



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**Escuaramidas inductoras de plegamiento en
compuestos peptidomiméticos: Diseño, síntesis
y estudios conformacionales**

Luis Martínez Crespo



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología
Química**

**Escuaramidas inductoras de plegamiento en
compuestos peptidomiméticos: Diseño, síntesis
y estudios conformacionales**

Luis Martínez Crespo

**Director/a: Antonio Costa Torres
Director/a: M^a del Carmen Rotger Pons**

Doctor/a por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Antonio Costa Torres y Dra. M^a Carmen Rotger Pons, de la Universitat de les Illes Balears,

DECLARAMOS:

Que la tesis doctoral que lleva por título “Escuaramidas inductoras de plegamiento en compuestos peptidomiméticos: Diseño, síntesis y estudios conformacionales”, presentada por Luis Martínez Crespo para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo nuestra supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmamos este documento.

Dr. Antonio Costa Torres

Dra. M^a del Carmen Rotger Pons

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antonio Costa Torres', with a long horizontal stroke at the end.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carmen Rotger Pons', with a long horizontal stroke at the end.

Palma de Mallorca, 06 de Octubre de 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc vull donar les gracies als meus directors de tesis, Carme Rotger i Toni Costa, per la confiança que van depositar en mi. Esper haver complit amb les expectatives. També vull donar les gracies a tot el departament de química i especialment a tots els companys que han passat pel grup de Química Supramolecular de la UIB durant aquests anys: Marty-Lo, Helen, Charly, Xiscake, Alberty-Na, A. SamPeeta, Ruth-enia, Manel, Lucas, Tomeu, Pere, T. Frontera, David, T. Bauzà, Jeroni, Neus, Kenia, Susana, etc. He de dir que se m'ha fet molt còmode treballar amb tots vosaltres. A més, vull donar les gracies als tècnics dels Serveis Científicotècnics, especialment a la Dra. Rosa Gomila i al Dr. Gabriel Martorell per la seva ajuda a l'hora de realitzar e interpretar els espectres de RMN i HRMS.

Hi ha una persona molt especial dins sa meva trajectòria dins sa química. Ella ha estat companya de carrera, companya de grup de investigació i sobretot ha estat, és i serà (esper) una gran amiga. Moltes gracies Carol, ets una gran professional i una tia genial.

Sempre he pensat que no seria qui som sense l'educació rebuda dels meus pares. Ells sempre m'han recolzat en totes les meves decisions i els hi dec tot. Mon pare ha estat per mi un exemple de humilitat i serietat a la feina, i ma mare un exemple de fortalesa i esperit de lluita. Moltes gracies per tot! També he tingut sempre una segona mama, que a més és germana i amiga. Linilla moltes gracies per estimar-me tant (jo a tu també, tot i que mai ho digui).

Si hay que hablar de alguien que se preocupe por mí, esa es mi abuelita. Muchas gracias por tu dedicación extrema a todos nosotros. Además, el resto de mi familia también son gente muy especial para mí, me quieren tod@s un montón y me lo paso pipa con ell@s. No os nombro a todos porque pareceremos los vecinos, pero comer juntos los fines de semana, arreglar el mundo a chillidos, jugar a básquet, a la play, a truc, las cenas de primos, oír lo de "*Luis, córtate el pelo!*", responder a ello ... son cosas que no tienen precio.

També he de donar les gracies a tots els meus amics i amigues. A nivell laboral sou sa part negativa, perquè sempre me liau, però sense vosaltres sa meva vida seria molt avorrida, així que moltes gracies a tots i totes, que ja sabeu qui sou.

I finalment, tot i que no menys important, en Vicentet. Si hi ha una persona realment conscient del que m'ha costat fer aquesta tesis, aquest ets tu, així que moltes gracies per sa teva ajuda i recolzament "incondicionals".

Además, debo agradecer la subvención económica que ha permitido la realización de esta tesis:



Govern de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

A mis Padres y Abuelos

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Synthesis and Conformational Studies of Peptido-Squaramide Foldable Modules: a New Class of Turn-Mimetic Compounds. Luis Martínez, Angel Sampedro, Elena Sanna, Antoni Costa and Carmen Rotger. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2012**, *10*, 1914-1921.

Synthesis and Biological Evaluation of N,N'-Squaramides with High in Vivo Efficacy and Low Toxicity: Toward a Low-Cost Drug against Chagas Disease. Francisco Olmo, Carmen Rotger, Inmaculada Ramírez-Macías, Luis Martínez, Clotilde Marín, Lucas Carreras, Kristína Urbanova, Manel Vega, Guillermo Chaves-Lemaur, Angel Sampedro, María Jose Rosales, Manuel Sánchez-Moreno and Antonio Costa. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, *57*, 987-999.

Hydrogen Bonded Squaramide-Based Foldable Module Induces Both β - and α -Turns in Hairpin Structures of α -Peptides in Water. Luis Martínez, Gabriel Martorell, Angel Sampedro, Pablo Ballester, Antoni Costa and Carmen Rotger. *Organic Letters*, **2015**, *17*, 2980-2983.

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	grado centígrado
Å	angstrom (10^{-10} m)
Δ	incremento
(S)-ABOC	<i>(S)-aminobicyclo[2.2.2]octane-2-carboxylic acid</i>
¹ H	protón
¹³ C	carbono trece
AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxiribonucleico
AGRP	<i>agouti-related protein</i>
Aib	2-aminoisobutyric acid
Ala	alanina
Amp	4-aminoprolina
AMPP	<i>3-(3-aminomethyl)phenylazo]phenylacetic acid</i>
Anh.	anhidro
Arg	arginina
Asn	aspargina
BBS	<i>borate buffered saline</i>
Bn	bencilo
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonil
^t Bu	<i>tert</i> -butil
Bu ₂ P ⁻	anión dibutilfosfato
Bu ₂ P-TBA	sal dibutilfosfato de tetrabutilamonio
Calc.	calculado
Cbz	carbobenciloxi
CDRs	<i>complementarity-determining regions</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPA	<i>propane pipicollic acid</i>
Cy	ciclohexil
DADME	<i>1,2-diamino-1,1-dimethylethane</i>
Dcha.	derecha
DIPEA	diisopropiletilamina
DMF	dimetilformamida

DTG ⁺	catión 1,3-di- <i>o</i> -toluilguanidinio
ECA	enzima convertidora de angiotensina
en	etilendiamina
eq.	equivalentes
ESI	<i>electrospray ionization</i>
ET	módulo escuaramida-N-metiletilendiamina
EtOH	etanol
EtONa	etóxido sódico
Exp.	experimental
F	fenilalanina
Fmoc	fluorenilmetiloxycarbonil
G	glicina
GABA	ácido γ -aminobutírico
Glu	glutamina
Gly	glicina
Har	Homoarginina
HBTU	hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
IC ₅₀	máxima concentración inhibidora promedio
IgG	inmunoglobulina G
Izq.	izquierda
K	lisina
K _{dim}	constante de dimerización
L	leucina
LAD-1	deficiencia de adhesión leucocitaria tipo 1
Leu	leucina
Lys	lisina
Me	metilo
MeOH	metanol
MIDAS	<i>Metal Ion Dependent Adhesion Site</i>
mM	milimolar
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonil
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>

Phe	fenilalanina
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobencenofurano
PPIs	<i>Protein - Protein Interactions</i>
Pro	prolina
Q	glutamina
R	arginina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
sat.	saturado
SI	índice de selectividad
SQ1	módulo escuaramida-ácido γ -aminobutírico
SQ2	módulo escuaramida-(N-metil-1,3-propilendiamina)
SQ3	módulo escuaramida-ácido N-metil- γ -aminobutírico
SQ4	módulo escuaramida-N-metiletildiamina-carbonilo
T	treonina
TG	trombastenia de Glanzman
TBA	tetrabutilamonio
Thr	treonina
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
T3P	anhídrido propilfosfónico
UV	ultravioleta
V	valina
Val	valina
Vis	visible
W	triptófano
Y	tirosina

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral, titulada “Escuaramidas inductoras de plegamiento en compuestos peptidomiméticos: Diseño, síntesis y estudios conformacionales”, se recoge el desarrollo de varios módulos escuaramídicos de plegamiento y su uso en el diseño y síntesis de compuestos peptidomiméticos.

En primer lugar se han estudiado las propiedades conformacionales de tres compuestos escuaramídicos de estructura minimalista que podrían plegarse debido a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. Estos compuestos contienen grupos funcionales que permiten el acoplamiento del módulo de plegamiento a cadenas peptídicas, lo que los hace adecuados para el desarrollo de compuestos peptidomiméticos. La principal diferencia entre los tres compuestos reside en el número de átomos que constituirían el ciclo formado por el enlace de hidrógeno intramolecular. En base a los resultados obtenidos se ha establecido la estructura básica de un nuevo módulo escuaramídico de plegamiento, que se ha utilizado en el diseño y síntesis de un compuesto pseudo-peptídico lineal de mayor tamaño. El estudio conformacional de éste indica que el módulo de plegamiento induce en cierta proporción el plegamiento de la estructura.

En el siguiente paso se han mejorado los módulos de plegamiento escuaramídicos desarrollados previamente, tanto en la primera etapa de este trabajo como en trabajos previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación. Sustituyendo un NH escuaramídico por un grupo N-Me se ha mejorado considerablemente la capacidad de plegamiento de los módulos escuaramídicos. De esta forma se ha demostrado que una unidad escuaramida secundaria - terciaria es más adecuada para inducir el plegamiento de estructuras lineales que una escuaramida disecundaria.

El módulo de giro mejorado ha sido utilizado en el diseño y síntesis de dos estructuras tipo horquilla β , una paralela y otra antiparalela. El estudio de sus propiedades conformacionales muestra que estas estructuras se pliegan de forma más efectiva que el pseudopéptido anterior, lo que confirma la mejora del módulo de giro.

Mediante una nueva modificación de la estructura escuaramídica de plegamiento se ha obtenido una unidad de giro directamente insertable en secuencias peptídicas. Utilizando condiciones habituales de síntesis peptídica en fase sólida se ha podido sintetizar un mimético de horquilla β de estructura más extensa que las anteriores, formado por el módulo de giro y diez residuos de α -aminoácidos. Sus propiedades conformacionales se han estudiado en disolución acuosa y se ha observado la presencia mayoritaria de dos conformeros tipo horquilla β antiparalela que se diferencian principalmente en la zona de giro. En un conformero el giro está formado por un ciclo de diez miembros y en el otro por un ciclo de trece, tal como sucede en los giros β y α naturales, respectivamente.

También se ha insertado el módulo de giro escuaramídico en un precursor lineal para inducir el plegamiento de la estructura y favorecer así una reacción de macrociclación. De esta forma se ha obtenido un mimético RGD macrocíclico.

Además, se han realizado estudios de interacción con diferentes sales. Los resultados obtenidos indican que el plegamiento de estructuras escuaramídicas solo inhibe la interacción de la unidad escuaramída con aniones cuando el confórmero plegado está completamente poblado.

RESUM

En aquesta Tesi Doctoral, titulada, "Esquaramides inductores de plegament en composts peptidomimètics; Disseny, síntesis y estudis conformacionals", es recull el desenvolupament de varis mòduls esquaramídics de plegament y el seu ús en el disseny i síntesi de composts peptidomimètics.

En primer lloc s'han estudiat les propietats conformacionals de tres composts esquaramídics d'estructura minimalista que podrien plegar-se degut a la formació d'un enllaç d'hidrogen intramolecular. Aquests composts contenen grups funcionals que permeten l'acoblament del mòdul de plegament a cadenes peptídiques, el que els fa adequats pel desenvolupament de composts peptidomimètics. La principal diferència entre els tres composts resideix en el nombre d'àtoms que constituïrien el cicle format per l'enllaç d'hidrogen intramolecular. En base als resultats obtinguts s'ha establert l'estructura bàsica d'un nou mòdul esquaramídic de plegament, que s'ha utilitzat en el disseny i síntesi d'un composts pseudopeptídic lineal de major mida. El seu estudi conformacional indica que el mòdul de plegament indueix en certa proporció el plegament de l'estructura.

La següent passa va ser la millora dels mòduls de plegament esquaramídics desenvolupats prèviament, tant a la primera etapa d'aquest treball com a treballs previs duts a terme al nostre grup d'investigació. Substituint un NH esquaramídic per un grup N-Me s'ha millorat considerablement la capacitat de plegament dels mòduls esquaramídics. D'aquesta manera s'ha demostrat que una unitat esquaramida secundària - terciària és més adequada per induir el plegament d'estructures lineals que una esquaramida disecundària.

El mòdul de gir millorat ha estat utilitzat en el disseny i síntesi de dos estructures tipo forquilla β , una paral·lela i una altre antiparal·lela. L'estudi de les seves propietats conformacionals mostra que aquestes estructures s'apleguen de forma més efectiva que el pseudopeptid anterior, confirmant la millora del mòdul anterior.

Mitjançant una nova modificació de l'estructura esquaramídica de plegament s'ha obtingut una unitat de gir directament inserible a seqüències peptídiques. Utilitzant condicions habituals de síntesi peptídica en fase sòlida s'ha pogut sintetitzar un mimètic de forquilla β d'estructura més extensa que les anteriors, format pel mòdul de gir y deu residus de α -aminoàcids. Les seves propietats conformacionals s'han estudiat en dissolució aquosa y s'ha observat la presència majoritària de dos confòrmers tipus forquilla β antiparal·lela que es diferencien principalment en la zona de gir. A un dels confòrmers el gir està forma per un cicle de deu membres i a l'altre per un cicle de tretze, tal com es dona en els girs β y α naturals, respectivament.

També s'ha inserit el mòdul de gir esquaramídic a un precursor lineal per induir-ne el plegament y afavorir així una reacció de macrociclació. D'aquesta manera s'ha obtingut un mimètic RGD macrocíclic.

A més, s'han realitzat estudis d'interacció amb diferents sals. Els resultats obtinguts indiquen que el plegament d'estructures esquaramídiques només inhibeix la interacció de la unitat esquaramida amb anions quant el confórmer plegat està completament poblat.

SUMMARY

This Doctoral Thesis, entitled “Squaramides as folding promoters in peptidomimetic compounds: Design, synthesis and conformational studies”, describes the development of squaramidic folding modules and their use in the design and synthesis of peptidomimetic compounds.

Firstly, three minimalist squaramidic compounds have been synthesized and their conformational properties have been evaluated. These compounds contain functional groups that could promote folding induced by the formation of an intramolecular hydrogen bond in peptomimetic compounds, since these functional groups allow the coupling of the foldable module to peptidic chains. These three compounds differ in the chain length that link the hydrogen bond donor and acceptor groups. The conformational study has permitted to determine the best foldable module and it has been inserted in a linear peptomimetic structure to evaluate its ability to induce the folding of the structure, behaving like a β -turn mimetic. However, the outcome of this design proved to be flexible and gives a mixture of folded and non-folded conformers in solution.

In order to improve the the folding capabilities of the squaramidic modules developed at the beginning of this thesis, as well as those developed before in our research group, we proposed a new design. In it, one of the squaramidic NH groups has been substituted by an N-Me group and the folding ability of the modules has been considerably increased. These results have demonstrated that a secondary - tertiary squaramide is better than a dissecondary squaramide to induce the folding of a linear structure.

The new turn module has been used in the design and synthesis of a parallel and an antiparallel β -hairpin like structures. Their conformational properties have been evaluated, confirming that the turn module has been improved and the folded structures are the main conformers in solution.

The developed structure of the turn module formed by a secondary - tertiary squaramide unit has been conveniently modified again to be able to insert it in a peptide sequence. A larger β -hairpin mimetic, formed by ten amino acids and the folding module, has been prepared by a conventional solid-phase procedure. This new peptidomimetic compound has been studied in aqueous solution and two main species have been observed, being both antiparallel β -hairpin structures. One of the conformers is the structure proposed in the design, with the turn module mimicking a natural β -turn. In the other conformer the turn region is analogous to a natural α -turn, constituted by a thirteen membered cycle.

This third β -turn module has also been inserted in a linear precursor to induce the folding of the structure, favoring by this way a macrocyclization reaction. A macrocyclic RGD mimetic has been obtained using this strategy.

In addition, interaction studies with different salts have been performed. These studies reveal that the interaction between the squaramide of a foldable module and an anion is inhibited only when the folded conformation is completely populated.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Química supramolecular	3
1.2. Peptidomiméticos	5
1.2.1. Características generales	5
1.2.2. Estructuras secundarias de proteínas	7
1.2.3. Clasificación de los peptidomiméticos	13
1.2.4. Compuestos miméticos de giro β	15
1.2.4.1. Miméticos de giro β internos	16
1.2.4.2. Miméticos de giro β externos	18
1.2.5. Estructuras tipo horquilla β	20
1.2.6. Análogos RGD	25
1.2.6.1. Integrinas	25
1.2.6.2. Miméticos de la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD)	27
1.2.7. Macro ciclación de estructuras peptídicas y pseudopeptídicas	31
1.3. Escuaramidas	35
1.3.1. Características generales	35
1.3.2. Autoensamblaje y propiedades conformacionales	37
1.3.3. Interacción con aniones y cationes	39
1.3.4. Escuaramidas como agentes terapéuticos	43
2. Objetivos	47
3. Escuaramidas disecundarias como miméticos de giro β	51
3.1. Modelos de giro minimalistas	53
3.1.1. Diseño	53
3.1.2. Síntesis de las escuaramidas 1 , 2 y 3	55
3.1.3. Estudio conformacional de los modelos de giro 1 , 2 y 3 mediante RMN	57
3.1.3.1. Modelo 1 (-sq-NH _b -CH ₂ -CO-)	59
3.1.3.2. Modelo 2 (-sq-NH _b -(CH ₂) ₂ -CO-)	64
3.1.3.3. Modelo 3 (-sq-NH _b -(CH ₂) ₃ -CO-)	66
3.2. Mimético de horquilla β con el módulo SQ1	77
3.2.1. Diseño	77
3.2.2. Síntesis del pseudopéptido 8	78
3.2.3. Estudio conformacional del modelo de horquilla 8	79

4. Escuaramidas secundaria - terciarias como módulos de plegamiento mejorados	85
4.1. Modelos de giro minimalistas	87
4.1.1. Diseño.....	87
4.1.2. Síntesis de las escuaramidas 15, 16, 17 y 19	89
4.1.3. Estudio conformacional de los modelos de giro 15, 16, 17 y 19	91
4.1.3.1. Modelo 15 : escuaramida terciaria + amina terciaria.....	91
4.1.3.2. Modelo 17 : escuaramida terciaria + amina secundaria	98
4.1.3.3. Modelo 16 : escuaramida terciaria + C=O	102
4.1.3.4. Modelo de giro α 19	108
4.2. Actividad antiparasitaria de la aminoescuaramida 15	114
4.3. Estudio de interacción con aniones fosfato y cationes guanidinio.....	116
4.3.1. Diseño.....	116
4.3.2. Síntesis de las escuaramidas 28 y 29	117
4.3.3. Interacción con anión fosfato.....	118
4.3.4. Interacción con catión guanidinio	124
4.4. Miméticos de horquilla β con el módulo SQ3.....	128
4.4.1. Diseño.....	128
4.4.2. Síntesis de los pseudopéptidos 31 y 32	129
4.4.3. Estudio conformacional de los modelos de horquilla 31 y 32	131
4.4.3.1. Mimético de horquilla β antiparalela 31	131
4.4.3.2. Mimético de horquilla β paralela 32	142
5. Inserción de unidades de giro escuaramídicas en secuencias peptídicas.	147
5.1. Modelo de giro 42	149
5.1.1. Diseño.....	149
5.1.2. Síntesis de la escuaramida 42	151
5.1.3. Estudio conformacional del modelo de giro 42	151
5.2. Mimético de horquilla β 46	159
5.2.1. Diseño.....	159
5.2.2. Síntesis del pseudopéptido 46	159
5.2.3. Estudio conformacional del modelo de horquilla 46	160
5.3. Mimético de horquilla β plegable en disolución acuosa 50	166
5.3.1. Diseño.....	166
5.3.2. Síntesis del pseudopéptido 50	167
5.3.3. Estudio conformacional del mimético de horquilla 50	168

5.4. SQ4 como módulo preorganizador en síntesis de macrociclos: Mimético RGD macrocíclico 53	180
5.4.1. Diseño.....	180
5.4.2. Síntesis del macrociclo pseudopeptídico 53	182
6. Conclusiones	187
7. Parte experimental	191
7.1. Métodos generales.....	193
7.2. Experimentos de RMN en función de la concentración	194
7.3. Experimentos de RMN en función de la temperatura	194
7.4. Determinación de la constante de asociación entre el anión dibutilfosfato (Bu ₂ P ⁻) y las escuaramidas 14 , 15 y 29 mediante RMN	195
7.5. Determinación de la constante de asociación entre el catión 1,3-di-o-toluilguanidinio (DTG ⁺) y las escuaramidas 14 , 15 , 28 y 29 mediante RMN.....	195
7.6. Síntesis	196
Anexo	221

1. Introducción

1.1. Química Supramolecular

El estudio de la Química Supramolecular¹ fue impulsado por Jean-Marie Lehn en 1969 a partir de sus trabajos pioneros sobre la idea del reconocimiento molecular. La trascendencia de dichos estudios le condujo a la obtención del Premio Nobel en 1987 junto con Donald J. Cram y Charles J. Pedersen. Recientemente Jean-Marie Lehn ha anunciado que “La Química Supramolecular apunta al desarrollo de sistemas químicos de elevada complejidad, a partir de componentes que interactúan entre sí mediante fuerzas intermoleculares no covalentes”,² de forma que muchas disciplinas de la química confluyen en este campo, entre las que se puede incluir la Bioinorgánica, la Bioquímica, la Ciencia de Materiales o la Nanotecnología.

Las principales interacciones no covalentes en las que se fundamenta la Química Supramolecular son enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, coordinación de metales, fuerzas Van der Waals, fuerzas hidrofóbicas, interacciones π - π , interacciones ion- π , etc. Se diferencian entre ellas por factores como la direccionalidad o la magnitud de la energía de la interacción de enlace, entre otros.

Dos conceptos básicos, fundamentales dentro de la química supramolecular, son los de *reconocimiento molecular*³ y de *autoensamblaje*.⁴

El reconocimiento molecular se basa en la interacción atractiva no covalente entre una molécula anfitriona o receptor (*host*) y una molécula huésped o sustrato (*guest*), complementaria a la anterior, para dar lugar a un complejo receptor - sustrato.

El término autoensamblaje hace referencia a la asociación no covalente de dos o más moléculas de un mismo producto en condiciones de equilibrio para formar estructuras moleculares de orden superior. En este proceso se da una complementariedad funcional y estructural de los diversos componentes a través de múltiples interacciones no covalentes. Una complementariedad de este tipo también puede darse entre distintas regiones estructurales de una misma molécula para inducir una conformación concreta de la molécula.

La principal motivación para el estudio de las interacciones supramoleculares ha sido siempre el hecho de que existen gran cantidad de procesos químicos en los sistemas biológicos basados en este tipo de interacciones. Algunos de esos procesos son la acción enzimática, fenómenos de transporte a través de membranas, la estructura tridimensional que adopta el ADN, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas o las interacciones proteína-proteína. En todos estos procesos también se debe dar una complementariedad química y estructural entre las

¹ (a) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*, VCH: Weinheim, Germany, **1995**. (b) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons: West Sussex, UK, **2000**.

² Lehn, J.-M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4763.

³ Gellman, S. H. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1231.

⁴ Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Seto, C. T. *Science* **1991**, *254*, 1312.

distintas regiones de interacción, un factor imprescindible dentro de las interacciones supramoleculares.

1.2. Peptidomiméticos

1.2.1. Características Generales

Las proteínas constituyen la mayor parte de la materia de un organismo y son elementos con funciones esenciales para la vida. Sus funciones más importantes son:⁵

- reconocimiento receptor-ligando. Los receptores y sus ligandos biológicos están implicados en multitud de procesos celulares, y la mayoría de éstos son estructuras proteicas.
- Catálisis. La mayoría de enzimas que catalizan reacciones químicas en los organismos son proteínas.
- regulación. Cambios conformacionales de ciertas proteínas pueden servir para controlar procesos celulares.
- función estructural. Las proteínas estructurales se autoensamblan para generar algunos de los mayores elementos estructurales de los sistemas vivos.

Además, se conocen multitud de péptidos, de menor tamaño que las proteínas, biológicamente activos, que actúan como neurotransmisores, neuromoduladores, inhibidores de enzimas o sustratos, promotores o inhibidores del crecimiento y hormonas. Estos compuestos intervienen en los procesos de comunicación entre células, uniéndose a sus receptores específicos en las membranas celulares. De esta forma intervienen en el control de multitud de funciones vitales tales como metabolismo, defensa del sistema inmunitario, digestión, respiración, sensibilidad al dolor, reproducción y niveles electrolíticos. Todo esto hace que estos péptidos tengan un gran interés a nivel terapéutico.^{6,7}

Existen una serie de factores responsables de que los péptidos biológicamente activos, como los indicados anteriormente, tengan un uso muy limitado como fármacos. Entre dichos factores cabe citar que los péptidos presentan una baja estabilidad metabólica frente al proceso de proteólisis en el tracto intestinal y en la sangre. Por otra parte, son difíciles de absorber después de su ingestión oral debido a su elevada masa molecular y a la falta de transportadores específicos, por lo que son rápidamente excretados a través del hígado y los riñones. Además algunos péptidos causan efectos indeseados al interaccionar con varios receptores a partir de distintas conformaciones del péptido. Finalmente cabe citar que la síntesis de péptidos a gran escala normalmente es laboriosa.

Para solventar dichos inconvenientes y disponer así de productos con mejores propiedades farmacológicas se han desarrollado toda una serie de compuestos conocidos como peptidomiméticos.^{8,9,10,11} Un peptidomimético es un compuesto que

⁵ Petsko, G. A.; Ringe, D. *Protein Structure and Function*, New Science Press, **2004**.

⁶ Kieber-Emmons, T; Murali, R; Greene, Ml. *Current opinion in biotechnology* **1997**, 435.

⁷ Antosova, Z; Mackova, M; Kral, V; Macek, T. *Trends in biotechnology* **2009**, 27, 628.

⁸ Pelay-Gimeno, M; Glas, A; Koch, O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, 54, 8896.

⁹ Avan, I; Hall, CD; Katritzky, AR. *Chemical Society Reviews* **2014**, 43, 3575.

¹⁰ Vagner, J; Qu, H; Hruby, VJ. *Current opinion in chemical biology* **2008**, 12, 292.

puede imitar o bloquear el efecto biológico de un péptido o proteína a nivel del receptor. Cuando el peptidomimético imita el efecto del péptido biológicamente activo, se le llama agonista, y cuando lo inhibe, se le llama antagonista. Cabe indicar que desde el punto de vista farmacológico y médico son igualmente interesantes los dos efectos.

En cuanto a las propiedades farmacológicas, un peptidomimético debe cumplir los siguientes requisitos: ser estable a nivel metabólico, tener buena biodisponibilidad, mostrar elevada afinidad y selectividad por el receptor, y mostrar los mínimos efectos secundarios.

La mayoría de los receptores y enzimas biológicos con los que interaccionan las proteínas y péptidos naturales para cumplir su función biológica son también proteínas.^{12,13} Aunque la interacción entre dos proteínas (PPI) puede implicar una gran cantidad de residuos de aminoácidos en la zona de contacto, solo son las interacciones en pequeñas regiones (normalmente entre 4 y 8 residuos) las que resultan clave para la formación del complejo receptor-substrato, Figura 1.

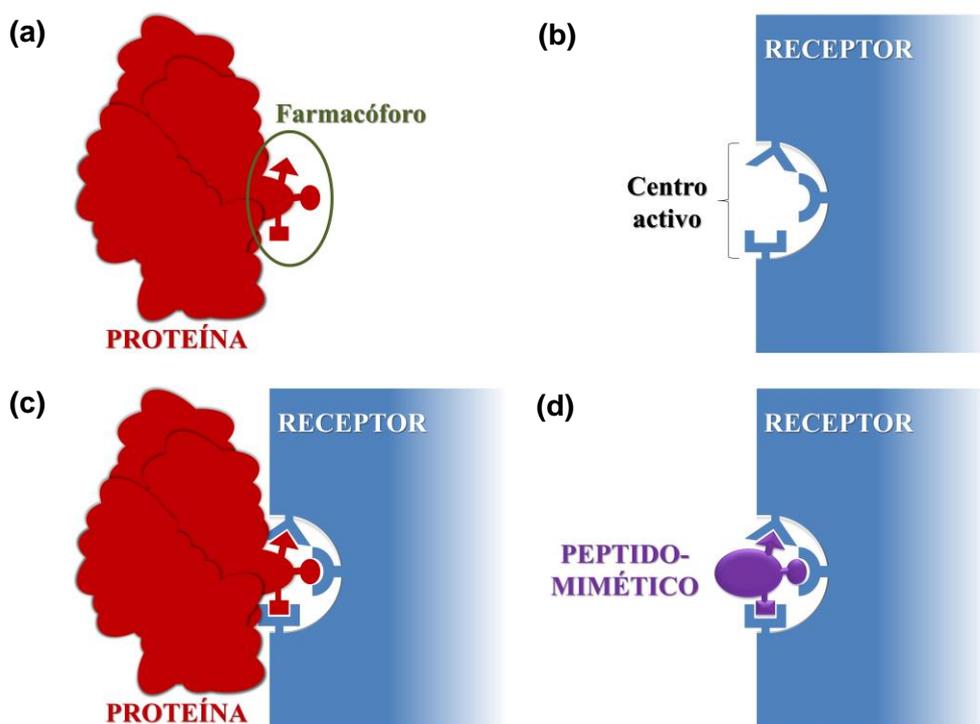


Figura 1. (a) Proteína natural capaz de interaccionar con un receptor concreto mediante una secuencia farmacofórica. (b) Receptor con capacidad para interaccionar con uno o varios ligandos mediante su centro activo. (c) Complejo proteína-receptor. (d) Complejo peptidomimético-receptor.

La principal estrategia para el diseño de fármacos peptidomiméticos se basa en identificar las pequeñas secuencias de aminoácidos de una proteína que interaccionan con el centro activo (farmacóforo) y diseñar moléculas que puedan imitar su patrón de interacción, Figura 1 (a). La principal ventaja de utilizar moléculas pequeñas como

¹¹ Giannis A., Kolter T.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1244.

¹² Milroy, L.-G.; Grossmann, T.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4695.

¹³ Watkins, A. M.; Arora, P. S. *European journal of medicinal chemistry* **2015**, 94, 480.

fármacos es que su síntesis es más sencilla y económica. Además, al eliminarse gran parte de la estructura peptídica, en los peptidomiméticos se eliminan porciones estructurales que pueden interactuar con otros receptores, evitando efectos secundarios en el organismo. Asimismo, se evitan fragmentos estructurales que pueden actuar como centro de anclaje a las proteasas, que son las enzimas encargadas de la degradación de péptidos y proteínas mediante el proceso de proteólisis.

El patrón de interacción de la secuencia farmacofórica en una proteína estará definido tanto por las características electrostáticas de los grupos funcionales que dan la interacción como por la disposición tridimensional de éstos, la cual depende directamente de la estructura secundaria de la secuencia, Figura 1 (c). Por lo tanto, para interactuar con un receptor concreto una molécula pequeña deberá tener grupos funcionales que imiten electrostáticamente a los centros de interacción con el receptor, pudiendo ser o no los mismos que en la secuencia natural, y una conformación adecuadamente restringida, Figura 1 (d). Por su parte, los péptidos biológicamente activos, cuando están disueltos en un medio fisiológico acuoso se encuentran en una multitud de conformaciones en equilibrio dinámico, por lo que una molécula con conformación restringida mostrará mayor afinidad por el receptor, debido a que el proceso de interacción ligando - receptor conllevará un menor descenso de la entropía del sistema. Además, esa molécula también será más selectiva al evitarse la presencia de otras conformaciones del péptido que puedan interactuar con otros receptores.

Otra aplicación de los peptidomiméticos, además de su uso como fármacos, es la posibilidad de explorar la relación estructura - actividad de diferentes receptores y ligandos, mediante la evaluación de la afinidad por un receptor concreto de peptidomiméticos con una secuencia farmacofórica en distintas conformaciones restringidas.

1.2.2. Estructuras secundarias de proteínas

La arquitectura de las proteínas se basa en una compleja mezcla de fragmentos estructurales tridimensionales que consisten en un número reducido de estructuras secundarias, encontrándose entre las más importantes las hélices α , los giros β , las láminas β y los bucles. Los fragmentos estructurales activos de las proteínas (farmacóforos) suelen ser regiones de pequeño tamaño que se encuentran en su superficie y que están formando algún tipo de estructura secundaria como las nombradas anteriormente.^{5,14,15,16}

Los giros se pueden definir como regiones en una estructura proteica donde la cadena polipeptídica cambia su dirección 180° , y es bastante común encontrarlos en la superficie de las proteínas. Los giros en proteínas están clasificados en función del

¹⁴ Crisma, M.; Formaggio, F.; Moretto, A.; Toniolo, C. *Peptide Science* **2006**, *84*, 3.

¹⁵ Rotondi, KS; Gierasch, LM. *Peptide Science* **2006**, *84*, 13.

¹⁶ Toniolo, C; Benedetti, E. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **1980**, *9:1*, 1.

número de residuos de aminoácidos que contienen. Los giros más comunes en las proteínas son los giros β . En la formación de este tipo de giros están implicados cuatro residuos de α -aminoácidos que forman un enlace de hidrógeno intramolecular entre el residuo i y el residuo $i+3$ y dando como resultado un ciclo de diez miembros, Figura 2. Si se establece un enlace de hidrógeno entre los residuos i y $i+2$ se forma un ciclo de siete miembros denominado giro γ , y si se forma un enlace de hidrógeno entre los residuos i y $i+4$, se forma un ciclo de trece miembros conocido como giro α . La repetición sucesiva de giros α , también conocido como giro β I G1, da lugar a una hélice α .

En 1968, Venkatachalam realizó una clasificación conformacional de los giros β en función de los valores de los ángulos diedros ϕ_2 , ψ_2 , ϕ_3 y ψ_3 .¹⁷ En la Figura 2, cada ángulo diedro se representa como la rotación del enlace correspondiente. Los valores que puede adquirir cada ángulo diedro, en grados ($^\circ$), son los siguientes: ϕ_2 (-60, 60), ψ_2 (30, -30, 120, -120), ϕ_3 (90, -90, 80, -80, 60, -60), ψ_3 (0, 30, -30). Diferentes combinaciones de estos valores para cada ángulo diedro dan como resultado cada uno de los seis tipos de giros β presentes en las proteínas y péptidos naturales (tipo I, I', II, II', III y VI).

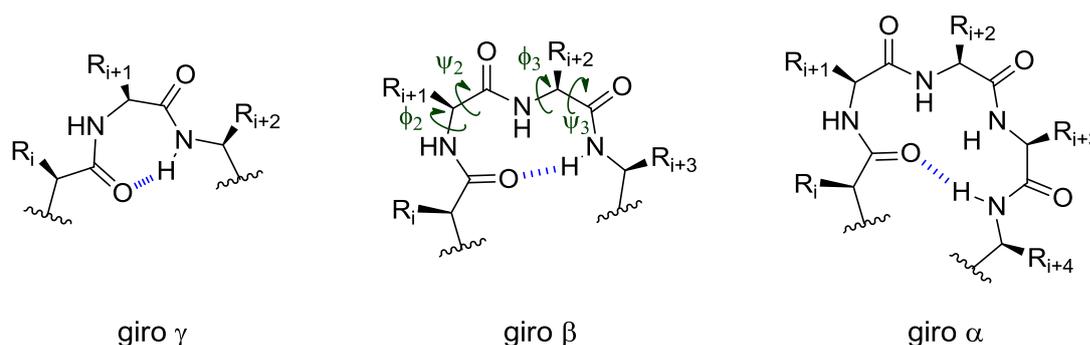


Figura 2. Diagrama esquemático de giros naturales.

Una cadena β es una cadena peptídica extendida que contiene todos los enlaces peptídicos en un mismo plano, de forma que los grupos N-H y C=O de la cadena principal están orientados en dirección aproximadamente perpendicular a la dirección de la cadena, Figura 3.

Si varias cadenas β se acoplan mediante la formación de enlaces de hidrógeno intercadena, a partir de los grupos N-H (dador de enlace de hidrógeno) y C=O (aceptor de enlace de hidrógeno), se forman las láminas β . En función del sentido N-terminal \rightarrow C-terminal relativo de las cadenas, pueden existir láminas β antiparalelas o paralelas. En las láminas antiparalelas, al pasar de una cadena β a la siguiente se invierte el sentido y los enlaces de hidrógeno que las unen son colineales, Figura 4, mientras que en las láminas paralelas todas las cadenas tienen la misma dirección y se da una desviación en la colinealidad de los enlaces de hidrógeno, Figura 4. Normalmente las láminas β antiparalelas se encuentran en una secuencia polipeptídica continua, de forma que cada cadena está directamente unida a la siguiente mediante un giro β ; mientras que las láminas β paralelas se dan entre cadenas β alejadas en la estructura

¹⁷ Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, 6, 1425.

primaria de la proteína (secuencia). Las cadenas laterales de los residuos forman ángulos de 90° con el plano de la lámina, tal como se representa para una cadena β en la Figura 3 (b).

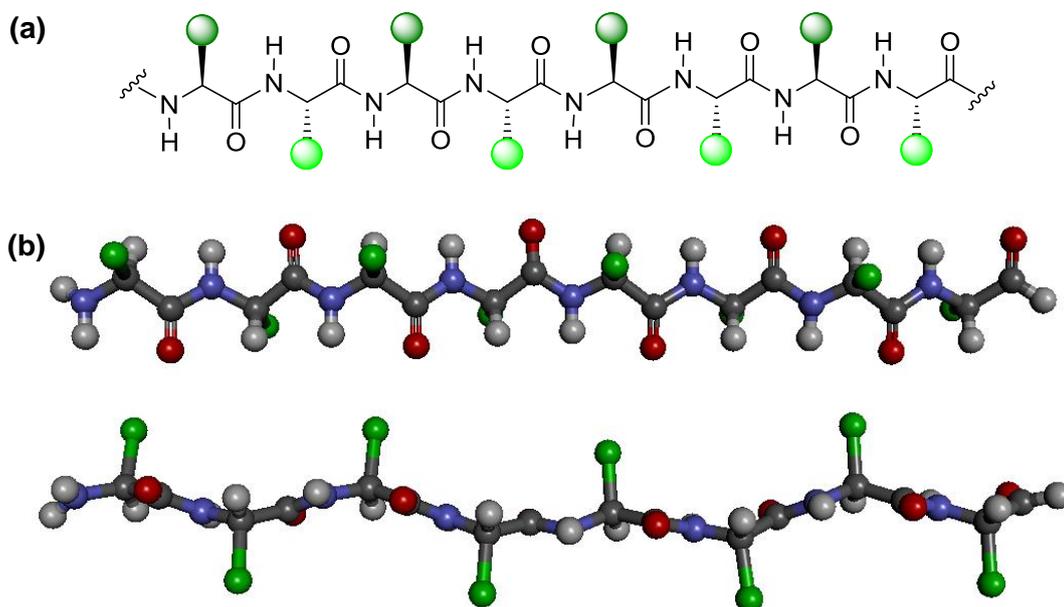


Figura 3. Cadena β . **(a)** Representación 2D. En forma de esfera verde se representan los sustituyentes que sobresalen hacia afuera (●) o hacia adentro (●) del plano que contiene el esqueleto de la cadenas β . **(b)** Representación 3D vista desde dos ángulos distintos.

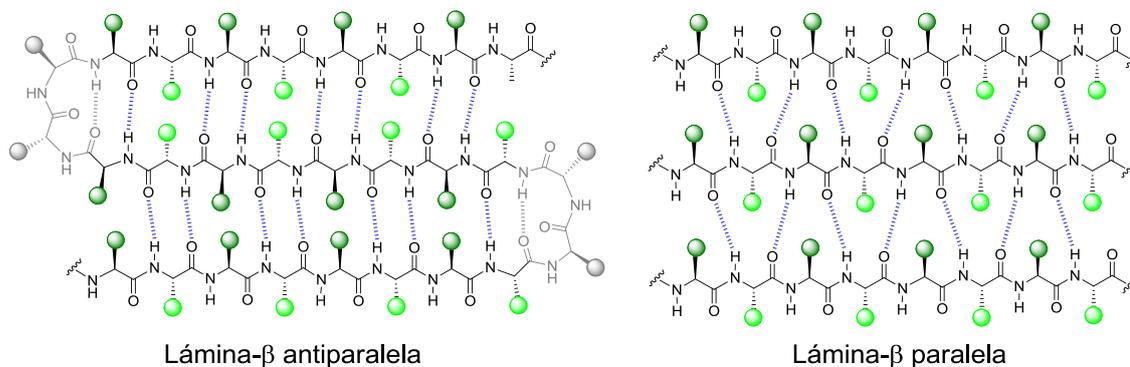


Figura 4. Láminas β paralela y antiparalela. En forma de esfera verde se representan los sustituyentes que sobresalen hacia afuera (●) o hacia adentro (●) del plano que contiene el esqueleto de las cadenas β y en gris se marcan los giros β .

La forma más sencilla de lámina β antiparalela es una horquilla β , la cual está constituida por un giro β unido a dos cadenas β antiparalelas que interaccionan entre sí por enlaces de hidrógeno, análogamente a como sucede en las láminas β , Figura 5.

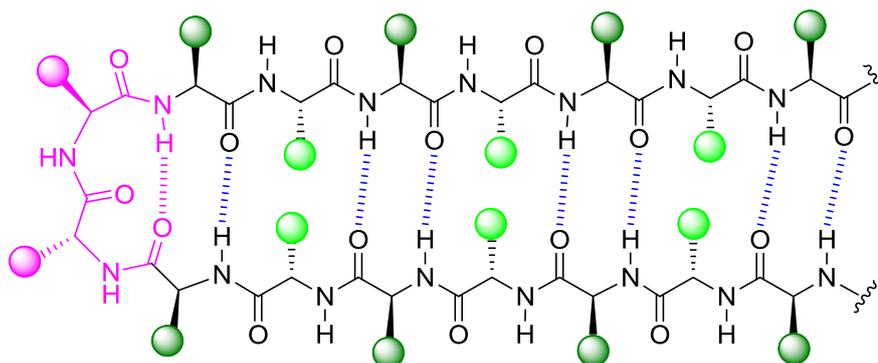


Figura 5. Horquilla β . En forma de esfera verde se representan los sustituyentes que sobresalen hacia afuera (●) o hacia adentro (◐) del plano que contiene el esqueleto de las cadenas β y en rosa se marca el giro β .

En los casos en que la región activa de una proteína o péptido natural tiene la conformación de giro, suelen ser las cadenas laterales de los residuos de aminoácido que forman el giro las que interactúan con el receptor, siendo así tan importante para la interacción proteína - receptor la secuencia de aminoácidos que forman el giro como la conformación de giro requerida.^{18,19} En estos casos el tipo de giro juega un papel crucial, ya que éste predeterminará la orientación de las cadenas laterales.

Como ejemplos de ello cabe destacar la Angiotensina II y las proteínas Agouti y AGRP (*Agouti-related protein*).

La Angiotensina II es una hormona que estimula la sed, el aumento de la presión sanguínea y la secreción de aldosterona. Estudios en disolución de este octapéptido indican que probablemente adopta conformaciones de giro para enlazarse a ciertos receptores, Figura 6.²⁰

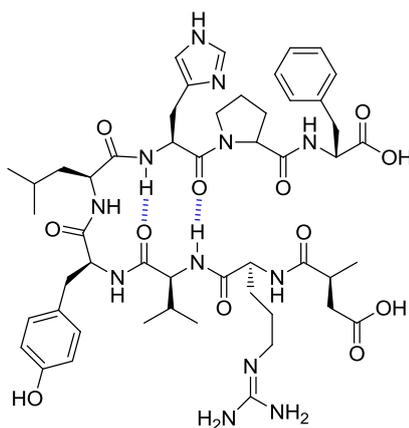


Figura 6. Angiotensina II en la conformación de giro β al enlazarse a un anticuerpo monoclonal.

Las proteínas Agouti y AGRP son dos proteínas de 131 y 132 residuos de aminoácidos, respectivamente, que actúan como antagonistas endógenos en los

¹⁸ Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 793.

¹⁹ Brakch, N.; El Abida, B.; Rholam, M. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, **2006**, *6*, 163.

²⁰ Spyroulias, G. A.; Nikolakopoulou, P.; Tzakos, A.; Gerothanassis, I. P.; Magafa, V.; Manessi-Zoupa, E.; Cordopatis, P. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2163.

receptores de melanocortina (MCR) inhibiendo de forma competitiva la acción de una hormona estimulante de melanocitos. La proteína Agouti se halla frecuentemente en el pelo y está relacionada con la pigmentación. La AGRP está relacionada con la conducta alimentaria y el metabolismo, así como con la obesidad y la diabetes. Ambas proteínas muestran elevada potencia como antagonistas de melanocortina para los receptores MC1-R y MC4-R. Se ha demostrado que los fragmentos C-terminales ricos en cisteínas de ambas proteínas (Agouti 48 residuos; AGRP 46 residuos) muestran la misma actividad que las proteínas completas.²¹ Mediante resonancia magnética nuclear (RMN) se ha determinado la estructura del dominio C-terminal para el fragmento de 46 residuos de AGRP, Figura 7.²² Los primeros 34 residuos del fragmento peptídico forman una estructura tipo lámina β constituida por tres cadenas β , formando las dos últimas cadenas una estructura tipo horquilla β . Es en el giro de esta horquilla donde se encuentran tres residuos de aminoácido esenciales para la interacción con el receptor,²³ Arg¹¹¹-Phe¹¹²-Phe¹¹³ en la proteína original.

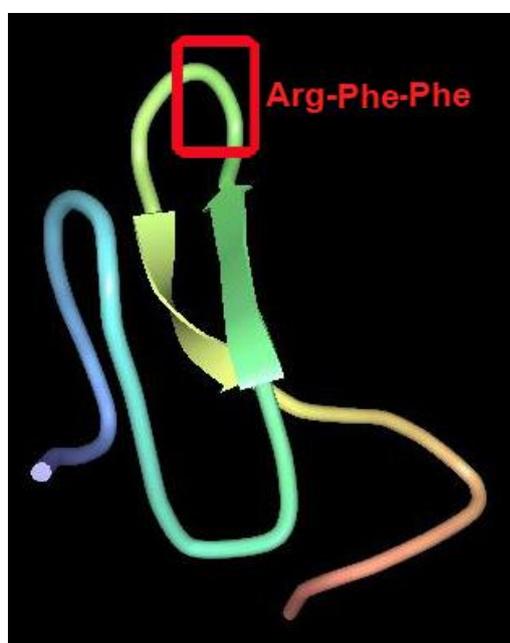


Figura 7. Representación a nivel de estructura secundaria del fragmento C-terminal de 46 residuos de aminoácidos de la AGRP. Se remarca la zona de giro β en que se encuentran tres residuos de aminoácidos claves en la interacción con los receptores, Arg¹¹¹-Phe¹¹²-Phe¹¹³.

Al igual que los giros β , el resto de estructuras β descritas, es decir cadenas, horquillas y láminas, también pueden estar implicadas en procesos biológicos de reconocimiento molecular. Para ello son esenciales los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los residuos que las constituyen. En las zonas intermedias de las láminas β , si la secuencia de aminoácidos es la adecuada, se pueden crear superficies polares y no polares que podrán influir tanto en la estructura tridimensional de la proteína como en la interacción con otras moléculas. Además, las cadenas β de

²¹ Dinulescu, D. M.; Cone, R. D.; *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 6695.

²² AGRP (Accession No. P42127; pdb 1hyk).

²³ Tota, M. R.; Smith, T. S.; Mao, C.; MacNeil, T.; Mosley, R. T.; Van der Ploeg, L. H.; Fong, T. M. *Biochemistry* **1999**, 38, 897.

los extremos de una lámina β , presentes en una horquilla β o aisladas²⁴ tienen grupos N-H y C=O libres que pueden interactuar por enlace de hidrógeno con otras moléculas u otras regiones de la proteína.

Estas estructuras de mayor extensión que los giros pueden encontrarse tanto en sustratos como en receptores peptídicos, así como en las regiones de unión entre las subunidades que forman un complejo proteico. Un claro ejemplo se observa en el proceso de ensamblaje del P-pilus de una bacteria, concretamente en la unión de las subunidades PapD y PapK de una chaperona. La estructura cristalina del complejo PapD - PapK indica que en la unión entre estas dos proteínas la región nombrada como G1 de PapK adopta una conformación de lámina β y se une a los extremos de dos láminas β de PapD, de forma que la región de unión es una lámina β con cadenas de ambas subunidades, Figura 8.²⁵

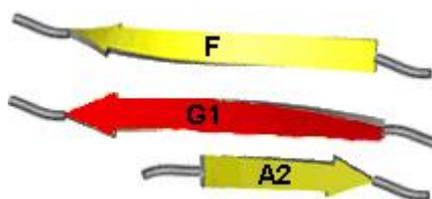


Figura 8. Representación de la zona de unión entre las subunidades PapK y PapD de una chaperona en la estructura cristalina del complejo PapK - PapD. Se indica la nomenclatura asignada por los autores a las tres cadenas β implicadas.²⁵

Un comportamiento similar al anterior se observa en los anticuerpos de la familia IgG (Inmunoglobulinas G), que son proteínas cuya estructura consta de seis regiones conocidas como CDRs (*complementarity-determining regions*). Aunque la secuencia de aminoácidos en esas regiones puede ser variable, adoptan estructuras secundarias definidas, conocidas como conformaciones permitidas o canónicas. El análisis de estructuras cristalinas ha demostrado que cuatro de las seis CDRs nombradas adoptan estructura de horquilla β .²⁶

Las estructuras peptídicas con un reducido número de aminoácidos existen en disolución como una multitud de confórmeros en equilibrio y difícilmente adoptan una única estructura secundaria determinada. Sin embargo, existe una gran cantidad de péptidos cíclicos naturales con interesantes actividades biológicas, debido a su reducida libertad conformacional que les permite adoptar de forma efectiva la conformación activa.²⁷ Es muy común que la estructura macrocíclica implique la fijación de un confórmero tipo horquilla β , como sucede por ejemplo en el caso de la Gramicidina S y la Tirocidina A, ambos componentes del antibiótico Tirotricina, Figura 9. Parece ser que estos compuestos interactúan con la membrana celular causando la muerte de las células, por lo que ambos muestran potente actividad antimicrobiana, aunque también son elevadamente tóxicos en eritrocitos, hígado y riñón. Otro ejemplo es uno de los miembros más pequeños de la familia BB (Bowman-Birk) de inhibidores de serina proteasa, que adopta una estructura tipo horquilla β en la estructura

²⁴ Es poco común la existencia de cadenas β aisladas en las proteínas y péptidos naturales.

²⁵ Sauer, FG; Fütterer, K; Pinkner, JS; Dodson, KW. *Science* **1999**, 285, 1058.

²⁶ Chothia, C.; Gelfand, I.; Kister, A. *Journal of molecular biology* **1998**, 278 (2), 457.

²⁷ Fairlie, D. P.; Abbenante, G.; March, D. R. *Curr. Med. Chem.* **1995**, 2, 654.

cristalina de este compuesto enlazado a tripsina, Figura 9.²⁸ También pueden encontrarse en la naturaleza macrociclos peptídicos con una estructura tipo giro β estabilizada. Esto se observa por ejemplo en “proteínas con actividad redox” como glutaredoxin, donde la formación de un enlace disulfuro entre dos cisteínas genera un macrociclo tetrapeptídico que constituye la región activa, Figura 9.²⁹

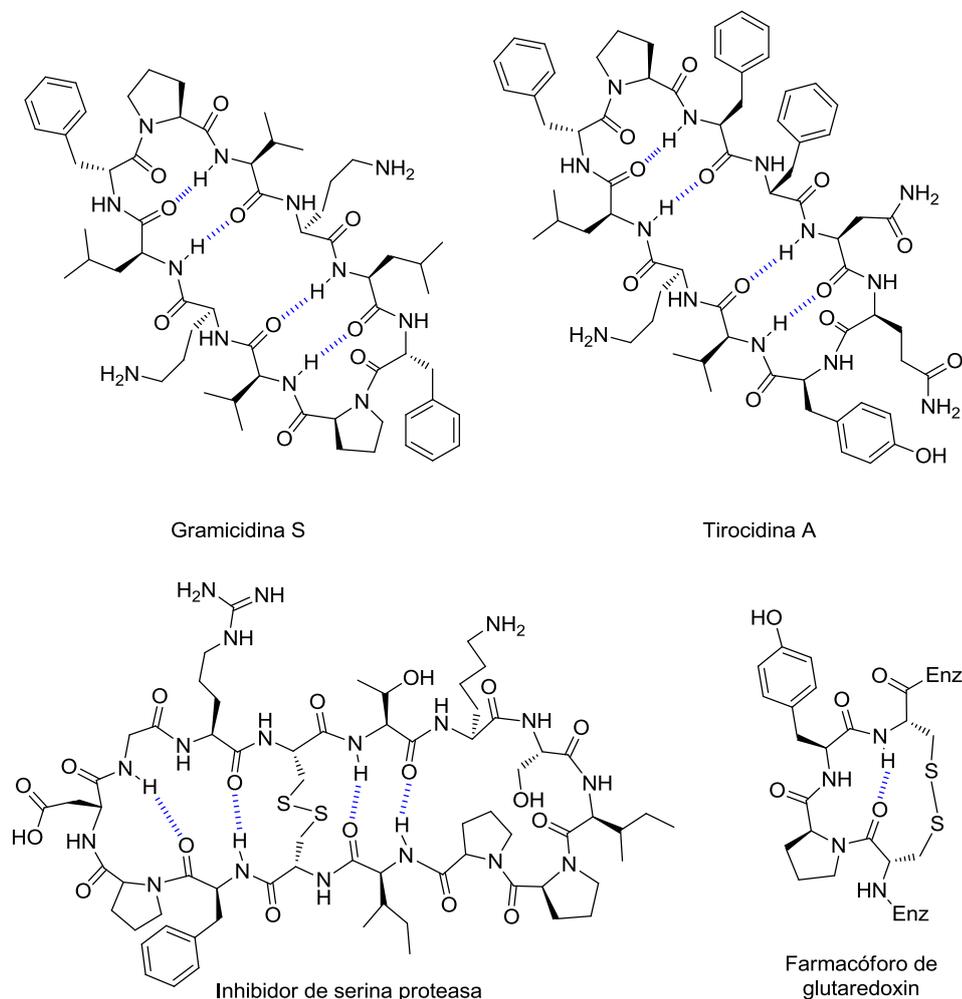


Figura 9. Ciclopeptidos naturales con actividad biológica.

1.2.3. Clasificación de los peptidomiméticos

Los compuestos peptidomiméticos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los que tienen una estructura de base peptídica y los que tienen una estructura no peptídica.

Para el diseño de los primeros, asumiendo la estructura de un péptido natural biológicamente activo como estructura base, es decir, como si fuese una plantilla, se pueden realizar una serie de modificaciones estructurales y funcionales que permitan

²⁸ Luckett, S.; Santiago Garcia, R.; Barker, J. J.; Konarev, A. V.; Shewry, P. R.; Clarke, A. R.; Brady, R. L. *J. Mol. Biol.* 1999, 290, 525.

²⁹ (a) Musiol, H.-J.; Siedler, F.; Quarzago, D.; Moroder, L. *Biopolymers* 1994, 34, 1553. (b) Siedler, F.; Quarzago, D.; Rudolph-Bohner, S.; Moroder, L. *Biopolymers* 1994, 34, 1563.

obtener un peptidomimético con propiedades farmacológicas más adecuadas para su uso como fármaco. En la cadena peptídica del peptidomimético se puede acilar el grupo N-terminal o amidar el grupo C-terminal, para evitar la acción de las aminopeptidasas o las carboxipeptidasas respectivamente. También en la cadena peptídica se podrán introducir cambios estructurales que aumenten la resistencia ante las proteasas y confieran restricción conformacional a la cadena, ocasionando un cambio en las propiedades electrostáticas y en la estructura secundaria de la cadena.^{9,11} Los más comunes son: cambios en la función amina, ya sea por N-alquilación o por reemplazamiento (depsipéptidos); modificación del carbono α , por inversión de configuración, por alquilación o por reemplazamiento (azapéptidos, ...); extensión del esqueleto de un residuo con uno o dos átomos (aminoácidos β y γ , y derivados); reemplazamiento del grupo carbonilo (tioamidas, sulfonamidas, ...); inversión de la dirección de la cadena peptídica (isómeros retro-inversos); ciclación de un residuo de aminoácido o dos consecutivos; así como múltiples combinaciones de todos ellos. Otra estrategia muy utilizada en el diseño y síntesis de este tipo de peptidomiméticos es la ciclación de cadenas lineales (ver apartado 1.2.7).

Como ejemplo se muestra en la Figura 10 el fragmento C-terminal de la hormona polipeptídica gastrina,³⁰ y un peptidomimético tipo isómero retroinverso basado en su estructura.³¹

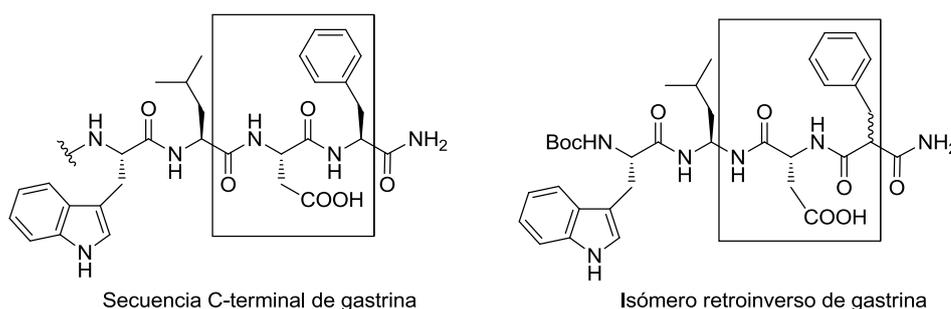


Figura 10. Peptidomimético de estructura peptídica. En el recuadro se engloba el fragmento que contiene la dirección de la cadena invertida.

En cuanto al segundo tipo de peptidomiméticos, se trata de estructuras no peptídicas, generalmente policiclos de bajo peso molecular con una conformación muy restringida, que contienen cadenas laterales con grupos funcionales capaces de mimetizar el patrón de interacción de un farmacóforo.^{32,33}

En la Figura 11 se muestran dos ejemplos clásicos de este tipo de peptidomiméticos. El primero es un potente inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA),³⁴ y el segundo es la morfina, que es un alcaloide opiáceo natural que interacciona con un receptor de β -endorfina, imitando la acción de este péptido compuesto de 31 aminoácidos.

³⁰ La gastrina es una hormona que estimula la secreción de ácidos gástricos.

³¹ Rodríguez, M.; Dubreuil, P.; Bali, J.-P.; Martínez, J. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 758.

³² Rizzo, S.; Waldmann, H. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4621.

³³ Bursavich, M.; Rich, D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 541.

³⁴ Flynn, G. A.; Giroux, E. L.; Dage, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7914.

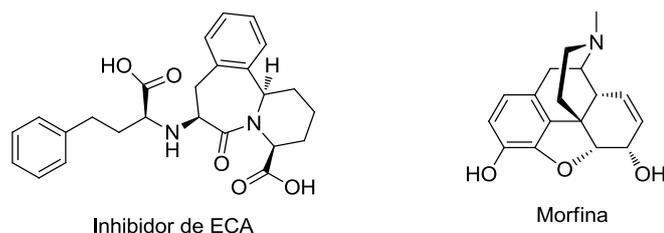


Figura 11. Peptidomiméticos policíclicos de estructura no peptídica.

1.2.4. Compuestos miméticos de giro β

Debido a la importancia de los giros β en la actividad biológica de gran cantidad de proteínas y péptidos naturales, uno de los grupos más estudiados y desarrollados dentro de los peptidomiméticos son los compuestos miméticos de giro β . Existe una gran cantidad de ejemplos de este tipo de peptidomiméticos en la bibliografía y se han desarrollado una gran variedad de fármacos basados en esta estructura secundaria.^{11,18,19,35,36,37,38} Entre ellos se pueden encontrar fármacos hormonales, inhibidores de desórdenes inmunológicos, anti-VIH, inhibidores de desórdenes inflamatorios crónicos, antitrombóticos, opiáceos, para enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, antitumorales, etc.

Se pueden diferenciar dos tipos de miméticos de giro β : los internos, que mimetizan el patrón de interacción con un receptor biológico, y los externos, que mimetizan la función estructural induciendo un cambio de sentido de la cadena peptídica, Figura 12. Esta diferenciación no implica que no puedan existir miméticos de giro β capaces de mimetizar ambas funciones y es posible utilizar estrategias similares para el diseño de miméticos de giro β de uno y otro tipo.

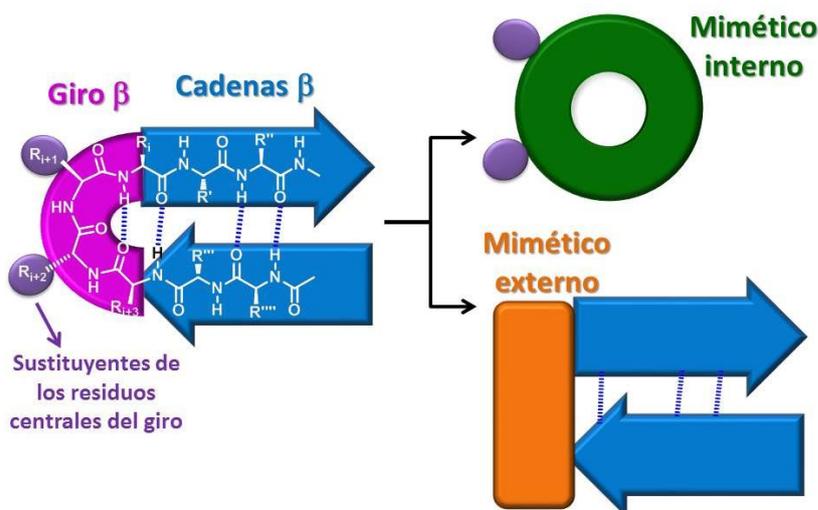


Figura 12. Clasificación de los miméticos de giro β .

³⁵ Nair, R.; Baravkar, S.; Ingole, T.; Sanjayan, G. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 13874.

³⁶ Suat Kee, K.; Jois, S. D. S. *Current Pharmaceutical Design*, **2003**, 9, 1209.

³⁷ Eguchi, M.; Kahn, M. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 447.

³⁸ MacDonald, M.; Aubé, J. *Current Organic Chemistry*, **2001**, 5, 417.

1.2.4.1. Miméticos de giro β internos

En los miméticos de giro β de tipo interno el esqueleto del compuesto mimético reemplaza el espacio que ocuparía la cadena peptídica del giro β natural al interactuar con el centro activo de un enzima o receptor biológico.

Como ya se ha comentado para los peptidomiméticos en general, para el diseño de este tipo de miméticos de giro β se deberán utilizar grupos funcionales adecuados para interactuar con el receptor y éstos deberán tener una disposición tridimensional relativa definida.

La forma más directa de obtener un mimético de giro β interno es mediante la macrociclación de precursores lineales, de forma que los macrociclos resultantes tengan la secuencia peptídica del giro β natural con la conformación de giro fijada (ver procedimientos en apartado 1.2.7).³⁸ Un ejemplo de este tipo es el octreótido, un fármaco conocido bajo el nombre comercial de Sandostatin®, Figura 13. Se trata de un análogo de la hormona natural somatostatina (SRIF). Este fármaco peptídico comercial ha sido aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso clínico en el tratamiento de diarrea severa en pacientes con tumores intestinales. La forma biológicamente activa de la somatostatina es una conformación de giro β tipo II' donde los residuos $i+1$ y $i+2$ son Trp⁸ y Lys⁹. El octreótido se sintetizó con la intención de fijar una conformación de giro β que dispusiera los aminoácidos Trp y Lys como residuos centrales del giro.³⁹

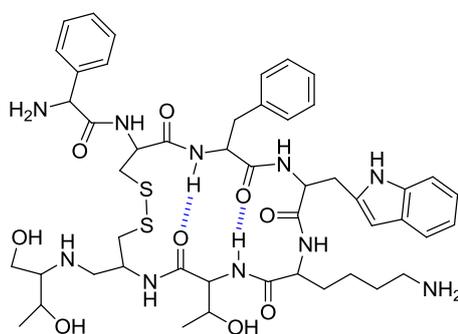


Figura 13. Estructura del octreótido.

Otra estrategia útil para el diseño de este tipo miméticos de giro β es la sustitución de los residuos del giro por un módulo no peptídico, pseudopeptídico o peptídico pero formado por residuos no naturales. Éste módulo tendrá un esqueleto estructural con ciertas restricciones conformacionales, y soportará cadenas laterales con los grupos funcionales y la distribución espacial adecuados para interactuar con el centro activo del receptor biológico. Lo más habitual es utilizar estructuras mono o policíclicas como esqueleto central del giro, debido a la elevada rigidez de éstas.^{37,38,40}

³⁹ Rappe, A. K.; Casewit, C. J. *Molecular Mechanics Across Chemistry*; University Science Books: California **1997**, pp. 167-209.

⁴⁰ Souers, A. J.; Ellman, J. A. *Tetrahedron* **2001**, 57 (35), 7431.

Esta estrategia se aplicó en la obtención de un mimético de baja masa molecular de un anticuerpo monoclonal que actúa contra el receptor del reovirus tipo 3.⁴¹ El fragmento Tyr-Ser-Gly-Ser-Thr forma parte de una región hipervariable de dicho anticuerpo monoclonal, Figura 14 (a). A partir de la estructura de rayos X del complejo antígeno - anticuerpo se observó que esa región adquiría una conformación de giro β , y se desarrolló un mimético cíclico de bajo peso molecular que contenía las cadenas laterales análogas a las de la proteína original e imitaba la conformación de giro. Para ello se reemplazó el ciclo de diez miembros que constituye el giro β por un ciclo covalente de 10 miembros. En el macrociclo resultante, el enlace de hidrógeno del giro natural se sustituye por un enlace peptídico que cierra el ciclo covalente. De esa forma se obtuvo un compuesto resistente a las proteasas y que, a su vez, imita la capacidad de interacción del anticuerpo original, Figura 14 (b).⁴²

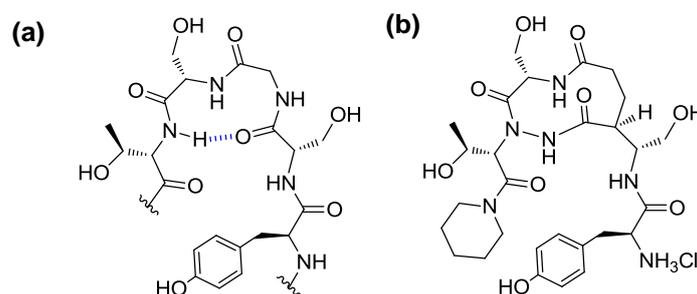


Figura 14. (a) Fragmento Tyr-Ser-Gly-Ser-Thr de un anticuerpo monoclonal en la conformación de giro β activa. (b) Mimético de reducida masa molecular de ese anticuerpo.

Otro ejemplo que pone de manifiesto la relevancia de la estructura del giro β se halla en la base estructural de los receptores opiáceos y su relación con la morfina y el péptido endógeno encefalina ($\text{NH}_2\text{-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-COOH}$), Figura 15 (a). Estudios realizados ponen de manifiesto que existe una relación entre una conformación de giro β de la encefalina y su actividad analgésica. La síntesis de miméticos de la encefalina como los que se muestran en la Figura 15 (b) y (c), que contienen una estructura cíclica que imita la función del giro β en la encefalina, revelaron que estos compuestos son adecuados para interactuar con los receptores opiáceos y, de hecho, poseen actividades analgésicas importantes.^{43,44}

⁴¹ Williams, W. V.; Kieber-Emmons, T.; VonFeldt, J.; Greene, M. I.; Weiner, D. B. *J. Boil. Chem.* **1991**, 266, 5182.

⁴² Saragovi, H. U.; Fitzpatrick, D.; Raktabutr, A.; Nakanishi, H.; Kahn, M.; Greene, M. I. *Science* **1991**, 253, 792.

⁴³ Su, T.; Nakanishi, H.; Xue, L.; Chen, B.; Tuladhar, S.; Johnson, M. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 835.

⁴⁴ Kim, H.; Kahn, M. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **2000**, 3, 167.

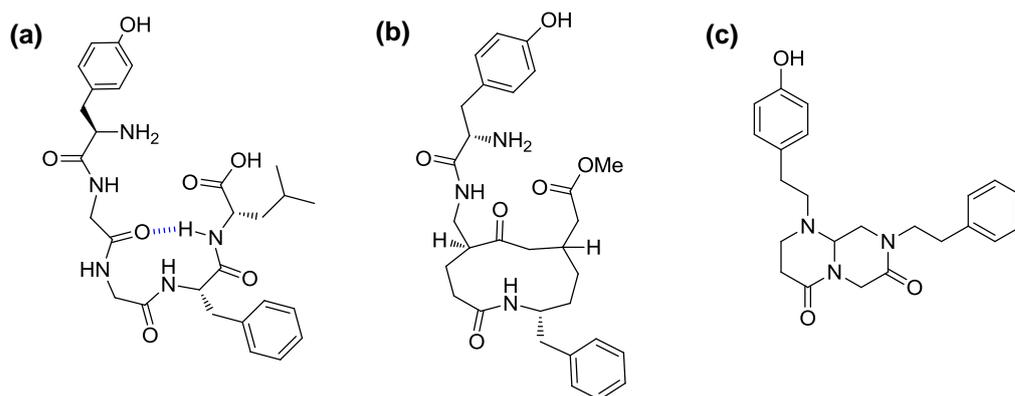


Figura 15. (a) Encefalina en su conformación de giro β activa. (b) Mimético de giro β de segunda generación. (c) Mimético de giro β de cuarta generación. Ambos han mostrado propiedades analgésicas similares a las de encefalina.

Una tercera estrategia en la obtención de miméticos internos ha sido el diseño de moléculas basadas en un esqueleto lineal, con las cadenas laterales idóneas y cuyo plegamiento se ve inducido por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares,⁴⁵ aunque este tipo de giros son utilizados principalmente como miméticos de función estructural.

1.2.4.2. Miméticos de giro β externos

Un compuesto mimético de tipo externo no mimetiza *per se* el giro β sino que estabiliza la geometría β de los péptidos unidos covalentemente, imitando la función estructural de los giros β . Estos miméticos de giro β podrán ser módulos estructurales, tanto lineales como cíclicos, de elevada rigidez estructural. Así, la unión de este tipo de módulo a dos cadenas de estructura adecuada puede dar como resultado una estructura capaz de plegarse debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, tal como sucede en las horquillas β naturales.

En la Figura 16 se muestran algunos ejemplos de miméticos de giro β externos, utilizados como unidades de giro en el diseño de estructuras tipo horquilla β .

Los módulos (a)⁴⁶ y (b)^{47,48} son ejemplos clásicos de módulos policíclicos aromáticos capaces de preorganizar dos cadenas peptídicas. También existen módulos cíclicos alifáticos con la misma capacidad, como son (c)⁴⁹ y (d)⁵⁰. En el diseño del módulo (c) se sigue la misma estrategia que en el de un mimético de giro β interno comentado anteriormente, Figura 16, de forma que usando un giro β natural como plantilla se construye un ciclo de diez miembros donde el enlace de hidrógeno

⁴⁵ Mothes, C.; Larregola, M.; Quancard, J.; Goasdoué, N.; Lavielle, S.; Chassaing, G.; Lequin, O.; Karoyan, P. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 55.

⁴⁶ Feigel, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 181.

⁴⁷ Tsang, K.; Diaz, H.; Graciani, N.; Kelly, J. W. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (9), 3988.

⁴⁸ Díaz, H.; Espina, J. R.; Kelly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8316.

⁴⁹ Kemp, D. S.; Stites, W. E. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 5057.

⁵⁰ André, C.; Legrand, B.; Deng, C.; Didierjean, C.; Pickaert, G.; Martinez, J.; Averlant-Petit, M.; Amblard, M.; Calmes, M. *Org. Lett.* **2012**, *14* (4), 960.

intramolecular se reemplaza por un enlace amida. Por su parte, el derivado de β -aminoácido (S)-ABOC (d) muestra características conformacionales que lo convierten en un buen candidato para el desarrollo de diferentes peptidomiméticos, como hélices, horquillas, etc.

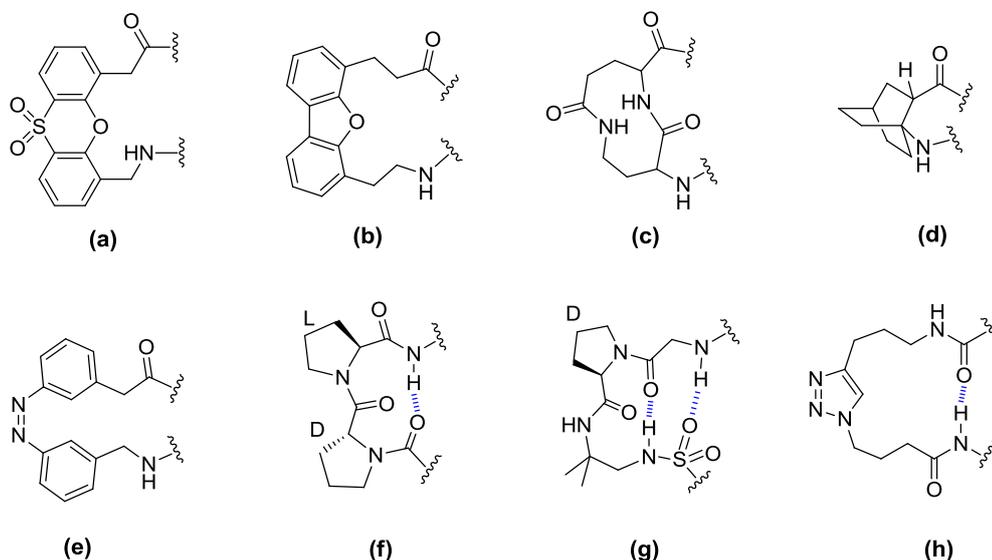


Figura 16. Estructuras representativas de algunos tipos de miméticos de giro β externos. (a) y (b), policiclos aromáticos; (c) y (d), ciclos no aromáticos; (e), alqueno; (f) y (g) inductores de giro mediante enlaces de hidrógeno intramolecular; (h) ciclo aromático de síntesis sencilla.

Una característica de la unidad AMPP (e) es que se puede inducir la formación del confórmero *cis*- o del confórmero *trans*- selectivamente, irradiándola a diferentes longitudes de onda (UV-Vis), y este hecho se ha aprovechado para sintetizar horquillas β fotocontrolables, donde el confórmero *cis*- induce la formación de la horquilla y el confórmero *trans*- la evita.^{51,52,53}

El módulo D-Pro-L-Pro (f) es un típico inductor de giro con tendencia a adoptar un giro β tipo II'.⁵⁴ Por otra parte, el módulo D-Pro-DADME se ha utilizado para el desarrollo de una horquilla β paralela (ver ejemplo en Figura 19), así como para la síntesis del sulfonamidoderivado (g) que muestra un patrón de enlace de hidrógeno análogo al que inicia una horquilla β antiparalela.⁵⁵

Por último, el anillo 1,2,3-triazol (h) es otro ejemplo de sistema cíclico que permite prolongar dos cadenas peptídicas. Este ejemplo es especialmente interesante a nivel sintético, ya que dicho anillo se puede obtener mediante una cicloadición de tipo "click" azida - alquino.⁵⁶

⁵¹ Podewin, T.; Rampp, M. S.; Turkanovic, I.; Karaghiosoff, K. L.; Zinth, W.; Hoffmann-Röderm, A. *Chem. Comm.* **2015**, 51, 4001.

⁵² Dong, SL; Löweneck, M; Schrader, TE.; Schreier, W. J.; Zint, W.; Moroder, L.; Renner, C. *Chem Eur. J.* **2006**, 12, 1114.

⁵³ Aemissegger, A.; Krautler, V.; Gunsteren, W. F.; Hilvert, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2929.

⁵⁴ Nair, C. M.; Vijayan, M.; Venkatachalapathi, V.; Balaram, P. *J. S. C. Chem. Comm.* **1979**, 1183.

⁵⁵ Langenhan, JM; Fisk, JD; Gellman, SH. *Organic letters* **2001**, 3, 2559.

⁵⁶ Oh, K.; Guan, Z. *Chem. Comm.* **2006**, 29, 3069.

Cabe destacar que dos de los miméticos anteriores contienen residuos de prolina en su estructura. El aminoácido prolina es el aminoácido más común en los giros beta de proteínas naturales. Esto se debe a su estructura cíclica, que confiere cierta rigidez conformacional al conjunto. Además la prolina es el único aminoácido que origina una amida terciaria, lo que hace más probable la conformación *cis* de dicho grupo (presente en los giros β tipo VI), la cual es desfavorable frente a la *trans* en amidas secundarias. Este hecho ha inspirado el uso, en el diseño de miméticos de giro β , de diferentes residuos de conformación restringida, así como residuos con tendencia a inducir la formación de enlaces amida *cis*. Ejemplos típicos son D- y L-Pro, D-aminoácidos, N-metil aminoácidos y otros residuos cíclicos derivados de α -, β -, γ - y δ -aminoácidos.³⁵

1.2.5. Estructuras tipo horquilla β

Dentro del campo de los peptidomiméticos se han dedicado amplios esfuerzos al estudio de miméticos de cadenas, horquillas y láminas β , los cuales se pueden tratar de forma conjunta debido a la estrecha relación estructural que existe entre ellas.^{57,58,59,60}

Las hélices α y las láminas β son las principales estructuras secundarias que adoptan largas cadenas polipeptídicas en el plegamiento de proteínas naturales. El estudio de los factores que condicionan la formación de estas estructuras es de gran importancia, ya que su comprensión puede ser muy útil para intervenir en el plegamiento de proteínas naturales, y para diseñar y sintetizar nuevos catalizadores, materiales y biomateriales con diferentes propiedades; además del ya comentado interés de las diferentes estructuras secundarias en el diseño de fármacos peptidomiméticos.^{61,62}

Los conocidos como miméticos de cadena β suelen ser macrociclos que contienen una secuencia peptídica concreta, de forma que ésta tiene restringida la conformación de cadena β , o estructuras lineales que pueden contener ciclos carbonados, heterociclos y otras insaturaciones.^{37,63,64}

Una estructura tipo horquilla β se basa en dos cadenas que interaccionan entre sí mediante enlaces de hidrógeno, unidas por una unidad de giro que induce el plegamiento de la molécula. Las cadenas enfrentadas podrán estar dispuestas en forma paralela o antiparalela y normalmente son cadenas peptídicas, tal como se muestra en la Figura 17, aunque también pueden contener segmentos no peptídicos. Una estructura tipo horquilla β capaz de mantenerse en disolución en un medio concreto podrá ser útil para fijar la conformación de pequeñas secuencias de

⁵⁷ Nowik, J. S.; Smith, E. M.; Pairish, M. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 401.

⁵⁸ Hughes, R. M.; Waters, M. L. *Current Opinion in Structural Biology* **2006**, 16, 514.

⁵⁹ Nowick, J. S. *Accounts of chemical research* **2008**, 41, 1319.

⁶⁰ Robinson, J. A. *Accounts of chemical research* **2008**, 41, 1278.

⁶¹ Searle, MS. *J. Chem. Soci. Perkin Trans. 2.* **2001**.

⁶² Stotz, CE; Topp, EM. *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93, 2881.

⁶³ Loughlin, W. A.; Tyndall, J. D. A.; Glenn, M. P.; Hill, T. A.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2010**, 110, PR32.

⁶⁴ Glenn, M. P.; Fairlie, D. P. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2002**, 2, 433.

aminoácidos, o análogos sintéticos, tanto si se trata de una conformación de giro como si se trata de una conformación de cadena β ; y lo mismo sucederá con secuencias algo más extensas presentes en horquillas y láminas β . Además, considerando que una horquilla β es la versión más sencilla de una lámina β , el estudio de las diferentes interacciones que podrán darse entre las dos cadenas β de una estructura de horquilla será la forma más sencilla de estudiar las interacciones presentes en las láminas β naturales.

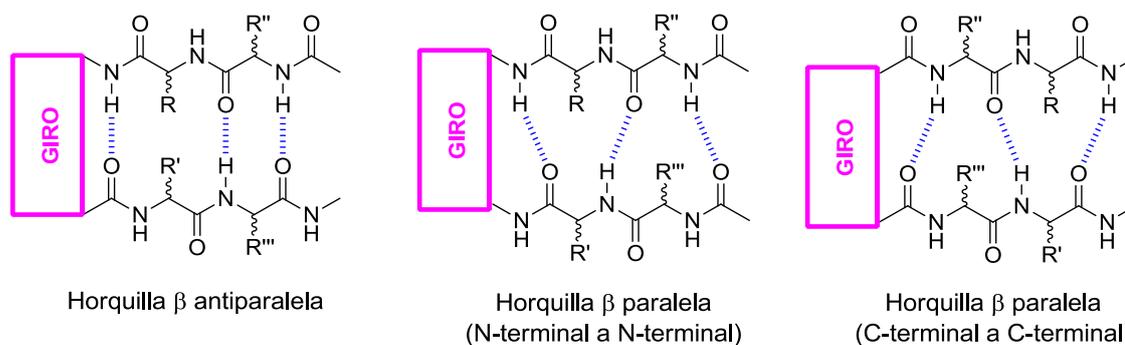


Figura 17. Estructura general de peptidomiméticos tipo horquilla.

La conformación tipo horquilla β de estas estructuras viene condicionada tanto por la efectividad de la unidad de giro como por las interacciones entre las cadenas β enfrentadas. Como ya se ha indicado anteriormente, las unidades de giro serán miméticos de giro β externos, los cuales deberán ser capaces de enfrentar de forma adecuada a las dos cadenas para que interaccionen entre ellas. En el apartado anterior se han mostrado toda una serie de miméticos de giro útiles como unidades de giro de estructuras tipo horquilla, Figura 16.

Un ejemplo simple pero eficaz lo proporciona la síntesis de miméticos de horquilla β utilizando química "click", Figura 18 (a).^{65,65} Además, mediante esa misma reacción, se ha sintetizado un polímero capaz de plegarse según una estructura tipo lámina β , para luego autoensamblarse generando nanoestructuras, Figura 18 (b).⁶⁶

Aunque se han realizado estudios conformacionales de estructuras tipo horquilla β en diferentes disolventes orgánicos, debido a la variable polaridad que puede existir en las zonas interiores de una proteína, en general, los estudios más relevantes son los realizados en disolución acuosa, ya que es el medio natural en el que se encuentran plegadas las proteínas. La fijación del conformero tipo horquilla β suele ser más complicada cuanto más polar es el disolvente, siendo el agua el disolvente que menos la favorece. Esto se debe a que las principales interacciones que provocan el conformero tipo horquilla β son enlaces de hidrógeno, y el agua es un fuerte competidor a la hora de interaccionar con los centros dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno. En el caso de los disolventes orgánicos, cuanto más polares sean éstos más competirán. Por tanto, cuanto más extensas sean las cadenas mayor será el número de enlaces de hidrógeno que se puedan formar entre ellas y más estable será la horquilla β . En los últimos 25 años se han diseñado y estudiado muchas estructuras

⁶⁵ Wu, C.-F.; Zhao, X.; Lan, W.-X.; Cao, C.; Liu, J.-T.; Jiang, X.-K.; Li, Z.-T. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4261.

⁶⁶ Yu, T.; Bai, J. Z.; Guan, Z. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 1117.

tipo horquilla β para entender cómo afectan los residuos de las cadenas a la conformación en disolución acuosa. A partir, tanto de la observación de secuencias de proteínas naturales, como de estudios experimentales de estructuras sintéticas, se ha determinado que residuos aromáticos, como Phe, Tyr o Trp, residuos alifáticos, como Val, Leu o Ile, y residuos cargados, como Arg, Lys o Asp, suelen estabilizar las cadenas β ; mientras que otros como Gly o Ala las desestabilizan.⁶⁷ Un efecto que favorece mucho la formación de horquillas β en agua es la formación de un clúster hidrofóbico debido a interacciones entre residuos aromáticos y/o alifáticos de las cadenas enfrentadas. Este hecho crea un entorno menos polar alrededor del esqueleto de la horquilla que estabiliza los enlaces de hidrógeno entre cadenas, y las interacciones hidrofóbicas entre grupos laterales de las cadenas enfrentadas favorecen el acercamiento entre éstas.

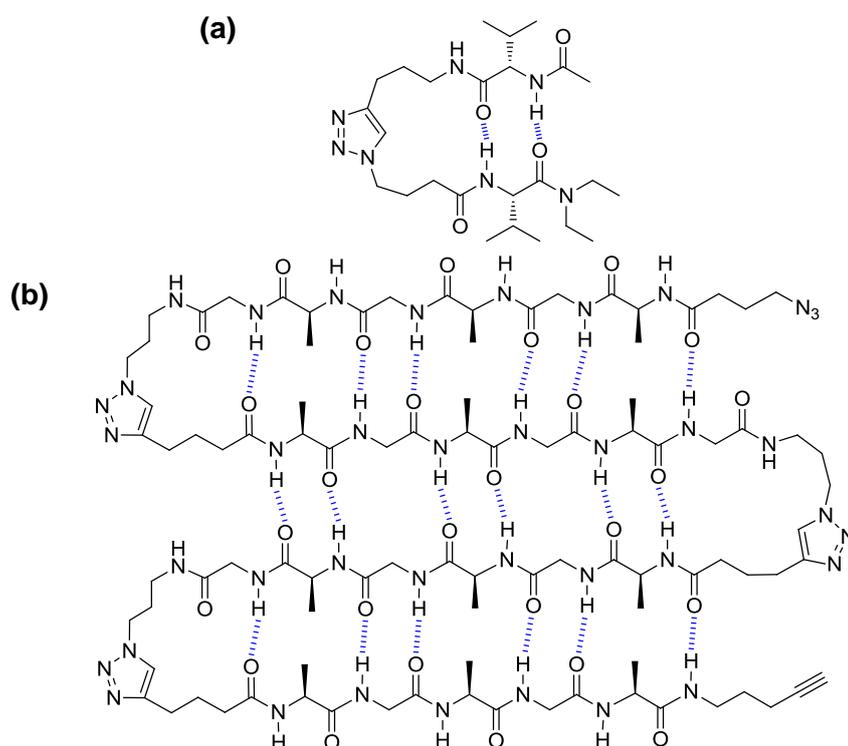


Figura 18. Anillo 1,2,3-triazol utilizado como inductor de giro. **(a)** Estructura tipo horquilla β . **(b)** Estructura tipo lámina β .

El grupo de Gellman ha dedicado varios trabajos al estudio de diferentes factores que afectan a la estabilidad de una estructura tipo horquilla β .⁶⁸ Por ejemplo, se ha descrito un dodecapéptido que en disolución acuosa adquiere dos conformaciones en equilibrio, una conformación de horquilla β antiparalela y otra de cadena desplegada, siendo la proporción de horquilla β en el equilibrio del 61%.⁶⁹ Este péptido contiene la unidad de giro D-Pro-Gly⁷⁰ y en las cadenas β contiene cuatro residuos hidrofóbicos (Trp, Tyr, Phe y Val) que en un segmento de la proteína GB1 forman un clúster hidrofóbico, estabilizando una conformación tipo horquilla,⁷¹ Figura 19 (a). La

⁶⁷ Nowick, J. S.; Insaf, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10903.

⁶⁸ Espinosa, J. F.; Syud, F. A.; Gellman, S. H. *Protein Science* **2002**, *11*, 1492.

⁶⁹ Espinosa, JF; Gellman, SH. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2330.

⁷⁰ Fisk, J. D.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5443.

⁷¹ Gallagher, T.; Alexander, P.; Bryan, P.; Gilliland, G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 4721.

sustitución de D-Pro por Asn disminuye la proporción del conformero plegado y la sustitución de los residuos Phe y Val por Ser también, demostrando así la importancia de la rigidez que aporta la prolina en la unidad de giro y de la formación del clúster hidrofóbico entre las cadenas. Al sustituir el residuo D-Pro por L-Pro en la unidad de giro, ésta pierde su capacidad de plegamiento, por lo que el dodecapeptido resultante se ha utilizado como modelo de estructura desplegada.

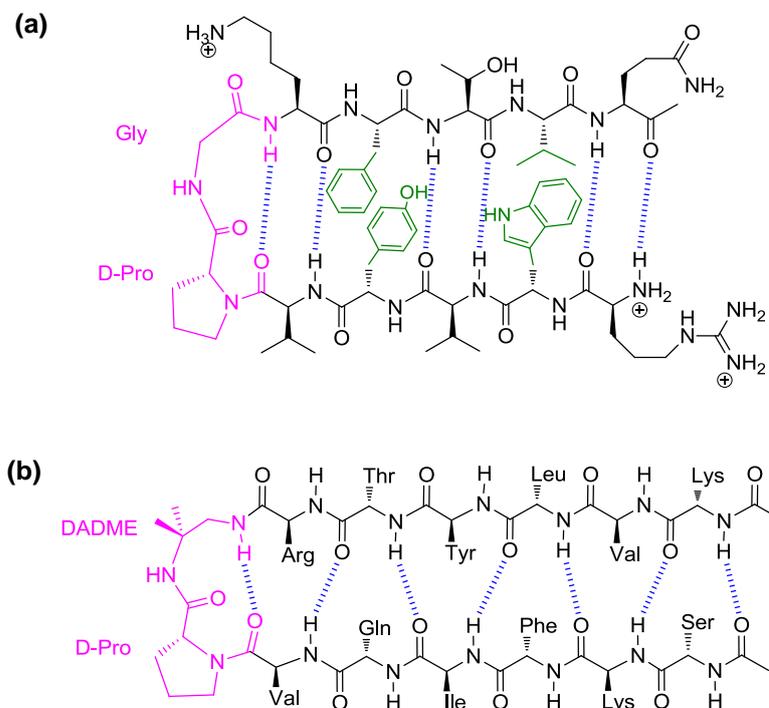


Figura 19. (a) Estructura tipo horquilla β antiparalela estable en disolución acuosa, donde se remarcan la **unidad de giro** y los residuos que dan lugar a un **clúster hidrofóbico**. (b) Estructura tipo horquilla β paralela estable en disolución acuosa.

Otro estudio realizado en el mismo grupo de investigación mostró que una mayor longitud de las cadenas β implicaba mayor estabilidad de la horquilla, debido al mayor número de enlaces de hidrógeno que estabilizan la estructura.⁷²

Por otro lado, una pequeña modificación en la unidad de giro D-Pro-Gly⁷⁰ permitió cambiar la dirección de una de las cadenas peptídica acopladas a dicha unidad y obtener así un mimético de horquilla β paralela especialmente estabilizada en la zona más cercana al giro, Figura 19 (b).⁷³

Una estrategia muy utilizada para la estabilización de una estructura tipo horquilla β es la macrociclación de ésta. Por ejemplo se pueden unir los extremos de la cadena principal mediante un molde o "template" que estabiliza la conformación de horquilla β de toda la secuencia, Figura 20 (a). Este molde es comúnmente un mimético de giro β , siendo bastante común el uso del módulo D-Pro-L-Pro (ver ejemplo en Figura 29).^{60,74} También es común la unión covalente de cadenas laterales mediante la formación de

⁷² Stanger, HE; Syud, FA; Espinosa, JF.; Gariat, I.; Muir, T.; Gellman, S. H. *PNAS* **2001**, 98, 12015.

⁷³ Fisk, J. D.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 343.

⁷⁴ Obrecht, D; Chevalier, E; Moehle, K.; Robinson, J. A. *Drug Discovery Today*, **2012**, 9, e63.

puentes disulfuro⁷⁵ o el cierre del macrociclo mediante reacciones de metátesis,⁷⁶ entre otras, Figura 20 (b).

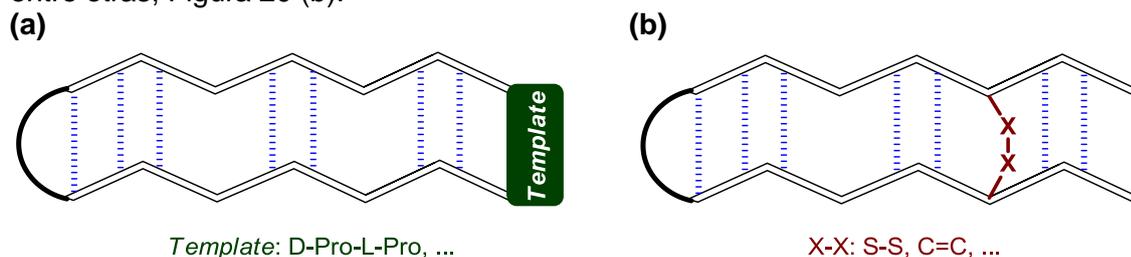


Figura 20. Representación de estructuras tipo horquilla β estabilizadas por macrociclación. **(a)** Unión de los extremos a un *template*. **(b)** Unión entre grupo de cadenas laterales.

Tal como se ha observado en el ejemplo de la Figura 18 (b), el uso de unidades de giro y cadenas adecuadas también puede dar lugar a estructuras tipo lámina β . Los miméticos de lámina β desarrollados en el grupo de Nowick son ejemplos representativos de esta estrategia de diseño.⁵⁹ En la Figura 21 se muestran dos ejemplos de estructuras tipo lámina β pseudopeptídicas desarrolladas mediante el uso del mimético de cadena β ácido 5-amino-2-metoxibenzoico y de unidades de giro basadas en la formación de ciclos de 9 y 10 miembros, inducidos por un enlace de hidrógeno intramolecular. El primero de ellos se basa en tres cadenas unidas por dos unidades de giro, de forma que las dos cadenas de los extremos de la lámina contienen el módulo ácido 5-amino-2-metoxibenzoico, Figura 21 (a). El segundo ejemplo es un macrociclo pseudopeptídico de 54 miembros formado por dos cadenas β unidas a los extremos de dos unidades de giro. Una de las cadenas β contiene dos módulos de ácido 5-amino-2-metoxibenzoico, que impiden la agregación por esa cadena e inducen la conformación de lámina β a lo largo de la molécula. Así, en disolución acuosa se forman dímeros de la molécula mediante interacciones entre dos cadenas β , que muestran una estructura tipo lámina β paralela formada por cuatro cadenas, Figura 21 (b).⁵⁹

⁷⁵ Óngora-Benítez, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2013**, *114*, 901.

⁷⁶ Vega, M.; García-Aranda, M.; González-Muñiz, R. *Med. Res. Rev.* **2010**, *31*, 677.

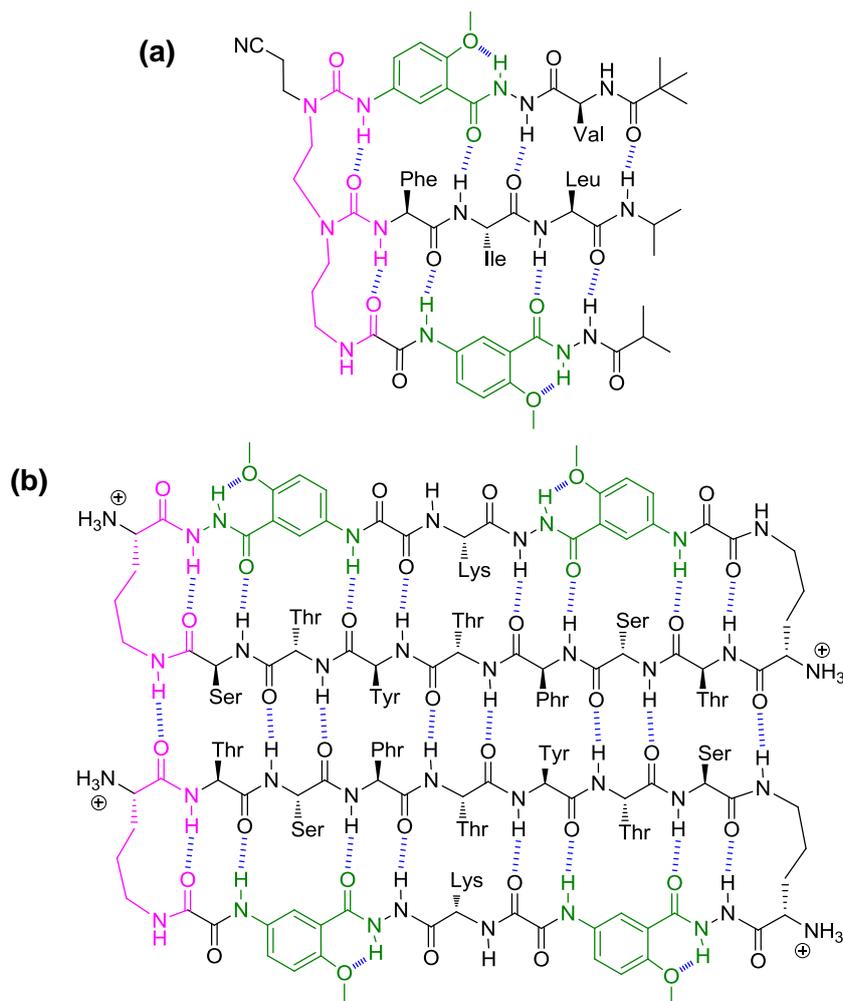


Figura 21. Miméticos de lámina β basados en giros inducidos por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares y en el mimético de cadena β ácido 5-amino-2-metoxibenzoico. **(a)** Mimético formado por tres cadenas antiparalelas estudiado en disolución en cloroformo. **(b)** Mimético macrocíclico que forma un sistema dimérico de 4 cadenas antiparalelas.

1.2.6. Análogos RGD

De entre los múltiples peptidomiméticos, los denominados análogos RGD (Arg-Gly-Asp) son particularmente interesantes debido a su aplicación biológica.

1.2.6.1 Integrinas

Los análogos RGD están diseñados para interactuar con las integrinas. Las integrinas son un grupo de receptores celulares que constituyen una de las cuatro grandes familias de moléculas de adhesión celular (CAM).⁷⁷ Las integrinas son los principales receptores de adhesión implicados en la adhesión célula - matriz, y

⁷⁷ Alberts, B.; Johson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell 5th Ed.*, Garland Science, 2008.

también existen integrinas implicadas en interacciones célula - célula.^{77,78} Excepto en eritrocitos maduros, todos los tipos celulares expresan en su superficie una o más integrinas, y en algunos tipos celulares, como por ejemplo las plaquetas, las integrinas son los receptores expresados de forma mayoritaria.

A nivel estructural, las integrinas son glucoproteínas transmembranarias constituidas por dos subunidades, una α y una β , unidas entre ellas de forma no covalente, Figura 22. La nomenclatura más usada para denominar a las integrinas es $\alpha_x\beta_y$, donde X y Y serán un número que hará referencia a cada una de las subunidades correspondientes. Estos receptores constan de un dominio extracelular largo, un dominio transmembranario hidrofóbico y un corto dominio citoplasmático (15-77 residuos de aminoácidos para la subunidad α y 40-60 para la β). El dominio extracelular es bastante variable entre las diferentes integrinas, dependiendo éste de las subunidades α y β que compongan cada integrina.

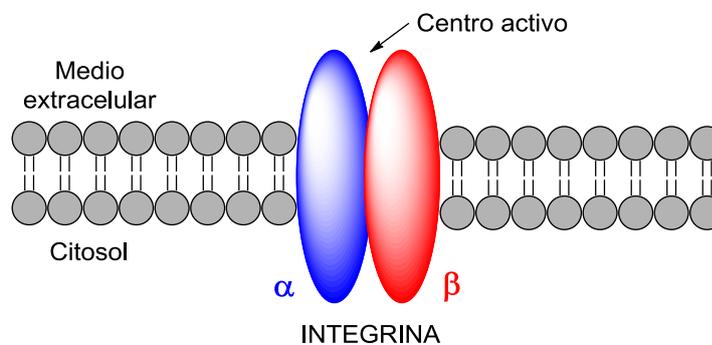


Figura 22. Representación de la estructura de una integrina.

Las integrinas pueden unirse a elementos presentes en ambos lados de la membrana celular. En el interior de la célula, la subunidad β de la integrina se adhiere a la forma activa de la talina y a través de ésta la integrina quedará unida a un complejo de proteínas que forman un anclaje al citoesqueleto de actina.⁷⁹ En el exterior de la célula, las integrinas se unen a toda una serie de ligandos que pueden encontrarse en la matriz extracelular (adhesión célula - matriz) o en la superficie de otras células (adhesión célula - célula). Los ligandos de la matriz extracelular suelen ser proteínas que están libres en el medio o que forman parte de algún tejido de la matriz al que se adherirá la célula. Algunos ejemplos son fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, colágeno, laminina, vinculina o factor von Willebrand. Por otra parte, los ligandos presentes en la superficie de otras células suelen ser moléculas de adhesión celular (glucoproteínas) como la cadherina-E o algunos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Las integrinas se unen a sus ligandos extracelulares a partir de sus centros activos. Éstos son zonas capaces de reconocer secuencias peptídicas específicas. Un ejemplo prototípico es la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que es reconocida por 8 de las 24 integrinas que se conocen hasta el momento ($\alpha_8\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$). Esta secuencia está presente en ligandos de la matriz

⁷⁸ arczyk, M.; Carracedo, S.; Gullberg, D. *Cell Tissue Res* **2009**, 339, 269.

⁷⁹ Esto sucede para todas las integrinas menos para $\alpha_6\beta_4$, que se encuentra en células epiteliales y se une a las proteínas plectina y disotnina, para quedar ligada al esqueleto de keratina.

extracelular, como por ejemplo en la fibronectina. Cabe destacar que para que se dé un reconocimiento efectivo también pueden ser importantes los aminoácidos que la flanquean.

Las integrinas pueden adoptar dos conformaciones, activa e inactiva, y pueden ir variando de una a otra en un proceso dinámico conocido como regulación alostérica. Dichos cambios conformacionales permiten a estos receptores transmembranarios transmitir información entre la matriz extracelular y el citosol de la célula mediante un proceso de señalización, que puede darse en ambos sentidos (señalización *outside-in* o *inside-out*).⁸⁰ La interferencia en estos procesos permite regular las funciones de las integrinas.

Como ya se ha comentado, las integrinas están implicadas en procesos de adhesión celular y de señalización, y eso hace que se vean implicadas en toda una serie de procesos biológicos como hemostasia, cicatrización de heridas, respuesta inmune, desarrollo embriológico, etc. Debido a ello es de gran importancia el hecho de que la acción de las integrinas pueda ser regulada, para así poder controlar todos esos procesos. Además, defectos en la estructura, expresión o función de las integrinas pertenecientes a ciertos tipos de células, normalmente debidos a mutaciones genéticas, pueden ser los causantes de toda una serie de patologías, ya que esos defectos causan un desorden en los procesos de adhesión y migración de esas células, y por tanto en su función biológica.^{80,81} Algunos ejemplos de este tipo de patologías son: deficiencia de adhesión leucocitaria tipo 1 (LAD-1) y variantes, asma, trombostenia de Glanzman (TG), trombosis, epidermolísis bullosa y varios tipos de cáncer.^{82,83}

1.2.6.2 Miméticos de la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD)

La implicación de las integrinas en los procesos biológicos y patológicos comentados anteriormente las convierte en una diana para el diseño y aplicación de fármacos.^{84,85} En base a ello se han estudiado toda una serie de agonistas y antagonistas de integrinas, entre los que se encuentran anticuerpos bloqueantes de función, disintegrinas (péptidos naturales con la secuencia RGD), péptidos con la secuencia RGD no naturales y moléculas pequeñas no peptídicas.^{80,84,86,87,88}

Las principales ventajas de las moléculas pequeñas artificiales frente a agonistas o antagonistas de integrinas naturales son su mayor facilidad de síntesis, su resistencia frente a peptidasas y su capacidad para alcanzar el centro activo de la integrina tanto en su forma activa como en su forma inactiva. Los análogos o miméticos RGD son

⁸⁰ Huveneers, S.; Truong, H.; Danen, E. H. *Int. J. Radiat. Biol.* **2007**, *83*, 743-751.

⁸¹ Wehrle-Haller, B.; Imhof, B. *J. Pathol.* **2003**, *200* (4), 481.

⁸² Avraamides, C.; Garmy-Susini, B.; Varner, J. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8* (8), 604.

⁸³ Desgrosellier, J. S.; Cheresh, D. A. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9.

⁸⁴ Wang, Z.; Chui, W.-K.; Ho, P. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7* (2), 159.

⁸⁵ Mousa, S. *Expert Opin. Ther. Targets* **2000**, *4* (2), 143.

⁸⁶ Shimaoka, M.; Springer, T. A. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2003**, *2*, 703.

⁸⁷ Perdih, A.; Dolenc, M. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (22), 2371.

⁸⁸ Lu, D.; Scully, M.; Kakkar, V.; Lu, X. *Toxins* **2010**, *2* (10), 2411.

moléculas pequeñas capaces de simular el patrón de interacción de esa secuencia peptídica con la integrina, y contemplan tanto moléculas no peptídicas como moléculas peptídicas no naturales que contengan la secuencia RGD, las cuales suelen obtenerse mediante el uso de D-aminoácidos o mediante la ciclación de estructuras peptídicas.^{87,89,90,91,92} Los principales puntos de interacción de la secuencia RGD con el centro activo de las integrinas son el grupo carboxilato de la cadena lateral de aspartato (D) y el grupo guanidinio de la cadena lateral de arginina (R), Figura 23.

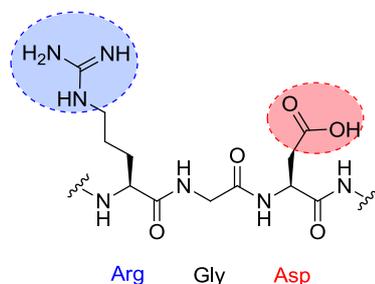


Figura 23. Secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Se marcan los grupos **ácido carboxílico** y **guanidino** de las cadenas laterales, que en el medio extracelular estarán en sus formas iónicas.

Ya se ha comentado que el reconocimiento de una secuencia peptídica por parte de un receptor biológico depende de la conformación de éste. Esto significa que una secuencia peptídica solo será reconocida por un receptor concreto si adopta la conformación adecuada y además la misma secuencia puede ser reconocida por diferentes receptores en función de su conformación.⁹³ Considerando esta idea, Kessler *et al.* insertaron la secuencia peptídica RGD en estructuras ciclopeptídicas para reducir así su diversidad conformacional, Figura 24.^{94,95}

El pentapéptido cíclico α (RGDfV) incorpora en su estructura la secuencia RGD y un residuo de D-Val. La presencia del residuo tipo D induce la formación de un giro β II' donde D-Val es el residuo $i+1$ y L-Phe es el residuo $i+2$ (residuos centrales). A su vez, la presencia de este giro β condiciona la conformación de toda la estructura cíclica, induciendo un giro γ con glicina como residuo $i+1$ (residuo central), Figura 24 (a) y (b). Por otro lado, el estudio conformacional de *cilengitide*, un derivado metilado del ciclopeptido anterior, muestra que el giro γ centrado en Gly se mantiene y el giro β II' desaparece, formándose en su lugar dos giros γ inversos centrados en los residuos Arg y Asp, Figura 24 (c). Aun así, comparando la conformación de la secuencia RGD en α (RGDfV) y *cilengitide* se observa que éstas son parecidas y muestran distancias similares entre los carbonos β de Arg y Asp. Estos dos pentapéptidos cíclicos

⁸⁹ Danhier, F.; Breton, A.; Préat, V. *Mol. Pharm.* **2012**, 9 (11), 2961.

⁹⁰ Auzzas, L.; Zanardi, F.; Battistini, L.; Burreddu, P.; Carta, P.; Rassa, G.; Curti, C.; Casiraghi, G. *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 1255.

⁹¹ Andronati, S.A.; Karaseva, T.L.; Krysko, A.A. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 1183.

⁹² Wang, W.; Borchardt, R.; Wang, B. *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 437.

⁹³ Wilson, I. A.; Haft, D. H.; Getzoff, E. D.; Tainer, J. A.; Lerner, R. A.; Brenner, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 5255.

⁹⁴ Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. *FEBS Lett.*, **1991**, 291, 50.

⁹⁵ Gurrath, M.; Müller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 210, 911.

muestran actividad como antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$, además de ser selectivos respecto a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁹⁶

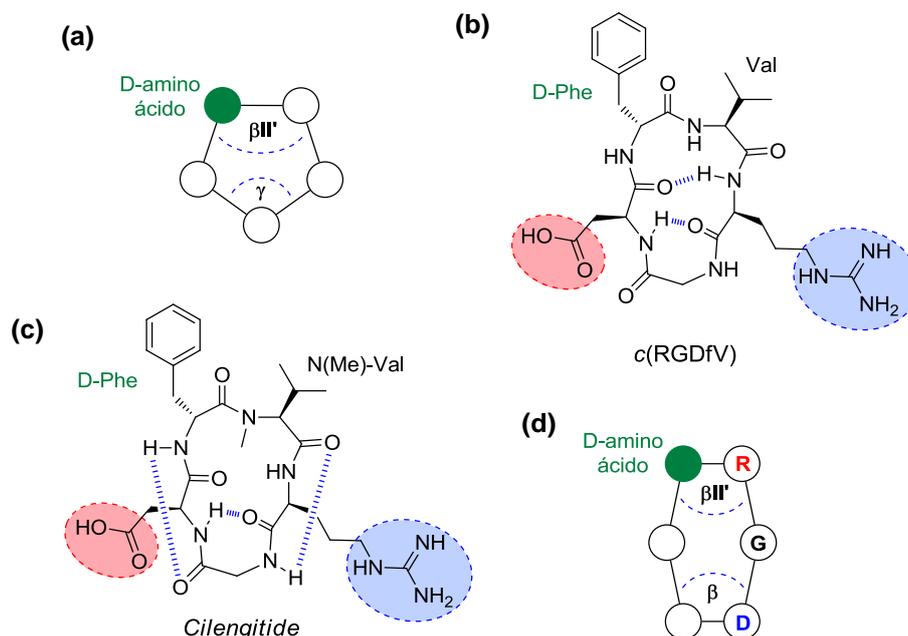


Figura 24. Estudios conformacionales desarrollados en el grupo de Kessler. **(a)** Representación general del efecto de un D-aminoácido en un pentapéptido cíclico. **(b)** Representación conformacional 2D de c(RGDfV). **(c)** Representación conformacional 2D de *cilengitide*. **(d)** Representación general del efecto de un D-aminoácido en un hexapéptido cíclico con la secuencia RGD extendida.

Kessler *et al.* también estudiaron el efecto de giros β inducidos por D-aminoácidos en la conformación de diferentes hexapéptidos RGD cíclicos, y se observó que se daban dos giros β en posiciones opuestas en el ciclo, Figura 24 (d). Algunos de éstos mostraron actividad antagonística frente a $\alpha_{IIb}\beta_3$, y selectividad frente a $\alpha_v\beta_3$; debido a que la secuencia RGD tenía una conformación más extendida, quedando los carbonos β de Arg y Asp más alejados.

Se ha estudiado el uso de *cilengitide* para el tratamiento de glioblastoma,⁹⁷ y otros tipos de cáncer, debido a su acción “antiangiogénica” al actuar como antagonista de las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$.⁸² Otro aspecto importante de éste fármaco es que no actúa como inhibidor de otras integrinas, convirtiéndolo en un fármaco selectivo. Sin embargo, los ensayos clínicos de fase III realizados con *cilengitide* en combinación con temozolamida no han resultado satisfactorios para el tratamiento de glioblastoma,⁹⁸ lo cual indica los múltiples factores⁹⁸ que intervienen en la resolución terapéutica de la enfermedad.

La resolución por rayos X de la estructura cristalina de algunos segmentos extracelulares de integrinas, en ausencia o en presencia de ligandos artificiales de

⁹⁶ Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Honczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033.

⁹⁷ Las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ están ampliamente expresadas en toda una serie de líneas celulares de glioblastoma.

⁹⁸ Marelli, U. K.; Rechenmacher, F.; Sobahi, T. R. A.; Mas-Moruno, C.; Kessler, H. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 222.

bajo peso molecular, resultan relevantes en el estudio de la interacción entre los ligandos y el centro activo de las integrinas. En el año 2001 se publicó la estructura cristalina del segmento extracelular de la integrina $\alpha_v\beta_3$ ⁹⁹ y en el año siguiente se publicó la estructura del complejo formado por ese segmento extracelular y el pentapéptido cíclico *cilengitide*, Figura 25.¹⁰⁰ En dicho complejo se observa que los principales puntos de interacción del ligando son el grupo carboxilato de la cadena lateral de Asp y el grupo guanidinio de la cadena lateral de Arg. El grupo carboxilato interacciona por puente salino con un catión Mn^{2+} de la zona MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*), mediante un átomo de oxígeno, y forma enlaces de hidrógeno con dos grupos NH de amida de la cadena peptídica principal de Tyr122 y Asn215 mediante el otro oxígeno. El grupo guanidinio interacciona por puente salino con los grupos carboxilato de dos residuos Asp218 y Asp150. Desde un punto de vista global de la interacción con el centro activo, el esqueleto cíclico de *cilengitide* se encuentra situado en una grieta en la zona de unión entre las dos subunidades α y β de la integrina,¹⁰¹ y las cadenas laterales de Arg y Asp están dirigidas en sentidos opuestos de forma que el grupo carboxilato interacciona con centros de la subunidad β y el grupo guanidinio con centros de la subunidad α .

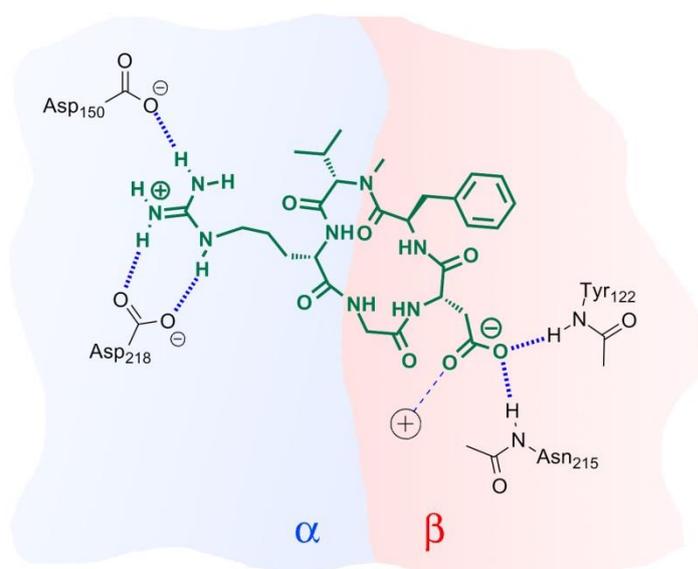


Figura 25. Algunos de los análogos RGD antagonistas de integrinas más importantes.

En 2004 se publicaron las estructuras del segmento extracelular de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ formando 2 complejos, uno con *eptifibatide* y otro con *tirofiban*,¹⁰² Figura 26. Ambas estructuras revelaron que el centro activo de esta integrina también se encuentra en una zona entre las subunidades α y β , y que el grupo que mimetiza al carboxilato de aspartato (D) interacciona con centros de la subunidad β , mientras que el grupo que mimetiza al guanidinio de arginina (R) interacciona con centros de la subunidad α .¹⁰² De hecho las interacciones básicas que se dan con el ligando para los

⁹⁹ Xiong, J.P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D.L.; Joachimiak, A.; Goodman, S.L.; Arnaout, M.A. *Science* **2001**, *294*, 339.

¹⁰⁰ Xiong, J.P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S.L.; Arnaout, M.A. *Science* **2002**, *296*, 151.

¹⁰¹ En esta zona glicina da interacciones hidrofóbicas con la subunidad α .

¹⁰² Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B.S.; Wang, J.H.; Springer, T.A. *Nature*, **2004**, *432*, 59.

segmentos extracelulares de las dos integrinas comentadas son muy similares, por lo que son pequeñas diferencias en la estructura del centro activo de cada integrina las que harán que muchos ligandos sean selectivos para una integrina frente a las otras.

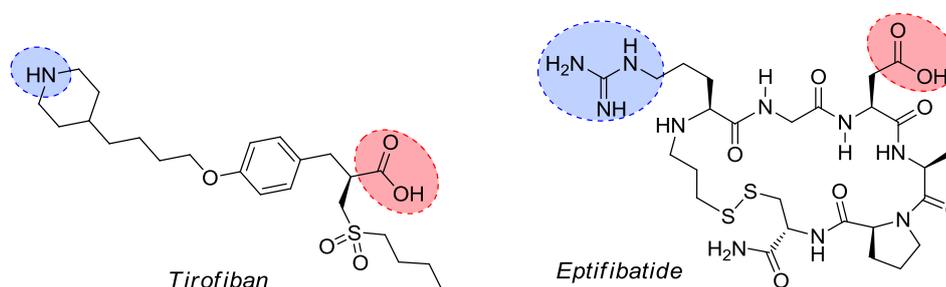


Figura 26. Análogos RGD antagonistas de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Tirofiban (Aggrastat®) fue aprobado en 1999 para aplicación intravenosa y se utiliza junto a heparina para el tratamiento del síndrome coronario agudo (grupo de síntomas atribuidos a la obstrucción de las arterias coronarias).¹⁰³ Por su parte, *eptifibatide* (Integrilin®) también se utiliza en el tratamiento del síndrome coronario agudo.¹⁰⁴

La información estructural de los complejos ligando - “integrina” sugiere que los grupos carboxilato y guanidinio de la secuencia RGD deben encontrarse alejados en el espacio para interactuar de forma adecuada. Por tanto, en el diseño de miméticos RGD, será importante el uso de distintas estrategias para mantener alejados en el espacio a los grupos que mimetizan al carboxilato y al guanidinio. Una de las principales estrategias será la introducción de restricciones conformacionales en la estructura del peptidomimético. Además, ligeras diferencias en el espacio conformacional de la secuencia RGD podrán hacer que un ligando sea más afín al centro activo de una integrina o de otra, pudiéndose así obtener ligandos selectivos para un tipo de integrina frente a otros. La publicación de este tipo de información estructural permitió desarrollar modelos moleculares que permitieran el diseño estructural de nuevos antagonistas de integrinas.

1.2.7. Macrociclación de estructuras peptídicas y pseudopeptídicas

Como ya se ha comentado, un peptidomimético debe ser una molécula con un tiempo de vida relativamente largo en un entorno fisiológico. Además debe poseer características conformacionales adecuadas para interactuar con receptores biológicos concretos y de estructura relativamente sencilla, para facilitar al máximo su síntesis. Con este fin, la inserción de secuencias peptídicas en estructuras cíclicas resulta una herramienta útil en el diseño y síntesis de peptidomiméticos.^{105,106} La ciclación en sí misma, confiere a estos compuestos una alta resistencia frente a

¹⁰³ Bazzino, O. y colaboradores. *N. Engl. J. Med.*, **1998**, 338, 1488.

¹⁰⁴ Harrington, R.A. y colaboradores. *N. Engl. J. Med.*, **1998**, 339, 436.

¹⁰⁵ Katsara, M.; Tselios, T.; Deraos, S.; Deraos, G.; Matsoukas, M.-T.; Lazoura, E.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. *Curr. Med. Chem.*, **2006**, 13, 2221.

¹⁰⁶ Hill, T. A.; Shepherd, N. E.; Diness, F.; Fairlie, D. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 13020.

peptidasas. Además, la inserción de una secuencia peptídica concreta en una estructura cíclica restringe la libertad conformacional de esa secuencia.

En los apartados anteriores ya se han mostrado algunos ejemplos de péptidos naturales y peptidomiméticos macrocíclicos (Figuras 9, 13, 20, 21, 24 y 26). Una etapa muy importante en la síntesis de péptidos y pseudopéptidos macrocíclicos es la ciclación de los correspondientes precursores lineales.^{107,108} La macrociclación se puede dar entre los dos extremos de la cadena principal, entre dos grupos de cadenas laterales o entre un extremo de la cadena principal y un grupo lateral. Normalmente los extremos de la cadena principal son un grupo ácido carboxílico (C-terminal) y un grupo amino (N-terminal) y éstos se unen mediante una lactamización. Esta reacción también puede darse en los otros dos tipos de ciclación comentados, y es una de las reacciones más comunes juntamente con las reacciones de lactonización y formación de puentes disulfuro.

Un problema común en las reacciones de macrociclación son los procesos intermoleculares que dan como resultado la formación de polímeros de los precursores lineales, Figura 27. La forma de intentar evitar la polimerización es dar las reacciones de macrociclación en condiciones de alta dilución, típicamente concentraciones submilimolares, para favorecer prioritariamente la reacción intramolecular.

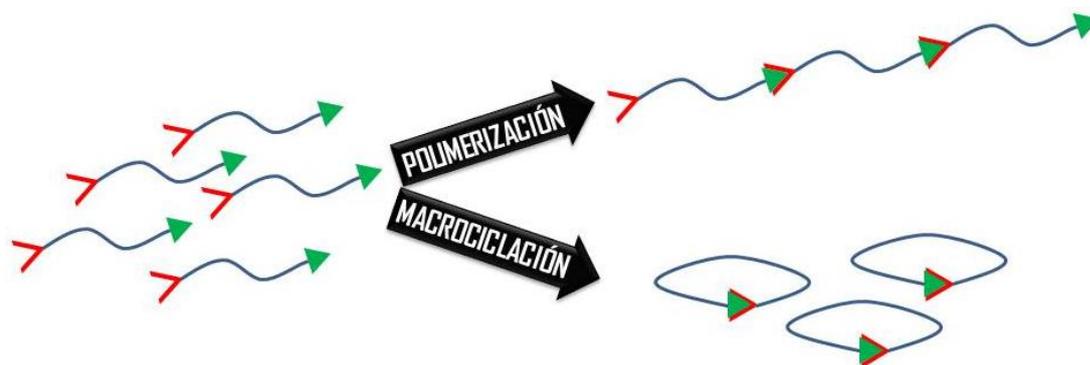


Figura 27. Procesos que pueden darse con un precursor lineal en condiciones de macrociclación.

Una forma de conseguir condiciones de pseudodilución es soportar los precursores lineales sobre un polímero o resina insoluble en el medio de reacción, de tal forma que difícilmente se encontrarán dos monómeros para dar la reacción de polimerización. Además, la síntesis en fase sólida permite purificar los intermedios de reacción simplemente filtrando y lavando la resina utilizada. La Figura 28 muestra la síntesis de un mimético macrocíclico de hélice α mediante esta estrategia.¹⁰⁹ El precursor lineal, unido a la resina, se hace reaccionar con un ácido dicarboxílico en condiciones de lactonización, para obtener el correspondiente macrociclo.

¹⁰⁷ White, C. J.; Yudin, A. K.; *Nature Chemistry*, **2011**, 3, 509.

¹⁰⁸ Clark, R. J.; Craik, D. J. *Biopolymers*, **2010**, 94, 414.

¹⁰⁹ Caporale, A.; Sturlese, M.; Gesiot, L.; Zanta, F.; Wittelsberger, A.; Cabrele, C. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8072.

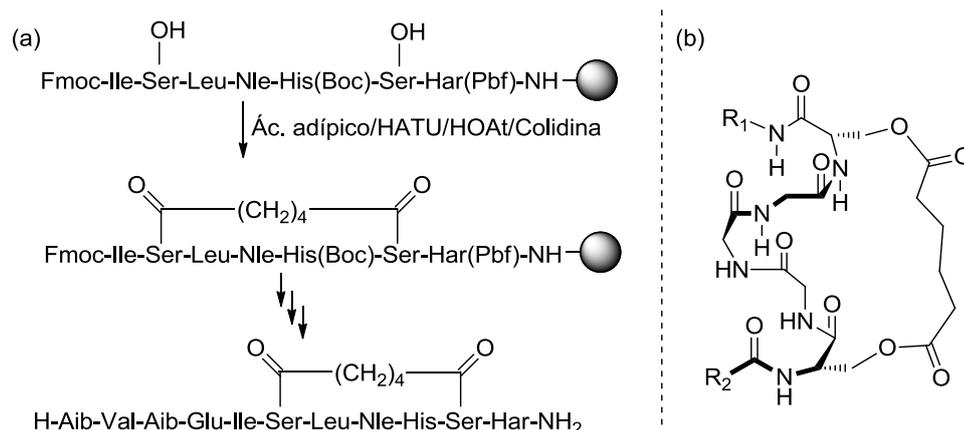


Figura 28. (a) Síntesis en fase sólida de un undecapéptido macrocíclico. **(b)** Conformación tipo hélice alfa estabilizada por la estructura cíclica. No se muestran las cadenas laterales para mayor claridad.

Una táctica muy común en la macrociclación de precursores lineales, tanto en síntesis en fase sólida como en disolución, es la inserción de módulos de plegamiento que pre-organicen la estructura lineal para que los extremos se encuentren en el espacio y se favorezca así la reacción intramolecular, o ciclación, frente a la intermolecular, o polimerización.¹¹⁰ Los módulos de plegamiento más comúnmente utilizados en la macrociclación de péptidos y pseudopéptidos son los miméticos de giro β . Debido a esto es común la inserción de residuos de D- y L-Pro, D-aminoácidos, N-metil aminoácidos y pseudoprolinas,¹¹¹ además de módulos de giro no peptídico como los que ya se han visto en apartados anteriores.

En general se obtiene más fácilmente la ciclación de péptidos de elevado tamaño, formados por más de diez residuos de aminoácidos, que la de péptidos de pequeño tamaño. Esto se debe a que los primeros tienen tendencia a establecer enlaces de hidrógeno intramoleculares en disolución, adoptando así conformaciones tipo horquilla β que acercan los extremos de la cadena peptídica.¹¹² En presencia de un mimético de giro β en la estructura lineal, el plegamiento comentado será aún más acusado en los péptidos de elevado tamaño y también podrá ser provocado en los de menor tamaño.

En base a estas ideas, Favre *et al.* han descrito varios ciclopéptidos de tamaño variable, 7 - 10 aminoácidos, con el objetivo de mimetizar ciertas secuencias peptídicas presentes en anticuerpos de la familia IgG.^{26,113} En la estructura sólida de esos anticuerpos se observó cómo ciertas regiones de la proteína adoptaban una conformación de horquilla. Como ejemplo, en la Figura 29 se esquematiza la ciclación de uno de los péptidos. Los precursores lineales se obtuvieron mediante síntesis en fase sólida y posterior separación de la resina. El módulo D-Pro-L-Pro se introdujo en la región intermedia de dichos precursores lineales para inducir el plegamiento de éstos en disolución y obtener así, mediante lactamización entre los extremos C-

¹¹⁰ Blankenstein, J.; Zhu, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1949.

¹¹¹ (a) Las pseudoprolinas se obtienen mediante la ciclocondensación de los aminoácidos serina, treonina o cisteína con un aldeído o cetona, y se puede revertir esa reacción una vez que se ha dado la macrociclación, recuperándose los aminoácidos iniciales. (b) Fairweather, K. A.; Sayyadi, N.; Luck, I. J.; Clegg, J. K.; Jolliffe, K. A. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3136.

¹¹² Daidone, I.; Neuweiler, H.; Doose, S.; Sauer, M.; Smith, J. C. *PLOS Comput. Biol.* **2010**, *6*, 276.

¹¹³ Favre, M.; Moehle, K.; Jiang, L.; Pfeiffer, B.; Robinson, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2679.

terminal y N-terminal, los ciclopéptidos correspondientes con rendimientos mayores al 90%.

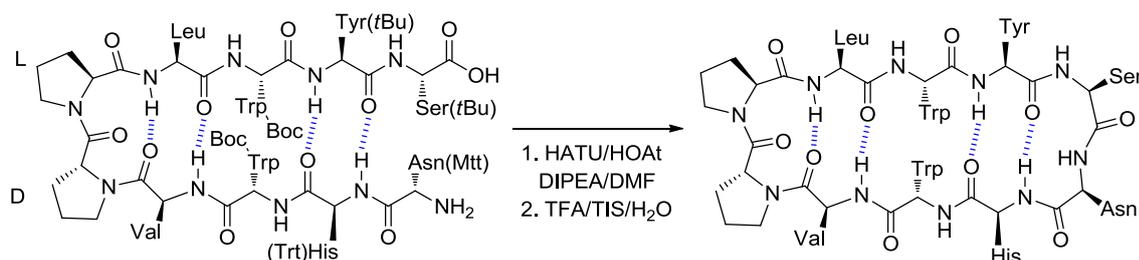


Figura 29. Macro ciclación en disolución de un decapeptido con el módulo D-Pro-L-Pro en la zona intermedia del precursor lineal. Condiciones: 1 mg/mL en DMF y en presencia de HATU (3 equiv), HOAt (3 equiv) y DIEA (0.6% v/v)

También se ha descrito la macro ciclación en disolución de péptidos y pseudopéptidos de menor tamaño. En la Figura 30 se muestran dos ejemplos de precursores lineales con un módulo cíclico no peptídico capaz de aproximar los grupos amino y carboxilo de los extremos para inducir la ciclación de la estructura. En la síntesis de los miméticos RGD con el módulo 4-aminoprolina (Amp), la macro ciclación del precursor lineal ocurre a una concentración de 3.5 mM en DMF, para obtener rendimientos alrededor del 75 %, Figura 30 (a).¹¹⁴ Por su parte, Sernissi *et al* describen la obtención del macrociclo a una concentración 3.5 mM del precursor lineal disuelto en THF, para obtener un 55% de rendimiento, Figura 30 (b).¹¹⁵ De esta forma se obtuvieron macrociclos RGD de conformación restringida con capacidad antagonista frente a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

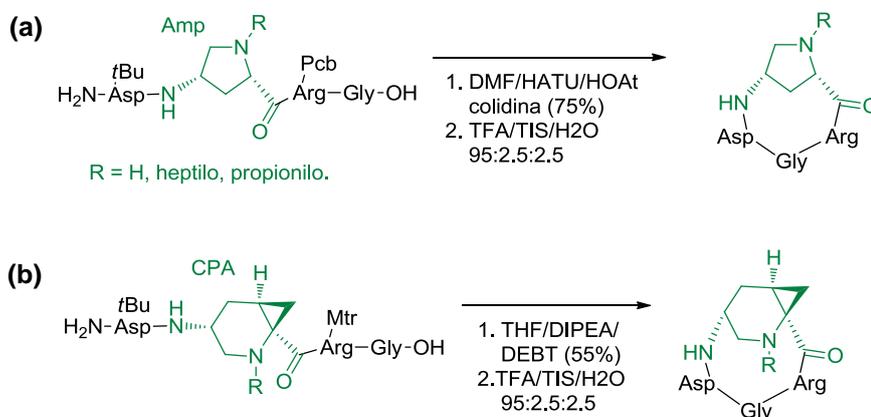


Figura 30. Macro ciclación en disolución de miméticos RGD pseudopeptídicos pequeños.

Además de las reacciones mostradas, existen multitud de métodos que se han utilizado para la ciclación de péptidos y pseudopéptidos, entre éstos: ciclaciones asistidas por cationes metálicos, ciclaciones vía tioésteres o lactonas, ciclaciones vía química "click", o ciclaciones vía reacciones de metátesis.

¹¹⁴ Zanardi, F.; Burreddu, P.; Rassu, G.; Auzzas, L.; Battistini, L.; Curti, C.; Sartori, A.; Nicastro, G.; Menchi, G.; Cini, N. *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*, 1771.

¹¹⁵ Sernissi, L.; Petrović, M.; Scarpi, D.; Guarna, A.; Trabocchi, A.; Bianchini, F.; Occhiato, E.G. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11187.

1.3. Escuaramidas

En este trabajo se ha utilizado la unidad escuaramida para desarrollar estructuras miméticas de giro β . El uso de esta estructura frente a otras muchas posibles se debe fundamentalmente a las características estructurales y propiedades supramoleculares de las escuaramidas, que las convierten a priori en candidatas ideales para este fin.

1.3.1. Características generales

Escuaramida es el nombre que se le atribuye comúnmente a los aminoderivados del ácido escuárico (3,4-dihidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona), Figura 31. En escuaramidas terciarias el nitrógeno escuaramídico está enlazado a dos sustituyentes R, mientras que en escuaramidas secundarias uno de esos sustituyentes es un hidrógeno.

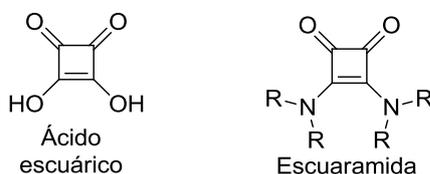


Figura 31. Estructura química del ácido escuárico y del grupo escuaramida.

Las escuaramidas presentan una estructura plana y rígida basada en un anillo aromático de cuatro miembros con dos grupos carbonilo contiguos y dos grupos amino enlazados a dos carbonos del anillo, también contiguos. Una escuaramida secundaria contiene centros dadores (NH) y aceptores (C=O) de enlace de hidrógeno. Las estructuras resonantes zwitteriónicas como las que se muestran en la Figura 32 permiten entender las principales características de este grupo. Una deslocalización del par electrónico no enlazante de uno de los nitrógenos a través del sistema π hace que el oxígeno carbonílico más lejano adquiera una densidad de carga negativa, mientras que el grupo NH pierde parte de su densidad electrónica para adquirir una densidad de carga positiva.¹¹⁶

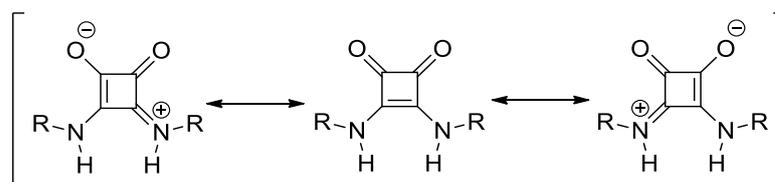


Figura 32. Formas resonantes zwitteriónicas para una escuaramida disecundaria.

Tal como sucede en el grupo amida, el enlace C_{S_q} -NH tiene rotación restringida, ya que tiene cierto carácter de doble enlace. La barrera de energía rotacional para la mutua interconversión entre los rotámeros Z y E en escuaramidas secundarias es del orden de ~ 63 kJ/mol.¹¹⁷ Este valor es algo mayor a la barrera rotacional de un enlace acil-Pro (55 KJ/mol), aunque menor que la barrera rotacional de una amida primaria

¹¹⁶ Cerioni, G.; Janoschek, R.; Rappoport, Z.; Tidwell, T. T. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6212.

¹¹⁷ Rotger, M. C.; Piña, M. N.; Frontera, A.; Martorell, G.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2302.

(75-85 KJ/mol), por lo que los rotámeros Z y E pueden coexistir en equilibrio en disolución. Así, para una escuaramida disecundaria pueden observarse en disolución los conforméromos Z,Z y Z,E, Figura 33.¹¹⁷ El conforméromo E,E no suele estar presente en disolución debido a la interacción estérica que se da entre los sustituyentes R enlazados a los nitrógenos de escuaramida.

Los dos conforméromos Z,Z y Z,E dan lugar a dos patrones de interacción de enlace de hidrógeno diferentes, tal como se muestra en la Figura 33. Además, tal como se observa en la Figura 34, la proximidad entre los grupos dadores y aceptores que forman enlaces de hidrógeno vecinos implica que para el conforméromo Z,Z se produzcan interacciones secundarias favorables y para el conforméromo Z,E se den interacciones secundarias tanto favorables como desfavorables.¹¹⁸

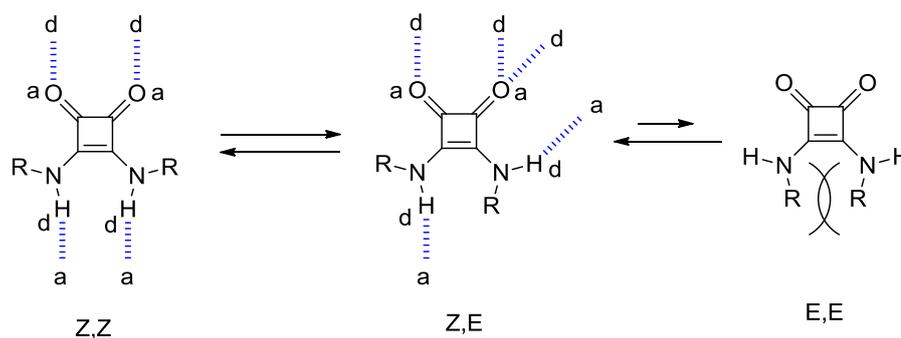


Figura 33. Equilibrio conformacional en escuaramidas secundarias y patrón de interacción por **enlace de hidrógeno** para los conforméromos más estables (d = dador, a = aceptor).

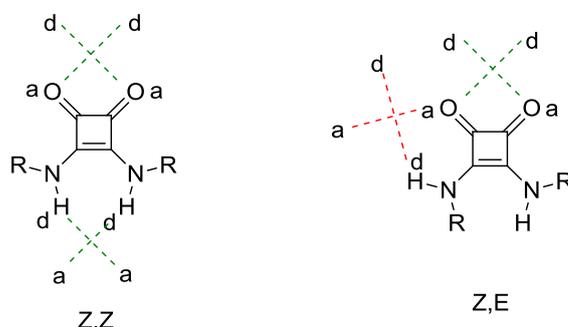


Figura 34. Interacciones secundarias en la formación de enlaces de hidrógeno de escuaramidas secundarias. Interacciones favorables (---) y desfavorables (---).

Por su parte, las escuaramidas terciarias muestran una barrera rotacional de ~71 kJ/mol. Esta barrera es algo más elevada que la correspondiente a las escuaramidas primarias y secundarias. Las escuaramidas terciarias existen en disolución como una mezcla de conforméromos en equilibrio en proporción aproximada 1:1.¹¹⁹

Las propiedades descritas convierten a las escuaramidas en un grupo muy interesante dentro del campo de la química supramolecular,^{120,121} que como se ha indicado previamente, está basada en el estudio de interacciones no covalentes entre

¹¹⁸ Jorgensen, W. L.; Pranata, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2008.

¹¹⁹ Thorpe, J. E. *J. Chem. Soc. B*, **1968**, 435.

¹²⁰ Storer, R.; Aciro, C.; Jones, L. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2330.

¹²¹ Alemán, J.; Parra, A.; Jiang, H.; Jørgensen, K. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (25), 6890.

moléculas o entre fragmentos estructurales de una misma molécula. Éste grupo se ha utilizado en el desarrollo de gran variedad de sistemas, como son sistemas autoensamblados, receptores moleculares, quimiosensores, fármacos, catalizadores,^{121,122} sistemas bioconjugados^{123,124} y transportadores biológicos.^{125,126}

1.3.2 Autoensamblaje y propiedades conformacionales

En la bibliografía se han descrito numerosas estructuras cristalinas de compuestos escuaramídicos. En estado sólido las escuaramidas disecundarias se encuentran mayoritariamente en su conformación Z,Z promoviendo la formación de agregados cabeza - cola mediante la formación de una red de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo de una escuaramida y los grupos NH de otra. Estos agregados se observan por ejemplo en el empaquetamiento en estado sólido de la dipiridinoescuaramida que se muestra en la Figura 35 (a) y (b).¹²⁷ El empaquetamiento entre los agregados cabeza-cola dependerá de cada tipo de molécula y de los grupos funcionales presentes. Por ejemplo, en el caso de la dipiridinoescuaramida se establecen interacciones π - π de apilamiento aromático o *stacking* entre los anillos escuaramídicos de dos moléculas vecinas, los cuales muestran orientaciones opuestas debido al carácter fuertemente dipolar de los anillos de escuaramida, Figura 35 (c).

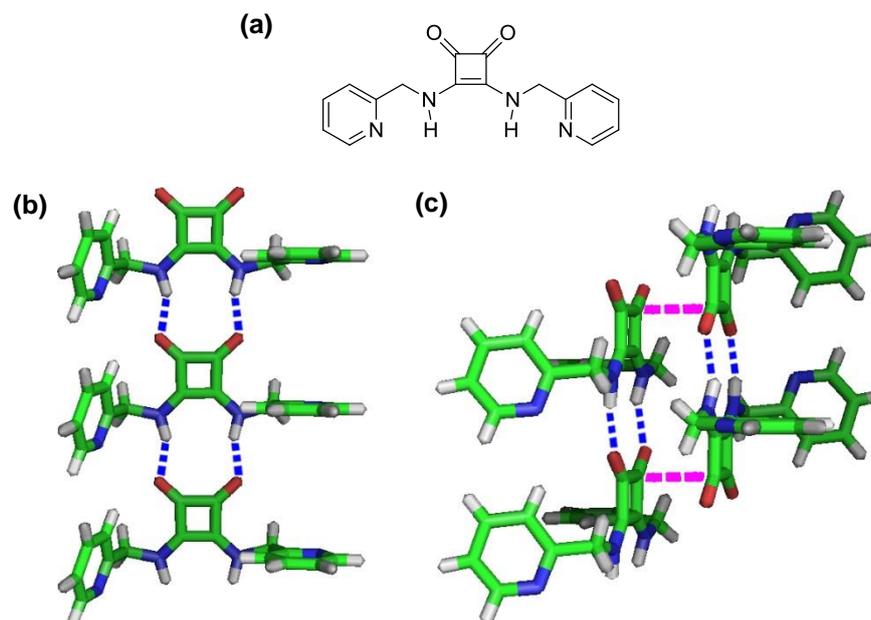


Figura 35. (a) Estructura química de 3,4-bis-(2-metilaminopiridil)-1,2-dioxo-3-ciclobuteno en estado sólido cristalino. (b) Agregados cabeza-cola de tamaño indefinido formados por **enlaces de hidrógeno** intermoleculares. (c) Empaquetamiento por interacciones π - π *stacking*.

¹²² Auvil, T.; Schafer, A.; Mattson, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 2633.

¹²³ Wurm, F.; Klok, H.-A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 8220.

¹²⁴ Wurm, F.; Steinbach, T.; Klok, H.-A. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7815.

¹²⁵ Wu, X.; Busschaert, N.; Wells, N.; Jiang, Y.-B.; Gale, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 1476.

¹²⁶ Edwards, S.; Valkenier, H.; Busschaert, N.; Gale, P.; Davis, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, 54, 4592.

¹²⁷ Prohens, R.; Portell, A.; Puigjaner, C.; Tomàs, S.; Fujii, K.; Harris, K.; Alcobé, X.; Font-Bardia, M.; Barbas, R. *Crystal Growth & Design* **2011**, 11, 3725.

Es posible diseñar escuaramidas donde el conformero Z,E sea mayoritario frente al Z,Z. Para ello cabe establecer interacciones intramoleculares adecuadas. Uno de los pocos ejemplos donde se observa este hecho en estructuras cristalinas es en la N-carbamoil escuaramida de la Figura 36. En esta estructura un enlace de hidrógeno intramolecular entre un grupo carbonilo en la posición α de un sustituyente de la escuaramida y el NH estructuralmente más alejado forma un ciclo de siete miembros y estabiliza el conformero Z,E correspondiente. De esta forma la molécula adquiere un patrón de enlace que la convierte en un isómero de guanina, lo que causa la formación de dímeros estables como los que se muestran en la figura, tanto en estado cristalino como en disolución en cloroformo.¹²⁸

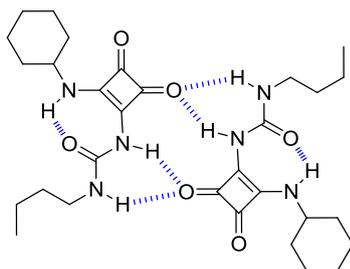


Figura 36. Dímero del conformero Z,E de una escuaramida, identificado en disolución y en estado cristalino.

En nuestro grupo de investigación se diseñó un módulo escuaramídico capaz de adoptar conformaciones plegadas debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares. Dicho módulo, formado por una escuaramida disecundaria presenta un grupo amino en la posición δ de la cadena alifática de uno de los sustituyentes, Figura 37.¹¹⁷ Disuelto en CDCl_3 y a concentraciones milimolares el conformero más abundante se corresponde con un ciclo de nueve miembros resultado de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno de amina y el NH escuaramídico estructuralmente más alejado. De esta forma queda restringida la conformación E,Z de la escuaramida. Dicho conformero se encuentra en equilibrio con otro conformero Z,Z que forma un ciclo de seis miembros al establecerse un enlace de hidrógeno intramolecular entre el N de amina y el NH escuaramídico estructuralmente más cercano. Además, existe una tercera especie dimérica en equilibrio con las anteriores.

Este módulo se utilizó como inductor de giro en la síntesis de macrociclos oligoescuaramídicos, Figura 38.^{114,129} Mediante la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, los precursores lineales se pliegan en disolución, permitiendo la obtención de los macrociclos en disolventes polares próticos, como metanol y etanol, y sin necesidad de recurrir a condiciones de alta dilución. De esta manera se han sintetizado macrociclos de tamaño variable, siendo el primer ejemplo publicado de cómo oligómeros no naturales diseñados para dar una estructura plegada mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares pueden utilizarse para obtener grandes estructuras macrocíclicas.

¹²⁸ Davis, AP; Draper, SM; Dunne, G; Ashton, P. *Chem. Comm.* **1999**, 2265.

¹²⁹ Rotger, C.; Piña, M. N.; Vega, M.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6844-6848.

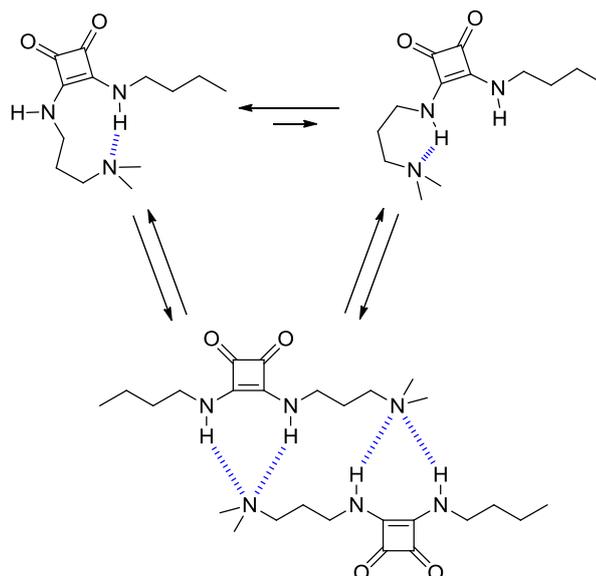


Figura 37. Equilibrio conformacional para una escuaramida plegable.

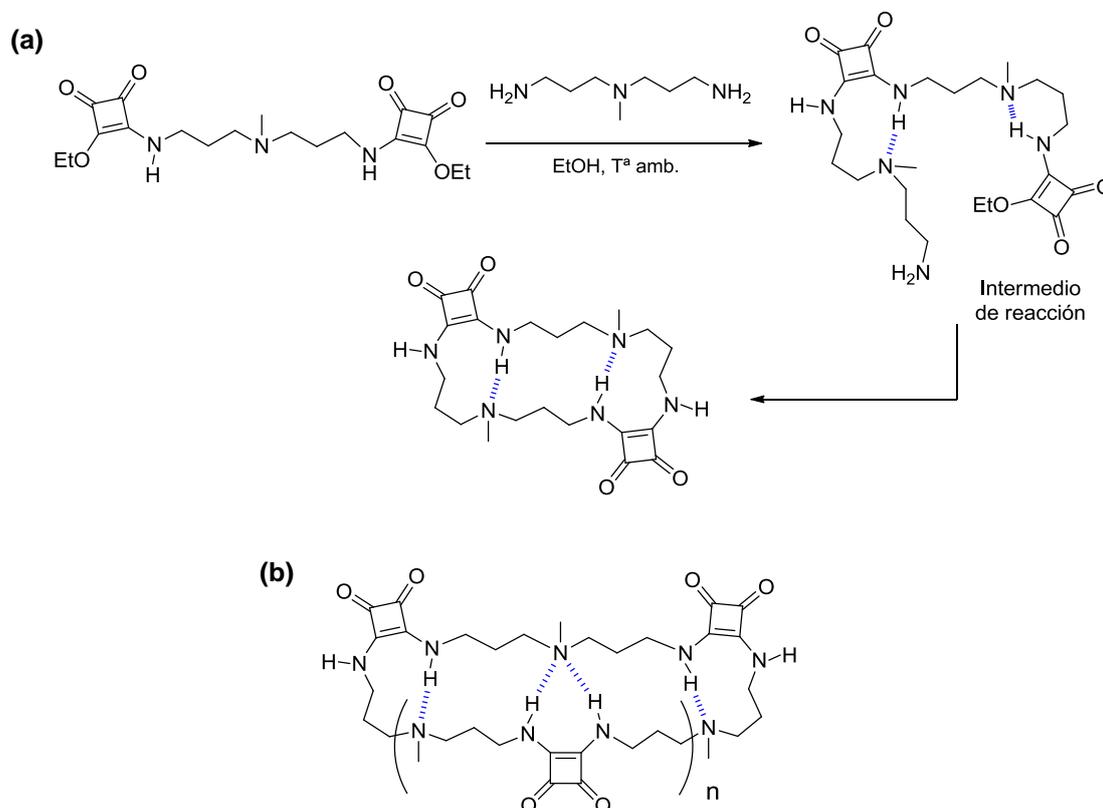


Figura 38. (a) Formación de un macrociclo diescuaramídico en etanol promovida por el plegamiento del intermedio de reacción. (b) Otros macrociclos oligoescuaramídicos de tamaño variable ($n = 1 - 4$) obtenidos de forma análoga al anterior.

1.3.3. Interacción con aniones y cationes

Debido a la capacidad de las escuaramidas para actuar como grupos donadores y aceptores de enlace de hidrógeno, éstas pueden interactuar tanto con aniones, mediante los dos grupos NH, como con cationes, a través de los oxígenos

carbonílicos, Figura 39. La interacción con aniones se ve favorecida al poderse establecer a partir del confórmero Z,Z de la escuaramida dos interacciones de enlace de hidrógeno con el anión.

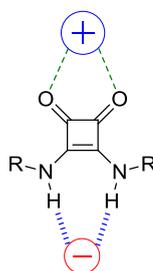


Figura 39. Centros de interacción con aniones y/o cationes para una escuaramida disecundaria.

Estudios teóricos realizados en nuestro grupo de investigación revelaron el carácter aromático tanto del anillo de escuarato como del anillo de escuaramida.^{130,131} Dichos estudios revelaron que el carácter aromático del anillo se acentúa al formar enlaces de hidrógeno, a través de los grupos carbonilo y NH ya sea con otras unidades escuaramida o con otras moléculas como aniones y cationes. Este hecho explica la extraordinaria estabilidad de los agregados cabeza - cola y de las interacciones con especies iónicas, Figura 40.

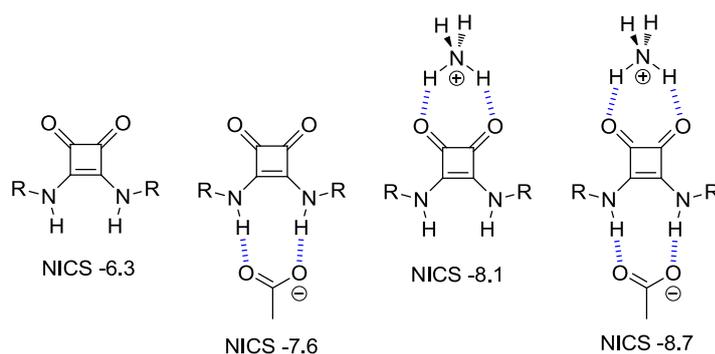


Figura 40. Estructuras calculadas. A menor NICS, anillo más aromático.

Estas propiedades se han aplicado en el diseño de receptores moleculares tanto de cationes como de aniones, Figura 41.

¹³⁰ Quiñonero, D; Prohens, R; Garau, C; Frontera, A. *Chem. phys. Let.* **2002**, 351, 115.

¹³¹ Quiñonero, D; Frontera, A; Suñer, GA; Morey, J.; Costa, A.; Ballester, P.; Deya, P. M. *Chem. Phys. Lett.*, **2000**, 326, 247.

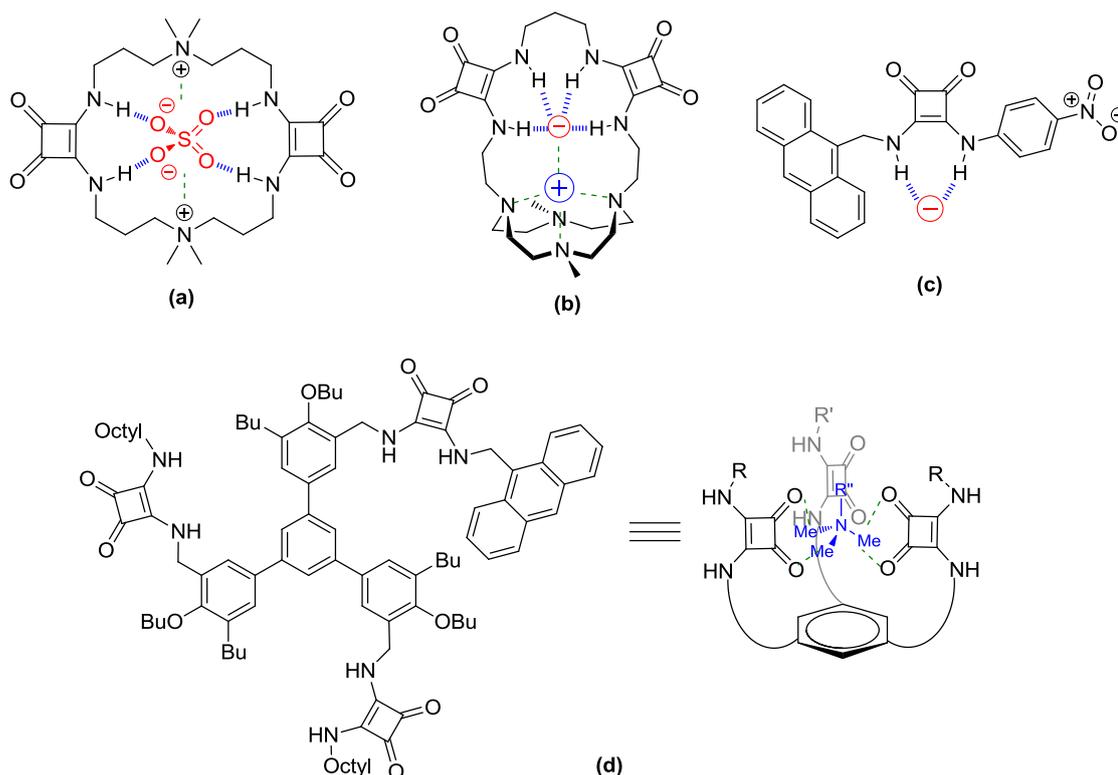


Figura 41. Receptores escuaramídicos de iones. **(a)** Macrociclo diescuaramídico. **(b)** Criptando diescuaramídico. **(c)** Sensor fluorométrico de cloruro. **(d)** Sensor fluorométrico de especies tetraalquilamonio.

Por ejemplo, el macrociclo diescuaramídico de la Figura 41 (a) es un eficiente receptor de sulfato en disolución acuosa.¹³² Además, recientemente, estudios realizados sobre la interacción entre este mismo receptor con moléculas fosforiladas, como el ATP y la manosa-6-fosfato, entre otras, han servido para poner en evidencia la elevada afinidad de los macrociclos oligoescuaramídicos como el de la figura por moléculas iónicas fosforiladas presentes en el exterior de la membrana celular.¹³³

El cavitando de la Figura 41 (b), un derivado escuaramídico de un éter azacorona, puede coordinar Cu(II) a partir de los pares de electrones del N del módulo éter azacorona. El complejo formado es capaz de reconocer aniones F⁻, Cl⁻ y Br⁻, que interaccionan con los NH escuaramídicos y con el Cu(II).¹³⁴ Al igual que Cu(II), el Zn(II) también puede coordinarse para formar otro sistema receptor de F⁻ y Cl⁻. Por su parte, el mismo receptor sin el catión Zn(II) es capaz de reconocer oxoaniones como sulfato y fosfato.¹³⁵

La escuaramida de la Figura 41 (c) actúa selectivamente como sensor colorimétrico y luminiscente de Cl⁻ en DMSO.¹³⁶

¹³² Prohens, R.; Martorell, G.; Ballester, P.; Costa, A. *Chem. Commun.* **2001**, 0, 1456.

¹³³ Sampedro, A.; Villalonga-Planells, R.; Vega, M.; Ramis, G.; Villalonga, P.; Fernández de Matos, S.; Costa, A.; Rotger, C. *Bioconj. Chem.* **2014**, 25, 1537.

¹³⁴ Ambrosi, G.; Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Guerri, A.; Micheloni, M.; Paoli, P.; Pontellini, R.; Rossi, P. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 702.

¹³⁵ Ambrosi, G.; Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Macedi, E.; Micheloni, M.; Paoli, P.; Pontellini, R.; Rossi, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 1670.

¹³⁶ Elmes, R.; Turner, P.; Jolliffe, K. *Org. Lett.* **2013**, 15, 5638.

Finalmente, el receptor tripodal de la Figura 41 (d) es un fluorosensor capaz de reconocer selectivamente fosfolípidos derivados de colina en cloroformo frente a otros tipos de fosfolípidos. Dicho reconocimiento se da gracias a la capacidad de este receptor para interactuar con el grupo tetraalquilamonio a partir de los oxígenos escuaramídicos.^{137,138}

La capacidad de las escuaramidas para interactuar tanto con cationes como con aniones ha permitido el reconocimiento de pares iónicos por parte de un receptor tripodal desarrollado en nuestro grupo de investigación, Figura 42.¹³⁹ Sales de ioduro de tetraalquilamonio forman complejos 1:3 receptor:par iónico al situarse cada par iónico entre dos unidades escuaramida, tal como se muestra en la figura. Además, la adición del anión trimesoato a la disolución provoca un cambio en la orientación de los anillos de escuaramida debido al desplazamiento de los aniones iniciales en el complejo anterior, y el receptor en cloroformo y en ausencia de sales forma agregados que generan un gel, mediante interacciones de enlace de hidrógeno y π - π *stacking*.

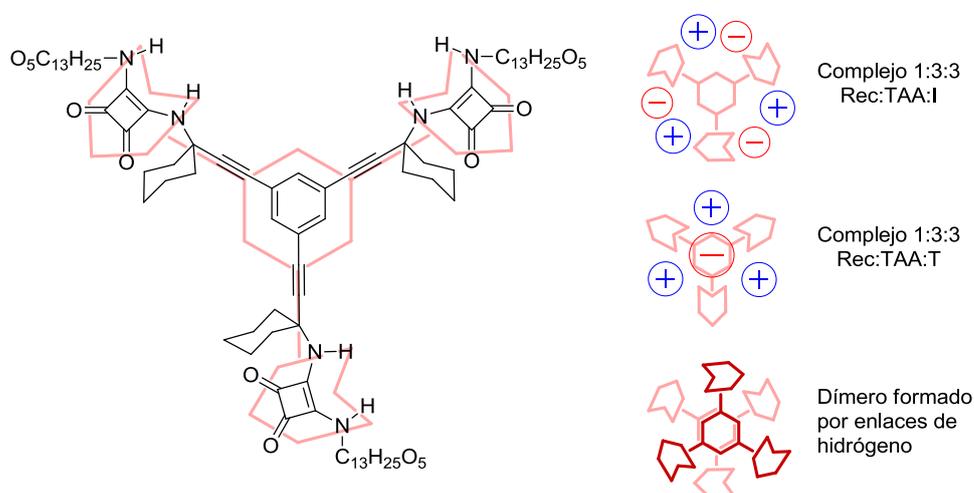


Figura 42. Receptor tripodal diseñado para reconocer aniones y cationes. (Rec=receptor; TAA=tetraalquilamonio; I=ioduro; T=trimesoato)

La capacidad de las escuaramidas para interactuar con aniones se ha usado también en el desarrollo de especies ionofóricas capaces de transportar Cl^- a través de membranas celulares^{126,140} y en el desarrollo de materiales poliméricos capaces de insertar selectivamente aniones en su estructura.^{141,142} En definitiva, los estudios de interacción de escuaramidas con especies iónicas resultan interesantes a la hora de anticipar el comportamiento de diferentes especies escuaramídicas en entornos biológicos, donde se encuentran gran cantidad de centros iónicos.

¹³⁷ Tomàs, S.; Prohens, R.; Deslongchamps, G.; Ballester, P.; Costa, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2208.

¹³⁸ Tomàs, S.; Prohens, R.; Vega, M.; Rotger, C.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9394.

¹³⁹ Soberats, B.; Martínez, L.; Sanna, E.; Sampedro, A.; Rotger, C.; Costa, A. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7533.

¹⁴⁰ Deng, L.-Q.; Lu, Y.-M.; Zhou, C.-Q.; Chen, J.-X.; Wang, B.; Chen, W.-H. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 2859.

¹⁴¹ Rostami, A.; Wei, C.; Guérin, G.; Taylor, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2059.

¹⁴² Manesiotis, P.; Riley, A.; Bollen, B. *J. Mater. Chem. C* **2014**.

1.3.4. Escuaramidas como agentes terapéuticos

Debido a las propiedades conformacionales y de reconocimiento de las escuaramidas, se ha incorporado este módulo estructural en el diseño y desarrollo de fármacos y otras moléculas bioactivas, como ionóforos o marcadores celulares fluorescentes.¹³³ En la Figura 43 se muestran varios ejemplos de escuaramidas de estructura relativamente sencilla y con propiedades farmacológicas relevantes. Por ejemplo, el fármaco *BMY-25368* demostró elevada actividad como inhibidor del receptor H_2 y ha alcanzado fases clínicas III en el tratamiento de úlceras gástricas.¹⁴³ El *SCH-527123* es un antagonista del receptor CXCR2, un receptor de interleucina 8, con el que se han llevado a cabo estudios clínicos para el tratamiento de asma y COPD.¹⁴⁴ Por su parte, la tercera estructura que se muestra en la Figura 1.40 forma parte de una familia de escuaramidas inhibidoras de ARN polimerasa, por lo que podría mostrar acción antibiótica,^{145,146} y recientemente se ha determinado la estructura cristalina del complejo formado por esta molécula y la holoenzima de ARN polimerasa.¹⁴⁷

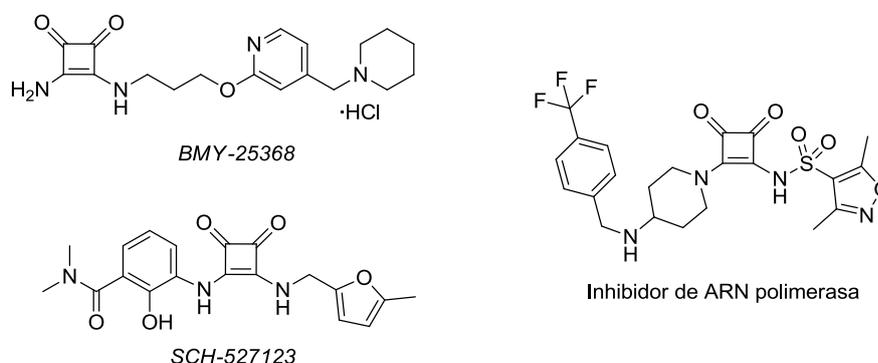


Figura 43. Ejemplos de escuaramidas con propiedades farmacológicas.

En 2006 se publicaron dos patentes mundiales independientes en las que se estableció por primera vez la actividad anticancerígena de derivados de escuaramidas.¹⁴⁸ En ambos casos, la actividad biológica se fundamenta en un mecanismo de inhibición enzimática de kinasas. En base a estas publicaciones se desarrollaron los compuestos macrocíclicos mostrados en la Figura 38, así como ciertos derivados, mostrando algunos de éstos actividad anticancerígena.^{149,150} Su elevado interés farmacológico ha llevado a posteriores estudios acerca de su

¹⁴³ Kijima, H; Isobe, Y; Muramatsu, M; Yokomori, S.; Suzuki, M.; Hiuchi, Shohei. *Biochem Pharmacol*, **1998**, *55*, 151.

¹⁴⁴ Dwyer, M. P. *et al. J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7603.

¹⁴⁵ Buurman, E.; Foulk, M.; Gao, N.; Laganas, V.; McKinney, D.; Moustakas, D.; Rose, J.; Shapiro, A.; Fleming, P. *Journal of Bacteriology* **2012**, *194*, 5504.

¹⁴⁶ Smet, C.; Duckert, J.-F.; Wieruszkeski, J.-M.; Landrieu, I.; Buée, L.; Lippens, G.; Déprez, B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4815.

¹⁴⁷ Molodtsov, V.; Fleming, P. R.; Eyermann, C. J.; Ferguson, A. D.; Foulk, M. A.; McKinney, D. C.; Masse, C. E.; Buurman, E. T.; Murakami, K. S. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3156.

¹⁴⁸ Prudhomme, M.; *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **2006**, *1*, 55.

¹⁴⁹ WO 2010/066933 A1.

¹⁵⁰ Villalonga, P.; Fernández de Matos, S.; Ramis, G; Obrador-Hevia, A; Sampedro, A.; Rotger, C.; Costa, A. *Chem. Med. Chem.* **2012**, *7*, 1472.

interacción con membranas celulares y sobre el mecanismo de internalización celular.^{133,151}

Las escuaramidas son ciclos rígidos con centros capaces de establecer interacciones análogas a las de un enlace peptídico, y eso las convierte en un módulo interesante para el diseño de peptidomiméticos. En esta línea se han diseñado miméticos de α -aminoácidos donde el grupo carboxilo se sustituye por el anillo de escuarato, de forma que mediante reacciones de condensación los derivados pueden insertarse en cadenas polipeptídicas, Figura 44 (a).^{152,153} También se ha utilizado el anillo de escuaramida en sustitución de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de algunos residuos de aminoácidos, como son el grupo carboxilato de Glu y Aps,¹⁵³ el grupo amida de Gln,¹⁵⁴ el grupo guanidino en Arg¹⁵⁵ y el grupo fosfato de Thr y Ser fosforiladas, éstas últimas implicadas en el ciclo celular al interactuar con la prolil-isomerasa Pin1, Figura 44 (b).¹⁵⁶

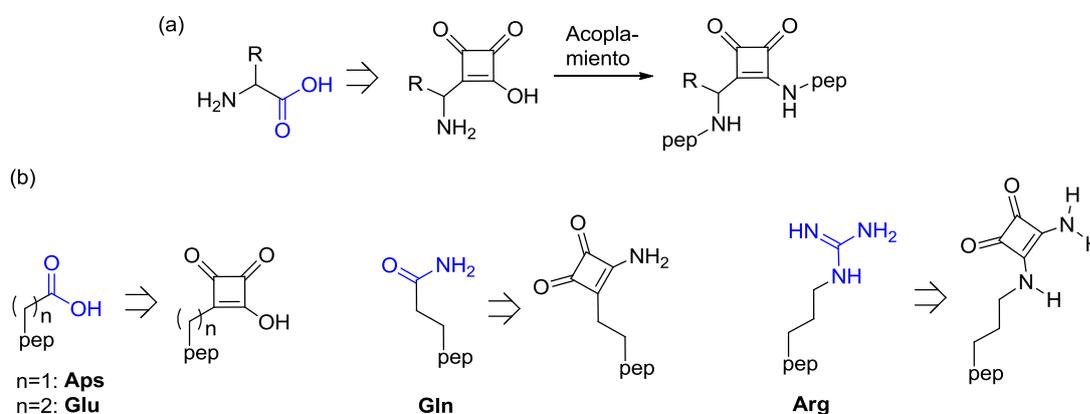


Figura 44. Diseño de peptidomiméticos pseudopeptídicos. En azul se marcan los grupos funcionales que serán sustituidos por un derivado de ácido escuárico.

También se han desarrollado peptidomiméticos escuaramídicos de estructura no peptídica, como los fármacos *SCH-527123*, Figura 43, y *Perzinfotel*, Figura 45. Este último es un antagonista del neurotransmisor NMDA (Ácido N-metil-D-Aspártico) y se desarrolló a partir de unos derivados de aminoácido con el grupo ácido fosfónico al final de la cadena lateral. Dicho grupo actúa como isótero del grupo carboxilo de la cadena lateral de NMDA, por lo que los derivados comentados mostraron actividad como antagonistas de NMDA. Como parte del desarrollo, la región del esqueleto del aminoácido se reemplazó por el anillo escuaramida,¹⁵⁷ y en un siguiente paso se eliminaron los NH escuaramídicos en posición Z para evitar que el grupo fosfonato

¹⁵¹ Giner-Casares, J. J.; Keller, J.; Rotger, C.; Costa, A.; Brezesinski, G. *Chem. Phys. Chem.* **2012**, *13*, 453.

¹⁵² T. Ishida, T. Shinada y Y. Ohfune. *Synthesis*, **2005**, 2723.

¹⁵³ Shinada, T.; Hayashi, K.; Hayashi, T.; Yoshida, Y.; Horikawa, M.; Shimamoto, K.; Shigeri, Y.; Yumoto, N.; Ohfune, Y. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1663.

¹⁵⁴ Shinada, T.; Nakagawa, Y.; Hayashi, K.; Corzo, G.; Nakajima, T.; Ohfune, Y. *Amino Acids* **2003**, *24*, 293.

¹⁵⁵ Lee, C.-W.; Cao, H.; Ichiyama, K.; Rana, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4243.

¹⁵⁶ Smet, C.; Duckert, J.-F.; Wieruszkeski, J.-M.; Landrieu, I.; Buée, L.; Lippens, G.; Déprez, B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4815.

¹⁵⁷ Kinney, W. A.; Lee, N. E.; Garrison, D. T.; Podlesny, E. J.; Sommonds, J. T.; Bramlett, D.; Notvest, R. R.; Kowal, D. M.; Tasse, R. P. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4720.

formara enlaces de hidrógeno intramoleculares con los NH escuaramídicos,¹⁵⁸ Figura 45.

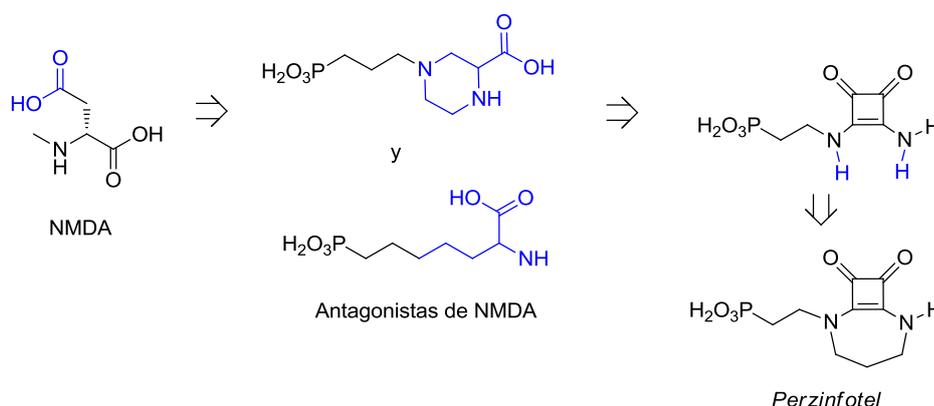


Figura 45. Desarrollo de Perzinfotel. En azul se marcan las regiones estructurales que se van a modificar en el siguiente paso.

Además, las propiedades de las escuaramidas también han permitido el diseño de varios miméticos RGD no peptídicos. Urbahns y *col.* utilizaron el módulo escuaramida como mimético del grupo guanidinio,¹⁵⁹ gracias a sus características como dador de enlace de hidrógeno, para diseñar el mimético RGD lineal que se muestra en la Figura 46 (a). Por su parte, Narasimhan y *col.* también desarrollaron los miméticos RGD escuaramídicos que se muestran en la Figura 46 (b) y (c). El diseño contemplaba básicamente dos cargas de signo opuesto en los extremos de la molécula y un “linker” de unos 14 átomos. La presencia de anillos escuaramídicos y anillos de ciclohexilamina confieren rigidez y resistencia frente a la acción de peptidasas. Además en el compuesto de la Figura 46 (c) se utiliza la capacidad de un ácido amidoescuárico para actuar como mimético de ácido carboxílico. Estos compuestos inhiben la adhesión celular, debido a su afinidad en la unión con integrinas $\alpha_v\beta_3$.

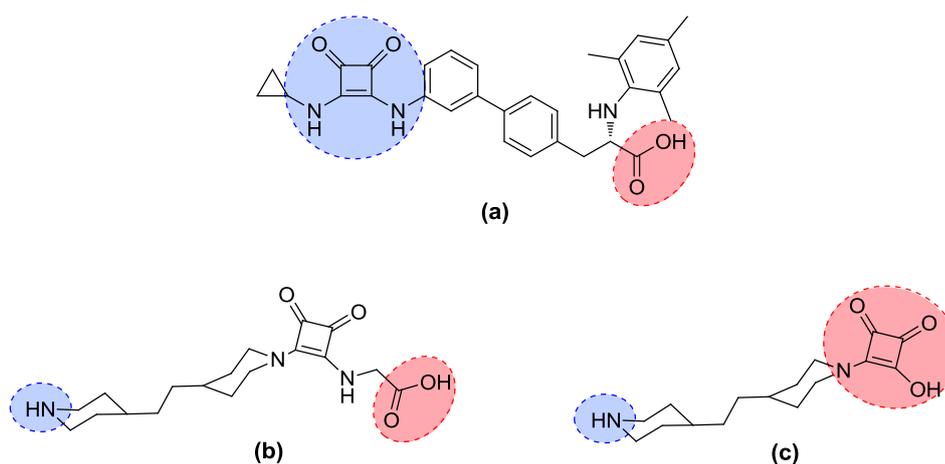


Figura 46. Miméticos RGD escuaramídicos.

¹⁵⁸ Kinney, W. A.; Abou-Gharbia, M.; Garrison, D. T.; Schmid, J.; Kowal, D. M.; Bramlett, D. R.; Miller, T. L.; Tasse, R. P.; Zaleska, M. M.; Moyer, J. A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 236.

¹⁵⁹ Urbahns, K.; Härter, M.; Albers, M.; Schmidt, D.; Stelte-Ludwig, B.; Brüggemeier, U.; Vaupel, A.; Keldenich, J.; Lustig, K.; Tsujishita, H.; Gerdes, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 6151.

Considerando la utilidad de las escuaramidas en el desarrollo de estructuras con actividad biológica y sus propiedades conformacionales, es muy interesante el estudio de estructuras escuaramídicas como módulos de plegamiento en el diseño de diferentes tipos de peptidomiméticos. En esta tesis se describen los estudios realizados en el desarrollo de varios miméticos de giro β escuaramídicos y en su uso para la síntesis de miméticos pseudopeptídicos de horquilla β y de miméticos RGD macrocíclicos. Además, también se estudia el efecto de la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en la interacción del grupo escuaramida con aniones y cationes.

2. *Objetivos*

El proyecto de esta tesis doctoral se fundamenta en el conocimiento previo de las propiedades conformacionales de las escuaramidas y de la actividad demostrada por algunos de estos compuestos en sistemas biológicos. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es el desarrollo de módulos escuaramídicos inductores de plegamiento y su uso en el diseño y síntesis de compuestos peptidomiméticos.

Para llevar a cabo este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- **Desarrollar un módulo escuaramídico inductor de plegamiento que sea fácilmente insertable en compuestos peptídicos o peptidomiméticos.** Para ello se estudiarán las propiedades conformacionales de varios compuestos modelo de estructura minimalista, constituidos esencialmente por el módulo de estudio. Dichos compuestos dispondrán de grupos funcionales que induzcan el plegamiento de la estructura mediante interacciones intramoleculares no covalentes. Además, deberán tener en su estructura grupos funcionales que permitan el acoplamiento directo con cadenas polipeptídicas. Se establecerá la estructura básica mediante el estudio de un grupo reducido de compuestos que difieran entre sí en el número de átomos que separan los dos grupos responsables del plegamiento. Posteriormente, el módulo de plegamiento podrá ser optimizado mediante modificaciones de la estructura básica. Éstos modelos minimalistas se estudiarán mediante RMN en disolventes de reducida polaridad.
- **Sintetizar compuestos peptidomiméticos que contengan un módulo escuaramídico y evaluar la actividad de los módulos como inductores de giros para obtener estructuras tipo horquilla β sencillas.** Los módulos escuaramídicos que presenten unas propiedades conformacionales adecuadas se utilizarán como unidades inductoras de giro en el diseño y síntesis de pseudopéptidos capaces de adoptar estructuras tipo horquilla β . El plegamiento de estas estructuras se estudiará mediante RMN en disolventes polares apróticos y próticos, lo que permitirá evaluar la efectividad de los módulos de giro.
- **Obtener un compuesto peptidomimético que adopte una estructura plegada tipo horquilla β en medio acuoso.** La unidad de giro escuaramídica más adecuada se utilizará en el diseño de una estructura tipo horquilla β más extensa que las anteriores. Dicho diseño también implicará la elección adecuada de los residuos peptídicos que formarán las cadenas β , para obtener así una estructura soluble y plegable en disolución acuosa. Para la síntesis de este compuesto se desarrollará previamente un precursor sintético que permita la incorporación directa de la unidad de giro en una secuencia peptídica mediante una metodología sintética en fase sólida convencional. De esta forma se facilitará la incorporación del módulo escuaramídico de giro en secuencias peptídicas más largas que las sintetizadas previamente.

- **Utilizar un módulo escuaramídico de plegamiento en la síntesis de un peptidomimético macrocíclico.** Para ello el módulo de plegamiento será insertado en un precursor lineal con el objetivo de que induzca el plegamiento de dicho precursor, favoreciendo la reacción de macrociclación. De esta forma se evaluará la capacidad de preparar macrociclos pseudopeptídicos bioactivos en disolución.
- **Evaluar el efecto del plegamiento de los módulos desarrollados sobre la interacción del grupo escuaramida con iones biológicamente relevantes.** Algunos modelos minimalistas representativos, cuyo comportamiento en disolución habrá sido previamente estudiado, se utilizarán en estudios de interacción con sales que contengan los cationes y aniones de interés. Estos estudios también se realizarán por RMN.

**3. Escuaramidas disecundarias
como miméticos de giro β**

3.1. Modelos de giro minimalistas

3.1.1. Diseño

El principal objetivo de este primer capítulo es establecer la estructura básica de un nuevo módulo de giro capaz de mimetizar la función estructural de los giros β naturales. El diseño del nuevo módulo se basa en las propiedades conformacionales de las escuaramidas secundarias y sus centros dadores de enlace de hidrógeno.

El nuevo módulo deberá tener los grupos funcionales adecuados que permitan su acoplamiento a secuencias peptídicas. Típicamente, los bloques estructurales desarrollados para funcionar como miméticos de giro β contienen grupos amino o carboxilato terminales para que puedan ser fácilmente incorporados a residuos peptídicos mediante la formación de enlaces amida. Los ésteres alquílicos del ácido escuárico se condensan fácilmente con grupos amino para dar las correspondientes escuaramidas, lo que convierte a las escuaramidas en un grupo adecuado para su incorporación en estructuras peptídicas. Los estudios realizados para el módulo escuaramídico de plegamiento descrito previamente en nuestro grupo de investigación sugieren que las escuaramidas son un grupo funcional con elevado potencial para el desarrollo de peptidomiméticos plegados, siempre y cuando exista un grupo aceptor de enlace de hidrógeno en uno de los sustituyentes escuaramídicos a una distancia adecuada de la unidad escuaramida.

En los primeros módulos estudiados, que constituyen los antecedentes de este trabajo, el grupo aceptor era una amina terciaria situada a una distancia de tres enlaces de carbono, Figura 47 (a).¹¹⁷ El nuevo módulo escuaramídico que se pretende estudiar en este capítulo incorpora un aminoácido en uno de los sustituyentes, unido por el grupo amino al anillo de escuarato mediante condensación con un éster escuárico precursor, Figura 47 (b). A su vez, el grupo carboxilo del residuo del aminoácido permitirá, posteriormente, el acoplamiento del módulo de giro a una cadena peptídica mediante un enlace peptídico empleando métodos habituales de condensación peptídica. En esta estructura el oxígeno carbonílico de la amida resultante podrá actuar como aceptor de enlace de hidrógeno. El otro sustituyente de la escuaramida, una amina u otro aminoácido, podrá condensarse de forma análoga para dar lugar a la diescuaramida correspondiente, proporcionando así el NH escuaramídico que actuará como dador de enlace de hidrógeno.

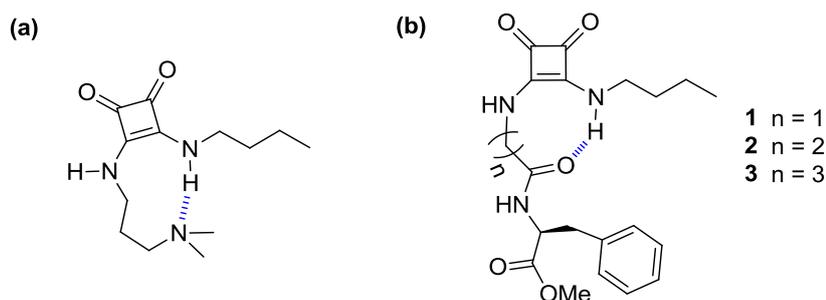


Figura 47. (a) Módulo plegable previo. (b) Modelos iniciales para el estudio de promoción de giros β .

En base a estos principios, se han diseñado tres compuestos escuaramídicos como modelos iniciales para evaluar la idoneidad del diseño del nuevo giro. Estos compuestos **1**, **2** y **3** de estructura minimalista contienen los mismos elementos estructurales de la unidad de giro, pero difieren entre sí en la longitud de la cadena del sustituyente escuaramídico que contiene el grupo carbonilo que actuará como aceptor de enlace de hidrógeno, Figura 47 (b). De esta manera, al formarse la estructura plegada se podrán obtener ciclos de diferente tamaño, por lo que estos tres modelos permitirán determinar la distancia más adecuada entre la unidad escuaramida y el grupo aceptor de enlace de hidrógeno para inducir el plegamiento o giro de la molécula. Los sustituyentes elegidos con este propósito han sido los aminoácidos glicina (Gly), β -alanina (β -Ala) o ácido γ -aminobutírico (GABA). Al tratarse de α , β y γ aminoácidos, las cadenas carbonadas entre sus grupos amino y carboxilo contienen uno, dos y tres metilenos, y por lo tanto estas tres estructuras, al plegarse según el patrón previsto, formarían ciclos de ocho, nueve y diez miembros, Figura 48. Como modelo de la unión del módulo a una cadena peptídica, los tres aminoácidos se condensarán con la fenilalanina-metiléster. En estos modelos iniciales el segundo sustituyente para la obtención de las diescuaramidas es la *n*-butilamina.

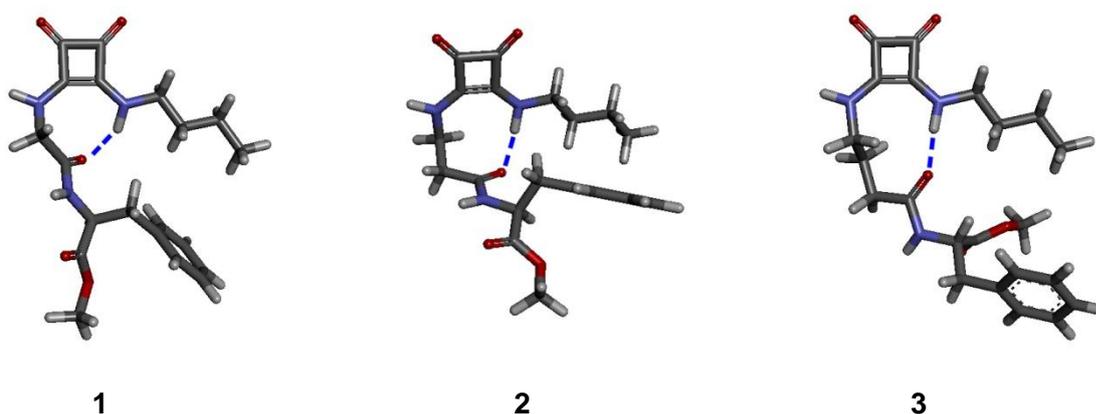


Figura 48. Geometría optimizada de los modelos de giro **1**, **2** y **3** en la conformación de plegamiento que da lugar a ciclos de 8, 9 y 10 miembros respectivamente.

A la hora de abordar los estudios conformacionales de estos tres compuestos cabe esperar que en disolución exista un equilibrio entre las diferentes conformaciones posibles para cada una de estas moléculas. Además del plegamiento esperado, que implica la forma *E,Z* de la escuaramida y que permite la formación del correspondiente enlace de hidrógeno intramolecular, las moléculas también podrán encontrarse en la forma *Z,Z* correspondiente a la estructura totalmente desplegada. Además, de forma

análoga a lo observado en los módulos descritos anteriormente,¹¹⁷ cabe considerar la posibilidad de que, mediante un enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del grupo amida y el NH escuaramídico más cercano, puedan formarse otro tipo de anillos de menor tamaño, dando lugar a ciclos de cinco, seis y siete miembros; aunque, salvo para el caso de la formación de un anillo de seis miembros, los otros dos son energéticamente más desfavorables,¹⁶⁰ Figura 49. Además no debemos olvidar que los numerosos grupos donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno que poseen estas estructuras permiten la formación de especies diméricas o agregados de orden superior. Estas especies competirán sin duda con la estructura objetivo, pero su peso relativo en los equilibrios en disolución puede ser minimizado utilizando concentraciones bajas y disolventes adecuados.

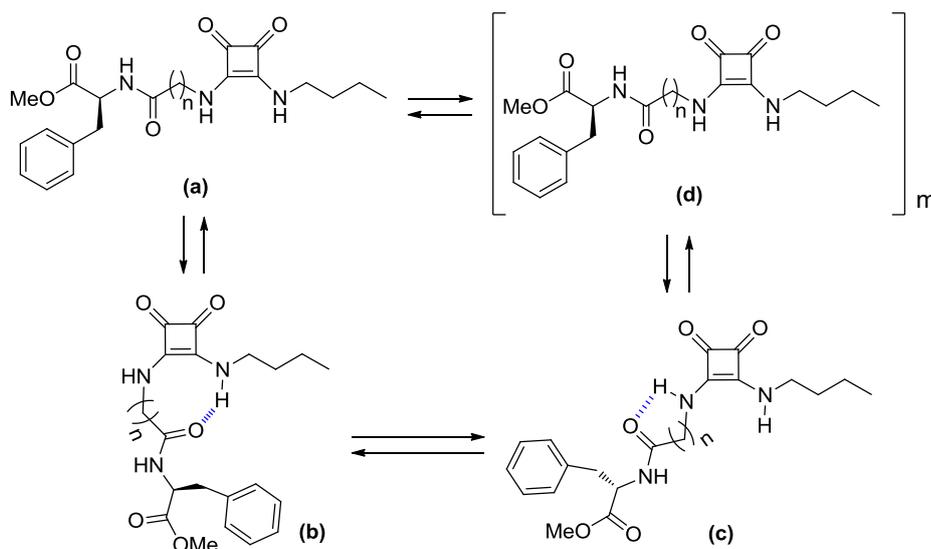


Figura 49. Equilibrio conformacional entre las posibles especies presentes en disolución para los modelos **1** ($n = 1$), **2** ($n = 2$) y **3** ($n = 3$). **(a)** forma desplegada **(b)** conformero de giro **(c)** plegamiento alternativo **(d)** agregados.

3.1.2. Síntesis de las escuaramidas **1**, **2** y **3**

En la Figura 50 se representa el esquema sintético seguido para la obtención de los tres compuestos modelo **1**, **2** y **3**. La síntesis de estos compuestos se ha diseñado de forma modular, ya que existen elementos estructurales comunes a los tres compuestos. Así, y mediante la combinación de los mismos, se puede obtener una mayor diversidad estructural y funcional, que puede ser de un gran interés en la realización tanto de estos como de futuros estudios.

La síntesis de estos compuestos se ha llevado a cabo preparando, en primer lugar, la monoescuaramida éster **4**, al tratarse de un elemento estructural común a los tres. Este compuesto puede combinarse con los distintos aminoácidos seleccionados para obtener los diferentes compuestos modelo. Dicha síntesis se ha realizado a partir de reacciones de condensación, según las cuales se forman los enlaces C-N escuaramídicos y el enlace amida de la molécula.

¹⁶⁰ Kuhn, B.; Mohr, P.; Stahl, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2601.

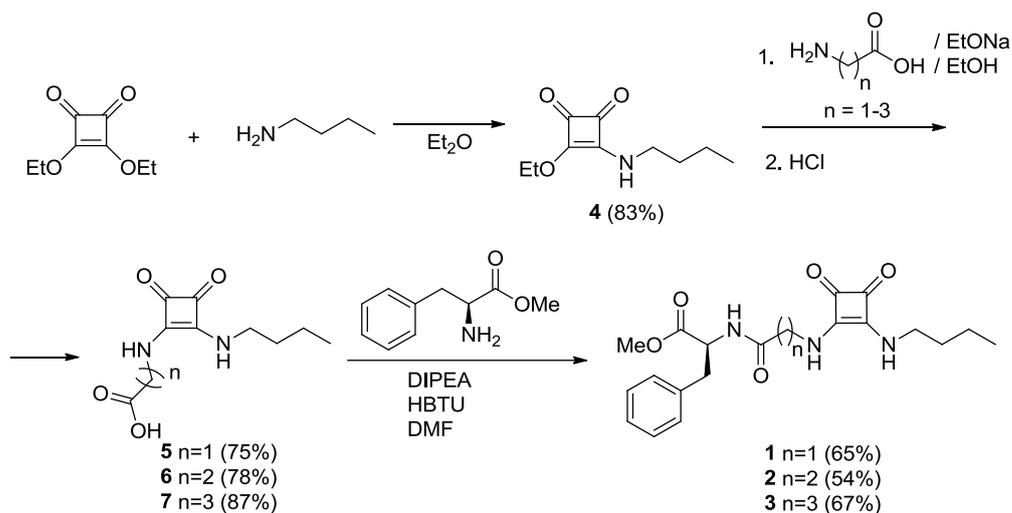


Figura 50. Esquema sintético para los tres modelos iniciales.

Generalmente las escuaramidas se obtienen mediante la condensación de un diéster alquílico de ácido escuárico con aminas. En el primer paso sintético se llevó a cabo la condensación de un equivalente de escurato de dietilo con un equivalente de *n*-butilamina en dietiléter como disolvente, para favorecer la monofuncionalización del escurato de dietilo y obtener la monoescuaramida éster **4**. En estas condiciones se aísla el compuesto de monocondensación en un 83% de rendimiento, evitándose generar la diescuaramida simétricamente disustituida. Dicha monoescuaramida éster se corresponde con la mitad estructural común a los tres modelos diseñados, por lo que es conveniente que se pueda obtener de forma sencilla y a escala multigramo ya que se utilizará en la síntesis de los tres compuestos.

En el segundo paso, la monoescuaramida éster **4** se condensó con un equivalente de cada uno de los tres aminoácidos indicados: glicina (Gly, $n=1$), β -alanina (β -Ala, $n=2$) y ácido γ -aminobutírico (GABA, $n=3$), para obtener las correspondientes diescuaramidas **5**, **6** y **7**. Los aminoácidos en medio neutro o ligeramente básico se encuentran mayoritariamente en su forma zwitteriónica. La protonación del grupo amino reduce su carácter nucleófilo. Para evitarlo y facilitar la reacción con la monoescuaramida **4**, se preparó la sal sódica del aminoácido disuelto en etanol, añadiendo un equivalente de etóxido sódico. La sal, sin aislar, se condensó con la monoescuaramida éster **4** en etanol, obteniéndose las diescuaramidas asimétricamente sustituidas **5**, **6** y **7**, las cuales se aislaron como ácidos tras el tratamiento del crudo de reacción con HCl acuoso.

El tercer paso consistió en la reacción de acoplamiento peptídico entre el grupo carboxilato de las diescuaramidas obtenidas en el paso anterior y el metiléster del aminoácido natural L-fenilalanina (Phe-OMe), para obtener las escuaramidas **1**, **2** y **3**. Esta reacción se llevó a cabo utilizando hexafluorofosfato de *o*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU) como agente de acoplamiento, en presencia de diisopropiletilamina (DIPEA) y utilizando dimetilformamida (DMF) como disolvente. El agente de acoplamiento se eligió en base a los bajos índices de racemización descritos para este reactivo cuando se utiliza en reacciones similares.¹⁶¹ Este

¹⁶¹ Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.

procedimiento, una vez optimizado, se ha utilizado en la mayoría de las reacciones de acoplamiento peptídico llevadas a cabo para la síntesis de los compuestos de esta tesis. Los compuestos **1-3** se obtuvieron con un rendimiento global que varía entre el 40 y el 48 %.

3.1.3. Estudio conformacional de los modelos de giro **1, 2 y 3** mediante RMN

Una de las técnicas más adecuadas para el estudio de las propiedades conformacionales de una molécula en disolución es la resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN), mono y bidimensional. La solubilidad de los compuestos **1-3** permitió realizar dichos estudios en dos disolventes orgánicos distintos y de constante dieléctrica bien diferenciada, como son el cloroformo y el acetonitrilo.

El cloroformo es un disolvente de polaridad media que favorece la formación de los enlaces de hidrógeno tanto intra- como intermoleculares. Sin embargo, el acetonitrilo es un disolvente que, debido a su constante dieléctrica más elevada, dificulta la formación de enlaces de hidrógeno. En general, en este disolvente los enlaces de hidrógeno intermoleculares se ven desfavorecidos, y los enlaces de hidrógeno intramoleculares, que suelen ser más fuertes que los anteriores, pueden verse debilitados o no.¹⁶²

A la hora de realizar los estudios conformacionales de un compuesto resulta útil comparar los desplazamientos químicos de los protones susceptibles de formar enlace de hidrógeno con los desplazamientos químicos esperados para ese tipo de protón expuesto al disolvente. Así, a 298 K y en CDCl_3 , un NH de amida peptídico totalmente expuesto al disolvente tiene típicamente un desplazamiento químico de ^1H RMN sobre 5.8 - 6.4 ppm.¹⁶³ Para NH escuaramídicos, los valores observados en compuestos de baja constante de dimerización son de 5 - 5.5 ppm, y para grupos CH_2 - α adyacente a NH escuaramídico se observan valores de 3.5 - 3.7 ppm.^{117,138} Por otra parte, en CD_3CN a 298 K, el desplazamiento químico habitual para una señal de NH de amida que no está implicado en ningún enlace de hidrógeno es de 6.2 - 6.4 ppm.¹⁶² Sin embargo si el grupo NH pertenece a un residuo de α -aminoácido puede sufrir un efecto paramagnético producido por el carbonilo en posición β , por lo que se observan desplazamientos químicos alrededor de 6.9 ppm. Para confirmar este hecho y obtener valores de desplazamientos químicos con los que comparar los valores observados en los compuestos estudiados se registró el espectro de ^1H RMN en CD_3CN a 298 K para el dipéptido Boc-GABA-Phe-OMe, cuyo NH amídico no tiene opción de formar enlace de hidrógeno intramolecular. Por otra parte, los espectros registrados en acetonitrilo de diferentes compuestos escuaramídicos tomados como patrón, indican que un NH escuaramídico completamente expuesto al disolvente mostrará desplazamientos químicos cercanos a 6.2 ppm y un CH_2 - α mostrará valores de 3.5 - 3.7 ppm.

¹⁶² Gellman, S. H.; Dado, G. P.; Liang, C-B; Adam, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1164.

¹⁶³ Fisk, J. D.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5443.

Cuando en disolución existen varias especies y/o conformeros en equilibrio rápido a temperatura ambiente, las señales de ^1H RMN presentan un desplazamiento químico promedio de los desplazamientos correspondientes al mismo núcleo en la mezcla de conformeros en equilibrio. Al bajar la temperatura, las moléculas en disolución reciben menos energía del medio y la interconversión de especies en equilibrio se ralentiza en la escala de tiempo de la RMN. Debido a esto, por debajo de la temperatura de coalescencia se pueden observar varias señales para un mismo protón, donde cada una corresponde a una especie o conformación diferente.

El grupo escuaramida es un grupo especialmente adecuado para el estudio conformacional en disolución mediante experimentos de ^1H RMN, debido a que las barreras de rotación de los enlaces N-C son suficientemente elevadas para que la velocidad de interconversión entre los diferentes rotámeros sea lenta en la escala de tiempo de la RMN, pudiéndose alcanzar en la mayoría de los casos condiciones de temperatura que permitan distinguir entre dichos rotámeros en el espectro. Además, los núcleos más afectados por este tipo de cambios conformacionales muestran desplazamientos químicos diferentes, en función de la conformación y de las interacciones que forman. Concretamente, en una diescuaramida, los desplazamientos químicos de los hidrógenos que están orientados hacia un grupo carbonilo del anillo experimentarán un desapantallamiento por efecto paramagnético del grupo carbonilo, por lo que las señales correspondientes en el espectro de ^1H RMN experimentarán un desplazamiento a campo bajo. Como se muestra en la Figura 51, en una escuaramida disecundaria en su conformación E,Z los núcleos afectados por dicho efecto paramagnético son el NH escuaramídico para el enlace escuaramídico E y el $\text{CH}_2\text{-}\alpha$ del sustituyente para el enlace Z. En base a ello, diferencias entre los desplazamientos químicos de dos núcleos análogos, ya sean los dos NH o los dos $\text{CH}_2\text{-}\alpha$, serán indicativas de la presencia de un conformero E,Z en disolución. Además, si un NH escuaramídico está implicado en la formación de un enlace de hidrógeno, su señal se verá desplazada a campo bajo, y cuanto mayor sea la interacción mayor será también dicho desplazamiento.¹¹⁷ El desplazamiento a campo bajo de una señal por formación de enlace de hidrógeno es mayor que el producido por efecto paramagnético.

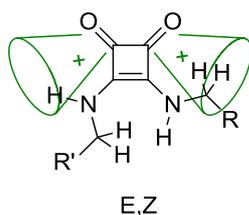


Figura 51. Representación del efecto paramagnético de los carbonilos escuaramídicos sobre los hidrógenos de una escuaramida disecundaria en su forma E,Z.

En disolventes de baja polaridad, como cloroformo o acetonitrilo, los núcleos totalmente expuestos al disolvente o totalmente aislados de éste, por estar implicados en enlaces de hidrógeno intramoleculares, experimentan una menor influencia de la variación de la temperatura en su desplazamiento químico. Sin embargo, la variación de desplazamiento químico con la temperatura será bastante más pronunciada en el caso de núcleos parcialmente expuestos al disolvente y que formen enlaces de hidrógeno, inter- o intramoleculares. En estos casos, la disminución de la temperatura favorece la formación de dichos enlaces de hidrógeno. Para cuantificar el efecto de la

de la concentración y la temperatura, especialmente en aquellos protones susceptibles de formar enlaces de hidrógeno.

Un aumento en la concentración favorece la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, observándose un desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes a los protones implicados en esas interacciones. Sin embargo, los protones implicados en la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares son más insensibles al aumento de la concentración. El efecto de la concentración se evaluó mediante la adquisición de espectros ^1H RMN a diferente concentración.

En la figura 53 se muestra la superposición de los espectros registrados para **1** en CDCl_3 en el rango de concentraciones de 1 a 100 mM. Se observa un importante desplazamiento a campo bajo de las tres señales de NH de la molécula, NHa, NHb y NHd, a medida que aumenta la concentración, sugiriendo la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, para dar lugar a agregados supramoleculares en lugar de especies monoméricas plegadas. Curiosamente, la diferencia de desplazamiento químico en el intervalo de concentraciones estudiado (1 - 100 mM) es mayor para los NHa y NHb, 0.49 y 0.40 ppm, que para el NHd, 0.23 ppm, lo que indica que la agregación del compuesto tiene lugar fundamentalmente a través de los NH escuaramídicos.

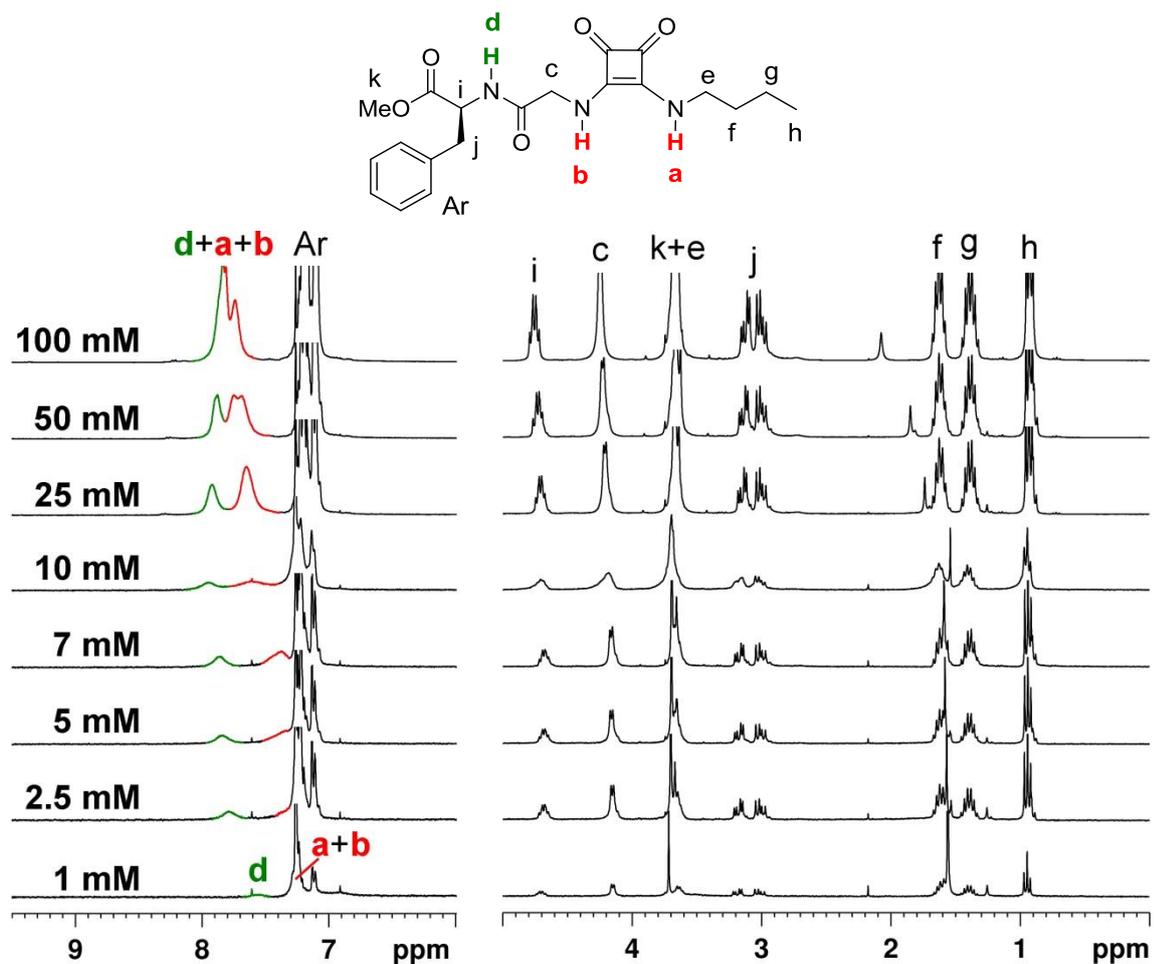


Figura 53. Serie de espectros ^1H RMN de **1** (CDCl_3 , 298K) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la concentración.

Para evaluar el efecto de la temperatura y determinar la formación de enlaces de hidrógeno intra- o intermoleculares, se registraron una serie de espectros de protón del compuesto **1** (2 mM) en CDCl_3 , en el rango de 257 - 314 K. En la Figura 54 se muestra el conjunto de espectros realizados. Los espectros muestran que las tres señales de NH se desplazan considerablemente al disminuir la temperatura. El coeficiente de variación para los tres protones NH resulta idéntico, $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T = -0.011 \text{ ppm/K}$. Estos valores se asemejan bastante a las variaciones descritas para protones capaces de formar enlaces de hidrógeno intermoleculares, lo que indica que principalmente se favorece la formación de agregados con la disminución de la temperatura.¹⁶⁴

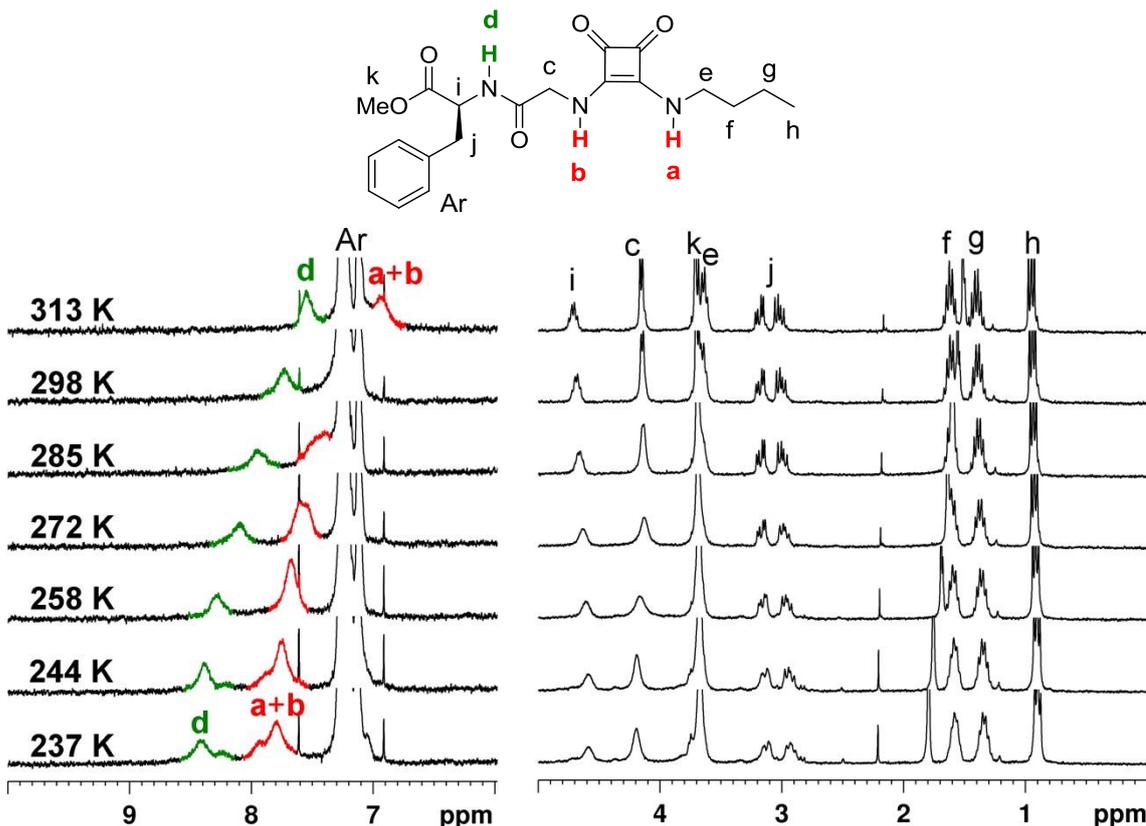


Figura 54. Serie de espectros ^1H RMN de **1** (CDCl_3 , 2mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

Tanto en los espectros registrados en el rango de 1 a 10 mM como en los registrados para realizar el estudio de variación de temperatura, todos ellos en CDCl_3 , la señal NHd presenta desplazamientos químicos más altos que las señales NHa y NHb, Figuras 53 y 54. Además, las señales NHa y NHb han mostrado mayor dependencia de la concentración que la señal NHd. Estos resultados sugieren que el NH amídico está implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular más fuerte que los enlaces de hidrógeno intermoleculares en los que participan los NH escuaramídicos en la formación de agregados. El enlace de hidrógeno intramolecular puede estar presente tanto en una especie monomérica como en agregados del compuesto, Figura 55. Además, el hecho de que los NH escuaramídicos muestren desplazamientos químicos y dependencias de la concentración y la temperatura prácticamente idénticos indica que estos dos núcleos tienen un entorno químico muy similar, lo cual permite descartar conformeros del tipo E,Z. Los desplazamientos químicos de los NH escuaramídicos en función de la concentración son consistentes con un modelo de dimerización 1:1, con una constante $K_{\text{dim}} = 260 \pm 85$. El dímero propuesto en la figura 55, uno de los más probables, resulta de la interacción entre dos

especies monoméricas como la propuesta anteriormente. La formación de dímeros de este tipo justifica que todos los NH tengan un coeficiente $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ considerablemente elevado, ya que todos ellos están implicados en la formación de enlaces de hidrógeno que se refuerzan al disminuir la temperatura.

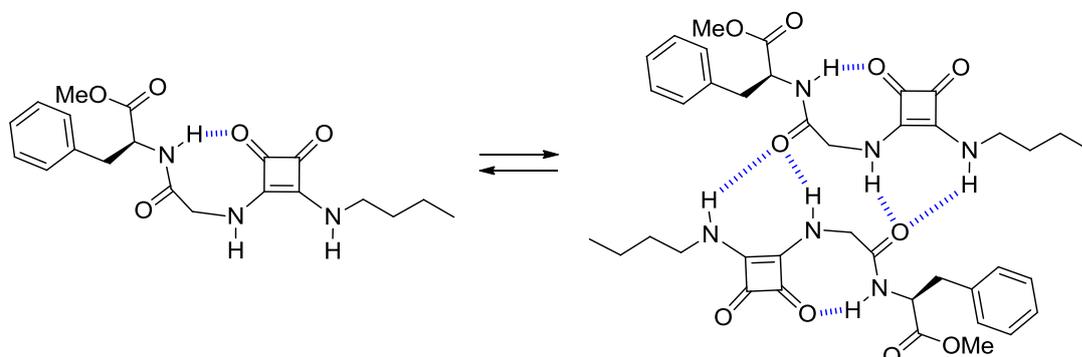


Figura 55. Formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el NH de amida (dador) y un oxígeno de carbonilo escuaramídico (aceptor). Equilibrio entre una especie monomérica y una especie dimérica.

La dependencia de la concentración que muestra la señal NHd en el rango 1 - 10 mM indica que al aumentar la concentración se está favoreciendo la formación, en mayor o menor medida, de otros agregados donde este hidrógeno está implicado en enlaces de hidrógeno intermoleculares, como por ejemplo los dímeros y agregados cabeza-cola que se representan en la Figura 56.

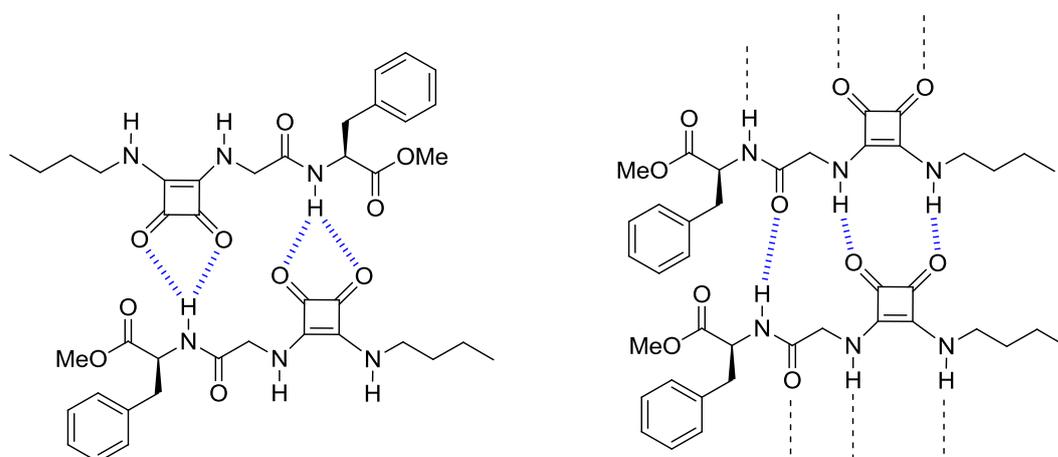


Figura 56. Representación de posibles agregados de 1.

Para obtener mayor información sobre las especies en equilibrio, se registraron los espectros NOESY y ROESY (2D RMN) de **1** en CDCl_3 a una concentración 2 mM. Los espectros muestran señales de entrecruzamiento entre el CH_3 del metiléster y los protones de la cadena alifática de n-butilo. Este resultado indica la presencia de dímeros cruzados como los que se muestran en las Figuras 55 y 56 izq.

Debido a la tendencia del compuesto **1** a formar enlaces de hidrógeno intermoleculares en cloroformo, se procedió a su estudio en acetonitrilo. El acetonitrilo posee cierto carácter aceptor de enlace de hidrógeno, por lo que compite con oxígenos carbonílicos del compuesto **1**. Como consecuencia, la formación de enlaces

de hidrógeno se ve desfavorecida, especialmente la de los intermoleculares, que conducen a la formación de dímeros y agregados.

El espectro de ^1H RMN de **1** en acetonitrilo presenta un conjunto de señales bien resueltas, Figura 57. La asignación de las señales se llevó a cabo mediante el análisis del correspondiente espectro COSY. Las señales NHa y NHb muestran el mismo desplazamiento químico, 6.2 ppm, lo que indica que probablemente el conformero mayoritario de la escuaramida en disolución es la forma Z,Z en la que no se forman enlaces de hidrógeno intramoleculares. La señal NHd aparece a 7 ppm, en concordancia con el desplazamiento químico esperado.

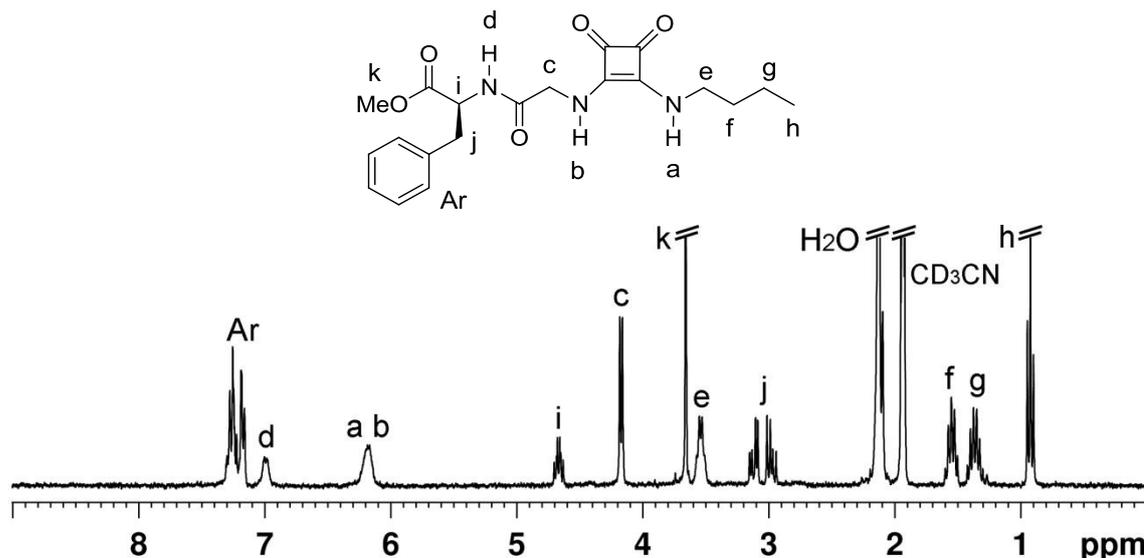


Figura 57. Espectro de ^1H RMN de **1** (CD_3CN , 2 mM, 298 K) y asignación de las señales.

Para corroborar la suposición anterior, se procedió a evaluar el efecto de la temperatura sobre el desplazamiento químico de una disolución 2 mM en CD_3CN del compuesto **1**, Figura 58. En este caso se observa un ligero desplazamiento de las señales de NH a campo alto al aumentar la temperatura, siendo éste bastante más moderado que en CDCl_3 y de la misma magnitud para las tres señales, $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T = -0.003$ ppm. La ligera dependencia de la temperatura que muestran estas señales y sus desplazamientos químicos indican que la molécula se encuentra fundamentalmente en su forma abierta, donde ningún centro donador está implicado en la formación de enlaces de hidrógeno.

En resumen, el análisis conformacional del compuesto **1** indica que en una disolución 2 mM en CDCl_3 a 298 K el producto se encuentra principalmente en forma monomérica. El conformero principal es el resultante de la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el NH de la amida y un oxígeno del carbonilo escuaramídico vecino. Esta especie monomérica está en equilibrio rápido con una pequeña proporción de dímero, probablemente del tipo que se propone en la Figura 55. Al modificar la temperatura o la concentración, varía la relación monómero/dímero presente en disolución. Por otra parte, en una disolución 2 mM de **1** en CD_3CN a 298 K el producto se encuentra en forma monomérica abierta y la disminución de la temperatura no afecta a esa situación.

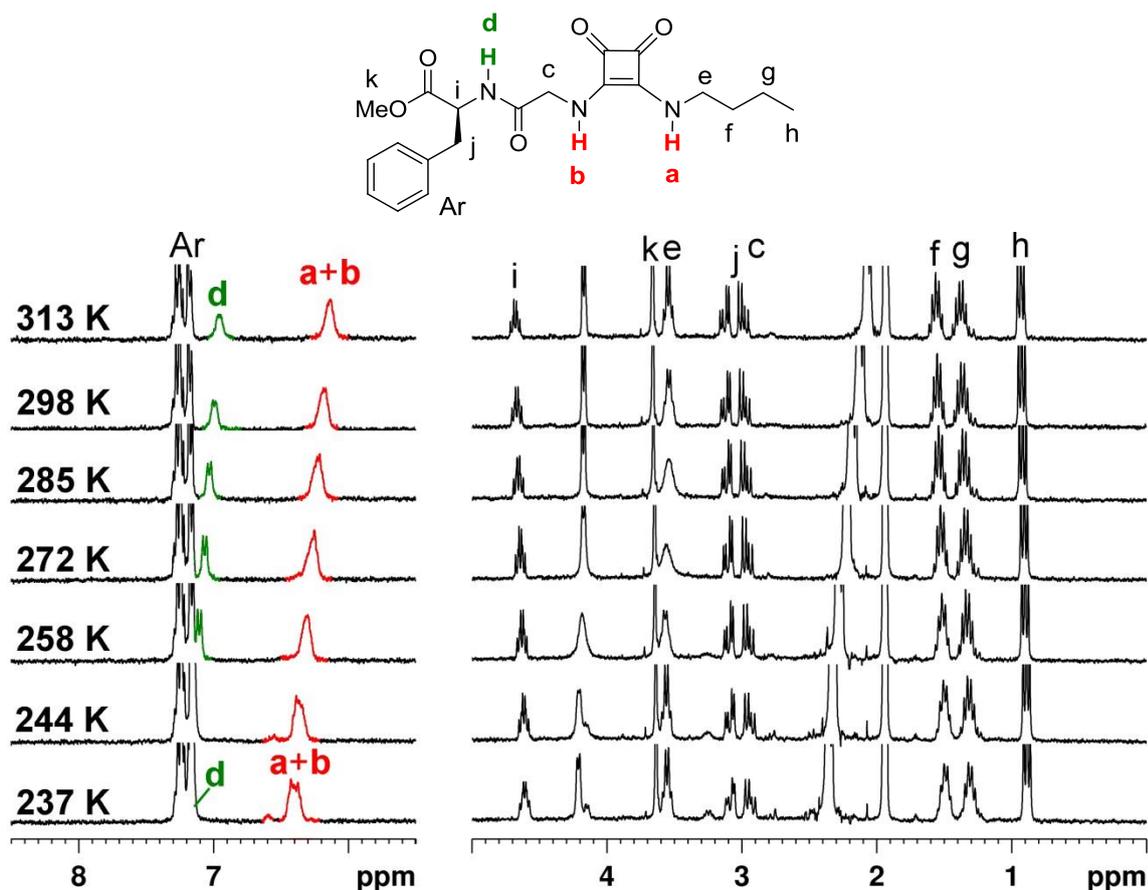


Figura 58. Serie de espectros ^1H RMN de **1** (CD_3CN , 2 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

3.1.3.2. Modelo **2** (-sq-NH_b-(CH₂)₂-CO-)

De forma análoga al estudio descrito en el apartado anterior para el modelo **1**, se llevó a cabo, el estudio relativo al modelo **2**. Este producto es muy insoluble en CDCl_3 , en comparación con los otros dos modelos, y la máxima concentración que se puede tener en disolución es aproximadamente 1 mM. Debido a esto, no fue posible realizar experimentos a distintas concentraciones.

En la Figura 59 se muestra la asignación de las señales del espectro de ^1H RMN en CDCl_3 para la escuaramida **2**. Esta asignación se ha hecho a partir de un experimento COSY. Las tres señales de NH aparecen entre 6.3 y 6.6 ppm, desplazamientos químicos habituales para NH totalmente expuestos al disolvente.

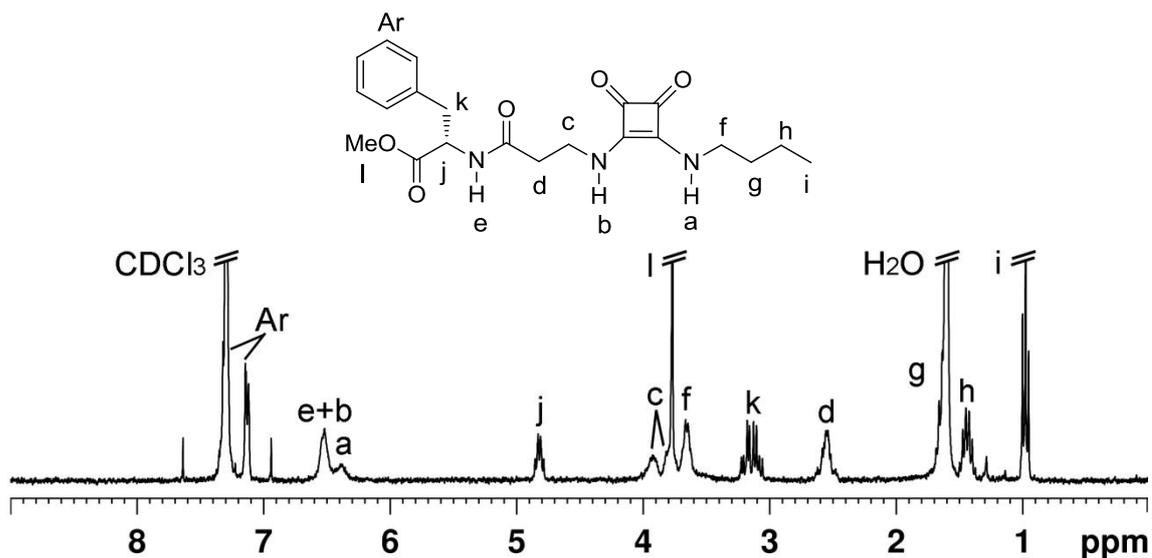


Figura 59. Espectro de ^1H RMN de **2** (CDCl_3 , 1 mM, 298 K) y asignación de las señales.

En la Figura 60 se muestra como varía el espectro de ^1H RMN en CDCl_3 con la temperatura. Las tres señales de NH muestran desplazamientos químicos muy similares en todo momento y una fuerte dependencia de la temperatura, $\Delta\delta_{\text{promedio}}(\text{NH})/\Delta T = -0.015$ ppm/K, lo que indica la formación de agregados favorecida por la disminución de la temperatura.

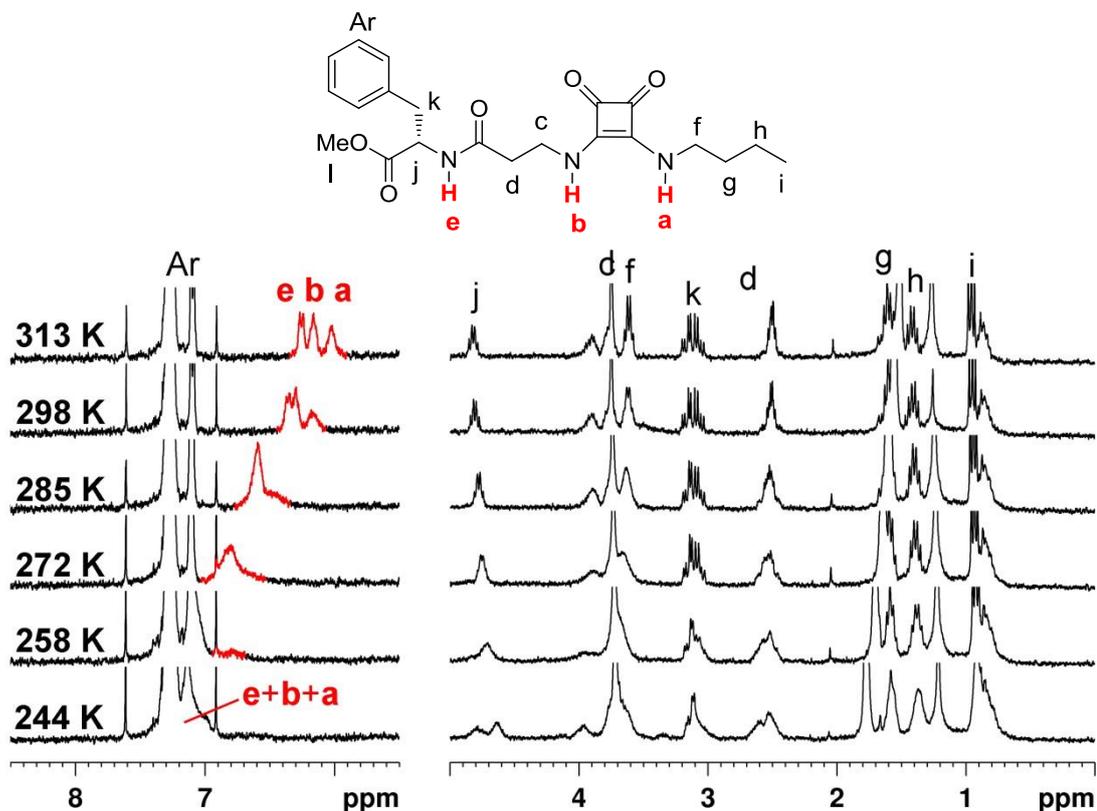


Figura 60. Serie de espectros ^1H RMN de **2** (CDCl_3 , 1 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

En la Figura 61 se muestran las estructuras de los dos tipos de agregados propuestos para **2**, las cuales explicarían la variación de los desplazamientos químicos

observada al disminuir la temperatura. En estas estructuras las escuaramidas se representan en conformación Z,Z y todos los grupos NH están implicados en la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Ambas estructuras propuestas justifican la similitud del desplazamiento químico de los dos NH escuaramídicos. Los agregados cabeza-cola propuestos pueden ser de tamaño indefinido, al poder ensamblarse más moléculas de producto por ambos extremos. La posibilidad de formar estos agregados de orden elevado, favorecida a altas concentraciones, explicaría la baja solubilidad del producto, ya que los agregados de gran tamaño resultan poco solubles en cloroformo.

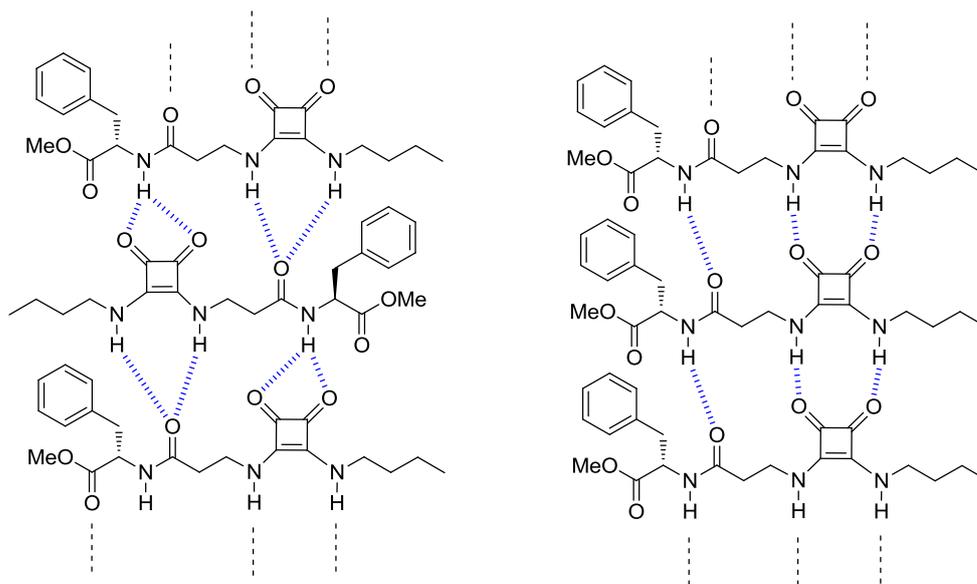


Figura 61. Representación de posibles agregados del producto **2**. Las líneas discontinuas verticales indican la formación de agregados de tamaño indefinido al establecerse interacciones de enlace de hidrógeno intermoleculares.

En el modelo **2** no se observan indicios de la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, además de la baja solubilidad que presenta el compuesto en disolventes orgánicos. Por ello, a partir del estudio en cloroformo podemos concluir que este modelo no adopta la estructura plegada deseada.

3.1.3.3. Modelo 3 (sq-NH_b-(CH₂)₃-CO-)

Finalmente, siguiendo la misma estrategia que en los modelos anteriores, se realizaron estudios conformacionales para evaluar la capacidad inductora de giro β del compuesto **3**.

En la figura 62 se muestra el espectro de ¹H RMN en CDCl₃ para el modelo **3** a una concentración 2 mM junto con la asignación de las señales. La asignación se realizó a partir de un experimento TOCSY. En el espectro de ¹H RMN se observa que las señales NH_a y NH_b presentan desplazamientos químicos bien diferenciados, al igual que las señales de (CH₂)_c y (CH₂)_g. La señal NH_b presenta un desplazamiento químico de 6.42 ppm, mientras que la señal de NH_a aparece alrededor de 7.14 ppm,

solapada con las señales del anillo aromático.¹⁶⁵ En cuanto a los CH_2 - α , se puede observar que el $(\text{CH}_2)_c$ tiene un desplazamiento químico a 3.44 ppm, mientras que el del $(\text{CH}_2)_g$ es de 3.73 ppm. Estos desplazamientos químicos sugieren la presencia en disolución del conformero E,Z que promueve la estructura de giro, Figura 63. Como se puede observar en la figura, los protones de NHb y de $(\text{CH}_2)_g$ están dirigidos hacia los grupos carbonilo del anillo de escuaramida, lo que es coherente con el hecho de que la señal para $(\text{CH}_2)_c$ tenga un desplazamiento a campo más alto que la señal para $(\text{CH}_2)_g$. Por otra parte, el hecho de que el NHa forme un enlace de hidrógeno intramolecular con el oxígeno del grupo amida explica que la señal de este NH tenga un desplazamiento a campo bajo respecto a los otros dos grupos NHb y NHf.

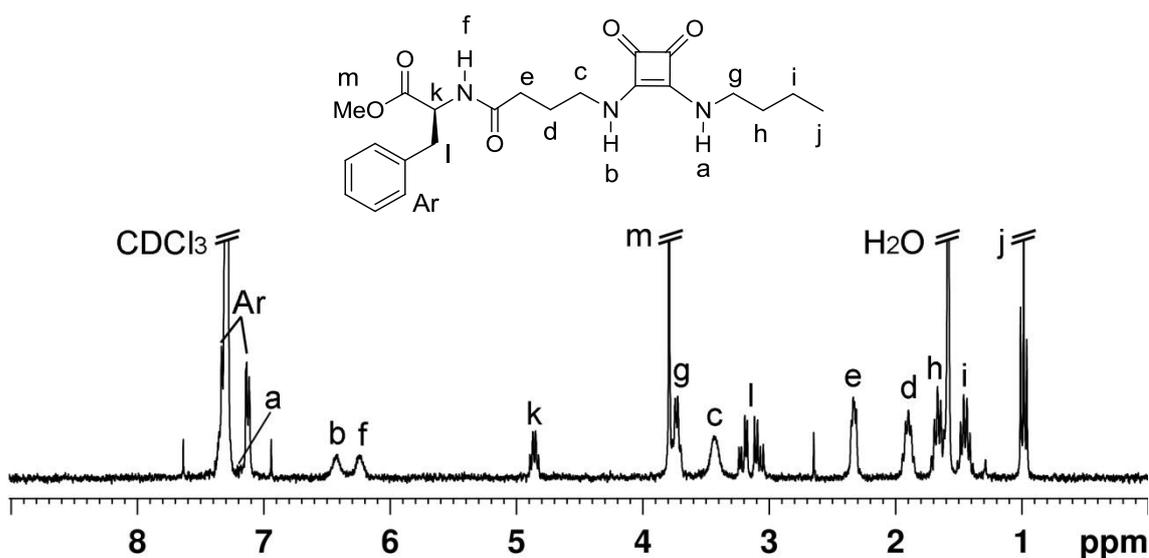


Figura 62. Espectro de ^1H RMN de **3** (CDCl_3 , 2 mM, 298 K) y asignación de las señales.

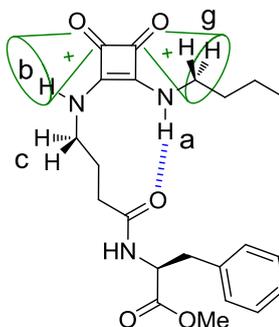


Figura 63. Modelo **3** representado en la conformación E,Z. Los hidrógenos NHb y $(\text{CH}_2)_g$ se ven desapantallados por la influencia de los carbonilos escuaramídicos. El NHa forma un enlace de hidrógeno intramolecular con el carbonilo del grupo amida, por lo que se ve muy desapantallado.

Al igual que el compuesto **1**, el compuesto **3** muestra una elevada solubilidad en CHCl_3 , Figura 64. Las señales del espectro de ^1H RMN más sensibles a los cambios de concentración son las correspondientes a NHa, NHb, NHf y $(\text{CH}_2)_c$. Todas ellas se desplazan a campo alto a medida que disminuye la concentración. A bajas concentraciones (< 5 mM) se diferencian claramente las tres señales de NH. Sin embargo, a elevadas concentraciones (50 - 100 mM) las tres aparecen superpuestas.

¹⁶⁵ Viendo el espectro a 313 K, donde la señal del NH escuaramídico de butilamina aparece a 7.00 ppm, se puede deducir que en el espectro a 298 K esta señal está oculta bajo la señal aromática.

Estos hechos sugieren que en el rango de concentraciones estudiado coexisten en equilibrio formas monoméricas y agregados del compuesto **3**, predominando a altas concentraciones los agregados moleculares y a bajas concentraciones las especies monoméricas.

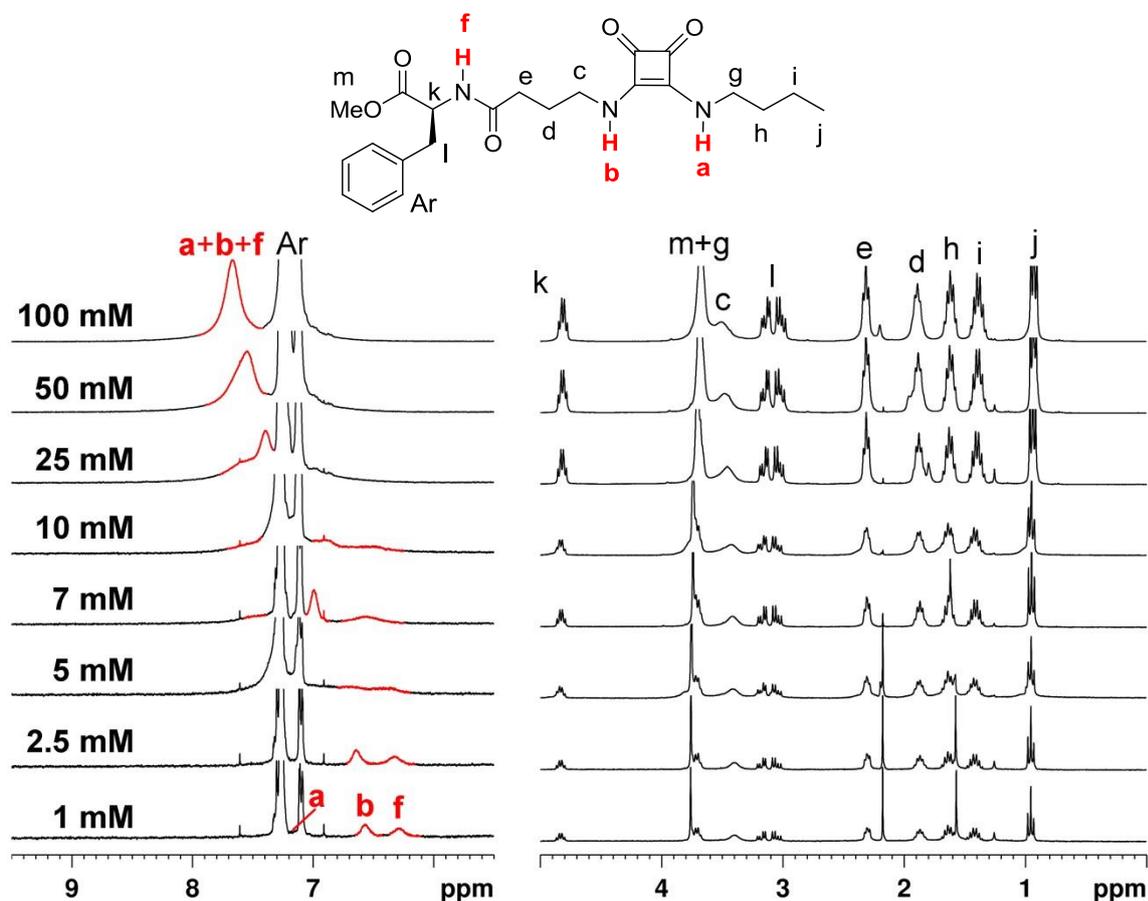


Figura 64. Serie de espectros ^1H RMN de **3** (CDCl_3 , 298 K) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la concentración.

En la Figura 65 se muestra la variación del espectro de ^1H RMN en CDCl_3 en función de la temperatura de una disolución 2 mM de **3**. El cambio más notable se observa en el desplazamiento de las señales NHa, NHb, NHf y $(\text{CH}_2)_c$. Así, a medida que disminuye la temperatura, algunas señales se vuelven anchas hasta la coalescencia y posterior desdoblamiento, claramente observable a 237 K. La temperatura de coalescencia para dichas señales se sitúa alrededor de 280 K.¹⁶⁶

A baja temperatura se observa claramente la presencia de, al menos, dos especies en equilibrio. A partir de experimentos COSY y TOCSY realizados a 237 K se pudieron asignar todas las señales del espectro de ^1H RMN a esa temperatura. A modo de ejemplo, en la Figura 66 se muestra la asignación de las señales NH de las dos especies en disolución, mediante el análisis de la zona del espectro de TOCSY que relaciona esas señales con las señales alifáticas. Para el NHf se asignaron dos señales bien diferenciadas, una a 6.21 ppm y otra a 7.72 ppm. Para el NHa también se

¹⁶⁶ La temperatura de coalescencia es la temperatura a partir de la cual dos especies en equilibrio se encuentran en rápido intercambio y no son detectables (un solo máximo de intensidad) en la escala de tiempo de la RMN. En este punto la señal se presenta ancha y de baja intensidad.

asignaron dos señales, una a 7.40 ppm y otra a 8.38 ppm. Sin embargo el NHb muestra una única señal a 7.55 ppm. Considerando que esta última señal es de intensidad similar a las desdobladas, es posible que exista otra señal correspondiente al NHb en la zona aromática, solapada por las señales provenientes del anillo de fenilalanina. La señal correspondiente al $(\text{CH}_2)_c$ se encuentra desdoblada en dos señales muy próximas entre sí, a 3.13 ppm y 3.24 ppm.

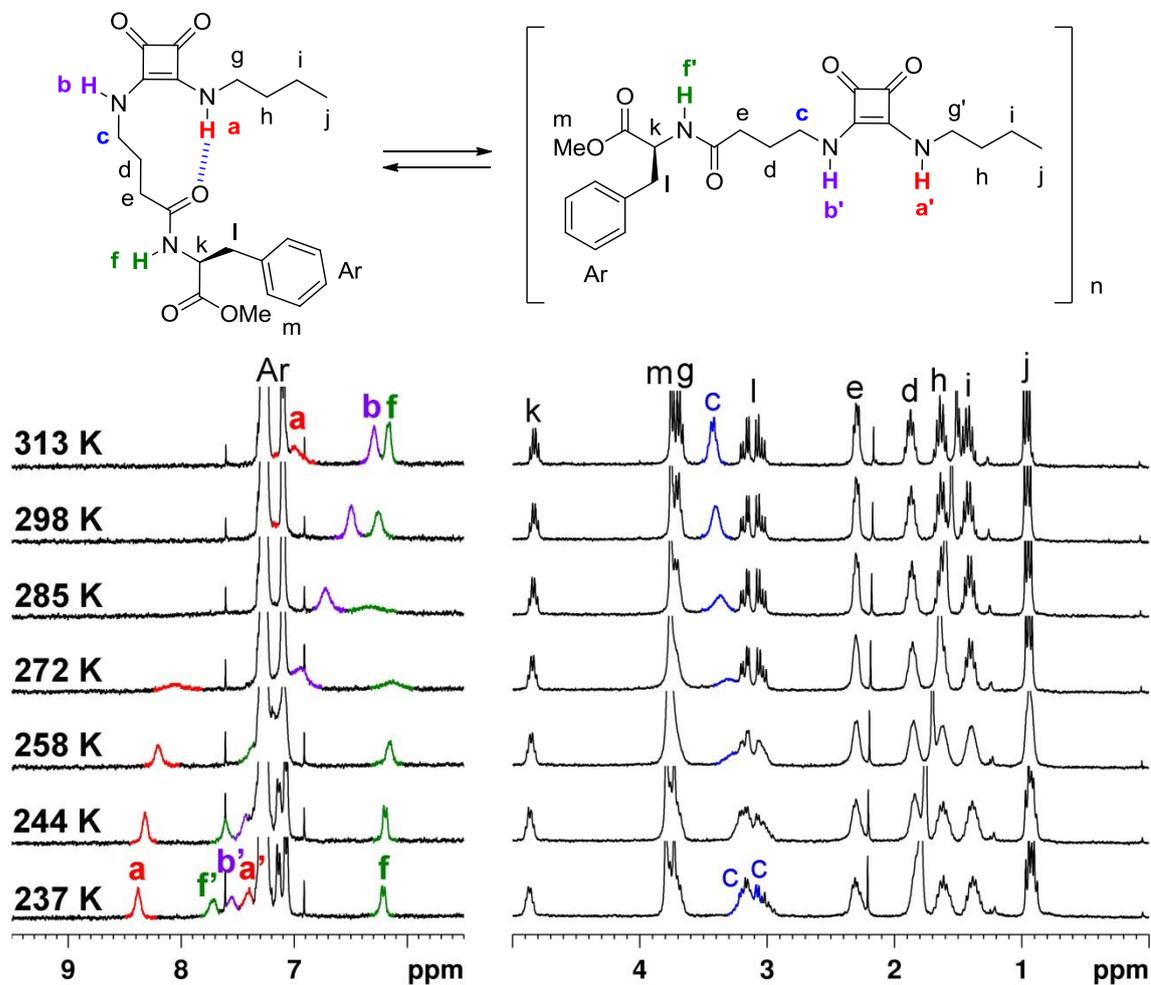


Figura 65. Serie de espectros ^1H RMN de **3** (CDCl_3 , 2 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

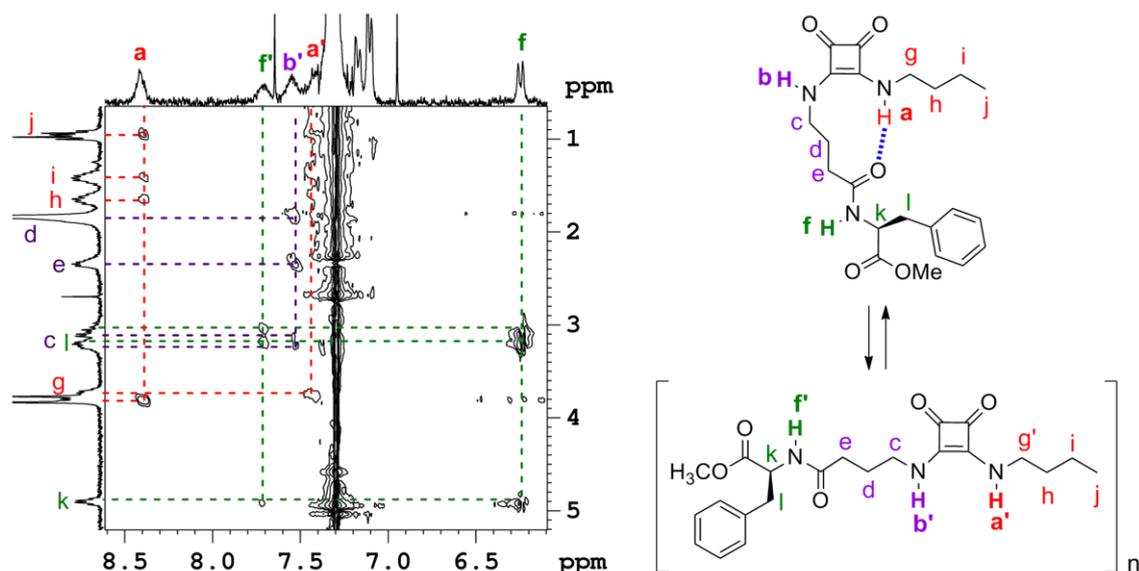


Figura 66. Representación parcial del espectro TOCSY de **3** (CDCl_3 , 2 mM, 237 K). A la derecha de la figura se representa el equilibrio correspondiente a las dos especies identificadas. Se asigna un color a cada sistema de espín.

Estos resultados indican que a 298 K probablemente existan dos o más especies en equilibrio rápido. A baja temperatura se ralentiza el equilibrio y se puede identificar un patrón de señales para cada una de ellas, Figuras 65 y 66. A 237 K la integral de las señales indica que esas especies se hallan en una relación aproximada de 55:45.

Las señales de los desplazamientos químicos a 8.38 ppm, para el NH_a , y 6.21 ppm, para el NH_f corresponden a la conformación mayoritaria. La integral de ambas señales es idéntica. La señal asignada al protón NH_a a 8.38 ppm presenta el desplazamiento químico más bajo de los tres NH. Es lógico pensar que esta señal pertenezca a la conformación de giro deseada, donde este NH está formando un fuerte enlace de hidrógeno intramolecular con el carbonilo del grupo amida. Por debajo de la temperatura de coalescencia, esta señal muestra cierta dependencia de la temperatura, con un coeficiente de $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T = -0.009 \text{ ppm/K}$, debido a que la disminución de la temperatura favorece el enlace de hidrógeno intramolecular. En cuanto a la señal asignada al NH_f a 6.21 ppm, por debajo de la temperatura de coalescencia muestra un desplazamiento químico prácticamente independiente de la temperatura, ya que en la conformación de giro propuesta este NH no forma ningún enlace de hidrógeno, ni en estado monomérico ni al formarse una posible especie dimérica, Figura 67 (c).¹⁶⁷

La variación de desplazamiento químico para la señal de $(\text{CH}_2)_c$, la cual se mueve a campo alto con la variación de la temperatura, también es coherente con la presencia significativa de la conformación E,Z en disolución, ya que en esta conformación $(\text{CH}_2)_c$ se encuentra alejado de la influencia paramagnética del carbonilo escuaramídico, Figura 63.

En cuanto al resto de señales NH a 237 K; NH_f' , 7.72 ppm, NH_b' , 7.55 ppm, y NH_a' , 7.40 ppm; correspondientes a la especie minoritaria, se observan bastante más

¹⁶⁷ Este tipo de estructura dimérica ha sido descrita en numerosas ocasiones para mono y diescuaramidas (ver referencias 117 y 136).

desapantalladas que las mismas señales a 298 K y muestran dependencia de la temperatura incluso por debajo de la temperatura de coalescencia, Figura 65. De forma análoga a lo razonado para los ejemplos anteriores, cabe asumir que en esta especie la escuaramida presenta una conformación Z,Z y que el protón amídico también participa en la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares. En la figura 67 se muestran una serie de dímeros propuestos para el modelo **3**. Cabe remarcar que en estructuras escuaramídicas similares a las de estos modelos **1**, **2** y **3**, se han descrito dímeros análogos al que se muestra en la figura 67 (d).¹¹⁷

Al igual que para el compuesto **1**, se registraron los espectros de NOESY y ROESY en CDCl_3 del compuesto **3**. Una vez más se observó proximidad espacial entre el CH_3 del metiléster y la cadena de n-butilo. Este tipo de contacto es indicativo de la conformación de giro identificada, aunque también sugiere la formación de dímeros cruzados. Estas últimas especies resultan más probables que los agregados cabeza-cola, ya que el compuesto muestra una elevada solubilidad en cloroformo que probablemente no se daría si predominara la formación de agregados tipo cabeza-cola, Figura 67 (d).

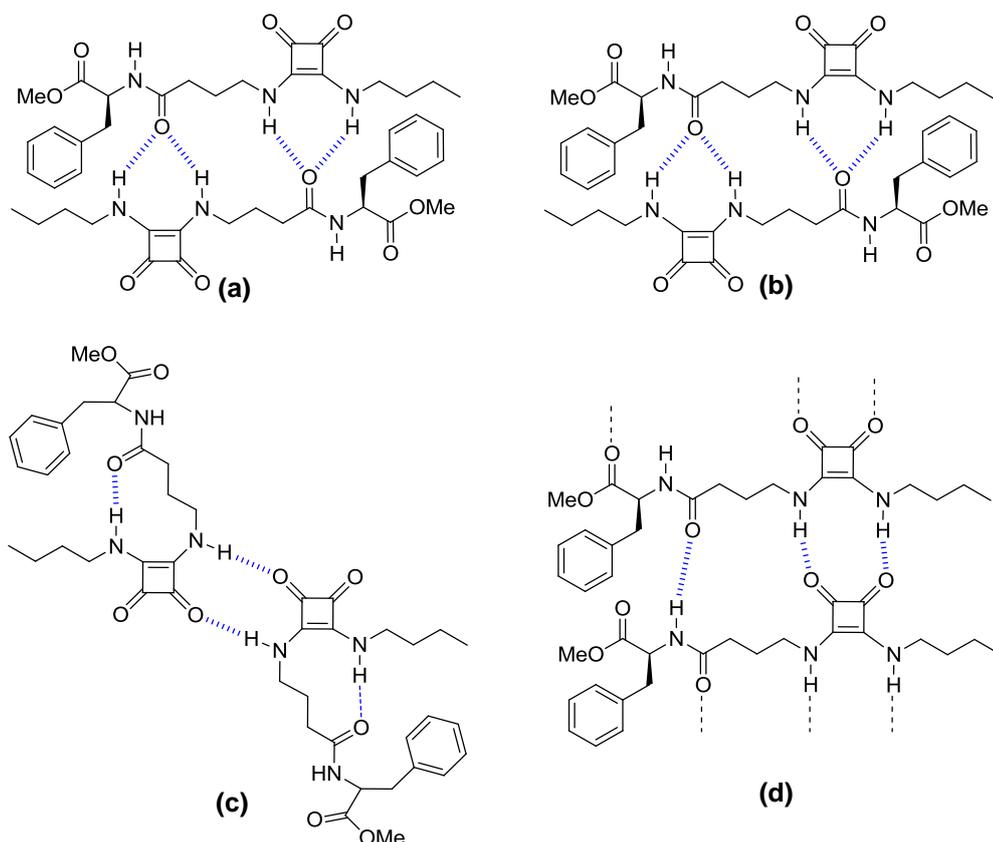


Figura 67. Representación de posibles agregados de **3**.

Para confirmar la asignación realizada a 237 K se ha estudiado el efecto de la concentración, Figura 68. La solubilidad de **3** en CDCl_3 a 237 K es aproximadamente 7 mM, por eso en la realización de este estudio no se registraron espectros a concentraciones mayores.

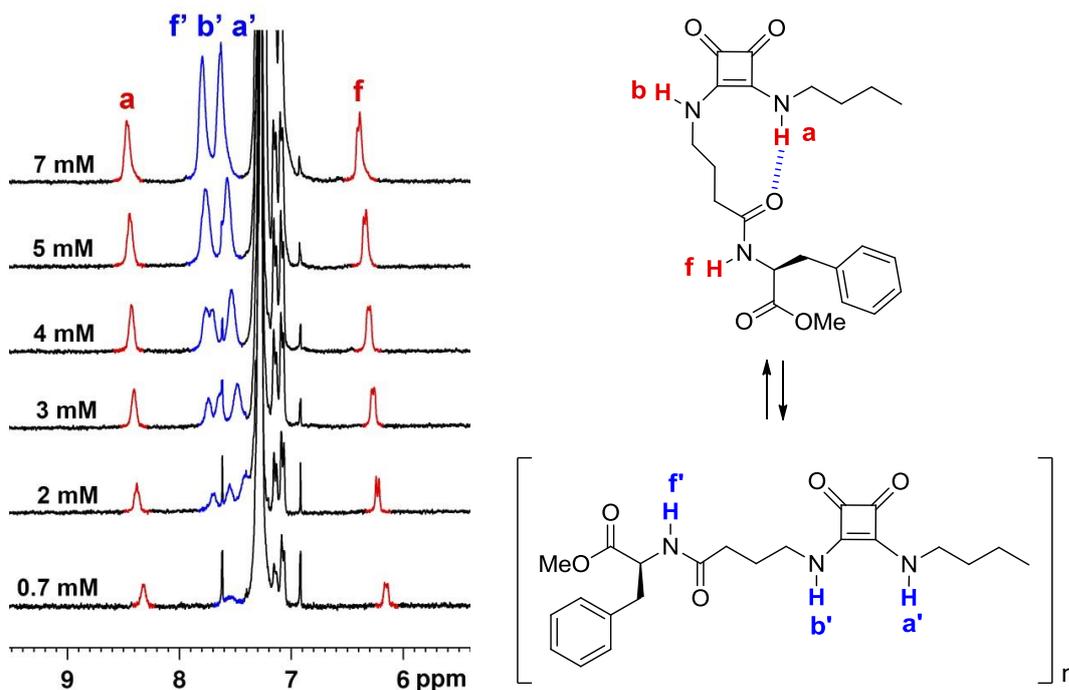


Figura 68. Serie de espectros ^1H RMN de **3** (CDCl_3 , 237 K) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la concentración.

Para cualquier concentración, a 237 K, la señal NH_a y la señal NH_f atribuidas anteriormente a la conformación mayoritaria muestran la misma integral relativa, y un desplazamiento químico prácticamente constante. En cuanto a las otras señales NH_a' , NH_b' y NH_f' , presentes en la zona de 7.4 - 7.9 ppm, se observa cómo, al aumentar la concentración, aumenta su intensidad en relación a la de las señales NH_a y NH_f . De esta forma resulta evidente que al aumentar la concentración, aumenta la proporción de agregados respecto a la especie monomérica plegada, por lo que la integral relativa de las señales correspondientes a especies poliméricas se incrementa con la concentración.

A la luz de los resultados obtenidos a partir de los estudios en CDCl_3 , se decidió investigar el comportamiento de **3** en CD_3CN , con la intención de evitar la agregación molecular.

En la Figura 69 se muestra la asignación de las señales del espectro de ^1H RMN en CD_3CN para el modelo **3**, realizada a partir de un experimento TOCSY. Al igual que en el espectro de ^1H RMN de **3** en CDCl_3 a 298 K, se observan desplazamientos diferentes entre señales que en principio deberían tener desplazamientos químicos similares, y estas diferencias concuerdan con las que se esperaría encontrar si el modelo **3** estuviera en la conformación E,Z en disolución, Figura 63. Así, el NH_a , implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular, muestra un mayor desplazamiento químico, a 6.56 ppm, que el NH_b , a 6.15 ppm. Por otra parte, el $(\text{CH}_2)_g$, bajo el efecto paramagnético del carbonilo escuaramídico, muestra mayor desplazamiento químico, a 3.56 ppm, que el $(\text{CH}_2)_c$, a 3.34 ppm. En CD_3CN , la diferencia de desplazamiento químico para cada par de señales es menor que en CDCl_3 .

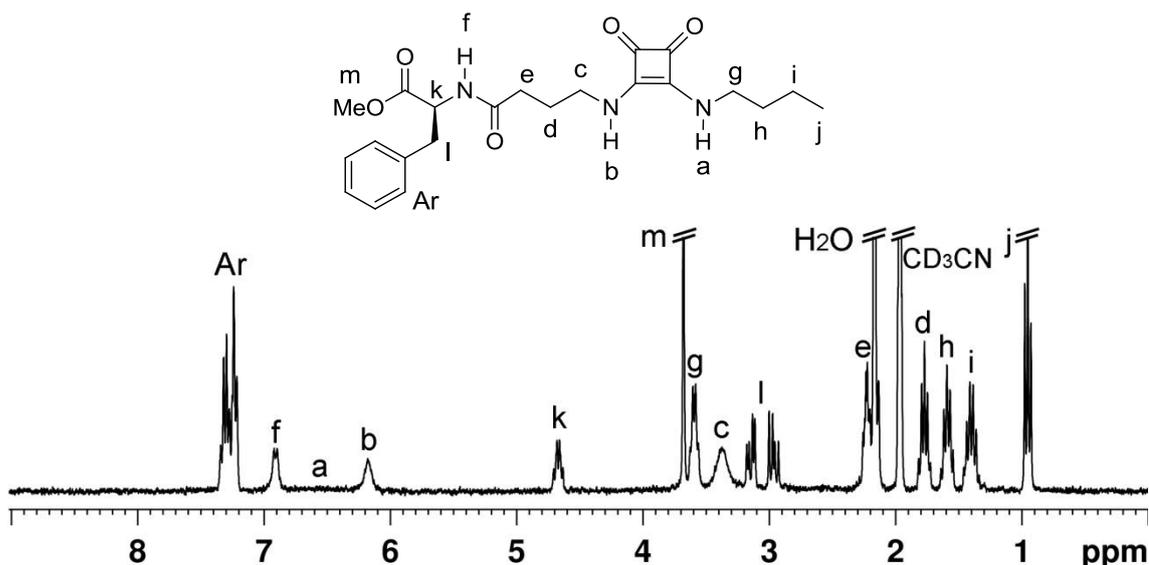


Figura 69. Espectro de ^1H RMN de 3 (CD_3CN , 2 mM, 298 K) y asignación de las señales.

El análisis de la variación del desplazamiento químico con la temperatura muestra desplazamientos característicos para los protones NH_a , NH_b , NH_f , $(\text{CH}_2)_c$ y $(\text{CH}_2)_g$, Figura 70. Para poder seguir de forma inequívoca la variación del desplazamiento químico de las señales del espectro de ^1H RMN a lo largo del experimento, se registró el espectro TOCSY de la muestra a 244 K, donde una vez más se pueden observar señales NH desdobladas pertenecientes a dos especies en equilibrio.

La señal NH_a muestra una fuerte dependencia de la temperatura y una temperatura de coalescencia alrededor de 298 K. Su desdoblamiento se observa claramente a 244 K, observándose una señal a 7.72 ppm, NH_a , que se asignó a la conformación de giro β (E,Z) donde este NH forma un enlace de hidrógeno intramolecular con el carbonilo amídico, y otra a 6.42 ppm NH_a' que se asignó a la conformación Z,Z desplegada.

En cuanto a la señal $(\text{CH}_2)_c$, a 244 K aparece desdoblada en tres señales, dos a campo alto, a 3.02 y 2.87 ppm, $(\text{CH}_2)_c$, y una a campo bajo, a 3.48 ppm, $(\text{CH}_2)_c'$, respecto a la señal a 298 K (3.3 ppm). Las dos primeras corresponderían a la estructura de giro donde los correspondientes hidrógenos no se verían influidos por el efecto paramagnético del carbonilo escuaramídico, mientras que la otra correspondería a la forma abierta, donde esos hidrógenos sí pueden recibir dicho efecto.

Por su parte, las señales NH_b y NH_f también aparecen desdobladas a 244 K, aunque la diferencia entre sus desplazamientos químicos es menor, y son poco dependientes de la temperatura. Esta baja dependencia de la temperatura y la posición de sus desplazamientos químicos indican que probablemente estos protones están totalmente expuestos al disolvente, de forma que no están implicados en interacciones por enlace de hidrógeno. La señal NH_b a 6.48 ppm se asigna al conformero donde este hidrógeno se ve influenciado por el efecto paramagnético del carbonilo. La otra señal para este núcleo, NH_b' , aparece algo más a campo alto, a 6.36 ppm, solapada con la otra señal de NH escuaramídico de la misma especie, NH_a' ; lo que corrobora que la forma abierta estará principalmente como conformero Z,Z.

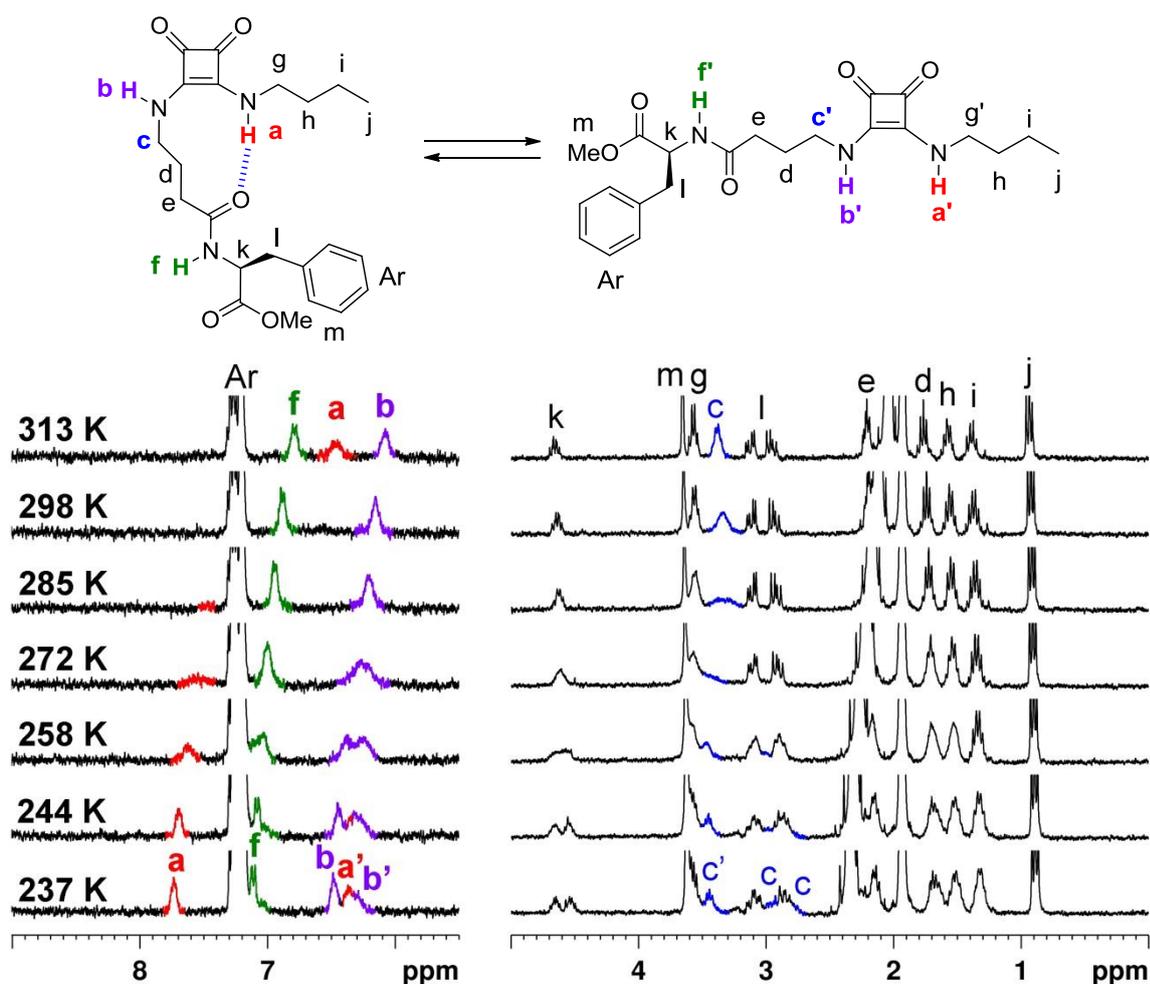
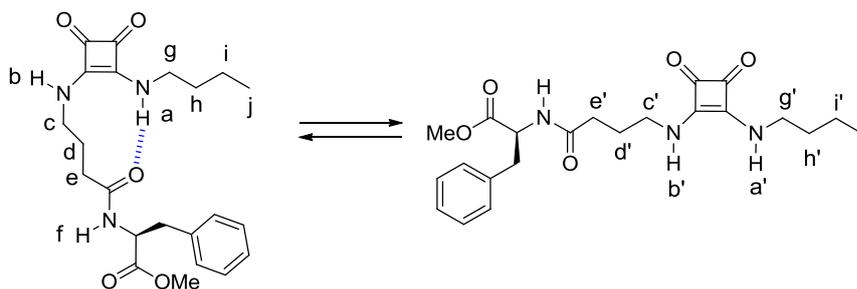


Figura 70. Serie de espectros ^1H RMN de **3** (CD_3CN , 1 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

Tal como se muestra en la Tabla 1, un análisis exhaustivo del espectro TOCSY a 244 K permitió observar dos patrones de señales para todo el fragmento estructural GABA-Sq-NHBut, asignable cada uno a una de las conformaciones propuestas. El hecho de que en la conformación E,Z se forme un ciclo que restringe la rotación de los enlaces que lo forman provoca que los protones metilénicos (CH_2)c y (CH_2)e del sustituyente GABA aparezcan como señales separadas, ya que en ambos casos los dos hidrógenos enlazados al mismo carbono tienen un entorno químico diferente.

Además, se registraron los espectros ROESY y NOESY en CD_3CN a 244 K para el modelo **3**, con el objetivo de encontrar alguna señal adicional que reafirmase la presencia de la conformación E,Z en esa disolución. Sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes.

Tabla 1. Desplazamientos químicos de ^1H RMN de **3** (CD_3CN , 2 mM, 244 K) para las dos conformaciones propuestas. En negrita se marcan los desplazamientos químicos más relevantes en la asignación de las dos especies.



Giro β (E,Z)	δ (ppm)	Desplegada (Z,Z)	δ (ppm)
a	7.72	a'	6.42
b	6.48	b'	6.36 / 6.48
c	3.02 / 2.87	c'	3.48
d	1.70	d'	1.71
e	2.18 / 2.25	e'	2.17
g	0.92	g'	0.92
h	1.35	h'	1.34
i	1.55	i'	1.53
j	3.61	j'	3.60

En resumen, se han hallado indicios experimentales que apuntan a que el compuesto **3** en disolución adopta de forma mayoritaria la conformación E,Z que da lugar a una estructura plegada tipo giro β , tanto en cloroformo como en acetonitrilo a concentraciones milimolares. En cloroformo, la formación de este conformero compete con la formación de distintos agregados, mientras que en acetonitrilo existen en equilibrio las conformaciones E,Z y Z,Z.

Por lo tanto, se ha podido determinar que el modelo **3** es el más adecuado para inducir giros β tanto en cloroformo como en acetonitrilo de entre los tres evaluados. A partir de estos resultados, en los estudios posteriores se ha utilizado el fragmento estructural escuaramida-GABA (SQ1) como nuevo módulo mimético de giro β . Hay que remarcar que al formarse el enlace de hidrógeno intramolecular se forma un anillo de 10 miembros, como ocurre en los giros β naturales.

A nivel comparativo, se ha comprobado que los modelos **1** y **3** muestran una solubilidad similar en cloroformo, en ambos casos muy superior a la del modelo **2**. Esta observación se atribuye a la mayor tendencia de los dos primeros a formar dímeros cruzados antes que agregados cabeza-cola, mientras que para el otro modelo solo se han podido proponer agregados de tamaño indefinido. La presencia de dímeros cruzados se ve apoyada por experimentos de espectrometría de masas mediante la técnica ESI-HRMS. En el espectro para el modelo **1** se observa que el pico base corresponde a una especie tipo $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, es decir la masa correspondiente a dos moléculas de producto con un catión sodio. El pico correspondiente a $[\text{M}+\text{Na}]^+$ solo tiene una intensidad del 2.4%. Para el modelo **2** el pico base se corresponde con el pico $\text{M}+\text{Na}$, apareciendo también en este caso el pico $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, con una intensidad del 90 % aproximadamente en referencia al pico base. En cuanto al modelo **3**, el pico

base vuelve a corresponderse con $[2M+Na]^+$, mostrando el pico $[M+Na]^+$ una intensidad próxima al 20 % en referencia al pico base. Todos estos espectros se registraron en idénticas condiciones experimentales para que pudieran ser comparables. Pese a que es posible que los agregados no estén presentes en disolución, sino que se formen durante la ionización de la muestra, estos resultados indican que los modelos **1** y **3** muestran mayor tendencia a la formación de dímeros que **2**, ya que como se desprende del estudio conformacional realizado, este compuesto tiene tendencia a formar agregados de orden superior.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que en estructuras escuaramídicas con sustituyentes amida adicionales, la posición del grupo amida puede condicionar propiedades del compuesto tales como su solubilidad o su preferencia a formar diferentes tipos de agregados. Estas observaciones podrían ser útiles a la hora de diseñar futuras estructuras escuaramídicas destinadas a la formación de distintos tipos de estructuras supramoleculares, resultado del autoensamblaje de las moléculas.

3.2. Mimético de horquilla β con el módulo SQ1

3.2.1. Diseño

Una vez establecido el módulo de plegamiento más adecuado, el SQ1, se ha diseñado también un mimético de horquilla β para analizar la capacidad de ese módulo como unidad de giro al incorporarse en estructuras más complejas, Figura 71. La molécula se ha diseñado con el objetivo de que en disolución puedan formarse tres enlaces de hidrógeno intramoleculares como inductores de la estructura plegada, reforzando así el efecto de la unidad de giro y dando lugar a la formación de una estructura tipo horquilla β antiparalela. Para ello se ha incluido en el diseño una unidad de etilendiamina (*en*), que actúa como espaciador. Al tratarse de una diamina de longitud adecuada, ésta permite llevar a cabo la unión entre la unidad escuarato y el grupo carboxilato de un aminoácido, y de este modo los grupos donadores y aceptores de enlace de hidrógeno se ordenan para que pueda formarse una estructura tipo horquilla β antiparalela.

La cadena unida al extremo escuarámico del módulo de giro SQ1 está constituida por el espaciador "en" y el aminoácido Leu, y la cadena unida al carbonilo de GABA está formada por el dipéptido H₂N-Gly-Phe-COOH. El grupo C-terminal de este escuaramido-péptido se ha funcionalizado en forma de ciclohexilamida para favorecer la capacidad aceptora de enlace de hidrógeno del carbonilo y aumentar la solubilidad del compuesto en disolventes orgánicos. Los residuos de α -aminoácido Phe y Leu, así como el grupo protector Cbz, se han elegido para favorecer la solubilidad del compuesto en disolventes orgánicos.

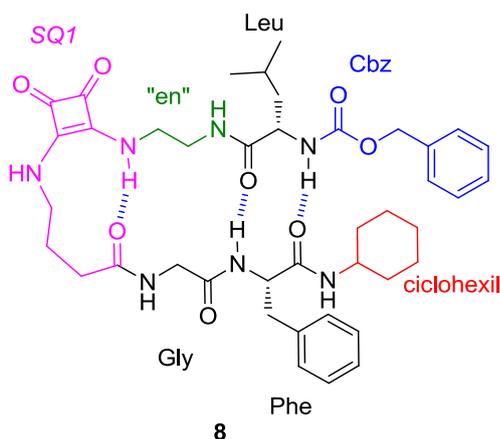


Figura 71. Mimético de horquilla β 8. "en": etilendiamina; Cbz: carboxibencil.

Los residuos de α -aminoácido utilizados son residuos naturales y constituyen la primera aproximación a la incorporación de dos cadenas peptídicas antiparalelas unidas a la unidad de giro. La estructura propuesta sería la mínima expresión de una horquilla β , ya que las cadenas tienen una longitud de solo dos residuos de aminoácido y por ello los estudios conformacionales se llevarán a cabo en disolventes

orgánicos, que no son tan competitivos como el agua a la hora de establecer enlaces de hidrógeno.

3.2.2. Síntesis del pseudopéptido 8

En la Figura 72 se muestra el esquema sintético seguido para la obtención del producto **8**. Para sintetizar este compuesto primero se han preparado por separado cada uno de los sustituyentes escuaramídicos, los cuales se han condensado secuencialmente con la unidad escuarato, obteniéndose así el producto final. Las reacciones de condensación utilizadas son similares a las descritas para los modelos iniciales. A lo largo de la síntesis se ha utilizado el grupo Boc (*tert*-butiloxicarbonil) como grupo protector de amina. Este grupo puede eliminarse en condiciones ácidas.

En primer lugar se procedió a preparar la monoescuaramida éster **10**. Mediante el procedimiento descrito anteriormente para el acoplamiento peptídico (HBTU, DIPEA, DMF), se llevó a cabo la reacción entre la etilendiamina Boc-monoprottegida y el aminoácido natural L-Leu con el grupo amino protegido mediante el carbamato carbobenciloxi (Cbz), obteniéndose el correspondiente producto de acoplamiento **9**. Este producto contiene dos grupos amina, cada uno de ellos protegido con grupos protectores ortogonales, lo que permitió la desprotección selectiva de uno de los extremos. Siguiendo el esquema sintético, se procedió a la eliminación del grupo protector Boc en CH₂Cl₂ - TFA 10 %, condiciones habituales utilizadas para este tipo de reacción, obteniendo la correspondiente sal de TFA. El grupo Cbz resultó inerte en estas condiciones. A continuación se condensó la amina resultante de la desprotección anterior con un equivalente de escuarato de dietilo, introduciendo unas modificaciones respecto al procedimiento habitual en este tipo de reacciones. En concreto, esta reacción se llevó a cabo en presencia de exceso de DIPEA, para liberar la amina de la sal de trifluoroacetato, y se adicionó un 5 % de etanol al dietiléter utilizado como disolvente de la reacción, para favorecer la solubilidad de la sal de TFA de la amina. De esta forma se obtiene el producto de monocondensación **10** con un rendimiento global del 56 %.

Por otra parte se sintetizó el tripéptido **13**, correspondiente al segundo sustituyente de la diescuaramida diseñada. Inicialmente, la Boc-Gly se condensó con la ciclohexilamida de fenilalanina en las condiciones de acoplamiento ya descritas (HBTU, DIPEA, DMF), obteniéndose como producto de la reacción el derivado dipeptídico correspondiente, **11**. A continuación se desprotegió el grupo amino tratando el producto en medio ácido, para obtener la sal de TFA correspondiente. Una vez aislado el dipéptido desprotegido, se llevó a cabo la incorporación del último residuo mediante su reacción con N-BocGABA. Para esta reacción se utilizaron de nuevo las condiciones de formación de enlace peptídico (HBTU, DIPEA, DMF). De esta forma se obtuvo el derivado tripeptídico **12**. Por último, este compuesto se trató en CH₂Cl₂ - TFA 10% para desproteger el grupo amino terminal y obtener así la correspondiente sal de TFA, **13**. El rendimiento global para el tripéptido Boc-prottegido **12** fue del 54 %, y considerando que las desprotecciones de amina Boc-prottegida son prácticamente cuantitativas, se asumió este rendimiento global también para la sal de TFA **13**.

3. Escuaramidas disecundarias como miméticos de giro β

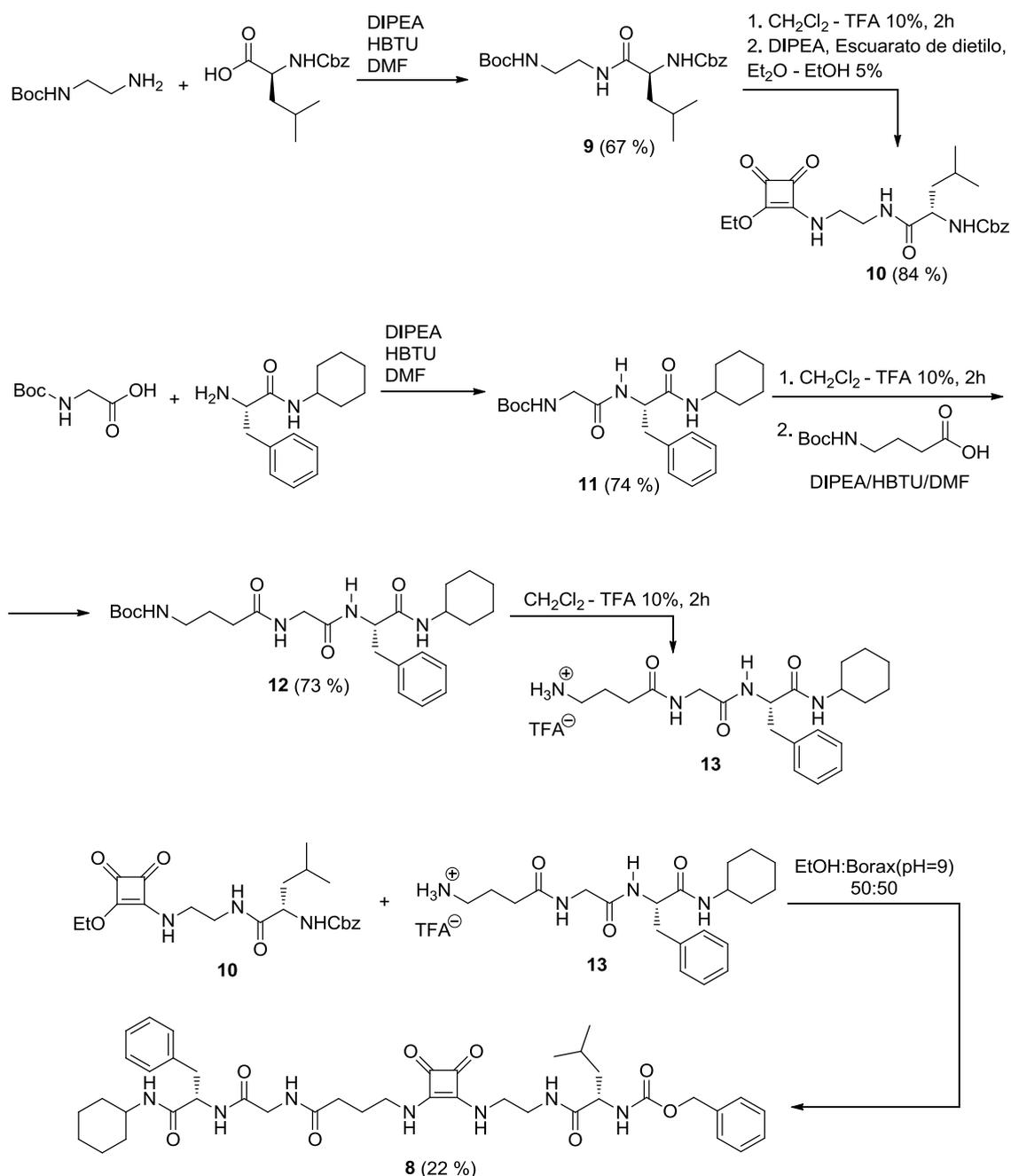


Figura 72. Esquema sintético para el producto **8**.

Por último, la condensación en cantidades equimolares entre la monoescuaramida éster **10** y la amina **13**, en un medio de etanol y tampón bórax acuoso de pH = 9 en proporción 50:50 v:v, permitió obtener el producto final **8**, con un rendimiento de la reacción del 22 %.

3.2.3. Estudio conformacional del modelo de horquilla **8**

Para evaluar la capacidad del nuevo módulo SQ1 de inducir la formación de estructuras tipo horquilla β en el compuesto **8**, se realizaron experimentos de RMN encaminados a estudiar la conformación de **8** en disolución de cloroformo y

acetonitrilo. Pese a la presencia de residuos destinados a favorecer la solubilidad del pseudopéptido en disolventes orgánicos, éste resultó poco soluble en ambos disolventes. De hecho, no se pudieron evaluar los cambios conformacionales en función de la temperatura ni de la concentración, ya que no se pudieron obtener concentraciones superiores a 1 mM y la solubilidad del producto **8** resultó ser mucho menor a temperaturas inferiores a 298 K e insuficiente para registrar los espectros.

Por lo tanto se registraron los espectros de TOCSY, ROESY y NOESY con una disolución saturada (~2 mM) de **8** en CDCl₃ a 298 K. El hecho de que todas las señales de NOESY fueran del mismo signo que la diagonal sugiere que al menos parte de las especies en disolución son agregados moleculares. Los experimentos de 2D RMN se repitieron sobre una disolución 0.8 mM. En este caso, el signo de los picos de entrecruzamiento indicaba que había una proporción considerable de especies monoméricas. Sin embargo, los contactos no adyacentes, aunque en algunos casos sugieren la presencia de estructuras plegadas, no son lo suficientemente concluyentes para determinar su estructura, Figura 73.

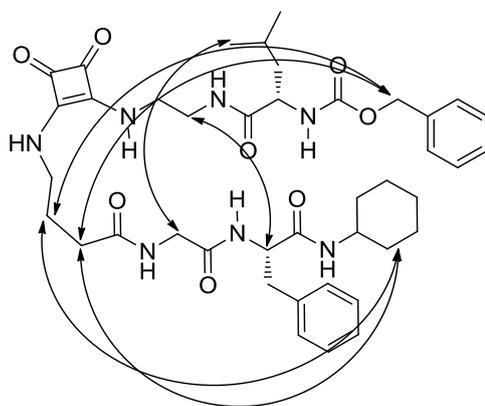


Figura 73. Contactos identificados en el espectro NOESY de **8** (0.8 mM) en CDCl₃ a 298 K.

Para realizar los estudios conformacionales en CD₃CN a 298 K se preparó una disolución saturada del compuesto (~1 mM) para limitar la formación de agregados moleculares que compitan con la estructura plegada. El hecho de no poder trabajar a bajas temperaturas implica no poder ralentizar o detener los equilibrios entre las especies presentes en disolución y por tanto no poder cuantificarlas en relación al resto de especies en equilibrio. A partir de los experimentos COSY y TOCSY registrados en estas condiciones se asignaron los desplazamientos químicos para todos los protones de la molécula, Tabla 2. La zona del espectro TOCSY que muestra el cruzamiento entre las señales de NH y las señales alifáticas permite asociar cada señal de NH con un sistema de espín concreto, pudiéndose asignar así todas las señales, Figura 74. Cada sistema de espín se ha marcado con un color diferente en la estructura de la molécula. Las líneas coloreadas dibujadas sobre el espectro TOCSY indican las líneas donde se sitúan las señales que forman cada sistema de espín.

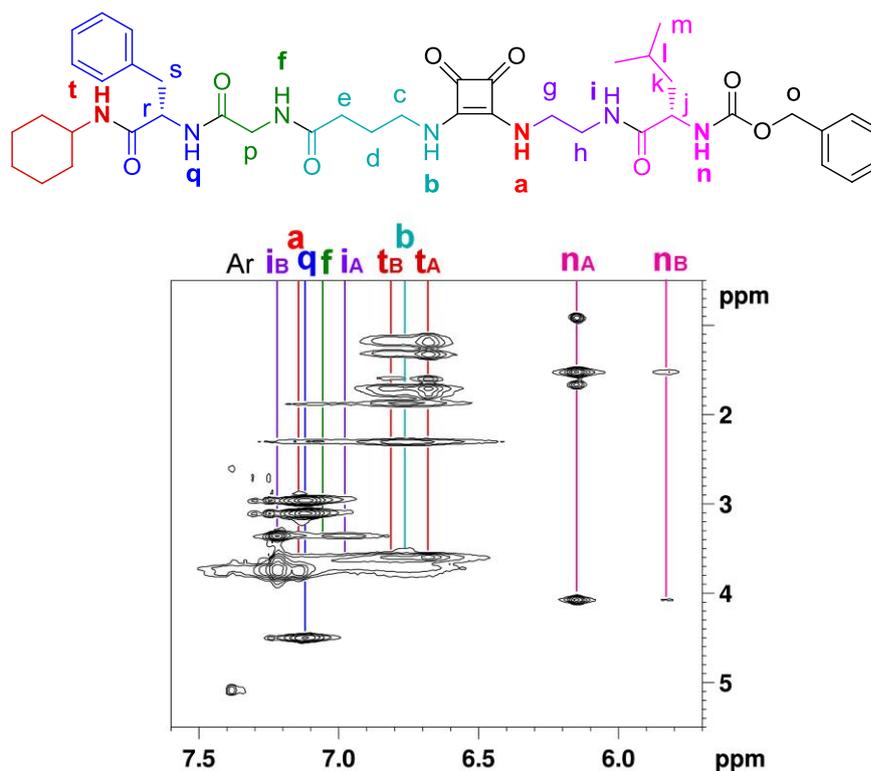


Figura 74. Región NH - alifáticos del espectro de TOCSY de una disolución de **8** (CD_3CN , 1 mM, 298 K). Las líneas de color permiten asignar cada NH a un sistema de espín concreto.

Tabla 2. Desplazamientos químicos de ^1H RMN (ppm) de **8** (CD_3CN , 1 mM, 298 K). El color indica el sistema de espín de la Figura 73. Las letras en negrita corresponden a los núcleos NH de la molécula.

Protón	8A	8B	Protón	8A	8B
a	7.14	7.14	m	0.96	0.91
b	6.76	6.76	n	6.15	5.82
c	3.58	3.58	o	5.11 / 5.06	5.11 / 5.06
d	1.87	1.87	p	3.79 / 3.68	3.79 / 3.68
e	2.28	2.28	q	7.12	7.12
f	7.07	7.07	r	4.49	4.49
g	3.76 / 3.71	3.77 / 3.73	s	3.09 / 2.95	3.09 / 2.95
h	3.64 / 3.35	3.62	Ar	7.25 / 7.29	7.25 / 7.29
i	6.96	7.22	t	6.68	6.83
j	4.01	4.07	Cy	3.59, 1.81	3.59, 1.81
k	1.60/1.48	1.52		1.59, 1.31	1.59, 1.31
l	1.80	1.65		1.19	1.19

El análisis de los desplazamientos químicos de la Tabla 2, sugiere la presencia de dos conforméros **8A** y **8B** en equilibrio como especies mayoritarias presentes en disolución.

Los picos de entrecruzamiento observados para los NH escuaramídicos indican que probablemente la unidad de giro *SQ1* está cumpliendo su función estructural, al menos en una proporción considerable. Los desplazamientos químicos de dichas señales, 7.14 para **NHa** y 6.76 para **NHb**, aparecen a campo más bajo que los habituales para este tipo de núcleos en CD_3CN a 298 K, 6.1 - 6.2 ppm, siendo el desplazamiento químico para el **NHa** el mayor de los dos. Este hecho sugiere que el **NHa** forma un enlace de hidrógeno intramolecular y que el **NHb** se encuentra expuesto al efecto

al NHn, la señal que aparece a campo más bajo se corresponde con la conformación **8A** donde este NH forma un enlace de hidrógeno intramolecular, mientras que la otra se corresponde con la conformación **8B**, en la cual está completamente expuesto al disolvente. Se debe tener en cuenta que generalmente para un NH de carbamato el desplazamiento químico es menor que para un NH de amida, lo que concuerda con los valores observados y las estructuras propuestas.

Con el objetivo de obtener evidencias adicionales que apoyaran la presencia de las estructuras propuestas para las especies en equilibrio **8A** y **8B**, se registraron los correspondientes espectros de NOESY y ROESY para esta muestra, Figura 76. Los NOEs registrados para ambos conforméromos indican proximidad entre el NHa y los grupos (CH₂)d y (CH₂)e del otro sustituyente. Estos contactos, junto al que se observa entre los grupos (CH₂)h de **8A** y (CH₂)d, apuntan hacia la conformación E,Z de la escuaramida, promovida por el enlace de hidrógeno intramolecular entre el NHa y el carbonilo de la otra cadena.

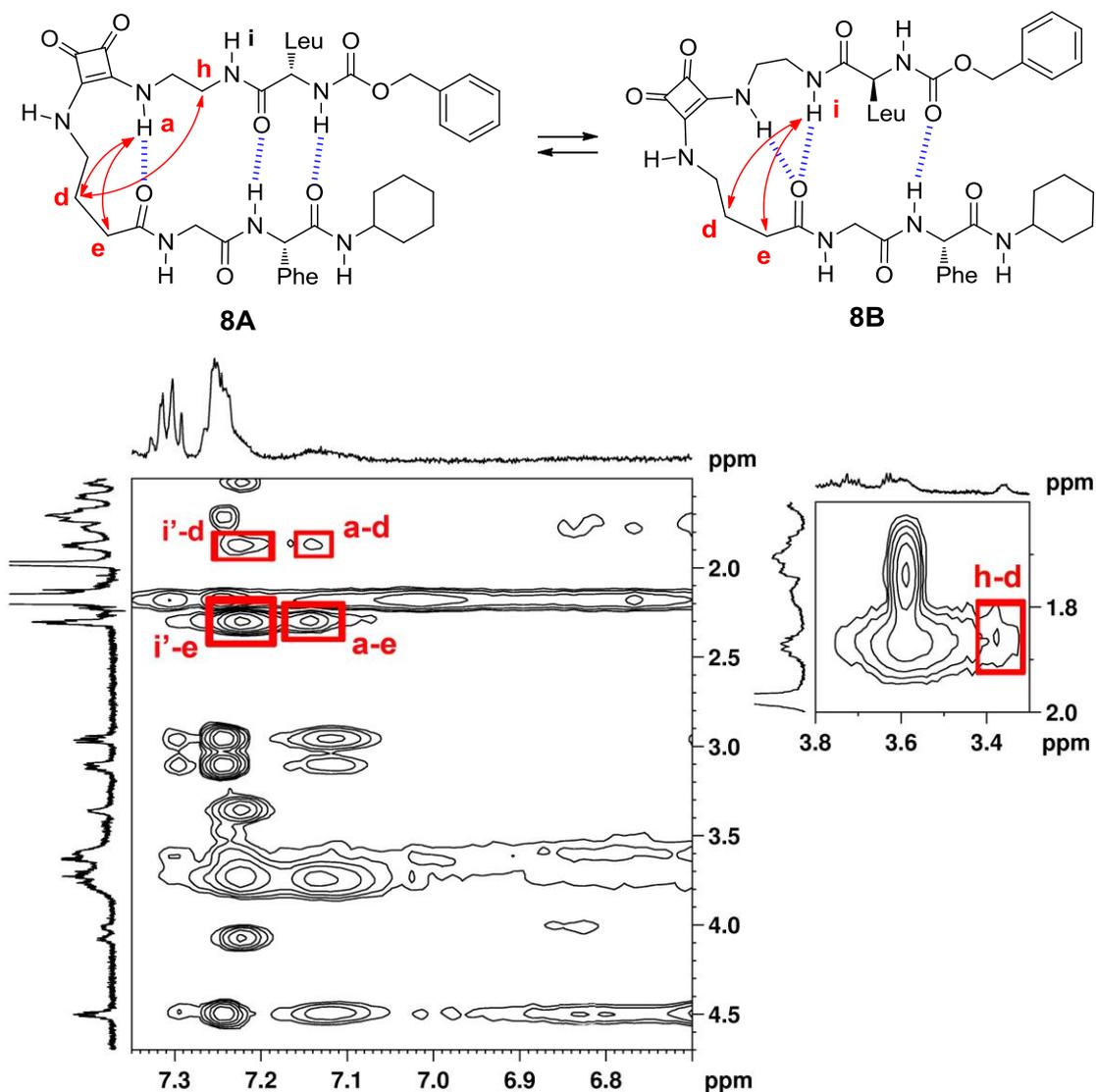


Figura 76. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de **8** (CDCl₃, 1 mM, 298 K).

Por otra parte, para el conformero **8B** se detectaron dos contactos entre el NHi y los (CH₂)_d y (CH₂)_e, que confirmaban la formación del enlace de hidrógeno de NHi con el carbonilo del extremo de la unidad de giro SQ1, tal como se ha propuesto para esta especie.

En conclusión, se ha determinado que en un disolvente como cloroformo la nueva unidad de giro no es capaz de inducir la formación de una estructura tipo horquilla, ya que en este disolvente predomina la formación en disolución de agregados ante la formación de especies monoméricas plegadas. Sin embargo, los estudios en acetonitrilo, donde la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares se ve desfavorecida, han demostrado la efectividad de la unidad SQ1 como unidad de giro, ya que ésta induce la formación de dos conformeros tipo horquilla presentes en disolución. Ambos conformeros se encuentran en equilibrio y mimetizan tanto los giros β como los giros α naturales. Sin embargo, este sistema es conformacionalmente muy flexible, con tendencia a autoagregarse y no ha demostrado ser muy adecuado para inducir estructuras plegadas en medios competitivos como el agua, por lo que se procedió al rediseño de la unidad de giro.

***4. Escuaramidas secundaria - terciarias como
módulos de plegamiento mejorados***

4.1. Modelos de giro minimalistas

4.1.1. Diseño

El principal objetivo de este capítulo es mejorar el diseño del módulo escuaramídico inductor de giro estudiado en el capítulo anterior, SQ1, para incrementar la proporción del confórmero plegado de la molécula en disolución.

Cuando un sustituyente alquílico se dirige hacia el carbonilo escuaramídico más cercano puede establecerse un enlace de hidrógeno C-H...O=C energéticamente favorable.¹⁶⁸ La presencia de interacciones favorables adicionales en una estructura concreta puede implicar la estabilización de una de las conformaciones adquiridas por dicha estructura frente a las otras. Por ello se optó por diseñar nuevos módulos de plegamiento análogos a los anteriores basados en una escuaramida secundaria - terciaria. Como hipótesis de partida se planteó que la proporción de confórmero E,Z aumentaría en disolución respecto a la de Z,Z. La base de esta hipótesis es que, además del enlace de hidrógeno intramolecular que induce la estructura de giro, se dará una interacción adicional C-H...O=C con el nuevo sustituyente, por ejemplo un metilo, Figura 77.

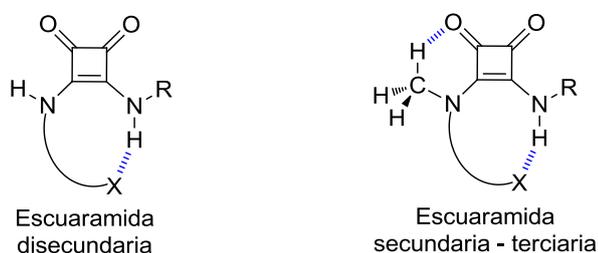


Figura 77. Esquema general de unidades de giro de base escuaramida disecundaria y secundaria - terciaria en la conformación E,Z que permite el plegamiento. X es un grupo aceptor de enlace de hidrógeno.

Además, eliminando uno de los centros dadores de enlace de hidrógeno (NH) de la unidad escuaramida se evitaría la formación en disolución de especies agregadas o plegadas que compitan con la presencia mayoritaria del confórmero objetivo. Por ejemplo, los agregados cabeza-cola, típicos de escuaramidas disecundarias, fijan la conformación Z,Z de las escuaramidas (ver Figura 35). Además, dímeros cruzados como los que se han propuesto para las escuaramidas disecundarias **1** y **3** también fijan la conformación Z,Z (Ver Figuras 55 y 67). En ambos casos los dos enlaces de hidrógeno que establecen los NH escuaramídicos, dirigidos en la misma dirección, gobiernan la conformación mayoritaria. Eliminando uno de los NH escuaramídicos se evitaría la doble interacción por enlace de hidrógeno y en consecuencia la conformación Z,Z dejaría de estar favorecida frente a la E,Z.

¹⁶⁸ May, E.; Destro, R.; Gatti, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12248.

En base a este razonamiento y con el objetivo de evaluar esta hipótesis, se diseñaron los nuevos compuestos **15** y **16**, mediante la sustitución del NH escuaramídico no implicado en la formación del enlace de hidrógeno intramolecular por NMe, Figura 78.

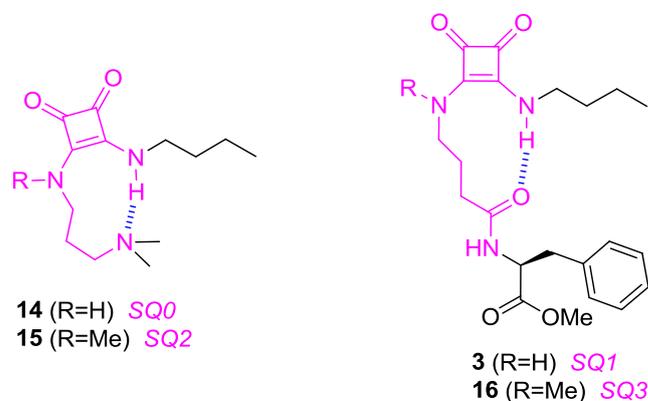


Figura 78. Modelos escuaramídicos de plegamiento.

Estos dos compuestos modelo permiten evaluar la capacidad de plegamiento de los nuevos módulos sq-(N-Me)-1,3-diaminopropano (SQ2), presente en el compuesto **15**, y sq-(N-Me)GABA (SQ3), presente en el compuesto **16**. De esta forma se podrá comparar el efecto del grupo metilo sobre los dos tipos de módulos ya evaluados con los compuestos **14** y **3**, es decir el módulo SQ0, que utiliza una amina terciaria como grupo aceptor de enlace de hidrógeno, y el módulo SQ1, en el que el grupo aceptor es el grupo carbonilo de una amida.

Además, se planteó evaluar el efecto del número de sustituyentes del grupo amino de la unidad SQ2 en la formación del enlace de hidrógeno intramolecular, y por lo tanto, en el plegamiento de la molécula. Por un lado, cuanto menos sustituida está una amina menos estabilizado está su ácido conjugado y por tanto menos básica es. Por otro lado, cuanto más sustituido está un grupo amino mayor impedimento estérico puede presentarse a la hora de establecer enlaces de hidrógeno. Para este estudio se prepararon los compuestos **17** y **18**, derivados del compuesto **15**, Figura 79.

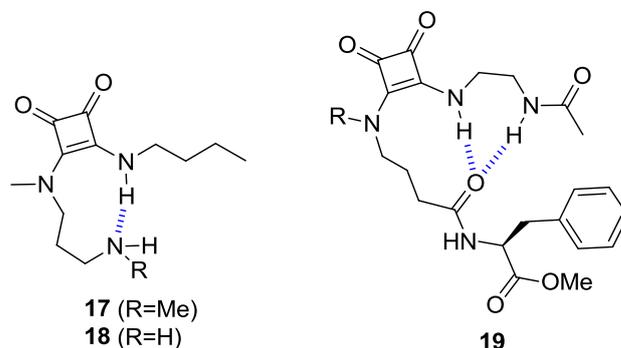


Figura 79. Modelos escuaramídicos de plegamiento ligeramente modificados.

El compuesto **19**, que contiene el módulo de giro SQ3, se diseñó para evaluar si dicho módulo, combinado con el espaciador etilendiamina en la misma estructura, era capaz de mimetizar en una estructura sencilla un giro α natural mediante una doble interacción por enlace de hidrógeno con el oxígeno amídico donador, Figura 79.

4.1.2. Síntesis de las escuaramidas 15, 16, 17 y 19

La síntesis de las nuevas escuaramidas secundaria - terciarias se llevó a cabo mediante reacciones de acoplamiento peptídico y escuaramídico similares a las descritas previamente, utilizando los precursores comerciales convenientes en cada caso.

La monoescuaramida éster **4** se condensó con un equivalente de N,N,N'-trimetil-1,3-diaminopropano en etanol para obtener el compuesto **15**, Figura 80. Mediante un procedimiento análogo y utilizando N-Boc-N,N'-dimetil-1,3-diaminopropano se obtuvo la aminoescuaramida **20**. Ésta se trató con un 10% de ácido trifluoroacético en CH₂Cl₂, aislándose la correspondiente sal de TFA **21**. La sal **21** se disolvió en NaOH 1M y mediante extracciones con CH₂Cl₂ se obtuvo una mezcla formada por el compuesto **17**, en un 70 %, y el subproducto **22** en un 30 %, los cuales se separaron fácilmente por precipitación selectiva del compuesto **22**.

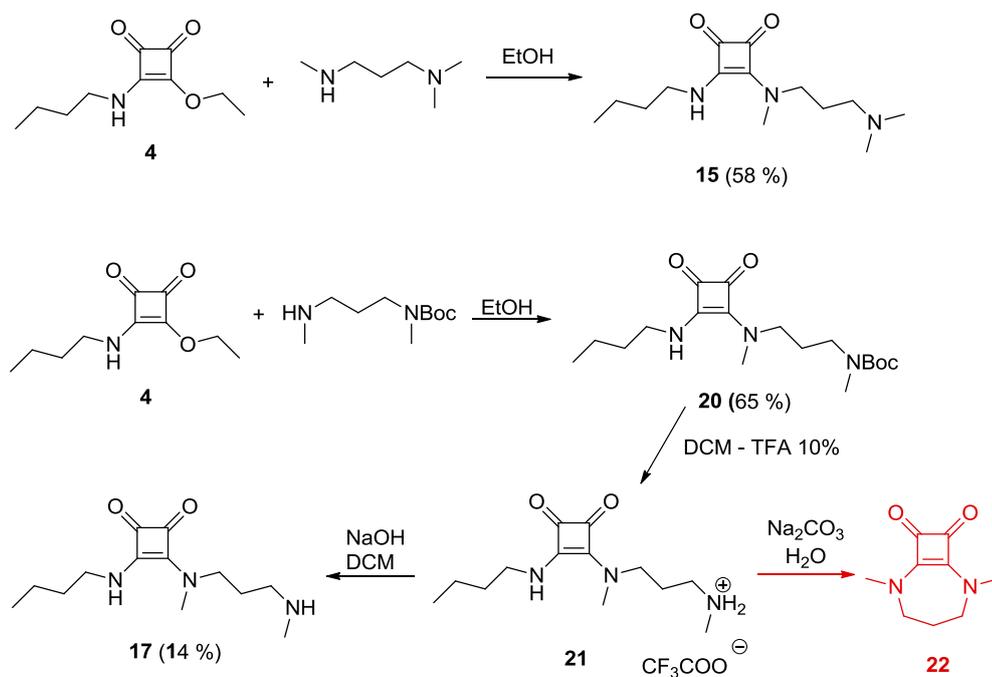


Figura 80. Esquema sintético de los productos 15 y 17.

Se comprobó que al disolver la sal **21** en una disolución acuosa de Na₂CO₃ de pH 9 y concentrar el disolvente la conversión a **22** resultó ser total. El producto **22** pudo ser aislado y completamente caracterizado por espectroscopia de RMN y difracción de rayos X. La estructura determinada para el compuesto **22** corresponde a la de un compuesto cíclico formado por una escuaramida diterciaria.

Para obtener el compuesto **18**, se planteó la ruta sintética mostrada en la Figura 81, que condujo al compuesto cíclico **23**. El último paso sintético, que implica la desprotección del grupo ftalimida, requiere el uso de hidracina y altas temperaturas utilizando MeOH o CH₂Cl₂ como disolvente. En estas condiciones el producto de la desprotección **18** evoluciona para dar el subproducto de ciclación **23**.

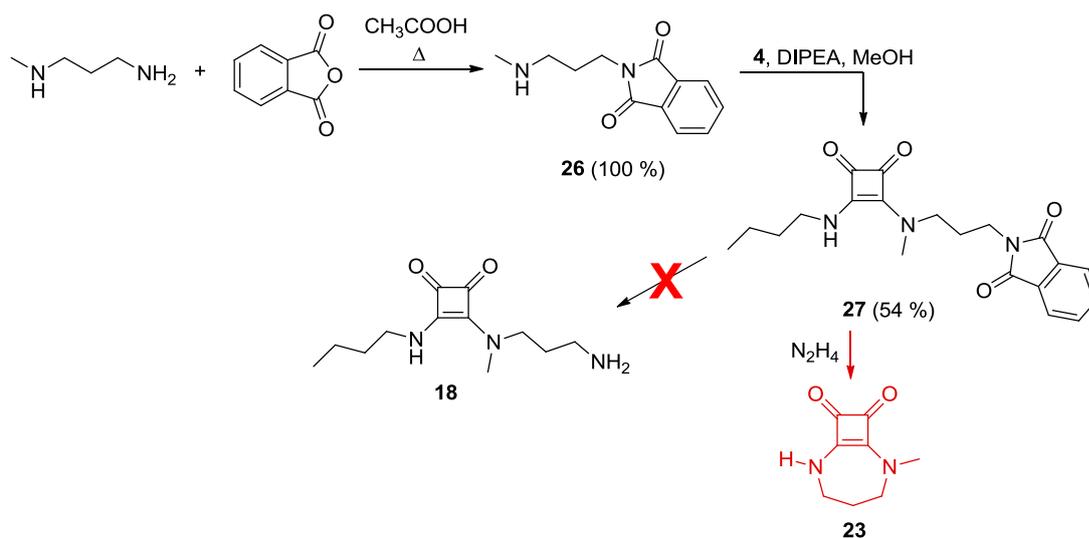


Figura 81. Esquema sintético propuesto para la síntesis del compuesto **18** y que conduce a la obtención del producto **23**.

A pesar de que el compuesto **17** se obtuvo con cierta dificultad y que el compuesto **18** ni siquiera pudo aislarse, la formación de los compuestos **22** y **23** es un resultado muy interesante, tal como se discute en el apartado 4.1.3.2.

La síntesis de la escuaramida **16** mediante un procedimiento análogo al de **3** no resultó adecuada, ya que al condensar el aminoácido ácido N-Metil-γ-aminobutírico (N-MeGABA) con la monoescuaramida éster **4**, se obtuvieron rendimientos muy bajos. Como alternativa se planteó la ruta sintética de la Figura 82. El N-Boc-N-MeGABA y Phe-OMe se condensaron en condiciones habituales para obtener el derivado dipeptídico **24** con un rendimiento del 97 %. Seguidamente se desprotegió el grupo Boc en DCM:TFA 9:1 v:v y la sal de TFA obtenida se trató con DIPEA en MeOH para obtener la forma neutra de la amina. La disolución que contenía la amina libre se utilizó directamente para condensar dicha amina con 1.1 equivalentes de la monoescuaramida éster **4**, obteniendo así el compuesto **16**.

Por otra parte, la etilendiamina monoacetilada se condensó con 1.2 equivalentes de escuarato de dietilo en una mezcla Et₂O:EtOH 9:1 v:v para obtener la nueva monoescuaramida éster **25** con un rendimiento del 50 %, que seguidamente se condensó con un equivalente de la amina N-MeGABA-Phe-OMe en MeOH y en presencia de DIPEA, tal como se ha descrito para el compuesto anterior, Figura 82. Las condensaciones finales con el derivado escuaramídico en la síntesis de los compuestos **16** y **19** transcurrieron con rendimientos del 39 % y el 35 % respectivamente.

4. Escuaramidas secundaria - terciarias como módulos de plegamiento mejorados

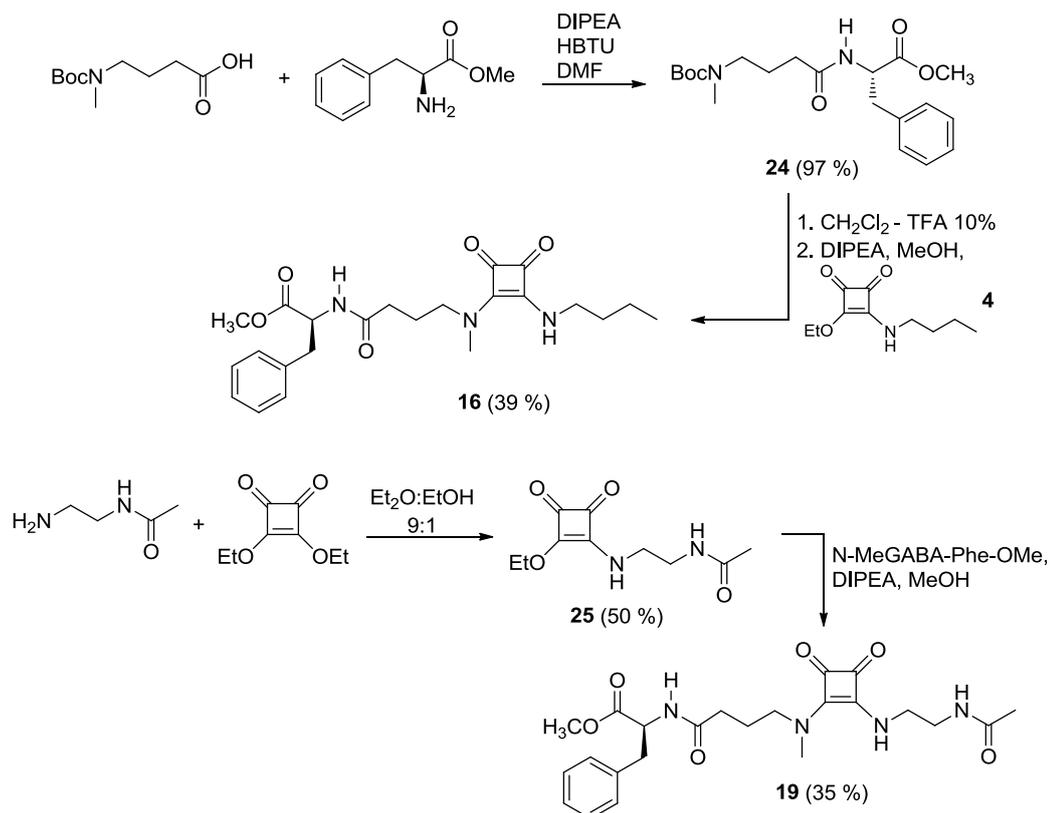


Figura 82. Esquema sintético de los productos 16 y 19.

4.1.3. Estudio conformacional de los modelos de giro 15, 16, 17 y 19

4.1.3.1. Modelo 15: escuaramida terciaria + amina terciaria

Para evaluar la eficiencia del nuevo módulo de plegamiento escuaramídico con un grupo amina como grupo aceptor de enlace de hidrógeno, SQ2, se llevaron a cabo diferentes experimentos de RMN con el compuesto **15** disuelto en CDCl₃, que sirvieron para determinar su conformación en disolución. En la Figura 83 se muestra el espectro de **15** en cloroformo a una concentración 2.5 mM a 298 K y la asignación de las señales correspondientes a cada protón de la molécula. La observación más destacable es el desplazamiento químico del NHa, a 8.35 ppm, que aparece bastante más a campo bajo de lo habitual para un NH escuaramídico. Dicho desplazamiento químico se debe probablemente a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular.

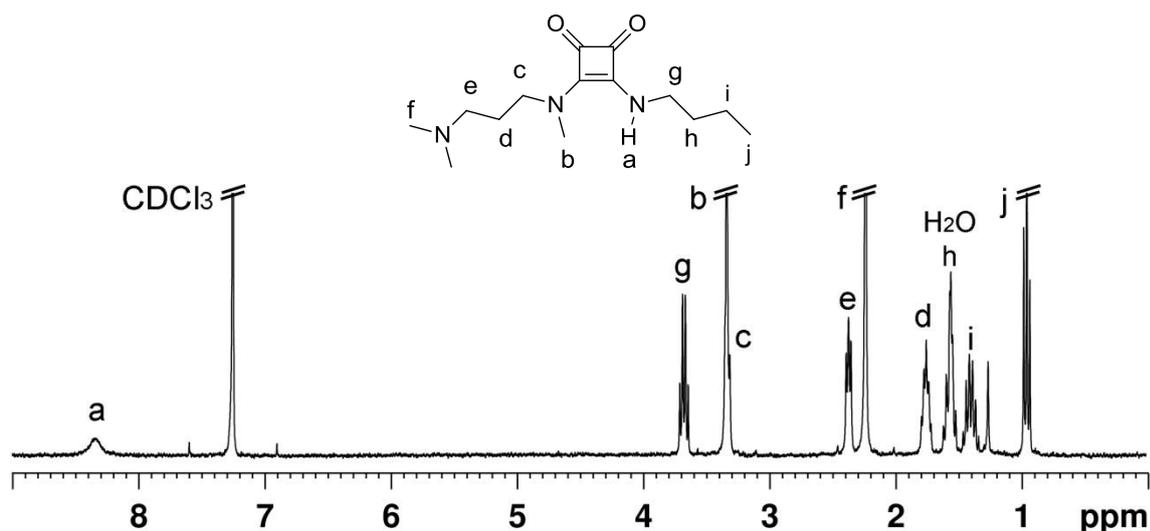


Figura 83. Espectro de ^1H RMN de **15** (CDCl_3 , 2.5 mM, 298 K) y asignación de las señales.

Los espectros de ^1H RMN a diferentes concentraciones muestran que el desplazamiento químico de todos los protones es independiente de la concentración, Figura 84. Este resultado permite asegurar que en el rango de concentración del experimento, 1 - 100 mM, no existe agregación de la muestra y por tanto es muy probable que el NHa escuaramídico forme un enlace de hidrógeno intramolecular con el nitrógeno de la amina terciaria.

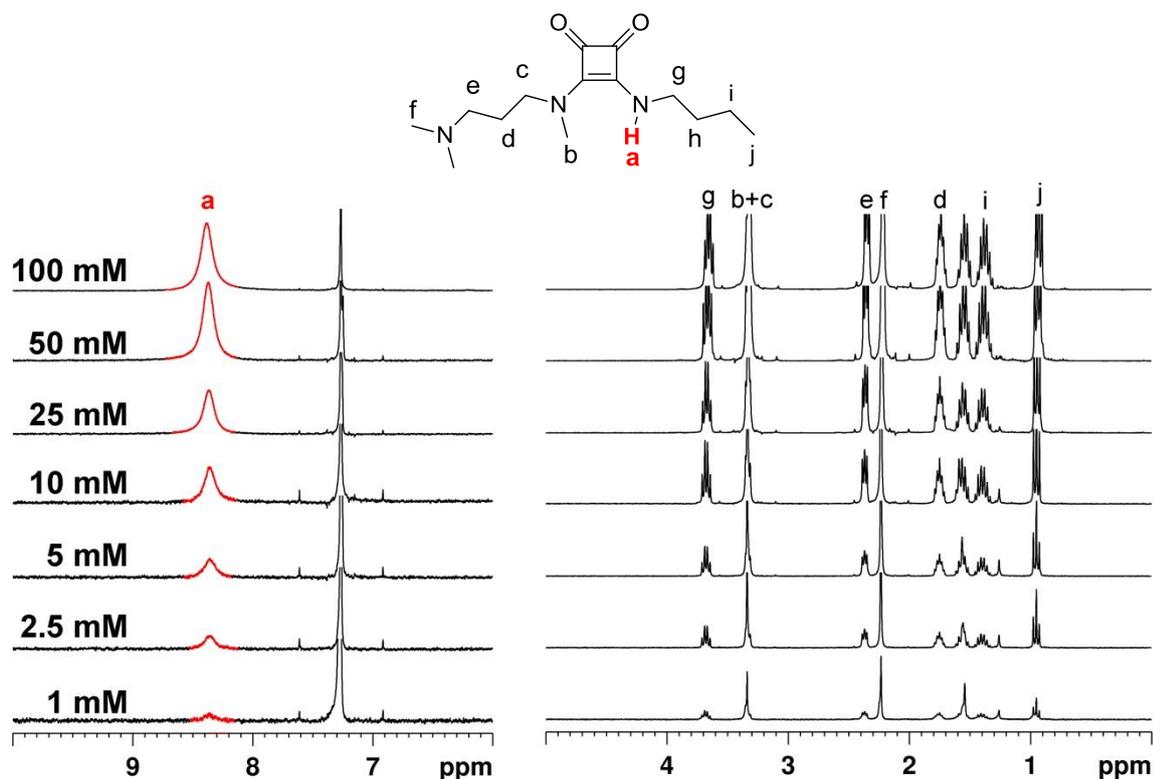


Figura 84. Serie de espectros ^1H RMN de **15** (CDCl_3 , 298 K) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la concentración.

Para corroborar la formación del enlace de hidrógeno se obtuvieron espectros a distintas temperaturas, Figura 85. La disminución de la temperatura revela un desplazamiento a campo bajo de la señal de NHa debido a que dicho enlace se refuerza a bajas temperaturas. Cabe destacar que ninguna señal del espectro se desdobra a bajas temperaturas, lo que indica que probablemente en esta disolución exista el confórmero plegado como única especie.

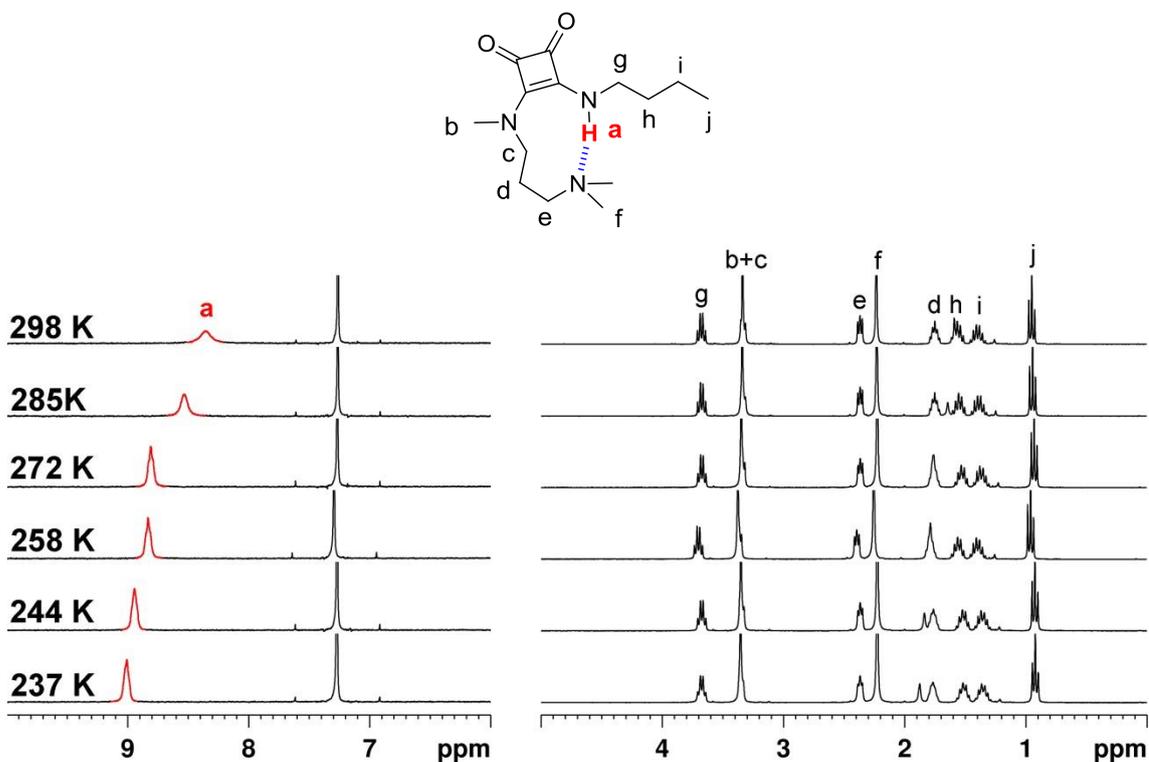


Figura 85. Serie de espectros ^1H RMN de **15** (CDCl_3 , 10 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

El experimento NOESY realizado a 258 K para una disolución de **15** (10 mM) en CDCl_3 mostró un número elevado de picos de entrecruzamiento entre núcleos situados en sustituyentes distintos, Figura 86. Estas señales de NOESY indican claramente la proximidad de los metilos situados en la amina terciaria, $(\text{CH}_3)_f$, y todos los hidrógenos de la cadena butílica, $(\text{CH}_2)_j$, $(\text{CH}_2)_i$, $(\text{CH}_2)_h$ y $(\text{CH}_2)_g$. Además el NHa escuaramídico da señales de cruzamiento con los grupos $(\text{CH}_2)_c$, $(\text{CH}_2)_e$ y $(\text{CH}_3)_f$ del otro sustituyente. Todo ello indica claramente la presencia exclusiva del confórmero objetivo (E,Z) en la disolución.

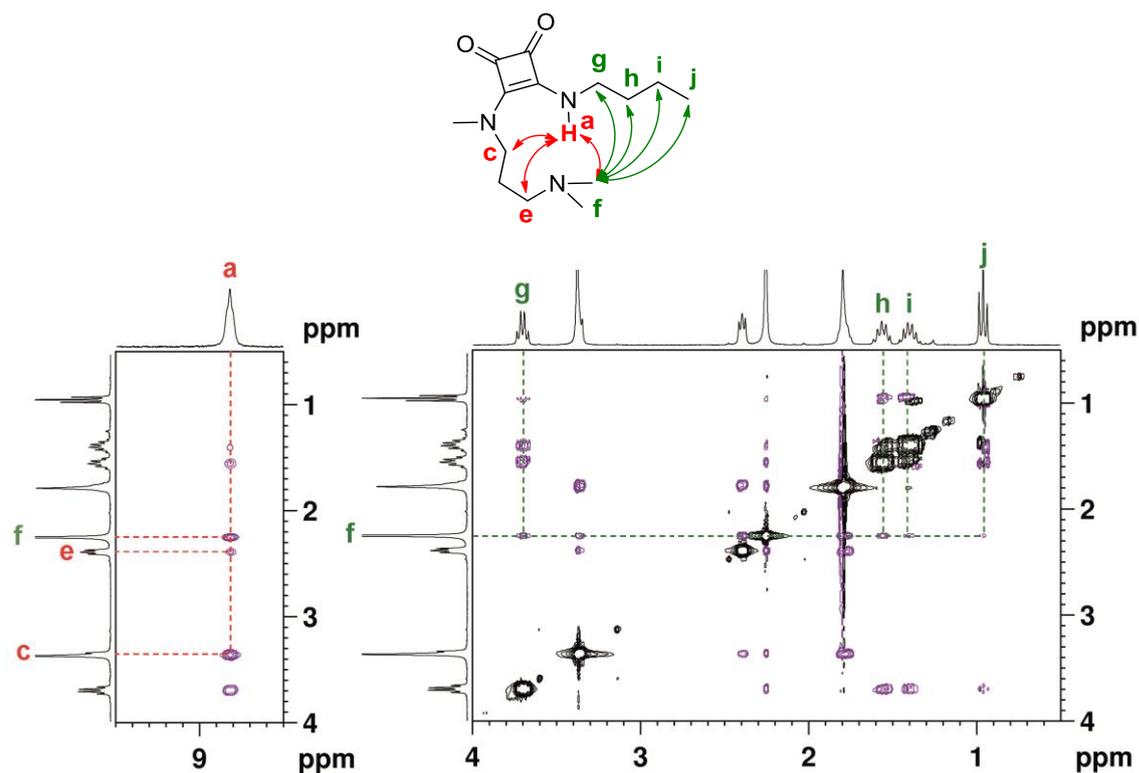


Figura 86. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de **15** (CDCl_3 , 10 mM, 258 K).

Para evaluar la estabilidad del enlace de hidrógeno intramolecular se realizó un experimento HMBC y se estudió el efecto de la adición de $\text{DMSO-}d^6$ sobre la disolución de CDCl_3 .

El experimento ^{15}N HMBC muestra picos de correlación entre los nitrógenos del compuesto y los correspondientes hidrógenos situados a dos o tres enlaces de distancia, pero además se puede detectar la presencia de enlaces de hidrógeno de elevada intensidad al observar señales de cruzamiento entre el N que actúa como aceptor de enlace de hidrógeno y el hidrógeno con que interacciona.¹⁶⁹

En la Figura 87 se muestra el espectro correspondiente al ^{15}N HMBC obtenido a partir de una disolución de **15** (100 mM) en CDCl_3 a 237 K y en el que se puede observar la correlación entre el NHa escuaramídico y el nitrógeno de la amina terciaria N_3 . Al no estar unidos a una distancia menor de tres enlaces, esta correlación indica claramente la formación del enlace de hidrógeno intramolecular fuerte entre esos núcleos.

¹⁶⁹ Dingley, AJ; Nisius, L; Cordier, F; Grzesiek, S. *Nature protocols* **2008**, 3, 242.

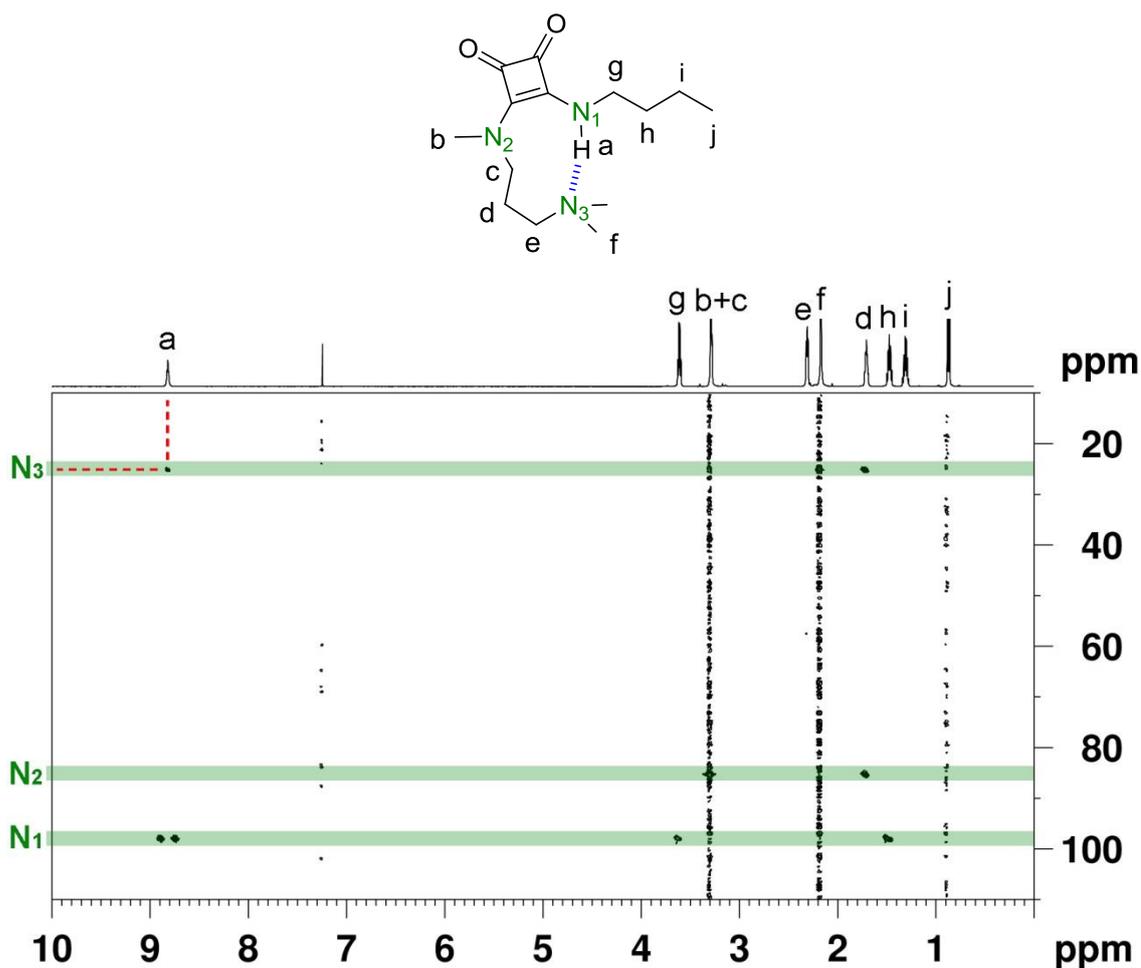


Figura 87. ^{15}N HMBC de **15** (CDCl_3 , 100 mM, 237 K). Se señala el pico de cruzamiento $\text{NH}_a\text{--N}_3$ indicativo del enlace de hidrógeno que forman estos núcleos.

El DMSO es un disolvente más polar que el cloroformo o el acetonitrilo y tiene un importante carácter aceptor de enlace de hidrógeno lo que lo convierte en un disolvente muy competitivo en la interacción con los centros dadores de enlace de hidrógeno. Una adición progresiva de $\text{DMSO-}d^6$ a una disolución de un compuesto en CDCl_3 se traduce en un cambio acusado del desplazamiento químico de las señales de los NH que se encuentren completamente expuestos al disolvente, debido a la interacción de las moléculas de DMSO con ese centro. Por otra parte, cuanto menos expuestos al disolvente estén los NH, menor será el efecto observado.

Al llevar a cabo dicho experimento con una disolución de **15** (5 mM) se observó que la señal del NH_a prácticamente no se desplaza al aumentar la proporción de DMSO, 0 - 10 %. Únicamente se observan cambios en el desplazamiento químico de los protones de la cadena alifática, atribuibles al cambio de polaridad del medio, Figura 88. Este hecho indica que el NH escuaramídico está fuertemente enlazado al nitrógeno de amina y por tanto no está expuesto al disolvente.

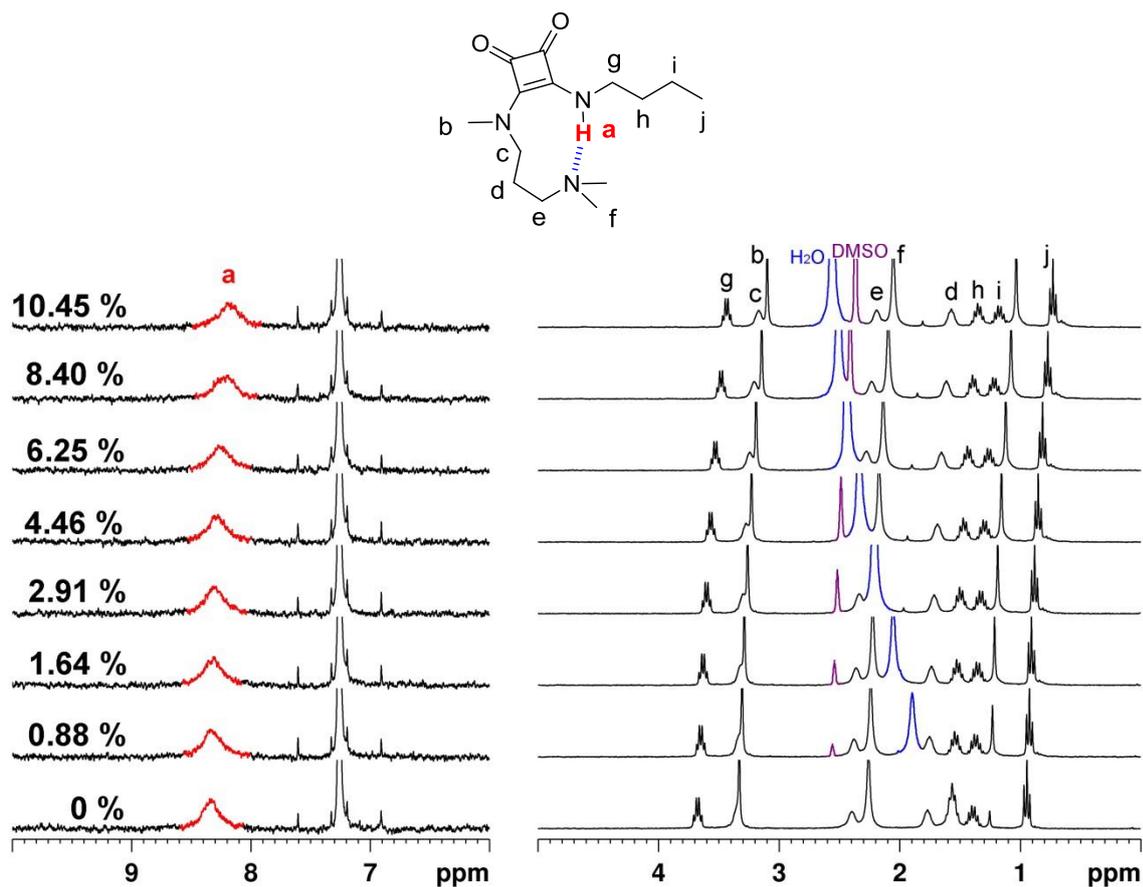


Figura 88. Serie de espectros ^1H RMN que muestran el efecto de la adición de DMSO sobre una disolución de **15** (CDCl_3 , 5 mM, 272 K). Los porcentajes indican la proporción de DMSO (v/v) en la mezcla.

En vista de que se mantenía plegada la estructura de **15** al adicionar DMSO a la disolución en cloroformo, se registró el espectro NOESY de una disolución de **15** (10 mM) en $\text{DMSO}-d^6$. Este experimento permitió identificar señales de cruzamiento entre los dos sustituyentes escuaramídicos análogas a las observadas en CDCl_3 , las cuales reflejan claramente que en este disolvente competitivo la conformación predominante es la E,Z, que permite mantener plegada la molécula. En la Figura 89 se muestran los picos de cruzamiento detectados.

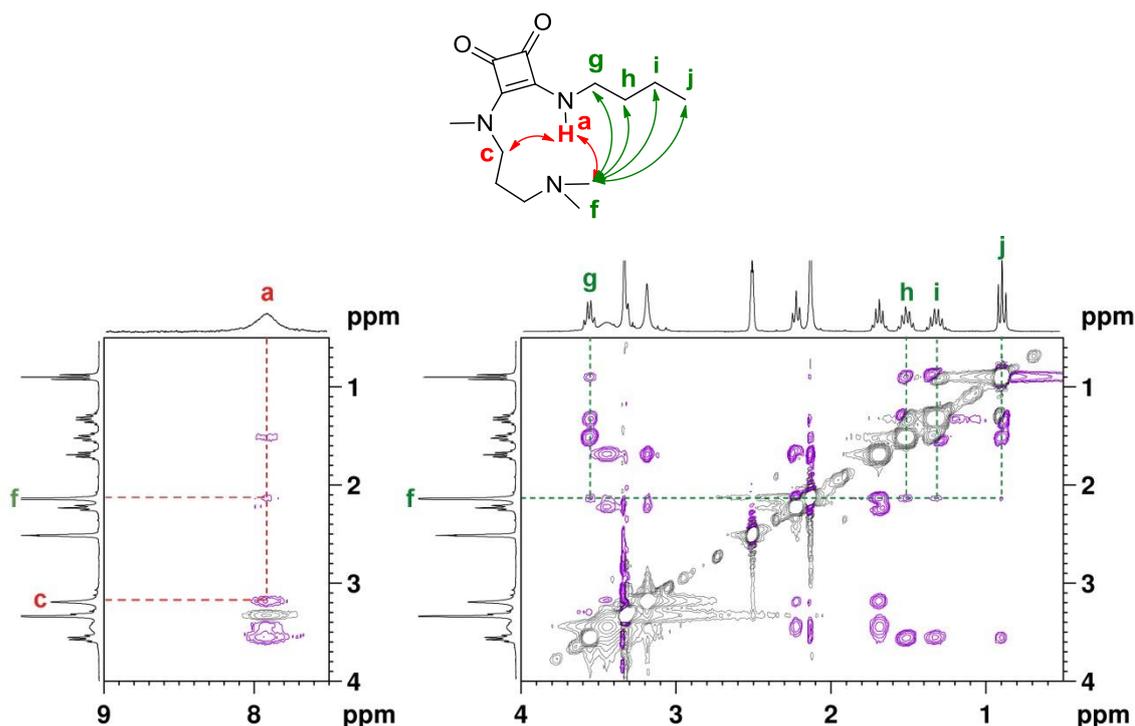


Figura 89. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de una disolución de **15** (DMSO- d_6 , 10 mM, 298 K).

El compuesto **15** se cristalizó en una mezcla de CH_2Cl_2 - pentano, obteniéndose cristales adecuados para la resolución de su estructura cristalina por difracción de rayos X, Figura 90. El análisis de la estructura cristalina revela que en estado sólido también se forma el enlace de hidrógeno intramolecular que induce el plegamiento de la molécula ($\text{NH}\cdots\text{N} = 2.100 \text{ \AA}$), descrito previamente en disolución. De esta manera se demuestra cuán favorable es la conformación E,Z para la unidad escuaramida. Esta conformación, además de permitir la formación del enlace de hidrógeno intramolecular, también permite que se establezcan dos interacciones de tipo $\text{CH}\cdots\text{O}$ entre los carbonilos escuaramídicos y los núcleos CH_3 y CH_2 unidos a los N escuaramídicos, donde las distancias $\text{CH}\cdots\text{O}$ son de 2.498 y 2.574 \AA respectivamente, claramente menores a la suma de sus radios de Van der Waals (2.72 \AA). Dichas interacciones energéticamente favorables contribuyen a reducir la libertad conformacional de los sustituyentes escuaramídicos, fijando así su conformación, Figura 90 (a). Además en la estructura cristalina se observa el empaquetamiento de las moléculas mediante interacciones de apilamiento aromático desplazado "stacking offset $\pi\cdots\pi$ " entre los anillos escuaramídicos, de forma que el dipolo de cada anillo tiene sentido opuesto al de los otros dos anillos con los que interacciona. La distancia entre los centroides de dos anillos escuaramídicos es de 3.269 \AA , similar a la de moléculas aromáticas que muestran este tipo de interacción, 3.3 - 3.6 \AA .¹⁷⁰ Estas interacciones dan lugar al apilamiento de las moléculas en columnas que se extienden a lo largo del eje que atraviesa los anillos, y las cuales se empaquetan en dirección perpendicular a ese eje, Figura 90 (b) y Figura 90 (c).

¹⁷⁰ Dahl, T. *Acta Chem. Scand.* **1994**, *48*, 95.

La estructura cristalina permitió observar por primera vez una estructura escuaramídica plegada mediante la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular.

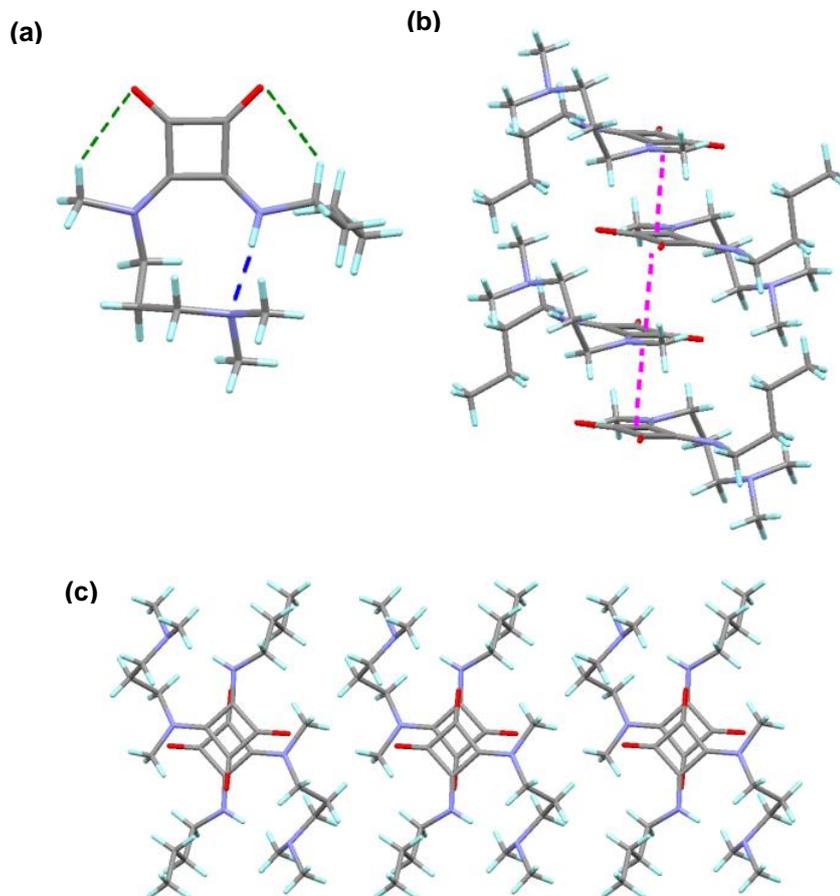


Figura 90. Estructura cristalina de **15**. **(a)** Molécula plegada debido a una interacción por **enlace de hidrógeno intramolecular NH...N**, en la que también se observan interacciones **CH...O**. **(b)** Visión lateral de una columna formada por interacciones de **stacking π · π** entre anillos escuaramídicos. **(c)** Visión superior de columnas empaquetadas.

4.1.3.2. Modelo 17: Escuaramida terciaria + amina secundaria

El estudio conformacional del compuesto **17** se llevó a cabo de forma análoga al del compuesto **15**.

Tal como sucede con el compuesto **15**, el espectro de ^1H RMN de **17** (2.5 mM) en CDCl_3 a 298 K muestra un desplazamiento químico de la señal NHa de 8.59 ppm, debido a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. Por su parte, la señal de $(\text{CH}_2)_g$ aparece a 3.70 ppm, desplazada a campo bajo por el efecto paramagnético del carbonilo escuaramídico, Figura 91. Ambos valores sugieren la presencia en disolución del conformero E,Z plegado,

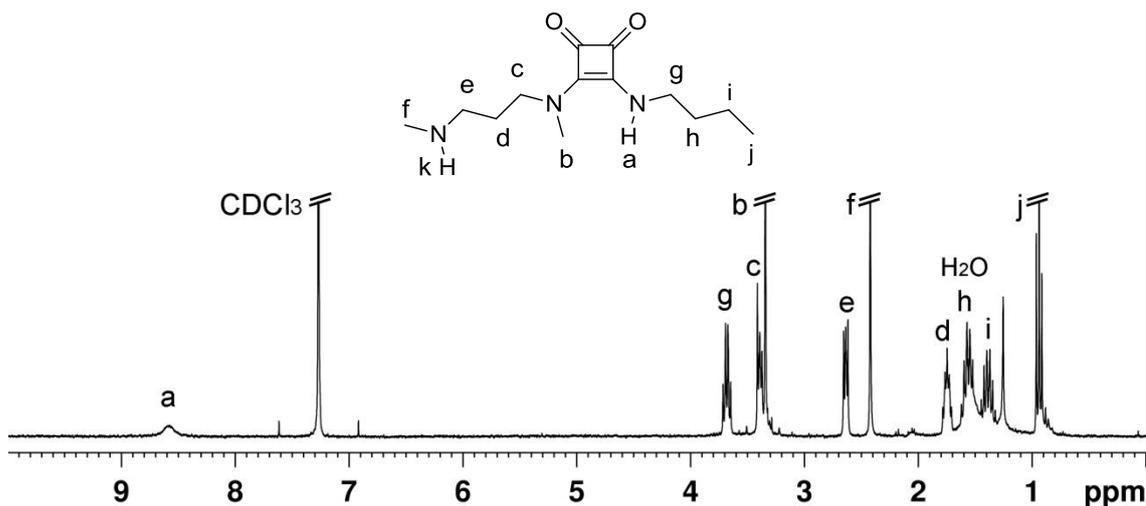


Figura 91. Espectro de ^1H RMN de **17** (CDCl_3 , 2.5 mM, 298K) y asignación de las señales.

Los espectros obtenidos en función de la concentración indican la ausencia de agregados, ya que no se observan desplazamientos significativos de las señales en los espectros registrados en el rango 1 - 50 mM, Figura 92 (a).

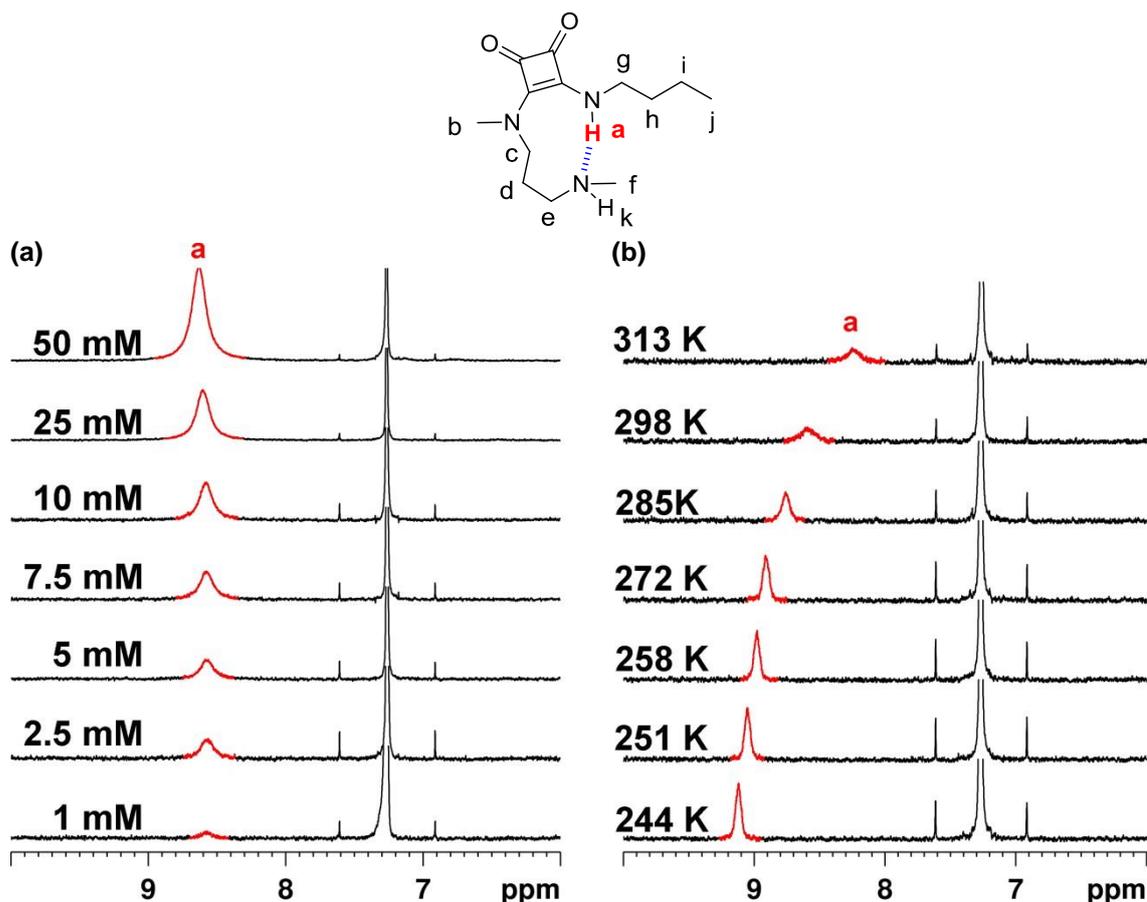


Figura 92. (a) Serie de espectros ^1H RMN de **17** (CDCl_3 , 298K) que muestran el cambio en el desplazamiento químico de la señal del NH escuaramídico en función de la concentración. **(b)** Serie de espectros ^1H RMN de **17** (CDCl_3 , 2.5 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos de la señal del NH escuaramídico en función de la temperatura.

Por otra parte, el experimento en función de la temperatura muestra como al disminuir la temperatura el NHa experimenta un desplazamiento a campo bajo, resultado de la mayor interacción entre los núcleos implicados en el enlace de hidrógeno intramolecular favorecido por la baja temperatura, Figura 92 (b).

En el espectro NOESY de una disolución de **17** (2.5 mM) en CDCl_3 a 272 K se observaron señales de entrecruzamiento que confirmaron el plegamiento de la molécula en disolución, como son los contactos intercadena NHa-- $(\text{CH}_2)_c$, NHa-- $(\text{CH}_3)_f$ y $(\text{CH}_3)_f$ -- $(\text{CH}_2)_g$, Figura 93.

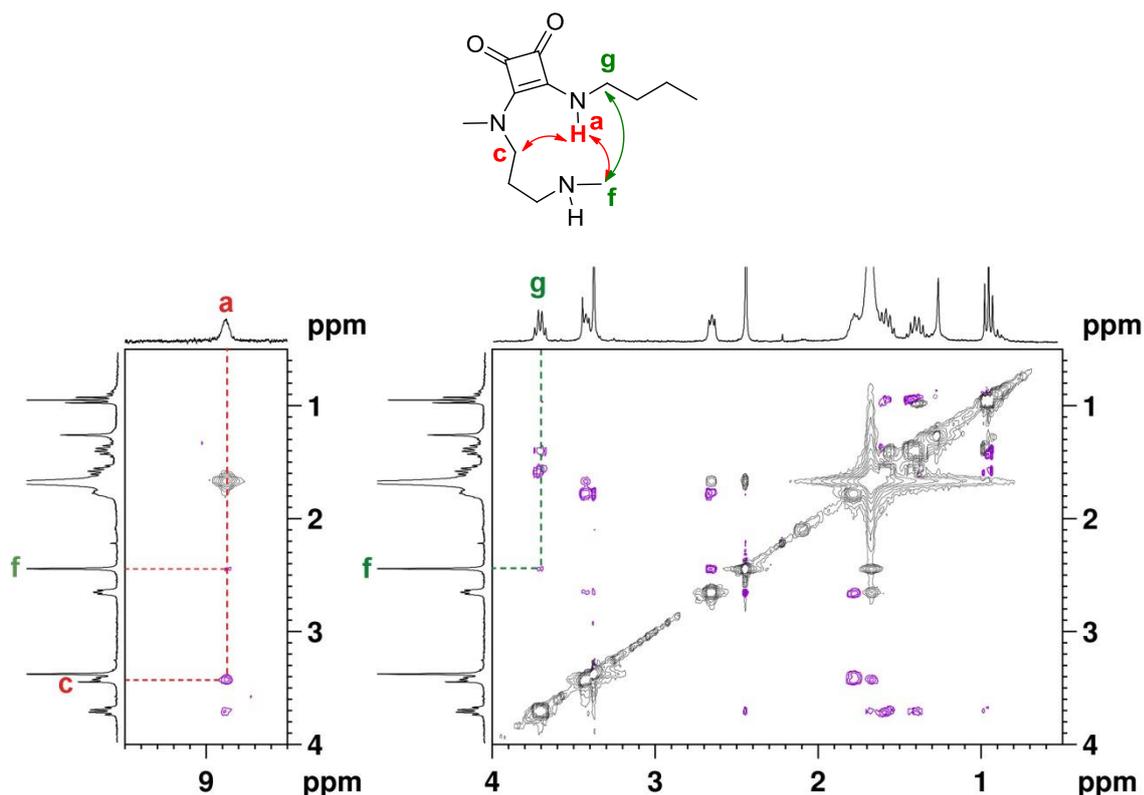


Figura 93. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de **17** (CDCl_3 , 2.5 Mm, 272 K).

El compuesto **17** se cristalizó en una mezcla de CH_2Cl_2 - pentano, y se resolvió la estructura cristalina por difracción de rayos X, observándose una vez más el plegamiento de la molécula en estado sólido ($\text{NH}\cdots\text{N} = 2.086 \text{ \AA}$), así como las interacciones intramoleculares $\text{CH}\cdots\text{O}$ (2.442 y 2.540 \AA), Figura 94 (a). El empaquetamiento de las moléculas plegadas se lleva a cabo fundamentalmente mediante la formación de un enlace de hidrógeno entre la amina secundaria y el carbonilo de otra unidad escuaramida ($\text{NH}\cdots\text{O} = 2.554 \text{ \AA}$), formándose cadenas de moléculas plegadas, Figura 94 (b). Estas cadenas se asocian entre sí mediante interacciones de *stacking* que se establecen entre los anillos escuaramídicos vecinos ($\pi\cdots\pi = 3.426 \text{ \AA}$), de manera que se forma una columna constituida por dos cadenas de sentidos opuestos, debido a la interacción entre los dipolos de los anillos enfrentados, Figura 94 (c). El empaquetamiento de las columnas en forma de espiga sitúa los dímeros de compuestos escuaramídicos en dos ejes diferentes, cuya dirección varía unos 60° de uno a otro, Figura 94 (d).

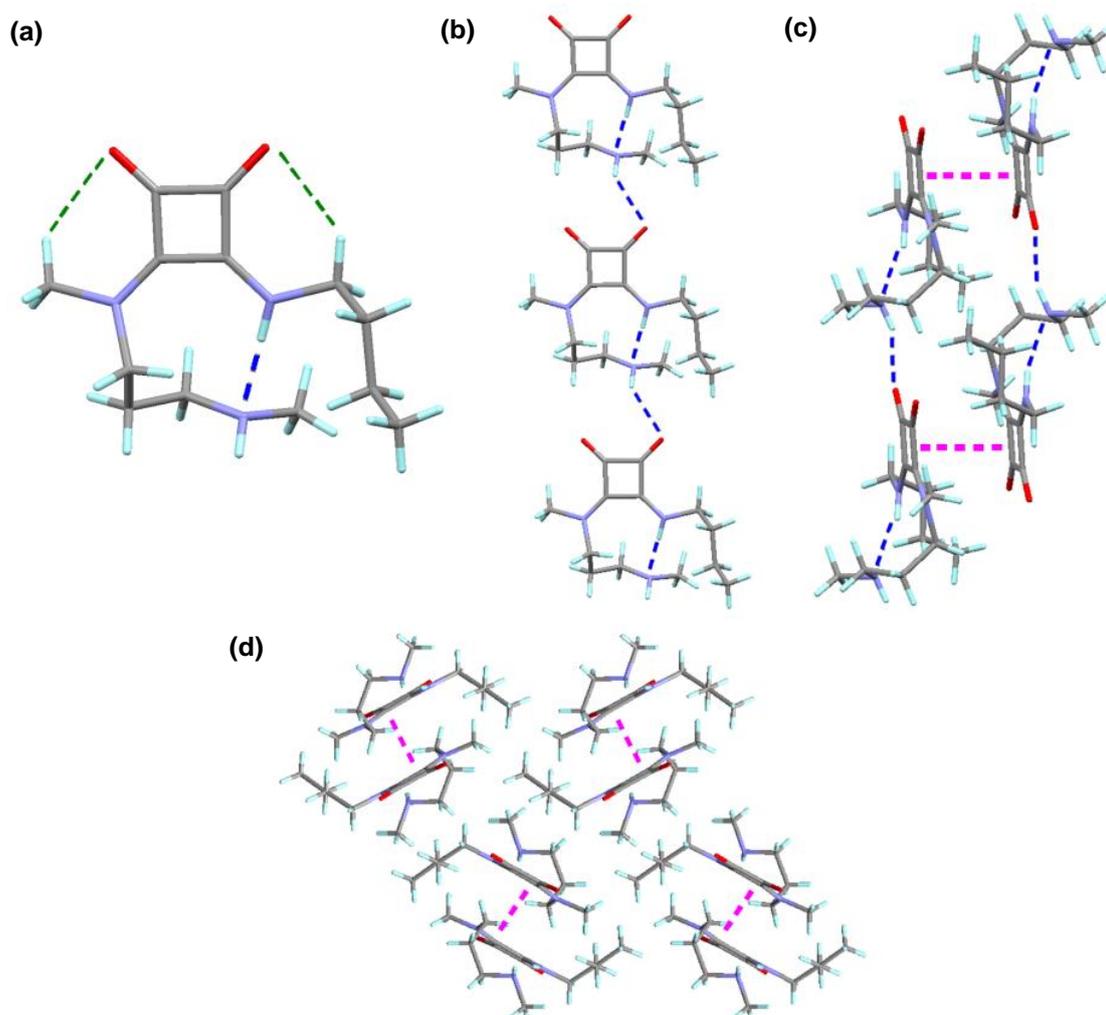


Figura 94. Estructura cristalina de **17**. **(a)** Molécula plegada debido a una interacción por enlace de hidrógeno intramolecular NH··N, en la que también se observan interacciones CH··O. **(b)** Visión frontal de una cadena formada por enlaces de hidrógeno intermoleculares NH··O. **(c)** Visión lateral de una columna formada por dos cadenas en direcciones opuestas que interactúan entre sí mediante *stacking* $\pi\cdots\pi$ entre anillos escuaramídicos. **(d)** Visión superior de columnas empaquetadas.

Considerando los resultados obtenidos para el compuesto **15**, era de esperar que el derivado **17** se comportara de forma análoga ya que ambos presentan una elevada similitud estructural. Por tanto, pequeñas diferencias en los espectros son las que indicarán cuál de los dos compuestos forma un enlace de hidrógeno intramolecular energéticamente más estable. Tanto a 298 K como a 244 K se puede observar que el NH escuaramídico del derivado **17** aparece ~ 0.15 ppm más desapantallado que el correspondiente a **15**. Esta observación coincide con el hecho de que la distancia NH··NHMe en la estructura cristalina de **17** (2.086 Å) es ligeramente menor que la distancia NH··NMe₂ en **15** (2.100 Å). Las diferencias comentadas indican que el impedimento estérico que ofrecen los metilos enlazados al nitrógeno de amina debilitan el enlace de hidrógeno intramolecular que induce el plegamiento, aunque este efecto sea ligero.

En conjunto, los resultados obtenidos con los compuestos **15** y **17** indican que la presencia en el módulo de giro de una escuaramida secundaria - terciaria combinada con la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular desplaza el equilibrio

conformacional hacia el conformero E,Z de forma exclusiva. Este hecho contrasta con el comportamiento de las escuaramidas disecundarias en las que siempre se observan varias especies en equilibrio.

Una consecuencia inesperada debido a la existencia exclusiva de la conformación E,Z fue la obtención de los compuestos **22** y **23**, como resultado de sendas ciclaciones intramoleculares. En ambos casos el grupo amino ataca nucleofilamente al carbono escuaramídico en posición cuatro, de forma que desplaza a la butilamina. Dicha reacción es muy rápida en las condiciones básicas indicadas anteriormente (pH > 9). La eficacia de la reacción se debe a que la conformación E,Z preorganiza el compuesto, favoreciendo la reacción de ciclación intramolecular, Figura 95 (a). De hecho, el compuesto **17** en estado sólido cristalino reacciona intramolecularmente para dar el compuesto cíclico **22**. La conversión es completa al cabo de 60 días. La reacción de ciclación descrita resulta muy interesante para el diseño y desarrollo de diferentes sistemas moleculares, como por ejemplo un nuevo grupo protector de aminas primarias o un nuevo sistema autoinmolativo de base escuaramida que permita liberar al medio una molécula (carga) de forma controlada. Esta última aplicación está siendo desarrollada en la actualidad en nuestro grupo de investigación, Figura 95 (b).

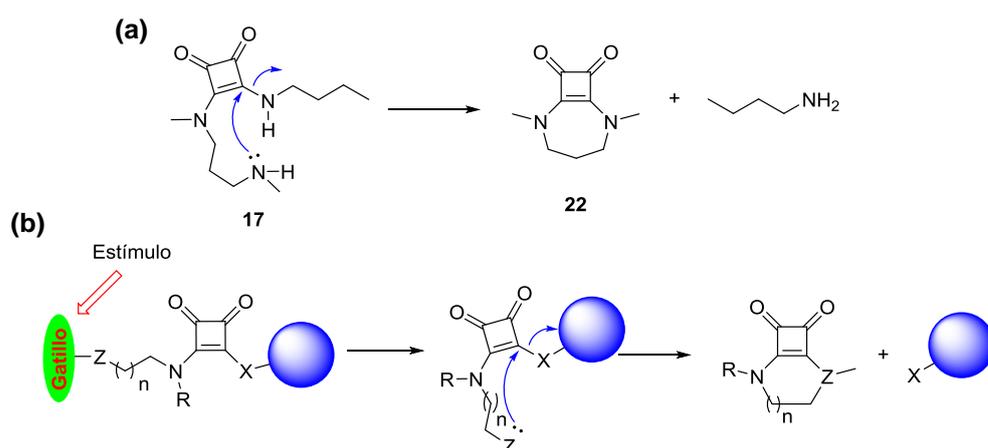


Figura 95. (a) Reacción de ciclación intramolecular de **17** para rendir **22**. **(b)** Esquema general de un sistema autoinmolativo donde la activación de un gatillo molecular mediante un estímulo libera el nucleófilo Z, que provoca la ciclación de la forma E,Z de la escuaramida liberando la carga.

4.1.3.3. Modelo 16: escuaramida terciaria + C=O

Siguiendo en la misma línea de trabajo y para poder evaluar el efecto de la presencia de una escuaramida secundaria - terciaria en el módulo que incorpora el aminoácido GABA, se realizó el estudio conformacional del compuesto **16**, cuya única diferencia respecto al compuesto **3** reside en la incorporación de un grupo metilo en uno de los dos nitrógenos escuaramídicos. En la Figura 96 se muestra el espectro de ^1H RMN de **16** (2.5 mM) en CDCl_3 a 298 K junto con la asignación de las señales de todos los protones. La señal de NHa aparece a 7.56 ppm, mientras que la señal de NHf aparece a 6.00 ppm, situación que indica la presencia probable en disolución del

confórmero de giro, donde el NHf está expuesto al disolvente y el NHa forma un enlace de hidrógeno intramolecular y aparece por tanto desapantallado.

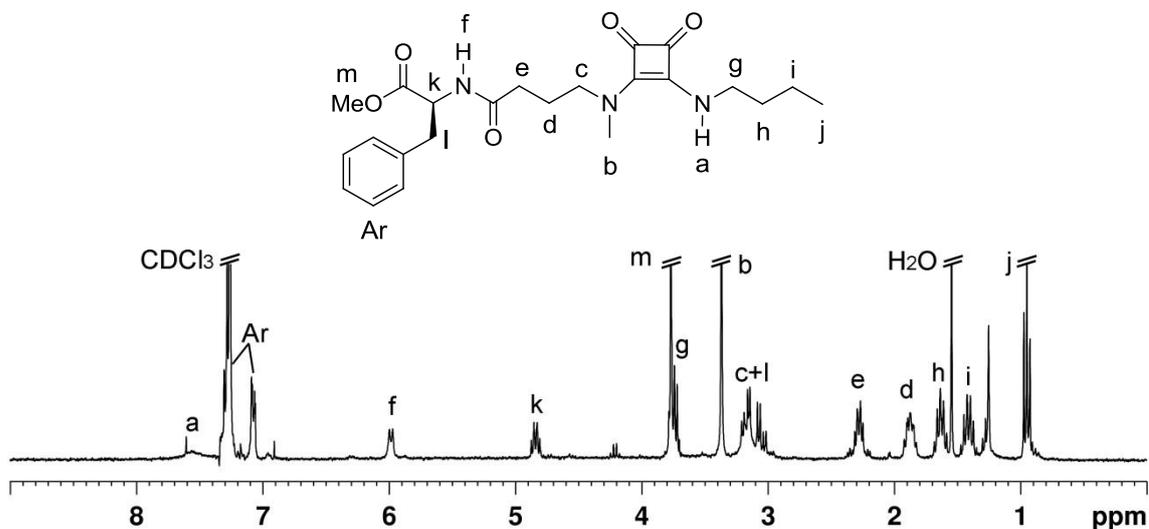


Figura 96. Espectro de ^1H RMN de **16** (CDCl_3 , 2.5 mM, 298 K) y asignación de las señales.

Los espectros de ^1H RMN registrados a diferentes concentraciones indican que la señal de NHa prácticamente no varía su desplazamiento químico en el rango de concentraciones 1 - 25 mM ($\Delta\delta = 0.054$ ppm), Figura 97. La señal de NHf sí se muestra algo más dependiente de la concentración, ya que la diferencia de desplazamiento químico para las señales de este NH en los espectros a 1 mM y a 25 mM es de 0.295 ppm.

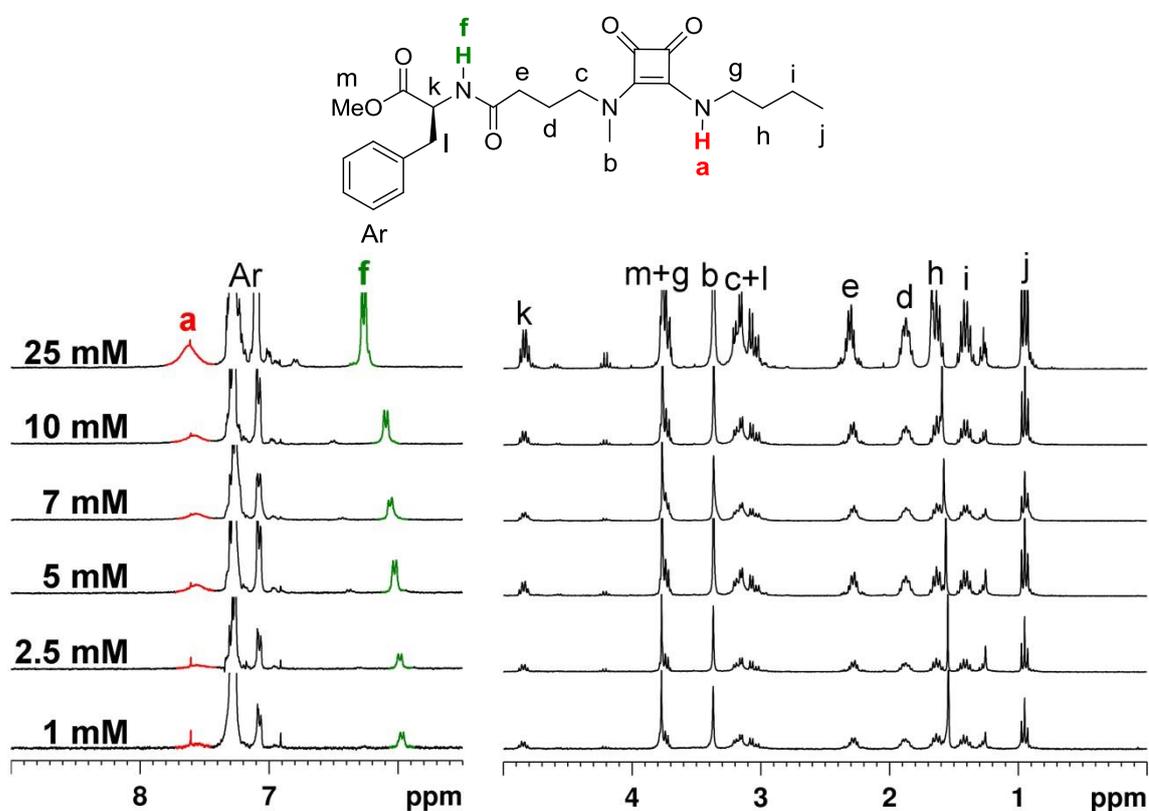


Figura 97. Serie de espectros ^1H RMN de **16** (CDCl_3 , 298K) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la concentración.

Un análisis más detallado de estos resultados refleja que en el rango de concentraciones 1 - 10 mM la dependencia del desplazamiento químico con la concentración es despreciable para NHa y tan solo varía 0.1 ppm para NHf. Esta observación sugiere que entre 1 y 10 mM la única especie en proporción considerable en disolución sea el conformero plegado, en el que ninguno de los dos NH de la molécula está implicado en la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares. A concentraciones mayores que 10 mM se forman especies agregadas, reflejándose ello en la mayor dependencia de la concentración de las señales.

El estudio del efecto de la temperatura sobre el desplazamiento químico se realizó en una disolución de **16** (10 mM) en CDCl₃ y permitió determinar los valores de los coeficientes $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ para los dos NH de la molécula, Figura 98. Dichos coeficientes tienen un valor de -0.005 ppm/K para NHa y -0.003 ppm/K para NHf, lo que indica que NHa está aislado del disolvente por la formación del enlace de hidrógeno intramolecular, mientras que NHf está completamente expuesto al disolvente.

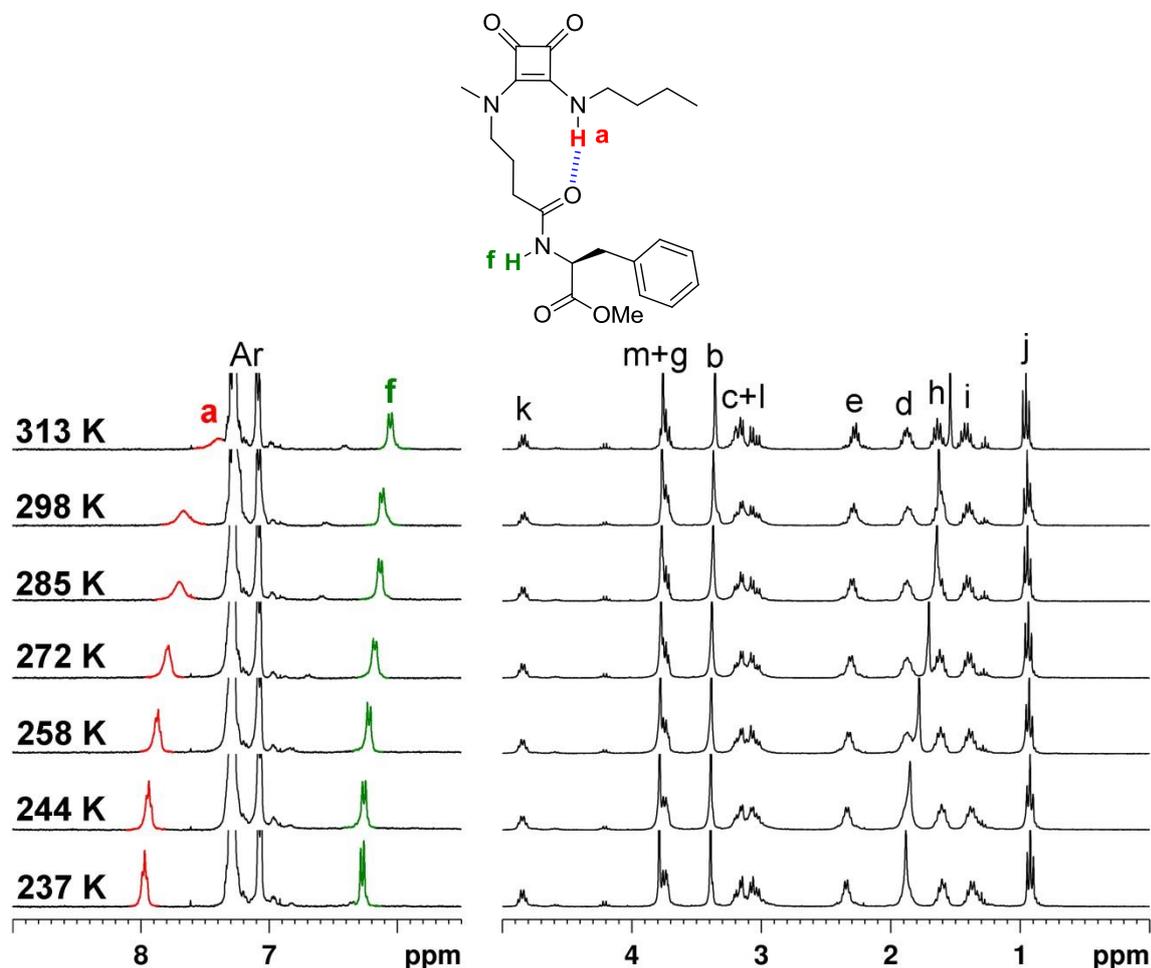


Figura 98. Serie de espectros ¹H RMN de **16** (CDCl₃, 10 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

El espectro NOESY de una disolución de **16** (10 mM) a 237 K muestra señales de entrecruzamiento entre el NHa y los (CH₂)c y (CH₂)d del otro sustituyente, lo que indica la proximidad de estos núcleos en disolución, Figura 99. Esta proximidad es una consecuencia de la conformación E,Z de la escuaramida.

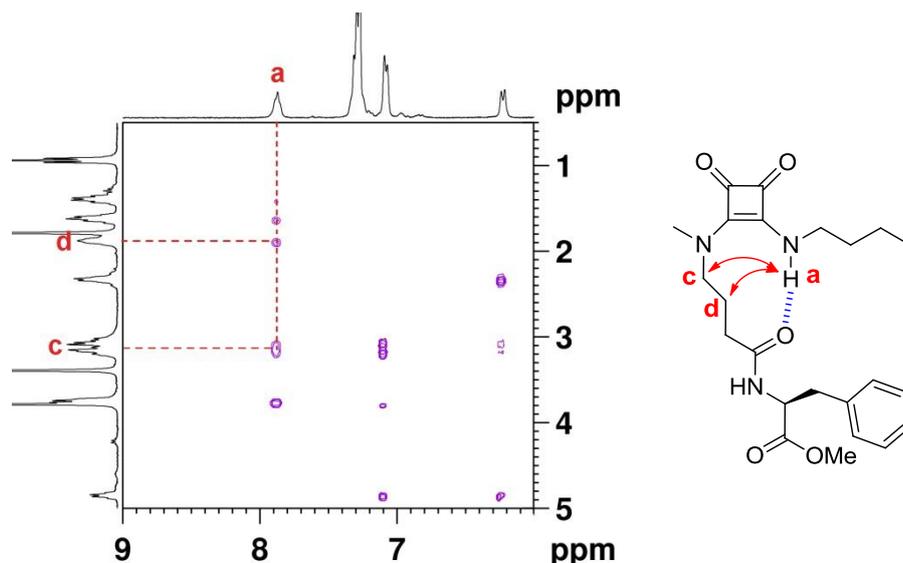


Figura 99. Espectro NOESY parcial de **16** (CDCl_3 , 10 mM, 237 K).

Considerando la posible presencia de agregados de orden superior en la disolución de cloroformo, que podría ocasionar una interpretación errónea de algunos experimentos, como por ej. NOESY, se realizó el estudio conformacional del compuesto **16** en acetonitrilo.

En la Figura 100 se muestra el espectro de ^1H RMN de una disolución de **16** (5 mM) en CD_3CN a 298 K con la asignación de sus señales. Al igual que en el correspondiente espectro en CDCl_3 , se observa que el NHa tiene un desplazamiento químico a campo más bajo de lo esperado para un NH escuaramídico libre. Este protón aparece solapado con las señales aromáticas a 7.30 ppm. Por su parte el NHf presenta un desplazamiento típico de NH peptídico en CD_3CN , a 6.9 ppm. Asumiendo la ausencia de agregados en el medio, el análisis del espectro indica que el NHa forma un enlace de hidrógeno intramolecular con el oxígeno amídico, dando lugar al conformero E,Z.

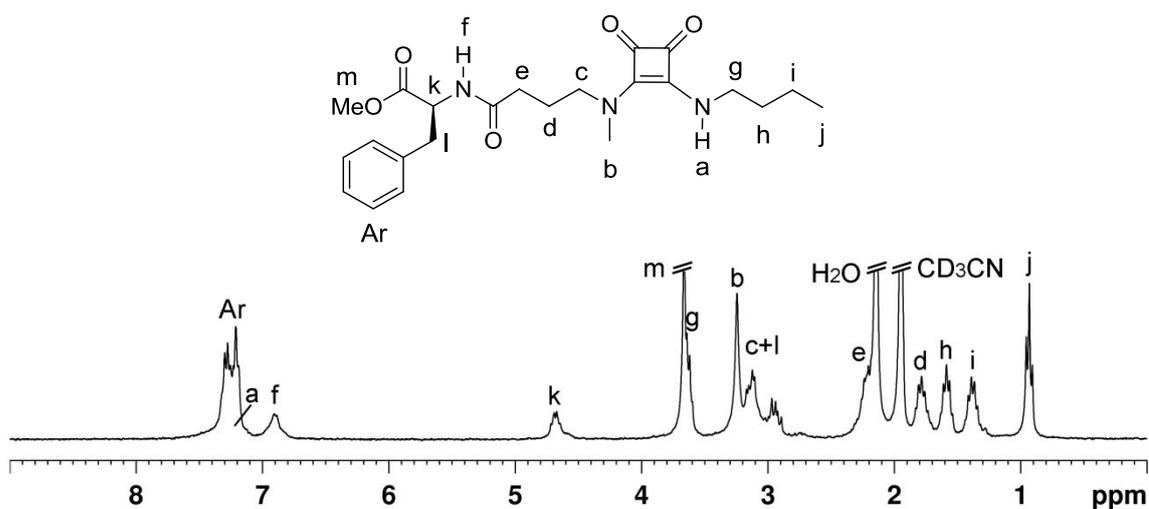


Figura 100. Espectro de ^1H RMN de **16** (CD_3CN , 2.5 mM, 298 K) y asignación de las señales.

Para validar este resultado se estudió el efecto de la temperatura sobre el desplazamiento químico en una muestra de **16** (5 mM) en CD_3CN , a partir del cual se

calcularon los coeficientes de $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ en el rango de 285 - 258 K, Figura 101. Los valores obtenidos para NHa y NHf fueron de -0.006 ppm/K en ambos casos, indicando con ello una ligera dependencia de la temperatura. Este resultado puede atribuirse, en el caso de NHf, a su completa exposición al disolvente, y en el caso de NHa, a su implicación en la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. Además, comparando los espectros a 313 K y a 244 K se puede apreciar que la señal de $(\text{CH}_2)_c$ se desplaza a campo alto al disminuir la temperatura. Este desplazamiento se debe probablemente a que se está incrementando la proporción de moléculas en la conformación E,Z, en la cual estos hidrógenos no están bajo el efecto paramagnético del carbonilo escuaramídico. A 244 K se observa la aparición de dos señales de NH correspondientes a una especie minoritaria, NHa' y NHf'. Esta especie minoritaria, presente en disolución en una proporción de 7 %, muestra un desplazamiento químico de NHf' cercano a 7 ppm, similar al de NHf de la especie mayoritaria, y un desplazamiento químico de NHa' a 6.32 ppm, mucho más a campo alto que el de NHa a 7.75 ppm. Estos desplazamientos sugieren que se trata de la forma Z,Z desplegada de la molécula.

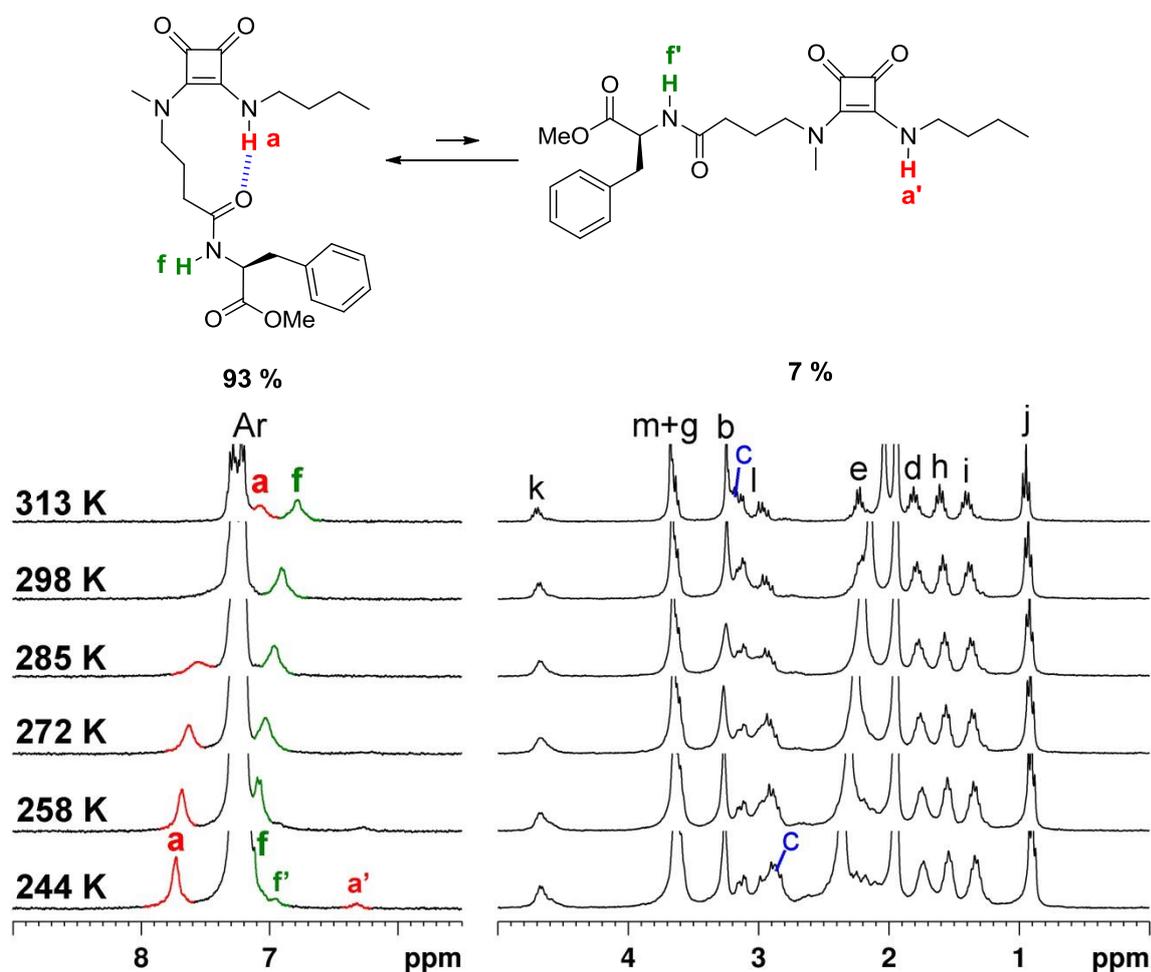


Figura 101. Serie de espectros ^1H RMN de **16** (CD_3CN , 5 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

Para confirmar la presencia del conformero E,Z en disolución, se registró el espectro NOESY de una disolución de **16** (5 mM) en CD_3CN a 244 K. Tal como se muestra en la Figura 102, se observaron picos de cruzamiento entre la señal NHa y las

señales (CH₂)_c y (CH₂)_d, las cuales, considerando la ausencia de agregados en la muestra, confirman la presencia de la conformación E,Z en disolución.

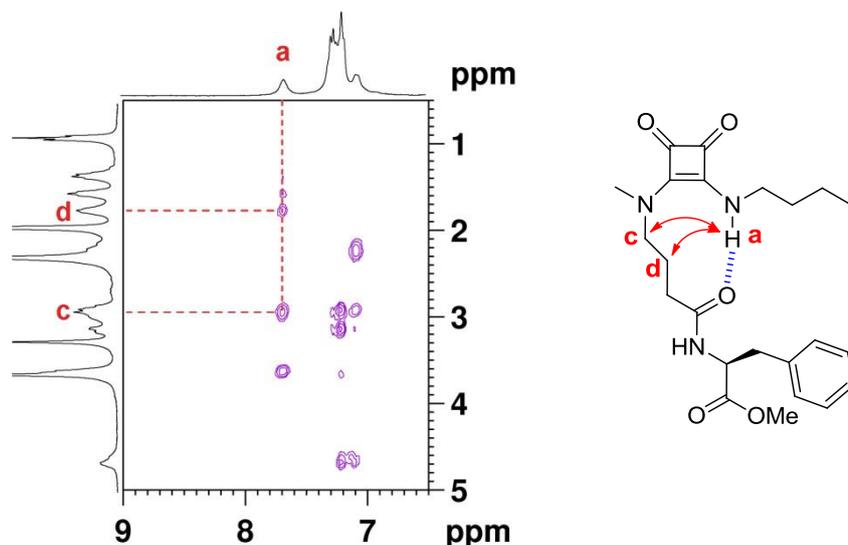


Figura 102. Espectro NOESY parcial de **16** (CD₃CN, 2.5 mM, 244 K).

El compuesto **16** se cristalizó a partir de una mezcla CH₂Cl₂ - pentano, obteniéndose cristales adecuados para la resolución de la estructura cristalina por difracción de rayos X, Figura 103. En dicha estructura las moléculas de **16** se encuentran en la conformación E,Z y se observa la formación del correspondiente enlace de hidrógeno intramolecular (NH··N = 1.895 Å) y de las interacciones CH··O (2.440 y 2.499 Å), observadas en los compuestos **15** y **17**, Figura 103 (a). Este compuesto muestra un comportamiento análogo al de los dos modelos anteriores, donde la estructura plegada se observa tanto en disolución como en estado sólido. Adicionalmente, en el sólido se observa la formación mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares NH··O (2.046 Å) de cadenas de moléculas plegadas donde todos los anillos de escuaramida tienen el mismo sentido, Figura 103 (b). En el empaquetamiento de esas cadenas, cada una interacciona con otras dos cadenas vecinas de sentido opuesto mediante interacciones de *stacking* π - π y dipolo - dipolo entre anillos escuaramídicos (π··π = 3.789 Å), Figura 103 (c) y (d).

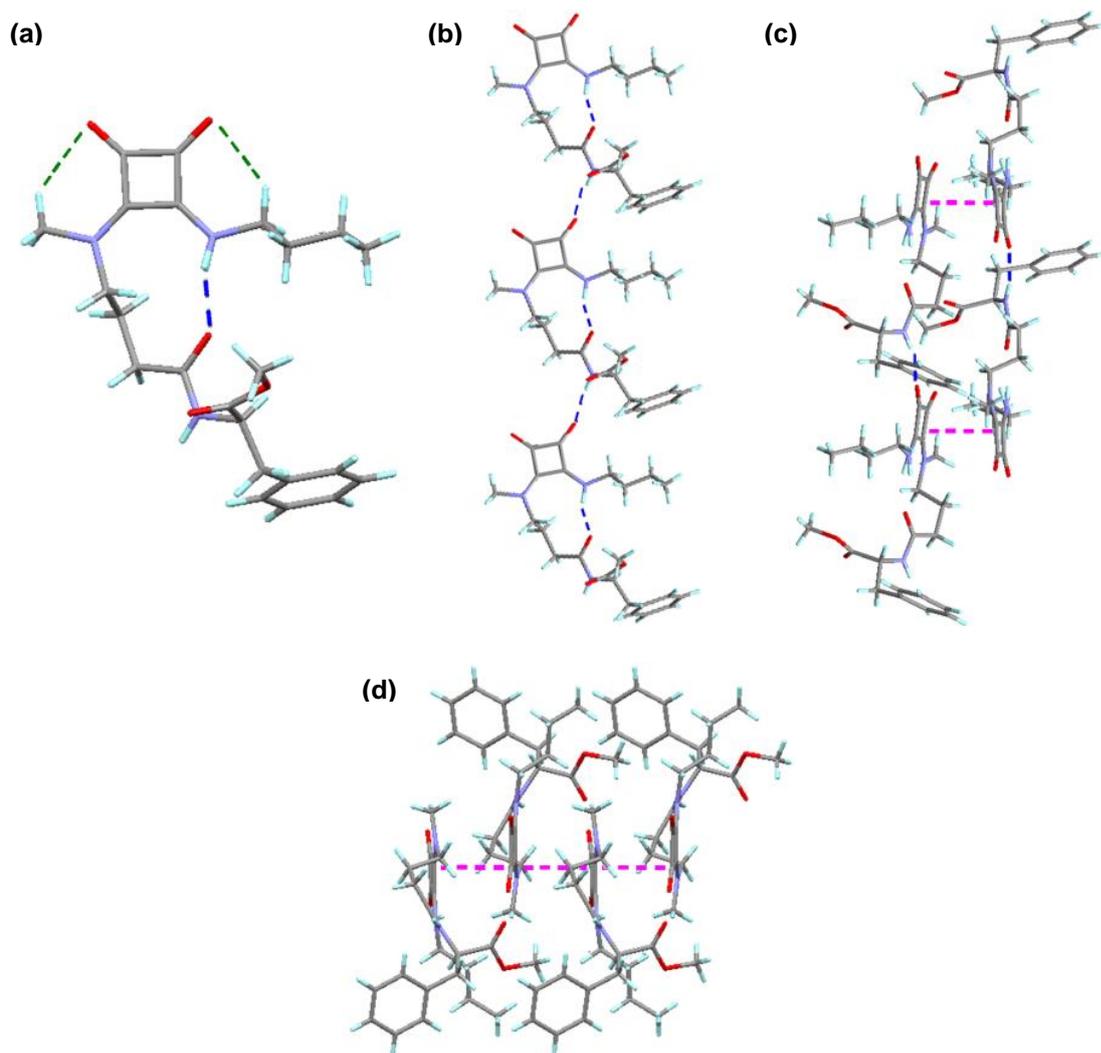


Figura 103. Estructura cristalina de **16**. **(a)** Molécula plegada debido a una interacción por **enlace de hidrógeno intramolecular NH...O**, en la que también se observan interacciones **CH...O**. **(b)** Visión frontal de una cadena formada por **enlaces de hidrógeno intermoleculares NH...O**. **(c)** Visión lateral de dos cadenas vecinas con direcciones opuestas que interaccionan entre sí mediante **stacking $\pi\cdots\pi$** entre anillos escuaramídicos. **(d)** Visión superior de cadenas empaquetadas.

En conclusión, se ha demostrado que el compuesto **16** adopta la conformación E,Z de forma mayoritaria tanto en cloroformo como en acetonitrilo. Esta conformación está muy favorecida como resultado de la formación del enlace de hidrógeno intramolecular que induce el plegamiento de la estructura. De esta manera se forma un ciclo de diez miembros que mimetiza el comportamiento de un giro β natural.

4.1.3.4. Modelo de giro α **19**

En el apartado anterior se ha demostrado que la introducción del grupo N-metilo en el módulo escuaramídico permite obtener de forma muy efectiva compuestos que mimeticen giros β naturales. El compuesto **19** se diseñó con el objetivo de evaluar si también se podría promover la formación de un segundo enlace de hidrógeno para dar lugar a un mimético de giro α natural análogo al observado para el compuesto **8**. En

este caso el segundo enlace de hidrógeno se obtiene sustituyendo la cadena de n-butilo por un fragmento que incluye un grupo amida adicional. En el espectro de ^1H RMN del derivado **19** (2.5 mM) en CDCl_3 a 298 K se observan los desplazamientos químicos de las señales de NHa, NHf i NHi a 7.72, 6.22 y 6.64 ppm, respectivamente, Figura 104. La señal correspondiente al NHf muestra un desplazamiento químico típico de NH de amida en CDCl_3 , mientras que la señal de NHi, que es la que introduce esta modificación, aparece desplazada a campo bajo respecto a los valores esperados para una amida no asociada. Por su parte, la señal de NHa aparece muy desplazada a campo bajo respecto a los valores habituales de un NH escuaramídico. Estas observaciones sugieren que el NHa está implicado en la formación de un enlace de hidrógeno fuerte, el NHi está implicado en la formación de un enlace de hidrógeno más débil y el NHf está expuesto al disolvente.

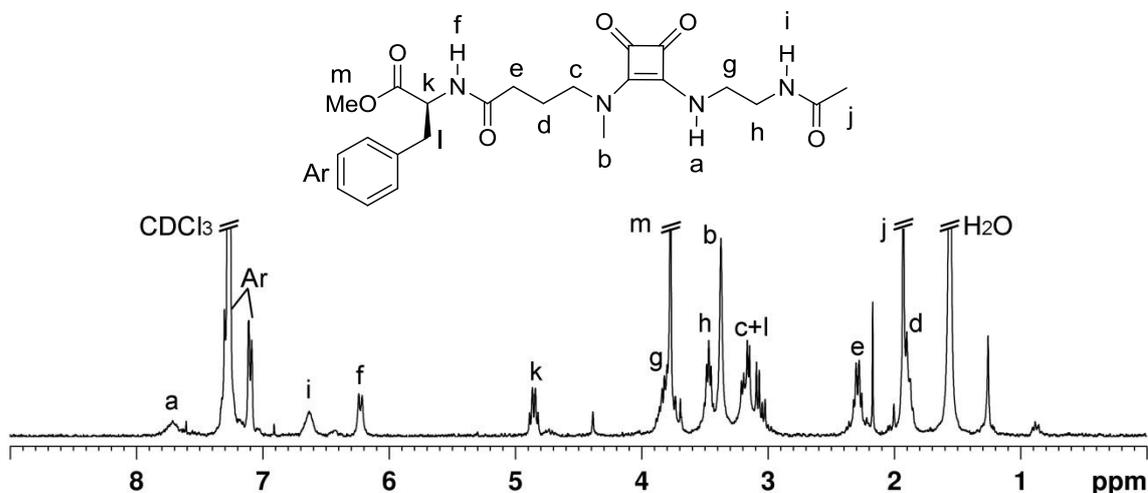


Figura 104. Espectro de ^1H RMN de **19** (CDCl_3 , 2.5 mM, 298 K) y asignación de las señales.

En la Figura 105 se muestran la superposición de espectros de ^1H RMN en CDCl_3 obtenidos en los estudios de variación de la concentración, Figura 105 (a), y la temperatura, Figura 105 (b). En estos estudios se observó que mientras el desplazamiento químico del NHa es independiente de la concentración en el intervalo de concentraciones 1 - 50 mM, las señales de NHi y NHf experimentan un desplazamiento a campo bajo de 0.26 ppm y 0.50 ppm respectivamente. Los espectros registrados de una disolución 2.5 mM de **19** en el rango de temperaturas 237 - 313 K permitieron calcular los coeficientes $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ de los núcleos NHa, NHi y NHf, obteniendo valores de -0.007, -0.008 y -0.002 ppm/K respectivamente.

Estos resultados sugieren que el NHa forma un enlace de hidrógeno intramolecular que se refuerza con la disminución de la temperatura e impide la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, mientras que el NHf a concentraciones menores a 5 mM está completamente expuesto al disolvente y a concentraciones mayores se ve implicado en la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares favorecidos por la concentración. Por su parte, NHi muestra una dependencia de la temperatura similar a la de NHa y una dependencia de la concentración menor a la de NHf, lo que sugiere que este NH está formando un enlace de hidrógeno intramolecular en una proporción considerable de especies en disolución.

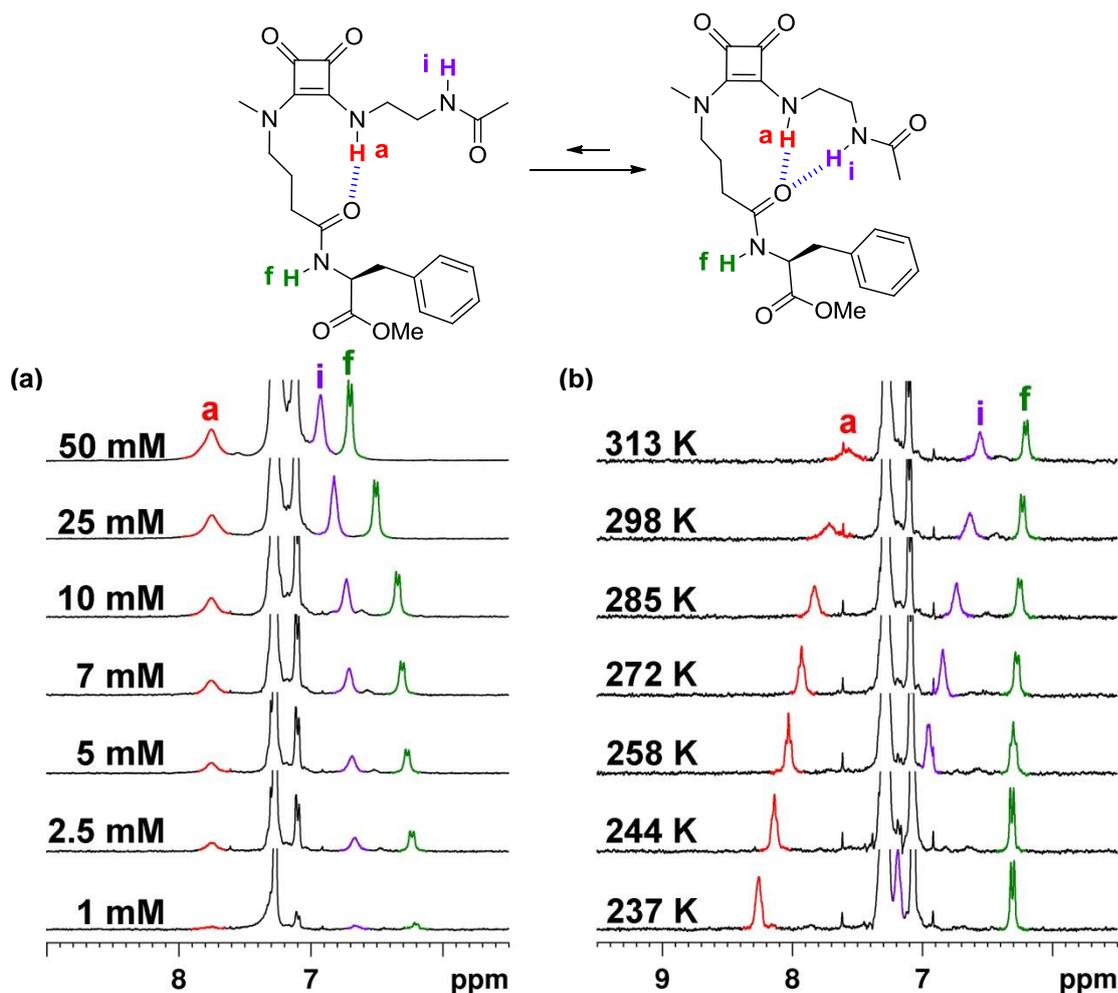


Figura 105. (a) Serie de espectros ¹H RMN de **19** (CDCl₃, 298K) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos de los protones NH en función de la concentración. (b) Serie de espectros ¹H RMN de **19** (CDCl₃, 2,5 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos de los protones NH en función de la temperatura.

Para completar el estudio conformacional de **19** y determinar el grado de implicación del NH_i en un enlace de hidrógeno intramolecular, se analizó el efecto producido sobre el desplazamiento químico de los NH por la adición de cantidades crecientes de DMSO. La adición progresiva de DMSO se realizó sobre una disolución de **19** (2.5 mM) en CDCl₃, y se observó que la señal de NH_f es la más afectada por la adición de DMSO, con un desplazamiento de 1.60 ppm a campo bajo al aumentar la proporción de DMSO de 0 a 13 %, Figura 106. La señal de NH_i se ve mucho menos afectada por la adición de DMSO, desplazándose 0.41 ppm a campo bajo, lo que indica que dicho NH está menos expuesto al disolvente que el NH_f, probablemente debido a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular con el oxígeno carbonílico del fragmento de GABA. Dicha interacción da lugar a un ciclo de trece miembros que mimetiza los giros α naturales. Por otra parte, el NH_a sufre un ligero desplazamiento a campo alto de 0.3 ppm, lo que confirma que se encuentra alejado de la influencia del disolvente, debido a la formación de otro enlace de hidrógeno intramolecular fuerte. Estos resultados indican que en disolución de cloroforno existe la especie plegada en la que se forman dos ciclos, uno de trece miembros y otro

interior de diez miembros, sostenidos mediante dos enlaces de hidrógeno intramoleculares, que mimetizan la estructura de los giros α naturales.

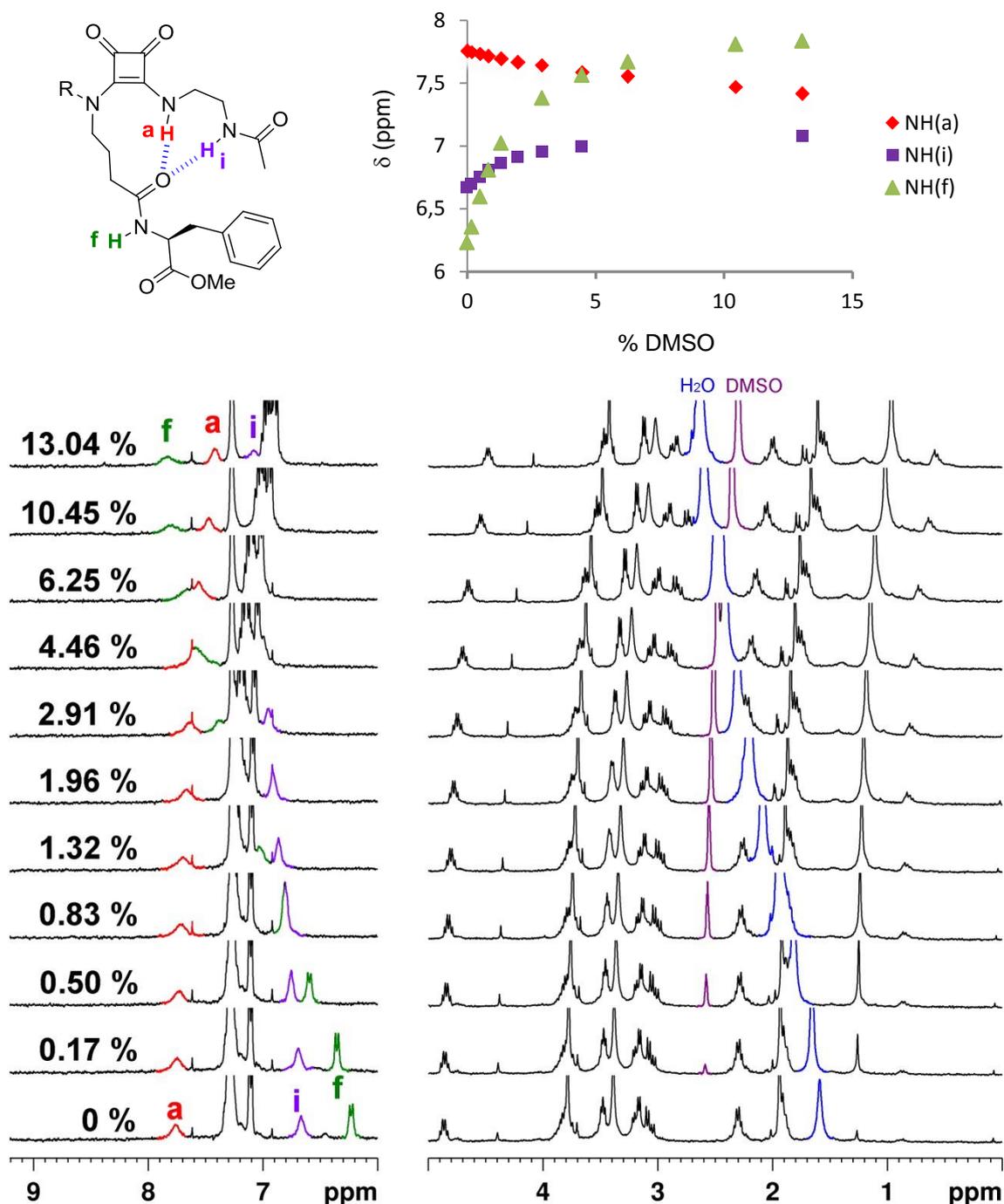


Figura 106. Serie de espectros ^1H RMN que muestran el efecto de la adición de DMSO sobre una disolución de **19** (CDCl_3 , 5 mM, 298 K). Los porcentajes indican la proporción de DMSO (v/v) en la mezcla.

Por otra parte, para estudiar la robustez del ciclo de 13 miembros, se realizó el estudio conformacional del compuesto **19** en acetonitrilo. Cabe recordar que en este disolvente se desfavorece la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, con lo que se evitan en gran parte la presencia de agregados poliméricos, y también pueden verse debilitados los enlaces de hidrógeno intramoleculares relativamente

débiles. En la Figura 107 se muestra el espectro de ^1H RMN de una disolución de **19** (2.5 mM) en CD_3CN a 298 K con la asignación de sus señales. En el espectro, la señal correspondiente al NHa queda solapada por las señales aromáticas a 7.3 ppm. Éste es el único protón que muestra un desplazamiento químico distinto al que cabría esperar si todos los hidrógenos estuvieran completamente expuestos al disolvente.

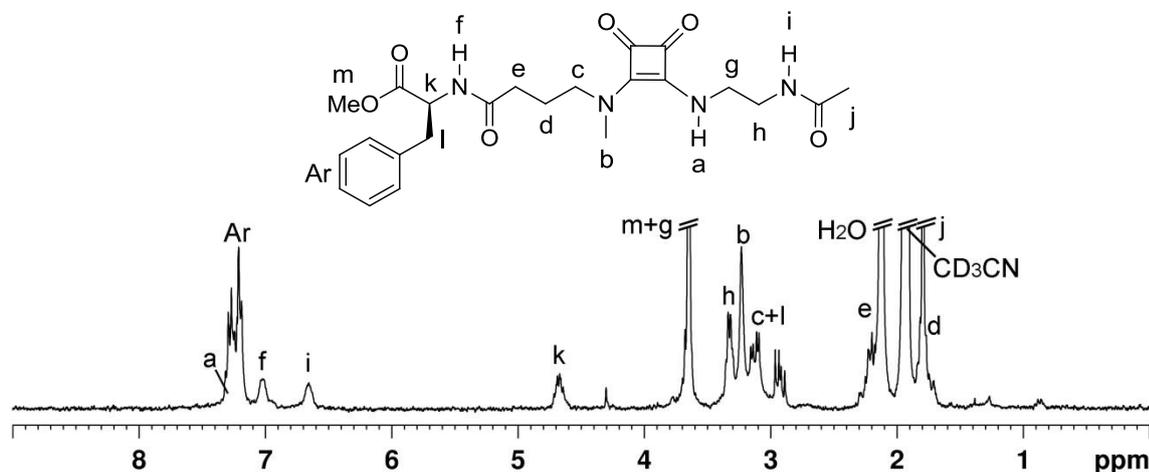


Figura 107. Espectro de ^1H RMN de **19** (CD_3CN , 2.5 mM, 298 K) y asignación de las señales.

Los desplazamientos químicos de los tres NH resultaron ligeramente dependientes de la temperatura, obteniéndose coeficientes $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ con valores de -0.004 , -0.005 y -0.003 ppm/K para NHa, NHf y NHi, respectivamente, Figura 104.

Los estudios conformacionales realizados en acetonitrilo indican que el NHa está completamente aislado del disolvente, por su implicación en un fuerte enlace de hidrógeno intramolecular, mientras que los protones NHf y NHi están completamente expuestos al disolvente, por lo que el conformero presente en la disolución de acetonitrilo sería el que se muestra en la figura 108.

Para confirmar estos resultados se realizaron experimentos NOESY en los dos medios de estudio comentados, pero en ningún caso se obtuvieron datos relevantes que permitieran confirmar las diferentes estructuras propuestas.

Por lo tanto, los experimentos realizados con el compuesto **19** sugieren que en un disolvente de baja polaridad como cloroformo se establece un enlace de hidrógeno intramolecular que forma un ciclo de diez miembros. Adicionalmente se ha observado la formación del conformero tipo giro α promovido por la previa formación del giro β . El enlace de hidrógeno intramolecular que da lugar al giro β resulta mucho más fuerte y efectivo, tal como sucedía con **16**, que el segundo enlace de hidrógeno intramolecular que da lugar al giro α . El aumento de la polaridad del medio ha demostrado desfavorecer la formación del enlace de hidrógeno que da lugar al giro α , y en acetonitrilo se ha observado únicamente el conformero mimético de giro β .

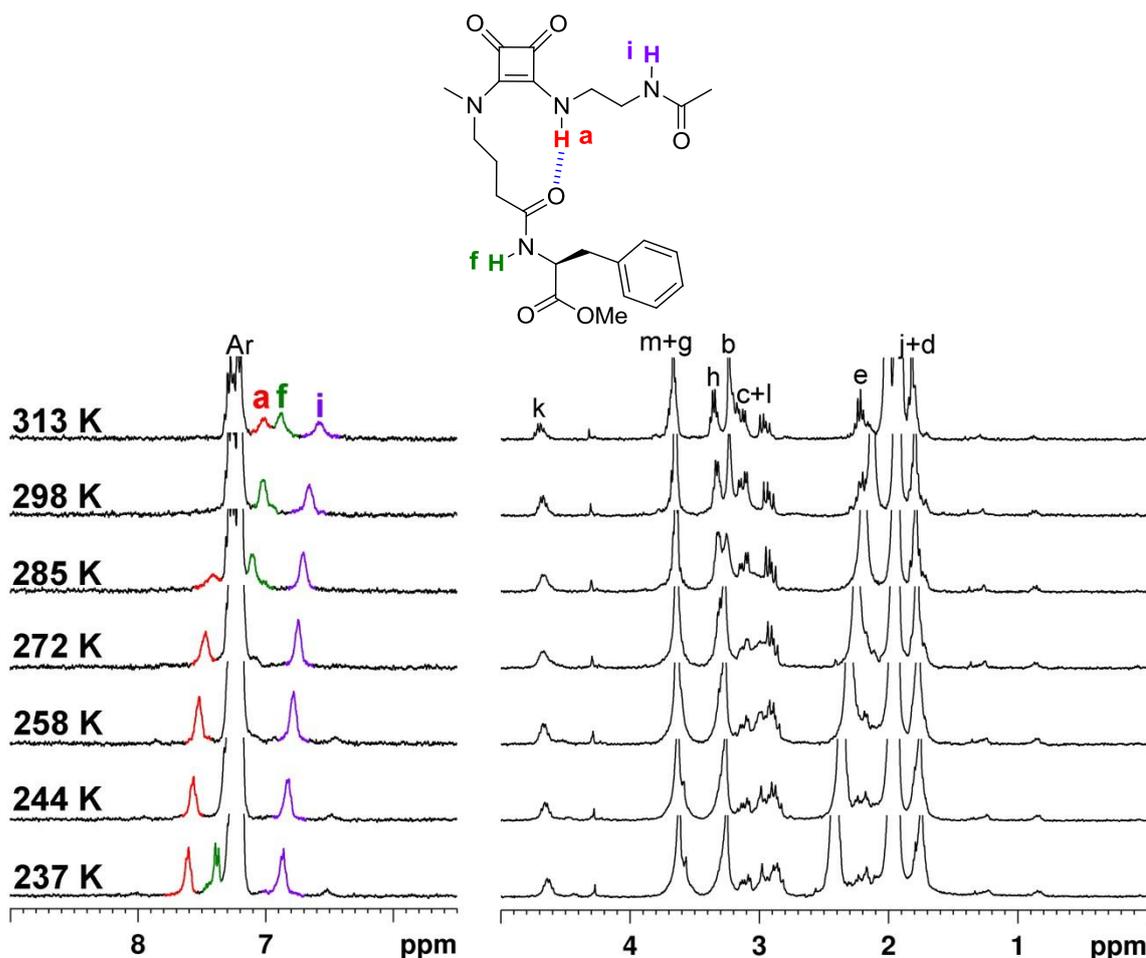


Figura 108. Serie de espectros ¹H RMN de 19 (CD₃CN, 2,5 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

En resumen, los estudios realizados con los nuevos modelos han demostrado que una escuaramida secundaria - terciaria es más efectiva para el diseño de estructuras inductoras de giros que una escuaramida disecundaria, aumentando la proporción del conformero E,Z en disolución, por lo que se han mejorado notablemente los módulos de giro desarrollados previamente.

4.2. Actividad antiparasitaria de la aminoescuaramida 15

Este apartado se ha realizado en el marco del proyecto colaborativo CONSOLIDER "Supramolecular Chemistry Applied to the Design, Synthesis and Evaluation of Bioactive Compounds of Antiinflammatory, Antitumour or Antiparasitic Action" (CSD2010-00065).

Considerando las propiedades farmacológicas que han mostrado algunos compuestos escuaramídicos de estructura referible, entre otras, a las sintetizadas en esta tesis, se decidió evaluar la capacidad de diferentes diescuaramidas de estructura sencilla para actuar como agentes antiparasitarios. Para ello se seleccionaron compuestos que pudieran sintetizarse mediante rutas sintéticas de pocos pasos a partir de productos de bajo coste, ya que la mayoría de las enfermedades a las que se dirige, como son la Leishmania y la enfermedad de Chagas, son endémicas de países pobres que no pueden costear gastos sanitarios elevados. Estas enfermedades denominadas "enfermedades olvidadas" ("*neglected diseases*") se convierten en crónicas, ocasionando numerosas muertes al año. En la actualidad solo existen en el mercado tratamientos tóxicos, inefectivos y de elevado coste.¹⁷¹¹⁷²

En el conjunto de compuestos evaluados se incluyó la aminoescuaramida **15**, además de los precursores **5** y **7** obtenidos durante la síntesis de los modelos **1** y **3**, Figura 109.

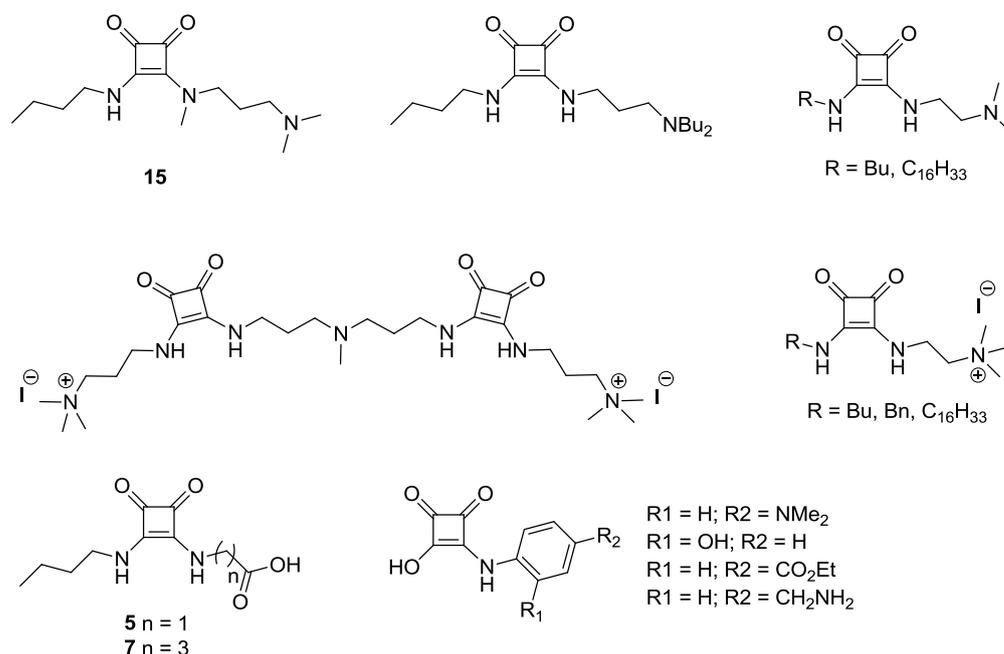


Figura 109. Selección de las escuaramidas evaluadas contra *T. cruzi*, *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*.

El estudio de la actividad antiparasitaria fue llevado a cabo por el grupo de Parasitología Molecular de la Universidad de Granada. Inicialmente se realizaron

¹⁷¹ WO 2014/184416 A1.

¹⁷² Olmo, F.; Rotger, C.; Ramírez-Macias, I.; Martínez, L.; Marín, C.; Carreras, L.; Urbanová, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaire, G.; Sampedro, A.; Rosales, M. J.; Sánchez-Moreno, M.; Costa, A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 987.

estudios *in vitro* con las formas extracelulares (epimastigotes) del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, y las formas intracelulares (amastigotes) de dicho parásito en células Vero, de mamífero. En estos estudios se evaluó tanto la capacidad de los compuestos para inducir la muerte del parásito, como su toxicidad en las células huésped. Aquellos compuestos que produjeron mejores resultados se estudiaron *in vivo* sobre ratones BALB/c. En conjunto se analizaron las características farmacológicas de los compuestos tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad.¹⁷¹ Los mismos compuestos escuaramídicos se estudiaron también para su aplicación como fármacos contra la enfermedad de Leishmania, mediante experimentos *in vitro* con los parásitos *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*.

Estos estudios mostraron que escuaramidas con grupos tetraalquilamonio y escuaramidas con grupos ácidos, como ácidos carboxílicos o amidoescuáricos, no mostraban buenos resultados, mientras que varias aminoescuaramidas mostraron los resultados más interesantes, siendo el compuesto **15** el más prometedor, Tabla 3.

Tabla 3. Actividad *in vitro*, toxicidad y índice de selectividad observados para el compuesto **15** y el compuesto de referencia benznidazol, tanto en formas extracelulares (epimastigotes) como en formas intracelulares (amastigotes) de *Trypanosoma cruzi*.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) ^a		toxicidad IC ₅₀ (μM) ^b	SI ^c	
	epimastigotes	amastigotes		epimastigotes	amastigotes
benznidazol	15.9 ± 1.1	23.3 ± 4.6	13.6 ± 0.9	0.8	0.6
15	9.4 ± 0.4	8.5 ± 0.4	453.1 ± 22.6	48.2 (60)	53.3 (89)

^aIC₅₀: concentración requerida para dar un 50 % de inhibición. ^bFrente a células Vero tras 72 h de cultivo. ^cSI (índice de selectividad) = IC₅₀(células Vero) / IC₅₀(epimastigotes y amastigotes). Entre paréntesis: número de veces que el compuesto excede el fármaco de referencia.

Como hemos visto en apartados anteriores la presencia de la amina terciaria en el sustituyente de la escuaramida terciaria es muy favorable para que estos compuestos adopten la conformación E,Z. El pK_a de la forma protonada del compuesto **15** es de 8.8, lo que implica que a pH fisiológico coexistirán la forma protonada de la molécula y la forma neutra. Esto permite que este compuesto adopte una estructura plegada mediante la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular, facilitando muy probablemente el paso a través de membranas, Figura 110. Aunque no se conoce el mecanismo de actuación de la aminoescuaramida **15**, el equilibrio entre estas especies es remarkable, ya que este compuesto ha mostrado mucha mayor actividad que derivados análogos con el nitrógeno cargado de forma permanente, en forma de sal de tetraalquilamonio.

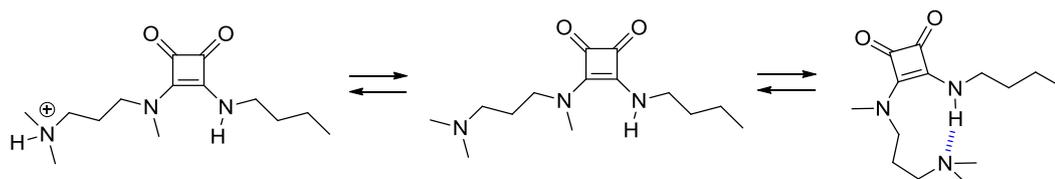


Figura 110. Especies de **15** coexistentes a pH fisiológico.

4.3. Estudio de interacción con aniones fosfato y cationes guanidinio

4.3.1. Diseño

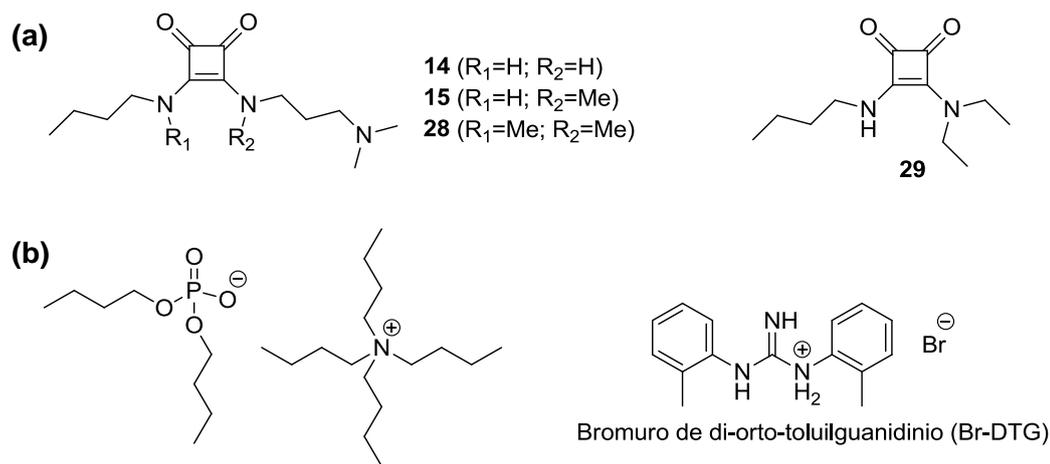
Las escuaramidas secundarias tienen una gran afinidad por los aniones, especialmente oxoaniones como el sulfato, fosfato y carboxilato (Ver apartado 1.3.3). También se ha descrito la capacidad de las escuaramidas para asociarse a cationes del tipo tetraalquilamonio. Existen numerosos ejemplos en la bibliografía de receptores de aniones y/o cationes que incorporan en su estructura escuaramidas (ver apartado 1.3.3). Más recientemente se ha descrito la importancia de la interacción de compuestos oligoescuaramídicos cíclicos con aniones de membrana para favorecer su internalización celular.¹³³

Dados estos antecedentes y una vez conocida la excelente actividad antiparasitaria del compuesto **15**, se planteó estudiar como afectaba el plegamiento de estructuras escuaramídicas simples a su capacidad para interaccionar con cationes y aniones y evaluar la diferencia de afinidad entre escuaramidas terciarias y secundarias al asociarse a aniones. Cabe recordar que el plegamiento de las unidades escuaramídicas descritas hasta el momento implica la interacción intramolecular entre grupos dadores y aceptores de enlace de hidrógeno.

Para este estudio se seleccionaron los compuestos escuaramídicos **14**, **15**, **28** y **29**, mostrados en la Figura 111 (a). Como se puede observar, todos ellos están relacionados con la estructura del compuesto **15**. De esta forma se pretendió evaluar comparativamente el efecto sobre la interacción con aniones y cationes de factores como son: tipo de escuaramida (disecundaria, secundaria - terciaria o diterciaria), la presencia de un nitrógeno en posición δ o la intensidad de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

En base a la actividad biológica demostrada por el compuesto **15**, se decidió realizar el estudio de interacción utilizando iones biológicamente relevantes como son el anión fosfato o el catión guanidinio. Las sales utilizadas en este estudio se muestran en la Figura 111 (b). El anión dibutilfosfato (Bu_2P^-) es un modelo de grupo fosfato, el cual está presente por ejemplo en los diferentes fosfolípidos que forman una membrana celular o en cadenas de ácidos nucleicos. Por su parte, el catión 1,3-di-*o*-toluilguanidinio (DTG^+) se puede usar como modelo del grupo guanidinio, el cual está presente en proteínas y péptidos ricos en residuos de arginina como por ejemplo los conocidos como CPPs (*cell penetrating peptides*).¹⁷³ Dicho grupo actúa como doble dador de enlace de hidrógeno y podría interaccionar simultáneamente con los dos oxígenos aceptores de enlace de hidrógeno presentes en las escuaramidas.

¹⁷³ Schmidt, N; Mishra, A; Lai, GH; Wong, G. *FEBS letters* **2010**, 584, 1806.



Dibutilfosfato de tetrabutilamonio (Bu_2P-TBA)

Figura 111. (a) Escuaramidas utilizadas como receptores y (b) sales utilizadas en el estudio de interacción de escuaramidas con aniones y cationes.

4.3.2. Síntesis de las escuaramidas 28 y 29

Para realizar este estudio se utilizaron los derivados **14** y **15**, preparados con anterioridad, y además se sintetizaron los compuestos **28** y **29**. En la Figura 112 se muestra a modo de recordatorio la ruta sintética que conduce a la obtención de los compuestos **14** y **15** a partir de la monoescuaramida éster **4**. Análogamente, la condensación de la monoescuaramida éster **4** con 2 equivalentes de dietilamina rindió la diescuaramida **29**, Figura 112.

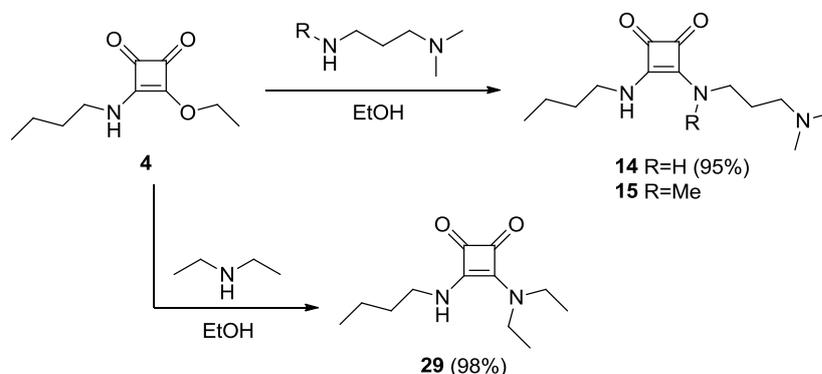


Figura 112. Esquema sintético para los productos **14**, **15** y **29**.

Para sintetizar el compuesto **28**, en primer lugar se metiló el nitrógeno escuaramídico de la monoescuaramida éster **4** con 1.2 equivalentes de yoduro de metilo, en DMF y en presencia de 1.2 equivalentes de hidruro sódico. El compuesto obtenido **30** se condensó con 1.1 equivalentes de N,N,N'-trimetil-1,3-propilendiamina en EtOH para obtener la diescuaramida **28**, Figura 113.

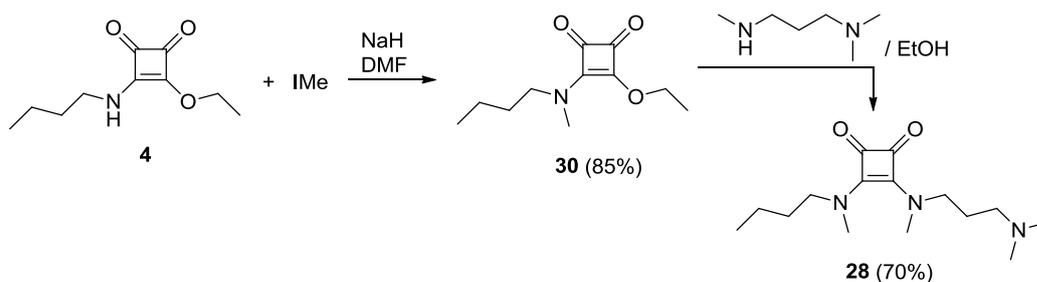


Figura 113. Esquema sintético para el producto **28**.

4.3.3. Interacción con anión fosfato

Para evaluar la interacción entre las diferentes escuaramidas y el anión Bu_2P^- se llevaron a cabo valoraciones de cada uno de los derivados de escuaramida con la sal de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$ a 298 K. Para ello se registraron diferentes espectros de ^1H RMN de disoluciones donde la concentración de escuaramida se mantuvo constante y se fue aumentando la concentración de sal. Estos estudios se realizaron en disolución en CDCl_3 , un disolvente de baja polaridad que favorece interacciones electrostáticas y por enlace de hidrógeno, y en disolución en $\text{DMSO}-d^6$, un disolvente de polaridad más elevada y especialmente competitivo en la interacción con los centros dadores de enlace de hidrógeno. Estos dos disolventes permiten reproducir entornos hidrofóbicos y entornos polares respectivamente. Ambos sirven, en primera aproximación, como modelo de los diferentes medios fisiológicos que pueden encontrarse los compuestos con actividad biológica.

Ya se ha comprobado que en disolución de cloroformo la escuaramida **15** no muestra agregación. Por su lado, los estudios previos realizados para el compuesto **14** indican que a 298 K y concentraciones milimolares la proporción de agregados de **14** es despreciable.¹¹⁷ En base a todo esto se ignoraron los equilibrios de dimerización a la hora de realizar los ajustes de las valoraciones que se comentan a continuación.

En la Figura 114 (a) se muestra la superposición de los espectros registrados para disoluciones de **14** (3 mM) en CDCl_3 con diferentes proporciones de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$. Las señales que se ven más afectadas por el aumento de la concentración de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$ son las dos señales de NH escuaramídicos, NHa y NHb, que se ven muy desplazadas a campo bajo debido al desapantallamiento que sufren estos núcleos al interactuar por enlace de hidrógeno con los oxígenos del anión Bu_2P^- . A 298 K existe un equilibrio rápido entre diferentes conformeros de **14**, principalmente el E,Z y el Z,Z, por lo que a esa temperatura no se detectan las señales de los dos NH escuaramídicos. Hay que recordar que algunas de estas especies en equilibrio forman enlaces de hidrógeno intramoleculares que dan lugar a ciclos de 6 o 9 miembros. En este caso la asociación con el anión implica la ruptura de esas interacciones, que compiten con la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares energéticamente muy favorables. La asociación con el anión desplaza el equilibrio E,Z = Z,Z en favor de la conformación Z,Z, que queda fijada. En este punto empiezan a distinguirse a 298 K las dos señales NHa y NHb correspondientes, cuya resolución aumenta a medida que aumenta la proporción del complejo. Los desplazamientos químicos de los protones NHa y NHb,

registrados en función de la concentración de ligando fosfato, se utilizaron para ajustar los datos experimentales a un modelo teórico de interacción de estequiometría 1:1. El leve desplazamiento que se observa para algunas señales alifáticas se debe probablemente al cambio de la fuerza iónica del medio al aumentar la concentración de sal y no se consideraron relevantes para el cálculo de la constante de afinidad. En la Figura 114 (b) se representan los datos experimentales (\blacklozenge) junto a la curva teórica (—) calculada para cada núcleo. La constante de equilibrio calculada tiene un valor de $K = 3860 \text{ M}^{-1}$ ($\log K = 3.58$).

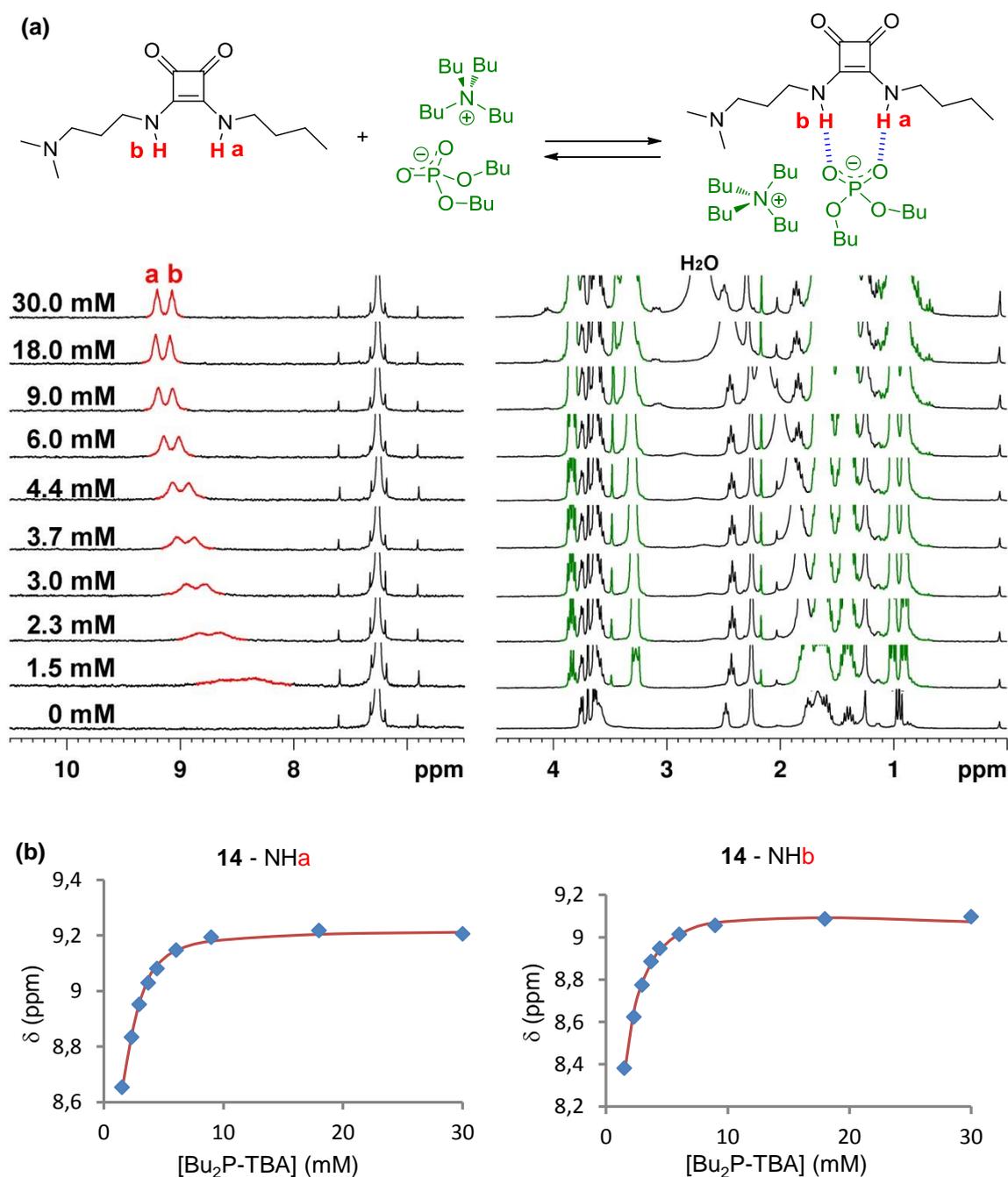


Figura 114. Valoración de la escuaramida **14** con la sal $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$. (a) Serie de espectros de ^1H RMN que muestran el efecto de la adición de cantidades crecientes de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$ sobre una disolución de **14** (CDCl_3 , 3 mM, 298 K). A la izquierda de cada espectro se indica la concentración de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$. (b) Datos experimentales (\blacklozenge) y curva teórica (—) calculada para un modelo 1:1.

En la Figura 115 se muestra la valoración del derivado **29** (3 mM) en CDCl_3 con $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$. A medida que se incrementa la concentración de anión, el NHa se ve fuertemente desapantallado ($\Delta\delta = 3.37$ ppm) por la adición del ligando y el $(\text{CH}_2)_b$ también sufre un desapantallamiento, aunque mucho menor ($\Delta\delta = 0.23$ ppm), Figura 115 (a). Para formar el complejo, el anión Bu_2P^- debe interactuar por enlace de hidrógeno con el NHa, quedando muy próximo al $(\text{CH}_2)_b$, lo que explica los efectos de desapantallamiento comentados.

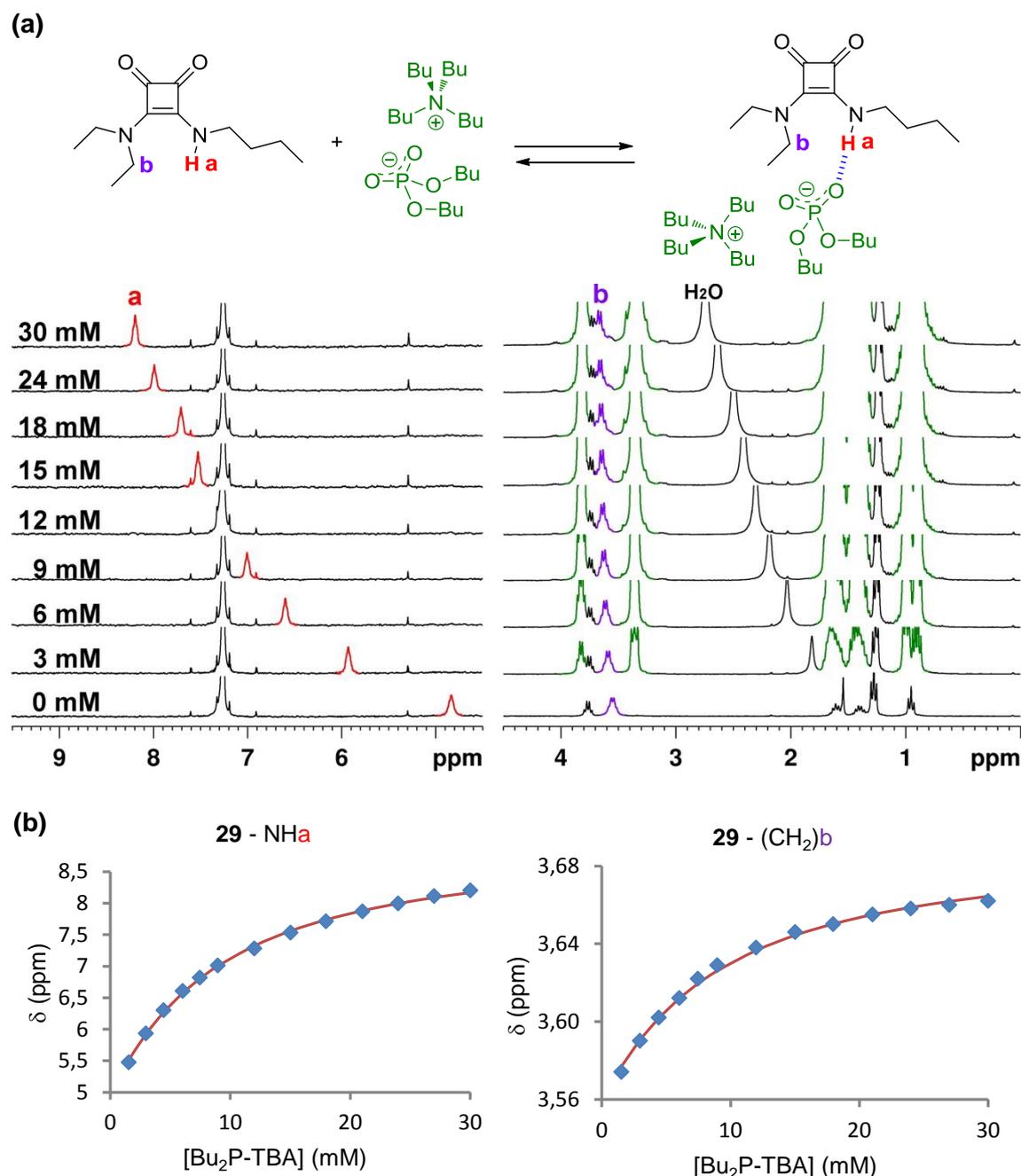


Figura 115. Valoración de la escuaramida **29** con la sal $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$. (a) Serie de espectros de ^1H RMN que muestran el efecto de la adición de cantidades crecientes de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$ sobre una disolución de **29** (CDCl_3 , 3 mM, 298 K). A la izquierda de cada espectro se indica la concentración de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$. (b) Datos experimentales (\blacklozenge) y curva teórica (—) calculada para un modelo 1:1.

En la Figura 115 (b) se representan, para NHa y (CH₂)₆, los datos experimentales de desplazamiento químico y las curvas teóricas calculadas, según un modelo de interacción 29:Bu₂P-TBA 1:1. La constante de equilibrio calculada tiene un valor de $K = 135 \text{ M}^{-1}$ ($\log K = 2.13$), un orden de magnitud inferior a la obtenida con la diescuaramida secundaria.

Estos comportamientos contrastan con el observado sobre un compuesto amino - escuaramídico que carece de los dos NH escuaramídicos, como es el derivado **15**. En este caso la adición de diez equivalentes de Bu₂P-TBA sobre una disolución de **15** (3 mM) en CDCl₃ afecta mínimamente al desplazamiento químico del NHa escuaramídico, Figura 115. En base a ello resulta evidente que el fuerte enlace de hidrógeno intramolecular en **15** inhibe la interacción con el anión Bu₂P⁻.

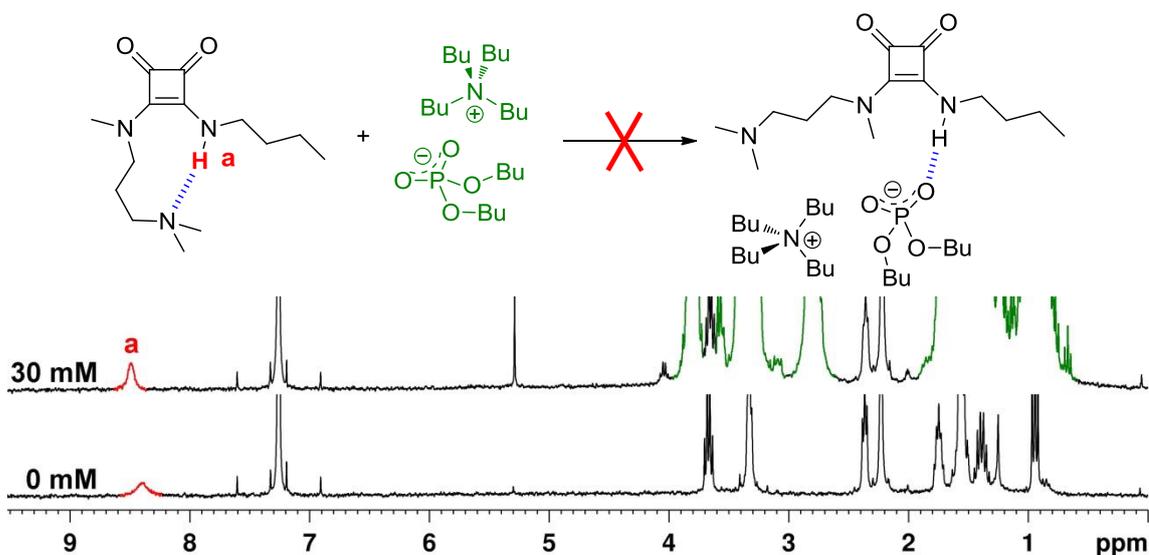


Figura 115. Espectro ¹H RMN de **15** (3 mM) en ausencia de Bu₂P-TBA y en presencia de diez equivalentes de esta sal. Se indica la concentración de Bu₂P-TBA a la izquierda de cada espectro.

Las valoraciones entre los compuestos **14**, **15** y **28** y la sal de Bu₂P-TBA se realizaron también en disolución de DMSO. En este medio los tres compuestos mostraron afinidad por el anión fosfato, por lo que pudieron calcularse las tres constantes de afinidad. El hecho de que el DMSO sea un disolvente muy competitivo permitió debilitar el enlace de hidrógeno intramolecular del compuesto **15** y facilitar su asociación con el anión. Los datos experimentales se ajustaron para los tres compuestos a un modelo teórico 1:1. En la Figura 116 se muestra como los datos de desplazamiento químico a diferentes concentraciones del ligando se ajustan a la curva teórica calculada para los modelos comentados.

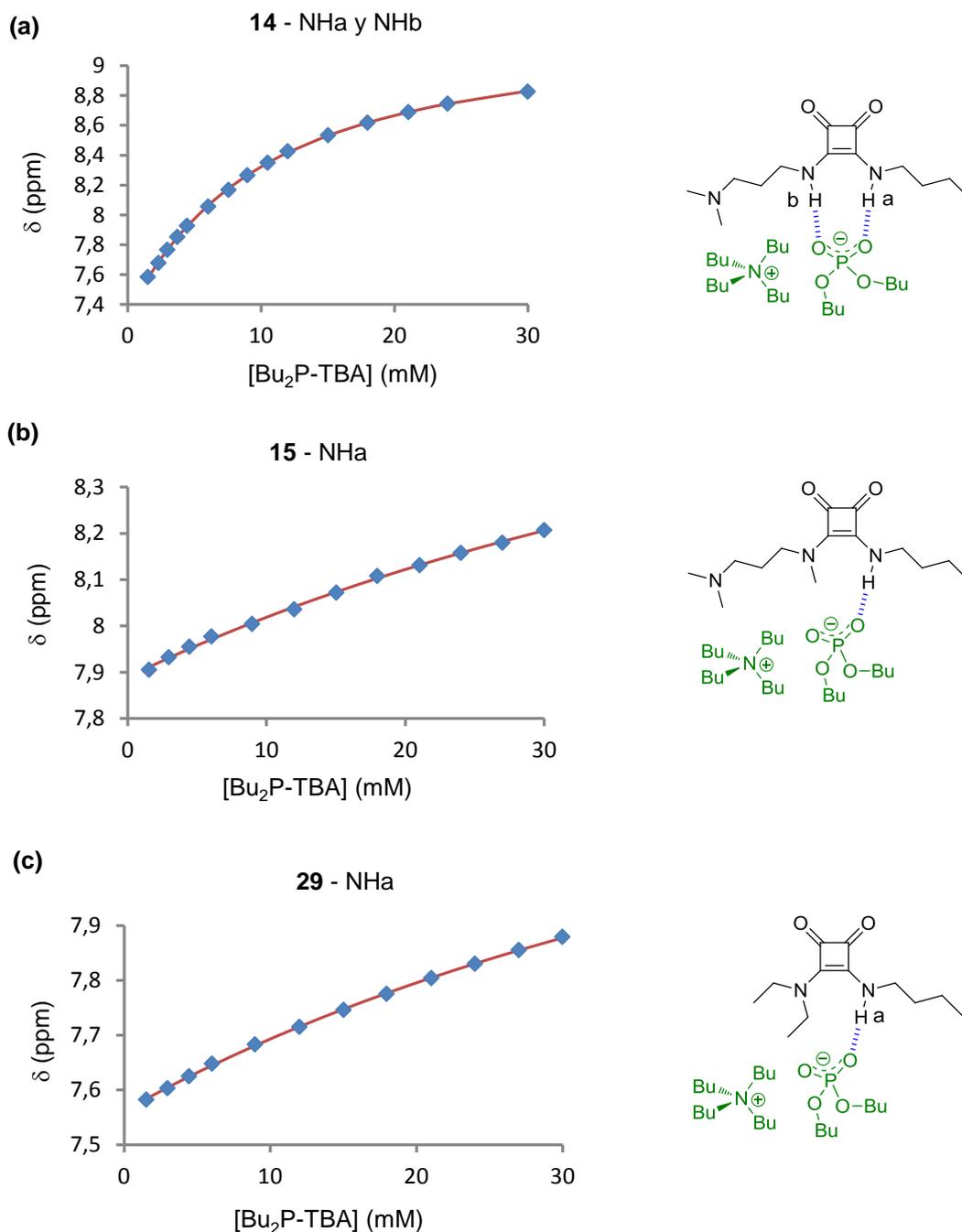


Figura 116: Datos experimentales (\blacklozenge) y curvas teóricas (—) calculadas para modelos 1:1 de las valoraciones realizadas en DMSO-*d*⁶. **(a)** **14** vs Bu₂P-TBA, **(b)** **15** vs Bu₂P-TBA, **(c)** **29** vs Bu₂P-TBA.

A modo de resumen, en la Tabla 4 se recogen los valores de las constantes de asociación obtenidos en las valoraciones anteriores para los dos disolventes utilizados. En todos los casos el error experimental resultó ser menor al 15 %.

Tabla 4. Valores de constante de equilibrio para la formación del complejo entre cada escuaramida con la sal Bu₂P-TBA.

Sq	CDCl ₃		DMSO-d ⁶	
	log K	K (M ⁻¹)	log K	K (M ⁻¹)
14	3.59 ± 0.04	3860 ± 1	2.087 ± 0.005	122 ± 1
29	2.13 ± 0.02	135 ± 1	1.18 ± 0.03	15 ± 1
15	- ^a	- ^a	1.14 ± 0.05	14 ± 1

Sq: escuaramida, ^a: no se observa interacción

Los valores obtenidos muestran que la mayor afinidad corresponde al complejo formado con la escuaramida **14**. Este hecho es coherente con el patrón de interacción planteado para este compuesto, donde se forman dos enlaces de hidrógeno entre los NH escuaramídicos y dos oxígenos del anión fosfato, Figura 116. El hecho de poder formar simultáneamente dos enlaces de hidrógeno con el anión es energéticamente más favorable que los enlaces de hidrógeno intramoleculares de las estructuras plegadas presentes en disolución. Sin embargo, la escuaramida secundaria - terciaria **15** solo puede formar un enlace de hidrógeno con el anión y por contrapartida debe romperse uno intramolecular muy favorable, lo que explica el hecho de que no exista interacción con el anión. La escuaramida **29**, un modelo de escuaramida secundaria - terciaria que no puede formar enlaces de hidrógeno intramoleculares, muestra menor interacción que **14** en ambos disolventes, ya que solo tiene un centro dador de enlace de hidrógeno, aunque en este compuesto no existe competencia por dicho centro como ocurre en **15**, Figura 116.

El plegamiento fuertemente establecido de **15** en CDCl₃ impide que se forme el complejo con la sal en este disolvente. El enlace de hidrógeno intramolecular que provoca ese plegamiento se ve debilitado al disolverse el compuesto en DMSO, por lo que en este disolvente sí que se da la formación del complejo **15**:Bu₂P-TBA, con una constante de equilibrio muy similar a la de la escuaramida secundaria - terciaria modelo **29**, Figura 117.

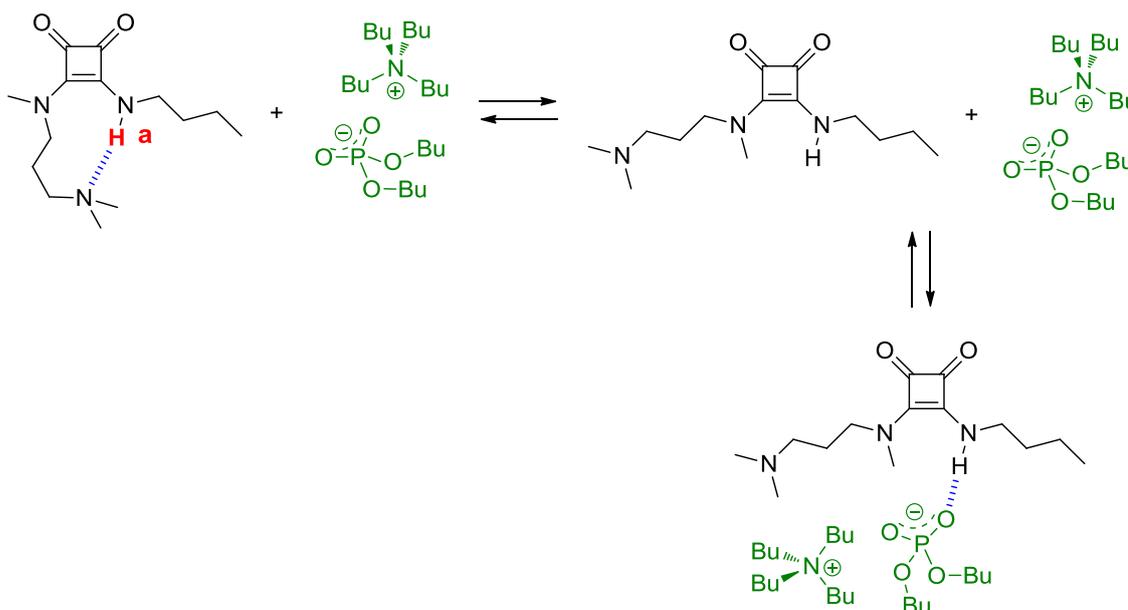


Figura 117. Equilibrio entre las especies plegada y abierta de **15** y el complejo **15**:Bu₂P-TBA.

4.3.4. Interacción con catión guanidinio

Para evaluar la interacción entre las diferentes escuaramidas y el catión 1,3-di-*o*-toluilguanidinio (DTG⁺) se llevaron a cabo valoraciones de la sal Br-DTG con cada una de las escuaramidas, a 298 K y en disolución en CDCl₃. Para ello se registraron diferentes espectros de ¹H RMN de disoluciones donde la concentración de esa sal se mantuvo constante y se fue aumentando la concentración de la escuaramida correspondiente. El pK_a del ion guanidinio es de 12.5 y el de la forma protonada de **15** es de 8.8, y al ser el primero bastante más elevado, no se espera que la amina terciaria de los compuestos escuaramídicos desprotone al catión DTG⁺.

En la Figura 118 (a) se observa cómo se ven afectadas las señales del catión DTG⁺ al ir aumentando la concentración de escuaramida **14**, así como el equilibrio de formación del correspondiente complejo. Los protones NH del DTG⁺ no se observan durante la valoración, pero sí que se aprecia la ligera variación de las señales de metilo y los protones aromáticos, provocada por la interacción con la escuaramida. Valoraciones análogas a ésta se realizaron con las escuaramidas **15**, **28** y **29**. En las Figuras 118 (b) y 119 se muestra para cada valoración el correspondiente complejo Br-DTG:escuaramida y la comparación de los datos experimentales con las funciones calculadas según modelos Br-DTG:escuaramida 1:1, y en la Tabla 5 se recogen los valores de constante de equilibrio calculados para cada complejo.

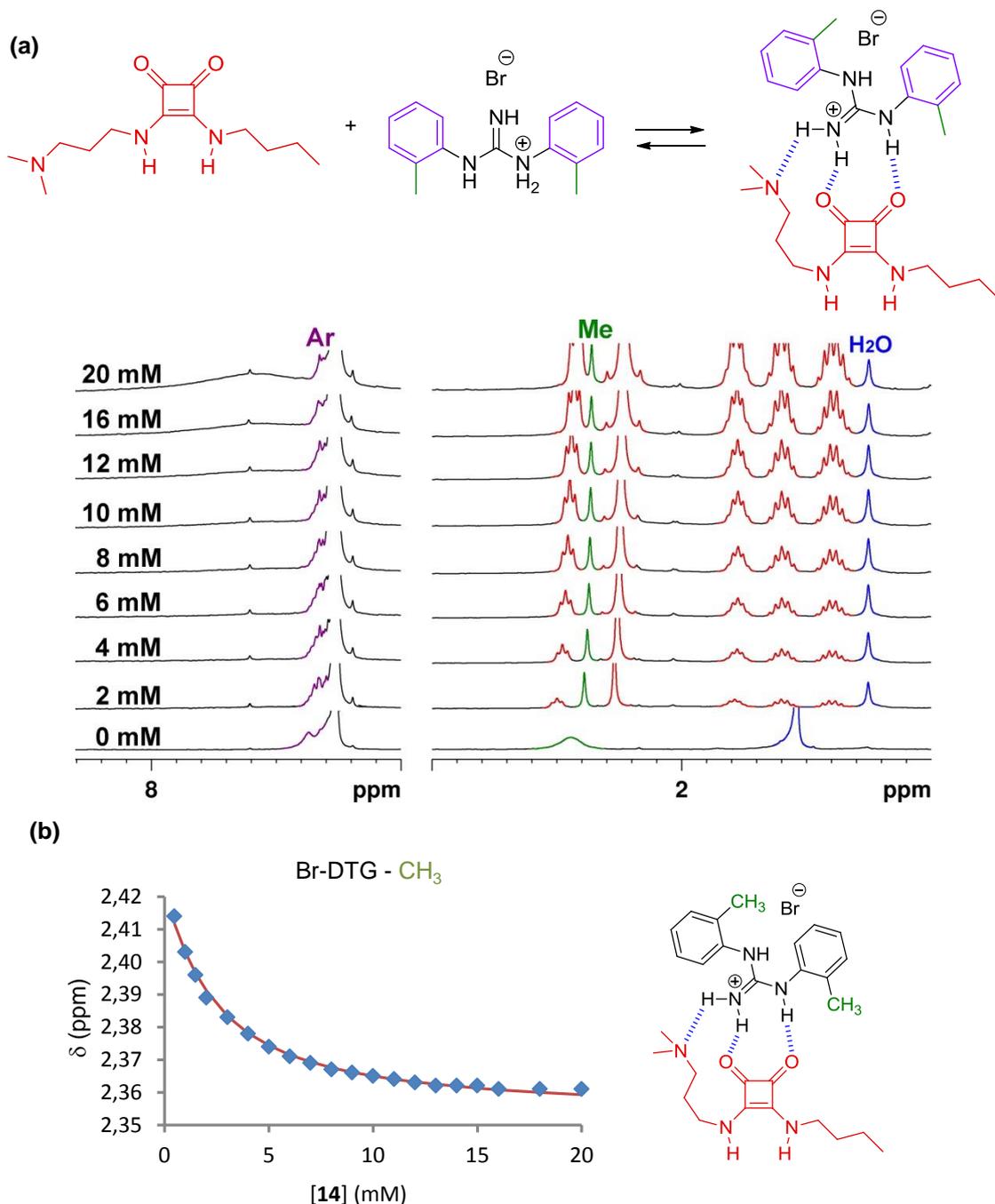


Figura 118. Valoración de la sal Br-DTG con la escuaramida **14**. **(a)** Serie de espectros de ^1H RMN que muestran el efecto de la adición de cantidades crecientes de **14** sobre una disolución de Br-DTG (CDCl_3 , 1 mM, 298 K). A la izquierda de cada espectro se indica la concentración de **14**. **(b)** Datos experimentales (\blacklozenge) y curva teórica (—) calculada para un modelo 1:1.

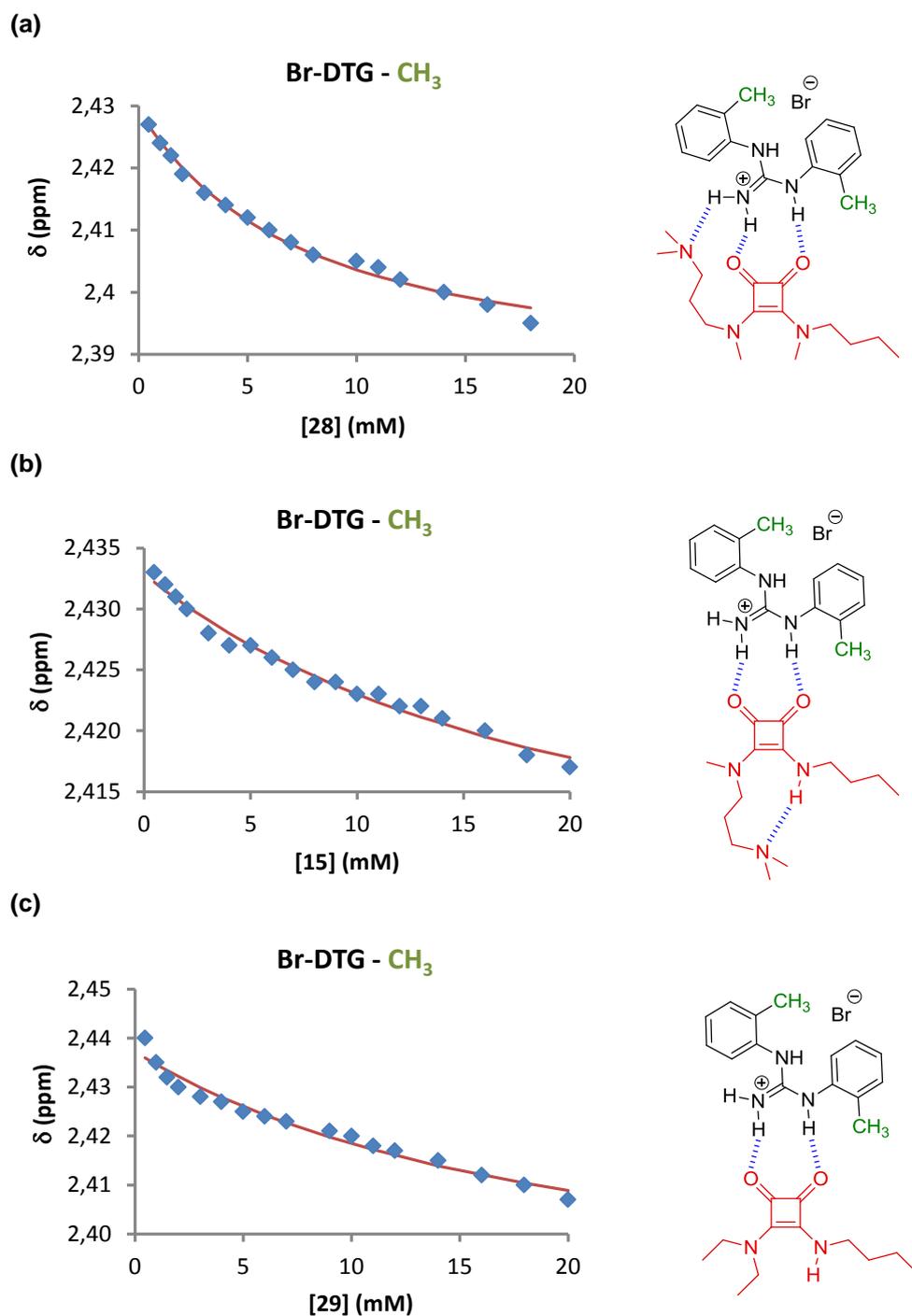


Figura 119. Datos experimentales (\blacklozenge) de desplazamiento químico del CH_3 de DTG^+ y curvas teóricas (—) calculadas para modelos 1:1 de las valoraciones realizadas en CDCl_3 . (a) Br-DTG vs **28**, (b) Br-DTG vs **15**, (c) Br-DTG vs **29**.

Tabla 5. Valores de constante de equilibrio para la formación del complejo entre cada escuaramida (Sq) con la sal Br-DTG.

Sq	log K	K (M^{-1})
14	2.81 ± 0.02	650 ± 1
28	2.16 ± 0.06	145 ± 1
15	1.66 ± 0.06	45 ± 1
29	1.71 ± 0.09	50 ± 1

Las escuaramidas **14** y **28** muestran los valores de constante de equilibrio mayores, ya que ambas interaccionan con el catión DTG⁺ a partir de los oxígenos de los carbonilos escuaramídicos y, probablemente, con asistencia del nitrógeno de amina. La afinidad es mayor para el compuesto **14**, probablemente debido a que la escuaramida disecundaria **14** interacciona al mismo tiempo con el catión guanidinio y con el anión bromuro de otro par iónico, a través de los NH escuaramídicos. Se ha descrito que cuando se produce esta circunstancia se incrementa simultáneamente la capacidad donadora y aceptora de enlace de hidrógeno de la escuaramida.¹³⁰ Las constantes de asociación calculadas para las escuaramidas **29** y **15** son similares entre ellas, y de menor valor que el de las otras dos escuaramidas. La menor afinidad con el catión por parte de estas escuaramidas se debe probablemente a que éstas solo interaccionan a partir de los oxígenos de los carbonilos escuaramídicos, ya que **29** no tiene grupo amino y **15** está en su conformación plegada, donde el grupo amino está formando el correspondiente enlace de hidrógeno intramolecular.

Los estudios de la interacción de estos compuestos con iones no son exhaustivos, ya que simplemente pretenden mostrar la tendencia en la capacidad de interacción con cationes y aniones de distintos tipos de escuaramidas, así como evaluar el efecto de interacciones intramoleculares sobre dicha capacidad. Se ha demostrado que el hecho de que estas estructuras formen enlaces de hidrógeno intramoleculares afecta significativamente a la capacidad de interacción con cationes y aniones de módulos escuaramídicos cuando la conformación E,Z de plegamiento está muy fijada en el medio de estudio, como es el caso del compuesto **15** en cloroformo. El mismo compuesto disuelto en DMSO, donde el enlace de hidrógeno causante del plegamiento es menos intenso, ha mostrado en la interacción con fosfato constantes de equilibrio similares a las de una escuaramida secundaria - terciaria sin la posibilidad de establecer el enlace de hidrógeno intramolecular. También se ha demostrado que la interacción entre Bu₂P⁻ y una escuaramida disecundaria, en los dos medios estudiados, es de intensidad considerablemente mayor a la interacción de ese mismo anión con una escuaramida secundaria - terciaria, ya que se pueden establecer dos interacciones de enlace de hidrógeno con el anión. Además, se ha observado la interacción de la unidad escuaramida con el catión DTG⁺, que se ha visto reforzada por la presencia de un N de amina en posición δ de uno de los sustituyentes, siempre y cuando este nitrógeno no esté formando un enlace de hidrógeno intramolecular fuerte.

4.4. Miméticos de horquilla β con el módulo SQ3

4.4.1. Diseño

Considerando la efectividad demostrada por el nuevo módulo SQ3 para inducir el plegamiento de los compuestos **16** y **19** tanto en cloroformo como en acetonitrilo, se estableció el objetivo de utilizar dicho módulo como nueva unidad de giro para el diseño de estructuras tipo horquilla β , tanto paralela como antiparalela.

El nuevo mimético de horquilla β antiparalela **31** se diseñó introduciendo ciertas modificaciones en la estructura del mimético de horquilla inicial **8**, Figura 120. La modificación más importante es el uso del módulo SQ3 como nueva unidad de giro en lugar del SQ1, de forma que el nuevo mimético contiene una escuaramida secundaria - terciaria en su estructura. En el compuesto **31**, de forma análoga a lo descrito anteriormente para el compuesto **8**, la cadena de etilendiamina (marcada en verde en la Figura 120) cumple una doble función. Por un lado, esta diamina actúa como un módulo espaciador que sitúa al residuo de leucina (Leu) en la posición adecuada para que interactúe por enlaces de hidrógeno intramoleculares con el residuo de fenilalanina (Phe). Además permite acoplar el módulo de giro a un residuo peptídico de forma que la molécula tenga un extremo C-terminal y otro N-terminal, como si fuera una secuencia peptídica natural. El grupo N-terminal se acetiló con la intención de que el correspondiente NH amídico permita la formación de un enlace de hidrógeno. Además, el aminoácido glicina (Gly) se sustituyó por valina (Val), para favorecer la solubilidad en disolventes orgánicos, compensando así la sustitución del grupo Cbz por acetamida.

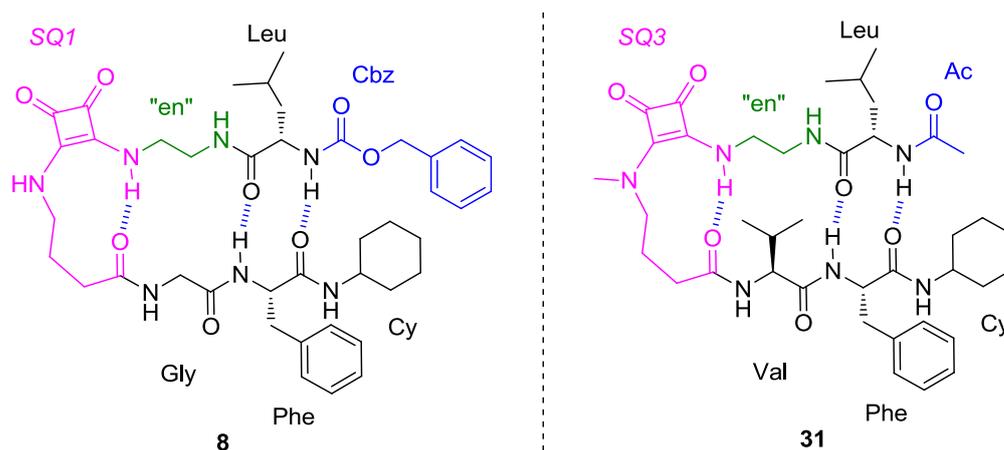


Figura 120. Diseño del mimético de horquilla β antiparalela **31**, basado en la introducción de modificaciones sobre la estructura de **8**.

Por otro lado, se aprovechó la capacidad del módulo SQ3 de unirse con dos grupos amina, uno por cada extremo, para diseñar un nuevo mimético de horquilla β paralela que contemple la formación de tres enlaces de hidrógeno intermoleculares entre dos residuos dipeptídicos unidos directamente al módulo de giro, Figura 121. La nueva horquilla contiene el dipéptido $\text{H}_2\text{N-L-Val-L-Phe-COOH}$ con el extremo C-terminal en

forma de amida, por condensación con ciclohexilamina. Éste se une al módulo escuaramídico SQ3 a través del grupo carboxilato. En el otro extremo del módulo de giro se sitúa el dipéptido H₂N-L-Ala-L-Ala-COOH con su grupo C-terminal en forma de *tert*-butyl amida. Las dos cadenas acopladas a la unidad de giro tendrían la misma dirección y sentido, originando un mimético de horquilla β paralela “C-terminal a C-terminal”.

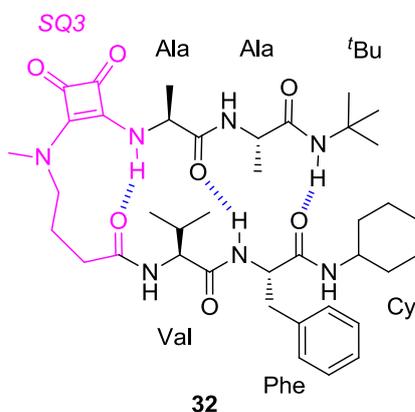


Figura 121. Diseño del mimético de horquilla β paralela **32**.

4.4.2. Síntesis de los pseudopéptidos **31** y **32**

La síntesis de las escuaramidas pseudopeptídicas **31** y **32** se llevó a cabo mediante acoplamientos peptídicos y escuaramídicos como los que se han descrito en apartados anteriores, utilizando el grupo Boc como grupo protector de aminas.

En la Figura 122 se muestra el esquema de síntesis del compuesto **31**, el cual contempla la síntesis inicial de las cadenas peptídicas y su posterior acoplamiento a la unidad de escurato, tal como se hizo para el compuesto **8**. Así, la N-acetil-L-leucina se funcionalizó con etilendiamina Boc-monoprottegida utilizando las condiciones habituales de acoplamiento, HBTU y DIPEA en DMF, para obtener el compuesto **33**. La desprotección del grupo Boc permitió obtener la correspondiente amina en forma de sal de TFA. Esta sal, una vez neutralizada con DIPEA en EtOH, se hizo reaccionar con escurato de dietilo en una mezcla Et₂O:EtOH 70:30 v:v, obteniendo la monoescuaramida éster **34**. De forma paralela, se utilizaron las condiciones de acoplamiento peptídico y desprotección de Boc ya descritas para sintetizar el tripéptido **36**. Los aminoácidos N-Boc-L-valina y L-fenilalanina ciclohexilamida se acoplaron en proporciones estequiométricas para obtener el compuesto **35**. Una vez eliminado el grupo protector Boc, la amina obtenida se acopló con el aminoácido N-Boc-N-Me-GABA, obteniéndose el compuesto **36**. La etapa final del proceso consistió en la desprotección del tripéptido **36** y posterior acoplamiento por condensación con la monoescuaramida éster **34**, obteniéndose el producto final **31**, con un rendimiento global del 5 %.

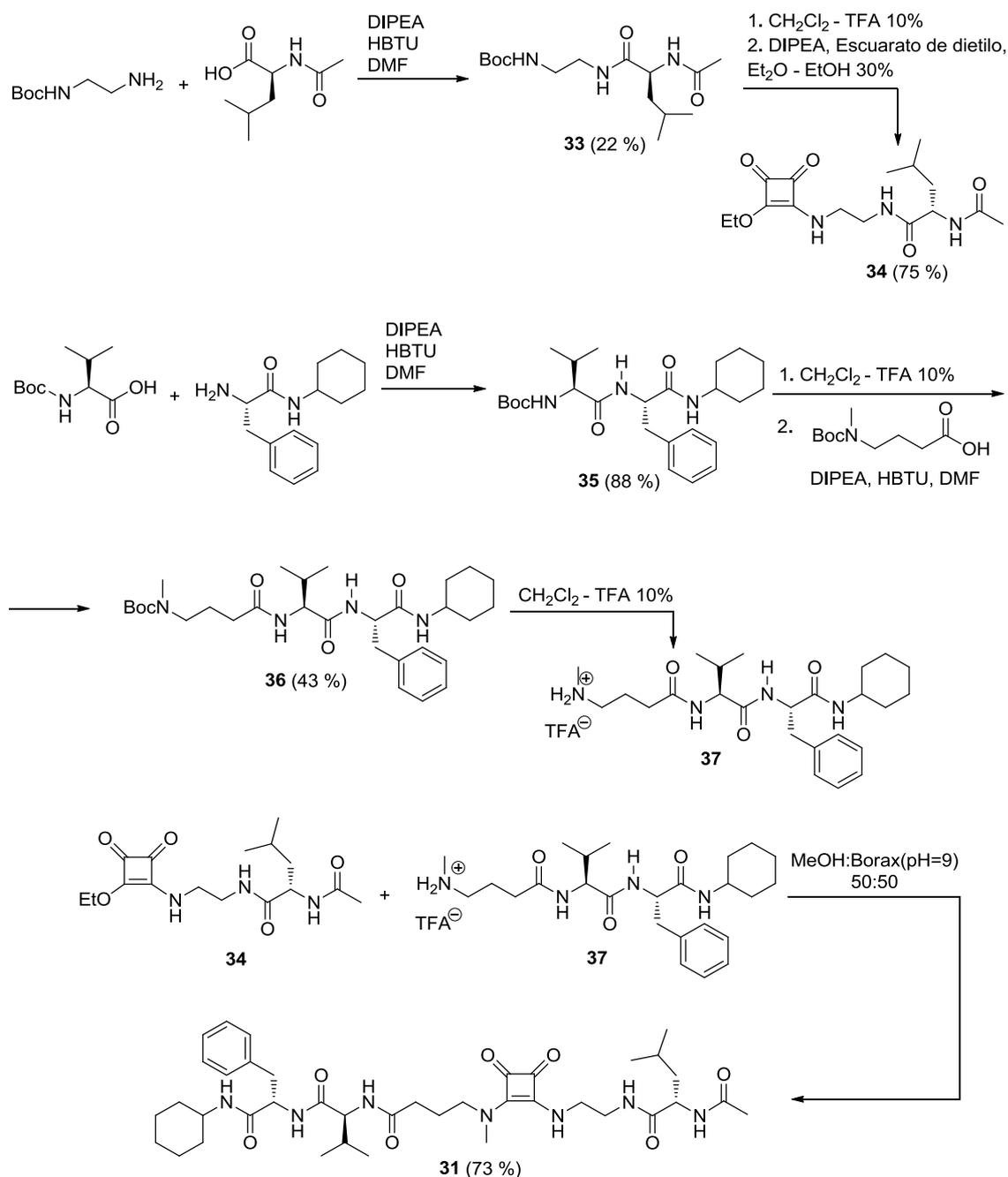


Figura 122. Esquema sintético para el producto **31**.

El primer paso en la síntesis del compuesto **32** fue la obtención del precursor **38**, que constituye la estructura esencial de la unidad de giro del compuesto final, para luego acoplarlo con los residuos dipeptídicos de forma conveniente, Figura 123. En ese primer paso se hizo reaccionar el aminoácido N-MeGABA con 2 equivalentes de escuarato de dietilo, obteniéndose la monoescuaramida éster **38**. Por otro lado se trató el dipéptido NH₂-L-Ala-L-Ala-COOH con 2.5 equivalentes del anhídrido de Boc en una mezcla 1,4-dioxano:NaOH 1M 2:1 v:v, para obtener el dipéptido Boc-protégido **39**. Éste se acopló con 4 equivalentes de *tert*-butilamina utilizando las condiciones ya descritas, HBTU y DIPEA en DMF, para obtener el derivado dipeptídico **40**. Una vez eliminado el grupo protector, la correspondiente amina se unió con el éster escuárico del módulo **38** obteniéndose la escuaramida **41**. Finalmente el derivado **41** se acopló con la amina proveniente de la desprotección del dipéptido **35**, obtenido previamente.

De esta forma se obtuvo el pseudopéptido escuaramídico **32** con un rendimiento global del 4 %.

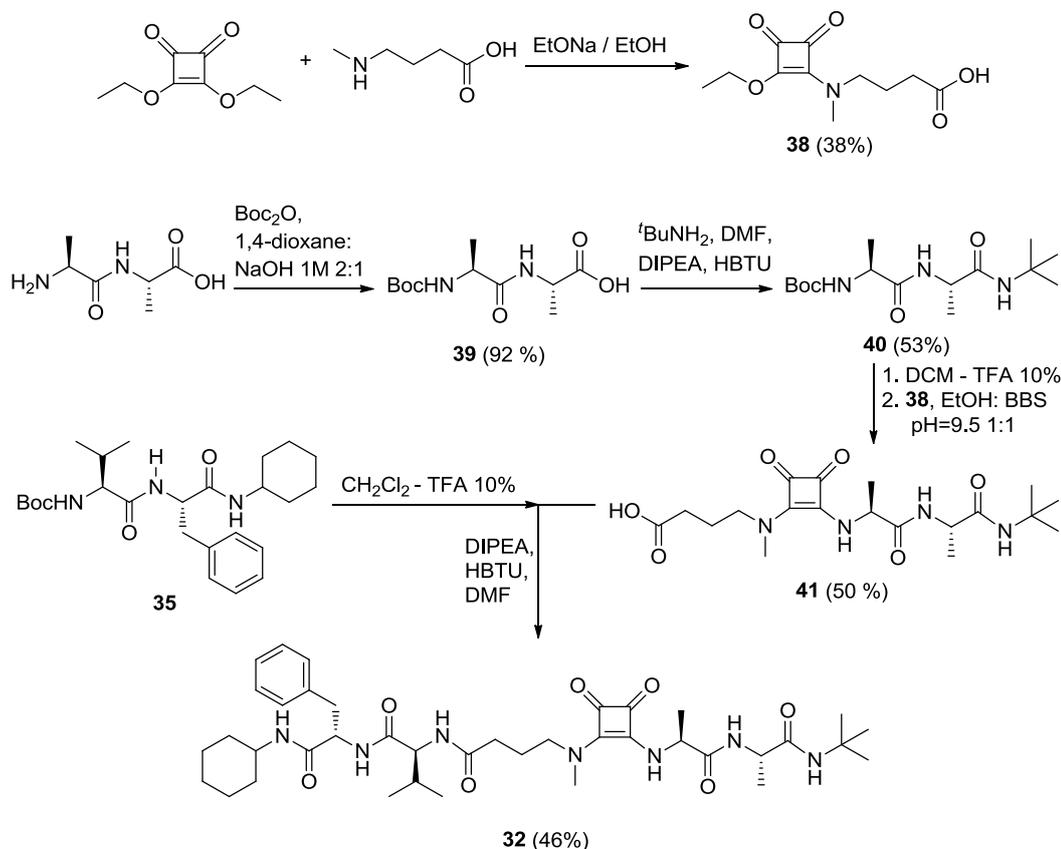


Figura 123. Esquema sintético para el producto **32**.

4.4.3. Estudio conformacional de los modelos de horquilla **31** y **32**

Una vez sintetizados los miméticos de horquilla β con la nueva unidad de giro SQ3, se procedió a su estudio conformacional. El cloroformo se descartó como disolvente debido a la elevada tendencia a formar agregados que mostró en ese disolvente el precursor **8**, un compuesto de estructura referible a la de los nuevos miméticos de horquilla β . Por tanto, los estudios se realizaron en acetonitrilo, un disolvente polar aprótico que desfavorece la formación de agregados, y en metanol, un disolvente polar prótico y por lo tanto competitivo a la hora de formar enlaces de hidrógeno intramoleculares.

4.4.3.1. Mimético de horquilla β antiparalela **31**

Para llevar a cabo el estudio conformacional, se registraron los espectros de COSY, TOCSY, ROESY y NOESY de una disolución de **31** (1 mM) en acetonitrilo a 298 K. Los dos primeros experimentos permitieron asignar los desplazamientos químicos de los hidrógenos de la molécula, Tabla 6. La zona del espectro de TOCSY que muestra el cruzamiento entre las señales de NH y las señales alifáticas permite asociar cada

señal de NH con un sistema de espín concreto, pudiéndose asignar así todas las señales, Figura 124.

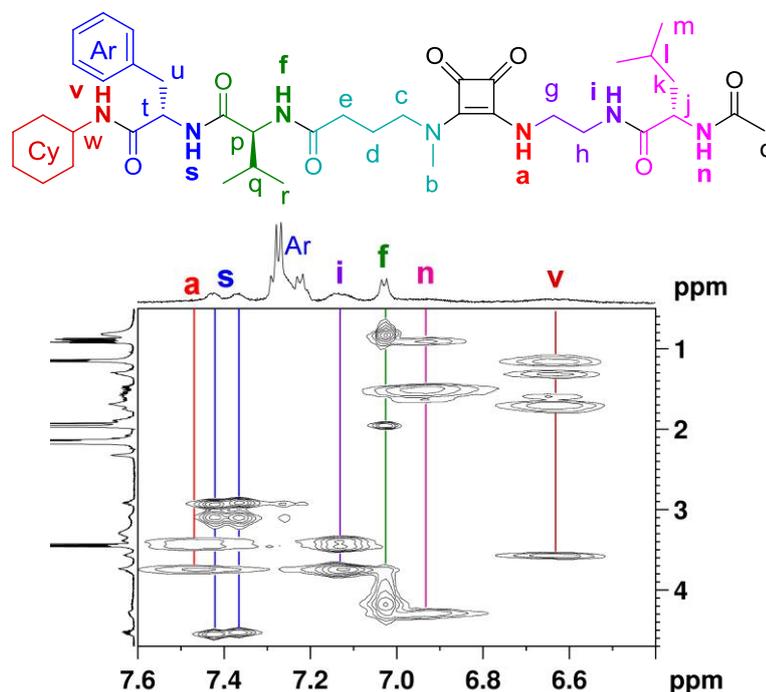


Figura 124. Región NH - alifáticos del espectro de TOCSY de una disolución de **31** (CD_3CN , 1 mM, 298 K). Las líneas de color permiten asignar cada NH a un sistema de espín concreto.

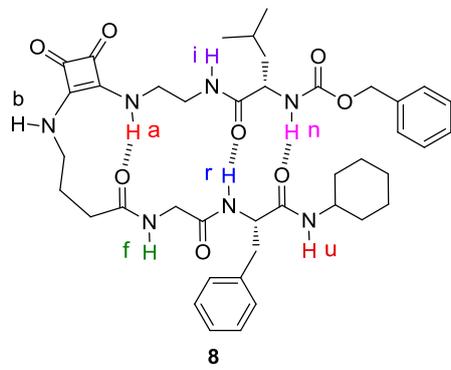
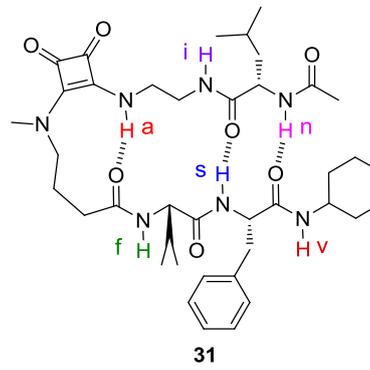
Tabla 6. Desplazamientos químicos de ^1H RMN (ppm) de **31** (CD_3CN , 1 mM, 298 K).

Núcleo	δ (ppm)	Núcleo	δ (ppm)	Núcleo	δ (ppm)
a	7.47	j	4.30	s	7.42 / 7.36
b	~3.30	k	1.55 / 1.49	t	4.55 / 4.52
c	3.30	l	1.64	u	2.92 / 3.10
d	1.90	m	0.92 / 0.89	Ar	7.21 / 7.26
e	2.33	n	6.92	v	6.63
f	7.03	o	2.12	w	3.57
g	3.74	p	4.17	Cy	1.75 / 1.31 / 1.15
h	3.40 / 3.46	q	1.95		
i	7.13	r	0.83		

A modo comparativo, se muestran los desplazamientos químicos de los NH de esta molécula y los del compuesto **8** registrados en las mismas condiciones, Tabla 7. El NH escuaramídico, NHa, y el NH de la Phe, asignado como NHr en **8** y NHt en **31**, muestran desplazamientos químicos bastante más elevados (~ 0.3 ppm) en el compuesto **31** que en **8**. Considerando que estos NH están directamente implicados en enlaces de hidrógeno intramoleculares que se establecen en el conformero tipo horquilla β , se puede deducir que existe una mayor proporción de ese conformero en el nuevo compuesto **31**. En cuanto al tercer NH que forma enlace de hidrógeno intramolecular, NHn, no se pueden comparar directamente los valores, ya que en el compuesto **8** es un NH de carbamato y en el compuesto **31** es un NH de amida, aunque su desplazamiento químico en **31** no indica la formación de un enlace de hidrógeno fuerte. El NHi para la nueva estructura muestra una única señal de desplazamiento químico inferior a la observada para ese NH en **8**. En cuanto a los

NH_f, NH_u y NH_v, que en las estructuras tipo horquilla están dirigidos hacia el disolvente y no forman enlace de hidrógeno intramolecular, no se observan diferencias de desplazamientos químicos considerables entre los compuestos **8** y **31**, mostrando además desplazamientos químicos típicos para este tipo de núcleos en CD₃CN.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de los protones NH de **8** (1 mM) y **31** (1 mM) en CD₃CN a 298 K.

 <p style="text-align: center;">8</p>		 <p style="text-align: center;">31</p>	
Protón	δ (ppm)	Protón	δ (ppm)
a	7.14	a	7.47
f	7.07	f	7.03
i	7.22 / 6.96	i	7.13
n	6.83 / 6.15	n	6.92
r	7.12	s	7.42 / 7.36
u	6.68	v	6.63

El análisis de los espectros ROESY y NOESY permitió identificar los contactos entre protones próximos de diferentes cadenas, tal como se indica en la Figura 125. Análogamente a lo observado para los compuestos **16** y **19**, se detectó el pico de entrecruzamiento NHa--(CH₂)c característico de la conformación E,Z de la escuaramida. Además se detectaron otros picos de entrecruzamiento intercadena, como son los contactos CH_q--NH_n, (CH₃)_m--(CH₂)_{Cy} y (CH₃)_m--(CH₂)_e, que confirmaron la disposición enfrentada de las cadenas.

Los resultados obtenidos a 298 K indican que en acetonitrilo el compuesto **31** se encuentra mayoritariamente plegado adoptando una estructura tipo horquilla β. Sin embargo la anchura de algunas de las señales de NH en el espectro sugiere la presencia de varias especies en equilibrio. El espectro registrado a 277 K de la misma muestra permitió identificar dos grupos de señales diferentes para los núcleos NH que se asignaron como pertenecientes a dos especies distintas **31A** y **31B** en equilibrio y proporciones similares. Se observó que las señales desdobladas pertenecientes al mismo NH no tienen desplazamientos químicos muy distintos en ningún caso, por lo que probablemente las dos especies tengan un patrón de enlace de hidrógeno muy similar, con ligeras diferencias conformacionales, Figura 126 y Tabla 8. En los experimentos NOESY y ROESY registrados en estas condiciones se observaron menos picos de entrecruzamiento que a temperatura ambiente, sin embargo se pudieron identificar los contactos NHa--(CH₂)c y NHa--(CH₂)d, que confirman la conformación E,Z de la escuaramida en ambas especies así como un contacto intercadena (CH₂)g--(CH₂)s en la especie **31A**.

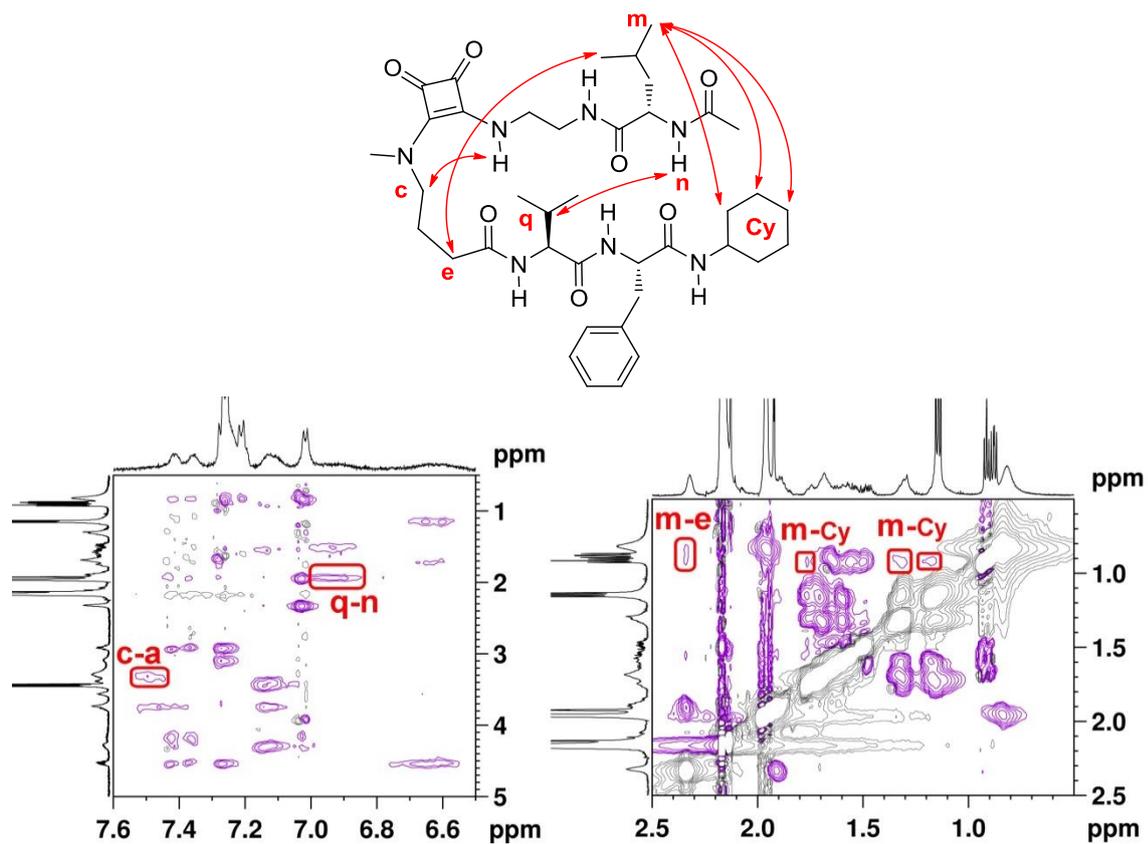


Figura 125. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de **31** (CD_3CN , 1 mM, 298 K).

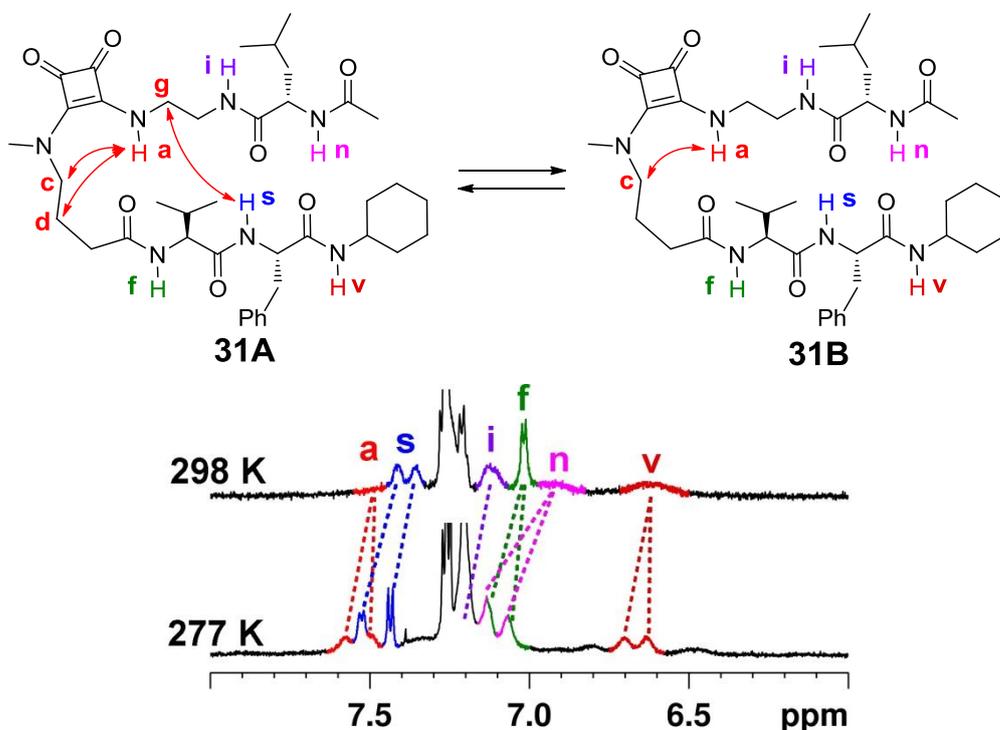


Figura 126. Desdoblamiento de las señales de los protones NH de **31** (CD_3CN , 1 mM) al pasar de 298 K a 277 K y especies identificadas a 277 K.

Tabla 8. Desplazamientos químicos de los protones NH (ppm) de **31** (CD₃CN, 1 mM, 277 K).

Protón	31A	31B
a	7.57	7.49
f	7.06	7.12
i	7.20	7.17
n	7.14	7.06
s	7.52	7.43
v	6.70	6.63

La existencia de diferentes especies en equilibrio también se observó en un disolvente más polar como es el metanol. Los estudios en CD₃OH se realizaron a partir de una muestra del compuesto **31** de concentración 5 mM a 231 K, donde el equilibrio entre las especies en disolución resultó ser suficientemente lento para poder observar un grupo de señales para cada una de las especies identificadas, ver Figura 128.

Una vez identificados los diferentes sistemas de espín en el espectro de TOCSY se procedió a relacionarlos entre sí para poder asignar las señales a las diferentes especies en disolución, ya que cada sistema de espín de la molécula presenta un grupo de señales distinto para cada especie. Dicha relación se realizó identificando en el espectro de NOESY señales evidentes por su proximidad en la estructura. Como ejemplo, en la Figura 127 se muestra la región NH - alifáticos del espectro de NOESY en azul, con el espectro TOCSY superpuesto en negro. En la figura se han marcado en verde los contactos entre cada NH amídico y el H α del aminoácido vecino, de forma que se relacionan entre sí los diferentes sistemas correspondientes al confórmero **31A**. En base a estos contactos se pudieron indentificar dos grupos de señales para el sustituyente escuaramídico en-Leu-Ac (a \rightarrow o) y tres grupos de señales para la región Leu-Phe-Cy (f \rightarrow Cy) enlazada al extremo de N-MeGABA. Los grupos de señales correspondientes a las dos cadenas unidas a la escuaramida también se relacionaron entre ellas mediante el conjunto de señales NOE estructuralmente no obvios, que aportaron también información conformacional acerca de cada especie. De esta forma un grupo de señales del sustituyente en-Leu-Ac se pudo relacionar con dos grupos de señales del otro sustituyente Leu-Phe-Cy, definiéndose así las especies **31A** y **31B** con la región estructural en-Leu común, y el resto de señales se asignaron a la especie **31C**.

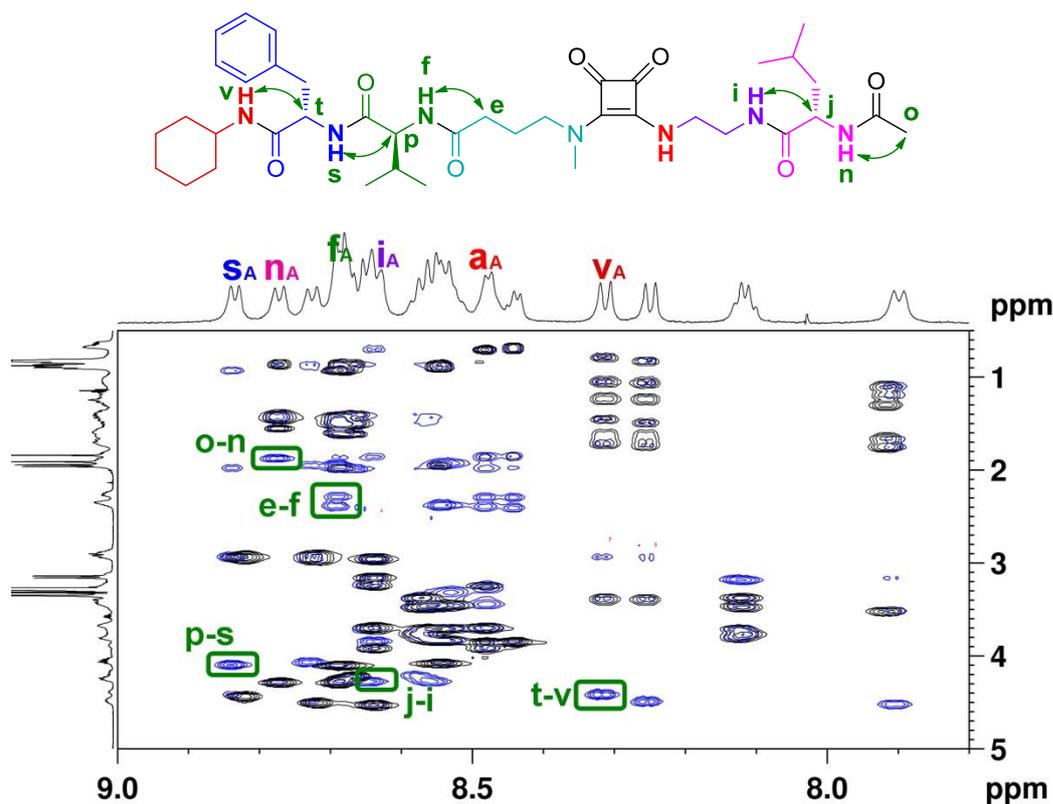


Figura 127. Superposición de la región NH - alifáticos de los espectros TOCSY, negro, y NOESY, azul, de una disolución de **31** (CD₃OH, 5 mM, 231 K). Se marcan las señales de NOESY que permiten relacionar entre sí los sistemas de espín de una misma especie, **31A**.

De esta forma, los experimentos COSY, TOCSY y NOESY permitieron asignar las señales del espectro de ¹H RMN para las tres especies observadas, Figura 128 y Tabla 9. La integral de las señales del espectro indicó que cada una de las tres especies identificadas está en la disolución en una proporción del 33 %.

El análisis de los espectros indica que las señales NH_a y (CH₃)_b asignadas a los conformeros **31A** y **31B** aparecen a campo más bajo que las correspondientes señales en **31C**, lo que sugiere que el módulo de giro SQ3 en los dos primeros conformeros se halla en la conformación plegada E,Z mientras que en el conformero **31C** está en la conformación Z,Z. Por otra parte, el NHs muestra un desplazamiento químico 0.19 ppm más a campo bajo en la especie **31A** que en la especie **31B**, lo que indicaría que el enlace de hidrógeno que forma es algo más fuerte en la primera especie. Los otros dos NH situados en el mismo sustituyente también muestran desplazamientos químicos mayores para la especie **31A** que para la **31B**, concretamente diferencias de 0.25 ppm para NH_f y 0.41 ppm para NH_v, lo que sugiere que en la primera especie estos NH están formando enlaces de hidrógeno intermoleculares. A partir de este análisis se dedujo que la especie **31C** corresponde a un conformero abierto que se halla en equilibrio con dos especies plegadas, la **31A** y **31B**.

4. Escuaramidas secundaria - terciarias como módulos de plegamiento mejorados

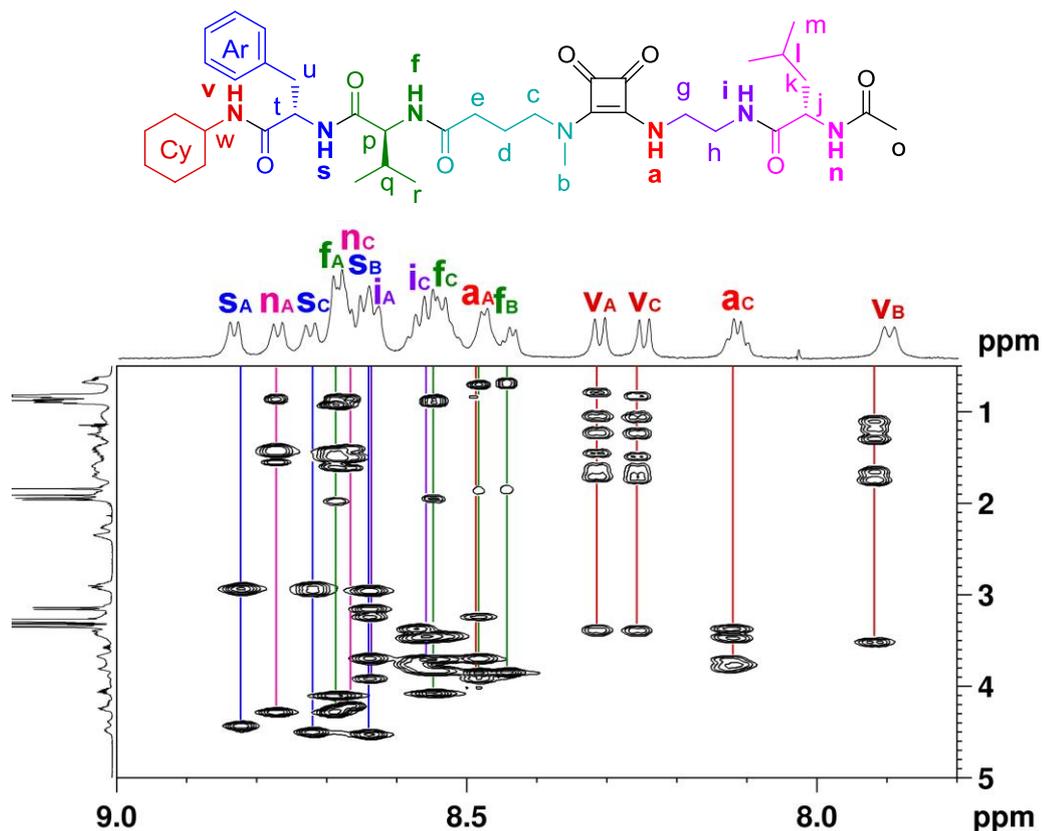


Figura 128. Región NH - alifáticos del espectro de TOCSY de una disolución de **31** (CD₃OH, 5 mM, 231 K). Las líneas de color permiten asignar cada NH a un sistema de espín concreto.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de ¹H RMN de **31** (CD₃OH, 5 mM, 231 K).

Protón	31A	31B	31C	Protón	31A	31B	31C
a	8.49	8.49	8.13	o	1.87	1.99/1.97	1.94
b	3.38	3.35	3.18	p	4.10	3.86/3.84	4.07
c	-	4.09/3.60	3.44/3.30	q	1.98	1.86/1.84	1.94
d	1.98/1.92	1.98/1.92	1.98/1.92	r	0.91	0.70/0.68	0.88
e	2.38/2.30	2.38/2.30	2.38/2.30	s	8.84	8.65	8.74
f	8.70	8.45/8.48	8.56	t	4.43	4.52	4.50
g	3.91/3.69	3.91/3.69	3.83/3.77 3.71	u	2.94	3.16/2.95	2.94
h	3.24/3.22	3.24/3.22	3.46/3.37	Ar	7.21	7.35	7.24
i	8.65	8.65	8.57	v	8.33	7.92	8.26
j	4.27	4.27	4.27	w	3.38	3.51	3.39
k	1.42	1.42	1.47	Cy	1.66/1.44	1.71/1.28	1.70/1.48
l	1.54	1.54	1.60		1.23/0.77	1.10	1.23/0.82
m	0.85	0.85	0.91				
n	8.78	8.78	8.69				

Para obtener más información estructural acerca de las distintas conformaciones del compuesto **31** en disolución de metanol, se analizaron los espectros NOESY y ROESY. En los conformeros **31A** y **31B** no se pudieron identificar las típicas señales $\text{NH}_a\text{--}(\text{CH}_2)_c$ y $\text{NH}_a\text{--}(\text{CH}_2)_d$ que habían permitido anteriormente identificar la conformación E,Z de la escuaramida. Esto se debe a que el NH_a muestra un desplazamiento químico casi idéntico al de NH_f del conformero **31B** y por tanto esas señales 2D probablemente aparecen solapadas con los NOEs $\text{NH}_f\text{--}(\text{CH}_2)_c$ y $\text{NH}_f\text{--}(\text{CH}_2)_d$, los cuales son señales intensas y que ofrecen información sobre proximidades evidentes entre núcleos estructuralmente muy próximos. Pese a ello, se identificaron toda una serie de picos de cruzamiento, tal como se indica en las Figuras 129 y 130. Las señales $(\text{CH}_2)_e\text{--}(\text{CH}_2)_g$, $(\text{CH}_2)_e\text{--CH}_j$, $(\text{CH}_2)_e\text{--}(\text{CH}_2)_k$ y $(\text{CH}_2)_e\text{--}(\text{CH}_3)_m$ indican proximidad espacial entre el $(\text{CH}_2)_e$, junto al carbonilo de GABA, y el sustituyente escuaramídico opuesto, situación que requiere la conformación E,Z de la escuaramida. La similitud de desplazamientos químicos observados para los núcleos $(\text{CH}_2)_e$, $(\text{CH}_2)_g$ y CH_j en las distintas especies identificadas implica que las señales $(\text{CH}_2)_e\text{--}(\text{CH}_2)_g$ y $(\text{CH}_2)_e\text{--CH}_j$ pueden atribuirse a cualquiera de las tres especies **31A**, **31B** y **31C**, y que las señales $(\text{CH}_2)_e\text{--}(\text{CH}_2)_k$ y $(\text{CH}_2)_e\text{--}(\text{CH}_3)_m$ definen proximidades de la zona común observada para las especies **31A** y **31B**. Se han hallado toda una serie de señales para la especie **31A** que indican la disposición paralela de las dos cadenas peptídicas, como son las señales $\text{CH}_p\text{--}(\text{CH}_2)_g$, $\text{CH}_t\text{--}(\text{CH}_2)_g$, $(\text{CH}_2)_g\text{--NH}_s$ y $(\text{CH}_2)_g\text{--Ar}$, que correlacionan el $(\text{CH}_2)_g$ con diferentes núcleos a lo largo de la cadena opuesta, o las señales $\text{NH}_n\text{--}(\text{CH}_3)_r$ y $(\text{CH}_3)_o\text{--NH}_v$. Para la especie **31B** también se han detectado señales de correlación entre núcleos de las dos cadenas enfrentadas, como son las señales $\text{CH}_j\text{--NH}_f$, $(\text{CH}_3)_o\text{--NH}_v$, $(\text{CH}_2)_g\text{--Ar}$, $(\text{CH}_3)_o\text{--Ar}$ y $(\text{CH}_3)_m\text{--Ar}$. En cuanto a la especie **31C** se ha observado la señal $(\text{CH}_3)_b\text{--NH}_a$, de intensidad muy elevada, que confirma la conformación Z,Z de la escuaramida. También se ha detectado la señal $(\text{CH}_3)_o\text{--NH}_v$, que indica algún tipo de plegamiento alternativo de la molécula, aunque la información obtenida es insuficiente para proponer una estructura concreta, la cual implicaría en cualquier caso una disfuncionalidad de la unidad de giro SQ3.

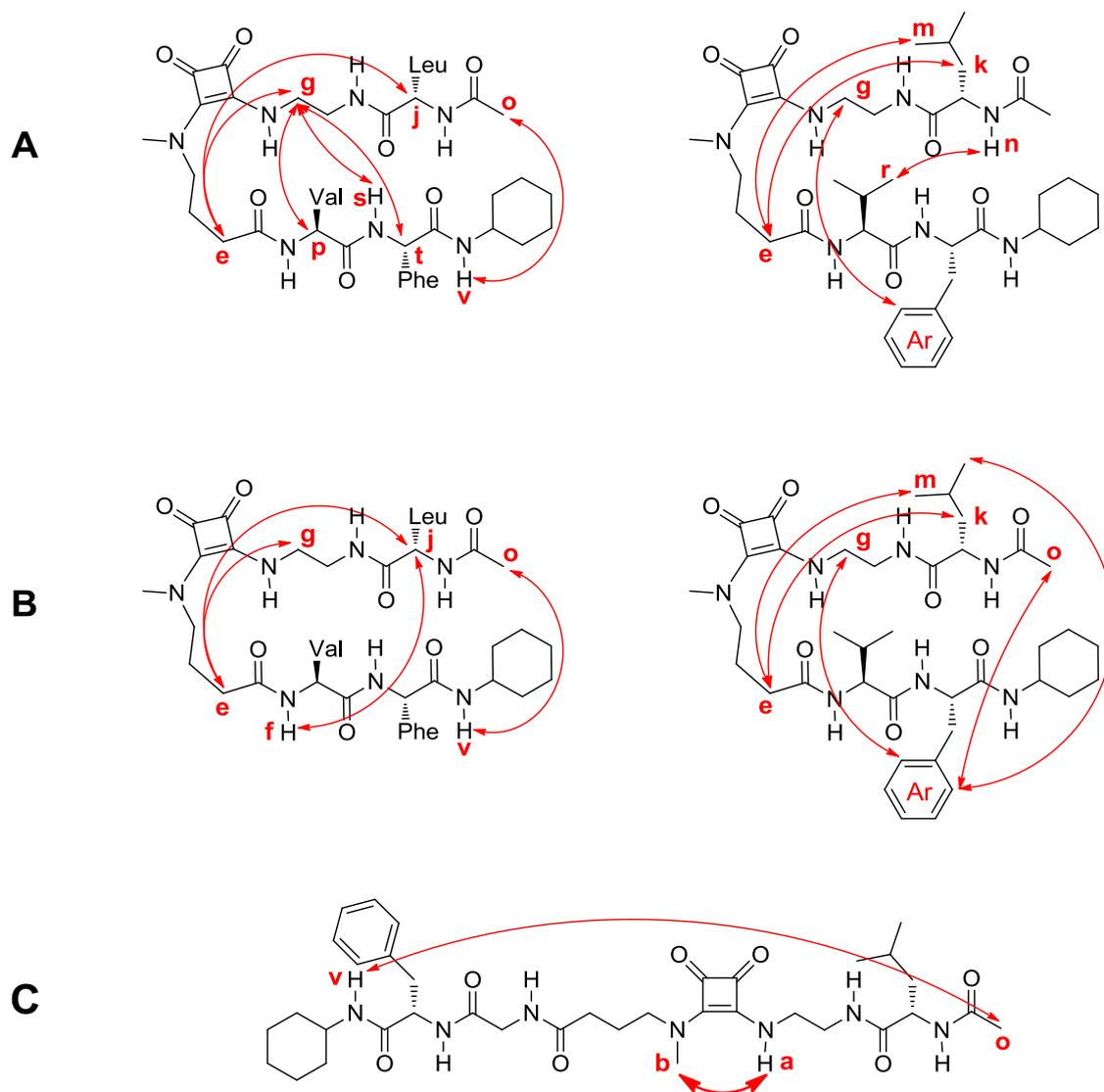


Figura 129. Representación de los NOEs identificados para las especies **31A**, **31B** y **31C** en una disolución en CD_3OH de **31** (5 mM) a 231 K.

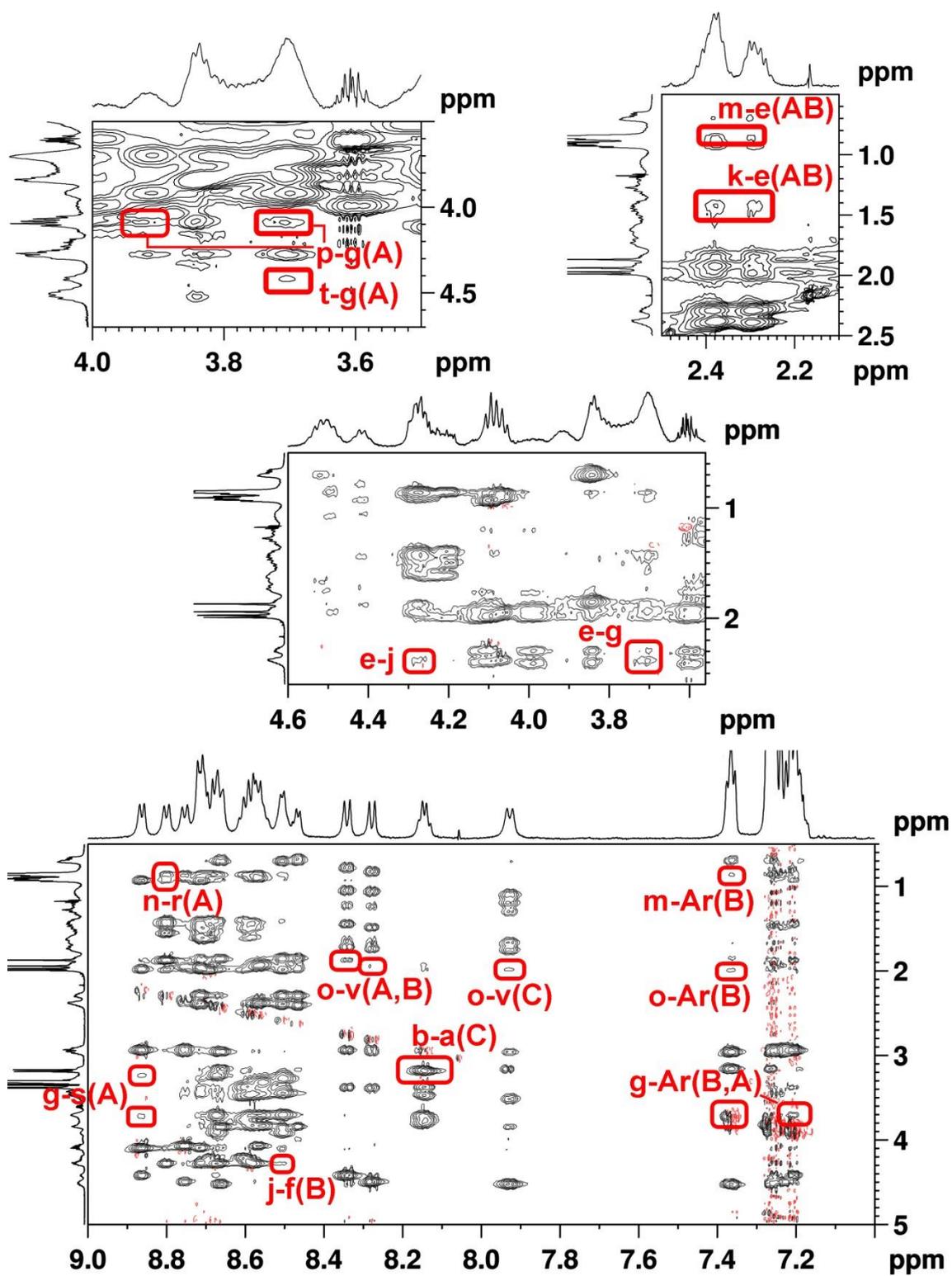


Figura 130. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de 31 (CD₃OH, 5 mM, 231 K).

En base a los resultados obtenidos en CD_3OH se concluyó que a 231 K coexisten en disolución dos conforméromos bien diferenciados, Figura 131. El **31C**, en una proporción del 33 %, tendría la unidad escuaramida en su conformación Z,Z, de forma que ésta no induciría el plegamiento deseado de la molécula. El otro sería el conforméromo tipo horquilla β deseado, donde la unidad SQ3 actúa como unidad de giro y promueve la interacción entre las dos cadenas acopladas a sus extremos, entre las cuales se han observado toda una serie de NOEs. Dicho conforméromo está presente en una proporción del 66 %. Además, se han identificado dos especies de proporciones iguales para el conforméromo tipo horquilla β , que difieren ligeramente en la zona Leu-Phe-Cy. Si se considera que a esta temperatura es probable que exista un cierto grado de agregación, se puede proponer un dímero como el que se muestra en la Figura 131 como especie **31A**. Este dímero considera la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares por parte de los núcleos NHf y NHv, cuyas señales son las que muestran mayor diferencia de desplazamiento químico entre las especies **31A** y **31B**, Tabla 9. La proporción de dímero en disolución podría incrementarse aumentando la concentración de producto. Este tipo de dímero es una estructura tipo lámina β , similar a los miméticos de lámina diméricos desarrollados en el grupo de Nowik,⁵⁹ y esta estructura podría ser utilizada como base en el diseño de miméticos de lámina β de base escuaramida con una estructura más extendida.

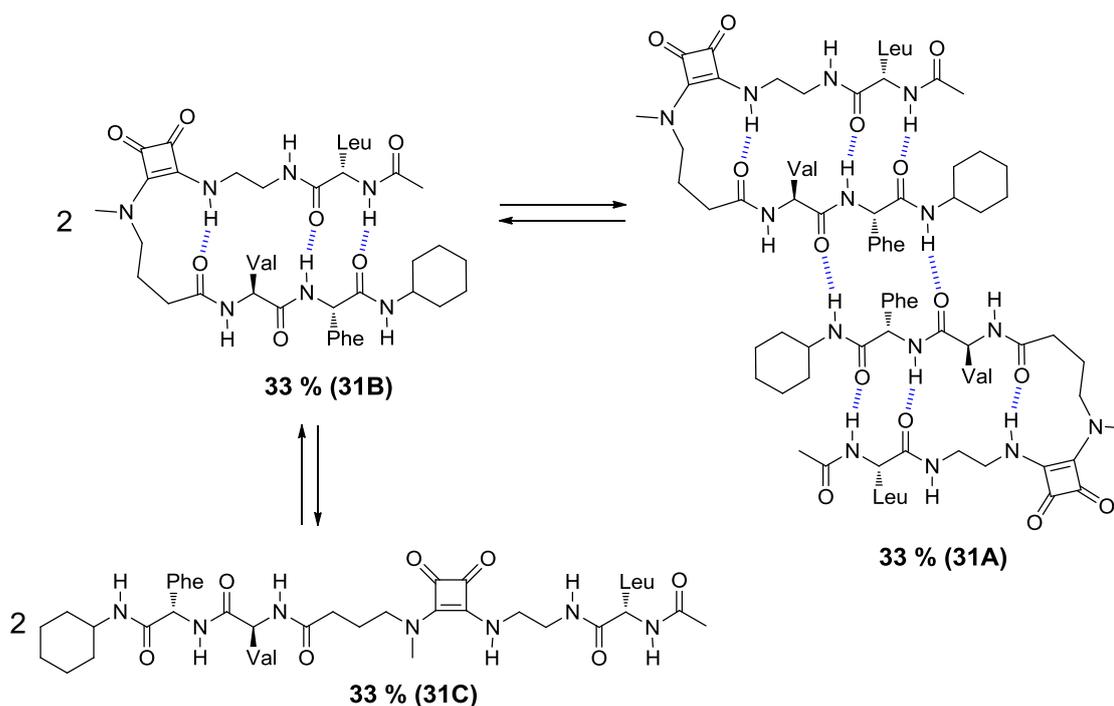


Figura 131. Equilibrio conformacional propuesto para **31** (CD_3OH , 5 mM, 231 K). Este equilibrio es compatible con los NOEs y desplazamientos químicos observados para las especies **31A**, **31B** y **31C** identificadas.

4.4.3.2. Mimético de horquilla β paralela **32**

Una vez probado que el módulo SQ3 inducía la formación de una estructura tipo horquilla antiparalela de pequeño tamaño en un disolvente polar prático como el metanol, se planteó llevar a cabo el estudio conformacional del compuesto **32** en las mismas condiciones. Este derivado está diseñado para formar una estructura tipo horquilla paralela con el objetivo de evaluar si el módulo inductor de giro β era suficientemente efectivo para preorganizar dos cadenas paralelas e inducir la formación de los enlaces de hidrógeno intramoleculares. El compuesto **32** resultó ser insoluble en acetonitrilo, por lo que se estudió directamente en metanol. Para ello se preparó una muestra en CD_3OH de concentración 5 mM y se realizaron los experimentos de RMN 2D a 233 K, condiciones en las cuales se pudieron identificar tres especies en equilibrio lento. A partir de los sistemas de spin identificados en el experimento TOCSY y las conexiones entre ellos observadas en el espectro de NOESY se asignaron las señales del espectro ^1H RMN correspondientes a los protones de cada una de las tres especies en equilibrio, Figura 132 y Tabla 10.

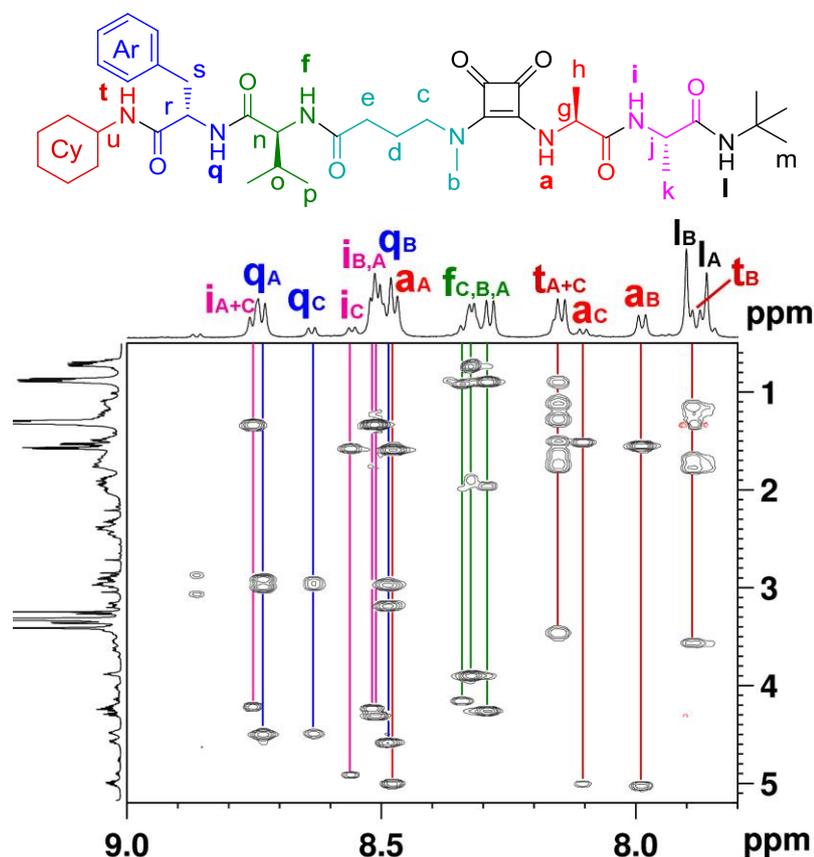


Figura 132. Región NH - alifáticos del espectro TOCSY de una disolución de **32** (CD_3OH , 5 mM, 233 K). Las líneas de color reúnen las señales que permiten asignar cada NH a un sistema de espín concreto.

Tabla 10. Desplazamientos químicos de ^1H RMN (ppm) de **32** (CD_3OH , 5 mM, 233 K).

Protón	32A	32B	32C	32A' + 32C'
a	8.48	7.99	8.10	
b		3.26		
c	3.42/3.34	4.03/3.64	3.48/3.29	
d	2.05/1.90	2.00	2.05/1.90	
e	2.47/2.40	2.40/2.34	2.47/2.40	
f	8.32	8.29	8.34	
g	5.00	5.02	5.00	
h	1.59	1.55	1.51	
i	8.52	8.51	8.56	8.75
j	4.22	4.30	4.91	4.21
k	1.33	1.33	1.57	1.33
l	7.90	7.86	7.90	7.56/7.42
m	1.33	1.33	1.33	1.31
n	3.90	4.25	4.15	
o	1.90	1.95	1.97	
p	0.73	0.89	0.91	
q	8.73	8.49	8.63	
r	4.50	4.57	4.91	
s	2.98/2.91	3.18/2.96	1.57	
Ar	7.24	7.35	7.24	
t	8.15	7.89	8.15	
u	3.45	3.56	3.45	
Cy	1.73/1.63/ 1.50/1.27/ 1.11/0.90	1.76/1.68/ 1.32/1.15	1.73/1.63/ 1.50/1.27/ 1.11/0.90	

Se observa que la señal del protón NHa para la especie **32A** aparece desapantallada 0.49 ppm en comparación con el mismo protón de la especie **32B**. Además las señales del $(\text{CH}_2)_c$ para la especie **32A** aparecen 0.61 y 0.30 ppm a campo más alto que las señales para la especie **32B**, lo que sugiere que la especie **32A** es un conformero tipo E,Z donde NHa forma un enlace de hidrógeno intramolecular, Figura 133 y Tabla 11. Además la señal de NHq de **32A** aparece 0.24 ppm desapantallada respecto a la de **32B**, lo que indica la probable formación de un segundo enlace de hidrógeno intramolecular en la especie **32A** por parte de NHq, que daría lugar al conformero tipo horquilla β . Las señales de NHt también muestran una diferencia de desplazamiento químico considerable en las dos especies, lo que puede deberse a algún tipo de interacción que implique una deformidad del extremo de la estructura tipo horquilla. El resto de señales NH muestran desplazamientos químicos muy similares en las dos especies.

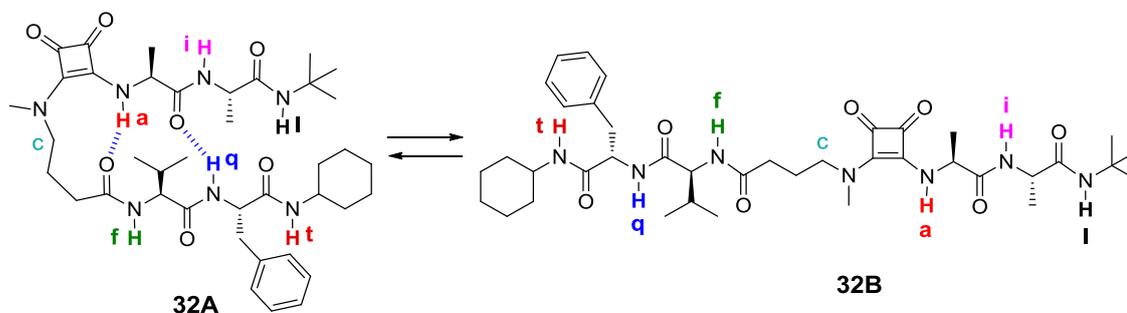
**Figura 133.** Equilibrio conformacional propuesto para **32** (CD_3OH , 5 mM, 233 K). Este equilibrio es compatible con los desplazamientos químicos observados para los protones NH de las dos especies mayoritarias **32A** y **32B** identificadas.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de los protones NH (ppm) de **32** (CD₃OH, 5 mM, 233 K).

Núcleo	32A	32B	32C	32A' + 32C'
a	8.48	7.99	8.10	
f	8.32	8.29	8.34	
i	8.52	8.51	8.56	8.75
l	7.90	7.86	7.90	7.56/7.42
q	8.73	8.49	8.63	
t	8.15	7.89	8.15	

En cuanto a la especie minoritaria **32C**, los desplazamientos químicos muestran una situación intermedia entre **32A** y **32B**.

Para las especies **32A** y **32C** se identificaron también dos subespecies minoritarias **32A'** y **32C'** que se diferenciaban de las primeras únicamente en el desplazamiento químico de los núcleos del extremo Ala-N^tBu (i→m). Las señales de NH_i de las subespecies **32A'** y **32C'** aparecen superpuestas a unos 0.23 ppm a campo más bajo que la señal de ese mismo núcleo en **32A** y 0.19 ppm a campo más bajo que en **32C**, mientras que para NH_l las señales de **32A'** y **32C'** aparecen a campo más alto. Estas diferencias en los desplazamientos químicos de esas dos señales indican un cambio conformacional en la zona Ala-Ala-N^tBu como el que se muestra en la Figura 134, de forma que las especies **32A'** y **32C'** son confórmeros donde NH_i forma un enlace de hidrógeno intramolecular con el carbonilo de GABA para dar un ciclo de 13 miembros análogo al que se forma en los giros α naturales.

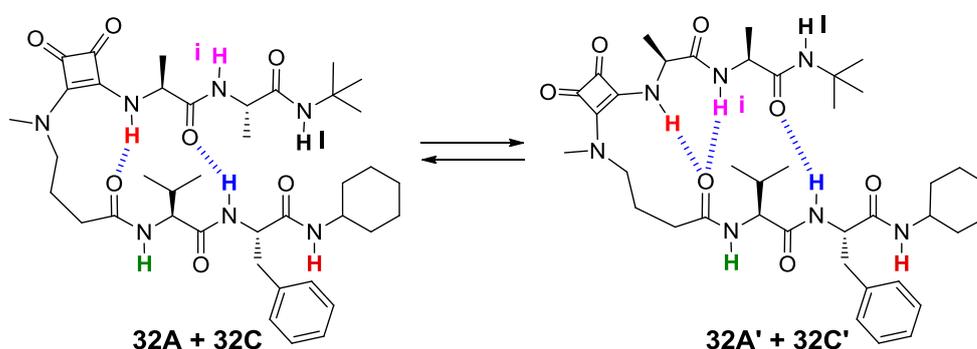


Figura 134. Equilibrio conformacional propuesto para **32** (CD₃OH, 5 mM, 233 K). Este equilibrio es compatible con los desplazamientos químicos observados para los protones NH de las dos especies **32A** y **32C** identificadas.

Las señales identificadas en el espectro de NOESY confirmaron los confórmeros propuestos para las especies **32A**, **32B** y **32C**, Figura 135. La señal (CH₃)_b--NH_a indica que la escuaramida adopta conformación Z,Z en la especie **32B**. Para las especies **32A** y **32C** se observan las señales (CH₂)_c--NH_a, (CH₂)_d--NH_a y (CH₂)_e--NH_a que indican la conformación E,Z de la escuaramida. Además en la especie **32A** se observan las señales intercadena (CH₃)_h--NH_q y (CH₃)_h--CH_n.

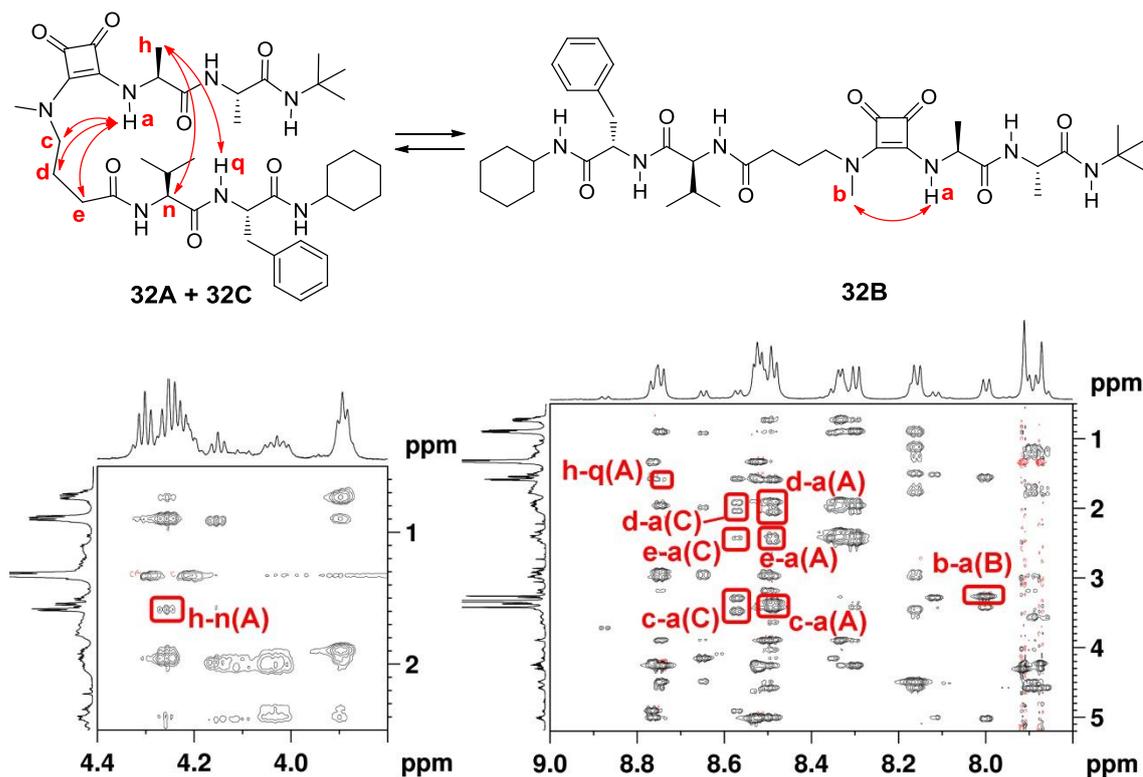


Figura 135. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de **32** (CD_3OH , 5 mM, 233 K).

En resumen, los estudios realizados indican que en una disolución de **32** (5 mM) en metanol y a una temperatura de 233 K, existe un equilibrio entre un conformero desplegado y dos conformeros plegados del compuesto, Figura 136.

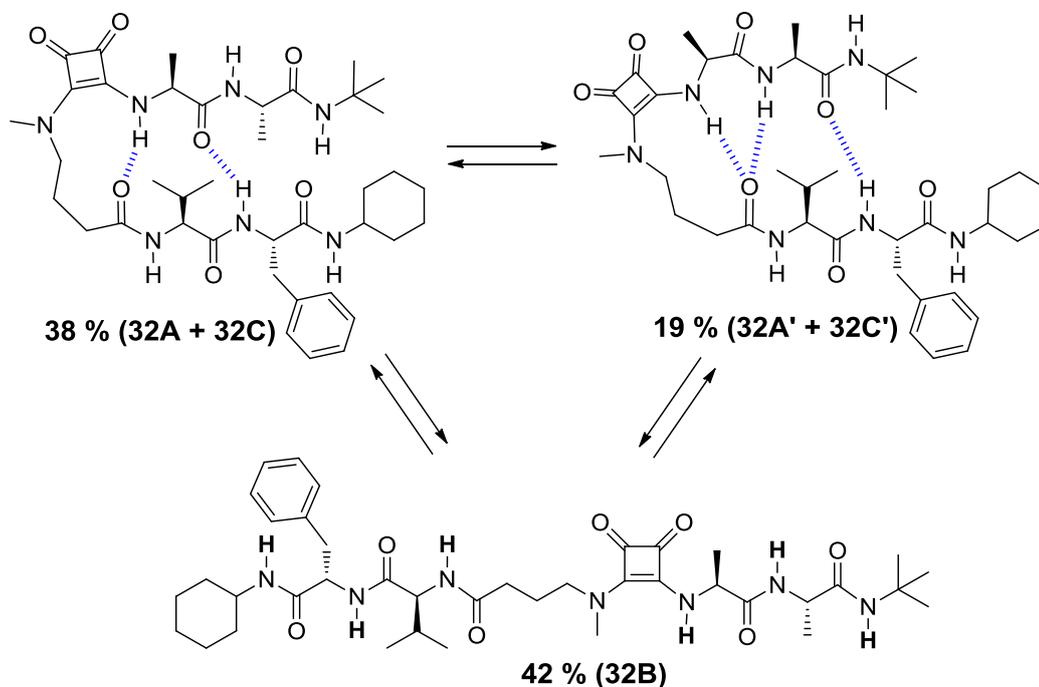


Figura 136. Equilibrio conformacional propuesto para **32** (CD_3OH , 5 mM, 233 K). Este equilibrio es compatible con los NOEs y desplazamientos químicos observados para las especies **32A**, **32A'**, **32B**, **32C** y **32C'** identificadas.

En los dos conformeros plegados el módulo SQ3 cumple su función como unidad de giro, estableciéndose un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno carbonílico de GABA y el NH escuaramídico. Dicho giro, en el conformero plegado mayoritario promueve la formación de una estructura tipo horquilla β . En cuanto al otro conformero plegado, el giro β promueve la formación de un segundo enlace de hidrógeno que da lugar a un ciclo de 13 miembros análogo a un giro α natural, que constituye la unidad de giro de una nueva estructura tipo horquilla. Las integrales de las señales de NH permitieron determinar la proporción de cada una de las especies en la disolución, observándose que en la muestra estudiada existe un 43 % del conformero desplegado, un 38 % del conformero objetivo, donde el módulo mimético de giro β promueve la formación de una estructura tipo horquilla paralela, y un 19 % del conformero plegado alternativo, cuya estructura tipo horquilla es promovida por la formación de un ciclo análogo a un giro α .

Se ha demostrado por lo tanto, que el módulo SQ3 es más eficiente que su análogo SQ1 en su aplicación como unidad de giro en el diseño de estructuras tipo horquilla β . Los modelos de horquilla β antiparalela y paralela diseñados, que contemplan la formación de tres enlaces de hidrógeno intramoleculares en cada caso, han demostrado adoptar estructuras tipo horquilla en una proporción de más del 50 % en disolución en metanol. Las especies observadas en ambas muestras indican que el mimético de horquilla β antiparalela **31** resulta más efectivo que el mimético de horquilla β paralela **32**, y en ambos casos se han observado subespecies del conformero plegado basadas en sutiles diferencias conformacionales difíciles de determinar. Para el mimético de horquilla β antiparalela **31** no se ha observado la formación del giro α que se había detectado para el mimético predecesor **8** y para el mimético de horquilla β paralela **32** sí se ha observado la presencia de un conformero promovido por la formación de un ciclo tipo giro α , aunque dicho conformero existe como especie minoritaria.

***5. Inserción de unidades de giro escuaramídicas en
secuencias peptídicas***

5.1. Modelo de giro 42

5.1.1. Diseño

El objetivo inicial de este capítulo es desarrollar un módulo de giro escuaramídico que pueda insertarse directamente en una secuencia peptídica y muestre una capacidad inductora de plegamiento similar a la de los módulos de giro estudiados en el capítulo anterior, basados en la unidad escuaramida secundaria - terciaria, para obtener compuestos peptidomiméticos.

En la mayoría de los casos la síntesis de secuencias peptídicas se lleva a cabo mediante el acoplamiento peptídico de aminoácidos a partir del extremo C-terminal utilizando una estrategia de protección - desprotección del grupo amino. Por lo tanto, un módulo diseñado para incorporarse en una ruta sintética de este tipo deberá disponer de un grupo ácido carboxílico y otro amino, o grupos equiparables a ellos.

Para el diseño de la nueva unidad de giro se tomó como base el módulo SQ3, cuyo plegamiento se debe a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el NH escuaramídico y un oxígeno carbonílico de un grupo amida. El carbonilo está situado sobre el carbono δ de la cadena que constituye el sustituyente sobre el otro nitrógeno escuaramídico de forma que se genera un ciclo de 10 miembros. En el nuevo módulo SQ4 únicamente se cambió la dirección del enlace amida respecto al anterior, lo que implica que el grupo amino proviene de la N-metiletildiamina, unida por el otro extremo a la unidad escuarato para dar una escuaramida terciaria, y el grupo ácido carboxílico proviene de un aminoácido de una de las cadenas peptídicas unidas al módulo de giro, Figura 137.

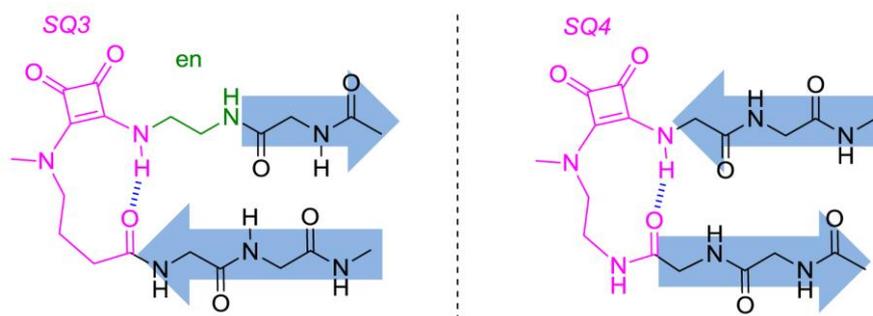


Figura 137. Unidades de giro escuaramídicas en una secuencia peptídica de C-terminal a N-terminal.

Para poder insertar la nueva unidad de giro en una secuencia peptídica se diseñó la estructura precursora **44**, Figura 138 (a). A nivel sintético, esta estructura es formalmente un aminoácido con el grupo amino protegido con un grupo protector R adecuado para la síntesis que se pretende realizar. Por tanto, este módulo puede acoplarse directamente tanto con grupos amino como ácidos carboxílicos,

provenientes de aminoácidos naturales o no naturales, para obtener compuestos peptidomiméticos. El residuo de **44** insertado en una secuencia peptídica ocupa seis posiciones de la cadena principal en una secuencia peptídica natural, por lo que podría sustituir a dos residuos de α aminoácido en una cadena peptídica sobre la que se quisiera inducir un plegamiento, Figura 138 (b). Para sustituir un giro β natural por un mimético escuaramídico, se sustituirían los dos residuos centrales del giro β por el residuo de **44**, Figura 138 (c).

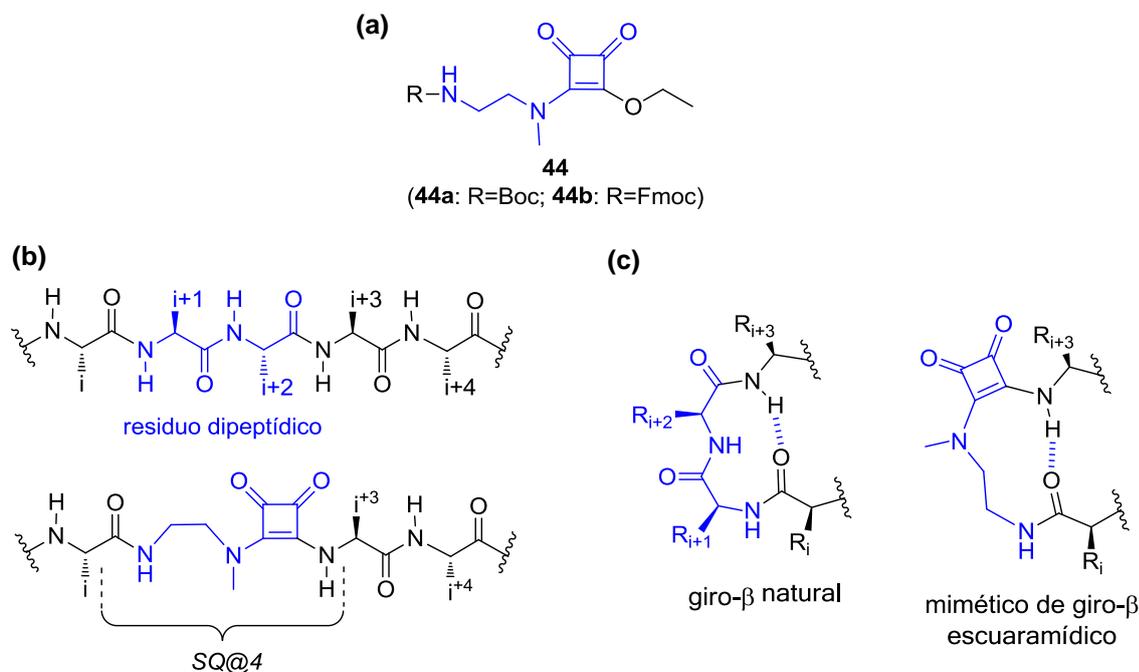


Figura 138. Inserción directa del módulo SQ4 en una secuencia peptídica natural. Se indica en azul el residuo del compuesto **44** y el residuo dipeptídico al que sustituye. (a) Precursor sintético **44**. (b) Cadena desplegada. (c) Giro β .

Para estudiar la capacidad de plegamiento del módulo SQ4, se diseñó el modelo de giro minimalista **42**, cuya estructura proviene del acoplamiento del precursor **36** con una unidad de ácido acético y una de butilamina, como ejemplos de ácido carboxílico y amina, Figura 139.

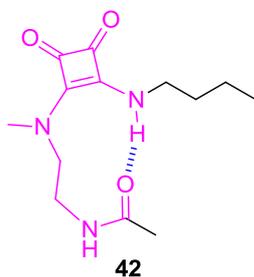


Figura 139. Modelo de giro β que contiene el módulo SQ4.

5.1.2. Síntesis de la escuaramida **42**

En la síntesis del compuesto **42**, Figura 140, inicialmente se acopló la (N-Boc)etilendiamina con escuarato de dietilo en Et₂O para obtener la monoescuaramida éster **43**. Este compuesto intermedio se hizo reaccionar en DMF con ioduro de metilo en presencia de hidruro sódico para metilar el nitrógeno escuaramídico y obtener el compuesto **44a**, con un rendimiento global de 76 %. Esta monoescuaramida éster terciaria es equivalente a un dipéptido con el extremo amino Boc-prottegido, ya que la función éster escuárico permite la condensación con grupos amina. La posterior eliminación del grupo Boc permite acoplar el grupo amino con grupos ácido carboxílico. Por tanto, dicho compuesto sirve como precursor en la síntesis de cualquier secuencia peptídica donde se pretenda insertar el módulo SQ4.

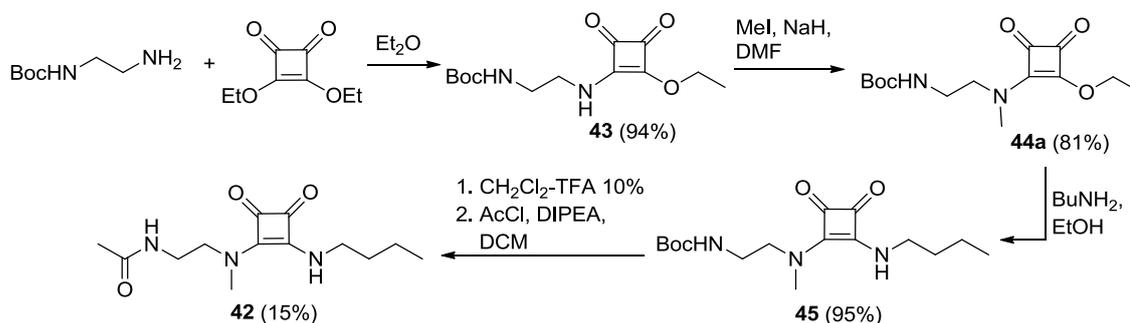


Figura 140. Esquema sintético de la escuaramida **42**.

En la etapa siguiente, el compuesto **44a** se hizo reaccionar con butilamina en EtOH para obtener la correspondiente escuaramida **45**. Finalmente se desprotegió el grupo Boc con una mezcla CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v y la amina resultante se acetiló por reacción con cloruro de acetilo en CH₂Cl₂ en presencia de DIPEA. El producto final **42** se obtuvo con un rendimiento global del 11 %.

5.1.3. Estudio conformacional del modelo de giro **42**

El estudio conformacional de la escuaramida **42** se realizó en cloroformo y acetonitrilo, de forma análoga a la descrita con los modelos minimalistas anteriores, **3**, **16** y **19**, con la intención de evaluar la capacidad de plegamiento del compuesto.

En la Figura 141 se muestra el espectro ¹H RMN de **42** (2.5 mM) en CDCl₃ a 298 K con la asignación de las señales. La señal correspondiente al protón amídico NHa a 7,6 ppm es ancha y aparece más desapantallada de lo que cabría esperar para un NH escuaramídico. Ello se debe probablemente a su implicación en un enlace de hidrógeno. Por su parte el NHe aparece a 6.31 ppm, un desplazamiento químico habitual para un protón NH de amida expuesto al disolvente.

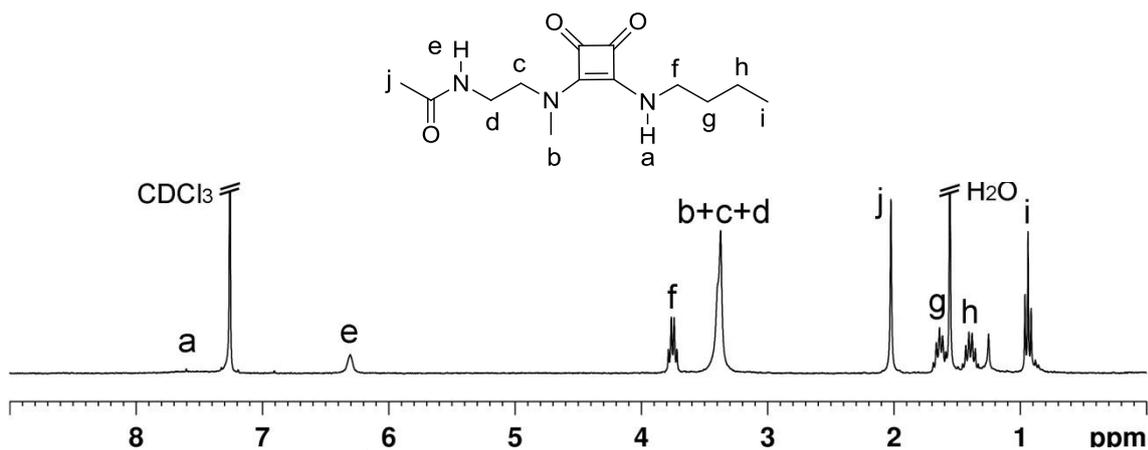


Figura 141. Espectro de ^1H RMN de **42** (CDCl_3 , 2.5 mM, 298 K) y asignación de las señales.

Para investigar si el enlace de hidrógeno era de tipo inter- o intramolecular se registraron los espectros en función de la concentración, Figura 142. En el rango de 1 - 10 mM la señal de NHa varía muy poco con la concentración ($\Delta\delta = +0.270$ ppm), mientras que la señal de NHe muestra mucha mayor dependencia ($\Delta\delta = +0.536$ ppm). Por tanto lo más probable es que en este rango de concentraciones el NHa esté formando un enlace de hidrógeno intramolecular con el oxígeno carbonílico de la amida.

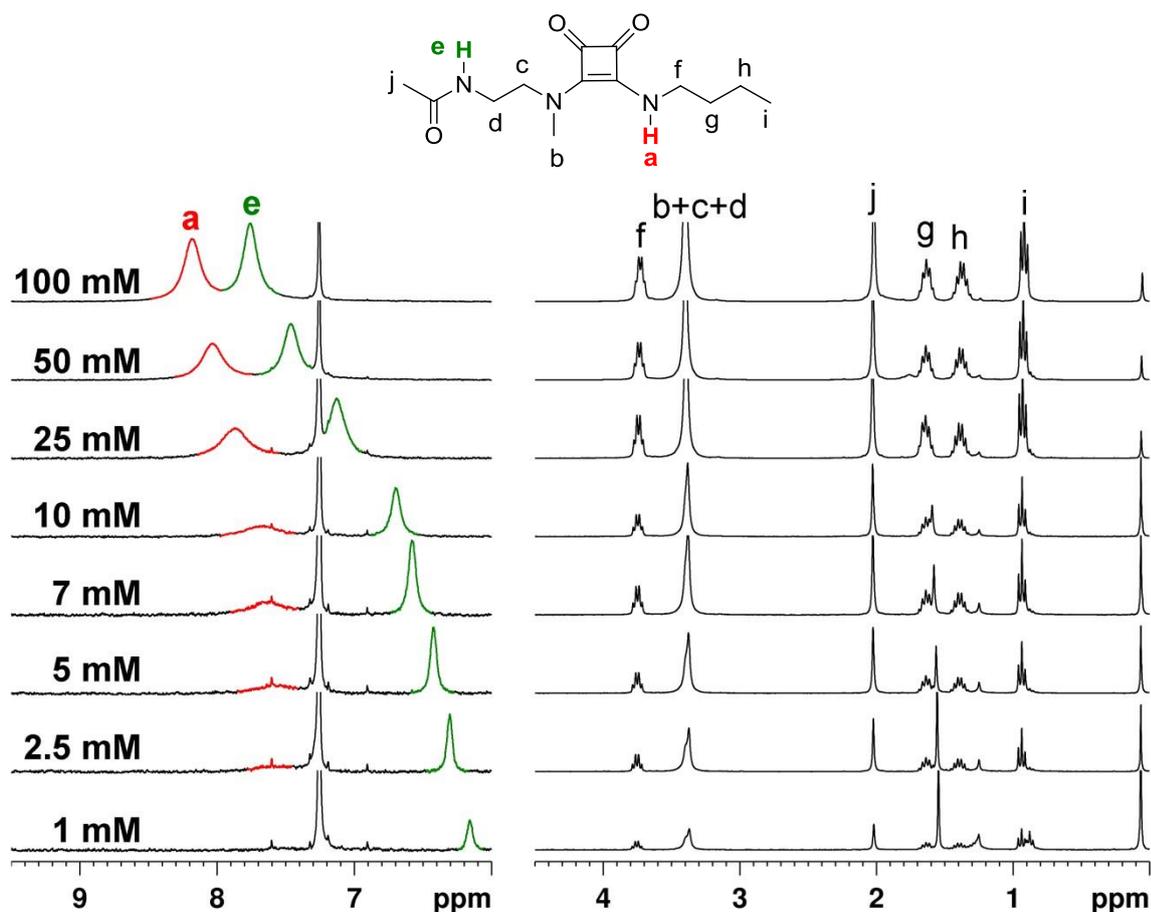


Figura 142. Serie de espectros ^1H RMN de **42** (CDCl_3 , 298K) que muestran el cambio en los desplazamientos químicos en función de la concentración.

Por su parte el NHe está implicado en la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares. La dependencia de la concentración que muestran las dos señales NHa ($\Delta\delta = +0.515$ ppm) y NHe ($\Delta\delta = +1.062$ ppm) en el rango de 10 – 100 mM indica que a altas concentraciones existe una cantidad significativa de especies donde ambos núcleos están implicados en la formación de agregados, aunque cabe remarcar que en todo momento el protón NHe es el que resulta más sensible a las variaciones de concentración.

En la Figura 143 se muestra el experimento de dependencia de la temperatura del espectro ^1H RMN para una disolución de **42** (1 mM) en CDCl_3 . Los valores del coeficiente $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ son -0.007 ppm/K tanto para NHa como para NHe. Estos valores indican una cierta dependencia de la temperatura para ambas señales. Probablemente el NHe está implicado en la formación de agregados, que se ven favorecidos con la disminución de la temperatura. Por su parte, el protón NHa forma un enlace de hidrógeno intramolecular que se refuerza por la disminución de la temperatura, provocando así el plegamiento de la molécula.

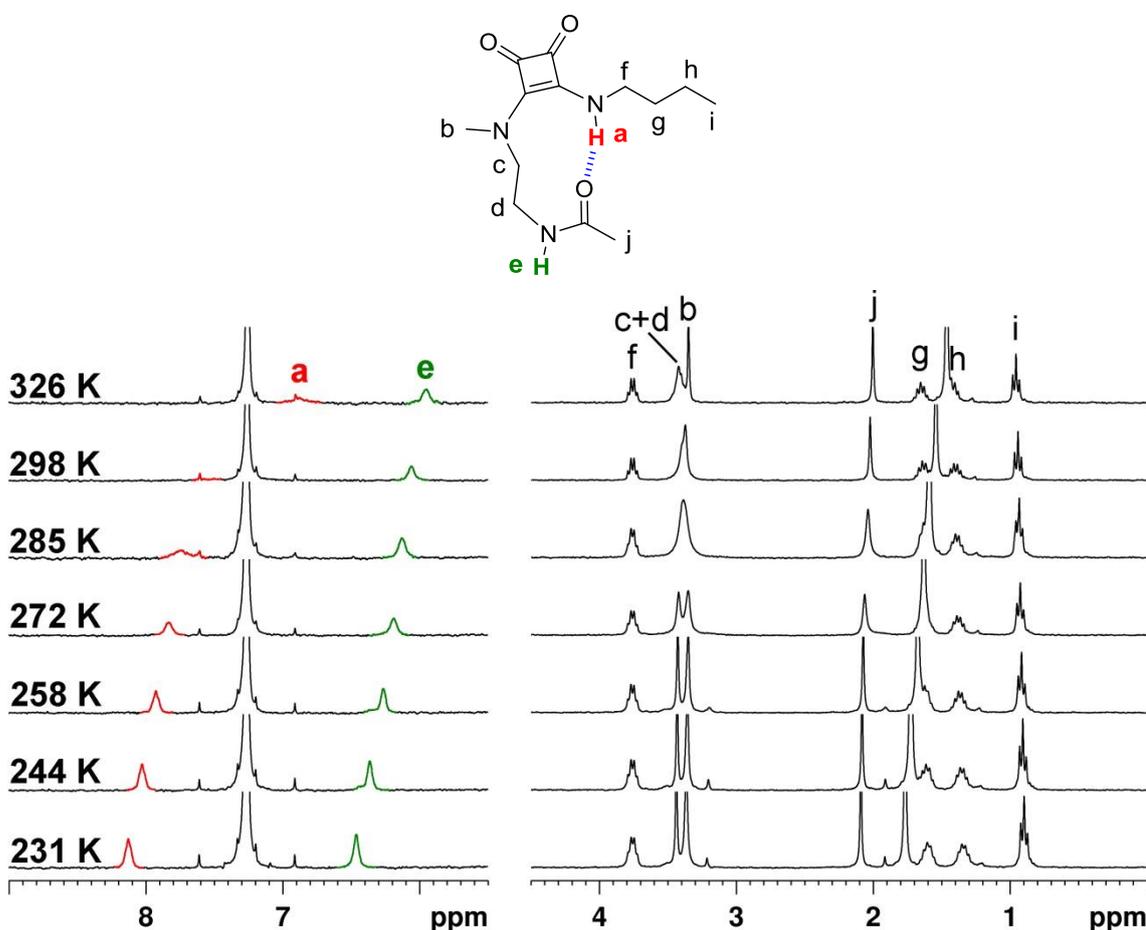


Figura 143. Serie de espectros ^1H RMN de **42** (CDCl_3 , 1 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

La adición de DMSO sobre **42** (1 mM, CDCl_3) a 272 K permite confirmar la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que mantiene al protón NHa aislado del disolvente, Figura 144. Se observa claramente como el incremento en la proporción de DMSO en el medio implica un cambio muy pronunciado en el desplazamiento químico del NHe de $+1.578$ ppm entre 0 - 9,91 % de DMSO, mientras

que el desplazamiento químico de NHa solo se altera ligeramente, +0.084 ppm entre 0 - 9,91 % de DMSO. Esto indica que el NHe está completamente expuesto al disolvente mientras que el NHa está completamente aislado de él.

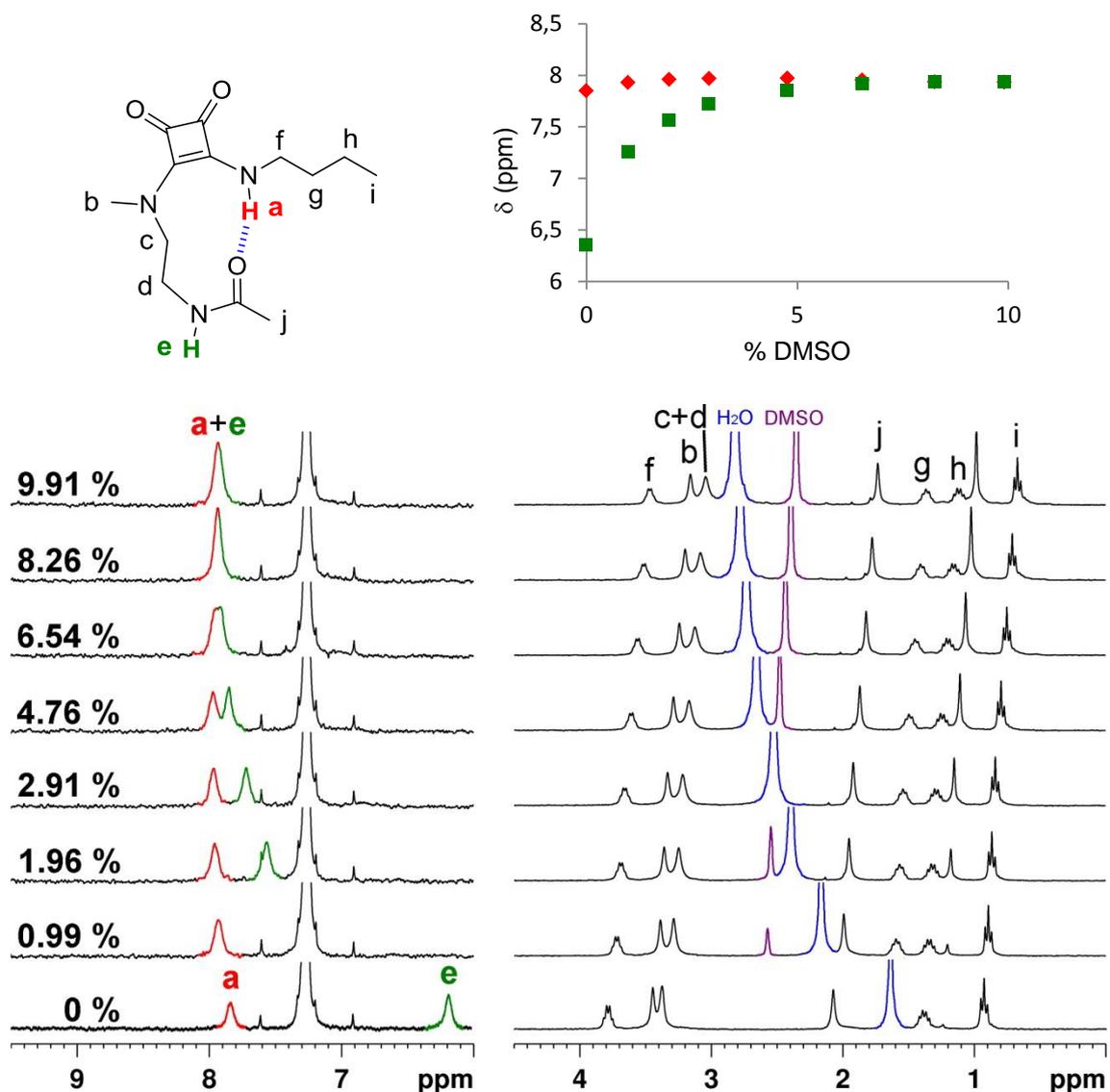


Figura 144. Serie de espectros ^1H RMN que muestran el efecto de la adición de DMSO sobre una disolución de **42** (CDCl_3 , 1 mM, 272 K). Los porcentajes indican la proporción de DMSO (v/v) en la mezcla.

En el espectro NOESY de **42** (1 mM, CDCl_3) a 244 K, se observaron las señales de proximidad entre el NHa y los metilenos (CH_2)c y (CH_2)d, que indican que la escuaramida adopta su conformación E,Z inducida por la formación del enlace de hidrógeno intramolecular, Figura 145.

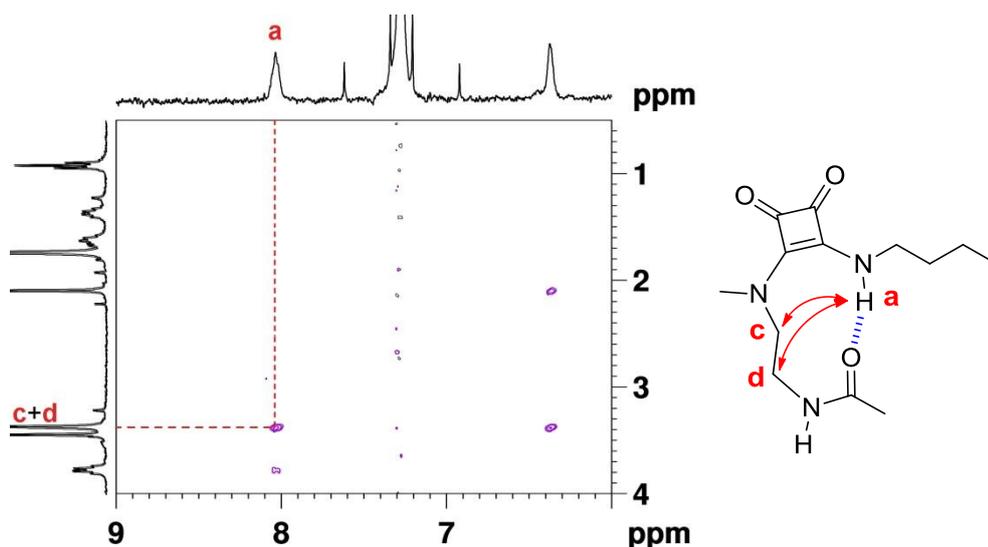


Figura 145. Espectro NOESY parcial de **42** (CDCl_3 , 1 mM, 244 K).

Con este derivado **42** también se registraron los espectros en CD_3CN para estudiar su comportamiento en un medio donde la formación de agregados es más desfavorable.

En la Figura 146 se observa el espectro de ^1H RMN de **42** (5 mM, CD_3CN) a 298 K, así como la asignación de las señales. Mientras que la señal NHe muestra un desplazamiento químico a 6.8 ppm, tal como sucede con un NH amídico completamente expuesto al disolvente, la señal NHa, aparece muy ancha a ~ 7.7 ppm, desplazamiento mayor al habitual para NH escuaramídicos expuestos al disolvente. Estos datos sugieren que el NHa se ve desapantallado debido a una interacción por enlace de hidrógeno intramolecular con el oxígeno carbonílico de la amida.

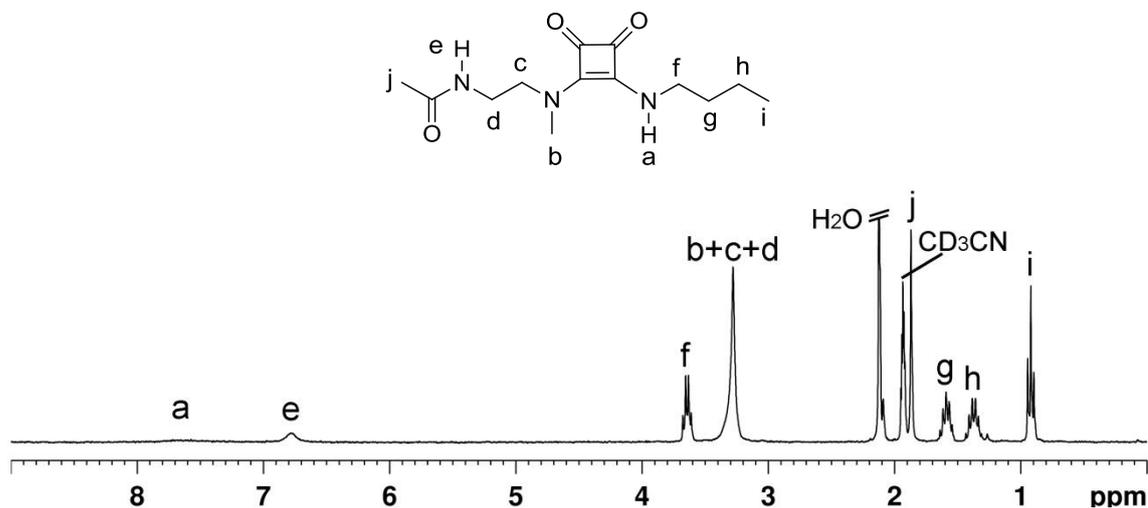


Figura 146. Espectro de ^1H RMN de **42** (CDCl_3 , 5 mM, 298 K) y asignación de las señales.

El estudio en función de la temperatura permitió calcular los coeficientes $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ para las señales NHa y NHe por debajo de la temperatura de coalescencia, cercana a 298 K, Figura 147. Los valores de esos coeficientes son -0.007 ppm/K para el NHa y -0.003 ppm/K para el NHe. Éstos indican una elevada dependencia de la temperatura para el NHa, que forma un enlace de hidrógeno intramolecular, y una baja

dependencia de la temperatura por parte del NH_e, debido a su completa exposición al disolvente.

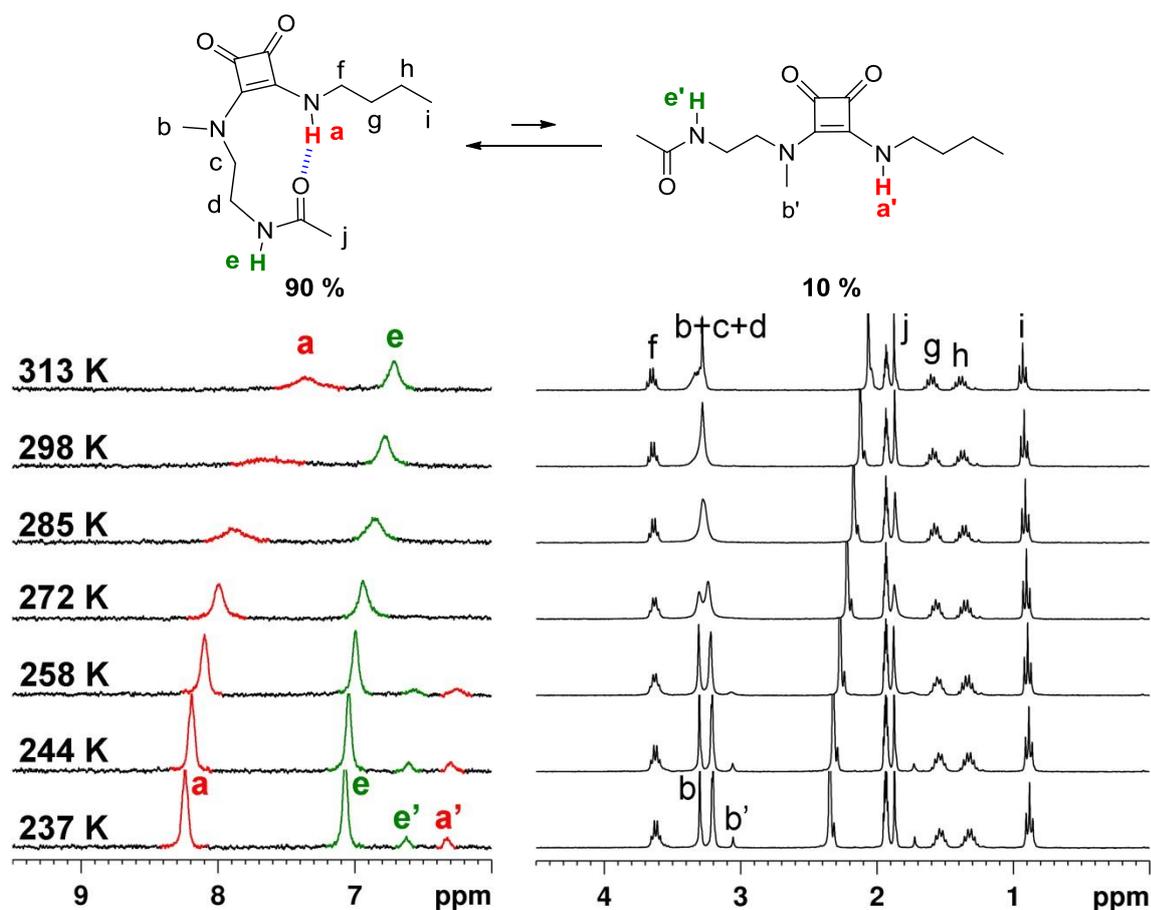


Figura 147. Serie de espectros ^1H RMN de **42** (CD_3CN , 5 mM) que muestran los cambios en los desplazamientos químicos en función de la temperatura.

A temperaturas inferiores a 258 K se observan dos señales para cada NH lo que indica la presencia de dos especies en equilibrio en una proporción 90:10, Figura 147. En la especie mayoritaria el NH_a aparece a 8.25 ppm, a campo bastante más bajo que el NH_e, a 7.08 ppm, lo que sugiere que esta especie mayoritaria es el confórmero E,Z donde el NH_a está formando un enlace de hidrógeno intramolecular. En cuanto a la especie minoritaria, NH_{a'} aparece a 6.32 ppm, tan solo 0.3 ppm a campo más alto que el NH_{e'}. Estos desplazamientos indican que la especie minoritaria probablemente sea el confórmero Z,Z. Además la señal $(\text{CH}_3)_b$ también aparece desdoblada en el espectro, mostrando mayor desplazamiento químico para la especie mayoritaria, $(\text{CH}_3)_b$, donde soporta el efecto paramagnético del carbonilo escuaramídico, que para la minoritaria, $(\text{CH}_3)_{b'}$.

La Figura 148 muestra una región del espectro de NOESY de una disolución de **42** (1 mM) en CD_3CN a 244 K, a partir del que se identifican de nuevo las proximidades entre el NH_a y los metilenos $(\text{CH}_2)_c$ y $(\text{CH}_2)_d$. Estos NOEs son característicos de la conformación E,Z de la escuaramida estabilizada por el enlace de hidrógeno intramolecular entre NH_a y el oxígeno carbonílico de la amida.

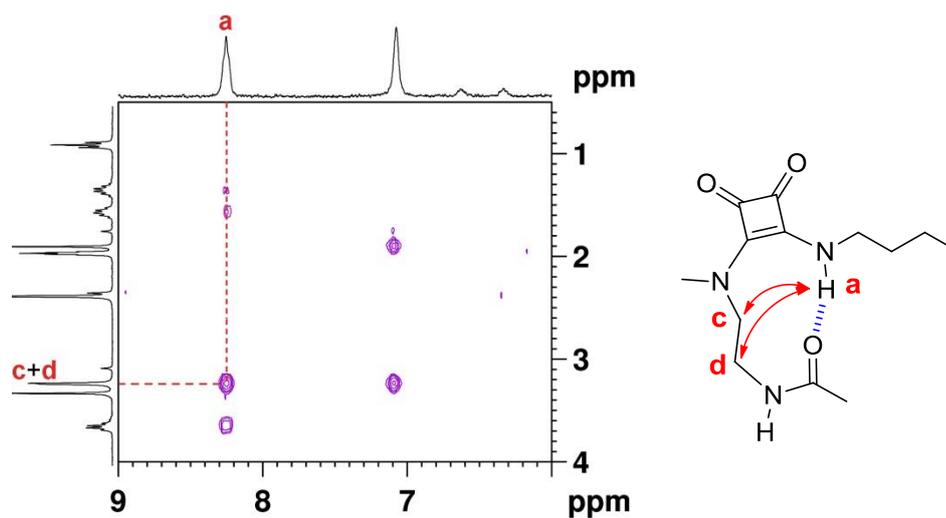


Figura 148. Región seleccionada del espectro de NOESY de **42** (CD₃CN, 1 mM, 244 K).

El compuesto **42** se cristalizó en AcOEt y la estructura cristalina se resolvió por difracción de rayos X, Figura 149. Las moléculas de **42** en estado sólido se encuentran en la conformación E,Z, lo que permite que se forme el enlace de hidrógeno intramolecular NH··O (1.931 Å) que provoca su plegamiento. Además, también se han identificado interacciones de tipo enlace de hidrógeno intramoleculares CH··O (2.459 y 2.513 Å) entre los carbonilos escuaramídicos y el grupo N-Me y (CH₂)_α de ambos sustituyentes. Estas interacciones estabilizan la conformación E,Z de la escuaramida, Figura 149 (a). El análisis de los ángulos de torsión que definen la unidad de giro revela que ésta es prácticamente coplanaria, Figura 149 (b). Mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares NH··O (2.015 Å) se forman cadenas de moléculas plegadas de longitud indefinida que se empaquetan en un mismo plano generando láminas que se apilan paralelamente una sobre otra, Figura 149 (c) y (d).

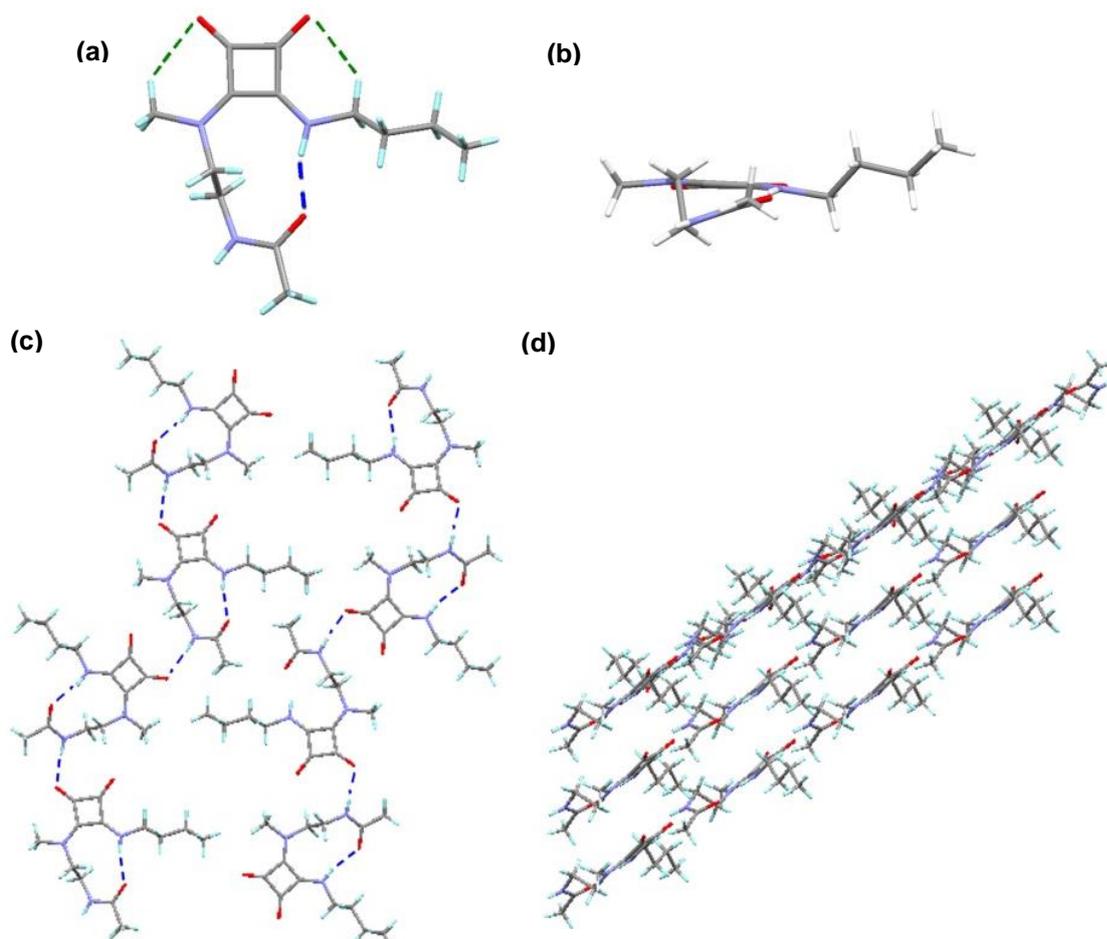


Figura 149. Estructura cristalina de **42**. **(a)** Molécula plegada debido a una interacción por **enlace de hidrógeno intramolecular NH...O**, en la que también se observan interacciones **CH...O**. **(b)** Visión lateral de una molécula **(c)** Visión frontal de dos cadenas formadas por **enlaces de hidrógeno intermoleculares NH...O** que se encuentran en un mismo plano. **(d)** Visión lateral de varias láminas apiladas.

Así pues los estudios realizados sobre el compuesto **42** demuestran que éste se encuentra mayoritariamente en la forma E,Z plegada tanto en disolución en cloroformo como en acetonitrilo.

5.2. Mimético de horquilla β 46

5.2.1. Diseño

Una vez confirmada la capacidad de plegamiento del módulo SQ4, se diseñó el mimético de horquilla β 46 con el objetivo de evaluar la capacidad de dicho módulo de enfrentar las dos cadenas enlazadas a él e inducir así el plegamiento de la estructura, obteniendo miméticos de estructura tipo horquilla, Figura 150. Esta nueva unidad de giro SQ4 se caracteriza por permitir su inserción directa en secuencias peptídicas, por lo que las cadenas acopladas directamente al módulo son dos derivados dipeptídicos. Por un lado, el dipéptido NH₂-Gly-L-Phe-COOH con el extremo C-terminal funcionalizado como *tert*-butilamida se une al anillo de escuarato del módulo de giro. Por otro lado el dipéptido NH₂-L-Ala-L-Ala-COOH con el extremo N-terminal acetilado se une al grupo amino situado en el otro extremo del módulo. El plegamiento de la unidad de giro puede así inducir la formación de dos enlaces de hidrógeno adicionales entre las dos cadenas enfrentadas, de forma que la molécula adquirirá una conformación análoga a la de una horquilla β antiparalela.

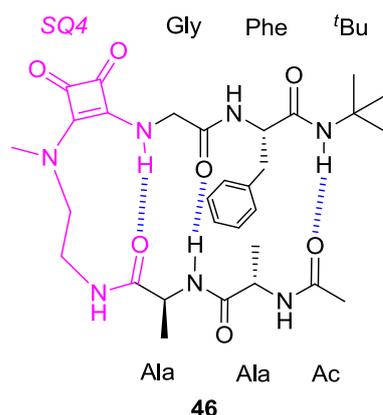


Figura 150. Diseño del mimético de horquilla β 46.

5.2.2. Síntesis del pseudopéptido 46

La síntesis del compuesto 46 se llevó a cabo mediante el acoplamiento de los dos derivados dipeptídicos con los extremos del precursor 44, cuya síntesis se ha descrito en el apartado 5.1.2, Figura 151.

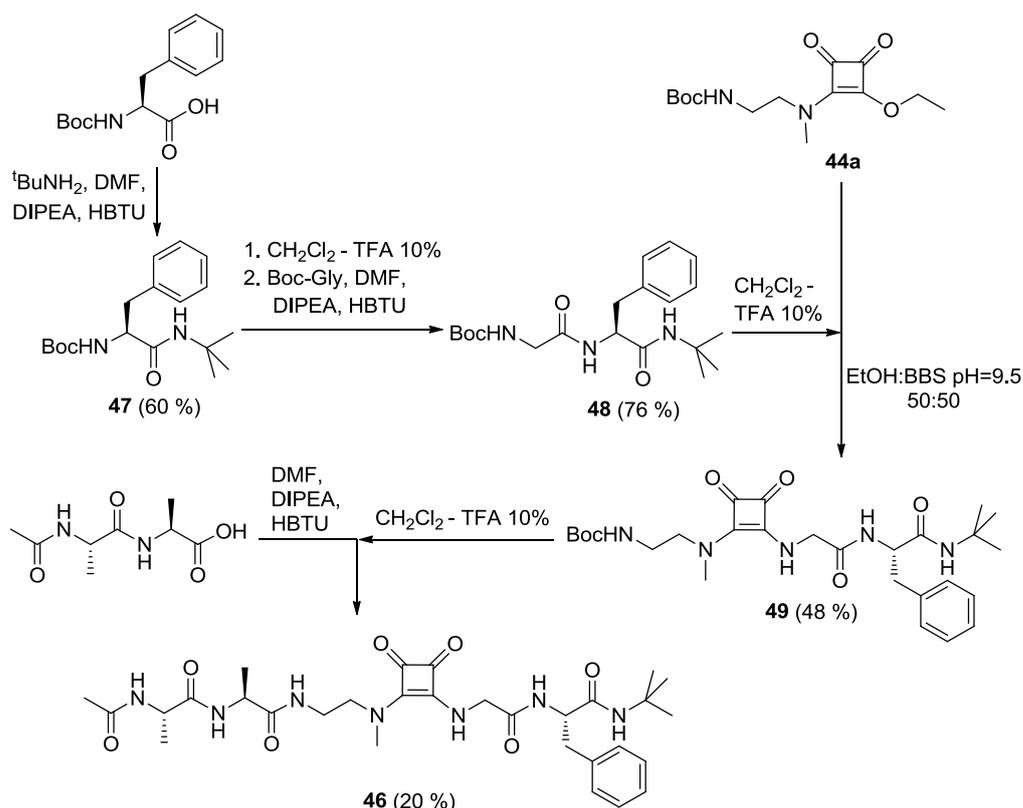


Figura 151. Esquema sintético para el producto **46**.

El acoplamiento peptídico de Boc-Phe con *tert*-butilamina rindió el derivado **47** en un 60 %, el cual se desprotegió en CH_2Cl_2 - TFA 10 %. La correspondiente sal de TFA se neutralizó con DIPEA en DMF y se acopló, utilizando HBTU como agente de acoplamiento, con el aminoácido Boc-Gly para obtener el derivado dipeptídico **48** con un rendimiento del 76 %. A continuación, el grupo amino del compuesto **48** se liberó del grupo protector Boc en las condiciones habituales y la amina libre se hizo reaccionar con un equivalente de la escuaramida éster **44a** en una mezcla 50:50 de EtOH y tampón BBS (*Borate buffered saline*) 100 mM de pH 9.5, obteniéndose la escuaramida **49**. Tras la desprotección del grupo Boc en las condiciones habituales y la posterior neutralización con DIPEA en DMF, la amina resultante se acopló con el dipéptido Ac-L-Ala-L-Ala-COOH en presencia de HBTU para obtener el producto final **46**, siendo el rendimiento global de los acoplamientos de las dos cadenas dipeptídicas a la unidad de giro del 10 %.

5.2.3. Estudio conformacional del modelo de horquilla **46**

Siguiendo en la misma línea de estudio que se llevó a cabo con los otros miméticos de horquilla **8**, **31** y **32** que consideraban la formación de tres enlaces de hidrógeno intramoleculares, el compuesto **46** se estudió disuelto en acetonitrilo y en metanol.

Los espectros COSY, TOCSY y NOESY de una disolución de **46** (5 mM) en CD_3CN a 231 K permitieron determinar el desplazamiento químico de las señales de ^1H RMN de todos los protones de la molécula, Figura 152 y Tabla 12. A dicha temperatura se

podieron diferenciar dos especies, **46A** y **46B**, en una proporción del 75 % y el 25 % respectivamente.

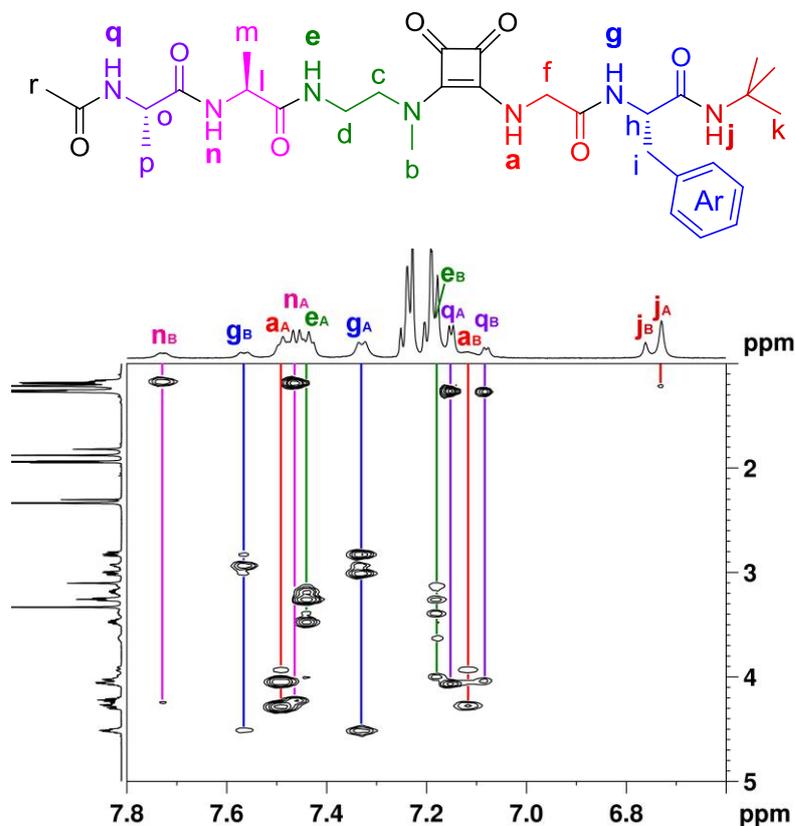


Figura 152. Región NH - alifáticos del espectro de TOCSY de una disolución de **46** (CD_3CN , 5 mM, 231 K). Las líneas de color permiten asignar cada NH a un sistema de espín concreto.

Tabla 12. Desplazamientos químicos de ^1H RMN (ppm) de **46** (CD_3CN , 5 mM, 231 K).

Protón	46A	46B	Protón	46A	46B
a	7.49	7.12	j	6.72	6.75
b	3.33	3.10	k	1.22	-
c	3.26	4.00 / 3.39	l	4.24	4.24
d	3.47 / 3.18	3.62	m	1.18	1.17
e	7.44	7.18	n	7.46	7.73
f	4.28 / 4.04	4.27 / 3.93	o	4.06	4.03
g	7.33	7.56	p	1.26	1.27
h	4.51	5.40	q	7.15	7.08
i	3.01	2.83	r	1.88	1.83
Ar	7.24 / 7.19	-			

Las señales NHa y $(\text{CH}_3)_b$ de la especie **46A** aparecen 0.39 y 0.23 ppm a campo más bajo que las correspondientes a la especie **46B**, mientras que la señal $(\text{CH}_2)_c$ aparece 0.74 ppm a campo más bajo en la especie **46B**. Estas diferencias sugieren que en la especie **46A** la escuaramida se encuentra en la conformación E,Z estabilizada por el enlace de hidrógeno intramolecular entre NHa y el carbonilo amídico situado en el extremo del módulo de giro SQ4, mientras que en la especie **46B** la escuaramida se encuentra en su conformación Z,Z, Figura 153.

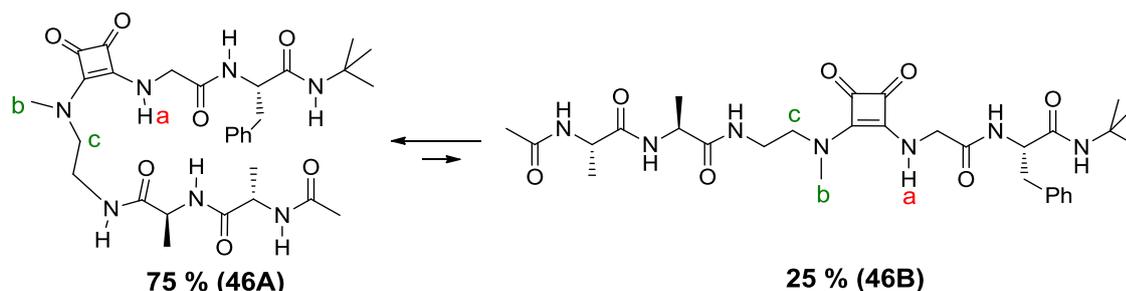


Figura 153. Equilibrio conformacional propuesto para **46** (CD_3CN , 5 mM, 231 K). Este equilibrio es compatible con los desplazamientos químicos observados para los protones NH de las especies **46A** y **46B** identificadas.

En el espectro NOESY, las señales que correlacionan los protones $\text{NH}_a\text{--}(\text{CH}_2)_c$ y $\text{NH}_b\text{--}(\text{CH}_2)_d$ confirman la conformación E,Z de la escuaramida en la especie **46A**, Figura 154. Además, en esta especie también se han encontrado toda una serie de señales de entrecruzamiento entre núcleos de las dos cadenas enfrentadas, como son $\text{NH}_n\text{--CH}_h$, CHO--CH_h , $(\text{CH}_3)_p\text{--}(\text{CH}_2)_i$, $(\text{CH}_2)_d\text{--Ar}$ y $(\text{CH}_3)_r\text{--CH}_h$. Cabe destacar que las dos primeras señales intercadena citadas son especialmente indicativas de una estructura tipo horquilla β , ya que implican contactos entre los núcleos situados sobre el esqueleto peptídico, y junto a la tercera señal indican la proximidad de los residuos Phe y Ala enfrentados.

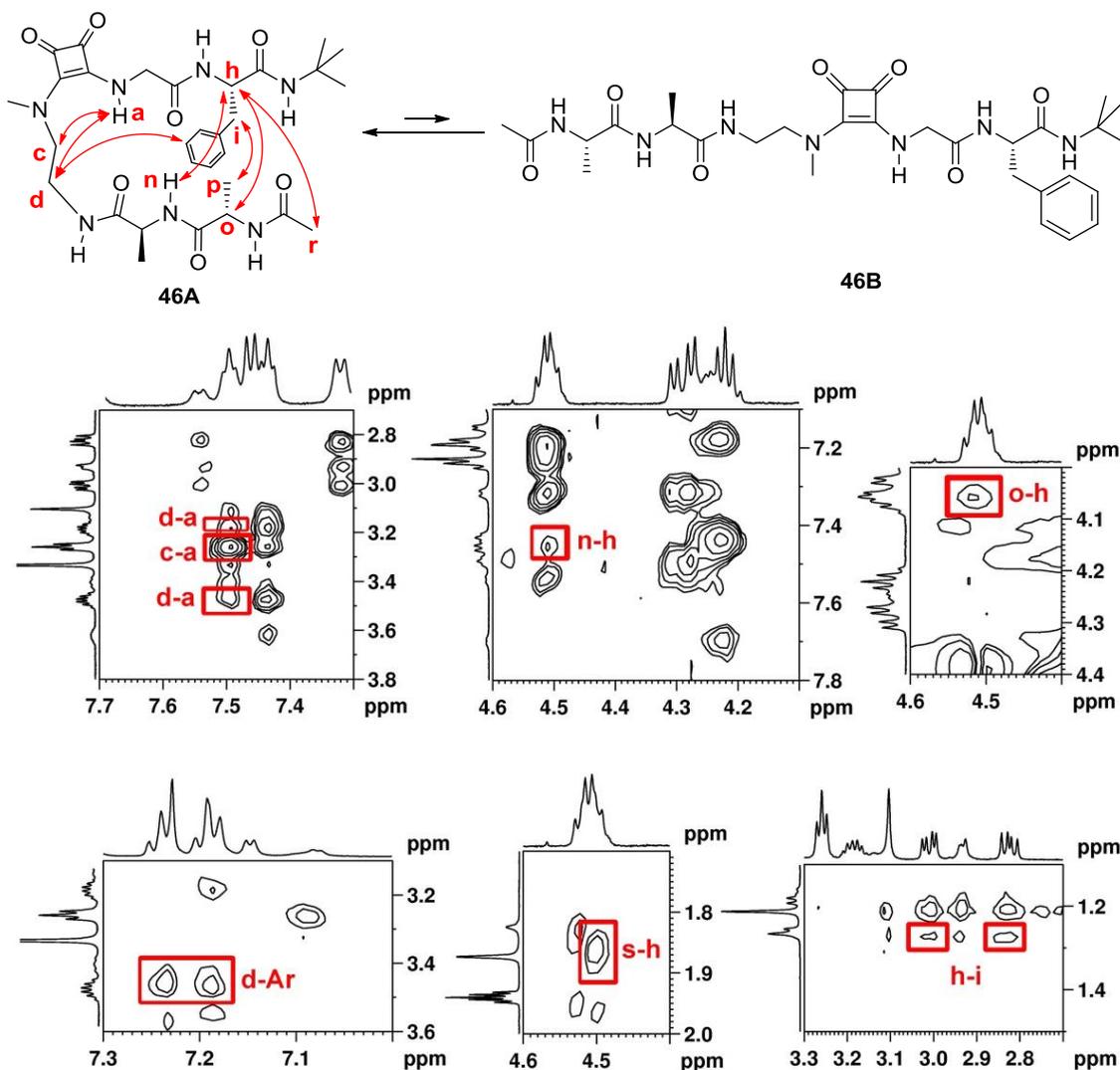


Figura 154. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de **46** (CD_3CN , 5 mM, 231 K).

Los espectros COSY, TOCSY y NOESY de **46** (CD_3OH , 6 mM, 233 K) permitieron asignar las señales de ^1H RMN de forma que, a baja temperatura, se pudieron diferenciar las dos especies en disolución en una proporción **46A:46B** 50:50, Figura 155 y Tabla 13. La señal del protón (CH_3)_b de la especie **46A** aparece 0.19 ppm desapantallada respecto a la correspondiente señal en **46B**, lo que sugiere que en la primera especie la escuaramida está en la conformación E,Z y en la segunda en la Z,Z. En general los desplazamientos químicos de los protones NH no varían mucho de una especie a otra, aunque sí cabe remarcar que las señales de NH_a y NH_n, dos núcleos que formarían enlace de hidrógeno intramolecular en la estructura tipo horquilla objetivo, aparecen a campo más bajo en la especie **46A**.

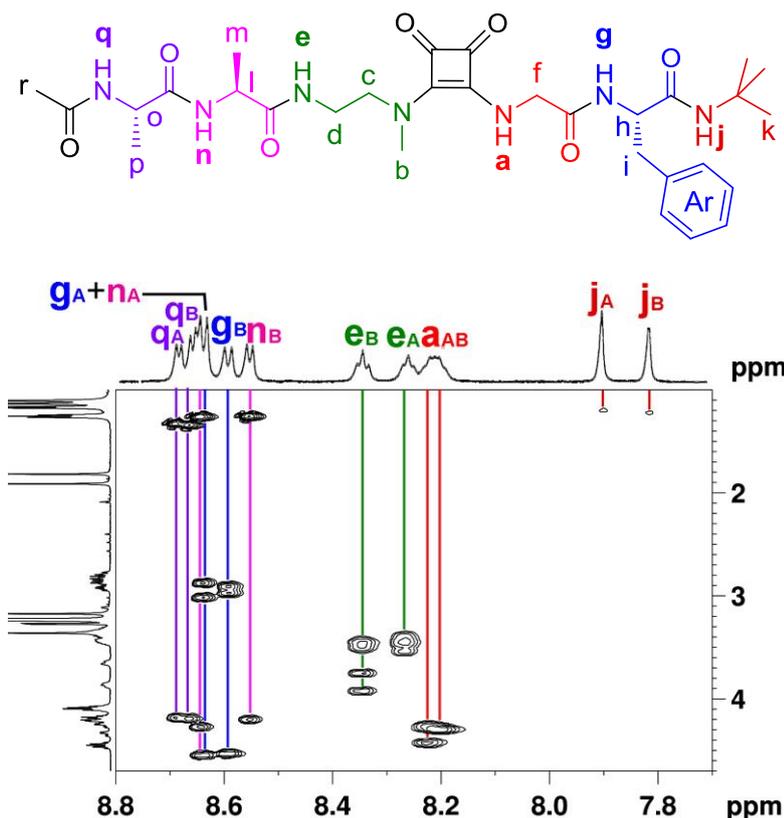


Figura 155. Región NH – alifáticos del espectro TOCSY de una disolución de **46** (CD₃OH, 6 mM, 233 K). Las líneas de color permiten asignar cada NH a un sistema de espín concreto.

Tabla 13. Desplazamientos químicos de ¹H RMN (ppm) de **46** (CD₃OH, 6 mM, 233 K).

Protón	46A	46B	Protón	46A	46B
a	8.22	8.20	j	7.81	7.90
b	3.44	3.25	k	1.21	1.19
c	-	3.47	l	4.27	4.20
d	3.54/3.44	3.74/3.92	m	1.25	1.25
e	8.27	8.34	n	8.64	8.55
f	4.42	4.29	o	4.18	4.19
g	8.64	8.59	p	1.32	1.34
h	4.54	4.53	q	8.69	8.66
i	2.87/3.01	2.90/2.97	r	1.90	1.99
Ar	7.26	7.24			

En el espectro NOESY aparecen señales que correlacionan NHa--(CH₂)d en la especie **46A** y NHa'--(CH₃)b' en la especie **46B**, que confirman la forma E,Z de la primera especie y la forma Z,Z de la segunda, Figura 156. Además, en la especie **46A** se observaron las señales CHh--CHO y (CH₃)p--CHh, especialmente diagnósticas de una estructura tipo horquilla β, así como las señales (CH₂)f--CHO, (CH₃)r--CHh, CHO--Ar, (CH₃)r--Ar y NHe--Ar, que también indican la proximidad entre las dos cadenas enfrentadas.

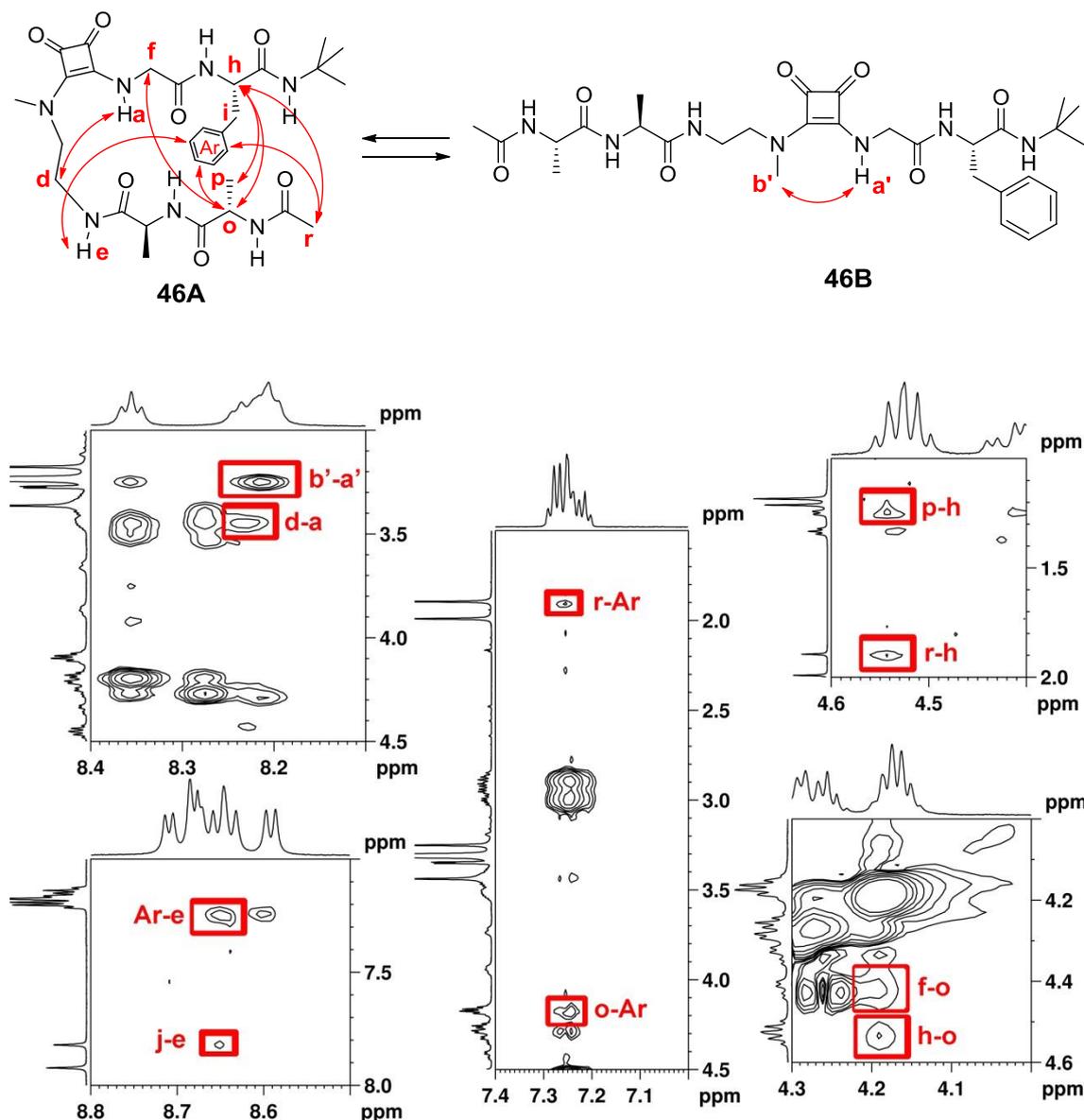


Figura 156. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de **46** (CD_3OH , 6 mM, 233 K).

Así pues, los espectros de RMN 2D del mimético **46** realizados en CD_3CN y CD_3OH han demostrado que la unidad de giro SQ4 induce la conformación tipo horquilla β en un 75 % en acetonitrilo y en un 50 % en MeOH. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en CD_3OH con el mimético de horquilla β paralela **31**, se puede afirmar que el módulo SQ3 es ligeramente más efectivo a la hora de inducir el plegamiento de la estructura que el SQ4, ya que la proporción de especies plegadas para ese compuesto es mayor, 66%. Sin embargo, a diferencia de los otros miméticos de horquilla estudiados, el compuesto **46** ha mostrado una única especie E,Z plegada, sin subespecies derivadas de ella, así como NOEs más típicos de estructuras tipo horquilla β , que indican la disposición extendida, paralela y próxima del esqueleto peptídico.

5.3. Mimético de horquilla β plegable en disolución acuosa 50

5.3.1. Diseño

Conociendo la efectividad de los módulos escuaramídicos de plegamiento desarrollados hasta el momento, se planteó como nuevo objetivo incorporar el nuevo módulo SQ4 en una secuencia peptídica de mayor longitud. Además, el hecho de preparar un pseudopéptido de mayor entidad capaz de formar un mayor número de enlaces de hidrógeno intramoleculares permitiría evaluar la capacidad del nuevo módulo para inducir la formación de una estructura tipo horquilla β en disolución acuosa, un medio aún más competitivo por lo que respecta a la formación de enlaces de hidrógeno que el MeOH. Por lo tanto se diseñó el peptidomimético **50** que incorpora en su secuencia el módulo SQ4 junto con diez aminoácidos naturales, Figura 157.

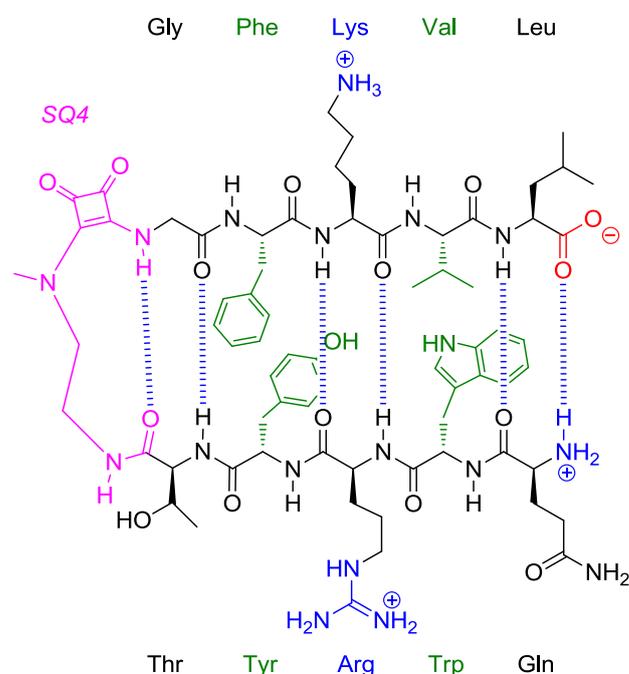


Figura 157. Diseño del mimético de horquilla β paralela **50**. Phe, Tyr, Trp y Val son residuos hidrofóbicos. El grupo amino de Lys, el grupo guanidina de Arg y el grupo amino terminal son centros básicos de la molécula y el grupo carboxilo terminal es un centro ácido.

El diseño de la nueva estructura considera la formación de 6 enlaces de hidrógeno intramoleculares que estabilizan una conformación tipo horquilla β . Esta molécula contiene 4 residuos hidrofóbicos (Phe, Tyr, Trp, Val), dos en cada una de las cadenas enfrentadas, con la intención de que interactúen entre ellos formando un clúster hidrofóbico que favorezca el plegamiento de la estructura en agua, tal como sucede en el extremo C-terminal de la proteína natural GB1 (residuos 41-56). Los residuos básicos Lys y Arg estarán protonados a pH neutro o ligeramente ácido, lo que favorecerá la solubilidad del compuesto en agua y evitará la agregación molecular. El resto de residuos de aminoácido, menos Gly, son residuos típicamente presentes en láminas β naturales, y ninguno de ellos se repite para facilitar la asignación de señales

en los estudios conformacionales. Los extremos de la cadena están en forma de ácido carboxílico y grupo amino, los cuales a pH neutro o ligeramente ácido estarán en sus formas iónicas y podrán interactuar electrostáticamente para estabilizar la conformación tipo horquilla.

5.3.2. Síntesis del pseudopéptido 50

La síntesis del pseudopéptido **50** se planteó como una síntesis peptídica en fase sólida convencional. En la mayoría de los casos este tipo de reacciones implican el uso de DMF como disolvente y Fmoc como grupo protector de amina. En la síntesis de los compuestos **42** y **46** se ha insertado el módulo SQ4 a partir del precursor **44a**. Este compuesto no es adecuado para su uso en un proceso de síntesis en fase sólida en las condiciones indicadas, ya que la amina está protegida con el grupo Boc en lugar de Fmoc, y además, DMF no es un disolvente adecuado para la condensación del éster escuárico con un grupo amino. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo una ligera modificación en la estructura del precursor sintético, para que pudiera incorporarse en este tipo de síntesis sin problemas, Figura 158.

El grupo amino del compuesto **44a** se desprotegió en CH_2Cl_2 - TFA 10 %, y la sal de TFA obtenida se neutralizó con DIPEA. La amina resultante se hizo reaccionar con un equivalente de Fmoc N-hidroxisuccinimida para obtener la amina Fmoc-protégida **44b**. Seguidamente, la monoescuaramida éster **44b** se hizo reaccionar con el aminoácido Gly en una mezcla 50:50 de EtOH y tampón BBS a pH 9.5. La diescuaramida obtenida se neutralizó con HCl para obtener el compuesto **51** con un rendimiento global del 85 %.

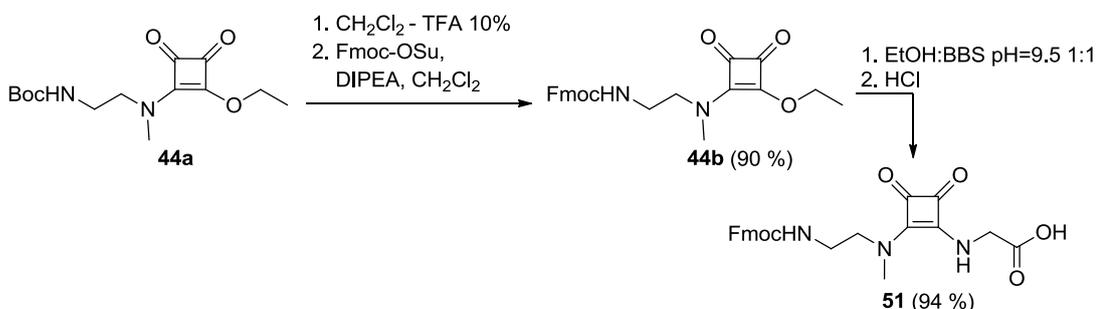


Figura 158. Esquema sintético para el producto **51**.

La diescuaramida **51** contiene el elemento estructural necesario para insertar la unidad de giro SQ4 en una secuencia peptídica, Figura 159. Este compuesto tiene un grupo ácido carboxílico en un extremo y un grupo amino Fmoc-protégido en el otro extremo, como si fuera un aminoácido con el grupo amino protegido, lo que permite que dicho compuesto se use en procedimientos de síntesis en fase sólida.

La síntesis del pseudopéptido **50** se llevó a cabo en la unidad de química combinatoria del Parc Científic de Barcelona, en el grupo de la doctora M. Royo. Para ello se utilizó una síntesis en fase sólida utilizando una resina de 2-clorotritil y química Fmoc estándar. En dicho procedimiento la escuaramida **51** se utilizó como si fuera un residuo de aminoácido más, Figura 159.

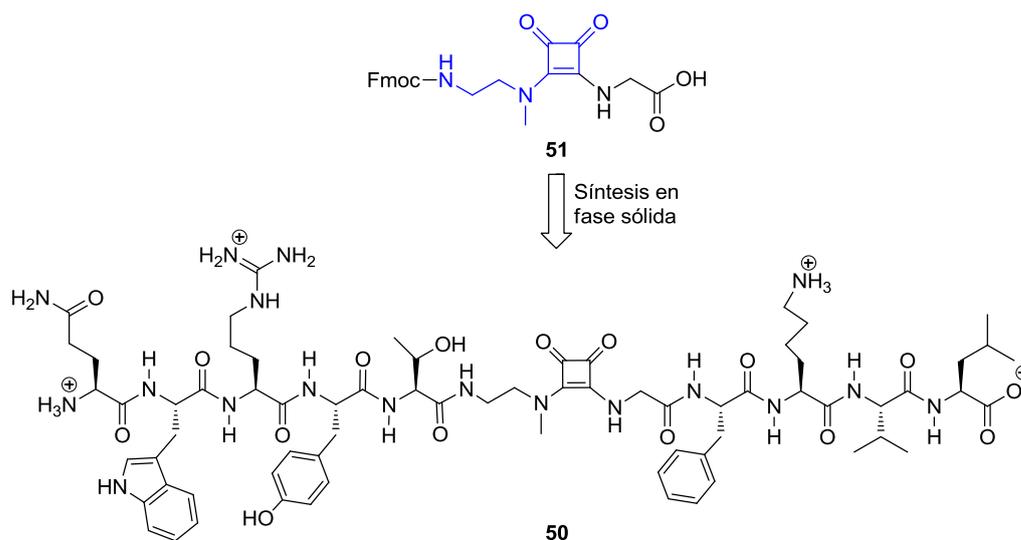


Figura 159. Precursor sintético **51** utilizado en la síntesis en fase sólida del compuesto **50**. En azul se marca el residuo de **44** que constituye el elemento estructural esencial para insertar la unidad de giro SQ4.

5.3.3. Estudio conformacional del mimético de horquilla **50**

Para evaluar la efectividad de la unidad de giro escuaramídica para inducir estructuras tipo horquilla en disolución acuosa, se llevaron a cabo los estudios conformacionales pertinentes mediante experimentos de RMN. A pesar de tratarse de una estructura de tamaño bastante mayor que el resto de compuestos estudiados anteriormente, el espectro de ^1H RMN de **50** presenta un gran número de señales relativamente agudas y resueltas incluso a temperatura ambiente, lo que indica que existen una o varias estructuras de conformación definida en régimen de intercambio lento en la escala de tiempo de la RMN. La existencia de varias especies en disolución con espectros ligeramente diferentes entre sí dificultó la asignación del espectro debido a la gran cantidad de señales observadas en el espectro monodimensional, lo que hace que muchas aparezcan solapadas.

El estudio se llevó a cabo sobre una disolución de **51** (5 mM) en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 95:5 a pH 2.6 y a 278 K. A esta temperatura se pudieron distinguir dos conformaciones mayoritarias presentes en proporciones similares. La reducida velocidad del equilibrio entre las especies existentes hace que todas las señales aparezcan desdobladas en el espectro. Como ya se ha comentado, este hecho dificulta el análisis de los espectros de RMN, aunque también es una ventaja, ya que permite identificar y analizar por separado las dos especies mayoritarias, además de hacer una estimación de la proporción relativa de cada una de ellas.

Mediante un procedimiento análogo al descrito para el mimético de horquilla **31**, se identificaron las dos conformaciones presentes en disolución y se asignaron las correspondientes señales de ^1H RMN. Al pH indicado se asumió que los centros básicos de la molécula están protonados y que el ácido carboxílico del extremo C-terminal está en su forma neutra. Los espectros COSY y TOCSY permitieron identificar los diferentes sistemas de espín, diferenciados según un sistema de colores en las

Figuras 160 y 161. Cada sistema de espín se corresponde con un residuo de α -aminoácido, además del módulo escuaramídico insertado en la estructura (ET).

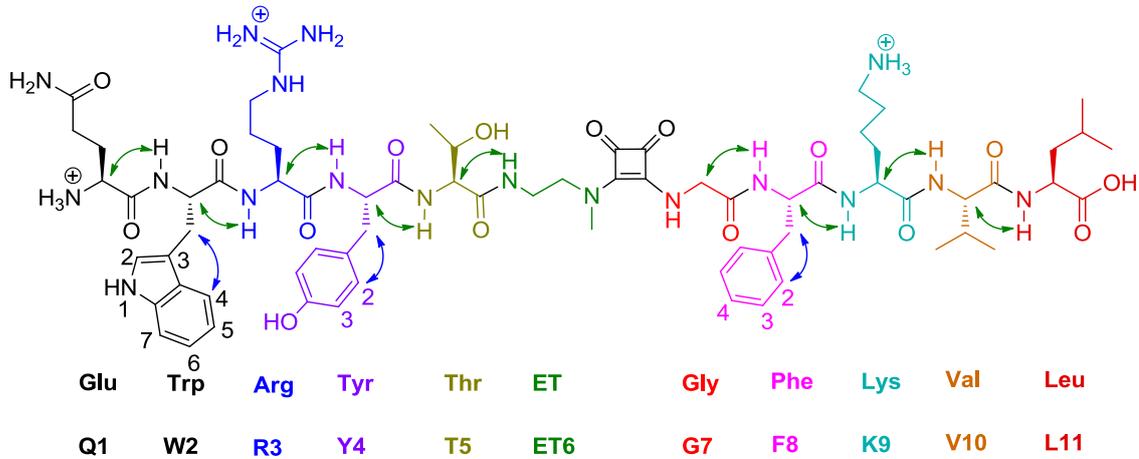


Figura 160. Estructura de **50** donde cada sistema de espín se indica con un color diferente. Se indican los NOEs que permiten relacionar los sistemas de espín vecinos (\leftrightarrow) y los que permiten relacionar los sistemas aromáticos con sus correspondientes residuos de α -aminoácido (\leftrightarrow).

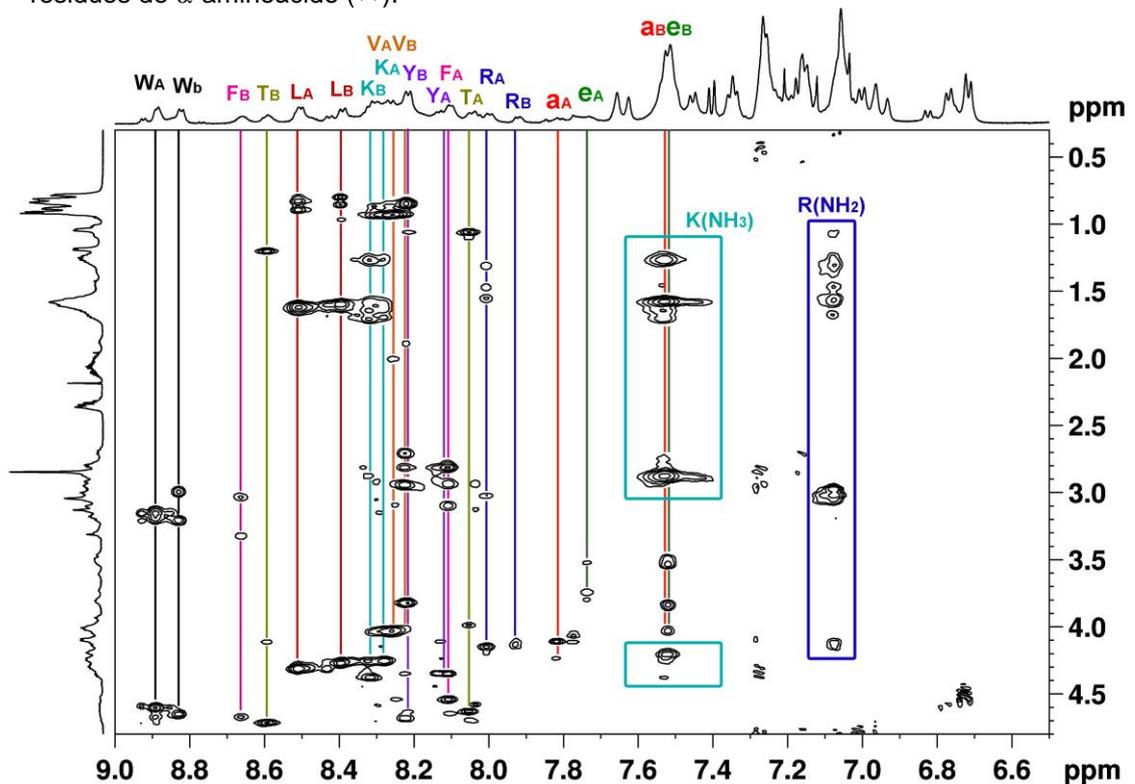


Figura 161. Región NH – alifáticos del espectro TOCSY de una disolución de **50** (5 mM, H₂O:D₂O 95:5, 278 K) a pH 2.60. Las líneas de color reúnen las señales que correlacionan cada NH a un sistema de espín concreto. En esta figura se utiliza la nomenclatura de una letra para referirse a los residuos de aminoácido.

Los residuos vecinos correspondientes a la misma especie se relacionaron a partir de los típicos NOEs NH--CH α , Figura 160, y las dos cadenas enlazadas al anillo de escuarato se relacionaron mediante NOEs intercadena. Además, los tres sistemas aromáticos de la molécula pudieron asignarse inequívocamente a los residuos Trp, Tyr y Phe en base a los NOEs (CH₂) β --Ar indicados en azul en la Figura 160. De esta

forma se pudieron determinar todas las señales de ^1H RMN de las dos especies **50A** y **50B**, Tabla 14.

Tabla 14. Desplazamientos químicos de ^1H RMN de **50** ($\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 95:5, 5 mM, 278 K) a pH 2.60.

Confórmero 50A:

AA	NH	H α	H β	Otros
L11	8.505	4.304	1.612	H γ :1.612 H δ :0.0888/0.824
V10	8.255	4.027	1.999	H γ :0.920
K9	8.271	4.247	1.681/1.624	H γ :1.257 H δ :1.575 H ϵ : - NH $_3$: -
F8	8.104	4.532	3.084/2.928	Ar(2):7.164 Ar(3):7.279 Ar(4):7.367
G7	a: 7.766	4.056	-	
Et6	e: 7.733	d: 3.789/3.735	c: 3.518/3.279	b: 3.052
T5	8.047	4.622	3.975	H γ :1.050
Y4	8.105	4.338	2.799	Ar(2):7.057 Ar(3):6.780
R3	8.000	4.142	1.543/1.461	H γ :1.306 H δ :3.006 NH ϵ :7.087 NH(Ar):10.06 Ar(4):7.530 Ar(5):7.056
W2	8.887	4.592	3.183/3.144	Ar(6):7.189 Ar(7):7.456
Q1		4.010	2.059/2.028	H γ :2.374 NH $_2$: -

Confórmero 50B:

AA	NH	H α	H β	Otros
L11	8.390	4.258	1.588	H γ :1.588 H δ :0.847/0.722
V10	8.215	3.815	1.883	H γ :0.827
K9	8.314	4.367	1.706/1.645	H γ :1.265 H δ :1.573 H ϵ :2.874 NH $_3$:7.533
F8	8.658	4.665	3.318/3.026	Ar(2):7.277 Ar(3):7.367
G7	a: 7.515	4.197	-	
Et6	e: 7.512	d: 3.826/3.526	c: 4.024/3.481	b:2.852
T5	8.592	4.706	4.104	H γ :1.194
Y4	8.22	4.677	2.933/2.696	Ar(2):7.013 Ar(3):6.733
R3	7.924	4.105	1.530/1.435	H γ :1.276 H δ :2.926 NH ϵ :7.081 NH(Ar):10.12 Ar(4):7.358 Ar(5):7.036
W2	8.826	4.646	3.199/2.985	Ar(6):7.168 Ar(7):7.403 NH(Ar):10.13 Ar(4):7.541 Ar(5):7.071
W2'	8.923	4.581	3.204/3.145	Ar(6):7.225 Ar(7):7.506
Q1		3.936	2.059/2.028	H γ :2.373 NH $_2$: -
Q1'		4.021	2.107/2.087	H γ :2.374 NH $_2$: -

En la Tabla 15 se muestran los desplazamientos químicos de cada NH en las dos especies **50A** y **50B**, y la diferencia entre éstos. Las mayores diferencias se observan para NH α , NH(Phe), NH ϵ y NH(Thr), que son los protones NH más cercanos a la unidad de giro SQ4. Este hecho sugiere que las dos especies indicadas son dos confórmeros con un patrón de enlace de hidrógeno diferente, principalmente en la región cercana al giro, Figura 162. Las señales de NH(Phe) y NH(Thr) aparecen 0.55 ppm desapantalladas para la especie **50B** respecto a la especie **50A**, lo que sugiere que estos núcleos están formando un fuerte enlace de hidrógeno intramolecular en la especie **50B**, mientras que en la otra especie están expuestos al disolvente. Por su parte el protón NH α aparece 0.25 ppm desapantallado en la especie **50A** debido a que

en dicha especie forma un enlace de hidrógeno intramolecular que se debilita en la especie **50B**, a causa de la interacción que forma el NH(Phe) con el mismo carbonilo. Además, la señal de NH_e aparece 0.22 ppm a campo bajo en la especie **50A**, lo que podría ser debido a que en esta especie esté formando un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo del residuo de Thr, una interacción irrelevante para nuestro estudio.

Tabla 15. Desplazamientos químicos de los protones NH (ppm) de **50** (H₂O:D₂O 95:5, 5 mM, 278 K).

NH	50A	50B	$\Delta\delta$
Leu	8.505	8.390	-0.115
Val	8.255	8.215	-0.040
Lys	8.271	8.314	0.043
Phe	8.104	8.658	0.554
a	7.766	7.515	-0.251
e	7.733	7.512	-0.221
Thr	8.047	8.592	0.545
Tyr	8.104	8.220	0.116
Arg	8.000	7.924	-0.076
Trp	8.887	8.826	-0.061

$${}^a\Delta\delta(\text{NH}) = \delta(\text{NH}_{50\text{B}}) - \delta(\text{NH}_{50\text{A}})$$

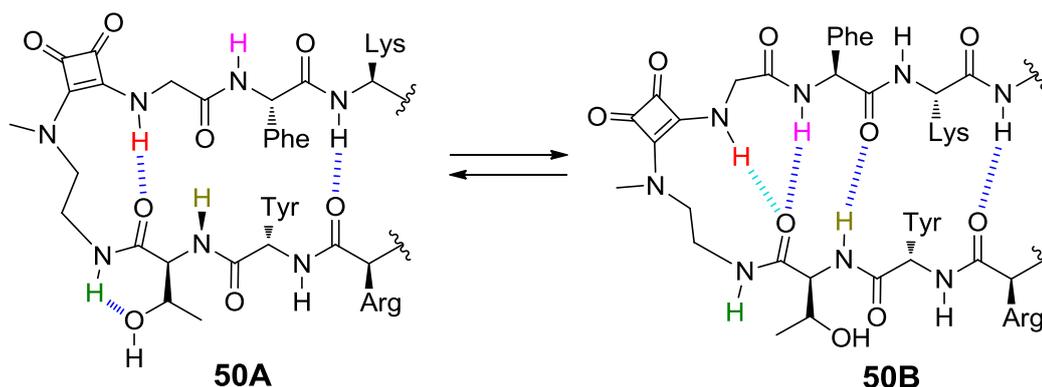


Figura 162. Patrones de enlace de hidrógeno propuestos para la región cercana al giro de las especies **50A** y **50B** en base a los desplazamientos químicos de los NH.

El análisis de los espectros indica que en el conformero **50A** la escuaramida está en conformación E,Z, de manera que se forma un enlace de hidrógeno intramolecular que da lugar a un ciclo de diez miembros análogo a un giro β y enfrenta a las dos cadenas peptídicas acopladas a la unidad de giro, interaccionando éstas entre sí para dar lugar a una estructura tipo horquilla. En cuanto al conformero **50B**, la escuaramida también está en su conformación E,Z, de manera que el carbonilo de Thr interacciona con NH_a y NH(Phe) y se genera un ciclo de 13 miembros análogo a un giro α natural y del cual se prolongan dos cadenas peptídicas que interaccionan entre ellas para dar lugar a otra estructura tipo horquilla con un patrón de enlace de hidrógeno completamente diferente al de la primera.

Para evaluar la relevancia del estado de protonación en las especies coexistentes en disolución se realizó un estudio similar a partir de una disolución de **50** (5 mM) a un pH ligeramente ácido de 5.25. Para ello se preparó una disolución en H₂O:D₂O 95:5

que contenía el tampón $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{CD}_3\text{COO}^-$ 100mM, y a 278 K. En estas condiciones de pH los grupos básicos de la molécula estarán protonados y el grupo ácido estará desprotonado, de forma que podrá formarse una interacción electrostática entre el grupo N-terminal y el grupo C-terminal. En la Figura 163 se observa la superposición de los espectros TOCSY de la muestra a pH 2.60 (negro) y a pH 5.25 (rosa). Esta figura nos permite observar la gran diferencia de desplazamientos químicos entre los protones NH de Leu (L11) a diferentes pH. Un análisis más exhaustivo de los espectros permite identificar diferencias de desplazamiento químico en los protones de los residuos Leu y Val. En la Tabla 16 se muestran los valores de desplazamiento químico de esos núcleos a pH 5.25. La comparación de los espectros obtenidos a dos pHs distintos muestra que los únicos protones afectados por la desprotonación del grupo ácido carboxílico son los que se encuentran en los residuos del extremo C-terminal. Ello se debe al apantallamiento provocado por la presencia de la carga negativa. Esta observación indica que los confórmeros tipo horquilla propuestos no requieren la interacción electrostática del extremo para mantenerse.

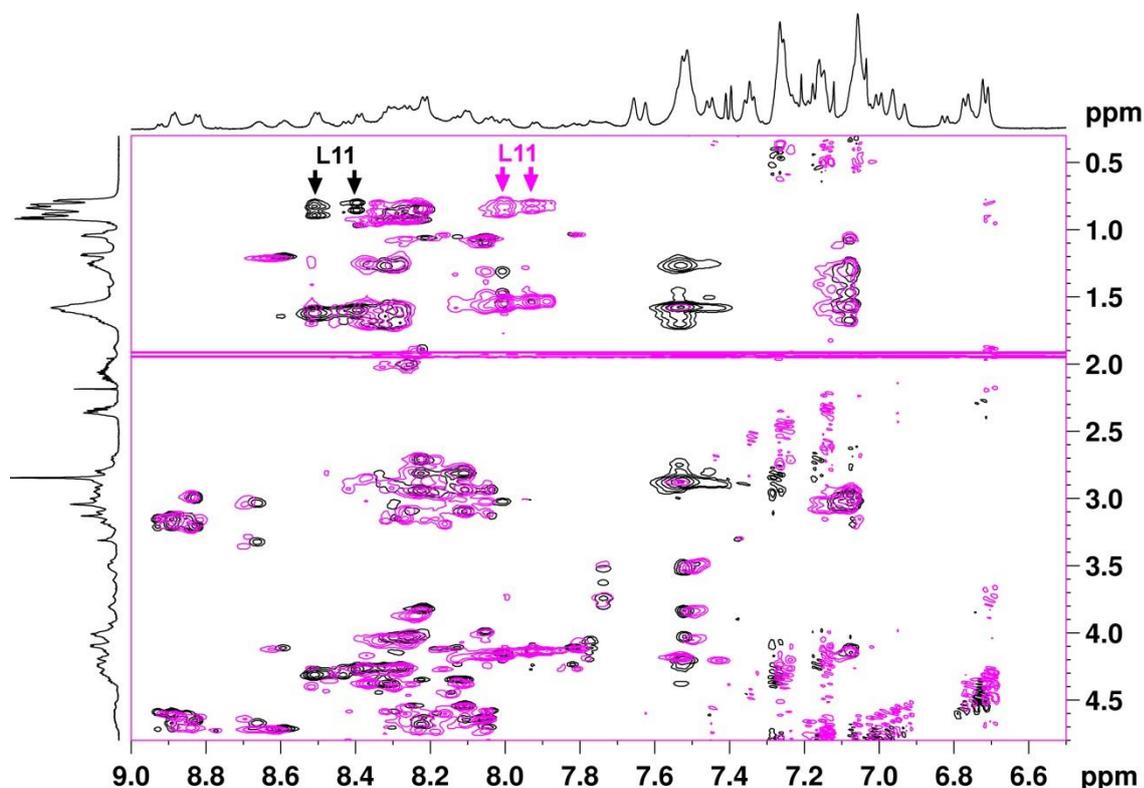


Figura 163. Superposición de la región NH – alifáticos de los espectros de TOCSY para dos disoluciones de **50** (5 mM) en $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 95:5 a 278 K a diferentes pH. Negro (pH = 2.60) y rosa (pH = 5.25).

Tabla 16. Desplazamientos químicos de ^1H RMN (ppm) de **50** ($\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 95:5; 5 mM, 278 K) a pH 5.25. Se muestran solo los valores que difieren de los observados a pH 2.60.

Confórmero 50A:				
AA	NH	Hα	Hβ	Otros
L11	8.013	4.145	1.529	H γ :0.861
V10	8.268	4.032	2.001	H γ :0.9
V10'	8.338	4.042	2.006	H γ :-

Confórmero 50B:				
AA	NH	Hα	Hβ	Otros
L11	7.937	4.107	1.521	H γ :1.521 H δ :8.829/0.788
V10	8.243	3.859	1.892	H γ :0.827/0.792

Para confirmar la estructura de los dos confórmeros tipo horquilla propuestos **50A** y **50B**, se analizaron los espectros NOESY registrados a pH 2.60 y 5.25, Figuras 165 y 166, respectivamente. Además, también se realizaron experimentos en las mismas condiciones de concentración, pH y temperatura que las anteriores, utilizando como disolvente D_2O 100%. En D_2O desaparecen las señales de NH por intercambio con los protones del disolvente lo cual permitió analizar con mayor comodidad la porción aromática del espectro. En la Figura 167 se muestran regiones seleccionadas del espectro en D_2O a pH 5.25.

Las señales marcadas en las Figuras 165, 166 y 167 confirman la presencia de los confórmeros tipo horquilla propuestos anteriormente, tal como se representa en la Figura 164. Para la especie **50A** se observaron las señales $\text{NH}\alpha\text{--}(\text{CH}_2)\text{c}$ y $\text{NH}\alpha\text{--}(\text{CH}_2)\text{d}$ indicativas de la forma E,Z de la escuaramida, tal como sucedía con los otros compuestos que contienen la unidad de giro SQ4. Las señales $\text{NH}(\text{Thr})\text{--CH}\alpha(\text{Phe})$ y $\text{CH}\alpha(\text{Tyr})\text{--CH}\alpha(\text{Phe})$ son contactos típicos entre el esqueleto de las cadenas β de una estructura tipo horquilla β , y junto a las señales $\text{CH}\beta(\text{Tyr})\text{--CH}\alpha(\text{Phe})$ y $\text{NH}(\text{Phe})\text{--Ar}2(\text{Tyr})$ indican la proximidad de los residuos Phe y Tyr enfrentados en la zona próxima a la unidad de giro de la conformación tipo horquilla β objetivo. Además, los NOEs $\text{NH}(\text{Thr})\text{--CH}\beta(\text{Phe})$, $\text{NH}(\text{Arg})\text{--NH}(\text{Val})$, $\text{NH}(\text{Leu})\text{--Ar}7(\text{Trp})$ y $\text{CH}\alpha(\text{Leu})\text{--Ar}4(\text{Trp})$, observados a pH 5.25, también indican proximidades entre las dos cadenas peptídicas a lo largo de toda la estructura de horquilla.

En cuanto a la especie **50B** se han observado los picos de cruzamiento $\text{NH}\alpha\text{--NH}(\text{Phe})$ y $\text{NH}(\text{Phe})\text{--NH}(\text{Thr})$ que confirman la formación del ciclo de 13 miembros análogo a un giro α . Las señales entre las cadenas laterales de Tyr, Trp y Lys, tales como $\text{Ar}2(\text{Tyr})\text{--CH}\alpha(\text{Lys})$, $\text{Ar}3(\text{Tyr})\text{--CH}\alpha(\text{Lys})$, $\text{Ar}2(\text{Tyr})\text{--CH}\beta(\text{Lys})$, $\text{Ar}2(\text{Tyr})\text{--CH}\delta(\text{Lys})$, $\text{Ar}4(\text{Trp})\text{--CH}\delta(\text{Lys})$, $\text{Ar}5(\text{Trp})\text{--CH}\beta(\text{Lys})$ y $\text{Ar}7(\text{Trp})\text{--CH}\alpha(\text{Lys})$, indican la proximidad entre dichas cadenas laterales, tal como contempla el confórmero tipo horquilla planteado. Además, también se han observado las señales intercadena $\text{CH}\alpha(\text{Phe})\text{--Ar}2(\text{Tyr})$, $\text{CH}\alpha(\text{Phe})\text{--NH}(\text{Arg})$, $\text{Ar}7(\text{Trp})\text{--NH}(\text{Val})$, $\text{NH}(\text{Val})\text{--CH}\beta(\text{Trp})$ y $\text{NH}(\text{Arg})\text{--CH}\gamma(\text{Leu})$, que confirman una vez más la conformación tipo horquilla.

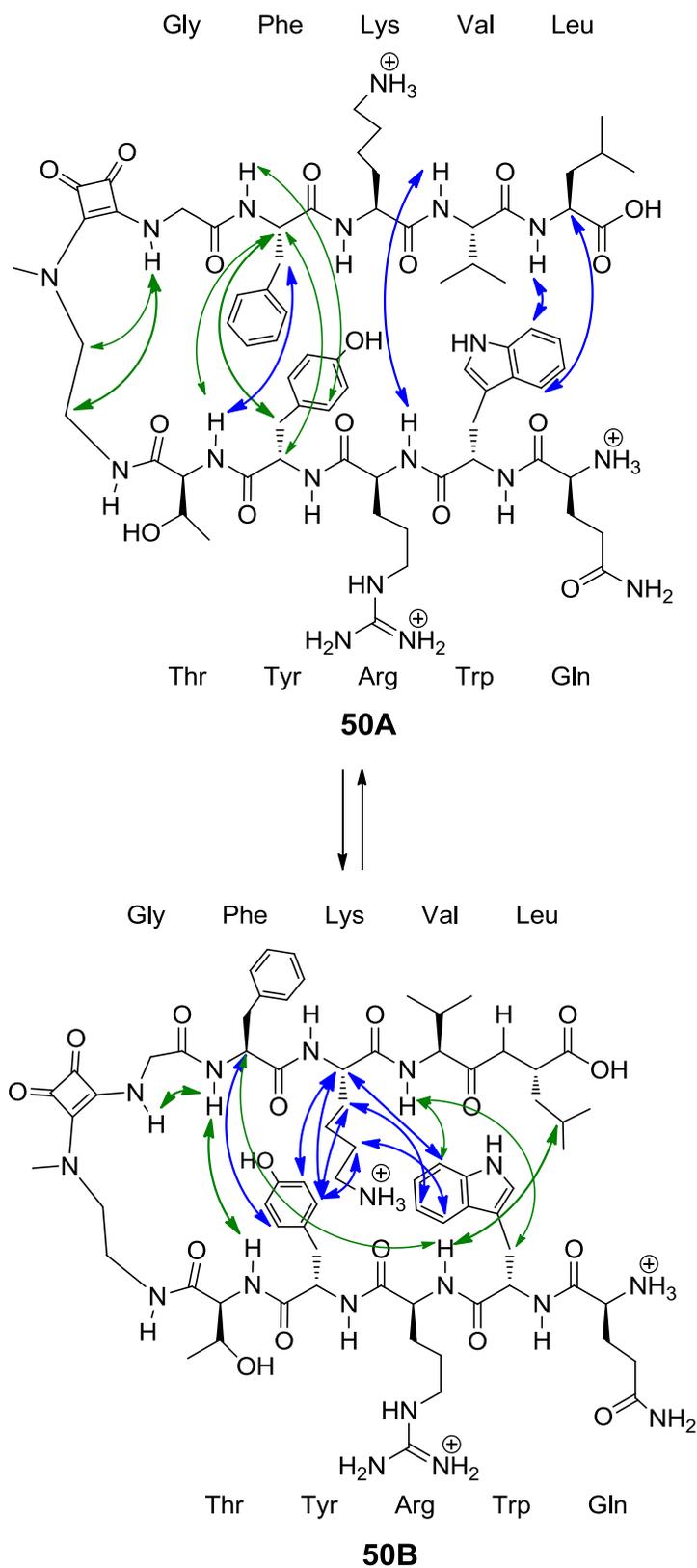


Figura 164. Noes relevantes observados en los experimentos de NOESY de **50** (5 mM) en H₂O:D₂O 95:5 y en D₂O, a diferentes pH. Verde (pH = 2.60) y azul (pH = 5.25).

5. Inserción de unidades de giro escuaramídicas en secuencias peptídicas

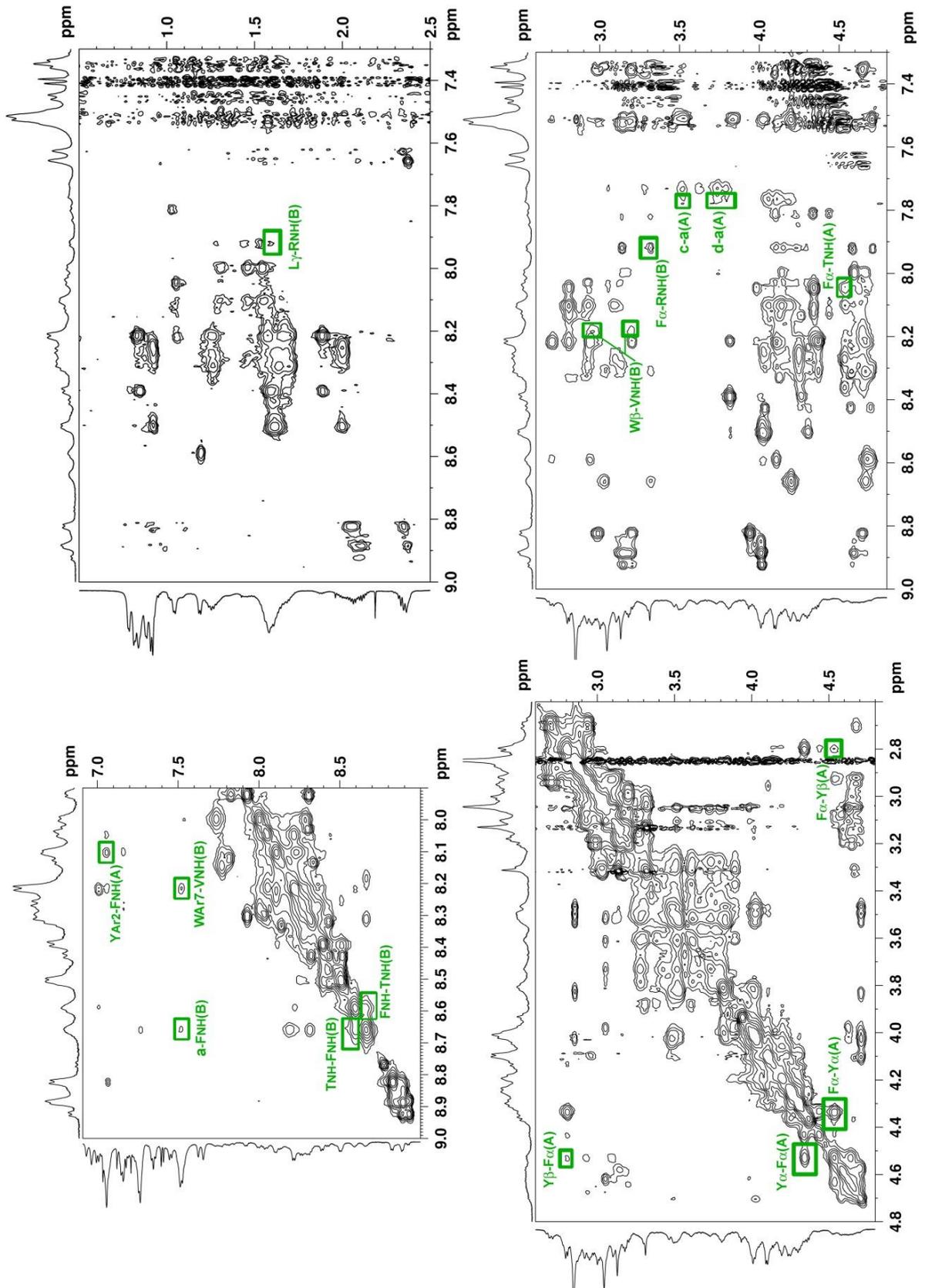


Figura 165. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de una disolución de **50** (5 mM, H₂O:D₂O 95:5, 278 K) a pH 2.60.

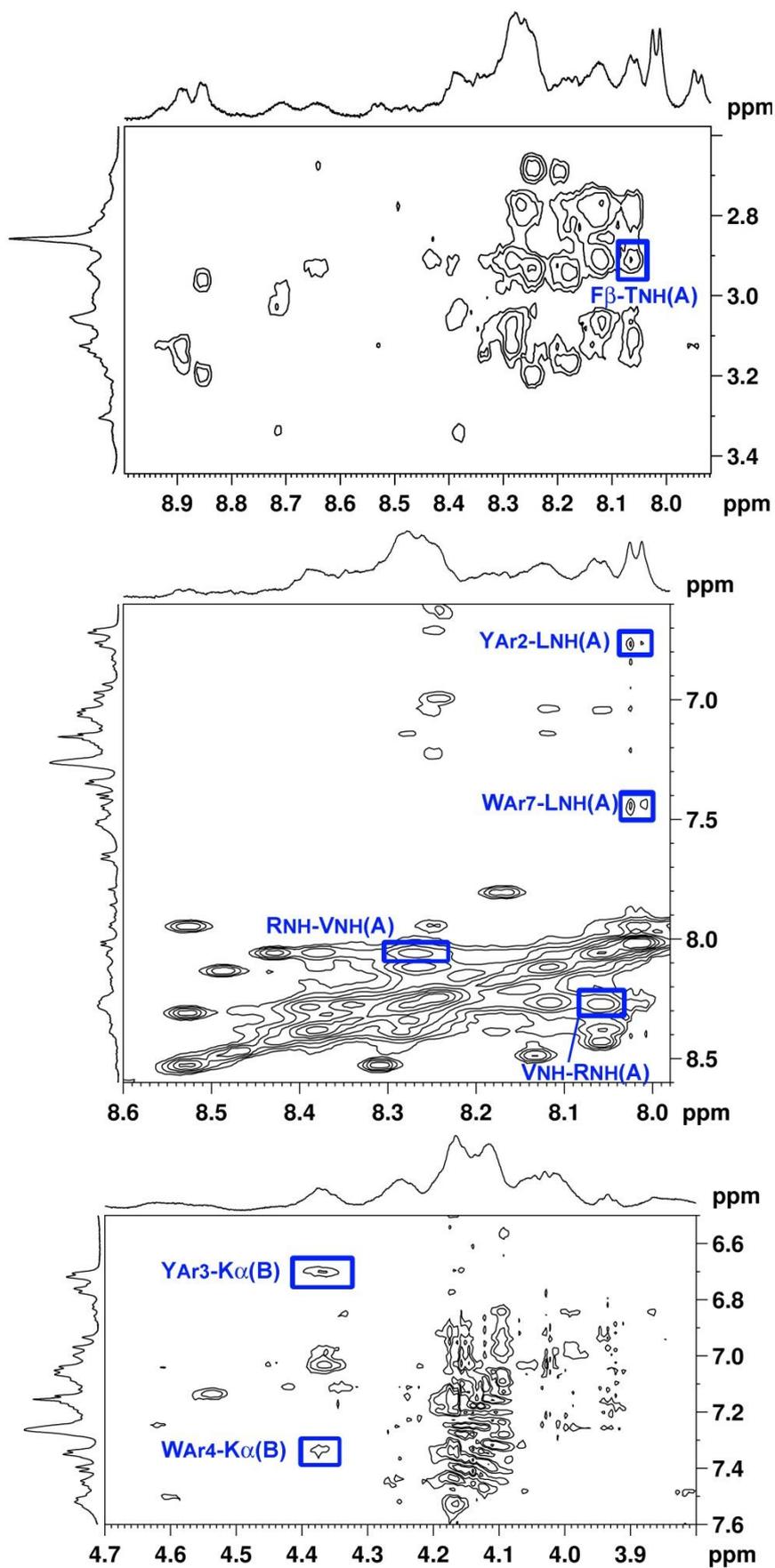


Figura 166. Regiones seleccionadas del espectro NOESY de una disolución de **50** (5 mM, H₂O:D₂O 95:5, 278 K) a pH 5.25.

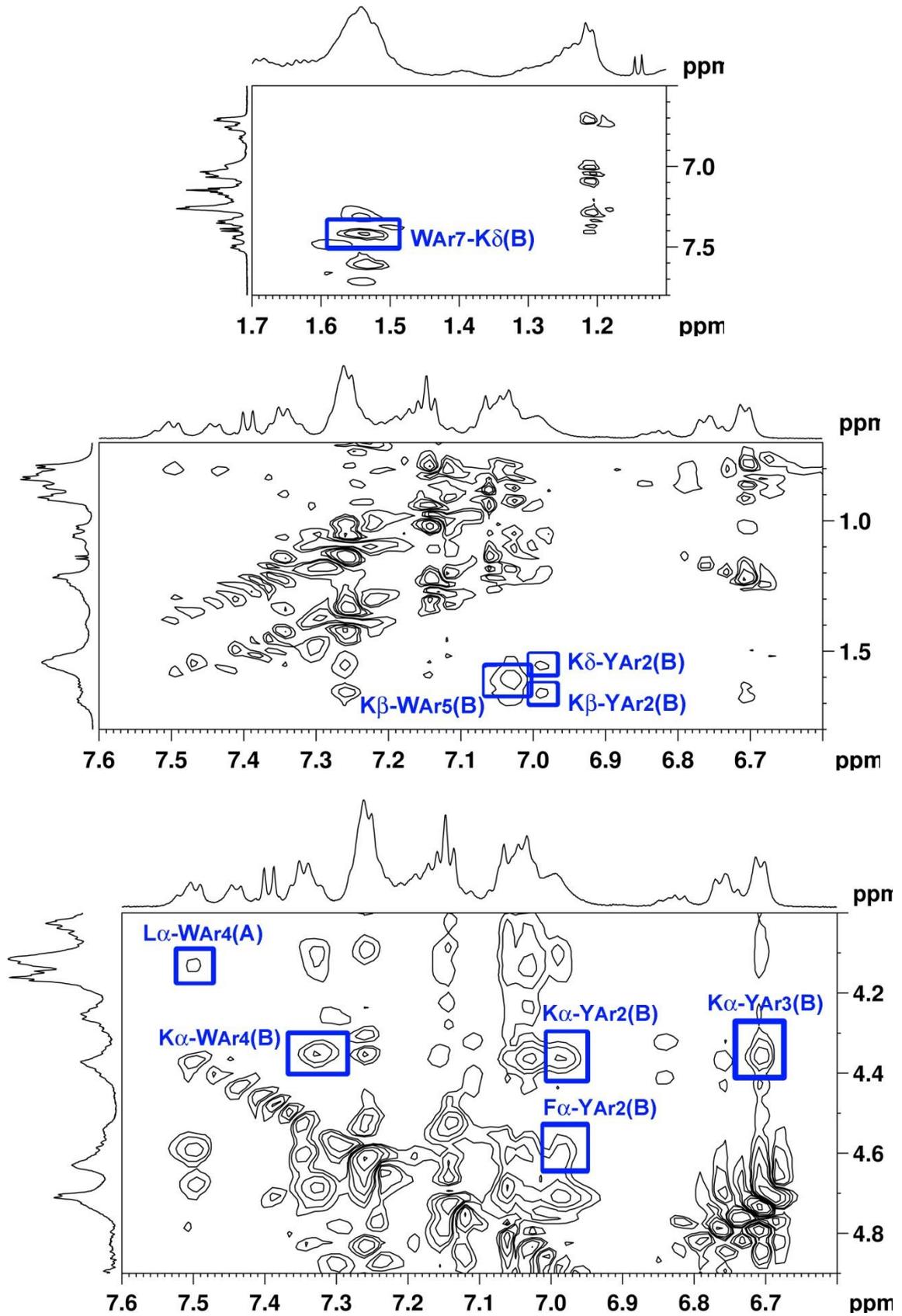


Figura 167. Regiones seleccionadas del espectro de NOESY de una disolución de 50 (5 mM, D₂O, 278 K) a pH 5.25.

Para evaluar la exposición al disolvente por parte de los protones NH y confirmar los dos tipos de giro caracterizados se realizó un experimento adicional. En este caso se preparó una disolución de **50** en H₂O y una vez disuelto el compuesto se añadió D₂O de forma que finalmente se obtuvo una muestra de concentración 5 mM en una mezcla H₂O:D₂O 40:60. Se registró el espectro de ¹H RMN de la muestra en el instante de su preparación y al cabo de 24 horas, momento en que ya se había alcanzado el equilibrio de intercambio H-D entre el disolvente y todos los protones NH del compuesto, Figura 168. El análisis de ambos espectros indica que la intensidad de las señales de los NH(Trp), NH(Tyr) y NHe no se altera. Por otra parte el resto de señales de NH de amida van disminuyendo de intensidad a lo largo de las 24 h siguientes a la preparación de la muestra. Ello se debe a que los núcleos NH(Trp), NH(Tyr) y NHe están expuestos al disolvente tanto en el confórmero **50A** como en el **50B** y por tanto se intercambian rápidamente con las moléculas de agua. Por su parte, el resto de NH están implicados en la formación de un enlace de hidrógeno en alguno de los dos confórmeros, lo que los mantiene parcialmente aislados del medio, ralentizando el intercambio con el agua. En términos generales los NH escuaramídicos son más ácidos que los de amida, por lo que la velocidad de intercambio es más elevada para los primeros. Sin embargo se ha observado que la señal de NHa del confórmero **50A** disminuye más lentamente que la del confórmero **50B**, lo que corrobora que el enlace de hidrógeno que da lugar al ciclo de diez miembros tipo giro β es más fuerte para el primer confórmero que para el segundo.

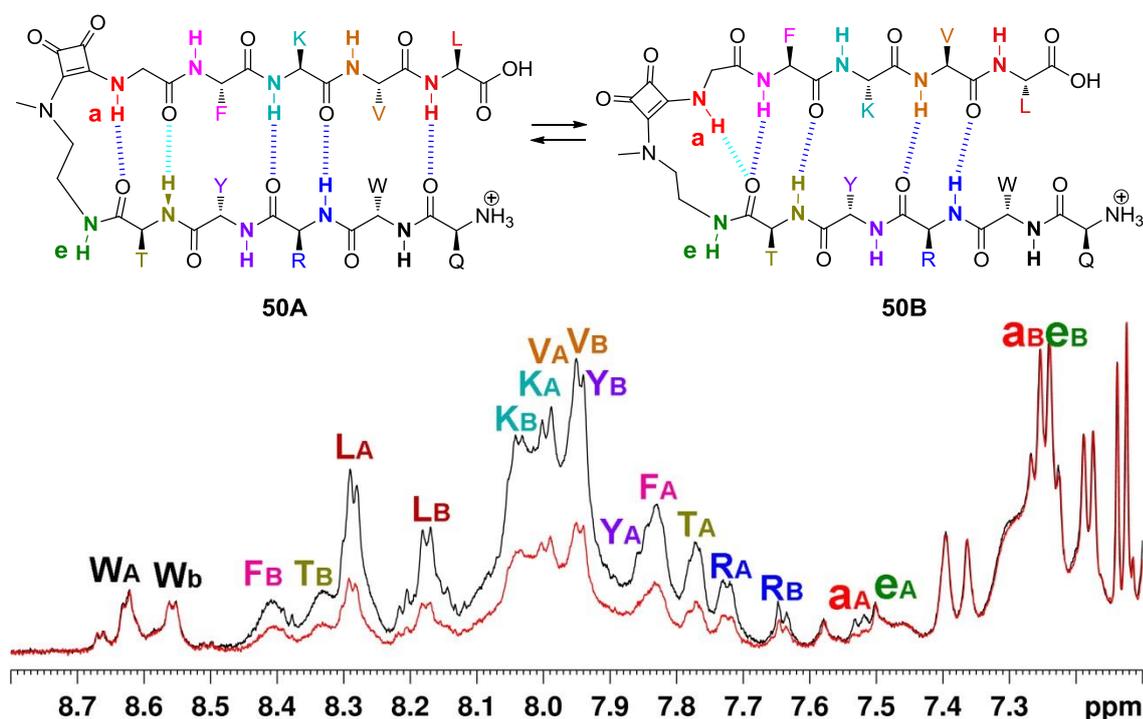


Figura 168. Espectros ¹H RMN de **50** (5 mM, H₂O:D₂O 40:60, 278 K) a pH 2.60, a t = 0 h (negro) y t = 24 h (rojo) después de la adición de D₂O.

Además de los estudios realizados por RMN, el espectro de dicroísmo circular realizado con una muestra de **50** (0.05 mM) en H₂O a pH = 4.96 también mostró evidencias de la presencia de estructuras tipo horquilla β en disolución, al observarse

una banda negativa a 210 nm,¹⁷³ Figura 169. La presencia de aminoácidos aromáticos en la estructura puede dar perturbaciones en el espectro de dicroísmo circular de una estructura de horquilla, como la banda positiva que se observa a 228 nm.¹⁷⁴

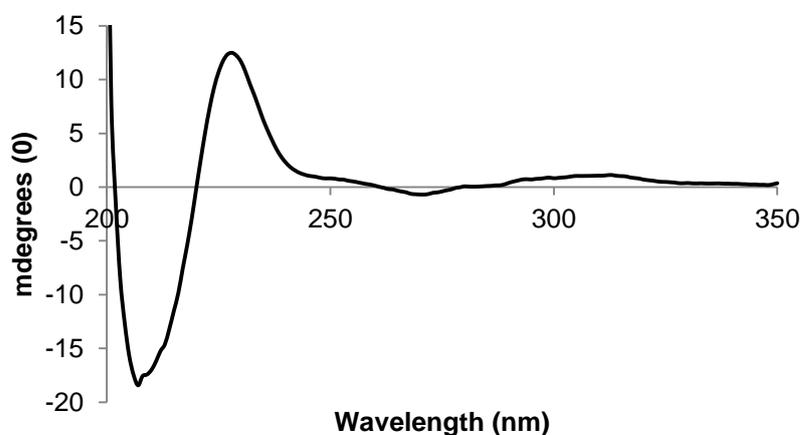


Figura 169. Espectro experimental de dicroísmo circular (media de 5 medidas + suavizado) de **50** (0.05 mM) en H₂O.

Los estudios realizados en disolución acuosa con el compuesto **50** han demostrado la efectividad del módulo *SQ4* para inducir la formación de estructuras tipo horquilla β . La región estructural de giro en el confórmero **50A** está constituida por el módulo mimético de giro β *SQ4*, mediante la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que da lugar a un ciclo de diez miembros. Por otra parte, en el confórmero **50B** se establece un segundo enlace de hidrógeno intramolecular que genera un ciclo de trece miembros análogo a un giro α . La interconversión entre los dos confórmeros es suficientemente lenta como para distinguirlas en los espectros de RMN. El equilibrio conformacional implica una reordenación de todas las interacciones de tipo enlace de hidrógeno establecidas a lo largo de la cadena, ya que cambia la posición relativa de todos los enlaces peptídicos y las cadenas laterales de los residuos.

¹⁷³ Típicamente, las estructuras de horquilla β dan lugar a una banda de dicroísmo circular alrededor de 210 nm y las estructuras tipo hélice α dan lugar a dos bandas a 208 y 222 nm.

¹⁷⁴ Mahalakshmi, R.; Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L.; Balaram, P. *Chem. Bio. Chem.* **2005**, 6, 2152.

5.4. SQ4 como módulo preorganizador en síntesis de macrociclos: Mimético RGD macrocíclico 53

5.4.1. Diseño

Una vez evaluada la capacidad de los módulos de giro escuaramídicos para inducir el plegamiento de estructuras tipo horquilla β , se estableció como siguiente objetivo estudiar la capacidad del módulo SQ4 para inducir la preorganización de estructuras pseudopeptídicas lineales en disolventes orgánicos y favorecer reacciones de macrociclación en los extremos de las mismas. Tal como se ha comentado en el Capítulo 1, de introducción, en la síntesis en disolución de estructuras macrocíclicas una de las estrategias habituales que se siguen para favorecer el paso de macrociclación es la preorganización de precursores lineales mediante el uso de módulos de plegamiento insertados en su estructura. Estos módulos son capaces de inducir el plegamiento de la molécula y aproximar así los centros entre los que se va a formar el enlace que cerrará el macrociclo, aumentando el rendimiento de la reacción.

Para realizar los estudios de ciclación se decidió diseñar un mimético RGD macrocíclico, cuya actividad biológica pudiera ser evaluada una vez sintetizado el compuesto. Una táctica habitual para el diseño de antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ es la inserción de la secuencia RGD y de un módulo estructural de giro en una estructura macrocíclica, de forma que la rigidez inherente del módulo utilizado condicione la conformación de todo el macrociclo, induciendo la formación de un giro γ donde Gly sea el residuo central, tal como sucede en α (RGDfV), Figura 170 (a) y (b).^{90,175,176}

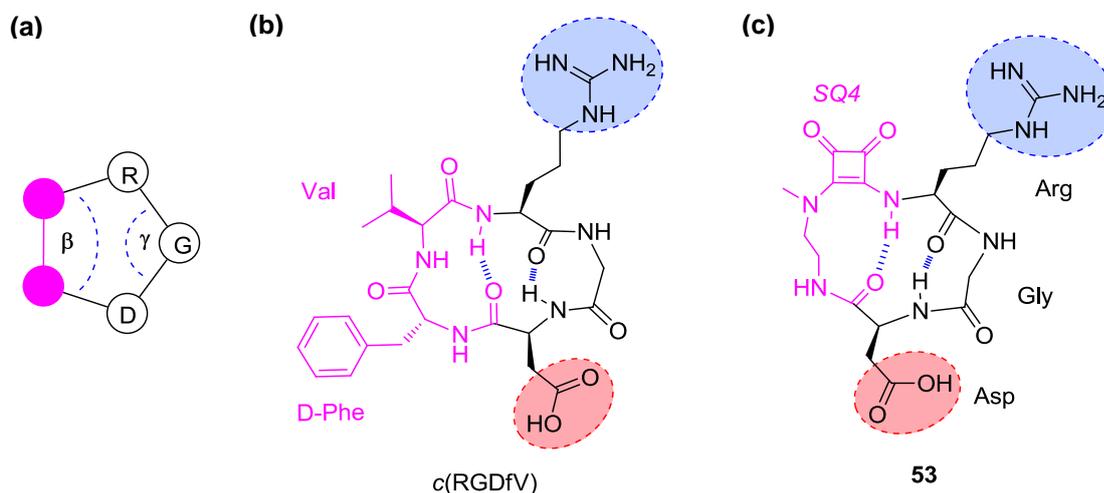


Figura 170. Diseño del mimético RGD macrocíclico **53**. (a) Diseño general. (b) Antagonista de la integrina $\alpha_v\beta_3$. (c) Macrociclo RGD-escuaramídico **53**.

De esta forma, el mismo módulo de giro que preorganiza la estructura para favorecer la reacción de macrociclación, puede fijar la conformación del compuesto

¹⁷⁵ Haubner, R.; Schmitt, W.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881.

¹⁷⁶ Urman, S.; Gaus, K.; Yang, Y.; Strijowski, V.; Sewald, N.; De Pol, S.; Reiser, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3976.

final en disolución una vez sintetizado. Por todo ello y como prueba de concepto, se diseñó el peptidomimético RGD macrocíclico **53**, Figura 170 (c). Como se observa en la figura, la estructura de este macrociclo consta de la unidad de giro SQ4 unida al tripeptido NH₂-Arg-Gly-Asp-COOH por sus dos extremos. De esta forma se obtiene un macrociclo de 15 miembros análogo a ciclengitide o c(RGDfV), miméticos de la estructura secundaria que adopta la secuencia RGD al interactuar con la integrina $\alpha_v\beta_3$. La estructura del macrociclo **53**, no solo guarda similitud con el c(RGDfV) en cuanto a tamaño y grupos funcionales situados sobre el esqueleto macrocíclico sino que también permite la formación de dos enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el NH escuaramídico y el carbonilo del Asp, y entre el NH de Asp y el carbonilo de la Arg, dando lugar a un giro γ centrado en el residuo de Gly y fijando así una conformación concreta de la secuencia Arg-Gly-Asp.

Para sintetizar el macrociclo **53** se diseñó el precursor lineal **57**. Este precursor contiene el módulo de giro SQ4 unido al extremo amino terminal del dipéptido H₂N-Arg-Gly-CO₂H y al grupo carboxilo del aminoácido Asp. De esta forma el pseudopéptido **57** contiene la unidad de giro que puede inducir su plegamiento, preorganizando la estructura para disponer los grupos amino y carboxilo de los extremos próximos y facilitar la formación del macrociclo, Figura 171. Dicha preorganización de la estructura lineal favorecerá la reacción intramolecular frente a la intermolecular, aumentando el rendimiento de la reacción de macrociclación. Adicionalmente la formación de este tipo de estructuras plegadas reduce la formación de agregados moleculares, lo que incrementa la solubilidad de los productos de partida.

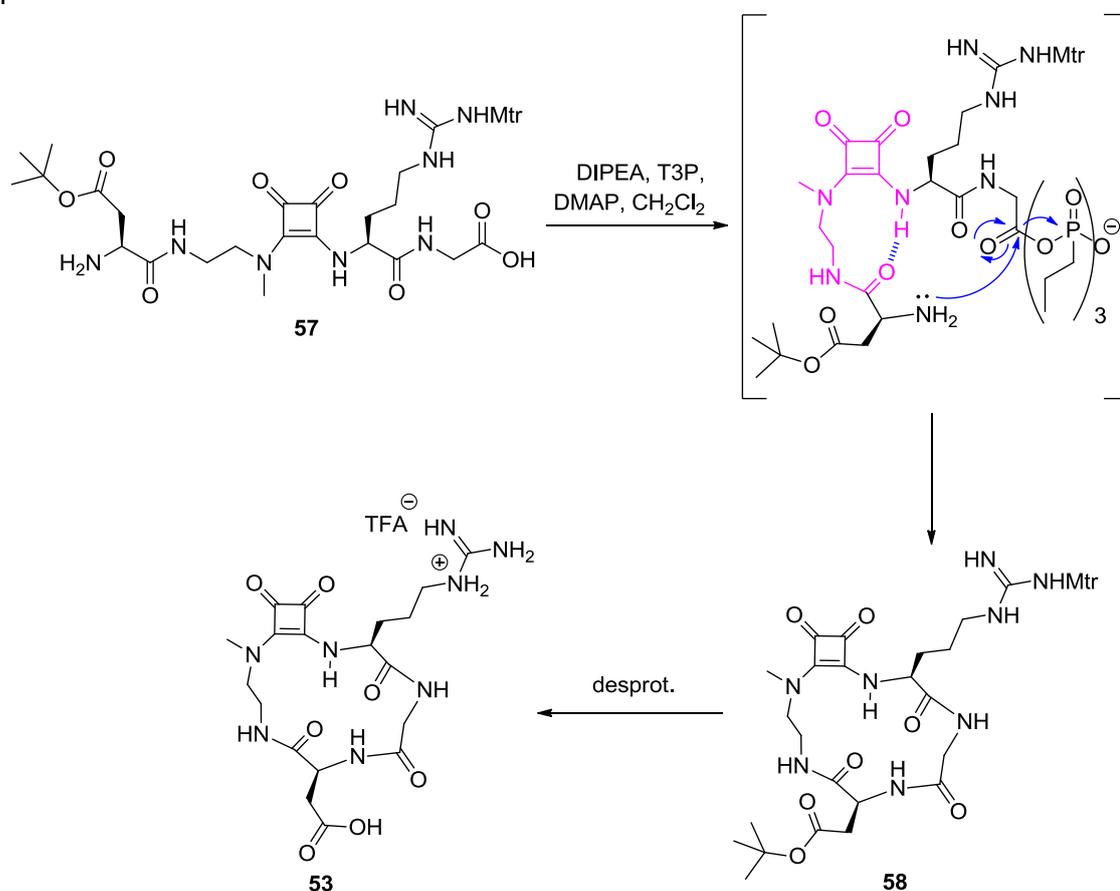


Figura 171. Macrociclación del escuaramidopéptido **57**, precursor del mimético RGD **53**.

5.4.1. Síntesis del macrociclo pseudopeptídico 53

A la hora de plantear la ruta sintética para obtener el precursor lineal **57** es necesario elegir los grupos protectores tanto permanentes como no permanentes. Habitualmente en una síntesis peptídica se utilizan grupos protectores ortogonales. Concretamente, la síntesis de macrociclos RGD implica el uso de grupos protectores ortogonales que puedan desprotegerse en tres tipos de condiciones diferentes. Las cadenas laterales de Arg y Asp suelen protegerse con grupos que se eliminan en condiciones ácidas, como es el caso del grupo carboxilo de Asp en forma de *tert*-butiléster o el grupo guanidino de Arg sulfonilado (Mtr, Pbf, ...). Por tanto, para construir la cadena principal se deben utilizar grupos protectores lábiles en dos tipos de condiciones diferentes entre ellas y diferentes a las condiciones ácidas que desprotegerán los grupos de las cadenas laterales. Por ejemplo, partiendo de un aminoácido con el grupo carboxilo principal en forma de benziléster se podrá crecer la cadena mediante la adición consecutiva de aminoácidos Fmoc-protegidos, hasta adicionar finalmente un módulo estructural XX Cbz-protegido, Figura 172. De esta forma, en los pasos de desprotección previos a un acoplamiento peptídico el grupo Fmoc se desprotegerá en condiciones básicas, y los grupos Cbz y benziléster, que actúan como grupos protectores de los extremos de la estructura lineal N-terminal y C-terminal respectivamente, se desprotegerán en condiciones de reducción para rendir el precursor lineal necesario para la ciclación. Finalmente, después de la macrociclación, se desprotegerán las cadenas laterales de Arg y Asp en medio ácido.

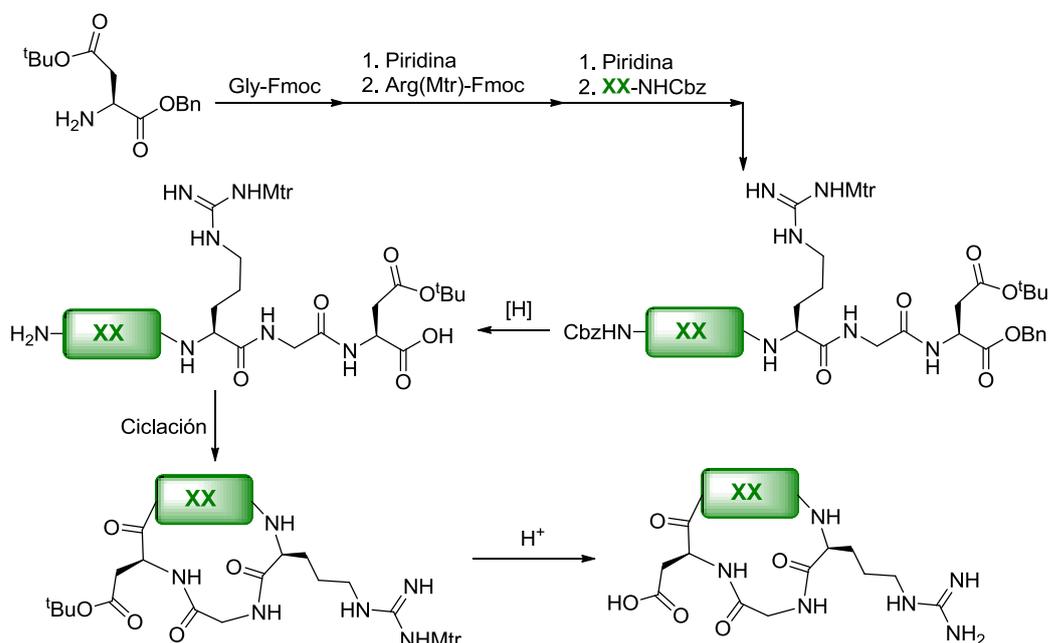


Figura 172. Posible ruta sintética de un mimético RGD macrocíclico, donde se utilizan grupos protectores lábiles en condiciones básicas (Fmoc), reductoras (Cbz y OBn) y ácidas (O^tBu y Mtr). XX representa un módulo estructural que se acopla a los extremos de la secuencia Arg-Gly-Asp para formar el macrociclo.

La reactividad de los ésteres escuáricos ha permitido llevar a cabo la síntesis del compuesto **53** sin necesidad de utilizar un grupo protector de amina como Fmoc. De este modo se simplifica bastante el proceso de síntesis, ya que solo se utilizaron grupos protectores lábiles en condiciones ácidas, como son el grupo *tert*-butiléster y el

Mtr, y en condiciones reductoras como el benziléster y el Cbz, Figura 173. Así, el compuesto **44a**, diseñado para la inserción del módulo SQ4 en secuencias peptídicas, se trató en CH₂Cl₂ - TFA 10% para eliminar el grupo Boc. La amina obtenida, en forma de sal de TFA, se neutralizó con DIPEA en DMF y se acopló con N-CbzAsp(^tBu) en presencia de HBTU para obtener la monoescuaramida éster **54**. El hecho de que este tipo de ésteres escuáricos no sean reactivos en disolventes como CH₂Cl₂ o DMF permitió llevar a cabo el acoplamiento descrito sin riesgo de polimerización por el otro extremo de la molécula. El compuesto **54** se acopló con Arg(Mtr) en EtOH:BBS pH = 9.5 1:1 para obtener la diescuaramida **55**, que se acopló a su vez con Gly-OBn en las condiciones habituales, dando lugar al compuesto **56**. El tratamiento de este compuesto en condiciones reductoras, H₂ Pd(C) 10%, permitió desproteger cuantitativamente los dos extremos de la estructura y obtener así el pseudopéptido escuaramídico **57** con un rendimiento global del 25 %.

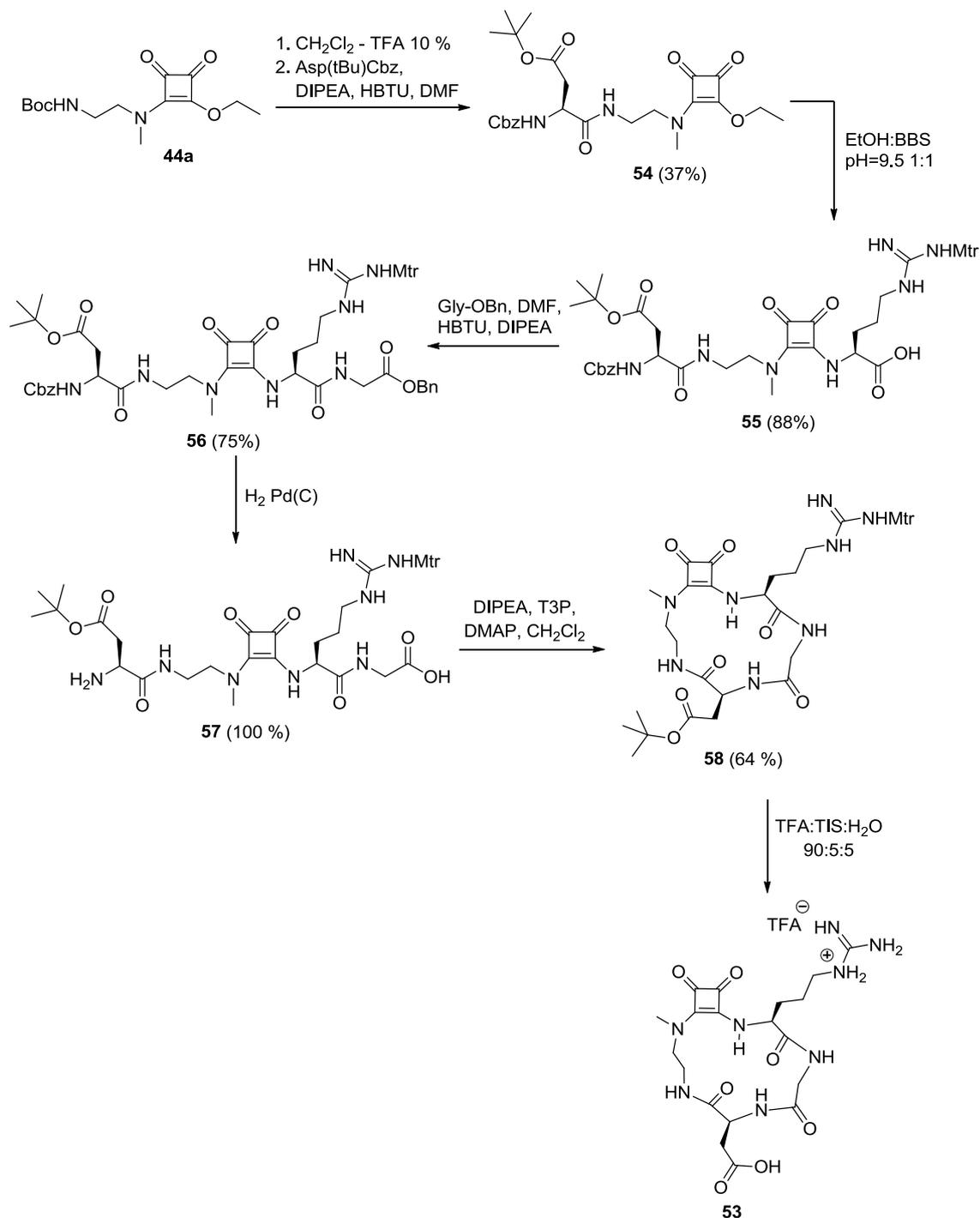


Figura 173. Esquema sintético del producto **53**.

El siguiente paso de macrociclación de **57** implica el acoplamiento entre los grupos amino y carboxilo de los extremos de la estructura. Para llevar a cabo esta reacción se decidió utilizar CH_2Cl_2 , un disolvente de polaridad reducida en el que se favorece la formación del enlace de hidrógeno intramolecular que favorece la reacción de ciclación y que es de uso común en la formación de enlaces amida. Dicha reacción se llevó a cabo en una disolución de **57** (20 mM) en presencia de DIPEA en exceso y anhídrido propilfosfónico (T3P) como agente de condensación. Se obtuvo el producto macrocíclico **58** con un 64 % de rendimiento. La desprotección de las cadenas laterales de Asp y Arg se llevó a cabo en una mezcla TFA:TIS:H₂O 95:2.5:2.5,

obteniendo el compuesto **53**. Pese a haber identificado el producto, todavía no se ha podido optimizar el proceso de purificación que permita obtenerlo en unas condiciones de pureza adecuadas para la evaluación de su actividad biológica.

La síntesis descrita demuestra la viabilidad de la unidad de giro *SQ4* como módulo preorganizador en reacciones de macrociclación, ya que no fue necesario recurrir a condiciones de alta dilución del precursor lineal **57** (20 mM). Este procedimiento permitirá la síntesis de macrociclos pseudopeptídicos cuya conformación podrá ser condicionada por el enlace de hidrógeno intramolecular de la unidad de giro.

6. Conclusiones

A lo largo de esta tesis se han diseñado y sintetizado un conjunto de compuestos escuaramídicos y péptidoescuaramídicos y se han estudiado sus propiedades conformacionales para evaluar la formación de estructuras plegadas.

En base a los estudios realizados se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Se ha comprobado que el oxígeno carbonílico de un grupo amida es un centro dador de enlace de hidrógeno adecuado para el diseño de módulos escuaramídicos de plegamiento. Dicho grupo carbonilo situado en la posición δ de un sustituyente escuaramídico establece un enlace de hidrógeno intramolecular con el NH escuaramídico más alejado, induciendo la formación de un ciclo de diez miembros análogo a los giros β naturales.
- Se ha demostrado que una unidad escuaramida secundaria - terciaria es más adecuada para el diseño de módulos de plegamiento que una escuaramida disecundaria, debido a que la primera establece una interacción adicional que favorece la presencia en disolución del conformero E,Z frente al Z,Z.
- Los módulos estructurales SQ1, SQ2, SQ3 y SQ4 inducen la formación de estructuras plegadas mediante la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular.
- Los módulos escuaramídicos de plegamiento SQ1, SQ3 y SQ4 se han utilizado en el desarrollo de miméticos de horquilla β . Estos módulos han permitido la síntesis de peptidomiméticos que en disolución adoptan estructuras tipo horquilla paralelas y antiparalelas. Los giros que inducen la formación de este tipo de estructuras están constituidos por ciclos de diez y trece miembros análogos a los giros β y α naturales, respectivamente. En los casos en que se forma el ciclo de trece miembros, ambos tipos de estructuras permanecen en equilibrio. Estas estructuras se han caracterizado tanto en disolventes polares próticos como apróticos.
- Además, el desarrollo de precursores sintéticos adecuados ha permitido que el módulo de giro SQ4 pueda insertarse directamente en una secuencia peptídica en condiciones propias de una síntesis peptídica. Este procedimiento permite obtener compuestos peptidoescuaramídicos donde se sustituyen únicamente dos aminoácidos de la secuencia original.
- Se ha sintetizado un mimético RGD macrocíclico sin necesidad de recurrir a condiciones de alta dilución. La preorganización del precursor lineal en el medio de reacción, inducida por un módulo escuaramídico de plegamiento presente en la estructura, favorece la reacción de macrociclación frente a la polimerización.

- Se ha observado que las escuaramidas disecundarias interaccionan más intensamente con aniones y cationes que las escuaramidas secundaria - terciarias. En los módulos de plegamiento desarrollados, la interacción de una escuaramida con un anión puede verse inhibida, pero solo en las condiciones en que el confórmero plegado sea muy estable.

7. Parte experimental

7.1. Métodos generales

Los disolventes y reactivos utilizados de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Panreac o TCI Chemicals se han utilizado sin purificación previa. Cuando ha sido necesario, los disolventes se han secado y destilado según los procedimientos indicados en la bibliografía.¹ El H₂O utilizada en los procesos de síntesis, elaboración o preparación de muestras se ha purificado por electroósmosis con un equipo ELIX10 (Millipore) y, posteriormente, por tratamiento a través de un equipo MilliQ (Millipore) consiguiendo una resistividad máxima de 18,2 MΩ. Los disolventes deuterados utilizados en los experimentos de RMN se han adquirido con calidad espectroscópica para RMN con una riqueza del 99,98%. DMSO-*d*₆ y CD₃CN han sido utilizados sin tratamiento previo. CDCl₃ ha sido almacenado con tamiz molecular (3 Å).

El sistema RF-HPLC de Gilson utilizado para la purificación de los productos está equipado con bombas modelo 321 y un módulo detector UV-Vis-152.

Los espectros de RMN (¹H y ¹³C) se han registrado en un instrumento Bruker AVANCE - 300 MHz o bien mediante un instrumento Bruker AVANCE - 600 MHz. Los desplazamientos químicos indicados en ppm están referenciados a la señal residual del disolvente deuterado utilizado.

Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Micromass AutoSpec 3000, provisto de un sistema de entrada de la muestra mediante electroespray (ESI) o bien mediante un sistema Bruker Autoflex MALDI-TOF. Los espectros de 1D y 2D RMN han sido procesados, analizados y editados con el software TOPSPIN 2.1. Los espectros de 2D RMN del compuesto **50** han sido procesados con el software NMRPipe y han sido analizados y editados con el software Sparky-linux2.6.

¹ Armarego, W. L. F.; Chai, C. *Purification of Laboratory Chemicals, 6th Ed.*, Butterworth Heinemann, Elsevier, Oxford, UK. **2009**.

7.2. Experimentos de RMN en función de la concentración

Los experimentos de dilución se realizaron a partir de una disolución inicial de producto en CDCl_3 de concentración 25 - 100 mM, en función de la solubilidad de cada producto. Se registró el espectro de ^1H RMN de cada disolución inicial. A partir de una alícuota de esta disolución se preparó otra más diluida adicionando el volumen adecuado (0.25 - 1 mL) de disolvente para obtener una disolución de menor concentración, de la cual se registró el espectro de ^1H RMN. Este procedimiento de dilución se repitió de forma sucesiva para obtener una colección de espectros de ^1H RMN de concentración variable de producto (1 - 100 mM).

7.3. Experimentos de RMN en función de la temperatura

Para llevar a cabo los estudios de variación de temperatura se registraron espectros de ^1H RMN de una disolución de concentración conocida (1 - 10 mM) a diferentes temperaturas (326 - 231 K). Los disolventes utilizados en estos estudios fueron CDCl_3 o CD_3CN . Los coeficientes $\Delta\delta(\text{NH})/\Delta T$ para cada señal se obtuvieron a partir de la ecuación 1, donde δ_1 y δ_2 son los desplazamientos químicos (ppm) a las temperaturas T_1 y T_2 (K), respectivamente.

$$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} = \frac{\delta_2 - \delta_1}{T_2 - T_1} \quad 1$$

7.4. Determinación de la constante de asociación entre el anión dibutilfosfato (Bu_2P^-) y las escuaramidas 14, 15 y 29 mediante RMN

Se preparó una disolución madre de escuaramida de concentración 3 mM en CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$. Seguidamente, se preparó una disolución de la sal $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$ de concentración 60 mM utilizando como disolvente la disolución anterior 3 mM de escuaramida (valoración a concentración constante de escuaramida).

Para llevar a cabo la valoración se introdujo 0.50 mL de la disolución madre de escuaramida en un tubo de RMN y se registró el espectro de ^1H RMN. Seguidamente se adicionó progresivamente en dicho tubo volúmenes variables de la segunda disolución, obteniéndose concentraciones crecientes de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$ (0 - 30 mM). Después de cada adición se registró el espectro de ^1H RMN, de forma que se obtuvo una colección de espectros de concentración constante de escuaramida y concentración variable de $\text{Bu}_2\text{P-TBA}$ (0 - 10 eq.).

Para obtener la constante de asociación, los desplazamientos químicos de las señales correspondientes al compuesto escuaramídico (valorado) que se vieron significativamente afectadas por el transcurso de la valoración se ajustaron a un modelo de interacción escuaramida: Bu_2P^- 1:1, en todos los casos, mediante el software HypNMR2008 4.00.0068.

7.5. Determinación de la constante de asociación entre el catión 1,3-di-*o*-toluilguanidinio (DTG^+) y las escuaramidas 14, 15, 28 y 29 mediante RMN

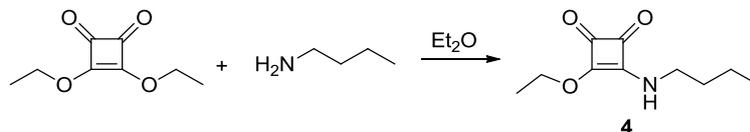
Se preparó una disolución madre de Br-DTG de concentración 1 mM en CDCl_3 . Seguidamente, se preparó una disolución de escuaramida de concentración 30 mM utilizando como disolvente la disolución 1 mM de Br-DTG.

Para llevar a cabo la valoración se introdujo 0.50 mL de la disolución madre de Br-DTG en un tubo de RMN y se registró el espectro de ^1H RMN. Seguidamente se adicionó progresivamente en dicho tubo volúmenes variables de la segunda disolución, obteniéndose concentraciones crecientes de Br-DTG (0 - 30 mM). Después de cada adición se registró el espectro de ^1H RMN, de forma que se obtuvo una colección de espectros de concentración constante de Br-DTG y concentración variable de escuaramida (0 - 20 eq.).

Para obtener la constante de asociación, los desplazamientos químicos de las señales correspondientes al catión DTG^+ (valorado) que se vieron significativamente afectadas por el transcurso de la valoración se ajustaron a un modelo de interacción DTG^+ :escuaramida 1:1, en todos los casos, mediante el software HypNMR2008 4.00.0068.

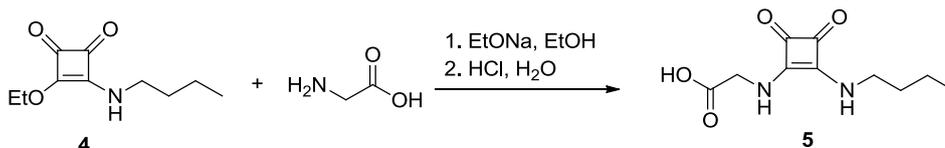
7.6. Síntesis

3-n-butilamino-4-etoxi-3-ciclobuten-1,2-diona, **4**:



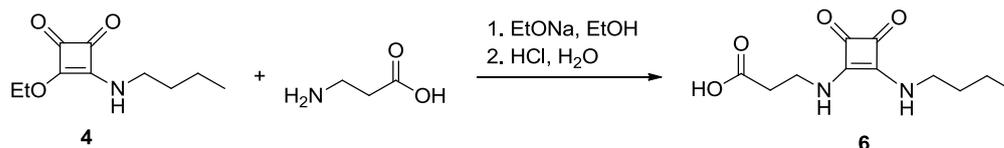
La síntesis de este compuesto se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía.¹¹⁷

Ácido 2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)acético, **5**:

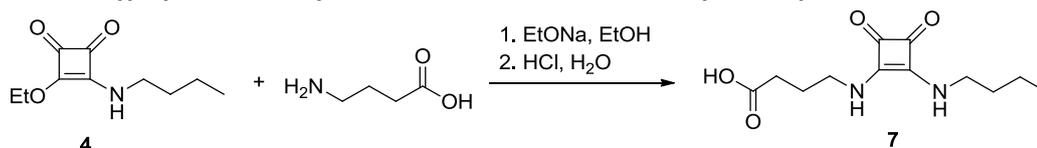


Glicina (375 mg, 5.00 mmol) y etóxido sódico (375 mg, 5.5 mmol) se adicionaron sobre EtOH (150 mL), y la suspensión resultante se agitó hasta su completa disolución. Sobre esta disolución se adicionó otra disolución de **4** (1 g, 5.07 mmol) en EtOH (20 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida, obteniéndose un sólido amarillo, correspondiente a la sal sódica del producto final. El sólido se digirió en Et₂O (50 mL) y se filtró. Seguidamente se disolvió en la mínima cantidad de agua y se acidificó la disolución con HCl 37 % hasta obtener un pH 2-3. Durante la acidificación apareció un precipitado, el cual se filtró y se lavó con agua fría para rendir **5** (851 mg, 3.76 mmol) como un sólido blanco. R = 75 %. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12.87 (1H, s), 7.52 (2H, s), 4.24 (2H, s), 4.47 (2H, s), 4.71 (2H, m), 1.30 (2H, m), 0.86 (3H, t, *J*=7.5Hz) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 186.17, 185.6, 174.4, (171.1, 170.8), 47.7, 46.1, 35.9, 22.2, 16.7 ppm. HRMS(ESI): *m/z* calc. para C₂₀H₂₈N₄O₈Na [2M+Na]⁺ 475.1805, exp. 475.1815.

Ácido 2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propanoico, **6**:

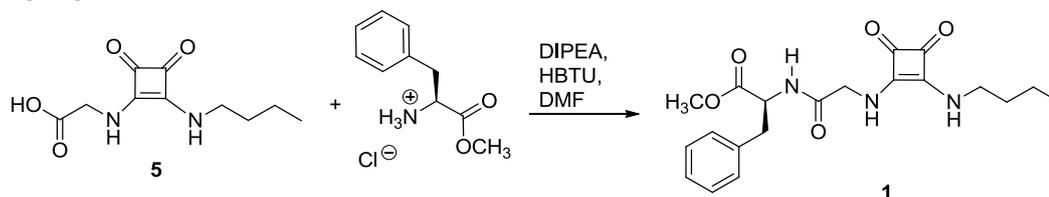


La síntesis del compuesto **6** se llevó a cabo de forma análoga a la síntesis del compuesto **5**, por medio de la reacción entre β-alanina (270 mg, 3 mmol) y **4** (592 mg, 3 mmol), para obtener **6** (563 mg, 2.34 mmol) como un sólido blanco. R = 78 %. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12.37 (1H, s), 7.40 (2H, s), 3.67 (2H, q, *J*=6Hz), 3.46 (2H, m), 1.47 (2H, m), 1.30 (2H, m), 0.87 (3H, t, *J*=8.1Hz) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 185.4, 175.9, 171.0, 170.6, 46.0, 38.6, 35.9, 22.1, 16.7 ppm. HRMS(ESI): *m/z* calc. para C₂₂H₃₂N₄O₈Na [2M+Na]⁺ 503.2118, exp. 503.2138.

Ácido 2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)butanoico, 7:

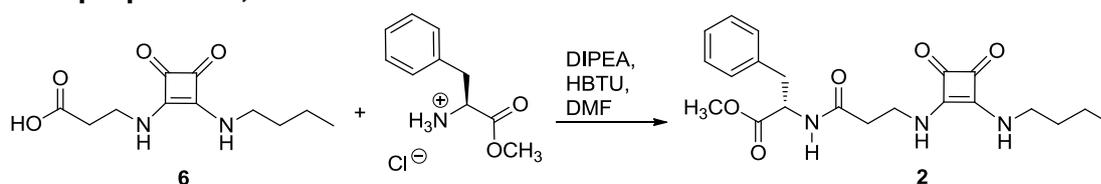
La síntesis del compuesto **7** se llevó a cabo de forma análoga a la síntesis del compuesto **5**, por medio de la reacción entre ácido γ -aminobutírico (157 mg, 1.5 mmol) y **4** (296 mg, 1.5 mmol), para obtener **7** (337 mg, 1.32 mmol) como un sólido blanco. R = 87 %. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ : 12.13 (0.6H, s), 7.30 (0.6, s), 3.46 (4H, m), 2.24 (2H, t, $J=6\text{Hz}$), 1.72 (2H, m), 1.48 (2H, m), 0.87 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 185.5, 177.2, 170.9, 46.1, 45.8, 36.0, 33.7, 29.4, 22.2, 16.7 ppm. HRMS(ESI): m/z calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$ [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 531.2431, exp. 531.2441.

Procedimiento general de reacciones de acoplamiento amídico: El ácido carboxílico y la amina se disolvieron en DMF. A la disolución resultante se añadió DIPEA (8 eq) como base y HBTU (3 eq) disuelto en DMF como agente de acoplamiento. Todo el proceso se llevó a cabo bajo atmósfera de argón y la mezcla de reacción se protegió de la luz y se agitó durante 15 h. El crudo de reacción se purificó tal como se especifica para para cada compuesto.

(S)-metil 2-((2-(2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)acetamido)-3-fenilpropanoato, 1:

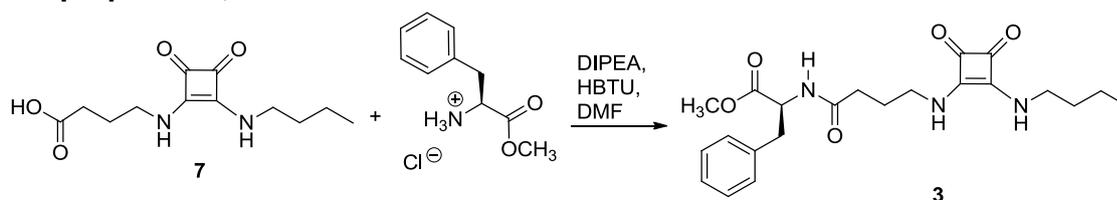
El compuesto **1** se sintetizó a partir de **5** (500 mg, 2.20 mmol) y Phe-OMe-HCl (710 mg, 3.96 mmol) en DMF (20 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. A continuación, se eliminó el disolvente y se disolvió el crudo en CH_2Cl_2 (50 mL). La disolución se lavó con HCl 3M (3 X 30 mL), H_2O (30 mL) y NaCl sat. (30 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El sólido obtenido se digirió en Et_2O (70 mL) y se filtró para obtener parte del producto final. El líquido filtrado se concentró hasta eliminar aprox. el 90 % del disolvente, para favorecer la precipitación del resto de producto. El sólido obtenido se recrystalizó en una mezcla CH_2Cl_2 - hexano para rendir **1** (552 mg, 1.42 mmol) en forma de sólido blanco. R = 65 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.73 (1H, s), 7.13 (2H, d, $J=5.7\text{Hz}$), 4.67 (1H, q, $J=6.3\text{Hz}$), 4.14 (2H, s), 3.70 (3H, s), 3.64 (2H, m), 3.15 (1H, m), 3.04 (1H, m), 1.62 (2H, m), 1.39 (2H, m), 0.94 (3H, t, $J=7.2\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 185.8, 184.8, 174.3, 172.2, 168.9, 138.6, 131.8, 131.2, 129.7, 56.7, 55.1, 49.6, 47.2, 40.2, 35.8, 22.3, 16.4 ppm. HRMS(ESI): m/z calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{Na}$ [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 797.3486, exp. 797.3473.

(S)-metil 2-(3-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propanamido)-3-fenilpropanoato, 2:



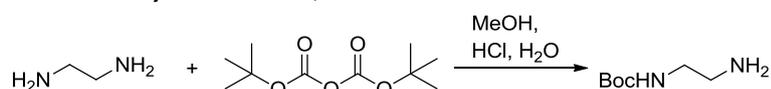
La síntesis del compuesto **2** se llevó a cabo de forma análoga a la síntesis del compuesto **1**, por medio de la reacción entre **6** (500 mg, 2.00 mmol) y Phe-OMe-HCl (365 mg, 2.00 mmol), para obtener **2** (434 mg, 1.08 mmol) como un sólido blanco. R = 54 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.13 (2H, d, $J=5.7\text{Hz}$), 6.52 (2H, s), 6.38 (0.8H, s), 4.82 (1H, q, $J=5.7\text{Hz}$), 3.93 (1H, s), 3.78 (1H, s), 3.77 (3H, s), 3.66 (2H, q, $J=5.7\text{Hz}$), 3.18 (1H, m), 3.13 (1H, m), 2.55 (2H, m), 1.45 (2H, m), 0.98 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 185.4, 175.1, 173.5, 170.9, 170.6, 140.2, 132.2, 131.4, 129.7, 56.8, 54.9, 46.0, 39.9, 35.9, 22.1, 16.6 ppm. HRMS(ESI): m/z calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 424.1848, exp. 424.1848.

(S)-metil 2-(4-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)butanamido)-3-fenilpropanoato, 3:



La síntesis del compuesto **3** se llevó a cabo de forma análoga a la síntesis del compuesto **1**, por medio de la reacción entre **7** (509 mg, 2.00 mmol) y Phe-OMe-HCl (663 mg, 3.7 mmol), para obtener **3** (556 mg, 1.34 mmol) como un sólido blanco. R = 67 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.13 (2H, d, $J=5.7\text{Hz}$), 6.41 (1H, s), 6.24 (1H, s), 4.86 (1H, q, $J=6.3\text{Hz}$), 3.79 (3H, s), 3.74 (2H, q, $J=6\text{Hz}$), 3.44 (2H, s), 3.17 (1H, m), 3.12 (1H, m), 2.33 (2H, m), 1.90 (2H, m), 1.67 (2H, m), 1.45 (2H, m), 0.99 (3H, t, $J=7.2\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 185.3, 175.5, 171.1, 170.3, 138.7, 131.8, 131.3, 129.8, 56.24, 55.1, 47.1, 46.1, 40.5, 35.8, 29.8, 22.3, 16.4 ppm. HRMS(ESI): m/z calc. para $\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 853.4112, exp. 853.4136.

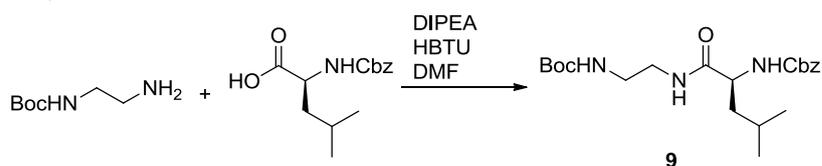
tert-butil-(2-aminoetil)carbamato, 15:



La síntesis de este compuesto se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía.²

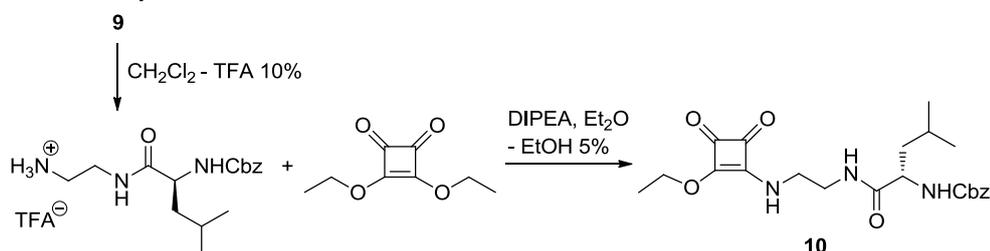
² Lee, D. W.; Hyun-Joon; Lee, H. W. K. *Synthetic Communications* **2007**, *37*, 737.

(S)-bencil tert-butil (1-((2-aminoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)dicarbamato, 9:



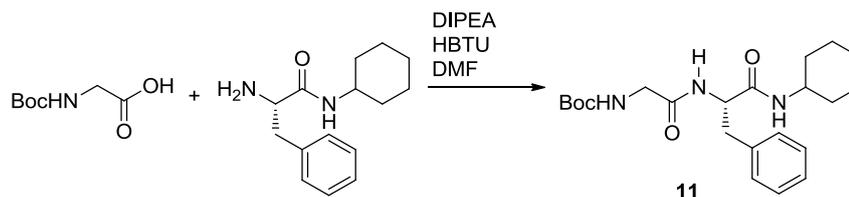
El compuesto **9** se preparó a partir de (N-Boc)etilendiamina (361 mg, 2.26 mmol) y N-Cbz-L-leucina (500 mg, 1.88 mmol) en DMF (20 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. Una vez transcurrida la reacción se eliminó el disolvente, se disolvió el crudo en CH_2Cl_2 (60 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 3M (3 X 60 mL), H_2O (60 mL) y NaCl sat. (60 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El sólido obtenido se digirió en Et_2O (70 mL) y se filtró para obtener parte del producto final. El líquido filtrado se concentró hasta eliminar aprox. el 90 % del disolvente, favoreciendo la precipitación del resto de producto. Todo el sólido obtenido se recrystalizó en una mezcla CH_2Cl_2 - hexano para rendir **9** (517 mg, 1.27 mmol) como un sólido blanco. R = 67 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.35 (5H, s), 6.61 (1H, s), 5.11 (2H, m), 4.91 (1H, s), 4.14 (1H, q, $J=3.9\text{Hz}$), 3.33 (2H, m), 3.26 (2H, m), 1.66 (2H, m), 1.48 (1H, m), 1.44 (9H, s), 0.94 (6H, d, $J=6.6\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 175.5, 159.1, 140.2, 131.2, 131.5, 130.8, 80.8, 68.5, 56.3, 31.4, 27.4, 26.1, 24.6 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 430.2318, exp. 430.2320.

(S)-benzil (1-((2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)carbamato, 10:



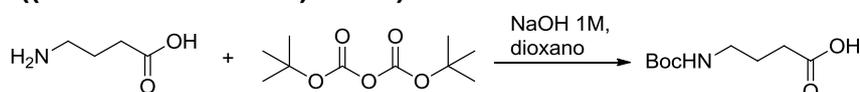
9 (100 mg, 0.25 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más purificación. La sal de TFA se disolvió en EtOH (1 mL) y sobre la disolución resultante se adicionó DIPEA (0.200 mL, 2.00 mmol) y Et_2O (17 mL). Esta disolución se adicionó gota a gota sobre una disolución de escuarato de dietilo (129 mg, 0.76 mmol) en Et_2O (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 48 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo de reacción se disolvió en CH_2Cl_2 (20 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 3M (3 X 20 mL), H_2O (20 mL) y NaCl sat. (20 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El producto se purificó por cromatografía en columna (Al_2O_3 ; CH_2Cl_2 :AcOEt, 66:33 \rightarrow 0:100) para rendir **9** (90 mg, 0.21 mmol) como un sólido blanco. R = 84 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.33 (5H, s), 7.13 (0.7H, s), 7.98 (0.7H, s), 6.62 (0.3H, s), 6.15 (0.3H, s), 5.66 (0.7, s), 5.11 (2H, m), 4.73 (2H, q, $J=7.2\text{Hz}$), 4.14 (1H, m), 3.77 (0.7H, m), 3.53 (2H, m), 3.43 (1.3H, m), 1.67 (2H, m), 1.51 (1H, m), 1.44 (1H, t, $J=6.6\text{Hz}$), 0.92 (6H, t, $J=4.8\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 180.6, 176.2, 175.0, 159.2, 138.9, 131.9, 130.6, 72.8, 69.8, 56.9, 47.1, 43.8, 42.4, 27.5, 25.7, 24.4, 18.5 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 454.1954, exp. 454.1943.

(S)-tert-butil (2-((1-(ciclohexilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)carbamato, 11:



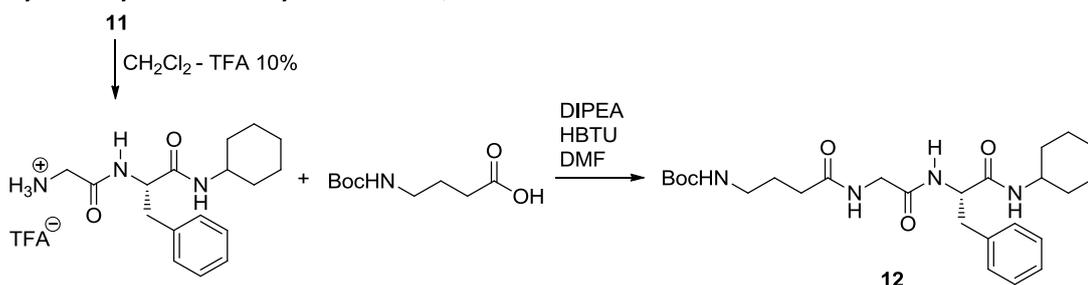
El compuesto **11** se preparó a partir de (N-Boc)glicina (250 mg, 1.01 mmol) y fenilalanina ciclohexilamida (250 mg, 1.01 mmol) en DMF (20 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. Una vez transcurrida la reacción se eliminó el disolvente, se disolvió el crudo en CH₂Cl₂ (30 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 3M (3 X 30 mL), H₂O (30 mL) y NaCl sat. (30 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró. El sólido obtenido se digirió en Et₂O (50 mL) y se filtró para obtener parte del producto final. El líquido filtrado se concentró hasta eliminar aprox. el 90 % del disolvente, para obtener el resto de producto en forma de precipitado. Todo el sólido obtenido se recrystalizó en una mezcla CH₂Cl₂ - hexano para rendir **11** (302 mg, 0.75 mmol) en forma de sólido blanco. R = 74 %. ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7.26/7.22 (5H, m), 6.60 (1H, s), 5.46 (1H, s), 5.01 (1H, s), 4.56 (1H, q, J=5.7Hz), 3.77 (2H, d, J=5.7Hz), 3.65 (2H, m), 3.18/2.94 (2H, m), 1.56 (4H, m), 1.44 (9H, s), 1.28 (4H, m), 1.01 (2H, m) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 172.6, 172.0, 158.9, 140.7, 139.4, 131.1, 129.4, 81.2, 56.8, 50.6, 46.4, 35.3, 31.3, 28.3, 27.7, 27.6 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para C₂₂H₃₃N₃O₄Na [M+Na]⁺ 426.2369, exp. 426.2373.

Ácido 4-((tert-butoxicarbonil)amino)butanoico:



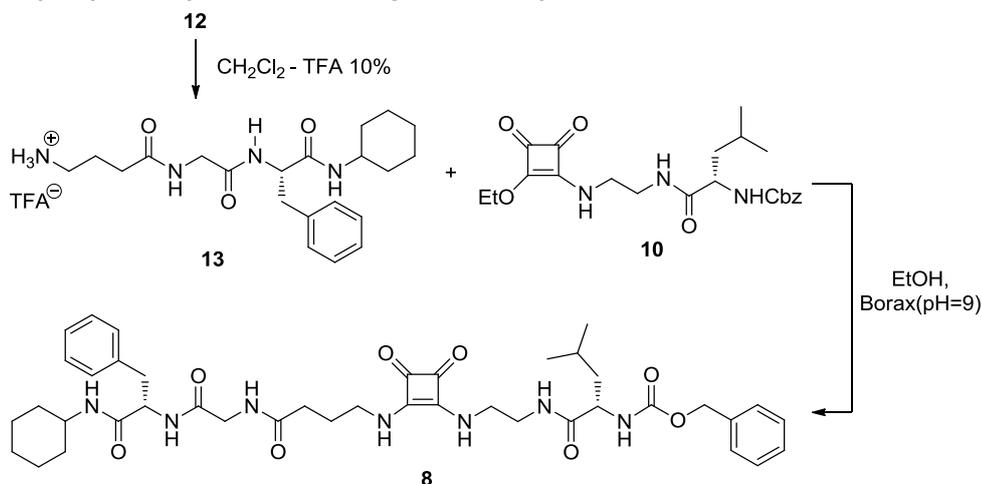
Una disolución de ácido γ-aminobutírico (500 g, 4.85 mmol) en una mezcla NaOH 1M:dioxano 1:1 v:v (50 mL) se enfrió a 6 °C y se le adicionó gota a gota una disolución de Boc₂O (2.117 g, 9.70 mmol) en dioxano (6 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. El disolvente de la disolución se eliminó bajo presión reducida y el crudo de reacción se disolvió en KHSO₄ 1M (20 mL). El producto se extrajo en AcOEt (2 X 20 mL) y la fase orgánica se lavó con NaCl sat. (20 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró, obteniéndose el ácido N-Boc-γ-aminobutírico (759 mg, 3.73 mmol) como un aceite ligeramente amarillo. R = 77 % ¹H RMN (CDCl₃) δ: 4.66 (1H, s), 3.20 (2H, m), 2.41 (2H, t, J=6Hz), 1.83 (2H, m), 1.45 (9H, s) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 177.4, 158.8, 80.6, 34.1, 31.4, 28.1 ppm.

(S)-tert-butil (4-((2-((1-(ciclohexilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)amino)-4-oxobutil)carbamato, 12:



11 (200 mg, 0.50 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más purificación. Esta sal de TFA se combinó con ácido N-Boc- γ -aminobutírico (102 mg, 0.50 mmol) en DMF (10ml) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. El disolvente se eliminó bajo presión reducida, se disolvió el crudo en CH₂Cl₂ (50 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 3M (2 X 40 mL), H₂O (40 mL) y NaCl sat. (40 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró. El sólido obtenido se digirió en Et₂O (50 mL) y se filtró para obtener parte del producto final. El líquido filtrado se concentró hasta eliminar aprox. el 90 % del disolvente, para obtener el resto de producto precipitado. Todo el sólido obtenido se recristalizó en una mezcla CH₂Cl₂ - hexano para rendir **12** (178 mg, 0.36 mmol) en forma de sólido blanco. R = 73 %. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 7.22 (5H, m), 6.87 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 6.74 (1H, s), 5.69 (1H, d, $J=6.6$ Hz) 4.56 (1H, q, $J=6.6$ Hz), 3.89 (2H, m), 3.65 (1H, m), 3.14 (2H, m), 3.02 (1H, m), 3.13 (1H, m), 2.26 (3H, t, $J=6$ Hz), 1.80 (2H, m), 1.62 (4H, m), 1.44 (9H, s), 1.25 (4H, m), 0.98 (2H, m) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ : 175.5, 172.7, 171.8, 158.7, 140.9, 132.3, 131.2, 129.3, 80.6, 57.0, 50.7, 45.2, 35.5, 31.4, 28.9, 28.3, 27.7 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para C₂₆H₄₀N₄O₅Na [M+Na]⁺ 511.2896, exp. 511.2879.

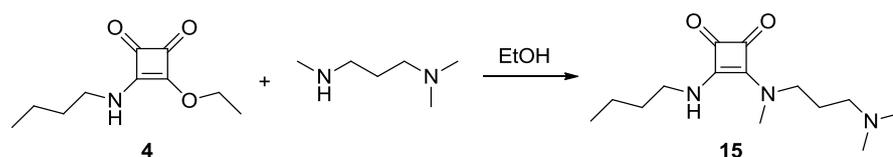
benzil ((S)-1-((2-((2-((4-((2-(((S)-1-(ciclohexilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)amino)-4-oxobutil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)carbamato, 8:



12 (112 mg, 0.23 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más

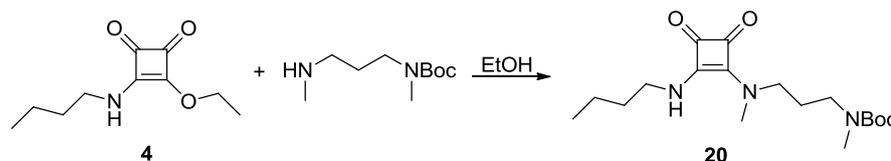
purificación. La sal de TFA **13** se disolvió en tampón bórax 0.1 M a pH 9 (10 mL). La disolución resultante se adicionó sobre una segunda disolución de **10** (100 mg, 0.23 mmol) en EtOH (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, durante este periodo se forma un precipitado en suspensión. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se eliminó el EtOH de la mezcla bajo presión reducida y se decantó la disolución acuosa. El crudo obtenido se digirió con AcOEt (15 mL), se filtró y se lavó con H₂O a 0 °C (5 mL), obteniéndose parte del producto final. La disolución de AcOEt se concentró hasta alcanzar el 20 % del volumen inicial, apareciendo un precipitado que se separó por filtración. Este sólido se lavó con AcOEt a 0 °C para rendir el resto del producto. De esta forma se obtuvo **8** (40 mg, 0.05 mmol) como un sólido blanco. R = 22 %. ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7.94 (1.5H, s), 7.73 (1.5H, s), 7.49 (1.5H, s), 7.23 (2H, s), 6.78 (0.7H, s), 6.41 (0.2H, s), 6.13 (0.8H, s), 5.11 (1H, d, J=6Hz), 5.05 (1H, d, J=6Hz), 4.66 (1H, s), 4.31 (1H, s), 3.91 (2H, s), 3.71 (4H, m), 3.62 (1H, s), 3.52 (1H, s), 3.39 (1H, s), 3.08 (2H, m), 2.37 (2H, s), 1.97 (2H, s), 1.68 (8H, m), 1.09 (2H, m), 0.92 (8H, m) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 185.5, 175.9, 175.3, 172.7, 171.8, 171.0, 159.1, 140.8, 140.2, 132.3, 131.1, 129.4, 68.5, 57.0, 56.3, 50.6, 46.0, 45.2, 41.2, 35.3, 30.1, 28.3, 27.7, 27.6, 27.3, 26.1, 24.6 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₄₁H₅₅N₇O₈Na [M+Na]⁺ 796.4010, exp. 796.4006.

3-(butilamino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona, 15:



A una disolución de N,N,N'-trimetil-1,3-diaminopropano (89 mg, 0.76 mmol) en EtOH (5 mL) se adicionó **4** (150 mg, 0.76 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el crudo de reacción se lavó con pentano (10 mL) y se purificó por cromatografía en columna (Al₂O₃; CH₂Cl₂:EtOH, 95:5) para obtener **15** (25 mg, 0.09 mmol) como un sólido blanco. R = 58 %. Mp: 55 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.36 (1H, br), 3.67 (2H, q, J = 6.9 Hz), 3.34 (3H, s), 3.30 (2H, m), 2.37 (2H, m), 2.23 (6H, s), 1.75 (2H, m), 1.55 (2H, m), 1.37 (2H, m), 0.95 (3H, t, J = 7.2 Hz) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 183.7, 183.6, 169.4, 168.8, 54.5, 48.66, 45.2, 44.9, 36.5, 34.0, 24.1, 20.2, 14.2 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₁₄H₂₆N₃O₂ [M+H]⁺ 268.2025, exp. 268.2022.

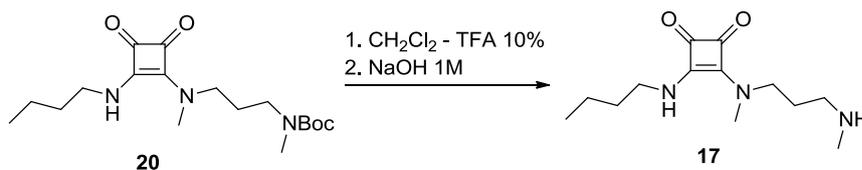
tert-butil(3-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)propil)(metil)carbamate, 20:



Sobre una disolución de N-(*tert*-butil)oxicarbonil-N,N'-trimetil-1,3-diaminopropano (276 mg, 1.40 mmol) en EtOH (5 mL) se adicionó otra disolución de **4** (283 mg, 1.40 mmol) en EtOH (6 mL) y la mezcla se agitó durante 20 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo se disolvió en CH₂Cl₂ (20 mL) y la disolución obtenida se

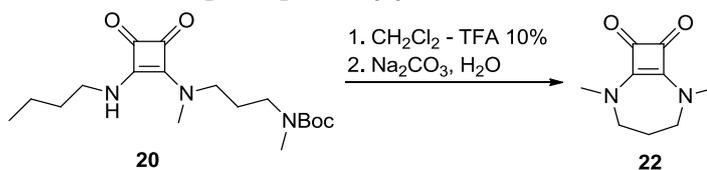
lavó con HCl 0.1M (2 X 15 mL) y NaCl sat. (15 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El sólido obtenido se lavó con pentano y se decantó el disolvente. Esta operación se repitió utilizando Et_2O . El sólido se filtró para para rendir **20** (321 mg, 0.91 mmol) como un sólido blanco. R = 65 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 5.85 (1H, br), 3.74 (2H, q, $J = 6.6\text{Hz}$), 3.47 (2H, br), 3.29 (3H, s), 2.88 (3H, s), 1.89 (2H, q, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.63 (2H, q, $J = 7.5\text{Hz}$), 1.47 (9H, s), 1.41 (2H, q, $J = 7.5\text{Hz}$), 0.95 (3H, q, $J = 7.5\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.9, 183.8, 169.5, 169.0, 156.8, 80.2, 54.5, 48.66, 47.2, 45.9, 36.5, 34.0, 24.1, 20.2, 14.2 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 376.4462, exp. 376.4470.

3-(butilamino)-4-(metil(3-(metilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona, **17**:



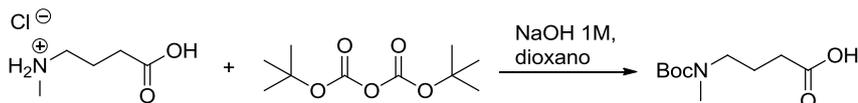
Una disolución de **20** (100 mg, 0.28 mmol) en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El crudo de reacción se disolvió en NaOH 1M (5 mL) y se extrajo en CH_2Cl_2 (6 X 6 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO_4) y se concentraron. El sólido obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 (3 mL) y se añadió pentano (10 mL), obteniéndose un precipitado que se separó del sobrenadante por filtración. El filtrado se concentró bajo presión reducida para rendir **17** (10 mg, 0.04 mmol) como un sólido blanco. R = 14 %. Mp: 208 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 8.63 (1H, br), 3.67 (2H, q, $J = 6.6\text{Hz}$), 2.27 (2H, br), 2.63 (2H, t, $J = 5.4\text{Hz}$), 2.41 (3H, s), 1.74 (2H, q, $J = 5.4\text{Hz}$), 1.57 (2H, q, $J = 7.8\text{Hz}$), 1.38 (2H, q, $J = 9\text{Hz}$), 0.94 (2H, t, $J = 7.2\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.6, 182.3, 169.2, 168.8, 167.7, 55.4, 48.8, 46.9, 44.8, 38.6, 36.5, 36.3, 34.0, 29.5, 26.7, 20.2, 14.2 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 254.1869, exp. 254.1874.

2,6-dimetil-2,6-diazabicyclo[5.2.0]non-1(7)-en-8,9-diona, **22**:



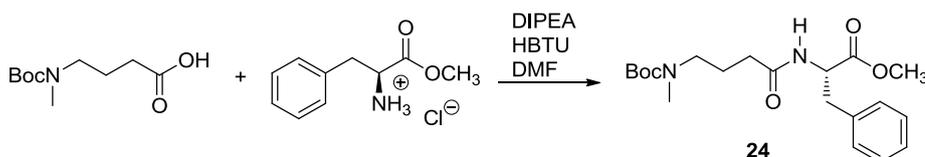
20 (100 mg, 0.28 mmol) se disolvió en H_2O (12 mL) y sobre la disolución resultante se añadió HCl 3M (0.467 mL, 1.4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 4 h. Seguidamente se dejó enfriar y se llevó a pH 9 adicionando Na_2CO_3 sólido. El disolvente se eliminó bajo presión reducida para rendir **22** (30 mg, 0.17 mmol) como un sólido blanco. R = 66 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 3.41 (6H, s), 3.31 (4H, t, $J = 5.3\text{Hz}$), 2.06 (2H, m) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 184.6, 169.9, 57.7, 40.9, 31.8 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 181.0972, exp. 181.0977.

Ácido 4-((tert-butoxicarbonil)(metil)amino)butanoico:

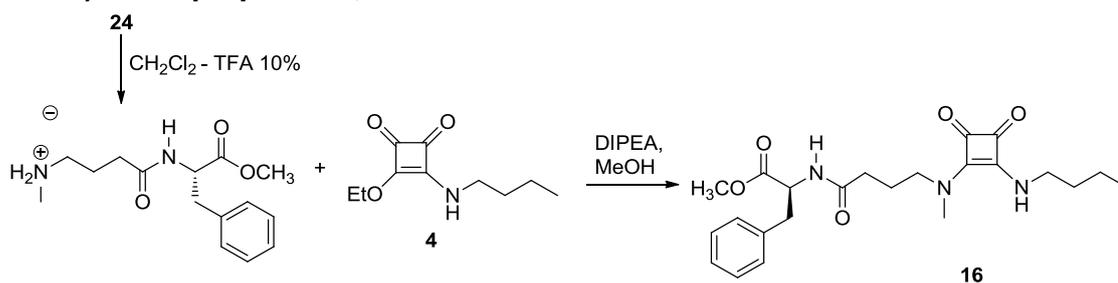


Una disolución del clorhidrato del ácido N-metil- γ -aminobutírico (500 g, 3.25 mmol) en una mezcla NaOH 1M:dioxano 1:1 v:v (20 mL) se enfrió a 6 °C y se le adicionó gota a gota una disolución de Boc₂O (1.421 g, 6.5 mmol) en dioxano (6 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. Durante este tiempo se formó un precipitado, que se separó del líquido por filtración. El disolvente de la disolución se eliminó bajo presión reducida y el crudo de reacción se disolvió en KHSO₄ 1M (20 mL). El producto se extrajo en AcOEt (2 X 20 mL) y la fase orgánica se lavó con NaCl sat. (20 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró, obteniéndose el ácido N-Boc-N-metil- γ -aminobutírico (680 mg, 3.12 mmol) como un aceite amarillo. R = 96 %. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 3.29 (2H, br), 2.85 (3H, s), 2.36 (2H, t, *J* = 7.2Hz), 1.85 (2H, m, *J* = 6.9Hz), 1.46 (9H, s) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 178.7, 156.4, 80.2, 48.3, 34.6, 31.4, 28.8, 23.3 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para C₁₀H₁₉NO₄Na [M+Na]⁺ 240.1212, exp. 240.1211.

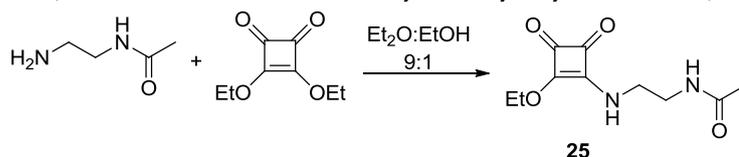
(S)-metil-2-(4-((tert-butoxicarbonil)(metil)amino)butanamido)-3-fenilpropanoato, **24**:



El compuesto **24** se sintetizó a partir de ácido N-Boc-N-metil- γ -aminobutírico (120 mg, 0.55 mmol) y Phe-OMe-HCl (178 mg, 0.99 mmol) disueltos en DMF (15 mL) siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. Transcurrida la reacción se eliminó el disolvente y se disolvió el crudo en CH₂Cl₂ (20 mL). La disolución obtenida se lavó con HCl 3M (3 X 20 mL) y NaCl sat. (20 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró, obteniéndose un aceite muy viscoso. La purificación del crudo se llevó a cabo mediante la adición de Et₂O (10 mL) sobre éste. La mezcla se agitó durante 10 min y se decantó el disolvente. El proceso de adición de Et₂O se repitió tres veces más, y todas las porciones de Et₂O se concentraron para rendir **24** (202 mg, 0.53 mmol) como un aceite ligeramente marrón. R = 97 %. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 7.28, 4.84 (1H, br), 3.73 (1H, s), 3.16 (4H, m, *J* = 5.7Hz), 2.82 (3H, s), 2.13 (2H, m, *J* = 6.9Hz), 1.79 (2H, m, *J* = 6.9Hz), 1.46 (9H, s) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 172.7, 156.8, 136.8, 129.7, 128.9, 127.5, 79.9, 53.7, 52.7, 47.6, 38.2, 34.6, 33.6, 28.9, 24.2 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para C₂₀H₃₀N₂O₅K: 401.2052, exp. 401.2033.

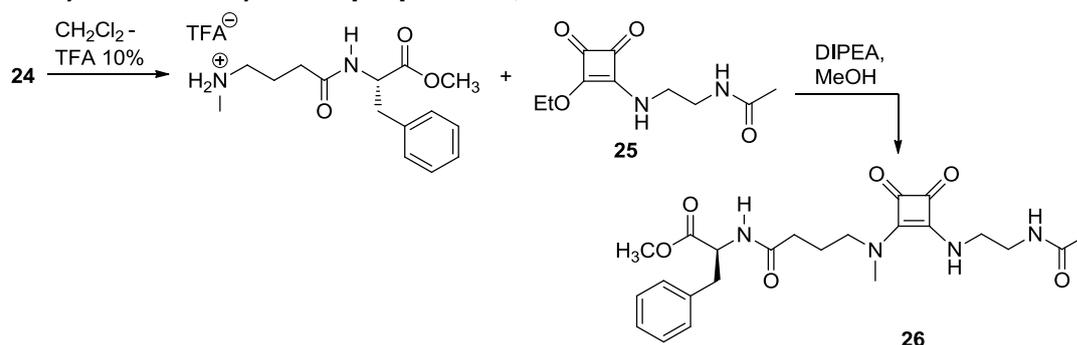
(S)-metil-2-(4-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)butan-amido)-3-fenilpropanoato, 16:

24 (68 mg, 0.18 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón, obteniéndose el trifluoroacetato de la amina, que se utilizó sin purificar en el siguiente paso sintético. La sal de TFA se adicionó sobre una disolución de **4** (39 mg, 0.20 mmol) en MeOH (5 mL). Sobre la mezcla se adicionó DIPEA (0.09 mL, 0.9 mmol) y disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. Se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el crudo de reacción se disolvió en 10 mL de CH₂Cl₂. La disolución obtenida se lavó con HCl 3M (2 X 10 mL) y NaCl sat. (10 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró. El producto se purificó por cromatografía en columna (Al₂O₃; AcOEt) para obtener **15** (25 mg, 0.09 mmol) como un sólido blanco. R = 58 %. Mp: 137 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ: (CDCl₃) δ: 7.55 (1H, s), 7.10 (2H, d, *J* = 5.7Hz), 6.03 (1H, d, *J* = 5.7Hz), 4.84 (1H, q, *J* = 6.9Hz), 3.78 (5H, s), 3.37 (3H, s), 3.12 (4H, m, *J* = 6.6Hz), 2.29 (2H, q, *J* = 7.8Hz), 1.89 (2H, m, *J* = 5.1Hz), 1.64 (2H, m, *J* = 7.8Hz), 1.42 (2H, m, *J* = 7.8Hz), 0.96 (3H, t, *J* = 7.2Hz) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 183.2, 173.0, 172.2, 168.2, 136.4, 129.6, 129.0, 128.9, 127.6, 54.0, 52.9, 51.9, 44.7, 38.2, 37.7, 33.5, 31.1, 24.2, 20.1, 14.2 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₂₃H₃₁N₃O₅Na: 452.2161, exp. 452.2162.

N-(2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)acetamide, 25:

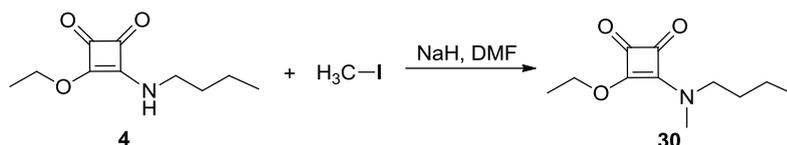
Sobre una disolución de escuarato de dietilo (233 mg, 1.37 mmol) en Et₂O (9 mL) se adicionó otra de N-(2-amino)etilacetamida (116 mg, 1.14 mmol) en una mezcla Et₂O:EtOH 21:4 v:v (15 mL). La mezcla se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. Parte del producto **25** apareció en forma de precipitado, el cual se separó por filtración y se lavó con Et₂O. La disolución se concentró bajo presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en EtOH (0.5 mL) y se adicionó Et₂O (10 mL), obteniéndose un precipitado que se separó del líquido por filtración para rendir el resto del escuaramido-éster **25**. En total se obtuvo 130 mg (0.57 mmol) de **25** como un sólido blanco. R = 50 %. Mp: 136 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ: 6.87 (1H, s), 6.19 (1H, s), 4.76 (2H, br), 3.78 (1H, br), 3.61 (1H, br), 3.50 (2H, br), 2.00 (3H, s), 1.47 (3H, t, *J* = 6.6Hz) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 190.1, 183.1, 177.3, 173.9, 173.5, 170.2, 69.6, 44.6, 44.2, 23.4, 16.5 ppm. HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calc. para C₁₀H₁₄N₂O₄K [M+K]⁺ 265.059, exp. 265.058.

(S)-metil2-(4-((2-((2-acetamidoetil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)-amino)butanamido)-3-fenilpropanoato, 26:

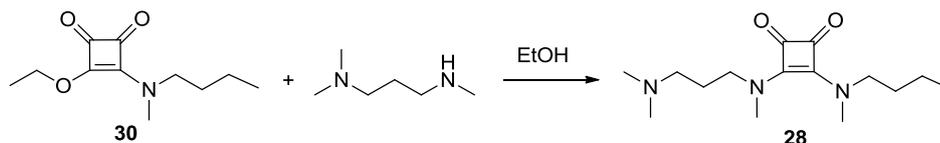


24 (200 mg, 0.53 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina obtenido se utilizó sin más purificación en el siguiente paso sintético. La sal de TFA se adicionó sobre una disolución de **25** (120 mg, 0.53 mmol) en MeOH (9 mL). Seguidamente se adicionó DIPEA (0.477 mL, 4.77 mmol) y se agitó la mezcla durante 96 h. Se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el aceite obtenido se lavó con Et_2O hasta obtener un sólido. El producto se precipitó a partir de una mezcla CH_2Cl_2 :hexano para rendir **26** (90 mg, 0.19 mmol) como un sólido blanco. R = 35 %. Mp: 105 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.76 (1H, br), 7.11 (2H, d, $J = 7.5\text{Hz}$), 7.67 (1H, br), 6.23 (1H, d, $J = 7.5\text{Hz}$), 4.86 (1H, q, $J = 6.6\text{Hz}$), 3.78 (5H, m), 3.48 (2H, t, $J = 5.4\text{Hz}$), 3.39 (3H, s), 3.16 (3H, m, $J = 5.7\text{Hz}$), 3.09 (2H, m, $J = 6.6\text{Hz}$), 2.30 (2H, q, $J = 6.6\text{Hz}$), 1.91 (2H, m), 1.59 (3H, br) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 183.4, 182.7, 172.9, 172.4, 171.8, 168.7, 167.8, 136.3, 129.6, 129.1, 127.6, 53.9, 53.0, 52.0, 44.2, 41.0, 38.2, 37.8, 31.6, 24.1, 23.5 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{Na}$ $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 939.4228, exp. 939.4243.

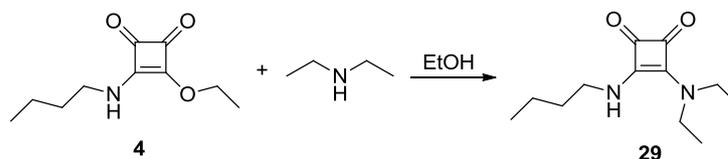
3-(butil(metil)amino)-4-ethoxiciclobut-3-en-1,2-diona, 30:



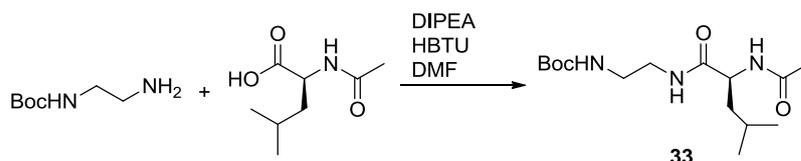
Una disolución de **4** (300 mg, 1.5 mmol) en DMF anhidro (6 ml) se adicionó a una suspensión de NaH 60 % (73 mg, 1.2 mmol) en DMF anhidro (8 ml) a 0 °C, en agitación y bajo atmósfera de N_2 . La mezcla se agitó durante 30 minutos a 0 °C. Seguidamente se adicionó yoduro de metilo (0.114 mL, 1.2 mmol), se eliminó el baño de agua-hielo y se agitó durante 30 minutos adicionales. A continuación se adicionó HCl 1M (2 mL) y la mezcla de reacción se diluyó en agua (20 mL). El crudo de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 20 mL), se lavó con HCl 3M (2 X 20 mL) y NaCl sat. (1 X 10 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El sólido obtenido se lavó con pentano para rendir **30** (273 mg, 1.30 mmol) como un aceite amarillo. R = 85 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 4.76 (2H, dq, $J = 6.9\text{Hz}$), 3.66 (1H, t, $J = 6.9\text{Hz}$), 3.40 (1H, t, $J = 7.2\text{Hz}$), 3.32 (1.5H, s), 1.13 (1.5H, s), 1.60 (2H, m, $J = 9\text{Hz}$), 1.44 (3H, t, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.33 (2H, q, $J = 7.2\text{Hz}$), 0.94 (3H, dt, $J = 7.2\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 189.5, 185.54, 182.9, 176.5, 69.9, 52.3, 36.4, 29.9, 19.8, 16.3, 14.1 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 234.1106, exp. 234.1114.

3-(butil(metil)amino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona, 28:

A N,N,N'-trimetil-1,3-diaminopropano (61 mg, 0.52 mmol) se adicionó **30** (100 mg, 0.47 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 h en ausencia de disolvente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (Al_2O_3 ; CH_2Cl_2 :EtOH, 98:2). El sólido obtenido se digirió en hexano (5 mL) y se filtró para obtener **28** (93 mg, 0.33 mmol) como un aceite amarillo. R = 70 %. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 3.69 (4H, m, $J = 7.2\text{Hz}$), 3.16 (6H, s), 2.32 (2H, t, $J = 7.2\text{Hz}$), 2.23 (6H, s), 1.82 (2H, m, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.62 (2H, m, $J = 7.5\text{Hz}$), 1.34 (2H, m, $J = 7.5\text{Hz}$), 0.94 (2H, t, $J = 7.5\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 184.1, 183.9, 169.3, 169.1, 56.7, 53.1, 51.4, 46.0, 40.4, 40.2, 30.4, 26.6, 20.1, 14.4 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 282.2176, exp. 282.2160.

3-(butilamino)-4-(dietilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona, 29:

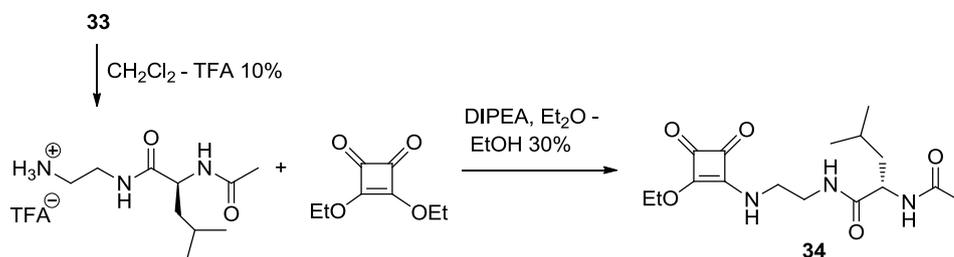
Se disolvieron dietilamina (61 mg, 0.52 mmol) y **4** (100 mg, 0.51 mmol) en EtOH (1 mL) y la mezcla se agitó durante 15 h. El crudo de reacción se digirió en hexano (5 mL) y se filtró para obtener **29** (111 mg, 0.50 mmol) como un sólido blanco. R = 98 %. Mp: 110 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 5.29 (1H, br), 3.75 (2H, q, $J = 6.9\text{Hz}$), 3.56 (4H, q, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.61 (2H, m, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.39 (6H, t, $J = 7.8\text{Hz}$), 1.94 (3H, t, $J = 6.9\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 183.2, 182.5, 167.9, 167.6, 44.8, 44.7, 34.0, 20.0, 15.7, 14.2 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 247.1422, exp. 247.1410.

(S)-tert-butil(2-(2-acetamido-4-metilpentanamido)etil)carbamate, 33:

El compuesto **33** se preparó a partir de (N-Boc)etilendiamina (477 mg, 2.89 mmol) y (N-acetil)leucina (500 mg, 2.89 mmol) en DMF (20 mL) según el procedimiento general de acoplamiento descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. Una vez transcurrida la reacción se eliminó el disolvente, se disolvió el crudo en CH_2Cl_2 (60 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 0.3M (4 X 60 mL), H_2O (2 X 60 mL) y NaCl sat. (60 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El producto se disolvió en Et_2O (60 mL) y se evaporó el 90 % del volumen de disolvente formándose un precipitado que se aisló mediante filtración para rendir **33** (170 mg, 0.54 mmol) como un sólido blanco. R = 19 %. Mp: 135 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 6.67 (1H, br), 5.88 (1H, br), 4.92 (1H, br), 4.42 (1H, m, $J = 5.4\text{Hz}$), 3.48 (2H, br), 3.28 (2H, br), 2.03 (3H, s), 1.57 (2H, m), 1.46 (11H, br), 0.96 (6H, s) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 173.2, 170.7, 157.0, 80.2, 52.3, 41.9, 40.9,

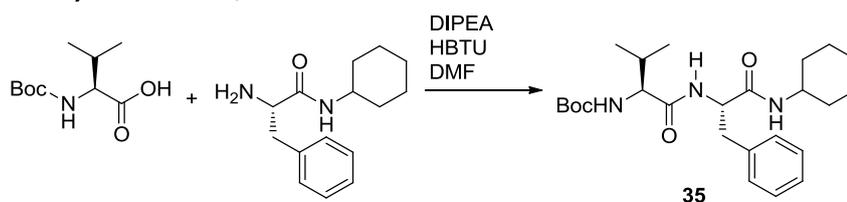
40.6, 34.4, 28.8, 25.2, 23.6, 23.2, 22.6 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $C_{15}H_{29}N_3O_4Na$ $[M+Na]^+$ 328.2056, exp. 328.2066.

(S)-2-acetamido-N-(2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)-4-metilpentanamida, 34:



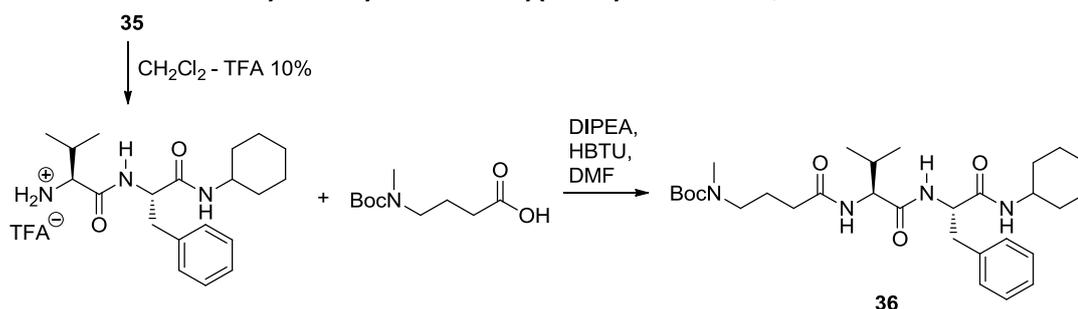
33 (160 mg, 0.51 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin posterior purificación. La sal de TFA se disolvió en una mezcla Et_2O :EtOH 2:1 v:v (18 mL) y sobre la disolución resultante se adicionó DIPEA (0.408 mL, 4.08 mmol). Esta disolución se adicionó gota a gota sobre otra de escuarato de dietilo (129 mg, 0.76 mmol) en Et_2O (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 48 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo de reacción se lavó con Et_2O y se decantó (4 X 20 mL) para rendir **34** (130 mg, 0.38 mmol) como un sólido blanco. R = 75 %. Mp: 151 °C; 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 4.75 (2H, br), 4.29 (1H, br), 3.58 (2H, br), 3.36 (2H, m, J = 7.8Hz), 2.02 (3H, s), 1.63 (3H, m), 1.47 (3H, t, J = 6.3Hz), 1.47 (6H, dd, J = 6.6Hz) ppm. ^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ : 190.1, 183.1, 177.3, 174.1, 173.2, 170.7, 69.6, 44.6, 44.2, 34.4, 25.2, 23.6, 23.2, 22.6, 16.5 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $C_{16}H_{25}N_3O_5Na$ $[M+Na]^+$ 362.1692, exp. 362.1702.

tert-butil((S)-1-(((S)-1-(ciclohexilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato, 35:



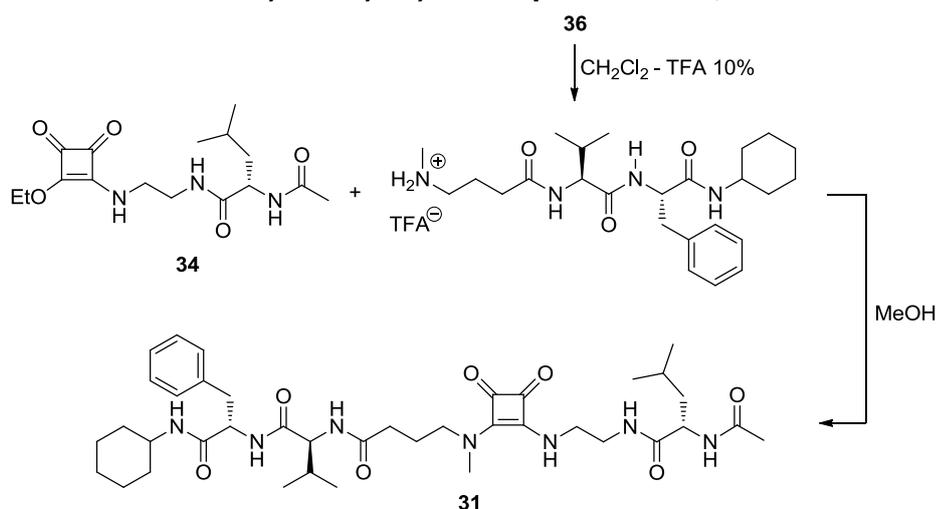
El compuesto **35** se obtuvo a partir de N-Boc-L-valina (265 mg, 1.22 mmol) y fenilalanina ciclohexilamida (300 mg, 1.22 mmol) en DMF (10 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. A la mezcla de reacción se adicionó CH_2Cl_2 (50 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 1M (3 X 50 mL), H_2O (50 mL) y NaCl sat. (50 mL), se secó ($MgSO_4$) y se concentró. El sólido obtenido se digirió en Et_2O (20 mL) y se filtró para rendir **35** (475 mg, 1.07 mmol) como un sólido blanco. R = 88 %. Mp: 205 °C con descomposición; 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 6.48 (1H, br), 5.74 (1H, br), 4.83 (1H, br), 4.57 (1H, q, J = 6.3Hz), 3.89 (1H, br), 3.67 (1H, m, J = 7.8Hz), 3.19 (1H, m, J = 7.8Hz), 2.99 (1H, m, J = 7.8 Hz), 2.18 (1H, m, J = 5.7Hz), 1.77 (2H, m), 1.58 (4H, m), 1.42 (9H, s), 1.26 (4H, m), 1.05 (2H, m), 0.93 (3.3H, d, J = 6.9Hz), 0.82 (2.7H, d, J = 6.9Hz) ppm. ^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ : 172.5, 162.9, 156.5, 79.8, 70.2, 50.1, 49.2, 37.9, 37.4, 37.0, 36.6, 28.8, 28.3, 16.3 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $C_{25}H_{39}N_3O_4K$ $[M+K]^+$ 484.258, exp. 484.257.

tert-butil(4-(((S)-1-(((S)-1-(ciclohexilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-4-oxobutil)(metil)carbamate, 36:



35 (150 mg, 0.34 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más purificación. Esta sal de TFA se combinó con ácido N-Boc-N-metil- γ -aminobutírico (74 mg, 0.34 mmol) en DMF (10 ml) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. El disolvente se eliminó bajo presión reducida, se disolvió el crudo en CH_2Cl_2 (25 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 3M (2 X 25 mL) y NaCl sat. (25 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El sólido obtenido se digirió en acetona (20 mL) y se filtró para rendir **36** (78 mg, 0.14 mmol) como un sólido blanco. R = 42 %. Mp: 210 °C con descomposición; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 6.97 (1H, d, J = 7.5Hz), 6.87 (1H, br), 6.25 (1H, br), 4.70 (1H, q, J = 5.4Hz), 3.68 (1H, br), 3.38 (1H, br), 3.20 (1H, br), 3.03 (2H, m), 2.84 (3H, s), 2.19 (3H, m), 1.77 (2H, br), 1.60 (4H, m), 1.48 (9H, s), 1.25 (4H, m), 1.07 (2H, m), 0.84 (6H, dd, J = 7.5Hz) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 174.3, 171.6, 170.0, 157.3, 137.9, 129.7, 128.8, 127.0, 80.4, 60.7, 54.6, 48.9, 47.2, 37.8, 34.5, 33.2, 33.0, 30.1, 28.9, 25.9, 25.4, 24.1 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 567.3522, exp. 567.3513.

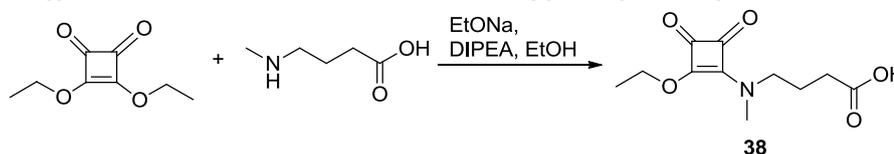
(S)-2-acetamido-N-(2-((2-((4-(((S)-1-(((S)-1-(ciclohexilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-4-oxobutil)(metil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)-4-metilpentanamida, 31:



36 (80 mg, 0.15 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más purificación. La sal de TFA se disolvió en MeOH (5 mL) y se adicionó DIPEA (0.135

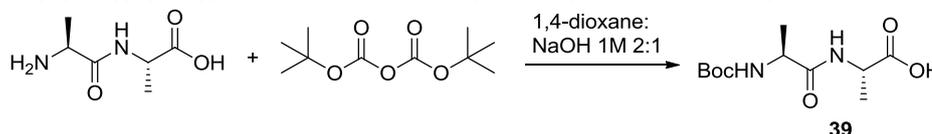
mL, 1.35 mmol). La disolución resultante se adicionó sobre una disolución de **34** (50 mg, 0.15 mmol) en MeOH (2 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 8 días. Finalmente, se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el sólido resultante se digirió en H₂O, se filtró y se secó para rendir **31** (81 mg, 0.11 mmol) como un sólido blanco. R = 73 %. Mp: 188 °C con descomposición; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): 8.03 (1H, br), 7.91 (3H, br), 7.60 (2H, br), 7.17 (5H, br), 4.44 (1H, q, *J* = 5.7Hz), 4.19 (1H, q, *J* = 7.2Hz), 4.04 (1H, br), 3.57 (2H, br), 3.14 (2H, br), 2.89 (1H, br), 2.79 (1H, d, *J* = 8.7Hz), 2.16 (2H, br), 1.78 (5H, br), 1.56 (6H, br), 1.35 (2H, br), 1.05 (6H, br), 0.81 (3H, d, *J* = 6.3Hz), 0.77 (3H, d, *J* = 6.6Hz), 0.71 (6H, d, *J* = 5.7Hz) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆): 183.3, 182.7, 173.5, 173.0, 171.6, 170.4, 170.0, 168.5, 168.1, 138.6, 130.0, 128.8, 127.1, 59.1, 54.6, 52.0, 48.3, 43.9, 41.9, 41.9, 38.6, 37.1, 33.1, 33.0, 32.2, 31.1, 26.1, 25.3, 25.1, 23.8, 23.4, 22.5, 20.0, 19.0 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₃₉H₅₉N₇O₇Na [M+Na]⁺ 760.4374, exp. 760.4375.

Ácido 4-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)butanoico, **38**:



A una disolución de ácido N-metil- γ -aminobutírico (150 mg, 0.98 mmol) en EtOH (15 mL) se adicionó EtONa (62 mg, 0.98 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min. Seguidamente se añadió DIPEA (0.490 mL, 4.90 mmol). La disolución resultante se adicionó gota a gota sobre una disolución de escuarato de dietilo (167 mg, 0.98 mmol) en EtOH (5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 48h. Transcurrido este tiempo se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el crudo de reacción se lavó con Et₂O (2 X 50 mL) y se disolvió en H₂O (20 mL). Se adicionó HCl 37 % a la disolución hasta alcanzar pH 1, y se extrajo el producto con CH₂Cl₂ (3 X 25 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Finalmente el producto se lavó con hexano para rendir **38** (115 mg, 0.48 mmol) como un aceite incoloro. R = 49 %. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 4.76 (2H, q, *J* = 7.2Hz), 3.74 (1.1H, t, *J* = 6.9Hz), 3.47 (2H, q, *J* = 6.9Hz), 3.34 (1.3H, s), 3.16 (1.7H, s), 2.43 (2H, m, *J* = 3.6Hz), 1.98 (2H, m, *J* = 6.9Hz), 1.451 (3H, t, *J* = 6.9Hz) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ : 189.2, 183.4, 183.2, 169.0, 168.4, 63.8, 58.6, 53.2, 46.7, 25.5, 25.4, 19.1, 7.7 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₁₁H₁₅NO₅Na [M+Na]⁺ 264.0848, exp. 264.0856.

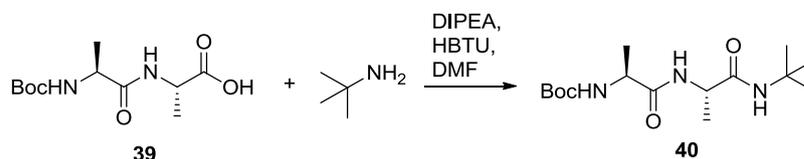
Ácido (S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)propanamido)propanoico, **39**:



Una disolución de L-Ala-L-Ala (250 mg, 1.56 mmol) en una mezcla NaOH 1M:dioxano 1:1 v:v (12 mL) se enfrió a 0 °C. A esa temperatura se adicionó gota a gota una disolución de Boc₂O (852 mg, 3.90 mmol) en dioxano (6 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h, observándose la aparición de un precipitado. El dioxano de la disolución se eliminó bajo presión reducida y se adicionó KHSO₄ 1M (20 mL). El producto se extrajo en AcOEt (3 X 30 mL) y la fase orgánica se lavó con NaCl sat. (40 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró para rendir

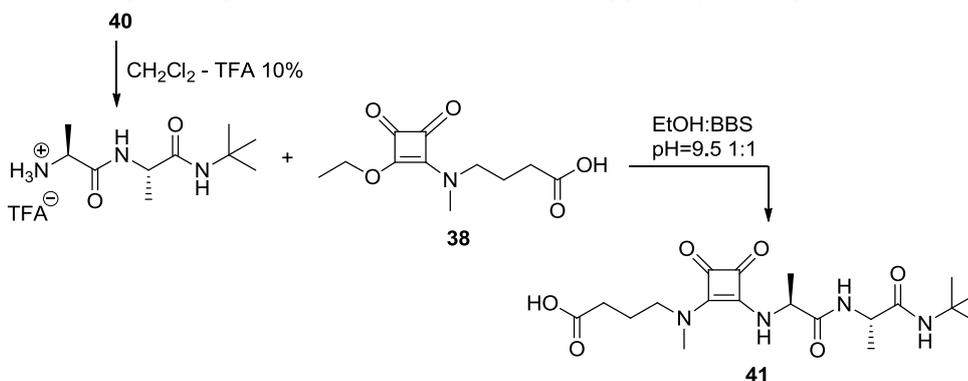
39 (372 mg, 1.43 mmol) como un sólido blanco. R = 92 %. Mp: 109 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 6.89 (1H, d, $J = 6.9\text{Hz}$), 5.15 (1H, br), 5.56 (1H, t, $J = 6.9\text{Hz}$), 4.22 (1H, br), 1.44 (12H, s), 3.55 (3H, d, $J = 6.9\text{Hz}$) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 176.0, 173.4, 156.2, 67.5, 50.4, 48.6, 28.7, 27.8, 18.6, 18.4 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{K} [\text{M}+\text{K}]^+$ 299.101, exp. 299.100.

tert-butil((S)-1-(((S)-1-(tert-butilamino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato, 40:



El compuesto **40** se sintetizó a partir de **39** (325 mg, 1.25 mmol) y *tert*-butilamina (365 mg, 4.99 mmol) en DMF (10 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. A la mezcla de reacción se adicionó CH_2Cl_2 (50 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 1M (4 X 30 mL), H_2O (50 mL) y NaCl sat. (50 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. Sobre el residuo obtenido se adicionó Et_2O (30 mL), se filtró y se eliminó el Et_2O de la disolución bajo presión reducida. El aceite obtenido se lavó con hexano para rendir **40** (209 mg, 0.66 mmol) como un sólido blanco. R = 53 %. Mp: 138 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 6.59 (1H, br), 5.94 (1H, s), 4.93 (1H, br), 4.31 (1H, t, $J = 7.2\text{Hz}$), 4.11 (1H, br), 1.44 (9H, s), 1.33 (15H, s) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 172.9, 171.5, 80.4, 51.7, 50.9, 49.7, 29.1, 28.7, 18.9, 18.6 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 338.204, exp. 338.206.

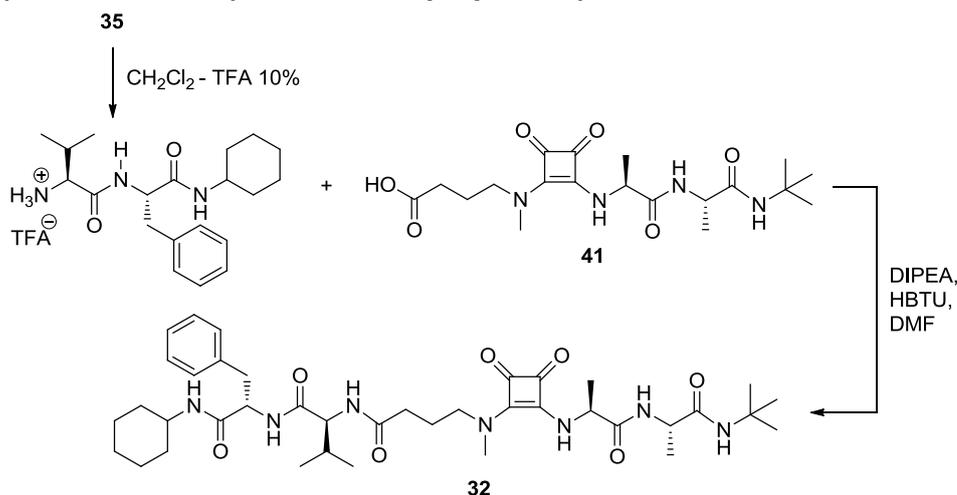
Ácido 4-((2-(((S)-1-(((S)-1-(tert-butilamino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)butanoico, 41:



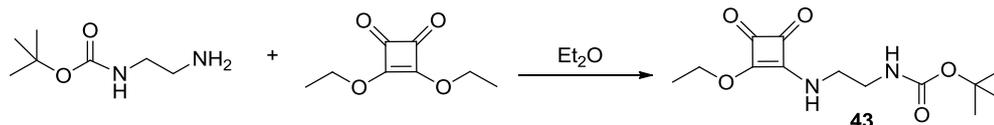
40 (189 mg, 0.60 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más purificación. La sal de TFA se disolvió en H_2O (1 mL) y se adicionó NaOH 1M hasta llegar a pH 9. Sobre esta disolución se adicionó tampón BBS (6 mL). La mezcla resultante se adicionó sobre una disolución de **38** (145 mg, 0.60 mmol) en EtOH (7 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 h. El EtOH de la mezcla se eliminó bajo presión reducida. Sobre el residuo se adicionaron 10 mL de H_2O y la disolución se acidificó con HCl al 37 % hasta alcanzar pH 1. El producto se extrajo en AcOEt (2 X 20 mL) y la fase orgánica se secó (MgSO_4) y se concentró. Finalmente se digirió el producto en Et_2O y se filtró para rendir **41** (123 mg, 0.30 mmol) como un sólido blanco.

R = 50 %. Mp: 147 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12.15 (1H, br), 7.92 (1H, d, *J* = 7.5Hz), 7.57 (1H, d, *J* = 8.1Hz), 7.29 (1H, s), 4.82 (1H, m, *J* = 7.8Hz), 4.17 (1H, q, *J* = 7.2Hz), 3.18 (2H, s), 2.23 (3H, br), 1.77 (2H, t, *J* = 6.6Hz), 1.33 (3H, d, *J* = 6.9Hz), 1.20 (9H, s), 1.14 (3H, d, *J* = 7.2Hz) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 183.8, 182.8, 177.0, 172.3, 172.0, 168.9, 167.3, 53.2, 51.3, 50.9, 49.5, 31.2, 29.3, 23.8, 19.9, 19.3 ppm. HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calc. para C₁₉H₃₁N₄O₆ [M+H]⁺ 441.224, exp. 411.226.

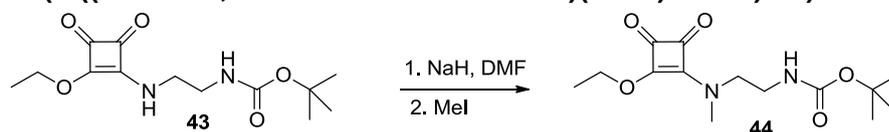
(S)-2-(4-((2-(((S)-1-(((S)-1-(tert-butylamino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)butanamido)-N-((S)-1-(ciclohexilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-3-metilbutanamida, 32:



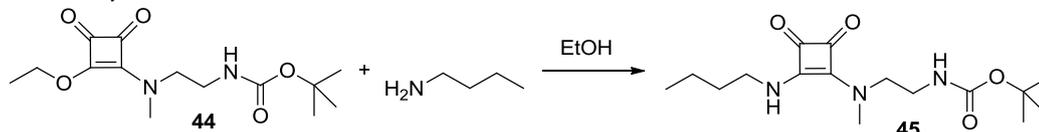
35 (127 mg, 0.29 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más purificación. Esta sal de TFA se combinó con **41** (90 mg, 0.22 mmol) en DMF (10ml) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. Se adicionó CH₂Cl₂ (30 mL) sobre la mezcla de reacción y la disolución obtenida se lavó con HCl 1M (2 X 25 mL) y NaCl sat. (25 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró. El sólido obtenido se digirió en Et₂O, se filtró y se precipitó a partir de una mezcla CH₂Cl₂:hexano. El sólido obtenido se digirió en H₂O ligeramente ácida (4 X 10 mL a pH 5) para rendir **32** (75 mg, 0.10 mmol) como un sólido blanco. R = 46 %. Mp: 160 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8.52 (1H, d, *J* = 8.4Hz), 7.94 (2H, br), 7.33 (1H, d, *J* = 7.5Hz), 7.23 (7H, s), 4.83 (0.5H, m), 4.57 (1H, br), 4.44 (0.5H, m), 4.17 (0.5H, m), 4.04 (0.5H, br), 3.65 (1H, t, *J* = 7.2Hz), 2.81 (8H, br), 2.18 (2H, br), 1.98 (2H, q, *J* = 6.6Hz), 1.62 (7H, br), 1.35 (2H, d, *J* = 6.9Hz), 1.20 (9H, s), 1.12 (3H, br), 0.92 (3H, d, *J* = 6.6Hz), 0.85 (3H, d, *J* = 6.6Hz), 0.70 (3H, d, *J* = 6.6Hz) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 183.9, 182.6, 172.9, 172.2, 172.1, 171.5, 170.4, 168.5, 167.4, 138.6, 130.0, 128.8, 127.0, 59.0, 54.6, 53.2, 50.9, 49.5, 48.3, 38.7, 33.1, 33.0, 31.1, 29.3, 26.1, 25.3, 24.4, 20.0, 19.9, 19.3, 19.0 ppm. HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calc. para C₃₉H₅₉N₇O₇Na [M+Na]⁺ 760.437, exp. 760.439.

tert-butil(2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)-carbamato, 43.

Una disolución de N-Boc-etilendiamina (2.0 g, 12.5 mmol) en Et₂O (100 ml) se adicionó gota a gota a una disolución de escurato de dietilo (2.55 g, 15.0 mmol) en Et₂O (20 mL) en agitación. La mezcla se agitó durante 12 h a temperatura ambiente, formándose un precipitado blanco. El sólido se filtró, se lavó con Et₂O frío, se disolvió en CH₂Cl₂ y se precipitó con pentano, obteniéndose **43** (3.34 g, 11.7 mmol) como un sólido blanco. R = 94 %. Mp: 106 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ: 6.83 (0.6H, s), 6.06 (0.4H, s), 4.97 (1H, s), 4.75 (2H, s), 3.76 (0.8H, s), 3.55 (1.2H, s), 3.36 (2H, q, *J* = 4,5Hz), 1.42 (12H, s). ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 190.1, 183.1, 178.1, 173.2, 156.7, 80.2, 70.3, 45.6, 41.1, 28.8, 16.3. HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calc. para C₁₃H₂₀N₂O₅K [M+K]⁺ 323.1009, exp. 323.1009.

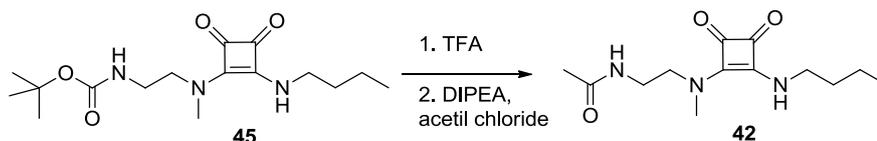
tert-butil(2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)etil)carbamato, 44.

Una disolución de **43** (3.0 g, 10.5 mmol) en DMF anhidro (35 ml) se adicionó a una suspensión de NaH 60 % (506 mg, 12.7 mmol) en DMF anhidro (25 ml) a 0° C, en agitación y bajo atmósfera de N₂. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 0° C. Seguidamente se adicionó yoduro de metilo (0.79 mL, 12.7 mmol), se eliminó el baño de agua-hielo y se agitó durante 30 minutos más. A continuación se adicionó HCl 1M (20 mL) y la mezcla de reacción se diluyó en agua (200 mL). El crudo de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 200 mL), se lavó con HCl 3M (2 X 200 mL) y NaCl sat. (1 X 30 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró. El sólido obtenido se lavó con pentano para rendir **44a** (2.55 g, 8.55 mmol) como un sólido blanco. R = 81 %. Mp: 105 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ: 4.75 (2H, q, *J* = 7,0 Hz), 3.71 (1.5H, t, *J* = 5.3 Hz), 3.46, (0.5H, q, *J* = 5.4 Hz), 3.39 (2H, q, *J* = 6.0 Hz), 3.38 (1H, s), 3.21 (2H, s), 1.41 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.39 (9H, s). ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 189.6, 182.7, 177., 173.1, 156.7, 80.16, 70.1, 70.1, 51.8, 38.1, 37.5, 28.7, 16.4. HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calc. para C₁₄H₂₂N₂O₅Na [M+Na]⁺ 321.1426, exp. 321.1406.

tert-butil(2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)-amino)etil)-carbamato, 45.

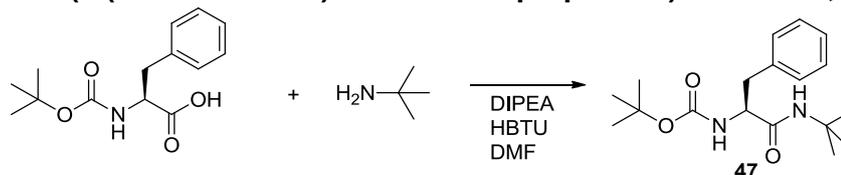
A una disolución de **44a** (200 mg, 0.67 mmol) en EtOH (3 mL) se añadió n-butilamina (196 mg, 2.68 mmol), manteniendo el medio en agitación. La mezcla se agitó durante 12 h a temperatura ambiente y seguidamente se concentró a sequedad. El crudo de reacción se lavó con pentano y se precipitó a partir de una mezcla CH₂Cl₂-pentano para rendir **45** (208 mg, 0.64 mmol) como un sólido blanco. R = 95 %. Mp: 137 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ: 4.98 (1H, br), 3.76 (2H, q, *J* = 6.2 Hz), 3.38 (5H, s), 3.27 (2H, q, *J* = 5.4 Hz), 1.63 (2H, m, *J* = 7.6 Hz), 1.44 (9H, s), 1.39 (2H, m, *J* = 7.2Hz), 0.93 (3H, t, *J* = 7.3Hz). ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 183.5, 183.3, 168.4, 168.1, 157.6, 81.2, 51.1, 44.8, 40.4, 38.2, 33.4, 28.7, 20.1, 14.2. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₁₆H₂₇N₃O₄Na [2M+Na]⁺ 673.3884, exp. 673.3901.

N-(2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)-etil)acetamida, 42



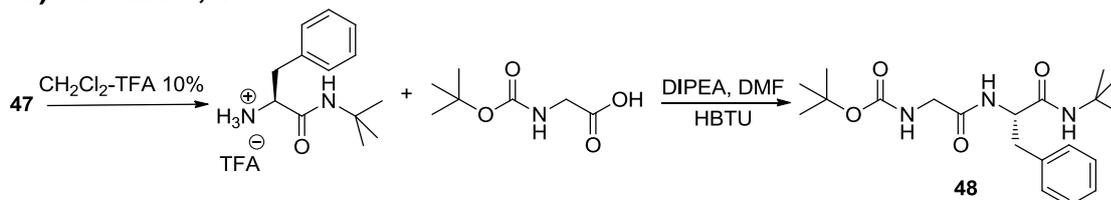
Un disolución de **45** (200 mg, 0.62 mmol) en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón, obteniéndose la correspondiente sal de trifluoroacetato de la amina, que se utilizó sin posterior purificación. La sal se disolvió en CH_2Cl_2 y con DIPEA (0.856 ml, 4.92 mmol). La mezcla se enfrió a 0°C y se adicionó cloruro de acetilo (0.223 ml, 3.07 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1.5 h, se concentró y el crudo se purificó por cromatografía en columna (Al_2O_3 ; CH_2Cl_2 :EtOH, 100:0 \rightarrow 98:2). El producto obtenido se lavó con Et_2O para obtener **42** (25 mg, 0.09 mmol) como un sólido blanco. R = 15 %. Mp: 176°C ; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 6.45 (1H, s), 3.75 (2H, q, $J = 6.5$ Hz), 3.38 (7H, s), 2.03 (3H, s), 1.64 (2H, m, $J = 7.3$ Hz), 1.39 (2H, m, $J = 7.7$ Hz), 0.94 (3H, t, $J = 7.3$ Hz) ppm. ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.3, 183.0, 173.2, 168.3, 168.2, 50.4, 44.9, 39.5, 38.2, 33.8, 23.2, 20.1, 14.2 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{Cs}$ $[\text{M}+\text{Cs}]^+$ 400.0637, exp. 400.0623.

(S)-tert-butil(1-(tert-butilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato, 47



El compuesto **47** se sintetizó a partir de Boc-Phe-OH (500 mg, 1.89 mmol) y tert-butilamina (248 mg, 3.39 mmol) en DMF (15 mL) según el procedimiento general para el acoplamiento amídico descrito anteriormente. Finalizado el tiempo de reacción se eliminó el disolvente y el crudo se disolvió en CH_2Cl_2 (25 mL). La disolución obtenida se lavó con HCl 3M (2 X 25 mL), NaCl sat. (25 mL), se secó (MgSO_4) y se concentró. El residuo obtenido se disolvió en Et_2O , se filtró y concentró. Esta operación se repitió utilizando pentano. El producto sólido obtenido de la disolución de pentano se lavó con hexano para rendir **47** (362 mg, 1.13 mmol) como un sólido blanco. R = 60 %. Mp: 133°C ; ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.26 (m), 5.22 (2H, br), 4.14 (1H, q, $J = 5.8$ Hz), 3.09 (1H, dd, $J = 5.7$ Hz), 2.93 (1H, dd, $J = 6.2$ Hz), 1.43 (9H, s), 1.20 (9H, s) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 170.4, 155.7, 137.6, 129.9, 129.1, 127.3, 80.4, 57.0, 51.6, 39.6, 28.9, 28.7 ppm. HRMS (MALDI-TOF): m/z calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 343.1998, exp. 343.1999.

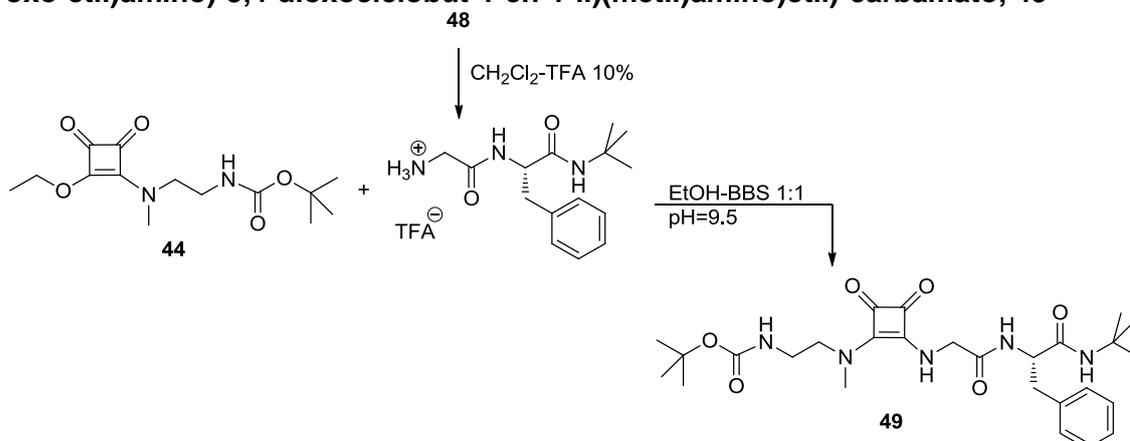
(S)-tert-butil(2-((1-(tert-butilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxo-etil)carbamato, 48



47 (200 mg, 0.62 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 :TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina resultante se utilizó

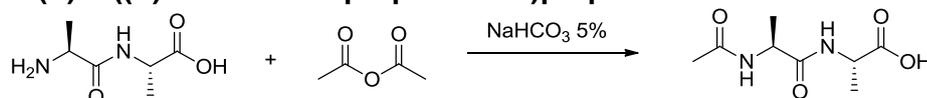
sin más purificación. Esta sal de TFA se combinó con Boc-Gly-OH (109 mg, 0.62 mmol) en DMF (20ml) según el procedimiento general descrito anteriormente. El disolvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo se disolvió en CH₂Cl₂ (25 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 3M (2 X 25 mL) y NaCl sat. (25 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró. El crudo se trató con pentano. El líquido se decantó y se evaporó parcialmente hasta obtener un precipitado, el cual se filtró. El procedimiento de disolución-precipitación se repitió dos veces más para obtener **48** (180 mg, 0.48 mmol) como un sólido blanco. R = 76 %. Mp: 163 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7.26 (m), 6.70 (1H, d, *J* = 6.4 Hz), 5.20 (1H, s), 5.04 (1H, s), 4.47 (1H, q), 3.79 (2H, d, *J* = 5.6 Hz), 3.17 (1H, dd, *J* = 5.0 Hz), 2.88 (1H, dd, *J* = 8.9 Hz), 1.44 (9H, s), 1.18 (9H, s) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 169.7, 169.4, 156.4, 137.2, 129.9, 129.1, 127.5, 80.8, 55.4, 51.9, 44.8, 39.4, 28.9, 28.7 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₂₀H₃₁N₃O₄Na [M+Na]⁺ 400.2212, exp. 400.2210.

(S)-tert-butil(2-((2-((2-((1-(tert-butilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxo-etil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)etil)-carbamato, 49



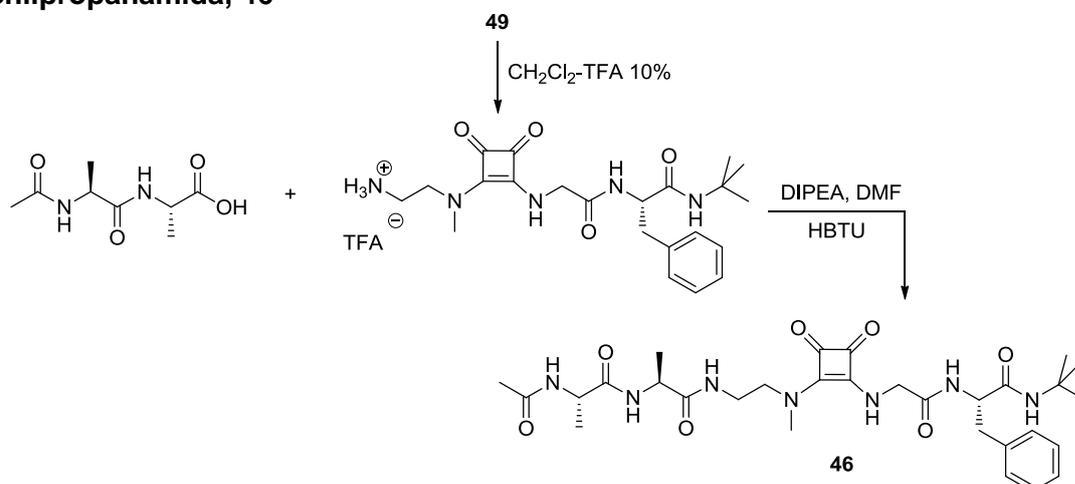
48 (150 mg, 0.40 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin más purificación. La sal de TFA se disolvió en una disolución de tampón borato (BBS) de pH 9.5 (5 mL). Sobre dicha disolución se añadió una disolución de **44a** (119 mg, 0.40 mmol) en EtOH (5 mL) y la mezcla se agitó durante 4 días. El EtOH de la mezcla se eliminó bajo presión reducida y se añadió agua destilada (15 mL) a la disolución acuosa restante. La disolución se acidificó con HCl 37 % hasta pH 2 y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinaron y concentraron. El residuo obtenido se lavó con Et₂O y se cristalizó a partir de una mezcla CH₂Cl₂ - pentano para rendir **49** (100 mg, 0.19 mmol) como un sólido blanco. R = 48 %. Mp: 200 °C; ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7,23 (m), 6,87 (1H, dd, *J* = 7,0 Hz), 5,28 (1H, br), 4,99 (1H, br), 4,48 (1H, q, *J* = 6,1 Hz), 4,33 (2H, d, *J* = 5,8 Hz), 3,37 (7H, br), 3,31 (1H, dd, *J* = 14,9 Hz), 2,94 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz), 1,41 (9H, s), 1,19 (9H, s) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 183.8, 169.7, 169.2, 168.9, 167.3, 157.4, 137.3, 129.8, 129.1, 128.9, 127.4, 80.2, 55.7, 51.9, 47.4, 39.2, 38.2, 28.9, 28.7 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₂₇H₃₉N₅O₆Na [M+Na]⁺ 552.2798, exp. 552.2782.

Ácido (S)-2-((S)-2-acetamidopropanamido)propanoico



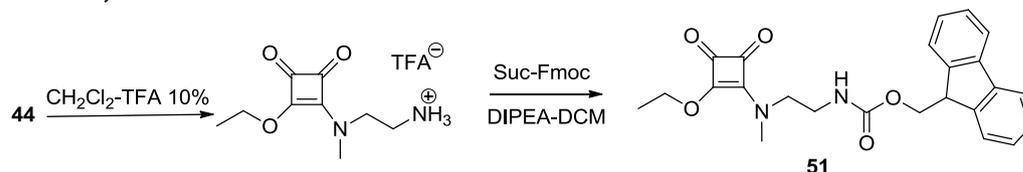
Ac-L-Ala-L-Ala-OH se preparó mediante el procedimiento descrito en la bibliografía.³

(S)-2-(2-((2-((S)-2-((S)-2-acetamidopropanamido)propanamido)etil)(metil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)acetamido)-N-(tert-butil)-3-fenilpropanamida, 46



Una disolución de **49** (90 mg, 0.17 mmol) en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin purificar. Esta sal de TFA se combinó con Ac-L-Ala-L-Ala (62 mg, 0.31 mmol) en DMF (10 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el crudo se lavó con Et₂O. El residuo se disolvió en acetato de etilo (20 mL), se filtró, y se extrajo con agua (2 x 15 mL). La fase acuosa se concentró y el producto se purificó por HPLC en fase reversa [Columna: XBridge Prep C18 5µm CDBTM, 19 x 150 mm; detector a λ = 254 nm; Fase móvil: isocrático H₂O-CH₃CN 80/20 durante 30 min., flujo: 3 mL/min] para rendir **46** (20 mg, 0.03 mmol) como un sólido blanco. R = 20 %. Mp: 258 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 7.25 (2H, d, *J* = 6.3 Hz), 7.21 (3H, d, *J* = 5.9 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 4.8 Hz), 6.43 (1H, s), 4.51 (1H, q, *J* = 6.0 Hz), 4.27 (2H, m, *J* = 7.3 Hz), 4.15 (1H, m, *J* = 1.3 Hz), 4.11 (0.6H, d, *J* = 5.7 Hz), 4.08 (0.4H, d, *J* = 5.9 Hz), 3.44 (2H, m, *J* = 7.0 Hz), 3.29 (5H, br), 3.02 (1H, dd, *J* = 5.9 Hz), 2.91 (1H, dd, *J* = 8.0 Hz), 1.91 (3H, s), 1.28 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 1.24 (9H, s), 1.23 (3H, d, *J* = 7.3 Hz) ppm. ¹³C RMN (CD₃CN) δ: 172.9, 171.8, 170.2, 169.2, 137.9, 129.9, 128.7, 126.9, 55.1, 51.2, 51.0, 49.4, 47.0, 38.5, 37.8, 37.0, 28.2, 22.5, 17.2. ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₃₀H₄₃N₇O₇Na [M+Na]⁺ 636.3122, exp. 636.3114. tR (HPLC) = 21.52 min.

(9H-fluoren-9-il)metil(2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)etil)-carbamato, 51

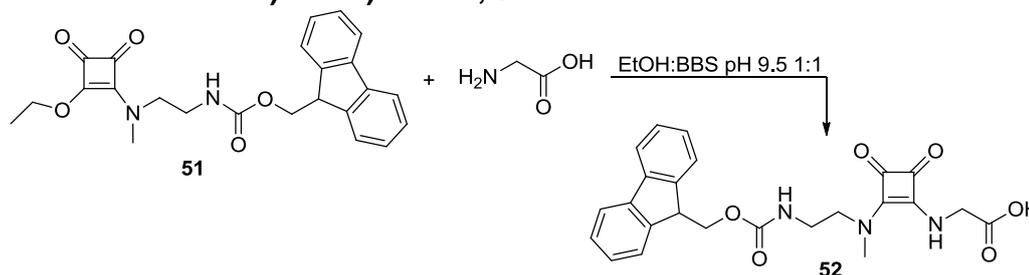


Una disolución de **44a** (0.664 g, 3.35 mmol) en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente, se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin purificar. Esta sal de TFA se añadió a una disolución de N-hidroxisuccinimida éster de

³ Cox, R. J.; Jenkins, H.; Schouten, J. A.; Stentiford, R. A.; Wareing, K. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 2023.

Fmoc (1.130 g, 3.35 mmol) y DIPEA (2.334 mL, 13.40 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 h. Seguidamente se lavó la disolución con HCl 3M (2 x 50 mL), H₂O (50 mL) y NaCl sat. (50 mL), se secó (MgSO₄) y se concentró. Finalmente el producto se digirió en pentano y se filtró, para rendir **44b** (1.272 g, 3.03 mmol) como un sólido blanco. R = 90%. Mp: 100 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 7.75 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.40 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.32 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 5.17 (0.6H, br), 4.90 (0.4H, br), 4.71 (2H, m, *J* = 7.1 Hz), 4.48 (1H, d, *J* = 6.2 Hz), 4.34 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 4.19 (1H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.77 (1H, t, *J* = 5.4 Hz), 3.49 (2H, m, *J* = 5.5 Hz), 3.34 (1H, s), 3.20 (2H, s), 1.39 (3H, t, *J* = 7.1 Hz) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 190.1, 182.5, 175.7, 173.0, 157.3, 144.2, 141.7, 128.2, 127.6, 125.5, 125.3, 120.5, 120.4, 70.3, 67.6, 51.3, 47.5, 38.9, 37.5, 16.2 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₂₄H₂₄N₂O₅Na [M+Na]⁺ 443.1583, exp. 443.1592.

Ácido 2-((2-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etil)(metil)-amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)acético, **52**



Una disolución de **44b** (1.272 g, 3.03 mmol) en ethanol (25 ml) se adicionó gota a gota sobre otra de Gly (0.727 g, 9.68 mmol) en tampón borato (BBS) pH 9.5 (25 mL), y la mezcla de reacción se agitó durante 14 h a temperatura ambiente. El EtOH de la mezcla se eliminó a baja presión y la disolución acuosa resultante se acidificó con HCl 37 % hasta pH 2. El precipitado blanco formado se separó del líquido por filtración. El producto se lavó con agua fría y se secó bajo una corriente de argón para rendir **51** (1.266 g, 2.82 mmol) como un sólido blanco. R = 94 %. Mp: 123 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 7.71 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.36 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.28 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.13 (1H, s b), 4.38 (4H, d, *J* = 5.8 Hz), 4.16 (1H, t, *J* = 6.5 Hz), 3.30 (7H, s) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 183.7, 183.2, 172.2, 169.0, 168.3, 157.2, 144.7, 141.6, 129.8, 128.5, 128.0, 126.0, 121.0, 66.4, 51.7, 47.6, 45.4, 40.4, 37.9 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₂₄H₂₃N₃O₆Na [M+Na]⁺ 472.1485, exp. 472.1492.

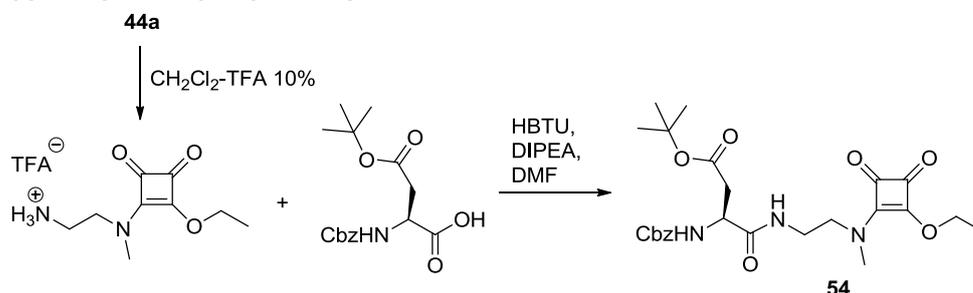
Escuaramidopeptido **50⁴**

El compuesto **50** se sintetizó en una resina de Cloro Tritil (f=1.7 mmol/g) utilizando química Fmoc estándar. Se utilizaron Oxima y DIC como agentes de acoplamiento. Tras completar la síntesis, el péptido se liberó de la resina usando una mezcla de TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) durante 2 h. El producto se purificó mediante HPLC de fase reversa en una columna C₁₈ (XBridge Prep C18 5µm OBD 19x100 mm) usando H₂O (0.1% HCOOH)-acetonitrilo (0.1% HCOOH) con un gradiente (95:5-80:20 en un minute y 80:20-65:35 en 6 minutos). La pureza del péptido fue comprobada por HPLC-MS con una columna analítica C18 (XSelect 3.5 µm 4.6x50 mm) en water (0.1% HCOOH)-

⁴ La síntesis del pseudopéptido **50** se llevó a cabo en la unidad de química combinatoria del Parc Científic de Barcelona, en el grupo de la doctora M. Royo.

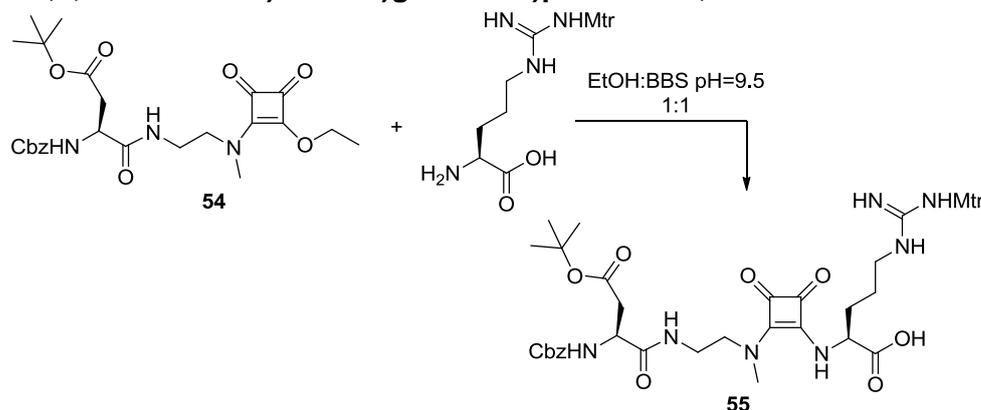
acetonitrilo (0.1% HCOOH) con un gradiente (95:5-0:100 en 4.5 minutos). MS: m/z calc. para C₇₀H₁₀₃N₁₈O₁₆ [$M^{+3}/3$] 483.93, exp. 484.22. tR (HPLC) = 1.30 min.

(S)-tert-butil-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-4-((2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)etil)amino)-4-oxobutanoato, 54:



44a (1.000 g, 3.35 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂:TFA 9:1 v:v (15 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se eliminó el disolvente y el exceso de TFA con una corriente de argón. El trifluoroacetato de la amina se utilizó sin purificar. Esta sal de TFA se combinó con Asp^{(t)Bu}Cbz (1.192 mg, 3.69 mmol) en DMF (10 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente. La mezcla de reacción se disolvió en CH₂Cl₂ (60 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 1M (3 X 50 mL), H₂O (50 mL), NaOH 0.05 M (2 X 30 mL) y NaCl sat. (50 mL). Finalmente se secó la disolución (MgSO₄) y se concentró para obtener **54** (627 mg, 1.245 mmol) como un aceite ligeramente amarillo. R = 37 %. ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7.36 (4H, m), 6.99 (0.3H, br), 6.89 (0.7H, br), 6.03 (0.3H, t, *J* = 8.1 Hz), 5.83 (0.7H, t, *J* = 8.1 Hz), 5.15 (2H, br), 4.74 (2H, q, *J* = 6.9 Hz), 4.46 (1H, br), 3.63 (2H, br), 3.48 (2H, br), 3.31 (1H, s), 3.16 (1H, s), 2.89 (1H, m), 2.59 (1H, m), 1.41 (12H, m) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 190.0, 189.3, 182.9, 182.7, 177.4, 176.6, 172.7, 172.6, 171.9, 171.8, 171.4, 156.7, 136.6, 136.4, 128.9, 82.0, 70.1, 67.9, 51.9, 50.8, 37.7, 37.4, 28.4, 16.2 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para C₂₅H₃₃N₃O₈Na [M+Na]⁺ 526.2165, exp. 526.2155.

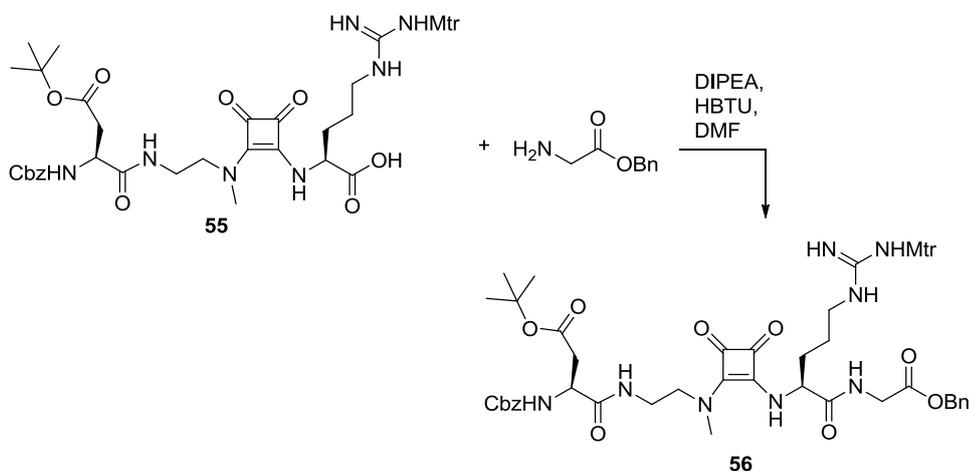
Ácido (S)-2-((2-((S)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)-4-(tert-butoxi)-4-oxobutana-mido)etil)(metil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5-(3-((4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)sulfonil)guanidino)pentanoico, 55:



A una disolución de **54** (480 mg, 0.953 mmol) en EtOH (10 mL) se adicionó una disolución de Arg(Mtr) (504 mg, 1.049 mmol) en tampón borato (BBS) pH 9.5 (10 mL) y la mezcla se agitó durante 15 h. El EtOH de la mezcla se eliminó bajo presión reducida y se añadió agua destilada (20 mL). La disolución acuosa resultante se acidificó con HCl 37 % hasta pH 2. El precipitado blanco formado se separó del líquido por filtración.

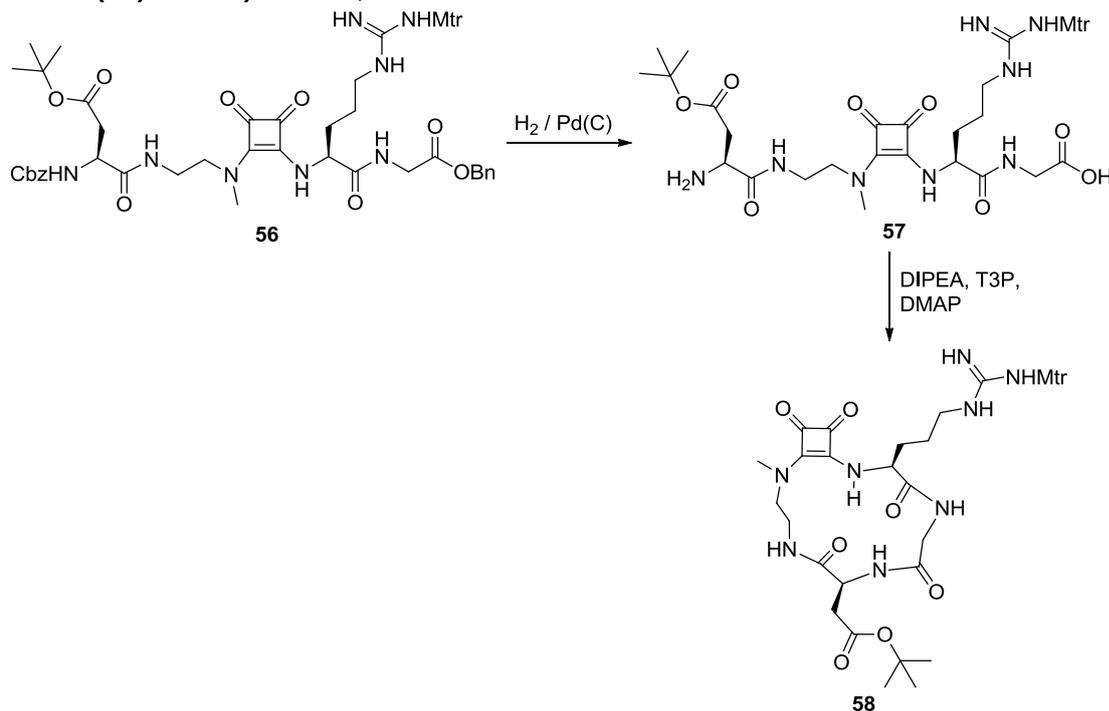
El producto se lavó con agua fría y con Et₂O, y seguidamente se secó bajo una corriente de argón para rendir **55** (710 mg, 0.84 mmol) como un sólido blanco. R = 88 %. Mp: 145 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12.87 (2H, br), 8.19 (1H, br), 7.71 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.31 (5H, br), 6.75 (1H, br), 6.65, (1H, s), 6.38 (1H, br), 4.99 (2H, m), 4.76 (1H, br), 4.29 (1H, br), 3.76 (3H, s), 3.26 (4H, br), 3.04 (2H, br), 2.56 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.83 (1H, br), 1.67 (2H, br), 1.49 (2H, br), 1.49 (9H, s) ppm. ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 183.3, 182.9, 171.9, 170.2, 167.7, 158.3, 157.3, 156.6, 138.5, 137.8, 137.8, 136.4, 135.5, 129.2, 128.6, 124.4, 112.6, 81.0, 66.4, 56.3, 52.5, 51.2, 38.4, 30.5, 28.5, 26.3, 24.5, 18.9, 12.6 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₃₉H₅₃N₇O₁₂NaS [M+Na]⁺ 866.3371, exp. 866.3361.

(S)-tert-butil-4-((2-((2-(((S)-1-((2-(benciloxi)-2-oxoetil)amino)-5-(3-((4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)sulfonyl)guanidino)-1-oxopentan-2-il)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)(metil)amino)etil)amino)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-4-oxobutanoato, **56:**



El compuesto **56** se sintetizó a partir de **55** (650 mg, 0.77 mmol) y Glyc-OBn (202 mg, 1.00 mmol) en DMF (4 mL) según el procedimiento general descrito anteriormente para el acoplamiento amídico. La mezcla de reacción se diluyó en CH₂Cl₂ (25 mL) y la disolución obtenida se lavó con HCl 1M (3 X 20 mL), H₂O (20 mL) y NaCl sat. (20 mL). Finalmente se secó la disolución (MgSO₄) y se concentró para obtener **56** (572 mg, 0.577 mmol) como un sólido blanco. R = 75 %. Mp: 90 °C con descomposición; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8.47 (1H, br), 8.15 (1H, br), 7.61 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.50 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.31 (5H, br), 6.64 (2H, br), 6.36 (1H, br), 5.08 (2H, s), 4.98 (1H, m), 4.84 (1H, br), 4.29 (1H, br), 3.86 (2H, m), 3.75 (3H, s), 3.01 (2H, br), 2.56 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.79 (1H, br), 1.63 (1H, br), 1.44 (2H, br), 1.31 (9H, s) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ: 183.1, 173.2, 172.5, 171.1, 170.0, 169.2, 166.5, 158.8, 156.9, 139.0, 136.9, 136.5, 135.6, 134.1, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 125.2, 112.1, 82.2, 67.7, 67.5, 67.7, 67.5, 55.8, 41.8, 40.9, 38.0, 37.6, 28.4, 18.8, 12.4 ppm. HRMS (ESI): *m/z* calc. para C₄₈H₆₂N₈O₁₃NaS [M+Na]⁺ 1013.4055, exp. 1013.4060.

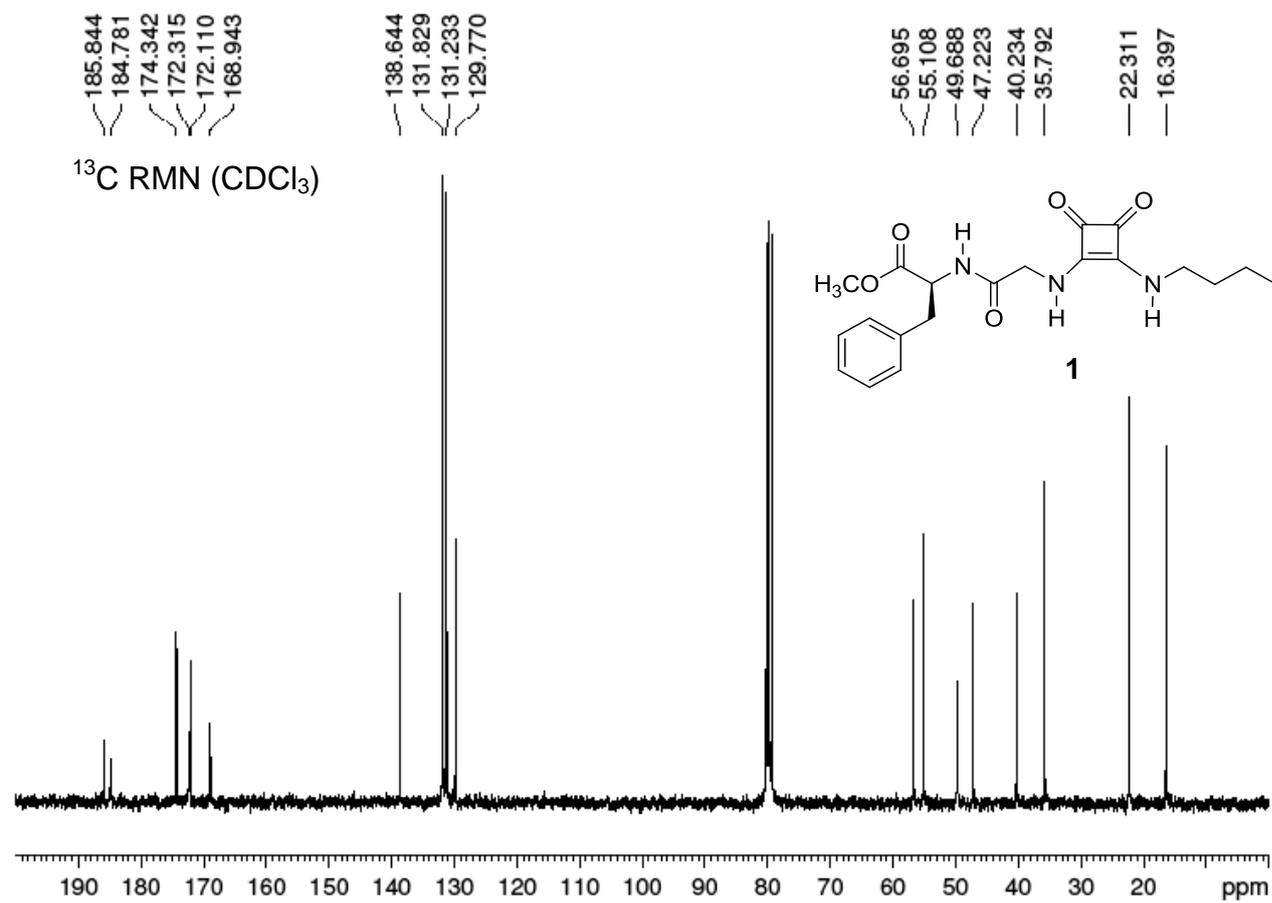
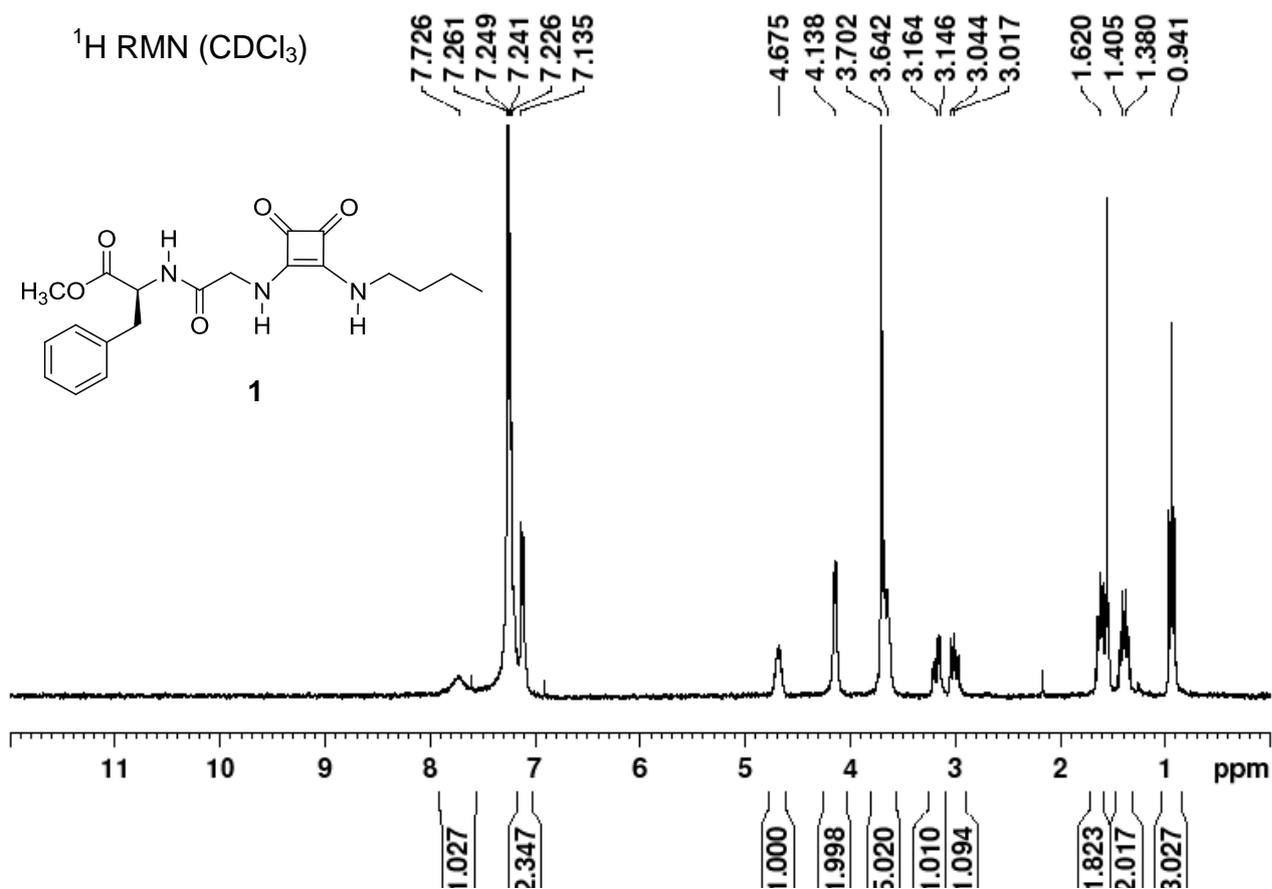
tert-butil-2-((7S,13S)-13-(3-(3-((4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)sulfonil)guanidino)propil)-2-metil-6,9,12,16,17-pentaoxo-2,5,8,11,14-pentazabiciclo[13.2.0]heptadec-1(15)-en-7-il)acetato, **58:**

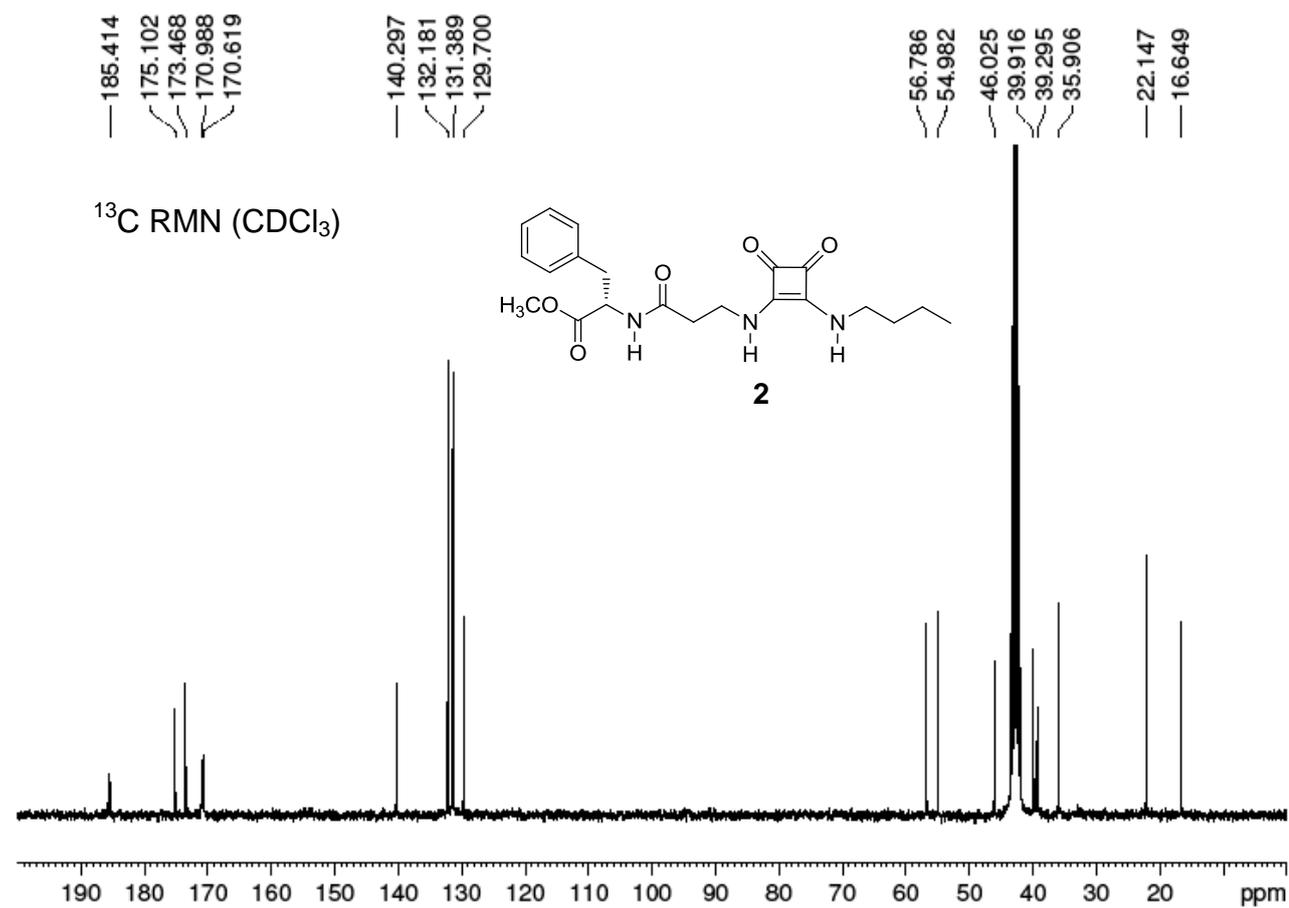
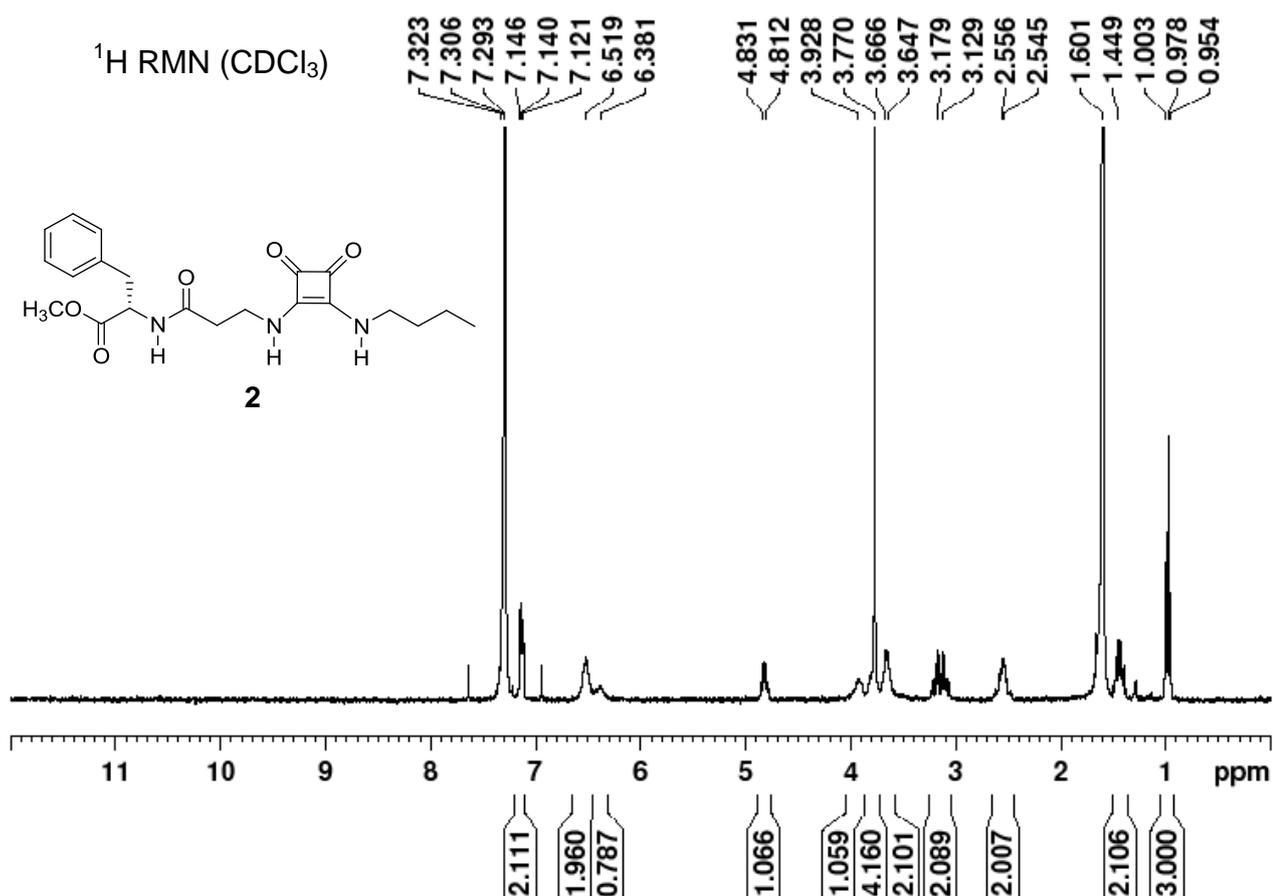


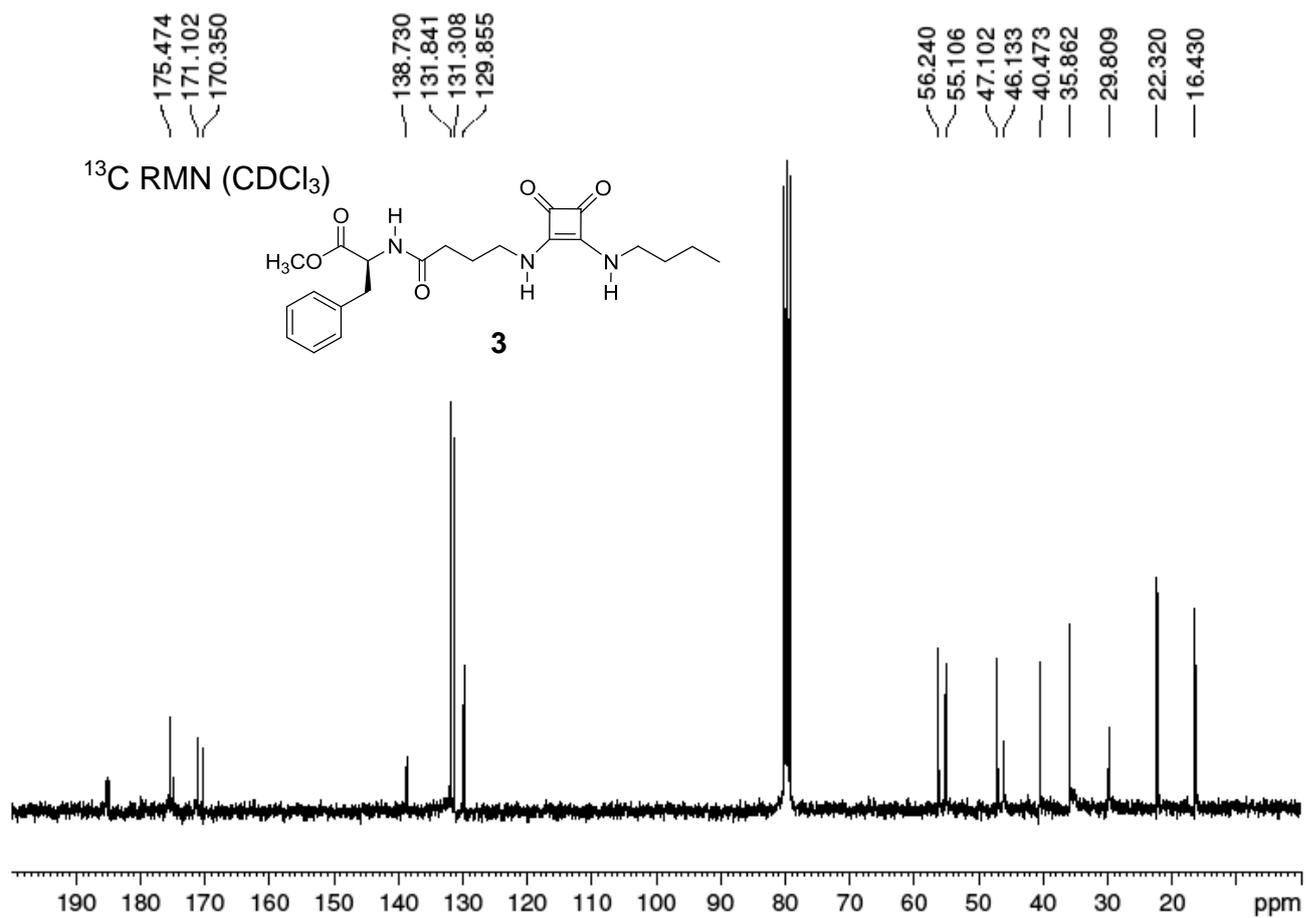
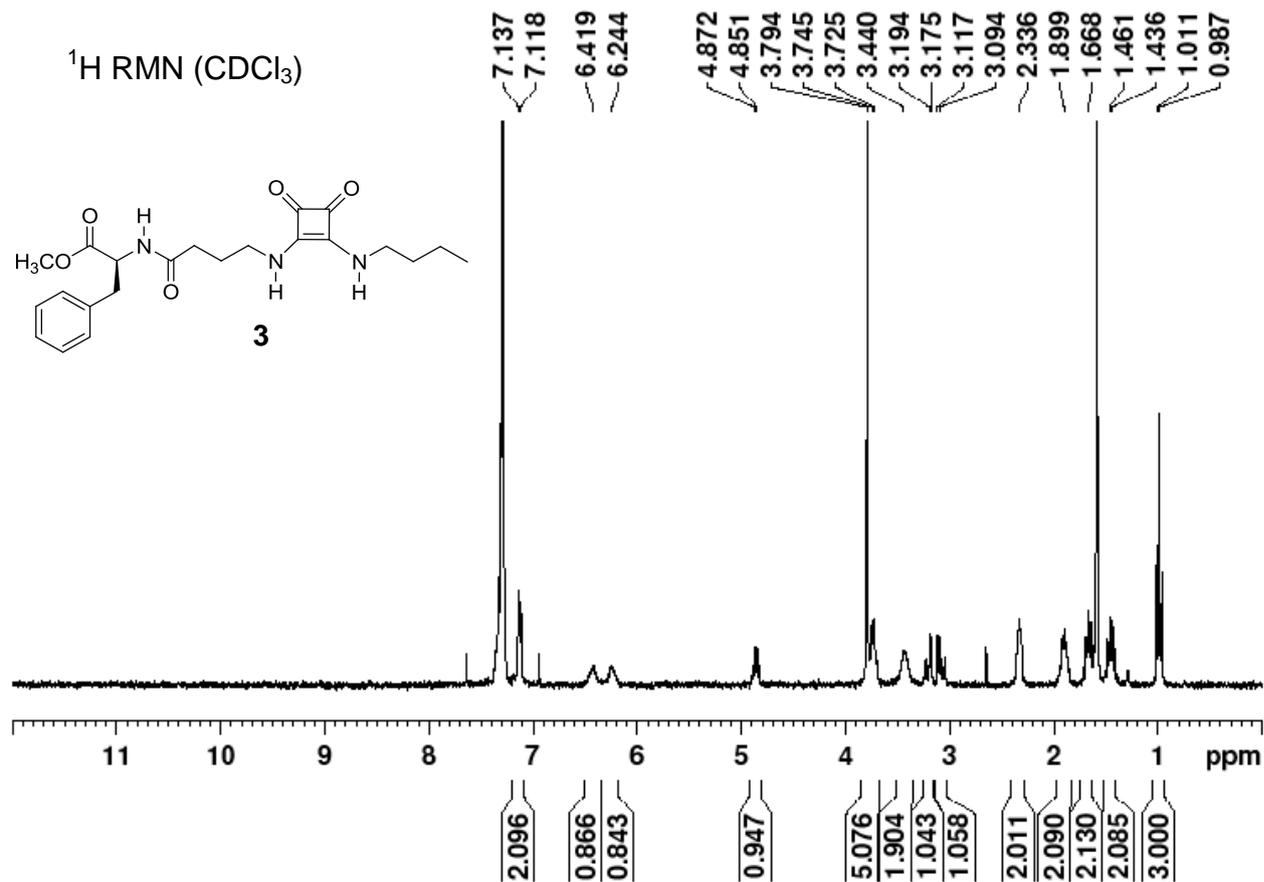
A una disolución de **56** (150 mg, 0.15 mmol) en DMF (10 mL) se adicionaron 60 mg de Pd(C) 10 %. La mezcla se agitó durante 15 h en atmósfera de H_2 . La mezcla se filtró a través de zeolita. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el sólido resultante se lavó con Et_2O para rendir **57** (115 mg, 0.15 mmol) como un sólido gris. R = 99 %.

A una disolución de DIPEA (0.408 ml, 2.34 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) se adicionó DMAP (1.60 mg, 0.01 mmol) y una disolución de T3P en AcOEt al 50 % peso (0.619 ml, 1.04 mmol). Por otro lado se preparó una disolución de **57** (100 mg, 0.13 mmol) y DIPEA (0.045 ml, 0.26 mmol) en CH_2Cl_2 (4 mL), y ésta se adicionó gota a gota sobre la primera disolución, durante 1 h. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h en atmósfera de argón. Una vez acabada la reacción, se adicionó CH_2Cl_2 (10 mL) y la disolución se lavó con HCl 0.1 M (3 X 10 mL), H_2O (10 mL) y NaCl sat. (10 mL). Finalmente, la disolución se secó ($MgSO_4$) y se concentró para obtener **58** (62 mg, 0.08 mmol) como un sólido blanco. R = 64 %. Mp: 145 °C con descomposición; 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 6.51 (3H, br), 4.68 (3H, br), 4.29 (1H, br), 3.81 (3H, bs), 3.28 (5H, br), 3.10 (3H, br), 2.66 (3H, s), 2.60 (3H, s), 2.11 (3H, s), 1.73 (9H, br), 1.38 (5H, s) ppm. ^{13}C RMN ($DMSO-d_6$) δ : 183.8, 170.3, 158.8, 157.1, 138.8, 136.8, 134.1, 128.9, 125.1, 112.1, 81.9, 55.9, 41.1, 28.4, 24.6, 18.8, 12.4 ppm. HRMS (ESI): m/z calc. para $C_{33}H_{48}N_8O_{10}Na$ $[M+Na]^+$ 771.3101, exp. 771.3112.

Anexo

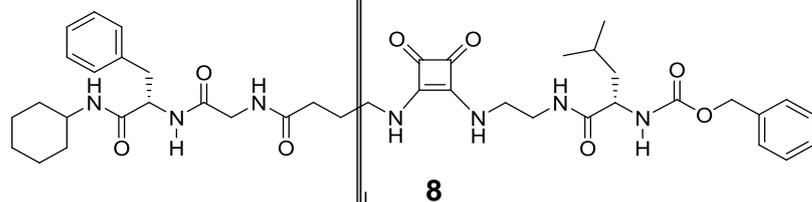




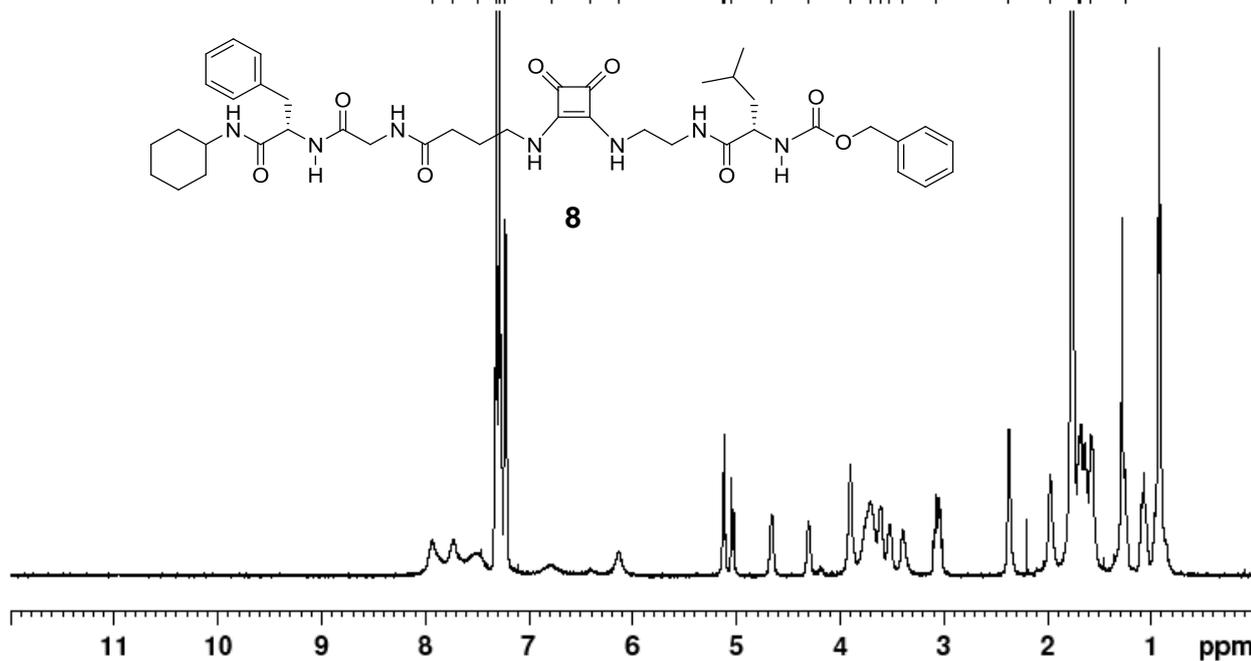


Compuesto 14:

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3)

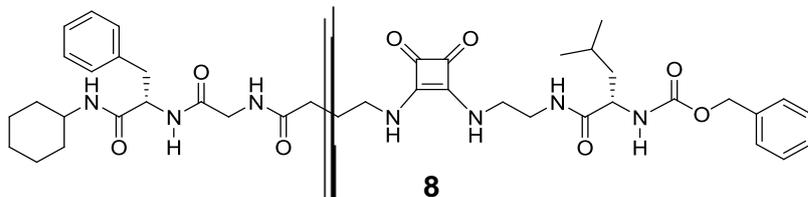


7.937
7.730
7.493
7.318
7.290
7.230
6.778
6.408
6.136
5.134
5.114
5.049
4.667
4.656
4.309
3.902
3.709
3.616
3.521
3.395
3.077
2.372
1.973
1.698
1.688
1.677
1.584
1.252

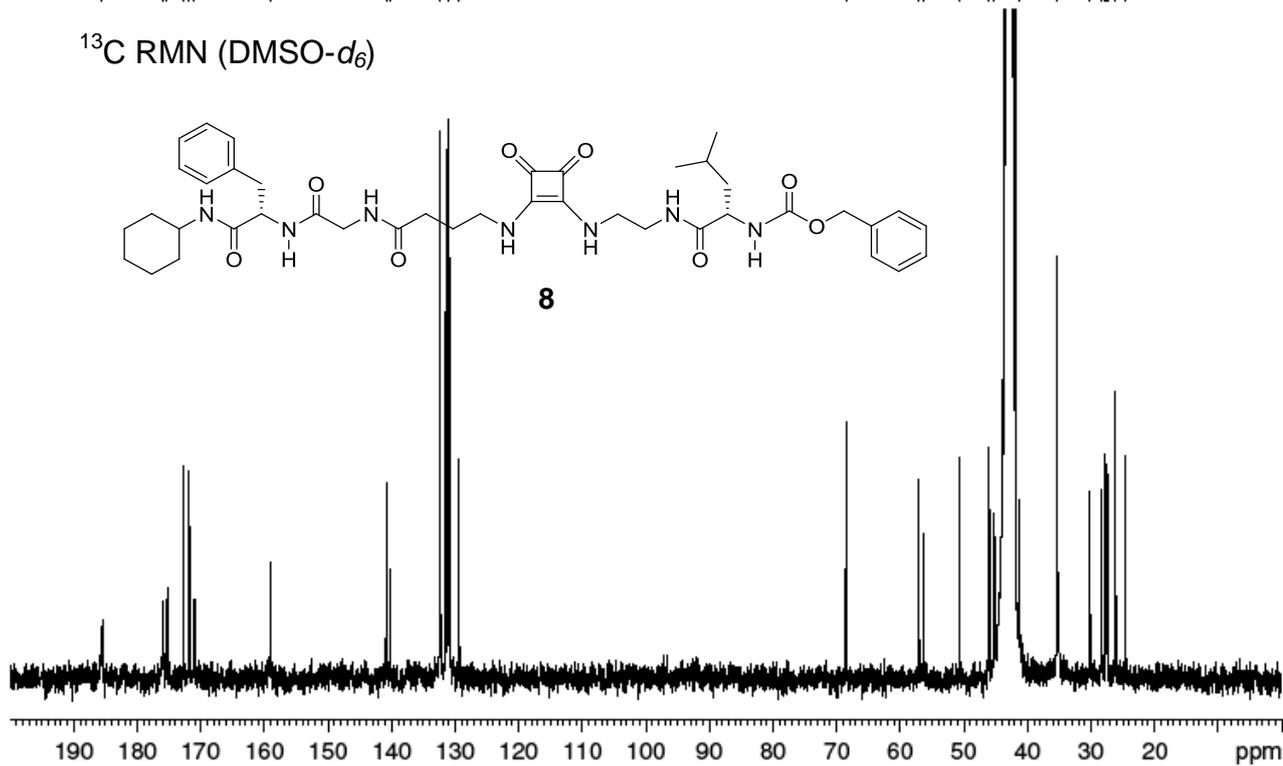


1.506
1.547
1.608
0.702
0.142
0.756
1.103
0.869
0.939
0.842
2.044
5.795
1.123
2.000
2.042
2.210
8.256
4.190
2.216
7.649

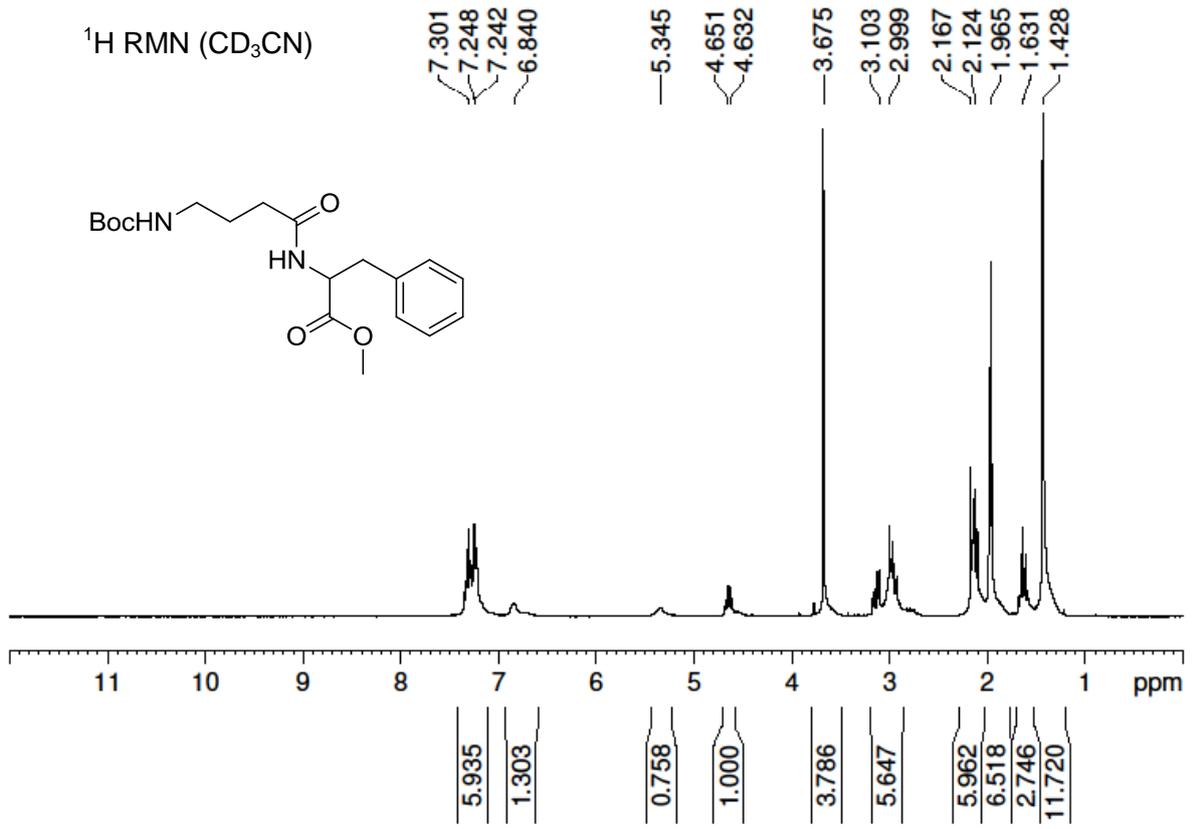
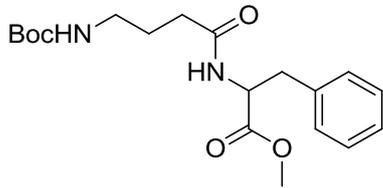
$^{13}\text{C RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$)

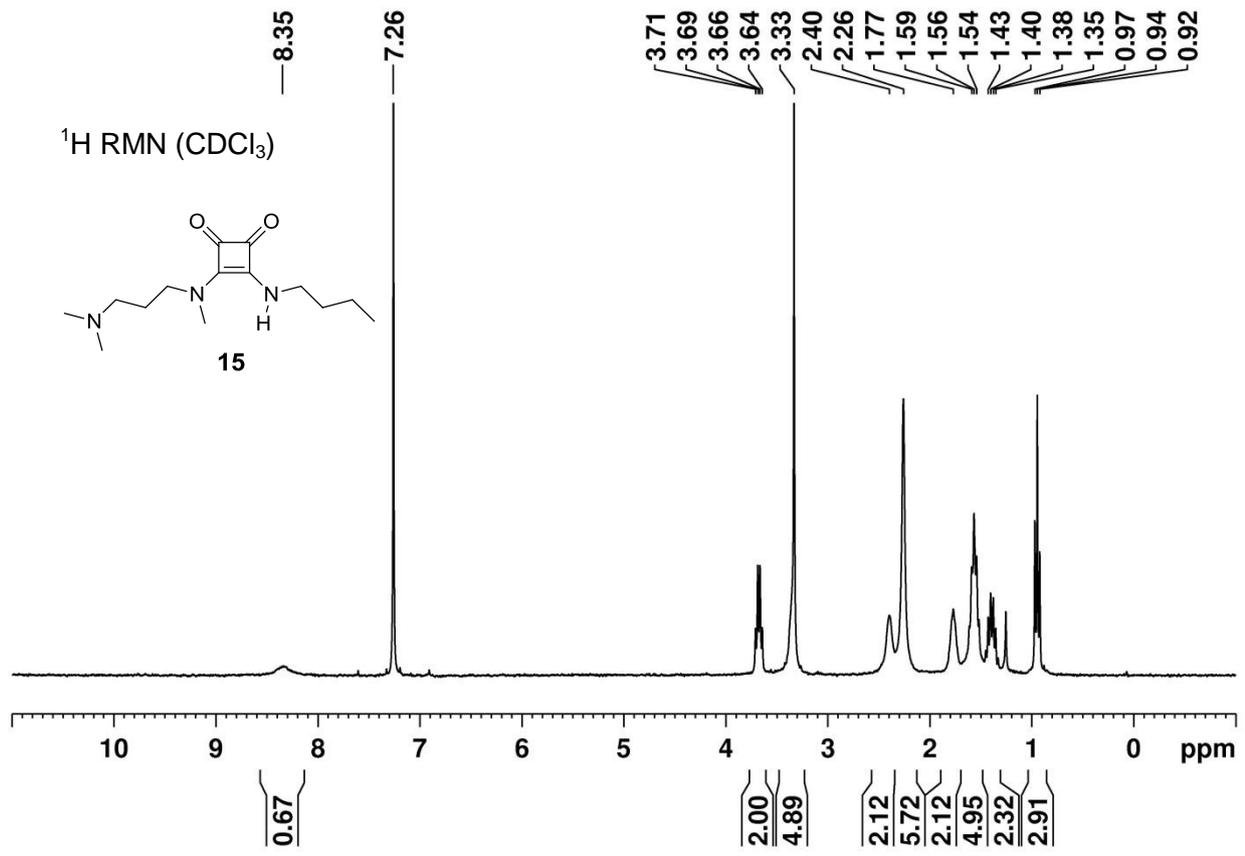


185.522
175.971
175.306
172.696
171.840
171.018
159.078
140.849
140.219
132.348
131.160
129.399
68.537
57.057
56.329
50.653
46.000
45.191
41.209
35.353
30.155
28.339
27.702
27.627
27.360
26.112
24.593



^1H RMN (CD_3CN)

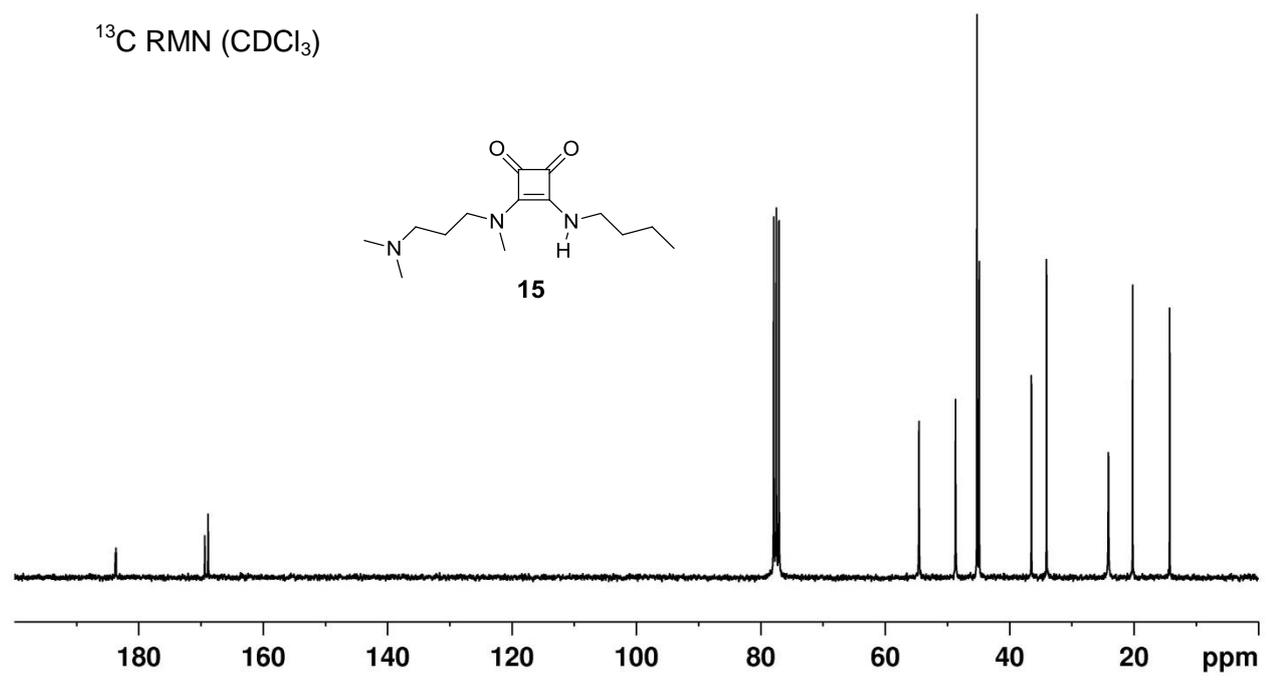


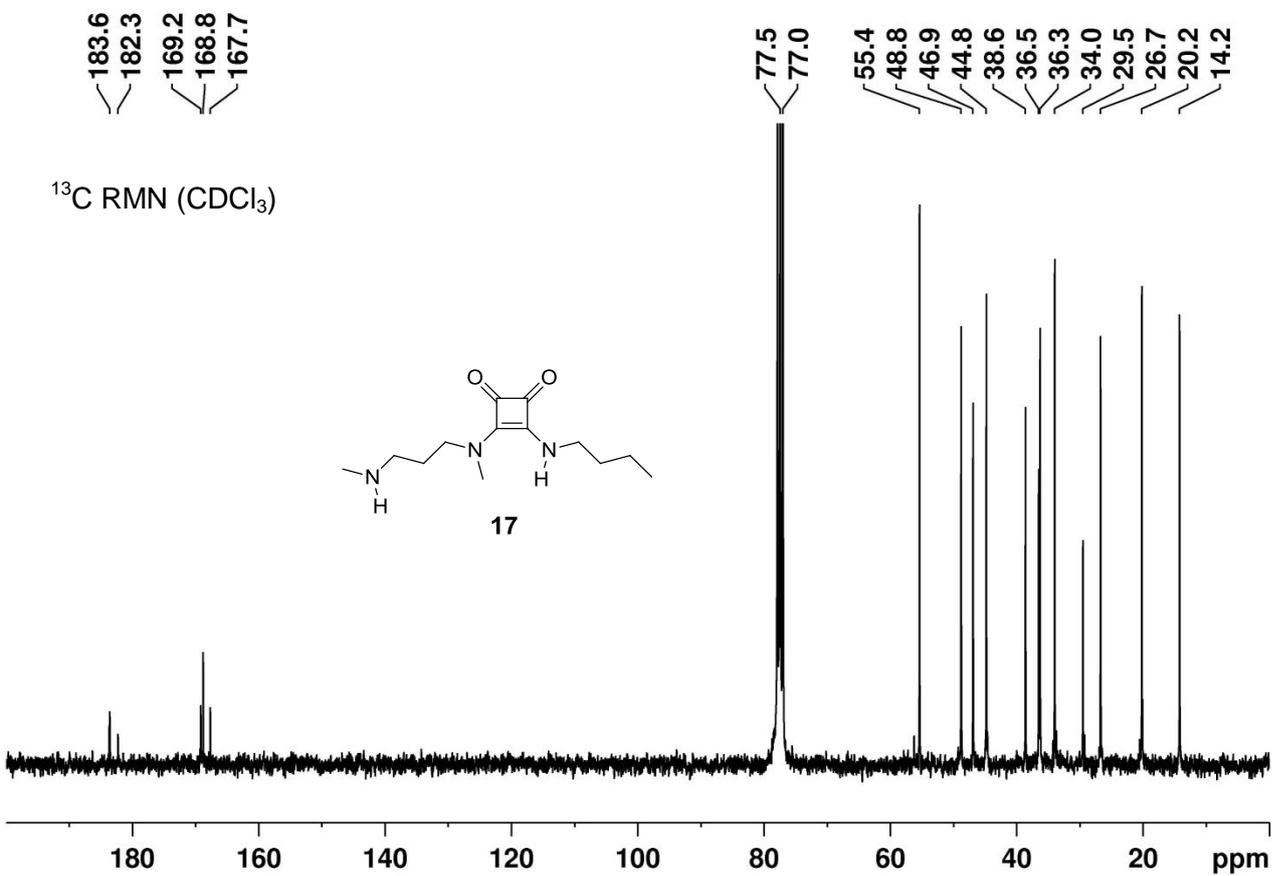
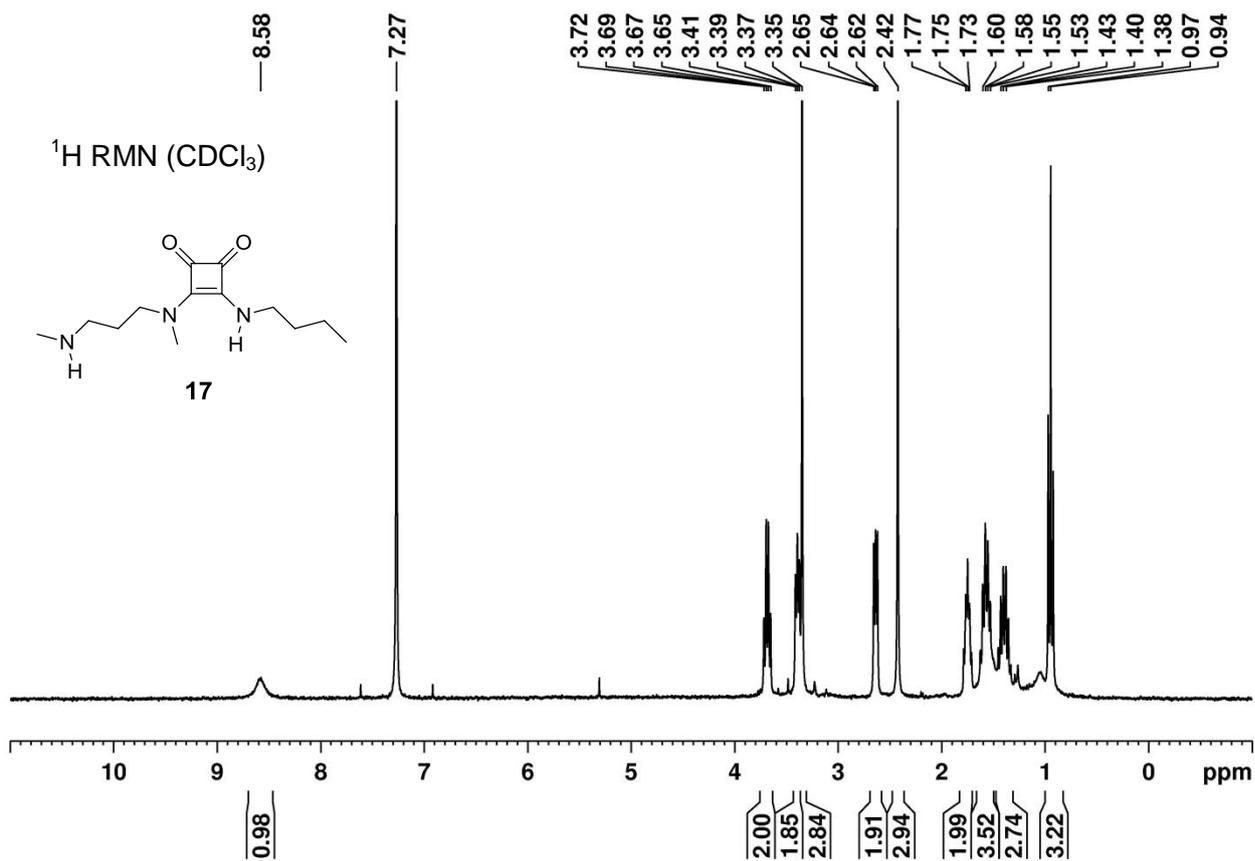


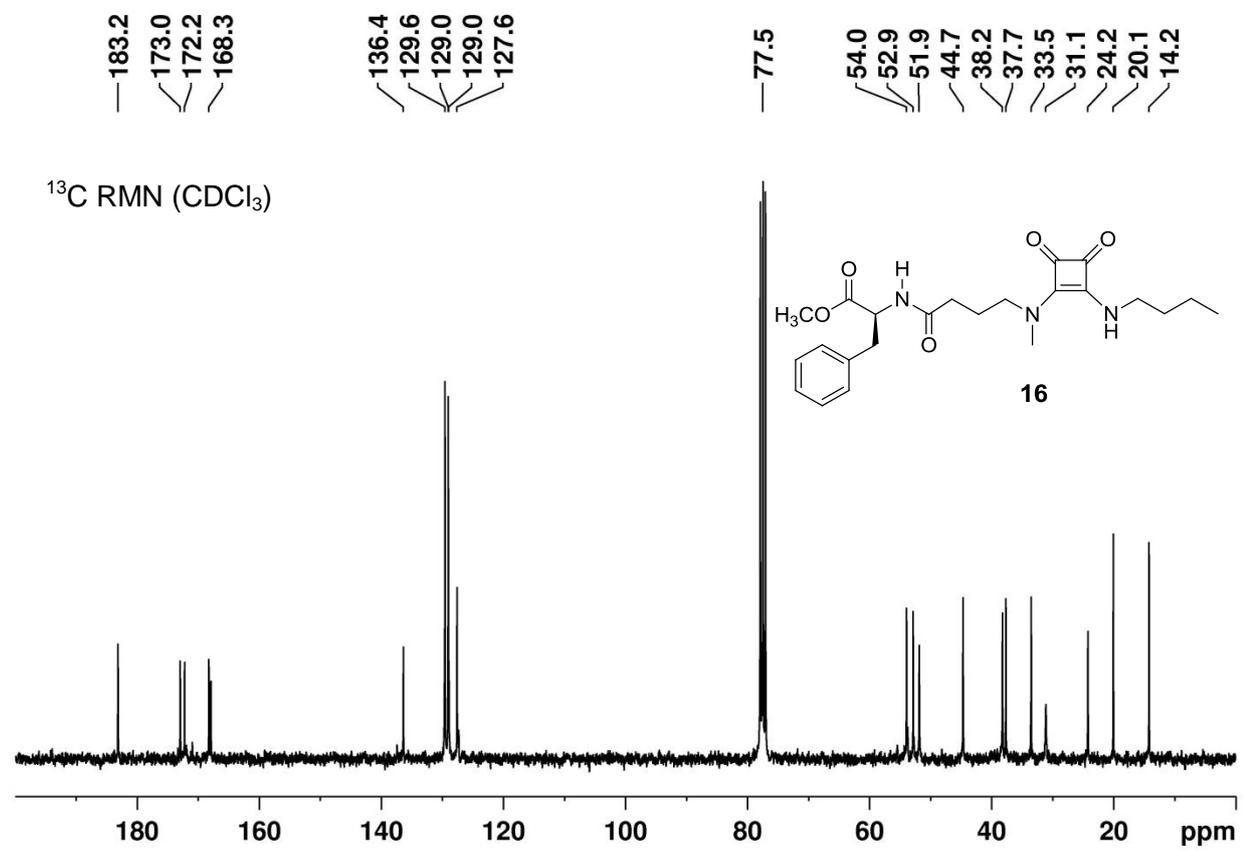
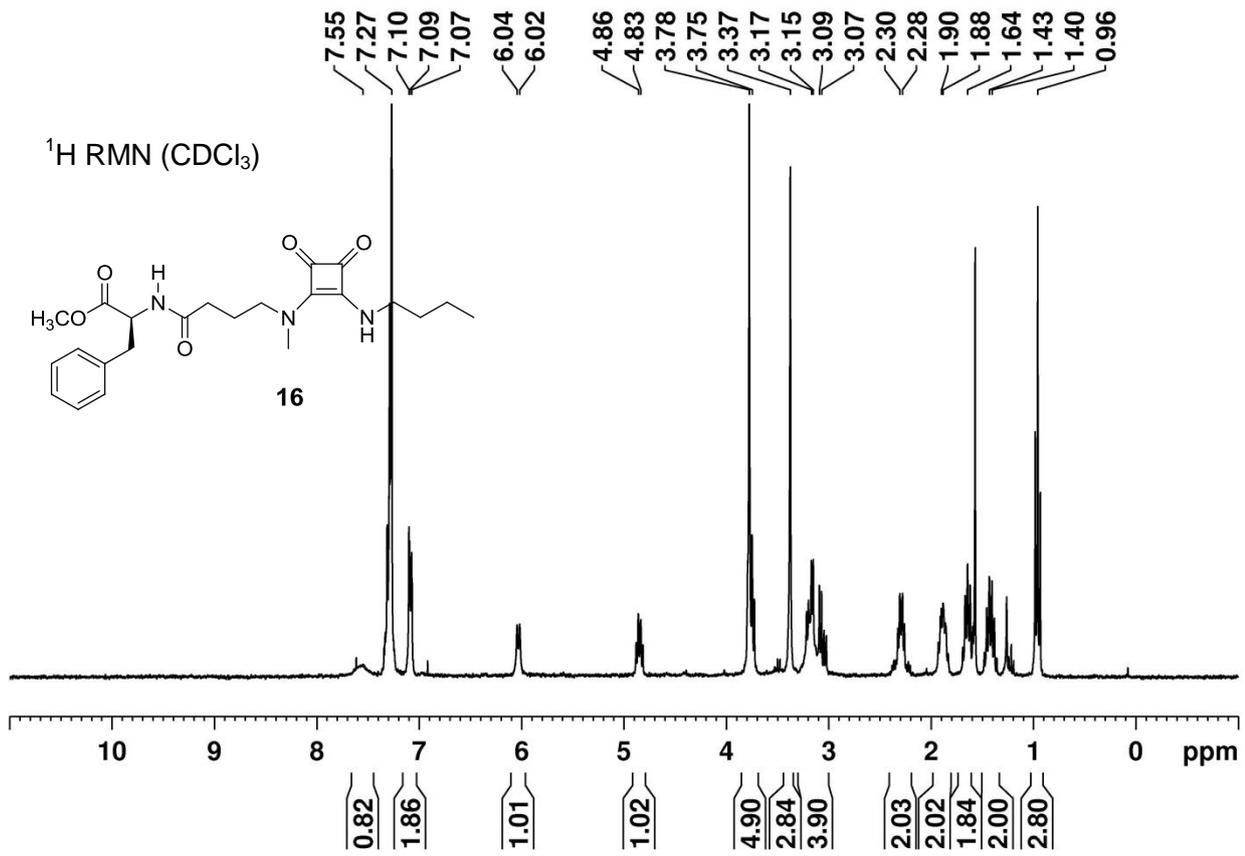
183.8
183.6
169.4
168.8

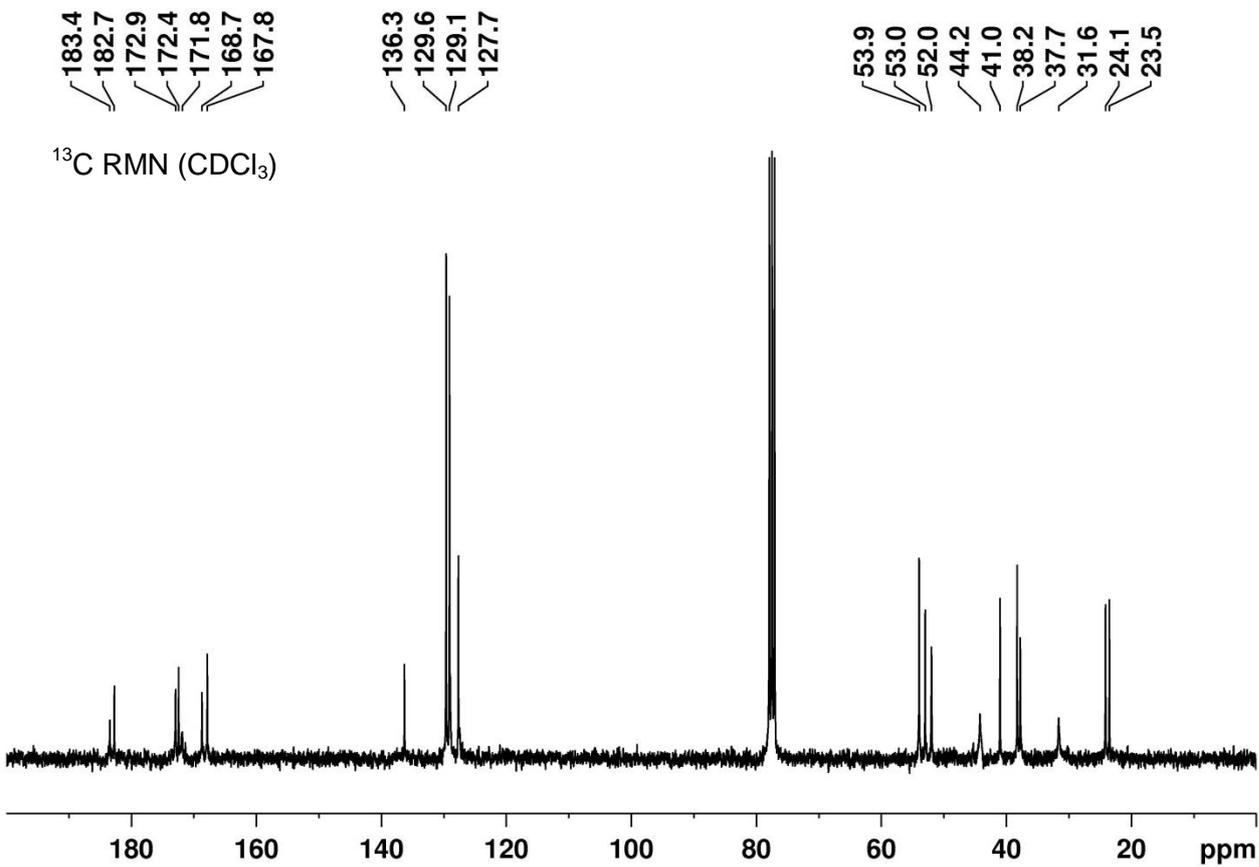
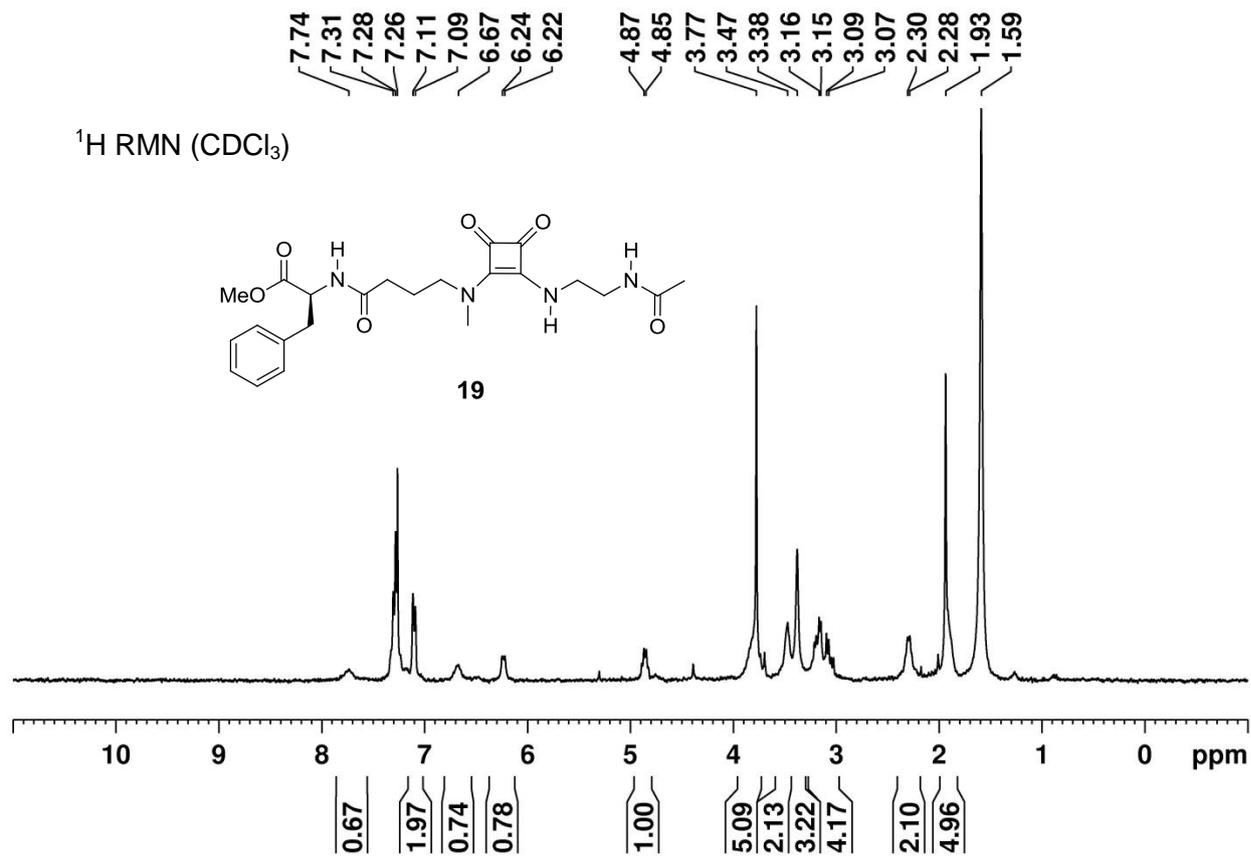
77.9
77.5
77.1
54.5
48.7
45.2
44.9
36.5
34.0
24.1
20.2
14.2

¹³C RMN (CDCl₃)

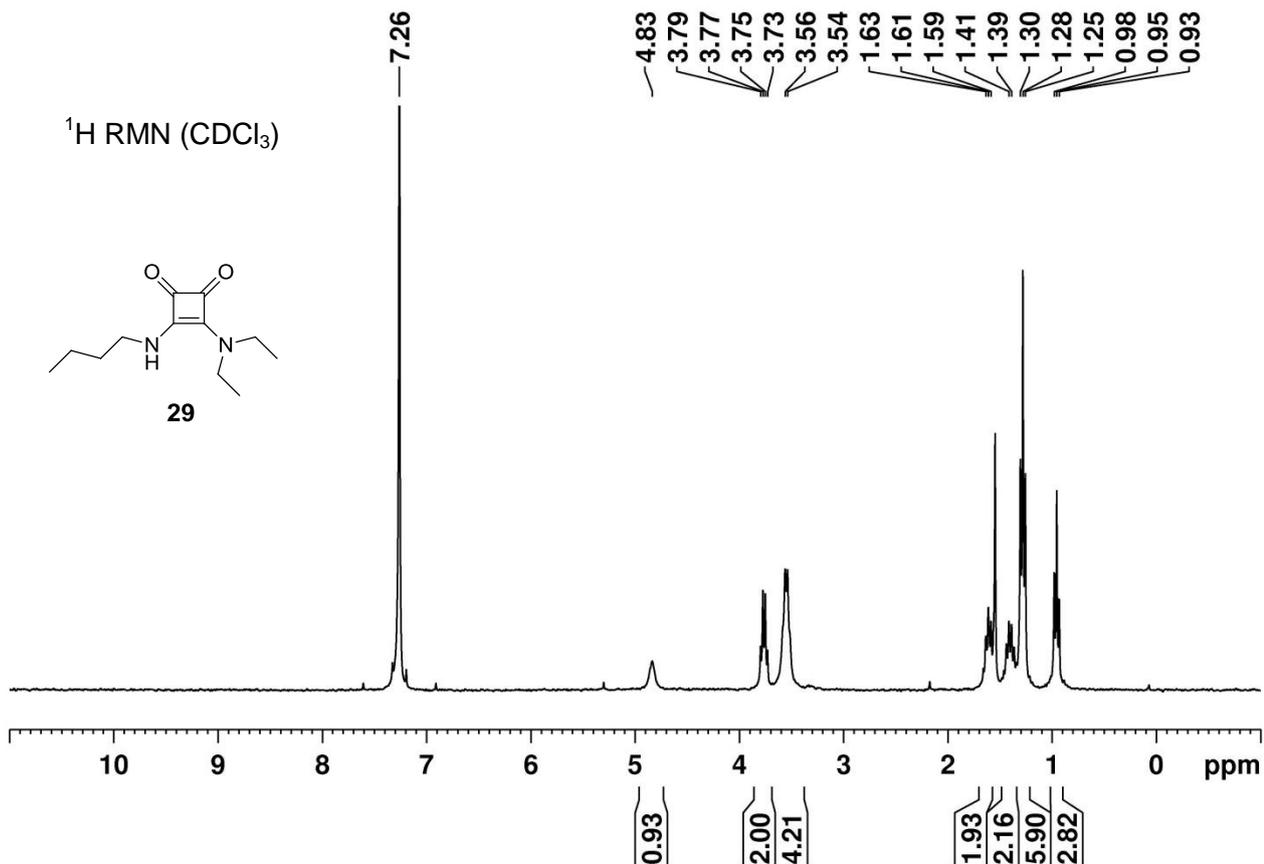
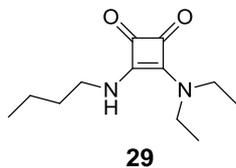








¹H RMN (CDCl₃)



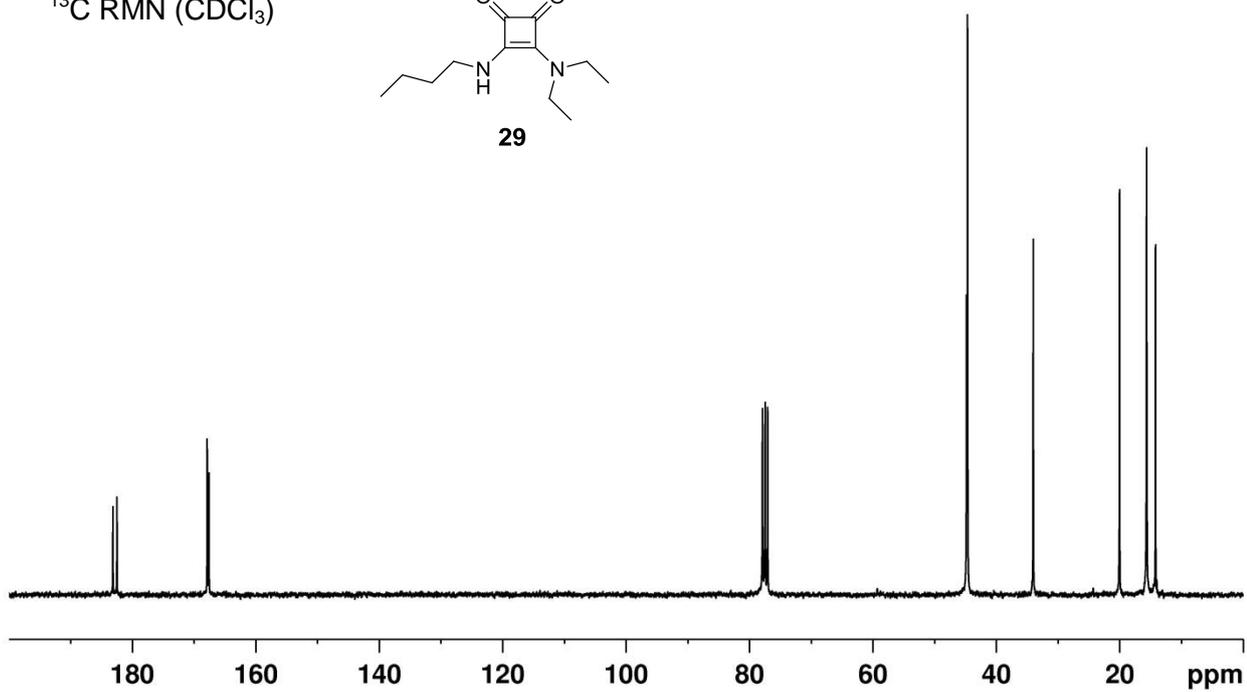
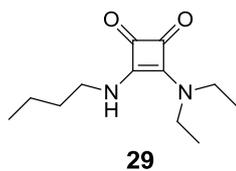
183.2, 182.5, 167.9, 167.6

77.9, 77.5, 77.1

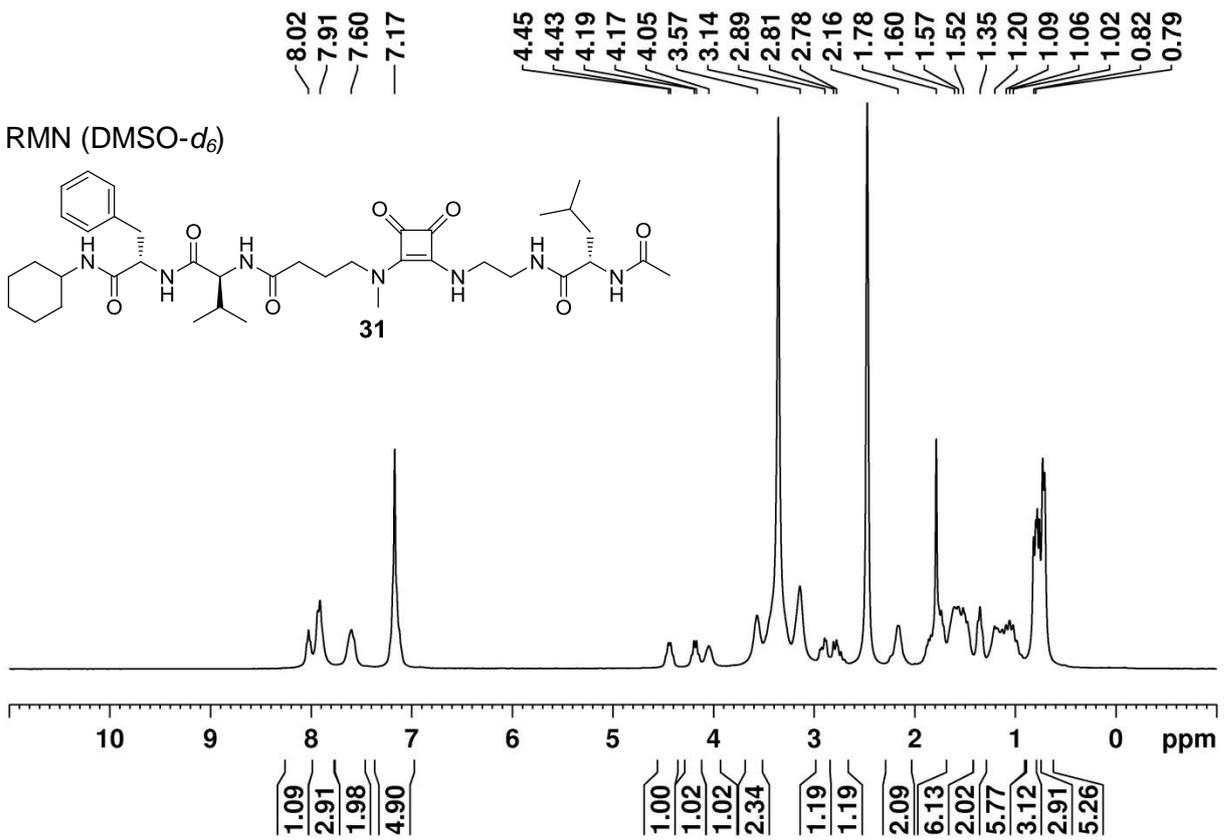
44.8, 44.7, 34.0

20.1, 15.7, 14.2

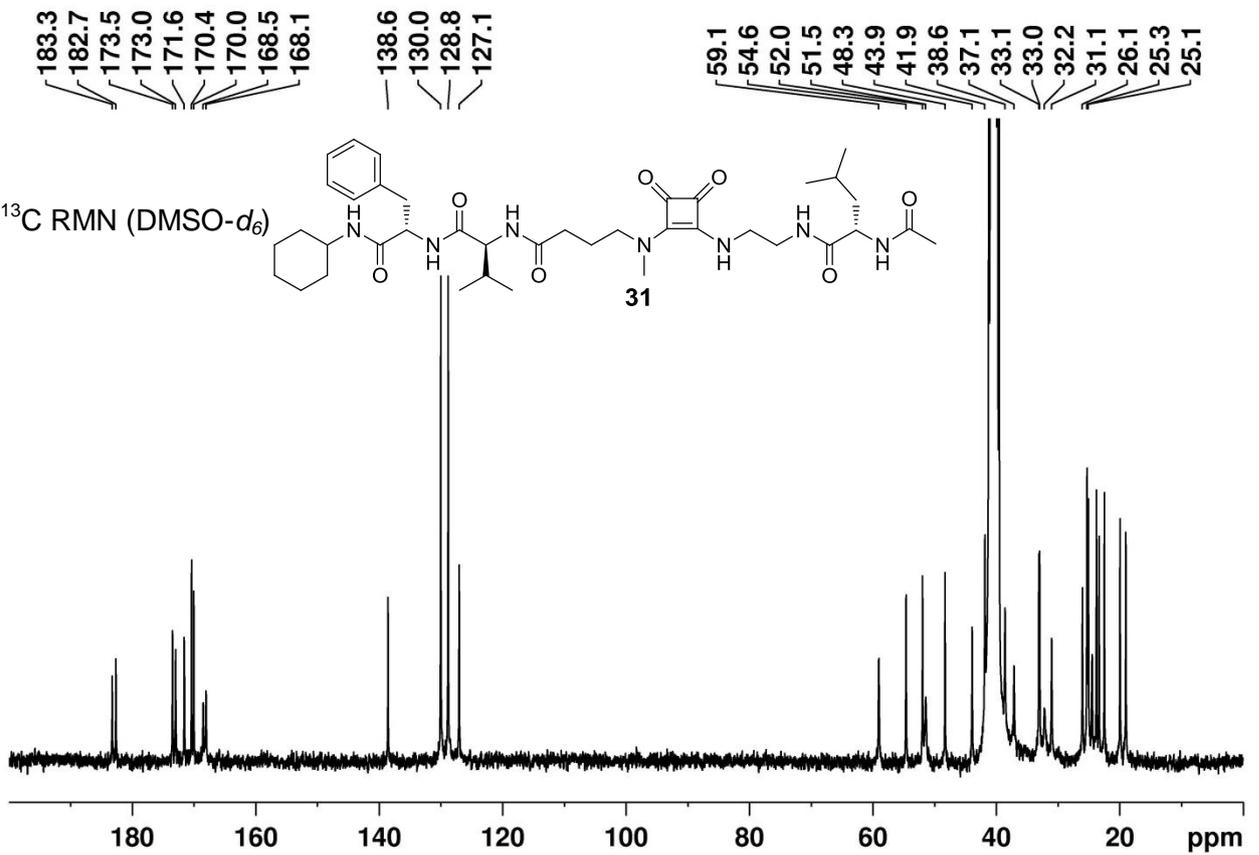
¹³C RMN (CDCl₃)

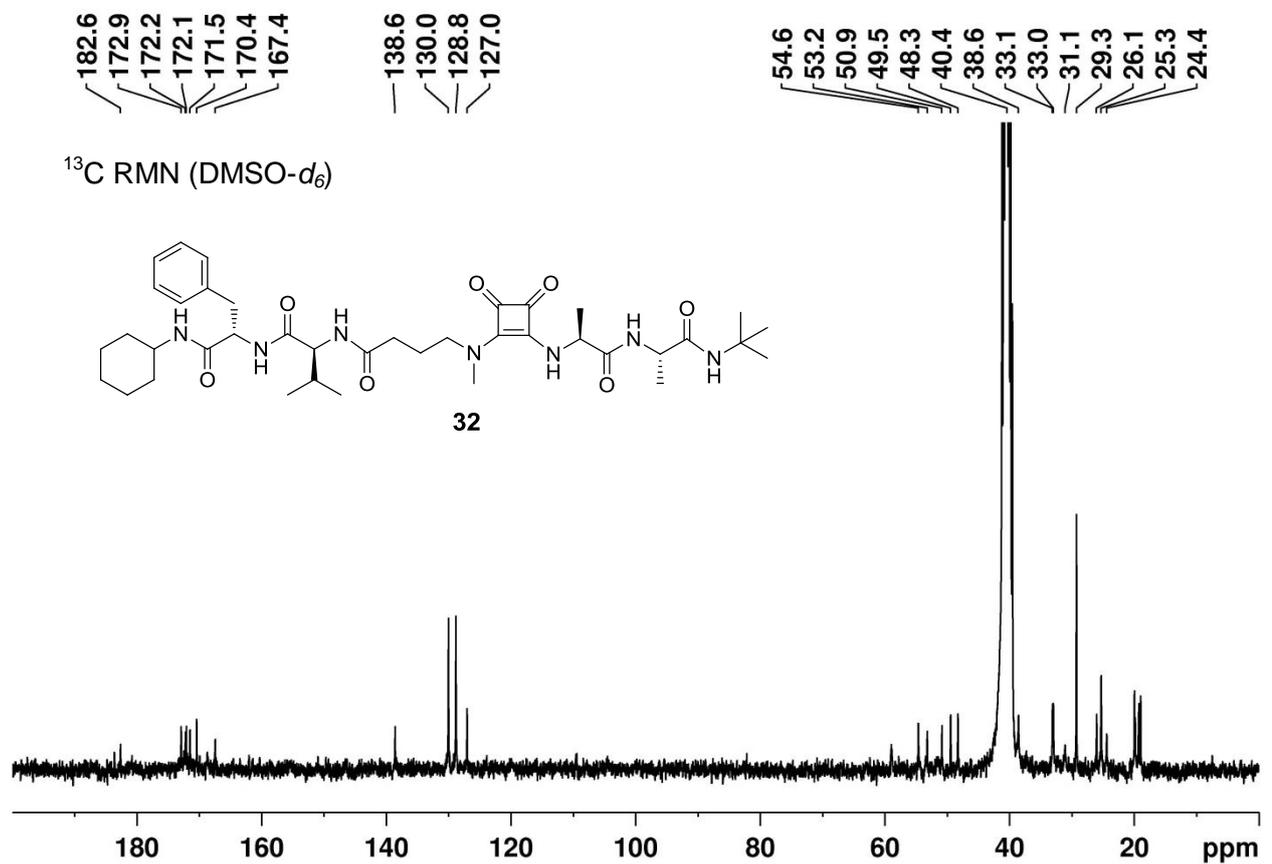
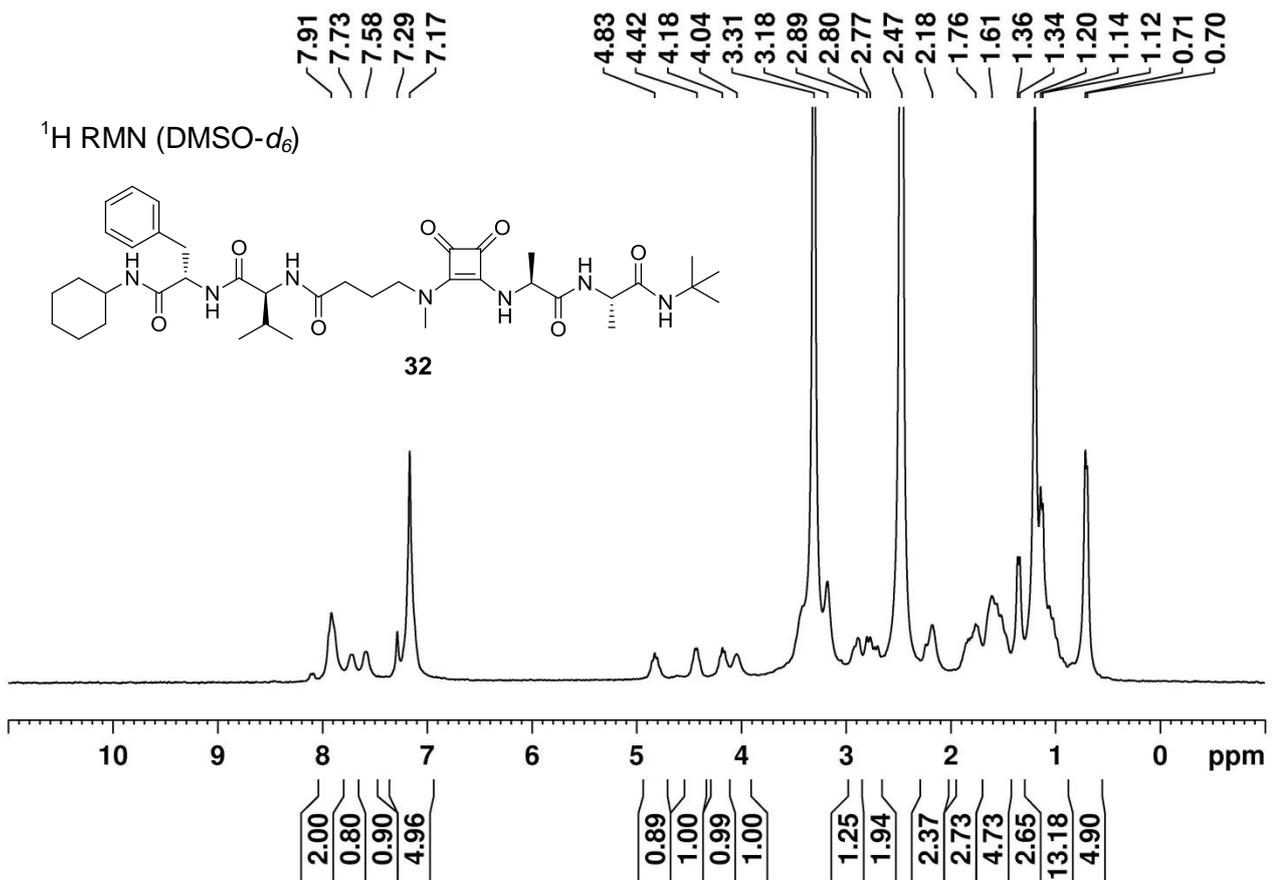


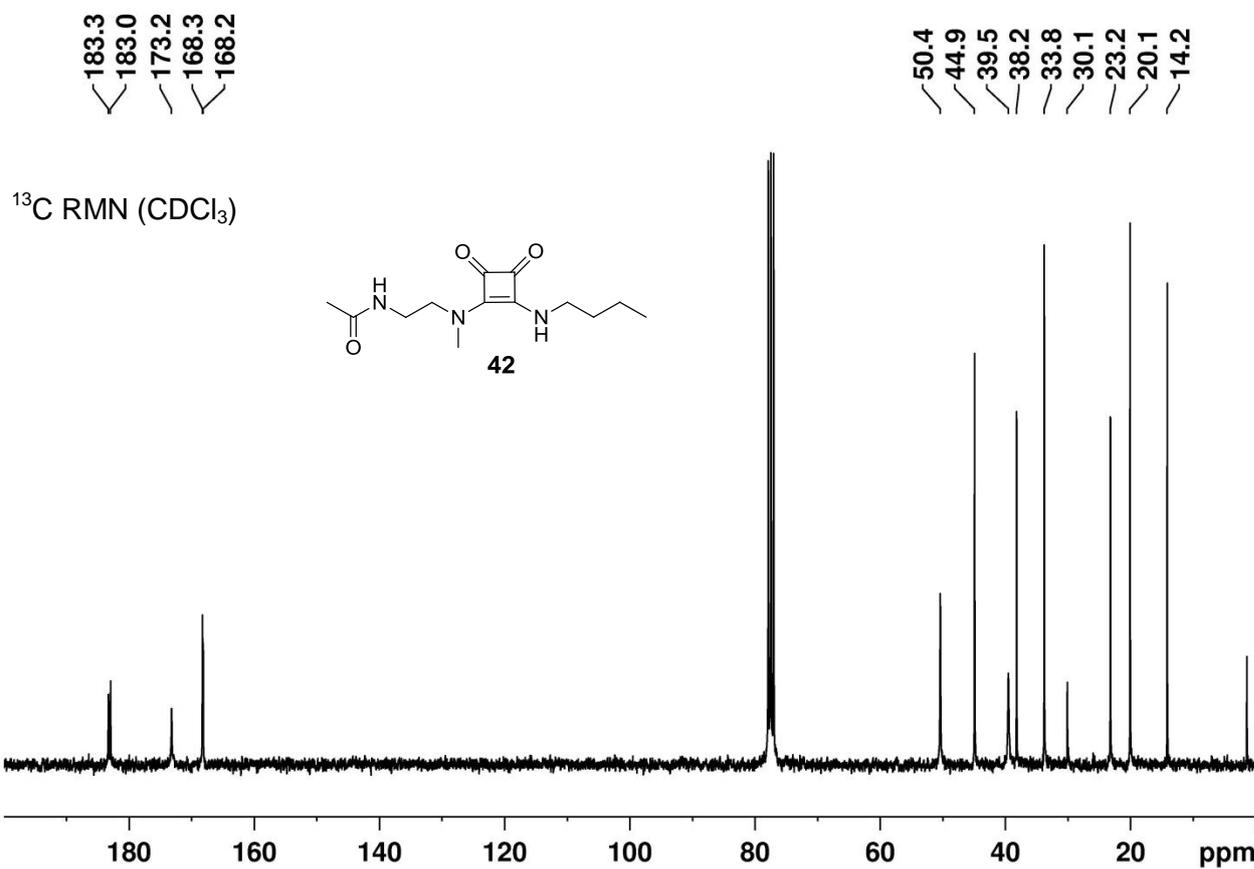
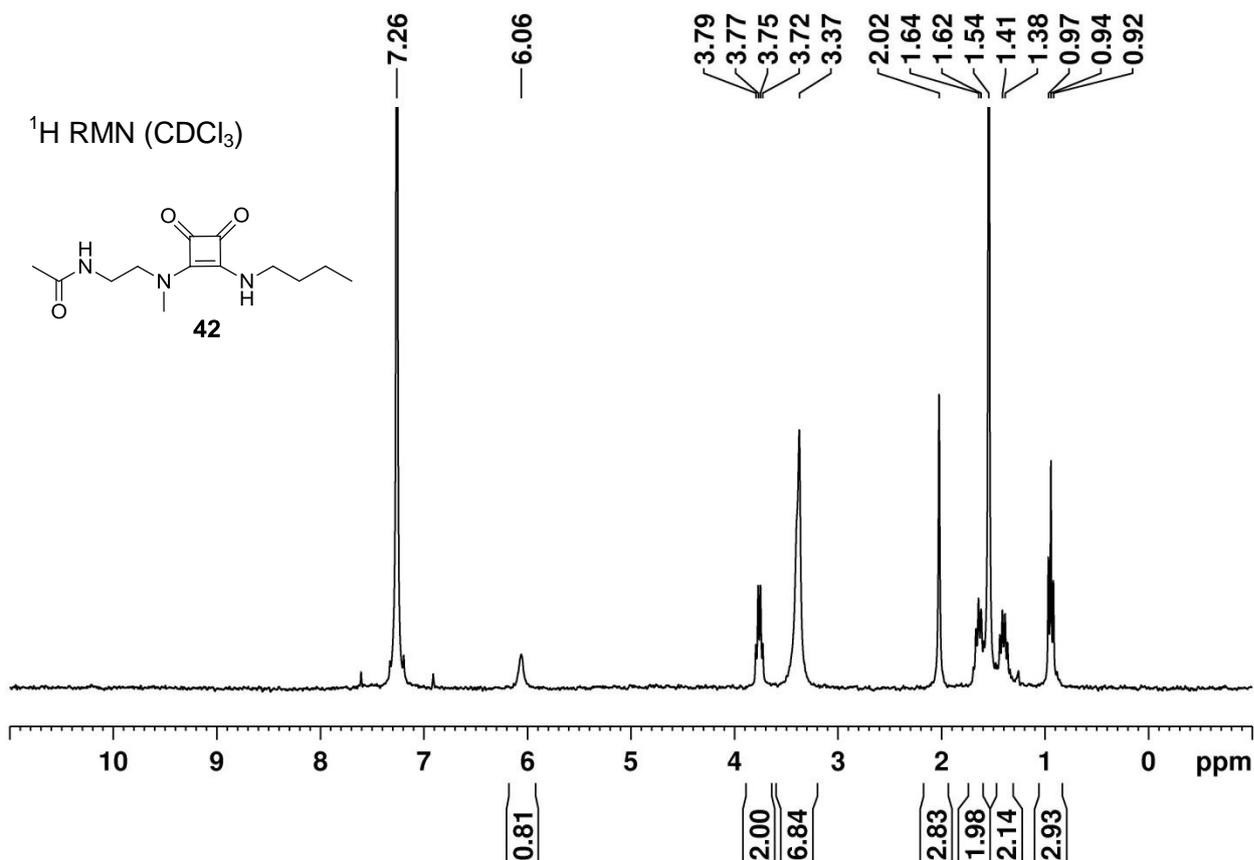
¹H RMN (DMSO-d₆)

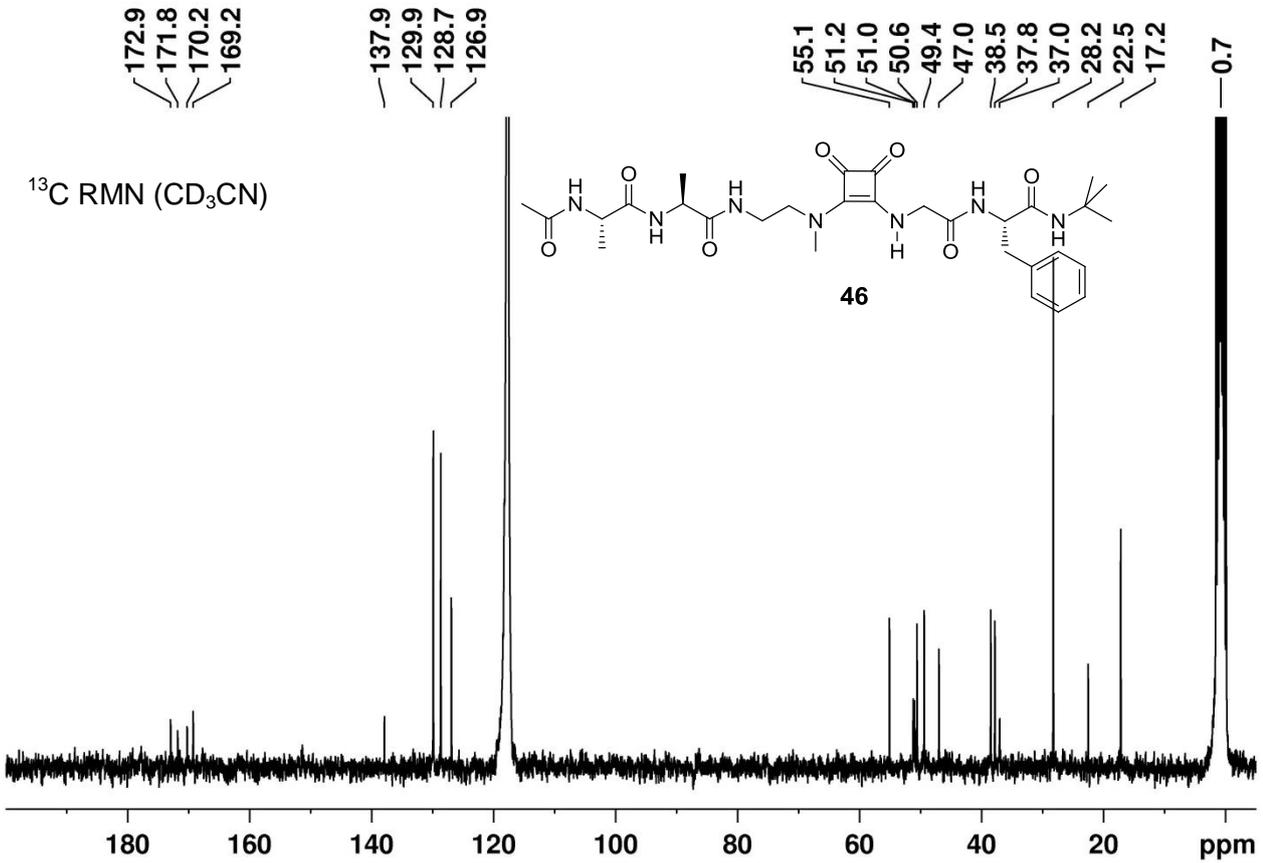
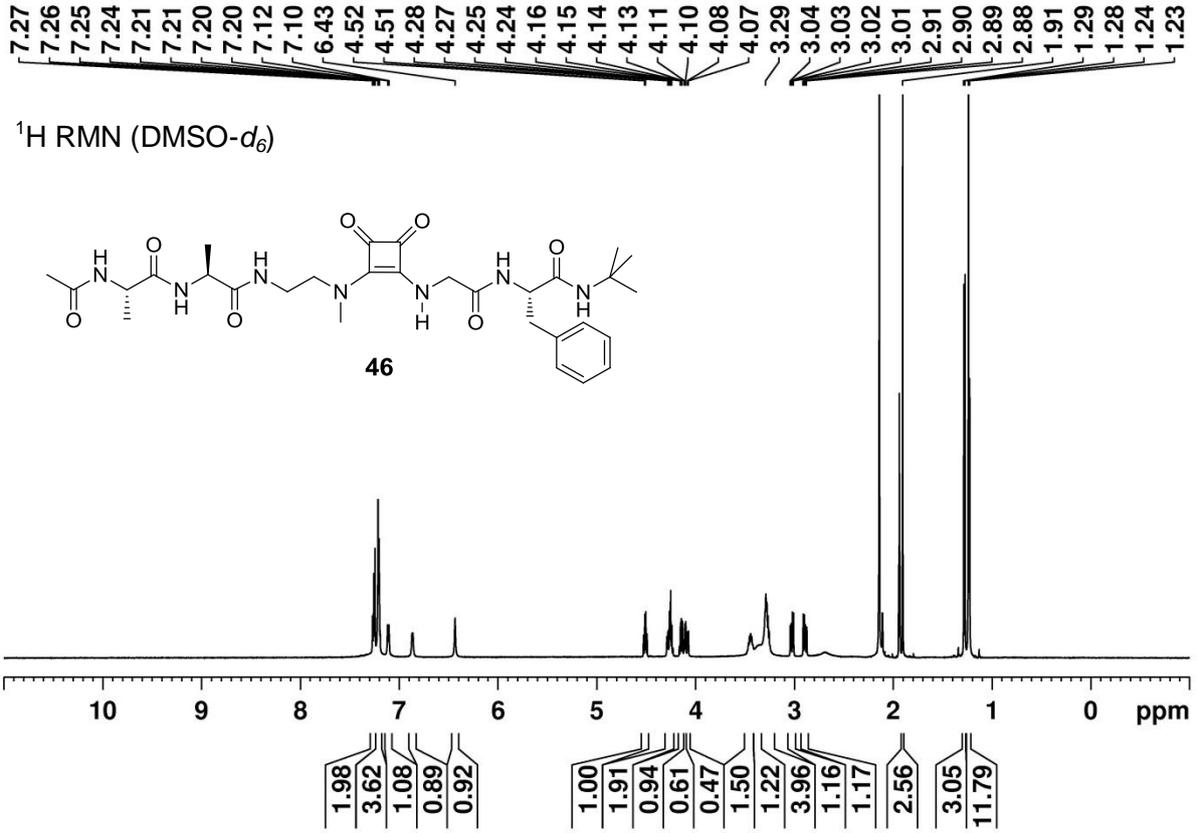


¹³C RMN (DMSO-d₆)

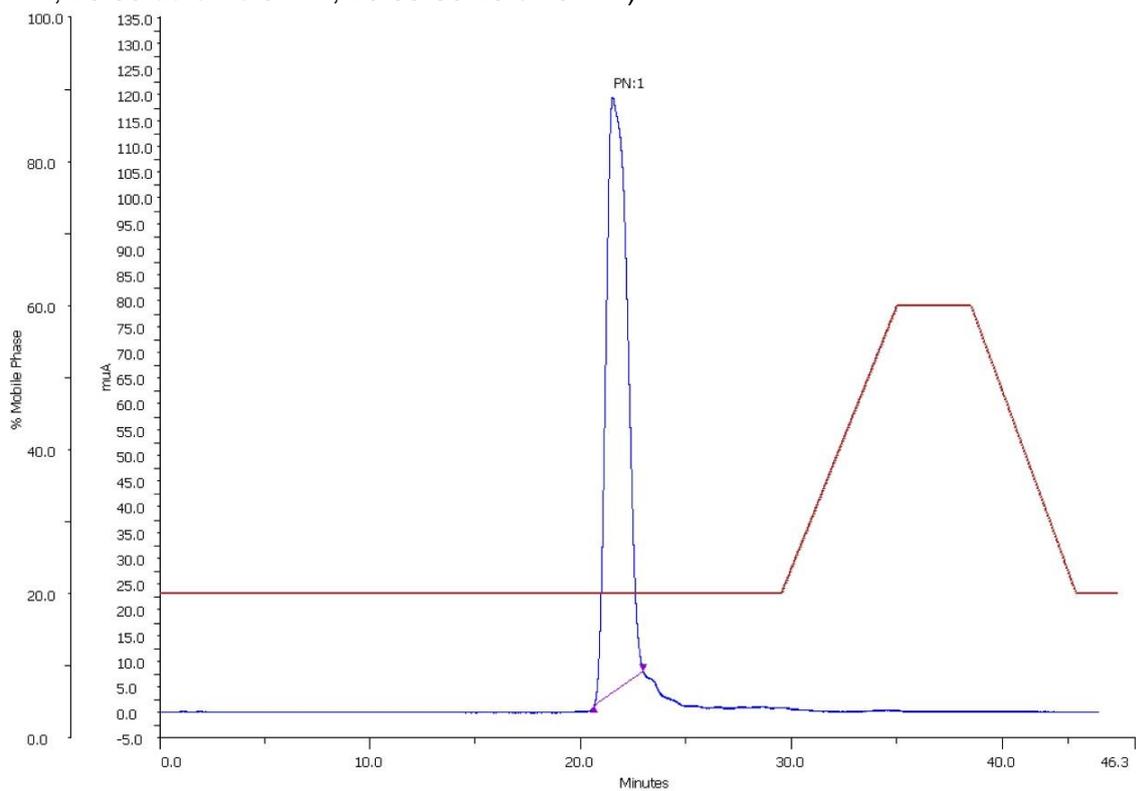




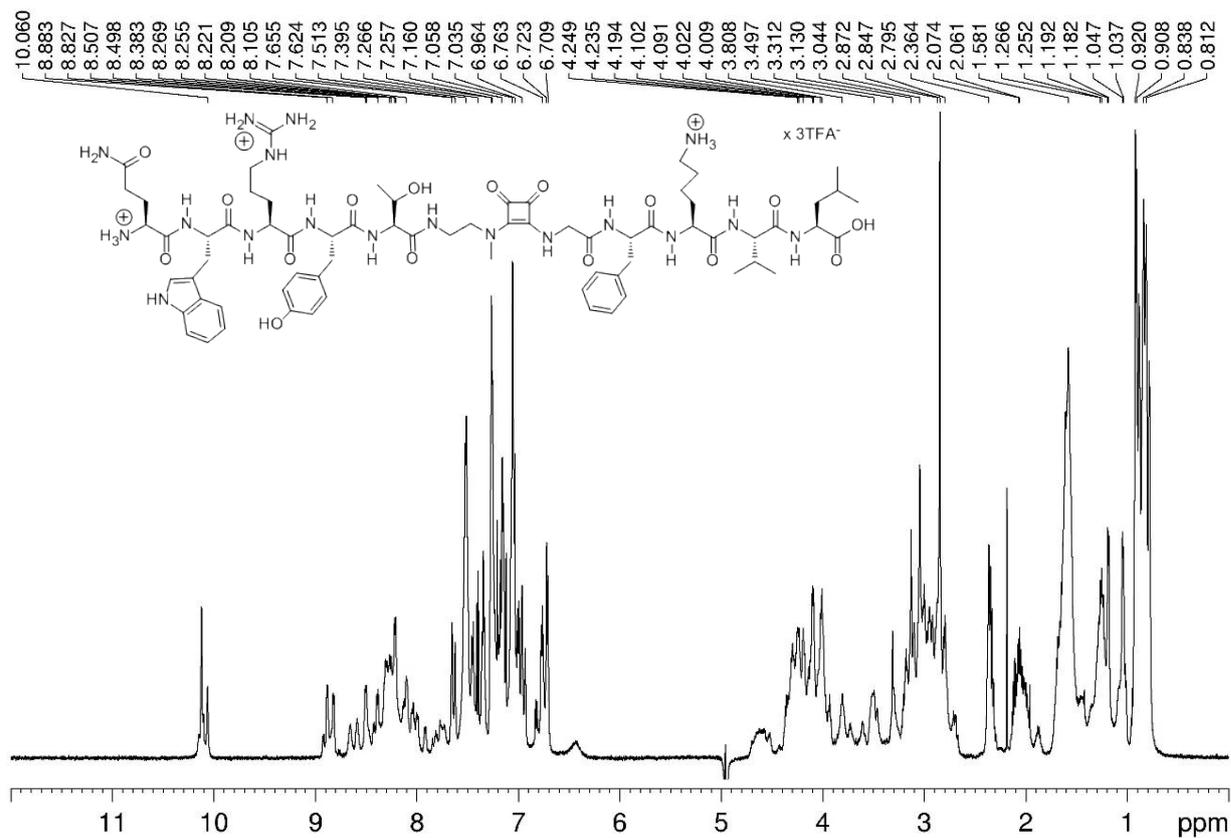


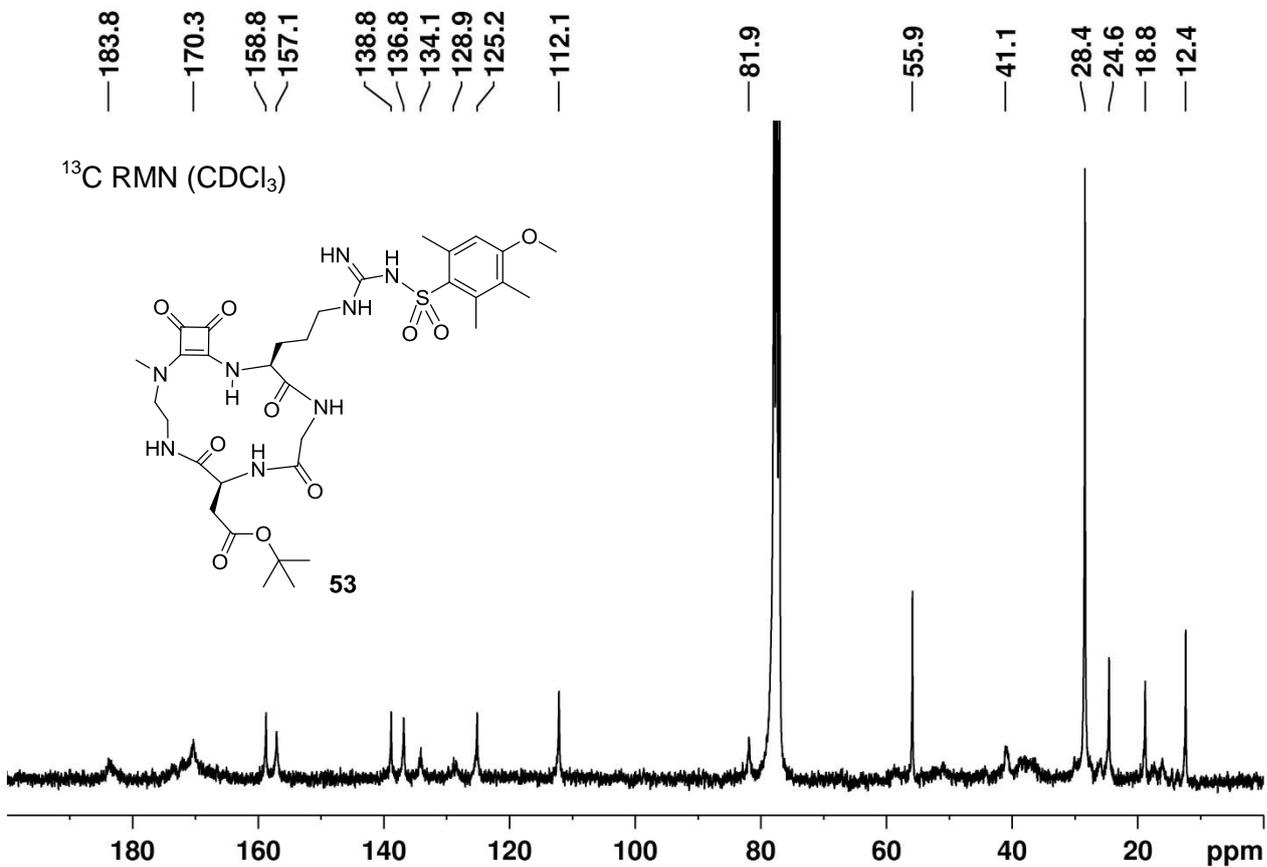
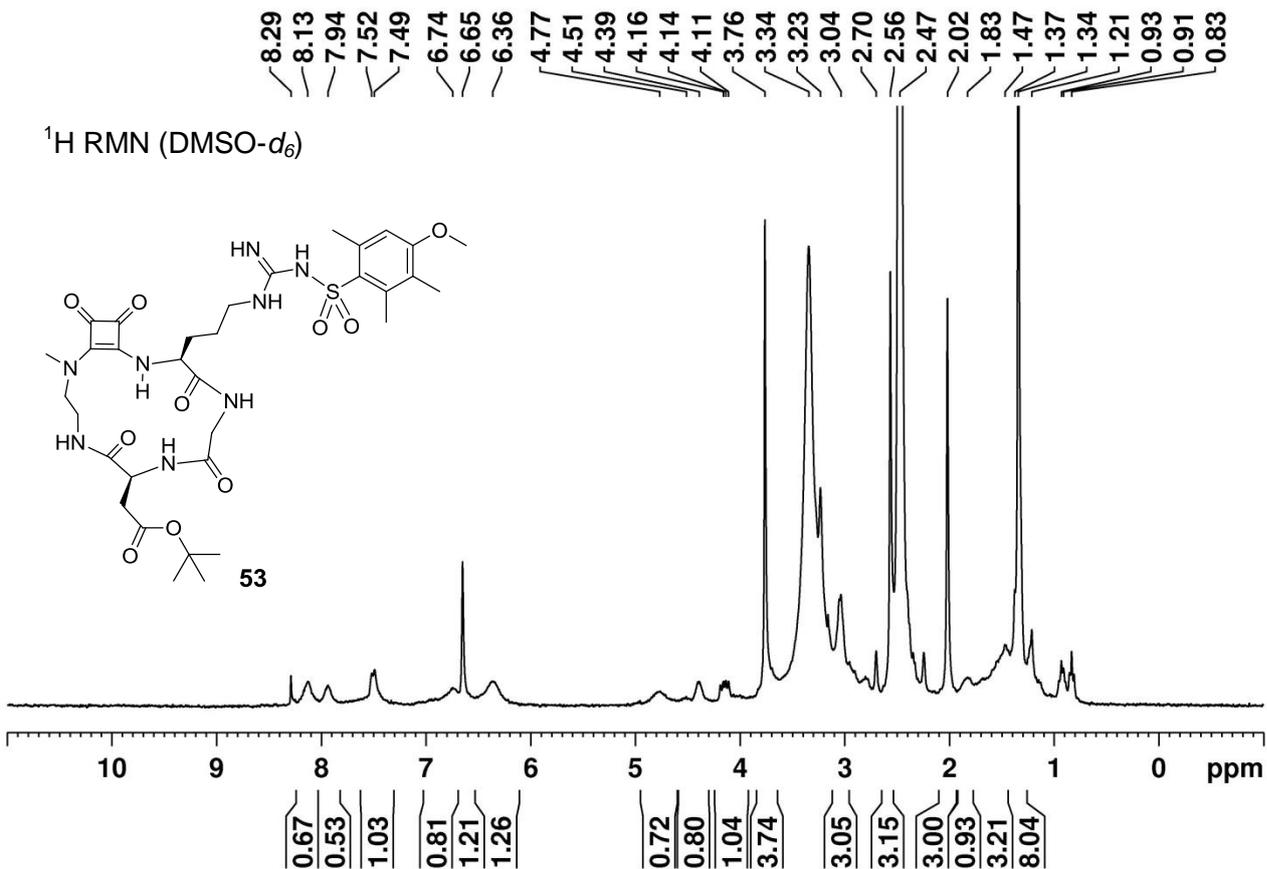


Traza HPLC de **46** en H₂O-CH₃CN (Isocrático y gradientes: 80:20 durante 30 min; 80:20-20:80 en 5 min; 20:80 durante 5 min; 20:80-80:20 en 5 min)

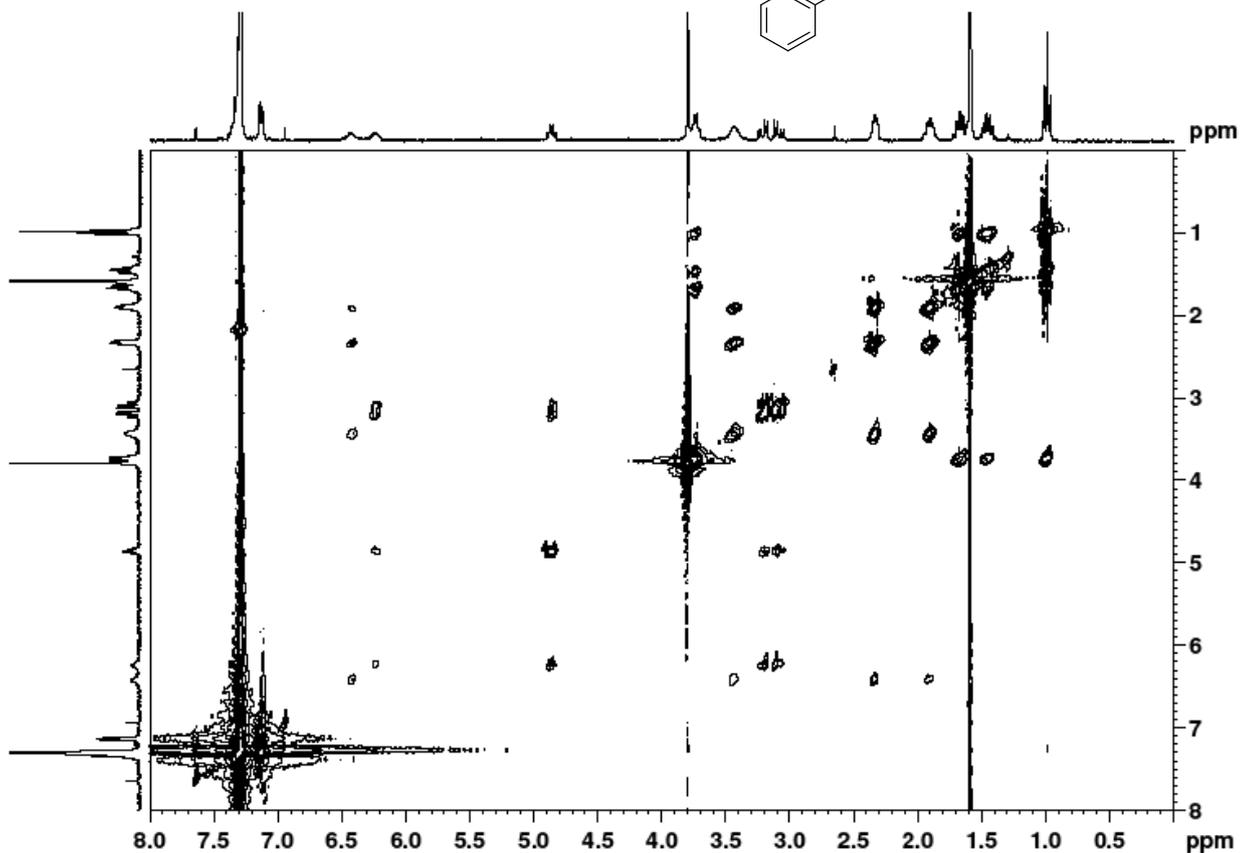
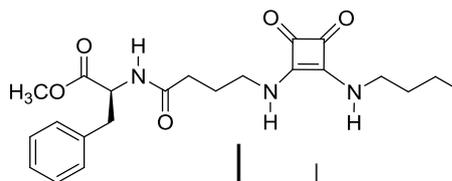


50 (H₂O-D₂O 5%, 5 Mm, 278K, pH 2.60)

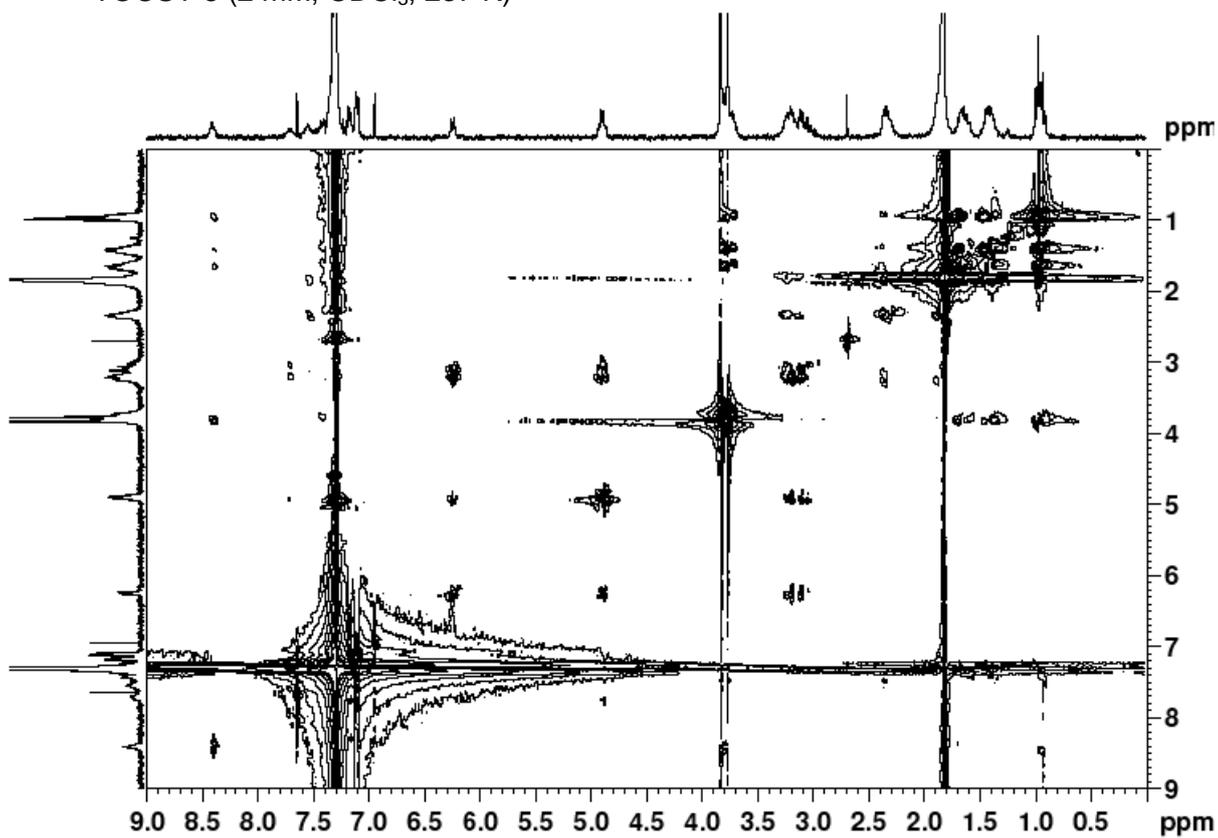




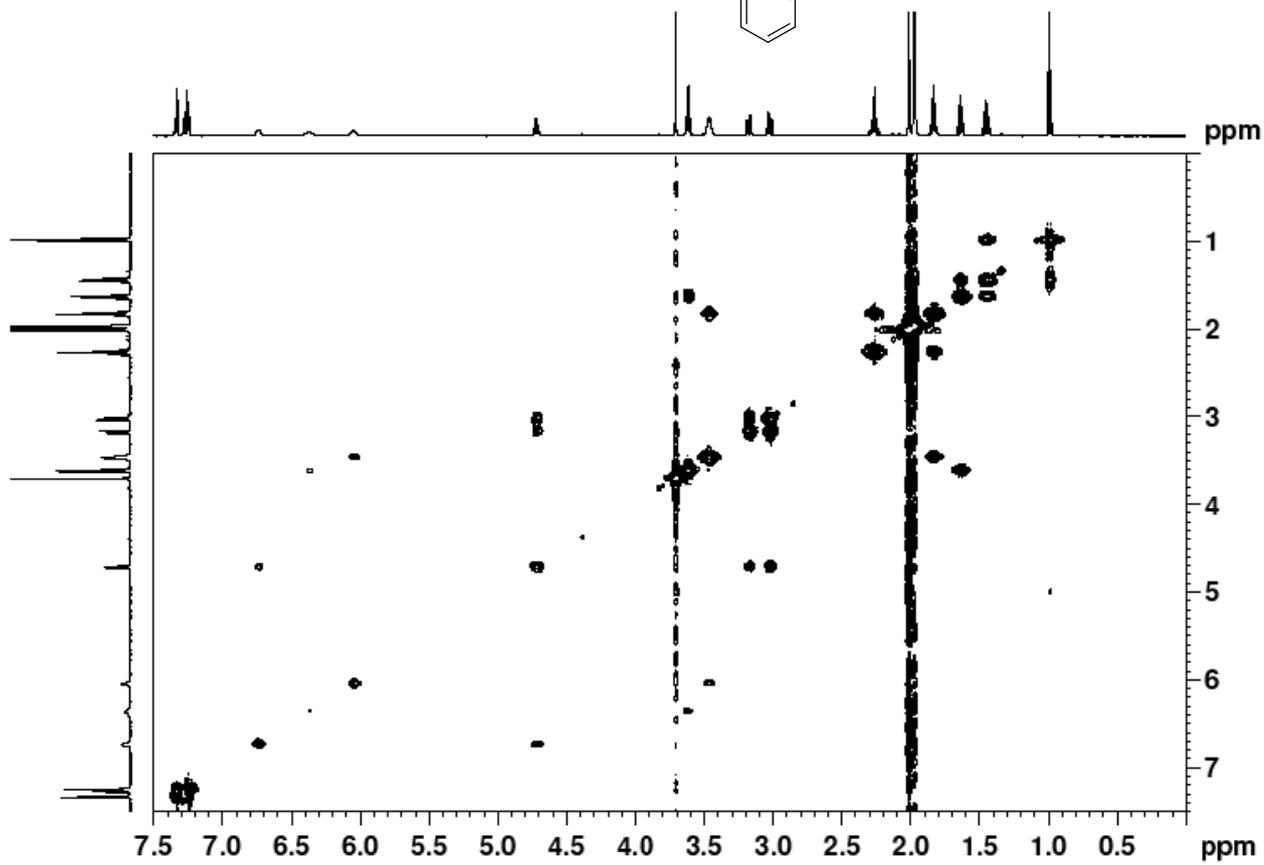
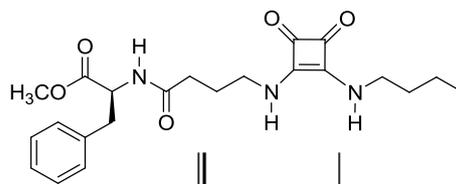
TOCSY 3 (2 mM, CDCl₃, 298 K):



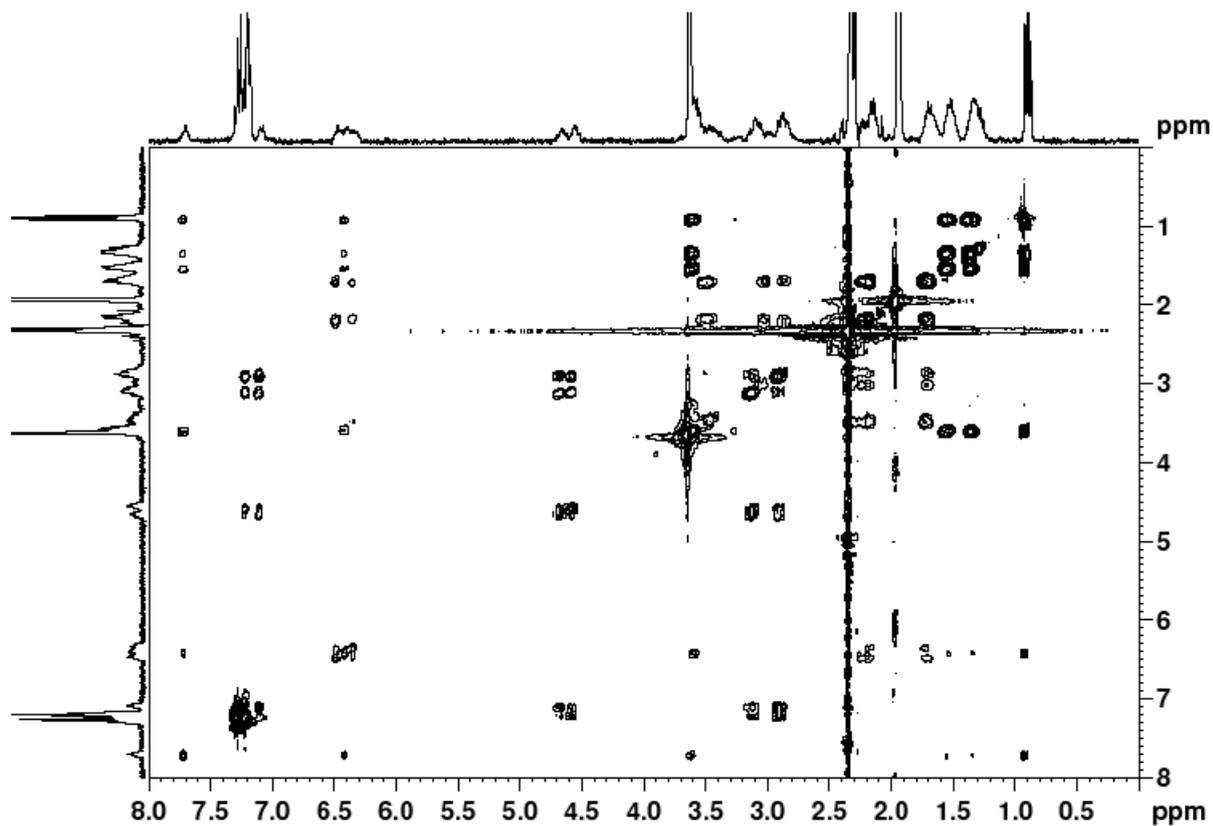
TOCSY 3 (2 mM, CDCl₃, 237 K)



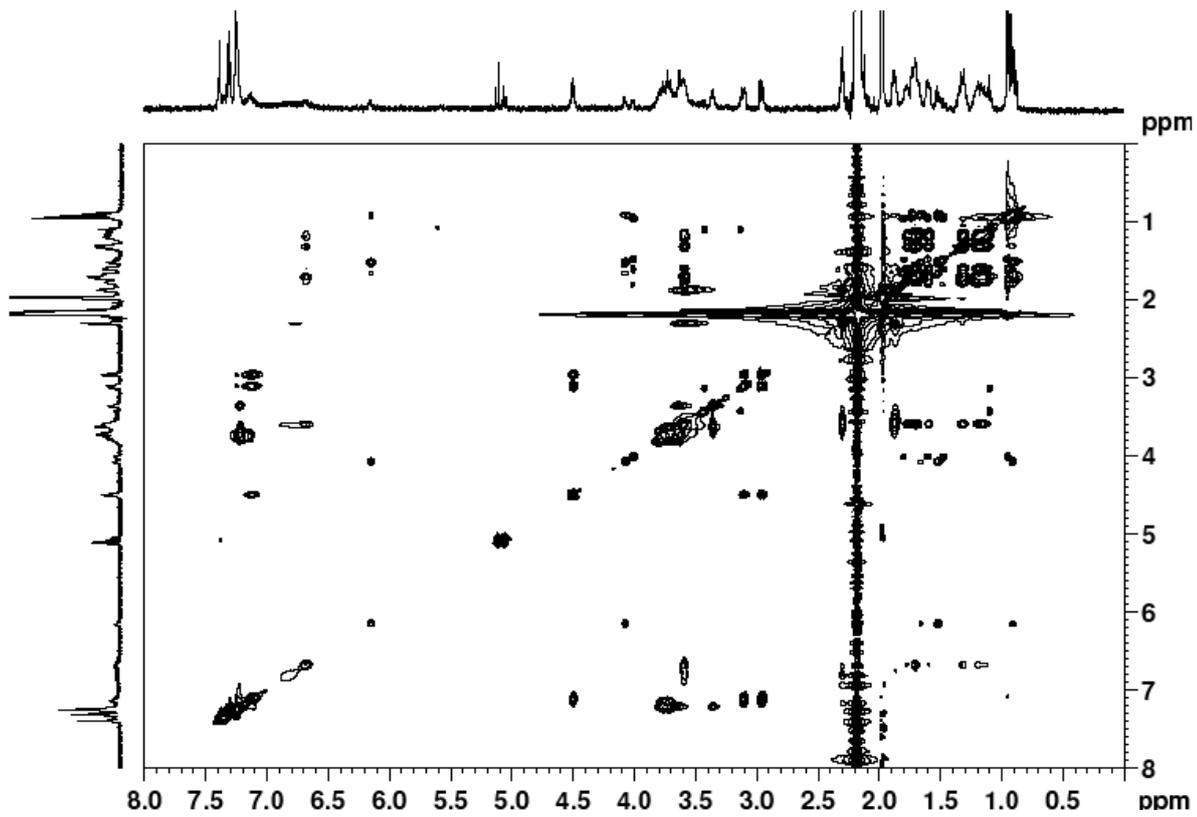
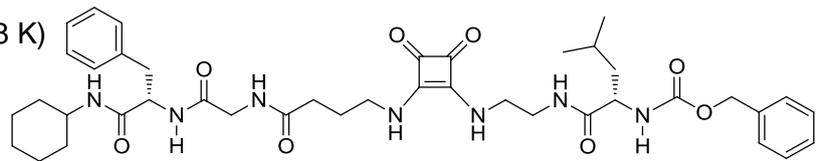
COSY 3 (2 mM, CD₃CN, 344 K)



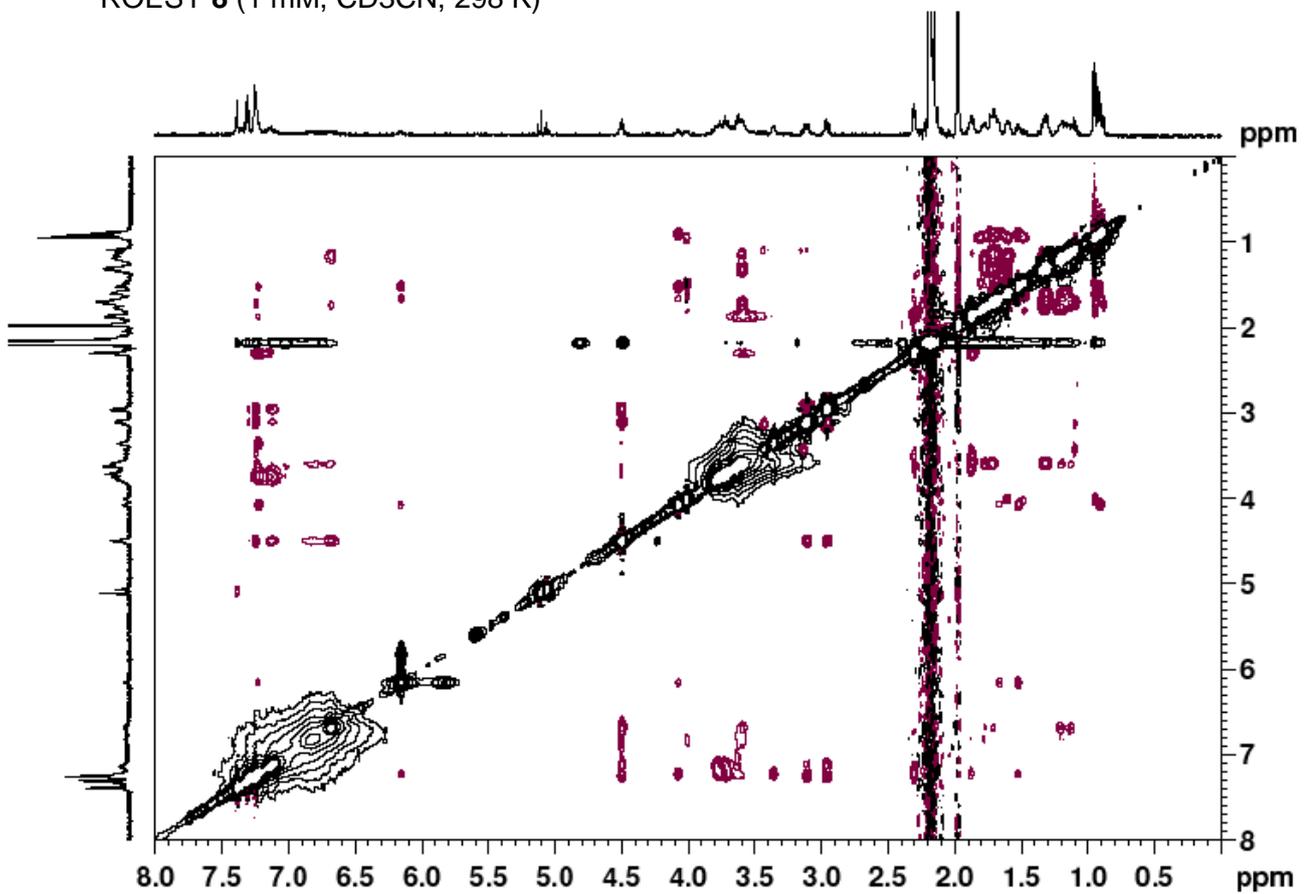
TOCSY 3 (2 mM, CD₃CN, 244 K)



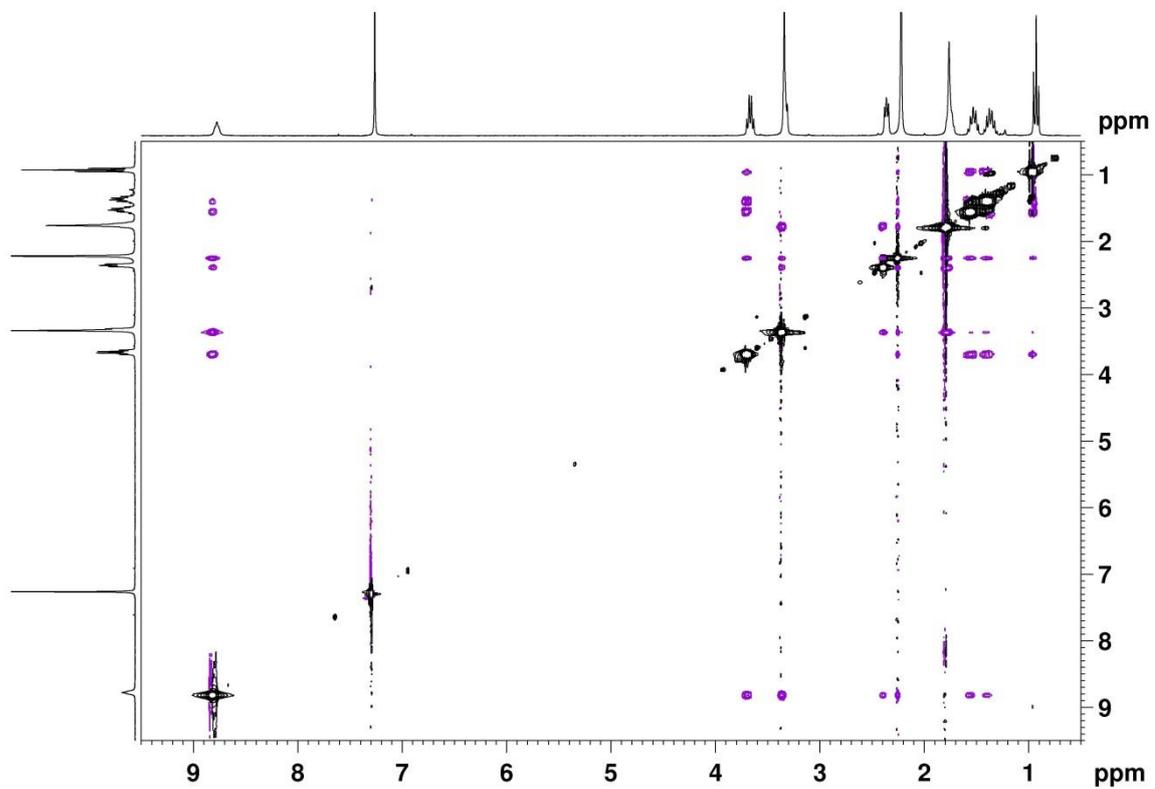
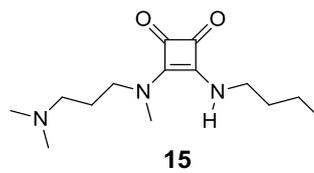
TOCSY 8 (1 mM, CD₃CN, 298 K)

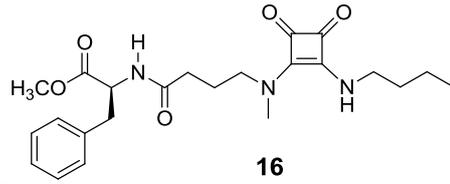


ROESY 8 (1 mM, CD₃CN, 298 K)

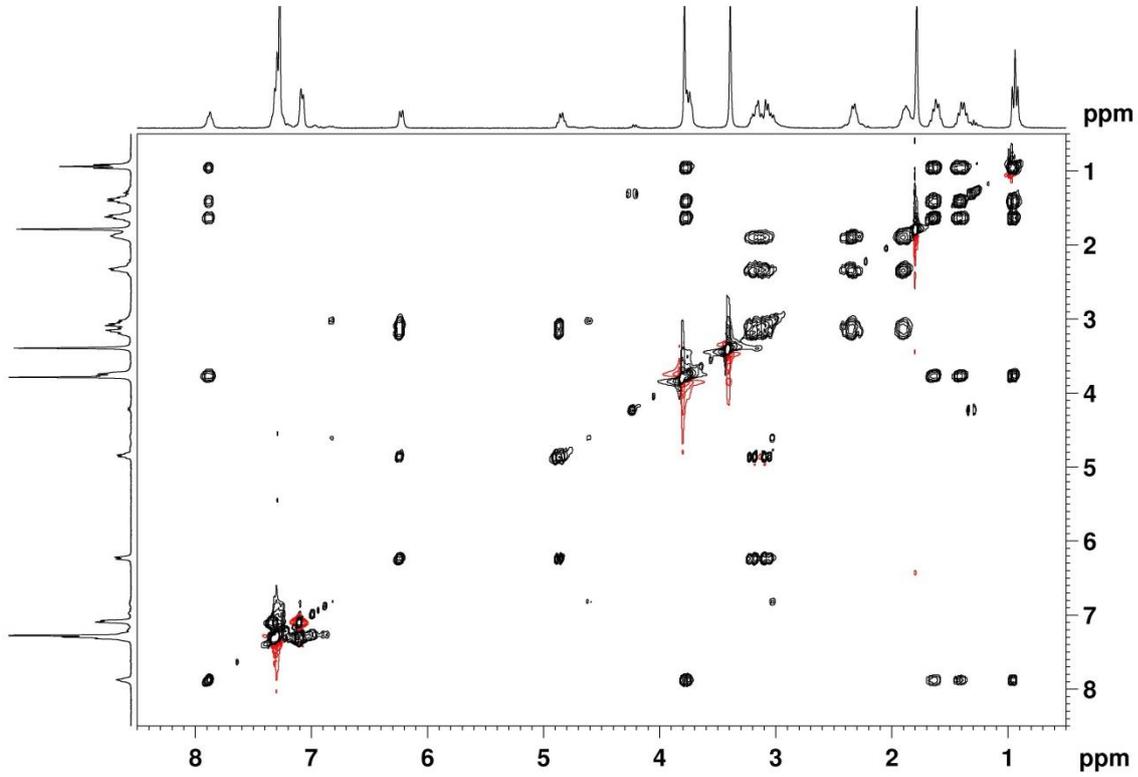


NOESY **15** (CDCl₃, 10 mM, 258 K)

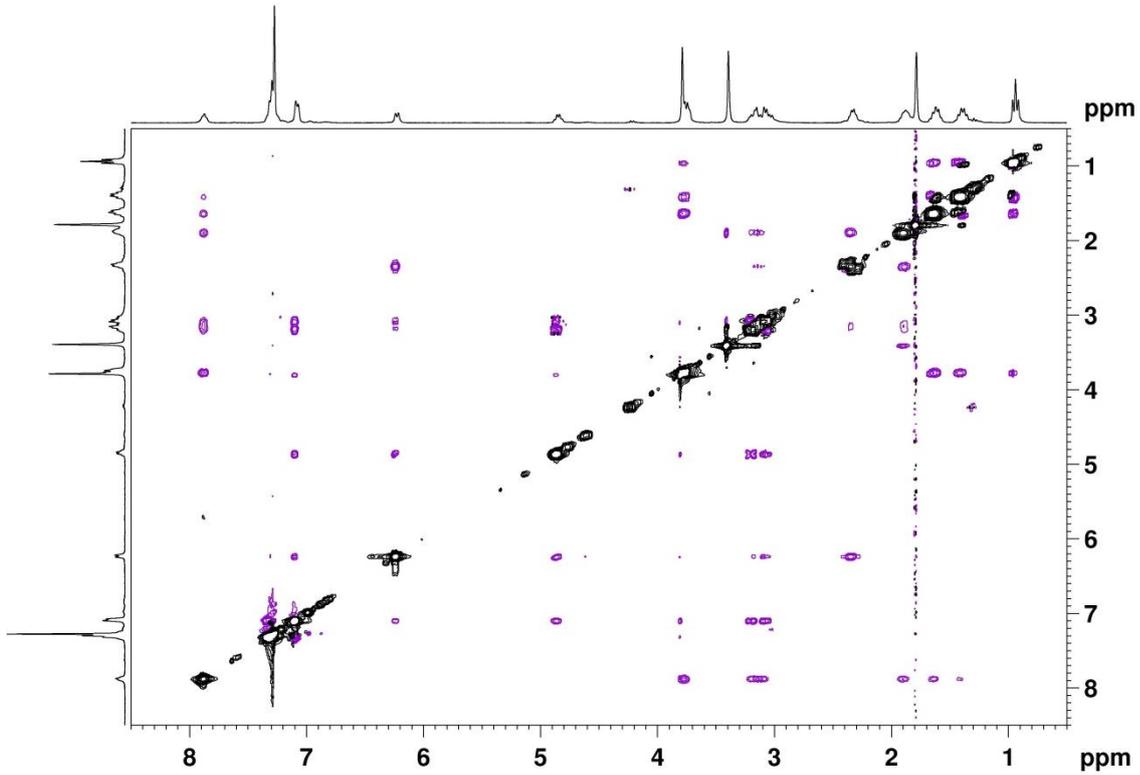


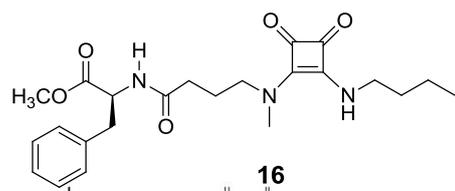


TOCSY 16 (CDCl₃, 10 mM, 237 K)

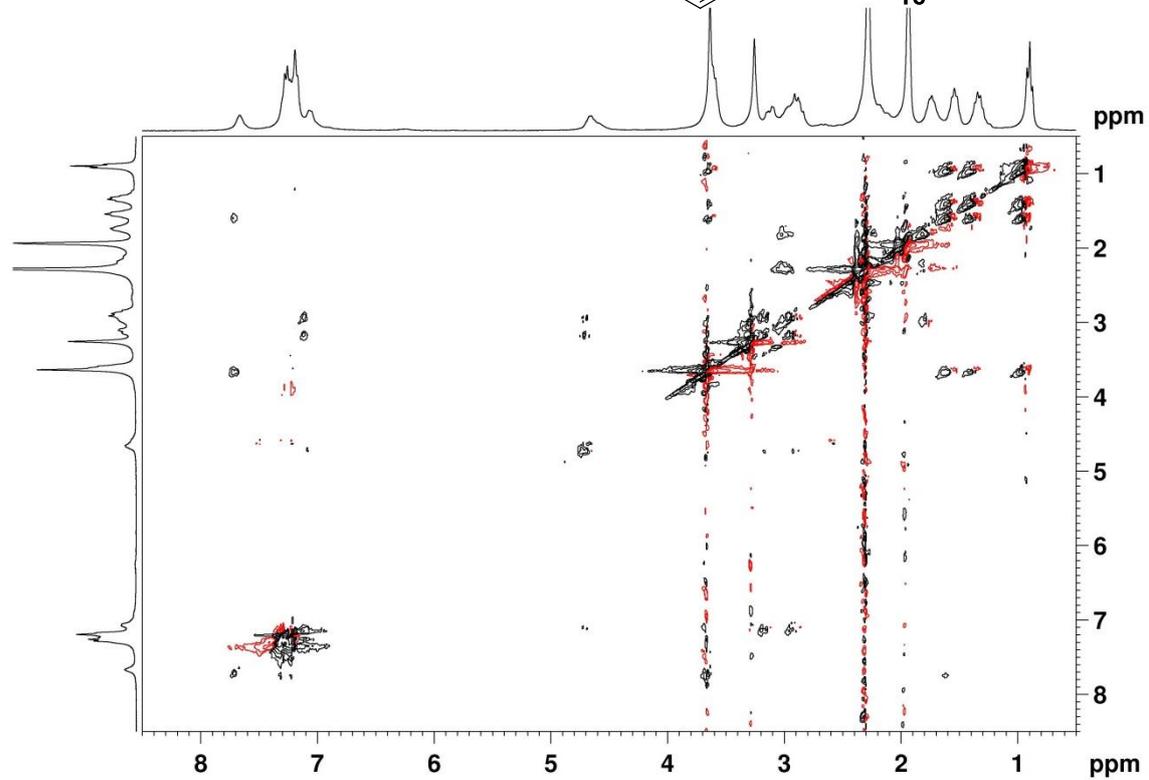


NOESY 16 (CDCl₃, 10 mM, 237 K)

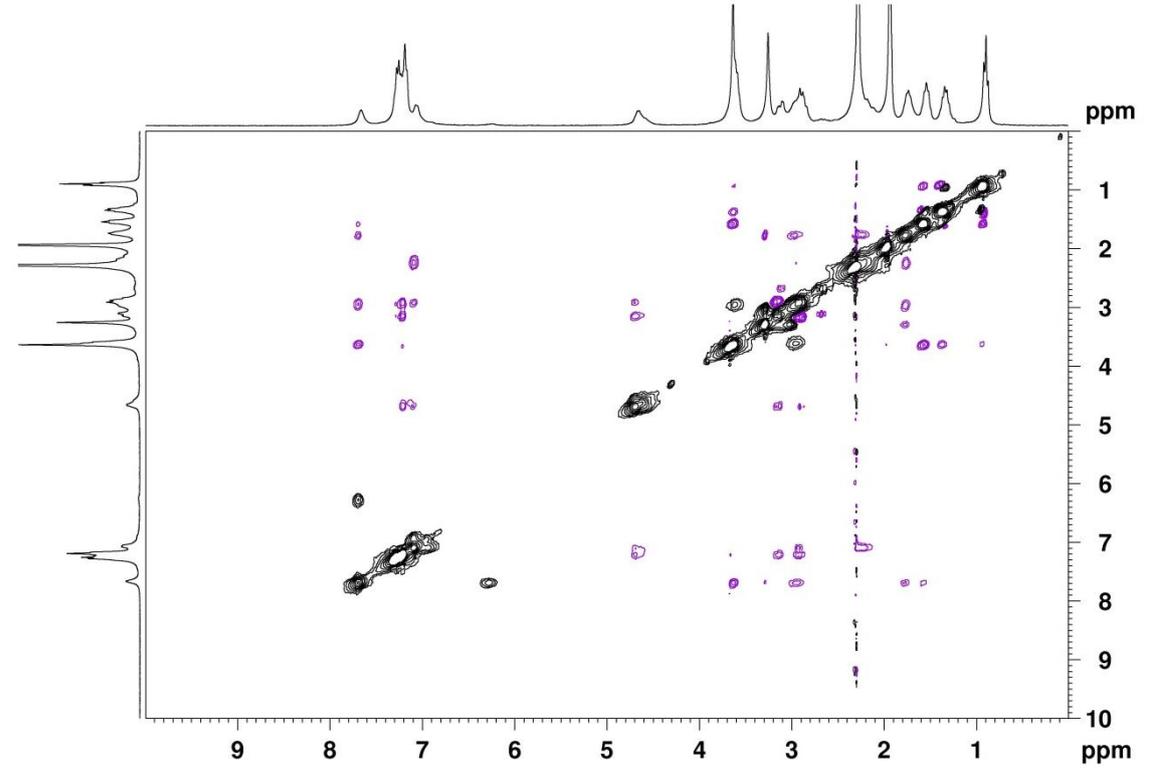


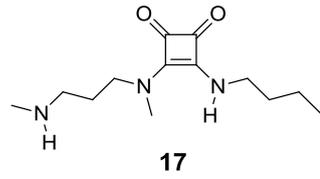


TOCSY 16 (CD₃CN, 2.5 mM, 244 K)

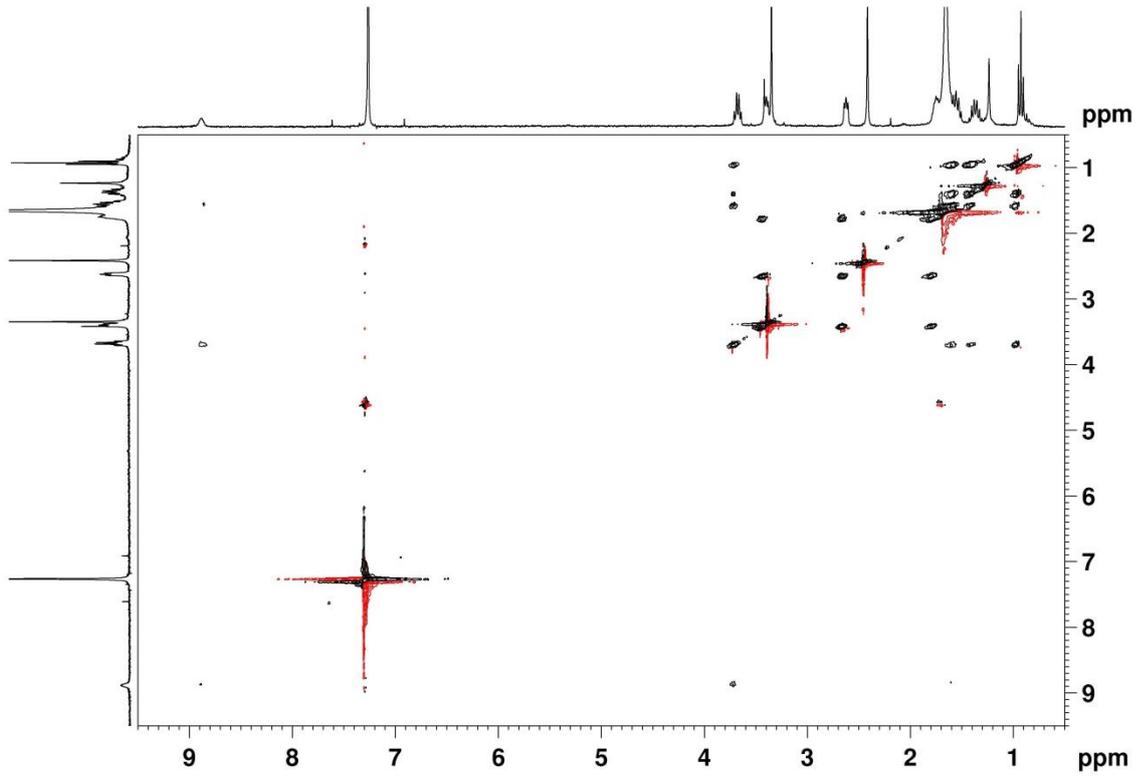


NOESY 16 (CD₃CN, 2.5 mM, 244 K)

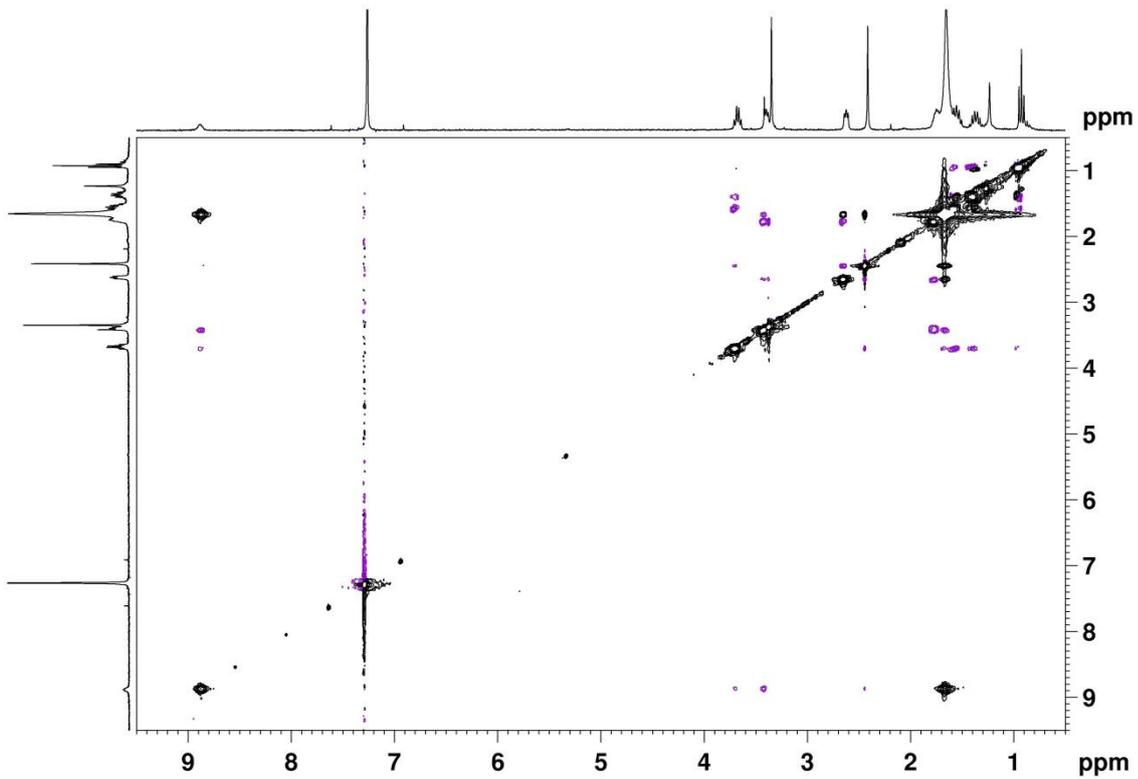


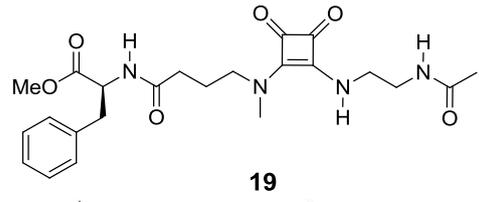


TOCSY 17 (CDCl₃, 2.5 mM, 272 K)

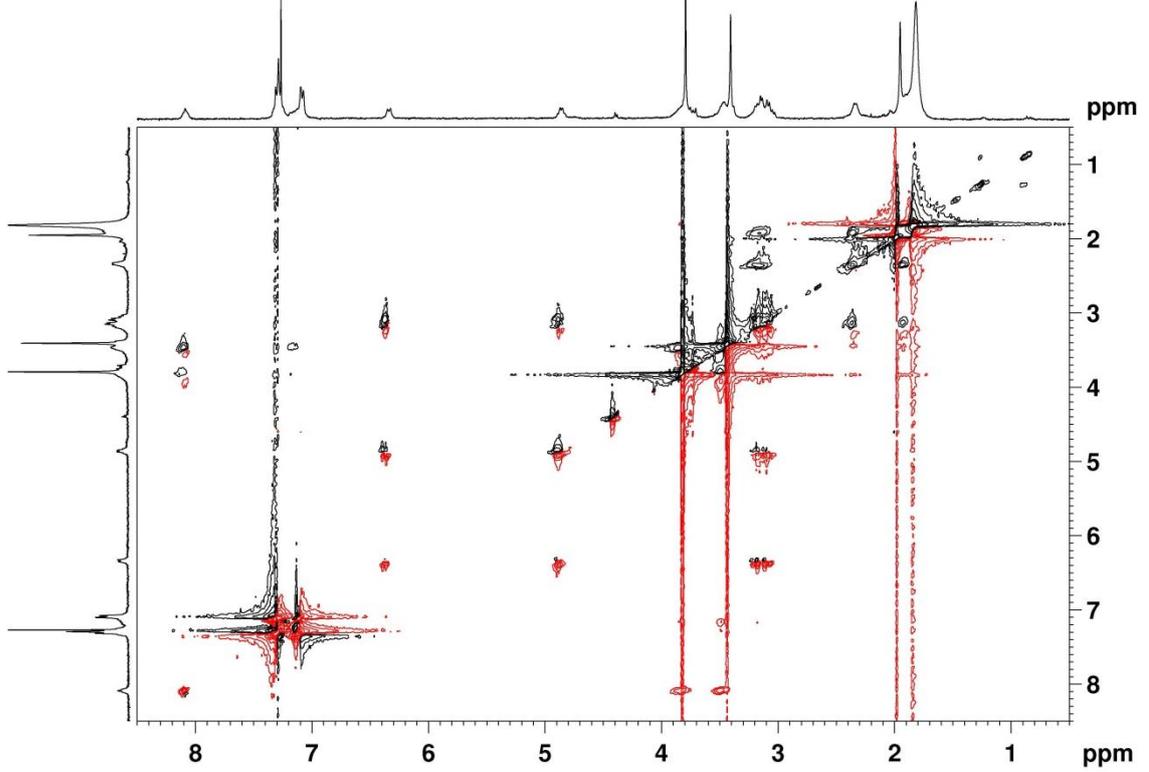


NOESY 17 (CDCl₃, 2.5 mM, 272 K)

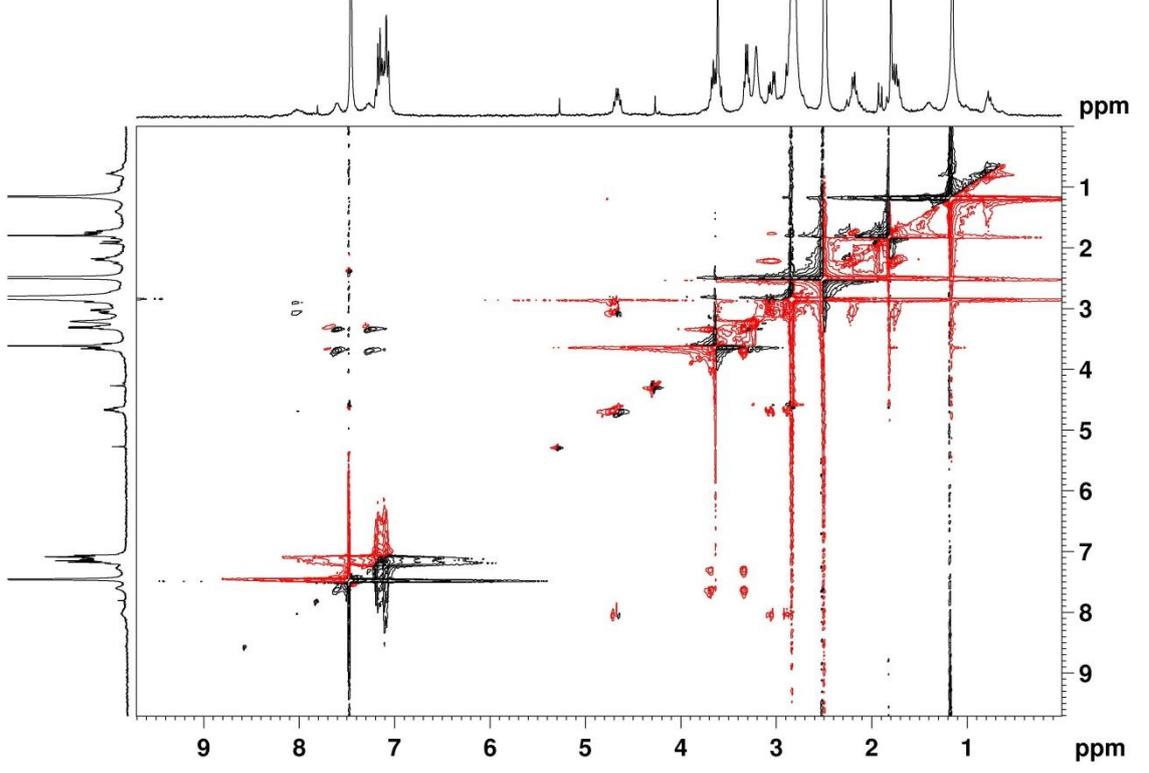




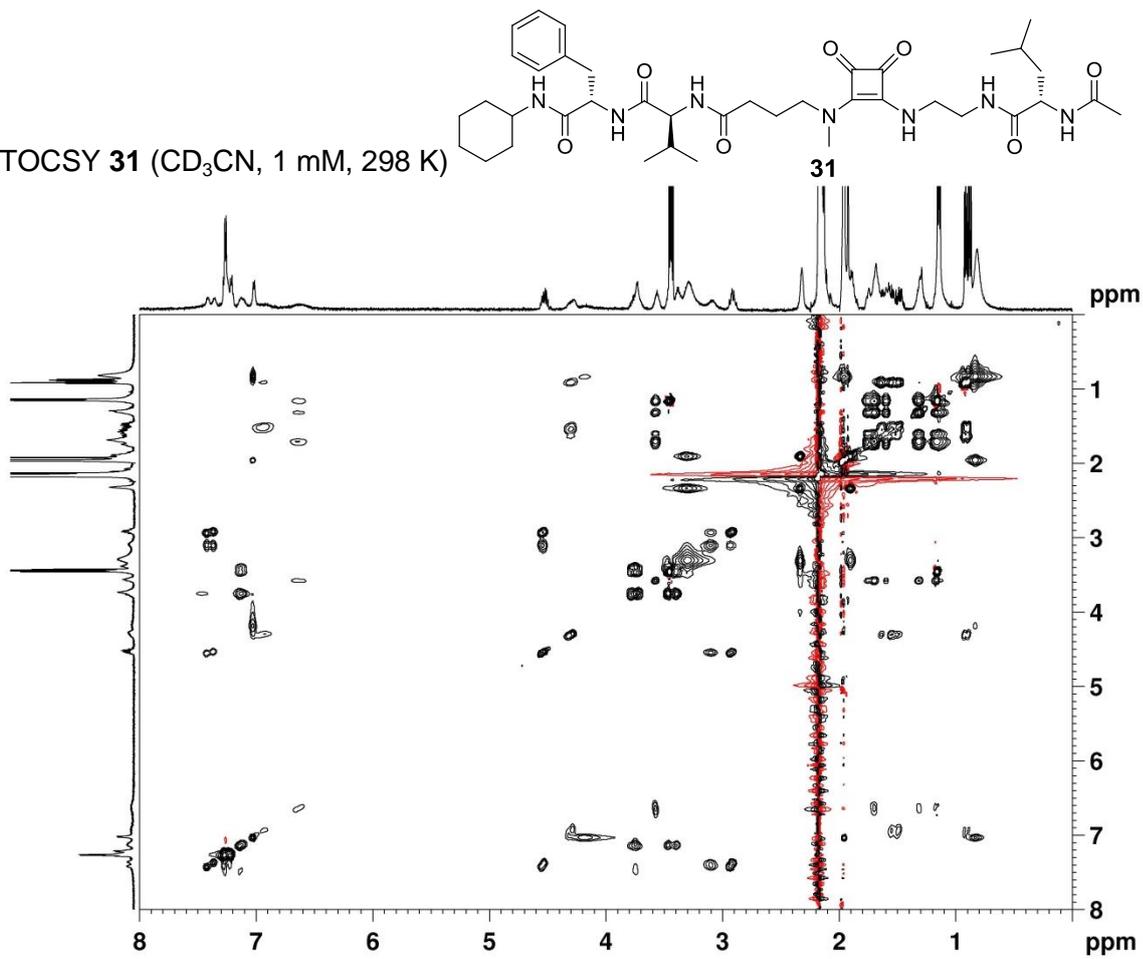
TOCSY **19** (CDCl₃, 2.5 mM, 258 K)



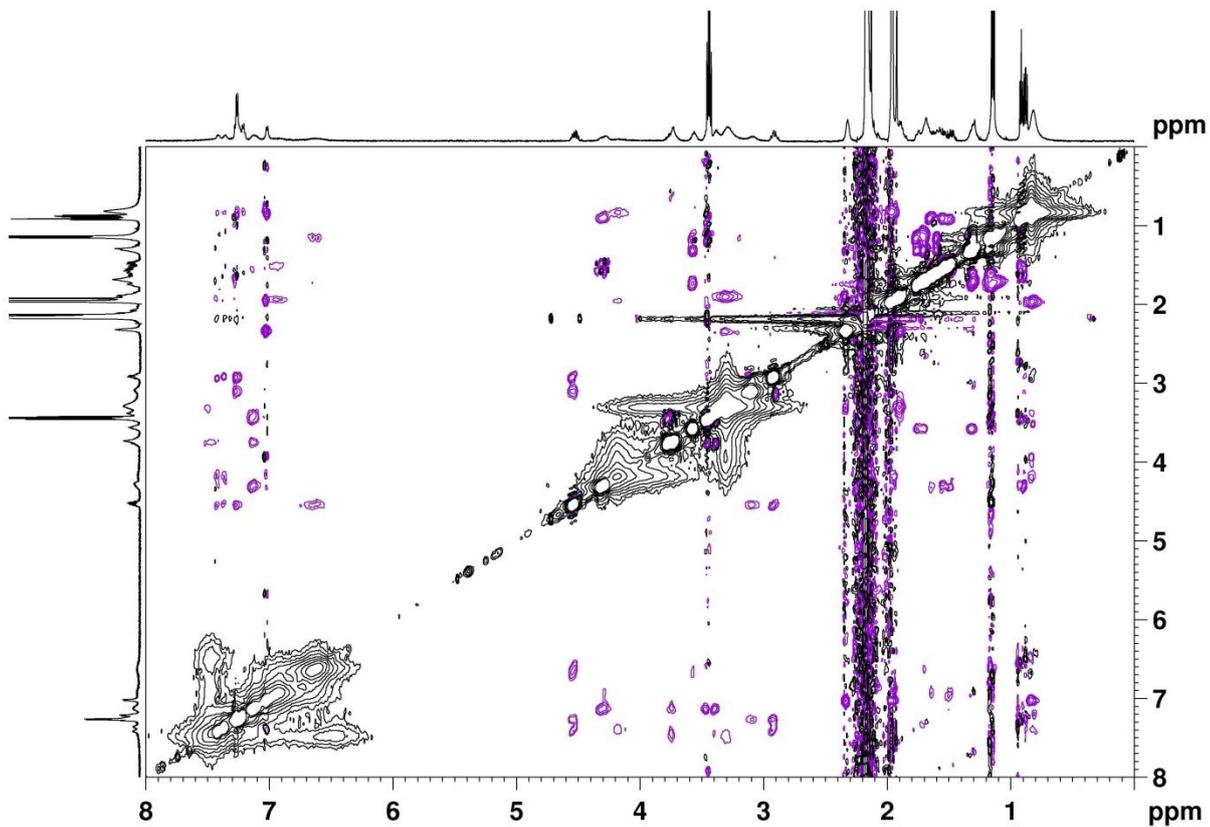
TOCSY **19** (CDCl₃-DMSO 13%, 2.5 mM, 298 K)



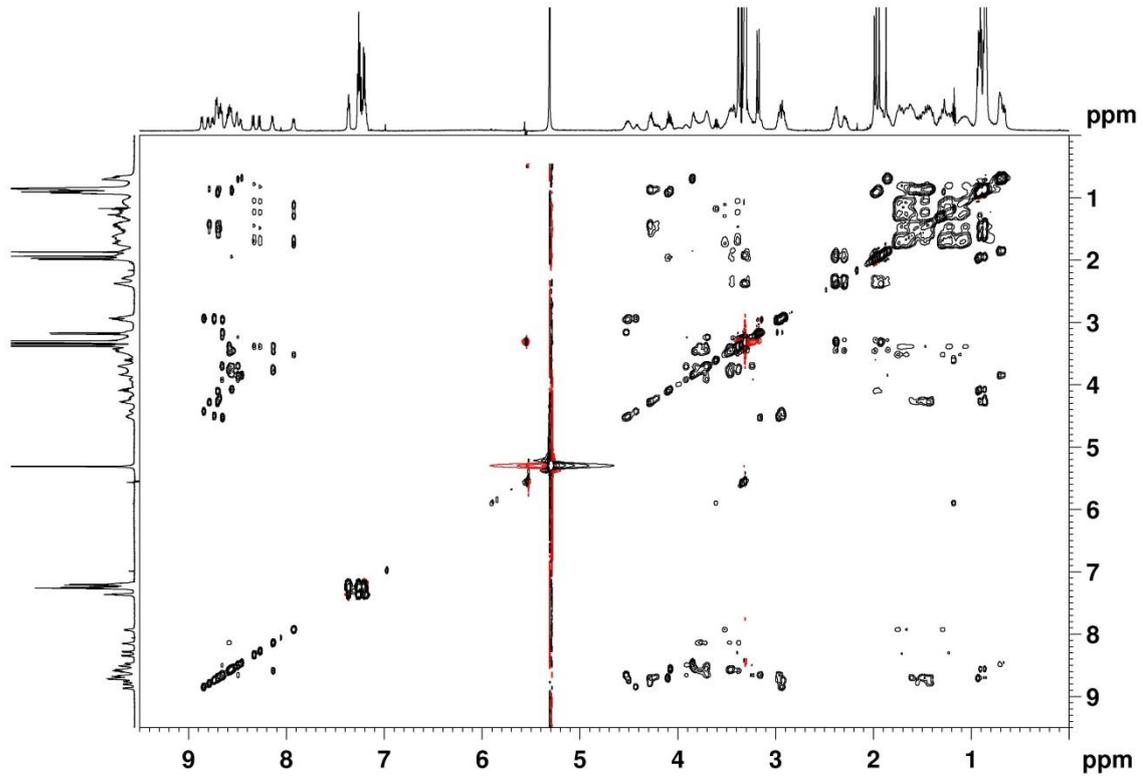
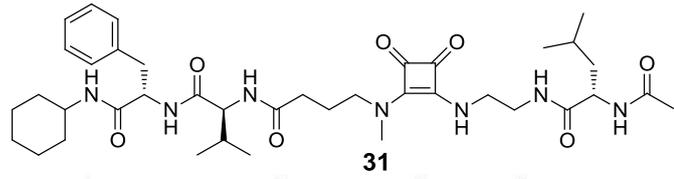
TOCSY 31 (CD₃CN, 1 mM, 298 K)



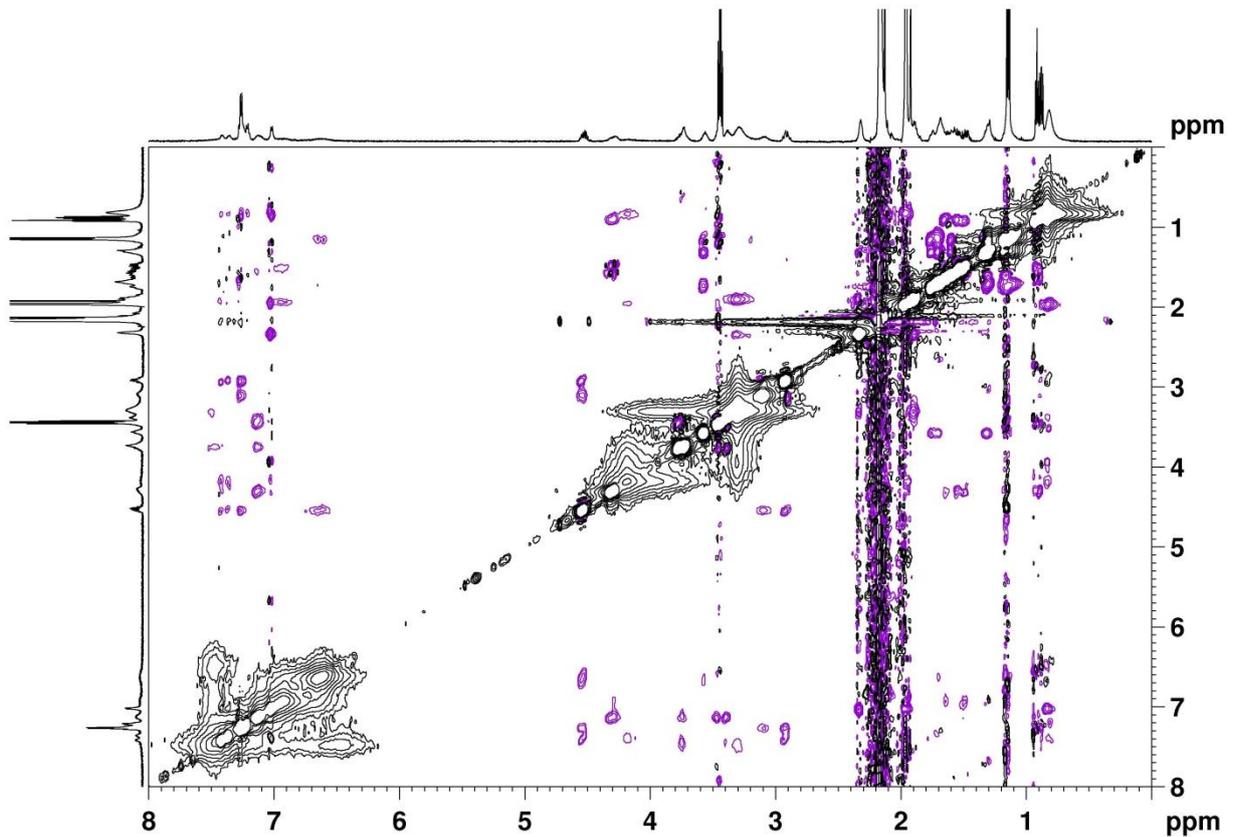
NOESY 31 (CD₃CN, 1 mM, 298 K)

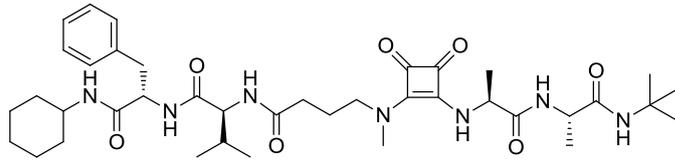


TOCSY 31 (CD₃OH, 5 mM, 231 K)



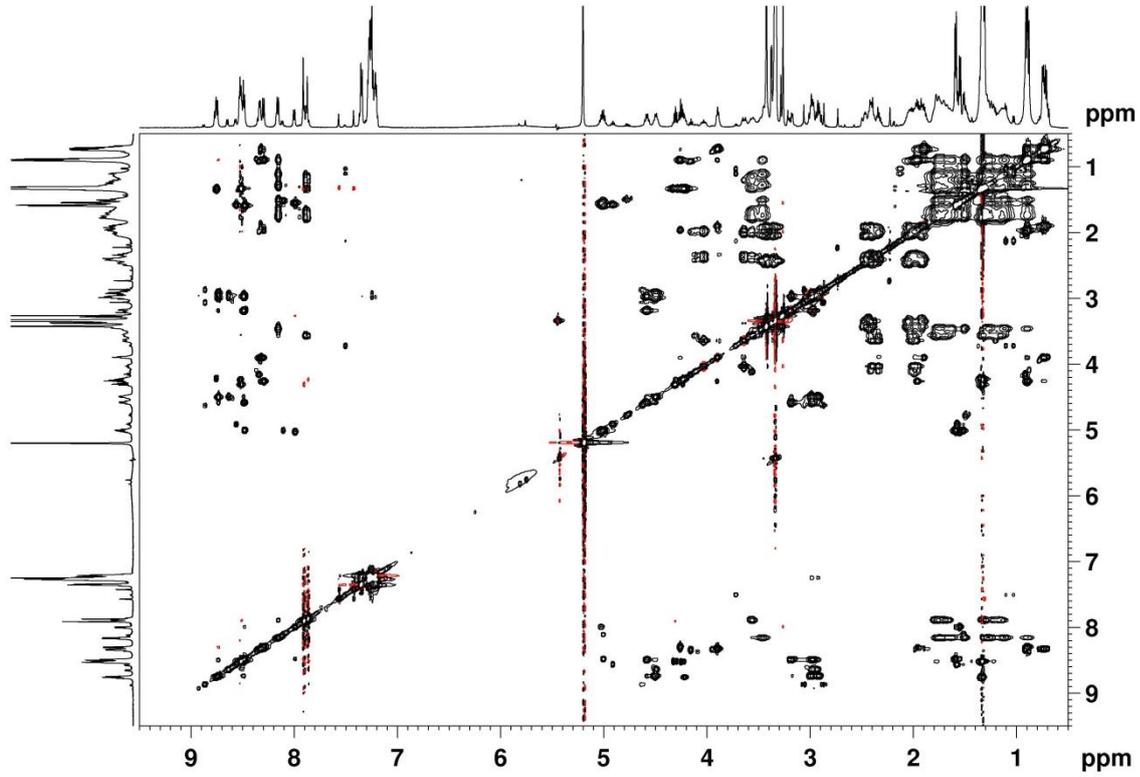
NOESY 31 (CD₃OH, 5 mM, 231 K)



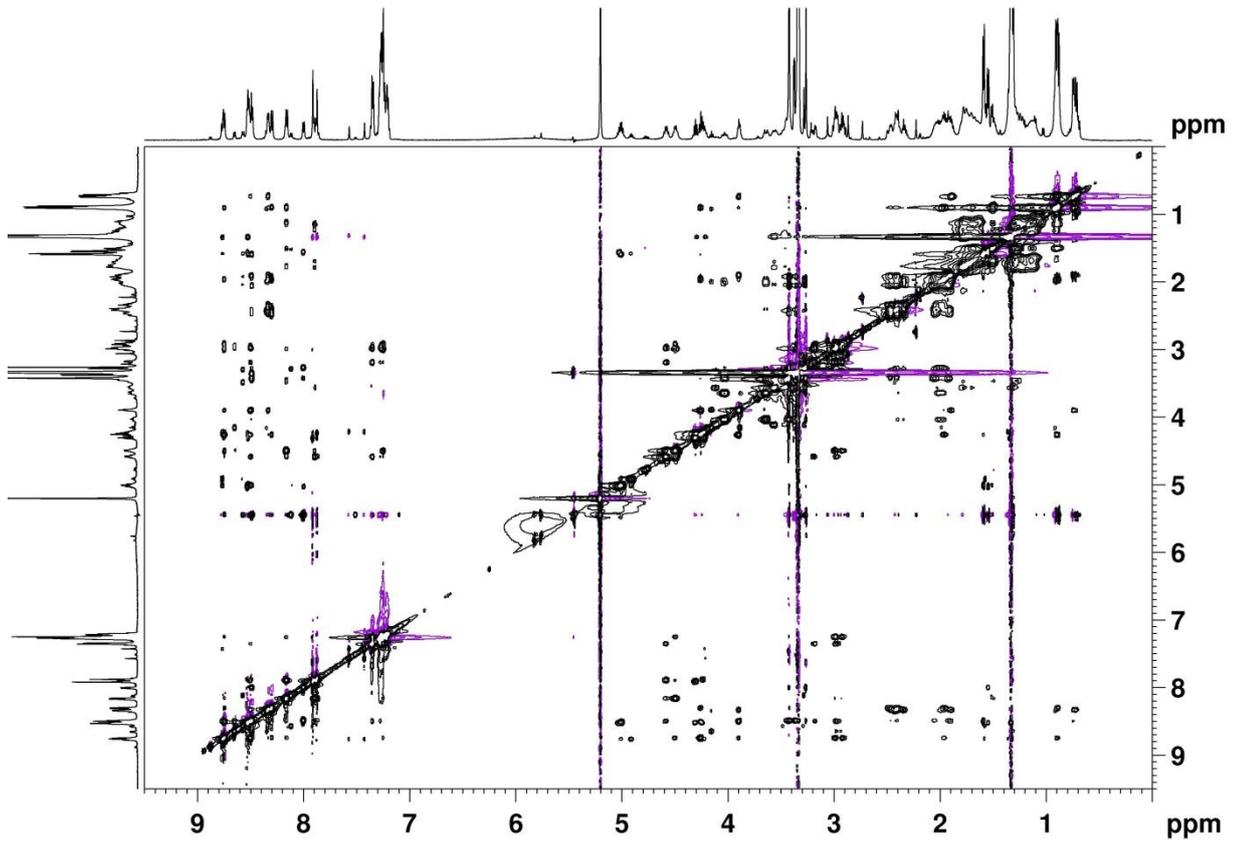


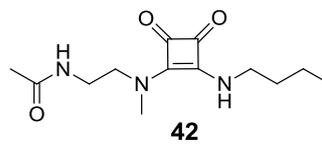
TOCSY 32 (CD₃OH, 5 mM, 233 K)

32

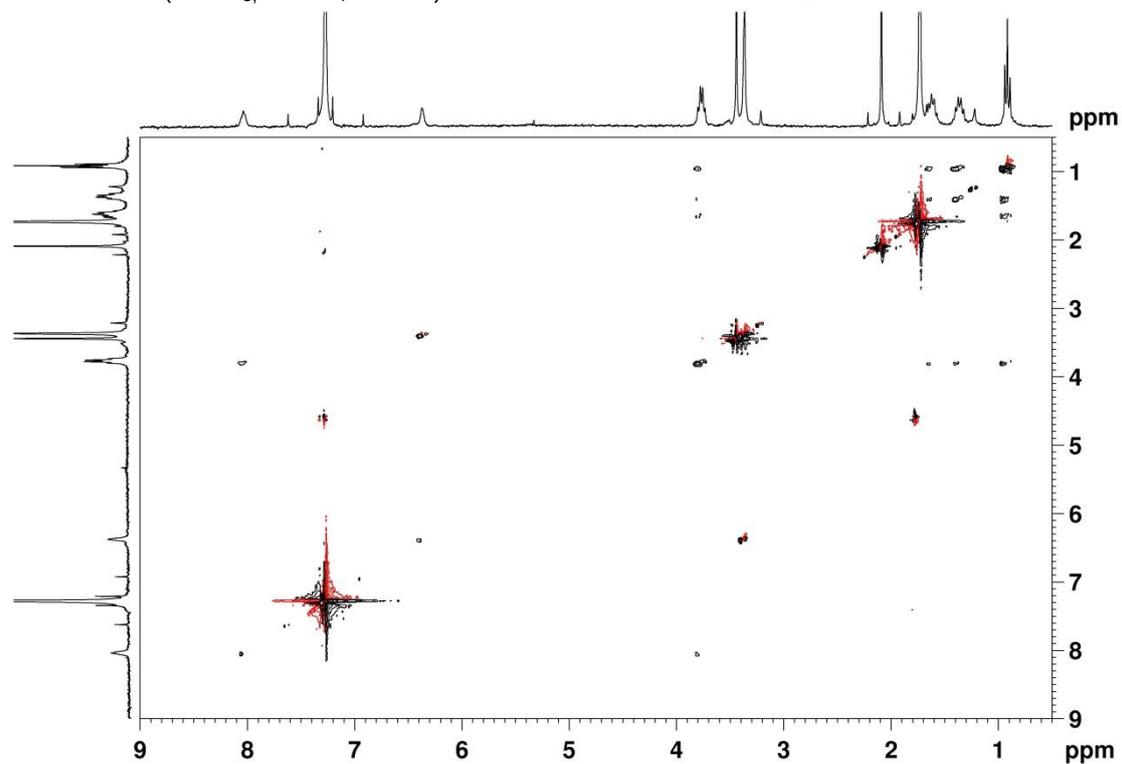


NOESY 32 (CD₃OH, 5 mM, 233 K)

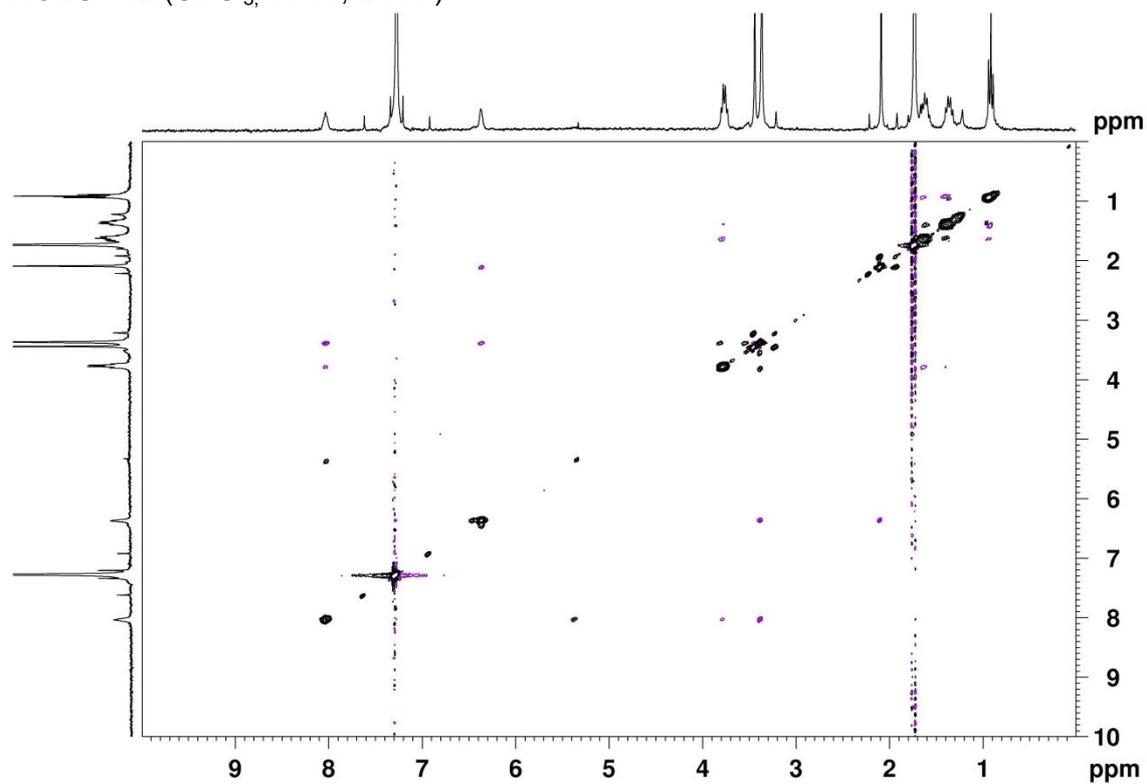


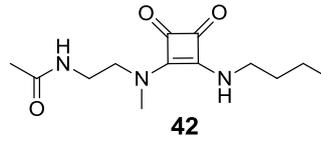


TOCSY **42** (CDCl₃, 1 mM, 244 K)

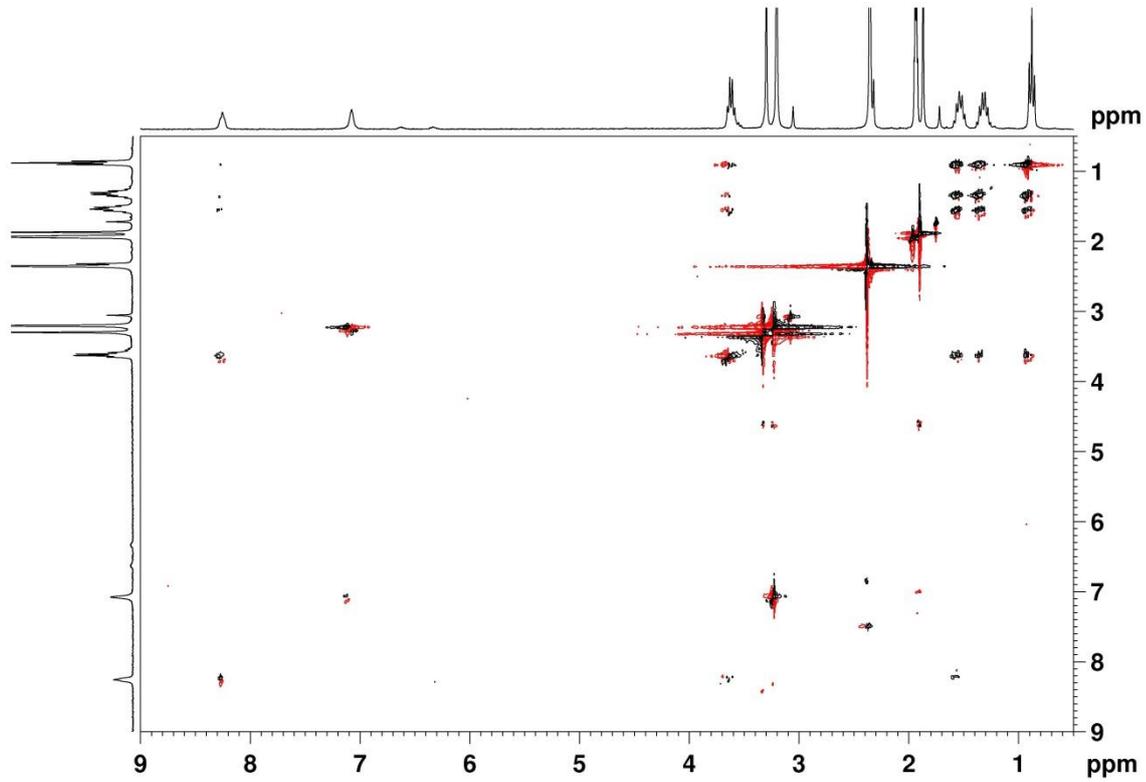


NOESY **42** (CDCl₃, 1 mM, 244 K)

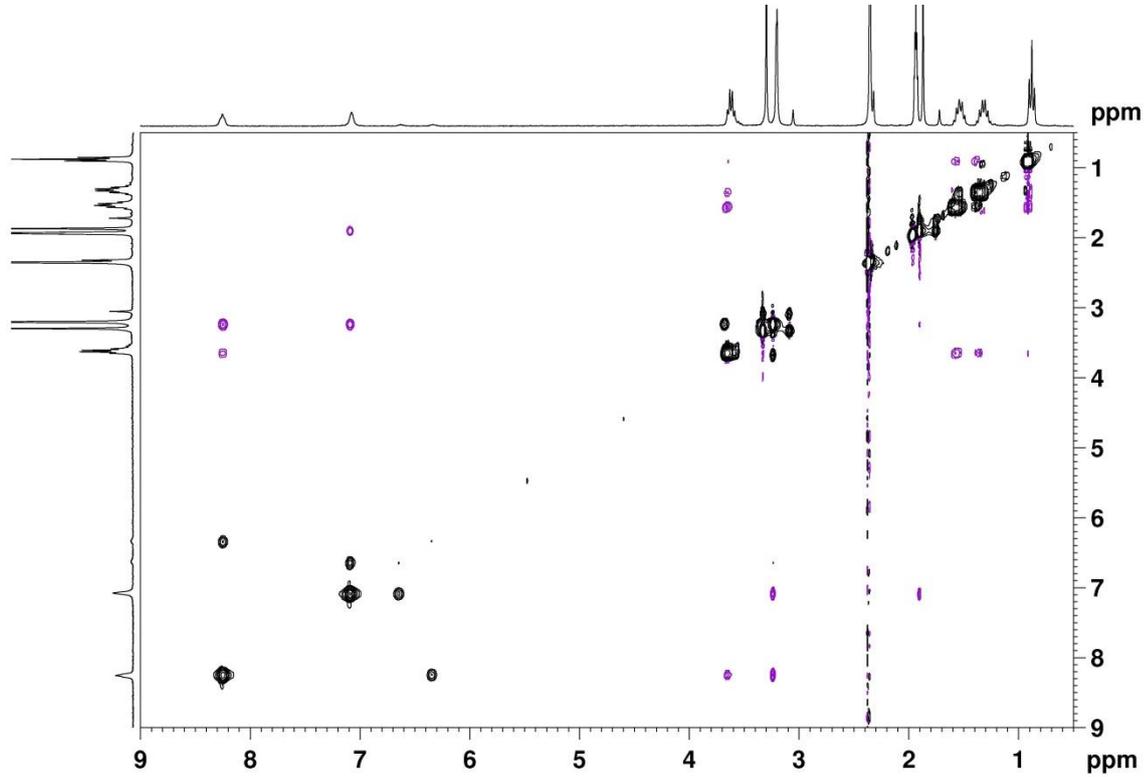


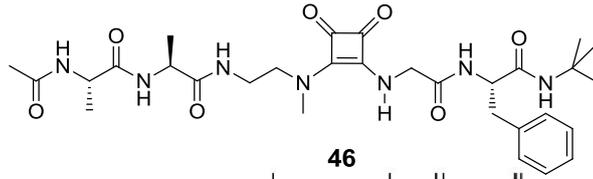


TOCSY 42 (CD₃CN, 1 mM, 244 K)

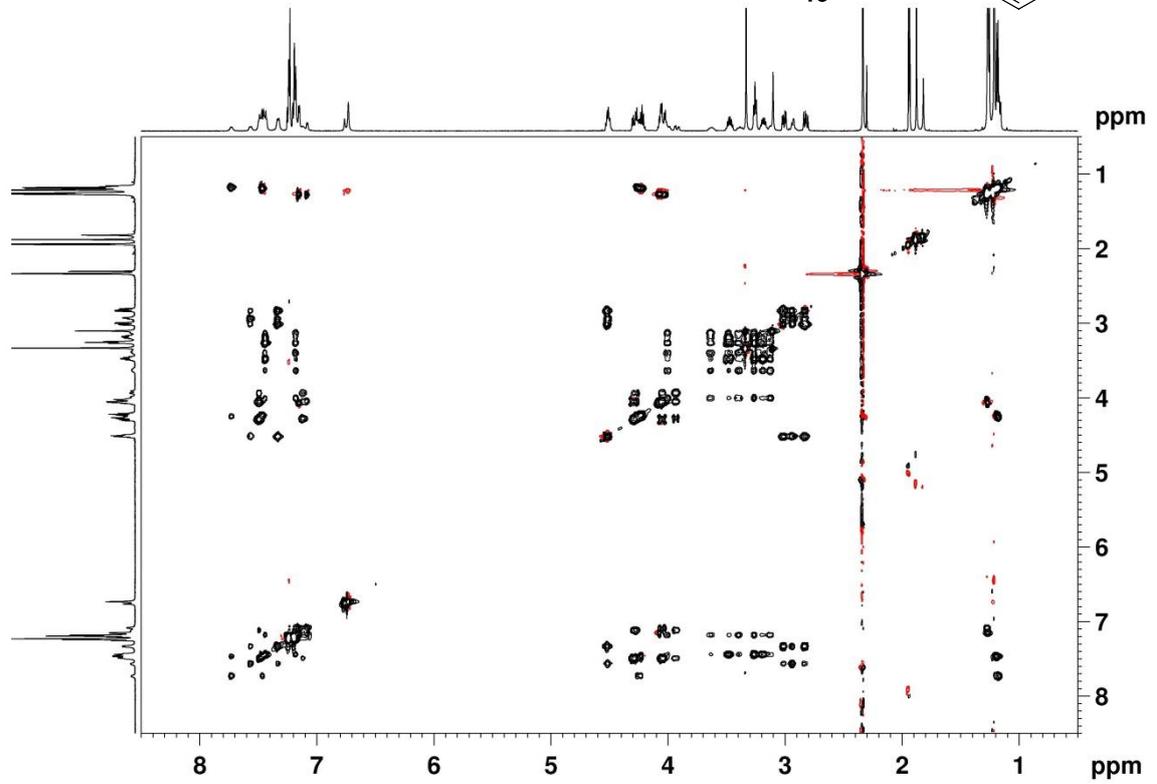


NOESY 42 (CD₃CN, 1 mM, 244 K)

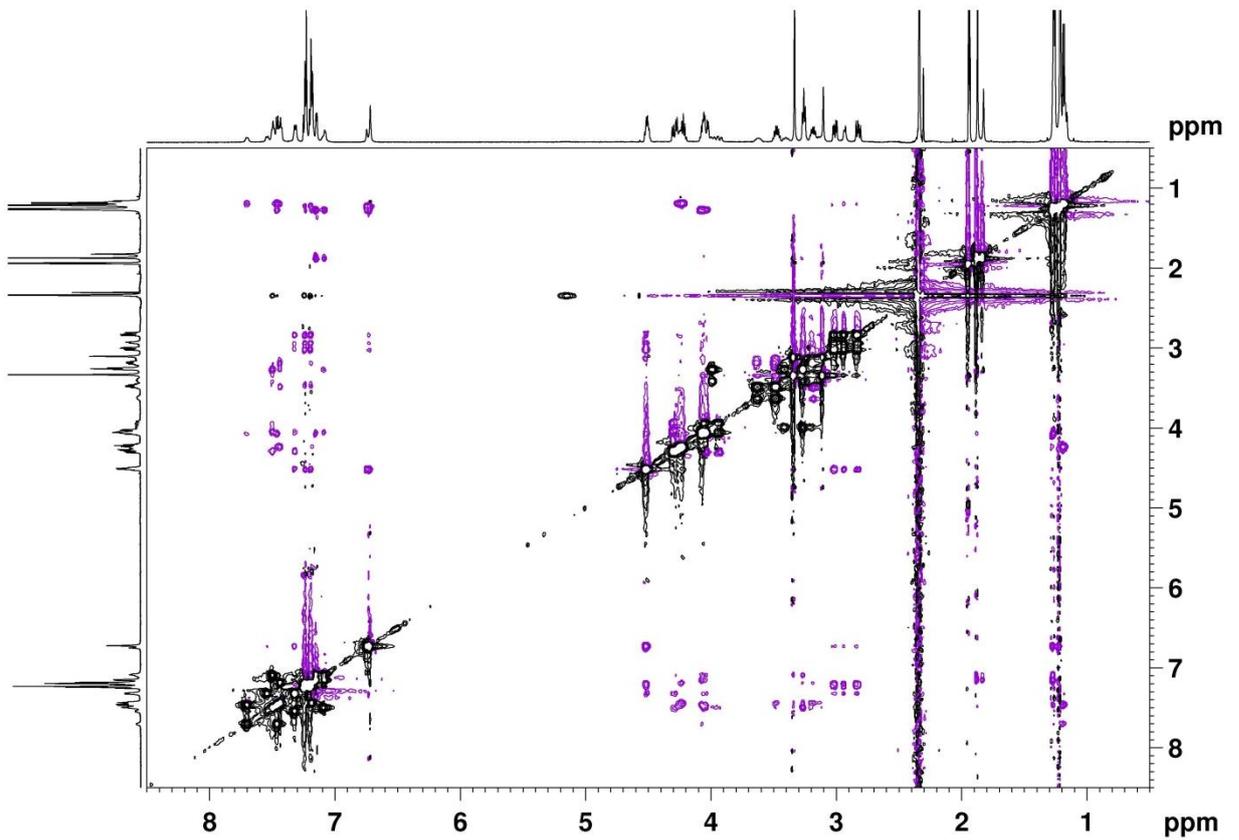


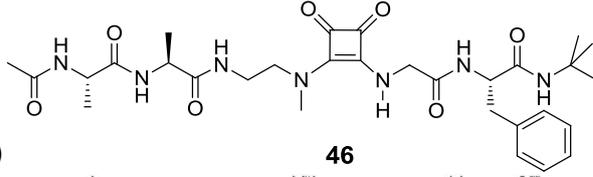


TOCSY 46 (CD₃CN, 5 mM, 231 K)

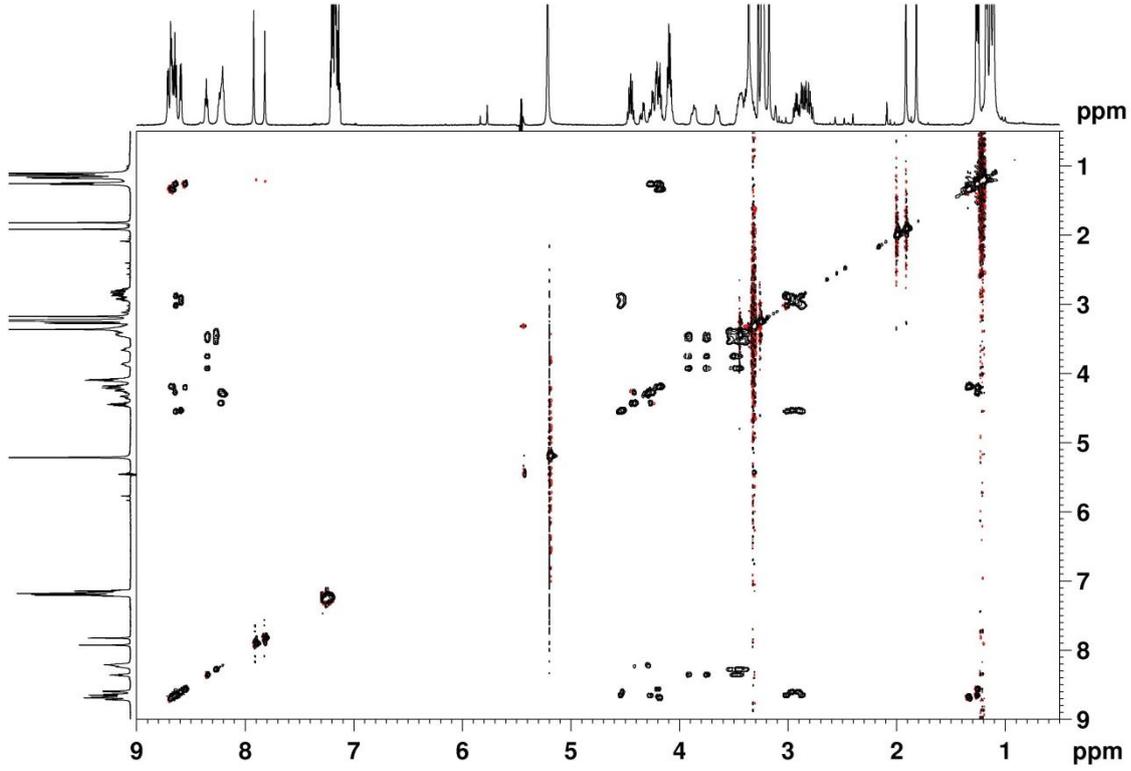


NOESY 46 (CD₃CN, 5 mM, 231 K)





TOCSY 46 (CD₃OH, 6 mM, 233 K)



NOESY 46 (CD₃OH, 6 mM, 233 K)

