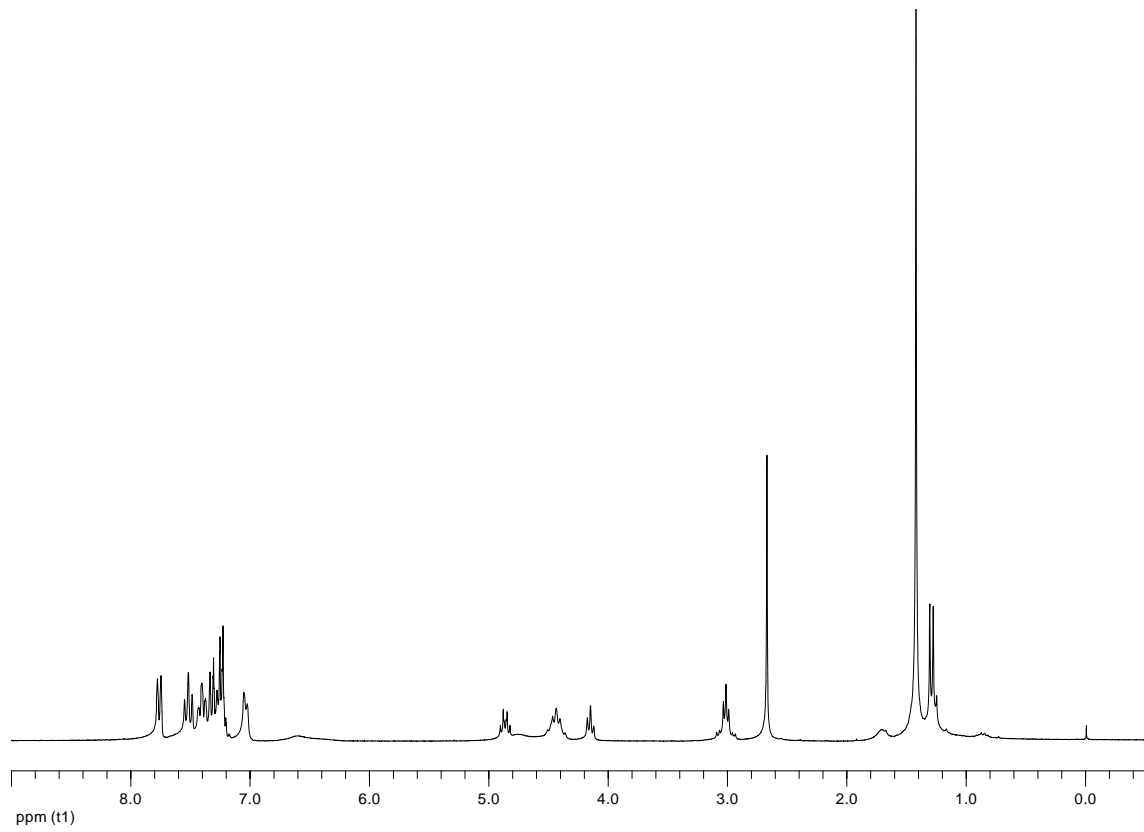
**Boc-D-Phe-L-MeN- $\gamma$ -Ach-OFm**



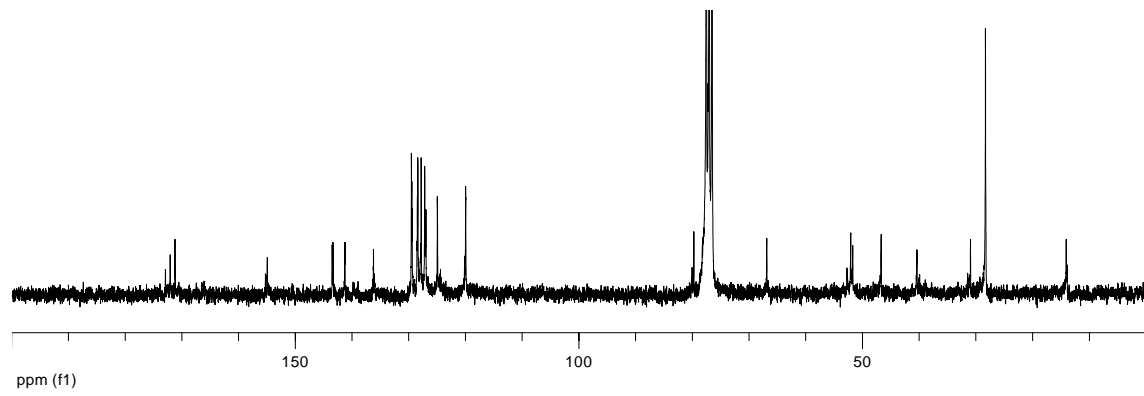
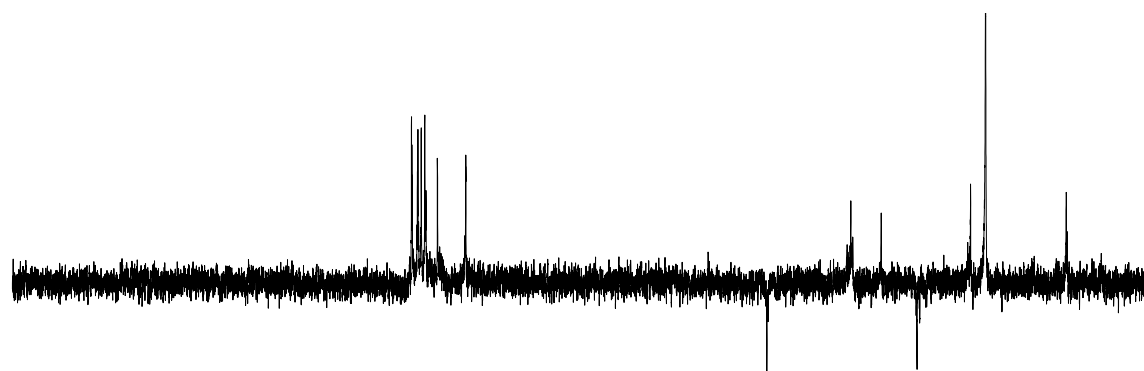
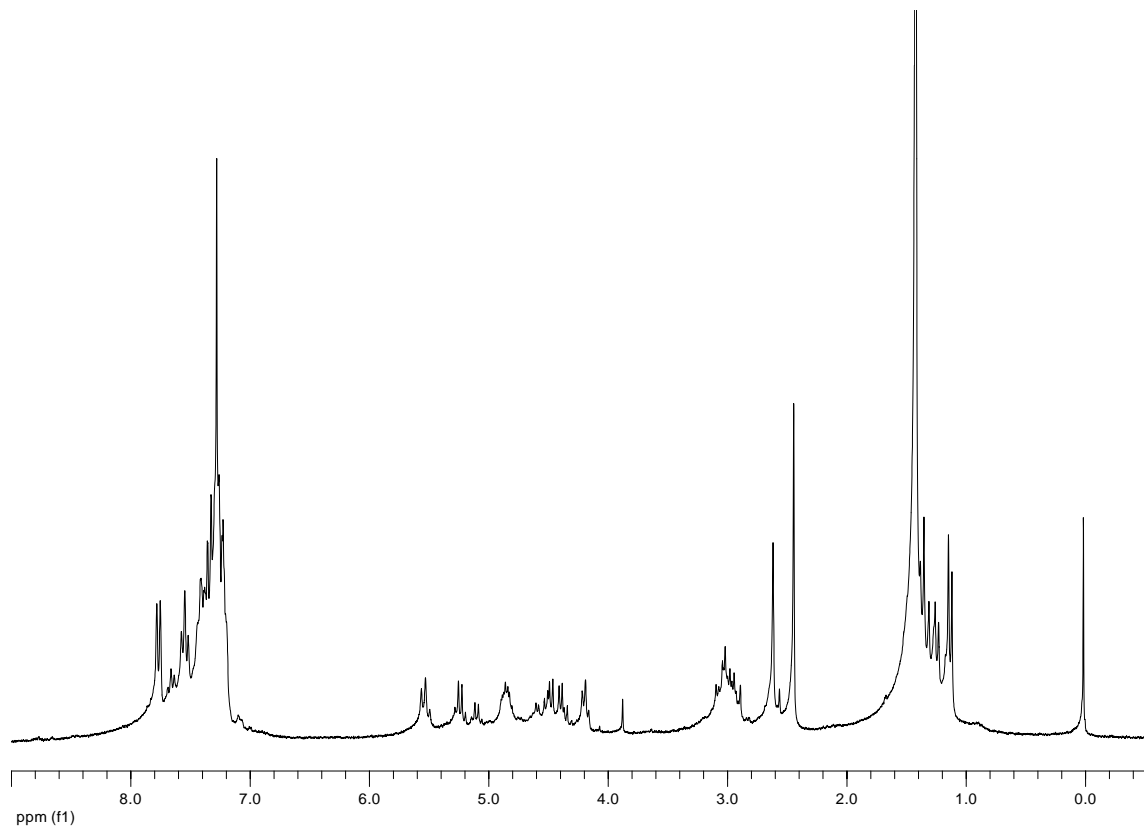
**Boc-[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-]-OFm**



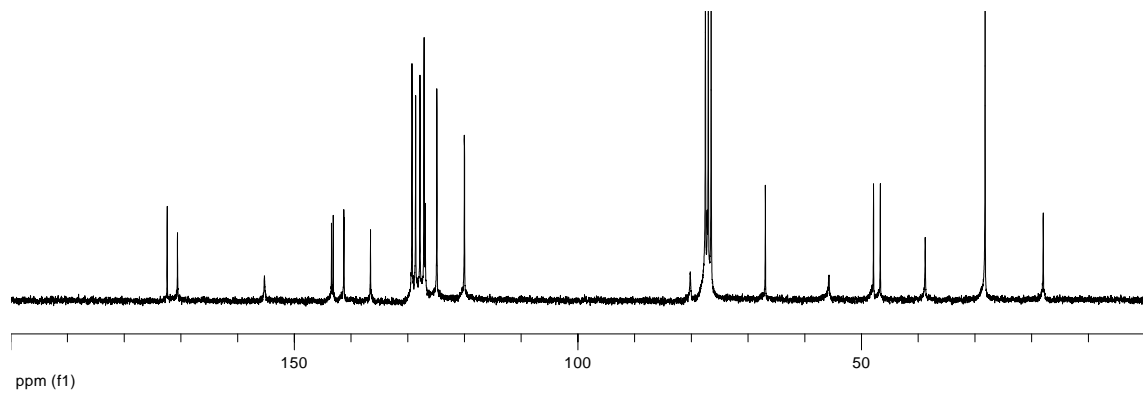
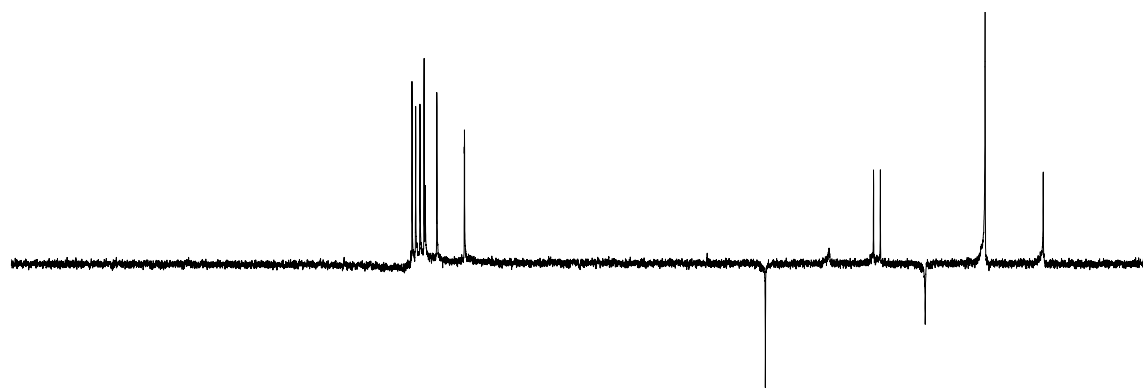
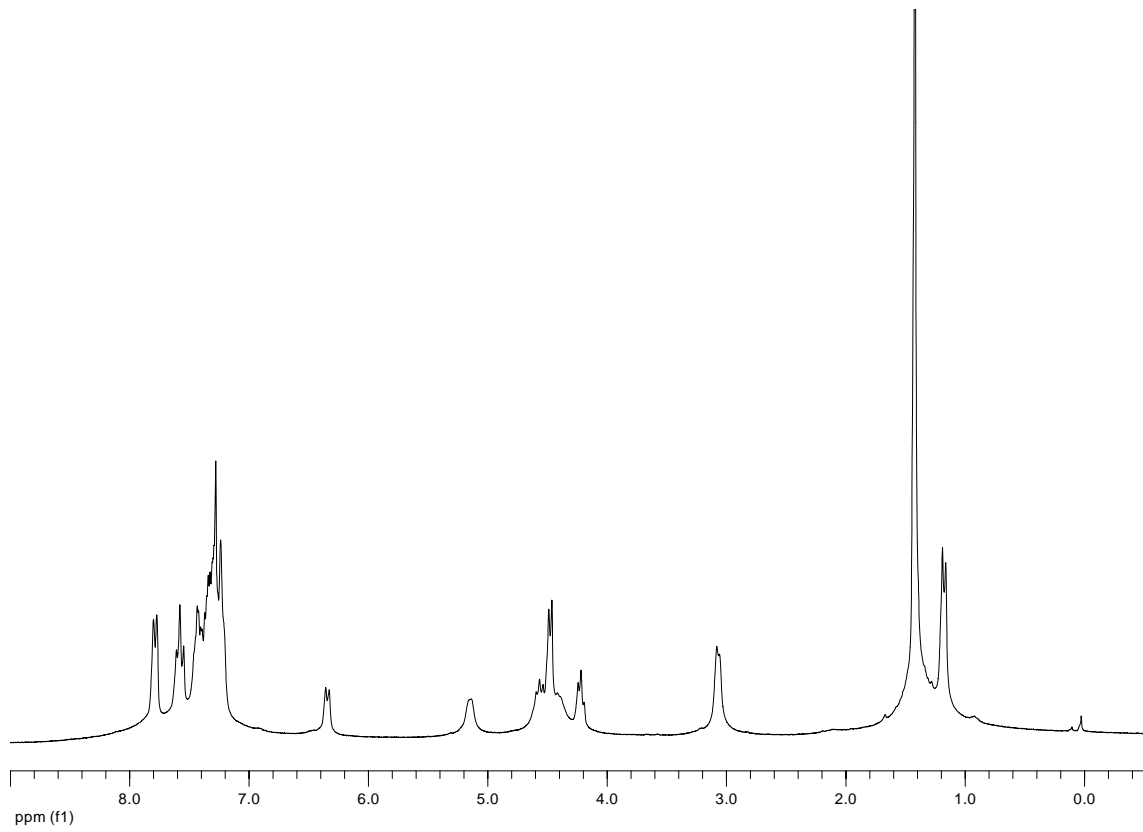
**Boc-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm**



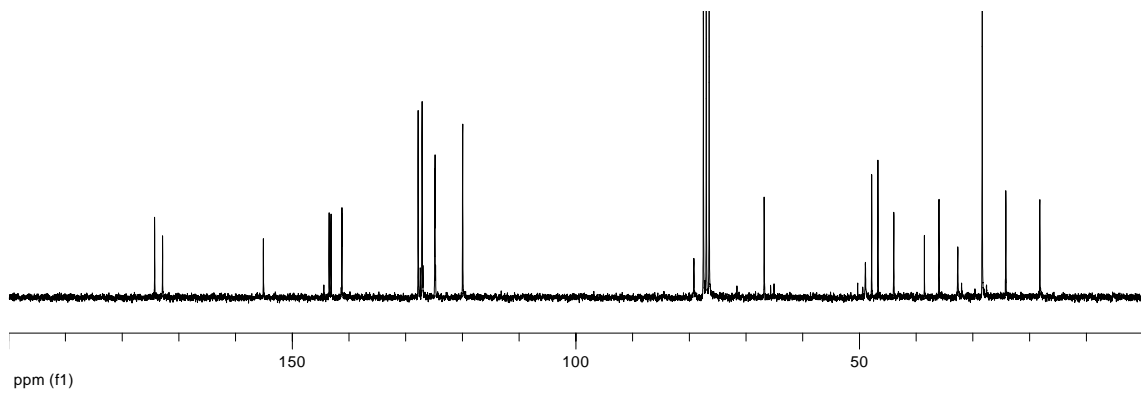
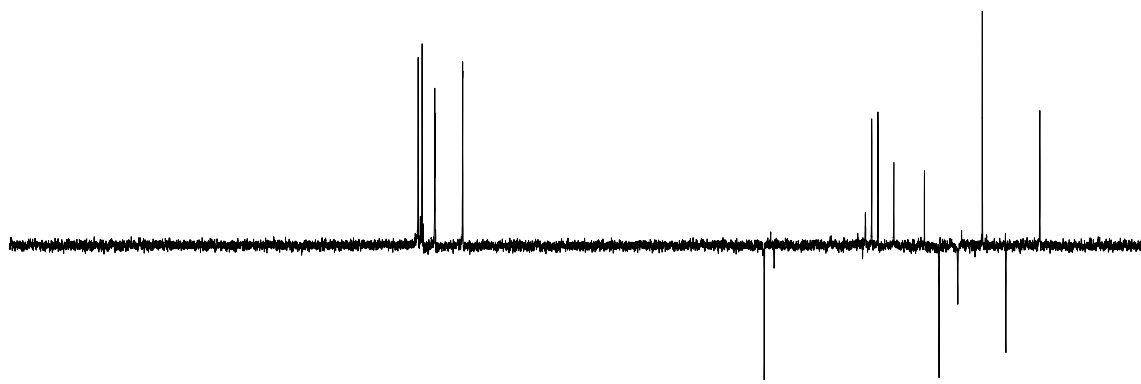
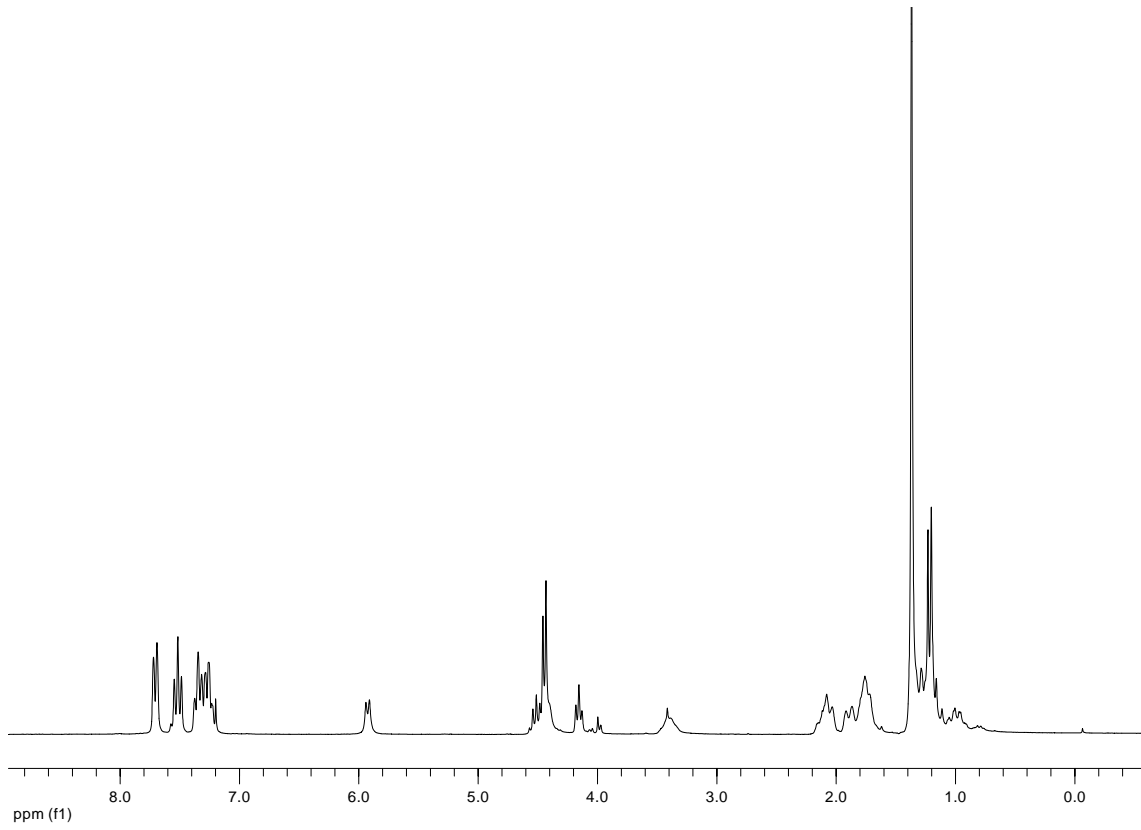
**Boc-L-Phe-D-MeN-Ala-OFm**



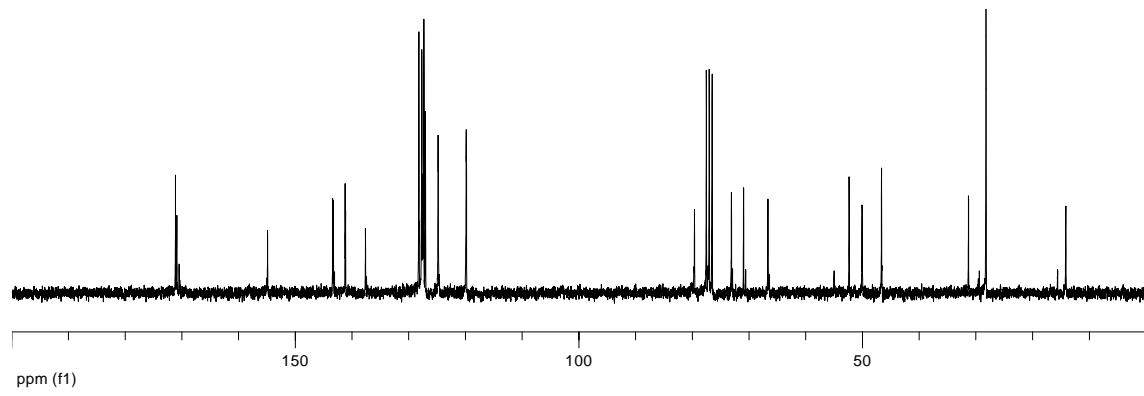
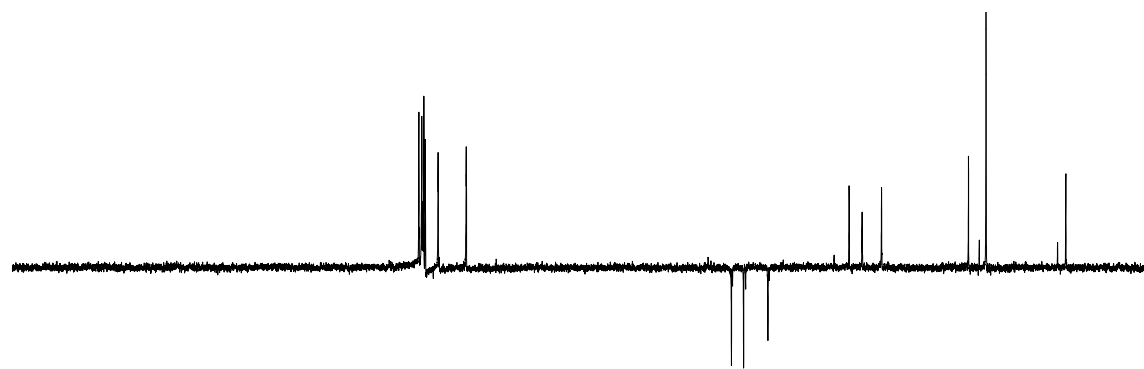
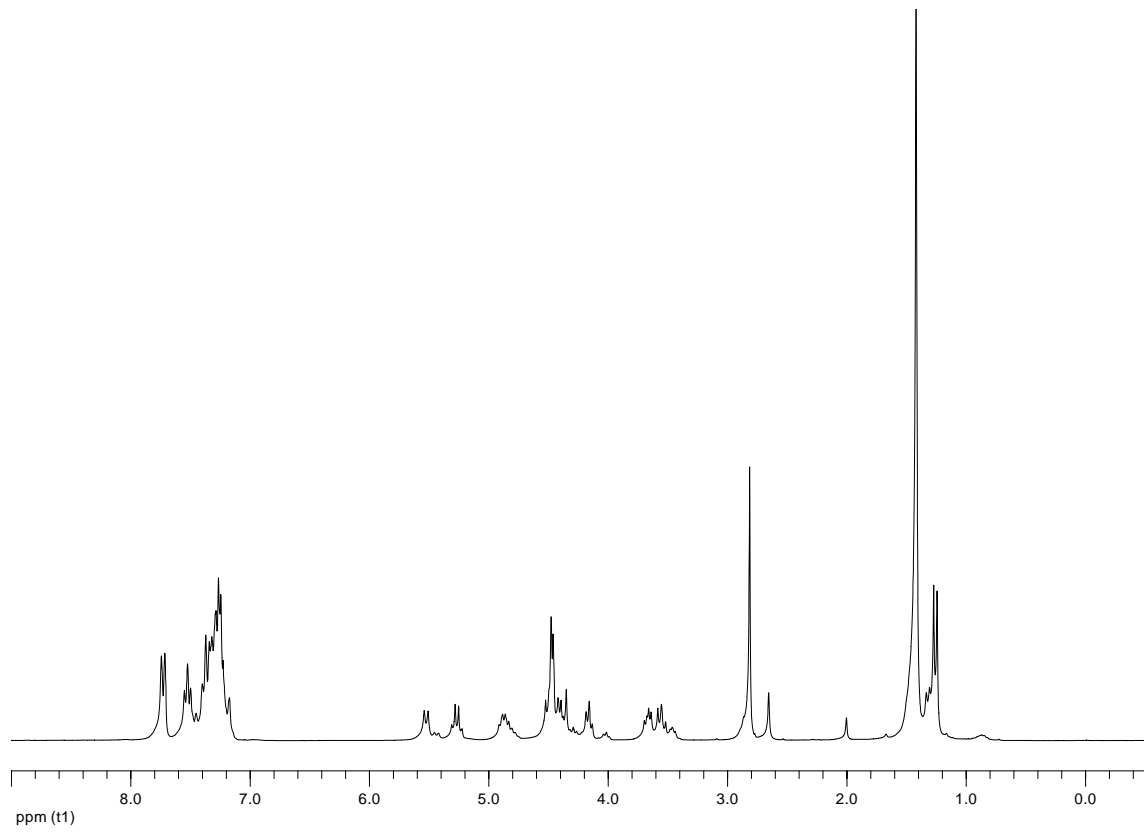
**Boc-L-Phe-D-Ala-OFm**



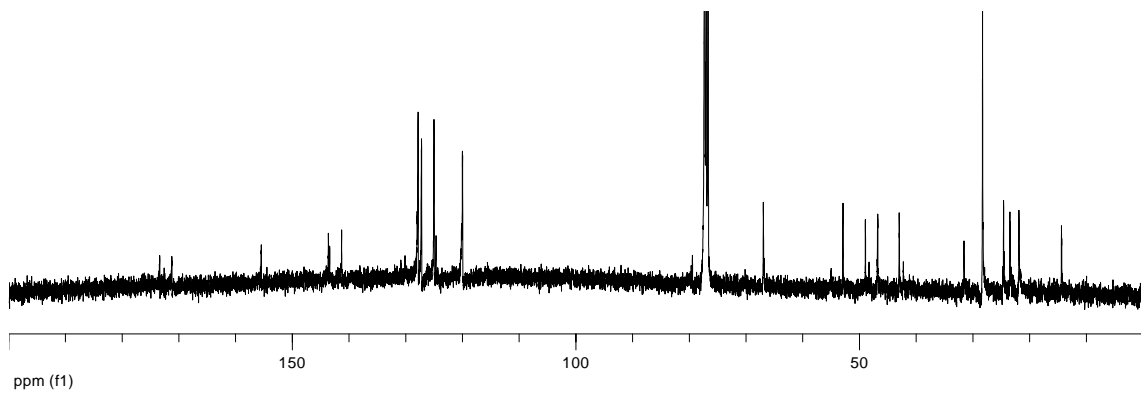
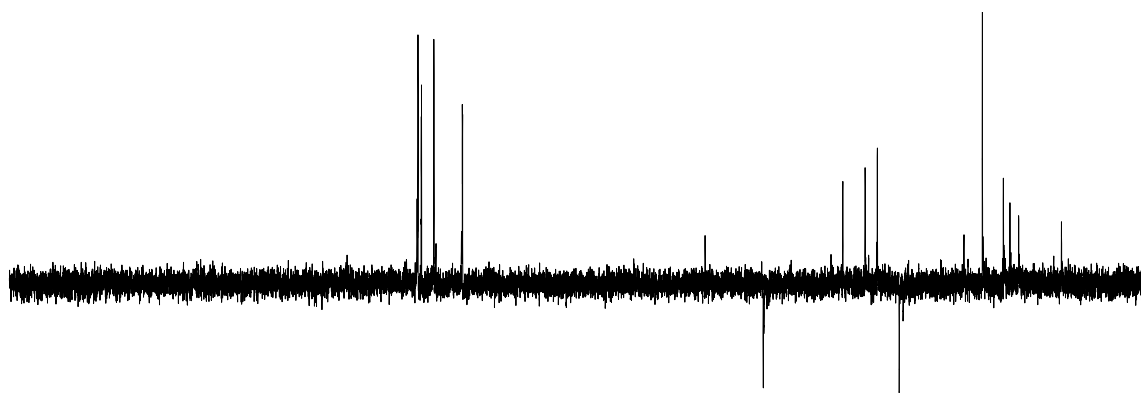
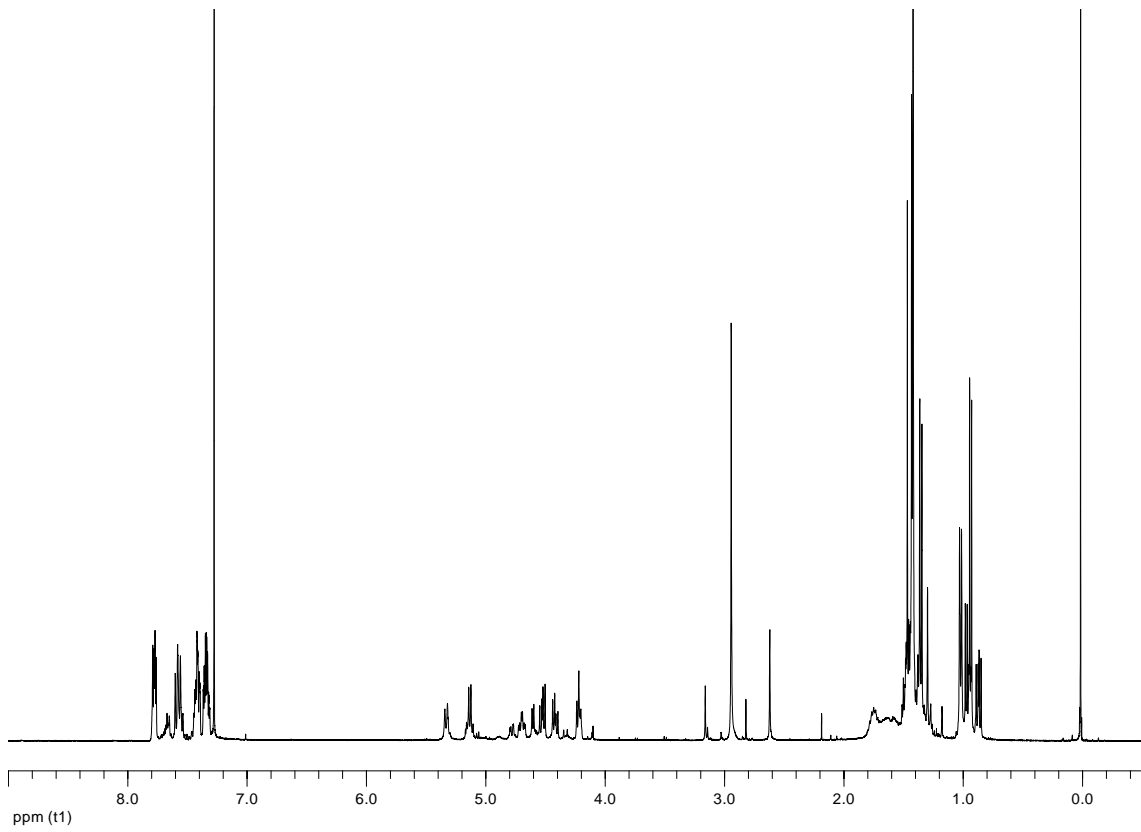
**Boc-L- $\gamma$ -Ach-D-Ala-OFm**



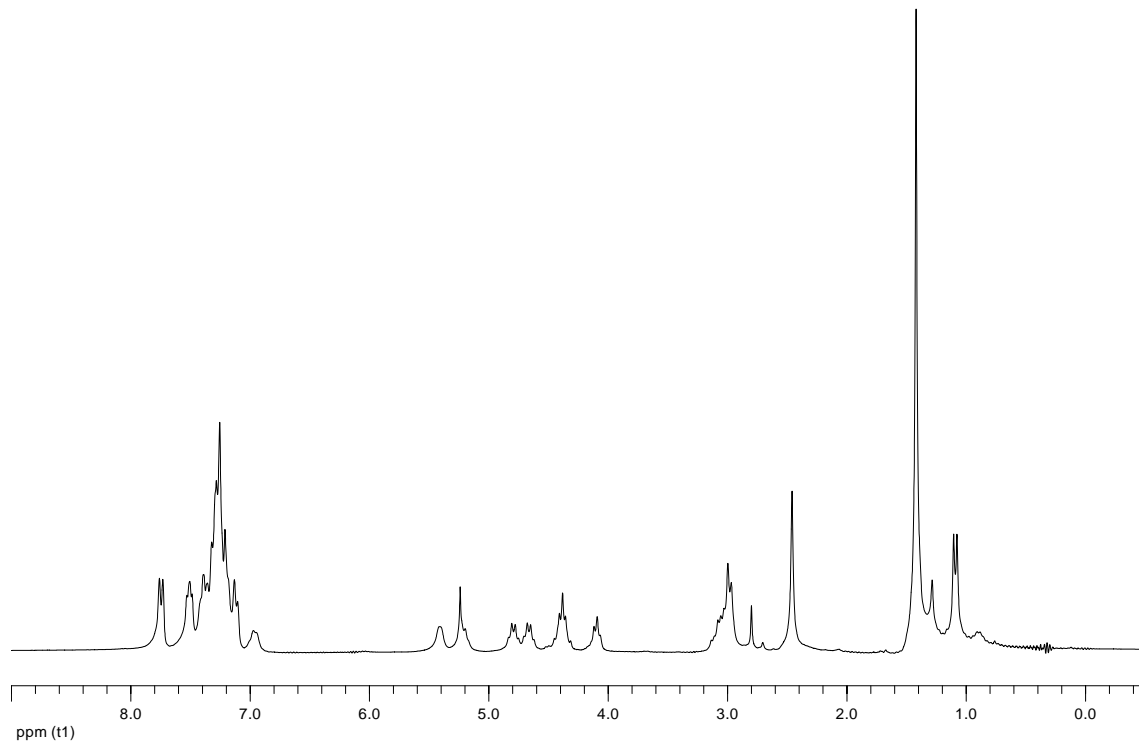
**Boc-[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala]-OFm**



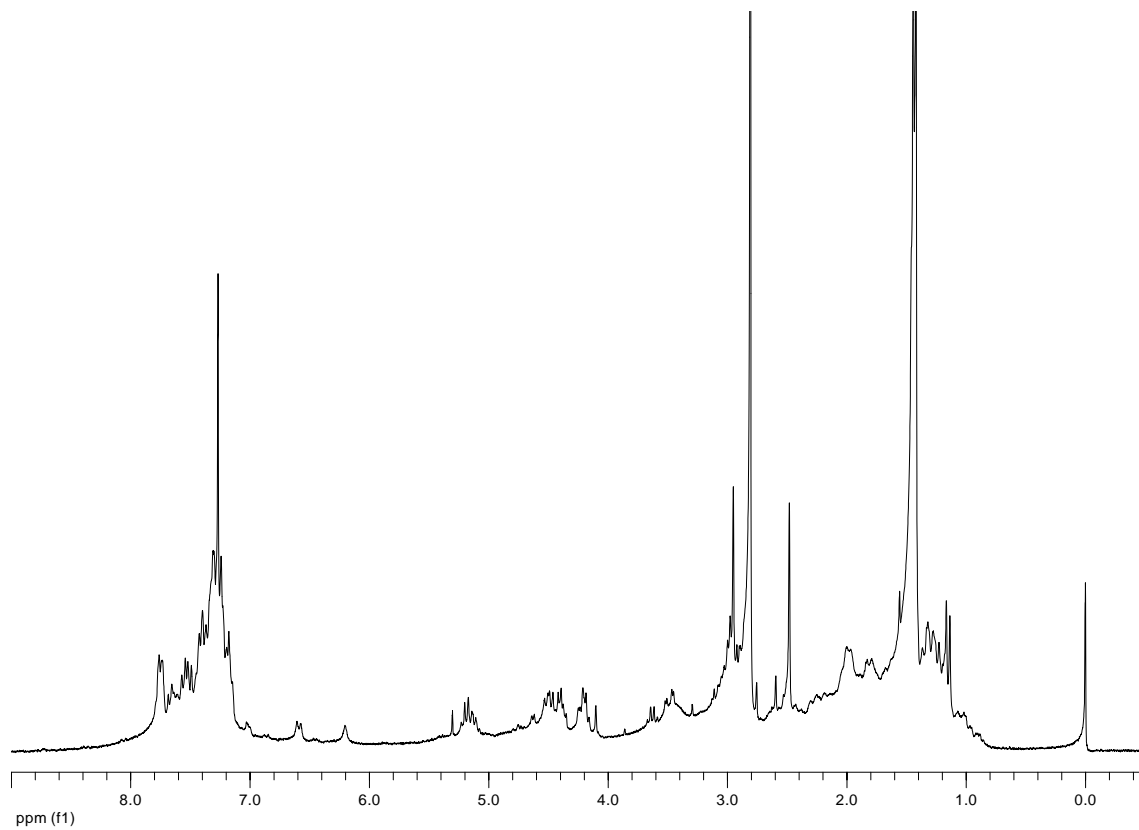
**Boc-L-Leu-D-MeN-Ala-OFm**



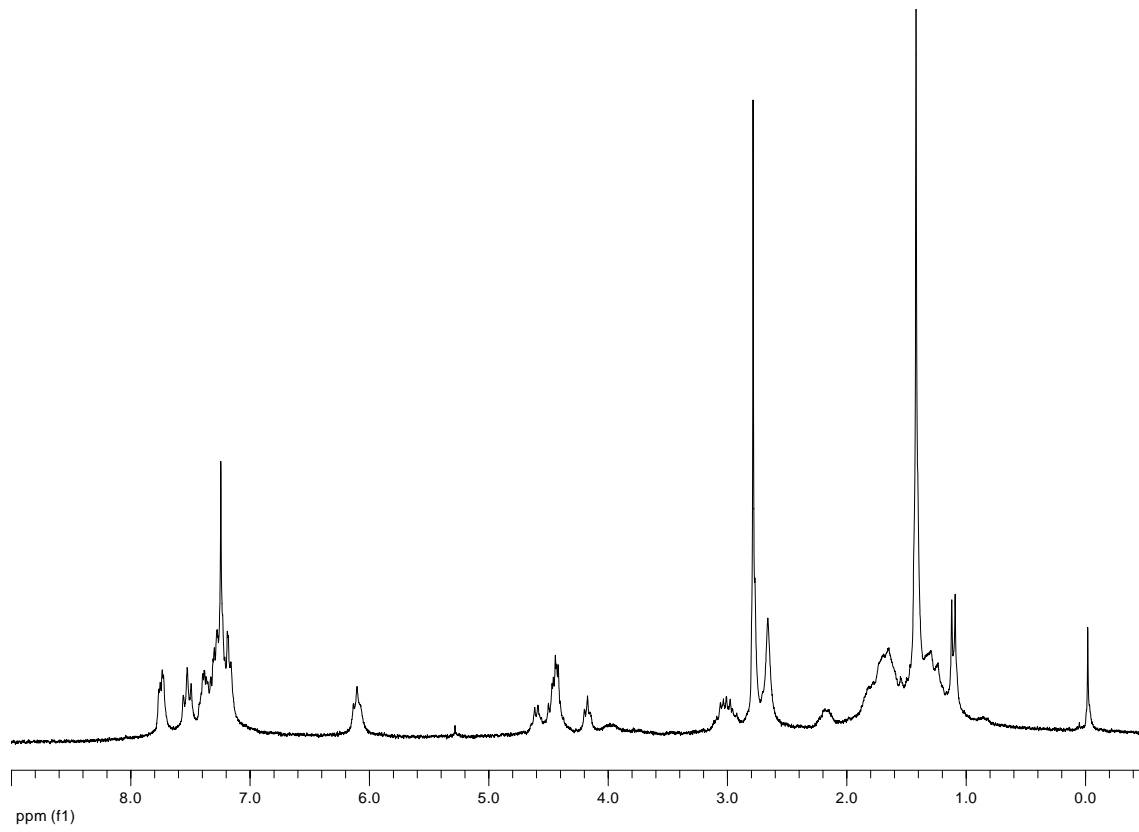
**Boc-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe-OFm**



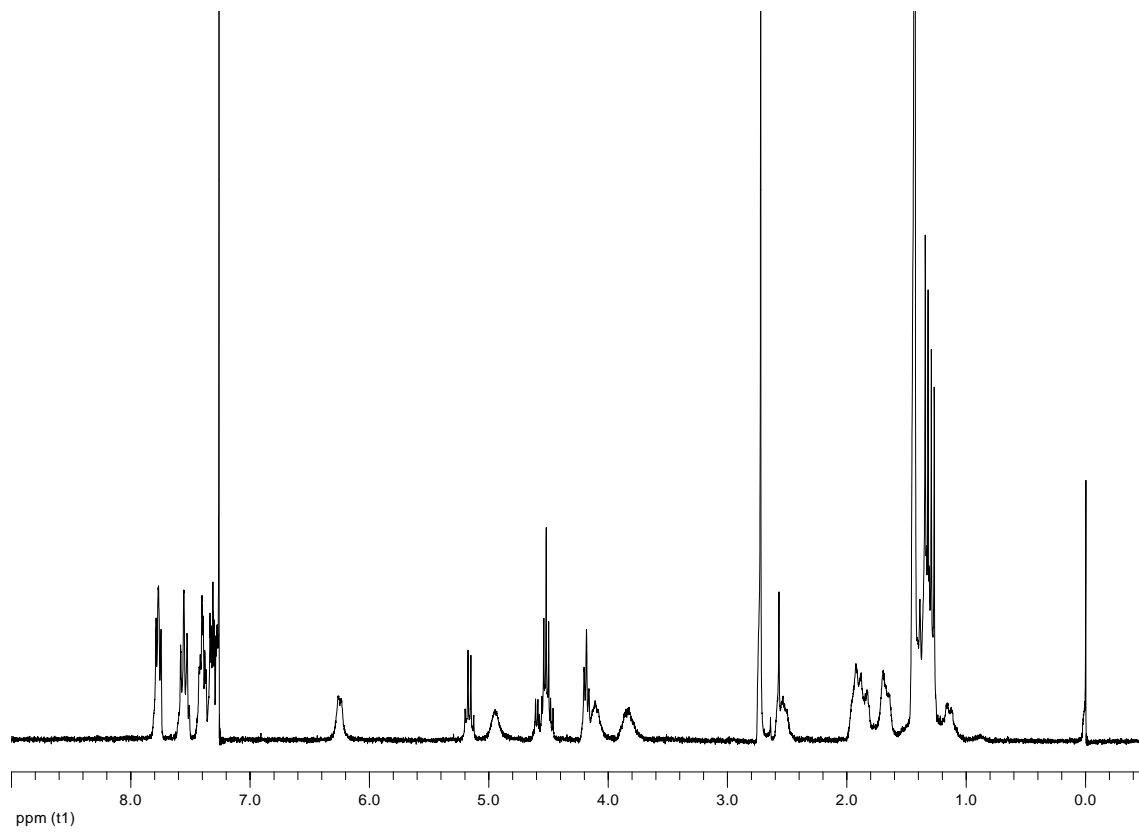
**Boc-D-γ-Ach-L-Phe-D-MeN-Ala-OFm**



**Boc-D-MeN- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-Ala-OFm**



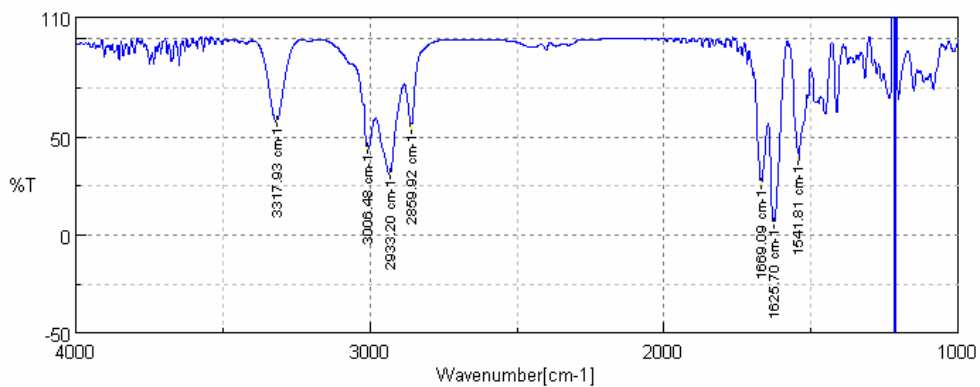
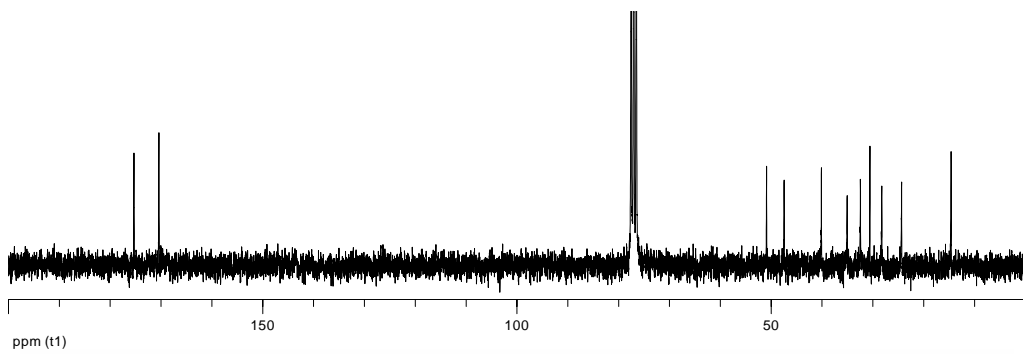
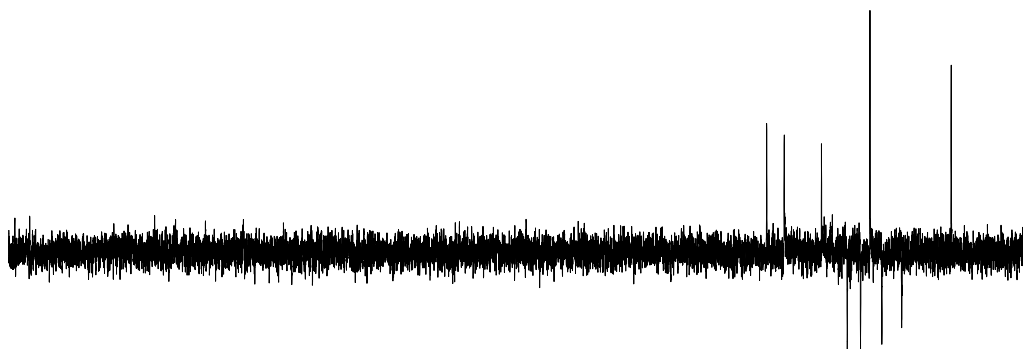
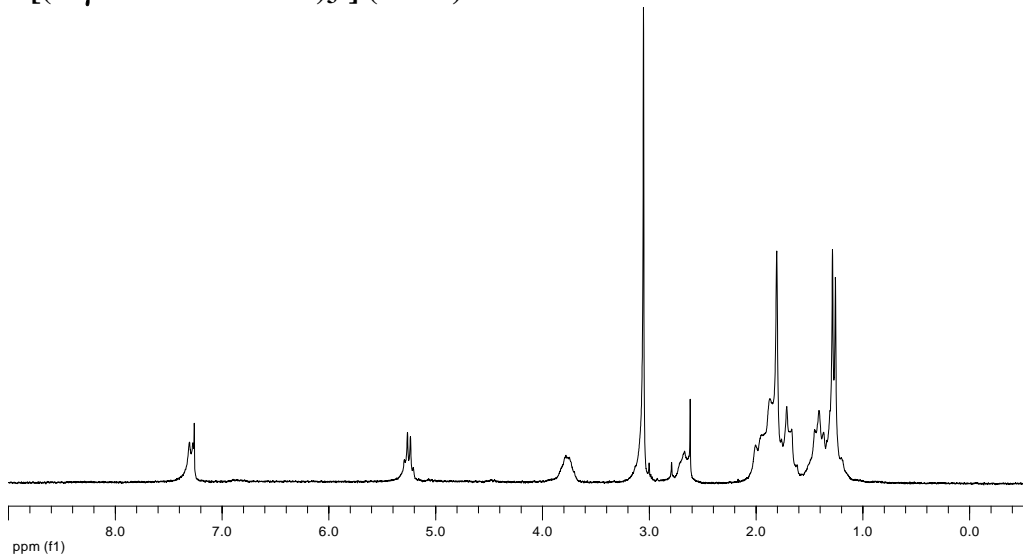
**Boc-D-Ala-L-gamma-Ach-D-MeN-Ala-OFm**



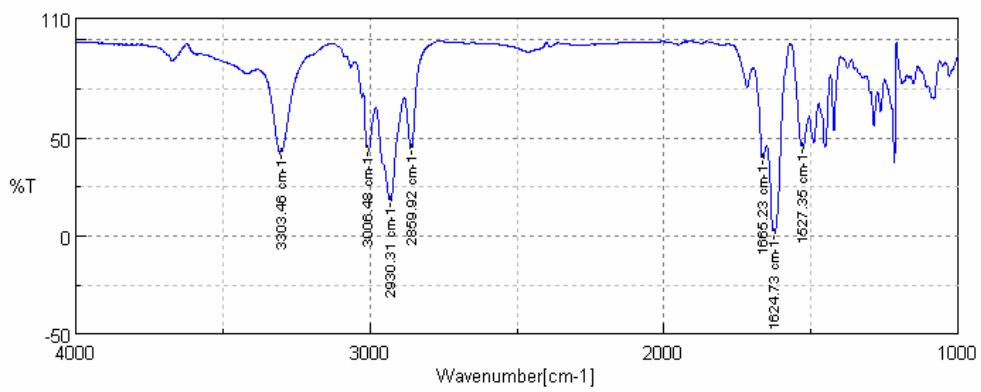
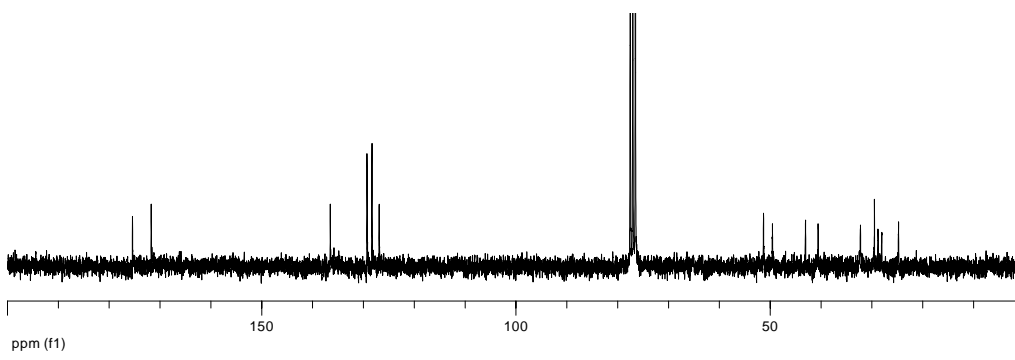
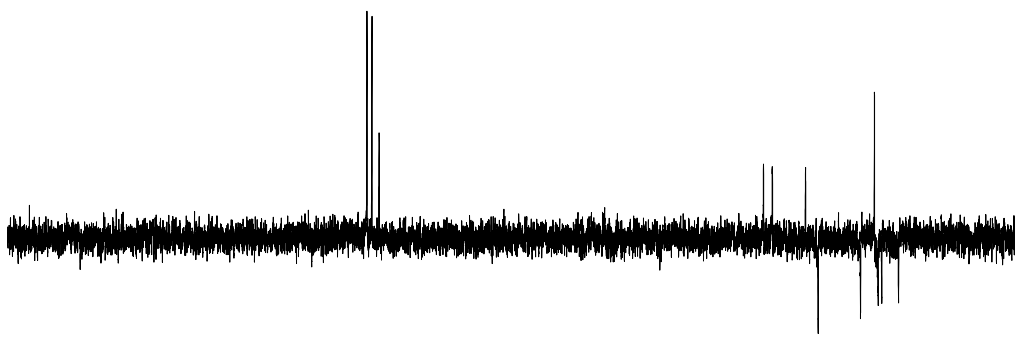
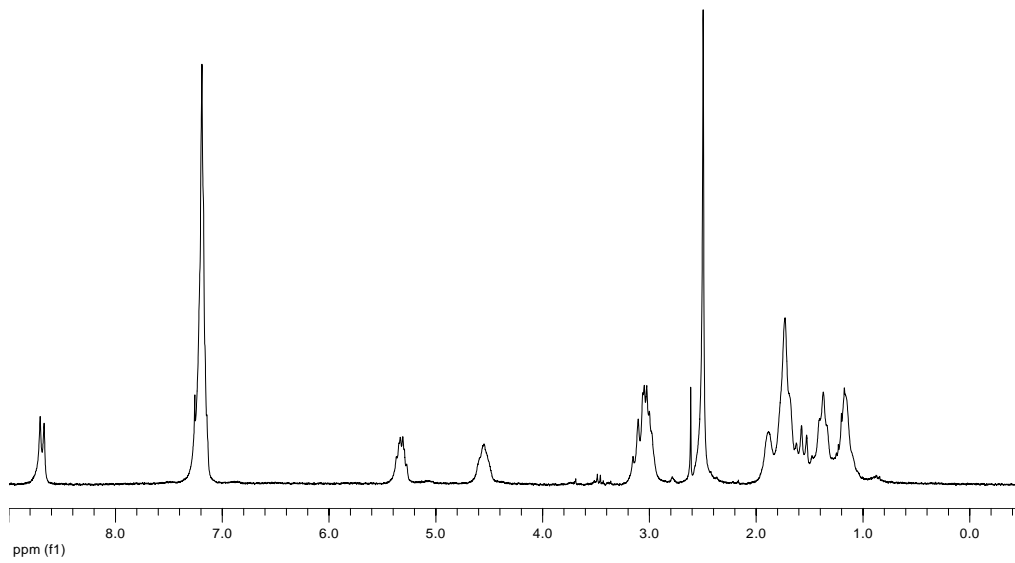
## 11.6. Ciclopéptidos N-metilados

### 11.6.1. Ciclohexapéptidos

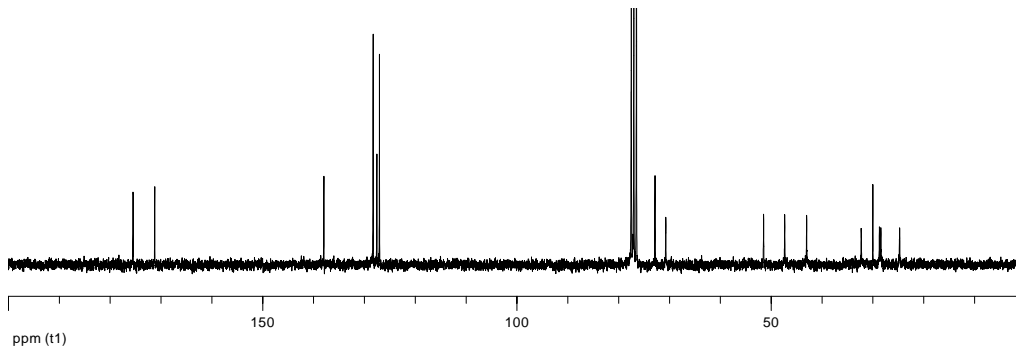
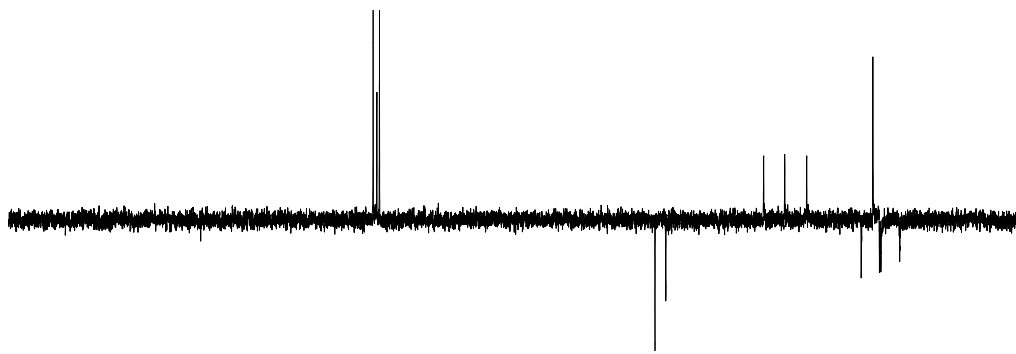
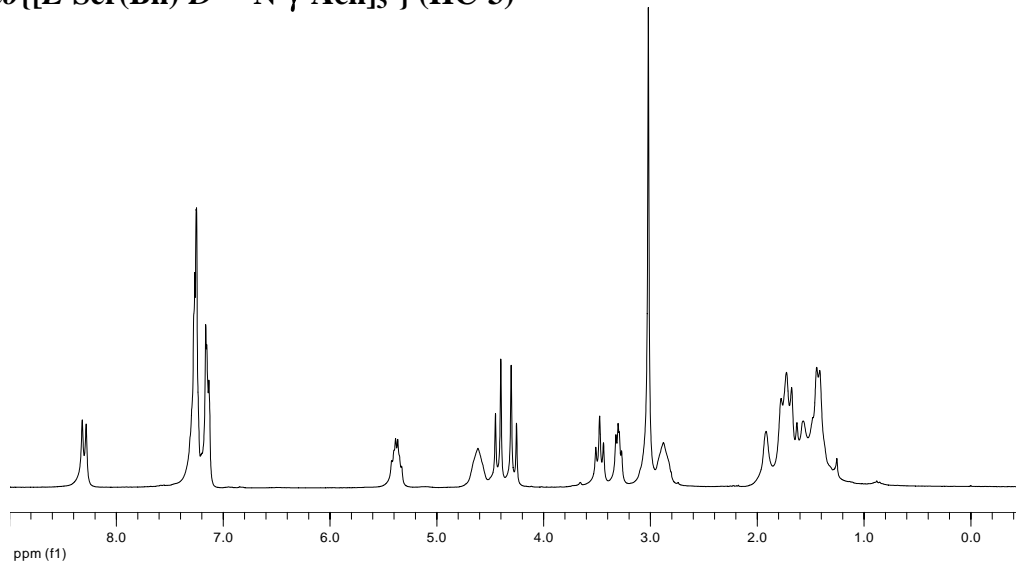
#### *Ciclo*[(L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala)<sub>3</sub>] (HC-1)



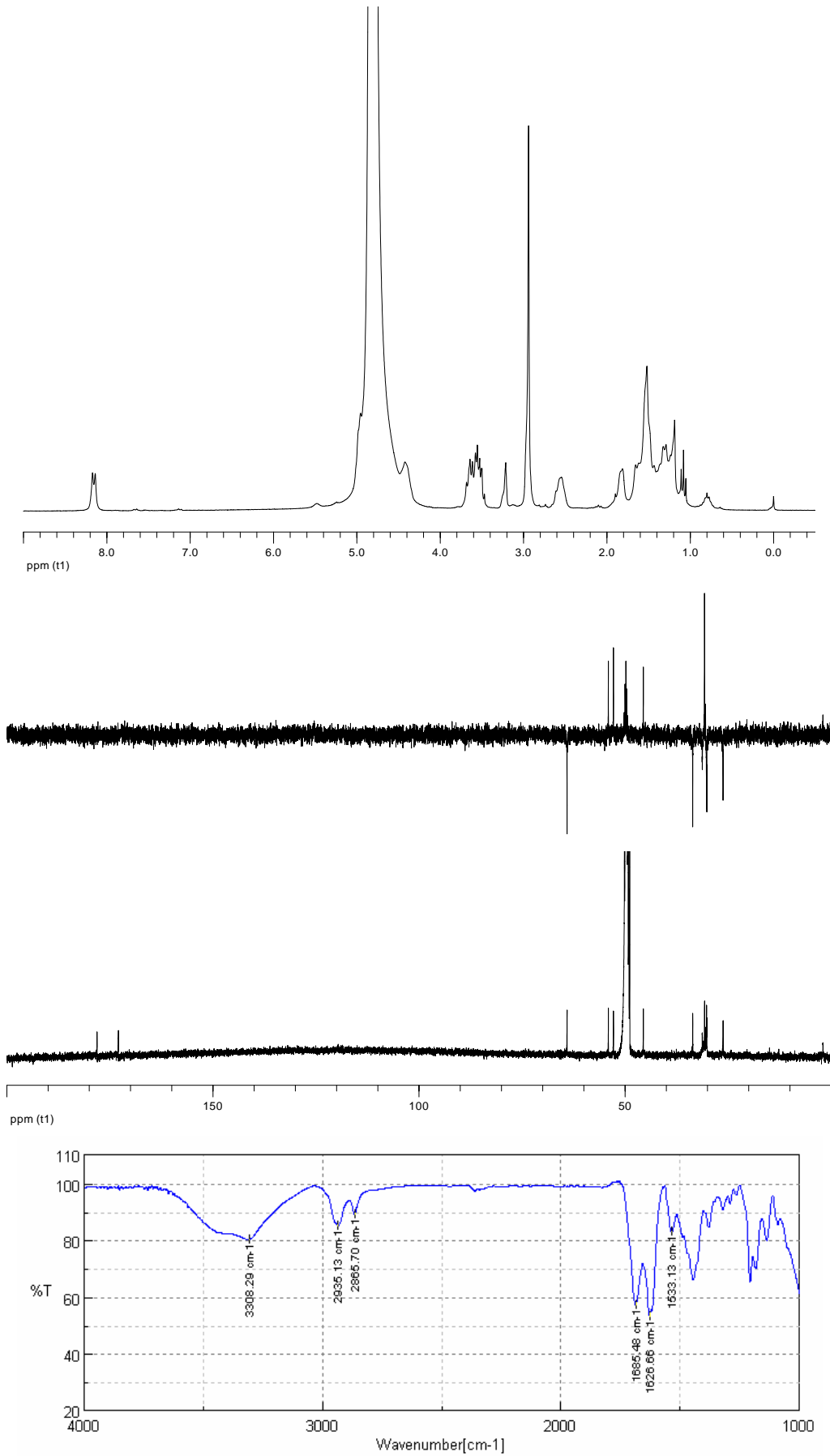
**Ciclo[(D-Phe-L-<sup>Me</sup>N-γ-Ach)<sub>3</sub>] (HC-2)**



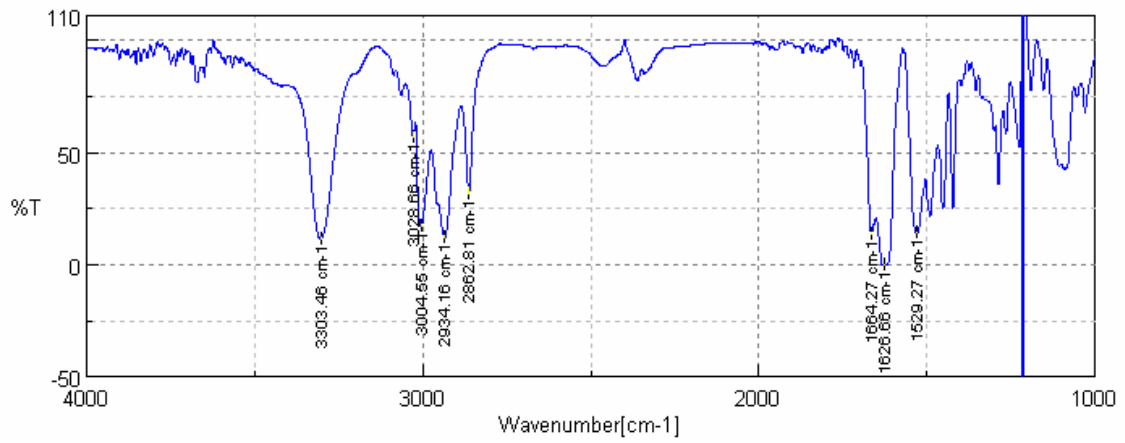
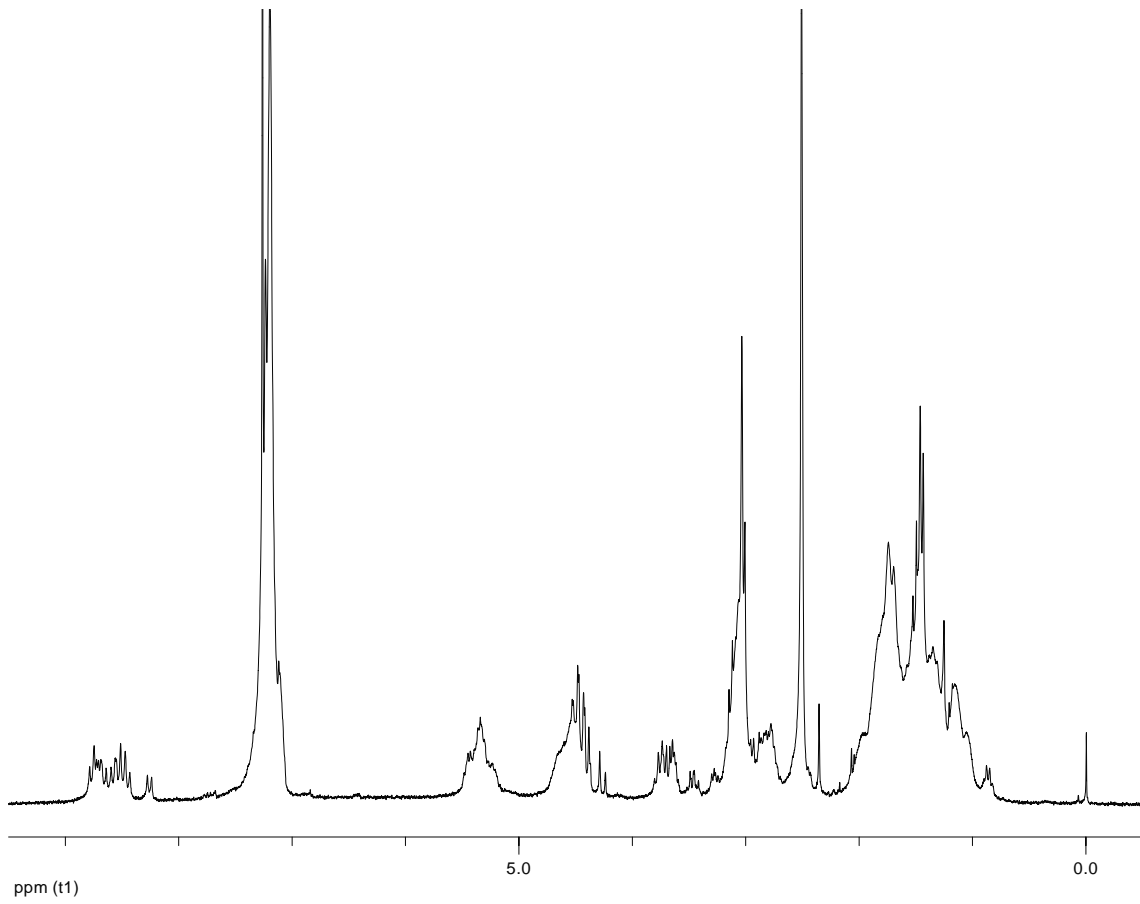
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>3</sub>} (HC-3)**



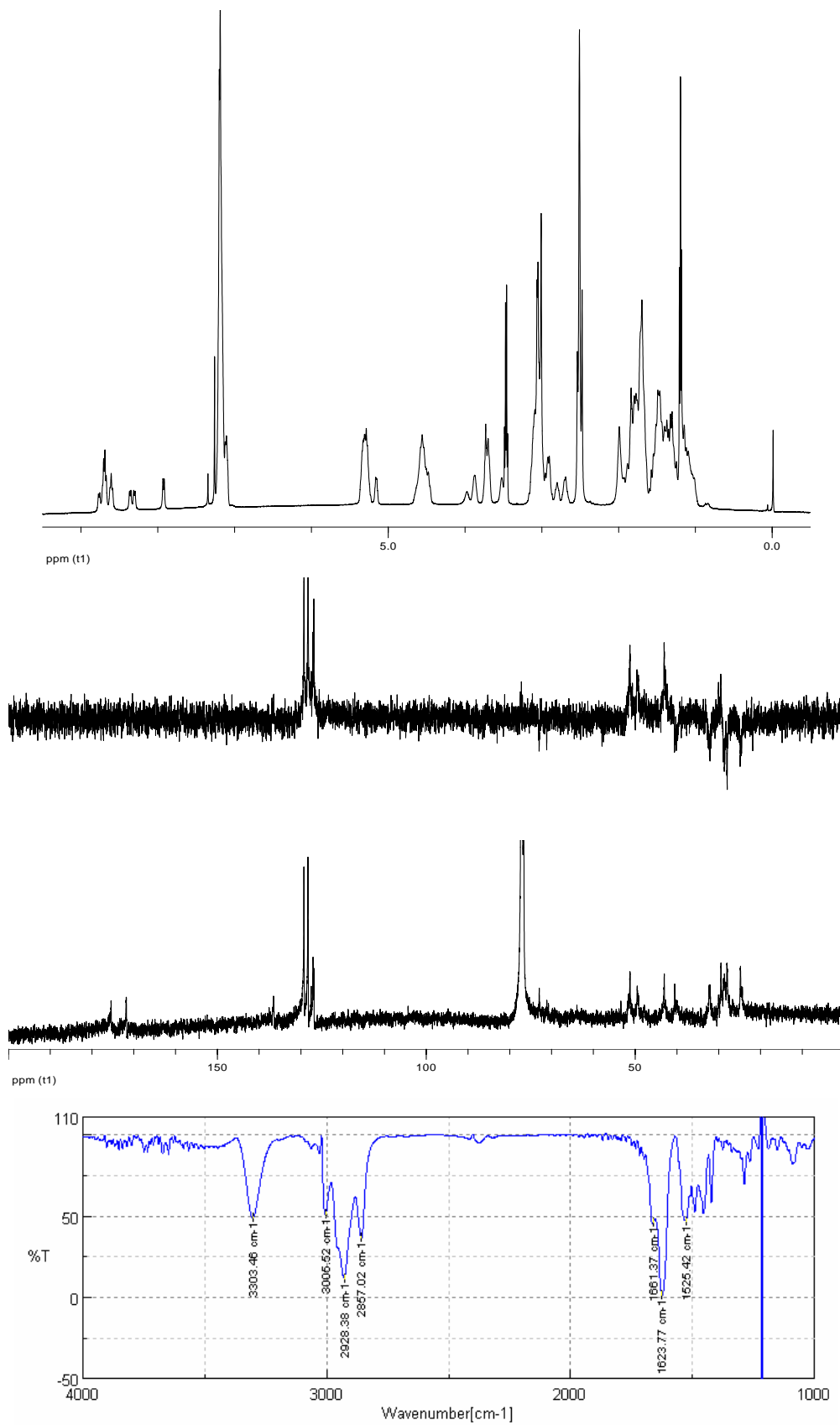
**Ciclo[(L-Ser-D-MeN-γ-Ach)<sub>3</sub>] (HC-4)**



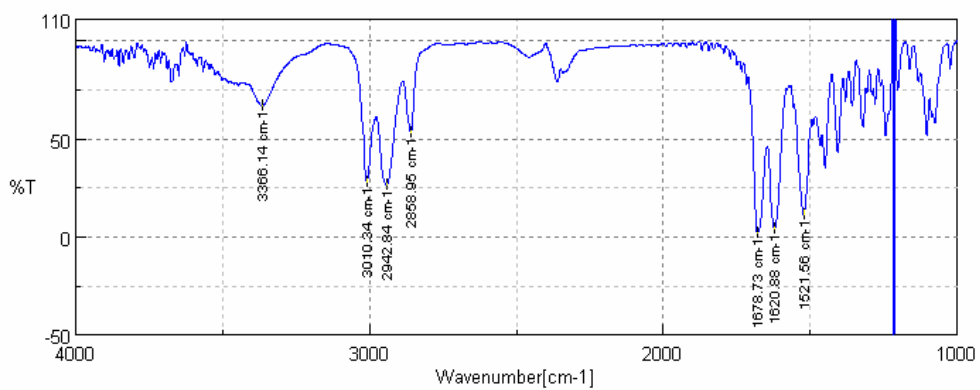
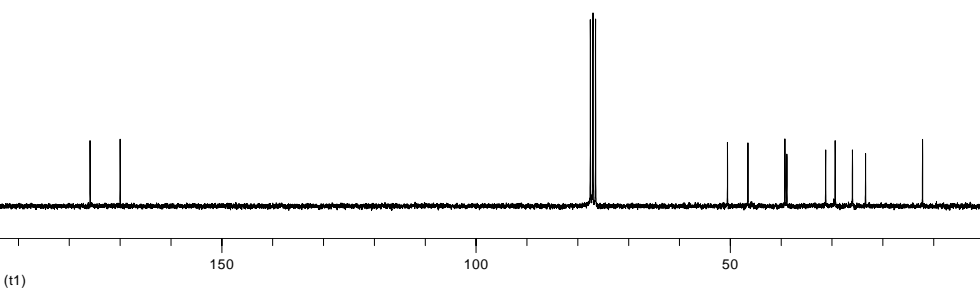
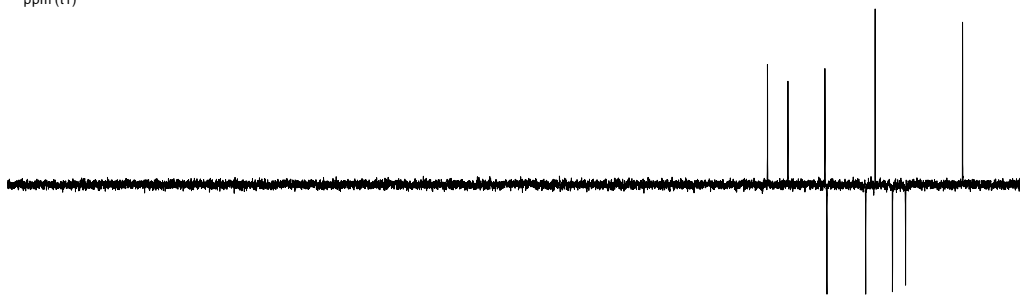
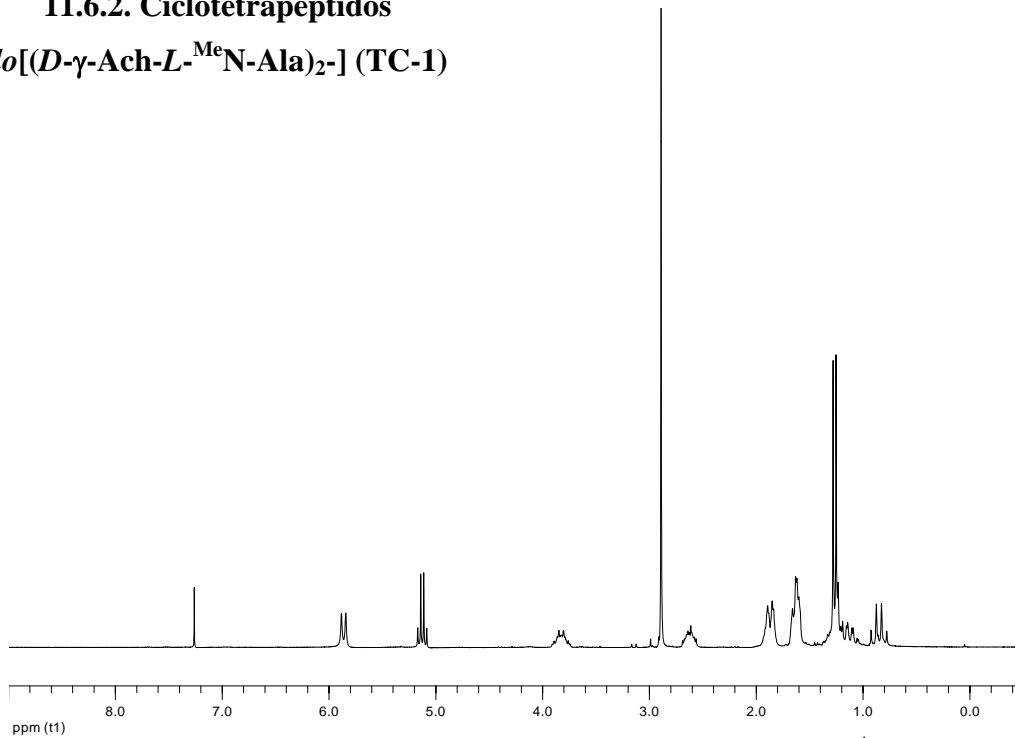
**Ciclo{L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach-[L-Phe-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>-} (HC-5)**



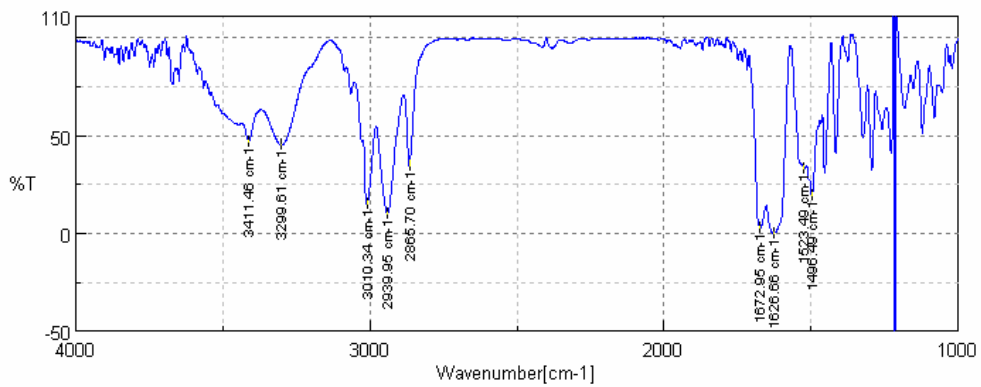
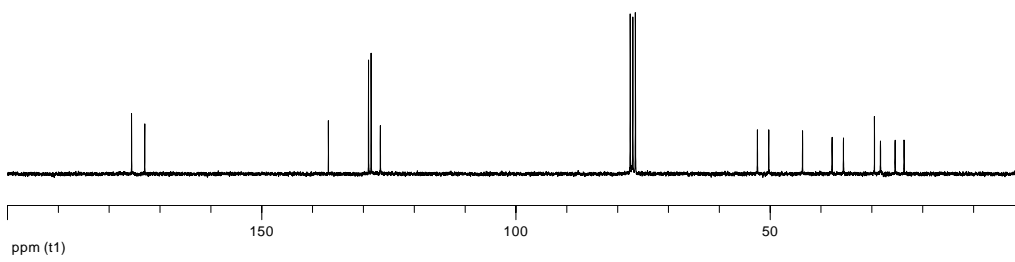
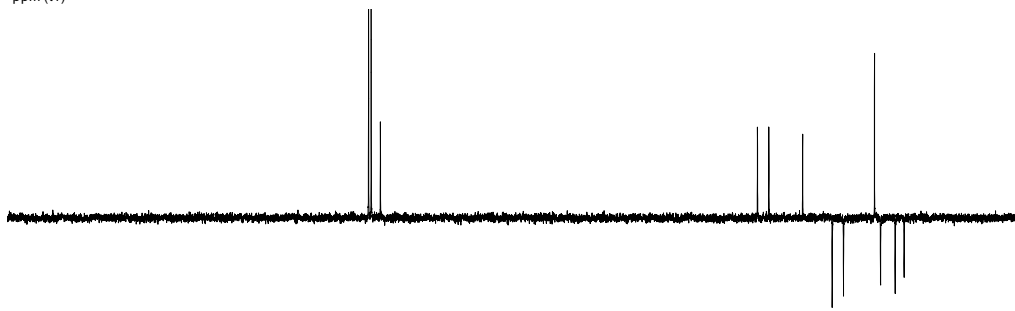
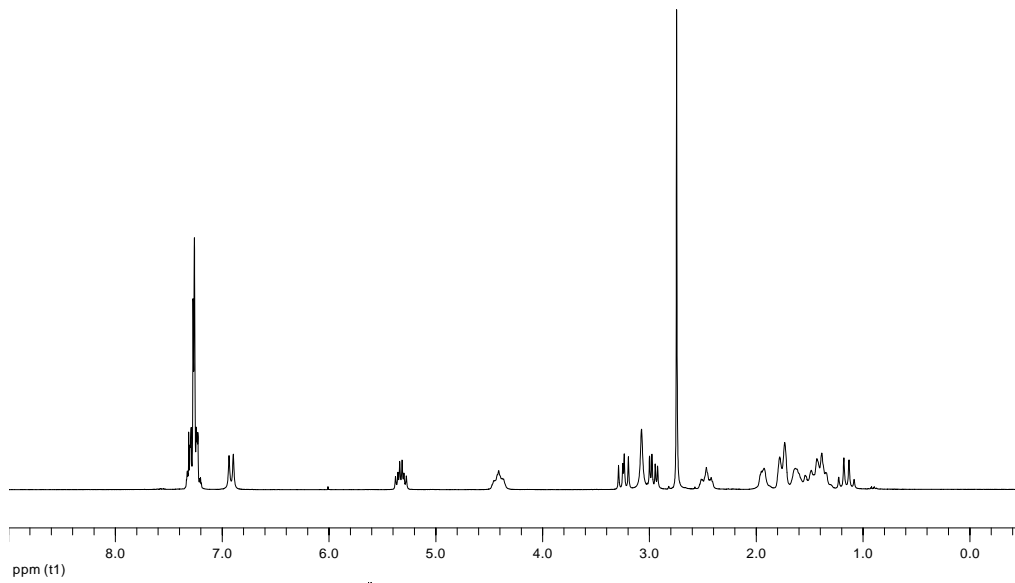
**Ciclo[L-Ser-D-MeN-γ-Ach-(L-Phe-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]- (HC-6)**



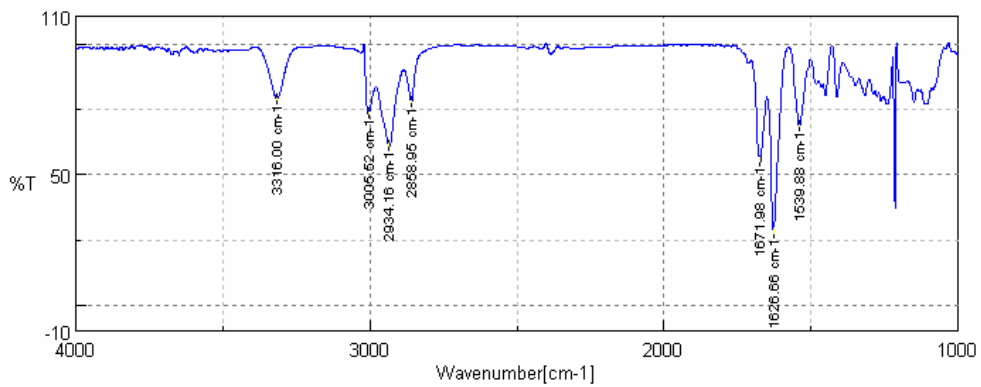
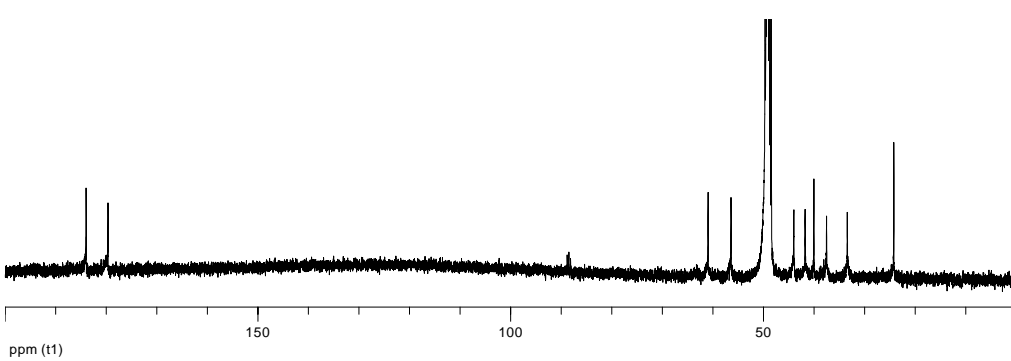
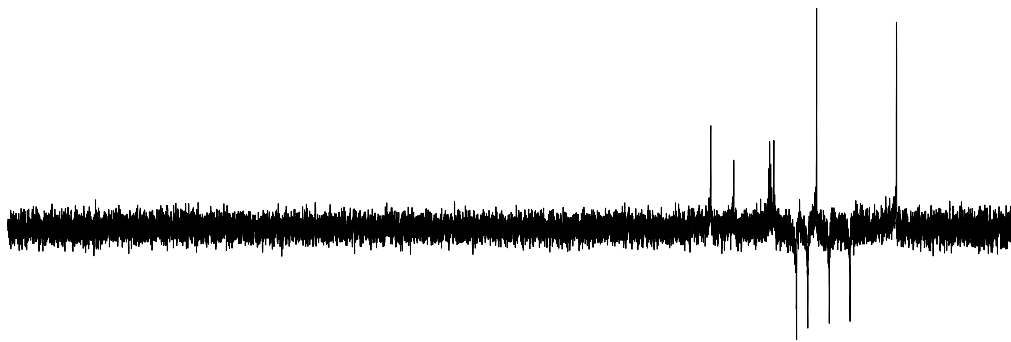
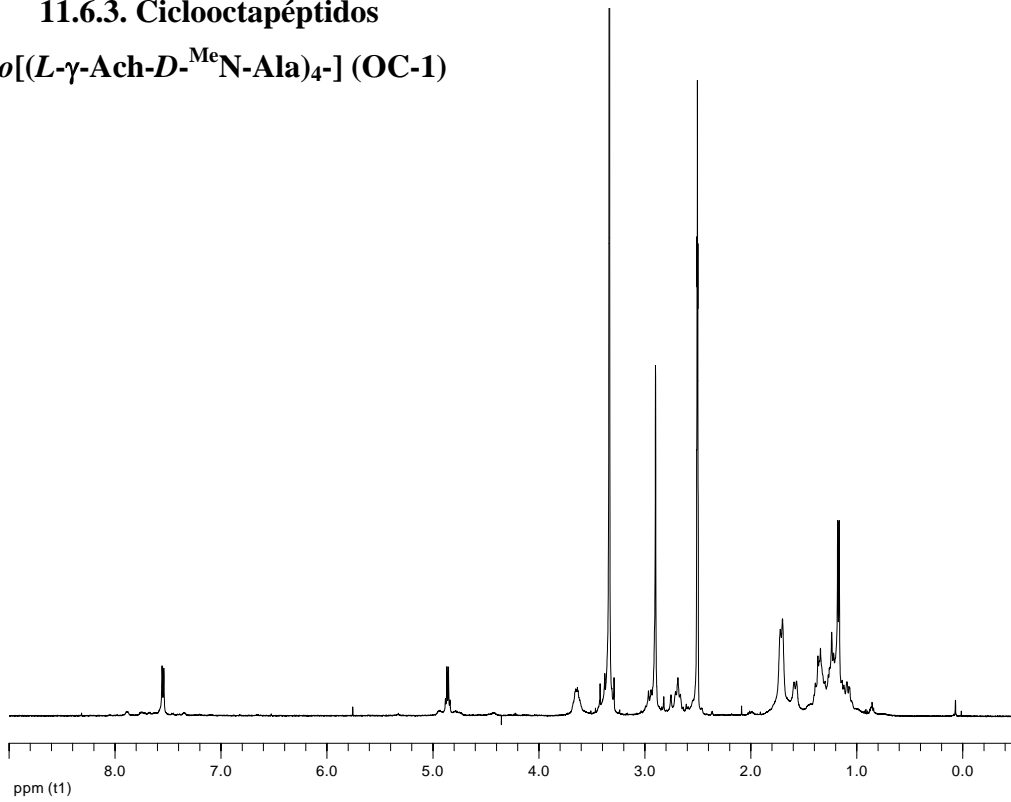
**11.6.2. Ciclotetrapéptidos**  
***Ciclo*[(D-γ-Ach-L-MeN-Ala)<sub>2</sub>]** (TC-1)



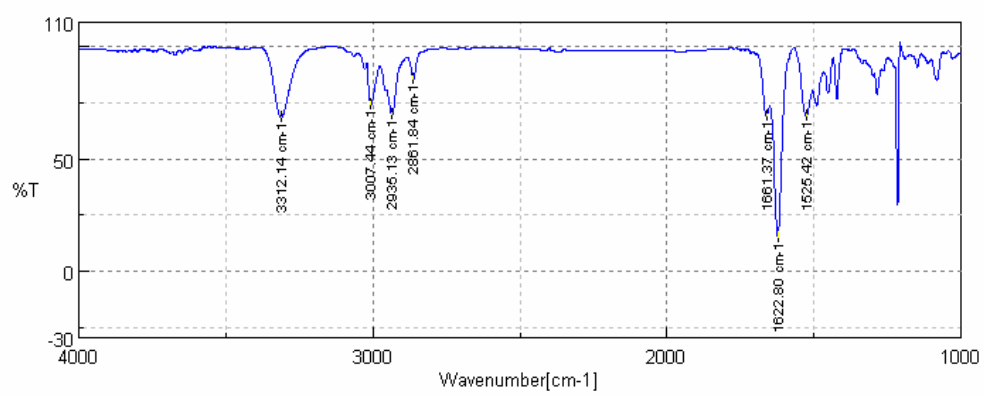
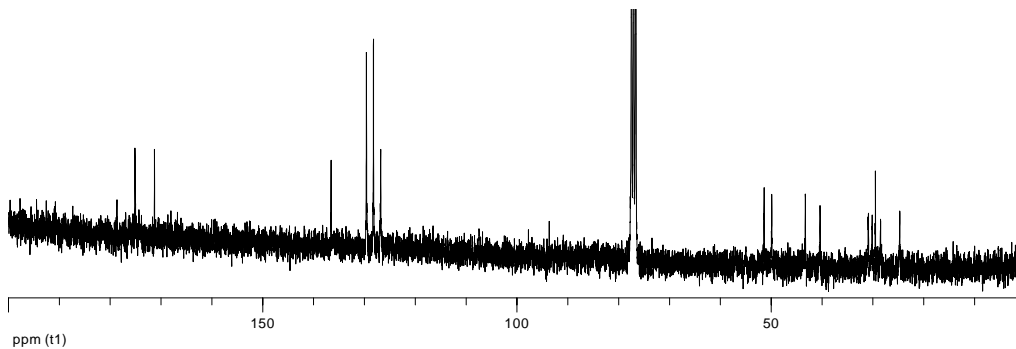
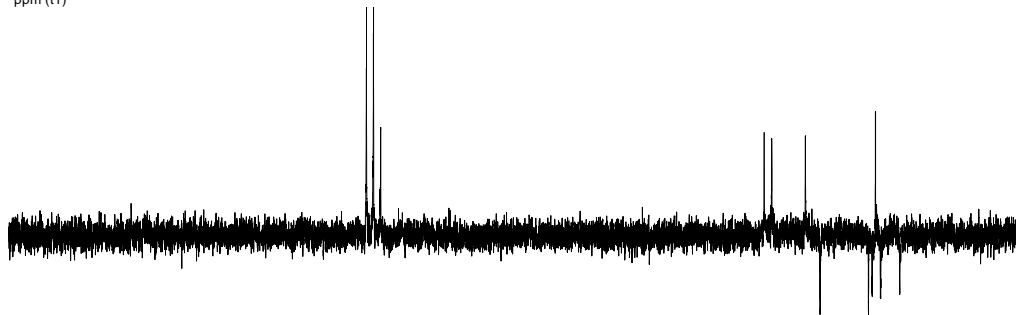
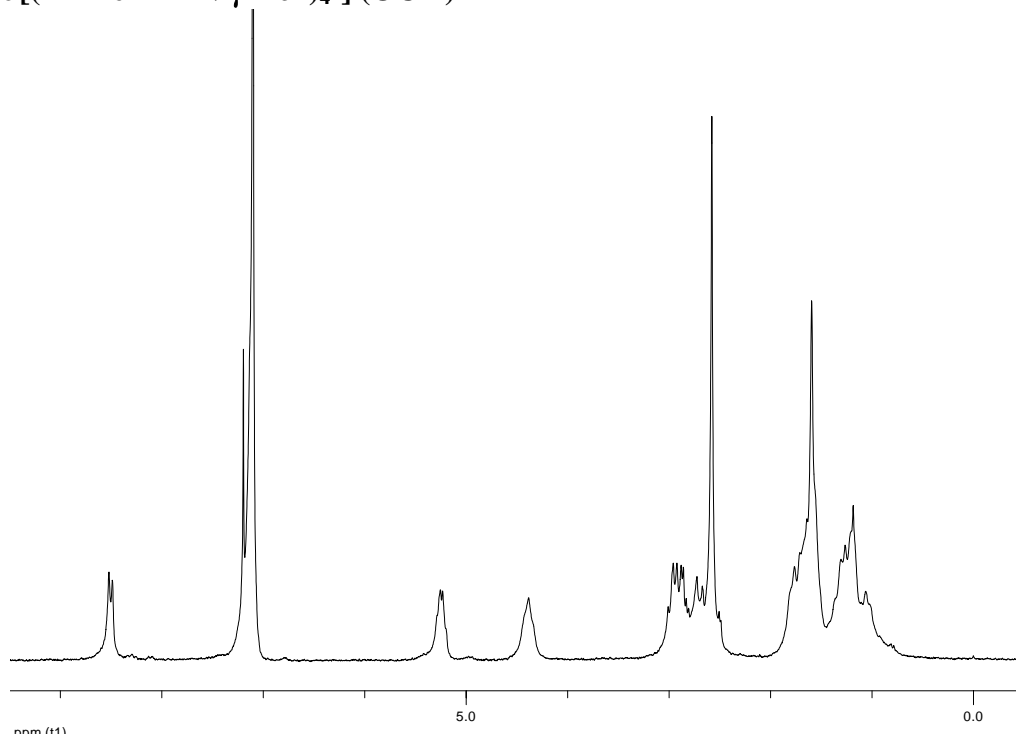
**Ciclo[(D-Phe-L-Me<sup>N</sup>-γ-Ach)<sub>2</sub>] (TC-2)**



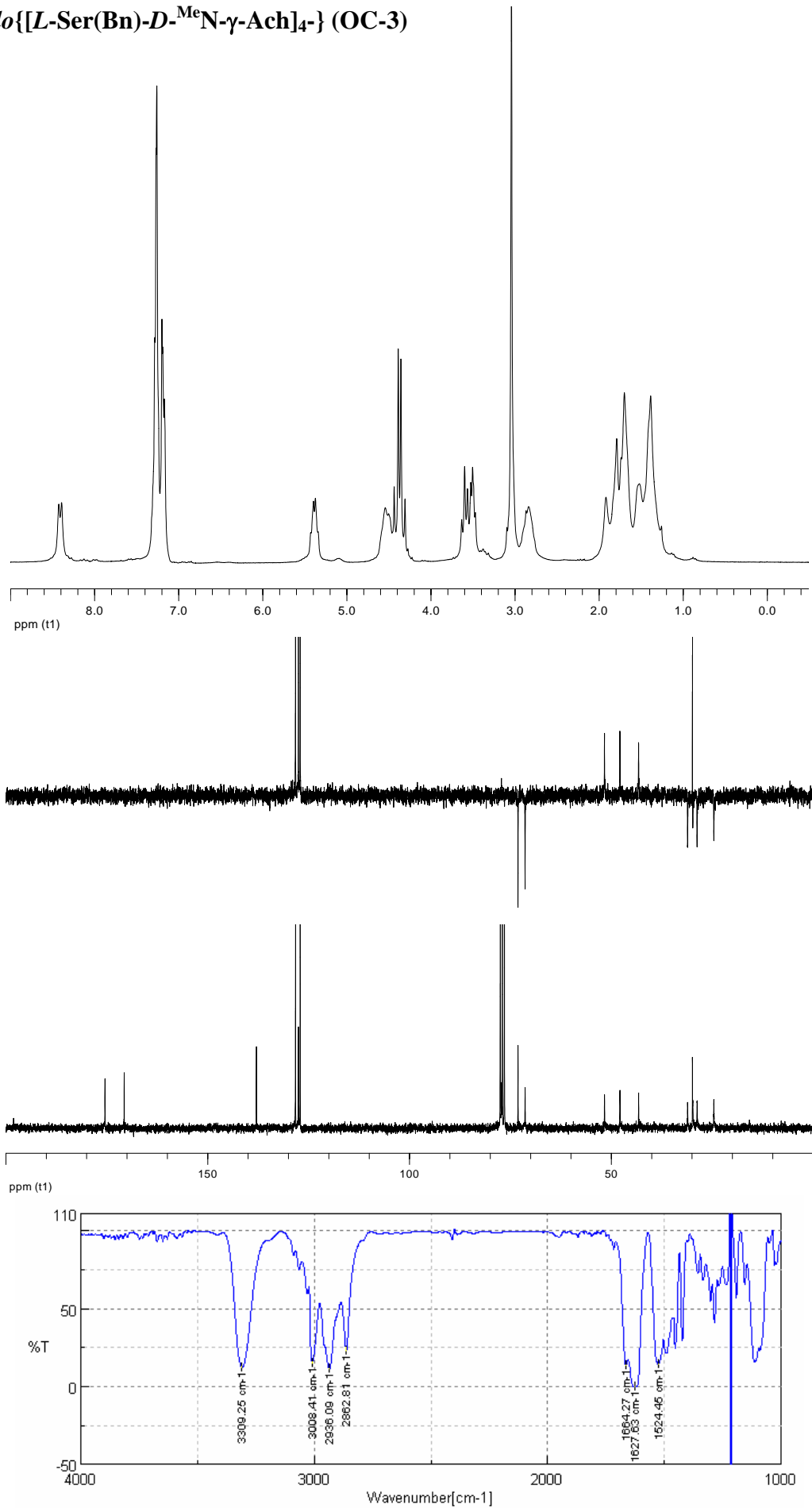
**11.6.3. Ciclooctapéptidos**  
***Ciclo*[(L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>4</sub>]- (OC-1)**



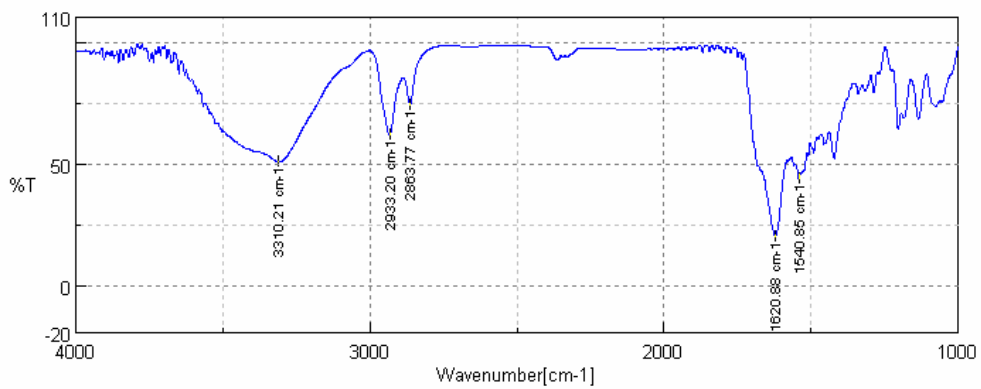
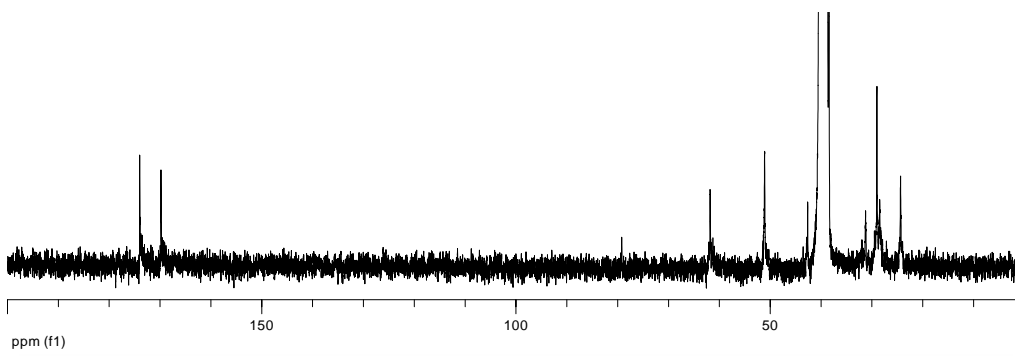
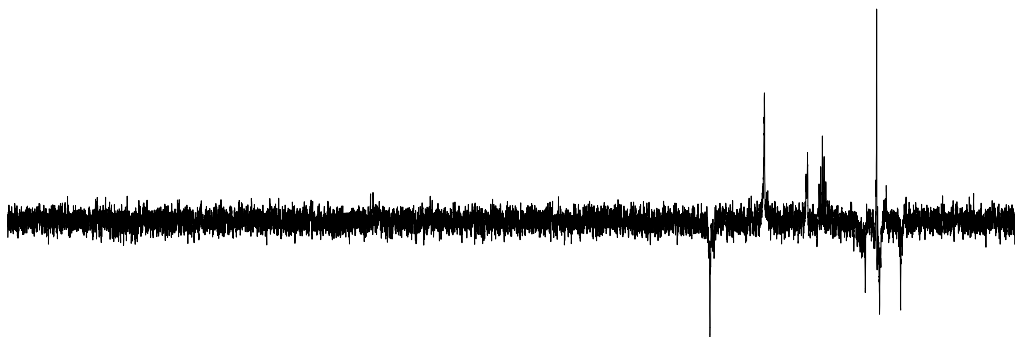
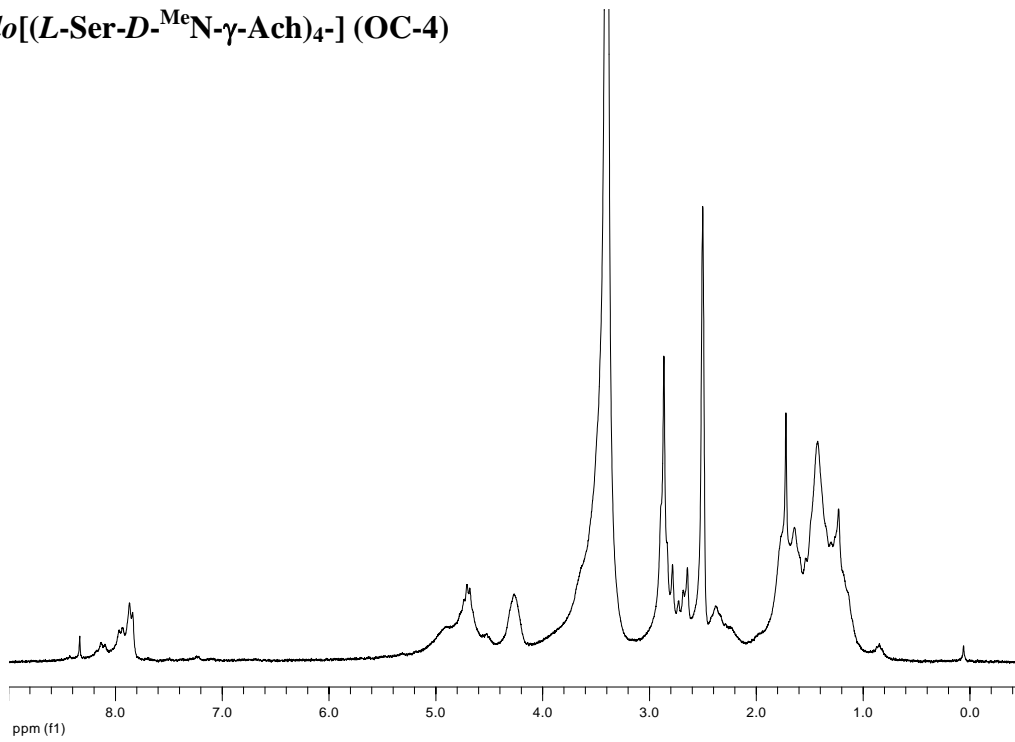
**Ciclo[(D-Phe-L-Me<sup>N</sup>-γ-Ach)<sub>4</sub>] (OC-2)**



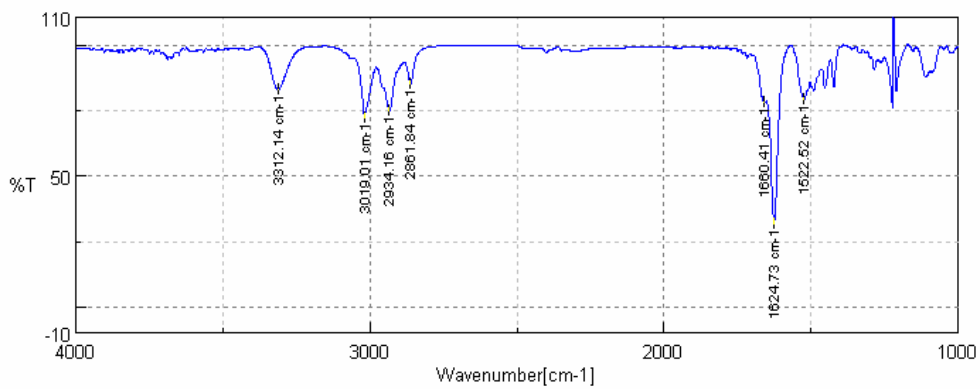
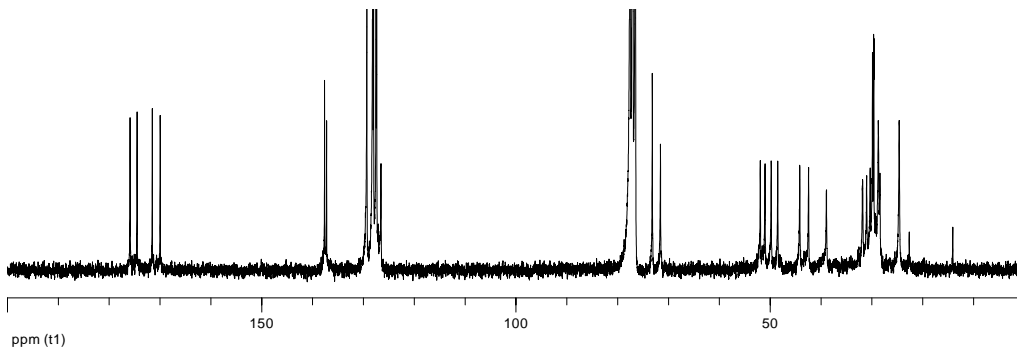
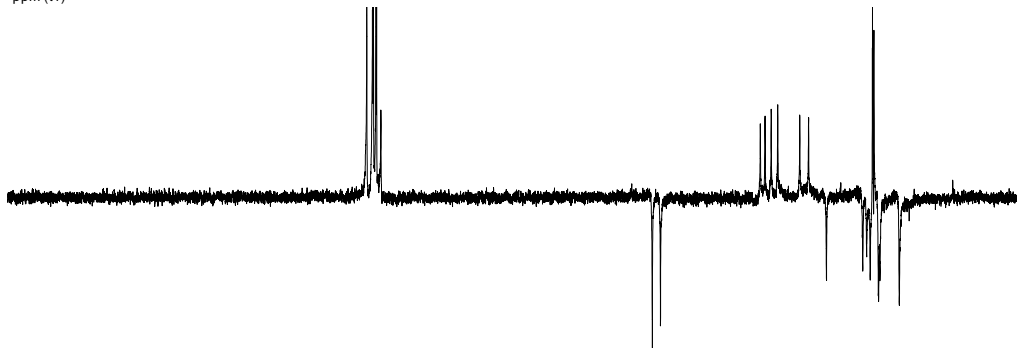
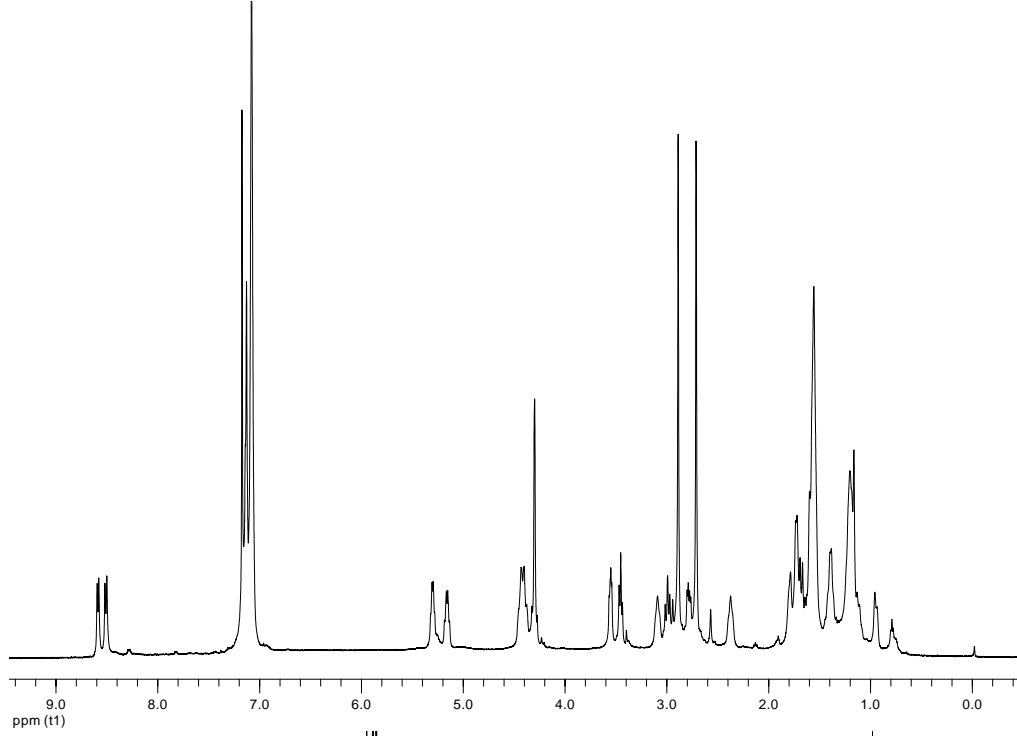
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>4</sub>} (OC-3)**



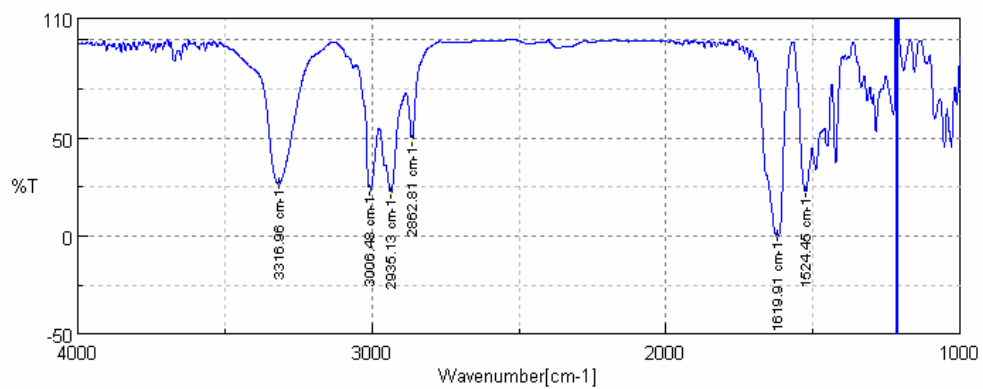
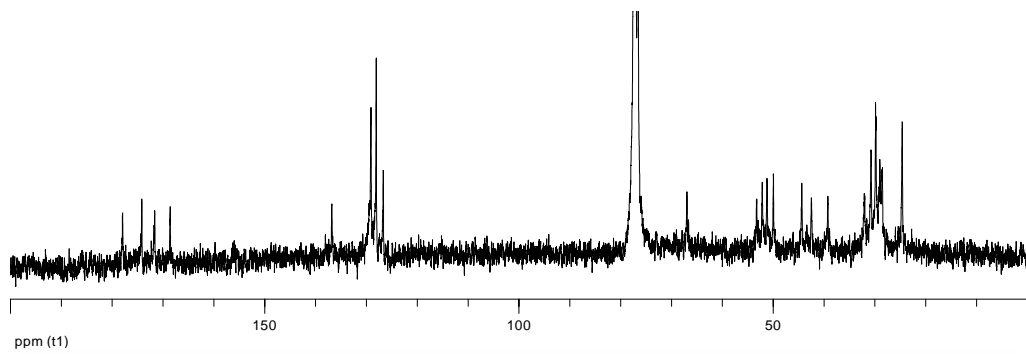
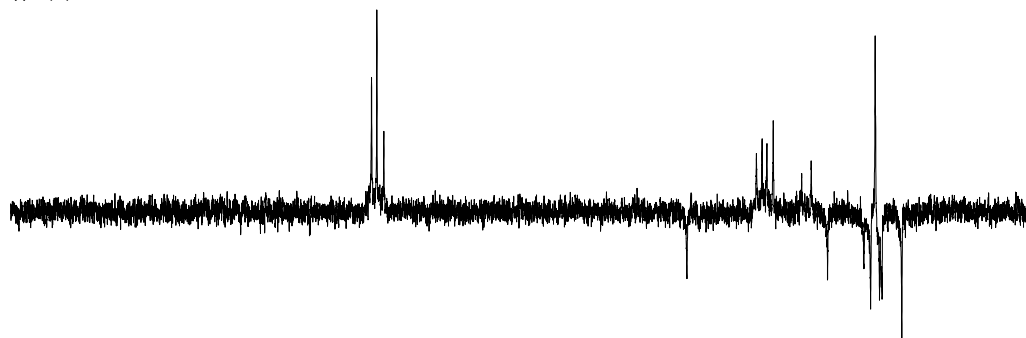
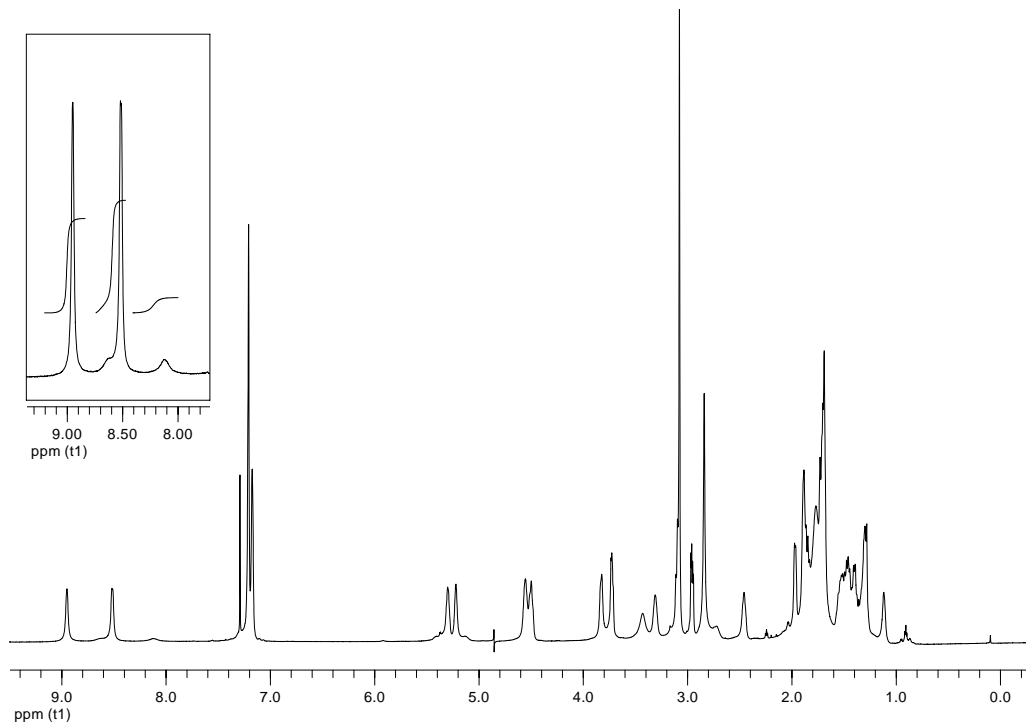
**Ciclo[(L-Ser-D-MeN-γ-Ach)<sub>4</sub>] (OC-4)**

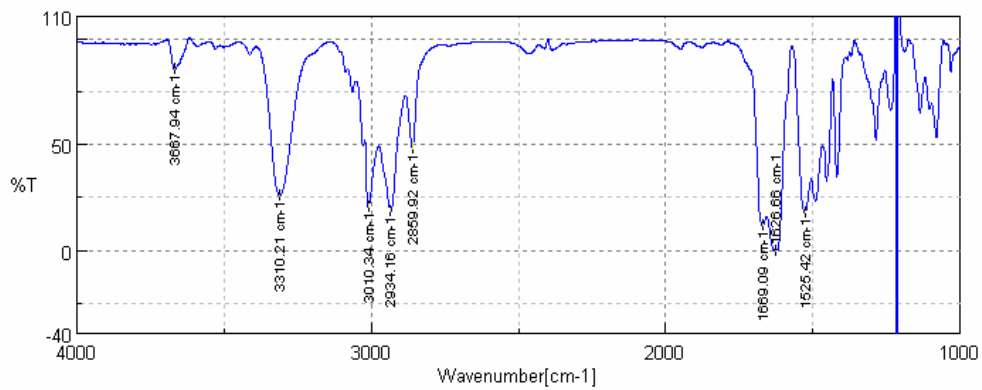
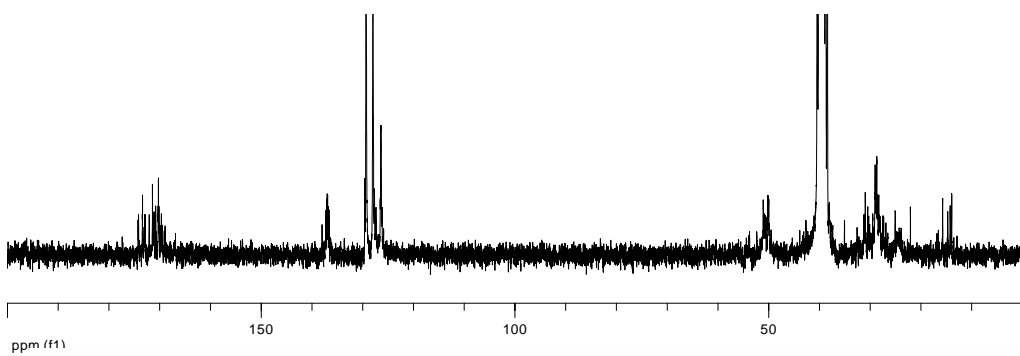
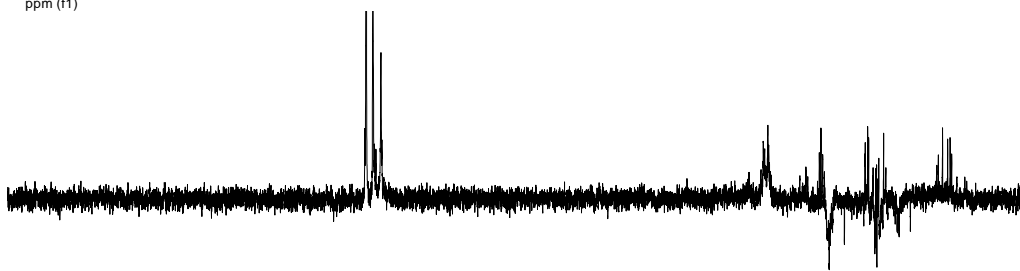
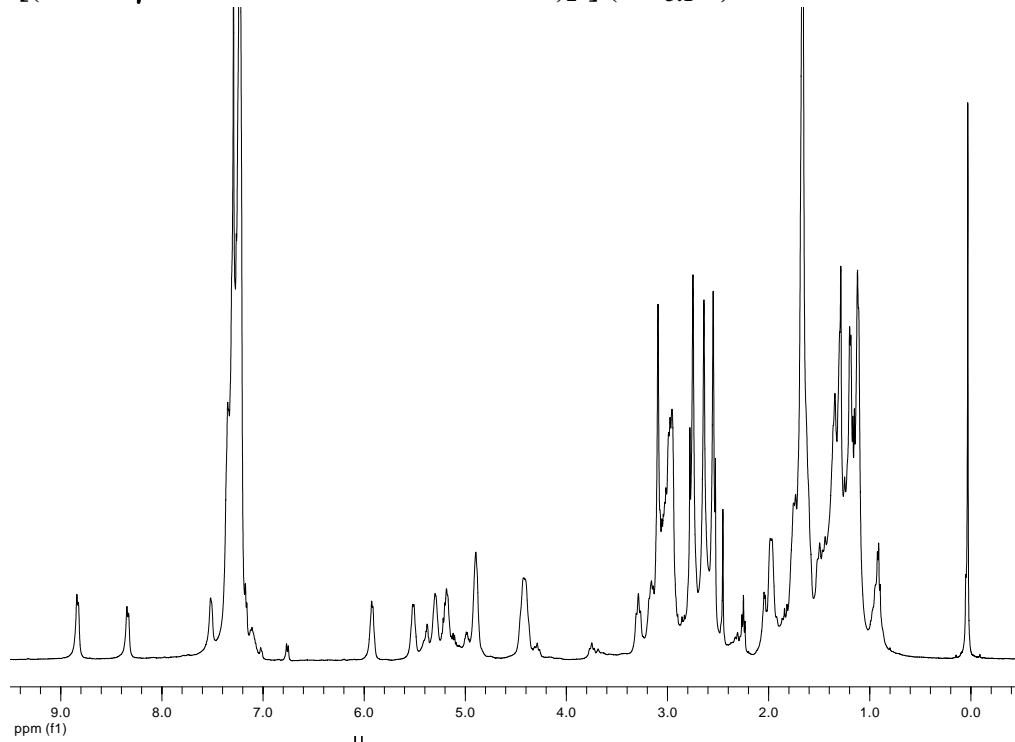


**Ciclo{[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>-} (OC-5)**

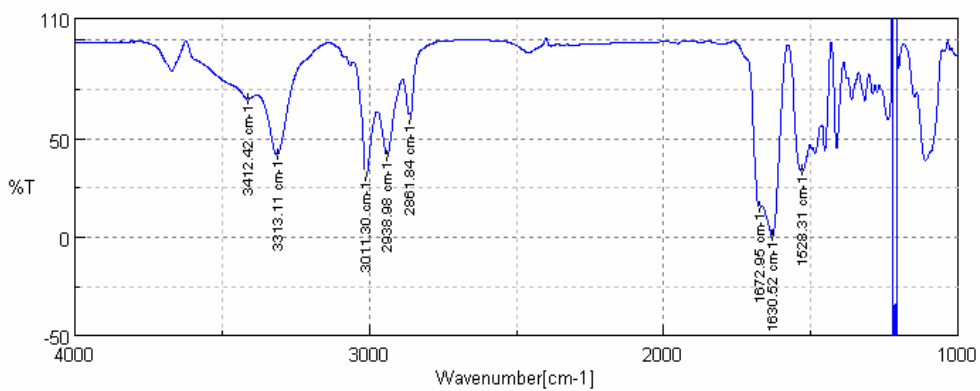
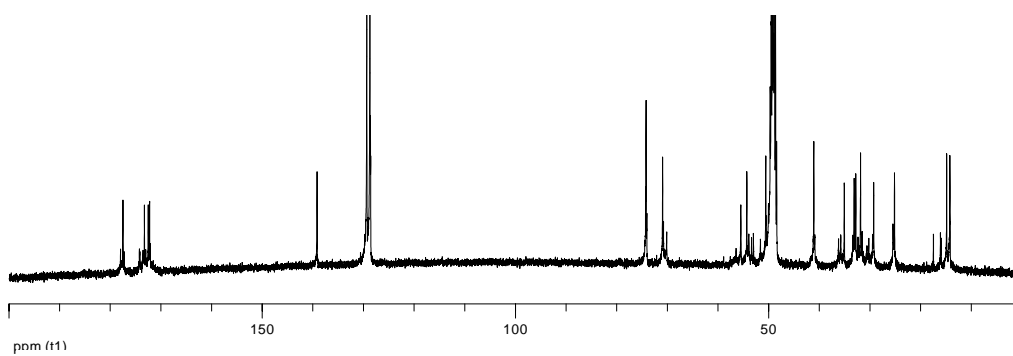
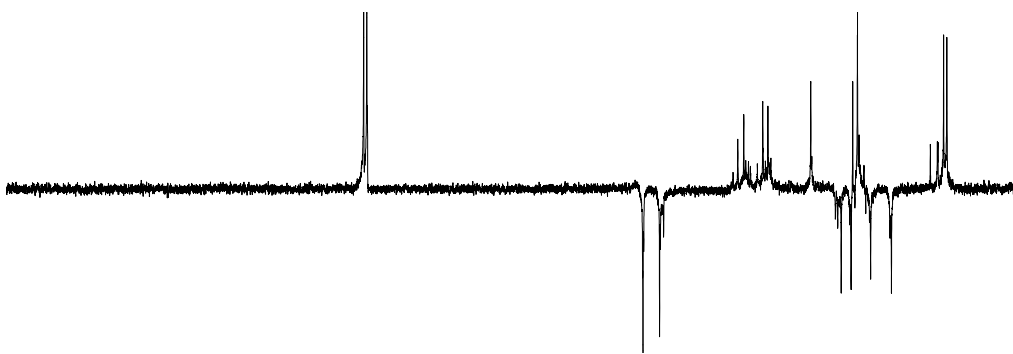
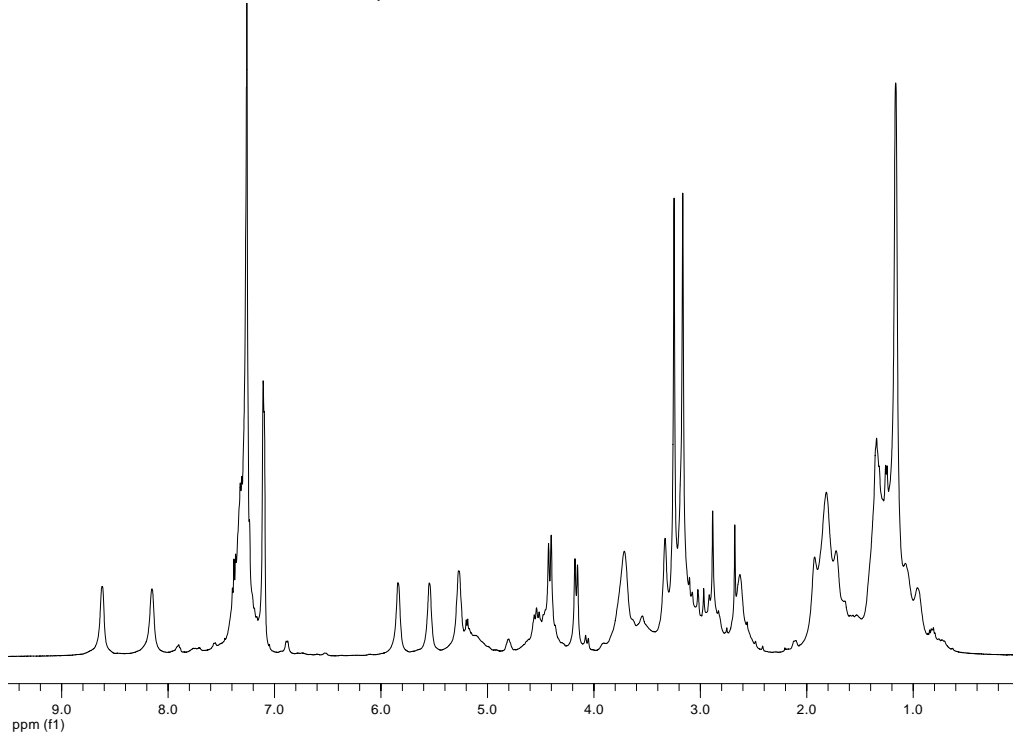


**Ciclo[(L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]-] (OC-6)**

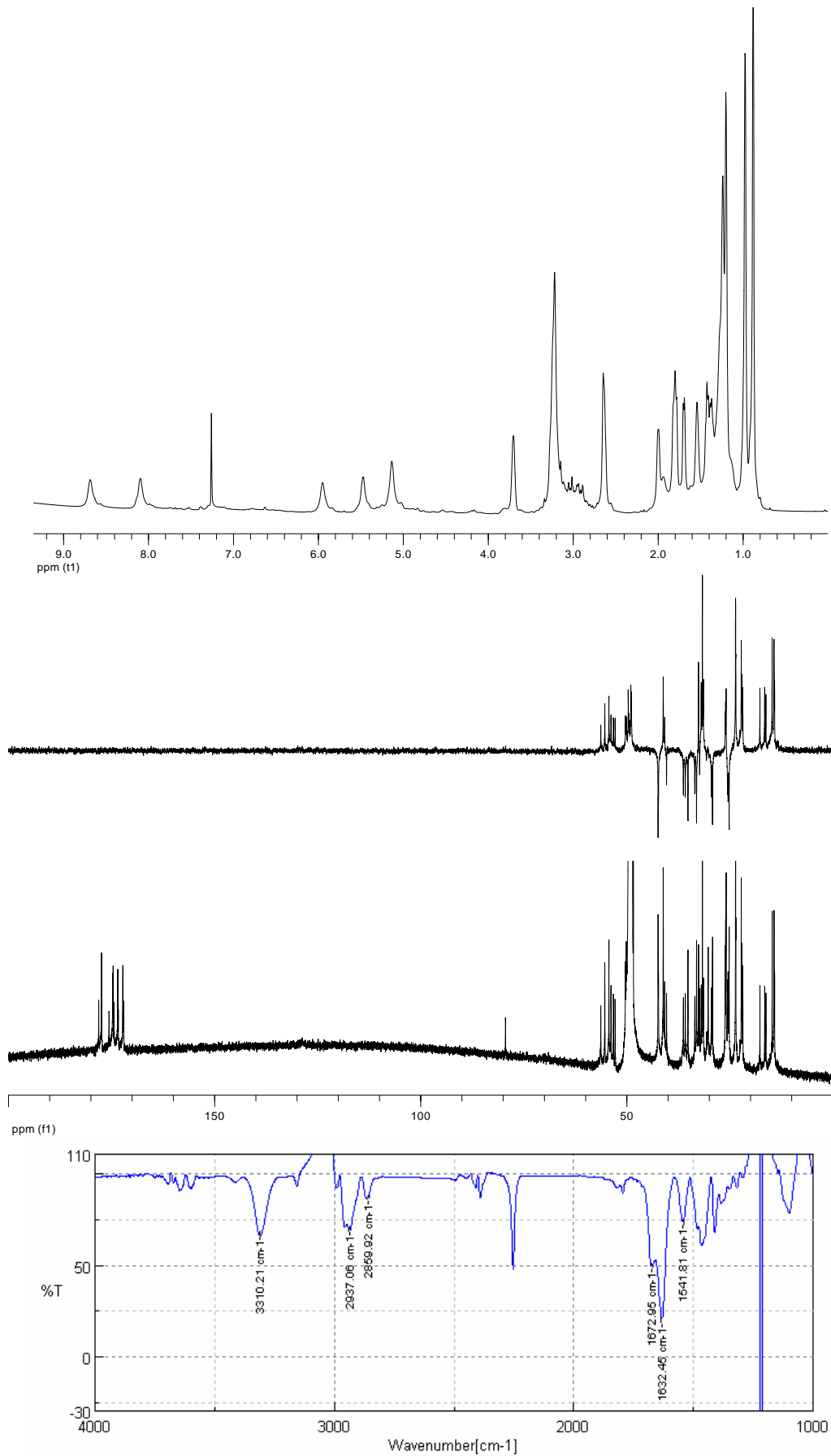


**11.6.4. (3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-Ciclooctapéptidos*****Ciclo*[(L-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-D-Phe-L-<sup>Me</sup>N-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-] (OC<sub>3:1-1</sub>)**

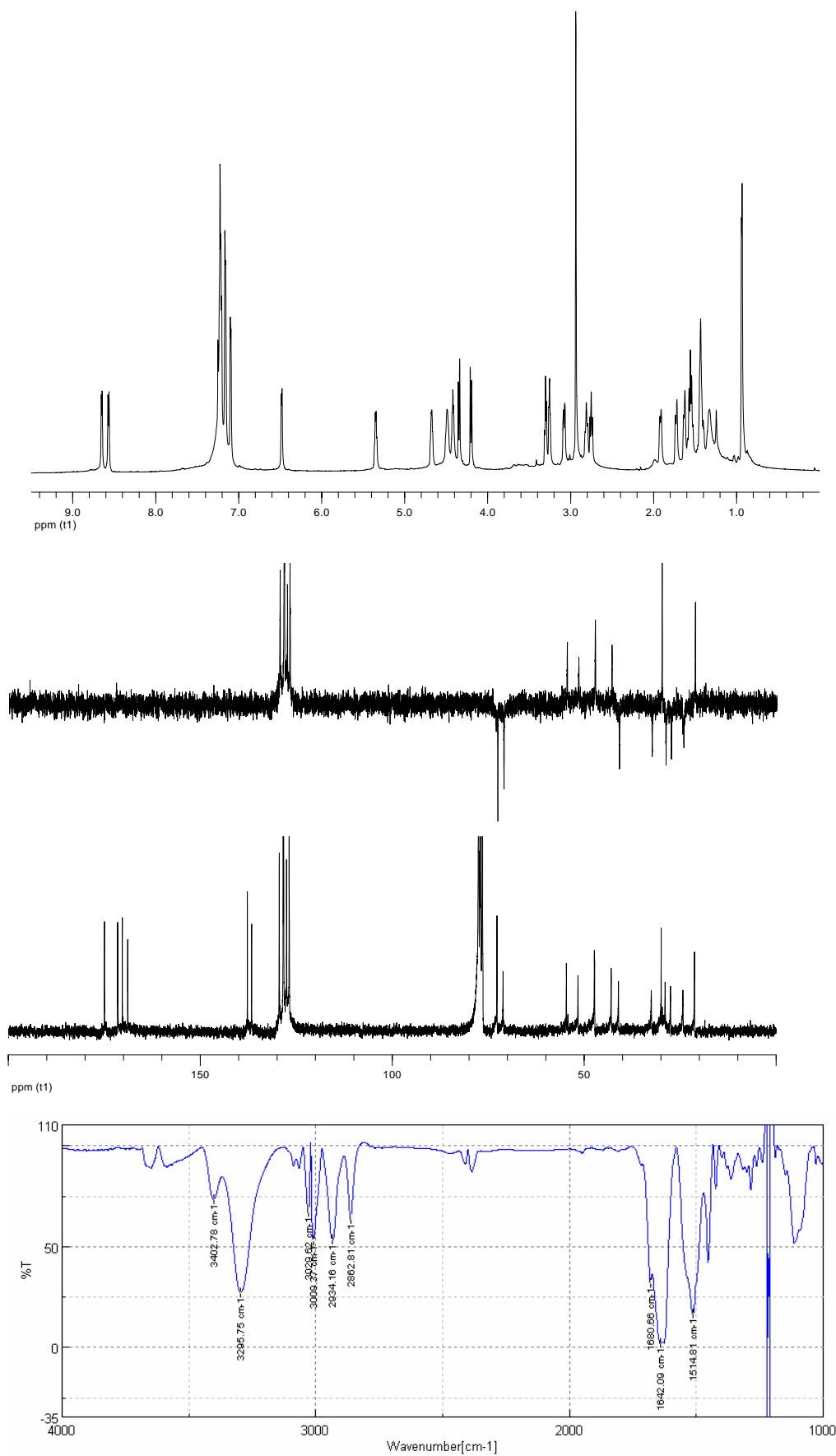
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>}-} (OC<sub>3:1-2</sub>)**



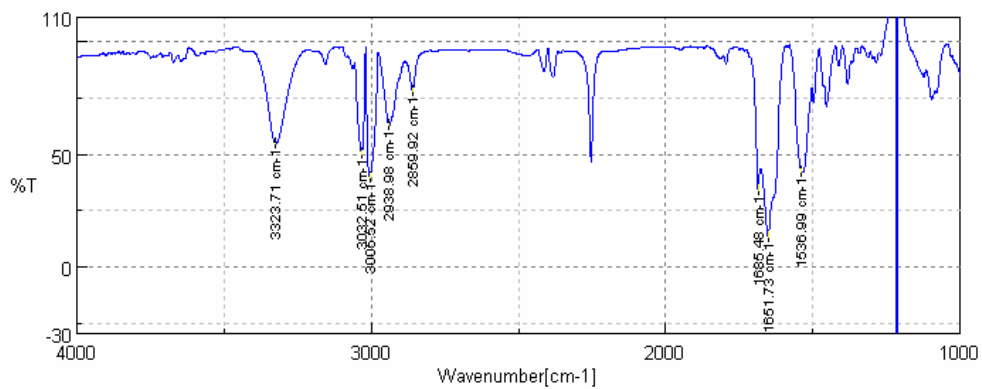
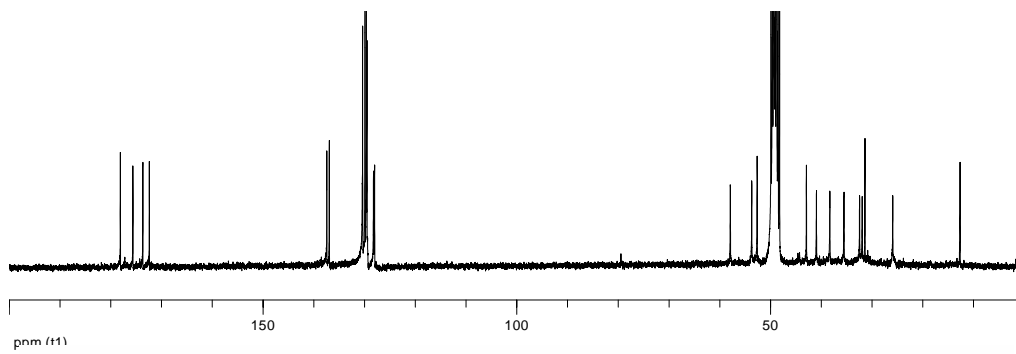
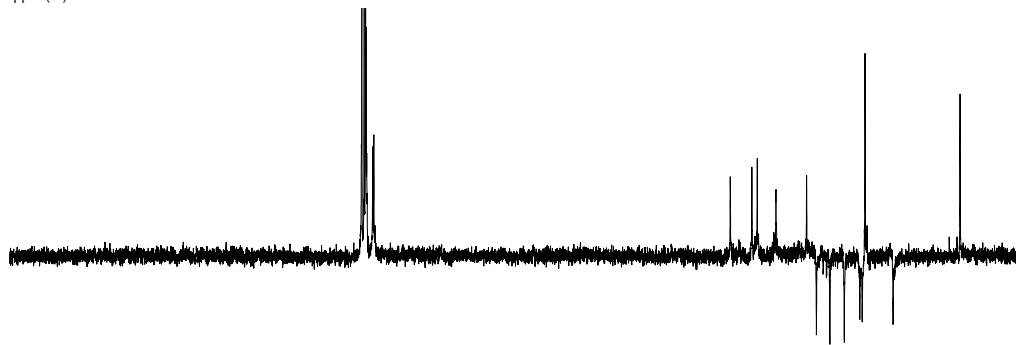
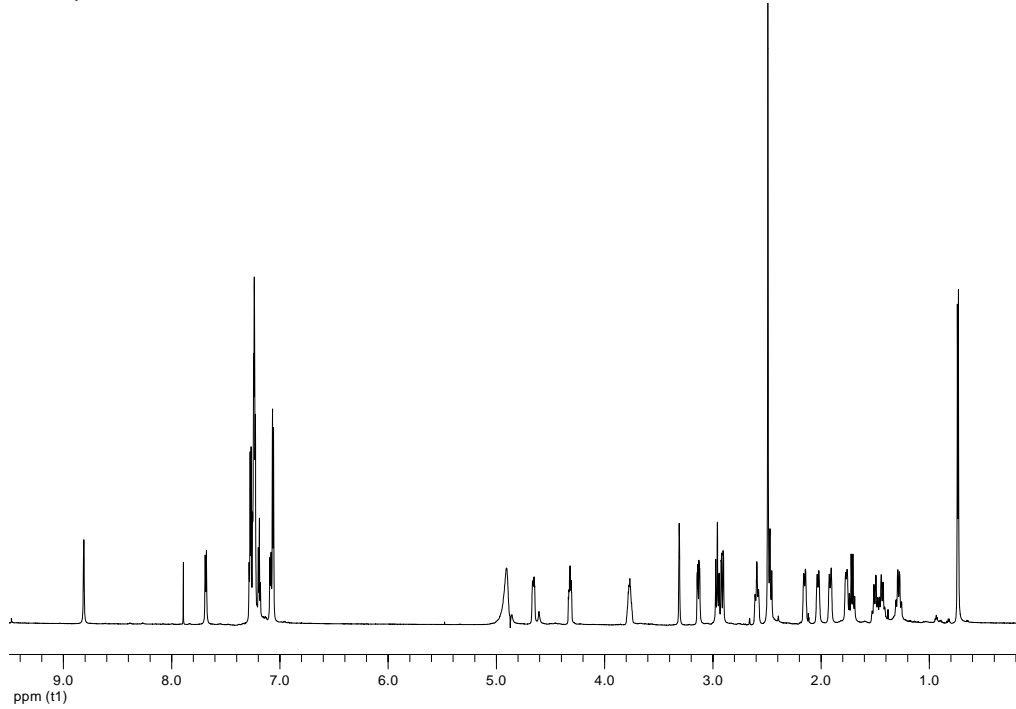
**Ciclo{[L-Leu-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-3</sub>)**



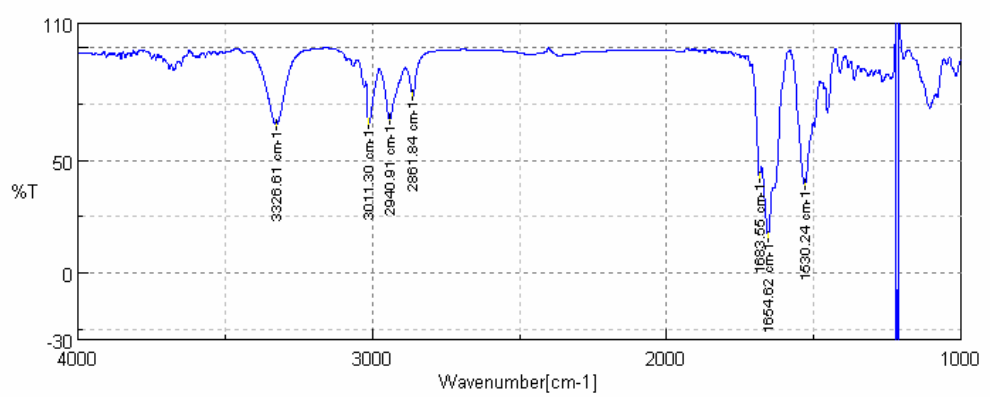
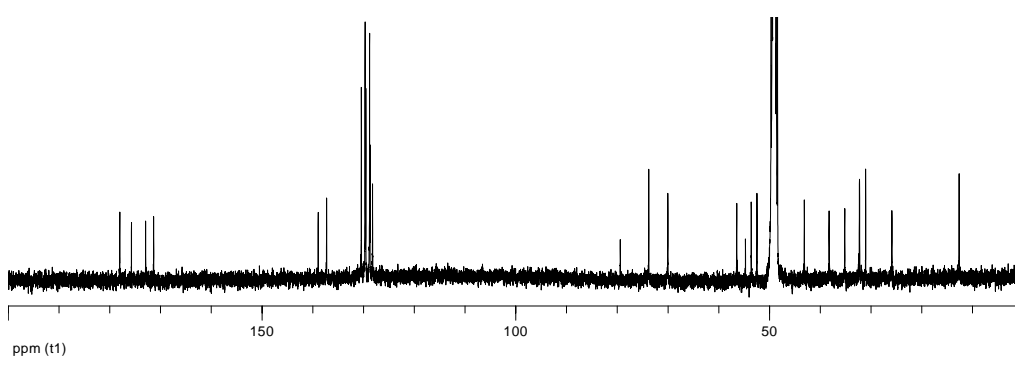
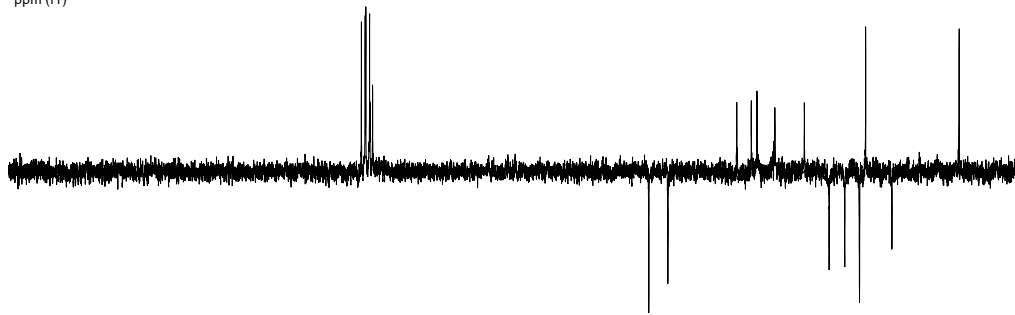
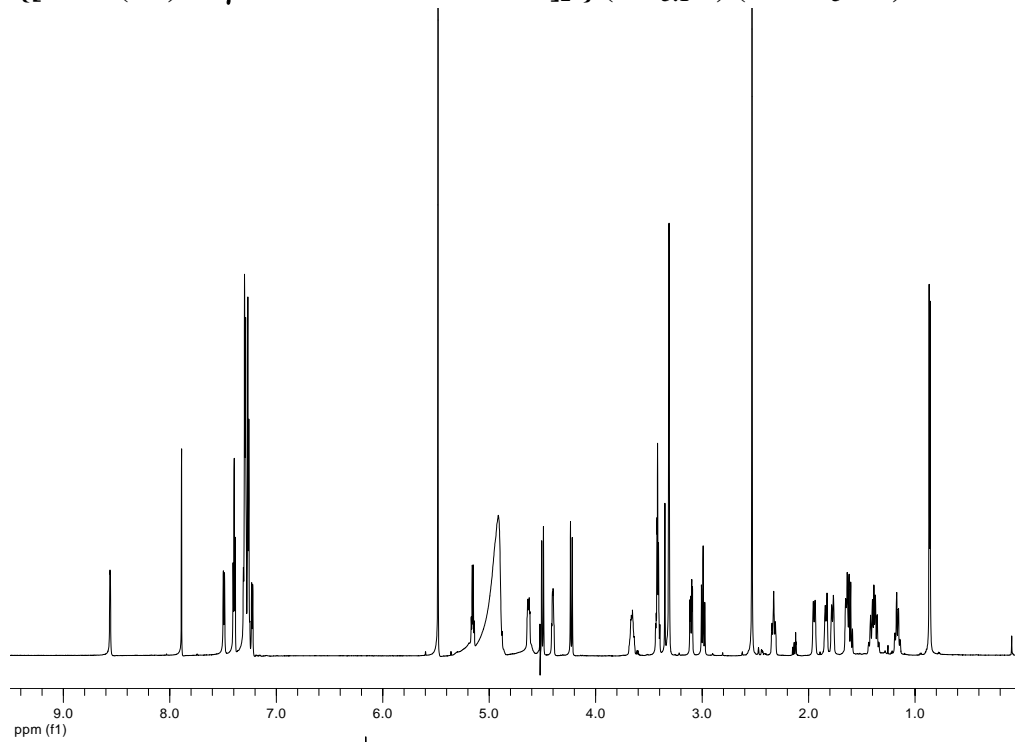
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-4</sub>)**



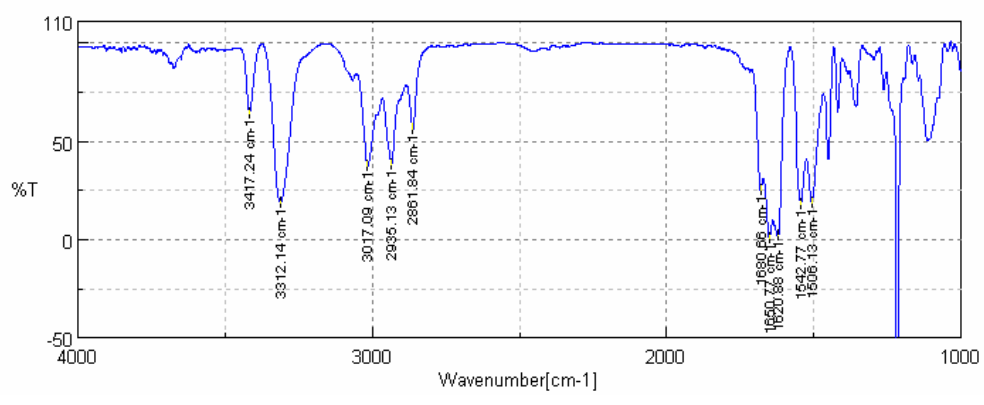
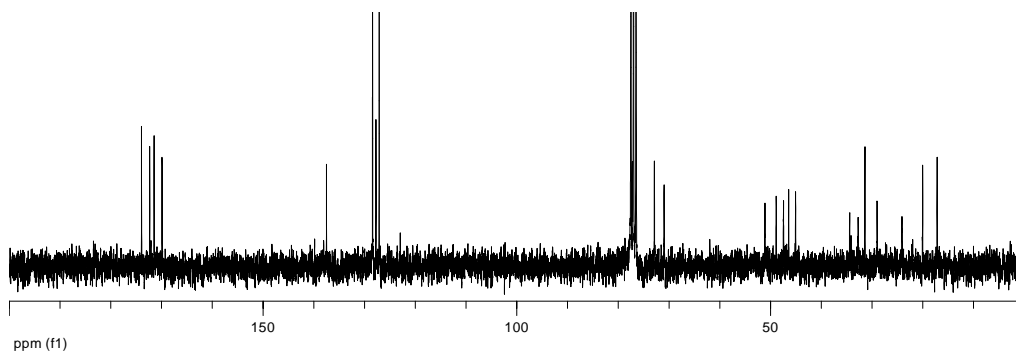
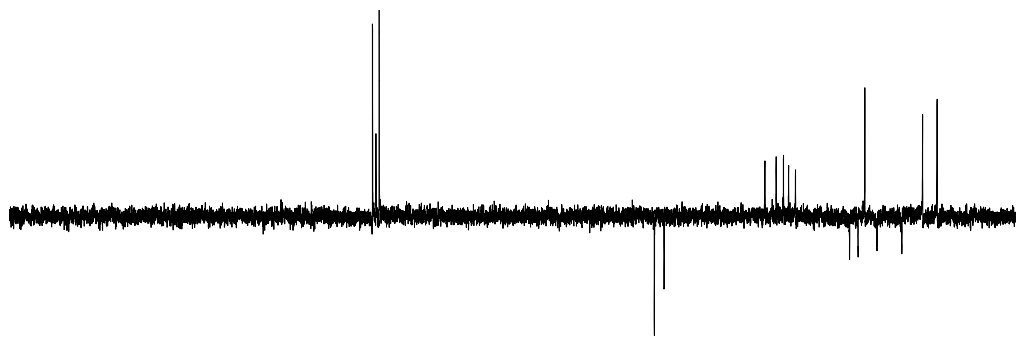
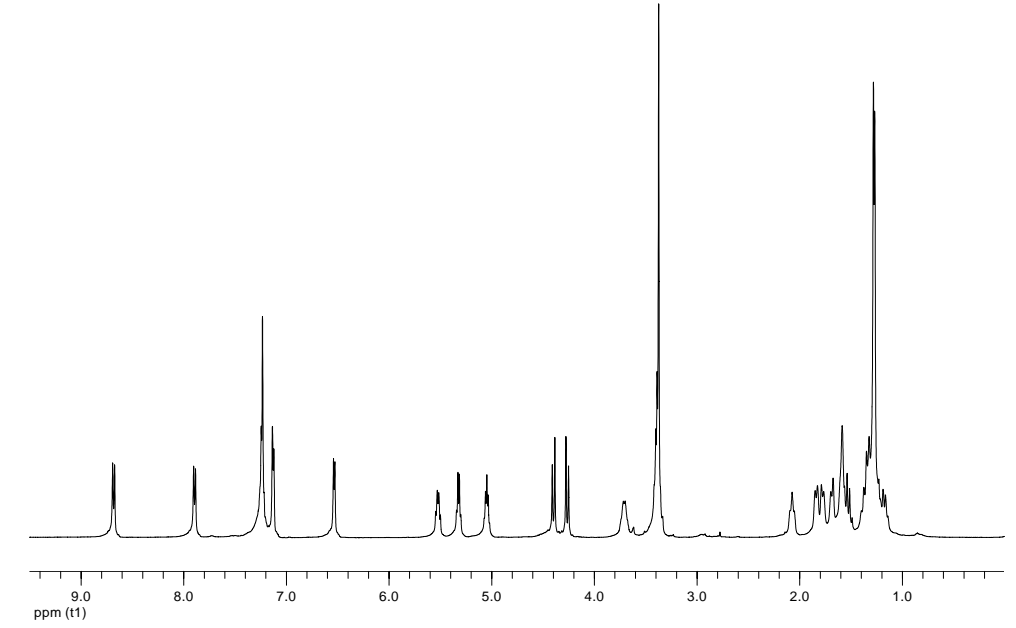
**Ciclo[*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe]<sub>2</sub>] (OC<sub>3:1-5</sub>) (en CD<sub>3</sub>OH)**



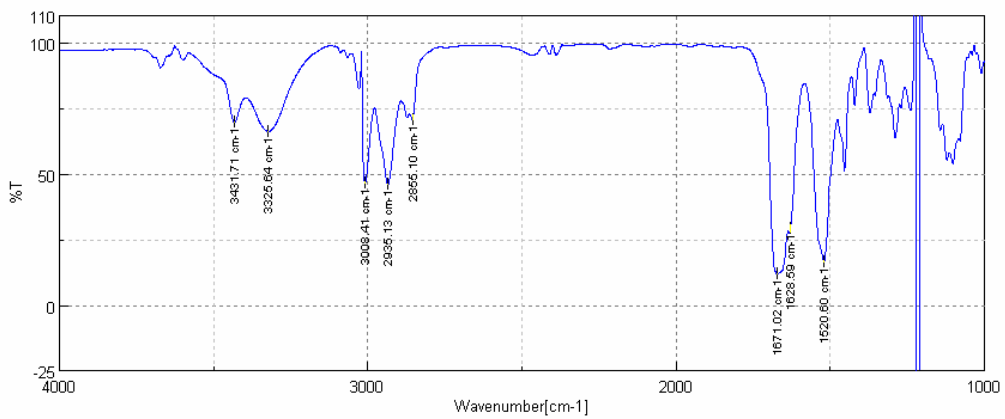
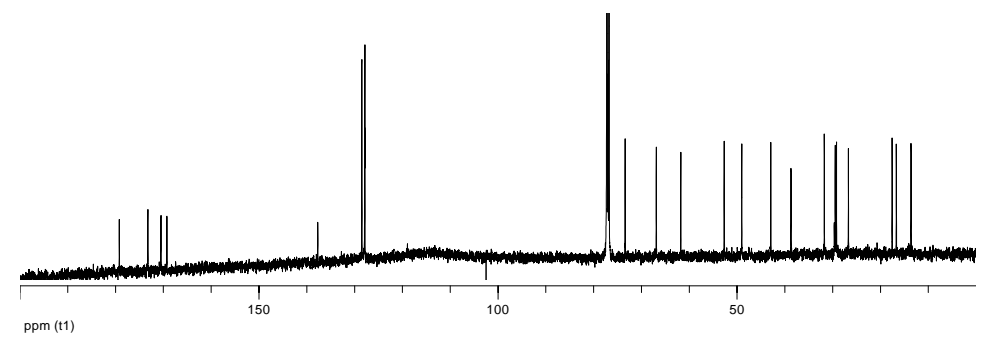
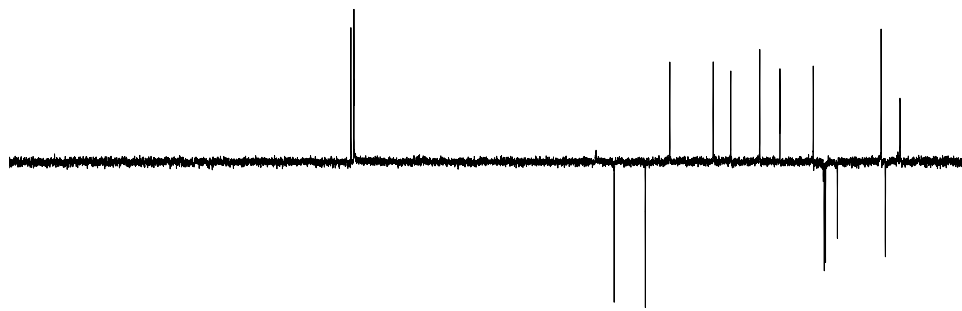
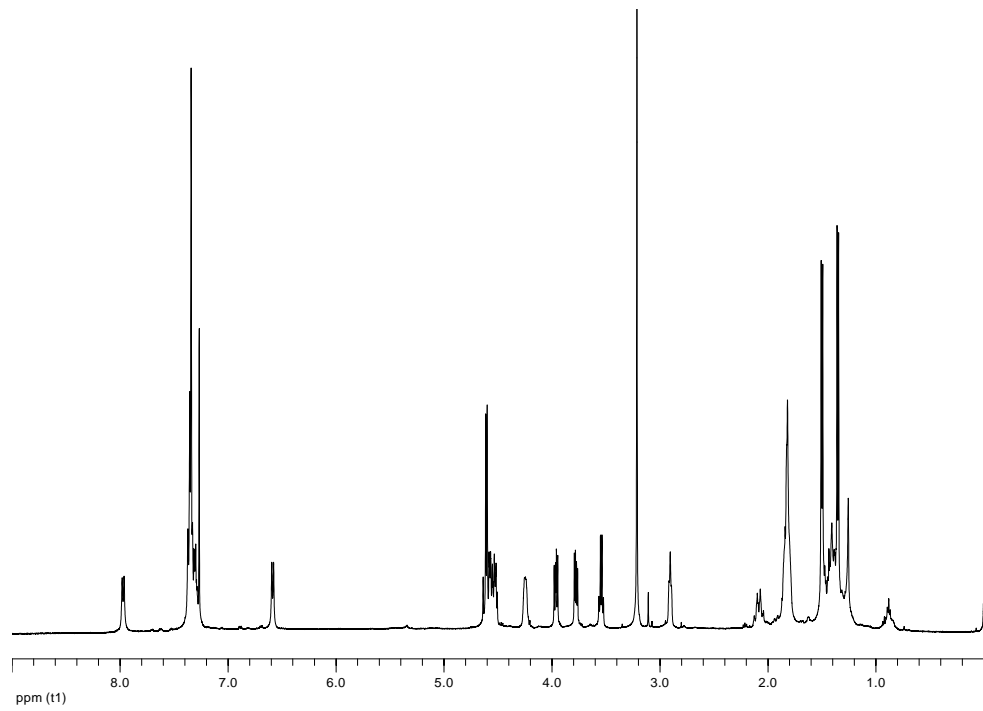
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-γ-Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-6</sub>) (en CD<sub>3</sub>OH)**

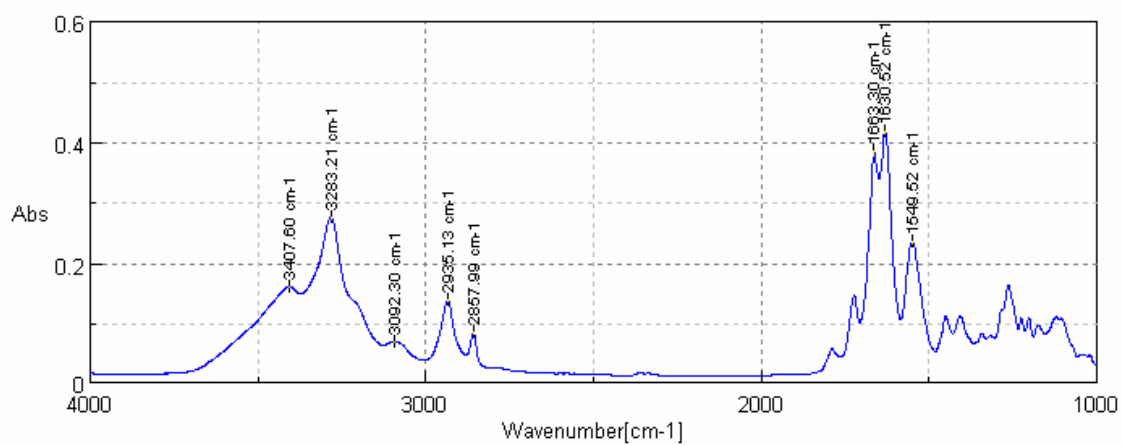
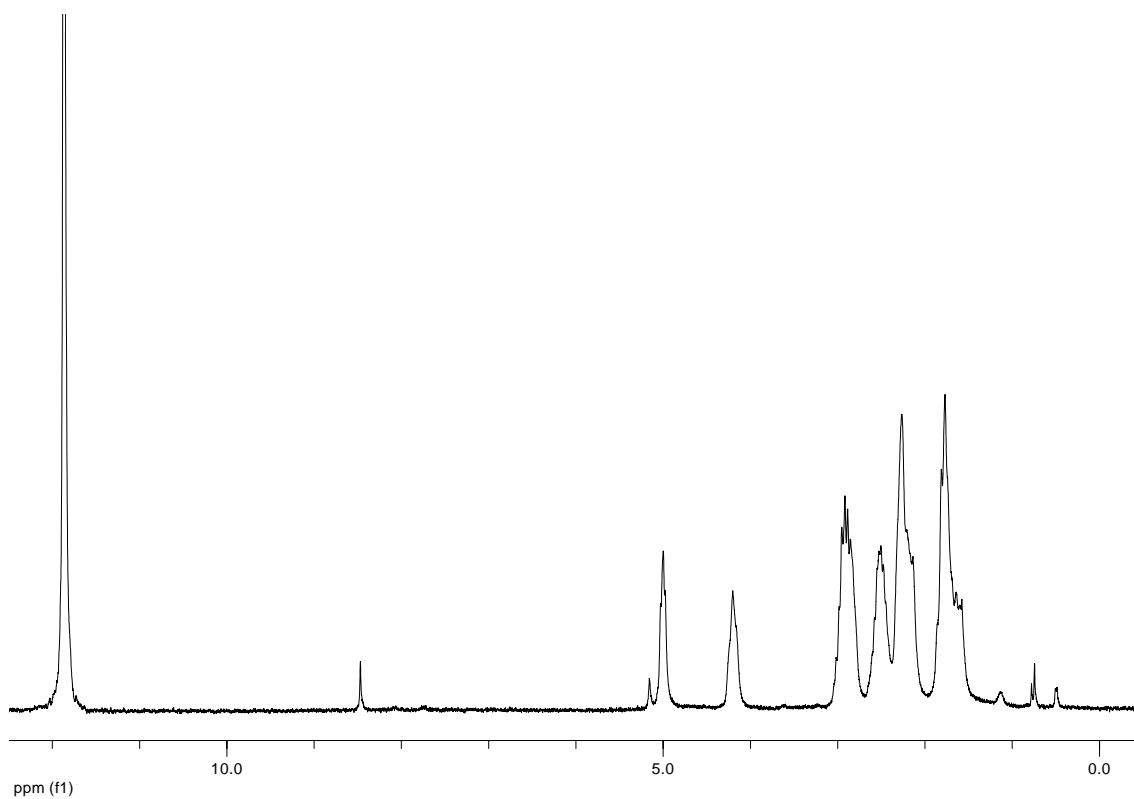


**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-7</sub>)**

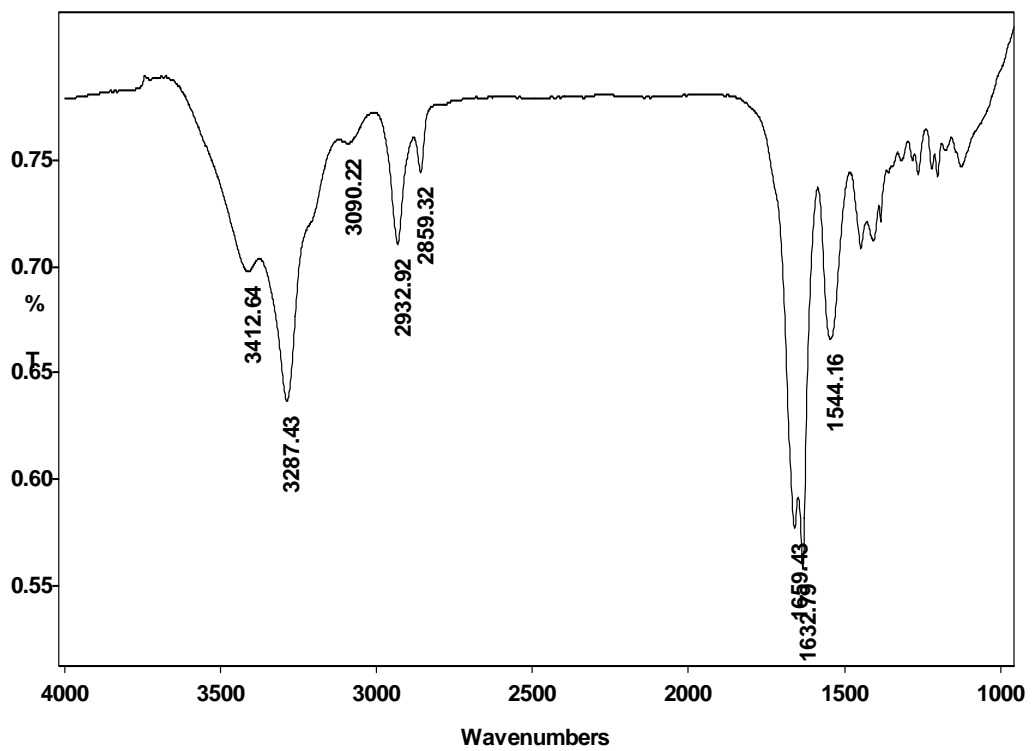
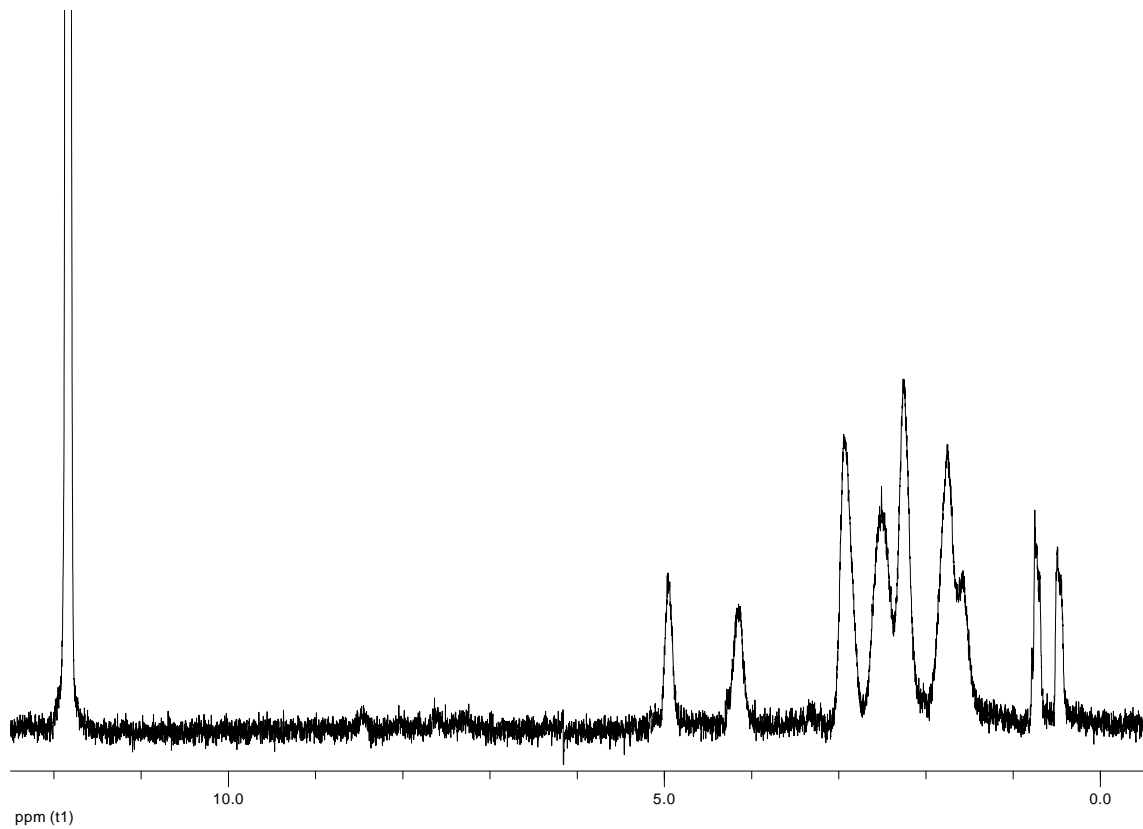


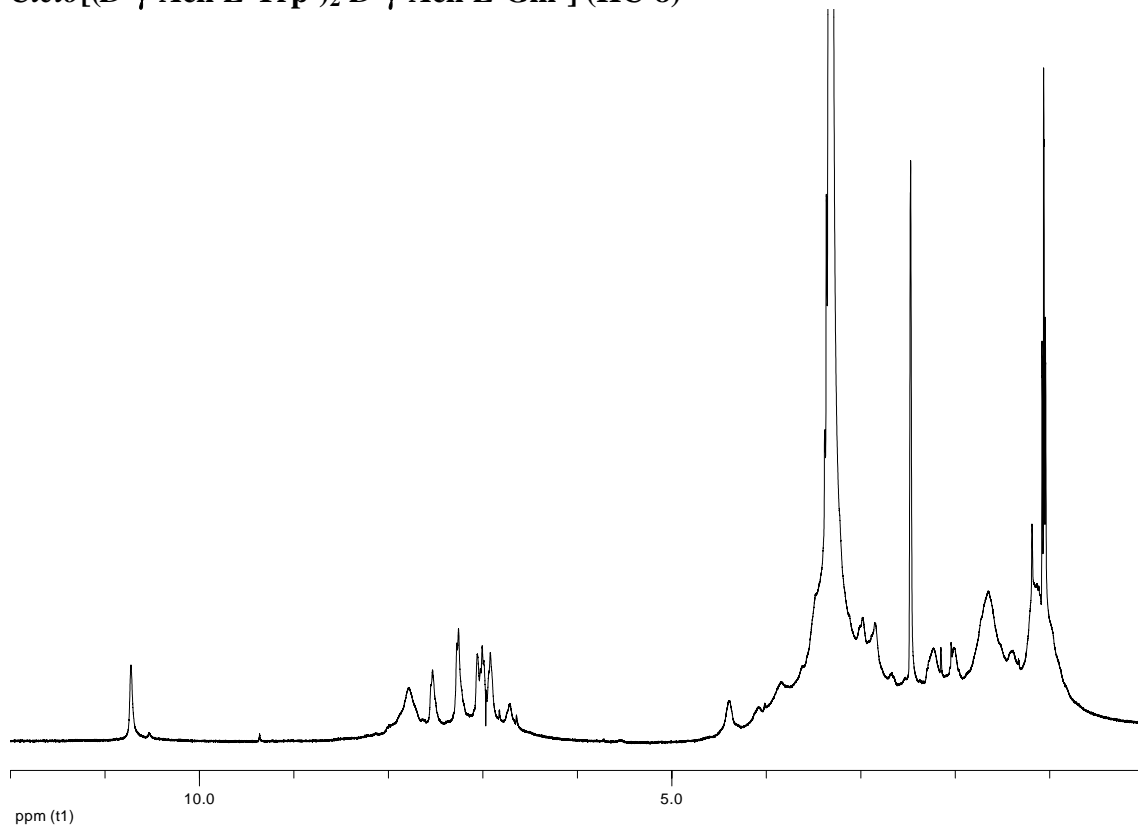
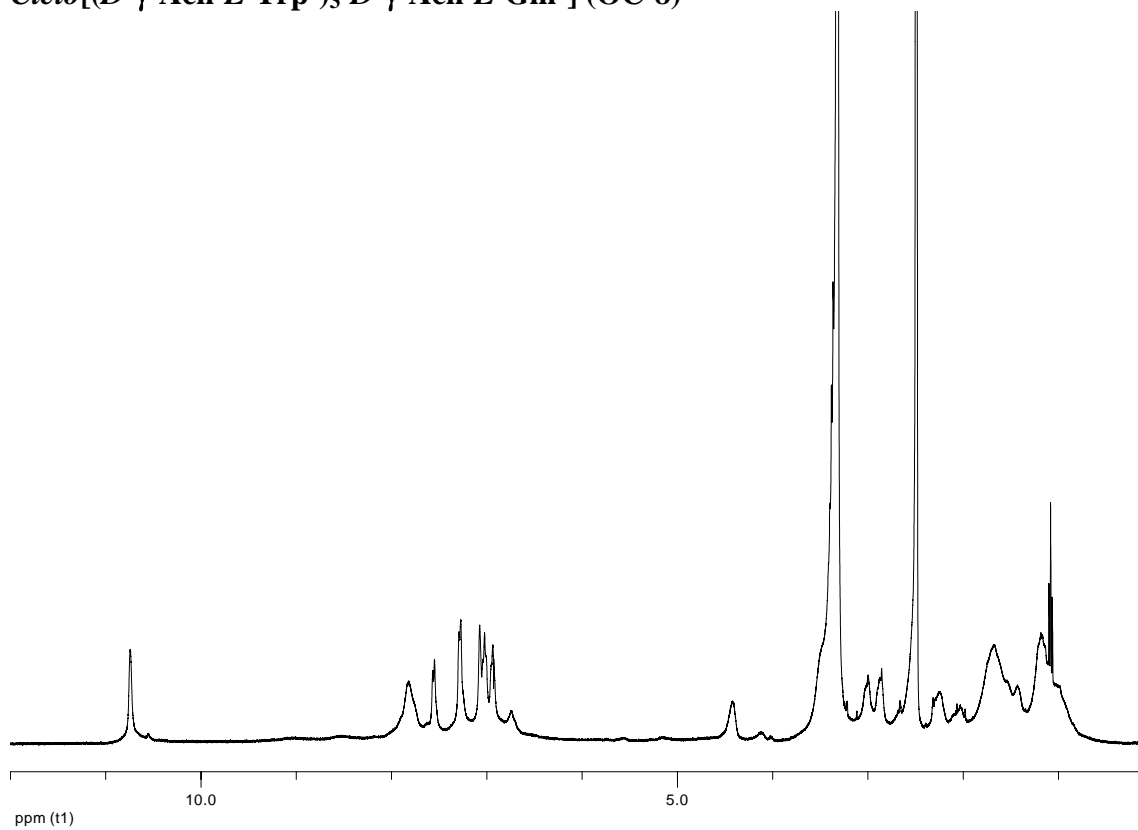
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-8</sub>)**



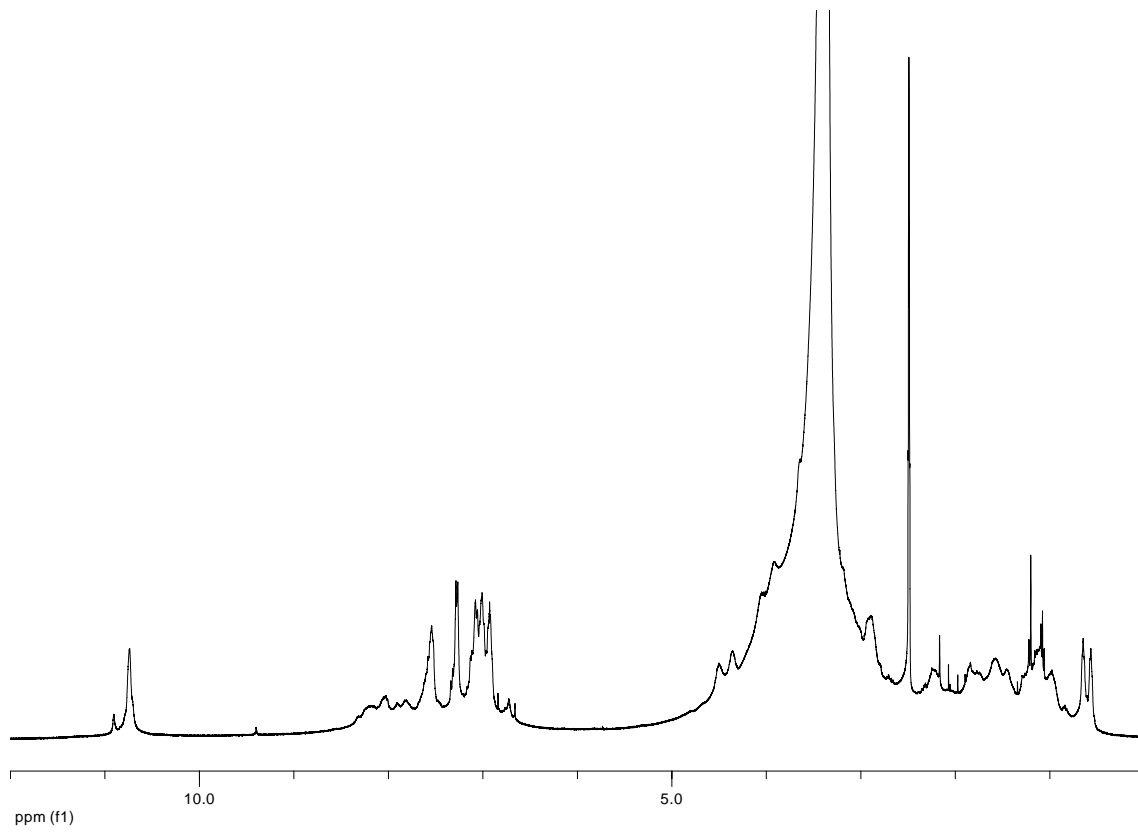
**11.7.  $\alpha,\gamma$ -Nanotubos peptídicos sólidos; síntesis en fase sólida*****Ciclo*{[(1*S*,3*R*)- $\gamma$ -Ach-*L*-Gln]<sub>3</sub>-} (HC-7)**

*Ciclo*{[(1*S*,3*R*)- $\gamma$ -Ach-*L*-Arg]<sub>4</sub>}(OC-7)

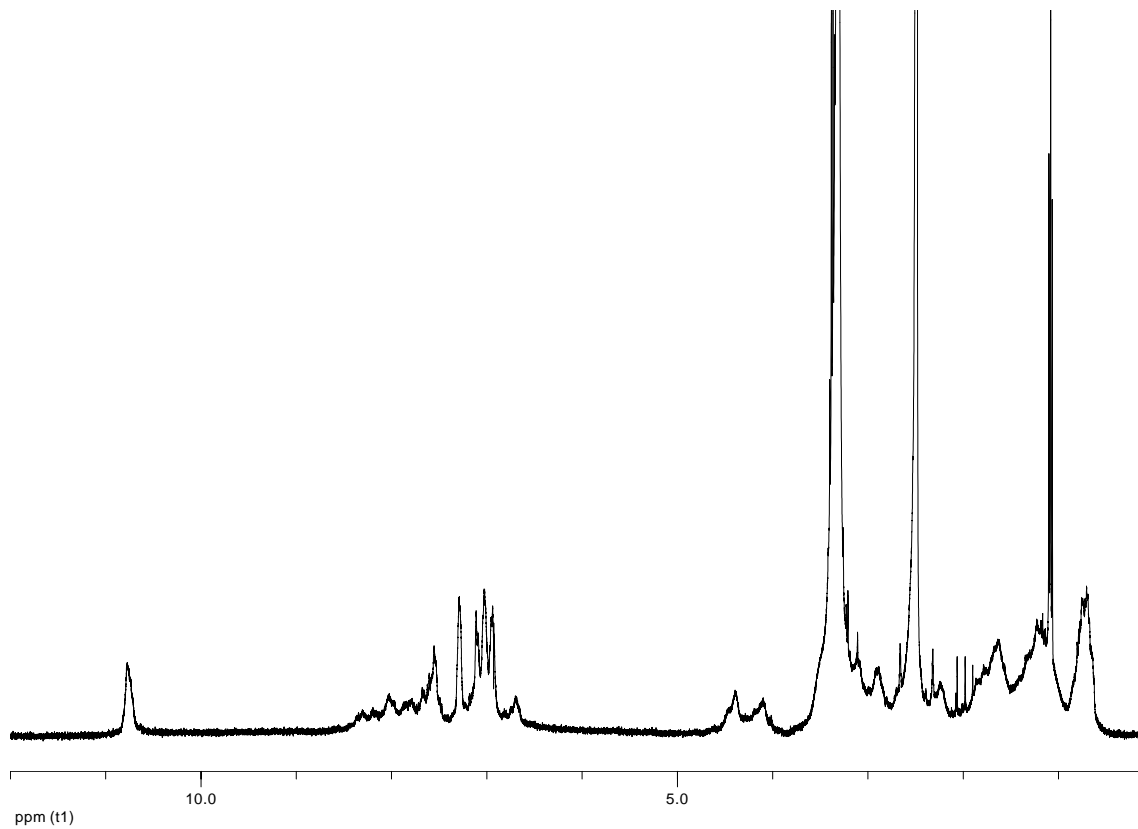


**11.8.  $\alpha,\gamma$ -Nanotubos peptídicos de membrana, síntesis en fase sólida*****Ciclo*[(*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Trp-)<sub>2</sub>-*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Gln-] (HC-8)*****Ciclo*[(*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Trp-)<sub>3</sub>-*D*- $\gamma$ -Ach-*L*-Gln-] (OC-8)**

***Ciclo(D-Trp-L-γ-Ach-D-Trp-L-Leu-D-Trp-L-γ-Ach-D-Trp-L-Gln-) (OC<sub>3:1-9</sub>)***



***Ciclo(L-Trp-L-γ-Ach-D-Leu-L-Trp-D-Leu-(1R,3S)-γ-Ach-D-Trp-L-Gln-) (OC<sub>3:1-10</sub>)***

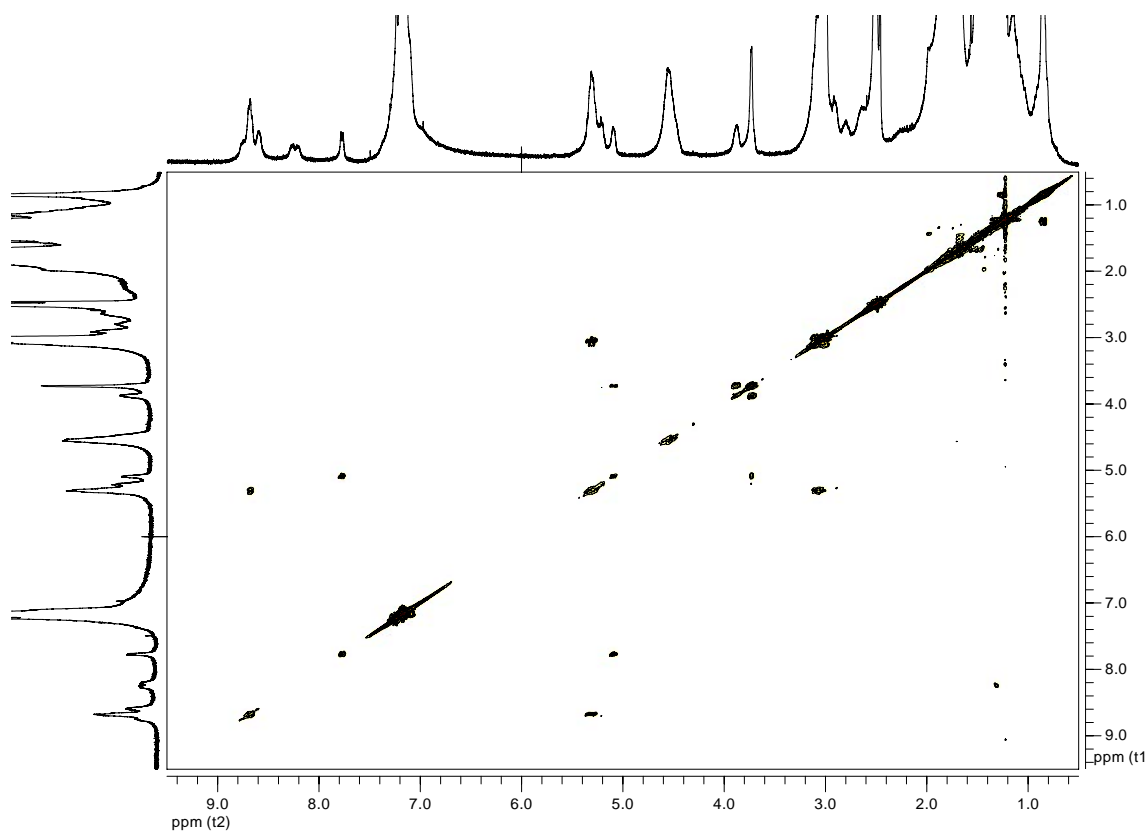


**BIDIMENSIONALES**

**Asignación de los ciclopéptidos mediante  $^1\text{H}$  NMR.** Los NOESY y ROESY se adquirieron a tiempos de mezcla no optimizados entre 175-500 ms, siendo la referencia:  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta=7,26$  ppm), MeOH ( $\delta=3,31$  ppm) o el TMS (0.00 ppm).

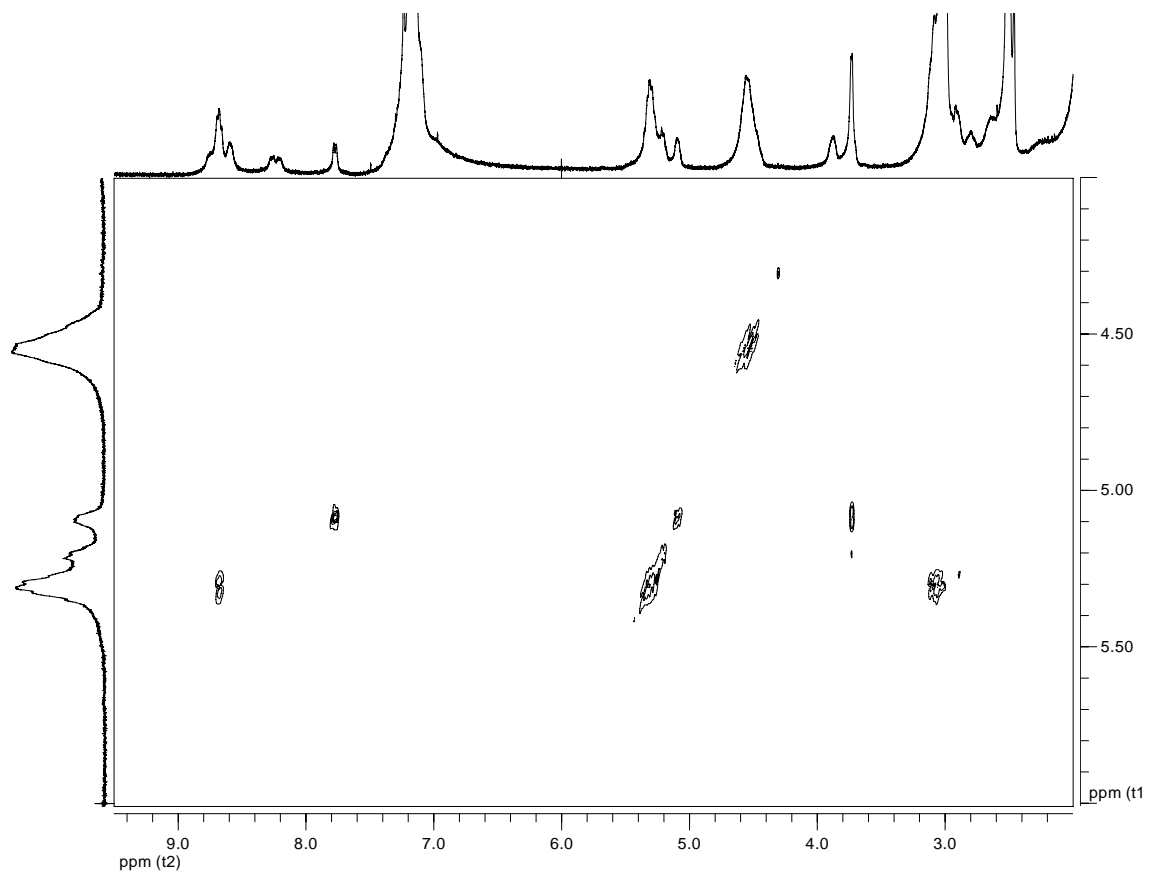
***Ciclo*[L-Ser-D-MeN- $\gamma$ -Ach-(L-Phe-D-MeN- $\gamma$ -Ach) $_2$ -] (HC-6)**

COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):

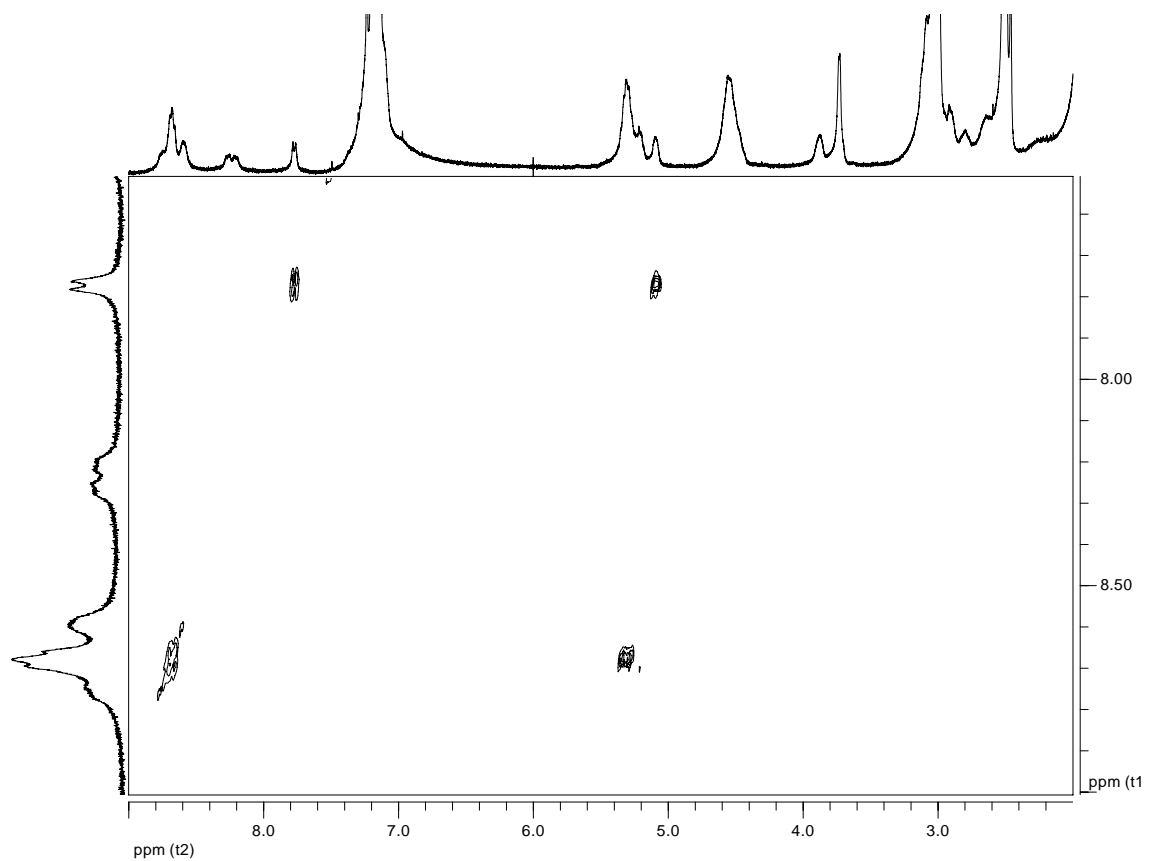


**Ciclo[L-Ser-D-MeN-γ-Ach-(L-Phe-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]- (HC-6)**

COSY (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); (Ampliación 9,5-2,0 ppm : 6,0-4,0 ppm):

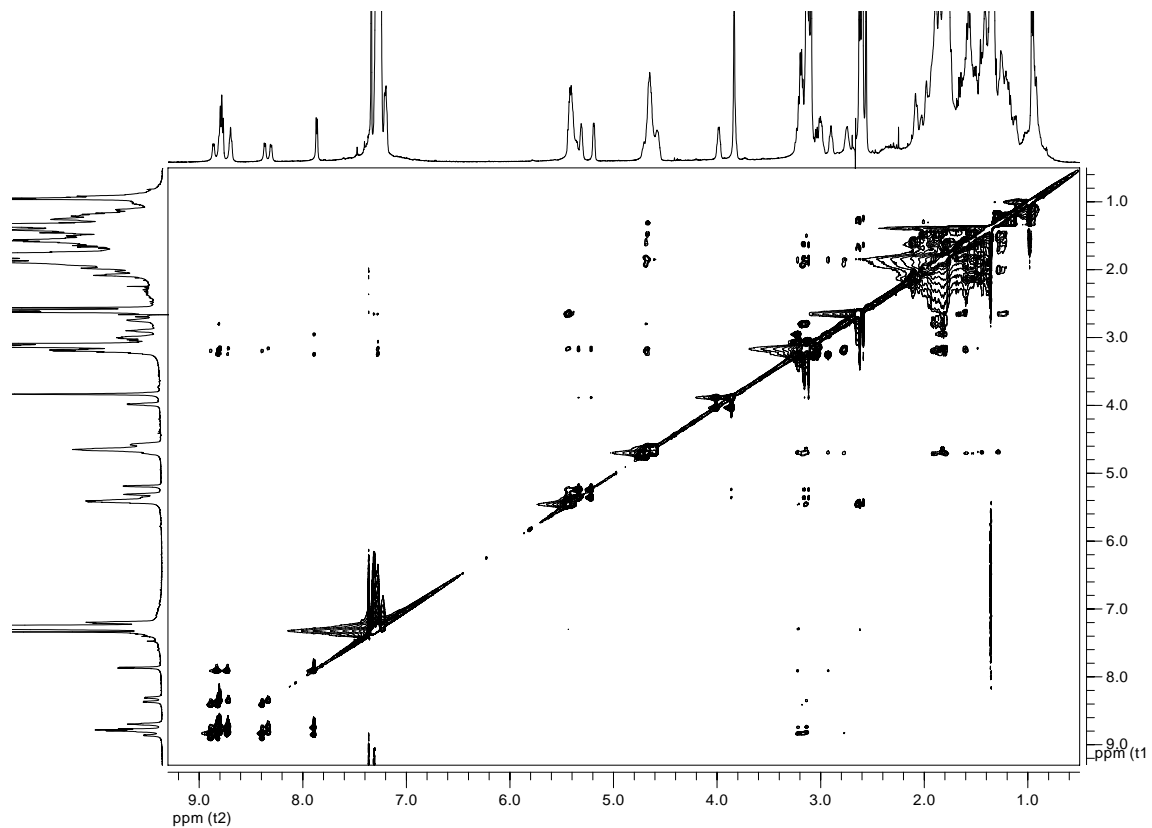


COSY (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); (Ampliación 9,0-2,0 ppm : 9,0-7,5 ppm):

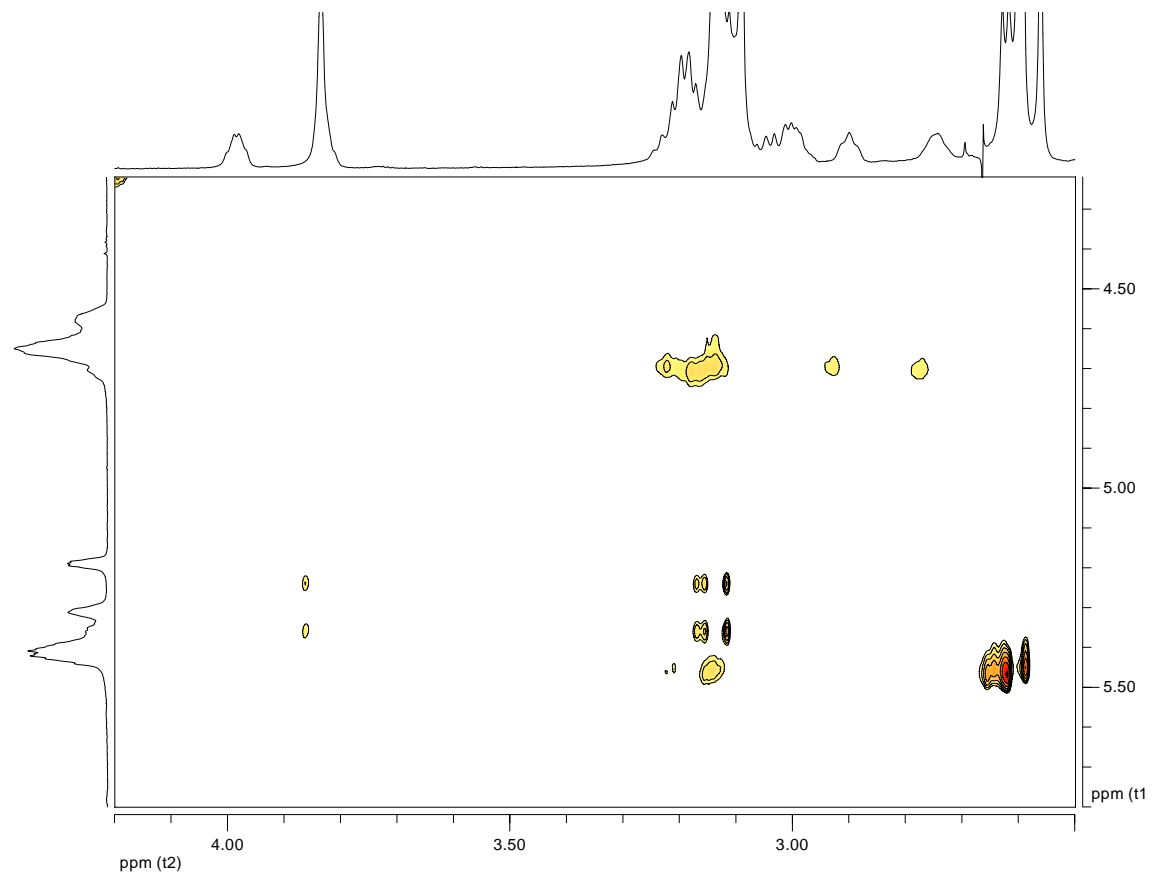


**Ciclo[L-Ser-D-MeN-γ-Ach-(L-Phe-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]- (HC-6)**

NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):

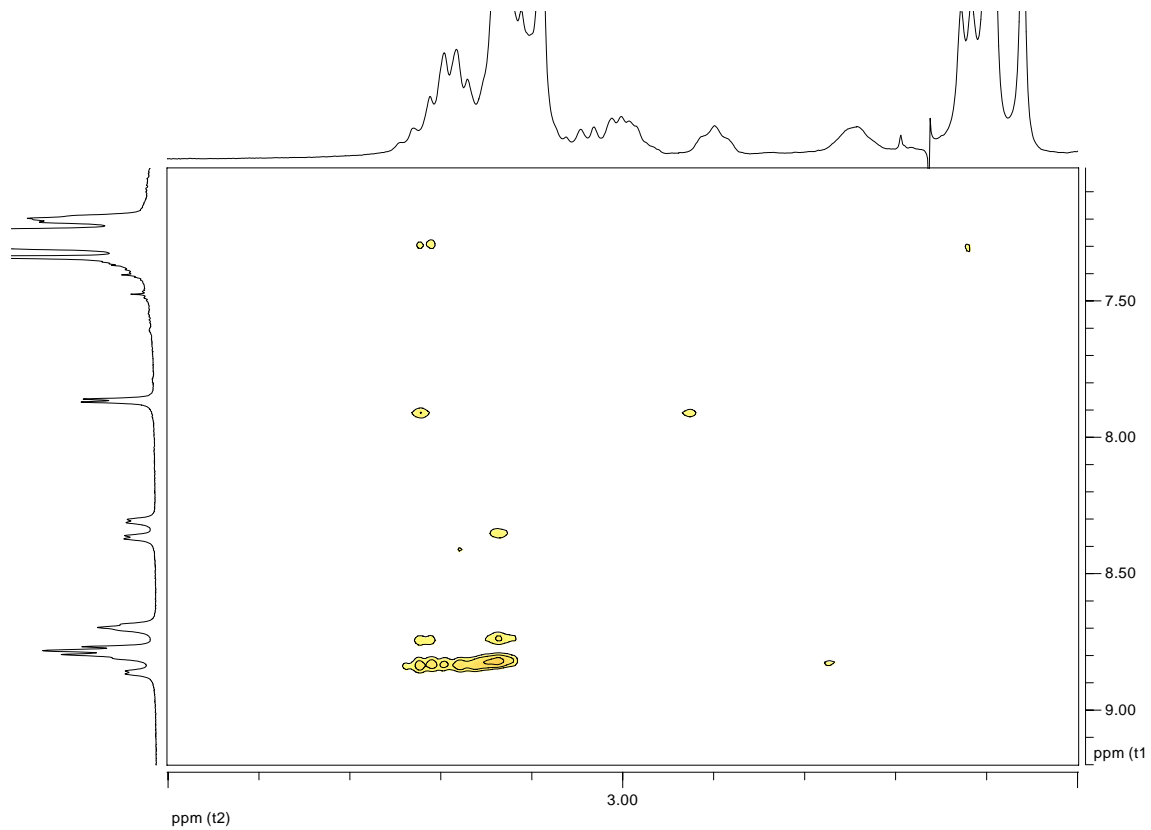


NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 4,2-2,5 ppm : 5,8-4,2 ppm):

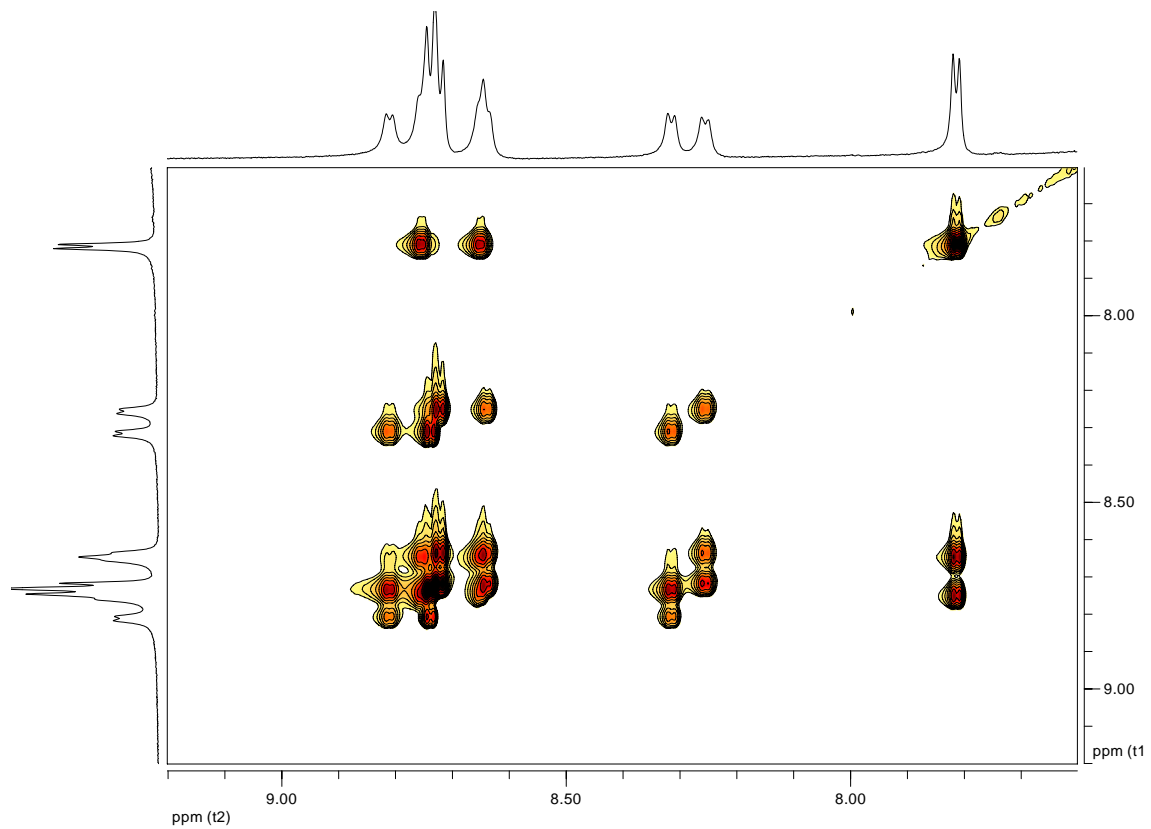


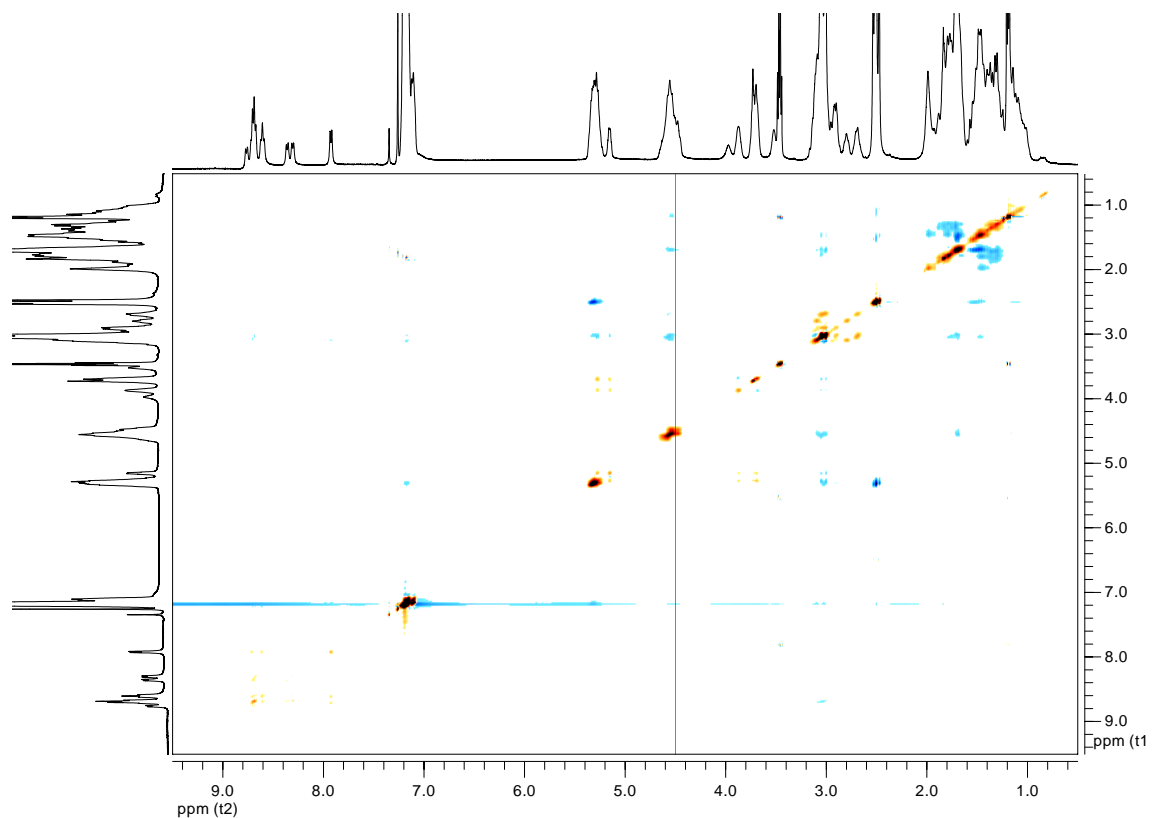
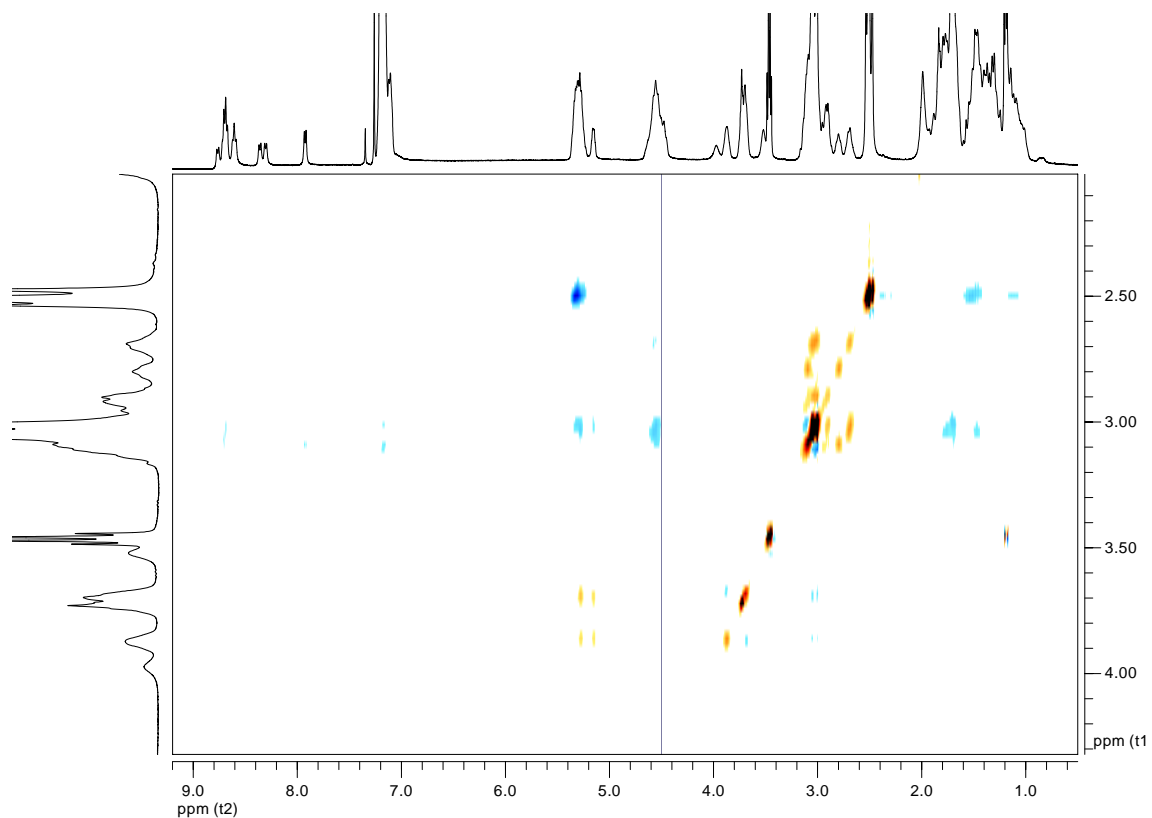
**Ciclo[L-Ser-D-MeN-γ-Ach-(L-Phe-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>-] (HC-6)**

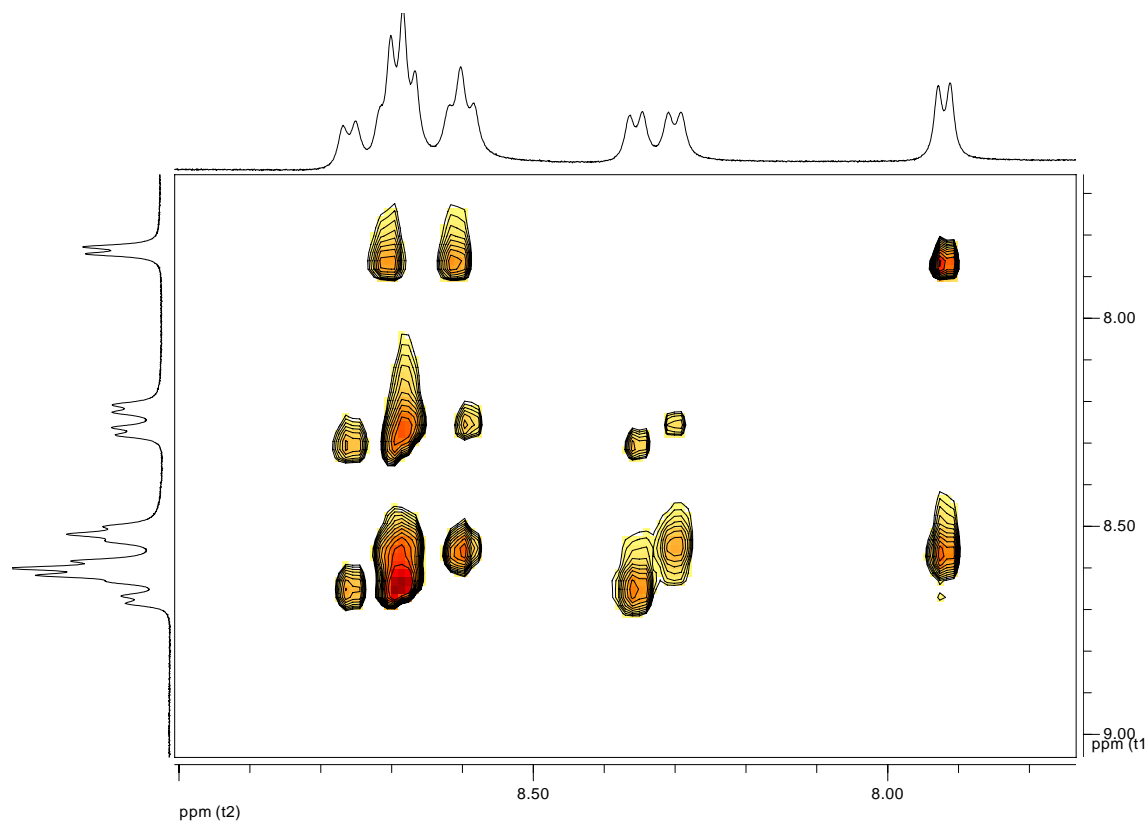
NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 3,5-2,5 ppm : 9,2-7,0 ppm):

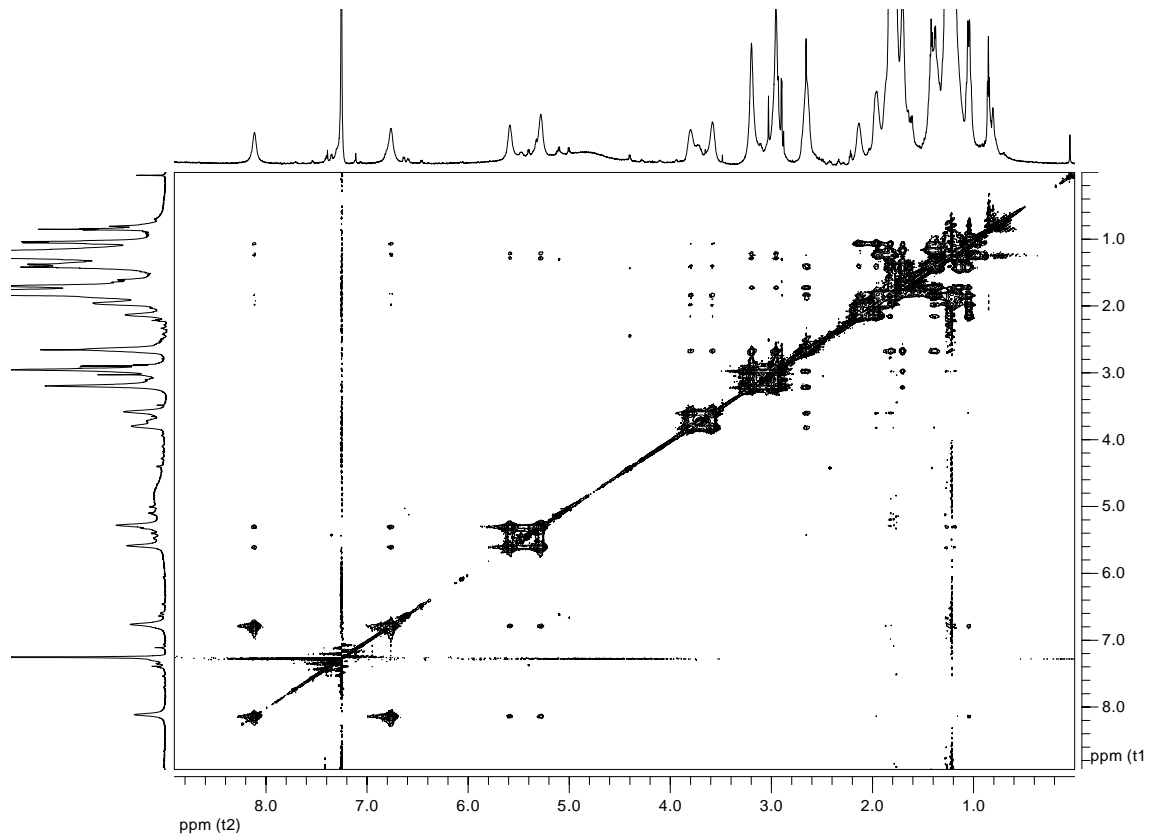
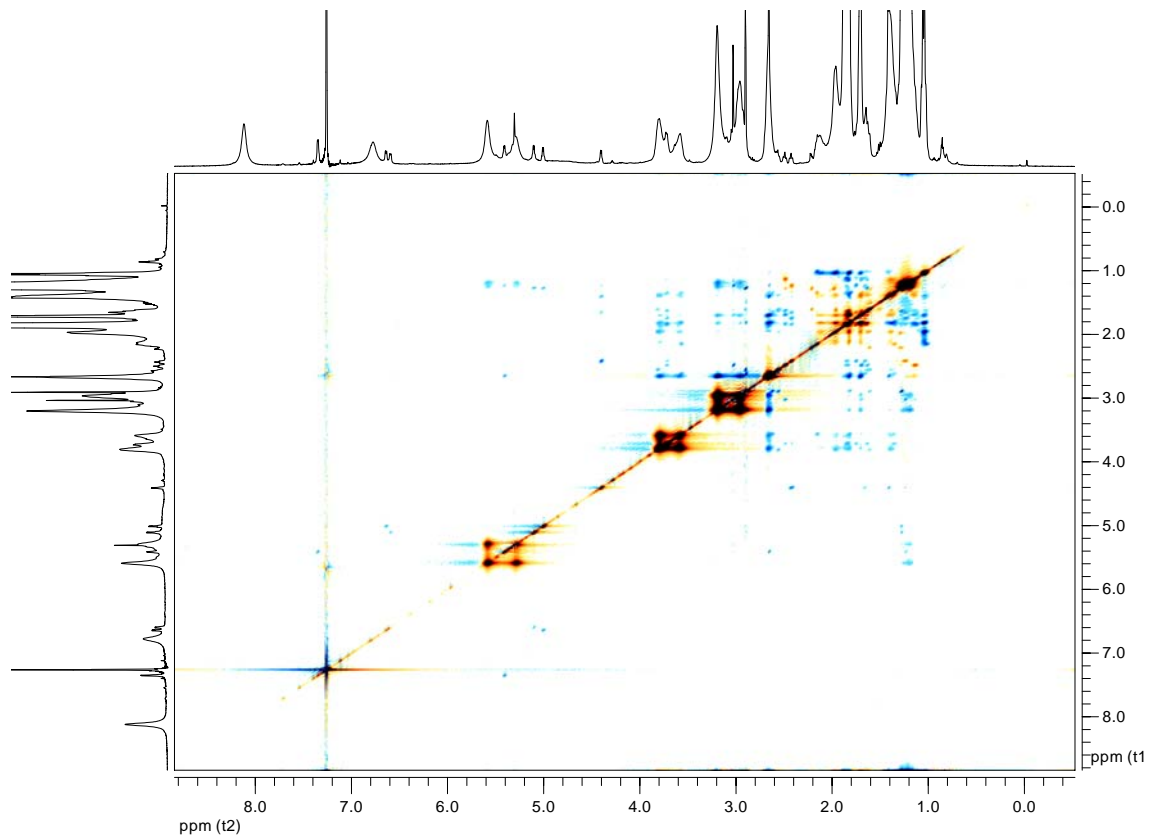


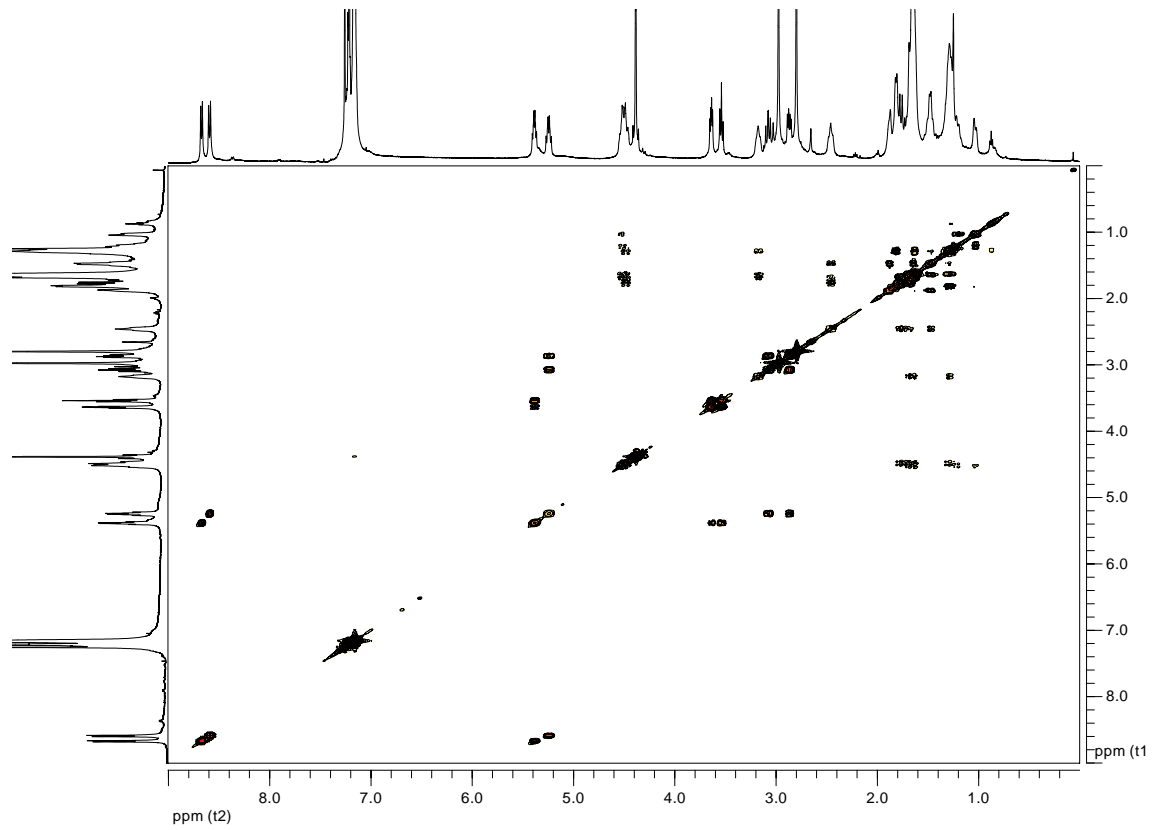
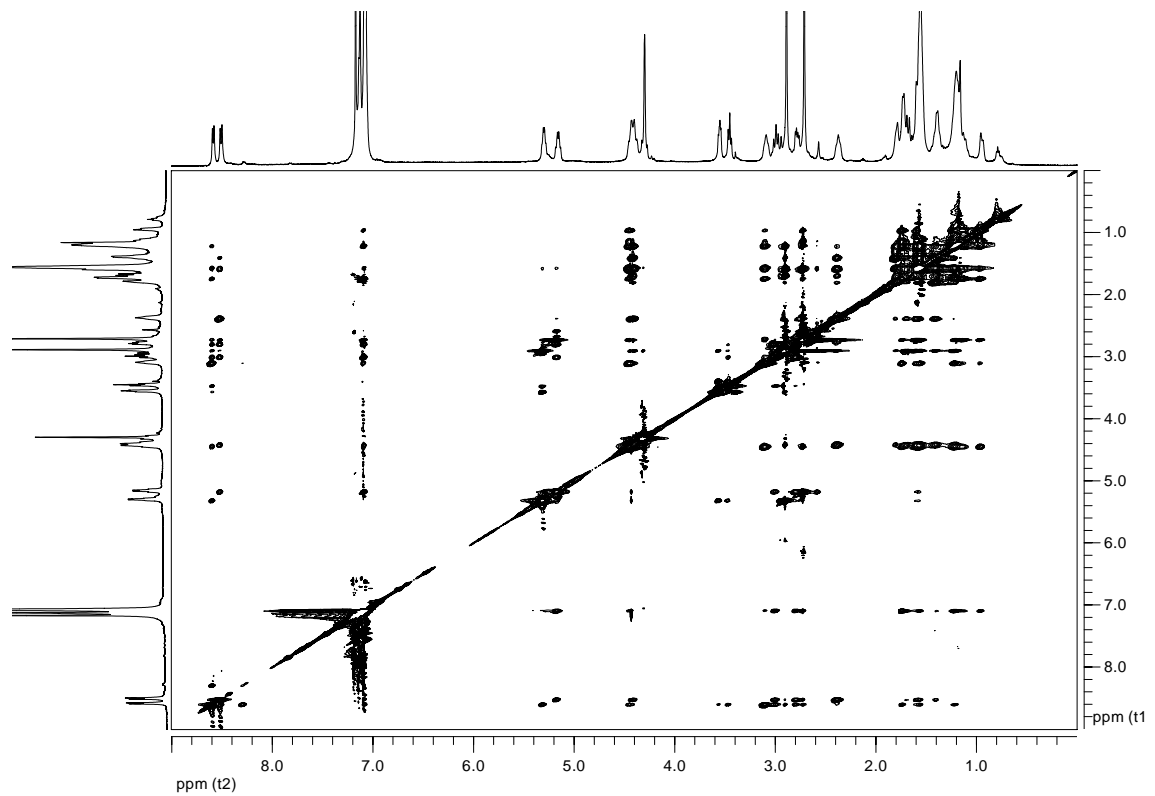
NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,2-7,6 ppm : 9,2-7,6 ppm):



**Ciclo[L-Ser-D-MeN- $\gamma$ -Ach-(L-Phe-D-MeN- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>-] (HC-6)**ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,2-6,5 : 4,3-2,0 ppm):

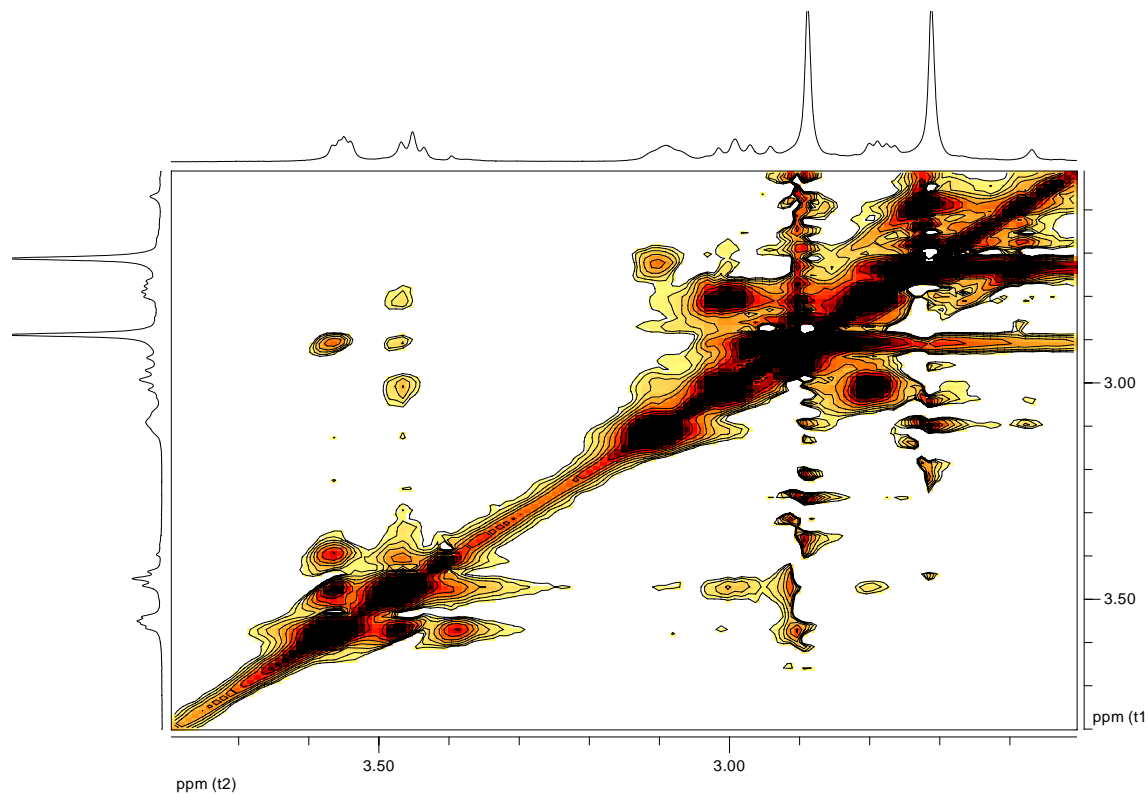
**Ciclo[L-Ser-D-MeN- $\gamma$ -Ach-(L-Phe-D-MeN- $\gamma$ -Ach)<sub>2</sub>-] (HC-6)**ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,0-7,7 ppm : 9,0-7,7 ppm):

**Ciclo[*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>4</sub>] (OC-1)**NOESY (CDCl<sub>3</sub>; -10 °C; concentración: 5 mM; 750 MHz):ROESY (CDCl<sub>3</sub>; -10 °C; concentración: 5 mM; 750 MHz):

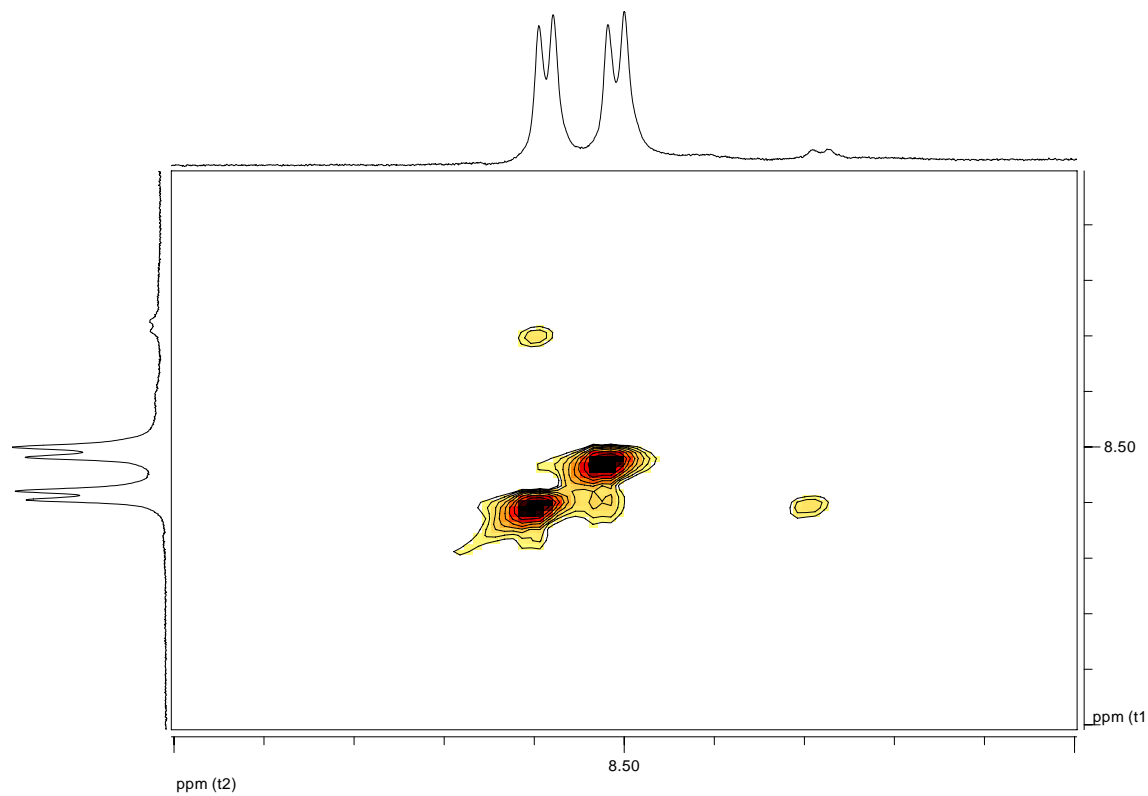
**Ciclo{[L-Phe-D-MeN- $\gamma$ -Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach]<sub>2</sub>} (OC-5)**COSY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):

**Ciclo{[L-Phe-D-<sup>Me</sup>N-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-<sup>Me</sup>N-γ-Ach]<sub>2</sub>-} (OC-5)**

NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 3,8-2,5 ppm : 3,8-2,5 ppm):

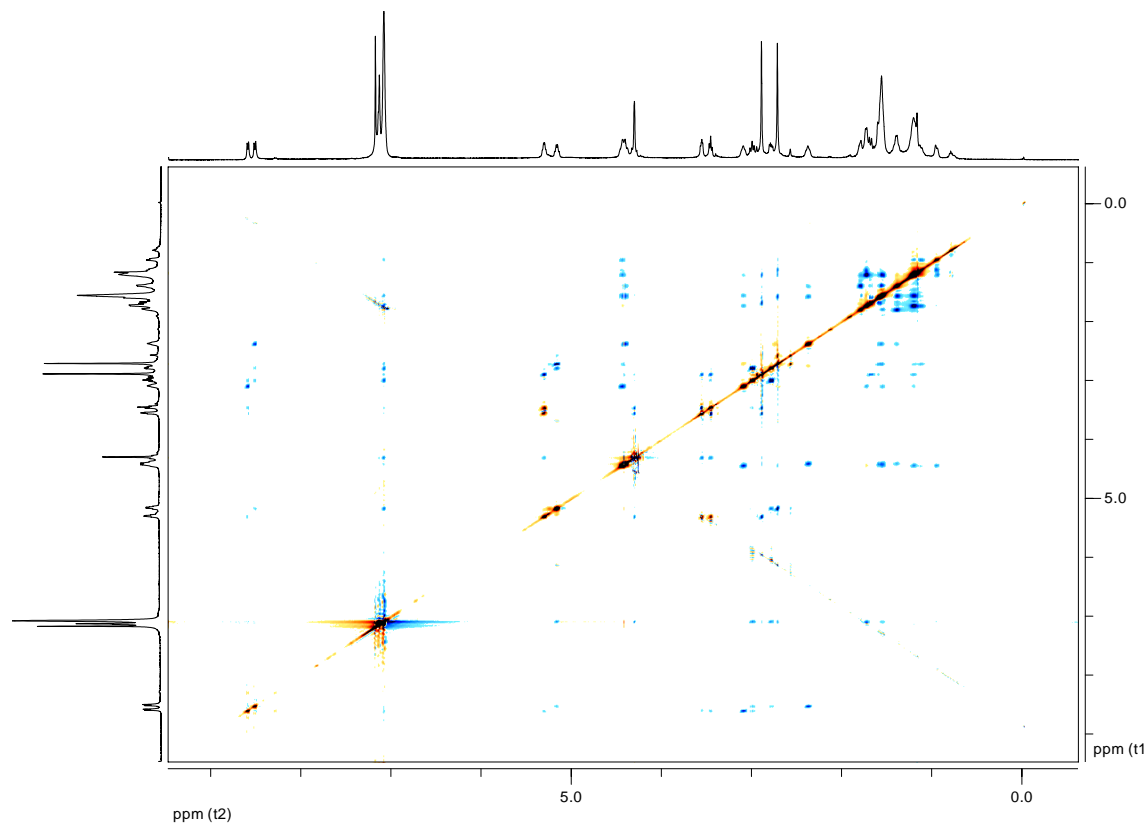


NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,0-8,0 ppm : 9,0-8,0 ppm):

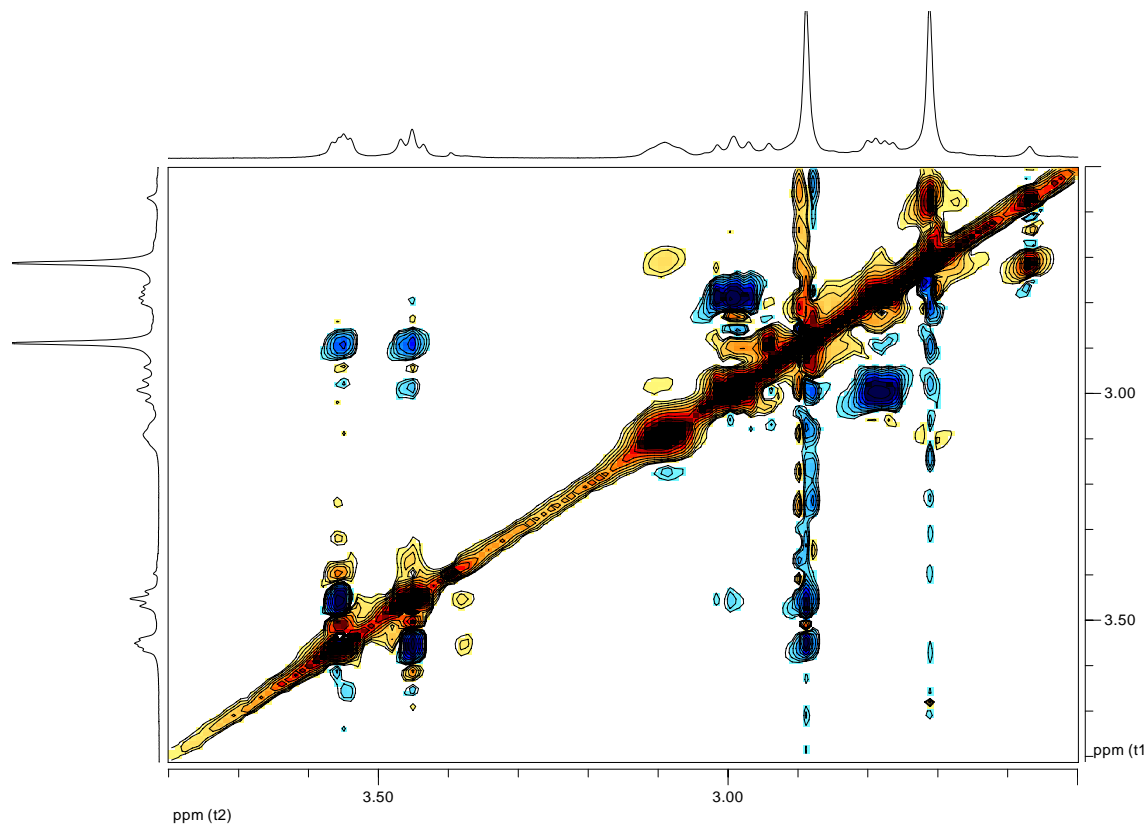


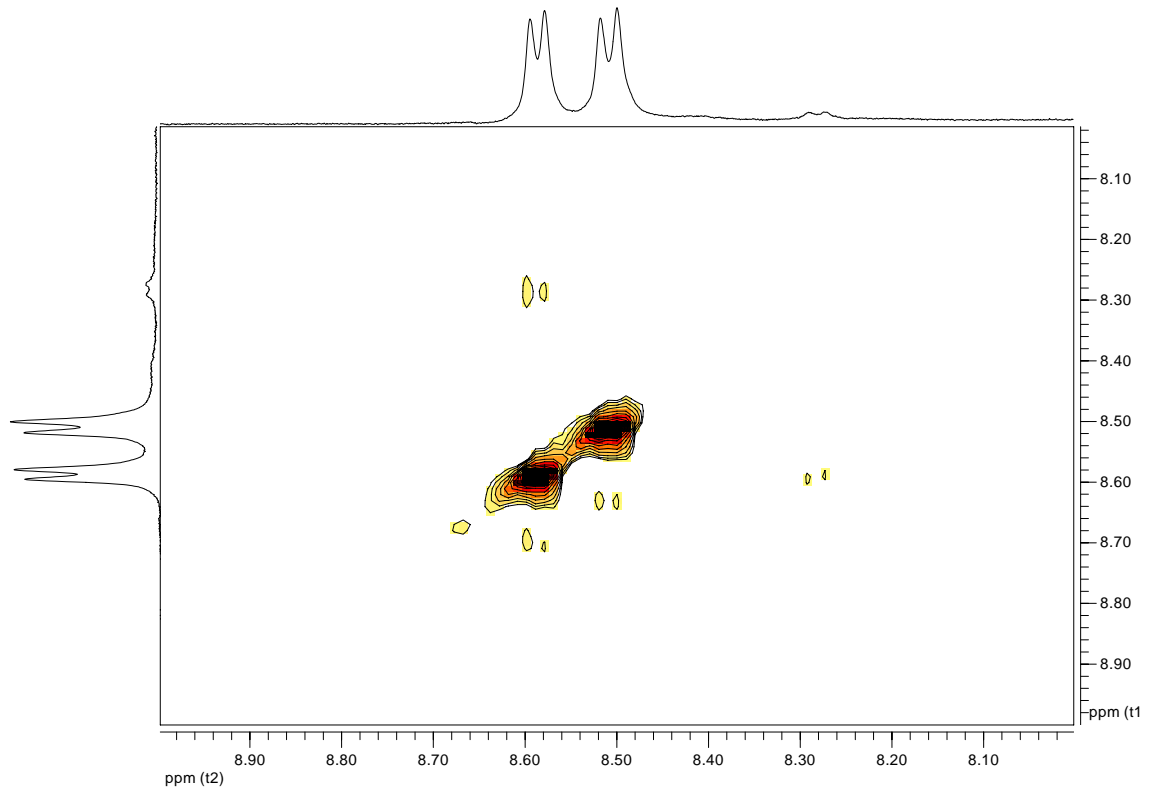
**Ciclo{[L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN-γ-Ach]<sub>2</sub>-} (OC-5)**

ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):



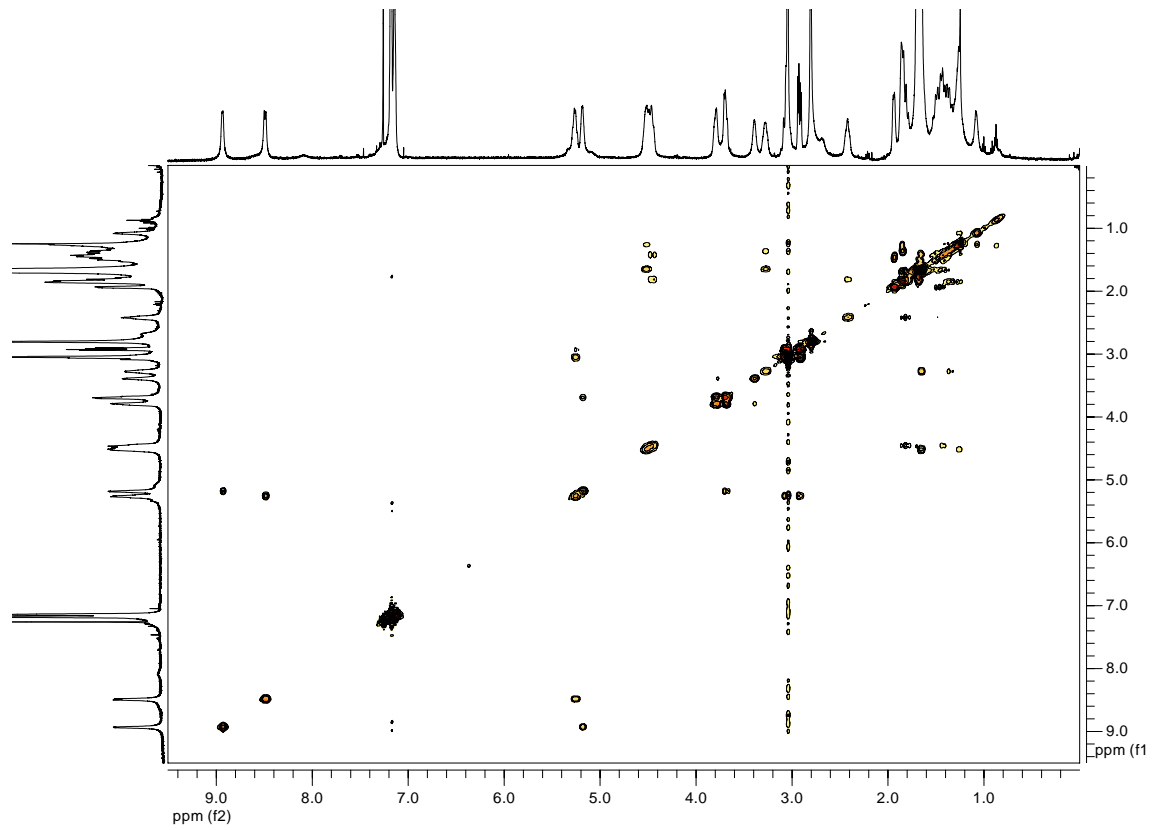
ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 3,8-2,5 ppm : 3,8-2,5 ppm):



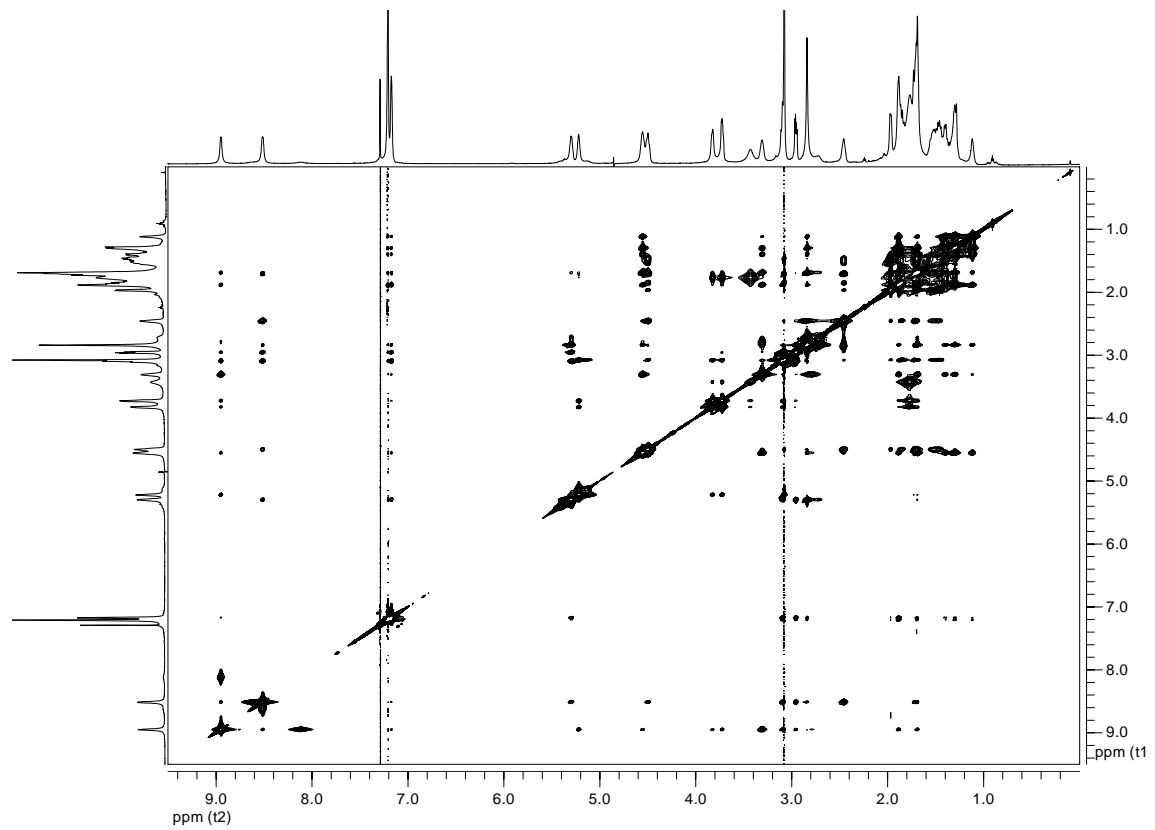
**Ciclo{[L-Phe-D-MeN- $\gamma$ -Ach-L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach]<sub>2</sub>-} (OC-5)**ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,0-8,0 ppm : 9,0-8,0 ppm):

**Ciclo[(L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>] (OC-6)**

COSY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):

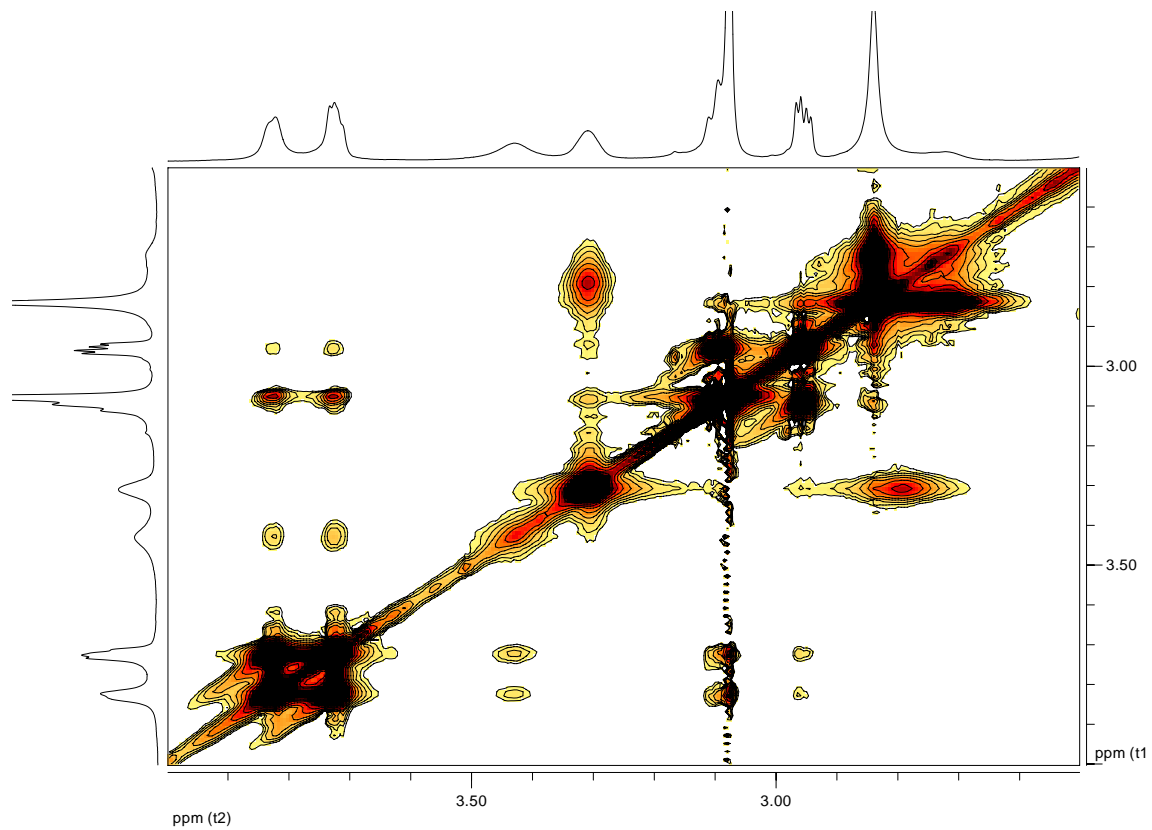


NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):

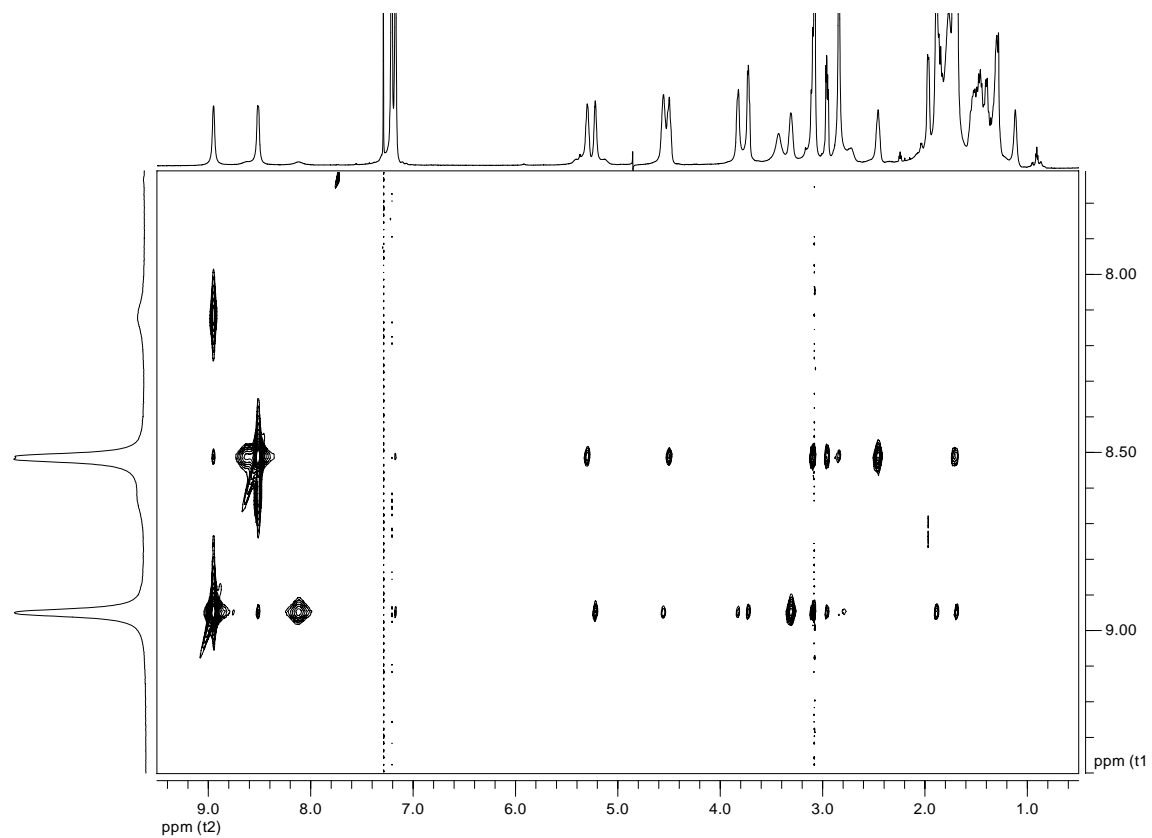


**Ciclo[(L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]-] (OC-6)**

NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 4,0-2,5 ppm : 4,0-2,5 ppm):

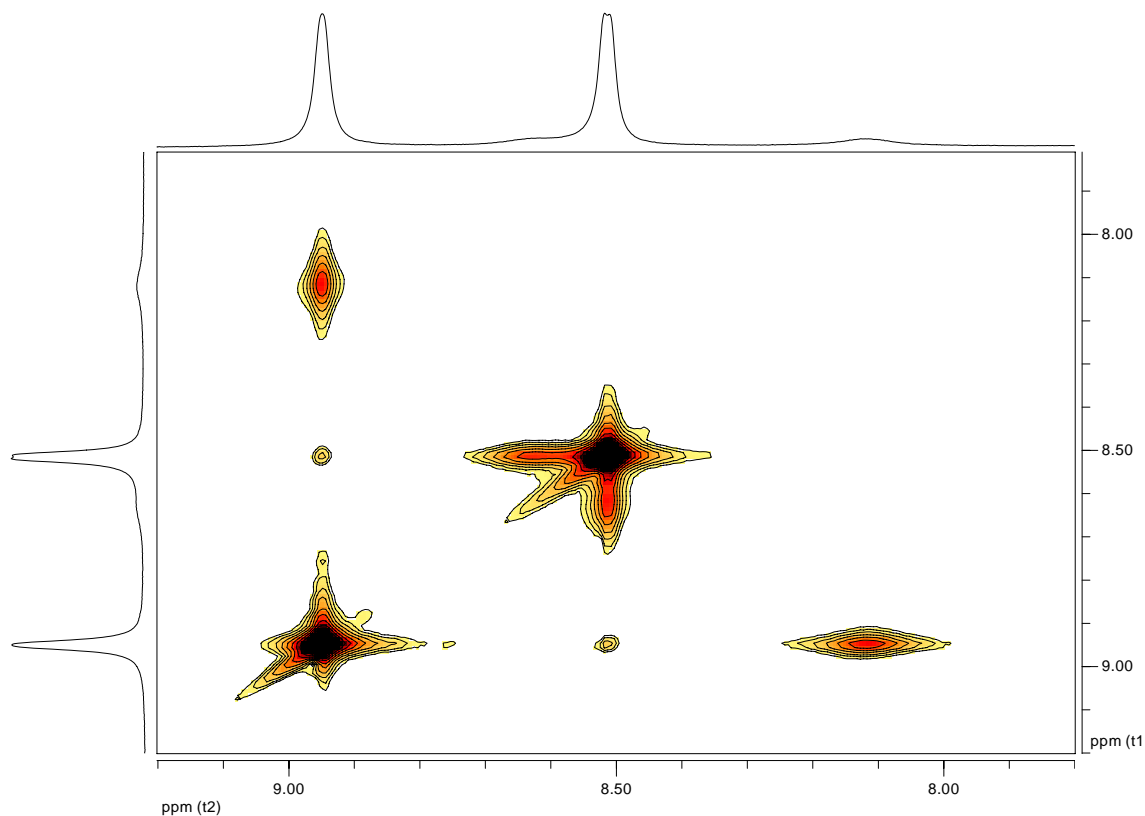


NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,5-0,5 ppm : 9,4-7,7 ppm):

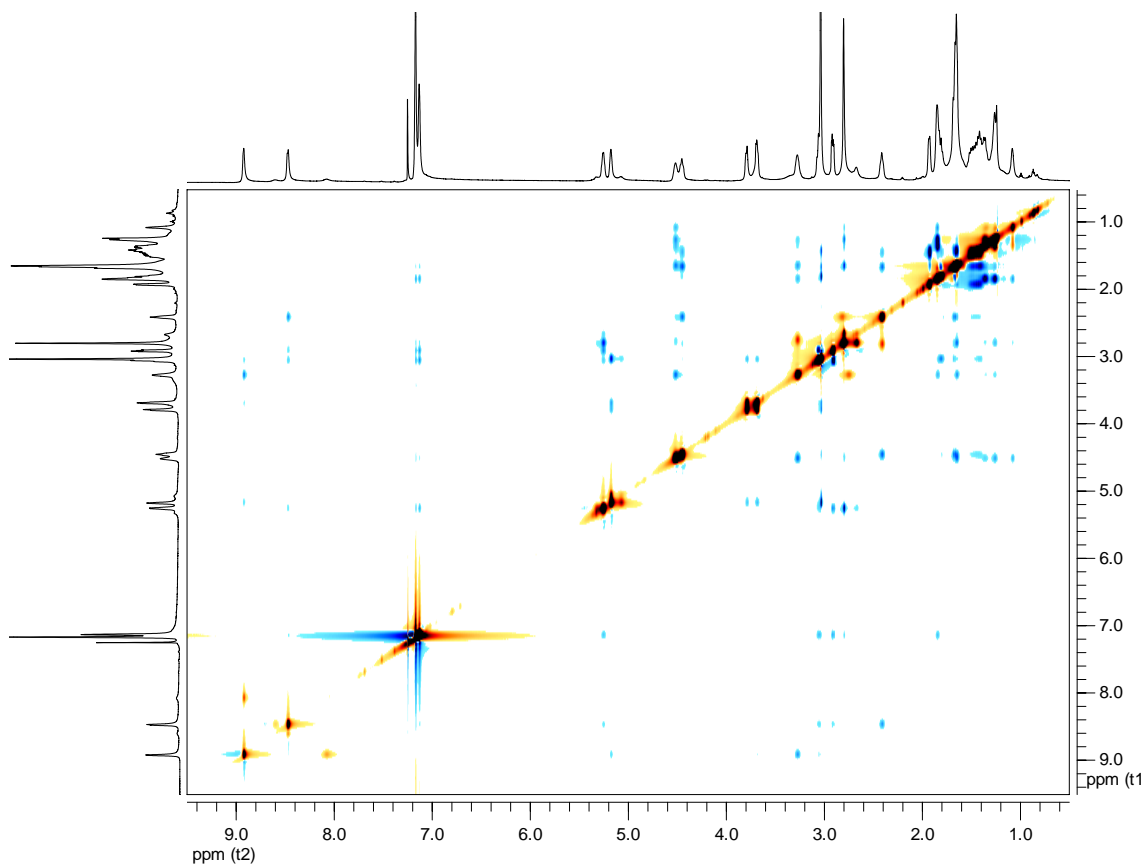


**Ciclo[(L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]-] (OC-6)**

NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,2-7,8 ppm : 9,2-7,8 ppm):

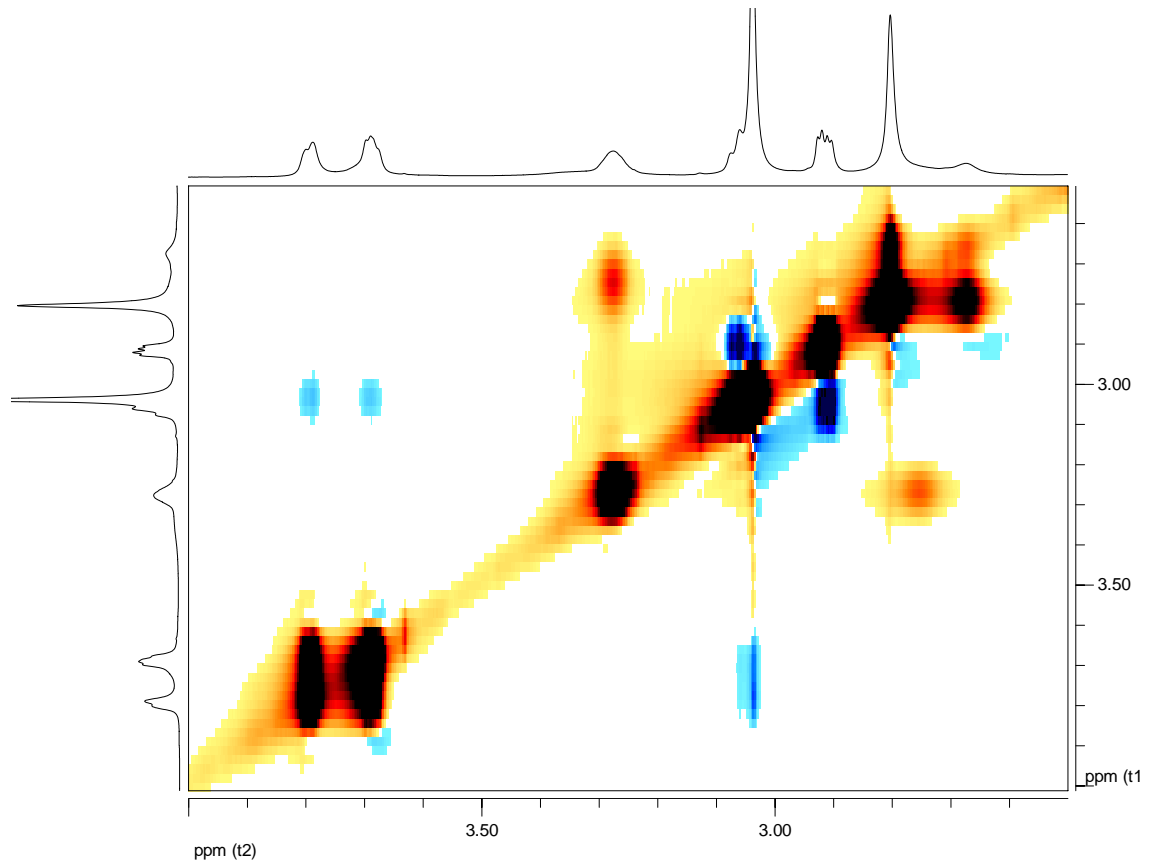


ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):

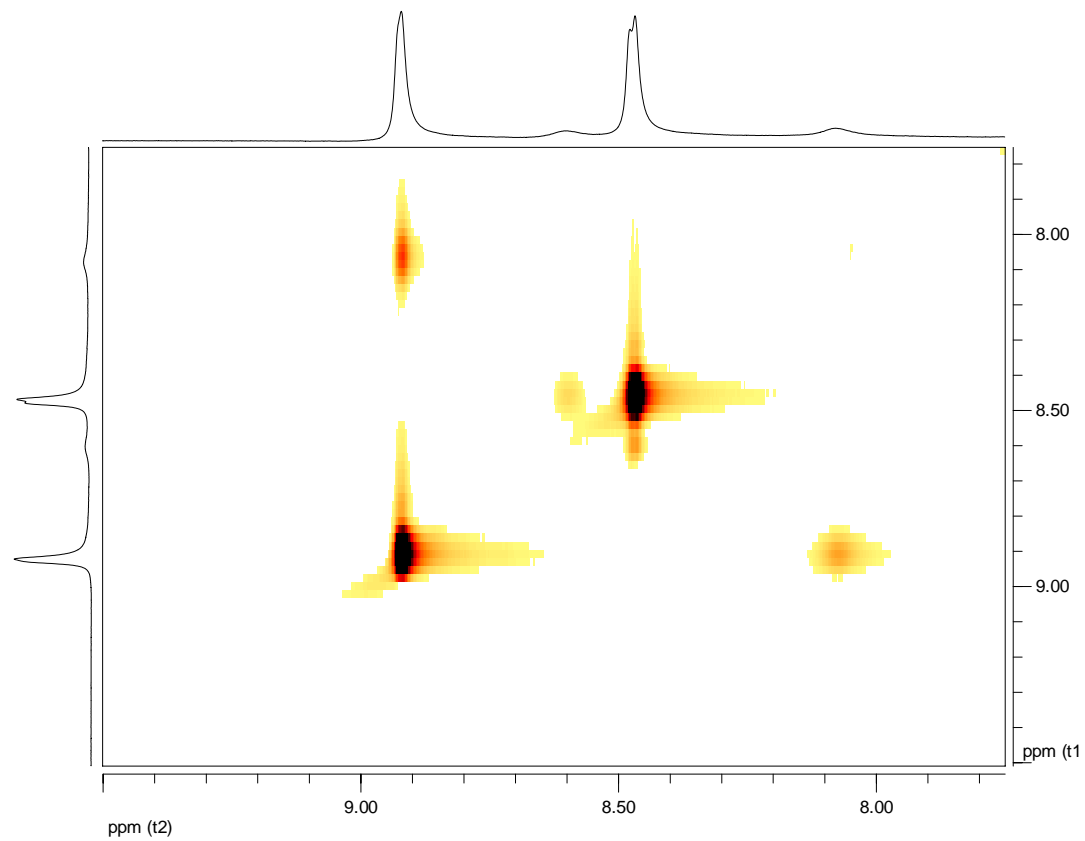


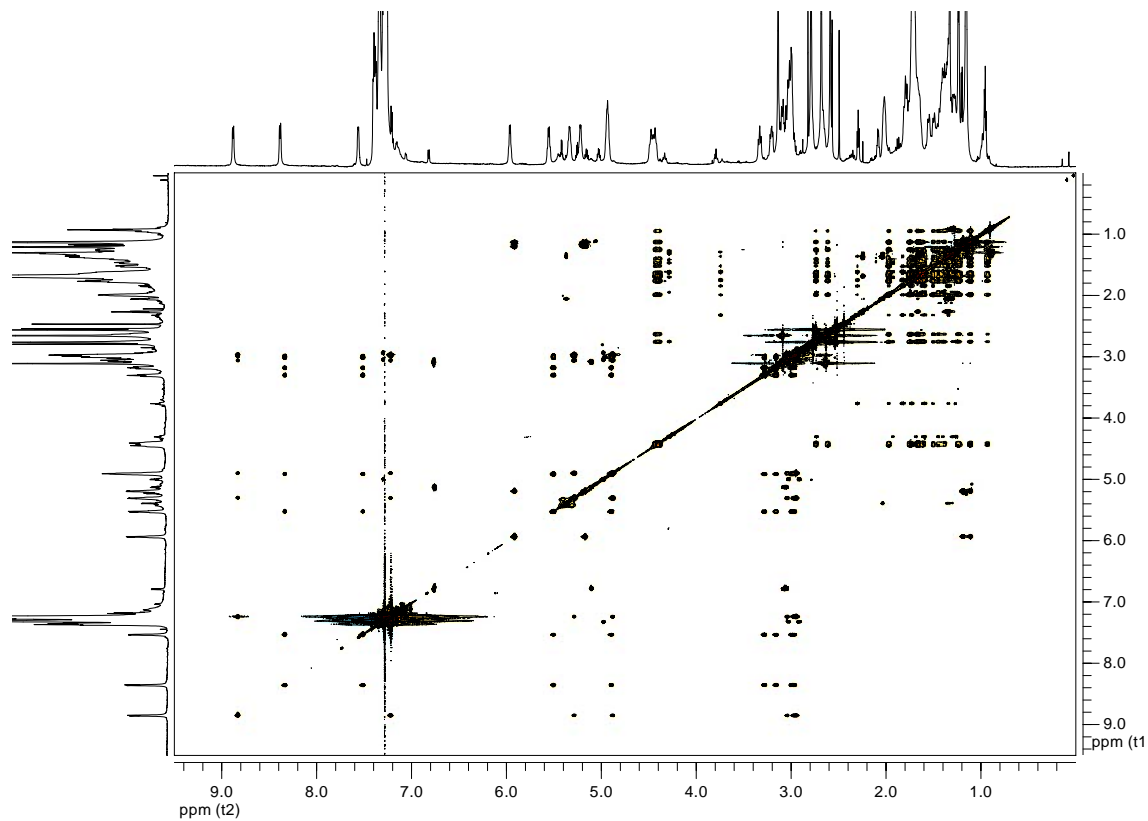
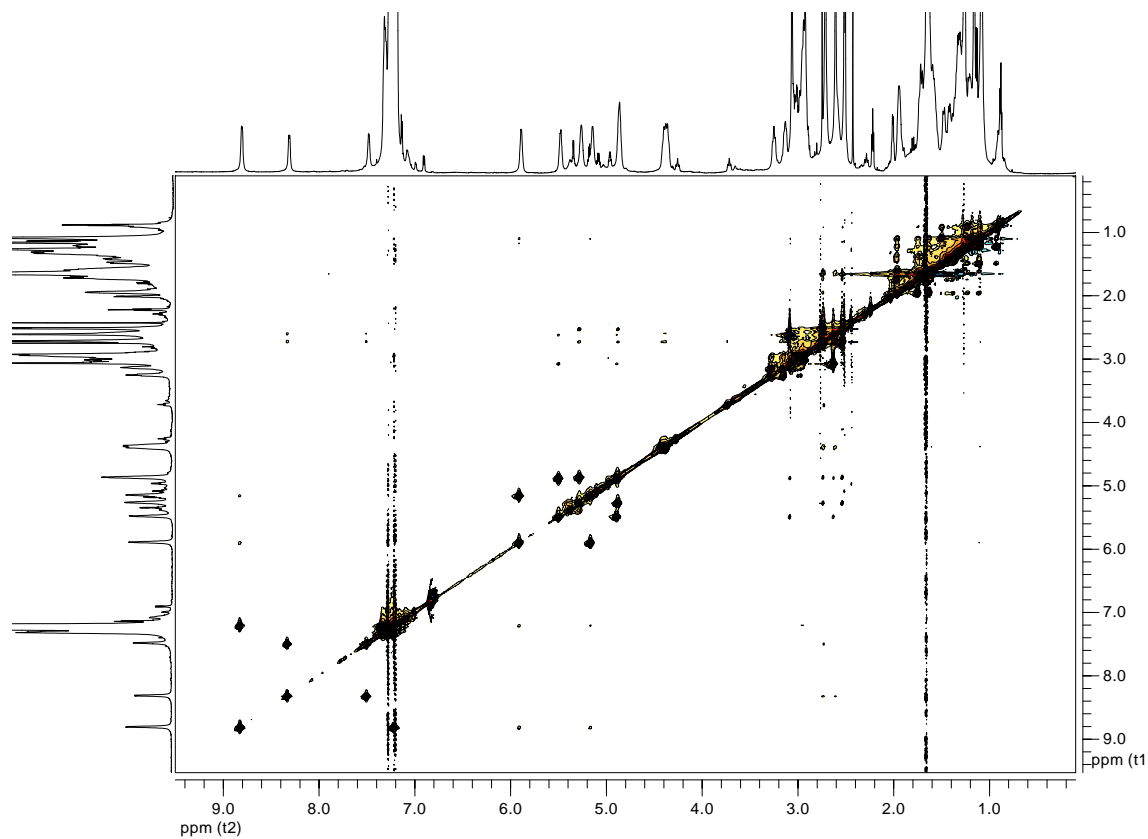
**Ciclo[(L-Phe-D-MeN-γ-Ach-L-Ser-D-MeN-γ-Ach)<sub>2</sub>]-] (OC-6)**

ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 4,0-2,5 ppm : 4,0-2,5 ppm):



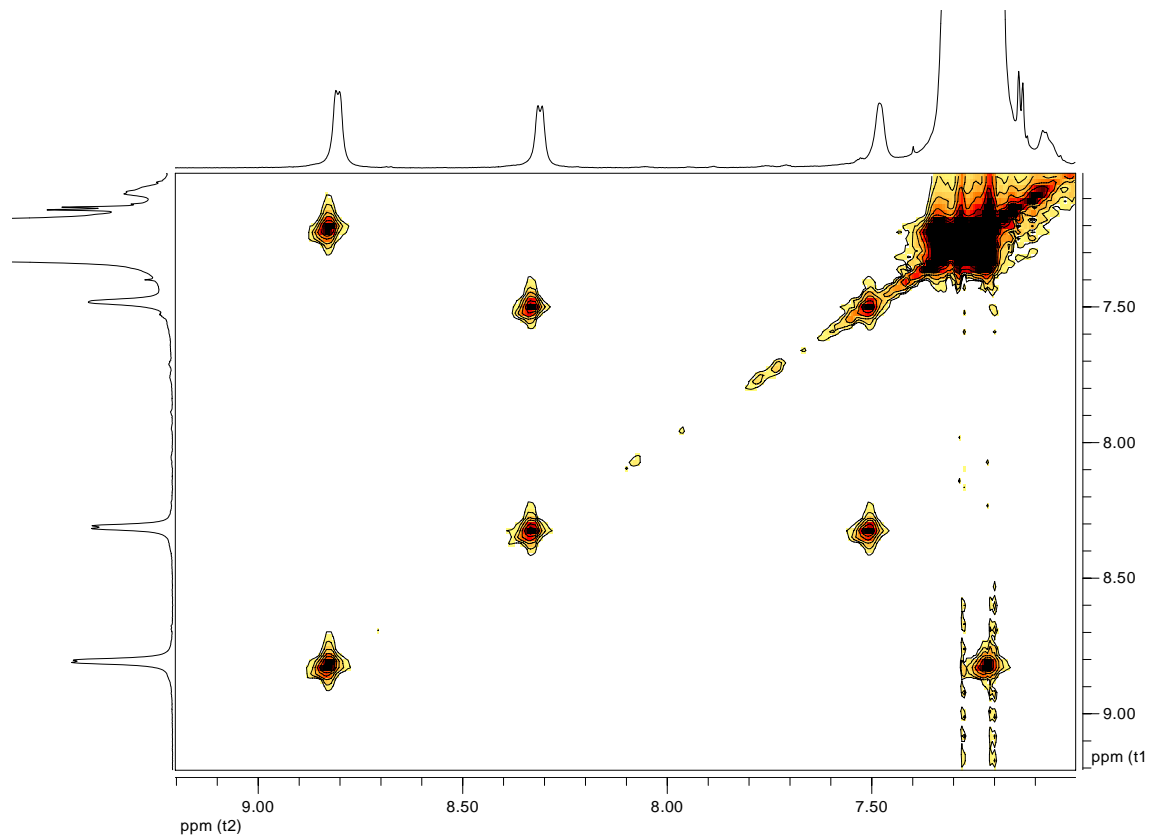
ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 9,5-7,75 ppm : 9,5-7,75 ppm):



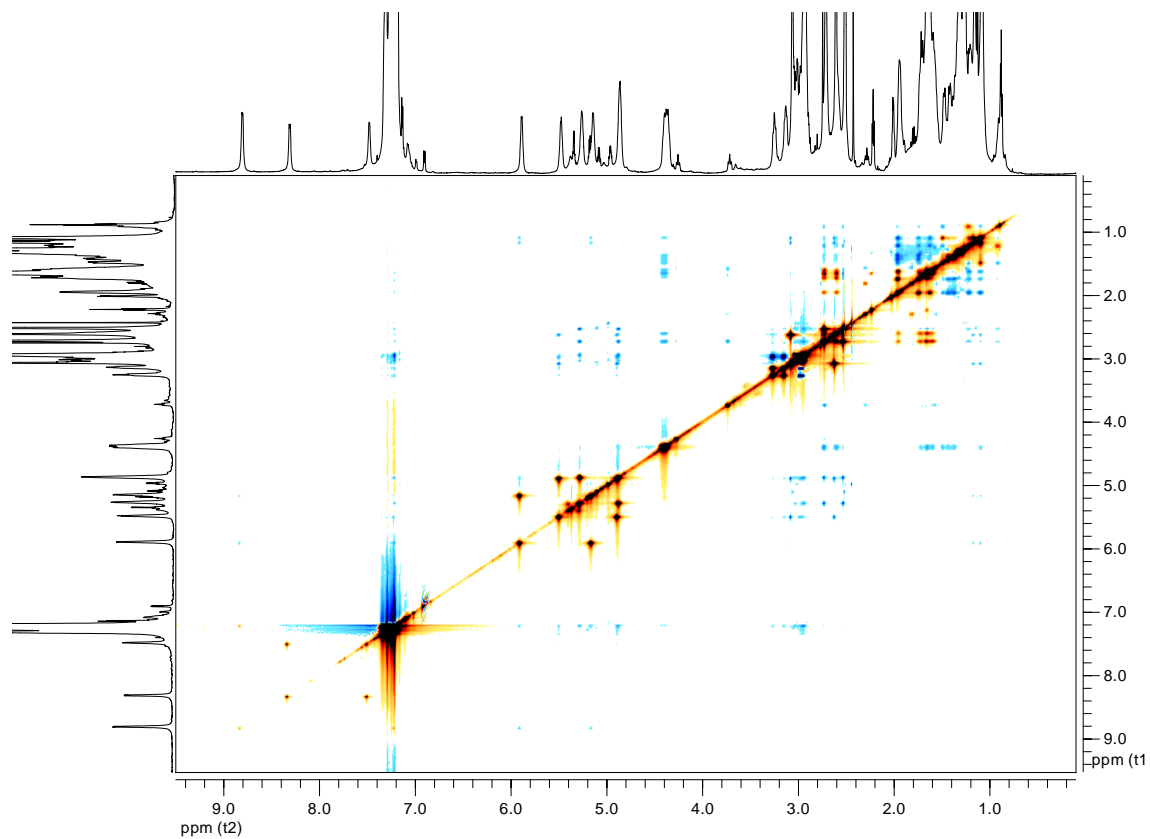
**Ciclo[*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe]<sub>2</sub>] (OC<sub>3:1-1</sub>)**TOCSY (CDCl<sub>3</sub>; 20 °C; concentración: 7,14 mM; 750 MHz):NOESY (CDCl<sub>3</sub>; 20 °C; concentración: 7,14 mM; 750 MHz):

**Ciclo[*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe]<sub>2</sub>] (OC<sub>3:1-1</sub>)**

NOESY (CDCl<sub>3</sub>; 20 °C; concentración: 7,14 mM; 750 MHz); (Ampliación 9,2-7,0 ppm : 9,2-7,0 ppm):

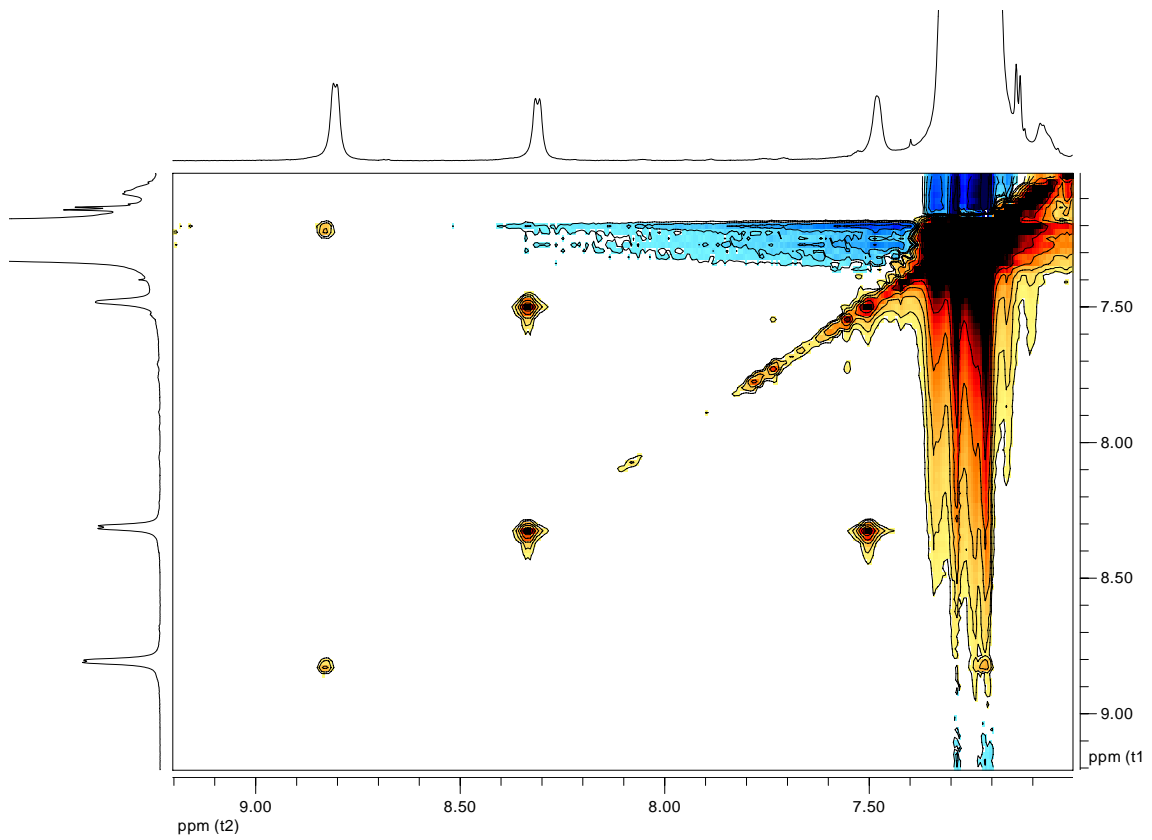


ROESY (CDCl<sub>3</sub>; 20 °C; concentración: 7,14 mM; 750 MHz):



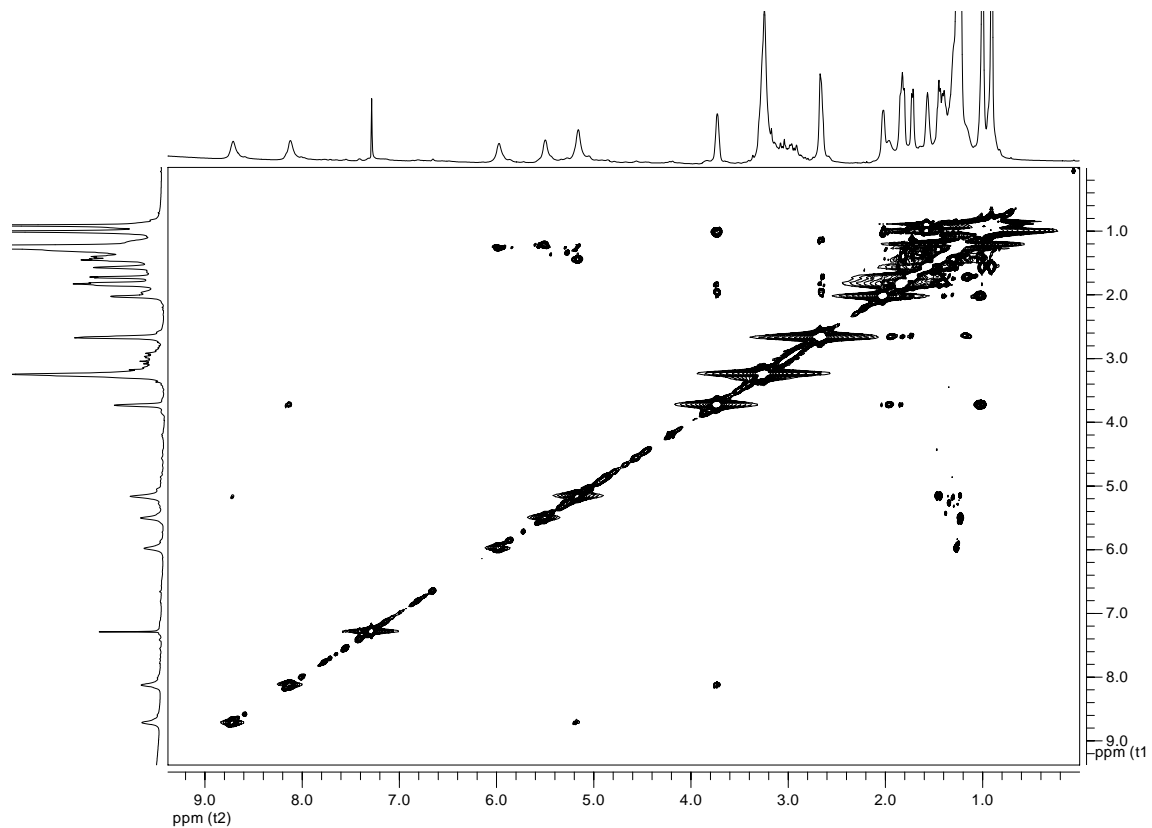
**Ciclo[*L*-<sup>Me</sup>N- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe]<sub>2</sub>] (OC<sub>3:1-1</sub>)**

ROESY (CDCl<sub>3</sub>; 20 °C; concentración: 7,14 mM; 750 MHz); (Ampliación 9,2-7,0 ppm : 9,2-7,0 ppm):

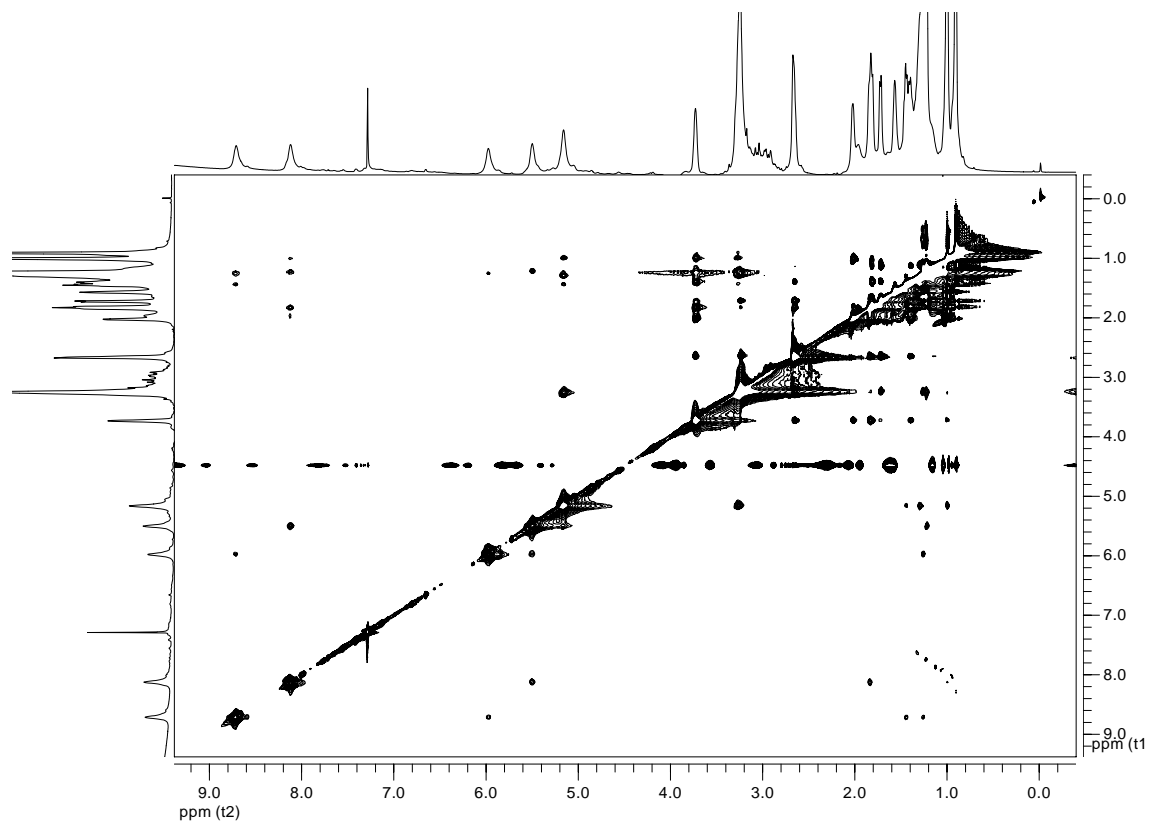


**Ciclo[(L-Leu-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-MeN-Ala)<sub>2</sub>]-] (OC<sub>3:1-3</sub>)**

COSY (CDCl<sub>3</sub>; -18 °C; concentración: 65,50 mM; 750 MHz):

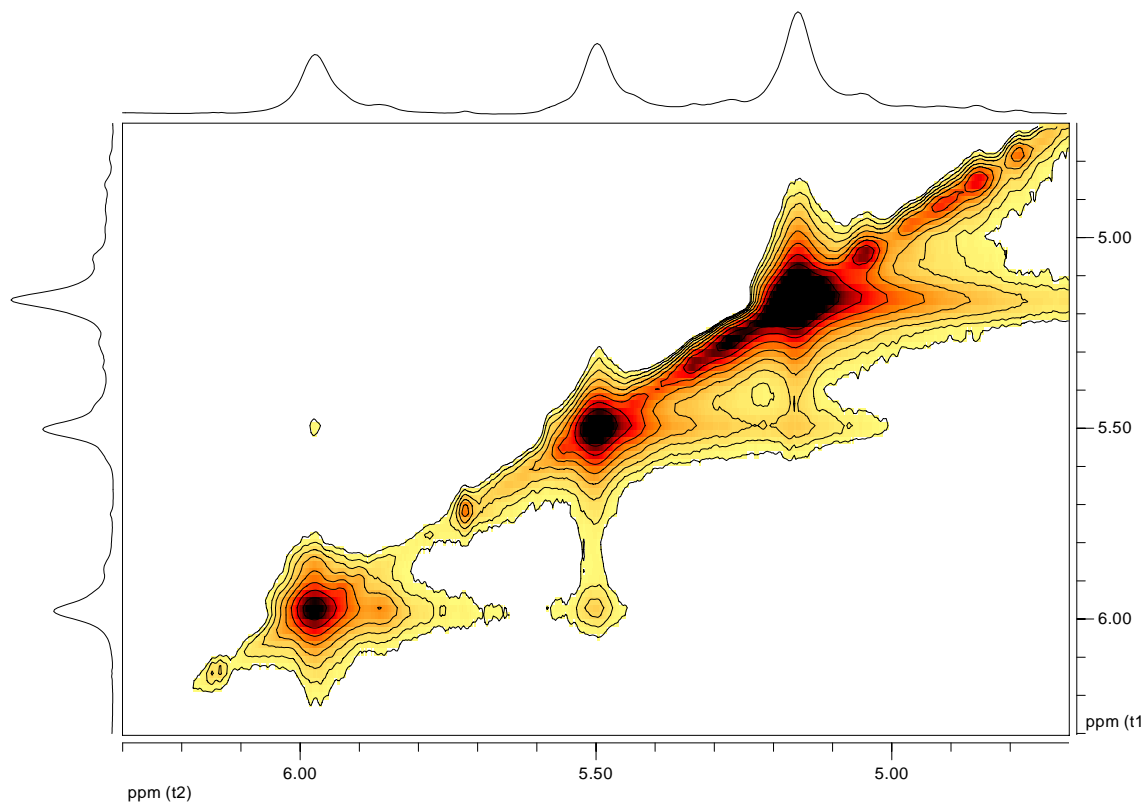


NOESY (CDCl<sub>3</sub>; -18 °C; concentración: 65,50 mM; 750 MHz):

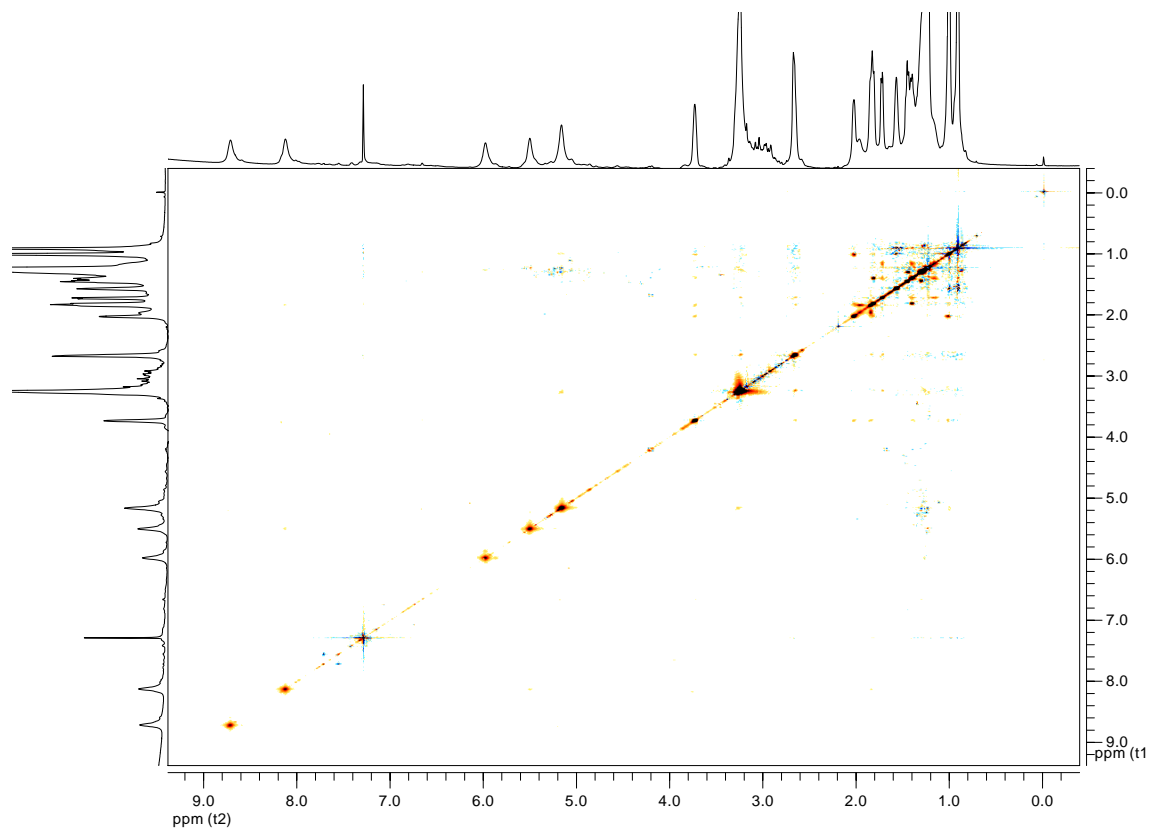


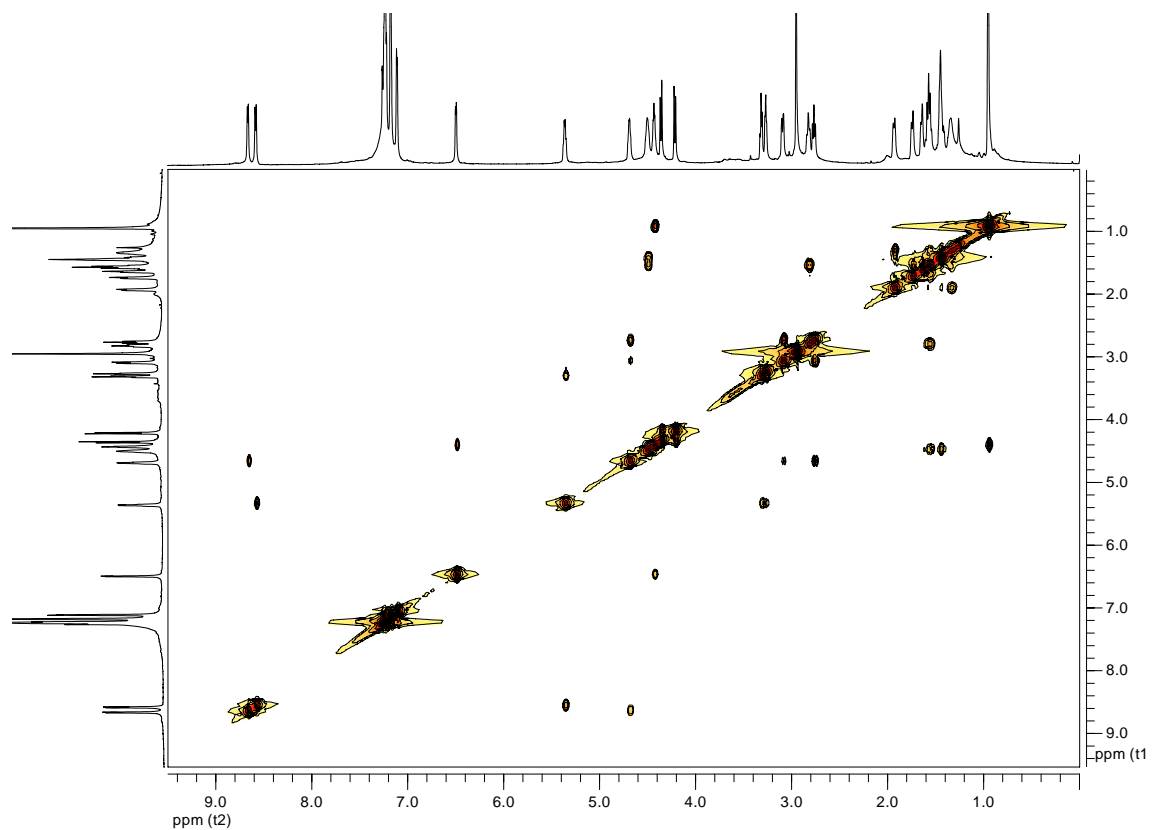
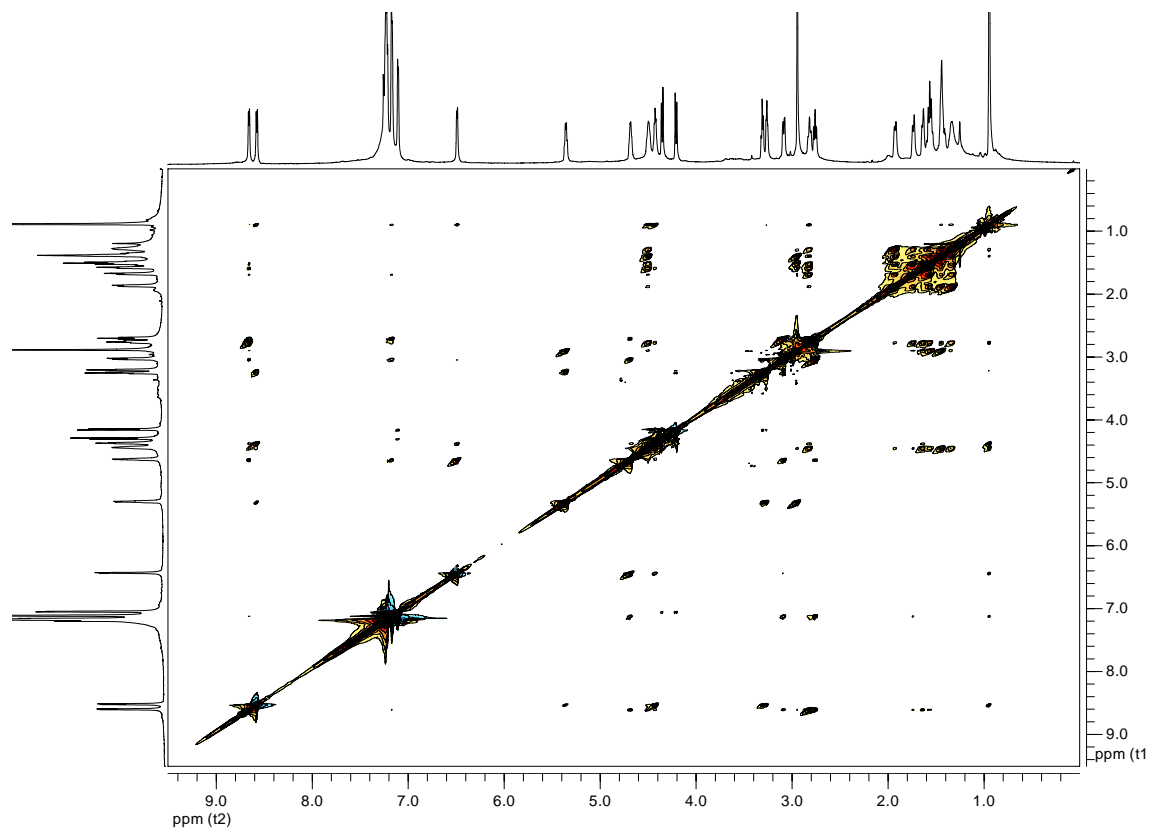
**Ciclo[*L*-Leu-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala-*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-<sup>Me</sup>N-Ala]<sub>2</sub>] (OC<sub>3:1-3</sub>)**

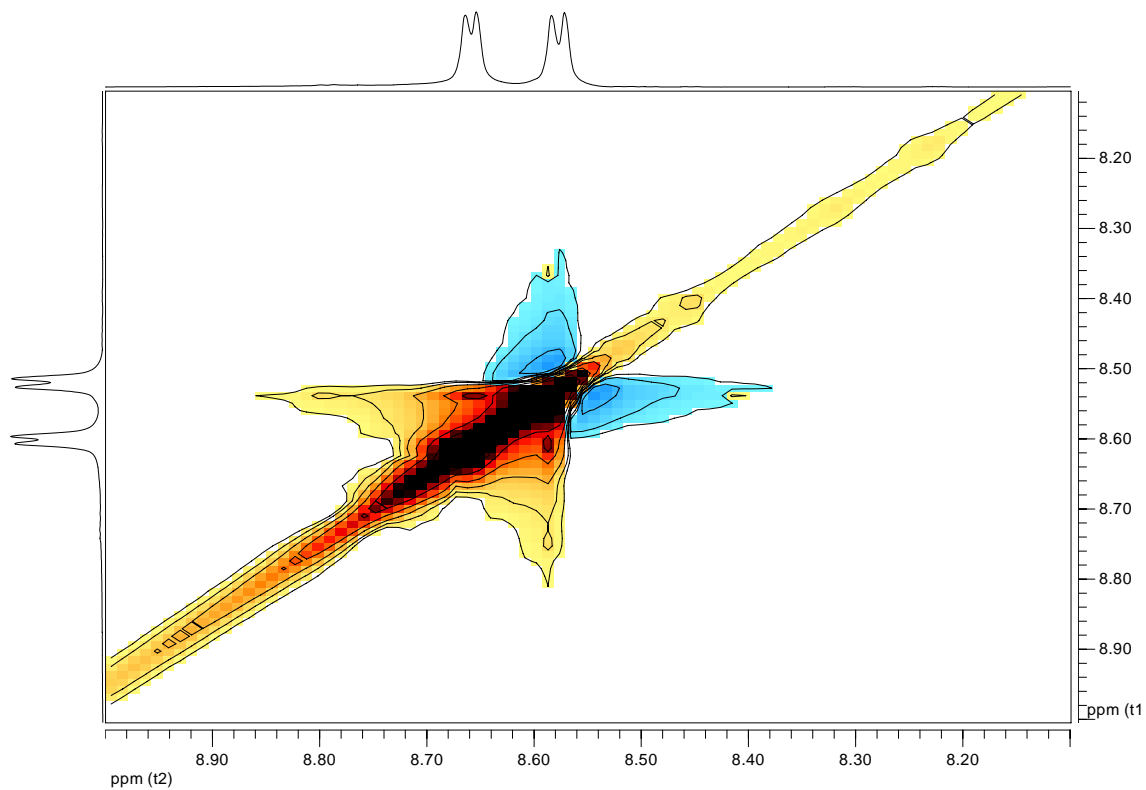
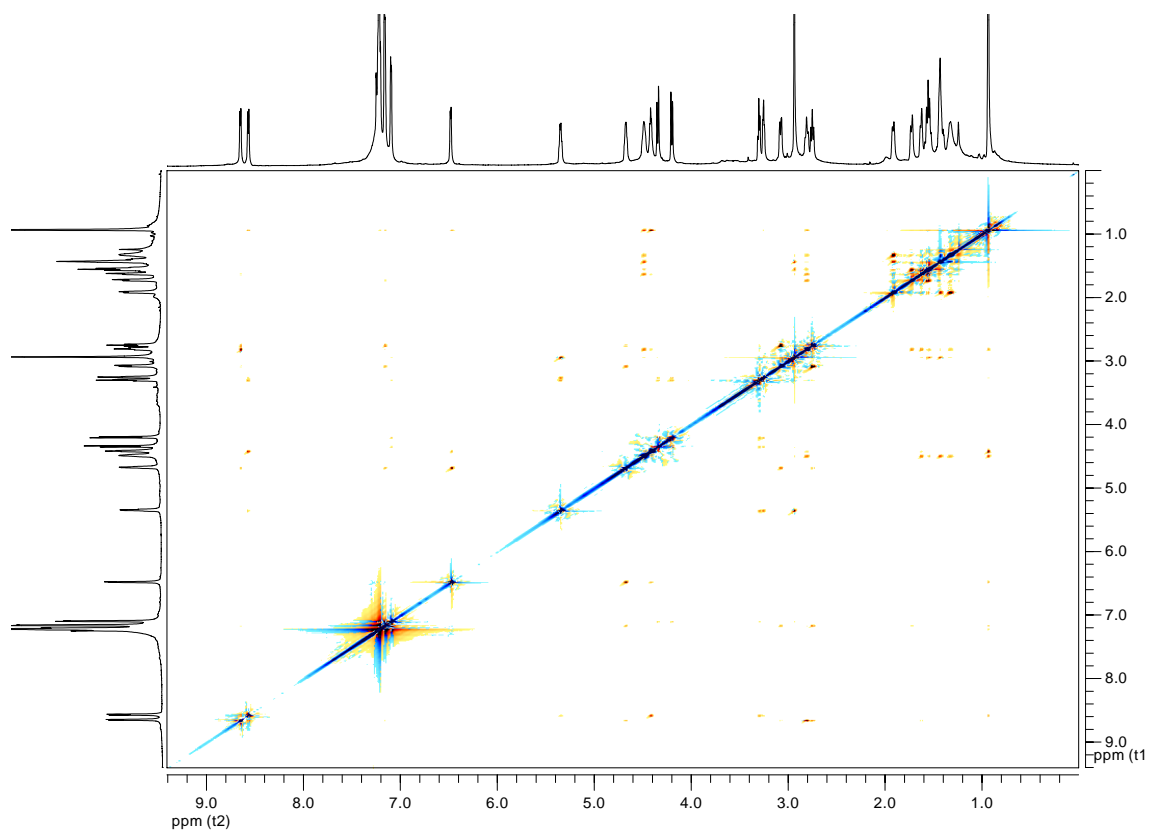
NOESY (CDCl<sub>3</sub>; -18 °C; concentración: 65,50 mM; 750 MHz); (Ampliación 6,8-4,7 ppm : 6,3-4,7 ppm):



ROESY (CDCl<sub>3</sub>; -18 °C; concentración: 65,50 mM; 750 MHz):

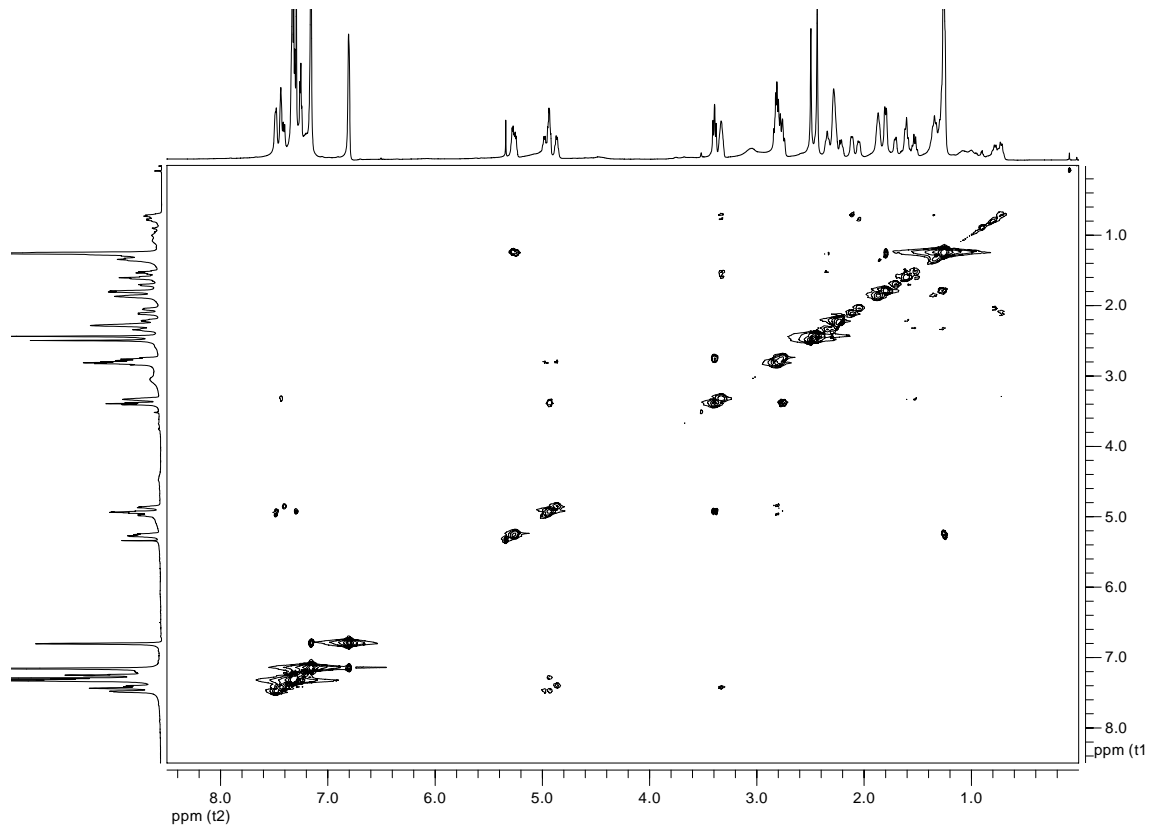


**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-4</sub>)**COSY (CDCl<sub>3</sub>; 25 °C; 750 MHz):NOESY (CDCl<sub>3</sub>; 25 °C; 750 MHz):

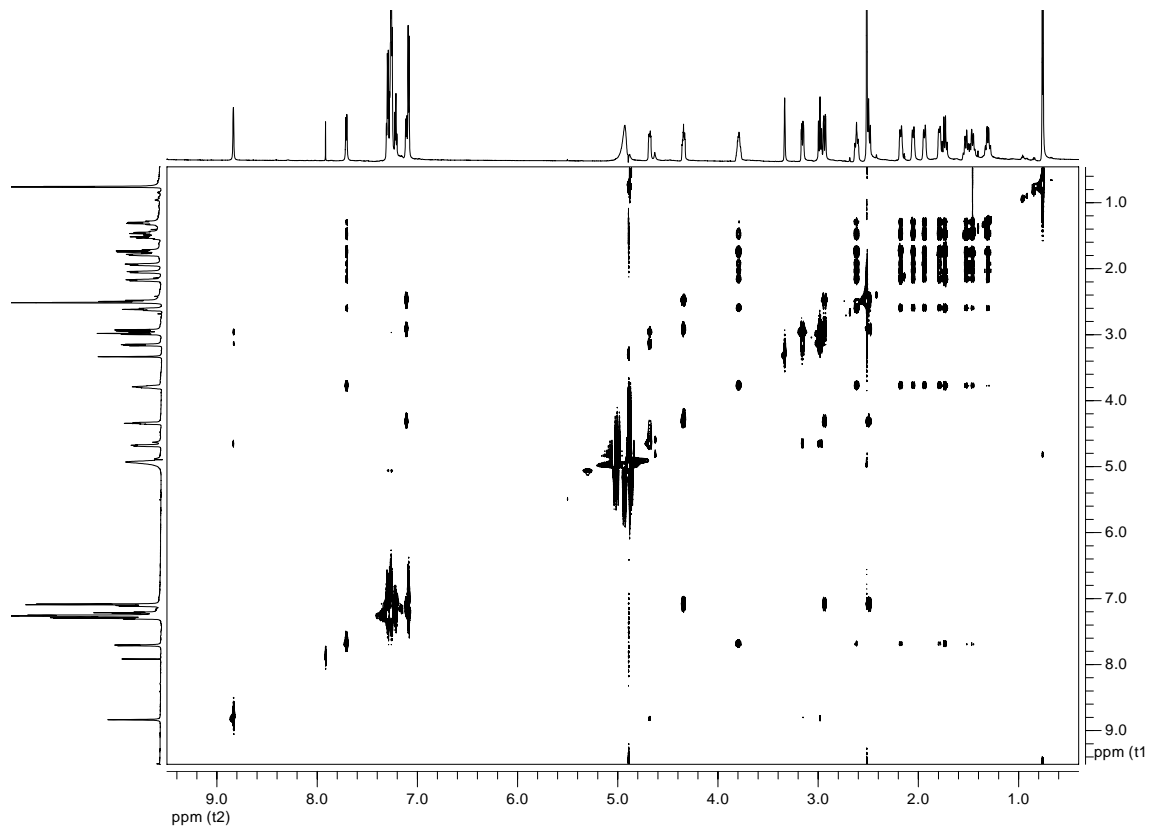
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-4</sub>)**NOESY (CDCl<sub>3</sub>; 25 °C; 750 MHz); (Ampliación 9,0-8,1 ppm : 9,0-8,1 ppm):ROESY (CDCl<sub>3</sub>; 25 °C; 750 MHz):

**Ciclo[*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe]<sub>2</sub>] (OC<sub>3:1-5</sub>)**

COSY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 70:30; 25 °C; 750 MHz):

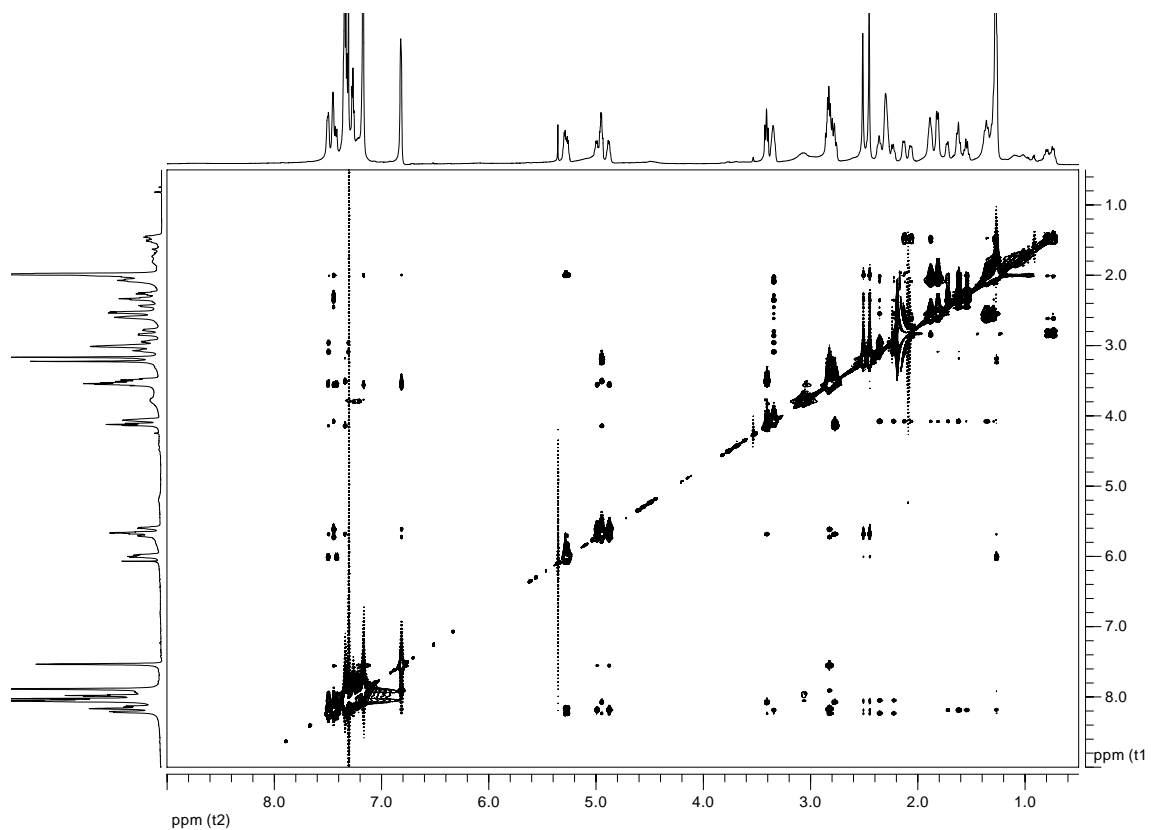


TOCSY (CD<sub>3</sub>OH; 750 MHz):

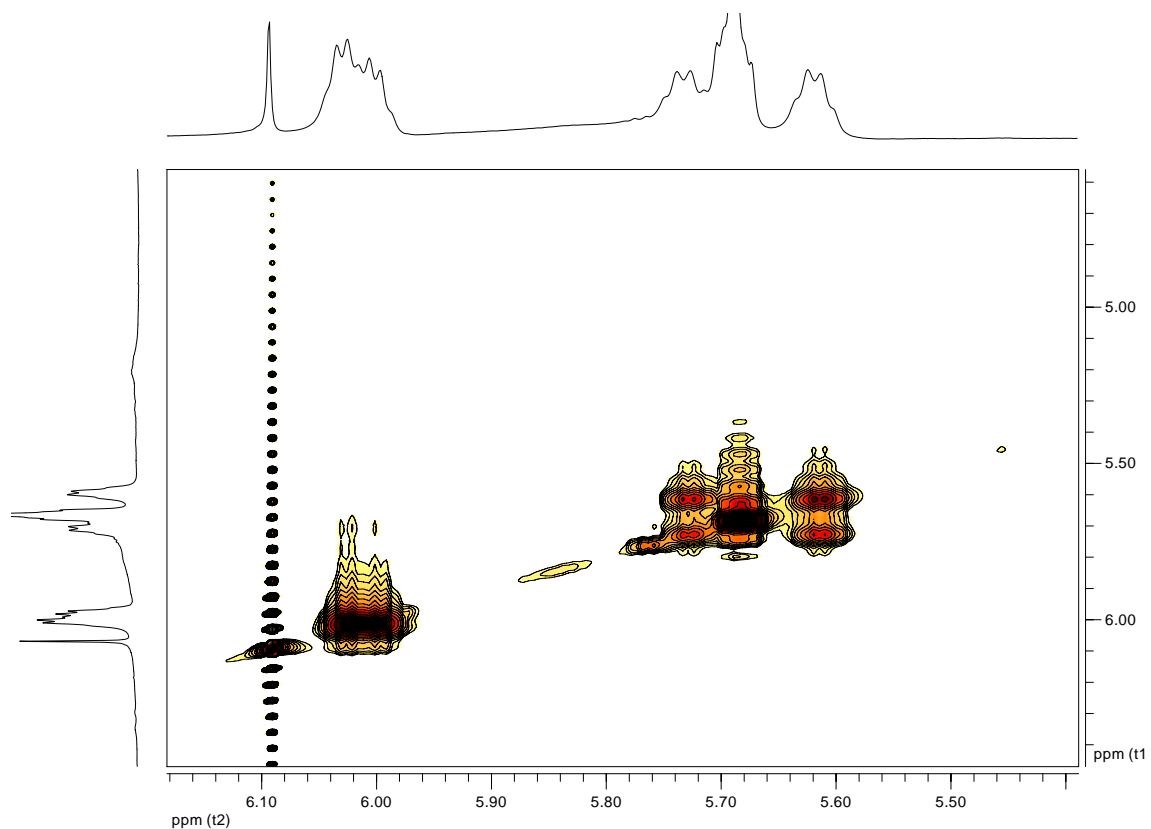


**Ciclo[(L-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-] (OC<sub>3:1-5</sub>)**

NOESY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 70:30; 25 °C; 750 MHz):

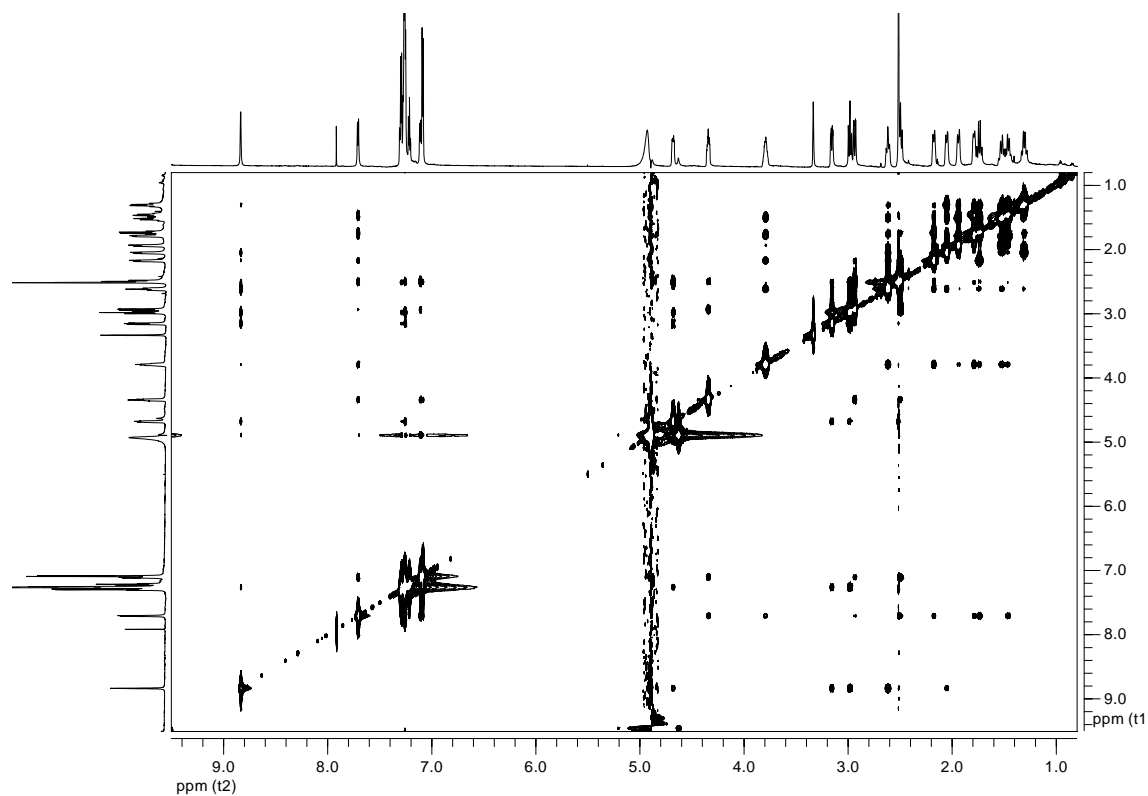


NOESY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 70:30; 25 °C; 750 MHz); (Ampliación 6,2-5,4 ppm : 6,5-4,5 ppm):

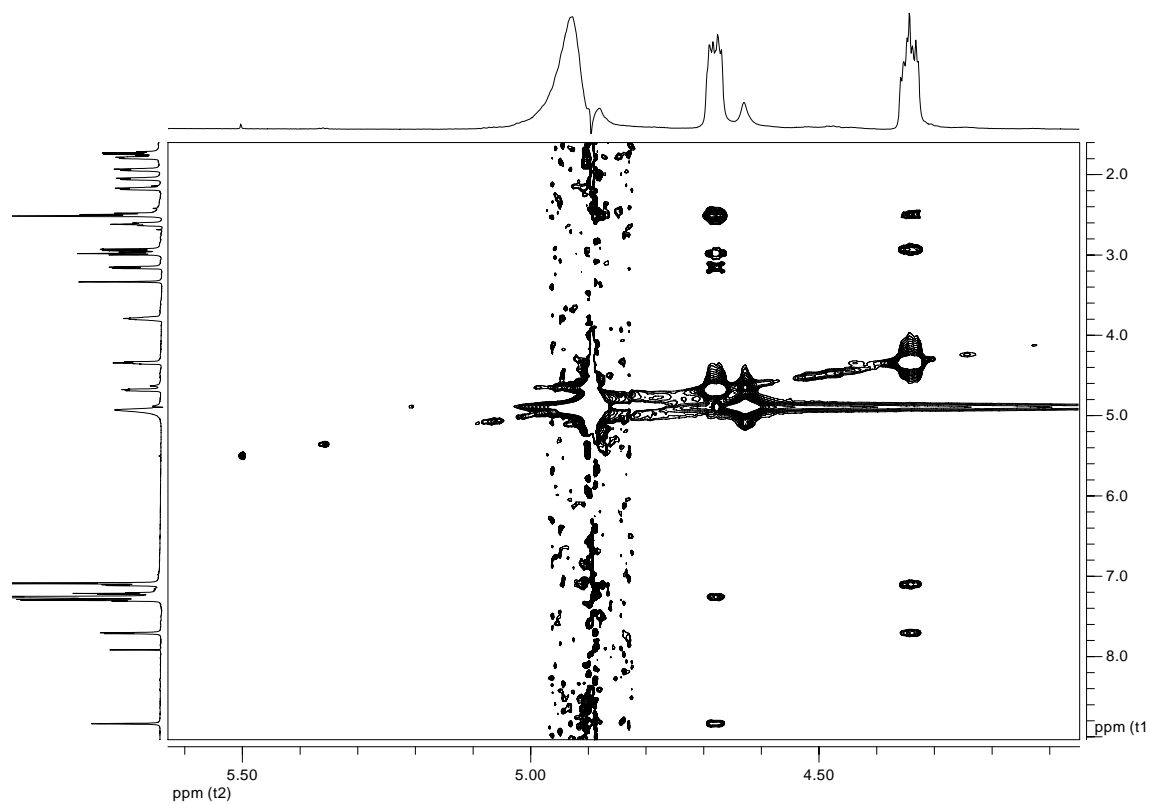


**Ciclo[*L*- $\gamma$ -Ach-*D*-Phe-*L*-<sup>Me</sup>N-Ala-*D*-Phe]<sub>2</sub>] (OC<sub>3:1-5</sub>)**

NOESY (CD<sub>3</sub>OH, 750 MHz):

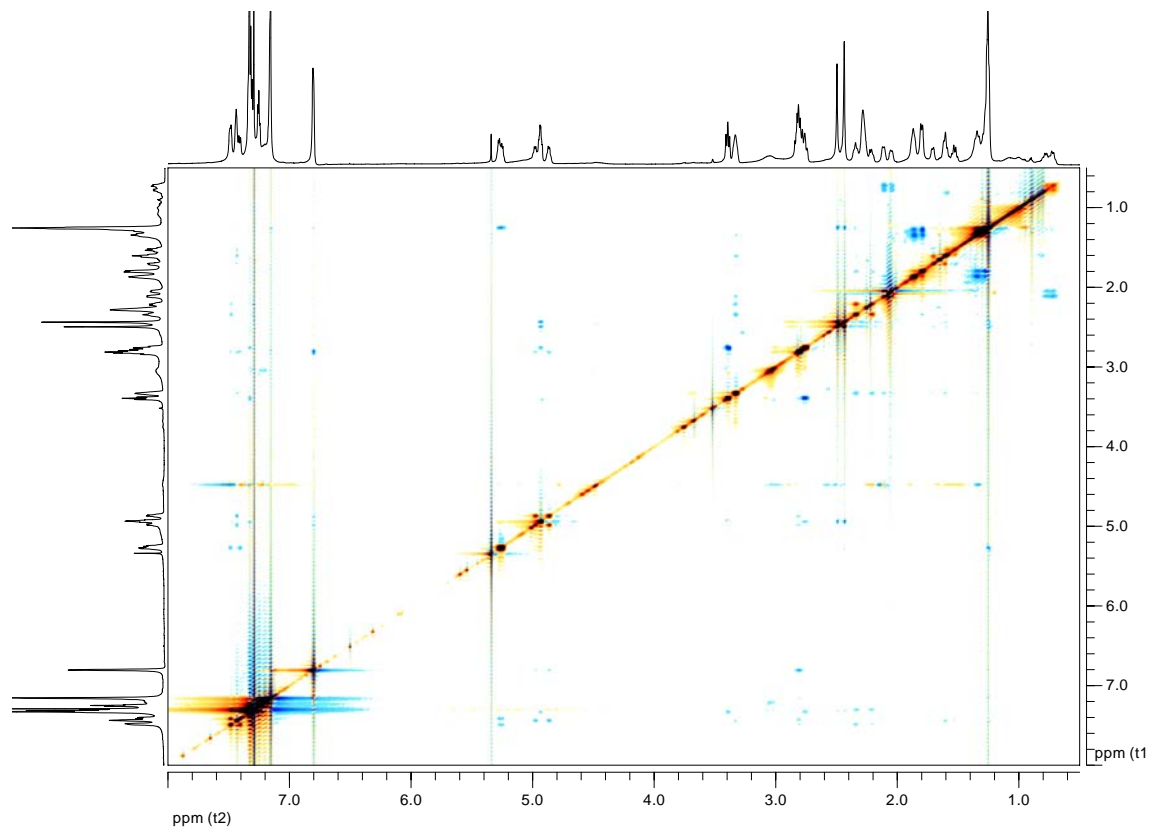


NOESY (CD<sub>3</sub>OH, 750 MHz); (Ampliación 5,1-4,0 ppm : 9,0-1,6 ppm):

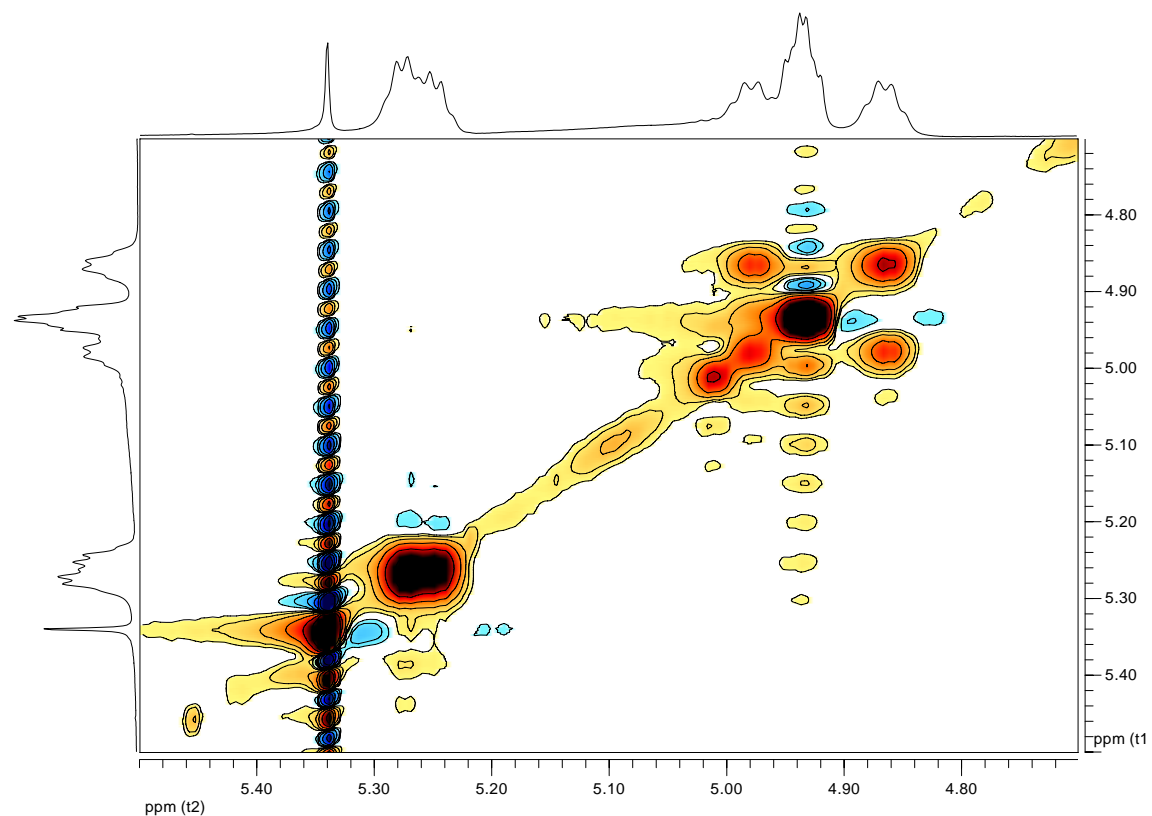


**Ciclo[(L-γ-Ach-D-Phe-L<sup>Me</sup>N-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-] (OC<sub>3:1-5</sub>)**

ROESY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 70:30; 25 °C; 750 MHz):

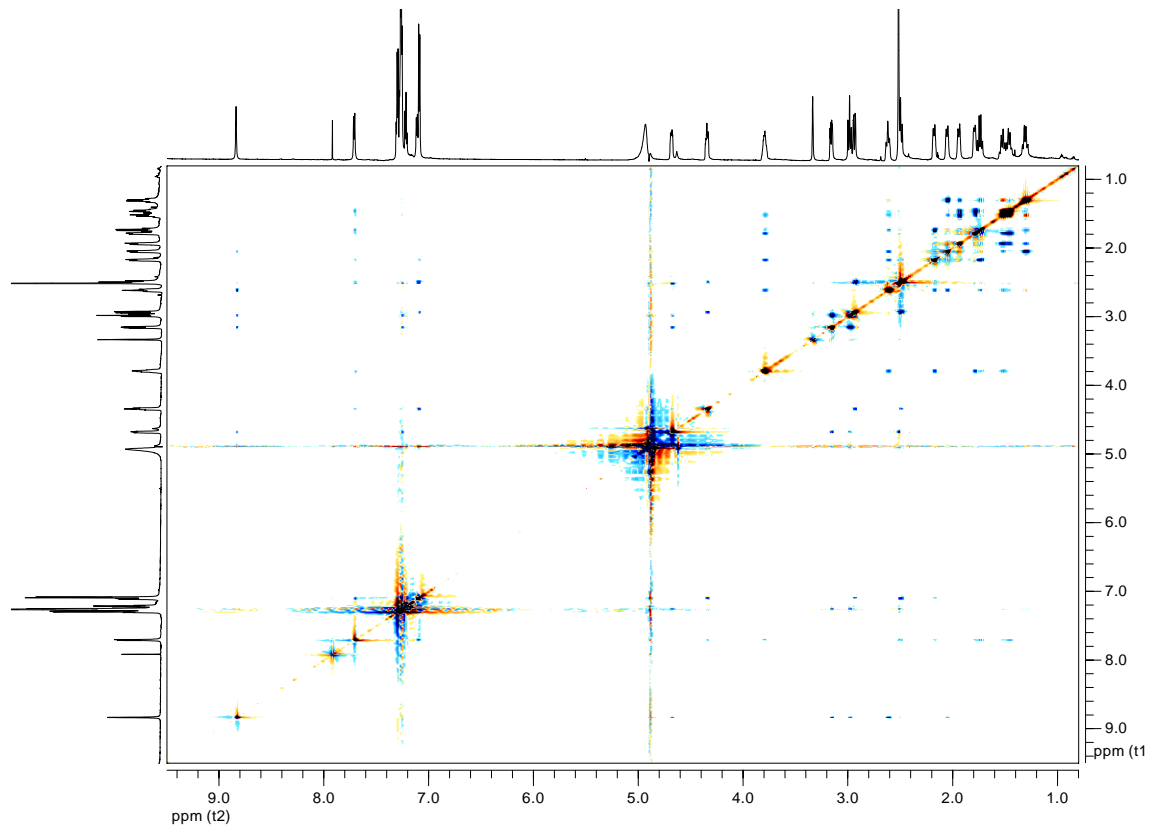


ROESY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 70:30; 25 °C; 750 MHz); (Ampliación 5,5-4,7 ppm : 5,5-4,7 ppm):

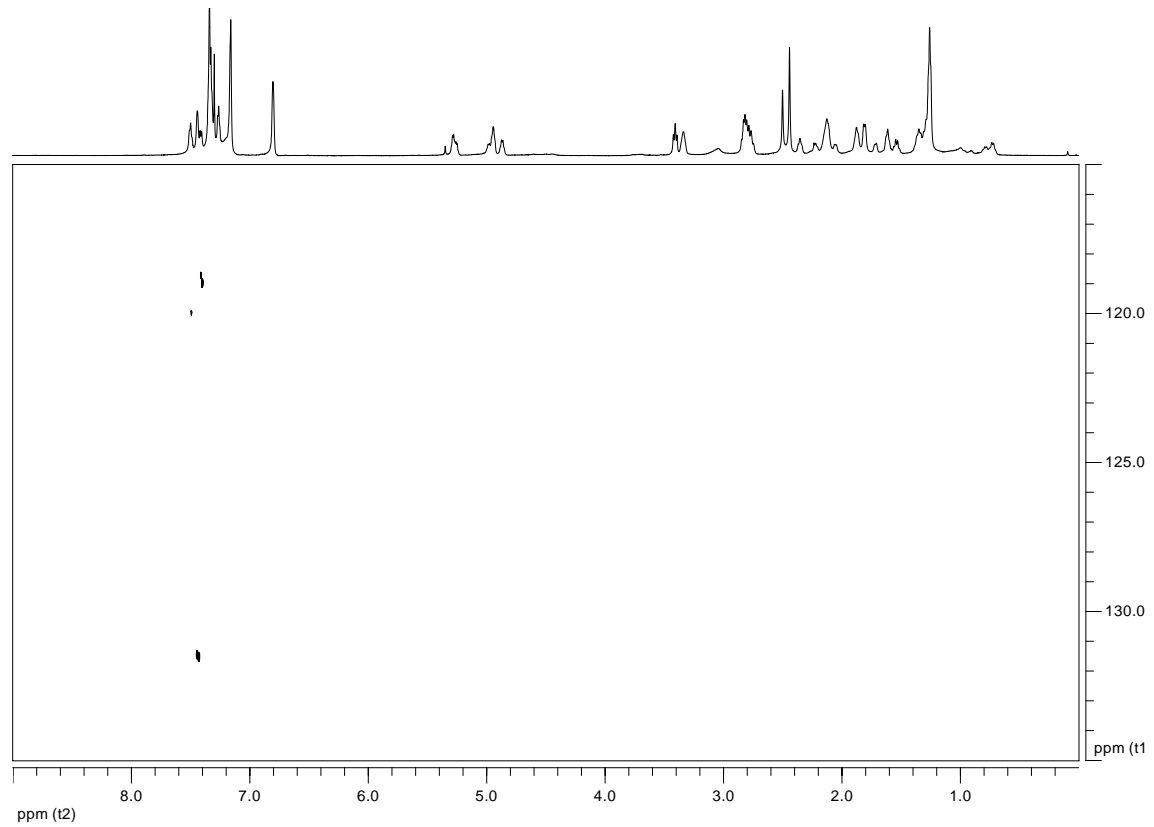


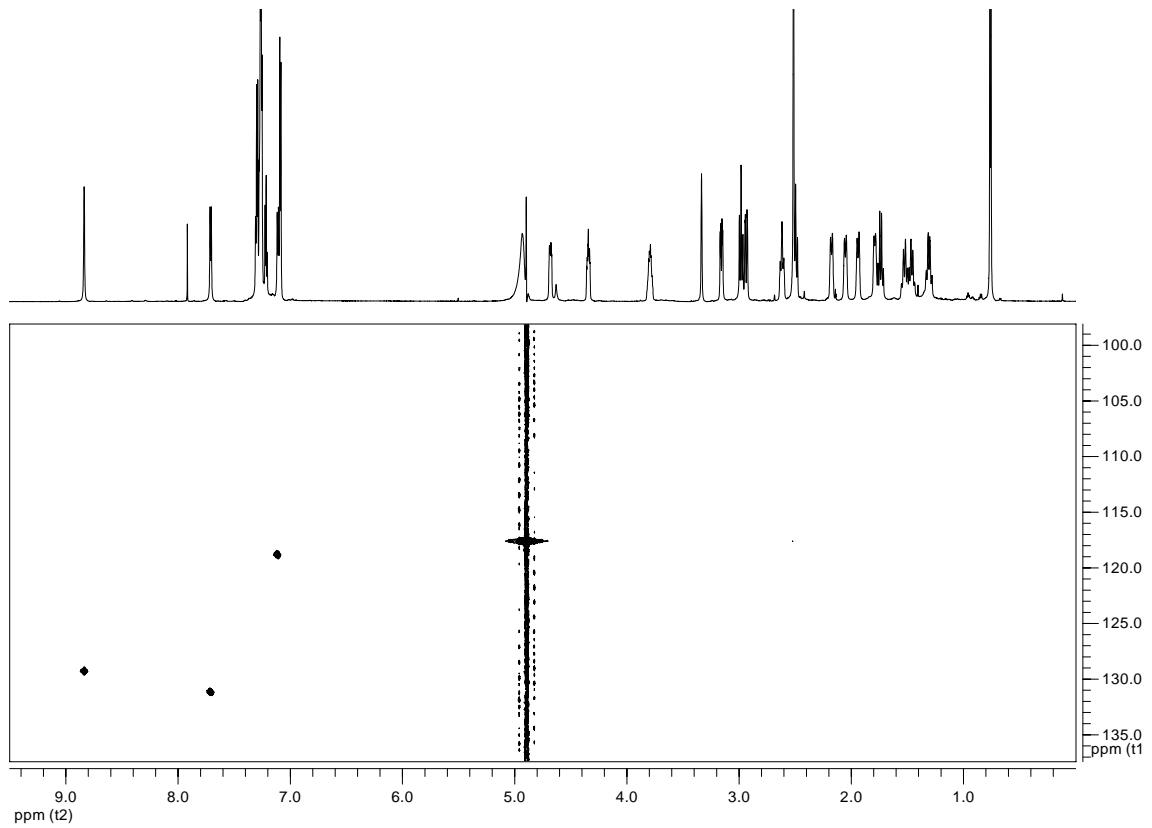
**Ciclo[(L-γ-Ach-D-Phe-L-MeN-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-] (OC<sub>3:1-5</sub>)**

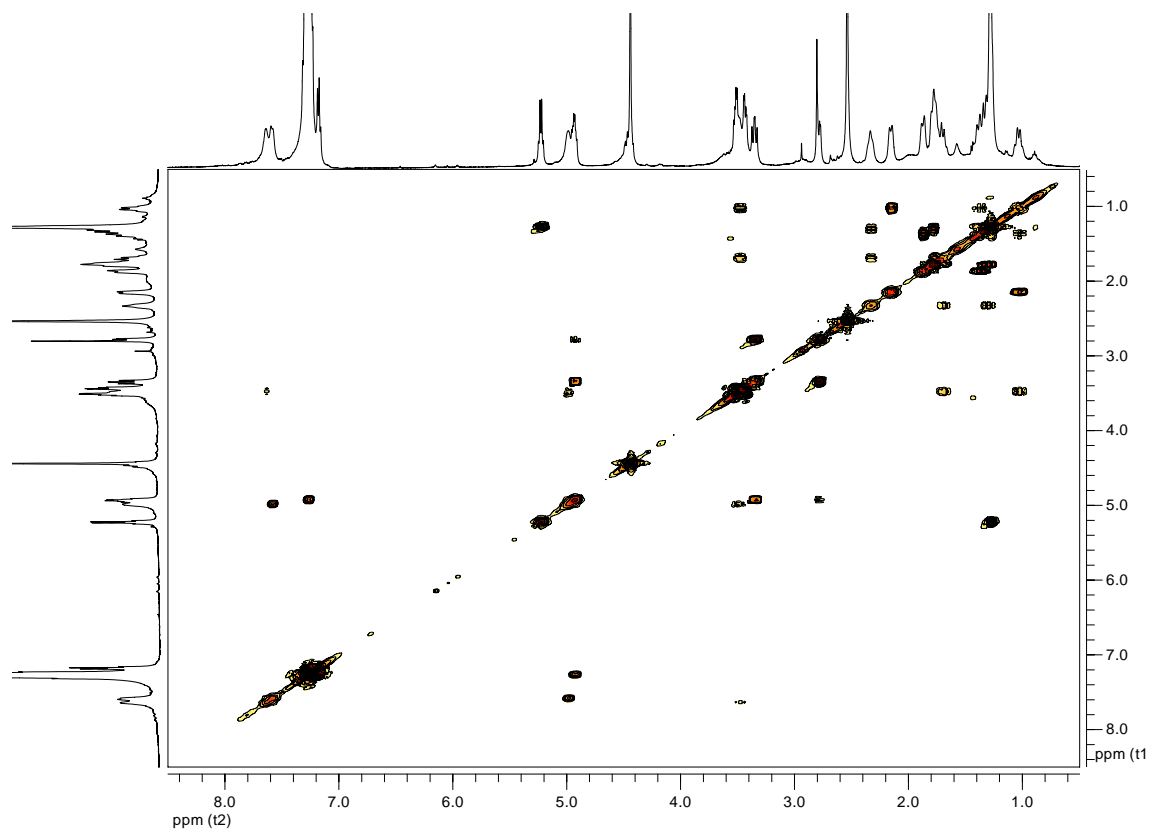
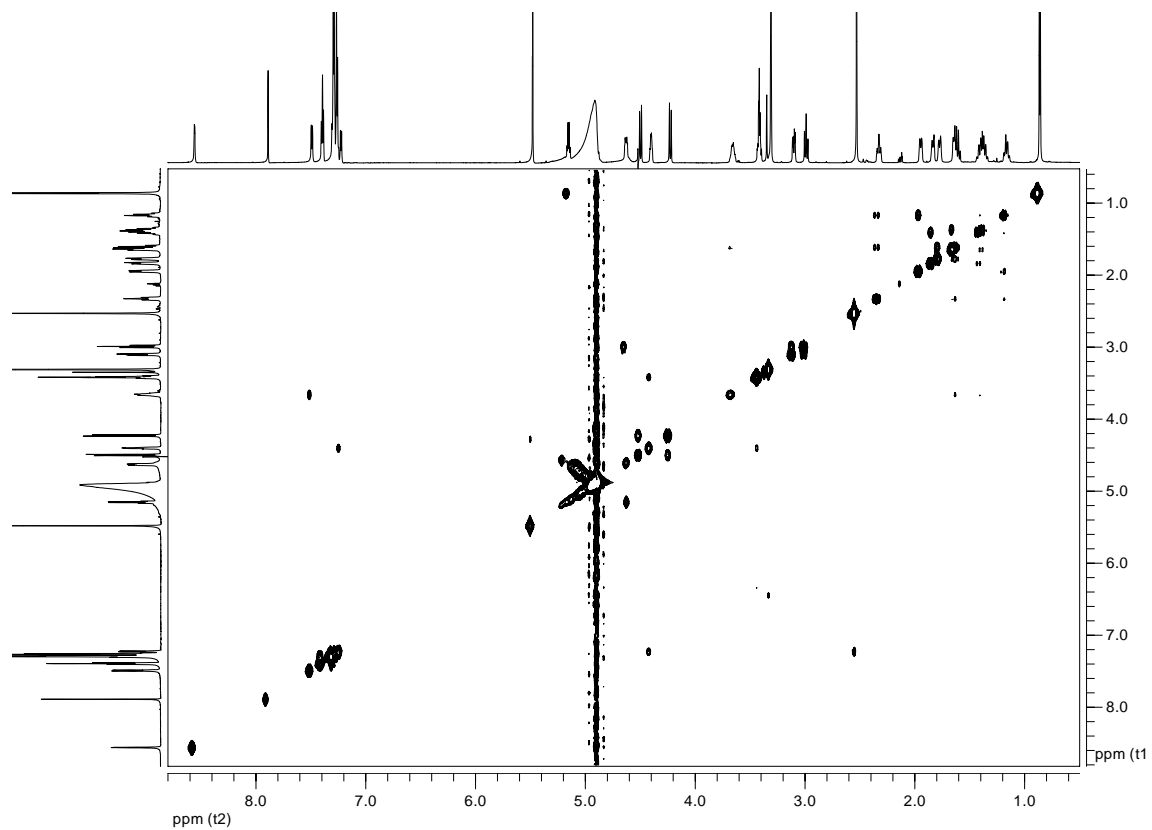
ROESY (CD<sub>3</sub>OH, 750 MHz):

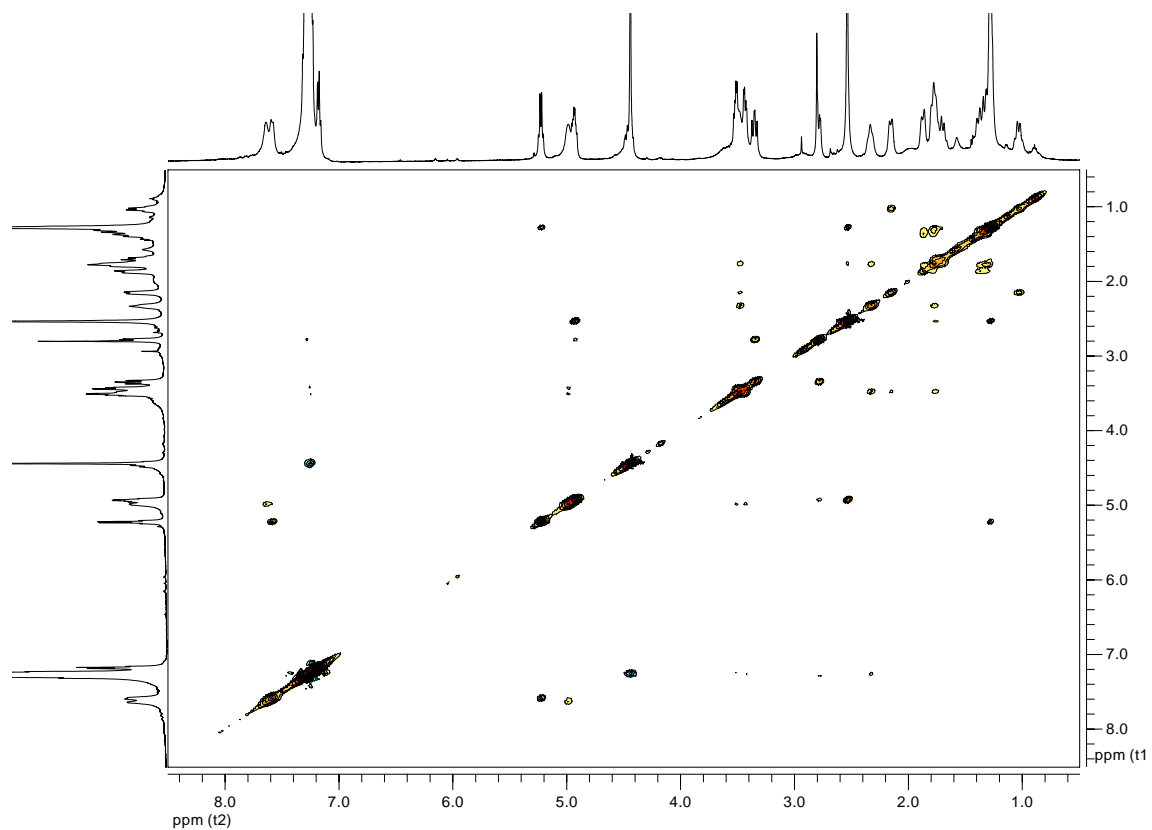
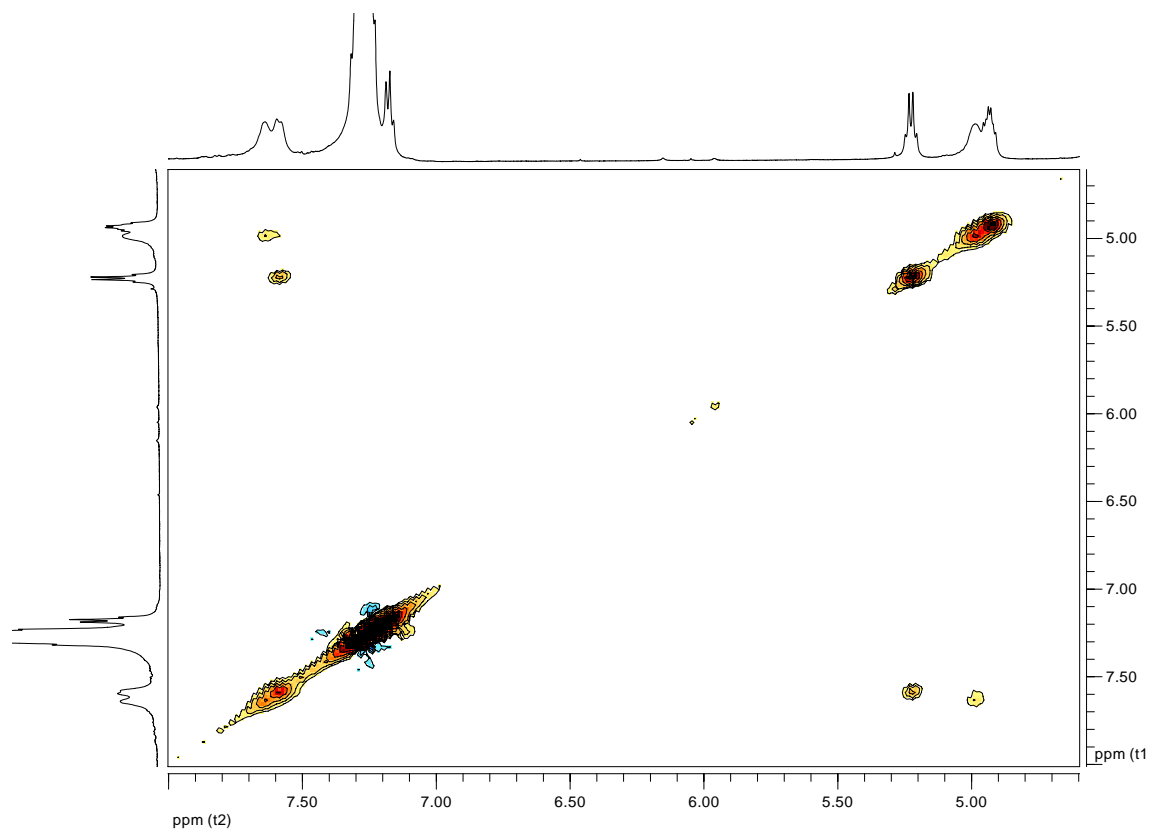


Correlación <sup>15</sup>N- <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 70:30; 25 °C; 750 MHz):



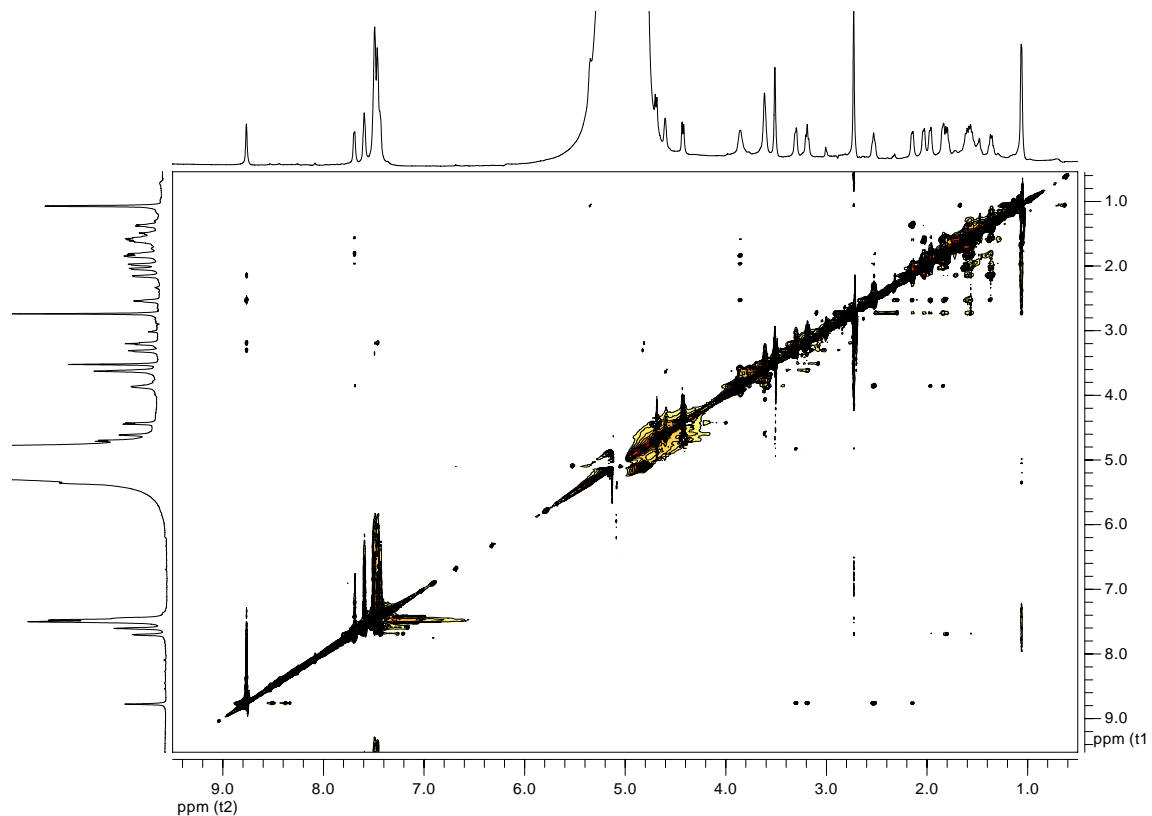
**Ciclo[(L- $\gamma$ -Ach-D-Phe-L-<sup>Me</sup>N-Ala-D-Phe)<sub>2</sub>]-] (OC<sub>3:1-5</sub>)**Correlación <sup>15</sup>N- <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OH; 25 °C; 750 MHz):

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-6</sub>)**COSY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 40:60; 25 °C; concentración: 40 mM; 500 MHz):COSY (CD<sub>3</sub>OH; 25 °C; 750 MHz):

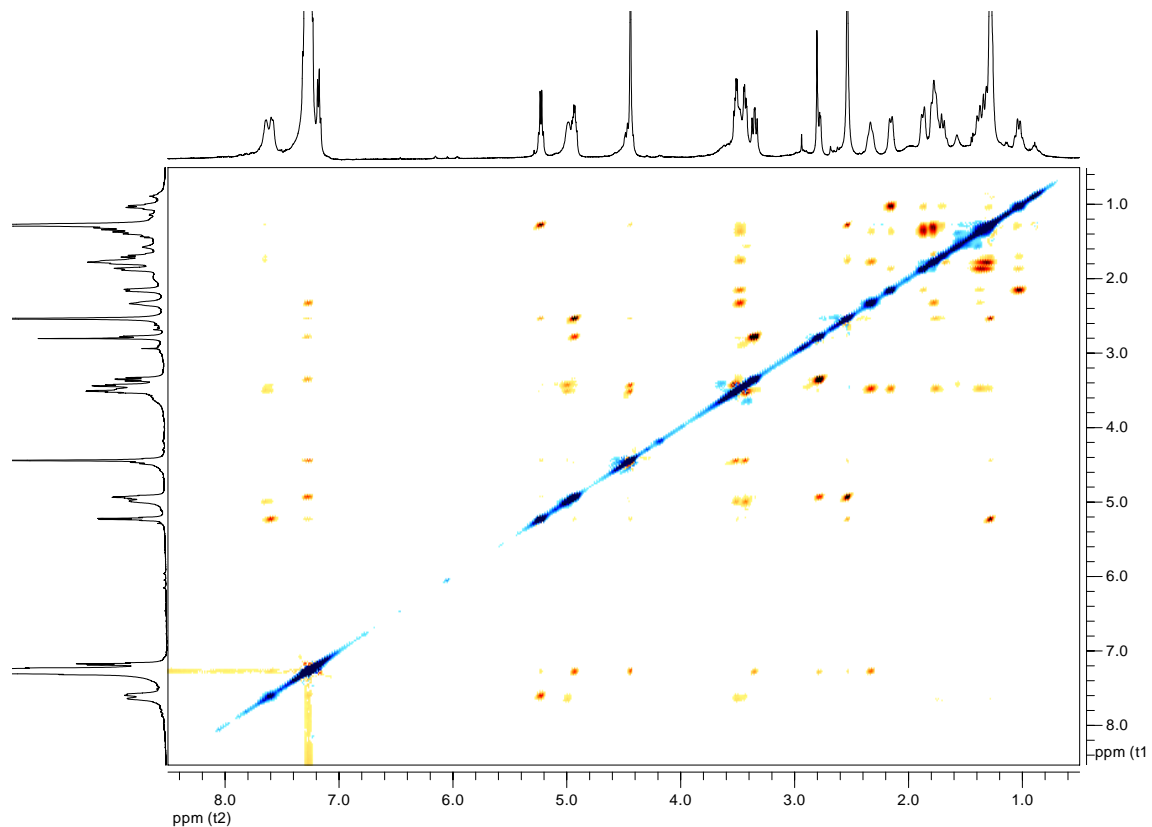
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D- $\gamma$ -Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-6</sub>)**NOESY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 40:60; 25 °C; concentración: 40 mM; 500 MHz):NOESY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 40:60; 25 °C; concentración: 40 mM; 500 MHz); (8,0-4,5 ppm : 8,0-4,5 ppm):

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-γ-Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-6</sub>)**

NOESY (CD<sub>3</sub>OH; 25 °C; 750 MHz):

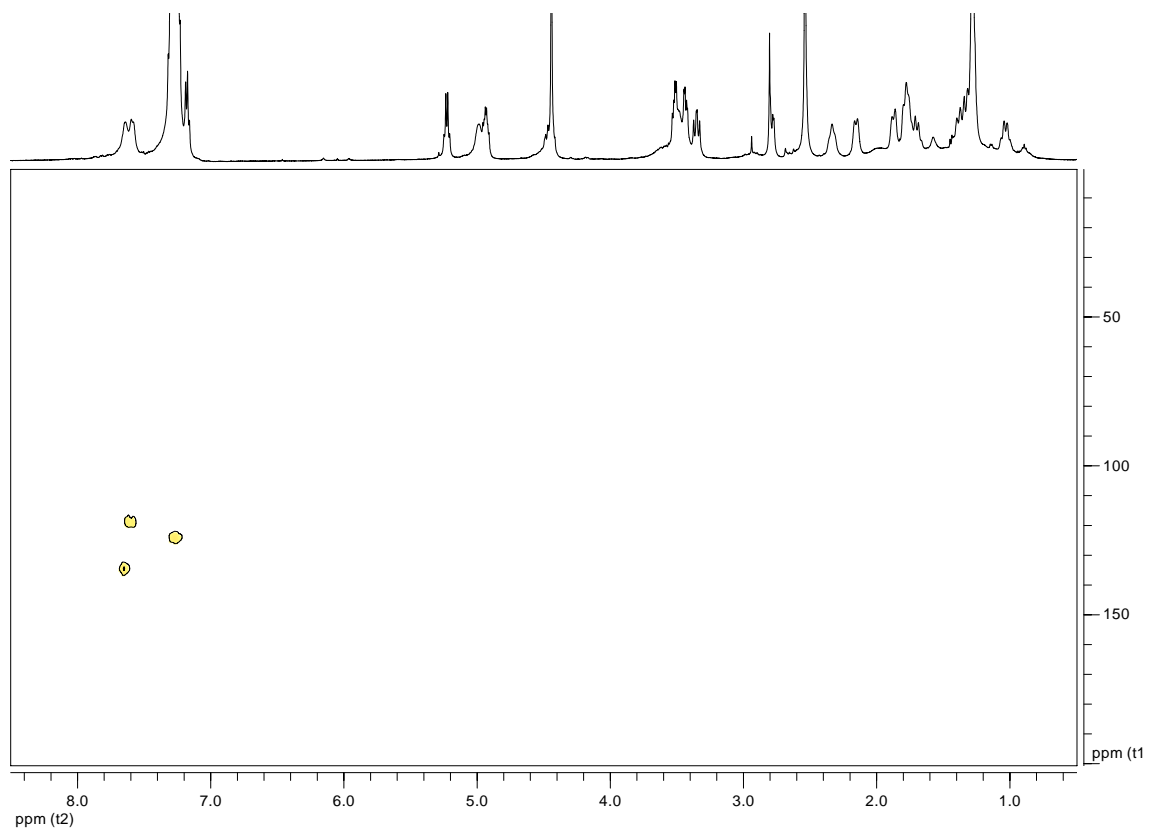


ROESY (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 40:60; 25 °C; concentración: 40 mM; 500 MHz):



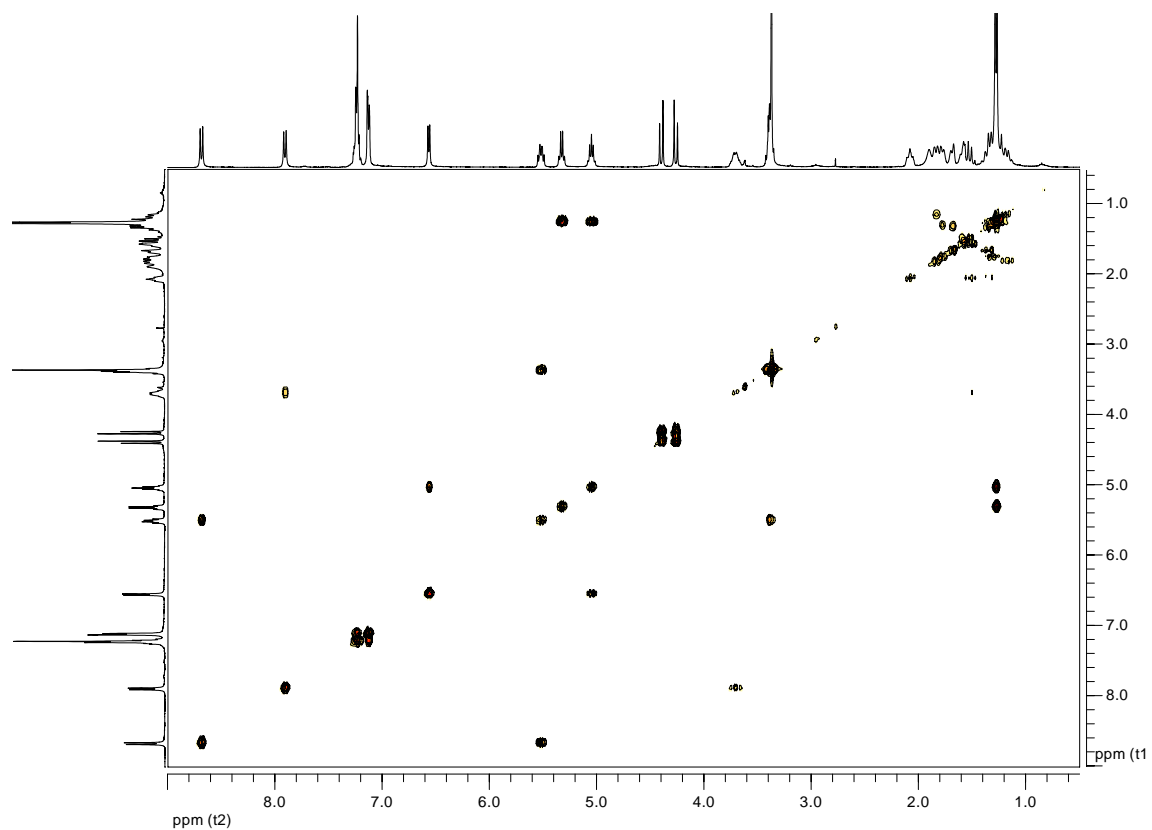
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-γ-Ach-L-Phe-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-6</sub>)**

Correlación <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub> 40:60; 25 °C; concentración: 40 mM; 500 MHz):

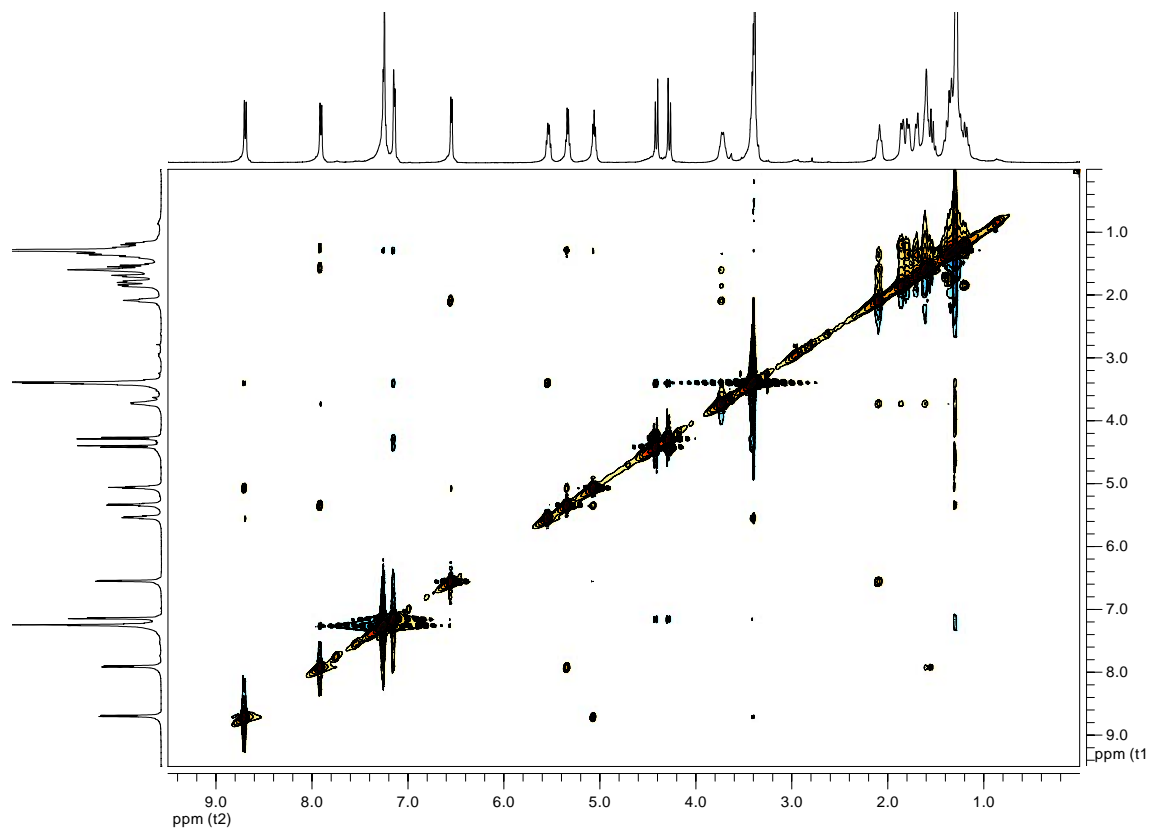


**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-7</sub>)**

COSY (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):

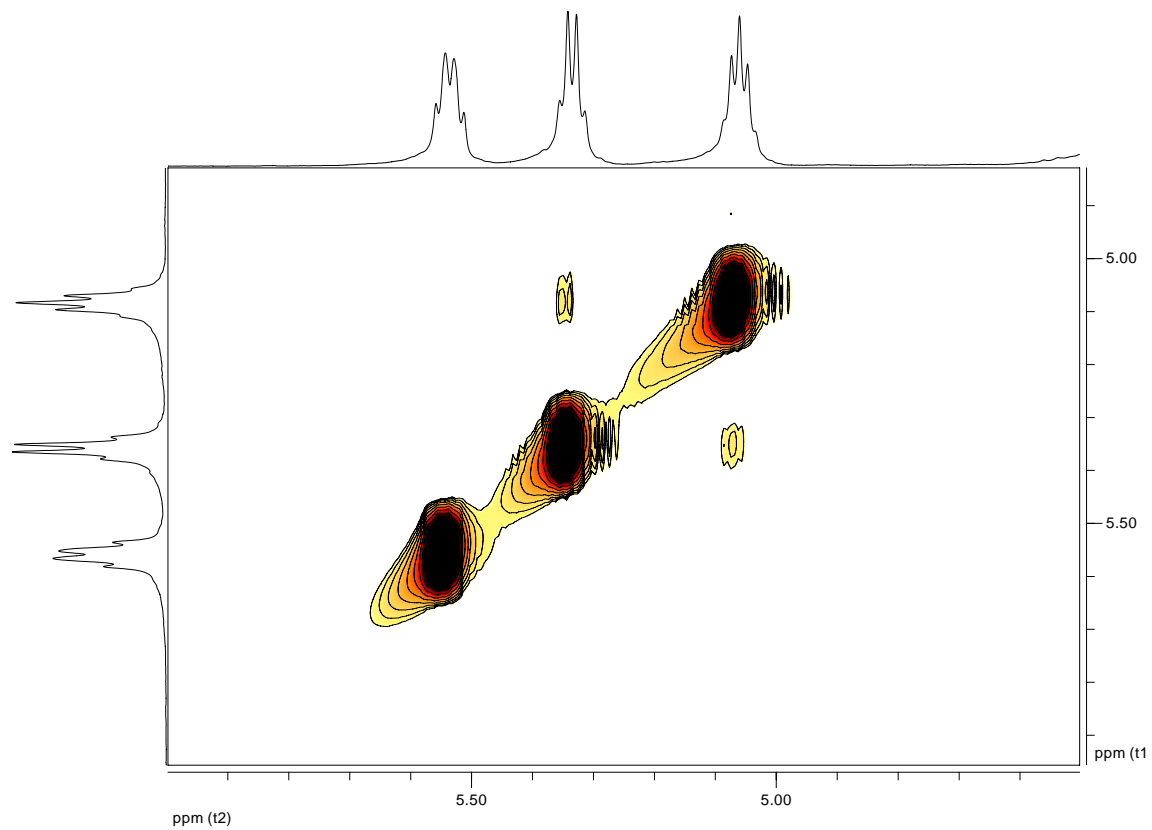


NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):

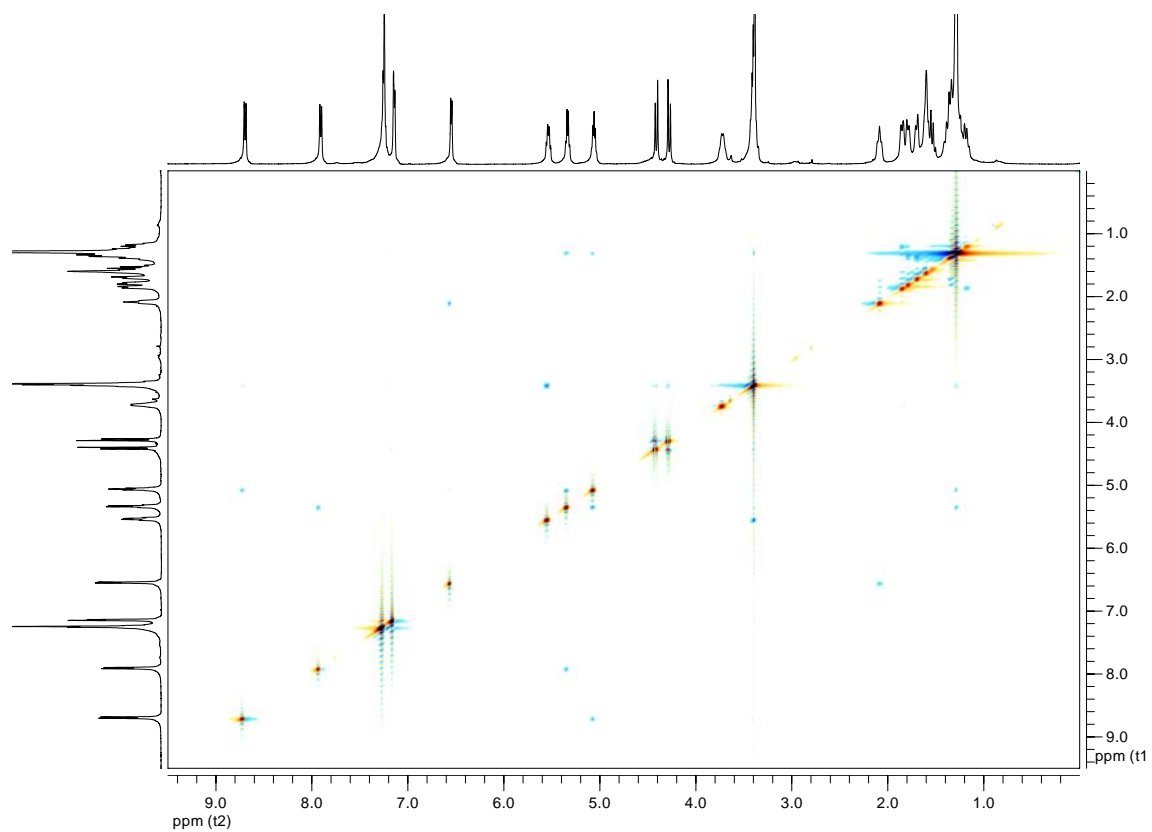


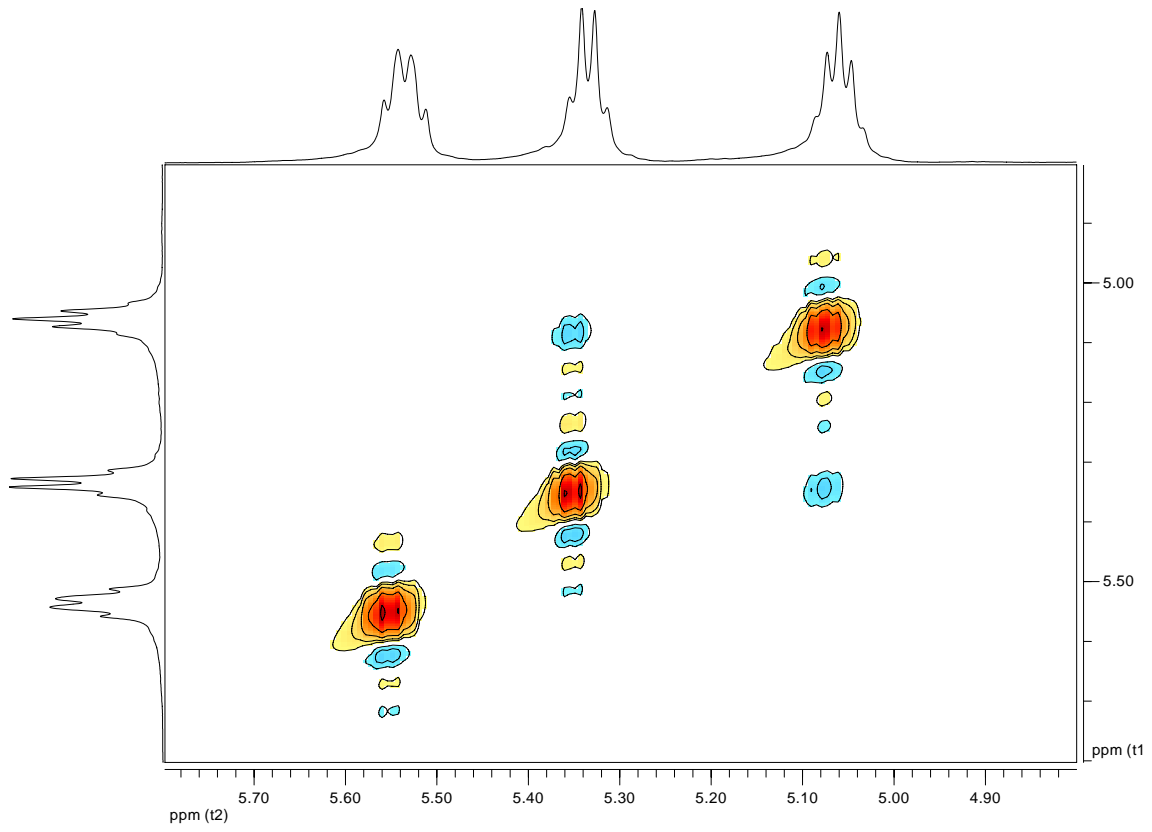
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-7</sub>)**

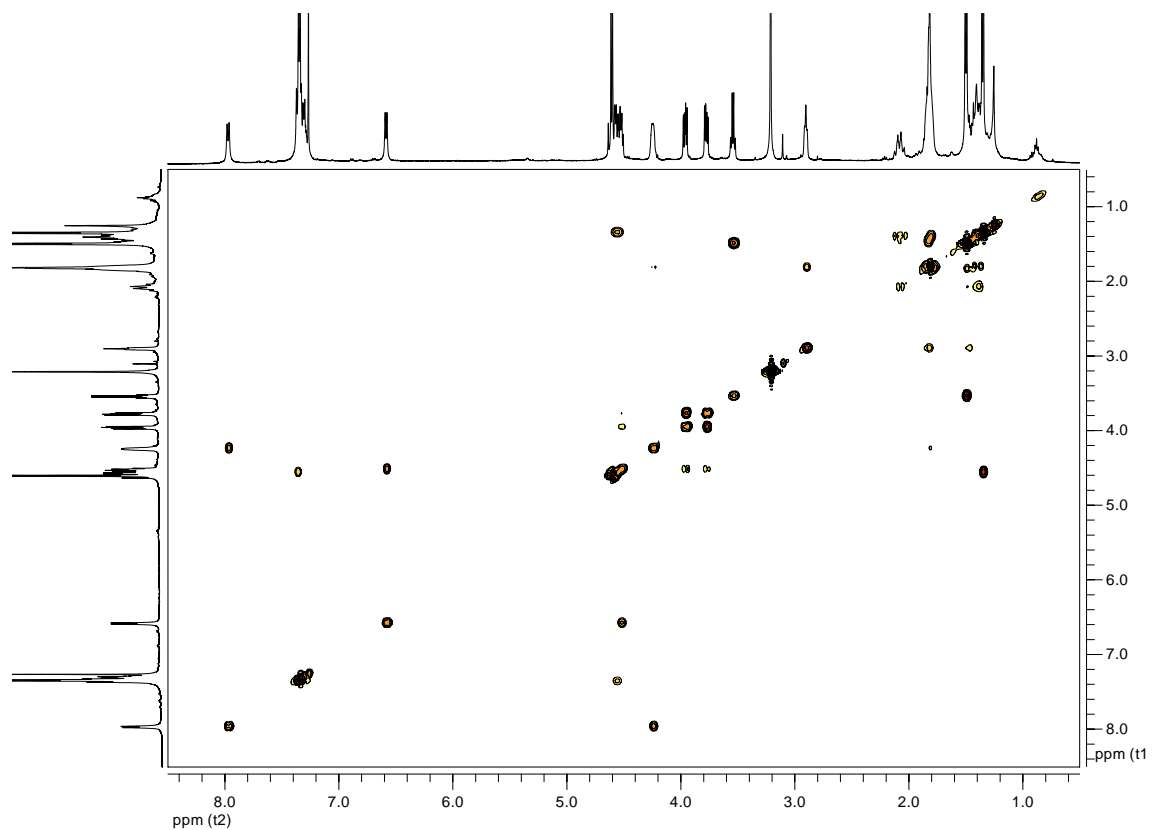
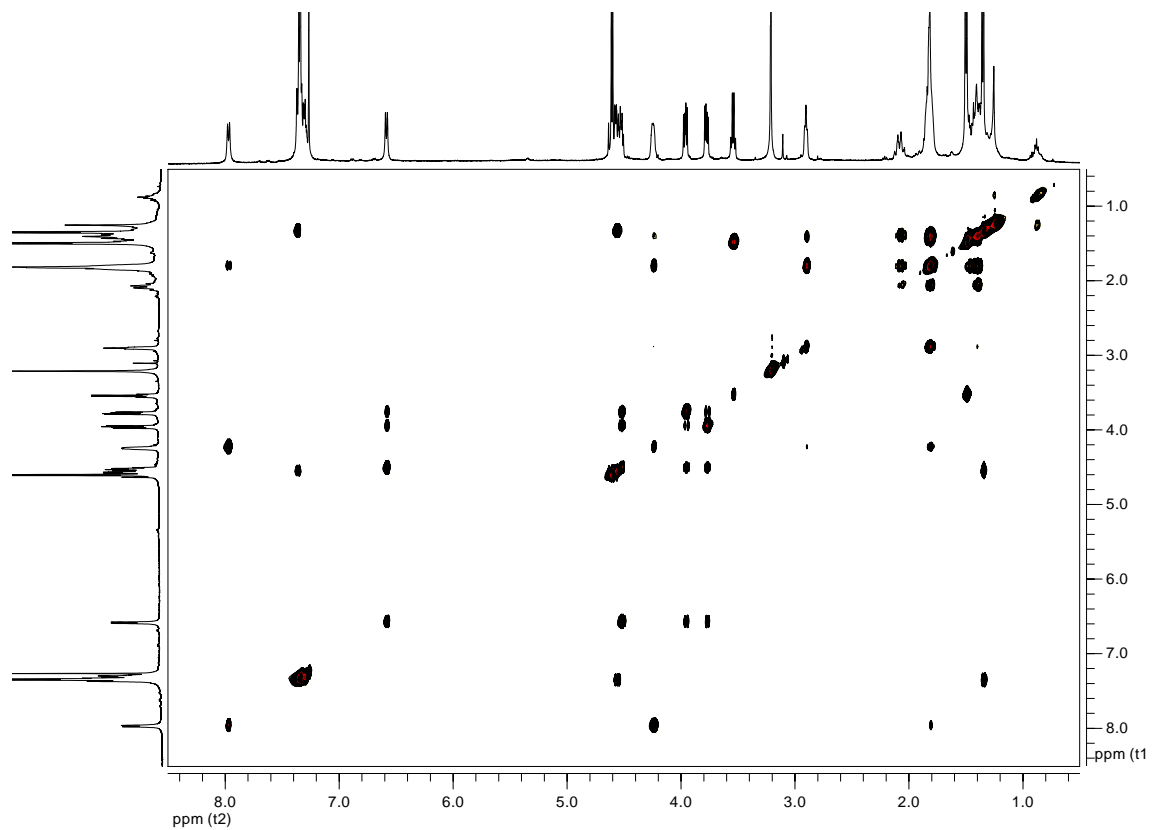
NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 6,0-4,5 ppm : 6,0-4,8 ppm):

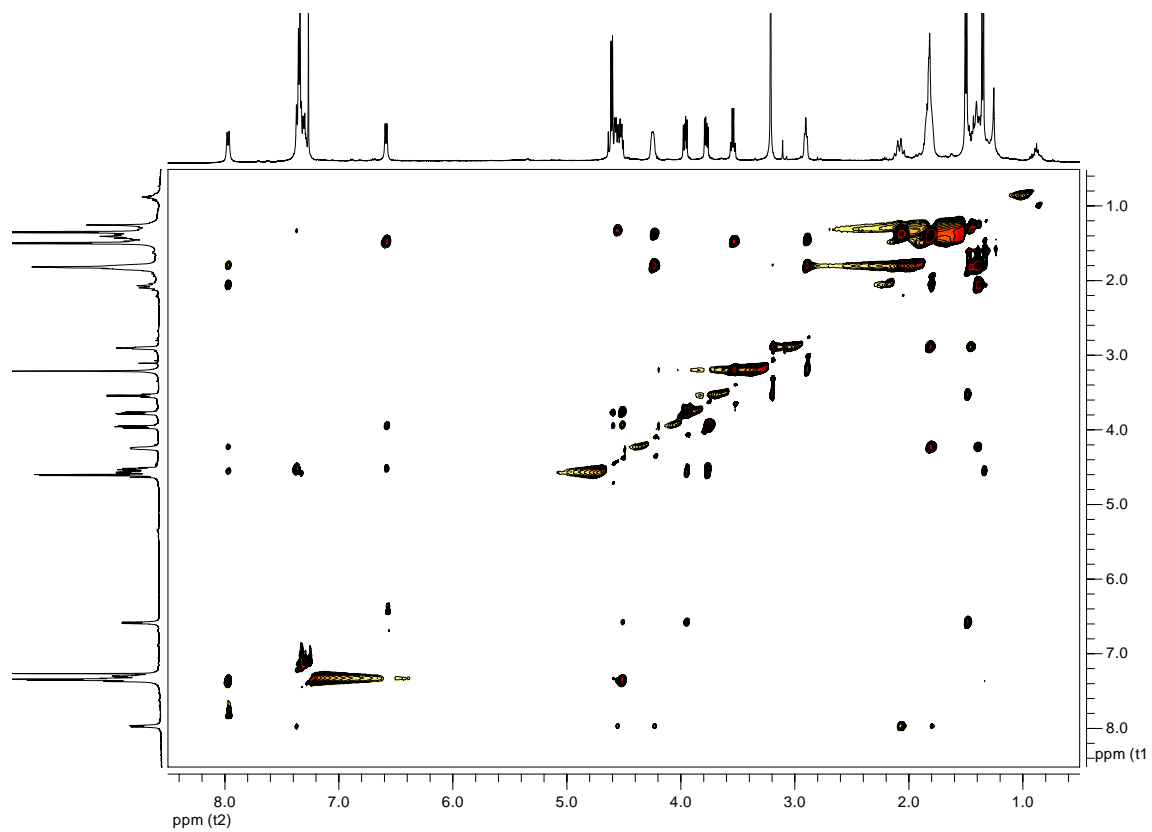
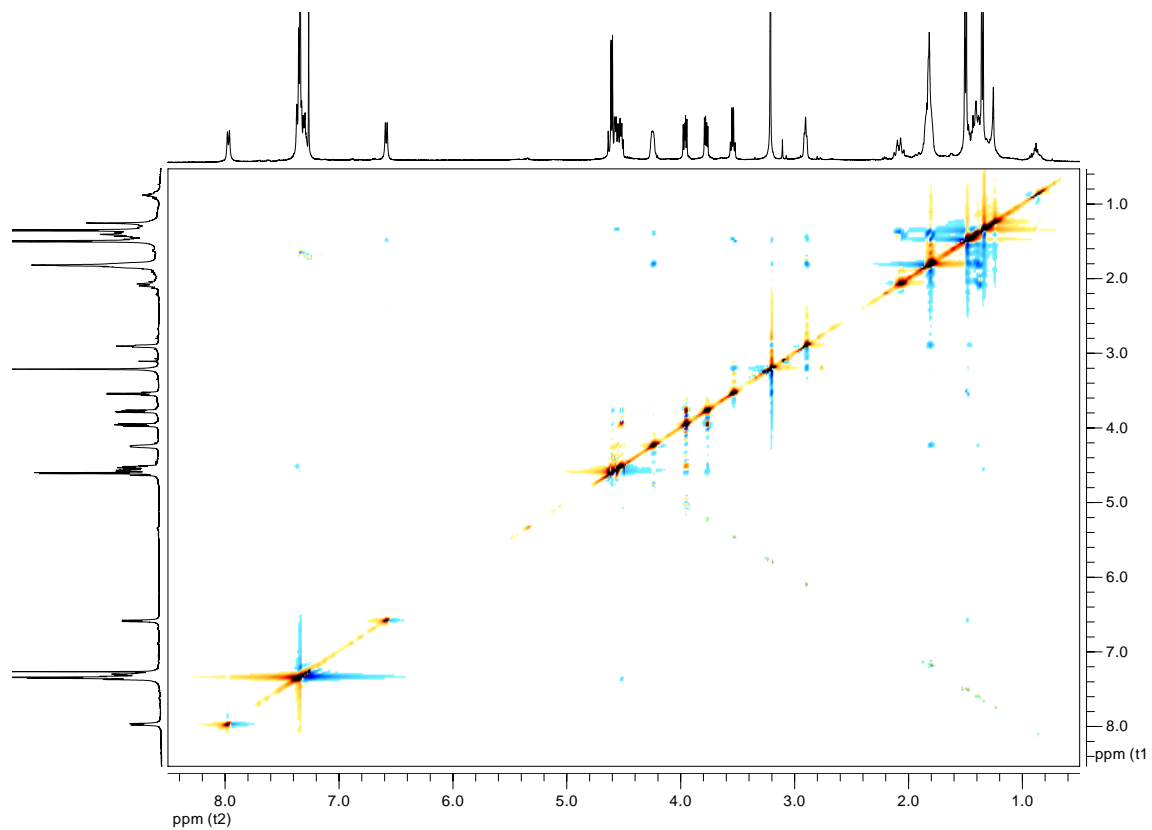


ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz):



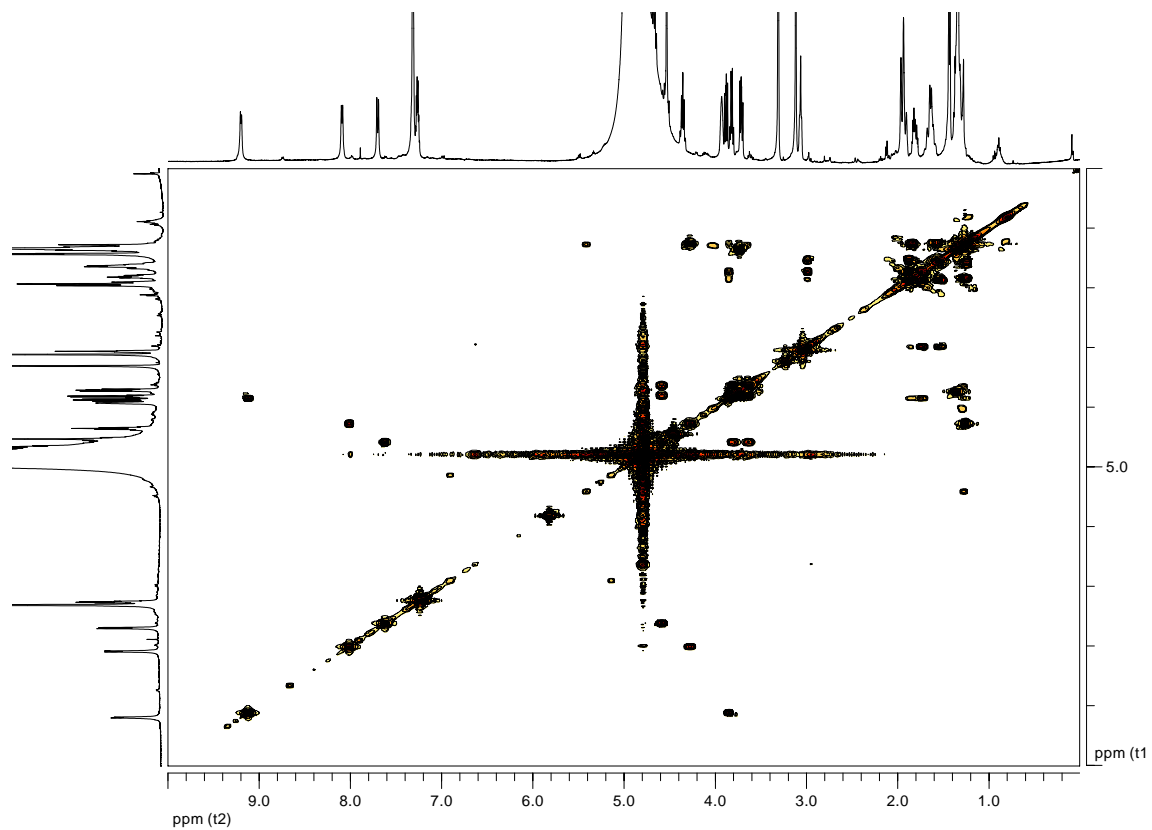
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-MeN-Ala-L-γ-Ach-D-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-7</sub>)**ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 750 MHz); (Ampliación 5,8-4,8 ppm : 5,8-4,8 ppm):

**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-8</sub>)**COSY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):TOCSY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):

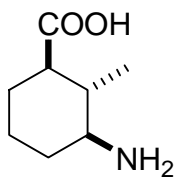
**Ciclo{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-8</sub>)**NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):ROESY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):

***Ciclo***{[L-Ser(Bn)-D-Ala-L- $\gamma$ -Ach-D-MeN-Ala]<sub>2</sub>-} (OC<sub>3:1-8</sub>)

COSY (CD<sub>3</sub>OH, 500 MHz):



## **ANEXO 2: DATOS DE RAYOS X**

**Ácido (*trans,trans*)-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico**

Los cristales se obtuvieron por cristalización de 5 mg en CHCl<sub>3</sub>/hexano.

Difractómetro: Nonius "MACH3".

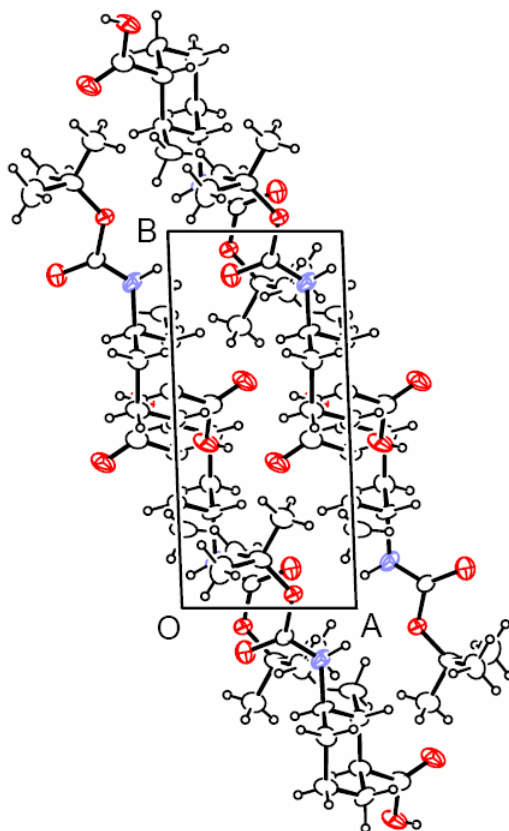
Programas: XCAD4 -CAD4 Diffractometer Data Reduction- (Harms, K.; Wocadlo, S. University of Marburg, Marburg, Germany, **1995**); WinGx (Farrugia, L. J. *J. Appl. Cryst.* **1999**, 32, 837-838); PSISCANS -Psi-scan Empirical Absorption Correction- (North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Mathews, F. S. *Acta. Crystallogr. Sect A* **1968**, 24, 351-359); SADABS -Multiple Equivalent Absorption Correction- (Area-Detector Absorption Correction; Siemens Industrial Automation, Inc.: Madison, WI, **1996**); SHELXL-97 -Crystal Structure Refinement- (G. M. Sheldrick, Institute für Anorganische Chemie, Universität Göttingen, D-37077 Göttingen, Germany); PARST - Geometrical Calculations- (Nardelli, M. *J. Appl. Cryst.* **1995**, 28, 659).

Table 1.

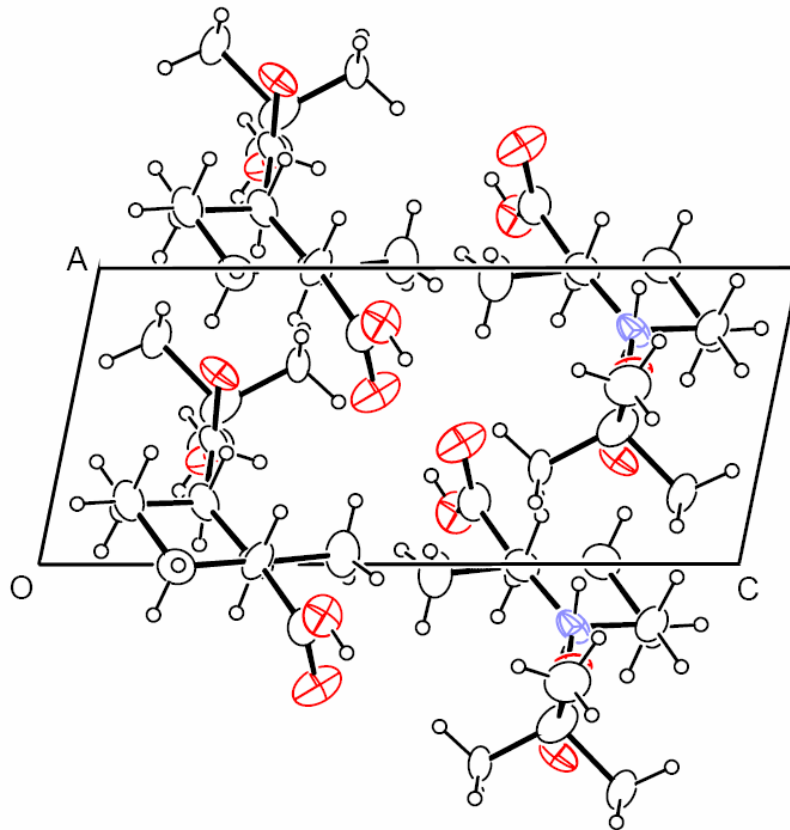
Identification code	2001jg01	
Empirical formula	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N O <sub>4</sub>	
Formula weight	257.32	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	1.54184 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P -1	
Unit cell dimensions	a = 5.286(6) Å	α = 77.60(10)°
	b = 11.500(10) Å	β = 78.73(18)°
	c = 12.512(15) Å	γ = 89.84(16)°
Volume	728.0(14) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.174 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.707 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	280	
Crystal size	0.56 x 0.08 x 0.04 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	3.94 to 64.35°.	
Index ranges	-6<=h<=0, -13<=k<=13, -14<=l<=14	
Reflections collected	2722	
Independent reflections	2722 [R(int) = 0.0000]	
Completeness to theta = 64.35°	99.4 %	
Absorption correction	Empirical (DIFABS)	
Max. and min. transmission	0.9723 and 0.6930	

Refinement method	Full-matrix least-squares on $F^2$
Data / restraints / parameters	2722 / 0 / 167
Goodness-of-fit on $F^2$	1.838
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.2270, wR2 = 0.5892
R indices (all data)	R1 = 0.4135, wR2 = 0.6309
Largest diff. peak and hole	0.829 and -0.952 e.Å <sup>-3</sup>

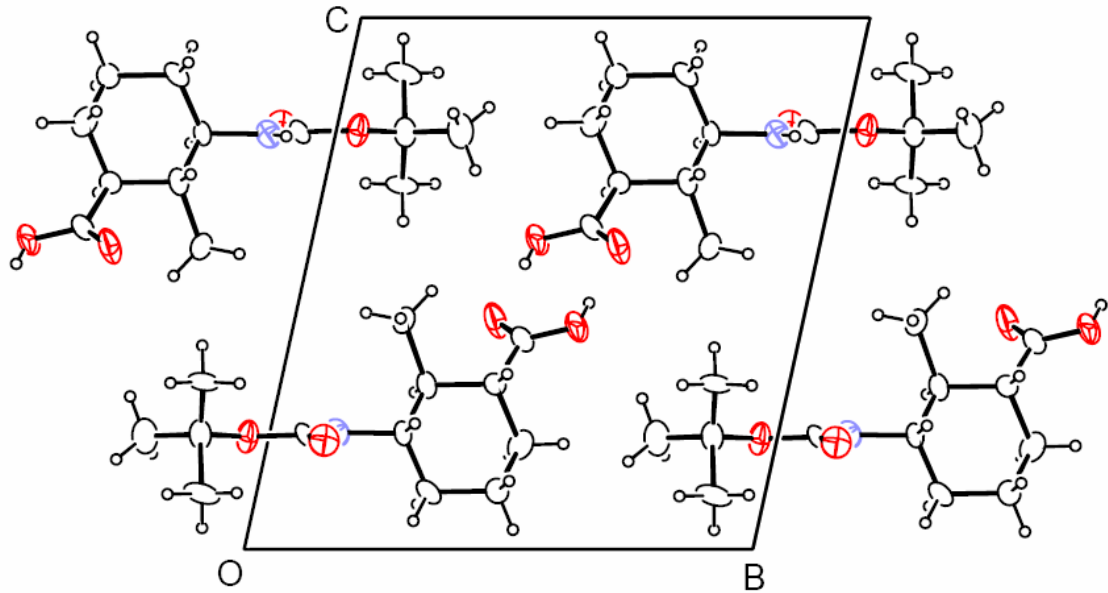
Plano ab:

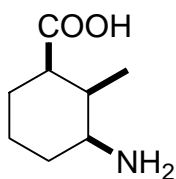


Plano ac:



Plano bc:



**Ácido (cis,cis)-3-amino-2-metilciclohexanocarboxílico**

Los cristales se obtuvieron por cristalización de 5 mg en etanol.

Difractómetro: Nonius "MACH3".

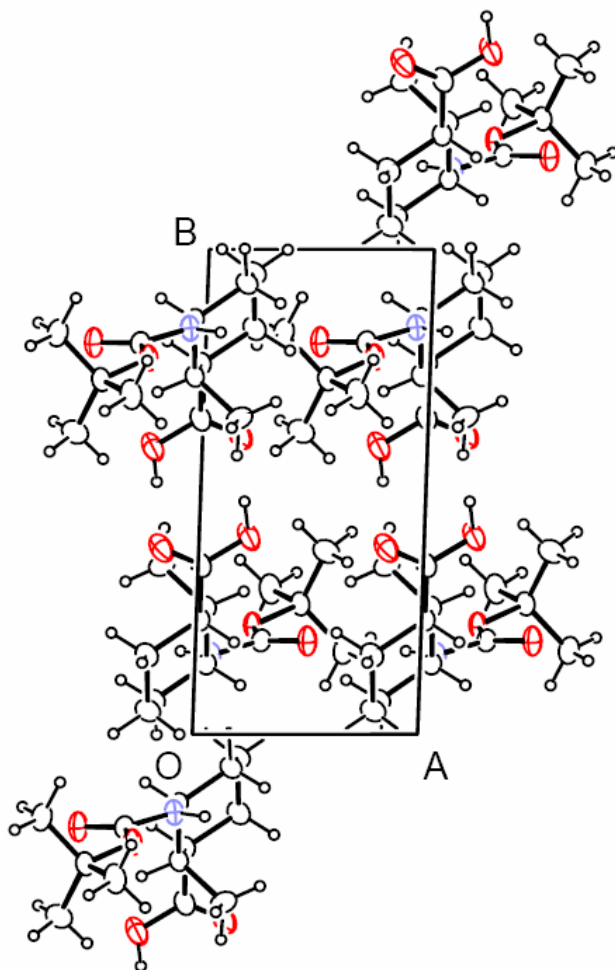
Programas: XCAD4 -CAD4 Diffractometer Data Reduction-; E-STATS -Distribution of E-Statistics-; STDANAL -Analysis of Standard Intensities-; PSIABS -Psi-scan Empirical Absorption Correction-; SHELXL-97 -Crystal Structure Refinement-; PARST -Geometrical Calculations-.

Table 1.

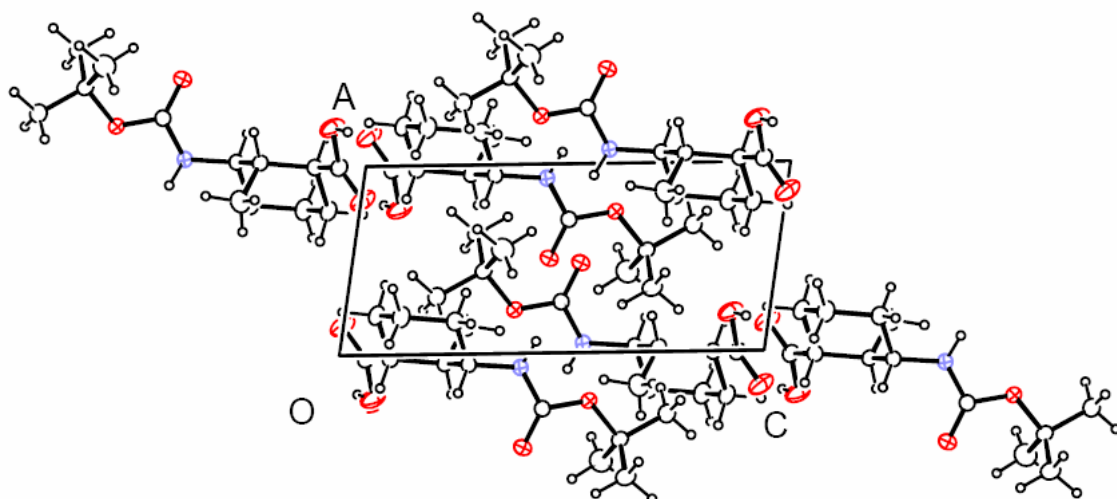
Identification code	2001jg03	
Empirical formula	$C_{13} H_{23} N O_4$	
Formula weight	257.32	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	1.54184 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 5.3423(2) Å	$\alpha = 85.730(6)^\circ$
	b = 11.4359(10) Å	$\beta = 81.101(4)^\circ$
	c = 11.9361(5) Å	$\gamma = 87.365(6)^\circ$
Volume	718.01(7) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.190 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.717 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	280	
Crystal size	0.72 x 0.16 x 0.04 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	3.76 to 73.45°	
Index ranges	-6 ≤ h ≤ 6, 0 ≤ k ≤ 14, -14 ≤ l ≤ 14	
Reflections collected	3045	
Independent reflections	2891 [R(int) = 0.0637]	
Completeness to theta = 73.45°	99.9 %	
Absorption correction	Psi-scan	
Max. and min. transmission	0.9628 and 0.709	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	2891 / 0 / 256	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.054	

Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0516, wR2 = 0.1369
R indices (all data)	R1 = 0.0720, wR2 = 0.1522
Extinction coefficient	0.011(2)
Largest diff. peak and hole	0.430 and -0.290 e.Å <sup>-3</sup>

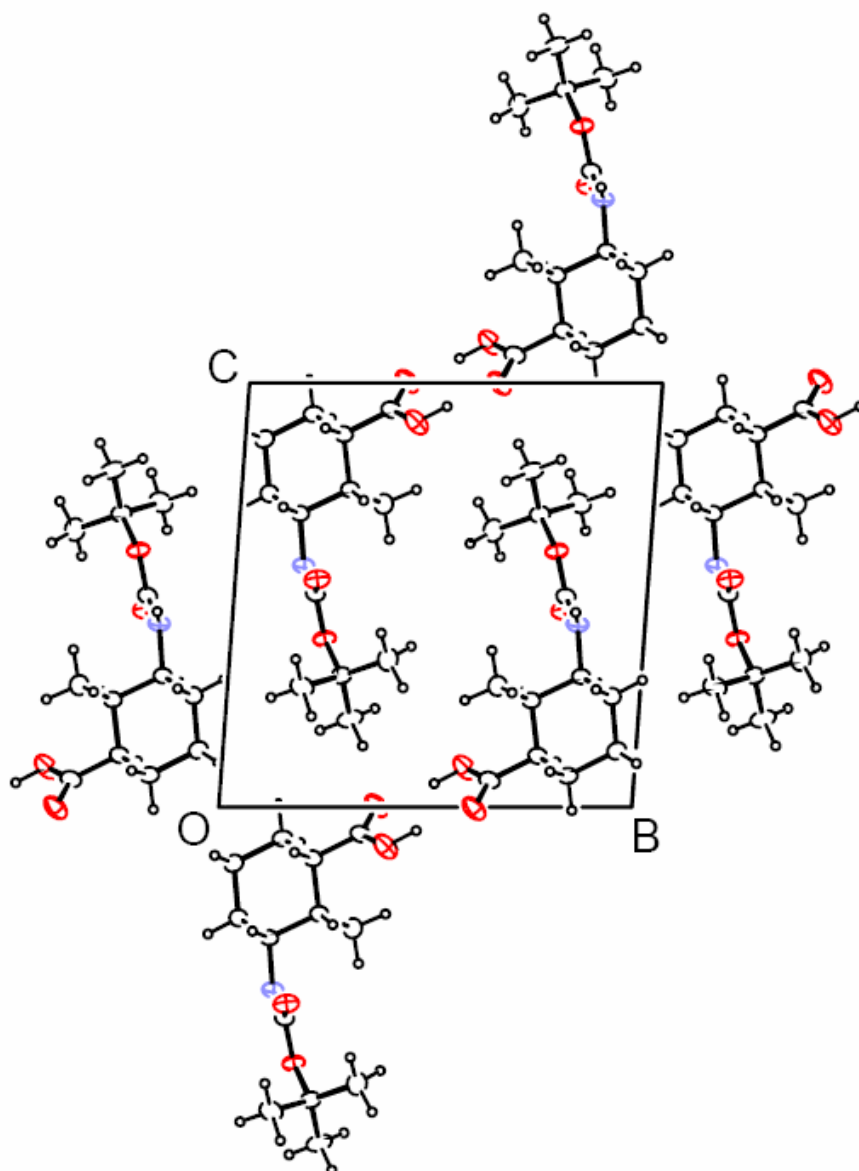
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:



## Ciclohexapéptidos

**Obtención de cristales de los péptido HC-2 y HC-6 para análisis por rayos X.** Cristal del **HC-2** en  $\text{CHCl}_3$ : Un primer cristal se obtuvo a partir de 3 mg de **HC-2** que se disolvieron en 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  y se equilibró mediante difusión con 5 mL de hexano, resultando cristales de forma espontánea después de 2-4 días. Un segundo cristal de este ciclo-péptido se obtuvo cristalizándolo en MeOH, que se equilibró con 5 mL de hexano, resultando cristales incoloros después de 2-4 días. El péptido **HC-6** se cristalizó a partir de 3 mg disueltos en 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  equilibraron con 5 mL de hexano, resultando cristales de forma espontánea después de 2-4 días.

**Análisis de los datos cristalográficos del cristal HC-2 en MeOH.** Los datos fueron tomados en un difractor Bruker a baja temperatura (100 K) equipado con un ánodo rotatorio FR591 KappaCCD 2000 ( $\text{Cu K}\alpha$ ) y Osmic multilayer confocal optics. Todos los cálculos se realizaron en un IBM-compatible PC usando los programas: COLLECT (Nonius BV, **1997-2000**); HKL Denzo and Scalepack (Otwinowski, Z.; Minor, W. "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode", *Methods in Enzymology*, Volume 276: *Macromolecular Crystallography* **1997**, part A, p. 307-326, Carter, C.W. Jr.; Sweet, R. M., Eds., Academic Press. New York); SORTAV (Blessing, R. H. *Acta Cryst.* **1995**, A51, 33-38) y SHELX-97 (G. M. Sheldrick, Institute für Anorganische Chemie, Universität Göttingen, D-37077 Göttingen, Germany); WinGx (Farrugia, L. J. *J. Appl. Cryst.* **1999**, 32, 837-838); SIR97 (Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R.; *J. Appl. Cryst.* **1999**, 32, 115-119); ORTEP3 (Farrugia, L. J. *J. Appl. Cryst.* **1997**, 30, 565); PLATON (SQUEEZE) (Spek, A. L. (**2001**), University of Utrecht, The Netherlands); y PARST (Nardelli, M. - *J. Appl. Cryst.* **1995**, 28, 659).

**Análisis de los datos cristalográficos de los cristales de HC-2 y de HC-6.** Los datos fueron recogidos en un difractor Bruker SMART 1000 a baja temperatura (110 K) equipado con un tubo sellado ( $\text{Mo K}\alpha$ ) y un monocromador de grafito altamente ordenado. Todos los cálculos fueron hechos en un IBM-compatible PC usando los programas: SMART (Bruker AXS, Madison, USA); SAINTT (Bruker AXS, Madison, USA); SADABS (Area-Detector Absorption Correction; Siemens Industrial Automation, Inc.: Madison, WI, **1996**) y SHELX-97; WinGx; SIR97; ORTEP3 y PARST. Para el cristal **HC-2** se usó el SnB 2.2 (Weeks, C. M., Miller, R. *J. Appl. Cryst.* **1999**, 32, 120-124).

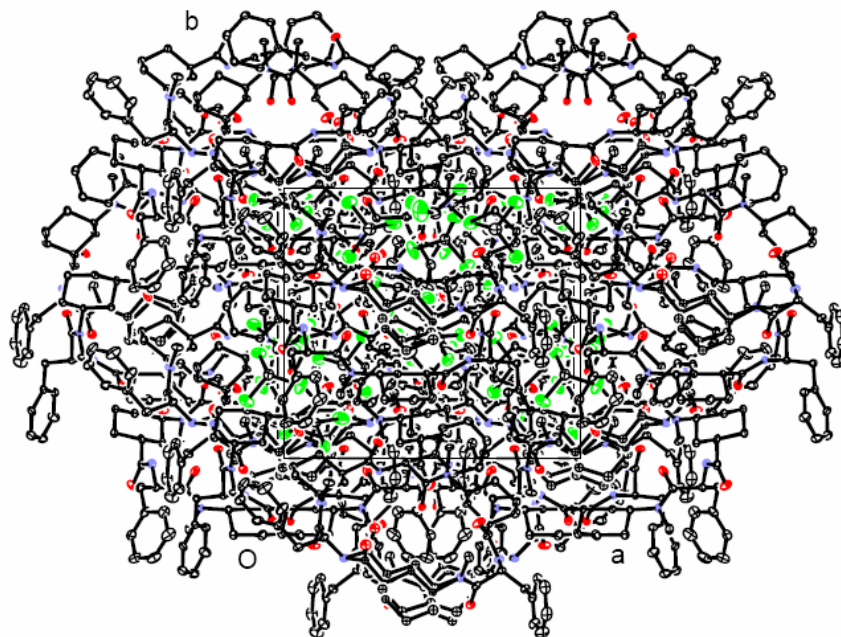
**Cristal del HC-2 en CHCl<sub>3</sub>:\***

Table 1.

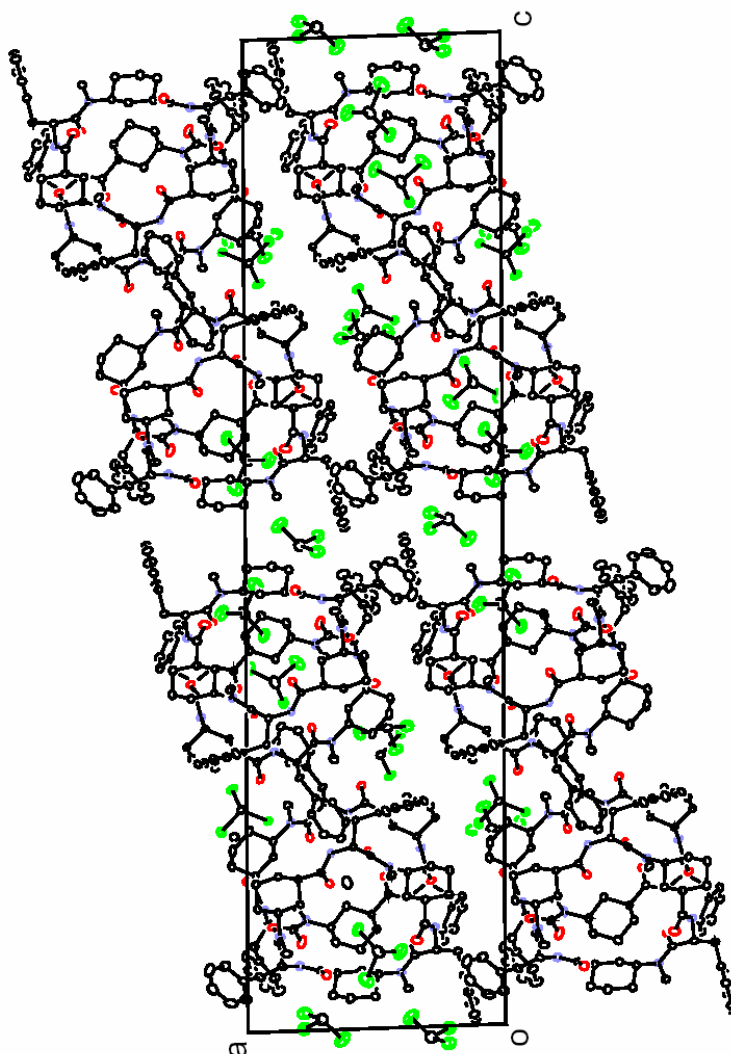
Identification code	jg03ma1n	
Empirical formula	(C <sub>51</sub> H <sub>66</sub> O <sub>6</sub> N <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> (HCCl <sub>3</sub> ) <sub>5</sub>	
Formula weight	1157.52	
Temperature	110(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	I2	
Unit cell dimensions	a = 15.0485(18) Å	α = 90°
	b = 13.7200(16) Å	β = 91.672(2)°
	c = 58.019(7) Å	γ = 90°
Volume	11974(3) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.284 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.405 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	4856	
Crystal size	0.45 x 0.37 x 0.11 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.40 to 28.31°.	
Index ranges	-19<=h<=19, -18<=k<=18, 0<=l<=77	
Reflections collected	49061	
Independent reflections	27343 [R(int) = 0.0315]	
Completeness to theta = 28.31°	96.3 %	
Absorption correction	SADABS	
Max. and min. transmission	0.9568 and 0.8389	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	27343 / 18 / 1327	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.043	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0861, wR2 = 0.2387	
R indices (all data)	R1 = 0.1245, wR2 = 0.2796	
Absolute structure parameter	0.00(6)	
Largest diff. peak and hole	2.320 and -1.655 e.Å <sup>-3</sup>	

\* [www.ccdc.cam.ac.uk/data](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data) (CCDC-207028)

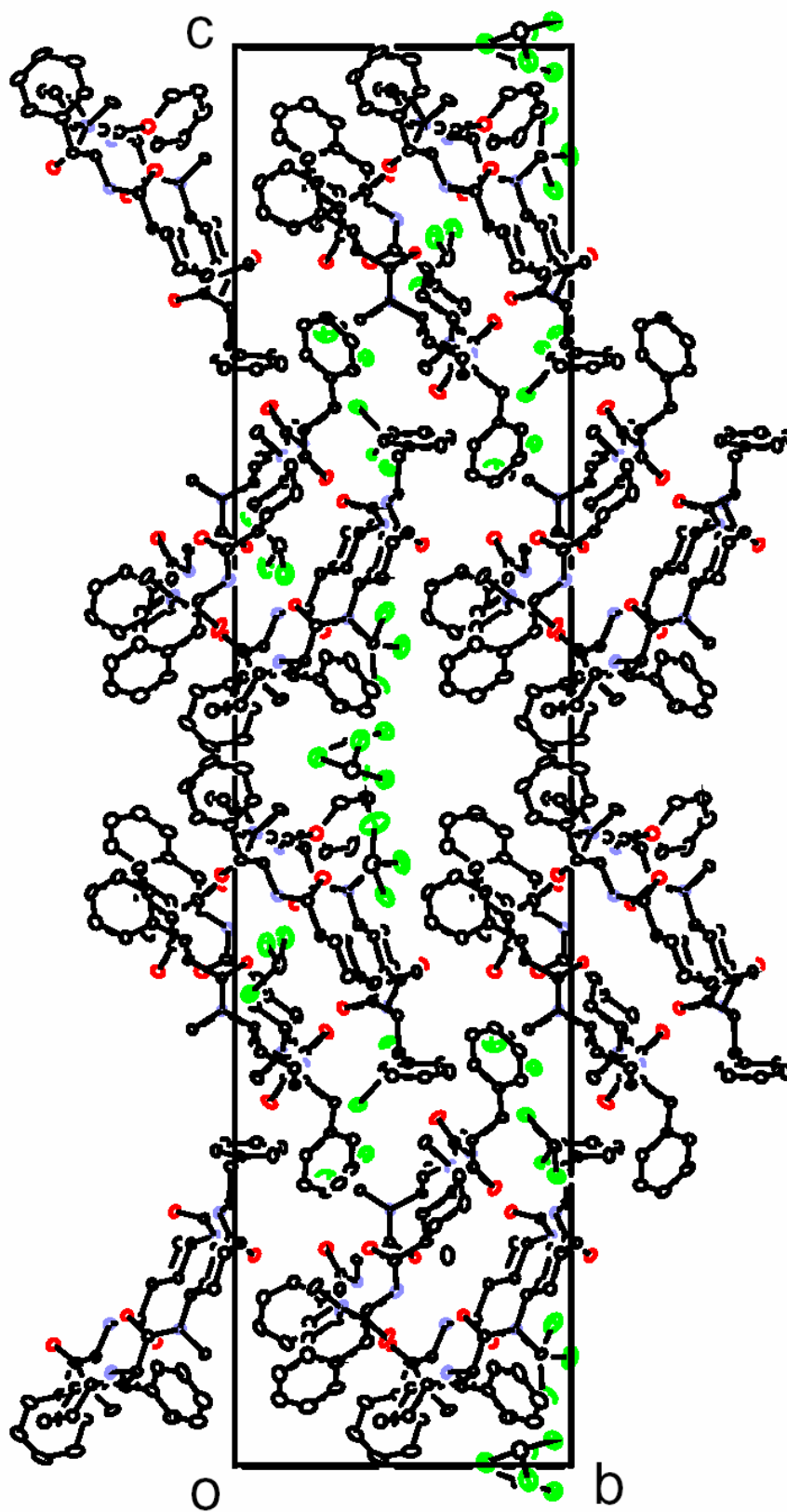
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:

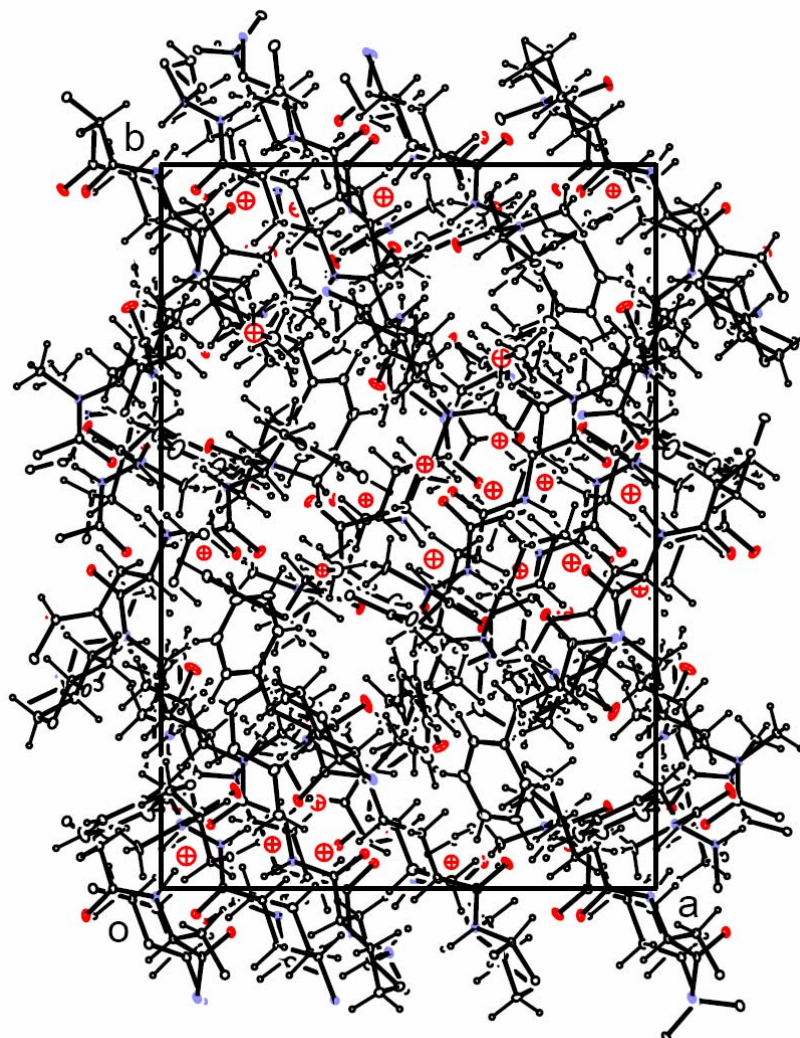


**Cristal del HC-2 en MeOH:**

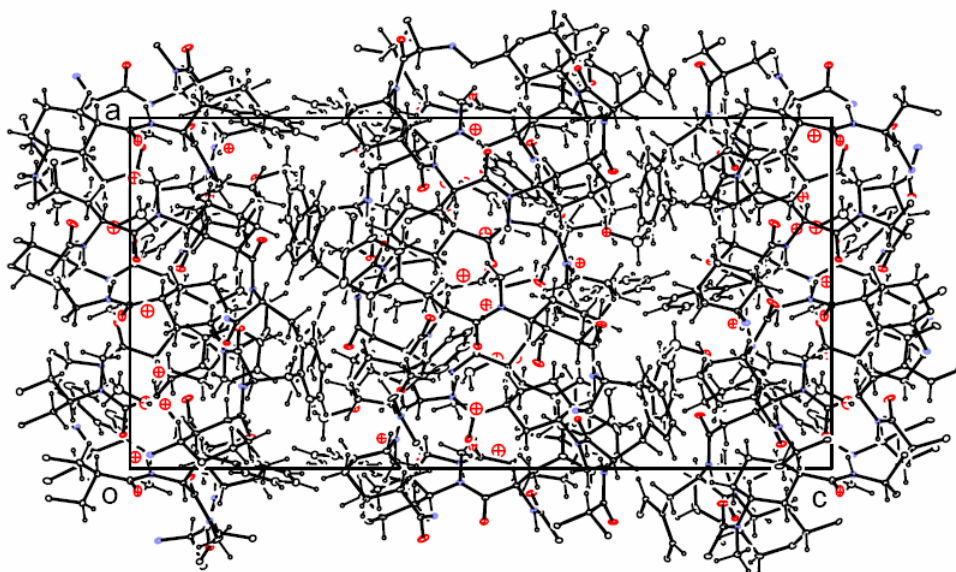
Table 1.

Identification code	jg05ma1n	
Empirical formula	2(C <sub>51</sub> H <sub>66</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> ), 2(CH <sub>3</sub> OH), 4(H <sub>2</sub> O)	
Formula weight	1854.34	
Temperature	110.0(1) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	
Unit cell dimensions	a = 15.258(3) Å	α = 90°
	b = 22.288(4) Å	β = 90°
	c = 30.607(6) Å	γ = 90°
Volume	10409(3) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.183 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.081 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	4000	
Crystal size	0.37 x 0.28 x 0.25 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.13 to 26.43°	
Index ranges	-18<=h<=19, 0<=k<=27, 0<=l<=38	
Reflections collected	63063	
Independent reflections	21219 [R(int) = 0.0588]	
Completeness to theta = 26.43°	99.4 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.98 and 0.7095	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	21219 / 8 / 1209	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.084	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0795, wR2 = 0.2075	
R indices (all data)	R1 = 0.1249, wR2 = 0.2387	
Absolute structure parameter	0.9(13) (meaningless)	
Largest diff. peak and hole	1.07 and -0.63 e.Å <sup>-3</sup>	

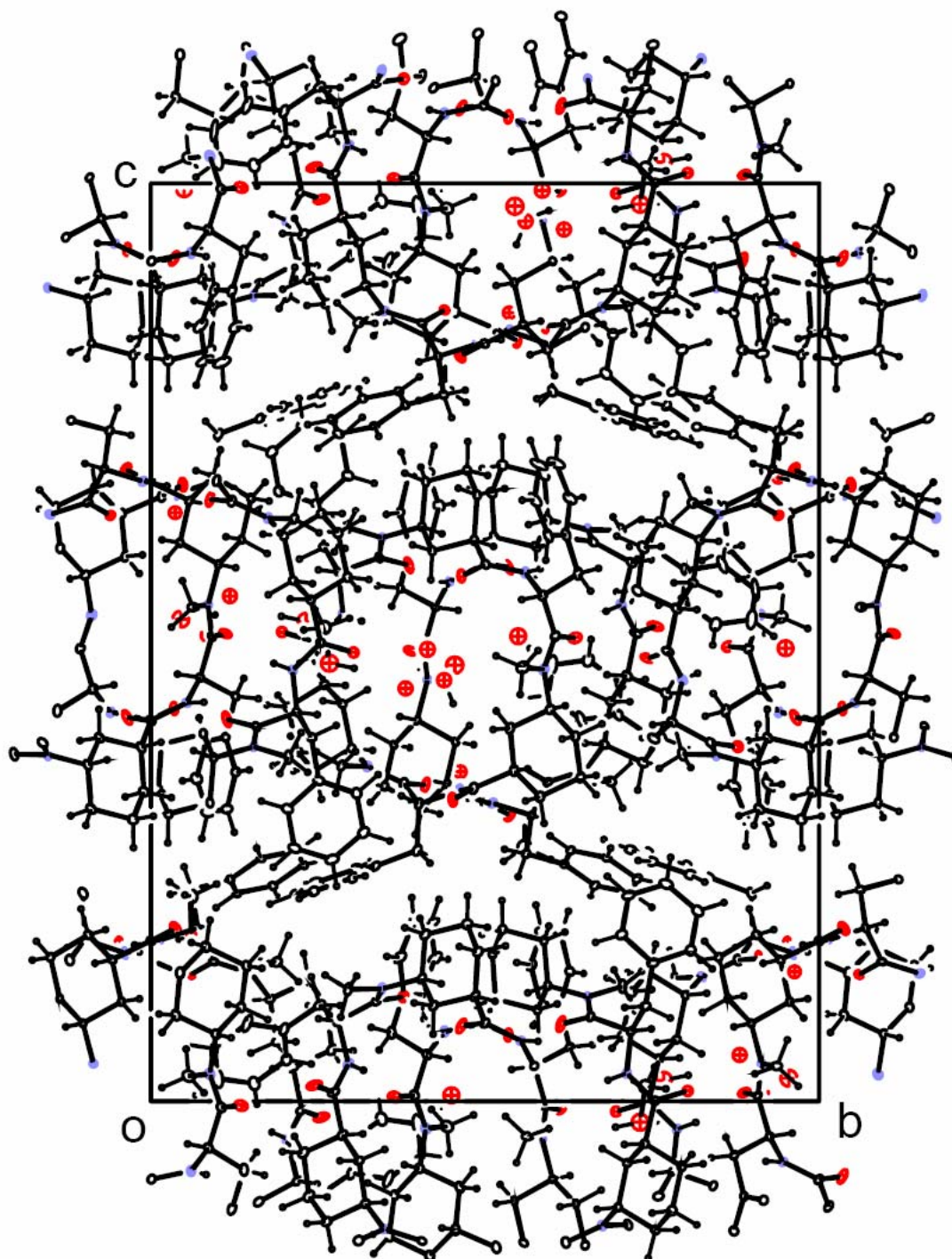
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:

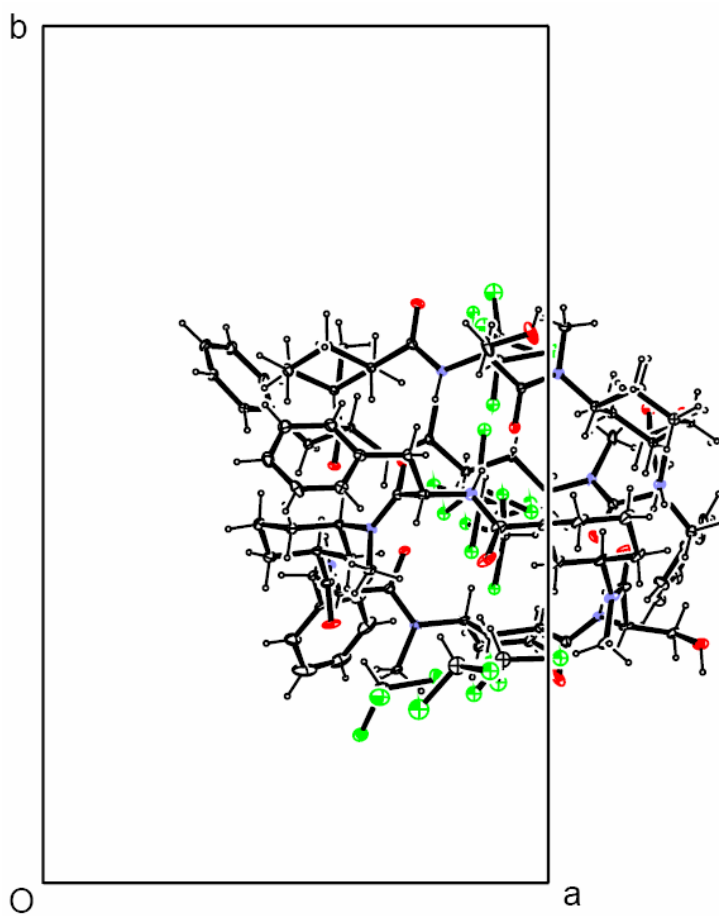


**Cristal del HC-6:**

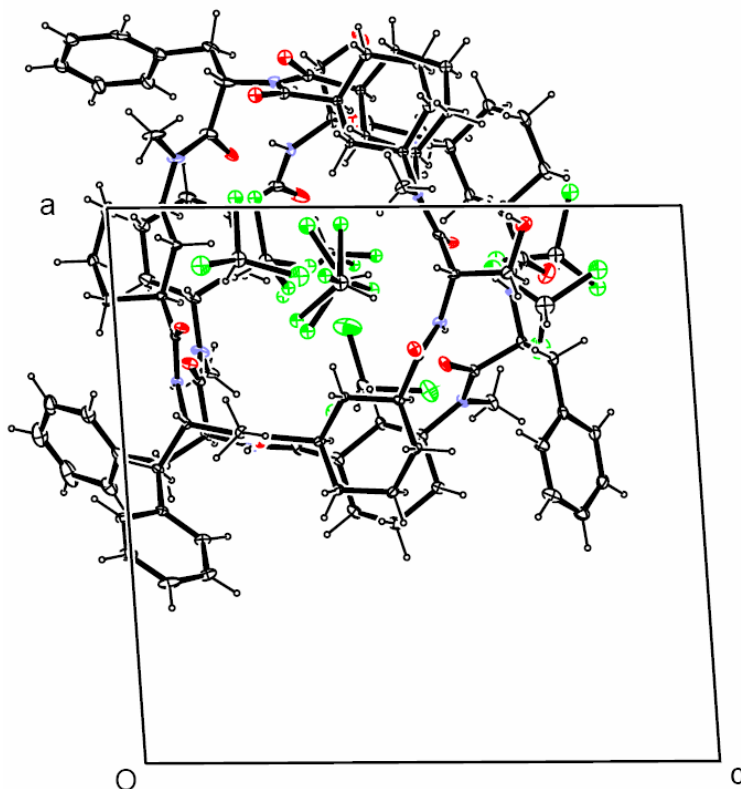
Table 1.

Identification code	jg06ma1n	
Empirical formula	2(C <sub>45</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> ), 7(HCCl <sub>3</sub> ), H <sub>0.8</sub> C <sub>0.8</sub> Cl <sub>2.4</sub>	
Formula weight	2527.41	
Temperature	110.0(1) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21	
Unit cell dimensions	a = 15.143(3) Å	α = 90°
	b = 25.610(5) Å	β = 93.753(4)°
	c = 15.681(3) Å	γ = 90°
Volume	6068(2) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.383 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.584 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	2623.2	
Crystal size	0.74 x 0.42 x 0.39 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.35 to 26.51°	
Index ranges	-18<=h<=18, -31<=k<=31, 0<=l<=19	
Reflections collected	51477	
Independent reflections	23971 [R(int) = 0.0399]	
Completeness to theta = 26.51°	97.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.796 and 0.666	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	23971 / 439 / 1332	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.018	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0922, wR2 = 0.2393	
R indices (all data)	R1 = 0.1372, wR2 = 0.2811	
Absolute structure parameter	0.00(7)	
Largest diff. peak and hole	1.084 and -0.798 e.Å <sup>-3</sup>	

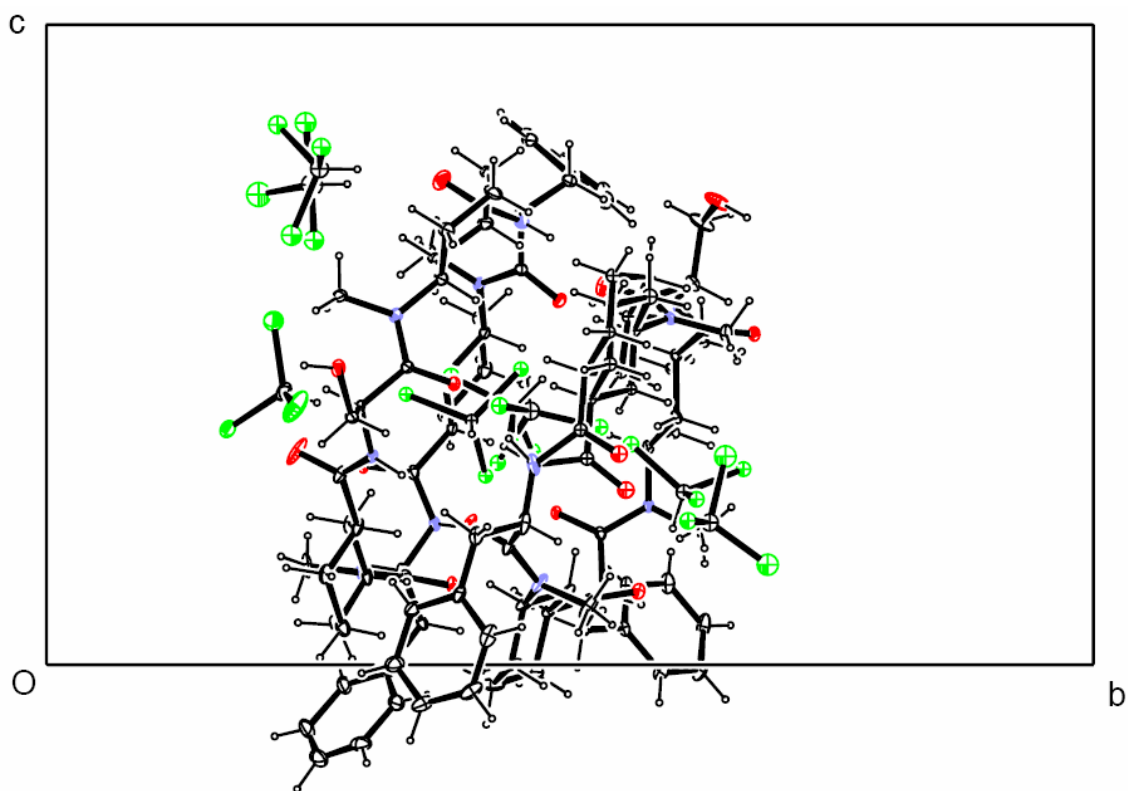
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:



### Ciclotetrapéptidos

**Obtención de cristales del péptido TC-2 para análisis por rayos X.** Cristal del **TC-2 en C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>**: 3 mg del péptido se disolvieron en 0,5 mL de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> y se equilibró mediante difusión con 5 mL de hexano, resultando cristales de forma espontánea después de 2-4 días. Cristal del **TC-2 en MeOH**: 3 mg del péptido se disolvieron en 1 mL de MeOH y se equilibraron con 5 mL de hexano, resultando cristales de forma espontánea después de 2-4 días.

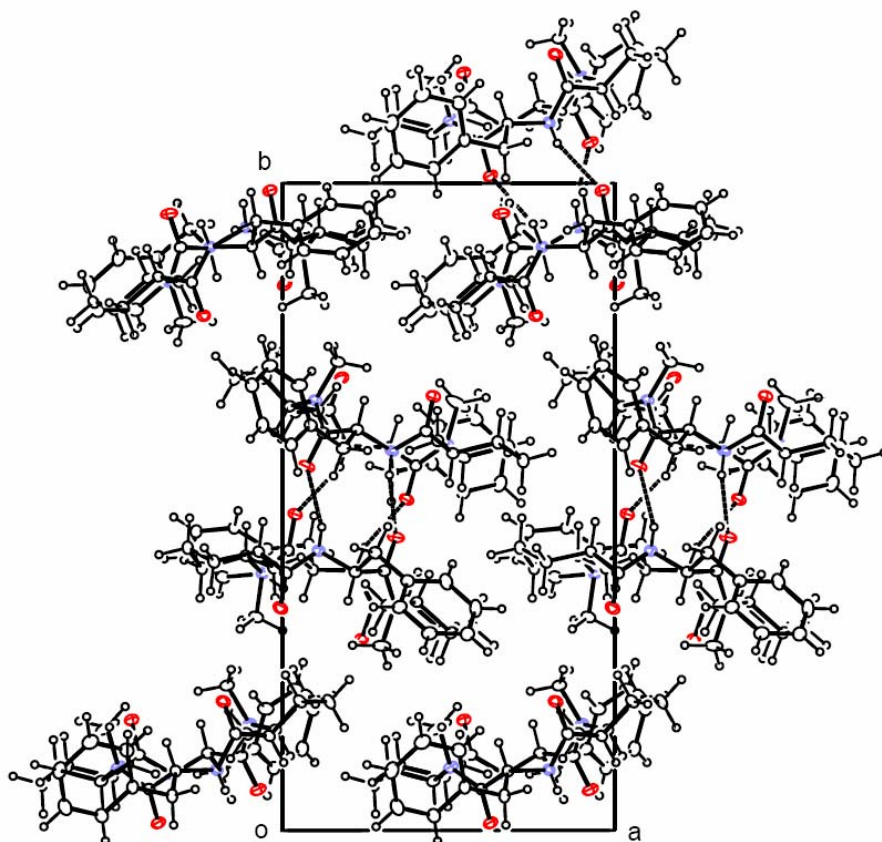
**Análisis de los datos cristalográficos de los cristales de TC-2 en CHCl<sub>3</sub> y de TC-2 en MeOH.** Los datos fueron recogidos en un difractómetro Bruker SMART 1000 a baja temperatura (110 K) equipado con un tubo sellado (Mo K $\alpha$ ) y un monocromador de grafito altamente ordenado. Todos los cálculos fueron hechos en un IBM-compatible PC usando los programas: SMART; SAINTT; SADABS y SHELX-97; WinGx; SIR97; ORTEP3; y PARST.

**Cristal del TC-2 en C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>:**

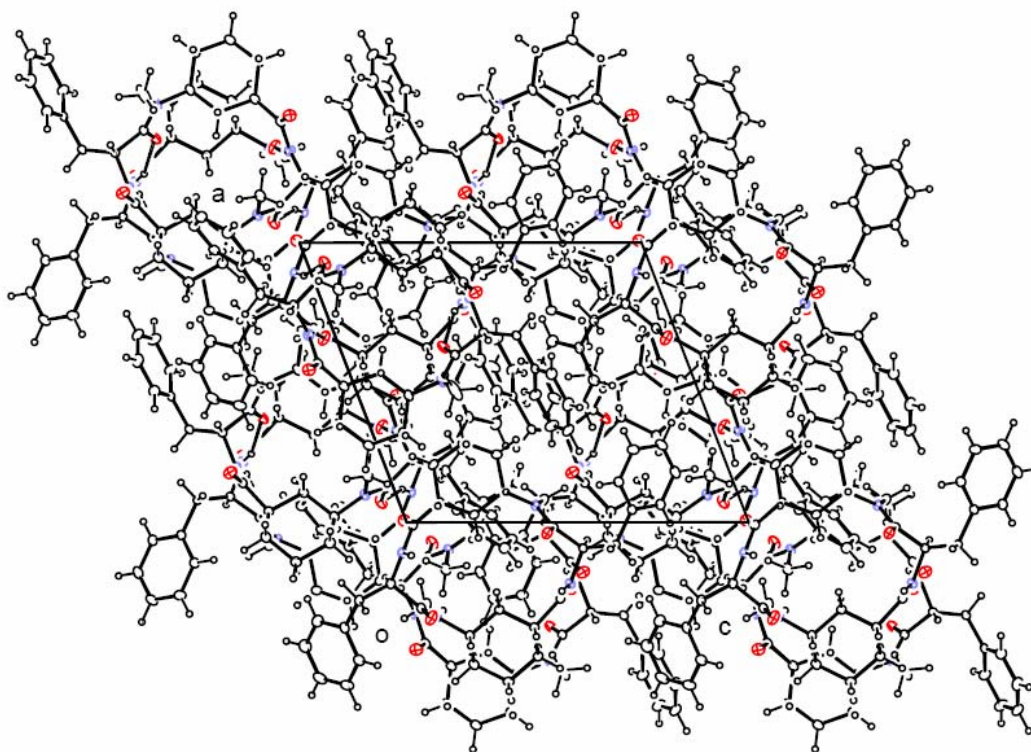
Table 1.

Identification code	jg10ma1n	
Empirical formula	C <sub>34</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	
Formula weight	572.73	
Temperature	110.0(1) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2(1)	
Unit cell dimensions	a = 11.7406(19) Å	α = 90°
	b = 21.343(3) Å	β = 110.975(3)°
	c = 13.412(2) Å	γ = 90°
Volume	3138.1(9) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.212 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.080 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1232	
Crystal size	0.98 x 0.82 x 0.49 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.86 to 28.28°	
Index ranges	-15 ≤ h ≤ 14, -27 ≤ k ≤ 28, 0 ≤ l ≤ 17	
Reflections collected	25482	
Independent reflections	13987 [R(int) = 0.0181]	
Completeness to theta = 28.28°	95.8 %	
Absorption correction	SADABS	
Max. and min. transmission	0.9619 and 0.9258	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	13987 / 1 / 778	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.018	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0356, wR2 = 0.0841	
R indices (all data)	R1 = 0.0416, wR2 = 0.0880	
Absolute structure parameter	0.1(5)	
Largest diff. peak and hole	0.246 and -0.178 e.Å <sup>-3</sup>	

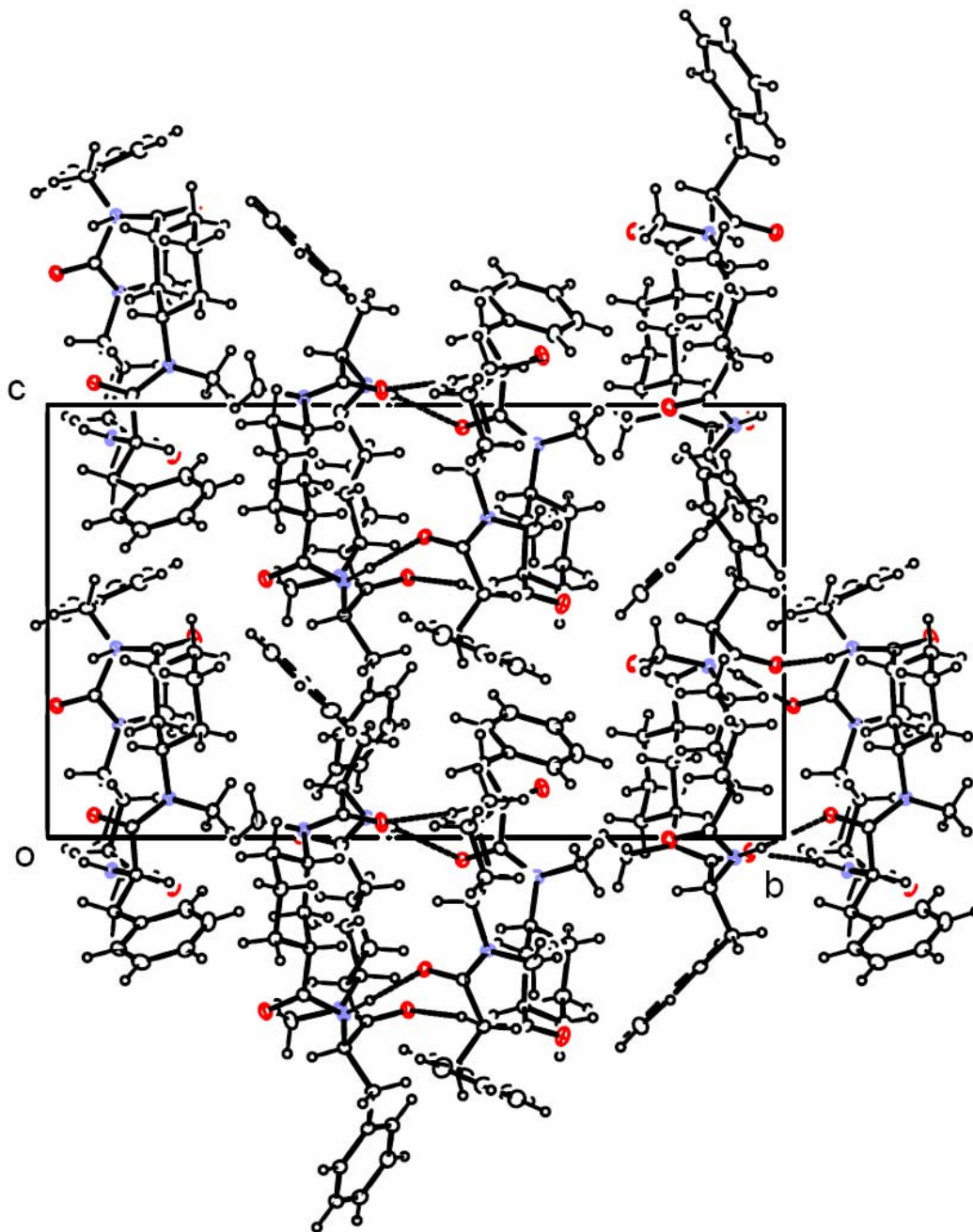
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:

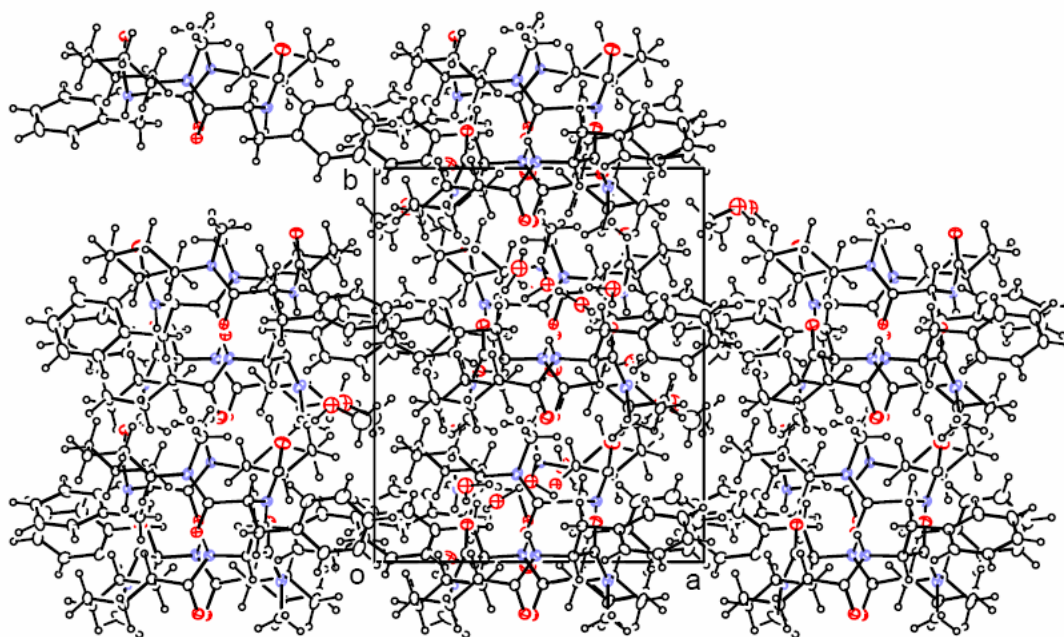


**Cristal del TC-2 en MeOH:**

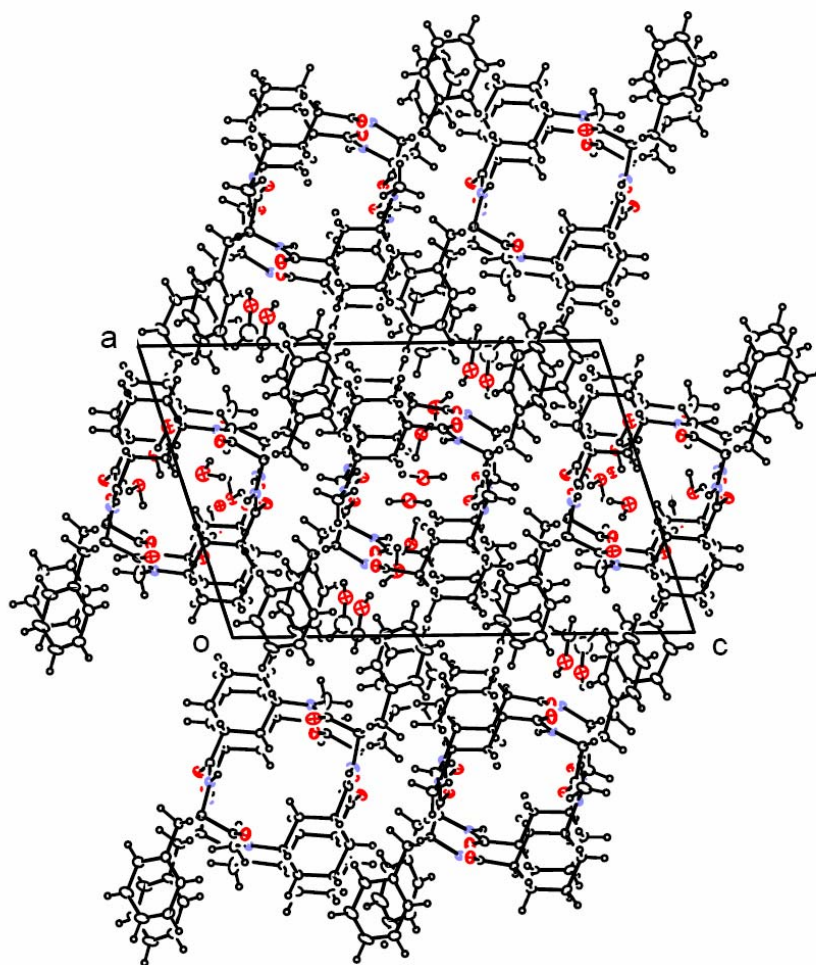
Table 1.

Identification code	jg07ma1n	
Empirical formula	C <sub>69</sub> H <sub>102</sub> N <sub>8</sub> O <sub>15</sub>	
Formula weight	641.79	
Temperature	110(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 <sub>1</sub>	
Unit cell dimensions	a = 12.9029(17) Å	α = 90°
	b = 14.6931(19) Å	β = 107.321(2)°
	c = 19.457(3) Å	γ = 90°
Volume	3521.5(8) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.211 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.085 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1384	
Crystal size	0.54 x 0.39 x 0.15 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.10 to 28.29°	
Index ranges	-17 ≤ h ≤ 16, -17 ≤ k ≤ 19, 0 ≤ l ≤ 25	
Reflections collected	23385	
Independent reflections	15139 [R(int) = 0.0231]	
Completeness to theta = 28.29°	94.9 %	
Absorption correction	SADABS	
Max. and min. transmission	1.0000 and 0.8705	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	15139 / 14 / 867	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.029	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0631, wR2 = 0.1652	
R indices (all data)	R1 = 0.0970, wR2 = 0.1899	
Absolute structure parameter	0.0(11)	
Extinction coefficient	0.0018(6)	
Largest diff. peak and hole	1.241 and -0.430 e.Å <sup>-3</sup>	

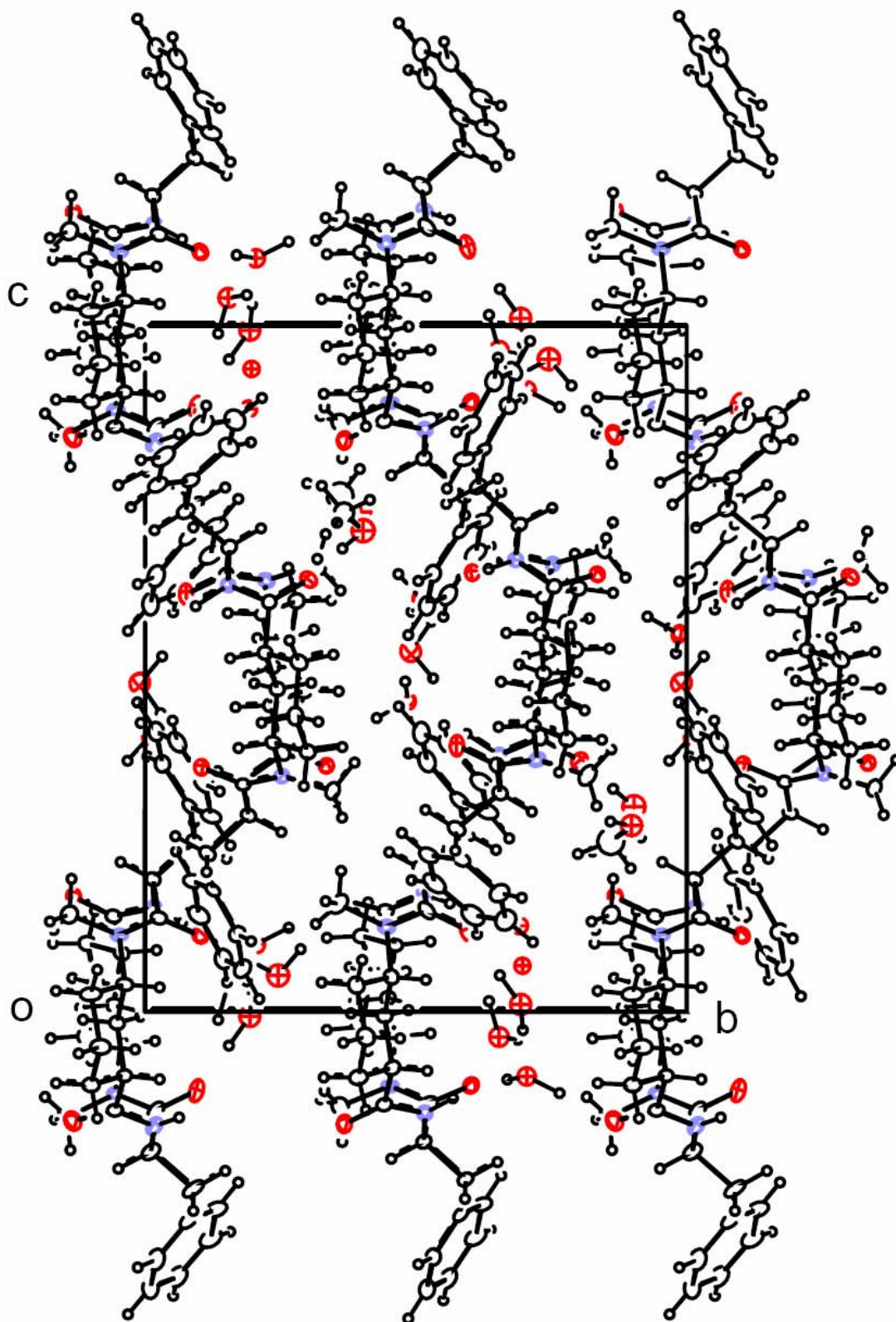
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:



## Ciclooctapéptidos

**Obtención de cristales de los péptido OC-1 y OC-2 para análisis por rayos X.** Un cristal del **OC-1 (no dímero)** se obtuvo por cristalización de 3 mg del péptido en 1 mL CHCl<sub>3</sub> equilibrado con 5 mL de hexano después de 2 días. En otro experimento, 3 mg de **OC-1** se disolvieron en 1mL de CHCl<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub>, resultando cristales de forma espontanea después de 1 día. El péptido **OC-2** se cristalizó a partir de 3 mg disueltos en 1mL de MeOH que se equilibró mediante difusión con 5 mL de hexano, resultando cristales de forma espontanea después de 2-4 días.

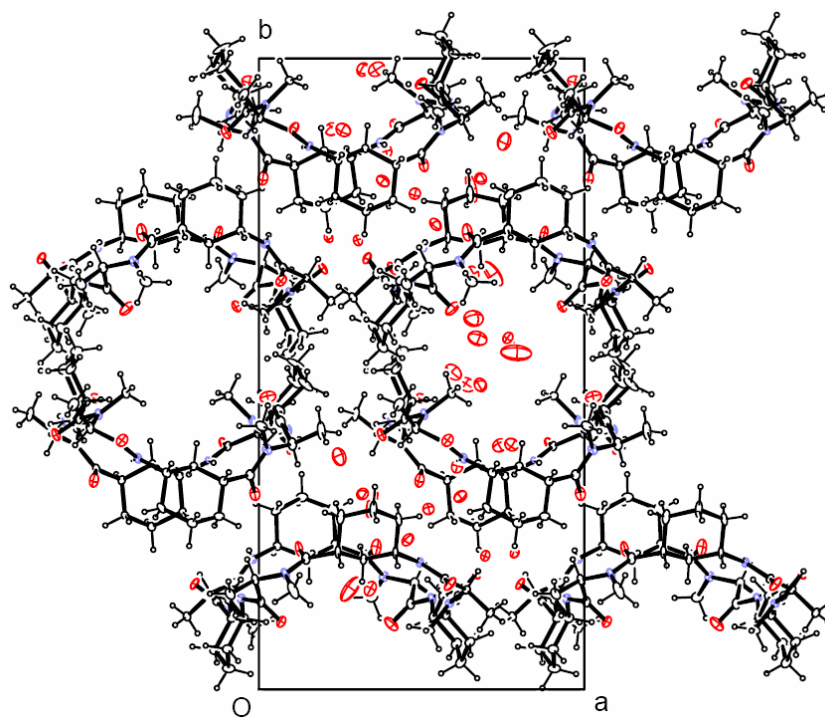
**Análisis de los datos cristalográficos de los cristales de OC-1 (no dímero) y de OC-1 (dímero) y del cristal OC-2.** Los datos fueron tomados en un difractómetro Bruker a baja temperatura (cristal del **OC-1** como dímero: a 120 K y crital del **OC-2** a 100 K) equipado con un ánodo rotatorio FR591 KappaCCD 2000 (Cu K $\alpha$ ) y Osmic multilayer confocal optics. Todos los cálculos se realizaron en un IBM-compatible PC usando los programas: COLLECT; HKL Denzo and Scalepack; SORTAV (Blessing, R. H. *Acta Cryst.* **1995**, A51, 33-38) y SHELX-97; WinGx; SIR2002 (Burla, M. C.; Camalli, M.; Carrozzini, B.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Polidori, G and Spagna, R. "SIR 2002: th program" *J. Appl. Cryst.* **2003**, 36, 1103); ORTEP3; PLATON (SQUEEZE) (Spek, A. L. (2001), University of Utrecht, The Netherlands); y PARST. Mientras que los datos del cristal del **OC-1** que no forma dímero se recogieron en un difractómetro Bruker SMART 1000 a baja temperatura (110 K) equipado con un tubo sellado (Mo K $\alpha$ ) y un monocromador de grafito altamente ordenado.

**Cristal del OC-1 (no dímero):**

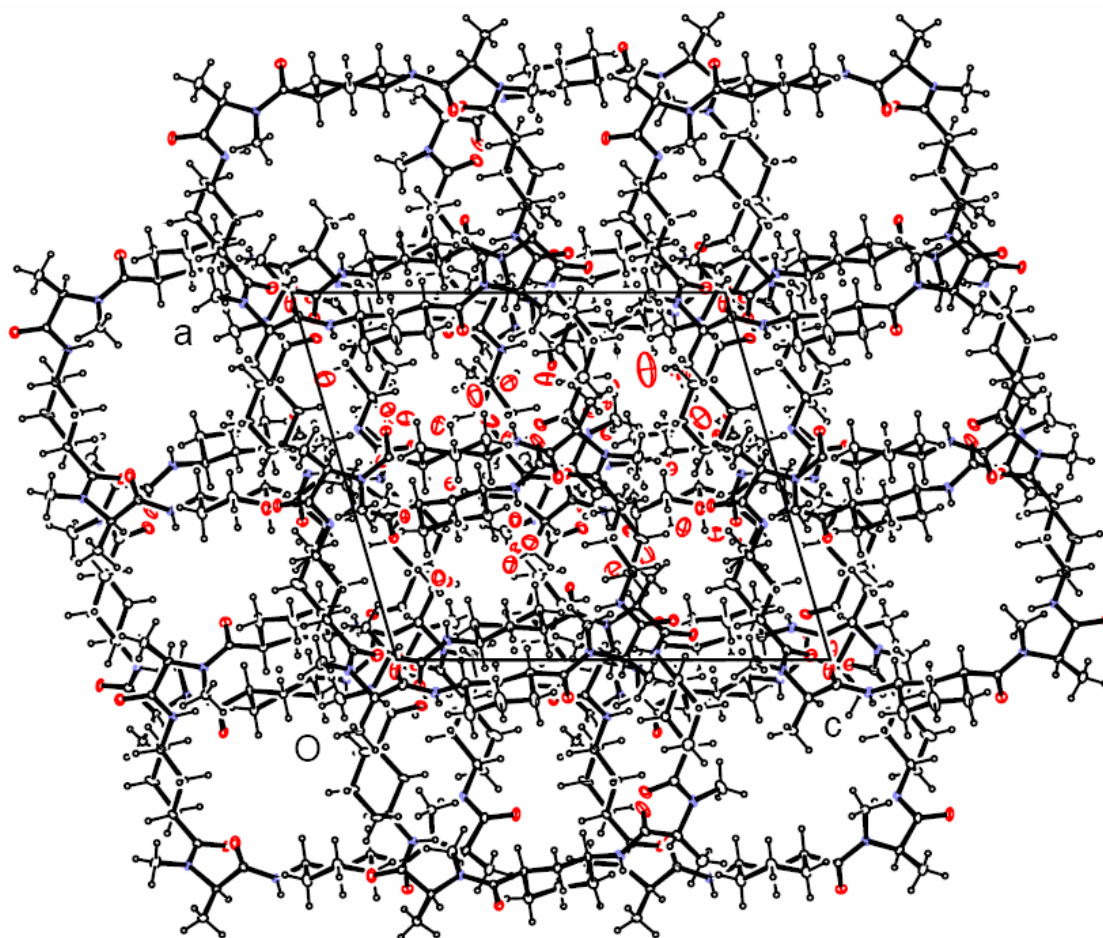
Table 1.

Identification code	jg08ma1n	
Empirical formula	2(C <sub>44</sub> H <sub>72</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> ), 33.5(H <sub>2</sub> O)	
Formula weight	2285.73	
Temperature	110.0(1) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 <sub>1</sub>	
Unit cell dimensions	a = 14.534(2) Å	α = 90°
	b = 27.026(5) Å	β = 105.992(3)°
	c = 16.523(3) Å	γ = 90°
Volume	6239.0(18) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.217 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.098 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	2494	
Crystal size	1.62 x 0.49 x 0.16 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.28 to 26.37°	
Index ranges	-18 ≤ h ≤ 17, -33 ≤ k ≤ 33, 0 ≤ l ≤ 20	
Reflections collected	41390	
Independent reflections	23203 [R(int) = 0.0562]	
Completeness to theta = 26.37°	98.7 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.98 and 0.2833	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	23203 / 1668 / 1403	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.093	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.1143, wR2 = 0.2917	
R indices (all data)	R1 = 0.1579, wR2 = 0.3208	
Largest diff. peak and hole	1.011 and -0.492 e.Å <sup>-3</sup>	

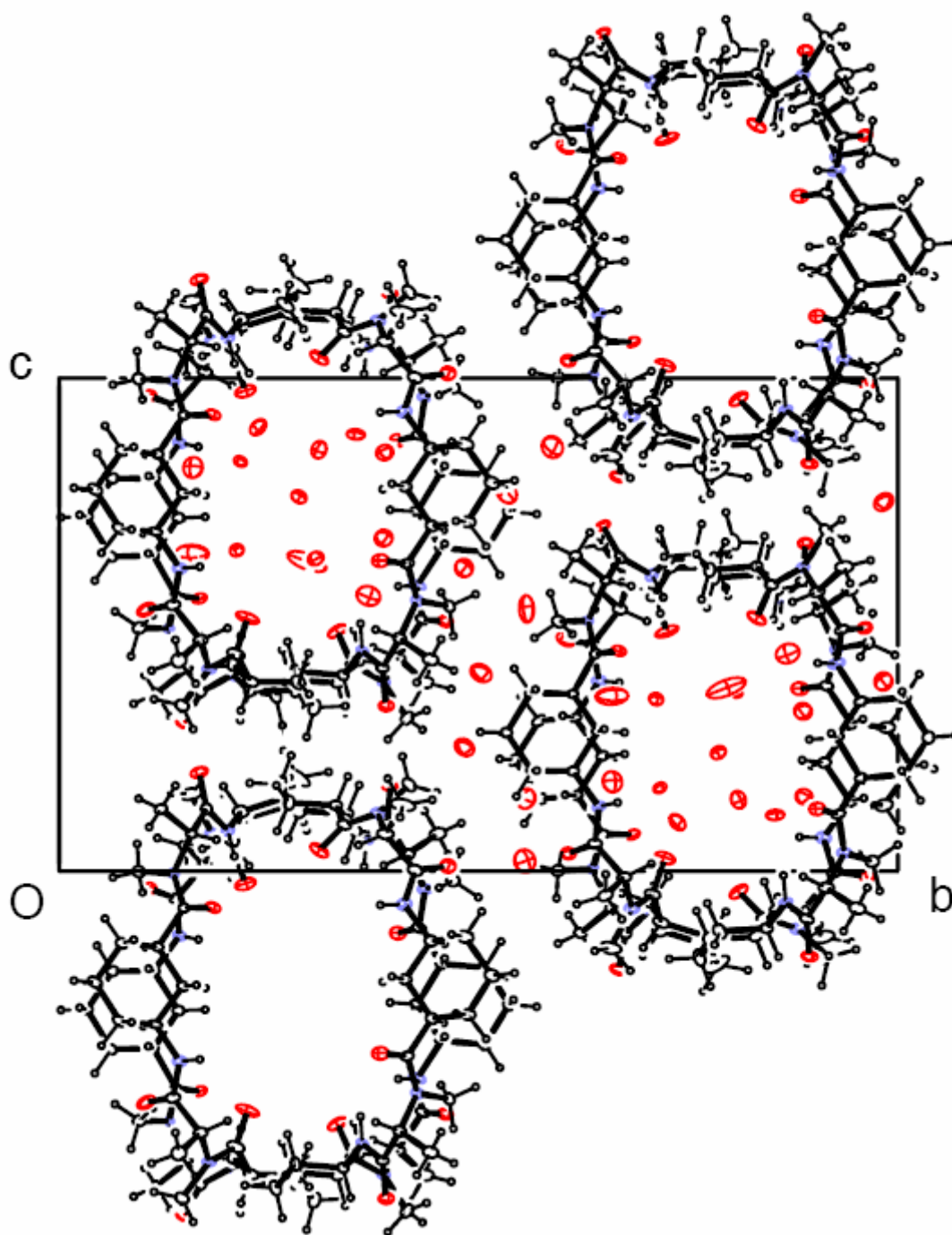
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:



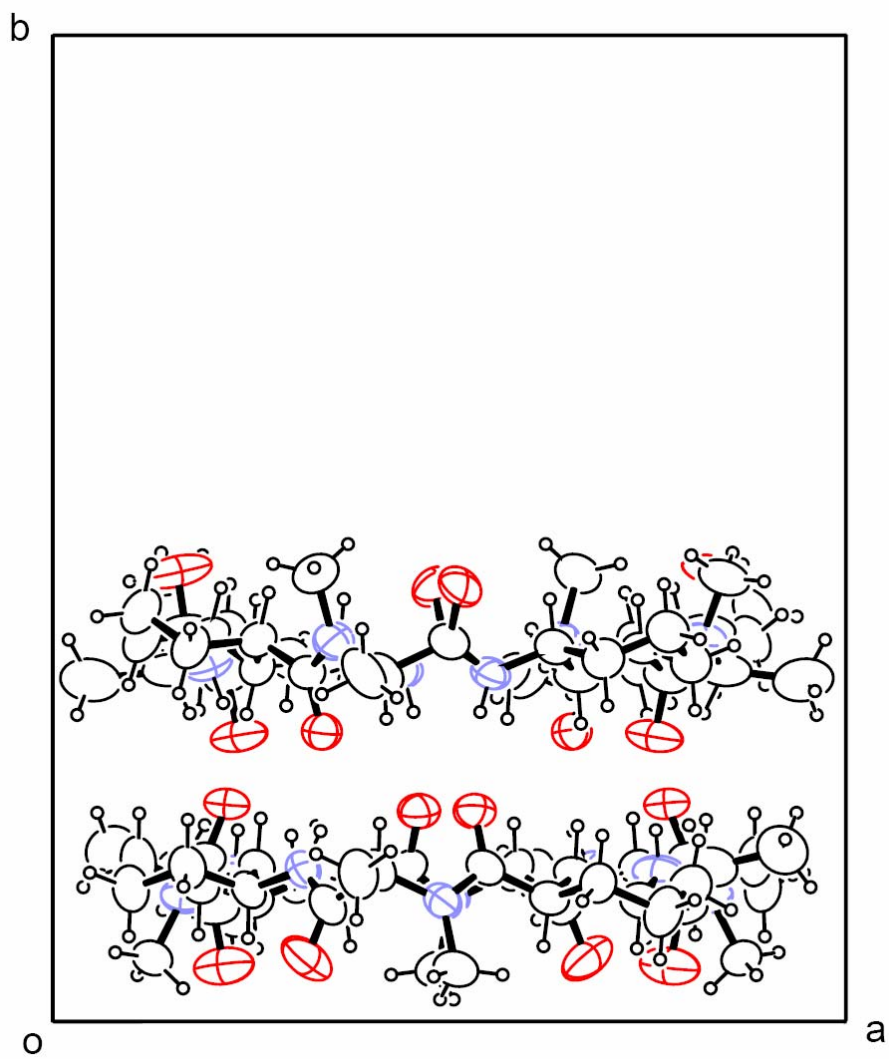
**Cristal del OC-1 (dímero):\***

Table 1.

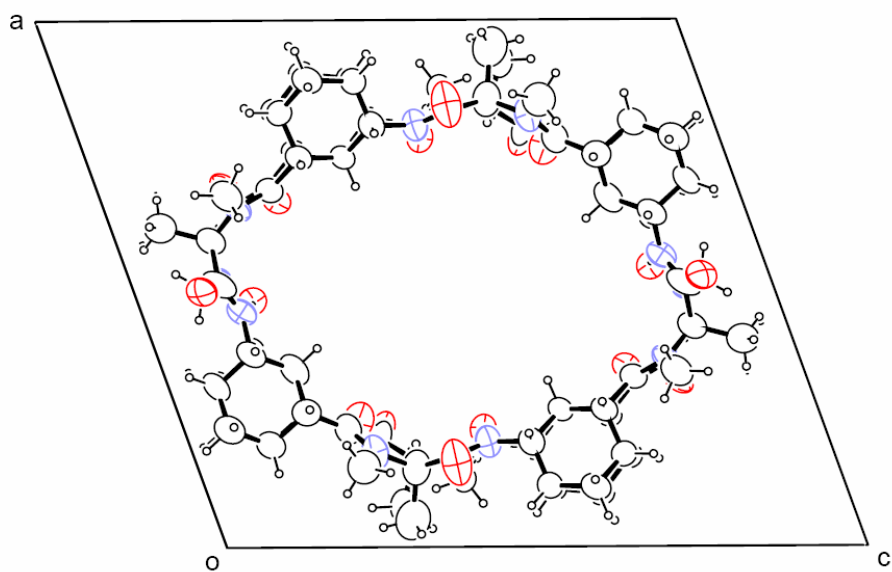
Identification code	2004jg04	
Empirical formula	2(C <sub>44</sub> H <sub>72</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> ), H <sub>2</sub> O	
Formula weight	1700.21	
Temperature	120.0(1) K	
Wavelength	1.5418 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	I 2	
Unit cell dimensions	a = 17.4492(8) Å	α = 90°
	b = 20.3758(11) Å	β = 109.708(5)°
	c = 19.9046(14) Å	γ = 90°
Volume	6662.4(7) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	0.848 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.479 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1844	
Crystal size	0.95 x 0.67 x 0.3 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.92 to 65.38°	
Index ranges	-20 ≤ h ≤ 0, -23 ≤ k ≤ 24, -21 ≤ l ≤ 23	
Reflections collected	46280	
Independent reflections	11266 [R(int) = 0.085]	
Completeness to theta = 65.38°	99.1 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.866 and 0.238	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	11266 / 3 / 559	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.193	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.1078, wR2 = 0.2875	
R indices (all data)	R1 = 0.1194, wR2 = 0.3157	
Absolute structure parameter	0.1(4)	
Extinction coefficient	0.0024(5)	
Largest diff. peak and hole	0.427 and -0.427 e.Å <sup>-3</sup>	

\* [www.ccdc.cam.ac.uk/data](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data) (CCDC-265524)

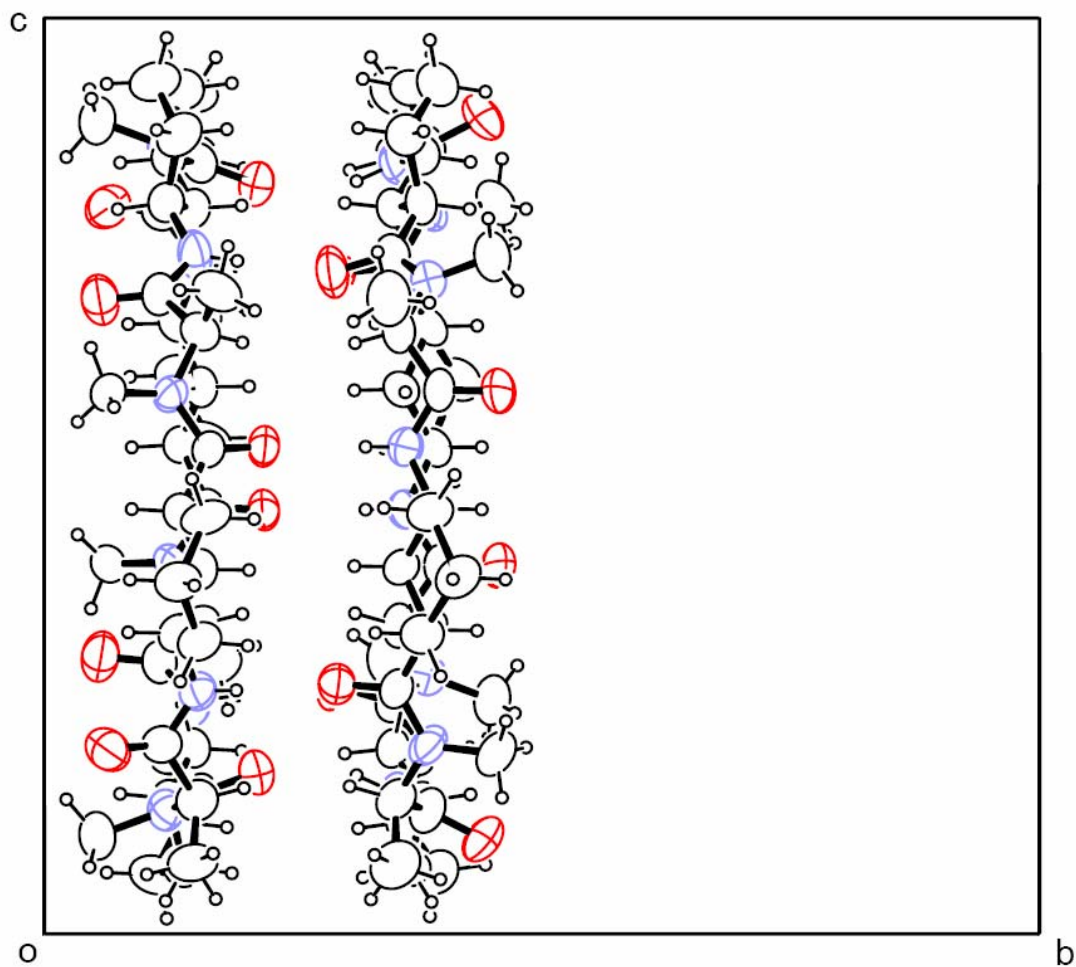
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:



**Cristal del OC-2:\***

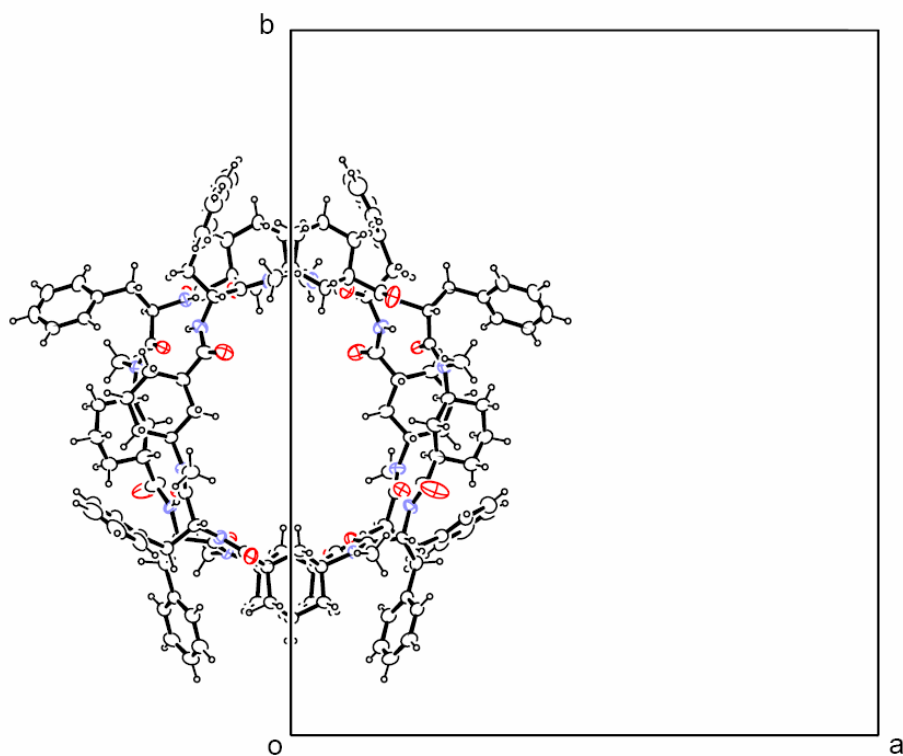
Table 1.

Identification code	2003jg05	
Empirical formula	C <sub>68</sub> H <sub>88</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	
Formula weight	1145.47	
Temperature	100.0(1) K	
Wavelength	1.5418 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C2	
Unit cell dimensions	a = 26.7257(3) Å	α = 90°
	b = 29.7095(4) Å	β = 111.969(1)°
	c = 22.5651(3) Å	γ = 90°
Volume	16615.8(4) Å <sup>3</sup>	
Z	8	
Density (calculated)	0.916 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.481 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	4928	
Crystal size	0.3 x 0.25 x 0.1 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.11 to 60.16°	
Index ranges	-30 ≤ h ≤ 27, -33 ≤ k ≤ 33, 0 ≤ l ≤ 25	
Reflections collected	67045	
Independent reflections	23772 [R(int) = 0.0455]	
Completeness to theta = 60.16°	99.1 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.94848 and 0.80064	
Refinement method	Full-matrix-block least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	23772 / 50 / 1511	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.037	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0717, wR2 = 0.1976	
R indices (all data)	R1 = 0.0765, wR2 = 0.2025	
Absolute structure parameter	0.05(18) [estimated, but not refined]	
Extinction coefficient	0.00080(5)	
Largest diff. peak and hole	0.468 and -0.256 e.Å <sup>-3</sup>	

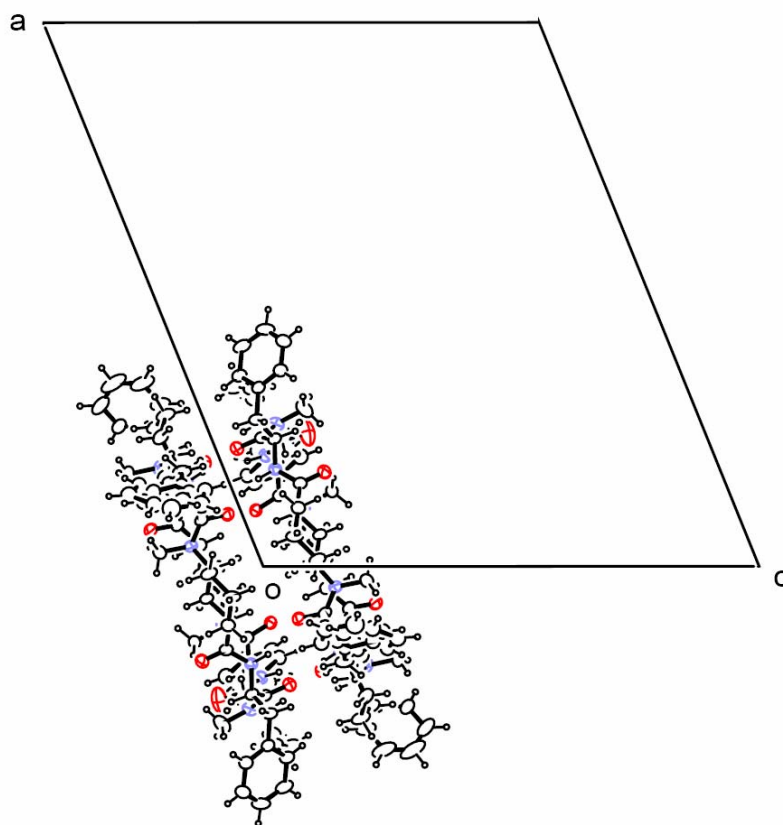
\* [www.ccdc.cam.ac.uk/data](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data) (CCDC-265525)

Dímero 1:

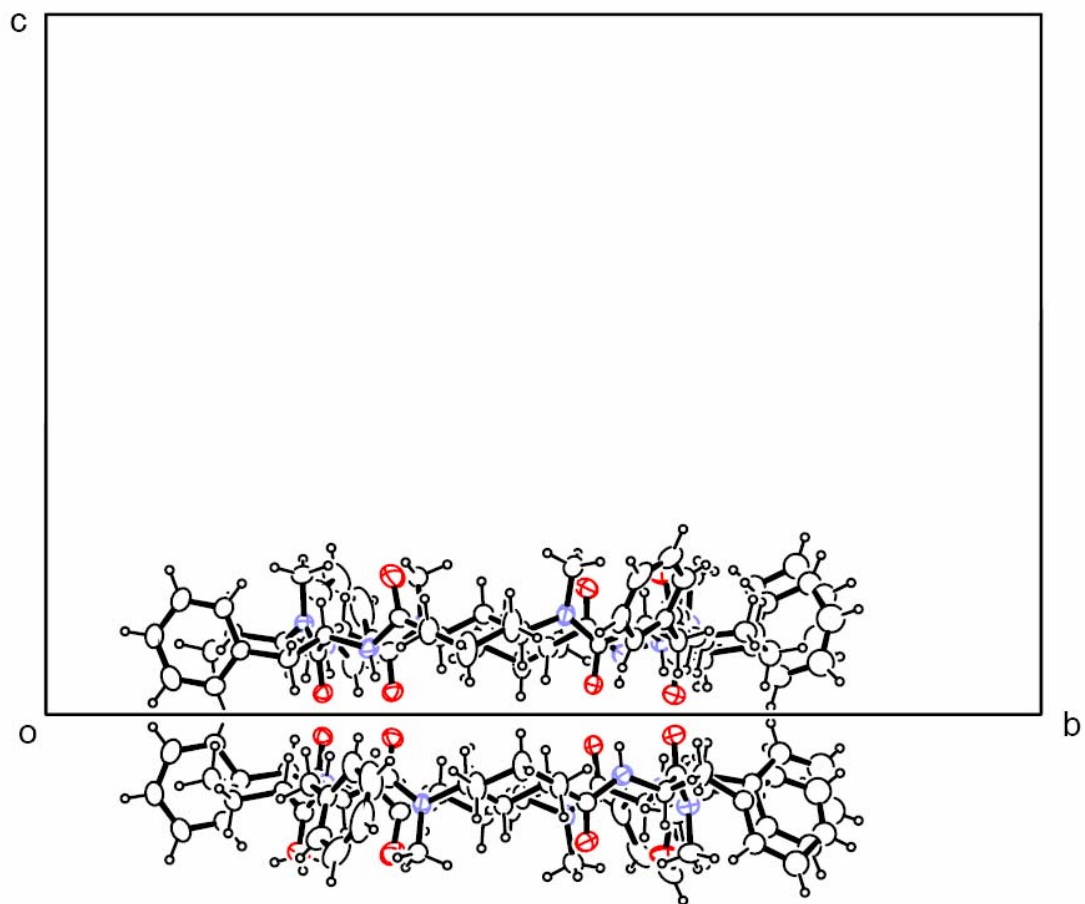
Plano ab:



Plano ac:

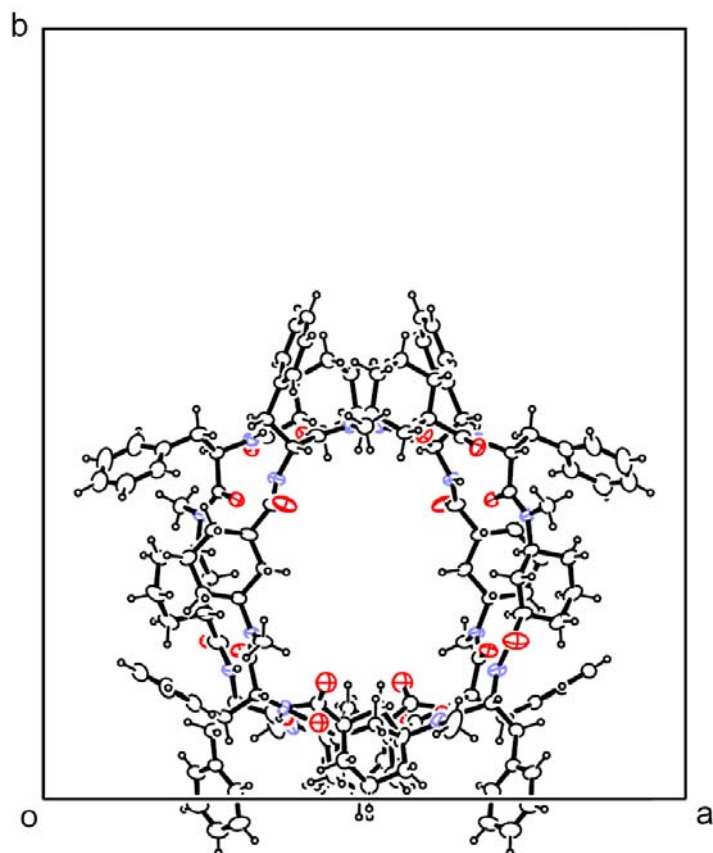


Plano bc:

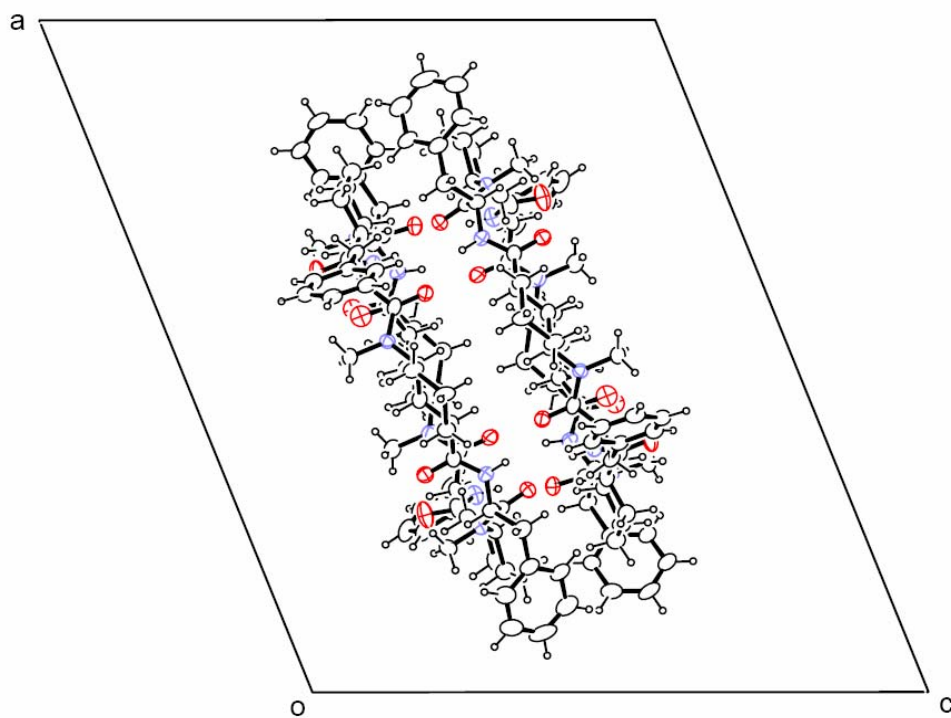


Dímero 2:

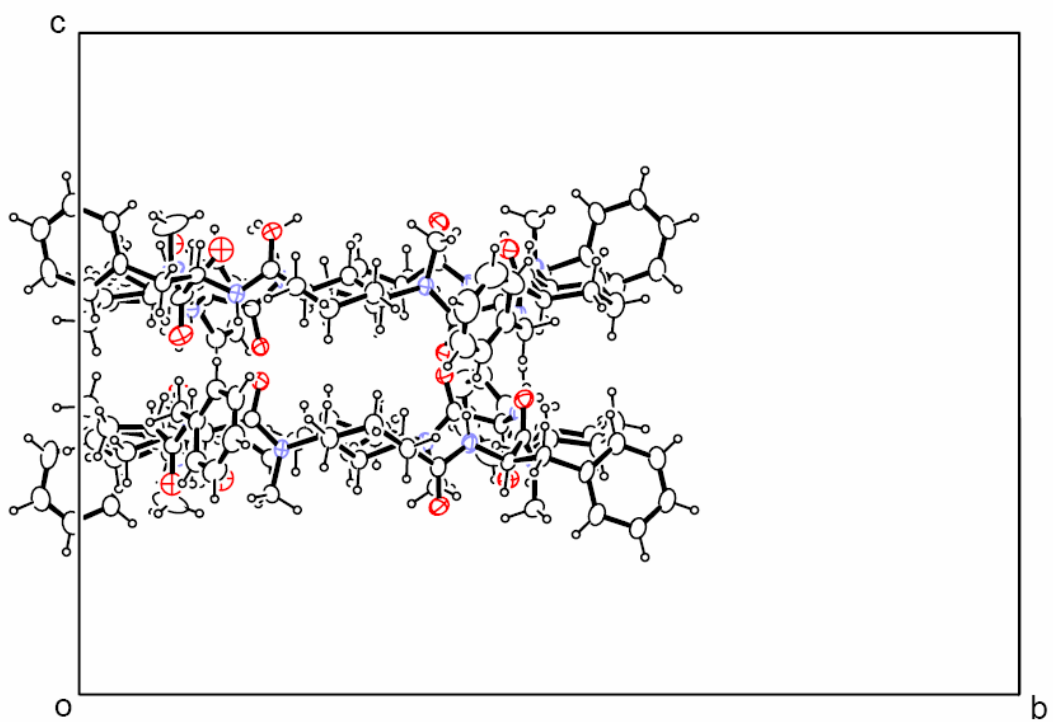
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:



**(3 $\alpha$ ,1 $\gamma$ )-ciclooctapéptidos**

**Obtención de cristales de los péptido OC<sub>3:1-1</sub> y del OC<sub>3:1-6</sub> para análisis por rayos X.** El péptido OC<sub>3:1-1</sub> se cristalizó de 3 mg de péptido purificado por HPLC que se disolvieron en 1mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se equilibró mediante difusión con 5 mL de hexano, resultando cristales incoloros después de 2-4 días. El péptido OC<sub>3:1-6</sub> se cristalizó a partir de 5 mg disueltos en 0,5 mL de MeOH, resultando cristales de forma espontánea después de 2 días.

**Análisis de los datos cristalográficos del péptido OC<sub>3:1-1</sub>.** Los datos fueron tomados en un difractorómetro Bruker a baja temperatura (100 K) en un Bruker Nonius FR591 KappaCCD2000 equipado con un ánodo rotatorio FR591 KappaCCD 2000 (Cu K $\alpha$ ) y Osmic multilayer confocal optics. Todos los cálculos se realizaron en un IBM-compatible PC usando los programas: COLLECT; HKL Denzo and Scalepack; SORTAV y SHELX-97; WinGx; SIR2002; ORTEP3; PLATON (SQUEEZE); y PARST.

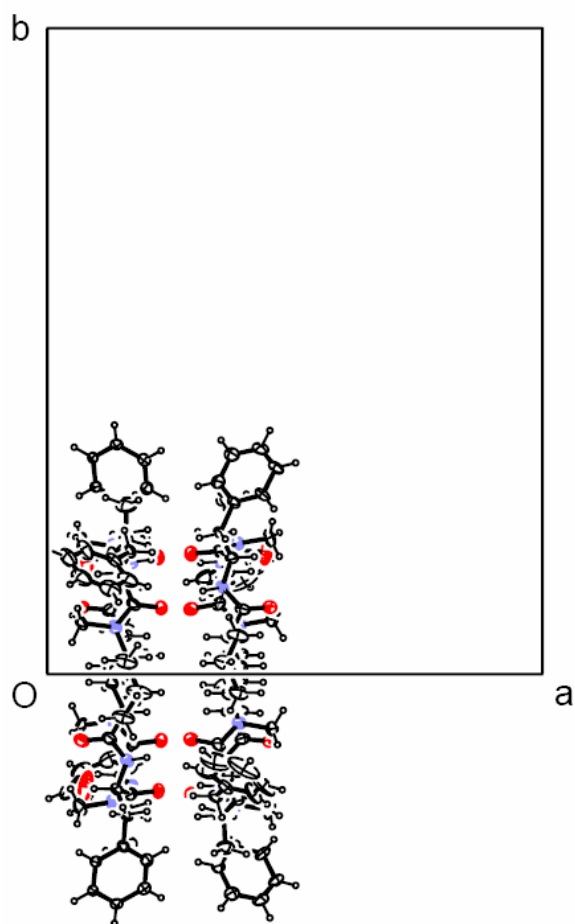
**Análisis de los datos cristalográficos del péptido OC<sub>3:1-6</sub>.** Los datos fueron tomados en un difractorómetro Bruker SMART 1000 a baja temperatura (120 K) equipado con un tubo sellado (Mo K $\alpha$ ) y un monocromador de grafito altamente ordenado. Todos los cálculos se realizaron en un IBM-compatible PC usando los programas: SMART; SAINTT; SADABS y SHELX-97; WinGx; SIR97; ORTEP3; y PARST.

**Cristal del OC<sub>3:1-1</sub>**

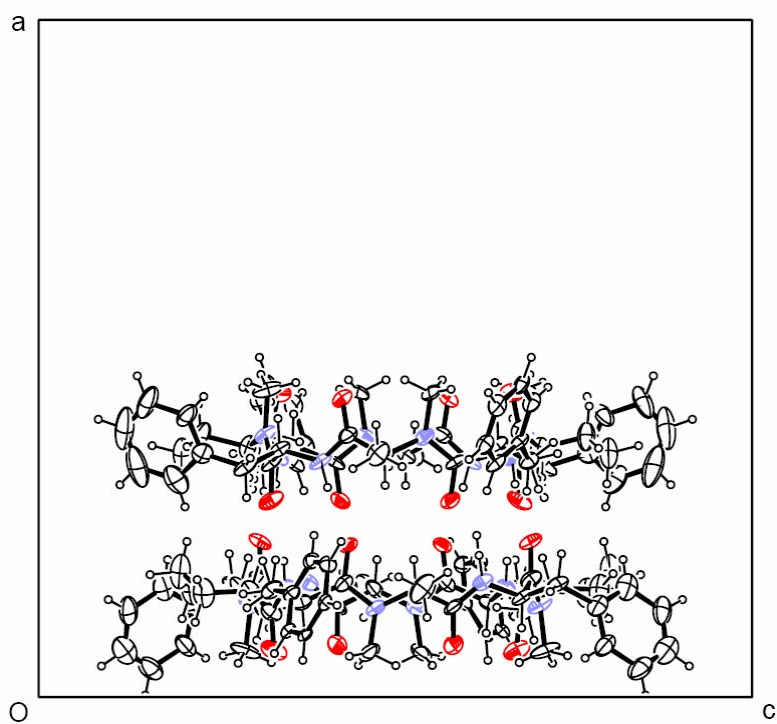
Table 1.

Identification code	2003jg07	
Empirical formula	C <sub>60</sub> H <sub>76</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> , H <sub>2</sub> O	
Formula weight	1055.3	
Temperature	100.0(1) K	
Wavelength	1.5418 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	C 2 2 2 <sub>1</sub>	
Unit cell dimensions	a = 21.9089(18) Å	α = 90°
	b = 28.648(2) Å	β = 90°
	c = 22.991(2) Å	γ = 90°
Volume	14430(2) Å <sup>3</sup>	
Z	8	
Density (calculated)	0.971 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.53 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	4528	
Crystal size	0.17 x 0.1 x 0.08 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.54 to 54.24°	
Index ranges	0 ≤ h ≤ 23, 0 ≤ k ≤ 30, -24 ≤ l ≤ 24	
Reflections collected	69791	
Independent reflections	8800 [R(int) = 0.071]	
Completeness to theta = 54.24°	99.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.958 and 0.363	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	8800 / 1310 / 805	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.761	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.1527, wR2 = 0.3756	
R indices (all data)	R1 = 0.1605, wR2 = 0.3903	
Absolute structure parameter	0.1(5)	
Largest diff. peak and hole	1.31 and -0.501 e.Å <sup>-3</sup>	

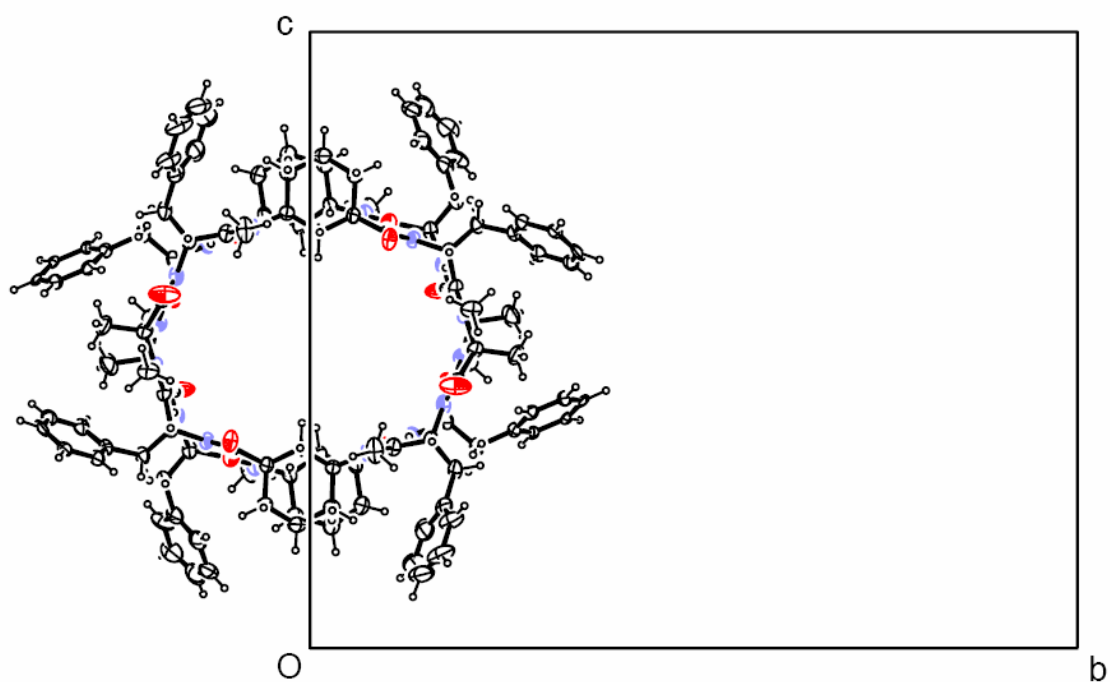
Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:

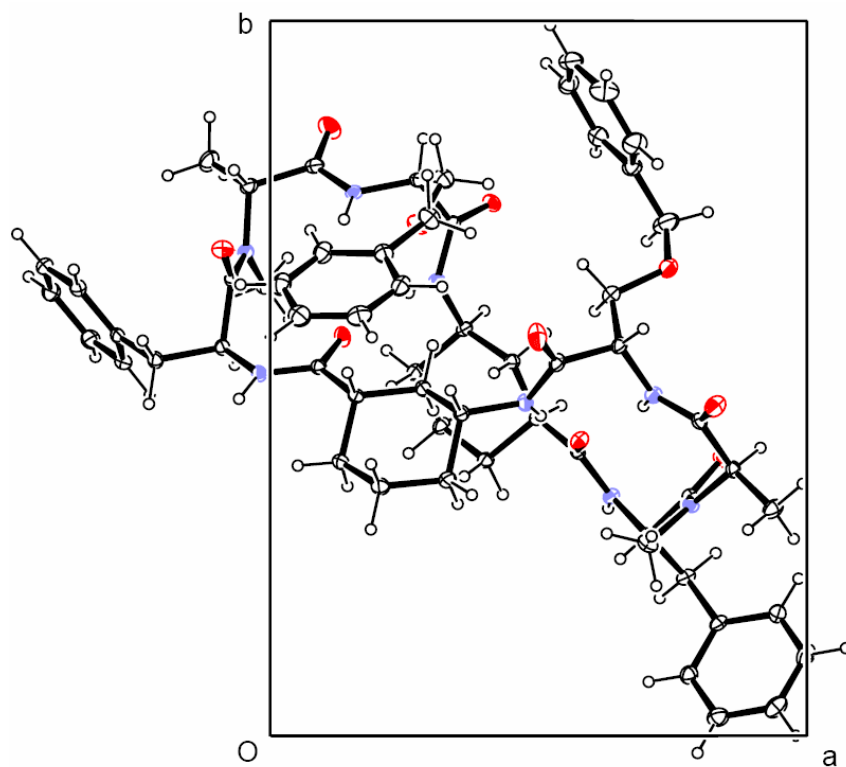


**Cristal del OC<sub>3:1-6</sub>**

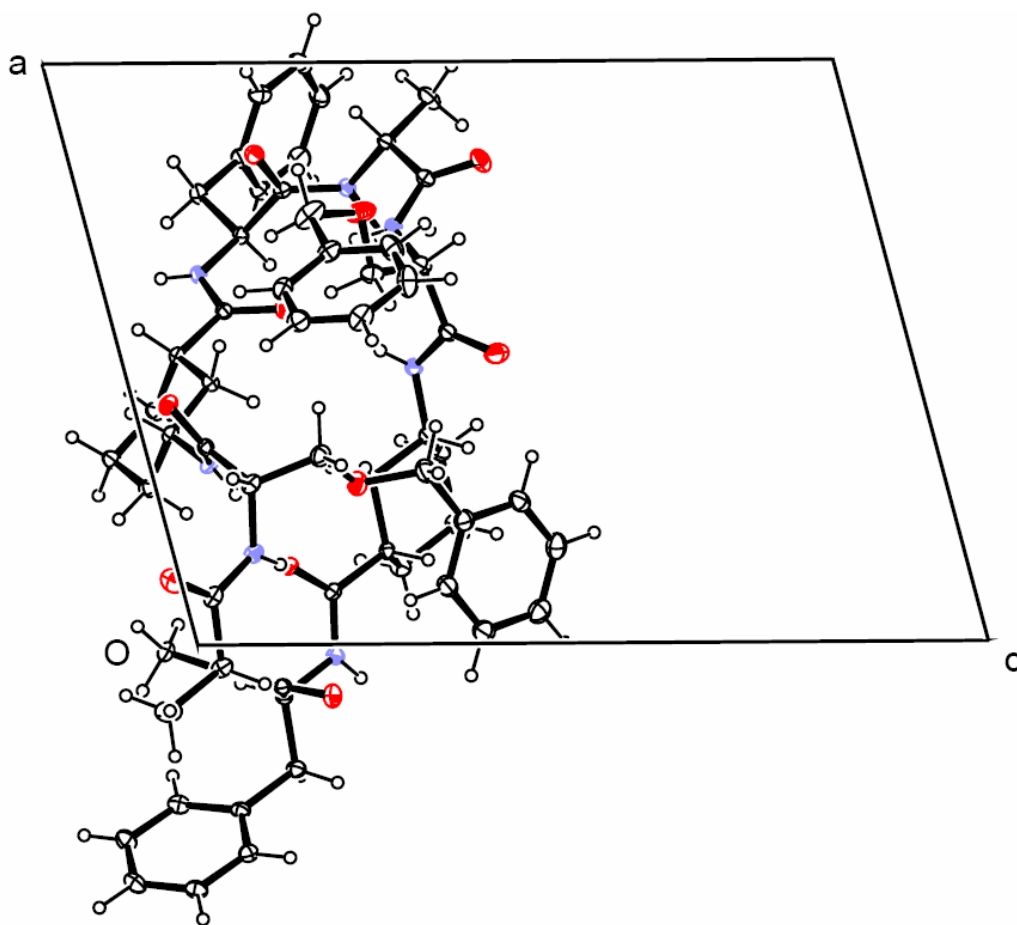
Table 1.

Identification code	jg09ma1n	
Empirical formula	C <sub>60</sub> H <sub>76</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub> 2(CH <sub>3</sub> OH)	
Formula weight	1133.37	
Temperature	120.0(1) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 <sub>1</sub>	
Unit cell dimensions	a = 12.3157(13) Å	α = 90°
	b = 15.8572(17) Å	β = 104.647(2)°
	c = 16.1945(17) Å	γ = 90°
Volume	3059.9(6) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.230 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.086 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1216	
Crystal size	0.77 x 0.22 x 0.12 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.71 to 28.31°	
Index ranges	-16 ≤ h ≤ 15, -20 ≤ k ≤ 20, 0 ≤ l ≤ 21	
Reflections collected	28872	
Independent reflections	13486 [R(int) = 0.0284]	
Completeness to theta = 28.31°	96.1 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.99 and 0.7695	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	13486 / 1 / 769	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.056	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0432, wR2 = 0.1013	
R indices (all data)	R1 = 0.0606, wR2 = 0.1128	
Absolute structure parameter	-0.3(6)	
Largest diff. peak and hole	0.63 and -0.261 e.Å <sup>-3</sup>	

Plano ab:



Plano ac:



Plano bc:

